

ノ ー ト

^1H NMR の代謝実験への応用：リンゴ食が尿成分に与える影響の検討

立屋敷 哲*¹ 清水 美帆*¹ 戸栗 彩代*¹

Application of ^1H NMR Spectroscopy to a Metabolic Study: Effects of Apple Diet on the Amounts of Human Urinary Chemicals

Satoshi TACHIYASHIKI*¹, Miho SHIMIZU*¹ and Sayo TOGURI*¹

A study was made to uncover the dietary influence of apple diet on the chemical composition of human urinary excretion by using ^1H NMR spectroscopy. Three subjects participated in a 6 day metabolic study, where the first 3 days was a normal diet and the latter three days was an apple diet. The amount excreted of each metabolite in the urinary samples of the three subjects collected every half day was not always proportional to the creatinine content, except for citrate which showed a good linear relationship between them with $R^2=0.90$. The results suggested that no dietary influence was expected for endogeneous citrate in contrast to other metabolites. The amount excreted of each metabolite in every half day sample varied regularly depending on day or night: the amount during nighttime tended to be less than that during daytime, including creatinine for two subjects, while the reverse was observed for one subject, although the tendency was less regular. The amount of excreted metabolites increased appreciably with the apple diet for one subject, and was almost unchanged for the other two subjects. Principal component analysis of all the urinary samples gave a grouping corresponding to each subject on the principal component map. Urinary samples from each subject also had a tendency to gather in two groups depending on the period of apple diet or normal diet, and on day or night.

序

核磁気共鳴法 (NMR) はタンパク質の構造を含む有機物の化学構造の研究法として大変強力な方法であるが、様々な成分よりなる生体試料、食品などの化学種を同時に同定・定量する簡便な多成分同時分析法としても有用である^{1, 2)}。血液・尿の分析など臨床検査の手段としても利用が進んでおり³⁻⁵⁾、癌などの疾病の指標物質 (バイオマーカー) の検索などにも用いられている。最近では、 ^1H NMR スペクトル全体を統計的手法である多変量解析により解析することにより代謝物総体を計測・解析し、これを生理現象、疾患、病態などに直接結びつける ^1H NMR メタボミックスなる分野が注目され始めている⁶⁻¹⁰⁾。老化、高血圧、糖尿病といった生活習慣病や、癌の診断、病態把握にはバイオマーカーよりも代謝物全体の変動を観測しパターン認識する方法 (メタボロームプロファイリング) が有効と考えられている。ただし、

代謝物プロファイル分析をこのような目的に用いるためには代謝物の日々の変化、性別や国・文化などの因子による代謝物プロファイルの違いの有無を把握しておく必要がある¹¹⁻¹³⁾。

我々は今までに ^1H NMR を利用して食品・飲料中の各種成分の定量分析¹⁴⁻¹⁷⁾、食品の分子レベルでのキャラクタリゼーション¹⁴⁻¹⁷⁾、これらを利用した産地¹⁸⁾、品質・タイプ分析¹⁶⁾、不正表示に対する品質評価¹⁹⁾などの試みを行ってきた。体液の分析に関しても実際に血液、尿の分析を行い、その多成分同時分析法としての有用性を認めてはいたが、実際の代謝研究への応用には到っていなかった。このような分野のNMRによる最近の研究法は、600 MHz、750 MHzといった最新の高磁場 NMR 装置を用いた測定と、この測定値処理についての様々な自動化に基いたものである⁷⁻⁹⁾。NMR スペクトル全域を 0.02 ppm ずつ積分して 500 個の測定値に変換し、このものの全体を統計処理するというプロファイル解析が利用

*¹ 生物無機化学研究室, 女子栄養大学: Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Kagawa Nutrition University.

されている。これに対して、我々が今までに上記研究で行なってきた方法は、帰属が明らかにされている限られた数のシグナル高のみを計測するというものである。そこで今回、20~30個の限られた選別されたデータのみを用いて統計処理するという簡略化された手法が代謝実験に対しどの程度有用であるか明らかにするために、単一の食品だけを摂取することにより体重減を図る方法・単品ダイエットのひとつであるりんご食ダイエットを行なった際の尿成分の変化の有無を ^1H NMRにより追跡した。若い女性間で関心が高い様々なダイエット法の中で、単品ダイエットは摂取できる栄養素に偏りがあり、栄養学的には適切な体重減量法とは言えない。身体に何らかの変化が現れ、尿成分に影響する可能性があるかと推定される。

