

図4. 一炭素単位代謝系におけるビタミンの役割
 DHF, dihydrofolate; THF, tetrahydrofolate; SAM, S-adenosylmethionine; SAH, S-adenosylhomocysteine; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; MS, methionine synthase; CBS, cystathionine β -synthase.

3) UL 算定のための科学的根拠

妊娠を計画している女性において、神経管閉鎖障害の発症および再発を予防するために、受胎前後に 0.36-5mg/日の葉酸が投与されているが、副作用の報告はない。一方、葉酸過敏症 (1-10mg/日) として、発熱、蕁麻疹、紅斑、そう痒症および呼吸困難が起こることが報告されている。また、健常者においては、葉酸サプリメント摂取によって、亜鉛の糞便中への排泄の増加や亜鉛の吸収阻害が報告されている⁴⁾。このように、合成葉酸の長期間摂取についての生体影響は必ずしも明らかではない。これらのことから、成人での UL を 1mg(1,000μg)/日とした。

(3) 食事摂取基準

表 1 に食事摂取基準を示した。

表 1. 葉酸の食事摂取基準

性別	男女			
	AI (μg/日)	EAR (μg/日)	RDA (μg/日)	UL (μg/日)
0- (月)	42			
6- (月)	51			
1-2 (歳)		70	85	200
3-5 (歳)		90	110	300
6-7 (歳)		110	135	400
8-9 (歳)		130	160	500
10-11 (歳)		150	185	600
12-14 (歳)		170	210	800
15-17 (歳)		200	240	900
18-29 (歳)		200	240	1000
30-49 (歳)		200	240	1000
50-69 (歳)		200	240	1000
70以上 (歳)		200	240	1000
妊婦 (付加量)			200	
授乳婦 (付加量)			80	

1) 0～ (月)

母乳含量(54 μg/L)×1 日の泌乳量 (0.78 L) から算出し、AI 値を 42μg/日とした。

2) 6～ (月)

乳児(0～(月))AI 値(42μg/日)×(6～ (月) の体位基準値の体重/0～ (月) の体位基準値の体重)^{0.75} から算出し、AI 値を 51μg/日とした。

3) 1 歳以上

成人 (18～29 歳) の EAR として 200μg/日、RDA として 240μg/日を採用した。各年齢区分の RDA は、体表面積比で補正して算出した。

4) 中高齢者

50 歳以上の中高齢者において、加齢に伴って葉酸の生体利用率が変わるとした報告はない。また、70 歳以上の高齢者でも、特別の配慮が必要であるというデータはない。しかし、年齢に依存して、ホモシステイン濃度が上昇することが示されている⁵⁾。これらを考慮して、EAR および RDA は、成人と同等とした。

5) 妊婦・授乳婦

妊娠中の付加量を 200μg/日とした。授乳婦については、母乳への泌乳量 40μg に、食品中の葉酸の化学的特性を加味して算出した。葉酸は、神経管閉鎖障害のリスク低減と関連のあることが示唆されている。このため、妊娠を計画している女性および妊婦については、受胎前 1 ヶ月以上から妊娠第 1 三半期においては、サプリメントなどを利用して、とくに 400μg/日の付加が必要である⁶⁾。

6) 許容上限摂取量 UL

1,000μg/日を NOAEL とし、UL を成人で 1,000μg/日とした。各年齢区分の UL は体重比から求めた。

(4) その他

30 歳以上の成人および中高齢者においては、動脈硬化症を予防するために積極的に

葉酸の摂取が必要である。また飲酒や喫煙によって血中葉酸レベルの低下することが知られているので、飲酒者および喫煙者では必要量以上の葉酸を摂取する必要がある⁷⁾。一方、ビタミン B₁₂ 欠乏の悪性貧血患者では、数カ月から数年間 0.35-500mg/日の葉酸の投与によって、神経症状が増悪されているので、注意が必要である。

7. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards EW, Krumdieck CL. Local and systemic effects of cigarette on folate and Vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 1994;60:559-60.

文献

1. 科学技術庁資源調査会編. 日本食品成分表の改定に関する調査報告—五訂日本食品成分表— 科学技術庁資源調査会報告 第124号, 平成12年 2000.
2. 井戸田正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則文, 前田忠雄. 最近の日本人乳組成に関する全国調査 (第十報)—水溶性ビタミン含量について—. *日本小児栄養消化器病学会雑誌* 1996;10:11-20
3. Milne DB, Johnson LK, Mahalko JR, Sandstead HH. Folate status of adult males living in a metabolic unit: possible relationships with iron nutriture. *Am J Clin Nutr* 1983;37:768-73.
4. Simmer K, Iles CA, James C, Thompson RPH. Are iron-folate supplements harmful? *Am J Clin Nutr* 1987;45:122-5.
5. Tucker KL, Selhub J, Wilson PWF, Rosenberg IH. Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentration in the Framingham Heart Study. *J Nutr* 1996;126:3025-31.
6. 先天異常の発症リスクの低減に関する検討会. 神経管閉鎖障害の発症リスクの低減に関する報告書 平成12年12月 2000.

研究報告書

IV. 食事摂取基準のための資料の研究報告書

8. ビオチン

分担研究者 渡邊敏明 姫路工業大学 教授

研究協力者 福井 徹 病体生理研究所 室長

研究要旨 第7次改定作業において、使用した資料と数値策定において、検討した事項を整理した。

ビオチン

(1) 基本事項

1) ビオチン(図1)として数値を策定した。

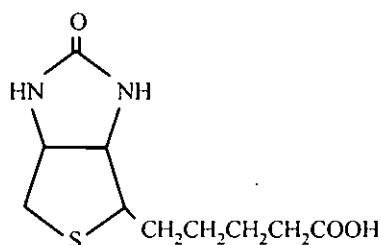


図1. ビオチンの構造式 (C₁₀H₁₆N₂O₃S = 244.3)

2) 消化・吸収

食品中のビオチンはほとんどがタンパク質中のリジンと結合した形で存在する。ビオチンはレバー(100μg/100g)、米(60μg)、卵黄(50μg)や魚肉(20μg)などに多く含まれ、肉(2~10μg)、野菜(2~10μg)、果物(1~3μg)には少ない。食品加工や保存加工によって損失するが、その残存率は食品や加工法によって異なり、20~90%の幅がある¹⁾。

腸内消化において、タンパク結合型ビオチンはまずタンパク質の分解を受け、ビオチンやビオチニルペプチドとなり、これらが最終的に膵臓由来のビオチニダーゼによって加水分解され、ビオチンが遊離し、吸収され

る²⁾。生体内ビオチンはカルボキシラーゼの補酵素として利用され、その分解を経て細胞内および血液と細胞間の再利用、腎臓での再吸収があり欠乏が起こりにくい機構となっている。一方、ビオチン自体も異化代謝を受け、ビオチンの一部とその代謝物は尿中に排泄される(図2)。

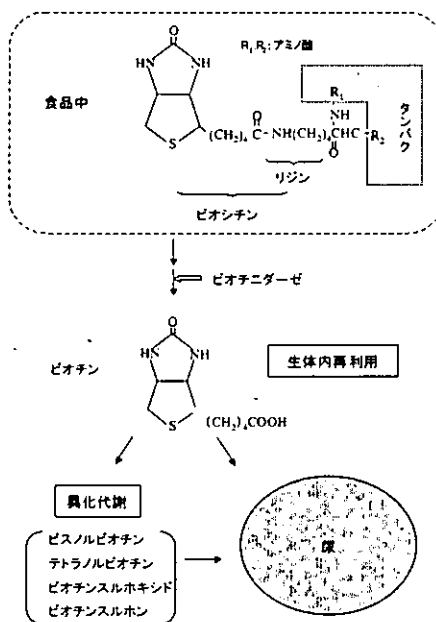


図2. 食品中ビオチンの形態と消化・吸収

このようにビオチンの吸収と排泄にいたる一連の流れは明らかにされているが、食品の消化率とビオチン遊離率、腸管吸収率などは系統的に検討されていない。また、腸内においてビオチンは腸内細菌によっても産生されると言われているが、腸内細菌叢のビオチン産生とその寄与に関しての定量的な検討はされていない。

