

タミンの代謝特性を考慮して策定した。

(1) ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>、ナイアシンは、妊婦の各時期のエネルギー付加量から策定した。

(2) ビタミンB<sub>6</sub>は、妊娠により、血漿ピリドキサルリン酸濃度が低下する。妊娠末期においても、血漿中のピリドキサルリン酸濃度を非妊娠時と同様に30 nmol/lに維持する必要があると考え、この濃度を維持するためのピリドキシン付加量として策定した。

(3) ビタミンB<sub>12</sub>は、胎児への蓄積量が0.1~0.2 μg/日であるというデータがある。そこで、妊婦に対する付加量として、最大値の0.2 μg/日をもとに策定した。

(4) パントテン酸は、エネルギー代謝にかかわるビタミンである。妊娠によるエネルギー必要量の増大にともなう付加量が必要である。しかしながら、エネルギー摂取量の増大にともなうパントテン酸必要量は明らかではない。そこで、非妊婦と妊婦のパントテン酸摂取量の食事調査報告の比較から、妊婦への付加量を策定した。

(5) 葉酸は、妊娠により必要量が顕著に増大する。通常の適正な食事摂取時に100 μg/日のプテロイルモノグルタミン酸を補足すると、妊婦の赤血球中の葉酸レベルを適正量に維持することができたというデータをもとに策定した。

(6) ビオチンは、妊娠中に尿中排泄量および血清の値が低下することから、妊娠は要求量を増大させる。しかしながら、どの程度付加すべきであるかというデータはない。そこで、この改定においては暫定的に、(0~5カ月の乳児の目安量) × {妊婦のエネルギー付加量の平均値 / (0~5カ月の男女乳児のエネルギーの推定エネルギー必要量の平均値)} の値から算出した。

(7) ビタミンCの妊婦の付加量は、乳児の必要量をもとにしたデータから策定した。

#### ■授乳婦の付加量

母乳中のビタミン含量と1日当たりの泌乳量(哺乳量と同値とみなした)から計算した。

#### ■上限量

人における大量摂取データをもとにして策定した。ただし、18歳以上のみの設定とした。17歳以下は過剰摂取による健康障害のデータがないためである。その数値は遊離型のビタミン(サプリメントもしくはビタミン剤)の量である。

今回の改定では、つぎの三つの水溶性ビタミンについて上限量を策定できた。

(1) ピリドキシン：感覚神経障害を指標として上限量を策定した。成人(18歳以上)の上限量をピリドキシンとして60 mg/日とした。

(2) ニコチンアミドとニコチン酸：大量投与は、消化器系に悪影響(消化不良、ひどい下痢、便秘)を及ぼし、肝臓にも障害(肝機能低下、劇症肝炎)を与える。成人(18歳以上)のニコチンアミドの上限量を300 mg/日、ニコチン酸の上限量を100 mg/日とした。

(3) プテロイルモノグルタミン酸：過剰摂取による悪影響(神経障害、発熱、じん麻疹、紅斑、そう痒症、呼吸困難)の発生が報告されている。成人(18歳以上)の上限量をプテロイルモノグルタミン酸として1,000 μg/日とした。なお、この値を食事性葉酸値に換算すると1,700 μg/日となる。

#### 特記事項

##### ■ナイアシンーナイアシン当量

ナイアシン活性を有する主要な化合物として、ニコチンアミド、ニコチン酸、トリプトファンがある。ナイアシンの食事摂取基準の数値をニコチンアミド相当量として示し、ナイアシン当量(niacin equivalent; NE)という単位で策定した。トリプトファン-ニコチンアミド転換率を重量比で1/60とした。ナイアシン当量は下記の式から求められる。ナイアシン当量(mgNE) = ニコチンアミド(mg) + ニコチン酸(mg) + 1/60トリプトファン(mg)

五訂日本食品標準成分表に記載されている「ナイアシン」とは「ニコチンアミド+ニコチン酸」の量であり、トリプトファンから生合成されるナイアシンは含まれない。したがって、食品中のナ

イアシン当量を求めるには、食品中のトリプトファン量(たんぱく質量の約1%である)に1/60をかけた値を足さねばならない。五訂日本食品標準成分表に記載されているたんぱく質量(g)を6で割った数値をトリプトファン由来のナイアシン量(mg)として差し支えない。

#### ■葉酸—妊娠可能女性への注意事項

葉酸は、神経管閉鎖障害のリスク低減と関連がある。このため、妊婦のみでなく妊娠を計画している女性は、食事性葉酸として400 $\mu$ g/日の摂取が望ましい。

#### ■ビタミンC—喫煙者に対する注意事項

喫煙者では、非喫煙者に比べてビタミンCの代謝回転が1日当たりで約35mg高いというデータがある。喫煙者が非喫煙者と同量のビタミンCの体内貯蔵量を保つためには、非喫煙者よりも35mg以上のビタミンCを摂取する必要がある。また、受動喫煙者でも血漿ビタミンC濃度の低下が示されていることから、該当する人は同年代の非喫煙者以上に、ビタミンCを摂取することが望まれる。

\* \* \*

原 著

## 日本人女性の母乳中ビオチン, パントテン酸 およびナイアシンの含量

<sup>1</sup>兵庫県立大学環境人間学部食環境解析学教室, <sup>2</sup>病体生理研究所研究室,  
<sup>3</sup>滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科, <sup>4</sup>明治乳業(株)研究本部栄養科学研究所,  
<sup>5</sup>(独)国立健康・栄養研究所栄養所要量研究部微量栄養成分代謝研究室

渡邊 敏明<sup>1</sup>, 谷口 歩美<sup>1</sup>, 福井 徹<sup>2</sup>, 太田 万理<sup>3</sup>  
福渡 努<sup>3</sup>, 米久保明得<sup>4</sup>, 西牟田 守<sup>5</sup>, 柴田 克己<sup>3</sup>

Vitamins(Japan), 78(8), 399-407 (2004)

### The Contents of Biotin, Pantothenic Acid and Niacin in Mature Milk of Japanese Women

Toshiaki WATANABE<sup>1</sup>, Ayumi TANIGUCHI<sup>1</sup>, Tooru FUKUI<sup>2</sup>, Mari OTA<sup>3</sup>, Tsutomu FUKUWATARI<sup>3</sup>,  
Akie YONEKUBO<sup>4</sup>, Mamoru NISHIMUTA<sup>5</sup>, Katsumi SHIBATA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Environment Analysis, School of Human Science and Environment, University of Hyogo,  
Himeji 670-0092, Japan, <sup>2</sup>Clinical Laboratory, Byotai Seiri Laboratory, Itabashi, Tokyo 173-0025, Japan  
<sup>3</sup>School of Human Cultures, University of Shiga Prefecture, Hikone 522-8533, Japan  
<sup>4</sup>Laboratory of Nutritional Science, Meiji Milk Co., Ltd., Odawara 250-0862, Japan  
<sup>5</sup>Division of Human Nutrition, The Incorporated Administrative Agency of Health and Nutrition,  
Shinjuku, Tokyo 162-8636, Japan

To clarify the concentration of water-soluble vitamins in the mature milk of Japanese women who had delivered a healthy, full-term infant, the contents of biotin, pantothenic acid and niacin were measured in the present study. Milk samples were obtained from 25 healthy nursing women for 21 to 89 days and for 90 to 180 days of lactation in summer and winter, respectively. Total biotin and pantothenic acid were quantified microbiologically using *Lactobacillus plantarum*, and niacin was measured by HPLC. The biotin content in mature milk was 3.87 ng/ml on average, which was lower than those reported previously. The average content of pantothenic acid was 5.30 µg/ml, which was nearly double the value used to set the Adequate Intake in 6<sup>th</sup> revised National Reference Intake in Japan. On the other hand, the mean concentration of niacin was 2.22 µg/ml, which was not markedly different from the value in other studies. It is suggested that these values are of importance in the setting of an Estimated Average Requirement for these vitamins.

**Key Words:** Japanese women, mature milk, biotin, pantothenic acid, niacin

(Received January 30, 2004)

<sup>1</sup>〒670-0092 姫路市新在家本町1-1-12(平成16年4月に名称変更:旧姫路工業大学), <sup>2</sup>〒173-0025 東京都板橋区熊野町47-11, <sup>3</sup>〒522-8533 彦根市八坂町2,500, <sup>4</sup>〒250-0862 小田原市成田540, <sup>5</sup>〒162-8636 東京都新宿区戸山1-23-1

## 緒 言

わが国においては、平成11年(1999年)に第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準<sup>1)</sup>が策定された。この改定において、水溶性ビタミン6種類およびミネラル6種類の所要量がはじめて策定された。ピオチン、パントテン酸およびナイアシンの栄養所要量が算出された。栄養所要量の算出においては、これまでに報告されている多くの栄養疫学調査や出納試験の結果が基礎的なデータとして利用されている。さらに、乳幼児において水溶性ビタミンの栄養所要量を算出するためには、母乳中のビタミン含量が一つの指標として使用されている。

母乳にはタンパク質、炭水化物および脂肪ばかりでなくビタミンやミネラルなどの大部分の栄養素が含まれている。これらの栄養素は、消化、吸収の効率がよく、乳児にとってはバランスの取れた栄養源である。このため、一般に健康な母親の母乳で育てられている乳児には栄養欠乏症はほとんど見られない。これは、母乳には乳児の発育のために必要な栄養素が十分に含まれていることを示している。

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準において、乳児におけるピオチン、パントテン酸およびナイアシンの所要量策定は下記のとおりである<sup>1)</sup>。

母乳のピオチン量は、初乳ではわずかであるが、授乳に伴って徐々に増加し、成熟乳では血清のピオチン量よりも高い値を示している。これまでの各国における報告では、成熟乳のピオチン量は3.9~12.7 µg/lの範囲にあり、平均6 µg/lである<sup>2)</sup>。この値から乳児におけるピオチン摂取量を4.5 µg/日としている。

母乳に含まれるパントテン酸量を分析した報告は多数ある。Songら<sup>3)</sup>は、初乳に比べて成熟乳のパントテン酸量が高いことを示している。母乳のパントテン酸量は、1.4~6.7 mg/lとばらつきがあるが、英国では概ね2.2~2.7 mg/lの範囲にある。わが国の成熟乳のパントテン酸量は2.1~3.5 mg/lである<sup>4)</sup>。これらの値から母乳のパントテン酸量を2.4 mg/lとし、所要量を1.8 mg/日としている。

母乳のナイアシン含量は0.2 mg/100 g(0.21 mg/dl)、トリプトファンの含量は15 mgあるいは21 mg/100 g(15.5 mgあるいは22 mg/dl)と報告されている<sup>2)</sup>。乳児におけるトリプトファン-ナイアシン転換率の研究は見あたらない。実験動物のデータに基づき、乳児ではトリプト

ファンからナイアシンの供給はないものとして、乳児の所要量はナイアシン量として2 mgとしている。

このようにこれらのビタミンの所要量の策定においては、十分な検討がなされているとは云えない。とくに日本人を対象としたデータはほとんどなく、食生活が異なる欧米人でのデータを用いて、わが国の栄養所要量を策定している。そこで、著者らは、わが国の授乳婦から採取した母乳を利用して、水溶性ビタミン含量を分析した。今回はこれまでにまとまっているデータの一部を報告する。