実験方法

代謝実験：健康な女子大生（21~22歳）3名を被験者とした。日常生活条件下、まず通常の食事（朝・昼・晩、1日3食）を3日間、次に夕食1食分をりんご2個のみ（ふじ、1個300g）に置き換えた食事（約270kcal）を3日間摂取させ、この6日間の尿を採取した。その際、飲料は水またはお茶類のみ自由摂取、特別な運動はしない、禁煙とし、朝夕の食事前には必ず排尿を行った。このりんご食による摂取熱量は通常の夕食の半分以下である。被験者の1日の食事は約1,600kcalであるので、りんご食は1日の必要熱量の17%となる。また、水を除くと摂取栄養成分の97%が炭水化物である。

尿試料：1日目の朝食以降を採取開始とした。排尿時には毎回、全尿を採取しメスシリンダーで測容した後、約4mlをガラスの密閉容器に移し直ちに冷凍保存した。各被験者について前日採取した尿のうち、朝食後から夕食前までの尿を昼間尿試料、夕食後から翌日の朝食前までを夜間尿試料として、測容した尿量に比例するように各保存尿を採取し混合調製した。

尿成分の分析：尿試料の0.54mlと内部標準DSS（0.01mol/l）の重水溶液0.06mlとを混和したものを測定に供した。 ^1H NMRは日本電子製JEOL-EX270フーリエ変換NMR分光測定装置でホモゲートデカップリング法にて測定した。測定は64回積算とした。得られたNMRスペクトルから、DSSのシグナル高に対する目的物質のシグナル高の相対値を、その成分含有量に比例する値として求めた。また、微量成分に関してはシグナルを拡大し、クエン酸に対する相対値を求め、元のスペクトル中のDSSのシグナル高に対する値に換算した。

主成分分析：（株）エスミ、EXCEL多変量解析 Ver. 4.0、主成分分析（相関行列）を用いた。

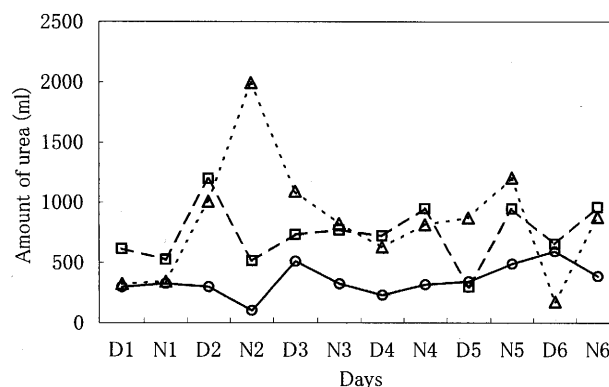


Fig. 1. Time course of the amount of urine in every half day during the metabolic study: ○, subject A; □, subject B; △, subject C. The D1, N1, ..., indicate the daytime and the nighttime samples at the 1st day, ..., respectively.

結果と考察

被験者の尿量の経日変化をFig. 1に示した。尿量は個人差も大きく変動幅も大きい、通常食時とりんご食時とで有意差はみられなかった。

尿の ^1H NMRスペクトル：尿の ^1H NMRの一例をFig. 2に示した。NMRスペクトル中の各NMRシグナルに対する化学シフト値は物質の種類に依存し、装置によらずほぼ一定である。そこで、既報の帰属結果⁸⁾を基に、本測定における尿中の成分として以下の物質が同定された：1.07ppm(d: doublet), イソブタン酸；1.21(d), 3-ヒドロキシブタン酸；1.27(s: singlet)；1.33(d), 乳酸；1.47(d), アラニン；1.92(s), 酢酸；2.02(s), N-アセチルグリコプロテイン；2.33(s), ピルビン酸；2.41(s), コハク酸；2.61(q: quartet), クエン酸；2.72(s), ジメチルアミン；2.83(s), トリメチルアミン；3.02(s), クレアチン・クレアチニン；3.23(s), コリン；3.26(s), トリメチルアミノオキシド (TMAO)；3.54(s), グリシン；3.75(s)；3.78(s)；3.92(s), クレアチン；3.96(d), 馬尿酸；4.03(s), クレアチニン；5.78, 尿素；6.56；7.10；7.37(m: multiplet), フェニルアラニン；7.54(d)・7.82(d), 馬尿酸；8.01；8.21；8.45(s), ギ酸。以上の成分のうち、数値のみを記したものは未同定のものである。尿試料中の成分濃度に比例するものとして、これらの物質のシグナル高を内部標準物質のDSSのシグナル高で除した値を求めた¹⁸⁾。更に、この値に昼間および夜間の総尿量(ml)を掛けたものを、その成分の昼夜の排泄量に比例する量とした。この値は内部標準DSSの濃度を基に質量に換算することも可能である¹⁴⁾。

