

the diet were not special. In the present experiment, the minimum requirement of Trp in the growing mice was found around 0.03g/100 g of diet in the presence of a suitable amount of NiA.

From the comparison of the body weight gain, food intake, liver and kidney weights, NAD and NADP contents in live and kidney, and the urinary excretion of Nam and its metabolites between the groups fed with the diets of 0.03% Trp-0% NiA and 0.03% Trp-0.006% NiA, the diet containing 0.03% Trp-0% NiA diet (the composition is shown in Table 1) was an excellent diet for producing a niacin-deficiency for mice. Therefore, we get a useful item for comparisons of behaviors and metabolic disturbances between the QPRT-knockout mice and niacin-deficient mice.

#### Acknowledgment

This investigation was supported by The Ministry of Health, Labor and Welfare.

#### References

- 1) Fukuoka S, Nyaruhucha CM and Shibata K: Characterization and functional expression of the cDNA encoding human brain quinolinate phosphoribosyl-transferase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1395: 192-201, 1998
- 2) Shibata K, Hayakawa T, Taguchi H and Iwai K: Regulation of pyridine nucleotide coenzyme metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 294: 207-218, 1991
- 3) Schwarcz R, Whetsell RM and Mangano RM: Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 219: 316-318, 1983
- 4) Pullman MP and Colowick SP: Preparation of 2- and 6-pyridones of N<sup>1</sup>-methylnicotinamide. *J. Biol. Chem.*, 206: 121-127, 1954
- 5) Shibata K, Kawada T, and Iwai K: Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 424: 23-28, 1988
- 6) Shibata K and Murata K: Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nutr. Int.*, 2: 177-181, 1986
- 7) Shibata K and Tanaka K: Simple measurement of blood NADP and blood levels of NAD and NADP in humans. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 2941-2942, 1986
- 8) Shibata K: Ultramicro-determination of N<sup>1</sup>-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)*, 61: 599-604, 1987
- 9) Shibata, K: High-performance liquid chromatographic measurement of nicotinamide N-oxide in urine after extracting with chloroform. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 1329-1331, 1989
- 10) Shibata K, Tanaka K, and Murata K: Efficiency of exogenous quinolinic acid as niacin in rats. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 2025-2032, 1986
- 11) Larkins BA, Lending CR and Wallace JC: Modification of maize-seed-protein quality. *Am. J. Clin. Nutr.*, 58: 264S-269S, 1993
- 12) Henderson LM, Deodhar T, Krehl WA and Elvehjem CA: Factors affecting the growth of rats receiving niacin-tryptophan deficient diets. *J. Biol. Chem.*, 170: 261-268, 1947
- 13) Krehl WA, Henderson LM, Huerga JD, and Elvehjem CA: Relation of amino acid imbalance to niacin-tryptophan deficiency in growing rats. *J. Biol. Chem.*, 166: 531-540, 1946
- 14) Harper AE and Katayama M: The influence of various carbohydrates on the utilization of low protein rations by the white rat. *J. Nutr.*, 49: 261-275, 1953
- 15) Shibata K, Hashimoto C and Onodera M: Effect of kind of dietary carbohydrate on the growth of weanling rats fed with a niacin-free and low-protein diet. *The Bulletin of Triokoku-Gakuen* 17: 1-11, 1991

〈トリプトファン研究会記録〉

## ナイアシン欠乏マウスの作成

福渡 努、本多 奈保子、佐々木 隆造、柴田 克己

滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻  
〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町2500

**要旨** 近年、特定の遺伝子を欠損させた動物を作製する技術が開発され、その動物を解析することにより様々な病態との関係を明らかにすることが可能となってきた。Trp-ナイアシン代謝研究においても、今後はナイアシン合成経路に関与する遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを使う研究が期待され、当研究室でもキノリン酸代謝に関与するQuinolate phosphoribosyltransferase (QPRT) 遺伝子ノックアウトマウスの作製を進めている。その際、QPRT遺伝子ノックアウトマウスのナイアシン欠乏状態を野生型のマウスと比較することが必要となる。ところが、ナイアシンはTrpから生合成できるため、ナイアシン欠乏状態にするためにはTrp量をうまく制限した特殊な組成の飼料を開発する必要がある。我々は、このマウス用ナイアシン欠乏飼料の作成に成功したので報告する。Trpをほとんど含まないツェインにTrpが第一制限アミノ酸となるように他のアミノ酸を適量添加し、糖質源をすべてショ糖とした。これに種々の含量のTrpを加え、各々の飼料にニコチン酸を添加して、ニコチン酸の添加効果が認められた時の飼料をナイアシン欠乏飼料とした。Trp含量0.03%において、NIA添加群はNIA非添加群と比して、体重、肝・腎重量が顕著に増加し、肝・腎中のNAD量も有意に増加した。

**キーワード：**ナイアシン、欠乏、マウス、トリプトファン、飼料

〈トリプトファン研究会記録〉

## 運動とトリプトファン代謝 —血中動態からの推測—

伊藤 康宏<sup>1)</sup>、米倉 麗子<sup>1)</sup>、斎藤 邦明<sup>2)</sup>、柴田 克己<sup>3)</sup>、  
内藤 純子<sup>1)</sup>、中上 寧<sup>1)</sup>、長村 洋一<sup>1)</sup>

**要旨** トリプトファンの主要な代謝経路であるキヌレニン経路の代謝産物にはキヌレン酸、アントラニル酸、NADなど重要な生理活性を有するものが多い。我々はこれまでにキヌレニン経路の中間代謝産物であるキヌレニンの血中濃度が、運動により変化することを報告した。また、その変化は負荷強度に依存しているように思われる。しかしながら、被検者の運動習慣あるいは主観的な負荷強度の違いにより、血中キヌレニン濃度は増加する場合や減少する場合がある。これはトリプトファン代謝の大部分を占めるキヌレニン経路の酵素活性が運動の影響を受けることを意味する。すなわち、末梢のトリプトファン代謝系が運動パフォーマンスや運動による爽快感や疲労感などに関与する可能性が示唆される。これらの生理現象が、運動へのエネルギー代謝のみに関与しているのか、あるいは知覚神経系を介した中枢神経系にも関与するののかについて、我々は現在研究を続けている。

**キーワード**：運動、トリプトファン代謝系、キヌレニン経路

### I. 緒言

運動に際して発生する疲労には、中枢疲労と末梢疲労があるとされている。中枢疲労の主要因は、運動により血中に増加した遊離トリプトファンの脳内への取り込みによって生じた余剰のセロトニンであるとNewsholmeらによって提唱されている<sup>1)</sup>。Davisらは運動で発生する中枢疲労は、トリプトファンとトランスポーターを競合する分岐鎖アミノ酸および血中遊離脂肪酸を抑制する糖分を摂取することによりその発生を遅延できることを示した<sup>2)</sup>。一方の末梢疲労は筋疲労であり、これはグリコーゲンなどエネルギー源の消耗であるとされている<sup>3)</sup>。しかしながら、脳内トリプトファンの大多数はキヌレ

ニン経路により代謝されること、また、トリプトファンはキヌレニン経路を介して解糖系やニコチンアミド代謝系へ代謝されることから、我々は運動によって発生する疲労の一部は少なくともトリプトファンのキヌレニン経路の代謝産物に由来すると考えている。すなわち、トリプトファンはキヌレニン経路を介してキヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレニン、アントラニル酸、キノリン酸などのほか解糖系、ニコチンアミド代謝系へと代謝され神経伝達物質やエネルギー賦活源あるいはフリーラジカルの産生源などになる。運動を行うと、これらキヌレニン経路の代謝産物の増加あるいは減少により中枢疲労あるいは末梢疲労を増減させるのではないかと考えている。これらのことから、

1) 藤田保健衛生大学衛生学部臨床化学  
〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98  
E-mail: yasitoh@fujita-hu.ac.jp

2) 岐阜大学医学部臨床検査医学  
3) 滋賀県立大学人間文化学部

我々はこれまでにキヌレニン経路の初期の中間代謝産物であるキヌレニンの運動前後での血中動態について調べ<sup>5,6)</sup>、適度な運動の指標となる可能性について検討してきた<sup>5,7)</sup>。

運動中にはトリプトファンは主にトリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ (EC 1.13.11.11: TDO) およびインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (EC 1.13.11.42: IDO) によってN-ホルミルキヌレニンへと分解される。また、継続する運動習慣はキヌレニン経路を活性化し、血中のトリプトファンおよびNAD濃度を高める<sup>6,8)</sup>。この論文では、運動による血液中のトリプトファン、キヌレニン、3-ヒドロキシキヌレニンおよびNADの変化を調べ、そこから運動負荷時のトリプトファン代謝について考察した。

## II. 被検者と方法

### 1) 被検者

被検者は運動習慣のあるグループと運動習慣の無いグループとした。全ての被検者には予め実験の内容を説明し、インフォームドコンセントを得た。

### 2) 採血

採血は、運動開始の1時間前と運動終了直後に行った。採血後直ちに氷中に置き、血液凝固後直ちに遠心分離して血清を採取した。NADは、採血直後に全血20 $\mu$ lを専用の緩衝液で十分

