

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明－

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

主任研究者の報告書

6. 妊婦，授乳婦における水溶性ビタミンの尿中排泄量調査

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

我々は、若年成人において、介入試験や通常生活時の調査を行うことで、ビタミン B₁₂ を除く 8 種類の水溶性ビタミンについて、尿中排泄量が摂取量を鋭敏に反映することを明らかにした。尿中水溶性ビタミン排泄量は水溶性ビタミンの栄養状態を反映することを示しており、基準値を設けることによって尿中水溶性ビタミン排泄量から水溶性ビタミン摂取不足および過剰摂取を評価できることを明らかにした。本調査では妊婦，授乳婦を対象として毎月一度、24 時間尿の採尿を継続することで、水溶性ビタミン尿中排泄量の推移を追跡調査した。水溶性ビタミンの尿中排泄量を分析し、非妊娠、非授乳女性（女子学生）の尿中排泄量と本研究室で設定した若年成人の尿中排泄量基準値と比較することで、妊娠や授乳が水溶性ビタミンの代謝におよぼす影響について検討した。なお、本調査は昨年度から引き続いて行っており、ここでは昨年度の結果と合わせて報告した。

A. 目的

近年、栄養素摂取量を反映するバイオマーカーとして尿の利用が注目を集めている。これまでに、尿中窒素排泄量を利用したたんぱく質摂取量の評価¹⁾、尿中スクロースおよびフルクトース排泄量を利用した糖類摂取量の評価²⁾、尿中カリウム排泄量を利用したカリウム摂取量の評価³⁾が確立されている。

本研究室では、尿中水溶性ビタミン排泄量を指標として水溶性ビタミンの栄養状態を評価することを目指して、水溶性ビタミンの尿中排泄量と摂取量の関係について調べてきた。これまでに、半精製食と合成ビタミンを7日間連続して摂取させた被験者の尿中水溶性ビタミン排泄量を測定することにより、食事摂取基準の推奨量 (RDA) の水溶性ビタミンを摂取した場合、どれだけの水溶性ビタミンが尿に排泄されるのかを明らかにした⁴⁾。また、一般的な食事に水溶性ビタミンを推奨量の0~6倍付加した時の尿中水溶性ビタミン排泄量を測定することにより、ビタミンB₁₂を除く8種類の水溶性ビタミンについて、尿中排泄量は摂取量依存的に増大し、その相関は非常に高いことを明らかにした⁵⁾。これらの結果は、尿中水溶性ビタミン排泄量は水溶性ビタミン栄養状態を反映することを示しており、基準値を設けることによって尿中水溶性ビタミン排泄量から水溶性ビタミン栄養状態の不良および過剰摂取を評価できることを明らかにした。そこで本研究では、妊娠、授乳期における水溶性ビタミンの栄養状態を評価することを目的とし、妊婦、授乳婦を対象とした水溶性ビタミンの尿中排泄量を継続的に調査した。

B. 調査方法

1. 対象者

S県内の妊婦20名、授乳婦41名（妊娠期から乳児が満1歳の誕生日を迎える月まで）

を対象として、毎月1回の頻度で継続的な研究調査を実施した。また、非妊娠・非授乳女性として、S県内の大学に在籍する女子学生105名を対象にして、食事調査採尿を実施した。このうち、尿の取り忘れまたは取りこぼしがないこと、蓄尿時間が22時間以上26時間以内であること、尿量が250 mL以上であること、自記式食事歴法質問票 (DHQ) から算出したエネルギー摂取量が500 kcal以上4000 kcal以下であること、最近1ヶ月間はビタミン剤を服用していないことの全てを満たす者を解析の対象とした。女子学生については、上記の条件に加え、クレアチニン (mg/day) / 体重 (kg) 比が10.8~25.2の範囲外のものも除外し、74名を解析の対象とした。

なお、本研究は滋賀県立大学倫理審査委員会において承認を得ており、対象者には調査の目的、検査内容、個人情報の保護などについて十分な説明を行い、インフォームド・コンセントを得ている。

2. 自記式食事歴法質問票 (DHQ)

対象者には毎月1回の調査日にDHQに回答してもらった。これを五訂日本食品標準成分表⁶⁾に基づいて解析し、ビオチンを除く8種類の水溶性ビタミン摂取量を算出した。ビオチンを除いた理由は、五訂日本食品標準成分表⁸⁾に成分値が記載されていないためである。また、ナイアシンについては、トリプトファンからニコチンアミドが生合成されるため、ナイアシン当量摂取量として算出した。

