

results clearly show that an excess intake of biotin increased the risk of adverse effects. A further study is therefore needed to collect enough data to set UL for biotin.

## Acknowledgment

This investigation forms part of "Studies on the Dietary Reference Intakes for Japanese" (principal investigator, Katsumi Shibata) which was supported by a grant for comprehensive research on cardiovascular and life-style related diseases from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

## References

- Bonjour, J. P., Biotin in man's nutrition and therapy a review. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **47**, 107–118 (1977).
- Dakshinamurti, K., and Chauhan, J., Biotin. *Vitamin Horm.*, **45**, 337–384 (1989).
- Watanabe, T., Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J. Nutr.*, **113**, 574–581 (1983).
- Watanabe, T., Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. *J. Nutr.*, **123**, 2101–2108 (1993).
- Watanabe, T., Dakshinamurti, K., and Persaud, T. V. N., Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture. *J. Nutr.*, **125**, 2114–2121 (1995).
- Dakshinamurti, K., Modi, V. V., and Mistry, S. P., Biotin deficiency produces hyperglycemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **127**, 396–400 (1968).
- Maebashi, M., Makino, Y., Furukawa, Y., Ohinata, K., Kimura, S., and Takao, S., Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin diabetes mellitus. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **14**, 211–218 (1993).
- Nagamine, T., Saito, S., Yamada, S., Arai, T., Takehara, K., and Fukui, T., Biotinidase activity in patients with liver disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, **28**, 899–906 (1993).
- Arbuckle, H. A., and Morelli, J., Holocarboxylase synthetase deficiency presenting as ichthyosis. *Pediatr. Dermatol.*, **23**, 142–144 (2006).
- Grunewald, S., Champion, M. P., Leonard, J. V., Schaper, J., and Morris, A. A., Biotinidase deficiency: a leukoencephalopathy. *Neuropediatrics*, **35**, 211–216 (2004).
- Mikati, M. A., Zalloua, P., Karam, P., Habbal, M. Z., and Rahi, A. C., Novel mutation causing partial biotinidase deficiency in a Syrian boy with infantile spasms and retardation. *J. Child Neurol.*, **21**, 978–981 (2006).
- Paul, P. K., Duttagupta, P. N., and Agarwal, H. C., Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of female rats. *Curr. Sci.*, **42**, 206–208 (1973).
- Paul, P. K., Duttagupta, P. N., and Agarwal, H. C., Antifertility effect of biotin and its amelioration by estrogen in the female rat. *Curr. Sci.*, **42**, 613–615 (1973).
- Baumgartner, E. R., and Suormala, T., Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism. *Internat. J. Vitam. Nutr. Res.*, **67**, 377–384 (1997).
- Dietary Reference Intakes for Japanese, Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan, Daiichishuppan, Tokyo (2005).
- Reeves, P. G., Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.*, **127**, 838S–841S (1997).
- Pullman, M. E., and Colowick, S. P., Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide. *J. Biol. Chem.*, **206**, 121–127 (1954).
- 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-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23–28 (1988).
- Kimura, M., Fujita, T., and Itokawa, Y., Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29–31 (1982).
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623–5628 (1983).
- Gregory 3<sup>rd</sup>, J. F., and Kirk, J. R., Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879–883 (1979).
- Watanabe, F., Abe, K., Katsura, H., Takenaka, S., Mazumder, Z. H., Yamaji, R., Ebara, S., Fujita, T., Tanimori, S., Kirihata, M., and Nakano, Y., Biological activity of hydroxo-vitamin B<sub>12</sub> degradation product formed during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5177–5180 (1998).
- Shibata, K., Ultramicro-determination of *N*<sup>1</sup>-methyl-nicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)*, **61**, 599–604 (1987).
- Skeggs, H. R., and Wright, L. D., The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21–26 (1944).
- Aiso, K., and Tamura, T., Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for  $\alpha$ -amylase and protease treatment. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **44**, 361–370 (1998).
- Fukui, T., Iinuma, K., Oizumi, J., and Izumi, Y., Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 491–498 (1994).
- Fukuwatari, T., Wada, H., Sasaki, R., and Shibata, K., Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide N-oxide and nicotinic acid by rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 44–50 (2004).
- Shibata, K., Takahashi, C., Fukuwatari, T., and Sasaki, R., Effects of excess pantothenic acid administration on the other water-soluble vitamin metabolisms in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 385–391 (2005).
- Hymes, J., Fleischhauer, K., and Wolf, B., Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyltransferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem. Mol. Med.*, **56**, 76–83 (1995).
- Peters, D. M., Griffin, J. B., Stanley, J. S., Beck, M. M., and Zempeni, J., Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **283**, C878–C884 (2002).

- 31) Stanley, J. S., Griffin, J. B., and Zempleni, J., Biotinylation of histones in human cells: effects of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5424–5429 (2001).
- 32) Narang, M. A., Dumas, R., Ayer, L. M., and Gravel, R. A., Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 15–23 (2004).
- 33) Manthey, K. C., Griffin, J. B., and Zempleni, J., Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J. Nutr.*, **132**, 887–892 (2002).
- 34) Scheerger, S. B., and Zempleni, J., Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **73**, 461–467 (2003).
- 35) Crisp, S. E., Griffin, J. B., White, B. R., Toombs, C. F., Camporeale, G., Said, H. M., and Zempleni, J., Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur. J. Nutr.*, **43**, 23–31 (2004).
- 36) Lewis, B., Rathman, S., and McMahon, R., Dietary biotin intake modulates the pool of free and protein-bound biotin in rat liver. *J. Nutr.*, **131**, 2310–2315 (2001).
- 37) Zempleni, J., and Mock, D. M., Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**, 504–508 (1999).
- 38) Mock, D. M., and Mock, N. I., Serum concentrations of bisnorbiotin and biotin sulfoxide increase during both acute and chronic biotin supplementation. *J. Lab. Clin. Med.*, **129**, 384–388 (1997).
- 39) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academy Press, Washington, DC (1998).

# Characterization of tryptophan–niacin metabolism in rats fed with an excessive tryptophan diet

A. Okuno \*, T. Fukuwatari, R. Sasaki, K. Shibata

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

---

**Abstract.** We investigated tryptophan–niacin metabolism in rats when fed with an excessive tryptophan diet. Male rat of the Wistar strain (3 weeks old) were divided into the four groups of five rats each, and one of the group was fed with a 20% casein diet added with 0, 0.5, 1, 2, and 5% tryptophan for 30 days. The last day urine samples (24-h urine) were collected for analyses for the metabolites of tryptophan such as kynurenic acid (KA), xanthurenic acid (XA), 3-hydroxyanthranilic acid (3-HA), quinolinic acid (QA), nicotinamide (Nam), *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide (MNA), *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide(4-Py), and *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-Py). The urinary excretion of KA, XA, and 3-HA were increased according to the intake of tryptophan. However, the excretion of QA was almost the same in the groups between the groups of 2 and 5% tryptophan diets. The sum metabolites of Nam+MNA+2-Py+4-Py were almost the same in the 1–5% tryptophan diets. The value of (2-Py+4-Py)/MNA decreased sharply in the 0.5 and 1% Trp diets. Therefore the adverse effects of dietary Trp were observed from the diet containing 0.5% Trp, which was calculated as 0.45 g/kg of rat body weight. © 2007 Published by Elsevier B.V.

*Keywords:* Quinolinic acid; *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide; *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide; Tryptophan; Niacin; *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide

---

## 1. Introduction

Niacin, serotonin and melatonin are very important bioactive compounds, which derive from an essential amino acid, tryptophan. Niacin is concerned with various metabolisms as a vitamin. Serotonin is involved in relieving pain, hypnosis, and tranquilizes as a

---

\* Corresponding author. Tel./fax: +81 749 28 8449.

E-mail address: kshiabta@shc.usp.ac.jp (A. Okuno).

neurotransmitter. Melatonin is a pineal hormone which works the rhythm of sleep. Based on these facts, tryptophan is widely found on the market as supplement. The adverse effects of tryptophan are not well known. We started to research the metabolism change of tryptophan by an excessive intake of tryptophan.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Vitamin-free milk casein, sucrose, L-methionine, Gelatinized cornstarch, L-tryptophan (Trp), nicotinamide (Nam), and quinolinic acid (QA) were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Kynurenic acid (KA), xanthurenic acid (XA), 3-hydroxyanthranilic acid (3-HA), and *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide (MNA) chloride were purchased from Tokyo Kasei Kogyo (Tokyo, Japan). *N*<sup>1</sup>-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-Py) and *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide (4-Py) were synthesized by the methods of Pullman and Colowick [1] and Shibata et al. [2], respectively. The mineral (AIN-93-G-MX) and niacin-free vitamin (AIN-93-VX) mixtures were obtained from Oriental Yeast Kogyo (Tokyo, Japan). All other chemicals used were the highest purity available from commercial sources.