ビオチンが他の水溶性ビタミンと大きく異なる点は、鶏卵生卵白中のアビジンが小腸内で遊離したビオチンと強固に結合し、ビオチンの腸からの吸収を妨げることであり、卵白障害は食事性ビオチン欠乏の典型である。

ビオチンの生物学的有効性に関して、これらの要因を網羅的に検討した報告はなく、したがって、生体利用率を考慮した所要量策定はできなかった。

(2) 策定に使用した基本的な数値

1) 母乳中の含量

日本人の成熟乳³⁾ 5.2µg/L、およびビオチン欠乏が認められていない一般乳児用調整粉乳⁴⁾ 5.9µg/L(n=5)の値から平均値 5.5µg/Lを採用した(表1)。

表1. 母乳および調整粉乳中のビオチン濃度

報告者	ビオチン含量 (µg/100ml)	備考
Hirano M ³⁾	0.52	成熟乳
渡邊敏明 ⁴⁾	0.59	一般乳児用

2) EAR 算定のための科学的根拠

ビオチン欠乏症を通常の食事摂取下では、実験的に再現できないため、EAR を設定することは出来なかった。

3) AI 設定

日本人の健康成人(男女各 30 名, 40~70 歳)のビオチン摂取量は 29.8~33.3µg/日(平均値 30.4µg/日)である⁵⁾。この報告から、40 歳~70 歳の AI 値を 30µg/日とした。

3) UL 算定のための科学的根拠

ビオチンの UL に関する信頼あるデータはなく、策定しなかった。先天性ビオチン欠乏症での 10~20mg/日の長期投与においても副作用は報告されていないが、健康人においてこれ以上摂取しても健康の維持に寄与しないとされる量はビオチンの医薬品としての常用投与量である 2mg/日とした。

(3) 食事摂取基準

表2に食事摂取基準を示した。

表2. ビオチンの DRI

年齢	AI µg/日
0~(月)	4.5
6~(月)	5.5
1~2(歳)	8
3~5(歳)	10
6~7(歳)	14
8~9(歳)	16
10~11(歳)	18
12~14(歳)	22
15~17(歳)	26
18~29(歳)	30
30~49(歳)	30
50~69(歳)	30
70 以上(歳)	30
妊婦(付加量)	2
授乳婦(付加量)	5

1) 0~(月)

母乳含量(5.5µg/L)×1日の泌乳量(0.78 L)から算定した。

2) 6~(月)

乳児(0~) AI 値(4.5µg/日)×(6~(月)の体位基準値の体重/0~(月)の体位基準値の体重)^{0.75}による計算値から算定した。

3) 1歳以上

乳児(0~(月))の AI 値と体表面積比との比較による計算値(4.5µg/日×(対象年齢区分の体位基準値の体重/0~(月)の体位基準値の体重)^{0.75})と、成人(40~70 歳)の食事摂取量調査⁵⁾の値から数値を算定した。

4) 高齢者

必要量に関するデータがないため、調査のある成人(40~70 歳)と同じ値とした。

5) 妊婦・授乳婦

妊婦については、妊娠中のビオチン欠乏状態が報告⁶⁾されているため、乳児 0~(月)とのエネルギー比を用い、4.5µg/日×{エネルギー需要の増加量/0~(月)のエネルギー需要量}の値を付加量とした。授乳婦については、母乳への移行量である 4.5µg/日を付加量とした。

(4) その他

なし

文献

1. Harding MG. and Crooks H. Lesser known vitamins in foods. *J Am Diet Assoc* 1961; **38**, 240, 1961
2. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its role in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 1996;255,1-11.
3. Hirano M, Honma K, Daimatsu T, Hayakawa K, Oizumi J, Zaima K, Kanke, Y. Longitudinal variations of biotin content in human milk. *Int J Vitam Nutr Res* 1992;62, 281-2.
4. 渡邊敏明, 福井 徹. わが国の調製粉乳に含まれているビオチン量の分析. *日本栄養・食糧学会誌* 1996;49, 343-7.
5. 柴田克己. 厚生労働省科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進研究事業)「日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究」平成13年度報告書. 2002; 72-6
6. Mock DM, Quirk JG, Mock NI. Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2002 ; 75, 295-9.

Ⅲ. 食事摂取基準のための資料の研究報告書

9. ビタミン C

研究協力者 梅垣敬三 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 室長

研究要旨

第7次改定作業において、使用した資料と数値策定において、検討した事項を整理した。

ビタミン C

(1) 基本事項

1) アスコルビン酸として策定

ビタミン C はアスコルビン酸と同じ生物学的効力を有する化合物であり、酸化型のデヒドロアスコルビン酸も該当する。ビタミン C の食事摂取基準の数値はアスコルビン酸 (図 1) として策定した。

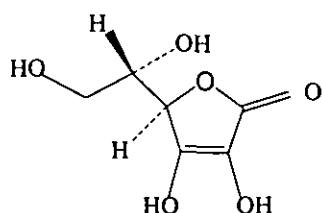


図 1. アスコルビン酸の構造式
($C_6H_8O_6 = 176.12$)

2) 消化・吸収

ビタミン C は、消化管から吸収されて速やかに血中に送られる。食事から摂取したビタミン C もサプリメントから摂取したビタミン C も、その生体内利用率に差異はなく、その吸収率は、30~180mg/日程度までは 70~90% と高く¹⁾、摂取量が 1g/day 以上になると、吸収率は 50% 以下になる。酸化型のデヒドロアスコルビン酸も速やかに還元酵素によりアスコルビン酸に変換されるため生物学的な効力をもつ。体内のビタミン C レベルは、消化管からの吸収率、体内における再利用、腎臓からの未変化体の排泄により調節されている (図 2 参照)。

(2) 策定に使用した基本的な数値

1) 母乳中の含量

ビタミン C のサプリメントを摂取していない授乳 6 ヶ月目の母乳に含まれるビタミン C 量は、34 mg/L~83 mg/L と幅がある。母

乳中のビタミン C 量は 12 ヶ月の間に約 8~12% 低下する。母乳中のビタミン C 濃度は 50mg/L を採用した²⁾。

2) RAI 算定のための科学的根拠

ビタミン C を 1 日 6~12mg 摂取していれば壊血病は発症しないことから³⁾、安全率を考慮した 50~60mg が壊血病予防の所要量として策定されてきた⁴⁾。一方、疫学の研究ならびにインビトロ研究から血漿のアスコルビン酸濃度が 50 μ M 程度であれば心臓血管系の疾病予防効果⁵⁾ならびに有効な抗酸化作用^{6, 7)}が、期待できると報告されている。血漿ビタミン C 濃度を 50 μ M 程度に維持する成人のビタミン C 摂取量は、約 100mg/日であることが多くの研究から示されている⁸⁻¹⁰⁾。また、摂取量が 80mg/日までは未変化体のビタミン C の尿中排泄はほとんどなく、体内消失は最小限に抑えられること¹¹⁻¹⁴⁾、摂取量が 100mg/日以上では体内ビタミン C レベルを反映する白血球ビタミン C 濃度¹⁵⁾がほぼ飽和することが示されている^{11, 12)} (図 3 参照)。

以上の報告から成人のビタミン C の必要量は、抗酸化作用と疾病予防が期待できる血漿濃度の維持に必要な摂取量、尿中排泄を最小限にとどめ白血球濃度を飽和させる摂取量を総合的に評価し、推奨十分摂取量 (Recommended Adequate Intake RAI) という考え方にに基づき 100mg とした。また、Levine らの報告¹²⁾を踏まえて男女差はつけないこととした。

3) UL 算定のための科学的根拠

ビタミン C の過剰症はヒトでは認められていない¹⁶⁾。これはビタミン C を過剰摂取しても消化管からの吸収率が低下し、尿中排泄が増加するためである。ビタミン C の過剰摂取の影響として、3~4g/日以上での摂取量で健康者に下痢が認められている^{17, 18)}。ビタミ

ン C の過剰摂取により腎結石の形成が危惧されるが、1日 4g 以下のビタミン C 摂取では、その可能性は否定されている¹⁹⁾。ビタミン C の過剰摂取が鉄の吸収を高め、鉄の過剰症または酸化障害を増加する可能性も否定されてはいるが、腎障害を有する人や遺伝的なヘモクロマトーシスの患者ではその可能性は否定できない。

