

with various food groups, and found that intake of green vegetables correlated well with folate status and Hcy levels. Furthermore, it was revealed by the quartile analysis that the highest Hcy group showed the lowest BMD, the lowest serum folate concentration, the lowest folate intake and the lowest intake of green vegetables. This analysis suggests that insufficient intake of green vegetables, but not insufficient caloric intake, causes folate insufficiency in the group with the highest Hcy.

The strength of the present study is that it is the first study to show that nutritional status of folate might affect the homocysteine level, a putative risk factor for osteoporosis, in Japanese patients with type 2 diabetes. The present study is also meaningful in promoting awareness of the importance of diet quality, because patients with diabetes are at high risk of developing osteoporosis. In contrast, the present study has some limitations. First, the sample size was not large enough for conclusions regarding marginal insignificant *P*-values. We estimated sample size using a correlation coefficient obtained from a previous cross-sectional study assessing the relationship between BMD and plasma Hcy⁸. The correlation coefficient of femoral BMD with Hcy was -0.18 and the sample size was estimated to be $n = 153$ (two-sided $\alpha = 0.1$, $\beta = 0.2$), while we analyzed 125 patients. Second, we only analyzed patients with type 2 diabetes and comparison with non-diabetic subjects is necessary. An unanswered question is whether diabetes modulates the effects of nutritional state of folate on Hcy metabolism, and the effects of Hcy levels on BMD. Finally, a longitudinal study is required to examine the effects of Hcy on rate of BMD loss and risk of fracture for a longer duration in patients with type 2 diabetes. It is also necessary to determine whether encouraging patients with higher Hcy levels to eat more green vegetables is useful as a dietary intervention to improve Hcy levels and BMD.

In conclusion, the present study shows that BMD inversely correlates to plasma Hcy levels in Japanese patients with type 2 diabetes, and that dietary intake and the serum concentration of folate are determinant factors of Hcy levels. When our group was analyzed across quartiles, BMD, serum folate concentration, folate intake and intake of green vegetables were lowest in the highest Hcy group. Taken together, in Japanese patients with type 2 diabetes, a diet low in green vegetables rather than a calorie-restricted diet might be the more important factor in the declining nutritional status of folate that increases the Hcy level, a putative risk factor for osteoporosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by Diabetes Masters Conference and Japan Diabetes Foundation. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

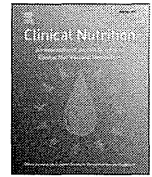
1. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes – a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007; 18: 427–444.
2. Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, *et al.* Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 1317–1328.
3. Adami S. Bone health in diabetes: considerations for clinical management. *Curr Med Res Opin* 2009; 25: 1057–1072.
4. Lammes E, Törner A, Akner G. Nutrient density and variation in nutrient intake with changing energy intake in multi-morbid nursing home residents. *J Hum Nutr Diet* 2009; 22: 210–218.
5. Grzybek A, Klosiewicz-Latoszek L, Targosz U. Changes in the intake of vitamins and minerals by men and women with hyperlipidemia and overweight during dietetic treatment. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: 1162–1168.
6. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, *et al.* Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Intern Med* 2006; 166: 88–94.
7. Baines M, Kredan MB, Usher J, *et al.* The association of homocysteine and its determinants MTHFR genotype, folate, vitamin B₁₂ and vitamin B₆ with bone mineral density in postmenopausal British women. *Bone* 2007; 40: 730–736.
8. Golbahar J, Hamidi A, Aminzadeh MA, *et al.* Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methyl-ene-tetrahydrofolate reductase C667T polymorphism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women: a cross-sectional study. *Bone* 2004; 35: 760–765.
9. Golbahar J, Aminzadeh MA, Hamidi SA, *et al.* Association of red blood cell 5-methyltetrahydrofolate folate with bone mineral density in postmenopausal Iranian women. *Osteoporos Int* 2005; 16: 1894–1898.
10. Morris MS, Jacques PF, Selhub J. Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone* 2005; 37: 234–242.
11. Cagnacci A, Baldassari F, Rivolta G, *et al.* Relation of homocysteine, folate, and vitamin B₁₂ to bone mineral density of postmenopausal women. *Bone* 2003; 33: 956–959.
12. Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, *et al.* Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 152–158.
13. Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, *et al.* Homocysteine and vitamin B₁₂ status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 921–929.
14. Dhonukshe-Rutten RA, Lips M, de Jong N, *et al.* Vitamin B-12 status is associated with bone mineral content and bone mineral density in frail elderly women but not in men. *J Nutr* 2003; 133: 801–807.
15. Harpey JP, Rosenblatt DS, Cooper BA, *et al.* Homocystinuria caused by 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: a case in an infant responding to methionine, folinic acid, pyridoxine, and vitamin B12 therapy. *J Pediatr* 1981; 98: 275–278.
16. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, *et al.* The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1–31.

17. Lubec B, Fang-Kircher S, Lubec T, *et al.* Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1315: 159–162.
18. Saito M, Fujii K, Marumo K. Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int* 2006; 79: 160–168.
19. Krumdieck CL, Prince CW. Mechanisms of homocysteine toxicity on connective tissues: implications for the morbidity of aging. *J Nutr* 2000; 130: 365s–368s.
20. Koh JM, Lee YS, Kim YS, *et al.* Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1003–1011.
21. Herrmann M, Schmidt J, Umanskaya N, *et al.* Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone* 2007; 41: 584–591.
22. The Committee of the Japan Diabetes Society on the Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Invest* 2010; 1: 212–228.
23. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 422: 43–52.
24. Shibata K, Fukuwatari T, Watanabe T, *et al.* Intra- and inter-individual variations of blood and urinary water-soluble vitamins in Japanese young adults consuming a semi-purified diet for 7 days. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009; 55: 459–470.
25. Fukuwatari T, Yoshida E, Takahashi K, *et al.* Effect of fasting on the urinary excretion of water-soluble vitamins in humans and rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2010; 56: 19–26.
26. Takahashi K, Yoshimura Y, Kaimoto T, *et al.* Validation of a food frequency questionnaire based on food groups for estimating individual nutrient intake. *Jpn J Nutr* 2001; 59: 221–232.
27. Miyaki K, Tohyama S, Murata M, *et al.* Salt intake affects the relation between hypertension and the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Am J Hypertens* 2005; 18: 1556–1562.
28. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, *et al.* Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004; 350: 2033–2041.
29. Herrmann M, Peter Schmidt J, Umanskaya N, *et al.* The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B₆ and B₁₂ deficiencies in osteoporosis: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1621–1632.
30. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, *et al.* Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994; 96: 239–246.
31. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, *et al.* Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693–2698.
32. Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, *et al.* Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991–1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med* 1999; 131: 331–339.
33. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, *et al.* Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 2–11.
34. Carmel R. *Cobalamin Deficiency, Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge University Press, Cambridge, 2001.
35. Chanarin I. *The Megaloblastic Anemias*, 2nd edn. Blackwell Scientific, Oxford, 1979.
36. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. The B vitamins and choline: overview and methods. In: Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes: For Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. National Academy Press, Washington DC, 1998; 306–356.
37. Adams JF, Clark JS, Ireland JT, *et al.* Malabsorption of vitamin B₁₂ and intrinsic factor secretion during biguanide therapy. *Diabetologia* 1983; 24: 16–18.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/clnu>

Correspondence

Overestimated serum albumin levels in patients with hip fracture

Hip fracture is associated with high mortality and morbidity. Malnutrition has been reported to an important predictor of clinical outcomes. Serum albumin level and blood total lymphocyte count (TLC) are considered to be the simple, but reliable markers indicating the patients' nutritional status, and often employed in various clinical settings including hip fracture.¹ Recently O'Daly et al.² in the recent issue of *Clinical Nutrition*, studied the significance of these two markers as the predictors of outcome in hip fractured patients. They defined protein energy malnutrition (PEM) as serum albumin level below 3.5 g/dl and TLC below 1500/mm³. Patients with both parameters below the cut-off had higher one year mortality than those with both values above the cut-off (odds ratio; 4.6). Cox regression analysis revealed that serum albumin level (hazard ratio; 0.932) and age were independent prognostic factors of mortality. Lee et al.³ also reported that serum albumin was associated with increased post-operative complications (odds ratio; 6.23) after adjusting for various confounders. Although these findings are of clinical interest, measurement method for serum albumin is not described. Serum albumin level can be measured with various ways, each having its own pros and cons. BCG (bromocresol green) binding assay is the most frequently used one, but has the disadvantage that BCG also binds to α 1 and α 2 globulins, which are acute phase proteins and increased in inflammation. Thus, serum albumin level can be overestimated with BCG assay. Then, we have measured serum albumin level in 86 patients with hip fracture by BCG assay (albumin-BCG) and nephelometry (albumin-N), which is based on antigen-antibody interaction and free from the interference by globulins. Written consent was obtained from the subjects or the proxy. Albumin-BCG (3.86 ± 0.42 g/dl) was significantly higher than albumin-N (3.51 ± 0.43 g/dl) by paired *t*-test ($p < 0.001$). Next, we have compared the number of subjects with their serum albumin level below or above the cut-off of 3.5 g/dl (Table 1). All subjects with albumin-BCG below 3.5 g/dl had also albumin-N below 3.5 g/dl. In contrast, approximately half of the subjects with albumin-BCG above 3.5 g/dl had albumin-N below 3.5 g/dl. Our results show that the measurement of serum albumin level by BCG assay could overestimate the serum albumin level, and underestimate the percentage of subjects with PEM in hip fractured patients. Thus, the method of serum albumin measurement must be specified, and the positive interference by globulins in the

Table 1
Comparison of albumin-BCG and albumin-N.

		Albumin-N	
		<3.5 g/dl	≥3.5 g/dl
Albumin-BCG	<3.5 g/dl	13	0
	≥3.5 g/dl	36	37

Albumin-BCG and Albumin-N indicate the serum albumin level determined by BCG assay, and that by nephelometry, respectively. Data were analyzed by chi-square test ($p = 0.002$).

bye-binding assay should be taken into account in the nutritional assessment of the hip fractured subjects.

Conflict of interest statement

None of the authors have any conflicts of interest.

References

- Gibson RS. Assessment of protein status. In: Gibson RS, editor. *Principles of nutritional assessment*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2005. p. 403–42.
- O'Daly BJ, Walsh JC, Quinlan JF, Falk GA, Stapleton R, Quinlan WR, et al. Serum albumin and total lymphocyte count as predictors of outcomes in hip fractures. *Clin Nutr* 2010;29:89–93.
- Lee HP, Chang YY, Jean YH, Wang HC. Importance of serum albumin level in the preoperative tests conducted in elderly patients with hip fracture. *Injury* 2009;40:756–9.