### 2.2. Animal and diet

The care and treatment of the experimental animals conformed to the University of Shiga Prefecture guidelines for the ethical treatment of laboratory animals. Twenty male rats of the Wistar strain (3 weeks old obtained from Clea, Japan) were divided into four groups of five each, and placed in an individual metabolic cage (CT-10 for rats; Clea Japan). One of the groups was fed with a 20% casein diet as a control group and others were fed with test diets which added the 20% casein diet to 0.5, 1, 2, and 5% Trp (Table 1), and allowed free access to food and water. The animal room was maintained at the temperature of around 20 °C with 60% humidity and a 12 h light/12 h dark cycle (light onset at 6:00 a.m.). Body weight and food intake were measured daily at around 9:00 a.m., and food and water were

Table 1

	Ctrl diet (%)	Test diet (Ctrl diet+Trp)			
		(% )			
		+0.5% Trp	+1.0% Trp	+2.0% Trp	+5.0% Trp
Casein	20	20	20	20	20
L-Methionin	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Gelatinized comstarch	45.9	45.4	44.9	43.9	40.9
Sucrose	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4
Corn oil	5	5	5	5	5
Mineral mixture (AIN-93-G-MX)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93-VX niacin free)	1	1	1	1	1
Trp	0	0.5	1	2	5

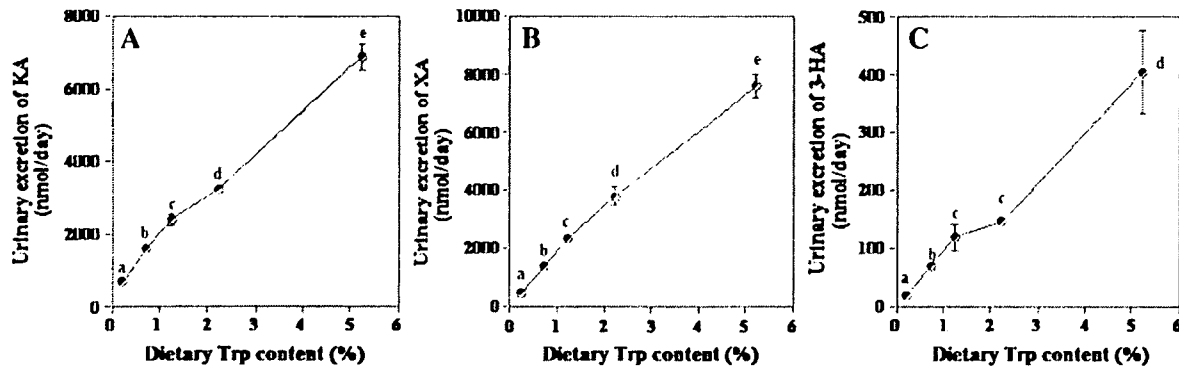


Fig. 1. Effect of Trp intake on the urinary excretion of KA (A), XA (B), and 3-HA (C) in rats. A different letter on the circle means a significant difference at  $p < 0.05$ , as determined by Tukey–Kramer multiple comparisons test.

renewed daily. The experimental period was for 30 days. Urine samples (10:00 a.m.–10:00 a.m.; 24-h urine) were collected on the last day. Urine samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until needed.

### 2.3. Analyses

The urinary contents of Nam, 2-Py, and 4-Py were simultaneously measured by the HPLC method of Shibata et al. [2], and those for MNA by the method of Shibata [3]. Urinary concentration of 3-HA was measured by the HPLC method of Shibata and Onodera [4], while the urinary concentration of KA was measured by the method of Shibata [5]. The urinary concentration of XA was measured by the method of Shibata and Onodera [6], and QA was measured by the method of Mawatari et al. [7].

## 3. Results and discussion

Trp has widely appeared on the market and consequently, there is a risk of taking excessive amounts of Trp. Hence, it is important to know what is happening when taking excessive Trp. As the first experiment of the series of studies on the adverse effects of Trp,

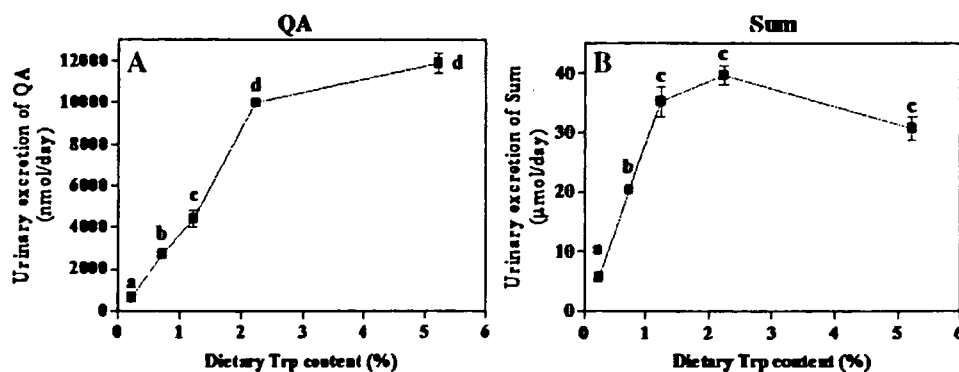


Fig. 2. Effect of Trp intake on the urinary excretion of QA in rat. (A) Sum=Nam+MNA+2-Py+4-Py. (B) A different letter on the circle means a significant difference at  $p < 0.05$ , as determined by Tukey–Kramer multiple comparisons test.

we investigated the Trp-niacin metabolism in rats when fed an excessive Trp diet. The body weight gain and food intake of the rats fed with the 5% Trp-added diet was the lowest of all the groups. The data showed a clear adverse effect in rats fed with the 5% Trp-added diet. The urinary excretion of such Trp catabolites as KA, XA, and 3-HA were increased according to the intake of Trp (Fig. 1).

Thus, it might be that the enzyme activities concerning Trp to 3-HA are enough to be able to metabolize the diet containing up to 5% Trp. However, the excretion of QA was almost the same in the groups between 2 and 5% Trp diets (Fig. 2A). Thus, it might be that the metabolism of 3-HA to QA was saturated in the 5% Trp diet. It means the enzyme of  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde decarboxylase activity increased. The sum metabolites of Nam + MNA + 2-Py + 4-Py were almost the same in the 1 and 5% Trp diets, which showed the metabolism of QA to nicotinic acid mononucleotide was saturated in the 2 and 5% Trp diet. It means quinolinate phosphoribosyl transferase QPRT activity saturated in 1% Trp diet. (Fig. 2B) The value of (2-Py + 4-Py)/MNA decreased sharply in the 0.5 and 1% Trp diets.

## References

- [1] K. Shibata, T. Kawada, K. Iwai, Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*<sup>1</sup>-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 424 (1988) 23–28.
- [2] M.E. Pullman, S.P. Colowick, Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide, *J. Biol. Chem.* 206 (1954) 121–127.
- [3] K. Shibata, Ultramicro-determination of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography, *Vitamins* 61 (1987) 599–604.
- [4] K. Shibata, M. Onodera, Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography, *Agric. Biol. Chem.* 55 (1991) 143–148.
- [5] K. Shibata, Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, as endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 430 (1988) 376–380.
- [6] K. Shibata, M. Onodera, Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (1992) 974.
- [7] K. Mawatari, et al., Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection, *Anal. Chim. Acta* 302 (1995) 179–183.

---

**総 説**

---

**生理活性ミネラルとB群ビタミンの生体利用率との関係\***

滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻\*\*

柴田 克己, 福渡 努

Vitamins (Japan), 82 (2), 115-125 (2008)

**Relationship between Bioactive Minerals and Bioavailability of B-group vitamins**

Katsumi Shibata, Tsutomu Fukuwatari

Laboratories of Food Science and Nutrition, Department of Life Style Studies, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture

In Japan, two basic texts are used for nutritional guidance, Standard Tables of Food Composition in Japan and Dietary Reference Intakes for Japanese, 2005. The "Food Composition Tables" describe the nutrient values of foods, and "Dietary Reference Intakes" reports the values that humans can use. Synthetic vitamins have been often used in experiments to determine vitamin requirements, and the bioavailability of synthetic vitamins is considered to be 100%. However, the bioavailability of a vitamin from foods may not be 100% because most vitamins existing in nature are bound to proteins, sugars, or other compounds. Although it is necessary to determine the bioavailability of vitamins in food consumed, no method has been established. We introduce a practical method to determine the bioavailability of vitamins in food. In particular, we are also interested in the effects the dietary intake of minerals and micronutrients exerts on the bioavailability of vitamins. We believe that the results of these studies will contribute to the maintenance of public health in Japanese.

**Key words:** bioavailability, vitamin, food, mineral, urine

(Received June 20, 2007)

**はじめに**

本論文は、2006年2月10日に開催されたビタミンB研究委員会主催のシンポジウム「B群ビタミンと生理活性ミネラル」での講演で、著者らが担当した「生理活性ミネラルとB群ビタミンの生体利用率との関係」を文章化したものである。講演した内容は、すでに確立されたものばかりでなく、著者らのみが提唱している内容も含まれている。

食品中に含まれるビタミン含量が明らかにされたのと

同時に、摂取した食品由来のビタミンが、どの程度我々の体が消化・吸収し、かつ利用しているのかに関して、多くの栄養学者・医学者が興味をもっていたが、十分な情報が得られないまま、今日に至っている。

「食品成分表」の値は、化学的な方法により、食品中のビタミンをできる限りより多く抽出できる方法を駆使し、かつビタミン型(遊離型のビタミン)にまで分解したのち、測定した値である。いわゆる資源としての数値が記載されている。一方、「食事摂取基準」の数値は、ヒトが利用できる値が記載されている。たとえば、あるヒトが

\*本論文はビタミンB研究委員会シンポジウム「B群ビタミンと生理活性ミネラル」(平成18.2.10大阪)の講演内容をまとめたものである。

\*\*〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町2500

1日の食事から2mgのチアミンを摂取しても、このヒトが消化・吸収し、かつ利用できたチアミンの量は1mgにすぎない可能性がある。

文献検索ソフトを利用して、「bioavailability」と「vitamin」をキーワードにして調べると、葉酸とビタミンB<sub>6</sub>に関する論文が多く検索され、次にナイアシンが検索される。これらのほとんどの論文は、著者ら（おそらく多くの人々）が知りたい「習慣的に食べている1日食事由来のビタミンがどの程度我々の体で消化・吸収され、かつ利用されているかを知りたい」に関する情報を定量的に与えてくれない。いずれも、定性的な現象を報告しているにすぎない。動物性食品に含まれるB群ビタミンの利用性は高いが、植物性食品は低い、というものである。たとえば、トウモロコシの「ぬか」に含まれるナイアシン、チアミン、パントテン酸の利用性が「ぬか」の製粉状態により異なるとか<sup>1)</sup>、食物繊維の存在はビタミンB<sub>6</sub>の吸収を阻害するとか<sup>2)</sup>、ヨーグルトの摂取はチアミン、リボフラビン、ビタミンB<sub>6</sub>栄養状態を低下させる傾向があるとか<sup>3)</sup>、牛乳の摂取が食品中の葉酸の消化・吸収率を高めるとか<sup>4)</sup>、植物食品中にはビタミンと糖類が結合したものの<sup>5)6)</sup>、あるいはタンパク質と結合したものの<sup>7)</sup>が報告されており、これらの結合型ビタミンは消化されにくいいため、吸収が悪いことが報告されている<sup>8)9)</sup>。さらに、まぐろ、パン、ピーナッツバター中のビタミンB<sub>6</sub>の栄養有効性を相対的に求めた結果、まぐろ中のビタミンB<sub>6</sub>が他の食品よりも高かったという報告もある<sup>10)</sup>。