## 実験方法

### 1. 被験者

1998年7月~9月(夏季)および1998年12月~1999年3月(冬季)に日本全国47都道府県で4,234検体の母乳が授乳中の母親から提供され、凍結保存された。このうち、授乳婦の条件として、喫煙習慣がないこと、ビタミン剤を服用していないこと、食べ物の好き嫌いがいいこと、母乳採取時の年齢が40歳未満、また、乳児の条件として、出生児体重が2,500 g以上、アレルギーの既往のないこと、を分析試料の条件とした。

対象者にはあらかじめ研究の趣旨を説明し、協力を依頼、口頭で同意を得た。研究の遂行にあたっては、すべてヘルシンキ宣言に従って行なった。

### 2. 母乳採取

母乳を、泌乳期別に泌乳1~5日、6~10日、11~20日、21~89日、90~179日、180~365日に分類した。これらの試料のうち泌乳21~89日と90~179日の母乳を測定対象とし、夏季および冬季の試料が同数となるように、また母乳量なるべく多いものを選定した。

選定された母乳試料は、泌乳21~89日(夏季)22検体、(冬季)21検体、泌乳90~179日(夏季)18検体、(冬季)17検体、総計78検体であった。なお、凍結保存した検体を分注する際には、解凍した後、超音波処理により均一化した。分注した検体は、それぞれのビタミン分析の直前まで凍結保存しておいた。

### 3. ピオチンの分析

採取したサンプルに1/15 Mリン酸緩衝液を加えたものを測定用試料とした。試料は4.5 N硫酸溶液で120°C 1時間加水分解し、4.5 N水酸化ナトリウム溶液で中和

した後に、ビオチン量を測定した。これを総ビオチン量とした。ビオチンの分析は、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 を用いた微生物定量法の一つである比濁法に従った<sup>5)6)</sup>。試料のビオチン量は、 $\mu\text{mol/l}$  および  $\text{ng/ml}$  として表した。

#### 4. パントテン酸の分析

##### 4-1. パパイン・ジアスターゼ法<sup>4)</sup>

母乳の調製方法：母乳 5 ml に蒸留水 45 ml を加えて 121°C、15 分間オートクレーブをかけ、冷却後、ジアスターゼ 0.1 g、パパイン 0.1 g、2.5 M 酢酸ナトリウム溶液 2 ml を加えて混和後、1N 塩酸で pH 4.5 に保持した。これを 100°C、10 分間加熱後、冷却し、10% メタリン酸溶液 0.3 ml を加えて、1N 水酸化ナトリウムで pH 6.8 に調製し、蒸留水で 100 ml とした後、ろ過(東洋濾紙, No.5C)した。この溶液 15 ml を蒸留水で 100 ml に調製し、試料溶液とした。定量は *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物定量法によった。

##### 4-2. アミダーゼ・ホスファターゼ法

母乳 100  $\mu\text{l}$  に 10 IU/ml のホスファターゼ(Alkaline from calf intestine, SIGMA P7923) 溶液(50 mM Tris-HCl, pH 8.3に溶解)を 50  $\mu\text{l}$ 、パントテン酸フリーアミダーゼ溶液 50  $\mu\text{l}$ 、15  $\mu\text{g/ml}$  還元型グルタチオン溶液(50 mM Tris-HCl, pH 8.3 に溶解)を 50  $\mu\text{l}$  加えた。この混合液を 37°C で 2 時間インキュベーションを行うことで、CoA、ホスホパンテテイン、パンテテインを遊離型のパントテン酸とした。反応を止めるために、2.25 ml の 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)を加え、さらに、100°C の熱湯中に、反応管を 5 分間放置した。氷中で 5 分間以上放置して、十分に冷却した後、10,000  $\times g$  で 5 分間遠心分離を行った。その結果得られた上清を適当に水にて希釈して、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を検定菌として、定量を行った。なお、用いたパントテン酸フリーアミダーゼ溶液は、ハト肝アセトンパウダー(Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376) 0.5 g を秤量後、10 倍量の 0.02 M  $\text{KHCO}_3$  を加え、氷冷下で、20 分間、回転子を用いて静かに回転しながら、抽出を行った。その後、10,000  $\times g$ 、5 分間の遠心分離を行い上清を得た。上清中に含まれるパントテン酸およびその誘導体を除去するために、3.2 g の活性化した Dowex 1(CL)を加え、5 分間氷冷下で、回転子を用いて静かに回転した。その後、10,000  $\times g$ 、5 分間の遠心分離を行い、パントテン酸フリーのアミダーゼ溶液を得た。

#### 5. ナイアシンの分析

採取したサンプル 150  $\mu\text{l}$  に 20  $\mu\text{g/ml}$  イソニコチンアミド溶液 1350  $\mu\text{l}$  を加え、オートクレーブにて 121°C、10 分間加熱した。遠心上清 1.2 ml に 70% 過塩素酸 70  $\mu\text{l}$  を加えてよく混合し、遠心上清 1 ml を測定用試料とした。測定用試料 1 ml に炭酸カリウムを 1.2 g 加えた後、ジエチルエーテル 10 ml で抽出し、乾固させた抽出物を水 0.5 ml に溶解させた。HPLC を用いてニコチンアミド量を測定し<sup>7)</sup>、総ニコチンアミド量をナイアシン量とした。

#### 6. 統計学的解析

母乳に含まれるそれぞれのビタミン量は、スチューデント t 検定およびノンパラメトリックのマン・ホイットニー U 検定を用いて、2 群間の比較を行った。確率が  $p < 0.05$  の場合、有意な差異があると判定した。統計学的解析は、すべて統計パッケージ StatView Ver.5.5 を用いて行った。

## 結 果

### 1. ビオチン

母乳に含まれるビオチンの分析結果をまとめたものが表 1 である。分析した 78 名の母乳のビオチン含量は、全体で平均すると  $3.87 \pm 1.31 \text{ ng/ml}$  ( $15.9 \pm 5.3 \text{ pmol/ml}$ ) であった。さらに母乳の採取時期で比較すると、授乳 21~89 日の成熟乳では  $4.09 \pm 1.53 \text{ ng/ml}$  ( $16.7 \pm 6.3 \text{ pmol/ml}$ ) であるのに対して、授乳 90~179 日の成熟乳では  $3.61 \pm 0.92 \text{ ng/ml}$  ( $14.8 \pm 3.8 \text{ pmol/ml}$ ) と低値ではあったが、有意な差異は認められなかった。また夏季と冬季で比較しても、母乳ビオチン含量に相違は見られなかった。

表 1. The content of total biotin in human milk.

分類	サンプル数	総ビオチン量	
		( $\text{pmol/ml}$ )	( $\text{ng/ml}$ )
全母乳	78	$15.9 \pm 5.3^a$	$3.87 \pm 1.31$
21-89日成熟乳	43	$16.7 \pm 6.3$	$4.09 \pm 1.53$
夏季採取	22	$16.1 \pm 5.0$	$3.94 \pm 1.22$
冬季採取	21	$17.4 \pm 7.4$	$4.25 \pm 1.81$
90-179日成熟乳	35	$14.8 \pm 3.8$	$3.61 \pm 0.92$
夏季採取	18	$13.9 \pm 3.9$	$3.39 \pm 0.94$
冬季採取	17	$15.7 \pm 3.5$	$3.84 \pm 0.86$

<sup>a</sup>mean  $\pm$  SD.

表2. The content of pantothenic acid in human milk.

分類	サンプル数	パントテン酸量 (nmol/ml)		
		総量	遊離型	補酵素型
全母乳	78	24.16±6.55 <sup>a</sup>	17.77±5.98	6.46±5.36
21-89日成熟乳	43	26.30±6.59	18.44±7.17	7.87±4.66
夏季採取	22	26.98±5.83	17.32±7.18	9.68±4.16
冬季採取	21	25.58±7.37	19.61±7.13	5.97±4.48
90-179日成熟乳	35	21.55±5.54 <sup>*</sup>	16.95±4.02	4.73±5.71
夏季採取	18	20.24±4.60	17.20±4.62	3.29±3.79
冬季採取	17	22.94±6.23	16.69±3.40	6.26±7.02

<sup>a</sup>mean±SD.<sup>\*</sup>p<0.05.

表3. The difference of total pantothenic acid content in human milk by the pre-treatment.

母乳		パントテン酸量		
		総量	遊離型	補酵素型
アミダーゼ・ホスファターゼ前処理法	nmol/ml	21.44±3.19 <sup>a*</sup>	17.34±1.37	3.19±4.10 <sup>*</sup>
	μg/ml	4.7±0.7 <sup>*</sup>	3.8±0.3	0.7±0.9 <sup>*</sup>
パパイン・ジアスターゼ前処理法	nmol/ml	16.42±1.82	15.97±1.82	0.46±0.91
	μg/ml	3.6±0.4	3.5±0.4	0.1±0.2

<sup>a</sup>mean±SD (n=7), <sup>\*</sup>p<0.05.

パパイン・ジアスターゼ前処理法：母乳1 mlに蒸留水9 mlを加えオートクレーブにて121℃, 15分間加熱後、冷却。ジアスターゼ(和光純薬(株))20 mg, パパイン(和光純薬(株))20 mg, 2.5 M 酢酸ナトリウム溶液を0.4 ml添加し攪拌した後、1 N 塩酸でpH 4.5に調整し37℃, 18時間保温。その後100℃湯浴中10分間加熱し、冷却後10%メタリン酸溶液60 μlを加え、1N水酸化ナトリウム溶液でpH 6.8に調整、蒸留水で20mlとする。濾過後、この溶液3 mlを蒸留水で20 mlとし、微生物定量法に供す。

## 2. パントテン酸

表2は母乳中に含まれるパントテン酸の分析結果をまとめたものである。分析した総パントテン酸含量は、全体で平均すると24.16±6.55 nmol/ml (5.30±1.44 μg/ml)であった。さらに、母乳の採取時期で比較すると、授乳21~28日の成熟乳では26.30±6.59 nmol/ml (5.76±1.44 μg/ml)であるのに対して、授乳90~179日の成熟乳では21.55±5.54 nmol/ml (4.72±1.21 μg/ml)と有意に低値を示した。一方、夏季と冬季における差異は、授乳期間に関わらず有意な差異は認められなかった。母乳中における遊離型と補酵素型の割合は表2に示したように、遊離型が約7割、補酵素型が約3割の比率で存在していた。

母乳中の総パントテン酸含量を測定するには、補酵素型を遊離型にする前処理が必要である。この方法に

関して、二通りの方法が報告されているので、この二つの前処理方法によって、同じ母乳中の総パントテン酸含量に差異が認められるか否かを検討した。その結果は、表3に示したように、パパイン・ジアスターゼ前処理法の場合の総パントテン酸含量は16.42±1.82 nmol/ml (3.6±0.4 μg/ml, n=7)であったのに対し、アミダーゼ・ホスファターゼ前処理法では21.44±3.19 nmol/ml (4.7±0.7 μg/ml, n=7)であり、アミダーゼ・ホスファターゼ前処理法の方が有意に高い値を示した。遊離型のパントテン酸含量は、表3に示した様に、両方法には差異は認められなかった。一方、母乳中に補酵素型として含まれていると推定されるパントテン酸量は表3に示したように、パパイン・ジアスターゼ前処理法が顕著に低い値を示した。

## 3. ナイアシン

表4に母乳中のナイアシン含量を測定した結果を示し

表4. The content of total nicotinamide (niacin) in human milk.

