

図4. 半精製食を摂取した日本人女性に認められたトリプトファンからナイアシンの転換率(A)と転換係数(B)の毎日の変化. 各々の点は10人の被験者の平均 $\pm$ SEM. 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.

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

5. 内分泌攪乱物質候補フタル酸エステルによる  
トリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用  
—マウスにおける影響—

研究協力者 福渡 努 滋賀県立大学 助手

研究概要

我々は、内分泌攪乱物質候補に挙げられているフタル酸エステルの中で最も生産量の多いフタル酸ジ(エチルヘキシル)(DEHP)がラットのトリプトファン-ニコチンアミド代謝を攪乱する事を明らかにした。そこで、今回は DEHP の及ぼす影響の普遍性を検証するために、我々はマウスのトリプトファン-ニコチンアミド代謝に及ぼす影響を調べた。20%カゼイン食に DEHP を添加した飼料で 21 日間飼育した。結果、体重増加量、肝臓重量は添加した DEHP 用量依存的に増加した。尿中のトリプトファン代謝産物量の分析より、アミノカルボキシムコン酸-セミアルデヒドデカルボキシラーゼ (ACMSD) の活性が阻害され、アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒドからキノリン酸が大量に生成し、Trp-ナイアシン転換率が上昇することが推察された。これはラット同様の結果であり、DEHP によるトリプトファン-ニコチンアミド代謝攪乱は普遍性を高めたと言えるだろう。

A. 目的

フタル酸エステルは内分泌攪乱物質候補に挙げられており、食料品の包装材、医療器具、壁紙、そしておもちゃと、我々の生活の至るところでプラスチックの可塑剤として広く使用されている。フタル酸エステルの安全性についての研究は半世紀以上にわたり研究されてきたが、1970 年代からはフタル酸エステルは動物実験で、肝腫瘍を引き起こす、生殖毒性（流産、奇形児、生殖能力低下、異常な精子数、精巣の損傷など）を示すなどという報告がされてきており、ヒトへの影響が懸念されている。その中でも最も生産量の多いフタル酸ジ(エチルヘキシル)(DEHP)の無毒性量(NOAEL)に関しては、精巣の病理組織学的変化を指標とすると 3.7mg/kg/day、発生に関する明確な有毒影響（胚致死、胎児の形質異常など）を指標にすると 14mg/kg/day になるという報告がある。我々はこの DEHP をラットに摂取させることによってトリプトファン-ニコチンアミド転換経路(図 1)が攪乱させることを明らかにしてきた。これは、アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒドからキノリン酸が大量に生成し、トリプトファン-ニコチンアミド転換率が上昇するという代謝攪乱である。

マウスはラットと多少異なる代謝をすることが解っている。本研究では、研究媒体を

このマウスに移行した場合に同様の代謝攪乱が起こるかどうかを検証し、この代謝攪乱の普遍性を高めることを目的とした。

B. 実験方法

1. 試薬

飼料に使用したカゼイン、L-メチオニン、ショ糖は和光純薬工業（株）より購入した。ミネラル混合 (AIN93 配合)、ビタミン混合 (AIN93 配合)、セルロースパウダーはオリエンタル酵母工業（株）より購入した。

尿中代謝産物の定量用標準品として使用したアンスラニル酸、キヌレン酸、キサントレン酸、3-ヒドロキシアンスラニル酸、 $N^1$ -メチルニコチンアミド (MNA) は東京化成工業（株）より、キノリン酸、ニコチンアミド、フタル酸ジ(エチルヘキシル) は和光純薬工業（株）より購入した。 $N^1$ -メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py)、 $N^1$ -メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) は合成し利用した。

2. 動物の飼育方法

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会で承認を受けた。

飼育室の温度は 22°C 前後に、湿度は 60% 前後に調節した。明暗サイクルは、午前 6 時～午後 6 時を明、午後 6 時～午前 6 時までを暗とした。

## 2.1 実験

6週齢のICR系雄マウス20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5群に分け、マウス用代謝ケージに入れた。飼料は表1に示す20%カゼイン食をコントロール食とした。テスト群としてDEHPをコントロール群に0.1%、0.5%、1%、2%添加した飼料を与え、21日間飼育した。飼料と水は自由摂取とし、1日おきの午前9-10時に新しいものと交換した。2日おきに体重を測定した。

実験最終日の1日尿(午前10時-翌日午前10時:24時間)を集めた。尿は分析するまで塩酸酸性下、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

実験最終日の採尿後にマウスを断頭屠殺し、血液を採取し、肝臓を摘出した。肝臓重量を測定し、尿はトリプトファン-ニコチンアミド転換経路代謝産物量の測定に使用した。

## 3. 分析方法

### 3.1 トリプトファン-ニコチンアミド

#### 代謝産物の測定方法

尿を $0.45\mu\text{m}$ のマイクロフィルターでろ過し、これに含まれるアンスラニル酸、キヌレン酸、キサントレン酸、3-ヒドロキシアンスラニル酸およびキノリン酸を各々HPLC法で直接測定した。

尿中のMNAの定量は、強アルカリ性下でアセトフェノンと縮合させることにより蛍光物質に変換し、これをHPLCにて測定した。

尿中のニコチンアミド、2-Py および 4-Pyの定量には、尿に炭酸カリウムを飽和量加えた後、ジエチルエーテルで抽出し、乾固させた抽出液を水に溶解したものをHPLCにて測定した。

## C. 結果

### 1.1 体重への影響

体重の経日変化のグラフを図2に示した。マウスの体重増加に対してDEHPは0.5%添加群まで影響を及ぼさなかったが、1.0%添加群では若干、2.0%添加群では明らかに体重増加が抑制された。体重増加量をラットと比較してみると(図3)、マウスもラットも同様、1.0%DEHP添加群から抑制がみられた。

### 1.2 肝臓重量におよぼす影響

図4に示す。マウスの体重10g当たりの肝臓重量は0.5%添加群からDEHP添加量に依存して有意に増加した。ラットでも体重100g当たりの肝臓重量は0.05%添加群からDEHP添加量に依存して有意に増加した。これは

DEHPの投与により肝肥大が起こったためと思われる。

### 1.3 トリプトファン-ニコチンアミド代謝への影響

テスト群の飼料摂取量は対照群およびコントロール群より少なく、尿中代謝産物量の値は飼料摂取量の影響を受けるため、値は1g飼料摂取量当たりで示すのが常法であるが、今回代謝ケージの問題などからマウスの飼料摂取量を正確に測定することができなかった。よって、本実験では、尿中に毎日ほぼ一定量存在すると言われていたクレアチニンの尿中排泄量を測定し補正したデータを用いた。なお、本実験で使用した飼料はニコチンアミドを含まないため、ニコチンアミドおよびそれ以降の代謝産物もすべて摂取したトリプトファンに由来する。

アンスラニル酸-3-ヒドロキシアンスラニル酸の尿中代謝産物量はどの群においてもDEHPの摂取による影響を受けなかった。しかし、図5に示すキヌレン酸の尿中代謝産物量においては、マウスでもラット同様に、添加したDEHP濃度依存的に有意に増加した。

ニコチンアミド異化代謝経路上における結果は、マウスにおいて、主要経路であるニコチンアミドN-オキシド尿中代謝産物量が、ラットにおいては4-Pyを除く代謝産物において、添加したDEHP濃度依存的に増加する傾向がみられた。

図6に示す尿中ニコチンアミド異化代謝産物総量は、マウスにおいてもラット同様に、添加したDEHP濃度依存的に増加した。

## D. 考察

ACMSDase (EC 4.1.1.45)はトリプトファン-ニコチンアミド転換率の調節酵素である。トリプトファン-ニコチンアミド転換経路に流入したトリプトファンの約90%がACMSからアセチルCoAとなる経路へ流入するが、この酵素の活性が高いとトリプトファンにおいてはACMSからアセチルCoAとなる経路へ代謝される割合がさらに増加する。逆にACMSDase活性が低いとニコチンアミドへ代謝される割合が増加し、トリプトファン-ニコチンアミド転換率が上昇する。よって、キヌレン酸以降の代謝産物量が増加した場合は、ACMSDase活性は低下していると考えられる。

