

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 ^a	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

^amean \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. ビオチン

これまでに報告された本邦および欧米の母乳ビオチン

ン含量をまとめたものが表5である。Heardら⁸⁾は、母乳ビオチンの99%以上のビ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Johnson⁹⁾は、初乳に比べ成熟乳ではビオチン濃度が高いことを示した。

ビ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¹⁰⁾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¹¹⁾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)の母乳でもビ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、ビオチン含量は0.87 \pm 0.42 $\mu\text{g}/100\text{g}$ であった¹²⁾。

Hiranoら¹³⁾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¹⁴⁾で母乳ビオチン量を分析している。これまでの結果と同様に、泌乳時期に従ってビオチン量が増加し、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、遊離型ビオチンの割合が、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⁸⁾の結果とは異なり、今後の検討が必要である。

ビ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	母乳ビオチン量(μg)	授乳期	授乳日数	分析法
Hood and Johnson, '80	0.295/100ml	初乳	1日	同位体希釈法
	1.246	成熟乳	49日	
Goldsmith <i>et al.</i> , '82	0.07/100g	早期移行乳	3-8日	微生物学的定量法(比濁法)
	0.3	移行乳	10-14日	
	0.47	成熟乳	30-47日	
Ford <i>et al.</i> , '83	0.02 l /100ml	初乳	1-5日	微生物学的定量法(比濁法)
	0.22	移行乳	6-15日	
	0.533	成熟乳	1-244日	
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	出産後	<5日	微生物学的定量法(比濁法)
	0.45 (n.d.-2.7)	授乳	2ヶ月	
	nd-1.8	授乳	6ヶ月	
	0.18-1.0	授乳	9ヶ月	
Hirano <i>et al.</i> , '92	0.08/100ml	初乳	<5日	微生物学的定量法(プレート法)
	0.18	移行乳	6-14日	
	0.52	成熟乳	15-24日	
Present study '04	0.41/100ml	成熟乳	21-89日	微生物学的定量法(比濁法)
	0.36	成熟乳	90-179日	

解法が行われているが, パパイン処理を用いた Salmenpera ら¹⁵⁾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ることが示唆される。

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¹⁾。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¹⁶⁾。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¹⁷⁾¹⁸⁾。

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¹⁶⁾。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 μg 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¹⁹⁾²²⁾。

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⁴⁾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¹⁾。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⁴⁾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²³⁾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 Picciano²⁴⁾は, 2.2~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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⁴⁾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³⁾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²⁵⁾、一般調製粉乳で、製品100g当たり2000 μ g(400 μ g/100kcal、あるいは14%調乳液100ml当たり280 μ 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 μ 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いた人工栄養児で、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²⁶⁾。

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 μ 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¹¹⁾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 μ g/ml、6~15日では1.42 μ g/ml、16~244日では1.82 μ g/mlと増加が見られた。

井戸田ら⁴⁾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 μ g/ml、授乳6~10日で1.2 μ g/ml、授乳11~15日で2.4 μ g/ml、31~60日で2.3 μ g/ml、61~120日で1.9 μ g/ml、121~240日で1.8 μ g/mlであった。Fordら¹¹⁾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 \rightarrow 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¹¹⁾の報告とHPLC法を用いた井戸田ら⁴⁾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 (μ 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 $\mu\text{g/ml}$ であり, 日本人を対象とした 2.3 $\mu\text{g/ml}$ ⁴⁾, イギリス人を対象とした 1.82 $\mu\text{g/ml}$ ¹¹⁾ とほぼ同値であった。分娩後 21~89 日では 2.33 $\mu\text{g/ml}$, 90~179 日では 2.10 $\mu\text{g/ml}$ 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 の消化吸收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—¹⁾では, 四訂日本食品標準成分表²⁷⁾に記載された 2.1 $\mu\text{g/ml}$ (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, Ford¹¹⁾の報告に基づいて 1.8 $\mu\text{g/ml}$ 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²⁾。

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 $\mu\text{g/ml}$ 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ビオチ

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。ビ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。母乳のビオチン含量は平均 3.87 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 B₆, Folate, Vitamin B₁₂, 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, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-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, Iinuma 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, 滴留昭久 (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では、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}^{0.75}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}^{0.75}×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^{0.75}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さなければならない。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、 $\{(対象年齢区分の体位基準値の体重/18\sim 29歳の体位基準値の体重)^{0.75} \times (1+成長因子)\}$ から策定したが、このような外挿方法が妥当か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、 $\{(対象年齢区分の体位基準値の体重/18\sim 29歳の体位基準値の体重)^{0.75} \times (1+成長因子)\}$ 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考えられる。

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N⁵-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、目安量を算定した。

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 μ mol/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 μ mol/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合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 μ g/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、(0~5ヶ月の乳児の目安量) \times |(妊婦のエネルギー付加量の平均値) / (0~5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 Quinolate Production by Inhibiting α -Amino- β -Carboxymuconate- ϵ -Semialdehyde Decarboxylase (ACMSD), a Key Enzyme of the Tryptophan Pathway

Tsutomu Fukuwatari,* Seiko Ohsaki,* Shin-ichi Fukuoka,† Ryuzo Sasaki,* and Katsumi Shibata*¹

*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 α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde (ACMS) via 3-hydroxyanthranilate (3-HA). ACMS decarboxylase (ACMSD) directs ACMS to acetyl CoA; otherwise ACMS is non-enzymatically converted to quinolate (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 disruptors. 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. Quinolate 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 disruptors when intake of a tryptophan-rich diet and exposure to phthalate esters occur coincidentally.

