

れている例を中心に検索した。

K の過剰症の報告はほとんどなく、UL の設定は難しい。しかし、摂取量の上限設定がないことの危険性から、Olson は K の UL を  $20 \mu\text{g}/100\text{kcal}$  と提唱した<sup>10)</sup>。成人のエネルギー所要量を  $2000\text{--}2500 \text{ kcal}$  とした場合、 $400\text{--}500 \mu\text{g}/\text{day}$  が UL となる。これはフィロキノン (K1)、メナキノン (K2) を対象とした値であり、合成品であるメナジオン (K3) は中毒症状が現れやすいためこれには適用できない。しかし、実際にはさらに高用量の K 補給によっても過剰症はほとんど見られない。乳児の出血症予防の目的で母親に高用量の K 補給をした例として、授乳期の母親へ K1 を  $2.5$  あるいは  $5 \text{ mg}/\text{day}$  6 週間経口投与した例と<sup>11)</sup>、出産前10日の妊婦に K1 を  $10 \text{ mg}/\text{day}$  2週間経口投与した例<sup>12)</sup>があるが、いずれも過剰症は認めていない。この投与によって、母体の血液、臍帯血、母乳及び乳児血液中 K1 濃度は上昇し、出血症予防の効果がみられる。また、骨粗鬆症治療の目的で、メナテトレノン (K2) を閉経後及び老人性骨粗鬆症あるいは二次性骨粗鬆症患者に対して  $15, 45, 90, 135 \text{ mg}/\text{day}$  24週間投与した試験例がある<sup>13)</sup>。この試験での副作用の発現頻度は  $15 \text{ mg}$  群 (74例中8例)、 $45 \text{ mg}$  (79例中2例)、 $90 \text{ mg}$  (72例中3例)  $135 \text{ mg}$  群 (85例中5例) となっているが、いずれも胃痛、腹痛、下痢、顔面発赤・潮紅、皮疹・薬疹、頭痛など軽度なものであり、溶血性貧血といった重篤な症状は現れない (Table 5)。また、投与量と副作用発現頻度の間に相関性は見られず、これらの投与量で骨量増加効果が認められている (Fig 2)。乳児に対する高用量の投与例として、 $3 \times 1 \text{ mg}/\text{day}$  あるいは  $2 \times 2 \text{ mg}/\text{day}$  の反復経口投与、 $1 \text{ mg}$  の単回筋肉内注射などがあるが、この投与方法での過剰症も報告されていない<sup>14)</sup>。Omaye<sup>9)</sup> は、乳児の中毒発現量を  $5\text{--}10 \text{ mg}/\text{day}$ 、早産児の中毒量を  $10 \text{ mg}/\text{day}$  とし、成人に対しては過剰症が見られないとし

ている (Table 6)。

#### D. 考 察

D は小腸からのカルシウム吸収と正常な骨形成維持に必要とされ、また、癌細胞の増殖抑制、正常細胞への分化誘導活性を有する。D の所要量は、6歳~成人で  $2.5 \mu\text{g}/\text{day}$ 、妊娠期・授乳期及び0~5歳で  $10 \mu\text{g}/\text{day}$  と定められている、国民栄養調査の結果、日本人は平均  $10 \mu\text{g}/\text{day}$  の D を摂取しており、所要量を満たしている。しかしながら、閉経後発症する骨粗鬆症の予防や骨量減少の抑制において、十分な D 補給が重要であるとの知見が近年相次いで報告され、現在の所要量では不十分であると考えられ始めている。調査結果で示したように、 $50 \mu\text{g}/\text{day}$  の投与では血中 D 代謝物濃度に異常は認められず、高 Ca 血症も惹起されない。小児においては、 $42.5 \mu\text{g}/\text{day}$  では問題ないが、 $100 \mu\text{g}/\text{day}$  投与で血中  $1,25\text{-D}$  濃度が正常値上限に達する。従って、D の UL としては  $50 \mu\text{g}/\text{day}$  が適当ではないかと判断した。

K は、豆類、油類あるいはハウレン草などの緑黄色野菜に含まれる K1 (フィロキノン) と腸内細菌や微生物が産生する K2 (メナキノン) があり、K2 には側鎖長の異なるいくつかの同族体が存在する。普段我々が摂取する K は、主に K1、K2 であり、米国では1日当たり約  $60\text{--}200 \mu\text{g}$  が摂取されている<sup>15)</sup>。納豆や豆類を多く摂取する日本の食生活においても、K の1日必要量は食事から充分補給されていると考えられる。しかし、乳児の出血症予防あるいは骨粗鬆症予防の目的において、妊婦や高齢者の K の栄養補給はさらに重要と考えられる。今回の調査結果から、成人に対しては最高  $135 \text{ mg}/\text{day}$  の K が投与されているが、明らかな過剰症は発現していない。乳児に対しては、 $4 \text{ mg}/\text{day}$  の投与量は一応安全と判断できる。このような結果から、K の UL の設定は困難であるが、少なくとも  $15\text{--}135 \text{ mg}/\text{day}$  の投与でに

軽度ながら、腹痛、頭痛、顔面発赤・潮紅、皮疹・薬疹などの症状を示すことから、これ以上の摂取は控えるべきではないかと推察される。

#### E. 結 論

D 及び K の UL について文献調査を行った。D の UL について、高Ca血症を示さず血中 25-D 及び 1,25-D 濃度が正常範囲内であることを評価基準として検討した結果、50 µg/day が適当であると判断した。K については、過剰症の報告がほとんどないことから明確な UL を導くことが困難であったが、15 mg/day 以上の摂取は注意を要する必要があると判断された。

#### F. 文 献

- 1) Endocrine J, 1994, 41, 329-37, Sato K et al
- 2) J Nutr, 1989, 119, 1639-46, Takeuchi A et al
- 3) Acta Vitaminol Enzymol 1984, 6, 77-82, Riis B et al.
- 4) Am J Clin Nutr 1990, 52, 701-6, Himmelstein S et al
- 5) N Eng J Med 1992, 326, 1173-7 Jacobus CH et al
- 6) J Toxicol Clin Toxycol, 1998, 36, 719-21, Lee DC et al
- 7) Acta Pediatr Scand 1984, 73, 225-31, Markestad T et al
- 8) J Nutr, 1989, 119, 1825-8, Chesney RW
- 9) Adv Exp Med Biol, 1984, 177, 169-203 Omaye ST
- 10) J Nutr, 1989, 119, 1820-4, Olson JA
- 11) Pediatrics, 1997, 99, 88-92 Marshall GFR et al
- 12) Obstet Gynecol, 1993, 81, 251-4, Anai T et al
- 13) 新薬と臨床, 41, 1249-79, 折茂肇 他
- 14) Eur J Pediatr 1997, 156, 126-30, Comelissen M et al
- 15) J Nutr, 1998, 128, 785-8, Booth

Table 1 - Indices of calcium metabolism in the three groups before and after 1 year of treatment. Initial values are given as mean  $\pm$  1 SD. Integrated values obtained from examinations during the treatment period are given in per cent (see text). Furthermore the normal levels in premenopausal women are given (mean  $\pm$  1 SD).

Measured variables	D <sub>3</sub> (50 $\mu$ g/day)		1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> 1 $\alpha$ -OHD <sub>3</sub> (0.25 $\mu$ g/day)		Placebo		Normal values in premenopausal women
	t <sub>0</sub>	change %	t <sub>0</sub>	change %	t <sub>0</sub>	change %	
S-calcium (mmol/l)	2.38 $\pm$ 0.06	***103 $\pm$ 2	2.43 $\pm$ 0.06	**103 $\pm$ 2	2.45 $\pm$ 0.07	100 $\pm$ 4	2.37 $\pm$ 0.07
S-phosphate (mmol/l)	1.09 $\pm$ 0.11	105 $\pm$ 10	1.23 $\pm$ 0.11	102 $\pm$ 13	1.13 $\pm$ 0.11	103 $\pm$ 12	1.28 $\pm$ 0.16
S-alk. phos. (U/l)	165 $\pm$ 47	96 $\pm$ 15	142 $\pm$ 28	111 $\pm$ 23	175 $\pm$ 59	99 $\pm$ 19	125 $\pm$ 34
U-calcium (mmol/mmol Cr)	0.65 $\pm$ 0.15	***145 $\pm$ 41	0.58 $\pm$ 0.19	**116 $\pm$ 31	0.67 $\pm$ 0.16	118 $\pm$ 27	0.19 $\pm$ 0.18

\*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001.

