

研究年度	演題	種別	発表機関	刊行した文書	論文著者
昭和41	75-111	1-13	くろさか	遠藤隆とマユノケの商標内編 五式機「マユノケ」の改良の概 要と「マユノケ」機組のイロイロ である本機製造機組の概況	本誌、技術研 究報告、科学 技術新聞

VI. 研究成果の刊行に関する 一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻	頁	出版年
福渡努, 三木啓子, 東野勲, 柴田克己	腸内細菌のパントテン酸前駆体の投与がパントテン酸欠乏幼若ラットの成長とパントテン酸の尿中排泄量におよぼす影響	ビタミン	83	131-37	2009
福渡努, 葛谷真子, 佐藤志織, 柴田克己	ラットへのビタミンB ₁ あるいはビタミンB ₂ の過剰投与がB群ビタミンの尿中排泄量におよぼす影響	日本食品衛生学会誌	50	70-74	2009
福渡努, 伊藤景子, 柴田克己	ピリドキシン塩酸塩の大量摂取が幼若ラットの成長と水溶性ビタミン排泄量におよぼす影響	日本食品衛生学会誌	50	75-79	2009
福渡努, 倉田華織, 柴田克己	ニコチン酸の大量摂取が幼若ラットの成長, B群ビタミンの尿中排泄量およびトリプトファン代謝におよぼす影響	日本食品衛生学会誌	50	80-84	2009
Fukuwatari T, Shibata K	Consideration for diurnal variations in human blood NAD and NADP concentrations	<i>J Nutr Sci Vitaminol</i>	55	279-81	2009
柴田克己, 杉本恵麻, 廣瀬潤子, 福渡努	定量法の違いによる母乳中のビタミンB ₆ 量の変動	日本栄養食糧学会誌	62	131-35	2009
柴田克己, 遠藤美佳, 山内麻衣子, 廣瀬潤子, 福渡努	日本人の母乳中(1~5か月)の水溶性ビタミン含量の分布(資料)	日本栄養食糧学会誌	62	179-84	2009
福井富徳, 廣瀬潤子, 福渡努, 木村尚子, 佐々木敏, 柴田克己	自由食摂取時における日本人学生の血中水溶性ビタミン値の男女差について	栄養学雑誌	67	284-90	2009
守谷 彩, 福渡努, 柴田 克己	精製飼料を投与した Wistar 系ラットの栄養パラメーター(資	ビタミン	83	612-17	2009

	料)				
Shibata K, Fukuwatari T, Watanabe T, Mamoru Nishimuta M	Intra- and Inter-Individual Variations of Blood and Urinary Water-soluble Vitamins in Japanese Young Adults Consuming a Semi-purified Diet for 7 Days	<i>J Nut Sc</i> <i>Vitamino</i>	55	459-70	2009
Fukuwatari T, Sugimoto E, Tsuji T, Hirose J, Fukui T, Shibata K	Urinary excretion of vitamin B ₁₂ depends on urine volume in female university students and elderly subjects in Japan	<i>Nutrition</i> <i>Research</i>	29	839-845	2009
Takahashi K, Fukuwatari T, Shibata K	Fluorometric determination of pantothenic acid in human urine by isocratic reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with post-column derivatization	<i>J Chromatogr B</i>	877	2168-72	2009
柴田克己, 福 渡努	水溶性ビタミン	<i>臨床栄養</i>	115	528-34	2009
柴田克己, 辻 とみ子, 福渡 努	高齢者のビタミンサプリメント 摂取—健康維持に良いこと と悪いこと—	<i>ビタミン</i>	83	659-61	2009
吉田宗弘, 乾 由衣子, 福永 健治	乳児における市販離乳食から の微量ミネラルの摂取	<i>微量栄養素研究</i>	26	41-45	2009
吉田宗弘	微量ミネラル	<i>臨床栄養</i>	115	553-64	2009
吉田宗弘	微量元素 (2) 日本人はセレン 摂取を増やすべきか	<i>臨床栄養</i>	111	5	2007
吉田宗弘	日本人におけるモリブデン栄 養の現状	<i>臨床栄養</i>	111	3	2007
吉田宗弘	微量元素 (5) マンガン摂取 - 過不足と茶の影響	<i>臨床栄養</i>	112	1	2008
吉田宗弘	誘導体化とガスクロマトグラ	<i>Trace Nutrients</i>	25	147-51	2008

	フイー - 質量分析によるセレン超過食品中の含セレンアミノ酸の同定 -	<i>Research</i>			
吉田宗弘	食品中のセレンの分布と栄養有効性	<i>Biomed Res Trace Elements</i>	19	290-296	2008
吉原花織, 福永健治, 吉田宗弘	飼料中モリブデン濃度がラット臓器および血清モリブデン濃度に及ぼす影響	<i>Trace Nutrients Research</i>	24	120-123	2007
吉田宗弘, 生田剛	食品および飲料水中のバナジウム含量と日本人のバナジウム摂取量 (予報)	<i>Trace Nutrients Research</i>	24	65-70	2007
Yoshida M, Takada A, Hirose J, Endô M, Fukuwatari T, Shibata K.	Molybdenum and Chromium Concentrations in Breast Milk from Japanese Women.	<i>Biosci Biotechnol Biochem.</i>	72	2247-50	2008
Yoshida M, Okada T, Namikawa Y, Matsuzaki Y, Nishiyama T, Fukunaga K.	Evaluation of nutritional availability and anti-tumor activity of selenium contained in selenium-enriched Kaiware radish sprouts.	<i>Biosci Biotechnol Biochem</i>	71	2198-205	2007
Yoshida M, Sano K, Ishiyuki, E, Nishiyama T, Fukunaga K.	Assessment of Nutritional Availability of Selenium in Selenium-enriched Pumpkin.	<i>Biomedical Research on Trace Elements</i>	18	391-394	2007.
Himeno M, Tsugawa N, Kuwabara A, Fujii M, Kawai N, Kato Y, Kihara N, Toyoda T, Kishimoto M,	Effect of vitamin D supplementation in the institutionalized elderly.	<i>J Bone Miner. Metab</i>	27	733-737	2009

Ogawa Y, Kido S, Noike T, Okano T, Tanaka K					
Kuwabara A, Tsugawa N, Tanaka K, Fujii M, Kawai N, Mukae S, Kato Y, Kojima Y, Takahashi K, Omura K, Kagawa R, Inoue A, Noike T, Kido S, Okano T	Improvement of vitamin D status in Japanese institutionalized elderly by supplementation with 800 IU of vitamin D ₃ .	<i>J. Nutr. Sci. Vitaminol</i>	55	453-58	2009
Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H, Tsuji H, Shide K, Kamao M, Chiba T, Inagaki N, Okano T, Kido S.	High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease	<i>Osteoporos Int.</i>	20	935-42	2009
吉田宗弘	広範囲 血液・尿化学検査, 免疫学的検査-その数値をどう読むか- [第7版] IV. 生化学的検査[2] G. 金属モリブデン	<i>日本臨床</i>	68	333-36	2010
Kuwata A, Himeno M, Tsugawa N, Kamao M,	Hypovitaminosis and K are highly prevent and independent of overall malnutrition in the institutionalized elderly.	<i>Asia Pac J Clin. Nutr</i>	19		2010

