に，はじめにフェリシアン化カリウム溶液を送液し，次に水酸化ナトリウム溶液を送液した．この改良により，再現性を高めることに成功した．分析条件を以下に示した．移動相は 0.2 M NaH_2PO_4 を用い，流速 1.0 mL/min で流した．反応液 1 は 0.01% $K_3Fe(CN)_6$ で流速 0.15 mL/min で流した．反応液 2 は 15% NaOH で流速 0.15 mL/min で流した．反応コイルは PEEK チューブ (外径，1.80 mm；内径，0.50 mm) で長さは 1200 mm，カラムは Shodex Rs-pak NN-614（150·6.0 mmI.D.）を使用し，カラム温度は 40℃に維持し，検出は励起波長 365 nm，蛍光波長 435 nm で行った．

3.4　尿中のリボフラビンの測定方法

尿中リボフラビンは，リボフラビン自体が発する蛍光を蛍光検出器付きの HPLC で測定した[16]．HPLC 注入用試料は，集めた尿を 0.45 μm のミクロフィルターでろ過した液である．カラムは Tosoh - 80Ts (250×4.6mm I.D.)を用い，移動相としては 10 mM NaH_2PO_4 (pH5.5；6 M NaOH で pH を調整)：メタノール＝7:3 を使用した．流速は 0.8 mL / min で，カラム温度は 40℃に維持した．検出は，励起波長 445nm，蛍光波長 530nm で行った．

3.5　尿中の PIC の測定方法

ビタミン B_6 の異化代謝産物である PIC は，PIC 自体が発する蛍光を蛍光検出器付きの HPLC で測定した[17]．HPLC 注入用試料は，集めた尿を 0.45 μm のミクロフィルターでろ過した液である．移動相として 500 mL の超純水に 85 %リン酸を 2.3 mL 添加し，50%KOH で pH 2.2 に調製後，900 mL に定容した後，100 mL のメタノールを加えたものを使用した．カラムは Tosoh TSKgel ODS-120A(250 mm×4.6 mm I.D.)を使用し，流速 1.0 mL / min で流した．カラム温度は 30℃に維持した．測定は励起波長 355 nm，蛍光波長 436 nm で行った．

3.6　尿中のアスコルビン酸（還元型アスコルビン酸＋酸化型アスコルビン酸＋2,3-ジケトグロン酸）の測定方法

メタリン酸酸性下で保存した尿を Kishida ら[18]の方法にしたがって，オサゾン誘導体に変換した後測定をおこなった．カラムは Waters μBondasphere 5μ C_{18}-100A (150×3.9 mm I.D.)を用い，移動相として，アセトニトリル 500mL に終濃度が 0.1% になるようにトリエチルアミン(pH3.0)溶液を加えた後，水で 1000 mL にしたものを使用した．カラム温度は 40℃に維持し，流速 1.0 mL / min で，検出は 505 nm で行った．

C.　結果と考察

1.　体重と飼料摂取量への影響

幼若ラットの体重増加量（Fig. 2-A）と飼料摂取量（Fig. 2-B）は，0.1%ビスフェノール A 添加食では対照群と比較して，有意な低下は認められなかった．0.5%添加食の投与によっては，体重増加量も飼料摂取量も対照群と比較して有意に低下した．

1.2　臓器重量への影響

0.1%ビスフェノール A 添加食の投与は，Table 2 に示したように，肝臓，腎臓，心臓，肺臓，脾臓，脳，精巣の各重量に，全く影響を与えなかった．0.5%添加食では，肝臓，腎臓及び脾臓がラット当たりでは減少傾向を示したが，100 g 体重当たりの値に換算した値では，差異を認めなかった．有意な差異が認められたのは，精巣のみであった．他の臓器重量には差異は認められなかった．

1.3　トリプトファン-3-ヒドロキシアンスラニル酸代謝系への影響

Figure 3 に示した化合物はトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の上流部分に位置する中間代謝産物である．これらは，体内にほとんど検出されないことから，尿中への排泄量がほぼ生成量を反映する．0.1%ビスフェノールA添加食の摂取により，アンスラニル酸の生成量は増加し，キヌレン酸は増加傾向を示した．0.5%添加食では，アンスラニル酸は増加傾向を示し，キヌレン酸は有意に増加した．一方，キサンツレン酸および 3-ヒドロキシアンスラニル酸の生成量は，0.1%添加食でも 0.5%添加食でも対照群の 1/2 程度にまで低下した．

1.4　キノリン酸の生成量とトリプトファン-ニコチンアミド転換率への影響

キノリン酸（Fig. 4-A）の生成量は飼料中のビスフェノールA量に応じて低下した．全く同じ結果が，トリプトファン-ニコチンアミド転換率（Fig. 4-B）においてもみられた．

1.5　キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ活性に及ぼす影響(in vitro)

トリプトファン-ニコチンアミド代謝系の中間代謝産物の測定から，ビスフェノールAの作用部位がキヌレニン 3-ヒドロキシラーゼであると推定されたので，本酵素活性に及ぼす影響を in vitro で調べた．Figure 5 に示したように，本酵素活性は，反応液に添加するビスフェノールAの添加量に応じて阻害された．

1.5　尿中へのチアミン，リボフラビン，PIC およびアスコルビン酸の排泄量に及ぼす影響

ビスフェノールAの摂取により，尿中へのチアミン(Fig. 6-A)，リボフラビン(Fig. 6-B)，アスコルビン酸（この場合はアスコルビン酸＋デヒドロアスコルビン酸＋2,3-ジケトグロン酸）(Fig. 6-D)の排泄量は有意に増大した．一方，ビタミン B_6 の異化代謝産物である PIC はビスフェノールAの摂取により有意に低下した(Fig. 6-C).

D．考察

我々は，ラットに 1%ビスフェノール A 含有食を添加すると，トリプトファン－ニコチンアミド転換率が顕著に低下することを報告した[1]．1%ビスフェノールA群のラット 1 匹あたりの 1 日の摂取量は約 200 mg であり，体重 1 kg あたりでは，800 mg となる．この量は雌性ホルモンのかく乱作用が報告されている 400 mg/kg 体重/日[19]の倍量に相当した．そこで，0.1%ビスフェノール含有食，0.5%含有食の投与がトリプトファン－ニコチンアミド転換率に及ぼす影響を調べた．前報[1]では，6 週齢のラットを用いたが，一般的に毒性の表れやすいと考えられている離乳したての 3 週齢のラットを今回は使用した．幼若ラットの飼料摂取量と体重増加におよぼす影響は，0.1%群では認められなかったが，0.5%群では認められた(Fig. 2)．また，各種臓器重量におよぼす影響の結果も，0.1%含有食では全く影響を及ぼさなかったが，0.5%含有食の投与は精巣重量の低下をもたらした(Table 2)．すなわち，0.1%ビスフェノールA含有食の投与はラットに見かけ上の影響を全く与えなかった．しかしながら，0.1%ビスフェノールA含有食の投与は，対照群である 0%含有食群と比較して，トリプトファン－ニコチンアミド転換経路の代謝産物であるアンスラニル酸