Table 2 - Concentrations of vitamin D metabolites in the three treatment groups before and after 1 year of treatment. All values are given as mean  $\pm$  1 SEM. Furthermore normal levels are given (mean).

Measured variables	D <sub>3</sub> (50 $\mu$ g/day)		1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> / 1 $\alpha$ -OHD <sub>3</sub> (0.25 $\mu$ g/day)		Placebo		Normal values
	t <sub>0</sub>	t <sub>4</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>4</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>4</sub>	
25OHD <sub>3</sub> (ng/ml)	13 $\pm$ 2	** 48 $\pm$ 2	25 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4	24 $\pm$ 4	22 $\pm$ 3	29
24,25(OH) <sub>2</sub> D (ng/ml)	1.9 $\pm$ 0.2	**6.2 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 0.7	3.7 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.5	2.8
1,25(OH) <sub>2</sub> D (pg/ml)	28 $\pm$ 2	30 $\pm$ 4	24 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3	29 $\pm$ 4	30

\*\* = p < 0.01.

Table 3

Serum biochemistry values after treatment with placebo or vitamin D in control and vitamin D-treated groups\*

	Week -2	0	2	4	6	7
25(OH)D (ng/mL)						
Control group	17.5 $\pm$ 1.7	20.0 $\pm$ 2.0	19.5 $\pm$ 2.2	19.3 $\pm$ 2.1	18.9 $\pm$ 1.9	18.9 $\pm$ 2.3
Vitamin D group	14.3 $\pm$ 2.0†	16.2 $\pm$ 1.9	23.8 $\pm$ 2.2‡	29.4 $\pm$ 2.9‡	31.5 $\pm$ 2.2‡	32.0 $\pm$ 2.7 ‡
1,25(OH) <sub>2</sub> D (pg/mL)						
Control group	28.2 $\pm$ 2.2	12.9 $\pm$ 2.4	26.7 $\pm$ 2.4	26.9 $\pm$ 2.0	25.4 $\pm$ 2.9	24.7 $\pm$ 2.1
Vitamin D group	28.0 $\pm$ 2.2	24.4 $\pm$ 2.3	29.4 $\pm$ 2.4	29.2 $\pm$ 2.1	25.2 $\pm$ 2.3	27.5 $\pm$ 3.1
PTH (pmol/L)						
Control group	6.76 $\pm$ 0.99	5.92 $\pm$ 0.58	5.58 $\pm$ 0.46	5.62 $\pm$ 0.69	5.04 $\pm$ 0.56†	4.38 $\pm$ 0.53 †
Vitamin D group	8.96 $\pm$ 1.56†	6.53 $\pm$ 0.58	5.73 $\pm$ 0.43†	5.30 $\pm$ 0.44†	4.51 $\pm$ 0.45†	4.17 $\pm$ 0.46 †
BGP (nmol/L)						
Control group	0.95 $\pm$ 0.16	0.86 $\pm$ 0.16	0.84 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.14	1.02 $\pm$ 0.14	0.81 $\pm$ 0.10
Vitamin D group	0.90 $\pm$ 0.10	0.86 $\pm$ 0.10	0.81 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.12†	0.72 $\pm$ 0.12
Calcium (mmol/L)						
Control group	1.21 $\pm$ 0.01	1.26 $\pm$ 0.02	1.22 $\pm$ 0.02	1.24 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.01	1.27 $\pm$ 0.02
Vitamin D group	1.25 $\pm$ 0.01	1.26 $\pm$ 0.02	1.26 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.03†	1.27 $\pm$ 0.03	1.30 $\pm$ 0.02

\*  $\bar{x}$   $\pm$  SEM.

† Significantly different from week 0, P < 0.05 (paired t test).

‡ Significantly different from control, P < 0.0001 (paired t test).

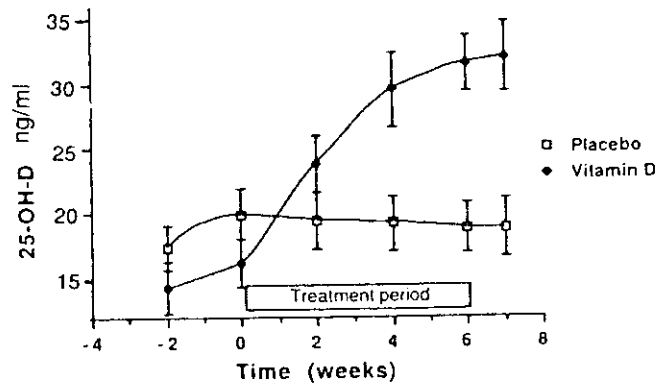


Fig. 1 Effect of vitamin D supplement (50 µg/d) or placebo on serum 25(OH)D ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

Table 4 Vitamin D

Recommended Intake	Therapeutic Dose	Toxic Concentration
10 µg/day	<u>Infants</u> 75 µg/day <u>Adults</u> 3,750 µg/day	<u>Acute:</u> 25 - 75 µg/kg/day <u>Chronic:</u> 250 - 12,500 µg/day
Therapeutic Uses	Toxic Symptoms	
Prophylaxis of rickets Hypoparathyroidism Adult osteomalacia,	<u>Acute:</u> Anorexia, nausea, vomiting, diarrhea, headache, polyuria, polydipsia. <u>Chronic:</u> Weight loss, pallor constipation, fever, hypercalcemia, calcium deposits in soft tissues.	

Table 5 副作用の内訳

群	15mg 群	45mg 群	90mg 群	135mg 群	A 群
症 例 数	74	79	72	85	81
発 現 例 数 (%)	8 (10.8)	2 (2.5)	3 (4.2)	5 (5.9)	2 (2.5)
発 現 件 数 (%)	9 (12.2)	2 (2.5)	4 (5.6)	7 (8.2)	2 (2.5)
消化器系症状	胃 痛	2			1
	胃部不快感		1	1	
	心窩部痛	1			2
	腹痛	1 <sup>1</sup>		1 <sup>2</sup>	
	下痢	1 <sup>1</sup>	1		
	胸やけ 嘔気	1			1 <sup>3</sup>
皮膚症状	顔面発赤・潮紅	1			1 <sup>4</sup>
	皮疹・薬疹	1		1	
	皮膚掻痒感			1 <sup>2</sup>	
神経中枢症状	頭痛				1 <sup>4</sup>
	頭重感				1
	ふらつき				1 <sup>3</sup>
その他	口の中が苦い	1			

同一症例で2件以上の症状が重複している場合は、同一症例であることを例数の右肩の数字で示した。

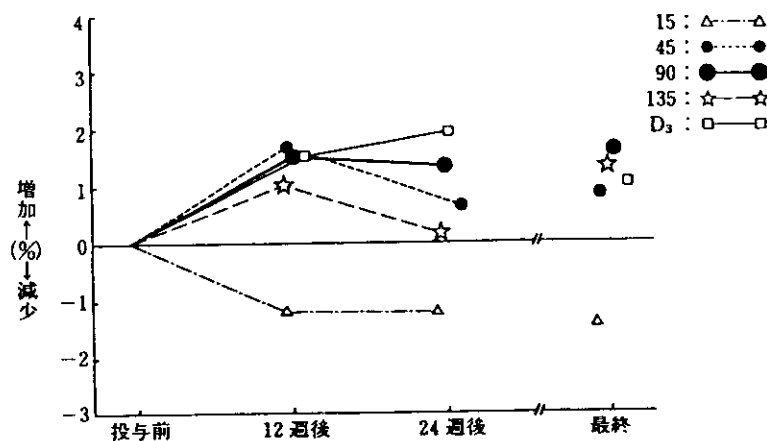


Fig. 2 骨粗鬆症患者に15, 45, 90, 135 mg/日のビタミンK<sub>2</sub>を投与した際の中指骨皮質幅の経時的変化

Table 6 Vitamin K

Recommended Intake	Therapeutic Dose	Toxic Concentration
Easy to meet needs by diet and gut bacteria synthesis.	1-10 mg	<u>Infants:</u> 5-10 mg/day (ip) <u>Premature Infants:</u> 10 mg/day
Suggested intake of 70-140 µg/day.		<u>Adults:</u> Essentially nontoxic.
Water-soluble Menadione is toxic at 5-10 mg dose level.		

Therapeutic Uses	Toxic Symptoms
Bleeding associated with Vitamin K deficiency. Biliary obstruction or fistula. Malabsorption syndromes. Hepatocellular disease. Drug induced hypoprothrombinemia.	<u>Infants:</u> Hemolytic anemia, hyperbilirubinemia, kernicterus. <u>Premature Infants:</u> Kernicterus.

