

健康食品中に含有するβ-ニコチンアミドモノヌクレオチドの定量法の構築

篠塚達也¹⁾、吉野宏毅²⁾、吹譯友秀、関根利一、大澤沙千代、西村真紀³⁾、松本 浩二

Development of a quantitative method of β-nicotinamide mononucleotide in dietary supplements.

Tatsuya SHINOZUKA, Hiroki YOSHINO, Tomohide FUKIWAKE, Toshikazu SEKINE, Sachiyo OSAWA,

Maki NISHIMURA and Koji MATSUMOTO

要旨

フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いて、健康食品中に含有するβ-ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)の迅速定量分析法の構築を検討した。カラムはCOSMOSIL 3PBr、移動相はメタノール/20 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液(pH6.4) (5:95)を用いることで迅速分析が可能となった。構築した分析法で添加回収率、直線性、定量限界を求めたところ、良好な結果が得られた。また、市販された健康食品中のNMNを本分析法にて分析したところ、含有するNMNを定量できた。

キーワード：フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィー、健康食品、β-ニコチンアミドモノヌクレオチド

Keywords: HPLC-PDA, dietary supplement, β-nicotinamide mononucleotide

(令和7年6月3日受付 令和7年6月25日受理)

はじめに

β-ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)は、リボースと水溶性ビタミンであるニコチンアミドがN-グリコシド結合したヌクレオチドである。NMNはヒトの体内に入ると、補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)に変換され、サーチュインを活性化することがマウスによる研究で報告¹⁾されている。サーチュインはNAD依存性に様々なタンパク質の修飾を行う酵素の総称であり、老化や寿命の制御に重要な役割を担っている²⁻⁴⁾。そのため、NMNは寿命延命効果が期待され、NMNを含有する食品はアンチエイジングを暗示・標ぼうして日本国内外で販売されていることが多い。

日本では、NMNは令和2年3月31日付け薬生監麻発0331第9号「食薬区分における成分本質(原材料)の取扱いの例示」⁵⁾において「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質(原材料)リスト」に規定された。それ以降、NMNを含有する健康食品は、医薬品的効能効果を標ぼうしない限り食品として取り扱われることが明確となったため、各社製品を開発し、現在は多数の製品が日本国内で流通している。

NMNの安全性については、ラットや人等を対象とした研究がなされており、ラットにおいて、無毒性量(NOEL)は800 mg/kg体重以上と報告⁶⁾されている。また、日本人男性を対象とした結果では、1日1

回NMNを100 mg、250 mg、500 mg単回経口投与したところ、全ての用量で血圧や脈拍などに変化を認めず、肝機能、腎機能の検査においても異常値を示さなかった報告^{4,7)}がある。これらの報告により、NMNの摂取は安全性が高いことが確認されていることになるが、日本において多数の商品が流通し始めたのは2020年以降であり、日本国内で流通しているNMNを含有した健康食品中のNMN含有量の知見は報告されていない。また、含有量が多い製品を継続摂取した場合には健康被害の発生も否定はできない。健康危機事案が発生した際に、迅速にNMNの定量が行えるよう、HPLCを用いた迅速定量分析法の構築を行い、併せて流通している製品のNMN含有量の実態調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試薬及び標準品

- 1) 標準品：NMN(純度98.0%以上、東京化成工業)。
- 2) 試薬：メタノール(HPLC用、富士フィルム和光純薬)、ギ酸アンモニウム(特級、富士フィルム和光純薬)、0.45 μm polytetrafluoroethylene membrane filter(0.45 μm PTFEメンブランフィルター：メルク)、水はメルク製Milli-Q Integral MT 5SUにより製造された超純水を使用した。
- 3) 標準溶液：標準品を秤量後、水で標準原液(1 mg/mL)を調製した。それを水で希釈し検量線用の標

1) 現：千葉県健康福祉部薬務課、2) 現：千葉県君津保健所、3) 元千葉県衛生研究所

準溶液を調製した。

4) 添加回収試験用標準溶液：標準品を秤量後、水で添加回収試験用標準溶液 (2 mg/mL) を調製した。

2. 試料

インターネット通販サイトで購入した 10 製品を試料とした。製品形態はカプセル 7 製品、錠剤 3 製品であった。また、添加回収試験用の試料としてインターネット通販サイトで購入した NMN を含有していないカプセル 1 製品を使用した。