Fujii M, Kawai N, Fukuda M, Ogawa Y, Kido S, Okano T, Tanaka K					
Hirota K, Shunsuke G, Hideki F, Yasuhiro H, Akira K, Koji S, Yoshihiro T Naoki O, Ken-ichi N, Kimie N, Naoko T, Toshio O, Riko K and Masafumi F	Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients Parathyroid Klotho and FGFR1 in uremia	<i>Kidney International</i>	77	232-38	2009
Ohta H, Kuroda T, Onoe Y, Orito S, Ohara M, Kume M, Harada A, Tsugawa N, Okano T, Sasaki S	The impact of lifestyle factors on serum 25-hydroxyvitamin D levels: a cross-sectional study in Japanese women aged 19-25 years	<i>J Bone Miner Metab</i>	27	682-8	2009
津川尚子, 岡野登志夫	ビタミンDと骨粗鬆症	<i>Vitamins (Japan)</i>	83	651-658	2009
津川尚子, 高瀬友貴, 峯上卓也, 土井綾子, 小池さやか, 鎌尾まや, 上西一弘, 石	思春期のビタミンK栄養評価 一曲率解析法を応用した新規 評価法の開発	<i>Osteoporosis (Japan)</i>	18	1	2010

田裕美, 岡野 登志夫					
Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, Uwano M, Yamaguchi N, Uenishi K, Ishida H, Sasaki S, Okano T.	Vitamin K content of foods and dietary vitamin K intake in Japanese young women.	<i>J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)</i>	53	464-70	2007
Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Wada A, Mori T, Murata K, Nishino R, Ukita T, Uenishi K, Tanaka K, Okano T.	Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.	<i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci</i>	859	192-200	2007
Nakamura K, Tsugawa N, Saito T, Ishikawa M, Tsuchiya Y, Hyodo K, Maruyama K, Oshiki R, Kobayashi R, Nashimoto M, Yoshihara A, Ozaki R, Okano T, Yamamoto M.	Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study.	<i>Bone</i>	42	271-7	2008
Tsugawa N,	Low plasma phylloquinone	<i>Bone Miner</i>	26	79-85	2008

Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Ozaki R, Tanaka K, Okano T.	concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women	<i>Metab.</i>			
Nakamura K, Saito T, Yoshihara A, Ishikawa M, Tsuchiya Y, Oshiki R, Kobayashi R, Maruyama K, Hyodo K, Nashimoto M, Tsugawa N, Okano T, Oyama M, Yamamoto M.	Low calcium intake is associated with increased bone resorption in postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study.	<i>Public Health Nutr</i>	12	2366-70	2009

VII. 研究成果の刊行物・別刷

ノート

腸内細菌のパントテン酸前駆体の投与がパントテン酸欠乏幼若ラットの成長とパントテン酸の尿中排泄量におよぼす影響

¹滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科, ²第一ファインケミカル株式会社福渡 努¹, 三木 啓子¹, 東野 勲², 柴田 克己¹

Vitamins (Japan), 83 (3), 131-137 (2009)

Effects of Feeding Pantothenic Acid Precursors on Microflora, Growth and Urinary Excretion of Pantothenic Acid in Young Pantothenic Acid-deficient Rats

Tsutomu Fukuwatari¹, Keiko Miki¹, Isao Azumano² and Katsumi Shibata¹¹Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture²Daiichi Fine Chemical Co., Ltd.

Pantothenic acid is very unstable under acid or alkaline conditions to be hydrolyzed to pantolactone and β -alanine. There is no information of the pantothenate deficiency which might be caused by hydrolysis with gastric acid. It may be possible that pantothenate is synthesized again from pantolactone and β -alanine by enterobacteria. Accordingly when pantolactone and β -alanine was administered to pantothenate-deficient infant rats, the growth and pantotheate content in liver and urine were compared with normal rats. Consequently pantolactone and β -alanine has not supported the growth similar to pantothenate-deficiency.

Key words: pantothenic acid, pantolactone, β -alanine, urine, rat

(Received April 16, 2007)

緒言

パントテン酸は酸やアルカリに不安定で、パントテン酸の前駆体でもあるパンラクトンと β -アラニンに加水分解される。このことから、胃酸によってパントテン酸が加水分解される可能性があるが、パントテン酸欠乏の発生は全く報告されていない。その理由の一つに、腸内細菌によってパンラクトンと β -アラニンからパントテン酸が再合成され、そのパントテン酸を利用している可能性が挙げられている。さらに、ヒトを含む哺乳動物の大腸に生息する腸内細菌はパントテン酸の *de novo* 生合成経路も有しており、合成された一部を利用していると言われている。また、肉を中心とした食事よりも野菜の多

い食事を摂ったときや、ヒトにセルロースを摂取させたときに、糞中のパントテン酸含量が高くなるという報告がある¹⁾。しかし、糞中のパントテン酸含量が高くなっても、尿中に排泄されるパントテン酸量には明らかな増大は認められていないか、あるいは若干増大している。一方、ヒトにパントテン酸を含まない食事を10週間にわたって投与すると、尿中のパントテン酸排泄量は速やかに検出限界以下に減少したが、実験最終日においても血液中のパントテン酸含量は低下せず、欠乏と思われる症状は認められなかった、という報告がある²⁾。この欠乏実験の結果は、腸内細菌によって合成されたパントテン酸の利用が示唆されるが、腸内細菌合成のパントテン酸の体内利用性に関しては未だに不明である。

¹ 〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町2500

そこで、我々は、栄養学の常法を使用して、幼若ラットの飼料摂取量と成長を指標として、パントテン酸の *de novo* 生合成経路の直前の前駆体であるパントラクトンと β -アラニンとを投与することで、腸内細菌の合成したパントテン酸の体内利用性を検討したので報告する。その結果、少なくとも幼若ラットにおいては、パントラクトンと β -アラニンの同時投与によるパントテン酸効果はないと判断された。

実験方法

1. 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% 前後に維持し、明暗サイクルは、午前 6 時～午後 6 時を明、午後 6 時～午前 6 時を暗とした。

3 週齢の Wistar 系雄ラット 25 匹を日本クレア株式会社より購入した。直ちに、平均体重がほぼ均等になるように 5 匹ずつ 5 群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。その日から、Table 1 に示した飼料を与えた。AIN-93-VX 配合に従った 20% カゼイン食投与群 (パントテン酸含量は 0.00147%) を正対照群とし、パントテン酸を含まない 20% カゼイン食投与群を負対照群とした。試験食群として、①正対照群に与えた 20% カゼイン食に含まれるパントテン酸と等モルのパントラクトンと β -アラニンを含む飼料を投与した群、②正対照群に与えた 20% カゼイン食に含まれるパントテン酸と等モルのパントラクトンのみを含む飼料を投与した群、③正対照群に与えた 20% カゼイン食に含まれるパントテン酸と等モルの β -アラニンのみを含む飼料を投与した群を作製した。飼育期間は 28 日間である。飼料と水は自由摂取とし、1 日ないし 2 日お