Water-soluble menadione can produce anemia, skin irritation, polycythemia, splenomegaly, renal and hepatic damage, and death. Also implicated in hemolytic anemia, hyperbilirubinemia, and kernicterus. Menadione can induce erythrocyte hemolysis in individuals with genetic defect in glucose-6-phosphate dehydrogenase.

## 平成10年度研究報告書

分担研究課題 ビタミンCと水溶性ビタミンの安全性評価に関する研究

分担研究者 大塚 恵（お茶の水女子大学生生活科学部助教授）

研究要旨 実験動物に対するビタミンC多量投与による白血球機能の変化について、短期投与および長期投与の効果を調べた。モルモット白血球の走化性を指標としてビタミンC過剰摂取、正常摂取、欠乏の3群について走化性を調べたところ、過剰のビタミンC投与では走化性に変化は認められなかった。一方、ビタミンCの長期多量投与による実験動物の成育および白血球機能の変化については、100週齢までの飼育期間中、体重増加、外観、死亡率において顕著な異常は認められなかった。さらに、長期多量投与の場合には正常に比べ白血球の走化性は高い値を維持し、また、走化性は加齢に伴って低下するが多量投与はこれを緩和する傾向がみられたが、統計的には有意な差は認められなかった。

### A 研究目的

成人のビタミンC所要量である50 mgは、通常の摂取内の範囲での体内貯留量を平均1500 mg、代謝回転率を平均3%とし、吸収率、若干の安全率を見込んで設定されている。国民栄養調査（平成8年度）によれば、ビタミンCの摂取量は一日一人当たり131 mgであるが、各個人の生活環境に由来する要因によって体内のビタミンC濃度が低下し、また、ビタミンCの多様な生理作用を効果的に利用するには、より多くの摂取が必要とされる場合もある。

ここでは、実験動物への「ビタミンC大量投与による白血球機能の変化」について、短期投与および長期投与の実験結果について報告する。

### B 研究方法

#### 1) モルモット白血球走化性に及ぼすビタミンC投与の影響（短期実験）

ビタミンC摂取量の違いによる白血球走化性

への影響を調べるため、モルモット18匹を3群にわけ、過剰群、正常群、欠乏群とした。いずれも、市販固形飼料で4日間予備飼育後、ビタミンC欠乏飼料（日本クレア製モルモット用特殊飼料）を与え、高AsA群にはビタミンCを一日100 mg/匹、正常群には5 mg/匹、欠乏群には0.1 mg/匹を経口投与し、2週間及び3週間飼育を行った。飼育期間終了後、ネブタール麻酔したモルモットを開腹して腹部大動脈より採血した。ヘパリン加血と6%デキストランを加えて混和し血漿層を分離し、Ficoll-Paqueの上に重層して室温で遠心後、沈渣より赤血球を溶血させて多形核白血球を調製した。細胞数はThomaの血球計算板を用いて顕微鏡により算定した。ビタミンCの濃度は高速液体クロマトグラフィーにより測定した。走化性の測定には、2つの方法を用いた。アガロースプレート法はアガロースプレート内で移動した細胞を染色し、その距離を測定する方法であり、ポイデン法はケモタキシスチャンバーのメンブランフィルタ

ーに付着した細胞を染色し、細胞数を算定する方法である。走化性因子には、細菌由来の合成ペプチド FMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine) をDMSOに溶解して $10^{-8}$  Mで使用した。

## 2) モルモット白血球走化性に及ぼす多量ビタミンC投与の影響 (長期実験)

ビタミンC摂取の違いによる長期ビタミンC投与の影響を調べるため、3週齢のモルモットを正常群と多量投与群にわけて63週齢まで飼育を行った。飼料は、ビタミンC含有量の異なる3種の特殊飼料(1kgの飼料中にビタミンCを4 mg, 202 mg, 1700 mg含有)を用いて、正常群には一日5 mg/匹、多量投与群には一日100 mg/匹の摂取となるよう前日の飼料摂取量をもとに混合して与えた。5週毎に各群より6匹を選び、ネンブータル麻酔後解剖して採血を行った。白血球数、白血球中のビタミンC濃度の測定は短期の場合と同様に行った。走化性については走化性とランダム運動が同時に測定可能であること、再現性に富むなどの利点のあるアガロースプレート法により測定した。

## C 研究結果

1) 短期投与実験の結果:白血球数と白血球内のビタミンC濃度をFig.1に示す。飼育2週間の白血球数は、ビタミンC過剰群および欠乏群では正常群に比べ有意に高い値を示したが、飼育3週間において過剰群でやや高い値をしめしたものの統計的には有意な差は認められなかった。また、ビタミンC濃度は欠乏群で2週間、3週間と有意に低くなっているが、過剰群と正常群では有意差はなかった。このことから、白血球中のビタミンC濃度の上昇には3週間以上の投与が必要であることが推察された。一方、白血球数とビタミンCの濃度の間

には弱い負の相関が認められた(Fig.2,  $r = -0.528$ ,  $p < 0.05$ )。

アガロース法とポイデン法による走化性の結果をFig.3に示す。アガロース法では飼育2週間で過剰群および欠乏群で有意に低い走化性を示したが、3週間では違いは認められなかった。これは、白血球数における変化とパラレルの結果であった。一方、ポイデン法では、2週間の欠乏群においてのみ有意に低い値が得られた。アガロース法による走化性の結果とビタミンC濃度の関係をFig.4に示す。これより、ビタミンC濃度の低い場合には走化性の低くなることが推察された。

2) 長期投与の結果: 期間中の体重変化をFig.5に、死亡した動物の匹数をFig.6に示す。過剰群と正常群いずれにおいても定期的に2-3匹の動物の死亡することが観察された。

経日的な白血球数の変化をFig.7に、白血球ビタミンC濃度をFig.8に、走化性をFig.9に示す。加齢とともに白血球数は増加しており、過剰群は正常群に比べてやや低い値を推移したが、43週齢を除き有意な差は認められなかった。一方、ビタミンC濃度は投与10週目(13週齢)までは両群に顕著な差は認められなかった。しかし、投与15週目で有意に高い値を示し、その後40週目でピークとなり、その後ほぼ高いビタミンC濃度が維持された。走化性の結果は、33週齢でピークとなり、その後加齢に伴って徐々に低下した。過剰群ではやや走化性の高い傾向が認められたが、53週齢を除き有意な差は認められなかった。

期間中の両群の組織中ビタミンC濃度をFig.10に示す。過剰群ではいずれの組織においても経日的に高い濃度が維持された。また、副腎、脳を除く組織では、白血球に比べて早い段階で、過剰群の組織内ビタミンC濃度が高くなり、飼育5週目で顕著な差が認められた。



## D 考察

モルモットの白血球走化性を指標として、短期および長期の過剰投与について検討した。モルモットの正常な成育には2 mg/日/匹が必要であるという報告に基づき、5 mgのビタミンCを投与する群を正常として用い、また、その20倍の濃度を過剰群として実験を行った。

短期投与の初期段階で、過剰、欠乏ともに白血球数および走化性の増加がみられたが、これはビタミンCの過剰投与あるいは欠乏が一種のストレスとなったためではないかと推察される。また、細胞内のビタミンCは欠乏により比較的すみやかに減少するが、過剰に投与しても増加はみられず、経口投与の場合には白血球内ビタミンCレベルの増加には長期を必要とすることが考えられた。

長期投与ではビタミンC含有飼料を用いたが、この場合においても白血球内の濃度が有意に増加するためには5週間以上を要した。加齢に伴う変化として白血球数の増加および走化性の減少がみられ、細胞数は増加しても個々の細胞の機能は低下することが明らかとなった。また、ビタミンCの過剰投与では統計的に有意ではないが、走化性がやや高く細胞数はやや低い傾向がみられたことから、長期の動物実験ではビタミンCの過剰投与により、加齢にともなって進行する細胞機能の低下を緩和する可能性が示唆された。