Key Words: phthalate ester; endocrine disrupter; tryptophan metabolism; quinolate; 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 disruptors. 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 α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde (ACMS), which is converted by ACMS decarboxylase (ACMSD, EC4.1.1.45) to α -aminomuconate- ϵ -semialdehyde (AMS). AMS eventually leads to acetyl-CoA through the glutarate pathway, or otherwise non-enzymatic cyclization of ACMS results in the formation of quinolate (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.

Quinolate 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

¹ 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.

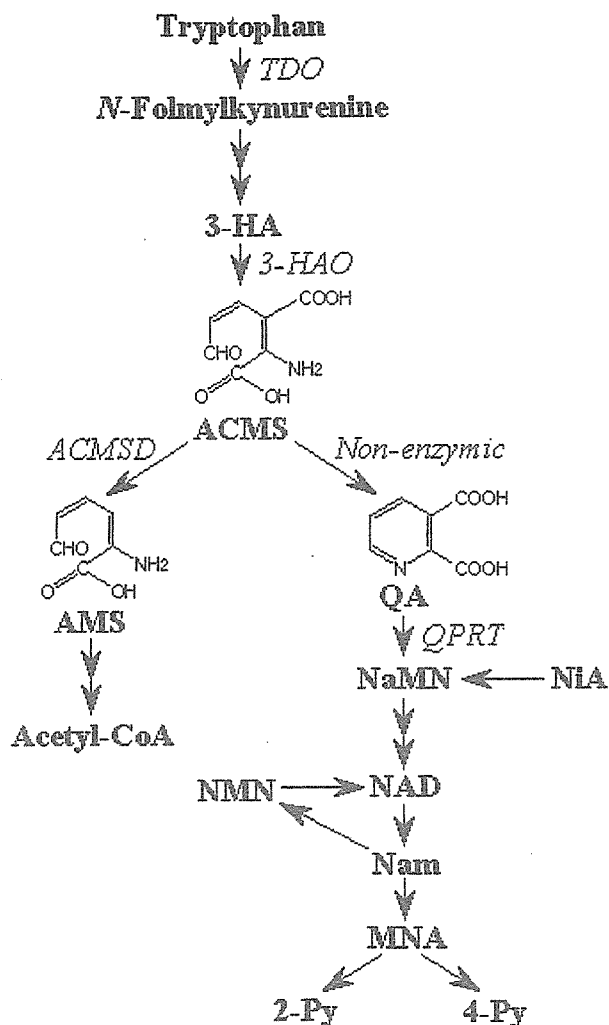


FIG. 1. Schematic diagram of the tryptophan-NAD pathway. Enzymes are underlined. 3-HA: 3-hydroxyanthranilate; ACMS: α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde; AMS: α -aminomuconate- ϵ -semialdehyde; QA: quinolinate; NaMN: nicotinic acid mononucleotide; NiA: nicotinate; NMN: nicotinamide mononucleotide; 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: α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -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°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- μm microfilter, and 20 μl of the filtrates was injected into a STR ODS II column (4.6×250 mm I.D., particle size 7 μm) (Shinwa Chemical, Kyoto, Japan). The mobile phase was 50 mmol/l KH_2PO_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- μ m microfilter, and 20 μ l of the filtrates was injected into a Unisil Q C18 column (4.6 \times 250 mm I.D., particle size 5 μ m) (GL Sciences, Tokyo). The mobile phase was 20 mmol/l KH₂PO₄, 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 μ 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- μ m microfilter, and 20 μ l of the filtrates was injected into a CHEMCOSORB 7-ODS-L column (4.6 \times 250 mm I.D., particle size 7 μ m) (Chemco Scientific, Osaka, Japan). The mobile phase was 10 mmol/l KH₂PO₄ (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- μ m microfilter, and 20 μ l of the filtrates was injected into a Tosoh 80Ts column (4.6 \times 250 mm I.D., particle size 7 μ m) (Tosoh, Tokyo). The mobile phase was a mixture of 20 mmol/l KH₂PO₄, 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 quinolinatase 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 μ mol/l leupeptin, and 20 μ 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 μ 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. ACMS was produced by the addition of an excess quantity of the purified 3-HA oxygenase (50 μ l containing 0.4 mg protein). After the formation of ACMS 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 μ l of the esters dissolved in ethanol was added before the addition of the enzyme. The control incubation contained 50 μ 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 μ l of 500 mmol/l potassium phosphate buffer, pH 7.0, 50 μ l of 10 mmol/l QA, 50 μ l of 10 mmol/l phosphoribosylpyrophosphate, 10 μ l of 100 mmol/l MgCl₂, 20 μ l of phthalate monoester dissolved in ethanol, 270 μ l of water, and 50 μ l of the enzyme preparation. The control incubation contained 20 μ 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- μ m microfilter, and 20 μ l of the filtrate was injected into a HPLC column, Tosoh 80Ts (4.6 \times 250 mm I.D., particle size 7 μ 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

