

表 1. 飼料組成

	群分け			
	Control 群	0.01%群	0.1%群	1.0%群
Casein	20(%)			
L-Methionine	0.2			
Gelatinized cornstarch	46.9			
Sucrose	23.4			
Corn oil	5			
Mineral mixture(AIN-93M MX)	3.5			
Vitamin mixture(AIN93-VX)	1			
Folic Acid( $\mu\text{g}$ /上記飼料 100g)	0.2	10.2	100.2	1000.2

表 2. 葉酸の大量投与がラットの臓器重量におよぼす影響

臓器	Control 群	0.01%群	0.1%群	1.0%群
脳	1.1 $\pm$ 0.08	1.1 $\pm$ 0.04	1.0 $\pm$ 0.03	1.2 $\pm$ 0.01
心臓	0.7 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.03
肝臓	8.8 $\pm$ 0.25	8.6 $\pm$ 0.50	8.8 $\pm$ 0.28	8.5 $\pm$ 0.42
腎臓	1.6 $\pm$ 0.01	1.6 $\pm$ 0.03	1.7 $\pm$ 0.03	1.6 $\pm$ 0.02
脾臓	0.7 $\pm$ 0.03	0.7 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.03
肺	1.2 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.04
精巣	2.0 $\pm$ 0.10	2.0 $\pm$ 0.09	2.0 $\pm$ 0.05	2.0 $\pm$ 0.05

値は平均値 $\pm$ SEM (n = 5)で示した。

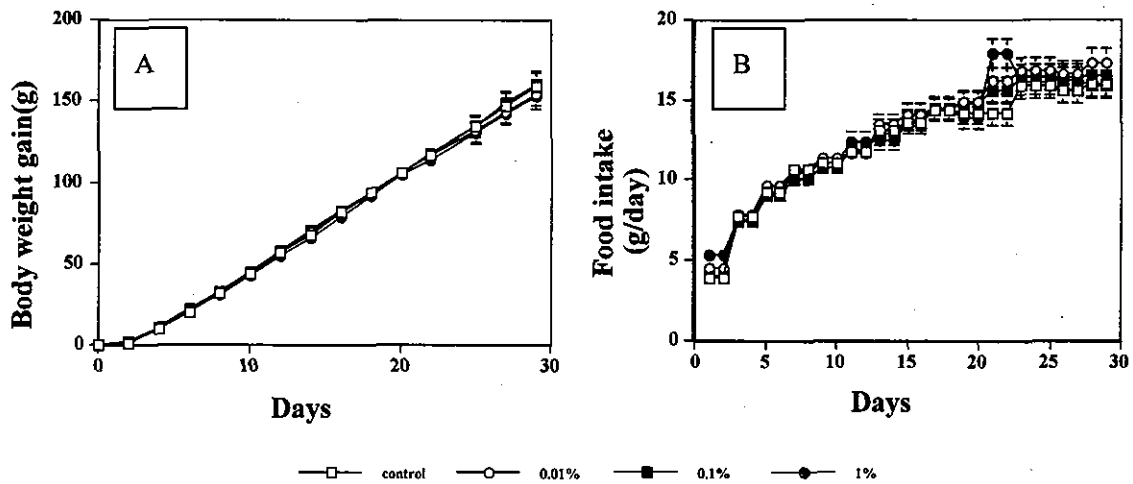


図1. 葉酸の大量投与が幼若ラットの体重増加量(A)と飼料摂取量(B)におよぼす影響。数値は平均値±SEM (n=5)で示した。

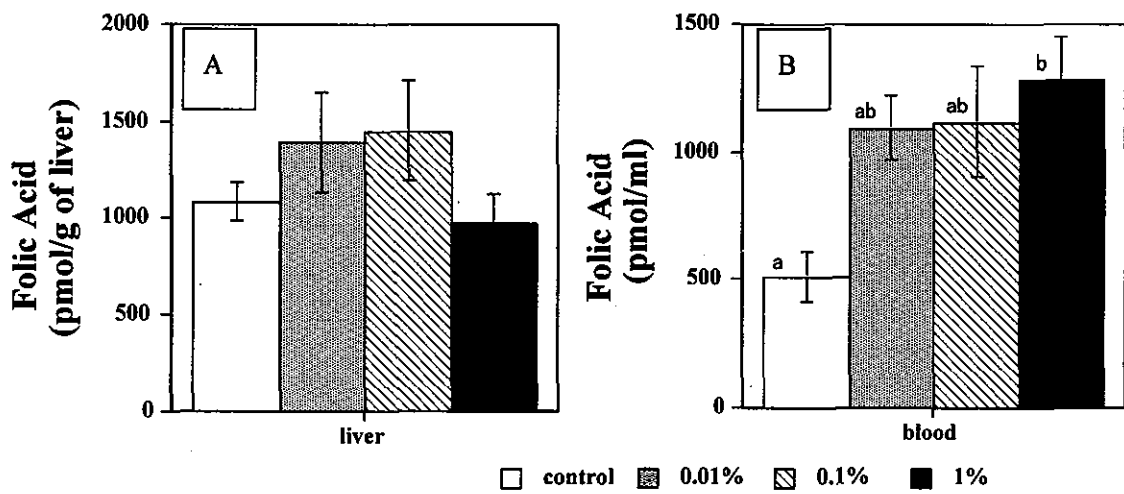


図2. 葉酸の大量投与がラット肝臓中と血液中の葉酸含量に及ぼす影響。数値は平均値±SEM (n=5)で示した。

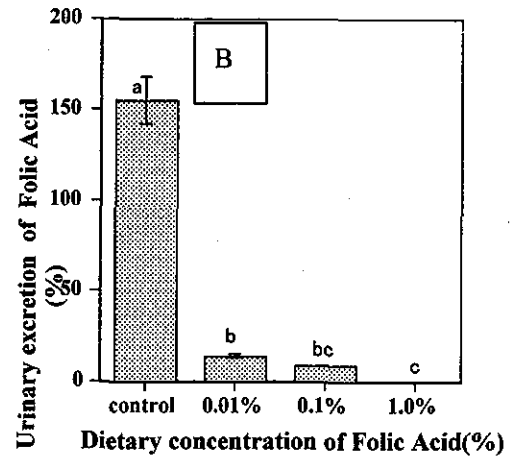
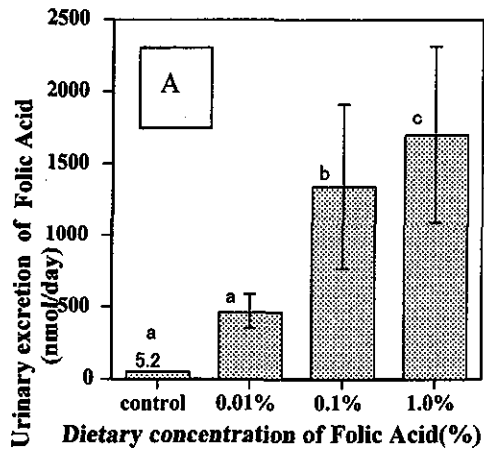


図3. 葉酸の大量投与が尿中への葉酸排泄量におよぼす影響  
 数値は平均値±SEM (n = 5)で示した.