ビタミン C の UL を下痢の発症に基づいて設定する考え方もあるが、成人においても UL を設定する根拠が乏しいこと、幼児、子供、青年期、妊婦の過剰摂取の影響については UL を設定するためのデータがないこと、授乳婦にビタミン C を過剰摂取させても母乳中のビタミン C 量は影響を受けないという報告²⁰⁾から、現時点では UL は定めないこととした。

(3) 食事摂取基準

表 1 に食事摂取基準を示した。

1) 0～(月)

母乳含量(50mg/L)×1日の授乳量(0.78 L)から算定した。

2) 6～(月)

乳児(0～)AI 値(50mg/L)×(6～(月)の体重/0～(月)の体重)^{0.75}と成人(18～29歳)の年齢区分のデータに、{(6～(月))の体重/成人(18～29歳)の年齢区分の体重)^{0.75}×1.3}をかけた数値の二つの値を基に計算した。

3) 1歳以上

基本的には成人の RAI=100mg から対象年齢区分の体表面積の値の比較を示す式、(対象年齢区分の体重/科学的根拠のある年齢区分の体重)^{0.75}×(1+成長因子)を用いて策定した。

4) 高齢者

高齢者では男女とも若い年代に比べて体が細くなっているが、加齢とともに酸化ストレスが増大すると考えられることから²¹⁾、ビタミン C の必要量は若い世代と同じ値にした。

5) 妊婦・授乳婦

妊婦の所要量は、おそらく乳児の壊血病を防ぐことができるというデータ^{22, 23)}から 10 mg を妊娠していない女性の所要量に付加した。授乳婦には母乳として与えるビタミン C 量を付加する必要があるため、乳児の必要量 40mg を付加した。

(4) その他

喫煙者では、非喫煙者に比べてビタミン C の代謝回転が約 35 mg 高いというデータがある²⁴⁾。喫煙者が非喫煙者と同量のアスコルビ

ン酸の体内貯蔵量を保つためには、非喫煙者よりも 35mg 以上のビタミン C を摂取する必要がある。また、受動喫煙者でも血漿ビタミン C 濃度の低下が示されていることから^{25, 26)}、該当する人は同年代の必要量以上にビタミン C を摂取することが推奨される。

表 1. 男女のビタミン C の食事摂取基準

性別	男女	
	AI	UL
年齢		
	mg/日	mg/日
0～(月)	40	—
6～(月)	40	—
1～2(歳)	45	—
3～5(歳)	50	—
6～7(歳)	60	—
8～9(歳)	70	—
10～11(歳)	80	—
12～14(歳)	90	—
15～17(歳)	100	—
18～29(歳)	100	—
30～49(歳)	100	—
50～69(歳)	100	—
70 以上(歳)	100	—
妊婦(付加量)	10	—
授乳婦(付加量)	40	—

文献

1. Kallner, A., D. Hartmann, and D. Hornig, *Steady-state turnover and body pool of ascorbic acid in man*. Am J Clin Nutr, 1979, 32(3): p. 530-9.
2. 科学技術庁資源調査会編(1996)五訂日本食品標準成分表。科学技術庁報告。
3. Burri, B.J. and R.A. Jacob, *Human metabolism and the requirement for vitamin C*. Vitamin C in health and disease, ed. J.F. L. Packer. 1997, New York: Marcel Dekker.
4. 五次改定日本人の栄養所要量
5. Gey, K.F., *Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of*

- epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer.* Biofactors, 1998. **7**(1-2): p. 113-74.
6. Byun, J., D.M. Mueller, J.S. Fabjan, and J.W. Heinecke, *Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein.* FEBS Lett, 1999. **455**(3): p. 243-6.
 7. Jialal, I., G.L. Vega, and S.M. Grundy, *Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein.* Atherosclerosis, 1990. **82**(3): p. 185-91.
 8. Brubacher, D., U. Moser, and P. Jordan, *Vitamin C concentrations in plasma as a function of intake: a meta-analysis.* Int J Vitam Nutr Res, 2000. **70**(5): p. 226-37.
 9. 木村 典代・関根 豊・高橋 裕子・井上 喜久子・岡 純・樋口満, 中高年女性水泳愛好者の水溶性ビタミン (B1,B2,C) の栄養状態. 栄養学雑誌2000, **58**: 267-271.
 10. Kobayashi, M., S. Sasaki, and S. Tsugane, *Validity of a self-administered food frequency questionnaire used in the 5-year follow-up survey of the JPHC Study Cohort I to assess carotenoids and vitamin C intake: comparison with dietary records and blood level.* J Epidemiol, 2003. **13**(1 Suppl): p. S82-91.
 11. Levine, M., C. Conry-Cantilena, Y. Wang, R.W. Welch, P.W. Washko, K.R. Dhariwal, J.B. Park, A. Lazarev, J.F. Graumlich, J. King, and L.R. Cantilena, *Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3704-9.
 12. Levine, M., Y. Wang, S.J. Padayatty, and J. Morrow, *A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9842-6.
 13. Blanchard, J., T.N. Tozer, and M. Rowland, *Pharmacokinetic perspectives on megadoses of ascorbic acid.* Am J Clin Nutr, 1997. **66**(5): p. 1165-71.
 14. Melethil, S., W.D. Mason, and C.-J. Chang, *Dose-dependent absorption and excretion of vitamin C in humans.* Int J Pharmaceut, 1986. **31**: p. 83-89.
 15. Omaye, S.T., E.E. Schaus, M.A. Kutnink, and W.C. Hawkes, *Measurement of vitamin C in blood components by high-performance liquid chromatography. Implication in assessing vitamin C status.* Ann N Y Acad Sci, 1987. **498**: p. 389-401.
 16. Morton, D.J., E.L. Barrett-Connor, and D.L. Schneider, *Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women.* J Bone Miner Res, 2001. **16**(1): p. 135-40.
 17. Cameron, E. and A. Campbell, *The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer.* Chem Biol Interact, 1974. **9**(4): p. 285-315.
 18. Wandzilak, T.R., S.D. D'Andre, P.A. Davis, and H.E. Williams, *Effect of high dose vitamin C on urinary oxalate levels.* J Urol, 1994. **151**(4): p. 834-7.
 19. 美濃 眞 他 ビタミンCの安全性 ビタミン1998. **72**: 19-23.
 20. Byerley, L.O. and A. Kirksey, *Effects of different levels of vitamin C intake on the vitamin C concentration in human milk and the vitamin C intakes of breast-fed infants.* Am J Clin Nutr, 1985. **41**(4): p. 665-71.
 21. Cheng L. Cohen M, Bhagavan HN. Vitamin C and the elderly. In Watson RR, ed. CRC Handbook of Nutrition in aged. Boca Raton, FL. CRC Press. Pp 157-185.
 22. Goldsmith, G.A., *Human requirements for vitamin C and its use in clinical medicine.* Ann N Y Acad Sci, 1961. **92**: p. 230-45.
 23. Rajalakshmi, R., A.D. Deodhar, and C.V. Ramakrishnan, *Vitamin C Secretion During Lactation.* Acta Paediatr Scand, 1965. **54**: p. 375-82.
 24. Kallner, A.B., D. Hartmann, and D.H. Hornig, *On the requirements of ascorbic acid in man: steady-state turnover and body pool in smokers.* Am J Clin Nutr, 1981. **34**(7): p. 1347-55.
 25. Tribble, D.L., L.J. Giuliano, and S.P. Fortmann, *Reduced plasma ascorbic acid concentrations in nonsmokers regularly exposed to environmental tobacco smoke.* Am J Clin Nutr, 1993. **58**(6): p. 886-90.
 26. Preston, A.M., C. Rodriguez, C.E. Rivera, and H. Sahai, *Influence of environmental tobacco smoke on vitamin C status in children.* Am J Clin Nutr, 2003. **77**(1): p. 167-72.

