

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617016

研究課題名(和文)新規たんぱく質代謝研究法の確立とその活用に関する基礎研究

研究課題名(英文) Establishment and application of the indicator amino acid oxidation method as a new protein requirement research method

研究代表者

木戸 康博(Kido, Yasuhiro)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：50195319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、指標アミノ酸酸化(IAAO)法について、窒素出納法との整合性を確認すること、IAAO法によるたんぱく質代謝に関するデータを蓄積することである。ラットを用いて新規たんぱく質代謝研究法としてIAAO法を確立し、たんぱく質の質評価、たんぱく質栄養状態の評価、各種病態時のたんぱく質代謝要求量の推定を行った。日本人成人男性および高齢者においてIAAO法によりたんぱく質代謝要求量を算出した。成人女性のたんぱく質代謝要求量を性周期との関連で明らかにした。本研究の研究成果は、IAAO法は窒素出納法と整合性があることを示し、日本人のたんぱく質食事摂取基準として、広く健康行政への活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to validate the conformity of the indicator amino acid oxidation method (IAAO) with the nitrogen balance method, and gather data on the protein metabolism using the IAAO method.

We established the IAAO method as a new protein requirement research method, conducted protein quality evaluations, evaluated the nutritional state of the proteins employed, and estimated the amount of metabolic demand for protein under various conditions using rats. In addition, we calculated protein requirements in adult and elderly Japanese subjects using the IAAO method. Furthermore, we clarified the relationship between the protein requirement for adult Japanese females and the estrus cycle.

These results suggested that the IAAO method conformed with results obtained using the nitrogen balance method. We expect that our results will be useful in the establishment of dietary reference intakes for protein for the Japanese, and contribute widely to health policies for Japanese.

研究分野：時限付き

科研費の分科・細目：統合栄養科学・9047

キーワード：たんぱく質 代謝要求量 指標アミノ酸酸化法

1. 研究開始当初の背景

たんぱく質代謝の研究は、窒素出納法によって進歩してきた。現在のたんぱく質必要量は窒素出納法に基づき算定されている。窒素出納法では、食事などの摂取窒素量と、尿や便、皮膚表面などからの排泄窒素量の差を調べ、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用な方法として用いられているが、出納値が正に傾きやすいという短所があり、窒素出納法に代わる新しいたんぱく質代謝研究法の確立が望まれている。

研究代表者は、これまでに実験動物や健康成人、高齢者を対象として、窒素出納法を用いてたんぱく質代謝について研究してきた。窒素出納法では、低たんぱく質代謝に適応した条件でたんぱく質必要量を算出しなければならない。従って、通常の生活を営んでいる健康な人が日常習慣的に摂取すべきたんぱく質量を推定することができない。無たんぱく質食を摂取した時に尿中への窒素排泄量が一定になるまで少なくとも5日間を要する(*J Nutr*, 108, 97, 1978)。この間、内容と量(エネルギーとたんぱく質量)が同一の食事を摂取し続け、尿、糞便、その他の窒素も回収して全ての窒素損失量を測定しなければならない。全ての排泄窒素量を正確に測定することは容易ではなく、測定者、被験者ともに負担が大きい。

近年、ヒト不可欠アミノ酸必要量を算出するために、¹³C 標識アミノ酸を用いる方法が開発された。たんぱく質構成アミノ酸の炭素骨格は分解されCO₂として呼気に失われることに基づき、¹³C 標識アミノ酸の経口投与後、アミノ酸分解量として呼気への¹³CO₂ 排出量を測定するものである。¹³C 標識アミノ酸法の一つに、指標アミノ酸酸化法(indicator amino acid oxidation method: IAAO法)がある。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、そのたんぱく質の構成アミノ酸パターン通りにすべてのアミノ酸が揃っている必要がある。第一制限アミノ酸によりたんぱく質合成量は制限され、たんぱく質合成に利用されずに余った他のアミノ酸はエネルギーとして利用され分解される。IAAO法はこのアミノ酸の代謝を原理として利用する。IAAO法をたんぱく質必要量算出に最初に応用したのは Humayun らである(*Am J Clin Nutr*, 86, 995, 2007)。健康な成人男性を対象とし、卵たんぱく質パターンのアミノ酸混合を不足から十分量に変化させ、指標アミノ酸として一定量の[1-¹³C]フェニルアラニン(¹³C-Phe)を投与する IAAO 法を用いてたんぱく質必要量を算出した(*Am J Clin Nutr*, 86, 995, 2007)。その後、我々も IAAO 法を用いてたんぱく質必要量を算出した(アミノ酸研究, 3, 75, 2009)。研究代表者は、2008年度から IAAO 法によるたんぱく質必要量算出に関する基礎研究を実験動物(ラット)を用いて実施してきた。IAAO 法と窒素出納法

