

13. Due A, Toubro S, Skov AR, Astrup A. Effect of normal-fat diets, either medium or high in protein, on body weight in overweight subjects: a randomised 1-year trial. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2004) **28**, 1283-1290.
14. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, McGuckin BG, Brill C, Mohammed BS, Szapary PO, Rader DJ, Edman JS, Klein S. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med* (2003) **348**, 2082-2090.
15. Samaha FF, Iqbal N, Seshadri P, Chicano KL, Daily DA, McGrory J, Williams T, Williams M, Gracely EJ, Stern L. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med* (2003) **348**, 2074-2081.
16. Seshadri P, Iqbal N, Stern L, Williams M, Chicano KL, Daily DA, McGrory J, Gracely EJ, Rader DJ, Samaha FF. A randomized study comparing the effects of a low-carbohydrate diet and a conventional diet on lipoprotein subfractions and C-reactive protein levels in patients with severe obesity. *Am J Med* (2004) **117**, 398-405.
17. Yancy WS Jr, Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* (2004) **140**, 769-777.
18. Brinkworth GD, Noakes M, Keogh JB, Luscombe ND, Wittert GA, Clifton PM. Long-term effects of a high-protein, low-carbohydrate diet on weight control and cardiovascular risk markers in obese hyperinsulinemic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2004) **28**, 661-670.
19. Dansinger ML, Gleason JA, Griffith JL, Selker HP, Schaefer EJ. Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone diets for weight loss and heart disease risk reduction: a randomized trial. *JAMA* (2005) **293**, 43-53.
20. Truby H, Baic S, deLooy A, Fox KR, Livingstone MB, Logan CM, Macdonald IA, Morgan LM, Taylor MA, Millward DJ. Randomised controlled trial of four commercial weight loss programmes in the UK: initial findings from the BBC "diet trials". *BMJ* (2006) **332**, 1309-1314.
21. Takahashi M, Ikemoto S, Ezaki O. Effect of the fat/carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *J Nutr Sci Vitaminol* (1999) **45**, 583-593.
22. Kennedy AR, Pissios P, Otu H, Roberson R, Xue B, Asakura K, Furukawa N, Marino FE, Liu FF, Kahn BB, Libermann TA, Maratos-Flier E. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2007) **292**, E1724-1739.
23. Larosa JC, Fry AG, Muesing R, Rosing DR. Effects of high-protein, low-carbohydrate dieting on plasma lipoproteins and body weight. *J Am Diet Assoc* (1980) **77**, 264-270.
24. Browning JD, Weis B, Davis J, Satapati S, Merritt M, Malloy CR, Burgess SC. Alterations in hepatic glucose and energy

- metabolism as a result of calorie and carbohydrate restriction. *Hepatology* (2008) **48**, 1487-1496.
25. Thomas DE, Elliott EJ, Baur L. Low glycaemic index or low glycaemic load diets for overweight and obesity. *Cochrane Database Syst Rev* (2007) CD005105.
 26. Bouche C, Rizkalla SW, Luo J, Vidal H, Veronese A, Pacher N, Fouquet C, Lang V, Slama G. Five-week, low-glycemic index diet decreases total fat mass and improves plasma lipid profile in moderately overweight nondiabetic men. *Diabetes Care* (2002) **25**, 822-828.
 27. Ebbeling CB, Leidig MM, Sinclair KB, Hangen JP, Ludwig DS. A reduced-glycemic load diet in the treatment of adolescent obesity. *Arch Pediatr Adolesc Med* (2003) **157**, 773-779.
 28. Ebbeling CB, Leidig MM, Sinclair KB, Seger-Shippe LG, Feldman HA, Ludwig DS. Effects of an ad libitum low-glycemic load diet on cardiovascular disease risk factors in obese young adults. *Am J Clin Nutr* (2005) **81**, 976-982.
 29. McMillan-Price J, Petocz P, Atkinson F, O'Neill K, Samman S, Steinbeck K, Caterson I, Brand-Miller J. Comparison of 4 diets of varying glycemic load on weight loss and cardiovascular risk reduction in overweight and obese young adults: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* (2006) **166**, 1466-1475.
 30. Slabber M, Barnard HC, Kuyil JM, Dannhauser A, Schall R. Effects of a low-insulin-response, energy-restricted diet on weight loss and plasma insulin concentrations in hyperinsulinemic obese females. *Am J Clin Nutr* (1994) **60**, 48-53.
 31. Sloth B, Krog-Mikkelsen I, Flint A, Tetens I, Bjorck I, Vinoy S, Elmstahl H, Astrup A, Lang V, Raben A. No difference in body weight decrease between a low-glycemic-index and a high-glycemic-index diet but reduced LDL cholesterol after 10-wk ad libitum intake of the low-glycemic-index diet. *Am J Clin Nutr* (2004) **80**, 337-347.
 32. Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, Smith SR, Ryan DH, Anton SD, McManus K, Champagne CM, Bishop LM, Laranjo N, Leboff MS, Rood JC, de Jonge L, Greenway FL, Loria CM, Obarzanek E, Williamson DA. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med* (2009) **360**, 859-873.
 33. Cornier MA, Donahoo WT, Pereira R, Gurevich I, Westergren R, Enerback S, Eckel PJ, Goalstone ML, Hill JO, Eckel RH, Draznin B. Insulin sensitivity determines the effectiveness of dietary macronutrient composition on weight loss in obese women. *Obes Res* (2005) **13**, 703-709.
 34. Ebbeling CB, Leidig MM, Feldman HA, Lovesky MM, Ludwig DS. Effects of a low-glycemic load vs low-fat diet in obese young adults: a randomized trial. *JAMA* (2007) **297**, 2092-2102.
 35. Pittas AG, Das SK, Hajduk CL, Golden J, Saltzman E, Stark PC, Greenberg AS, Roberts SB. A low-glycemic load diet

- facilitates greater weight loss in overweight adults with high insulin secretion but not in overweight adults with low insulin secretion in the CALERIE Trial. *Diabetes Care* (2005) **28**, 2939-2941.
36. Klemsdal TO, Holme I, Nerland H, Pedersen TR, Tonstad S. Effects of a low glycemic load diet versus a low-fat diet in subjects with and without the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (2010) **20**, 195-201.
37. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* (2008) **7**, 95-96.
38. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**, 3441-3446.
39. Varady KA, Bhutani S, Klempel MC, Phillips SA. Improvements in vascular health by a low-fat diet, but not a high-fat diet, are mediated by changes in adipocyte biology. *Nutr J* (2011) **10**, 8.
40. Wycherley TP, Brinkworth GD, Keogh JB, Noakes M, Buckley JD, Clifton PM. Long-term effects of weight loss with a very low carbohydrate and low fat diet on vascular function in overweight and obese patients. *J Intern Med* (2010) **267**, 452-461.
41. Bradley U, Spence M, Courtney CH, McKinley MC, Ennis CN, McCance DR, McEneny J, Bell PM, Young IS, Hunter SJ. Low-fat versus low-carbohydrate weight reduction diets: effects on weight loss, insulin resistance, and cardiovascular risk: a randomized control trial. *Diabetes* (2009) **58**, 2741-2748.