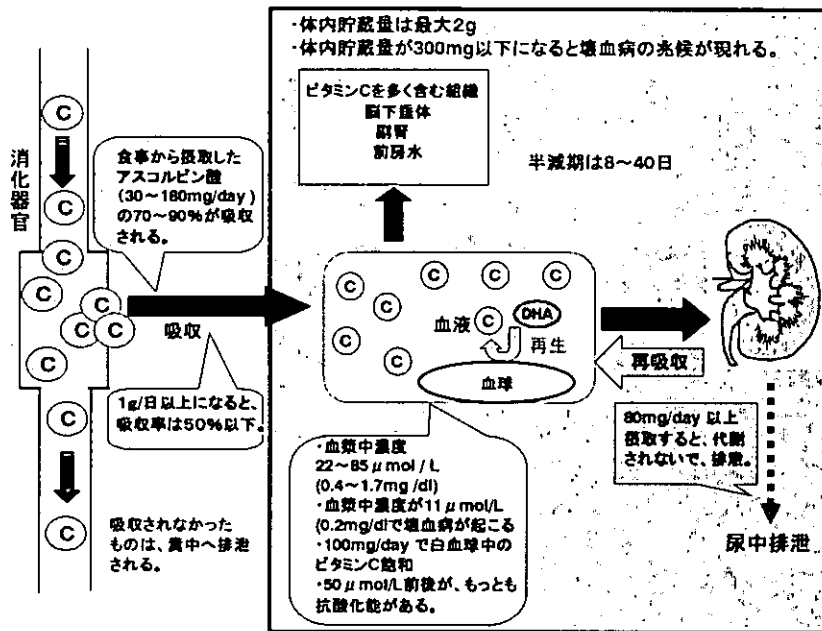


図2 ビタミンCの吸収、代謝、排泄

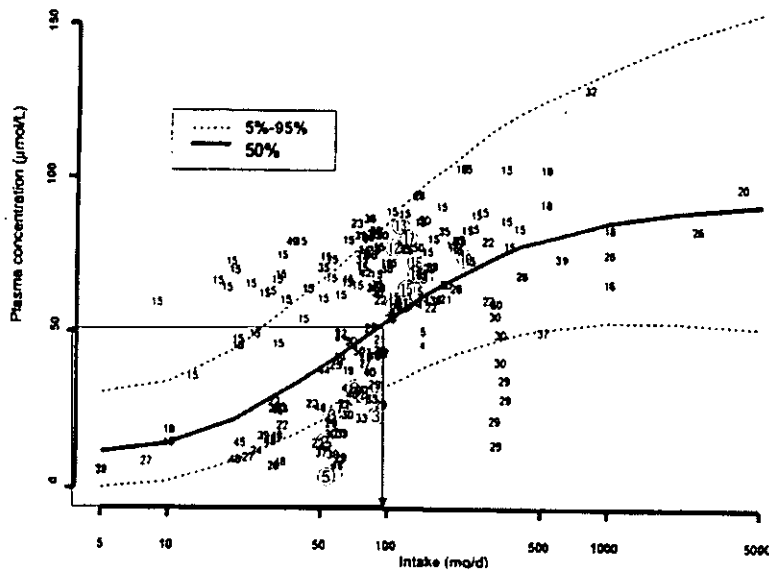


図3. ビタミンCの摂取量と血漿ビタミンC濃度の関係

アスコルビン酸の摂取量と血漿中濃度を調べた36論文を分析した Int J Vitam Nutr Res 70(5):226-237 (2000) から引用。番号は日本人で検討した論文のデータを追加したもの。この図において血漿中のアスコルビン酸濃度が50 μM 以上になる摂取量は100mg/day以上である。

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

1. 水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 -ビタミン B₁-

研究協力者 福渡 努 滋賀県立大学 助手

研究要旨 第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、健康障害を引き起こさない最大上限摂取量に関する報告がないことから、ビタミン B₁ の許容上限摂取量は策定されなかった。しかし、ビタミン B₁ の大量投与により様々な毒性を示唆する臨床症状が報告されている。本年度においては、チアミン塩酸塩の大量摂取がラットにおよぼす影響について検討することを目的とした。チアミン塩酸塩の終濃度を 0.0006, 0.006, 0.06, 0.18, 1.0%とした食餌をラットに 30 日間投与した。飼料摂取量、体重増加量にチアミン塩酸塩大量摂取の影響は認められず、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の各重量にも影響は認められなかった。1.0%チアミン塩酸塩食を摂取したラットには軽度の下痢および盲腸の膨潤が認められたが、健康上悪影響をおよぼす危険性のないものであった。これらの結果から、1.0%チアミン塩酸塩食による悪影響は認められず、ラットにおけるチアミン塩酸塩の NOAEL は 1,000 mg/kg 体重/日であった。

A. 目的

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、ビタミン B₁ の許容上限摂取量は策定されなかった。これは、「健康障害を引き起こさない最大上限に関する成績はないので、NOAEL, LOAEL は策定しなかった。したがって、許容上限摂取量については策定しなかった。」ためである。米国の Dietary Reference Intakes においても、ビタミン B₁ の許容上限摂取量は策定されていない¹⁾。これは、一般に利用される 50 mg/日以下のチアミン摂取では悪影響が現れず、ビタミン B₁ 経口摂取による悪影響について系統的に調べた報告がないためである。しかし、チアミンの大量摂取による不安、掻痒、呼吸障害、吐き気、腹痛、アナフィラキシーショックなどの臨床症状が報告されている²⁾。チアミン 500 mg/日の筋肉注射により掻痒感を訴える症例が報告されており³⁾、989 人へのチアミン塩酸塩 100 mg の静脈注射により 11 人が灼熱感を、1 人が掻痒感を訴える症例も報告されている⁴⁾。

以上のように、ビタミン B₁ 大量投与により様々な毒性を示唆する臨床症状が報告されているものの、経口摂取による悪影響について系統的に調べた研究報告がないため、許容上限摂取量を策定できない。本研究では、ビタミン B₁ の許容上限摂取量を策定するための基礎的データを得ることを目的として、

チアミン塩酸塩の大量摂取がラットにおよぼす影響について検討した。

B. 研究方法

動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は 22°C 前後、湿度は 50% 前後、午前 6 時-午後 6 時を明、午後 6 時-午前 6 時を暗とした。3 週齢の Wistar 系雄ラット 20 匹を日本クレア (株) より購入し、平均体重がほぼ等しくなるよう 4 匹ずつ 5 群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。20% カゼイン食にチアミン塩酸塩を 0.0006, 0.006, 0.06, 0.18, 1.0% 添加した食餌を与え、30 日間飼育した。飼料と水は自由摂取とし、1 日ないし 2 日おきの午前 9 時-10 時に新しいものと交換した。また、その際に体重と飼料摂取量を測定した。飼育最終日の 1 日尿および 1 日糞 (午前 10 時-翌日午前 10 時: 24 時間) を集めた。飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し、血液を採取した。脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣を摘出し、各臓器重量を測定した。血液、肝臓はチアミンの測定に使用した。尿はチアミン、リボフラビン、4-ピリドキシン酸、ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸、葉酸、アスコルビン酸の測定に使用した。

分析

尿中チアミン含量の測定として、尿を 0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC によ

る分析に供した。糞中チアミン含量の測定として、糞 0.1 g に 10 倍量の 10%メタリン酸溶液を加え、37°Cで放置後、ハンドミキサーを用いて均一化した。遠心後の水層を取り、沈殿に 3%メタリン酸溶液 2.5 ml を加えて攪拌し、遠心上清を先の水層と合わせた。これを 0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。血中総チアミン含量の測定として、EDTA-4Na を 0.4 mg 入れた 1.5 ml チューブに採取した血液 200 μl を加えてよく混合し、さらに 5% TCA を 400 μl 加えてよく混合した。遠心上清 200 μl に 4 M 酢酸ナトリウム溶液を 30 μl 、1%タカジアスターゼ B 溶液を 20 μl 加え、37°Cで一晩放置後、0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。肝総チアミン含量の測定として、肝臓 0.5 g に 10 倍量の 5% TCA を加えてホモジナイズし、遠心上清 200 μl に 4 M 酢酸ナトリウム溶液を 30 μl 、1%タカジアスターゼ B 溶液を 20 μl 加え、37°Cで一晩放置後、0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Shodex Rs-pak NN-614 ($\phi 6.0 \times 150 \text{ mm}$)、移動相および流速：0.2 M NaH_2PO_4 、1.0 ml/min、反応液：0.01% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、0.15 ml/min および 15% NaOH、0.15 ml/min、カラム温度：40°C、検出器：蛍光光度計、励起波長 365 nm、蛍光波長 435 nm とし、ポストカラム法を用いた。

