

生物定量法を用いて測定した¹⁴⁾。詳細はII-21.に記載した。

1-3. 統計学的解析

数値はすべて平均値 ± 標準誤差で表した。GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) を用いた。検定は One-way Analysis of Variance (ANOVA) により、有意差が認められた場合、Tukey's Multiple Comparison Test で個々の群間の有意差をみた。

C. 結果

1. グルコースの制限が飼料摂取量および体重増加量におよぼす影響

栄養障害の指標として、飼料摂取量の減少とそれに伴う体重増加の抑制が挙げられる。本研究では、21日間の飼育で、飼料摂取量および体重増加量にグルコース制限による影響は認められなかった (図 1)。

2. グルコースの制限が臓器重量におよぼす影響

飼育最終日に脳、肝臓、腎臓、精巣を摘出し、重量を測定した。各臓器重量にグルコース制限の影響は認められなかった (表 2)。

3. グルコースの制限が血清中成分におよぼす影響

飼育最終日の血清中のグルコース、総タンパク、尿酸、クレアチニン、ALT、トリグリセリドを測定した。総タンパク、尿酸、クレアチニン、ALT には差がみられず、各

群グルコース制限の影響が認められなかった。トリグリセリドは G:F=1:4 群において他の群の 1.5~3 倍と高値を示した。グルコースは G:F=0:1 群で他の群より有意に低いものの、他の群の 8 割程度のグルコース値を示した (図 2)。

4. グルコースの制限が尿中成分におよぼす影響

飼育最終日の尿中のグルコース、クレアチニンを測定した。尿酸には各群グルコース制限の影響はみられなかった。グルコース量はグルコース摂取量に比例しており、G:F=0:1 群でも微量であるが 1 mg/dl のグルコースが存在した (図 3)。

5. グルコースの制限が尿中ビタミン排泄量におよぼす影響

尿中のチアミン、リボフラビン、4-ピリドキシニン酸、シアノコバラミン、ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸、葉酸排泄量を測定した。チアミン、リボフラビン、4-ピリドキシニン酸、シアノコバラミン、パントテン酸には各群グルコース制限の影響はみられなかった。ニコチンアミド代謝産物、葉酸においてグルコース摂取の低い群で排泄量の減少がみられた (図 4)。

D. 考察

本研究では、グルコース摂取の必須性を明らかにするため、ラットに糖質の割合を減らし高タンパク食下でグルコース量 0~14.95%の飼料を与えて 21 日間飼育し、グルコース制限がラットにおよぼす影響について調べた。

飼料摂取量、体重増加量および臓器重量についてグルコース制限による影響はなかった。

血清中成分について、血清中トリグリセリドは、G:F=1:4 群でのみ他の群より高い値となったが、G:F=0:1 群ではグルコース摂取の多い群と差がないことから、血中脂質にもグルコース制限の影響はなかったと考える。血清中グルコースでは、グルコース摂取の全くない G:F=0:1 群で他の群の 8 割程度の値を示した。これは、糖原生アミノ酸やフルクトースから糖新生によりグルコースが補われたためと考えられる。

尿中グルコース量は全体として 1~6 mg/dl とわずかな違いであるが、摂取グルコース量に比例していた。グルコース摂取の全くない G:F=0:1 群でも 1 mg/dl 程度のグルコースが排泄されており、糖新生によってグルコースが補われていることが示唆される。また、スクロース群はその成分上 G:F=1:1 群と同様の値になるはずであるが、2 倍程度の違いがあった。このことよりスクロースの生体利用率が低いことが示された。

尿中ビタミン排泄量では、ニコチンアミド代謝産物、葉酸においてグルコース摂取の低い群で排泄量が減少した。ニコチンアミド代謝産物については、グルコース制限における糖新生の必要から NAD の利用量が増え、尿への排泄量が減少したと考えられる。葉酸については、葉酸はセリン、グリシン代謝、メチオニン合成系に関与し、セリン、グリシン、メチオニンは糖原生アミノ酸であるため、グルコース制限におけ

る糖新生の必要から葉酸の利用量が増え、尿への排泄量が減少したことが考えられる。

以上の結果より、生体指標において、グルコース制限によってラットに影響があると考えられるほどの違いはみられなかった。また、グルコース摂取の全くなかったスクロース群でも血清中、尿中でラットに影響がないと考えられる量のグルコースが存在していたため、本研究ではグルコース摂取の必須性はないことが示された。

今回は、高タンパク食、21 日間でのグルコース制限であったが、さらに長い期間グルコース制限を続けた場合の、高タンパク食や糖新生による肝臓への影響、また、低タンパク食下でのグルコース制限の影響についても調べていく必要がある。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準

- (2005年版), 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書. 東京, 2004.
2. Katsumi SHIBATA, Chie HASHIMOTO and Michiko ONODERA .Effect of Kind of Dietary Carbohydrate on the Growth of Weanling Rats Fed with a Niacin-Free and Low-Protein Diet.Reprinted from the *Bulletin of Teikoku-Gakuen* (1991) 17
 3. Naoko KIMURA, Tsutomu FUKUWATARI, Ryuzo SASAKI, Katsuimi SHIBATA.The Necessity of Niacin in Rat Fed on a High Protein Diet.*Biosci Biotechnol Biochem* (2005) 69 (2),273-279
 4. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. Lipid. chromatographic determination of the total thiamin content of blood.*Clin. Chem.*, (1982) 28, 29-31
 5. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己. 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. *食衛誌* (2004) 45, 231-238.
 6. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K . New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol. Chem* (1983) 258, 5623-5628.
 7. Gregory JF, Kirk JR . Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr* .(1979) 32, 879-883.
 8. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric. Food Chem.*(1998) 46, 5177-5180.
 9. Shibata K, Kawada T, Iwai K . Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-28.
 10. Shibata K . Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.
 11. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol. Chem* (1944) 156, 21-26.
 12. Wright LD, Skeggs HR . Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*..*Proc Soc Exp Biol Med* (1944) 56, 95-98.
 13. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y . Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* (1994) 40, 491-498.
 14. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis : Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatments. *J Nutr Sci Vitaminol*, (1998) 44, 361-370.