攪拌した後、90 $^{\circ}$ Cで2分間加熱処理した<sup>9)</sup>。

### 3) 測定法

トリプトファン：血清トリプトファンは、日立L-8500高速アミノ酸分析計 (日立：東京) で測定した。

キヌレニン：血清キヌレニンはSaitoらの方法で行い、ODCカラムを用いたHPLC法で測定した<sup>10)</sup>。

3-ヒドロキシキヌレニン：血清3-ヒドロキシキヌレニンはNaitoらの方法で行い、ODS-Aカラムを用いたHPLC法で測定した<sup>11)</sup>。

NAD：NADは色素法を用いて測定した<sup>9)</sup>。

POMS試験：POMS検査は、気分の変化を評価する質問紙法としてMcNairらによって開発された方法であり、緊張-不安 (tention-anxiety)、抑鬱-落ち込み (depression-dejection)、怒り-敵意 (anger-hostility)、活気 (vigor)、疲労 (fatigue) および混乱 (confusion) の6項目の気分尺度を測定できる<sup>12)</sup>。結果の解釈は緊張-不安、抑鬱-落ち込み、怒り-敵意、疲労および混乱ではスコアは低い方が良く、活気ではスコアは高い方が良いとされる<sup>12)</sup>。この研究ではPOMS試験を運動直前および運動終了直後に行った。

### 4) 統計学的処理

走行前後の有意差検定にはStudent paired *t* 検定を用い、危険率5%以下を統計学的有意とした。不良標本の棄却にはThompsonの棄却検定を用いた。また、結果の表示は平均値土標準偏差

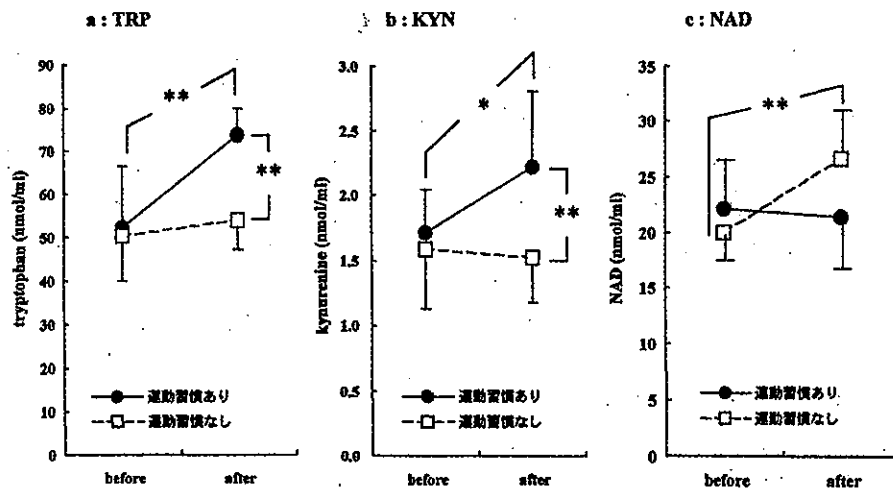


図1 運動習慣を持つ被検者と持たない被検者でのハーフマラソン前後のトリプトファン (a: TRP)、キヌレニン (b: KYN)、NAD (c: NAD) の比較。\*\*:  $p < 0.01$ 、\*:  $p < 0.05$

表した。

### Ⅲ. 結果

安静時条件下におけるトリプトファンおよびその代謝産物の変動は次のようであった。

#### 1) トリプトファン

運動習慣のある人では、血中トリプトファン濃度は、1時間以上の有酸素運動によって増加したが、運動習慣の無い人では増加しなかった(図1a)。また、安静時の血中トリプトファン濃度は、運動習慣のある人と運動習慣の無い人で差はなかった(図2a)。

#### 2) キヌレニン

運動習慣のある人では、血中キヌレニン濃度

は、1時間以上の有酸素運動によって増加したが、運動習慣の無い人では増加しなかった(図1b)。また、有酸素運動の前と後で、トリプトファンとキヌレニンはそれぞれ高い相関があった(図3)。また、安静時の血中キヌレニン濃度は、運動習慣のある人では運動習慣の無い人より有意に高かった( $p < 0.01$ )。しかし、アスリートでは低値であった(図2b)

#### 3) 3-ヒドロキシキヌレニン

3-ヒドロキシキヌレニンは、運動習慣のある人では運動の前後でほとんど変化はなかった(図4)。また、運動の前にはキヌレニンと3-ヒドロキシキヌレニンの間に相関があったが、運動の後にはキヌレニンと3-ヒドロキシキヌレニンの間に相関はなく、運動による血中キヌレニ

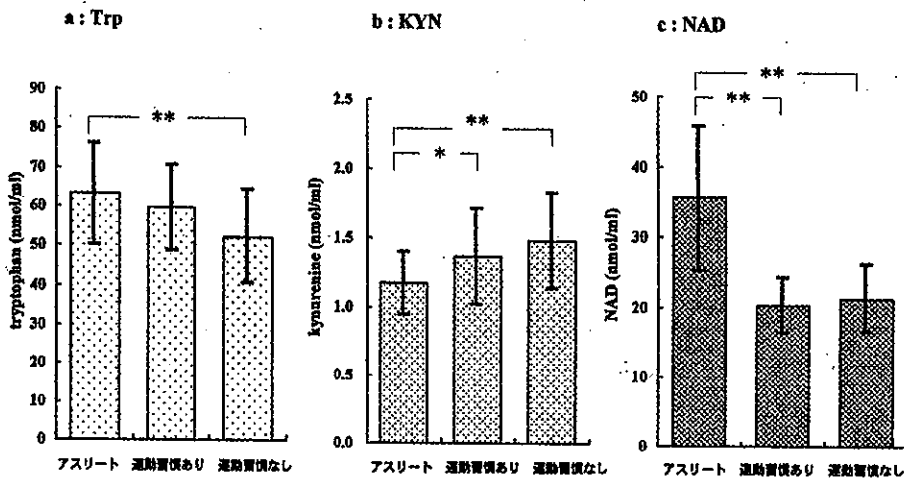


図2 運動習慣を持つ被検者、持たない被検者およびアスリートでの安静時のトリプトファン (a: Trp)、キヌレニン (b: KYN)、NAD (c: NAD) の比較。\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$

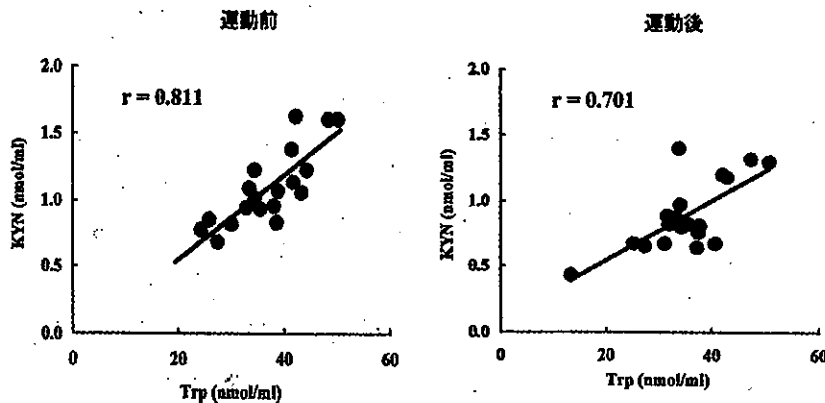


図3 運動前後のトリプトファンとキヌレニンの血中濃度の相関

ンレベルの変化に依存しない可能性が示された(図5)。

4) NAD

運動習慣のある人では、血中NAD濃度は、1時間以上の有酸素運動によって増加しなかったが、運動習慣の無い人では増加した(図1c)。また、安静時の血中濃度は運動習慣のある人は運動習慣の無い人より有意に高かった( $p < 0.01$ )(図2c)。

最後にトリプトファン代謝と精神活動状態を調べるためにPOMSテストのスコアとの関連性を調べてみた。その結果、POMSスコアと血中キヌレニン濃度の間に相関が認められた。活気とキヌレニン濃度の間には正の相関があった。また、その他の5項目との間には負の相関があった(表1)。

IV. 考察

今回は運動の前後におけるトリプトファンおよびその代謝産物の変動と疲労感や活気など精神活動の関係を調べた。その結果、運動中に血中トリプトファンはキヌレニンに代謝されるが、運動習慣の有無によりその動態に差があることが示された。その代謝の中心となる酵素はIDOと考えられる<sup>13)</sup>。すなわち、IDO活性は運動中に発生するNOやIFN $\gamma$ などのサイトカインによって誘導され、トリプトファンをキヌレニンに代謝する<sup>10)</sup>。被検者の中にはキヌレニン濃度が低下する人もあったが、その原因は基質となるトリプトファン量が減少したためと考えられた。キヌレニンはキヌレニン3-モノオキシゲナーゼ

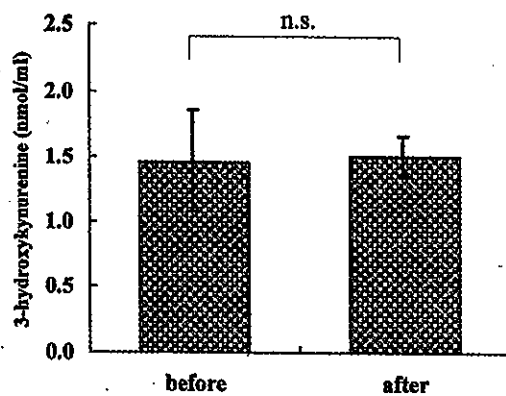
(EC 1.14.13.9) によって3-ヒドロキシキヌレニンへ代謝される。3-ヒドロキシキヌレニンは強いフリーラジカルの産生源であり、運動によ

表1 運動前後でのPOMSスコアと血清キヌレニンの相関

	(n=22)	
	before exercise	after exercise
tention-anxiety	-0.410*	-0.383
depression-dejection	-0.492*	-0.272
anger-hostility	-0.429*	-0.156
vigor ※	0.437*	0.573*
fatigue	-0.506*	-0.541*
confusion	-0.569*	-0.596*