### 1. 生体利用率とは

食事から摂取したビタミンをヒトがどの程度消化・吸収し、かつ利用されているかを表す言葉は統一されておらず、成書を見ると、生理活性、生物有効性、生物学的有効性、生体利用度、栄養有効性、栄養効率、生体利用率などの名称が使用されている。そこで、「日本人の栄養所要量－食事摂取基準－策定検討会」では、食事から摂取したビタミンをヒトがどの程度消化・吸収し、かつ利用されているかを表す言葉として、「生体利用率」を使用することを決めた<sup>11)</sup>。今までも「生体利用率」という言葉は使用されているが、この「生体利用率」に関する定義は、研究者間でまちまちである。血液中の値を指標とした数値をいう研究者もいる。尿中の値を指標とした数値をいう研究者もいる。実験動物を使用する場合は、臓器中の値あるいは体重の増加量を指標とすることができるが、ヒトを被験者とする場合は、血液と尿に限られる。したがって、ヒトを被験者として、栄養素の利用性を調べる実験において、著者らは、血液中の値を指標とする場合は「消化・吸収率」とし、尿中の値を使用する時は「生体利用率」とすべきであると、提案している。

次に、著者らが提案している生体利用率の概念を詳細に述べたい。例をニコチンアミドとする。ニコチンアミド

表1. ラット肝臓中のナイアシン関連化合物含量

	概数 (nmol/g)
NAD <sup>+</sup> + NADH	700
NADP <sup>+</sup> + NADPH	300
遊離ニコチンアミド	400
総ニコチンアミド	1400

ドはそのままの形では機能を果たすことはできないので、細胞内では、多くは補酵素型として存在している（表1）。さらに、その機能を発揮するために、アポ酵素と結合し、ホロ酵素の一部として存在していなければならない。我々が食事として摂取する状態では、もちろん、加工程度、保存状態に依存するが、ニコチンアミドをはじめとしてB群ビタミンは、ホロ酵素の一部として存在している割合が高い。ニコチンアミド補酵素の場合は、組織を強酸性下で処理し、酵素タンパク質を変性・失活させることで、酵素タンパク質から遊離してくる。単なる熱処理だけでは遊離しにくい。ニコチンアミドを例として、ビタミンの体内運命（利用性）を図1～図4の4枚の図で説明する。図1は消化・吸収過程の概略図である。ホロ酵素の成分として摂取されたNADは、胃の酸性条件下で遊離する。遊離したNADは消化酵素成分であるNADピロホスファターゼ、ヌクレオシダーゼにより加水分解され、ニコチンアミドが遊離する。なお、NMN（ニコチンアミドモノヌクレオチド）→NR（ニコチンアミドリボシド）→ニコチンアミドの両反応を触媒する酵素は、小腸膜酵素であると思われる<sup>12)</sup>。ニコチンアミドの血液中への転送は、エネルギー非依存的かつ非飽和型である<sup>13)</sup>。血液から臓器・組織へのニコチンアミドの移行は単純拡散によって行われるが（図2）、細胞はニコチンアミドを速やかに補酵素型に合成することで細胞内捕捉している<sup>14)</sup>（図3）。補酵素型となったのちは、アポ酵素と結合し、ホロ酵素となり機能を果たす。そして、一定時間働けば、役目を終えて、タンパク質部分はプロテオソーム系で処理され、一方、NADは、図4に示したようにニコチンアミド、MNA（N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド）、2-Py（N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド）、4-Py（N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド）へと代謝され、尿中に排泄される。図1～図4に示した過程をすべて含めた概念として「生体利用」と呼ぶことを提案したい。簡潔に述べれば、「消化・吸収」と「吸収後の体内利用」を合わせた概念である。ビタミンの「生体利用率」とは、ヒトが摂取した食事に含まれるビタミンがどの程度ヒトが利用できたのかという数値である。つまり、「（体内で利用されたビタミン量／摂取ビタミン量）」である。



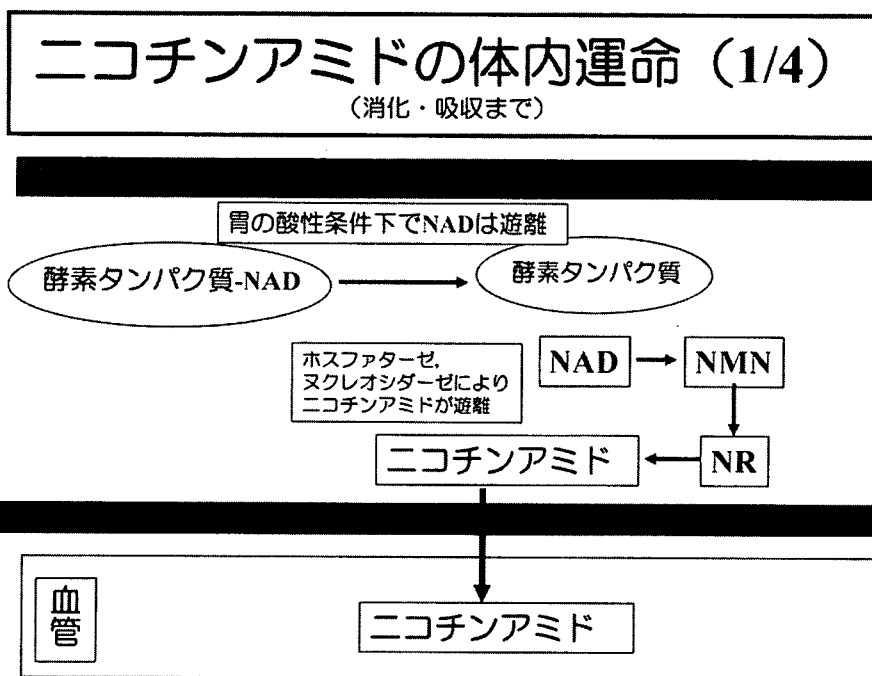


図1. ニコチンアミドの体内運命 (1/4) (消化・吸収まで)  
 NAD = nicotinamide dinucleotide; NMN = nicotinamide mononucleotide; NR = nicotinamide riboside.

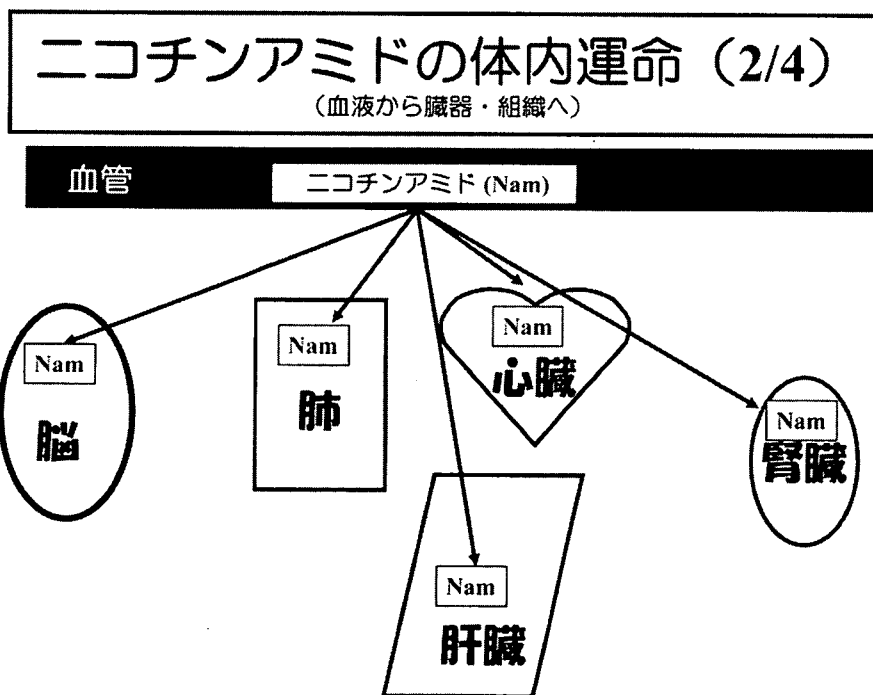


図2. ニコチンアミドの体内運命 (2/4) (血液から組織へ)  
 Nam = nicotinamide;

## ニコチンアミドの体内運命 (3/4)

(補酵素型へ, そして酵素タンパク質と結合, 機能を果たす, そして役目を終えて異化経路へ)

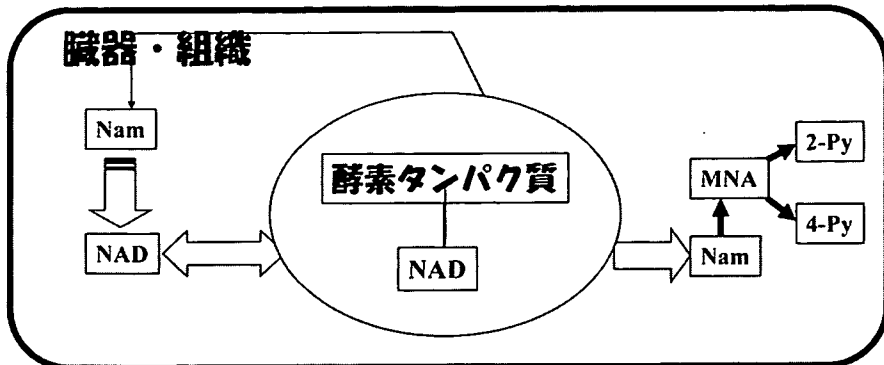


図 3. ニコチンアミドの体内運命 (3/4) 補酵素型へ, そして酵素と結合, 機能を果たす, そして役目を終えて異化経路へ  
 MNA = *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide; 2-Py = *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide; 4-Py = *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide.