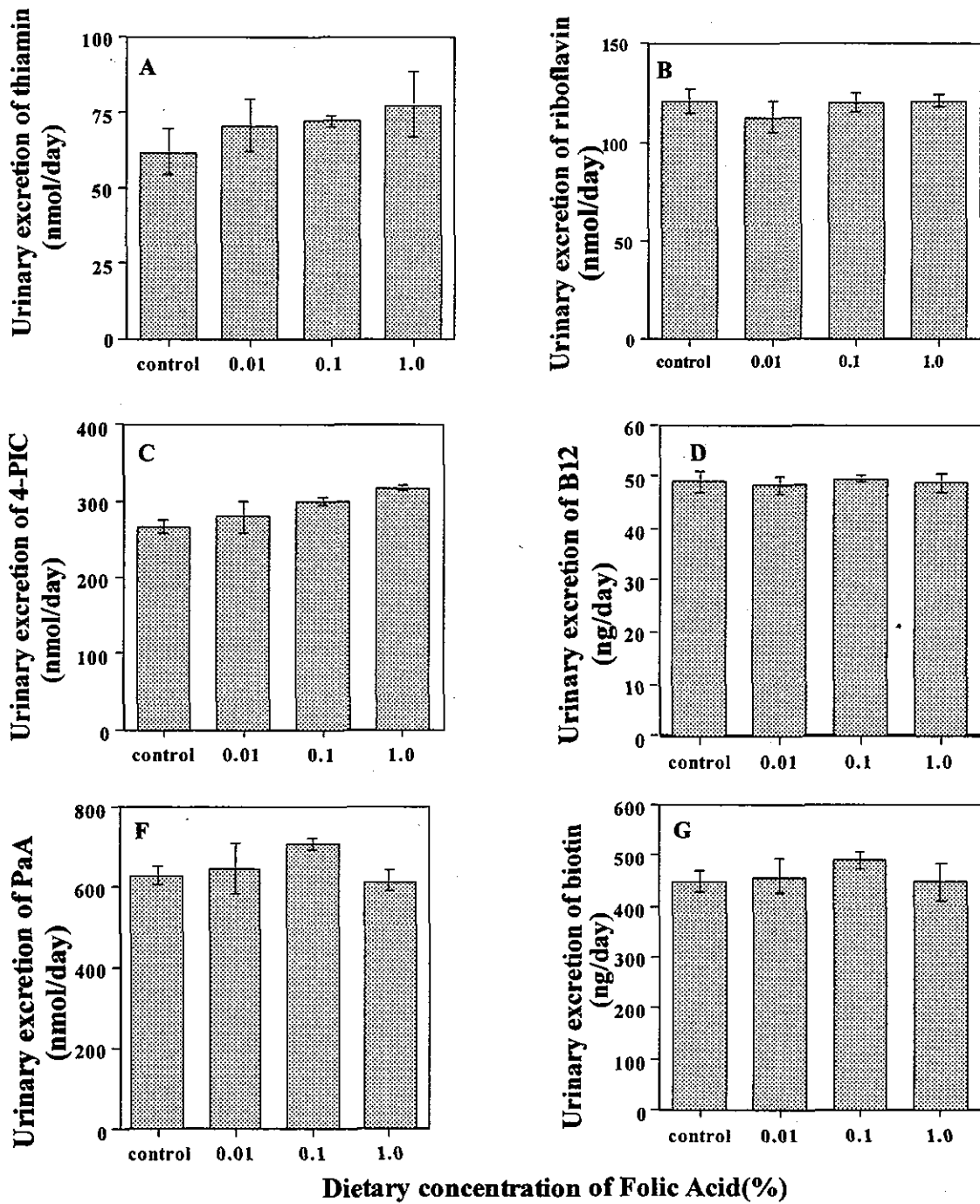


図4. 葉酸の大量投与がB群ビタミン代謝に及ぼす影響  
 数値は平均値±SEM (n = 5)で示した。

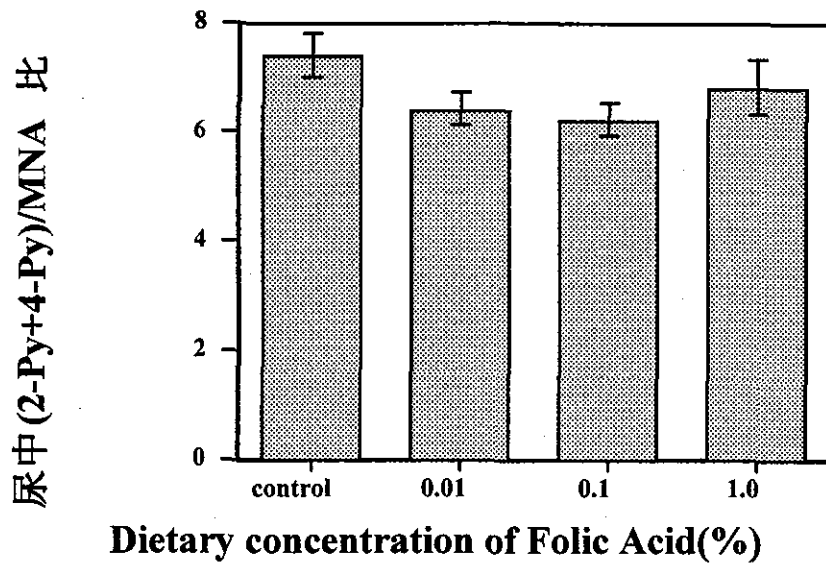


図5. 葉酸の大量投与がナイアシン異化代謝産物排泄量比, (2-Py + 4-Py)/MNA におよぼす影響

値は平均値±SEM (n = 5)で示した。

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）  
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究  
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

