

①

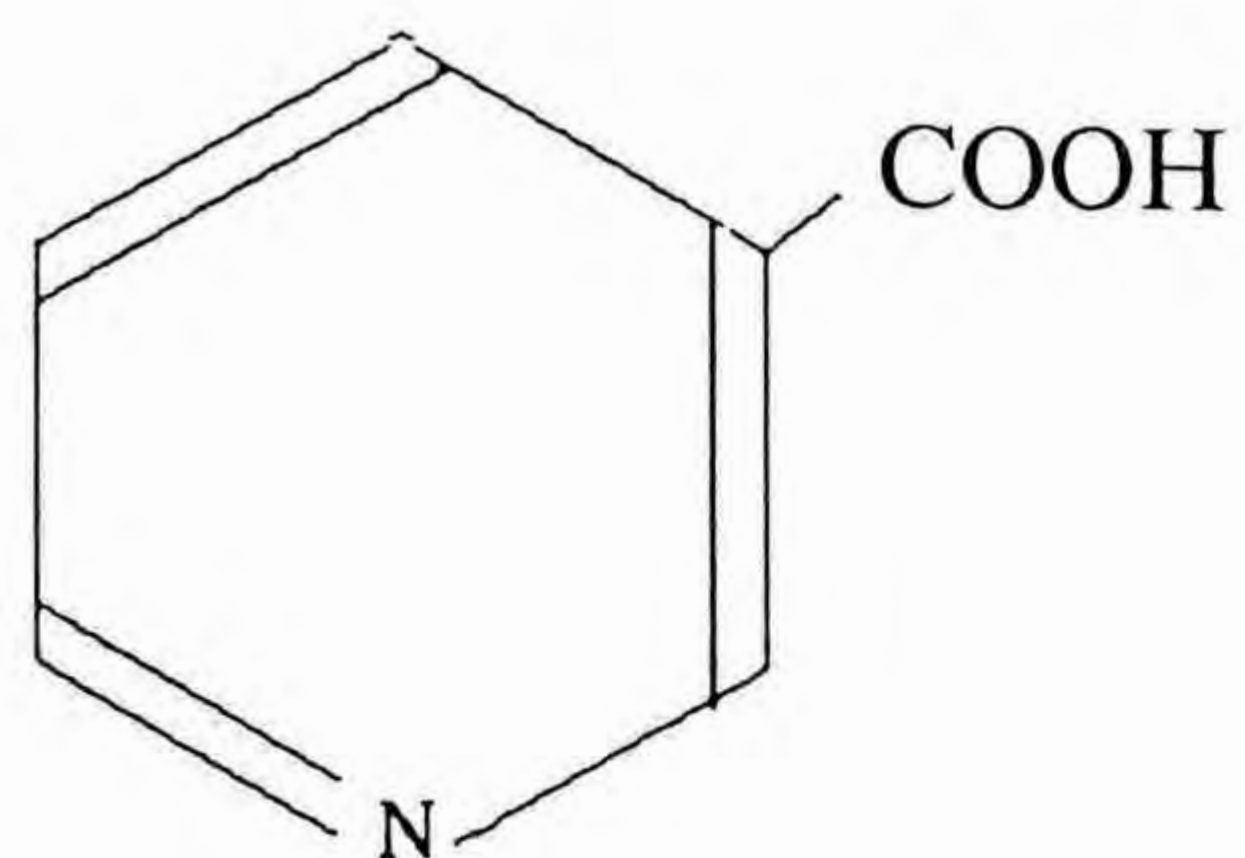
# 食品中結合型ナイアシンの定量法とその利用性

1991

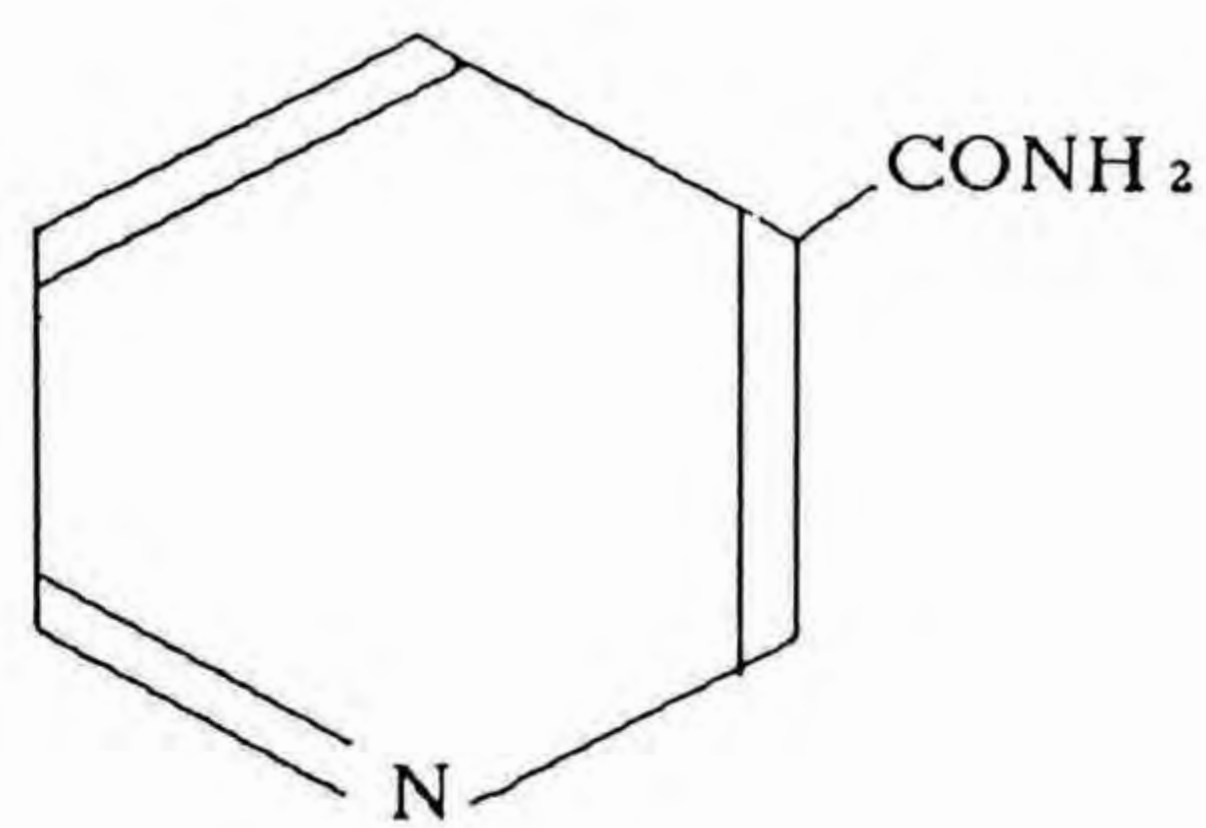
岡本 秀己



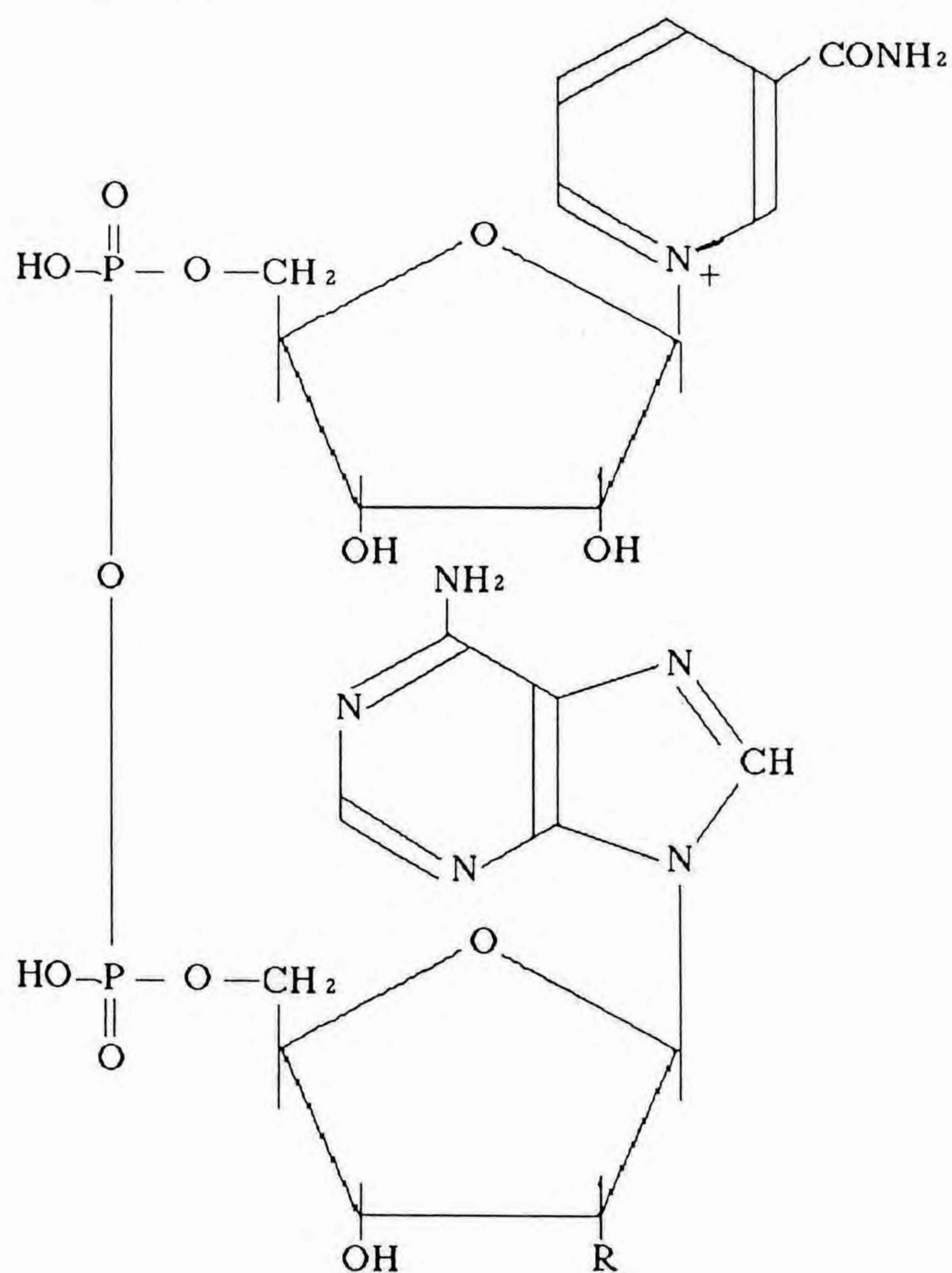
主たる物質の化学構造式



Nicotinic Acid



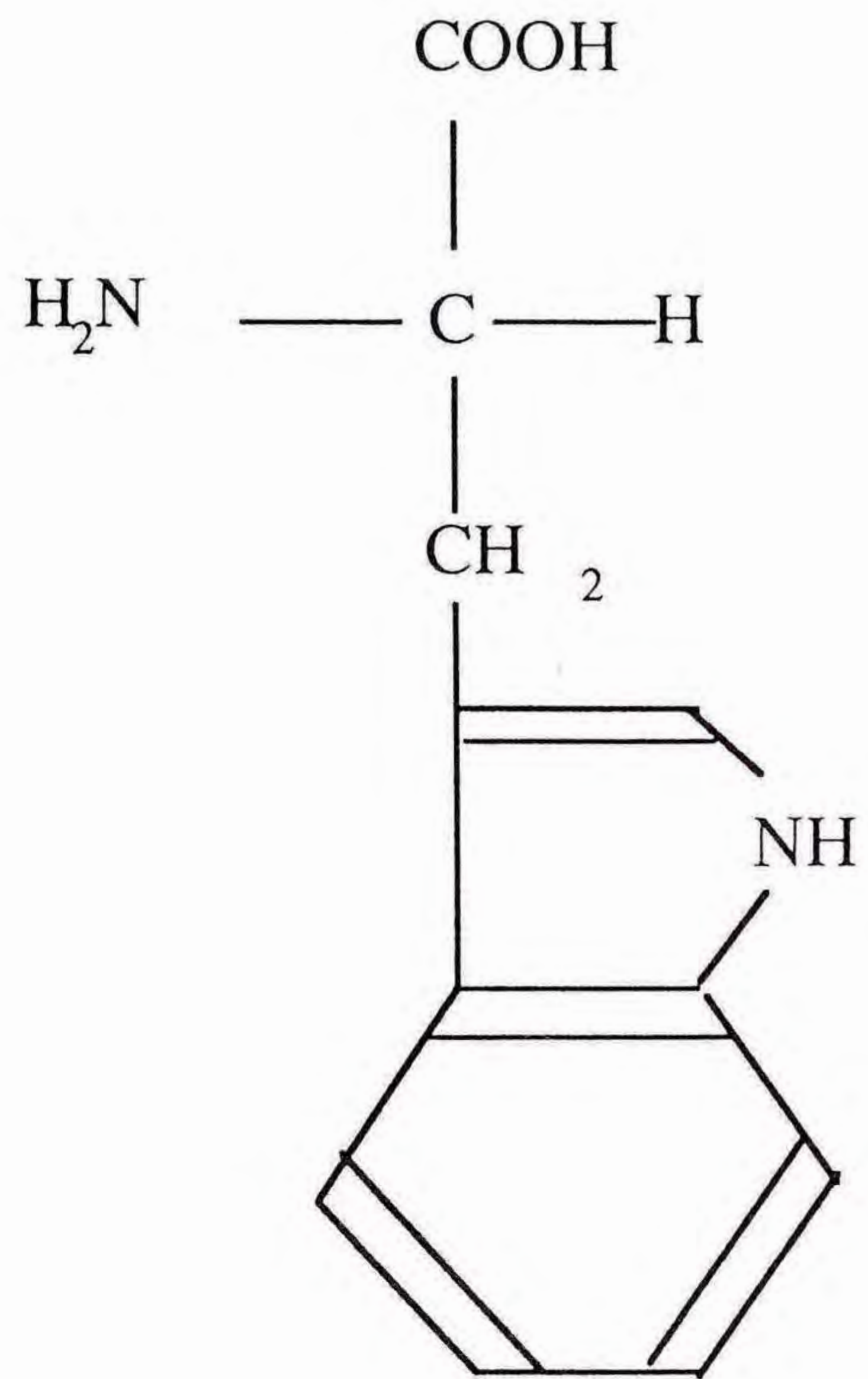
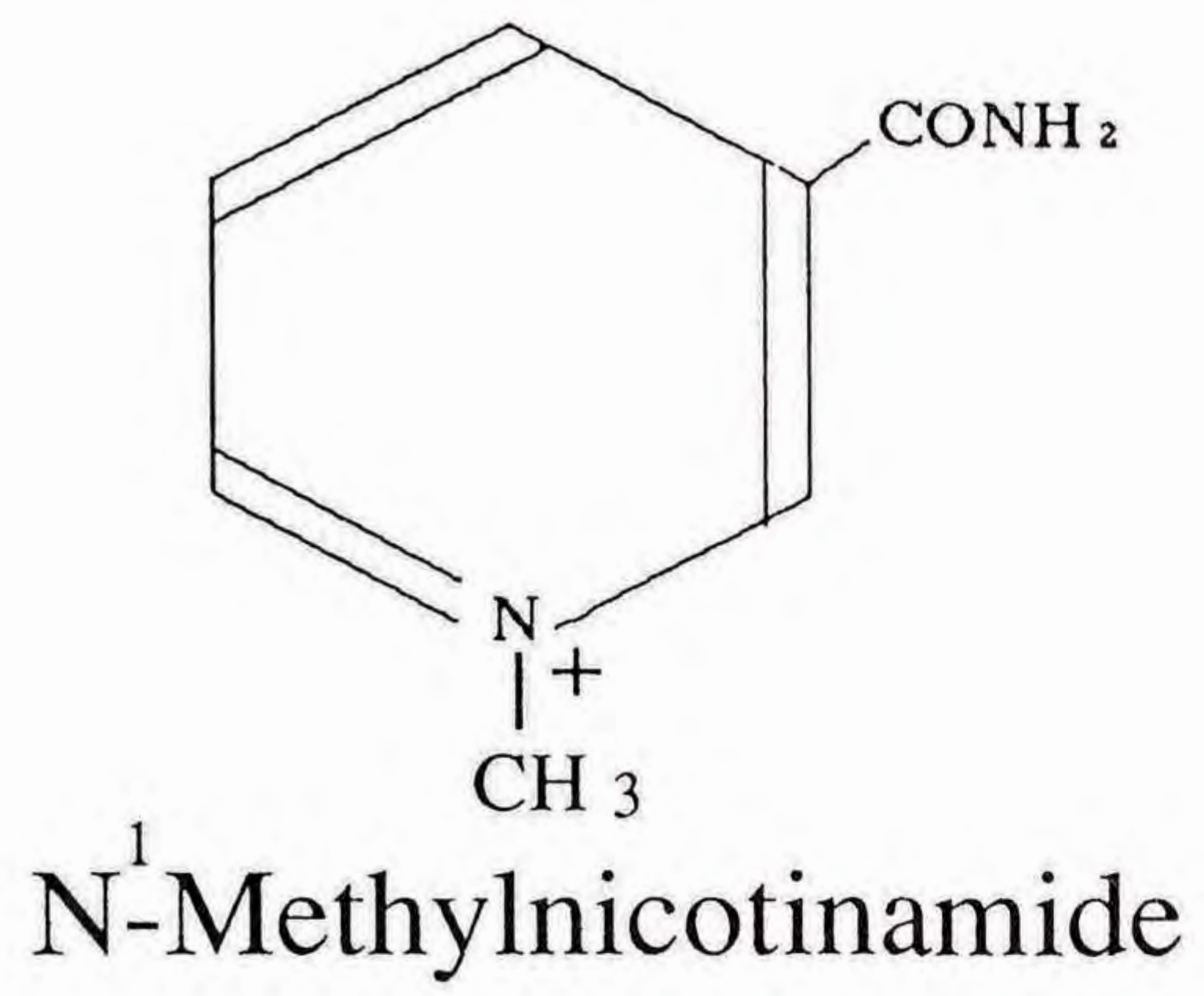
Nicotinamide



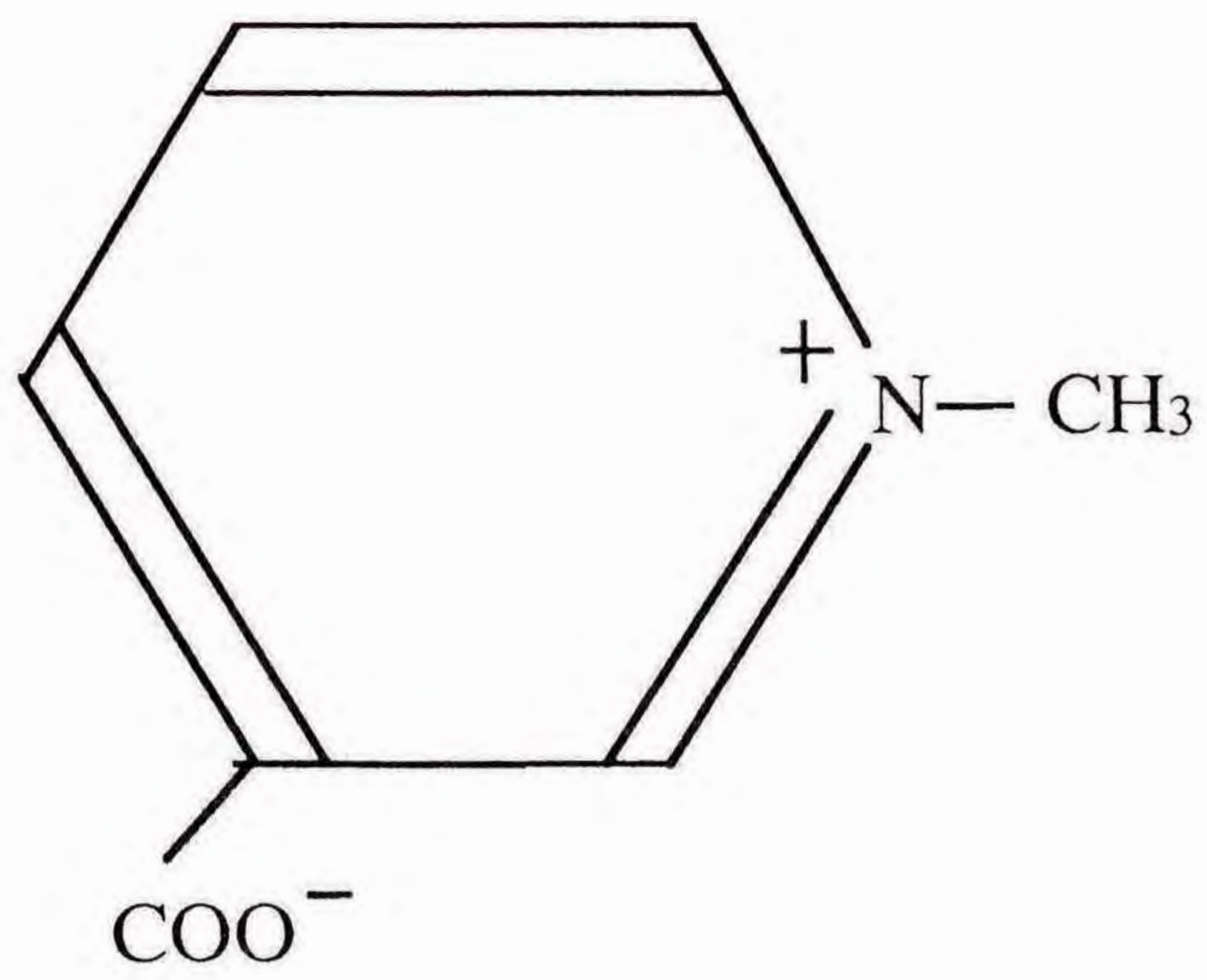
NAD(R=OH) ,Nicotinamide adenine dinucleotide

NADP(R=OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>),Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate





Tryptophan



Trigonelline



## 目次

序論		・・・1
第1章	穀類中ナイアシンの微生物定量法における結合型ナイアシンの影響	・・・5
第1節	<i>L. plantarum</i> の各種ナイアシン誘導体による増殖の比較	・・・5
第2節	試料分解法と測定法の違いによるナイアシン測定値の比較	・・・12
第3節	Non-diffusibleナイアシン標品の <i>L. plantarum</i> に対する利用性	・・・13
第4節	トウモロコシおよびダイズ中ナイアシンの <i>L. plantarum</i> に対する利用性	・・・15
第5節	イオン交換カラムクロマトグラフィーによる結合型ナイアシンの精製とその <i>L. plantarum</i> による利用性	・・・20
第6節	<i>L. plantarum</i> による結合ナイアシンの取り込み	・・・25
第7節	遊離型および結合型ナイアシンの分別定量法	・・・28
第8節	小括	・・・29
第2章	調理・加工による穀類中ナイアシンの変動	・・・31
第1節	小麦加工品製造過程におけるナイアシンの変動	・・・31
第2節	米、米ヌカ調理中におけるナイアシンの変動	・・・37
第3節	考察	・・・42
第4節	小括	・・・43
第3章	加水分解酵素による米ヌカ結合型ナイアシンの可溶化と有効化	・・・45
第1節	加水分解酵素によるナイアシンの可溶化および有効化	・・・45
第2節	セルラーゼと他の水解酵素による2段酵素反応のナイアシン可溶化および有効化	・・・50



第3節	セルラーゼ、エステラーゼのナイアシン可溶化および有効化 に及ぼす影響	・・52
第4節	米ヌカ抽出物および酵素処理物のイオン交換カラムクロマト グラフィ	・・54
第5節	セルラーゼ処理物の非吸着画分のエステラーゼ処理	・・59
第6節	小括	・・61
第4章	酵素処理した結合型ナイアシンの生物学的有効性	・・63
第1節	米ヌカに対するセルラーゼ処理がラットのナイアシン利用に 与える影響	・・63
第2節	米ヌカ抽出液に対するセルラーゼ処理がラットのナイアシン 利用に与える影響	・・71
第3節	小括	・・77
第5章	ヒトにおけるナイアシン利用率測定法の検討	・・79
第1節	ヒトのナイアシン栄養実験法の検討	・・79
第2節	ヒトの血中、尿中ナイアシン誘導体含量に及ぼすニコチン酸 投与の影響	・・90
第3節	ヒトの玄米胚芽中ナイアシン利用性の検討の試み	・・99
第4節	小括	・103
第6章	HPLCによる食品中ナイアシンの定量	・106
第1節	HPLCによるナイアシン関連物質の分離	・106
第2節	HPLCによる食品中ナイアシンの定量	・112
第3節	米の発芽過程におけるナイアシンの挙動	・127
第4節	小括	・131
総括		・133
謝辞		・142



文献

・143

本論文に直接関係する研究発表

・147



## 序論

ナイアシンは、脂肪、炭水化物、アミノ酸の代謝など、多くの生物学的反応に関与している重要なビタミンである<sup>1)</sup>。また、ビタミンB群の中で最も所要量の多いビタミンであり<sup>2)</sup>、生体内含量も最も多く<sup>3)</sup>、動物ではトリプトファンから生合成されるなど<sup>4, 5, 6, 7)</sup>、特異なビタミンといえる。

ナイアシンという名称は、ニコチン酸とニコチンアミド、更に、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(NMN)、ニコチン酸アデニンジヌクレオチド、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(以下 NAD)及びそのリン酸化物(以下 NADP)など、Lactobacillus plantarum (以下 L. plantarum) で定量されるニコチン酸と等価の化合物を総称する<sup>8)</sup>。

ナイアシンの研究の歴史は古く、1918年、Goldbergerらがトウモロコシを主食とする人たちとペラグラの発生の関係から、ある種の栄養欠乏を示唆したことから始まった<sup>9)</sup>。1937年、Elvehjemらが黒舌病のイヌ(ヒトのペラグラ症状と似ている)の治療にニコチン酸が有効であることを示し、さらに抗ペラグラ因子を肝臓から単離し、ニコチンアミドであることを明かにしている<sup>10)</sup>。

ペラグラは、皮膚病、痴呆症、そして死に至る病気として、かつて、南アメリカやインドなどトウモロコシを主食とする多くの地域で発生していたが、現在でもなお、アフリカやアジアなどの発展途上の国では深刻な問題となっている<sup>11)</sup>。

このペラグラの原因は、トウモロコシのアミノ酸インバランス<sup>12)</sup>や貯蔵中に発生するかび<sup>13)</sup>などが原因のひとつであるとする研究報告、あるいはアルコールの多飲<sup>14)</sup>、紫外線<sup>15)</sup>、ホルモン<sup>16)</sup>などを原因とする報告がある。しかしながら、トウモロコシをアルカリ性の石灰水(lime water)で加熱調理する中央アメリカでは、ペラグラの罹患率は極めて低く、この調理法により、トウモロコシの結合型ナイアシンが遊離化されているということから<sup>17)</sup>、ペラグラの主たる原因は、穀類中に存在する結合型ナイアシンの難利用性にあると考えられている<sup>18, 19)</sup>。

結合型ナイアシンについては、ナイアシン定量菌、L. plantarum (L. arabinosus) に利用されがたいナイアシンが小麦中に存在することが、Krehlら<sup>20)</sup>により初めて報告がされ、その後、Kodicekら<sup>21)</sup>は、穀類中のナイアシンは相当部分が



結合型で存在し、ラット、イヌ、ブタ、家禽等に利用されないと述べている。

従って、結合型ナイアシンとは、そのままでは動物等に有効でないが、アルカリ分解等により、有効となるナイアシンと一般に理解される。

その後、Ghoshら<sup>22)</sup>の各種穀類のナイアシンの3/4以上が結合型で存在すると報告や、Carterらの大部分の穀物ナイアシンのラットに対する利用率は50%以下で、調理により利用率が向上するという報告<sup>23)</sup>、wheat branのナイアシンはヒトにはほとんど利用されないとする報告など<sup>24)</sup>、穀類中のナイアシンに関して、多くの研究が行われてきた。この結合型、穀類以外ではmustard、groundnut<sup>22)</sup>、potatoに存在し、豆類や動物性食品では認められていない<sup>23)</sup>。

しかし、モロコシのナイアシンについて、Belavadyら<sup>25)</sup>は、ラットに100%利用される遊離型であると報告し、Ghoshら<sup>21)</sup>は、85%が結合型で有効でないとし、Carterら<sup>26)</sup>は、100%が結合型でまったく利用されないという相反する報告もされていることから、結合型ナイアシンの定義が各研究者で異なるとも考えられる。

また、穀物の種類や品種、収穫時期で結合型のタイプは異なり、動物の種類によってもその利用率には差がある<sup>27)</sup>とも考えられているが、結合型ナイアシンの利用性に関して明確な報告はない。

結合型ナイアシンの難利用性の原因は、その構造にあると考えられ、トウモロコシ<sup>28)</sup>、小麦胚芽<sup>29)</sup>から結合型が単離され、グルコースとエステル結合していると推定された。この推定のもとに合成された結合型ナイアシンは、ラットに対して、利用性は高く、この考えは否定された。ヘミセルロースとの結合が原因であるとか<sup>30)</sup>、ナイアシンメチルエステルの難利用性<sup>31)</sup>など構造に関する報告はされているが、結合型ナイアシンの構造は未だ明かとはされていない。

一方、ナイアシン定量法には、Konig反応を利用した比色法<sup>32)</sup>、高速液体クロマトグラフ法<sup>33, 34, 35)</sup>、微生物定量法<sup>36)</sup>等いくつかの方法がある。このうち比色法は臭化シアンを使うので取扱いが危険であり、高速液体クロマトグラフィーは天然物については検討中の段階である。そこで、微生物定量法が最も広く用いられている。四訂日本食品標準成分表<sup>37)</sup>でも特異性が高いことから、*L. plantarum*を用いる微生物定量法が採用されている。しかしながら、培養に時間がかかり、操作が煩雑であるという欠点から、近年、成分分析の高速化と簡便化が進むなか、改良が望まれている。



通常、食品中のナイアシンを測定する場合の試料の前処理方法は、100倍量の1 N-硫酸あるいは水酸化ナトリウムを加え、15ポンド加圧、120℃30分間分解している<sup>32)</sup>。したがって、穀類のナイアシン定量では、有効でない結合型ナイアシンも遊離化して定量しており、実際に有効なナイアシン値とはかなり異なったものとなっている可能性がある。その結果、ナイアシンを多く含む穀類を充分摂取しているにも関わらず、ナイアシン欠乏になるというようなことが起こりうる。

また、NAD、NADPは酸処理や熱処理でニコチンアミドを遊離するが、アルカリ分解では遊離せず、結合型ナイアシンは酸処理、熱処理では遊離化せず、アルカリ処理によってのみ遊離型となる<sup>37)</sup>ということから、試料の分解方法等により、ナイアシン値は大きく変動すると考えられる。

結局、結合型と遊離型、有効型（あるいは利用型）と難利用型の明確な区別がされておらず、それぞれの定量法も確立されていない中で、ナイアシン栄養が論じられているといえよう。

以上のことより、著者は、ヒトのナイアシン栄養を考える場合、結合型ナイアシンの取扱いを明確にしておく必要があると考える。そのためにも、結合型ナイアシンの統一した定義を示し、そのうえで構造を明かとし、難利用性の原因を解明して、ヒトに対する利用性などを明確にすることが重要である。本研究では、ナイアシン定量法における結合型ナイアシンの態度、抽出条件や分析方法などいくつかの問題点を検討し、穀類中の結合型ナイアシンの利用性を明かとすることを目的としている。

そこで、第1章では、ナイアシン微生物定量法における結合型ナイアシンの態度を遊離型ナイアシン関連物質に対する感応性などの比較から検討し、遊離型ナイアシンと結合型ナイアシンの分別定量法を確立した。第2章では、その応用として、穀類の調理・加工における結合型ナイアシンの変動を明かとし、実際の利用への可能性を示した。第3章では、結合型ナイアシンの難利用性について、構造面からアプローチするため、各種加水分解酵素による結合型ナイアシンの可溶化と遊離化を検討し、Cellulase処理及びCellulaseとEsteraseの連続処理が有効であることを明らかにした。その結果をもとに、第4章では、ラットに対する穀類中ナイアシンの利用性を検討し、Cellulase酵素処理した結合型ナイアシンの生



物的有効性を示した。第5章では、ヒトにおけるナイアシンの利用性を明かとするため、投与量、実験期間などの実験条件と投与ナイアシン量に対して、最も鋭敏に感応する生化学的指標を検討した。第6章では、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるナイアシン関連物質の定量法を示し、HPLC法による食品中ナイアシンの定量法を微生物法と比較検討し、米発芽中のナイアシンの挙動を示すと共に、HPLC法における結合型ナイアシンの態度について検討した。



## 第1章 穀類中ナイアシンの微生物定量法における結合型ナイアシンの影響

微生物定量法は特異性や測定感度が高いことから、特にビタミンの定量では有効な手段である。しかし、培養に時間がかかるため、迅速化のために種々の試みがなされてきた。ナイアシンについてはMatsunagaら<sup>39)</sup>が固定化乳酸菌を用いる方法を報告している。宮本らは、*Lactobacillus casei*を用いる葉酸微生物定量法の前培養と本培養の中間に葉酸を制限した培地で中間培養をし、その対数期の菌を大量接種することにより、本培養時間を3-4 hにまで短縮した<sup>40)</sup>。さらに著者は宮本のもとで、*L. plantarum*を用いる迅速微生物定量法（以下迅速法）の検討を重ねてきた。

そこで、本章では、遊離型および結合型ナイアシンを迅速法と従来の微生物定量法（以下通常法）で測定し、比較検討した。

第1節では、迅速法におけるナイアシン誘導体の利用性、第2節では、試料分解法と定量法（迅速法と通常法）の違いによるナイアシン測定値を比較した。

第3、4、5節では、小麦胚芽から調製した結合型ナイアシンの*L. plantarum*に対する影響について検討を加え、第6節では、結合型ナイアシンの*L. plantarum*への取り込み、第7節では、食品中の遊離型および結合型ナイアシンの分別定量の可能性を示した。

### 第1節 *L. plantarum*の各種ナイアシン誘導体による増殖の比較

ナイアシンの生物活性型であるニコチン酸、ニコチンアミド、NAD、NADH、NADP（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）、NADPHに対して、*L. plantarum*は、通常法で等価に感応し、ナイアシン誘導体のニコチヌル酸で20%、トリゴネリン、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドでは5%以下しか利用されないとKertcherらは報告している<sup>41)</sup>が、迅速法で、これらの化合物がどの様に感応するのか、検討した。



## 1-1. 実験材料と方法

### 1-1-1. 使用菌株

定量菌には、*L. plantarum* ATCC8014を用いた。

### 1-1-2. 試薬

ニコチン酸、ニコチンアミドおよびその他の試薬は和光純薬の特級のもの、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下NAD）、ニコチヌル酸、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド、トリゴネリンはSigma社のものを用いた。

### 1-1-3. 培地

保存培地、接種用前培養培地は、日水製薬の一般乳酸菌用のものを用いた。微生物定量用の2倍濃度基礎培地（以下基礎培地）は、Table 1-1.に示したように、特記しない限り通常法、迅速法ともに岩井ら<sup>42)</sup>の共通培地をもとにし、これからシステインとアスパラギンを除き、Lシスチンを2倍濃度培地100ml当り20mg加え、pH6.0とした。迅速法の間接培養培地（以下中間培地）は、ニコチン酸1 $\mu$ g/mlの溶液30mlと活性炭処理した10%ペプトン水5ml、蒸留水215ml、上記基礎培地250mlを混和したものを用いた。

### 1-1-4. 微生物定量

#### 1-1-4-a. 通常法

*L. plantarum*を保存培地から前培養培地5mlに無菌的に接種し、18~24時間、37℃で前培養した。これを3,000r.p.m.で15分間遠心分離し、上清を除去し、菌体を滅菌生理食塩水に懸濁した。この操作を2度繰り返す、この懸濁液の0.5mlを滅菌生理食塩水50mlに懸濁したもの（1:100希釈）を接種菌液とした。標準に用いたニコチン酸保存液は、10mg/50%エタノール100ml<sup>43)</sup>とし、この保存標準液を1000倍希釈した標準液（100ng/ml）を作成し、定量検液も同濃度（30~100ng/ml）になるように適宜希釈した。

12×105mm試験管に検液または標準液に蒸留水を加えて2.5mlとし、2倍濃度基礎培地2.5mlを加え、全量を5mlとした。アルミニウムキャップをした後、オートクレーブで120℃、10分滅菌し、冷却した。これに上記1:100希釈接種菌液を滅菌駒込ピペットで1滴ずつ無菌的に接種し、37℃で18~24時間本培養した後、分光光度計を用いて、600nmで透過率（あるいは吸光度）を測定した。



Table 1-1. Composition of basal medium.

Ingredient	Weight/100g medium
Thiamin	100 $\mu$ g
Riboflavin	100 $\mu$ g
Biotin	0.8 $\mu$ g
-----	
Calcium Pantothenate	100 $\mu$ g
p-Aminobenzoic acid	20 $\mu$ g
Pyridoxal-HCl	40 $\mu$ g
Pyridoxine-HCl	100 $\mu$ g
Pyridoxamin (HCl) <sub>2</sub>	40 $\mu$ g
-----	
Adenine-HCl	2mg
Guanine-HCl	2mg
Uracil-HCl	2mg
-----	
Xanthine	2mg
-----	
L-Tryptophan	4mg
L-Cystein-HCl	8mg
-----	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	80mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4mg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4mg
-----	
Casein acid hydrolysate	1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6g
CH <sub>3</sub> COONa	4g
Glucose	4g



測定値からのナイアシン量の計算は、投与ナイアシン量の対数を横軸に、透過率を縦軸に、あるいは、投与ナイアシン量を横軸に吸光度を縦軸にとり、平行線定量法によった。

#### 1-1-4-b. 迅速法

迅速化の操作をFig. 1-1. に示す。 *L. plantarum* を通常法と同様に前培養した後、1:10希釈接種菌液を中間培養培地に接種し、16時間培養した。これを3,000r.p.m.、15分間遠心分離し、滅菌生理食塩水で2度洗浄して菌体を集め、その中間培地量の8倍の2倍濃度基礎培地に懸濁した(1:8希釈)。この1:8希釈懸濁液2.5mlと標準液もしくは検液2.5mlを試験管に分注し、37℃の水槽中で3~4時間培養して、600nmで透過率(あるいは吸光度)を測定した。なお中間培養終了後は無菌的操作の必要はなかった。

測定値からのナイアシン量の計算は、1-1-4-a. と同様の方法で行った。

#### 1-1-5. 検液の調整

ニコチン酸(M.W123.11)、ニコチンアミド(同122.2)、NAD(同663.5)、ニコチヌル酸(同180.2)、トリゴネリン(同173.6)、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド(同172.6)の溶液を0.5μMの濃度に作成し、その0.2~2.0ml/tubeずつ分注し、迅速法、通常法で測定して、本菌に対するナイアシン利用性を調べた。

#### 1-1-6. 統計解析

有意差検定には、Studentのt検定を用いた。

### 1-2. 実験結果と考察

18時間培養の通常法の結果をFig. 1-2. に示し、3、4、5、6時間と培養時間の差で違いがみられなかったため、5時間培養の迅速法の結果をFig. 1-3. に示す。

通常法において、本菌は、ニコチンアミド、NADに対して、ニコチン酸と同程度の利用性を示し、ニコチヌル酸では50%、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド、トリゴネリンに対しては、まったく利用性を示さなかった。

迅速法に関しても、ナイアシン誘導体のうち、ニコチンアミドとNADは、ニコチン酸と等モルで利用し、ニコチヌル酸は約40%の利用率を示し、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドとトリゴネリンではまったく利用しなかった。



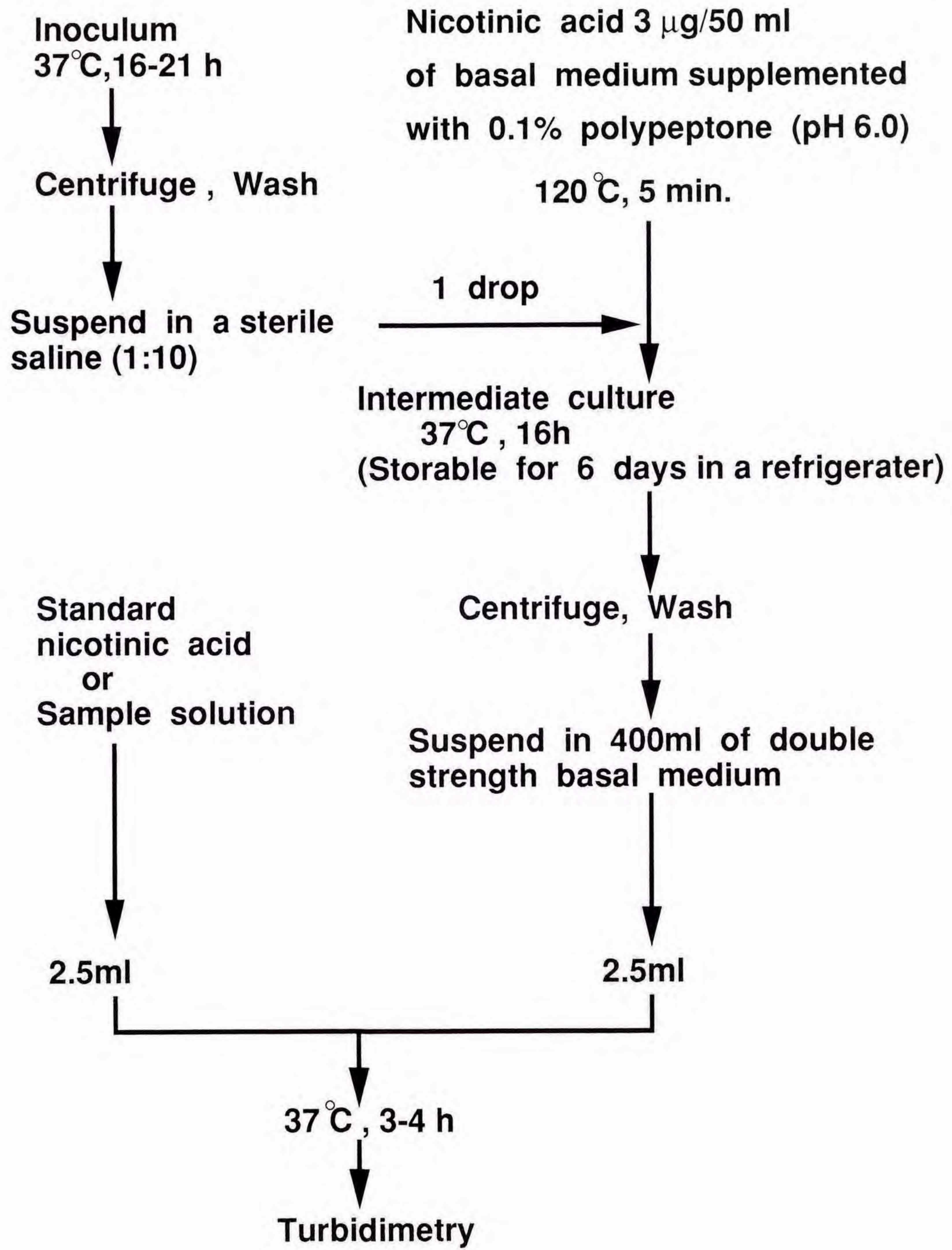
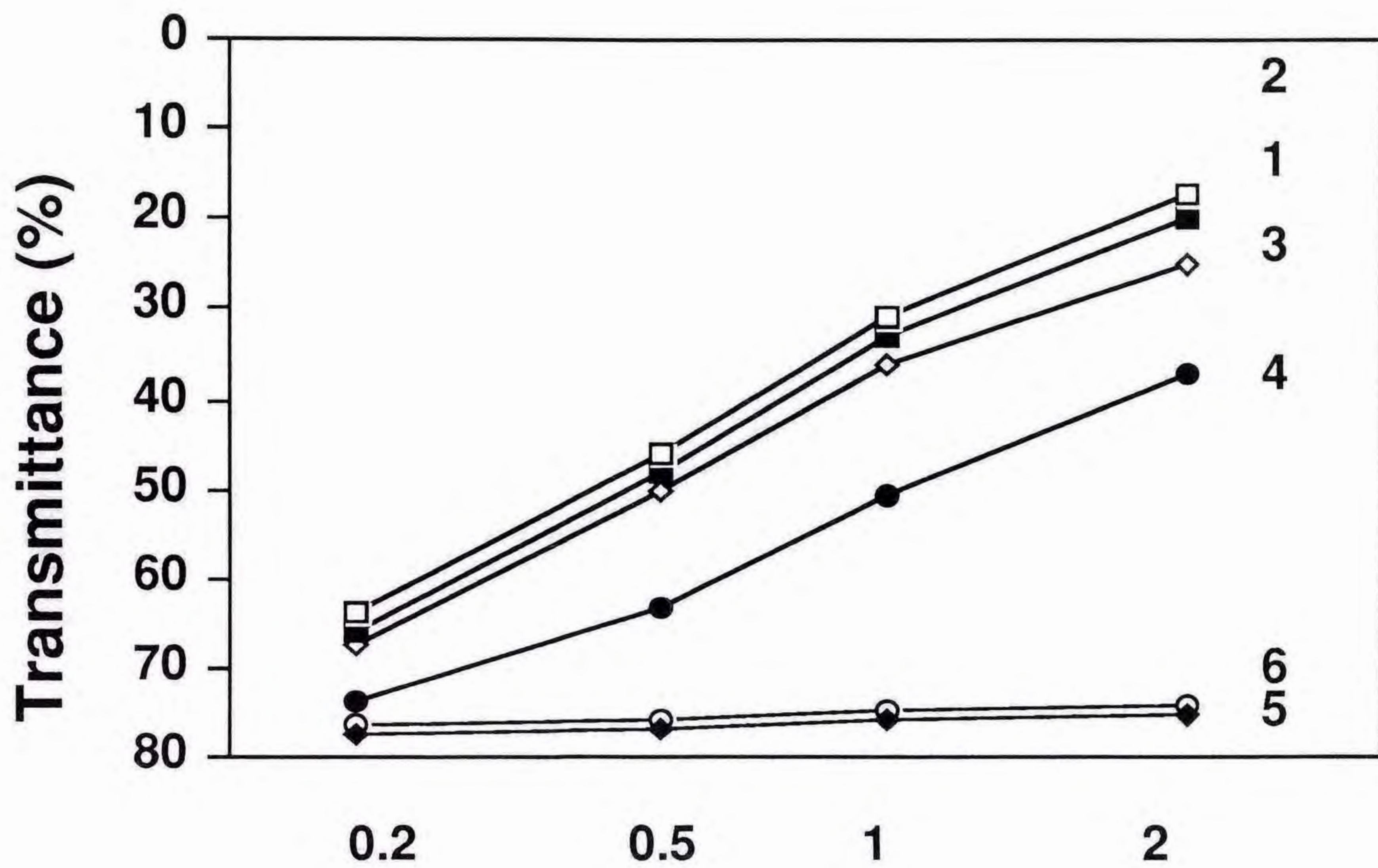


Fig.1-1. Procedure of rapid microbioassay for niacin with *L. plantarum*.





**Nicotinic acid or its derivative ( n mol)**

**Fig.1-2. Responce of *L. plantarum* to nicotinic acid derivatives in the conventional microbioassay.**

**1: Nicotinic acid , 2: Nicotinamide, 3:NAD**

**4: Nicotinuric acid , 5: Trigonelline ,**

**6: N<sup>1</sup> - methylnicotinamide**



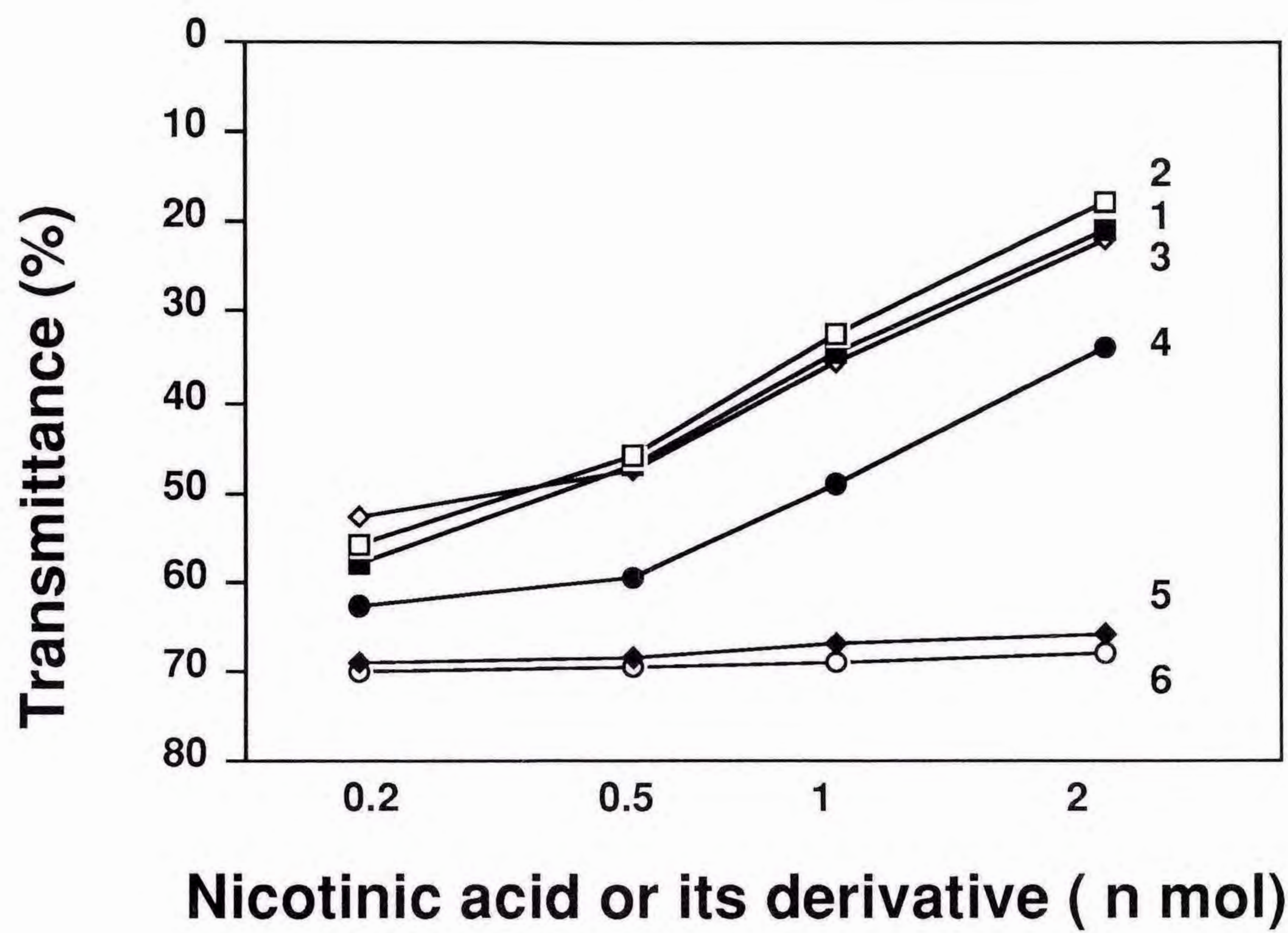


Fig.1-3. Responce of *L.plantarum* to nicotinic acid derivatives in the rapid microbioassay.