3. 24時間尿の蓄尿

対象者には、採尿日に日常と同様の飲食行動および生活行動を行なうように依頼した。起床後の2回目の尿から翌朝起床後の1回目の尿までを採尿し、24時間尿とした。対象者は、採尿開始時刻、終了時刻、尿の取りこぼし、および取り忘れの有無を記録した。24時間尿の容量を測定し、測定するビタミンごと

に安定化処理を行い、使用するまで -20°C で保存した。

4. 尿中水溶性ビタミン排泄量の分析

ビタミン B₁

チアミン塩酸塩量として示した。尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した⁷⁾。

ビタミン B₂

リボフラビン量として示した。尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した⁸⁾。

ビタミン B₆

4-ピリドキシン酸(4-PIC)量として示した。尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した⁹⁾。

ビタミン B₁₂

シアノコバラミン量として示した。尿 900 μL に 100 mM 酢酸緩衝液(pH 4.8) 180 μL 、超純水 680 μL 、0.0025 % シアン化カリウム溶液 20 μL 、10%メタリン酸 20 μL を加え、 120°C で 5 分間オートクレーブ処理した。氷冷後、遠心分離によって得た上清を測定用試料とした。*Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法にて測定した¹⁰⁾。

ナイアシン

ニコチンアミド、*N*¹-メチルニコチンアミド(MNA)、*N*¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)、*N*¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)の合計量として示した。尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って尿中ニコチンアミド、2-Py、4-Py、尿中 MNA 含量を測定した^{11, 12)}。

パントテン酸

尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した後、HPLC 法にて測定した¹³⁾。

葉酸

プテロイルモノグルタミン酸量として示した。尿 4.5 mL に 1M アスコルビン酸溶液を 0.5 mL 加えて安定化した。*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物学的定量法を用いて測定した¹⁴⁾。

ビオチン

尿をそのまま測定用試料とした。*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法を用いて測定した¹⁵⁾。

ビタミン C

アスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸、2, 3-ジケトグルコン酸の合計量とした。尿 2 mL に 10 %メタリン酸溶液 2 mL を加えて安定化させた。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した¹⁶⁾。

5. 統計処理

DHQ より算出した尿中水溶性ビタミン排泄量の解析には GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA) を用いた。非妊娠、非授乳女性(女子学生)の値と比較して One-way ANOVA (Dunnnett 法)による検定を行った。尿中排泄量と基準値の関係は、*t* 検定による検定を行った。

C. 結果

1. 対象者の特徴

表 1 に、対象者の年齢、身長、体重、BMI を示した。

女子学生の身体状況は「日本人の食事摂取基準(2010年版)¹⁷⁾」の基準体位(19~29歳)と同程度であった。

2. 尿中水溶性ビタミン排泄量

女子学生、妊婦(初期、中期、末期)、授乳婦(前期、後期)における尿中水溶性ビタミン排泄量を図 1 に示した。女子学生と比べて、ビタミン B₁ は妊婦末期において、ビタミン B₂ は妊婦末期と授乳婦前期において低値を

示した。ビタミン B₆ は妊婦中期と授乳婦後期において、ナイアシンでは妊婦中期、末期、授乳婦後期において高値を示した。パントテン酸は妊婦中期から授乳婦後期まで、ビタミン C は授乳婦において低値を示した。ビタミン B₁₂、葉酸、ビオチンにおいて差はみられなかった。

3. 尿中排泄量基準値との比較

妊婦（初期・中期・末期）、授乳婦（前期・後期）における月齢ごとの尿中排泄量と本研究室で求められた若年成人の尿中排泄量基準値¹⁸⁾を比較した（図2）。排泄量基準値は食事摂取基準の推奨量に準じた食事をした場合の尿中排泄量を示している。吸収率や必要量の違いによって個人差があるため、基準値には下限値と上限値が策定されているが、今回は体内での必要量が満たされているかどうかを調べるため、下限値を用いた。つまり、基準値を上回ると体内での必要量が満たされており、基準値を下回ると体内での必要量が満たされていないと考える。

ヒトにおいて、ビタミン B₁₂ の尿中排泄量は、尿量に比例することが明らかになっており、基準値は策定されていないことから、本調査からは除外した。ビタミン B₆、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビオチンは基準値を上回り、ビタミン C は全ての群で、ビタミン B₁ は妊婦中期、末期において、ビタミン B₂ は妊婦初期、末期において基準値を下回った。

