

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

3. ビタミンの上限量の検討 -葉酸-

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究では、葉酸の上限量を考える際に必要な基礎データを得るために、葉酸を継続的に大量摂取させた影響について、ラットを用いて調べた。その結果、①葉酸の大量摂取（1%添加食）においても、幼若ラットの成長障害も飼料摂取量の低下も認められず、下痢も見られなかった。②B 群ビタミン代謝に葉酸の大量投与による影響はみられなかった。③ラットにおいて、葉酸を少なくとも 840 mg/kg 体重/日まで継続的に摂取させても悪影響は現れず、ラットの NOAEL は 840 mg/kg 体重/日以上であるといえた。今回は、飼料に葉酸を重量で 1%となるように混餌したものを 30 日間連続投与したが、健康障害はみられなかった。仮に人間においてこの値を利用するならば、ラットと人間という種差、個体差、30 日間という短期毒性試験であるという点を考慮し、不確定因子として 1000 で除した 0.8 mg/kg weight/day 以上という値が NOAEL の最低値であると考えることができる。60 kg の人ならば、5 mg/日程度を上限量と、考えてもさしつかえないであろう。

A. 目的

葉酸は B 群の水溶性ビタミンの一つである。近年、妊娠初期の葉酸の十分な摂取は、胎児神経管閉鎖障害の予防に効果があるとされている(1)。神経管閉鎖障害は、主に、先天性の脳や脊髄の癒合不全のことをいい、脊髄の癒合不全を二分脊髄という。そして現在、妊婦への 400 μ g/日の葉酸摂取が厚生労働省から通知されている(2)。しかし、通常の食品のみからの摂取は 200 μ g/日程度であるため妊婦の必要量を満たすことが困難であり、したがって、諸外国のようにサプリメントによる補足が必要となる。しかし、その簡便性や知識不足などによって過剰摂取する危険性があり、健康障害が懸念される。そのため、上限量の設定が必要となる。

日本人の食事摂取基準(2005 年度版)の概要(3)によると 18 歳以上の男女の葉酸の上限量は 1000 μ g/日である。しかしこの値は NOAEL(健康障害非発現量)により算出されたものであり(4)、葉酸の LOAEL(健康障害最低発現量)はわかっていない。葉酸の過剰害としては、主に神経障害などが言われている。また葉酸を摂取しすぎているとビタミン B₁₂ 不足によって起こる巨赤芽球性貧血を隠してしまう(5)。葉酸によるこれらの過剰害を防ぐためにも、葉酸の上限量を決定する上で NOAEL だけではなく LOAEL も算出する必要がある。

本研究は、葉酸の LOAEL を算出することを最終目標とした研究である。葉酸の大量投与実験を、ヒトに対して行うことは倫理的に不可能であるので、ラットに大量の葉酸を投与し、体重増加量、飼料摂取量の測定、尿中の水溶性ビタミン量の測定、臓

器重量及び肝臓中、血液中の葉酸量の測定から、葉酸の LOAEL を検索した。

B. 研究方法

動物飼育

(1)飼育、採尿、解剖方法

〈飼育方法〉

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、平均体重がほぼ均等になるように 5 匹ずつ 4 群に分けて、ラット用代謝ケージに入れた。その日から、表 1 に示した飼料を与えた。20% Casein 食を Control 食とし、大量投与群には 20% Casein 食に葉酸を 0.01%、0.1%、1.0% 添加したもので飼育した。飼料と水は自由摂取とし、1 日ないし 2 日置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。飼育条件としては、室温 20℃、湿度 60%、午前 6 時～午後 6 時を明、午後 6 時～翌朝 6 時を暗とする明暗サイクルで行った。

実験開始日を Day 0 として、飼育最終 3 日にあたる Day 27, Day 28, Day 29 の 1 日尿（午前 9 時～翌朝午前 9 時：24 時間）を集めた。尿は塩酸酸性下で、-20℃で保存した。

飼育 4 週間目に当たる Day 30 に断頭屠殺し、採血及び肝臓、腎臓、肺、脾臓、心臓、精巣、脳の摘出を行い、各臓器の重量を測定した。また、尿中の B 群ビタミン量、肝臓中、血液中の葉酸量を測定した。

