

図 8. DEHP の投与が B 群ビタミンとアスコルビン酸の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。

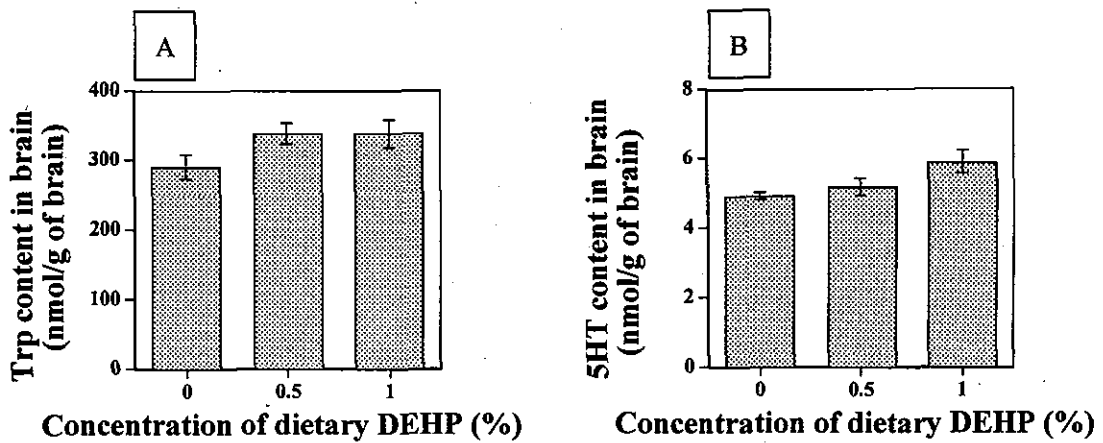


図9. DEHPの投与が脳中のトリプトファン(A)とセロトニン(5-HT) (B)含量におよぼす影響
 値は平均値±SEMで示した (n=5~8). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.

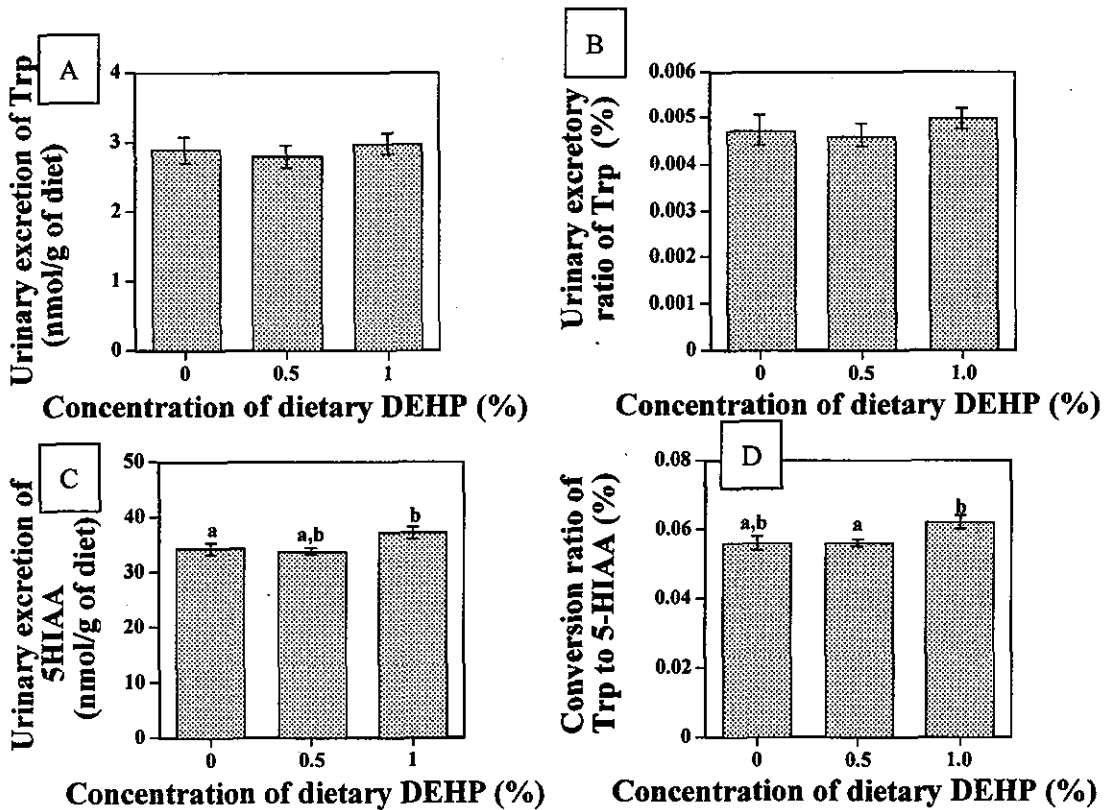


図10. DEHPの投与が尿中へのトリプトファン(A, B)と5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA) (C, D)排泄量におよぼす影響
 値は平均値±SEMで示した (n=5~8). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.

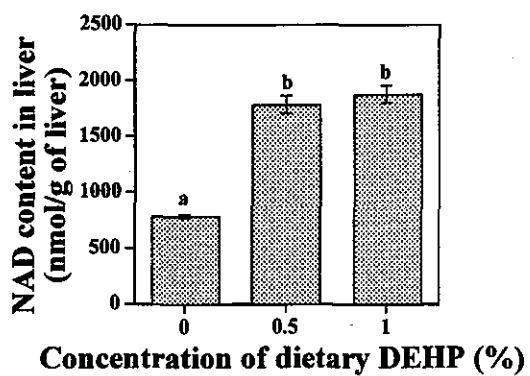


図 11. DEHP の投与が肝臓中の NAD 含量におよぼす影響
値は平均値±SEM で示した (n=5~8). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.