今回のアンスラニル酸-3-ヒドロキシアンスラニル酸までの尿中代謝産物量のグラ

フとキヌレン酸または総ニコチンアミド異化代謝産物の尿中排泄量のグラフを比べてみると、後者のグラフは明らかに前者までのグラフではみられなかった形（添加したDEHP濃度依存的に増加する形）となっている。このことから、今回の実験でキヌレン酸または総ニコチンアミド異化代謝産物の尿中排泄量が、添加したDEHP濃度依存的に増加した原因は、ACMSDase活性が低下したためだと言える。

フタル酸エステルは体内に入ると膀胱リパーゼにより加水分解され、モノフタル酸エステル(MEHP)へと代謝される。実際にこのMEHPをマウスの肝臓に加える *in vitro* の実験で ACMSDase の活性を阻害したという本研究室の研究結果があることがこの裏付けとなると考えられる。

#### E. 結論

ラットを用いた実験と同様の結果が得られた。よってこれをもって、ラットで起きたトリプトファン-ニコチンアミド代謝攪乱はラットと多少代謝の異なるマウスにおいても起こることが明らかとなった。

DEHPによるトリプトファン-ニコチンアミド代謝攪乱は普遍性を増した。ラットとは多少異なる代謝系を持つ人間においても、起こりうる可能性が増したと言えるだろう。

#### F. 健康危険情報

特記する情報は無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohta, M., Kitamura, J., Fukuwatari, T., Sasaki, R., and Shibata, K. (2004) Effects of dietary di(2ethylhexyl) phthalate on the metabolism of tryptophan toniacin in mice. *Exp. Anim.* 53(1), 57-60.

##### 2. 学会発表

日本栄養食糧学会近畿支部大会で発表  
(2003年10月25日)

#### H. 知的財産権の出願・登録

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### 引用文献

1. Bell, F. P. (1982) *Environ. Health Perspect.* 45:41-50.
2. Dunnett, C. W. (1955) *J. Am. Stat. Assoc.* 50:1096.
3. Fukuwatari, T., Suzuki, Y., Sugimoto, E., and Shibata, K. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:705-710.
4. Fuwatari, T., Suzuki, Y., Sugimoto, E., and Shibata, K. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:2687-2691.
5. Ghafoorunissa and Rao, B. S. (1974) *Life Sci.* 15:1957-1602.
6. Gray, T. J. B. G., Beaman, J. A., Foster, J. R., and Gangolli, S. D. (1983) *Toxicology* 28: 167-179.
7. Gray, T. J. B. G., Beaman, J. A., Foster, J. R., and Gangolli, S. D. (1983) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 67:15-25.
8. Hayashi, O. (1965) *Vitamins* 31:107-114.
9. Lake, B. G., Gangolli, S. D., Grasso, P., and Lloyd, A. G. (1975) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32:335.
10. Marx, J. L. (1972) *Science* 178:46-47.
11. Mawatari, K., Oshiba, K., Iinuma, F., and Watanabe, M. (1995) *Anal. Clin. Acta.* 302:179-183.
12. Mayer, F. L., Stalling, D. L., and Johnson, J. L. (1972) *Nature* 238:411-413.
13. Pullman, M. P. and Colowick, S. P. (1954) *J. Biol. Chem.* 206:121-127.
14. Shibata, K. (1987) *Vitamins (Japan)* 61:599-604.
15. Shibata, K., Kawada, T., and Iwaki, K. (1988) *J. Chromatogr.* 424:23-28.
16. Shibata, K., (1988) *J. Chromatogr.* 430:376-380.
17. Shibata, K. and Matsuo, H. (1989) *J. Nutr.* 119:896-901.
18. Shibata, K., Kakehi, H., and Mastuo, H. (1990) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 36:87-98.
19. Shibata, K. and Onodera, K. (1991) *Agric. Biol. Chem.* 55:143-148.
20. Shibata, K. and Onodera, M. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56:974.
21. Shibata, K., Fukuwatari, T., Enomoto, A., and Sugimoto, E. (2001) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 47:263-266.
22. Ward, J. M., Peters, J. M., Perella, C. M., and Gonzalez, F. J. (1998) *Toxic. Pharmacol.* 26:240-246.
23. Williams, D. T. (1973) *J. Agric. Food Chem.* 21:1128-1129.

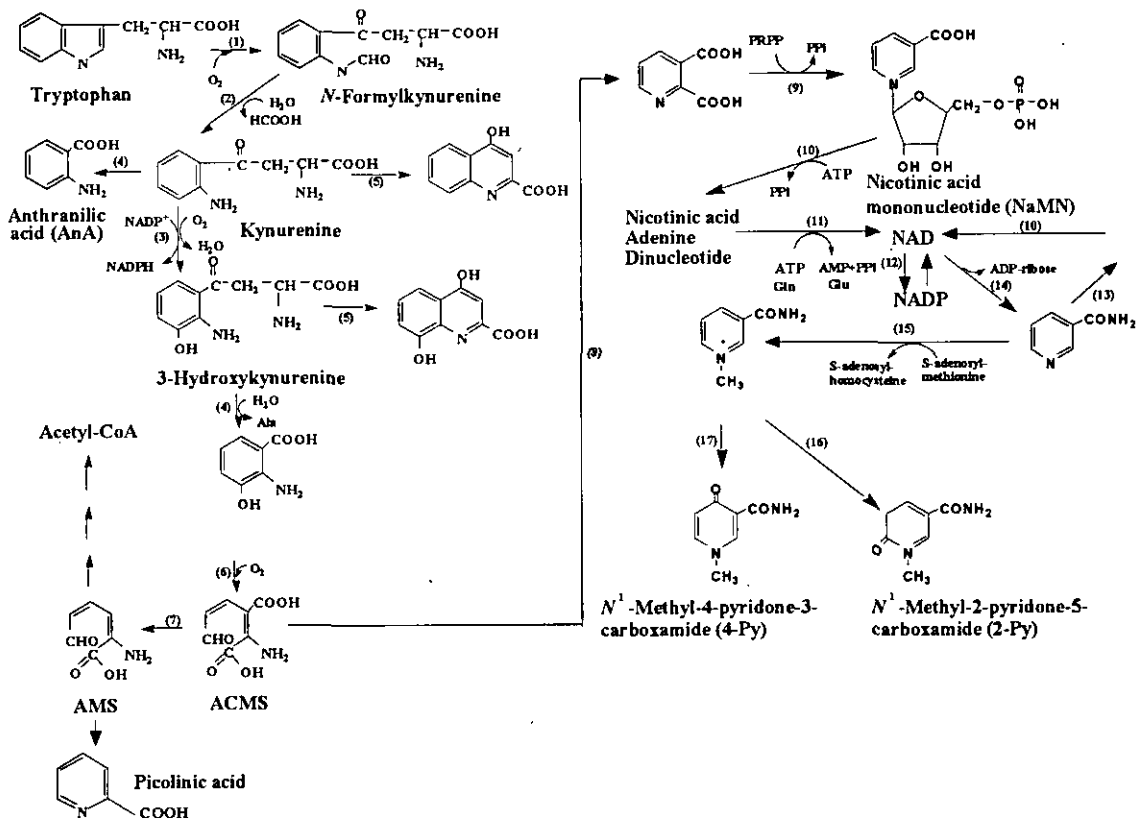


図1. トリプトファン-ニコチンアミド転換経路

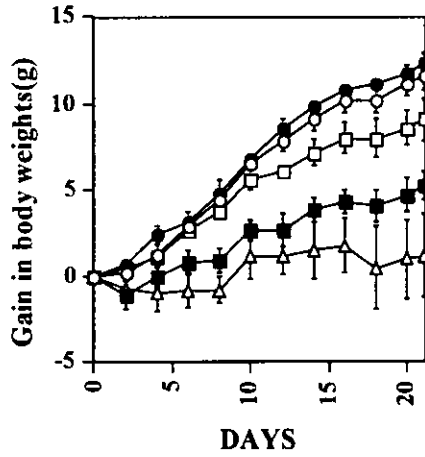


図2. DEHP 添加による体重の経日変化

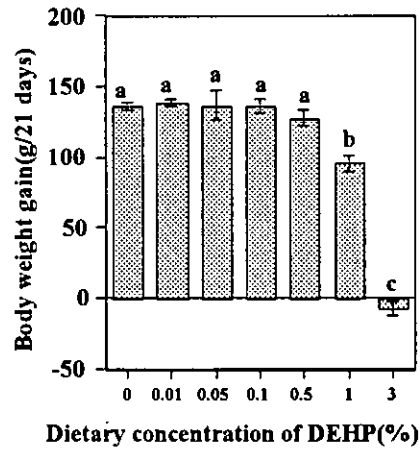
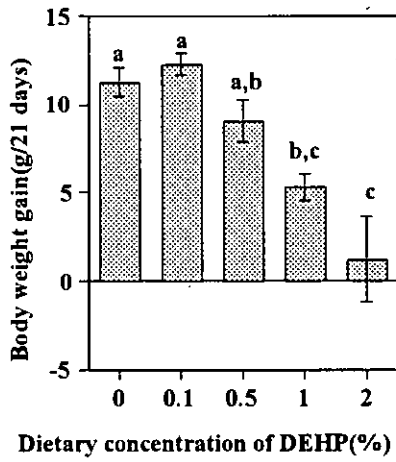