とキヌレン酸の産生量を各々有意に増大あるいは増大傾向させ，一方，キサンツレン酸と 3-ヒドロキシアンスラニル酸の産生量を有意に低下させた(Fig. 3)．さらに，キノリン酸の産生量を有意に低下させ，この結果と連動してトリプトファン－ニコチンアミド転換率を有意に低下させた(Fig. 4)．すなわち，広く家庭用品に使用されているビスフェノール A の生物学的暴露量を推定するには，これらの代謝産物量を測定することが有効であることが明らかとなった．

次に，前報[1]で推測したビスフェノール A の作用点を調べた．本経路の代謝産物の変動から，ビスフェノール A の作用点をキヌレニン 3-ヒドロキシゲナーゼと推定した[1]．今回の実験結果でも，全く同じ現象が認められた(Figs.2 and 3)．そこで，本酵素活性におよぼすビスフェノール A の影響を in vitro で調べた．その結果は，Fig. 5 に示したように，濃度依存的に活性が阻害された．本酵素は多くの化合物によって活性が変動することが知られている．例えば，Nishimoto ら[21]は，反応系にリン脂質を添加すると活性が有意に増大することを，Shin ら[22]は分岐鎖 α−ケト酸が阻害することを，Mayer ら[23]は Cu^{2+} や Dicumarol による阻害を，Okamoto・Hayaishi[24]は甲状腺機能亢進，すなわちチロキシンによる阻害を，Bender・Smith[25]はある種の芳香族化合物による阻害を報告している．Müller[26]は「Flavin-dependent hydroxylases」と題する論文の中で，多くの芳香族化合物が Flavin-dependent hydroxylases によって水酸化される反応を紹介している．

キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼはミトコンドリア外膜に存在する FAD 酵素であり，補酵素として NADPH を要求する[20]．そこで，トリプトファン－ニコチンアミド転換経路に関与する B 群ビタミンの代謝におよぼす影響を調べた．その結果は Fig. 6 に示したように，チアミン（ビタミン B_1）とリボフラビン(ビタミン B_2)の排泄量がビスフェノール A の摂取により有意に増大し，ビタミン B_6 の異化代謝産物である PIC は減少した．摂取量が等しい時は(Fig. 6 の値は 1 g の飼料を摂取した時の値)，尿中へのビタミンの排泄量の増大は，一般的に，体内での必要度の低下を意味するものと考えられる．チアミンとリボフラビンの排泄量の増大は，ビスフェノール A が体内において，これらの必要とする酵素反応を阻害している可能性を示唆している．なお，リボフラビンとビスフェノール A との接点は多くのフラビン酵素が芳香族化合物の水酸化反応に関与している[26]という事実から推定されるが，チアミンとビスフェノール A との接点は不明である．一方，PIC 排泄量の減少は，ビタミン B_6 が関与する反応，例えば，アミノ酸の異化代謝をビスフェノール A が亢進させていることを示唆している．

アスコルビン酸はラットでは，ビタミンではない．ラットは生体異物を摂取するとアスコルビン酸の産生量を増大させることが知られている[27]．この増大は解毒に関係する薬物代謝系に関連する応答である．本実験においても，Fig. 6-D に示したように，ビスフェノール A の摂取により増大したことから，ラットはビスフェノール A を生体異物として認識し，水酸基を付加させて，脂溶性から水溶性物質に変化させて，積極的にビスフェノール A を尿中に排泄されているものと思われる．

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

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. 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，スチレンモノマーによるトリプトファン―ニコチンアミド転換経路のかく乱作用．食衛誌，**45,** 1-7 (2004).
2. Goldberger, J., Wheeler, G. A., The experimental production of pellagra in human subjects by means of diet. U.S. Pub. Health Serv. Hygienic Lab. Bull. No. 120. (1920).
3. Krehl, W. A., Teply, L. J., Sarma, P.S., Elvehjem, C. A., Growth-retarding effect of corn in nicotinic acid-low rations and its counteraction by tryptophane. Science, **101**, 489-490 (1945).
4. Perlzweig, W. A., Rosen, F., Levitas, N., Robinson, J., The excretion of nicotinic acid derivatives after ingestion of tryptophane by man. J. Biol. Chem., **167**, 511-514 (1947)
5. 福渡努，柴田克己，早川史子，杉本悦郎，ある地域の女子学生のナイアシン摂取量と血中ナイアシン補酵素レベル．ビタミン，74, 137-141 (2000).
6. Pullman, M. P., Colowic, S. P., Preparation of 2- and 6-pyridones of $\underline{N}^1$-methylnicotinamide. J. Biol. Chem., **206**, 121-127 (1954).
7. Shibata, K., Kawada, T., Iwai. K., 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 (1988).
8. 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).
9. Shibata, K., Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.,* **430**, 376-380 (1988).
10. 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).
11. Mawatari, K., Oshida, K., Iinuma, F., Watanabe, M., Determination of quinolinic

acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. Anal. Chim. Acta., **302**, 179-183 (1995)

12. 柴田克己，高速液体クロマトグラフィーによる $\underline{N}^1$-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).
13. de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., Biochem. J., **60**, 604-617 (1955).
14. Shibata, K., Toda, S., Effects of thyroxine on the conversion ratio of tryptophan to nicotinamide in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem., **58**, 1757-1762 (1994).
15. Kimura, M., Fujita, T., Itokawa, Y., Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. Clin. Chem., **28**, 29-31 (1982).
16. Roughead Z. K., McCormick, D. B., Urinary riboflavin and its metabolites: effects of riboflavin supplementation in healthy residents of rural Georgia (USA). Eur. J. Clin. Nutr., **45**, 299-307 (1991)
17. Gregory, J. F., Kirk, J. R., Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. Am. J. Clin. Nutr., **32**, 879-883 (1979).
18. Kishida, K., Nishimoto, Y., Kojo, S., Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performamce liquid chromatography. Anal. Chem., **64**, 1505-1507 (1992).
19. Ashby, J., Tinwell, H., Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. Environ Health Perspect., **106**, 719-720 (1998).
20. Okamoto, H., Hayaishi, O., Solubilization and partial purification of kynurenine hydroxylase from mitochondria outer membrane and its electron donors. Arch. Biochem. Biophys., **131**, 603-608 (1969).
21. Nishimoto, Y., Takeuchi, F., Shibata, Y., Isolation of L-kynurenine 3-hydroxylase from the mitochondrial outer membrane of rat liver. J. Biochem., **78**, 573-581 (1975).
22. Shin, M, Yamada, O., Sano, K., Umezawa, C., Effect of branched chain α-keto acids on kynurenine 3-hydroxylase from rat liver. J. Nutr. Sci. Vitaminol., **28**, 203-207 (1982).
23. Mayer, G., Ullrich, V., Staudinger, H., Possible involvement of cytochrome b5 in L-kynurenine-3-hydroxylase of rat liver mitochondria. Hoppe-Seyler's Physiol. Chem., **349**, 459-464.
24. Okamoto, H., Okada, F., Hayaishi, O., Kynurenine metabolism in hyperthyroidism. A biochemical basis for the low NAD(P) level in hyperthyroid rat liver. J. Biol. Chem., **246**, 7759-7763 (1971).
25. Bender, D. A., Smith, W. R., Inhibition of kynurenine hydrolase by benserazide, cardidopa and other aromatic hydrazine derivatives: evidence for sub-clinical iatrogenic niacin deficiency. Biochem. Soc. Trans., **6**, 120-122 (1978).
26. Müller, F., Flavin-dependent hydroxylases. Biochem. Soc. Trans., 13, 443-445 (1985).
27. Horia, F., Yoshida, A., Effects of some xenobiotics on ascorbic acid metabolism