の概念とは、全く違うものである。窒素出納法で解明できなかったことが、IAAO 法で解明できる可能性が非常に高いと確信してきた。

2. 研究の目的

まず、[課題 1] 新規たんぱく質代謝研究法として、条件設定等の基礎研究を行い、IAAO 法を確立する。次に、確立した IAAO 法を用いて、[課題 2] たんぱく質の質評価、[課題 3] たんぱく質栄養状態の評価へ応用する。さらに、[課題 4] ライフステージ別のたんぱく質要求量を推定する。[課題 5] 各種病態時のたんぱく質要求量の推定にも活用の範囲を広げる。[課題 6] ヒトへの活用として、成人女性のたんぱく質要求量を性周期との関連で明らかにする。

本研究は、IAAO 法について、現在のたんぱく質必要量算出に用いられている窒素出納法との整合性を確認するための基礎研究と、IAAO 法によるたんぱく質代謝に関するデータの蓄積を目的とする。最終的には、ヒトを対象とした研究に応用し、厚生労働大臣が告示する「日本人のたんぱく質食事摂取基準」として、広く日本国民の健康行政にも活用されることが期待される。

3. 研究の方法

[課題 1] 新規たんぱく質代謝研究法として指標アミノ酸酸化(IAAO)法を確立する。(平成 23 年度)

Wistar/ST 系雄性ラット(5週齢)にメンテナンス食として 20%カゼイン食を 24 時間以上自由摂取させた。IAAO 法実施の前日 20:00 より 13 時間、ラットを絶食させた。実験日、9:00 から 18:00 の間、3 時間ごとに実験食を 4 回与えた。実験食は、5%、10%、15%、20%、25%、30%カゼイン食のうちいずれか 1 種類とした。1 回の給餌量は 1 日摂食量の 1/8 量とした。ラットは一定速度で換気を行っているチャンパーに入れ、チャンパー内の気体をラットの呼気の一部として呼気採取バックに採取した。15:00、18:30 に呼気を採取し、¹³CO₂ 量を赤外分光分析装置 POcone(大塚電子株式会社)にて測定した。15:00 の呼気¹³CO₂ 量をベースラインとし、5%、10%、15%、20%、25%、30%カゼイン食摂取時のそれぞれの 18:30 の呼気¹³CO₂ 量を¹³C-Phe 酸化量としてプロットした。2 本の直線から得た屈曲点を、たんぱく質要求量であると判断した。本研究では、摂取するたんぱく質の量や標識物質の量とタイミングなどを検討した。

[課題 2] たんぱく質の質の評価法を確立する。(平成 23 年度)

SD 系雄性ラット(5週齢)を用いた。実験食のたんぱく質源には、牛乳カゼイン、小麦グルテン(WG)、卵白たんぱく質(EW)、大豆たんぱく質(SPI)を用いた。さらに、要求量を満たすまでのたんぱく質摂取量のいずれか 1 点(5 g/kg BW/day のタンパク質摂取時)で呼

気 $^{13}\text{CO}_2$ 量を比較し、たんぱく質の質を評価することを試みた。

[課題 3] たんぱく質栄養状態の評価法を確立する。(平成 23 年度)

課題 5 と併せて検討することとした。

[課題 4] ライフステージ別のたんぱく質要求量の推定法を確立する。(平成 23・24 年度)

健康な日本人男性(23±0.6 歳、n=6)及び高齢者(70~74 歳、n=10)(75~79 歳、n=10)を被験者に、鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とした際の IAAO 法を行った。食事中のたんぱく質を不足から十分量に変化させ、指標アミノ酸として一定量の ^{13}C -Phe を経口摂取する。実験実施期間は実験日と 2 日間の栄養維持期間の計 3 日間とし、食事中のたんぱく質量を変化させて数回実施する。栄養維持期間では、栄養が過不足なく摂取できる献立を用意し、栄養状態を整える。実験日の実験食は、厚生白書の食品群別摂取量の 20 歳以上の摂取量を参考にし、一般的な日本人の食事を再現する。栄養維持期間と実験日には、用意した食事以外は水のみ飲食可とする。実験食は 3 時間毎に一定量を摂取する。2 回の食事を摂取後、指標アミノ酸として一定量の ^{13}C -Phe を経口摂取し、呼気を採取して呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定する。

[課題 5] 各種病態時のたんぱく質要求量の推定法を確立する。(平成 24・25 年度)