1: Nicotinic acid , 2: Nicotinamide, 3:NAD

4: Nicotinuric acid , 5: Trigonelline ,

6: N<sup>1</sup> - methylnicotinamide



これらの誘導体のニコチン酸に対する活性比は通常法、迅速法でほぼ一定であった。ナイアシン誘導体は、通常法の条件と迅速法の条件下で、ほぼ同じニコチン酸活性を示したので、これらが混在する試料でも、迅速法の結果は通常法の結果と一致することになる。ただニコチヌル酸については、Kertcherら<sup>41)</sup>は、二酸化炭素生成法ではニコチン酸の約5%、濁度法では約20%、また、Johnson<sup>46)</sup>は、滴定法でニコチン酸と同一の活性があることをそれぞれ報告しており、このものは他の誘導体と異なり、実験条件の差によりかなり変動するものと思われる。しかし、一般に食品を測定するには、生体に広く分布するものではないので、問題ないと考えられた。

## 第2節 試料分解法と測定法の違いによるナイアシン測定値の比較

数種食品試料について、試料分解条件を変えて抽出し、ナイアシン量を通常法と迅速法で定量し、その結果を比較した。

### 2-1. 材料と実験方法

#### 2-1-1. 材料

米ヌカ、オートミール、乾燥トウモロコシ、牛肉の4種について分析を行った。

#### 2-1-2. 試料分解法および抽出法

##### 2-1-2-a. 酸分解法

酸分解による検液は、村田ら<sup>44)</sup>の方法に準じ、試料1~5gを粉碎あるいは磨碎し、1N硫酸50mlを加えて、オートクレーブで120℃、0.5h加圧分解<sup>45)</sup>したあと、水酸化ナトリウムにてpH6.0に調整した。

##### 2-1-2-b. アルカリ分解法

アルカリ分解による検液は、AOAC法<sup>10)</sup>に従い、試料5gを粉碎あるいは磨碎して水酸化カルシウム1.5gと蒸留水60mlともにあるいは1N水酸化ナトリウムで120℃、2時間加圧分解して調製した。



### 2-1-3. 測定方法

第1節、1-1-4. 微生物定量に準じ、通常法及び迅速法で測定を行った。

### 2-2. 実験結果と考察

数種食品についてアルカリ分解と酸分解で検液を調製し、迅速法は培養を4時間に固定して通常法の結果と比較した。その平均値と標準偏差をTable 1-2. に示す。この表から穀類では酸分解値がアルカリ分解値より明らかに低いことがわかったので、これらの値についてt検定した結果をTable 1-3. に示す。この表からアルカリ分解値は通常法と迅速法とでいずれも有意差がなかったが、酸分解では穀類の通常法の値が有意に高かった。一方、アルカリ分解と酸分解を比較すると、穀類では常にアルカリ分解の値が高く、迅速法について比較した方が通常法で比較したt値より大きかった。これは、穀類中にある結合型ナイアシン<sup>22)</sup>がそのままではヒトのほか、本菌にも殆ど利用されないが、アルカリ分解により利用される型になり、また酸分解液中にある結合型ナイアシンは迅速法では利用され難いが、18時間以上の培養中にその一部が何らかの方法で利用されるようになると推定された。

すなわち低分子の誘導体は迅速法と通常法で同じ態度を示すが、高分子の結合型ナイアシンは態度を異にすると考えられる。なお、牛肉ではどの比較でも有意な差はなかった。

## 第3節 Non-diffusibleナイアシン標品の L. plantarum に対する利用性

### 3-1. 実験材料および方法

#### 3-1-1. 試料の調製

Masonらの方法<sup>47)</sup>に従い、50gの小麦胚芽（マニトバ産、偏平）を粉碎し、50% エタノールで12時間、4℃で抽出し、濾過後、濾液を1,200×G、30分遠心分離した。上清を40℃で減圧濃縮して、エタノールを除去した後、凍結乾燥し、これを



Table 1-2. Comparison of niacin values determined by several assay methods ( Niacin mg/100g)

Assay	Conventional		Rapid(4h)	
	Alkaline	Acid	Alkaline	acid
Rice bran	54.5 ± 9.0	43.0 ± 3.5	62.0 ± 2.8	36.8 ± 1.5
Oatmeal	1.05 ± 0.07	0.78 ± 0.05	1.11 ± 0.08	0.69 ± 0.08
Corn	1.86 ± 0.11	1.33 ± 0.12	1.82 ± 0.10	0.99 ± 0.05
Beef	5.90 ± 0.10	6.05 ± 0.19	6.03 ± 0.20	6.12 ± 0.13

Table 1-3. t-test for the assay data.

Comparison	Alkaline and acid hydrolyses		Conventional and rapid assay	
	Conventional assay	Rapid assay	Alkaline hydrolysis	Acid hydrolysis
Rice bran	p< 0.05	p<0.001	ns	p<0.025
Oatmeal	p<0.001	p<0.001	ns	p<0.05
Corn	p<0.001	p<0.001	ns	p<0.1
Beef	ns	ns	ns	ns

ns: not significant.



2度、ジエチルエーテル100mlで洗い、残渣を蒸留水に懸濁して、1,200×G、4℃で遠心分離し、これを透析膜で1昼夜透析を行った。この透析内液を10,000×G、4℃で30分遠心分離し、上清を凍結乾燥して、約1gのnon-diffusible niacin (NDN) 標品を調製した。

### 3-1-2. ナイアシン定量法

第1節、1-1-4で示した通常法、迅速法によった。

## 3-2. 実験結果と考察

Table 1-4. に、NDN標品中ナイアシンに対する抽出条件の影響を調べた結果を示す。NDN標品をアルカリ分解したものの通常法測定値は、標品1gあたり9.0mgで、水抽出したものの迅速法測定値1.0mgの9倍のナイアシン活性を示した。また、迅速法における各分解方法間、水抽出における各測定法では、0.1%以下の危険率で有意差が認められた。結合型ナイアシンが水よりは酸、さらに、アルカリに不安定であり、迅速法では培養時間が短いので、その間に本菌に利用される形に変換しうる余裕はないが、18時間以上培養を行う通常法では一部が何らかの理由で利用されると考えられる。

## 第4節 トウモロコシおよびダイズ中ナイアシンの L. plantarum に対する利用性

### 4-1. 実験材料および方法

乾燥トウモロコシおよびダイズを水酸化ナトリウムおよび硫酸濃度を変え、第1節、1-1-4. に準じて、通常法と迅速法で分析した。

### 4-2. 実験結果と考察

Table 1-5. にKodicek<sup>21)</sup>が結合型ナイアシンの存在を報告しているトウモロコシについて、抽出条件を変え、ナイアシン値を測定し、検討した結果を示す。



Table 1-4. Effects of extraction conditions on the niacin activity of non-diffusible niacin preparation(mg/g) .

Autoclaved at 120° C				
with	for	Rapid microbioassay	Conventional microbioassay	p
Water*	0.5hr	1.0±0.14	2.7±0.85	<0.001
	p	<0.001	<0.001	
1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5hr	4.3±0.34	7.0±1.26	<0.01
	p	<0.001	n. s. **	
1N NaOH	1hr	7.8±0.56	9.0±0.81	n. s.

\* Extracted at room temperature, \*\* not significant.



Table 1-5. Effects of extraction conditions on the niacin activity of corn (mg/100g).

Autoclaved at 120° C		Rapid microbioassay	Conventional microbioassay
with	for		
1.0N NaOH		1.87±0.17	1.72±0.18
0.5N NaOH	2hr	1.87±0.12	1.76±0.22
0.25N NaOH		2.11±0.25	1.75±0.20
1.0N NaOH		1.88±0.17	1.67±0.21
0.5N NaOH	1hr	1.87±0.12	1.82±0.31
0.25N NaOH		2.22±0.23	1.93±0.16
1.0N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1.13±0.13	1.31±0.10
0.5N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5hr	0.77±0.06	1.09±0.05
0.1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.44±0.05	0.73±0.04
Water*	0.5hr	0.49±0.06	0.88±0.06

\* Extracted at room temperature.



この場合、アルカリ分解ではアルカリ濃度、加熱時間を増しても測定値は上昇しなかった。しかし、酸抽出では酸の濃度が低くなるにつれ、結合型の遊離化がおこりにくくなった。迅速法の水抽出の測定値と酸0.1Nの測定値がほぼ等しいことより、0.1Nの酸では結合型ナイアシンは、ほとんど遊離されず、Cleggら<sup>48)</sup>の0.1N塩酸、100°C、1時間分解では結合型は、遊離されないという報告と一致した。

穀類中試料は一般にデンプンを多く含むため、水抽出すると検液が白濁し、以後の操作が困難なので、遊離型ナイアシン抽出には0.1N硫酸、120°C、30分の加圧抽出が適当と考えられる。このトウモロコシの検液調製法と培養時間との関係はNDN標品と同じ傾向を示し、これらのことは穀類に共通の傾向とも考えられる。なお、ここで、0.5N以上の硫酸では結合型ナイアシンの遊離が一部みられたが、さらに条件を厳しくすれば全部の結合型ナイアシンが酸でも遊離されるのか、また、されないとすれば酸で遊離されるものの動物に対する利用率はどうかということについては、今後さらに検討したいと考える。

Table 1-6. は結合型ナイアシンの存在が報告されていないダイズについての抽出条件の影響を比較した結果である。

この場合は、酸抽出の条件が違っても結果に差は認められず、通常法と迅速法の値も同程度であった。アルカリ分解値が酸または水抽出より低かったことについてはさらに、検討すべきであるが、ダイズには結合型ナイアシンが認められていないことと合わせ考えて、NDN標品やトウモロコシの場合に認められた迅速法と通常法の差は、結合型ナイアシンに起因するといえるであろう。



Table 1-6. Effects of extraction conditions on the niacin activity of soybean (mg/100g).

Autoclaved at 120° C		Rapid microbioassay	Conventional microbioassay
with	for		
1.0N NaOH	2hr	1.93±0.12	2.13±0.15
1.0N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		2.90±0.26	2.72±0.15
0.5N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5hr	2.87±0.19	2.63±0.06
0.1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		2.78±0.23	2.68±0.50
Water*	6hr	2.47±0.15	2.28±0.03
Water*	1hr	2.37±0.15	2.19±0.02

\* Extracted at room temperature.



## 第5節 イオン交換カラムクロマトグラフィーによる結合型ナイアシンの精製 とその L. plantarum による利用性

小麦胚芽から結合型ナイアシン標品を精製し、通常法ならびに迅速法により培養し、L. plantarumの生長曲線を求め、遊離のニコチン酸の場合と比較して、両者の活性の違いについて検討した。

### 5-1. イオン交換カラムクロマトグラフィーによる小麦胚芽結合型ナイアシンの精製

#### 5-1-1. 材料と実験方法

0.005M トリス塩酸緩衝液 pH7.3 (50%エタノール) で平衡化した DEAEセルロースカラムに、NDN標品10gを添加後、同緩衝液を流し、天秤型フラクションコレクター (Toyo SF-160K) により、17mlずつ分取し、画分69から0.5M塩化ナトリウムをリニアグラデIENTで溶出した。

溶出液中のナイアシン溶出パターンはHITACHI220 Spectrophotometerで、265 nmの吸光度を測定して求めた。さらに、各画分より0.5mlを取り、ロータリーエバポレーターを用い、50°Cで減圧濃縮、乾固を行い、これに蒸留水2.5mlを加えて、微生物定量用検液とし、このうち0.5mlを2N水酸化ナトリウム0.5mlでアルカリ分解し、通常法で測定した値を総ナイアシン値とし、未分解のまま、迅速法で測定した値を遊離型ナイアシン値とした。

#### 5-1-2. 結果

NDN標品のイオン交換カラムクロマトグラムをFig.1-4.に示す。アルカリ分解し、通常法で測定した結果を総ナイアシン値とし、検液を未分解のまま迅速法で測定した結果を一応遊離型ナイアシン値とした。総ナイアシン値と遊離型ナイアシン値の差が結合型ナイアシン値と考えられるが、画分N0.15、17、18は、その差がとくに大きかった。中でも画分N0.15は、迅速法値が小さく、検出限界レベルであるため、遊離型ナイアシンがほとんど含まれないものと考えられた。この画分を濃縮、凍結乾燥して、“結合型ナイアシン標品”として、以下の実験に用いた。



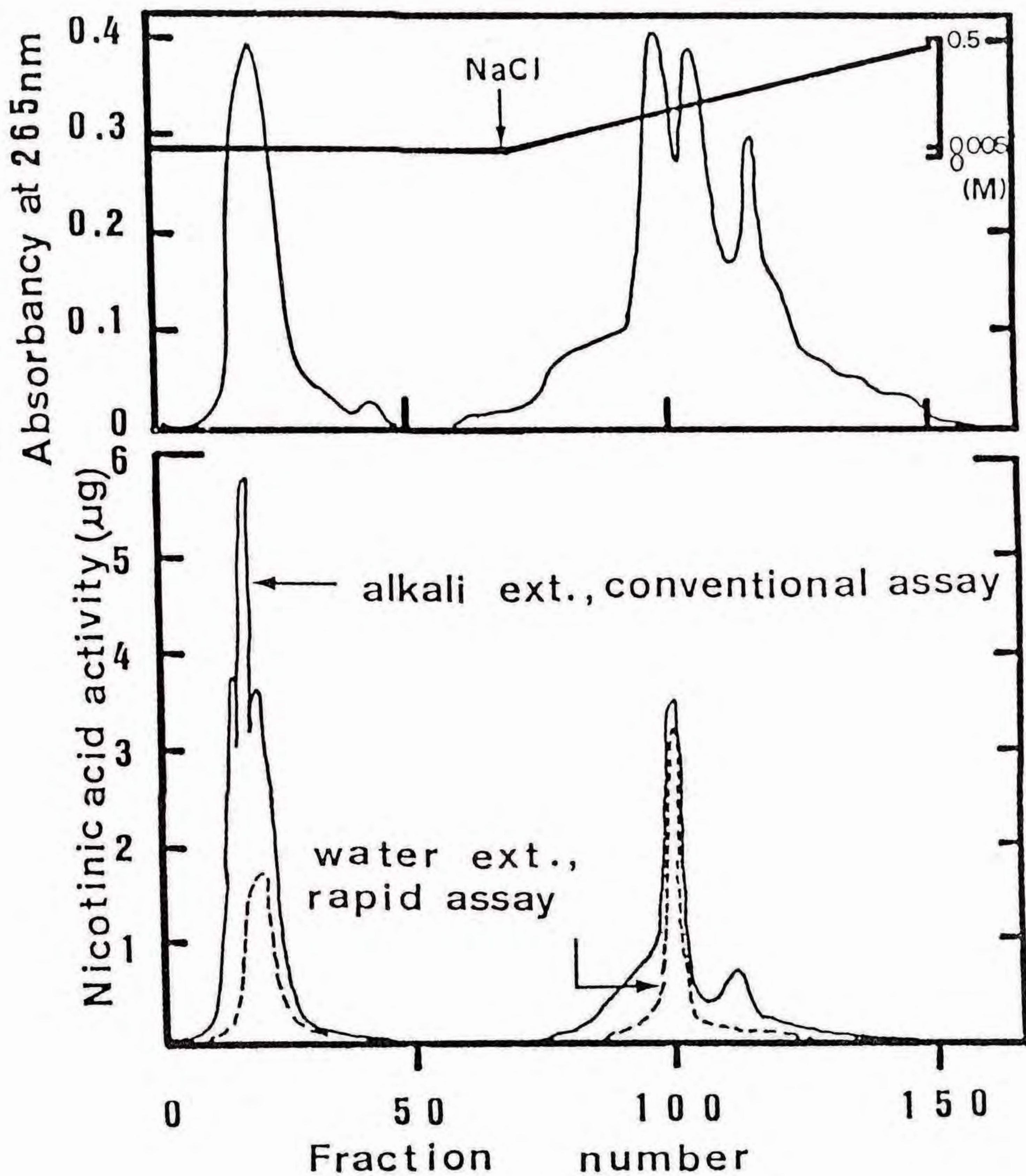


Fig.1-4. Ion-exchange chromatography of non-diffusible niacin preparation on DEAE-cellulose.

Ten g of the preparation were applied to DEAE-cellulose column (4×30 cm) previously equilibrated with 0.005M Tris buffer (pH7.3). One-tenth ml and 0.5ml of each fraction (17ml) were applied for the determinations of absorbance and the niacin activity respectively.



## 5-2. 結合型ナイアシン標品の L.plantarum による利用

### 5-2-1. 材料と実験材料

5-1. で得た結合型ナイアシン標品を使用し、1節、1-1-4-a. で述べた通常法および迅速法で培養し、増殖の様子を濁度で示した。

### 5-2-2. 結果および考察

Fig. 1-5. は通常法の結果を示す。

結合型ナイアシンを加えた場合は、10-13時間の間でほとんど増殖せず、いわゆる二段増殖相を示し、この時期をこえるとニコチン酸と同様の増殖相となった。この増殖しない時期は菌体は何らかの方法で、結合型ナイアシンを利用するための準備段階と考えられる。そしてこの時期以後、結合型ナイアシン200ng相当量はニコチン酸100ngに近い活性を示した。

Fig. 1-6. は迅速法の結果を示す。

2時間目あたりから、結合型ナイアシンとニコチン酸の増殖活性に差が現れ、その差は時間を追うごとに大きくなった。しかし、結合型ナイアシンの200ng相当量とニコチン酸の50ngの活性は、培養3-4.5時間にわたり、ほぼ等しく、両者の活性の比率はほぼ一定であった。すなわち、結合型ナイアシンはニコチン酸の1/4の活性を示し、通常法の場合よりもその比が小さいことがわかった。しかし、実際の食品中では、結合型ナイアシンはかなり複雑な形で存在すると考えられ、この結合型ナイアシン標品のように純粋なものより、さらに低い活性となることもありうると思われる。



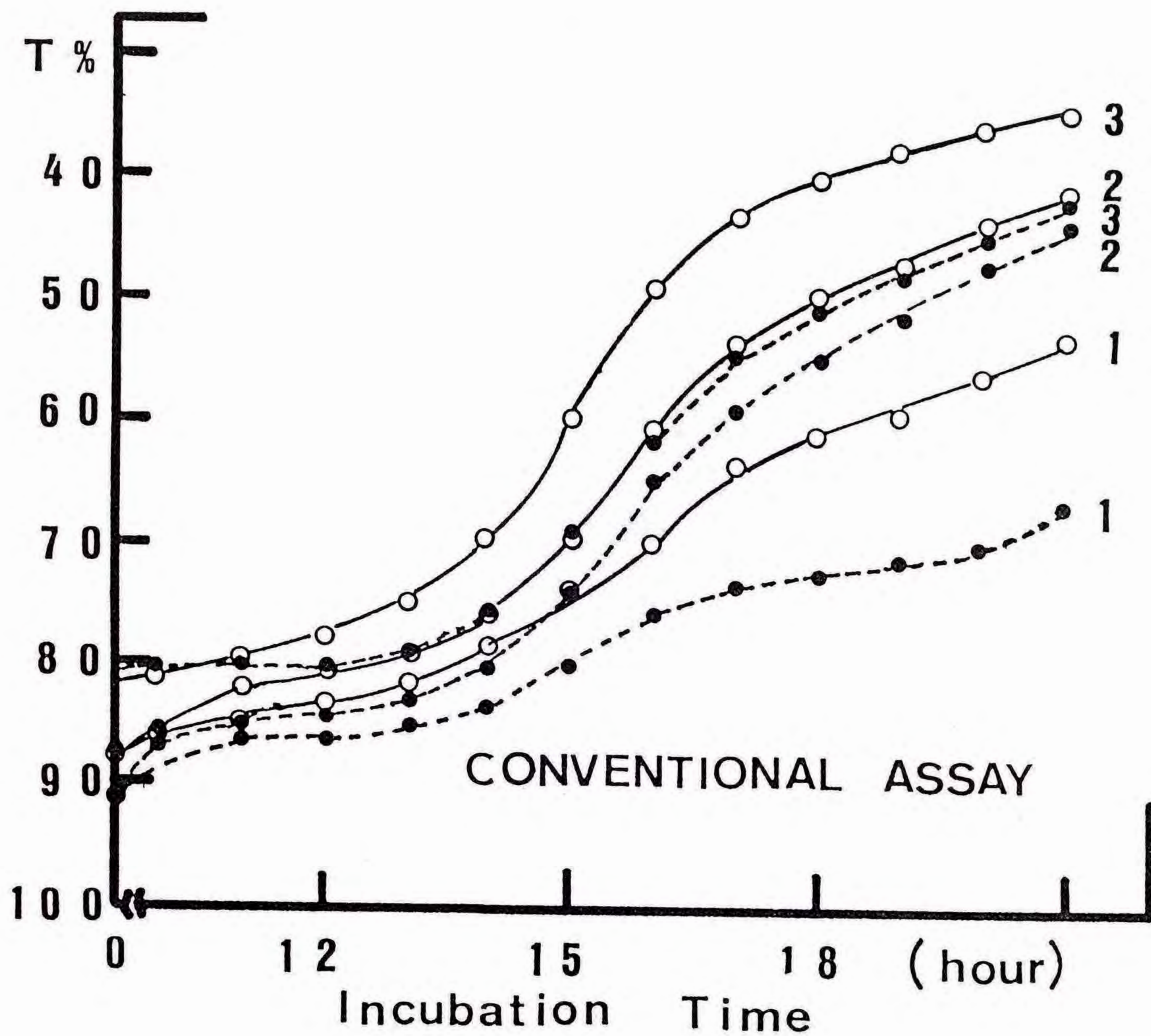


Fig. 1-5. Growth curves of *L. plantarum* with nicotinic acid or bound niacin preparation by the conventional bioassay.

○: Nicotinic acid, ●: Bound niacin, 1:50, 2:100, 3:200ng or ng equivalent/5ml.



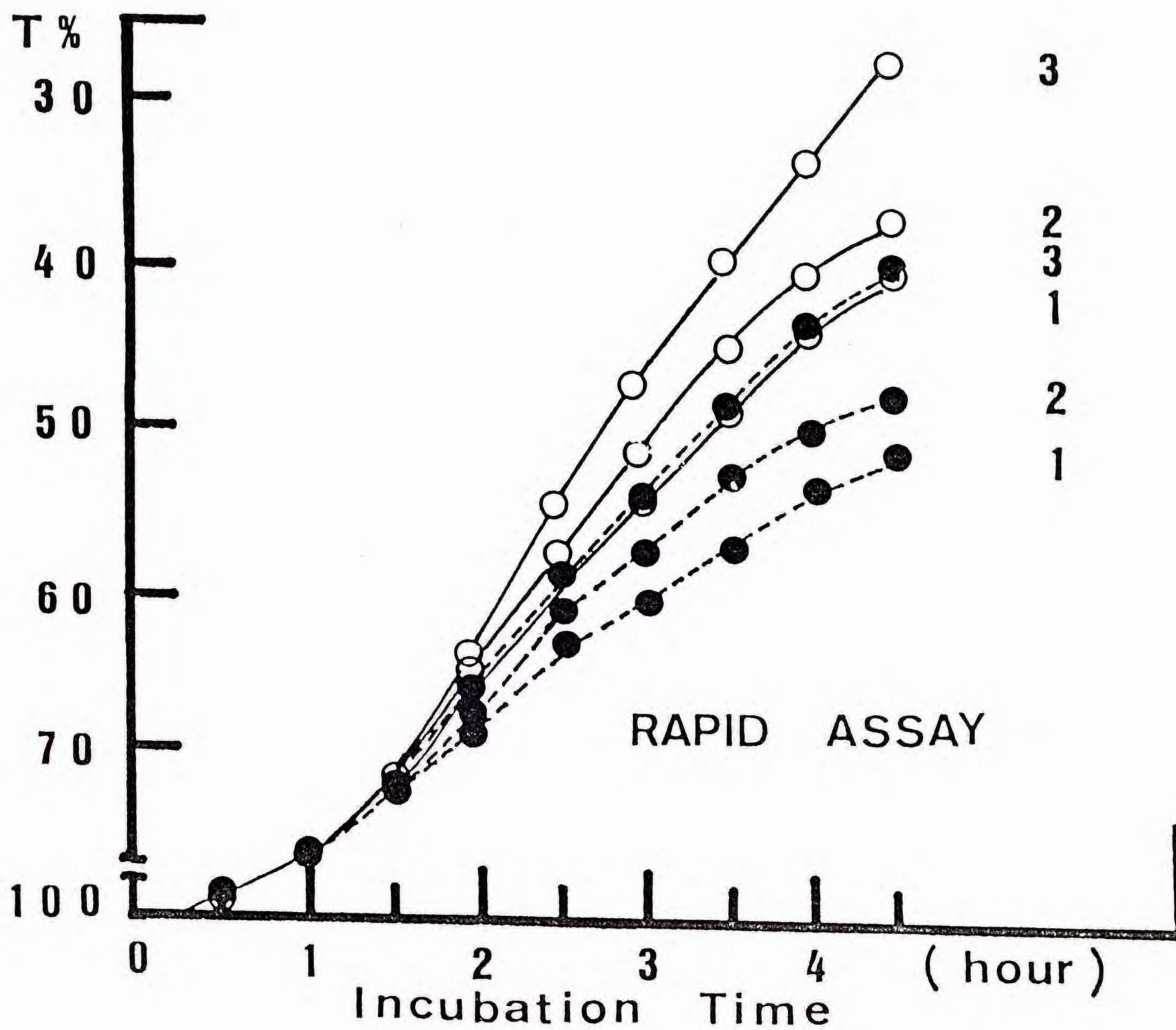


Fig.1-6. Growth curves of *L. plantarum* with nicotinic acid or bound niacin preparation by the rapid bioassay.

○:Nicotinic acid, ●:Bound niacin, 1:50, 2:100, 3:200ng or ng equivalent/5ml.



## 第6節 L.plantarumによる結合型ナイアシンの取り込み

前記の実験において、培養法およびナイアシン源の違いによって増殖に異なる結果が得られた理由を明らかにするために、本菌のナイアシン取り込みについて検討を行った。

### 6-1. 材料と実験方法

ナイアシン源として結合型ナイアシン標品もしくは、ニコチン酸を用い、培地総量25mlで通常法と迅速法の条件で培養を行った。培養後、遠心分離を行い、菌体と培地に分け、それぞれをアルカリ分解、酸分解、または未分解のまま、調製した各検液についてナイアシン活性を通常法で測定した。

### 6-2. 結果および考察

Table 1-7. に、結合型ナイアシンとニコチン酸で培養した時の菌体への取り込みの結果を示した。結合型ナイアシン600ng相当量を加えて、迅速法の条件で培養した場合、アルカリ分解により培地中に190ng、菌体中に175ngが検出された。また、水抽出、酸分解によっては、培地、菌体にはナイアシン活性は認められなかった。

これらの結果より、迅速法による培養では結合型ナイアシンは酸によって遊離されない結合型のまま、培地、菌体内もしくは菌体表面に存在していると考えられる。

結合型ナイアシンを加えて、通常法の条件で培養した場合、アルカリ分解により培地中に270ng、菌体中に220ng、酸分解により培地中に250ng、菌体中に105ng検出された。水抽出では、いずれにも活性は認められなかった。これは迅速法の結果と考え合わせると、通常法が比較的長時間培養であるため、取り込み量も多く、取り込まれた結合型ナイアシンは酸によって遊離されてくるような、ゆるい結合のナイアシンに変化していると推定され、第5節で述べた通常法の生長曲線でみられた、10-13時間目のプラトーな時期は結合型ナイアシンが菌体に取り込ま



Table 1-7. Niacin activities in the culture medium and the bacterial cells by incubation of the conventional and rapid microbioassay conditions supplemented with nicotinic acid or bound niacin preparation.

Supplemented niacin	Incubation period(hr)	Niacin activity (ng)					
		Water ext.		Acid ext.		Alkali ext.	
		Medium	Cell	Medium	Cell	Medium	Cell
Bound niacin	0	N. S. *	N. S.	—**	N. S.	—	—
600ng equivalent per 25ml medium	4(Rapid)	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	190	175
	21(Con.)	N. S.	N. S.	250	105	270	220
Niacin acid 600ng per 25ml medium	4(Rapid)	N. S.	405	—	—	N. S.	450
	21(Con.)	N. S.	475	—	—	N. S.	400

\* Not significant activity, \*\* not measured.



れ、酸で遊離できる程度の結合に変わるのに要する時間とも推定できる。

ニコチン酸の場合、培養方法にかかわらず、すみやかに遊離型のまま菌体に取り込まれ、培地中にニコチン酸活性は認められないという結果を得た。なお、これらの場合、アルカリ分解でも培地、菌体ナイアシンの合計が添加量の67-82%であるのは、培地中にナイアシンの一部が消費されたことのほかに、菌体からのナイアシン抽出が不完全であったことや培地中では低濃度となるために検出限界以下となり、測定が不完全であったことなどが考えられる。



## 第7節 遊離型および結合型ナイアシンの分別定量法

第6節の結果より、小麦胚芽中の結合型ナイアシンが迅速法によって、その1/4程度がL.plantarumに利用されるということが明らかとなり、このことより、T:1N NaOH、120°C、2時間加圧分解、通常法または迅速法での測定値、A:0.1N、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、120°C、0.5時間抽出、迅速法での測定値、F.N.:遊離型ナイアシン値、B.N.:結合型ナイアシン値とすると、

$$T = F.N. + B.N. \quad (1)$$

$$A = F.N. + 1/4 B.N. \quad (2)$$

(1)、(2)式を変形すると、

$$B.N. = 4/3 (T - A) \quad (3)$$

$$F.N. = T - B.N. \quad (4)$$

となる。この結果、小麦中の結合型ナイアシンおよび遊離型ナイアシンの分別定量が可能となった。この方法により、種々の食品のナイアシンの存在形態や実際にヒトに利用できる有効性ナイアシン量などを知ることができる。摂取ナイアシン量と有効性ナイアシンを掌握することにより、実態にあった栄養管理が可能と思われる。なお、小麦以外の穀類中のナイアシンについては必ずしも同じ結果が得られるとは限らないのでさらに、それぞれの標品による検討が必要と考えている。



## 第8節 小括

1. 迅速法において、ナイアシン誘導体のうち、ニコチンアミドとNADはニコチン酸と等モルで同じ活性を、ニコチヌル酸は約40%の活性を示し、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドとトリゴネリンはナイアシン活性を殆ど示さなかった。また、これらの誘導体のニコチン酸に対する活性比は通常法、迅速法でほぼ一定であった。ナイアシン誘導体は、通常法の条件と迅速法の条件下で、ほぼ同じニコチン酸活性を示したので、これらが混在する試料でも、迅速法の結果は通常法の結果と一致するという結果を得た。
2. 米ヌカ、オートミール、トウモロコシの穀物を試料とした場合、アルカリ分解した方が酸分解したものより、通常法、迅速法ともに有意に高いナイアシン値を得た。一方、通常法と迅速法の比較では、アルカリ分解した試料では、いずれも測定値に差はなかったが、酸分解試料の場合、通常法の方が有意に高いナイアシン値を得た。しかし、牛肉を試料とした場合には、どの方法による値の間にも有意差はなかった。また、穀類試料は、1Nの水酸化ナトリウム、120°C、2時間、加圧分解で完全に結合型ナイアシンが遊離され、0.1Nの硫酸、120°C、0.5時間、加圧抽出では、結合型ナイアシンは分解をうけず、遊離型のみが抽出されることがわかった。
3. 小麦胚芽からイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した結合型ナイアシン標品をナイアシン源とした生長曲線は、通常法の条件では、培養10-13時間目で増殖が一時とまる、いわゆる二段増殖相を示し、その後は結合型ナイアシン200ng相当量がニコチン酸100ngに近い活性を示した。一方、迅速法の条件では、二段増殖相はみられず、2時間目から結合型ナイアシンとニコチン酸の間に増殖の差が現れ、3-4.5時間培養において、結合型ナイアシン200ng相当量はニコチン酸50ngとほぼ同じ活性を示すことが明かとなった。
4. 結合型ナイアシン標品を用いて、迅速法の条件で培養すると、菌体への取り込みはみられるが、結合型のまま存在し、通常法の条件で培養すると、迅速法



の場合よりも菌体への取り込み量は増加し、取り込まれた結合型は酸により遊離されてくるような、ゆるい結合のものに変化した。ニコチン酸は、通常法、迅速法の条件にかかわらず、すみやかに大部分、菌体内に取り込みが行われるという結果を得た。

5. 小麦製品中の結合型ナイアシン量は、アルカリ分解の迅速法測定値または通常法測定値と酸分解（0.1N程度の酸）の迅速法測定値の差の4/3倍、遊離ナイアシン量はアルカリ分解値から結合型ナイアシン量を差し引くことにより、分別定量ができることを示した。



## 第2章 調理・加工による穀類中ナイアシンの変動

結合型ナイアシンは、強酸やアルカリで処理すれば生物に利用される型に変換する<sup>49)</sup>。その例として、tortillaというアメリカインディアンの伝統的な主食が挙げられる<sup>50)</sup>。これは挽いたトウモロコシ粉をアルカリ水で加熱調理したもので、この食品中のナイアシンはヒトに利用される型で存在することが知られている。調理加工操作が結合型を遊離型に変換したと考えられるが、他の食品について、調理加工が結合型ナイアシンに及ぼす影響や有効性ナイアシンとの分別定量について言及した報告はほとんどない。

日本食品標準成分表<sup>37)</sup>のナイアシン値は、試料に100倍量の1N-硫酸を加え、120℃、30分間分解して、結合型を遊離型に変換し、総ナイアシン値として掲載され、その数値は栄養的に利用できる真のナイアシン値と必ずしも一致しない。ヒトに有効なナイアシン値を得るには、結合型と遊離型を分別定量するとともに、結合型ナイアシンの確かな利用率も明らかにする必要があると考える。

第1章では、穀類中の結合型と遊離型ナイアシンの分別定量の可能性を示し得た。第2章では、穀類として摂取している小麦製品の中から、酵母による発酵工程をもつパンと加工過程でかんすいによるアルカリ処理のある中華麺を選び、米を材料としたものから、炊飯、糠漬けを選んで、結合型ナイアシンと遊離型ナイアシンの分別定量ならびにナイアシンの遊離化に及ぼす調理・加工過程の影響について検討を行なった。

### 第1節 小麦加工品製造過程におけるナイアシンの変動

#### 1-1. 材料と実験方法

##### 1-1-1. 製パン

日清製粉強力粉250g、砂糖25g、食塩5g、乾燥酵母7.5g、脱脂粉乳5g、無塩バター50gを37℃の温湯137.5gでよくこね、37℃で1時間一次発酵し、60gずつのロール型に整形後、更に37℃で30分の二次発酵を行なった。

予熱しておいたオーブンで180℃、15分間上記ドウを焼いたものを試料とした。



なお、胚芽パンの場合、強力粉25gを減じて、創建社(株)偏平小麦胚芽25gを加えた。

### 1-1-2. 製麺

強力粉70g、炭酸ソーダ1.4g、食塩2.1gに、蒸留水40mlを加え、30分間こね、2mmの厚さに延ばし、2mmの太さに切断後、蒸し器で10分間蒸したものを試料とした。

### 1-2. 遊離型および結合型ナイアシンの分別定量法

通常法、迅速法は第1章、第1節に従い、試料分解法は、総ナイアシン値については、1N水酸化ナトリウム、120℃、2時間加圧分解、遊離型ナイアシン値については、0.1N硫酸、120℃、0.5時間加圧抽出とした。分別の計算は、第1章、第7節で示した方法で行った。

### 1-3. 結果

パン、胚芽入りパン、中華麺の製造過程における遊離型および結合型ナイアシン値の変化をそれぞれFig.2-1.~Fig.2-3.に示した。

#### 1-3-1. パン (Fig.2-1.)

原材料(480g)中の総ナイアシン含量は $6.02 \pm 0.16$ mg、そのうち遊離型57.5%、結合型42.5%、発酵後のドウ(462g)では、総ナイアシン含量は $6.3 \pm 0.13$ mg、うち遊離型62.7%、結合型37.3%、焼成後のパン(414g)では、総ナイアシン含量は $6.58 \pm 0.11$ mg、うち遊離型67.4%、結合型32.6%であった。原材料中のナイアシンの内、約半分は脱脂粉乳と乾燥酵母に含まれるナイアシンであり、しかも動物由来のナイアシンには結合型は存在しないことから、遊離型の割合が高くなっている。



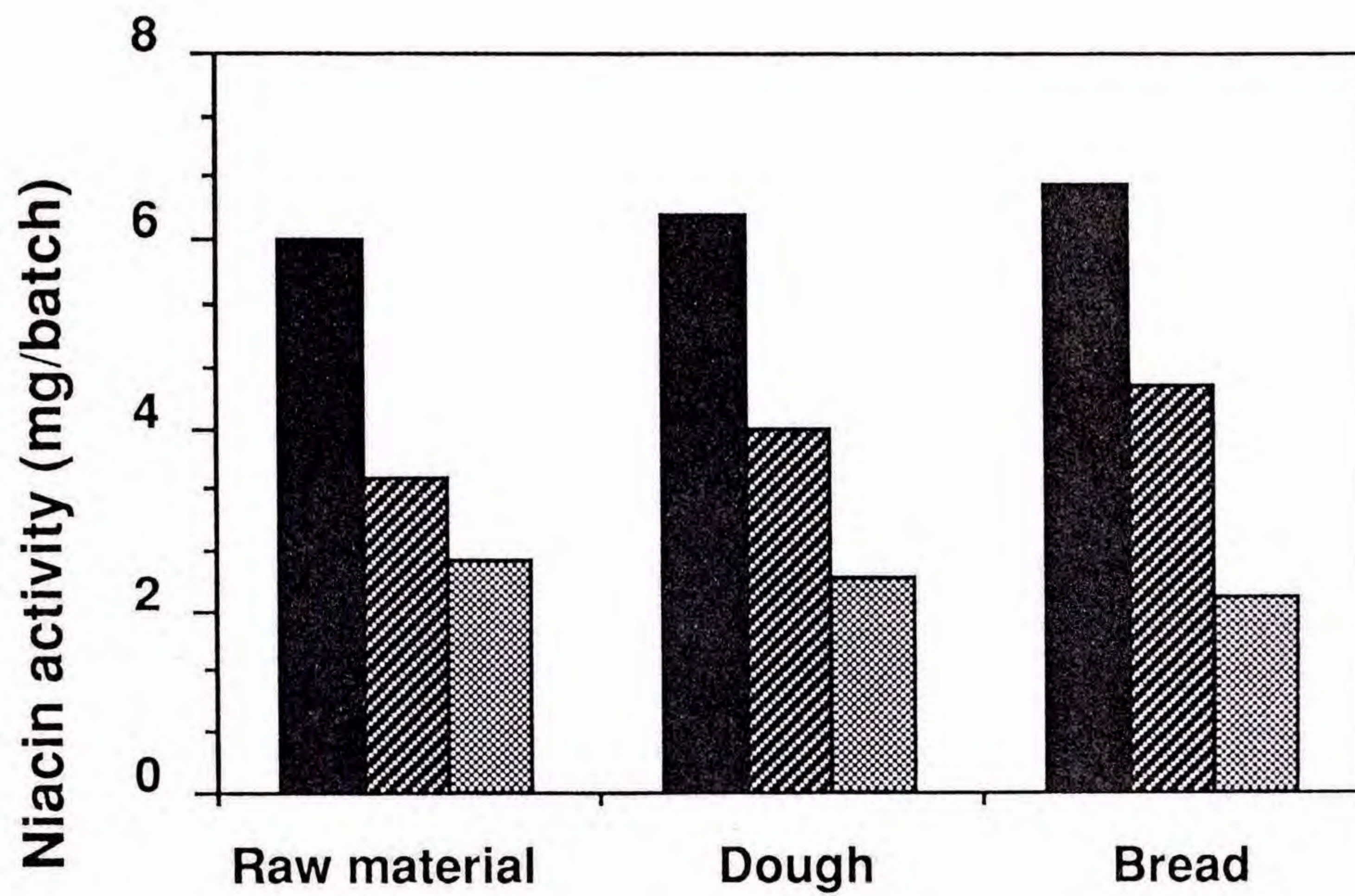


Fig.2-1. Change of niacin activities during fermentation and baking processes of bread.

■ ; Total , ▨ ; Free , ▩ ; Bound



### 1-3-2. 胚芽入りパン (Fig. 2-2.)

原材料中 (480g) の総ナイアシン含量は  $8.21 \pm 0.66$  mg で、そのうち遊離型は 46.2%、結合型は 53.8%、発酵後のドウ (461g) では、総ナイアシン含量は、 $8.36 \pm 0.35$  mg、うち遊離型 72.6%、結合型 27.4%、焼成後のパン (415g) では、総ナイアシン含量は  $8.63 \pm 0.40$  mg、うち遊離型 75.6%、結合型 24.4% であった。

胚芽にはナイアシンが豊富に含まれるが、本実験に使用した胚芽のナイアシンの 80% 以上が結合型であった。製パン過程で、ナイアシンの損失はみられなかった。しかし、この間に結合型ナイアシンの一部が遊離されたと考えられる結果を得たが、これが酵母の作用、加熱あるいは「こねる」という物理的作用によるものと推定されたが、結合型ナイアシンの構造とも関わる問題でもあり、更に検討を要する。

### 1-3-3. 蒸し中華麺 (Fig. 2-3.)

原材料中 (113.5g) の総ナイアシン含量は  $1.1 \pm 0.12$  mg で、そのうち遊離型は 39.3%、結合型 60.7%、アルカリ性液でこねる (生麺 110.8g) と、総ナイアシン含量は  $1.11 \pm 0.11$  mg、うち遊離型 43.5%、結合型 56.5%、蒸した後の麺 (113.8g) では、総ナイアシンは  $1.17 \pm 0.17$  mg で、うち遊離型が 49.7%、結合型 50.3% であった。

蒸し中華麺であるため、加熱中のナイアシン損失は認められなかったが、ゆで麺の場合、ゆで汁中への溶出による損失が予想される。

かん水はアルカリ性で、これを加えるとグルテンは水和性を増して膨潤する。しかし、ナイアシンについては、かん水を加えるだけでは遊離化はほとんど認められず、また、加熱することにより遊離型ナイアシンの増加がみられたが、その増加は統計的に有意ではなかった。中華麺と同様、アルカリ加熱処理をともなう tortilla は、アルカリ処理中に澱粉粒とタンパク体の膨潤と崩壊、焼く工程で物理的破壊と消失がおこり、のり状のものを形成するとされており<sup>(51)</sup>、遊離化は、この焼くという操作を伴ったときに起こると報告されている<sup>(52)</sup>。中華麺の場合もおそらく、加熱調理という操作が重要であると推定されるが、その温度、pH、トウモロコシと小麦との違いで、tortilla との場合と異なる結果を示した。



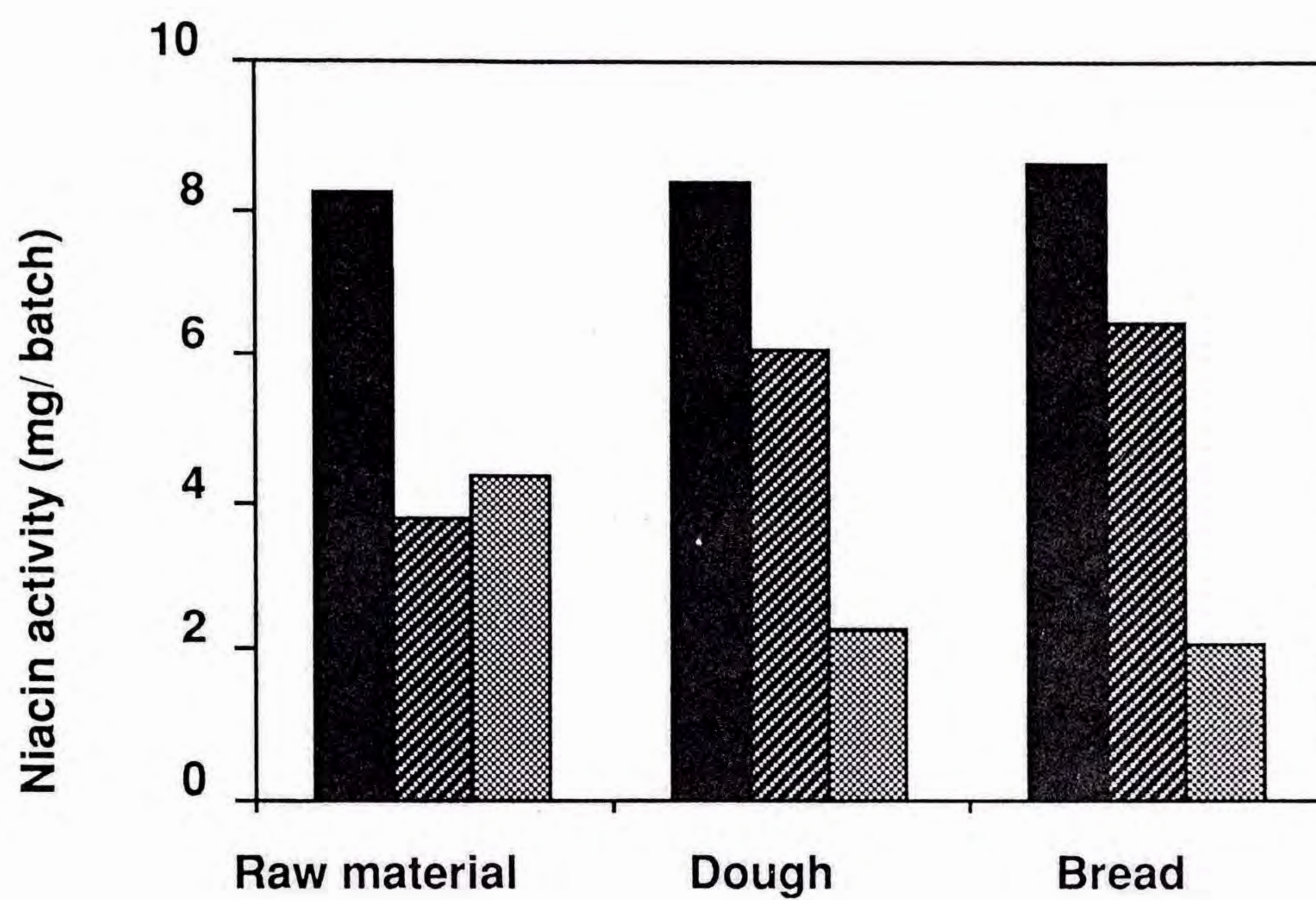


Fig.2-2. Change of niacin activities during fermentation and baking processes of bread added wheat bran.

■ ; Total , ▨ ; Free , ▩ ; Bound



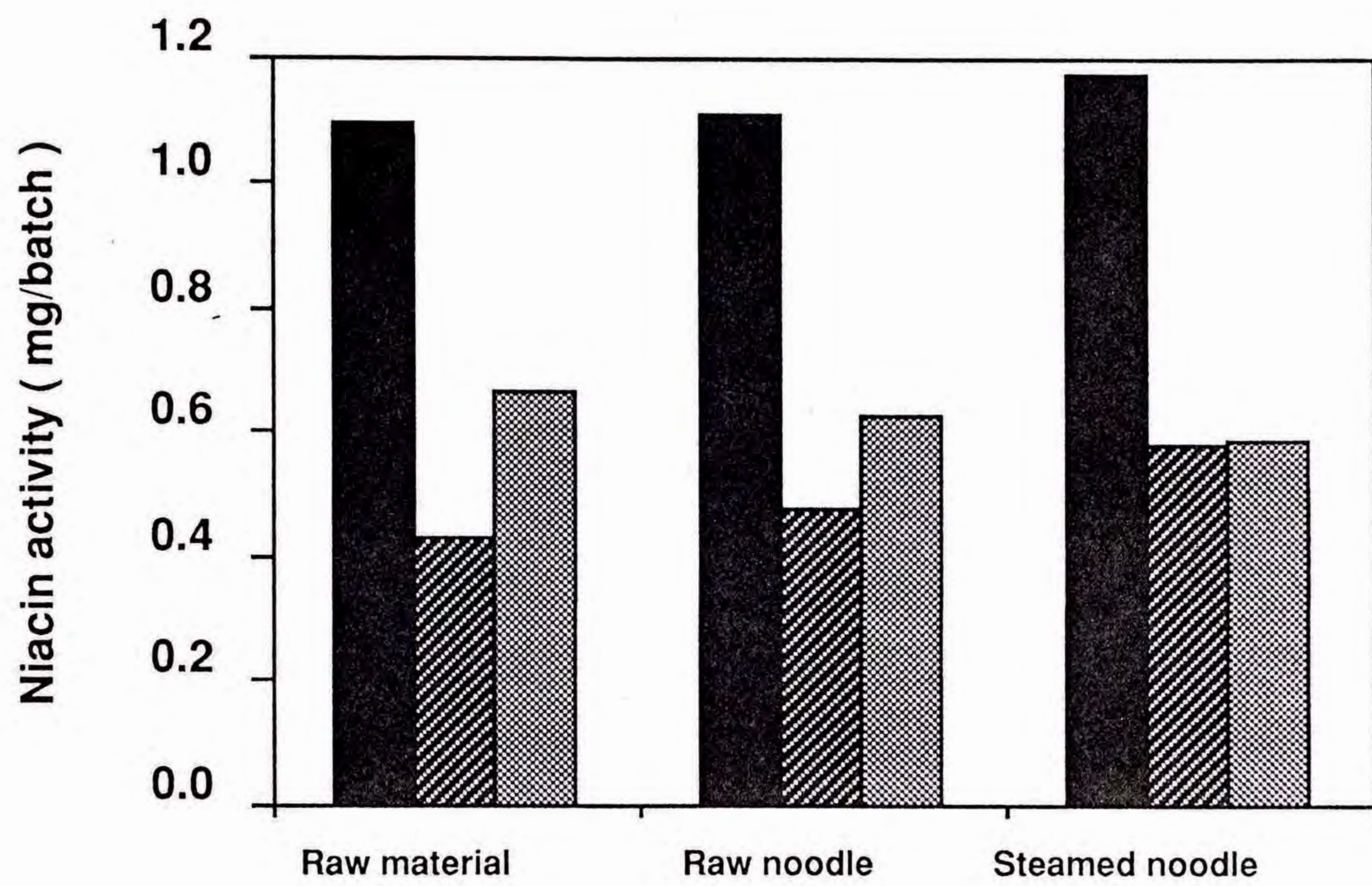


Fig. 2-3. Change of niacin activities during preparation of chinese noodle.

