

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

7. 妊婦，授乳婦における水溶性ビタミンの排泄率調査

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

我々は学童，大学生，高齢者を対象として水溶性ビタミンの摂取量と尿中への排泄量との関連性を検討し，いずれの年齢階層においても尿中排泄量は摂取量を反映することを明らかにしてきた．本調査では妊婦，授乳婦における水溶性ビタミンの摂取量と尿中排泄量の関係を明らかにすることを目的とした．妊娠および授乳期間中の女性を対象とし，毎月一度，自記式食事歴法質問票（DHQ）の記入と 24 時間尿の採尿を継続して実施し，水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量の推移を追跡調査した．さらに摂取量と尿中排泄量の関係から尿中排泄率（尿中排泄量 / 摂取量 × 100）を算出し，その値を非妊娠・非授乳女性（女子学生）と比較することにより，妊娠や授乳が水溶性ビタミンの代謝におよぼす影響を検討した．ビタミン B₁，ビタミン B₂ の尿中排泄率は妊婦末期においてが低下したことから，妊娠末期におけるこれらのビタミンの必要量増加が示唆された．妊婦においてナイアシンの尿中排泄率が顕著に増加し，トリプトファン-ナイアシン転換率の上昇を示す結果となった．パントテン酸，ビタミン C の排泄率は授乳期に低下した理由は，母乳への分泌量が多いためであると考えられる．

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。水溶性ビタミンについても、平成15年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究」および平成18年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究」で行われたヒト介入試験^{4,5)}によって、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を鋭敏に反映することが明らかにされた。さらには、平成19年度厚生労働科学研究費補助金「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」⁶⁾で行われた自由に日常生活を営んでいるヒトを対象とした調査でも、ビタミンB₁₂、ビオチンを除く7種類の水溶性ビタミンについて、摂取量と尿中排泄量との間に相関が認められた。

妊娠や授乳期間中は代謝が亢進し、必要量が増加しているとの考えから、日本人の食事摂取基準（2010年版）⁷⁾ではエネルギー、たんぱく質、脂質、ビタミンKを除く12種類のビタミン、マグネシウム、鉄、銅、亜鉛、セレン、ヨウ素、カリウムについて付加量が設定されている。しかしながら、ビタミンに関して、妊婦や授乳婦で必要量が増加していることを示した科学的根拠は乏しい。したがって、本研究では、妊婦および授乳婦の水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量との関係を検討し、妊娠や授乳がビタミンの代謝におよぼす影響を明らかにすることを目的

とした。

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（女子学生）105名について食事調査と採尿を実施した。

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もの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⁸⁾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うよう依頼した。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处理をし、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 1M 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 B₂

リボフラビン量として示した。尿 4.5 mL に 1M 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¹⁰⁾。

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 1M 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¹¹⁾。

ビタミン B₁₂

シアノコバラミン量として示した。尿 900 μ L に 100 mM 酢酸緩衝液(pH4.8) 180 μ L, 超純水 680 μ L, 0.0025%シアン化カリウム溶液 20 μ L, 10%メタリン酸 20 μ L を加え、120°C で5分間オートクレーブ処理を行った。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¹²⁾。

ナイアシン

ニコチンアミド, N¹-メチルニコチンアミド

(MNA), N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N¹-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 1M 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-Py¹³⁾, および MNA 含量¹⁴⁾ を測定した。

パントテン酸

尿 4.5 mL に 1M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した後、HPLC 法にて測定した¹⁵⁾。

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¹⁶⁾。

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 を加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した¹⁷⁾。

5. 尿中排泄率の算出

これまでの研究でビタミン B₁₂を除く8種類の水溶性ビタミンは摂取量に比例して尿中排泄量も変動することが明らかになっている^{4,5)}。そこで、女子学生と妊婦(初期, 中期, 末期), 授乳婦(前期, 後期)のビタミン摂取量の違いを補正するために、尿中排泄率(尿中排泄量 / 摂取量 × 100)を算出した。

6. 統計処理

DHQ より算出した水溶性ビタミン摂取量とその尿中排泄量, 尿中排泄率の解析には GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA) を用いた。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。また、摂取量と平均推定必要量 (EAR)、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、栄養素等摂取量を示した。

女子学生 (20.1 ± 2.3 歳) と比べて、妊婦の年齢は 10.2 歳、授乳婦の年齢は 11.3 歳高かった。胎児の成長にともない妊婦の体重は増加した。身長は妊婦、授乳婦ともに女子学生との間に差は認められなかった。