SD 系雄性ラットを 3 週齢で購入し、1 週間の予備飼育後、17.2%カゼイン食を自由摂取させる C (Control) 群、2.6%カゼイン食を自由摂取させる L (Low protein) 群、L 群と pair-feeding をして 17.2%カゼイン食を摂取させる CP (Control Pair-feeding) 群の 3 群に分けた。各カゼイン食で 3 週間飼育後、7~9 週齢のラットで IAAO 法を行った。

[課題 6] ヒトたんぱく質要求量の推定法を確立する。(平成 24・25 年度)

鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とした際の IAAO 法を用いて、健康な日本人成人女性(21.3±0.2 歳、n=10)のたんぱく質代謝要求量を、低温期(卵胞期)と高温期(黄体期)に分けて検討した。

4. 研究成果

[課題 1] 新規たんぱく質代謝研究法として指標アミノ酸酸化(IAAO)法を確立する。(平成 23 年度)

IAAO 法により、代謝要求量を満たすたんぱく質摂取量はカゼインが 13.1 g/kg BW/day、小麦グルテンが 18.1 g/kg BW/day であると算出され、窒素出納法により算定されている値と同等であった。日常的な食事を摂取しているラットにおいて、IAAO 法により代謝要求量を算出する方法を確立することができた。

[課題 2] たんぱく質の質の評価法を確立する。(平成 23 年度)

SD 系雄性ラットにおいて、呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量に基づき算出したたんぱく質代謝要求量を満たすたんぱく質摂取量は、カゼイン、WG、SPI、EW でそれぞれ 18.1 g/kg BW/day、22.2 g/kg BW/day、17.5 g/kg BW/day、10.1 g/kg BW/day であった。また、5 g/kg BW/day のたんぱく質摂取時の呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、カゼイン、WG、SPI、EW でそれぞれ 10.3 (%)/100 g BW、11.3 (%)/100 g BW、10.8 (%)/100 g BW、9.5 (%)/100 g BW であった。たんぱく質代謝要求量を満たすたんぱく質摂取量と 5 g/kg BW/day のたんぱく質摂取時の呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量との間に正の相関が認められた ($r=0.952$ 、 $P<0.05$)。以上の結果から、食事たんぱく質の質は、5 g/kg BW/day のたんぱく質摂取時の呼気 $^{13}\text{CO}_2$ 量によって推定できることを明らかにした。

[課題 3] たんぱく質栄養状態の評価法を確立する。(平成 23 年度)

課題 5 と併せて検討することとした。IAAO 法によって、低たんぱく質栄養状態ラットのたんぱく質代謝の評価が可能であると示唆された。

[課題 4] ライフステージ別のたんぱく質要求量の推定法を確立する。(平成 23・24 年度)

鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とした際の IAAO 法により、たんぱく質要求量は、日本人成人男性で 0.89 g/kg 体重/日、高齢者(70~74 歳)で 1.20 g/kg 体重/日、高齢者(75~79 歳)で 1.28 g/kg 体重/日であった。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。

[課題 5] 各種病態時のたんぱく質要求量の推定法を確立する。(平成 24・25 年度)

C 群と CP 群のたんぱく質代謝要求量は、それぞれ 17.8 g/kg BW/day、9.3 g/kg BW/day と推定された。今回、L 群の屈曲点は算出できなかったため、今後たんぱく質摂取量を変化させ、より詳細に検討しなければならない。C 群と CP 群では習慣的なたんぱく質の摂取量を反映していたことから、IAAO 法により習慣的なたんぱく質摂取量に適應した時の代謝要求量の算出が可能であると考えられた。また、0%カゼイン食摂取時において、15:00 から 19:00 までに排出された呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、CP 群および L 群では C 群と比較して有意に高値となった。CP 群と L 群では、習慣的なたんぱく質摂取量の低下により、たんぱく質代謝プールが小さくなっていて考えられる。そのため、たんぱく質合成量も低下し、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量が増加したと考えられた。以上の結果より、0%カゼイン食で IAAO 法を行うことによってたんぱく質代謝

プールを推定できることが示唆された。

[課題 6] ヒトたんぱく質要求量の推定法を確立する。(平成 24・25 年度)

鶏卵たんぱく質をたんぱく質源とした際の IAAO 法により、健康な日本人成人女性 (21.3±0.2 歳、n = 10) のたんぱく質代謝要求量は、低温期は 0.80 g/kg 体重/日、高温期は 0.60 g/kg 体重/日と算出された。成人女性の場合、性周期に伴いたんぱく質代謝要求量も大きく変化していることが推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Aki Ogawa, Yuka Naruse, Yasutaka Shigemura, Yukiko Kobayashi, Isao Suzuki, Sayori Wada, Kohsuke Hayamizu, Masashi Kuwahata, and Yasuhiro Kido. 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(6), p418-425, 2011.
2. 小川亜紀, 廣瀬太洋, 桑波田雅士, 鈴木公, 木戸康博. ラットにおける指標アミノ酸酸化法によるタンパク質必要量算出とタンパク質の質の評価. *外科と代謝・栄養.* 45(5), P175-180, 2011.
3. 木戸康博, 小川亜紀, 廣瀬太洋, 小林ゆき子, 桑波田雅士. 指標アミノ酸酸化法によるタンパク質必要量. *アミノ酸研究.* 5(1), P7-11, 2011.

