

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
生活習慣病予防や身体機能維持のためのエネルギー・たんぱく質必要量の推定法に関する基盤的研究

研究代表者 田中 茂穂 国立健康・栄養研究所 基礎栄養研究部 部長

・ 研究分担者の報告書

指標アミノ酸酸化法(IAAO法)に基づくたんぱく質の推定平均必要量の検討
(指標アミノ酸酸化法による日本人高齢者のたんぱく質代謝要求量に関する研究)

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 教授
研究協力者 吉田 英世 東京都健康長寿医療センター研究所 研究副部長
小川 亜紀 京都府立大学大学院生命環境科学研究科 特任研究員

先行研究において、指標アミノ酸酸化（Indicator Amino Acid Oxidation; IAAO）法を用いて、成人男性や学童期、高齢者のたんぱく質代謝要求量（必要量）が算出されている。しかし、これまでに、IAAO 法による日本人高齢者のたんぱく質代謝要求量の研究については報告されていない。本研究において、昨年度は、75~79 歳の健康な日本人高齢者を対象として、鶏卵をたんぱく質源とし、たんぱく質代謝要求量を IAAO 法により算出した。

本年度は、健康な 70~74 歳の日本人高齢者（男性 6 名、女性 4 名）を被験者とし、たんぱく質代謝要求量を IAAO 法により算出した。摂取たんぱく質量が、0.5、0.7、0.9、1.0、1.2、1.4 g/kg BW/day となるよう調整した 6 段階の実験食を用いた。実験食のエネルギー摂取量は基礎代謝量×1.5 kcal/day とした。被験者に、実験日の 9:00 から 18:00 まで 1 時間ごとに、実験食を 1 日摂取量の 1/12 量ずつ提供した。指標アミノ酸として、L-[1-¹³C]-フェニルアラニン（¹³C-Phe）を用いた。13:00 に¹³C-Phe、¹³C 標識炭酸水素ナトリウム（NaH¹³CO₃）を経口摂取させ、14:00 から 18:00 までは 1 時間ごとに¹³C-Phe を経口摂取させた。¹³C-Phe 経口摂取開始より 19:00 まで、30 分ごとに呼気を回収した。呼気中¹³C 標識二酸化炭素（¹³CO₂）量を赤外分光分析装置により測定し、Mixed Effect Change Point Regression Model（ME-CPRM）により解析し、たんぱく質代謝要求量を算出した。

13:00 の¹³C-Phe 摂取後、いずれのたんぱく質摂取量においても急速に呼気 ¹³CO₂ 量が上昇した。18:30 に採取した各たんぱく質摂取量での呼気 ¹³CO₂ 量を ME-CPRM により解析した結果、変曲点は 1.20 g/kg BW/day と算出された。

鶏卵をたんぱく質源とした際の健康な 70~74 歳の日本人高齢者のたんぱく質代謝要求量（推定平均必要量）は、IAAO 法により 1.20 g/kg BW/day であると算出された。本研究の昨年度の検討では、75~79 歳で 1.28 g/kg BW/day と算出されており、70 歳代の二つの区分でたんぱく質代謝要求量に顕著な違いは認められなかった。高齢者では若年成人と比較して、より多くのたんぱく質を摂取する必要があると考えられた。

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、窒素平衡維持量を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。しかし、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ている。そこで、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 標識アミノ酸法のひとつである。体内で必要とされ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必要がある。体内でのたんぱく質合成量は第一制限アミノ酸量によって制限される。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。第一制限アミノ酸の摂取量が増すと、他のアミノ酸もたんぱく質合成に多く利用され、アミノ酸由来の呼気中へのCO₂排出量は減少する。IAAO法の原理はこの反応を利用するものである。¹³Cで標識した指標アミノ酸を経口摂取し、発生する[¹³C]-CO₂(¹³CO₂)量を測定する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、初めてIAAO法をたんぱく質必要量の測定に応用した。その結果、成人男性のたんぱく質必要量を0.93 g/kg BW/dayと算出し、現行の値より高値であったと報告した。そ