各成分量の対クレアチニン量比：3人の被験者について、実験期間6日間の昼・夜尿試料の計36試料について、各成分量のクレアチニン量との相関を検討した。クレアチニンは筋肉中のクレアチリン酸の分解によって生じるクレアチンの排泄形態である。飲食物によって影

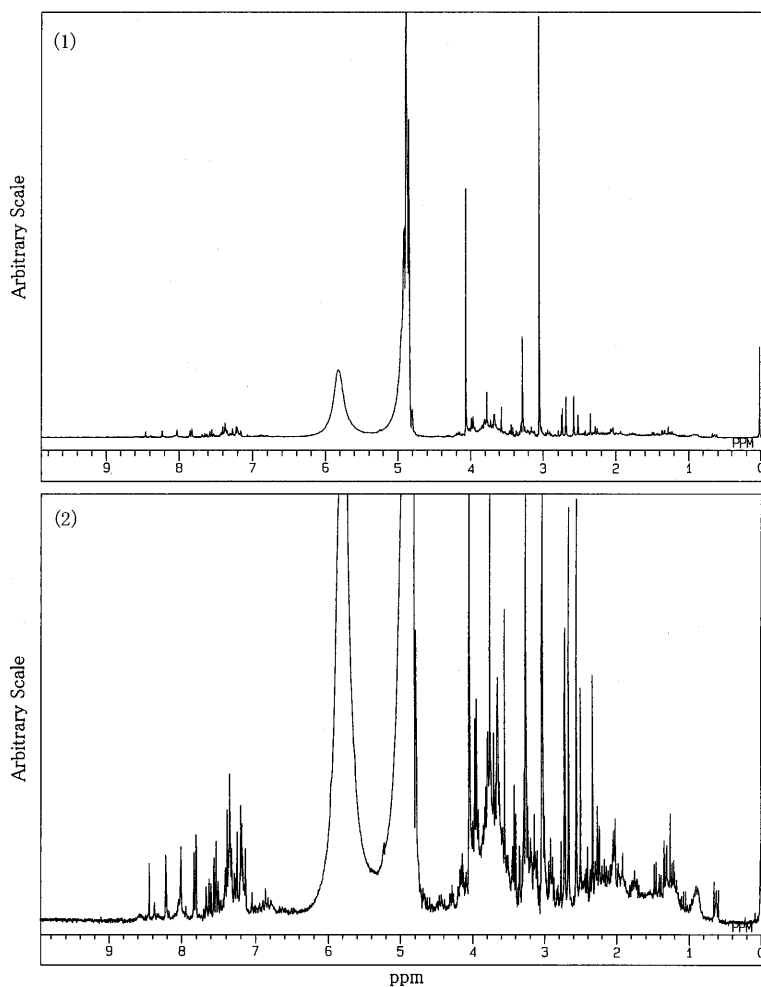


Fig. 2. ^1H nmr spectrum of urinary sample (D4) of subject B. (2) is a vertical expansion of (1). Assignments of signals in the spectrum are indicated in the text.

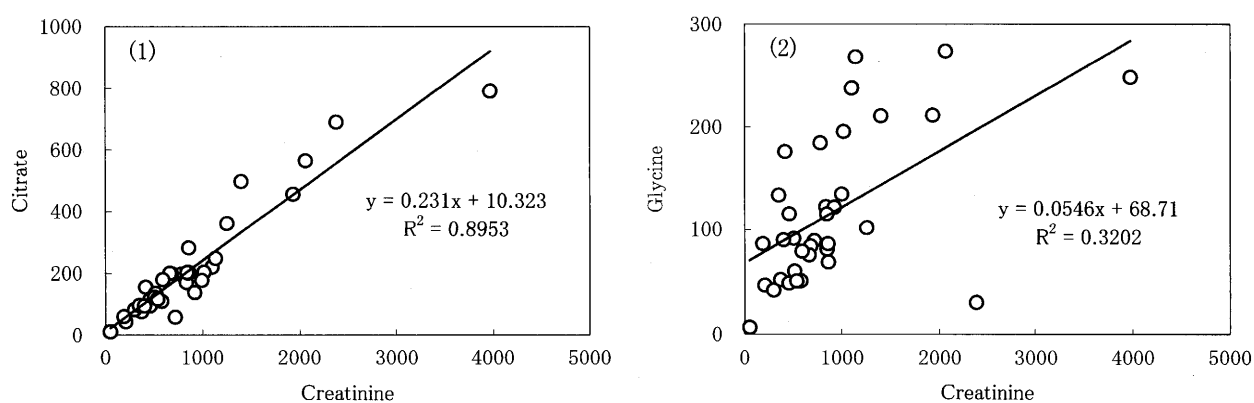


Fig. 3. Plots of the amounts of citrate (1) and glycine (2) against those of creatinine for all the urinary samples (32samples). Ordinate is a value of (Nmr signal height of a chemical component/DSS signal height) $\times$ (amount of urine (ml)). The value is proportional to the amount of the component.