in rats. J. Nutr., **112**, 416-425 (1982).

Table 1. Composition of the Diets

	Control diet (%)	Test diet	
		0.1% BPA (%)	0.5% BPA (%)
Casein	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	45.9	45.8	45.4
Sucrose	22.9	22.9	22.9
Corn oil	5	5	5
Mineral mixure[1] (AIN-93M)	5	5	5
Vitamin mixure(NiA-free)[1] (AIN-93-VX containing 25% choline bitartrate	1	1	1
Bisphenol A	0	0.1	0.5

[1]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)).

Table 2. Effect of Dietary BPA on the Organ Weights.

	Control	0.1% BPA	0.5% BPA
Liver (g/rat)	7.77 ± 0.55	7.24 ± 0.32	6.27 ± 0.17
Kidney (g/rat)	1.62 ± 0.07[a]	1.54 ± 0.07[a]	1.29 ± 0.07[b]
Heart (g/rat)	0.71 ± 0.03	0.66 ± 0.02	0.59 ± 0.04
Lung (g/rat)	0.92 ± 0.04	0.89 ± 0.04	0.80 ± 0.03
Spleen (g/rat)	0.61 ± 0.04[a]	0.57 ± 0.04[a,c]	0.44 ± 0.05[b,c]
Brain (g/rat)	1.10 ± 0.04	1.09 ± 0.02	1.00 ± 0.03
Testis (g/rat)	1.58 ± 0.08[a]	1.50 ± 0.08[a]	0.65 ± 0.03[b]
Liver (g/100 g of b. w.[1])	4.71 ± 0.16	4.73 ± 0.16	4.91 ± 0.14
Kidney (g/100 g of b. w.)	0.99 ± 0.03	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.02
Heart (g/100 g of b. w.)	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.46 ± 0.02
Lung (g/100 g of b. w.)	0.56 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.63 ± 0.03
Spleen (g/100 g of b. w.)	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.34 ± 0.03
Brain (g/100 g of b. w.)	0.67 ± 0.04	0.72 ± 0.02	0.79 ± 0.03
Testis (g/100 g of b. w.)	0.96 ± 0.03[a]	0.98 ± 0.03[a]	0.48 ± 0.02[b]

[1]b. w. = body weight.

Male rats of the Wistar strain (3 weeks old) were obtained from Clea Japan (Tokyo, Japan) and immediately placed in individual metabolic cages (CT-10; Clea Japan). They were then divided into three groups, and fed *ad libitum* for 22 days (Table 1).

Values are means ± SEM for five rats; different superscript letters mean significant difference at $p<0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

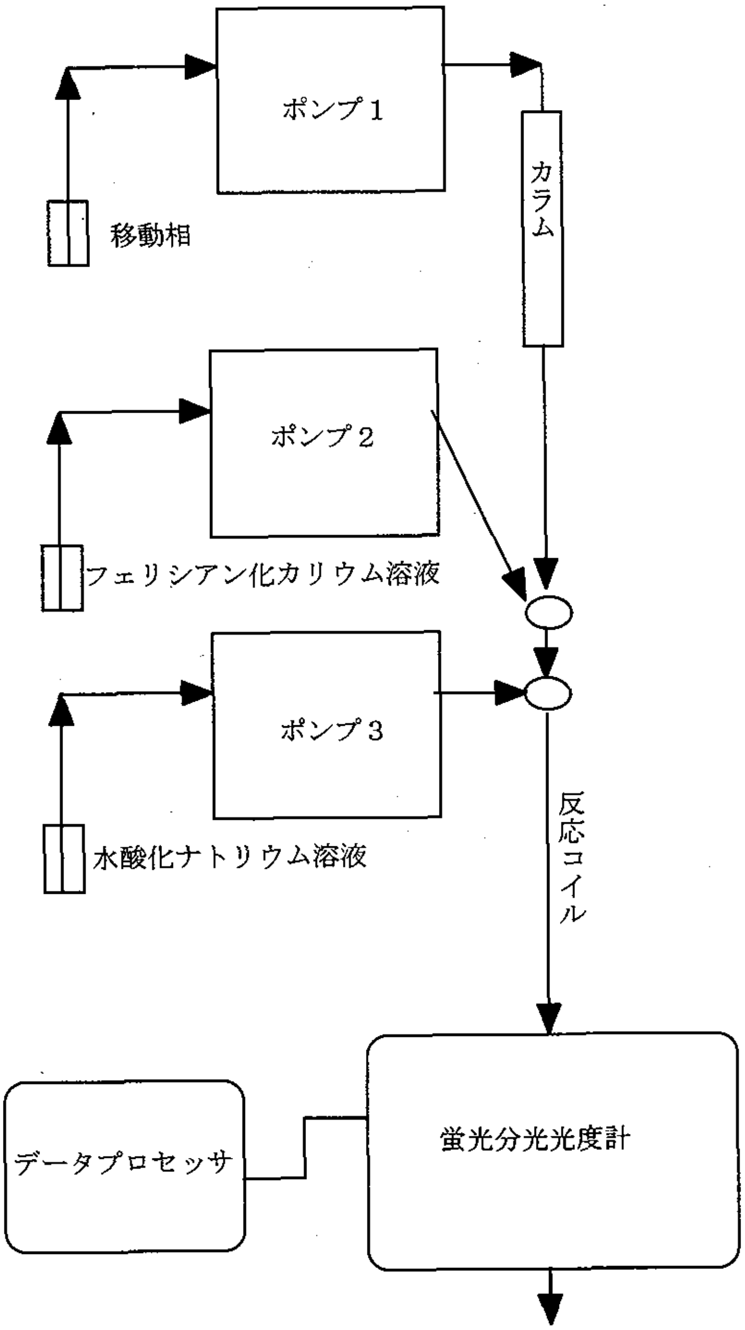


Fig. 1. Diagram of HPLC System for Measurement of Thiamin.

