

である。したがって、(2-Py + 4-Py)/MNA排泄量比はアミノ酸栄養が悪いと低下する。この比はスポット尿(1ml)から可能であり、またMNA、2-Py・4-Py(同時定量)もHPLCを用いて簡単に測定できるため、アミノ酸栄養の指標として利用できる。ペラグラ患者ではこの排泄量比が1以下になる。正常者は2-3である。このことは、ペラグラ患者ではアミノ酸栄養も悪いのであろう。ちなみに、この排泄量比は過剰の遊離トリプトファンあるいはニコチン酸あるいはニコチンアミドを過剰に投与すると低下するので、従来いわれていたようなナイアシン栄養の指標として使うことはできない。ヒトに限ればナイアシンの供給源と良質のタンパク質の給源は両者ともに、獣鳥魚肉類であるために、混同されていたのであろう。

5. 補酵素作用

酸化還元反応の補酵素:ニコチン酸およびニコチンアミドは、体内でNAD(P)となり、多くの酸化還元反応の補酵素として作用している。例えば、アルコールの代謝に関わるアルコール脱水素酵素、糖の代謝に関わるグルコース-6-リン酸脱水素酵素、クエン酸回路のピルビン酸脱水素酵素、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素など500種類程度の酵素が知られている。さらに、ATPの産生にも関与しており、1分子のNADHから電子伝達系と酸化的リン酸化系により3分子のATPが作られる。ビタミンC・Eを介する抗酸化系における最終還元物質はNADHあるいはNADPHである。また、脂肪酸の生合成、ステロイドホルモンの生合成など、生体の非常に多くの反応に関わっている。

NADの補酵素作用として、ユニークなものとしてウロカナナーゼがある。この酵素は、トランスウロカニン酸を4-イミダゾロンプロピオン酸に変換する酵素であり、酸化還元反応ではない。ト

ランスウロカニン酸はヒスチジンの脱アミノにより生成するが、皮膚の角質層に多量に存在しており、紫外線防御に関与している。ペラグラ皮膚炎(ナイアシン欠乏時に紫外線をあびることが原因で生じる皮膚炎)との関連で興味を持たれている。

6. 補酵素作用以外の作用

ADP-リボシル化反応:NAD⁺(ニコチンアミド-リボース-ADP)はADP-リボシル化反応の基質としても使われている。ポリADP-リボシル化を触媒する酵素、ポリADPリボース合成酵素は核に局在しており、核内の機能性タンパク質をポリADPリボシル化して、DNAの修復、DNAの合成もしくは細胞の分化に関わっている。モノADP-リボシル化反応は主に細菌毒素によって行われている。例えば、ジフテリア毒素はタンパク質合成に関わるElongation factor 2をモノADP-リボシル化し、その活性を失わせる。また、コレラ毒素や百日咳毒素は細胞内のアデニレートシクラーゼをモノADP-リボシル化して、細胞膜の定法伝達系を攪乱させる。

cADP-リボースはカルシウムの移動に関与している。

7. 欠乏症はどのようにして起こるのか

ペラグラはナイアシンの欠乏症と一般的には考えられている。ニコチン酸、ニコチンアミドは抗ペラグラ活性を有する代表的な化合物である。ニコチンアミドはビタミンの中では例外的にトリプトファンからも生合成されている。われわれ日本人が日常的に摂取している食事では、ニコチンアミドそのものとトリプトファンから体内でニコチンアミドに変換される量は、ほぼ同じである。トリプトファンからニコチンアミドの変換にはビタミンB₂、ビタミンB₆、ニコチンアミドが関与しており、さらにビタミンB₁も関与している可能性が示唆されている。したがって、ペラグラ

はこれらのうちの一つもしくは複合的な不足によって起こる。ペラグラの主症状は、皮膚炎 (dermatitis), 下痢 (diarrhea), および精神神経症状 (dementia) である。したがって、英語の頭文字をとって、「3D症」と呼ばれることもある。ただし、初期状態としては食事不振、体重減少、めまい、抑鬱状態などであり、特徴的ではない。ペラグラの皮膚炎症状は、日光に露出する部位に左右対称に発生することが特徴である。胃腸症状としては下痢のほかに食欲不振、嘔吐、腹痛、低(無)胃酸症などが知られている。口腔粘膜や舌も発赤腫張をする。精神神経症状として、痴呆のほかに知覚異常、運動障害、幻覚など多彩な症状が出現する。ペラグラ患者は日本ではアルコール多飲者の中にみられることがある。生化学的にはニコチンアミドの異化代謝産物であるMNA, 2-Py, 4-Pyの尿中への排泄量がペラグラ患者では正常者に比して顕著に低下する。また、(2-Py+4-Py)/MNA排泄量がペラグラ患者では1以下となる。さらに、血液中のNAD値も低下するようである。

ペラグラ患者にニコチン酸、ニコチンアミドを投与すると治癒することが発見されてから、約60年が過ぎた。現在までに、ニコチン酸、ニコチンアミドの補酵素作用については、ほぼ解明されたといっても過言ではないと思われるが、抗ペラグラ活性についての解明は、緒についたばかりの感がある。すなわち、皮膚炎については、トリプトファン代謝産物であるN-ホルミルキヌレニン、キヌレニン、3-ヒドロキシキヌレニンが光増感作用をもっていることから、これらの化合物の蓄積との関連が考えられている。下痢症状は一般的には小腸粘膜細胞の細胞内cAMP濃度が上昇して、イオンの能動輸送に影響をおよぼし、Na⁺と水を腸に大量流出させ

ることによって生ずる。このcAMPの生成を調節しているタンパク質がモノADP-リボシル化されると、cAMPの生成の抑制がきかなくなり上昇する。精神神経症状に関しては、トリプトファン代謝産物であるキノリン酸の作用ではないかとされる説がある。キノリン酸は興奮性神経伝達物質のグルタミン酸に対する受容体を活性化させる興奮毒として作用している。また、ラットでは脳内各部位におけるキノリン酸代謝酵素(キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ)の活性の高低と、キノリン酸による神経障害の程度との間には逆相関のあることが見出されている。これらの解明は早期になすべき重要な課題である。さらに、トリプトファンからのナイアシン生成量はタンパク質摂取量に応じて増加するものと考えられているが、増加しないというデータもある。この問題についても、その方法論を含めて再度検討し直す必要がある。

8. 薬理作用

ニコチン酸とニコチンアミドの生理作用は全く同じであるが、(これは、ニコチン酸が肝臓ですばやくNAD⁺を経由してニコチンアミドとなり、全身に送られるためである)薬理作用は全く異なる。

8-1. ニコチン酸の血清コレステロールおよび中性脂肪低下作用

米国のCoronary Drug Projectの報告によれば、冠状動脈性心臓病の患者にニコチン酸を毎日3g投与し続けると4ヶ月程で、血清中のコレステロール含量には10-20%の低下が、中性脂肪含量には50%の低下が認められたことを報告している。さらに、投与を続けてもこれ異常の低下は認められなかったと報告している。ニコチン酸のこの作用機序としては、脂肪組織の脂肪分解の抑制による遊離脂肪酸の血中への流出の減少、肝臓における超低密度

リポタンパク質 (VLDL) や低密度リポタンパク質 (LDL) の合成の低下, 内因性コレステロール排泄の増加, 組織中でのコレステロール合成の抑制, 脂質吸収の阻害などが提案されている。なお, ニコチンアミドにはこの作用はない。

8-2. ニコチン酸の血管拡張作用

ニコチン酸を大量に服用すると, 交感神経を介さずに血管平滑筋を直接弛緩させて, 血管を拡張させる。これは, ニコチン酸がプロスタグランジンE1の合成もしくは放出を促進させ, 結果としてcAMPレベルを上昇させることによると説明されている。

ニコチン酸を大量に服用すると副作用としてFlushingが起こる。これは, 血管拡張作用の結果として起こるものである。Flushingは血液中のニコチン酸濃度が上昇中にのみ起こるものであって, たとえ高濃度であっても一定のレベルに保たれている時には起こらない。

話は変わるが, ニコチン酸を主成分とする混合製剤が肉の発色剤 (赤身の肉の鮮やかさを長く保つために使用されていた) として使用され, そのような肉を食べて, 一過性の顔面紅潮, 上半身のほてり (たまに下半身), かゆみなどのいわゆるFlushing症状を訴える例が昭和57年~61年に報告されている。なお, ニコチン酸およびニコチンアミド (ニコチンアミドも肉の赤身を鮮やかに保つには有効) の食肉ならびに鮮魚類への使用は昭和57年には禁止されている。

8-3. ニコチンアミドの抗糖尿病作用

マウス, イヌ, サル, ラットなどの各種動物にストレプトゾトシンを投与すると糖尿病となる。しかし, これを投与する10~15分前に, あらかじめ大量のニコチンアミドを投与しておくこと, この糖尿病誘発を阻止することができる。ストレプト

ゾトシンを投与すると, 膵臓の島細胞中のNAD含量が低下するが, あらかじめニコチンアミドを投与することでこの低下を防げることから, ニコチンアミドの抗糖尿病作用の一つはNADの前駆体としての作用である。しかし, ニコチン酸には抗糖尿作用はない。膵臓ではニコチン酸からNADを合成できないからであろう。