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

5. カツオ由来ナイアシン高濃度含有パウダーのナイアシンとしての生物有効性

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

ヒトを用いて、カツオ由来ナイアシン高濃度含有パウダー（カツオパウダー）中のナイアシンの生物有効性について調べた。21-23 歳の健康な女子学生 8 名を対象として、厚生労働省が示した食事摂取基準を満たす食事を 4 日間与えた。1, 2 日目はその食事のみを与えた。3 日目はその食事+ナイアシン 51 mg を含むカツオパウダー 15 g を摂取させた。カツオパウダーを摂取させた日、3 日目に、摂取カツオパウダー中のナイアシンの 52% がニコチンアミド代謝産物として尿中に排泄された。4 日目においても、尿中のニコチンアミド代謝産物は投与前よりも高い値を示した。これらのことから、このカツオパウダー中のニコチンアミドの生物有効性は高く、ビタミンのナイアシンの良い給源となることが示唆された。

A. 目的

ナイアシンにはニコチン酸とニコチンアミドの他に糖やタンパク質と結合した結合型ナイアシンも存在する。結合型ナイアシンは穀類中に多く存在し、消化されにくい¹⁾ため、哺乳動物には利用されにくい¹⁾。したがって、ある食品をナイアシンの供給源として評価するためには、化学的な方法によって測定されたナイアシン量のみならず、生物有効性も重要な因子となる。

世界的にみると、ビタミンの欠乏症で最も頻繁にみられるのは、ペラグラである²⁾。米国では、20世紀初頭に大発生し、公衆衛生上の大きな問題となり³⁻⁶⁾、結果的に有効物質であるナイアシンの発見⁷⁾に繋がったという経緯がある。Millerは⁸⁾、1978年に米国におけるペラグラによる死者をまとめている。日本ではペラグラの発生と時を同じくしてビタミンB₁欠乏である脚気が流行したが⁹⁾、ペラグラの発生は報告されていない。これは、ナイアシンの豊富な魚を食していたことと無関係ではないと思われる。カツオは特にナイアシン含量の高い魚であるが、保存の点で扱いにくい魚であった。しかし、最近、我々は、新しい手法で、保存性の優れたカツオ由来の高濃度ナイアシン含有パウダーを開発することに成功した(後述の実験方法の項を参照)。そこで、本実験では、ヒトを用いて、ナイアシン高含有カツオパウダー(カツオパウダー)に含まれるナイアシンの生物有効性について検討した。

さらに、ニコチンアミドには糖尿病を予防する作用があること(ニコチン酸にはこの作用はない)が実験用小動物で証明されている¹⁰⁾。そこで、本実験では、カツオパウダーをラットに摂取させ、STZ誘発性糖尿病を予防できるか否かについても検討した。

B. 研究方法

ナイアシン高含有鰹パウダー製造方法の概略

鰹節製造時に副産する煮汁を出発物質として、Fig. 1に示した製造フローに従って製造した。Table 1に主な成分含量を、Table 2にアミノ酸含量を示した。

第一実験(ヒトを用いた生物有効性を求めるための実験)

(1) 被験者

21~23歳の健康な女性8名(身長、159.5±1.2cm; 体重、53.0±0.8kg)を対象とした。厚生労働省が示す食事摂取基準¹¹⁾(生活活動強度IIの18~29歳女性、約1800 kcal/day、タンパク質55 g/day、炭水化物300 g/day、脂質46 g/day)を満たす食事(Table 3)を4日間与えた。食事中にはビタミン体のナイアシンは0であるが、トリプトファンが645mg含まれ、この量はナイアシン当量として、約11mgである。被験者は、一定の生活スケジュール(起床、6時; 朝食、7時30分; 昼食、12時30分; 夕食、18時30分; 就寝、11時)に従って行動させた。飲料については、市販の水を自由摂取させた。実験開始日をday 1とした。day 3に5gのカツオパウダー(ナイアシン17mgを含む)を朝食後、昼食後、夕食後の計3回、食事終了後、別途摂取させた。カツオパウダー由来のナイアシン摂取量は51mg、食事由来のナイアシン当量摂取量は11mgであった。起床後2回目から翌日起床直後までの尿を24時間尿とし、実験期間中4日分の24時間尿を採集した。

(2) 尿中のニコチンアミド代謝産物の測定

N¹-メチルニコチンアミド(MNA)については、尿中のMNAを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、HPLCを用いて定量した¹²⁾。

N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)およびN¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)については、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、乾固させた抽出物を水に溶解させた。HPLCを用いてこの溶解物を定量した¹³⁾。

(3) カツオパウダー中のニコチンアミド量の測定

カツオパウダー1gに水1Lを加え、室温で10分間攪拌した溶液をニコチンアミド測定用試料とした。試料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、乾固させた抽出物を水に溶解させた。HPLCを用いて定量を行った¹³⁾。その結果、本実験に使用したカツオパウダー中のニコチンアミド量は3.4mg/gであった。この含量(3.4mg/g)は五訂に本食品標準成分表に記載されているかつお節中のナイアシン含量の約7.5倍であった。

第二実験 (STZ-誘発糖尿病ラットに対する影響)

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

5週齢のWistar系雄ラット20匹を日本クレア(株)より購入し、体重が均等になるよう10匹ずつ2群に分けた。試験食群として、20%カゼイン食に5%となるようカツオパウダー(ナイアシン含量340mg/100gカツオパウダー)を添加したカツオ食群(ナイアシン含量;17mg/100g飼料)を設定した(Table 4)。対照群として、カツオ食中のアミノ酸含量と等しくなるよう22%カゼイン食群を設定した(Table 4)。ラットは1匹ずつ金網ケージにて29日間飼育し、飼料と水は自由摂取とした。動物室の温度は20℃前後、湿度は50%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。飼育開始日をday 0とした。