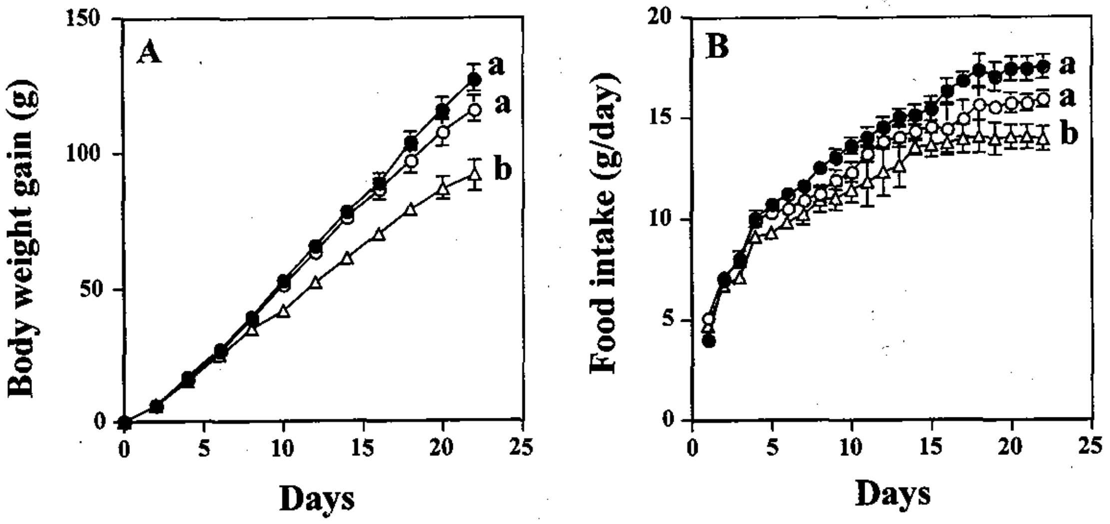
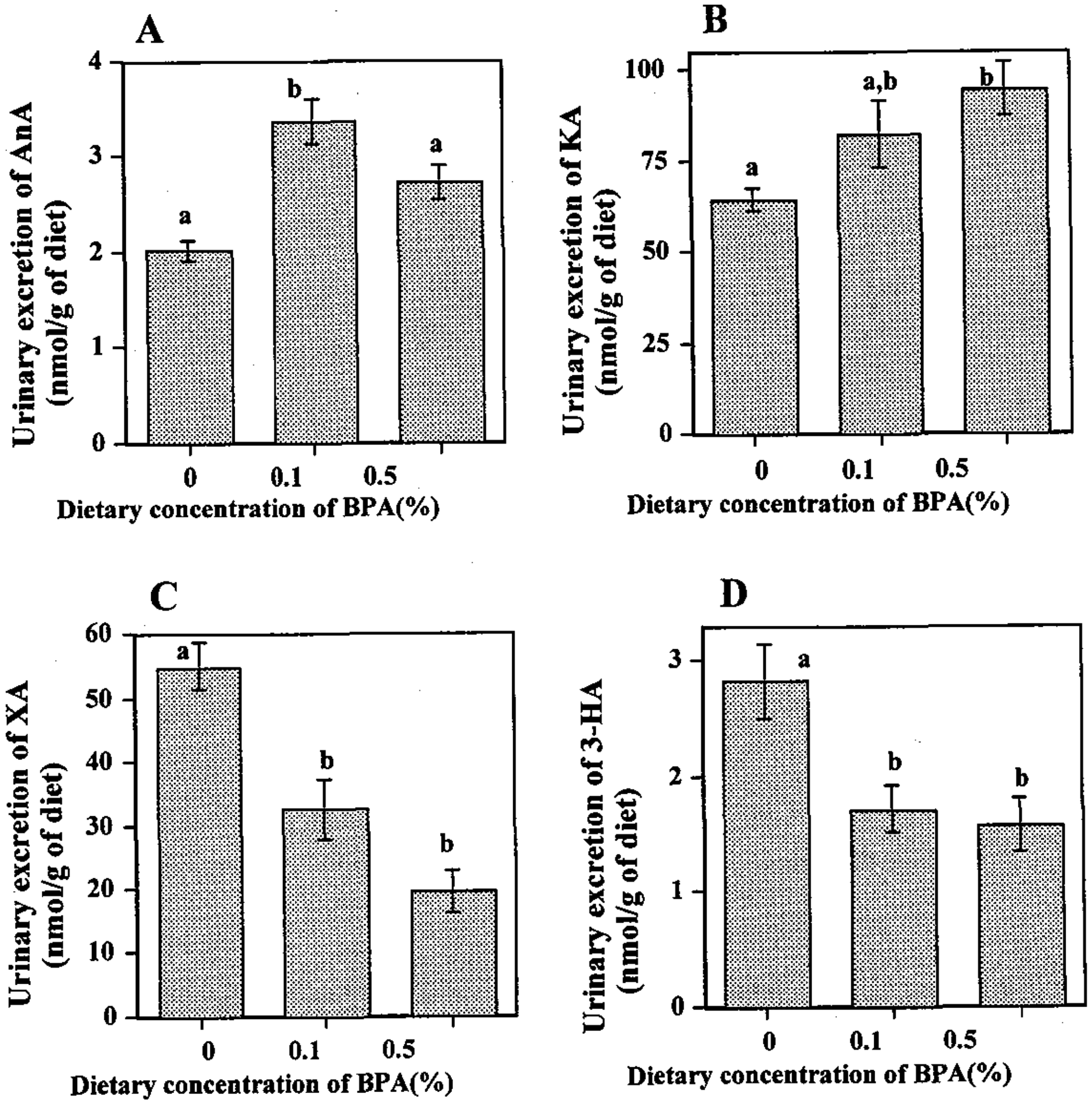


Fig. 2. Effects of Bisphenol A on the Body Weight Gain (A) and Food Intake (B) in Rats.

Male rats of the Wistar strain (3 weeks old) were obtained and immediately placed in individual metabolic cages (CT-10; Clea Japan). They were fed ad libitum the food (Table 1) for 22 days. ●, 0% bisphenol A (control) group; ○, 0.1% bisphenol A group, △, 0.5% bisphenol group. Values are means ± SEM for five rats; a different superscript letter means significant difference at $p<0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test.



Fig, 3. Effects of Bisphenol A on the Urinary Excretion of AnA (A), KA (B), XA (C), and 3-HA (D). The 24-hour urine samples were collected at the last day of the experiment. Values are means ± SEM for five rats; a different superscript letter means significant difference at $p<0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test. AnA = anthranilic acid, KA = kynurenic acid, XA = xanthurenic acid, 3-HA = 3-hydroxyanthranilic acid.