分類	サンプル数	ナイアシン濃度	
		(nmol/ml)	( $\mu\text{g/ml}$ )
全母乳	78	18.2 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	2.22 $\pm$ 0.65
21-89日成熟乳	43	19.1 $\pm$ 5.7	2.33 $\pm$ 0.70
夏季採取	22	20.5 $\pm$ 5.4	2.50 $\pm$ 0.66
冬季採取	21	17.6 $\pm$ 5.8	2.14 $\pm$ 0.71
90-179日成熟乳	35	17.2 $\pm$ 4.6	2.10 $\pm$ 0.57
夏季採取	18	18.4 $\pm$ 4.9	2.24 $\pm$ 0.59
冬季採取	17	15.9 $\pm$ 4.2	1.94 $\pm$ 0.51

<sup>a</sup>mean $\pm$ SD.

た。分析した78名の母乳中のナイアシン濃度の平均は18.2 $\pm$ 5.3 nmol/ml (2.22 $\pm$ 0.65  $\mu\text{g/ml}$ )であった。授乳21~89日の成熟乳では19.1 $\pm$ 5.7 nmol/ml (2.33 $\pm$ 0.70  $\mu\text{g/ml}$ )、授乳90~179日の成熟乳では17.2 $\pm$ 4.6 nmol/ml (2.10 $\pm$ 0.57  $\mu\text{g/ml}$ )であり、母乳の採取時期による相違は認められなかった。また、夏季と冬季で比較しても、母乳中のナイアシン含量に相違は認められなかった。

## 考 察

### 1. バイオチン

これまでに報告された本邦および欧米の母乳バイオチ

ン含量をまとめたものが表5である。Heardら<sup>8)</sup>は、母乳バイオチンの99%以上のバイオチンがタンパク質とは結合せずに、乳児に利用され易い状態で存在していることを示唆し、HoodとJohnson<sup>9)</sup>は、初乳に比べ成熟乳ではバイオチン濃度が高いことを示した。

バイオチンの定量法は一般的に乳酸菌による微生物定量法が使用されている。この方法によるGoldsmithら<sup>10)</sup>の報告では初乳期、移行期、成熟期にかけて平均0.07から0.47  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ へと増加している。Fordら<sup>11)</sup>の報告でも、満期産(39週以降)の母乳で0.21から0.533  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ と泌乳時期に伴って増加している。なお早期産(29~34週)の母乳でもバイオチン濃度にも大きな違いは見られていない。さらに出産後10日から6ヶ月の間に得た成熟乳でも、バイオチン含量は0.87 $\pm$ 0.42  $\mu\text{g}/100\text{g}$ であった<sup>12)</sup>。

Hiranoら<sup>13)</sup>は、日本人授乳婦を対象にして、微生物定量法の1つであるプレート法<sup>14)</sup>で母乳バイオチン量を分析している。これまでの結果と同様に、泌乳時期に従ってバイオチン量が増加し、35名の成熟乳では平均0.52 $\pm$ 0.21  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ と欧米の報告と比べて差異は認められない。なお、遊離型バイオチンの割合が、初乳、移行乳および成熟乳でそれぞれ53.9, 64.0, 77.2%と増加しているが、これはHeardら<sup>8)</sup>の結果とは異なり、今後の検討が必要である。

バイオチン定量のための前処理には一般的に酸加水分

表5. List of the biotin content in human milk.

文献	母乳バイオチン量( $\mu\text{g}$ )	授乳期	授乳日数	分析法
Hood and Johnson, '80	0.295/100ml 1.246	初乳 成熟乳	1日 49日	同位体希釈法
Goldsmith <i>et al.</i> , '82	0.07/100g 0.3 0.47	早期移行乳 移行乳 成熟乳	3-8日 10-14日 30-47日	微生物学的定量法(比濁法)
Ford <i>et al.</i> , '83	0.021/100ml 0.22 0.533	初乳 移行乳 成熟乳	1-5日 6-15日 1-244日	微生物学的定量法(比濁法)
Friend <i>et al.</i> , '83	0.87/100g	成熟乳	10日-6ヶ月	微生物学的定量法(比濁法)
Heard <i>et al.</i> , '87	2.03/100ml	蓄積母乳		放射化学的定量法
Salmenpera <i>et al.</i> , '85	n.d./100ml 0.45 (n.d.-2.7) nd-1.8 0.18-1.0	出産後 授乳 授乳 授乳	<5日 2ヶ月 6ヶ月 9ヶ月	微生物学的定量法(比濁法)
Hirano <i>et al.</i> , '92	0.08/100ml 0.18 0.52	初乳 移行乳 成熟乳	<5日 6-14日 15-24日	微生物学的定量法(プレート法)
Present study '04	0.41/100ml 0.36	成熟乳 成熟乳	21-89日 90-179日	微生物学的定量法(比濁法)

解法が行われているが, パパイン処理を用いた Salmenpera ら<sup>15)</sup>の報告では, 母乳では出産後5日間ではほとんどの授乳婦でビオチンは認められなかった。しかし, 出産2ヵ月後ではビオチン量は  $0.45 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  に増加し, その後の変化は見られず一定である。

以上のように, これまでの報告では, 初乳のビオチン濃度は多くの場合  $0.1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  以下である。しかし, 移行乳から成熟乳へと増加し, 成熟乳での総ビオチン含量は平均で約  $0.5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  であり, 初乳に比べて成熟乳で高値を示している。また, 人種差は認められず食生活による影響はあまりないものと考えられる。

今回測定した母乳ビオチン含量については, 平均  $0.39 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  であった。採取時期や季節によって大きな差異は認められなかった。しかしながら, これまでに報告されている成熟乳のビオチン含有量と比べ低値であった。この相違については明らかではない。なお, 血清中のビオチン濃度は季節によって変動することが報告されているが, 母乳では季節変動はみられず, 夏季と冬季での摂取している食事には影響されないことが示唆される。

ビオチンは, 第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—において, 栄養所要量がはじめて策定された<sup>1)</sup>。0~5ヶ月の乳児で,  $5 \mu\text{g}/\text{日}$ , 6~11ヶ月の乳児で  $6 \mu\text{g}/\text{日}$  とされた。しかしながら, 平成12年(2002年)に改訂された五訂日本食品標準成分表にもビオチンは記載されていない。また平成15年(2003年)に食品添加物として認可されたが, 使用が保健機能食品に限られ, 食品や調製粉乳への添加はいまだに許可されていない。

わが国の調製粉乳に含まれる総ビオチン量は, 一般調整粉乳, いわゆる育児用およびフォローアップ粉ミルクでは平均  $1.04 \mu\text{g}/100 \text{ kcal}$  であり, 治療用特殊ミルクでは平均  $0.40 \mu\text{g}/100 \text{ kcal}$  である<sup>16)</sup>。これは, 分析数は少ないが, 米国の粉ミルクのビオチン含量  $2.3 \mu\text{g}/100 \text{ kcal}$ , 米国小児科学会(AAP)およびFAO/WHOの推奨値  $1.5 \mu\text{g}/100 \text{ kcal}$  に比較して低値である<sup>17)18)</sup>。

わが国における人工栄養児のビオチン摂取量は, 推定では1日に750 mlの粉ミルクを摂取した場合に, 一般調整粉乳では平均  $5.2 \mu\text{g}/\text{日}$  (最少  $2.3 \mu\text{g}/\text{日}$ ) である。一方, 治療用特殊ミルクの場合には, 平均  $2.3 \mu\text{g}/\text{日}$  (最少  $0.2 \mu\text{g}/\text{日}$ ) である<sup>16)</sup>。治療用特殊ミルク摂取によるビオチン欠乏症例のビオチン摂取量は  $0.75 \mu\text{g}$  および  $0.4 \mu\text{g}/\text{日}$  と, わが国の乳児の所要量と比べ著しく低値であった<sup>19)22)</sup>。

このためビオチン含量が少ない調製粉乳, とくに治

療用特殊ミルクを与えられている乳児で, ビオチン欠乏症の誘発が報告されている。今後, 乳幼児において, とくに食事管理が必要とされている患者のビオチン摂取量について注意が必要であろう。

## 2. パントテン酸

母乳のパントテン酸含量は, 第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—では, 井戸田ら<sup>4)</sup>の日本人の母乳中のデータを採用し,  $0.24 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  としている<sup>1)</sup>。一方, 五訂日本食品標準成分表では, この表を編集した科学技術庁資源調査会独自のデータから  $0.5 \text{ mg}/100 \text{ g}$  の値が採用されている。この両者の値の違いは, 母乳中の総パントテン酸を測定するために行う前処理方法の違いに起因しているものと思われる。井戸田ら<sup>4)</sup>は, 母乳をパパイン・ジアスターゼ前処理法で行っている。一方, 五訂日本食品標準成分表に示されている数値の前処理方法は, 本論文で示した方法のアミダーゼ・ホスファターゼ法である。

そこで, 補酵素型パントテン酸処理方法の違いによる母乳中パントテン酸含量測定値への影響を調べるため, ハト肝臓由来アミダーゼ・牛小腸ホスファターゼ法とパパイン・ジアスターゼ法を行った。その結果は表3に示した通りであるが, アミダーゼ・ホスファターゼ法の結果がパパイン・ジアスターゼ法より高い値を示した。表3に示したように, パパイン・ジアスターゼによる前処理法は, 母乳中の補酵素型パントテン酸に対しては, 有効な方法ではないことが明らかとなった。したがって, 日本人の母乳中の総パントテン酸含量としては, 著者らが表3に示した値と五訂日本食品標準成分表の値から,  $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  が妥当であると判断した。

事実, Johnson ら<sup>23)</sup>も, 著者らが用いている方法と同じ方法で測定した結果,  $6.70 \mu\text{g}/\text{ml}$  という値を報告している。一方, パパイン・ジアスターゼ法で測定した Picciano<sup>24)</sup>は,  $2.2\sim 2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  という値を報告している。

著者らの結果では, 21~89日に得られた人乳と90~179日に得られた人乳の間で有意な差異が認められたが, 彼らの報告では差異は報告されていない。井戸田ら<sup>4)</sup>の報告では, 分娩後3~30日乳では  $36 \mu\text{g}/\text{ml}$  程度, 31~240日乳では  $28 \mu\text{g}/\text{ml}$  程度であり, 差異が認められている。これが, 日本人と米国人による差異か, 食生活による差異かは今後機会があれば明らかにしたい。なお, Song ら<sup>3)</sup>は, 早産の授乳婦の総パントテン酸含量は, 満期出産の授乳婦よりも高い値を示したと報告して