図3. DEHP 添加による体重増加量への影響 (左: マウス, 右: ラット)

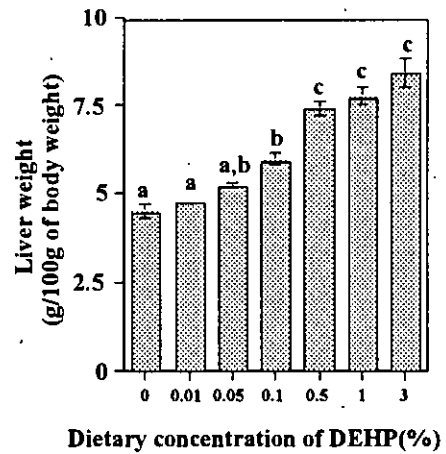
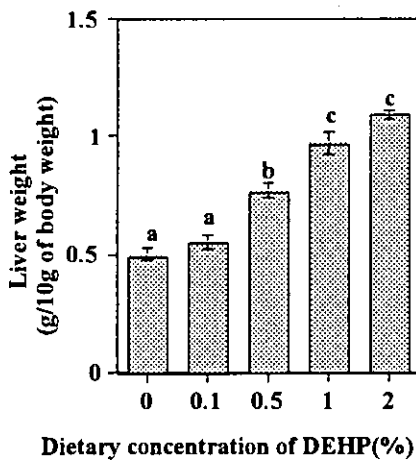


図4. DEHP 添加による肝臓重量への影響 (左: マウス, 右: ラット)

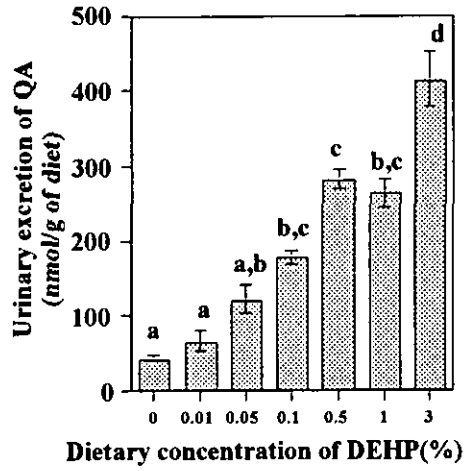
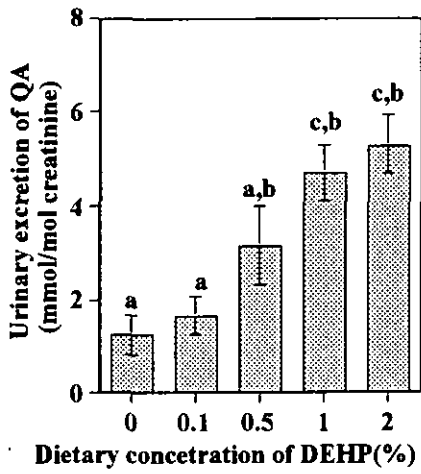


図5. DEHP添加による尿中キノリン酸量への影響 (左: マウス, 右: ラット)

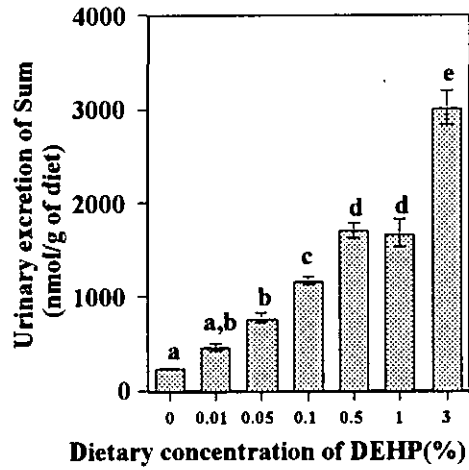
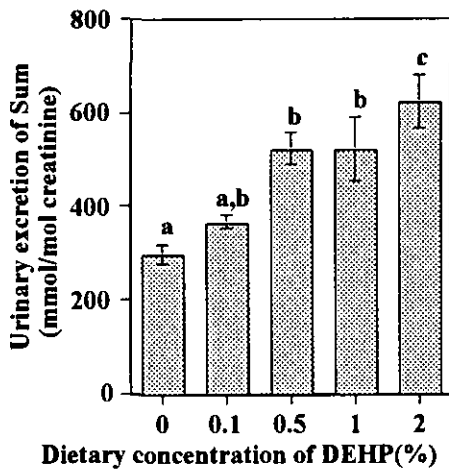


図6. DEHP添加による尿中ニコチンアミド異化代謝産物総量への影響 (左: マウス, 右: ラット)

表 1. 飼料組成

	Control diet	Test diet (control diet+various amount of DEHP) (%)			
	(nicotinic acid-free 20% casein diet) (%)	0.1%DEHP	0.5%DEHP	1.0%DEHP	2.0%DEHP
Vitamin-free casein	20	20	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	45.9	45.9	45.9	45.9	45.9
Sucrose	22.9	22.8	22.4	21.9	20.9
Corn oil	5	5	5	5	5
Mineral mixture	5	5	5	5	5
Vitamin mixture	1	1	1	1	1
(nicotinic acid-free)					
DEHP	0	0.1	0.5	1	2



V. 分担研究者・研究協力者の報告書

6. 内分泌攪乱物質候補ビスフェノール A, スチレンモノマーによる  
トリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用

研究協力者 福渡 努 滋賀県立大学 助手

研究要旨

内分泌攪乱物質候補であるビスフェノール A とスチレンモノマーがトリプトファン-ニコチンアミド代謝に及ぼす影響を調べた。1%ビスフェノール A 含有食の投与により、トリプトファン-ニコチンアミド転換率は対照群の 1/15 に低下した。尿中のトリプトファン代謝産物量の分析より、キヌレニンから 3-ヒドロキシキヌレニンへの反応に関与するキヌレニンモノヒドロキシラーゼにビスフェノール A が作用することが推察された。1%スチレンモノマー含有食の投与により、転換率は軽度ではあるが有意に低下した。

A. 目的

我々は、内分泌攪乱物質候補に挙げられているフタル酸エステル類がトリプトファン-ニコチンアミド代謝を攪乱する事を明らかにした<sup>1-4)</sup>。フタル酸エステルに類似した構造を持つ内分泌攪乱物質候補としてビスフェノール A とスチレンモノマーが挙げられる (図 1)。ビスフェノール A は弱いフェノール臭をもつ白色結晶性粉末で、ビスフェノール A 型エポキシ樹脂として一般家庭の食器、自動車部品、CD 等のディスク、缶詰や缶飲料の内側のコーティング等に幅広く使用されている<sup>5)</sup>。ビスフェノール A をラットに大量に (400 mg/kg 体重/日) 投与すると雌性ホルモンの攪乱作用が起こるが<sup>6)</sup>、雌性ホルモン様作用は 17 $\beta$ -エストラジオールの 1/10,000 以下である<sup>7)</sup>。また、抗アンドロゲン作用、甲状腺ホルモンであるチロキシンのアンタゴニストとしての作用<sup>8)</sup>も報告されている。スチレンモノマーは芳香ある無色の液体で、ラップや発泡スチロール、カップ麺等の容器に用いられる代表的な合成ポリスチレン樹脂の原料である。スチレンの単分子であるスチレンモノマーは弱いながらも生殖毒性があるとされている<sup>10)</sup>。

本研究では、内分泌攪乱物質候補に挙げられているビスフェノール A およびスチレンモノマーがフタル酸エステルと同様にトリプトファン-ニコチンアミド代謝を攪乱するか否かを調べた。また、内分泌攪乱物質候補としては採りあげられていないが、フタル酸エステルの構造類似体であり、かつトリプト