[学会発表](計 11 件)

1. 小川亜紀, 廣瀬太洋, 小林ゆき子, 桑波田雅士, 木戸康博. 「ラットにおける指標アミノ酸酸化法による食事タンパク質の質の評価」第 65 回日本栄養・食糧学会大会、3Q-15p、東京、2011 年 5 月.
2. 廣瀬太洋, 荒木直子, 小川亜紀, 和田小依里, 小林ゆき子, 桑波田雅士, 木戸康博. 「指標アミノ酸酸化法を用いた日本人成人男性のたんぱく質必要量の算出」第 65 回日本栄養・食糧学会大会、3Q-16p、東京、2011 年 5 月.
3. 廣瀬太洋, 荒木直子, 小川亜紀, 和田小依里, 小林ゆき子, 桑波田雅士, 木戸康博. 「指標アミノ酸酸化法を用いた日本人成人男性のたんぱく質代謝の測定」日本外科代謝栄養学会第 48 回学術集会、AAS-07、名古屋、2011 年 7 月.

4. Aki Ogawa, Tahiro Hirose, Yukiko Kobayashi, Kohsuke Hayamizu, Masashi Kuwahata, Yasuhiro Kido. “An evaluation of the quality of dietary protein using an IAAO method” 11th Asian Congress of Nutrition 2011 (ACN 2011), PD1-002, Singapore, July 2011.
5. Tahiro Hirose, Naoko Araki, Aki Ogawa, Yukiko Kobayashi, Sayori Wada, Masashi Kuwahata, Yasuhiro Kido. “Estimation of protein requirement for young Japanese men using the indicator amino acid oxidation method” 11th Asian Congress of Nutrition 2011 (ACN 2011), PD3-069, Singapore, July 2011.
6. 廣瀬太洋, 荒木直子, 小川亜紀, 和田小依里, 小林ゆき子, 桑波田雅士, 速水耕介, 木戸康博. 「指標アミノ酸酸化法を用いた日本人成人男性のたんぱく質代謝要求量の算出」日本アミノ酸学会第 5 回学術大会、名古屋、2011 年 11 月.
7. 小川亜紀, 速水耕介, 川端二功, 和田小依里, 小林ゆき子, 鈴木公, 桑波田雅士, 木戸康博. 「指標アミノ酸酸化法によるタンパク質の質の簡易的評価法への応用」第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2J-5a、仙台、2012 年 5 月.
8. Aki Ogawa, Haruka Murayama, Chikage Goto, Yukiko Kobayashi, Kohsuke Hayamizu, Sayori Wada, Masashi Kuwahata, Yasuhiro Kido. “A simple evaluation method for the quality of dietary protein in rats using an indicator amino acid oxidation method” 16th International Congress of Dietetics 2012 (ICD 2012), 1176, Sydney Australia, September 2012.
9. 小川亜紀, 村山陽香, 小林ゆき子, 桑波田雅士, 木戸康博. 「指標アミノ酸酸化法によるタンパク質の質の簡易的評価法の検討」第 59 回日本栄養改善学会学術総会、03-224-122、名古屋、2012 年 9 月.
10. 小川亜紀, 村山陽香, 速水耕介, 横井香里, 辻智子, 桑波田雅士, 木戸康博. 「指標アミノ酸酸化法によるタンパク質の簡易的評価法の検討」日本アミノ酸学会第 6 回学術大会、P-2、千葉、2012 年 9 月.
11. Yasuhiro Kido, Tahiro Hirose, Chikage Goto, Naoko Araki, Mamiko Sumi, Aki Ogawa, Kohsuke Hayamizu, Yukiko Kobayashi, Masashi Kuwahata. “Protein requirement of young Japanese men using the indicator amino acid oxidation technique” 8th Asia pacific conference on clinical nutrition. Symposium 16-2, June 2013.

〔図書〕(計 1 件)

1. 木戸康博: 2 章 9 節 アミノ酸の必要量 (pp.112-117), アミノ酸科学の最前線-基礎研究を活かした応用戦略-, 監修 (鳥居邦夫, 門脇基二), 全 281 頁, シーエムシー出版, 東京, (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸 康博 (Yasuhiro Kido)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号 : 50195319