Tetsuo Nakano

Department of Orthopedics, Tamana Central Hospital, Japan

Akiko Kuwabara*

Department of Health and Nutrition,
Osaka Shoin Women's University, 4-2-26 Hishiyaniishi,
Higashiosaka-shi, Osaka 577-8550, Japan

*Tel.: +81 6 6723 8181;

fax: +81 6 6723 8348.

E-mail address: kuwabara.akiko@osaka-shoin.ac.jp.

Kiyoshi Tanaka

Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University, Japan

29 July 2010

たんぱく質・アミノ酸の必要量に関する研究

木戸 康博

京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻栄養科学研究室

摂取エネルギーは十分であっても、摂取たんぱく質が不足した時にクワシオコルが発症し、感染症などを併発しやすい。たんぱく質必要量は、身体の構造と機能を正常に維持するために必要な摂取量（代謝要求量）であり、食事たんぱく質必要量は、それらの要求量を満たす量である。たんぱく質必要量は、窒素出納法によって決定されてきた。しかし、窒素出納法にはその方法上様々な問題がある。指標アミノ酸酸化（IAAO）法は、窒素出納法とは原理が大きく異なり、窒素出納法の代替法として動物とヒトにおいて開発された。私たちは、指標アミノ酸酸化法を用いてラットと健康成人男性の食事たんぱく質必要量とたんぱく質の質を再評価した。その結果、指標アミノ酸酸化法は全てのライフステージ（幼児、小児、学童、成人、高齢者）の食事たんぱく質必要量の評価だけでなく、代謝要求量が大きく変化している術後、傷害、感染症などいろいろな病態時の食事たんぱく質必要量の推定、また、たんぱく質の質の評価にも利用できることがわかった。

栄養学雑誌, Vol.69 No.6 285-293 (2011)

キーワード: たんぱく質・アミノ酸, たんぱく質必要量, 代謝要求量, 窒素出納法, 指標アミノ酸酸化法

はじめに

たんぱく質必要量に関する議論は1955年に「タンパク質必要量に関するFAO委員会」¹⁾で行われた。このFAO委員会¹⁾では、人の不可欠アミノ酸必要量パターンを重視し、これと同じ理想的なアミノ酸組成を持つたんぱく質（比較基準たんぱく質）の必要量が決められた。

1963年の「タンパク質必要量に関するFAO/WHO合同専門グループ」²⁾では、たんぱく質必要量は無たんぱく質食摂取時に身体から失われる不可避窒素損失量によって規定されるという新しい概念が導入された。

1971年の「エネルギーとタンパク質の必要量に関するFAO/WHO合同特別専門家委員会」³⁾では、エネルギーとたんぱく質が初めて一緒に検討された。この特別専門家委員会では、生物価の高いたんぱく質であっても、窒素平衡維持のための最小必要量は、不可避窒素損失量よりも大きいとした。また、集団に対する必要量を決定する場合、エネルギーとたんぱく質とは考え方が異なることも明確にした。

1981年の「エネルギーとタンパク質必要量に関する協議会」⁴⁾では、個人のたんぱく質必要量を最適レベルの身体活動を行ってエネルギー平衡を維持している人の、身体から失われる窒素と等しい最小の食事たんぱく質摂取量と定義された。子どもや妊婦、授乳婦では、良好な健康状態を維持しながら、組織の増殖肥大、あるいは乳汁分泌に必要なたんぱく質も含まれる。すべての必要量の算定値は、適当な期間続けて求められた要求量を参考に

決められた。このような期間の摂取量は、ある特定の1日の摂取量と区別するために、「習慣的」あるいは「日常の摂取量」といえる。習慣的摂取量を「1日当りの摂取量」で表しているが、これらの量が毎日摂取しなければならない量であることを意味しているわけではない。

2002年の「タンパク質とアミノ酸の必要量に関するWHO/FAO/UNU合同専門家協議会」⁵⁾では、成人のアミノ酸必要量の算定根拠が窒素出納法の成績から¹³C-指標アミノ酸を用いたトレーサー実験に変わった。たんぱく質必要量については、引き続き窒素出納法の成績が用いられたが、皮膚などからの損失は1981年の8 mgN/kg/日より低い5 mgN/kg/日の値が採用され、安全摂取量が0.75から0.83 g/kg/日に改定された。

このように、たんぱく質とアミノ酸の必要量に関する研究は、確実に進歩してきた。しかし、窒素出納法と¹³C-指標アミノ酸を用いたトレーサー実験の結果の解釈等、議論を必要とする課題は山積している。本稿では、私たちの最新のデータを示すとともにたんぱく質とアミノ酸の必要量の考え方について概説する。

I. たんぱく質欠乏症

たんぱく質欠乏症は、イギリス領黄金海岸（現ガーナ共和国）で1933年にCicely D. Williams⁶⁾によって最初に報告され、クワシオコル（kwashiorkor）と命名された。クワシオコルの主原因は、エネルギーは足りているがたんぱく質が不足することである。浮腫、毛髪の変

本論文は、平成23年度（第58回日本栄養改善学会学術総会）学会賞受賞対象論文である。

連絡先：木戸康博 〒606-8522 京都府京都市左京区下鴨半木町1-5 京都府立大学大学院生命環境科学研究科
電話・FAX 075-703-5402 E-mail kido@kpu.ac.jp

色、ペラグラ様皮疹、下痢、低たんぱく質血症、発育障害などが特徴である。1990年から1年間、国際協力事業団（現国際協力機構）の専門家として、ガーナ共和国ガーナ大学医学部野口記念医学研究所で、現地の乳幼児の栄養調査と栄養改善プログラムの開発に関わることができた。この時はじめて、途上国における栄養問題の重要性を実際に感じる事ができた。現地では、ガーナ共和国保健省、WHO、UNICEF など関係組織とともに2回のセミナーを開催した⁷⁻⁹⁾。

II. たんぱく質必要量の考え方

食事のたんぱく質必要量とは、生体が必要とする量、すなわち代謝要求量を満たすために必要な摂取量である（図1）。代謝要求量は、アミノ酸を消費する代謝経路を維持するために必要な量と成長、妊娠、授乳など特別な必要量の和として求めることができる。維持必要量とは、アミノ酸を消費し、尿、糞便、皮膚、毛髪、分泌物など生体から排泄される全ての損失を補完できる量をいう。

たんぱく質の必要量がエネルギー摂取量に大きく影響を受けるにもかかわらず、健康づくりのための運動基準相当の運動を行った時のたんぱく質必要量については全く検討されていなかった。そこで、厚生省（現厚生労働省）の健康づくりのための運動所要量（現健康づくりのための運動基準2006）に相当する運動施行時にたんぱく質必要量が変動するかを検討した結果、運動所要量に相当する運動を行ってもたんぱく質必要量を増加させる必要がないことを明らかにした^{10,11)}。窒素出納法を用いた

この研究では、尿、糞便、だけでなく皮膚など生体から排泄される窒素損失量を測定した。表1に示したように、皮膚などから排泄される窒素を測定していれば、「健康づくりのための運動（200～400 kcal/日のエネルギー消費）をしても摂取するたんぱく質を増やす必要はない」と結論できる。しかし、皮膚などから排泄される窒素を測定しないと、「健康づくりのための運動（200～400 kcal/日のエネルギー消費）を実施すると、摂取するたんぱく質を増やさなくても体たんぱく質の蓄積が増加する」という結論になる。すなわち、窒素出納試験を用いてたんぱく質代謝を評価するためには、尿、糞便、皮膚、毛髪、分泌物など生体から排泄される全ての損失を測定しなければならない。実際に、尿、糞便、皮膚、毛髪、分泌物など生体から排泄される全ての損失を測定することは非常に困難である。

食事たんぱく質必要量とは、代謝要求量を満たし、窒素平衡を維持するために食事として摂取すべきたんぱく質またはその成分であるアミノ酸、またはその両者である。したがって、食事たんぱく質必要量は次式で示すことができる。

$$\text{食事たんぱく質必要量} = \text{代謝要求量} \div \text{利用効率}$$

食事からの窒素摂取量がゼロで、エネルギーとその他の栄養素が十分量摂取されている場合に、尿中に排泄される窒素量は徐々に減少し、一定の値となる。尿中に排泄される窒素量が一定となるためには5～7日間を要することが報告されている（図2）¹²⁾。すなわち、食事からのたんぱく質摂取量を変化させた時には、少なくとも7日間の適応期間を要し、このようにして得られた窒素平

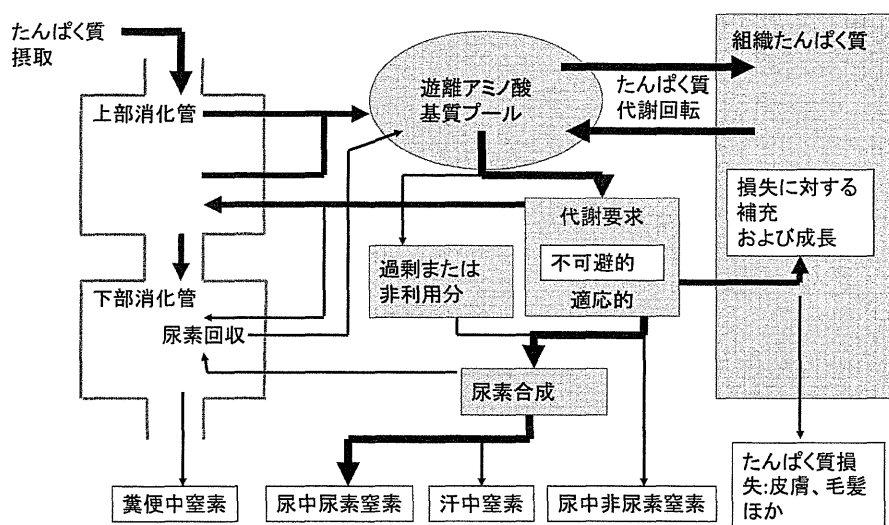
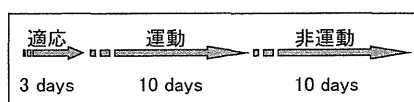


図1 アミノ酸の代謝要求の概略図

成人の不可欠アミノ酸必要量は、窒素平衡をもたらすために必要なアミノ酸摂取量として測定される。

表1 1.08 g/kg/日のたんぱく質摂取量時の窒素出納値に及ぼす運動 (400 kcal/日) の影響¹⁰⁾

Subjects	Non-exercise period						Exercise period					
	IN	FN	TD	DN	UN	NB	IN	FN	TD	DN	UN	NB
L	181.9	15.5	98.3	7.6	150.6	8.1	181.0	15.5	98.3	17.6	149.3	-1.4
M	177.2	19.4	96.0	3.5	124.8	29.5	177.8	16.1	97.9	9.7	123.5	28.5
N	181.9	12.6	99.9	10.3	145.9	13.1	180.0	17.5	97.2	18.4	134.0	10.0
O	179.0	16.8	97.6	8.2	147.9	6.1	179.2	17.8	97.0	9.8	145.5	6.1
P	177.7	20.7	95.3	8.4	152.0	-3.4	178.3	24.0	93.5	9.5	136.8	8.0
Q	180.5	17.7	97.1	5.6	142.2	15.0	179.2	16.8	97.6	7.4	135.6	19.5
Mean	179.7	17.1	97.4	7.3	143.9	11.4	179.3	18.0	96.9	12.1*	137.5*	11.8
SD	2.0	2.9	1.6	2.4	10.0	11.0	1.2	3.1	1.7	4.7	9.1	10.6