3. 装置及び測定条件

1) 装置

LC-30AD ポンプ、SIL-30AC オートサンプラー、CTO-20AC カラムオープン及び SPD-M30A フォトダイオードアレイ検出器で構成される島津製作所製 Nexera X2 を使用した。

2) 測定条件

カラム：COSMOSIL 3PBr (3.0 mm i.d. × 150 mm、3 μm、ナカライテスク)、流速：0.4 mL/min、注入量：1 μL、カラム温度：40°C、移動相：メタノール/20 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.4) (5:95)、分析時間：5 分、測定波長 (Max-plot)：210-400 nm、定量波長：264 nm

4. 抽出条件の検討

カプセル 1 の内容物約 50 mg を精密に採取し、水、メタノール又は移動相を各 5 mL 加えて、10 分間超音波抽出した後、1,730×g で 10 分間遠心分離し、上澄液を得た (1 回目の抽出)。残留物に水、メタノール又は移動相を各 2 mL 加えて同様の操作をし、上澄液を得た (2 回目の抽出)。さらに、その残留物に水、メタノール又は移動相を各 2 mL 加えて同様の操作をし、上澄液を得た (3 回目の抽出)。得られた各上澄み液を 0.45 μm PTFE メンブランフィルターでろ過し、試料溶液とした。各試料溶液は前述の 3. 2) 測定条件に示す条件で分析を行った。

2) 測定条件に示す条件で分析を行った。

5. 試料溶液の調製

錠剤はそのまま乳鉢で微粉末にした後、カプセルはその内容物を乳鉢で微粉末にした後、試料約 50 mg を精密に量り、水 5 mL を加えて 10 分間超音波抽出した後、1,730×g で 10 分間遠心分離し、上澄液を 10 mL メスフラスコに入れた。残留物に水 4 mL を加え、同様の操作をし、上澄液を先の 10 mL メスフラスコに加えて、水で正確に 10 mL とした。得られた液を 0.45 μm PTFE メンブランフィルターでろ過し、試料溶液とした。錠剤 1 及び錠剤 2 以外の試料溶液は水で 10 倍希釈したものを分析した。

6. 添加回収試験

添加回収試験用試料として、NMN を含有していないカプセル 1 製品を使用した。なお、NMN を含有する製品に原材料が近い製品を使用し、あらかじめ、上記の 3. 2) 測定条件で HPLC-PDA 分析を行い、

NMN が含有していないことを確認した。カプセル内容物を乳鉢で微粉末にし、約 50 mg を秤量した試料に添加回収試験用標準溶液 0.5 mL を添加した以外の操作は試料溶液の調製と同様の操作を行った。試料調製は 3 回行った。

結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

参考として NMN の構造式を図 1 に示す。はじめにの項で述べたが、NMN はリボースとニコチンアミドに由来するヌクレオチドであり、ヌクレオチドは高極性化合物⁸⁾である。そのため、NMN は高極性化合物であることが推測され、実際、当研究室において汎用的に使用している ODS カラムでは、NMN は保持されず、保持時間 0.2 分付近に NMN のピークが確認された。尾崎らの先行研究^{9,10)}では、NMN を含むニコチンアミド誘導体の分析では COSMOSIL 3PBr カラムを使用していることから、そのカラムを使用したところ、保持を確認できた。また、尾崎ら⁹⁾は、HPLC 分析の移動相にメタノール/20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) (5:95) を用いているが、その条件では NMN のピークがショルダーピークとなってしまう、良好なピークが得られなかった (データ未掲載) が、同じ報告⁹⁾中の LC-MS 分析で使用していたメタノール/20 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.4) (5:95) で分析を行ったところ、良好なピーク形状となったことから、移動相はメタノール/20 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.4) (5:95) とした。