## E 結論

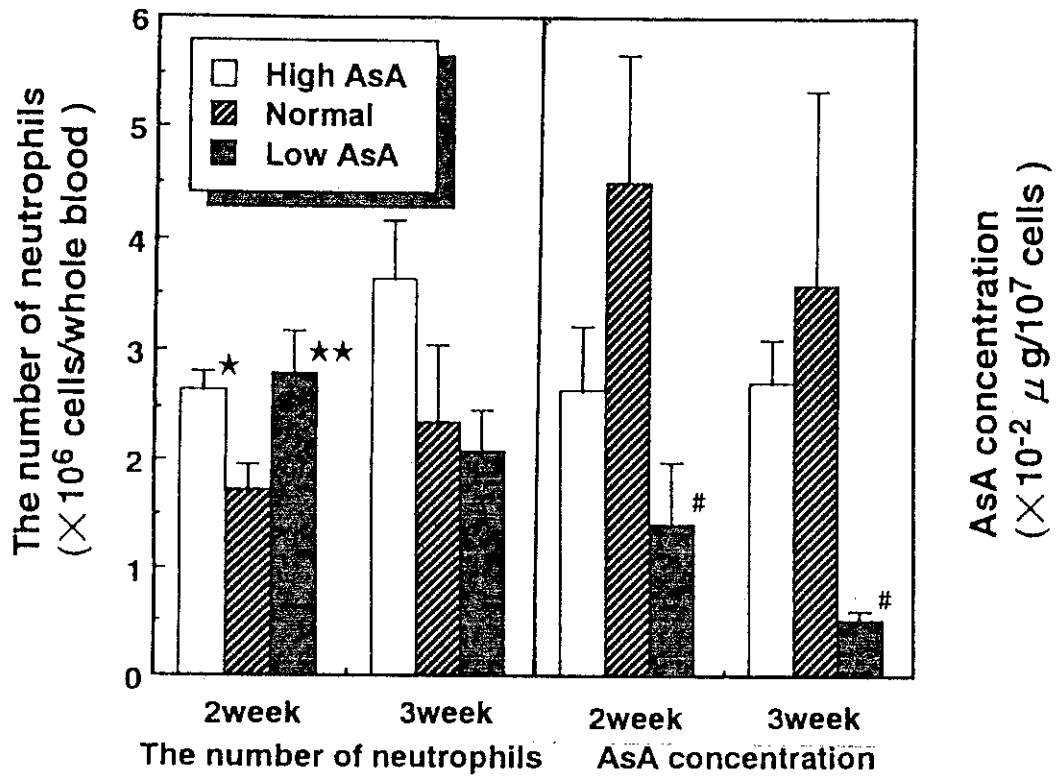
実験動物に対するビタミンC多量投与による白血球機能の変化について、短期投与および長期投与の効果を調べた。モルモット白血球の走化性を指標として過剰、正常、欠乏の3群について走化性を調べたところ、過剰のビタミンC投与では走化性に変化は認められなかった。一方、ビタミンCの長期多量投与に

よる実験動物の成育および白血球機能の変化について調べることを目的とした。その結果、100週齢までの飼育期間中、体重増加、外観、死亡率において顕著な異常は認められなかった。長期多量投与の場合には正常に比べ白血球の走化性は高い値を維持した。さらに、走化性は加齢に伴って低下するが多量投与はこれを緩和する傾向がみられた。

## F 研究発表

### 論文発表

- 1) Effect of high concentration of ascorbate on catalase activity in cultured cells and tissues of guinea pigs. Nemoto S., Otsuka M., Arakawa N. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 43(3), 297-309, 1997
- 2) The Effect of L-ascorbic acid on age-related changes of pyridinoline in cartilage collagen of guinea pigs. Kim M-Y., Otsuka M., Shimamura E., Arakawa N. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 44(2) 217-224, 1998
- 3) ビタミン研究のブレイクスルー：「ビタミンC」(2) コラーゲン生合成におけるビタミンCの役割 大塚恵、荒川信彦 ビタミン73(2) 99-101, 1998



MEAN  $\pm$  SE

Significantly different from Normal group

(\*:P<0.001, \*\*:P<0.05, #:P<0.001)

Fig. 1 The number of neutrophils and AsA concentration in neutrophils of guinea pigs

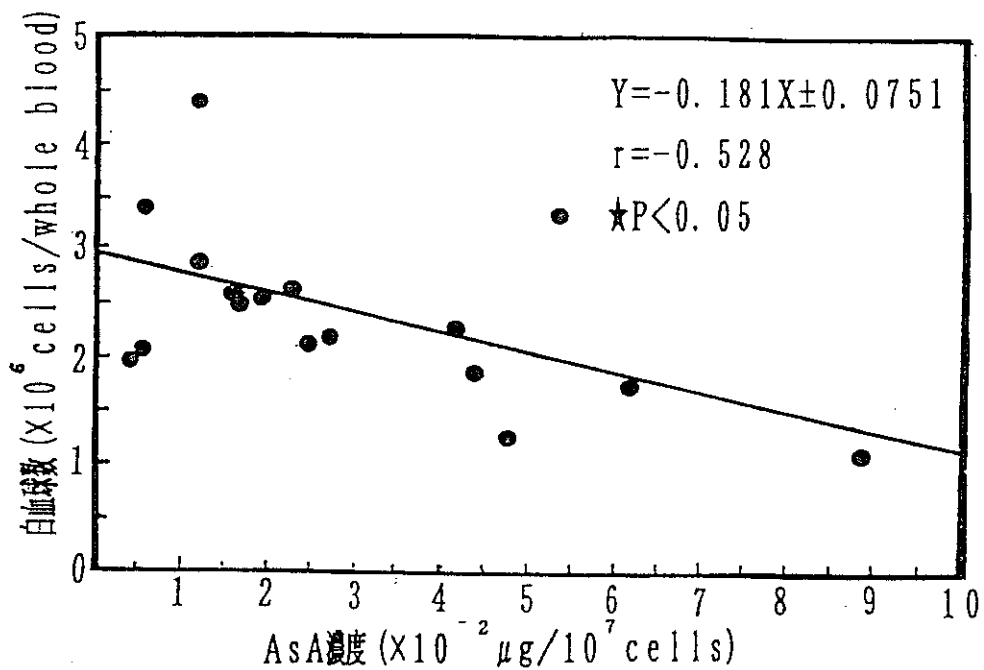


Fig. 2 モルモットの白血球中AsA濃度と白血球数の相関性

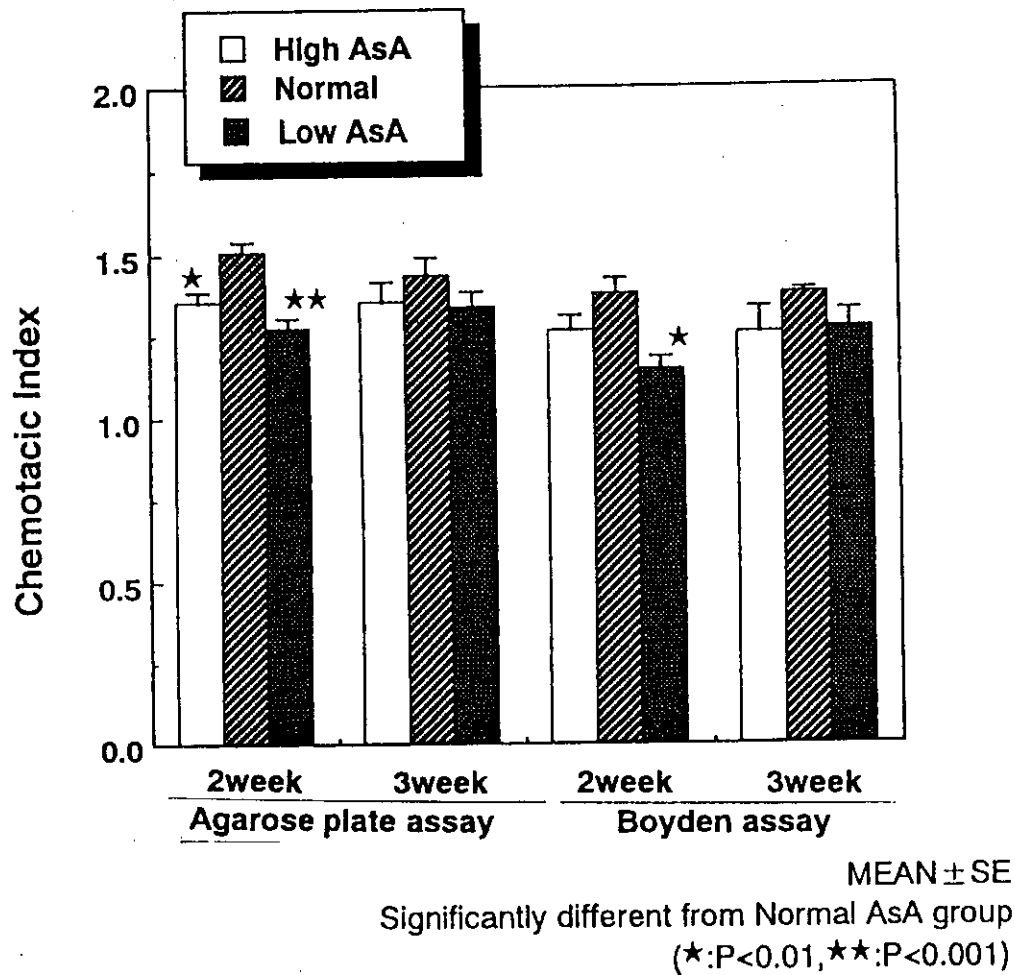


Fig. 3 Chemotactic index of high and low ascorbate neutrophils by agarose plate assay and Boyden assay