きに新しいものに交換した。ラットの世話は午前 8 時～10 時の間に行い、体重と飼料摂取量を測定した。実験開始日を Day 0 として、飼育最終日の Day 28 の 1 日尿 (Day 28 の午前 9 時～Day 29 午前 9 時:24 時間) を集めた。尿は塩酸酸性下で集め、採尿後、分析に供するまで -20℃ で保存した。

採尿終了後の Day 29 の午前 9 時～10 時に断頭にて屠殺した。また、尿中の B 群ビタミン量を測定した。

2. 化学薬品

ビタミンフリーミルクカゼイン、ショ糖、L-メチオニンは和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。コーンオイルは味の素株式会社 (東京) より購入した。 α -コーンスターチ、ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)³⁾、ビタミン混合 (AIN-93-VX)³⁾ はオリエンタル酵母株式会社より購入した。チアミン塩酸塩 ($C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl = 337.27$)、リボフラビン ($C_{17}H_{20}N_4O_6 = 376.37$)、ニコチンアミド ($C_6H_6N_2O = 122.13$)、パントテン酸カルシウム ($C_{18}H_{32}N_2O_{10} \cdot Ca = 476.54$) および β -アラニン ($C_3H_7NO_2 = 89.09$) は、和光純薬工業株式会社より購入した。パントラクトン ($C_6H_{10}O_3 = 130.14$) は Sigma (ミズーリ, 米国) より購入した。4-ピリドキシン酸 (4-PIC, $C_8H_9NO_4 = 183.16$) は ICN Pharmaceuticals (カリフォルニア, 米国) が製造したものを、和光純薬工業株式会社を通して得た。*N*¹-Methylnicotinamide (MNA) 塩化物 ($C_7H_9N_2O \cdot HCl = 159.61$) は東京化成工業株式会社 (東京) より得た。*N*¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py, $C_7H_8N_2O_2 = 152.15$) と *N*¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py, $C_7H_8N_2O_2 = 152.15$) は、Pullman と Colowick⁴⁾、および Shibata ら⁵⁾ の方法で合成した。他の化学薬品は市販品の中で最高純度のものを使用した。

Table 1. Composition of the diets.

	Positive control	Negative control	Pantolactone	β -Alanine	Pantolactone + β -Alanine
Vitamin-free milk casein	20	20	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	50.2	50.2	50.2	50.2	50.2
Sucrose	25.1	25.1	25.1	25.1	25.1
Mineral mixture (AIN-93-G-MX)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93-VX, PaA free)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Calcium pantothenate	0.0016	0	0	0	0
Pantolactone	0	0	0.00087	0	0.00087
β -Alanine	0	0	0	0.0006	0.0006

Values are expressed g per 100 g of diet.

3. 分析

3-1. チアミンの測定

尿を0.45 μ mフィルターで濾過し、その濾液20 μ Lを直接HPLCに注入した。定量方法は文献6に示したポストカラム-HPLC法にしたがった。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 mol/L NaH₂PO₄，1.0 mL/min，反応液1：0.01% K₃Fe(CN)₆，0.15 mL/min，反応液2：15% NaOH，0.15 mL/min，カラム温度：40 $^{\circ}$ C，検出器：蛍光光度計，励起波長365 nm，蛍光波長435 nmとした。

3-2. リボフラビンの測定

尿を0.45 μ mフィルターで濾過し、その濾液20 μ Lを直接HPLCに注入した。定量方法は文献7に示したHPLC法にしたがった。分析条件は、カラム：Tosoh ODS-80Ts (ϕ 4.6 x 250 mm)，移動相：10 mmol/L 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 $^{\circ}$ C，検出器：蛍光光度計，励起波長445 nm，蛍光波長530 nmとした。

3-3. ピリドキサルの異化代謝産物の4-ピリドキシン酸の測定

尿を0.45 μ mフィルターで濾過し、その濾液20 μ Lを直接HPLCに注入した。定量方法は文献8に示したHPLC法にしたがった。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 $^{\circ}$ C，検出器：蛍光光度計，励起波長355 nm，蛍光波長436 nmとした。

3-4. シアノコバラミンの測定方法

尿を常法に従い、KCN溶液を用いて尿中のビタミンB₁₂をシアノコバラミンに変化させ、安定化処理を行った⁹⁾。その処理尿を適量添加したビタミンB₁₂定量用基礎培地(日本製薬株式会社)2 mLに*Lactobacillus leichmanii*, ATCC 7830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。

3-5. ニコチンアミドの異化代謝産物のMNA, 2-Py, 4-Pyの測定方法

尿中のニコチンアミドおよびその異化代謝産物であるMNA, 2-Py, 4-Pyを測定し、この合計を総ニコチンアミド代謝産物とした。尿中のニコチンアミド, 2-Py, 4-Pyは以下の方法で同時定量した⁵⁾。尿1 mLに内部標準として1 mg/mLのイソニコチンアミドを10 μ L加えた。炭酸カリウム1.2 gを添加した後、ジエチルエーテル5 mLを加えて、5分間室温でよく混合し、エーテル層を取り出した。エーテルによる抽出操作を2回繰り返し、取り出したエーテルを蒸発乾固させた。この乾固物を水0.5 mLに溶解し、溶解液を0.45 μ mフィルターで濾過し、濾液20 μ LをHPLCに注入した。分析条件は、カラム：Chemcosorb 7-ODS-L (ϕ 4.6 x 250 mm)，移動相：10 mmol/L 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 $^{\circ}$ 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含量を測定するために¹⁰⁾、尿0.1 mL，水0.7 mL，1 mol/L イソニコチンアミド0.2 mL，0.1 mol/L アセトフェノン溶液0.5 mLを混合した後、6 mol/L NaOH溶液1 mLを加えて10分間水冷した。99%ギ酸0.5 mLを加えて15分間水中で放置した後、沸騰水浴中で5分間放置し、十分に氷冷してから遠心上清を0.45 μ mフィルターで濾過し、その濾液20 μ LをHPLCに注入した。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 mmol/L EDTA-2Naを含む20 mmol/L 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 $^{\circ}$ C，検出器：蛍光光度計，励起波長382 nm，蛍光波長440 nmとした。

3-6. パントテン酸の測定

尿を適量添加した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¹¹⁾。

3-7. 葉酸の測定

尿を適量添加した葉酸定量用基礎培地(DIFCO)2 mLに*Lactobacillus casei* 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¹²⁾。

3-8. ビオチンの測定方法

尿を適量添加したビオチン定量用基礎培地(日本製薬株式会社)2 mLに*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014を接種した。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¹³⁾。

