

厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業

微量栄養素（ビタミン、ミネラル）の安全性

評価研究

平成10年度～平成12年度

総合研究報告書

主任研究者 五十嵐 脩

平成13年（2001年）4月

厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業

微量栄養素（ビタミン、ミネラル）の安全性

評価研究

平成12年度

総括・分担研究報告書

主任研究者 五十嵐 脩

平成13年（2001年）4月

## 目 次

### I. 平成12年度総括研究報告概要

主任研究者 五十嵐 脩 .....	1
-------------------	---

### II. 総括研究報告

五十嵐 脩

微量栄養素（ビタミン、ミネラル）の安全性評価研究 .....	3
--------------------------------	---

### III. 主任ならびに分担研究報告

1. 五十嵐 脩（茨城キリスト教大学教授）

ビタミン、ミネラルの安全摂取範囲の設定及びビタミンE同族体の 代謝（動物実験） .....	7
--	---

2. 岡野登志夫（神戸薬科大学衛生化学研究室教授）

「日本人におけるビタミンD大量摂取時の血中骨代謝マーカーの変動」 .....	11
--	----

3. 玉井 浩（大阪医科大学小児科）

ビタミンE大量投与における安全性に関する検討 .....	19
------------------------------	----

4. 糸川嘉則（福井県立大学教授）

ヒトにおけるセレン、モリブデンの測定と動態に関する研究 .....	21
-----------------------------------	----

5. 湯川 進（和歌山県立医科大学第三内科教授）

血液透析患者における血中ビタミンC濃度および ビタミンEとの関連に関する検討 .....	23
---	----

6. 藤原葉子（お茶の水女子大学生生活科学部助教授）

ビタミンCの安全摂取範囲の設定 —文献検索と日本人のビタミンC摂取基準値について— .....	29
--	----

7. 鈴木和春（東京農業大学教授）

ミネラルの安全性評価 .....	35
------------------	----

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名 =生活安全総合研究事業

研究課題名 =微量栄養素（ビタミン、ミネラル）の安全性評価研究（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）=15,000,000

研究期間（西暦）=1998-2000

研究年度（西暦）=2000

主任研究者名（所属施設名）=五十嵐脩（茨城キリスト教大学）

分担研究者名=糸川嘉則（福井県立大学）、湯川 進（和歌山県立医科大学）、岡野登志夫（神戸薬科大学）、藤原葉子（お茶の水女子大学）、玉井 浩（大阪医科大学）、鈴木和春（東京農業大学）

研究目的=国民の健康や栄養への関心が高まる中で、サプリメントやビタミン剤などへの需要は極めて高いものがある。微量栄養素であるビタミンやミネラルの摂取不足は欠乏症を招くが、近年の新しい研究はそれらに疾病の1次予防やリスクリダクションの効果があることを示しており、時として多量の摂取が効果があるという研究結果も多数発表されている。そのため、第6次改定の日本人の栄養所要量では、一部のビタミンとミネラルに許容上限摂取量が設定され、これらの値を含めて食事摂取基準と呼ばれるようになった。このことは、ビタミンにしる、ミネラルにしる、その種類によっては過剰に摂取すれば、健康に危害をもたらす危険性があることを明示したものといえよう。我々は、この栄養所要量の発表以前より、本研究でビタミン、ミネラルの過剰摂取の害を避けるために、ビタミン、ミネラルの安全な摂取範囲を決める研究に取りかかっていたが、この場合、文献調査だけでなく、日本人に投与し、そのデータに基づいて安全範囲を設定しようとした。勿論、過剰の害が殆ど知られていないビタミンは研究対象からはずした。その他、ビタミンE同族体の代謝や腎疾患でのビタミン欠乏の可能性なども探り、ミネラルについても安全性を探るための測定法の開発に努めた。

研究方法=安全性範囲の設定に関しては、ビタミンE、D、Cについては昨年度の研究でかなり明らかにされているので、そのフォローアップに重点をおいて研究を進めた。即ち、ビタミンD多量投与の際の骨代謝マーカーのより詳細な検討、ビタミンE投与の際のDNAの酸化ストレスで生じる8-ヒドロキシ-グアノシンの尿中排泄、腎不全患者のビタミンCやEの充足度などを調べた。また、ビタミンE同族体（ $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノール）の代謝産物の同定とナトリウム排泄への効果、ヒトにおけるセレン、モリブデンの動態と他の栄養素との関係、サプリメントにおける適正処方量の範囲の決定などを行った。

結果と考察=ビタミンE(d- $\alpha$ -トコフェロール)を800mg/日成人男性に投与しても生化学的なマーカーには影響しないことが昨年度の研究で明らかにされているので、今年度はこのような投与が酸化ストレスに影響するかどうかについて検討を加えた。測定

は尿中への 8-ヒドロキシ-グアノシン排泄で検討したが、その濃度は対照群に比べても全く差が認められなかった。このことは、このような大量のビタミンE投与でも酸化的なストレスは遺伝子レベルで起きていないことを示すものであった。ビタミンDについては、昨年度1日 200  $\mu$ g の投与で、血中 25-ヒドロキシ-D 3 の上昇が普通観察される安全範囲の最大値付近まで上昇したので、それ以外多数の骨代謝マーカーの変動について検討を加えた。しかし、骨吸収、化骨に関係するマーカーは正常範囲内にあり、上昇したのはDの非活性型と考えられる 24,25-ジヒドロキシ-D 3 のみであり、このような多量のビタミンD投与に対してヒトは正常な状態の骨代謝を維持しており、安全性の範囲にあると判断した。ビタミンE同族体である $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノールを投与し、その代謝産物を調べた結果、いずれも $\gamma$ -CEHC（昨年度の研究報告に構造式あり）であることが分かった。この代謝は同時に $\alpha$ -トコフェロールを投与することで促進され、 $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノールを比較すると、後者の方がより多くの代謝産物を産出し、その排泄経路は胆汁よりは尿であることが確かめられた。更に、ラットに食塩を付加投与した時のナトリウムの排泄を有意に高く行うことも確認された。また、血液透析を受けている腎不全患者では、ビタミンEよりはビタミンC欠乏状態にあることやヒトの血液中のセレンとモリブデン濃度に関連する栄養素などについても検討し、セレンと亜鉛濃度が相関することなどが認められた。次いで、13種のビタミンについてそのLOAEL, NOAEL, ULなどを文献的に調べ、これまでのビタミンD、ビタミンE、Cについての本研究の結果をあわせ、それらの安全摂取範囲の設定を行うと共に、そのデータに基づいて、サプリメントとしての1日最大処方量を提案した。この数値には、そのビタミンが食品にどのように使われているかについても考慮したものである。その値はレチノール 1,500  $\mu$ g、 $\beta$ -カロチン 10mg、ビタミンD 25  $\mu$ g、ビタミンE(d- $\alpha$ -トコフェロールとして)300mg、ビタミンK 30mg、ビタミンB1 100mg、B2 60mg、B6 30mg、B12 1.5mg、葉酸 1mg、ピオチン 500  $\mu$ g、パントテン酸 1g、ナイアシン(ニコチン酸 30mg、ニコチンアミド 60mg)、ビタミンC 1gとした。