図1

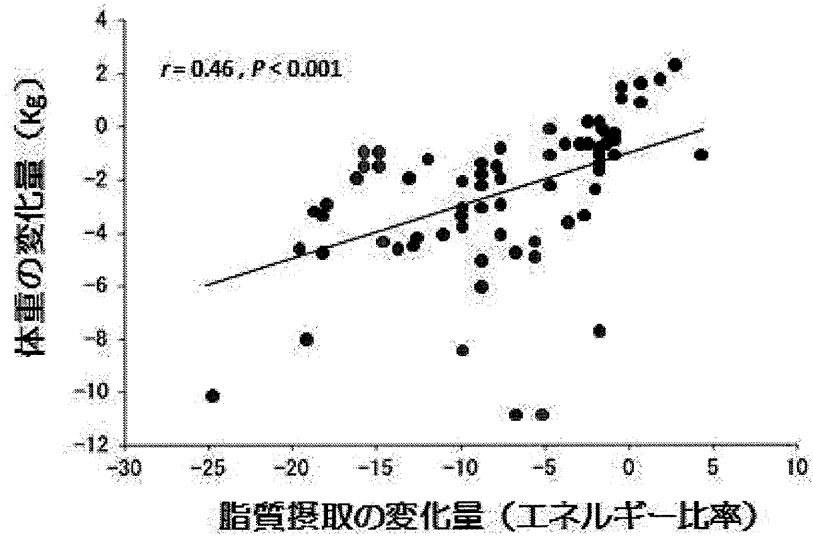


図1 脂肪エネルギー比率の低下は体重減少をもたらす。多くの介入研究を集めたメタ・アナリシスの結果を示す⁴⁾。

図2

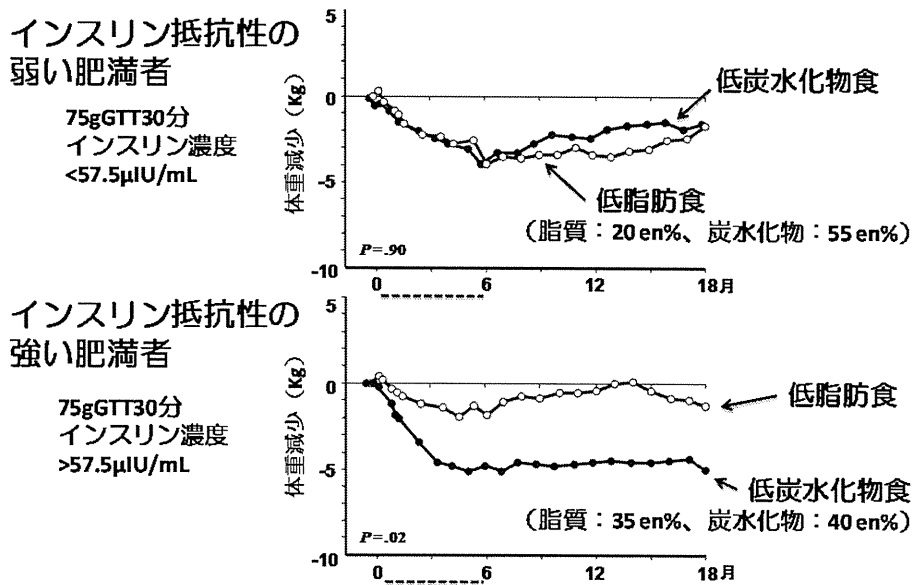


図2 肥満者 (BMI > 30) の最適な脂肪エネルギー比率はインスリン抵抗性の程度によって異なる³⁴⁾。

糖尿病でない肥満者 18-35 歳の男女 56 人を対象に、75 gGTT の血中インスリン 30 分値 57.5 μIU/ mL 以下 (インスリン非抵抗性群) と以上 (インスリン抵抗性群) の 2 群に対し、それぞれ低脂肪食 (高グリセミック食 ; 55 en%炭水化物/ 20 en%脂質/ 25 en%蛋白質) と低炭水化物食 (低グリセミック食 ; 40 en%炭水化物/ 35 en%脂質/ 25 en%蛋白質) を 6 ヶ月間介入し (図中点線部分)、その後 1 年間フォローした³⁴⁾。どちらもエネルギー摂取量は約 400 kcal 減少したが、体重減少量では極端な差が認められた。インスリン抵抗性群では低炭水化物食 (低グリセミック食) で強い体重減少が認められた。

II. 研究分担者の報告書

2. 妊娠・授乳期におけるカルシウム摂取量と骨量の変動

研究分担者 上西 一弘 女子栄養大学栄養生理学研究室

研究要旨

現在使用されている日本人の食事摂取基準 2010 年版では、妊娠期にはカルシウム付加は必要ないとされている。この是非を確認するために、妊娠・授乳期の骨量の変動を縦断的に測定し、カルシウム摂取量と合わせて検討した。その結果、踵骨骨量は妊娠が進むにつれて低下していたが、産後 1 ヶ月では回復傾向にあった。現在、踵骨骨量の測定を継続中であり、出産後では橈骨の DXA 測定も行っている。

A. 目的

現在使用されている日本人の食事摂取基準 2010 年版では、妊娠期にはカルシウム付加は必要ないとされている。これは推奨量を摂取できていれば、妊娠・授乳期に腸管からのカルシウム吸収率が増加し、必要量を取り入れていると考えられること、また、妊娠・授乳期には骨量は低下するものの、授乳終了後 6 ヶ月で骨量は妊娠前の値に回復することから、決められたものである。

しかし、日本人を対象として妊娠・授乳期の骨量を縦断的に測定した報告は少ない。本研究は妊娠・授乳期の骨量の変動を縦断的に測定し、カルシウム摂取量と合わせて検討することを目的とした。

