

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

3. 水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 –パントテン酸–

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、過剰摂取あるいは投与による毒性および副作用は認められていないことから、パントテン酸の許容上限摂取量は策定されなかった。パントテン酸の毒性および副作用が認められていない最大の理由は、パントテン酸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、パントテン酸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。パントテン酸カルシウムの終濃度を 0.0016, 1.0, 3.0%とした食餌をラットに 29 日間投与した。3.0% パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて飼料摂取量および体重増加量の抑制が認められた。1.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットには飼料摂取量、体重増加量、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の各重量にパントテン酸カルシウム大量摂取の影響は認められなかった。これらの結果から、ラットにおけるパントテン酸の LOAEL は 2,760 mg/kg 体重/日、NOAEL は 920 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、パントテン酸の許容上限摂取量は策定されなかった。これは、「これまでの報告では、パントテン酸の過剰摂取あるいは投与による毒性および副作用は認められていない。この結果、パントテン酸の毒性はきわめて低いと考えられている。LOAEL および NOAEL は正確には決められないので、パントテン酸の許容上限摂取量を設定することは今回はしなかった。」ためである。米国の Dietary Reference Intakes においても、パントテン酸の許容上限摂取量は策定されていない¹⁾。これは、パントテン酸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、パントテン酸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、パントテン酸カルシウム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 12 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 3 群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。

20%カゼイン食にパントテン酸カルシウムを 0.0016, 1.0, 3.0%添加した食餌を与え、29 日間飼育した。0.0016%添加食摂取ラットを対照群、1.0, 3.0%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。血液は総パントテン酸の測定に、肝臓は総パントテン酸、CoA 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。血および肝総パントテン酸含量の測定として、血液 100 μ l を 50 mM KPB (pH 7.0) 1 ml に加えてよく混和し、肝臓約 0.1 g を 10 倍量の 50 mM KPB (pH 7.0) 中でホモジナイズした。これらを 100℃で 5 分間加熱後、氷冷し

た. 遠心上清 100 μ l に 10 U/ml ホスファターゼ 50 μ l, 10 U/ml アミダーゼ 50 μ l, 15 μ g/ml 還元型グルタチオン 50 μ l を加えて 37°C で 2 時間処理し, 50 mM KPB (pH 7.0) 2.25 ml を加え, 100°C で 5 分間加熱後, 氷冷した. 遠心上清を取り, 沈殿に水 2.5 ml を加えて攪拌し, 遠心上清を先の上清と合わせた. これを用いて上記の *Lactobacillus Plantarum*, ATCC 8014 による微生物学的パントテン酸定量法の供した. 肝 CoA 含量の測定として. 上記の肝総パントテン酸含量の測定でホモジナイズ, 加熱, 氷令して得た遠心上清を用いた. この遠心上清 50 μ l に 1 M Tris-HCl (pH 7.2) 250 μ l, 1 M KCl 50 μ l, 0.2 M L(-)-リンゴ酸ナトリウム 50 μ l, 0.08 M アセチルリン酸 50 μ l, 0.02 M β -NAD⁺ 50 μ l, 100 U/ml リンゴ酸デヒドロゲナーゼ 20 μ l, クエン酸シンターゼ 20 μ l を加えて 30°C で 2 分間加熱後, 50 U/ml ホスホトランスアセチラーゼ 60 μ l を加えて 340 nm における 1 分間の NADH の産生量を追跡した.

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.

尿中リボフラビ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: 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 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, 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 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.

尿中アスコルビン酸含量の測定として, 尿 100 μ l に 0.2% 2, 6-ジクロロインドフェノール 100 μ l, 1% 塩化スズ-5% メタリン酸 50 μ l, 2% 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 M 硫酸 120 μ l 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 μ l を蒸発乾固させ, 乾固物をアセトニトリル 200 μ l 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: μ Bodasphere 5 μ C18-100A (ϕ 3.9 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°C, 検出器: 紫外分光光度計 505 nm とした.