Day 8の午前9時に対照群、試験食群をそれぞれ5匹ずつ、対照食-生理食塩水群及び対照食-STZ群、試験食-生理食塩水群及び試験

食-STZ群の4群に分けた。対照食-STZ群及び試験食-STZ群には、生理食塩水0.5mlに70mg/kg body weightとなるように溶解させたストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内注射した。また、対照食-生理食塩水群及び試験食-生理食塩水群には生理食塩水0.5mlを腹腔内注射した。

Day 28の9時より6時間絶食し、15時に尾静脈から採血した。小型血糖測定機グルテストエース((株)三和化学研究所)を用いて空腹時血糖を測定した。

Day 29にラットを断頭屠殺し、直ちに頸動脈血を採取し、血中NAD含量及び血中NADP含量を測定した。また、肝臓を摘出し、肝NAD含量、肝NADP含量及び肝 α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase (ACMSD)活性を測定した¹⁴⁾。

(2) NAD・NADPの定量方法¹⁵⁻¹⁸⁾

1) 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(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。

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。

2) 抽出方法

血液および肝臓からのNAD・NADP測定用試料の作成方法は柴田ら¹⁵⁾が開発した0.1Mニコチンアミドを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 6.0を用いる熱抽出法で行った。

3) 測定方法

NAD・NADPの測定方法は、柴田ら¹⁵⁻¹⁸⁾が報告した酵素サイクリング法に従って行った。

C. 結果

第一実験

ヒトにおいてナイアシンはMNA, 2-Py, 4-Pyのいずれかの化合物として尿中に排泄されることから, MNA, 2-Py, 4-Pyの合計を総ニコチンアミド代謝産物量とし, カツオパウダーに含まれるナイアシンがどの程度利用されるのか調べた. 規定の食事を与えると尿中の総ニコチンアミド代謝産物量は day 1 では $53 \pm 5 \mu\text{mol/day}$, day 2 では $47 \pm 4 \mu\text{mol/day}$ であったが, カツオパウダーを服用した day 3 では $222 \pm 14 \mu\text{mol/day}$ に増加した (Fig. 2-A). 翌日の day 4 でも $93 \pm 4 \mu\text{mol/day}$ と, 投与前の値よりも高い値を示した. この現象は被験者 8 名全員に共通していた (Fig. 2-B). day 1 および day 2 の平均尿中総ニコチンアミド代謝産物量は $49 \pm 4 \mu\text{mol/day}$ (day 1 および day 2 のナイアシン当量摂取量は約 11mg, すなわち約 $90 \mu\text{mol}$ である. したがって, 摂取量に対するニコチンアミド異化代謝三部の排泄量比は 54% である.) であったことから, カツオパウダーの摂取により増大した量は $217 \mu\text{mol/day}$ ($222 + 93 - 49 - 49 =$) と推定した. この値はカツオパウダー 15 g 中に含まれるナイアシン 51 mg ($418 \mu\text{mol}$) の 52% であった.

第二実験

(1) 飼料摂取量と体重増加量

飼料摂取量と体重の変化量を各々 Fig. 3-A と Fig. 3-B に示した. Day 8 までの予備飼育期間において, 対照食群と試験食群との間に飼料摂取量及び体重増加量の違いは認められなかった. 対照食-STZ 群及び試験食-STZ 群の飼料摂取量は STZ 投与直後に減少したが, day 11 より増加しはじめ, 積算飼料摂取量は対照食-生理食塩水群及び試験食-生理食塩水群の約 1.5 倍となった. しかし, 対照食-STZ 群及び試験食-STZ 群の体重増加量は, 対照食-生理食塩水群及び試験食-生理食塩水

群より低く, 30~40% であった. 飼料摂取量及び体重増加量において, 対照食-生理食塩水群と試験食-生理食塩水群間に, また対照食-STZ 群及び試験食-STZ 群間に有意な差異は認められなかった.

(2) 血糖値

対照食-STZ 群及び試験食-STZ 群の血糖値は対照食-生理食塩水群及び試験食-生理食塩水群間に比べ, 著しく高い値となった (Table 5). また, 対照食-STZ 群と試験食-STZ 群間の血糖値に差は認められなかった.

(3) 血中 NAD・NADP 含量

ナイアシン摂取量が必要量を満たさない場合には血中 NAD 含量は低くなり, 必要量に達すると飽和値を示すことから¹⁹⁾, 血中 NAD 含量はナイアシン栄養状態を反映する. 対照食-生理食塩水群, 試験食-生理食塩水群及び試験食-STZ 群間の血中 NAD 含量に差異は認められなかった (Table 5). 対照食-STZ 群の血中 NAD 含量は他の 3 群に比べ, 有意に低い値を示した.

一方, 血中 NADP 含量はナイアシン摂取量の多少に関わらず容易に変動しないことが報告されている²⁰⁾. しかしながら, 今回の実験においては, 試験食-STZ 群の血中 NADP 含量は対照食-生理食塩水群よりも高い値を示した. なお, 他の群とは有意な差異は認められなかったことから, やはり NADP 含量は変動しにくいものと思われた.

(4) 肝 ACMSD 活性

STZ 誘発糖尿ラットでは肝 ACMSD 活性が著しく高くなることが報告されている¹⁴⁾. 今回の実験においても, 対照食-STZ 群及び試験食-STZ 群の肝 ACMSD 活性は対照食-生理食塩水群及び試験食-生理食塩水群間の約 12 倍の値を示した (Table 5).