の後、IAAO法によるたんぱく質必要量については、学童期の子ども⁹⁾、成人男性^{7,8)}や成人女性¹⁰⁾を対象として検討され、報告されている。Humayunら⁷⁾はIAAO法に、たんぱく質源としてアミノ酸混合物を用いているが、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。京都府立大学において、たんぱく質源として鶏卵を用いて、IAAO法により日本人成人男性(22±0.6歳)のたんぱく質代謝要求量を検討した結果、0.89 g/kg BW/day⁸⁾であった。

昨年度の本研究では、日本人高齢者(75~79歳)においてIAAO法によりたんぱく質代謝要求量を算出したが、それまで、高齢者を対象とした報告はなかった。また、窒素出納法による高齢者のたんぱく質必要量についての研究報告例も少なく、日本人の食事摂取基準(2010年版)¹¹⁾においては70歳以上で1区分となっている。本研究において、本年度は、鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とするIAAO法において、70~74歳の健康な日本人高齢者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(京都府立大学、承認番号51)を得て、実施した。

1) 被験者

70~74歳の自立した生活を営む健康な日本人高齢者(男性6名、女性4名)を被験者とした。平均年齢71.9±0.3歳、平均体重58.3±2.6 kg、および平均BMIは23.0±0.9 kg/m²であった。各被験者の年齢、体重、BMIおよび日記式食事歴法質問票(DHQ)による食事調査結果はTable 1に示した。

2) 実験食

摂取たんぱく質量が、0.5、0.7、0.9、1.0、1.2、1.4 g/kg BW/dayとなるよう調整した6

段階の実験食を用いた。たんぱく質源には鶏卵を用い、玉子焼きにして提供した。6段階のたんぱく質量のそれぞれの玉子焼きの栄養成分組成を Table 2 に示した。

実験食の1日あたりのエネルギー摂取量は、70歳以上の基礎代謝基準値(男性:21.5 kcal/kg BW/day、女性:20.7 kcal/kg BW/day)に各被験者の体重および身体活動レベル(1.50)を乗じて算出した¹¹⁾。エネルギー源には、いろいろ、粉あめを用いた。コーンスターチ、甘藷澱粉、スクロースおよび水を混合して加熱し、冷やしたものを、いろいろとした。粉あめは、紅茶に溶かして提供した。

1.4 g/kg BW/day のたんぱく質に含まれるフェニルアラニンとチロシンの量(76.6 mg/kg BW および 57.0 mg/kg BW)と同量になるよう、摂取たんぱく質量 0.5~1.2 g/kg BW/day の実験食には、結晶フェニルアラニンと結晶チロシンを添加した(Table 3)。栄養素の不足が生じないよう、1日目安量のマルチビタミンおよびマルチミネラル(株式会社 DHC, 大塚製薬株式会社)を提供した。

3) 実験プロトコール

被験者には、実験前日および実験中の激しい運動およびアルコールの摂取を避けるように依頼した。また、前日 21 時以降は水、お茶および紅茶以外は摂取せず、実験開始まで 12 時間絶食を依頼した。

被験者に、実験日の 9:00 から 18:00 まで 1 時間ごとに、実験食を 1 日摂取量の 1/12 量ずつ提供した。

13:00 の実験食とともに、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を 0.176 mg/kg BW、L-[1- ^{13}C]phenylalanine (^{13}C -Phe) を 0.66 mg/kg BW 摂取させた。14:00 以降は 18:00 まで、実験食とともに ^{13}C -Phe を 1.20 mg/kg BW 摂取させた。13:00 から 19:00 まで経時的に、呼気バッグにて呼気を採取した(Table 4)。赤外線分光分析装置 POCone

(大塚電子株式会社)にて呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した。

各被験者に 6 段階のたんぱく質摂取量のすべての実験への参加を依頼した。2013 年 11 月 13 日~26 日の 2 週間の実験期間内に、各被験者につき述べ 6 日間の実験を実施した。