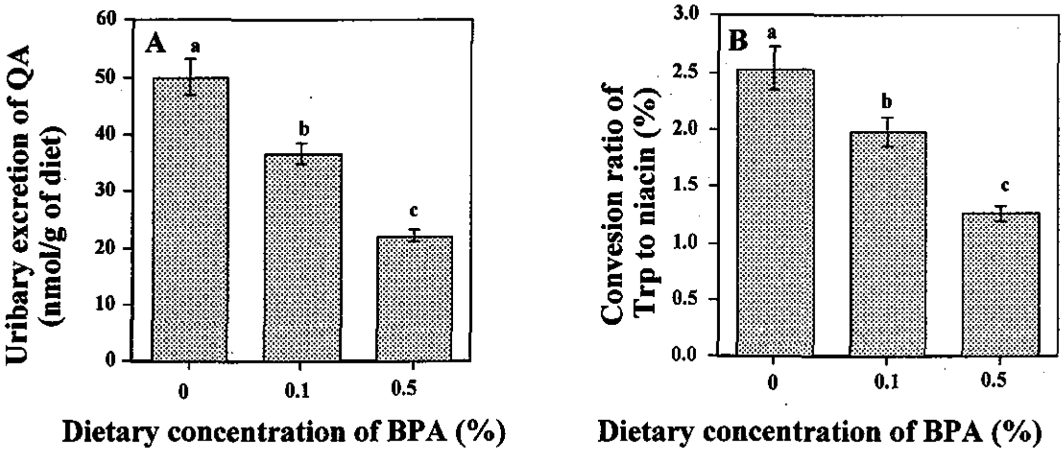


Fig. 4. Effects of Bisphenol A on the Urinary Excretion of QA (A) and the Conversion Ratio of Trp to Nam (B).

The 24-hour urine samples were collected at the last day of the experiment. Values are means ± SEM for five rats; a different superscript letter means significant difference at $p<0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test. QA = quinolinic acid, Trp = tryptophan, Nam = nicotinamide.

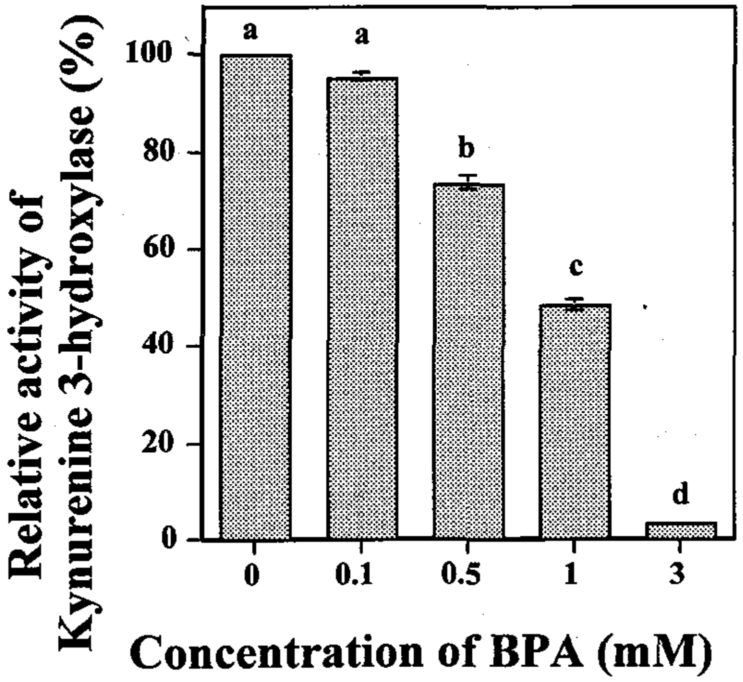


Fig. 5. Inhibition of Kynurenine 3-Hydroxylase Activity by Bisphenol A in vitro.

Values are means ± SEM for three separate experiments; a different superscript letter means significant difference at $p<0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

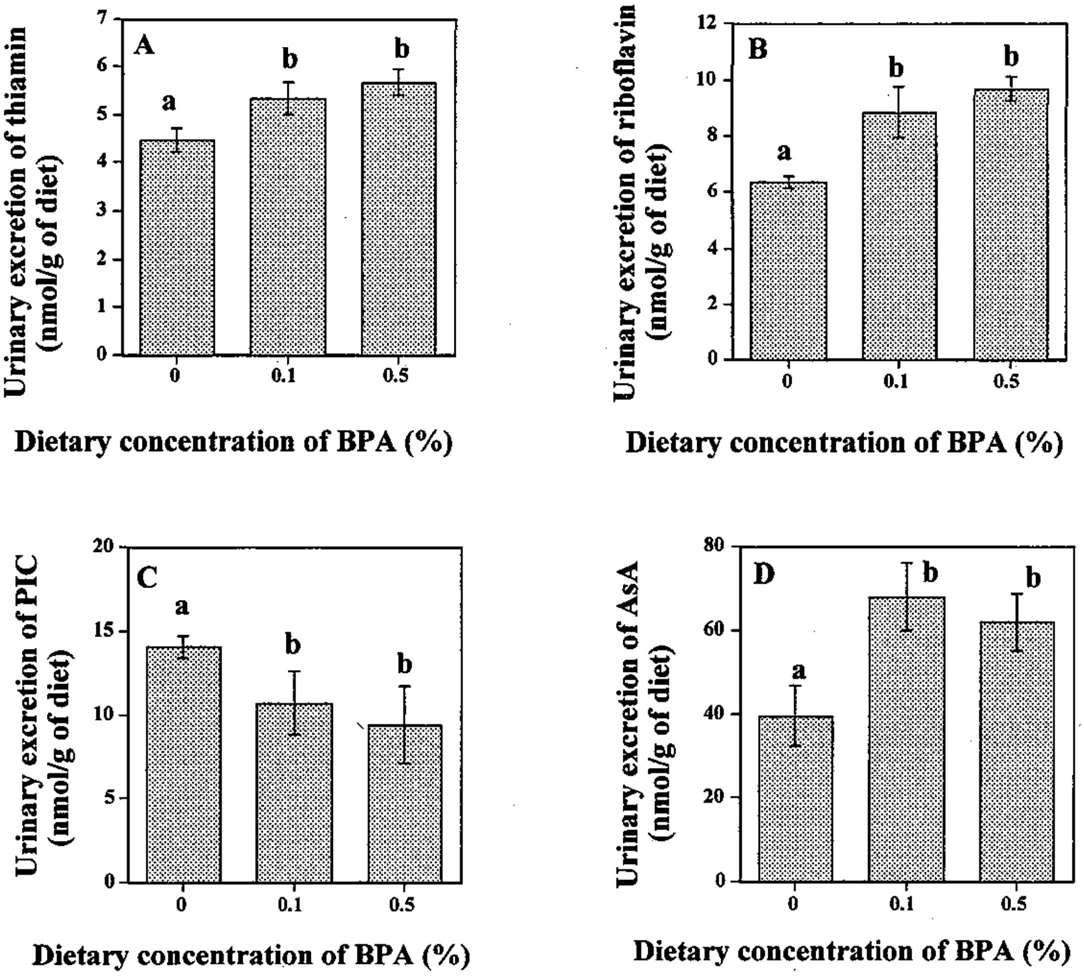


Fig. 6. Effects of Bisphenol A on the Urinary Excretion of Thiamin (A), Riboflavin (B), 4-Pyridoxic Acid (PIC) (C), and Ascorbic Acid (D).