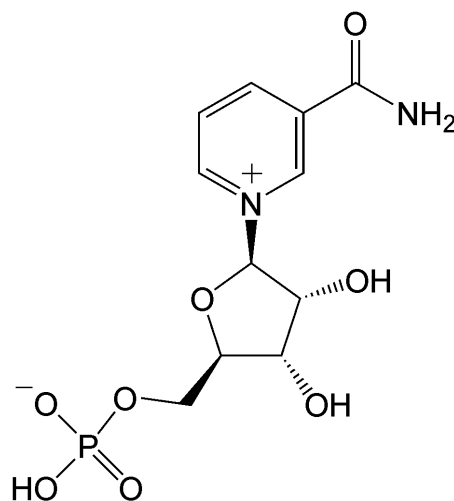


図 1 NMN の構造式

表1 各溶媒における抽出効率

	カプセル1の内容物		
	抽出液中のNMNの含有量 (%)		
	水	メタノール	移動相
1回目 ^a	96.26	96.83	96.35
2回目 ^b	2.22	2.28	3.51
3回目 ^b	0.03	0.03	0.14
合計	98.51	99.14	100.00

a 抽出液量 5 mL

b 抽出液量 2 mL

2. 抽出条件の検討

食品からの NMN の抽出には 2%アセトニトリルを含有した水¹¹⁾、クロロホルム/メタノール混液⁹⁾等が使用されている。抽出液の調製が簡易となるよう、水、メタノール及び移動相を用いて抽出条件の検討を行った。また、健康食品からの医薬品成分等の抽出では超音波抽出¹²⁻¹⁴⁾がよく用いられていることから、抽出方法は超音波抽出を用いた。

検討結果を表1に示した。3つの抽出溶媒でほぼ同様の結果が得られたことから、調製の簡易さを考慮し、抽出溶媒は水とし、抽出回数は1回目が5 mL、2回目が4 mLの計2回とした。

3. 検量線の直線性、検出限界、定量限界

0.50 µg/mL～500 µg/mL の範囲で良好な直線性 ($r^2=0.999$ 以上) が得られた。また、本分析法における検出限界は 0.15 µg/mL、定量限界は 0.50 µg/mL であった。

4. 添加回収試験

回収率は 100.2% ($n=3$)、RSD は 0.86% と良好な結果が得られた。

この結果から、本定量分析で健康食品中の NMN が十分に定量可能であると考えられた。

5. 試料への適用

本分析法を用い分析した代表的な試料の HPLC-PDA クロマトグラムを図2に、定量結果を表2に示した。なお、錠剤及びカプセルの1個の平均重量は、錠剤は10個を、カプセルは10個の内容物を測定し、その平均値を算出したものを記載した。

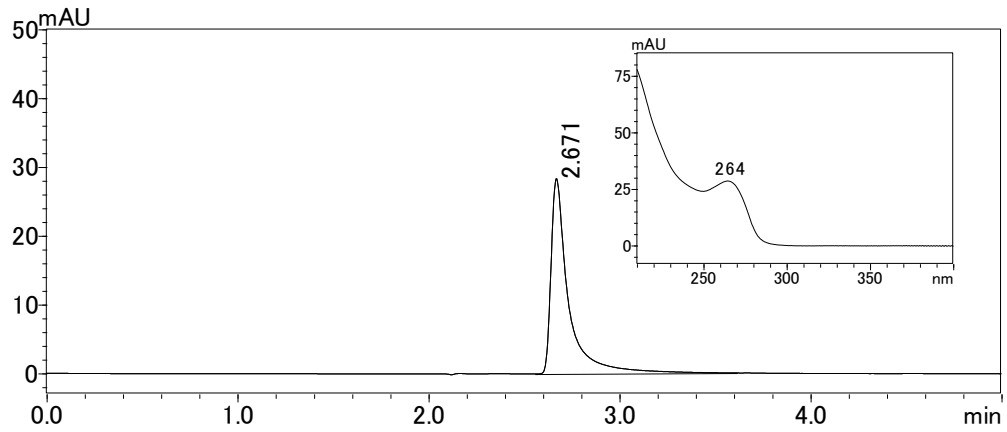
外装等に記載された1日あたりの摂取目安量の最大個数から計算される NMN の1日最大摂取量はカプセル5で 872 mg であった。農薬等の一日摂取許容量 (ADI) は、全ての毒性試験の中で最も小さい

NOAEL を安全係数 100 で割って設定される¹⁵⁾。ラットにおける NOAEL は 800 mg/kg 体重以上とされていることから、この報告⁶⁾の最小値から算出した ADI は 8 mg/kg/日となり、体重 60 kg の人の場合、480 mg となる。NMN の1日最大摂取量 872 mg という数値はこの ADI を超過することとなり、毎日摂取することで、健康被害が発生する可能性が否定できない。