B. 方法

横浜市の産科に通院する妊婦 160 名を対

象に妊娠初期（登録時、妊娠 5～12 週）、中期（妊娠 24 週）、末期（妊娠 34 週）出産時（出産後 2～3 日）産後 1 ヶ月に、身長、体重、踵骨骨量、食物摂取頻度調査（出産時を除く）を実施した。妊娠初期、中期、末期は秤量又は目安量記録法および写真記録法による食事調査を行った。

踵骨骨量は超音波式骨量測定装置アキレス A-1000InSight（GE ヘルスケア社）を用いて測定し、ステフネス値を骨量とした。

C. 結果

登録時の平均年齢は 31.7 ± 3.7 歳、身長は 158.9 ± 4.6 cm、体重は 51.5 ± 6.4 kg であった。BMI が 18.5 未満の者が 23.3%、25 以上の者が 4.9%存在した。

カルシウム摂取量は妊娠初期 409 ± 128 mg（平均値±標準偏差）、中期 465 ± 128 mg、

末期 443±123 mg、出産後 1 ヶ月 443±134 mg であった。

図 1 に調査期間中の踵骨骨量（ステフネス値）の変動を示した。初期から出産時にかけて低下したが、産後 1 ヶ月目には回復傾向にあった。

D. 考察

対象となった妊婦・授乳婦のカルシウム摂取水準は低く、推奨量に達していない者が大部分であった。

踵骨骨量は妊娠が進行するに伴い低下し、出産時に最も低値となっていたが、産後 1 ヶ月目には回復傾向がみられた。この間のカルシウム摂取量はほとんど同水準であった。

今回の対象者のカルシウム摂取量はほとんど同じ水準であり、個人差が少ない集団であった。その中でのカルシウム摂取量のレベルによる、骨量の変動について検討する予定である、さらには出産後には DXA 法による橈骨骨密度の測定を行っており、その

変動についても検討する予定である。

E. 結論

妊娠・授乳期の骨量の変動を検討した。踵骨骨量（ステフネス値）は妊娠が進むにつれて低下したが、産後 1 ヶ月目には回復傾向にあった。

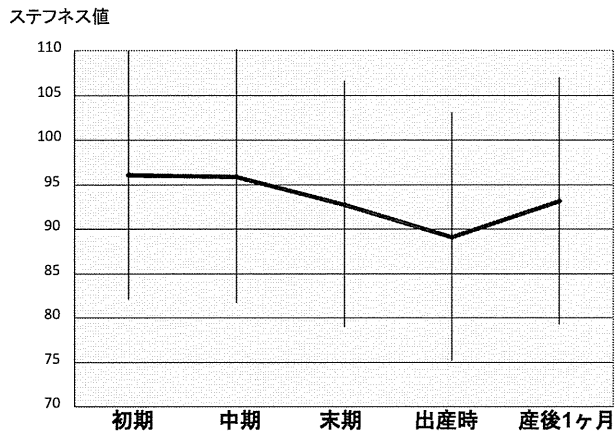
F. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 妊娠・授乳期の踵骨骨量の変動



II. 研究分担者の報告書

3. たんぱく質の出納と生活習慣病関連の検討解析

研究分担者 木戸 康博 京都府立大学大学院生命環境科学研究科

研究要旨

【目的】 現行のたんぱく質必要量は、窒素出納法により算定されている。窒素出納法は、たんぱく質代謝研究に有用な手段であるが、被験者と測定者への負担が大きく、たんぱく質必要量が低く算出されるなどの問題点も指摘されている。本研究では、近年新しく開発された指標アミノ酸酸化（IAAO）法を用い、鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とした日本人成人男性のたんぱく質代謝要求量を算出した。

【方法】 被験者は健康な成人男子大学生 6 名（延べ 36 名）とし、平均年齢は 23 ± 0.6 歳、平均体重および平均 BMI はそれぞれ 61.5 ± 1.4 kg および 20.5 ± 0.4 kg/m² であった。自記式食事歴法質問票（DHQ）による食事調査を行った結果、被験者のたんぱく質摂取量および主要栄養素エネルギー比率は、それぞれ平成 21 年国民健康・栄養調査における 20～29 歳男性の摂取中央値と同程度であった。被験者は、実験前日より調整された食事（エネルギー量: 2240～2360 kcal/day、たんぱく質量: 1.1～1.4 g/kg 体重/day）を摂取した。実験日の 9:00 から 18:00 までは 1 時間ごとに、基礎代謝量 $\times 1.5$ kcal/day の 1/12 量のエネルギーおよび 1 日摂取量の 1/12 量のたんぱく質を含む実験食を摂取した。実験食は、たんぱく質摂取量が 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 あるいは 1.2 g/kg 体重/day となるように調整した。実験食は、たんぱく質源として、玉子焼きを用い、たんぱく質摂取量が 1.0 g/kg 体重/day 以下の場合、1.0 g/kg 体重/day での Phe と Tyr 摂取量に達するまで Phe と Tyr をアミノ酸として追加摂取した。指標アミノ酸として、[1-¹³C]標識 Phe（¹³C-Phe）を用いた。¹³C 標識物質として 13:00 に ¹³C-Phe、NaH¹³CO₃ を経口摂取し、14:00 から ¹³C-Phe を 1 時間ごとに 5 回経口摂取した。¹³C 標識物質経口摂取開始より 30 分間隔で食事終了 1 時間後までの呼気中 ¹³CO₂ 量を赤外線分光分析装置により測定した。加えて、¹³C-Phe 摂取開始後 330 分に被験者の末梢静脈より採血し、血漿アミノ酸濃度を分析した。

【結果】 ¹³C-Phe 摂取により、呼気中 ¹³CO₂ 量は上昇し、摂取開始後 330 分では、たんぱく質摂取量が最も少ない 0.2 g/kg 体重/day の時に最大となり、たんぱく質の摂取量に依存して減少した。しかし、1.0 g/kg 体重/day 以上の摂取量では呼気中 ¹³CO₂ 量がほぼ一定となった。ME-CPRM により変曲点を算出したところ、0.89 g/kg 体重/day であった。また、たんぱく質摂取量が 0.2 g/kg 体

重/day および 1.2 g/kg 体重/day の被験者の血漿 Phe と Tyr 濃度に有意な差はなく、血漿中のアミノ酸プールの大きさは、たんぱく質摂取量によって変化しなかった。

【結論】IAAO 法を用いた日本人成人男性のたんぱく質代謝要求量は、0.89 g/kg 体重/day と算出された。本方法は、簡便性に優れた方法であり、傷病者や妊婦、高齢者にも小さな負担で試験を実施することが可能であると考えられた。