結論=本研究も3年目を迎え、全てのビタミンについて、ほぼ許容上限摂取量を策定することができ、一部のミネラルにも安全摂取範囲の設定ができたものと思われる。この際のビタミンの摂取は医薬品と異なり、数十年といった長期間での安全性を考えたものである。このような許容上限摂取量を考え、個々の製品の上限值を設定出来たので、この成果を広く行政、商品開発の場で利用していただきたいと考えている。

総括研究報告書

微量栄養素（ビタミン、ミネラル）の安全性評価研究

主任研究者 五十嵐 脩 茨城キリスト教大学 教授

研究要旨 本年度は、本研究の最終年度であるので、各ビタミン、ミネラルについて、安全性摂取範囲の設定を行うと共に、そのデータを基にサプリメントにおける最大含量（1日に摂取しても十分な最大摂取量）と最低含量の設定をビタミンについてのみ策定した。ミネラルについては、種々の理由から、日本人の栄養所要量についての値を変える必要はないと判断したためである。その他、昨年度までの検討結果を踏まえて、より突っ込んだ研究を行い、ビタミンE同族体の代謝経路の確立や腎疾患時のビタミンE、Cの摂取量などの策定なども行った。また、ミネラルについては、セレン、モリブデンの生体内動態の解明や亜鉛などとの生体内濃度の相関についても検討を加えた。なお、ビタミンDについては、昨年度に引き続き安全性を検討し、昨年度の結果である1日200  $\mu$ gの摂取が骨代謝に関連するマーカーの値に全く影響しないことを最確認した。これらのデータを、サプリメントやOTC医薬品の基準の設定や新しい商品の設計に利用されることを望みたい。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

糸川嘉則・福井県立大学教授；湯川進  
・和歌山県立医科大学教授；岡野登志夫・神戸薬科大学教授；藤原葉子・お茶の水女子大学助教授；玉井浩・大阪医科大学教授；鈴木和春・東京農業大学教授

A. 研究目的

国民の健康や栄養への関心が高まる中で、サプリメントやビタミン剤への需要は極めてたかいものがある。微量栄養素であるビタミン、ミネラルはその摂取不足は欠乏症を招くが、近年はその1つ1つについて、疾病の1次予防やリスクリダクション

の観点から、時として多量に摂取されることがある。そのため第6次改定の日本人の栄養所要量においては許容上限摂取量が一部のビタミンとミネラルの食事摂取基準として設定された。このことは、ビタミン・ミネラルを過剰に摂取すれば、危険を伴うことを明確に示したものといえよう。我々は、この6次改訂の栄養所要量策定が行われる以前よりビタミン、ミネラルについてその安全性摂取範囲の策定に取り組んできた。その成果の一部は栄養所要量の策定にも利用されたが、我々はあくまでも日本人についてのデータを基に、ビタミン、ミネラルの安全性を再評価しようとしたもので、この研究結果はその成果をまとめたものである。また、同時期にサプリメントについて、それぞれのビタミン、ミネラルに

ついて製品での最大含量を設定する必要がある行政的に生じた。それで、本班員はそのような視点でのまとめも行った。その他、腎疾患時のビタミンE、Cの必要量の設定や微量元素であるセレン、モリブデン、亜鉛の体内動態と相関性などについても検討した。

## B. 研究方法

1). ビタミンE大量投与時の尿中 8-ヒドロキシ-2-デオキシグアノシン(8OH DG)の変動

1日 800mg の $\alpha$ -トコフェロールを投与した際のDNA酸化生成物である 8OH DGの値への影響を検討した。

2). ラットにおける $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノール投与時の代謝物の同定とナトリウム排泄への影響

ラットにこの両ビタミンE同族体を投与し、尿中及び胆汁中の最終代謝物を同定するとともに、食塩を含む水を飲ませた時の尿中へのナトリウム排泄への影響を調べた。

3). ヒトにビタミンDを投与したときの骨代謝マーカーの変動

昨年度の研究に基づき、昨年度は測定出来なかった 24,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> などのマーカーの変動を調べた。

4). 血液透析患者における血液中ビタミンEとC濃度の関連性について

腎不全で透析を受けている患者についてビタミンE製剤、ビタミンC製剤を服用している患者と服用していない患者について、その血液中ビタミンE、C濃度を測定した。

5). ビタミンCの安全摂取範囲の設定

主に、文献検索と女子大生を対象にした血液中のビタミンC濃度と食事摂取との関連性について検討した。

6). ヒトにおけるセレンとモリブデンの測定と動態について

両元素は黒鉛炉原子吸光法で測定し、その他の元素についても測定し、それらの相関性について調べた。

7). サプリメントにおける適正処方量の設定について

平成12年度において、サプリメントについてその基準を設定する作業が厚生省内のワーキンググループで行われることになったため、本研究班でも全員が分担して、その基準作りに携わった。その作業は、その経緯から考え、本班員はビタミンについてのみ、基準を策定することにした。全員が最低含有量(1粒又は1錠、1日量)は栄養所要量の値とすることに合意し、次いで、文献値より、NOAEL, LOAEL, ULを求め、また、副作用なども考慮し、全てのビタミンについてその最大含量を策定した。その際、化合物毎に設定することにした。例えば、ナイアシンはニコチン酸とニコチンアミドに分けること、ビタミンAはレチノールと $\beta$ -カロチンについて設定するなどである。

