

についてもリボフラビン大量摂取による影響は認められなかった (Fig. 2).

## 2.5 まとめ

1.0% リボフラビン混餌食を摂取しても、リボフラビンはほとんど吸収されずに糞中に排泄されるだけであり、悪影響を及ぼさないことが考えられる。さらに、リボフラビンの大量投与が、他のB群ビタミンの尿中排泄量に及ぼす影響を調べたが、全く影響を及ぼさなかった。以上の結果から、本研究におけるリボフラビンのNOAELを1.0%混餌食とした。ラットの体重当たりに換算すると、体重170gのラットが1.0%のリボフラビンを含む食餌を1日に約15g摂取したことから、ラットにおけるリボフラビンのNOAELは900mg/kg体重/日程度となった。さらなる研究により、この値はさらに高く設定できることが予想される。

**謝辞** 本研究は、平成16年度～平成18年度の厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準（栄養所要量）策定に関する研究」（主任研究者：柴田克己）の成果の一部である。関係各位に謝意を表す。

## 文 献

- 1) 厚生労働省 (2004). 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-策定委員会報告書, 2004年10月.
- 2) Stephen, J. M., Grant, R., Yeh, C. S. Anaphylaxis from administration of intravenous thiamine. *Am. J. Emerg. Med.*, **10**, 61-63 (1992).
- 3) Royer-Morrot, M. J., Zhiri, A., Paille, F., Royer, R. J. Plasma thiamine concentrations after intramuscular and oral multiple dosage regimens in healthy men. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 219-222 (1992).
- 4) Wrenn, K. D., Murphy, F., Solvis, C. M. A toxicity study of parenteral thiamine hydrochloride. *Ann. Emerg. Med.*, **18**, 867-870 (1989).
- 5) Schoenen, J., Lenaerts, M., Bastings, E. High-dose riboflavin as a prophylactic treatment of migraine: Results of an open pilot study. *Cephalalgia*, **14**, 328-329 (1994).
- 6) Schoenen, J., Jacquy, J., Lenaerts, M. Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis. A randomized controlled trial. *Neurology*, **50**, 466-470 (1998).
- 7) Peluchetti, D., Antozzi, C., Roi, S., DiDonato, S., Cornelio, F. Riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Functional evaluation of recovery after high dose vitamin supplementation. *J. Neurol. Sci.*, **105**, 93-98 (1991).
- 8) Fukuwatari, T., Wada, H., Sasaki, R., Shibata, K. Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide *N*-oxide and nicotinic acid in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 44-50 (2004).
- 9) Shibata, K., Takahashi, C., Fukuwatari, T., 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).
- 10) Sawamura, H., Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2977-2984 (2007).
- 11) Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of excess folic acid on growth and metabolism of water-soluble vitamins in weaning rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **49**, 51-55 (2008).
- 12) Fukuwatari, T., Toriochi, M., Ohta, M., Sasaki, R., Shibata, K. Metabolic disturbance of tryptophan-nicotinamide conversion pathway by putative endocrine disruptors, bisphenol A and styrene monomer. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **45**, 1-7 (2004).
- 13) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628 (1983).
- 14) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem. Int.*, **4**, 187-194 (1982).
- 15) Gregory, J. F. 3rd, and Kirk, J. R. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883 (1979).
- 16) Kishida, K., Nishimoto, Y., Kojo, S. Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **64**, 1505-1507 (1992).
- 17) Shibata, K., Kawada, T., 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).
- 18) Shibata, K. Ultramicro-determination of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins*, **61**, 599-604 (1987).
- 19) Skeggs, H. R., Wright, L. D. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26 (1944).
- 20) Aiso, K., 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).
- 21) Horio, F., Yoshida, A. Effects of some xenobiotics on ascorbic acid metabolism in rats. *J. Nutr.*, **112**, 416-425 (1982).
- 22) Horio, F., Shibata, T., Makino, S., Machino, S., Hayashi, Y., Hattori, T., Yoshida, A. UDP glucucosyltransferase gene expression is involved in the stimulation of ascorbic acid biosynthesis by xenobiotics in rats. *J. Nutr.*, **123**, 2075-2084 (1993).

## ノート

## ピリドキシン塩酸塩の大量摂取が幼若ラットの成長と水溶性ビタミン排泄量におよぼす影響

(平成 20 年 6 月 4 日受理)

福渡 努\* 伊東景子 柴田克己

### Effects of Excess Pyridoxine-HCl on Growth and Urinary Excretion of Water-soluble Vitamins in Weaning Rats

Tsutomu FUKUWATARI\*, Keiko ITOH and Katsumi SHIBATA

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture: 2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan; \* Corresponding author

To determine the tolerable upper intake level of pyridoxine-HCl in humans, we investigated the effects of excess pyridoxine-HCl administration on body weight gain, food intake, tissue weight, and urinary excretion of water-soluble vitamins in weaning rats. The weaning rats were freely fed ordinary diet containing 0.0007% pyridoxine-HCl (control diet) or the same diet with 0.1%, 0.5%, 0.8% or 1.0% pyridoxine-HCl for 30 days. The body weight gain in the 0.8% and 1.0% groups, and the total food intake in the 1.0% group were significantly lower than those in the control group. The urinary excretion of pantothenic acid in the pyridoxine-HCl added groups were higher than that in the control group, while excessive pyridoxine-HCl intake did not affect the urinary excretion of other water-soluble vitamins. These results showed that the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) for pyridoxine-HCl was 0.1% in diet, corresponding to 90 mg/kg body weight/day, and lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) was 0.5% in diet, corresponding to 450 mg/kg body weight/day.

(Received June 4, 2008)

**Key words:** ピリドキシン pyridoxine; ビタミン B<sub>6</sub> vitamin B<sub>6</sub>; 過剰 excess; 上限量 tolerable upper intake level: UL; 健康障害非発現量 (無毒性量) no-observed-adverse-effect-level: NOAEL; 最低健康障害発現量 (最小毒性量) lowest-observed-adverse-effect-level: LOAEL; 食事摂取基準 Dietary Reference Intake

#### 緒言

ビタミン B<sub>6</sub> は B 群ビタミンの 1 つである。ビタミン B<sub>6</sub> 活性を有する代表的な化合物として、ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミンの三形がある。この報告では、ビタミン B<sub>6</sub> という名称は、これら三形の総称名として使用する。これらの三形のビタミン B<sub>6</sub> は、体内では補酵素ピリドキサルリン酸に変換されたのち、アミノ酸の異化代謝ならびに、神経伝達物質である生理活性アミンの生成にもかかわっている。

近年、サプリメントの普及で手軽にビタミン B<sub>6</sub> を摂取できるようになり、不足を補うことができるようになった。なお、ビタミン B<sub>6</sub> 製剤として市場に出回っている形は、ピリドキシンである。その反面、知識の不足により、過剰に摂取してしまい、健康に悪影響を及ぼす危険性が懸

念されている。そこで、国民の健康維持のために、栄養素の必要量を策定している厚生労働省は、サプリメントの乱用を防ぐ目的で、上限量も「日本人の食事摂取基準 (2005 年版)」中で策定している<sup>1)</sup>。なお、「日本人の食事摂取基準 (2005 年版)」<sup>1)</sup>での「上限量」とは、健康障害をもたらす危険がないとみなされる習慣的な摂取量の上限を与える量のことである。

ビタミン B<sub>6</sub> の過剰摂取による毒性報告としては、数 g/日のピリドキシンを数か月程度摂取したときに、感覚神経障害が発生したというものがある<sup>2)</sup>。食事摂取基準 (2005 年版) では 18 歳以上の男女の上限量 (tolerable upper intake level: UL) を 60 mg/日と定めている<sup>1)</sup>。この値の根拠となっているのは、手根幹症候群の患者 24 人にピリドキシン 100~300 mg/日を 4 か月間投与しても、感覚神経障害は認められなかったという報告である<sup>3)</sup>。しかし、健康人を被験者としていないことや、最低健康障害発現量 (lowest-observed-adverse-effect-level: LOAEL)

\* 連絡先

滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科: 〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

Table 1. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on body weight gain and food intake

|                          | Control    | +0.1%     | +0.5%      | +0.8%      | +1.0%      |
|--------------------------|------------|-----------|------------|------------|------------|
| Initial body weight (g)  | 36.9±0.8   | 37.7±0.8  | 37.7±0.6   | 37.6±0.5   | 37.6±0.4   |
| Final body weight (g)    | 229.4±4.5  | 235.6±3.6 | 211.8±6.8  | 203.1±6.7* | 183.2±5.3* |
| Body weight gain (g/30d) | 192.6±4.9  | 198.0±3.9 | 174.1±6.5  | 160.8±6.9* | 140.9±4.4* |
| Food intake (g/30d)      | 407.8±15.0 | 402.6±7.7 | 369.2±10.5 | 366.5±8.0  | 339.7±7.1* |

Each value is expressed as the mean±SEM (n=4). \*p<0.05 versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

が不明なこと、また、成人に対する値しか定められていないなどの問題がある。

上限量を設定するには健常者を被験者とした実験が必要である。しかし、ヒトに過剰害が現れる可能性があるほどの大量のビタミンを投与することは、倫理的に不可能である。そこで、著者らは実験動物を用いてビタミンの健康障害非発現量 (no-observed-adverse-effect-level: NOAEL) を調べることを目的として、これまでにニコチンアミド<sup>4)</sup>、パントテン酸<sup>5)</sup>、ビオチン<sup>6)</sup>、葉酸<sup>7)</sup>の大量摂取が幼若ラットの成長と各ビタミンの体内動態に及ぼす影響について検討してきた。本研究では、幼若ラットに大量のピリドキシン塩酸塩を投与し、体重増加量と飼料摂取量、ビタミンB<sub>6</sub>の体内動態、尿中水溶性ビタミン排泄量を測定することにより、ラットに対するピリドキシン塩酸塩のNOAELとLOAELを推定した。

## 実験方法

### 1. 動物の飼育方法

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%前後に維持し、明暗サイクルは、午前6時～午後6時を明、午後6時～午前6時を暗とした。

3週齢のWistar系雄ラット20匹を日本クレア株式会社より購入し、4匹ずつ5群に分けた。0.0007%のピリドキシン塩酸塩を含有する20%カゼイン食を対照食とし、対照食に0, 0.1, 0.5, 0.8, 1.0%のピリドキシン塩酸塩を添加した飼料を与え、30日間飼育した。飼育最終日の1日尿および1日糞を集めた。尿は塩酸酸性下で集め、採尿後、分析に供するまで-20°Cで保存した。採尿終了後、ラットを断頭屠殺し、採血および脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の摘出を行い、各臓器重量を測定した。

### 2. 分 析

チアミン<sup>8)</sup>、リボフラビン<sup>9)</sup>、ピリドキサルリン酸 (PLP)<sup>10)</sup>、ビタミンB<sub>6</sub>代謝産物4-ピリドキシン酸 (4-PIC)<sup>11)</sup>、アスコルビン酸<sup>12)</sup>はHPLC法により測定した。ニコチンアミド (Nam)<sup>13)</sup>、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (MNA)<sup>14)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py)<sup>13)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py)<sup>13)</sup>はHPLC法により測定し、これらの合計を総ニコチンアミド代謝産物とした。総ビタミンB<sub>6</sub><sup>15)</sup>、シアノコバラミン<sup>16)</sup>、パントテン酸<sup>17)</sup>、葉酸<sup>18)</sup>、ビオチン<sup>19)</sup>は微生物学的

定量法により測定した。

### 3. 有意差検定

すべてのデータは平均値±SEMで示した。有意差検定は、まず一元配置の分散分析を行い、有意差が認められたときには、Tukey-Kramerの多重比較テストを行った。有意差は、p<0.05で判定した。なお、検定は、統計ソフトGraphPad Prism (version 5.01; GraphPad, San Diego, CA, USA)を用いた。