栄養素等摂取量では、総エネルギー量は女子学生 1716 ± 317 kcal、妊婦 1831 ± 467 kcal、授乳婦 1978 ± 435 kcal であった。食事摂取基準推定エネルギー必要量 (30~49 歳 女性 身体活動レベル I 1700 kcal) に付加量 (妊婦初期 +50kcal、中期 +250 kcal、末期 +450 kcal、授乳婦 +350 kcal) を考慮して比較すると、妊婦では初期、中期、末期のいずれにおいても食事摂取基準よりも低値で、授乳婦でも低値を示した。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いずれも食事摂取基準で示された範囲内であった。

2. 水溶性ビタミン排泄率の比較

女子学生、妊婦 (初期、中期、末期)、授乳婦 (前期、後期) における尿中ビタミン排泄率を図 1 に示した。妊娠末期のビタミン B₁、ビタミン B₂、パントテン酸排泄率は女子学生に比べて低く、ビタミン B₆、ナイアシンは妊婦で高値を示した。授乳婦のビタミン B₂、パントテン酸、葉酸、ビタミン C は女子学生よりも低値を、ナイアシンは高値を示した。

D. 考察

本研究では、女子学生 74 名、妊婦延べ 20 名、授乳婦延べ 41 名を対象として、DHQ による食事調査と 24 時間蓄尿を行い、水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量の間関係を調査し、尿中ビタミン排泄率を算出した。排泄率で比較することにより、摂取量の差を考慮することができる。また、排泄率は体内でのビタミン代謝を反映しているため、各ビタミンの栄養状態を評価することができる。つまり、排泄率の上昇は体内での必要量の低下を示し、排泄率の低下は体内での必要量の増加を示す。この排泄率を非妊婦・非授乳婦である女子学生と比較した。

「日本人の食事摂取基準 (2010 年版)⁷⁾」の基準体位 (19~29 歳) は身長 158 cm、体重 53 kg、BMI 21.2 であり、本調査の対象者の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。

摂取量と排泄量から排泄率を求め、女子学生、妊婦 (初期、中期、末期)、授乳婦 (前期、後期) において比較した。妊婦末期においてビタミン B₁、ビタミン B₂ の排泄率が低下した。ビタミン B₁、ビタミン B₂ はエネルギー要求量に応じて必要量が増大する。妊娠期の体重増加により、基礎代謝量が増大する妊婦末期では、エネルギー必要量が増加する。それに伴い、妊娠末期では体内でのビタミン B₁、ビタミン B₂ の必要量が増加している可能性が示された。ナイアシンにおいて妊婦は

女子学生に比べ、排泄率が 3 倍に上昇する。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になっている¹⁸⁾。そのため、体内での必要量が十分に満たされ、尿中への排泄量が増加したと考えられる。また、ビタミン C とパントテン酸においては、授乳婦で女子学生に比べて低い排泄率を示した。日本人の食事摂取基準 (2010 年版)⁷⁾ では、母乳中のビタミン C 含量の値として 50 mg/L を採用している。哺乳量を 780 mL と仮定すると、1 日当たりの母乳中ビタミン C 含量は 39 mg/day となる。これは授乳婦のビタミン C 摂取量 (98 mg/day) の 40% に相当し、ビタミン C は母乳への分泌が顕著なビタミンであると考えられる。また、パントテン酸においては、母乳中含量は 5.0 mg/L となり、1 日当たりの母乳中パントテン酸含量は 3.9 mg/day となる。これは授乳婦のパントテン酸摂取量 (6.2 mg/day) の 63% に相当し、パントテン酸も母乳への分泌が顕著なビタミンであると考えられる。これより、授乳婦においてビタミン C、パントテン酸の排泄率低下が認められたのは、母乳への分泌によるものと考えられる。

本調査において、女子学生の水溶性ビタミン排泄率と比較して変動が見られたのは、妊婦ではビタミン B₁、ビタミン B₂、パントテン酸が低下し、ビタミン B₆、ナイアシンは増加した。授乳婦ではビタミン B₂、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビタミン C の 5 種類であり、ナイアシンのみが増加した。本調査結果より、妊婦、授乳婦における水溶性ビタミン必要量の推移のモデルを構築できると期待する。