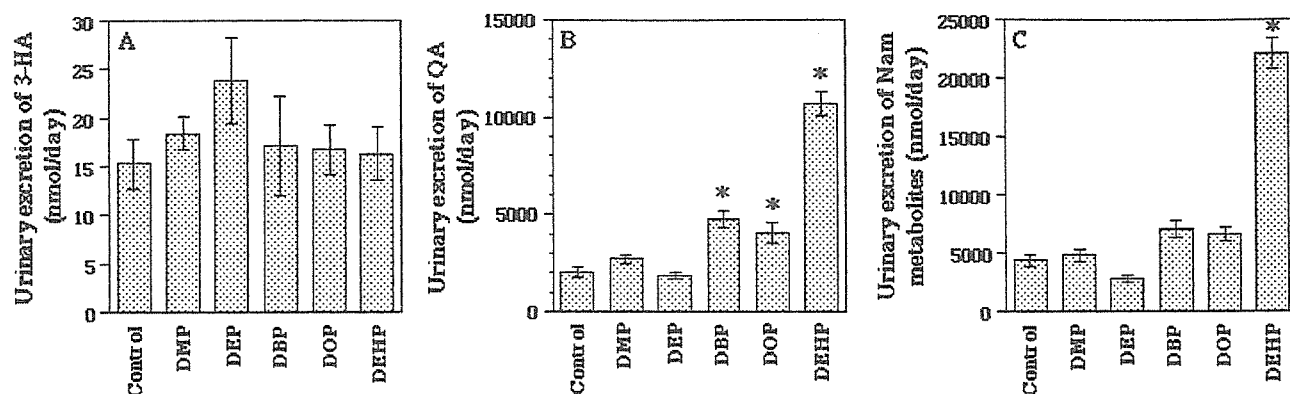


FIG. 2. Effects of phthalate diesters on the urinary excretion of 3-HA (A), QA (B), and Nam metabolites (C) in rats. Male Wistar rats at 6 weeks old were fed with a diet containing 2.6 mmol phthalate ester/kg diet *ad libitum* for 21 days. The phthalate esters used were DMP, DEP, DBP, DOP, or DEHP. Urine 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.

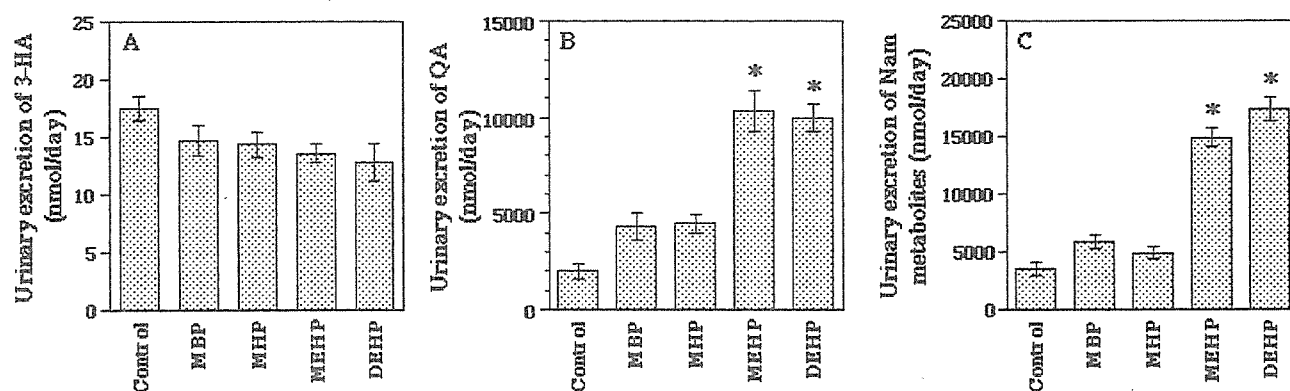


FIG. 3. Effects of phthalate monoesters on the urinary excretion of 3-HA (A), QA (B), and Nam metabolites (C) in rats. Male Wistar rats at 6 weeks old were fed with a diet containing 2.6 mmol phthalate ester/kg diet *ad libitum* for 21 days. The phthalate esters used were MBP, MHP, MEHP, or DEHP. Urine 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

TABLE 1
Effects of Phthalate Monoesters on the Activity of ACMSD or QPRT^a

	Vehicle	MEP	MBP	MHP	MEHP
Rat ACMSD activity ($\mu\text{mol/h/g}$ liver)	9.3 ± 0.3	10.0 ± 0.4	$7.2 \pm 0.6^*$	$3.9 \pm 0.2^*$	$0.9 \pm 0.3^*$
Mouse ACMSD activity ($\mu\text{mol/h/g}$ kidney)	3.07 ± 0.13	2.88 ± 0.15	$2.63 \pm 0.30^*$	$1.12 \pm 0.34^*$	$0.21 \pm 0.16^*$
Human ACMSD activity ($\mu\text{mol/h/mg}$ protein)	21.5 ± 1.1	22.6 ± 1.3	17.7 ± 1.3	$3.5 \pm 1.0^*$	$1.6 \pm 0.4^*$
Rat QPRT activity ($\mu\text{mol/h/g}$ liver)	1.27 ± 0.03	1.30 ± 0.07	1.29 ± 0.04	1.29 ± 0.05	1.25 ± 0.04
Human QPRT activity ($\mu\text{mol/h/mg}$ protein)	10.7 ± 0.4	11.5 ± 0.3	11.7 ± 0.4	11.1 ± 0.2	11.1 ± 0.5

