

図 1. リボフラビン大量摂取が飼料摂取量 (A) および体重増加量 (B) におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した.

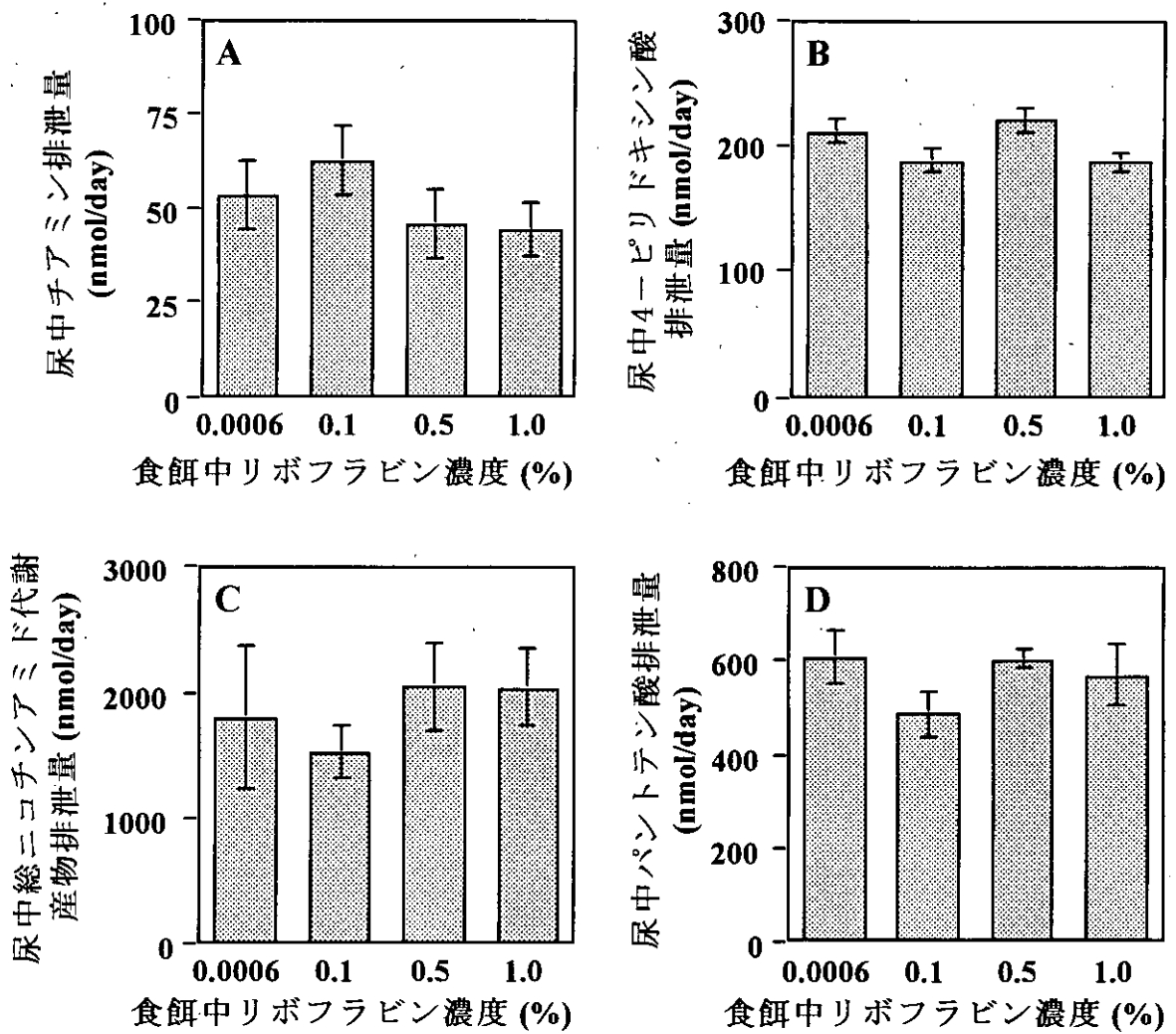


図2. リボフラビンの大量摂取がチアミン (A), 4-ピリドキシニン酸 (B), ニコチンアミド総代謝産物 (C), パントテン酸 (D) の各尿中排泄量におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した.

表1 リボフラビン大量摂取が臓器重量におよぼす影響

	食餌中のリボフラビン濃度			
	0.0006%	0.1%	0.5%	1.0%
脳 (g)	1.49±0.12	1.57±0.06	1.53±0.02	1.52±0.03
心臓 (g)	0.68±0.01	0.68±0.02	0.73±0.03	0.72±0.03
肺 (g)	1.08±0.03	1.22±0.13	1.07±0.07	1.12±0.12
肝臓 (g)	8.25±0.25	8.63±0.14	7.69±0.13	7.97±0.39
脾臓 (g)	0.66±0.02	0.68±0.02	0.68±0.03	0.67±0.04
腎臓 (g)	1.61±0.05	1.66±0.05	1.56±0.02	1.51±0.03
精巣 (g)	1.58±0.03	1.71±0.06	1.63±0.07	1.65±0.03

値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した。

表2 リボフラビン大量摂取が尿中リボフラビン量および糞中総ビタミンB<sub>2</sub>量におよぼす影響

	食餌中のリボフラビン濃度			
	0.0006%	0.1%	0.5%	1.0%
尿 (nmol/day)	115±4	282±17*	266±34*	302±20*
糞 (μmol/day)	0.03±0	0.88±0.24	55.06±5.60	136.66±28.03*

値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した。\*は0.0006%リボフラビン添加食摂取ラットの値と有意差があることを示す (p < 0.05)。

表3 リボフラビン大量摂取が血液および肝総ビタミンB<sub>2</sub>量におよぼす影響

	食餌中のリボフラビン濃度			
	0.0006%	0.1%	0.5%	1.0%
血液 (pmol/ml)	184±12	205±9	345±59	398±57*
肝臓 (nmol/g of liver)	94.3±2.7	88.5±2.0	96.2±1.1	91.9±2.6

値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した。\*は0.0006%リボフラビン添加食摂取ラットの値と有意差があることを示す (p < 0.05)。

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

3. 水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 -パントテン酸-

研究協力者 福渡 努 滋賀県立大学 助手

研究要旨 第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、過剰摂取あるいは投与による毒性および副作用は認められていないことから、パントテン酸の許容上限摂取量は策定されなかった。パントテン酸の毒性および副作用が認められていない最大の理由は、パントテン酸経口摂取による悪影響について系統的に調べた報告がないことによる。本年度においては、パントテン酸の大量摂取がラットにおよぼす影響について検討することを目的とした。パントテン酸カルシウムの終濃度を 0.0016, 1.0, 3.0%とした食餌をラットに 29 日間投与した。3.0%パントテン酸カルシウム食餌摂取ラットにおいて飼料摂取量および体重増加量の抑制が認められた。1.0%パントテン酸カルシウム食餌摂取ラットには飼料摂取量、体重増加量、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の各重量にパントテン酸カルシウム大量摂取の影響は認められなかった。これらの結果から、ラットにおけるパントテン酸の LOAEL は 2,760 mg/kg 体重/日、NOAEL は 920 mg/kg 体重/日であった。

A. 目的

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、パントテン酸の許容上限摂取量は策定されなかった。これは、「これまでの報告では、パントテン酸の過剰摂取あるいは投与による毒性および副作用は認められていない。この結果、パントテン酸の毒性はきわめて低いと考えられている。LOAEL および NOAEL は正確には決められないので、パントテン酸の許容上限摂取量を設定することは今回はしなかった。」ためである。米国の Dietary Reference Intakes においても、パントテン酸の許容上限摂取量は策定されていない<sup>1)</sup>。これは、パントテン酸経口摂取による悪影響について系統的に調べた報告がないためである。本研究では、パントテン酸の許容上限摂取量を策定するための基礎的データを得ることを目的として、パントテン酸カルシウムの大量摂取がラットにおよぼす影響について検討した。