C. 結果

パントテン酸カルシウム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 0.0016~3.0% のパントテン酸カルシウ

ムを含む食餌を与えて 29 日間飼育した。この飼育期間において、対照群に比し、3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて飼料摂取量および体重増加量の抑制が認められた (図 1)。

パントテン酸カルシウムの大量摂取が臓器重量におよぼす影響

飼育 29 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。各群の体重が異なることから、体重 100 g 当たりの各臓器重量を比較した。3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて、若干ではあるが、肝臓および腎臓重量の増加が認められた (表 1)。1.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて、各臓器重量にはパントテン酸カルシウム摂取の影響は認められなかった (表 1)。

パントテン酸カルシウムの大量摂取が尿中パントテン酸排泄量におよぼす影響

飼育 29 日目の 1 日尿に含まれるパントテン酸量を測定した。各群の飼料摂取量が異なることから、飼料摂取 1 g 当たりの尿中パントテン酸排泄量を比較した。0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットに比し、1.0%および 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの尿中パントテン酸排泄量はそれぞれ約 340 倍、約 630 倍と濃度依存点に増加した (図 2)。

パントテン酸カルシウムの大量摂取が血中および肝総パントテン酸濃度、肝 CoA 濃度におよぼす影響

飼育 29 日目の血液および肝臓に含まれる総パントテン酸量、肝臓に含まれる CoA 量を測定した。血中総パントテン酸濃度は 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの 1.5 倍の値を示した (図 3-A)。肝総パントテン酸濃度は 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの 2.2 倍の値を示した (図 3-B)。肝 CoA 濃度は常に 220 nmol/g of liver を示し、パントテン酸カルシウム大量摂取の影響を受けなかった (図 3-C)。

パントテン酸カルシウムの大量摂取が尿中 B 群ビタミン排泄量におよぼす影響

飼育 29 日目の 1 日尿に含まれるチアミン、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、アスコルビン酸の含量を測定した。各群の飼料摂取量が異なることから、飼料摂取 1 g 当たりの各ビタミン代謝産物量

として示した。リボフラビン、ニコチンアミド代謝産物、アスコルビン酸の各尿中排泄量にはパントテン酸カルシウム大量摂取による影響は認められなかった (図 4)。しかし、3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの尿中チアミン排泄量は 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの 5%の値に低下した (図 4-A)。1.0%および 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの尿中 4-ピリドキシン酸排泄量は 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの 15%の値に低下した (図 4-C)。また、ニコチンアミド代謝産物の排泄比を示す (2-Py + 4-Py) : MNA 比は 3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて 0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの約 60%に低下した (図 4-F)。

D. 考察

本研究では、パントテン酸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 0.0016~3.0%のパントテン酸カルシウムを含む食餌を与えて 29 日間飼育し、パントテン酸カルシウムの大量摂取がラットにおよぼす影響について検討した。3.0%パントテン酸カルシウム食の摂取により、飼料摂取量および体重増加量が抑制され、明らかな悪影響が認められた。一方、1.0%パントテン酸カルシウム食を摂取したラットには、飼料摂取量、体重増加量、臓器重量に影響は認められなかった。ラットにはパントテン酸源としてパントテン酸カルシウムを大量に与えたが、3.0%パントテン酸カルシウム食 100 g に含まれるカルシウム量は 0.25 g である。パントテン酸カルシウム以外のカルシウムは食餌 100 g 当たり 0.49 g 含まれることから、カルシウム摂取量の増加が悪影響を引き起こしたのではない。以上の結果から、本研究では、3.0%パントテン酸カルシウム食を摂取したラットにはパントテン酸カルシウム摂取による悪影響が認められ、1.0%パントテン酸カルシウム食を摂取したラットには影響は認められず、これらのラットの摂取量からパントテン酸の LOAEL および NOAEL を算定した。すなわち、体重 200 g のラットが 3.0%のパントテン酸カルシウムを含む食餌を 1 日に約 20 g 摂取し、パントテン酸カルシウム (分子量 476.5) 1 mol にはパントテン酸 (分子量 219.2) 2 mol が含まれていることから、パントテン酸の LOAEL を 2,760 mg/kg 体重/日とした。同様に、体重 200 g のラットが 1.0%のパントテン酸カルシウムを含む食餌を 1 日に約 20 g 摂取したことから、