## 結果および考察

### 1. 体重増加量、飼料摂取量、肉眼的所見

0.8%および1.0%添加群の体重増加量は対照群と比べて有意に低値を示した (Table 1)。1.0%添加群の総飼料摂取量は対照群と比べて有意に低値を示した。飼育中、下痢をしているラットは認められなかった。これらを指標にした場合の最小健康障害発現量 (lowest-observed-adverse-effect level; LOAEL) を0.8%添加群、健康障害非発現量 (no-observed-adverse-effect level; NOAEL) を0.5%添加群とした。

なお、毛並み、臓器は、肉眼的所見において異常は認められず、行動異常も認められなかった。

### 2. 臓器重量

体重100g当たりの臓器重量をTable 2に示した。0.8%と1.0%添加群の脳重量および腎臓重量は対照群より高値を示した。0.5%以上の添加群の肝臓重量は対照群より高値を示した。心臓、脾臓、肺、精巣の重量については、対照群との間に差異の認められた群はなかった。これらの指標を基に判断すると、LOAELは0.5%添加群、NOAELは0.1%添加群となる。

### 3. 肝臓中総ビタミンB<sub>6</sub>量と血漿中ピリドキサルリン酸含量

肝臓中の総ビタミンB<sub>6</sub>量は、Fig. 1に示したように、投与した飼料中のピリドキシン塩酸塩量に応じて増加した。補酵素型ビタミンB<sub>6</sub>であるピリドキサルリン酸の血漿中の含量は、0.1%添加群で有意に増大し、これ以上のピリドキシン塩酸塩を摂取してもさらに増大することはなかった。

### 4. 尿中への4-PIC排泄量

ビタミンB<sub>6</sub>異化代謝産物である4-PICの尿中排泄量は、Fig. 1Cに示したように、ピリドキシン塩酸塩の添加量が多くなるにつれて増大した。しかし、その増加は直線

Table 2. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on tissue weights of rats

|        | Control   | +0.1%     | +0.5%      | +0.8%      | +1.0%      |
|--------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| Brain  | 0.51±0.03 | 0.52±0.01 | 0.59±0.03  | 0.61±0.01* | 0.66±0.02* |
| Heart  | 0.34±0.01 | 0.34±0.01 | 0.36±0.01  | 0.36±0.01  | 0.36±0.01  |
| Liver  | 4.83±0.12 | 5.06±0.08 | 5.84±0.12* | 6.96±0.14* | 7.31±0.08* |
| Kidney | 0.76±0.00 | 0.77±0.02 | 0.79±0.01  | 0.85±0.01* | 0.89±0.01* |
| Spleen | 0.35±0.05 | 0.31±0.01 | 0.35±0.01  | 0.41±0.02  | 0.43±0.02  |
| Lung   | 0.63±0.05 | 0.52±0.01 | 0.64±0.02  | 0.62±0.01  | 0.71±0.02  |
| Testis | 0.97±0.02 | 0.97±0.05 | 1.02±0.02  | 1.04±0.04  | 1.07±0.03  |

Each value is expressed as g/100 g body weight and represents the mean±SEM ( $n=4$ ). \* $p<0.05$  versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

Table 3. Summary of the NOAEL's and the LOAEL's of pyridoxine-HCl (PN-HCl) determined from various indices of rats

| Indices                                      | NOAEL              | LOAEL             |
|--|--------------------|-------------------|
| Body weight and food intake                  | 0.5% PN-HCl group  | 0.8% PN-HCl group |
| Organ weights                                | 0.1% PN-HCl group  | 0.5% PN-HCl group |
| Urinary excretion<br>catabolic ability of PN | >0.1% PN-HCl       | 0.1% PN-HCl group |
| B-group vitamins<br>ascorbic acid            | <1.0% PN-HCl group | —                 |
| catabolic ability of Nam*                    | 0.8% PN-HCl group  | 1.0% PN-HCl group |
|  | 0.1% PN-HCl group  | 0.5% PN-HCl group |

\* Nam = nicotinamide.

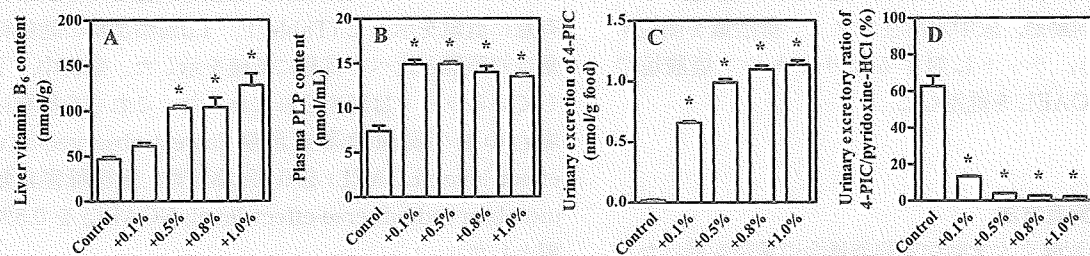


Fig. 1. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on vitamin B<sub>6</sub> content in the liver (A), the PLP concentration in blood (B), urinary excretion of 4-PIC (C) and the urinary excretory ratio of 4-PIC/pyridoxine-HCl (D)

Each value is expressed as the mean±SEM ( $n=4$ ). \* $p<0.05$  versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

的ではなく、双曲線状となり、0.5%添加食群ではほぼ飽和状態となっていた。

一方、4-PIC排泄量/ピリドキシン塩酸塩摂取量として示した4-PIC排泄率はピリドキシン塩酸塩の摂取量に応じて有意に低下し、Fig. 1Cに示した尿中4-PIC排泄量と逆の双曲線状を示した。このことは、ラットでは、0.1%ピリドキシン塩酸塩添加食によってピリドキシンの異化代謝反応系がほぼ飽和した状態となったことを意味している。このピリドキシン→ピリドキサル→4-PICの異化代謝能力から判断すると、LOAELは0.1%添加食群、NOAELはそれ以下となる。

##### 5. B群ビタミンの尿中排泄量

ビタミンB<sub>6</sub>を含めて、B群ビタミンは補酵素として糖質、脂質、アミノ酸代謝にかかわっているため、ピリドキシン塩酸塩の大量摂取により、他のビタミン代謝の均衡を崩す恐れがある。しかし、パントテン酸を除いて、他のB群ビタミンの尿中排泄量に顕著な影響は認められなかった

(Fig. 2)。パントテン酸の尿中排泄量は0.1%ピリドキシン塩酸塩添加群で急激に増加したが、それ以上に摂取してもさらなる増加は認められず、濃度依存性は認められなかった。ビオチンにおいては、0.8%添加食群のみが対照食に対して有意に増大した。ピリドキシン塩酸塩の大量摂取がパントテン酸の代謝に何らかの影響を与えることは明らかであるが、その機構は不明である。パントテン酸もビオチンも濃度依存性が認められなかったことから、尿中のB群ビタミンの排泄量を指標にしたNOAELは1.0%添加食群以上であると判断した。

##### 6. アスコルビン酸の尿中排泄量

アスコルビン酸はラットではグルコースから合成できるため、ビタミンではないが、測定したところ、1.0%ピリドキシン塩酸塩添加食の尿中排泄量が、対照食群と比較して有意に増大していた (Fig. 2H)。

##### 7. ナイアシン代謝産物の尿中排泄量および排泄量比

ナイアシンの異化代謝はさまざまな栄養因子によって影

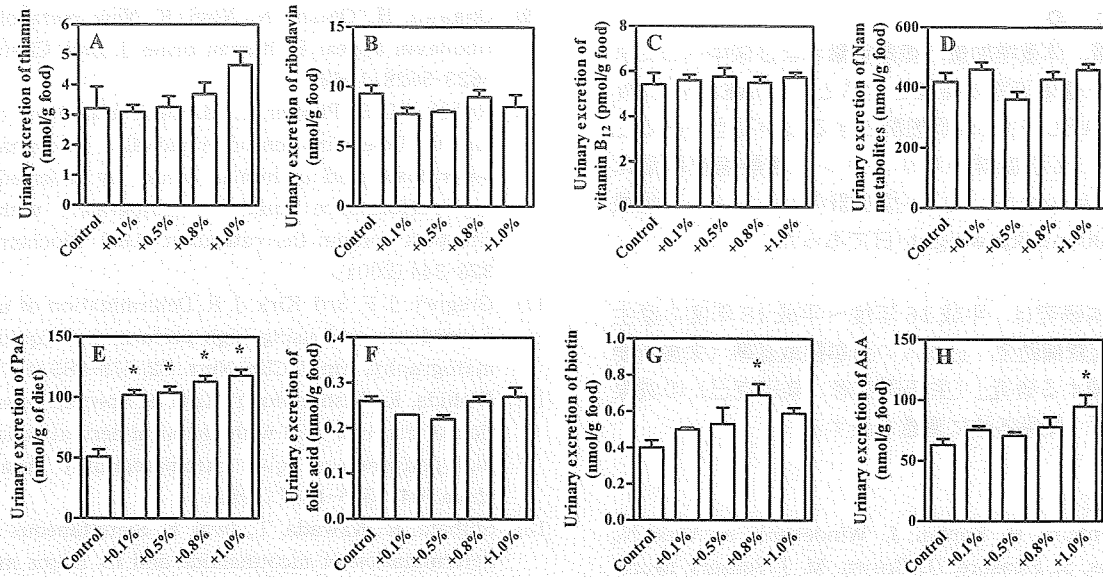


Fig. 2. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on urinary excretions of thiamin (A), riboflavin (B), vitamin B<sub>12</sub> (C), nicotinamide (Nam) metabolites (D), pantothenic acid (PaA) (E), folic acid (F), biotin (G) and ascorbic acid (AsA) (H). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \* $p < 0.05$  versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

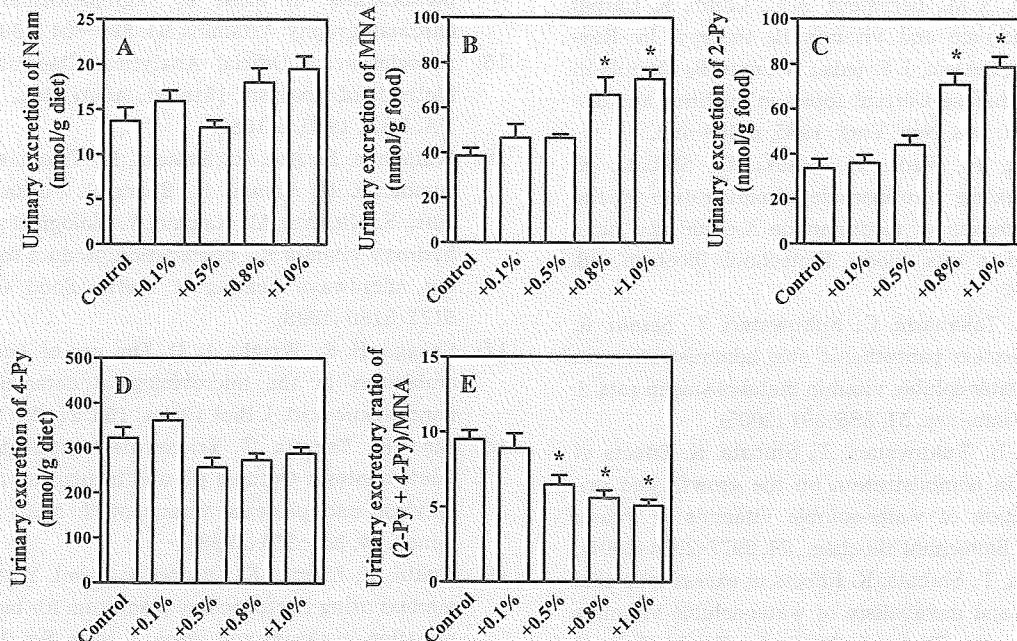


Fig. 3. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on urinary excretions of nicotinamide (Nam) (A), MNA (B), 2-Py (C) and 4-Py (D), and the urinary excretory ratio of (2-Py+4-Py)/MNA (E). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \* $p < 0.05$  versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