B. 研究方法

動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は 22°C 前後、湿度は 50% 前後、午前 6 時～午後 6 時を明、午後 6 時～午前 6 時を暗とした。3 週齢の Wistar 系雄ラット 12 匹を日本クレア（株）より購入し、平均体重がほぼ等しくなるよう 4 匹ずつ 3 群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。

20%カゼイン食にパントテン酸カルシウムを 0.0016, 1.0, 3.0% 添加した食餌を与え、29 日間飼育した。0.0016% 添加食餌摂取ラットを対照群、1.0, 3.0% 添加食餌摂取ラットを大量摂取群とした。飼料と水は自由摂取とし、1 日ないし 2 日おきの午前 9 時～10 時に新しいものと交換した。また、その際に体重と飼料摂取量を測定した。飼育最終日の 1 日尿および 1 日糞（午前 10 時～翌日午前 10 時：24 時間）を集めた。飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し、血液を採取した。脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣を摘出し、各臓器重量を測定した。血液は総パントテン酸の測定に、肝臓は総パントテン酸、CoA の測定に使用した。尿はチアミン、リボフラビン、4-ピリドキシニン酸、ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸、葉酸、アスコルビン酸の測定に使用した。

分析

尿中パントテン酸含量の測定として、尿 10  $\mu$ l を含むパントテン酸定量用基礎培地（日水製薬株式会社）2 ml に *Lactobacillus Plantarum*, ATCC 8014 を接種した。16 時間培養後、比色計を用いて 660 nm における濁度を測定した。血および肝総パントテン酸含量の測定として、血液 100  $\mu$ l を 50 mM KPB (pH 7.0) 1 ml に加えてよく混和し、肝臓約 0.1 g を 10 倍量の 50 mM KPB (pH 7.0) 中でホモジナイズした。これらを 100°C で 5 分間加熱後、氷冷し

た。遠心上清 100  $\mu$ l に 10 U/ml ホスファターゼ 50  $\mu$ l, 10 U/ml アミダーゼ 50  $\mu$ l, 15  $\mu$ g/ml 還元型グルタチオン 50  $\mu$ l を加えて 37°C で 2 時間処理し, 50 mM KPB (pH 7.0) 2.25 ml を加え, 100°C で 5 分間加熱後, 氷冷した。遠心上清を取り, 沈殿に水 2.5 ml を加えて攪拌し, 遠心上清を先の上清と合わせた。これを用いて上記の *Lactobacillus Plantarum*, ATCC 8014 による微生物学的パントテン酸定量法の供した。肝 CoA 含量の測定として, 上記の肝総パントテン酸含量の測定でホモジナイズ, 加熱, 氷冷して得た遠心上清を用いた。この遠心上清 50  $\mu$ l に 1 M Tris-HCl (pH 7.2) 250  $\mu$ l, 1 M KCl 50  $\mu$ l, 0.2 M L(-)-リンゴ酸ナトリウム 50  $\mu$ l, 0.08 M アセチルリン酸 50  $\mu$ l, 0.02 M  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 50  $\mu$ l, 100 U/ml リンゴ酸デヒドロゲナーゼ 20  $\mu$ l, クエン酸シンターゼ 20  $\mu$ l を加えて 30°C で 2 分間加熱後, 50 U/ml ホスホトランスアセチラーゼ 60  $\mu$ l を加えて 340 nm における 1 分間の NADH の産生量を追跡した。

尿中チアミン含量の測定として, 尿を 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過し, 20  $\mu$ l を HPLC による分析に供した。分析条件は, カラム: Shodex Rs-pak NN-614 ( $\phi$ 6.0 x 150 mm), 移動相および流速: 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 ml/min, 反応液: 0.01% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.15 ml/min および 15% NaOH, 0.15 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光光度計, 励起波長 365 nm, 蛍光波長 435 nm とし, ポストカラム法を用いた。

尿中リボフラビン含量の測定として, 尿を 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過し, 20  $\mu$ l を HPLC による分析に供した。分析条件は, カラム: Tosoh ODS-80Ts ( $\phi$ 4.6 x 250 mm), 移動相: 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.5)-メタノール (70 : 30 v/v), 流速: 0.8 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光光度計, 励起波長 445 nm, 蛍光波長 530 nm とした。

尿中 4-ピリドキシン酸含量の測定として, 尿を 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過し, 20  $\mu$ l を HPLC による分析に供した。分析条件は, カラム: TSKgel ODS-120A ( $\phi$ 4.6 x 250 mm), 移動相: 2.2% リン酸 (pH 2.2)-メタノール (90 : 10 v/v), 流速: 1.0 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光光度計, 励起波長 355 nm, 蛍光波長 436 nm とした。

尿中ニコチンアミド代謝産物量はニコチンアミド, N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (MNA), N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計とした。尿中ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py 各含量の測定として, 尿 1 ml

に炭酸カリウム 1.2 g を添加した後, ジエチルエーテル 10 ml を加えてよく混合し, エーテル層を蒸発乾固させた。この乾固物を水 0.5 ml に溶解し, 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過し, 20  $\mu$ l を HPLC による分析に供した。分析条件は, カラム: Chemcosorb 7-ODS-L ( $\phi$ 4.6 x 250 mm), 移動相: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.0)-アセトニトリル (96 : 4 v/v), 流速: 1.0 ml/min, カラム温度: 25°C, 検出器: 紫外分光光度計 260 nm とした。内部標準であるイソニコチンアミドのピーク面積から回収率を求め, ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py 量を算出した。尿中 MNA 含量の測定として, 尿 0.1 ml, 水 0.7 ml, 1M イソニコチンアミド溶液 0.2 ml, 0.1M アセトフェノン溶液 0.5 ml を混合した後, 6M NaOH 溶液 1 ml を加えて 10 分間氷冷し, 99% ギ酸 0.5 ml を加えて 15 分間室温で放置した。沸騰水浴中で 5 分間放置した後, 十分に氷冷し, 遠心上清を 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過し, 20  $\mu$ l を HPLC による分析に供した。分析条件は, カラム: Tosoh ODS 80Ts ( $\phi$ 4.6 x 250 mm), 移動相: 1 g/l 1-ヘプタスルホン酸ナトリウムおよび 1 mM EDTA-2Na を含む 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.0)-アセトニトリル (97 : 3 v/v), 流速: 1.0 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光光度計, 励起波長 382 nm, 蛍光波長 440 nm とした。

尿中アスコルビン酸含量の測定として, 尿 100  $\mu$ l に 0.2% 2, 6-ジクロロインドフェノール 100  $\mu$ l, 1% 塩化スズ-5% メタリン酸 50  $\mu$ l, 2% 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 M 硫酸 120  $\mu$ l を加えて混和し, 37°C で 3 時間放置後, 水 1 ml, 酢酸エチル 1 ml を加えて混和した。遠心分離後, 酢酸エチル層 600  $\mu$ l を蒸発乾固させ, 乾固物をアセトニトリル 200  $\mu$ l に溶解し, 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過し, 20  $\mu$ l を HPLC による分析に供した。分析条件は, カラム:  $\mu$  Bodasphere 5 $\mu$  C18-100A ( $\phi$ 3.9 x 150 mm), 移動相: 0.1% トリエチルアミン (pH 3.0)-アセトニトリル (50 : 50 v/v), 流速: 1.0 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 紫外分光光度計 505 nm とした。

### C. 結果

パントテン酸カルシウムの大量摂取が飼料摂取量および体重増加量におよぼす影響

薬剤や栄養素の大量摂取による明らかな過剰害を調べる指標として, 飼料摂取量の低下とそれに伴う体重増加量の抑制が挙げられる。本研究では, 3 週齢 Wistar 系雄性ラットに 0.0016~3.0% のパントテン酸カルシウ