4) 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差で示した。経時的に採取した呼気サンプルに関して、13:00 の POCone 測定値を Pre 値として差し引いた値を呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量(%/kg BW)とした。18:30 の呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量を Mixed Effect Change Point Regression Model (ME-CPRM)¹²⁾により解析し、IAAO 法における変曲点を算出した。

C 結果

呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的变化を Figure 1 に示した。13:00 の ^{13}C -Phe 摂取後、いずれのたんぱく質摂取量においても急速に呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量が上昇した。17:00 以降、呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、0.5 g/kg BW/day のたんぱく質摂取時は 1.4 g/kg BW/day の摂取時に比べ高い値で推移した。

18:30 の呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量を ME-CPRM により解析したところ、変曲点は 1.20 g/kg BW/day と算出された(Figure 2)。鶏卵をたんぱく質源とした際の 70~74 歳の健康な日本人高齢者のたんぱく質代謝要求量(推定平均必要量)は 1.20 g/kg BW/day と算出された。

D 考察

本報告において、70~74 歳の健康な日本人高齢者のたんぱく質代謝要求量は 1.20 g/kg BW/day と算出された。本研究の昨年度の検討では、75~79 歳で 1.28 g/kg BW/day と算出されており、70 歳代の二つの区分でたんぱく質代謝要求量に顕著な違いは認められなかった。

本研究で IAAO 法により算出されたたん

ばく質代謝要求量 1.20 g/kg BW/day は、現行のたんぱく質必要量である 0.85 g/kg BW/day と比較して高値である。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、低たんぱく質摂取に適應させたたんぱく質代謝状態での窒素平衡維持に必要なたんぱく質量である。よって、このたんぱく質必要量を下回るたんぱく質量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。そのため、現行のたんぱく質必要量は、加齢による除脂肪量の低下を防止できる値であるか不明である。サルコペニア等が問題となる高齢者では、骨格筋の変化によるたんぱく質代謝への影響も考慮する必要がある。また、身体活動量が低下すると骨格筋のたんぱく質代謝が低下し、たんぱく質代謝要求量は大きくなる。エネルギー摂取量が低い場合にもたんぱく質代謝要求量は大きくなるため、高齢者ではたんぱく質摂取量が不足しないよう考慮が必要である。一方で、IAAO 法は、一定のたんぱく質摂取状態への適應期間を必要とせず、日常的に摂取している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。日常的な食事と異なるたんぱく質摂取レベルに変化させて一定量のたんぱく質を継続的に摂取するとき、たんぱく質代謝が安定するまでには 5~7 日間を要する¹³⁾。そのため、IAAO 法の実験日にたんぱく質摂取量を一時的に変化させても、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。習慣的に十分量のたんぱく質を摂取している状態で IAAO 法によって算出される値は、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。よって、このたんぱく質摂取量を下回るたんぱく質量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。

本研究の結果、70 歳代の高齢者では、これまでに京都府立大学で実施した日本人成人男性のたんぱく質代謝要求量の検討結果⁸⁾と比べて高値であった。加齢により、最大換気量、腎血流量、肺活量等の生理機能は低下し、体組織では骨格筋が減少し、脂肪は増加傾向となる。高齢者では、成人に比べて肝臓でのアルブミン合成能が低下するほか、たんぱく質分解能も低下する¹⁴⁾。これらの変化により、たんぱく質の代謝回転速度や生理機能が低下することが高齢者のたんぱく質の生体内利用効率に影響を与えていると考えられた。