響を受けることが明らかにされている<sup>20)</sup>。そこで、個々の異化代謝産物量に及ぼす影響を Fig. 3 に示した。ピロキシン塩酸塩摂取量の増加に伴い、MNA と 2-Py 排泄量は増大した。4-Py 排泄量には影響は認められなかった。合計量は Fig. 2D に示したようにピロキシン塩酸塩摂取の影響を受けなかった。

栄養状態に偏りが生じると、ニコチンアミド異化代謝産

物である MNA を 4-Py に変換する酵素活性が低下するために、4-Py の排泄量が減少する<sup>19)</sup>。したがって、尿中の (2-Py+4-Py)/MNA 比は栄養状態の悪化を知る上でよい指標となる。Fig. 3E に示したように、尿中の (2-Py+4-Py)/MNA 比は、ピロキシン塩酸塩添加量依存的に低下していった。このデータを指標にすると、LOAEL が 0.5% 添加群、NOAEL が 0.1% 添加群となる。

## 8. ま と め

飼料摂取量, 体重増加量, 臓器重量および尿中へのビタミン排泄量を健康障害の指標とすると, LOAELを0.5%添加群, NOAELを0.1%添加群とするのが妥当であると判断した. 0.5%添加群のピリドキシン塩酸塩摂取量は450 mg/kg weight/日, 0.1%添加群のピリドキシン塩酸塩摂取量は90 mg/kg weight/日であった.

謝 辞 本研究は, 平成16年度~平成18年度の厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準(栄養所要量)策定に関する研究」(主任研究者: 柴田克己)の成果の一部である. 関係各位に謝意を表す.

## 文 献

- Schaumburg, H., Kaplan, J., Windebank, A., Vick, N., Rasmus, S., Pleasure, D., Brown, M. J. Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. *N. Eng. J. Med.*, **309**, 445-448 (1985).
- 厚生労働省(2004). 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— 策定委員会報告書, 2004年10月.
- Del Tredici, A. M., Bernstein, A. L., Chinn, K. Carpal tunnel syndrome and vitamin B<sub>6</sub> therapy. In: Reynolds, R. D., Leklem, J. E. (eds.). *Vitamin B<sub>6</sub>: Its role in health and disease. Current topics in nutrition and disease.* Alan R. Liss, New York, 1985, p. 459-462.
- Fukuwatari, T., Wada, H., Sasaki, R., Shibata, K. Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide *N*-oxide and nicotinic acid in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 44-50 (2004).
- Shibata, K., Takahashi, C., Fukuwatari, T., 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).
- Sawamura, H., Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2977-2984 (2007).
- Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of excess folic acid on growth and metabolism of water-soluble vitamins in weaning rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **49**, 51-55 (2008).
- Fukuwatari, T., Toriochi, M., Ohta, M., Sasaki, R., Shibata, K. Metabolic disturbance of tryptophan-nicotinamide conversion pathway by putative endocrine disruptors, bisphenol A and styrene monomer. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **45**, 1-7 (2004).
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628 (1983).
- Rybak, M. E., Pfeiffer, C. M. Clinical analysis of vitamin B<sub>6</sub>: Determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite post column derivatization. *Anal. Biochem.*, **333**, 336-344 (2004).
- Gregory, J. F. 3rd, Kirk, J. R. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883 (1979).
- Kishida, K., Nishimoto, Y., Kojo, S. Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **64**, 1505-1507 (1992).
- Shibata, K., Kawada, T., 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).
- Shibata, K. Ultramicro-determination of *N*<sup>1</sup>-methyl-nicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins*, **61**, 599-604 (1987).
- Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 15th ed., AOAC, Inc., Arlington, VA, USA, 1990, p. 1089.
- Watanabe, F., Abe, K., Katsura, H., Takenaka, S., Mazumder, Z. H., Yamaji, R., Ebara, S., Fujita, T., Tanimori, S., Kirihata, M., Nakano, Y. Biological activity of hydroxy-vitamin B<sub>12</sub> degradation product formed during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5177-5180 (1998).
- Skeggs, H. R., Wright, L. D. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26 (1944).
- Aiso, K., 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., Inuma, K., Oizumi, J., Izumi, Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 491-498 (1994).
- Shibata, K. Relationship between the ratio of the excreted by-products of niacin metabolism, *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridon-5-carboxamide + *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridon-3-carboxamide/*N*<sup>1</sup>-methyl-nicotinamide and amino acid intake. *Vitamins*, **64**, 1-18 (1990).

## ノート

## ニコチン酸の大量摂取が幼若ラットの成長, B群ビタミンの尿中排泄量およびトリプトファン代謝におよぼす影響

(平成20年6月4日受理)

福渡 努\* 倉田華織 柴田克己

## Effects of Excess Nicotinic Acid on Growth and the Urinary Excretion of B-Group Vitamins and the Metabolism of Tryptophan in Weaning Rats

Tsutomu FUKUWATARI\*, Kaori KURATA and Katsumi SHIBATA

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture: 2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan; \*Corresponding author

To determine the tolerable upper intake level of nicotinic acid in humans, we investigated the effects of excess nicotinic acid administration on body weight gain, food intake, and urinary excretion of water-soluble vitamins and the metabolism of tryptophan in weaning rats. The weaning rats were freely fed a niacin-free 20% casein diet (control diet) or the same diet with 0.1%, 0.3% or 0.5% nicotinic acid for 23 days. The excess nicotinic acid intake did not affect body weight gain, food intake, serotonin contents in the brain, stomach and small intestine, or the urinary excretions of water-soluble vitamins. Although excess nicotinic acid did not affect the upper part of the tryptophan-nicotinamide pathway, 0.5% nicotinic acid diet increased the urinary excretion of quinolinic acid. The diet containing more than 0.3% nicotinic acid also increased the urinary excretion of nicotinic acid, which is usually below the limit of detection. As determined from the results of body weight gain and food intake as indices for apparent adverse effects, the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) for nicotinic acid was 0.5% in diet, corresponding to 450 mg/kg body weight/day. As judged from an increase of urinary quinolinic acid and nicotinic acid as indices of metabolic change, NOAEL was 0.1% in diet, corresponding to 90 mg/kg body weight/day, and the lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) was 0.3% in diet, corresponding to 270 mg/kg body weight/day.

(Received June 4, 2008)

**Key words:** ニコチン酸 nicotinic acid; ナイアシン niacin; 過剰 excess; 上限量 tolerable upper intake level: UL; 健康障害非発現量 (無毒生量) no-observed-adverse-effect-level: NOAEL; 最低健康障害発現量 (最小毒性量) lowest-observed-adverse-effect-level: LOAEL; 食事摂取基準 Dietary Reference Intakes

## 緒言

B群ビタミンの1つであるニコチン酸のグラム単位での摂取には、強力な血清コレステロール低下作用と中性脂肪低下作用が認められることが知られている。例えば、米国の Coronary Drug Project の報告<sup>1)</sup>によると、冠状動脈性心臓病の患者にニコチン酸を毎日3g投与し続けると、4か月ほどで、10~20%の血清コレステロール含量の低下、および50%の血清中性脂肪含量の低下が認められた。1日にグラム単位というニコチン酸の高投与により高脂血症が改善されるため、その予防のためサプリメントが出回っている。しかし、簡便性や知識不足などによって過剰

摂取する危険性があり、血管拡張作用によるフラッシング<sup>2)</sup>や肝臓障害<sup>3)</sup>などの健康障害の発現が懸念される。したがって、過剰摂取による健康障害を未然に防ぐために、上限量の設定が必要となる。

「日本人の食事摂取基準 (2005年版)」<sup>4)</sup>において、健康障害をもたらす危険がないとみなされる習慣的な摂取量の上限を与える量として上限量を策定している。18歳以上の男女のニコチン酸の上限量は100 mg/日である<sup>4)</sup>。この値は高脂血症患者の治療薬として用いた臨床データから求められたものであり、上限量を求めるためにデザインされた研究報告ではない。精度の高い上限量を策定するには、健常者を被験者とした介入試験をする必要である。しかし、ヒトを用いた栄養素の上限量を求めるための介入試験を行うことが倫理的に極めて困難である以上、動物試験の

\* 連絡先

滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科: 〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

データを参考に必要性もある。そこで、著者らは実験動物を用いてビタミンの最低健康障害発現量 (lowest-observed-adverse-effect-level: LOAEL) および健康障害非発現量 (no-observed-adverse-effect-level: NOAEL) を調べることを目的として、これまでにニコチンアミド<sup>5)</sup>、パントテン酸<sup>6)</sup>、ビオチン<sup>7)</sup>、葉酸<sup>8)</sup> の大量摂取が幼若ラットの成長と各ビタミンの体内動態に及ぼす影響について検討してきた。

ニコチン酸の毒性を動物実験で調べた報告は極めて少なく、しかも古いものである。例えば、1938年にChenら<sup>10)</sup>は、1日当たり2gのニコチン酸を20日間投与したイヌでは体重の減少が観察され、さらにけいれんを起こして死亡したが、1gでは8週間投与しても悪影響は見られなかったと報告した。また、1939年にUnnaは<sup>11)</sup>、イヌに1g/kg体重のニコチン酸ナトリウム塩を63日間投与しても悪影響は認められず、ラットにおいても1g/日のニコチン酸ナトリウム塩を40日間投与し続けても悪影響はなかったと報告した。

本研究では、ニコチン酸の大量投与が幼若ラットの飼料摂取量と体重増加量、水溶性ビタミンおよびトリプトファン-ニコチンアミドの代謝に及ぼす影響について検討することにより、ラットに対するニコチン酸のNOAELとLOAELを推定した。

## 実験方法

### 1. 動物の飼育方法

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℃前後、湿度は50%前後に維持し、明暗サイクルは、午前6時～午後6時を明、午後6時～午前6時を暗とした。

3週齢のWistar系雄ラット20匹を日本クレア株式会社より購入し、5匹ずつ4群に分けた。ニコチン酸欠-20%カゼイン食を対照食とし、対照食に0.1, 0.3, 0.5%のニコチン酸を添加した飼料を与え、23日間飼育した。飼育最終日の1日尿および1日糞を集めた。尿は塩酸酸性下で集め、採尿後、分析に供するまで-20℃で保存した。採尿終了後、ラットを断頭屠殺し、採血および脳、胃、小腸の摘出を行った。

### 2. 分 析

チアミン<sup>11)</sup>、リボフラビン<sup>12)</sup>、ビタミンB<sub>6</sub>代謝産物4-ピリドキシン酸(4-PIC)<sup>13)</sup>、トリプトファン<sup>14)</sup>、セロトニン<sup>15)</sup>、アンスラニル酸<sup>16)</sup>、キヌレン酸<sup>17)</sup>、キサントレン

酸<sup>18)</sup>、3-ヒドロキシアンスラニル酸<sup>18)</sup>、キノリン酸<sup>19)</sup>はHPLC法により測定した。ニコチンアミド(Nam)<sup>20)</sup>、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド(MNA)<sup>14)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)<sup>21)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)<sup>20)</sup>はHPLC法により測定し、これらの合計を総ニコチンアミド代謝産物とした。シアノコバラミン<sup>22)</sup>、パントテン酸<sup>23)</sup>、葉酸<sup>24)</sup>、ビオチン<sup>25)</sup>は微生物学的定量法により測定した。