\*\*：相関係数が有意 ( $p < 0.05$ ) であった。

※：活気は正の相関が認められた。



n.s.: 有意差なし

図4 運動前後での血清3-ヒドロキシキヌレニンの変化

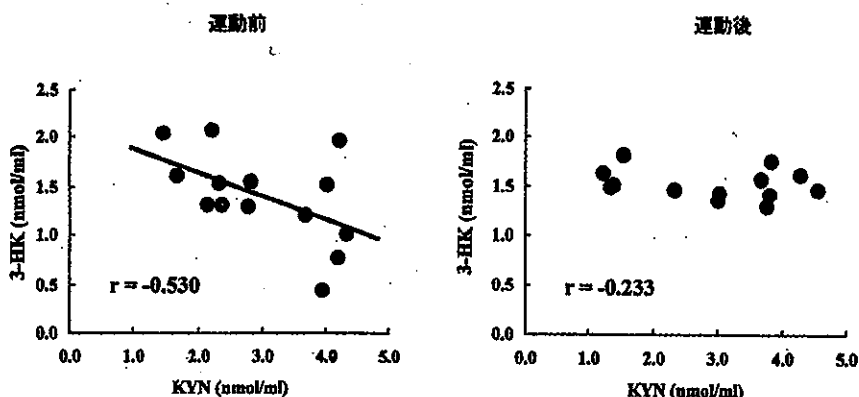


図5 運動前後でのキヌレニンと3-ヒドロキシキヌレニンの関係の変化

て血中濃度が増加することは生理的に不都合である。しかし、3-ヒドロキシキヌレニンが、運動前後でほとんど変化しなかったことから、キヌレニン3-モノオキシゲナーゼ活性は運動によって影響を受けないことが示唆された。さらに、 $\alpha$ アミノ $\beta$ カルボキシムコン酸 $\epsilon$ セミアルデヒドを代謝するACMSDase (EC 4.1.1.45) 活性の亢進はトリプトファンを糖新生へ誘導するが、この酵素は一過性の運動の影響を受けないことが報告されている<sup>10)</sup>。これらのことから、トリプトファンからエネルギー産生系への代謝は、一過性の運動の影響を受けない可能性が高いことが示された。しかしながら、運動前後の血中のトリプトファン、キヌレニンおよびNADの変化は運動習慣のある人と運動習慣の無い人で異なっていた<sup>9)</sup>。したがって、継続する運動習慣はトリプトファンの代謝やニコチンアミドの代謝に影響を与える可能性があると考えられる。また、血中キヌレニン濃度と気分との間に相関がある理由として次の2つの原因が推測できる。まず、運動習慣によってトリプトファンからグルコースやNADが産生されやすくなり、骨格筋や肝臓にエネルギー源が多く保存され、運動による末梢疲労が減少する。もうひとつは、運動によりキヌレニナーゼ (EC 3.7.1.3) が活性化されてキヌレニンの分解が亢進し、キヌレニンから代謝されたアントラニル酸や神経伝達物質であるキヌレン酸が増加する。これらの代謝産物が知覚神経系に何らかの影響を及ぼしたことが考えられる。どちらもNewsholmeらの仮説とは異なり、今後の検討を要する問題である。

## 文献

- 1) EA. Newsholme, IN. Acworth and E. Blomstrand: Amino acids, brain neurotransmitters and a functional link between muscle and brain that is important in sustained exercise. *Advances in myochemistry*, 127-133, John Libbey Eurotext, London, (1987)
- 2) Davis JM, Alderson NL and Welsh RS: Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72: 573s-578s, 2000
- 3) Davis JM and Bailey SP: Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 29: 45-57, 1996
- 4) Costill DL, Bowers R, Branam G and Sarks K: Muscle glycogen utilization during prolonged exercise on successive days. *J. Appl. Physiol.*, 31: 834-838, 1971
- 5) Ito Y, Saito K, Maruta K, Nakagami Y, Koike T, Oguri Y and Nagamura Y: Kynurenine concentration of serum was increased by exercise. *Adv. exp. med. biol.*, 467: 717-722, 1999
- 6) 米倉麗子、伊藤康宏、柴田克己、福渡 努、齋藤邦明、小栗諄人、朝山正己、長村洋一: 走行運動負荷がTrp-NAD経路に及ぼす影響. *健康創造研究*, 1: 57-64, 2002
- 7) 伊藤康宏、小栗諄人、中上 寧、丸田一皓、古池隆明、米倉麗子、山田幸恵、橋本朋久、横田千穂、内藤純子、長村洋一: 適度な運動の指標としてのキヌレニンの血中動態. *藤田学園医学会誌*, 24: 121-124, 2000
- 8) Fukuwatari T, Shibata K, Ishihara K, Fushiki T and Sugimoto E: Elevation of blood NAD level after moderate exercise in young women and mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 47: 177-179, 2001
- 9) Shibata K and Murata K: Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nutr. Int.*, 2: 177-181, 1986
- 10) Saito K, Crowley JS, Markey SP and Heyes MP: A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation. *J. Biol. Chem.*, 21: 15496-15503, 1993
- 11) Naito J, Ishiguro I, Murazumi T and Morimoto M: Determination of kynurenine in serum by high-performance liquid chromatography after enzymatic conversion to 3-hydroxykynurenine. *Anal. Biochem.*, 161: 16-19, 1987
- 12) McNair DM, Lorr M and Droppleman LF: Profile of Mood States. Educational and Industrial Testing Service, San Diego, USA (1992)
- 13) Ito Y, Yonekura R, Maruta K, Koike T, Nakagami Y, Shibata K, Saito K and Nagamura Y: Tryptophan metabolism was accelerated by exercise in rat. *Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA (in press)
- 14) Shibata K and Toda S: Effects of thyroxine on the conversion ratio of tryptophan to nicotinamide in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 1787-1762, 1994

<Proceeding of JSTRY Meeting>

## **Tryptophan metabolism was estimated by tryptophan metabolites in blood during exercise**

Yasuhiro Ito<sup>1)</sup>, Reiko Yonekura<sup>1)</sup>, Kuniaki Saito<sup>2)</sup>, Katsumi Shibata<sup>3)</sup>,  
Junko Naito<sup>1)</sup> and Yoichi Nagamura<sup>1)</sup>

1) Department of Clinical Chemistry, School of Health Sciences, Fujita Health University,  
Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

2) Department of Laboratory Medicine, Gifu University School of Medicine,  
Gifu 500-8705, Japan

3) Department of Life Style Studies, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture,  
Hikone, Shiga 522-8533, Japan

**Summary** The kynurenine pathway is the major metabolic pathway for tryptophan, and metabolites such as kynurenate, anthranilate and NAD possess important physiological activities. We previously reported that exercise alters serum levels of kynurenine, an intermediate metabolite in the kynurenine pathway, in an intensity-dependent manner. However, serum levels of kynurenine increase or decrease depending on exercise habits and subjective exercise intensity. This is because exercise affects the enzymatic activity of the kynurenine pathway, which accounts for the majority of the tryptophan metabolism. In other words, peripheral tryptophan metabolism may be involved in exercise performance or post-exercise euphoria and fatigue. We have been conducting research to determine whether these physiological phenomena are only involved with energy metabolism or the central nervous system via the sensory nervous system.

**Key words:** Exercise, Tryptophan metabolism, Kynurenine pathway



## Nicotinamide suppresses hyperphosphatemia in hemodialysis patients

YUTAKA TAKAHASHI, ARAKI TANAKA, TSUKASA NAKAMURA, TSUTOMU FUKUWATARI, KATSUMI SHIBATA, NORIAKI SHIMADA, ISAO EBHARA, and HIKARU KOIDE

Division of Nephrology, Department of Medicine, Koto Hospital, Tokyo, Japan; Mizue Dialysis Center, Tokyo, Japan; Department of Medicine, Shinmatsudo Central General Hospital, Chiba, Japan; and Department of Life Style Studies, University of Shiga Prefecture, Shiga, Japan

### Nicotinamide suppresses hyperphosphatemia in hemodialysis patients.

**Background.** The use of calcium- or aluminum-based phosphate binders against hyperphosphatemia is limited by the adverse effects of hypercalcemia or aluminum toxicity in long-term hemodialysis. Because nicotinamide is an inhibitor of sodium-dependent phosphate cotransport in rat renal tubule and small intestine, we examined whether nicotinamide reduces serum levels of phosphorus and intact parathyroid hormone (iPTH) in patients undergoing hemodialysis.

**Methods.** Sixty-five hemodialysis patients with a serum phosphorus level of more than 6.0 mg/dL after a 2-week washout of calcium carbonate were enrolled in this study. Nicotinamide was administered for 12 weeks. The starting dose was 500 mg/day, and the dose was increased by 250 mg/day every 2 weeks until serum phosphorus levels were well controlled at less than 6.0 mg/dL. A 2-week posttreatment washout period followed the cessation of nicotinamide. Blood samples were collected every week for measurement of serum calcium, phosphorus, lipids, iPTH, and blood nicotinamide adenine dinucleotide (NAD).