響されず、人により一定していると理解されている。したがって、対クレアチニン比を検討することにより、各成分の飲食物依存性を知ることができると考えられる。この量比の相関をクエン酸、グリシンについて Fig. 3 に

示した。クエン酸量はクレアチニン量と 1:1 の大変良い対応をしている (Fig. 3. (1), $R^2=0.90$)。一方、グリシンでは相関は小さい (Fig. 3. (2), $R^2=0.32$)。他の成分はほぼこれら両者の中間に位置していた (下記)。尿

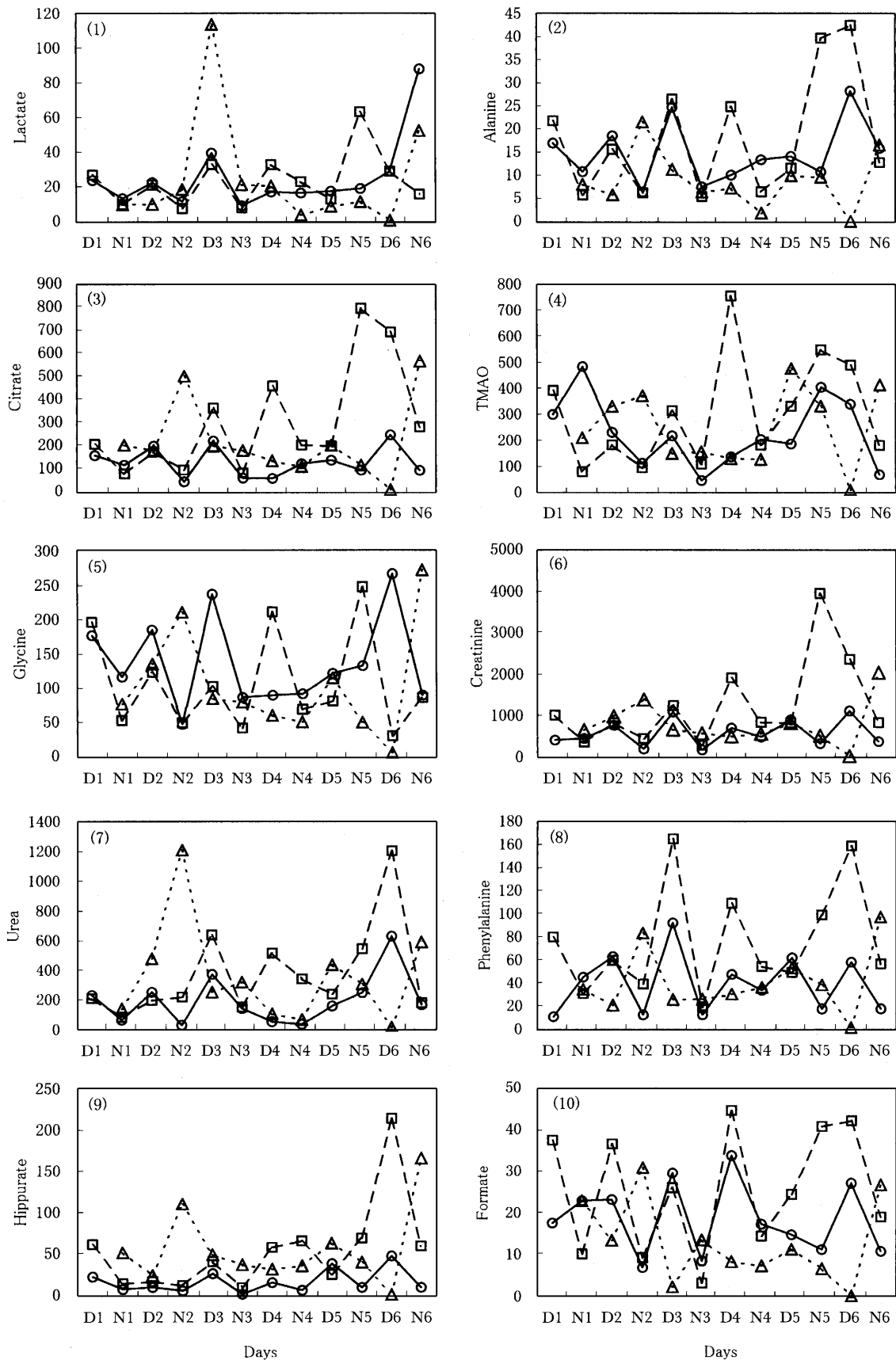


Fig. 4. Time course of urinary components every half day (day and night): $\bigcirc$, subject A; $\square$, subject B; $\triangle$, subject C. The D1, N1, ..., indicate the daytime and the nighttime samples at the 1st day, ..., respectively. (1) lactate, (2) alanine, (3) citrate, (4) TMAO, (5) glycine, (6) creatinine, (7) urea, (8) phenylalanine, (9) hippurate, (10) formate. Pyruvate showed a similar pattern of the time course to that of (8), and acetate, to that of (2). The ordinate is the same as that of Fig. 3.

