

・ 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 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 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砕し、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。肝総ビタミン B₂ 量の測定として、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℃、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℃、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℃、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℃、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℃、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。

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臓の総ビタミン 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)。肝臓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.

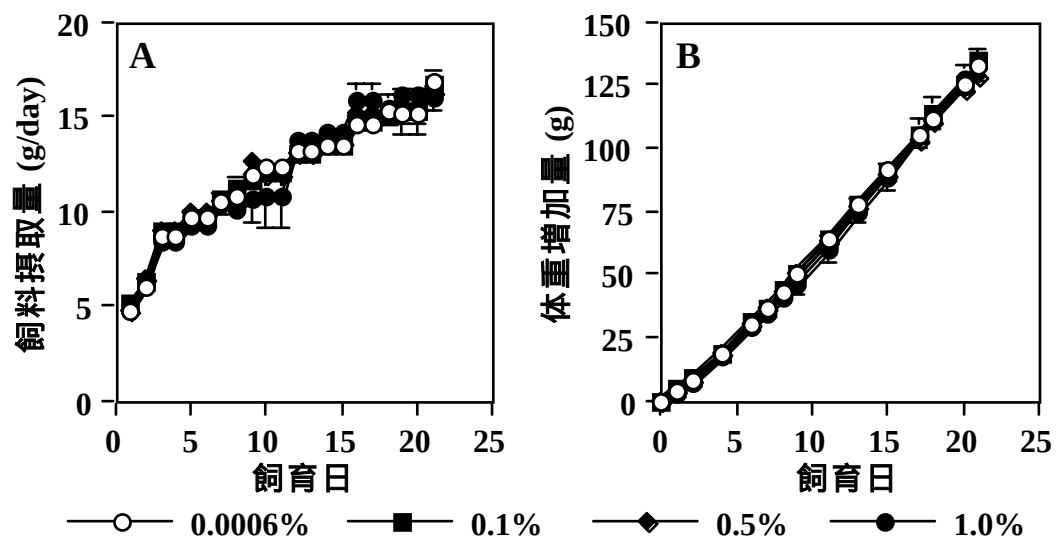


図 1. リボフラビン大量摂取が飼料摂取量 (A) および体重増加量 (B) におよぼす影響。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=4) として示した。

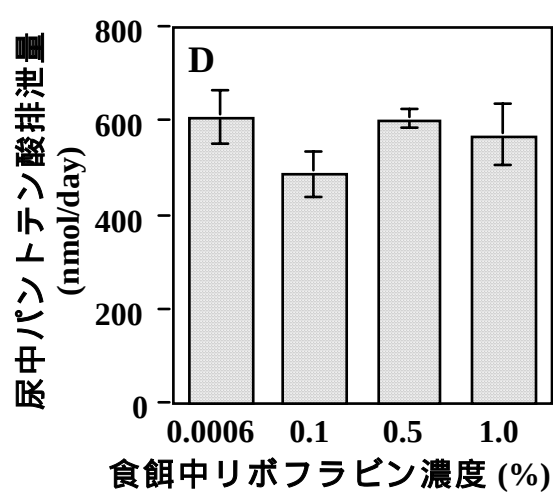
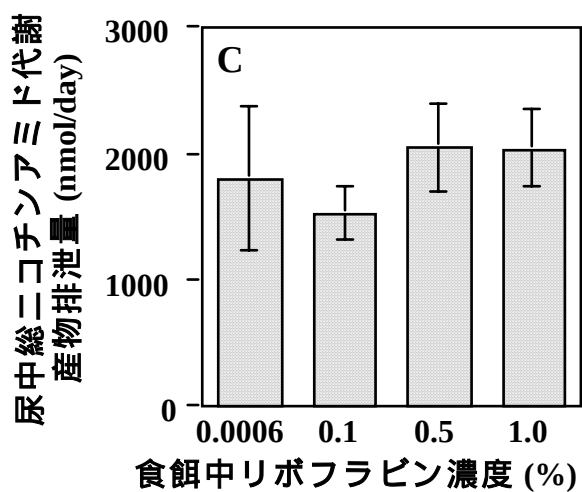
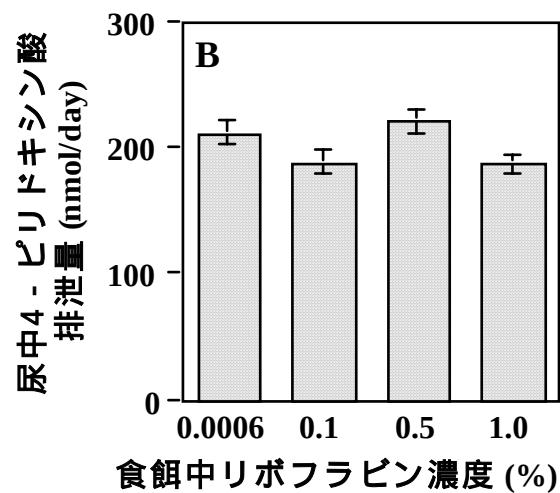
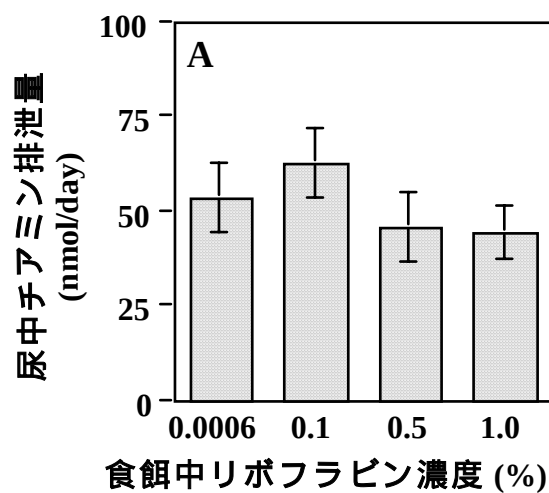