## II. 主任研究者の報告書

### 4. ビタミンの上限量の検討 -内因性ニコチンアミド-

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

ナイアシン欠乏ラットにジエチルヘキシルフタレート(DEHP)を添加すると、成長抑制が改善された。この結果はペラグラに対するDEHPの有用性を意味する。ところが、DEHPはトリプトファンから生合成される内因性の神経毒であるキノリン酸の生合成量を顕著に高めてしまうという危険性がある。本研究では、DEHP添加による内因性神経毒キノリン酸(QA)増加のため起こる悪影響の有無を詳細に調べ、安全性を検討することを目的とした。4週齢のWistar系雄ラットを3群に分け、1群をcontrol群とし通常食（20%カゼイン食）を、残り2群にはTest群として通常食にDEHPを0.5%あるいは1%添加した飼料を与えた。飼育43日目より、さらにキノリン酸量を増加させ、その影響を調べるため、20%カゼイン食にトリプトファンを1%添加したものを通常食とした。総飼育日数は132日間である。その結果、体重増加量、飼料摂取量にはDEHP投与による影響は認められなかった。尿中キノリン酸排泄量は顕著に増加したが、投与したラットには身体的、行動的な影響は見られなかった。臓器重量は肝臓、脳、腎臓においてDEHP投与による増大が認められた。しかし、脳中のトリプトファン、セロトニン含量に影響は見られなかった。以上のことより、今回の研究においては、DEHP投与により、既報のように、ナイアシン合成量が増加し、キノリン酸排泄量も上昇したが、身体的、行動的影響は見られなかったことから、ペラグラに対し、安全性の高い予防物質であると思われた。

## A. 目的

ペラグラはナイアシンの欠乏症で、症状の代表的なものは、皮膚疾患である。その他の症状は、消化管粘膜に発赤を伴う炎症が生じることによる下痢である。また、頭痛、不眠、幻覚、錯乱などの中枢神経症状などが上げられる。ペラグラ患者が適切な処置を受けなかった場合、いろいろな器官に障害を受け、死に至る(1)。

現在日本においてペラグラはあまりなじみのない欠乏症であるが、現在もなお途上国のトウモロコシ多食地域などでペラグラが発生している(2)。実際にどの程度の割合で発生しているかは不明だが、JICA(国際協力機構)の支援を受けたタンザニアのペラグラ調査の結果から、深刻な地域では20-30%の住民がペラグラに侵されていることが判明した(3)。ところが、ペラグラ問題は重要でありながら、主要な援助機関が重視しておらず、調査や対策が行われていないことが現状である。そのため、すでにペラグラが発生していると判明している地域に対しては、治療及び予防対策を積極的に行う必要があり、どのような予防対策が最も効果的であるかを検討することも重要である。

そこで、過去のナイアシン欠乏ラットに対するジエチルヘキシルフタレート(DEHP)添加実験において、DEHPを添加すると、成長抑制が改善されたという結果がある(4)ののだが、このことを基に、ペラグラに対してDEHPが有用であるのではないかと考えた。

DEHP(図1)はフタル酸エステルの1つで、特に使用量が多い。また、塩化ビニル系合成樹脂の可塑剤として使用されており、

その用途は食品の包装材、医療器具、壁紙、おもちゃなど幅広く使用されている。DEHPを含むフタル酸エステルは、発ガン性が指摘され、安全性に関する研究は半世紀以上にわたりおこなわれてきた。そして、2000年にIARC(国際ガン研究機関)より発表された、「発ガン性評価の分類」によると、DEHPは「グループ3(ヒトに対する発ガン性について分類できない)」とされている。

本研究室においても、これまでDEHPに関する研究が行われてきた。そしてDEHPがトリプトファン(Trp)-ナイアシン代謝に影響を及ぼすことを明らかにした(5-10)。その影響というのは、DEHPがモノエチルヘキシルフタレート(MEHP)に加水分解され、そのMEHPがTrp代謝産物である $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -カルボキシムコネート- $\epsilon$ -セミアルデヒド(以下ACMS)から $\alpha$ -アミノムコネート- $\epsilon$ -セミアルデヒド(以下AMS)にいたる過程の酵素、アミノカルボキシムコネート-セミアルデヒドカルボキシラーゼ(ACMSD)活性を阻害し、その結果ACMSがキノリン酸(QA)経路に流れ、Trp-からナイアシンへの転換率が上昇し、ナイアシン合成が高まるというストーリーである(10)(図2)。しかし、ナイアシンとともに増加するQAは神経毒であり、アルツハイマーや、パーキンソン病の患者の脳内に多量に蓄積していることから、QAはこれらの原因物質ではないかと考えられている(11)。そのことから、QAの増加が懸念される。

そこで本研究では、DEHP添加によるQA量の増加が行動異常などの身体的影響、臓器重量に対する影響の有無、また尿中Trp-ナイアシン代謝産物を測定し、さらに安全性を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### <飼育>

4週齢のWistar系雄ラット21匹を日本クレア(株)より購入し、体重が均等になるように5匹、8匹、8匹の3群に分けて、1匹ずつラット用代謝ケージに入れた。その日から、1群をcontrol群とし通常食(20%カゼイン食)を、残り二群にはTest群としてDEHPを0.5%あるいは1%添加したDEHP添加食を与えた。飼育45日目より、Trp-ナイアシン代謝経路中間代謝産物であるQAをさらに増加させ、身体に現れる影響を観察するため、20%カゼイン食にTrpを1%添加したものを通常食とし、そこにDEHPを0.5%あるいは1%添加した飼料をTest群に与えた。(表1)この1%という値は、過去の本研究室の実験結果に基づく値で、臓器など身体に影響を及ぼさない値である。1%Trpを添加することにより、飼料中のTrp含量は、2.3mg/g of dietから、12.3mg/g of dietとなった。

飼料と水は自由摂取とし、2日ないし3日置きに新しいものに交換した。ラットの世話は午前8-10時の間に行い、体重と飼料摂取量を測定した。飼育条件としては、室温20°C、湿度60%、午前6時-午後6時を明、午後6時-翌朝午前6時を暗とする明暗サイクルで行った。この様にして、133日間飼育した。

実験開始日をDay 0として、飼育最終3日に当たるDay 130, 131, 132の1日尿(午前9時-翌日午前9時:24時間)を集めた。尿は使用するまで塩酸酸性下、-20°Cで保存した。

Day 133に断頭屠殺し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣を採取し、重量を測

定した。そして、脳中のSHTおよびTrp濃度、肝臓中のNAD濃度を測定した。またチアミン、リボフラビン、ビタミンB<sub>6</sub>代謝産物(4-ピリドキシン酸, 4-PIC)、ビタミンB<sub>12</sub>、総ニコチンアミド異化代謝産物、パントテン酸、葉酸、ビオチンおよびアスコルビン酸の尿中排泄量の測定も行った。

### <測定項目>

- ・脳中 Trp, セロトニン (5-HT)
- ・尿中 Trp, 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA)
- ・肝臓中 NAD
- ・尿中 チアミン, リボフラビン, ビタミンB<sub>6</sub>代謝産物(4-PIC), ビタミンB<sub>12</sub>, パントテン酸, 葉酸, ビオチン, アスコルビン酸,