今回検査した製品は内容量が 20～60 個であり、外装等に記載された1日あたりの摂取目安量は 1～4 個となっており、1週間以上の継続摂取が想定される。継続摂取による NMN の効果を報告している論文¹⁶⁾として、健常な高齢男性を対象に、NMN を1日あたり 250 mg を12週間経口投与した臨床研究があり、投与によりサルコペニアの予防効果が期待できる結果が報告されている。今回検査した製品では、1日最大摂取量が 250 mg 程度の製品は3製品 (カプセル5、6及び7) が該当した。NMN の安全性は高いと考えられているが、臨床研究に使用された量に近い量や超える量の製品が確認できた。

カプセルについては、製品の包装に NMN の1カプセルあたりの含有量を示唆・暗示した数字が記載されていた。定量により確認した NMN の含有量は、概ねそれらの数値に近い結果が得られたが、カプセル5のみ若干少なかった。また、今回は全て NMN を含有している旨が明記された製品を購入したが、NMN を含んでいない製品は確認できなかった。錠剤1及び錠剤2は NMN の含有量が少なかったが、製品の原材料表示ではマカ等の NMN 以外の成分が記載されており、そもそも NMN の含有量が少なかったと考えられた。

1) NMN 100 µg/mL



2) カプセル 1

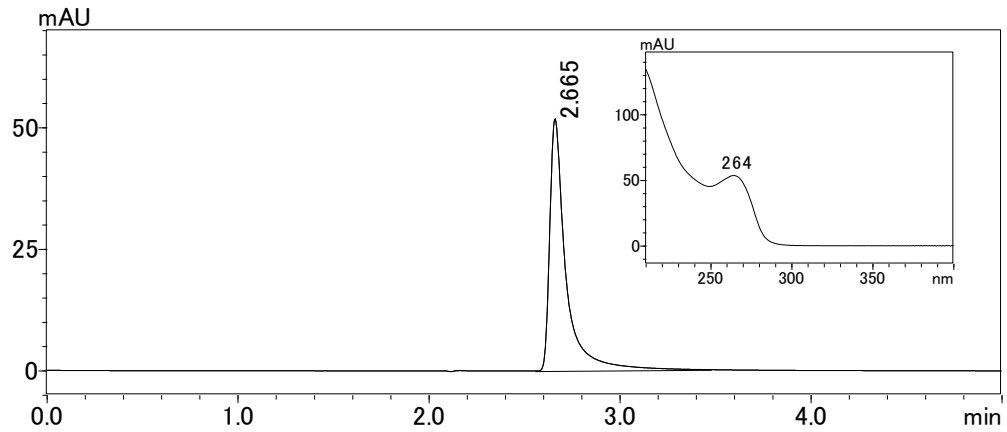


図 2 NMN 標準溶液及び代表的な試料の HPLC-PDA クロマトグラム (UV:264 nm) 及び UV スペクトル

表 2 NMN の定量結果

試料	含有量 (mg/g)	1個の平均重量 ^a (mg)	1個中の含有量 ^b (mg)	外装等に記載された含有量 (mg)	外装等に記載された1日あたりの摂取目安量 (個)	推定される1日最大摂取量 (mg/日)
カプセル 1	343.5	346	118.9 ± 1.29	125	1~2	237.8
カプセル 2	61.4	213	13.1 ± 0.46	15	1~2	26.2
カプセル 3	189.1	274	51.8 ± 1.01	55	1~2	103.6
カプセル 4	521.3	280	146.0 ± 1.08	150	1	146.0
カプセル 5	754.4	289	218.0 ± 1.38	250	4	872.0
カプセル 6	785.3	318	249.7 ± 0.45	250	1	249.7
カプセル 7	641.1	394	252.5 ± 1.41	250	1~2	505.0
錠剤1	1.3	256	0.3 ± 0.03	記載なし	1	0.3
錠剤2	1.1	304	0.3 ± 0.03	記載なし	1	0.3
錠剤3	192.1	245	47.1 ± 0.45	記載なし	2	94.2

^a n=10 (カプセルについては内容物)

^b 平均値 ± 標準偏差 (n=3)

まとめ

健康食品中の NMN について、HPLC-PDA による迅速定量分析法の構築を検討した。添加回収試験において良好な結果が得られたことから、分析法として妥当であると考えられる。また、本分析法を 10 製品に適用したところ、含有する NMN を定量することが出来た。NMN は安全性が高いと考えられているが、超高濃度の製品が流通する可能性もあり、そのような製品を摂取することで健康被害が発生する可能性も否定できない。そのため、今後も継続的に調査を続けることは有用と考えられる。