8-4. ニコチンアミドの抗精神分裂病作用

精神分裂病は脳のある部位のNAD(P)欠乏症 (NAD(P)の生合成活性がきわめて弱い, NAD(P)の分解活性がきわめて強い) であるとする説がある。また, ニコチンアミドは幻覚誘発物質の生合成を阻止することによって, 抗精神分裂病作用を発揮するという説もある。Hofferは毎日1gのニコチンアミドの投与で改善が見られたと報告している。

9. 毒性

マウスおよびラットに対するニコチン酸の半致死量 (LD₅₀) は経口投与で5~7g/kg体重, 腹腔内投与で4~5g/kg体重である。一般的にニコチンアミドはニコチン酸の2倍の毒性を有する。これらの毒性の一部はMNA合成によるメチル基不足あるいはNAD合成によるATPおよび5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸 (PRPP) の不足によるものと考えられる。

ヒトにおける毒性は不明である。

II. 測定方法

1. 微生物を利用した食品中のナイアシン定量方法

1-1. 適用

ナイアシンとしてのビタミン効力のある化合物の総量 (ニコチン酸, ニコチンアミド, およびこれらのヌクレオチド型などの合計量) を一度に求めることのできる唯一の方法である。食品中のナイアシン総量を求めるための標準法となっ

ており、通常の食品のすべてに適用できる。ちなみに、日本食品標準成分表に記載されているナイアシン量は、この方法で求められた値である。

食品中の遊離の各ナイアシン関連化合物を個別定量するには、後述のHPLC法が適している。ただし、HPLC法でのリテンションタイムがスタンダードの化合物と一致しても、その化合物であるとは断言できないが、その画分をこの微生物定量法に供し、菌が生育すれば、それは確実にナイアシン化合物であると言えるので、同定の一助にもなる。

1-2. 原理

乳酸菌の一種である*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (旧名: *Lactobacillus arabinosus* 17-5) は、NADのde novo生合成経路を欠損しているため、生育にナイアシンが必須であり、その生育度は、一定の範囲内で培地中のナイアシン量に比例する。本菌においては、NADはニコチン酸からのsalvage経路によって生合成されている。ニコチンアミドは、本菌の有するニコチンアミダーゼ (EC 3.5.1.19) によって完全にニコチン酸へ変換されてから利用される1) ため、ニコチンアミドのビタミン効力は、ニコチン酸と等価になる。したがって、ナイアシン関連化合物を含まないナイアシン定量用の培地に測定試料を添加して本菌を一夜培養し、その生育度を分光光度計で測定するだけで、容易にナイアシン含量が求められる。

1-3. 微生物定量法で特に必要な試薬、器具および装置

i) 試薬類

◎*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014: 日本製薬(株)または米国のATCCから購入

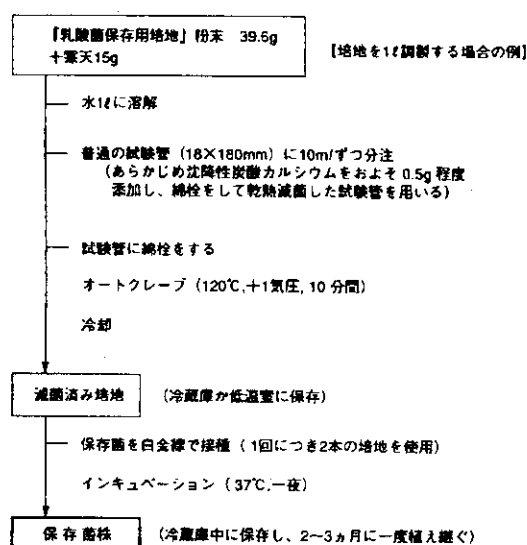
◎乳酸菌保存用培地: 日本製薬(株)から購入。組成は表II-1に示す。

表II-1. 乳酸菌用保存培地の組成

酵母エキス粉末	1.0 %
ペプトン	0.5
グルコース	1.0
酢酸ナトリウム	0.5
リン酸一カリウム	0.2
寒天	1.5

水を加えて、pH を6.8に調整後、100 mlにする。

図II-1に示した手順で乳酸菌の保存培養を行う。



図II-1. ナイアシン定量用乳酸菌*Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014の保存培養法

◎寒天

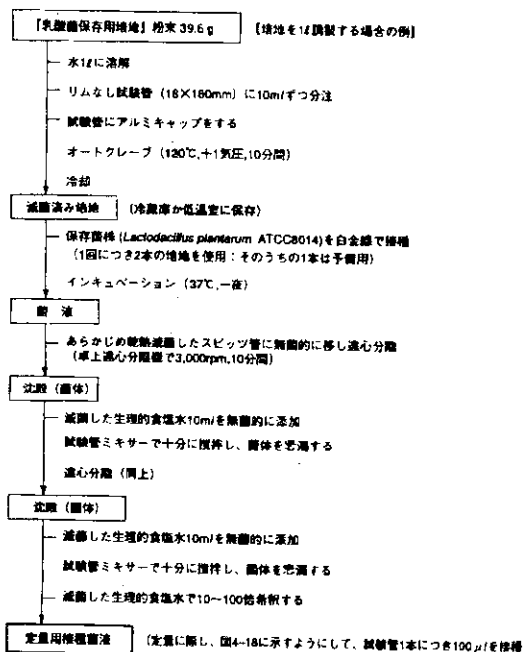
◎ナイアシン定量用培地: 日本製薬(株)から購入。組成は表II-2に示す。

表II-2. ニコチン酸定量用培地“ニッスイ”の成分組成

カザミノ酸“ニッスイ”	14 g	パントテン酸カルシウム	400 μ g
レシチン	400 mg	ピリドキシン塩酸塩	800 μ g
DL-トリプトファン	200 mg	リン酸二水素カリウム	1 g
アデニン塩酸塩	20 mg	リン酸一水素カリウム	1 g
グアニン塩酸塩	20 mg	硫酸マグネシウム	400 mg
ウラシル	20 mg	硫酸鉄 (II)	20 mg
チアミン塩酸塩	200 μ g	硫酸マンガン	20 mg
リボフラビン	400 μ g	酢酸ナトリウム (無水)	20 g
ビオチン	0.8 μ g	グルコース	40 g
<i>p</i> -アミノ安息香酸	200 μ g		

この混合粉末を必要量秤取し、水に溶解すると、その溶液のpHは自動的に6.8になるので、通常はpH調整の必要はない。

図II-2に示した手順でナイアシン定量用乳酸菌液の調製を行う。



図II-2. ナイアシン定量用乳酸菌液の調製法

◎ニコチン酸:市販の特級試薬を用い、標準液の標準原液として、1 mg/ml の濃度の水溶液を調製する。凍結保存すれば、長期間使用可能である。なお、正確な濃度は、前述の分子吸光係数から算出する。

ii) 器具類 市販の特級試薬

◎白金線: 乳酸菌移植用 (実際にはニクロム線で代用されることが多い)

◎白金耳: 同上

◎リム無し試験管 (18 x 180 mm)

◎同上用アルミキャップ

◎デイスペンサーピペット (Hitachi 3340型): 常に一定容量の菌液を接種するためのもの。

iii) 装置類

◎オートクレーブ

◎ホモジナイザー: 測定試料の均質化用 (Potter-Elvehjem型など)

◎卓上遠心分離器: 菌体分離用。冷却機能は必要としない。

◎高速遠心分離器: 測定試料調製用。冷却機能は必ずしも必要としない。

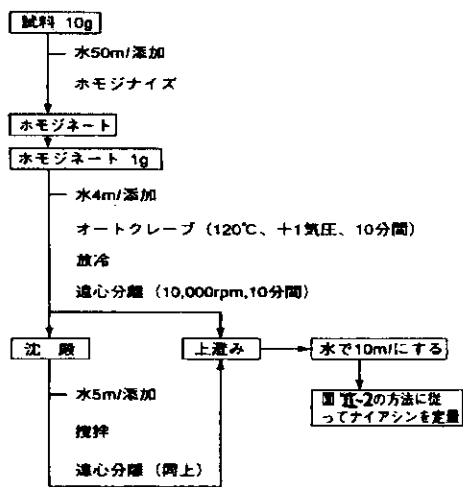
◎インキュベーター: 37 °Cの温度を一定に保つことができれば、孵卵器やウオーターバス・インキュベーターなど、どのようなタイプのもでもよい。

◎分光光度計: 菌体の吸光度測定用。540 ~ 680 nm の領域のいずれかの波長で吸光度が測定できればよい。タイムコースも測定したければ、米国Coleman 社製ジュニア型分光光度計が必要。

◎試験管ミキサー

1-4. 試料調製法

試料調製の具体的な方法の一例を、図II-3に示す。



図II-3. 食品中のナイアシン定量用試料の調製法

この最終抽出液から0.1 ml取り、ナイアシン定量用培地に加えると、食品100g当りのナイアシン量として5mg程度含まれているものであれば、検量線のほぼ中央付近 (85 ng) で定量できる。なお、この方法は感度が高いので、測定液に添加する試料量はごくわずかでよく、通常の試料においては脱色する必要はない。

可食部100g当りのナイアシン量は、ほとんどの食品で0.1～10mgの範囲に入るので、これを参考にして、測定試料の希釈率などを決める。動物性食品は、植物性食品よりも一般にナイアシン含量が高い。日本食品標準成分表によると、動物性食品中の最高値は、かつおぶしの45.0mg/100gであり、植物性食品では米ぬかの25.0mg/100gであるが、最低値は、両者ともゼロと表示されている。