ムを含む食餌を与えて 29 日間飼育した。この飼育期間において、対照群に比し、3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて飼料摂取量および体重増加量の抑制が認められた (図 1)。

#### パントテン酸カルシウムの大量摂取が臓器重量におよぼす影響

飼育 29 日目に脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣を摘出し、各臓器重量を測定した。各群の体重が異なることから、体重 100 g 当たりの各臓器重量を比較した。3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて、若干ではあるが、肝臓および腎臓重量の増加が認められた (表 1)。1.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて、各臓器重量にはパントテン酸カルシウム摂取の影響は認められなかった (表 1)。

#### パントテン酸カルシウムの大量摂取が尿中パントテン酸排泄量におよぼす影響

飼育 29 日目の 1 日尿に含まれるパントテン酸量を測定した。各群の飼料摂取量が異なることから、飼料摂取 1 g 当たりの尿中パントテン酸排泄量を比較した。0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットに比し、1.0%および 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの尿中パントテン酸排泄量はそれぞれ約 340 倍、約 630 倍と濃度依存点に増加した (図 2)。

#### パントテン酸カルシウムの大量摂取が血中および肝総パントテン酸濃度、肝 CoA 濃度におよぼす影響

飼育 29 日目の血液および肝臓に含まれる総パントテン酸量、肝臓に含まれる CoA 量を測定した。血中総パントテン酸濃度は 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの 1.5 倍の値を示した (図 3-A)。肝総パントテン酸濃度は 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの 2.2 倍の値を示した (図 3-B)。肝 CoA 濃度は常に 220 nmol/g of liver を示し、パントテン酸カルシウム大量摂取の影響を受けなかった (図 3-C)。

#### パントテン酸カルシウムの大量摂取が尿中 B 群ビタミン排泄量におよぼす影響

飼育 29 日目の 1 日尿に含まれるチアミン、リボフラビン、4-ピリドキシン酸、ニコチンアミド代謝産物、アスコルビン酸の含量を測定した。各群の飼料摂取量が異なることから、飼料摂取 1 g 当たりの各ビタミン代謝産物量

として示した。リボフラビン、ニコチンアミド代謝産物、アスコルビン酸の各尿中排泄量にはパントテン酸カルシウム大量摂取による影響は認められなかった (図 4)。しかし、3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの尿中チアミン排泄量は 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの 5%の値に低下した (図 4-A)。1.0%および 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの尿中 4-ピリドキシン酸排泄量は 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの 15%の値に低下した (図 4-C)。また、ニコチンアミド代謝産物の排泄比を示す (2-Py + 4-Py) : MNA 比は 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの約 60%に低下した (図 4-F)。

#### D. 考察

本研究では、パントテン酸の許容上限摂取量を策定するための基礎的データを得ることを目的として、ラットに 0.0016~3.0%のパントテン酸カルシウムを含む食餌を与えて 29 日間飼育し、パントテン酸カルシウムの大量摂取がラットにおよぼす影響について検討した。3.0%パントテン酸カルシウム食の摂取により、飼料摂取量および体重増加量が抑制され、明らかな悪影響が認められた。一方、1.0%パントテン酸カルシウム食を摂取したラットには、飼料摂取量、体重増加量、臓器重量に影響は認められなかった。ラットにはパントテン酸源としてパントテン酸カルシウムを大量に与えたが、3.0%パントテン酸カルシウム食 100 g に含まれるカルシウム量は 0.25 g である。パントテン酸カルシウム以外のカルシウムは食餌 100 g 当たり 0.49 g 含まれることから、カルシウム摂取量の増加が悪影響を引き起こしたのではない。以上の結果から、本研究では、3.0%パントテン酸カルシウム食を摂取したラットにはパントテン酸カルシウム摂取による悪影響が認められ、1.0%パントテン酸カルシウム食を摂取したラットには影響は認められず、これらのラットの摂取量からパントテン酸の LOAEL および NOAEL を算定した。すなわち、体重 200 g のラットが 3.0%のパントテン酸カルシウムを含む食餌を 1 日に約 20 g 摂取し、パントテン酸カルシウム (分子量 476.5) 1 mol にはパントテン酸 (分子量 219.2) 2 mol が含まれていることから、パントテン酸の LOAEL を 2,760 mg/kg 体重/日とした。同様に、体重 200 g のラットが 1.0%のパントテン酸カルシウムを含む食餌を 1 日に約 20 g 摂取したことから、

パントテン酸の NOAEL を 920 mg/kg 体重/日とした。

本研究では、大量摂取したパントテン酸の動態を明らかにするため、尿中のパントテン酸含量、血液および肝臓のパントテン酸含量、肝臓の CoA 含量を測定した。尿中のパントテン酸含量はパントテン酸カルシウムの大量摂取により数百倍に増加し、その増加は摂取量依存性を示した。3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて血中および肝臓パントテン酸濃度の増加が認められた。しかし、肝 CoA 濃度には影響は認められなかった。パントテン酸の大量摂取により体内のパントテン酸保持量は増加するが、そのほとんどは尿に排泄され、またパントテン酸の生理活性型である CoA の恒常性は厳密に保たれることを示している。尿中パントテン酸排泄量の測定がパントテン酸大量摂取の指標になるうることも示している。

パントテン酸カルシウムの大量摂取により、尿中 4-ピリドキシン酸排泄量が減少した。4-ピリドキシン酸はピリドキザールをオキシダーゼが酸化することによって産生する。ビタミン B<sub>6</sub> 栄養状態の指標について検討しなかったが、悪影響が認められなかった 1.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいても尿中 4-ピリドキシン酸排泄量が減少したことから、ビタミン B<sub>6</sub> 栄養が悪化したというより、むしろピリドキザール代謝が影響を受けたことが考えられる。尿中ニコチンアミド代謝産物量はパントテン酸カルシウムの大量摂取の影響を受けなかったが、尿中ニコチンアミド代謝産物の構成比を示す (2-Py + 4-Py) / MNA がパントテン酸カルシウム大量摂取によって減少した。2-Py と 4-Py は MNA をオキシダーゼが酸化することによって産生することから、パントテン酸カルシウム大量摂取によって MNA 代謝が影響を受けたことが考えられる。これらより、パントテン酸大量摂取はオキシダーゼに影響をおよぼす可能性が考えられる。パントテン酸カルシウム大量摂取による悪影響がどのような機構によって生じるのかは不明であるが、オキシダーゼが関与するかもしれない。

#### E. 健康危機情報

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. Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press.

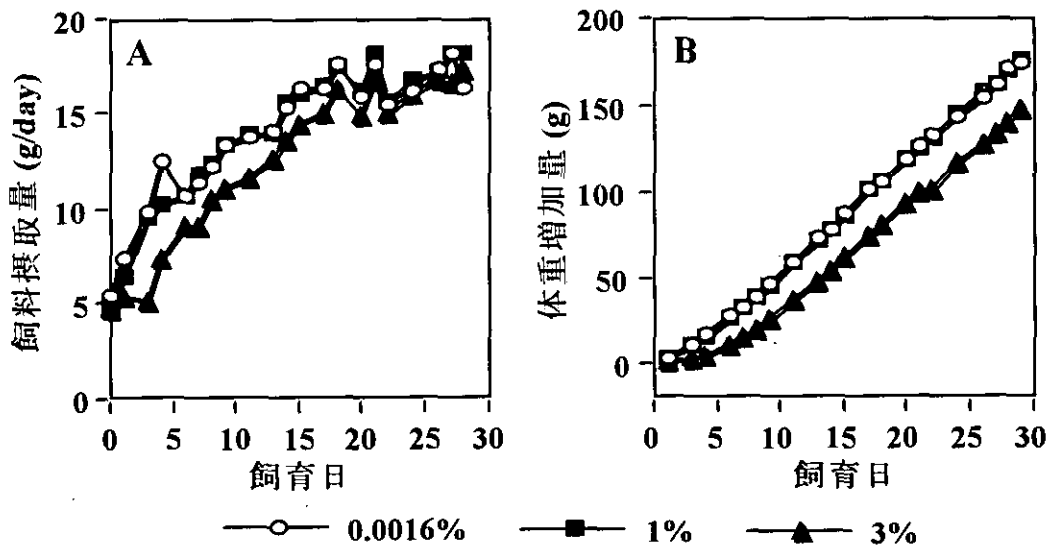


図 1. パントテン酸カルシウム大量摂取が飼料摂取量 (A) および体重増加量 (B) におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した.