($p < 0.05$ vs non-exercise period)

摂取たんぱく質量：1.08 g/kg/日
 エネルギー摂取量：42.8~43.8 kcal/kg/日
 代謝性糞中排泄量：12.4 mgN/kg/日
 運動強度：65% VO₂max
 運動によるエネルギー消費量：400 kcal/日

略語：IN, 摂取窒素；FN, 糞中窒素；TD, 真の吸収率；DN, 経皮窒素；UN, 尿中窒素；NB, 窒素出納値

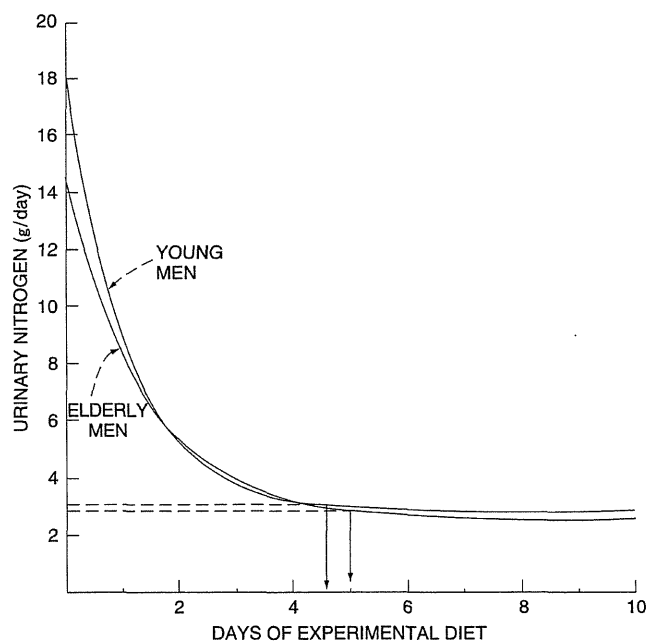


図2 無たんぱく摂取後の尿中窒素排泄量の変化

(J Nutr; 108, 97 (1978) を改変)

維持に必要な食事からのたんぱく質摂取量は、最小たんぱく質必要量と定義できる。

私たちは、たんぱく質代謝には、適応現象が存在することに着目した。習慣的なたんぱく質摂取状態に適応しており、低たんぱく質代謝適応が成立していない状態(たんぱく質摂取レベルを変更した実験日)で、たんぱく質代謝を推定できる指標アミノ酸酸化(indicator amino acid oxidation: IAAO)法を用いることにより、習慣的な

たんぱく質摂取状態でのたんぱく質代謝要求量の推定を試みた。たんぱく質の摂取量を習慣的な摂取量よりも少ない摂取量に変化させた時に、その少ない摂取たんぱく質量でのたんぱく質代謝状態を反映する期間は、少なくとも7日間を要する(図3)。つまり、一過性のたんぱく質代謝応答は、その時の習慣的なたんぱく質摂取時の代謝を反映していることを意味する。習慣的に十分量のたんぱく質を摂取している時に、生体内で合成されるたん

ばく質と分解されるたんぱく質はほぼ一定であり、たんぱく質代謝回転が定常状態であると考えられる。この時たんぱく質合成に必要なアミノ酸は、体内の遊離アミノ酸プールから供給される。この遊離アミノ酸プールのアミノ酸の供給源は、食事、体たんぱく質の分解、および体内合成である(図4)。

たんぱく質必要量とたんぱく質代謝要求量は、その意味するところが異なる。窒素出納法で求めるたんぱく質必要量は、低たんぱく質栄養状態に適応した状態での最小たんぱく質摂取量を意味する。この最小たんぱく質必要量を下回る摂取量が続くと、たんぱく質欠乏症が発症すると考えられる。一方、IAAO法で求めるたんぱく質代謝要求量は、その時の習慣的なたんぱく質摂取時の代謝を維持するために必要なたんぱく質摂取量を意味する。このたんぱく質代謝要求量を下回る摂取量が続けてもたんぱく質欠乏症が発症することはない、その時のたんぱく質摂取量でのたんぱく質代謝に適応していくと考えられる。

たんぱく質摂取量を窒素出納法で求めたたんぱく質必要量に適応させた時のたんぱく質代謝要求量は、たんぱ

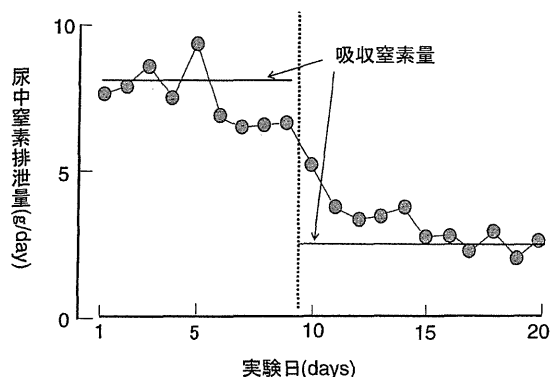


図3 たんぱく質の摂取量を変化させた時の尿中窒素排泄量の変化

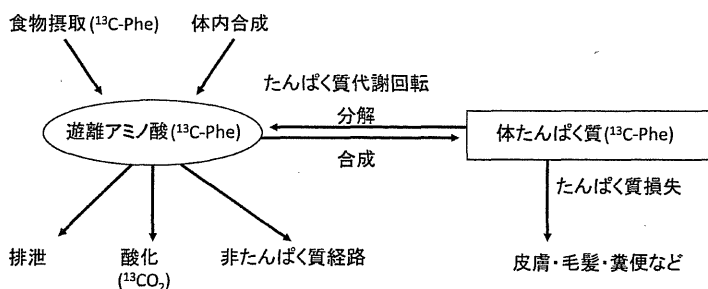


図4 たんぱく質必要量の考え方

成人のたんぱく質必要量は、体外に失われる窒素量を補い、体たんぱく質量を維持するために必要な食事たんぱく質の最小摂取量である。

く質必要量と一致すると考えられる。すなわち、窒素出納法で求めた最小たんぱく質必要量にたんぱく質代謝が適応すると、体内の遊離アミノ酸プールもその時のたんぱく質代謝に見合ったサイズになると推定される。このため、この低たんぱく質状態に適応したたんぱく質代謝を維持するために必要なたんぱく質代謝要求量は、最小たんぱく質必要量と一致すると考えられる。

Ⅲ. 指標アミノ酸酸化 (IAAO) 法の原理

IAAO法の理論は、食事に含まれているあるアミノ酸がたんぱく質代謝要求量以下であれば(すなわち、制限アミノ酸)、他のすべての不可欠アミノ酸(^{13}C -標識アミノ酸を含む)はたんぱく質合成には利用することができず、この余分の不可欠アミノ酸は酸化されて、不可逆的に重碳酸塩プールに遊離され、呼気中に排泄される、というものである。例えば、図5に示したように、遊離アミノ酸プール中の制限アミノ酸(ここではリシン)がたんぱく質要求量よりも少ないと、たんぱく質合成量は低下し、余った指標アミノ酸(ここでは $[1-^{13}\text{C}]$ フェニルアラニン(^{13}C -Phe))の酸化量が増加し、その炭素骨格は $^{13}\text{CO}_2$ として排泄される。この $^{13}\text{CO}_2$ 排泄量は、摂取するたんぱく質量が増加し、遊離アミノ酸プール中の制限アミノ酸(ここではリシン)がたんぱく質要求量たんぱく質要求量と等しくなるまで減少する。制限アミノ酸(ここではリシン)が合成すべきたんぱく質に必要な量以上に供給されると、たんぱく質をそれ以上合成する必要がないので、指標アミノ酸由来の呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 排泄量は一定となる(図6)。この屈曲点が食事たんぱく質必要量と考えられる。この条件を満たすためには、指標アミノ酸として ^{13}C -Pheを利用する場合に、組織や血液中の ^{13}C -Pheと ^{12}C -Phe濃度の割合と量が一定であることが必要である。

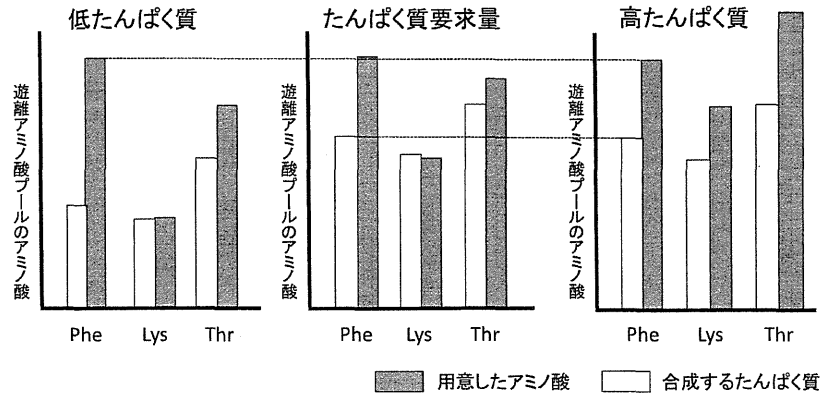


図5 指標アミノ酸酸化法の原理

リシンが第一制限アミノ酸と仮定すると、合成するたんぱく質よりも用意したアミノ酸の量が少ない状態(低たんぱく質)では、合成すべきたんぱく質に必要なリシン量が供給されないため、たんぱく質合成量は低下し、他の余った指標アミノ酸は分解され、その炭素骨格は呼吸CO₂として排出される。しかし、合成すべきたんぱく質に必要な量以上にリシンが供給される(高たんぱく質)と、たんぱく質はそれ以上合成する必要がないので、指標アミノ酸由来の呼吸CO₂の排泄量は一定となる。

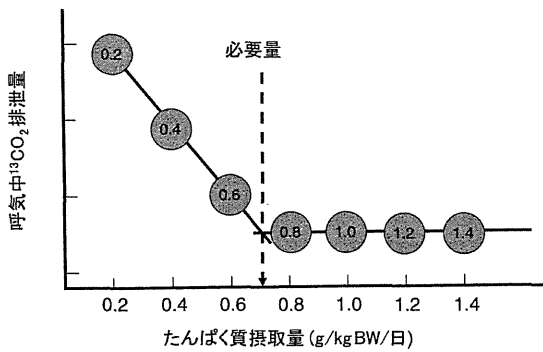


図6 指標アミノ酸酸化法 (IAAO 法)

