

指標アミノ酸酸化法 (IAAO法) を用いた 日本人成人男性におけるロイシン必要量の研究 (予備検討試験)

*児玉晃孝¹、高田和子²、速水耕介³、陳慶義¹、増澤陽子¹、秋月さおり¹、林幹朗¹、樋口智子¹、櫛木智裕¹、藤居亙¹、三本木千秋¹、加藤弘之⁴、小林久峰⁴、村上仁志⁴、Rajavel Elango⁵

¹国際アミノ酸科学協会、²東京農業大学、³横浜薬科大学、⁴味の素 (株)、⁵The University of British Columbia

背景及び目的

- 背景
 - かつて、アミノ酸必要量は窒素出納法により測定されていたが、その方法に起因する課題により低く見積もられるという課題があった。
 - その後、24時間指標アミノ酸酸化法、24時間¹³Cロイシン出納試験、たんぱく質組成からの推定、等によりアミノ酸の必要量が算出され、2007年にWHO/FAO/UNUから必須アミノ酸の推定平均必要量が報告された。
 - 現在、必須アミノ酸の摂取基準を設定している国・機関は、ドイツ・オーストリア・スイス、韓国、米国・カナダ、WHOにとどまり、日本では設定されていない。
 - 低侵襲型指標アミノ酸酸化 (Indicator Amino Acid Oxidation: IAAO) 法は、出納測定を行う必要がなく、アミノ酸必要量を正確に測定することができる方法である。
- 目的：
 - 日本において日本人を用いたIAAO法によるアミノ酸必要量評価を行うための予備試験として、被験食調製、被験食摂取、臨床検査、尿中安定同位体分析及び呼気中¹³CO₂排泄速度測定が適切に実施できることを確認する。

方法

被験者及び被験食摂取方法

- 被験者：健康成人日本人男性 (No.4：35歳、No.5：48歳)
- 評価対象アミノ酸：L-ロイシン
- 指標アミノ酸：L-[1-¹³C]フェニルアラニン
- 研究デザイン：オープン、クロスオーバー試験
- 被験食摂取方法
 - 適応期間 (2日)：たんぱく質 (1 g/kg/day) 及びエネルギー (安静時エネルギー×1.7) の日本の代表的な食事を摂取
 - 実験日 (3日目)：1晩の絶食後、20あるいは120 mg/kg/dayのロイシンを含む被験食 (1 gたんぱく質/kg/day) 及びエネルギー (安静時エネルギー×1.5) を1時間毎に1/12ずつ8回摂取
 - 実験日から次の適応期間開始まで4日間の間隔

被験食摂取及び測定ポイント

Hour	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Test meal	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲
Isotopes									
NaH ¹³ CO ₃				■					
L-[1- ¹³ C]Phe				♣	♣	♣	♣		
Samples									
Breath				♥♥♥♥♥				♥♥♥♥♥	
Urine				♦♦♦				♦♦♦	
VCO ₂					♠				

♣ (4h) L-[1-¹³C]フェニルアラニン (0.66 mg/kg)
♣ (4-7h) L-[1-¹³C]フェニルアラニン (1.22 mg/kg/h)
■ NaH¹³CO₃ (0.176 mg/kg)

測定項目及び方法

- 分時二酸化炭素排出量 (VCO₂) (mL/min)：連続開放回路間接熱量測定法により測定
- 呼気中¹³CO₂比率：呼気バッグで呼気を採取し、連続フロー方式安定同位体比質量分析計により測定
- 尿中L-[1-¹³C]フェニルアラニン比率：ポジティブエレクトロスプレーイオン化モードのトリプル四重極質量分析計により測定