4. 有意差検定

すべてのデータは平均値 \pm SEMで示した。有意差検定は、まず一元配置の分散分析を行い、有意差が認められた時にはStudent-Newman-Keulsの多重比較テストを行った。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。検定には統計ソフトGraphPad Prism version 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いた。

結果と考察

1. 体重増加量と飼料摂取量におよぼす影響

離乳したての3週齢のラットを被検動物とした。正対照群には1% AIN-93-VX配合を含む20%カゼイン食(パントテン酸含量は0.00147%)を、負対照群にはパントテン酸を含まない1% AIN-93-VX配合を含む20%カゼイン食を投与した。試験食群には、①正対照群と等モルのパントラクトンと β -アラニンを含む飼料を、②正対照群と等モルのパントラクトンのみを含む飼料を、③正対照群

と等モルの β -アラニンのみを含む飼料をそれぞれ投与した。投与期間は28日間とした。Fig. 1に示したように、試験群の三つの群すべてにおいて体重の増加量と飼料摂取量は負対照群と同じであり、パントラクトンと β -アラニンはラットの成長に全く寄与していないことが明らかとなった。

2. 臓器重量におよぼす影響

Table 1に示した正・負対照群、三つの試験飼料を幼若ラットに28日間投与した後の、脳、肺、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、胃、精巣の各重量をTable 2に示した。Fig. 1に示した飼料摂取量および体重増加量と同様に、負対照群と三つの試験群の臓器重量は正対照群に比して低値を示した。

3. 尿中、糞中、血液中、肝臓中のパントテン酸含量

正・負対照群、三つの試験群の尿中、糞中、血液中、肝臓中のパントテン酸含量をTable 3に示した。正対照群のパントテン酸含量がいわゆる正常値である。負対照群では明らかに尿中への排泄量が低下し、肝臓中の含量も低い値を示した。血液中の値は、我々の用いた方法では、すべての群において検出限界以下であった。パントテン酸は*L. plantarum*を用いる微生物定量方法を用いているが、感度が悪いので、血液中の値の測定は常に検出限界程度の値となり、きわめて精度の低い値となる。これは、血液中の結合型のパントテン酸を*L. plantarum*が利用で

きる遊離型にするための処理により希釈度が高くなることに起因する。現在、適正な処理方法を検討中である。

糞中のパントテン酸の値も、血液と肝臓中の値と同じく、正対照群が負対照群よりも高い値を示した。また、大腸に生息する細菌のパントテン酸前駆体であるパントラクトン、あるいは β -アラニンを添加した飼料を投与しても、糞中のパントテン酸量は負対照群とほぼ同じであった。一方、パントラクトンと β -アラニン同時投与群の糞中パントテン酸含量は、正対照群との間に有意の差異は認められなかった。したがって、パントテン酸の前駆体の投与は、腸内細菌のパントテン酸合成を促進しているものと考えられた。しかしながら、肝臓中と尿中のパントテン酸量は、負対照群と全く同じであったことから、大腸内で合成されたパントテン酸をラットは利用しにくいことが明らかとなった。このことは、肉を中心とした食事よりも野菜の多い食事を摂ったとき、また、ヒトにセルロースを摂取させたとき、糞中のパントテン酸含量が高くなるが、糞中のパントテン酸含量が高くなっても尿中に排泄されるパントテン酸量には明らかな増加は認められていないか、あるいは若干増加しているという報告¹⁾と一致するものであった。

緒言で述べたように、摂取したパントテン酸が、胃内でパントラクトンと β -アラニンに加水分解され、そして、腸内細菌によってパントラクトンと β -アラニンからパン

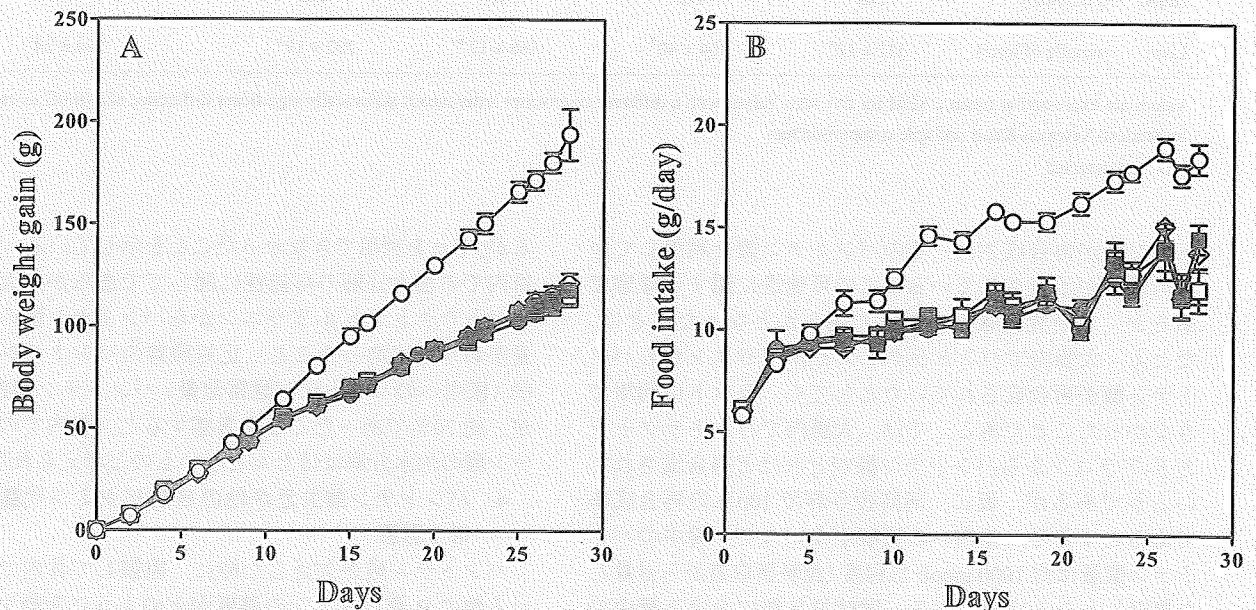


Fig. 1. Effects of dietary pantolactone, β -alanine, and simultaneous administration of pantolactone and β -alanine on the body weight gain (A) and food intake (B).

Weaning rats of the Wistar strain were fed with a pantothenic acid-containing diet (positive control, ○), and pantothenic acid-free diet (negative control, ●). As the test groups, the rats were fed with a PaA-free diet containing pantolactone (■), β -alanine (□), or pantolactone and β -alanine (◇) for 28 days. Values are means \pm SEM for five rats.