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. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimura M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, 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.
5. Fukuwatari T, and Shibata K. Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* (2008) 54, 223-9.
6. 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, 平成 19 年度総括・分担研究報告書. (2008).
7. 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).
8. 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).
9. 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.
10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. New metabolites of rivoflavin appear in human urine. *J Biol. Chem* (1983) 258, 5623-8.
11. Gregory JF, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) 32, 879-83.
12. 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.
13. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
14. Shibata K. Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.
15. 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. *J Chromatography* (2009) 877, 2168-2172.
16. 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.
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. 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 ± 標準偏差として示した。

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。

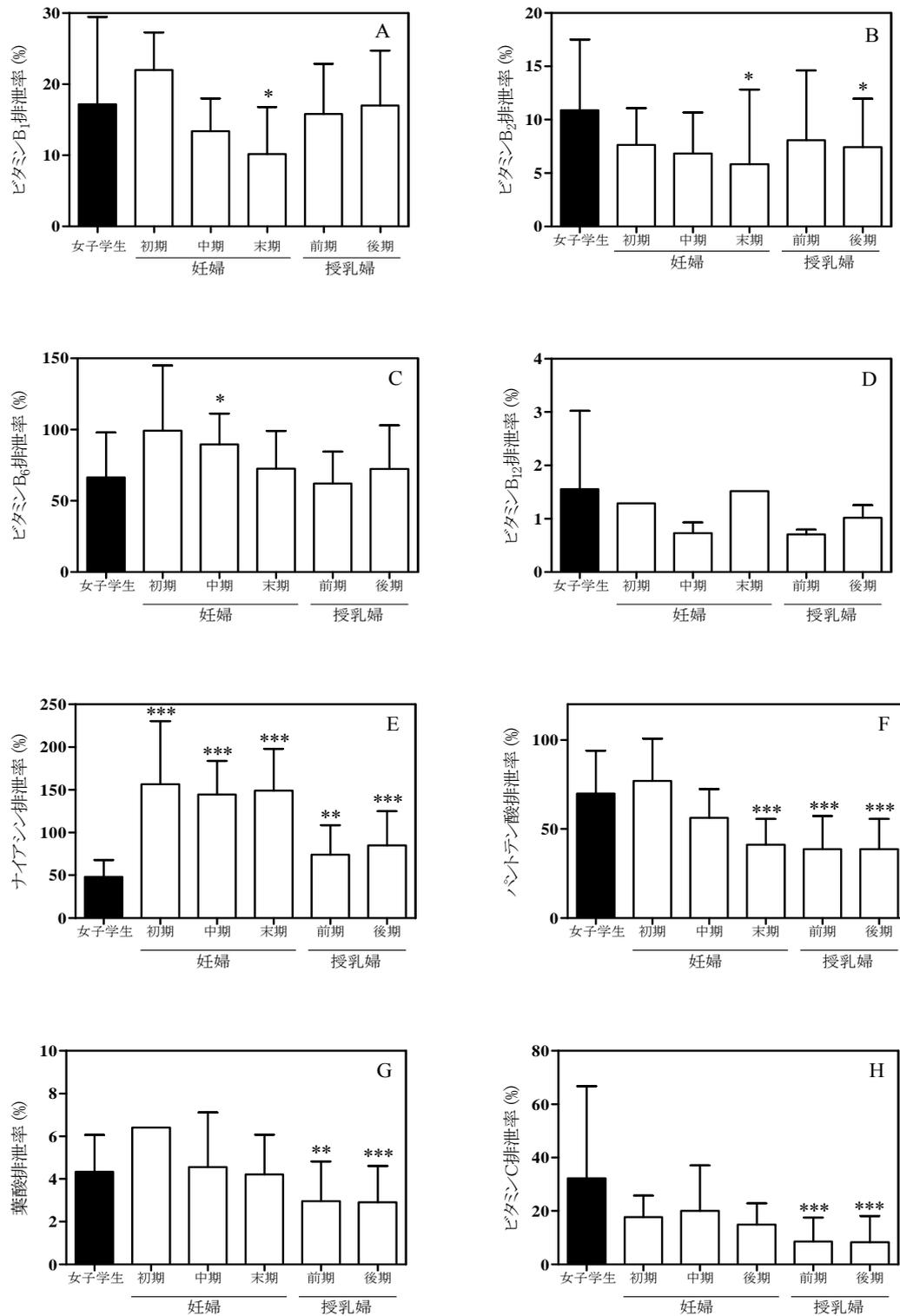


図1. 女子学生, 妊婦, 授乳婦におけるビタミンB₁ (A), ビタミンB₂ (B), ビタミンB₆ (C), ビタミンB₁₂ (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビタミンC (H) の尿中排泄率.

値は平均値 ± 標準偏差として示した. *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).