表1 パントテン酸カルシウム大量摂取が臓器重量におよぼす影響

	食餌中のパントテン酸カルシウム濃度		
	0.0016%	1.0%	3.0%
脳 (g/100g 体重)	0.74±0.07	0.78±0.07	0.87±0.05
心臓 (g/100g 体重)	0.37±0	0.37±0.01	0.39±0.01
肺 (g/100g 体重)	0.51±0.01	0.56±0.04	0.62±0.03
肝臓 (g/100g 体重)	4.67±0.06	4.73±0.15	5.19±0.14*
脾臓 (g/100g 体重)	0.32±0.01	0.35±0.03	0.39±0.03
腎臓 (g/100g 体重)	0.85±0	0.86±0.02	0.96±0.02*
精巣 (g/100g 体重)	1.03±0.01	1.09±0.02	0.99±0.04

値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した. \*は0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの値と有意差があることを示す ( $p < 0.05$ ).

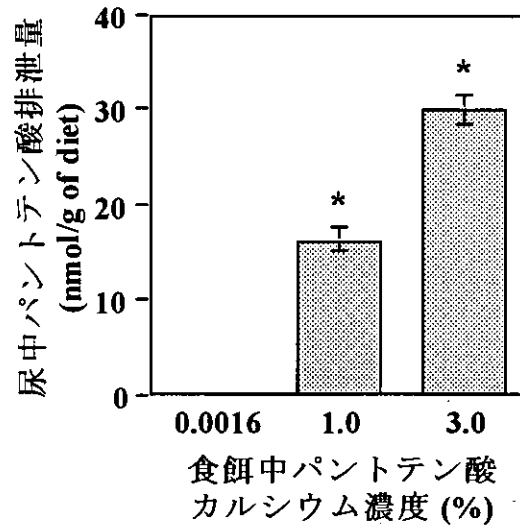


図2. パントテン酸カルシウム大量摂取が尿中パントテン酸排泄量におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した. \*は0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの値と有意差があることを示す ( $p < 0.05$ ).

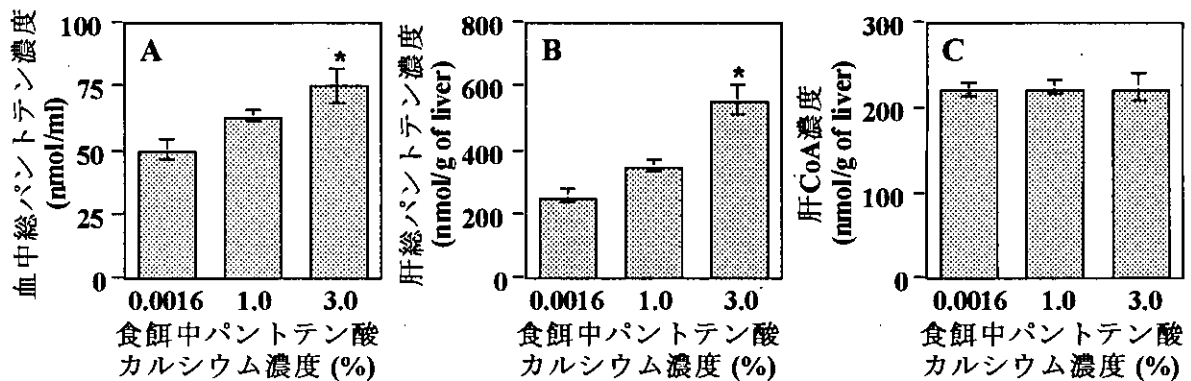


図3. パントテン酸カルシウム大量摂取が血中総パントテン酸濃度 (A) 肝総パントテン酸濃度 (B) および肝 CoA 濃度 (C) におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した. \*は0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの値と有意差があることを示す ( $p < 0.05$ ).

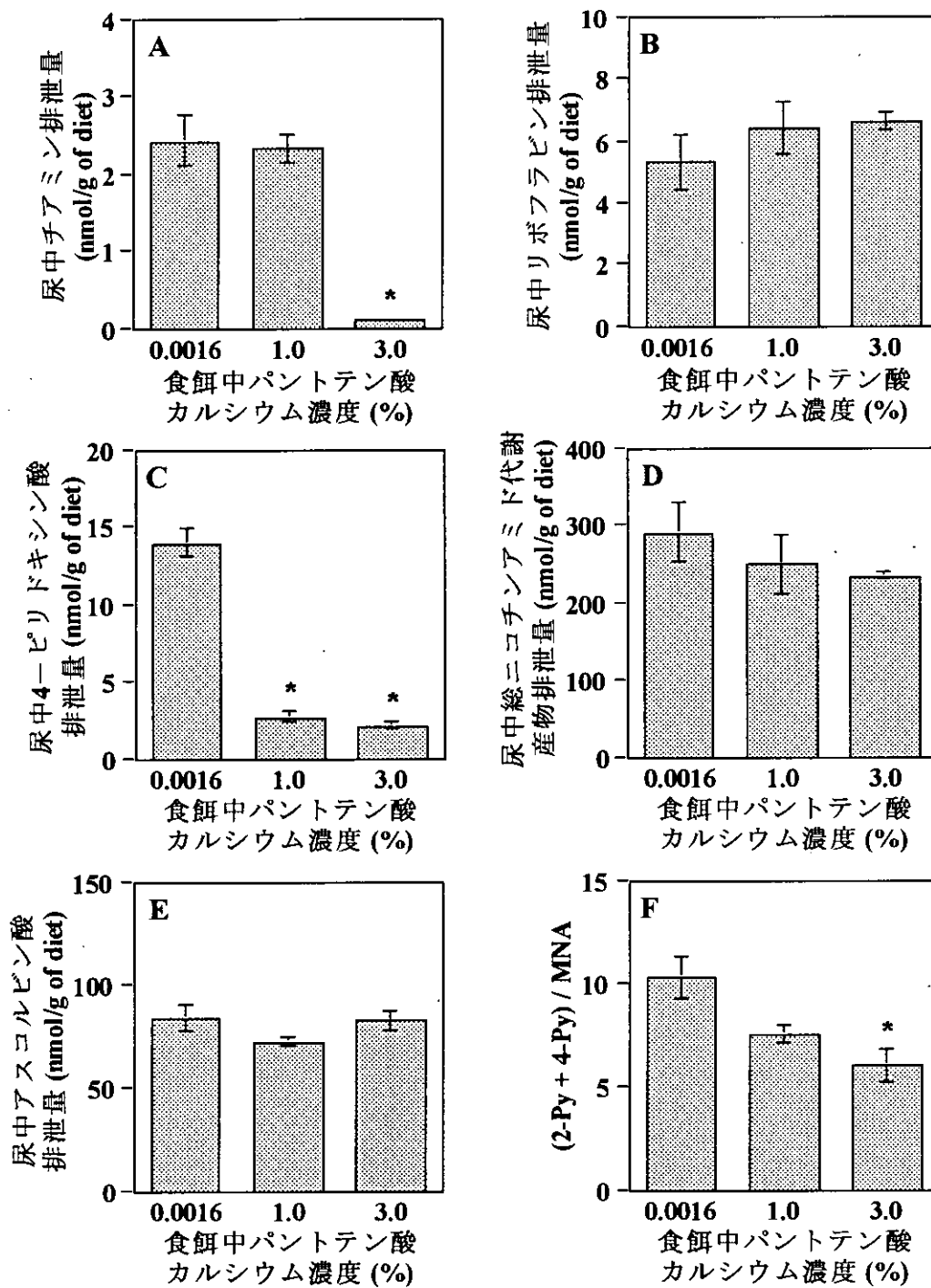


図4. パントテン酸カルシウムの大量摂取がチアミン (A), リボフラビン (B), 4-ピリドキシン酸 (C), ニコチンアミド総代謝産物 (D), アスコルビン酸 (E) の各尿中排泄量, およびニコチンアミド代謝産物比 (F) におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した. \*は0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの値と有意差があることを示す ( $p < 0.05$ ).