### Trp-ナイアシン代謝産物

(アンスラニル酸(AnA), キヌレン酸(KA), キサツレン酸(XA), 3-ヒドロキシアニラニル酸(3-HA), QA, ニコチンアミド(Nam), 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))

## C. 結果と考察

### (1)体重増加量と飼料摂取量

Day 20頃までは、飼料摂取量に関してcontrol群・0.5%DEHP群と、1.0%DEHP群の間に差がみられたが、それ以降は大きな差はみられなかった(図3)。

体重増加量は、飼料摂取量に影響を受け、1.0%DEHP群がわずかながら増加量の抑制がみられたが、ほぼ同じ曲線を描いた。従って、体重増加量及び飼料摂取量に有意な影響は見られなかった。



## (2)尿中ビタミン排泄量

尿中 Trp - ナイアシン転換経路代謝産物排泄量, 転換率

QA · Nam · MNA · 2-Py · 4-Py · Sum

図4に結果を示した。SumはNam, MNA, 2-Py, 4-Pyをたした値である。QA · Nam · MNA · 2-Py · Sumにおいて, 排泄量・転換率ともに顕著にDEHPの添加により増加した。

Trp-QA転換率は, Control群と, 0.5%DEHP群・1.0%DEHP群間で有意差がみられ, 転換率は46倍増加した。しかし, 行動異常など身体的異常は何も観察されなかった。

Trp-Sum転換率も同様にControl群と, 0.5%DEHP群・1.0%DEHP群間で有意差がみられた。その増加量は4倍程度だった。

AnA · KA

図5に結果を示した。尿中AnA排泄量は, Control群と0.5%DEHP群間で有意差が見られたが, Control群と1.0%DEHP群間では差が見られなかった。

尿中KA排泄量は, Control群と0.5%DEHP・1.0%DEHP群間で有意差が見られた。

XA · 3-HA

図6に結果を示した。尿中XA排泄量は, 減少し, Control群と0.5%DEHP・1.0%DEHP群間で有意差が見られた。

尿中3-HA排泄量・転換率に有意差は見られなかった。

$2-Py / 4-Py \cdot (2-Py + 4-Py) / MNA$

図7に結果を示した。2-Py/4-Py値は増加したが, (2-Py+4-Py)/MNA値は減少した。

(2-Py+4-Py)/MNA値は, タンパク質

栄養が悪化したときや, 体調が悪くなると低くなる(11)。

尿中 V.B<sub>1</sub> · B<sub>2</sub> · B<sub>12</sub>, 4-PIC, パントテン酸 (PaA), 葉酸 (FA), biotin, ascorbic acid 排泄量

結果を図8に示した。V.B<sub>1</sub>, 4-PIC, biotinはControl群と0.5%DEHP・1.0%DEHP群間で有意差が, FA, ascorbic acidはControl群と1.0%DEHP群間で有意差が見られ, 排泄量は減少した。しかし, PaAは尿中排泄量が増加した。VB<sub>2</sub>, VB<sub>12</sub>に有意差は見られなかった。

## (3)臓器重量

飼育最終日に開腹し, 脳, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 精巣の重量を測定した結果, 体重100gあたりの臓器重量として表2にまとめた。0.5%と1%DEHP添加群において, 脳, 肝臓と腎臓がcontrol群よりも有意に高い値をしめした。その他の臓器は, 有意差がみられなかった。

## (4) Trp, 5-HT, 5-HIAA 測定結果

脳中 Trp, 5-HT 量

図9に結果を示した。脳中Trp, 5-HT濃度にDEHPの摂取は, 有意な影響をおよぼさなかった。

尿中 Trp, 5-HIAA 排泄量

図10に結果を示した。Trp排泄量に有意差は見られなかったが, 5-HIAA排泄量は, control群と1.0%DEHP添加群間で有意差がみられた。

## (5) 肝臓中 NAD 測定

図11に結果を示した。Trpからニコチンアミドへの合成は肝臓中で行われる。control群と0.5%・1.0%DEHP群間で有意差がみられた, 約2倍増加した。

#### D. 健康危機情報

特記する情報なし

#### E. 研究発表

##### 1. 発表論文

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### F. 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

#### G. 引用文献

1. Goldberger J. (1916) Pellagra: Causation and a method of prevention. *J Am Med Assoc*, 66:471-476.
2. Carpenter KJ. (1983) The relationship of pellagra to corn and the low availability of niacin in cereals. *Experientia Suppl*, 44:197-222.
3. 独立行政法人国際協力機構のホームページ. <http://www.jica.go.jp/>
4. Shibata K, Motooka K, Murata K, Iwai K. (1982) 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.
5. Shibata K, Fukuwatari T, Enomoto A, Sugimoto E. (2001) Increased conversion

ratio of tryptophan to niacin by dietary di-*n*-butylphthalate. *J Nutr Sci Vitaminol*, 47:263-266.

6. Fukuwatari T, Suzuki Y, Sugimoto E, Shibata K. (2002) Elucidation of the toxic mechanism of plasticizers, phthalic acid esters, putative endocrine disrupters: effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66:705-710.
7. Fukuwatari T, Suzuki Y, Sugimoto E, Shibata K. (2002) Identification of toxic mechanism of plasticizers, phthalic acid Esters, which is a Putative Endocrine disrupters: Time-dependent increase in quinolinic acid and its metabolites in rats fed di(2-ethylhexyl)phthalate diet. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66:2687-2691.
8. Ohta M, Kitamura J, Fukuwatari T, Sasaki R, Shibata K. (2004) Effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in mice. *Experimental Animals*, 53:57-60.
9. Fukuwatari T, Ohta M, Sugimoto E, Sasaki R, Shibata K. (2004) Effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate, a putative endocrine disrupter, on enzyme activities involved in the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1672:67-75.
10. Fukuwatari T, Ohsaki S, Fukuoka S, Sasaki R, Shibata K. (2004) Phthalate esters enhance quinolinate production by inhibiting  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdeh

yde decarboxylase (ACMSD), a key enzyme of the tryptophan pathway.

Toxicol Sci, 81:302-308.

11. 柴田克己 (1990) ニコチンアミドの異化代謝産物、*N*<sup>1</sup> - メチルニコチンアミドとそのピリドン体の排泄量比とアミノ酸栄養との関係. ビタミン, 64:1-18.