実際に生体内では、大部分のナイアシンは補酵素型 (主としてNAD) として存在しているが、死後は急速に分解されてニコチンアミドとなる。動物体にはほとんど存在しないが、植物体においては、ニコチンアミダーゼ活性が高い

ので、さらにニコチン酸へと変換される。よって、ナイアシンの主体は、動物性食品ではニコチンアミドであり、植物性食品ではニコチン酸である。

1-5. 測定方法

i) 菌株の保存培養

図II-1に示す方法でこの培地を調製し、10mlずつ試験管に分注後、綿栓(もしくはモルトン栓)をして10分間オートクレーブした後、放冷して固めたものに、*L. plantarum* 菌体を白金線で穿刺し、37℃で18～24時間培養する。この菌は、比較的生命力が強く、冷蔵庫中であれば半年間くらい保存しておいても死滅しないようであるが、少なくとも3カ月に1回は植え継ぎをしながら保存することが望ましい。定量に使う直前には、2～3日間、毎日植え継いで、菌を活性化させる必要がある。

ii) 接種用菌液の調製

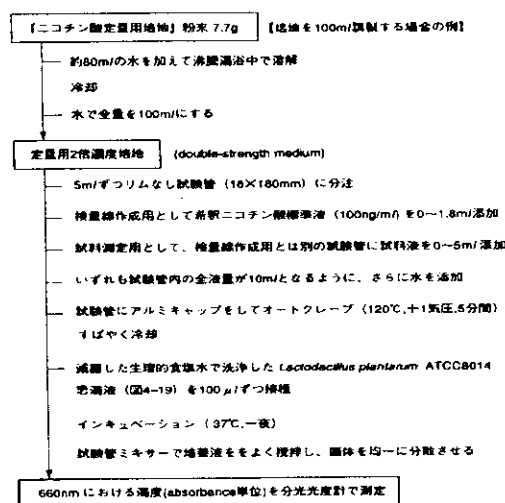
定量を行うに際し、まず図II-2の方法で接種用菌液を調製する。接種菌液の濃度は、1回の測定試料全体にわたって一定であっても、あまり濃いとハイブランクになり、あまり薄いと生育が悪くなる。適当な濃度にする必要がある。少し経験すれば、肉眼で菌液を見ただけで適切な濃度がわかるようになるが、一応の目安としては、100 μlずつ接種する場合、純水と比べてかすかに白濁している程度(660nmにおける透過度が90～95%くらい) がよい。

iii) 定量用培地の調製

L. plantarum の生育に必須の成分のうち、ナイアシンだけを除いた培地を調製すればよく、いままでに種々の培地が用いられているが、自分で各成分を一定量ずつ秤取して調製するよりも、あらかじめ調合済みの市販品の培地を使う方が、はるかに便利である。その一例として、日水製薬(株)から市販されているニコチ

ン酸定量用培地“ニッスイ”の組成を表II-2に示す。なお、この微生物定量法に必要な菌株である *L. plantarum* も同社から入手できる。もちろん米国の ATCC (American Type Culture Collection) から直接購入することも可能である。この培地は、いつでも容易に入手でき、50g入り1瓶で標準法なら130本分、1/2スケール法なら260本分の量である。この粉末を熱水に溶解するだけで定量用培地ができ、きわめて便利である。培地に同封されている説明書には、『溶解後、pHを6.8 ± 0.1 に補正すること。』となっているが、通常は単に加熱した脱イオン水に溶解するだけで培地のpHはこの範囲になり、わざわざpHを調整する必要はない。

この培地のブランク値は非常に低く、自分で各化合物を調合して定量用培地を調製した場合には、これほど低いブランク値を得るのは容易でない。この定量用培地を5mlずつ試験管に分注する。検量線用としては、各試料管にニコチン酸（ニコチンアミドでも、同様の結果が得られる）を0～180ng加え（使用直前に、1mg/mlのニコチン酸標準液の標準原液を希釈して100 ng/mlの標準液を調製し、それを0～1.8 ml加える）、適切に希釈した試料液は、別の試験管に加える。さらに水を加え、各試験管内の全液量は、すべて正確に10mlとする。これらの操作法をまとめて図II-4に示す。



ここに示した 10 ml / 法では、検量線は、ニコチン酸が少なくとも 0～180 ng/Tube の範囲で直線になる。

図II-4. 食品などに含まれているナイアシンの微生物定量方法

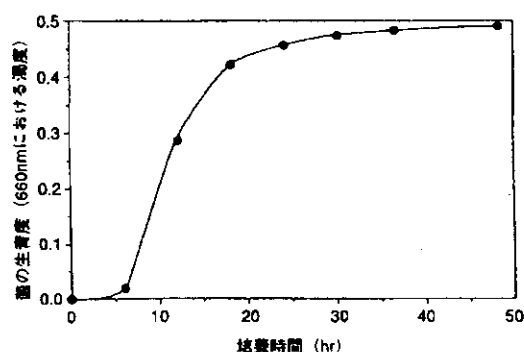
以上は、標準的な方法であるが、全体のスケールを1/2にしても同様にを行うことができ、試薬類の節約になるが、定量可能な上限値も1/2になる。試料などを加えた試験管にアルミキャップをして5分間オートクレーブ後、速やかにオートクレーブから取り出し、放冷または水冷する。この加熱滅菌済み培地は、少なくとも数日間は保存できるので、後日使用しても構わない。培地の加熱時間が長くなると培地中の栄養素の熱分解が進み、菌の生育が悪くなるので注意せねばならない。

iv) 菌株の接種と培養

以前は、接種用菌液を注射器や駒込ピペットなどで1滴ずつ各試験管に接種する方法が用いられていたが、そのやり方では、多数の試験管のすべてにわたって正確に等量ずつ菌液を分注することは困難である。しかし、この接種菌液の量をすべて同一にしないと正確な結果が得られない。微生物定量法におけるばらつきの原因の一つがこれによるものである。すなわち、たとえ各試験管中のナイアシン量が

同一であっても接種菌液の量を増すと、菌体由来のナイアシンのために、必ず生育度もやや増大する。そのために、ディスペンサーピペットなどを使って接種することが望ましい。これによって、測定結果のばらつきはかなり小さくなる。ちなみに筆者が使っているディスペンサーピペットは、ドイツのHitachi社製の3340型であり、岩城硝子(株)が日本での販売元となっており、非常に便利なものであって、一度菌液を吸い上げれば、100 μ lにセットした場合、連続的に38本の試験管に正確に100 μ lずつ分注できる。ディスペンサー本体とチップは、オートクレーブで容易に滅菌できるが、実際には本体まで滅菌する必要はなく、チップの上部に綿栓用の綿を詰め(この綿は、硬く詰めすぎると液の吸入・排出がうまくできなくなり、逆に緩すぎると菌液の中に綿が落ち込むことがある)、チップだけをアルミホイルで包んでオートクレーブすれば十分である。実際に接種する直前にアルミホイルからチップを出し、本体に取り付けて使用する。菌液を接種する場合、雑菌の混入を防ぐために、クリーンベンチや無菌箱の中あるいはガスバーナーの炎のすぐ横で操作するのが常識になっているが、今までの経験によると、空気の流れのないところで、素早く接種すれば、雑菌が生えることはまずない。

菌を接種した測定試料は、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター中で20時間前後培養する。菌の生育は、図II-5に示すように、インキュベーション開始後6時間目くらいから急速に生育し、20時間くらいでほぼ終了に近づく。



図II-5. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8017の生育タイムコース

ニコチン酸を120 ng添加したニコチン酸定量用培地(全液量; 10 ml)を用いて37 $^{\circ}$ Cで培養した時の結果

その後も吸光度は徐々に増し、48時間後でもまだ少し増大しており、2週間後になっても48時間後のときより吸光度は数%増大する。しかし、菌体の増殖が完全に停止するまで測定を待つ必要はない。菌の生育がはっきりと肉眼で見える程度になってから以降は、どの時間に測定しても、ニコチン酸の検量線は、すべてほぼ完全に直線となる。微生物定量法の場合は、検量線は毎回同時に作成せねばならないので、培養時間を厳密に決める必要はないが、一応20時間以上経過しておれば、菌の生育はほぼ終了に近くなっており、値も安定して測定がしやすくなる。スケジュールの都合によっては、そのまま放置して2-3日後に測定しても構わないので、微生物定量法は、実験計画を立てるのがとても楽である。

v) 菌体吸光度の測定と計算

吸光度を測定する分光光度計は、ごく一般的なものよい。しかし、キュベットに試料を移して測定した場合には雑菌が入るので、測定後にそれを元に戻して、さらに培養を続けることはできず、同一の試料で生育のタイムコース

を調べたりすることはできない。これに対して、米国Coleman社のジュニア型分光光度計などでは、試験管型のセルがあり、それにアルミキヤップをして培養すれば、中の試料を取り出さなくても、そのまま分光光度計で吸光度が測定できる。この試験管型セルは、普通の試験管に比べて高価であるが、上質のパイレックスのリムなし試験管 (18 x180 mm) で代用可能である。