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

4. 栄養所要量に従った食事摂取時のトリプトファン-ナイアシン転換係数

研究協力者 福渡努 滋賀県立大学 助手

研究要旨

ナイアシンの必要量を確立するには、はじめにトリプトファンからどの程度のナイアシンが体内で合成されているかを明らかにしなければならない。日本人の栄養所要量では、従来の研究から、60 mg のトリプトファンがナイアシン 1 mg と等価であるという値を採用している。しかしながら、このトリプトファン-ナイアシン転換係数は、多くの栄養因子によって変動することが明らかにされ、更なる検討が要求されている。そこで、第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準に従った栄養素量を投与した時の本転換係数を調べた。被験者は 10 名の女子学生で、実験期間の 7 日間は、同じホテルに宿泊し、一定の生活スケジュールをおくらせた。転換率を測定するために、実験期間中、24 時間尿を毎日集めた。転換率はトリプトファン摂取量と尿中に排泄されるナイアシン異化代謝産物である  $N^1$ -メチルニコチンアミド、 $N^1$ -メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド、 $N^1$ -メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミドの合計量との比較から求めた。その結果、第六次改定日本人の栄養所要量に従った時のトリプトファン-ナイアシン転換係数は  $73 \pm 19$  であった。これは、73 mg のトリプトファンが 1 mg のナイアシンと等価であるということを示す。

A. 目的

1920 年に Goldberger が、トリプトファンによってペラグラの治療ができることを初めて発見してから 80 年以上たった<sup>1)</sup>。1945 年に Krehl らが、トウモロコシを含む食事を食べさせたラットの著しい成長遅延の特徴が、適量のトリプトファンを補足することにより抑えられたことを示した<sup>2)</sup>。さらに彼らは、食事 100 g 中のニコチン酸 1 mg は 50 mg のトリプトファンによって交換できることを明らかにした。1947 年に Perlzweig らは、小児と成人の両方においてトリプトファンの摂取がニコチンアミドの代謝産物の  $N^1$ -メチルニコチンアミド (MNA) の尿中排泄の刺激を導き、増加させることを報告した<sup>3)</sup>。1952 年に、トリプトファンがペラグラを治療できるという最初の明らかな証拠が Goldsmith によって報告された<sup>4)</sup>。

トリプトファンがニコチンアミドにどれだけ転換できるかの概算は、ヒトのナイアシン必要量を決定するのに非常に重要である。1956 年のアメリカ合衆国での研究では、Horwitt らが男性において、およそ 60 mg のトリプトファンが 1 mg のナイアシンと等価であることを証明した<sup>5)</sup>。これは、異なるレベルのナイアシンとトリプトファンの摂取量

と、MNA 排泄量のレベルとの比較から算定された。彼らの報告には、グループ間の転換率の平均が、消耗と補充の期間の長さによって 46 分の 1 から 86 分の 1 の間でいろいろ大きく変動したと記された。

ヒトの妊娠期間中の、一定の代謝産物排泄の増加した割合は、何人かの研究者によって報告されている。例えば Wertz らは妊娠期間後期のナイアシン 1 mg に相当するトリプトファンの量が、7 から 30 mg までいろいろである（平均 18 mg）と報告している<sup>6)</sup>。Goldsmith らは、投与したトリプトファンのうち平均 3.3% がナイアシンに転換されたことを、言い換えれば別の方法で明らかにした。彼らは、トリプトファンの投与後、ナイアシンの代謝産物である MNA と  $N^1$ -メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py) の排泄を比較することによって 55.8 mg のトリプトファンが 1 mg のナイアシンと等価であると明らかにした<sup>7)</sup>。彼らの報告によると、転換率が個々の被験者間でかなりの差があると記されており、1 mg のナイアシンはトリプトファンの 35~86 mg に相当することを見出した。これらの報告は、転換率の値に高い変動があることを指摘した。遺伝や食事の変動を通じて維持できるトリプトファンとナイアシンとの

消費の確固たる関係の存在を仮定することが合理的ではないことを示唆している (Horwitt<sup>8)</sup>). しかし、一方で Horwitt はトリプトファンとナイアシンとの関係の評価をはっきりさせることは重要だと説いた。この理解の不足は、今日なお問題である。

その報告は、すべてアメリカ人の被験者を使って行われたと言及した。今実験では、日本人の被験者が評価される。1969年、1973年、1980年に行われた3つの論文は、先に完了されている<sup>9-11)</sup>。これらの3つの報告には、アメリカ人の被験者を使って得られた資料に見られるのと同じように、転換率が個々の被験者間でかなりばらついていた。従って、日本の健康栄養の研究グループは1 mgのナイアシンは60 mgのトリプトファンから得られる値を採用したが<sup>12)</sup>、より純粋な食事を食べさせた日本の被験者のもっと多くの実験が必要であると述べた。

この実験では、20~22歳の10人の健康な日本の女子学生を選び、7日間、日本人の栄養所要量とほとんど同じ組成のナイアシンを含まない精製した食事を与えた<sup>12)</sup>。ナイアシンの十分な量がトリプトファンの食事摂取から供給されるだろうということを考慮に入れて、食事はナイアシンを含まなかった。転換率は、トリプトファンの摂取した量とMNAと2-Py、N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)のようなナイアシンの主な尿中代謝産物とを比較することによって算定した。

## B. 研究方法

### 被験者

選抜した日本の女子学生10人の被験者は、年齢20.9±0.7(平均±SEM)歳、身長161.8±1.4 cm、実験開始時の体重55.7±1.7 kg、実験終了時は55.6±1.5 kgであった。今回の研究は、独立行政法人国立健康・栄養研究所の倫理委員会により審理され、承認された。

### 実験方法

すべての被験者は、9日間(2003年3月3日~3月11日)、同じ施設に生活した。実験は3月4日の午前6時に開始し、3月11日の午前6時に終了した。第1日目は3月4日午前6時から、3月5日午前6時までであった。実験最終日、第7日目は3月10日午前6時から3月11日午前6時であった。24時間尿(午前6時~午前6時)は毎日採集した。集めた尿は、直ちに濃塩酸を加え、終濃度が0.1 mol/Lになるように酸性化し、尿量を測定し、サンプルは使用するまで-20°Cで保存した。

血液は前腕の静脈血管から採血し、直ちにニコチンアミド<sup>13)</sup>とNAD<sup>14)</sup>、NADP<sup>15)</sup>の総量をおのおの分析した。

一日の予定は、部分的に制限した。午後10時に消灯し、午前6時に起床し、朝食は午前8時から9時、昼食は午後0時30分から1時10分、夕食は午後6時30分から7時とした。半精製食の組成と分量は表1に示した。一日当たりの総エネルギー量は1,800 kcal、総たんぱく質量はおよそ55 g、総脂質エネルギー比25%であった。食事には一日当たり674 mgのトリプトファンが含まれている(およそ3.3 mmol; 0.674/204 = 3.3×10<sup>-3</sup> mol)。これは和光純薬(大阪)から購入したカゼインとグルテンのたん白含量はおのおの87.5%と81.6%で、そのうちカゼインとグルテンのトリプトファン含量がそれぞれ1.3%と1.1%と仮定して算定した。被験者の時間は起床から就寝まで監視した。体重と身長は朝食前に毎日測定した。被験者は午前9時から12時10分までと午後1時10分から6時までは第1日目から7日目まで講義に出席した。