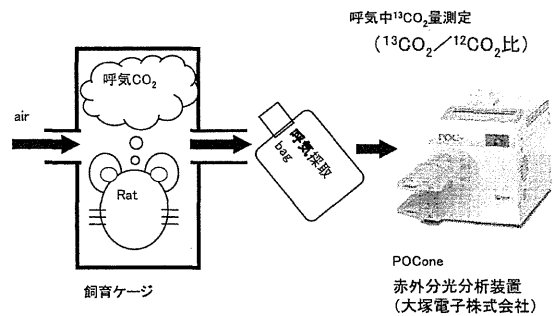


図7 呼気の採取と呼気分析の方法

IV. たんぱく質代謝研究における IAAO 法の利点

たんぱく質代謝研究における IAAO 法の利点は次の3つが考えられる。

第1に、トレーサーが試験たんぱく質とは別なので、栄養学的にかなりの量のトレーサーを与えても問題がないことである。指標アミノ酸の摂取量は一定に保たれているので、試験たんぱく質よりも指標アミノ酸のほうが濃度の変化が小さい。指標アミノ酸としては、¹³C-Phe が最も高い頻度で利用されてきた。今後、様々なアミノ酸を指標アミノ酸として利用し、たんぱく質代謝に用いる指標アミノ酸としての評価も必要である。

第2に、出納試験を必要とせず、異なるたんぱく質摂取レベルに対して事前に実験食に適応させる必要がないことである。習慣的な食生活の条件でたんぱく質代謝要

求量を求めることが可能である。個々人に見合ったたんぱく質代謝要求量が算出でき、体調や生活スタイルが変化すれば、その都度、最適なたんぱく質代謝要求量を算出することができる。また IAAO 法は、成人だけでなく成長期から高齢者まで同じ方法でたんぱく質代謝要求量を再評価できると考えられる。

第3に、アミノ酸酸化測定の精度や正確さについて高いレベルが要求されないことである。屈曲点は、試験たんぱく質摂取量が十分であることの上の指標であり、それは指標物質の酸化率が正確に測定されているか否かに依存しない。私たちは、一定速度で空気を送り込んでいる飼育ケージにラットを入れ、飼育ケージ内の気体を呼吸採取バッグに採取し、赤外分光分析装置(大塚電子株式会社)を用いて、呼吸¹³CO₂量を¹²Cとの割合として測定している(図7)。

V. ラットにおける IAAO 法によるたんぱく質代謝要求量の測定¹³⁾

実験食のたんぱく質源としてカゼインと小麦グルテンを用い、IAAO 法によるたんぱく質代謝要求量について、実験食のたんぱく質源により違いが見られるかを検討した。ラットは、小麦グルテンを実験食として用いる場合も含めたすべての実験について、実験前24時間以上、20%カゼイン食を自由摂取とした。実験日、ラットは、6段階のカゼインを含む実験食(4.3, 8.6, 12.9, 17.2, 21.5, 25.8%カゼイン食)、または、6段階の小麦グルテンを含む実験食(7.2, 10.8, 14.4, 18.0, 21.6, 25.2%小麦グルテン食)のうち一つを09:00から18:00まで3時間ごとに4回摂取した。1回の給餌量はラットの1日摂食量の1/8量ずつとした。¹³C 標識物質投与は3回目の給餌時の15:00 (NaH¹³CO₃, 0.88 mg/kg BW; NaHCO₃, 7.92 mg/kg BW; ¹³C-Phe, 3.3 mg/kg BW; Phe, 29.7 mg/kg BW) に開始し、16:00, 17:00, 18:00 (¹³C-Phe, 6.0 mg/kg BW; Phe, 54.0 mg/kg BW) まで続けた。¹³C 標識物質経口投与後ただちにラットをチャンバーに入れた。15:00から19:00まで30分ごとに、チャンバー内の気体を呼気サンプルとして呼気採取バッグに採取し、赤外分光分析装置(POCone; 大塚電子株式会社)により呼気中¹³CO₂量を測定した。

たんぱく質含量が6段階のカゼイン食を実験食とする実験(n=8)と小麦グルテン食を実験食とする実験(n=8)それぞれ6回のIAAO法は、実施日は2日間隔と

し、2週間以内に完了した。実験食の組成を表2に示した。

IAAO 法においては、低たんぱく質食から十分なたんぱく質食に食事内容を変化させても、食事時の¹³C-Phe と¹²C-Phe の量および [1-¹²C] チロシン (¹²C-Tyr) の量を一定に保つことが必要である。このように調整された食事を摂取した時に、組織や血漿中の¹³C-Phe だけでなく、¹³C-Tyr と¹²C-Tyr の量も一定であることを確認することが必要である。4.3%カゼイン食と17.2%カゼイン食を摂取した時のラットの血漿 Phe と Tyr 濃度を表3に示した。カゼイン食のたんぱく質レベルを4.3%から17.2%に変化させても、血漿¹³C-Phe と¹²C-Phe 濃度の割合と量が一定であった。また、血漿¹³C-Tyr と¹²C-Ty 濃度の割合と量も一定であった。さらに、¹²C-Ty に対する¹³C-Tyr の割合は、¹²C-Phe に対する¹³C-Phe の割合よりも小さく、このことは、Phe から Tyr への代謝は亢進していないことを示唆している。また、肝臓および腓腹筋の遊離アミノ酸について測定した結果、血漿と同様にカゼイン食のたんぱく質レベルを4.3%から17.2%に変化させても、血漿¹³C-Phe と¹²C-Phe 濃度の割合と量および血漿¹³C-Tyr と¹²C-Ty 濃度の割合と量も一定であった(表3)。

たんぱく質代謝要求量は、18:30の¹³CO₂量を特異的回帰法(2段階線形交差)¹⁴⁾により解析し、段階的なたんぱく質摂取量に対する呼気中¹³CO₂が最小値となる屈曲点として算出した。本研究では、ラットにおいてIAAO法により、カゼインをたんぱく質源とした時のたんぱく

表2 実験食の組成

Protein	Casein diet						Wheat gluten diet					
	4.3%	8.6%	12.9%	17.2%	21.5%	25.8%	7.2%	10.8%	14.4%	18.0%	21.6%	25.2%
	g/kg diet						g/kg diet					
Casein	50	100	150	200	250	300	-	-	-	-	-	-
Wheat gluten	-	-	-	-	-	-	100	150	200	250	300	350
Cornstarch	557	523	490	457	423	390	527	498	470	440	411	383
Sucrose	278	262	245	228	212	195	265	250	235	221	206	190
Rapeseed oil	35	35	35	35	35	35	31	27	22	18	14	9
Soy bean oil	15	15	15	15	15	15	12	10	8	6	4	3
Vitamins	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Minerals	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Cellulose	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
L-Phenylalanine	11	9	7	5	2	-	9	7	5	3	1	-
L-Tyrosine	13	10	8	5	3	-	13	11	10	9	8	6
Energy (kJ/g)	15.4	15.4	15.5	15.5	15.5	15.6	15.5	15.5	15.5	15.5	15.6	15.6

カゼインのたんぱく質含量は86.2% (N×6.38)、小麦グルテンのたんぱく質含量は72.0% (N×5.70) である。食事時のフェニルアラニン含量は、全ての食事で13,500 mg/kg dietとした。ただし、25.2%小麦グルテン食の場合には、14,350 mg/kg dietとした。また、食事時のチロシン含量は、全ての食事で15,000 mg/kg dietとした。

表3 血漿、肝臓、腓腹筋のフェニルアラニンおよびチロシン濃度

Diet	Phenylalanine			Tyrosine		
	¹³ C-Phe	¹² C-Phe	Total	¹³ C-Tyr	¹² C-Tyr	Total
Plasma (nmol/mL)						
4.3% casein	13.2 ± 2.9	47.2 ± 4.3	60.4 ± 7.0	7.5 ± 2.0	113.0 ± 29.4	120.6 ± 30.7
17.2% casein	12.1 ± 2.5	50.8 ± 10.0	62.9 ± 11.8	8.5 ± 1.4	119.8 ± 15.2	128.3 ± 16.2
Liver (nmol/g)						
4.3% casein	10.6 ± 0.4	40.9 ± 5.1	51.5 ± 4.9	7.4 ± 1.3	99.4 ± 32.0	106.9 ± 33.2
17.2% casein	10.4 ± 2.1	43.1 ± 10.5	53.6 ± 12.3	8.8 ± 2.8	92.5 ± 7.5	101.4 ± 9.2
Gastrocnemius muscle (nmol/g)						
4.3% casein	13.0 ± 1.7	46.6 ± 4.5	59.6 ± 5.7	8.4 ± 0.8	91.9 ± 8.7	100.3 ± 8.5
17.2% casein	11.6 ± 1.9	48.2 ± 2.5	59.8 ± 3.6	7.0 ± 1.1	84.7 ± 5.8	91.7 ± 5.0

平均値 ± SE (4.3% casein, n=5; 17.2% casein, n=5). 全てのデータに4.3% casein 群と17.2% casein 群との間に Student's t-test にて有意差を認めなかった。

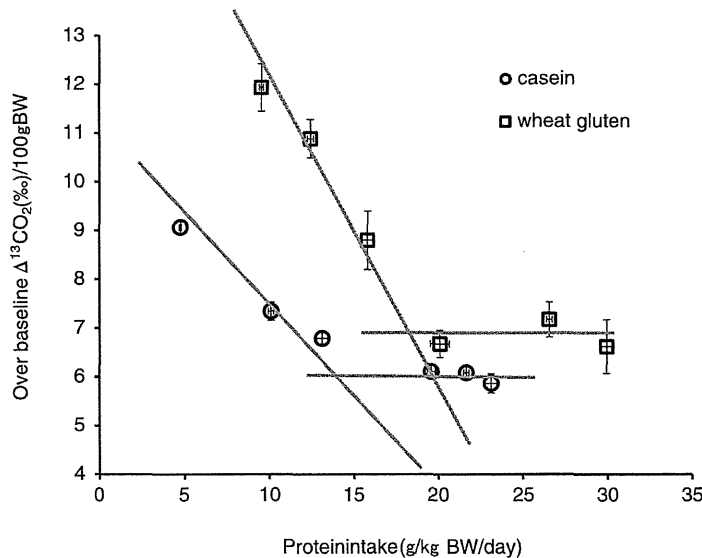


図8 たんぱく質代謝要求量の算出

カゼイン食 (n=8) と小麦グルテン食 (n=8) のたんぱく質摂取量を変化させた時の呼気 ¹³CO₂ 産生量の変化を平均値 ± 標準偏差で示した。カゼイン食の回帰直線式は、 $y = 10.73 - 0.35x$ と $y = 6.17$ であり、小麦グルテン食の回帰直線式は、 $y = 18.87 - 0.66x$ と $y = 6.92$ であった。屈曲点は、カゼイン食が 13.1 g/kg BW/日、小麦グルテン食が 18.1 g/kg BW/日であった。