成分で排泄量が飲食物の影響を受けずに一定であるものには、クレアチニンのほかに、体内でヘモグロビンの破壊が一定の速度で進行していることで生じるウロクロム、体内プリン体の代謝産物である内因性の尿酸などが知られている。ここで得られた結果は内因性のクエン酸も飲食物の影響を受けずに一定であることを示唆しており、このことが尿一般に成り立つ事実であるのか否かは興味深い。クエン酸は主たる代謝（異化）経路であるTCA回路の最初の生成物である。他の成分の R^2 は：1.28ppm（未同定シグナル），0.82；トリメチルアミン，0.74；アラニン，0.65；フェニルアラニン，0.58；ギ酸，0.58；1.09ppmのシグナル，0.51；ピルビン酸，0.50；酢酸，0.47；TMAO，0.46；馬尿酸，0.45；尿素，0.42；ジメチルアミン，0.39；1.21ppmのシグナル，0.34；グリシン，0.32；コハク酸，0.28；乳酸，0.14であった。これらの中で、尿素は摂取タンパク質量に依存、TMAOは魚肉摂取で高値を示し²⁰⁾、乳酸は運動後に嫌氣的代謝に基き増大することが知られている。ここで得られたこれらの物質とクレアチニンとの小さい相関係数はこのことと矛盾しない。

各成分量の昼夜ごとの経時変化：3人の被験者について、各尿成分の排泄量の昼夜ごとの経時変化をFig. 4に示した。Fig. 4.(6)はクレアチニン量の経時変化である。被験者Aでは、ほぼ、昼・夜・昼・夜と排泄量が夜に低くなるジグザクの規則的昼夜変動を示している。被験者Bについても、5日目を除けば同様のパターンとなっている。被験者Cについては、かなり不規則であり、むしろ夜に排泄量が増大する場合が見られた。このことは、昼に比べて夜は異化作用が低下する傾向にある一方で、代謝の状況は個人差・生理学的な違いが大きいことを示している。その他の各成分も大筋はクレアチニンと似たパターンの経時変化を示すが、被験者Bの5日目以外に、被験者Aについても成分により1, 4, 5, 6日目のいずれか、もしくは複数の日で昼よりも夜の方の排泄量が多くなっており（Fig. 4.(1)～(10)）、これらの成分については飲食物その他の要因が影響しているものと推定される。Fig. 5に尿中各成分の昼と夜の6日間平均値を示した。この図では、上述したように、AとBでは夜に排泄量が減少し、Cでは逆に昼に少ないことが明瞭に示されている。