### 試薬

ビタミン欠ミルクカゼインとグルテン、コーンスターチ、グラニュー糖、ビタミン類、キノリン酸(QA)、アンストラニル酸(AnA)は和光純薬(大阪)から購入した。キヌレニン硫酸塩とMNA塩化物、キサントレン酸(XA)、キヌレニン酸(KA)、3-ヒドロキシアンストラニル酸(3-HA)は東京化成工業(東京)から購入した。2-Pyと4-PyはPullmanとColowick<sup>16)</sup>と柴田ら<sup>17)</sup>による方法で合成した。

### 分析

尿のMNAは、柴田のHPLC法で測定した<sup>18)</sup>。尿中の2-Pyと4-Py量は柴田らのHPLC法により同時に測定した<sup>17)</sup>。尿中のKA<sup>19)</sup>とXA<sup>20)</sup>、3-HA<sup>20)</sup>、AnA<sup>21)</sup>、QA<sup>22)</sup>は、HPLC法で測定した。血中の総ニコチンアミド(遊離ニコチンアミド+NAD+NADP)量は、柴田らのHPLC法で測定した<sup>17)</sup>。NAD(NAD<sup>+</sup>+NADH)量とNADP(NADP<sup>+</sup>+NADPH)量はそれぞれ酵素サイクル法により測定した。

## C. 結果

### 血中ナイアシン量

ヒトは栄養状態がよい場合は、体の機能は一定に保たれている。ヒトの全血中の総ニコチンアミド量は50~80 nmol/ml、NADは25~40 nmol/ml、NADPは8~15 nmol/ml程度に調節されている<sup>23)</sup>。今回の実験では、ニコチンアミドとNAD、NADPの総量は正常範囲内

だった (表2)。

#### トリプトファン-ナイアシン代謝の上流の尿中代謝産物

図1は、実験期間中に採集したAnAとKA、XA、3-HA、QAの尿中排泄量を表している。図2に示すとおり、これらの代謝産物はトリプトファンからのみ生ずる。被験者は実験前の期間に自由に食事したのであるが、尿中に見られるおのおの上流の代謝産物は、比較的一定の水準にとどまった。これらの発見は、被験者が実験前の期間中、およそ同じ量のトリプトファンを摂取したことを暗に示しているかも知れない。今回の実験中に、トリプトファンは一日あたり674 mgあるいは3300  $\mu\text{mol}$ 程度摂取された。最終日の第7日目で、トリプトファンからの構成の占める割合はAnAでおよそ0.06%、KAは0.13%、XAは0.11%、3-HAは0.13%、QAは0.34%と計算した。

#### トリプトファン-ナイアシン代謝の下流の尿中代謝産物

図3は、実験期間中に採集したMNAと2-Py、4-Pyの尿中排泄量を表している。下流の代謝産物は第4日目までは徐々に減少したが、第4日目から第7日目まではより一定にとどまった。今回の実験では、被験者が食べた規定食にはナイアシンが含まれていないため、これらの代謝産物は摂取したトリプトファンからのみ生じた。しかしながら、前半の日である第1日目、2日目、3日目の合計(MNA+2-Py+4-Py)の高い値は、実験前の期間に摂取したナイアシンの影響が現れているのかも知れない。

#### トリプトファンからナイアシンの転換率と転換係数

図4-Aはトリプトファンからナイアシンへの転換率を示し、同時に、図4-Bはトリプトファンからナイアシンへの転換係数を示す。転換率は第4日目まで徐々に減少し、後にそれらは一定の水準にとどまった。このデータは、実験前の期間に蓄えられたナイアシンが、最後の3日間までに使い尽くすようになるかも知れないことを暗に示している。それゆえに、第1日目、2日目、3日目からのデータは、トリプトファンからナイアシンへの真の転換率を反映しないかも知れない。最終日、第7日目において、以下の方程式、 $\{(MNA+2\text{-Py}+4\text{-Py}) (\mu\text{mol}/\text{日}) / (\text{トリプトファン摂取量 } 3300 \mu\text{mol}/\text{日})\} \times 100$  を使って算定した転換率は1.5%であった。ニコチンアミドの尿中排泄量は非常に小さく、一日あた

り300 nmol以下であり、使用した方法<sup>17)</sup>では検知するのに限界に近いのであろう。それゆえに、ニコチンアミドの値は、転換率を算定するには含まなかった。

一般に、栄養分野ではナイアシン1 mgをトリプトファン当量の量として使用している。従って、トリプトファンがナイアシンになる転換係数は以下の方程式、 $1 / (\text{転換率} / 100) \times 0.6 \times (122/204)$  で算出し、そして、ニコチンアミドを摂取後の尿中排泄量の割合は0.6である。以前の試験では<sup>24)</sup>、摂取したニコチンアミドのおよそ60%がMNA、2-Py、4-Pyとして排泄された。ニコチンアミドの分子量は122であり、トリプトファンは204である。第7日目の転換係数は、およそ73であった。

#### 男性での実験

同様の試験を一人の男性を使って行った。食事は日本人の栄養所要量どおりに維持した<sup>12)</sup>。摂取した総たんぱく質量は一日あたり65 gであった。被験者は日本人男性で、年齢は51歳、身長は176.8 cm、体重は69.0 kgであった。彼のデータは図3に示した。AnAとKA、XA、3-HA、QAの尿中排泄量は、女性の実験で得られた範囲にあった。転換係数は、しかしながら女性の実験と比較してそう高くはなかった。

#### D. 考察

補酵素のナイアシンは、哺乳動物で400種類以上の酵素に必要である。これの要求は、大部分がB群ビタミンに集中している。補酵素のナイアシンの前駆体に関する限りでは、3つの知られている栄養素、すなわちニコチン酸とニコチンアミド、トリプトファンがある。これらの内のニコチン酸とニコチンアミドは直接、補酵素のNADとNADPに結合するが一方、トリプトファンは補酵素に結合するようになるまでにキノリン酸に転換しなければならない。トリプトファンからキノリン酸への転換経路は(図2を参照)多くの栄養因子<sup>25,26)</sup>やホルモン因子<sup>27)</sup>によって複雑に調節されている。これは、転換率の標準偏差がとても高い理由だ。それゆえに、ヒトが栄養所要量に従った全栄養素を摂取したときに適切な値を知ることは重要だ。

現在、日本人の被験者でのトリプトファン-ナイアシン転換に関する論文が3報ある<sup>9-11)</sup>。これらの報告には、重要な変動が認められた。今回の実験では、被験者は日本人の栄養所要量に従った精製食を食べた。今回の条件の下では、その転換率  $\{(MNA+2\text{-Py}+$

4-Py) ( $\mu\text{mol}/\text{日}$ )/(トリプトファン摂取量 3300  $\mu\text{mol}/\text{日}$ ) $\times 100$  は、実験の最終日に 1.5%と評した。転換係数は 73 であったが、前述の食事を摂取した時に若い日本女性の体内で、1 mg のニコチンアミドが 73 mg のトリプトファンから作られることを意味している。今回の理想的な制限した条件下では、まだ標準偏差はおおよそ 25%と高く、いくらかのばらつきは遺伝的要因のせいかもしれないことを暗に示している。

ひとりの男性を使って平行した実験を行った。彼の転換係数は 50 で (表 3)、女性の実験で得られた範囲にあった。

結論として、73 と認めた転換係数は、73 mg のトリプトファンが 1 mg のニコチンアミドあるいは 1 mg のニコチン酸と等価であることを示し、日本人の成人に適切であろう。しかしながら、この値が 25%と高い偏差があることも考慮する必要がある。