## C. 実験結果及び調査結果

1). ビタミンE大量投与時の尿中 8-ヒドロキシ-2-デオキシグアノシン(8OH DG)の変動

1日 800mg の $\alpha$ -トコフェロールをヒトに投与した際のDNA酸化生成物である 8OH DGの値への影響を検討したが、変化は見られなかった。従って、ビタミンEの大量投与が核内における酸化的ストレスを軽減するという証明は得られなかったが、本研究終了後もその他の抗酸化ビタミンとの相互作用などを検討する予定にしている。

2). ラットにおける $\gamma$ -トコフェロール及び $\gamma$ -トコトリエノール投与時の代謝物の同定とナトリウム排泄への影響

$\gamma$ -トコフェロールの代謝物の同定は、昨年度行い、 $\gamma$ -CEHCと同定したが、

γ-トコトリエノールの代謝物の同定は今年度初めて行い、γ-トコフェロール同様γ-C E H Cであることを確認した。また、α-トコフェロールと併用するとγ-トコフェロールと同様に代謝物であるγ-C E H Cの産生量が増加した。また、ナトリウム排泄への効果を調べた結果、γ-トコフェロールとγ-トコトリエノール共に、食塩付加ラットのナトリウム排泄を促進した。

### 3). ヒトにビタミンDを投与したときの骨代謝マーカーの変動

昨年度の研究で、D3の200 μg/日の投与で、血液中の25-OH-D3が限界値近くまで上昇することが分かったので、今年度は、それ以外のD代謝物を初めとする骨代謝マーカーの変動を調べた。その結果、上昇した25-OH-D3は24,25-OH-D3に代謝され、骨代謝マーカーには悪影響を及ぼしていないことが確かめられ、昨年度設定したビタミンDの許容上限量が1日200 μgであることが再確認された。

### 4). 血液透析患者における血液中ビタミンEとC濃度の関連性について

透析患者について、血液中ビタミンC濃度とビタミンE濃度を測定し、両者の相関性を調べた。ビタミンCの低濃度群では、ビタミンE値も低かったが、透析患者で、ビタミンCの欠乏状態にある患者が高率に発見された。今後は、ビタミンEとCの関連がどのような機構によるか検討する予定である。

### 5). ビタミンCの安全摂取範囲の設定

女子学生での血液中ビタミンC濃度の検討及び文献検索の結果より、ビタミンCの安全摂取量は最大1日1gと推定した。

### 6). ヒトにおけるセレンとモリブデンの測定と動態について

乳製品についてのこの両元素の定量が不可能であったことより、ヒトの血液での定

量可能な方法を確立し、栄養素摂取と両元素の血液濃度との相関を調べたところ、血清中の亜鉛とセレンの間に相関が認められたが、他の栄養素とは相関が認められなかった。

### 7). サプリメントにおける適正処方量の設定について

平成11年度から始まったいわゆる栄養補助食品の検討会の結論により、栄養機能食品の制度を立ち上げることになり、12年度において、該当するビタミンとミネラルについてその含量範囲を設定することになり、本研究班でも、ビタミンについて検討した。その結果の詳細は、まとめて五十嵐の分担報告書に記載されているが、NOAEL, LOAEL, ULに基づいて、最大含有量を設定した。最低含量は上に述べた通り、栄養所要量そのものとした。各ビタミン毎の最大含有量のみをここに示す。ビタミンA (レチノール) 1,500 μg (5000 IU)、β-カロチン 10mg、D 25 μg、ビタミンE 300mg、ビタミンK 15mg、ビタミンB1 100mg、B2 60mg、B6 30mg、B12 1.5mg、葉酸 1mg、ピオチン 500 μg (暫定値)、パントテン酸 1g、ナイアシン (ニコチン酸 30mg、ニコチンアミド 60mg)、ビタミンC 1g

### E. 結論

本研究も3年目の最終年度となり、各ビタミン及び一部のミネラルについて安全摂取範囲の設定がほぼ出来たものと思われる。ビタミンはいずれも数十年といった長期間摂取しても副作用を示さない量を設定することを目的とし、それを許容上限摂取量 (UL) とした。しかし、1つの製品のみを利用するわけではないので、安全性を考え、一製品での上限量も設定した。また、そのためのヒトでの試験も実施し、参考とした。なお、従来生理活性が低いために余り考慮されることがなかったγ-トコフェ

ロールやγ-トコトリエノールの代謝物がナトリウム排泄などの作用をもつことが確認され、このような同族体の生理活性をビタミンEとして活性のみならず、他の視点で再検討する必要があることも極めて重要である。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

ビタミン、ミネラルの安全摂取範囲の設定及びビタミンE同族体の代謝（動物実験）

分担研究者 五十嵐 脩 茨城キリスト教大学 教授

研究要旨 全てのビタミンについて、これまでの研究成果を合わせて、安全摂取範囲の設定を行った。それと同時に、いわゆるサプリメントの規格基準の策定のための1製品からの1日上限摂取量（1錠、又は1カプセルでの最大含量）と最低含量を設定した。なお、この値は各ビタミンのNOAEL, LOAEL, ULに基づいて決めたものである。ビタミンEについては、同族体であるγ-トコフェロールとγ-トコトリエノールについて、昨年度に引き続き代謝産物の同定を行い、両者共にγ-CEHCであり、尿中や胆汁酸中に出現するが、主経路は尿であることを明らかにした。また、この両者共に、ラットに食塩を付加した食事を与えると、ナトリウム排泄を増加させることが明らかになった。これはこれらの同族体の代謝物であるγ-CEHCがナトリウム排泄を促進しており、γ-トコフェロールとγ-トコトリエノールのこのような効果がビタミンE以外の作用として重要なことが確認された。