いる。しかしながら、早期出産あるいは満期出産においても、初期乳と成熟乳との間に、総パントテン酸含量に差異は認められなかったと報告している。

わが国の調製粉乳に含まれる総パントテン酸量は、某社の資料によれば<sup>25)</sup>、一般調製粉乳で、製品100g当たり2000 $\mu$ g(400 $\mu$ g/100kcal、あるいは14%調乳液100ml当たり280 $\mu$ g)である。この人工乳を1日750ml与えると、2.1mg/日のパントテン酸が摂取できることになる。この値は、第六次改定日本人の栄養所要量の値(1.8mg/日)にほぼ相当する。しかしながら、もし、第七次改定で、5.0 $\mu$ g/mlという値が採用されれば、乳児(0~5ヶ月)のパントテン酸所要量は3.5mg/日程度の値となると推定される。そのようになれば、調製粉乳中のパントテン酸含量は増加させる必要がある。しかしながら、従来の調製粉乳を飲んで人工栄養児で、パントテン酸欠乏が生じたという報告は見あたらない。これは、エネルギー代謝、特に脂肪酸代謝に必須であるパントテン酸が欠乏しないように、内的にも外的にも守られる防御調節機構があることに起因しているものと思われる。つまり、パントテン酸が長期間欠乏しても、血中パントテン酸レベルは変化せず、腸内細菌が寄与している可能性がある。事実、成人では、パントテン酸をほとんど含まない食事を9週間連続投与しても、欠乏症状が認められなかったことが報告されている<sup>26)</sup>。

結論として、日本人の母乳中の総パントテン酸含量の値としては、5.0 $\mu$ g/mlが妥当である。

### 3. ナイアシン

表6は、これまでに報告されている母乳中のナイア

シン含量についてまとめたものである。Fordら<sup>11)</sup>は、イギリス人授乳婦18~24名を対象として、微生物定量法により母乳ナイアシン含量を分析した。分娩後の母乳ナイアシン含量の平均値は、分娩後1~5日では0.50 $\mu$ g/ml、6~15日では1.42 $\mu$ g/ml、16~244日では1.82 $\mu$ g/mlと増加が見られた。

井戸田ら<sup>4)</sup>は、日本人授乳婦を対象として、HPLC法により母乳ナイアシン含量を調べている。母乳ナイアシン含量の平均値は、授乳3~5日で0.7 $\mu$ g/ml、授乳6~10日で1.2 $\mu$ g/ml、授乳11~15日で2.4 $\mu$ g/ml、31~60日で2.3 $\mu$ g/ml、61~120日で1.9 $\mu$ g/ml、121~240日で1.8 $\mu$ g/mlであった。Fordら<sup>11)</sup>の報告と同様に、母乳ナイアシン含量は初乳から移行乳、成乳へと増加し、成乳では一定のレベルを保つことを示している。

一般に食品中のナイアシン含量を測定する場合は、酸性溶液中で試料をオートクレーブ処理し、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014を用いた微生物定量法に供する。穀類にはタンパク質や糖質と結合した結合型ナイアシンが多く存在しており、微生物が利用できるような結合型ナイアシンを遊離型のニコチン酸にするための操作である。ヒトでは摂取したニコチン酸は、補酵素型であるNADを介して、すぐにニコチンアミドに転換され、またヒトはニコチン酸→ニコチンアミド反応がきわめて弱いため、母乳中のナイアシンはニコチンアミドあるいはNAD、NADPとして存在する。微生物定量法を用いたFordら<sup>11)</sup>の報告とHPLC法を用いた井戸田ら<sup>4)</sup>の報告とを比較すると、測定法の違いによる差異は認められない。本研究では、オートクレーブ処理によりNADおよびNADPをニコチンアミドに分解し、HPLCを用いてニコチンアミド量を測定し、総ニコチン

表6. List of the niacin content in human milk.

文献	母乳ナイアシン量 ( $\mu$ g/ml)	授乳期	授乳日数	分析法
Ford et al, '83	0.50	初乳	1-5日	微生物学的定量法
	1.42	移行乳	6-15日	
	1.82	成熟乳	1-244日	
Idota et al, '96	0.70	初乳	3-5日	HPLC法
	1.2	移行乳	6-10日	
	2.4	移行乳	11-15日	
	2.6	成熟乳	16-30日	
	2.3	成熟乳	31-60日	
	1.9	成熟乳	61-120日	
	1.8	成熟乳	121-240日	
	1.7	成熟乳	241-482日	
Present study '04	2.33	成熟乳	21-89日	HPLC法
	2.10	成熟乳	90-179日	

アミドをナイアシン量とした。

今回測定した母乳ナイアシン含量は平均2.22 µg/mlであり, 日本人を対象とした2.3 µg/ml<sup>4)</sup>, イギリス人を対象とした1.82 µg/ml<sup>11)</sup>とほぼ同値であった。分娩後21~89日では2.33 µg/ml, 90~179日では2.10 µg/mlであり, 採取時期による変動は認められなかった。また, 季節変動も認められなかった。食事が母乳ナイアシン含量におよぼす影響については不明であるが, 母乳ナイアシン含量は生活習慣や季節に関係なく一定値を示すことが示唆される。本研究では, オートクレープ処理を行わずにニコチンアミド含量を測定することにより母乳中の遊離ニコチンアミド量を測定したところ, その値は総ニコチンアミド量の約20%を示した(柴田ら, 未発表)。この結果は, 母乳中のナイアシンは主に補酵素型であるNADあるいはNADPとして存在することを示唆するものである。成人では食品中のNADあるいはNADPは消化時にニコチンアミドに分解され, ニコチンアミドが小腸で受動拡散によって吸収される。しかし, 乳児におけるNADあるいはNADPの消化吸収に関する報告は見当たらず, 乳児が母乳中のNADあるいはNADPをどの程度利用しているのかは不明である。

第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—<sup>1)</sup>では, 四訂日本食品標準成分表<sup>27)</sup>に記載された2.1 µg/ml (0.2 mg/100 g)を母乳ナイアシン含量として採用している。0~5カ月の乳児ではトリプトファンからナイアシンの供給はないため, 0~5カ月の乳児の所要量は, 母乳量750 mlとして, 2 mgとなる。米国・カナダでは, Fordら<sup>11)</sup>の報告に基づいて1.8 µg/mlを採用し, トリプトファンからナイアシンの供給はなく, 母乳量780 mlとして, 0~6カ月の乳児の所要量を2 mgとしている<sup>2)</sup>。

わが国の調製粉乳に含まれるナイアシン量は, 一般調製粉乳, いわゆる育児用およびフォローアップ粉ミルクでは4.6~8.4 µg/mlである。わが国における人工栄養児のナイアシン摂取量を推定すると, 1日に750 mlを摂取した場合, 3.4~6.3 mg/日となる。この値は日本および米国・カナダの所要量を上回るものである。この量の調製粉乳を摂取した人工栄養児にナイアシン欠乏症が見られたという報告はない。

## 要 約

わが国における母乳の水溶性ビタミン含量を明らかにするために, 健常授乳婦人から得た母乳のピオチ

ン, パントテン酸およびナイアシンの含量を分析した。母乳の採取は, 授乳後21~89日間および90~180日間で夏季と冬季に採取した。ピオチンおよびパントテン酸は乳酸菌を利用した微生物定量法で測定し, ナイアシンは, HPLC法で測定した。母乳のピオチン含量は平均3.87 µg/mlとこれまでに報告されている値と比較して低値を示した。パントテン酸の含量は平均5.30 µg/mlであり, この値は第六次改定で採用された値の約2倍の値であった。一方, ナイアシンの含量は, 2.22 µg/mlとこれまでの値と比較して, 特に差異は観察されなかった。これらの値は, 今後これらのビタミンの栄養所要量を策定するための基礎的なデータとして重要である。

## 謝 辞

本研究は平成13年度から15年度の厚生労働科学研究費補助金(研究課題名: 日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究)を受けて行ったものである。関係各位に謝意を表する。

(平成16.1.30 受付)

## 文 献

- 1) 厚生省(1999)第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—平成11年6月
- 2) Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic acid, Biotin, and Choline. *National Academy Press*, Washington DC
- 3) Song WO, Chan GM, Wyse BW, Hansen RG (1984) Effect of pantothenic acid status on the content of the vitamin in human milk. *Am J Clin Nutr* 40, 317-324
- 4) 井戸田 正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則文, 前田忠雄(1996)最近の日本人乳組成に関する全国調査(第10報)—水溶性ビタミン含量について—。日本小児栄養消化病学会雑誌 10, 11-20
- 5) Wright LD, Skeggs HR (1944) Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* 56, 95-98
- 6) Baker H, Sobota H (1962) Microbiological assay methods for vitamins. *Ad Clin Chem* 5, 173-235
- 7) Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 424, 23-28
- 8) Heard GS, Redmond JB, Wolf B (1987) Distribution and bioavailability of biotin in human milk. *Fed Proc* 46, 897 (Abstract)
- 9) Hood RL, Johnson AR (1980) Supplementation of infant formulations with biotin. *Nutr Rep Internat* 21, 727-731
- 10) Goldsmith SJ, Eitenmiller RR, Feeley RM, Barnhart HM,

- Maddox FC (1982) Biotin content of human milk during early lactational stages. *Nutr Res* 2, 579-583
- 11) Ford JE, Zechalko A, Murphy J, Brooke OG (1983) Comparison of the B vitamin composition of milk from mothers of preterm and term babies. *Arch Dis Child* 58, 367-372
  - 12) Friend BA, Shahani KM, Long CA, Vaughn LA (1983) The effect of processing and storage on key enzymes, B vitamins, and lipids of mature human milk I. Evaluation of fresh samples and effects of freezing and frozen storage. *Pediatr Res* 17, 61-64
  - 13) Hirano M, Honma K, Daimatsu T, Hayakawa K, Oizumi J, Zaima K, Kanke Y (1992) Longitudinal variations of biotin content in human milk. *Internat J Vit Nutr Res* 62, 281-282
  - 14) Fukui T, Inuma K, Oizumi J, Izumi Y (1994) Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* 40, 491-498
  - 15) Salmenpera L, Perheentupa J, Pispala JP, Siimes MA (1985) Biotin concentrations in maternal plasma and milk during prolonged lactation. *Internat J Vit Nutr Res* 55, 281-285
  - 16) 渡辺敏明, 櫻田京子, 安井顕一, 若林一郎, 渡辺孝男, 辻一郎, 久道 茂 (1999) 地域住民における B 群ビタミンの栄養状態に関する検討. *東北公衆衛生* 48, 23(抄録)
  - 17) Watanabe T, Fukui T (1988) Low biotin content of infant formulas made in Japan. *Food Add Contam* 15, 619-625
  - 18) American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition (1976) Commentary on breast-feeding and infant formulas, including proposed standards for formulas. *Pediatr* 57, 278-285
  - 19) Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission (1994) Codex standard for infant formula. *CODEX STAN 72-1981* (amended 1983, 1985, 1987) 4, 17-24
  - 20) 樋口隆造, 水越真理, 小山佳紀, 重里敏子, 西本幸弘, 中西直之, 小池通夫 (1996) アミノ酸調製粉末によるビオチン欠乏症の2例. *日本小児科学会雑誌* 100, 1908-1912
  - 21) 高野裕子, 梅林典子, 廣瀬伸一, 渡辺敏明, 吉田一郎, 満留昭久 (1998) 特殊調製乳(S22)による栄養中にビオチン欠乏症を呈したメチルマロン酸血症の乳児例. *日本先天代謝異常学会* 14, 218 (抄録)
  - 22) 阿部博紀, 金沢正樹, 大竹 明, 新美仁男, 佐藤好範, 山本重則, 柿沼宏明, 山口昭弘, 福士 勝 (1991) アミノ酸調製粉末(605Z)によると思われるビオチン欠乏症の1例. *日本先天代謝異常学会* 7, 172 (抄録)
  - 23) Johnson L, Vaughan L, Fox HM (1981) Pantothenic acid content of human milk. *Am J Clin Nutr* 34, 2205-2209
  - 24) Picciano MF (1995) Vitamins in milk. Water-soluble vitamins in human milk. *Handbook of Milk Composition*, Academic Press
  - 25) ソフトカード明治コナミルク「ほほえみ」の組成
  - 26) Fry PC, Fox HM, Tao HG (1976) Metabolic response to a pantothenic acid deficiency diet in humans. *J Nutr Sci Vitaminol* 22, 339-346
  - 27) 科学技術庁資源調査会 (1989) 四訂日本食品標準成分表, 15版. 平成元年