パントテン酸の NOAEL を 920 mg/kg 体重/日とした。

本研究では、大量摂取したパントテン酸の動態を明らかにするため、尿中のパントテン酸含量、血液および肝臓のパントテン酸含量、肝臓の CoA 含量を測定した。尿中のパントテン酸含量はパントテン酸カルシウムの大量摂取により数百倍に増加し、その増加は摂取量依存性を示した。3.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいて血中および肝総パントテン酸濃度の増加が認められた。しかし、肝 CoA 濃度には影響は認められなかった。パントテン酸の大量摂取により体内のパントテン酸保持量は増加するが、そのほとんどは尿に排泄され、またパントテン酸の生理活性型である CoA の恒常性は厳密に保たれることを示している。尿中パントテン酸排泄量の測定がパントテン酸大量摂取の指標になるうることも示している。

パントテン酸カルシウムの大量摂取により、尿中 4-ピリドキシン酸排泄量が減少した。4-ピリドキシン酸はピリドキサールをオキシダーゼが酸化することによって産生する。ビタミン B₆ 栄養状態の指標について検討しなかったが、悪影響が認められなかった 1.0%パントテン酸カルシウム食摂取ラットにおいても尿中 4-ピリドキシン酸排泄量が減少したことから、ビタミン B₆ 栄養が悪化したというより、むしろピリドキサール代謝が影響を受けたことが考えられる。尿中ニコチンアミド代謝産物量はパントテン酸カルシウムの大量摂取の影響を受けなかったが、尿中ニコチンアミド代謝産物の構成比を示す (2-Py + 4-Py) / MNA がパントテン酸カルシウム大量摂取によって減少した。2-Py と 4-Py は MNA をオキシダーゼが酸化することによって産生することから、パントテン酸カルシウム大量摂取によって MNA 代謝が影響を受けたことが考えられる。これらより、パントテン酸大量摂取はオキシダーゼに影響をおよぼす可能性が考えられる。パントテン酸カルシウム大量摂取による悪影響がどのような機構によって生じるのかは不明であるが、オキシダーゼが関与するかもしれない。

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.

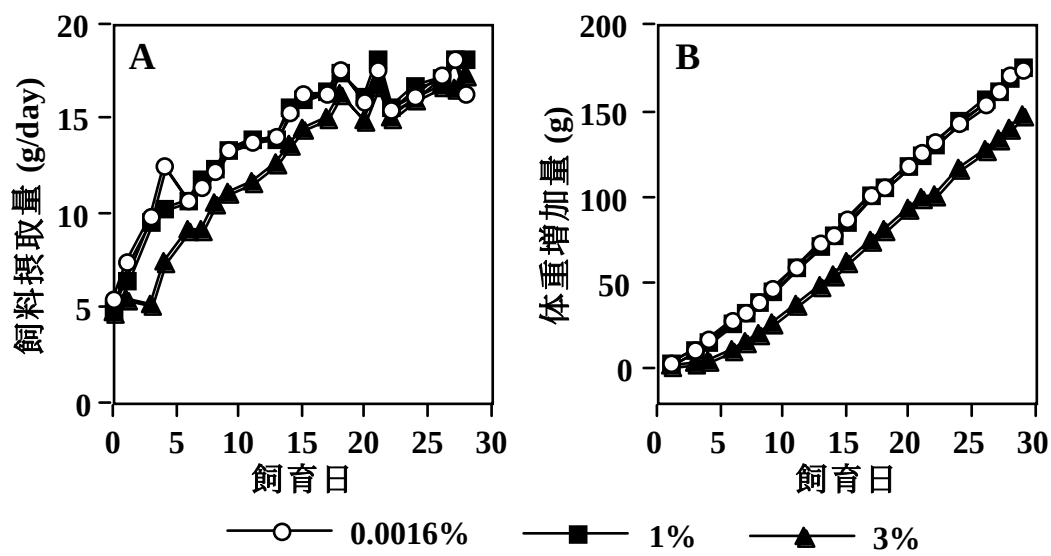


図 1. パントテン酸カルシウム大量摂取が飼料摂取量 (A) および体重増加量 (B) におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した.