D. 考察

体内のナイアシンプールが飽和に達する

と、余剰のナイアシンはニコチンアミド代謝産物として尿に排泄される¹⁹⁾。したがって、尿中の総ニコチンアミド代謝産物量を指標として、食品中のナイアシンの生物有効性を調べるのが可能となる。本実験において、女子学生にナイアシンを高濃度で含むカツオパウダーを投与したところ、投与量の52%がニコチンアミド代謝産物として尿中に排泄された。一方、女子学生にニコチンアミド標品50mgをそれぞれ朝食後、昼食後、夕食後の計3回、総量で150mg服用させると、ニコチンアミド服用量の64%が投与日の24時間尿中に排泄されることが報告されている²⁰⁾。また、ニコチンアミド75mgを含む総合ビタミン剤を男子学生に服用させると、ニコチンアミド服用量の55%が投与日の24時間尿中に排泄されることが報告されている²¹⁾。これらの既報の報告は^{20,21)}、本研究のニコチンアミド51mgの負荷に比べ多い摂取量であるが、カツオパウダー中のニコチンアミド代謝産物排泄率はこれらの報告と近い値であった。したがって、カツオパウダー中のナイアシンはサプリメントやビタミン剤として使用されているニコチンアミド標品と同等の生物有効性を持つと考えられる。

自己免疫的機序により膵β細胞が傷害を受けると、インスリン依存型糖尿病を発症する。そのモデル動物を作製するために、膵β細胞特異的に毒性を示すストレプトゾトシン(STZ)が用いられている¹⁰⁾。一方、STZ投与時に大量のニコチンアミドを同時投与することにより、STZ誘発性糖尿病を予防することが報告されている²²⁾。そこで、カツオパウダー投与がどの程度STZ-誘発糖尿ラットの予防に有効であるか否かを調べてみた。その結果、STZ誘発糖尿ラットの血糖値及び体重増加量に対し、カツオパウダー摂取による予防、改善は見られなかった。STZ誘発性糖

尿病の予防効果を示したニコチンアミドの投与量は500mg/kg body weightと大量であり²²⁾、細胞内のNAD濃度は一過性に高濃度になることが推察される。本実験においてSTZ投与までのニコチンアミド摂取量は約20mg/kg body weightであり、また経口摂取したものと併せ、ニコチンアミド腹腔内投与時に比べβ細胞内NAD濃度が低いためにカツオパウダー摂取による糖尿病予防・改善効果が見られなかったことが推察される。なお、今回用いたカツオパウダー中にはニコチン酸は含まれておらず、ニコチンアミドのみが含まれている。

トリプトファン-NAD生合成経路において、 α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehydeはACMSDによって代謝されるとアセチルCoAにまで代謝され、さもなくば自己環状化してキノリン酸になることによってNADにまで代謝される。STZ誘発糖尿ラットではACMSD活性が著しく高くなるため、トリプトファンからのNAD生成交量が減少し、ナイアシン栄養状態が悪くなる。対照食-STZ群の血中NAD含量は対照食-生理食塩水群に比べ有意に低く、ナイアシン栄養状態の悪化を示している。しかし、試験食-STZ群はカツオパウダーを摂取したため、血中NAD含量は対照食-生理食塩水群及び試験食—生理食塩水群と同じレベルを維持しており、ナイアシン栄養状態の悪化を防いでいる。この結果から、カツオパウダーはナイアシン栄養状態の悪化を予防・改善するためのナイアシン供給源となりうる可能性がある。

結論として、我々が前に報告した小麦ふすま²³⁾とコーヒー抽出液乾固物(インスタントコーヒーパウダー)²⁴⁾と同様に、今回作成したカツオ由来のパウダーは、ナイアシンを生物有効性の高い遊離型のニコチンアミドとして含有していることが示唆された。また、カツオパウダーはカツオブシと同様に味質

的にも優れ、かつ保存性にも優れていることから、通常食品として、さらにはトウモロコシ多食地域の予防食品としても有用であると考えられる。

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

日本家政学会誌, 56 巻, 4 月号に掲載予定

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. Carpenter, K. J. (1983) The relationship of pellagra to corn and the low availability of niacin in cereals. *Experientia Suppl.*, **44**, 197-222.
2. 独立行政法人国際協力機構のホームページ. www.jica.go.jp/
3. Goldberger, J. (1916) Causation and a method of prevention. *J. Am. Med. Assoc.*, **66**, 471-476.
4. Goldberger, J. (1922) The relation of diet to pellagra. *J. Am. Med. Assoc.*, **78**, 1676-1680.
5. Goldberger, J., Tanner, W. F. (1925) A study of the pellagra-preventive action of dried beans, casein, dried milk, and brewer's yeast, with a consideration of the essential preventive factors involved. *Pub. Health Rep.*, **40**, 54-80.
6. Goldberger, J., Wheeler, G. A., Lillie, R. D., Rogers, L. M. (1926) A further study of butter, fresh beef, and yeast as pellagra preventives, with consideration of the relation of factor P-P of pellagra (and black tongue of dogs) to vitamin B. *Pub. Health Rep.*, **41**, 297-218.
7. Elvehjem, C. A., Madden, R. J., Strong, F. M., Woolley, D. W. (1937) The isolation and identification of the anti-black tongue factor. *J. Biol. Chem.*, **123**, 137-149.
8. Miller, D. F. (1978) Pellagra deaths in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 558-559.
9. 糸川嘉則, 柴田克己編集, (2003) 「栄養学総論 改訂第3版」, 南江堂, 東京 p.51.
10. Raikieten, N., Raikieten, M., Nadkarni, N. (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37917). *Cancer Chemother. Rept.*, **29**, 91-98.
11. 厚生省保健医療局地域・保健・健康増進課生活習慣病対策室 (1999) 第六次改定 日本人の栄養所要量-食事摂取基準-.
12. 柴田克己 (1987) 高速液体クロマトグラフィによる尿中 N^1 -メチルニコチンアミドの超微量定量法, *ビタミン*, **61**, 599-604.
13. Shibata, K., Kawada, T., Iwai, K. (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N^1 -methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N^1 -methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28.
14. Ichiyama, A., Nakamura, S., Kawai, H., Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O., Senoh, S. (1965) Studies on the metabolism