A. 目的

たんぱく質必要量の算出には、これまで窒素出納法が用いられてきた^{1,2)}。窒素出納法は、食事等からの摂取窒素量と、皮膚表面や尿、糞等からの排出窒素量を調べ、それらの出納に基づき窒素平衡を維持できる量をもってたんぱく質必要量としている。窒素出納法はたんぱく質栄養研究に最も標準的かつ有効な方法として用いられているが、摂取窒素量を過大評価し、排泄窒素量を過小評価することから、出納値が正に傾きやすいこと³⁾や、被験者および測定者への負担が大きいことが指摘され、より簡便な測定法の確立が望まれてきた。

指標アミノ酸酸化 (Indicator Amino Acid Oxidation; IAAO) 法は、近年新しく開発された¹³C 標識アミノ酸法の 1 つである。体内で必要とするたんぱく質が、過不足なく合成されるためには、たんぱく質の構成アミノ酸が、全て揃っていることが必要である。体内で必要とするたんぱく質の合成は、第一制限アミノ酸量に依存しているため、摂取する第一制限アミノ酸量が少なければ、たんぱく質合成に利用されなかった他のアミノ酸の余剰分がエネルギーとして利用され、二酸化炭素 (CO₂) として呼気中へ排出される。一方、第一制限アミノ酸の摂取量が増すと、他のアミノ酸のたんぱく質合成への利用量も増加し、アミノ酸の酸化により発生する CO₂ の呼気中

への排出量も減少する。IAAO 法は、このアミノ酸代謝の反応を利用し、¹³C で標識された指標アミノ酸を経口摂取し、発生する¹³CO₂ 量を測定するものである⁴⁾。

IAAO 法は、現在までにブタやヒトにおいて、不可欠アミノ酸の必要量算出に用いられてきた^{5,6)}。2007 年に Humayun ら⁷⁾ は、成人男性のたんぱく質必要量の測定に IAAO 法を応用した。その結果、たんぱく質必要量を 0.93 g/kg 体重/day と算出し、現行の値より高値であったと報告した。IAAO 法は、適応期間を設けず、習慣的なたんぱく質摂取量におけるたんぱく質代謝応答でのたんぱく質必要量の算出が可能であるため、各ライフステージでの必要量だけでなく、急性期の傷病者に対しても試験の実施が可能である。しかし、Humayun ら⁷⁾ が行った成人男性を対象とした IAAO 法では、たんぱく質源としてアミノ酸混合物を用いていた。アミノ酸混合の消化・吸収機構はたんぱく質とは異なると考えられるので、たんぱく質をたんぱく質源とした IAAO 法を行うことが必要である。しかし、成人男性において、たんぱく質源としてアミノ酸混合物ではなくたんぱく質を用いた研究は未だ報告されておらず、そのための基礎研究も十分に行われていない。さらに、IAAO 法で算出された値の解釈や、指標アミノ酸の選択など、依然として検討すべき課題は山積している。

そこで本研究では、鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とする IAAO 法において、日本人成人男性のたんぱく質代謝要求量を算出した。

B. 方法

本研究は、京都府立大学倫理委員会の承認を得て行った。

1) 被験者

健康な成人男性 6 名（延べ 36 名）を被験者とした。各被験者の特徴および DHQ による食事調査結果は表 1 に示した。被験者は、試験前日および試験中の激しい運動およびアルコールの摂取を避けた。また、試験前日の 22 時以降は水、お茶および紅茶以外は摂取せず、試験開始まで 11 時間絶食とした。

2) 実験食

実験食 1 回の摂取量は、1 日のエネルギー摂取量およびたんぱく質摂取量の 1/12 とした。エネルギー摂取量は、18 歳から 29 歳男性の基礎代謝基準値（24.0 kcal/kg 体重/day）に個人の体重および身体活動レベル I（1.50）を乗じて算出した⁸⁾。たんぱく質摂取量は、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 あるいは 1.2 g/kg 体重/day とした。食事は、たんぱく質源として鶏卵たんぱく質、エネルギー源として、いろいろ、粉あめを用いた。各たんぱく質摂取量時の鶏卵たんぱく質の栄養成分組成を表 2 に示した。たんぱく質摂取量が 1.0 g/kg 体重/day 以下の場合、1.0 g/kg 体重/day での Phe と Tyr 摂取量（54.7 mg/kg 体重および 40.7 mg/kg 体重）に達するまで Phe と Tyr をアミノ酸として追加摂取した（表 3）。

3) 実験プロトコール

実験は試験日前日と試験日の計 2 日間とした。試験日前日には、被験者は 3 食の調整食を摂取した。調整食は、全ての被験者において基礎代謝量×1.5 で算出したエネルギー摂取量を満たしており（2240～2360 kcal/day）、たんぱく質摂取量は平成 21 年国民健康・栄養調査での同年齢区分の平均中央値と同程度であった（1.1～1.4 g/kg BW/day）。また、試験日前日の 22 時以降より水、お茶および紅茶以外は摂取せず、試験開始まで 11 時間絶食とした。試験日は 9 時より試験を開始し、19 時までとした。実験食は試験開始から 1 時間毎に同量ずつ計 10 回摂取した。安定同位体の摂取は、5 回目の食事より開始し、5 回目の食事では、NaH¹³CO₃ を 0.176 mg/kg 体重、L-[1-¹³C]phenylalanine (¹³C-Phe)（99 atom percent excess; Cambridge Isotope Laboratories）を 0.66 mg/kg 体重 摂取した。それ以降では、実験食の摂取終了まで、実験食とともに ¹³C-Phe を 1.20 mg/kg 体重摂取した。そして、安定同位体の摂取開始と同時に呼気バッグにて呼気回収を開始し、全ての実験食の摂取終了 1 時間後まで 30 分毎に呼気を回収した。回収した呼気は赤外線分光分析装置 POCone（大塚電子株式会社）にて呼気中 ¹³CO₂ 量を測定した。

また、安定同位体の摂取が終了した後の 18 時 30 分の呼気回収と同時に末梢静脈より採血した。採取した血液の血漿画分は、血漿アミノ酸分析に供した。

4) 血漿中アミノ酸分析

被験者より採取した血液は、直ちに遠心分離し（12,000 rpm、15 min、4°C、血漿画分と

血球画分に分け、血漿画分を -80°C で使用するまで保存した。使用時には、自然解凍した血漿画分に、エタノールを添加、75%エタノールとし、除タンパク処理を行った。これを再び遠心分離し（12,000 rpm、15 min、 4°C ）、上清をエタノール可溶画分として以後の実験に用いた。