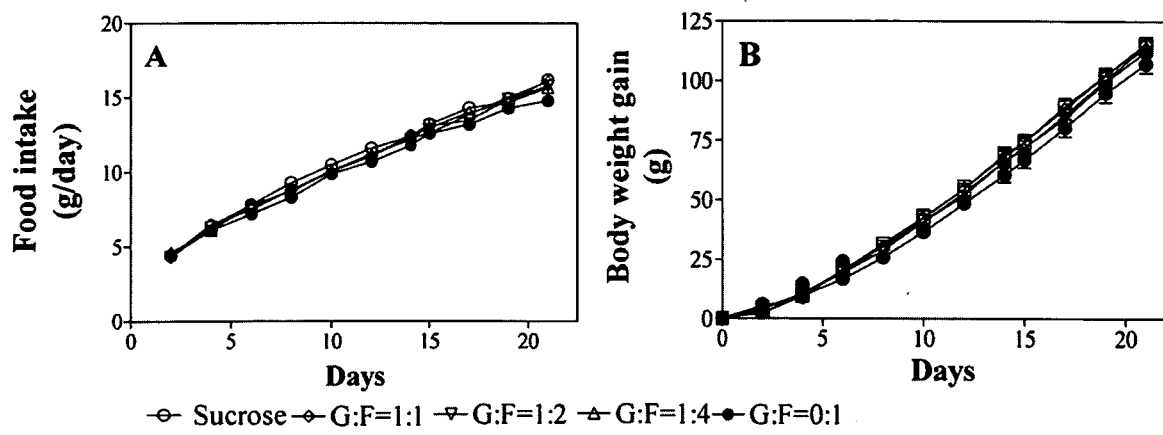


図 1. グルコース制限が飼料摂取量 (A) および体重増加量 (B) におよぼす影響. 値は平均値 ± 標準誤差として示した. G:グルコース, F:フルクトース

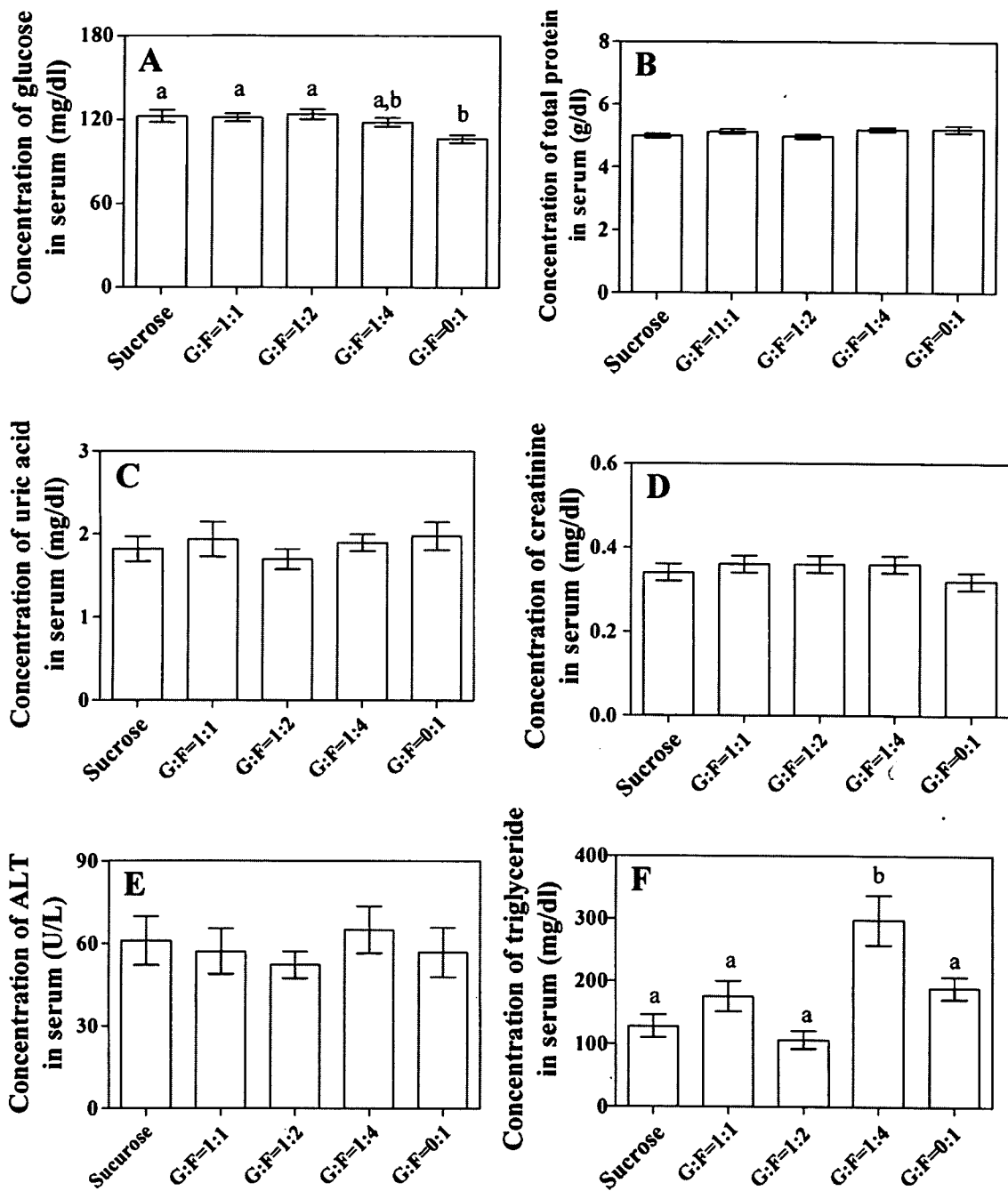


図 2. グルコースの制限が血清中グルコース (A), 総タンパク (B), 尿酸 (C), クレアチニン (D), ALT (E), TG (F) におよぼす影響。値は平均値 ± 標準誤差として示した。異なる添え字は有意差を表す。G: F=グルコース:フルクトース。

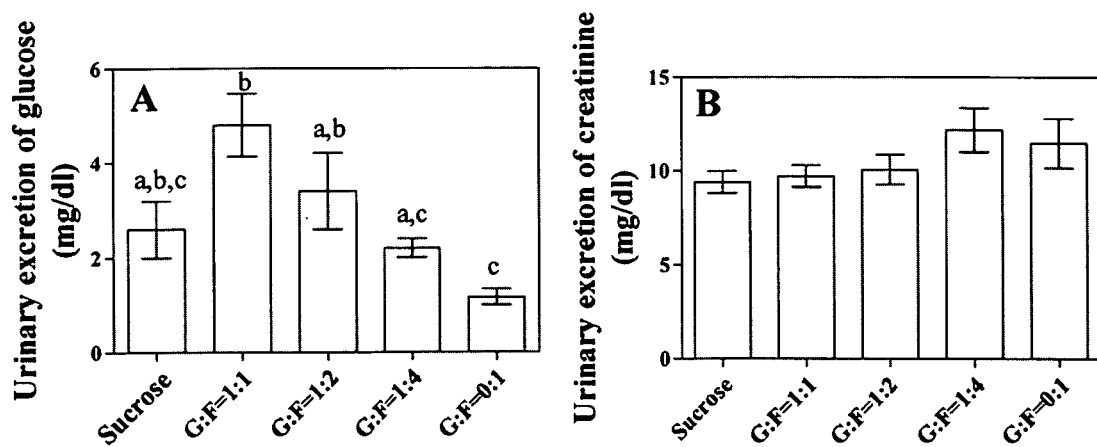


図3. グルコースの制限が尿中グルコース (A), クレアチニン (B)におよぼす影響. 値は平均値 ± 標準誤差として示した. 異なる添え字は有意差を表す. G: F=グルコース:フルクトース.