Table 2. Effects of dietary pantolactone, β -alanine, and simultaneous administration of pantolactone and β -alanine on the weights of various organs and tissues

	Positive control	Negative control	Pantolactone	β -Alanine	Pantolactone + β -Alanine
Brain (g)	1.26 \pm 0.02 ^a	1.16 \pm 0.02 ^b	1.17 \pm 0.02 ^b	1.16 \pm 0.01 ^b	1.18 \pm 0.01 ^b
Lung (g)	1.42 \pm 0.05 ^a	0.88 \pm 0.06 ^b	0.97 \pm 0.06 ^b	1.06 \pm 0.08 ^b	0.91 \pm 0.05 ^b
Heart (g)	0.87 \pm 0.02 ^a	0.62 \pm 0.01 ^b	0.63 \pm 0.01 ^b	0.62 \pm 0.03 ^b	0.64 \pm 0.02 ^b
Kidney (g)	1.81 \pm 0.02 ^a	1.58 \pm 0.03 ^b	1.53 \pm 0.03 ^b	1.47 \pm 0.05 ^b	1.47 \pm 0.05 ^b
Liver (g)	10.33 \pm 0.27 ^a	8.00 \pm 0.43 ^b	8.39 \pm 0.30 ^b	8.75 \pm 0.62 ^{ab}	8.53 \pm 0.40 ^{ab}
Spleen (g)	0.66 \pm 0.01 ^a	0.43 \pm 0.02 ^b	0.46 \pm 0.03 ^b	0.46 \pm 0.03 ^b	0.43 \pm 0.03 ^b
Stomach (g)	1.13 \pm 0.03 ^a	0.84 \pm 0.04 ^b	0.91 \pm 0.03 ^b	0.87 \pm 0.05 ^b	0.87 \pm 0.03 ^b
Testis (g)	2.32 \pm 0.08 ^a	2.06 \pm 0.06 ^b	2.03 \pm 0.06 ^b	2.05 \pm 0.02 ^b	2.03 \pm 0.06 ^b

Values are expressed as mean \pm SEM for five rats; Values with a different superscript letter means statistically significant difference at $p < 0.05$, as calculated by Student-Newman-Keuls multiple comparison test.

Table 3. Effects of dietary pantolactone, β -alanine, and simultaneous administration of pantolactone and β -alanine on the concentrations of pantothenic acid in urine, feces, blood, and liver.

	Positive control	Negative control	Pantolactone	β -Alanine	Pantolactone + β -Alanine
Urine (nmol/day)	814 \pm 69 ^a	11 \pm 2 ^b	11 \pm 3 ^b	16 \pm 2 ^b	10 \pm 3 ^b
Feces (nmol/day)	152 \pm 16 ^a	47 \pm 9 ^b	63 \pm 14 ^b	71 \pm 13 ^b	97 \pm 7 ^{ab}
Blood (nmol/mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Liver (nmol/g of liver)	512 \pm 12 ^a	164 \pm 40 ^b	168 \pm 17 ^b	202 \pm 19 ^b	204 \pm 24 ^b

Values are expressed as mean \pm SEM for five rats; Values with a different superscript letter means statistically significant difference at $p < 0.05$, as calculated by Student-Newman-Keuls multiple comparison test.

ND : not detected.

トテン酸が再合成され、そのパントテン酸を利用している可能性が示唆されている。この可能性に関する考察であるが、本研究結果から確実に明らかとなったことは、たとえ、大腸内でパントラクトンと β -アラニンからパントテン酸が再合成されていたとしても、ラットは利用できなかったことである。では、大腸内でパントラクトンと β -アラニンからパントテン酸がどれほど再合成されているかであるが、仮に、同時投与群で100%の再合成率であるとすると、体内への吸収がないので、糞中のパントテン酸量は約1000 nmol/日程度(飼料摂取量から計算した概数)となるはずである。同時投与群における糞中のパントテン酸排泄量は約100 nmol/日(Table 3)、負対照群が50 nmol/日程度(Table 3)であった。これらの結果は、摂取したパントラクトンと β -アラニンから再合成されたパントテン酸量は非常にわずかであったこと、および負対照群でもパントテン酸がある程度 *de novo* 合成してい

るが、それを利用できなかったことを示している。さらに、胃内での加水分解の可能性に関してであるが、大腸内でパントラクトンと β -アラニンからパントテン酸の再合成量がわずかであったこと、正対照群のパントテン酸排泄率(尿中へのパントテン酸排泄量/パントテン酸摂取量)が、約70%であったことを考慮すると、胃内でのパントテン酸の加水分解はほとんどないものと考えられた。

4. パントテン酸欠乏が他のB群ビタミン代謝におよぼす影響

パントテン酸が欠乏した時に、協調して体内で働いている他のB群ビタミンの濃度がどのように変動するのかを調べた。Table 4に尿中の排泄量におよぼす影響を示した。値は1日尿中に排泄された量で示した。1日当たりのチアミン排泄量および総ニコチンアミド異化代謝産物排泄量は、正対照群が他の群に比して有意に高い値を示した。一方、他のビタミンにおいては、正の対照群が他

Table 4. Effects of dietary pantolactone, β -alanine, and simultaneous administration of pantolactone and β -alanine on the concentrations of other B-group vitamins in urine.

	Positive control	Negative control	Pantolactone	β -Alanine	Pantolactone + β -Alanine
Thiamin (nmol/day)	50.8 \pm 7.5 ^a	17.0 \pm 4.2 ^b	21.0 \pm 3.7 ^b	22.9 \pm 7.1 ^b	17.4 \pm 1.7 ^b
Riboflavin (nmol/day)	120 \pm 17	116 \pm 107	108 \pm 10	124 \pm 10	103 \pm 9
4-PIC (nmol/day)	231 \pm 12 ^a	182 \pm 8 ^b	175 \pm 15 ^b	151 \pm 17 ^b	145 \pm 9 ^b
Nicotinamide and its metabolites (μ mol/day)	6.72 \pm 0.87 ^a	3.89 \pm 0.20 ^b	4.00 \pm 0.25 ^b	3.24 \pm 0.49 ^b	4.17 \pm 0.37 ^b
Folic acid (nmol/day)	6.7 \pm 0.9	7.2 \pm 0.7	7.0 \pm 0.7	7.2 \pm 0.8	8.6 \pm 0.8
Biotin (nmol/day)	4.01 \pm 0.49 ^a	1.85 \pm 0.14 ^b	1.28 \pm 0.11 ^b	1.77 \pm 0.12 ^b	1.92 \pm 0.23 ^b
Cyanocobalamin (pmol/day)	20.2 \pm 3.5 ^a	12.6 \pm 1.0 ^b	12.7 \pm 0.7 ^b	12.2 \pm 1.1 ^b	11.2 \pm 2.0 ^b

Values are expressed as mean \pm SEM for five rats; Values with a different superscript letter means statistically significant difference at $p < 0.05$, as calculated by Student-Newman-Keuls multiple comparison test.