## ニコチンアミドの体内運命 (4/4)

(利用されたのち, 尿中に排泄)

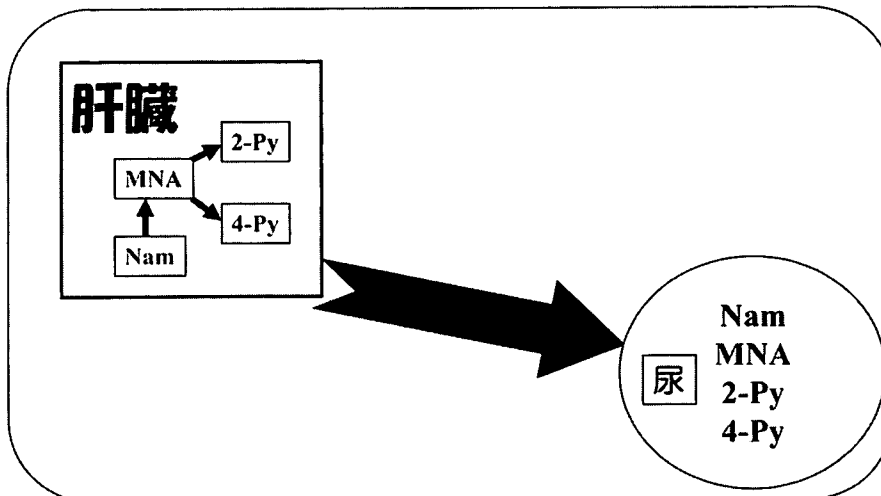


図 4. ニコチンアミドの体内運命 (4/4) (利用されたのち, 尿中に排泄)

### 2. 摂取したビタミン量をどのようにして測定するのか

この問題は, 技術的には簡単である. 1日に摂取する食事を倍量作り, 半分を食べ, 半分を分析用に供すればよい.

### 3. 体内で利用されたビタミン量をどのようにして測定するのか

知りたい情報は, 1日に食べた食事由来のビタミンのうち, どの程度が図1~図4に示した代謝運命をたどったのか, という数値を測定しなければならない. 1日に

食べた食事由来のビタミンの生体利用率を調べるためには、前歴の食事の影響を消し去るために、ある期間同じ食事を摂取しなければならない。その期間は少なくとも4日間は必要である<sup>15)</sup>。

図1～図4では、真っ直ぐな代謝運命を書いたが、実際には、①消化、②吸収、③細胞内への輸送、④補酵素への合成、⑤アポ酵素との結合、⑥ホロ酵素機能を発揮、⑦ホロ酵素終末、⑧補酵素の分解、⑨遊離ビタミンの異化、⑩尿中への排泄の各過程で影響を及ぼす因子がある。また、摂取したビタミンがそのままの形で尿中にすべて排泄されるわけではない。そこで、現実的な生体利用率を求めるためには、一つの仮定をもうけた相対生体利用率を提案したい。その仮定は、遊離型のビタミンの生体利用率を100%とすることである。

各過程で影響をおよぼす因子を具体的に順に述べたい。食品にはビタミンの構造を破壊するものが含まれている。たとえば、thiaminase<sup>16)</sup>、果物や野菜に含まれる耐熱性のポリフェノールがチアミンを破壊することが<sup>17)</sup>、果物に含まれる有機酸が亜鉛依存性のコンジュゲラーゼ<sup>18)</sup>(ポリグルタミン酸型葉酸を吸収可能なモノグルタミン酸型葉酸に変換する酵素)を阻害することが<sup>19)</sup>、牛乳が食品中の葉酸の消化・吸収率を高めることが<sup>20)</sup>、生卵白に含まれるアビジンというタンパク質はビオチンと特異的に結合して吸収を阻害することが<sup>21)</sup>知られている。血液中から臓器・組織中への転送に影響を与える因子に関する具体的な情報はないが、脳内へのトリプトファンの転送が、血液中のチロシン、フェニルアラニンや分岐鎖アミノ酸の量によって影響<sup>22)</sup>を受けるといようなことから、摂取した食品の組み合わせにより、この転送が影響されるものと考えられる。補酵素への生合成系とホロ酵素活性の両方に影響をおよぼす因子には、アンチビタミンとよばれるビタミン類縁化合物がある。チアミンに対してはピリチアミンが<sup>23)</sup>、リボフラビンに対してはガラクトフラビンが<sup>24)</sup>、ナイアシンに対しては3-アセチルピリジジン<sup>25)</sup>、

6-アミノニコチンアミド<sup>26)</sup>、イソニコチン酸ヒドラジド<sup>27)</sup>が、葉酸に対しては4-アミノプテリン<sup>28)</sup>、メトトロキセート<sup>29)</sup>が知られている。しかしながら、これらのアンチビタミンは食品中には含まれていないため、現実的には薬剤被害が考えられるのみである。

さて、我々は豊かになればなるほど種々の食品の組み合わせが行われる。食品は、組み合わせによって、ある場合は単独の栄養価の総和以上の効果がでる場合と、反対に総和以下の栄養価となる場合がある。したがって、我々が、過去に行ってきた単独の食品中の一つのビタミンの生体利用率を求めても<sup>30)31)</sup>、学問的には価値があっても、すぐには実生活には役に立たないし、「食事摂取基準」で考慮すべき「生体利用率」として使用することもできない。

そこで、1日に摂取した食事の水溶性ビタミンの生体利用率を、図5と図6に示した方法で求める実験方法を、著者らは提案している<sup>32)</sup>。試験食投与時の尿中ビタミン排泄量 = (試験食投与時の1日尿中ビタミン排泄量) / (試験食中のビタミン含量)。遊離型ビタミン投与の尿中ビタミン排泄率 = (遊離型ビタミン付加によって増大した1日尿中ビタミン量 (遊離型ビタミン付加試験食投与時の1日尿中ビタミン排泄量 - 試験食投与時の1日尿中ビタミン排泄量)) / (遊離型ビタミン付加量)。生体利用率(%)は、(試験食投与時の尿中ビタミン排泄率 / 遊離型ビタミン投与の尿中ビタミン排泄率) × 100から求めた。つまり、この報告で述べる食事由来のビタミンの生体利用率とは、遊離型(合成型)ビタミン投与時の生体利用率を100%とした時の相対的な数値である。

#### 4. 尿中への排泄量はどのように調節されているのか

著者らの推測の域をでないが、ビタミンの摂取量が必要量を満たさないときは、再吸収系が能動的にはたらい、尿中への排泄を積極的に抑えている、一方、体内飽

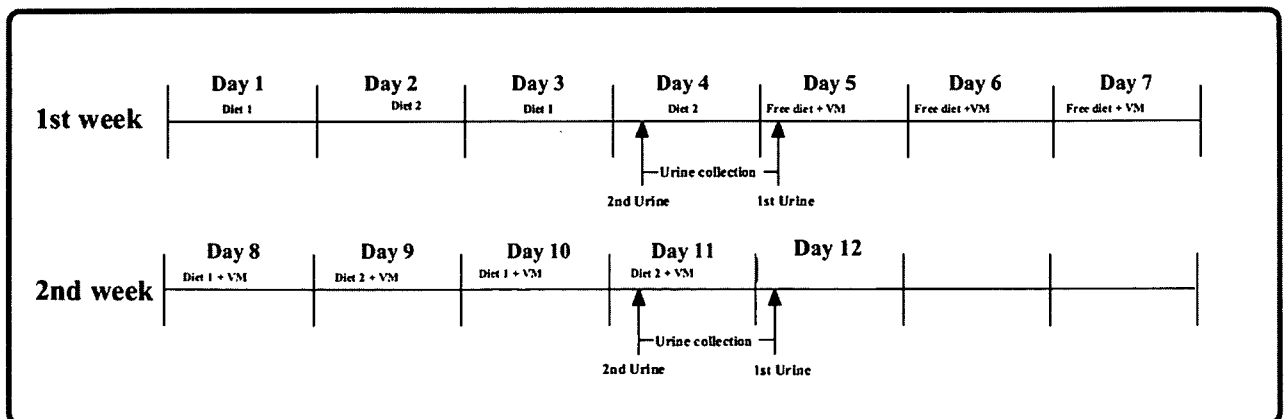


図5. 著者らが提案する1日食事由来のB群ビタミンの生体利用率の実験計画の概略

和量を超えるような過剰な摂取量の場合は、排泄系が能動的にはたらいで、積極的に尿中に排泄を行っている。そして、必要量から体内飽和量との間の摂取量の時は、再吸収も排泄系も積極的にはたらいでおらず、ただ単純

拡散によって尿中にもれでているだけであると考えている。模式的に書くと図7のようになる。著者らが提案する生体利用率を求める時は、摂取量と排泄量との関係が正比例の関係にある範囲内で行わなければならない。