D. 考察

本調査では、健康な女子学生 74 名、妊婦 20 名、授乳婦 41 名を対象として、毎月 1 回 24 時間蓄尿を行い、24 時間尿中に含まれる 9 種類の水溶性ビタミンの測定を行った。これらの値について非妊娠、非授乳女性（女子学生）と妊婦（初期、中期、後期）、授乳婦（前期、後期）で比較した。対象者の体位は日本

人の食事摂取基準（2010 年版）¹⁹⁾ で定められた基準体位とほぼ一致した。栄養素等摂取量においては、エネルギー摂取量は推定エネルギー必要量（EER）より低値であったものの、たんぱく質エネルギー比、総脂質エネルギー比、炭水化物エネルギー比は摂取基準に定められた範囲内であった。このことより、本調査の対象者は標準的な食生活を送っており、特に偏りのある集団ではないと考えられる。

尿中排泄量を女子学生と妊婦（初期・中期・末期）、授乳婦（前期・後期）で比較した。ビタミン B₁ は妊婦末期において尿中排泄量が低下し、基準値を下回った。これは体内での必要量が増加したため、尿中に排泄される分が体内で利用され、排泄量が減少したためと考えられる。ビタミン B₁ はエネルギー代謝に必要とされるため、体重の増加に伴う基礎代謝量の増加がみられる妊婦末期において、エネルギー必要量の増加とともに、ビタミン B₁ 必要量も増加したものと考えられる。ナイアシンは妊婦中期、末期において尿中排泄量が増加し、基準値を 3 倍近く上回った。妊婦ではトリプトファン-ナイアシン転換率が 2~3 倍に上昇することが明らかとなっている²⁰⁾。そのため、妊婦では体内でのナイアシン必要量が満たされており、過剰分が尿中へ排泄されたと考えられる。パントテン酸は妊婦中期から授乳婦後期にかけて、ビタミン C は授乳婦において排泄量が減少した。授乳婦では尿の他に、母乳への分泌が考えられる。パントテン酸とビタミン C は母乳への分泌量が特に多く、それぞれ摂取量の 40%、63% が母乳中へ分泌される。そのため、母乳に分泌されたパントテン酸、ビタミン C の体内での必要量が増加し、授乳婦の尿中排泄量が減少したと考えられる。また、妊婦中期から末期にかけて、パントテン酸の尿中排泄量が減少している。妊婦中期と末期においては妊婦

のエネルギー要求量は大きく増加する。パントテン酸はエネルギー要求量の増加に伴い、必要量が増加するという代謝特性を持つと考えられており、妊婦中期と末期におけるエネルギー要求量の増大に伴い、パントテン酸必要量も増加し、尿中への排泄量が減少したと考えられる。

尿中排泄量は摂取量により大きく変動するため、さらに各水溶性ビタミンの摂取量を考慮する必要がある。

E. 健康危険情報
特記する情報なし

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. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献

1. Bingham SA. Urine nitrogen as a biomarker for the validation of dietary protein intake. *J Nutr* (2003) 133, 921-4
2. Tasevska N, Runswick SA, McTaggart A, Bingham SA. Urinary sucrose and fructose as biomarkers for sugar consumption. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2005) 14, 1287-94.

3. Tasevska N, Runswick SA, Bingham SA. Urinary potassium is as reliable as urinary nitrogen for use as a recovery biomarker in dietary studies of free living individuals. *J Nutr* (2006) 136, 1334-40.
4. 柴田克己. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金, 循環器等生活習慣病対策総合研究事業, 日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンス構築に関する研究—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—, 平成 19 年度総括・分担研究報告書. (2008).
5. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準 (2005 年版), 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書. (2004).
6. 科学技術庁資源調査会編. 日本食品成分表の改定に関する調査報告—五訂日本食品標準成分表—大蔵印刷局, 東京 (2000).
7. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己. 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位, *食品衛生学雑誌* (2004) 45, 231-8.
8. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. New metabolites of rivoflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) 258, 5623-8.
9. Gregory JF, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) 32, 879-83.
10. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem*

