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 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¹⁾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²⁾や肝臓障害³⁾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は、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)」⁴⁾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⁴⁾。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

データを参考にする必要性もある。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⁵⁾、パントテン酸⁶⁾、ビオチン⁷⁾、葉酸⁸⁾ 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¹⁰⁾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¹¹⁾、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¹¹⁾、リボフラビン¹²⁾、ビタミンB₆代謝産物4-ピリドキシン酸(4-PIC)¹³⁾、トリプトファン¹⁴⁾、セロトニン¹⁵⁾、アンスラニル酸¹⁶⁾、キヌレン酸¹⁷⁾、キサントレン

酸¹⁸⁾、3-ヒドロキシアンスラニル酸¹⁸⁾、キノリン酸¹⁹⁾はHPLC法により測定した。ニコチンアミド(Nam)²⁰⁾、N¹-メチルニコチンアミド(MNA)¹⁴⁾、N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)²¹⁾、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)²⁰⁾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²²⁾、パントテン酸²³⁾、葉酸²⁴⁾、ビオチン²⁵⁾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⁺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²⁶⁾。肝臓以外にはニコチン酸からNAD⁺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.

生合成経路は存在しない¹⁷⁾。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と考えられた。

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⁵⁾、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、キサンツレン酸、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²⁷⁾、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²⁸⁾。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²⁹⁾、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ムコン酸-セミアルデヒドカルボキシラー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B₆異化代謝産物4-ピリドキシン酸、ビタミンB₁₂、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 B₁₂ (D), pantothenic acid (E), folic acid (F) and biotin (G)

Each value is expressed as the mean $\pm$ 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 $\pm$ 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³⁰⁾。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*¹-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*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28 (1988).
- 21) Shibata, K. Ultramicro-determination of *N*¹-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 B₁₂ 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 α -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).