#### E. 健康危機情報

特記する必要なし。

#### F. 研究発表

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. Goldberger J, Wheeler GA. (1920) *U.S. Pub. Health Serv. Hygienic Lab. Bull.*, No. 120.
2. Krehl WA, Teply LJ, Sarma PS, Elvehjem CA. (1945) *Science*, **101**, 489-490.
3. Perlzweig WA, Rosen F, Levitas N, Robinson J. (1947) *J. Biol. Chem.*, **167**, 511-514.
4. Goldsmith GA, Sarett HP, Register UD, Gibbens J. (1952) *J. Clin. Invest.*, **31**, 533-542.
5. Horwitt MK, Harvey CC, Rothwell WS, Cutler JL, Haffron D. (1956) *J. Nutr.* **60 Suppl.**, **1**, 1-43.
6. Wertz AW, Lojkin ME, Bouchard BS, Derby MB. (1958) *J. Nutr.*, **64**, 339-353.
7. Goldsmith GA, Miller ON, Unglaub WG. (1961) *J. Nutr.*, **73**, 172-176.
8. Horwitt MK. (1958) *J. Am. et DiAssoc.*, **34**, 914-918.
9. Nakagawa I, Takahashi T, Suzuki T, Masana Y. (1969) *J. Nutr.*, **99**, 325-330.
10. Nakagawa I, Takahashi T, Sasaki A, Kajimoto M, Suzuki T. (1973) *J. Nutr.*, **103**, 1195-1199.
11. 村田希久, 本岡和美 (1980) 日本栄養・食糧学会誌, **33**:339-406.
12. 第 6 次改定 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—(1999) 健康・栄養情報研究会 編 第一出版
13. 柴田克己 (1988) ビタミン, **62**, 225-233.
14. Shibata K, Murata K. (1986) *Nutr. Int.*, **2**, 177-181.
15. Shibata K, Tanaka K. (1986) *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2941-2942.
16. Pullman ME, Colowick SP. (1954) *J. Biol. Chem.*, **206**, 121-7.
17. Shibata K, Kawada T, Iwai K. (1988) *J. Chromatogr.*, **424**, 23-8.
18. 柴田克己 (1987) ビタミン, **61**, 599-604.
19. Shibata K. (1988) *J. Chromatogr.*, **430**, 376-380.
20. Shibata K, Onodera M. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 974.
21. Shibata K, Onodera M. (1991) *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 143-148.
22. Mawatari K, Oshida K, Iinuma F, Watanabe M. (1995) *Anal. Chim. Acta.*, **302**, 179-183.
23. 柴田克己, 松尾弘子 (1989) ビタミン, **63**, 569-572.
24. 柴田克己, 小野寺学子, 島田俊一, 安田和人 (1992) ビタミン, **66**, 309-314.
25. 柴田克己 (1996) ビタミン, **70**, 369-382.
26. 柴田克己 (1997) ビタミン, **71**, 519-529.
27. 柴田克己 (1998) ビタミン, **72**, 85-96.

表 1. 食事組成

	(g/日)	注釈
ビタミン欠カゼイン	39.5	87.5%のたんぱく質が含まれ、正味のたんぱく質量は 34.6 g である。トリプトファン量は 1.3% で 449.3 mg のトリプトファンが供給される。
グルテン	25.0	81.6%のたんぱく質が含まれ、正味のたんぱく質量は 20.4 g である。トリプトファン量は 1.1% で 224.4 mg のトリプトファンが供給される。
コーンスターチ	274	
グラニュー糖	50	
脂質		S:M:P=3:4:3 となるようにした。多価不飽和脂肪酸は n-6:n-3=4:1 とした。
大豆油	10.1	
なたね油	13.8	
やし油	6.2	
ラード	8.9	
食物繊維		
水溶性	3.6	水溶性食物繊維は松谷化学工業製の「ファイバーゾル」を使用し、不溶性食物繊維はトスコ株式会社製のラミーの繊維を使った。
不溶性	14.4	
ミネラル混合	18.0	組成は下記を参照。
合計	463.5	

朝食と夕食は、上記の粉末混合物 139 g に 91 ml の水を加え、よく混ぜ、250°C のオーブンで 9 分焼いた。焼き上がりの重量は 175 g であった。その食事と 0.3 g のビタミン混合（組成は下記を参照）を被験者に与えた。昼食には、上記の混合物 185.5 g に 122 ml の水を加え、よく混ぜ、250°C のオーブンで 10 分焼いた。焼き上がりの重量は 233 g であった。その食事と 0.4 g のビタミン混合（組成は下記を参照）を被験者に与えた。

ミネラル混合の組成は、CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O を 1,100 mg と CaCO<sub>3</sub> を 860 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 2,200 mg, KHCO<sub>3</sub> を 3,500 mg, MgCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O を 2,100 mg, FeSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O を 60 mg, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O を 13 mg, ZnCl<sub>2</sub> を 19 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O を 6.3 mg, KI を 0.2 mg, NaCl を 8,142 mg であった。

ビタミン混合の組成は、レチノールアセテート (5,000,000 IU/g) を 3.6 mg (1,800 IU) とコレカルシフェロールを 2.5 μg, dl-α-トコフェロール(油脂から 5 mg 供給される)を 4.47 mg, フィロキノンを 13 μg, チアミン塩酸塩を 0.9 mg, リボフラビンを 1.0 mg, ピリドキシン塩酸塩を 1.5 mg, シアノコバラミンを 2.4 μg, パントテン酸カルシウムを 5.5 mg, プテロイルグルタミン酸を 200 μg, D(+)-ビオチンを 30 μg, アスコルビン酸を 100 mg にグラニュー糖を加え、1 g にした。



表 2. 7 日間精製食を摂取させた日本の若年女性の総ニコチンアミドと NAD, NADP の血中レベル

	Value (nmol/ml 全血)
総ニコチンアミド (NAD + NADP + 遊離ニコチンアミド)	68.4 ± 2.2
NAD (NAD <sup>+</sup> + NADH)	35.3 ± 1.4
NADP (NADP <sup>+</sup> + NADPH)	9.8 ± 0.3

数値は 10 人の被験者の平均 ± SEM である。

表 3. 日本人の栄養所要量どおりの精製食を摂取した日本人男性(年齢 51 歳)におけるトリプトファン代謝物の尿中排泄量

代謝物	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
AnA (μmol/日)	1.3	1.1	1.4	1.8	1.5
KA (μmol/日)	5.6	6.0	5.4	7.1	6.5
XA (μmol/日)	2.8	3.0	3.4	4.0	4.0
3-HA (μmol/日)	4.4	3.5	4.1	5.1	4.4
QA (μmol/日)	25.5	18.5	21.7	21.0	19.6
MNA (μmol/日)	12.9	22.7	14.0	32.3	22.6
2-Py (μmol/日)	68.5	54.8	48.8	49.2	48.0
4-Py (μmol/日)	9.5	8.6	7.1	7.6	7.0
Sum=MNA+2-Py+4-Py(μmol/日)	90.9	86.2	69.9	89.1	77.6
転換率(%) <sup>1</sup>	2.3	2.2	1.8	2.3	2.0
転換係数 <sup>2</sup>	42.8	45.1	55.6	43.6	50.1

被験者は、1日あたり 65 g のたんぱく質、あるいは 3900 μmol のトリプトファンを含んだ食事を摂取した(図 1 を参照)。

<sup>1</sup> 転換率は、以下の方程式から算定した。転換率 = Sum (μmol/日) / 一日当たりのトリプトファン摂取量 (3900 μmol) × 100。