- of the benzene ring of tryptophan in mammalian tissues. II. Enzymic formation of α -aminomuconic acid from 3-hydroxyanthranilic acid. *J. Biol. Chem.*, **240**, 740-749.
15. Shibata, K., Murata, K. (1986) Blood NAD as an index of niacin nutrition, *Nutr. Int.*, **2**, 177-181
 16. Shibata, K. and Tanaka, K. (1986) Simple measurement of blood NADP and blood levels of NAD and NADP in humans, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2941-2942.
 17. 柴田克己, 岩井和夫 (1990) NADP 定量方法の改良と女子学生の血液中の NADP 値の訂正, *ビタミン*, **64**, 193-196.
 18. 柴田克己, 福渡努, 土居美紀, 緒方進, 下岡令美, 田口寛 (2001) マイクロプレートリーダーを利用した NAD および NADP の微量定量法, *ビタミン*, **75**, 455-462.
 19. Shibata, K., Matsuo, H. (1989) Effect of gradually increasing levels of nicotinamide in a niacin-free and tryptophan-limited diet on the blood NAD levels and the urinary excretion of nicotinamide metabolites in rats. *Agric. Bio. Chem.*, **53**, 1333-1336.
 20. 柴田克己, 松尾弘子 (1990) 女子学生にニコチンアミド投与後の血中 NAD, NADP 値並びにニコチンアミド異化代謝産物の尿中排泄量の変動. *ビタミン*, **64**, 1591-1593.
 21. 柴田克己, 小野寺学子, 島田俊一, 安田和人 (1992) ニコチンアミドを総合ビタミン剤として長期間投与時のニコチンアミド代謝の変動ならびにその有効性, *ビタミン*, **66**, 309-314.
 22. Schein, P. S., Cooney, D. A., Vernon, M. L. (1967) The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res.*, **27**, 2324-2332.
 23. 福渡努, 木戸亜也子, 柴田克己 (2002) ラットにおける小麦ふすまのナイアシン活性. *日本家政学会誌*, **53**, 477-481.
 24. 福渡努, 斉藤智恵, 佐々木隆造, 柴田克己 (2003) ラットにおけるインスタントコーヒーのナイアシン活性. *日本家政学会誌*, **54**, 77-82.

Table 1. The Composition of Major Constituents of the Bonito Power High in Niacin Content.

	%
Water	0.79
Total nitrogen	14.37
Lipid	0.12
Ash	14.18
NaCl	0.08

Table 2. The Amino Acids Composition of the Bonito Powder High in Niacin Content.

Amino acids	mg/100g
Phosphoserine	74
Taurine	531
Aspartic acid	318
Hydroxyproline	140
Threonine	409
Serine	498
Glutamic acid	942
Sarcosine (N-Methylglycine)	348
α -Aminoadipic acid	0
Proline	735
Glycine	2425
Alanine	1604
α -Aminobutyric acid	15
Valine	561
Cystine	19
Methionine	369
Isoleucine	374
Leucine	831
Thyrosine	385
Phenylalanine	469
β -Alanine	1177
γ -Aminobutyric acid	15
Histidine	19593
1-Methylhistidine	2480
Hydroxylysine	30
Ornithine	92
Lysine	1353
Arginine	5234
Total	41021

Table 3. Composition of the Diet.

	(g/day)	Remarks
Vitamin-free milk casein	22.6	The casein contained 87.5% protein, so the net protein amount was 19.8 g. Tryptophan content was 1.3%, so 257 mg of tryptophan was supplied.
Gluten	43.2	The gluten contained 81.6% protein, so the net protein amount was 35.3 g. Tryptophan content was 1.1%, so 388 mg of tryptophan was supplied. Total protein = 55 g. Total tryptophan = 645 mg.
Cornstarch	250	
Sucrose	50	Total carbohydrate = 300 g.
Fats		Total fat = 46 g.
Soybean oil	10.6	
Rapeseed oil	16.0	
Coconut oil	6.1	
Lard	13.3	
Dietary fiber		Soluble dietary fiber used, "Fibersol" was obtained from Matsutani Chemical Industry Co., Ltd. (Osaka, Japan), and insoluble dietary fiber used, Ramie powder was obtained from Tosco Co., Ltd. (Tokyo, Japan).
Soluble	3.6	
Insoluble	14.4	
Mineral mixtures	13.8	The composition is shown below.
Total amount (g)	425.6	
Total energy (kcal)	1,834	

For breakfast and supper, 128 g of the above powder mixture was added to 90 ml of water, and mixed well, and was baked for 9 min at 250°C. The weight of the baked meal was *ca.* 175 g (170 g ~ 180 g). The meal and 0.3 g of the vitamin mixture (composition shown below) were given to the subjects. For lunch, 170 g of the above mixture was added to 120 ml of water, and mixed well, and was baked for 10 min at 250°C. The weight of the baked meal was *ca.* 233 g (225 g ~ 240 g). The meal and 0.4 g of the vitamin mixture (composition shown below) were given to the subjects.