測定後、再度培養を続行する必要がない場合には、それぞれのセルまたは試験管による値のばらつきをなくすために、1本の専用セルに順次各試料を移して測定することが望ましい。いずれにせよ、測定の直前に菌液を試験管ミキサーで十分にかくはんして、菌体を均一に分散させねばならない。

微生物定量法の場合には、菌の生育度を吸光度により測定するのであり、特定の化合物の吸収を測定するのではないので、測定波長は540～680nmの範囲内の任意の波長を選んで(たとえば660nm)、常にそれで測定するとよい。この波長範囲で測定すれば、培地中の各成分の影響(吸収)が出なくて都合である。吸光度を読みとり、これをニコチン酸量に対してプロットすると、図II-6にその一例を示すように、少なくとも0～180ngの範囲で完全に直線関係が得られるので、未知試料の吸光度から、計算によりナイアシン含量が容易に求められる。

ナイアシンの微生物定量法は、熟練すれば、ばらつきは比較的小さくなるが、それでも一般の理化学的方法(感度は微生物定量法よりもはるかに低い)よりはばらつきが大きいので、1試料につき少なくとも3連で実験を行うべきであり、特に正確さが要求される場合には、5連くらいでやらねばならない。

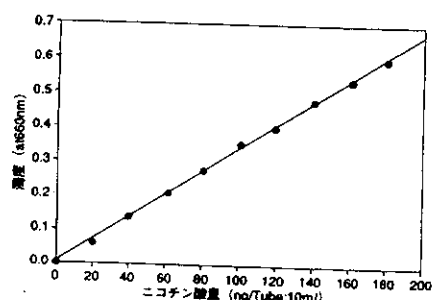


図6-6. 微生物定量法によるニコチン酸の検量線
 $Y=0.003371 X+0.01817, r=0.9990$
 ニコチン酸量 (ng in 10 ml / Tube) = [濁度] × 296.6 - 5.390 (この例では、ニコチン酸量として、5～180 ng の範囲内で有効)

vi) 特異性

ニコチン酸とニコチンアミドは、同一のレスポンスをするが、これらのヌクレオチド型の各化合物は、表3に示すように、ニコチン酸やニコチンアミドに比べると非常に低いレスポンスかしない。これらの化合物は、NAD生合成の中間体である。しかし、これらを加水分解してナイアシンを遊離させれば、等価のレスポンスをするようになる。通常の食品中には、このようなヌクレオチド型の化合物は、ほとんど存在しないので、試料を加水分解する前処理は、必ずしも必要ではない。実際に食品を加水分解してみると、ナイアシンの定量値が、むしろ低下することが多いので、注意が必要である。ただし、NADが残存しているような特別に新鮮な食品では、加水分解しないと、NADは定量されてこない。

1-6. 注解

ナイアシンの定量においては、均質化した試料を1Nの酸やアルカリ中で、10分間、あるいは30分間、120℃で加熱して結合型のナイアシンを遊離させてから微生物定量法に供するということがよく行われている。しかし、酸処理やアルカリ処理をすると、処理をしない場合よりも検出されるナイアシン量が低く出ることが多く、

このような前処理には疑問がある。酸やアルカリによる処理後の中和 (pHを6.8に調製) も注意深く行わないと、試料液のpHのずれで菌の生育が悪くなる。ピリジンヌクレオチドの酸化型はアルカリによってピリジン環にヒドロキシル基が導入されることがあり⁵⁾、還元型は酸によってピリジン環が非常にプロトン化されやすく、さらに先に反応が進行するようである⁶⁾。そうすればビタミンとしての効力が消失してしまい、元々存在していた量よりも低い定量値が得られるので注意を要する。実際にNADHを、1Nの硫酸中で30分間オートクレーブすると、ピリジン環が修飾され、微生物定量法に供しても定量されなくなってしまう。しかし、還元型と酸との組み合わせ以外では、標準のピリジンヌクレオチド類を1Nの酸かアルカリ中で30分間オートクレーブしても、その処理前後の定量値には、それほど差はないようである。もっとも、食品中には、NADHは含まれていないとみなせる。

一般に微生物定量法は、理化学的定量法に比べて、ばらつきが大きいとされているが、下記の諸点に注意すれば、かなりの改善がなされるはずである。

①接種する菌体は、十分に活性化させ (元気付け) たものを用いること。

②すべてのピペッティングを正確にすること。特に菌液、ニコチン酸標準液、および試料液の添加に際しては、ピペッティングの誤差がそのまま結果にも表れるので、濃厚溶液を少量 (1 ~ 10 μ l) 添加するよりも、希釈液を大量 (0.1 ~ 1 ml のオーダー) 添加すること。

③検量線作成用に培地に添加する標準ニコチン酸液 (100 ng/ml) は、毎回標準原液 (1 mg/ml) を希釈して使用する。さもないと、これは非常に希薄な溶液であるために、ガラスへ

の吸着などが起こり、古いものでは濃度がかなり低下してしまっているので注意が必要である。このことは、アイソトープ実験の分野でよく言われることである。ポリの容器中であれば、ガラスよりは良好となる。

④測定試料をオートクレーブする際に、培地中の栄養成分の熱分解を最小限に押さえるため、試料をオートクレーブに入れておく時間は、必要最短にすること。⑤分光光度計で吸光度を測定する直前に、試験管ミキサーで十分にかくはんして、菌体を均一に分散させてから測定すること。

⑥検量線は正常なのに、試料中のナイアシン量が、予想よりもはるかに少ないとか、全く菌が生えないときは、その試料中に乳酸菌の生育阻害剤が混入していることが多いので、添加する試料量のレベルを2,3変化させ、それに応じたレスポンスをするかどうかや、さらにニコチン酸標準液を追加して、得られる値がその分増加するかどうかなどをチェックする必要がある。阻害剤の例としては、高塩濃度、重金属イオン、抗生物質などが一般的である。これらは、特殊な試料や特別の処理をした場合などに含まれることがある。また、ときには試料液のpHにも注意が必要である。

2. 臓器、血液などの生体試料中のNAD、NADPの定量方法

1. ピリジンヌクレオチド補酵素

NAD(NAD⁺ + NADH; 以下NADと表示してある場合は酸化型と還元型の両化合物を示す) およびNADP(NADP⁺ + NADPH; 以下NADPと表示してある場合は酸化型と還元型の両化合物を示す)を必要とする酵素は約500種類にも達する。したがって、生体はこれらの補酵素が欠乏に陥りにくいようにする機構をもっている。さらに、NAD、NADPが短期間に大量に必要な

時には、トリプトファンから速やかにNAD, NADPを供給する機構も持っている。NAD, NADPの生体内濃度を知ることは、種々の貴重な情報を与えてくれる。

2. 化学薬品と測定機器

2-1. 化学薬品

使用した化学薬品の購入先, 調製法, 保存方法などを表II-3から表II-6にまとめて示した。

表III-3. 生体試料からNAD・NADP抽出に使用する試薬(50 mM KPB, pH 6.0 + 100 mM ニコチンアミド)の購入先と作製方法のまとめ

使用する試薬名と購入先

試薬名	購入先
ニコチンアミド	和光純薬工業(株)
KH ₂ PO ₄	和光純薬工業(株)
K ₂ HPO ₄	和光純薬工業(株)

KPB = KH₂PO₄-K₂HPO₄ Bufferの略称として使用。

抽出溶液作製のために, あらかじめ500 mM KPB, pH 6.0を作製

- そのために, まず500 mM KH₂PO₄溶液を500 mlと500 mM K₂HPO₄溶液を500 ml作製する。

試薬	作製方法
500 mM KH ₂ PO ₄ 溶液を500 ml作製*	KH ₂ PO ₄ (分子量: 136.09)を34.02 g秤量し, 500 mlのビーカーに入れ, 水を450 ml程度加え, 完全に溶解する。そして, 水にて500 mlにする。保存ビンに移し替える。
500 mM K ₂ HPO ₄ 溶液を500 ml作製*	K ₂ HPO ₄ (分子量: 174.18)を43.55 g秤量し, 500 mlのビーカーに入れ, 水を450 ml程度加え, 完全に溶解する。そして, 水にて500 mlにする。保存ビンに移し替える。

- 500 mM KPB, pH 6.0の作製

作製する溶液	作製方法
500 mM KPB, pH 6.0を100 ml程度作製*	200 mlのビーカーに500 mM KH ₂ PO ₄ 溶液, 90 mlを移し替える。そして, 500 mM K ₂ HPO ₄ 溶液を滴下していき, pHを6.0に調整する。

- 生体試料からNAD (NAD⁺ + NADH), NADP (NADP⁺ + NADPH) 抽出に使用する試薬(50 mM KPB, pH 6.0 + 100 mM NiA-NH₂)の作製

作製する溶液	作製方法
50 mM KPB, pH 6.0 + 100 mM NiA-NH ₂ * ¹	500 mM KPB, pH 6.0を100 mlとり, NiA-NH ₂ を12.2 g加える。NiA-NH ₂ が完全に溶解後, 水で1000 mlにする。

*¹保存は, 室温でもかまわないが, 低温の方が, カビがはえにくく, 長く保存できる。使用する前

にビンを振って, 眼に見える固形物がなければ使用しても良い。固形物は多くの場合, カビである。

表III-4. NAD⁺の絶対量測定に使用する試薬の購入先と作製方法のまとめ

試薬名	購入先
ピロリン酸ナトリウム	和光純薬工業(株)
セミカルバジド塩酸塩	和光純薬工業(株)
NaOH	和光純薬工業(株)