の群に対して、明確に高い値を示すことはなかった。尿中の排泄量は、摂取したビタミン量に比例する。飼料摂取量は、Fig. 1 に示したように、正の対照群が負の対照群および三つの試験群に比して有意に高く、試験期間中の総飼料摂取量は、正の対照群を 100% (382 g) とすると、負の対照群は 75% (288 g)、パントラクトン群が 77% (293 g)、 β -アラニン群が 77% (296 g)、パントラクトン + β -アラニン群が 76% (296 g) であった。差異が認められたチアミンとナイアシンとその異化代謝産物の総計量を飼料摂取量で補正しても、有意に高い値を示した。ビタミンの代謝は体内よりも、尿の方が影響が現れやすい。摂取量が等しい時には、尿中への排泄量の低下は体内での必要量の充進を意味する。逆に尿中への排泄量の増大は必要量の低下を意味する。つまり、パントテン酸欠乏によって、尿中のチアミンとナイアシンの排泄量が増大したことは、パントテン酸欠乏時にはチアミンとナイアシンの必要量が低下していることを意味している。

パントテン酸欠乏あるいはパントテン酸誘導体の摂取が、血液中および肝臓中の他の B 群ビタミン濃度におよぼす影響を検討した。血液、肝臓のいずれにおいても、チアミン、リボフラビン、ビタミン B₆、ニコチンアミド、葉酸、ビオチン、シアノコバラミンの各濃度には影響をおよぼさなかった。つまり、パントテン酸欠乏は、血液と肝臓中の他の B 群ビタミン濃度には影響をおよぼしにくいことが、はじめて明らかとなった。

まとめ

腸内細菌はパントテン酸をパントラクトンと β -アラニンから生合成できると言われている。このことは事実であるが、腸内で生成したパントテン酸をラットは体内で利用できていないことが、はじめて明確に証明された。おそらく、パントテン酸が生成している大腸においては、

パントテン酸を吸収する機構が存在していないためであろう。ヒトについては、今後、同様の実験を行って確認する必要があるが、腸内で合成されたパントテン酸を体内で利用している可能性はきわめて低いことが予想される。

謝 辞

本研究は、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業「日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究 - 微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明 -」(主任研究者、柴田克己)の成果の一部である。関係各位に謝意を表する。

(平成 20.4.16 受付)

文 献

- 1) 山口順 (1958) 腸内細菌によるパントテン酸の合成とセルロース摂取の影響. *ビタミン* 15, 39-43
- 2) Fry RC, Fox HM, Tao HG (1976) Metabolic response to a pantothenic acid deficient diet in humans. *J Nutr Sci Vitaminol* 22, 339-346
- 3) Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127, 838S-841S
- 4) Pullman ME, Colowick SP (1954) Preparation of 2- and 6-pyridones of N¹-methylnicotinamide. *J Biol Chem* 206, 121-127.
- 5) Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 424, 23-28
- 6) 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己 (2004) 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. *食衛誌* 45, 231-238
- 7) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1983) New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* 258, 5623-5628

- 8) Gregory JF 3rd, Kirk JR (1979) Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 32, 879-883
- 9) Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y (1998) Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* 46, 5177-5180
- 10) 柴田克己 (1987) 高速液体クロマトグラフィーによる尿中 N¹-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
- 11) Skeggs HR, Wright LD (1944) The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* 156, 21-26
- 12) Aiso K, Tamura T (1998) Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* 44, 361-370
- 13) Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y (1994) Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* 40, 491-498

ノート

ビタミン B₁ あるいはビタミン B₂ の大量摂取が幼若ラットの成長と水溶性ビタミン排泄量におよぼす影響

(平成 20 年 6 月 4 日受理)

福渡 努* 葛谷真子 佐藤志織 柴田克己

Effects of Excess Vitamin B₁ or Vitamin B₂ on Growth and Urinary Excretion of Water-soluble Vitamins in Weaning Rats

Tsutomu FUKUWATARI*, Mako KUZUYA, Shiori SATOH and Katsumi SHIBATA

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture: 2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan; * Corresponding author

To determine the tolerable upper intake levels of vitamin B₁ and vitamin B₂ in humans, we investigated the effects of excess thiamin or riboflavin administration on body weight gain, food intake, tissue weights, and urinary excretion of B-group vitamins in weaning rats. The weaning rats were freely fed ordinary diet containing 0.0006% thiamin-HCl or the same diet with 0.006%, 0.03%, 0.18% or 1.0% thiamin-HCl for 30 days, or the diet containing 0.0006% riboflavin or the same diet with 0.1%, 0.5 or 1.0% riboflavin for 22 days. Mild diarrhea was seen only in the rats fed with 1.0% thiamin-HCl diet. Excess thiamin-HCl or riboflavin did not affect body weight gains, food intake or tissue weights. The urinary excretions of water-soluble vitamins also did not differ among the diets. These results clearly showed that feeding a diet containing up to 1.0% thiamin-HCl or 1.0% riboflavin did not induce apparent adverse effects, and the no-observed-adverse-effect-levels (NOAELs) for thiamin-HCl and riboflavin in rats might be 1.0% in diet, corresponding to 900 mg/kg body weight/day.

(Received June 4, 2008)

Key words: チアミン thiamin; リボフラビン riboflavin; 過剰 excess; 上限量 tolerable upper intake level: UL; 健康障害非発現量 (無毒性量) no-observed-adverse-effect-level: NOAEL; 最低健康障害発現量 (最小毒性量) lowest-observed-adverse-effect-level: LOAEL; 食事摂取基準 Dietary Reference Intake

緒言

ヒトにおけるビタミン B₁ あるいはビタミン B₂ の健康障害非発現量 (no-observed-adverse-effect-level: NOAEL, 毒性学の領域では無毒性量と和訳されているが, 食事摂取基準では意識されて, このように和訳されている) および最低健康障害発現量 (lowest-observed-adverse-effect-level: LOAEL, 毒性学の領域では最小毒性量と和訳されているが, 食事摂取基準では意識されて, このように和訳されている) が明らかにされていないため, 「日本人の食事摂取基準 (2005 年版)」¹⁾ では, ビタミン B₁ とビタミン B₂ の上限量 (tolerable upper level intake: UL) は策定されなかった。「日本人の食事摂取基準 (2005 年版)」¹⁾ での「上限量」とは, 健康障害をもたらす危険がないとみなされる習慣的な摂取量の上限を与え

る量のことである。

ビタミン B₁ の大量投与による悪影響として, 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⁾。また, 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⁾。このように, 非経口投与による悪影響は報告されているが, 経口投与時におけるビタミン B₁ の大量投与時の報告は見当たらない。

ビタミン B₂ については, 49 人の偏頭痛患者に 400 mg/日のリボフラビンを食事とともに 3 か月間服用させても副作用は現れず⁵⁾, 偏頭痛患者 55 人に 400 mg/日のリボフラビンあるいはプラセボを 3 か月間服用させるとリボフラビンを摂取した患者 2 名に下痢と多尿が認められた⁶⁾。また, 慢性疲労に苦しんでいる 24 歳の女性に 2 年間にわたって 100 mg/日のリボフラビンを投与しても

* 連絡先

滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科: 〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

副作用は認められなかったという報告⁷⁾や、慢性疲労で苦しんでいる14歳の少女にはじめの1年間は200 mg/日のリボフラビンを、次の2年間は100 mg/日を投与しても悪影響はなかったという報告⁷⁾がある。しかしながら、これらの報告は、いずれも患者の自己申告であり、生化学的な指標の検査はしていないため、上限量の設定のデータとして使用することはできない。