## 各論

### 5) 水溶性ビタミン

Keyword: 食事摂取基準、水溶性ビタミン、2005年

柴田克己 Katsumi SHIBATA

◆滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻

水溶性ビタミンには、B群ビタミン(8種類: ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビオチン)とビタミンCが含まれる。平成12年度~16年度で使用されている第六次改定において、はじめて9種類すべての水溶性ビタミンの食事摂取基準が策定された。今回の改定においても、9種類すべての水溶性ビタミンの食事摂取基準を策定した。ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ナイアシン、葉酸、ビタミンCは推定平均必要量で設定した。パントテン酸とビオチンは目安量で設定した。上限量が設定できたものは、ビタミンB6、ナイアシン、葉酸の3種類であった。

#### はじめに

水溶性ビタミンとは、名のごとく、水に溶けるビタミンである。これに対して、油脂に溶けるビタミンを脂溶性ビタミンという。水溶性ビタミンとして分類されているものは、9種類でB群ビタミンと称されている8種類のビタミン(ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビオチン)とビタミンCである。脂溶性ビタミンは4種類で、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンKである。水溶性ビタミンには、歴史的に、ヒトにおいて明確かつ特徴的な欠乏症の報告があるものと(ビタミンB1=脚気、ビタミンB12=悪性貧血、ナイアシン=ペラグラ、葉酸=貧血、ビタミンC=壊血病)と特徴的ではないが欠乏症が報告されているもの(ビタミンB2=口角炎・舌炎、ビタミンB6=けいれん、パントテン酸=四肢の末端の灼熱感、ビオチン=皮膚炎)に分けられる。

#### 食品中のビタミンの生体利用率を考慮して策定すべきである

9種類の水溶性ビタミンの中でビタミンCを除く8種類のB群ビタミンは、食品中ではほとんどが結合型ビタミン、すなわち、たんぱく質と結合した状態で存在している。特に、植物性食品では、糖質などと結合した状態でも存在する。つまり、食品中のB群ビタミンは吸収される前に遊離型の状態にまで消化されるという過程が必要であり、遊離型のビタミン(サプリメントもしくはビタミン剤)を摂取した時と結合型のビタミンがほとんどである食事由来の時とは、生体利用率が異なる。したがって、食事摂取基準を策定するには、まず遊離型のビタミンの必要量を設定し、この数値に食品由来のビタミンの生体利用率を考慮して策定すべきである。

今回の改定では、食品由来のビタミンB6は75%、食品由来のビタミンB12は50%、食品由来の葉酸

\*How to determine the Dietary Reference Intakes in Japanese.:Water-soluble vitamins

は50%という生体利用率を適用した。しかしながら、これらの生体利用率の値は、日本人を被検者としたものではなく、しかも日本人が日常的に食するものでもない。

食品由来のビタミンB1、食品由来のビタミンB2、食品由来のナイアシンは生体利用率が明らかでないので適用しなかった。

日本人を被検者した典型的な日本食を食べさせたときの生体利用率を求める実験が必要である。なお、パントテン酸とビオチンは目安量として設定したので、生体利用率の考慮は対象外となる。

## 乳児（0～5ヶ月）の食事摂取基準の考え方

乳児（0～5カ月）は、母乳を適量摂取している限り、健常に発育する。この考え方にしたがって策定する方法が最も妥当である。したがって、この時期の食事摂取基準は母乳中のビタミン含量と哺乳量からAI値として求めることができる。今回の改定においては、この考え方に従って策定した。

## 乳児（6～11ヶ月）の食事摂取基準の考え方

「乳児（6～11ヶ月（月）」は、母乳と離乳食の二つの食品形態から栄養素を摂取している。健常に成長している乳児が摂取する母乳量と母乳中のビタミン含量および離乳食から得られビタミン量を調査・実測する方法が、現実的かつ妥当な策定方法であると考えられる。

今回の改定では、①ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ナイアシン、葉酸、ビタミンCの数値は、乳児（0～（月））の目安量に体表面積比、{(6～（月））の体位基準値の体重/0～（月）の体位基準値の体重}<sup>0.75</sup>をかけた数値（0～（月）の値から外挿した値という）と成人（18～29歳）の推奨量に、{(6～（月））の体位基準値の体重/成人（18～29歳）の体位基準値の体

重}<sup>0.75</sup>×1.3} をかけた数値（成人の値から外挿した値という）の二つの値の平均値とした。②パントテン酸とビオチンの数値は、乳児（0～（月））のAI値に体表面積比、{(6～（月））の体位基準値の体重/0～（月）の体位基準値の体重}<sup>0.75</sup>をかけた数値から計算した。

## 1～69歳の食事摂取基準の考え方

精度の高い推奨量を設定するには、被検者に種々の量のビタミンを含む食事を投与し続け、欠乏症状が現れた量と現れなかった量を求める実験をすべきであるが、倫理上この種の実験をおこなうことはもはやできない。そこで、過去に行われた介入試験から、推奨量を推定せざるを得ない。この考え方で食事摂取基準の策定を行う限り、何度改定作業をおこなっても、基本的に数値が変わることはない。

欠乏という臨床指標に替わる水溶性ビタミンの栄養状態の指標を探ることが必要である。ヒトにおいて得られる試料は血液と尿のみである。平成13年度～15年で採択された厚生労働科学研究費補助金（研究課題名：日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究）を受けて行った成果から、健常者では血液中の水溶性ビタミン値は摂取量によって変動せず、尿中に排泄される水溶性ビタミン量が、摂取した水溶性ビタミン量をよく反映することが明らかとなった。健常に暮らしている限り、血液中の水溶性ビタミン含量が変動しないのは、体内の恒常性の維持が健康であるという考え方からすれば当然のことである。

理想的な水溶性ビタミン摂取量は体内が丁度飽和された量であろう。この丁度飽和された量の摂取時までは、おそらく尿中に排泄されるビタミン量は、少量の、一定の不可避量程度であると考えられる。尿中に排泄される水溶性ビタミン量は余剰摂取量を意味する。したがって、水溶性ビタミンの必要量を定めるには、尿中に排泄されるビタミン量が急激に増大する摂取量を求めれば良いと考えられる。

一方において、尿中のビタミン量を測定するのではなく、期待されるビタミンの機能が、体内で正常に発揮されているか否かを判断する指標を決め、その機能を示す代謝産物の量から、水溶性ビタミンの必要量を決定するという方法も考えられる。たとえば、ビタミンB12とメチルマロン酸、ビオチンと3-ヒドロキシイソ吉草酸、葉酸とホモシステインである。

必要量の少ないビタミンは生体代謝に関わる酵素数が少ないため、比較的明確な代謝障害が認められるが、必要量の多いビタミンでは、様々な代謝が攪乱されるため、明確な代謝障害が現れない。たとえば、ナイアシンは生体内酵素の20%程度の補酵素として機能しているため、明確な代謝障害は現れない。従って、現時点では、尿中に排泄されるビタミン量と摂取したビタミン量との関係から、体内飽和点を求める方法が妥当であると考えられる。この方法によって食事摂取基準の値が策定されたのは、ビタミンB1とビタミンB2のみであった。

さらに、食事摂取基準は男女別でかつ年齢区分ごと(1~2(歳)、3~5、6~7、8~9、10~11、12~14、15~17、18~29、30~49、50~69、70以上)に定められるので、各年齢区分の被検者と使用した実験を行わなければならない。しかし、被検者は18歳以上69歳未満の成人のみが被検者として利用されたデータがほとんどである。データの少ない年齢区分へは、①ビタミンB1、ビタミンB2、ナイアシンはエネルギーの摂取基準の値の比較から数値を策定した、②ビタミンB6は、たんぱく質の推奨量との比較から策定した、③ビタミンB12、葉酸、ビタミンCは、体表面積値の比較を示す式、 $\{(\text{対象年齢区分の体位基準値の体重}/18\sim29\text{歳の体位基準値の体重})^{0.75} \times (1+\text{成長因子})\}$ から策定したが、このような外挿方法が妥当名否かの検討が必要である。

パントテン酸とビオチンについては、今回の改定でも、「1歳以上」も目安量として設定せざるを得なかった。「1歳以上」の推定平均必要量を設定できるに足る十分なデータが未だ得られないため

である。通常の食生活をしている人では、欠乏症は認められていない。したがって、各年齢区分の値は、食事調査結果を基にして策定した。報告のない年齢区分の値は、体表面積値の比較を示す式、 $\{(\text{対象年齢区分の体位基準値の体重}/18\sim29\text{歳の体位基準値の体重})^{0.75} \times (1+\text{成長因子})\}$ から策定した。パントテン酸とビオチンの機能を示す生体指標の検索が必要であるとともに、これらのビタミンの異化代謝経路の解明も必要である。

生体が平時に比べて、有事(ルーティンワーク以上の仕事を続けた時、あるいは疾病時など)には代謝が亢進されるため、補酵素として機能している水溶性ビタミンの要求量は増大するものと思われる。たとえば、高熱を発すると、摂取量が同じでも、尿中に排泄されるビタミンB1排泄量が顕著に低下する。これは、高熱時にビタミンB1の要求量が高まったことを意味する。したがって、有事における水溶性ビタミンの必要量を定めることも必要である。このようなことを明らかにしていけば、代謝性疾患である生活習慣病の一次予防となるビタミン必要量を明らかにすることができるものとする。

以下に各水溶性ビタミンの必要量の求め方の概要をまとめた。

### 1. ビタミンB1

ビタミンB1は、エネルギー代謝に関与するビタミンであり、遊離型チアミンを負荷した実験などから、体内プールが飽和すると急激に尿中に排泄されるチアミン量が増大することから求めた。