尿中リボフラビン含量の測定として、尿を 0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Tosoh ODS-80Ts ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$)、移動相：10 mM NaH_2PO_4 (pH 5.5)-メタノール (70 : 30 v/v)、流速：0.8 ml/min、カラム温度：40°C、検出器：蛍光光度計、励起波長 445 nm、蛍光波長 530 nm とした。

尿中 4-ピリドキシン酸含量の測定として、尿を 0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：TSKgel ODS-120A ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$)、移動相：2.2%リン酸 (pH 2.2)-メタノール (90 : 10 v/v)、流速：1.0 ml/min、カラム温度：40°C、検出器：蛍光光度計、励起波長 355 nm、蛍光波長 436 nm とした。

尿中ニコチンアミド代謝産物量はニコチンアミド、 N^1 -メチルニコチンアミド (MNA)、 N^1 -メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py)、 N^1 -メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計とした。尿中ニコチンアミド、2-Py、4-Py 各含量の測定として、尿 1 ml に炭酸カリウム 1.2 g を添加した後、ジエチ

ルエーテル 10 ml を加えてよく混合し、エーテル層を蒸発乾固させた。この乾固物を水 0.5 ml に溶解し、0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Chemcosorb 7-ODS-L ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$)、移動相：10 mM KH_2PO_4 (pH 3.0)-アセトニトリル (96 : 4 v/v)、流速：1.0 ml/min、カラム温度：25°C、検出器：紫外分光光度計 260 nm とした。内部標準であるイソニコチンアミドのピーク面積から回収率を求め、ニコチンアミド、2-Py、4-Py 量を算出した。尿中 MNA 含量の測定として、尿 0.1 ml、水 0.7 ml、1M イソニコチンアミド溶液 0.2 ml、0.1M アセトフェノン溶液 0.5 ml を混合した後、6M NaOH 溶液 1 ml を加えて 10 分間氷冷し、99%ギ酸 0.5 ml を加えて 15 分間室温で放置した。沸騰水浴中で 5 分間放置した後、十分に氷冷し、遠心上清を 0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Tosoh ODS 80Ts ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$)、移動相：1 g/L 1-ヘプタスルホン酸ナトリウムおよび 1 mM EDTA-2Na を含む 20 mM KH_2PO_4 (pH 3.0)-アセトニトリル (97 : 3 v/v)、流速：1.0 ml/min、カラム温度：40°C、検出器：蛍光光度計、励起波長 382 nm、蛍光波長 440 nm とした。

尿中パントテン酸含量の測定として、尿 10 μl を含むパントテン酸定量用基礎培地 (日水製薬株式会社) 2 ml に *Lactobacillus Plantarum*, ATCC 8014 を接種した。16 時間培養後、比色計を用いて 660 nm における濁度を測定した。

尿中葉酸含量の測定として、尿 10 μl を含む葉酸定量用基礎培地 (DIFCO) 2 ml に *Lactobacillus rhamnosus*, ATCC 2733 を接種した。22 時間培養後、比色計を用いて 660 nm における濁度を測定した。

尿中アスコルビン酸含量の測定として、尿 100 μl に 0.2% 2, 6-ジクロロインドフェノール 100 μl 、1%塩化スズ-5%メタリン酸 50 μl 、2% 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 M 硫酸 120 μl を加えて混和し、37°Cで 3 時間放置後、水 1 ml、酢酸エチル 1 ml を加えて混和した。遠心分離後、酢酸エチル層 600 μl を蒸発乾固させ、乾固物をアセトニトリル 200 μl に溶解し、0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム： μ Bodasphere 5 μ C18-100A ($\phi 3.9 \times 150 \text{ mm}$)、移動相：0.1%トリエチルアミン (pH 3.0)-アセトニトリル (50 : 50 v/v)、流速：1.0 ml/min、カラム温度：40°C、検出器：紫外分光光度計 505 nm とした。

C. 結果

チアミン塩酸塩の大量摂取が飼料摂取量および体重増加量におよぼす影響

薬剤や栄養素の大量摂取による明らかな過剰害を調べる指標として、飼料摂取量の低下とそれに伴う体重増加量の抑制が挙げられる。本研究では、3週齢 Wistar 系雄性ラットに 0.0006～1.0%のチアミン塩酸塩を含む食餌を与えて 30 日間飼育した。この飼育期間において、飼料摂取量および体重増加量にはチアミン塩酸塩の大量摂取による影響は認められなかった(図 1)。しかし、チアミン塩酸塩 1.0%添加食を摂取したラットにおいて、軽度の下痢が観察された。

チアミン塩酸塩の大量摂取が臓器重量におよぼす影響

飼育 30 日目に脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣を摘出し、各臓器重量を測定した。各臓器重量にはチアミン塩酸塩の大量摂取による影響は認められなかった(表 1)。しかし、チアミン塩酸塩 1.0%チアミン塩酸塩食を摂取したラットにおいて、盲腸が 3 倍程度に膨張し、内容物の滞留が観察された。

チアミン塩酸塩の大量摂取が尿および糞中チアミン排泄量におよぼす影響

飼育 30 日目の 1 日尿および 1 日糞に含まれるチアミン量を測定した。尿中チアミン排泄量はチアミン塩酸塩摂取量依存的に増加し、1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットの値は 0.0006%チアミン塩酸塩食摂取ラットの約 900 倍を示した(表 2)。糞中チアミン排泄量も同様にチアミン塩酸塩摂取量依存的に増加し、1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットの値は 0.0006%チアミン塩酸塩食摂取ラットの約 6000 倍を示した(表 2)。

チアミン塩酸塩の大量摂取が血および肝臓チアミン濃度におよぼす影響

飼育 30 日目の血液および肝臓に含まれる総チアミン量を測定した。血中総チアミン濃度はチアミン塩酸塩摂取量依存的に増加し、1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットの値は 0.0006%チアミン塩酸塩食摂取ラットの約 8 倍を示した(表 3)。肝臓チアミン濃度も同様にチアミン塩酸塩摂取量依存的に増加し、1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットの値は 0.0006%チアミン塩酸塩食摂取ラットの約 4 倍を示した(表 3)。

チアミン塩酸塩の大量摂取が尿中 B 群ビタミン排泄量におよぼす影響

飼育 30 日目の 1 日尿に含まれるリボフラビン、4-ピリドキシン酸、ニコチンアミド代

謝産物、パントテン酸、葉酸、アスコルビン酸の含量を測定した。リボフラビン、4-ピリドキシン酸、ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸、葉酸の各尿中排泄量にはチアミン塩酸塩の大量摂取による影響は認められなかった(図 2)。しかし、1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットにおいて、尿中アスコルビン酸排泄量が 0.0006%チアミン塩酸塩食摂取ラットの 1.6 倍に増加した(図 2-F)。

D. 考察

本研究では、ビタミン B₁ の許容上限摂取量を策定するための基礎的データを得ることを目的として、ラットに 0.0006～1.0%のチアミン塩酸塩を含む食餌を与えて 30 日間飼育し、チアミン塩酸塩の大量摂取がラットにおよぼす影響について検討した。飼料摂取量および体重増加量にはチアミン塩酸塩の大量摂取による影響は認められず、また臓器重量にもチアミン塩酸塩の大量摂取による影響は認められなかった。チアミン塩酸塩 1.0%チアミン塩酸塩食を摂取したラットにおいて軽度の下痢が観察されたが、飼料摂取量および体重増加量には影響が認められなかったことから、消化・吸収を阻害する重篤な影響をおよぼしたとは考えにくい。また、1.0%チアミン塩酸塩食を摂取したラットの盲腸は 3 倍程度に膨潤し、内容物が滞留していたが、この現象は難吸収性の化合物を大量投与した時にみられる共通的な現象であるため、悪影響とは見なさない。以上の結果から、本研究では、チアミン塩酸塩 1.0%チアミン塩酸塩食を摂取したラットにはチアミン塩酸塩摂取による影響は認められず、このラットの摂取量からチアミン塩酸塩の NOEL を算定した。すなわち、体重 200 g のラットが 1%のチアミン塩酸塩を含む食餌を 1 日に約 20 g 摂取したことから、チアミン塩酸塩の NOEL を 1,000 mg/kg 体重/日とした。