食事調査により被験者の習慣的なエネルギー摂取量は 1,746±164 kcal/day、たんぱく質摂取量は 1.05±0.14 g/kg BW/day と算出された (Table 1)。これらの値は、平成 23 年国民健康・栄養調査¹⁵⁾の 70 歳以上男女におけるエネルギー摂取量の中央値 (1,691 kcal/day)、たんぱく質摂取量の中央値 (1.16 g/kg BW/day) と比較してやや高値であったが、本研究の被験者は適切な栄養摂取ができていた集団であると考えた。高齢者では栄養摂取や身体活動における個人差が大きく、それは暦年齢よりも総死亡率と強い相関を示すと報告されている¹⁶⁾。高齢者では、現在の心身の状態を考慮した適切な栄養摂取を図ることが重要である。健康な在宅高齢者と施設入居者や在宅ケア対象の高齢者では、生理機能や生活活動量に差があるため、たんぱく質代謝要求量も異なることが考えられる。

E 結論

本研究の結果より、鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とした際の健康な日本人高齢者 (70~74 歳) のたんぱく質代謝要求量の EAR は 1.20 g/kg BW/day と算出された。

F 研究発表

1. 発表論文
なし

2. 学会発表

後藤千景, 小川亜紀, 小林ゆき子, 桑波田雅士, 吉田英世, 木戸康博. 指標アミノ酸酸化法による日本人高齢者のたんぱく質代謝要求量の算出. 第60回日本栄養改善学会学術総会(神戸), 2013年9月.

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.*, 27: 631-647, 1957.
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.*, 77: 109-127 2007.
3. Hegsted, D. M.: Balance studies. *J. Nutr.*, 106: 307-311, 1976.
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, 東京, 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.*, 55: 651-658, 1986.
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., 132:2251-2257, 2002.

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. Nutr.*, 86: 995-1002, 2007.
8. 木戸康博: たんぱく質の出納と生活習慣病関連の検討解析. 平成23年度厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業), 日本人の食事摂取基準の改定と活用に資する総合的研究. 平成23年度総括・分担研究報告書, 27-38, 2011.
9. Elango, R., Humayun, M. A., Ball, R. O., Pencharz, P. B.: Protein requirement of healthy school-age children determined by the indicator amino acid oxidation method. *Am. J. Clin. Nutr.*, 94: 1545-52, 2011.
10. Tian, Y., Liu, J., Zhang, Y., Piao, J., Gou, L., Tian, Y., Li, M., Ji, Y., Yang, X.: Examination of Chinese habitual dietary protein requirements of Chinese young female adults by an indicator amino acid method. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 20: 390-396, 2011.
11. 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討報告書: 日本人の食事摂取基準 [2010年版]. 第一出版, 東京, 2009.
12. Hayamizu, K., Kato, M., Hattori, S.: Determining amino acid requirements from 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.
13. Uauy, R., Scrimshaw, N. S., Rand, W. M., Yong, V. R.: 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.

14. 中坊幸弘, 木戸康博(編集). 応用栄養学 第3版, 講談社, 東京, 2012
15. 厚生労働省. 平成23年国民健康・栄養調査報告. 東京, 2013
16. Mitnitski AB, Graham JE, Mogilner AJ,

Rockwood K. Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatr* 2002; 2: 1

Table 1 Subject characteristics of elder persons (Age:70-74)

Subject	Sex	Age (y)	Weight (kg)	BMI ^{a),b)} (kg/m ²)	Energy intake ^{b)}	Protein intake ^{b)}	PFC ratio ^{b),c)} P : F : C (%E)
					(kcal/day)	(g/kg BW/day)	
A	M	74	59.3	21.9	2,318	1.50	15 : 29 : 56
B	M	73	59.9	23.1	2,668	1.88	17 : 33 : 50
C	M	71	72.7	27.1	1,371	0.63	14 : 18 : 68
D	M	70	59.3	21.1	1,420	0.76	13 : 18 : 69
E	M	72	58.7	21.2	1,989	1.11	15 : 25 : 60
F	M	71	65.5	23.3	1,745	0.90	13 : 47 : 40
G	F	72	57.2	25.3	1,434	1.10	18 : 32 : 50
H	F	72	53.6	24.5	1,587	0.99	14 : 20 : 66
I	F	72	41.2	17.4	-	-	-
J	F	72	55.9	25.4	1,179	0.62	12 : 19 : 69
Mean±SE		71.9±0.3	58.3±2.6	23.0±0.9	1,746±164	1.05±0.14	14 : 27 : 59

a) BMI: body mass index

b) Energy, BMI, Protein intake and PFC ratio data are estimated from self- administered diet history questionnaire.

c) PFC ratio: protein, fat and carbohydrate energy ratio.