Composition of the mineral mixture: 1,100 mg of CaHPO₄·2H₂O, 860 mg of CaCO₃, 2,200 mg of KH₂PO₄, 3,500 mg of KHCO₃, 2,100 mg of MgCl₂·2H₂O, 60 mg of FeSO₄·5H₂O, 13 mg of MnSO₄·5H₂O, 19 mg of ZnCl₂, 6.3 mg of CuSO₄·5H₂O, 0.2 mg of KI, and 4,000 mg of NaCl.

Composition of the vitamin mixture: 3.6 mg (1,800 IU) of retinal acetate reagent (500,000 IU/g), 2.5 µg of cholecalciferol, 5.1 mg of dl- α -tocopherol (4.6 mg was supplied from oils), 16 µg of phylloquinone (39 µg was supplied from oils), 0.9 mg of thiamin-HCl, 1.0 mg of riboflavin, 1.5 mg of pyridoxine-HCl, 2.4 µg of cyanocobalamin, 5.5 mg of calcium panthotenate, 200 µg of pteroylmonoglutamic acid, 30 µg of D(+)-biotin, 100 mg of ascorbic acid, made up 1 g with sucrose.

Table 4. Composition of the Diets.

	Control diet (NiA-free 22% casein diet) (%)	Test diet (control diet + bonito powder) (%)
Vitamin-free casein	22	20
L-Methionine	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	44.5	42.5
Sucrose	22.3	21.3
Corn oil	5	5
Mineral mixture	5	5
Vitamine mixture*	1	1
Bonito powder	0	5

*Vitamin mixture is niacin-free.

Table 5. Effects of the Bonito Powder Intake and STZ Injection on the Body Weight, Food Intake, Liver Weight, Blood Glucose Level, and Niacin Metabolism.

	Control diet saline injection	Control diet STZ injection	Test diet saline injection	Test diet STZ injection
Initial body weight (g)	111.9±1.3	111.9±1.3	112.0±1.4	112.3±1.6
Body weight at day 8 (g)	168.5±1.5	170.6±2.2	170.1±3.7	169.1±5.7
Final body weight (g)	313.6±5.6 ^a	234.4±10.2 ^b	323.0±7.0 ^a	219.4±12.8 ^b
Food intake* (g/21 days)	403.6±4.0 ^a	686.1±19.9 ^b	440.5±14.4 ^a	711.4±28.9 ^b
Body weight gain* (g/21 days)	145.1±4.8 ^a	63.8±10.9 ^b	153.0±4.9 ^a	50.3±9.3 ^b
Food efficiency ratio**	0.359±0.008 ^a	0.094±0.014 ^b	0.348±0.006 ^a	0.070±0.012 ^b
Liver weight (g)	15.1±0.4	12.7±0.8	14.4±0.6	12.2±0.6
ACMSD activity (μmol/h/g of liver)	2.1±0.4 ^a	23.6±3.0 ^b	2.2±0.5 ^a	29.5±2.2 ^b
Blood glucose level (mg/dl)	94±3 ^a	433±11 ^b	99±3 ^a	482±40 ^b
Blood NAD level (nmol/ml)	80.9±2.1 ^a	66.0±2.3 ^b	84.7±2.9 ^a	85.5±5.7 ^a
Blood NADP level (nmol/ml)	14.3±0.6 ^{ab}	15.9±0.9 ^{bc}	15.5±0.7 ^{bc}	18.3±0.4 ^c

* Data were calculated as total from day 8 to day 29.

** FER = body weight gain (g/21 days)/food intake (g/21 days).

Each values is the mean±SEM (n = 4 - 5). Values with different superscript letters are statistically different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple-comparison test.