表1 パントテン酸カルシウム大量摂取が臓器重量におよぼす影響

	食餌中のパントテン酸カルシウム濃度		
	0.0016%	1.0%	3.0%
脳 (g/100g 体重)	0.74±0.07	0.78±0.07	0.87±0.05
心臓 (g/100g 体重)	0.37±0	0.37±0.01	0.39±0.01
肺 (g/100g 体重)	0.51±0.01	0.56±0.04	0.62±0.03
肝臓 (g/100g 体重)	4.67±0.06	4.73±0.15	5.19±0.14*
脾臓 (g/100g 体重)	0.32±0.01	0.35±0.03	0.39±0.03
腎臓 (g/100g 体重)	0.85±0	0.86±0.02	0.96±0.02*
精巣 (g/100g 体重)	1.03±0.01	1.09±0.02	0.99±0.04

値は平均値±標準誤差 (n = 4) として示した. *は0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの値と有意差があることを示す ($p < 0.05$).

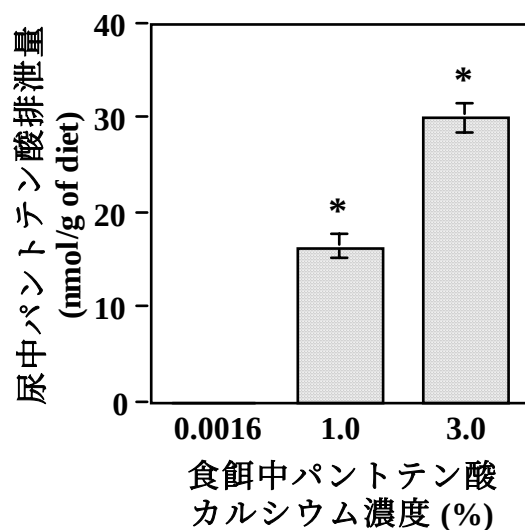


図2. パントテン酸カルシウム大量摂取が尿中パントテン酸排泄量におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した. *は0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの値と有意差があることを示す ($p < 0.05$).

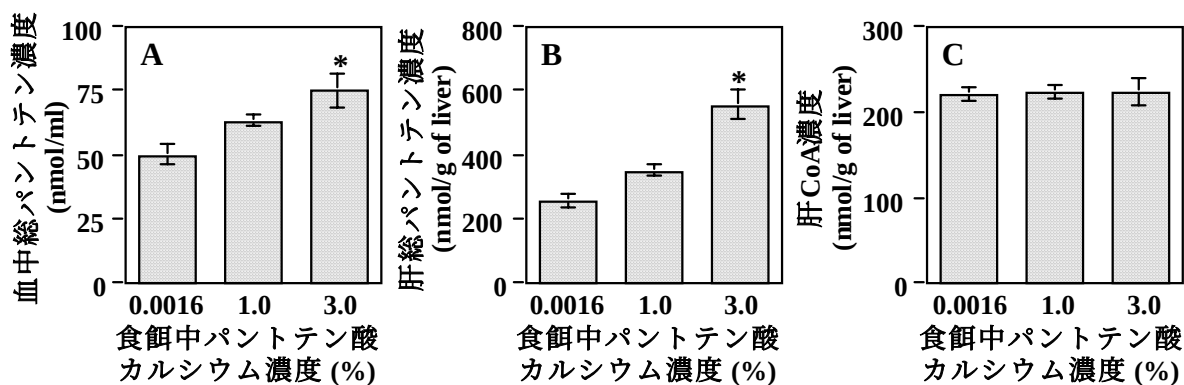


図3. パントテン酸カルシウム大量摂取が血中総パントテン酸濃度 (A) 肝総パントテン酸濃度 (B) および肝 CoA 濃度 (C) におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した. *は0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの値と有意差があることを示す ($p < 0.05$).