ファン-ニコチンアミド代謝経路の副産物であるピコリン酸およびピコリンアミドについても検討した。これらは低酸素応答を誘導することが知られており<sup>11)</sup>、免疫応答にも影響をおよぼす<sup>12)</sup>。ピコリン酸クロムとして糖質代謝及び脂質代謝の正常化の補助剤として有効であることも報告されている<sup>13)</sup>。

B. 実験方法

1. 試薬

飼料に使用したカゼイン、L-メチオニン、ショ糖は和光純薬工業 (株) より購入した。ミネラル混合 (AIN93 配合)、ビタミン混合 (AIN93 配合)、セルロースパウダーはオリエンタル酵母工業 (株) より購入した。

尿中代謝産物の定量用標準品として使用したアンスラニル酸、キヌレニン酸、キサンツレン酸、3-ヒドロキシアンスラニル酸、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (MNA) は東京化成工業 (株) より、キノリン酸、ニコチンアミド、ビスフェノール A、スチレンモノマー、ピコリン酸、ピコリンアミドは和光純薬工業 (株) より購入した。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) は合成した<sup>15)</sup>。NAD<sup>+</sup>はシグマケミカル (株) より購入した。

2. 動物の飼育方法

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会承認を受けた。

飼育室の温度は 22°C 前後に、湿度は 60% 前後に調節した。明暗サイクルは、午前 6 時一

午後6時を明, 午後6時—午前6時までを暗とした。

## 2.1 第一実験

6週齢のWistar系雄ラット25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5匹ずつ5群に分け, ラット用代謝ケージに入れた。飼料は表1に示す20%カゼイン食をコントロール食とした。フタル酸エステル含有食を投与した実験では1%フタル酸エステル含有食によってトリプトファン—ニコチンアミド代謝が顕著に攪乱されたことから<sup>2,5)</sup>, それぞれ1%のピコリン酸, ピコリンアミド, ビスフェノールA, スチレンモノマーをコントロール食に添加した飼料(表1)を与え, 21日間飼育した。飼料と水は自由摂取とし, 1日ないし2日おきの午前9—10時に新しいものと交換した。また, その前後に体重と飼料摂取量を測定した。

実験最終日の1日尿(午前10時—翌日午前10時:24時間)を集めた。尿は分析するまで塩酸酸性下,  $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

実験最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し, 血液を採取し, 肝臓を摘出した。血液, 肝臓はNAD含量の測定に使用した。尿はトリプトファン—ニコチンアミド転換経路代謝産物量の測定に使用した。

## 2.2 第二実験

6週齢のWistar系雄ラット25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5匹ずつ5群に分け, ラット用代謝ケージに入れた。飼料は20%カゼイン食をコントロール食(表1)とし, 0.05%, 0.1%のピコリン酸あるいは0.05%, 0.1%のピコリンアミドをコントロール食に添加した飼料を与え, 21日間飼育した。飼料と水は自由摂取とし, 1日ないし2日おきの午前9—10時に新しいものと交換した。また, その前後に体重と飼料摂取量を測定した。

実験最終日の1日尿(午前10時—翌日午前10時:24時間)を集めた。尿は分析するまで塩酸酸性下,  $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 3. 分析方法

### 3.1 トリプトファン—ニコチンアミド代謝産物の測定方法

尿を $0.45\ \mu\text{m}$ のマイクロフィルターでろ過し, これに含まれるانسラニル酸<sup>16)</sup>, キヌレン酸<sup>17)</sup>, キサンツレン酸<sup>18)</sup>, 3-ヒドロキシアンスラニル酸<sup>18)</sup>およびキノリン酸<sup>19)</sup>を各々文献に示したHPLC法で直接測定した。

尿中のMNAの定量は, 強アルカリ下でアセトフェノンと縮合させることにより蛍光

物質に変換し, これをHPLCにて測定した<sup>20)</sup>。

尿中のニコチンアミド, 2-Py および 4-Py の定量には, 尿に炭酸カリウムを飽和量加えた後, ジエチルエーテルで抽出し, 乾固させた抽出液を水に溶解したものをHPLCにて測定した<sup>15)</sup>。

### 3.2 血液中のNAD (NAD<sup>+</sup> + NADH) 含量の測定方法

血液中のNADの抽出は我々が開発した方法により<sup>21)</sup>, またNADの測定はアルコールデヒドロゲナーゼを用いる酵素サイクリング法により測定した<sup>21)</sup>。

## C. 結果

### 1. 第一実験

#### 1.1 体重と飼料摂取量への影響

ピコリンアミド群では3—4日目に5匹すべてが死亡し, ピコリン酸群では5—6日目に3匹, 7—8日目に1匹, 9日目に1匹が死亡した。

ビスフェノールA群はすべてのラットにおいて下痢が認められた。図3に実験期間中の体重の増加量と毎日の飼料摂取量の変動を示した。スチレンモノマー群の体重増加量および飼料摂取量には対照群との差異は認められなかった。ビスフェノールA群は実験初期において飼料摂取量が対照群の約1/3と少なく, かつ個体差も著しかった。飼育7日目から飼料摂取量は一定となったが, 対照群よりも低い値であった。体重増加量も飼料摂取量と同じく, ビスフェノールA群は低かった。

#### 1.2 肝臓重量と血中および肝組織中NAD含量におよぼす影響

ビスフェノールA群の肝臓重量は個体当たりの値では対照群よりも低い値を示したが, 体重100gあたりに換算した重量では差異は認められなかった(表2)。

ビスフェノールA群の血中および肝中NAD含量はともに対照群の約80%と低い値を示した。スチレンモノマー群の血中および肝中NAD含量については対照群との差異を認めなかった。

#### 1.3 トリプトファン—ニコチンアミド代謝への影響

ビスフェノールA群およびスチレンモノマー群の尿中トリプトファン—ニコチンアミド代謝産物量を表3に示した。ビスフェノールA群の飼料摂取量は対照群およびスチレンモノマー群より少なく, 尿中代謝産物量の値は飼料摂取量の影響を受けるため, 値は1g飼料摂取量当たりで示した。なお, 本実験

で使用した飼料はニコチンアミドを含まないため、ニコチンアミドおよびそれ以降の代謝産物もすべて摂取したトリプトファンに由来する。Fig. 2 にトリプトファンの代謝経路を示した。

アンストラニル酸とキヌレン酸の尿中排泄量は、ビスフェノール A およびスチレンモノマーの摂取による影響を受けなかった。しかし、ビスフェノール A 群では、キサントレン酸および 3-ヒドロキシアンストラニル酸以降の尿中代謝産物量は対照群の 1/2 から 1/20 まで低下した。動物個体当たりあるいは単位体重当たりの値に換算しても、同様の傾向が認められた。

スチレンモノマー群においては、キノリン酸より上流の代謝産物の尿中排泄量に差異は認められなかったが、ニコチンアミドの代謝産物である 4-Py の尿中排泄量は対照群の 2/3 に低下した。

#### 1.4 トリプトファン-ニコチンアミド転換率に及ぼす影響

トリプトファン-ニコチンアミド転換率は、 $\{ \text{ニコチンアミド} + \text{MNA} + 2\text{-Py} + 4\text{-Py (mol)} / \text{摂取したトリプトファン量 (mol)} \} \times 100$  から求めた (表 4)。コントロール食で飼育したラットの転換率は通常 2% 程度であり、本実験でも対照群の転換率はそれに近い  $2.18 \pm 0.18\%$  であった。これに対し、ビスフェノール A 群の転換率は  $0.15 \pm 0.04\%$  と顕著に ( $p < 0.05$ ) 減少していた。スチレンモノマー群も  $1.47 \pm 0.18\%$  と対照群よりも有意に ( $p < 0.05$ ) 低い値を示した。

## 2. 第二実験

体重増加量と飼料摂取量は、ピコリン酸 0.05%、0.1% 群でも、ピコリンアミド 0.05%、0.1% 群のいずれにおいても対照群と比して差異は認められなかった (図 4)。肝重量に差はみられなかった。