### 4. 有意差検定

すべてのデータは平均値±SEMで示した。有意差検定は、まず一元配置の分散分析を行い、有意差が認められた時には、Tukey-Kramerの多重比較テストを行った。有意差は、 $p < 0.05$ で判定した。なお、検定は、統計ソフトGraphPad Prism (version 5.01; GraphPad, San Diego, CA, USA)を用いた。

## 結果および考察

### 1. 体重増加量、飼料摂取量、肉眼的所見

3週齢Wistar系雄性ラットに0～0.5%のニコチン酸を含む飼料を与えて23日間飼育した。この飼育期間において、飼料摂取量および体重増加量にはニコチン酸の大量摂取による影響は認められなかった(Table 1)。また、肉眼的所見において、毛並み、行動などに異常は認められなかった。これらの指標を基に判断すると、NOAELは0.5%以上の添加食となる。

### 2. ニコチンアミド異化代謝経路

ニコチン酸の大量投与がニコチンアミド異化代謝経路に及ぼす影響を調べた。ニコチン酸の投与によりニコチンアミド、MNA、2-Py、4-Py排泄量は著しく増大した(Fig. 1A～D)。その増大量はニコチン酸投与量に依存せず、0.1%ニコチン酸添加食群、0.3%ニコチン酸添加食群と0.5%ニコチン酸添加食群では全く変わらなかった。一方、ニコチン酸排泄量はニコチン酸添加量依存的に増大した(Fig. 1E)。対照群においては、1日尿中にニコチン酸は検出できなかった。ニコチン酸排泄の増大を指標にすると、LOAELは0.3%添加食、NOAELは0.1%添加食となる。

ニコチン酸は肝臓においてニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチン酸アデニンジヌクレオチド、NAD<sup>+</sup>を経てニコチンアミドへと代謝される。ニコチンアミドは、通常、MNA、2-Py、4-Pyに異化代謝されて、尿中に排泄される。代謝しきれないニコチン酸はそのままの形で尿中に排泄される<sup>26)</sup>。肝臓以外にはニコチン酸からNAD<sup>+</sup>への

Table 1. Effects of excess nicotinic acid administration on body weight gain and food intake

|                          | Control   | +0.1%     | +0.3%     | +0.5%     |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Initial body weight (g)  | 38.7±1.7  | 38.6±1.6  | 38.6±1.0  | 38.8±0.8  |
| Final body weight (g)    | 186.1±3.3 | 188.0±7.2 | 192.7±4.0 | 188.2±4.0 |
| Body weight gain (g/30d) | 147.4±2.9 | 149.4±6.6 | 154.0±3.3 | 149.4±3.8 |
| Food intake (g/30d)      | 361.1±6.9 | 371.5±9.4 | 373.1±4.1 | 375.5±8.9 |

Each value is expressed as the mean±SEM (n=5).



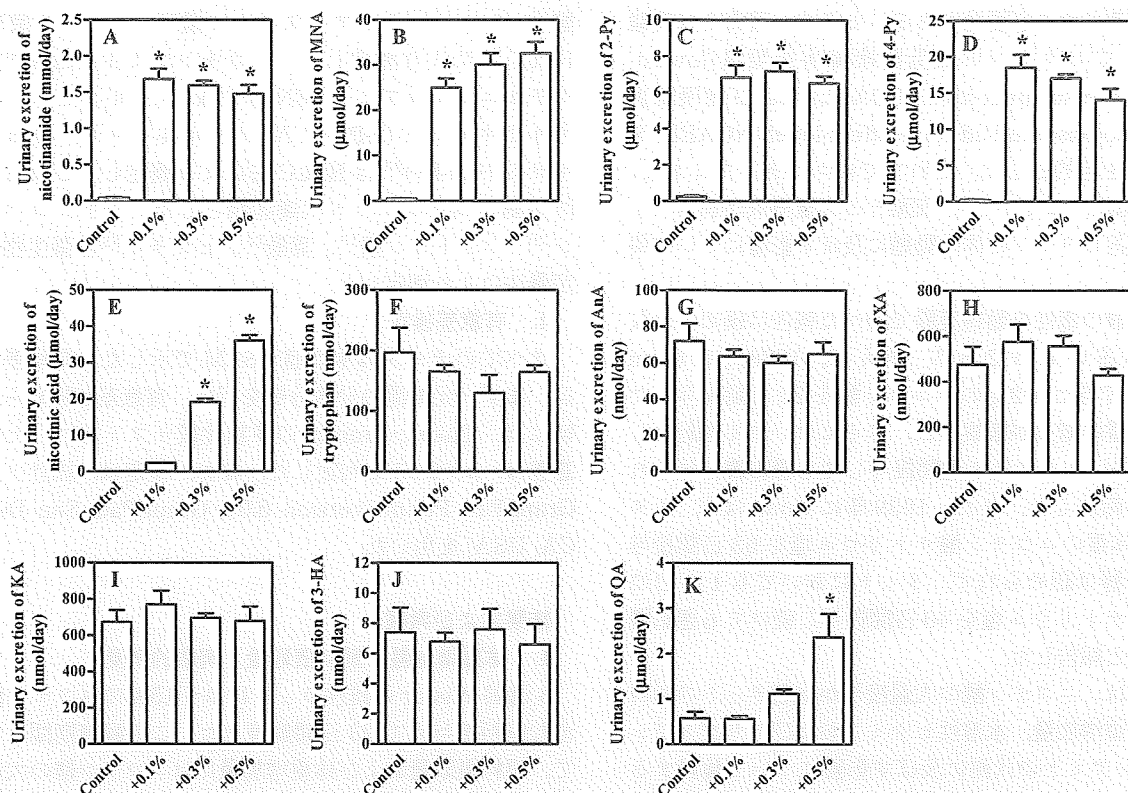


Fig. 1. Effects of excess nicotinic acid administration on urinary excretion of nicotinamide (A), MNA (B), 2-Py (C), 4-Py (D), nicotinic acid (E) tryptophan (F), anthranilic acid (AnA) (G), xanthurenic acid (XA) (H), kynurenic acid (KA) (I), 3-hydroxyanthranilic acid (3-HA) (J) and quinolinic acid (QA) (K)

Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). \* $p < 0.05$  versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

合成経路は存在しない<sup>17)</sup>。従って、本研究において0.1%以上のニコチン酸食によってニコチン酸の尿中排泄が認められたという結果は、大量のニコチン酸を摂取すると通常の異化代謝経路が飽和したために、通常は作動していないニコチン酸への代謝経路が働いたことを意味している。飼料摂取量や体重増加量などへの影響が認められなくても、ニコチン酸の大量摂取によってニコチンアミド異化代謝変動が生じていたことから、尿中へのニコチン酸排泄量をニコチン酸過剰摂取の予防に生体指標として利用できることが考えられた。

### 3. トリプトファン-キノリン酸経路

ニコチンアミドの大量摂取は尿中へのキノリン酸排泄量を増大させることから<sup>9)</sup>、ニコチン酸の大量投与がトリプトファン-キノリン酸経路に及ぼす影響について調べた。トリプトファン、アンスラニル酸、キサントレン酸、キヌレン酸、3-ヒドロキシアンスラニル酸については、大量のニコチン酸摂取による影響は認められなかった (Fig. 1E~J)。一方、0.3%ニコチン酸添加食群のキノリン酸排泄量は対照群の2倍、0.5%添加食群では4倍の値を示した (Fig. 1K)。キノリン酸排泄の増大を指標にすると、LOAELは0.5%添加食、NOAELは0.3%添加食となる。

キノリン酸は内因性の興奮性神経毒であり<sup>27)</sup>、腎障害を起因とする貧血を導く可能性も指摘されている<sup>28)</sup>。しか

し、キノリン酸産生が100倍に増加した幼若ラットには悪影響は認められないことから<sup>29)</sup>、本研究で認められた程度のキノリン酸産生の増加が何らかの悪影響を及ぼすとは考えにくい。ニコチン酸の大量摂取によってキノリン酸産生が増加する機構は不明であるが、キノリン酸とニコチンアミドは別々の酵素により5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸 (PRPP) と縮合して、それぞれニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチンアミドモノヌクレオチドとなることから、キノリン酸が大量に産生したニコチンアミドと競合した可能性が挙げられる。あるいは、増加したニコチンアミド異化代謝産物がキノリン酸産生の鍵酵素であるアミノカルボキシル-セミアルデヒドカルボキシル-ゼ活性を阻害したために、キノリン酸産生が増加した可能性も考えられる。

### 4. B群ビタミンの尿中排泄量

B群ビタミンは糖質、脂質、アミノ酸の代謝に協調して関与することから、ニコチン酸の大量摂取が他のB群ビタミンの代謝に作用するかを検討した。ニコチン酸の大量摂取によるチアミン、リボフラビン、ビタミンB<sub>6</sub>異化代謝産物4-ピリドキシン酸、ビタミンB<sub>12</sub>、パントテン酸、ビオチン、葉酸の排泄量の変動は認められなかった (Fig. 2)。尿中のB群ビタミンの排泄量を指標にしたNOAELは0.5%以上の添加食となる。

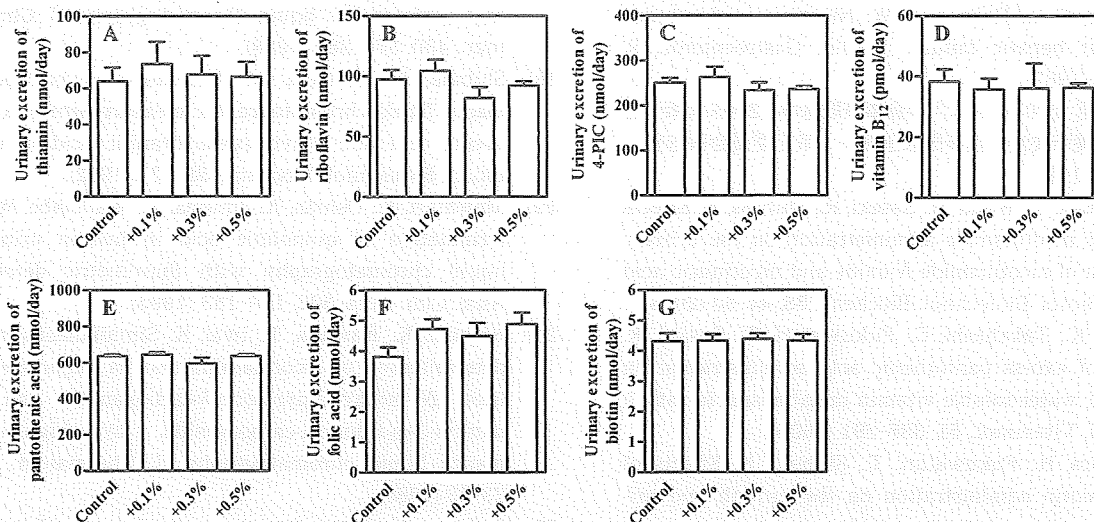


Fig. 2. Effects of excess nicotinic acid administration on urinary excretions of thiamin (A), riboflavin (B), 4-PIC (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), pantothenic acid (E), folic acid (F) and biotin (G). Each value is expressed as the mean ± SEM (n=5).