質代謝要求量は 13.1 g/kg BW/day に相当すると推定された (図8)。

小麦をたんぱく質源とした IAAO 法では、たんぱく質代謝要求量は 18.1 g/kg BW/day と算出され、カゼインをたんぱく質源とした時よりも高い値であった。たんぱく質必要量は良質のたんぱく質摂取で低く、劣質のたんぱく質摂取で高くなったという結果は、我々の仮説に合致し、IAAO 法はたんぱく質の質評価に利用することができると考えられた。

VI. ヒトにおける IAAO 法によるたんぱく質代謝要求量の測定

1日の総窒素必要量は、不可欠アミノ酸の適切な摂取レベルとバランス、それに α-アミノ窒素源となる十分な不可欠アミノ酸を供給することを満たすものである。2007年に Humayun ら¹⁵⁾ は、IAAO 法を用いて成人のたんぱく質必要量を再評価している。彼らによると成人男性のたんぱく質必要量は、0.93 g/kg BW/日であった。我々も、IAAO 法を用いて日本人成人男性のたんぱく質代謝要

求量を評価した。その結果、0.91 g/kg BW/日と推定した（データは未発表）。また、IAAO法を用いて、成人女性では0.91 g/kg/日¹⁶⁾、学童期では1.3 g/kg/日¹⁷⁾と報告されている。いずれも、窒素出納法で策定された値よりも大きい。

以上のように、IAAO法はたんぱく質代謝要求量の評価だけでなく、たんぱく質の評価にも利用できることがわかった。さらに、ライフステージ別のたんぱく質代謝要求量やいろいろな病態時のたんぱく質代謝要求の推定にも利用できる方法であると考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、荣誉ある日本栄養改善学会学会賞を授与されたことに対し、選考委員の先生をはじめ、本学会の諸先生に厚く御礼申し上げます。本研究は、大塚製薬株式会社徳島研究所、徳島大学大学院栄養学研究科ならびに京都府立大学大学院生命環境科学研究科で行われたものです。研究を遂行するにあたり終始ご指導いただいた岸恭一徳島大学名誉教授（現名古屋学芸大学教授）に深謝致します。また、大塚製薬株式会社では多大なご指導とご助言をいただきました郡英明博士（元佐賀研究所所長）に心より感謝申し上げます。京都府立大学では常に多くのご助言とご指導をいただきました中坊幸弘京都府立大学名誉教授（現川崎医療福祉大学教授）に厚く御礼申し上げます。最後になりましたが、徳島大学大学院栄養学研究科栄養生理学講座および京都府立大学大学院栄養科学研究室での共同研究者ならびに大学院・学部卒業生、在校生の皆さんに深く感謝いたします。

文 献

- 1) FAO: Protein requirements, Report of the FAO Committee, FAO Nutritional Studies, No. 16 (1957) FAO, Rome
- 2) WHO: Protein requirements, Report of a Joint FAO/WHO Expert Group, WHO Technical Report Series, No. 301 (1965) WHO, Geneva
- 3) WHO: Energy and Protein requirements, Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee, WHO Technical Report Series, No. 522 (1973) WHO, Geneva
- 4) WHO: Energy and Protein requirements, Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee, WHO Technical Report Series, No. 724 (1985) WHO, Geneva
- 5) WHO: Energy and Protein requirements, Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee, WHO Technical Report Series, No. 935 (2007) WHO, Geneva
- 6) Williams, C.D.: A nutritional disease of child-food associated with a maize diet, *Arch. Dis. Child.*, **8**, 423-433 (1933)
- 7) Proceeding of a seminar on weaning practices in Ghana, *Bulletin of Noguchi Memorial Institute for Medical Research*, **4**, 1-101 (1991)
- 8) Proceeding of a seminar on child nutrition and survival, *Bulletin of Noguchi Memorial Institute for Medical Research*, **5**, 1-185 (1992)
- 9) Armar-Klemesu, M., Rikimaru, T., Kennedy, D.O., et al.: Household food security, food consumption patterns, and the quality of children's diet in a rural northern Ghana community, *Food Nutr. Bull.*, **16**, 27-33 (1995)
- 10) Kido, Y., Tsukahara, T., Rokutan, K., et al.: Japanese dietary protein allowance is sufficient for moderate physical exercise in young men, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **43**, 59-71 (1997)
- 11) Kido, Y., Tsukahara, T., Rokutan, K., et al.: Recommended daily exercise for Japanese does not increase protein requirement in sedentary young men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **43**, 505-514 (1997)
- 12) Uauy, R., Scrimshaw, N.S., Rand, W.M., et al.: Human protein requirements: Obligatory urinary and fecal nitrogen losses and the factorial estimation of protein needs in elderly males, *J. Nutr.*, **108**, 97-103 (1978)
- 13) Ogawa, A., Naruse, Y., Shigemura, Y., et al.: 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.*, **57**, 418-425 (2011)
- 14) Hayamizu, 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.*, **49**, 115-120 (2011)
- 15) Humayun, M.A., Elango, R., Ball, R.O., et al.: Reevaluation of the protein requirement in young men with the indicator amino acid oxidation technique, *Am. J. Clin. Nutr.*, **86**, 995-1002 (2007)
- 16) Tian, Y., Liu, J., Zhang, Y., et al.: Examination of Chinese habitual dietary protein requirements of Chinese young female adults by indicator amino acid method, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **20**, 390-396 (2011)
- 17) Elango, R., Humayun, M.A., Ball, R.O., et al.: Protein requirement of healthy school-age children determined by the indicator amino acid oxidation method, *Am. J. Clin. Nutr.*, **94**, 1545-1552 (2011)

(受理：平成23年11月28日)

Dietary Requirements of Protein and Amino Acids

Yasuhiro Kido

Laboratory of Nutrition Science, Division of Applied Life Science, Graduate School of Life
and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

ABSTRACT

Even when energy intake is adequate, the classic protein deficiency disease kwashiorkor increases susceptibility to infection. The protein requirement defines the requirement in terms of the needs to maintain the physical structure and body functions, i.e. metabolic demands, and the dietary protein requirement will satisfy those demands. Protein requirement is generally determined by nitrogen balance studies, but various limitations are associated with this method. The indicator amino acid oxidation (IAAO) method, with a theoretical foundation quite different from that of the nitrogen balance method, was developed as an alternative for studies in animals and humans. We employed the IAAO technique to evaluate dietary protein requirements and protein quality in rats and healthy men. The results indicated that the IAAO method is effective for evaluating the dietary protein requirements for people of all ages and for postoperative patients or those with injuries or infections, all of who represent a wide range of metabolic demand. This method could also be used to evaluate protein quality.

Jpn. J. Nutr. Diet., 69 (6) 285~293 (2011)

Key words: amino acid and protein, protein requirement, metabolic demand, nitrogen balance method, indicator amino acid oxidation method

4. 生化学検査

(3) ビタミンと微量ミネラル

Vitamins and microminerals

柴田克己／福渡 努／吉田宗弘

SUMMARY

ビタミンと微量ミネラルは、食品中にまんべんなくは含まれておらず、加工・調理過程によって損失しやすい。また、ビタミンはきわめて壊れやすい。したがって、食事調査と食品成分表から算定される摂取量だけを用いて栄養管理を行うことはきわめて困難である。多くのビタミンといくつかの微量ミネラルは尿中に排泄されるので、栄養状態良好時の尿中排泄量値と比較することで、栄養管理が可能になる。

KEY WORDS

- ビタミン
- 微量ミネラル
- 尿
- 目標排泄量
- 栄養管理

I

はじめに

動物が生きていくためには、とにかく何かを食べなければならない。この能力は本能として獲得している。しかし、健康長寿のためには、すべての栄養素を適量摂取するという、さらなる能力が必要である。われわれは、食事内容が不適であっても、それ自体で痛みや苦しみを伴うことはないので自覚することができない。つまり、すべての栄養素を適量摂取する能力はない。過不足の状態が長期間持続して症状が顕在化し、病的な状態になって、はじめて食事の欠陥に気付くのである。

したがって、健康長寿のためには、後天的に栄養状態の評価方法を学ばなければならない。最も普及している栄養状態の評価方法は、「習慣的な栄養素摂取量」を「必要量」と比較する方法である。「習慣的な栄養素摂取量」は、食べた食品の

重量を測定すれば、「食品成分表」（現在は、『日本食品標準成分表 2010』¹⁾が利用できる）を利用して、摂取した栄養素量を知ることができる。「必要量」は『日本人の食事摂取基準』（2010年版）²⁾に記載されている。「習慣的な栄養素摂取量」と「必要量」を比較することで、栄養状態を評価することができる。しかし、この最も多用されている評価方法の限界として以下が挙げられる。

- ① 摂取した食品の原材料名と重量を精度高く記録することができない。
- ② 食品成分表の値は、単なる「化学的」な分析値の代表値であること。
- ③ 食事摂取基準の値は、あくまでも基準を示す値であること。

よって、栄養評価方法として多用されている「習慣的な栄養素摂取量」を「必要量」と比較する方法を補完する方法が必要となる。そこでわれわれは、非侵襲性の尿を生体指標とする栄養評価法を確立しつつある。

本稿では、尿中のビタミン量を測定することで栄養状態の何を知ることができると紹介する。また、微量ミネラルに関しては、生体試料を指標とした栄養管理において、尿を栄養状態の指標として使用できるものと尿以外の生体試料を用いなければならないものを紹介する。

II

ビタミン

1. 理論

13種類のビタミンのなかで、ビタミンA、ビタミンDおよびビタミンKを除く10種類のビタミンあるいはその異化代謝産物が尿中に排泄されることが報告されている^{3) 4)}。 α -トコフェロールの異化代謝産物である2,5,7,8-テトラメチル-2-(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン (α -CEHC) は、 α -トコフェロールの摂取量がある量以上に達すると摂取量に応じて増大することが報告されている⁵⁾。9種類の水溶性ビタミンではビタミンB₁₂を除く8種類のビタミンが摂取量に応じて尿中への排泄量が増大することが明らかにされている^{6) 7)}。

ビタミン欠乏食を投与した後の血液、尿中のビタミン量の変化の概念図を図1に示す。

2. 健康長寿を達成するための目標尿中水溶性ビタミン排泄量

われわれが報告した健康人の尿中排泄量を基にして作成した健康長寿を達成するための目標尿中水溶性ビタミン排泄量を表1に示す。 α -CEHCに関しては、現在検討中であるため記載していない。