研究協力者 茨城キリスト教大学講師 梶田泰孝

A. 研究目的

国民の健康への関心が高まる中で、サプリメントや健康食品への需要は益々高まっている。特に、平成11年度の「いわゆる栄養補助食品についての検討会」の検討結果の発表を受けて、平成12年度はその基準作りが行われることになった。本研究班は全てのビタミンについて、その基準を提示することが求められた。従って、本分担研究においても、班員との協議でビタミン全ての安全性評価を行い、そのNOAEL, LOAEL, ULを設定し、その中でサプリメント製品の最大含有量、最小含有量の設定を行うことにした。この部分には、全ての班員が関与したが、便宜上五十嵐の分担報告書に記載した。また、ビタミンEに

ついては、同族体であるγ-トコフェロールとγ-トコトリエノールについて、昨年度に引き続き代謝産物の同定を行い、それらの食塩付加動物でのナトリウム排泄への効果についても検討した。

B. 研究方法

1). ビタミンのNOAEL, LOAEL, ULの設定方法とサプリメントの最大含量の設定

平成12年度から実施されている日本人の食事摂取基準にも幾つかのビタミンについては、UL値が示されているが、我々班員は文献調査を中心にして、NOAEL, LOAEL, ULを設定することを試みた。そして、その値に基づいて、サプリメントの性質を考え、その上限値を定めた。その

値が必ずしもULと同じでないのは、同じような食品から摂取する機会が多いものは安全性をより考慮し、少な目に設定した。

2). $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノールの代謝産物の同定とナトリウム排泄への効果

代謝産物は $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノールをそれぞれ単独にビタミンE欠乏ラットに投与し、胆汁中への排泄物と尿中の排泄物を同定した。その際には、排泄物からHPLCで、排泄物画分を集め、メチルエステルに変換してから、HPLC法にて同定した。

### C. 試験結果

1). ビタミンのNOAEL, LOAEL, ULの設定方法とサプリメントの最大含量の設定

得られた結果の概要は表1にまとめて示した。文献などは省略した。最終的な1製品での最大含量は主任報告書に示してある。なお、最低含量は栄養所要量の数字をそのまま採用した(成人、男子と女子で異なるときは男子)。

2).  $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノールの代謝産物の同定とナトリウム排泄への効果

昨年度の研究で、 $\gamma$ -トコフェロールが $\gamma$ -CEHCに代謝されることが確かめられ、更に $\alpha$ -トコフェロールの同時投与がこの代謝を促進することも示された。今年度の研究結果では、 $\gamma$ -トコトリエノールも同じ代謝産物に代謝されること、その代謝物の生成量は $\gamma$ -トコフェロールよりも多いことが明らかになった。

そこで、 $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノールの食塩付加時のラットでのナトリウム排泄への効果と $\gamma$ -トコトリエノールの代謝産物の同定とナトリウム排泄への効果を調べた。

その結果、この両者とも食塩付加時のナトリウム排泄を促進することが示され、 $\gamma$ -トコトリエノールの方が作用が大きいことが分かった。この結果は、ビタミンE同族体が従来いわれていた抗酸化作用の他に全く違った作用を示した訳で、今後のビタミンE同族体の生理活性比の算出や新しい生理作用や機能の解明につながるものと期待される。

### D. 結論

サプリメント中のビタミンの最大含量と最小含量の設定を行った。ここで設定した値は最近厚生労働省が栄養機能食品として設定している値とは、設定の根拠が異なるため、一致していない。それは、各ビタミン毎にNOAEL, LOAEL, ULを文献から求め、各ビタミンの色々な食品での使用のされ方、食品由来の摂取量なども考慮したものである。

また、ビタミンE同族体である $\gamma$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコトリエノールについて、それらの最終代謝産物がいずれも $\gamma$ -CEHCであることを確認した。また、両者の食塩付加時のナトリウム排泄への効果を検討した結果、 $\gamma$ -トコフェロールよりも $\gamma$ -トコトリエノールの効果の方が大きいことを認めた。

ビタミン類について設定したNOAEL, LOAEL, UL及びサプリメントとしての上限値と下限値

	レチノール ( $\mu\text{g}$ )	$\beta$ -カロチン (mg)	ビタミンD ( $\mu\text{g}$ )	ビタミンE (mg)	ビタミンK (mg)	ビタミンB1 (mg)	B2 (mg)	B6 (mg)	B12 ( $\mu\text{g}$ )
NOAEL	3,000	25	60	-----	30	500	-----	200	1,500
LOAEL	6,500	--	95	-----	---	---	-----	-----	-----
UL	1,500	--	50	600	15	-----	-----	30—40	-----
上限値	1,500	10	25	300	30	100	60	30	1,500
下限値	600	3.6	2.5	10	0.07	1.3	1.3	1.6	2.4

ナイアシン

	葉酸 (mg)	ビオチン ( $\mu\text{g}$ )	パントテン酸 (mg)	ニコチン酸 (mg)	ニコチンアミド (mg)	C (mg)
NOAEL	4	10,000	10,000	30	1,500	2,000
LOAEL	15	-----	-----	50	3,000	3,000
UL	1.0	500	-----	30	-----	-----
上限値	1.0	500	1,000	30	60	1,000
下限値	0.2	30	5	17	17	100

分担研究報告書

「日本人におけるビタミンD大量摂取時の血中骨代謝マーカーの変動」

分担研究者 岡野 登志夫 神戸薬科大学衛生化学研究室 教授

研究要旨 昨年度、血中25-OH-D<sub>3</sub>濃度を指標にビタミンDの安全性限界の検討を行った。その結果、6週間のビタミンD<sub>3</sub> 200 μg/日の連日摂取では、高Ca血症のような重篤な過剰症は現れないが、ビタミンDの栄養状態としては過剰と考えられる 80 ng/mL の血中 25-OH-D<sub>3</sub> 濃度を示すことが明らかとなった。安全性限界の検討において、昨年は血中ビタミンD代謝物濃度、Ca、Pi、副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度及び腎機能、肝機能を中心とした血液生化学試験データを指標に評価したが、この条件下でビタミンD<sub>3</sub>がどの程度骨代謝に作用し得るかについては明らかではない。また、これまで安全性限界レベルでのビタミンD<sub>3</sub>を摂取した場合の血中骨代謝マーカーを詳細に検討した例はほとんど見受けられない。そこで、本年度は昨年度と同様のビタミンD摂取を行ったヒトの血中骨代謝マーカーを測定し、骨形成・骨吸収に対する影響について検討した。その結果、摂取群での骨形成マーカー、骨吸収マーカーはともに非摂取群と差異が無いことを確認した。また、25-OH-D<sub>3</sub>の主代謝物である24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の血中濃度は上昇したが、骨代謝に影響を与えるものではないことを確認した。これらの結果より、ビタミンD<sub>3</sub> 200 μg/日の6週間の摂取は、血中25-OH-D<sub>3</sub>及び24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度を上昇させるが、骨代謝系には影響しないと判断された。