次に、血液中の Phe および Tyr のキャプチャリングのため、 H^+ 型強カチオン交換樹脂を充填したスピンカラムによる固相抽出を行った。この分画は Aito-Inoue ら⁹⁾の方法を用いた。

H^+ 型の強カチオン交換樹脂（AG50W \times 8）をビーカーに適量とり、50%メタノールで数回洗浄した。そして、ミニスピンカラム（Ultrafree-MC, Durapore PVDF 5.0 mm, MILLIPORE）に50%メタノールとともに充填後、メタノールに溶出させるため、数秒間遠心分離した。さらに、200 μL の50%メタノールをカラムに3回添加し洗浄した後、200 μL の10 mM HCl で3回カラムを平衡化し、400 μL の7.5 N アンモニア 50%メタノールで2回抽出を行った。これらの溶出液をサンプルごとにまとめ、吸着画分とした。分画終了後、直ちに吸着画分を水流ポンプにて遠心真空乾固した。

次に、6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) による誘導化を行った。5倍希釈したアミノ酸混合溶液 H 型を 1.5 mL マイクロチューブに 10 μL 注入した。サンプルは目的の濃度まで希釈したものを 1.5 mL マイクロチューブに 10 μL 注入し、遠心濃縮器にて遠心真空乾固した。その後、アミノ酸混合溶液 H 型には、20 mM HCl を 20 μL 、ホウ酸緩衝液を 70 μL 、AQC 試薬を 10 μL 添加

した。サンプルには、20 mM HCl を 20 μL 、ホウ酸緩衝液を 60 μL 、AQC 試薬を 20 μL 添加した。それぞれボルテックスミキサーで攪拌し、 55°C のブロックヒーターで 10 分反応させ、誘導化した。

誘導化の完了したアミノ酸混合溶液 H 型およびサンプルを、RP-HPLC にて分析した。HPLC 装置および蛍光、UV-VIS 検出器には資生堂（株）の NANOSPACE SI-2 を用いた。測定は、蛍光検出器（励起波長 295 nm、蛍光波長 350 nm）、UV-VIS 検出器（測定波長 254 nm）で行った。分析カラムには、COSMIL 5C18-MS-II Packed Colum（4.6 mm i.d. \times 250 mm, ナカライテスク（株））を使用した。移動相には、0.1%ギ酸緩衝液-60%アセトニトリルを用い、流速は毎分 1.0 mL、カラム温度は 43°C 、注入量は 10 μL で行った。Phe および Tyr 溶出画分の溶出液は分取し、エレクトロスプレーイオンゼーションマスマスペクトロメトリー（ESI-MS）により $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を求めた。

ESI-MS による分析では、Phe 溶出画分では 336 (^{12}C -Phe) および 337 (^{13}C -Phe) m/z、Tyr 溶出画分では 352 (^{12}C -Tyr) および 353 (^{13}C -Tyr) m/z にピークが出現する。このピークに He ガスを用いた衝突誘起解離を行い、ピークが AQC 誘導化試薬とアミノ酸由来のものであることを確認した。その後、アミノ酸量の相対値を 100 とし、 ^{12}C -Phe と ^{13}C -Phe および ^{12}C -Tyr と ^{13}C -Tyr の相対値を求め ^{13}C -Phe および ^{13}C -Tyr の占める割合を算出した。

C. 結果

結果は、13 時の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を Pre 値とし、測定値から Pre 値（‰/kg 体重）を差し

引き $\Delta^{13}\text{CO}_2$ (%/kg 体重) として算出した。たんぱく質摂取量が 0.2 g/kg 体重/day および 1.2 g/kg 体重/day での呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的変化を示した (図 1)。

13 時の安定同位体の摂取後、すべてのたんぱく質摂取量において急速に呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量が上昇した。たんぱく質摂取量が 0.2 g/kg 体重/day および 1.2 g/kg 体重/day での呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、15 時 30 分以降たんぱく質摂取量の少ない 0.2 g/kg 体重/day では 1.2 g/kg 体重/day に比べ高い値で推移した。

たんぱく質摂取量が 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 あるいは 1.2 g/kg/day となるように調整した食事を摂取し、各たんぱく質摂取量での 18 時 30 分で採取した呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の比較を行った。その結果、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、たんぱく質摂取量が 1.0 g/kg 体重/day までではたんぱく質摂取量を増すにつれ、減少していった。たんぱく質摂取量が 1.0 g/kg 体重/day および 1.2 g/kg 体重/day では、たんぱく質摂取量に依存せず呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量はほぼ一定であった (図 2)。

全てのたんぱく質摂取量での 18 時 30 分における呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を、ME-CPRM¹⁰⁾ 用いて比較したところ、変曲点は 0.89 g/kg 体重/day と算出された (図 3)。本結果より、鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とした際の日本人成人男性のたんぱく質代謝要求量は 0.89 g/kg 体重/day、その 95%信頼値は 1.11 g/kg 体重/day であった。

18 時 30 分での血漿アミノ酸分析を行った結果、Phe と Tyr 濃度および $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比はたんぱく質摂取量 0.2 g/kg 体重/day と 1.2 g/kg 体重/day において有意な差を認めなかった (図 4, 表 4)。

D. 考察

鶏卵たんぱく質を 0.2 g/kg 体重/day あるいは 1.2 g/kg 体重/day 摂取した際の血漿 Phe 濃度および Phe 濃度全体に占める ^{13}C -Phe の割合は、ほぼ同じであり、血漿 Tyr 濃度および Tyr 濃度全体に占める ^{13}C -Tyr の割合も、ほぼ同程度であった (表 4)。小川ら¹¹⁾ は、ラットを用いて IAAO 法の基礎研究を行い、血漿、肝臓および腓腹筋における Phe 濃度および Phe 濃度全体に占める ^{13}C -Phe の割合ならびに Tyr 濃度および Tyr 濃度全体に占める ^{13}C -Tyr の割合がほぼ同程度であることを報告している。成人男性を被験者とした本研究においても、血漿 Phe 濃度および Tyr 濃度が一定であることを確認し、鶏卵たんぱく質をたんぱく質源として用いたアミノ酸プールならびにアミノ酸代謝速度は、本研究プロトコルにおいて定常状態であると考えられた。