### 2. ビタミンB2

ビタミンB2は、エネルギー代謝に関与するビタミンであり、遊離型のリボフラビンを負荷した実験などから、体内のプールが飽和すると急激に尿中に排泄されるリボフラビン量が増大することから求めた。

### 3. ビタミンB6

血漿中に存在するビタミンB6補酵素であるPLPは、体内組織のビタミンB6貯蔵量を良く反映する。血漿PLP濃度を30nmol/Lに維持できるビタミンB6摂取量を基準とした。一方において、ビ

タミンB6の必要量は、たんぱく質摂取量が増加すると増し、血漿PLP濃度は、たんぱく質当たりのビタミンB6摂取量と良く相関することが知られている。この解析値から、血漿PLPを30nmol/Lに維持できるビタミンB6量をたんぱく質当たりで算出した。

#### 4. ビタミンB12

ビタミンB12の必要量は、「適正な血液学的状態（正常なヘモグロビン値、正常な平均赤血球容積、正常な網状赤血球反応）と血清ビタミンB12状態（150 pmol/L以上）を維持するために必要なビタミンB12量を決定する方法」で算出した。

#### 5. ナイアシン

ペラグラ発症の指標となるN<sup>o</sup>-メチルニコチンアミド尿中排泄量を指標として必要量を求めた。

#### 6. パントテン酸

パントテン酸欠乏症を実験的に再現できないため推定平均必要量を設定できない。そこで、食事調査の値を用いて、目安量を算出した。

#### 7. 葉酸

葉酸は、一炭素代謝系に関与するビタミンであり、摂取量が減少すると、血清および赤血球中の葉酸が減少するとともに血清にホモシステインの蓄積がみられる。ホモシステインの蓄積は動脈硬化症の引き金となる。これらを基準値内（血清葉酸、7nmol/L以上；赤血球葉酸、300nmol/L以上；血清ホモシステイン、14 μmol/L未満）に維持できる食事の葉酸の摂取量から、必要量を求めた。

#### 8. ビオチン

推定平均必要量を設定するに足る実験データはない。そこで、食事摂取量から求めた。

#### 9. ビタミンC

抗酸化、心臓血管系の疾病予防が期待できる血漿ビタミンC濃度（約50 μmol/L以上）を維持する摂取量から求めた。

## 高齢者の食事摂取基準の考え方

70歳以上の高齢者の食事摂取基準を策定する上

で、考慮すべき主要な点は①消費エネルギー量の低下にともなう食事量の減少、②消化・吸収力の低下、③代謝能力の低下である。しかしながら、実際に食品由来の水溶性ビタミンの生体利用率が、高齢者においてどの程度低下しているのか、加齢に伴う代謝能力の低下に補酵素作用を有する水溶性ビタミンの補給がどの程度有効であるかに関するデータをみつけることはできなかった。高齢者を被検者とした介入試験は実際上不可能である。食事調査と尿中への水溶性ビタミン排泄量との関係を調べる実験が必要である。

## 妊婦の付加量の考え方

各ビタミンの付加量は、胎児の生育にともなう蓄積量と胎児の必要量の含量を基本に策定すべきである。しかし、この種のデータはほとんどなく、今回の改定では以下に示すごとく、統一的な考え方で策定できなかった。

#### 1. ビタミンB1

エネルギー付加量を基にした。

#### 2. ビタミンB2

エネルギー付加量を基にした。

#### 3. ビタミンB6

妊婦時の血漿PLP濃度の低下については妊婦特有の生理状態によって生じるものと考えられているが、妊娠末期においても、血漿中のPLP濃度を30nmol/Lに維持する必要があると考え、この濃度を維持するための量を付加量とした。

#### 4. ビタミンB12

胎児へのビタミンB12蓄積量から求めた。

#### 5. ナイアシン

エネルギー付加量を基にした。

#### 6. パントテン酸

非妊婦との食事調査報告の比較から妊婦への付加量を求めた。

#### 7. 葉酸

妊娠中に発生した大球性貧血は妊娠が終わると自然に治ってしまうことおよび妊娠中に葉酸の異化代謝の尿中排泄量が顕著に増大することから、

妊娠は葉酸の必要量を顕著に増大させることは明らかである。通常の適正な食事摂取時に100 μg/日のプテロイルモノグルタミン酸を補足すると妊婦の赤血球中の葉酸レベルが適正量に維持することができたというデータから付加量を求めた。

## 8. ビオチン

妊婦の尿中のビオチン排泄量および血清ビオチン量の低下が報告されていることから、妊娠はビオチンの要求量を増大させるものと考えられる。しかしながら、どの程度付加すべきであるかというデータはない。そこで、この改定においては暫定的に、 $(0\sim5\text{ヶ月の乳児の目安量}) \times \{(\text{妊婦のエネルギー付加量の平均値}) / (0\sim5\text{ヶ月の乳児のエネルギーの摂取基準量})\}$  の値を付加量とした。

## 9. ビタミンC

妊婦の付加量は、乳児の必要量を基にしたデータから求めた。

---

## 授乳婦の付加量の考え方

基本的に乳児に与える母乳中のビタミン量を維持できる量を付加するという考え方が妥当である。具体的には、母乳中のビタミン含量と1日当たりの泌乳量から計算し、さらに生体利用率を加味すればよい。今回の改定においても、すべての水溶性ビタミンにこの考え方を採用できた。

---

## 上限量の考え方

ヒトが必要とするビタミン量の10倍以上ものビタミンを簡単に入手できる時代となった。サプリメントの登場である。栄養素といえども、過剰による健康障害が存在する。おおざっぱに言えば、過剰症は欠乏症の裏返しである。なお、旧来型の食事形態を続ける限り、水溶性ビタミンの過剰症がでるほど摂取することはありえない。

上限量は健常人における長期間（1年以上）の大量摂取データを基にして策定すべきであるが、倫理上不可能である。したがって、治療に使用さ

れた量から推測する、あるいは動物実験から推測するという方法をとらざるを得ない。

今回の改定では、以下のように上限量を策定できたビタミンは3つ（ビタミンB6、ナイアシン、葉酸）であった。

### 1. ビタミンB6

ピリドキシン大量摂取時（数g/日を数ヶ月程度）には、感覚神経障害という明確な悪影響が観察される。この感覚神経障害を指標として上限量を求めた。

### 2. ナイアシン

ニコチンアミドはI型糖尿病患者へ、ニコチン酸は高脂血症患者への治療薬として大量投与されている。大量投与は、消化器系に悪影響（消化不良、ひどい下痢、便秘）をおよぼし、肝臓にも障害（肝機能低下、劇症肝炎）を与える。これらを指標として上限量を求めた。

### 3. 葉酸

プテロイルモノグルタミン酸の大量投与（～500mg/日）によって悪影響（神経障害、発熱、じん麻疹、紅斑、そう痒症、呼吸困難）の発生が報告されている。葉酸には明確な過剰症がある。神経障害を指標として上限量を求めた。



## Phthalate Esters Enhance Quinolinate Production by Inhibiting $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Carboxymuconate- $\epsilon$ -Semiaidehyde Decarboxylase (ACMSD), a Key Enzyme of the Tryptophan Pathway

Tsutomu Fukuwatari,\* Seiko Ohsaki,\* Shin-ichi Fukuoka,† Ryuzo Sasaki,\* and Katsumi Shibata\*<sup>1</sup>

\*Laboratory of Food Science and Nutrition, Department of Life Style Studies, School of Human Cultures, University of Shiga Prefecture, Hikone, Japan; and †Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji, Japan

Received March 18, 2004; accepted June 20, 2004

Tryptophan is metabolized to  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde (ACMS) via 3-hydroxyanthranilate (3-HA). ACMS decarboxylase (ACMSD) directs ACMS to acetyl CoA; otherwise ACMS is non-enzymatically converted to quinolinate (QA), leading to the formation of NAD and its degradation products. Thus, ACMSD is a critical enzyme for tryptophan metabolism. Phthalate esters have been suspected of being environmental endocrine disrupters. Because of the structural similarity of phthalate esters with tryptophan metabolites, we examined the effects of phthalate esters on tryptophan metabolism. Phthalate esters containing diets were orally given to rats and the urinary excreted tryptophan metabolites were quantified. Of the phthalate esters with different side chains tested, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and its metabolite, mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), most strongly enhanced the production of QA and degradation products of nicotinamide, while 3-HA was unchanged. This pattern of metabolic change led us to assume that these esters lowered ACMSD protein or its activity. Although DEHP could not be tested because of its low solubility, MEHP reversibly inhibited ACMSD from rat liver and mouse kidney, and also the recombinant human enzyme. Correlation between inhibition of ACMSD by phthalate esters with different side chains and urinary excretion of QA supports the notion that phthalate esters perturb tryptophan metabolism by inhibiting ACMSD. Quinolinate is a potential endogenous toxin and has been implicated in the pathogenesis of various disorders. Although toxicity of phthalate esters through accumulation of QA remains to be investigated, they may be detrimental by acting as metabolic disrupters when intake of a tryptophan-rich diet and exposure to phthalate esters occur coincidentally.

**Key Words:** phthalate ester; endocrine disrupter; tryptophan metabolism; quinolinate; metabolic disrupter.

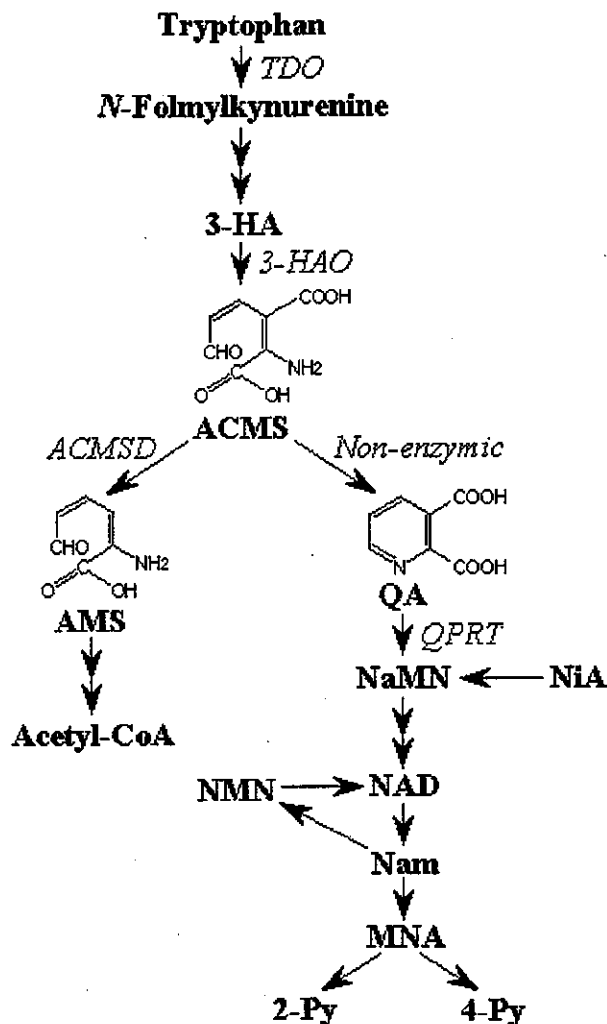
### INTRODUCTION

Phthalate esters are used as plasticizers in the manufacture of polyvinylchloride plastics, as solvents in certain industrial processes, and as vehicles for pesticides (Giam *et al.*, 1994). These esters are widely distributed in the ecosystem and have been suspected of being environmental endocrine disrupters. Of a variety of industrially important phthalate esters, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) has perhaps been most extensively used for the formation of plastics. A number of papers have reported that some phthalate esters are noxious to experimental animals (reviewed in Koizumi *et al.*, 2001; Shea *et al.*, 2003); administration of phthalate esters exhibits reproductive and developmental toxicity (David *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 1987; Wine *et al.*, 1997). It is believed that phthalate esters taken orally are hydrolyzed in the intestine before absorption, and the resulting products, monoesters, are primarily responsible for the toxicity of phthalate esters (Lake *et al.*, 1977).