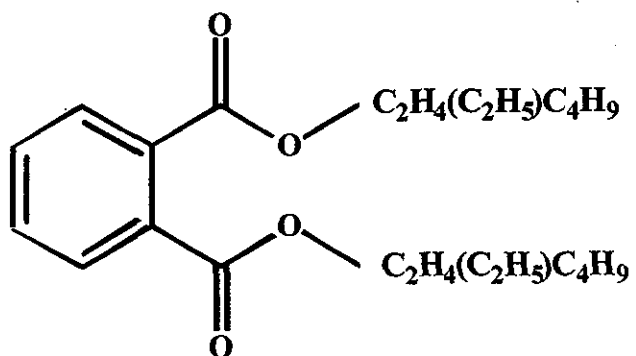


図1. ジエチルヘキシルフタル酸エステル(DEHP)の構造式

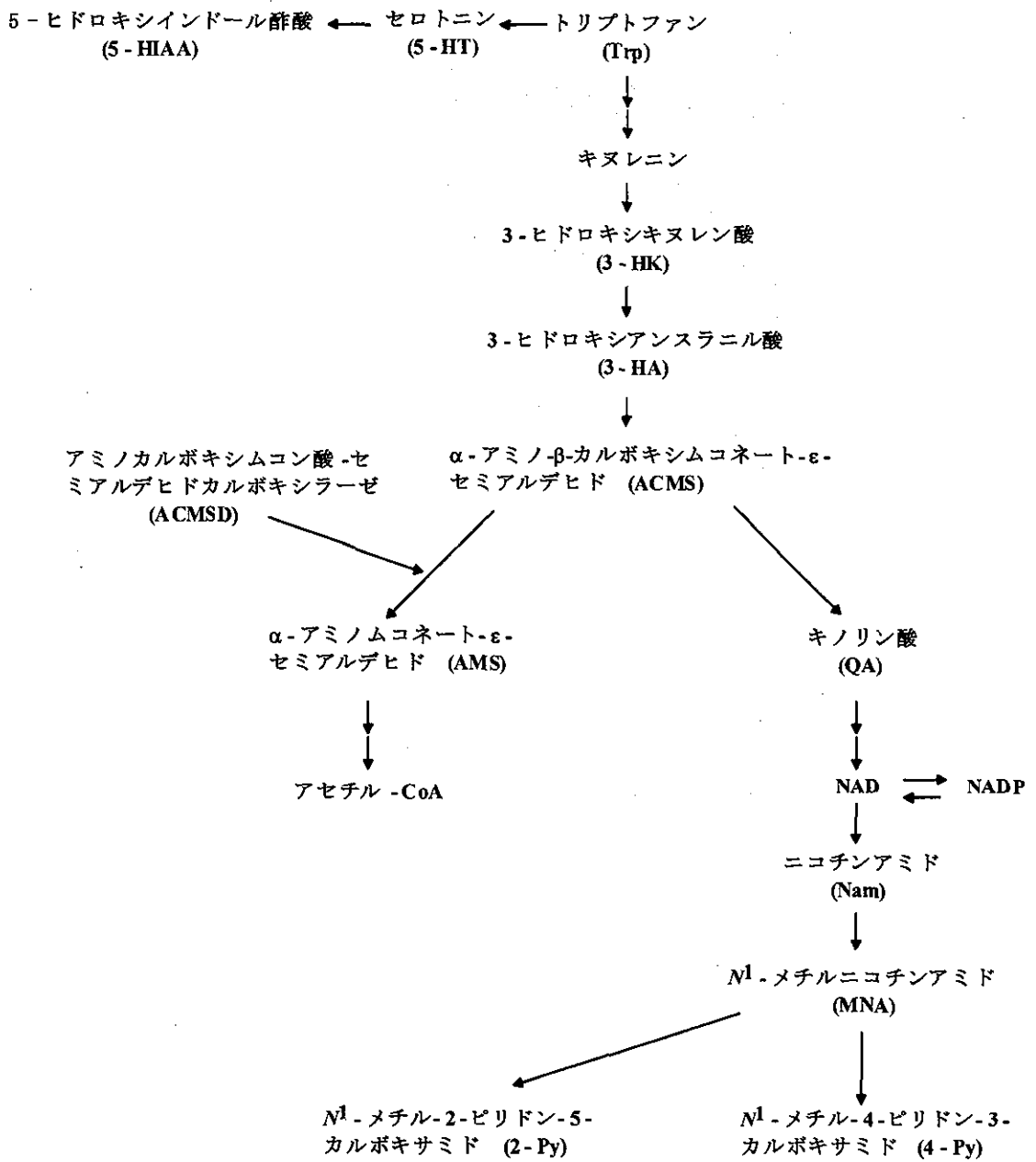


図2. トリプトファン-ナイアシン生合成経路

表 1. 飼料組成(%)

	Test diet (control diet + various amount of DEHP)		
	Control diet		
	20% casein diet (%)	0.5% DEHP (%)	1% DEHP (%)
Casein (Vitamin-free)	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	46.9	46.9	46.9
Sucrose	23.4	23.4	23.4
Corn oil	5	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture*	1	1	1
L-Tryptophan**	1	1	1
DEHP	0	0.5	1

\*nicotinic acid-free

\*\*Day 45 より添加

表 2. DEHP 摂取が臓器重量に及ぼす影響

(g/100g of Body weight)	Control	Test	
		0.5 % DEHP	1.0 % DEHP
脳	0.242±0.02 <sup>a</sup>	0.30±0.02 <sup>b</sup>	0.304±0.02 <sup>b</sup>
心臓	0.272±0.04	0.25±0.01	0.259±0.01
肺	0.423±0.03	0.37±0.01	0.412±0.02
肝臓	3.04±0.06 <sup>a</sup>	4.46±0.10 <sup>b</sup>	4.892±0.07 <sup>b</sup>
脾臓	0.169±0.01	0.18±0.01	0.202±0.01
腎臓	0.512±0.01 <sup>a</sup>	0.61±0.02 <sup>b</sup>	0.635±0.01 <sup>b</sup>
精巢	0.743±0.02	0.80±0.02	0.787±0.02

値は平均値±SEM で示した (n=5~8). 異なる添え字は  $p<0.05$  で有意差が認められたことを示す.