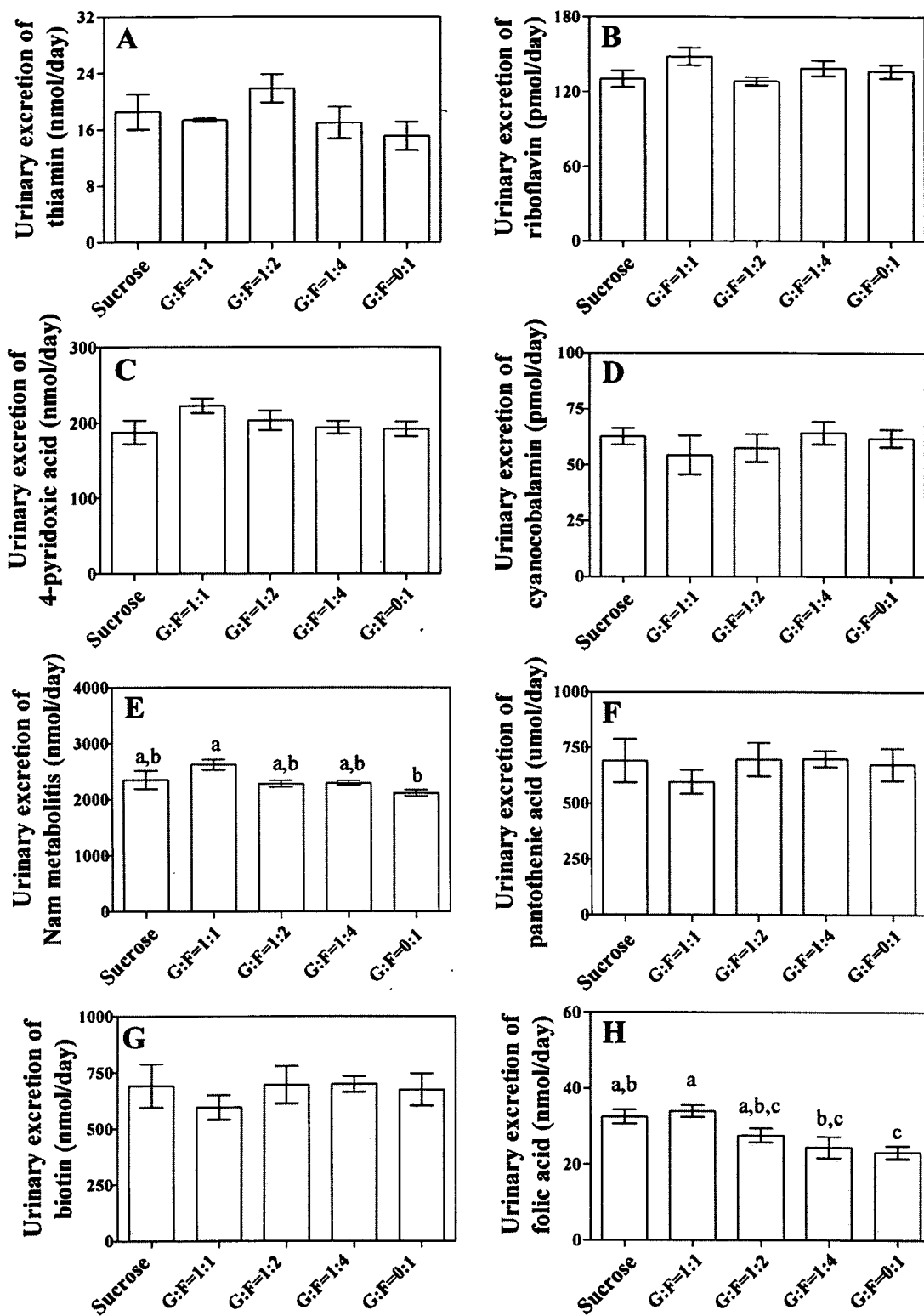


図 4. グルコースの制限がビタミン尿中排泄量におよぼす影響. チアミン(A), リボフラビン(B), 4-ピリドキシニン酸(C), シアノコバラミン(D), ニコチンアミド代謝産物(E), パントテン酸(F), ビオチン(G), 葉酸(H). 値は平均値±標準誤差として示した. 異なる添え字は有意差を表す. G:F=グルコース:フルクトース.

表 1. 飼料組成 (%)

	Sucrose	Glucose : Fructose			
		1 : 1	1 : 2	1 : 4	0 : 1
Vitamin-free milk casein	60	60	60	60	60
L-Methionine	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Sugar					
Sucrose	29.9				
Glucose		14.95	9.96	5.98	0
Fructose		14.95	19.94	23.92	29.9
Corn oil	5	5	5	5	5
Mineral mixture (AIN-93-MX)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93-VX,niacin free)	1	1	1	1	1

表 2. 臟器重量

	Sucrose	Glucose : Fructose			
		1 : 1	1 : 2	1 : 4	0 : 1
腦	1.55 ± 0.03	1.55 ± 0.07	1.55 ± 0.03	1.62 ± 0.02	1.58 ± 0.02
肝臟	8.32 ± 0.70	8.92 ± 0.23	8.53 ± 0.33	9.04 ± 0.27	8.59 ± 0.29
腎臟	2.03 ± 0.08	2.05 ± 0.06	2.07 ± 0.10	2.16 ± 0.09	2.07 ± 0.05
精巢	1.17 ± 0.11	1.26 ± 0.05	1.28 ± 0.05	1.23 ± 0.08	1.14 ± 0.05

II. 主任研究者の報告書

20. ヒトモデルとしてのラット系統差

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

ニコチンアミド (Nam) はトリプトファン (Trp) から生合成され、異化代謝されて尿中に排泄されるという点において、他の水溶性ビタミンとは異なる性質を持つ。ナイアシン栄養に関する動物実験を行う上で、ヒトにより近い Trp-Nam 経路および Nam 異化代謝経路を持つ実験動物を用いることが重要である。本研究では、Wistar 系 (Wistar), Sprague-Dawley 系 (SD), August-Copenhagen Irish 系 (ACI), Fischer 344 系 (F344) のラット 4 系統におけるこれらの代謝経路について、尿中代謝産物排泄量を比較することによって検討した。Trp からキノリン酸合成に至るまでは、各系統に大きな違いは認められなかった。一方、Wistar, SD, ACI ではニコチンアミドの主要な尿中最終代謝産物は N^1 -メチル-4-ピリドン-3-カルボキシアミド (4-Py) であった。F344 における主要尿中代謝産物は N^1 -メチルニコチンアミド (MNA) であった。これは、F344 では、MNA から 4-Py への酸化反応を触媒する酵素活性が著しく低く、同時に MNA から N^1 -メチル-2-ピリドン-5-カルボキシアミドの酸化酵素の活性も低いためであった。F344 の Nam 異化代謝はヒトとも大きく異なるため、ヒトのモデルとして適さないことが明らかとなった。SD, ACI の代謝は Wistar と同様にヒトに類似していることが明らかとなった。