The 24-hour urine samples were collected at the last day of the experiment. Values are means $\pm$ SEM for five rats; a different superscript letter means significant difference at $p<0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

Ⅱ. 主任研究者の報告書

7. ヒト, ラット, マウスにおけるトリプトファン–ニコチンアミド代謝の比較

主任研究者　柴田克己　滋賀県立大学　教授

研究要旨
トリプトファン–ニコチンアミド代謝経路の中間代謝産物にはユニークな生理活性を示す化合物が多く存在するため, ヒトのモデル動物が必要となる. 我々はヒト, ラット, マウスのニコチンアミド異化代謝経路を比較した結果, ヒトとラットでは基本的に同じ異化代謝経路が作動しており, ラットはヒトのモデル動物として使用できることを明らかにした. そこで, 今回は, トリプトファン–ニコチンアミドの全代謝産物, 特にトリプトファン–キノリン酸代謝産物について比較を行った. ヒトでは, アンスラニル酸, キヌレン酸, キサンツレン酸, 3-ヒドロキシアンスラニル酸及びキノリン酸の各排泄量が, 全トリプトファン代謝産物に対する割合は, いずれも5%以下であった. ラットでは, キヌレン酸が20%弱, キサンツレン酸が10%強, キノリン酸が30%弱排泄されており, ヒトとはかなり異なった排泄パターンであった. アンスラニル酸と3-ヒドロキシアンスラニル酸の排泄量はごくわずかであった. マウスの排泄パターンは比較的ヒトに類似していたが, キサンツレン酸が20%弱であったことが, 異なる点であった. これらの結果から, ヒトではトリプトファンが開裂すれば, 途中の中間代謝産物が蓄積することなく, 一気にニコチンアミド異化代謝産物まで流れやすいことが明らかとなった. ラットでは, 神経毒のキノリン酸が蓄積しやすいが, アンタゴニストのキヌレン酸も同程度蓄積していた. マウスではヒトと同じく, キノリン酸の蓄積は全く認められず, 速やかにニコチンアミド異化代謝経路に流入することが明らかとなった. 従って, トリプトファン–キノリン酸代謝に関する研究モデルとしては, マウスが適していることが明らかとなった.

A．目的

ニコチンアミドが生体内で必須アミノ酸のL-トリプトファンから生合成されることは良く知られている[1]．トリプトファン-ニコチンアミド転換経路上(Fig. 1.)にはユニークな生理活性を示す化合物が多く存在する．例えばキサンツレン酸は糖尿病を誘発し[2]，またその一方マラリアの生殖母細胞活性因子であり[3]アゴニストである[4]．キノリン酸は脳内にある興奮性アミノ酸レセプターであるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプターのアゴニストであり[5]，また一方，キヌレン酸とアンスラニル酸は，アンタゴニストであり[6,7]，ニュウロプロテクタントである．また，3-ヒドロキシアンスラニル酸は神経系細胞を相乗効果的に攻撃する[8]．よって，トリプトファン-ニコチンアミド転換経路調節のメカニズムを解明することは我々にとって有用である．トリプトファン-ニコチンアミド転換経路を研究するにあたって，ヒトに類似した適切なモデル動物を必要としているが，実験動物のこれらの代謝パターンは報告されていない．(マウスの主要なニコチンアミド代謝産物はニコチンアミドN-オキシドであるが，これはヒトやラットからは検出されない[9]．)

我々はヒト，ラット，マウスのニコチンアミド異化代謝経路を比較し，ヒトとラットでは基本的に同じ異化代謝経路が作動していることを報告した．本研究では，Trp-ニコチンアミド転換経路を研究するにあたって最適な実験動物を選ぶために，トリプトファン-ニコチンアミドの全代謝産物，特にトリプトファン-QA代謝産物について比較を行った．

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），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ていたアンスラニル酸(AnA)，キヌレン酸(KA)，キサンツレン酸(XA)，3-ヒドロキシアンスラニル酸(3-HA)，N1-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(QA)，ニコチンアミドは和光純薬工業（株）より購入した．N1-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)，N1-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)は合成した[10,11]．

本実験は滋賀県立大学実験動物委員会で承認を受け，独立行政法人国立健康・栄養研究所倫理委員会において承認を受けて行った．

（1）被験者

健康な女子学生10人を被験者とした．被験者の年齢は20.9±0.6才，身長は162.6±1.3cm，体重は54.67±1.57kgであった．7日間精製食（Table 1.）を摂取させ，実験最終日に24時間尿を採集した．

集めた24時間尿は,分析するまで塩酸酸性下，-20℃で保存した．

（2）実験動物

6週齢のWistar系雄ラットとICR系雄マウス5匹を日本クレア（株）より購入し，代謝ケージに入れた．飼料は20%カゼイン食[12]を与え，21日間飼育した．実験最終日に24時間尿を採集した．

集めた24時間尿は,分析するまで塩酸酸性下，-20℃で保存した．

（3）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0.45μmのミクロチューブでろ過し，これに含まれるAnA[15]，KA[12]，XA[14]，3-HA[14]およびQA[16]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[13]．

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[11]．

C．結果

Table 2に，ヒト，ラット，マウスにトリプトファン-ニコチンアミド代謝物質の尿中排泄量を示した．Fig. 2.はそれぞれ尿中排泄量のパーゼントをトリプトファン代謝物質総量に対する値で示した．

トリプトファン-ニコチンアミド転換経路の研究上この経路は二つに分けられ，一つがトリプトファン-QA代謝経路で，もう一つがQA-ニコチンアミド代謝経路である．

トリプトファン-QA代謝経路において，ヒトでは，AnA,KA,XA,3-HA,QAの各排泄量が，全トリプトファン代謝産物に対する割合は，いずれも5%以下であった．ラットでは，KAが20%弱，XAが10%強，QAが30%弱排泄されており，AnAと3-HAの排泄量はごくわずかであった．これらの結果は，トリプトファン-QA代謝パターンがヒトとラットで極めて異なることを示している．マウスでは，トリプトファン-QA代謝経路での主要な尿中代謝産物はXAで，それはトリプトファン代謝物質総量の20%弱を占め，AnA,KA,3-HA,QAの尿中排泄量は非常に低値を示した．代謝パターンはラットとヒトよりマウスとヒトで類似していることが解った．したがって，トリプトファン-QA代謝経路に関する研究において，ラットよりマウスがより適切な実験動物であることが明らかとなった．