^aEnzyme activities were measured in the presence or absence of 3 mmol/L phthalate monoester. ACMSD (α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase) was assayed with extracts from rat liver, mouse kidney, and COS-7 expressing recombinant human enzyme, and QPRT (quinolinate phosphoribosyltransferase) was assayed with extracts from rat liver and COS-7 expressing human enzyme. Extracts prepared from five animals and five cultures of COS-7 cells were assayed; values are means \pm SEM ($n = 5$). MEP: monoethyl phthalate; MBP: mono-*n*-butyl phthalate.

* $P < 0.05$ versus vehicle.

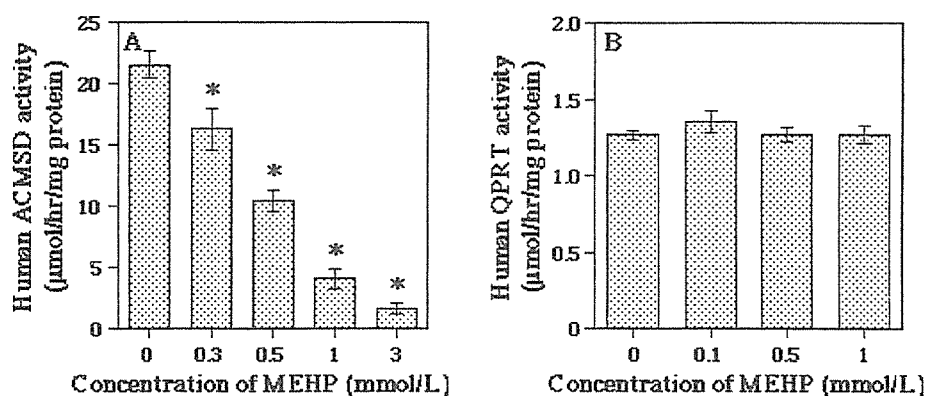


FIG. 4. MEHP inhibits human ACMSD activity in a dose-dependent manner. ACMSD activity is shown as the amount of enzyme that generates μmoles of AMS per hour per milligram of protein. QPRT activity is shown as the amount of enzyme that generates μmoles of nicotinic acid mononucleotide per hour per milligram of protein. Values are means \pm SEM, $n = 5$. * $P < 0.05$ versus the control.

tryptophan-NAD pathway but did not change the excretion of 3-HA, suggesting involvement of ACMSD in this phthalate ester-induced change of the tryptophan metabolism; the cellular concentration of ACMSD protein may be decreased or ACMSD activity may be directly inhibited by these esters. To test the latter possibility, rat, mouse, and human ACMSD activities were measured *in vitro* in the presence and absence of phthalate monoesters such as MEP, MBP, MHP, and MEHP. Extracts from rat livers, mouse kidneys, and COS-7 cells that express human recombinant ACMSD were used as enzyme sources. To show the specificity of the inhibition, QPRT from rat livers and COS-7 cells producing human enzyme were also assayed. Assays with the corresponding diesters could not be performed because the addition of the diesters caused turbidity in the mixture for the enzyme assay. Table 1 shows the results when ACMSD was assayed with and without 3 mmol/l phthalate ester. The high activity of human ACMSD compared with that from rats and mice, is probably due to the high expression of this recombinant human enzyme in COS cells. The same would be true for QPRT. MEP, the monoester with the shortest chain, was not inhibitory whereas low inhibition was found

with MBP. The inhibition became more potent as the length of the side chains in esters became longer; MHP and MEHP severely blocked the ACMSD activity from all sources, and MEHP was the most potent inhibitor. In contrast, neither human nor rat QPRT was affected by any of the phthalate monoesters. Figure 4A shows a dose-dependent inhibition of human ACMSD by MEHP; the presence of MEHP at 0.3 mmol/l caused a significant inhibition, and at 3 mmol/l the activity was inhibited by more than 90%. In agreement with Table 1, MEHP was not inhibitory to human QPRT at any of the concentrations tested (Fig. 4B).

To investigate whether the inhibition of ACMSD by MEHP was reversible or whether MEHP irreversibly inactivated the enzyme, human ACMSD was incubated for 10 min at 25°C with 3 mmol/l MEHP, at which the ACMSD activity would be inhibited by more than 90% (see Fig. 4). The enzyme was then diluted fivefold with 50 mmol/l Tris-HCl buffer, pH 7.6, and the diluted enzyme preparation was subjected to the enzyme assay. The final concentration of MEHP in the assay mixture was 0.06 mmol/l at which the inhibition of the enzyme should be negligible if the inhibition is reversible. The activity of the

diluted ACMSD was found to be comparable to that of the control enzyme diluted without treatment with MEHP (data not shown), indicating that the inhibition is reversible. A similar result was obtained using rat ACMSD.