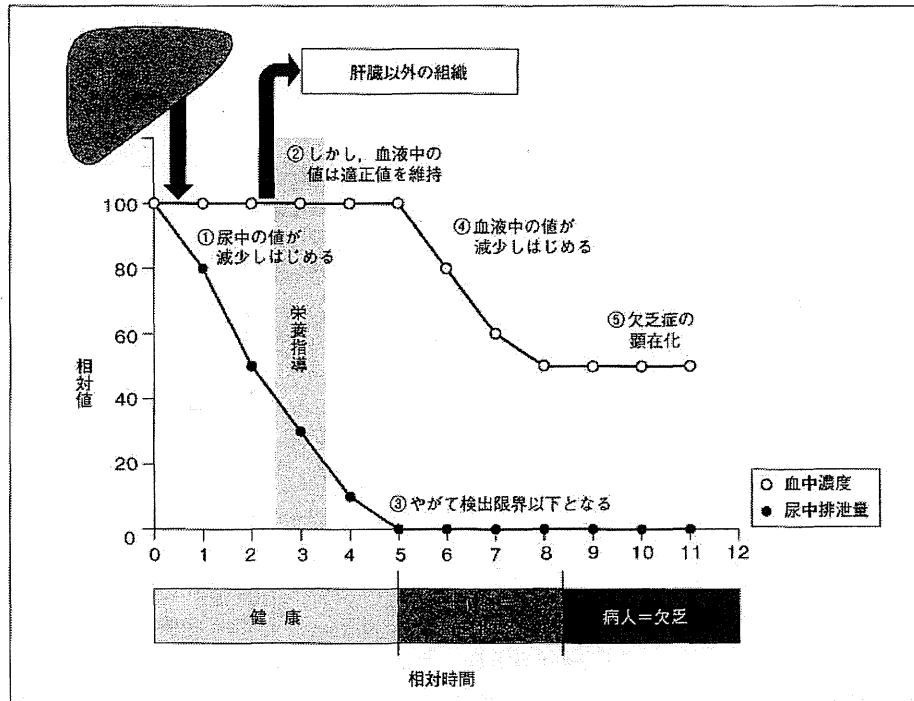


図1. ビタミン欠乏食投与後の血液中と尿中のビタミン量の変化の概念図

表1. 健康を維持するための目標尿中水溶性ビタミン排泄量

ビタミン (単位)	2~5歳	10~12歳	18~69歳	70歳以上
ビタミンB ₁ (μg/日)	30~150	70~300	100~400	100~400
ビタミンB ₂ (μg/日)	40~150	60~250	70~350	70~350
ビタミンB ₆ (μg/日)	150~600	300~1,000	500~1,400	500~1,400
ナイアシン (mg/日)	2.5~10	4.5~20	6~25	6~25
パントテン酸 (mg/日)	0.9~3	1.5~5.5	2.2~7	2.2~7
葉酸 (μg/日)	3~70	4.5~15	7~20	7~20
ビオチン (μg/日)	5~15	8.5~30	10~40	10~40
ビタミンC (mg/日)	9~70	20~90	25~90	25~90

3. 目標尿中水溶性ビタミン排泄量を活用した栄養指導例

ある症例の1日尿中の水溶性ビタミン排泄量を表2に示す。各ビタミンのコメントと総合コメントは表2に示した通りである。α-CEHCに関しては記載していない。

III

微量ミネラル

1. 微量ミネラルの栄養管理における尿試料の位置づけ

ここで述べる微量ミネラルとは『日本人の食事摂取基準』(2010年版)²⁾が対象

とする、鉄、亜鉛、銅、マンガン、ヨウ素、セレン、クロム、モリブデンの8元素である。これら8元素のうち尿で摂取量を把握し栄養管理が実施できるのは、消化管吸収率が高く、かつ主排泄経路が尿である、ヨウ素、セレン、モリブデンの3元素である。ただし、これら3元素でも計算に基づく摂取量推定値と尿中濃度との関連は変動が大きく、回帰式の精度が低い。したがって、現状では個人の摂取量を尿中濃度から正確に推定するのは難しい。出納試験での摂取量実測値と尿中排泄量との関連は図2のモリブデンのようにきわめて大きい¹⁰⁾。ゆえに、ヒトを対象とした実験から摂取量と尿中排泄量間の高精度な回帰式の確立が必要である。

残り5元素は消化管吸収率が低く、かつ変動する。さらに、クロムを除く4元素は血中でたんぱく質に結合し、尿は主排泄経路ではない。また、クロムは尿が主排泄経路とされるが、定量が難しく、信頼できる摂取量や尿中排泄量の情報が少ない。ゆえに、これら5元素では尿を用いた栄養管理は難しく、血清中濃度などを用いる必要がある。

2. ヨウ素とセレンの栄養管理

ヨウ素、セレン、モリブデンの3元素は尿中排泄量が摂取量と関連するので、尿を用いた栄養管理がある程度は可能である。ただし、前述のように尿中濃度と摂取量との回帰式の精度が不十分なので、複数回の測定が必要である。ここでは疾病発生との関連が大きいヨウ素とセレンに関して尿を用いた栄養管理を述べ、セレンに関しては血清を用いた栄養管理についても述べる。

(1) ヨウ素

集団では、1日尿のヨウ素濃度とヨウ素摂取量との間に「ヨウ素摂取量(μg/日) = 尿中ヨウ素濃度(μg/l) × 0.0235 × 体重(kg)」の回帰式が成立する¹¹⁾。『日本人の食事摂取基準』(2010年版)²⁾における成人のヨウ素推奨量130 μg/l/日を回帰式に代入すると、体重60 kgでは尿中濃度92 μg/lが得られる。この回帰式は集団を対象としているが、個人でもこの数値が1つの目安となる。なお世界保健機関(WHO)では尿中ヨウ素濃度100 μg/lを基準としており、集団では尿中濃度100 μg/l未満の人の割合がヨウ素摂取不足の人の割合に相当する¹²⁾。

(2) セレン

尿セレンを扱った総説では摂取セレンの尿中排泄率を50~70%としている¹³⁾。一方、セレンの1日尿中排泄量(μg/日)

表2. ある症例の1日尿中の水溶性ビタミン排泄量

測定ビタミン(単位)	測定結果	参考値(成人)	コメント
ビタミンB ₁ (μg/日)	1,938	100~400	サプリメントからビタミンB ₁ を大量に摂取している可能性があります。用量に気をつけてビタミンB ₁ を摂取してください。必要量は1.2mg/日です。
ビタミンB ₂ (μg/日)	2,526	70~350	サプリメントからビタミンB ₂ を大量に摂取している可能性があります。用量に気をつけてビタミンB ₂ を摂取してください。必要量は1.2mg/日です。
ビタミンB ₆ (μg/日)	3,978	500~1,400	サプリメントからビタミンB ₆ を大量に摂取している可能性があります。用量に気をつけてビタミンB ₆ を摂取してください。必要量は1.1mg/日です。
ナイアシン(mg/日)	10.3	6.0~25	ナイアシンの摂取に問題はありません。必要量は12mg/日です。
パントテン酸(mg/日)	13	2.2~7.0	パントテン酸を十分に摂取できていない可能性があります。必要量は5mg/日です。
葉酸(μg/日)	6.2	7~20	葉酸を十分に摂取できていない可能性があります。必要量は240μg/日です。
ビオチン(μg/日)	35	10~40	ビオチンの摂取に問題はありません。必要量は50μg/日です。
ビタミンC(mg/日)	12	25~90	ビタミンCを十分に摂取できていない可能性があります。必要量は100mg/日です。
総合コメント	一部のビタミンを十分に摂取できていない可能性、一部のビタミンを大量に摂取している可能性があるため、一度、管理栄養士に食事相談をしてください。		

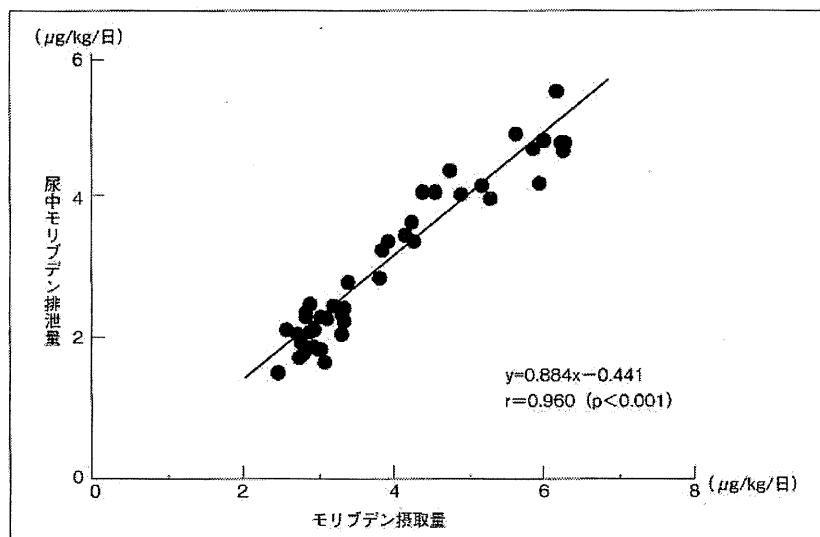


図2. 若年日本人女性におけるモリブデン摂取量実測値と尿中モリブデン排泄量との関係

とクレアチニン (Cre) 濃度あたりの随時尿のセレン濃度 ($\mu\text{g/g Cre}$) との間には高い相関が観察される¹⁴⁾。これらからセレン摂取量を随時尿のセレン濃度から推定可能である。日本人の尿中セレン濃度に関する報告は多いが、その値はおおむね25~60 $\mu\text{g/g Cre}$ である^{15) 16)}。個人単位でのセレンの栄養管理の場合、Creの1日排泄量と成人のセレン推奨量(男性30 $\mu\text{g/日}$ 、女性25 $\mu\text{g/日}$)を考慮すると、随時尿のセレン濃度が常に20 $\mu\text{g/g Cre}$ を下回る状態であればセレンの摂取不足といえる。