トリプトファン-ニコチンアミド代謝産物については、ピコリン酸およびピコリンアミドの摂取による影響は認められなかった。

### D. 考察

本実験では、内分泌攪乱物質候補であるビスフェノール A およびスチレンモノマーがトリプトファン-ニコチンアミド代謝におよぼす影響について検討した。ビスフェノール A 摂取により、ナイアシン栄養状態の指標となる血中および肝中の NAD 含量<sup>19)</sup>が低下した。ビスフェノール A 群のトリプトファン-ニコチンアミド転換率が対照群の 1/10 以下に低下したことから、ビスフェノール A はト

リプトファンからのニコチンアミド供給を阻害し、ナイアシン栄養を悪化させることが示された。実験初期はビスフェノール A 群の飼料摂取量が少なく、体重が増加しなかったが、それ以降は対照群よりもやや少ないものの飼料摂取量が増加し、それに伴って体重も増加した。ビスフェノール A 群と同程度の飼料摂取量および体重増加量を示す 10% カゼイン食摂取の場合でも、トリプトファン-ニコチンアミド転換率は 1.5% であったことから<sup>2)</sup>、ビスフェノール A 摂取によるトリプトファン-ニコチンアミド転換率の著しい低下は栄養状態の悪化によるものとは考えにくい。一方、スチレンモノマーについては、トリプトファン-ニコチンアミド転換率が対照群の 2/3 に低下した。しかし、血中および肝の NAD 含量には影響が認められなかったことから、この程度の転換率でも生体の維持・成長に必要な量のニコチンアミドをトリプトファンから生合成できたと考えられる。

我々は、フタル酸エステルであるフタル酸ジブチルおよびフタル酸ジ (2-エチルヘキシル) がトリプトファン-ニコチンアミド転換率を増加させることを見出した<sup>1-4)</sup>。1% フタル酸ジ (2-エチルヘキシル) 含有食群では、トリプトファン-ニコチンアミド転換率は対照群の約 10 倍に増加し、ニコチンアミドの過剰に伴う有害作用を引き起こす可能性を示した<sup>3)</sup>。3-ヒドロキシアンストラニル酸より上流の代謝産物の尿中排泄量はフタル酸エステル類の影響を受けなかったが、キノリン酸より下流の代謝産物の尿中排泄量がフタル酸エステル類濃度依存的に増加したことから、フタル酸エステル類がアミノカルボキシムコン酸セミアルデヒドデカルボキシラーゼ (ACMSD, EC4.1.1.45) 活性を阻害的し、非酵素的反応が進んでキノリン酸の産生が増加することが示唆された<sup>3, 4)</sup>。本実験において、ビスフェノール A およびスチレンモノマーの摂取によるキノリン酸の尿中排泄量の増加は認められなかった。本実験ではこれらの化合物が ACMSD 活性におよぼす影響について調べていないが、フタル酸エステルと構造が類似しているもののフタル酸エステル類とは異なり、ACMSD には大きな影響をおよぼさないことを示唆している。

ビスフェノール A の摂取により、アンストラニル酸およびキヌレン酸の尿中排泄量は影響を受けなかったが、3-ヒドロキシキノレンの代謝産物であるキサントレン酸の尿中

排泄量が対照群の 1/2 に低下し、3-ヒドロキシアンスラニル酸より下流の代謝産物の尿中排泄量は対照群よりも低値を示した。本実験では 3-ヒドロキシキヌレニンの尿中排泄量を測定していないが、これらの結果はキヌレニンから 3-ヒドロキシキヌレニンを生成する反応がビスフェノール A によって阻害されていることを示唆する。この反応は FAD 酵素であるキヌレニン 3-モノヒドロキシラーゼによって触媒され、補酵素として NADPH を要求する。

本実験では飼育最終日におけるビスフェノール A 摂取量は約 800 mg/kg 体重/日であり、実験対象のラットは雌性ホルモンかく乱作用を起こしうる<sup>6)</sup>ほど大量のビスフェノール A を摂取したことになる。3-ヒドロキシアンスラニル酸の生成は女性ホルモンの影響を受けやすく、女性の 3-ヒドロキシアンスラニル酸の尿中排泄量は、成熟期を 1 とすると、女性ホルモン濃度の低い初潮の始まる前では 10 倍以上、閉経後では 3 倍となる<sup>22)</sup>。エストロン投与によりトリプトファン-ニコチンアミド転換率は低下する<sup>23)</sup>。本実験で得られた結果からはビスフェノール A がトリプトファン-ニコチンアミド転換経路を阻害する機構を明らかにすることはできなかったが、ビスフェノール A の大量摂取による雌性ホルモン様作用がトリプトファン-ニコチンアミド代謝に影響をおよぼした可能性が考えられる。また、ビスフェノール A には抗アンドロゲン作用<sup>8)</sup>、チロキシン受容体アンタゴニストとしての抗チロキシン作用がある<sup>9)</sup>。チロキシンは ACMSD 活性を阻害してトリプトファン-ニコチンアミド転換率を増大させる<sup>24)</sup>。このように様々なホルモンがトリプトファン-ニコチンアミド代謝に影響することから、ビスフェノール A 摂取による内分泌攪乱作用が何らかの影響をおよぼした可能性も考えられる。

ピコリン酸あるいはピコリンアミド 1% 含有食により、数日胃内にすべてのラットが死亡した。0.05%、0.1% のピコリン酸あるいはピコリンアミドを含む飼料をラットに与えたところ、ラットの飼料摂取量、体重増加量、外見などには何ら影響しなかった。また、トリプトファン-ニコチンアミド代謝にも影響しなかった。例えばピコリン酸はカルボキシル基を持つピリジン環であり、フタル酸エステル類は脂肪酸エステルを有するベンゼン環であるように、ピコリン酸とピコリンアミドはフタル酸エステル類に類似した構造を

持つが、フタル酸エステル類と同様のトリプトファン-ニコチンアミド代謝攪乱作用を示さなかった。この作用はフタル酸エステル類に特異的なものであることから、ACMSD 活性の阻害には側鎖の構造あるいは環の構造が重要であると考えられる。ピコリン酸にはマクロファージが関わる炎症反応の調節<sup>10)</sup>、亜鉛の代謝<sup>25)</sup>との関連など生体内での重要な役割が示唆されている。しかし、内分泌攪乱に関する報告はないことから、内分泌系の攪乱を介して間接的にトリプトファン-ニコチンアミド代謝に影響する作用は持たないと予想される。

#### F. 健康危機情報

特記する情報はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

福渡努, 鳥落舞, 太田万理, 佐々木隆造, 柴田克己, 内分泌かく乱物質候補ビスフェノール A, スチレンモノマーのトリプトファン-ニコチンアミド転換経路のかく乱作用. *食品衛生学雑誌*, 45(1), 1-7 (2004).

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

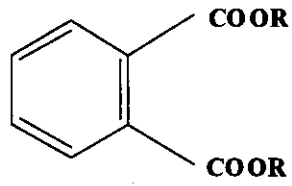
##### 3. その他

なし

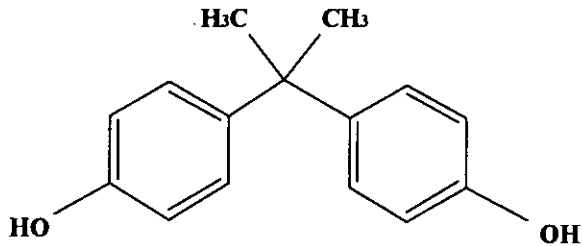
#### I. 引用文献

- 1) Shibata, K., Motooka, K., Murata, K., Iwai, K., Increase in growth rate and activity of the tryptophan-NAD pathway caused by di-n-butylphthalate in rats fed on a tryptophan-limited diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 28, 173-177 (1982).
- 2) Shibata, K., Fukuwatari, T., Enomoto, A., Sugimoto, E., Increased conversion ratio of tryptophan to niacin by dietary di-n-butylphthalate. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 47, 263-266 (2001).
- 3) Fukuwatari, T., Suzuki, Y., Sugimoto, E., Shibata, K., Elucidation of toxic mechanism of plasticizers, phthalic acid esters, a putative endocrine disrupter: effect of di(2-ethylhexyl)phthalate on the conversion ratio of tryptophan to niacin in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 66, 705-710 (2002).
- 4) Fukuwatari, T., Suzuki, Y., Sugimoto, E.,