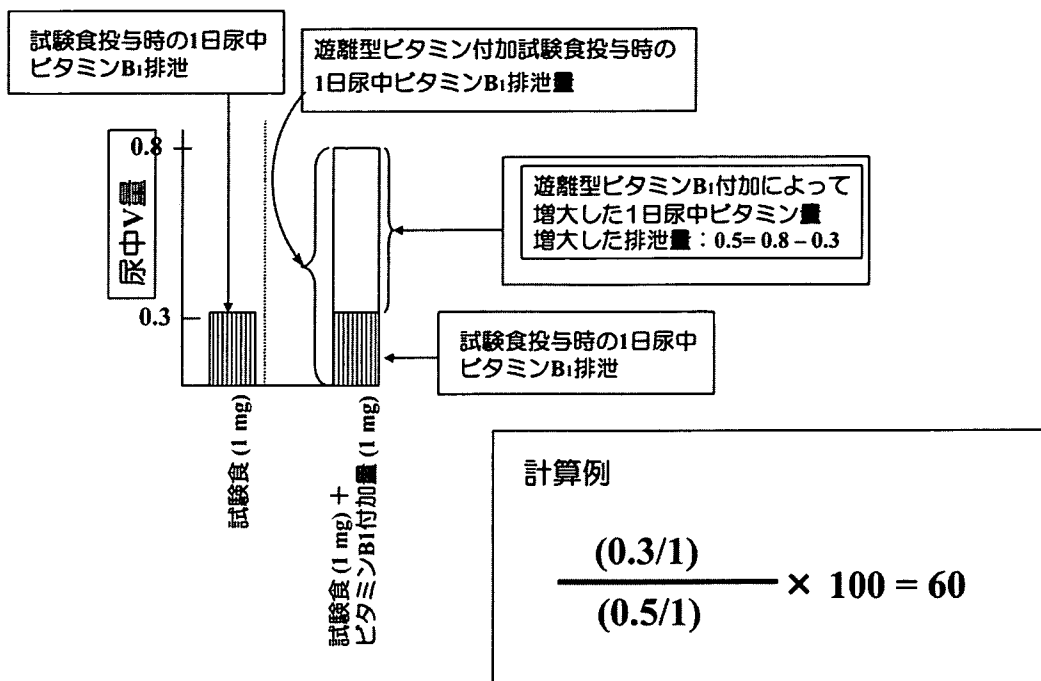


図6. 著者らが提案する1日食事由来のB群ビタミンの生体利用率の求め方

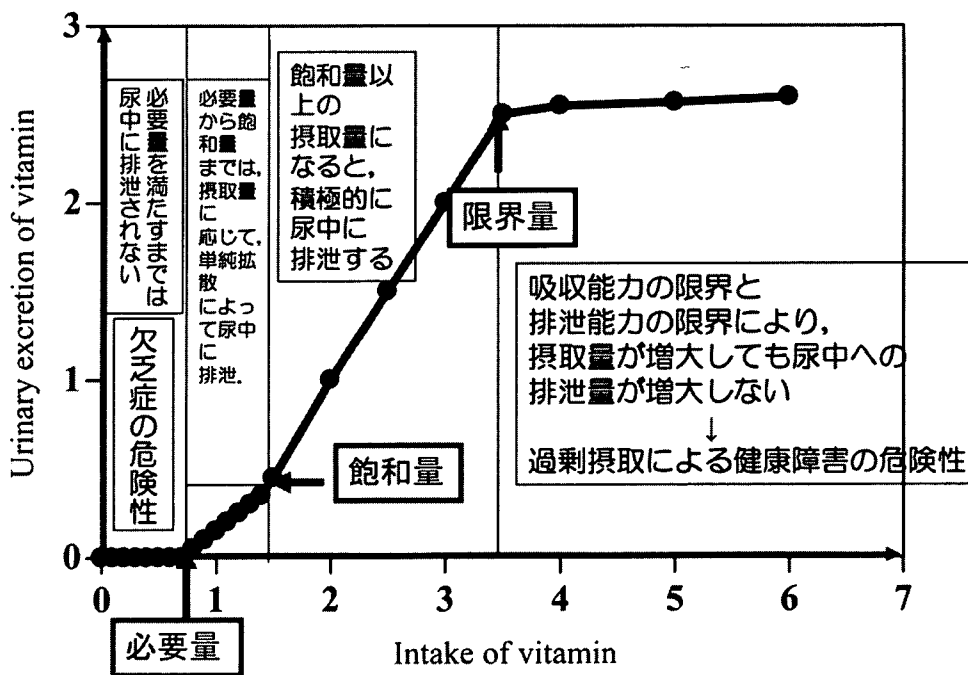


図7. ビタミンの尿中への排泄量への調節(推測)  
縦軸と横軸の数値はともに、相対的な数値である。

### 5. 1日食事由来のビタミンの生体利用率はどの程度か

ここで提案したような方法を駆使している論文を検索した結果、類似した方法を駆使した論文が一報のみ検索された。詳しく紹介する。代表的なアメリカ食中のビタ

ミンB<sub>6</sub>とパントテン酸の生体利用率<sup>33)</sup>という論文である。彼らの実験方法の概略を表2に示した。期間1と期間3は合成ビタミンを投与した期間で、この時に尿中に排泄されたビタミンB<sub>6</sub>量とパントテン酸量を100%の生体利用率と考えたものである。そして、期間2では、代表的なアメリカ食(表3)を与えた時に24時間尿中に排泄さ

表2. 代表的なアメリカ食中のビタミンB<sub>6</sub>とパントテン酸の生体利用率を求めた研究の実験方法の概略

期間1 実験開始日 1 ~ 35	期間2 実験開始日 36 ~ 70	期間3 実験開始日 71 ~ 91
半合成食 (ビタミンは合成品から供給)	代表的なアメリカ食 (ビタミンは食品中から供給)	半合成食 (ビタミンは合成品から供給)
ビタミンB <sub>6</sub> の摂取量: 1.1mg/日	ビタミンB <sub>6</sub> の摂取量: 2.3mg/日	ビタミンB <sub>6</sub> の摂取量: 2.7mg/日
パントテン酸の摂取量: 8.2mg/日	パントテン酸の摂取量: 11.5mg/日	パントテン酸の摂取量: 8.2mg/日

被験者: 6名の男性(21~35歳), 体重(65~72kg).

定期的に24時間尿を集め, ビタミンB<sub>6</sub>とパントテン酸排泄量を測定.

引用文献: Tarr JB, Tamura T, and Stockstad LR (1981) *Am J Clin Nutr* 34, 1328-1337.

表3. 実験に用いられた典型的なアメリカ食

Canned food	Weight (g)	Company
Beef puree	340	Gerber Products Co.,
Tuna	13	Star-Kist
Chicken	42	Swanson, Campbell Soup Co.,
Spinach	42	Co-op, Berkeley
Potatoes	170	Del Monte
Lima beans	4	Libby's
Peas	13	One Star
String beans	17	Libby's
Tomato juice	68	Libby's
Peaches	85	F & P
Pineapple	85	Del Monte
Carrots	43	Monarch
Frozen concentrated orange juice	20	River Valley

Other foods	Weight (g)	Company
Whole milk	406	Berkeley Farms
White bread	140	Kilpatrick's
Shredded wheat	30	Nabisco
Margarine	30	Co-op, Berkeley
Cottonseed oil	13	Gold-n-Sweet
Sucrose	42	C and H

Each subject received supplementary sucrose and corn oil (ratio of 3.5 to 1 by weight) in sufficient amounts to maintain constant body weight.

引用文献: Tarr JB, Tamura T, and Stockstad LR (1981) Availability of vitamin B<sub>6</sub> and pantothenate in an average American diet in man. *Am J Clin Nutr* 34, 1328-1337.

れるビタミン B<sub>6</sub> 量とパントテン酸量を測定し、この期間に排泄された値をもとに、期間 1 と期間 3 で得られた値を基準として比較することにより、体内で利用された値を求める、つまり、摂取実測値と尿中の値から、計算によって得られた利用されたビタミン値を得る。この計算によって得られた利用値と摂取実測値の比率から、生体利用率を求めている。代表的なアメリカ食に含まれるビタミン B<sub>6</sub> とパントテン酸の生体利用率を表 4 と表 5 に示した。ビタミン B<sub>6</sub> は 80% 程度、パントテン酸は 50% 程度という値を彼らは報告している。他のビタミンに関する報告はみあたらない。

我々も、女子学生が普段摂取している食事中のビタミンの生体利用率を測定しているが、まだ、原著論文として報告していないので、文章として報告できないが、平成 17 年度のシンポジウム「B 群ビタミンと生理活性ミネラル」で、紹介したとおりである。

## 6. ビタミンの生体利用率に影響をおよぼす栄養失調(ミネラル欠乏)

### 6-1. 生理活性ミネラルと B 群ビタミンの生体利用率との関係

生理活性ミネラルとこのシンポジウムでは発表したが、栄養学領域では「ミネラル」だけで充分である。生体に必要という意味合いを強めるために「生理活性」という単語をつけた。栄養学でいう「ミネラル」とは、「栄養素として生理作用に必要な無機物の称」である。日本語では、「無機質」という。無機物は、有機物に対する言葉で、無機物の中で、生体の成長・維持に不可欠な無機物を「無機質」という。

ところで、ミネラルは、B 群ビタミンの生体利用率に関して次の項目に関わっている。①結合型ビタミンの消化・吸収に関わるミネラル含有酵素、②遊離型ビタミン

表 4. 代表的なアメリカ食に含まれるビタミン B<sub>6</sub> の生体利用率(尿中へのビタミン B<sub>6</sub> 排泄量を指標にした場合)

被験者番号	尿中ビタミン B <sub>6</sub> (μg/d)			利用された見かけ上のビタミン B <sub>6</sub> 量 (mg/日)	生体利用率 (%)
	期間 1 (摂取量: 1.1mg/日)	期間 2 (摂取量: 2.3mg/日)	期間 3 (摂取量: 2.7mg/日)		
1	39	79	134	1.77	77
2	40	87	152	1.72	75
3	53	81	109	1.82	79
4	45	73	106	1.80	78
5	51	101	124	2.11	92
6	61	105	155	1.69	73
平均値	48	87	130	1.82	79

引用文献: Tarr JB, Tamura T, and Stockstad LR (1981) Availability of vitamin B<sub>6</sub> and pantothenate in an average American diet in man. *Am J Clin Nutr* 34, 1328-1337.