- 5 mg/mlのセミカルバジド塩酸塩を含む0.1 M ピロリン酸緩衝液, pH 8.8の作製
あらかじめ1 M NaOH(分子量: 40.00)溶液を100 ml作製しておく(4 gのNaOHを秤量し, 少量の水にて溶解後, 水を加えて100 mlにする)。

作製する溶液	作製方法
5 mg/mlのセミカルバジド塩酸塩を含む0.1 M ピロリン酸緩衝液, pH 8.8を100 ml作成*	4.46 gのピロリン酸ナトリウム(分子量: 446.05)と0.5 gのセミカルバジド塩酸塩(分子量: 111.53)を約80 mlの水で溶解後, 1 M NaOHでpHを8.8に調整。その後, 水で100 mlにする。

*¹保存は, 室温でもかまわないが, 低温の方が, カビがはえにくく, 長く保存できる。使用する前にビンを振って, 眼に見える固形物がなければ使用しても良い。固形物は多くの場合, カビである。

表III-5. NAD定量に使用する試薬の購入先と作製方法のまとめ

試薬名	購入先
NAD ⁺	和光純薬工業(株)
酵母Alcohol dehydrogenase (15,000 IU/ビンの製品)	オリエンタル酵母工業(株)
MTT	同仁化学研究所(株)
PMS (Phenazine methosulfate)	和光純薬工業(株)
グリシルグリシン	和光純薬工業(株)
NaOH	和光純薬工業(株)
グリセロール	和光純薬工業(株)

作製する溶液	作製方法
1 mg/ml NAD ⁺ を10 ml作成*	0.10 gのNAD ⁺ を秤量し, 10 mlの水を加える
10 µg/ml NAD ⁺ を10 ml作成* ²	9.9 mlの水に, 1 mg/ml NAD ⁺ を100 µl加える。すなわち, 100倍希釈する。
2.5 mg/ml MTTを50 ml作製* ³	0.125 gのMTTを秤量し, 50 mlの水を加え, 溶解する。実験中も, 水中に入れておき, 使用しないときは, 遮光した状態で保存する。
1 mg/ml PMSを50 ml作製* ⁴	0.050 gのPMSを秤量し, 50 mlの水を加え, 溶解する。実験中も, 水中に入れておき, 使用しないときは, 遮光した状態で保存する。

NAD測定用緩衝液(100 mM グリシルグリシン(分子量: 132.12)をNiA-NH₂と0.5 M エタノール 8.59 g秤量, NiA-NH₂(分子量: 122.13)を12.21 g秤量, エタノール(分

ン-NaOH緩衝液 (pH 7.4), 質量:46.07)を23.0 g秤量, これらを1000 ml*	800 mlの水で溶解する. 1 M NaOHを用いて, pHを7.4に調整. 水にて1000 mlにする.
50% グリセロール, 100 mlの作製*	50 mlのグリセロールに50 mlの水を加え, 攪拌する.
Alcohol dehydrogenase (ADH)	15,000 IUのADHが入っているビンに10 mlの50%グリセロール(-25°Cに冷却してあること)を加え, 溶解する. (15,000 IU/10 ml 50% グリセロール=1,500 IU/ml)の作製
500 mM KPB, pH 7.0, 100 ml程度の作製*	200 mlのビーカーに500 mM K ₂ HPO ₄ 溶液, 60 mlを移し替え, pH電極を入れる. そして, 500 mM KH ₂ PO ₄ 溶液を滴下していき, pHを7.0に調整する.
50 mM KPB, pH 7.0, 100 mlの作製*	500 mM KPB, pH 7.0を10 mlとり, 水を90 ml加え, 攪拌する.
ADH	1,500 IU/ml 50%グリセロールのADHを(75 IU/ml 50 mM KPB, pH 7.0)で20倍希釈する.

*¹-25°Cで保存する. 1年間は保存できる. 1 mlずつ分注して保存すること.

*²-25°Cで保存する. 3カ月は保存できる.

*³褐色ビンに入れて, 4°Cで保存する. 3ヶ月は保存できる.

*⁴用時調製. 溶解後, 5時間以内に使用すること. 1試料につき, 0.08 ml必要. 0.010 g前後のPMSを褐色ビンにあらかじめ正確に秤量しておき, 4°Cで保存する. 2年間は保存できる. 必要な量だけ水を加えて, 使用すると便利.

*⁵室温でもかまわないが, 低温の方が, カビがはえにくく, 長く保存できる. 使用する前にビンを振って, 眼に見える固形物がなければ使用しても良い. 固形物は多くの場合, カビである.

*⁶-25°Cで保存で保存すること. 溶液がなくなるまで, 使用可能.

*⁷-25°Cで保存すれば, 1年間は使用可能. 溶解するのに, 1時間程度かかる. 激しく攪拌しないこと. 冷蔵庫中にて一晩放置してもよい. 固形物が見えなくなったら, ゆっくり攪拌すること.

*⁸用時調製. 1試料につき, 50 μl必要. 必要量だけ, 希釈すること. 2日間は使用可能.

表III-6. NADP 定量に使用する試薬の購入先と作製方法のまとめ

試薬名	購入先
NADP ⁺	和光純薬工業(株)
Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 1,000 IU/ビン	Sigma Chemical Company
Type IX, from Baker's yeast	
グルコース6-リン酸・2Na塩	Sigma Chemical Company

作製する溶液	作製方法
1 mg/ml NADP ⁺ 溶液, 10 ml*	0.010 gのNADP ⁺ を秤量し, 10 mlの水で溶解する.
1 μg/ml NADP ⁺ 溶液, 10 ml*	9.9 mlの水に1 mg/ml NADP ⁺ を10 μl加え, 攪拌. すなわち, 1000倍希釈する.
0.2 M MgCl ₂ 溶液, 100 ml*	MgCl ₂ (分子量:95.21)を19.04 g秤量し, 水を加えて, 100 mlにする.
NADP測定用緩衝液(0.15 M NiA-NH ₂ を含む0.15 M グリシルグリシン-NaOH, pH 7.4), 1000 ml*	19.82 gのグリシルグリシン(分子量:132.12)と18.82 gのNiA-NH ₂ (分子量:122.13)に水800 mlで, 溶解する. 1 M NaOHを用いて, pHを7.4に調整. 水で1000 mlにする.
10 mM グルコース6-リン酸溶液, 30 mlの作製*	グルコース6-リン酸・Na塩(分子式量:304.1)を0.091 g秤量し, 水を30 ml加え, 溶解する.
Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (500 IU/ml 50% グリセロール)の作製*	500 IU/ml 50% グリセロールとなるように, 50% グリセロール(-25°Cに冷却してあること)に溶解する.
2 IU/ml 50 mM KPB, pH 7.0のG6PDH溶液の作製*	500 IU/ml 50%グリセロールのG6PDHを50 mM KPB, pH 7.0で250倍希釈する.

*¹-25°Cで保存する. 1年間は保存できる. 1 mlずつ分注して保存すること.

*²用時調製.

*³室温でもかまわないが, 低温の方がカビがはえにくく, 長く保存できる. 使用する前にビンを振って, 眼に見える固形物がなければ使用しても良い. 固形物は多くの場合, カビである.

*⁴冷蔵庫保存. 1ヶ月は使用可能.

*⁵-25°Cで保存すれば, 1年間は使用可能. 溶解するのに, 1時間程度かかる. 激しく攪拌しないこと. 冷蔵庫中にて一晩放置してもよい. 固形物が見えなくなったら, ゆっくり攪拌すること.

*⁶用時調製. 1試料につき, 50 μl必要. 必要量だけ, 希釈すること. 2日間は使用可能.

2-2. 測定機器

測定に使用したマイクロプレート用吸光測定装置はLabsystemsのMultiskan Ascent (製造元:Thermo Bioanalysis Company, FIN-00811 Helsinki, Finland. 輸入元:サーモバイオアナリ

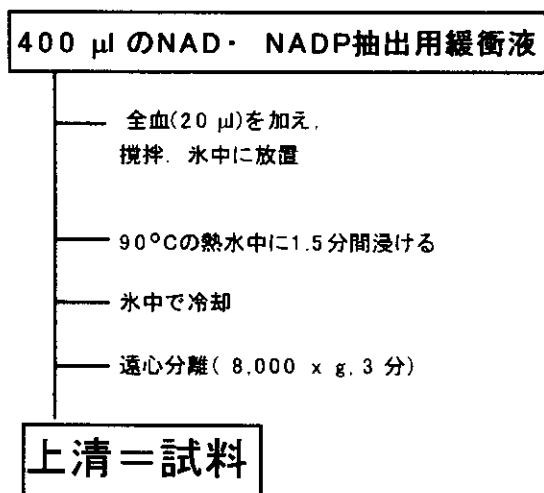
シスジャパン株式会社。販売元:大日本製薬株式会社 ラボラトリープロダクツ部) を使用し、570 nmのフィルターを使用した。本機器は、振とう機能、インキュベーション機能が付いており、96穴のスキャンを7秒間で行うことができる。さらに、振とう、インキュベーション、測定の間、データの保存はあらかじめプログラミングができるので、ピペット操作以外はすべて自動で行うことが可能である。