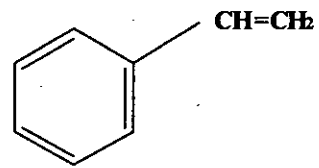
- Shibata, K., Identification of a toxic mechanism of the plasticizers, phthalic acid esters, which are putative endocrine disrupters: Time-dependent increase in quinolinic acid and its metabolites in rats fed di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biosci. Biotech., Biochem.*, **66**, 2687-2691 (2002).
- 5) 日本エポキシ樹脂工業会, エンドクリン問題について, 平成13年改訂.
  - 6) Ashby, J., Tinwell, H., Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ. Health Perspect.*, **106**, 719-720 (1998).
  - 7) Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., McDonnell, D. P., Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 205-212 (1997).
  - 8) Sohoni, P., Sumpter, J. P., Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.*, **158**, 327-339 (1998).
  - 9) Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K., Thyroid hormone action is disturbed by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 5185-5190 (2002).
  - 10) Ohtani, H., Ichikawa, Y., Iwamoto, E., Miura, I., Effects of styrene monomer and trimer on gonadal sex differentiation of genetic males of the frog *Rana rugosa*. *Environ. Res.*, **87**, 175-180 (2001).
  - 11) Musso, M. G., Sica, T., Taylor, L. S., Cox, G. W., Varesio, L., A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J. Biol. Chem.*, **182**, 1683-1693 (1995).
  - 12) Rapisarda, A., Pastorino, S., Massazza, S., Varesio, L., Bosco, M. C., Antagonistic effect of picolinic acid and interferon-gamma on macrophage inflammatory protein-1 $\alpha/\beta$  production. *Cell Immunol.*, **220**, 70-80 (2002).
  - 13) Press, R. I., Geller, J., Evans, G. W., The effect of chromium picolinate on serum cholesterol and apolipoprotein fractions in human subjects. *West J. Med.*, **152**, 41-45 (1990).
  - 14) Pullman, M. P., Colowic, S. P., Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide. *J. Biol. Chem.*, **206**, 121-127 (1954).
  - 15) Shibata, K., Kawada, T., Iwai, K., Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28 (1988).
  - 16) Shibata, K., Onodera, M., Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 143-148 (1991).
  - 17) Shibata, K., Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **430**, 376-380 (1988).
  - 18) Shibata, K., Onodera, M., Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 974, (1992).
  - 19) Mawatari, K., Oshida, K., Inuma, F., Watanabe, M., Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta.*, **302**, 179-183 (1995).
  - 20) 柴田克己, 高速液体クロマトグラフィーによる *N*<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドの超微量定量方法, *ビタミン*, **61**, 599-604 (1987).
  - 21) Shibata, K., Murata, K., Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nut. Int.*, **2**, 177-181 (1986).
  - 22) El-Zoghby, S. M., El-Kholy, Z. A., Swedy, S. M., Abdel-Tawab, G. A., The spontaneous urinary excretion of tryptophan metabolites "via kynurenine" in women with regards to the prepuberty, sexual maturity and menopause. *Acta Vitaminol. Enzymol.*, **32**, 155-158 (1978).
  - 23) Shibata, K., Kondo, K., Effects of progesterone and estrone on the conversion of tryptophan to nicotinamide in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1890-1893 (1993).
  - 24) Shibata, K., Toda, S., Effects of tyroxine on the conversion ratio of tryptophan to nicotinamide in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1757-1762 (1994).
  - 25) Krieger, I., Statter, M., Tryptophan deficiency and picolinic acid: effect of zinc metabolism and clinical manifestations of pellagra. *Am. J. Clin. Nutr.*, **46**, 511-517 (1987).



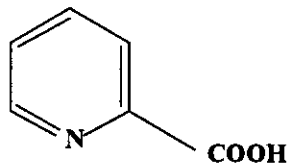
Phthalate esters



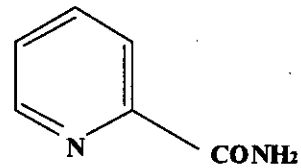
Bisphenol A



Styrene monomer



Picolinic acid



Picolinamide

図1. フタル酸エステル, ビスフェノール A, スチレンモノマー, ピコリン酸, ピコリンアミドの化学構造

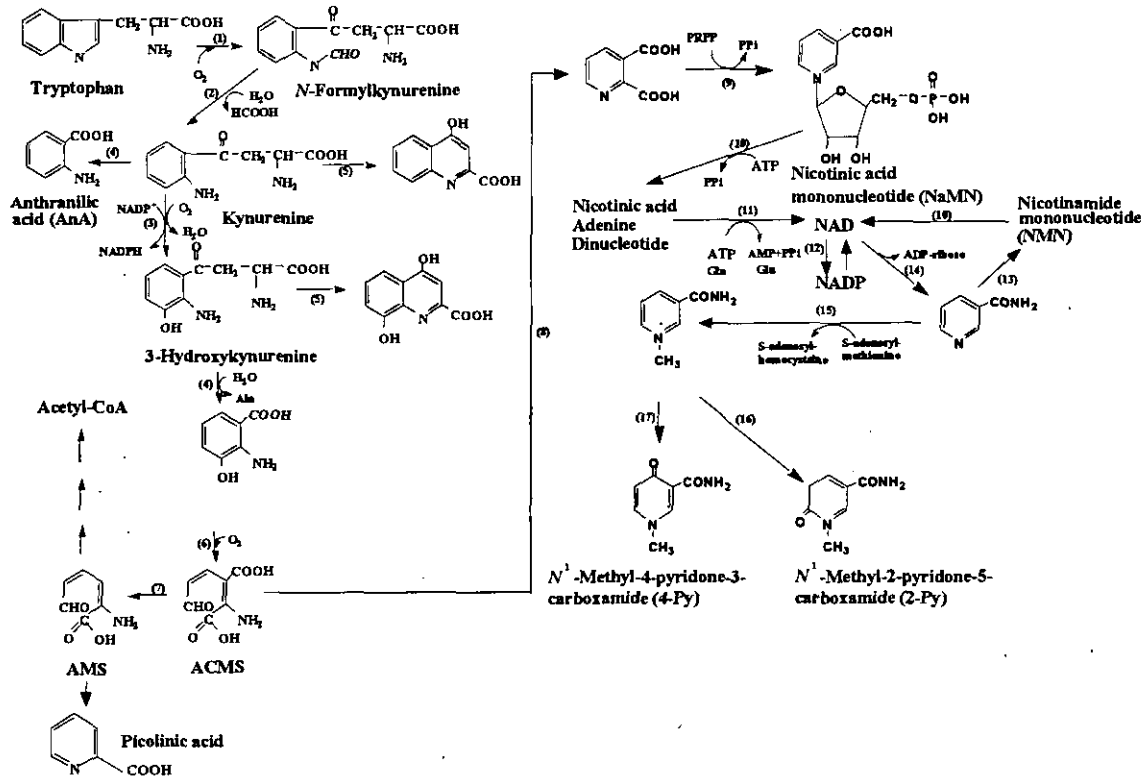


図2. トリプトファン-ニコチンアミド転換経路の概要

(1) tryptophan dioxygenase, (2) formylase, (3) kynurenine 3-hydroxylase, (4) kynureninase, (5) kynurenine aminotransferase, (6) 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase, (7) 2-Amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase, (8) non-enzymatic reaction, (9) quinolinate phosphoribosyltransferase, (10) nicotinic acid (nicotinamide) mononucleotide adenyltransferase, (11) NAD<sup>+</sup> synthetase, (12) NAD<sup>+</sup> kinase, (13) nicotinamide phosphoribosyltransferase, (14) NAD<sup>+</sup> degrading enzyme, (15) nicotinamide methyltransferase, (16) 2-Py-forming MNA oxidase, (17) 4-Py-forming MNA oxidase.