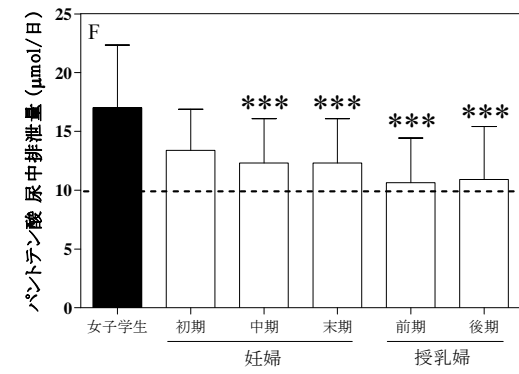
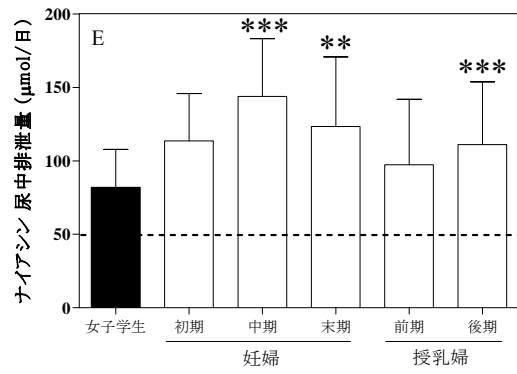
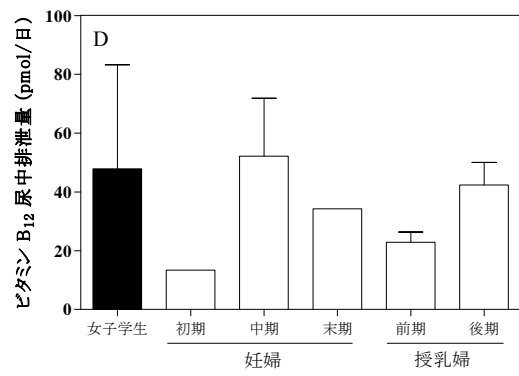
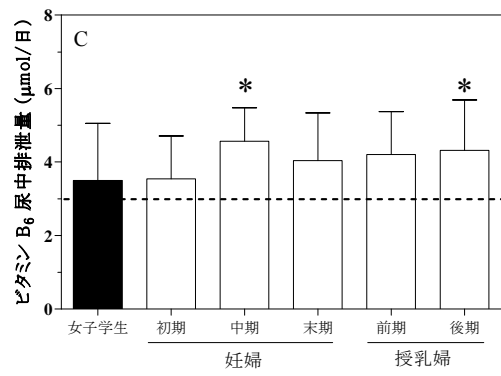
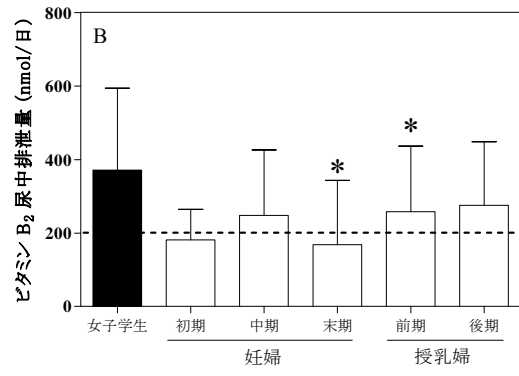
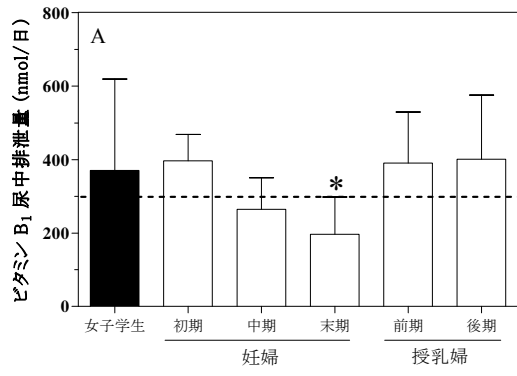
- (1998) 46, 5177-80.
11. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
 12. Shibata K. Ultramicro-determination of *N*¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 99-604.
 13. Takahashi K, Fukuwatari T, Shibata K. Fluorometric determination of pantothenic acid in human urine by isocratic reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal of Chromatography B* (2009) 877, 2168-2172.
 14. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44, 361-70.
 15. Wright LD, Skeggs HR. Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* (1944) 56, 95-8.
 16. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* (1994) 40, 491-8.
 17. Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S. Specific Determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high performance liquid chromatography. *Anal Chem* (1992) 64, 1505-7.
 18. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準 (2010年版), 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書. (2009).
 19. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto M, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N. 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* (2005) 51, 319-28.
 20. Fukuwatari T, Murakami M, Ohta M, Kimura N, Jin-No Y, Sasaki R, Shibata K. Changes in the urinary excretion of the metabolites of the Tryptophan-Niacin pathway during pregnancy in Japanese women and rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (2004) 50, 392-8.