本研究で、摂取たんぱく質レベルを 0.2 g/kg 体重/day から 1.2 g/kg 体重/day と変化させて変曲点を解析した結果、変曲点は 0.89 g/kg 体重/day、その 95%信頼値は 1.11 g/kg 体重/day となった。本研究で、鶏卵たんぱく質を用いて算出された 0.89 g/kg 体重/day という値は、現行のたんぱく質必要量である 0.72 g/kg 体重/day⁸⁾ と比較した場合、高値となった。現行のたんぱく質必要量は、窒素出納法で算出されており、窒素出納法で算出される値は最小たんぱく質必要量であるのに対し、IAAO 法で算出される値がたんぱく質代謝要求量であり、それぞれの算出値の意味するところが異なるため、本研究結果で高値を示したと考えられた。

窒素出納法で算出される最小たんぱく質必要量は、たんぱく質代謝状態を低たんぱく質

状態に適応させた状態での窒素平衡維持に必要なたんぱく質摂取量である。したがって、このたんぱく質必要量を下回るたんぱく質を継続的に摂取すると、たんぱく質欠乏症が発症すると考えられる。一方、IAAO法は、実験毎にそのたんぱく質摂取状態での適応を必要とせず、普通に生活している人が摂取している習慣的なたんぱく質摂取量でのたんぱく質代謝を維持するために必要なたんぱく質摂取量を推定することが出来る。

習慣的なたんぱく質摂取量でのたんぱく質代謝状態を変化させるためには、5~7日間を要する¹²⁾ので、たんぱく質摂取量を一時的に少ない摂取量に変化させても、習慣的なたんぱく質摂取量でのたんぱく質代謝応答となる。そのため、習慣的に十分量のたんぱく質を摂取している状態で、IAAO法により算出した値は、習慣的なたんぱく質摂取量でのたんぱく質代謝に必要なたんぱく質代謝要求量と考えられる。したがって、このたんぱく質摂取量を下回るたんぱく質を継続的に摂取してもたんぱく質欠乏症は発症しないと考えられる。

本研究において、食事調査により被験者の習慣的なたんぱく質摂取量は1.1 g/kg 体重/dayと算出され(表1)、平成21年国民健康・栄養調査の20~29歳男性におけるたんぱく質摂取量の平均中央値(1.0 g/kg 体重/day)と比較して同程度であった。そのため、本研究で算出したたんぱく質代謝要求量は、20~29歳日本人男性が習慣的に摂取しているたんぱく質状態における代謝要求量であると考えられた。

IAAO法で算出されるたんぱく質代謝要求量は、普通に生活している人が摂取している

習慣的なたんぱく質摂取量でのたんぱく質代謝を維持するために必要なたんぱく質摂取量である。したがって、実験食として摂取するたんぱく質レベルごとに、そのたんぱく質摂取状態への適応を必要としないので、代謝変動の激しい傷病者や、経時的に代謝の変化する妊婦などでもIAAO法によるたんぱく質代謝要求量の算出方法を適用することが可能と考えられた。

以上の結果から、各種病態やそれぞれのライフステージにおいてたんぱく質代謝要求量の推定が可能となり、今後、さらなるたんぱく質代謝に関する研究の進展に貢献出来るものと考えた。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Ogawa A, Naruse Y, Shigemura Y, Kobayashi Y, Suzuki I, Wada S, Hayamizu K, Kuwahata M, Kido Y. An evaluation of protein intake for metabolic demands and the quality of dietary protein in rats using an indicator amino acid oxidation method. *J Nutr Sci Vitaminol* (2011) **57**, 418-425.
- 2) 木戸康博. たんぱく質・アミノ酸の必要量に関する研究. *栄養学雑誌* (2011) **69**, 285-293.

2. 学会発表

- 1) Hirose T, Araki N, Ogawa A, Kobayashi Y, Wada S, Kuwahata M, Kido Y. Estimation of protein requirement for young Japanese men using the indicator amino acid oxidation method. 11th Asian Congress of Nutrition, Singapore. (2011) p. 236.
- 2) Ogawa A, Hirose T, Kobayashi Y, Hayamizu

K, Kuwahata M, Kido Y. An evaluation of the quality of dietary protein in rats using an IAAO method. 11th Asian Congress of Nutrition, Singapore. (2011) p.155.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献

1. Rose W C. The amino acid requirements of adult man. *Nutr Abst Rev* (1957) **27**, 631-647.
2. Rand W M, Pellet P L, Young V R. Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *Am J Clin Nutr* (2007) **77**, 109-127.
3. Hegsted D M. Balance studies. *J Nutr* (1976) **106**, 307-311.
4. 岸恭一, 木戸康博. タンパク質・アミノ酸の新栄養学. 講談社 2007.
5. Ball R O, Bayley H S. Influence of dietary protein concentration on the oxidation of phenylalanine by the young pig. *Br J Nutr* (1986) **55**, 651-658.
6. Kriengsinyos W, Wykes L J, Ball R O, Pencharz P B. Oral and intravenous tracer protocols of the indicator amino acid oxidation method provide the same estimate of the lysine requirement in healthy men. *J Nutr* (2002) **132**, 2251-2257.
7. Humayun M A, Elango R, Ball R O, Pencharz P B. Reevaluation of the protein requirement in young men with the indicator amino acid oxidation technique. *Am J Clin* (2007) **86**, 995-1002.
8. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準 2010年版. (2009) .
9. Aito-Inoue M, Ohtsuki K, Nakamura Y, Park Y, Iwai K, Morimitsu F, Sato K. Improvement in isolation and identification of food-derived peptides in human plasma based on precolumn derivatization of peptides with phenylisothiocyanete. *J Agric Food Chem* (2006) **54**, 5261-5266.
10. Hayzmizu K, Kato M, Hattori S. Determining amino acid requirements from repeated observations on indicator amino acid oxidation method by mixed-effect change-point regression models. *J Clin Biochem Nutr* (2011) **49**, 115-120.
11. Ogawa A, Naruse Y, Shigemura Y, Kobayashi Y, Suzuki I, Wada S, Hayamizu K, Kuwahata M, Kido Y. An evaluation of protein intake for metabolic demands and the quality of dietary protein in rats using an indicator amino acid oxidation method. *J Nutr Sci Vitaminol* (2011) **57**, 418-425.
12. Uauy R, Scrimshaw N S, Rand W M, Young V R. Human protein requirements: Obligatory urinary and fecal nitrogen losses and the factorial estimation of protein needs in elderly males. *J Nutr* (1978) **108**, 97-103.