DISCUSSION

This study was undertaken to investigate effects of phthalate esters orally given to rats on the tryptophan metabolism. DEHP, which has been most widely used in the formation of plastics, and its primary metabolite, MEHP, caused the most dramatic change in tryptophan metabolism. They markedly enhanced the urinary excretion of QA and its downstream metabolites, while the excretion of 3-HA was unchanged, raising the possibility that ACMSD, a critical enzyme acting at the branching point of tryptophan metabolism, is inhibited by these phthalate esters. In fact, MEHP reversibly inhibited ACMSD from human, mouse, and rat sources in a dose-dependent manner. Some of phthalate esters with different side chains promoted urinary excretion and inhibited ACMSD but their potency was far less than that of DEHP and MEHP. Thus it is very likely that the inhibition of ACMSD by phthalate esters blocks conversion of tryptophan to acetyl CoA and directs tryptophan metabolism to the NAD pathway (see Fig. 1), and thus cellular QA and Nam metabolites are accumulated, resulting in their increased excretion into the urine.

Isenberg *et al.* (2000) explored the metabolism of DEHP given orally to rats. MEHP was the most prominent hepatic metabolite of DEHP, and elevation of the hepatic MEHP concentration was time-dependent and dose-dependent, whereas the levels of DEHP and phthalate were minimal and did not correlate with the dose of DEHP or the time after its administration (Isenberg *et al.*, 2000). Oral administration of phthalate and 2-ethylhexanol, hydrolysis products of DEHP, did not affect the conversion rate of tryptophan to NAD (Fukuwatari *et al.*, 2002b). In agreement with the proposal that phthalate monoesters are produced from the diesters in the intestine before absorption (Lake *et al.*, 1977), these results indicate that MEHP is mainly responsible for the perturbation of tryptophan metabolism.

According to Isenberg *et al.* (2000), hepatic MEHP concentration in rats fed 1000 ppm DEHP for 2 weeks, conditions similar to those used in the present experiments, was 9 $\mu\text{mol/g}$ tissue. *In vitro* inhibition of ACMSD by MEHP was apparent (33%) at 0.3 mmol/l and greater than 90% at 3 mmol/l. These results suggest that the liver in rats fed 1000 ppm DEHP accumulates MEHP at the concentration sufficient to exhibit its inhibitory effect on ACMSD, although all of the MEHP molecules in the liver may not necessarily be available for this inhibition.

Previously we showed that ACMSD activity in the liver extracts from rats fed DEHP was similar to that of control animals (Fukuwatari *et al.*, 2002b). This result is not contradictory to our present finding that ACMSD is inhibited *in vitro* by MEHP. The inhibition is reversible, and therefore, even if

MEHP is accumulated in the liver of rats fed DEHP at concentrations sufficient to block ACMSD, MEHP would be washed out during the preparation of the enzyme; the resulting enzyme preparations would contain MEHP at levels that show little inhibition of ACMSD. Taken together, we conclude that phthalate esters perturb tryptophan metabolism through direct inhibition of ACMSD but not by reducing the ACMSD protein level. The mechanism by which ACMSD is inhibited remains to be examined. The very labile nature of ACMS, the substrate of ACMSD, hampers kinetic studies of this enzyme.

Quinolate is a potential endogenous toxin; it is neurotoxic and has been suspected of being involved in the development of a number of brain diseases (see review by Stone and Darlington, 2002). Although it is believed that the liver is a major site of tryptophan metabolism, expression of ACMSD, as well as its mRNA in the brain and kidney (Fukuoka *et al.*, 2002), suggests that the phthalate ester-induced metabolic alteration occurs in these organs. However, to date, there are no reports that show neurotoxicity of phthalate esters. When DEHP (0–200 mg/kg/day) was given to rats via oral gavage, few adverse effects on neurobehavioral evaluations were found (Moser *et al.*, 2003). DEHP given to mice through the diet to provide levels of 0.01–0.09% did not show detrimental effects on neurobehavioral parameters (Tanaka, 2002). Examination of tissue distribution by the use of the radioactive DEHP did not show significant accumulation of the radioactivity in the brain of rats (Tanaka *et al.*, 1975) and mice during the pre-weaning period (Eriksson and Darnerud, 1985). Quinolate also can be a uremic toxin responsible for anemia with renal failure by reducing the renal production of erythropoietin, a growth factor essential for erythrocyte formation (Pawlak *et al.*, 2003). When DEHP at a high dose (12,500 ppm in the diet) was given to rats, the erythrocyte count, hemoglobin, and hematocrit values were significantly lower than controls, but these effects were not found with a lower dose (2500 ppm; David *et al.*, 2000). Although no data indicating that phthalate esters exhibit adverse effects through accumulation of QA are available, effects of the concurrent intake of a tryptophan-rich diet and phthalate esters are worthy of further investigation. Such a series of misfortunes may contribute to triggering and/or exacerbating various diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by a Grant-in-Aid for the Encouragement of Young Scientists from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

REFERENCES

- David, R. M., Moore, M. R., Finney, D. C., and Guest D. (2000). Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol. Sci.* 55, 433–443.

