平成 15 年度厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究
主任研究者　柴田　克己　滋賀県立大学　教授

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 B_1−

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 B_1 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 B_1 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 B_1 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 B_1 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 B_1 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 B_1 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℃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℃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 を加えて撹拌し，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℃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℃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 (φ6.0 x 150 mm)，移動相および流速：0.2 M NaH_2PO_4，1.0 ml/min，反応液：0.01% $K_3Fe(CN)_6$，0.15 ml/min および 15% NaOH, 0.15 ml/min, カラム温度：40℃，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 (φ4.6 x 250 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℃，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 (φ4.6 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℃，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 (φ4.6 x 250 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℃，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 (φ4.6 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 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℃，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℃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 5µ C18-100A (φ3.9 x 150 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℃, 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総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). 肝総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 B_1 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 NOAEL 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 NOAEL 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 B_1 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 B_2，ビタミン B_6，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 B_6, Folate, Vitamin B_{12}, 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.

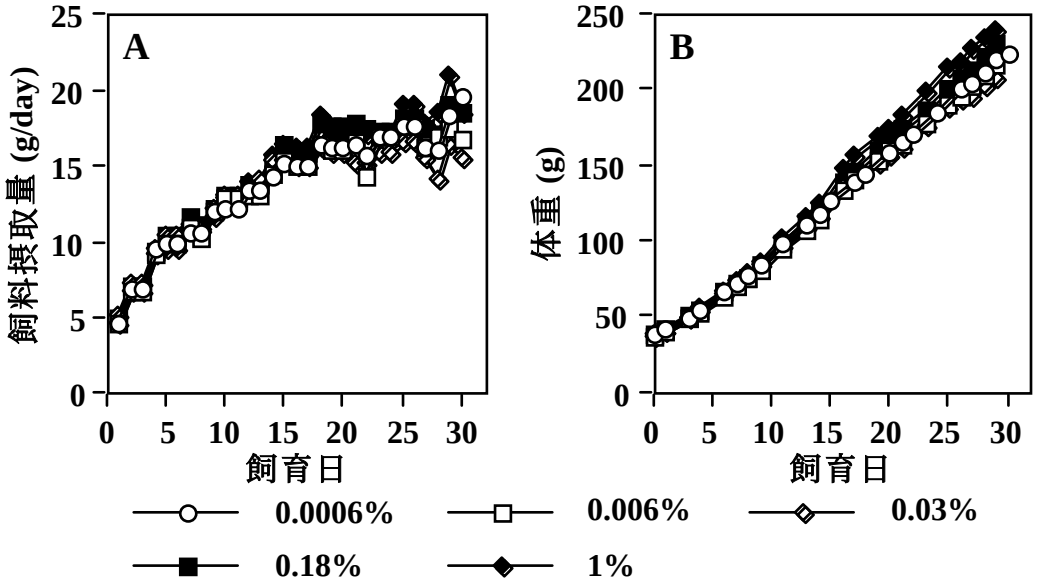

図 1.　チアミン塩酸塩大量摂取が飼料摂取量 (A) および体重 (B) におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した.

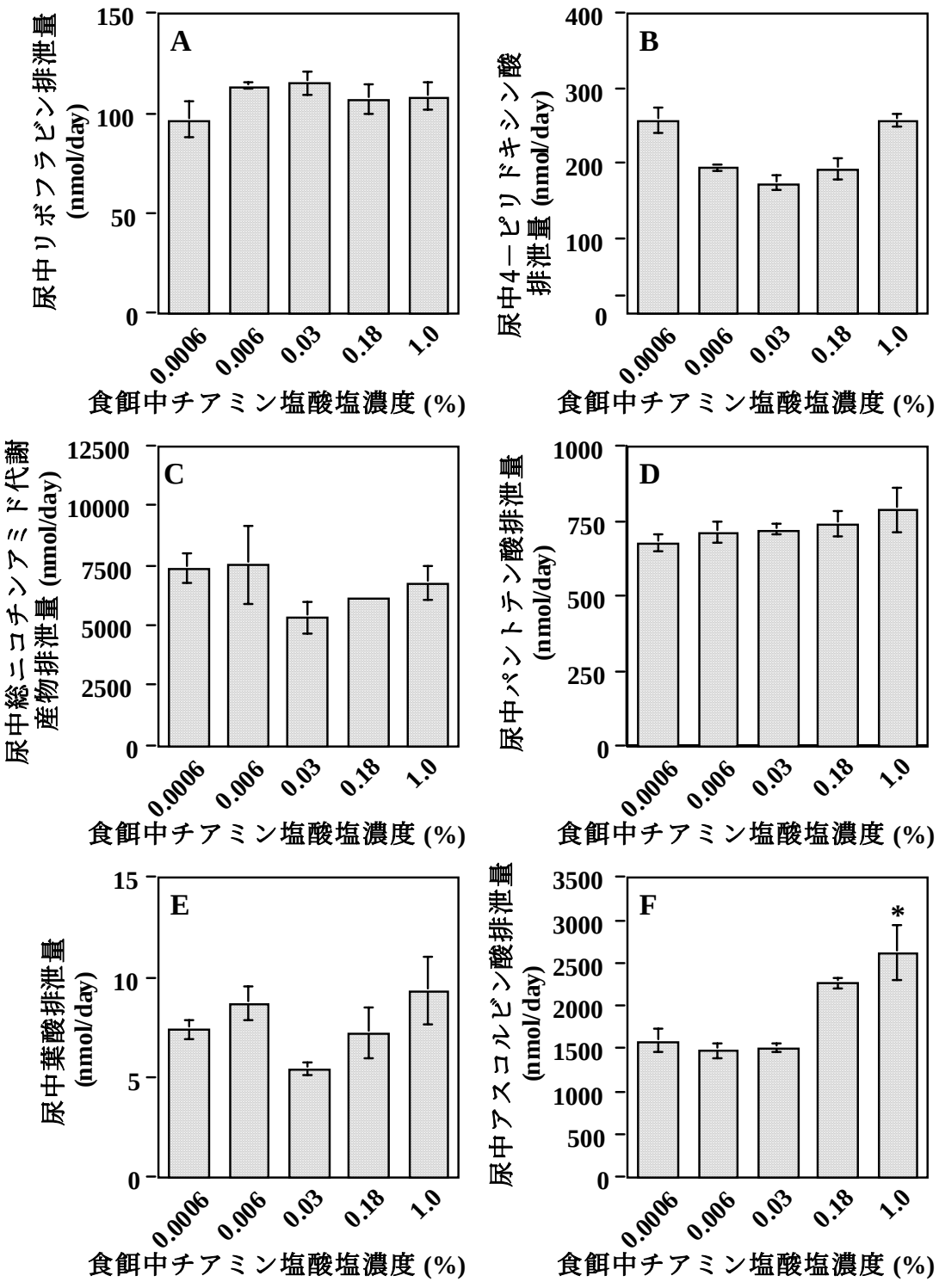

図 2. チアミン塩酸塩の大量摂取がリボフラビン (A), 4–ピリドキシン酸 (B), ニコチンアミド総代謝産物 (C), パントテン酸 (D), 葉酸 (E), アスコルビン酸 (F) の各尿中排泄量におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した. *は 0.0006%チアミン塩酸塩添加食摂取ラットの値と有意差があることを示す ($p < 0.05$).

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 ($p < 0.05$).