The tryptophan–NAD pathway consists of the kynurenine pathway and the NAD pathway. The kynurenine pathway is the main route of tryptophan metabolism (Fig. 1). This pathway is initiated by the oxidation of tryptophan by tryptophan oxygenase (TDO) in the liver or by indoleamine dioxygenase (IDO) in other tissues including the brain. The metabolite at a branching point in the tryptophan–NAD pathway is  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde (ACMS), which is converted by ACMS decarboxylase (ACMSD, EC4.1.1.45) to  $\alpha$ -aminomuconate- $\epsilon$ -semialdehyde (AMS). AMS eventually leads to acetyl-CoA through the glutarate pathway, or otherwise non-enzymatic cyclization of ACMS results in the formation of quinolinate (QA), from which NAD is synthesized through the NAD pathway. Thus, ACMSD activity plays a critical role in the tryptophan–NAD pathway. In mammals, NAD is also synthesized from niacin (nicotinate (NiA) and nicotinamide (Nam)) that can be obtained primarily from dietary sources.

Quinolinate is a potential endogenous toxin; QA is neurotoxic by acting as an agonist at the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-sensitive glutamate receptors. Schwarcz *et al.* (1983) and more recently Pawlak *et al.* (2003) have shown that QA can be a

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Laboratories of Food Science and Nutrition, Department of Life Style Studies, School of Human Cultures, University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522-8533, Japan. E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp.



**FIG. 1.** Schematic diagram of the tryptophan–NAD pathway. Enzymes are underlined. 3-HA: 3-hydroxyanthranilate; ACMS:  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde; AMS:  $\alpha$ -aminomuconate- $\epsilon$ -semialdehyde; QA: quinolinate; NaMN: nicotinic acid mononucleotide; NIA: nicotinate; NMN: nicotinamide mononucleotide; Nam: nicotinamide; MNA:  $N^1$ -methylnicotinamide; 2-Py:  $N^1$ -methyl-2-pyridone-5-carboxamide; 4-Py:  $N^1$ -methyl-4-pyridone-3-carboxamide; TDO: tryptophan 2,3-dioxygenase; 3-HAO: 3-hydroxyanthranilic acid 2,3-dioxygenase; ACMSD:  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde decarboxylase; QPRT: quinolinate phosphoribosyltransferase.

uremic toxin responsible for anemia associated with renal failure by reducing production of erythropoietin, a glycoprotein that promotes erythrocyte formation. Elevation of QA concentration has been implicated in the pathogenesis of various diseases including cerebral ischemia, spinal cord injury, Huntington’s disease, and multiple sclerosis (see review by Stone and Darlington, 2002).

The structural similarity of phthalates with tryptophan metabolites prompted us to examine the effects of phthalate esters on

the pathway of tryptophan metabolism. NAD can be supplied from tryptophan in the dietary protein. Therefore, administration of a niacin-deficient diet containing phthalate esters to rats and measurement of the tryptophan metabolites excreted in the urine make it possible to estimate phthalate ester-induced changes in tryptophan metabolism (Fukuwatari *et al.*, 2002a, 2002b; Shibata *et al.*, 2001). We previously reported that di-*n*-butyl phthalate (DBP) (Shibata *et al.*, 2001) and DEHP (Fukuwatari *et al.*, 2002a, 2002b) stimulated conversion of tryptophan to NAD. In this article, we show that phthalate esters elevate QA and its downstream metabolites in the urine, whereas excretion of 3-hydroxyanthranilate (3-HA) remains unchanged. Of the phthalate esters tested, DEHP and its primary metabolite, mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), were the most potent disrupters of tryptophan metabolism. We also present results showing that direct inhibition of ACMSD by phthalate esters is primarily responsible for the phthalate ester-induced change in tryptophan metabolism.

**MATERIALS AND METHODS**

**Chemicals.** The materials used were obtained from the indicated sources: vitamin-free milk casein, sucrose, L-methionine, dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), DBP, di-*n*-octyl phthalate (DOP), DEHP, monoethyl phthalate (MEP), Nam, and QA (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan); mono-*n*-butyl phthalate (MBP), mono-*n*-hexyl phthalate (MHP), MEHP, and  $N^1$ -methylnicotinamide (MNA) chloride (Tokyo Chemical Industry, Tokyo); gelatinized cornstarch (Nichiden Kagaku, Tokyo); corn oil (Ajinomoto, Tokyo); mineral and vitamin mixtures (Oriental Yeast Kogyo, Tokyo).  $N^1$ -methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-Py) and  $N^1$ -methyl-4-pyridone-3-carboxamide (4-Py) were synthesized by the method of Shibata *et al.* (1988). All other chemicals used were of the highest purity available from commercial sources.

**Animals and diets.** The care and treatment of the experimental animals conformed to The University of Shiga Prefecture guidelines for the ethical treatment of laboratory animals. Rats and mice were obtained from Clea Japan (Tokyo), and housed in a room maintained at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  with 60% humidity and a 12 h light/12 h dark cycle (light onset at 6:00 A.M.). Mice were used for preparation of ACMSD as described later. Body weight and food intake were measured daily at 10:00 A.M., and food and water were renewed daily. Male Wistar rats at 5 weeks old were placed in individual metabolic cages (CT-10; Clea Japan) and acclimated for 1 week. They were fed the control diet containing no phthalate esters. Experiments (five animals per group) were started by using rats at 6 weeks of age. The control diet consisted of 20% casein, 0.2% L-methionine, 45.9% gelatinized cornstarch, 22.9% sucrose, 5% corn oil, 5% mineral mixture (AIN-93 mineral mixture), and 1% vitamin mixture (niacin-free AIN-93 vitamin mixture). The phthalate esters tested were DMP, DEP, DBP, DOP, DEHP, MBP, MHP, or MEHP. Rats were fed with a diet containing 2.6 mmol phthalate ester/kg diet *ad libitum* for 21 days, and controls were fed without phthalate ester. The weight percent of individual phthalate esters in the diet ranges from 0.05% (500 ppm) of DMP to 0.1% (1000 ppm) of DEHP depending on their molecular weight values. Urine samples on the last day (10:00 A.M.–10:00 A.M.; 24-h urine) were collected in amber bottles containing 1 ml of 1 mol/l HCl, and stored at  $-25^\circ\text{C}$  until use.

**Determination of tryptophan metabolites in the urine.** Tryptophan metabolites were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). To determine 3-HA (Shibata and Onodera, 1992), urine samples were filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  microfilter, and 20  $\mu\text{l}$  of the filtrates was injected into a STR ODS II column (4.6  $\times$  250 mm I.D., particle size 7  $\mu\text{m}$ ) (Shinwa Chemical, Kyoto, Japan). The mobile phase was 50 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.0)-acetonitrile

(100:10 v/v) containing 3 mg/l ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)-2Na, the flow rate was 1 ml/min, the column temperature was maintained at 40°C, and 3-HA was detected at +500 mV electrochemical detection (ECD).

To determine QA (Mawatari *et al.*, 1995), urine samples were filtered through a 0.45- $\mu$ m microfilter, and 20  $\mu$ l of the filtrates was injected into a Unisil Q C18 column (4.6  $\times$  250 mm I.D., particle size 5  $\mu$ m) (GL Sciences, Tokyo). The mobile phase was 20 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.8, containing 0.00045% tetramethylammonium hydroxide and 1.2% hydrogen peroxide, the flow rate was 0.6 ml/min, and the column temperature was maintained at 40°C. The fluorescence intensity at 380 nm was measured upon excitation at 326 nm.

Nam, 2-Py, and 4-Py in the urine samples were measured simultaneously (Shibata, 1987a). Briefly, 1 ml of urine samples was mixed with 10  $\mu$ l of 1 mg/ml isonicotinamide as an internal standard, 1.2 g of potassium carbonate, and 10 ml of diethylether. The mixtures were shaken vigorously for 5 min, and centrifuged at 800  $\times$  g for 5 min. The organic layers were evaporated, and dissolved in 0.5 ml of water. Aliquots of each sample were filtered through a 0.45- $\mu$ m microfilter, and 20  $\mu$ l of the filtrates was injected into a CHEMCOSORB 7-ODS-L column (4.6  $\times$  250 mm I.D., particle size 7  $\mu$ m) (Chemco Scientific, Osaka, Japan). The mobile phase was 10 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.0)-acetonitrile (96:4 v/v), the flow rate was 1 ml/min, the column temperature was maintained at 40°C, and the detection wavelength was 260 nm.

To determine MNA (Shibata, 1987b), urine samples (0.1 ml each) were mixed with 0.7 ml of water, 0.2 ml of 1 mmol/l isonicotinamide, 0.5 ml of 0.1 mmol/l acetophenone, and 1 ml of 6 mol/l sodium hydroxide. After the mixtures were cooled on ice for 10 min, 0.5 ml of 99% formic acid was added, followed by boiling in a water bath for 5 min. The mixtures were cooled on ice, filtered through a 0.45- $\mu$ m microfilter, and 20  $\mu$ l of the filtrates was injected into a Tosoh 80Ts column (4.6  $\times$  250 mm I.D., particle size 7  $\mu$ m) (Tosoh, Tokyo). The mobile phase was a mixture of 20 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.0-acetonitrile (97:3 v/v) containing 1 g/l sodium heparinsulfonate and 1 mmol/l EDTA-2Na, the flow rate was 1 ml/min, and the column temperature was maintained at 40°C. The fluorescence intensity at 440 nm was measured upon excitation at 382 nm.

**Enzymes and assays.** Because the dietary protein has been shown to induce ACMSD in the rat liver (Fukuoka *et al.*, 1998), male Wistar rats (10 weeks old) were fed a high-protein diet (40% casein) for 4 weeks. Male ICR mice (9 weeks old) were fed the control diet (20% casein) for 1 week. Animals were sacrificed by decapitation, and the liver and kidneys were removed from rats and mice, respectively. The organs were immediately homogenized with a polytetrafluoroethylene (PTFE)-glass homogenizer in 5 volumes of cold 50 mmol/l potassium phosphate buffer, pH 7.0. The homogenate was centrifuged at 55,000  $\times$  g for 20 min, and the supernatant was used as an enzyme source. Four or five animals per group were used and the enzyme activities were assayed with the supernatant prepared from each organ.