A. 目的

ニコチンアミド (Nam) は生体内で必須アミノ酸の L-トリプトファン (Trp) から生合成される, ユニークなビタミンである¹⁾. Trp-Nam 代謝経路 (図 1) の中間代謝産物である NAD や NADP を補酵素とする酵素は 400 種類を超える. 脳内にある興奮性アミノ酸レセプターである N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターに対してキノリン酸 (QA) はアゴニストである²⁾のに対し, キヌレン酸とアンスラニル酸 (AnA) はアンタゴニストである^{3,4)}ことなどが知られている. これら Trp-Nam 代謝経路の中間代謝産物は尿中に排泄され, 各成分の量はその代謝に関与する酵素の活性によって変化する. 例えば, Nam の異化代謝産物である N¹-メチルニコチンアミド (MNA), MNA がさらにピリドン化された N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py) と N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の比率, (2-Py+4-Py)/MNA はアミノ酸や脂肪摂取のバランスが崩れると低下する^{5,6)}.

(2-Py+4-Py)/MNA と栄養状態に関する研究は Wistar 系ラットを用いて行ってきた. これは Trp-Nam 代謝に対するレスポンスがよい点やばらつきが少ないことが理由であった. そして Wistar 系ラットとヒトの Trp-Nam 代謝について比較した結果, Wistar 系ラットはヒトのモデルとして利用できることを明らかにした⁷⁾. 本研究は Wistar 系ラットを含む 4 系統のラットについて尿中 Trp-Nam 代謝産物を比較し, ヒトのモデルとしてより適した系統がいるか, あるいはヒトモデルには適さない系統がいるかを調べた.

B. 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 (AIN-93M-MX), ニコチン酸欠-ビタミン混合 (AIN-93-VX), α -コーンスターチ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 AnA, キヌレン酸 (KA), キサンツレン酸 (XA), 3-ヒドロキシアンスラニル酸 (3-HA), MNA は東京化学工業 (株) より, QA, Nam は和光純薬工業 (株) より購入した. 2-Py, 4-Py は合成した^{8,9)}.

2. 実験動物

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた. 飼育室の温度は 22°C 前後, 湿度は 50% 前後, 午前 6 時~午後 6 時を明, 午後 6 時~午前 6 時を暗とした.

Wistar 系 (Wistar), Sprague-Dawley 系 (SD), August-Copenhagen Irish 系 (ACI), Fischer 344 系 (F344) の 8 週齢雄ラットを各 5 匹ずつ日本クレア (株) より購入し, ラット用代謝ケージに 1 匹ずつ入れた.

飼料は 20% カゼイン食を与え, 10 日間飼育した. 飼料と水は自由摂取とし, 1 日ないし 2 日おきの午前 9 時に新しいものと交換した. また, その際に体重と飼料摂取量を測定した. 飼育最終日の 1 日尿 (午前 9 時~翌日午前 9 時: 24 時間) を集めた. 集めた 1 日尿は, 分析するまで塩酸酸性下, -20°C で保存した.

3. Trp-Nam 代謝産物の測定方法

尿を 0.45 μ m のマイクロフィルターでろ過し, これに含まれる AnA¹⁰⁾, KA¹¹⁾, XA¹²⁾, 3-HA¹²⁾, および QA¹³⁾を各々文献に示した HPLC 法で直接測定した.

尿中 MNA の定量は, 強アルカリ下でアセ

トフェノンと縮合させることにより、蛍光誘導体に変換し、これをHPLCにて測定した¹⁴⁾。

尿中の Nam, 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。この乾固物を水で溶解したものをHPLCにて測定した¹⁵⁾。

4. 統計処理

数値は平均 ± 標準誤差で示した。各系統の比較には一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った。p 値が 0.05 以下のとき、統計的有意差があるものとした。計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 4 を使用した。

C. 結果

1. 飼料摂取量および体重

図 2 に、各系統の 10 日間飼料摂取合計量、初日体重および最終日体重を示した。実験初日から実験最終日まで、体重の重い方から SD, Wistar, ACI, F344 の順に体重が異なった。

2. Trp-Nam 代謝経路上流 (Trp-QA) の尿中排泄量

図 3 に各系統の AnA, KA, XA, 3-HA, QA 尿中排泄量を示した。全ての代謝産物において、他系統よりも排泄量が多い、あるいは少ない系統がいた。しかし、最も低い値と高い値の差は 4 倍未満であった。

3. Nam 異化代謝経路の尿中排泄量

図 4 に各系統の Nam, MNA, 2-Py, 4-Py 尿中排泄量を示した。さらに Nam とその異化代謝物の尿中排泄合計量 (Nam met.) と Nam 異化代謝産物排泄比 (2-Py+4-Py)/MNA も図 4 に示した。尿中 MNA 排泄量は F344 が他系統より 6~17 倍と著しく多かった。F344 における尿中 2-Py 排泄量は他系統と同

程度であったが、尿中 4-Py 排泄量は他系統の 1/40 から 1/60 程度と著しく少なかった。その結果、F344 の Nam 代謝産物排泄比 (2-Py+4-Py)/MNA は他の系統より顕著に低かった。

D. 考察

本研究ではどのラットの系統がヒトのモデル動物として適しているかを検討するため、日本クレア (株) で購入することのできる 4 系統の疾患モデルでないラットを用い、Trp-Nam 代謝を比較した。代謝の比較は尿中へ排泄された Trp-Nam 代謝産物量を用いて行った。Trp-Nam 代謝産物全てを Trp 由来のものとするために、ナイアシン欠飼料を使用した。尿中排泄量は体重と飼料摂取量の違いを考慮し、飼料 1 g 摂取あたりで算出した。

本研究で測定した Trp-Nam 代謝産物で顕著な差がみられたのは F344 の MNA と 4-Py 尿中排泄量であった。F344 は MNA の排泄量が多く、4-Py の排泄量が少なかったため、(2-Py+4-Py)/MNA の比率が他の系統に比べて顕著に低かった。F344 は Nam met. において他の系統と差がみられず、差のみられた Nam と 2-Py は量的に Nam met. の 1/10 以下と少なかったことから、F344 の MNA 生成までの代謝は他の系統と大きな違いはなく、他の系統では 4-Py に代謝される量の MNA が F344 では代謝されずに MNA のまま尿に排泄されたと考えられる。この MNA→4-Py 代謝に関与する 4-Py 生成 MNA 酸化酵素の活性は低く、今回、4-Py 生成 MNA 酸化酵素が低い代わりに、MNA→2-Py 代謝に関与する 2-Py 生成 MNA 酸化酵素の活性が高くなるという現象もみられなかった。そこで F344 は両 MNA 酸化酵素の活性が他の系統に比べ低いことが