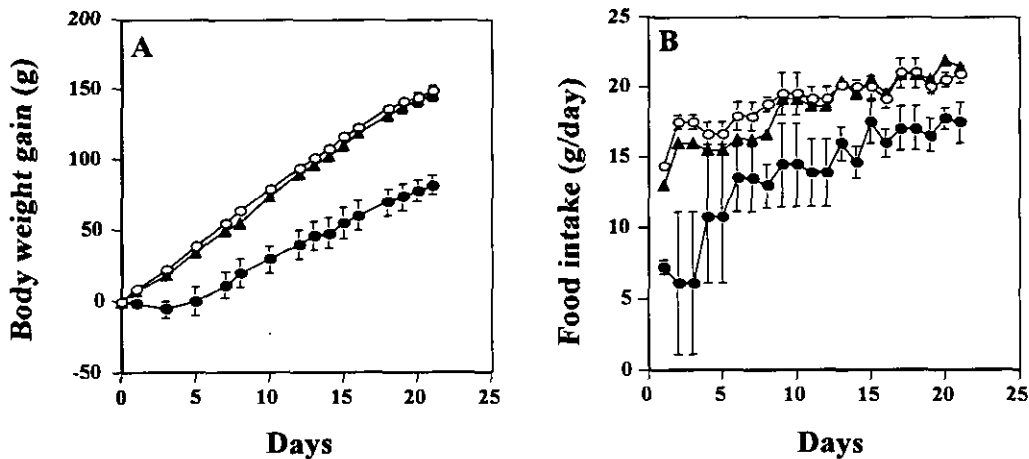


図3.ビスフェノールAおよびスチレンモノマーが体重増加量 (A) および飼料摂取量 (B) へおよぼす影響

○, コントロール群; ▲, スチレンモノマー群; ●, ビスフェノールA群

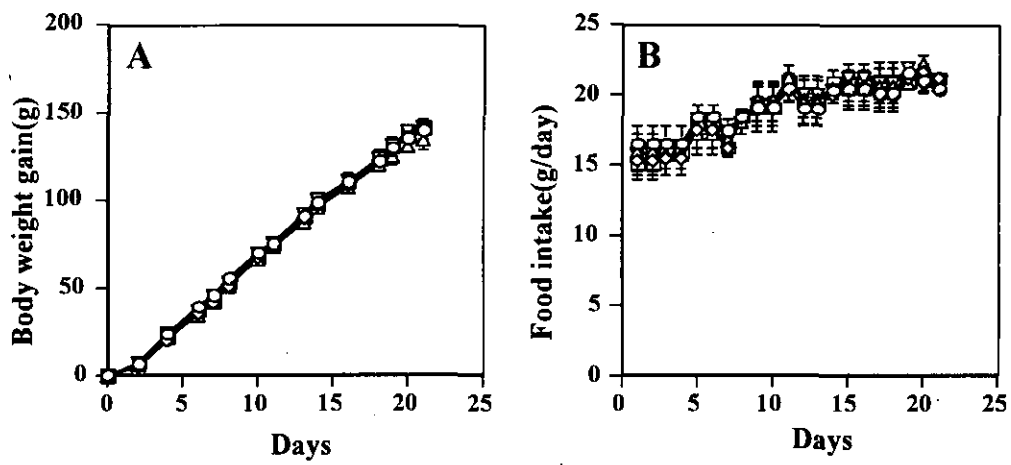


図4.ピコリン酸およびピコリンアミドが体重増加量 (A) および飼料摂取量 (B) へおよぼす影響

○, コントロール群; ◇, 0.05% ピコリン酸; □, 0.1% ピコリン酸; ▽, 0.05% ピコリンアミド; ◻, 0.1% ピコリンアミド



表 1. 飼料摂取量

	Control (%)	Picolinic acid (%)	Picolinamide (%)	Bisphenol A (%)	Styrene monomer (%)
Vitamin-free casein	20	20	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Gelatinized-cornstarch	45.9	44.9	44.9	44.9	44.9
Sucrose	22.9	22.9	22.9	22.9	22.9
Corn oil	5	5	5	5	5
Mineral mixture* <sup>1</sup>	5	5	5	5	5
Vitamin mixture* <sup>1</sup> (NiA-free)	1	1	1	1	1
Addition compound		1	1	1	1

\*<sup>1</sup>AIN 93 was used (Reeves, P. G., *Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J. Nutr.*, 127, 838S-841S (1997)).

表 2. ビスフェノール A およびスチレンモノマーが肝臓重量, 肝臓・血中 NAD 含量へおよぼす影響

	Control	Bisphenol A	Styrene monomer
Final body weight (g)	279.6 ± 5.6 <sup>a</sup>	213.5 ± 5.9 <sup>b</sup>	278.1 ± 5.6 <sup>a</sup>
Liver weight (g/rat)	12.21 ± 0.26 <sup>a</sup>	9.96 ± 0.64 <sup>b</sup>	13.17 ± 0.49 <sup>a</sup>
Liver weight (g/100 g of body weight)	4.37 ± 0.03	4.65 ± 0.18	4.73 ± 0.09
Blood NAD (nmol/ml of whole blood)	82.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	66.3 ± 2.5 <sup>b</sup>	87.1 ± 3.1 <sup>a</sup>
Liver NAD (nmol/g wet weight)	657 ± 24 <sup>a</sup>	514 ± 11 <sup>b</sup>	572 ± 37 <sup>ab</sup>

Male rats of the Wistar strain (6 weeks old) were obtained and immediately placed in individual metabolic cages (CT-10; Clea Japan). They were fed ad libitum (Table 1) for 21 days, then killed, and examined.

Values are means ± SEM for five rats; each superscript letter indicates a significant difference at  $p < 0.05$ , calculated by Tukey's multiple comparison test.

表 3. ビスフェノール A およびスチレンモノマーがトリプトファン-ニコチンアミド代謝へおよぼす影響

	Food intake (g/day)	AnA (nmol/g diet)	KA (nmol/g diet)	XA (nmol/g diet)	3-HA (nmol/g diet)	QA (nmol/g diet)	Nam (nmol/g diet)	MNA (nmol/g diet)	2-Py (nmol/g diet)	4-Py (nmol/g diet)
Control	20.6±0.5 <sup>a</sup>	3.03±0.38	56.8±1.5	92.2±6.0 <sup>a</sup>	7.31±0.26 <sup>a</sup>	43.2±3.3 <sup>a</sup>	10.1±0.5 <sup>a</sup>	11.8±0.6 <sup>a</sup>	12.1±0.9 <sup>a</sup>	209±19 <sup>a</sup>
Bisphenol A	17.3±0.9 <sup>b</sup>	3.78±0.61	52.1±11.4	38.7±5.5 <sup>b</sup>	3.77±0.16 <sup>b</sup>	7.1±0.5 <sup>b</sup>	2.4±1.1 <sup>b</sup>	1.8±0.3 <sup>b</sup>	1.8±0.4 <sup>b</sup>	11±3 <sup>b</sup>
Styrene monomer	21.3±0.6 <sup>a</sup>	3.65±0.40	61.9±4.5	96.7±7.2 <sup>a</sup>	6.55±0.24 <sup>a</sup>	36.5±7.3 <sup>a</sup>	7.2±1.1 <sup>a</sup>	9.1±1.3 <sup>a</sup>	10.2±1.6 <sup>a</sup>	137±16 <sup>c</sup>

Values are expressed as nmol/g of diet and mean ± SEM for five rats; each superscript letter in the same column indicates a significant difference at  $p < 0.05$ , calculated by Tukey's multiple comparison test. AnA, anthranilic acid; KA, kynurenic acid; XA, xanthurenic acid; 3-HA, 3-hydroxyanthranilic acid; QA, quinolinic acid; Nam, nicotinamide; MNA, *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide; 2-py, *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide; 4-Py, *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide.

表 4. ビスフェノール A およびスチレンモノマーがトリプトファン-ニコチンアミド転換率へおよぼす影響

	Control	Bisphenol A	Styrene monomer
SUM (Nam + MNA + 2-Py + 4-Py) (nmol/g of diet)	243.2 ± 20.9 <sup>a</sup>	17.2 ± 4.3 <sup>b</sup>	163.8 ± 19.7 <sup>c</sup>
Conversion ratio of tryptophan-nicotinamide (%)	2.18 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.47 ± 0.18 <sup>c</sup>

Male rats of the Wistar strain (6 weeks old) were obtained and immediately placed in individual metabolic cages (CT-10; Clea Japan). They were fed ad libitum (Table 1) for 21 days.

The 24-hour urine samples were collected on the last day of the experiment and measured.

Values are means ± SEM for five rats; each superscript letter indicates a significant difference at  $p < 0.05$ , calculated by Tukey's multiple comparison test.