マイクロプレートタイターは住友ベークライト(株)のELISA用プレートSを使用した。

3. 生体からの試料の調製方法

3-1. 血液

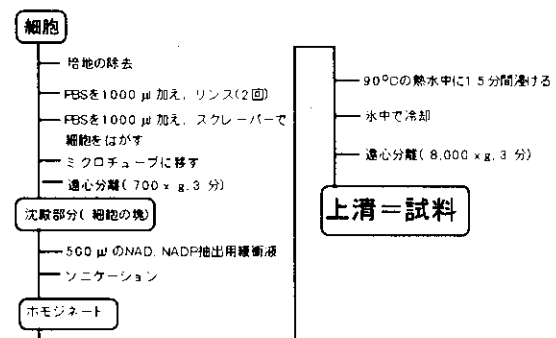
血液を試料とした時のNADおよびNADP測定用試料の調製方法を図II-7に示した。NAD・NADP抽出用緩衝液に血液を懸濁させた状態で、氷の中に入れておけば、少なくとも5時間は安定である。したがって、試料をすべて取り終えた後、まとめて熱処理を行えばよい。以下の各試料においても同様である。



図II-7. 血液を試料とした時のNAD, NADP定量用試料の作成方法

3-2. 培養細胞

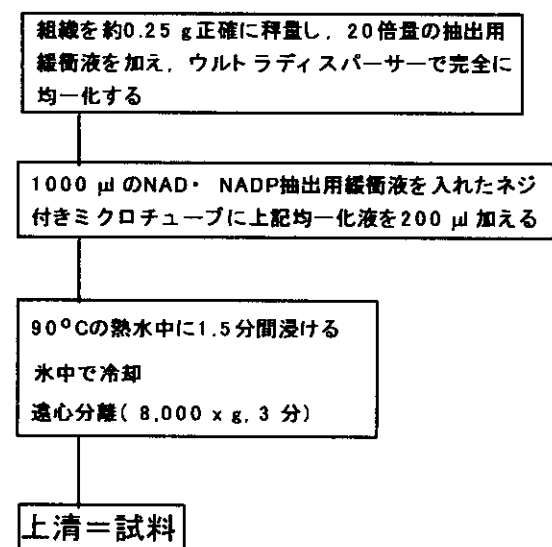
培養細胞を試料とする時のNADおよびNADP測定用試料の調製方法を図II-8に示した。細胞数が少ない場合には、加える抽出用緩衝液の量を少なくすればよい。なお、ソニケーションはヤマト科学(株)社製のPower Sonic Model 50 Ultrasonic Cell Disrupterを使用し、Output Control 50で、30秒間行った。



図II-8. 培養細胞を試料とした時のNAD, NADP測定用試料の調製方法

3-3. 肝臓、腎臓、食品などの組織

食品を含む生体組織を試料とする時のNADおよびNADP測定用試料の調製方法を図II-9に示した。



図II-9. 食品(or臓器)を試料とした時の

NAD, NADP測定用試料の調製方法

4. 定量方法

4-1. NADの定量方法

1セットの実験ごとに、以下の操作を行う。

図II-10に示した方法に従って、定量の標準として使用するNAD⁺ (表示は10 μg/ml)の正確な濃度を求める。

試薬	Reference cell (μl)	Sample cell (μl)
5 mg/mlのセミカルバジド塩酸塩を含む0.1 M ピロリン酸緩衝液, pH 8.8	500	500
水	1000	0
10 μg/ml NAD ⁺	0	1000
エタノール	10	10

↓

上記試薬をマイクロセルに順次入れ、混和する。
分光光度計で

340 nmの0合わせをする。

↓

75 IU/mlのADHを10 μlずつ入れ、340 nmの最高値を記録する。

図II-10. NAD⁺濃度の正確な値の求め方

この時の340 nmの最高値が0.048だとすると、10 μg/mlと表示してある溶液の真のNAD⁺値は、11.77 nmol/mlとなる； $(0.048/6200^*) \times (1.52 \times 10^{-3})^{*2} = 11.77 \times 10^{-9} \text{ mol} = 11.77 \text{ nmol}$ 。これは、10 μg/ml NAD⁺と表示した溶液1 ml中のmol数である。したがって、10 μg/ml NAD⁺と表示してある溶液の真のNAD⁺濃度は、11.77 nmol/mlとなる。

*¹ 6200はNADHの340 nmの分子吸光係数

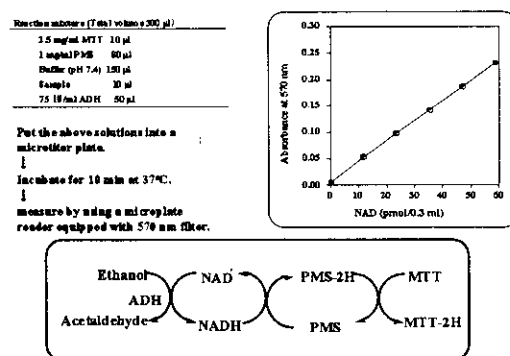
*² 1.52×10^{-3} はNAD⁺の絶対量測定時の全溶液量(図II-9を参照)

正確な濃度を求めたNAD⁺を使用してNAD⁺測定のための検量線を作製する。検量線作製のために使用する各種濃度のNAD⁺溶液を以

下のように作製する。そして、10 μlを使用する。

水(μl)	1000	900	800	700	600	500
11.77 nmol/ml NAD ⁺ (μl)	0	100	200	300	400	500
NAD ⁺ 濃度 (pmol/ml)	0	1177	2354	3531	4708	5885
10 μl中のNAD ⁺ 量 (pmol)	0	11.77	23.54	35.31	47.08	59.95

図II-11にNAD測定方法の概略を示した。



図II-11. NAD測定方法の概略

マイクロプレートタイターに8連式ピペットマンを使用して、MTT溶液、PMS溶液、NAD測定用緩衝液を入れていく。10秒間、960 rpmで浸とう後、5分間37°Cでプレインキュベーションを行った後、570 nmの吸光度を測定する(測定値1)。測定後、マイクロプレートが機器本体から出てくるので、上記のNAD⁺溶液(この液だけは、通常のピペットマンを使用)を順次入れていく。10秒間、960 rpmで浸とう後、直ちに570 nmの吸光度を測定する(測定値2)。5分間37°Cで再度プレインキュベーションを行った後、570 nmの吸光度を測定する(測定値3)。マイクロプレートが機器本体から出てくるので、ADHを8連ずつ30秒間隔で加え、加えるごとに10秒間、960 rpmで振とうを行なう。最後の8連にADHを加え、振とう後、各々の列が正確に37°Cで10分間、インキュベーションした後、570 nmの吸光度を測定する(測定値4)。すなわち、10分後、10分30秒後、11分後、..と測定を行う。

なお、あらかじめ上記の一連の操作をプログラミングしておくこと。NADの量は「測定値4」-「測定値3」から求める。なお、「測定値1」と「測定値2」は定量操作が正常に行われたかをチェックするために行うものである。その時の検量線の一例を図II-11に示した。また、その測定原理も図II-11に図示した。

試料の測定は、図II-7から図II-9に示した調製方法で作製した試料溶液を10 μl使用して定量が可能である。

4-2. NADPの定量方法

1セットの実験ごとに、以下の操作を行う。

図II-12に示した方法に従って、定量の標準として使用するNADP⁺ (表示は1 mg/ml) の正確な濃度を求める。

試薬	Reference cell (・I)	Sample cell (・I)
0.1 M NiA-NH ₂ を含む0.1 M グリシルグリシン-NaOH緩衝液, pH 7.4	500	500
10 mM グルコース6-リン酸	200	200
0.2 M MgCl ₂	100	100
水	500	460
1 mg/ml NADP ⁺	0	40

↓

上記試薬をマイクロセルに順次入れ、混和する。
分光光度計で340 nmの0合わせをする。

↓

2 IU/mlのG6PDHを10 μlずつ入れ、340 nmの最高値を記録する。

図II-12. NADP⁺濃度の正確な濃度の求め方

この時の340 nmの最高値が0.237だとすると、1 mg/mlと表示してある溶液の真のNADP⁺値は、1146.3 nmol/mlとなる; $(0.237/6200^*) \times (1.31 \times 10^{-3})^*2 = 5.000 \times 10^{-8}$ mol.