表 5. 代表的なアメリカ食に含まれるパントテン酸の生体利用率(尿中へのパントテン酸排泄量を指標にした場合)

被験者番号	尿中パントテン酸 (mg/日)			利用された見かけ上のパントテン酸量 (mg/日)	生体利用率 (%)
	期間 1 (摂取量: 8.2mg/日)	期間 2 (摂取量: 11.5mg/日)	期間 3 (摂取量: 8.2mg/日)		
1	5.4	2.6	3.5	5.14	44
2	3.6	2.4	3.1	6.22	54
3	5.6	3.5	4.3	6.15	54
4	3.6	1.7	2.5	4.65	40
5	4.4	3.4	3.9	6.97	61
6	2.7	1.7	2.4	5.66	49
平均値	4.2	2.6	3.3	5.79	50

引用文献: Tarr JB, Tamura T, and Stockstad LR (1981) Availability of vitamin B<sub>6</sub> and pantothenate in an average American diet in man. *Am J Clin Nutr* 34, 1328-1337.

から補酵素型の合成に関わるミネラル含有酵素, ③ビタミンの代謝に関わるミネラル含有酵素, ④ビタミンを補酵素とする過程に関わるミネラル含有酵素, である。我々が, 被験者とするヒトには栄養失調はいないので, これから述べることは, 疾病時においてのみみられる現象である。

結合型ビタミンの消化・吸収に関わるミネラル含有酵素として, アミノペプチダーゼ(Zn, Co), カルボキシペプチダーゼ(Zn),  $\alpha$ -アミラーゼ(Ca),  $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼ(通称: コンジュガーゼ)(Zn)などが知られている。亜鉛欠乏時患者においては, 食品に含まれているポリグルタミン酸型の葉酸の消化が低下することが予想される。しかし, モノグルタミン酸型は消化される必要がないので, 亜鉛欠乏患者ではモノグルタミン酸型の投与が有効である。なお, 亜鉛欠乏患者で, 葉酸の吸収後の体内利用率がどのようになっているかに関する情報はみあたらない。

遊離型ビタミンから補酵素型の合成に関わる酵素でミネラルを必要とする酵素に関する実験がある<sup>33)</sup>。ニコチンアミドからNADP<sup>+</sup>への生合成系においてMgを必要と

する酵素がある。ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ, NMN アデニリトランスフェラーゼ, NAD<sup>+</sup>シンターゼ, NAD<sup>+</sup>キナーゼである。表6に示したように, ミネラル欠乏ラットでは, トリプトファンからのナイアシンへの合成量が低下した。

ニコチンアミドからMNAをへて2-Pyと4-Pyへの異化代謝系において, 2-Py生成MNAオキシダーゼ(Mo, Fe)と4-Py生成MNAオキシダーゼ(Mo, Fe)がミネラル酵素である。ミネラル欠乏では, 表7に示したように, これら両酵素活性が低下し, 代謝産物である2-Pyと4-Pyの生成量が低下し, その結果, (2-Py+4-Py)/MNAが低下した。

ビタミンを補酵素とするミネラル含有酵素として, アルコールデヒドロゲナーゼ(ナイアシン, Zn), プロピオニルCoAカルボキシラーゼ(パントテン酸, K), グルタチオンペルオキシダーゼ(リボフラビン, Se), ピルビン酸カルボキシラーゼ(ビオチン, Mn), キサンチン酸化酵素(リボフラビン, Mo)などがある。ミネラル結合が体内のNAD含量におよぼす影響を調べたが, 表8に示したように, 差異は認められなかった。

表6. ミネラル欠乏がトリプトファン-ナイアシン代謝におよぼす影響(ラット)

	対照群	ミネラル欠乏群
尿中へのニコチンアミド及び異化代謝産物量の総和 (nmol/g food)	638 ± 58	304 ± 27*

ニコチンアミド及び異化代謝産物量の総和 = Nam + MNA + 2-Py + 4-Py.

\* 対照群との比較において,  $p < 0.05$  で有意差が認められた (Student *t* 検定).

引用文献: 柴田克己, 才野木当糸 (1993) ミネラル欠乏がトリプトファン-ニコチンアミド代謝に及ぼす影響. ビタミン 67, 429-434

表7. ミネラル欠乏がニコチンアミドの異化代謝におよぼす影響(ラット)

	対照群	ミネラル欠乏群
2-Py 生成 MNA オキシダーゼ (nmol/h/g 肝臓)	715 ± 54	307 ± 23*
4-Py 生成 MNA オキシダーゼ (nmol/h/g 肝臓)	1683 ± 199	628 ± 71*
尿中の (2-Py+4-Py)/MNA	9.6 ± 0.7	4.3 ± 0.5*

\* 各々, 対照群との比較において,  $p < 0.05$  で有意差が認められた (Student *t* 検定).

引用文献: 柴田克己, 才野木当糸 (1993) ミネラル欠乏がトリプトファン-ニコチンアミド代謝に及ぼす影響. ビタミン 67, 429-434

表8. ミネラル欠乏が体内のナイアシン含量におよぼす影響(ラット)

	対照群	ミネラル欠乏群
肝臓中の総ナイアシン (nmol/g)	2070 ± 60	2210 ± 80
全血中 NAD (nmol/mL)	81.2 ± 2.1	78.5 ± 0.9

引用文献: 柴田克己, 才野木当糸 (1993) ミネラル欠乏がトリプトファン-ニコチンアミド代謝に及ぼす影響. ビタミン 67, 429-434

## 7. おわりに

今回で、通算 65 回となる伝統あるビタミン B 研究委員会のシンポジウムで、ミネラルの話題が取り上げられたのは、はじめてのことである。微量栄養素であるミネラルとビタミンは体内で相互に共同して機能を発揮している。また、微量栄養素の適切な摂取は、脳機能の維持に重要である。しかしながら、摂取し、吸収されても、機能を発揮できる生体高分子内に組み込まれ、そして機能を発揮する細胞内小器官に移動することが必要である。さらに、機能を果たしたのちは、速やかに消えゆくこと（異化代謝・体外排出）も必要である。これら吸収後の一連の出来事を微量栄養素の「体内利用」という。高齢者においては、体内の微量栄養素濃度が十分であっても、効果がでないのは、この体内利用率が低下していることが一つの原因であろう。微量栄養素の消化管内での出来事（消化・吸収）は、吸収後の体内利用に関する事よりも、比較的知られている。最近では、ミネラルの体内利用に関することが分子レベルで理解できるようになってきた。さらに、化学合成法を駆使して、天然にはない配位子の異なる種々のミネラル錯体を合成し、吸収率を高くしたり、あるいは吸収後の体内利用に関することとして、標的タンパク質との親和性を増したり、結合を安定化させたりして、体内での利用を高めることも可能となってきた。平成 15 年の国民健康・栄養調査の結果では、微量栄養素の中には、平均摂取量が食事摂取基準（2005 年版）で策定された数値に満たないものもあった。微量栄養素補助食品の利用も必要であろう。

吸収後の微量栄養素が体内でどのような仕組みで機能を発揮しているのかが、分子レベルで順序立てて明らかになれば、微量栄養素 - 微量栄養素間の相互作用の解明につながり、この成果から新しい栄養指標が見いだされ、その栄養指標を利用して、個々人の栄養素適正摂取量を知ることができるものと考えられる。

（平成 19.6.20 受付）

## 文 献

- 1) Yu BH, Kies C (1993) Niacin, thiamin, and Pantothenic acid bioavailability to humans from maize bran as affected by milling and particle size. *Plant Foods Hum Nutr* 43, 87-95
- 2) Reynold RD (1988) Bioavailability of vitamin B<sub>6</sub> from plant foods. *Am J Clin Nutr* 48, 863-867
- 3) Elmadfa I, Heinzle C, Majchrzak D, Foissy H (2001) Influence of a probiotic yoghurt on the status of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in the healthy adult human. *An Nutr Met* 45, 13-18
- 4) Picciano MF, West SG, Ruch AL, Kris-Etherton PM, Zhao G, Johnson KE, Maddox DH, Fishell VK, Dirienzo DB, Tamura T (2004) Effect of cow milk on food folate bioavailability in young women. *Am J Clin Nutr* 80, 1565-1569
- 5) Tadera K, Kaneko T, Yagi F (1988) Isolation and structural elucidation of three new pyridoxine-glycosides in rice bran. *J Nutr Sci Vitaminol* 34, 167-177
- 6) Kodicek E, Wilson PW (1960) The isolation of niacytin, the bound form of nicotinic acid. *Biochem J* 76, 27p-28p
- 7) Das ML, Guha BC (1960) Isolation and chemical characterization of bound niacin (niacinogen) in cereal grains. *J Biol Chem* 235, 2971-2976
- 8) Carter EGA, Carpenter KJ (1982) The bioavailability for humans of bound niacin from wheat bran. *Am J Clin Nutr* 36, 855-861
- 9) Gregory III JF, Trumbo PR, Bailey LB, Toth JP, Baumgartner TG, Cerda JJ (1991) Bioavailability of pyridoxine-5'-β-D-glucoside determined in humans by stable-isotopic methods. *J Nutr* 121, 177-186
- 10) Kabir H, Leklem JE, Miller LT (1983) Comparative vitamin B-6 bioavailability from tuna, whole wheat bread and peanut butter in humans. *J Nutr* 113, 2412-2420
- 11) 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、平成 16 年 10 月、厚生労働省 (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/11/h1122-2.html>)
- 12) Gross CJ, Henderson LM (1983) Digestion and absorption of NAD by the small intestine of the rat. *J Nutr* 113, 412-420
- 13) Shuette SA, Rose RC (1983) Nicotinamide uptake and metabolism by chick intestine. *Am J Physiol* 245, G531-G538
- 14) Stein J, Daniel H, Whang E, Wenzel U, Hahn A, Rehner G (1994) Rapid postabsorptive metabolism of nicotinic acid in rat small intestine may affect transport by metabolic trapping. *J Nutr* 124, 61-66
- 15) Fukuwatari T, Ohta M, Kimura N, Sasaki R, Shibata K (2004) Conversion ratio of tryptophan to niacin in Japanese women fed on a purified diet conforming to the Japanese Dietary Reference Intakes. *J Nutr Sci Vitaminol* 50, 385-391
- 16) Murata K (1982) Actions of two types of thiaminases on thiamin and its analogues. *Ann New York Acad Sci* 378, 146-156
- 17) Hilker DM, Somogyi JC (1982) Antithiamins of plant origin: their chemical nature and mode of action. *Ann New York Acad Sci* 378, 137-145
- 18) Chandler CJ, Wang TT, Halsted CH (1986) Pteroylglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. *J Biol Chem* 261, 928-933
- 19) Wei MM, Gregory JE III (1998) Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border pteroylglutamate hydrolase in vitro: potential mechanism affecting the bioavailability of dietary polyglutamylfolate. *J Agric Food Chem* 46, 211-219
- 20) Picciano MF, West SG, Ruch AL, Kris-Etherton PM, Zhao G, Johnson KE, Maddox DH, Fishell VK, Dirienzo DB, Tamura T (2004) Effect of cow milk on food folate bioavailability in young women. *Am J Clin Nutr* 80, 1565-1569
- 21) Green NM (1963) Avidin. 3. The nature of the biotin-binding site. *Biochem J* 89, 599-609
- 22) Pardridge WM, Oldendorf WH (1975) Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochim Biophys Acta* 401, 128-136
- 23) Murdock DS, Gubler CJ (1973) Effects of thiamine deficiency and