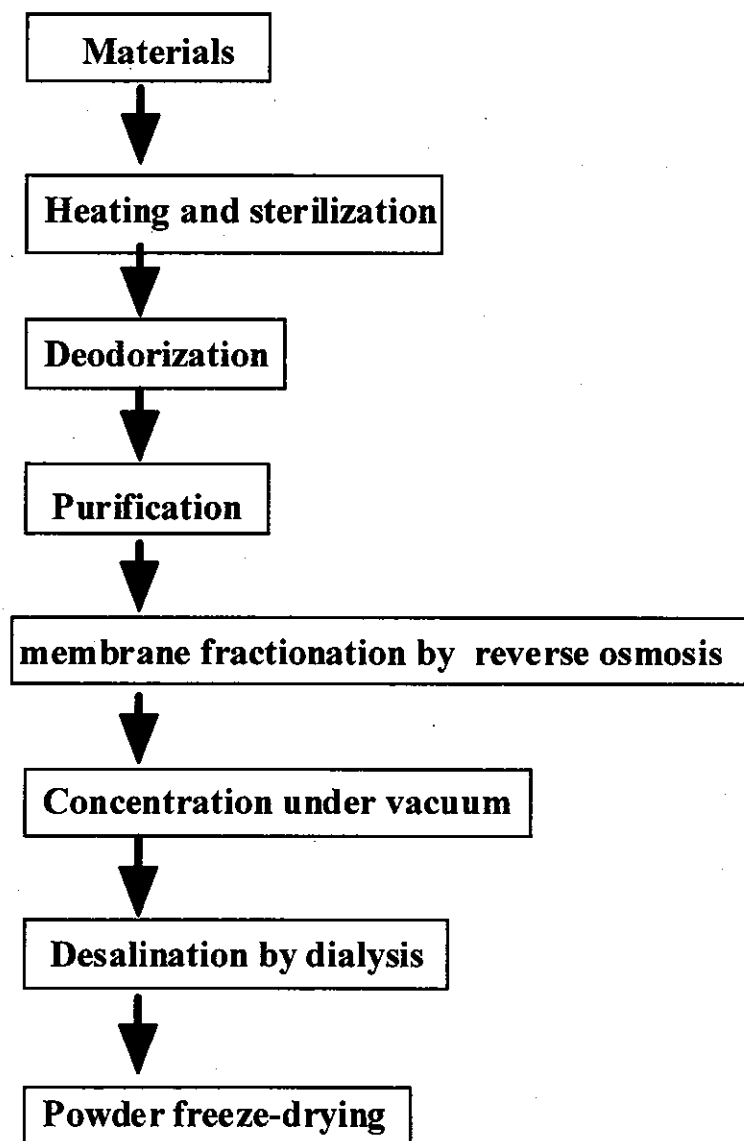


Fig. 1. Flow Diagram of Making of the Bonito Powder High in Niacin Content.

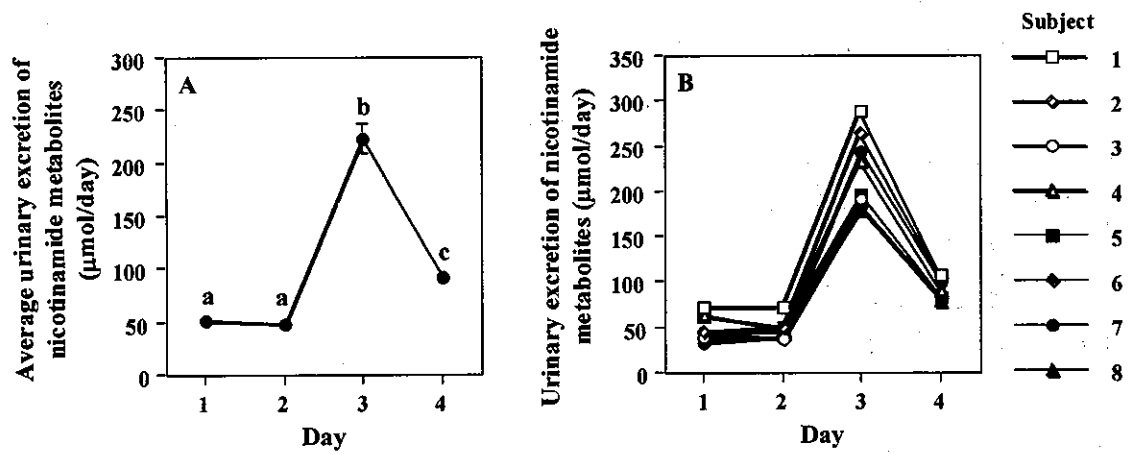


Fig. 2. Average urinary excretion (A) and individual excretion (B) of nicotinamide metabolites during experiment (Experiment 1). Values are means \pm SEM ($n = 8$) (A). A different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$ determined by paired ANOVA with post hoc testing using Tukey's multiple comparison test.

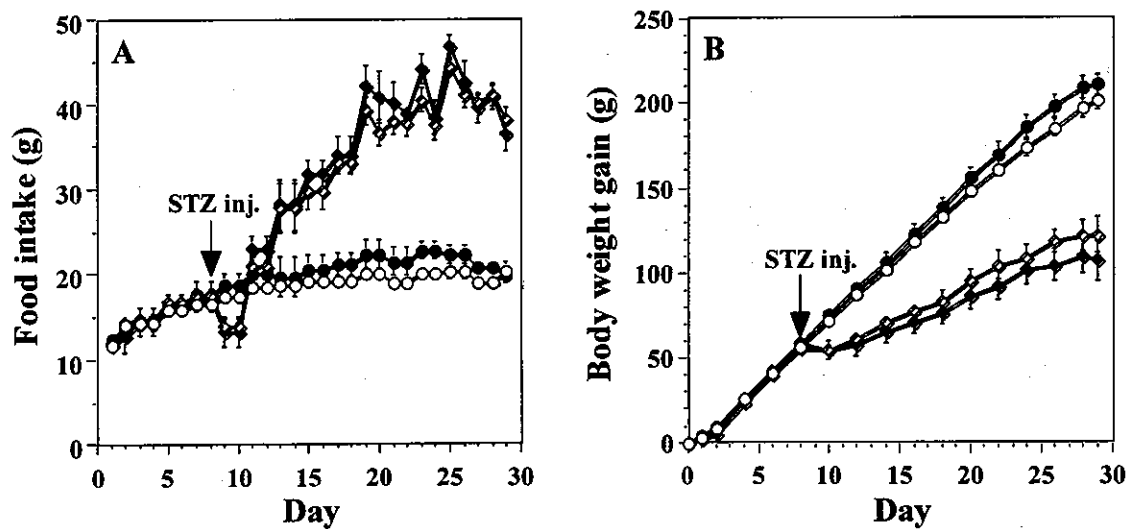


Fig. 3. Food Intake (A) and Body Weight Gain (B) (Experiment 2).

○, Control diet with saline injection; ◇, Control diet with STZ injection; ●, Test diet with saline injection; ◆, Test diet with STZ injection. Values are means \pm SEM ($n = 5$).