明らかになった。

他の代謝産物についても系統間で有意な差がみられたが、F344のMNAと4-Pyほど顕著な差はなく、その系統を特定付ける差ではないと考えられる。

各系統とヒトのTrp-Nam代謝を比較したものを図5に示した。値は各尿中代謝産物を代謝産物の合計(AnA + KA + XA + 3-HA + QA + Nam met.)で除したものに100を掛けたもので、パーセントで表した。ヒトの値は北村らが行った実験データ⁷⁾を用いた。

ヒトは中間代謝産物が蓄積することなくNam, MNAまでスムーズに代謝され、多くが最終代謝産物の1つである2-Pyに代謝される。Wistar, SD, ACIについては一部KAとXAに代謝されるが、ほとんどが最終代謝産物の1つである4-Pyまで代謝される。それに対してF344では一部がKAとXAに流れ、その後Nam, MNAまで代謝されるが、最終代謝産物である2-Pyや4-Pyまではほとんど代謝されない。

本研究によってF344はMNAで代謝が止まり、(2-Py+4-Py)/MNAの比率が利用できないため、ヒトのモデル動物として相応しくないことが明らかとなった。WistarだけでなくSDとACIもTrpが開裂すれば最終代謝産物である2-Py, 4-Pyまで代謝されるため、Trp-Nam代謝におけるヒトのモデル動物として利用できることが明らかになった。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

1. 平成19年 日本栄養・食糧学会中四国・近畿支部合同大会(平成19年11月・東広島市)

—ラットの系統によるニコチンアミド異化代謝の違い—高橋圭, 福渡努, 柴田克己. 滋賀県大・食生活

2. 第1回日本アミノ酸学会学術集会(平成19年11月・東京都)

—ラットの系統におけるトリプトファン(ニコチンアミド代謝の比較)—柴田克己, 高橋圭, 奥野海良人, 福渡努. 滋賀県大・食生活

3. 日本トリプトファン研究会第29回学術集会(平成19年12月・東京都)

—トリプトファン—ニコチンアミド代謝(ラットの系統による特徴)—奥野海良人, 高橋圭, 福渡努, 柴田克己. 滋賀県大・食生活

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. Horwitt K, Harvey CC, Rothwell WS, Cutler JL, Haffron D. Tryptophan-niacin relationships in man. Studies with diets deficient in riboflavin and niacin together with observation on the excretion of nitrogen and niacin metabolites. *J Nutr* (1965) 60, 1-43.

2. Gangong AH, Cotman CW. Kynurenic acid

- and quinolinic acid act at N-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* (1986) 236, 283-299.
3. Stone TW, Behan WM, Jones PA, Darlington LG, Smith RA. The role of Kynurenes in the production of neuronal death, and the neuroprotective effect of purines. *J Alzheimers Dis* (2001) 3, 355-366.
 4. Dale WE, Dang Y, Amiridze N, Brown OR. Evidence that kynurenine pathway metabolites mediate hyperbaric oxygen-induced convulsions. *Toxicol Lett* (2000) 30, 37-43.
 5. Shibata K. Relationship between the ratio of the excreted by-products of niacin metabolism, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide + *N*¹-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide / *N*¹-methylnicotinamide and amino acid intake. *Vitamins (Japan)* (1990) 64, 1-18.
 6. Shibata K. Effect of dietary corn oil content on the urinary excretion ratio of *N*¹-methylnicotinamide and its pyridones in rats. *Vitamins (Japan)* (1991) 65, 243-248.
 7. Kitamura J, Fukuwatari T, Ohta M, Higashida M, Sasaki R, Shibata K. Comparison of the metabolism of Tryptophan to niacin among humans, rats, and mice. *Journal of Creative Approach for Health* (2004) 3, 125-129.
 8. Pullman ME, Colowick SP. Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*¹-methylnicotinamide. *J Biol Chem* (1990) 36, 87-98.
 9. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-28.
 10. Shibata K, Onodera M. Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric Biol Chem* (1991) 55, 143-148.
 11. Shibata K. Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, as endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* (1988) 430, 376-380.
 12. Shibata K, Onodera M. Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acids in urine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1992) 56, 974.
 13. Mawatari K, Oshida K, Inuma F, Watanabe M. Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Chem. Acta.* (1995) 302, 179-183.
 14. Shibata K. Ultramicro-determination of *N*¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamin.* (1987) 61, 599-604.
 15. Shibata K, Kawada T, Iwai, K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* (1988) 424, 23-28.