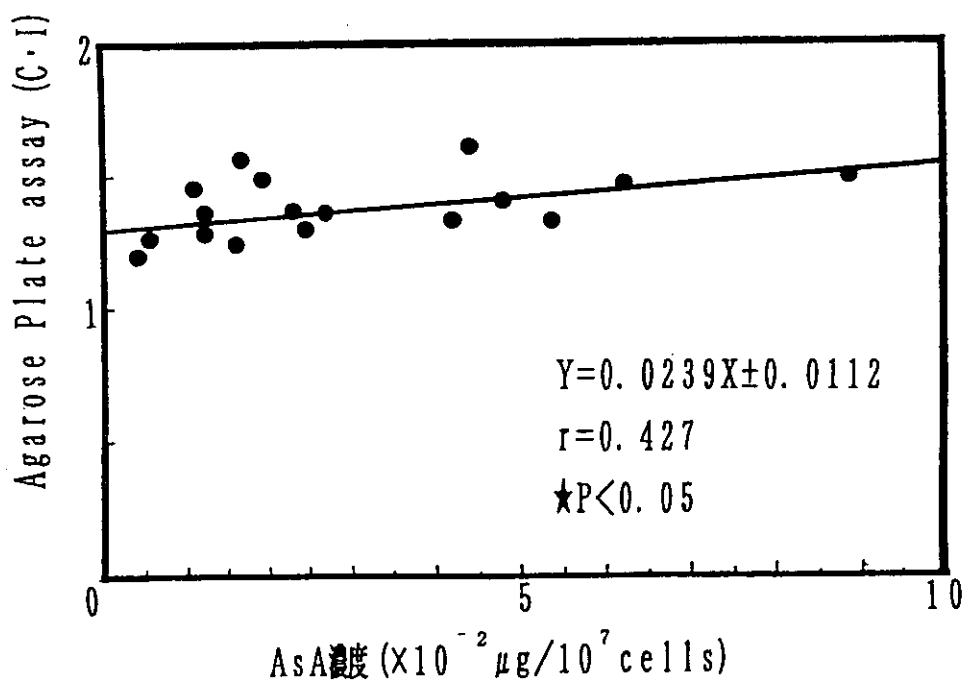
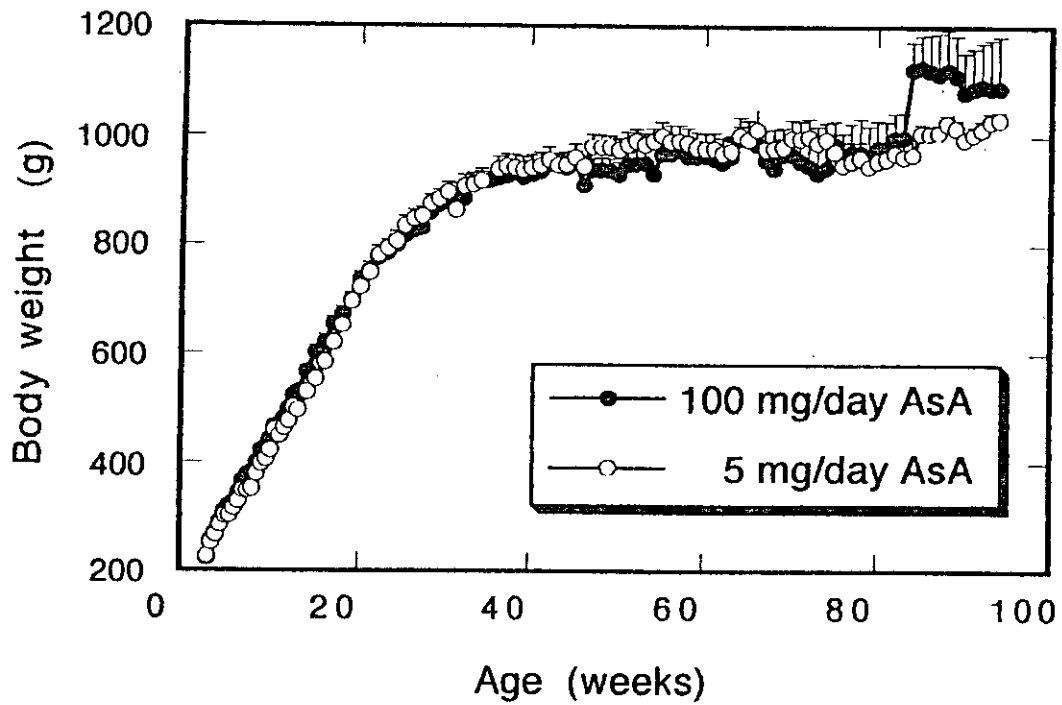
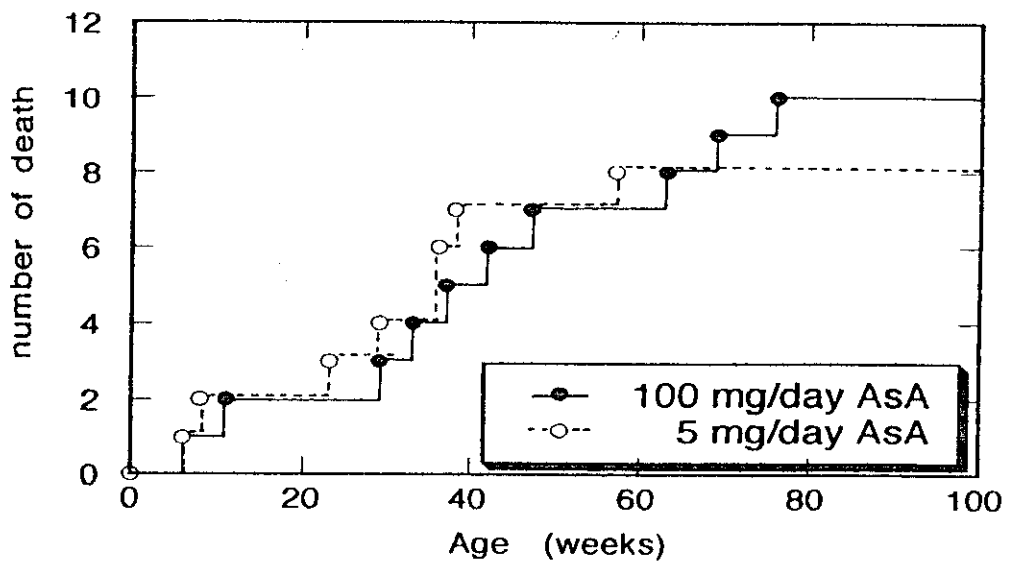


Fig. 4 白血球中のAsA濃度と走化性の相関性  
(Agarose Plate 法)



**Fig. 5 Growth curve of guinea pigs supplemented with ascorbic acid**

Number of animals as follows; 1-10w:70, 11-20w:60, 21-30w:40, 31-40w:35, 41-50w:30, 51-60w:25, 61-70w:20, 71-83w:10, 84-94w:4