- treatment with the antagonists, oxythiamine and pyriothiamine, on the levels and distribution of thiamine derivatives in rat brain. *J Nutr Sci Vitaminol* **19**, 237-249
- 24) Aksu O, Mackler B, Shepard TH, Lemire RJ (1968) Studies of the development of congenital anomalies in embryos of riboflavin-deficient, galactoflavin fed rats. II. Role of the terminal electron transport systems. *Teratology* **1**, 93-102
- 25) Woolley DW (1945) Production of nicotinic acid deficiency with 3-acetylpyridine, the ketone analogue of nicotinic acid. *J Biol Chem* **157**, 455-459
- 26) Dietrich LS, Friedland IM, Kaplan KA (1958) Pyridine nucleotide metabolism: Mechanism of action of the niacin antagonist, 6-aminonicotinamide. *J Biol Chem* **233**, 964-968
- 27) Comaish JS, Cooper M (1977) Isoniazid-induced pellagra. *Arch Dermatol* **113**, 986-987
- 28) Gavostro F, Pileri A, Camurati P (1955) Experimental research on the mechanism of action of folic acid antagonists: effects of 4-aminopterin on nucleic acids in the regenerating liver of the rat. *Arch Sci Med (Trino)* **100**, 1-19
- 29) Schoo MMJ, Pristupa ZB, Vickers PJ, Scrimgeour KG (1985) Folate analogues as substrates of mammalian folylpolyglutamate synthetase. *Can Res* **45**, 3034-3041
- 30) 福渡努, 齊藤智恵, 佐々木隆造, 柴田克己 (2003) ラットにおけるインスタントコーヒーのナイアシン活性. *日本家政学会誌*, **54**, 77-82
- 31) 福渡努, 江畑恵, 佐々木隆造, 紅林毅久, 橋詰昌幸, 柴田克己 (2005) カツオ由来ナイアシン高濃度含有パウダーのナイアシンとしての有効性. *日本家政学会誌*, **56**, 265-272
- 32) 柴田克己 (2005) パンを主食とした時の水溶性ビタミンの生体利用率 (第400回ビタミンB研究協議会) 平成17年5月28日, 三重県合歓の郷.
- 33) Tarr JB, Tamura T, Stockstad LR (1981) Availability of vitamin B6 and pantothenate in an average American diet in man. *Am J Clin Nutr* **34**, 1328-1337
- 34) 柴田克己, 才野木当糸 (1993) ミネラル欠乏がトリプトファン-ニコチンアミド代謝に及ぼす影響. *ビタミン* **67**, 429-434

## Evaluation of Nutritional Availability and Anti-Tumor Activity of Selenium Contained in Selenium-Enriched *Kaiware* Radish Sprouts

Munehiro YOSHIDA,<sup>1,2,†</sup> Toshihide OKADA,<sup>1</sup> Yûichi NAMIKAWA,<sup>1</sup> Yoshimi MATSUZAKI,<sup>1</sup> Toshimasa NISHIYAMA,<sup>3</sup> and Kenji FUKUNAGA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University, Suita, Osaka 564-8680, Japan

<sup>2</sup>High-Technology Research Center, Kansai University, Suita, Osaka 564-8680, Japan

<sup>3</sup>Department of Public Health, Kansai Medical University, Moriguchi, Osaka 570-8506, Japan

Received March 19, 2007; Accepted June 9, 2007; Online Publication, September 7, 2007

[doi:10.1271/bbb.70158]

We estimated the nutritional availability of selenium (Se) in Se-enriched *Kaiware* radish sprouts (SeRS) by the tissue Se deposition and glutathione peroxidase (GPX) activity of rats administered the sprouts, and examined the effect of SeRS on the formation of aberrant crypt foci (ACF) in the colon of mice administered 1,2-dimethylhydrazine (DMH) to evaluate anti-tumor activity. Male weanling Wistar rats were divided into seven groups and fed a Se-deficient basal diet or the basal diet supplemented with 0.05, 0.10, or 0.15 µg/g of Se as sodium selenite or SeRS for 28 d. Supplementation with Se dose-dependently increased serum and liver Se concentrations and GPX activities, and the selenite-supplemented groups showed a higher increase than the SeRS-supplemented groups. The nutritional availability of Se in SeRS was estimated to be 33 or 64% by slope ratio analysis. Male 4-week-old A/J mice were divided into seven groups and fed a low Se basal diet or the basal diet supplemented with selenite, SeRS, or selenite + non-Se-enriched radish sprouts (NonSeRS) at a level of 0.1 or 2.0 µg Se/g for 9 weeks. After 1 week of feeding, all mice were given six subcutaneous injections of DMH (20 mg/kg) at 1-week intervals. The average number of ACF formed in the colon of mice fed the basal diet was 4.3. At a supplementation level of 0.1 µg Se/g, only SeRS significantly inhibited ACF formation. At a supplementation level of 2.0 µg Se/g, both selenite and SeRS significantly inhibited ACF formation. The addition of NonSeRS to the selenite-supplemented diets tended to inhibit ACF formation, but this was not statistically significant. These results indicate that SeRS shows lower nutritional availability but higher anti-tumor activity than selenite.

**Key words:** selenium; selenium-enriched sprouts; nutritional availability; cancer prevention; aberrant crypt foci

Selenium (Se) is an essential trace element in human and animal nutrition, and it plays several important roles in the form of selenoproteins, including the families of glutathione peroxidases (GPXs), deiodinases and thioredoxine reductases.<sup>1)</sup> The average Se intake in the Japanese population is about 100 µg/d/capita.<sup>2–4)</sup> This estimated value is obviously higher than the Recommended Dietary Allowance (RDA) of Se for adults, but since foods with high Se content are limited to particular food groups such as fish, eggs, meats, and US hard wheat,<sup>4)</sup> a severely unbalanced diet may cause low Se status. It has been pointed out that vegetarians and vegans are most at risk from low Se intakes.<sup>5)</sup> Worldwide, there are some low Se areas, such as New Zealand and Finland.<sup>6)</sup> To prevent low Se status, the preparation of various types of high Se food is useful to increase daily Se intake.<sup>7)</sup>

The utilization of dietary minerals including Se is the net result of several physiological and metabolic processes that convert a portion of ingested minerals to certain metabolically critical forms that are necessary for normal physiological function. As for mineral nutrition, it is necessary to show the extent of biological utilization of dietary minerals in their critical or functional forms quantitatively. The quantitative description of biological utilization of dietary minerals has come to be called their bioavailability.<sup>8)</sup> More strictly, the term bioavailability must be replaced by nutritional availability, since there exists the impression that bioavailability includes not only nutritional but also pharmaco-

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-6-6388-8609; E-mail: hanmyou4@ipc.ku.kansai-u.ac.jp

**Abbreviations:** Se, selenium; SeRS, selenium-enriched *Kaiware* radish sprouts; NonSeRS, non selenium-enriched *Kaiware* radish sprouts; GPX, glutathione peroxidase; ACF, aberrant crypt foci; MeSec, Se-methylselenocysteine; ITC, isothiocyanate; DMH, 1,2-dimethylhydrazine; RDA, Recommended Dietary Allowance; HPLC, high performance liquid chromatography; ICPMS, inductively coupled plasma mass spectrometry; LOAEL, lowest observed adverse effect level; UL, tolerable upper intake level

logical activities. The nutritional availability of dietary Se varies with the chemical species of Se in foods.<sup>8)</sup> Since the compositions of Se species in Se-enriched foods are diverse,<sup>9)</sup> their nutritional availability is thought to vary with the kind of foods. Accordingly, Se-enriched foods should be evaluated for its nutritional availability.