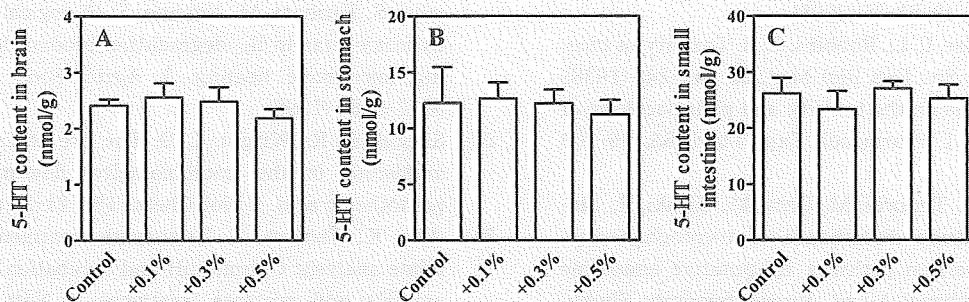


Fig. 3. Effects of excess nicotinic acid administration on 5-hydroxytryptamine (5-HT) contents in brain (A), stomach (B) and small intestine (C). Each value is expressed as the mean ± SEM (n=5).

5. セロトニン含量

ニコチン酸は偏頭痛に有効であるという報告があり、その理由としてニコチン酸はトリプトファンからセロトニンへの生合成量を低下させるという仮説がある<sup>30)</sup>。そこで、ニコチン酸の大量摂取が脳、胃および小腸上部のセロトニン含量に及ぼす影響を調べた。脳、胃、小腸のセロトニン含量はニコチン酸大量摂取の影響を受けなかった (Fig. 3)。セロトニン含量の変動を指標にした NOAEL は 0.5% 以上の添加食となる。

6. まとめ

0.5%ニコチン酸添加食は飼料摂取量、体重増加量、B群ビタミン尿中排泄量には影響を及ぼさなかったが、尿中へのキノリン酸排泄量を増加させた。また、0.3%ニコチン酸添加食は尿中へのニコチン酸の排泄量増加という代謝変動を招いた。体重増加量と飼料摂取量を健康障害の指標とすれば、ラットにおけるニコチン酸の NOAEL は 0.5% 以上のニコチン酸添加食、すなわち 450 mg/kg 体重/日以上であった。一方、代謝変動、すなわち、尿中へのニコチン酸およびキノリン酸の排泄量の増大を健康障害が現れ

る前に見られる代謝変動の指標とすれば、LOAEL は 0.3%ニコチン酸添加食、すなわち 270 mg/kg 体重/日であり、NOAEL は 0.1%ニコチン酸添加食、すなわち 90 mg/kg 体重/日となる。

謝辞 本研究は、平成 16 年度～18 年度の厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究」（主任研究者、柴田克己）の成果の一部である。関係各位に謝意を表す。

文献

- 1) The Coronary Drug Project Research Group. Clofibrate and niacin in coronary heart disease. J. Am. Med. Assoc., 231, 360-381 (1975).
- 2) Spies, T. D., Bean, W. B., Stone, R. E. The treatment of subclinical and classic pellagra. Use of nicotinic acid, nicotinic acid amide and sodium nicotinate, with special reference to the vasodilator action and the effect on mental symptoms. J. Am. Med. Assoc., 111, 584-592 (1938).

- 3) Clementz, G. L., Holmes, A. W. Nicotinic acid-induced fulminant hepatic failure. *J. Clin. Gastroenterol.*, **9**, 582-584 (1987).
- 4) 厚生労働省 (2004). 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— 策定委員会報告書, 2004年10月.
- 5) Fukuwatari, T., Wada, H., Sasaki, R., Shibata, K. Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide *N*-oxide and nicotinuric acid in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 44-50 (2004).
- 6) Shibata, K., Takahashi, C., Fukuwatari, T., 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).
- 7) Sawamura, H., Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2977-2984 (2007).
- 8) Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of excess folic acid on growth and metabolism of water-soluble vitamins in weaning rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **49**, 51-55 (2008).
- 9) Chen, K. K., Rose, C. L., Robbins, E. B. Toxicity of nicotinic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **38**, 241-245 (1938).
- 10) Unna, K. Studies on the toxicity and pharmacology of nicotinic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **65**, 95-103 (1939).
- 11) Fukuwatari, T., Toriochi, M., Ohta, M., Sasaki, R., Shibata, K. Metabolic disturbance of tryptophan-nicotinamide conversion pathway by putative endocrine disruptors, bisphenol A and styrene monomer. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **45**, 1-7 (2004).
- 12) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628 (1983).
- 13) Gregory, J. F. 3rd, Kirk, J. R. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883 (1979).
- 14) Shibata, K., Onodera, M., Aibara, S. High-performance liquid chromatographic measurement of tryptophan in blood, tissues, urine, and foodstuffs with electrochemical and fluorometric detections. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1475-1481 (1991).
- 15) Shibata, K., Onodera, M., Kawada, T., Iwai, K. Simultaneous micro-determination of serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid with 5-hydroxy-*N*<sup>1</sup>-methyl-tryptamine, as an internal standard, in biological materials by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, **430**, 381-387 (1988).
- 16) Shibata, K., Onodera, M. Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 143-148 (1991).
- 17) Shibata, K. Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, as endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **430**, 376-380 (1988).
- 18) Shibata, K., Onodera, M. Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 974 (1992).
- 19) Mawatari, K., Oshida, K., Iinuma, F., Watanabe, W. Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Clin. Acta*, **302**, 179-183 (1995).
- 20) Shibata, K., Kawada, T., 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).
- 21) Shibata, K. Ultramicro-determination of *N*<sup>1</sup>-methyl-nicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins*, **61**, 599-604 (1987).
- 22) Watanabe, F., Abe, K., Katsura, H., Takenaka, S., Mazumder, Z. H., Yamaji, R., Ebara, S., Fujita, T., Tanimori, S., Kirihata, M., Nakano, Y. Biological activity of hydroxy-vitamin B<sub>12</sub> degradation product formed during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5177-5180 (1998).
- 23) Skeggs, H. R., Wright, L. D. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26 (1944).
- 24) Aiso, K., 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).
- 25) 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.*, **40**, 491-498 (1994).
- 26) Shibata, K. The metabolism of niacin in each organ and the biological method for assessing the nutritional status of niacin in the rat. *Vitamins*, **61**, 39-56 (1987).
- 27) Schwarcz, R., Speciale, C., Okuno, E., French, E. D., Kohler, C. Excitatory Amino Acids and Epilepsy (Schwarcz, R., Ari, Y., eds.), 1986, p. 697-707.
- 28) Pawlak, D., Koda, M., Pawlak, S., Wolczynski, S., Buczek, W. Contribution of quinolinic acid in the development of anemia in renal insufficiency. *Am. J. Physiol.*, **284**, F693-F700 (2003).
- 29) Fukuwatari, T., Shibata, K. Formation of nicotinamide by the administration of di(2-ethylhexyl)phthalate does not cause the growth retardation of the young rat differing from the exogenously excess administration of nicotinamide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2423-2427 (2008).
- 30) Prousky, J., Seely, D. The treatment of migraines and tension-type headaches with intravenous and oral niacin (nicotinic acid): Systematic review of the literature. *Nutr. J.*, **4**, 3. doi: 10.1186/1475-2891-4-3 (2005).

## Note

## Consideration of Diurnal Variations in Human Blood NAD and NADP Concentrations

Tsutomu FUKUWATARI and Katsumi SHIBATA

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture,  
2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522–8533, Japan

(Received October 1, 2008)

**Summary** The sum of the urinary excretion of nicotinamide and its catabolites, which are metabolites of NAD and NADP, were observed to have clear diurnal variations in human urine. Then, we examined whether NAD and NADP in blood also showed the diurnal variation. All subjects were housed in the same facility and given the same diet during the experiment. In addition, we examined whether diurnal variations were affected by the intakes of dietary nicotinamide or not. As a result, neither the NAD nor the NADP content of the blood shows the diurnal variation regardless of the administered amount of nicotinamide. The concentrations of NAD and NADP did not increase according to the intake of nicotinamide. The existence of a mechanism by which NAD and the NADP levels of the blood are constantly maintained by the adjustment of the amount of excretion to the urinary bladder, was suggested.

**Key Words** diurnal variation, NAD, blood, human, vitamin

We reported a diurnal variation in the NAD and NADP catabolites  $N^1$ -methylnicotinamide,  $N^1$ -methyl-2-pyridone-5-carboxamide, and  $N^1$ -methyl-4-pyridone-3-carboxamide was observed (1) and an elevation of blood NAD level after moderate exercise (2). In the present study, we examined whether NAD and NADP in blood also showed the diurnal variation. In addition, we examined whether diurnal variations were affected by the intakes of dietary nicotinamide or not.

Ten healthy male Japanese college students participated in the present experiment. They did not have regular use of medications or dietary supplements, or habitual alcohol or cigarette consumption. Their age, body weight, height and body mass index (mean  $\pm$  SD) were  $22.1 \pm 2.3$  y old,  $63.6 \pm 5.2$  kg,  $174.0 \pm 4.6$  cm, and  $21.0 \pm 1.6$  kg/m<sup>2</sup>, respectively. This study was reviewed and approved by The University of Shiga Prefecture.

All subjects ( $n=10$ ) were housed in the same facility and given the same diet. The experimental period was 4 wk. The diet consisted of bread, margarine, ham, yoghurt, tomato, lettuce, and milk as breakfast; rice, toasted and seasoned laver, luncheon meat, boiled egg, raw cabbage, miso-soup, and Japanese tea as lunch; rice, soy sauce-seasonal Pacific saury, *tofu* (soybean curd), spinach (leaves, boiled), kiwifruit and Japanese tea as dinner; and cheese and jelly fruit mix as a midnight snack. The nutrient elements are shown in Table 1. Nutrients were calculated by using Standard Tables of Food Composition in Japan, Fifth revised and enlarged edition (3).

The subjects took the diet on days 1 to 5 of each week (experimental period, 4 wk). But, they lived freely to soften the restraint on days 6 and 7 of each week. Approximately 1-, 3- and 6-fold of the synthesized water-soluble vitamin mixture as vitamin mixture A, B and C shown in Dietary Reference Intakes for Japanese, 2005, were made (Table 2). They were given the diet only for the 1st week, the diet with vitamin mixture A for the 2nd week, the diet with vitamin mixture B for the 3rd week, and the diet with vitamin mixture C for the 4th week. One third of the dose was put into a small gelatinous capsule, and the capsule was administered three times daily after breakfast, lunch and dinner. A 10- $\mu$ L of finger blood was periodically taken at 08:00, 12:00, 18:00, and 21:00 an day 5 of each week and 32:00 which means 08:00 on day 6. The blood (10- $\mu$ L) was immediately put into a micro tube containing 200- $\mu$ L of cold 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 100 mM nicotinamide and the mixture was immersed in a hot water bath at 90°C for exactly 1.5 min, cooled on ice, and then centrifuged using an Eppendorf (15,000 rpm, 10 min, 4°C). The supernatant was stored at -20°C until needed. The treatment was done within 1 h after the blood collection. The NAD (NAD<sup>+</sup>+NADH) and NADP (NADP<sup>+</sup>+NADPH) were measured by the methods of Shibata and Murata (4) and Shibata and Tanaka (5), respectively.

Diurnal variations in the blood NAD and NADP were determined by two-way repeated measures analysis of variance with Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons. STATVIEW software (version 5.0; Abacus Concepts, Berkeley, CA) was used for all analysis.

Figure 1 shows the diurnal variations of blood NAD

E-mail: fukkie@shc.usp.ac.jp

Table 1. The composition of the diet.

| Energy and nutrients                                 | Amount |
|--|--------|
| Energy (kcal)  | 2,648  |
| Protein (g)  | 97.5   |
| Fat (g)  | 86.7   |
| Carbohydrates (g)                                    | 361    |
| Water-soluble vitamins <sup>1</sup>                  |        |
| Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)               | 1.12   |
| Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)            | 1.72   |
| Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)            | 1.12   |
| Vitamin B <sub>12</sub> ( $\mu$ g as cyanocobalamin) | 13.3   |
| Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)                  | 28.8   |
| Pantothenic acid (mg)                                | 6.75   |
| Folates ( $\mu$ g as pteroylmonoglutamic acid)       | 367    |
| Biotin ( $\mu$ g)                                    | —      |
| Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)                    | 125    |

<sup>1</sup> Nutrients are calculated by using the Standard Tables of Food Composition in Japan (3).