本研究では、大量摂取したチアミン塩酸塩の動態を明らかにするため、尿および糞中のチアミン含量、血液および肝臓の総チアミン含量を測定した。尿および糞中のチアミン含量はチアミン塩酸塩摂取量依存的に増加し、0.18%チアミン塩酸塩食摂取ラットの尿および糞中排泄量は 0.0006%チアミン塩酸塩食摂取ラットのそれぞれ約 90 倍、約 2,000 倍、1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットではそれぞれ約 900 倍、約 6,000 倍であった。チアミン塩酸塩の摂取量が 300 倍、約 1,600 倍に増加したことに比して、尿中排泄量の増加は低く、糞中排泄量の増加は高かったことから、チア

ミン塩酸塩の摂取量が高くなるほど吸収率が低下し、糞中へ排泄されることを示している。一方、血液および肝臓の総チアミン含量もチアミン塩酸塩摂取量依存的に増加し、0.18%チアミン塩酸塩食摂取ラットの血液および肝臓における濃度は0.0006%チアミン塩酸塩食摂取ラットのそれぞれ2.5倍、1.8倍、1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットではそれぞれ8.3倍、3.9倍であった。ビタミンB₁の主要な貯蔵部位は肝臓であるが、チアミン塩酸塩大量摂取による肝総チアミン濃度の増加は低いものであった。以上の結果から、吸収されたチアミンは体内に蓄積せず、そのほとんどは速やかに尿中へ排泄されることが示唆される。また、この機構は、チアミン塩酸塩を大量摂取しても悪影響が現れにくい理由の一つであると考えられる。

B群ビタミンは糖質、脂質、アミノ酸の代謝に協調して関与することから、チアミン塩酸塩の大量摂取が他のB群ビタミンの代謝に作用するか検討した。ビタミンB₂、ビタミンB₆、ナイアシン、パントテン酸、葉酸について各代謝産物の尿中排泄量を測定したが、チアミン塩酸塩の大量摂取による影響は認められなかった。1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットにおいて尿中アスコルビン酸排泄量が0.0006%チアミン塩酸塩食ラットの1.6倍に増加した。ラットはアスコルビン酸合成能を有し、生体異物の摂取によりアスコルビン酸合成が促進し⁵⁾、生体異物代謝に関連するCYPの合成は肝アスコルビン酸濃度に依存する⁶⁾。従って、1.0%チアミン塩酸塩食摂取ラットにおいて尿中アスコルビン酸排泄量が増加したのは、体内に大量に存在するチアミンを異物代謝するためにアスコルビン酸合成が促進された可能性が考えられる。

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. Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press.
2. Stephen JM, Grant R, Yeh CS. Anaphylaxis from administration of intravenous thiamine. *Am J Emerg Med* (1992) 10, 61-63.
3. Royer-Morrot MJ, Zhiri A, Paille F, Royer RJ. Plasma thiamine concentrations after intramuscular and oral multiple dosage regimens in healthy men. *Eur J Clin Pharmacol* (1992) 42, 219-222.
4. Wrenn KD, Murphy F, Solvis CM. A toxicity study of parenteral thiamine hydrochloride. *Ann Emerg Med* (1989) 18, 867-870.
5. Horio F, Yoshida A. Effects of some xenobiotics on ascorbic acid metabolism in rats. *J Nutr* (1982) 112, 416-425.
6. Horio F, Shibata T, Makino S, Machino S, Hayashi Y, Hattori T, Yoshida A. UDP glucuronosyltransferase gene expression is involved in the stimulation of ascorbic acid biosynthesis by xenobiotics in rats. *J Nutr* (1993) 123, 2075-2084.

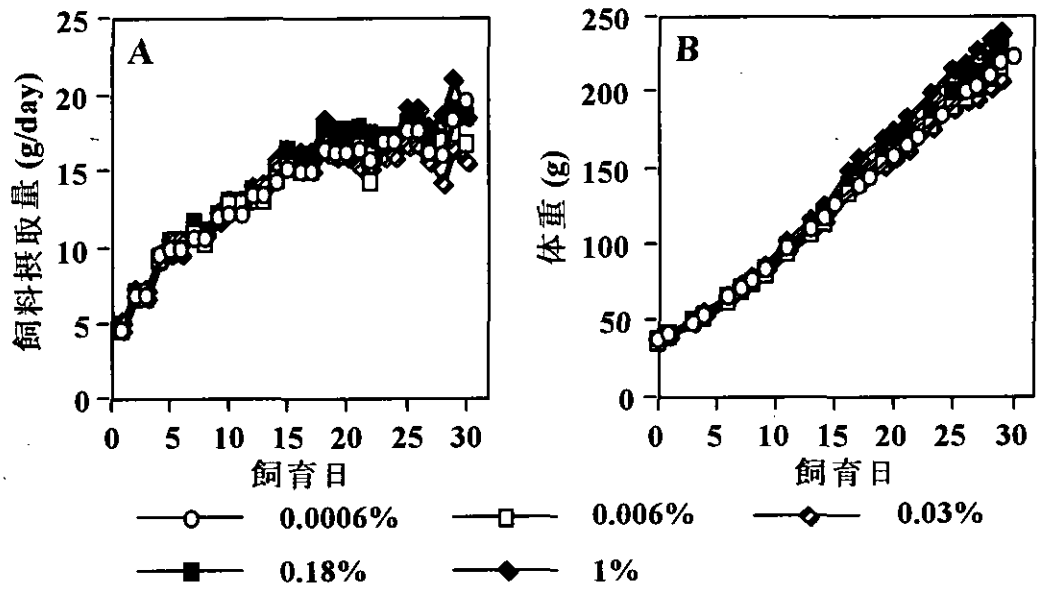


図 1. チアミン塩酸塩大量摂取が飼料摂取量 (A) および体重 (B) におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した.