表 1 被験者の特徴 (Protein intake および PFC 比率は DHQ より算出した)

	年齢 (歳)	体重 (kg)	身長 (cm)	BMI* (kg/m ²)	Protein intake (g/kg BW/day)	PFC 比率 (%)
A	23	66	178	20.8	0.9	14.6 : 27.0 : 58.4
B	24	57	170	19.7	1.2	13.4 : 27.5 : 59.0
C	22	59	175	19.3	1.0	11.4 : 28.9 : 59.7
D	20	60	172	20.3	1.2	12.2 : 27.3 : 60.4
E	23	64	172	21.6	1.2	13.5 : 30.9 : 55.6
F	23	63	173	21.0	1.3	15.0 : 32.2 : 52.8
平均値	22 ± 0.6	61.5 ± 1.4	173 ± 1.1	20.5 ± 1.4	1.1 ± 0.1	13.4 : 29.0 : 57.7

BMI: body mass index

結果は mean ± SE で示した。

表 2 各たんぱく質摂取量での 1 回の玉子焼き栄養成分組成 (体重 60 kg)

	たんぱく質摂取量 (g/kg BW/day)					
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
鶏卵重量 (g)	8.1	16.3	24.4	32.5	40.7	48.8
玉子焼き カロリー (kcal)	52.3	64.6	76.8	89.1	101.4	113.7
たんぱく質量 (g)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
脂質 (g)	0.8	1.7	2.5	3.3	4.2	5.0
炭水化物 (g)	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1

表 3 各たんぱく質摂取量のアミノ酸組成

	評定パターン (全卵パターン) mg/g	たんぱく質摂取量 (g/kg BW/day)					
		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
		Ala	61.4	12.3	24.6	36.8	49.1
Arg	75.1	15.0	30.0	45.1	60.1	75.1	90.1
Asn	33.3	6.7	13.3	20.0	26.6	33.3	40.0
Asp	33.3	6.7	13.3	20.0	26.6	33.3	40.0
Cys	22.1	4.4	8.8	13.3	17.7	22.1	26.5
Gln	56.6	11.3	22.6	34.0	45.3	56.6	67.9
Glu	56.6	11.3	22.6	34.0	45.3	56.6	67.9
Gly	33.3	6.7	13.3	20.0	26.6	33.3	40.0
His	22.7	4.5	9.1	13.6	18.2	22.7	27.2
Ile	62.8	12.6	25.1	37.7	50.2	62.8	75.4
Leu	83.3	16.7	33.3	50.0	66.6	83.3	100.0
Lys	75.7	15.1	30.3	45.4	60.6	75.7	90.8
Met	29.6	5.9	11.8	17.8	23.7	29.6	35.5
Phe	54.7	54.7	54.7	54.7	54.7	54.7	65.6
Pro	41.9	8.4	16.8	25.1	33.5	41.9	50.3
Ser	83.9	16.8	33.6	50.3	67.1	83.9	100.7
Thr	47.1	9.4	18.8	28.3	37.7	47.1	56.5
Trp	15.6	3.1	6.2	9.4	12.5	15.6	18.7
Tyr	40.7	40.7	40.7	40.7	40.7	40.7	48.8
Val	70.3	14.1	28.1	42.2	56.2	70.3	84.4

表 4 血漿中 ^{12}C 、 ^{13}C -Phe および Tyr 濃度と $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比

たんぱく質摂取量 (g/kg BW/day)	フェニルアラニン (nmol/mL)			チロシン (nmol/mL)		
	^{13}C -Phe	^{12}C -Phe	合計	^{13}C -Tyr	^{12}C -Tyr	合計
	0.2 (n=6)	13.6 ± 1.9 (21.2%)	50.2 ± 5.8 (78.8%)	63.9 ± 7.5 (100%)	9.2 ± 0.7 (12.2%)	66.7 ± 5.7 (87.8%)
1.2 (n=6)	12.5 ± 1.5 (19.3%)	51.8 ± 4.9 (80.7%)	64.3 ± 6.3 (100%)	9.9 ± 1.5 (13.8%)	59.3 ± 5.6 (86.2%)	69.2 ± 7.1 (100%)

結果は mean ± SE で示した。

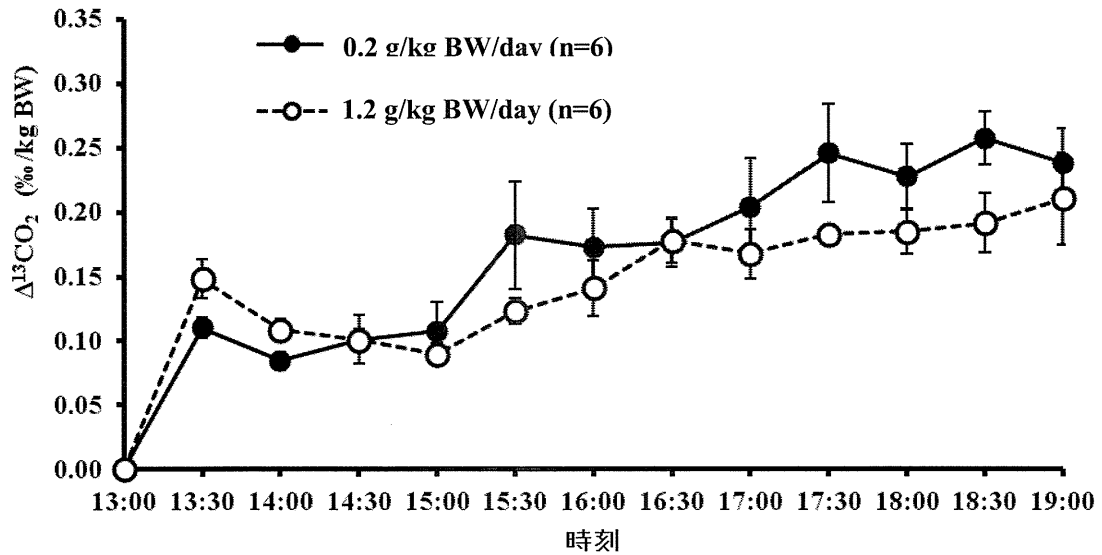


図1 たんぱく質摂取量が 0.2 g/kg BW/day、1.2 g/kg BW/day での IAAO 法による呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的変化
結果は mean \pm SE で示した。

