

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 3 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300258

研究課題名(和文) ヒト尿を用いたB群ビタミンとアミノ酸の栄養状態の統合的評価方法の創成

研究課題名(英文) Studies on the nutritional evaluation of amino acids and B-group vitamins

研究代表者

柴田 克己 (Shibata, Katsumi)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：40131479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は尿中に排泄されるビタミン量を測定することで、個々人の摂取した食べ物に含まれる生体有効性ビタミン量を推定することに成功した。しかし、尿中のビタミン量を測定するだけでは、その生理機能が反映されていないという限界があった。本研究はこの限界を打破する研究である。代表的な成果の一つとして、トリプトファン代謝を利用した機能性生体指標に関する報告を行った。この実験により、日本人の食事摂取基準で策定されたB群ビタミンの必要量の妥当性が支持された。尿中のビタミン排泄量並びにビタミンの生理機能を反映した2-オキソ酸を網羅的に測定し「2-オキソ酸レーダーチャート」を作成した。

研究成果の概要(英文)：We clarified that the urinary excretory amounts of water-soluble vitamins strictly reflected the available amounts of the water-soluble vitamins in the bodies from the data with experiments by rats and humans. However, some limitations which do not reflect functional activities of vitamins are pointed out. The present project was done to break through these limitations. The present project is to measure some 2-oxo acids, catabolites of amino acids, because B-group vitamins are involved in catabolism of amino acids. As one of the typical outcome, we reported about functional biomarkers of vitamins by using tryptophan catabolites. Findings from the current study supported the requirements of B-group vitamins set by the Dietary Reference Intakes for the Japanese. We succeeded to measure all of 2-oxo acids which reflect functional activity of vitamins. We prepared the "2-oxo acid-gram" as well as the "table of daily urinary excretion of vitamins".

研究分野：基礎栄養学

キーワード：ビタミン アミノ酸 尿 栄養状態 機能性生体指標

1. 研究開始当初の背景

申請者は尿中に排泄されるビタミン量を測定することで、個々人の摂取した食べ物に含まれる生体有効性ビタミン量を推定することに成功した。しかしながら、尿中のビタミン量を測定するだけでは、ビタミンの生理機能が反映されていないという限界があった。本研究はこの限界を打破する研究である。

2. 研究の目的

ヒトの B 群ビタミン栄養状態とアミノ酸栄養状態を、尿中に排泄される複数の 2-オキソ酸量から評価する方法の構築を目的とする (2-オキソ酸レーダーチャートの作成)。

アミノ酸の異化代謝には B 群ビタミンが補酵素として関わる反応が多いことに注目した。アミノ酸が異化代謝を受ける最初の反応は、共通しており、アミノ基がはずれ、2-オキソ酸となる反応である (ビタミン B6 あるいはナイアシンが関与)。その後の 2-オキソ酸代謝には B-群ビタミンが関わっている。

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸の 2-オキソ酸の網羅的な定量方法を確立する。

ヒトの栄養状態を尿という非侵襲性生体試料を用いる生体指標 (ビタミン排泄量) と 2-オキソ酸 (ビタミンの機能性生体指標) で評価するもので、ビタミンとアミノ酸栄養状態の統合的評価方法を構築し、もってヒトの健康寿命の延伸に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物あるいはヒトに規定食を与え、尿中に排泄されるビタミン並びのそれらの異化代謝産物量並びにアミノ酸異化産物である 2-オキソ酸量を高速液体クロマトグラフあるいは微生物を用いて測定した。

ヒト尿中のトリプトファン代謝産物を利用した B 群ビタミン必要量の評価方法

トリプトファン代謝には、ビタミン B6 以外にもビタミン B2、ナイアシンが直接的に、ビタミン B1 とパントテン酸が間接的に関与している。本実験は、日本人の食事摂取基準で策定された B-群ビタミン量の妥当性を検証するための実験として行った介入試験である。具体的には、B 群ビタミン混合物の段階的增加投与が、トリプトファン代謝の変動に好ましい変動を引き起こすのかあるいは変わらないのかを、10 名の日本人男性を被験者として調べた。実験期間は 4 週間で、この間、日本人の食事摂取基準を参照した栄養素量を含む同じ食事を基本食として与えた。エネルギー投与量は 2,700 kcal/日、たんぱく質投与量は 100 g/日 (トリプトファン投与量はその 1%として、1 g/日と算定) とした。実験 1 週目は基本食のみ、2 週目は基本食 + 基本食中の B-群ビタミン含量と同じ量の B-群ビタミン混合物、3 週目は基本食 + 基本食中の B-群ビタミン含量の 3 倍量の B-群ビタミン混合物、4 週目は基本食 + 基本食中の B-群ビタミン含量の 6 倍量の B-群ビタミン混合物を与えた。各々の週の 1 日目と 5 日目の 24 時間尿を集め、結果として、計 8 回集めた。