一般には個人のセレン栄養状態の評価に血清セレン濃度を用いる。日本人の血清セレン濃度の多くは110~130 $\mu\text{g/l}$ の範囲にある¹⁶⁾。世界13地域におけるセレン摂取量と血清セレン濃度からは、両者間に「セレン摂取量 ($\mu\text{g/日}$) = 血清セレン濃度 ($\mu\text{g/l}$) $\times 0.672 + 2$ 」という回帰式が得られ¹⁷⁾、推奨量に対応する血清セレン濃度は30~35 $\mu\text{g/l}$ となる。しかし、このような低血清セレン濃度は臨床症状を引き起こす可能性が高く、栄養管理での基準にはできない。セレン欠乏は長期間の静脈栄養または経腸栄養の施行中に発生しており、欠乏症例の血清セレン濃度は13~80 $\mu\text{g/l}$ である¹⁸⁾。一方、低セレン状態が種々の部位における癌発生の危険因子であることは広く知られており、血清セレン濃度60~70 $\mu\text{g/l}$ を下回るとリスクが高まるとする報告が多い¹⁹⁾。以上より、セレンの栄養管理という観点からは血清セレン濃度70~80 $\mu\text{g/l}$ を下限の目安とすべきである。

3. 鉄と亜鉛の栄養管理

摂取量と尿中濃度との関連が小さい鉄、亜鉛、銅、マンガン、クロムでは尿を用いた栄養管理は難しい。ここでは鉄

と亜鉛に関して、血清データを用いた栄養管理を述べる。

(1) 血清データに基づく鉄の栄養管理

わが国の成人女性の約25%は鉄欠乏性貧血である。さらに妊娠期では胎児への鉄供給のため鉄需要が高く、鉄の栄養管理がきわめて重要である。現在、鉄の栄養状態の指標として、血清鉄濃度、血清総鉄結合能 (total iron-binding capacity; TIBC)、血清不飽和鉄結合能 (unsaturated iron-binding capacity; UIBC)、および血清フェリチン濃度が利用されている。鉄欠乏では、血清鉄濃度は低下、TIBCは上昇するため、両者の差であるUIBC、および血清鉄濃度とTIBCの比(血清鉄濃度/TIBC)が鉄欠乏のより感度の高い指標となる。貯蔵鉄であるフェリチンは、理論的には鉄欠乏の最も鋭敏な指標であるが、感染など鉄以外の要因によっても変動するため、鉄摂取量との関連を認めないこともある¹⁹⁾。フェリチンは分析費用が高額なので、血清鉄濃度およびTIBCの測定に基づく栄養管理が現実的である。これらの基準値は検査機関ごとに若干の差異があり、女性の場合では血清鉄の下限が40~50 $\mu\text{g/dl}$ 、TIBCの上限が400~450 $\mu\text{g/dl}$ である。ただし栄養管理ではこれらの数値をそのまま流用せず、少し厳しい基準値を設定するのが適切である。

(2) 血清亜鉛濃度

亜鉛は体内存在量や1日摂取量が鉄に匹敵し、鉄と同程度に必要な量が多いミネラルである。亜鉛摂取不足による健康障害として味覚異常が有名である。また、寝たきりの高齢者では亜鉛栄養状態の低下が褥瘡発生を促進するため、介護・福祉施設では亜鉛の栄養管理が特に重要とされる²⁰⁾。現在のところ、亜鉛栄養状態を反映する指標として血清亜鉛のみが有

効とされている。多くの検査機関での血清亜鉛の正常下限は60~65 $\mu\text{g/dl}$ だが、これ以上でも味覚障害や褥瘡の進展などが観察されるので下限を80 $\mu\text{g/dl}$ にすべきとの提言がある²¹⁾。栄養管理でも後者を目安するのが適切であろう。血清亜鉛濃度は日内変動するので採血は早朝空腹時に統一するのがよい。

REFERENCES

- 1) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会 編著：日本食品標準成分表2010。東京，全国官報販売協同組合，2010
- 2) 「日本人の食事摂取基準」(2010年版)，厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/sessyu-kijun.html>)
- 3) Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, et al: Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J Nutr Sci Vitaminol* 51: 319-328, 2005
- 4) Schultz M, Leist M, Petrzika M, et al: Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2, 5, 7, 8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? *Am J Clin Nutr* 62: 1527-1534, 1995
- 5) Morinobu T, Yoshikawa S, Hamamura K, et al: Measurement of vitamin E metabolites by high-performance liquid chromatography during high-dose administration of α -tocopherol. *Eur J Clin Nutr* 57: 410-414, 2003
- 6) Fukuwatari T, Shibata K: Urinary water-soluble vitamins and their metabolite contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* 54: 223-229, 2008
- 7) Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, et al: Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamin levels correlate with their intakes in free-living Japanese schoolchildren. *Public Health Nutr* 14: 327-333, 2011
- 8) Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, et al: Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamin levels correlate with their intakes in free-living Japanese university students. *Eur J Clin Nutr* 64: 800-807, 2010
- 9) Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, et al: Urinary excretion of vitamin B₁, B₂, B₆, niacin, pantothenic acid, folate, and vitamin C correlates with dietary intakes of free-living elderly, female Japanese. *Nutr Res* 30: 171-178, 2010
- 10) Yoshida M, Hattori H, Ota S, et al: Molybde-

- num balance in healthy young Japanese women. *J Trace Elem Med Biol* 20 : 245-252, 2006
- 11) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences : Iodine. *in* Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington DC, National Academy Press, 258-289, 2001
 - 12) Benoist B, Andersson M, Egli I, et al : Iodine Status Worldwide. Geneva, WHO, 2004
 - 13) Robberecht HJ, Deelstra HA : Selenium in human urine ; concentration levels and medical implications. *Clin Chim Acta* 136 : 107-120, 1984
 - 14) Hojo Y : Evaluation of the expression of urinary selenium level as ng Se/mg creatinine and the use of single-void urine as a sample for urinary selenium determination. *Bull Environ Contam Toxicol* 27 : 213-220, 1981
 - 15) Hasunuma R, Tsuda M, Ogawa T, et al : Urinary selenium levels in Japanese males and females. *Bull Environ Contam Toxicol* 44 : 501-507, 1990
 - 16) 姫野誠一郎 : 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査(第7版) 2—その数値をどう読むか— : 生化学的検査(2)—金属 : セレン. *日臨* 68(増刊) : 329-332, 2010
 - 17) Navarro M, López H, Ruiz ML, et al : Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of daily dietary intake. *Sci Total Environ* 175 : 245-252, 1995
 - 18) Ertinan M, FitzGerald JM, Gleave M, et al : Intake of selenium in the prevention of prostate cancer ; a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* 16 : 1125-1131, 2005
 - 19) Asakura K, Sasaki S, Murakami K, et al : Iron intake does not significantly correlate with iron deficiency among young Japanese women : a cross-sectional study. *Public Health Nutr* 12 : 1373-1383, 2009
 - 20) 倉澤隆平, 久須周治郎, 奥泉宏康 : 亜鉛基礎研究の最前線と亜鉛欠乏症の臨床. *Biomed Res Trace Elements* 21 : 1-12, 2010
 - 21) 日本微量元素学会 : 日本微量元素学会設定「健康者血清亜鉛濃度の下限値」について. *Biomed Res Trace Elements* 21 : 182, 2010

しばた・かつみ

滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科教授

ふくわたり・つとむ

滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科准教授

よしだ・むねひろ

関西大学化学生命工学部生命・生物工学科教授

ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットの トリプトファン-ニコチンアミド代謝

—摂取ビタミン量との関係—

今井 絵理¹, 佐野 光枝¹, 福渡 努¹, 柴田 克己^{*1}

(2011年3月4日受付; 2011年6月28日受理)

要旨: トリプトファン (Trp) の異化代謝にはビタミン B₁, B₂, B₆ が関わっている。そこで, 低用量, 中用量, 十分量のビタミン混合を含む飼料を投与した時に Trp 異化代謝がどのように変動するのかを, 健常ラットと糖尿病ラットを用いて比較した。健常ラットにおいても, 糖尿病ラットにおいても, 飼料中のビタミン混合含量の差異は Trp 異化代謝には全く影響をおよぼさなかった。糖尿病ラットにおける Trp-ニコチンアミド (Nam) 転換率は健常ラットの 1/3 程度にまで低下していた。N¹-メチルニコチンアミドが体内に蓄積しやすい代謝状態にあった。この現象は体内の遊離状態の Nam 濃度の上昇を引き起こす可能性がある。遊離型の Nam は, poly(ADP-ribose) 合成酵素やヒストンデアセチラーゼなど種々の酵素の阻害剤である。したがって, 糖尿病時には Nam 代謝変動による影響が表れる可能性があり, さらなる研究が必要である。

キーワード: ストレプトゾトシン, 糖尿病, トリプトファン, ニコチンアミド, ビタミン

糖尿病は, 一般的に糖質の利用が極度に制限されるため, 肝臓における脂質の利用が著しく増大し, かつ糖新生が盛んとなる。すなわち, タンパク質の分解が進み, アミノ酸の異化代謝が亢進する。そのため, 脂質代謝に関わるビタミン B₂, ナイアシン, パントテン酸の要求量が増大し, かつアミノ酸の異化代謝に関わるビタミン B₆ の要求量が特に高まることが予想される。本研究では, 糖尿病におけるビタミン量の違いがトリプトファン-ニコチンアミド代謝におよぼす影響について, また, トリプトファン異化代謝について明らかにすることを目的とし, 以下の二つのことについて調べた。一つ目は, ビタミン摂取量の差異がトリプトファン異化代謝にどのような影響をおよぼすのかである。

二つ目は糖尿病ラットと健常ラットのニコチンアミドそのものの異化代謝の違いについてである。I型糖尿病のモデル動物であるストレプトゾトシンおよびアロキサン誘導糖尿病ラットでは, 健常ラットと比べ, トリプトファンの異化代謝がかなり亢進しているものと考えられている。Mehler *et al.*¹⁾, Ikeda *et al.*²⁾, Sanada *et al.*³⁾ は糖尿病ラットでは肝臓のアミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性が健常ラットと比べて顕著に高くなることを報告している。この酵素活性の増大はトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の鍵中間体とな

るキノリン酸の生成量の低下を引き起こし, ニコチンアミド経路への流入が低下し, グルタル酸経路への流入量が多くなり, 最終産物であるアセチル-CoA の生成量の増大を招くことになる。McDaniel *et al.*⁴⁾ は, アロキサン糖尿病 SD 系ラットではトリプトファンを負荷すると健常ラットと比べてニコチンアミドの異化代謝産物である N¹-メチルニコチンアミド (MNA) の尿中への排泄量が低くなっていたが, この現象はニコチンアミドのメチル化反応の低下によるものではなく, トリプトファンからニコチンアミドへの転換経路が低くなったためであろうと報告している。したがって, MacDaniel *et al.*⁴⁾ は, 糖尿病はニコチンアミドの異化代謝には影響をおよぼすことはないものと結論した。後に, Shibata *et al.* はアロキサン誘発⁵⁾ およびストレプトゾトシン誘発⁶⁾ 糖尿病 SD 系ラットでは, トリプトファンを負荷しない通常食摂取時でも, トリプトファンから生合成されるニコチンアミドの量が低下していることを MNA, N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py) および N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) を測定することで, 直接証明している。さらに, Shibata *et al.* は, アロキサン誘発糖尿病 SD 系ラット⁵⁾ とストレプトゾトシン誘発糖尿病 SD 系ラット⁶⁾ では, ニコチンアミドの異化代謝産物である 4-Py/2-Py 排泄量比ならびに (2-Py+4-Py)/MNA