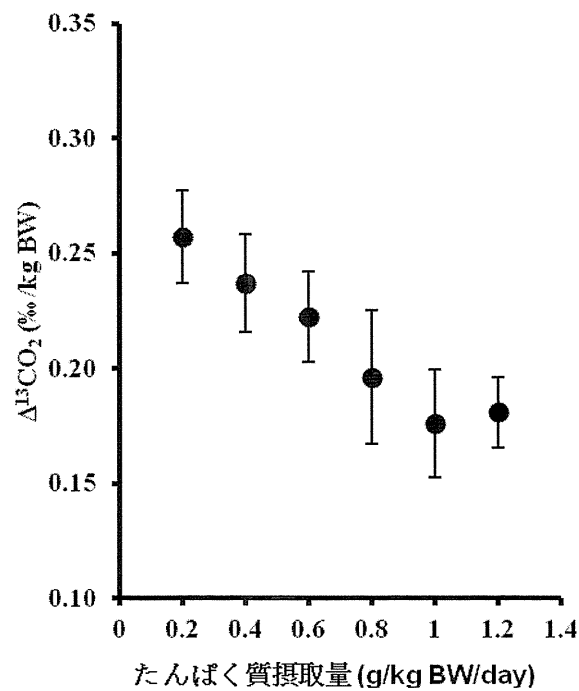


図2 たんぱく質摂取量と呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の相関
値は 18 時 30 分の $\Delta^{13}\text{CO}_2$ (‰/kg BW) を用いた。結果は mean \pm SE で示した。

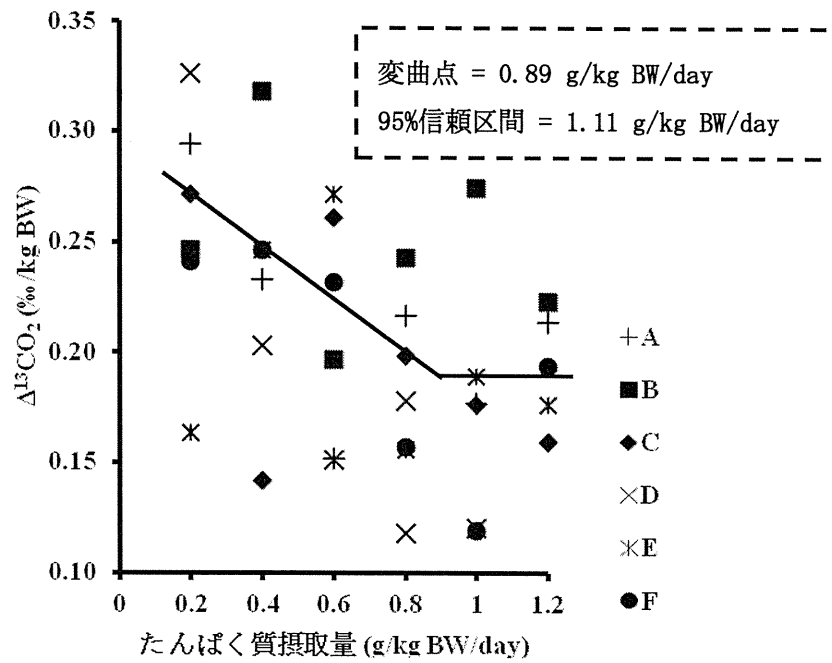


図3 各個人でのたんぱく質摂取量と呼気中¹³CO₂量の相関

V 値は 18 時 30 分の $\Delta^{13}\text{CO}_2$ (%/kg BW) を用い、変曲点の算出には ME-CPRM を用いた。

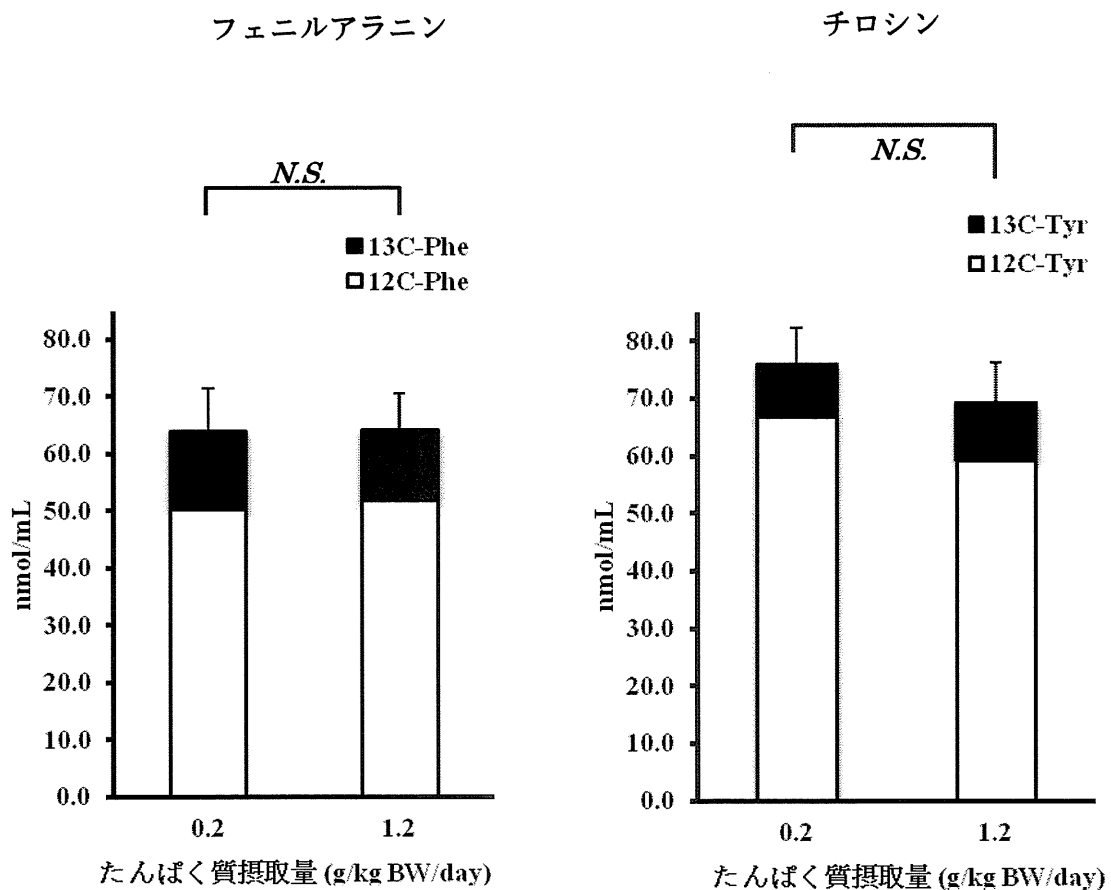


図4 たんぱく質 0.2 g/kg BW/day、1.2 g/kg BW/day 摂取時の血漿中 Phe、Tyr 濃度および $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比
結果は mean \pm SE で示した。全てのデータにおいて 0.2 g/kg BW/day および 1.2 g/kg
BW/day との間に Student's t-test において有意な差を認めなかった。