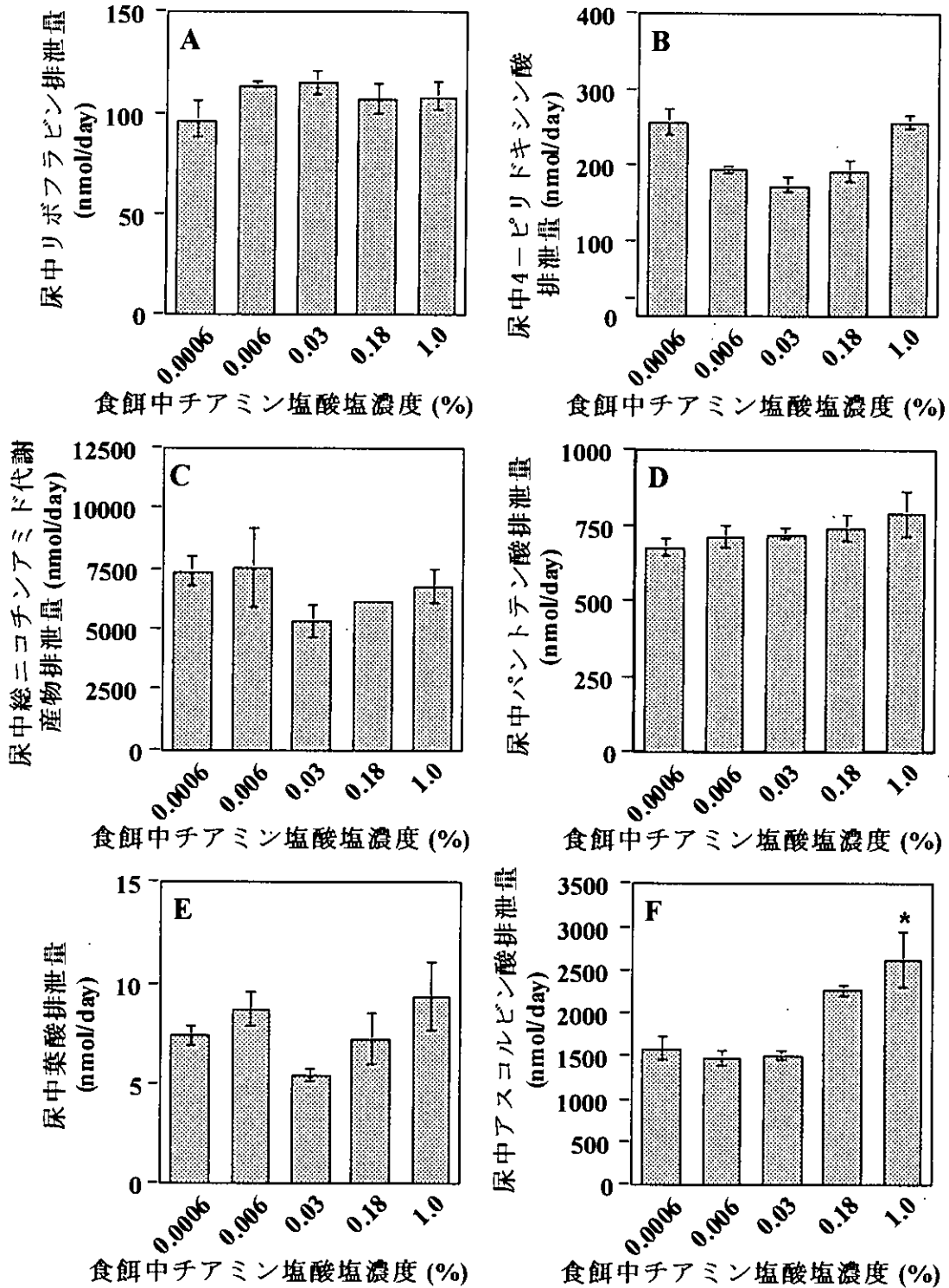


図2. チアミン塩酸塩の大量摂取がリボフラビン (A), 4-ピリドキシニン酸 (B), ニコチンアミド総代謝産物 (C), パントテン酸 (D), 葉酸 (E), アスコルビン酸 (F) の各尿中排泄量におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した. *は0.0006%チアミン塩酸塩添加食摂取ラットの値と有意差があることを示す ($p < 0.05$).

表1 チアミン塩酸塩大量摂取が臓器重量におよぼす影響

	食餌中のチアミン塩酸塩濃度				
	0.0006%	0.006%	0.03%	0.18%	1.0%
脳 (g)	1.70±0.05	1.67±0.07	1.46±0.07	1.49±0.10	1.74±0.07
心臓 (g)	0.76±0.03	0.77±0.04	0.73±0.01	0.77±0.03	0.76±0.01
肺 (g)	1.15±0.07	1.09±0.05	1.18±0.04	1.35±0.19	1.13±0.19
肝臓 (g)	9.81±0.60	9.62±0.50	9.26±0.43	11.06±0.39	11.18±0.40
脾臓 (g)	0.73±0.07	0.64±0.01	0.67±0.04	0.65±0.04	0.74±0.03
腎臓 (g)	1.68±0.02	1.79±0.08	1.72±0.02	1.90±0.09	1.90±0.05
精巣 (g)	2.32±0.07	2.02±0.31	2.16±0.11	2.29±0.05	2.35±0.07

値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した。

表2 チアミン塩酸塩大量摂取が尿および糞中チアミン量におよぼす影響

	食餌中のチアミン塩酸塩濃度				
	0.0006%	0.006%	0.03%	0.18%	1.0%
尿 (μmol/day)	0.06±0.01	1.33±0.09	1.91±0.15	5.57±0.48	56.91±3.59*
糞 (μmol/day)	0.02±0.01	0.27±0.02	3.68±0.26	39.74±2.54	123.32±34.47*

値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した。*は0.0006%チアミン塩酸塩添加食摂取ラットの値と有意差があることを示す (p < 0.05)。

表3 チアミン塩酸塩大量摂取が血液および肝総チアミン量におよぼす影響

	食餌中のチアミン塩酸塩濃度				
	0.0006%	0.006%	0.03%	0.18%	1.0%
血液 (nmol/ml)	0.82±0.01	1.30±0.04	1.52±0.05*	2.08±0.04*	6.81±0.31*
肝臓 (nmol/g of liver)	34.0±0.5	48.4±1.3	50.4±1.0*	62.6±2.3*	133.2±7.8*

値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した。*は0.0006%チアミン塩酸塩添加食摂取ラットの値と有意差があることを示す (p < 0.05)。

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

2. 水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 - ビタミン B₂ -

研究協力者 福渡 努 滋賀県立大学 助手

研究要旨 第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、健康障害を引き起こさない最大上限摂取量に関する報告がないことから、ビタミン B₂ の許容上限摂取量は策定されなかった。最大上限摂取量に関する報告がない最大の理由は、ビタミン B₂ 経口摂取による悪影響について系統的に調べた報告がないことによる。本年度においては、リボフラビンの大量摂取がラットにおよぼす影響について検討することを目的とした。リボフラビンの終濃度を 0.0006, 0.1, 0.5, 1.0%とした食餌をラットに 22 日間投与した。飼料摂取量、体重増加量にリボフラビン大量摂取の影響は認められず、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の各重量にも影響は認められなかった。これらの結果から、リボフラビン 1.0%リボフラビン食による悪影響は認められず、ラットにおけるリボフラビンの NOEL は 1,000 mg/kg 体重/日であった。

A. 目的

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、ビタミン B₂ の許容上限摂取量は策定されなかった。これは、「健康障害を引き起こさない最大上限に関する成績はない。ビタミン B₂ の大量投与では 60 mg/日あるいは 500 mg/日の成績があり、短期間では毒性が認められていない。したがって、NOAEL, LOAEL は策定しなかった。また、許容上限摂取量については策定しなかった。」ためである。米国の Dietary Reference Intakes においても、ビタミン B₂ の許容上限摂取量は策定されていない¹⁾。これは、50~500 mg/日のリボフラビン摂取では悪影響が現れず、ビタミン B₂ 経口摂取による悪影響について系統的に調べた報告がないためである。本研究では、ビタミン B₂ の許容上限摂取量を策定するための基礎的データを得ることを目的として、リボフラビンの大量摂取がラットにおよぼす影響について検討した。

B. 研究方法

動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は 22℃前後、湿度は 50%前後、午前 6 時~午後 6 時を明、午後 6 時~午前 6 時を暗とした。3 週齢の Wistar 系雄ラット 16 匹を日本クレア (株) より購入し、平均体重がほぼ等しくなるよう 4 匹ずつ 4 群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。

20%カゼイン食にリボフラビンを 0.0006, 0.1, 0.5, 1.0%添加した食餌を与え、22 日間飼育した。0.0006%添加食摂取ラットを対照群、0.1, 0.5, 1.0%添加食摂取ラットを大量摂取群とした。飼料と水は自由摂取とし、1 日ないし 2 日おきの午前 9 時~10 時に新しいものと交換した。また、その際に体重と飼料摂取量を測定した。飼育最終日の 1 日尿および 1 日糞 (午前 10 時~翌日午前 10 時:24 時間) を集めた。飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し、血液を採取した。脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣を摘出し、各臓器重量を測定した。血液、肝臓はリボフラビンの測定に使用した。尿はチアミン、リボフラビン、4-ピリドキシン酸、ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸の測定に使用した。

分析

尿中リボフラビン含量の測定として、尿を 0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。糞、血液および肝臓中の総ビタミン B₂ 量はリボフラビン、FMN、FAD、その他のリボフラビン誘導体をルミフラビンに分解して測定した。約 0.1 g の 1 日糞に 10 倍量の 0.1 M KPB (pH 7.0) を加えてソニケーターで粉碎し、0.1 M KPB (pH 7.0) で 200 倍希釈した後、80℃の熱水中で 15 分間振盪し、さらに 0.1 M KPB (pH 7.0) で 1~10 倍に希釈し、光分解用試料とした。光分解用試料 100 μl に水 440 μl と 0.5 M H₂SO₄ 260 μl を加えて 80℃で 15 分間加温し、10%トリ