■ ; Total , ▨ ; Free , ▩ ; Bound



## 第2節 米、米ヌカの調理中におけるナイアシンの変動

### 2-1. 材料と実験方法

#### 2-1-1. 炊飯

##### 2-1-1-a. 白米

白米300gを蒸留水1000mlで洗米し、420mlの蒸留水を加えて、30分浸漬、吸水後、ナショナル1リットル直接炊き電気炊飯器で炊飯を行なった。

##### 2-1-1-b. 玄米

玄米300gを蒸留水1000mlで洗米し、720mlの蒸留水を加えて、1時間浸漬を行い、SEBアルミニウム圧力釜で沸騰から20分間中火で炊いた後、20分間蒸らしを行なった。

##### 2-1-1-c. 糠漬け

糠床は、今井らの方法<sup>53)</sup>をもとにして調製した。米ヌカ1500gと10分間煮沸した塩水（並塩360g、水道水2650ml）を合わせたものを糠床(4510g)とした。このうち3476gを42日間、13リットル容蓋つきポリエチレンバケツ内にて、25℃で熟成させた。仕込から7日間ずつを1周期とし、その第1, 2, 4, 6日目に90回攪はんした。第1日目の糠床攪はん後、糠床80-120gを試料として採取した。糠漬の漬け込みは、キュウリ2本を水洗し、約5時間自然乾燥させ、1本当たり1gの並塩で板ずりしたものを第2周期から第6周期まで、各々の周期の第1日目に糠床の試料採取後から18時間漬けた。

### 2-2. 遊離型および結合型ナイアシンの分別定量法

第1章、第7節で示した計算式は、小麦中結合型ナイアシン標品について算定したもので、そのまま、この計算式を米に適用できない。そこで米製品については、暫定的に、A値をF.N.値、 $(T - A)$ 値をB.N.値として、計算した。



### 2-3. 結果

白米中および玄米中ナイアシンに対する洗米、炊飯の影響をFig.2-4.からFig.2-5.に、糠漬けの結果をFig.2-6.～Fig.2-8.に示した。

#### 2-3-1. 白米 (Fig.2-4.)

白米中(100g)総ナイアシン含量は $2.28 \pm 0.14$ mgで、うち遊離型14.2%、結合型85.8%、洗米すると、総ナイアシン量は0.59mg、うち遊離型33.7%、結合型66.3%、炊飯後は、総ナイアシン量が0.46mg、うち遊離型84.3%、結合型15.8%であった。

白米の場合、洗米で失われるのは結合型ナイアシンが多く、炊飯時には結合型が遊離型に変化すると思われる結果を得た。

#### 2-3-2. 玄米 (Fig.2-5)

玄米中(100g)ナイアシン含量は $9.57 \pm 0.33$ mgで、うち遊離型10.4%、結合型89.6%、洗米すると、総ナイアシン量は $7.73 \pm 0.19$ mg、うち遊離型は11.0%、結合型は、89.1%、炊飯後は、総ナイアシン量が $7.99 \pm 0.26$ mg、うち遊離型48.8%、結合型51.2%であった。

玄米の洗米では、ナイアシンの損失はほとんどなく、炊飯時に遊離型が増加した。しかし、総ナイアシンの1/2が結合型で残存した。

#### 2-3-3. 糠漬け (Fig.2-6.～Fig.2-8.)

糠床中のナイアシンの遊離化度(遊離型ナイアシン量/総ナイアシン量 $\times 100$ )をFig.2-6に、キュウリ漬物中の遊離化度をFig.2-7.に示した。

糠床熟成に伴い、糠床中の遊離型ナイアシンは増加し、それと共に、キュウリ漬物中のナイアシンも増加した。

また、漬物のナイアシン量の糠床のそれに対する割合をFig2-8.に示した。漬物の遊離化ナイアシンの比率の増加は、糠床の比率より高いことから、漬物へのナイアシンの浸透は結合型より遊離型の方が優勢であると推定された。糠床の水分活性は第3周期で最低で、その後上昇し、好気性細菌は、第1周期から第2周期にかけ、急激に増加していることなどから、熟成中のナイアシンの遊離化の原因には、菌の生育、酸生成、水分活性などが複雑に関係していると考えられる。



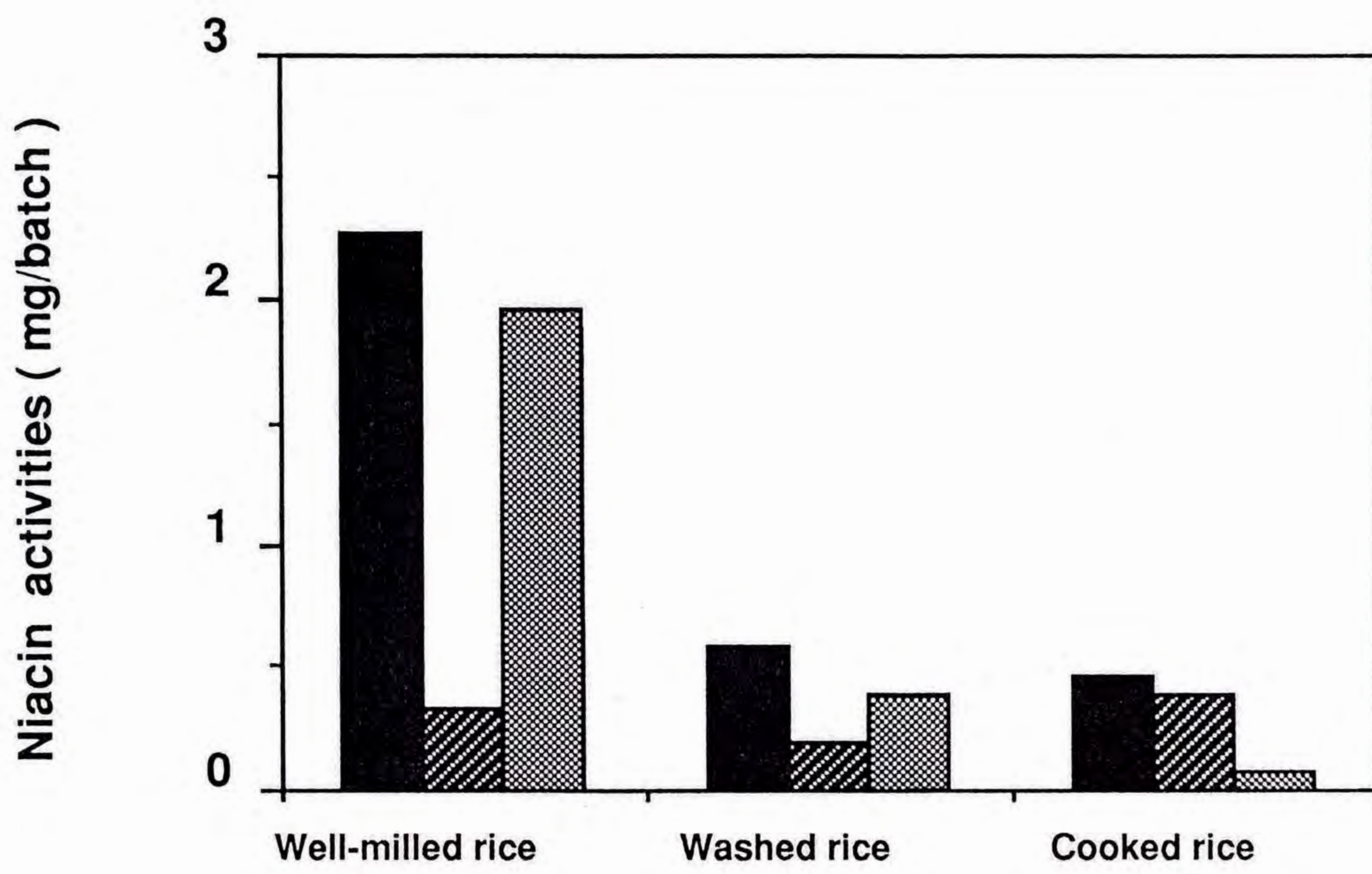


Fig. 2-4. Change of niacin activities during cooking well-milled rice.

■ ; Total , ▨ ; Free , ▩ ; Bound



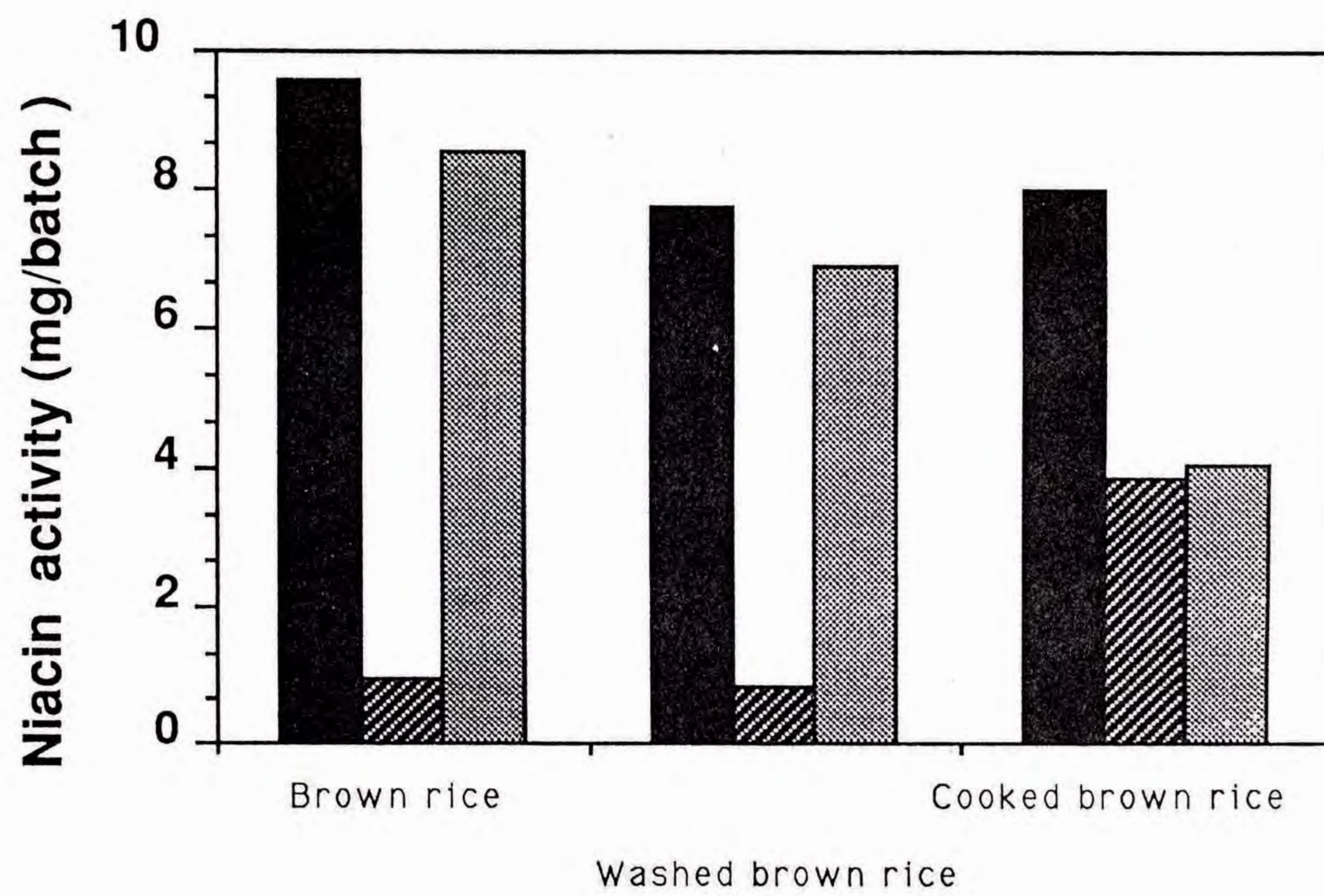


Fig. 2-5. Change of niacin activities during cooking brown rice.

■ ; Total , ▨ ; Free , ▩ ; Bound



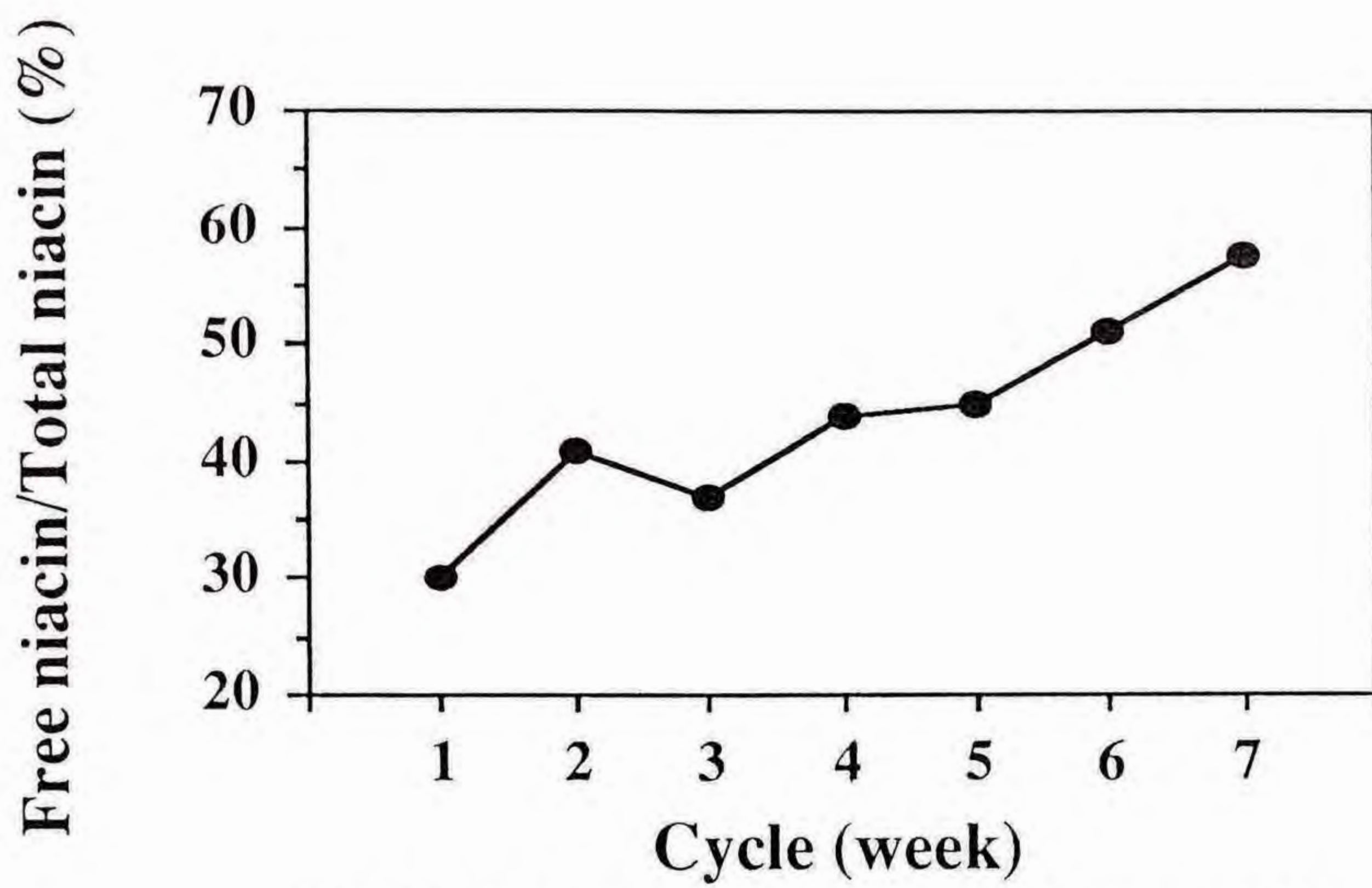


Fig.2-6. Ratio of free niacin to total niacin in the paste during aging.

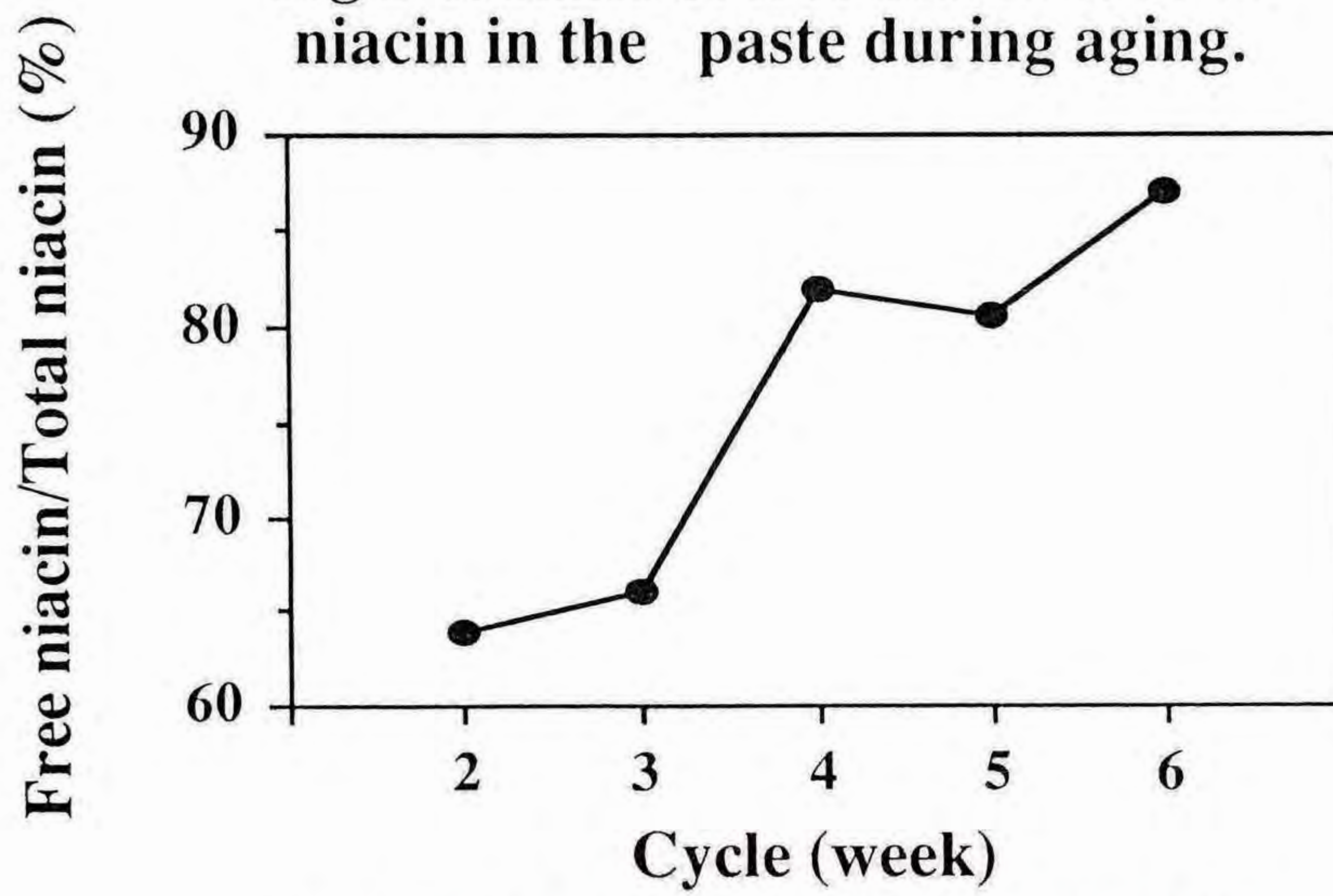


Fig.2-7. Ratio of free niacin to total niacin in cucumber during aging.

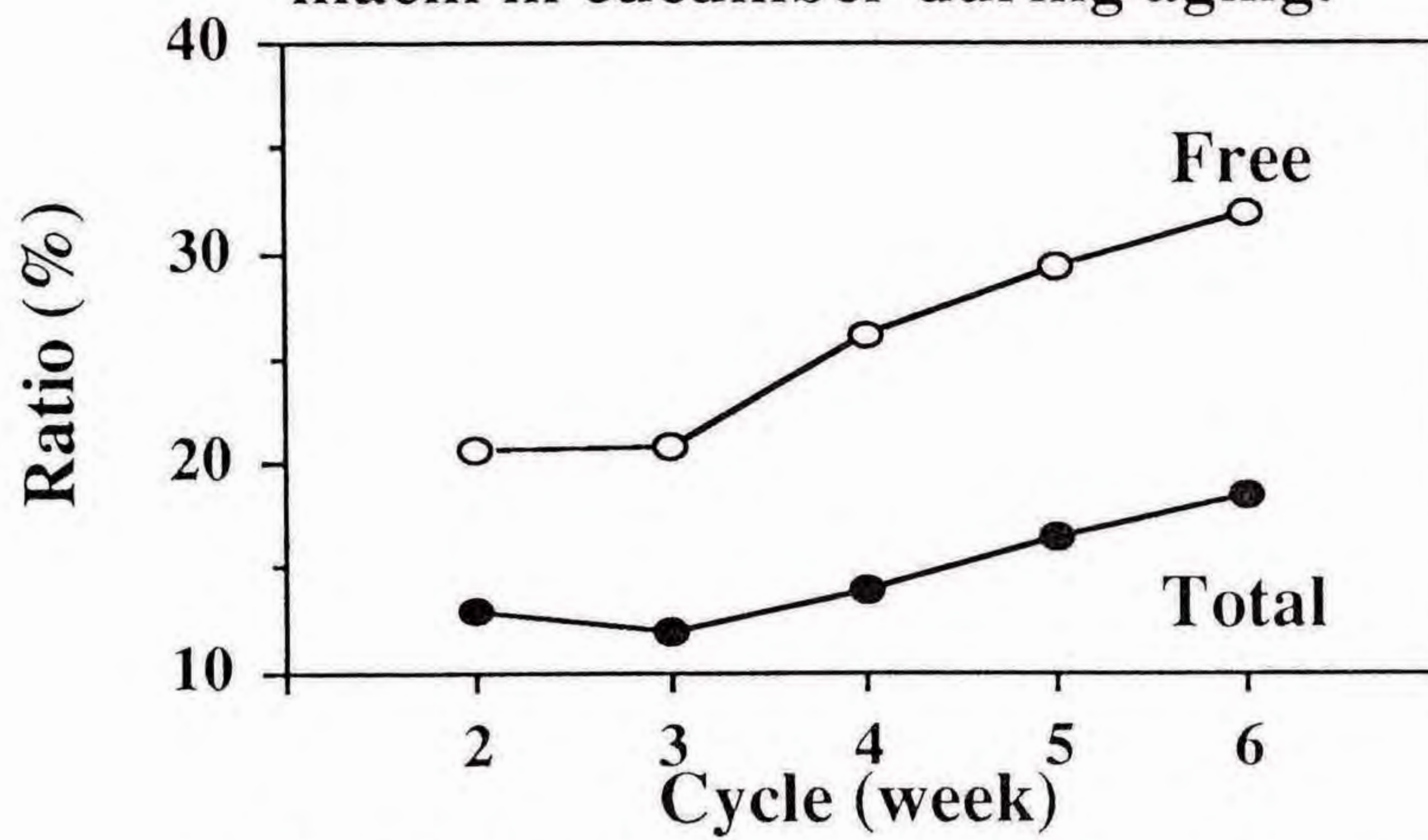


Fig.2-8. Ratio of niacin contents in cucumber to those of the rice bran paste.



### 第3節 考察

結合型ナイアシンの生物的非利用性に関わる問題として、自然界、特に食品中ナイアシンの存在形態とヒトに対するその生物活性、更に、結合型ナイアシンの有効性ナイアシンへの変換プロセスなどが重要である。

結合型ナイアシンは、アルカリや強酸で調理されない限り遊離されないとされている。調理・加工の操作、すなわち、加熱処理、物理的な力での組織の破壊や水分によるデンプンの膨潤などが、穀類に化学的変化あるいは物理的変化を引き起こし、有効性ナイアシンの割合を増加させるという今回の結果や調理によりラットの利用率が増加するというCarterら<sup>23)</sup>の結果を考え合わせると、穀類中ナイアシンには、アルカリ処理によってのみ切れる化学結合が原因による難利用性のものと、物理的な吸着あるいは取り囲みあるいは比較的弱い化学結合のため、普通の調理などでも有効性ナイアシンに変わりうる結合型ナイアシンが存在すると考えた方がむしろ自然であるかも知れない。

現在の一般的な日本人の食事から摂取されるナイアシン量は、計算値で1日約30-40ナイアシン当量である<sup>8)</sup>。その半分程度がトリプトファンに由来し、残り半分のナイアシンのうち、穀類に依存するナイアシンは1/3程度である。発展途上にある国々になると更に穀類の占める割合は増え、当然トリプトファン由来のナイアシンは減って、摂取ナイアシンの大半は利用できないナイアシンということになり、ナイアシンが豊富に含まれているとされる穀類を食べながらにして欠乏状態に陥ることになる。また、近頃、胚芽やふすまなど、ビタミンと食物繊維を売りものにして、朝食用のシリアルが出回っているが、特にナイアシンに関しては、その何割かは結合型でヒトに利用されないと思われる。

このように、穀類など結合型が多く含まれ、かなりの量を食べるものについては、遊離型と結合型ナイアシンの分別定量を行ない、少なくとも有効性ナイアシン量の表示を行なうことが望ましい。



#### 第4節 小括

調理・加工による穀類中ナイアシンの変化を結合型と遊離型ナイアシンの分別定量により明かとした。

1. パンおよび胚芽パン原材料中ナイアシンの各々42.5%、46.2%が結合型ナイアシンで存在したが、加工中にその一部が遊離化され、結合型が32.6%、24.4%まで減少した。製パン過程でのナイアシン損失は見られなかった。
2. 中華麺では、材料中総ナイアシンの60.7%が結合型で存在し、加工中に50.3%まで減少したが、結合型の損失はなかった。
3. 白米および玄米では、各々85.8%、89.6%が結合型であったが、白米では、洗米により、かなりのナイアシンが損失した。炊飯することにより、結合型の割合が、それぞれ15.8%、51.2%に減少した。
4. 糠床中およびキュウリ漬物中のナイアシンは、熟成と共に遊離型が増加し、その増加の割合が、キュウリ漬物中で高かったことより、キュウリへの浸透は、結合型ナイアシンより遊離型ナイアシンのほうが優勢であった。

結合型ナイアシンは、アルカリや強酸で調理されない限り遊離されないとされている。しかし、遊離型ナイアシン（有効性ナイアシン）の割合を増加させるという上述の結果から、調理・加工の操作、すなわち、加熱処理や物理的な力により組織の破壊がおこり、水分がデンプンの膨潤を引き起こし、また、乳酸菌や酵母など微生物の働きが穀類へ化学的変化あるいは物理的変化を引き起こしたものと推定された。

このことは、穀類中ナイアシンには、アルカリ処理によってのみ切れる化学結合が原因による難利用性のものと物理的な吸着や取り囲み、あるいは比較的弱い化学結合のため、普通の調理などでも有効性ナイアシンに変わりうる結合型ナイアシンが存在すると推察された。



穀類中のナイアシンは、加熱や熟成などの調理加工における各種操作により、その一部をヒトに有効な遊離型ナイアシンに転換するが、なお結合型は残存し、有効性ナイアシンの分別定量の必要性を確認した。



### 第3章 加水分解酵素による米ヌカ結合型ナイアシンの可溶化と有効化

第2章では、食品中の結合型ナイアシンと遊離型ナイアシンの分別定量の可能性を示し、調理操作等が遊離型ナイアシンへの変換に有効であることを示したが、なお、結合型の残存が認められた。難利用性ナイアシンを有効性ナイアシンに換えて、食品中のナイアシン活性を高めることは、食糧を有効に利用する上で重要である。

第3章では、難利用性ナイアシンを有効性ナイアシンに変換する酵素プロセスを検討し、更に、結合型ナイアシンの構造を明かとするを目的とした。

#### 第1節 加水分解酵素によるナイアシンの可溶化および有効化

一般に可溶性成分は酵素作用を受けやすいので、難利用性ナイアシンの有効化にはナイアシンの可溶化と可溶化されたナイアシンの遊離型への変換の2段階が必須となる。そこで、米ヌカを試料として、各種加水分解酵素を作用させ、不溶性ナイアシンの可溶化と有効性ナイアシンへの変換を検討した。

##### 1-1. 材料および実験方法

###### 1-1-1. 実験材料

米ヌカは、毛利精穀研究所より分与された搗精中期の、比較的果皮および糊粉層の少ない中層のものを使用した。

###### 1-1-2. 使用試薬

酵素反応に用いた酵素、プロテアーゼ (Type 1、膵臓、粗結晶)、プロナーゼ (Type XIV、*Streptomyces griseus*)、セルラーゼ ([EC 3.2.1.4]、*Aspergillus niger*、粗結晶) エステラーゼ ([EC 3.1.1.1]、基質カルボン酸エステル、ブタ肝臓) は、Sigma社製、タカジアスターゼ B は三共製薬、ジアスターゼは和光純薬製のものをそのまま使用し、他の試薬類は和光純薬の特級品を用いた。



### 1-1-3. 酵素反応

濃度、温度、反応時間を検討したうえで、最大の可溶化率を示す条件 (Table 3-1.) 下で酵素水解反応を行った。米ヌカ (2g) を使用緩衝液 (30ml) に懸濁させたものを基質とした。

### 1-1-4. 検液調製法およびナイアシン定量法

酵素反応液を pH6.0 に調整後、濾過で得た濾液について有効性ナイアシンと抽出総ナイアシンを定量した。有効性ナイアシンの定量には、濾液をそのまま用いた。抽出総ナイアシンの定量は、濾液を水酸化ナトリウム (終濃度 1 N) で 120°C、30 分間加圧分解したものを用いた。米ヌカを直接、1N 水酸化ナトリウムで 120°C、30 分間加圧分解したものを米ヌカ総ナイアシン値、0.1N 硫酸で 120°C、30 分間加圧抽出したものを米ヌカ遊離型ナイアシン値とした。ナイアシン定量は、第 1 章、1-1-4-a. に準じた、*L. plantarum* ATCC8014 を用いる微生物定量法によった。ナイアシン量は、4 回の独立した測定値の平均値に標準偏差をつけて表した。

### 1-1-5. 統計解析

第 1 章、第 1 節、1-1-6. と同様、有意差検定は、Student の t 検定によった。

## 1-2. 結果および考察

各酵素処理した米ヌカの有効性および抽出総ナイアシン量を Table 3-2. に示した。

反応液の米ヌカ総ナイアシン量に対する抽出総ナイアシン量の割合を可溶化率とすると、ナイアシンの可溶化率がセルラーゼ処理 (89.6%)、タカジアスターゼ処理 (81.3%) および 50% エタノール抽出 (76.8%) で高かった。

抽出総ナイアシン量に対する有効性ナイアシン量の割合を有効化率とすると、セルラーゼ (87.0%)、プロテアーゼ (75.7%)、エステラーゼ (68.8%) の各処理で高かった。有効性ナイアシンと抽出総ナイアシンの両パラメータから評価して、可溶性および有効性ナイアシン量を高めたのはセルラーゼであった。



Table 3-1. Conditions for enzymatic reaction.

Hydrolase	Hydrolase concentration* <sup>1</sup>	p H	Temperature (°C)
Protease	0.5	7.4* <sup>2</sup>	45
Pronase	0.5	7.4	45
Diastase	5	7.4	45
Cellulase	0.5	4.6* <sup>3</sup>	45
Takadiastase	5	4.6	45
Hemicellulase	1	4.6	45
Esterase	0.17	8.0* <sup>4</sup>	27

Rice bran(2g) was hydrolyzed in 30ml of the buffer solution with each hydrolase.

\*1 Per cent in the system for the enzymatic reaction.

\*2 1/10N phosphate buffer.

\*3 1/10N acetate buffer.

\*4 1/10N phosphate buffer.



Table 3-2. Effects of hydrolases on solubilization of bound niacin in rice bran.

Medium or enzyme for solubilization	Soluble niacin activity (mg/100g rice bran)* <sup>1</sup>		Rate of solubilization (%)	Rate of available form* <sup>3</sup> (%)
	Available niacin (I)* <sup>2</sup>	Total niacin (II)		
	Ethanol (50%)	16.8±0.29		
Buffer (pH 7.4)	28.7±1.26	41.8±4.50	69.3	68.7
Protease (do.)	32.0±1.00	42.3±1.53	70.1	75.7
Pronase (do.)	28.5±2.32	44.2±3.06	73.3	64.5
Diastase (do.)	28.5±0.50	42.5±1.29	70.5	67.1
Buffer (pH 4.6)	15.1±0.08	38.6±2.95	64.0	39.1
Cellulase (do.)	47.0±4.20	54.0±5.66	89.6	87.0
Takadiastase (do.)	30.3±3.79	49.0±5.57	81.3	61.8
Hemicellulase (do.)	21.9±2.69	41.0±0.71	68.0	53.4
Buffer (pH 8.0)	23.0±0.50	40.9±2.13	67.8	56.2
Esterase (do.)	29.8±2.75	43.3±5.30	71.8	68.8
1N NaOH	—	60.3±0.58* <sup>4</sup>	100	100
0.1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20.5±3.56* <sup>5</sup>	—	—	—

\*1 Mean±standard deviation (n=4).

\*2 Significantly different between cellulase treated and the control extracts (p<0.001), between takadiastase treated and the control extracts (p<0.005), between cellulase and takadiastase treated extracts (p<0.005), between esterase treated and the control extracts (p<0.01) and between cellulase and protease treated extracts (p<0.001).

\*3  $I / II \times 100$

\*4 Total niacin.

\*5 Free niacin.



このように、セルラーゼによる可溶化効率および有効化がともに水酸化ナトリウムについて高いことから、ナイアシンがセルロースによる物理的とり囲み、あるいはセルロースと化学結合している可能性が考えられ、結合型ナイアシンの栄養効率の低さと関連して興味深い。しかし、他の酵素にもある程度の効果が認められたことについては、小麦フスマの結合型ナイアシンはニコチン酸に多糖、糖ペプチド等が結合した数種のものがあるというMasonら<sup>47)</sup>の報告と考えあわせると、米ヌカにも数種のタイプのナイアシンが共存するものと考えられる。



## 第2節 セルラーゼと他の水解酵素による2段酵素反応のナイアシン可溶化 および有効化

第1節の結果より、セルラーゼが有効であったので、セルラーゼを反応させた後、他の水解酵素による2段可溶化を行った。

### 2-1. 実験材料および方法

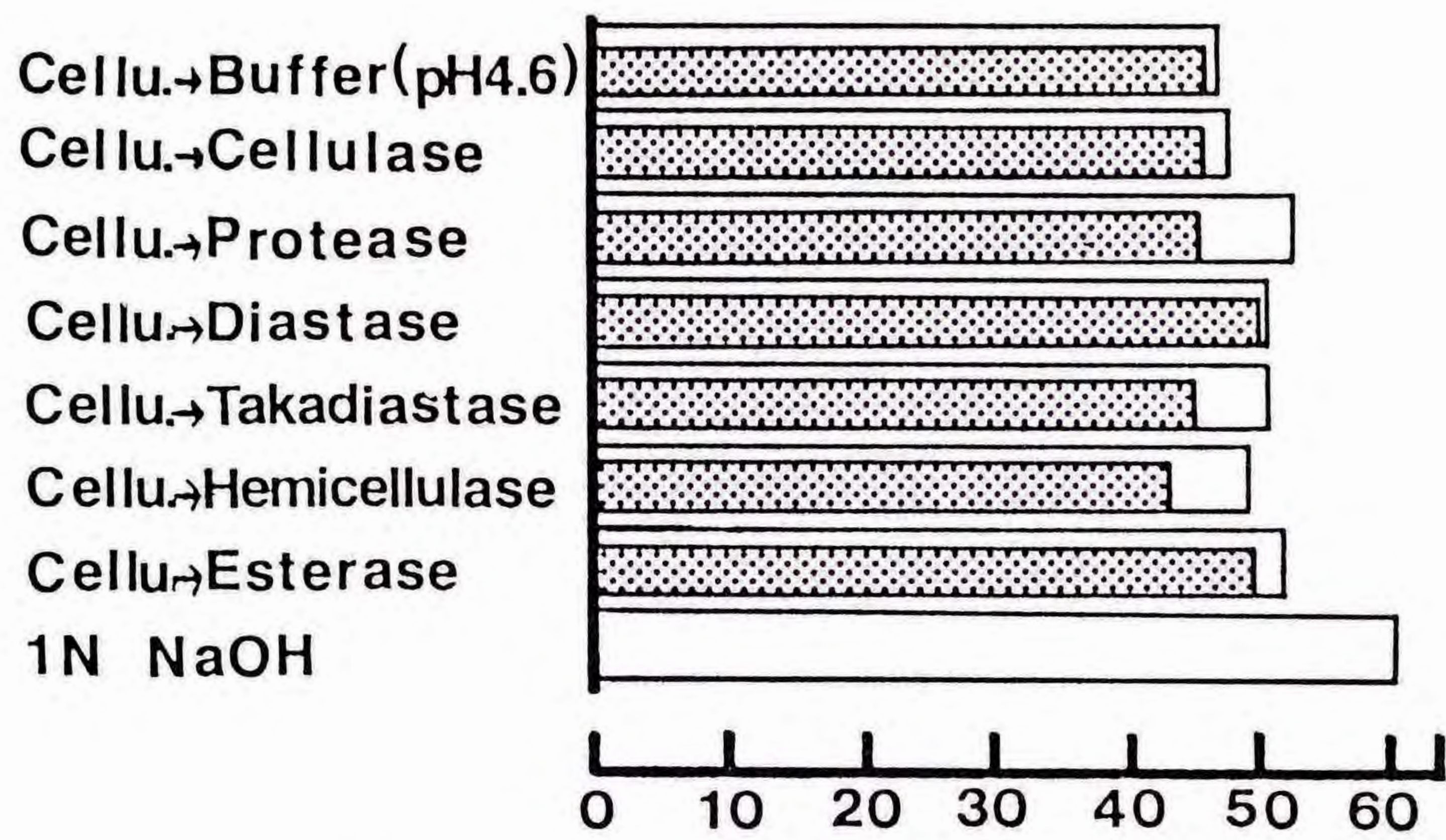
第1節に準じて行った。

### 2-2. 結果および考察

セルラーゼと他の水解酵素による2段酵素反応のナイアシン可溶化率および有効化率の結果をFig. 3-1.に示した。ナイアシンの可溶化率において、対照（セルラーゼと緩衝液の2段可溶化）と較べると、プロテアーゼ、エステラーゼで高かった。また、結合型ナイアシンの有効化はエステラーゼ、ジアスターゼで高かった。2段目の酵素にセルラーゼを用いると、対照と差が認められなかった。プロテアーゼでは、可溶化ナイアシン量だけが増加したが、エステラーゼでは、可溶化及び有効性ナイアシン量に増加がみられた。

このことにより、米ヌカ中結合型ナイアシンはセルロースとのかかわりのほかに、カルボン酸とのエステル結合の関与が考えられた。





Niacin Content by Microbioassay (mg /100g)

Fig.3-1. Effects of successive hydrolyses with cellulase and a hydrolase on solubilization of niacin and liberation of bound niacin in rice bran.

Blanked bar, total niacin; dotted bar, available niacin.



### 第3節 セルラーゼ、エステラーゼのナイアシン可溶化及び有効化におよぼす影響

セルラーゼおよびエステラーゼがナイアシンの可溶化と有効化に効果のあることがわかったが、ナイアシンの利用性、とくにセルロースが構造的妨害をしている可能性が高いため、セルラーゼ→エステラーゼ、エステラーゼ→セルラーゼと順序を変えて可溶化を行い、抽出総ナイアシン量と有効性ナイアシン量を測定した。

#### 3-1. 実験材料および方法

第1節に準じて行った。

#### 3-2. 結果および考察

Table 3-3. に示したように、セルラーゼ処理してからエステラーゼ処理した場合には、総ナイアシン値と有効性ナイアシン値に有意差は認められず、初めにエステラーゼ処理してからセルラーゼで処理した場合には、両値に有意差を認めた。しかし、セルラーゼ→エステラーゼの方が、エステラーゼ→セルラーゼより、両値とも高い値を得た。

この結果は、ナイアシンと糖などの物質がエステル結合し、この結合体のまわりをセルロースが包囲して、動物に対する利用を妨げているという著者の推定を裏付ける結果と思われる。ナイアシンエステル結合体の利用性や構造は、更に特異性の高いエステラーゼなどにより、明らかにしていきたいと考える。



Table 3-3. Soluble niacin content of rice bran after successive digestions with cellulase and esterase or esterase and cellulase.

Enzyme used for 1st digestion	Enzyme used for 2nd digestion	Soluble niacin content (mg/100g rice bran)	
		Available niacin	Total niacin
Cellulase	→ Esterase	45.0±1.00	48.3±2.52
			n. s.
Esterase	→ Cellulase	32.8±1.04	44.3±0.58
			p<0.01



## 第4節 米ヌカ抽出物および酵素処理物のイオン交換カラムクロマトグラフィー

### 4-1. 実験材料および方法

#### 4-1-1. 試料調製法

米ヌカ水抽出物は、米ヌカ0.2gを蒸留水で24時間、45℃で抽出し、pH6.0に調整後濾過し、濾液を凍結乾燥したものをカラムクロマトグラフィー用標品とした。

セルラーゼ処理物は、米ヌカ0.2gにセルラーゼを作用させ、沸騰水浴中で2分間加熱して酵素を失活させ、pH6.0に調整後濾過し、濾液を凍結乾燥したものをカラムクロマトグラフィー用標品とした。

セルラーゼ・エステラーゼ連続処理物は、米ヌカ0.2gにセルラーゼを作用させ、さらにエステラーゼを作用させ、沸騰水浴中で2分間加熱して酵素を失活させ、pH6.0に調整後濾過し、濾液を凍結乾燥したものを、カラムクロマトグラフィー用標品とした。

#### 4-1-2. DEAE-イオン交換カラムクロマトグラフィー

Mason ら<sup>47)</sup>の方法に従い、0.005Mトリス塩酸緩衝液(50%エタノール含有、pH 7.3)にカラムクロマトグラフィー用標品を溶かし、DEAE-セルロース(Sigma社)を充填した2×30cmカラムに添加し、0.005M-0.1Mトリス塩酸緩衝液、続いて0.1Mトリス塩酸緩衝液-0.5M塩化ナトリウム溶液のリニアグラデーションで溶出を行い、フラクションコレクターSF-100G(Toyo)で2.5mlの画分に分取した。UVICON UV-254F(Toyo)による254nmの吸光度から溶出パターンを得た。また、画分が終濃度0.5N水酸化ナトリウム溶液になるようにし、120℃、30分間加圧分解したものを総ナイアシン用検液、画分そのままを有効性ナイアシン用検液として、微生物定量により各画分のナイアシン量を求めた。

#### 4-1-3. ナイアシン定量法

ナイアシン定量は第1章、第1節、1-1-4-a.に準じて行った。



#### 4-2. 結果および考察

米ヌカ水抽出物のカラムクロマトグラムと各画分の総ナイアシン量と有効性ナイアシン量の結果をFig. 3-2. に示した。

吸着画分 (No. 41~50) は、総ナイアシンと有効性ナイアシン量がほぼ一致し、さらにニコチン酸添加実験でもこの画分への溶出を確認したので、この画分にはニコチン酸型ナイアシンが溶出していると考えられる。一方、非吸着画分 (No. 14~21) では、総ナイアシンと有効性ナイアシン値に差があるので、広い意味で結合型ナイアシンといえる。

第1章、第5節で、結合型ナイアシン定量法を検討した際、結合型標品は菌体に取り込まれにくいのが、18時間以上の培養でその50%程度が利用されたという事実から、この非吸着画分の有効性ナイアシン定量値については、結合型ナイアシンが定量された可能性と、ニコチン酸以外のナイアシン(ニコチンアミド)が定量された可能性とが考えられる。結合型ナイアシンとニコチン酸以外の有効性ナイアシンの分別は、今後の問題として、以下、本章では、吸着部の有効性ナイアシン定量値(総ナイアシン値と等しい)を吸着遊離型ナイアシン(adsorbed free niacin)量、非吸着部の総ナイアシン値を非吸着ナイアシン(non-adsorbed niacin)量、非吸着部の有効性ナイアシン値を非吸着遊離型ナイアシン(non-adsorbed free niacin)量、非吸着ナイアシン量と非吸着遊離型ナイアシン量の差を真性結合型ナイアシン(net bound niacin)量として区別した。なお、水抽出物では、非吸着ナイアシンと吸着遊離型ナイアシンの活性比は、5:4であった。

米ヌカ0.2gのセルラーゼ処理物のカラムクロマトグラムと各画分の総ナイアシンおよび有効性ナイアシン値をFig. 3-3. に示す。セルラーゼ処理の結果、Fig. 3-2の非吸着ナイアシンの約80%が吸着部に移ることが判った。

セルラーゼ-エステラーゼの連続処理物のカラムクロマトグラフィーを行った結果をFig. 3-4. に示した。非吸着部のナイアシンの84%は、アルカリ分解をすることなく、L. plantarum に利用される非吸着遊離型ナイアシンとして溶出した。非吸着ナイアシンと吸着遊離型ナイアシンの活性比は、2:3で遊離型が多かったが、米ヌカには、このふたつの酵素処理によっても遊離型になりえない、結合型ナイアシンが存在することが示された。



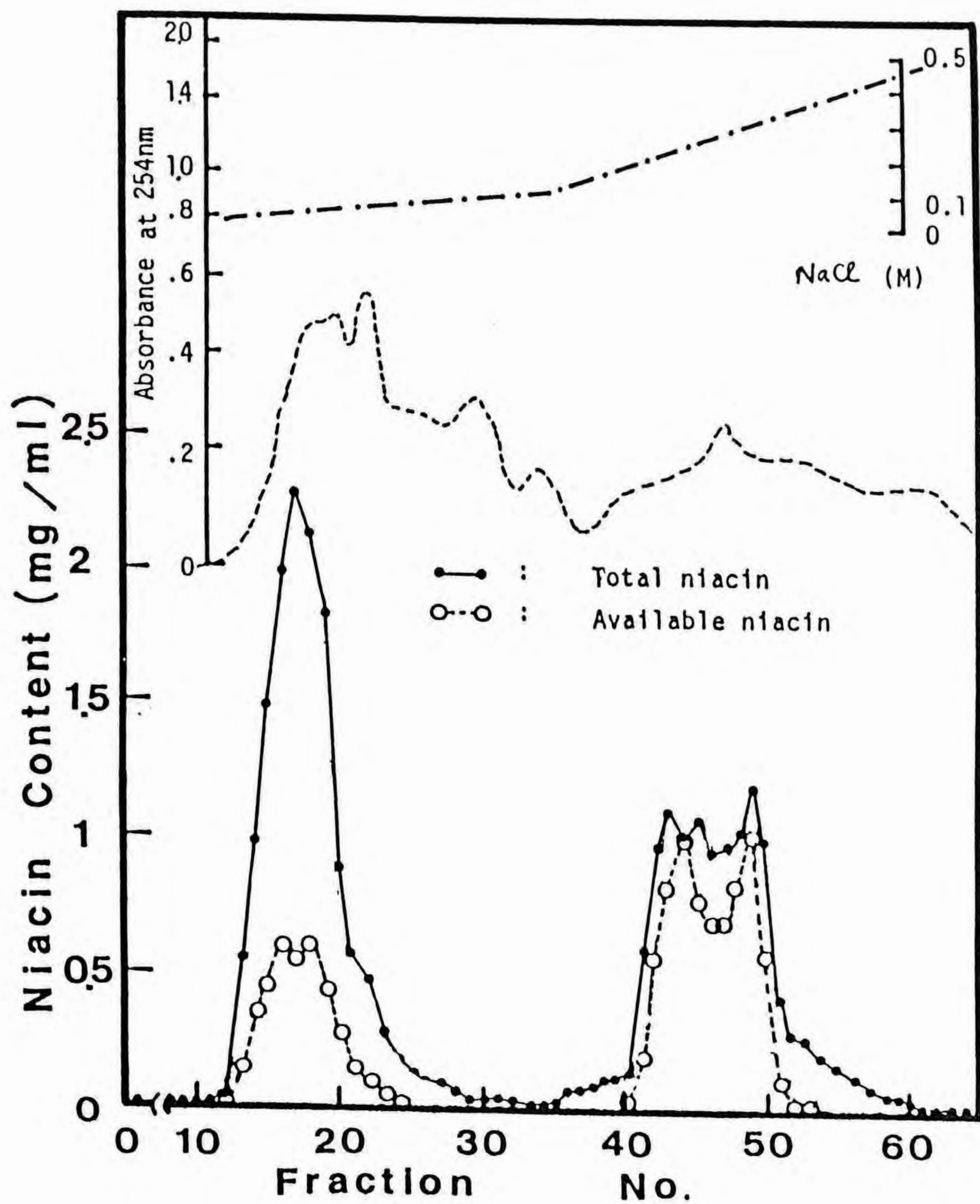


Fig.3-2. DEAE-cellulose column chromatography of the rice bran extract.

Water extract from rice bran (0.2g) was chromatographed on a DEAE-cellulose column (2×30cm) previously equilibrated with 0.005M-tris in 50% ethanol (pH 7.3). An aliquot of each fraction (2.5ml) was applied to the determination of the niacin content.

●—Total niacin; ○— Available niacin.



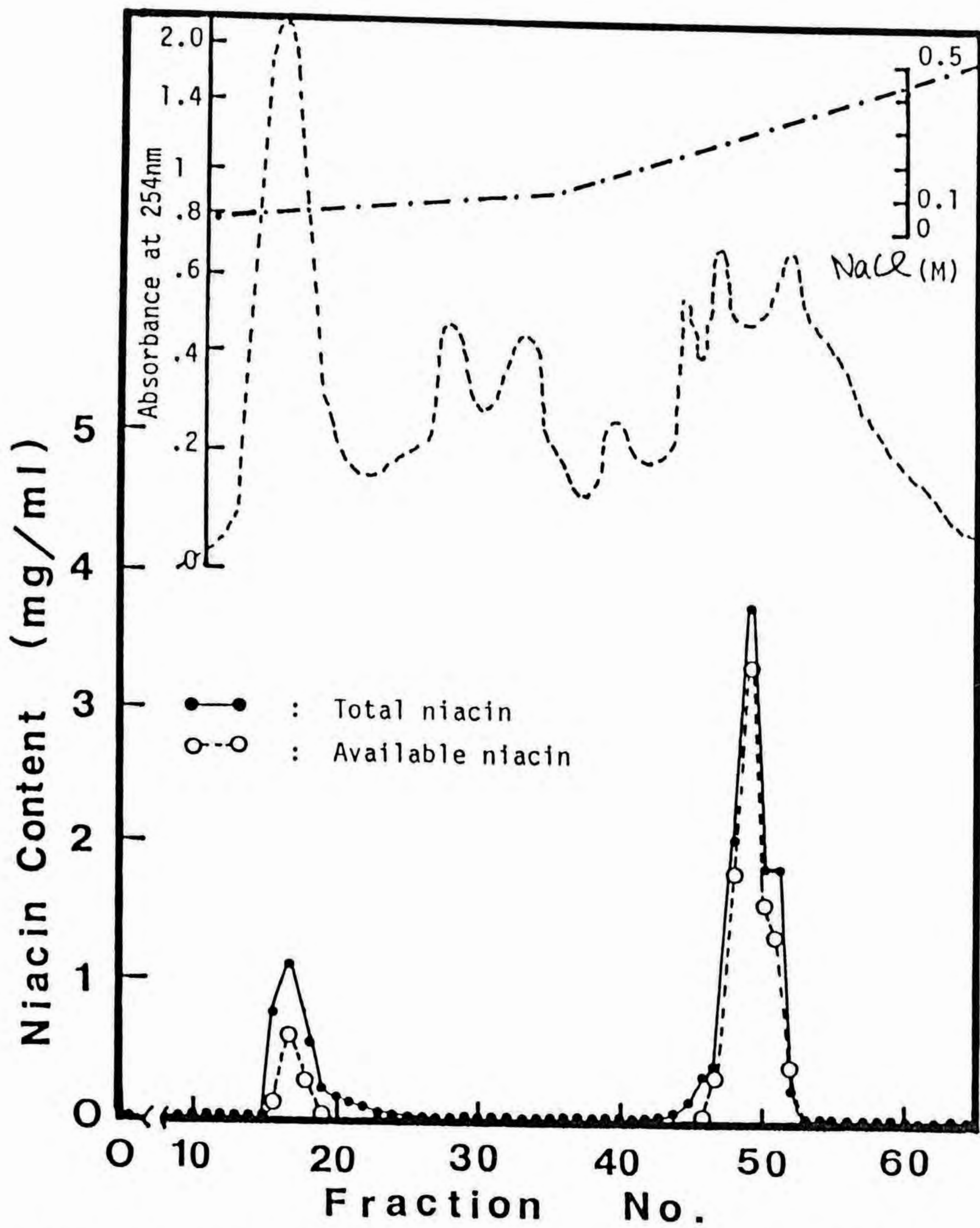


Fig.3-3. DEAE-cellulose column chromatography of the cellulase treated rice bran extract .

●—Total niacin; ○— Available niacin.