4. 研究成果

トリプトファン代謝産物のアンスラニル酸、キヌレン酸、キサントレン酸、3-ヒドロキシアンスラニル酸およびキノリン酸を測定した。個々人のこれらの代謝産物の日間変動を解析した結果、個人内において、有意な変動は認められなかった。つまり、必要量の B-群ビタミンを摂取していれば、トリプトファン代謝は恒常性を持って作動していることが明らかとなった。したがって、食事摂取基準で策定された B-群ビタミン量が不適で

あるというデータは得られなかった。

ラットにおいて食餌制限はビタミン B₁ の尿中排泄量を減少させ、一方でパントテン酸の尿中排泄量を増大させる

我々は穏やかな食餌制限がトリプトファン-ニコチンアミド転換率を著しく低下させることを報告し、この現象が「いわゆる飢餓時期」にペラグラが流行する一因となっている可能性を示唆した。本報告では、自由摂取群とその段階的な食餌制限（80%量，60%量，40%量，20%量の各群）が肝臓，腎臓，血液および尿中のB-群ビタミン含量におよぼす影響を調べた。このような食餌制限は肝臓，腎臓および血液中のB-群ビタミン含量にはほとんど影響をおよぼさなかった。ところが，尿中の排泄率（排泄量/摂取量）は，ビタミンごとに挙動が異なっていた。興味のある現象は，ビタミン B₁ 排泄率が 20%食餌制限食において自由食群と比較して顕著に低い値を示したこと（自由摂取群は 16%，20%制限食は 6%； $p < 0.01$ ），パントテン酸排泄率が 20%食餌制限食において自由食群と比較して顕著に高い値を示したこと（自由摂取群は 62%，20%制限食は 255%； $p < 0.01$ ）であった。

尿中 3-ヒドロキシキヌレニン排泄量は排卵前よりも排卵後の方が高い - ビタミン B₆ の要求量は排卵前よりも排卵後の方が高い可能性

日本人女性におけるトリプトファン-ニコチンアミド代謝と性周期との間の関連を調べた。排卵前と排卵後の尿中の9つのトリプトファン代謝産物を測定した。3-ヒドロキシアンスラニル酸は、排卵前期に比べ排卵後相の方が高かった。3-ヒドロキシキヌレニン排泄量のみが排卵前よりも排卵後の方が高かった。このことは、3-ヒドロキシキヌレニン 3-ヒドロキシアンスラニル酸反応を触媒するビタミン B₆ 酵素であるキヌレニナーゼ活性の低

下を意味している。

離乳ラットにおいて緩やかな食事制限はトリプトファン-ニコチンアミド転換率を著しく低下させる

適度なカロリー制限は栄養素の代謝を好ましい方向に変動させるといわれている。ビタミンのニコチンアミドは、ラットおよびヒトを含む哺乳動物において、L-トリプトファンから生合成される。この転換経路はニコチンアミドを供給するために重要な役割を果たす。我々は、L-トリプトファン-ニコチンアミド転換率が食餌制限によってどのような影響を受けるのかを調べた。離乳雄ラットを完全栄養食で63日間飼育し、食餌摂取量を変えることで、3群に分けた。一群は自由に摂取させ対照群とした。2群は対照群の80%量の飼料を、3群は対照群の65%量の飼料を与えた。経時的に24時間尿を採取し、L-トリプトファン-ニコチンアミド転換率を求めるためにニコチンアミドとその異化代謝産物のN¹-メチルニコチンアミド、N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド及びN¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミドを測定した。転換率は、採尿日のL-トリプトファン摂取量と上記4化合物の合計量との比較から計算した。その結果、L-トリプトファン-ニコチンアミド転換率は、離乳ラットにおいて体重が増加するような軽度な食餌制限下において顕著に低下することが見出された（対照群は 1.37±0.24%，80%制限群は 0.20±0.04%，65%制限群は 0.15±0.02%。対照群 vs. 制限群において、 $p < 0.01$ ）。