以上のように排泄量の昼夜ごとの経時変化パターンは

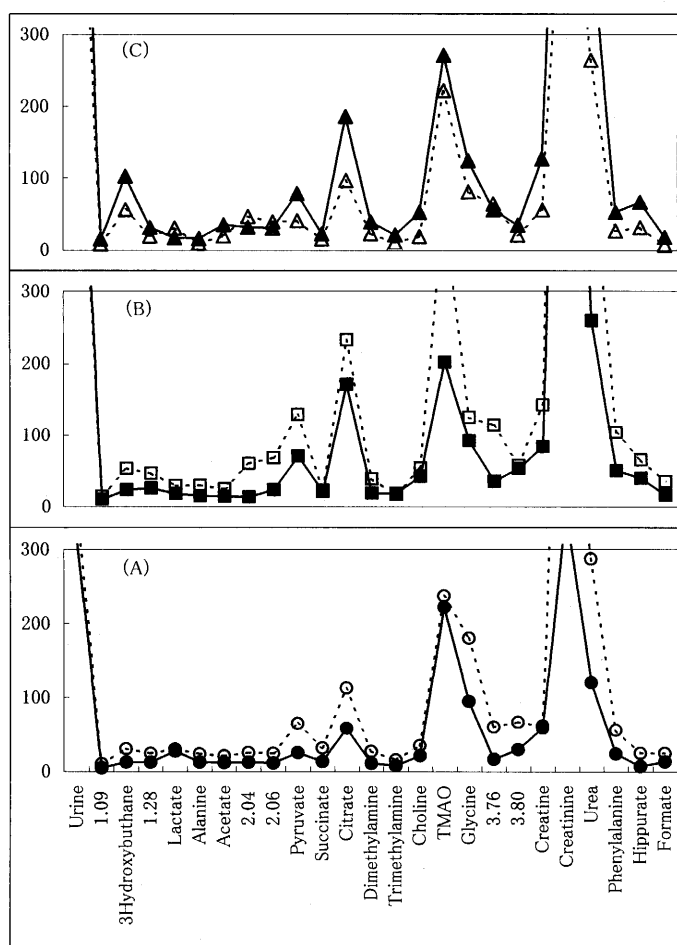


Fig. 5. Average values of urinary components in daytime and in nighttime during the metabolic study for each subject: ○●, subject A; □■, subject B; △▲, subject C. Open marks for samples of daytime, solid marks for nighttime. The ordinate is the same as that of Fig. 3.

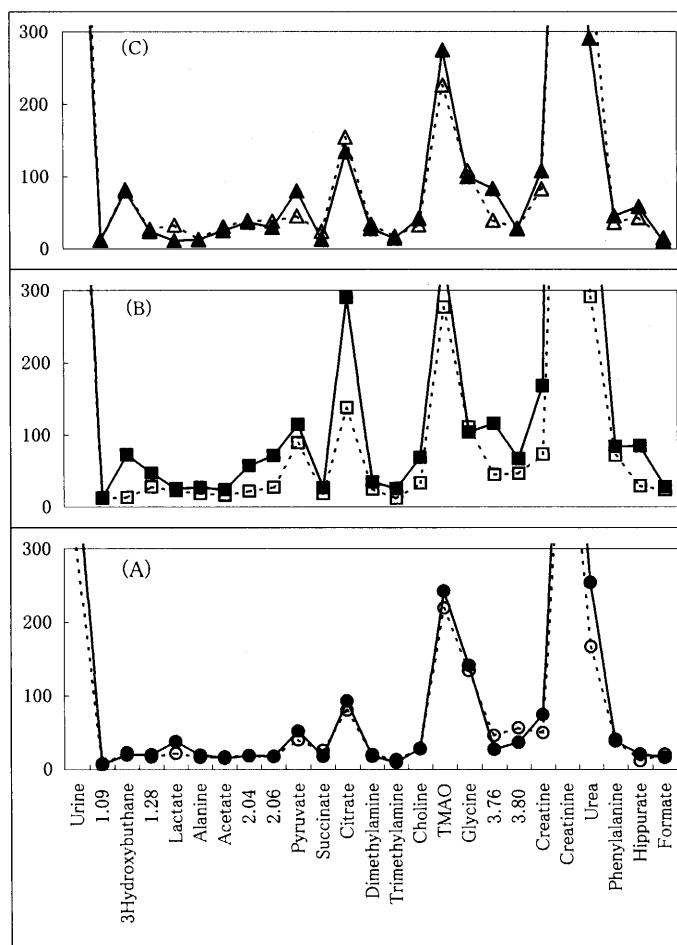


Fig. 6. Average values of urinary components in day and nighttime for each subject during the period of normal diet and the period of apple diet: ○●, subject A; □■, subject B; △▲, subject C. Open marks for samples in the period of normal diet, solid marks in the period of apple diet. The ordinate is the same as that of Fig. 3.