文献

- 1) Kiss T., Nyúl-Tót A., Balasubramanian P., Tarantini S., Ahire C., Yabluchanskiy A. et al.: Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation promotes neurovascular rejuvenation in aged mice: transcriptional footprint of SIRT1 activation, mitochondrial protection, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects. *Gero Science*, 40, 527-546 (2020).
- 2) Palls M., Verdagner E., Tajés M., Gutierrez-Cuesta J., Camins A.: Modulation of sirtuins: new targets for antiaging, *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 3, 61-69 (2008).
- 3) Shaikh S. B., Prabhu A., Bhandary Y. P.: Targeting anti-aging protein sirtuin (Sirt) in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis, *Journal of Cellular Biochemistry*, 120, 6878-6885 (2018).
- 4) 慶應義塾大学プレスリリース, 世界初 抗老化候補物質 NMN を、ヒトに安全に投与できることが明らかに (<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2024/1/24/240124-1.pdf>), 2025 年 4 月 22 日引用.
- 5) 食薬区分における成分本質(原材料)の取扱いの例示, 薬生監麻発 0331 第 9 号, 令和 2 年 3 月 31 日
- 6) Yu J., Shen Q., Li J.: Toxicology study profile of nicotinamide mononucleotide after acute and 90-day sub chronic dosing in Wistar rats and mutagenicity tests., *Current Research in Toxicology*, 6, 100171 (2024).
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2024.100171>
- 7) Irie J., Inagaki E., Fujita M., Nakaya H., Mitsuishi M., Yamaguchi S. et al.: Effect of oral administration of nicotinamide mononucleotide on clinical parameters and nicotinamide metabolite levels in healthy Japanese men., *Endocrine Journal*, 67, 153-160 (2020).
- 8) 長江 徳和, 塚本 友康, 小山 隆次: 逆相クロマトグラフィー用 C30 固定相の分離特性, *ぶんせき*, 10, 581-587 (2021)
- 9) Ozaki M., Shimotsuma M., Hirose T.: Separation of nicotinamide metabolites using a PBr column packed

with pentabromobenzyl group modified silica gel., *Analytical Biochemistry*, 655, 114837 (2022).

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114837>

10) Ozaki M., Shimotsuma M., Hirose T.: Separation of highly hydrophilic nicotinamide metabolites using a COSMOSIL PBr column., *MethodsX*, 10, 102061 (2023).

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102061>

11) Feng X., Zhu Y., Cheng Q., Li C., Zhang H.: Determination of β -nicotinamide mononucleotide dietary supplements by high performance liquid chromatography., *China Food Additives*, 32, 153 (2021).

12) Fukiwake T., Enomoto K., Yoshino H., Uchimoto K., Nishimura M., Ito R. et al.: Development of an analytical method for simultaneous detection of greater celandine and *Coleus forskohlii* in dietary supplements., *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, 29, 91-103 (2022).

13) 吹譯 友秀, 榎本 啓吾, 吉野 宏毅, 内本 勝也, 西村 真紀, 穉山 浩: 千葉県が買上げた健康食品から医薬品成分が検出された事例(2014年度~2021年度), *食品衛生学雑誌*, 63, 141-150 (2022)

14) 大嶋 智子, 宮本 伊織, 山口 之彦: 健康食品中の強壯、ダイエット、催眠および血糖降下薬に関連する医薬品 15 成分の液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)による一斉分析法の検討, *日本食品化学学会誌*, 17, 171-178 (2010)

15) 一日摂取許容量(ADI)とは?, 内閣府食品安全委員会 (<https://www.fsc.go.jp/iinkai/i-dai255/dai255kai-siryoku6-2.pdf>), 2025 年 6 月 11 日引用.

16) Igarashi M., Nakagawa-Nagahama Y., Miura M., Kashiwabara K., Yaku K., Sawada M. et al.: Chronic nicotinamide mononucleotide supplementation elevates blood nicotinamide adenine dinucleotide levels and alters muscle function in healthy old men., *NPJ Aging*, 8, Article number 5 (2022).

Doi: <https://doi.org/10.1038/s41514-022-00084-z>