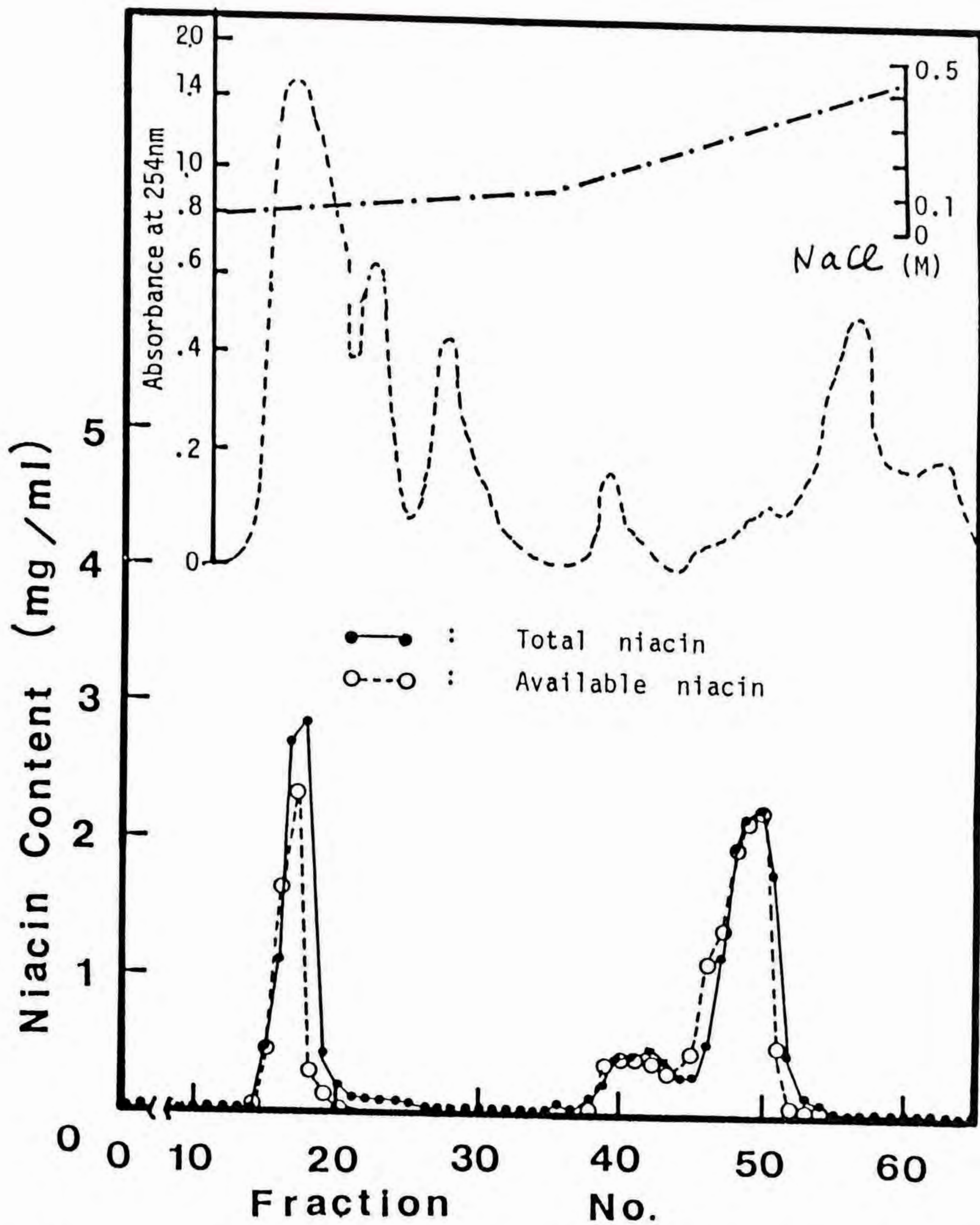


Fig. 3-4. DEAE-cellulose column chromatography of the cellulase and esterase treated rice bran extract.

●—Total niacin; ○—Available niacin.



## 第5節 セルラーゼ処理物の非吸着画分のエステラーゼ処理

### 5-1. 実験材料および方法

第4節でのセルラーゼ処理物の非吸着画分No. 16~20を集め、エステラーゼを作用させて、沸騰水浴中で2分間加熱して酵素を失活させたものをpH6.0に調整後、濾過し、濾液を凍結乾燥してカラムクロマトグラフィー用標品とした。クロマトグラフィーは第4節の方法、ナイアシン定量は第1章、第1節、1-1-4-a. に準じて行った。

### 5-2. 結果および考察

セルラーゼ処理物非吸着画分にエステラーゼ処理を行い、再カラムクロマトグラフィーを行った結果をFig. 3-5に示す。

セルラーゼ処理物の非吸着部の総ナイアシン活性の30%程度が吸着部に移行し、非吸着部に残ったナイアシンも大部分がアルカリ分解することなく、ナイアシン定量菌 L. plantarum に利用されるような非吸着遊離型ナイアシンに転換した。



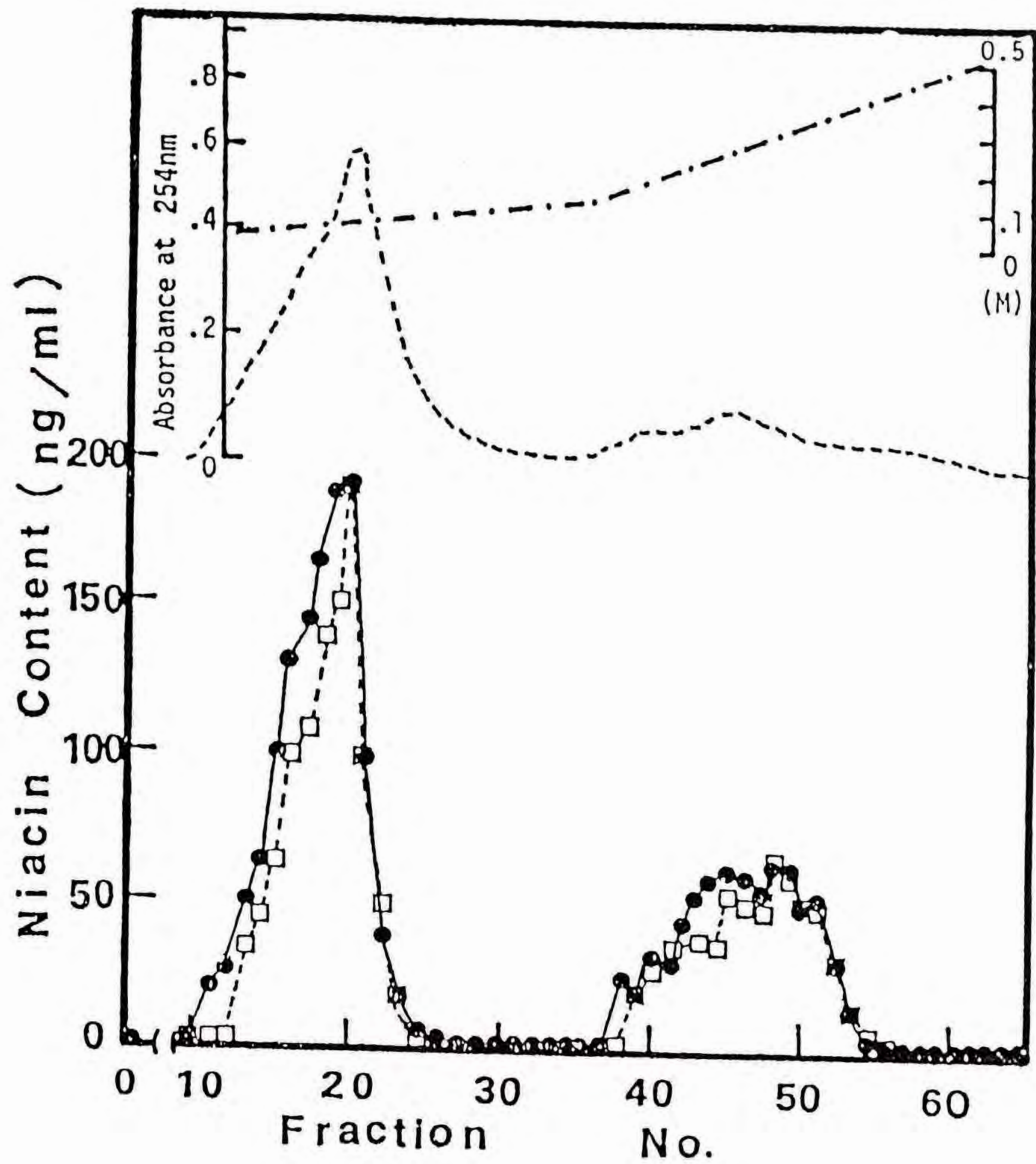


Fig. 3-5. DEAE-cellulose column chromatography of the esterase treated non-adsorbed fraction in Fig. 3-3.

The non-adsorbed fraction in Fig. 3-3. (50mg on a dry matter basis) was treated with esterase and then the hydrolysate was chromatographed on a DEAE-cellulose column.

●—Total niacin; □— Available niacin.



## 第6節 小括

穀類に存在する結合型ナイアシンの難利用性の原因を構造面から明らかにするために、米ヌカを試料として、プロテアーゼ、プロナーゼ、ジアスターゼ、セルラーゼ、タカジアスターゼ、ヘミセルラーゼ、エステラーゼの各種加水分解酵素のナイアシン可溶化効果及び結合型ナイアシンの有効化を検討し、効果の認められたセルラーゼとエステラーゼに対する結合型ナイアシンの挙動をDEAE-セルロースイオン交換カラムクロマトグラフィーで示した。

1. 米ヌカに至適条件で酵素を作用させた結果、セルラーゼ（89.6%）、タカジアスターゼ（81.3%）、エステラーゼ（71.8%）で可溶化率が高かった。結合型ナイアシンの有効化はセルラーゼ（87.0%）、プロテアーゼ（75.7%）で高かったが、いずれもアルカリ分解には及ばなかった。また、ヘミセルラーゼ（各々68%、53.4%）の効果は最低であった。
2. 最も効果のあったセルラーゼを作用させた後、さらに他の加水分解酵素を作用させた結果、第2段階にエステラーゼを適用した場合に、ナイアシンの可溶化及び有効化に効果が認められた。しかしながら、エステラーゼを作用させ、その後、セルラーゼを作用させても可溶化及び有効化の効果は有意（ $P < 0.01$ ）に低かった。
3. 米ヌカ水抽出物の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで、結合型ナイアシンが溶出する非吸着部と遊離型ナイアシンが溶出する吸着部の総ナイアシンの比は、5 : 4であった。
4. 米ヌカのセルラーゼ処理物のクロマトグラフィーでは、結合型ナイアシンの大部分が吸着部遊離型ナイアシン（ニコチン酸タイプ）に転換した。米ヌカにセルラーゼ→エステラーゼを連続作用させると、ナイアシンの大部分はニコチン酸タイプあるいはアルカリ分解せずに本定量菌 *L. plantarum* に利用される型（ニコチンアミドタイプ）に転換することを明らかにした。セルラーゼ処理物



の非吸着画分にエステラーゼを作用させると、この画分の約30%のナイアシンが遊離型となって吸着部に移行し、非吸着部に残ったナイアシンも遊離型ナイアシンに変換することを示した。

以上より、米ヌカ結合型ナイアシンの難利用性の一因は、セルロースにあると考えられる。穀類中結合型ナイアシンの可溶化および遊離化には、セルラーゼに続いてエステラーゼ処理を行う酵素プロセスが有効であることを示すことができた。



## 第4章 酵素処理した結合型ナイアシンの生物学的有効性

第3章では、結合型ナイアシンの構造面からのアプローチを試み、各種加水分解酵素を使って、難利用性ナイアシンを有効性ナイアシンに変換する酵素プロセスを検討し、セルラーゼとエステラーゼによる2段酵素処理が米ヌカ結合型ナイアシンを可溶化および遊離化させることを明らかとし、米ヌカ結合型ナイアシンの大部分は、糖などのアルコール類とエステル結合し、その周りをセルロースが取り囲むか、一部、セルロースとこのアルコール類が $\beta 1 \rightarrow 4$ で化学結合していると推定した。

そこで第4章、第1節では、米ヌカにセルラーゼを作用させ、これをラットに投与し、可溶化および遊離化された米ヌカ中ナイアシンの生物学的有効性について検討し、第2節では、米ヌカ抽出液にセルラーゼを作用させ、酵素処理を受けたナイアシンの生物学的有効性を検討した。

### 第1節 米ヌカに対するセルラーゼ処理がラットのナイアシン利用に与える影響

#### 1-1. 実験材料および方法

##### 1-1-1. 実験材料

米ヌカは、毛利精穀研究所（滋賀県彦根市）より分与された搗精中期の比較的、果皮および糊粉層の少ない中層のものを使用した。

##### 1-1-2. 試薬

セルラーゼ (*Aspergillus niger*、粗結晶)、NAD、アルコールデヒドロゲナーゼは、Sigma社より、ハーパー配合の塩混合は、オリエンタル酵母工業(株)より、チアゾリールブルーは、東京化成工業(株)より、コーンオイルは、日清食品(株)より購入した。飼料に用いたアミノ酸、コリン塩酸塩、ビタミン、コーンスターチ、ショ糖および他の試薬はすべて、和光純薬工業(株)の特級品を使用した。

##### 1-1-3. 実験動物、飼料および飼育方法

Wister系3週令の雄ラットを藤田幸四郎商店より購入し、2日間完全食で予備飼育を行なった後、本実験に用いた。



ラットを各4匹ずつ5群に分け、基礎食のみ、基礎食に1mg%ニコチン酸添加(米ヌカ5g中の総ナイアシン量に相当)、米ヌカ添加群として、基礎食に米ヌカ5%を添加した飼料、セルラーゼ処理米ヌカ5%を添加した飼料、アルカリ分解米ヌカ5%を添加した飼料をそれぞれに投与した。

基礎食については、柴田らの方法に従い<sup>53)</sup>、Table 4-1.に示したように、トリプトファンを0.043%に制限した飼料を用いた。なお、米ヌカおよび米ヌカ抽出物の重量分については、コーンスターチとコーンオイルで調整を行なった。

両実験共に、ラットは、22±2℃の室内で、ラットブラケット式架台で個別に飼育を行い、水および飼料は自由摂取とした。なお、飼料摂取量および体重測定は、午前10時に行なった。

#### 1-1-4. 米ヌカのセルラーゼ処理およびアルカリ分解法

セルラーゼ処理米ヌカは、第3章と同様に、米ヌカを1/10M酢酸緩衝液(pH 4.6)に懸濁させたものを基質とし、セルラーゼ(0.2%)と45℃で、24時間反応させ、pH7.0に調整後、これを凍結乾燥して作成した。アルカリ分解米ヌカ試料は、米ヌカを1N水酸化ナトリウム溶液で、120℃、1時間加圧分解し、pH 7.0に調整後、凍結乾燥して作成した。

#### 1-1-5. 試料作成

##### 1-1-5-a. 採血

屠殺前日にラットの尾より採血し、直ちに、50μlを0.1Mニコチンアミドを含む0.05Mリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)2ml中に入れ、5分間沸騰水浴中で加熱し、氷冷後、5000 r.p.m.で10分間遠心分離を行ない、上清を血中NAD定量用試料とした。

##### 1-1-5-b. 肝臓試料作製法

ラットをエーテル麻酔後開腹し、すみやかに肝臓を摘出し、0.2g前後を正確に秤量、20倍量の0.1Mニコチンアミドを含む0.05Mリン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)を加え、ホモゲナイズした。ただちに、2.5mlの0.1Mニコチンアミドを含む0.05Mリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)に、このホモジネイト0.5mlを加え、5分間沸騰水浴中で加熱し、氷冷後、5000 r.p.m.で10分間遠心分離を行ない、上清を肝臓中NAD用定量試料とした。

また、肝中ナイアシン量定量試料として、秤量した肝臓に5倍量の0.6N過塩



Table 4-1. Composition of a basal diet of tryptophan-limited, amino acids mixture.

Ingredient	%
Amino acid mixture (Miyazaki pattern except for Try 0.043% <sup>a</sup> )	10
$\alpha$ -Corn starch	40
Sucrose	40
Corn oil	5
Salt mixture (Harper's mixture <sup>b</sup> )	4
Vitamin mixture (NiA-free, Harper's mixture <sup>b</sup> )	1
Choline- chloride	0.1
	IU/100g diet
Vitamin A	1500
Vitamin D	150
Vitamin E	0.6

a) Miyazaki, M. and Hayakawa, S.: Reports of the Research Committee of Essential Amino Acids, 25, (1969), 89.

b) Harper, A. E.: J. Nutr. 68, (1959), 405.



素酸を加えてホモゲナイズし、これを5000 r.p.mで10分間、遠心分離し、さらに等量の0.6N過塩素酸を加えて、再抽出を行ない、1回目の上清と合わせて検液とした。

#### 1-1-6. 代謝産物測定法

##### 1-1-6-a. NAD定量法

Nisselbaumらの方法<sup>54)</sup>に従い、アルコールデヒドロゲナーゼによる生成NADHのチアゾリールブルーによる発色を波長556nmで測定した。なおこの方法ではNAD + NADH値が得られるが、記載はNADとした。

##### 1-1-6-b. ナイアシン定量法

第1章、第1節、1-1-4-a.の方法に準じた。

#### 1-1-7. 統計解析

第1章、第1節、1-1-6.に従い、有意差検定は、Studentのt検定によった。

## 1-2. 実験結果および考察

ニコチン酸欠の基礎食（トリプトファン制限食）、基礎食 + 1 mg%ニコチン酸、基礎食 + 未処理米ヌカ5%、基礎食 + セルラーゼ処理米ヌカ5%、基礎食 + アルカリ分解米ヌカ5%の各飼料で、ラットを29日間飼育した際の体重増加、飼料摂取量および肝重量をTable 4-2.に示した。

最終体重では、ニコチン酸添加群が $47.1 \pm 6.38$ gと最も体重増加が多く認められたが、米ヌカ添加群間では有意差は認められなかった。

飼料摂取量では、セルラーゼ処理群は、アルカリ処理群におよばなかったが、未処理群を上回った。

肝重量では、アルカリ処理群( $1.98 \pm 0.32$ g)で高いが、基礎食群とでも有意差がないことから、有効なナイアシン栄養の指標とは考えにくい。

結合型ナイアシンは、1N程度の酸、アルカリで1時間加圧分解を行なえば、完全に遊離化するか、一部生物に利用できる型に変わることが報告されているが<sup>21)</sup>、今回の *in vivo*の実験では、体重増加あるいは肝重量においては、米ヌカのセルラーゼ処理あるいはアルカリ処理の影響は認められなかった。これは、浦部ら<sup>55)</sup>が、トリプトファンを制限した10%アミノ酸混合飼料を基礎食とした



Table 4-2. Effect of cellulase treatment on availability of niacin in rice bran.

Group	Basal diet group	Nicotinic acid-added diet group	Normal rice bran-added diet group	Cellulase-treated rice bran-added diet group	Alkali-treated rice bran-added diet group
Initial body weight (g)	37.8 ± 6.08	37.6 ± 5.50	37.8 ± 4.25	37.9 ± 2.78	37.6 ± 3.04
Final body weight (g)	39.7 ± 3.25 <sup>a</sup>	47.1 ± 6.38	43.5 ± 6.45	44.0 ± 3.14	45.1 ± 1.93 <sup>a</sup>
Food intake (g)	98.8 ± 6.83 <sup>A</sup>	112.4 ± 8.86	103.3 ± 8.18	110.3 ± 6.11	119.4 ± 3.43 <sup>A</sup>
Liver weight(g)	1.71 ± 0.32	1.66 ± 0.23	1.68 ± 0.23	1.71 ± 0.23	1.98 ± 0.32

Values are means ± SD for 4 rats. The rats were kept for 29 days. Common superscript small and capital letters indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.



ラット飼育実験では、体重、肝重量では、ナイアシン栄養を反映しないと報告したものとも一致する。

Fig. 4-1. に各群の29日間の体重変化を示した。3週間すぎでは、ニコチン酸群についてセルラーゼ処理群に体重増加が多くみられたが、最終的には、最も順調に成長がみられたのはニコチン酸群で、アルカリ処理群、セルラーゼ処理群、未処理群、基礎食群と続いた。Table 4-3. に、米ヌカセルラーゼ処理の血中NAD量、肝中NAD量および肝中ナイアシン量への影響を示す。血中NAD量では、基礎食群とアルカリ処理群間で  $p < 0.05$  で有意差があり、アルカリによって、結合同型ナイアシンが遊離化され、ラットに利用されたと考えられる。セルラーゼ処理群では、アルカリ処理にはおよばなかったが、未処理群より高い値を示した。

肝臓1g中のNAD量では、未処理群がニコチン酸添加群に比べ、有意に低い値を示した ( $p < 0.05$ )。これは、Maize<sup>56)</sup>、Wheat bran<sup>57)</sup>、Rice<sup>58)</sup>の結果で報告されているのと同様、本実験においても米ヌカ結合同型ナイアシンのラットに対する難利用性を確認した。

セルラーゼ処理群では、未処理群より  $p < 0.01$  で有意に高い値を示し、セルラーゼ処理群とアルカリ処理群間で有意な差がないことから、セルラーゼ処理が米ヌカ結合同型ナイアシンを遊離化し、ラットに有効なナイアシンに変換したものと考えられる。

全肝中NAD量においても、セルラーゼ処理群は、未処理群より高い値を示し、アルカリ処理群とで有意な差はみられなかった。

肝臓1g中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群では、 $175.0 \pm 32.9$  ng/gと最も高い値を示し、全肝中ナイアシン量でも同様の結果であった。

本実験条件下でのセルラーゼ処理において、米ヌカ中のナイアシンの約90%が溶出し、そのうちの90%弱が、有効化することを第3章、第1節で微生物的に確認したが、血中NAD量、肝中NAD量、肝中ナイアシン量の結果から、ラットにおいてもセルラーゼ処理が、米ヌカ結合同型ナイアシンの生物学的利用性を高めることが示唆された。しかしながら、ニコチン酸添加群での終体重、血中NAD量は、米ヌカ添加群を上まわっており、米ヌカ中食物繊維の影響、例えば、栄養素の吸収阻害などが考えられた。



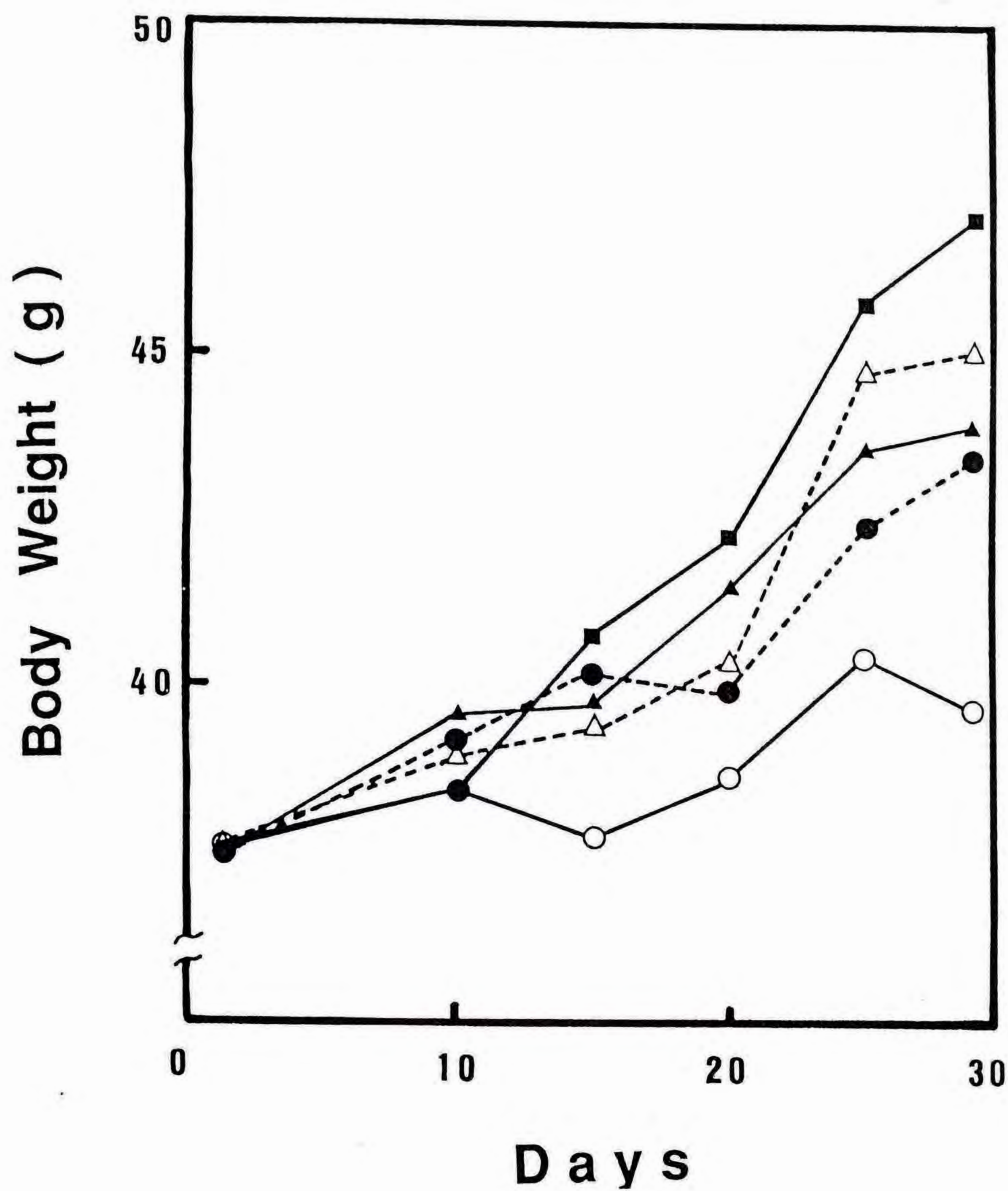


Fig. 4-1. Gains in body weight of rats, as influenced by different treatment to rice bran .

Values are means of 4 rats.

○:Control group.

■:Nicotinic acid-added group.

●:Untreated rice bran-added group.

▲:Cellulase treated rice bran-added group.

△:Alkali treated rice bran-added group.



Table 4-3. Effect of cellulase treatment on availability of niacin in rice bran.

Group	Basal diet group	Nicotinic acid-added diet group	Normal rice bran-added diet group	Cellulase-treated rice bran-added diet group	Alkali-treated rice bran-added diet group
NAD in blood (nmol/ml)	39.7 ± 4.80 <sup>a</sup>	60.8 ± 13.6	48.3 ± 12.6	52.6 ± 9.3	72.4 ± 16.3 <sup>a</sup>
NAD in liver (nmol/g)	287.5 ± 71.4 <sup>a, b, A</sup>	444.7 ± 29.3 <sup>a, c</sup>	336.9 ± 41.2 <sup>c, d, B</sup>	491.7 ± 45.3 <sup>A, B</sup>	491.4 ± 60.8 <sup>b, d</sup>
NAD in whole liver (nmol)	476.7 ± 22.5 <sup>a, b, c, A</sup>	775.7 ± 133.7 <sup>a</sup>	596.1 ± 30.3 <sup>A</sup>	846.8 ± 172.7 <sup>b</sup>	983.2 ± 268.2 <sup>c</sup>
Niacin in liver (μg/g)	130.1 ± 21.0	133.1 ± 24.3	133.5 ± 28.0	175.0 ± 32.9	134.4 ± 18.9
Niacin in whole liver (μg)	226.1 ± 72.7	221.2 ± 54.1	219.5 ± 20.0	300.4 ± 74.5	269.8 ± 80.0

Values are means ± SD for 4 rats. The rats were kept for 29 days. Common superscript small and capital letters indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.



## 第2節 米ヌカ抽出液に対するセルラーゼ処理がラットのナイアシン利用に与える影響

米ヌカ中の不溶性食物繊維の影響を取り除くために米ヌカを抽出し、抽出液に各処理を行なって、第1節と同様の実験を行なった。

### 2-1. 実験材料および方法

#### 2-1-1. 実験材料

第1節1-1-1.と同様とした。

#### 2-1-2. 実験動物、飼料および飼育方法

Wister系3週令の雄ラットを藤田幸四郎商店より購入し、2日間完全食で予備飼育を行なった後、本実験に用いた。

ラットを各5匹の5群に分け、基礎食のみ、基礎食に1.5mg%のニコチン酸添加（米ヌカ抽出物中に含まれる遊離型ナイアシンに相当）、米ヌカ抽出物添加群として、基礎食に米ヌカ抽出物を添加した飼料、セルラーゼ処理した米ヌカ抽出物を添加した飼料、アルカリ分解した米ヌカ抽出物を添加した飼料をそれぞれに投与した。基礎食、飼育条件は、第1節1-1-3.と同様とした。

#### 2-1-3. 米ヌカ抽出物のセルラーゼ処理およびアルカリ分解法

米ヌカ400gを3000mlのpH 4.6の酢酸緩衝液で24時間、45℃で抽出し、濾過後、上清を3等分し、それぞれを45℃、24時間インキュベート、24時間、45℃でセルラーゼ処理（酵素濃度0.2%）、水酸化ナトリウム終濃度1N濃度、120℃、1時間加圧分解処理を行ない、pH 7.0に調整後、凍結乾燥し、添加標品とした。

#### 2-1-4. 試料作成

血中NAD量定量試料、肝臓中NAD量定量用試料、肝中ナイアシン量定量用試料は、第1節1-1-5-b.と同様とした。

#### 2-1-5. 代謝産物測定法

NAD定量、ナイアシン定量は、第1節、1-1-6.と同様とした。

#### 2-1-6. 統計解析

第1章、第1節、1-1-6.に従い、有意差検定は、Studentのt検定によった。



## 2-2. 結果および考察

ニコチン酸欠の基礎食（トリプトファン制限食）、基礎食＋ニコチン酸、基礎食＋未処理米ヌカ抽出物、基礎食＋セルラーゼ処理米ヌカ抽出物、基礎食＋アルカリ分解米ヌカ抽出物の各飼料でラットを36日間飼育した際の体重増加量、飼料摂取量および肝重量をTable 4-4.に示した。

終体重では、セルラーゼ処理群が $51.4 \pm 4.02\text{g}$ と最も増加が多く、ニコチン酸群とともに基礎食群より有意に高かったが、未処理群、アルカリ処理群とでは有意な差は認められなかった。

飼料摂取量においては、米ヌカ抽出物添加の各群と基礎食群で $p < 0.01$ の危険率で有意な差があったが、米ヌカ抽出物添加各群間では、有意差はなかった。

肝重量においては、セルラーゼ処理群が最も高い値を示し（ $2.76 \pm 0.58\text{g}$ ）、基礎食間とで有意な差が認められた（ $p < 0.01$ ）。

終体重、飼料摂取量、肝重量において、基礎食群を米ヌカ抽出物添加各群が上まわった。

Fig. 4-2.に、飼育期間中の各群の体重の変化を示した。

基礎食群では、次第に飼料摂取量が落ち、他群に較べ、体重の増加が少なく、アルカリ処理群では、飼料摂取量が多かったにも関わらず、体重増加は他群に較べ、少なかった。未処理群では、実験開始30日目まで、最も体重増加が多かったが、最終的には、セルラーゼ処理群が他群を上回った。

Table 4-5.に、米ヌカ抽出物セルラーゼ処理の血中NAD量、肝中NAD量および肝中ナイアシン量への影響を示した。

血中NAD量では、アルカリ処理群（ $56.4 \pm 5.48\text{ nmol/ml}$ ）が最も高い値を示しており、セルラーゼ処理群（ $50.2 \pm 6.65\text{ nmol/ml}$ ）では、アルカリ処理群には及ばなかったものの、未処理群（ $42.1 \pm 4.96\text{ nmol/ml}$ ）を上まわり、基礎食群よりは、有意（ $p < 0.05$ ）に高かった。

肝臓1g中NAD量では、アルカリ処理群（ $236.5 \pm 27.3\text{ nmol/g}$ ）が最も高い値を示しており、セルラーゼ処理群（ $212.0 \pm 37.2\text{ nmol/g}$ ）では、アルカリ処理群には及ばず、未処理群（ $207.2 \pm 26.4\text{ nmol/g}$ ）を上まわっていたが、いずれも有意差はなかった。



Table 4-4. Effect of cellulase treatment on availability of niacin in rice bran extract.

Group	Basal diet group	Nicotinic acid-added diet group	Normal rice bran extract -added diet group	Cellulase-treated rice bran extract-added diet group	Alkali-treated rice bran extract-added diet group
Initial body weight (g)	35.4 ± 1.43	35.3 ± 3.51	35.4 ± 2.04	35.4 ± 2.36	35.4 ± 1.85
Final body weight (g)	42.4 ± 4.60 <sup>a, b</sup>	49.6 ± 5.31 <sup>a</sup>	50.4 ± 7.96	51.4 ± 4.02 <sup>b</sup>	48.5 ± 4.06
Food intake (g)	126.4 ± 16.1 <sup>A, B, C</sup>	147.2 ± 17.9	167.2 ± 16.0 <sup>A</sup>	157.4 ± 4.62 <sup>B</sup>	166.0 ± 17.3 <sup>C</sup>
Liver weight(g)	1.71 ± 0.34 <sup>a, b, c, A</sup>	2.40 ± 0.41 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.55 <sup>b</sup>	2.76 ± 0.58 <sup>A</sup>	2.29 ± 0.30 <sup>c</sup>

Values are means ± SD for 5 rats. The rats were kept for 36 days. Common superscript small and capital letters indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.



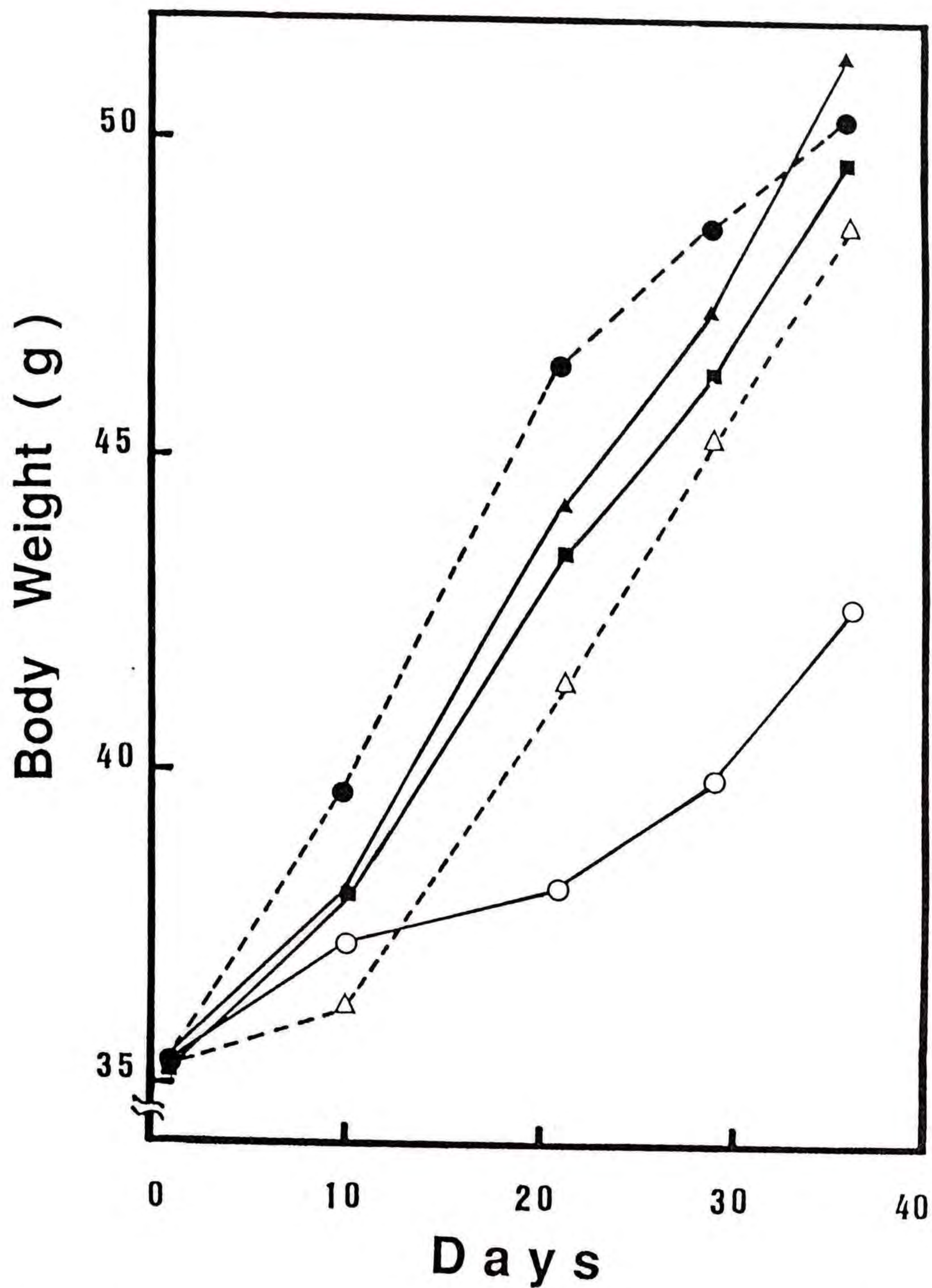


Fig. 4-2. Gains in body weight of rats, as influenced by different treatment to rice bran extract.

Values are means of 5 rats.

○:Control group.

■:Nicotinic acid-added group.

●:Untreated rice bran extract-added group.

▲:Cellulase treated rice bran extract-added group.

△:Alkali treated rice bran extract-added group.



Table 4-5. Effect of cellulase treatment on availability of niacin in rice bran extract.

Group	Basal diet group	Nicotinic acid-added diet group	Normal rice bran extract -added diet group	Cellulase-treated rice bran extract-added diet group	Alkali-treated rice bran extract-added diet group
NAD in blood (nmol/ml)	39.2 ± 5.24 <sup>a, A, B</sup>	50.8 ± 3.27 <sup>A, b</sup>	42.1 ± 4.96 <sup>b, c</sup>	50.2 ± 6.65 <sup>a</sup>	56.4 ± 5.48 <sup>B, c</sup>
NAD in liver (nmol/g)	213.0 ± 23.4 <sup>a</sup>	209.1 ± 17.9	207.2 ± 26.4	212.0 ± 37.2 <sup>a</sup>	236.5 ± 27.3
NAD in whole liver (nmol)	398.4 ± 105.7	498.0 ± 73.0	553.1 ± 143.6 <sup>A, a</sup>	572.0 ± 69.0 <sup>A</sup>	543.5 ± 111.8 <sup>a</sup>
Niacin in liver (μg/g)	162.0 ± 33.9	156.0 ± 34.0	129.1 ± 31.0	185.7 ± 15.8	180.0 ± 18.2
Niacin in whole liver (μg)	274.8 ± 58.0 <sup>a, A, B</sup>	366.4 ± 62.3 <sup>a, b</sup>	354.9 ± 154.7	509.3 ± 92.1 <sup>A, b</sup>	411.7 ± 65.9 <sup>B</sup>

Values are means ± SD for 5 rats. The rats were kept for 36 days. Common superscript small and capital letters indicate statistically significant differences at p<0.05 and p<0.01, respectively.



全肝中NAD量では、セルラーゼ処理群が最も高い値を示し ( $572.0 \pm 69.0$  nmol)、基礎食群 ( $398.4 \pm 105.7$  nmol) より有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。

肝臓1g中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群 ( $185.7 \pm 15.8 \mu\text{g/g}$ ) が最も高く、未処理群 ( $129.1 \pm 31.0 \mu\text{g/g}$ ) と有意に差がみられ ( $p < 0.01$ )、アルカリ処理群とは有意な差がないことから、抽出物に対する酵素処理が、結合型ナイアシンの有効化に効果があったと考えられる。

全肝中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群 ( $509.3 \pm 92.1 \mu\text{g}$ ) が、未処理群 ( $354.9 \pm 154.7 \mu\text{g}$ )、アルカリ処理群 ( $411.7 \pm 65.9 \mu\text{g}$ ) を上回っていた。

第1節の結果では肝中NADにおいて、本実験においては肝中ナイアシンと、違った指標で顕著なセルラーゼ処理の効果が認められた。これについては、米ヌカ抽出条件下では、第3章、第1節で述べた通り、米ヌカ中ナイアシンの約60%がいったん抽出され、そのうちの4割が遊離型で、残りの6割が結合型で存在し、この結合型が酵素の影響を受けるということから、第1節の実験とでは、米ヌカから抽出されたナイアシンのタイプが異なることが考えられ、吸収の程度や肝臓でのニコチン酸からNADへの代謝経路や速度が異なるのではないかと推定されるが、この点に関しては更に検討を要すると考える。



### 第3節 小括

穀類中結合型ナイアシンを有効性ナイアシンへ変換する酵素プロセスで、遊離化に最も有効であったセルラーゼを米ヌカおよび米ヌカ抽出物に作用させ、ラットに対する生物学的利用性について検討を行なった。

1. ニコチン酸欠の基礎食（トリプトファン制限食）、基礎食＋1 mg%ニコチン酸、基礎食＋未処理米ヌカ5%、基礎食＋セルラーゼ処理米ヌカ5%、基礎食＋アルカリ分解米ヌカ5%の各飼料で、ラットを29日間飼育した際、体重増加、飼料摂取量および肝重量においては、セルラーゼ処理群と未処理群で有意な差は認められず、この実験実験条件下では、体重増加あるいは肝重量に及ぼす、米ヌカのセルラーゼ処理あるいはアルカリ処理の影響は認められなかった。

肝臓1 g中のNAD量では、未処理群がニコチン酸添加群に較べ、有意に低い値を示した（ $p < 0.05$ ）。セルラーゼ処理群では、未処理群より $p < 0.01$ で有意に高い値を示し、セルラーゼ処理群とアルカリ処理群間で有意な差がないことから、セルラーゼ処理が米ヌカ結合型ナイアシンを遊離化し、ラットに有効なナイアシンに変換したものと考えられた。肝臓1 g中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群では、 $175.0 \pm 32.9$  ng/gと最も高い値を示し、全肝中ナイアシン量でも同様の結果であった。

2. ニコチン酸欠の基礎食（トリプトファン制限食）、基礎食＋ニコチン酸、基礎食＋未処理米ヌカ抽出物、基礎食＋セルラーゼ処理米ヌカ抽出物、基礎食＋アルカリ分解米ヌカ抽出物の各飼料でラットを36日間飼育した際、終体重では、セルラーゼ処理群が $51.4 \pm 4.02$ gと最も増加が多く、ニコチン酸群とともに基礎食群より有意に高かったが、未処理群、アルカリ処理群とでは有意な差は認められなかった。肝重量においては、セルラーゼ処理群が最も高い値を示し（ $2.76 \pm 0.58$ g）、基礎食間とで有意な差が認められた（ $p < 0.01$ ）。血中NAD量では、アルカリ処理群（ $56.4 \pm 5.48$  nmol/ml）が最も高い値を示しており、セルラーゼ処理群（ $50.2 \pm 6.65$  nmol/ml）では、アルカリ処理群には及ばなかったものの、未処理群（ $42.1 \pm 4.96$  nmol/ml）を上まわり、基礎食群よりは、



有意( $p < 0.05$ )に高かった。肝臓 1 g 中 NAD 量では、アルカリ処理群 ( $236.5 \pm 27.3 \text{ nmol/g}$ ) が最も高い値を示しており、セルラーゼ処理群 ( $212.0 \pm 37.2 \text{ nmol/g}$ ) では、アルカリ処理群には及ばず、未処理群 ( $207.2 \pm 26.4 \text{ nmol/g}$ ) を上まわっていたが、いずれも有意差はなかった。全肝中 NAD 量では、セルラーゼ処理群が最も高い値を示し ( $572.0 \pm 69.0 \text{ nmol}$ )、基礎食群 ( $398.4 \pm 105.7 \text{ nmol}$ ) より有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。肝臓 1 g 中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群 ( $185.7 \pm 15.8 \mu\text{g/g}$ ) が最も高く、未処理群 ( $129.1 \pm 31.0 \mu\text{g/g}$ ) と有意に差がみられ ( $p < 0.01$ )、アルカリ処理群とは有意な差がないことから、抽出物に対する酵素処理が、結合型ナイアシンの有効化に効果があったと考えられた。全肝中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群 ( $509.3 \pm 92.1 \mu\text{g}$ ) が、未処理群 ( $354.9 \pm 154.7 \mu\text{g}$ )、アルカリ処理群 ( $411.7 \pm 65.9 \mu\text{g}$ ) を上回っていた。

血中 NAD、肝中 NAD 量、ナイアシン量の結果から、ラットにおいてもセルラーゼ処理が、米ヌカ結合型ナイアシンの生物学的利用性を高めることが示唆された。



## 第5章 ヒトにおけるナイアシン利用率測定法の検討

難利用性結合型ナイアシンの構造および有効性の問題について、第1章では微生物法、第3章では酵素法、第4章ではラットによる生物法で検討を行なってきた。

第5章では、ヒトにおける食品中ナイアシンの利用率測定を目的として、ナイアシンをコントロールしたモデル食を中心に、実験方法、実験条件、ナイアシン栄養指標について検討を行ない、実際にヒトの玄米胚芽中結合型ナイアシンの利用性の測定を試みた。

### 第1節 ヒトのナイアシン栄養実験法の検討

#### 1-1. 実験方法

##### 1-1-1. 化学薬品

NAD、アルコールデヒドロゲナーゼはSigma社、チアゾリールブルーは東京化成工業(株)、ニコチン酸製剤は扶桑薬品工業(株)より購入し、他の定量用試薬は和光純薬工業(株)の特級品を使用した。

##### 1-1-2. 実験計画

被験者は、滋賀県立短期大学食物学科2回生の健康な女子3名とした。なお、本実験は、ヒトを対象にした実験であるため、ヘルシンキ宣言<sup>59)</sup>の精神に則って行なわれたものである。

実験期間は、各2日間の3期(計7日)とし、1期はナイアシンコントロール食、2期はナイアシンコントロール食+15mgニコチン酸/day、3期はナイアシンコントロール食+30mgニコチン酸/dayの食餌とした。各期毎に採血と採尿を行い、血中NAD、血中ナイアシン、尿中N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド(MNA)、尿中ナイアシンの測定を行なった。なお、2期の影響を除くため、2期と3期の間に1日のニコチン酸非投与日をおいた。

朝食は8時45分より、昼食は12時10分より学内で、夕食は保温式のランチジャーにいれて、自宅にて摂らせた。食生活以外の生活行動は自由とした。



### 1-1-3. 試料調製法

#### 1-1-3-a. 血液試料調製法

採血は、実験開始時（Pre期）と各期最終日の翌日朝食前に行ない、ヘパリン50 $\mu$ gの入ったスピッツグラスに被験者から血液約2mlを採血した。そのうちの1mlに0.6M過塩素酸を4ml加え、攪拌後、5,000r.p.m.で遠心分離し、その上清を適宜希釈して、ナイアシン定量用試料とした。

NAD定量用試料は、血液50 $\mu$ lを採血後直ちに、2mlの0.05Mリン酸カリウム緩衝液（含0.1Mニコチンアミド、pH6.0）に加え、90 $^{\circ}$ Cで、90秒間加熱し、氷冷、これを2度繰り返して、4 $^{\circ}$ C、5,000r.p.m.で10分間遠心分離して、上清を得た。

#### 1-1-3-b. 尿試料調製法

採尿は、トルエン、塩酸を各5mlずつ入れた採尿ビンに24時間、全尿を蓄尿し、濾過後、濾液を尿中MNA量およびナイアシン量の定量用試料とした。

#### 1-1-3-c. 食餌試料調整法

食餌は、1N硫酸溶液で120 $^{\circ}$ C、30分間加圧分解し、pH6.0に調整、適宜希釈して、ナイアシン微生物定量に供した。

### 1-1-4. 定量方法

#### 1-1-4-a. NAD定量

第4章、1節と同様の方法で行った。

#### 1-1-4-b. ナイアシン定量

第1章、第1節、1-1-1-a.と同様の方法で行った。

#### 1-1-4-c. N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド(MNA)定量

能勢・上田<sup>60)</sup>の方法に従い、アセトン縮合蛍光法で定量した。

## 1-2. 実験結果および考察

### 1-2-1. ナイアシンコントロール食のモデル作成

ヒトの実用的な栄養効力について栄養生理学的研究を進め、栄養素の有効性を検討することは重要であり、重要課題でもある。しかしながら、ヒトの栄養・代謝実験に用いられる食餌は再現性等が重視され、栄養成分構成の由来が確かなもの、例えば、デンプン、ブドウ糖、ビタミン剤などを配合した半合成食が使用さ



れることも多く、実験モデルと日常の食事内容との違いも大きい。加えて被験者の生活拘束から来るストレスや人権の問題も重なり、長期のヒトの実験は特に困難なものとなっている。

そこで、ヒトにおける食品中ナイアシン利用率の測定の実験食を通常の食事により近づけたものとし、実際の社会生活を送っている条件のもとに検討を行なった。

バランスのとれた食餌中のナイアシン量を知るために、滋賀県立短期大学集団給食実習の昼食献立1年分、44食について、日本食品標準成分表<sup>37)</sup>、日本食品アミノ酸組成表<sup>61)</sup>をもとに、栄養価計算を行なった。

Fig. 5-1.に、集団給食における食餌中ナイアシン当量を示した。ここでは、ニコチン酸及びニコチン酸アミドを総称してナイアシン、トリプトファン60mgからニコチン酸1mgが合成されるとして、ナイアシンと1/60トリプトファン量を加えたものをナイアシン当量とした<sup>20)</sup>。1食中のナイアシン当量の最低値が4.46、最高が22.4ナイアシン当量となっており、約5倍のバラツキがみられる。昼食44食分の平均は、ナイアシン  $6.59 \pm 3.58$ mg、トリプトファン  $284.9 \pm 72.2$ mg、ナイアシン当量  $11.3 \pm 4.07$ であり、日本人の平均的な食生活では、1日に約30ナイアシン当量が摂取されていると予想される。ナイアシンの栄養所要量は、20-30才女子で13mgということからすれば、普通の食生活をし、健康な人であれば、まず欠乏状態に陥ることはない。

Fig. 5-1.の陰部分は、トリプトファンに由来するナイアシン量であるが、総ナイアシン当量の平均44%を占めている。実際の食生活は、更にタンパク質摂取が多く、これを無視することはできない。柴田らは<sup>62)</sup>、ラットの実験で投与ニコチン酸に鋭敏に感応するのはトリプトファンを0.043%にコントロールしたトリプトファン制限アミノ酸混合食であると報告しているが、数少ないヒトのナイアシン利用性を検討したChaturvediら<sup>63)</sup>の報告では、トリプトファンについてはまったく言及されていない。しかしながら、ナイアシンコントロール食を作成するにあたり、ナイアシンコントロールと共にトリプトファン制限、則ちタンパク質の質と量の制限を厳しく行なわなければならないことは明らかである。

集団給食献立の中で、とくにナイアシン当量値の高い献立は、主菜のタンパク源が肉類、シーチキンなどで、反対に低い献立は、鶏卵、豆腐などが使われ、材



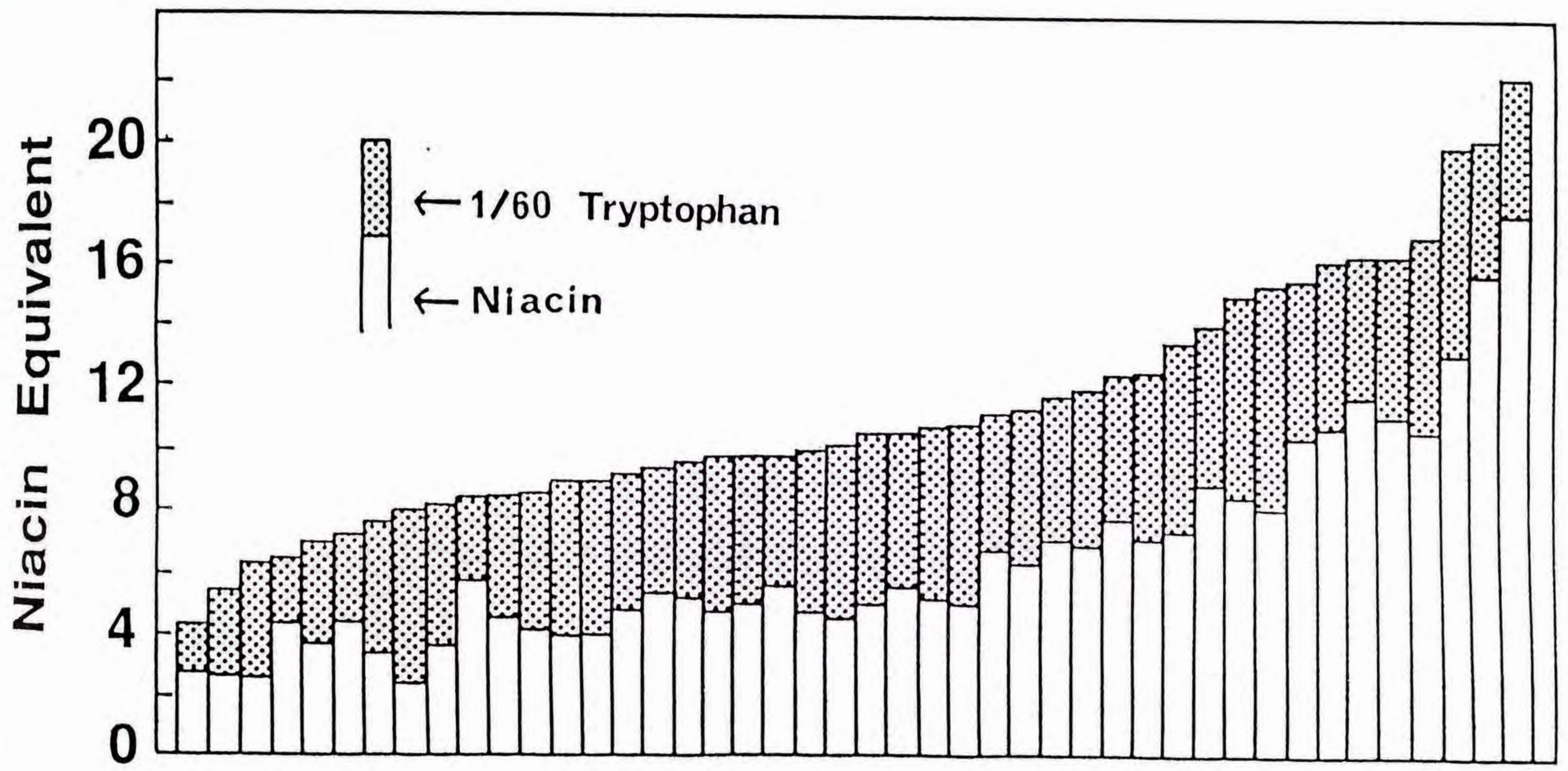


Fig.5-1. Calculated niacin equivalents of the meals cooked by food management class.



料の選択により、ナイアシン当量をおおきくコントロールできることが示めされた。そこで、生活活動強度 I の 20 才成人女子の所要量<sup>64)</sup>を満たすように、タンパク質、ナイアシン、トリプトファンの少ない食品材料を選定し、Table 5-1. に示すような、1 日分の食事材料を決めた。

主食から 700kcal を摂るとすると、食パンだけで摂る場合はナイアシン 1.89mg、トリプトファン 258mg で約 6.2 ナイアシン当量となり、米飯だけで摂る場合はナイアシン 1.42mg、トリプトファン 189mg で約 4.6 ナイアシン当量となる。すなわち、3 食とも米飯の方が、ナイアシン当量が低く、好ましいが、一方、献立が単調になり易く、今回の被験者が 20 才という年齢や調理側の簡便さなどを考え合わせ、パンが 1 食、米飯が 2 食とした。また、タンパク質は、料理として成立する最小限度の分量に押え、野菜類は、料理法が幅広いものを中心に選んだ。

食品材料・分量を決めたことで、食餌中ナイアシン量の変動がある程度抑えられ、多人数、長期間の栄養実験においては、食品材料の購入計画が立て易いなど多くの利点があると考えられる。

これらの材料を使って、和風、洋風、中華風取り混ぜ、異なった 7 日間分の献立の作成を試みた。塩、香辛料等の制限はせず、昼と夜の材料配分や全体のボリューム感、バランスに留意した。7 日分の食餌の総ナイアシン実測値の平均は、9.40mg/day であった。この献立をナイアシン利用効率測定のためのモデル食（ナイアシンコントロール食）とし、実験期間中、被験者に摂取させ、投与ニコチン酸の影響について、検討を行なった。

#### 1-2-2. ニコチン酸投与が及ぼす血中、尿中への影響

ナイアシン栄養欠乏判定には、一般的に、代謝産物である MNA、N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド（2-ピリドン）の尿への排泄量の測定が推奨されている<sup>1)</sup>。しかし、2-ピリドンの定量は再現性や時間的問題で難しく、臨床の場では、尿中ナイアシン量あるいは MNA の排泄量が指標とされている。しかしながら、投与あるいは摂取ナイアシン量の影響を鋭敏に反映し、利用効率を確定できる評価法という意味では、まだまだ検討の段階にある。

そこで、ナイアシンコントロール食を与えながら、ニコチン酸追加投与レベルを 0mg、15mg、30mg と変え、それぞれに対する血中 NAD とナイアシン、尿中 MNA と



Table 5-1. Energy, protein, niacin and tryptophan contents per day of niacin-controlled basal diet for woman (calculated) .

Food	Amount(g)	Energy(kcal)	Protein(g)	Niacin(mg)	Tryptophan(mg)
White bread	60	156	5.0	0.42	57.6
Cooked paddy rice	380	562	10.9	1.14	144.0
Milk	100	63	3.1	0.10	38.0
Egg	50	81	6.2	0.05	95.0
Ham	20	22	2.9	0.36	38.0
Tofu(Soybean curd)	80	62	5.4	0.08	80.0
Pork ground meat	30	79	5.5	1.62	60.0
Carrot	25	10	0.5	0.23	2.5
Sweet pepper	25	5	0.3	0.15	2.3
Onion	50	18	0.5	0.05	5.0
Cabbage	50	12	0.7	0.10	4.0
Cucumber	50	6	0.5	0.10	4.5
Pumpkin	40	14	0.5	0.24	6.4
Spinach	30	8	1.0	0.18	6.4
Bean sprouts	30	5	0.7	0.12	15.9
Tomatoes	30	5	0.2	0.15	1.5
Apples	100	50	0.2	0.10	1.0
Bananas	80	70	0.9	0.48	8.0
Miso	10	20	1.0	0.15	18.0
Sugar	20	76	0	0	-
Shoyu(soy-souce)	7	3	0.3	0.06	1.2
Vinegar	5	1	-	-	-
Oil	10	92	-	-	-
Butter	10	76	0	0	-
Mayonnaise	5	35	0.1	-	-
Starches	3	10	-	-	-
Jam(strawberries)	10	26	0.1	0	-
Jelly	100	104	-	-	-
Total	-	1 6 7 1	4 6 . 5	5 . 9	5 8 9



ナイアシンへの影響について検討を行なった。結果をFig. 5-2. からFig. 5-5. に示す。

血中 NAD量 (Fig. 5-2.) では、実験開始時 (Pre期) に個人差があるが、平均でみると各期の中で最も高い値を示し ( $59.7 \pm 16.1 \text{ nmol/ml}$ )、2期で最も低い値となった ( $51.7 \pm 6.43 \text{ nmol/ml}$ )。同様に、血中ナイアシン (Fig. 5-3.) でも、Pre期が  $146.7 \pm 81.0 \text{ nmol/ml}$  で最高、2期が  $91.7 \pm 5.78 \text{ nmol/ml}$  で最低であった。これは、投与ニコチン酸 0 mg の影響が2期に出たものと考えられ、その後のニコチン酸投与に従い、3期のところで増加し、3期の値が Pre期、1期を下回っていることから、おそらく、30mg投与の影響は、実験終了後に現れたと推定される。すなわち、2日間の同レベルニコチン酸投与においては、血中への影響が現れるのに少なくとも5日前後が要すると考えられた。尿中  $\text{N}^1$ -メチルニコチンアミド量 (Fig. 5-4.) への影響をみると、1期が最も低く ( $8.22 \pm 4.08 \text{ mg/day}$ )、3期で最も高く ( $16.2 \pm 6.16 \text{ mg/day}$ )、投与ナイアシンレベルの増加にしたがって、MNA量の増加が認められた。本実験の条件は、被験者数も少なく、同レベルニコチン酸投与期間が2日間と短いこともあり、個人差が大きく、各期の測定値間で統計的有意差は認められなかったが、投与ニコチン酸の影響が2日程度で現れ、少なくとも血中NAD量、血中ナイアシン量よりは、鋭敏な指標となると予想された。尿中ナイアシン値 (Fig. 5-5.) への影響は、血中NAD量、血中ナイアシン量への影響の出方と良く似ており、2期で最も低い ( $413 \pm 115 \mu\text{g/day}$ )、3期 ( $500 \pm 125 \mu\text{g/day}$ ) の値が1期を上回っており、ニコチン酸投与の影響が血中 NAD、血中ナイアシンに比べ、早い段階で現れたと考えられる。しかしながら、尿中MNA値を除いて、著しく投与ニコチン酸の影響を反映するものはなかったが、血中より尿中への影響の方が鋭敏であった。

同レベルニコチン酸投与期間が2日間では、摂取ニコチン酸量を血中、尿中に反映させることには不十分であったが、これまで、ヒトの栄養実験で最も軽視されてきた食餌について、一応、普段の食生活と変わらない程度のもので栄養実験を行なうことができた。投与期間、あるいは、どの程度のニコチン酸投与レベルで影響が現れるのか、また、ナイアシン栄養がトリプトファンやロイシンによるアミノ酸インバランス、ビタミンB群との複合的な関係によって左右される点についても、今後、実験食と共に更に検討をするつもりである。



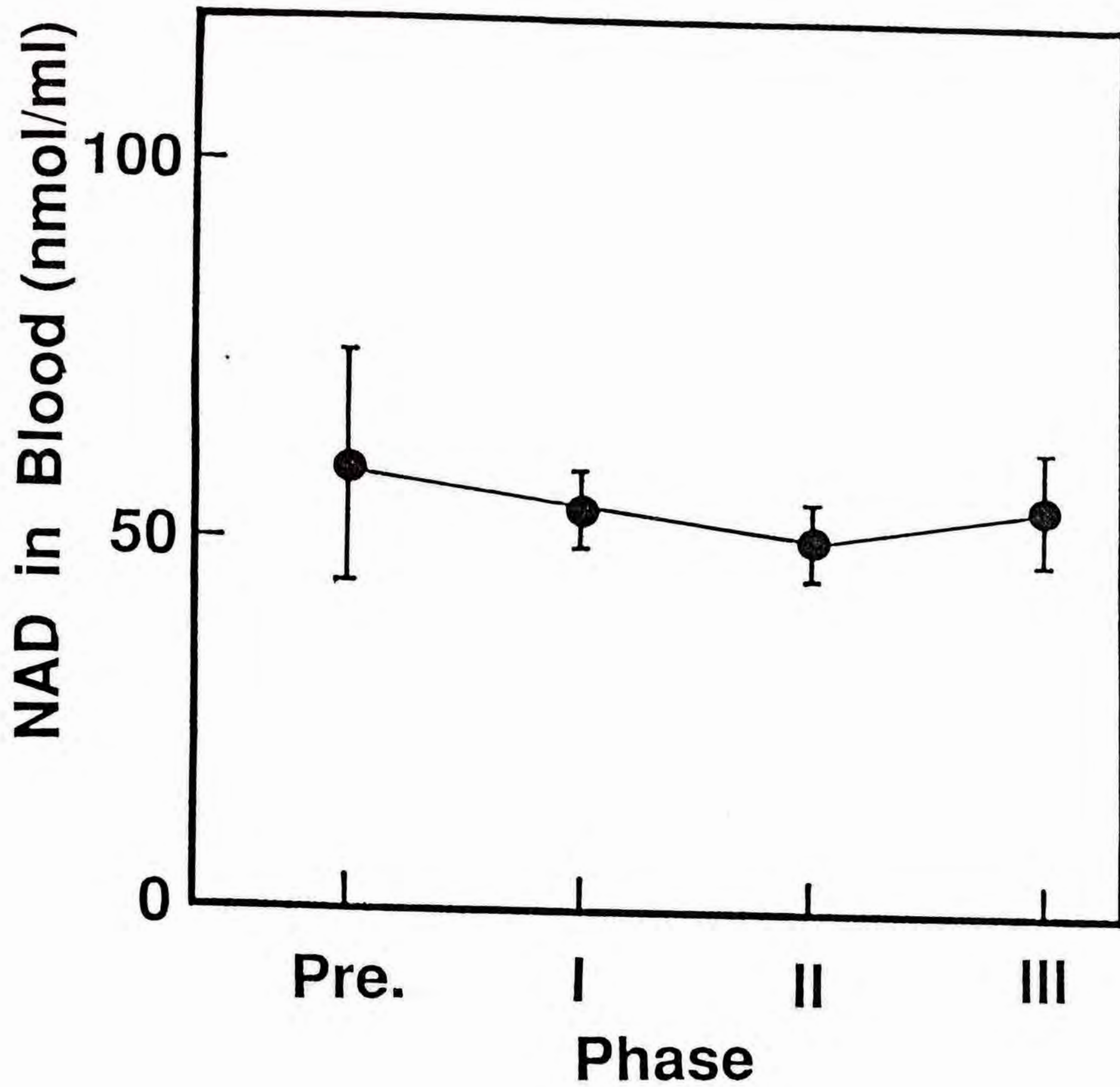


Fig. 5-2. Blood NAD concentration as influenced by supplemented nicotinic acid .

The experimental period was divided into three phases of two days each. During phase 1, the subjects were fed on a niacin -controlled basal diet. During the second and third phase, subjects were fed on diet as in phase 1 supplemented with 15mg and 30mg nicotinic acid /day, respectively and Pre. phase fed on ordinary meal.



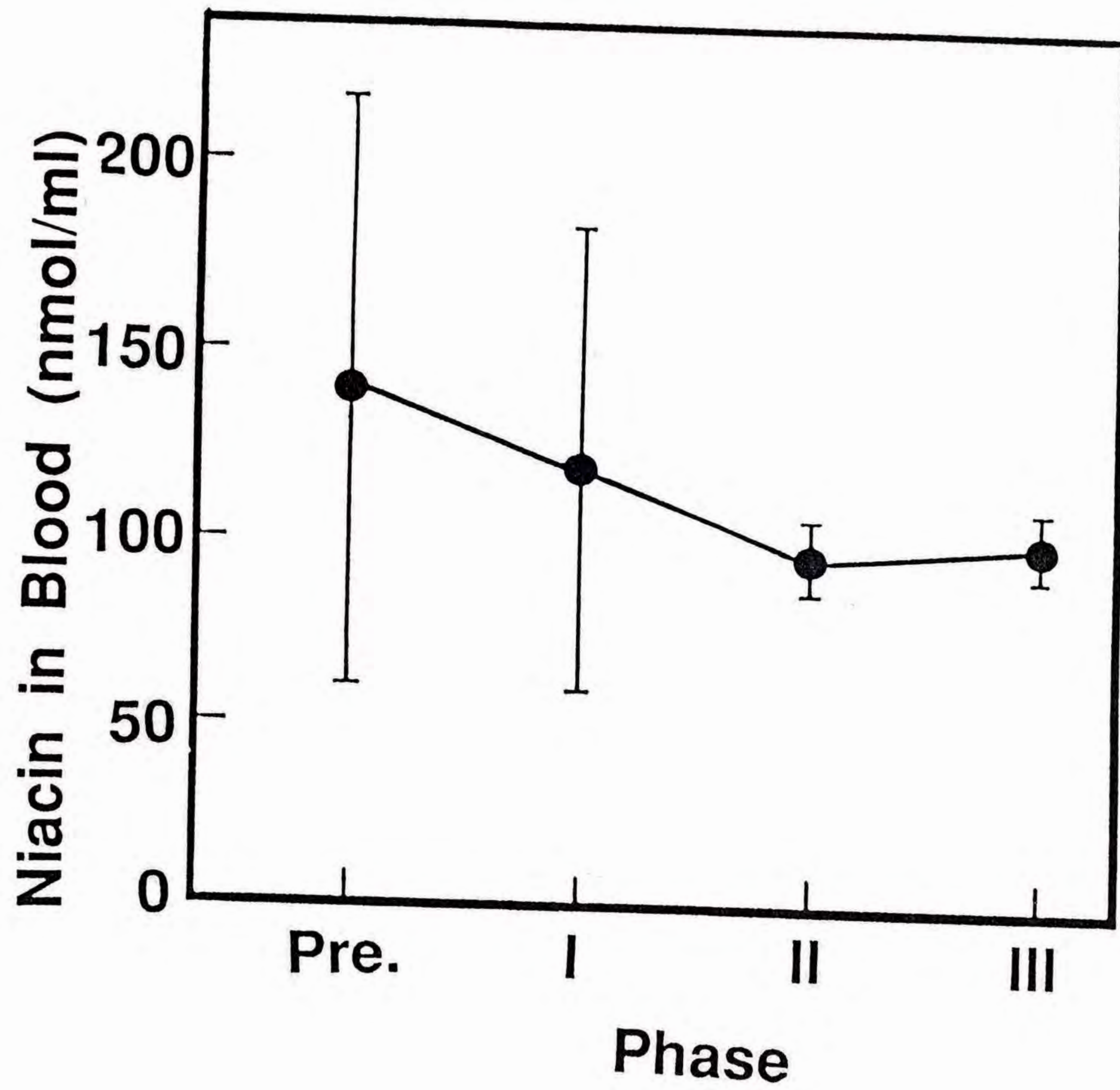


Fig. 5-3. Blood niacin concentration , as influenced by supplemented nicotinic acid .

The details are the same as in Fig.5-2..



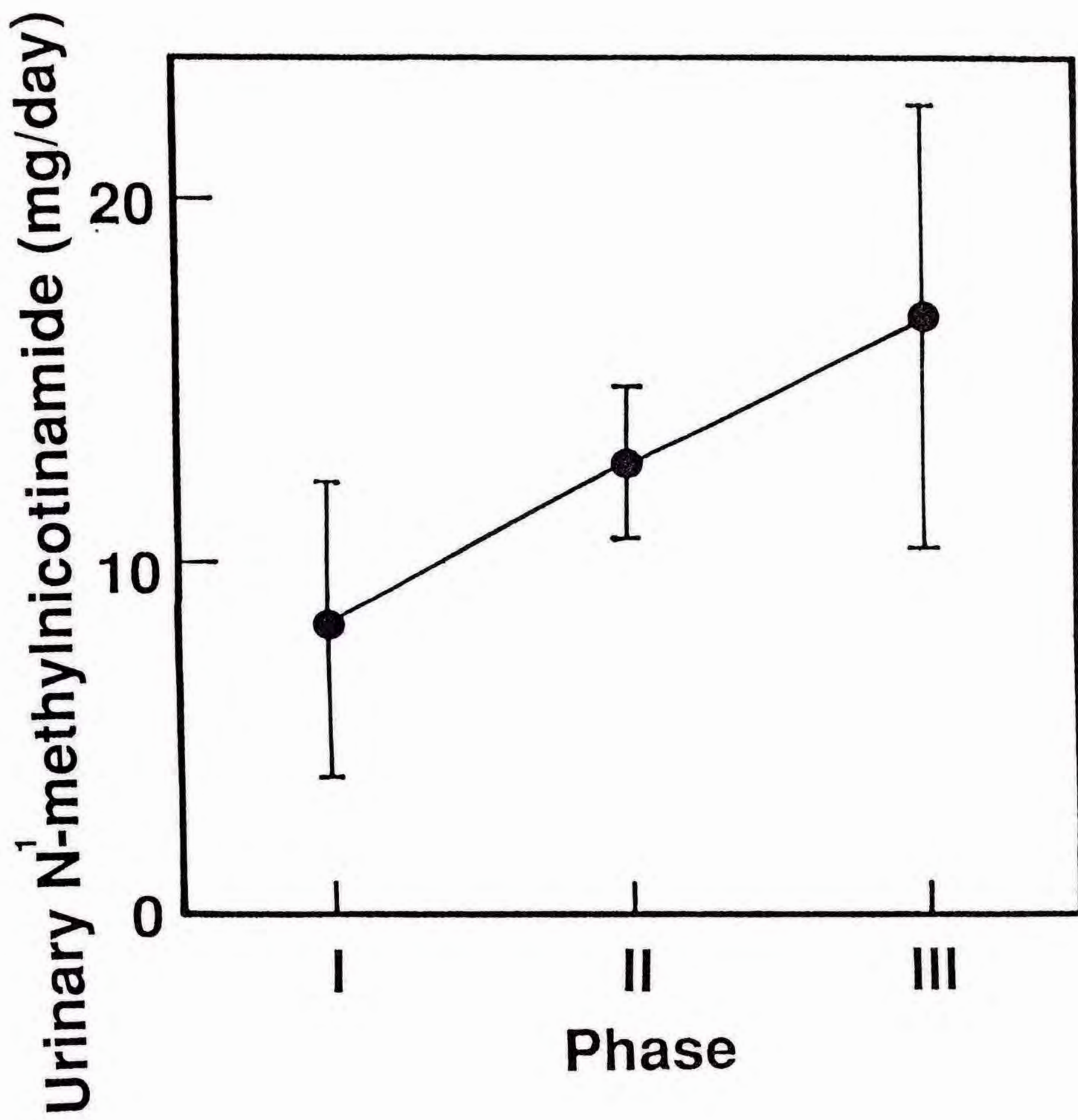


Fig. 5-4. Urinary excretion of N<sup>1</sup>-methylnicotinamide , as influenced by supplemented nicotinic acid .

The details are the same as in Fig.5-2..



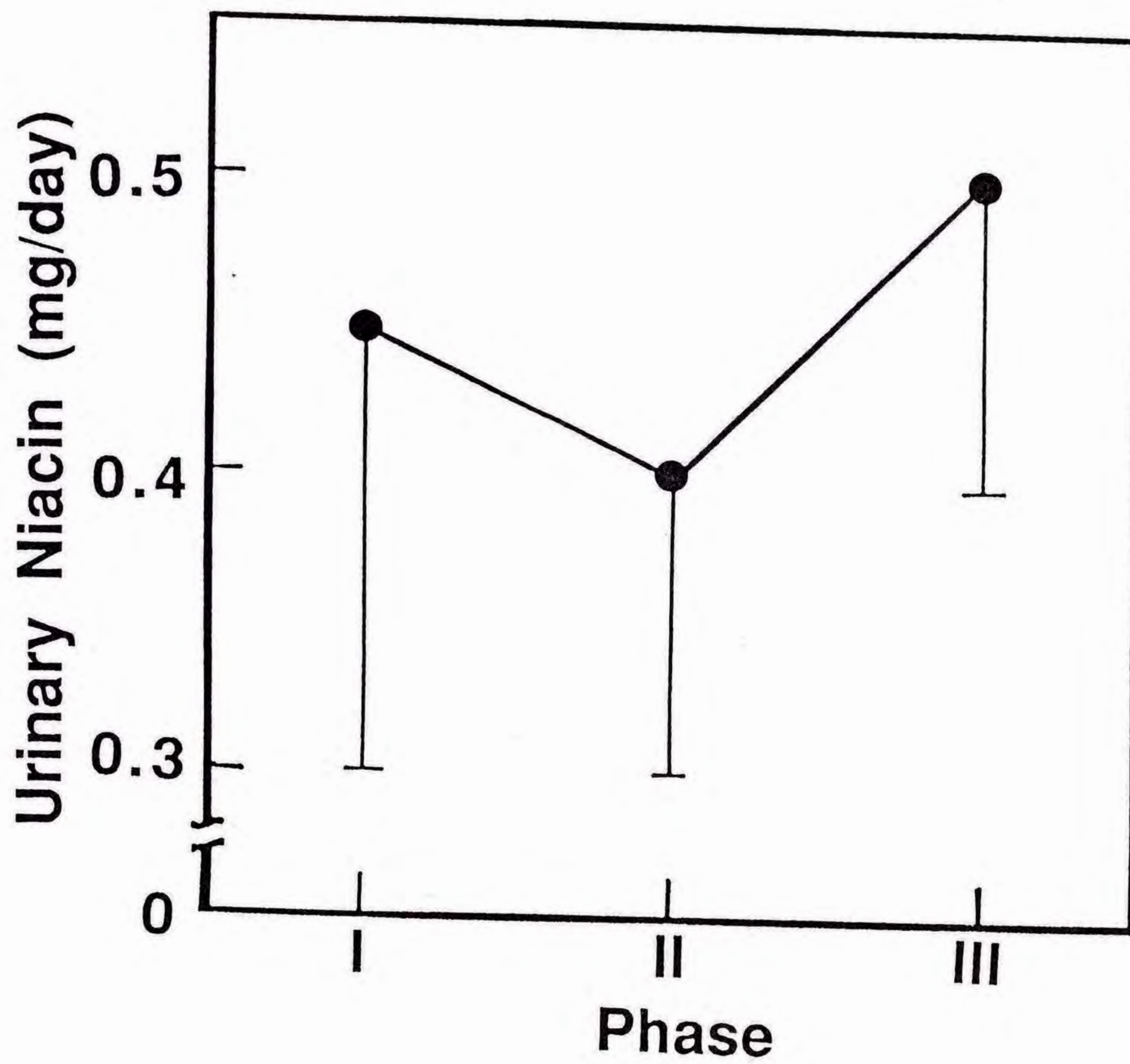


Fig. 5-5. Urinary excretion of niacin , as influenced by supplemented nicotinic acid .

The details are the same as in Fig.5-2..



## 第2節 ヒトの血中、尿中ナイアシン誘導体含量に及ぼすニコチン酸投与の影響

第2節では、第1節での結果からいくつかの実験条件の問題点を解決して、ヒトにニコチン酸を投与した時の血液及び尿中ナイアシン誘導体含量に及ぼす影響について測定を行ない、ナイアシン摂取量とナイアシン栄養状態の関係を検討した。

### 2-1. 実験方法

#### 2-1-1. 化学薬品

1節、1-1-1.と同じとした。

#### 2-1-2. 実験計画

被験者は、男性5名（身長 $172.2 \pm 4.82$ cm、体重 $63.6 \pm 4.83$ kg、年齢 $20.6 \pm 0.89$ 才）で、ヒトを対象にした実験であるため、被験者に研究目的を十分に説明し、ヘルシンキ宣言<sup>62)</sup> (1964) の精神に則って行なわれた。

第1節の方法に従い、Table 5-2.に示すような、ナイアシン量及びタンパク質の少ない食事材料から、コントロール食（2595kcal、タンパク質41.2g、ナイアシン6.26mg、トリプトファン540.4mg）を作成した。なお、タンパク質を制限し、高カロリーを得るため、腎臓病治療食用の低タンパク小麦粉、粉アメを使用した。

実験期間10日を各期3日の3期に分け、I期はコントロール食、II期はコントロール食+25mgニコチン酸添加/day、III期はコントロール食+50mgニコチン酸添加/dayで、ニコチン酸は朝食後服用とした。II期とIII期の間に1日のニコチン酸非投与日をおいた。食生活以外の生活行動は自由とした。

#### 2-1-3. 試料調製法

第1節、1-1-3.と同じ方法によった。

#### 2-1-4. 定量方法

第1節、1-1-4.と同じ方法によった。



Table 5-2. Energy, protein, niacin and tryptophan contents per day of niacin-controlled basal diet for man (calculated ) .

Food	Amount(g)	Energy(kcal)	Protein(g)	Niacin(mg)	Tryptophan(mg)
White bread	60	170	1.7	0.46	17.0
Cooked paddy rice	400	592	10.4	1.20	166.7
Milk	50	32	1.6	0.05	19.0
Egg	50	81	6.2	0.05	95.0
Ham	20	22	2.9	0.36	38.0
Tofu(Soybean curd)	80	62	5.4	0.08	80.0
Pork ground meat	20	53	3.7	1.08	40.0
Harusame(Starch noodle)	20	70	0.04	0	—
Carrot	20	6	0.2	0.18	2.0
Sweet pepper	25	5	0.3	0.15	2.3
Onion	50	18	0.5	0.05	5.0
Cabbage	50	12	0.7	0.10	4.0
Cucumber	50	6	0.5	0.10	4.5
Pumpkin	100	36	1.3	0.60	16.0
Spinach	30	8	1.0	0.18	6.4
Eggplant	100	18	1.1	0.50	12.0
Tomatoes	30	5	0.2	0.15	1.5
Apples	100	50	0.2	0.10	1.0
Bananas	100	88	1.1	0.60	10.0
Miso	10	20	1.0	0.15	18.0
Sugar	20	76	0	0	—
Shoyu(soy-souce)	12	5	0.5	0.10	2.0
Vinegar	10	2	—	—	—
Oil	20	184	—	—	—
Butter	20	152	0	0	—
Mayonnaise	10	70	0.2	—	—
Starches	3	10	—	—	—
Jam(strawberries)	10	26	0.1	0	—
Jelly	100	104	—	—	—
Carbonated beverages	350	137	—	—	—
Sweet potato starch	50	166	—	—	—
Kona-ame	80	305	—	—	—
Kinako	1	4	0.4	0.02	—
Total	—	2595	41.2	6.26	540.4



## 2-2. 実験結果

### 2-2-1. ニコチン酸投与の血中ナイアシン値とNAD値に及ぼす影響

投与ニコチン酸量の血中ナイアシン濃度への影響をFig. 5-6.に示した。ナイアシン濃度では、I、II期を通して、 $2.3\mu\text{g/ml}$ 前後と大きな変化は認められなかったが、I期ではバラツキが多いのに対して、II期ではバラツキが少なくなった。ナイアシン量が $50\text{mg/day}$ ニコチン酸添加のIII期に入ると著しい増加を示し、ナイアシン $50\text{mg}$ 投与の3日目では、平均値で $7.88\pm 1.13\mu\text{g/ml}$ まで上昇した。

I期の結果は、実験前のナイアシン摂取の影響を多分に反映したためと考えられる。III期の急激な上昇は、投与量が血中ナイアシン濃度の恒常性維持のレベルを越えた結果であり、許容範囲が少なくともニコチン酸投与 $25\text{mg/day}$ と $50\text{mg/day}$ の間であることを示唆しているが、今後、ニコチン酸投与量等の詳細な検討の必要と考えられた。

血中NAD濃度への影響をFig. 5-7.に示す。NAD量への影響を見ると、III期の2日目で、平均値で $31.7\pm 4.61\text{nmol/ml}$ と最高値を示しているが、各期の血中NAD濃度の変動はほとんどなく、ニコチン酸投与量の著しい影響は、ほとんど見られなかった。血中ナイアシン濃度と同様、血中NAD濃度を一定に保つよう調節機構が働くものと考えられ、その恒常性は高いものと推定される。

### 2-2-2. ニコチン酸投与の尿中ナイアシン値とMNA値に及ぼす影響

投与ニコチン酸量の尿中ナイアシン排泄値への影響をFig. 5-8.に示す。ナイアシン値の場合、平均値で見ると、ニコチン酸投与量 $0\text{mg}$ に対して $593.5\pm 106.0\mu\text{g/day}$ 、 $25\text{mg}$ に対して $620.7\pm 98.9\mu\text{g/day}$ 、 $50\text{mg}$ に対して $847.1\pm 259.9\mu\text{g/day}$ であった。

尿中ナイアシンでは、各期間に有意な差はなかったが、血中ナイアシンと同様の傾向を示し、III期で排泄量の増加が認められた。

ニコチン酸の代謝産物である尿中MNA排泄値の結果をFig. 5-9.に示す。平均値で見ると、ニコチン酸投与量 $0\text{mg}$ に対して $9.82\pm 1.72\text{mg/day}$ 、 $25\text{mg}$ に対し



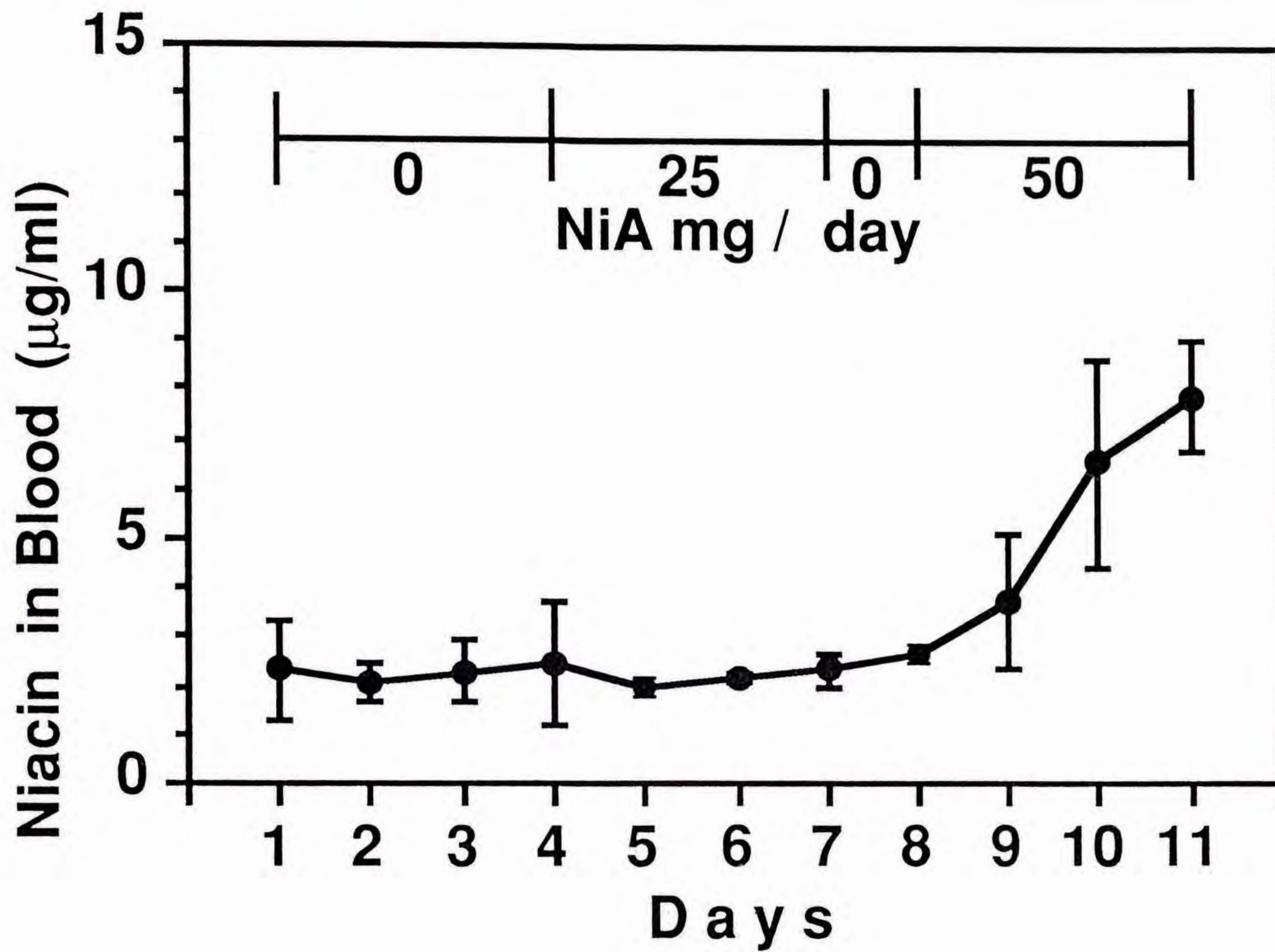


Fig.5-6 Blood niacin concentration, as influenced by supplemented nicotinic acid .

The experimental period was divided into three phases of three days each. During phase 1 the five subjects were fed on niacin - controlled diet. During the second and third phase, subjects were fed on diet as in phase I supplemented with 25mg and 50mg nicotinic acid /day , respectively.



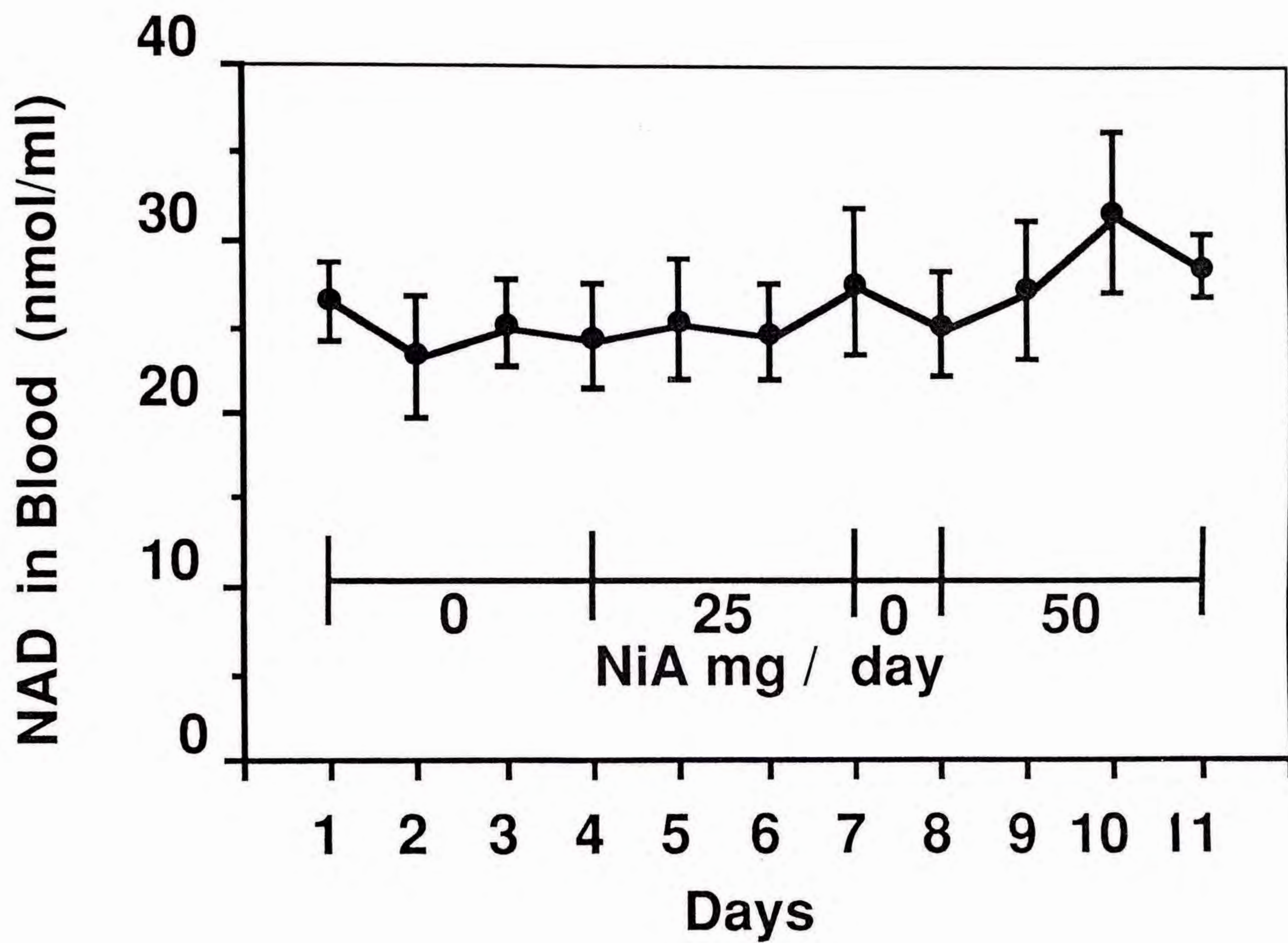


Fig. 5-7. Blood NAD concentration , as influenced by supplemented nicotinic acid .

The details are the same as in Fig.5-6.



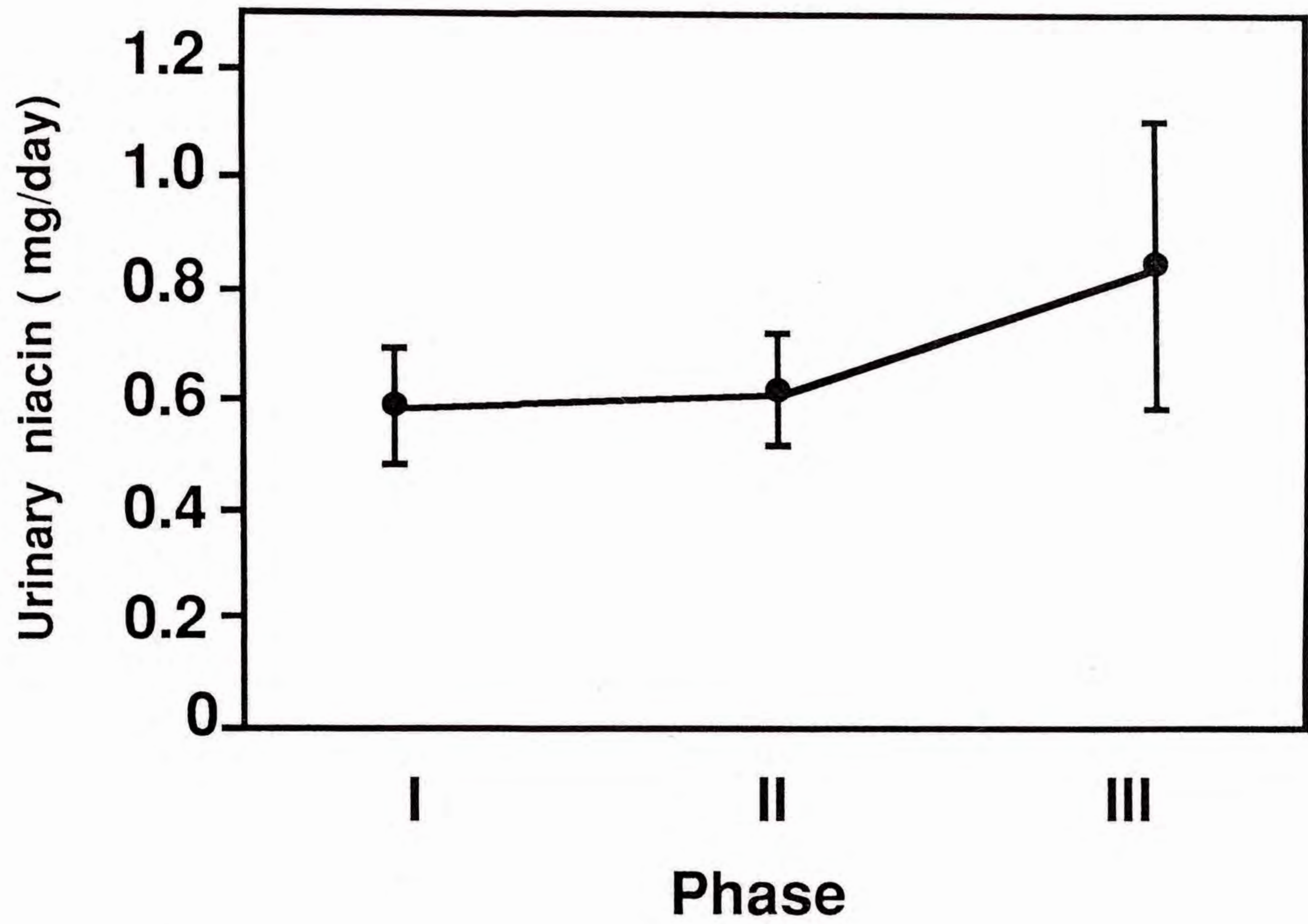


Fig. 5-8. Urinary excretion of niacin , as influenced by supplemented nicotinic acid .

The details are the same as in Fig. 5-6.



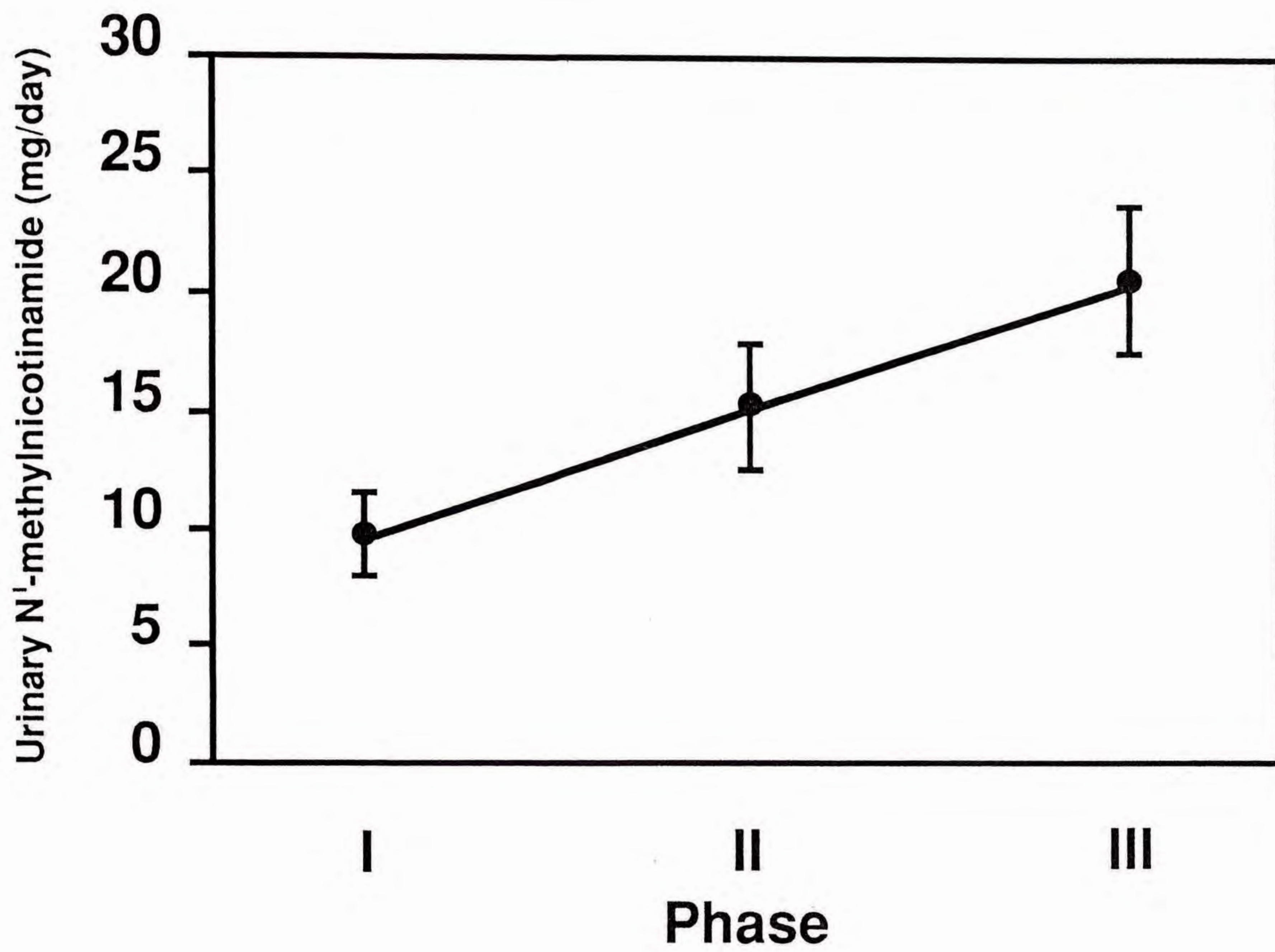


Fig. 5-9. Urinary excretion of N<sup>1</sup>-methylnicotinamide, as influenced by supplemented nicotinic acid .

The details are the same as in Fig.5-6.



て $15.2 \pm 2.65$ mg/day、50mgに対して $20.6 \pm 3.08$ mg/dayとほぼ直線的に増加し  
( $r=0.9083$ 、 $p<0.001$ )、各期の差は有意であり、ニコチン酸投与量と尿中MNA量  
には相関関係がみられた。

### 2-3. 考察

ヒトにおけるナイアシン投与後の血中ナイアシン濃度や尿中排泄について研究  
した報告はほとんどなく、食事調査によるナイアシン当量摂取量と尿中ナイアシ  
ン代謝物の関係について報告があるにすぎない<sup>65)</sup>。従って、連続投与したときの  
経日変動についての報告はない。

ナイアシンの吸収・排泄の個人差は、ビタミンCなど他のビタミンと同様個人  
差は大きいと考えられ<sup>66)</sup>、性、年齢、食事などの影響が考えられるので、本研究  
では、健康人を対象とし、性を男子、年齢を19~20歳とし、食事は同一、しかも  
トリプトファンからの影響を最小に抑えるためにタンパク質の制限下で行った実  
験である。

血中NAD濃度は、ニコチン酸投与量の影響はほとんど受けず、むしろ、個人  
間で変動がみられた。

血中ナイアシン濃度では、生活歴（主に食歴）により影響を受け、同一条件下  
ではほとんど差がみられなくなることから、個人差はほとんどないと考えられる。  
しかしながら、50mg/day投与になると個人の代謝能力の差などから、ナイアシン  
濃度に個人差が現れる。また、Ⅲ期の日をおうごとに、ナイアシン濃度が増加す  
ることから、投与量が通常血中ナイアシン恒常性維持のレベルを越えたと考え  
られる。この推察に従えば、恒常性維持の上限は、40mg/day（投与量25mg+食事  
由来15mg）~65mg/day（投与量50mg+食事由来15mg）、さらに血中ナイアシン増  
加量（1日当り 約 $2 \mu\text{g/ml} \times$ 血液量5000ml=約10mg）を考慮すれば40~55mg/  
day程度であることが示唆される。血中NAD濃度は変化しないことから、吸収さ  
れたニコチン酸がNADに変換される速度に追いつけなかった結果かもしれない。

尿中ナイアシン値は、血中ナイアシン値の結果と類似しており、血中からオー  
バーフローしたナイアシンが尿中に排泄されたと考えられ、摂取ナイアシン40mg  
以上で体内飽和量に達すると考える。



尿中MNA排泄値は、投与ニコチン酸のかなりの部分を占めているが、柴田らは、ナイアシン栄養の指標として使うことは好ましくないと報告している<sup>65)</sup>。しかし、本実験条件下のように、食事由来のナイアシンをできるだけ制限し、投与3日目の測定値を用いた場合、投与量に対し、高い相関関係を見いだすことができた。このような条件下では、尿中MNA排泄量がヒトを対象としたナイアシン栄養の有効な指標となりえることが再確認された。



### 第3節 ヒトの玄米胚芽中ナイアシン利用率測定を試み

第2節で得た結果をもとに、ヒトの玄米胚芽中ナイアシンの利用率を測定することを試みた。

#### 3-1. 実験方法

##### 3-1-1. 化学薬品

1節、1-1-1.と同じとした。

##### 3-1-2. 実験計画

被験者は、女性5名に、I期はコントロール食（1844kcal、タンパク質48.1g、ナイアシン7.3mg、トリプトファン644.9mg）、II期はコントロール食+30mgニコチン酸/day、III期はコントロール食（糖質、油脂を減じ、1480kcalとした）+150g粉末胚芽/dayで、IV期は、コントロール食（糖質、油脂を減じ、1480kcalとした）+150g扁平胚芽/dayを各3日間ずつ投与した。ヒトを対象にした実験であるため、被験者に研究目的を十分に説明し、ヘルシンキ宣言<sup>62)</sup>（1964）の精神に則って行なわれた。

##### 3-1-3. 試料調製法

第1節、1-1-3.と同じ方法によった。

##### 3-1-4. ナイアシン利用率測定法

ニコチン酸0mg、30mg投与に対する各被験者の尿中MNA排泄量が直線関係にあるとし、胚芽投与期の尿中MNA排泄量から利用ナイアシン量をもとめた。

#### 3-2. 結果と考察

投与ニコチン酸に対する尿中MNA排泄量の結果をFig.5-10.に示す。また、被験者5名の玄米胚芽利用率の結果をFig.5-11.に示す。

被験者Aの玄米胚芽利用率は、粉末胚芽で-10.2%、扁平胚芽で22%、被験者Bは、各々-87.3%、31.6%、被験者Cは、各々-0.6%、-23.9%、被験者Dは、各々74.4%、97.1%、被験者Eは、各々133%、102%であった。平均利用率は、粉末胚芽で27.3%、扁平胚芽で64.8%という結果であった。負の利用性を示す者、また、ほ



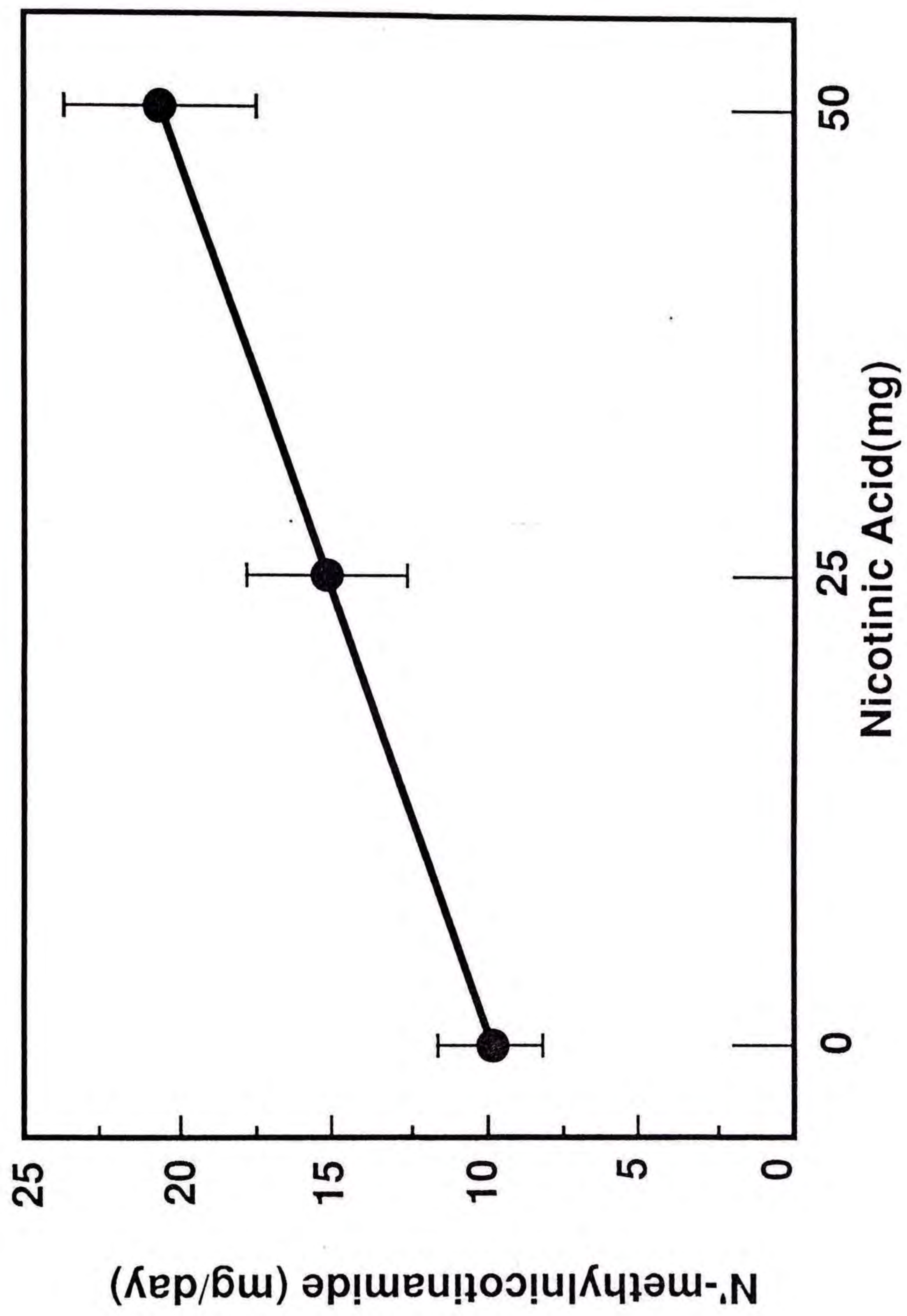
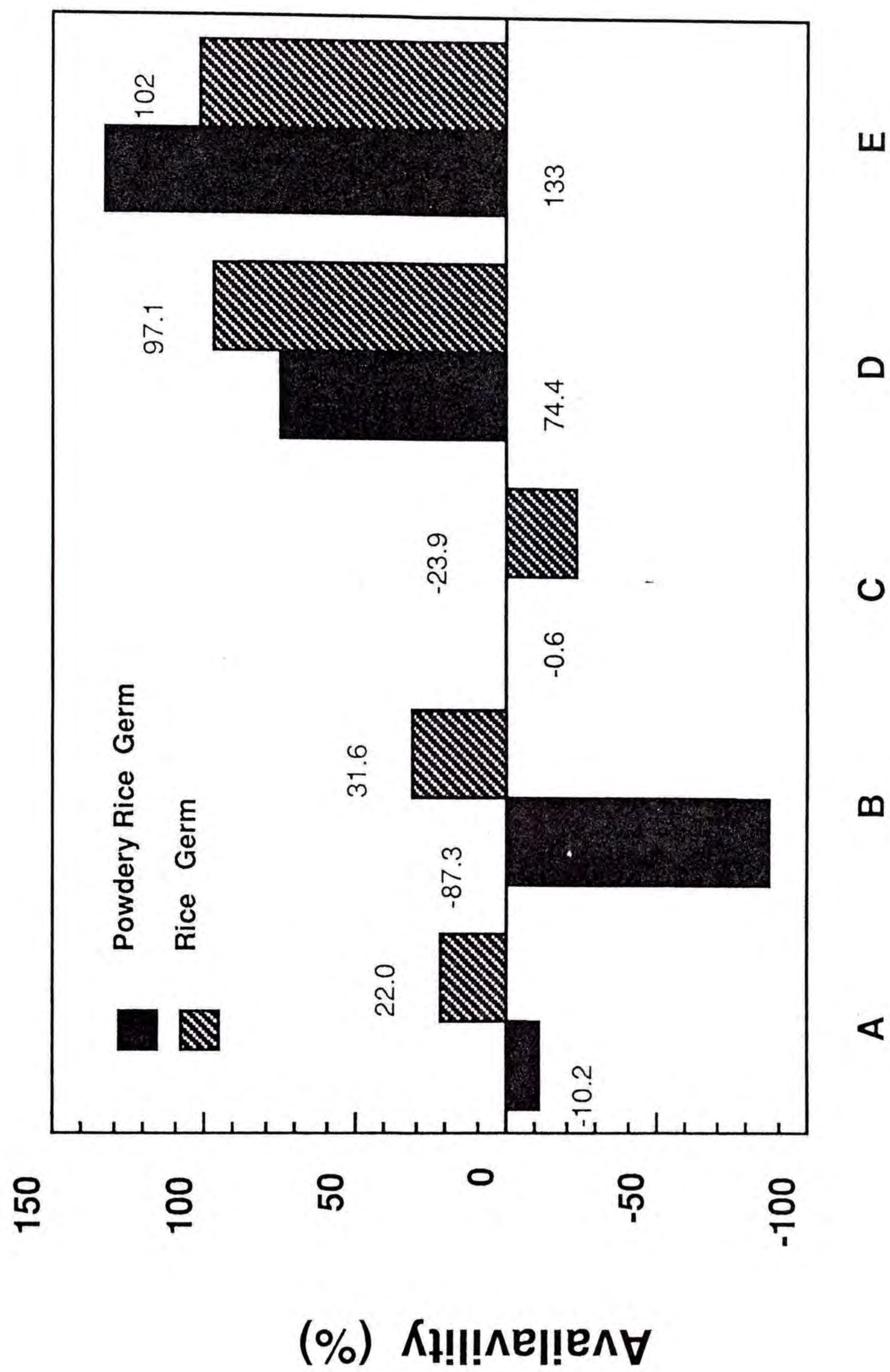


Fig.5-10. Urinary excretion of N-methylnicotinamide as influenced by supplemented nicotinic acid for women.





### Subjects

Fig. 5-11. Availability of niacin in rice germ for women.



ば100%の利用性を示すものと大きな個人差が見られた。この理由としては、投与玄米胚芽の量が多すぎたため、それに含まれる食物繊維の影響が第一に考えられた。玄米胚芽中の総ナイアシン値が100g当り11.2mgということで、投与尿中MNA量に影響を与えるナイアシン量にするために150g/dayを設定したことに若干の無理があったと考えられ、今後この点に関しては、ナイアシンの食品からの抽出等、生化学的指標を含め、さらに検討を続けたい。

また、偏平と粉末間での利用性の差は、本実験とは別にヒトに食物繊維を与え、糞便中ナイアシンを測定したところ、繊維食群で便中ナイアシン量が有意に増加した結果と考え合わせると、結合型ナイアシンの難利用性とは別に、食物繊維によるナイアシンの再吸着や吸収阻害などの可能性が示唆され、ヒトのナイアシン利用性に関する新たな問題が提示された。



#### 第4節 小括

1. ヒトにおけるナイアシン利用率測定法を確立するために、ナイアシンをコントロールしたモデル食を考案し、健康な成人女子3名を被験者とし、このナイアシンコントロール食を使ってニコチン酸投与レベルを0、15mg、30mgと変え、血中NAD、血中ナイアシン、尿中MNA、尿中ナイアシンへの影響を調べた。

1) 集団給食におけるナイアシン当量は  $11.3 \pm 4.1$  / 1食で、そのうち、44%がトリプトファンに由来するナイアシンであることを明かとし、ナイアシンコントロール食作成には、ナイアシンコントロールと共に、トリプトファン制限、則ち、タンパク制限が必須であることを確認した。20才女子対象のために考案したナイアシンコントロール食は、エネルギー1671kcal、タンパク質46.5g、ナイアシン5.9mg、トリプトファン589mg、15.7ナイアシン当量（以上計算値）であった。同一材料で、7日間、毎日違った献立の食餌を考案し、長期摂取できる実験食作成の可能性を示した。

2) 血中NAD量では、実験開始時に個人差があるが、平均でみると各期の中で最も高い値を示し ( $59.7 \pm 16.1 \text{ nmol/ml}$ )、ニコチン酸投与15mg/day期で最も低い値となった ( $51.7 \pm 6.43 \text{ nmol/ml}$ )。同様に、血中ナイアシン量でも、実験開始時が  $146.7 \pm 81.0 \text{ nmol/ml}$  で最高、15mg/day期が  $91.7 \pm 5.78 \text{ nmol/ml}$  で最低であった。これは、投与ニコチン酸0mgの影響が15mg/day期に出たものと考えられ、その後のニコチン酸投与に従い、30mg/day期のところで増加し、実験開始時、無投与期を下回っていることから、おそらく、30mg投与の影響は、実験終了後に現れたと推定される。すなわち、2日間の同レベルニコチン酸投与においては、血中への影響が現れるのに少なくとも5日前後が要すると考えられた。尿中N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド(MNA)量への影響をみると、無投与期が最も低く ( $8.22 \pm 4.08 \text{ mg/day}$ )、30mg/day期で最も高く ( $16.2 \pm 6.16 \text{ mg/day}$ )、投与ナイアシンレベルの増加にしたがって、MNA量の増加が認められた。投与ニコチン酸の尿MNA量への影響が2日程度で現れ、少なくとも血中NAD、血中ナイアシンよりは、鋭敏な指標となると予想された。尿中ナイ



アシンへの影響は、血中NAD、血中ナイアシンへの影響の出方と良く似ており、15mg/day期で最も低い(413±115 μg/day)、30mg/day期(500±125 μg/day)の値が無投与期を上回っており、ニコチン酸投与の影響が血中NAD、血中ナイアシンに較べ、早い段階で現れたと考えられる。しかしながら、尿中MNA量を除いて、著しく投与ニコチン酸の影響を反映するものはなかったが、血中より尿中への影響の方が鋭敏であった。

同レベルニコチン酸投与期間が2日間では、摂取ニコチン酸量を血中、尿中に反映させることには不十分であったが、これまで、ヒトの栄養実験で最も軽視されてきた食餌について、一応、普段の食生活と変わらない程度のもので栄養実験を行なうことができた。

2. 健康な男子5名に、10日間、ナイアシン、トリプトファンを制限したコントロール食の他に、ニコチン酸を連続投与(0mg、25mg、50mg各3日)し、毎日の血液中NAD値とナイアシン値及び各期毎の尿中MNA量とナイアシン量について検討を行った。
  - 1) 血中ナイアシン濃度では、無投与期、ニコチン酸投与25mg/day期を通して、2.3 μg/ml前後と大きな変化は認められなかったが、無投与期ではバラツキが多いのに対して、25mg/day期ではバラツキが少なくなった。ナイアシン量の50mg/day期に入ると著しい増加を示し、50mg/day投与期3日目では、平均値で7.88±1.13 μg/mlまで上昇した。無投与期の結果は、実験前のナイアシン摂取の影響を多分に反映し、50mg/day期の急激な上昇は、投与量が血中ナイアシン濃度の恒常性維持のレベルを越えた結果であり、許容範囲が少なくともナイアシン投与25mg/dayと50mg/dayの間であると考えられた。血中NAD量への影響を見ると、50mg/day期2日目で、31.7±4.61 nmol/mlと最高値を示しているが、各期の血中NAD濃度の変動はほとんどなく、ニコチン酸投与量の著しい影響はほとんど見られなかった。血中ナイアシン濃度と同様、血中NAD濃度を一定に保つよう調節機構が働くものと考えられ、その恒常性は高いものと推定される。



- 2) 投与ニコチン酸量の尿中ナイアシン排泄値は、ニコチン酸投与 0mg/dayに対して $593.5 \pm 106.0 \mu\text{g/day}$ 、25mg/dayに対して $620.7 \pm 98.9 \mu\text{g/day}$ 、50mg/dayに対して $847.1 \pm 259.9 \mu\text{g/day}$ であった。尿中ナイアシンでは、各期間に有意な差はなかったが、血中ナイアシンと同様の傾向を示し、50mg/day期での排泄量の増加が認められた。ニコチン酸の代謝産物である尿中MNA排泄値は、0mg/dayに対して $9.82 \pm 1.72\text{mg/day}$ 、25mg/dayに対して $15.2 \pm 2.65\text{mg/day}$ 、50mg/dayに対して $20.6 \pm 3.08\text{mg/day}$ とほぼ直線的に増加し ( $r=0.9083$ 、 $p<0.001$ )、各期の差は有意であり、ニコチン酸投与量と尿中MNA量には相関関係がみられた。
- 3) ナイアシン量をコントロールした食事とともに、ニコチン酸を同レベル3日間投与した際、ニコチン酸投与量と尿中MNA量に高い相関関係がみられ、ヒトの摂取ナイアシン測定の生化学的指標となることを明らかにした。
3. 結合型ナイアシンの利用性を明かとするため、女子5名に玄米粉末胚芽、玄米偏平胚芽を投与し、尿中MNA排泄量を生化学的指標として利用率を測定したところ、粉末胚芽中ナイアシンの平均27.3%、偏平胚芽中ナイアシンの平均64.8%を利用するという結果を得た。また、結合型ナイアシンの難利用性とは別に、食物繊維によるナイアシンの再吸着や吸収阻害などの新たな問題が示唆された。



## 第6章 HPLCによる食品ナイアシンの定量

各分野において分析・定量にHPLCが広く使われている。ビタミン類においても数多く報告されているが、ナイアシンにおいては確立された方法はなく、測定感度の問題や結合型の問題など、特に食品中ナイアシンの測定は困難となっている。

そこで、第6章では、HPLCによるナイアシン定量を確立することを目的として、第1節では、ナイアシン関連物質の分離定量を試み、第2節では、実際に食品中ナイアシンをHPLC法により測定し、微生物定量値とHPLC値との相関性を調べ、第3節では、HPLC法における結合型ナイアシンの態度を明かするため、米の発芽過程におけるナイアシンの変動を検討した。

### 第1節 HPLCによるナイアシン関連物質の分離

ナイアシン関連物質のHPLCによる分離が報告されているが<sup>33-35, 67-70</sup>、ある特定の2,3の化合物の相互分離に関する報告であり、食品中のナイアシン関連物質の測定に言及した報告は未だないようである。そこで、まず、ナイアシン関連物質の同時分離定量を試みた。

#### 1-1. 実験材料と方法

##### 1-1-1. 標準化合物

ニコチン酸、ニコチンアミド、NAD、NADP、トリゴネリン、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドの標準化合物を蒸留水に溶解して、10 $\mu$ g/mlの溶液を調製し、HPLC注入用試料とした。

##### 1-1-2. 分析装置

サンプルインジェクターはレオダイン社製7125型、ポンプはL-6200インテリジエントポンプおよびL-6000、カラムは陰イオン交換ゲル#3013-N(4 $\times$ 150mm)、UVモニターはL-4000UV、データ処理装置はD-2500、カラムオーブンは655A-52、オートサンプラーはAS-4000(以上はすべて日立製作所(株)製)を使用した。



### 1-1-3. 分析方法

標準化合物を10 $\mu$ l注入し、カラムを60 $^{\circ}$ Cに保ちながら、移動相を0.5ml/minで送液し、紫外吸収はすべて260nmでモニターした。

### 1-2. 実験結果および考察

リン酸緩衝液とアセトニトリル混合液のイソクラティックモードによる類似体6種の分離はできなかった。そこで、プログラム1 (Table 6-1.) のグラジエントにより、分離を行ったものをFig. 6-1. に示した。この条件では、ニコチンアミドとN<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドが分離しなかったため、プログラム2 (Table 6-2.) のグラジエント条件に替えて溶出したものをFig. 6-2. に示した。

リテンションタイム (分) は、トリゴネリンが2.77、ニコチンアミドが5.76、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドが7.23、NADが16.40、ニコチン酸が37.42、NADPが40.58と良好な分離が得られた。

ODS系のカラムによる分離も試みたが、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>とアセトニトリルの微妙な比率により溶出時間が変わること、しかもこれら6種の類似体の溶出が5分以内に完了するという理由から、多くの成分が含まれている食品中のナイアシンのHPLCによる分析条件としては不適當であり、前処理等の検討が必要と考えられた。



Table 6-1. Gradient program 1.

Time (min.)	2.5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.5mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10mM NH <sub>4</sub> Cl 1% CH <sub>3</sub> CN ( A )%		10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100mM NH <sub>4</sub> Cl 6% CH <sub>3</sub> CN ( B )%	
	0.00	100	0	
20.00	0		100	
30.00	0		100	
30.01	100		0	
50.00	100		0	



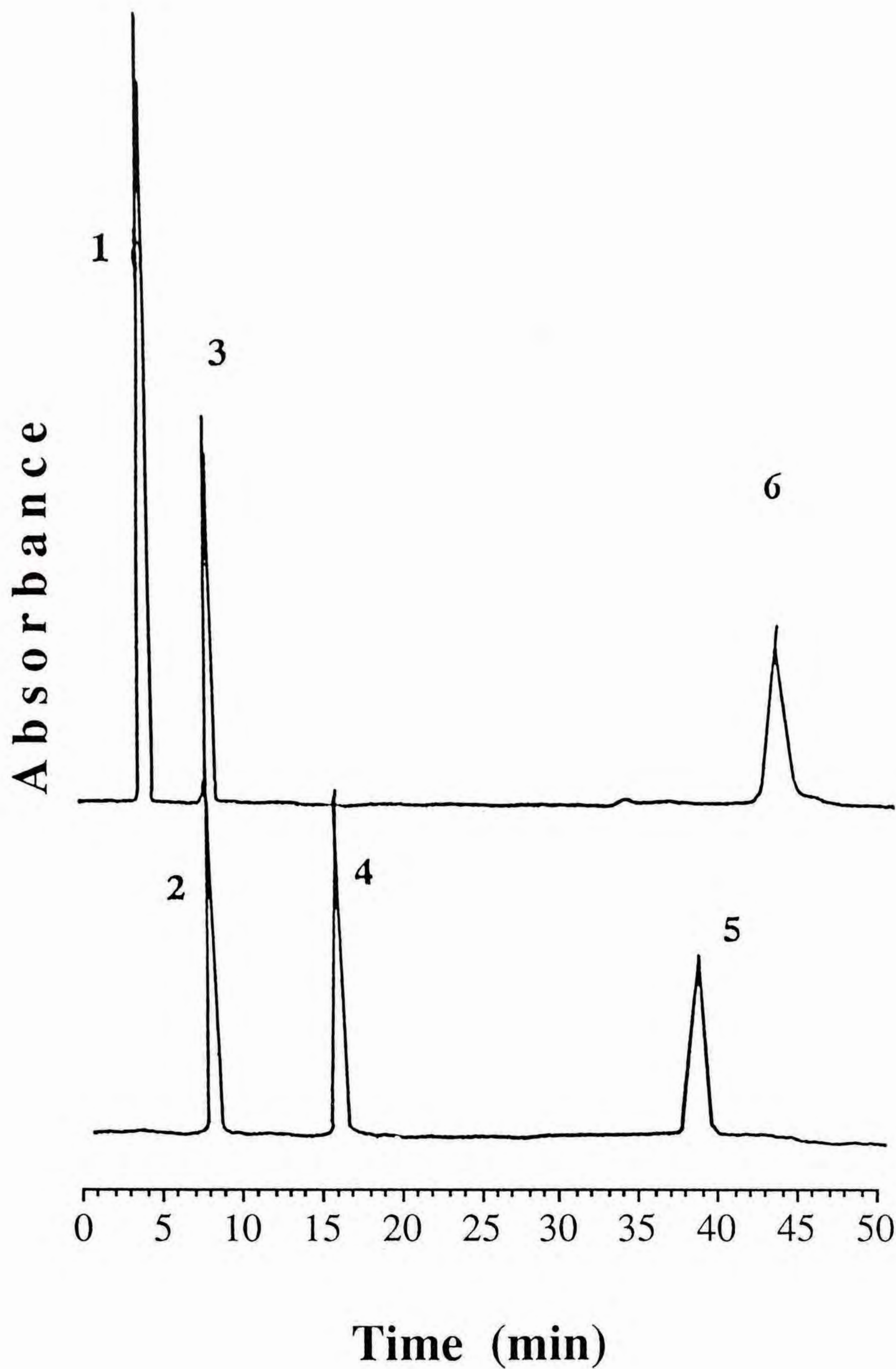


Fig. 6-1 Chromatogram of niacin derivatives on an anion-exchange column .

Column: An anion -exchange gel column # 3013-N (Hitachi),  
 Elution: Table 6-1. Flow-rate: 0.5ml/min, Detection  
 wavelength: 260nm, Oven temperature: 25°C. Peaks: 1;  
 trigonelline, 2; nicotinamide , 3; N<sup>1</sup>-methylnicotinamide, 4;  
 NAD, 5; nicotinic acid , 6; NADP.



Table 6-2.

Gradient program 2.

Time (min.)	2.5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.5mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5mM NH <sub>4</sub> Cl 1% CH <sub>3</sub> CN	10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 500mM NH <sub>4</sub> Cl 6% CH <sub>3</sub> CN
	( A )%	( B )%
0.00	100	0
10.00	80	20
30.00	60	40
40.00	40	60
40.01	100	0
60.00	100	0



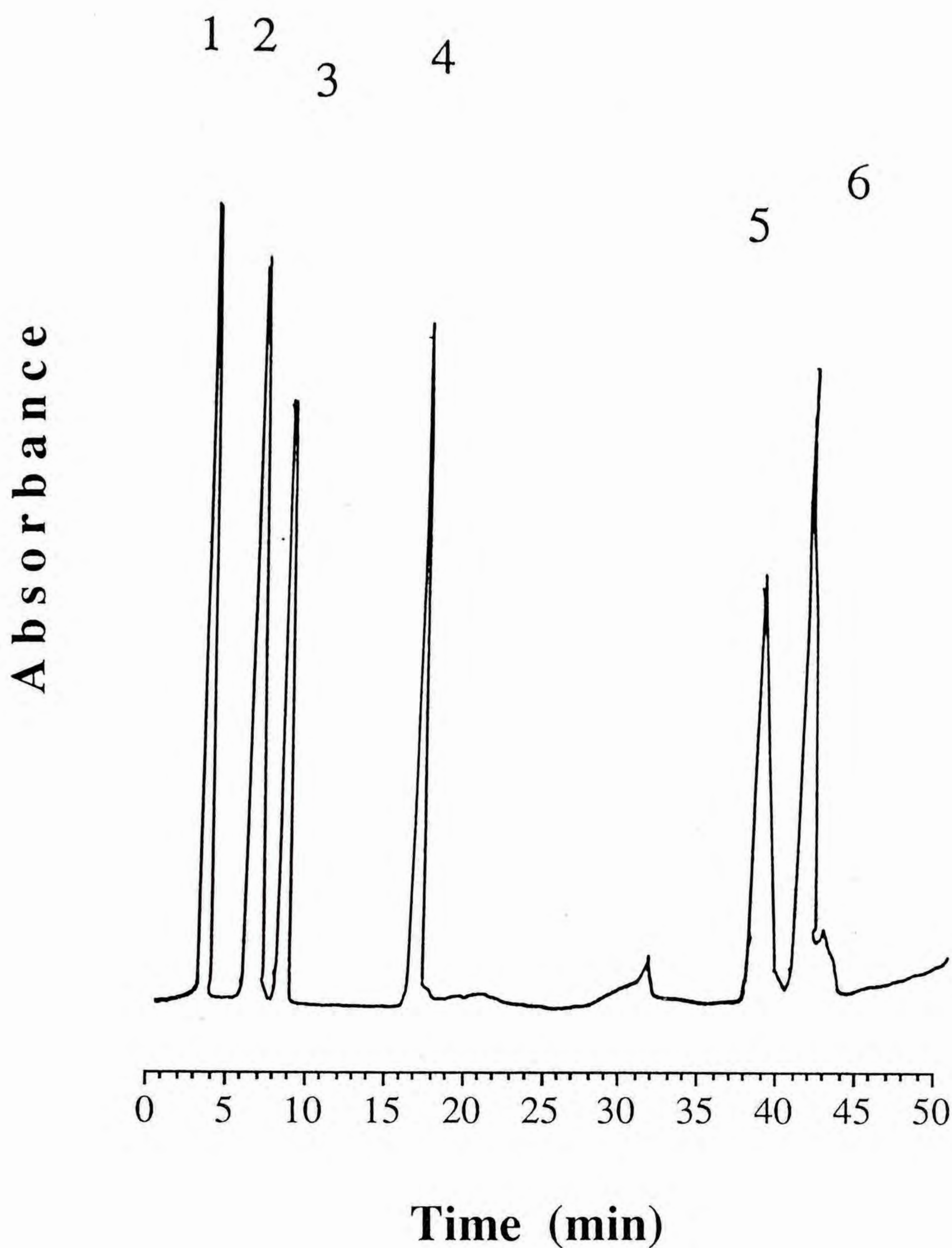


Fig. 6-2. Chromatogram of niacin derivatives on an anion-exchange column .

Column: An anion -exchange gel column # 3013-N (Hitachi),  
 Elution: Table 6-2. Flow-rate: 0.5ml/min, Detection  
 wavelength: 260nm, Oven temperature: 60°C. Peaks: 1;  
 trigonelline, 2; nicotinamide , 3; N<sup>1</sup>-methylnicotinamide, 4;  
 NAD, 5; nicotinic acid , 6; NADP.



## 第2節 HPLCによる食品中ナイアシンの定量

穀類以外の食品（魚類、黄緑野菜、その他の野菜、きのこ類、海草類）にも結合型が存在するというHPLCによる分析結果が小嶋ら<sup>71)</sup>によって報告された。一般的に使われている結合型ナイアシンという用語は、動物に難利用性であるナイアシンとして捉えられているが、小嶋らが結合型ナイアシンとよぶナイアシンが本来の難利用性結合型ナイアシンをさすものかどうか、また、ナイアシン抽出分解条件などの分析条件なども疑問に感じられたので、第1節で得られたHPLC分析条件で、いくつかの食品中のナイアシン分析を行い、HPLC値と微生物分析値との比較ならびにHPLC測定における結合型ナイアシンの問題について検討を行った。

### 2-1. 実験材料ならびに方法

#### 2-1-1. 材料と試料調製

試料として、ジャガイモ、ゴマ、きなこ、マグロ、鶏ササミ、エノキ茸、シメジ、ワカメ、キュウリ、タマネギ、ニンジン、ピーマン、ショウガを各5g精秤し、約50mlの各抽出液（水、0.1N硫酸、1N硫酸、1N水酸化ナトリウム）を加え、日本精機（株）製のBio-mixerで破碎抽出し、オートクレーブにて各々10分、10分、30分、1時間加圧抽出を行い、pH6.0に調整して100mlにメスアップ後、濾過した。これをミリポア製カラムガードHV13mm（pore size 0.46 $\mu$ m）を通して、HPLC測定用検液、ナイアシン濃度が100ng/ml程度になるよう希釈した溶液を微生物定量用検液とした。また、ニコチン酸、NAD、ニコチンアミドを水、0.1N硫酸、1N硫酸、1N水酸化ナトリウムとともに0分、10分、30分、60分、120分とオートクレーブで加圧抽出、pH6.0に調整し、HPLC法と微生物法で生成物とナイアシン活性を測定した。

#### 2-1-2. 分析方法

微生物定量は、第1章、第1節、1-1-1-a.、HPLC法は、本章、第1節に準じて行い、ただし、定量は、ニコチン酸、ニコチンアミド、NADについてのみ行った。



## 2-2. 結果

### 2-2-1. 各種抽出法による微生物定量値

Fig. 6-3-1. から Fig. 6-3-13. に抽出条件を変えて、微生物分析した各食品のナイアシン値 (mg/100g) を示した。

ジャガイモ (Fig. 6-3-1.) では、水や弱い酸ではナイアシンは遊離してこないが、抽出条件が過酷な 1N 硫酸、1N 水酸化ナトリウムによる加水分解では結合型が遊離して定量されており、このようなパターンの食品中には、結合型ナイアシンが存在していると考えられる。

しかし、動物性食品である、マグロ (Fig. 6-3-2.) や鶏ササミ (Fig. 6-3-3.)、きのこ類のエノキ茸 (Fig. 6-3-4.) やシメジ (Fig. 6-3-5.) では、抽出条件の違いによるナイアシン値の差は認められず、ほぼ同じ値を示した。このようなパターンの食品中では、結合型としてナイアシンは、存在しないと考えられる。

タマネギ (Fig. 6-3-6.) やキュウリ (Fig. 6-3-7.) では、抽出条件が苛酷になるとむしろナイアシン値は減少した。

ニンジン (Fig. 6-3-8.)、ピーマン (Fig. 6-3-9.)、ゴマ (Fig. 6-3-10.)、きなこ (Fig. 6-3-11.)、ショウガ (Fig. 6-3-12.) では、各抽出条件によるナイアシン値の違いは認められるが、大きな差ではなかった。

ワカメ (Fig. 6-3-13.) では、0.1N 硫酸抽出で最も有効に抽出できたが、他の抽出法では、試料の著しい膨潤が見られ、昆布などの海草類の抽出は、0.1N 硫酸が適当と考えられた。

これらの結果から、結合型が存在すると考えられる食品群 (穀類や芋類)、まったく結合型を含まない食品群、結合型は含まないがむしろ苛酷な抽出条件によりナイアシン値が減少する食品群と、抽出条件により変動するナイアシン値のパターンによって 3 タイプの食品群に大別できた。



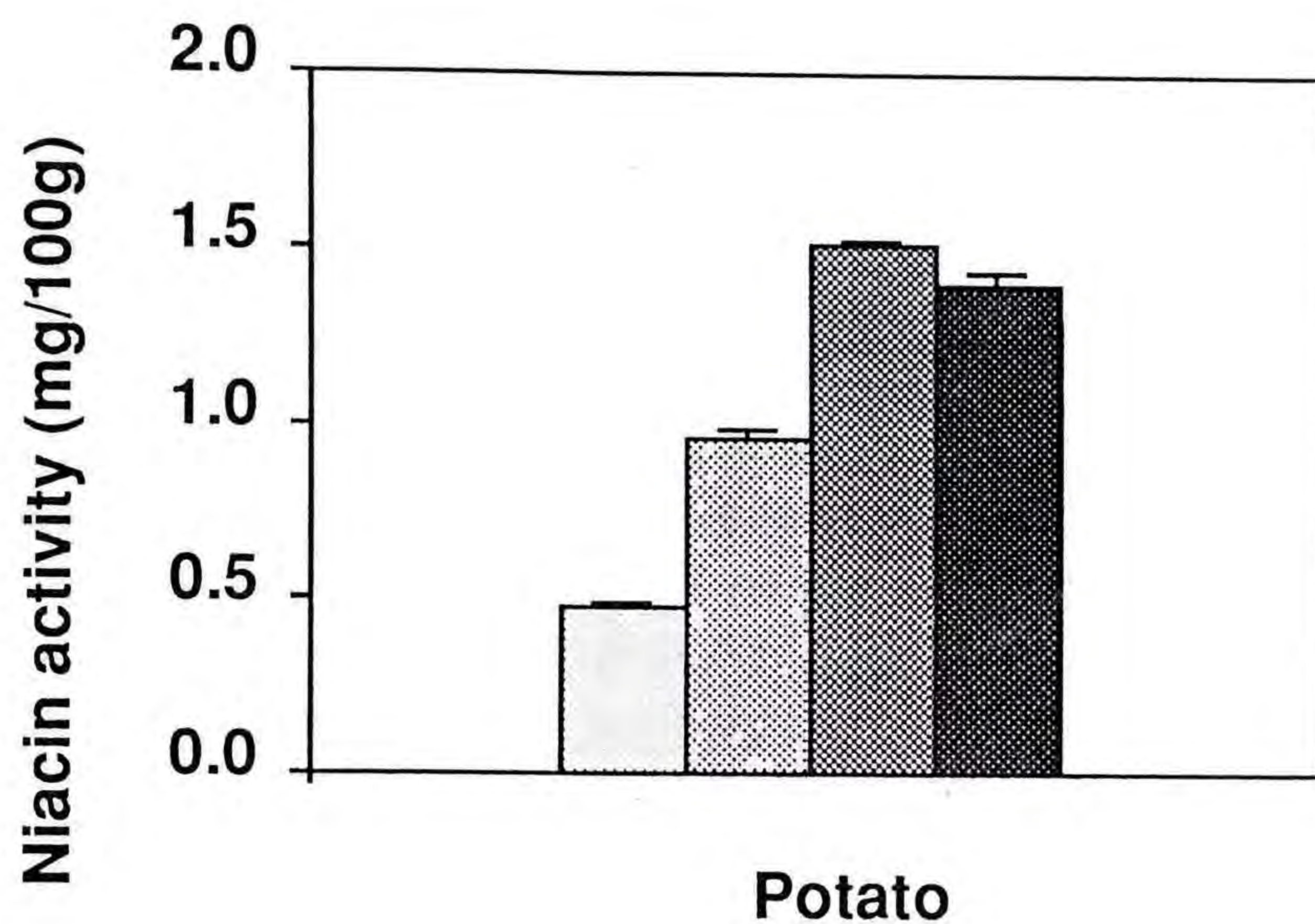


Fig.6-3-1. Microbioassay values of niacin in potato under the different conditions.

□: Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩: Acid extraction , ■: Alkaline extraction

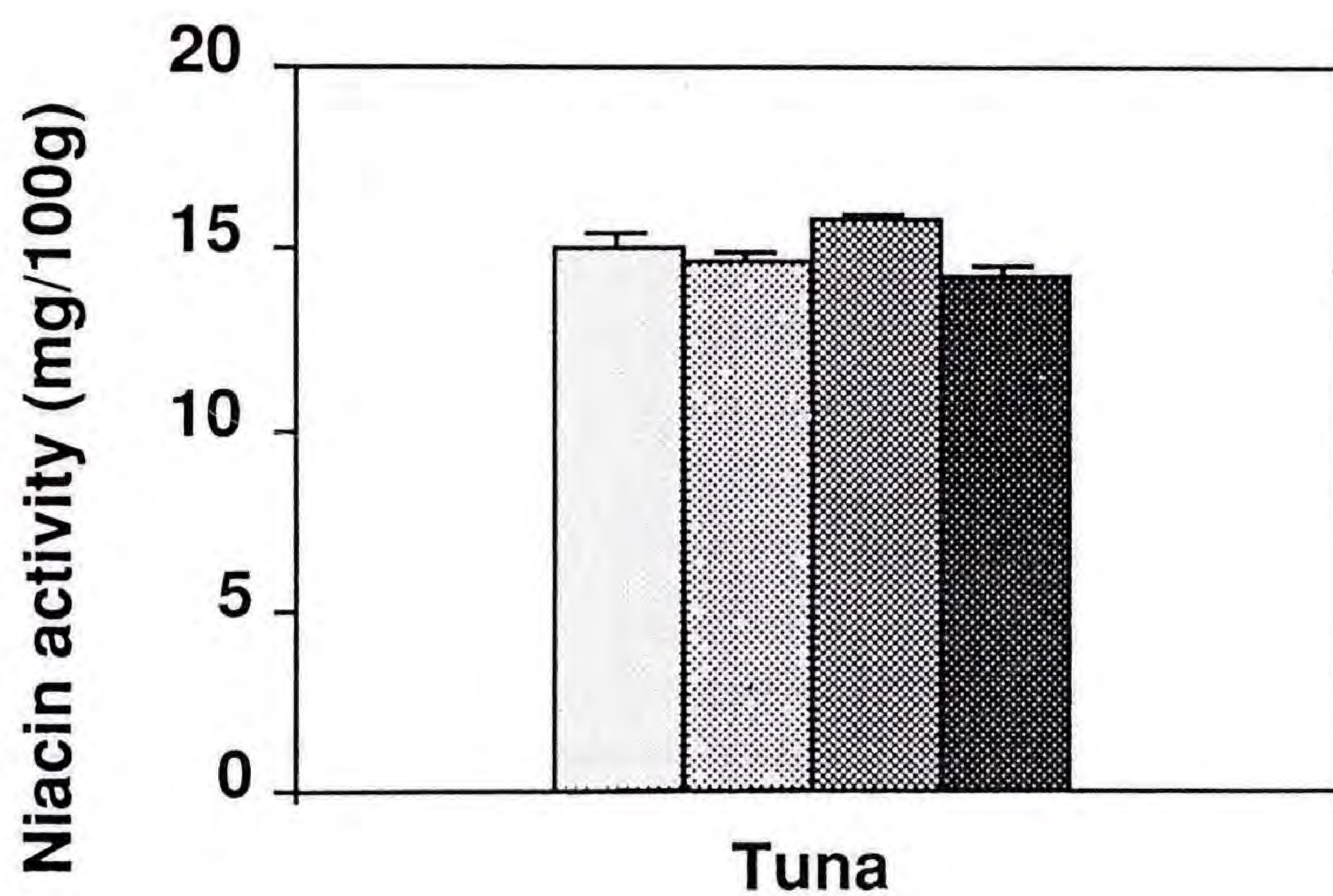


Fig.6-3-2. Microbioassay values of niacin in tuna under the different conditions.

□: Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩: Acid extraction , ■: Alkaline extraction



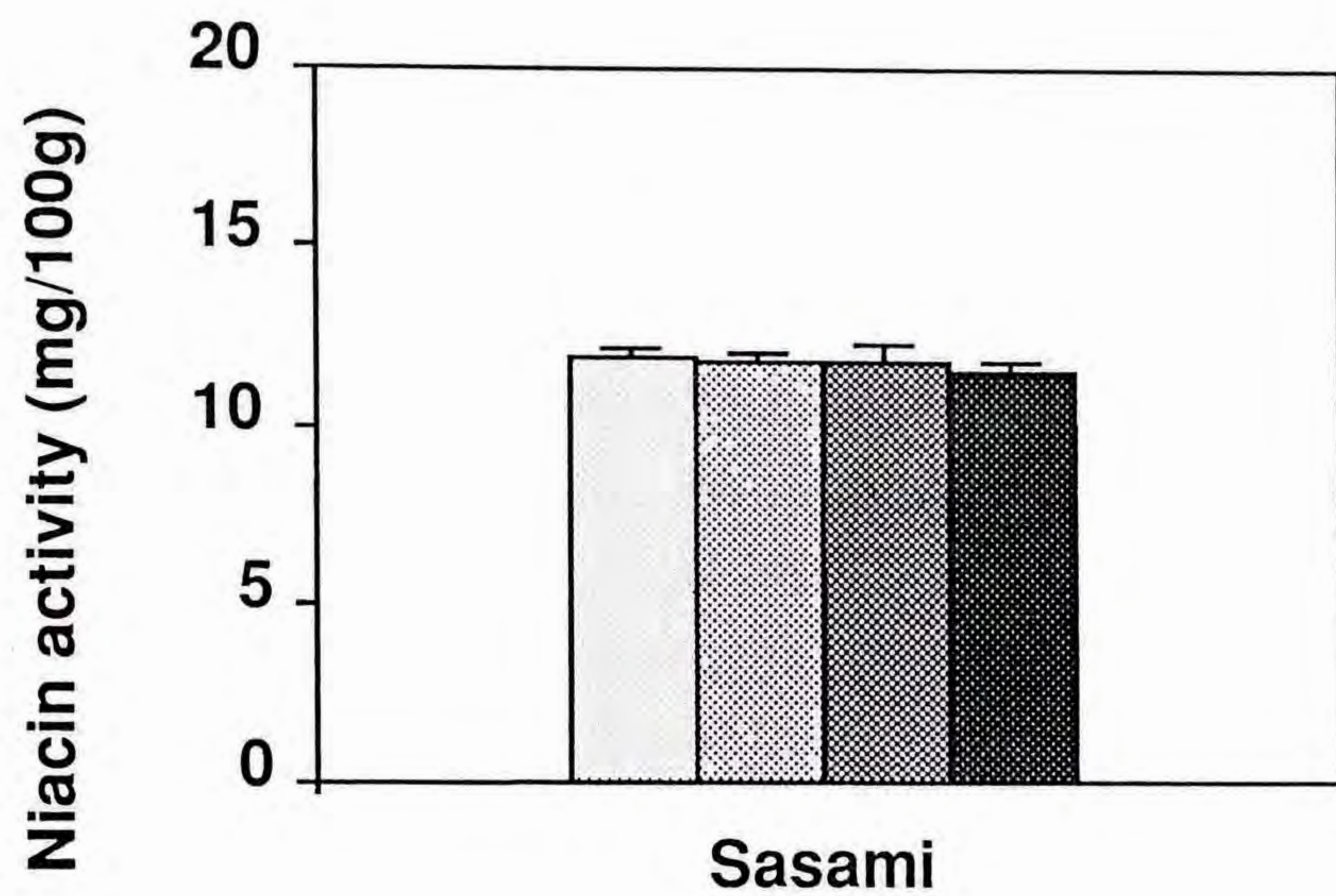


Fig.6-3-3. Microbioassay values of niacin in sasami under the different conditions.

□: Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩: Acid extraction , ■: Alkaline extraction

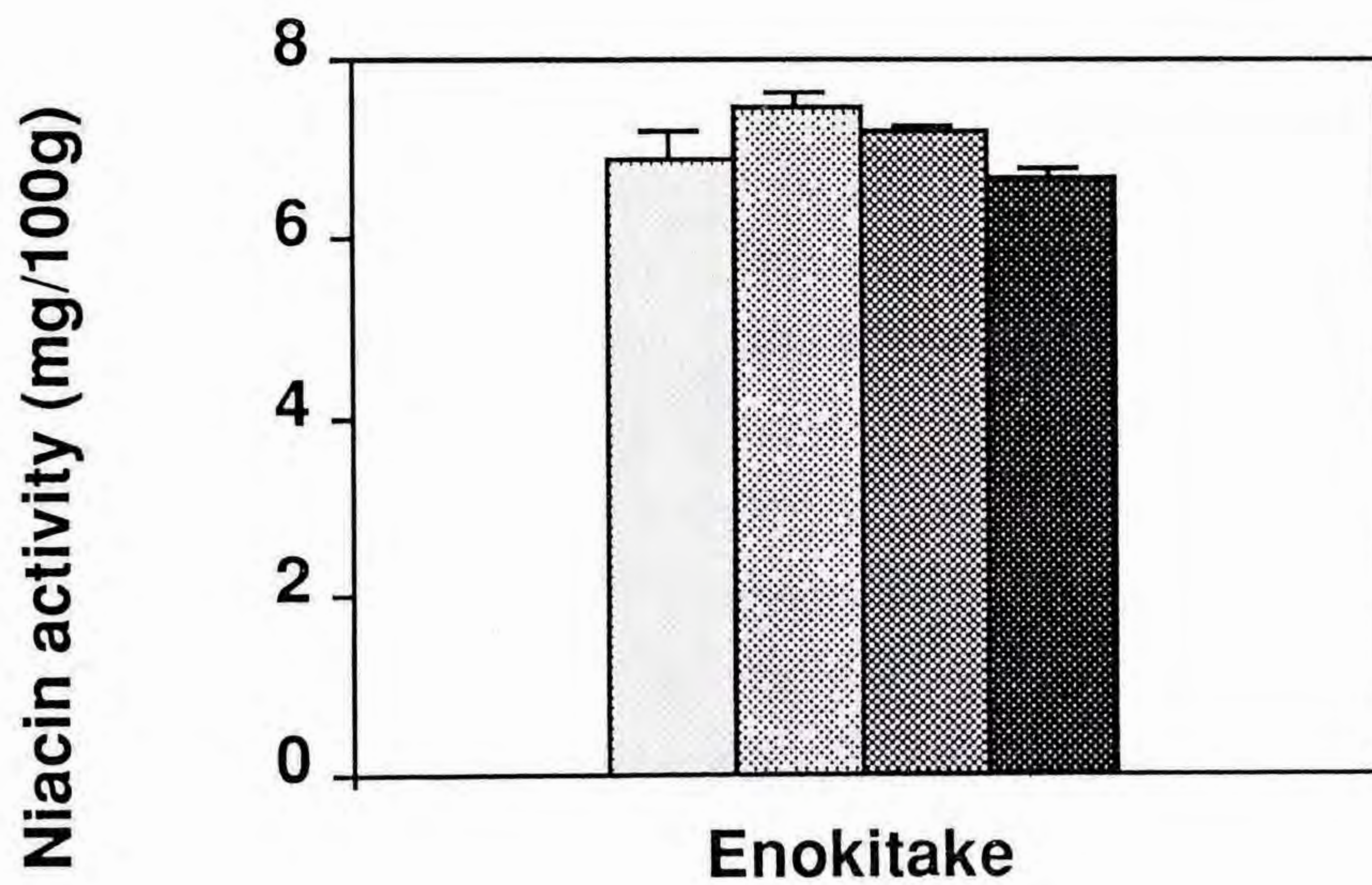


Fig.6-3-4. Microbioassay values of niacin in enokitake under the different conditions.

□: Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩: Acid extraction , ■: Alkaline extraction



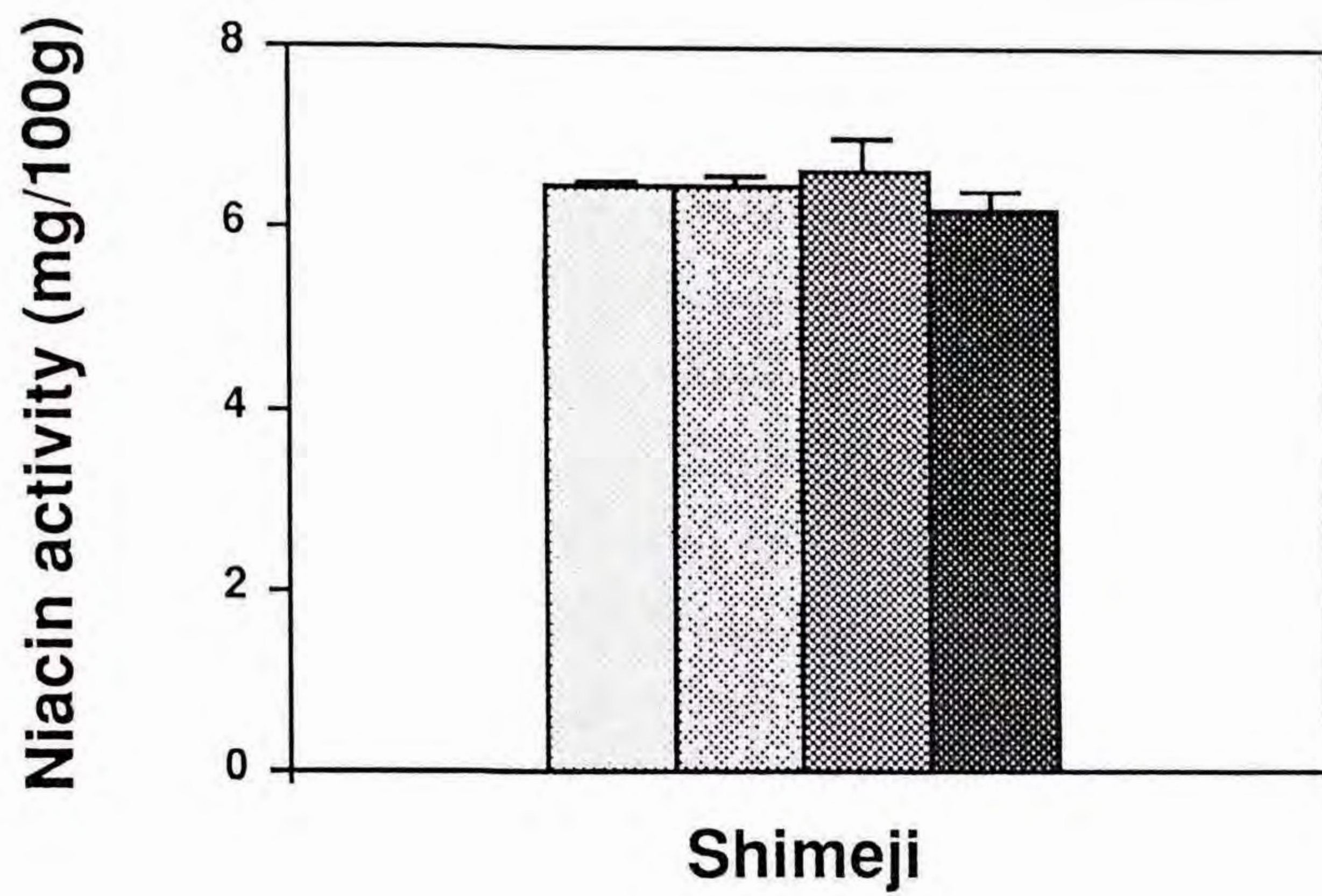


Fig.6-3-5. Microbioassay values of niacin in shimeji under the different conditions.

□:Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩:Acid extraction , ■: Alkaline extraction

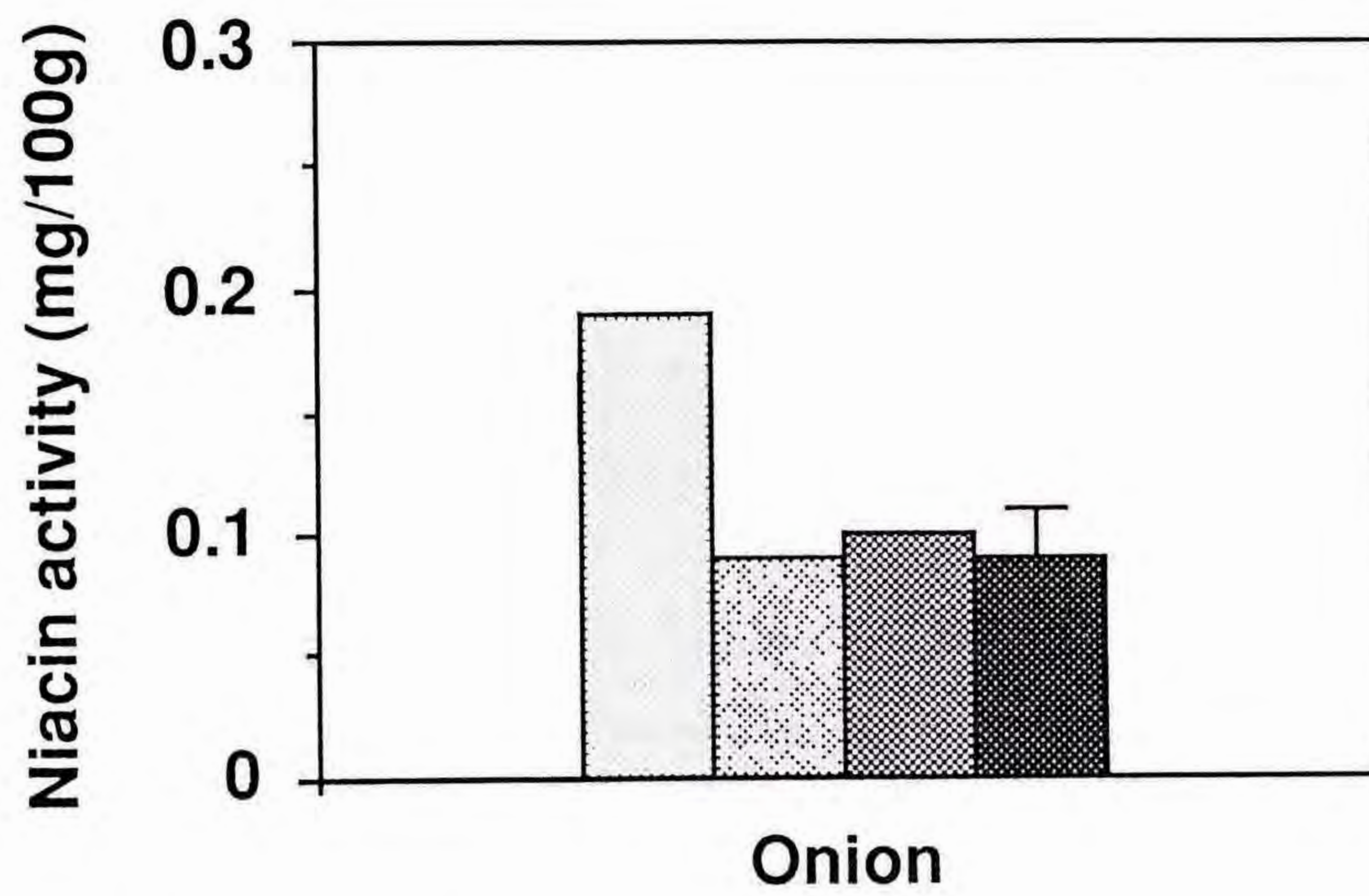


Fig.6-3-6. Microbioassay values of niacin in onion under the different conditions.

□:Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩:Acid extraction , ■: Alkaline extraction



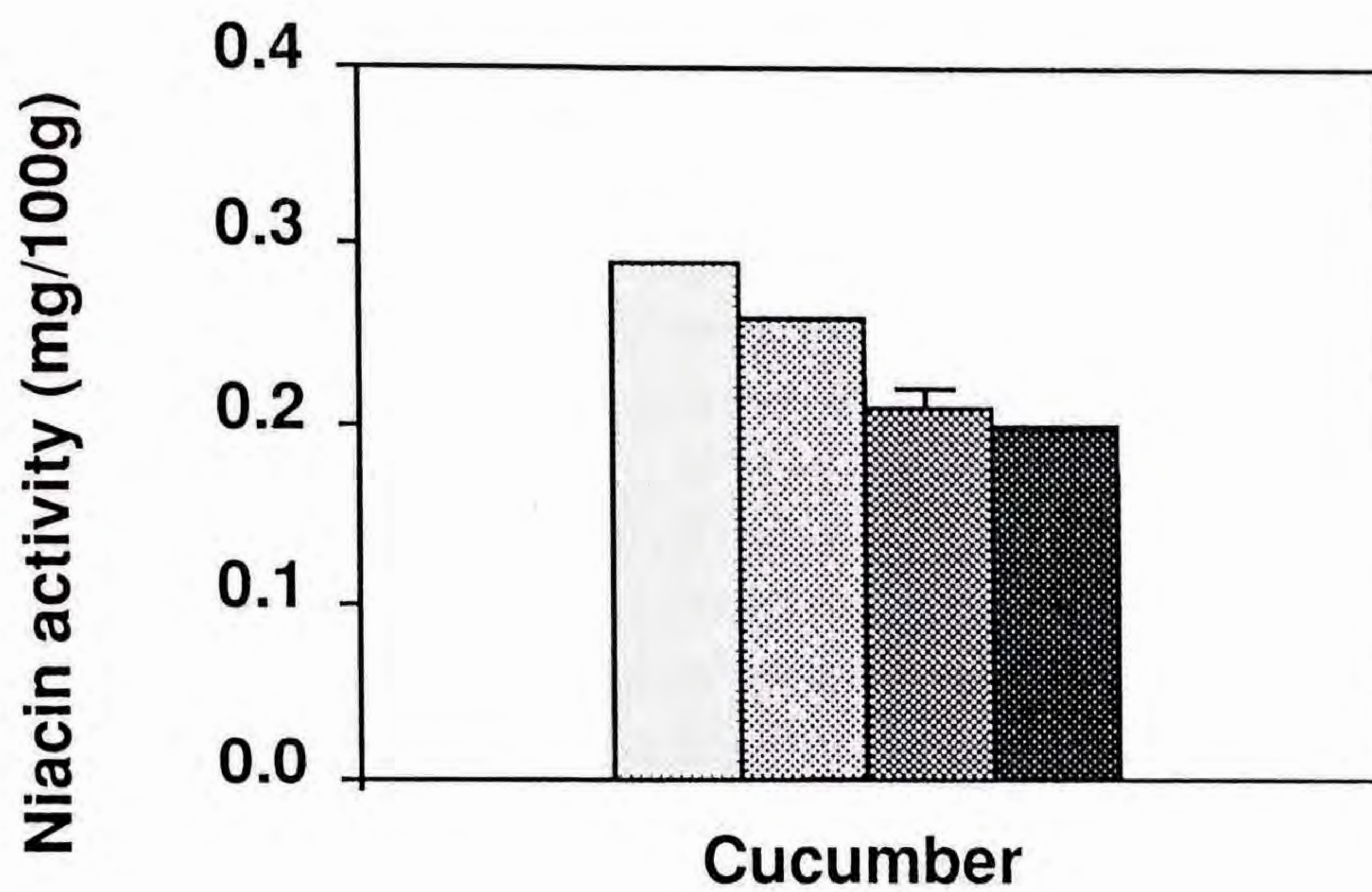


Fig.6-3-7. Microbioassay values of niacin in cucumber under the different conditions.

□: Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩: Acid extraction , ■: Alkaline extraction

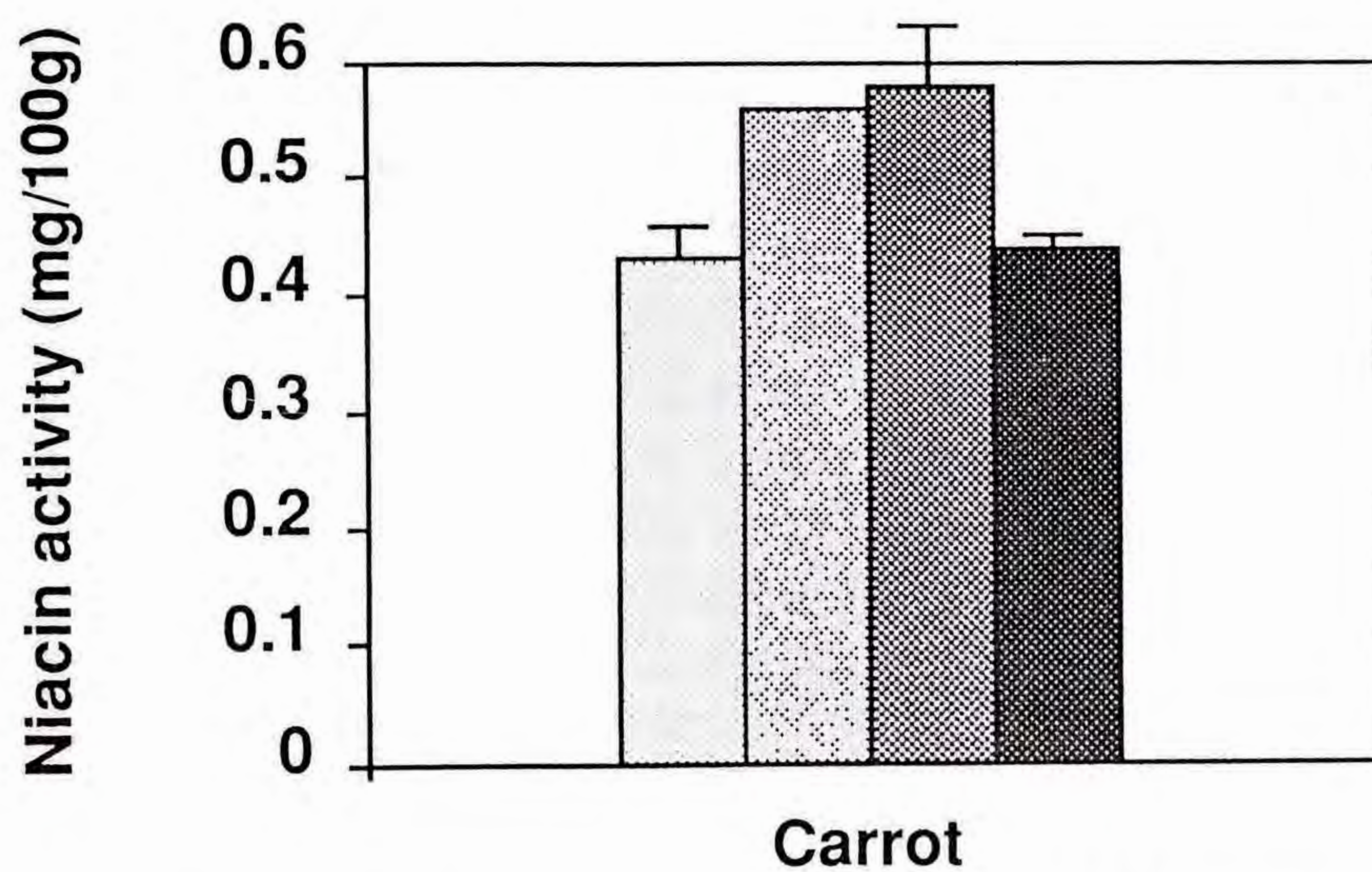


Fig.6-3-8. Microbioassay values of niacin in carrot under the different conditions.

□: Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩: Acid extraction , ■: Alkaline extraction



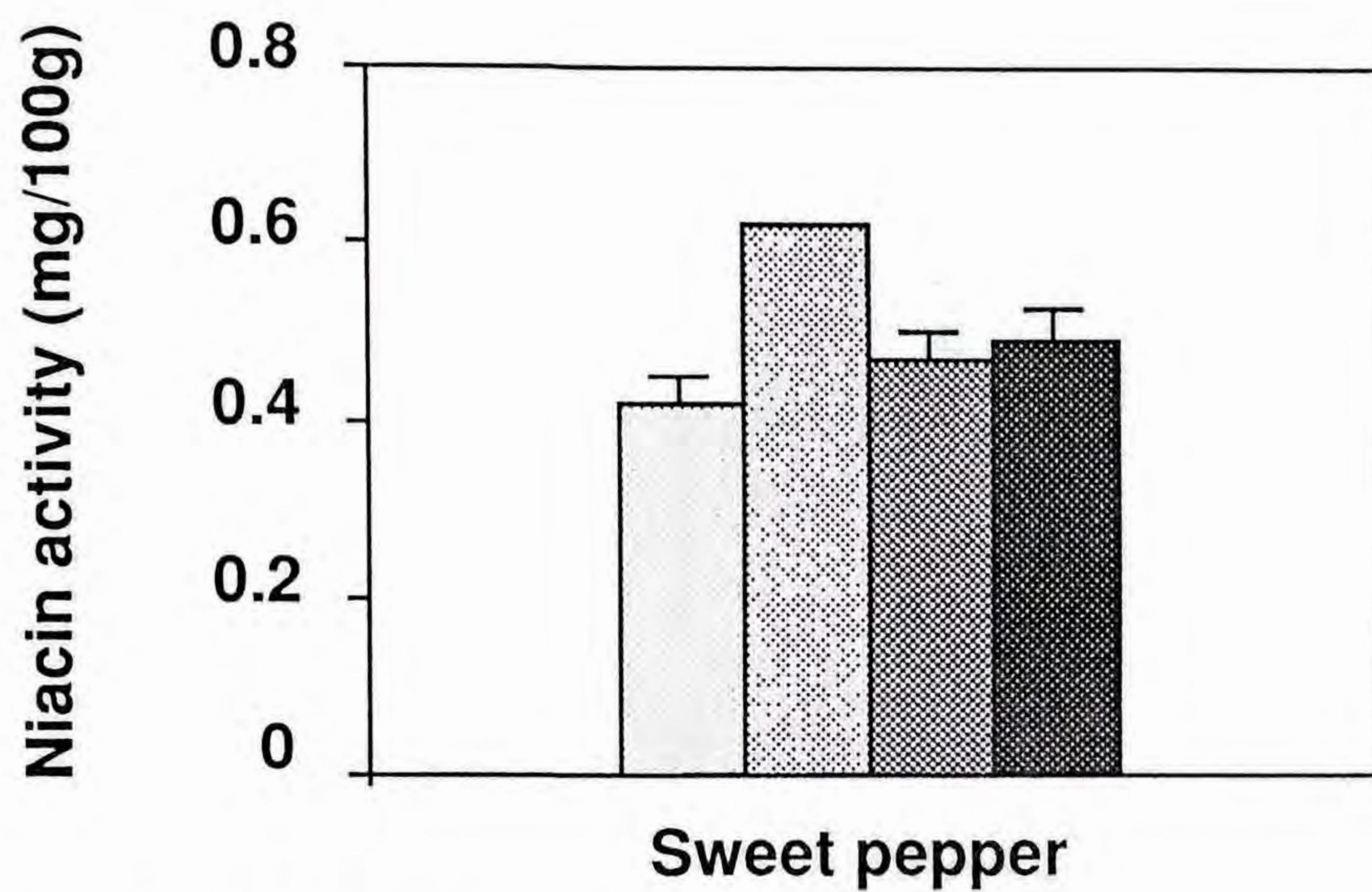


Fig.6-3-9. Microbioassay values of niacin in sweet pepper under the different conditions.

□: Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩: Acid extraction , ■: Alkaline extraction

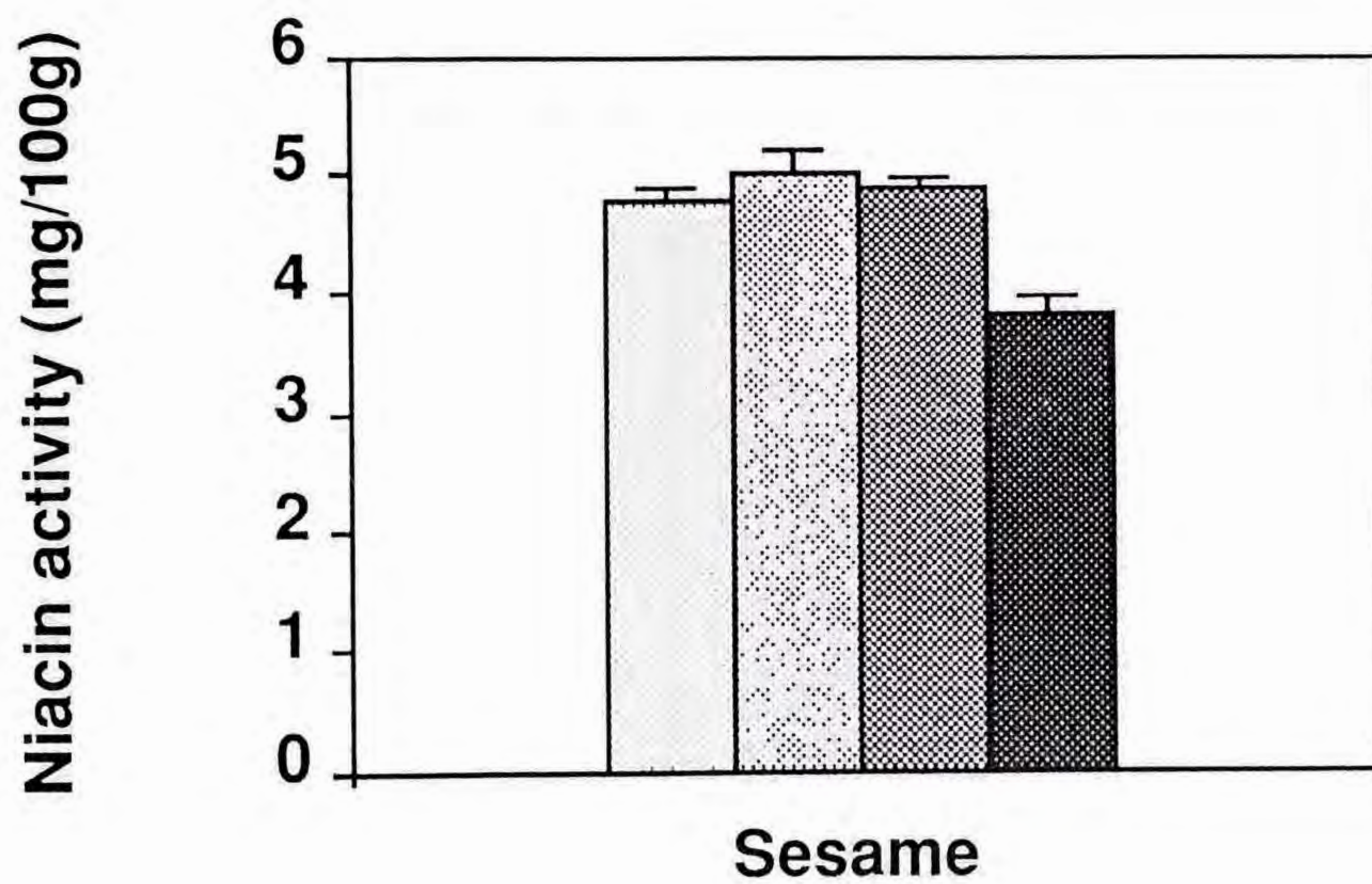


Fig.6-3-10. Microbioassay values of niacin in sesami under the different conditions.

□: Water extraction , ▨: Diluted acid extraction ,  
 ▩: Acid extraction , ■: Alkaline extraction



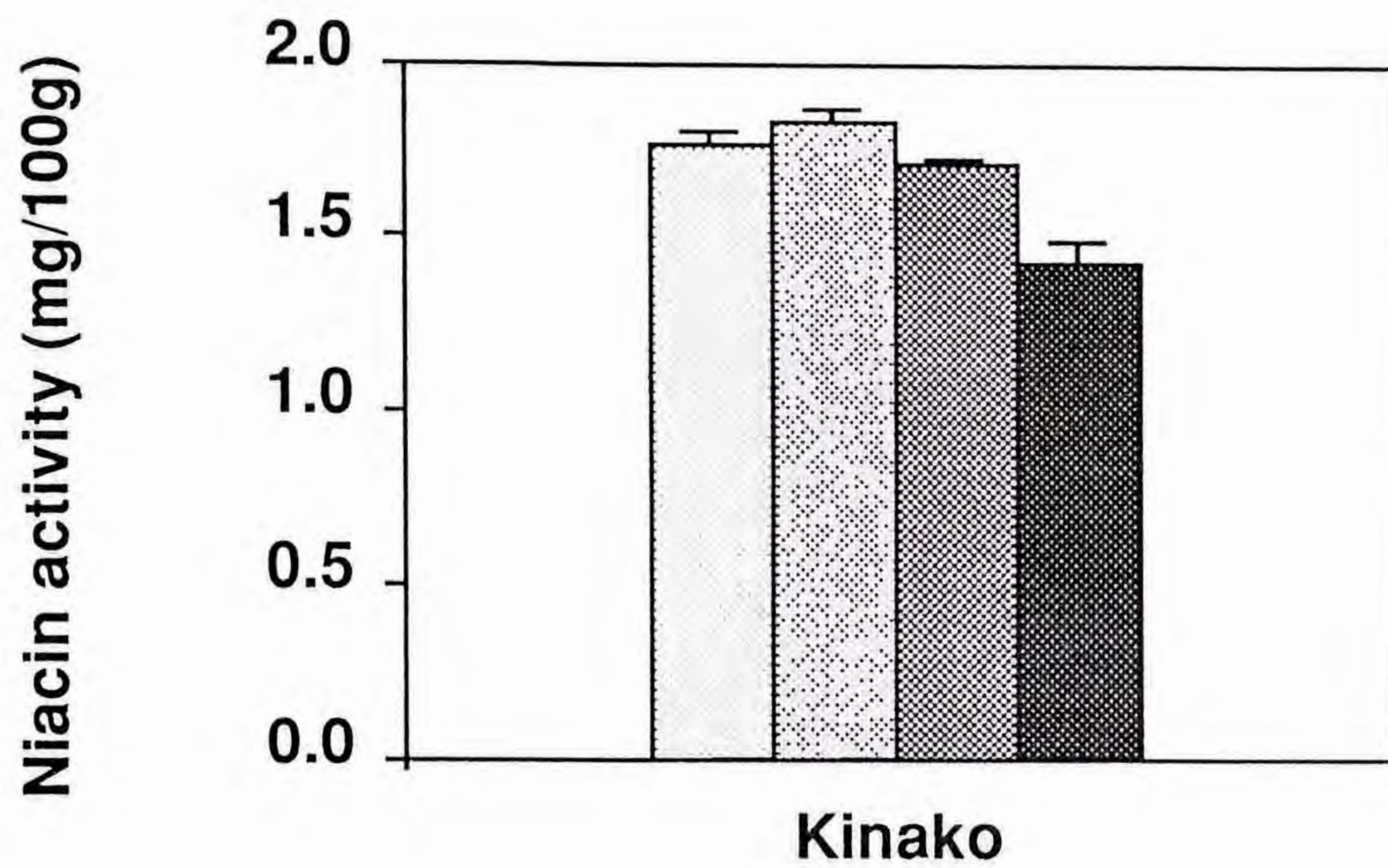


Fig.6-3-11. Microbioassay values of niacin in kinako under the different conditions.

□: Water extraction , ▤: Diluted acid extraction ,  
 ▨: Acid extraction , ■: Alkaline extraction

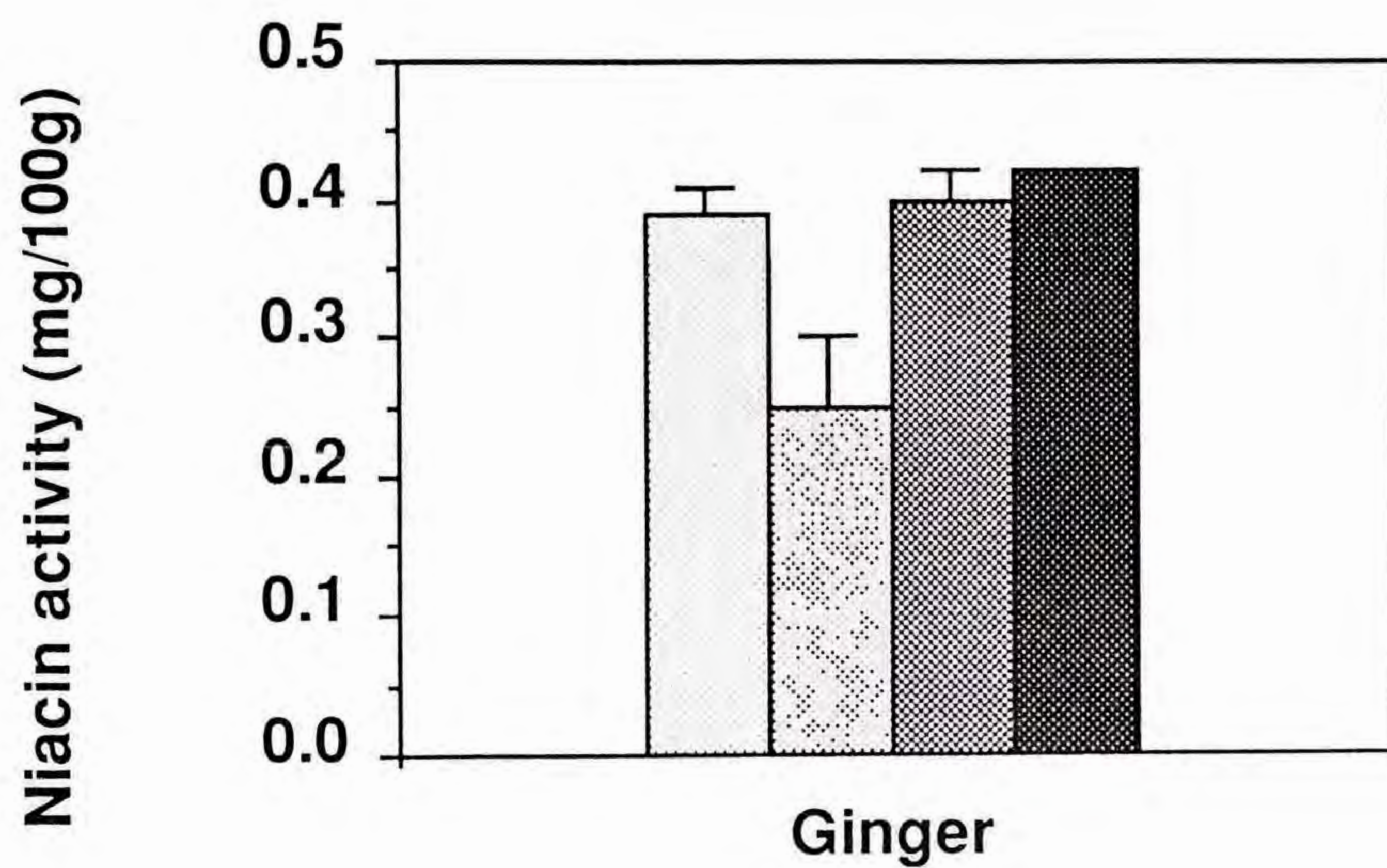


Fig.6-3-12. Microbioassay values of niacin in ginger under the different conditions.

□: Water extraction , ▤: Diluted acid extraction ,  
 ▨: Acid extraction , ■: Alkaline extraction



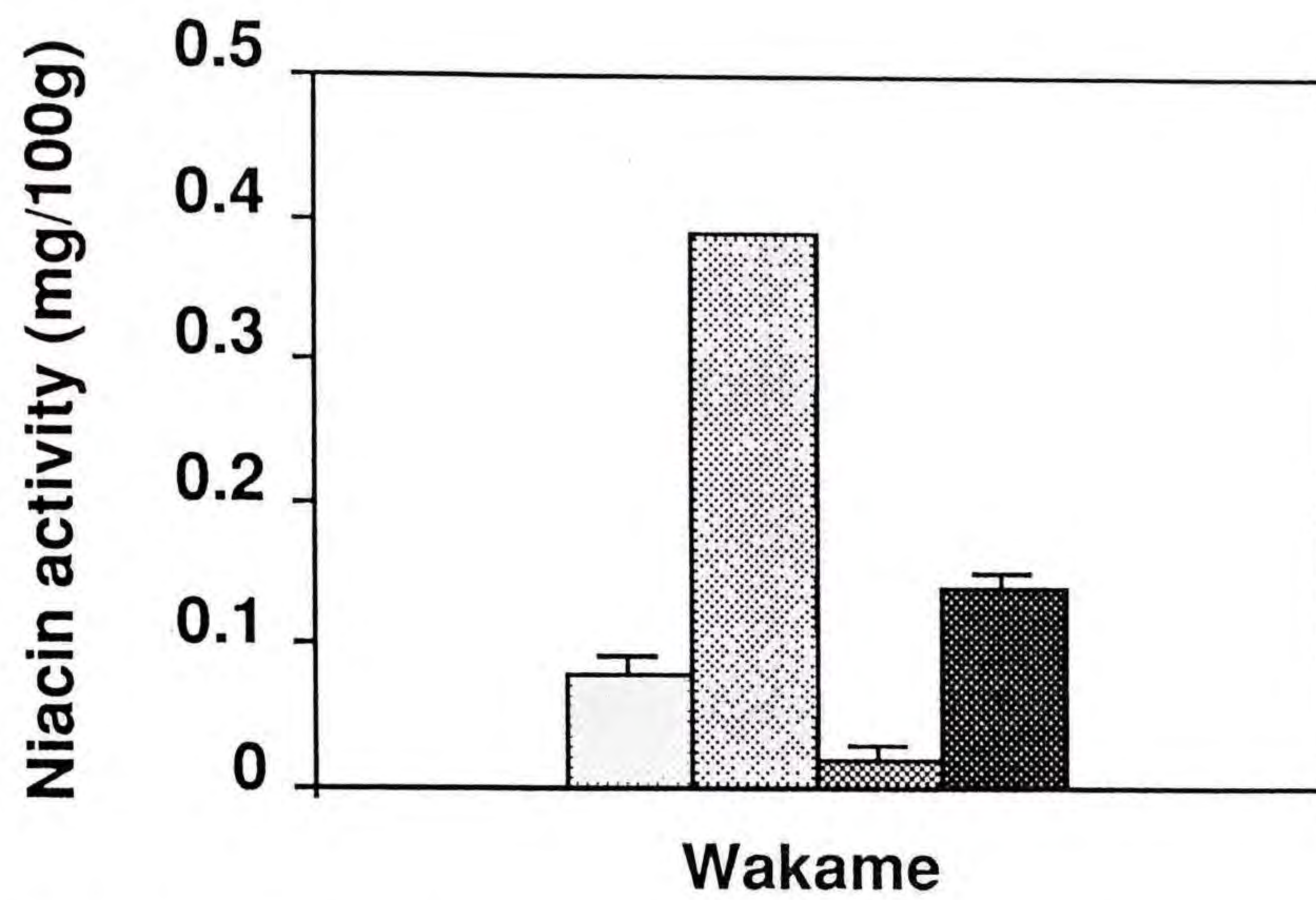


Fig.6-3-13. Microbioassay values of niacin in wakame under the different conditions.

: Water extraction , 
  : Diluted acid extraction ,  
 : Acid extraction , 
  : Alkaline extraction



## 2-2-2. 各種抽出法における微生物定量値とHPLC値との相関関係

各種抽出法で得られた微生物定量値と測定可能であったHPLC値 (Table 6-3.) の相関関係をFig. 6-4からFig. 6-7. に示した。HPLC値はニコチンアミド量をニコチン酸に計算しなおし、ニコチン酸と合計した値をナイアシン値とした。

水抽出の場合 (Fig. 6-4.) の回帰方程式、相関係数は、 $Y=0.615X+0.653$  ( $r=0.935$ ) と H P L C 値は微生物定量値より幾分低い値を示した。0.1N硫酸では (Fig. 6-5.)、 $Y=0.91X+0.068$  ( $r=0.942$ )、1N硫酸抽出 (Fig. 6-6.) では、 $Y=1.147X-2.17$  ( $r=0.981$ ) と微生物定量値とHPLC定量値との間に高い相関性が認められ、水酸化ナトリウム抽出では (Fig. 6-7.)、 $Y=0.876X+15.6$  ( $r=0.863$ ) と H P L C 値は、微生物定量値より、かなり高い値を示し、分解過程で、ニコチン酸と同じリテンションタイムを示す物質が生成あるいは溶出したと推定された。

## 2-2-3. ナイアシン誘導体安定性に及ぼす各種抽出条件における分解時間の影響

ニコチン酸、ニコチンアミド、N A D を食品を抽出した条件と同じ条件下で、抽出時間を変えて加圧分解し、H P L C 法で生成物質、微生物法でナイアシン活性を測定した。Fig. 6-8. にニコチンアミドの結果を示す。水抽出では、120分加圧分解しても100%ニコチンアミドで存在し、0.1N硫酸では、緩やかにアミドが遊離し、120分加圧分解で約20%がニコチン酸に転換した。1 N 硫酸では、10分で60%のニコチンアミドが分解して、ニコチン酸に転換し、120分では、100%ニコチン酸に転換した。1 N 水酸化ナトリウムでは、10分で完全にニコチン酸に転換した。

ニコチン酸では、いずれの抽出条件においてもニコチン酸の型で存在し、高い安定性を示した。

N A D では、0.1N硫酸、10分加圧分解で100%ニコチンアミドに転換し、1 N 硫酸では、N A D からニコチンアミドに、このニコチンアミドから一部ニコチン酸に転換していることがわかった。1 N 水酸化ナトリウムでは、10分でニコチン酸にまで分解が起こっていた。

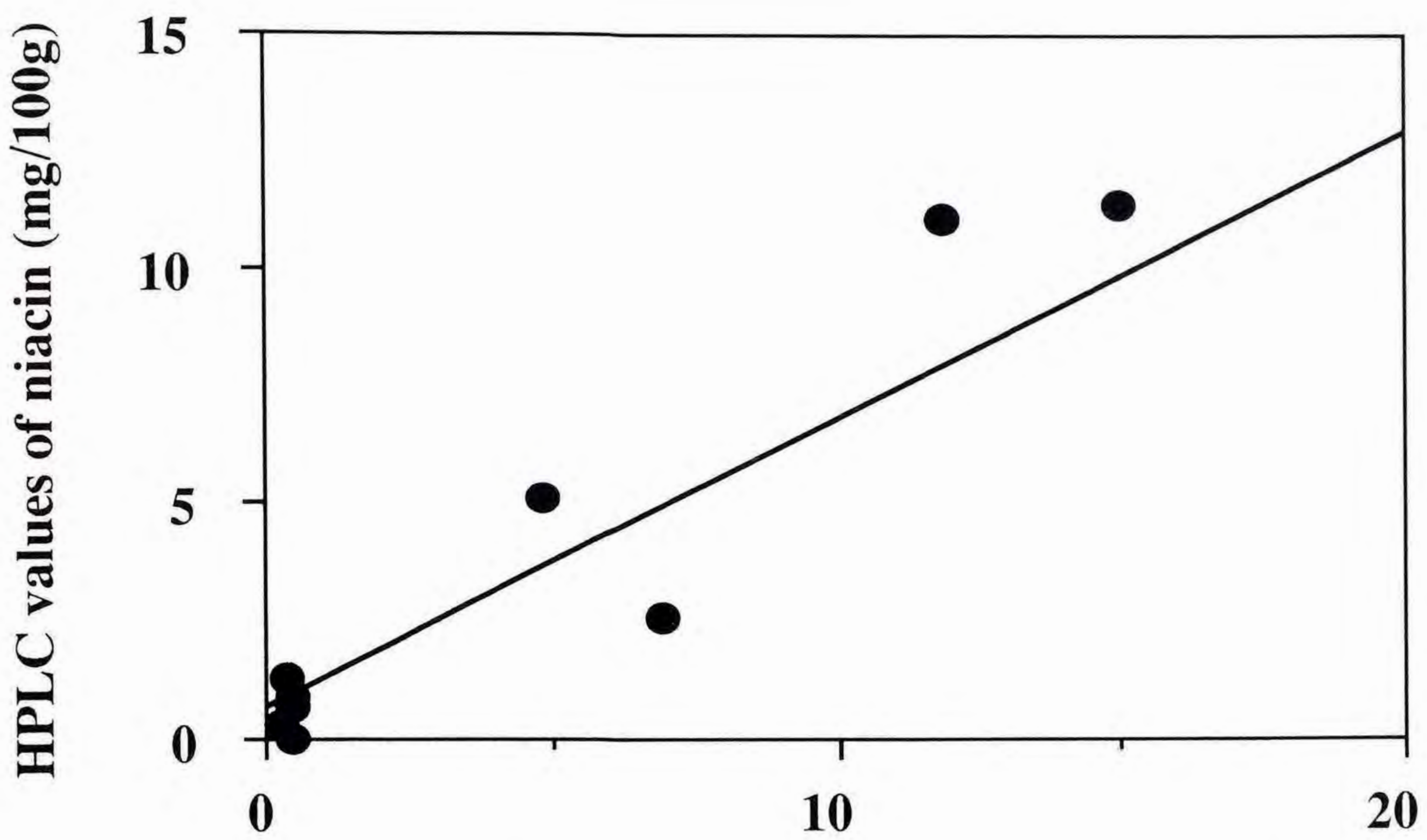
しかしながら、これらの分解条件下でニコチン酸分子の分解はなく、微生物定量値の低下は認められなかった。



Table 6-3 . HPLC values of niacin in some foods extracted by different conditions .(Niacin mg/100g)

Extract	Water extract		Diluted acid extract		Acid extract		Alkaline	
	Nicotinic acid	Nicotinamide	Nicotinic acid	Nicotinamide	Nicotinic acid	Nicotinamide	Nicotinic acid	Nicotinamide
Potato	0	0	0	1.0	1.17	0	4.74	0
Simeji	0	0	0	3.38	4.7	0	25.8	0
Tuna	0	11.4	2.5	11.0	8.96	7.22	20.84	0
Sasami	0	11.1	0	11.5	6.46	5.8	35.2	0
Enokitake	2.5	0	0	5.32	4.08	0	28.8	0
Sesami	5.08	0	0	7.72	2.56	0	0	0
Carrot	0.7	0	0	0	0	0	0	0
Sweet pepper	0.88	0	0	0	0	0	0	0
Cucumber	0.6	0	0	0	0	0	0	0
Ginger	1.28	0	0	0	0	0	0	0

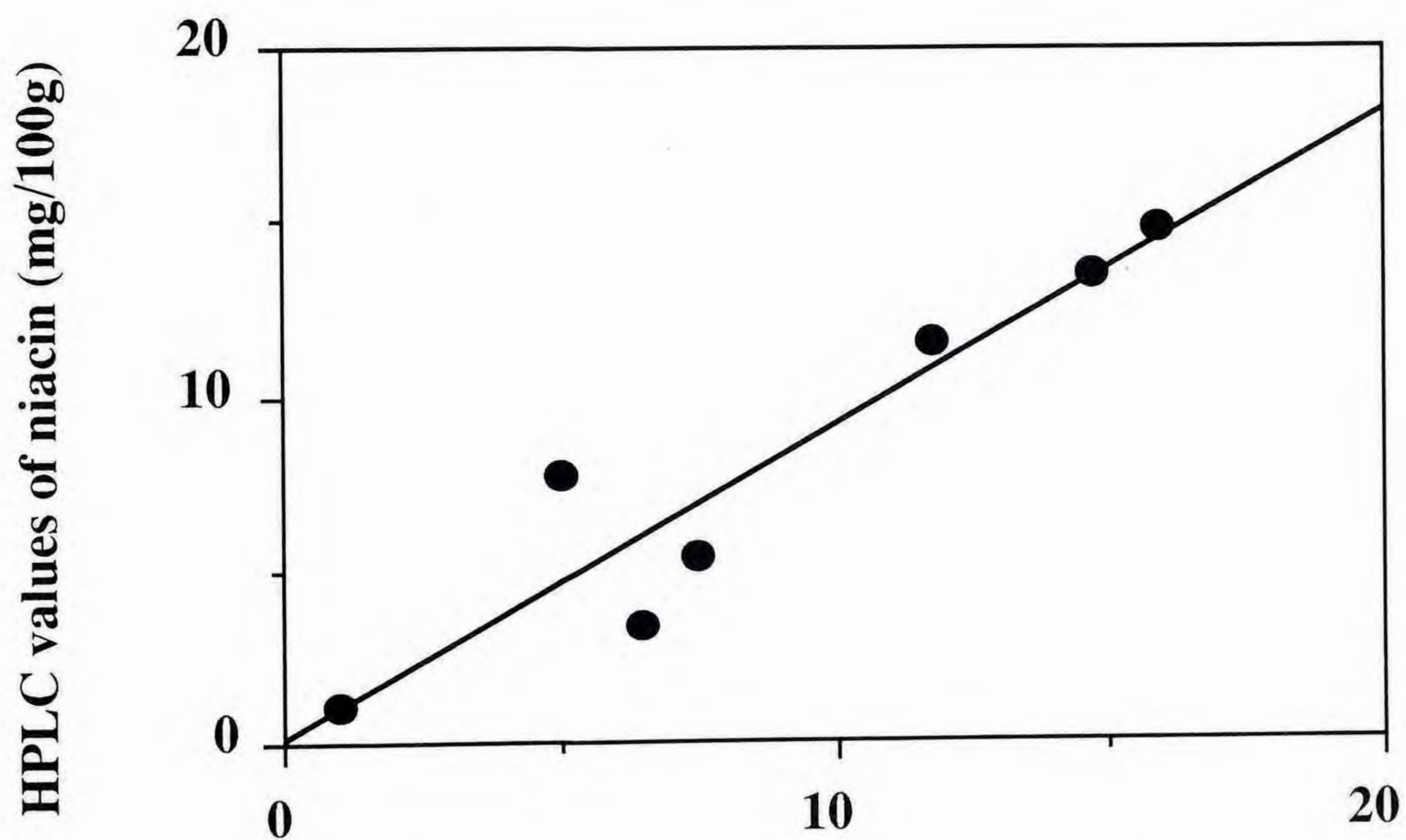




**Microbioassay values of niacin (mg/100g)**

Fig. 6-4. Correlation between HPLC values and Microbioassay values in "Water extract".

Regression line:  $Y=0.615X+0.653(r=0.935)$ .

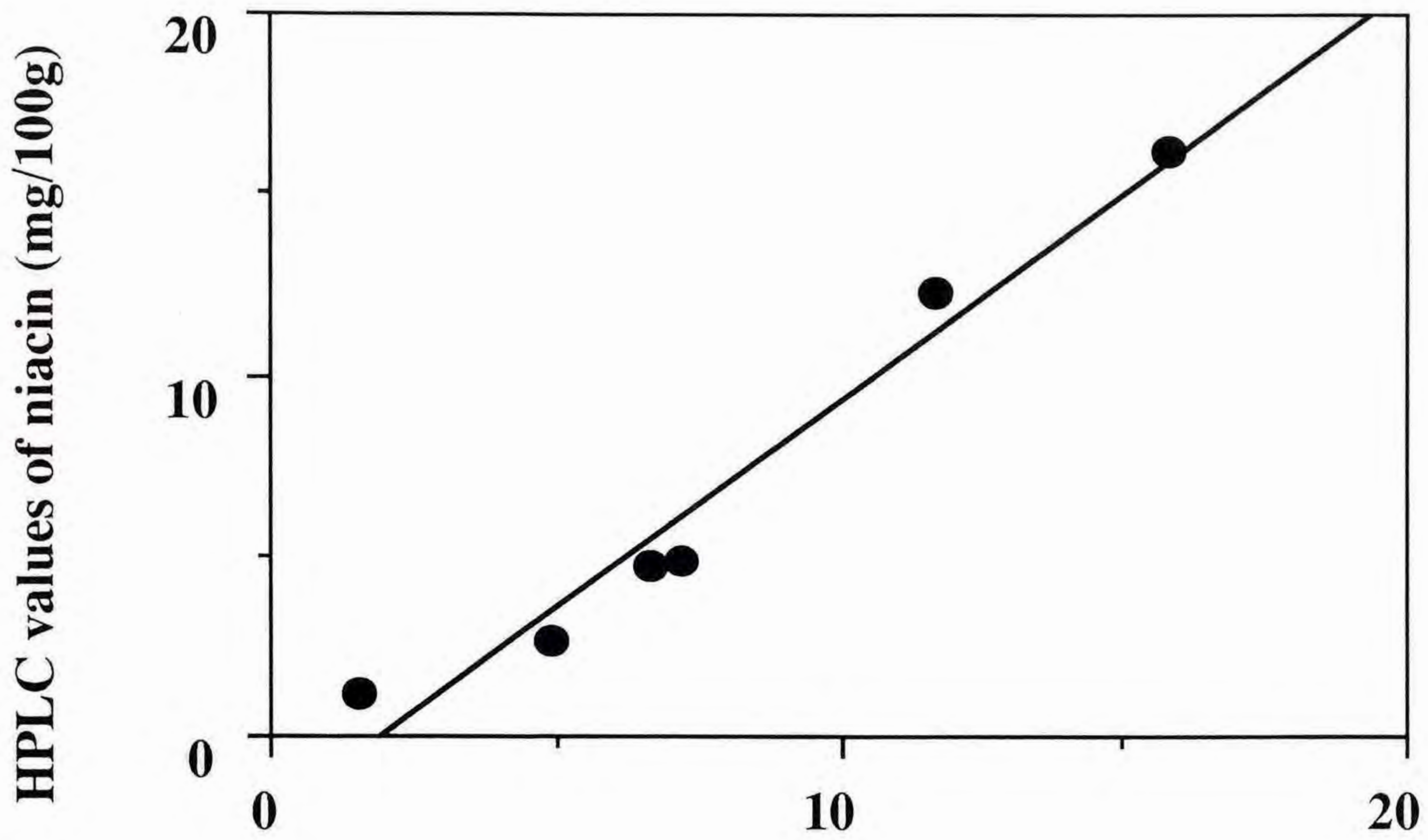


**Microbioassay values of niacin (mg/100g)**

Fig. 6-5. Correlation between HPLC values and Microbioassay values in "Diluted acid extract".

Regression line:  $Y=0.91X+0.068(r=0.942)$ .

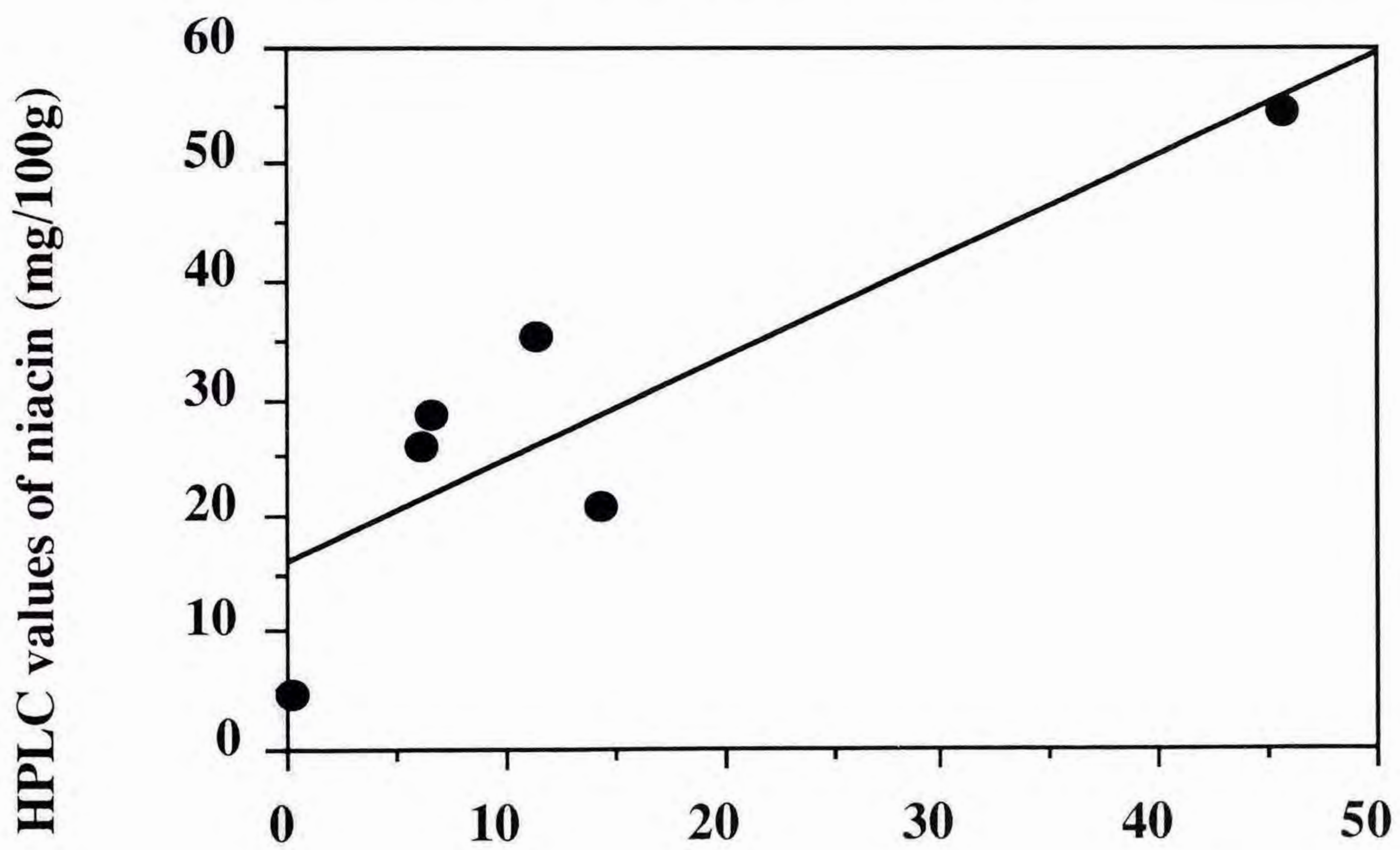




**Microbioassay values of niacin (mg/100g)**

Fig. 6-6. Correlation between HPLC values and Microbioassay values in "Acid extract" .

Regression line:  $Y=1.147X-2.174$  ( $r=0.981$ ).



**Microbioassay values of niacin (mg/100g)**

Fig. 6-7. Correlation between HPLC values and Microbioassay values in "Alkaline extract" .

Regression line:  $Y=0.876X+15.96$  ( $r=0.863$ ).



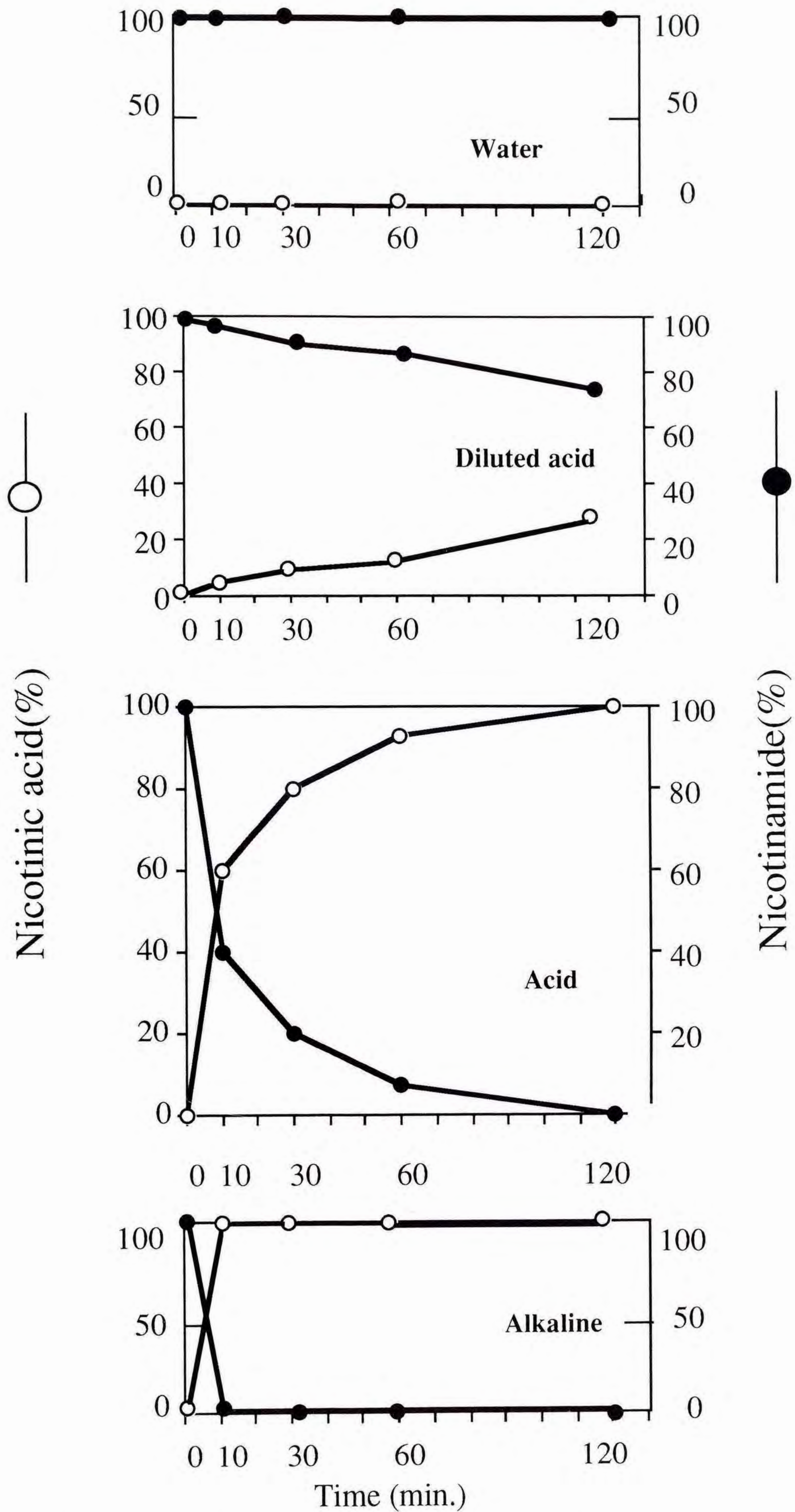


FIG.6-8. Effects of the heating time under the different conditions on the stability of nicotinamide.