0.04 ml中に 5.00×10^{-8} molのNADP⁺が溶けているので、1 mg/ml NADP⁺と表示された溶液の真のNADP⁺濃度は、 (5.00×10^{-8}) (mol)/(4 ×

10^{-2}) (ml)=1.25 μmol/mlとなる。

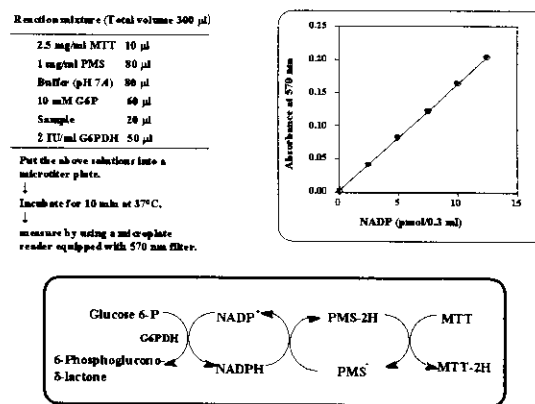
*¹ 6200はNADPHの340 nmの分子吸光係数

*² 1.31×10^{-3} はNADP⁺の絶対量測定時の全溶液量(図II-12を参照)

正確な濃度を求めたNADP⁺を使用してNADP⁺測定のための検量線を作製する。まず、正確に、1000倍希釈する(1.25 nmol/mlとなる)。例えば、今回の場合は、1250 pmol/mlのNADP⁺溶液ができあがる。次に、検量線作製のために使用する各種濃度のNADP⁺溶液を以下の様に作製する。そして、20 μlを使用する。

水(μl)	1000	900	800	700	600	500
1250.3 pmol/ml NADP ⁺ (μl)						
NADP ⁺ 濃度 (pmol/ml)	0	100	200	300	400	500
20 μl中のNADP ⁺ 量 (pmol)	0	125	250	375	500	625
	0	2.50	5.00	7.50	10.00	12.50

図II-13にNADP測定方法の概略を示した。



図II-13. NADP⁺測定法の概略

マイクロプレートタイターに8連式ピペットマンを使用して、MTT溶液、PMS溶液、NADP測定用緩衝液、G6-P溶液を順次入れていく。10秒間、960 rpmで浸とうし、5分間37°Cでプレインキュベーション後、570 nmの吸光度を測定

する(測定値1)。測定後、マイクロプレートが機器本体から出てくるので、上記のNADP⁺溶液(この液だけは、通常のピペットマンを使用)を順次入れていく。10秒間、960 rpmで浸とう後、直ちに570 nmの吸光度を測定する(測定値2)。5分間37°Cで再度ブレインキュベーションを行った後、570 nmの吸光度を測定する(測定値3)。マイクロプレートが機器本体から出てくるので、G6PDHを8連ずつ30秒間隔で加え、加えるごとに10秒間、960 rpmで振とうを行なう。最後の8連にG6PDHを加え、振とう後、各々の列が正確に37°Cで10分間、インキュベーションした後、570 nmの吸光度を測定する(測定値4)。すなわち、10分後、10分30秒後、11分後、・・と測定を行う。NADPの量は「測定値4」-「測定値3」から求める。なお、「測定値1」と「測定値2」は定量操作が正常に行われたかをチェックするために行うものである。その時の検量線の一例を図II-13に図示した。また、その測定原理も図II-13に図示した。

試料の測定は、図II-7から図II-9に示した調製方法で作製した試料溶液を20 µl使用して定量が可能である。

3. 臓器、血液などの生体試料および動物性食品中のニコチンアミドの定量と尿中のニコチンアミド、2-Py、4-Pyの定量方法

(1) ニコチンアミド、2-Py及び4-Pyの定量方法

動物性食品、例えば、牛肉、豚肉、魚肉、臓器に存在するナイアシンはニコチンアミドである。2-Py及び4-Pyはほとんど検出されない。本法に示した方法では0.1mg/100g食品以上のニコチンアミドを含んでいないと測定できない。実際にはニコチンアミドの供給源となる獣鳥魚肉類中には3mg/100g食品以上のニコチンアミドが含まれているので、この方法を適用するこ

とが可能である。

本HPLCシステムでのニコチンアミドの検出限界は1.22 ng/Injectionである。

2-Pyと4-Pyを含む生体試料は、実質上尿のみである。ちなみに、2-Pyと4-Pyの検出限界は、共に0.24 ng/Injectionである。他に肝臓と血液が若干量の2-Pyと4-Pyが検出されることがあるが、尿の値からみれば無視できる量である。

i) 適用

ニコチンアミド、2-Pyおよび4-Pyを含む血液、臓器、尿、食品、薬剤、液体飲料など、すべてに適用可能である。

ii) 原理

動物性食品及び生体試料: 試料を0.1g/mlのイソニコチンアミド水溶液(イソニコチンアミドを内部標準として用いる)と共にホモジナイズし、そのホモジネートを熱処理し(目的は、ピリジンスクレオチド類をニコチンアミドにするための操作)、変成タンパク質を除去した液を得る。この液はまだ濁っているため、この液に酸を加え、完全に除タンパクし、透明な液を得る。この液中のニコチンアミドをアルカリ性ジエチルエーテルで選択抽出した後、HPLCで定量を行う。なお、ニコチン酸はアルカリ性ジエチルエーテルで抽出されない。

尿を試料とした時: 尿1mlに1mg/mlのイソニコチンアミド溶液を10µl加える。この液中のニコチンアミド、2-Py、4-Pyをアルカリ性ジエチルエーテルで選択抽出した後、HPLCで定量を行う。

iii) 測定方法

①器具及び装置

使用する器具

* ねじ口試験管: マルエムMR-10(φ10×100mm)。

* 広口試験管：マルエムNX-50 (φ 30 × 100mm)。

* パスツールキャピラリーピペット。

* 1ml用注射器と0.45μmのマイクロフィルター。

* エッペンドルフ型マイクロチューブ (1.5ml):ろ過後のHPLC注入試料液を入れるために使用。

* 試験管 (φ 15 × 100mm):組織をホモジナイズする時に使用。

* HPLC用マイクロシリンジ(25ml)。

使用する機器

* ホモジナイザー：Ultra-Dispenser Model LK-21(ヤマト科学(株))

* オートクレーブ

* 冷却遠心機(ホモジネートをオートクレーブ後、沈殿物を除くために使用する):10,000×gの遠心力が得られるもの。

* エッペンドルフ型遠心機(マイクロチューブを遠心する時に使用)

* 振とう機(ねじ口試験管を試験管立てに入れたまま振とうできるもの):ELVIS EL-1T(株 杉山元医理器)

* 遠心機(ねじ口試験管をそのまま遠心できるもの):Centrifugal Evaporator Model RD-41(ヤマト科学(株))

* ドラフト内で40℃に加温できるインキュベーター(ジエチルエーテル抽出液を乾固させる時に使用)

* ミキサー(広口試験管に水を加えた後に、乾固物を溶解させる時に使用):Touch Mixer MT-31(ヤマト科学(株))

* HPLC-UV(ポンプ1台, 紫外吸収検出器, インジェクター, データプロセッサ, Chemcosorb 7-ODS-Lカラム(φ 4.6 × 250 mm))。

②試薬

* 50 mMリン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩

衝液(pH 7.0)の作成

3.402 gのリン酸一カリウムを秤量し, 水にて500 mlにする(50 mM リン酸一カリウムができる)。

4.355 gのリン酸二カリウムを秤量し, 水にて500 mlにする(50 mM リン酸二カリウムができる)。

pHメーターを使用して, 50 mM リン酸二カリウム溶液中に, 50 mM リン酸一カリウム溶液を加え, pHを7.0に調整する(50mM リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液(pH7.0)ができる)。

*ニコチンアミド

標準に用いるニコチンアミドは特級試薬を用いる。

標準液の調製:

ニコチンアミドを0.0019 g秤量し, 50 mM リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液(pH 7.0)を1.9 ml加え溶解する。この溶液を0.1 mlを取り, 50 mM リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液(pH 7.0)を4.9 ml加える。この溶液のUV吸収スペクトルを書かせ, 正確な濃度を, 260 nmの分子吸光係数 $3300\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ から計算する。この液を標準液とし, HPLCに20ml注入し, 1 nmol当たりのピーク面積を求めておく。ニコチンアミド溶液を小分けして-20℃付近で凍結保存する。1ヶ月は保存可能である。凍結・融解は繰り返さないこと。

*2-Py

標準に用いる2-Pyは市販されていないので, PullmanとColowickの方法にて合成し, 精製したものを使用する。

標準液の作成:

2-Pyを0.0019g秤量し, 水を1.9ml加える。この溶液を0.1mlを取り, 水を9.9ml加える。この溶液のUV吸収スペクトルを書かせ, 正確な濃

度を、260nmの分子吸光係数 $14,500\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ から計算する。この液を標準液とし、HPLCに20 μl 注入し、1nmol当たりのピーク面積を求めておく。2-Py溶液を小分けして凍結保存する。1年は保存可能である。凍結・融解は繰り返さないこと。

*4-Py

標準に用いる4-Pyは市販されていないので、柴田らの方法にて合成し、精製したものを使用する。

標準液の作成:

4-Pyを0.0019 g秤量し、水を1.9 ml加える。この溶液を0.1 ml取り、水を9.9 ml加える。この溶液のUV吸収スペクトルを書かせ、正確な濃度を、260 nmの分子吸光係数 $13,000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ から計算する。この液を標準液とし、HPLCに20 μl 注入し、1nmol当たりのピーク面積を求めておく。4-Py溶液を小分けして -20°C 付近で凍結保存する。1年は保存可能である。凍結・融解は繰り返さないこと。

*イソニコチンアミド

内部標準(回収率の計算に使用する)として特級試薬を用いる。

0.1 mg/mlイソニコチンアミド水溶液の作成:

0.1 gのイソニコチンアミドを秤量し、水にて1000 mlとする。冷蔵庫中に保存する。動物性食品、生体試料、錠剤、散剤を均一化するとき使用する。

1mlの0.1 mg/mlのイソニコチンアミドに水を4 ml加える(0.02mg/mlのイソニコチンアミドができる)。この液20 μl (0.4 μg のイソニコチンアミドを含む)をHPLCに注入し面積を求める。回収率の計算の100%の値とする。