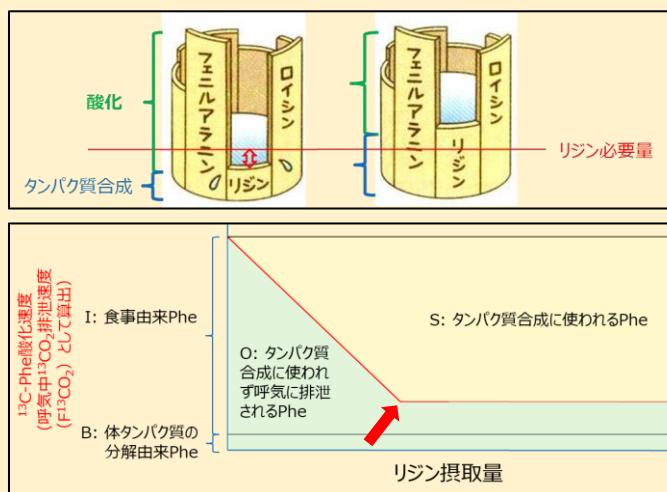
考察

- 本試験は、日本において日本人を用いたIAAO法によるアミノ酸必要量評価を行うための予備試験として実施された。
- 被験食は適切に調製され被験者に与えられた。臨床試験、臨床検査、尿中安定同位体分析及び呼気中¹³CO₂排泄速度は問題なく測定された。
- L-[1-¹³C]フェニルアラニンの酸化による呼気中¹³CO₂排泄速度に大きな個人差は認められず、Szwiegaらと同等の測定値であった。
- これらのことから、日本においてIAAO法を用いたアミノ酸必要量測定試験が実施可能であることが確認された。
- 今後、被験者数を増やし、6から7用量のロイシン摂取量によるIAAO法試験を実施し、日本人健康成人男性のロイシン必要量を推定する。
Szwiega, S et al., Dietary leucine requirement of older men and women is higher than current recommendations. Am J Clin Nutr 2021; 113:410-419.

謝辞

本試験は、汎用性を考慮して試験受託施設で実施し、有識者にアドバイザーとしてサポート頂き、高い科学レベルの試験を実施した。ジャパンフードテック (株) (被験食調製、品質試験)、CPCC (株) 及びチヨダパラメディカルケアクリニック (臨床試験、臨床検査)、大陽日酸 (株) 及び (有) イーエステック京都 (呼気分析)、積水メディカル (株) (尿分析) 及び (株) アイメックRD (統計解析) の試験担当者の皆様に感謝します。

IAAO法の原理



- ある必須アミノ酸 (ロイシン) が必要量に達しないと別のアミノ酸 (フェニルアラニン) が酸化により失われる量が増える (上図左)。必要量に達すれば酸化される量は一定になる (上図右)。
- フェニルアラニン量を一定にしてロイシンの量を変えた時、酸化により失われる量が一定になるポイント (ブレイクポイント、➡) がロイシンの必要量と推定できる (下図)。
- フェニルアラニンの中に¹³C-フェニルアラニンを加えてその酸化速度を測定し、呼気中¹³CO₂排泄速度 (F¹³CO₂) として算出する。

$$F^{13}CO_2 (\mu\text{mol/kg/day}) = [(FCO_2) (ECO_2) (44.6) (60)] / [(W) (0.82) (100)]$$

FCO₂：二酸化炭素生成速度、ECO₂：安定同位体の定常状態での呼気中の¹³CO₂比率 (APE)、W：体重 (kg)、44.6 (μmol/mL)、60 (min/h)；F¹³CO₂ (μmol/h)への変換定数、100：APEの画分への変換係数、0.82：重炭酸固定により体内に保持される二酸化炭素の補正係数

結果

被験食摂取

- 適応期間及び実験日において、全被験者は被験食を滞りなく摂取した。

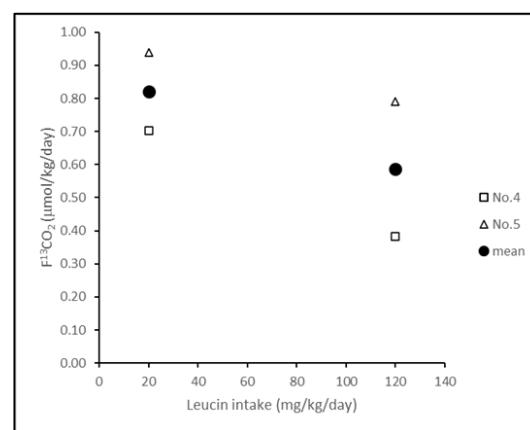
各種測定

- 呼気分析及び尿分析の測定において異常は認められなかった。

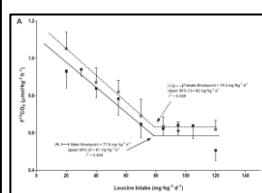
臨床試験

- 試験期間を通して、有害事象は認められなかった。

呼気中¹³CO₂排泄速度 (F¹³CO₂)



参考：Szwiega, S et al., 2021



- ロイシン120 mg/kg/dayに対して、20 mg/kg/dayでは約1.4倍の高値を示した。
- Szwiegaら (参考) と同等の測定値を示した。

研究倫理

本試験はUMINに登録され (UMIN000054129)、チヨダパラメディカルケアクリニック倫理審査委員会にて承認された (整理番号24031502)。

COI

高田和子、速水耕介、Rajavel Elangoは、国際アミノ酸科学協会とアドバイザー契約を締結している。