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

6. 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

ビスフェノールA含有食の摂取によるトリプトファン-ニコチンアミド代謝系におよぼす影響からビスフェノールAが3-ヒドロキシキヌレニンの産生に関与する Kynurenine 3-hydroxylase 活性を阻害していること示唆された。そこで、ビスフェノールAの Kynurenine 3-hydroxylase への阻害効果を *in vitro* で調べた。その結果、活性はビスフェノールAによって阻害された。すなわち、ビスフェノールAは Kynurenine 3-hydroxylase 活性を阻害することにより、トリプトファン-ニコチンアミド転換率を低下させることが明らかとなった。

A. 目的

我々は、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がトリプトファン-ニコチンアミド転換率を顕著に阻害することを報告した¹⁾。ヒトを含む哺乳動物はB群ビタミンの中で最も必要量の多いナイアシン(ビタミンB₃ともいう)をすでにビタミン体となっているニコチンアミドとして摂取しているが、トリプトファンからもニコチンアミドを生合成する経路を有している^{2,4)}。日本人が一般的な食事をしている場合、ナイアシンの約50%はトリプトファンから供給されている⁵⁾。したがって、ビスフェノールAの摂取によって、本転換経路が阻害されるという事実は公衆栄養学上重要な問題である。前報¹⁾では、ラットの飼料中に終濃度1%レベルでの影響を調べたのみであった。本研究は、本転換率に影響を及ぼす最低濃度とその作用部位の解明、さらに他のビタミン代謝に対する影響を調べることを目的として行ない、成果を得たので報告する。

B. 研究方法

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; AIN-93M)、ビタミン混合(AIN93配合; AIN-93VX、重酒石酸コリン添加)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、チアミン塩酸塩、リボフラビン、アスコルビン酸、ビスフェノールA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)はPullmanとColowickの方法³⁾により、*N*¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)は柴田らの方法⁴⁾により合成した。4-ピリドキシニン酸(PIC)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。

3週齢のWistar系雄ラットを日本クレア(株)より購入し、平均体重がほぼ等しくなるよう5匹ずつ3群(0, 0.1, 0.5%ビスフェノールA含有食)に分け、ラット用代謝ケージ(CT-10, 日本クレア(株)製)に入れた。飼料はTable 1に示す20%カゼイン食をコントロール食とした。試験食は、終濃度で0.1%, 0.5%を含む飼料を投与した。飼育期間は22日間で、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、その時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。トリプトファン代謝産物、ニコチンアミドおよびその代謝産物、チアミン、リボフラビン、PICを測定するための尿は分析するまで塩酸酸性下、-20°Cで保存した。アスコルビン酸とその代謝産物(デヒドロアスコルビン酸、2,3-ジケトグルン酸)を測定するための尿は

10%メタリン酸で2倍希釈した後、 -20°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各種臓器を取り出し、重量を測定した。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。なお、対照群の肝臓は、キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ活性の測定に使用した。

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た後、アンストラニル酸⁸⁾、キヌレニン酸⁹⁾、キサントレン酸¹⁰⁾、3-ヒドロキシアンストラニル酸¹⁰⁾およびキノリン酸¹¹⁾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¹²⁾。

尿中のニコチンアミド、2-Py および 4-Py の定量は、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、乾固させた抽出物を水に溶解し、その液を HPLC にて測定した⁷⁾。

3.2 キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ(EC 2.1.3.1)活性の測定方法

ラットから単離した直後の肝臓を材料として、De Duve ら¹³⁾の報告した遠心分画法にしたがってミトコンドリア画分を得、タンパク質濃度が 10 mg/mL 程度になるように適量の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に懸濁したものを本酵素活性源とした。酵素反応は柴田・戸田¹⁴⁾が報告した方法に従った。また、反応産物の 3-ヒドロキシキヌレニンの測定も柴田・戸田¹⁴⁾が報告

した HPLC 法に従った。簡単に説明すると、標準の酵素反応組成 (全容量 $500\mu\text{L}$) は次の通りである。 $50\mu\text{L}$ の 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、 $15\mu\text{L}$ の 10 mM KCN、 $50\mu\text{L}$ の 100 mM KCl、 $10\mu\text{L}$ の 10 mM NADPH、 $10\mu\text{L}$ の 10 mM 硫酸 L-キヌレニン、 $10\mu\text{L}$ のエタノール、 $255\mu\text{L}$ の水、 $100\mu\text{L}$ のミトコンドリア懸濁液。ミトコンドリア懸濁液を添加することで反応を開始し、 37°C で 10 分間行った。停止は 70% 過塩素酸を $40\mu\text{L}$ 添加することで行った。停止させた酵素反応液を室温で 5 分間放置後、 $10,000\times g$ 、3 分間遠心分離することで、上清を得た。沈殿には $500\mu\text{L}$ の水を加え、5 分間混合後、 $10,000\times g$ 、3 分間遠心分離することで、上清を得た。合わせた上清中の 3-ヒドロキシキヌレニンを HPLC を用いて測定した¹⁴⁾。ビスフェノール A の本酵素活性に及ぼす影響を調べるために、 5 mM 、 25 mM 、 50 mM 、 150 mM 濃度のビスフェノール A エタノール溶液を作成した。これらのビスフェノール A エタノール溶液を標準反応組成液のエタノール ($10\mu\text{L}$ 添加) の代わりに添加した。したがって、反応組成液中の終濃度は 0.1 mM 、 0.5 mM 、 1 mM 、 3 mM となる (参照、Fig. 5)。

3.3 尿中のチアミン (ビタミン B₁) の測定方法

基本的には、木村らが¹⁵⁾報告した血液中のチアミン測定方法に従った。HPLC 注入用試料は、集めた尿を $0.45\mu\text{m}$ のマイクロフィルターでろ過した液とする。木村らの方法では、チアミンをカラムで分離した後、反応液としてフェリシアン化カリウムと水酸化ナトリウム混合液を送液しているが、再現性が低かったため、Fig. 1 に示したよう