表 1. 被験者の身体的特徴

	女子学生 (n = 74)	妊婦 (n = 20)	授乳婦 (n = 41)
年齢 (歳)	20.1 ± 2.3	30.3 ± 3.4	31.4 ± 3.4
身長 (cm)	158.2 ± 5.0	159.3 ± 4.8	158.7 ± 5.3
体重 (kg)	50.7 ± 5.2	54.4 ± 8.7	50.6 ± 5.1
BMI (体重 kg/身長 m ²)	20.2 ± 1.7	21.4 ± 2.7	20.1 ± 1.9
栄養素等摂取量			
総エネルギー (kcal/day)	1716 ± 317	1831 ± 467	1978 ± 435
たんぱく質エネルギー比 (%)	13.6 ± 1.8	12.5 ± 3.9	13.2 ± 2.4
脂質エネルギー比 (%)	30.5 ± 4.9	26.4 ± 8.9	26.6 ± 5.7
炭水化物エネルギー比 (%)	55.9 ± 5.4	52.9 ± 15.9	57.1 ± 9.5

値は平均値 ± 標準偏差で示した。

栄養素等摂取量は、DHQ より算出した最近 1 ヶ月間の平均的な栄養素等摂取量を示す。



次項に続く

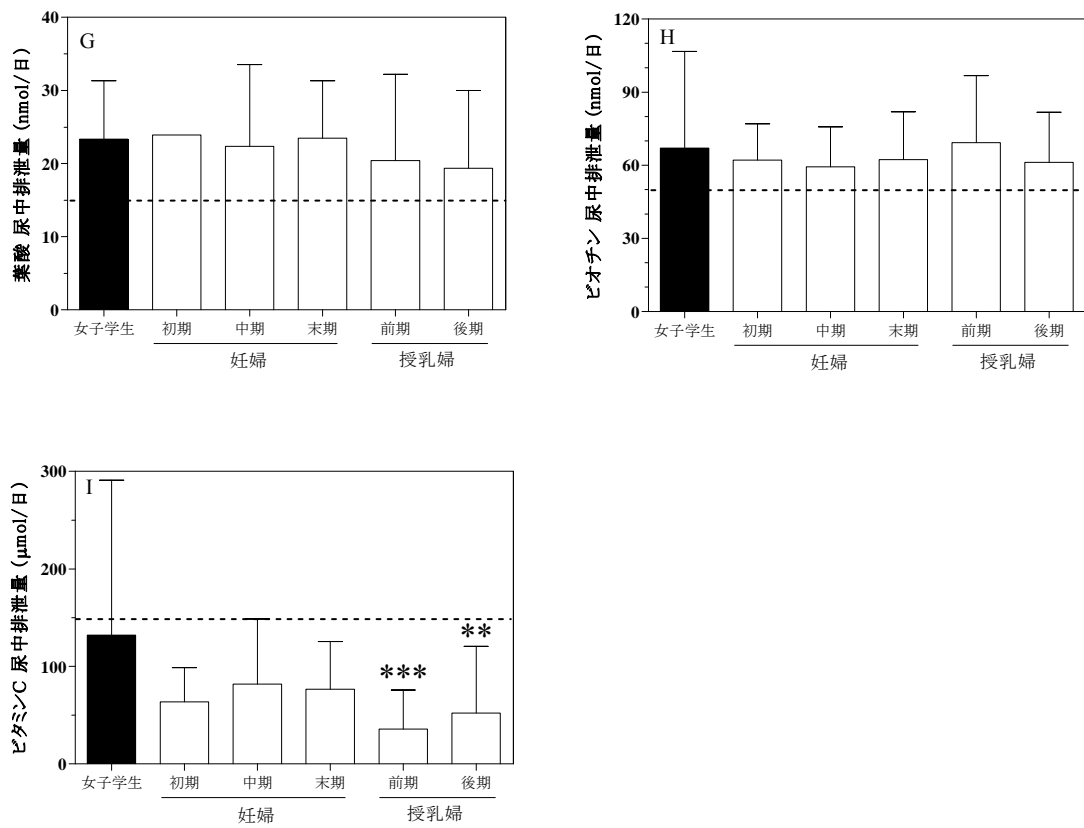


図1. 女子学生, 妊婦, 授乳婦におけるビタミンB₁ (A), ビタミンB₂ (B), ビタミンB₆ (C), ビタミンB₁₂ (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H), ビタミンC (I) 尿中排泄量. 値は平均値 ± 標準偏差として示した. 点線は尿中排泄量基準値 (下限値) を示した. *は女子学生との間に有意差があることを示す. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)