図 2. リボフラビンの大量摂取がチアミン (A) , 4-ピリドキシン酸 (B) , ニコチンアミド総代謝産物 (C) , パントテン酸 (D) の各尿中排泄量におよぼす影響 . 値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 4) として示した .

表1 リボフラビン大量摂取が臓器重量におよぼす影響

	食餌中のリボフラビン濃度			
	0.0006%	0.1%	0.5%	1.0%
脳 (g)	1.49 ± 0.12	1.57 ± 0.06	1.53 ± 0.02	1.52 ± 0.03
心臓 (g)	0.68 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.73 ± 0.03	0.72 ± 0.03
肺 (g)	1.08 ± 0.03	1.22 ± 0.13	1.07 ± 0.07	1.12 ± 0.12
肝臓 (g)	8.25 ± 0.25	8.63 ± 0.14	7.69 ± 0.13	7.97 ± 0.39
脾臓 (g)	0.66 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.68 ± 0.03	0.67 ± 0.04
腎臓 (g)	1.61 ± 0.05	1.66 ± 0.05	1.56 ± 0.02	1.51 ± 0.03
精巣 (g)	1.58 ± 0.03	1.71 ± 0.06	1.63 ± 0.07	1.65 ± 0.03

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 4) として示した。

表2 リボフラビン大量摂取が尿中リボフラビン量および糞中総ビタミンB₂量におよぼす影響

	食餌中のリボフラビン濃度			
	0.0006%	0.1%	0.5%	1.0%
尿 (nmol/day)	115 ± 4	282 ± 17*	266 ± 34*	302 ± 20*
糞 (μmol/day)	0.03 ± 0	0.88 ± 0.24	55.06 ± 5.60	136.66 ± 28.03*

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 4) として示した。*は0.0006%リボフラビン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 リボフラビン大量摂取が血液および肝臓ビタミンB₂量におよぼす影響

	食餌中のリボフラビン濃度			
	0.0006%	0.1%	0.5%	1.0%
血液 (pmol/ml)	184 ± 12	205 ± 9	345 ± 59	398 ± 57*
肝臓 (nmol/g of liver)	94.3 ± 2.7	88.5 ± 2.0	96.2 ± 1.1	91.9 ± 2.6

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 4) として示した。*は0.0006%リボフラビン添加食摂取ラットの値と有意差があることを示す ($p < 0.05$)。