上限量を設定するには健常者を被験者とした実験が必要である。しかし、ヒトに過剰害が現れる可能性があるほどの大量のビタミンを投与することは、倫理的に不可能である。そこで、著者ら実験動物を用いてビタミンの健康障害非発現量を調べることを目的として、これまでにニコチンアミド⁸⁾、パントテン酸⁹⁾、ピオチン¹⁰⁾、葉酸¹¹⁾の大量摂取が幼若ラットの成長と各ビタミンの体内動態に及ぼす影響について検討してきた。本研究では、ビタミンB₁とビタミンB₂の大量投与が幼若ラットの飼料摂取量と体重増加量、ビタミンB₁とビタミンB₂の体内動態に及ぼす影響について検討した。さらに、補酵素作用という共通の生理機能をもつ水溶性ビタミンの尿中排泄量を調べることで、ラットにおけるビタミンB₁とビタミンB₂のNOAELとLOAELを推定した。

実験方法

1. 動物の飼育方法

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%前後に維持し、明暗サイクルは、午前6時～午後6時を明、午後6時～午前6時を暗とした。

1.1 チアミン大量投与実験 (実験1)

3週齢のWistar系雄ラット20匹を日本クレア株式会社より購入し、4匹ずつ5群に分けた。0.0006%のチアミン塩酸塩を含有する20%カゼイン食を対照食とし、対照食に0, 0.006, 0.03, 0.18, 1.0%のチアミン塩酸塩を添加した飼料を与え、30日間飼育した。飼育最終日の1日尿および1日糞を集めた。尿は塩酸酸性下で集め、採尿後、分析に供するまで-20℃で保存した。採尿終了後、ラットを断頭屠殺し、採血および脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の摘出を行い、各臓器重量を測定した。

1.2 リボフラビン大量投与実験 (実験2)

投与した飼料以外は、実験1と同じである。0.0006%のリボフラビンを含有する20%カゼイン食を対照食とし、対照食に0, 0.1, 0.5, 1.0%のリボフラビンを添加した飼料を与え、22日間飼育した。

2. 分 析

チアミン¹²⁾、リボフラビン¹³⁾、ルミフラビン¹⁴⁾、ビタミンB₆代謝産物4-ピリドキシン酸(4-PIC)¹⁵⁾、アスコルビン酸¹⁶⁾はHPLC法により測定した。ニコチンアミド(Nam)¹⁷⁾、N¹-メチルニコチンアミド(MNA)¹⁸⁾、N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)¹⁷⁾、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)¹⁷⁾はHPLC法により測定し、これらの合計を総ニコチンアミド代謝産物とした。パントテン酸¹⁹⁾、葉酸²⁰⁾は微生物学的定量法により測定した。

3. 有意差検定

すべてのデータは平均値±SEMで示した。有意差検定は、まず一元配置の分散分析を行い、有意差が認められた時には、Tukey-Kramerの多重比較テストを行った。有意差は、 $p < 0.05$ で判定した。なお、検定には、統計ソフトGraphPad Prism (version 5.01; GraphPad, San Diego, CA, USA)を用いた。

結果および考察

1. チアミンの大量投与実験 (実験1)

1.1 体重増加量、飼料摂取量、肉眼的所見

薬剤や栄養素の大量摂取による明らかな健康障害を調べる指標の1つとして、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。そこで、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添加した飼料を30日間与えた。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(Table 1)。しかし、チアミン塩酸塩1.0%添加食を摂取したすべてのラット(4匹中4匹)において、軽度の下痢が観察された。この下痢は投与10日目あたりから観察された。下痢が観察されたものの、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及ぼしたとは考えにくい。

1.2 臓器重量

脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の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。しかし、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。この現象は難吸収性の化合物を大量投与したときに見られる共通的な現象であるため、悪影響とは見なさないことができる。なお、0.18%チアミン塩酸塩混餌食群では、盲腸の膨潤は認められなかった。

Table 1. Effects of excess thiamin-HCl administration on body weight gain and food intake

	Control	+0.006%	+0.03%	+0.18%	+1.0%
Initial body weight (g)	38.0±0.9	37.0±1.0	37.3±0.7	38.1±0.83	7.5±1.0
Final body weight (g)	223.1±3.5	216.1±6.9	208.0±3.5	230.5±7.3	239.4±8.9
Body weight gain (g/30 d)	185.1±3.3	179.1±6.0	170.8±4.1	192.4±7.5	201.9±8.2
Food intake (g/30 d)	408.0±7.2	408.3±14.5	401.3±1.6	433.6±11.9	433.2±12.5

Each value is expressed as the mean±SEM (n=4).

Table 2. Effects of excess thiamin-HCl administration on the thiamin contents in liver, blood, urine and feces

	Control	+0.006%	+0.03%	+0.18%	+1.0%
Liver (nmol/g)	34.1±0.5	48.4±1.3	50.4±1.0	62.6±2.3*	133.2±7.8*
Blood (nmol/mL)	0.82±0.01	1.30±0.04	1.52±0.05*	2.07±0.05*	6.80±0.31*
Urine (μmol/d)	0.06±0.01	1.33±0.09	1.91±0.15	5.57±0.48	56.91±3.59*
Feces (μmol/d)	0.02±0.01	0.27±0.02	3.68±0.26	39.74±2.54	123.32±34.47*

Each value is expressed as the mean±SEM ($n=4$). * $p<0.05$ versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

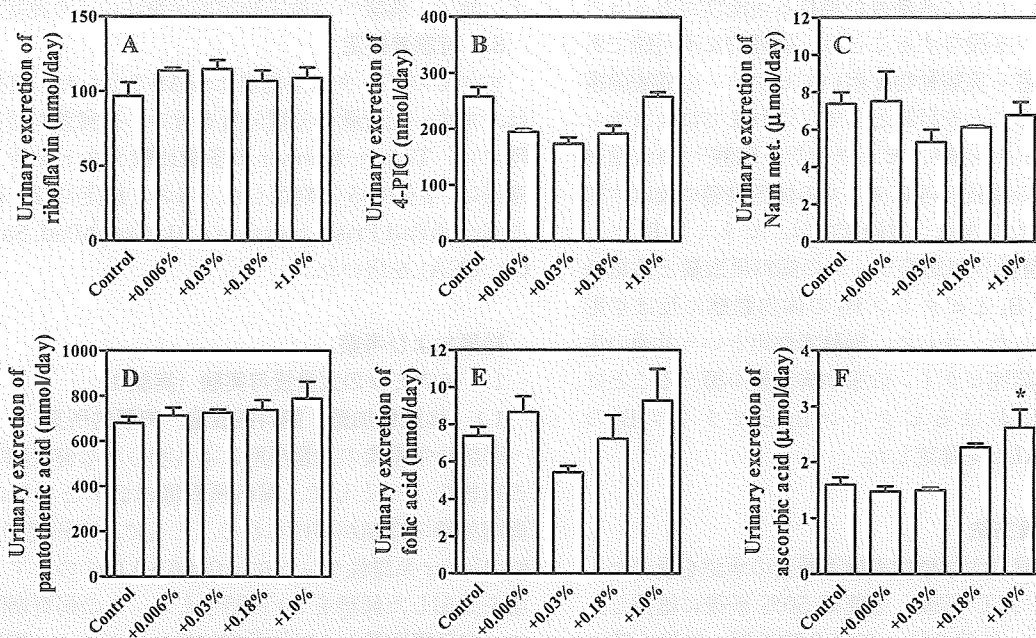


Fig. 1. Effects of excess thiamin-HCl administration on urinary excretions of riboflavin (A), 4-PiC (B), nicotinamide metabolites (Nam met) (C), pantothenic acid (D), folic acid (E) and ascorbic acid (F)