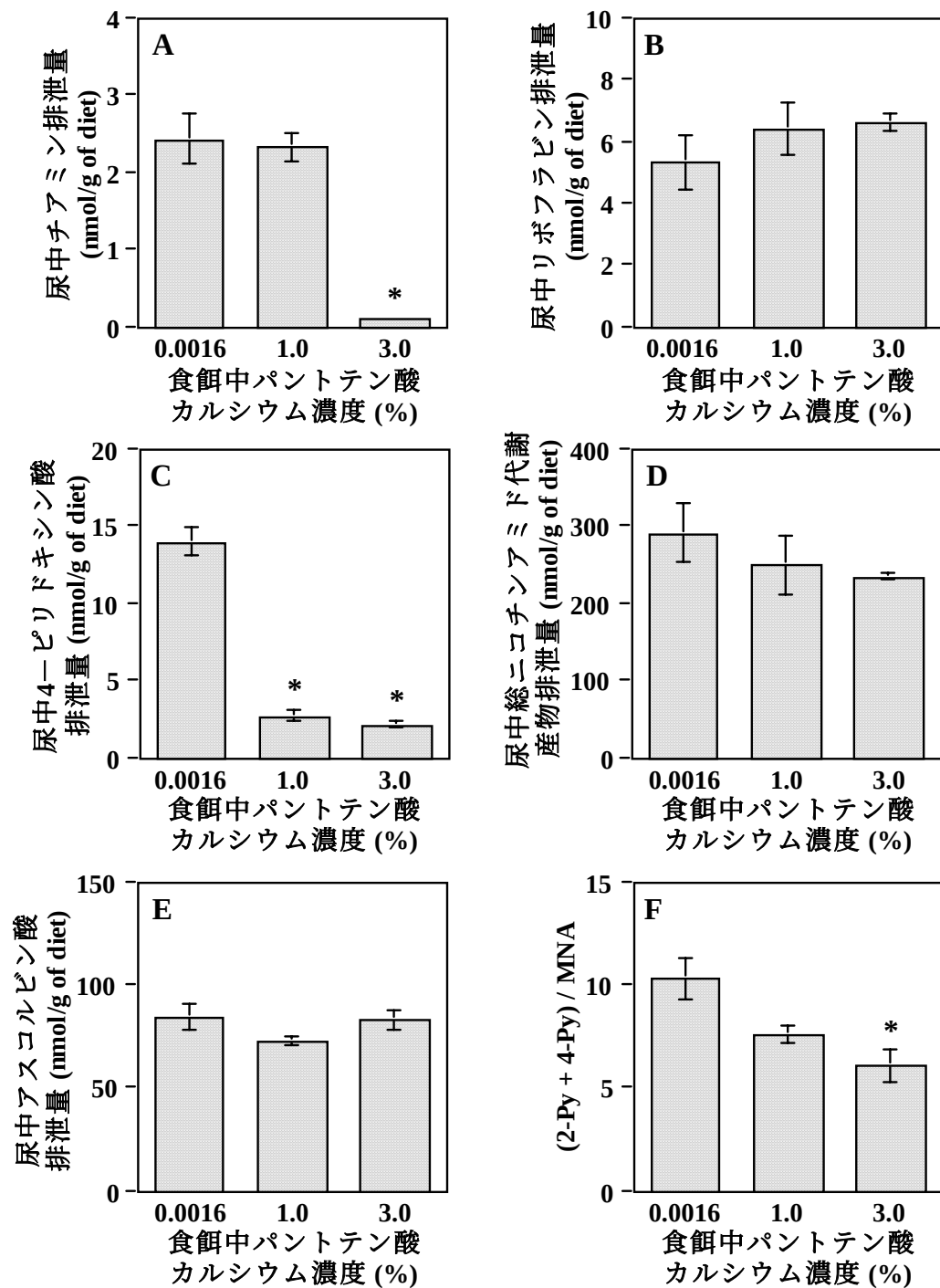


図4. パントテン酸カルシウムの大量摂取がチアミン (A), リボフラビン (B), 4-ピリドキシン酸 (C), ニコチンアミド総代謝産物 (D), アスコルビン酸 (E) の各尿中排泄量, およびニコチンアミド代謝産物比 (F) におよぼす影響。値は平均値±標準誤差 (n=4) として示した。*は0.0016%パントテン酸カルシウム食摂取ラットの値と有意差があることを示す ($p < 0.05$)。