クロロ酢酸 200 μ l を加えて混和した。遠心上清 200 μ l に 1 M NaOH 200 μ l を加え、20 cm の距離から 10 W の蛍光灯を 30 分間照射し、酢酸 20 μ l を加えた後、50 μ l を HPLC による分析に供した。血中総ビタミン B₂ 量の測定として、採血後の血液 500 μ l に直ちに水 500 μ l を加えて混和し、これを光分解用試料とした。光分解用試料 200 μ l に水 340 μ l と 0.5 M H₂SO₄ 260 μ l を加え、以降は糞中の総ビタミン B₂ 量の測定における光分解と同じ操作を行った。肝臓約 0.5 g を 10 倍量の 50 mM KPB (pH 7.0) を加えてホモジナイズし、これを光分解用試料とした。光分解用試料 200 μ l に水 340 μ l と 0.5 M H₂SO₄ 260 μ l を加え、以降は糞中の総ビタミン B₂ 量の測定における光分解と同じ操作を行った。分析条件は、カラム：Tosoh ODS-80Ts (ϕ 4.6 x 250 mm), 移動相：10 mM NaH₂PO₄ (pH 5.5)-メタノール (70 : 30 v/v), 流速：0.8 ml/min, カラム温度：40°C, 検出器：蛍光光度計, 励起波長 445 nm, 蛍光波長 530 nm とした。

尿中チアミン含量の測定として、尿を 0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Shodex Rs-pak NN-614 (ϕ 6.0 x 150 mm), 移動相および流速：0.2 M NaH₂PO₄, 1.0 ml/min, 反応液：0.01% K₃Fe(CN)₆, 0.15 ml/min および 15% NaOH, 0.15 ml/min, カラム温度：40°C, 検出器：蛍光光度計, 励起波長 365 nm, 蛍光波長 435 nm とし、ポストカラム法を用いた。

尿中 4-ピリドキシン酸含量の測定として、尿を 0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：TSKgel ODS-120A (ϕ 4.6 x 250 mm), 移動相：2.2%リン酸 (pH 2.2)-メタノール (90 : 10 v/v), 流速：1.0 ml/min, カラム温度：40°C, 検出器：蛍光光度計, 励起波長 355 nm, 蛍光波長 436 nm とした。

尿中ニコチンアミド代謝産物量はニコチンアミド, N¹-メチルニコチンアミド (MNA), N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計とした。尿中ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py 各含量の測定として、尿 1 ml に炭酸カリウム 1.2 g を添加した後、ジエチルエーテル 10 ml を加えてよく混合し、エーテル層を蒸発乾固させた。この乾固物を水 0.5 ml に溶解し、0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Chemcosorb 7-ODS-L (ϕ 4.6 x

250 mm), 移動相：10 mM KH₂PO₄ (pH 3.0)-アセトニトリル (96 : 4 v/v), 流速：1.0 ml/min, カラム温度：25°C, 検出器：紫外分光光度計 260 nm とした。内部標準であるイソニコチンアミドのピーク面積から回収率を求め、ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py 量を算出した。尿中 MNA 含量の測定として、尿 0.1 ml, 水 0.7 ml, 1 M イソニコチンアミド溶液 0.2 ml, 0.1 M アセトフェノン溶液 0.5 ml を混合した後、6M NaOH 溶液 1 ml を加えて 10 分間氷冷し、99% ギ酸 0.5 ml を加えて 15 分間室温で放置した。沸騰水浴中で 5 分間放置した後、十分に氷冷し、遠心上清を 0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Tosoh ODS 80Ts (ϕ 4.6 x 250 mm), 移動相：1 g/l 1-ヘプタスルホン酸ナトリウムおよび 1 mM EDTA-2Na を含む 20 mM KH₂PO₄ (pH 3.0)-アセトニトリル (97 : 3 v/v), 流速：1.0 ml/min, カラム温度：40°C, 検出器：蛍光光度計, 励起波長 382 nm, 蛍光波長 440 nm とした。

尿中パントテン酸含量の測定として、尿 10 μ l を含むパントテン酸定量用基礎培地 (日本製薬株式会社) 2 ml に *lactobacillus Plantarum*, ATCC 8014 を接種した。16 時間培養後、比色計を用いて 660 nm における濁度を測定した。

C. 結果

リボフラビンの大量摂取が飼料摂取量および体重増加量におよぼす影響

薬剤や栄養素の大量摂取による明らかな過剰害を調べる指標として、飼料摂取量の低下とそれに伴う体重増加量の抑制が挙げられる。本研究では、3 週齢 Wistar 系雄性ラットに 0.0006-1.0% のリボフラビンを含む食餌を与えて 22 日間飼育した。この飼育期間において、飼料摂取量および体重増加量にはリボフラビンの大量摂取による影響は認められなかった (図 1)。また、肉眼的所見において、毛並み、行動などに異常は認められなかった。

リボフラビンの大量摂取が臓器重量におよぼす影響

飼育 22 日目に脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣を摘出し、各臓器重量を測定した。各臓器重量にはリボフラビンの大量摂取による影響は認められなかった (表 1)。また、開腹時の肉眼的所見にも異常は認められなかった。

リボフラビンの大量摂取が尿中リボフラビン排泄量および糞中総ビタミン B₂ 排泄量におよぼす影響

飼育 22 日目の 1 日尿に含まれるリボフラビン量および 1 日糞に含まれるビタミン B₂ 量を測定した。大量摂取群の尿中リボフラビン排泄量は対照群の約 2.5 倍に増加し、大量摂取群の値は 0.1, 0.5, 1.0%リボフラビン食摂取ラットのいずれにおいてもほぼ同じ値を示した (表 2)。糞中総ビタミン B₂ 排泄量はリボフラビン摂取量依存的に増加し、1.0%リボフラビン食摂取ラットの値は対照群の約 4,300 倍を示した (表 2)。

リボフラビンの大量摂取が血および肝総ビタミン B₂ 濃度におよぼす影響

飼育 22 日目の血液および肝臓に含まれる総ビタミン B₂ 量を測定した。血中総リボフラビン濃度は 1.0%リボフラビン食摂取ラットにおいて対照群の約 2 倍を示した (表 3)。肝総リボフラビン濃度は各群ともほぼ同じ値を示した (表 3)。

チアミン塩酸塩の大量摂取が尿中 B 群ビタミン排泄量におよぼす影響

飼育 22 日目の 1 日尿に含まれるチアミン、4-ピリドキシン酸、ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸の含量を測定した。いずれの B 群ビタミンの各尿中排泄量にもリボフラビン大量摂取による影響は認められなかった (図 4)。

D. 考察

本研究では、ビタミン B₂ の許容上限摂取量を策定するための基礎的データを得ることを目的として、ラットに 0.0006~1.0%のリボフラビンを含む食餌を与えて 22 日間飼育し、リボフラビンの大量摂取がラットにおよぼす影響について検討した。飼料摂取量および体重増加量にはリボフラビンの大量摂取による影響は認められず、また臓器重量にもリボフラビンの大量摂取による影響は認められなかった。以上の結果から、本研究では、1.0%リボフラビン食を摂取したラットにはリボフラビン摂取による影響は認められず、このラットの摂取量からリボフラビンの NOAEL を算定した。すなわち、体重 200 g のラットが 1%のリボフラビンを含む食餌を 1 日に約 20 g 摂取したことから、リボフラビンの NOAEL を 1,000 mg/kg 体重/日とした。

本研究では、大量摂取したリボフラビンの動態を明らかにするため、尿中のリボフラビン含量、糞、血液および肝臓の総ビタミン B₂ 含量を測定した。尿中のリボフラビン含量は 0.1%以上のリボフラビン摂取により増加したものの、その値は 0.0006%リボフラビン食摂取ラットの約 2.5 倍であり、0.1%以上摂

取してもその値はほぼ同じであった。一方、糞中の総ビタミン B₂ 量はリボフラビン摂取量依存的に増加し、0.5%および 1.0%リボフラビン食摂取ラットの糞中排泄量はそれぞれ対照群の 0.0006%リボフラビン食摂取ラットのそれぞれ約 1,700 倍、約 4,300 倍であった。リボフラビンの摂取量が約 800 倍、約 1,600 倍に増加したことに比して、尿中排泄量の増加は低く、糞中排泄量の増加は高かったことから、リボフラビンを大量に摂取しても一定量しか吸収できず、吸収されなかったリボフラビンが糞中へ排泄されることを示している。血液および肝臓の総ビタミン B₂ 含量はリボフラビン大量摂取の影響をほとんど受けなかったことも、リボフラビンの吸収能には限界があることを示している。従って、1.0%以上のリボフラビンを摂取しても、吸収されずに糞中に排泄されるだけであり、悪影響をおよぼさないことが考えられる。本研究では暫定的にリボフラビンの NOAEL を 1,000 mg/kg 体重/日としたが、この値はさらに高く設定できることが予想される。

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. Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press.