Each value is expressed as the mean±SEM ($n=4$). * $p<0.05$ versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

1.3 肝臓、血液、尿および糞中のチアミン含量

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、肝臓、血液、尿および糞中のチアミン含量を測定した。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チアミン濃度は対照群ラットのそれぞれ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 (Table 2)。ビタミンB₁の主要な貯蔵部位は肝臓であるが、チアミン塩酸塩の摂取量が300倍、約1,600倍に増加したことに比して、肝チアミン濃度の増加は低いものであった。

1.0% チアミン塩酸塩食摂取ラットの尿中チアミン排泄量は対照食摂取ラットの約900倍を示した。1.0% チアミン塩酸塩添加食摂取ラットの糞中チアミン排泄量は約6,000倍を示した。チアミン塩酸塩摂取量の増加に比して、尿中排泄量の増加は低く、糞中排泄量の増加が高かったことは、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。

1.4 尿中水溶性ビタミン排泄量

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を検討した。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、ニコチンアミドとその代謝産物 (MNA, 2-Py, 4-Py) の合計量、パントテン酸、葉酸の含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 (Fig. 1)。

ラットにとってはビタミンではないが、アスコルビン酸の排泄量に及ぼす影響も調べたところ、1.0% チアミン塩酸塩添加食摂取ラットにおいて、尿中アスコルビン酸排泄量が対照群ラットの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²¹⁾、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²²⁾。したがって、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理由として、体内に大量に吸収されたチアミンをより水溶性の高い化合物へと代謝し、より早く尿中に排泄される形態にするために、体内でアスコルビン酸の合成が高まった可能性が考えられる。しかしながら、今回の実験においては、チアミンの尿中異化代謝産物に関する検討は行わなかった。

1.5 まとめ

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悪影響は認められなかったことから、本研究におけるチアミン塩酸塩の NOAEL を 1.0% 混餌食とした。ラットの体重当たりに換算すると、体重 200 g のラットが 1.0% のチアミン塩酸塩を含む食餌を 1 日に約 18 g 摂取したことから、ラットにおけるチアミン塩酸塩の NOAEL は 900 mg/kg 体重/日程度となった。

2. リボフラビンの大量投与実験 (実験 2)

2.1 体重増加量, 飼料摂取量, 肉眼的所見

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飼料を与えて 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 (Table 3)。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。

2.2 臓器重量

脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の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。また、開腹時の肉眼的所見にも異常は認められなかった。

2.3 肝臓, 血液, 尿および糞中のリボフラビン含量

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、肝臓、血液、尿および糞中のリボフラビン含

量を測定した。肝臓リボフラビン濃度は各群ともほぼ同じ値を示した (Table 4)。一方、血中リボフラビン濃度は 1.0% リボフラビン添加食摂取ラットにおいて対照群の約 2 倍を示した。

0.1% リボフラビン添加食群の尿中のリボフラビン排泄量は、対照群の約 2.5 倍に増加した。しかし、さらにリボフラビンの添加量を増やした 0.5, 1.0% 添加食群においても、尿中リボフラビン排泄量は増大しなかった。0.1% リボフラビン食摂取ラットの糞中リボフラビン排泄量は対照食摂取ラットの約 30 倍、0.5% リボフラビン食摂取ラットでは約 280 倍、1.0% リボフラビン食摂取ラットでは約 4,500 倍を示した。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対して、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。血液および肝臓中のリボフラビン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。

2.4 尿中水溶性ビタミン排泄量

飼育 22 日目の 1 日尿に含まれるチアミン、4-PIC、ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸、アスコルビン酸の含量を測定した。いずれの水溶性ビタミンの各尿中排泄量に

Table 3. Effects of excess riboflavin administration on body weight gain and food intake

	Control	+0.1%	+0.5%	+1.0%
Initial body weight (g)	39.0±1.3	38.8±1.1	39.1±1.3	39.1±0.6
Final body weight (g)	171.4±2.3	173.6±0.9	168.2±3.1	172.4±6.1
Body weight gain (g/30 d)	132.4±2.4	134.8±1.3	129.1±2.7	133.3±6.3
Food intake (g/30 d)	251.4±1.1	251.7±4.3	253.1±5.1	253.3±12.0

Each value is expressed as the mean±SEM (n=4).

Table 4. Effects of excess riboflavin administration on thiamin contents in liver, blood, urine and feces

	Control	+0.1%	+0.5%	+1.0%
Liver (nmol/g)	94.3±2.7	88.5±2.0	96.2±1.1	91.9±2.6
Blood (pmol/mL)	184±12	205±9	345±59	398±57*
Urine (μmol/d)	0.12±0.00	0.28±0.02*	0.27±0.03*	0.30±0.02*
Feces (μmol/d)	0.03±0.00	0.88±0.24	55.06±5.60	136.66±28.03*

Each values is expressed as the mean±SEM (n=4). **p*<0.05 versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

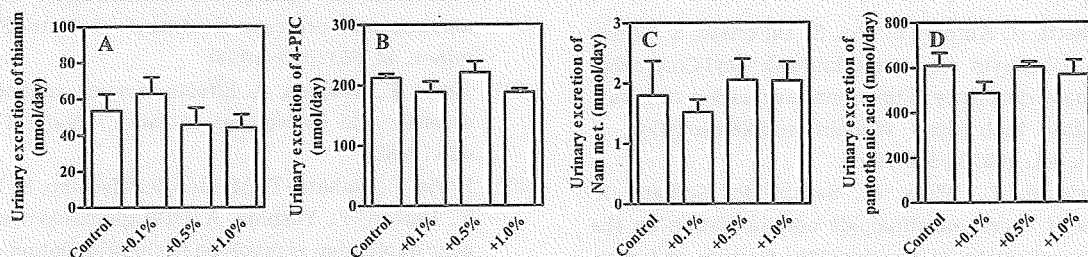


Fig. 2. Effects of excess riboflavin administration on urinary excretions of thiamin (A), 4-PIC (B), nicotinamide metabolites (Nam met) (C), and pantothenic acid

Each value is expressed as the mean±SEM (n=4).