<sup>2</sup> The niacin equivalent intake was calculated as follows: the average tryptophan content in food protein is 1.1% and 1/60 (on a weight basis) of tryptophan taken was converted into niacin in the body.

$97.5 \times 1,000 \times (1.1/100) \times (1/60) = 17.9$  mg.

17.9 (biosynthesized from tryptophan) + 10.8 (niacin from food) = 28.8.

Table 2. The vitamin contents in the vitamin mixtures for 3 capsules per day.

|                          | V. mix. A     | V. mix. B     | V. mix. C       |
|--------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| Thiamin                  | 1.4 mg/d      | 4.2 mg/d      | 8.4 mg/d        |
| Riboflavin               | 1.6 mg/d      | 4.8 mg/d      | 9.6 mg/d        |
| Pyridoxine               | 1.4 mg/d      | 4.2 mg/d      | 8.4 mg/d        |
| Cyanocobalamin           | 2.4 $\mu$ g/d | 7.2 $\mu$ g/d | 14.4 $\mu$ g/d  |
| Nicotinamide             | 15 mg/d       | 45 mg/d       | 90 mg/d         |
| Pantothenic acid         | 6 mg/d        | 18 mg/d       | 36 mg/d         |
| Pteroylmonoglutamic acid | 240 $\mu$ g/d | 720 $\mu$ g/d | 1,440 $\mu$ g/d |
| Biotin                   | 50 $\mu$ g/d  | 150 $\mu$ g/d | 300 $\mu$ g/d   |
| Ascorbic acid            | 100 mg/d      | 300 mg/d      | 600 mg/d        |

and NADP. Neither the NAD nor the NADP content of the blood shows the diurnal variation regardless of the administered amount of nicotinamide. The blood concentrations of NAD in the 1st, 2nd, 3rd, and 4th week were  $29.9 \pm 4.2$  (mean  $\pm$  SD for 50 samples),  $27.7 \pm 4.1$ ,  $31.4 \pm 4.1$ , and  $30.0 \pm 4.9$  nmol/mL, respectively. The blood concentrations of NADP in the 1st, 2nd, 3rd, and 4th week were  $10.0 \pm 2.1$  (mean  $\pm$  SD for 50 samples),  $9.6 \pm 1.4$ ,  $10.3 \pm 1.7$ , and  $10.4 \pm 1.2$  nmol/mL, respectively. The concentrations of NAD and NADP did not increase according to the intake of nicotinamide and diurnal variations were not observed. So, we calculated the mean  $\pm$  SD by using whole values ( $n=200$ ). The blood NAD content was  $29.7 \pm 4.6$  nmol/mL, and the blood NADP content was  $10.1 \pm 1.6$  nmol/mL. These values were almost the same as reported previously (2). Recently, Creeke et al. (6) reported that blood NAD and NADP concentrations were not depressed in subjects

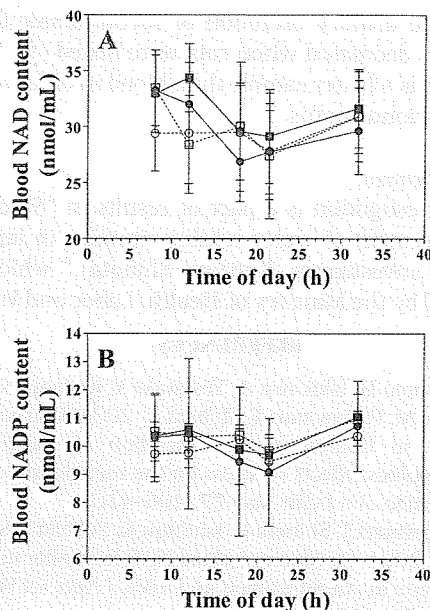


Fig. 1. The alterations in time of day of the blood NAD (A) and NADP (B) concentrations. ●, 1st-week (basal diet); ○, 2nd-week (basal diet+V. mix. A); ■, 3rd-week (basal diet+V. mix. B); □, 4th-week (basal diet+V. mix. C). Values are means  $\pm$  SD for 10 subjects.

with clinical pellagra. Their reported values in pellagrins were 29.7 nmol/mL in NAD, and 26.1 nmol/mL in NADP vs in healthy subjects 24.3 nmol/mL in NAD and 19.6 nmol/mL in NADP (6). They also reported that pellagrins were cured by administering 100 mg of nicotinamide, but increases in the levels of NAD and NADP were not observed (6). On the other hand, Fukuwatari et al. (2) revealed that exercise affects the blood NAD and NADP levels in humans and mice. In that case, to deal with acute energy expenditure, the salvage pathway of NAD would be accelerated by decreasing the catabolism of NAD. Generally, the blood concentrations of NAD and NADP are regulated by the reaction of nicotinamide phosphoribosyltransferase which is inhibited by NAD (7). We think that this is the main reason why the blood concentrations of NAD and NADP did not increase even when the intake of nicotinamide increased. The existence of a mechanism where by NAD and NADP levels of the blood were maintained constantly without diurnal variation, by the adjustment of the amount of the urinary excretion, was suggested.

Erythrocyte produces ATP by glycolysis. The TCA cycle doesn't exist. Therefore, we think that maintaining the concentration of NAD is equivalent to maintaining the ATP production ability constantly. On the other hand, NADP is an end product of the antioxidation system of the erythrocyte membrane. Therefore, we think that it has the mechanism maintained constantly.

We permitted that the urinary excretion of nicotinamide and its catabolites was not permitted until the blood NAD was saturated, and that the urinary excretion of nicotinamide catabolites increased for the first time after the blood NAD was saturated (8). Furthermore, we reported that the blood NAD did not change,

though the urinary excretion of nicotinamide and its catabolites decreased when rats were fasted (9). Therefore, urine is a better sample than blood in order to evaluate nutritional status.

#### Acknowledgments

This investigation is a part of results in "Studies on the requirement of water-soluble vitamins in Japanese (principal investigator, Katsumi Shibata)," which was supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare.

#### REFERENCES

- 1) Okamoto H, Ishikawa A, Yoshitake Y, Kodama N, Nishimuta M, Fukuwatari T, Shibata K. 2003. Diurnal variations in human urinary excretion of nicotinamide catabolites: effects of stress on the metabolism of nicotinamide. *Am J Clin Nutr* **77**: 406–410.
- 2) Fukuwatari T, Shibata K, Ishihara K, Fushiki T, Sugimoto E. 2001. Elevation of blood NAD level after moderate exercise in young women and mice. *J Nutr Sci Vitaminol* **47**: 177–179.
- 3) Resources Council, Science and Technology Agency. 2004. Standard Tables of Food Composition in Japan, Fifth revised and enlarged edition, 2004. Tokyo. (in Japanese).
- 4) Shibata K, Murata K. 1986. Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nutr Int* **2**: 177–181.
- 5) Shibata K, Tanaka K. 1986. Simple measurement of blood NADP and blood levels of NAD and NADP in humans. *Agric Biol Chem* **50**: 2941–2942.
- 6) Creeke PI, Dibari F, Cheung E, van den Briel T, Kyroussis E, Seal AJ. 2007. Whole blood NAD and NADP concentrations are not depressed in subjects with clinical pellagra. *J Nutr* **137**: 2013–2017.
- 7) Shibata K, Taguchi H, Nishitani Y, Okumura K, Shimabayashi Y, Matsushita N, Yamazaki H. 1989. End product inhibition of the activity of nicotinamide phosphoribosyltransferase from various tissues of rats by NAD. *Agric Biol Chem* **53**: 2283–2284.
- 8) Shibata K, Matsuo H. 1989. Effect of gradually increasing levels of nicotinamide in a niacin-free and tryptophan-limited diet on the blood NAD levels and the urinary excretion of nicotinamide metabolites in rats. *Agric Biol Chem* **53**: 1333–1336.
- 9) Shibata K, Iwai K. 1988. Effects of fasting on the blood NAD level, and urinary excretion of 5-hydroxyindole-3-acetic acid, and nicotinamide and its metabolites in rats. *Agric Biol Chem* **52**: 2287–2292.

定量法の違いによる母乳中のビタミン B<sub>6</sub> 量の変動柴田 克己<sup>\*1</sup>, 杉本 恵麻<sup>1</sup>  
廣瀬 潤子<sup>1</sup>, 福渡 努<sup>1</sup>

(2008年4月3日受付; 2008年12月11日受理)

**要旨:** 微生物定量法で測定した母乳中のビタミン B<sub>6</sub> 含量は HPLC 法で測定した値の 1/2 である。この原因を調べるために本実験を行った。ビタミン B<sub>6</sub> 要求株酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* は、遊離型ビタミン B<sub>6</sub> のみに応答する。この原因は、母乳に含まれるピリドキサル 5'-リン酸が、微生物定量法の前処理である既報の酸加水分解処理によって完全に遊離型に変換されなかったためであった。

**キーワード:** 母乳, ビタミン B<sub>6</sub>, 定量操作, ビタミン

われわれはわが国における母乳中の水溶性ビタミン含量を明らかにするために、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準(栄養所要量)に関する研究」および平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準(栄養所要量)に関する研究」において、健全な授乳婦から得た母乳中の水溶性ビタミンの含量を分析した。その成果は、資料として文献 1) に報告した。

母乳中のビタミン B<sub>6</sub> 含量を微生物定量法で測定すると、0.1 mg/L 前後という数値が得られた。この値は、日本人の食事摂取基準(2005 年版)<sup>2)</sup> の採用値 0.25 mg/L とは異なるものであった。日本人の食事摂取基準(2005 年版)<sup>2)</sup> では、伊佐ら<sup>3)</sup> の報告による HPLC 法で測定したデータが採用されている。

本研究では、定量法の違いによる母乳中のビタミン B<sub>6</sub> 量の違いが何に起因するのかを明らかにすることを目的として、同一の母乳サンプル中のビタミン B<sub>6</sub> 量を HPLC 法と微生物定量法によって測定し、違いの原因が特定できたので報告する。

## 実験方法

## 1. 母乳採取

滋賀県立大学倫理委員会の承認を得た上で、本研究の主旨について説明を行い、同意の得られた者から母乳を採取した。採取時間は指定せず、50 mL 遠心チューブ(住友ベークライト(株), 東京, MS-56500)に母乳を 10 mL 程度採集した。ただちに -20℃ の冷凍庫に置いて、分析に使用するまで保存した。

## 2. 微生物定量方法

母乳中のビタミン B<sub>6</sub> は、AOAC Official method<sup>4)</sup> の記載にしたがって、ビタミン B<sub>6</sub> 要求株である酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 を用いた微生物定量法にて測定した。

なお、*Saccharomyces carlsbergensis* は、遊離型のビタミン B<sub>6</sub> にのみ応答するので、母乳中のリン酸エステル型のビタミン B<sub>6</sub> をすべて遊離型にする操作を、五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアルに従い、酸加水分解を行った<sup>5)</sup>。その概略を図 1 に示した。

## 3. HPLC 定量方法

母乳中のビタミン B<sub>6</sub> として、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) とピリドキサル (PL) が含まれていることが知られている<sup>3)</sup> ので、PLP と PL を合算したものをビタミン B<sub>6</sub> として示した。測定は、Rybak & Pfeiffer<sup>6)</sup> の HPLC 法を改変して行った。その分析条件を表 1 に示した。

## 3.1 おもな試薬の調製方法

## PLP 標準溶液

PLP (Pyridoxal Phosphate Monohydrate, 式量 = 265.16) は、和光純薬工業株式会社より購入した。PLP の濃度(水溶液)は  $\epsilon_{388\text{nm}} = 3,441$  より求めた。