**Results.** The mean dose of nicotinamide was 1080 mg/day. The mean blood NAD concentration increased from  $9.3 \pm 1.9$  nmol/ $10^5$  erythrocytes before treatment to  $13.2 \pm 5.3$  nmol/ $10^5$  erythrocytes after treatment ( $P < 0.01$ ). The serum phosphorus concentration increased from  $5.4 \pm 1.5$  mg/dL to  $6.9 \pm 1.5$  mg/dL with the pretreatment washout, then decreased to  $5.4 \pm 1.3$  mg/dL after the 12-week nicotinamide treatment ( $P < 0.0001$ ), and rose again to  $6.7 \pm 1.6$  mg/dL after the posttreatment washout. Serum calcium levels decreased during the pretreatment washout from  $9.1 \pm 0.8$  mg/dL to  $8.7 \pm 0.7$  mg/dL with the cessation of calcium carbonate. No significant changes in serum calcium levels were observed during nicotinamide treatment. Median serum iPTH levels increased with pretreatment washout from 130.0 (32.8 to 394.0) pg/mL to 200.0 (92.5 to 535.0) pg/mL and then decreased from the maximum 230.0 (90.8 to 582.0) pg/mL to 150.0 (57.6 to 518.0) pg/mL after the 12-week nicotinamide treatment ( $P < 0.05$ ). With nicotinamide, serum

high-density lipoprotein (HDL) cholesterol concentrations increased from  $47.4 \pm 14.9$  mg/dL to  $67.2 \pm 22.3$  mg/dL ( $P < 0.0001$ ) and serum low-density lipoprotein (LDL) cholesterol concentrations decreased from  $78.9 \pm 18.8$  mg/dL to  $70.1 \pm 25.3$  mg/dL ( $P < 0.01$ ); serum triglyceride levels did not change significantly.

**Conclusion.** Nicotinamide may provide an alternative for controlling hyperphosphatemia and hyperparathyroidism without inducing hypercalcemia in hemodialysis patients.

End-stage renal disease (ESRD) is associated with calcium and phosphate metabolism abnormalities that can result in severe bone disease and ectopic calcification of cardiovascular tissues [1, 2]. Phosphorus-restricted diets are essential for the prevention of these deleterious complications in ESRD patients. Weekly dietary absorption of phosphate is approximately 4200 mg, assuming fractional absorption of phosphate is 60% [3], whereas phosphate efflux is approximately 1057 mg per 4-hour dialysis session or 3171 mg per week [4], suggesting a positive phosphorus balance in dialysis patients. The common phosphate binders contain aluminum or calcium. Aluminum accumulates in the tissues and causes neurologic, skeletal, and hematologic toxicities [5, 6]. Ingestion of calcium carbonate, an effective phosphate binder, leads to hypercalcemia and increases the risk of vascular calcification in ESRD patients [7, 8].

Nicotinamide is a circulating form of nicotinic acid. The biologic function of nicotinamide derives from its active form, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). Administration of nicotinamide is reported to increase the concentration of renal cortical tissue NAD, which was shown to inhibit phosphate uptake by brush border membrane vesicles obtained from rat proximal tubules [9, 10]. A similar effect of nicotinamide has been reported on phosphate uptake by brush border membrane vesicles isolated from the rat small intestine [11], suggesting that nicotinamide is probably an effective inhibitor of phosphorus absorption in the intestine.

**Key words:** nicotinamide, hyperphosphatemia, hemodialysis patients, nicotinamide adenine dinucleotide, parathyroid hormone, serum lipids.

Received for publication April 8, 2003

and in revised form September 8, 2003

Accepted for publication October 21, 2003

© 2004 by the International Society of Nephrology

Table 1. Baseline characteristics of study patients (N = 65)

Gender males/females	38/27
Age years	57.0 ± 11.5
Vitamin D users/nonusers	17/48
Time on dialysis years	6.5 ± 5.2
Etiology of end-stage renal disease	
Chronic glomerulonephritis	31
Diabetes mellitus	24
Hypertension	5
Polycystic kidney disease	3
Other	2
Laboratory values	
Serum phosphorus mg/dL	5.4 ± 1.5
Serum calcium mg/dL	9.1 ± 0.8
Serum calcium-phosphorus product mg <sup>2</sup> /dL <sup>2</sup>	48.4 ± 13.6
Serum intact parathyroid hormone pg/mL	187.3 ± 204.4

Numbers are number of patients unless otherwise indicated.

The aim of the present study was to examine whether nicotinamide lowers serum levels of phosphorus and intact parathyroid hormone (iPTH) in long-term hemodialysis patients.

## METHODS

Seventy-two hemodialysis patients were originally enrolled in the present study. All patients had been dialyzed three times weekly with a bicarbonate dialysate for 6.5 ± 5.2 years. The dialysate calcium concentration was 3.0 mEq/L. Patients with a history of serious gastrointestinal disease, malignancy, total parathyroidectomy, vasculitis, dementia, or poorly controlled diabetes mellitus were excluded. Inclusion criteria were stable dosage of calcium carbonate (2.9 ± 1.7 g/day) for at least 1 month and avoidance of intentional changes in diet throughout the study. Seventeen patients were being given vitamin D (0.4 ± 0.2 µg/day) at the start of the study. No changes in the dosage of vitamin D were made during the study.

We obtained written informed consent from each participant, and the study protocol was approved by the Human Research Ethics Committee of the Koto Hospital. Administration of calcium carbonate was discontinued during a 2-week pretreatment washout period (weeks -2 to 0). Sixty-five hemodialysis patients (38 men and 27 women; mean age, 57.0 years) with serum phosphorus levels of more than 6.0 mg/dL during the pretreatment washout period were eligible for nicotinamide treatment. Characteristics of these patients are shown in Table 1. The 65 patients received nicotinamide (Nippon Roche K.K., Tokyo, Japan) for 12 weeks (weeks 1 to 12). The starting dose of nicotinamide was 500 mg/day and was increased by 250 mg/day every 2 weeks if necessary to control the serum phosphorus concentration at less than 6.0 mg/dL. The nicotinamide was given twice daily in powder form immediately after meals. After 12 weeks of treatment, the patients were taken off nicotinamide (weeks 13 to 14, posttreatment washout period).

Blood samples were collected weekly prior to a hemodialysis session, and serum concentrations of phosphorus, calcium, and lipids were determined by standard clinical laboratory methods. The serum iPTH concentration was determined by immunochemilumetric assay (Intact PTH Kit) (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA) (upper limit of normal, 65 pg/mL). The blood NAD concentration was determined according to the Shibata and Murata-modified [12] Nisselbaum and Green method [13]. Blood NAD concentrations were expressed as NAD per 10<sup>5</sup> erythrocytes (nmol/10<sup>5</sup> erythrocytes) because NAD was not detected in serum. Dietary intake was estimated every 2 weeks as the protein catabolic rate (PCR) [14]. We judged the avoidance of intentional changes in diet by no change in PCR. Compliance was confirmed by face-to-face interview.

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) or as median values when the data were highly skewed. The Wilcoxon signed-rank test was used to analyze differences in paired group data. The effects of nicotinamide administration on the serum phosphorus concentrations and other laboratory values were assessed by comparing the serum levels at the end of the pretreatment washout period to those at the end of the treatment period. Spearman's rank correlation coefficient was calculated to assess association between the changes in serum phosphorus and other laboratory values. Statistical analyses were based on two-tailed Student *t* test. iPTH levels were shown as median (10<sup>th</sup> to 90<sup>th</sup> percentile) and expressed as box and whisker plots. The analysis of PTH data was based on Welch *t* test. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

The mean dose of nicotinamide at the end of the 12-week treatment period was 1080 ± 370 mg/day. The minimum dose of nicotinamide was 500 mg/day (7.9 mg/kg body weight/day) and the maximum was 1750 mg/day (33.3 mg/kg body weight/day). Compliance was confirmed in all cases. No significant changes were observed in PCR with nicotinamide treatment (before treatment, 1.1 ± 0.2 g/kg/day vs. after treatment, 1.1 ± 0.2 g/kg/day).

The blood NAD concentration increased from 9.3 ± 1.9 nmol/10<sup>5</sup> erythrocytes to 13.2 ± 5.3 nmol/10<sup>5</sup> erythrocytes with nicotinamide treatment (*P* < 0.01) (Fig. 1). The doses of nicotinamide were significantly correlated with blood NAD concentrations (*r* = 0.805, *P* < 0.0001). After the posttreatment washout period, the blood NAD level decreased significantly to 8.4 ± 2.7 nmol/10<sup>5</sup> erythrocytes (*P* < 0.005). There was no significant difference in the NAD concentration between the pretreatment washout period and the posttreatment washout period.

Serum phosphorus levels changed significantly with nicotinamide treatment (Fig. 2). Serum phosphorus levels

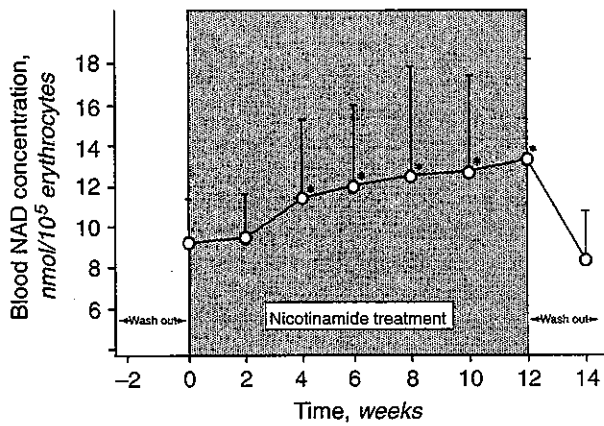


Fig. 1. Effect of nicotinamide on blood nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) concentration in hemodialysis patients. -2 weeks indicates the start of pretreatment washout. \*vs. 0 week,  $P < 0.01$ .