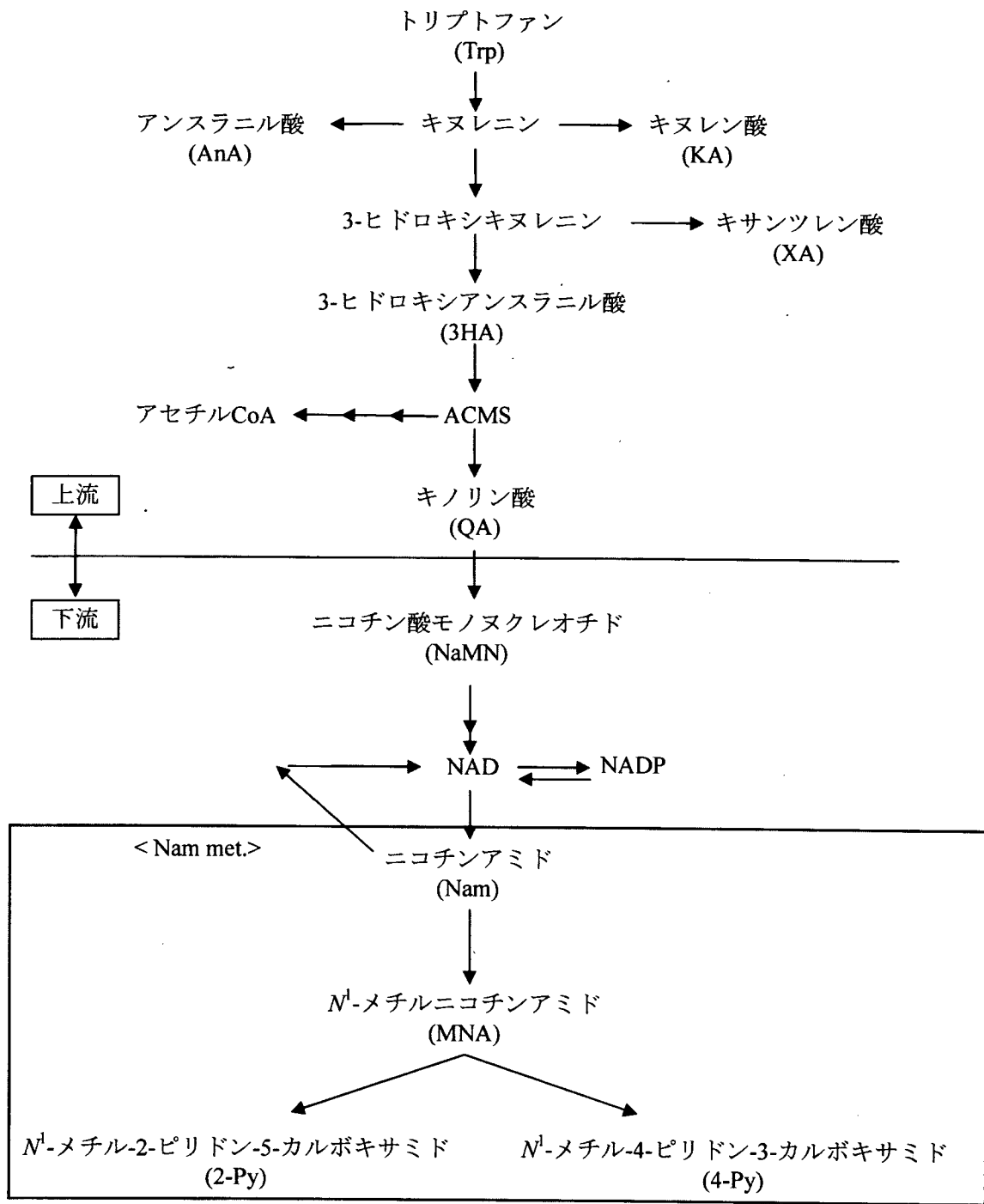


図1. トリプトファン - ニコチンアミド代謝経路.

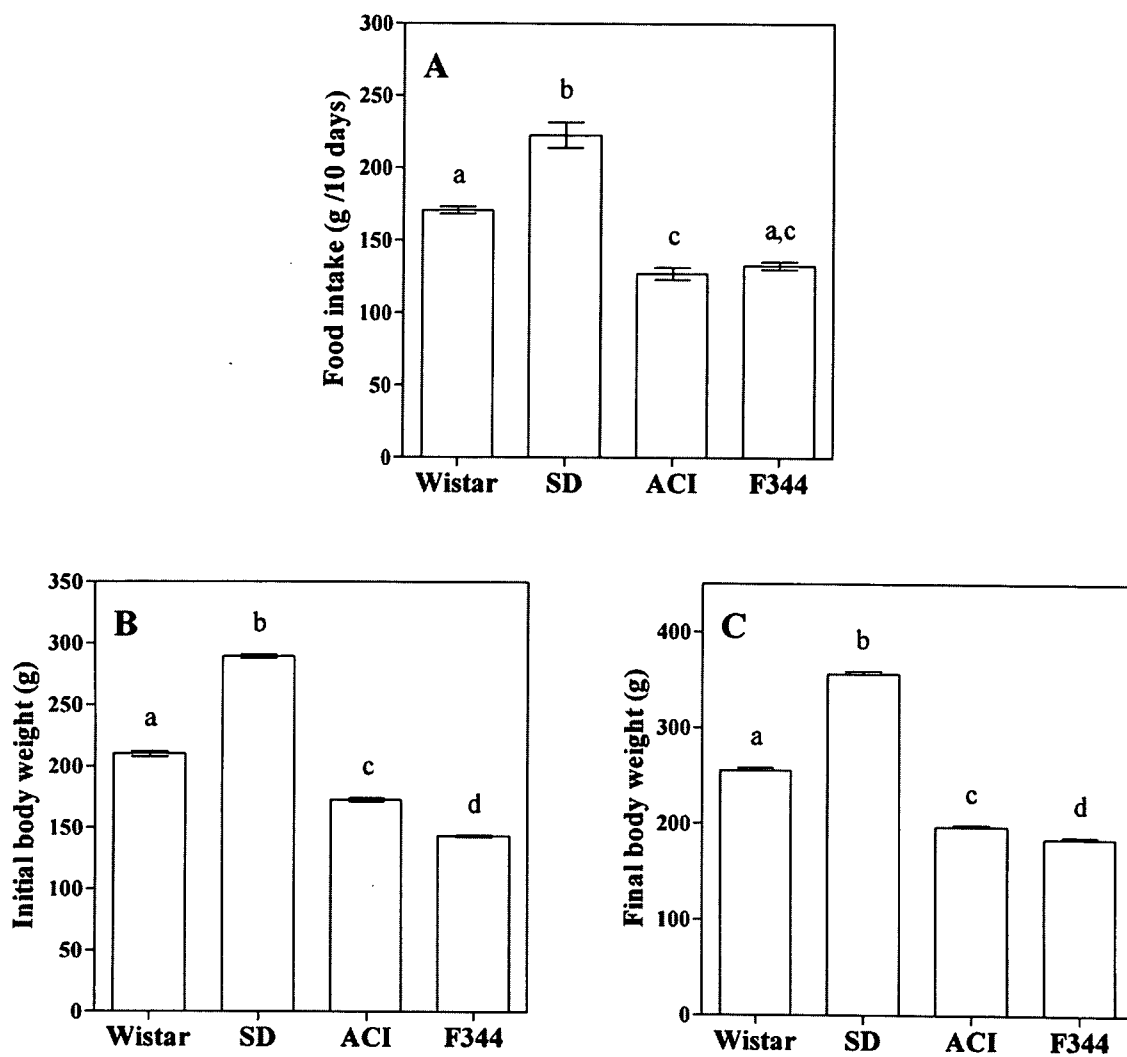


図2. ラット4系統における飼料摂取量 (A), 初日体重 (B) および最終日体重 (C). 値は平均値 ± 標準誤差 (n=5) として示した. 異なる添え字は有意差があることを示す ($p < 0.05$).