D. 考察

全体のトリプトファン代謝経路において，ヒトではトリプトファンが開裂すれば，途中の中間代謝産物が蓄積することなく，一気にニコチンアミド異化代謝産物であるMNA,2-Py,4-Pyにまで代謝される．ラットではトリプトファン-QA代謝経路の副産物であるKA,XAの両方が同程度蓄積しており，これは，キヌレニン→KAと3-ヒドロキシキヌレニン→XAの反応が，キヌレニン→AnAと3-ヒドロキシキヌレニン→3-HAの反応より活発であることを示している．QAの蓄積は，QA→NaMNの反応がラットの律速段階であり，しかし，一旦NaMNが生成するとそれは，スムーズに最終代謝産物2-Py,4-Pyに代謝されることを示している．マウスではもっとも豊富な代謝産物はニコチンアミドN-オキシドで40%を占めた．しかし，ニコチンアミドN-オキシドはラットとヒトには検出されなかった．

QAはNMDA受容体のアゴニストであり[5]，ニューロンを破壊するのに対し，KAはNMDA受容体のアンタゴニストである[6]．ヒトとラットは，QAとKAの割合がほとんど同じであったのに対し．マウスでは，QA生成量よりKA生成量が高かった．したがって，マウスのトリプトファン-QA代謝制御機構の解明は，神経損傷を防ぐための機能性食品開発のために有用であると言えるだろう．

E. 健康危機情報

特記する情報はない

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1．出許出願
なし

2．実用新案登録
なし

3．その他
なし

H. 引用文献

1. Horwitt K, Harvey CC, Rothwell WS, Cutler JL, Haffron D: Tryptophan-niacin relationships in man. Studies with diets deficient in riboflavin and niacin together with observation on the excretion of nitrogen and niacin metabolites. J Nutr 60: 1-43, 1965.
2. Meyramov G, Korchin V, Kocheryzkina N: Diabetogenic activity of xanthurenic acid determined by its chelating properties? Transplant Proc 30: 2682-2684, 1998.
3. Lopez-Burillo S, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Manchester LC, Reiter RJ: Melatonin xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha lipoic acid differentially reduces oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. J Pineal Res 34: 269-277, 2003.
4. Muhia DK, Swales CA, Deng W, Kelly JM, Baker DA: The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Mol Microbiol 42: 553-560, 2001.
5. Ganong AH, Cotman CW: Kynurenic acid and quinolinic acid act at N-methyl-D-aspartate receptors in the rat

hippocampus. J Pharmacol Exp Thr 236: 293-299, 1986.

6. Stone TW, Behan WM, Jones PA, Darlington LG, Smith RA: The role of kynurenines in the production of neuronal death, and the neuroprotective effect of purines. J Alzheimers Dis 3: 355-366, 2001.
7. Dale WE, Dang Y, Amiridze N, Brown OR: Evidence that kynurenine pathway metabolites mediate hyperbaric oxygen-induced convulsions. Toxicol Lett 30: 37-43, 2000.
8. Schwarcz R, Whetsell WO Jr, Foster AC: Quinolinic acid: an endogeneous metabolites that produces axon-aparing lesions in rat brain. Science 219: 316-318, 1983.
9. Shibata K, Kakehi H, Matsuo H: Niacin catabolism in rodents. J Nutr Sci Vitaminol 36: 87-98, 1990.
10. Pullman ME, Colowick SP: Preparation of 2- and 6-pyridones of N^1-methylnicotinamide. J Biol Chem 206: 121-127, 1954.
11. Shibata K, Kawada T, Iwai K: Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N^1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N^1-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 424: 23-28, 1988.
12. Shibata K: Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, as endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 430: 376-380, 1988.
13. Shibata K: Ultramicro-determination of N^1-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. Vitamins 61: 599-604, 1987.
14. 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.
15. 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.
16. Mawatari K, Oshida K, Iinuma F, Watanabe M: Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. Anal Chim Acta 302: 179-183, 1995.

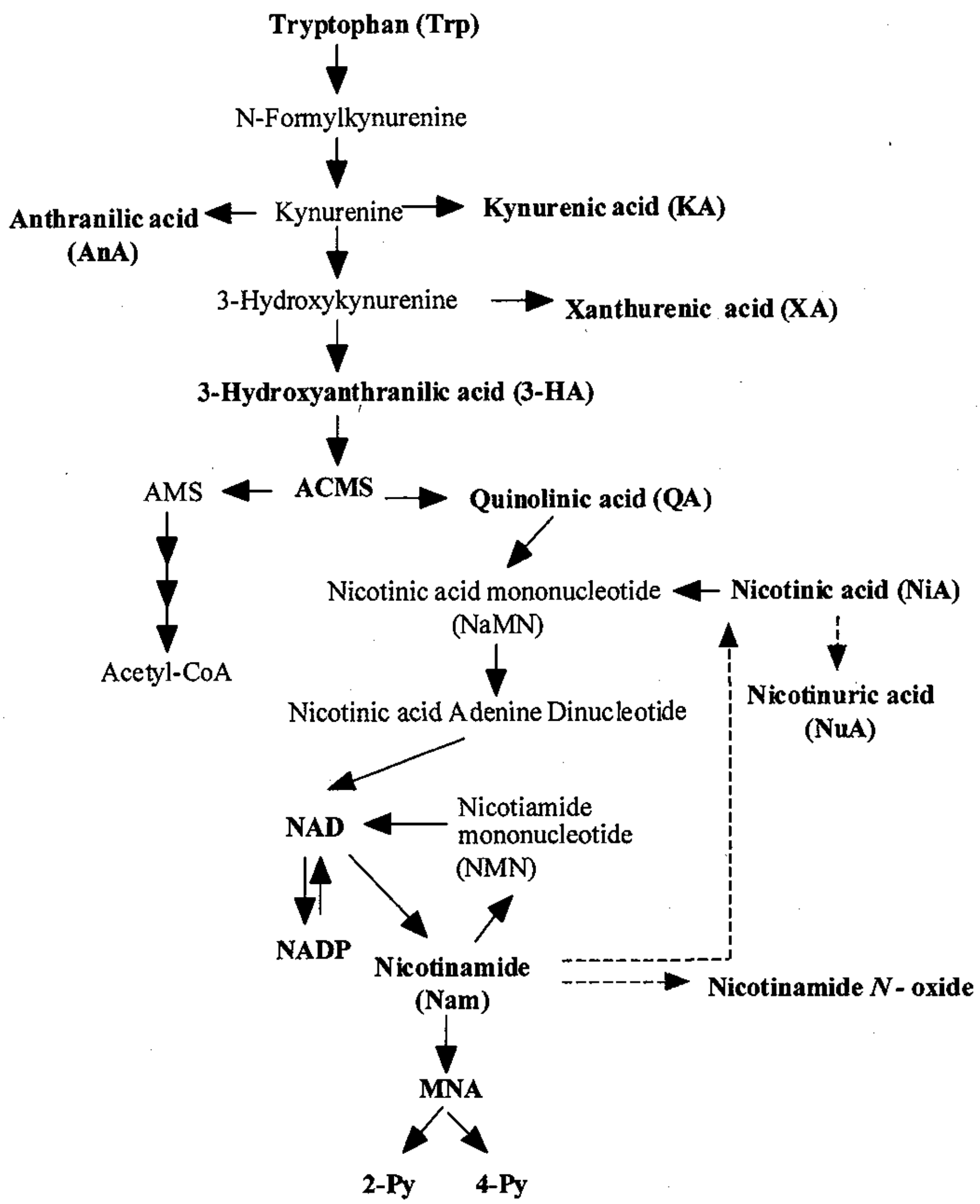


Fig. 1. Metabolic pathway from Typ.
Dotted line: mammals cannot conventionally convert Nam into NiA.