被験者AとBとで類似したが、排泄量の絶対値はこれと異なり、AとCとで比較的類似しており、A・CとBとはかなり異なっていた。Bはリンゴ食となる実験日の後半で特にピルビン酸、クエン酸、クレアチニン、フェニルアラニン、ギ酸の排泄量が多い傾向にあったが、AとCでは通常食期、リンゴ食期で明白な差は見られなかった (Fig. 4)。この結果は、酢酸、クエン酸、馬尿酸、乳酸、グリシンが被験者間で差が大きかったとの報告⁹⁾とは異なっている。Fig. 6に被験者別の通常食期、りんご食期の昼夜総平均値を示したが、Bではりんご食により尿中各成分排泄量が明白に増大しており、A、Cではわずかに増大～ほぼ不変であった。排泄されたクレアチニンの1週間分の総量は被験者A、B、Cでそれぞれ7,200, 15,100, 9,700と、BがA・Cよりかなり大きい値を示している。

主成分分析：各被験者あたり12個、3人分計36個の尿試料について測定全成分を用いて主成分分析を行なった (Fig. 7)。主成分1の固有ベクトルはすべての尿成分が0.08～0.22と正の値を持つことから、尿の「濃さ」

(成分全体としての排泄量の大きさ)に対応するものと解釈される。主成分2の固有ベクトルではコハク酸、グリシン、3.80ppmのシグナルなどが正の大きい値、馬尿酸、3-ヒドロキシブタン酸、2.04ppm、3.76ppmのシグナルなどが負の大きい値を持つが、この軸の意味づけはできていない。Fig. 7では、36個の尿試料は、グループ間の重なりはあるものの、ほぼ被験者別にグループを作っている。図中、主成分1の値が大きい (高排泄量の) 尿は被験者Bの22(N5)、23(D6)、および、被験者Cの28(N2)、36(N6)であり、Fig. 4.(4)中の大きな値に対応している。これらを除いた試料間では、被験者Cでは通常食期の尿は主成分2の値がリンゴ食期の尿より大きい側 (正方向)へ片寄って分布している。A・Bではグループ全体としてはそれぞれ右肩上がり分布となっているものの、その中で通常食期の尿はA・B共にわずかながらより正方向に分布する傾向にある。これらのことは、NMRを用いた方法で尿の個人差のみならず、通常食とリンゴ食による代謝の違いをある程度区別できる可能性を示している。Fig. 7に示されたような多成分分析における個人差、食物差による分布領域の広がり方は、代謝

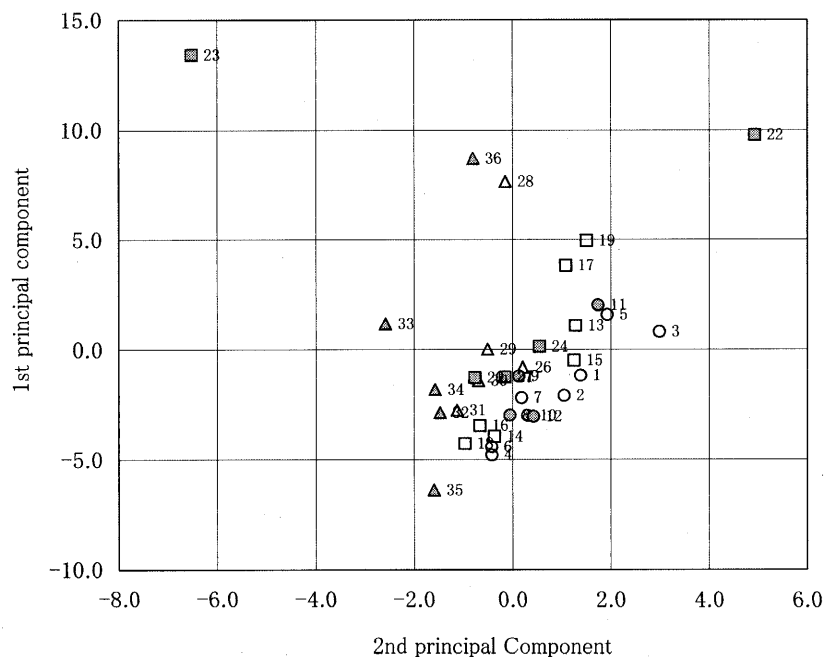


Fig. 7. The map of principal component analysis for all the urinary samples: ○●, subject A; □■, subject B; △▲, subject C. Open marks for samples in the period of normal diet, solid marks for period of apple diet. Sample numbers 1-36 in the map are in sequential order from daytime of 1st day to nighttime of 6th night of subject A (1-12), of subject B (13-24) and of subject C (25-36). Odd numbers indicate samples at daytime and even numbers at nighttime.