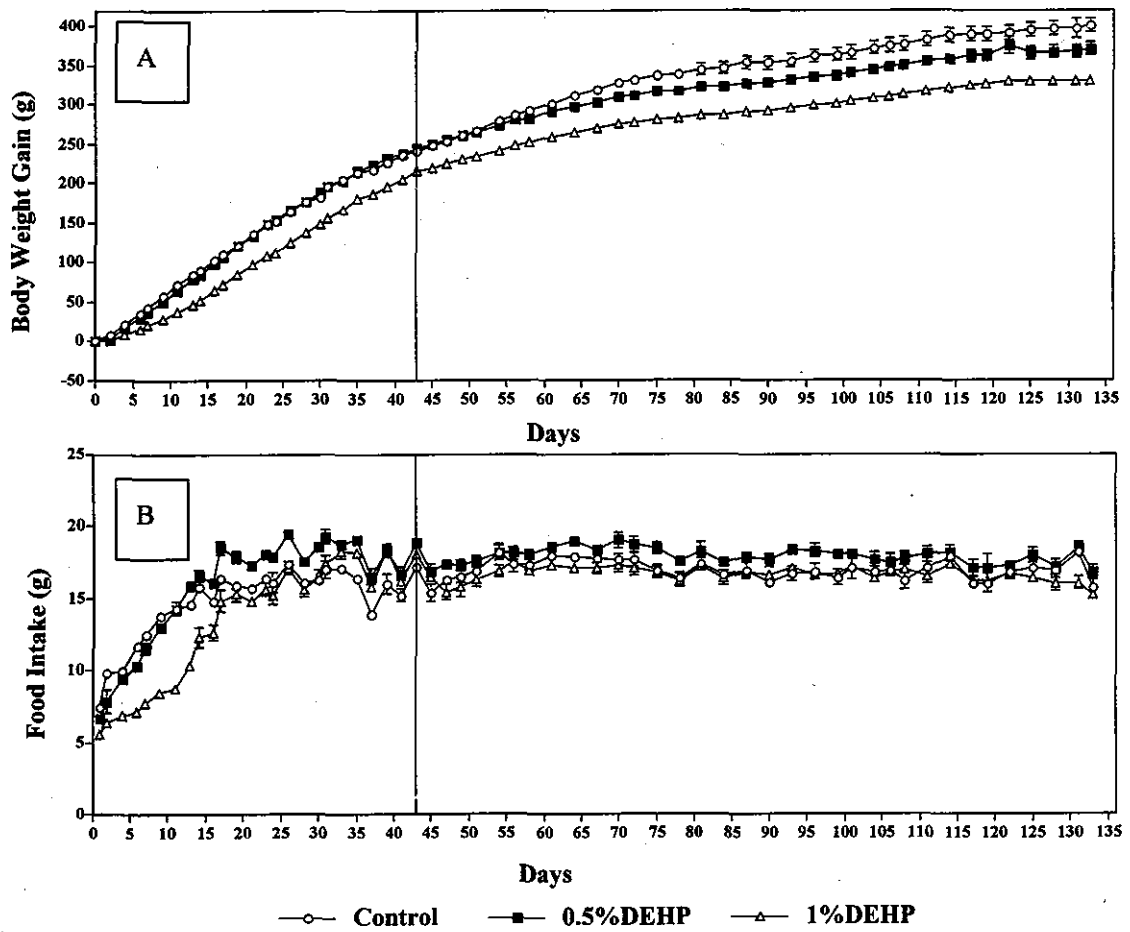
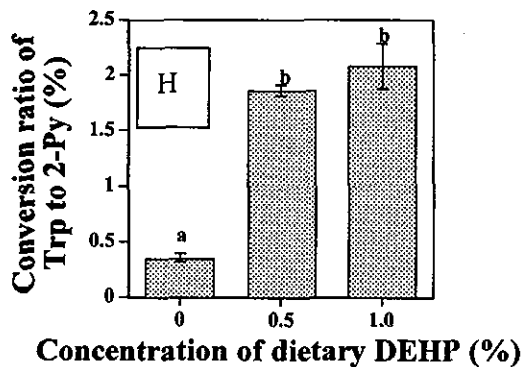
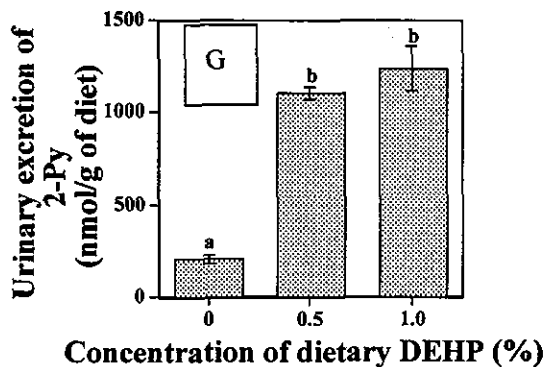
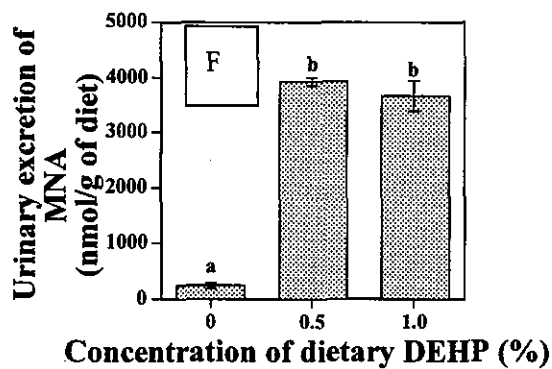
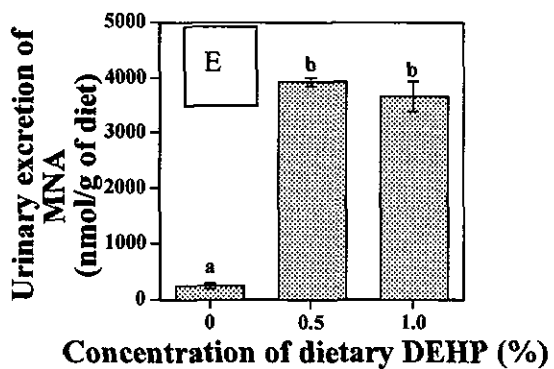
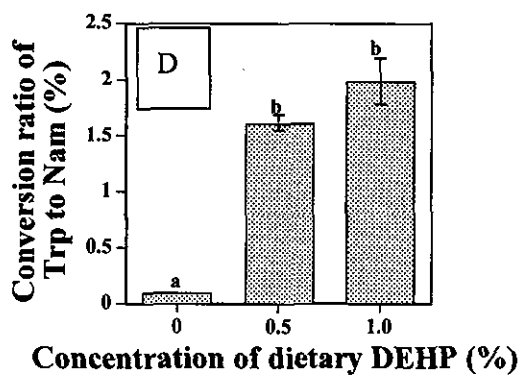
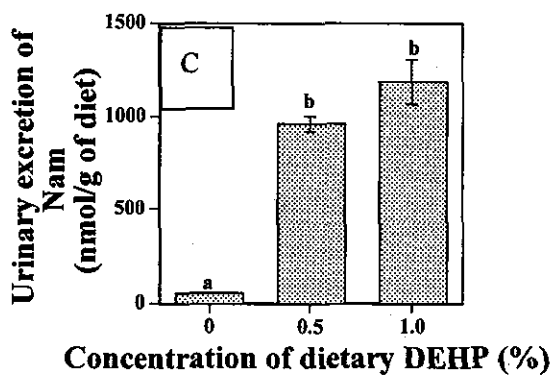
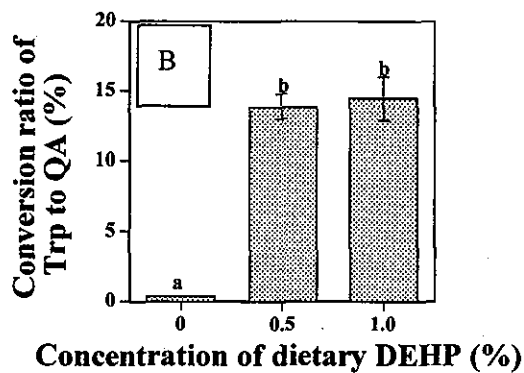
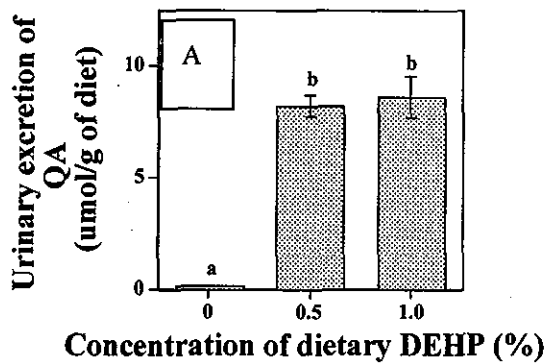