**Fig. 6 Number of death in guinea pigs supplemented with ascorbic acid as a function of age**

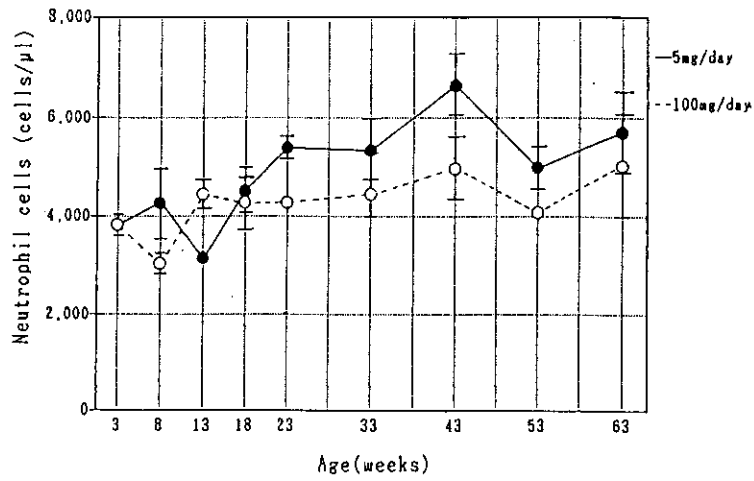


Fig. 7 Changes in the number of neutrophil cells from guinea pigs

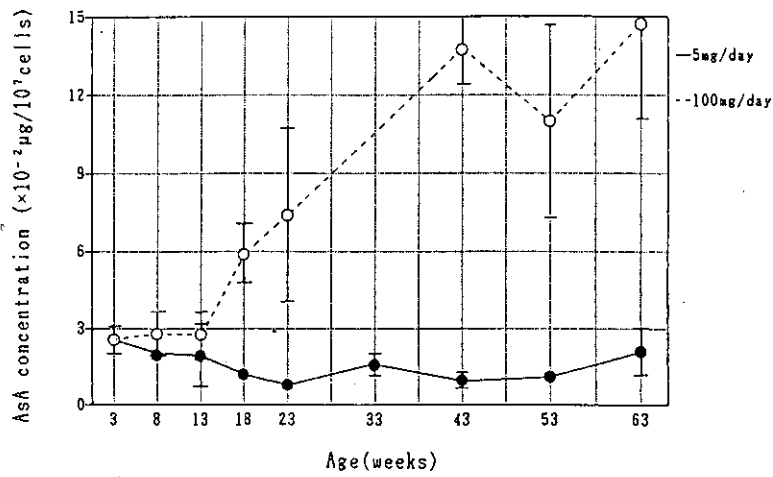


Fig. 8 Changes in AsA concentration in neutrophil cells from guinea pigs

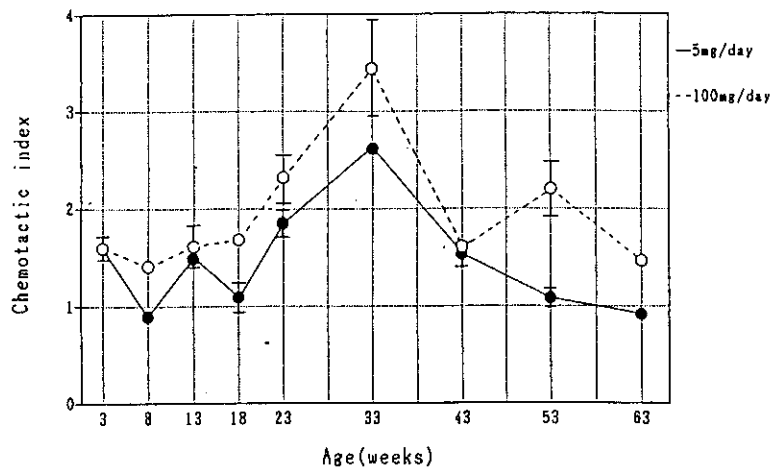


Fig. 9 Changes in chemotactic index by agarose plate assay

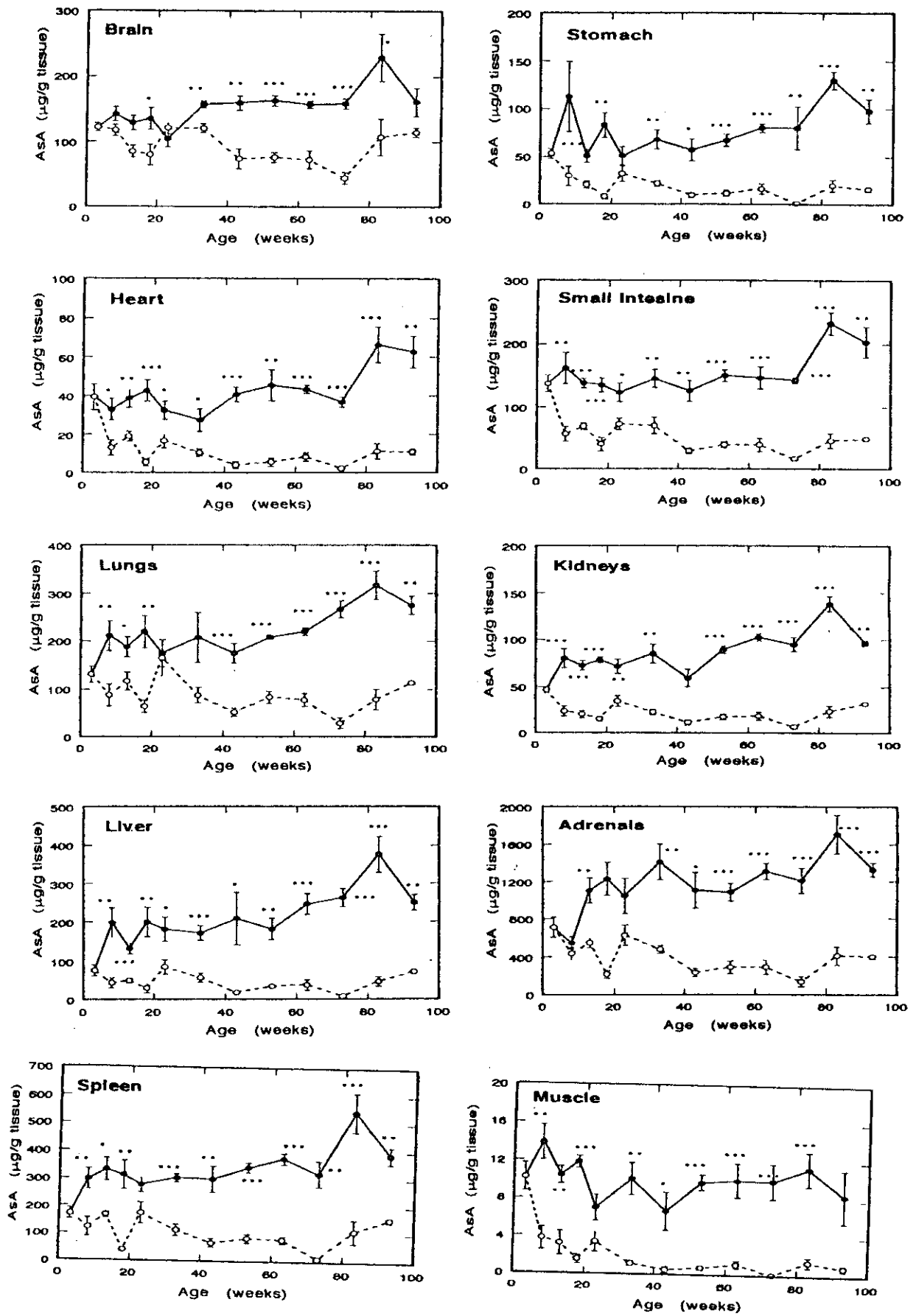


Fig. 10

Changes in ascorbic acid concentration in the various tissues of guinea pigs as a function of age

—●— 100 mg/day AsA      - - -○- - - 5 mg/day AsA

Values are means  $\pm$  SE of 6 in each age.

Significantly different from the value of 5 mg/day group (\*\*\*:p<0.001, \*\*:p<0.01, \*:p<0.05).

**研究要旨** ビタミンE大量投与時のラット肝細胞内特異的輸送タンパク質  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ TTP) のタンパクおよび mRNA 発現は抑制されること、また、欠乏時には mRNA 発現は増加すること、すなわち、体内  $\alpha$ -トコフェロール濃度を一定に維持する調節機構が存在することが明らかとなった。

分担研究者 玉井 浩 大阪医科大学教授

量がどのように変化するのかを検討したものである。

#### A. 研究目的

ビタミンEは抗酸化作用を有するため、フリーラジカル傷害により引き起こされる様々な疾患に対して有効な治療薬と考えられている。ビタミンEの肝細胞内特異的輸送タンパク質、 $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ TTP) が同定されて生体内での輸送システムが解明されつつあり、また、以前より家族性に血中ビタミンE値が低く神経障害をきたす疾患群が存在し、この疾患が $\alpha$ TTPをコードする遺伝子の異常が原因であることが明らかにされてからは、ビタミンEの体内動態を決定する因子として、この $\alpha$ TTPが大きな注目を集めている。また、最近では発癌や虚血性心疾患の予防のためのビタミンE製剤の長期大量摂取ブームが存在するが、本研究では、 $\alpha$ TTPが生体内でのビタミンE量を規定する因子の一つであるならば、ビタミンEが大量に投与された時、その調節機構として $\alpha$ TTP