物プロフィール (Fig. 7 のような主成分分析図における分布位置) を疾患, 病態などと結びつける際の基礎データとなろう。

リンゴダイエットの結果: 実験 1 日目から終了日までの各被験者の体重変化 (kg) は以下の通りである。A: 46.1, 46.0, 45.8, 46.2, 45.8, 45.4, 46.0。B: 53.6, 53.2, 52.3, 52.6, 51.6, 51.6, 51.6。C: 57.2, 56.0, 56.2, 55.2, 56.0, 56.0, 56.0。A と C では期間中の体重変動は大変小さく, B のみが, 必ずしもリンゴ食の効果とは言えないが, 1 週間の間に 2 kg 体重減少した。このことは, 尿成分の排泄量の大きさや排泄量の経時変化の乱れが特に被験者 B の実験期間後半部分で大きかったこと (Fig. 4 および Fig. 7 中の試料番号 22, 23) とよく対応している。実験期間の後半では, 被験者 B のみならず A・C 共に, 手足の冷え, 不眠といった不定愁訴をした。しかしながら, 被験者 A, C については, 上記のように, 通常食期とリンゴ食期で Fig. 7 中のわずかな分布の偏りが見られた以外には尿中の各種成分量の明白な変化としては現われて来なかった (Fig. 6)。

今回の代謝実験は被験者, 期間共に少なく, また 1 サイクルのみの実験であったために結果に対する定量的な議論はできなかった。しかしながら, 今回目的とした ^1H NMR により代謝を追跡するという点については, 代謝の傾向・特徴が見て取れ, 代謝実験に NMR を用いることの有用性が確かめられた。

文 献

- 1) Tamate, J., Bradbury, J.H.: *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 1291-1302 (1985)
- 2) Cho, S.I., Bellon, V., Eads, T.M., Stroshine, R.L., Krutz, G.W.: *J. Food Sci.*, **56**, 1091-1094 (1991)
- 3) Iles, R.A., Hind, A.J., Chalmers, R.A.: *Clin. Chem.*, **31**, 1795-1801 (1985)
- 4) Brown, C.E., Battocletti, J.H., Johnson, L.F.: *Clin. Chem.*, **30**, 606 (1984)
- 5) 松下和弘: 新医療, **12**, 59-63 (1985)
- 6) Nicholson, J.K., Connolly, J., Lindon, J.C., Holmes, E.: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 153-162 (2002)
- 7) Foxall, P.J.D., Spraul, M., Farrant, R.D., Lindon, L.C., Neild, G.H., Nicholson, J.K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 267-276 (1993)
- 8) Nicholson, J.K., Foxall, P.J.D., Spraul, M., Farrant, R.D., Lindon, L.C.: *Anal. Chem.*, **67**, 793-811 (1995)
- 9) Holmes, E., Foxall, P.J.D., Nicholson, J.K., Neild, G.H., Brown, S.M., Beddell, C.R., Sweatman, B.C., Rahr, E., Lindon, J.C., Spraul, M., and Neidig, P.: *Anal. Biochem.*, **220**, 284-296 (1994)
- 10) Gall, G.E., Colquhoun, I.J., Defernez, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 692-700 (2004)
- 11) Lenz, E.M., Bright, J., Wilson, I.D., Morgan, S.R., Nash, A.F.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 1103-1115 (2003)
- 12) Lenz, E.M., Bright, J., Wilson, I.D., Hughes, A., Morrisson, J., Lindberg, H., Lockton, A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **36**, 841-849 (2004)
- 13) Stanley, E.G., Bailey, N.J., Bollard, M.E., Haselden, J.N., Waterfield, C.J., Holmes, E., Nicholson, J.K.: *Anal. Biochem.*

- 343, 195-202 (2005)
- 14) 立屋敷 哲, 佐々木弘子, 辻村 卓: 女子栄養大学栄養科学研究所年報, **6**, 207-213 (1998)
 - 15) 立屋敷 哲, 日笠志津, 辻村 卓: 女子栄養大学紀要, **29**, 53-60 (1998)
 - 16) 立屋敷 哲, 刈屋妙子, 辻村 卓: 女子栄養大学紀要, **30**, 97-105 (1999)
 - 17) 立屋敷 哲, 刈屋妙子, 辻村 卓: 女子栄養大学栄養科学研究所年報, **8**, 199-203 (2000)
 - 18) 立屋敷 哲, 刈屋妙子, 奥崎政美, 佐々木弘子, 石井 和, 辻村 卓: 女子栄養大学栄養科学研究所年報, **7**, 61-67 (1999)
 - 19) 立屋敷 哲, 望月綾子, 刈屋妙子, 木幡浩昌, 清水美帆, 辻村 卓: 女子栄養大学栄養科学研究所年報, **9**, 209-214 (2001)
 - 20) Avison, M.J., Rothman, D.L., Nixon, T.W., Long, W.S., Siegel, N.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6053-6057 (1991)