図3. DEHPがラットの体重増加量(A)および飼料摂取量(B)におよぼす影響  
 飼育43日より、すべての群に1%となるように、トリプトファンを添加した飼料を投与した。  
 値は平均値±SEMで示した (n=5~8)





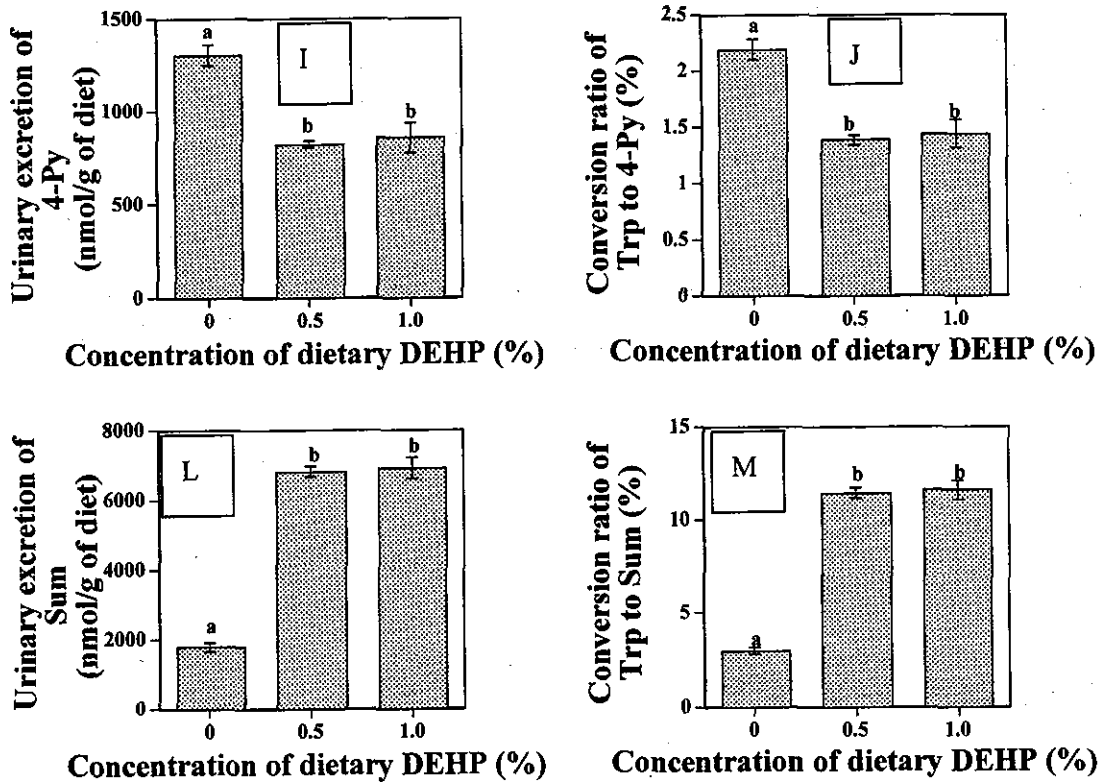


図4. DEHPの投与がトリプトファン-ナイアシン合成経路の下流代謝産物の尿中排泄量におよぼす影響。

値は平均値±SEMで示した (n=5~8)。異なる添え字は  $p < 0.05$  で有意差が認められたことを示す。

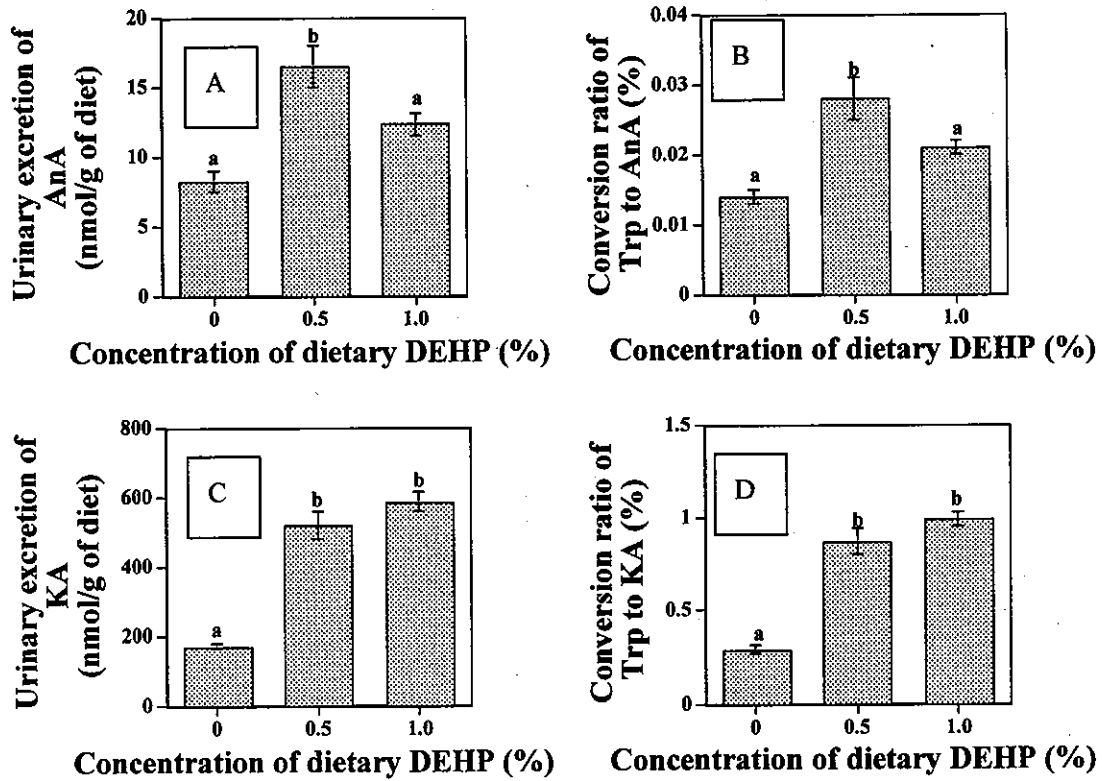


図5. DEHPの投与がトリプトファン-ナイアシン生合成経路の代謝産物であるアンスラニル酸(AnA)とキヌレン酸(KA)の尿中排泄量におよぼす影響。値は平均値±SEMで示した(n=5~8)。異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す。