D-トリプトファンの悪影響を予測する指標としての尿中 3-ヒドロキシキヌレニン/3-ヒドロキシアンスラニル酸排泄量比

我々は、D-トリプトファン（D-Trp）の安全量とその悪影響を予測する生体指標を、ラットを用いて調べた。7週齢のWistar系雄ラットを20%カゼイン食（対照群）と20%カゼイ

ン食に D-Trp を 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% になるように添加した試験食を 21 日間与え、実験最終日の 24 時間尿を集めた。各 D-Trp 添加群の体重増加量を一元配置の分散分析をしたところ、対照群と差異が認められた最小 D-Trp 添加食は 0.3% 食群であった。0.3% D-Trp 食群が摂取した 1 日当たりの D-Trp 摂取量は 0.21 g/kg 体重であった。差異が認められなかった群の中で最大の D-Trp 添加食は 0.2% 食群であった。0.2% D-Trp 摂取群の 1 日当たりの D-Trp 摂取量は 0.15 g/kg 体重であった。D-Trp 大量摂取による悪影響を予測する生体指標として、尿中の 3-ヒドロキシキヌレニン/3-ヒドロキシアンスラニル酸排泄量比が活用できる可能性を示した。

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 9 件)

1. Shibata K, Hirose J, Fukuwatari T. Method for evaluation of the requirements of B-group vitamins using tryptophan metabolites in human urine. *Int J Trp Res* (2015) **8**, 31-39.
2. Shibata K, Fukuwatari T. Tissue vitamin concentrations are maintained at constant by changing the urinary excretion rate of vitamins in rats restricted food intake. *Biosci Biotechnol Biochem* (2014) **78**, 2102-2109.
3. Shibata K. Urine 3-hydroxykynurenine is higher during the postovulatory phase than in the preovulatory phase indicating a higher vitamin B₆ requirement. *Biosci Biotechnol Biochem* (2014) **78**, 1757-1760.
4. Shibata K, Nakata C, Fukuwatari T. Moderate food restriction suppresses the

conversion of L-tryptophan to nicotinamide in weaning rats. *Biosci*

Biotechnol Biochem (2014) **78**, 478-481

5. Shibata K, Ohno T, Sano M, Fukuwatari T. Urinary ratio of 3-hydroxykynurenine/3-hydroxyanthranilic acid is an index to predicting the adverse effects of D-tryptophan in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (2014) **60**, 261-268.

[学会発表](計 5 件)

1. 辻愛, 中村肇伸, 柴田克己. 第 13 回日本栄養改善学会近畿支部学術総会(平成 26 年 12 月 7 日, 京都). マウスにおけるピオチン欠乏は卵子の質を劣化させる.
2. 前田 晃宏, 佐野 光枝, 福渡 努, 船越洋, 中村 敏一, 柴田 克己. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会(平成 26 年 5 月 30 日~6 月 1 日, 札幌), TDO KO マウスを用いて解析した D-トリプトファンからのニコチンアミド合成におよぼす TDO の寄与率
3. 中田千文, 福渡努, 柴田克己. 第 51 回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会(平成 24 年 10 月 20 日, 兵庫). 食餌制限はトリプトファン-ニコチンアミド転換率を低下させる.
4. 大野友彰, 福渡 努, 柴田克己. 第 52 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会(平成 25 年 10 月 26 日, 滋賀). ラットを用いた D-トリプトファンの安全性試験.
5. 前田晃宏, 船越洋, 中村敏一, 佐野光枝, 福渡努, 柴田克己. 第 52 回日本栄養・食糧学会大会 近畿支部大会(平成 25 年 10 月 26 日, 彦根). TDO 活性の低下に伴う L-トリプトファン制限食の必要性について.

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科
基礎栄養学研究室

<http://www.shc.usp.ac.jp/shibata/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田克己 (Shibata Katsumi)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号: 40131479

(2) 研究分担者

福渡努 (Fukuwatari Tsutomu)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号: 50295630

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: