

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

6. 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

ビスフェノールA含有食の摂取によるトリプトファン-ニコチンアミド代謝系におよぼす影響からビスフェノールAが3-ヒドロキシキヌレニンの産生に關与する Kynurenine 3-hydroxylase 活性を阻害していること示唆された。そこで、ビスフェノールAの Kynurenine 3-hydroxylase への阻害効果を *in vitro* で調べた。その結果、活性はビスフェノールAによって阻害された。すなわち、ビスフェノールAは Kynurenine 3-hydroxylase 活性を阻害することにより、トリプトファン-ニコチンアミド転換率を低下させることが明らかとなった。

A. 目的

我々は、内分泌攪乱物質候補に挙げられているビスフェノールAがトリプトファン-ニコチンアミド転換率を顕著に阻害することを報告した¹⁾。ヒトを含む哺乳動物はB群ビタミンの中で最も必要量の多いナイアシン(ビタミンB₃ともいう)をすでにビタミン体となっているニコチンアミドとして摂取しているが、トリプトファンからもニコチンアミドを生合成する経路を有している^{2,4)}。日本人が一般的な食事をしている場合、ナイアシンの約50%はトリプトファンから供給されている⁵⁾。したがって、ビスフェノールAの摂取によって、本転換経路が阻害されるという事実は公衆栄養学上重要な問題である。前報¹⁾では、ラットの飼料中に終濃度1%レベルでの影響を調べたのみであった。本研究は、本転換率に影響を及ぼす最低濃度とその作用部位の解明、さらに他のビタミン代謝に対する影響を調べることを目的として行ない、成果を得たので報告する。

B. 研究方法

1. 試薬

飼料に使用したカゼイン、L-メチオニン、ショ糖は和光純薬工業(株)より購入した。ミネラル混合(AIN93配合; AIN-93M)、ビタミン混合(AIN93配合; AIN-93VX、重酒石酸コリン添加)はオリエンタル酵母工業(株)より購入した。

尿中代謝産物の定量用標準品として使用したアンスラニル酸、キヌレン酸、キサントレン酸、3-ヒドロキシアンスラニル酸、N¹-メチルニコチンアミド(MNA)は東京化成工業(株)より、キノリン酸、ニコチン

アミド、チアミン塩酸塩、リボフラビン、アスコルビン酸、ビスフェノールAは和光純薬工業(株)より購入した。N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)はPullmanとColowickの方法³⁾により、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)は柴田らの方法⁴⁾により合成した。4-ピリドン-3-カルボキシン酸(PIC)はシグマケミカル(株)より購入した。

2. 動物の飼育方法

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会承認を受けた。

飼育室の温度は22℃前後に、湿度は60%前後に調節した。明暗サイクルは、午前6時～午後6時を明、午後6時～午前6時までを暗とした。

3週齢のWistar系雄ラットを日本クレア(株)より購入し、平均体重がほぼ等しくなるよう5匹ずつ3群(0, 0.1, 0.5%ビスフェノールA含有食)に分け、ラット用代謝ケージ(CT-10, 日本クレア(株)製)に入れた。飼料はTable 1に示す20%カゼイン食をコントロール食とした。試験食は、終濃度で0.1%, 0.5%を含む飼料を投与した。飼育期間は22日間で、飼料と水は自由摂取とし、1日ないし2日おきの午前9～10時に新しいものと交換した。また、その時に体重と飼料摂取量を測定した。

実験最終日の1日尿(午前10時～翌日午前10時:24時間)を集めた。トリプトファン代謝産物、ニコチンアミドおよびその代謝産物、チアミン、リボフラビン、PICを測定するための尿は分析するまで塩酸酸性下、-20℃で保存した。アスコルビン酸とその代謝産物(デヒドロアスコルビン酸、2,3-ジケトグルン酸)を測定するための尿は

10%メタリン酸で2倍希釈した後、 -20°C で保存した。

実験最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し各種臓器を取り出し、重量を測定した。尿はトリプトファン-ニコチンアミド転換経路代謝産物量の測定に使用した。なお、対照群の肝臓は、キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ活性の測定に使用した。

3. 分析方法

3.1 トリプトファン-ニコチンアミド代謝産物の測定方法

尿を $0.45\mu\text{m}$ のマイクロフィルターでろ過した後、アンスラニル酸⁸⁾、キヌレン酸⁹⁾、キサントレン酸¹⁰⁾、3-ヒドロキシアンスラニル酸¹⁰⁾およびキノリン酸¹¹⁾を各々文献に示した HPLC 法で直接測定した。

尿中の MNA の定量は、強アルカリ性下でアセトフェノンと縮合させることにより蛍光物質に変換し、これを HPLC にて測定した¹²⁾。

尿中のニコチンアミド、2-Py および 4-Py の定量は、尿に炭酸カリウムを飽和量加えた後、ジエチルエーテルで抽出し、乾固させた抽出物を水に溶解し、その液を HPLC にて測定した⁷⁾。

3.2 キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ(EC 2.1.3.1)活性の測定方法

ラットから単離した直後の肝臓を材料として、De Duve ら¹³⁾の報告した遠心分画法にしたがってミトコンドリア画分を得、タンパク質濃度が 10 mg/mL 程度になるように適量の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に懸濁したものを本酵素活性源とした。酵素反応は柴田・戸田¹⁴⁾が報告した方法に従った。また、反応産物の 3-ヒドロキシキヌレニンの測定も柴田・戸田¹⁴⁾が報告

した HPLC 法に従った。簡単に説明すると、標準の酵素反応組成 (全容量 $500\mu\text{L}$) は次の通りである。 $50\mu\text{L}$ の 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0), $15\mu\text{L}$ の 10 mM KCN, $50\mu\text{L}$ の 100 mM KCl, $10\mu\text{L}$ の 10 mM NADPH, $10\mu\text{L}$ の 10 mM 硫酸 L-キヌレニン, $10\mu\text{L}$ のエタノール, $255\mu\text{L}$ の水, $100\mu\text{L}$ のミトコンドリア懸濁液。ミトコンドリア懸濁液を添加することで反応を開始し、 37°C で 10 分間行った。停止は 70% 過塩素酸を $40\mu\text{L}$ 添加することで行った。停止させた酵素反応液を室温で 5 分間放置後、 $10,000\times\text{g}$, 3 分間遠心分離することで、上清を得た。沈殿には $500\mu\text{L}$ の水を加え、5 分間混合後、 $10,000\times\text{g}$, 3 分間遠心分離することで、上清を得た。合わせた上清中の 3-ヒドロキシキヌレニンを HPLC を用いて測定した¹⁴⁾。

ビスフェノール A の本酵素活性に及ぼす影響を調べるために、 5 mM , 25 mM , 50 mM , 150 mM 濃度のビスフェノール A エタノール溶液を作成した。これらのビスフェノール A エタノール溶液を標準反応組成液のエタノール ($10\mu\text{L}$ 添加) の代わりに添加した。したがって、反応組成液中の終濃度は 0.1 mM , 0.5 mM , 1 mM , 3 mM となる (参照, Fig. 5)。

3.3 尿中のチアミン (ビタミン B₁) の測定方法

基本的には、木村らが¹⁵⁾報告した血液中のチアミン測定方法に従った。HPLC 注入用試料は、集めた尿を $0.45\mu\text{m}$ のマイクロフィルターでろ過した液とする。木村らの方法では、チアミンをカラムで分離した後、反応液としてフェリシアン化カリウムと水酸化ナトリウム混合液を送液しているが、再現性が低かったため、Fig. 1 に示したよう

に、はじめにフェリシアン化カリウム溶液を送液し、次に水酸化ナトリウム溶液を送液した。この改良により、再現性を高めることに成功した。分析条件を以下に示した。移動相は 0.2 M NaH_2PO_4 を用い、流速 1.0 mL/min で流した。反応液 1 は 0.01% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ で流速 0.15 mL/min で流した。反応液 2 は 15% NaOH で流速 0.15 mL/min で流した。反応コイルは PEEK チューブ (外径, 1.80 mm ; 内径, 0.50 mm) で長さは 1200 mm, カラムは Shodex Rs-pak NN-614 (150-6.0 mm I.D.) を使用し、カラム温度は 40°C に維持し、検出は励起波長 365 nm, 蛍光波長 435 nm で行った。

3.4 尿中のリボフラビンの測定方法

尿中リボフラビンは、リボフラビン自体が発する蛍光を蛍光検出器付きの HPLC で測定した¹⁶⁾。HPLC 注入用試料は、集めた尿を 0.45 μm のマイクロフィルターでろ過した液である。カラムは Tosoh - 80Ts (250×4.6mm I.D.) を用い、移動相としては 10 mM NaH_2PO_4 (pH5.5 ; 6 M NaOH で pH を調整) : メタノール=7:3 を使用した。流速は 0.8 mL/min で、カラム温度は 40°C に維持した。検出は、励起波長 445nm, 蛍光波長 530nm で行った。

3.5 尿中の PIC の測定方法

ビタミン B_6 の異化代謝産物である PIC は、PIC 自体が発する蛍光を蛍光検出器付きの HPLC で測定した¹⁷⁾。HPLC 注入用試料は、集めた尿を 0.45 μm のマイクロフィルターでろ過した液である。移動相として 500 mL の超純水に 85 %リン酸を 2.3 mL 添加し、50%KOH で pH 2.2 に調製後、900 mL に定容した後、100 mL のメタノールを加えたものを使用した。カラムは Tosoh TSKgel

ODS-120A(250 mm×4.6 mm I.D.)を使用し、流速 1.0 mL / min で流した。カラム温度は 30°C に維持した。測定は励起波長 355 nm, 蛍光波長 436 nm で行った。

3.6 尿中のアスコルビン酸 (還元型アスコルビン酸+酸化型アスコルビン酸+2,3-ジケトグルロン酸) の測定方法

メタリン酸酸性下で保存した尿を Kishida ら¹⁸⁾の方法にしたがって、オサゾン誘導体に変換した後測定をおこなった。カラムは Waters μ Bondasphere 5 μ C_{18} -100A (150×3.9 mm I.D.)を用い、移動相として、アセトニトリル 500mL に終濃度が 0.1% になるようにトリエチルアミン(pH3.0)溶液を加えた後、水で 1000 mL にしたものを使用した。カラム温度は 40°C に維持し、流速 1.0 mL / min で、検出は 505 nm で行った。

C. 結果と考察

1. 体重と飼料摂取量への影響

幼若ラットの体重増加量 (Fig. 2-A) と飼料摂取量 (Fig. 2-B) は、0.1%ビスフェノール A 添加食では対照群と比較して、有意な低下は認められなかった。0.5%添加食の投与によっては、体重増加量も飼料摂取量も対照群と比較して有意に低下した。

1.2 臓器重量への影響

0.1%ビスフェノール A 添加食の投与は、Table 2 に示したように、肝臓、腎臓、心臓、肺臓、脾臓、脳、精巣の各重量に、全く影響を与えなかった。0.5%添加食では、肝臓、腎臓及び脾臓がラット当たりでは減少傾向を示したが、100 g 体重当たりの値に換算した値では、差異を認めなかった。有意な差異が認められたのは、精巣のみであった。他の臓器重量には差異は認められなかった。

1.3 トリプトファン-3-ヒドロキシアンスラニル酸代謝系への影響

Figure 3 に示した化合物はトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の上流部分に位置する中間代謝産物である。これらは、体内にほとんど検出されないことから、尿中への排泄量がほぼ生成量を反映する。

0.1%ビスフェノール A 添加食の摂取により、アンスラニル酸の生成量は増加し、キヌレン酸は増加傾向を示した。0.5%添加食では、アンスラニル酸は増加傾向を示し、キヌレン酸は有意に増加した。一方、キサントレン酸および 3-ヒドロキシアンスラニル酸の生成量は、0.1%添加食でも 0.5%添加食でも対照群の 1/2 程度にまで低下した。

1.4 キノリン酸の生成量とトリプトファン-ニコチンアミド転換率への影響

キノリン酸 (Fig. 4-A) の生成量は飼料中のビスフェノール A 量に応じて低下した。全く同じ結果が、トリプトファン-ニコチンアミド転換率 (Fig. 4-B) においてもみられた。

1.5 キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ活性に及ぼす影響(in vitro)

トリプトファン-ニコチンアミド代謝系の中間代謝産物の測定から、ビスフェノール A の作用部位がキヌレニン 3-ヒドロキシラーゼであると推定されたので、本酵素活性に及ぼす影響を in vitro で調べた。Figure 5 に示したように、本酵素活性は、反応液に添加するビスフェノール A の添加量に応じて阻害された。

1.5 尿中へのチアミン、リボフラビン、PIC およびアスコルビン酸の排泄量に及ぼす影響

ビスフェノール A の摂取により、尿中へ

のチアミン(Fig. 6-A)、リボフラビン(Fig. 6-B)、アスコルビン酸 (この場合はアスコルビン酸+デヒドロアスコルビン酸+2,3-ジケトグルン酸) (Fig. 6-D)の排泄量は有意に増大した。一方、ビタミン B₆ の異化代謝産物である PIC はビスフェノール A の摂取により有意に低下した(Fig. 6-C)。

D. 考察

我々は、ラットに 1%ビスフェノール A 含有食を添加すると、トリプトファン-ニコチンアミド転換率が顕著に低下することを報告した¹⁾。1%ビスフェノール A 群のラット 1 匹あたりの 1 日の摂取量は約 200 mg であり、体重 1 kg あたりでは、800 mg となる。この量は雌性ホルモンのかく乱作用が報告されている 400 mg/kg 体重/日¹⁹⁾の倍量に相当した。そこで、0.1%ビスフェノール含有食、0.5%含有食の投与がトリプトファン-ニコチンアミド転換率に及ぼす影響を調べた。前報¹⁾では、6 週齢のラットを用いたが、一般的に毒性の表れやすいと考えられている離乳したての 3 週齢のラットを今回は使用した。幼若ラットの飼料摂取量と体重増加におよぼす影響は、0.1%群では認められなかったが、0.5%群では認められた (Fig. 2)。また、各種臓器重量におよぼす影響の結果も、0.1%含有食では全く影響を及ぼさなかったが、0.5%含有食の投与は精巣重量の低下をもたらした (Table 2)。すなわち、0.1%ビスフェノール A 含有食の投与はラットに見かけ上の影響を全く与えなかった。しかしながら、0.1%ビスフェノール A 含有食の投与は、対照群である 0%含有食群と比較して、トリプトファン-ニコチンアミド転換経路の代謝産物であるアンスラニル酸

とキヌレン酸の産生量を各々有意に増大あるいは増大傾向させ、一方、キサントレン酸と 3-ヒドロキシアンスラニル酸の産生量を有意に低下させた(Fig. 3). さらに、キノリン酸の産生量を有意に低下させ、この結果と連動してトリプトファンニコチンアミド転換率を有意に低下させた(Fig. 4). すなわち、広く家庭用品に使用されているビスフェノール A の生物学的暴露量を推定するには、これらの代謝産物量を測定することが有効であることが明らかとなった.

次に、前報¹⁾で推測したビスフェノール A の作用点を調べた. 本経路の代謝産物の変動から、ビスフェノール A の作用点をキヌレニン 3-ヒドロキシゲナーゼと推定した¹⁾. 今回の実験結果でも、全く同じ現象が認められた(Figs. 2 and 3). そこで、本酵素活性におよぼすビスフェノール A の影響を *in vitro* で調べた. その結果は、Fig. 5 に示したように、濃度依存的に活性が阻害された. 本酵素は多くの化合物によって活性が変動することが知られている. 例えば、Nishimoto ら²¹⁾は、反応系にリン脂質を添加すると活性が有意に増大することを、Shin ら²²⁾は分岐鎖 α -ケト酸が阻害することを、Mayer ら²³⁾は Cu^{2+} や Dicumarol による阻害を、Okamoto・Hayaishi²⁴⁾は甲状腺機能亢進、すなわちチロキシンによる阻害を、Bender・Smith²⁵⁾はある種の芳香族化合物による阻害を報告している. Müller²⁶⁾は「Flavin-dependent hydroxylases」と題する論文の中で、多くの芳香族化合物が Flavin-dependent hydroxylases によって水酸化される反応を紹介している.

キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼはミトコンドリア外膜に存在する FAD 酵素であり、

補酵素として NADPH を要求する²⁰⁾. そこで、トリプトファンニコチンアミド転換経路に関与する B 群ビタミンの代謝におよぼす影響を調べた. その結果は Fig. 6 に示したように、チアミン (ビタミン B₁) とリボフラビン(ビタミン B₂)の排泄量がビスフェノール A の摂取により有意に増大し、ビタミン B₆ の異化代謝産物である PIC は減少した. 摂取量が等しい時は(Fig. 6 の値は 1 g の飼料を摂取した時の値)、尿中へのビタミンの排泄量の増大は、一般的に、体内での必要度の低下を意味するものと考えられる. チアミンとリボフラビンの排泄量の増大は、ビスフェノール A が体内において、これらの必要とする酵素反応を阻害している可能性を示唆している. なお、リボフラビンとビスフェノール A との接点は多くのフラビン酵素が芳香族化合物の水酸化反応に関与している²⁶⁾という事実から推定されるが、チアミンとビスフェノール A との接点是不明である. 一方、PIC 排泄量の減少は、ビタミン B₆ が関与する反応、例えば、アミノ酸の異化代謝をビスフェノール A が亢進させていることを示唆している.

アスコルビン酸はラットでは、ビタミンではない. ラットは生体異物を摂取するとアスコルビン酸の産生量を増大させることが知られている²⁷⁾. この増大は解毒に関係する薬物代謝系に関連する応答である. 本実験においても、Fig. 6-D に示したように、ビスフェノール A の摂取により増大したことから、ラットはビスフェノール A を生体異物として認識し、水酸基を付加させて、脂溶性から水溶性物質に変化させて、積極的にビスフェノール A を尿中に排泄されているものと思われる.

- E. 健康危機情報
特記する情報なし
- F. 研究発表
1. 発表論文
なし
 2. 学会発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許予定
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし
- H. 引用文献
1. 福渡努, 鳥落舞, 太田万理, 佐々木隆造, 柴田克己, 内分泌かく乱物質候補ビスフェノール A, スチレンモノマーによるトリプトファン-ニコチンアミド転換経路のかく乱作用. 食衛誌, **45**, 1-7 (2004).
 2. Goldberger, J., Wheeler, G. A., The experimental production of pellagra in human subjects by means of diet. U.S. Pub. Health Serv. Hygienic Lab. Bull. No. 120. (1920).
 3. Krehl, W. A., Teply, L. J., Sarma, P.S., Elvehjem, C. A., Growth-retarding effect of corn in nicotinic acid-low rations and its counteraction by tryptophane. Science, **101**, 489-490 (1945).
 4. Perlzweig, W. A., Rosen, F., Levitas, N., Robinson, J., The excretion of nicotinic acid derivatives after ingestion of tryptophane by man. J. Biol. Chem., **167**, 511-514 (1947)
 5. 福渡努, 柴田克己, 早川史子, 杉本悦郎, ある地域の女子学生のナイアシン摂取量と血中ナイアシン補酵素レベル. ビタミン, **74**, 137-141 (2000).
 6. Pullman, M. P., Colowic, S. P., Preparation of 2- and 6-pyridones of N^1 -methylnicotinamide. J. Biol. Chem., **206**, 121-127 (1954).
 7. Shibata, K., Kawada, T., Iwai, K., Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N^1 -methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N^1 -methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., **424**, 23-28 (1988).
 8. Shibata, K., Onodera, M., Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem., **55**, 143-148 (1991).
 9. Shibata, K., Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., **430**, 376-380 (1988).
 10. Shibata, K., Onodera, M., Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. Biosci. Biotech. Biochem., **56**, 974, (1992).
 11. Mawatari, K., Oshida, K., Iinuma, F., Watanabe, M., Determination of quinolinic

- acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta.*, **302**, 179-183 (1995)
12. 柴田克己, 高速液体クロマトグラフィーによる N^1 -メチルニコチンアミドの超微量定量方法, *ビタミン*, **61**, 599-604 (1987).
 13. de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., *Biochem. J.*, **60**, 604-617 (1955).
 14. Shibata, K., Toda, S., Effects of thyroxine on the conversion ratio of tryptophan to nicotinamide in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1757-1762 (1994).
 15. Kimura, M., Fujita, T., Itokawa, Y., Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29-31 (1982).
 16. Roughead Z. K., McCormick, D. B., Urinary riboflavin and its metabolites: effects of riboflavin supplementation in healthy residents of rural Georgia (USA). *Eur. J. Clin. Nutr.*, **45**, 299-307 (1991)
 17. Gregory, J. F., Kirk, J. R., Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883 (1979).
 18. Kishida, K., Nishimoto, Y., Kojo, S., Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **64**, 1505-1507 (1992).
 19. Ashby, J., Tinwell, H., Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ Health Perspect.*, **106**, 719-720 (1998).
 20. Okamoto, H., Hayaishi, O., Solubilization and partial purification of kynurenine hydroxylase from mitochondria outer membrane and its electron donors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 603-608 (1969).
 21. Nishimoto, Y., Takeuchi, F., Shibata, Y., Isolation of L-kynurenine 3-hydroxylase from the mitochondrial outer membrane of rat liver. *J. Biochem.*, **78**, 573-581 (1975).
 22. Shin, M., Yamada, O., Sano, K., Umezawa, C., Effect of branched chain α -keto acids on kynurenine 3-hydroxylase from rat liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **28**, 203-207 (1982).
 23. Mayer, G., Ullrich, V., Staudinger, H., Possible involvement of cytochrome b5 in L-kynurenine-3-hydroxylase of rat liver mitochondria. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.*, **349**, 459-464.
 24. Okamoto, H., Okada, F., Hayaishi, O., Kynurenine metabolism in hyperthyroidism. A biochemical basis for the low NAD(P) level in hyperthyroid rat liver. *J. Biol. Chem.*, **246**, 7759-7763 (1971).
 25. Bender, D. A., Smith, W. R., Inhibition of kynurenine hydrolase by benserazide, cardidopa and other aromatic hydrazine derivatives: evidence for sub-clinical iatrogenic niacin deficiency. *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 120-122 (1978).
 26. Müller, F., Flavin-dependent hydroxylases. *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 443-445 (1985).
 27. Horia, F., Yoshida, A., Effects of some xenobiotics on ascorbic acid metabolism

in rats. *J. Nutr.*, **112**, 416-425 (1982).

Table 1. Composition of the Diets

	Control diet (%)	Test diet	
		0.1% BPA (%)	0.5% BPA (%)
Casein	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	45.9	45.8	45.4
Sucrose	22.9	22.9	22.9
Corn oil	5	5	5
Mineral mixture ¹ (AIN-93M)	5	5	5
Vitamin mixture(NiA-free) ¹ (AIN-93-VX containing 25% choline bitartrate	1	1	1
Bisphenol A	0	0.1	0.5

¹AIN 93 was used (Reeves, P. G., Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.*, **127**, 838S-841S (1997)).

Table 2. Effect of Dietary BPA on the Organ Weights.

	Control	0.1% BPA	0.5% BPA
Liver (g/rat)	7.77 ± 0.55	7.24 ± 0.32	6.27 ± 0.17
Kidney (g/rat)	1.62 ± 0.07 ^a	1.54 ± 0.07 ^a	1.29 ± 0.07 ^b
Heart (g/rat)	0.71 ± 0.03	0.66 ± 0.02	0.59 ± 0.04
Lung (g/rat)	0.92 ± 0.04	0.89 ± 0.04	0.80 ± 0.03
Spleen (g/rat)	0.61 ± 0.04 ^a	0.57 ± 0.04 ^{a,c}	0.44 ± 0.05 ^{b,c}
Brain (g/rat)	1.10 ± 0.04	1.09 ± 0.02	1.00 ± 0.03
Testis (g/rat)	1.58 ± 0.08 ^a	1.50 ± 0.08 ^a	0.65 ± 0.03 ^b
Liver (g/100 g of b. w. ¹)	4.71 ± 0.16	4.73 ± 0.16	4.91 ± 0.14
Kidney (g/100 g of b. w.)	0.99 ± 0.03	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.02
Heart (g/100 g of b. w.)	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.46 ± 0.02
Lung (g/100 g of b. w.)	0.56 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.63 ± 0.03
Spleen (g/100 g of b. w.)	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.34 ± 0.03
Brain (g/100 g of b. w.)	0.67 ± 0.04	0.72 ± 0.02	0.79 ± 0.03
Testis (g/100 g of b. w.)	0.96 ± 0.03 ^a	0.98 ± 0.03 ^a	0.48 ± 0.02 ^b

¹b. w. = body weight.

Male rats of the Wistar strain (3 weeks old) were obtained from Clea Japan (Tokyo, Japan) and immediately placed in individual metabolic cages (CT-10; Clea Japan). They were then divided into three groups, and fed *ad libitum* for 22 days (Table 1).

Values are means ± SEM for five rats; different superscript letters mean significant difference at $p < 0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

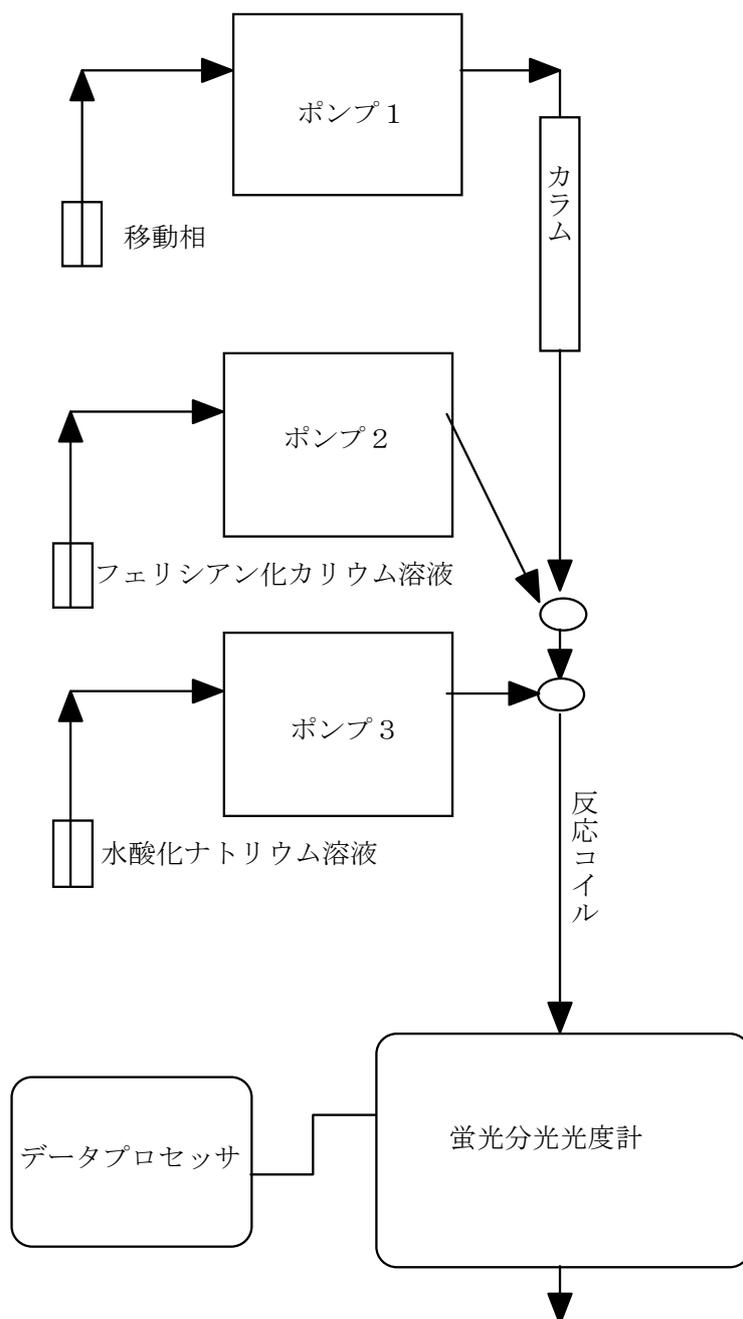


Fig. 1. Diagram of HPLC System for Measurement of Thiamin.

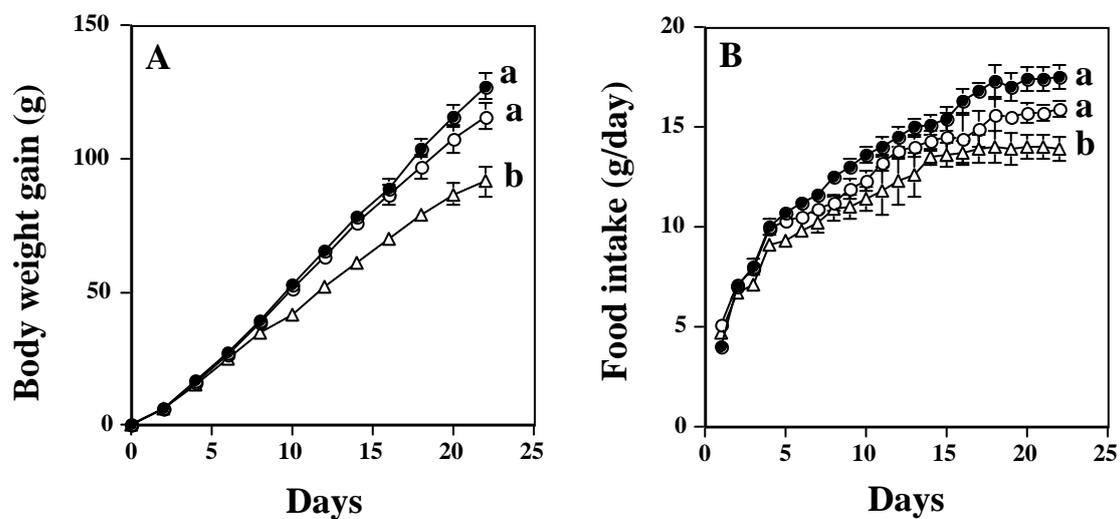


Fig. 2. Effects of Bisphenol A on the Body Weight Gain (A) and Food Intake (B) in Rats.

Male rats of the Wistar strain (3 weeks old) were obtained and immediately placed in individual metabolic cages (CT-10; Clea Japan). They were fed ad libitum the food (Table 1) for 22 days. ●, 0% bisphenol A (control) group; ○, 0.1% bisphenol A group, △, 0.5% bisphenol group. Values are means \pm SEM for five rats; a different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

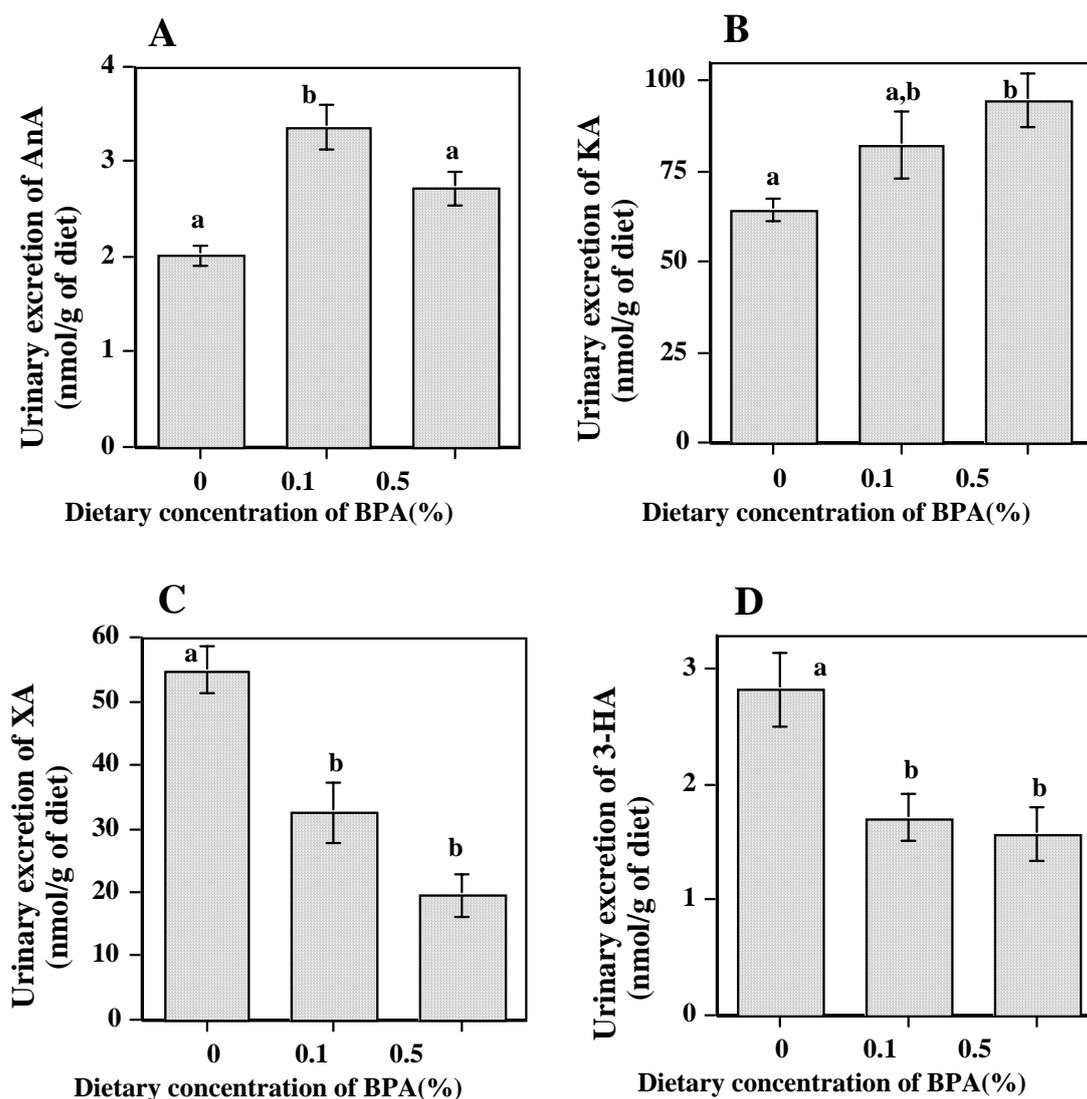


Fig. 3. Effects of Bisphenol A on the Urinary Excretion of AnA (A), KA (B), XA (C), and 3-HA (D). The 24-hour urine samples were collected at the last day of the experiment. Values are means \pm SEM for five rats; a different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test. AnA = anthranilic acid, KA = kynurenic acid, XA = xanthurenic acid, 3-HA = 3-hydroxyanthranilic acid.

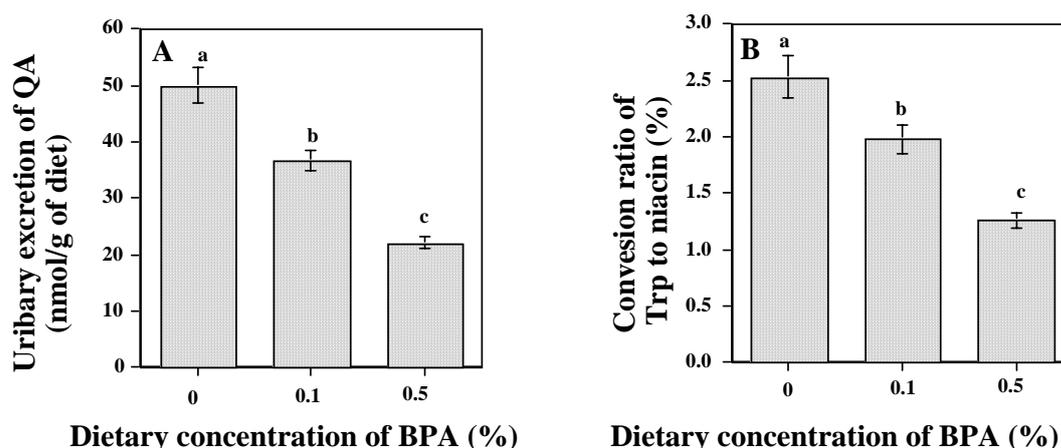


Fig. 4. Effects of Bisphenol A on the Urinary Excretion of QA (A) and the Conversion Ratio of Trp to Nam (B).

The 24-hour urine samples were collected at the last day of the experiment. Values are means \pm SEM for five rats; a different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test. QA = quinolinic acid, Trp = tryptophan, Nam = nicotinamide.