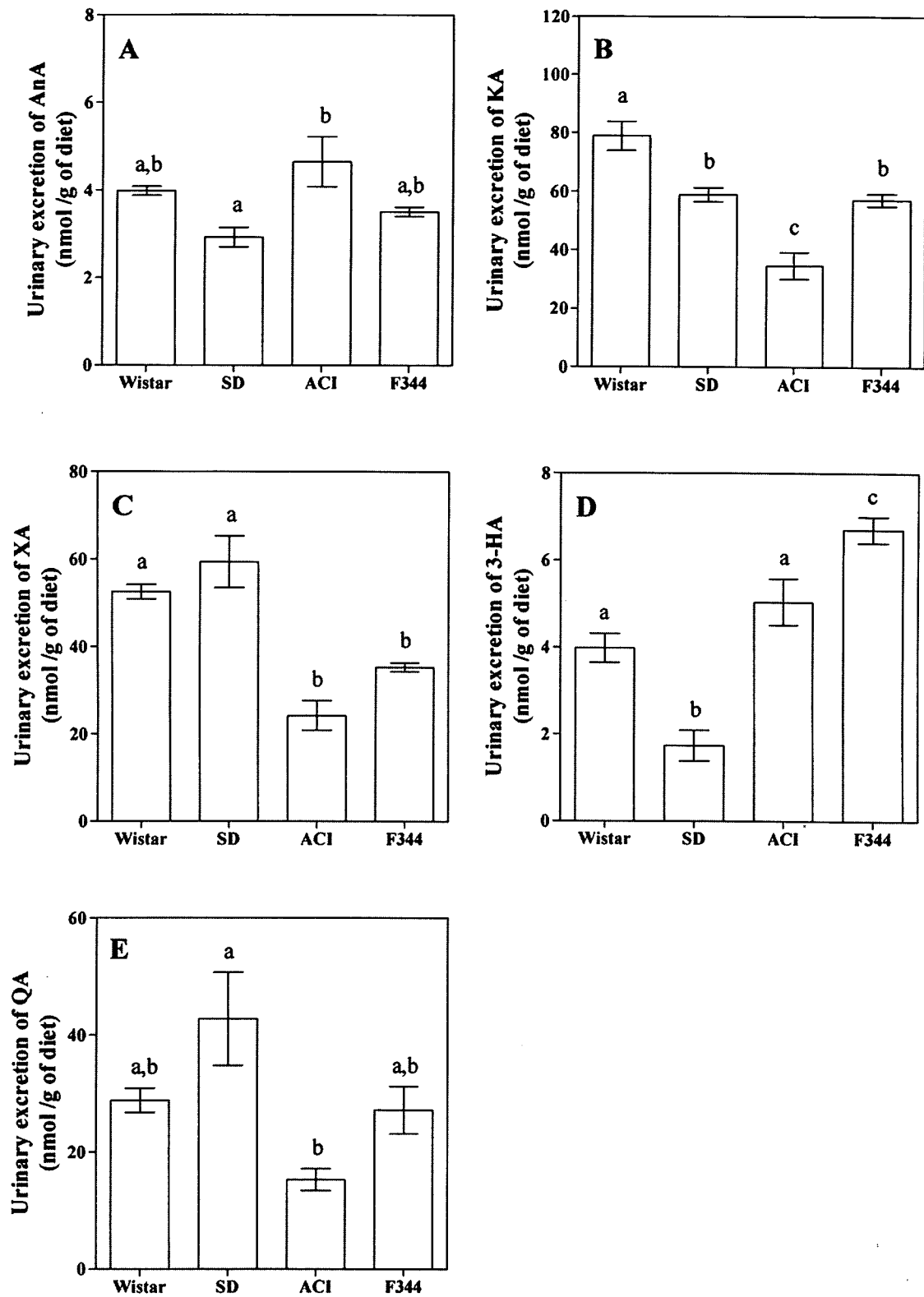


図3. ラット4系統における Trp-Nam 代謝経路の代謝産物 AnA (A), KA (B), XA (C), 3-HA (D), QA (E) の尿中排泄量. 値は平均値 ± 標準誤差 (n=5) として示した. 異なる添え字は有意差があることを示す ($p < 0.05$).

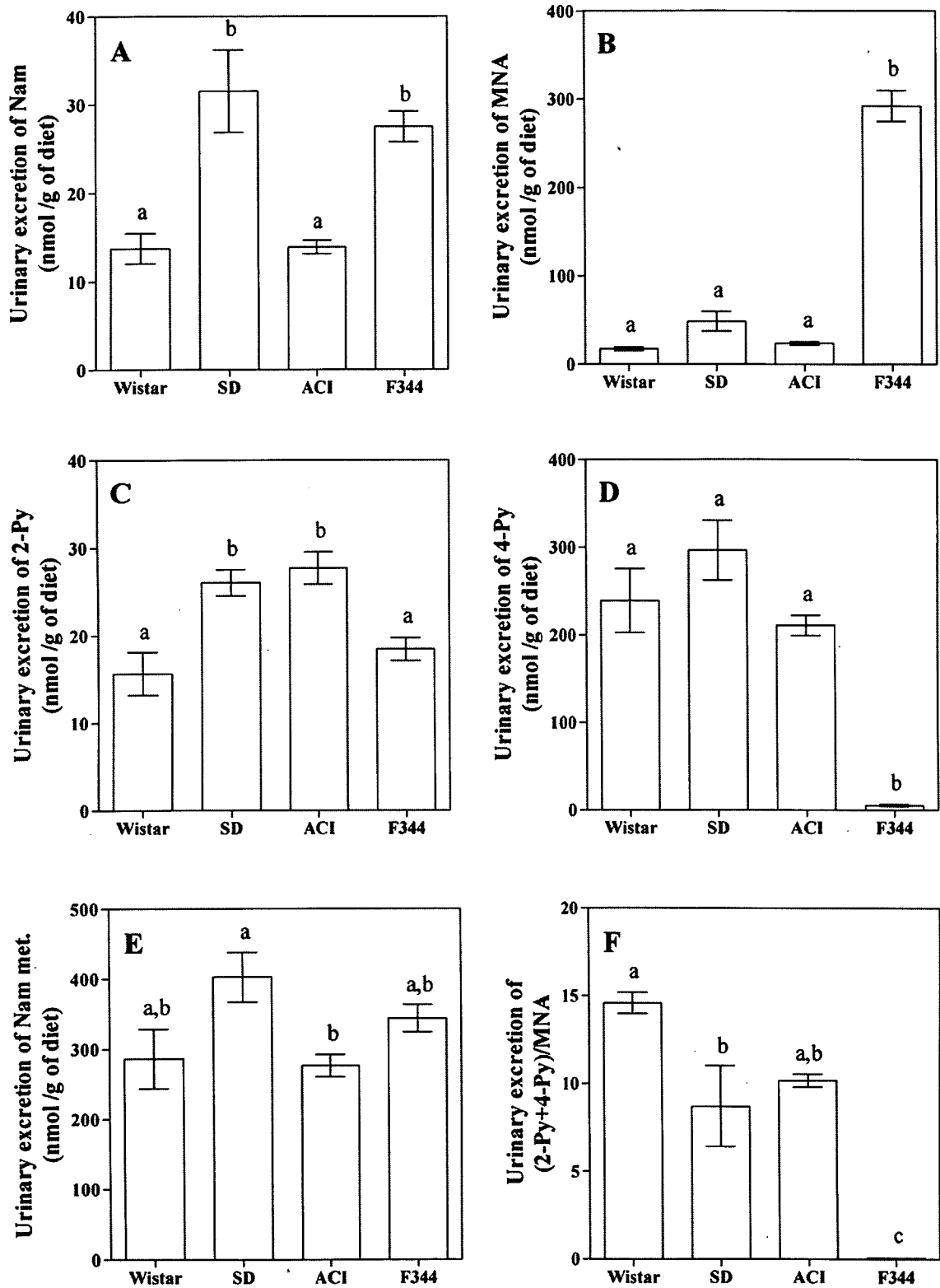


図4. ラット4系統におけるNam (A), Nam異化代謝産物 MNA (B), 2-Py (C), 4-Py (D), および総Nam異化代謝産物 (E)の尿中排泄量とNam異化代謝産物排泄比 (2-Py+4-Py)/MNA (F). 値は平均値 ± 標準誤差 (n=5) として示した. 異なる添え字は有意差があることを示す ($p < 0.05$).