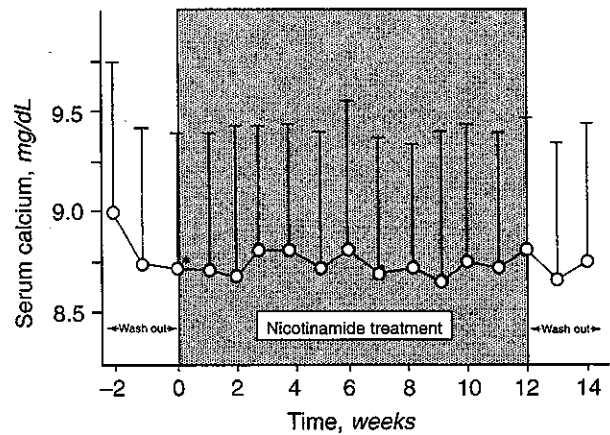


Fig. 3. Serum calcium levels in relation to nicotinamide treatment in hemodialysis patients.

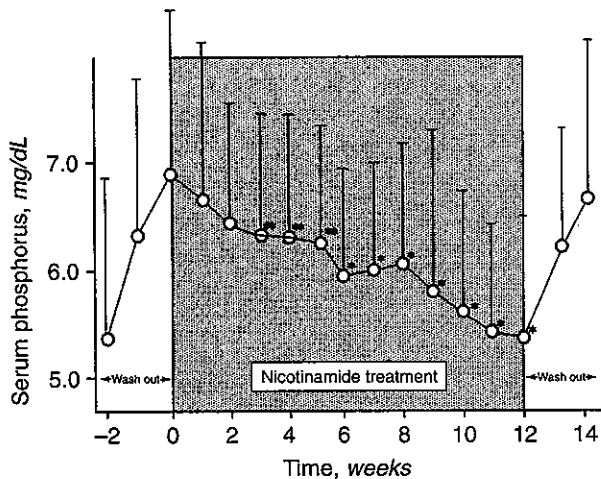


Fig. 2. Changes in serum phosphorus levels with nicotinamide treatment in hemodialysis patients. \*vs. 0 week,  $P < 0.001$ ; \*\*vs. 0 week,  $P < 0.01$ .

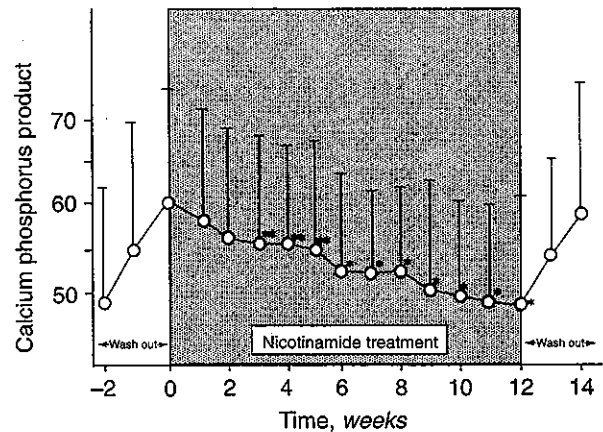


Fig. 4. Effect of nicotinamide treatment on calcium-phosphorus product in hemodialysis patients. \*vs. 0 week,  $P < 0.0001$ ; \*\*vs. 0 week,  $P < 0.01$ .

increased from  $5.4 \pm 1.5$  mg/dL before the pretreatment washout period to  $6.9 \pm 1.5$  mg/dL after the pretreatment washout period. Serum phosphorus levels decreased immediately after the start of nicotinamide treatment and continued to decrease until the cessation of treatment. Serum phosphorus levels decreased from  $6.9 \pm 1.5$  mg/dL to  $5.4 \pm 1.3$  mg/dL during the 12 weeks of nicotinamide treatment ( $P < 0.0001$ ). After the posttreatment washout, serum phosphorus levels increased significantly to  $6.7 \pm 1.6$  mg/dL ( $P < 0.0001$ ). Reductions in serum phosphorus levels were comparable between vitamin D users and nonvitamin D users.

Serum calcium levels decreased from  $9.1 \pm 0.8$  mg/dL before the pretreatment washout period to  $8.7 \pm 0.7$  mg/dL after the pretreatment washout period ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 3). Serum calcium levels were unchanged during the 12 weeks of nicotinamide treatment ( $8.8 \pm 0.7$  mg/dL,

$P = 0.4230$ ) and remained the same after the 2-week posttreatment washout period ( $8.8 \pm 0.7$  mg/dL). Serum calcium levels were similar between vitamin D users and nonvitamin D users.

The calcium-phosphate product increased significantly from  $48.4 \pm 13.6$  mg<sup>2</sup>/dL<sup>2</sup> to  $59.8 \pm 14.5$  mg<sup>2</sup>/dL<sup>2</sup> at the end of the pretreatment washout period ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 4). A calcium-phosphorus product decreased immediately and significantly to  $47.3 \pm 13.4$  mg<sup>2</sup>/dL<sup>2</sup> during the 12 weeks of nicotinamide treatment ( $P < 0.0001$ ). With the cessation of nicotinamide, the serum calcium-phosphorus product increased gradually, reaching  $58.7 \pm 16.1$  mg<sup>2</sup>/dL<sup>2</sup> after the 2-week posttreatment washout period ( $P < 0.0001$ ).

Median serum iPTH levels over the course of the study are shown in Figure 5. Median serum iPTH levels increased with the pretreatment washout from 130.0 (32.8 to 394.0) pg/mL to 200.0 (92.5 to 535.0) pg/mL ( $P < 0.05$ ).

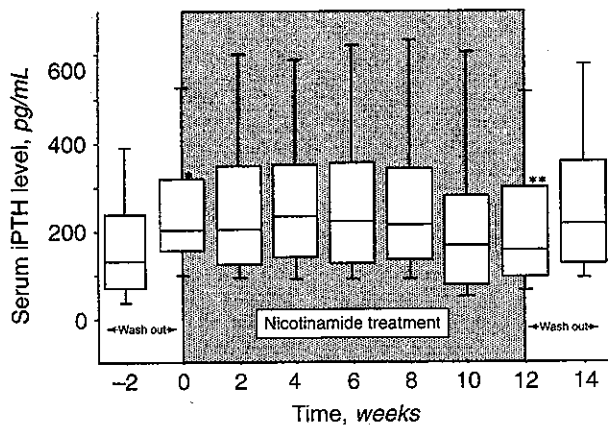


Fig. 5. Box and whisker plots showing serum intact parathyroid hormone (iPTH) levels in nicotinamide-treated hemodialysis patients. \* vs. -2 weeks,  $P < 0.05$ ; \*\* vs. 4 weeks,  $P < 0.05$ .

With nicotinamide treatment, median serum iPTH levels reached 230.0 (90.8 to 582.0) pg/mL on week 4 and decreased, reaching 150.0 (57.6 to 518.0) pg/mL by the end of the 12 weeks of treatment ( $P < 0.05$ ). After the 2-week posttreatment washout period, median serum iPTH levels were again increased to 220.0 (97.2 to 570.0) pg/mL. Median iPTH levels decreased with nicotinamide treatment in both vitamin D users and nonvitamin D users. Median serum iPTH levels after nicotinamide treatment did not differ significantly from those before the pretreatment washout. No changes were observed in serum magnesium concentrations with nicotinamide treatment. Serum alkaline phosphatase levels decreased significantly from  $173.8 \pm 79.3$  IU/L to  $159.3 \pm 68.4$  IU/L ( $P < 0.01$ ) at 6 weeks and to  $159.2 \pm 58.6$  IU/L ( $P < 0.01$ ) at 12 weeks after the start of nicotinamide treatment and then increased significantly to  $166.1 \pm 59.8$  IU/L ( $P < 0.05$ ) at 2 weeks after the cessation of nicotinamide.

Serum high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels increased significantly from  $47.4 \pm 14.9$  mg/dL before the pretreatment washout period to  $67.2 \pm 22.3$  mg/dL ( $P < 0.0001$ ) after the 12 weeks of nicotinamide treatment. In contrast, serum low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels decreased from  $78.9 \pm 18.8$  mg/dL to  $70.1 \pm 25.3$  mg/dL ( $P < 0.01$ ). There were no changes in serum total cholesterol levels (before treatment,  $160.9 \pm 30.3$  mg/dL vs. after treatment,  $161.6 \pm 33.9$  mg/dL) or in serum triglyceride levels (before treatment,  $145.7 \pm 82.2$  mg/dL vs. after treatment,  $131.4 \pm 69.6$  mg/dL) throughout the study period. Changes in serum HDL cholesterol levels correlated significantly with changes in NAD concentrations ( $r = 0.512$ ,  $P < 0.01$ ).

There were no significant changes in other laboratory values during nicotinamide treatment. Serum albumin and total serum proteins did not change significantly during the study. Adverse events possibly related to treat-

ment included diarrhea (five patients, 7.8%) and thrombocytopenia (one patient, 1.6%). The platelet count of the patient with thrombocytopenia decreased from  $16.8 \times 10^4/\mu\text{L}$  to  $8.3 \times 10^4/\mu\text{L}$ . Two weeks after discontinuance of nicotinamide, the platelet count increased to  $18.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ . There were no changes in his erythrocyte or leucocyte count during nicotinamide treatment. All six patients with adverse effects had received more than 1500 mg/day of nicotinamide. The diarrhea and thrombocytopenia disappeared when the nicotinamide was reduced or discontinued.

## DISCUSSION

Hyperphosphatemia is an important risk factor for the development of ectopic calcification and cardiovascular changes in patients undergoing hemodialysis. Although calcium- or aluminum-based phosphate binders are usually essential for avoiding hyperphosphatemia in long-term hemodialysis patients, certain adverse effects associated with the absorption of calcium and/or aluminum are inevitable. We showed in the present study that nicotinamide controls serum phosphorus levels in hemodialysis patients at levels similar to those achieved with currently available calcium- or aluminum-based phosphate binders.