研究協力者 津川 尚子 神戸薬科大学衛生化学研究室 講師  
時 善子 神戸薬科大学衛生化学研究室 大学院生

A. 研究目的

体内に摂取されたビタミンD (D) は肝臓で25位に水酸化を受け、25-OH-D<sub>3</sub>となった後、腎臓で1α位あるいは24位が水酸化される。肝臓での水酸化はほとんど制御を受けないため、吸収されたD<sub>3</sub>の量を反映する形で血中25-OH-D<sub>3</sub>濃度が上昇する。一方、腎臓での水酸化は様々なカルシウム (Ca) 代謝調節ホルモンによって調節されている。例えば、D欠乏などによる低Ca状態では血中PTH濃度が上昇し、腎臓の1α位水酸化酵素が誘導されることにより、1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度が上昇する。一方、血中Ca濃度が正常な状態である

場合には、一定濃度の1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度の維持に必要な1α位水酸化酵素のみが誘導され、むしろ25-OH-D<sub>3</sub>は24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>へ代謝されると考えられる。24位の水酸化経路は不活性化経路と考えられている一方、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が骨代謝に影響するとの報告もある。マウス、ラットあるいはウサギに薬理量の24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を投与すると、骨量増加や骨折の治癒効果が現われる<sup>1)</sup>。また、軟骨の器官培養実験では24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が静止軟骨細胞を成熟軟骨細胞様細胞に分化させる<sup>2)</sup>。

昨年度行なったDのUL設定に関する研究成果では、D<sub>3</sub> 200 μg/日を6週間

連日摂取したところ、明らかなDの過剰症（高Ca血症）は認められないものの、血中 25-OH-D<sub>3</sub>濃度がDの栄養状態としては過剰と考えられる 80 ng/mL を越えることが明らかとなった。しかし、その時の血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度は、非摂取群と変わらないことを確認した。これらのことから、Dの安全性限界は 200 µg/日と判断したが、この摂取量が骨代謝に及ぼす影響については昨年度の測定項目（血中Ca、Pi、副甲状腺ホルモン（PTH）濃度及び腎機能、肝機能を中心とした血液生化学試験データ）からだけでは判断することができない。前述のように、D<sub>3</sub>の摂取によって1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度が上昇しなくとも、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度が上昇する可能性は充分考えられる。また、25-OH-D<sub>3</sub>濃度の上昇が、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>や1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>と血中特異的D結合蛋白質（DBP）との結合を阻害することにより、free体の24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度を高め、その結果骨代謝への影響が増大する可能性も考えられる。

このような背景から、本年度は安全性限界レベルのD<sub>3</sub>を摂取した場合の血中骨代謝マーカーを詳細に検討することを目的に研究を行なった。試験方法は昨年と同様、試験対象者を20代の健康女性とし、D<sub>3</sub>を 200 µg (8000 IU)/日あるいは 100 µg (4000 IU)/日の連日6週間摂取し、血中24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度及び血中骨代謝マーカーの測定を行なった。

## B. 試験方法

### 【対象者】

20代健康女性。試験参加者は神戸薬科大学、大阪医科大学の女子学生を中心に募集し、自由意思により34名の参加同意が得られた。試験前の健康状態を把握するため、血液学的試験（赤血球数、白血球数、血小板数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球分類）及び血液生化学試験（GOT、GPT、LDH、ALP、γ-GTP、総蛋白、アルブミン、A/G比、T-CH、BUN、クレア

チニン、CPK）を行うと共に、Ca、D代謝に異常がないことを確認している。

### 【摂取群及び摂取方法】

参加者は本人の自由意思により非摂取群（n=9）、100 µg/日 摂取群（n=12）、200 µg/日 摂取群（n=13）の3群に分けられた。D補給剤には1カプセルあたりコレカルシフェロール 5 µg 含む「ステイタスD<sub>3</sub>」（全薬工業株式会社製）を使用した。100 µg/日 投与群は1日20カプセル、200 µg/日 投与群は1日40カプセルを毎食後3回にわけて摂取した。

### 【採血及び測定項目】

摂取開始前及び摂取開始より2週間ごとに採血を行い、血中24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度及び血中骨代謝マーカーの測定を行なった。骨形成マーカーとして血中Gla-オステオカルシン濃度（Gla-OC）、骨型アルカリフォスファターゼ（B-Alp）、血中I型プロコラーゲンN末端プロペプチド（PINP）を、骨吸収マーカーとして血中Glu-オステオカルシン濃度（Glu-OC）を測定した。

試験実施期間は、紫外線による血中D代謝物濃度の変動を避けるため10月～12月とした。

試験期間中、対象者はCaやD含量が極端に高いような食事を控え、通常の食事を摂るようにした。また本剤以外の薬剤、とくにCa剤、総合ビタミン剤の摂取は行わないことを指示した。

### 【測定方法】

対象者より EDTA2K 入の採血容器中に血液を採取し、3000 rpm, 10 分の遠心分離により得られた血漿を試料とした。

#### 1) 血中 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 濃度

血漿 0.5 mL に回収率補正用の [<sup>3</sup>H]-24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( [23,24(n)-<sup>3</sup>H]-24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ] : Amersham Co. (UK)製) を各 2,000 dpm 添加したのち、除タンパク及び脂質の抽出を行った。得られた脂質を Bond Elut C<sub>18</sub>OH column (Varian Associates, Inc. (USA))、Bond Elut C<sub>18</sub> column (Varian Associates, Inc. (USA)) ならび順相型 HPLC に順次適用し、

24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>画分を分取した。得られた画分24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度を、D欠乏ラット血漿を用いる競合的蛋白結合法(CPBA法)で測定し、回収率補正により血中濃度を算出した。