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

7. 水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 -ナイアシン-

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、ナイアシンの許容上限摂取量はニコチン酸の血管拡張による皮膚発赤作用に基づいて策定された。ニコチンアミドあるいはニコチン酸を継続的に大量摂取することにより過剰害が認められる。本年度においては、ラットを用いてニコチンアミドを大量摂取したときに観察される化学的指標を検索することを目的とした。ニコチンアミドの終濃度を 0, 0.003, 0.1, 0.2, 0.3%とした食餌をラットに投与し、尿中のニコチンアミド異化代謝産物量を測定した。0.1%以上のニコチンアミド添加食によってニコチンアミド異化代謝産物であるニコチンアミドN-オキシド、ニコチン酸およびニコチヌル酸が検出され、ニコチンアミドN-オキシドとニコチヌル酸の尿中排泄量は投与ニコチンアミド量に応じて増大した。これらの結果から、尿中のニコチヌル酸およびニコチンアミドN-オキシドを測定することにより、ニコチンアミド過剰摂取の指標として利用できる可能性が示された。将来、これらの指標をヒトに応用することにより、ニコチンアミド過剰摂取を予防できることが期待される。

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、ナイアシンの許容上限摂取量は米国、カナダに準じ、ニコチン酸の血管拡張による皮膚発赤作用に基づいて LOAEL50mg から策定された。しかし、本来許容上限摂取量とは継続的に摂取した場合の慢性的なものであるのに対して、皮膚発赤作用はニコチン酸を服用した場合に生じる一過性の症状であり、また身体に有害なものでもない。

ニコチンアミド、ニコチン酸を継続的に大量摂取し続けると、消化管、肝臓に障害をもたらす。本実験は、ラットを用いてニコチンアミドを継続的に大量摂取させたときに観察される化学的指標を検索することを目的とした。

B. 研究方法

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けたものである。

(1) 動物の飼育方法

3 週齢の Wistar 系雄ラットを日本クレア(株)より購入後、直ちに体重が均等になるように 4 匹ずつ 5 群に分けた。負の対照群としてトリプトファン制限-ニコチンアミド欠乏食 (Negative-Control 食 ; NC 食) 群、正の対

照群として NC+0.003%ニコチンアミド食 (Control 食 ; C 食) 群、試験食群として NC+0.1%ニコチンアミド食 (0.1%Nam 食) 群、NC+0.2%ニコチンアミド食 (0.2%Nam 食) 群、および NC+0.3%ニコチンアミド食 (0.3%Nam 食) 群の 3 群を設定した。各々のラットは 1 匹ずつ金網ケージにて、21 日間飼育した。飼料組成は Table 1. に示した。飼料と水は自由摂取とし、飼料は 1 日ないし 2 日に一回新しいものと交換した。その際、飼料摂取量と体重を測定した。

動物室の温度は 20°C 前後、湿度は 60% 前後、明暗サイクルは 6 時から 18 時を明、18 時から 6 時までを暗とした。

(2) 尿中代謝産物の分析方法

尿中キヌレニン酸 (KA), アンスラニル酸 (AnA), キサンツレン酸 (XA), 3-ヒドロキシアンスラニル酸 (3-HA), キノリン酸 (QA) の測定として、各尿 200  $\mu$ l 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。KA の分析条件は、カラム : Tosoh ODS 80Ts ( $\phi$ 4.6x250mm), 移動相 : 10mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5)-アセトニトリル(100:53 v/v), ポストカラム液 : 1 M 酢酸亜鉛, 流速 : 1ml/分, カラム温度 : 40°C, 検出器 : 蛍光分光光度計, 励起波長 344nm, 蛍光

波長 398nm とした. AnA の分析条件は, カラム: Tosoh ODS 80Ts ( $\phi 4.6 \times 250$ mm), 移動相: 1MKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.0)-超純水-アセトニトリル (1:12:7 v/v/v), 流速: 1ml/分, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光分光光度計, 励起波長 340nm, 蛍光波長 410nm とした. XA, 3-HA の分析条件は, カラム: STR ODS II ( $\phi 4.6 \times 250$ mm), 移動相: 3mg/ml EDTA-2Na を 1ml/l 含む 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.0)-アセトニトリル (10:1 v/v), 流速: 1ml/分, カラム温度: 40°C, 検出器: 紫外分光光度計 340nm とした. QA の分析条件は, カラム: Unisil Q C81 ( $\phi 4.6 \times 250$ mm), 移動相: 50 ml/l 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.8 by 0.2 M citric acid), 40 ml/l 過酸化水素, 30 ml/l 15%TMA, 流速: 0.6ml/分, カラム温度: 30°C, 検出器: 蛍光分光光度計, 励起波長 326 nm, 蛍光波長 380 nm とした<sup>8)9)10)11)</sup>.

尿中ニコチンアミド, 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)の測定として, 各サンプル 1ml に炭酸カリウム 1.2g を添加した後, ジエチルエーテル 10ml を加えてよく混合し, 40°C で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( $\phi 4.6 \times 250$ mm), 移動相: 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.0)-アセトニトリル (100:4 v/v), 流速: 1 ml/分, 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<sup>2)</sup>.

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, 0.1 M アセトフェノン溶液 0.5 ml を混合した後, 6 M NaOH 溶液 1ml 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 ( $\phi 4.6 \times 250$ mm), 移動相: 1 g/l 1-ヘプタスルホン酸ナトリウムおよび 1mM EDTA-2Na を含む 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.0)-アセトニトリル (97:3 v/v), 流速: 1ml/分, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光分光光度計, 励起波長 382 nm, 蛍光波長 440 nm とした<sup>5)</sup>.

尿中ニコチンアミド N-オキシドの測定として, 尿 1 ml に炭酸カリウム 1.2g を添加し

た後, クロロホルム 10ml を加えてよく混合し, 70°C でクロロホルム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( $\phi 4.6 \times 250$ mm), 移動相: 0.1 g/l Sodium salt octanesulfonic acid を含む 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.0)-メタノール (100:4 v/v), 流速: 1 ml/分, カラム温度: 25°C, 検出器: 紫外分光光度計 260 nm とした<sup>7)</sup>.

尿中ニコチン酸, ニコチヌル酸の測定として, 各尿 200  $\mu$ l 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 ( $\phi 4.6 \times 250$  mm), 移動相: 1.6 g/l tetra-*n*-butylammonium bromide を含む 10mM KPB (pH7.0)-アセトニトリル (100:9 v/v), 流速: 1 ml/分, カラム温度: 25°C, 検出器: 紫外分光光度計 260nm とした<sup>6)</sup>.

(3)血中および肝中 NAD・NADP 定量方法<sup>3)4)</sup>

血液 20  $\mu$ l を 100 mM ニコチンアミド-50mM KPB(pH6.0) 40  $\mu$ l に加えてよく混合し, 90°C で 1.5 分間加熱処理した後, 遠心上清を血中 NAD・NADP 含量の測定に用いた. 肝臓は, まず組織を約 0.25 g 正確に秤量し, 20 倍量の抽出用緩衝液を加え, ウルトラディスペーサーで完全に均一化した. この均一化液 200  $\mu$ l を, 1000  $\mu$ l の 100mM ニコチンアミド-50mM KPB(pH6.0)を入れたネジ付きマイクロチューブに加え, 90°C で 1.5 分間加熱処理した. 遠心上清を肝臓中 NAD・NADP 含量の測定に用いた.

NAD 含量の測定として, サンプル 10  $\mu$ l, 2.5 mg/ml MTT 溶液 10  $\mu$ l, 1 mg/ml PMS 溶液 80  $\mu$ l, 0.1 M ニコチンアミドと 0.5M エタノールを含む 65 mM グリシルグリシン-NaOH 緩衝液(pH 7.4)150  $\mu$ l, 75 IU/ml ADH 溶液 50  $\mu$ l をよく混和し, 37°C で 20 分間加温した後, 570 nm における吸光度を測定した. NADP 含量の測定として, サンプル 20  $\mu$ l, 2.5 mg/ml MTT 溶液 10  $\mu$ l, 1 mg/ml PMS 溶液 80  $\mu$ l, 0.15 M ニコチンアミドを含む 0.15 M グリシルグリシン-NaOH 緩衝液(pH 7.4)80  $\mu$ l, 10 mM グルコース 6-リン酸溶液 60  $\mu$ l, 2IU/ml G6PDH 溶液 50  $\mu$ l をよく混和し, 37°C で 20 分間加温した後, 570 nm における吸光度を測定した.

## C. 研究成果

### (1) 体重増加量・飼料摂取量

Fig. 1 に 1 日当たりの飼料摂取量および飼育開始日からの体重増加量の変化を示した. NC 群は体重増加量, 飼料摂取量ともに最も