Table 2 Composition of the omelet (Body Weight : 60 kg)

	Protein intake (g/kg BW/day)					
	0.5	0.7	0.9	1.0	1.2	1.4
Egg (g)	20	28	37	41	49	57
Olive oil (g)	2.0	2.8	3.7	4.1	4.9	5.7
Energy (kcal)	49	69	89	99	119	138
Protein (g)	2.5	3.5	4.5	5.0	6.0	7.0
Fat (g)	4.1	6.4	8.3	8.3	9.9	11.6

Table 3 Amino acid composition of reference protein and various test intake

	Reference protein (Egg protein composition) (mg/g protein)	Protein intake (g/kg BW/day)					
		0.5	0.7	0.9	1.0	1.2	1.4
Ala	61.4	30.7	43.0	55.3	61.4	73.7	86.0
Arg	75.1	37.6	52.6	67.6	75.1	90.1	105.1
Asn	33.3	16.7	23.3	30.0	33.3	40.0	46.6
Asp	33.3	16.7	23.3	30.0	33.3	40.0	46.6
Cys	22.1	11.1	15.5	19.9	22.1	26.5	30.9
Gln	56.6	28.3	39.6	50.9	56.6	67.9	79.2
Glu	56.6	28.3	39.6	50.9	56.6	67.9	79.2
Gly	33.3	16.7	23.3	30.0	33.3	40.0	46.6
His	22.7	11.4	15.9	20.4	22.7	27.2	31.8
Ile	62.8	31.4	44.0	56.5	62.8	75.4	87.9
Leu	83.3	41.7	58.3	75.0	83.3	100.0	116.6
Lys	75.7	37.9	53.0	68.1	75.7	90.8	106.0
Met	29.6	14.8	20.7	26.6	29.6	35.5	41.4
Phe	54.7	76.6	76.6	76.6	76.6	76.6	76.6
Pro	41.9	21.0	29.3	37.7	41.9	50.3	58.7
Ser	83.9	42.0	58.7	75.5	83.9	100.7	117.5
Thr	47.1	23.6	33.0	42.4	47.1	56.5	65.9
Trp	15.6	7.8	10.9	14.0	15.6	18.7	21.8
Tyr	40.7	57.0	57.0	57.0	57.0	57.0	57.0
Val	70.3	35.2	49.2	63.3	70.3	84.4	98.4

Table 4 The protocol for each study day

Time	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00
Exp.Diet ^{a)}											
¹³ C-Phe ^{b)}											
NaH ¹³ CO ₃ ^{c)}											
Breath sample ^{d)}											

a) The experimental diet () was a omlet, uiro, and sucrose. The diet was provided hourly for 10 h.

Each meal was isocaloric and isonitrogenous and represented 1/12 of each subject's daily requirement.

b) Priming dose of ¹³C-Phe was started at the 5th meal and continued hourly throughout the remaining 4 h of study. : 0.66 mg/kg BW. : 1.20 mg/kg BW.

c) Priming does of NaH¹³CO₃ was started at the 5th meal. : 0.176 mg/kg BW.

d) Breath samples () were collected at 13:00, 13:30, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00, 17:30, 18:00, 18:30, and 19:00.