Besides nutritional roles, Se is thought to be associated with cancer prevention, judging by the results of epidemiological studies.<sup>10,11)</sup> In particular, a recent finding, that overall cancer morbidity and mortality were nearly 50% lower with daily supplementation with Se at a level of 200 µg/d, is of great interest.<sup>12)</sup> The anti-tumor activity of Se has also been confirmed in numerous animal experiments,<sup>13)</sup> and a monomethylated Se metabolite is critical in Se chemoprevention.<sup>14)</sup> The metabolic conversion rate of monomethylated selenoamino acids such as Se-methylselenocysteine (MeSec) and  $\gamma$ -glutamyl-Se-methylselenocysteine to the monomethylated Se metabolite is probably higher than that of selenite, selenate, or selenocystine. These monomethylated selenoamino acids have been identified in several Se-enriched vegetables.<sup>9,15-17)</sup> The anti-tumor activities of these Se-enriched vegetables have also been evaluated, and have been found to be higher than that of selenite.<sup>18,19)</sup> Hence, the applicability of Se-enriched vegetables to cancer prevention is to be expected.

In previous studies, we prepared Se-enriched sprouts of various plant species including *Kaiware* radish and identified the main chemical species of Se in these Se-enriched sprouts as MeSec.<sup>20)</sup> In the present study, we estimated the nutritional availability of Se in Se-enriched *Kaiware* radish sprouts (SeRS) by tissue Se deposition and GPX activity, and also evaluated anti-tumor activity of SeRS.

In animal experiments to examine the anti-tumor activity of natural products, various chemical carcinogens have been used to induce tumors in liver, colon, and mammary gland. Among these chemicals, 1,2-dimethylhydrazine (DMH) has often been used to induce colon cancer.<sup>21)</sup> Since DMH injected is excreted in the bile after conversion to an active metabolite in various organs, the colon is most exposed to the active carcinogenic metabolite.<sup>22)</sup> Consequently, the active metabolite causes alkylation of DNA mainly in the colon, and induces colon cancer specifically.

On the other hand, it has been proposed that aberrant crypt foci (ACF) are preneoplastic lesions and that those with a crypt multiplicity of more than 4 continue growing to tumors.<sup>23)</sup> Since the experimental period for formation of ACF is short and the identification of ACF formed is done readily, ACF has been used as an index of precancerous lesions in the colon.<sup>24)</sup> Hence we therefore scored the number of ACF with a crypt multiplicity of more than 4 as an index for the risk of colon cancer in the present study.

**Table 1.** Composition of Basal Se-Deficient Diet Used in Experiment 1

Ingredients	%
<i>Torula</i> yeast <sup>a</sup>	35.2
Sucrose	51.8
Soybean oil	8.0
AIN93G salt mixture <sup>b</sup>	3.5
AIN93G vitamin mixture	1.0
Choline bitartrate	0.2
DL-Methionine	0.3

<sup>a</sup>KR yeast<sup>®</sup> kindly supplied by Kohjin (Tokyo). Crude protein content was 51.2%.

<sup>b</sup>Except for sodium selenate.

## Materials and Methods

**Preparation of SeRS.** Seeds of *Kaiware* radish (a type of Japanese white radish (*daikon*), the sprouts of which are eaten (scientific name, *Raphanus sativus*)) were purchased from a local retail shop in Osaka, Japan. SeRS were prepared by hydroponics using 10 µg Se/ml of sodium selenite solution, as described previously.<sup>20)</sup> Non-Se-enriched radish sprouts (NonSeRS) were also prepared using deionized water. SeRS and NonSeRS were freeze-dried and milled. The Se contents of the SeRS and NonSeRS were 110 and 0.03 µg/g dry weight respectively.

**Animal feeding.** The experimental protocol was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of Kansai Medical University and followed the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals" of the Prime Minister's Office of Japan. Experimental animals were fed in a room under a controlled 12 h light (8:00 to 20:00) and dark cycle at a temperature of 22 to 24 °C respectively and a humidity of 60%. The animals were given experimental diets and deionized water *ad libitum* during the entire experimental period.

In experiment 1, 42 male weanling Wistar rats were divided into seven groups and fed a *Torula* yeast-based Se-deficient basal diet or the basal diet supplemented with 0.05, 0.10, or 0.15 µg/g of Se as sodium selenite or dried powder of the SeRS for 28 d. The composition of the basal Se-deficient diet is shown in Table 1. Analysis showed the basal Se-deficient diet to contain less than 0.01 µg Se/g. After feeding for 28 d, the rats were anesthetized with diethyl ether, blood was collected from the aorta abdominalis, and the liver was excised, washed, blotted, and weighed.

In experiment 2, 84 male 4-week-old A/J mice were divided into seven groups and fed a casein-based low Se basal diet or the basal diet supplemented with selenite, dried powder of the SeRS, or selenite + dried powder of NonSeRS at a level of 0.1 or 2.0 µg Se/g for 9 weeks. The supplementary level of NonSeRS was equal to that of SeRS; when the supplementary Se levels were 0.1 or 2.0 µg/g, supplementary amounts of both sprouts were 0.91 or 18.2 mg/g respectively. The composition of the

**Table 2.** Composition of Basal Low Se Diet Used in Experiment 2

Ingredients	%
Casein	20.0
$\alpha$ -Corn starch	13.2
$\beta$ -Corn starch	39.75
Sucrose	10.0
Corn oil	7.0
AIN93G salt mixture <sup>a</sup>	3.5
AIN93G vitamin mixture	1.0
Choline bitartrate	0.25
Cellulose	5.0
L-Cystine	0.3

<sup>a</sup>Except for sodium selenate.

basal low Se diet is shown in Table 2. Since  $\alpha$ -linolenic acid inhibits the development of mammary gland and colon cancer induced by DMH,<sup>25)</sup> we used corn oil, which contains a lower level of this polyunsaturated fatty acid than soybean oil. Analysis showed the low Se basal diet to contain 0.035  $\mu$ g Se/g. After 1 week of feeding, all mice were given six subcutaneous injections at 1-week intervals of saline containing DMH (20 mg/kg body weight). After feeding for 9 weeks, the mice were anesthetized with diethyl ether, blood was collected by heart puncture, the liver was removed, washed with saline, blotted, and weighed, and the colon was removed, opened longitudinally, washed with saline, and fixed flat between paper towels in a Formalin Neutral Buffer Solution (containing 4% formaldehyde, pH 7.4; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).

**Assays.** The blood was kept at room temperature and serum was obtained. The liver was homogenized with 9 volumes of saline in a Teflon-glass homogenizer.

GPX activities in the serum and liver homogenate were assayed by a modification of the method of Paglia and Valentine,<sup>26)</sup> with *tert*-butyl hydroperoxide as the peroxide substrate.<sup>27)</sup> The standard assay medium contained 0.13 mM NADPH, 2 mM GSH, 0.27 mM *tert*-butyl hydroperoxide, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.4 unit of GSH reductase, 20  $\mu$ l of the serum and the liver homogenate, and 50 mM of sodium phosphate buffer (pH 7.0, 37°C), in a final volume of 3.0 ml. The reaction was started by adding the hydroperoxide to the assay medium, previously equilibrated at 37°C. Units of enzyme activity were defined as  $\mu$ mol NADPH oxidized per min.

Se in the sprouts and diets was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with a fluorometric detector.<sup>28)</sup> Up to 1 g of the diets or sprouts was carefully digested with 10 ml of nitric acid for 30 min. After that, the mixture was further digested with 5 ml of perchloric acid until the appearance of white fumes of perchloric acid. The volume of the digest was made up to 10 ml with water, and the diluted digest was heated with 1 ml of 10% HCl in a boiling water bath for 30 min. The pH of the mixture was then adjusted to 1.0

to 1.5 with 7 M of ammonium solution, and 1 ml of 0.1% 2,3-diaminonaphthalene dissolved in 0.1 M HCl was added. The volume of the mixture was made up to 30 ml with 0.1 M of HCl, and the mixture was incubated at 50°C for 30 min. Then the 4,5-benzopiazselenol formed was extracted with 10 ml of cyclohexane and quantified by HPLC. The conditions of HPLC was as follows: column, TSKgel Silica-60 (250  $\times$  4.6 mm i.d., Tosoh, Tokyo); mobile phase, cyclohexane/2-propanol (w/w = 99/1); flow rate, 1.0 ml/min; detection, a fluorescence detector (excitation 378 nm, emission 520 nm).

Se in the serum and liver homogenate was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS).<sup>29)</sup> In the case of serum, 200  $\mu$ l of the sample was heated with 0.5 ml of nitric acid in a boiling water bath until the disappearance of insoluble components. The volume of the digest was made up to 5.0 ml with water. In the case of liver, up to 10 ml of the homogenate was heated with 5 ml of nitric acid in a boiling water bath until the disappearance of insoluble components. The volume of the digest was made up to 25 ml with water. To determine Se, these diluted digests were directly nebulized to ICPMS and the ion intensity of <sup>82</sup>Se was monitored.

Protein was measured by the method of Lowry *et al.*,<sup>30)</sup> with bovine serum albumin as a standard. In experiment 1, serum biochemical tests, including total protein, albumin, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total lipid, total cholesterol, urea nitrogen, and creatinine, were also performed by a commercial service (Japan Medical Laboratory, Osaka, Japan).

**Analysis of ACF in colon of mice in experiment 2.** The fixed colon of mice was stained with 0.02% methylene blue for 3 min and then washed with saline. An operator who was unaware of the dietary treatment scored the number of ACF in the stained colon under a dissecting microscope. In the present study, we scored the number of ACF with a crypt multiplicity of more than 4 as described above.

**Assessment of nutritional availability of Se.** In experiment 1, the nutritional availability of Se from SeRS was assessed using sodium selenite as reference Se. The deposition of Se and the increase in GPX activity in the liver and serum were used as responses to increasing amounts of dietary Se. Since the responses (*R*) to increasing amounts of dietary Se (*X*) were assumed to be described by the general equation  $R = mX + k$ , the relative nutritional availability of Se from SeRS was estimated by the slope-ratio technique, which compares the slope of dose-response plots to the slope observed for selenite Se. Nutritional availability was defined as  $\{(\text{slope of SeRS})/(\text{slope of selenite}) \times 100\}$ .<sup>8)</sup>

**Statistics.** Experimental data were assessed by one-way analysis of variance. When the *F* value was