A novel calcium- and aluminum-free phosphate binder, poly[allylamine hydrochloride] (RenaGel, Gel-Tex Pharmaceuticals, Inc., Waltham, MA, USA), was recently reported to reduce serum phosphorus and iPTH concentrations without significant changes in serum calcium levels [15-17]. Total serum cholesterol and LDL cholesterol levels were also shown to be significantly reduced in RenaGel-treated patients without a reduction in HDL cholesterol [15-17].

Nicotinamide, a metabolite of nicotinic acid, stimulates biosynthesis of NAD, inhibits catabolism of NAD, and increases the ratio of NAD (oxidized) to NADH (reduced) [10]. The mechanism by which nicotinamide lowers serum phosphorus levels remains unknown. NAD is proposed to be an intracellular regulator of sodium-dependent phosphate transport [10]. Nicotinamide has been shown in rats to increase the renal cortical NAD concentration, inhibit phosphate uptake by brush border membrane vesicles of the renal proximal tubules in the rat kidney, and increase phosphate excretion in thyroparathyroidectomized rats [9, 10]. Intestinal phosphate transport is reported to occur by a sodium-independent, nonsaturable process and an active, sodium-dependent component of phosphate absorption in the duodenum and jejunum [18]. Katai et al [11] showed that nicotinamide inhibits phosphate uptake in the brush border membrane of rat small intestine. Furthermore, nicotinamide, apart from its inhibitory effect on poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 and its ability to restore intracellular NAD<sup>+</sup> pools, has recently been

suggested to act against the pathogenic process leading to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). A recent meta-analysis showed nicotinamide, when given at the time of IDDM diagnosis, to have a protective effect on residual cell function of the pancreas as assessed by C-peptide secretion [19]. It is probable that nicotinamide improves insulin secretion and consequently decreases serum phosphorus levels by shifting phosphorus from the extracellular to the intracellular space.

Nicotinamide significantly reduced serum phosphorus levels in hemodialysis patients in the present study. Mean serum phosphorus levels decreased significantly during the 12 weeks of nicotinamide treatment and increased significantly to pretreatment levels after the 2-week post-treatment washout, suggesting the serum phosphorus-lowering effect to be due to nicotinamide. The onset of nicotinamide action was relatively rapid; the substantial reduction in serum phosphorus levels occurred within 2 weeks. This study proved that the serum phosphorus-lowering ability of nicotinamide is nearly equivalent to that of calcium-based phosphate binders.

Serum calcium levels declined after the pretreatment washout in our study, probably due to the removal of calcium carbonate. Nicotinamide treatment did not change serum calcium levels during the 12 weeks. The risk of vascular calcification increases with increases in serum calcium-phosphorus product. The mean increase in serum calcium-phosphorus product we observed after the pretreatment washout along with the remarkable reduction to below prewashout levels indicates that nicotinamide can reduce the risk of vascular calcification in hemodialysis patients.

Several investigators have shown that increased serum phosphorus levels increase the synthesis and secretion of PTH [20–22]. Evidence exists for a direct role of serum phosphorus as a regulator of parathyroid gland function [23]. In the present study, median serum iPTH levels gradually decreased after the start of nicotinamide treatment and showed significant reduction after 12 weeks of treatment. The increase in serum phosphorus and the decrease in serum calcium with pretreatment washout stimulated a corresponding increase in median serum iPTH levels. The decline in serum iPTH levels during the second half of nicotinamide treatment was associated with the decline in serum phosphorus.

Nicotinamide treatment significantly increased serum HDL cholesterol and decreased LDL cholesterol in our subjects. Shepherd et al [24] reported that nicotinic acid elevates the HDL<sub>2</sub>-to-HDL<sub>3</sub> ratio because of a great increase in the absolute level of circulating HDL<sub>2</sub> and a small absolute decrease in circulating HDL<sub>3</sub>. Cardiovascular diseases, including myocardial infarction, sudden death, and stroke, collectively account for approximately 50% of the mortality of ESRD patients [25, 26]. There are multiple abnormalities in the lipid profile of ESRD

patients, and these may contribute to the high incidence of atherosclerosis [27]. Controlled clinical trials will ultimately determine whether an increase in HDL cholesterol will be of benefit to ESRD patients with atherosclerosis.

Nicotinamide treatment has a few adverse effects, including the possible occurrence of gastrointestinal disorders such as diarrhea. One patient showed a statistically significant decrease in platelet count during nicotinamide treatment. After the washout period, however, the platelet count returned to the pretreatment level. Nicotinamide has been used at 1500 mg/day to 3000 mg/day without adverse effects for protection of beta cells from end-stage destruction in patients with recent-onset IDDM [28]. However, we used a mean dose of 1080 mg/day. Rutkowski et al [29] reported recently that serum *N*-methyl-2-pyridine-5-carboxamide (2-PY), an end product of NAD degradation, was elevated in hemodialysis patients and that nicotinamide inhibited PARP-1 activity in vitro. In the present study, however, intracellular NAD levels in hemodialysis patients (9.3 nmol/10<sup>5</sup> erythrocytes) were nearly the same as levels in healthy subjects (9.0 nmol/10<sup>5</sup> erythrocytes) [12], suggesting that intracellular 2-PY concentrations may not be increased in chronic renal failure patients. Nicotinamide is a well-known inhibitor of PARP-1. Activation of PARP-1 has been implicated in the pathogenesis of stroke, myocardial ischemia, diabetes, cardiovascular dysfunction, shock, central nervous system injury, and various other forms of inflammation. Therefore, inhibition of PARP-1 by pharmacological agents may prove useful in the treatment of these diseases. Although blood NAD concentrations were increased up to 13.2 nmol/10<sup>5</sup> erythrocytes after nicotinamide administration in our study, it is not clear whether this concentration of intracellular NAD can inhibit PARP-1 activity. Further studies on adverse effects of long-term administration of nicotinamide are needed.

## CONCLUSION

Nicotinamide may provide an alternative for controlling hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in hemodialysis patients.

Reprint requests to Hikaru Koide, M.D., Division of Nephrology, Department of Medicine, Koto Hospital, 6-8-5 Ojima, Koto-ku, Tokyo 136-0072, Japan.

E-mail: hkoide@koto-hospital.or.jp

## REFERENCES

1. SLATOPOLSKY E, BRICKER NS: The role of phosphate restriction in the prevention of secondary hyperparathyroidism in chronic renal disease. *Kidney Int* 4:141–145, 1973
2. DELMEZ JA, SLATOPOLSKY E: Hyperphosphatemia: Its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 19:303–317, 1992

3. RAMIREZ JA, EMMETT M, WHITE MG, et al: The absorption of dietary phosphorus and calcium in hemodialysis patients. *Kidney Int* 30:753-759, 1986
4. HOU SH, ZHAO J, ELLMAN CF, et al: Calcium and phosphorus fluxes during hemodialysis with low calcium dialysate. *Am J Kidney Dis* 18:217-224, 1991
5. ALFREY AC, LEGENDRE GR, KAEHNY WD: The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N Engl J Med* 294:184-188, 1976
6. OTT SM, MALONEY NA, COBURN JW, et al: The prevalence of bone aluminum deposition in renal osteodystrophy and its relation to the response to calcitriol therapy. *N Engl J Med* 307:709-713, 1982
7. SLATOPOLSKY E, WEERTS C, LOPEZ-HILKER S, et al: Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. *N Engl J Med* 315:157-161, 1986
8. MERIC F, YAP P, BIA MJ: Etiology of hypercalcemia in hemodialysis patients on calcium carbonate therapy. *Am J Kidney Dis* 5:459-464, 1990
9. BERNDT TJ, PFEIFER JD, KNOX FG, et al: Nicotinamide restores phosphaturic effect of PTH and calcitonin in phosphate deprivation. *Am J Physiol* 242:F447-F452, 1982
10. KEMPSON SA, COLON-OTERO G, OU SY, et al: Possible role of nicotinamide adenine dinucleotide as an intracellular regulator of renal transport of phosphate in the rat. *J Clin Invest* 67:1347-1360, 1981
11. KATAI K, TANAKA H, TATSUMI S, et al: Nicotinamide inhibits sodium-dependent phosphate cotransport activity in rat small intestine. *Nephrol Dial Transplant* 14:1195-1201, 1999
12. SIBATA K, MURATA K: Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nutr Int* 2:177-181, 1986
13. NISSELBAUM JS, GREEN S: A simple ultramicro method for determination of pyridine nucleotides in tissues. *Anal Biochem* 27:212-217, 1969
14. SHINZATO T, NAKAI S, MIWA M, et al: New method to calculate creatinine generation rate using pre- and postdialysis creatinine concentrations. *Artif Organs* 21:864-872, 1997
15. CHERTOW GM, BURKE SK, LAZARUS JM, et al: Poly[allylamine hydrochloride] (RenaGel): A noncalcemic phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 29:66-71, 1997
16. GOLDBERG DI, DILLON MA, SLATOPOLSKY EA, et al: Effect of RenaGel®, a non-absorbed, calcium- and aluminum-free phosphate binder, on serum phosphorus, calcium, and intact parathyroid hormone in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 13:2303-2310, 1998
17. SLATOPOLSKY EA, BURKE SK, DILLON MA: Rena Gel®, a non-absorbed calcium- and aluminum-free phosphate binder, lowers serum phosphorus and parathyroid hormone. *Kidney Int* 55:299-307, 1999
18. BLEYER AJ, BURKE SK, DILLON M, et al: A comparison of the calcium-free phosphate binder sevelamer hydrochloride with calcium acetate in the treatment of hyperphosphatemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 33:694-701, 1999
19. POZZILLI P, BROWNE PD, KOLB H: Meta-analysis of nicotinamide treatment in patients with recent-onset IDDM. *Diabetes Care* 19:1357-1363, 1996
20. LOPEZ-HILKER S, DUSSO AS, RAPP NS, et al: Phosphorus restriction reverses hyperparathyroidism in uremia independent of changes in calcium and calcitriol. *Am J Physiol* 259:F432-F437, 1990
21. YI H, FUKAGAWA M, YAMATO H, et al: Prevention of enhanced parathyroid hormone secretion, synthesis and hyperplasia by mild dietary phosphorus restriction in early chronic renal failure in rats: Possible direct role of phosphorus. *Nephron* 70:242-248, 1995
22. SLATOPOLSKY E, FINCH J, DENDA M, et al: Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest* 97:2534-2540, 1996
23. NIELSEN PK, FELDT-RASMUSSEN U, OLGAARD K: A direct effect in vitro of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. *Nephrol Dial Transplant* 11:1762-1768, 1996
24. SHEPHERD J, PACKARD CJ, PATSCH JR, et al: Effects of nicotinic acid therapy on plasma high density lipoprotein subfraction distribution and composition and on apolipoprotein A metabolism. *J Clin Invest* 63:858-867, 1979
25. WHEELER DC: Should hyperlipidaemia in dialysis patients be treated? *Nephrol Dial Transplant* 12:19-21, 1997
26. BOMMER J, STROHBECK E, GOERICH J, et al: Arteriosclerosis in dialysis patients. *Int J Artif Organs* 19:638-644, 1996
27. O'NEAL D, LEE P, MURPHY B, BEST J: Low-density lipoprotein particle size distribution in end-stage renal disease treated with hemodialysis or peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 27:84-91, 1996
28. POZZILLI P, VISALLI N, SIGNORE A, et al: Double blind trial of nicotinamide in recent-onset IDDM (the IMDIAB III study). *Diabetologia* 38:848-852, 1995
29. RUTKOWSKI B, SLOMINSKA E, SZOLKIEWICZ M, et al: N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: A novel uremic toxin? *Kidney Int* 63 (Suppl 84):S19-S21, 2003