## 2) 血中 Gla- 及び Glu-OC 濃度

Gla-及びGlu-OCは、各々Takara社製「Gla-type Osteocalcin EIA Kit」あるいは「Undecarboxylated Osteocalcin EIA Kit」を用いて測定した。

## 3) 血中 B-Alp 濃度

住友製薬骨代謝マーカー測定用キット「オステオリックス [BAP]」を用いるEIA法で測定した。

## 4) 血中 PINP 濃度

Orion Diagnostica社製「Intact PINP Radioimmunoassay Kit」を用いて測定した。

### 【承認】

本試験は大阪医科大学の倫理委員会の承認を得たのちに実施した。

## C. 試験結果

血中24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度の経時変化をFig. 1に示す。摂取開始前の3群間の血中濃度に有意差は認められなかった。非摂取群では、開始後4から8週目でやや低下する傾向が見られた。一方、100 µg/日群では6週目まで徐々に増加し、6週目から終了1週目まではほぼ同等の値で推移した。これに対して、200 µg/日群では4週目までは100 µg/日群と同様の傾斜で血中濃度が増加したが、6週目で増加率がやや上昇し、その後終了1週目まで同じ割合で血中濃度の上昇が観察された。

骨形成マーカーであるGla-OC濃度は、3群ともに2~4 ng/mLの範囲でほとんど変動がなく、3群間での差異は認められなかった(Fig. 2)。健常人のGla-OC濃度は0.8~13.0 ng/mLであり、対象者の血中Gla-OC濃度はすべてこの範囲内であることも確認できた。一方、骨吸収マーカーであるGlu-OC濃度もD摂取による変化は認められず、正常な血中濃度範囲内で推移した(Fig. 3)。Fig. 4に示すB-Alp濃度で

は、200 µg/日摂取群が他の2群に比べてやや低い値で推移したが、摂取前も同様に低値であったことからD摂取による影響ではないと判断される。PINP濃度は、100 µg/日群では6週目および摂取終了後1週目で若干上昇する傾向があるが、200 µg/日群では逆に低下する傾向を示した(Fig. 5)。しかし、健常人の血中濃度12~100 µg/Lの範囲であること、また非摂取群においても4週目でやや低下、8週目で初期と同等の値に回復し、10 µg/L程度の変動が見られることから、D摂取群でみられた値の変動は生理的には意味がないと判断された。

## D. 考察

骨は常に骨吸収、骨形成の繰り返し(リモデリング)により維持されている。健常成人では骨吸収と骨形成の平衡が保たれ健康な骨を維持しているが、骨吸収の増大や骨形成の減少は骨の脆弱化を招く。骨には骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞があり、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に対する受容体(vitamin D receptor: VDR)は、骨芽細胞にしか存在しない<sup>3)</sup>。しかし、骨に対するDの主な直接作用は骨吸収であると考えられている。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は骨芽細胞のVDRと結合することにより、破骨細胞分化因子(Osteoclast differentiation factor: ODF/RANKL)が骨芽細胞表面に発現するのを促進する<sup>4)</sup>。破骨細胞前駆細胞表面に存在するODF受容体(RANK)はこれを認識し、成熟破骨細胞に分化するとともに細胞融合や活性上昇が惹起される<sup>5)</sup>。この作用機序から、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>あるいは25-OH-D<sub>3</sub>の濃度が上昇すると1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のfree体(DBP非結合型)が増加し、骨吸収を惹起することが予想される。一方、25-OH-D<sub>3</sub>に次いで血中濃度が高い24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は、軟骨細胞の分化、静止軟骨細胞におけるコラーゲンおよび非コラーゲン蛋白の合成促進、Alp活性の上昇作用を示すことが報告されている。また、*in vivo*にお

いては、骨量増加、骨折治癒効果を示し、骨形成に働く。しかし、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の作用機序については不明な点が多い。24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>はVDRにほとんど結合しない<sup>6)</sup>ことから24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に特異的な受容体が骨に存在する可能性も報告されている<sup>7)</sup>。

今回、血中24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度を測定した結果、用量依存的な血中濃度の上昇が観察された。健常成人の血中24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度は、1~4 ng/mLであることから、200 µg/日群の6週目と終了後1週目の血中濃度は正常値と比べて高めであると判断される。血中24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度の推移は、昨年度測定した25-OH-D<sub>3</sub>濃度推移と類似しており(参考: Fig. 6)、200 µg/日群の終了後1週目の24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度が6週目より上昇したのも、終了後1週目の25-OH-D<sub>3</sub>濃度の増加が一因と考えられる。24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は25-OH-D<sub>3</sub>と同様に強くDBPと結合するため、血中ではほとんどがDBP結合型として循環している。D過剰症の発現機序が1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のfree体増加によるものであるなら、200 µg/日群でみられる24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度の上昇は過剰症発現に一部寄与するはずである。しかし、血中24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度は25-OH-D<sub>3</sub>濃度に比べて10倍程度低く、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度の増加による過剰症発症への寄与は25-OH-D<sub>3</sub>に比べるとはるかに少ないと判断される。

OCは分化した骨芽細胞によって産生される非コラーゲン性骨基質蛋白である。OCの遺伝子上流には、D応答配列(VDRE)が存在し、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>はOCの産生を促進することが知られている<sup>8)</sup>。OCは産生後、合成細胞内で3つのグルタミン残基がビタミンK依存的にγ-カルボキシル化(Gla化)される<sup>9)</sup>。そのうち2箇所以上がGla化されると、ヒドロキシアパタイトとの親和性が高くなり、石灰化骨基質中に蓄積される。大部分のGla-OCは骨基質中に蓄積されるが、一部は血中に放出されることより、骨形成マーカーと

なる。一方、Gla化されなかったGlu-OC、あるいは脱炭酸されて生成したGlu-OCは、骨吸収とともに血中に放出される。今回の結果では、Gla及びGlu-OCの血中濃度がD摂取によって変化せず、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によるOCの産生促進や過剰症状の1つである骨吸収作用は惹起されていないと判断される。