#### B. 研究方法

a) ビタミンE欠乏・強化およびコントロールラットの作成

ウィスター系雄ラット各4匹ずつをビタミンE欠乏食、コントロール食(dl- $\alpha$ -tocopherol 50mg/kg) およびビタミンE強化食(dl- $\alpha$ -tocopherol 600mg/kg) にて20週間飼育したものをを用いた。

b)  $\alpha$ TTP 発現

(1)  $\alpha$ TTP タンパク発現 (Western Blot Analysis)

エーテル麻酔を施したラットを断頭後、開腹し肝臓を buffer A (0.25M sucrose, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.4) にて灌流し取り出し、速やかに細切し、2.3 容の buffer A を加えてホジェネイトした。ホモジェネイト液を 10,000 g にて 60 分間遠心し細胞質画分を調整し、SDS-PAGE

を行いニトロセルロース膜に転写後、この膜を抗 $\alpha$ TTPモノクローナル抗体を用いて Western blotting を行い、洗浄後アルカリフォスファターゼと結合したヤギ抗マウス 2 次抗体と incubate させ発色バッファーにて発色させた。2 次抗体および発色バッファーは Bio-Rad 社製のものを用いた。

#### (2) $\alpha$ TTP mRNA 発現 (Northern Blot Analysis)

ラット肝臓より acid guanidine thiocyanate 法により total RNA を抽出し、total RNA 10 $\mu$ g を 0.1%アガロースゲルにて泳動しナイロン膜に転写した。total RNA を含むナイロン膜を 60 $^{\circ}$ C、5XSSC、50%ホルムアミドの条件で 5X Denhard's solution , 250  $\mu$ g/dl salmon sperma DNA、0.1% SDS, 50 mM sodium phosphate(pH6.5)、および標識した cDNA をプローブとして加えた溶液にてハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識は random primer 法にて行った。ハイブリダイゼーションを行ったナイロン膜を室温、2XSSC、0.1%SDS 溶液にて 5 分間を 2 回、さらに 65 $^{\circ}$ C、0.1%SDS 溶液にて 20 分間洗浄しバイオイメージアナライザーにて解析した。

#### c) 血漿ビタミン E の測定

#### (1) 血漿

6 時間の絶食後にヘパリン加採血し遠心して得た血漿 0.5ml を褐色スピッツにとり、0.27mM の EDTA を含んだリン酸バッファー、6%ピロガロールエタノール溶液を 0.5ml 各々加える。内標物質として 0.2%トコロールエタノール溶液を 1ml 加え振盪する。60%KOH を 0.2ml 加えケン化した後ヘキサンにて抽出しエバポレイションした後エタノールに再溶解し、電気化学検出器を装着した HPLC にて $\alpha$ 、 $\gamma$ -トコフェロールを測定した。HPLC 条件はカラム:IRIKA RP18 (250X4mm)、移動相:メタノール/水/ $\text{NaClO}_4$  (1000/2/7, v/v/w) である。

#### (2) 肝臓中ビタミン E

リン酸バッファーにて灌流後に肝組織を取り出しホモジェナイズ後、得られたサンプルを血漿に準じてケン化、抽出し測定した。得られた値は含有蛋白濃度あたりで表わした。

### C. 結果

#### a) 血漿および肝臓中ビタミン E 含量

表-1 に示すごとく、ビタミン E 欠乏ではコントロールに比べ血漿および肝臓中ビタミン E 含量は低下し、ビタミン E 強化では増加した。

#### b) 肝臓中 $\alpha$ TTP 蛋白および $\alpha$ TTP



## mRNA 発現

図-1に示すごとく、ビタミンE強化食群では $\alpha$ TTP蛋白および $\alpha$ TTP mRNAともにその発現は抑制された。

ビタミンE欠乏食群では $\alpha$ TTP mRNAの発現は増加したが、 $\alpha$ TTP蛋白の発現はコントロールと差はなかった。

## D. 考察

ビタミンEは小腸で吸収され、キロミクロンに組み込まれた後、肝臓に運ばれる。肝細胞内で $\alpha$ TTPによって $\alpha$ -トコフェロールは運搬され、VLDLとともに血漿中に分泌される。 $\alpha$ TTPと結合できなかった過剰のトコフェロールはおそらく胆汁中に排泄されると考えられている。ヒトが大量のビタミンEを経口摂取しても血漿中では前値の3倍以上に上昇することはまずないが、これは $\alpha$ -TTPの輸送能力の飽和状態のため、過剰なトコフェロールが排泄された可能性がある。また、家族性ビタミンE欠乏症の患者では経口投与した $\alpha$ -トコフェロールは一旦吸収された後、血中濃度は急速に低下する。したがって、 $\alpha$ -TTPが $\alpha$ -トコフェロールの血漿中濃度を維持していると考えられる。さらに、今回の研究でみられるようにビタミンE欠乏時には $\alpha$ -TTPのmRNAの発現が増加したり、大量の $\alpha$ -トコフェロール投与時には肝臓中 $\alpha$ -TTP

のタンパクやmRNAの発現が低下したことは、 $\alpha$ -TTP量の調節を介して体内 $\alpha$ -トコフェロール量を一定に維持する調節機構が存在することを示唆している。

*In vitro*の系では周囲に水溶性抗酸化剤が存在しない時、高濃度の $\alpha$ -トコフェロールはpro-oxidantとして作用する可能性が指摘されている。生体では大量 $\alpha$ -トコフェロール投与により、過酸化反応が促進して傷害を発生した事実は証明されていないが、この調節機構はその防御に作用している可能性もある。本研究は体内 $\alpha$ -トコフェロール量を調節する $\alpha$ -TTP自身が $\alpha$ -トコフェロールによって遺伝子の転写レベルで調節されていることを示したものである。

## E. 結論

ビタミンE欠乏動物の肝臓では体内へのビタミンE取り込み機能に関与する $\alpha$ TTPmRNAが増加し、ビタミンE強化動物では $\alpha$ TTPmRNAおよび蛋白が増加することが判明した。このことは生体内にはビタミンEを一定に維持する機構が存在することが示唆している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kim, H-S., Arai, H., Arita, M., Sato, Y., Ogihara, T., Tamai, H., Inoue, K.,

Mino, M. (1996) Age-related changes of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein expression in rat liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 42: 11-18

2) Kim, H-S., Arai, H., Arita, M., Sato, Y., Ogihara, T., Inoue, K., Mino, M.,

Tamai, H. (1998) Effect of  $\alpha$ -tocopherol status on  $\alpha$ -tocopherol transfer protein expression and its mRNA level in rat liver. *Free. Radic. Res.* 28: 87-92

表-1

	E 欠乏	E 強化	コントロール
血漿 E 濃度 $\mu\text{g}/\text{dl}$	$91.7 \pm 11.4$	$2270.9 \pm 405.5$	$869.8 \pm 54.0$
血漿総脂質 $\text{mg}/\text{dl}$	$277.3 \pm 18.6$	$251.7 \pm 18.9$	$261.8 \pm 12.6$
血漿 E/総脂質 $\text{mg}/\text{g}$	$0.4 \pm 0.1$	$9.1 \pm 1.7$	$3.3 \pm 0.3$
肝臓中 E $\mu\text{g}/\text{g prot}$	$3.6 \pm 1.9$	$133.5 \pm 44.2$	$38.1 \pm 16.8$