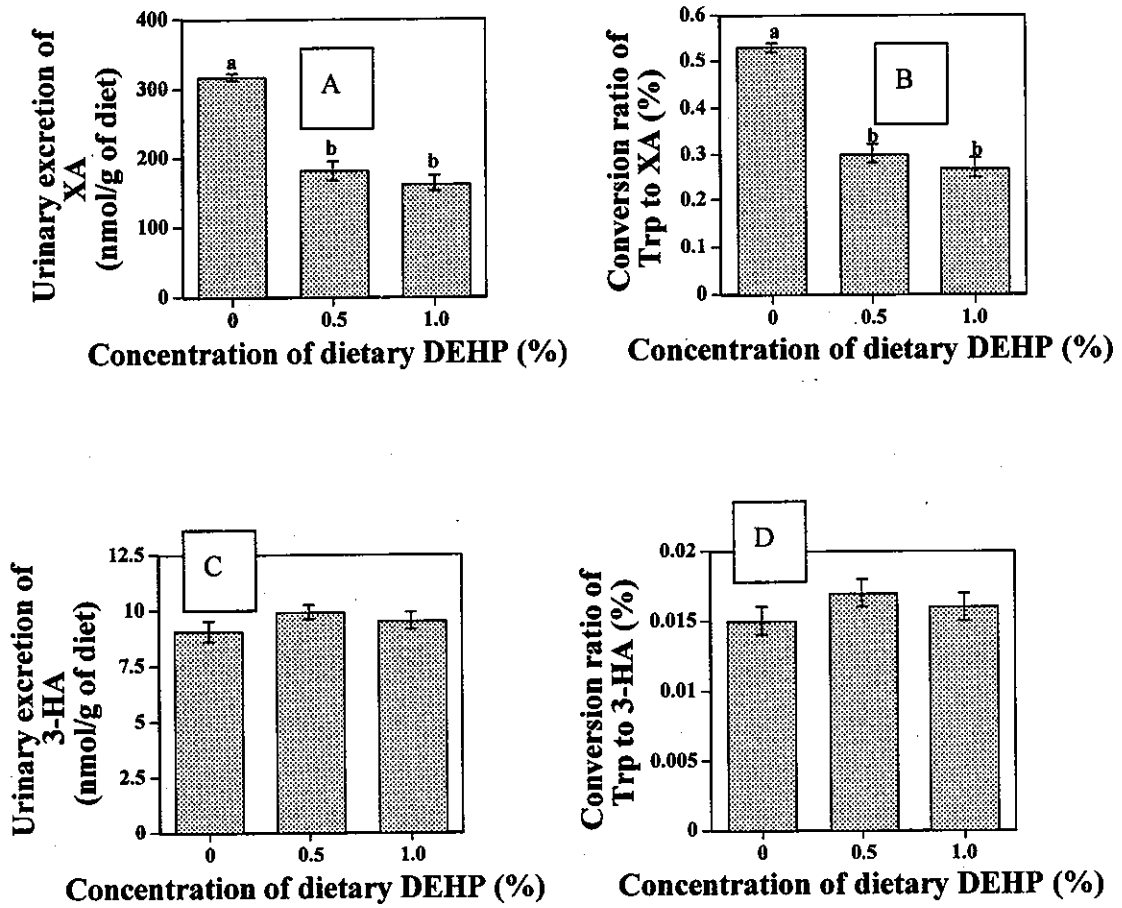


図6. DEHPの投与がトリプトファン-ナイアシン生合成経路の代謝産物であるキサンツレン酸(XA)と3-ヒドロキシアンスラニル酸(3-HA)の尿中排泄量におよぼす影響  
 値は平均値±SEMで示した (n=5~8). 異なる添え字は  $p < 0.05$  で有意差が認められたことを示す.

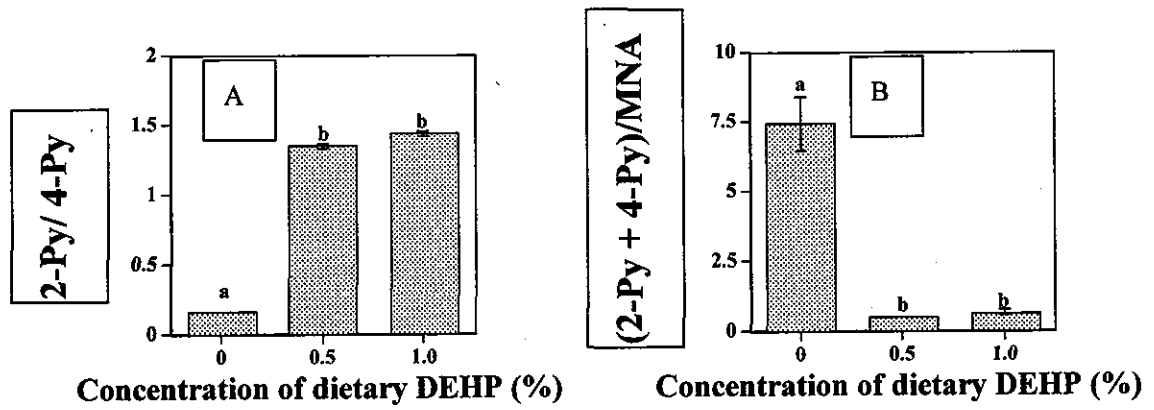


図7. DEHPの投与が2-Py/4-Py排泄量比および(2-Py + 4-Py)/MNA排泄量比におよぼす影響は平均値±SEMで示した (n=5~8). 異なる添え字は $p < 0.05$ で有意差が認められたことを示す.