Human ACMSD (Fukuoka *et al.*, 2002) or human quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT, EC 2.4.2.19) (Fukuoka *et al.*, 1998) transiently expressed in COS-7 cells was prepared from cells cultured for 72 h after transfection. Cells were harvested and lysed with 50 mmol/l Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 137 mmol/l sodium chloride, 1% Triton X-100, 5 mmol/l EDTA, 100  $\mu$ mol/l leupeptin, and 20  $\mu$ g/ml FOY-305. The homogenates were centrifuged at 100,000  $\times$  g for 15 min, and the supernatants were used for assaying enzyme activity.

The activity of ACMSD was measured as described (Ichijima *et al.*, 1965). The reaction mixture containing 10  $\mu$ l of 3.3 mmol/l 3-HA (in 50 mmol/l Tris-acetate buffer, pH 8.0); 0.5 ml of 0.2 mol/l Tris-acetate buffer, pH 8.0; and 0.8 ml of water was incubated in a cuvette for 5 min at 25°C. ACMSD was produced by the addition of an excess quantity of the purified 3-HA oxygenase (50  $\mu$ l containing 0.4 mg protein). After the formation of ACMSD was complete, as judged by its absorbance at 360 nm, 0.1 ml of the ACMSD preparation was added. The decrease in absorbance at 360 nm was followed for 5 min against a control incubation that contained all the ingredients except 3-HA. When the effects of phthalate monoesters were examined, 50  $\mu$ l of the esters dissolved in ethanol was added before the addition of the enzyme. The control incubation contained 50  $\mu$ l of ethanol. The effects of phthalate diesters could not be tested because of their low solubility in the enzyme assay mixture.

QPRT was assayed as described (Shibata *et al.*, 2000). The incubation medium contained 50  $\mu$ l of 500 mmol/l potassium phosphate buffer, pH 7.0, 50  $\mu$ l of 10 mmol/l QA, 50  $\mu$ l of 10 mmol/l phosphoribosylpyrophosphate, 10  $\mu$ l of 100 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 20  $\mu$ l of phthalate monoester dissolved in ethanol, 270  $\mu$ l of water, and 50  $\mu$ l of the enzyme preparation. The control incubation contained 20  $\mu$ l of ethanol. The reaction was started by addition of the enzyme, and the incubation was carried out at 37°C for 1 h. The reaction tube was placed in a boiling water bath for 5 min to stop the reaction, cooled on ice for 5 min, and centrifuged at 10,000  $\times$  g for 5 min. The supernatant was filtered through a 0.45- $\mu$ m microfilter, and 20  $\mu$ l of the filtrate was injected into a HPLC column, Tosoh 80Ts (4.6  $\times$  250 mm I.D., particle size 7  $\mu$ m) (Tosoh, Tokyo). The mobile phase was 10 mmol/l potassium phosphate buffer, pH 7.8, containing 1.48 g/l tetra-*n*-butylammonium bromide-acetonitrile (90:10 v/v), the flow rate was 1.0 ml/min, and the column temperature was maintained at 40°C. The product was detected at 265 nm.

**Statistical analysis.** The values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The statistical significance was determined by ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

## RESULTS

### Body Weight, Food Intake, and Liver Weight

Body weight of rats (6 weeks of age) at starting point of experiments was 140  $\pm$  3 g and their weight increased almost linearly with gains of 6.2  $\pm$  0.4 g per day. There was no significant difference in growth between groups fed phthalate esters and the control group. Food intake (g/day) of rats was 10  $\pm$  0.5 at 6 weeks of age and increased to 17  $\pm$  0.5, 20  $\pm$  0.7, and 22  $\pm$  0.8 at 7, 8, and 9 weeks, respectively. Phthalate esters showed no significant effect on food intake. Food intake/kg body weight/day varies depending on age (66 g at 6 weeks and 77 g at 9 weeks). When we used an average value of food intake (70 g/kg body weight/day), intake of phthalate esters was calculated to be 0.182 mmol/kg body weight/day, and therefore the weight values of phthalate esters ingested ranged from 35 mg/kg body weight/day of DMP to 70 mg of DEHP, depending on their molecular weight values.

DEHP causes hepatomegaly in rodents by proliferating peroxisome (Elcombe and Mitchell, 1986; Ward *et al.*, 1986). However, the liver weights of phthalate ester-fed groups measured at the end point of experiments (9 weeks of age) did not differ from those of the control groups, indicating that DHEP at the dose level given in this experiment does not cause significant peroxisome proliferation.

### Effects of Phthalate Diesters on the Urinary Excretion of the Tryptophan Metabolites

To assess the effects of various phthalate diesters on the tryptophan-NAD pathway, rats at 6 weeks of age were fed with a diet containing DMP, DEP, DBP, DOP, or DEHP for 21 days, and the urinary contents of tryptophan metabolites such as 3-HA, QA, Nam, MNA, 2-Py, and 4-Py were measured. The sum of Nam, MNA, 2-Py, and 4-Py was expressed as Nam metabolites. As shown in Figure 2A, the urinary excretion of 3-HA was not changed by any of the phthalate diesters used. In

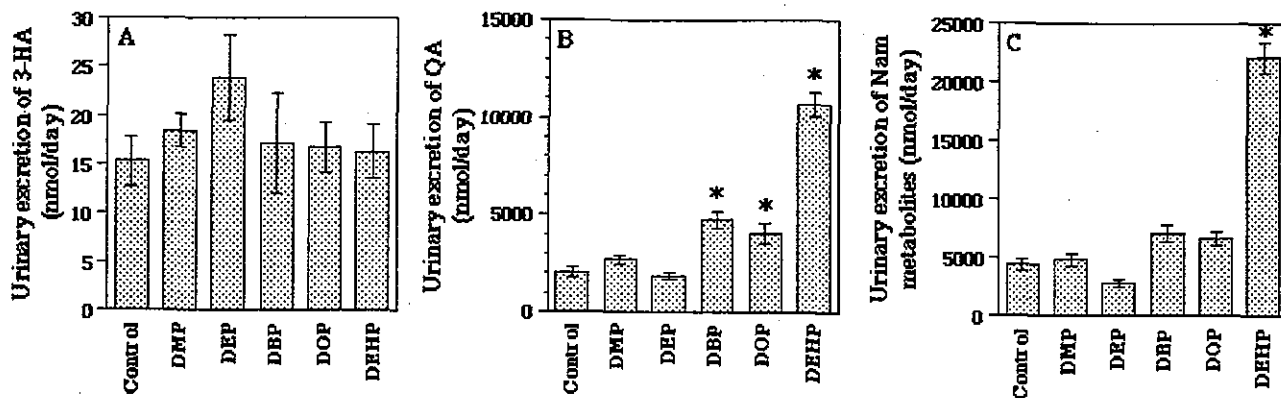


FIG. 2. Effects of phthalate diesters on the urinary excretion of 3-HA (A), QA (B), and Nam metabolites (C) in rats. Male Wistar rats at 6 weeks old were fed with a diet containing 2.6 mmol phthalate ester/kg diet *ad libitum* for 21 days. The phthalate esters used were DMP, DEP, DBP, DOP, or DEHP. Urine samples on the last day (10:00 A.M.–10:00 A.M.; 24-h urine) were collected in amber bottles containing 1 ml of 1 mol/L HCl. Values are means  $\pm$  SEM;  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  versus the control.

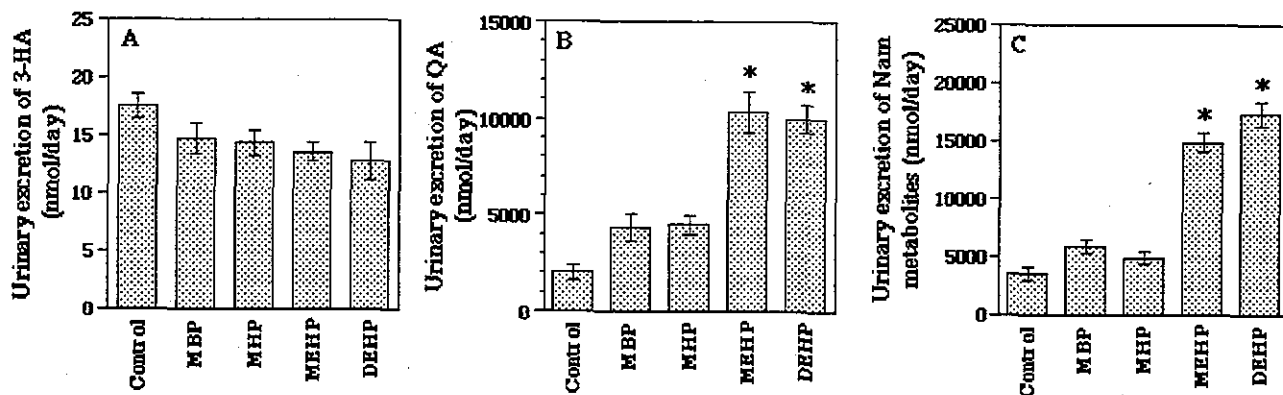


FIG. 3. Effects of phthalate monoesters on the urinary excretion of 3-HA (A), QA (B), and Nam metabolites (C) in rats. Male Wistar rats at 6 weeks old were fed with a diet containing 2.6 mmol phthalate ester/kg diet *ad libitum* for 21 days. The phthalate esters used were MBP, MHP, MEHP, or DEHP. Urine samples on the last day (10:00 A.M.–10:00 A.M.; 24-h urine) were collected in amber bottles containing 1 ml of 1 mol/L HCl. Values are means  $\pm$  SEM;  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  versus the control.

contrast, QA (Fig. 2B) and its downstream metabolites (Nam metabolites in Fig. 2C) were markedly elevated by DEHP. Both DBP and DOP also increased the urinary excretion of QA but to a lesser extent; DMP and DEP, however, had no effect (Fig. 2B). DME, DEP, DBP, and DOP did not affect the excretion of Nam metabolites (Fig. 2C). Thus the length and structure of side chains in the esters appear to be crucial for the urinary excretion of tryptophan metabolites. DEHP that has long and branched side chains was the most powerful disruptor of tryptophan metabolism.

*Effects of Phthalate Monoesters on the Urinary Excretion of the Tryptophan Metabolites*

Because the phthalate diester-induced effects may be due to the monoesters that are produced in the digestive organs (Lake *et al.*, 1977), we also examined phthalate monoesters. Rats at 6

weeks of age were fed with a diet containing MBP, MHP, or MEHP for 21 days, and the urinary excretion of the tryptophan metabolites was assayed. The experiments with DEHP were performed again for comparison with MEHP. As shown in Figure 3, the results were very similar to those when the diesters were used. The urinary excretion of 3-HA was unchanged after administration of the monoesters (Fig. 3A). Large increases in QA and Nam metabolites were found when MEHP was given, and those increases were similar to the ones found with DEHP (Fig. 3B and 3C). When MBP and MHP were given, there was an increase in the mean values of urinary QA and Nam metabolites, but the increase was not statistically significant.

*Effects of Phthalate Monoesters on ACMSD and QPRT*

Feeding of MEHP or DEHP strongly increased urinary excretion of QA and its downstream metabolites in the