## 報 文

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

(平成 16 年 3 月 24 日受理)

福 渡 努\* 鈴 浦 千 絵\* 佐 々 木 隆 造\* 柴 田 克 己†\*

Action Site of Bisphenol A as Metabolic Disruptor Lies in the  
Tryptophan-Nicotinamide Conversion PathwayTsutomu FUKUWATARI, Chie SUZUURA, Ryuzo SASAKI  
and Katsumi SHIBATA†(Laboratories of Food Science and Nutrition, Department of Life Style Studies, School of  
Human Cultures, The University of Shiga Prefecture: 2500 Hassaka-cho,  
Hikone 522-8533, Japan; † Corresponding author)

We have reported that the administration of bisphenol A to rats reduces the conversion ratio of tryptophan to nicotinamide. In the present paper, we show that bisphenol A, a monomer of polycarbonate plastics, inhibits the enzyme activity of kynurenine 3-hydroxylase. Namely, the conversion ratio of tryptophan to nicotinamide is reduced through the inhibition of kynurenine 3-hydroxylase activity by bisphenol A.

(Received March 24, 2004)

**Key words:** 内分泌攪乱物質 endocrine disruptor; ビスフェノール A bisphenol A; 代謝攪乱物質 metabolic disruptor; トリプトファン tryptophan; ニコチンアミド nicotinamide; キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ kynurenine 3-hydroxylase

## 緒 言

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<sup>1)</sup>。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 B<sub>3</sub>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<sup>2)~4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>1)</sup>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い、成果を得たので報告する。

## 実験方法

## 1. 試 薬

飼料に使用したカゼイン、L-メチオニン、ショ糖は和光純薬工業(株)より購入した。ミネラル混合 (AIN93 配合; 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ズラニル酸、キヌレン酸、キサントレン酸、3-ヒドロキシアンズラニル酸、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (MNA) は東京化成工業(株)より、キノリン酸、ニコチンアミド、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<sup>1</sup>-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<sup>3)</sup>により、N<sup>1</sup>-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<sup>4)</sup>により合成した。4-ピリドキシン酸 (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。

† 連絡先

\* 滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻: 〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

Table 1. Composition of the Diet

	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 mixture <sup>a</sup> (AIN-93M)	5	5	5
Vitamin mixture (NiA-free) <sup>a</sup> (AIN-93-VX containing 25 choline bitartrate)	1	1	1
Bisphenol A	0	0.1	0.5

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

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と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 μmのマイクロフィルターでろ過した後、アンスラニル酸<sup>8)</sup>、キヌレン酸<sup>9)</sup>、キサントレン酸<sup>10)</sup>、3-ヒドロキシアンスラニル酸<sup>10)</sup>およびキノリン酸<sup>11)</sup>をそれぞれ文献に示した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<sup>12)</sup>。

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<sup>7)</sup>。

#### 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<sup>13)</sup>の報告した遠心分画法に従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(pH 7.0)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<sup>14)</sup>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<sup>14)</sup>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 μL)は次のとおりである。50 μLの0.5 M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0), 15 μLの10 mM KCN, 50 μLの100 mM KCl, 10 μLの10 mM NADPH, 10 μLの10 mM 硫酸L-キヌレニン, 10 μLのエタノール, 255 μLの水, 100 μL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 μL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×g, 3分間遠心分離することで、上清を得た。沈殿には500 μLの水を加え、5分間混合後、10,000×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<sup>14)</sup>。

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製した。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 μL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(Fig. 5参照)。

#### 3.3 尿中のチアミン(ビタミンB<sub>1</sub>)の測定方法

基本的には、木村らが<sup>15)</sup>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 μm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に示したように、始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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を用い、流速1.0 mL/minで流した。反応液1は0.01% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>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1,200 mm, カラムはShodex Rs-pak NN-614 (150 mm×6.0 mm i.d.)を使用し、カラム温度は40°Cに維持し、検出は励起波長365 nm, 蛍光波長435 nmで行った。



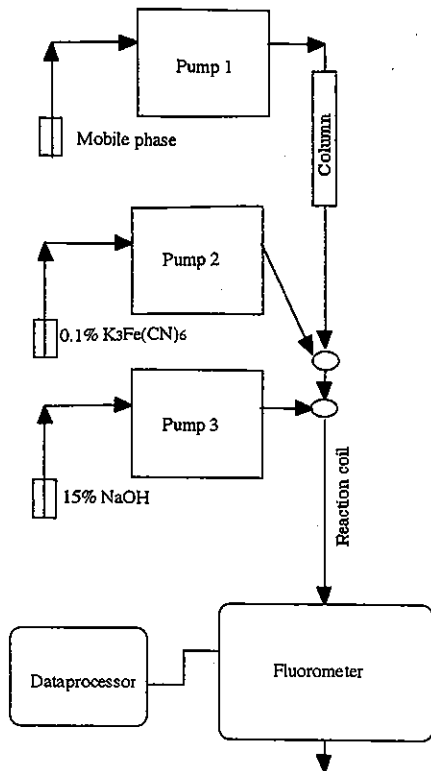


Fig. 1. Diagram of HPLC system for measurement of thiamin

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<sup>16)</sup>。HPLC注入用試料は、集めた尿を0.45 μmのマイクロフィルターでろ過した液である。カラムはTosoh TSKgel ODS-80Ts (250×4.6 mm i.d.)を用い、移動相としては10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.5; 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°Cに維持した。検出は、励起波長445 nm、蛍光波長530 nmで行った。

3.5 尿中のPICの測定方法

ビタミンB<sub>6</sub>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<sup>17)</sup>。HPLC注入用試料は、集めた尿を0.45 μmのマイ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°C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-ジケトグルン酸)の測定方法

メタリン酸酸性下で保存した尿をKishidaらの方法<sup>18)</sup>に従って、オサゾン誘導体に変換した後測定を行った。カラムはWaters μBondasphere 5 μC<sub>18</sub>-100A (150 mm×3.9 mm i.d.)を用い、移動相として、アセトニトリル500 mLに終濃度が0.1%になるようにトリエチルアミン(pH 3.0)溶液を加えた後、水で1,000 mLにしたものを使用した。カラム温度は40°Cに維持し、流速1.0 mL/minで、検出は505 nmで行った。

結果

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. 2A) と飼料摂取量 (Fig. 2B) は、0.1% ビスフェノールA添加食では対照群と比較

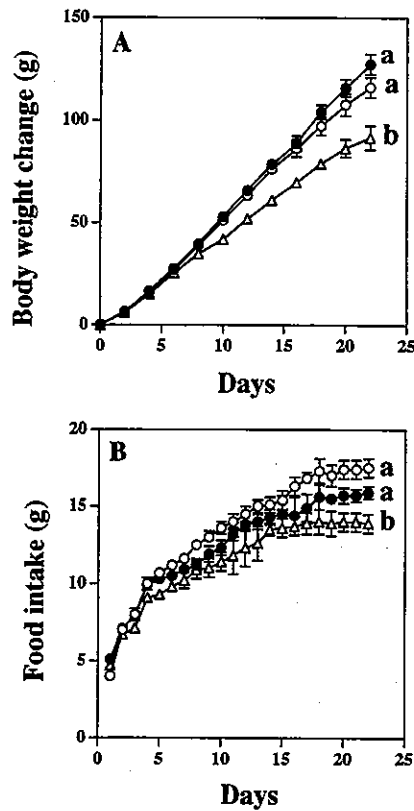


Fig. 2. Effects of bisphenol A on the body weight gain (A) and food intake (B) of rats.