M $\pm$ SE

図-1

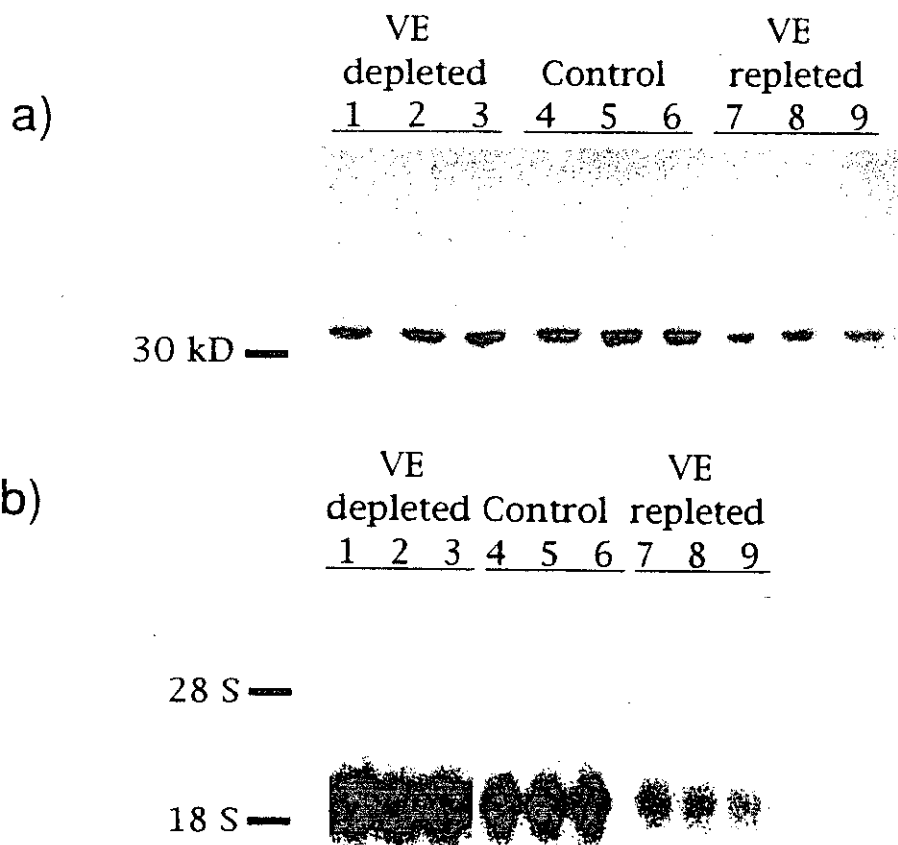


FIGURE 1 Western and Northern blot analysis of  $\alpha$ TTP. Lanes 1, 2 and 3: vitamin E (VE) -depleted group; lanes 4, 5, and 6: normal VE group; lanes 7, 8, and 9: VE-replete group. a) Western blot analysis of  $\alpha$ TTP expression in rat liver in each group. Densitometric analysis revealed that protein expression in the VE-replete group was decreased by about 300% compared with that in the normal VE group. In the VE-depleted group,  $\alpha$ TTP expression was constant. b) Northern blot analysis of  $\alpha$ TTP-specific mRNA level in each group. Analysis with the Bass 2000 system showed that the  $\alpha$ TTP-specific mRNA level was reduced by about 300% in the VE-replete group. On the other hand, the mRNA level in VE-depleted rats was increased to about 150% of normal.

## ミネラルの安全性評価（微量元素を中心に）

分担研究者 鈴木和春 東京農業大学教授

微量栄養素の一つであるミネラルは健康の保持増進に対し必須であると、同時に生活習慣病とある種のミネラル欠乏との間に深い関係があることも最近の研究で知られるようになってきている。そのためミネラルを中心とした栄養補助食品の開発が進められている昨今である。また、国民に対し、このような栄養補助食品を多量に摂取した時には生体に対し危険をおよぼすことが考えられる。そこで、安全な摂取量について十分な検討を行う必要がある。まず最初に Mg, P, Fe, Se, Zn, Cu のミネラルについて、許容上限摂取量の検討を行う目的で文献的検討を行った。

次に実験動物を用いて、ミネラルの過不足による生体内ミネラルの過剰蓄積が生体に及ぼす影響について検討を試みた。その結果、食事中鉄を不足させると肝臓に過剰な銅が蓄積したことを見出した。この肝臓に蓄積された銅は生体内の脂質の過酸化を促進させ生体内の過酸化脂質含量を増加させ、その結果、細胞膜に影響をあたえることを推察した。

### その1

#### マグネシウム (Mg)

##### 1. 栄養素としてのマグネシウム

マグネシウムは、生体内の物質代謝に重要な役割を演じている。成人の組織中のマグネシウム濃度は骨に約 60~65% と非常に高濃度含有されている。そのため、骨がマグネシウムの貯蔵庫であるといわれている。

マグネシウムが欠乏すると骨からマグネシウムが遊離され利用される。その際に副甲状腺ホルモンの関与が考えられる。あしかし、詳細な機構は不明である。また、マグネシウムの腸管吸収に関する情報は極めて少ない。

血中のマグネシウムの正常値は、1.60~1.70mEq/L(19.2~20.4mg/L)である。しかし、よほど激しい欠乏が起こらなければ値は低下しない。また、赤血球中マグネシウム濃度も同様に正常範囲を維持している。

ところで、マグネシウム欠乏は神経疾患、精神疾患、不整脈、心疾患などを引き起こすことが知られている。さらにカルシウム摂取量に対してマグネシウムの相対的摂取不足が種々な疾患の誘因として重要視されている。

##### 2. マグネシウム摂取量

マグネシウムは一般に植物性食品に多く、その摂取の多少がマグネシウム摂取量に差を生ずるものと思われる。

日本での1日の摂取量を白石は報告している1)。その結果は計算値では 279mg±39mg、蔭膳法では 229±47mgであった。

##### 3. マグネシウムの上限摂取量 (UL: Tolerable Upper Intake Levels) について

マグネシウムの過剰摂取による好ましくない影響が、通常の食品に含まれるマグネシウムで起きるという報告は見あたらない。健康人ならば、マグネ

シウム摂取量の多少に対応して腎臓が機能し、生体内のマグネシウムの恒常性を維持することが可能である (Mordess ら 1978, Rude ら, 1980, 2))。これまでに報告されているマグネシウムの過剰摂取による影響は食物以外から、例えば医薬品などから、多量のマグネシウムを摂取した場合に限られている。それゆえ、マグネシウムの UL は通常食物から摂取されるマグネシウムについてではなく、食物から摂取されるマグネシウム量に加えて、食物以外のマグネシウム給源からどの程度の量のマグネシウムを摂取した場合に好ましくない影響がみられるかを基準として判断することが妥当であると考えられる。

食物以外からのマグネシウムの過剰摂取によっておこる初期の好ましくない影響は下痢である。

マグネシウム補給食品の多量摂取によって心配するような影響がみられたという報告はない。しかし、多くの人々では何も起こらないようなマグネシウム摂取量であっても、ある人の場合には軽度の一過性下痢が起こることがある。それゆえ、下痢の発症の有無がマグネシウムの UL を決める最も確かな指標になると考えられる。この考え方をアメリカ合衆国の DRI では用いられ、下痢発症を指標として、食品以外からのマグネシウム摂取に関する UL を検討し、成人における、食品以外のマグネシウム摂取による LOAEL を 360mg/日として 3,4)、この値を基に、食品以外からのマグネシウム摂取量の UL を 350mg としている。この数値を体重換算にすると、5mg/kg/日となる。アメリカ合衆国においてはこの数値を 1 歳以上の各年齢区分の体重に乗じて各年齢区分の UL を求めている 2)。

また、0-12 カ月児の UL を決めるデータが無いため、UL は策定されていない 2)。わが国におけるマグネシウムの UL 策定に際しては、日本人における独自の研究報告が無いため、アメリカ合衆国の数値を採用し、体重換算によって 1 歳以上の年齢区分毎

に UL を決め、0-12 ヶ月児については UL を決めなかった。

1-8 歳までの UL は RDA に極めて近いいため、また、0-12 カ月児では UL を決める根拠が乏しいため、これらの年齢層においては食物からマグネシウムを摂取するようにすべきである。

一方、食物以外からのマグネシウムを多量に摂取して影響が現れるのは、腎臓機能が正常でない場合であり、この場合には影響が現れる以前に、血清マグネシウム濃度が 2-3.5mmol/L (4.8-8.4mg/dl) 以上になっていなければならないという報告がある (Rude ら, 1980, 2)。Durlach ら 5) の報告によると血中のマグネシウム濃度を上昇させるには体重 1kg 当たり 10mg/日以上マグネシウムを食事以外の栄養補助食品から摂取する必要であると報告している。また、Dimai ら 6) は、310mg/日のマグネシウムを食事から摂取している若年青年男性にさらに、マグネシウム補給食品から 360mg/日のマグネシウムを経口摂取させたが、血清マグネシウム濃度は上昇しなかったと報告している。一方、Fine ら 7) は、10-80mEq/日 (140-960mg/日) のマグネシウムを食事およびマグネシウム補給食品から摂取させ、マグネシウム吸収量が増加し、尿中排泄量増加を差し引いても体内保留量が増加すると報告している。このようなマグネシウムの体内保留量の増加による身体への影響に関しては、今後の研究課題である。

なお、マグネシウムの副作用は、信頼できるものとして、ただ一つ、多量の制酸剤や便秘薬を長期間使用している場合のみである。また、報告は一定したものではなく、LOAEL の根拠となるデータはない。さらに、1 日当たり 700mg 程度のマグネシウムの栄養補助食品では副作用の報告はないのでこの数値を NOAEL とした 8)。

リン

#### 1. 栄養素としてのリン