## PL 標準溶液

PL (Pyridoxal Hydrochloride Standard, 式量 = 203.62) は和光純薬工業(株)より購入した。PL 濃度(水溶液)は  $\epsilon_{316\text{nm}} = 5,388$  より求めた。

**3.2 HPLC 測定用ビタミン B<sub>6</sub> 測定用試料の調製方法** 調製法を図 2 に示した。ねじ口チューブ (2 mL 用) に母乳 0.3 mL と 5% メタリン酸溶液 0.3 mL を加え、5 分

\* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp)

<sup>1</sup> 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科 (522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500)

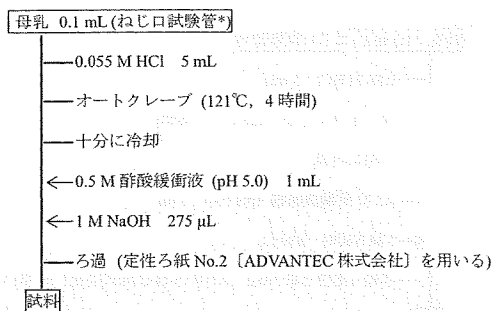


図1 微生物を用いる母乳中のビタミンB<sub>6</sub>の測定用試料溶液の調製方法

\* (株)マルエム (大阪) のNR-10 ねじ口試験管。

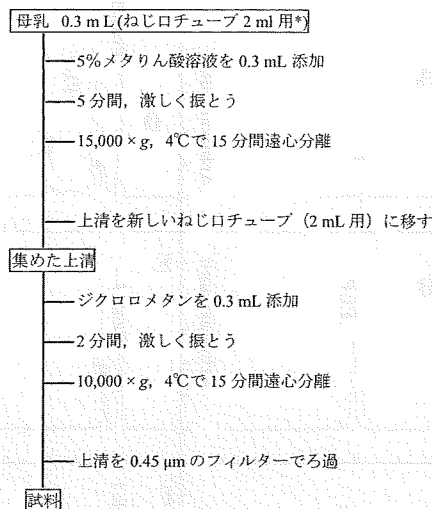


図2 HPLCを用いる母乳中のビタミンB<sub>6</sub>の測定用試料溶液の調製方法

\* ビーエム機器(株)(東京)のサンプルストックチューブT-203。

表1 PLおよびPLPの同時定量用HPLCの分析条件

|           |  |
|-----------|--|
| 分析カラム     | Tosoh ODS 80Ts<br>(平均粒子直径, 5 µm; 4.6 mm I.D. × 250 mm, 東ソー(株))   |
| 移動相と流速    | 5%アセトニトリルを含む 50 mM NaHPO <sub>4</sub> (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> の滴下により pH を 3.1 に調整), 0.7 mL/min |
| 反応液と流速    | 22 mM 亜塩素酸ナトリウム, 0.1 mL/min  |
| 検出法 (蛍光)  | 励起波長 325 nm, 蛍光波長 425 nm   |
| カラム温度     | 35°C   |
| 反応コイル温度   | 75°C   |
| 試料導入装置内温度 | 室温   |
| 試料注入量     | 20 µL  |
| PLの溶出時間   | 約 8.7 分  |
| PLPの溶出時間  | 約 10.2 分   |

間振とうさせた。振とう後, 10,000 × g, 4°C で 15 分間遠心し, 上清を新しいねじ口チューブ (2 mL 用) に移した。ジクロロメタン 0.3 mL を加え, 2 分間振とうさせた。10,000 × g, 4°C で 15 分間遠心し, 上清をマイクロフィルター (Millex-HV, 0.45 µm, 日本ミリポア(株), 東京) でろ過した。このろ液 20 µL を HPLC システムに注入した。

#### 4. 統計学的解析

数値はすべて平均値 ± 標準偏差で表した。測定方法の違いによる母乳中ビタミンB<sub>6</sub>量の比較には, paired *t*-test を行い, *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。

## 結 果

### 1. HPLC 法と微生物定量法による母乳中ビタミンB<sub>6</sub>の定量

母乳 81 検体を HPLC 法と微生物定量法で測定した結果を図3に示した。その結果, HPLC 法では 0.23 ± 0.06 mg/L であった。HPLC 法では, 母乳を除脂肪, 除タンパクした試料を HPLC に注入し, PL と PLP を分離

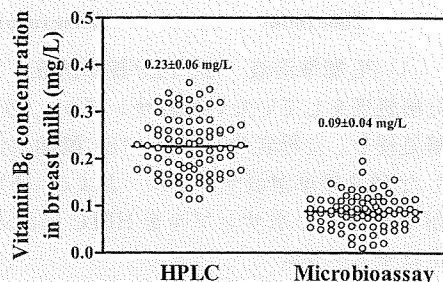


図3 HPLC 法と微生物定量法による母乳中のビタミンB<sub>6</sub>値の比較

\* 横線はおのこの測定方法の平均値を示す (各 *n* = 81)。ビタミンB<sub>6</sub>量はピリドキシン量 (分子量 = 169.18) として示した。微生物定量法の前処理としては図1の加水分解操作を行った。

して測定した。そのときの PL 標準液を注入したときのクロマトグラムを図4-Aに, PLP 標準液を注入したときのクロマトグラムを図4-Bに示した。そして, 母乳試料を注入した時のクロマトグラムを図4-Cに示した。上記のビタミンB<sub>6</sub>の値は, PLP と PL を合算したものである。

一方, 微生物定量法では, 0.09 ± 0.04 mg/L であった。すなわち, 既報のように<sup>1)3)7-12)</sup>, HPLC 法で測定した値は微生物定量法で測定した値の約 2 倍の値を示した。

### 2. HPLC 法と微生物定量法による母乳中ビタミンB<sub>6</sub>量の違いの原因の解明

同一の母乳を HPLC 法と微生物定量法で測定し, 差異が認められたので, この原因を追及した。原因としては, 微生物定量法で用いた酸加水分解処理による PLP → PL 変換反応が完全ではなかった可能性が高いと考えられたので, 微生物定量法の処理 (図1) をした試料を HPLC



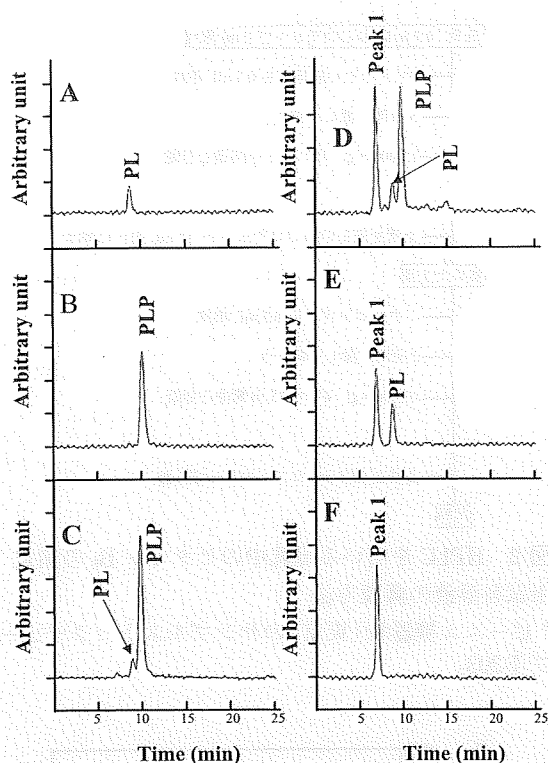


図4 (A) PL 標準溶液, (B) PLP 標準溶液, (C) 酸加水分解処理をしていない母乳サンプル, (D) 酸加水分解処理をした母乳サンプル, (E) 酸加水分解処理をした PLP 標準溶液サンプル, および (F) 酸加水分解処理をした水サンプルを HPLC に注入した時のクロマトグラム

\* クロマトグラム (A) : PL の溶出時間は約 8.7 分。9.95 nmol/L の PL 標準溶液を 20  $\mu$ L 注入した (絶対量は 0.20 pmol)。クロマトグラム (B) : PLP の溶出時間は約 10.2 分である。11.5 nmol/L の PLP 標準溶液を 20  $\mu$ L 注入した (絶対量は 0.23 pmol)。クロマトグラム (C) : 8.7 分のピークは PL と, 9.7 分のピークは PLP と同定した。0.3 mL の母乳を図 2 の処理を行い, ろ液を適当に希釈 (この場合は, 水で 30 倍希釈) した液を 20  $\mu$ L 注入した (PL の絶対量は 0.16 pmol, PLP の絶対量は 0.29 pmol)。クロマトグラム (D) : 6.8 分のピーク (Peak 1) は酸加水分解処理を行ったために出現したピークである。また, 8.7 分のピークは PL と, 9.7 分のピークは PLP と同定した。0.1 mL の母乳を図 1 の処理を行い, ろ液を 20  $\mu$ L 注入した (PL の絶対量は 0.26 pmol, PLP の絶対量は 0.26 pmol)。クロマトグラム (E) : 6.8 分のピークは酸加水分解処理を行ったために出現したピークである。また, 8.7 分のピークは PL と同定した。1,100 nmol/L の PLP 標準溶液を 0.1 mL 取り, 図 1 の処理を行い, ろ液を 20  $\mu$ L 注入した (PL として, 0.34 pmol が検出された)。なお, 理論値は 0.34 pmol である。クロマトグラム (F) : 6.8 分のピークは酸加水分解処理を行ったために出現したピークである。0.1 mL の水を図 1 の処理を行い, ろ液を 20  $\mu$ L 注入した。

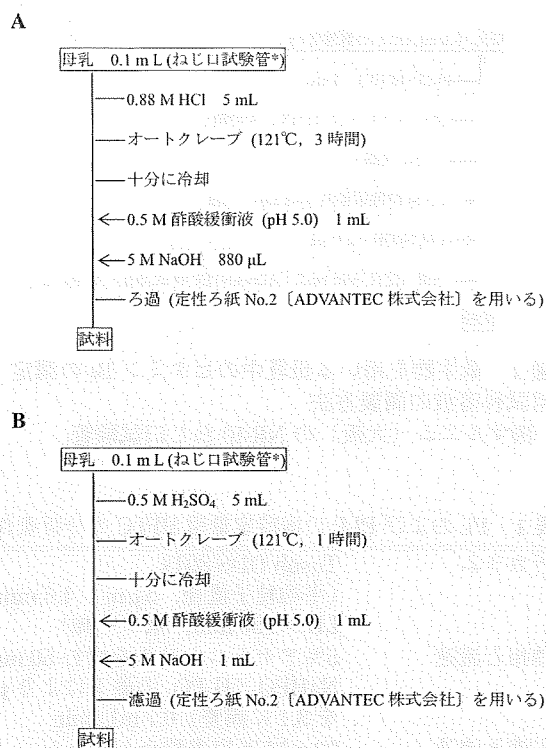


図5 微生物を用いる母乳中のビタミン B<sub>6</sub> の測定用試料溶液の調製方法の検討

(A) 0.88 M 塩酸; (B) 0.5 M 硫酸。\* (株)マルエム (大阪) の NR-10 ねじ口試験管

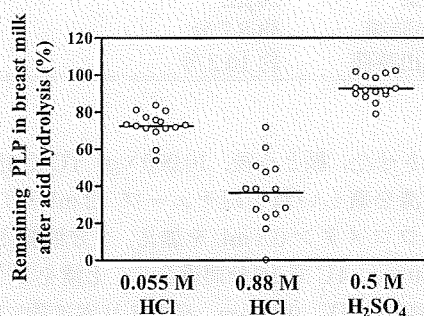


図6 酸加水分解処理後の母乳中 PLP 残存量の比較 横線は各処理の平均値を示す (各  $n=15$ )。酸加水分解処理を行わずに HPLC 法で測定した母乳中の PLP 量を 100% とした。