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* (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; different superscript letters indicate significant differences at *p*<0.05 in the Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

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 <sup>a</sup>	1.54±0.07 <sup>a</sup>	1.29±0.07 <sup>b</sup>
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 <sup>a</sup>	0.57±0.04 <sup>a, c</sup>	0.44±0.05 <sup>b, c</sup>
Brain (g/rat)	1.10±0.04	1.09±0.02	1.00±0.03
Testis (g/rat)	1.58±0.08 <sup>a</sup>	1.50±0.08 <sup>a</sup>	0.65±0.03 <sup>b</sup>
<hr/>			
Liver (g/100 g of b.w.*)	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 <sup>a</sup>	0.98±0.03 <sup>a</sup>	0.48±0.02 <sup>b</sup>

\* 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 indicate significant differences at  $p < 0.05$  in the Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

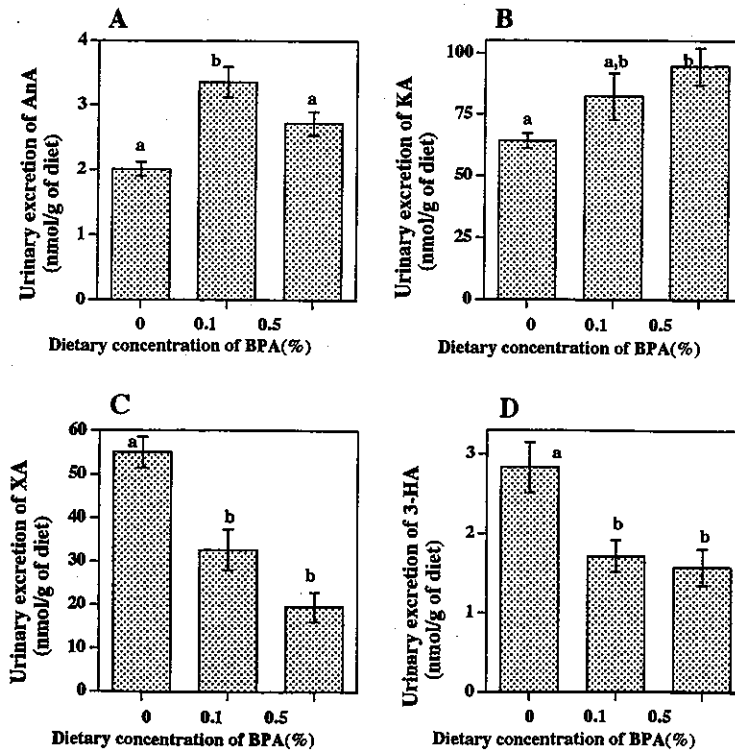


Fig. 3. Effects of bisphenol A on the urinary excretion of AnA (A), KA (B), XA (C) and 3-HA (D).

Twenty-four-hour urine samples were collected on the last day of the experiment. Values are means±SEM for five rats; different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  in the Student-Newman-Keuels multiple comparison test. AnA=anthranilic acid, KA=kynurenic acid, XA=xanthurenic acid, 3-HA=3-hydroxyanthranilic acid.

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。

## 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、腎臓およ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。

### 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

Fig. 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。

### 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. 4A) 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

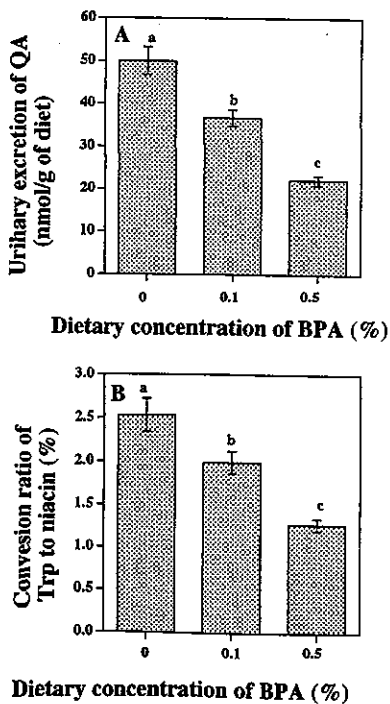


Fig. 4. Effects of bisphenol A on the urinary excretion of QA (A) and the conversion ratio of Trp to Nam (B).

Twenty-four-hour urine samples were collected on the last day of the experiment. Values are means  $\pm$  SEM for five rats; different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  in the Student-Newman-Keuels multiple comparison test. QA=quinolinic acid, Trp=tryptophan, Nam=nicotinamide.

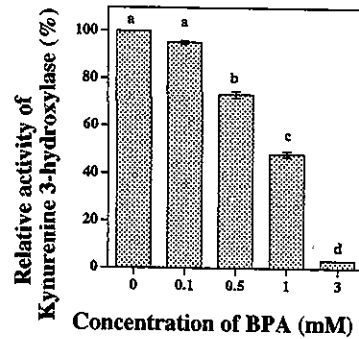


Fig. 5. Inhibition of kynurenine 3-hydroxylase activity by bisphenol A *in vitro*.

Values are means  $\pm$  SEM for three separate experiments; different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  in the Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

ファン-ニコチンアミド転換率 (Fig. 4B) においても見られた。

### 5. キヌレン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。Fig. 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。

### 6. 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. 6A)、リボフラビン (Fig. 6B)、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-ジケトグルン酸) (Fig. 6D) の排泄量は有意に増大した。一方、ビタミンB<sub>6</sub>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. 6C)。

### 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<sup>1)</sup>。1% ビスフェノールA群のラット1匹当たりの1日の摂取量は約200 mgであり、体重1 kg 当たりでは、800 mgとなる。この量は雌性ホルモンの攪乱作用が報告されている400 mg/kg 体重/日<sup>19)</sup>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<sup>1)</sup>では、6週齢のラットを用いたが、一般的に毒性の現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及ぼす影響は、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、各種臓器重量に及ぼす影響の結果も、

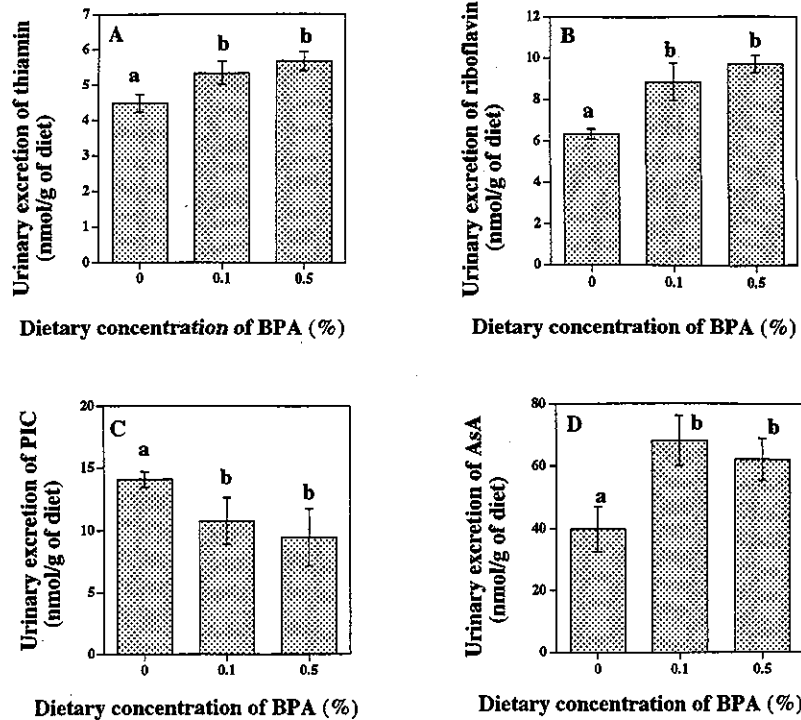


Fig. 6. Effects of bisphenol A on the urinary excretion of thiamin (A), riboflavin (B), 4-pyridoxic acid (PIC) (C) and ascorbic acid (D).

Twenty-four-hour urine samples were collected on the last day of the experiment. Values are means  $\pm$  SEM for five rats; different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  in the Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

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それぞれ有意に増大あるいは増大傾向にさせ、一方、キサントレン酸と 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<sup>1)</sup>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 の作用点をキノレン 3-ヒドロキシゲナーゼと推定した<sup>1)</sup>。今回の実験結果でも、全く同じ現象が認められた (Fig. 2, 3)。そこで、本酵素活性に及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<sup>21)</sup>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<sup>22)</sup>は分岐鎖  $\alpha$ -ケト酸が阻害することを、Mayer ら<sup>23)</sup>は  $\text{Cu}^{2+}$  や Dicumarol による阻害を、Okamoto ら<sup>24)</sup>は甲状腺機能亢進、すなわちチロキシンによる阻害を、Bender と Smith<sup>25)</sup>はある種の芳香族化合物による阻害を報告している。Müller<sup>26)</sup>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。

キノレン 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<sup>20)</sup>。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及ぼす影響を調べた。その結果は Fig. 6 に示したように、チアミン (ビタミン B<sub>1</sub>) とリボフラビン (ビタミン B<sub>2</sub>) 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<sub>6</sub> の異化代謝産物である PIC は減少した。摂取量が等しいときは (Fig. 6 の値は 1 g の飼料を摂取したときの値)、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 との接点はいくつか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<sup>26)</sup>という事実から推定されるが、