*HPLC分析に使用する移動相の作成

(1) 0.5 M リン酸一カリウム, pH 3.0の作成

68 gのリン酸一カリウムを秤量し、水を800 ml

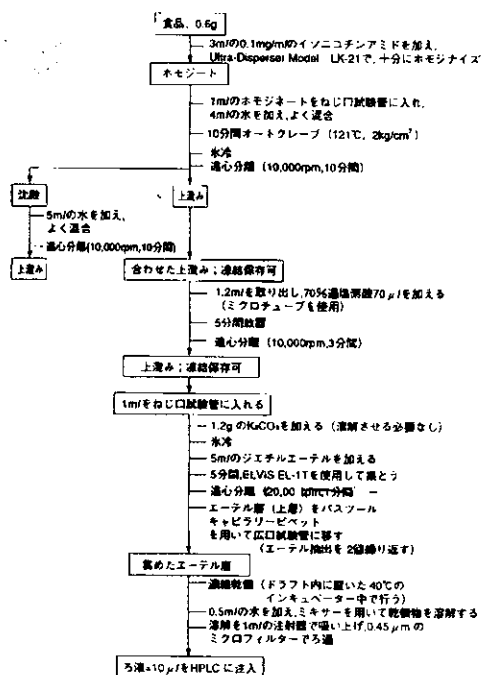
加え、完全に溶解する。この液にリン酸を滴下し、pHメーターを使い、pHを3.0に調整する。そして、水で1000 mlにする。

(2)移動相, 10 mM リン酸一カリウム(pH 3.0): アセトニトリル=96:4の作成

0.5 M リン酸一カリウム, pH 3.0を10 ml, 水を990 ml, アセトニトリルを41.7ml取り、よく混和する。

③操作

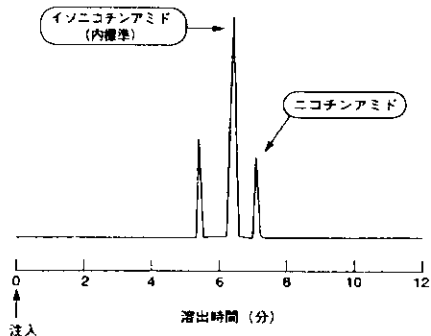
動物性食品および臓器を飼料とした時の操作方法を図II-14に示した。



図II-14. 動物性食品からのニコチンアミド測定用試料の調製方法

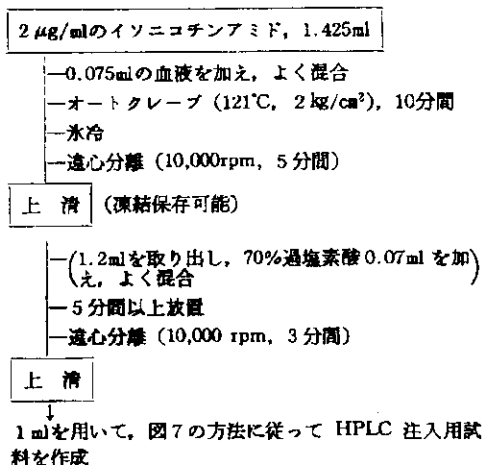
代表的な試料として、牛肉を用いた時の分析クロマトグラムと分析条件を図II-15に示した。

分析条件
 カラム：Chemcosorb 7-ODS-L(φ4.6×250mm)
 移動相：10mMKH₂PO₄(pH3.0)-アセトニトリル(96:4v/v)
 流速：1ml/分
 カラム温度：25℃
 検出器：紫外分光光度計 260nm



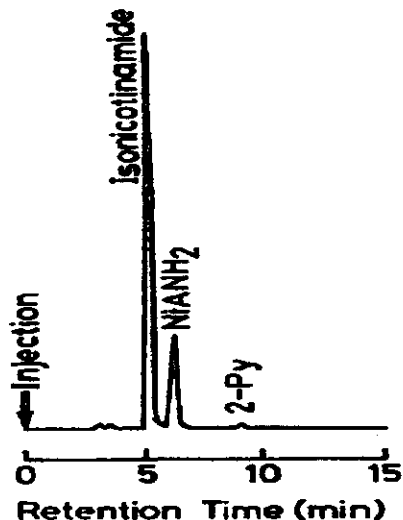
図II-15. 牛肉中のニコチンアミドのクロマトグラム例

血液を試料とした時の操作方法を図II-16に示した。



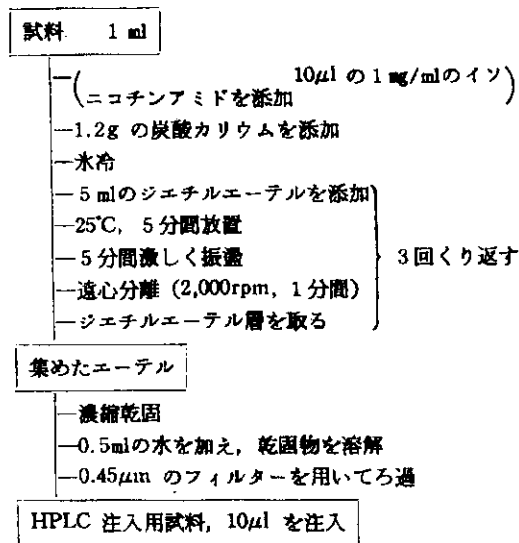
図II-16. 血液からのニコチンアミド, 2-Py, 及び4-Py定量用試料の調製方法

また, その時のHPLCクロマトグラムを図II-17に示した。



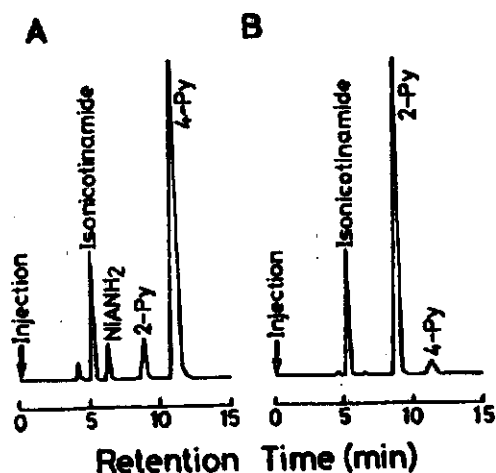
図II-17. ラット血液中のニコチンアミド(NIAmH₂), 2-Pyのクロマトグラム。

尿を試料とした時の操作方法を図II-18に示した。



図II-18. 尿を試料とした時のHPLC注入用試料の作成(ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py)

代表例として, ヒトとラットの尿を試料とした場合のHPLCクロマトグラムを図II-19に示した。



A: ラット尿, B: ヒト尿.

図II-18. 尿中のニコチンアミド(NIANH₂), 2-Py および4-Pyのクロマトグラム

4. 臓器, 血液などの生体試料, 動物性食品及び尿中のMNAの定量

(1) MNAの定量方法

MNAが実質的に検出できるのは尿のみである。肝臓, 血液に若干検出できる場合もあるが, 尿と比較すれば無視することができる。

i) 適用

可能性としては, MNAを含む血液, 臓器, 尿, 食品, 薬剤, 液体飲料など, すべてに適用可能である。

ii) 原理

動物性食品及び生体試料: 試料に水を加えホモジナイズし, そのホモジネートを酸処理し, 変成タンパク質を除去した液を得る。この液中のMNAを強アルカリ化でアセトフェノンと縮合させた後に酸性にする。そして, その反応液をHPLCで定量を行う。

iii) 測定方法

①器具及び装置

使用する器具

*ねじ口試験管: マルエムMR-10 (φ 10 ×

100mm)。

*1ml用注射器と0.45m μ のマイクロフィルター。

*エッペンドルフ型マイクロチューブ (1.5ml): ろ過をする前に反応液を入れて, 遠心分離を行う。また, ろ過後のHPLC注入試料液を入れるために使用。

*試験管 (φ 15 × 100mm): 組織をホモジナイズする時に使用。

*HPLC用マイクロシリンジ (25ml)。

使用する機器

*ホモジナイザー: Ultra-Dispenser Model LK-21 (ヤマト科学株)

*冷却遠心機 (ホモジネートを酸処理後, 沈殿物を除くために使用する): 10,000 × gの遠心力が得られるもの。

*エッペンドルフ型遠心機 (マイクロチューブを遠心する時に使用)

*ミキサー (反応液を混合していく時に使用): Touch Mixer MT-31 (ヤマト科学株)

*HPLC-蛍光分光光度計 (ポンプ1台, 蛍光分光光度計, インジェクター, データプロセッサ, Tosoh ODS 80Tsカラム (φ 4.6 × 250 mm)。

②試薬

*MNA

標準液の調製:

MNA-Clを0.0019 g秤量し, 水を1.9 ml加え溶解する。この溶液を0.1 ml取り, 水を4.9 ml加える。この溶液のUV吸収スペクトルを書かせ, 正確な濃度を, 265 nmの分子吸光係数4940M⁻¹・cm⁻¹から計算する。この液を標準液とし, 所定の反応を行った後, 反応液をHPLCに20 μ l注入し, 1 nmol当たりのピーク面積を求めておく。MNA溶液を小分けして-20°C付近で凍結保存する。1ヶ月は保存可能である。凍結・融解は繰り返さないこと。