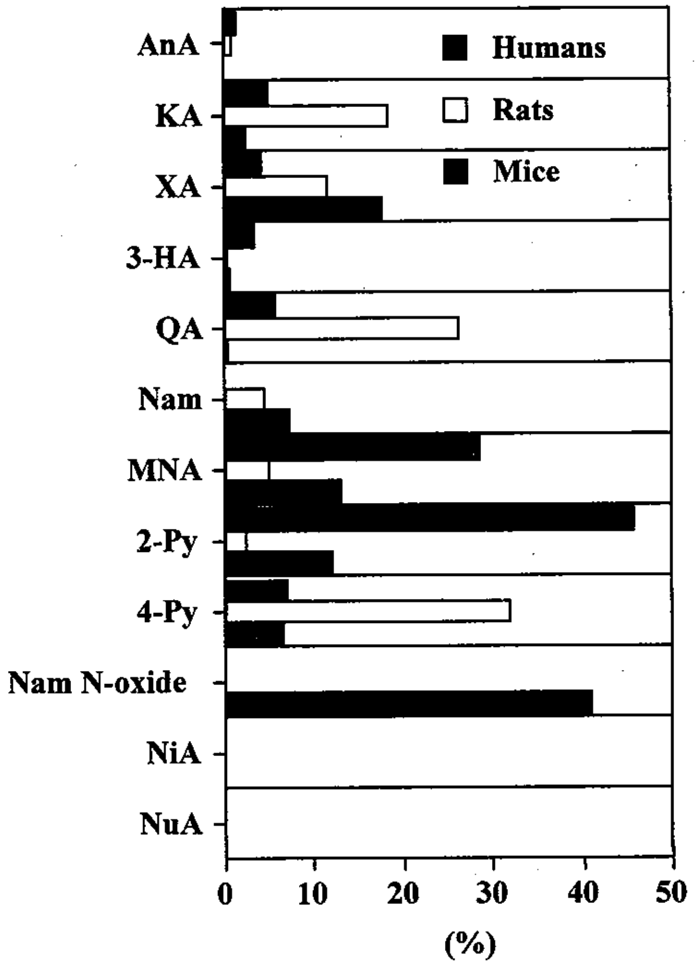


Fig. 2. Comparison of the Metabolism of Trp to Nam among Humans, Rats, and Mice.
The each value was expressed as percent over the total metabolites in each animal.

Table 1. The Composition of the Diets for Humans (around 20 years old women).

	(g/day)	Remarks
Vitamin-free milk casein	39.5	The casein contains 87.5% protein, so the net protein amount is 34.6 g.
Gluten	25.0	The wheat gluten contains 81.6% protein, so the net protein amount is 20.4 g.
Cornstarch	274	
Sucrose	50	
Fats		S:M:P = 3:4:3.
Soybean oil	10.1	
Rapeseed oil	13.8	n-6:n-3 = 4:1.
Coconut oil	6.2	
Lard	8.9	
Dietary fiber		Soluble dietary fiber was used "Fibersol" obtained from Matsutani Chemical Industry Co., Ltd. (Osaka, Japan), and insoluble dietary fiber was used ramie powder obtained from Tosco Co., Ltd. (Tokyo, Japan).
Soluble	3.6	
Insoluble	14.4	
Mineral mixtures	18.0	the composition is shown in the below.
Total amount	463.5	

For breakfast and supper, the above powder mixture of 139 g was added 91 ml of water, mixed well, and which was baked for 9 min at 250°C. The weight of the baked meal was 175 g. The meal and 0.3 g of the vitamin mixtures (the composition is shown in the below) were supplied to the subjects. For lunch, the above mixture of 185.5 g was added 122 ml of water, mixed well, and which was baked for 10 min at 250°C. The weight of the baked meal was 233 g. The meal and 0.4 g of the vitamin mixtures (the composition is shown in the below) were supplied to the subjects.

The composition of the mineral mixtures: 1,100 mg of $CaHPO_4$-$2H_2O$, 860 mg of $CaCO_3$, 2,200 mg of KH_2PO_4, 3,500 mg of $KHCO_3$, 2,100 mg of $MgCl_2$-$2H_2O$, 60 mg of $FeSO_4$-$5H_2O$, 13 mg of $MnSO_4$-$5H_2O$, 19 mg of $ZnCl_2$, 6.3 mg of $CuSO_4$-$5H_2O$, 0.2 mg of KI, and 8,142 mg of NaCl.

The composition of the vitamin mixtures: 3.6 mg (1,800 IU) of retinal acetate reagent (5,000,000 IU/g), 2.5 μg of cholecaldiferol, 4.47 mg of dl-α-tocopherol (5 mg was supplied from oils), 13 μg of phylloquinone, 0.9 mg of thiamin-HCl, 1.0 mg of riboflavin, 1.5 mg of pyridoxine-HCl, 2.4 μg of cyanocobalamine, 5.5 mg of calcium panthotenate, 200 μg of pteroylmonoglutamic acid, 30 μg of D(+)-biotin, 100 mg of ascorbic acid, and to make up 1 g with sucrose.

Table 2. Comparison of the Metabolism of Trp to Nam among Humans, Rats, and Mice.

	Humans*[1]	Rats*[2]	Mice*[3]
AnA	1,375± 187	53.1±10.1	3.0±0.3
KA	4,994± 215	1,256±186	59.1±2.7
XA	4,252± 217	791±39.3	434±42.4
3-HA	3,339± 394	15.3±0.9	10.1±1.2
QA	11,208± 827	1,789±259	5.8±2.1
Nam	N.D.	289±18.7	176±18.2
MNA	29,147±2,707	330±80.3	316±52.5
2-Py	46,741±3,241	166±31.9	297±50.6
4-Py	7,070± 462	2,183±461	159±29.4
Nam N-oxide	N.D.	N.D.	1,004±74.2
NiA	N.D.	N.D.	N.D.
NuA	N.D.	N.D.	N.D.

*[1]Values are means±SEM for 10 women and expressed as nmol/daily urine.

*[2]Values are means±SEM for 5 rats and expressed as nmol/daily urine.

*[3]Values are means±SEM for 5 mice and expressed as nmol/daily urine.