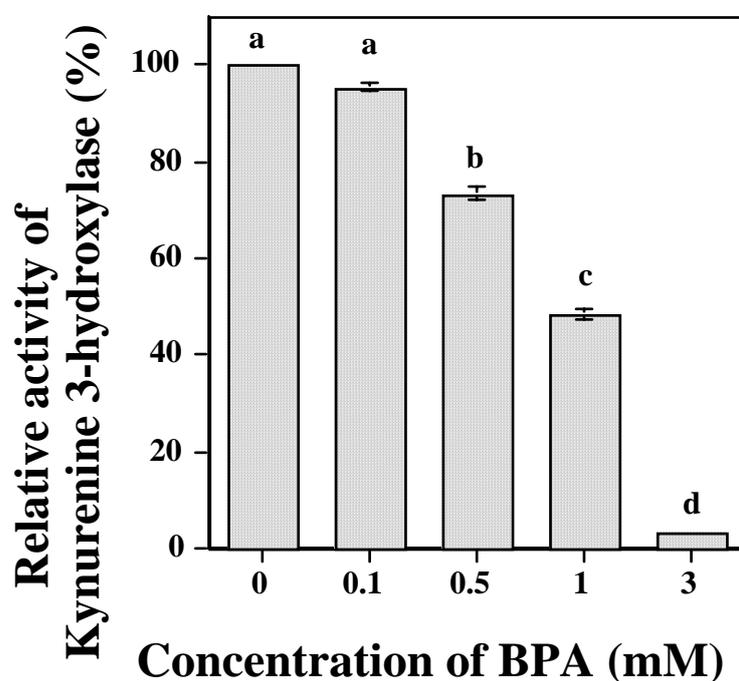


Fig. 5. Inhibition of Kynurenine 3-Hydroxylase Activity by Bisphenol A in vitro.

Values are means \pm SEM for three separate experiments; a different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test.

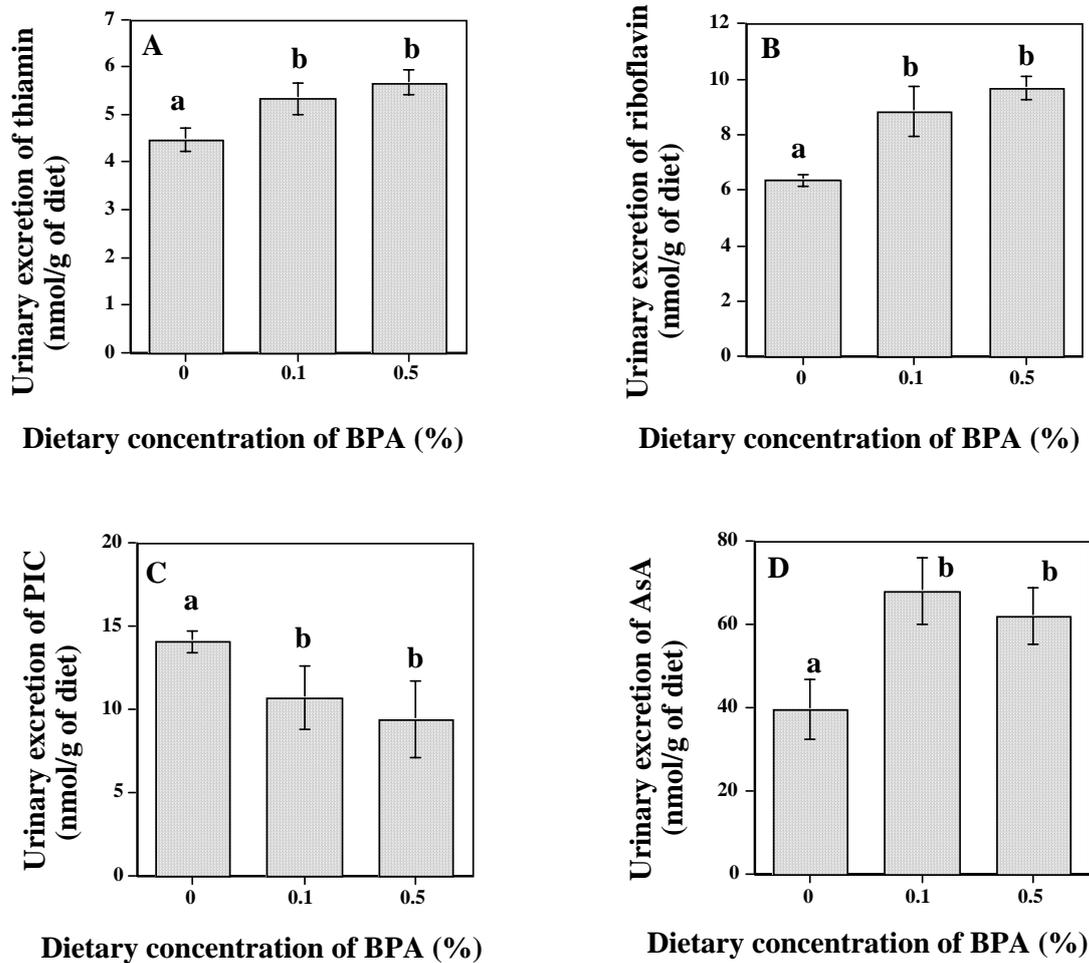


Fig. 6. Effects of Bisphenol A on the Urinary Excretion of Thiamin (A), Riboflavin (B), 4-Pyridoxic Acid (PIC) (C), and Ascorbic Acid (D).

The 24-hour urine samples were collected at the last day of the experiment. Values are means \pm SEM for five rats; a different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$, calculated by Student-Newman-Keuels multiple comparison test.