<sup>2</sup> 転換係数は、摂取したニコチンアミドの 60% が MNA と 2-Py, 4--Py として排泄されるという仮説に基づき算定した<sup>20)</sup>。転換係数 = 1 / { (転換率 / 100) / 0.6 × (122 / 204) }。ニコチンアミドの分子量は 122 で、トリプトファンは 204 である。

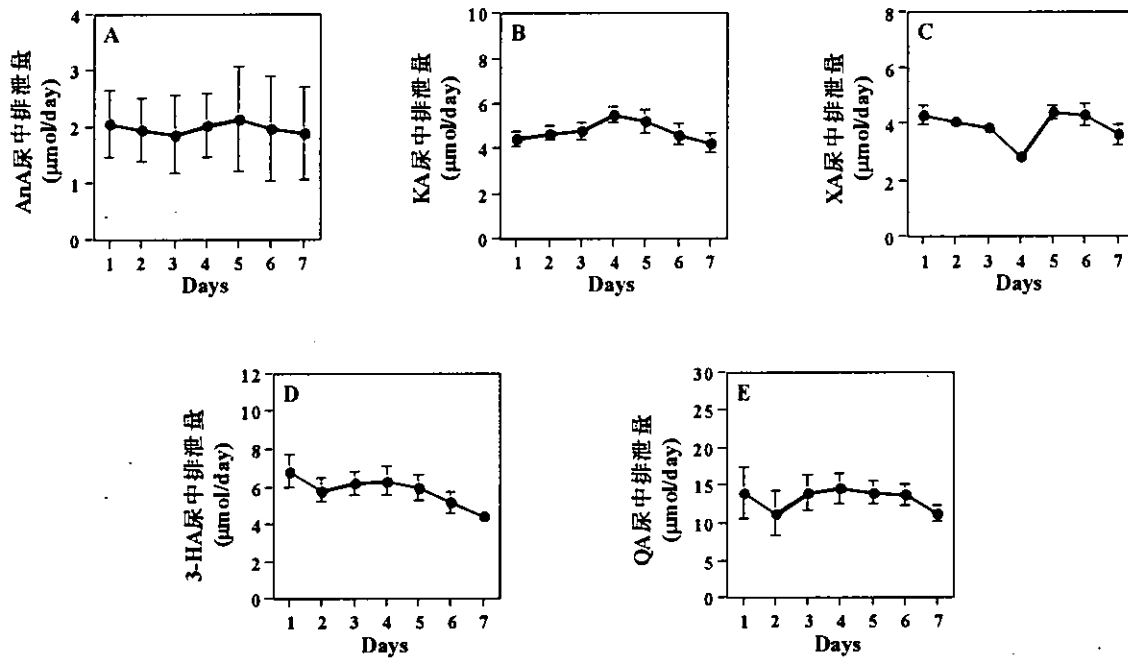


図1. 半精製食を摂取した日本人女性の AnA (A)と KA (B), XA (C), 3-HA (D), QA (E)の毎日の尿中排泄量の変化. 各々は10人の被験者の平均 $\pm$ SEMである. 彼女らは毎日, 674 mg のトリプトファンを含み, ナイアシンを含まない食事を摂った.

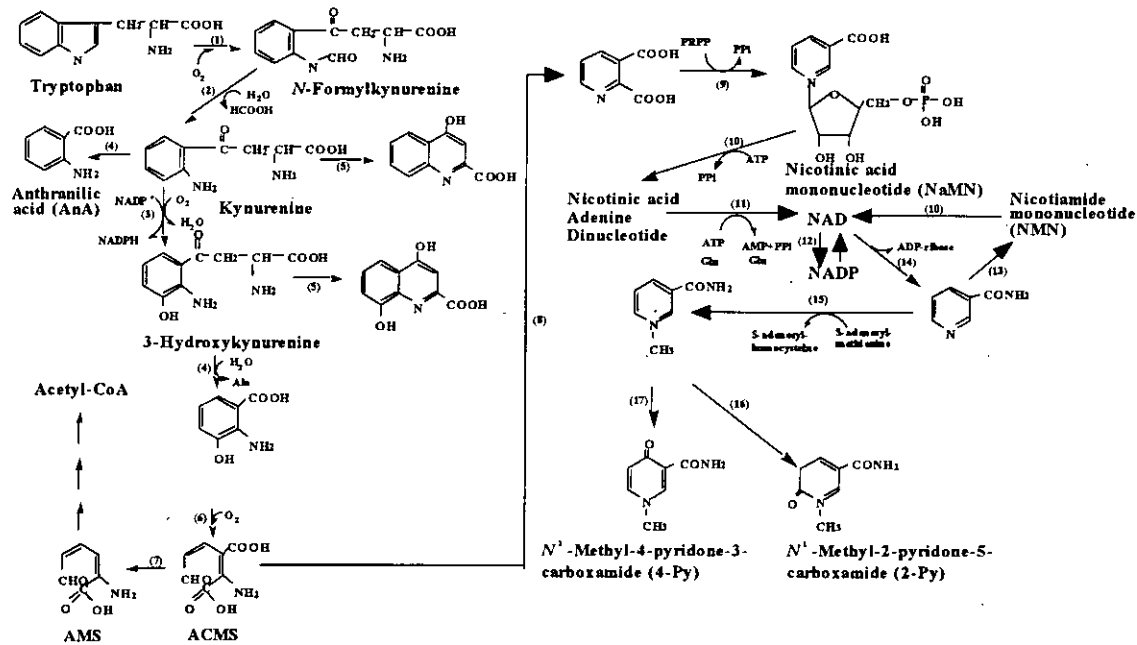


図 2. トリプトファンからナイアシンへの代謝経路. (1) Tryptophan 2,3-dioxygenase, (2) formylase, (3) kynurenine 3-hydroxylase, (4) 3-hydroxykynureninase, (5) kynurenine aminotransferase, (6) 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase, (7) aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase, (8) non-enzymatic (9) quinolinic acid phosphoribosyltransferase, (10) NMN (or NAMN) adenylyltransferase, (11) NAD synthesize, (12) NAD kinase, (13) nicotinamide phosphoribosyltransferase, (14) NAD glycohydrolase, (15) nicotinamide methyltransferase, (16) MNA oxidase (2-Py-forming), (17) MNA oxidase (4-Py-forming).  
ACMS= $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde, AMS= $\alpha$ -aminomuconate- $\epsilon$ -semialdehyde.

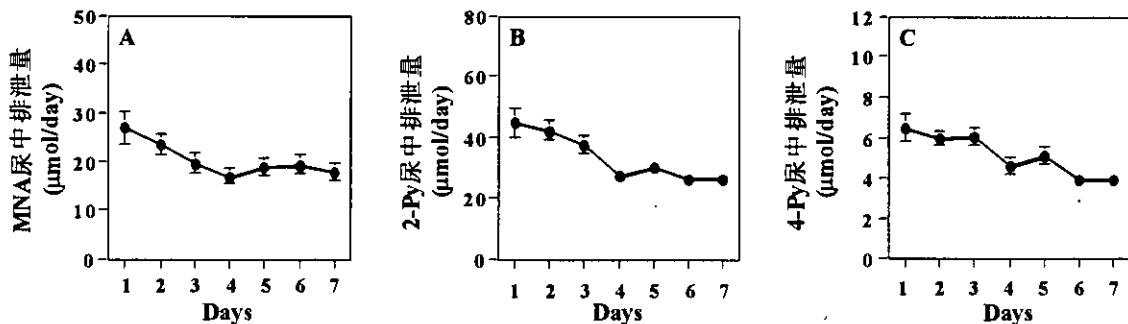


図 3. 半精製食を摂取した日本人女性の MNA (A) と 2-Py (B), 4-Py (C) の毎日の尿中排泄量の変化. 各々は 10 人の被験者の平均 $\pm$ SEM である. 彼女らは毎日, 674 mg のトリプトファンを含み, ナイアシンを含まない食事を摂った.