血中の総Alpは主に肝臓に由来し、その他のものとして小腸、骨、腎臓由来のAlpが存在する。骨型であるB-Alpは、骨芽細胞や軟骨細胞より産生されることより、骨形成マーカーの指標となる。また、PINPは骨形成に伴って合成されるI型プロコラーゲンがコラーゲンへ変換される際に放出されるN端プロペプチドであることから、骨形成マーカーとして認識されるものである<sup>10)</sup>。本試験の結果では、両者の血中濃度ともにD摂取による影響を受けていない。これらの結果より25-OH-D<sub>3</sub>あるいは24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度は上昇するものの、これに伴う1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>作用の増強や、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>自身の骨形成作用は起こっていないと判断された。

## E. 結論

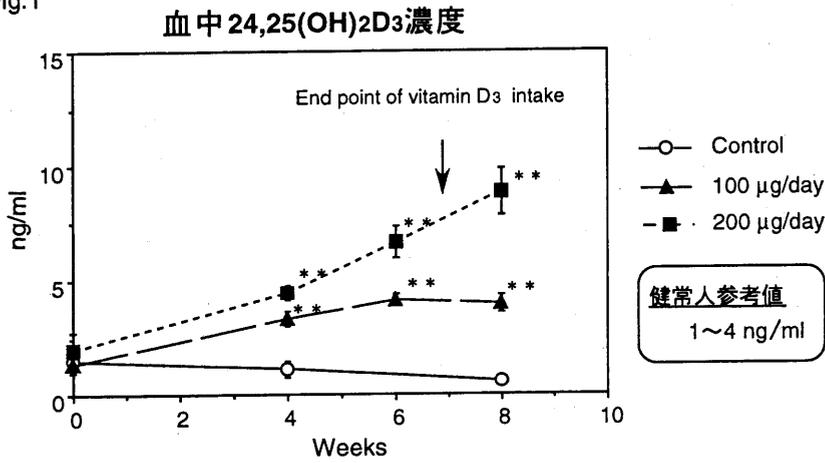
日本人におけるビタミンD<sub>3</sub>の安全性限界と考えられる200 µg/日の6週間の摂取は、血中25-OH-D<sub>3</sub>及び24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度を上昇させるが、これらのD代謝物濃度の上昇は骨代謝系に直接影響を及ぼすものではないと判断された。

## F. 文献

- 1) Am J Phys, 1983, 244, E298-304, Brommage R et al
- 2) Endocrinol, 1995, 136, 402-411, Schwartz Z et al
- 3) J Biol Chem, 1982, 257, 7481-7484, Walters MR et al
- 4) Biochem Biophys Res Commun, 1998, 246, 337-341, Tsukii K et al
- 5) Bone, 1999, 25, 109-113, Yasuda H et al

- 6) Endocrine Rev, 1995, 16, 200-257,  
Bouillon R et al
- 7) Bone, 1999, 25, 127-129, St-Arnaud
- 8) Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86,  
4455-4459, Kerner SA et al
- 9) Annal Intern Med, 1989, 111,  
1001-1005, Knapen MH et al
- 10) J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84,  
2390-2397, Garnero P et al

Fig.1



Significance of difference from  $t_0$ : \*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.01$