- Davis, B. J., Maronpot, R. R., and Heindel, J. J. (1994). Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **128**, 216–223.
- Elcombe, C. R., and Mitchell, A. M. (1986). Peroxisome proliferation due to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): Species differences and possible mechanisms. *Environ. Health Perspect.* **70**, 211–219.
- Eriksson, P., and Damerud, P. O. (1985). Distribution and retention of some chlorinated hydrocarbons and a phthalate in the mouse brain during the pre-weaning period. *Toxicology* **37**, 189–203.
- Fukuoka, S. I., Nyaruhucha, C. M., and Shibata, K. (1998). Characterization and functional expression of the cDNA encoding human brain quinolinate phosphoribosyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1395**, 192–201.
- Fukuoka, S. I., Ishiguro, K., Yanagihara, K., Tanabe, A., Egashira, Y., Sanada, H., and Shibata, K. (2002). Identification and expression of a cDNA encoding human α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase (ACMSD). A key enzyme for the tryptophan-niacin pathway and "quinolinate hypothesis." *J. Biol. Chem.* **277**, 35162–35167.
- Fukuwatari, T., Suzuki, Y., Sugimoto, E., and Shibata, K. (2002a). Elucidation of the toxic mechanism of the plasticizers, phthalic acid esters, putative endocrine disruptors: Effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 705–710.
- Fukuwatari, T., Suzuki, Y., Sugimoto, E., and Shibata, K. (2002b). Identification of a toxic mechanism of the plasticizers, phthalic acid esters, which are putative endocrine disruptors: Time-dependent increase in quinolinic acid and its metabolites in rat fed di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2687–2691.
- Giam, C. S., Atlas, E., Powers, M. A., and Leonad, J. E. (1994). Phthalic acid esters. In: *The Handbook of Environmental Chemistry* (O. Hutzinger, eds.), pp. 67–142. Springer-Verlag, Berlin.
- Ichiyama, A., Nakamura, S., Kawai, H., Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O., and Senoh, T. (1965). Studies on the benzene ring of tryptophan in mammalian tissues. II. Enzymic formation of α -aminomuconic acid from 3-hydroxy-anthranilic acid. *J. Biol. Chem.* **240**, 740–749.
- Isenberg, J. S., Kamendulis, L. M., Smith, J. H., Ackley, D. C., Pugh, G. Jr., Lington, A. W., and Klaunig, J. E. (2000). Effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on gap-junctional intercellular communication (GJIC), DNA synthesis, and peroxisomal beta oxidation (PBOX) in rat, mouse, and hamster liver. *Toxicol. Sci.* **56**, 73–85.
- Koizumi, M., Ema, M., Hirose, A., Kurokawa, A., and Hasegawa, R. (2001). No observed adverse effect levels of phthalate esters on reproductive and developmental toxicity; the differences with age and species in testicular toxicity, and tolerable daily intake of DEHP. *Jpn. J. Food Chem.* **8**, 9–10.
- Lake, B. G., Phillips, J. C., Linnell, J. C., and Gangolli, S. D. (1977). The *in vitro* hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **39**, 239–248.
- Lamb, J. C. 4th, Chapin, R. E., Teague, J., Lawton, A. D., and Reel, J. R. (1987). Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **88**, 255–269.
- Mawatari, K., Oshida, K., Iinuma, F., and Watanabe, M. (1995). Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta* **302**, 179–183.
- Moser, V. C., MacPhail, R. C., and Gennings C. (2003). Neurobehavioral evaluations of mixtures of trichloroethylene, heptachlor, and di(2-ethylhexyl)phthalate in a full-factorial design. *Toxicology* **188**, 125–137.
- Pawlak, D., Koda, M., Pawlak, S., Wolczynski, S., and Buczko, W. (2003). Contribution of quinolinic acid in the development of anemia in renal insufficiency. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **284**, F693–F700.
- Schwarcz, R., Whetsell, W. O. Jr., and Mangano, R. M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* **219**, 316–318.
- Shea, K. M., and American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. (2003). Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics* **111**, 1467–1474.
- Shibata, K. (1987a). Tryptophan-niacin metabolism in alloxan diabetic rats and partial prevention of alloxan diabetes by nicotinamide. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 811–816.
- Shibata, K. (1987b). Ultramicro-determination of N^1 -methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* **61**, 599–604.
- Shibata, K., Kawada, T., and Iwai, K. (1988). Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N^1 -methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N^1 -methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **424**, 23–28.
- Shibata, K., and Onodera, M. (1992). Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 974.
- Shibata, K., Fukuwatari, T., and Sugimoto, E. (2000). Reversed phase HPLC of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinate phosphoribosyltransferase. *J. Chromatogr.* **749**, 281–285.
- Shibata, K., Fukuwatari, T., Enomoto, A., and Sugimoto, E. (2001). Increased conversion of tryptophan to niacin by dietary di-n-butylphthalate. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **47**, 263–266.
- Stone, T. W., and Darlington, L. G. (2002). Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 609–620.
- Tanaka, T. (2002). Reproductive and neurobehavioral toxicity study of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) administered to mice in the diet. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1499–1506.
- Tanaka, A., Adachi, T., Takahashi, T., and Yamaha, T. (1975). Biochemical studies on phthalic esters I. Elimination, distribution and metabolism of di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology* **4**, 253–264.
- Ward, J. M., Diwan, B. A., Ohshima, M., Hu, H., Schuller, H. M., and Rice, J. M. (1986). Tumor-initiating and promoting activities of di(2-ethylhexyl)phthalate *in vivo* and *in vitro*. *Environ. Health Perspect.* **65**, 279–291.
- Wine, R. N., Li, L. H., Barnes, L. H., Gulati, D. K., and Chapin, R. E. (1997). Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.* **105**, 102–107.