### 2-3. 考察

食品中ナイアシン定量は、食品を酸あるいはアルカリ分解で分解し、定量に用いるのが通例であるが、本実験の結果から、穀類のような特殊な食品を除けば、水あるいは弱い酸で磨砕・破碎を伴う処理を行えば、十分にナイアシン抽出が可能であることが明かとなった。穀類についてもナイアシンの生物的活性のはっきりしない結合型ナイアシンを分解して測定することについては、むしろ、疑問が残る。食品によっては、強い酸やアルカリで抽出するとナイアシン測定値が低下するものがあり、田口も<sup>72)</sup>、生トウモロコシで同様の結果を得ており、ナイアシンの分解が起きているか抽出が困難となっているのではと推定している。

ニコチン酸、ニコチンアミド、NADについて、酸とアルカリで分解した結果、NADやニコチンアミドがニコチン酸へ転換していることがHPLCの結果で示されたが、微生物定量の結果では、活性の低下は認められず、食品分析におけるナイアシン活性の低下の原因については、今後検討したいと考えているが、pH調整により生成する塩等の影響の可能性もあると考えている。

HPLCによる測定では、目的物質以外の物質の除去のための前処理が大きな問題となるが、抽出条件が苛酷になればなるほど、溶出物質は増加し、また、ナイアシンの型も変わることから、できる限り緩やかな条件での抽出が望ましいと考えられた。

アルカリ分解した試料のHPLC値が高くなる原因については今後明確にしていきたいと考えている。



### 第3節 米の発芽過程におけるナイアシンの挙動

#### 3-1. 実験材料および方法

平成2年度産滋賀県日本晴の粳5gを1ミリメッシュのプラスチック製網をひいたシャーレに入れ、水道水10mlに浸漬し、温度25℃の暗室にて栽培した。

栽培1日目から1週間目までのナイアシン量を測定した。なお、水分は、1日に1度、粳が半分浸かるまで足した。

試料は、0.2Mリン酸緩衝液30mlを加え、氷冷しながら、Bio-mixerで5分間粉碎抽出した。この検液を50mlにメスアップし、濾過した溶液をカラムガードHV13mm (pore size 0.46 $\mu$ m)を通して、HPLC測定用検液とし、これを希釈して、そのまま微生物定量した値を遊離ナイアシン値とし、アルカリ分解して、微生物定量した値を総ナイアシン値とした。微生物定量は、第1章、第1節1-1-1-a.に準じた。

#### 3-2. 結果および考察

Fig. 6-9. に発芽中の遊離型および総ナイアシン値の変動を示した。両値とも発芽4日目で減少し、その後、遊離型ナイアシンは増加の傾向にあり、総ナイアシンは6日目まで増加、7日目で減少した。遊離化度をみるために、遊離型ナイアシン量/総ナイアシンを求め、Fig. 6-10. に示した。

発芽1日目では約53%と最低値を示し、2日目には増加したが、その後4日目まで減少し、その後、徐々に遊離化が進み、7日目では約68%の遊離化率を示した。

粳の発芽に必要な日数は、温度と日数の積算が100となるときと言われており、本実験では、粳を25℃で発芽させたため、4日目が発芽日に当たると考えられる。粳の状態は、根が約2mm、芽が約1mmぐらい生長しており、この時、発芽に大量のエネルギーを消費し、ナイアシンも消費されたと推定さる。その後もナイアシンの遊離化と消費とともに合成も進むと思われる。

以上の結果より、穀類中の結合型ナイアシンが、一種の貯蔵型であると推定された。



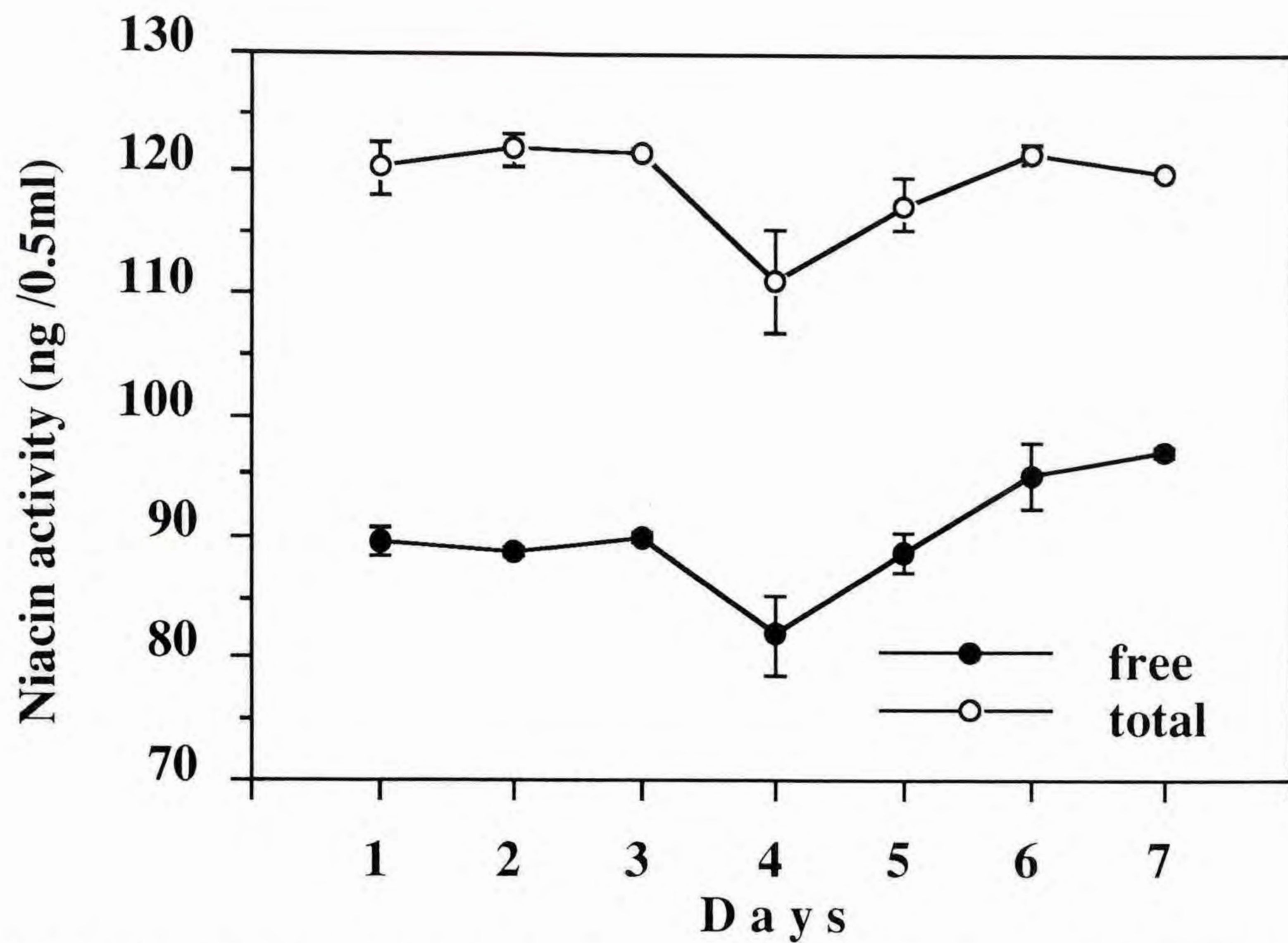


Fig.6-9. Niacin activity in rice during imbibition and germination.

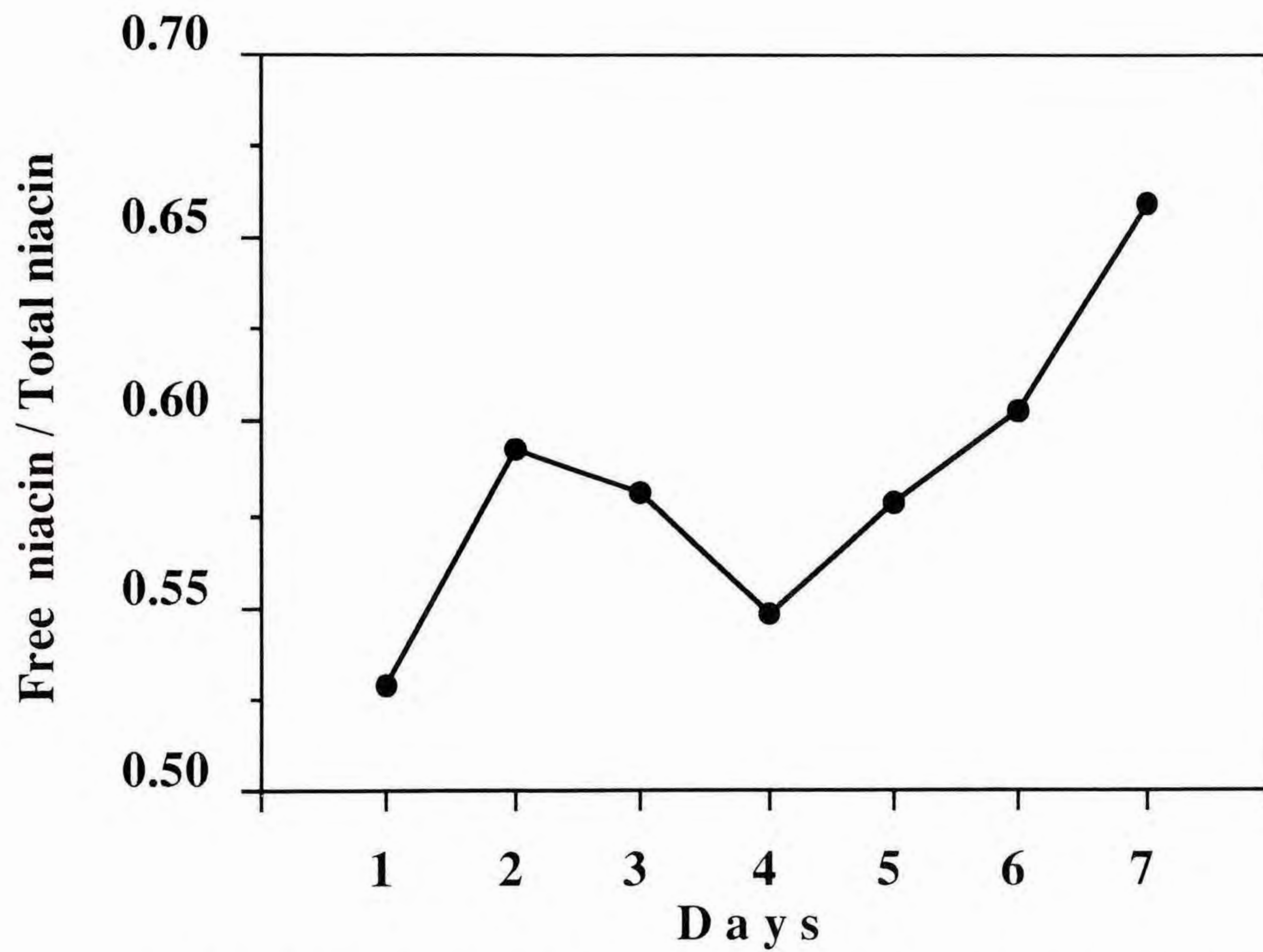


Fig.6-10. Ratio of free niacin to total niacin in rice during imbibition and germination.



Fig. 6-11. に発芽中の粃のHPLCを示した。発芽が進むにつれて、可溶物質が多くなり、加水分解等の様々な酵素反応が起こっていることを示している。しかし、7日までを見る限りでは、ニコチン酸、ニコチンアミド、NADの型では検出できなかった。微生物定量値の結果を考えあわせると、穀類中では、結合型が発芽により、遊離されてくるが、これは本来の遊離型ナイアシンではなく、これらに何かまだ結合しているナイアシンであろうと考えられる。すなわち、これは、有効型ナイアシンであり、HPLCにより、遊離型としては検出できないが、決して結合型ナイアシンと称するものではないと考える。この有効型ナイアシンのHPLCによる定量については、今後、さらに検討を続けたいと考えている。



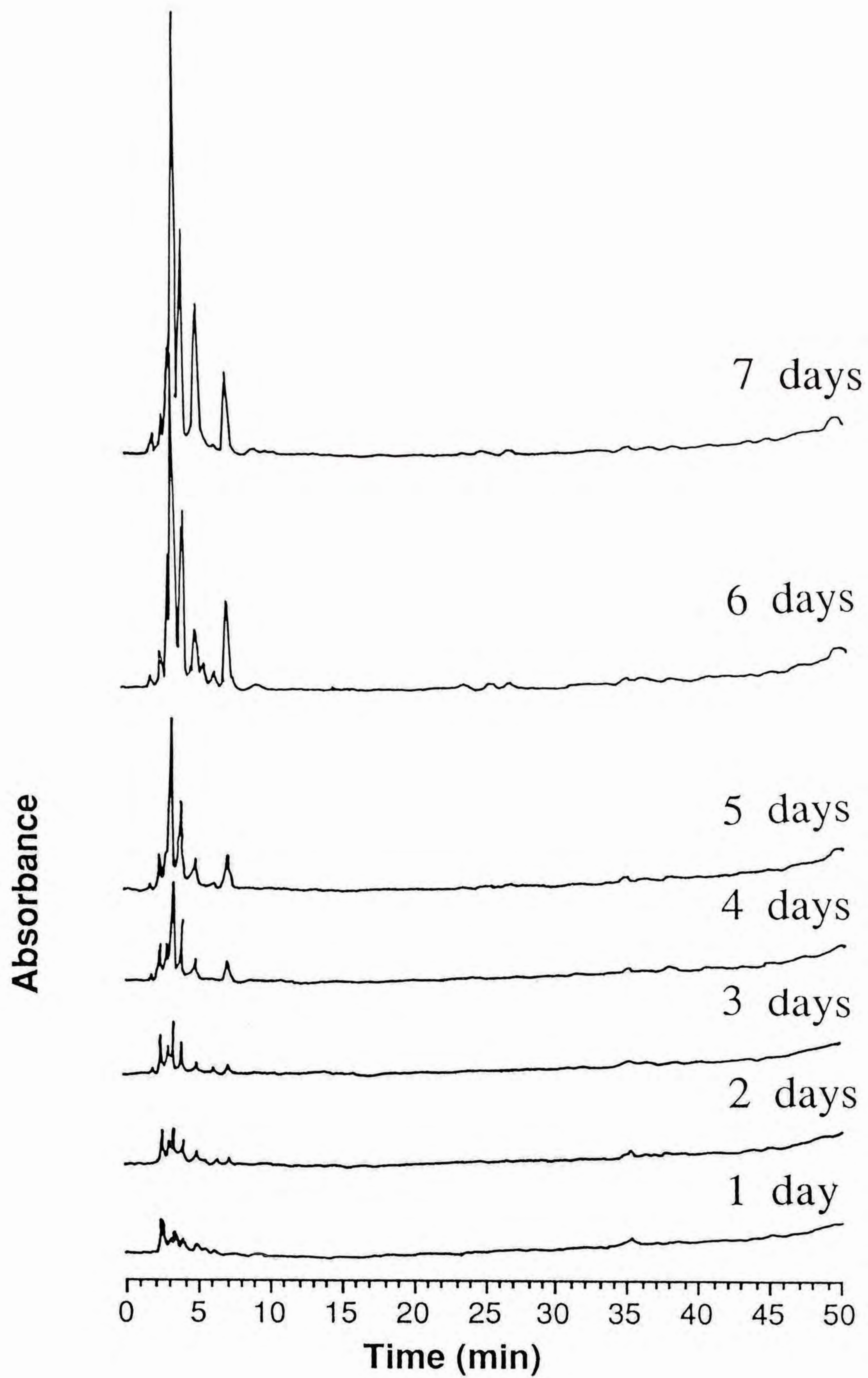


Fig. 6-11. Chromatogram of the extract of rice during imbibition and germination.



#### 第4節 小括

HPLC法によるナイアシン分離、定量の確立と食品中ナイアシンの定量への応用を目的として、抽出条件、更に、結合型ナイアシンの存在形態の意義について検討を行った。

1. ナシアシン誘導体6種のHPLCによる分離を検討し、陰イオン交換ゲル#3013-Nのパッキングカラムにて、カラムを60℃に保ちながら、リン酸緩衝液とアセトニトリル混合液のグラジエントモードにより、移動相を0.5ml/minで送液し、トリゴネリンがリテンションタイム2.77分、ニコチンアミドが5.76分、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドが7.23分、NADが16.40分、ニコチン酸が37.42分、NADPが40.58分と良好に分離でき、HPLCによるナイアシン分別定量法を示し得た。
2. 食品13種類を抽出条件を変えて、微生物法とHPLC法で測定し、比較検討を行った結果、
  - 1) ジャガイモでは、水や弱い酸ではナイアシンは遊離してこないが、抽出条件が過酷な1N硫酸、1N水酸化ナトリウムによる加水分解では結合型が遊離して定量された。動物性食品である、マグロや鶏ササミや、エノキ茸やシメジでは、抽出条件の違いによるナイアシン値の差は認められず、タマネギやキュウリでは、抽出条件が苛酷になるとむしろナイアシン値は減少した。ニンジン、ピーマン、ゴマ、きなこ、ショウガでは、各抽出条件によるナイアシン値の違いは認められたが大きな差ではなかった。これらの結果から、結合型が存在すると考えられる食品群、まったく結合型を含まない食品、結合型は含まないがむしろ苛酷な抽出条件によりナイアシン値が減少する食品と、抽出条件により変動するナイアシン値のパターンによって3タイプの食品群に大別できた。
  - 2) 各種抽出法における微生物定量値とHPLC値の関係をみると、水抽出の場合、回帰方程式、相関係数は、 $Y=0.615X+0.653$  ( $r=0.935$ )とHPLC値は微生物定量値より幾分低い値を示し、0.1N硫酸処理では、 $Y=0.91X+0.068$  ( $r=0.942$ )、1N硫酸抽出では、 $Y=1.147-2.17$  ( $r=0.981$ )と微生物定量値とHPLC定量値との間に高い一致性が認められ、水酸化ナトリウム抽出では、 $Y=0.876X+15.6$



( $r=0.863$ )とHPLC値は、微生物定量値より、かなり高い値を示した。

- 3) ニコチンアミドを食品を抽出した条件と同じ条件下で、抽出時間を変えて加圧分解すると、水抽出では、120分加圧分解しても100%ニコチンアミドで存在し、0.1N硫酸では、緩やかにアミドが遊離し、120分加圧分解で約20%がニコチン酸に転換した。1N硫酸では、10分で60%のニコチンアミドが分解して、ニコチン酸に転換し、120分では、100%ニコチン酸に転換した。1N水酸化ナトリウムでは、10分で完全にニコチン酸に転換した。ニコチン酸では、いずれの抽出条件においてもニコチン酸の型で存在し、高い安定性を示した。NADでは、0.1N硫酸、10分加圧分解で100%ニコチンアミドに転換し、1N硫酸では、NADからニコチンアミドに、このニコチンアミドから一部ニコチン酸に転換していることがわかった。1N水酸化ナトリウムでは、10分でニコチン酸にまで分解が起こっていた。しかしながら、これらの分解条件下でニコチン酸分子の分解はなく、微生物定量値の低下は認められなかった。

3. 発芽中の遊離型および総ナイアシン値の変動は、両値とも発芽4日目で減少し、その後、遊離型ナイアシンは増加の傾向にあり、総ナイアシンは6日目まで増加、7日目で減少した。遊離化度をみるために、遊離型ナイアシン量/総ナイアシンを求めると第1日目が約53%と最低値を示し、7日目では約68%の遊離化率を示した。発芽中の粃のHPLCは、発芽が進むにつれて、可溶物質が多くなるが、7日までを見る限りでは、ニコチン酸、ニコチンアミド、NADの型では検出できなかった。穀類中では、結合型が発芽により、遊離されてくるが、これは本来の遊離型ナイアシンではなく、これらに何かまだ結合しているナイアシンであろうと考えられる。これは有効型ナイアシンであり、HPLCにより検出できないが決して、結合型ナイアシンと称するものではないと考える。



## 総括

食品中のナイアシン定量における結合型ナイアシンの態度、抽出条件や分析方法などの問題を明かとし、さらに、穀類中の結合型ナイアシンの難利用性の原因を検討した。

1. 微生物定量における結合型および遊離型ナイアシンの態度を検討した。

1) 迅速法において、ナイアシン誘導体のうち、ニコチンアミドとNADはニコチン酸と等モルで同じ活性を、ニコチヌル酸は約40%の活性を示し、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドとトリゴネリンはナイアシン活性を殆ど示さなかった。また、これらの誘導体のニコチン酸に対する活性比は通常法、迅速法でほぼ一定であった。ナイアシン誘導体は、通常法の条件と迅速法の条件下で、ほぼ同じニコチン酸活性を示した。

2) 穀物を試料とした場合、アルカリ分解した方が酸分解したものより、通常法、迅速法ともに有意に高いナイアシン値を得た。一方、通常法と迅速法の比較では、アルカリ分解した試料ではいずれも測定値に差はなかったが、酸分解試料の場合、通常法の方が有意に高いナイアシン値を得た。しかし、牛肉を試料とした場合、どの方法による値の間にも有意差はなかった。また、穀類試料は、1Nの水酸化ナトリウム、120°C、2時間、加圧分解で完全に結合型ナイアシンが遊離され、0.1Nの硫酸、120°C、0.5時間、加圧抽出では、結合型ナイアシンは分解を受けず、遊離型のみが抽出されることがわかった。

3) 小麦胚芽より精製した結合型ナイアシンをナイアシン源とした *L. plantarum* の生長曲線は、通常法の条件では、二段増殖相を示し、結合型ナイアシン200ng相当量がニコチン酸100ngに近い活性を示した。迅速法の条件では、2時間目から結合型ナイアシンとニコチン酸の間に増殖の差が現れ、3-4.5時間培養において、結合型ナイアシン200ng相当量はニコチン酸50ngとほぼ同じ活性を示すことが明らかとなった。

4) 結合型ナイアシン標品を迅速法の条件で培養すると、菌体への取り込みはみられるが遊離化せずに結合型のまま存在し、通常法の条件で培養すると、迅速法



の場合よりも菌体への取り込み量は増加し、取り込まれた結合型は弱酸により遊離されてくる、ゆるい結合のものに変化した。ニコチン酸は、通常法、迅速法の条件にかかわらず、すみやかに菌体内に取り込みが行われた。

5) 小麦製品中の結合型ナイアシン量は、アルカリ分解の迅速法測定値または通常法測定値と酸分解(0.1N程度の酸)の迅速法測定値の差の4/3倍、遊離ナイアシン量はアルカリ分解値から結合型ナイアシン量を差し引くことにより、分別定量ができることを示した。

2. 穀類中ナイアシンの結合型と遊離型ナイアシンの変動に及ぼす調理・加工の影響を明らかにした。

1) パンおよび胚芽パン原材料中ナイアシンの各々42.5%、46.2%が結合型ナイアシンで存在し、加工中にその一部が遊離化し、32.6%、24.4%まで結合型は減少した。

2) 中華麺では、材料中総ナイアシンの60.7%が結合型で存在し、加工中に50.3%までに減少した。

3) 白米および玄米では、各々85.8%、89.6%が結合型であったが、炊飯することにより結合型の割合が、それぞれ15.8%、51.2%に減少した。

4) 糠床中およびキュウリ漬物中のナイアシンは、熟成と共に遊離型が増加し、その増加の割合が、キュウリ漬物中のほうが高かったことより、キュウリへの浸透は、結合型ナイアシンより遊離型ナイアシンのほうが優勢であった。

結合型ナイアシンは、アルカリや強酸で調理されない限り遊離されないとされている。調理・加工の操作、すなわち、加熱処理、物理的な力での組織の破壊や水分によるデンプンの膨潤などが、穀類への化学的変化あるいは物理的変化を引き起こし、有効性ナイアシンの割合を増加させるという結果から、穀類中ナイアシンには、アルカリ処理によってのみ切れる化学結合が原因による難利用性のものと物理的な結合あるいは比較的弱い化学結合のため、普通の調理などでも有効性ナイアシンに変わりうる結合型ナイアシンが存在すると推察された。

穀類中のナイアシンは、加熱や熟成などの調理加工における各種操作により、その一部をヒトに有効な遊離型ナイアシンに転換するが、なお結合型は残存し、有効性ナイアシンの分別定量の必要性を確認した。



3. 結合型ナイアシンの難利用性の原因を構造面から明らかにするために、米ヌカを試料として、プロテアーゼ、プロナーゼ、ジアスターゼ、セルラーゼ、タカジアスターゼ、ヘミセルラーゼ、エステラーゼの各種加水分解酵素のナイアシン可溶化効果及び結合型ナイアシンの有効化を検討し、効果の認められたセルラーゼとエステラーゼに対する結合型ナイアシンの挙動をDEAE-セルロースイオン交換カラムクロマトグラフィーで示した。

1) 米ヌカに酵素を作用させた結果、セルラーゼ(89.6%)、タカジアスターゼ(81.3%)、エステラーゼ(71.8%)で可溶化率が高かった。結合型ナイアシンの有効化はセルラーゼ(87.0%)、プロテアーゼ(75.7%)で高かったが、いずれもアルカリ分解には及ばなかった。

2) 最も効果のあったセルラーゼを作用させた後、第2段階にエステラーゼを適用した場合に、ナイアシンの可溶化及び有効化に効果が認められた。しかしながら、エステラーゼを作用させ、その後、セルラーゼを作用させても可溶化及び有効化の効果は低かった。

3) 米ヌカ水抽出物のイオン交換カラムクロマトグラフィーで、結合型ナイアシンが溶出する非吸着部と遊離型ナイアシンが溶出する吸着部の総ナイアシンの比は、5:4であった。米ヌカのセルラーゼ処理物のクロマトグラフィーでは、結合型ナイアシンの大部分が吸着部遊離型ナイアシンに転換した。米ヌカにセルラーゼ→エステラーゼを連続作用させると、ナイアシンの大部分は遊離型(ニコチン酸型とニコチンアミド型)に転換しすることを明らかにした。セルラーゼ処理物の非吸着画分にエステラーゼを作用させると、この画分の約30%のナイアシンがニコチン酸型の遊離型となって吸着部に移行し、非吸着部に残ったナイアシンもニコチンアミド型の遊離型ナイアシンに変換することを示した。

以上より、米ヌカ結合型ナイアシンの難利用性の一因は、セルロースにあると考えられる。穀類中結合型ナイアシンの可溶化および有効化させるには、セルラーゼに続いてエステラーゼ処理を行う酵素プロセスが有効であることを示すことができた。

穀類中のナイアシンの難利用性には、ナイアシンがセルロースなどの多糖類に囲まれた物理的結合による難利用性と、ナイアシンがある物質とエステル結合しているような化学的結合による難利用性がある可能性が高いことがこの実験の結



果から示唆された。

4. 穀類中結合型ナイアシンを有効性ナイアシンへ変換する酵素プロセスで、遊離化に最も有効であったセルラーゼを米ヌカおよび米ヌカ抽出物に作用させ、ラットに対する生物学的利用性について検討を行なった。

1) ニコチン酸欠の基礎食（トリプトファン制限食）、基礎食 + 1 mg%ニコチン酸、基礎食 + 未処理米ヌカ5%、基礎食 + セルラーゼ処理米ヌカ5%、基礎食 + アルカリ分解米ヌカ5%の各飼料で、ラットを29日間飼育した際、体重増加、飼料摂取量および肝重量においては、セルラーゼ処理群と未処理群で有意な差は認められず、この実験条件下では、体重増加あるいは肝重量においては、米ヌカのセルラーゼ処理あるいはアルカリ処理の影響は認められなかった。肝臓1g中のNAD量では、未処理群がニコチン酸添加群に比べ、有意に低い値を示した( $p < 0.05$ )。セルラーゼ処理群では、未処理群より  $p < 0.01$  で有意に高い値を示し、セルラーゼ処理群とアルカリ処理群間で有意な差がないことから、セルラーゼ処理が米ヌカ結合型ナイアシンを遊離化し、ラットに有効なナイアシンに変換したものと考えられた。肝臓1g中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群では、 $175.0 \pm 32.9$  ng/gと最も高い値を示し、全肝中ナイアシン量でも同様の結果であった。

血中NAD、肝中NAD量、ナイアシン量の結果から、セルラーゼ処理が、米ヌカ結合型ナイアシンの生物学的利用性を高めることが示唆された。

2) ニコチン酸欠の基礎食（トリプトファン制限食）、基礎食 + ニコチン酸、基礎食 + 未処理米ヌカ抽出物、基礎食 + セルラーゼ処理米ヌカ抽出物、基礎食 + アルカリ分解米ヌカ抽出物の各飼料でラットを36日間飼育した際、終体重では、セルラーゼ処理群が  $51.4 \pm 4.02$  gと最も増加が多く、基礎食群より有意に高かった。肝重量においては、セルラーゼ処理群が最も高い値を示し ( $2.76 \pm 0.58$  g)、基礎食間と有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。血中NAD量では、アルカリ処理群 ( $56.4 \pm 5.48$  nmol/ml) が最も高い値を示し、セルラーゼ処理群 ( $50.2 \pm 6.65$  nmol/ml) では、アルカリ処理群には及ばなかったものの、未処理群 ( $42.1 \pm 4.96$  nmol/ml) を上まわり、基礎食群よりは、有意 ( $p < 0.05$ ) に高かった。肝臓1g中NAD量では、アルカリ処理群 ( $236.5 \pm 27.3$  nmol/g) が最も高い値を示しており、セルラーゼ処理群 ( $212.0 \pm 37.2$  nmol/g) では、アルカリ処理群には及ばず、未処理群



( $207.2 \pm 26.4$  nmol/g) を上まわっていたが、いずれも有意差はなかった。全肝中NAD量では、セルラーゼ処理群が最も高い値を示し ( $572.0 \pm 69.0$  nmol)、基礎食群 ( $398.4 \pm 105.7$  nmol) より有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。肝臓1g中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群 ( $185.7 \pm 15.8$   $\mu$ g/g) が最も高く、未処理群 ( $129.1 \pm 31.0$   $\mu$ g/g) と有意に差がみられ ( $p < 0.01$ )、アルカリ処理群とは有意な差がなかった。また、全肝中ナイアシン量では、セルラーゼ処理群 ( $509.3 \pm 92.1$   $\mu$ g) が、未処理群 ( $354.9 \pm 154.7$   $\mu$ g)、アルカリ処理群 ( $411.7 \pm 65.9$   $\mu$ g) を上回っていた。これらの結果から、動物の場合にも穀物に対するセルラーゼ処理が結合型ナイアシンの有効化に効果があったと考えられた。

#### 5. ヒトの結合型ナイアシン測定法の検討を行なった。

1) ナシアシンをコントロールしたモデル食を考案し、健康な成人女子3名を被験者とし、このナイアシンコントロール食を使ってニコチン酸投与レベルを0、15mg、30mgと変え、血中NAD、血中ナイアシン、尿中MNA、尿中ナイアシンへの影響を調べた。集団給食におけるナイアシン当量は  $11.3 \pm 4.1$  / 1食で、そのうち、44%がトリプトファンに由来するナイアシンであることを明かとし、ナイアシンコントロール食作成には、ナイアシンコントロールと共に、トリプトファン制限、則ち、タンパク制限が必須であることを確認した。20才女子対象のために考案したナイアシンコントロール食は、エネルギー1671kcal、タンパク質46.5g、ナイアシン5.9mg、トリプトファン589mg、15.7ナイアシン当量(以上計算値)であった。同一材料で、7日間、毎日違った献立の食餌を考案し、長期摂取できる実験食作成の可能性を示した。血中NAD量では、実験開始時に個人差がみられ、平均でみると各期の中で最も高い値を示し ( $59.7 \pm 16.1$  nmol/ml)、ニコチン酸投与15mg/day期で最も低い値となった ( $51.7 \pm 6.43$  nmol/ml)。同様に、血中ナイアシン量でも、実験開始時が  $146.7 \pm 81.0$  nmol/mlで最高、15mg/day期が  $91.7 \pm 5.78$  nmol/mlで最低であった。これは、投与ニコチン酸0mgの影響が15mg/day期に出たものと考えられ、その後のニコチン酸投与に従い、30mg/day期のところで増加し、実験開始時、無投与期を下回っていることから、おそらく、30mg投与の影響は、実験終了後に現れたと推定された。すなわち、2日間の同レベルニコチン酸投与においては、血中への影響が現れるのに少なくとも5日前後を要すると考え



られた。尿中N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド(MNA)量への影響をみると、無投与期が最も低く(8.22±4.08mg/day)、30mg/day期で最も高く(16.2±6.16mg/day)、投与ナイアシンレベルの増加にしたがって、MNA量の増加が認められた。投与ニコチン酸の尿MNA量への影響が2日程度で現れ、少なくとも血中NAD、血中ナイアシンよりは、鋭敏な指標となると予想された。尿中ナイアシンへの影響は、血中NAD、血中ナイアシンへの影響の出方と良く似ており、15mg/day期で最も低い(413±115μg/day)、30mg/day期(500±125μg/day)の値が無投与期を上回っており、ニコチン酸投与の影響が血中NAD、血中ナイアシンに比べ、早い段階で現れたと考えられる。しかしながら、尿中NADを除いて、著しく投与ニコチン酸の影響を反映するものはなかったが、血中より尿中への影響の方が鋭敏であった。

同レベルニコチン酸投与期間が2日間では、摂取ニコチン酸量を血中、尿中に反映させることには不十分であったが、これまで、ヒトの栄養実験で最も軽視されてきた食餌について、一応、普段の食生活と変わらない程度のもので栄養実験を行なうことができた。

2) 健康な男子5名に、10日間、ナイアシン、トリプトファンをコントロールしたコントロール食の他に、ニコチン酸を連続投与(0mg、25mg、50mg各3日)し、毎日の血液中NAD値とナイアシン値及び各期毎の尿中MNA量とナイアシン量について検討を行った。血中ナイアシン濃度では、無投与期、ニコチン酸投与25mg/day期を通して、2.3μg/ml前後と大きな変化は認められなかったが、無投与期ではバラツキが多いのに対して、25mg/day期ではバラツキが少なくなった。ナイアシン量の50mg/day期に入ると著しい増加を示し、50mg/day投与期3日目では、平均値で7.88±1.13μg/mlまで上昇した。無投与期の結果は、実験前のナイアシン摂取の影響を多分に反映し、50mg/day期の急激な上昇は、投与量が血中ナイアシン濃度の恒常性維持のレベルを越えた結果であり、許容範囲が少なくともナイアシン投与25mg/dayと50mg/dayの間であると考えられた。血中NAD量への影響を見ると、50mg/day期2日目で、31.7±4.61nmol/mlと最高値を示しているが、各期の血中NAD濃度の変動はほとんどなく、ニコチン酸投与量の著しい影響はほとんど見られなかった。血中ナイアシン濃度と同様、血中NAD濃度を一定に保つよう調節機構が働くものと考えられ、その恒常性は高いものと推定された。投与ニコチン酸量に対する尿中ナイアシン排泄値は、ニコチン酸投与0mg/dayに対して593.5±



106.0  $\mu$ g/day、25mg/dayに対して620.7 $\pm$ 98.9  $\mu$ g/day、50mg/dayに対して847.1 $\pm$ 259.9  $\mu$ g/dayであった。尿中ナイアシンでは、各期間に有意な差はなかったが、血中ナイアシンと同様の傾向を示し、50mg/day期での排泄量の増加が認められた。ニコチン酸の代謝産物である尿中MNA排泄値は、0mg/dayに対して9.82 $\pm$ 1.72mg/day、25mg/dayに対して15.2 $\pm$ 2.65mg/day、50mg/dayに対して20.6 $\pm$ 3.08mg/dayとほぼ直線的に増加し ( $r=0.9083$ 、 $p<0.001$ )、各期の差は有意であり、ニコチン酸投与量と尿中MNA量は相関関係がみられた。ナイアシン量をコントロールした食事とともに、ニコチン酸を同レベル3日間投与した際、ニコチン酸投与量と尿中MNA量に高い相関関係がみられ、ヒトの摂取ナイアシン測定の生化学的指標となることを明らかにした。

3) 結合型ナイアシンの利用性を明かとするため、女子5名に玄米粉末胚芽、玄米偏平胚芽を投与し、尿中MNA排泄量を生化学的指標として利用率を測定したところ、粉末胚芽中ナイアシンの27.3%、偏平胚芽中ナイアシンの64.8%を利用するという結果を得た。また、結合型ナイアシンの難利用性とは別に、食物繊維によるナイアシンの再吸着や吸収阻害などの新たな問題が示唆された。

6. HPLC法によるナイアシン分離、定量の確立と食品中ナイアシンの定量への応用を目的として、まず、HPLC法の検討を行った。

1) ナイアシン誘導体6種のHPLCによる分離を検討し、陰イオン交換ゲル#3013-Nのパッキングカラムにて、カラムを60 $^{\circ}$ Cに保ちながら、リン酸緩衝液とアセトニトリル混合液のグラジエントモードにより、移動相を0.5ml/minで送液し、トリゴネリンがリテンションタイム2.77分、ニコチンアミドが5.76分、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドが7.23分、NADが16.40分、ニコチン酸が37.42分、NADPが40.58分と良好に分離でき、HPLCによるナイアシン分別定量法を示し得た。

2) 食品13種類を抽出条件を変えて、微生物法とHPLC法で測定し、比較検討を行った結果、ジャガイモでは、水や弱い酸ではナイアシンは遊離してこないが、1N硫酸、1N水酸化ナトリウムによる加水分解では結合型が遊離して定量された。動物性食品であるマグロや鶏ササミ、エノキ茸やシメジでは、抽出条件の違いによるナイアシン値の差は認められず、タマネギやキュウリでは、抽出条件が苛酷になるとむしろナイアシン値は減少した。ニンジン、ピーマン、ゴマ、きなこ、



ショウガでは、各抽出条件によるナイアシン値の違いは認められたが大きな差ではなかった。これらの結果から、結合同型が存在すると考えられる食品群、まったく結合同型を含まない食品、結合同型は含まないがむしろ苛酷な抽出条件によりナイアシン値が減少する食品の3タイプの食品群に大別できた。

各種抽出法における微生物定量値とHPLC値の関係をみると、水抽出の場合、回帰方程式、相関係数は、 $Y=0.615X+0.653$  ( $r=0.935$ )とHPLC値は微生物定量値より幾分低い値を示し、0.1N硫酸では、 $Y=0.91X+0.068$  ( $r=0.942$ )、1N硫酸抽出では、 $Y=1.147-2.17$  ( $r=0.981$ )と微生物定量値とHPLC定量値との間に高い一致性が認められ、水酸化ナトリウム抽出では、 $Y=0.876X+15.6$  ( $r=0.863$ )とHPLC値は、微生物定量値より、かなり高い値を示した。

3) 粳発芽中の遊離型および総ナイアシン値の変動は、両値とも発芽4日目に減少し、その後、遊離型ナイアシンは増加の傾向にあり、総ナイアシンは6日目まで増加、7日目で減少した。遊離化度は第1日目が約53%と最低値を示し、7日目では約68%の遊離化率を示した。発芽中の粳のHPLCは、発芽が進むにつれて、可溶物質が多くなるが、7日までを見る限りでは、ニコチン酸、ニコチンアミド、NADの型では検出できなかった。穀類中では、結合同型が発芽により、遊離されてくるが、これは本来の遊離型ナイアシンではなく、これらに何かまだ結合しているナイアシンであろうと考えられる。すなわち、有効型ナイアシンであり、HPLCにより検出できないが、結合同型ナイアシンと称するものではないと考える。

以上、総括すると、穀類中結合同型ナイアシンの定量法における問題を栄養学の立場から解決するため、穀類中結合同型ナイアシンに対するナイアシン定量菌 *L. plantarum*の態度を明かにし、試料分解法と定量法の組合せにより、遊離型ナイアシンと結合同型ナイアシンの分別定量法を示した。この方法を用いて、調理加工中の結合同型ナイアシンの挙動を明らかにし、結合同型ナイアシンを一部遊離型に変換するのに調理加工工程が有効であることを示した。さらに、結合同型ナイアシンの可溶化と遊離化にセルラーゼとエステラーゼの2段酵素処理が有効であることを明らかにした。また、セルラーゼ処理した米ヌカ結合同型ナイアシンのラットに対する生物的有効性を確認した。更に、ヒトにおけるナイアシン利用率測定を検討



し、長期栄養実験のための実験食、摂取ナイアシン量を鋭敏に反映する生物学的指標を示し、試みとして、ヒトの胚芽利用率を測定した。また、HPLC法によるナイアシン誘導体の分離定量法を示し、更に、HPLC法で食品中ナイアシンの測定を行い、微生物法の結果と比較検討し、実際の食品中ナイアシン測定への応用を試みた。また、植物体における結合型の存在形態、その意義について、いくつかの知見を示し得た。



## 謝辞

終りに臨み、本研究を遂行するにあたり、長年にわたり御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました大阪市立大学生生活科学部、宮本悌次郎教授に心から感謝申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、有益なる御助言と御指導を戴きました大阪市立大学生生活科学部、片山洋子教授、楠田貢典教授、三崎旭教授並びに中谷延二教授に深謝致します。

更に、本研究の実験遂行にあたり、特別の御指導並びに実験上の種々の便宜を提供して戴きました滋賀県立短期大学、灘本知憲教授並びに大阪市立大学生生活科学部、高谷友久講師に心より感謝申し上げます。

また、本研究を進める上で、御指導戴きました滋賀県立短期大学、早川史子助教授並びに浦部喜美子先生にお礼申し上げます。

更に、研究を進める上で、有益な御助言並びに便宜をはかって戴きました帝国女子大学、柴田克己助教授、京都大学食糧科学研究所、安本教傳教授、国立健康栄養研究所疲労生理研究室長、西牟田守博士に感謝致します。

また、被験者として、研究に協力していただきました滋賀県立短期大学学生の皆様に心より感謝致します。

更に、研究に御協力していただきました大阪市立大学生生活科学部食物学科並びに滋賀県立短期大学食物学科の皆様に感謝致します。



文献

- 1) 小原哲二郎・木村修一：最新栄養学、建帛社
- 2) 日本ビタミン学会編：ビタミン学実験法Ⅱ、356(1985)
- 3) ビタミンと補酵素（上）、日本生化学会編、239(1975)
- 4) M. K. Horwitt, C. C. Harvey, W. S. Rothwell, J. L. Cutler and D. Haffron :  
J. Nutr., 60 (Suppl. 1), 1(1956)
- 5) M. V. Pullman, A. San Pietro and S. P. Colowick: J. Biol. Chem., 206, 129  
(1954)
- 6) Y. Nishizawa and O. Hayaishi: J. Biol. Chem., 241, 3701(1966).
- 7) W. A. Krehl, L. J. Tepley, P. S. Sarma and C. A. Elvehjem : Science, 101,  
487(1945)
- 8) Recommended Dietary Allowances, 10th Ed., National Academy Press :  
p. 137(1989)
- 9) J. Goldberger, G. A. Wheeler and E. Sydenstricker, : J. Am. Med. Assoc.  
71, 944(1918)
- 10) C. A. Elvehjem, R. J. Madden, F. M. Strong and D. W. Wollen : J. Am. Chem. Soc.,  
59, 1767(1937)
- 11) J. S. Wall and K. J. Carpenter : Food. Tech. 198(1988)
- 12) C. Gopalan : Nutr. Rev., 26, 323(1968)
- 13) R. Schoental: Nutrition and Health, 2, 147(1983)
- 14) N. E. Cook and K. J. Carpenter: J. Nutr., 118, 963(1988)
- 15) J. Goldberger: J. Am. Med. Assoc. 78, 1676(1922)
- 16) D. A. Bender and A. R. Bender: Nutrition Abstracts and Reviews  
(Series A) 56, 695(1986)
- 17) E. Kodicek, D. R. Ashby, M. Muller and K. J. Carpenter: Proc. Nutr. Soc.,  
33, 105(1974)
- 18) K. J. Carpenter, E. Kodicek and P. W. Wilson : Br. J. Nutr., 14, 25(1960)
- 19) M. L. Das and B. C. Guha : J. Biol. Chem., 235, 2971(1960)
- 20) W. A. Krehl and F. M. Strong : J. Biol. Chem., 156, 1(1944)



- 21) E. Kodicek, R. Braude, S.K. Kon and K.G. Mitchell: Br. J. Nutr., 13, 363(1959)
- 22) H. P. Ghosh, P. K. Sarkar and B. C. Guha: J. Nutr., 79, 451(1963)
- 23) E. G. A. Carter and K. J. Carpenter : J. Nutr., 112, 2091(1982)
- 24) E. G. A. Carter and K. J. Carpenter : Am. J. Clin. Nutr., 36, 855(1982)
- 25) B. Belavady and C. Goparan : Ind. J. Biochem., 3, 44(1966)
- 26) E. G. A. Carter and K. J. Carpenter : Fedn. Proc. Fedn. Am., 39, 557(1980)
- 27) M. D. Chen Xue-Cun, Yen Tai-An, Tong Xiu-Zhen, He Yu-Fang, Yu Xiao-Yue, Liu Shu-Rong, and Yan Huai-Cheng : Nutr. Res., 3, 171(1983)
- 28) D. D. Christianson , J. S. Wall, R. J. Dimler and A. N. Booth : J. Agric. Food Chem., 16, 100(1968)
- 29) J. B. Mason and E. Kodicek : Cereal Chem., 50, 637(1973)
- 30) J. B. Mason, N. Gibson and E. Kodicek : Brit. J. Nutr., 30, 297(1973)
- 31) E. G. A. Carter , K. J. Carpenter and M. Friedman : Nutr. Repts. Intl., 25, 389(1982)
- 32) 宮本悌次郎 : 化学の領域, 増刊, 34, 219(1938)
- 33) R. B. Toma and M. M. Tabekhia : J. Food. Sci., 44, 263(1979)
- 34) M. W. Dong and J. L. Dicesare : Food Technol., 37, 58(1983)
- 35) P. J. van Niekerk, S. C. C. Smit E. S. P. Strydom and G. Armbruster: J. Agric. Food Chem., 32, 304(1984).
- 36) 宮沢滋 : ビタミン, 56, 487(1982)
- 37) 科学技術庁資源調査会編 : 四訂日本食品標準成分表, 大蔵省印刷局, p. 34 (1982)
- 38) 柴田克己 : ビタミン, 65, 355(1991)
- 39) T. Matsunaga, I. Karube, and S. Suzuki: Anal. Chem. Acta, 99, 233(1978)
- 40) 宮本悌次郎, 安澤寛子, 吉岡桂子, 飯尾潤子 : 大阪市大生活科学紀要, 30, 17(1982)
- 41) J. A. Kertcher, T. R. Guilarte, M. F. Chen, A. A. Rider and P. A. McIntyre : J. Nucl. Med., 20, 419(1979)
- 42) 岩井和夫, 沖中靖, 横溝久枝 : ビタミン, 35, 387(1967)



- 43) W.Horwitz,Ed.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,13th Ed.,pp.743,760(1980)
- 44) 村田希久、泉谷和子、三宅靖子：帝国学園紀要、4,1(1978)
- 45) M.Freed,Ed.:Methods of Vitamin Assay,Interscience Publishers,3rd Ed.,pp.50,173(1966)
- 46) B.C.Johnson :J. Biol. Chem.,159,227(1945)
- 47) J.B.Mason,N.Gibson and E.Kodicek:Br.J.Nutr.,30,297(1973)
- 48) K.M.Clegg,E.Kodicek and S.P.Mistry:Biochem.J.,50,326(1952)
- 49) A.E.Harper, B.D.Punekar and C.A.Elvehjem: J. Nutr.,66,163(1958)
- 50) K.J.Carpenter:Fed.Proc.,40,1531(1981)
- 51) M.H.Gomez,C.M. Mcdough, L.W. Rooney and R.D.Waniska:J.Food Sci.,54,330(1989)
- 52) 今井正武、平野進、饗場美恵子：農化,57,1105(1983)
- 53) 柴田克己：ビタミン、61,37(1987)
- 54) J.S.Nisselbaum and S.Green:J.Biol.Chem.,27,212(1969)
- 55) 浦部貴美子・早川史子：滋短大誌,26,31(1984)
- 56) L.H.Lin and L.M.Henderson:J.Biol.Chem., 247,8023(1972)
- 57) T.Hayakawa, K.Shibata and K.Iwai: Agric. Biol.Chem., 48,445(1984)
- 58) P.Pertrack, P.Greengard, A.Craston and F.Sheppy: J.Biol.Chem.,240,1725(1965)
- 59) 京大医学部医の倫理委員会訳：栄食誌,43,77(1990)
- 60) 能勢善嗣・上田潔：ビタミン,2,247(1950)
- 61) 科学技術庁資源調査会編：改訂日本食品アミノ酸組成表(1986)
- 62) 柴田克己・村田希久：ビタミン,56,469(1982)
- 63) A.Chaturvedi and P.Geervani:J.Nutr.Sci.Vitaminol.,32,327(1986)
- 64) 厚生省公衆衛生局栄養課編：日本人の栄養所要量,第一出版,(1985)
- 65) 柴田克己：家政誌,40,395(1989)
- 66) 村田 晃・馬場瑠美ら：ビタミン,64,1(1990)
- 67) E.E.Snell and L.D.Wright:J.Biol. Chem.,139,675(1941)
- 68) 田口寛：ビタミン,64,19(1990)



- 69) K. Shibata, T. Kawada and k. Iwai : J. Chromatogr. , 417, 173 (1987)
- 70) J. I. Patterson and R. R. Brown: J. Chromatogr., 182, 425 (1980)
- 71) 小嶋美穂子・青木茂・津田泰三・原田浩之 : 栄食誌, 43, 362 (1990)
- 72) 日本ビタミン学会編 : ビタミン学実験法Ⅱ、364 (1985)



本論文に直接関係する研究発表

1. 宮本悌次郎・安喜秀己・店田玲子：ナイアシン微生物定量法の迅速化．  
大阪市立大学生活科学部紀要、31,7-14(1983)
2. 安喜秀己・宮本悌次郎：穀類中ナイアシンの微生物定量における結合型  
ナイアシンの影響．日本家政学会誌、36,929-933(1985)
3. 安喜秀己・宮本悌次郎：加水分解酵素による米ヌカ結合型ナイアシンの  
可溶化と遊離．日本栄養食糧学会誌、39,473-478(1986)
4. 宮本悌次郎・鱸教江・安喜秀己：糠床熟成中の結合型ナイアシンの遊離と  
漬物中ナイアシン含量の変化．大阪市立大学生活科学部紀要、35,29-34  
(1987)
5. 岡本（安喜）秀己・浦部貴美子・早川史子・宮本悌次郎：セルラーゼ処理  
した米ぬか結合型ナイアシンのラットに対する有効性．滋賀県立短期大学  
学術雑誌、36,66-71(1989)
6. 岡本（安喜）秀己・宮本悌次郎：ヒトにおけるナイアシン利用率測定法  
の検討・・・ナイアシン制限食の考案・・・．滋賀県立短期大学学術雑誌、  
39,62-67(1990)
7. 岡本（安喜）秀己・宮本悌次郎：調理・加工による穀類中結合型ナイアシンの  
変化．調理科学、24,120-123(1991)．
8. 岡本秀己・灘本知憲・宮本悌次郎：ヒトの血中、尿中ナイアシン誘導体含量  
に及ぼすニコチン酸投与の影響．日本栄養食糧学会誌、投稿中
9. Okamoto, H., Nadamoto, T. and Miyamoto, T.: Comparison of a High  
Performance Liquid Chromatography with Microbioassay for  
Determination of Niacin in Foods, J. Nutr. Sci. Vitaminol. 投稿中