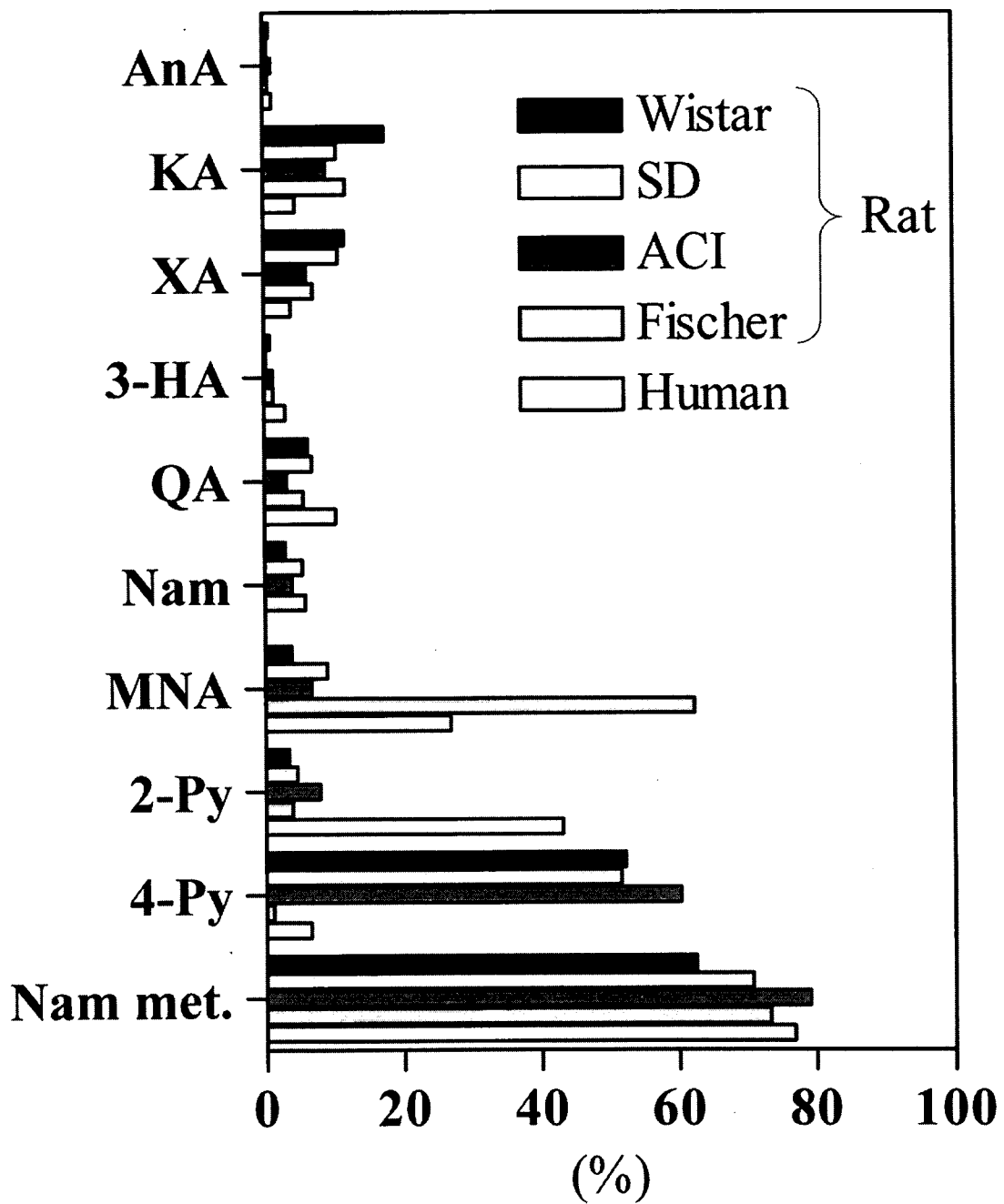


図5. ラット4系統とヒトの尿中における各 Trp-Nam 代謝産物が Trp-Nam 代謝産物合計量に占める割合.

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明－

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

21. 定量方法

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

以下の定量方法をまとめた。

- ・尿中水溶性ビタミンの定量方法
- ・尿中キノリン酸，クレアチニンの定量方法
- ・血液中水溶性ビタミンの定量方法

尿中水溶性ビタミンの定量方法

ヒトの 24 時間尿は、調査日の起床後第 1 回目の尿は捨て、第 2 回目の尿を遮光ボトルに集めた。回収後、尿量を測定し、ビタミンごとに表 1 に示した前処理を行い、分析まで -20°C で冷凍保存した。また、スポット尿も同様に、起床後第 1 回目の尿は捨て、第 2 回目の尿を遮光ボトルに集め、前処理を行った。

ラット尿は、代謝ケージの尿受けを洗ったのち、三角フラスコに 1 M 塩酸を 1 ml 入れ尿受けの下にセットし、24 時間採尿した。24 時間後、尿をメスシリンダーに入れ、0.1 M 塩酸で適当な用量にメスアップした。その後よく攪拌し、分析まで -20°C で冷凍保存した。

ビタミン B₁

ビタミン B₁ の尿中の測定は、チアミンを測定した。測定方法は、木村らによる HPLC 法¹⁾を改変した福渡らの方法²⁾による蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については表 2 に、構成図は図 1 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 0.1 M 塩酸

塩酸を 1 ml 秤量し、水を 115 ml 加えた。

② HPLC 用の移動相

りん酸二水素ナトリウム二水和物を 31.2 g 秤量し、水 800 ml に溶解した後、アセトニトリル 3 ml を加え、水にて全量を 1000 ml とした。

③ 0.01% フェリシアン化カリウム

フェリシアン化カリウムを 0.05 g 秤量し、水 500 ml に溶解してよく混和した。

④ 15% 水酸化ナトリウム

水酸化ナトリウムを 75 g 秤量し、水 425 ml を徐々に加えて混和した。

(2) 標準溶液の調製

① チアミン塩酸塩 (和光純薬工業株式会社、大阪) を 10 mg を秤量し、0.1 M 塩酸 10 ml に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 0.1 M 塩酸を加えてよく混和した。0.1 M 塩酸を対照として、この溶液の吸光度 (246 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{246 \text{ nm}} = 14,200$ より正確な濃度 (pmol) を求めた。これをチアミン標準溶液とした。

(3) サンプルの使用方法

測定試料である尿は、10,000 rpm (9,100 × g), 4°C で 5 分間遠心した後、マイクロフィルター (Millex-HV, 0.45 μm, 日本ミリポア株式会社、東京) を通してろ過した。ろ液 20 μl を HPLC システムに注入した。チアミン標準溶液はそのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とした。

(4) 計算方法

① チアミン標準溶液 20 μl を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 尿 20 μl を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

ラット・マウスの場合 (nmol/day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりのチアミン標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1/1000)^{*1} × 希釈倍率

ヒト尿の場合 (nmol/day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりのチアミン標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1/1000)^{*1} × 希釈倍率 × (10/9)^{*2}

*1: 単位を pmol から nmol にするため

*2: 尿を 1 M HCl (9:1, v/v) に処理を行い保存しているため