ノ ー ト

魚類における3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ/
アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性比
からのトリプトファン-ニコチンアミド変換率の推定

滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻

福渡 努, 真藤こず恵, 太田 万理, 佐々木隆造, 柴田 克己

Vitamins(Japan), 78(8), 409-411 (2004)

**Estimated Conversion Efficiency of Tryptophan-Nicotinamide
Using an Activity Ratio of 3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase to
Aminocarboxymuconate-semialdehyde Decarboxylase in Fishes**

Tsutomu FUKUWATARI, Kozue MATO, Mari OHTA, Ryuzo SASAKI, Katsumi SHIBATA

Laboratories of Food Science and Nutrition, Department of Life Style Studies, School of Human Cultures,
The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga, 522-8533, Japan

In order to estimate the conversion efficiency of tryptophan-nicotinamide in freshwater fishes, carp and crucian, the liver 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (3-HAO) and aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase (ACMSD) activities were measured. The activity ratios of 3-HAO/ACMSD in carp and crucian were both around 5. These values were extremely low compared with that of rat (650), which can synthesize a significant amount of nicotinamide from tryptophan. The activities of quinolinate phosphoribosyltransferase in carp and crucian were below the limit of detection. From these results, it was suggested that fishes cannot biosynthesize nicotinamide from tryptophan.

Key Words: fish, tryptophan, nicotinamide, 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase, aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase

(Received March 24, 2004)

緒 言

ヒトにおいて、B-群ビタミンの一つであるニコチンアミド(NiA-NH₂)が必須アミノ酸の一つであるトリプトファンから生合成されることはよく知られている。トリプトファン-NiA-NH₂ 転換率は、摂取トリプトファ

ン量と尿中に排泄される NiA-NH₂ 異化代謝産物量との比較から求めるのが、通常の方法である。しかしながら、尿の採取が困難である動物においては、他の方法の考案が必要である。田口ら¹⁾は、家畜類の飼料を考案する上で、トリプトファンからどの程度 NiA-NH₂ が生合成されているかが重要であるという認識から、トリプトファン-NiA-NH₂ 転換経路で鍵中間代謝物質である

キノリン酸の生成量を支配する二つの酵素, すなわち, キノリン酸生成酵素である3-ヒドロキシアンスラニル酸3,4-ジオキシゲナーゼ(3-HAO)とキノリン酸の生成量を抑制する酵素アミノカルボキシムコン酸-セミアルデヒド脱炭酸酵素(ACMSD)の活性比率から, トリプトファン-NiA-NH₂ 転換率を推定する方法を報告した. 今回は, その方法を使用して, 琵琶湖の固有種であり, 近年生息数が激減しているニゴロブナの本転換率を推定したので報告する. 合わせて, コイについても調べた.

実験方法

生後1年6ヶ月, 体長15~20 cm, 体重30~40 gのニゴロブナ(*Car. auratus grandoculis* Temminck et Schlegel)とコイ(*Cyprinus carpio* Linnaeus)を滋賀県水産試験場から入手した. 表1に飼育用飼料の組成を示した. 哺乳動物ではトリプトファン-NiA-NH₂ 代謝経路は肝臓のみに局在している. そこで, 魚においても肝臓を用いた. ニゴロブナの肝臓の量は非常に少ないため, 5匹から得られた肝臓をひとまとめにして処理した. コイからは肝臓を得, 5匹から得られたものをひとまとめにして処理した. 各々得た臓器は5倍量の50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)を加え, ガラス-テフロンホモゲナイザーで均一化した. ホモジネートは10,5000 × g で20分間遠心分離した後の上清を3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase(3-HAO, EC 1.13.11.6)活性, aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase(ACMSD, EC 4.1.1.45)活性, およびQuinolinic phosphoribosyltransferase(QPRT, EC 2.4.2.19)測定のための酵素源とした. また, 肝臓と筋肉中の総NiA-NH₂ 含量を測定した.

対照データを得るために, トリプトファンからNiA-NH₂ を効率よく合成できる動物として, ラットを使用した. ラットは雄 Wistar 系で, ナリアシン欠-20% カ,

表1. Composition of the Diet for Fishes.

Materials	%
Fish powders	50
Wheat flour	21
Vegetable oil cake	14
Rice bran	9
Food yeast	6

The food contains 43.0% crude protein, 3.0% crude fat, 3.0% crude ash, 2.0% Ca, and 1.5% P.

ゼイン食(ラットは20% カゼインを含む飼料を与えれば, すでにビタミン体となっているナイアシンを全く含まない飼料を与えても, 正常に生育する²⁾)で飼育した7週齢の肝臓を用いた. 酵素源の調製方法は, 魚の場合と同じである.

3-HAO 活性は Decker ら³⁾の方法により, ACMSD 活性は Ichiyama ら⁴⁾の方法により, QPRT は Shibata ら⁵⁾の方法により測定を行った.

総 NiA-NH₂ 含量の測定は Shibata ら⁶⁾の方法に従って行った.