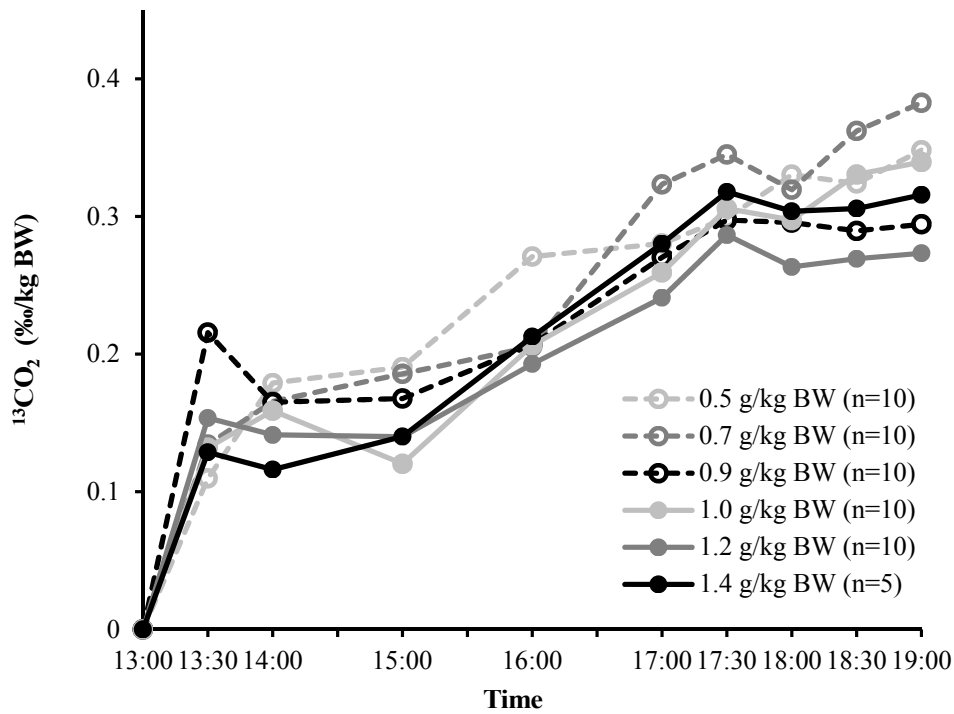


Figure 1 The effect of orally administered L-[1- ^{13}C] phenylalanine as the breath $^{13}\text{CO}_2$ enrichment of age 70-74

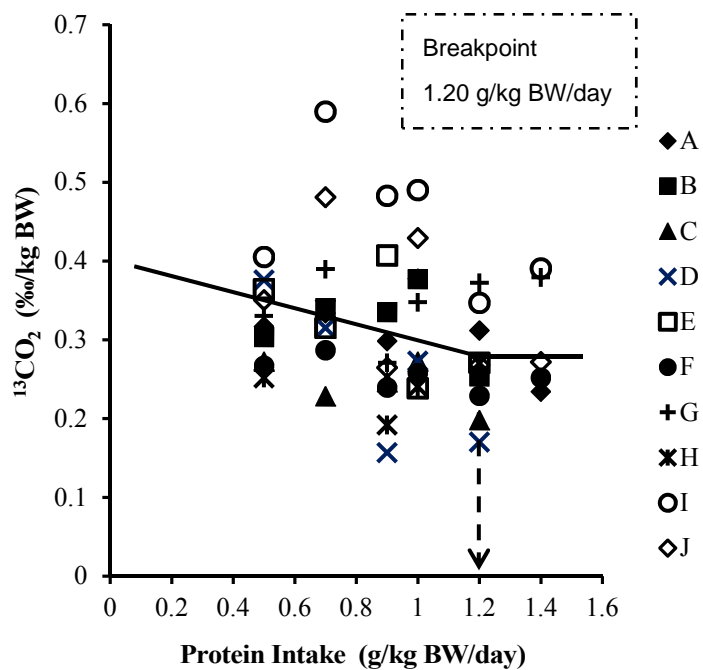


Figure 2 Relation between various protein intakes and the $^{13}\text{CO}_2$ of appearance of orally administered L-[1- ^{13}C] phenylalanine as the breath $^{13}\text{CO}_2$ enrichment.