Fig.2

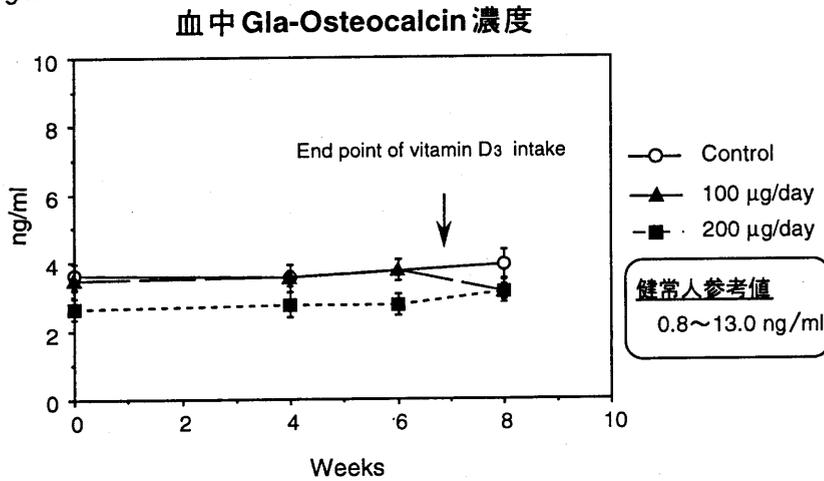


Fig.3

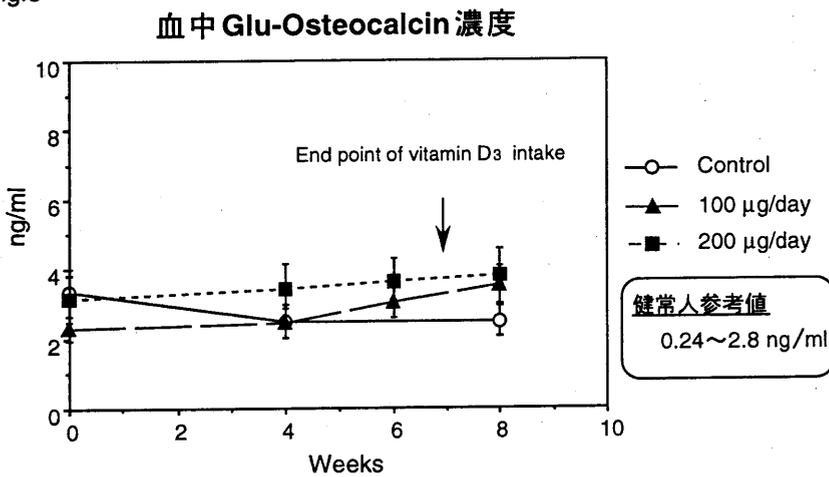


Fig.4

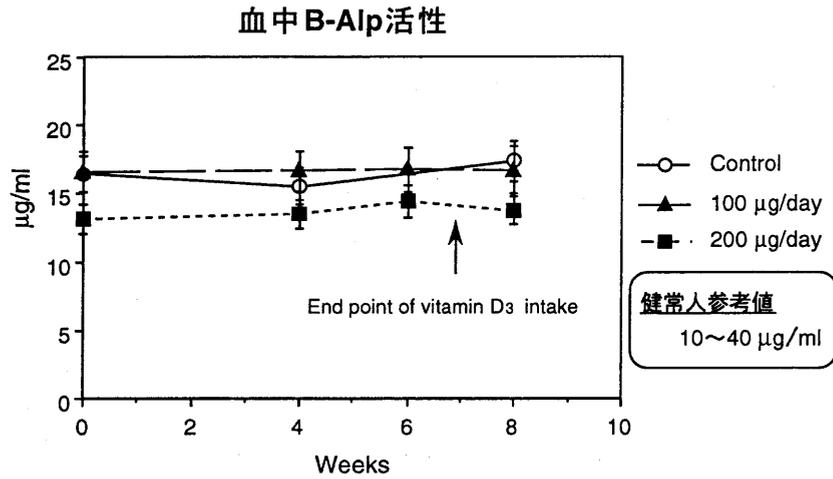


Fig.5

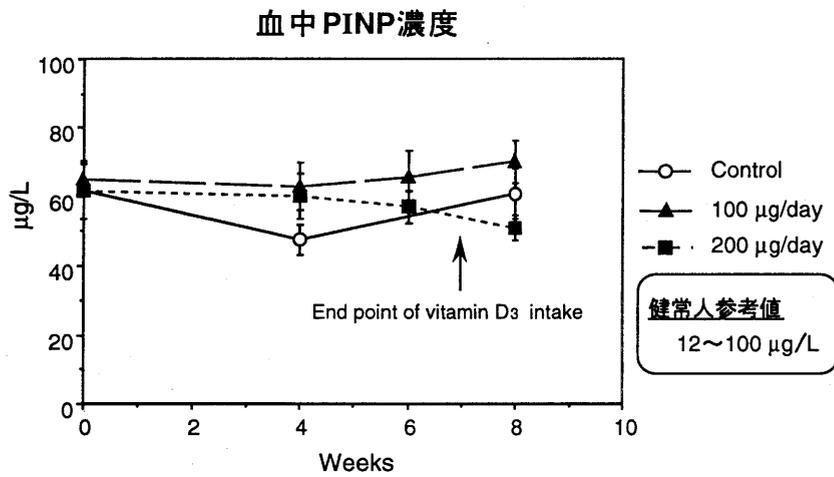
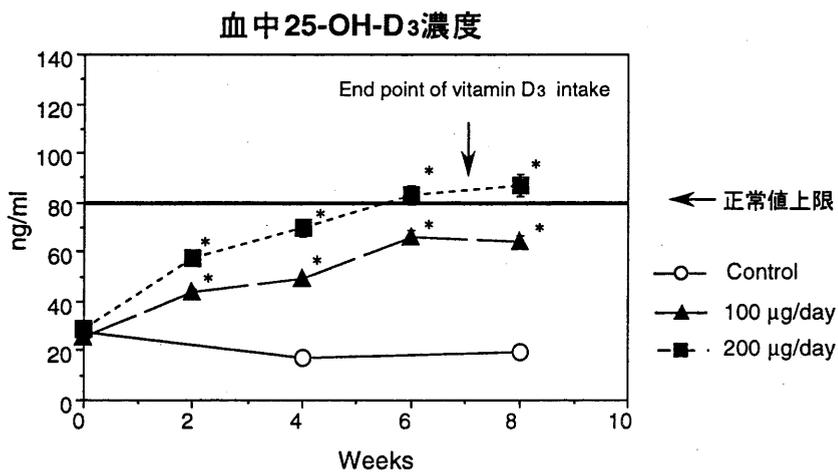


Fig.6



Significance of difference from  $t_0$ : \*  $p < 0.001$

# ビタミン E 大量投与における安全性に関する検討

大阪医科大学小児科 玉井浩

## 研究要旨

健常成人男性に対するビタミン E 大量投与時における酸化 DNA 損傷について検討した。14 名の成人男性にビタミン E 800mg/日を 28 日間連日経口投与した。血漿中ビタミン E は投与後に著明な増加を認めしたが、尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 値は投与前後において差を認めなかった。DNA 損傷が少ないと考えられる健常人においては、酸化 DNA 損傷に対するビタミン E の予防効果は少ないと考えられた。

## 研究目的

フリーラジカルは DNA の酸化を引き起こすことが知られており、また酸化 DNA 損傷は発ガンとの関係が指摘され注目されている。8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) はグアニン塩基の酸化生成物であり、酸化 DNA 損傷のマーカーとして知られている。また 8-OHdG の測定は HPLC 法や ELISA 法で比較的簡便に行うことができるため、広く利用されている。今回成人男性に対するビタミン E の大量投与が酸化 DNA 損傷に対して効果があるかを検討することを目的として、ビタミン E の大量投与時における尿中 8-OHdG を測定し検討した。

## 対象と方法

ビタミン E の経口投与を行った健常成人男性 14 名 (VE 群) と、VE を投与していない健常成人男性 8 名 (対照群) を対象とした。平均年齢 (歳) は VE 群で  $29.3 \pm 3.4$ 、対照群で  $27.0 \pm 1.2$  であった。ビタミン E の投与は d- $\alpha$ -トコフェロール 800mg (朝 200、昼 300、夕 300) を 28 日間連日経口投与した。投与前後において血液および尿を採取し血漿中ビタミン E および尿中 8-OHdG を測定した。ビタミン E は電気化学検出器を用いた

HPLC にて測定し、また 8-OHdG は ELISA 法にて測定した。

## 結果

ビタミン E 投与前後において血漿中  $\alpha$ -tocopherol は著明な増加を認めたが、尿中 8-OHdG は特に変化を認めなかった。

Table. Changes of plasma  $\alpha$ -tocopherol and urinary 8-OHdG

	before	after
Plasma $\alpha$ -tocopherol ( $\mu$ g/dl)		
VE	997 $\pm$ 171	3251 $\pm$ 1243*
Control	960 $\pm$ 206	788 $\pm$ 193
Urinary 8-OHdG (ng/mg creatinine)		
VE	7.7 $\pm$ 2.5	9.1 $\pm$ 4.3
Control	6.8 $\pm$ 1.6	8.2 $\pm$ 2.2

Data represent in Mean $\pm$ SD

\*P<0.01 compared for control