結果並びに考察

表2にコイとニゴロブナの3-HAO 活性, ACMSD 活性, および3-HAO/ACMSDの活性比を示した. トリプトファンから効率よく NiA-NH₂ を生合成できるラットの値と比較して, コイもフナも3-HAO 活性は顕著な差異は認められなかった. しかしながら, ACMSD 活性は, ラットと比較して, 数十倍も高く, その結果, この二つの活性比はラットと比較して, 数十分の一という値であった. 以前に報告¹⁾したように, 鳥類においても, 3-HAO 活性の種による差異は2~3倍程度であったが, 肝臓における ACMSD 活性(μmol/h/g)は顕著な差異が認められ, ニワトリでは5.5, ハトは9.0, スズメは32.7, カラスは52.2であった. 哺乳動物でも, トリプトファンを NiA-NH₂ の前駆体として利用できないネコ⁷⁾では, ACMSD 活性が50 μmol/h/g 肝臓と高くこの活性比は4.75と報告されている⁸⁾.

さらに, トリプトファン-NiA-NH₂ 転換経路の鍵物質であるキノリン酸をユニバーサルにナイアシン活性を有する物質に転換する酵素である QPRT 活性を測定したが, コイにおいても, フナにおいても, 検出限界以下であった(表3).

結論として, コイとフナは NiA-NH₂ の前駆体としてトリプトファンを利用できないと推測された.

さらに, トリプトファンから NiA-NH₂ が合成できないと推定されるコイ・フナと合成できるラットの筋肉中と肝臓中の総 NiA-NH₂ 含量を調べた結果(表3), 魚の含量が低かった. このことと, トリプトファン-NiA-NH₂ 生合成経路の強弱との関係についてはさらなる検討を有するが, 興味あることである.

NiA-NH₂ の補酵素である NAD・NADP は代謝に関わっている全酵素の約20%が必要としている. トリプトファンからの生合成経路は, この補酵素が必要な時

表 2. The Activities of 3-HAO, ACMSD, and the Ratio of 3-HAO/ACMSD in the Livers of Fishes.

	3-HAO ($\mu\text{mol/h/g}$)	ACMSD ($\mu\text{mol/h/g}$)	3-HAO/ACMSD
Carp	324	64	5.1
Crucian	430	69	6.2
Rat	481	0.74	650

The values are the mean of the separate three experiments.

表 3. Comparison of the QPRT Activity and the Concentration of Total NiA-NH₂ in Liver and Muscle.

	QPRT ($\mu\text{mol/h/g}$)	Total NiA-NH ₂	
		Liver (nmol/g)	Muscle (nmol/g)
Carp	N.D.	1129	293
Crucian	N.D.	626	188
Rat	0.35	2093	647

The values are the mean of the separate three experiments.

に、必要な量だけ速やかに供給するために存在していると考えている。従って、本経路が作動していない魚の飼育においては、NiA-NH₂の供給を適切に行うことが、養殖において一つの重要なポイントになるものと思われる。

ま と め

コイとフナのトリプトファン-NiA-NH₂ 転換率を 3-HAO/ACMSD 活性比から推定した結果、効率良く利用できるラットと比較して、数十分の一程度であった。肝臓においてのみナイアシン活性を示すキノリン酸という中間代謝産物をユニバーサルにナイアシン活性を有する化合物に転換する酵素である QPRT 活性もコイとフナには検出されなかった。以上のことから、魚においては、NiA-NH₂はトリプトファンからきわめて合成されにくいことが、はじめて明らかとなった。

謝 辞

本研究は、滋賀県立大学重点研究費の補助を受けた。コイとニゴロブナは滋賀県水産試験所から提供いただいた。また、実験は滋賀県立大学湖沼環境実験施設を使用した。関係各位に謝意を表する。

(平成 16. 3. 24 受付)

文 献

- 1) 田口 寛, 早野元日子, 柴田克己(1991) 鳥類における 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ/アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性比からのトリプトファン-NiA-NH₂ 変換率の推定. ビタミン **65**, 459-460
- 2) Shibata K, Mushiage T, Kondo T, Hayakawa T, Tsuge H (1995) Effects of vitamin B₆ deficiency on the conversion ratio of tryptophan to niacin. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 2060-2063
- 3) Decker RH, Kang HH, Leach FR, Henderson LM (1961) Purification and properties of 3-hydroxyanthranilic acid oxidase. *J Biol Chem* **236**, 3076-3082
- 4) Ichiyama A, Nakamura S, Kawai H, Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O, Senoh S (1965) Studies on the metabolism of the benzene ring of tryptophan in mammalian tissues. II. Enzymic formation of α -aminomuconic acid from 3-hydroxyanthranilic acid. *J Biol Chem* **240**, 740-749
- 5) Shibata K, Fukuwatari T, Sugimoto E (2000) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *J Chromatogr* **749**, 281-285
- 6) Shibata K, Kawada T, Iwai K (1987) High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide in rat tissue samples and blood after extraction with diethyl ether. *J Chromatogr* **422**, 257-262
- 7) Da Silva AC, Fried R, De Angelis RC (1952) The domestic cat as a laboratory animal for experimental nutrition studies. *J Nutr* **46**, 399-409
- 8) Ikeda M, Tsuji H, Nakamura S, Ichiyama A, Nishizuka Y, Hayaishi O (1965) Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. II. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. *J Biol Chem* **240**, 1395-1401