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp)

¹ 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科 (522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500)

排泄量比が健常ラットと比較して、差異が認められなかったことを証明し、MacDaniel *et al.*⁴⁾ が推測したように糖尿病はニコチンアミドの異化代謝には影響をおよぼすことはないという結論に支持を与えた。

ところが、ラットの系統をSD系ラットからWistar系ラットに変えて同様な実験を行ったところ、Wistar系ラットでは糖尿病になると、上記のニコチンアミド異化代謝産物の排泄量比が顕著に低下することをShibata *et al.*⁷⁾ は見いだした。この原因は、SD系ラットでは糖尿病状態でもMNA酸化酵素活性が低下しなかったが⁶⁾、Wistar系ラットでは低下したことであった⁷⁾。トリプトファンの異化代謝は種差や系統差あるいは性差による差異が著しいことが知られている²⁾⁸⁻¹³⁾。したがって、SD系ラットとWistar系ラット間で見られたニコチンアミドの異化代謝経路の差異はラットの系統に起因する特有のものである可能性が高いが、補酵素として関わっているビタミンの要求量の差異に起因する可能性も否定できない。

ビタミンB₂はキヌレニン3-モノオキシゲナーゼ¹⁴⁾と2-Py生成MNA酸化酵素、4-Py生成MNA酸化酵素の補酵素として¹⁵⁾、ビタミンB₆はキヌレニナーゼ¹⁶⁾、キヌレニンアミノトランスフェラーゼ¹⁷⁾の補酵素として必要である。間接的ではあるが、PRPPの前駆体のリボース-5-リン酸の生成に関与するトランケートラーゼ反応にビタミンB₁が必要である¹⁸⁾。このように、トリプトファンの異化代謝は複数のビタミンが関与する。そこで、ニコチンアミドの異化代謝経路がストレプトゾトシンで影響を受けるWistar系ラットを用いて、低用量、中用量、十分量のビタミン混合を含む飼料を投与した時にトリプトファン-ニコチンアミド代謝がどのような変動を示すかを調べた。また、糖尿病ラットと健常ラット間のトリプトファン異化代謝についても比較した。

実験方法

1. 動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は22℃前後、明暗サイクルは、午前6

時～午後6時を明、午後6時～午前6時を暗とした。

5週齢のWistar系雄ラットを日本クレア(株)より購入した。購入後、新しい環境に順応させるために、直ちに、ラット用代謝ケージ(日本クレア社製、CT-10)に個別に入れ、表1に示した1%AIN-93ビタミン混合¹⁹⁾を含む20%カゼイン食と水を自由に与え、1週間予備飼育した。そして、6週齢となった時点で、ラットの平均体重がほぼ均等になるように15匹ずつ二群に分けた。一群のラットを糖尿病にするために、0.1 mol/Lのクエン酸でpHを4.4に調整した0.5%食塩水1.0 mLにストレプトゾトシンをラットの体重1 kg当たり70 mgとなるように溶解した液を腹腔内に注射した。ストレプトゾトシン投与3日後、飽食時での血糖値が200 mg/dL以上のものを使用し²⁰⁾²¹⁾、ストレプトゾトシンを注射した群を糖尿病ラット群とした。他の群にはストレプトゾトシンを含まない同じ液を腹腔内に注射した。この群を健常ラット群とした。注射をした時間は午前9時から9時30分とした。さらに、糖尿病ラット群と健常ラット群の二つの群は、摂取させた飼料によって三つの群に細分化した。0.3%ビタミン混合食飼料を摂取させた低用量ビタミン混合食群、0.5%ビタミン混合食飼料を摂取させた中用量ビタミン混合食群、1.0%ビタミン混合食飼料を摂取させた十分量ビタミン混合食群の三群である。ストレプトゾトシンを投与したラットの飼料摂取量は、健常ラットよりも徐々に増え始め、糖尿病状態が落ち着いてきた10日後あたりから、約2倍になり飼料摂取量も安定化してくることを予備実験で確認した。既報もこの現象が見られることを報告している⁶⁾。糖尿病ラット群のビタミン摂取量を健常ラットの比較すべき群と揃えるために、実験開始10日間は、予備実験時の糖尿病ラットの飼料摂取量を基にしてビタミン混合量を毎日変えた飼料を投与した。糖尿病ラット群は、実験開始11日からは、表1に示したように、健常ラットに与えた各飼料の1/2量のビタミン混合を含む飼料を与えることで、比較すべき健常ラット群のビタミン摂取量と揃えた。

飼育期間は70日間とした。この間、飼料と水は自由

表1 飼料組成

	健常ラット			糖尿病ラット		
	0.3% VX 飼料群	0.5% VX 飼料群	1.0% VX 飼料群	調整0.3% VX 飼料群 ¹⁾	調整0.5% VX 飼料群 ¹⁾	調整1.0% VX 飼料群 ¹⁾
ビタミンフリーミルクカゼイン	20	20	20	20	20	20
L-メチオニン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
α-コングスターチ	46.8	46.8	46.8	46.8	46.8	46.8
ショ糖	24.2	24	23.5	24.35	24.25	24
コーン油	5	5	5	5	5	5
ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合 (ニコチン酸欠 AIN-93-MX)	0.3	0.5	1	0.15	0.25	0.5

各値は%で示した。¹⁾ 健常群ラットと糖尿病群ラットのビタミン混合摂取量のみを各ビタミン混合飼料群間でそろえるために、糖尿病ラットの飼料中のビタミン含量を1/2にした。その理由は、糖尿病ラットは健常ラットの約2倍の飼料摂取量であるためである。

摂取とし、毎日新しいものに交換した。ラットの世話
は午前8時~10時の間に行い、体重と飼料摂取量を測
定した。実験開始日を Day 1 として、飼育最終日の Day
70 の1日尿 (Day 70 の午前9時~Day 71 午前9時:24
時間) を集めた。非絶食時の尿を塩酸酸性下で集め、採
尿後、分析に供するまで-20℃で保存した。

2. 化学薬品

ビタミンフリーミルクカゼイン、ショ糖、L-メチオニ
ン、ニコチンアミド、アンスラニル酸は和光純薬工業(株)
(大阪)より購入した。コーンオイルは味の素(株)(東京)
より購入した。 α -コーンスターチ、ミネラル混合 (AIN-
93-G-MX)¹⁹⁾、ビタミン混合 (AIN-93-VX)¹⁹⁾ はオリエン
タル酵母(株)より購入した。キヌレン酸、キサントレン
酸、MNA は東京化成工業(株)(東京)より購入した。
2-Py および 4-Py は、各々 Pullman & Colowick²²⁾ および
Shibata *et al.*²³⁾ の方法により合成した。他の化学薬品は
市販品の中で最高純度のものを使用した。

3. 尿中のトリプトファン異化代謝産物の測定

アンスラニル酸²⁴⁾、キヌレン酸²⁵⁾、キサントレン酸²⁶⁾、
MNA²⁷⁾、Nam²³⁾、2-Py²³⁾、および 4-Py²³⁾ は各々文献に
示した方法で測定した。

4. 統計学的解析

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。データ
の比較には、二元配置分散分析 (2-way ANOVA) を行い、
差があると推定されたとき、Tukey 法にて多重比較検定
を行い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。計算には日本語
Windows 版 Statistical Package for Social Science (SPSS,
Chicago, IL) Ver.14 を用いた。

結 果

1. 飼料中のニコチン酸欠-ビタミン混合含量の違い
が尿量、血液および尿中生化学検査値におよぼす
影響

ストレプトゾトシンを投与した糖尿ラットの尿量は、
健常ラットに比べておよそ 19~35 倍であった。また、
血中グルコースおよび尿中グルコース排泄量、尿中尿素
窒素排泄量についても健常ラットに比べ糖尿ラットにお
いて有意に高値を示したが、ビタミン混合の摂取量の違
いによる影響は受けなかった (表 2)。

2. 飼料中のビタミン混合量の差異が通常ラットのト
リプトファンの異化代謝におよぼす影響

トリプトファンの異化代謝産物で、尿中に排泄される
主要な化合物の測定を行った。表 3 に示したように、健
常な Wistar 系雄ラットを低用量 (0.3% VX)、中用量 (0.5%
VX)、十分量 (1.0% VX) のニコチン酸フリーのビタミン
混合を含む飼料を自由に摂取させた時のアンスラニル
酸、キヌレン酸、キサントレン酸排泄量は、ビタミン混
合の摂取量の違いによる影響を全く受けなかった。

本実験ではニコチン酸フリー飼料を投与したので、生
成したニコチンアミドとその異化代謝産物はすべて飼料

表 2 飼料中のニコチン酸欠-ビタミン混合含量の違いが体重、飼料摂取量、尿量、生化学検査値におよぼす影響

	実験開始時 の体重 (g)	実験終了時 の体重 (g)	体重増加量 (g/70日)	飼料摂取量 (g/70日)	尿量 (mL)	血漿グルコース (mmol/L)	尿中グルコース (mmol/日)	尿中尿素窒素 (mmol/日)
健常ラット×0.3% VX	154±3	455±10	301±9	1415±24	9±1	5.7±0.3	0.0073±0.0005	12.9±0.9
健常ラット×0.5% VX	154±1	445±12	292±13	1428±26	15±3	5.3±0.3	0.0063±0.0017	13.1±0.9
健常ラット×1.0% VX	154±1	468±12	313±12	1471±22	12±1	6.4±0.2	0.0090±0.0007	13.6±0.5
糖尿ラット×調整 0.3% VX	157±3	198±19*	41±22*	2792±114*	312±16*	61.8±3.8*	193±19*	34.3±4.0*
糖尿ラット×調整 0.5% VX	155±2	219±25*	60±21*	2824±147*	281±45*	66.4±7.3*	173±36*	32.5±5.8*
糖尿ラット×調整 1.0% VX	154±3	205±16*	51±16*	2815±81*	346±19*	60.0±4.9*	193±9*	32.7±2.2*
2-way ANOVA <i>p</i> -values								
ストレプトゾトシン	0.493	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ビタミン含量	0.810	0.833	0.795	0.897	0.349	0.777	0.796	0.966
ストレプトゾトシン× ビタミン含量	0.810	0.494	0.592	0.953	0.288	0.627	0.796	0.920

各値は平均値±標準誤差 (n=5) で示した。*健常ラットに対して有意差 (p<0.05) が認められたことを示す。