に注入した。そのときのクロマトグラムは図 4-D に示したように, PLP のピークが認められた。すなわち, 図 1 に示した酸加水分解処理では, 母乳中の PLP は完全に PL に変換されていないことがはじめて明らかとなった。なお, PLP 標準液の場合は同様の処理により完全に PLP が PL に変換された (図 4-E)。図 4-E における一番はじめのピーク (6.8 分, peak 1 と表示) は, 酸加水分解処理によって出現するピークである (参照, 図 4-F)。

### 3. 酸加水分解によるPLP → PLへの変換条件の検討

そこで、微生物定量用の試料作成のための酸加水分解条件を、HPLC法を利用して検討した。

母乳0.1 mLに0.055 M HCl (参照, 図1), 0.88 M HCl (参照, 図5-A), 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (参照, 図5-B)のいずれかを5 mL加えて1~3時間オートクレーブしたのち, 0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) と水酸化ナトリウムで中和し, ミクロフィルター (Millex-HV, 0.45 μm, 日本ミリポア(株), 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。

そのときの結果を, 図6に示した。酸加水分解を行わずに測定した母乳中のPLP量を100%とすると, 0.055 M HCl処理 (図1の処理) によって72.4±7.7%のPLPが分解されなかった。同様に, 0.88 M HCl処理 (図5-Aの処理) では36.5±17.9%の, 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>処理 (図5-Bの処理) では92.6±6.7%のPLPが加水分解されなかった。母乳中のPLPを完全にPLに変換する酸加水分解法を見出すことは困難であった。

## 考 察

微生物定量法で測定した母乳中のビタミンB<sub>6</sub>含量はHPLC法で測定した値の1/2であった (図3)。

五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル<sup>5)</sup>に記載の方法である0.055 M HClを用いた酸加水分解処理では, 母乳中の約28%のPLPがPLに変換されたにすぎなかった (図6)。この結果は, 従来の酸加水分解処理では母乳中のPLPの一部しかPLに変換することができず, その処理を行った母乳試料を微生物定量法に供しても, 母乳に元々含有されていたPLに, PLP由来の若干のPLを合算しているにすぎないことが, はじめて明らかとなった。

母乳中のPLPを完全に酸加水分解できることを期待して0.88 M HClおよび0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いた酸加水分解処理を行ったが, 酸加水分解された母乳中のPLPはそれぞれ64%, 8%に過ぎなかった。この結果は, 微生物定量法による母乳中のビタミンB<sub>6</sub>量の場合, PLPの酸加水分解が十分に行えないために, 正確なビタミンB<sub>6</sub>量を求めることはできないことを示している。このため, 母乳中のビタミンB<sub>6</sub>量を測定するには, HPLC法を用いるべきである。

本研究は, 平成16-18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 (栄養所要量) の策定に関する研究」 (主任研

究者, 柴田克己) の成果の一部である。関係各位に謝意を表す。特に, 母乳採取にあたりご協力いただいた長尾早枝子先生に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 柴田克己, 遠藤美佳, 山内麻衣子, 廣瀬潤子, 福渡努 (2009) 日本人の母乳中 (1~5 か月) の水溶性ビタミン含量の分布 (資料). 日本栄養・食糧学会誌, 印刷中.
- 2) 厚生労働省 (2004) 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.
- 3) 伊佐保香, 垣内明子, 早川享志, 佐々木晶子, 新澤佳代, 戸谷誠之, 柘植治人 (2004) 日本人の母乳中ビタミンB<sub>6</sub>含量. ビタミン **78**, 437-40.
- 4) AOAC (2000) AOAC Official method 961.15. Vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine) in food extracts. Microbiological methods. In: AOAC International, Official Methods of Analysis (Horwitz W, ed), 17th ed., Chapter 45, p. 55-7, AOAC International, Arlington, VA.
- 5) 文部科学省 (2005) 五訂増補 日本食品標準成分表分析マニュアル. 科学技術学術審議会資源調査分科会食品成分委員会資料. p.82-4.
- 6) Rybak ME, Pfeiffer CM (2004) Clinical analysis of vitamin B<sub>6</sub>: Determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite post column derivatization. *Anal Biochem* **333**: 336-44.
- 7) West KD, Kirksey A (1976) Influence of vitamin B<sub>6</sub> intake on the content of the vitamin in human milk. *Am J Clin Nutr* **29**: 961-9.
- 8) Sneed SM, Zane C, Thomas MR (1981) The effects of ascorbic acid, vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub>, and folic acid supplementation on the breast milk and maternal nutritional status of low socioeconomic lactating women. *Am J Clin Nutr* **34**: 1338-46.
- 9) Styslinger L, Kirksey A (1985) Effects of different levels of vitamin B<sub>6</sub> supplementation on vitamin B<sub>6</sub> concentrations in human milk and vitamin B<sub>6</sub> intakes of breastfed infants. *Am J Clin Nutr* **41**: 21-31.
- 10) Reinken L, Dockx F (1985) Vitamin B<sub>6</sub> and protein concentrations in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Klin Padiatr* **197**: 40-3.
- 11) Borschel MW, Kirksey A, Hannemann RE (1986) Effects of vitamin B<sub>6</sub> intake on nutrition and growth of young infants. *Am J Clin Nutr* **43**: 7-15.
- 12) Sakurai T, Furukawa M, Asoh M, Kanno T, Kojima T, Yonekubo A (2005) Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* **51**: 239-47.

*J Jpn Soc Nutr Food Sci* 62: 131–135 (2009)

**Research Note**

Differences in Measured Amounts of Vitamin B<sub>6</sub> in Breast Milk  
according to Determination Method

Katsumi Shibata,<sup>\*,1</sup> Ema Sugimoto,<sup>1</sup> Junko Hirose,<sup>1</sup>  
and Tsutomu Fukuwatari<sup>1</sup>

(Received April 3, 2008; Accepted December 11, 2008)

**Summary:** The content of vitamin B<sub>6</sub> in breast milk measured by the microbiological method has been reported to be 1/2 of the value measured by the HPLC method. In order to confirm this discrepancy, the present experiment was performed. *Saccharomyces carlsbergensis* is a vitamin B<sub>6</sub> auxotrophic yeast that cannot respond to the bound type of vitamin B<sub>6</sub>, such as pyridoxal 5'-phosphate, but only to the free form of vitamin B<sub>6</sub>. This discrepancy was found to be due to the fact that pyridoxal 5'-phosphate in breast milk had not been completely converted into the free type by the recommended acid hydrolysis.

**Key words:** breast milk, vitamin B<sub>6</sub>, quantity method, vitamin

\* Corresponding author (E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp)

<sup>1</sup> Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522–8533, Japan

## 日本人の母乳中 (1-5 か月) の水溶性ビタミン含量の分布 (資料)

柴田 克己<sup>\*1</sup>, 遠藤 美佳<sup>1</sup>, 山内 麻衣子<sup>1</sup>  
 廣瀬 潤子<sup>1</sup>, 福渡 努<sup>1</sup>

(2008年4月3日受付; 2009年1月26日受理)

**要旨:** 日本人母乳中の水溶性ビタミン含量に関する報告は、すでに多くあるが、食生活の変化により変動するものと思われるので定期的な測定が必要である。そこで、最近の日本人の母乳中のすべての水溶性ビタミン含量を測定し、各水溶性ビタミン含量の分布図をまとめたので資料として報告する。各ビタミンの平均値 $\pm$ SDは以下に示す値であった。ビタミンB<sub>1</sub>含量はチアミン塩酸塩として $0.12\pm 0.06$  mg/L, ビタミンB<sub>2</sub>はリボフラビンとして $0.39\pm 0.13$  mg/L, ビタミンB<sub>6</sub>はピリドキシンとして $0.10\pm 0.04$  mg/L, ビタミンB<sub>12</sub>はシアノコバラミンとして $0.68\pm 0.26$   $\mu$ g/L, ナイアシンはニコチンアミドとして $1.4\pm 0.47$  mg/L, パントテン酸は $7.0\pm 2.5$  mg/L, 葉酸はプテロイルモノグルタミン酸として $46\pm 22$   $\mu$ g/L, ビオチンは $4.6\pm 2.6$   $\mu$ g/L, ビタミンCはアスコルビン酸として $46\pm 11$  mg/Lであった。

**キーワード:** 日本人, 母乳, ビタミン, 乳児, 含量, 分布

乳児 (0-5 か月) は、母乳のみで正常に発育する。したがって、乳児 (0-5 か月) の栄養素の必要量は、母乳の栄養素濃度 $\times$ 哺乳量で求めることができる。母乳中の水溶性ビタミン含量に関して、すでに多く報告されているが<sup>1-22)</sup>、測定方法やサンプリングの違いなどによって数値が異なっているものもあるため、記載された方法論を検証し、精度の高い値を求めることが必要である。さらに、食生活の変化により変動するものと思われるので定期的な測定が必要であり、データを蓄積していくことは重要な意義をもつものと考えられる。また、5年ごとに行われている食事摂取基準の改定に必要なエビデンスの構築にも寄与するものである。

そこで、最近の日本人の母乳中のすべての水溶性ビタミン含量を測定し、各水溶性ビタミン含量の分布図をまとめた。本論文の主眼は、独創的な研究から新しい事実と価値ある結論を提示することではなく、食事摂取基準を始めとする研究・実践活動に有用な情報を提供することであるため、報文ではなく資料とした。

### 方 法

#### 1. 母乳の採取方法

**1.1 被験者** 本研究は滋賀県立大学倫理審査委員会の承認を得た上で、本研究の主旨について説明を行い、同意の得られた者から採取し、妊娠ならびに出産が正常な経過で満期出産し、満月齢で1-5か月の乳児を完全母

乳哺育している日本人の母乳を対象にした。

**1.2 母乳採取** 時間は指定せず、子どもに授乳後または助産院に診察に来た際、母乳パック (カネソン本舗社製) に採取して、ただちに家庭用冷凍庫にて凍結した。この冷凍母乳を、凍結状態のまま、滋賀県立大学に送付してもらった。到着後は、分析に使用するまで $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

#### 1.3 ビタミンの測定方法

**1.3.1 ビタミンB<sub>1</sub>の分析** 母乳1 mLを遠心分離した。その結果、生じた一番上のクリーム状の層を取り除き、その下の黄色い液を集めた (中間層という)。この中間層150  $\mu$ Lに5%トリクロロ酢酸 (TCA) 300  $\mu$ Lを加えたのち、遠心分離を行い、タンパク質を除去した。得られた上清をマイクロフィルター (ろ過精度、0.45  $\mu$ m) でろ過し、そのろ液を、HPLCに注入した。HPLCの分析条件は、文献23)に記載された方法に従った。

**1.3.2 ビタミンB<sub>2</sub>の分析** 母乳中のビタミンB<sub>2</sub>はルミフラビン法にて測定した<sup>24)</sup>。まず、氷冷水440  $\mu$ Lに母乳100  $\mu$ Lを加え、 $80^{\circ}\text{C}$ 、15分間加熱した。冷却後、10% TCA 200  $\mu$ Lを加え、遠心分離後、上清200  $\mu$ Lをとり、1 M NaOH 200  $\mu$ Lを加えアルカリ性にした後、ガラス製容器に入れた。光分解装置 (液面から20 cm離れた高さから、蛍光灯 (10W) の光が当たるように木の箱 (縦35 cm $\times$ 横25 cm $\times$ 高さ28 cm) を作り、内面をすべてアルミ箔で覆い、内部で蛍光灯の光が反射するようにした)

\* 連絡者・別刷請求先 (E-mail : kshibata@shc.usp.ac.jp)

<sup>1</sup> 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科 (522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500)