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(6)

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 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 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 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 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, 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 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 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 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 (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 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 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 5 μ 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. 結果と考察

◆葉酸の大量投与が幼若ラットの成長に及ぼす影響

体重増加量, 飼料摂取量を示した (図 1) Control 群と試験群で体重増加量と飼料摂取量に差は見られなかった。飼育中, 下痢をしているラットはいなかった。また肉眼的所見において, 毛並み, 臓器に影響は認められず, 行動異常も認められなかった。

◆葉酸の大量投与が臓器重量に及ぼす影響の比較

臓器重量において, Control 群と試験 3 群に差異は認められなかった (表 2)。

◆葉酸の大量投与が肝臓, 血液中の葉酸量におよぼす影響の比較

肝臓中の葉酸量に大きな差異は認められなかった (図 2-A)。したがって肝臓中の葉酸は Control 群において既に飽和状態であったといえる。

また, 血液中の葉酸量は Test 群の 3 群では差が見られなかった (図 2-B)。したがって, 血液中の葉酸は 0.0102% 群で飽和状態になっていたと考えられる。

◆葉酸の大量投与が尿中の葉酸排泄量におよぼす影響の比較

尿中葉酸排泄量は Control 群に対して葉酸大量投与群で多く, 差がみられ, 摂取量に応じ尿中の葉酸排泄量は増加した (図 3-A)。

また, 葉酸排泄率は葉酸の摂取量に応じて順に低くなった (図-3B)。Control 群に比べ 0.01% 群では排泄率が大きく低下していた。したがって, 0.01% 群で葉酸がすでに飽和状態であったと考えられる。

◆葉酸の大量投与が B 群ビタミンの代謝におよぼす影響

葉酸を含めて、B 群ビタミンは補酵素として糖質、脂質、アミノ酸代謝において共同作業を行っているので、葉酸の大量摂取により、他のビタミン代謝の均衡を崩すおそれがある。葉酸のみに着目して影響が見られなかったとしても、他の B 群ビタミンに影響があれば、それは葉酸過剰摂取によるものと考えられる。しかし、図 4 に示したように、ビタミン B₁ (図 4-A)、ビタミン B₂ (図 4-B)、ビタミン B₆ (図 4-C)、ビタミン B₁₂ (図 4-D)、パントテン酸 (図 4-E)、ビオチン (図 4-F) の尿中への排泄量は、葉酸の大量摂取によって全く影響を受けなかった。

◆葉酸の大量投与が尿中(2-Py+4-Py)/MNA 比に及ぼす影響の比較

栄養状態に偏りが生じると、ニコチンアミド異化代謝産物である MNA から 4-Py に流れるための酵素の働きが悪くなり、4-Py の排泄量が減少してくる(7)。故に、尿中の (2-Py+4-Py)/MNA 比は栄養状態を知る上でよい指標となる。測定したところ図 5 に示したように、このナイアシン異化代謝産物排泄量比は葉酸の大量摂取によって、なんら影響を受けなかった。

したがって、ラットにおいて飼料中の葉酸含量が少なくとも 1.0%までは悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。1%添加群の飼育最終日の平均体重は 190.4g であり、葉酸の摂取量の平均値が 160mg/日であった。したがって、ラットにおいて少なくとも $160/190.4 \times 1000 = 840 \text{ mg/kg weight/日}$ の摂取は影響が認められないものと思われた。LOAEL が不確定であるので、ラットの NOAEL はこの値以上であると考えられる。仮に人間においてこの値を利用するならば、

ラットと人間という種差、個体差、30 日間という短期毒性試験であるという点を考慮し、不確定因子として 1000 で除した 0.8 mg/kg weight/day 以上という値が NOAEL の最低値であると考えることができる。60 kg の人ならば、5 mg/日程度を上限量と、考えてもさしつかえないであろう。

D. 健康危機情報

特記する情報なし

E. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

F. 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

G. 引用文献

1. Emery AE. (1977) Folates and fetal central-nervous-system malformations. *Lancet*, 26:1(8013):703.
2. 「神経管閉鎖障害の発症リスク提言のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について」、児母第 72 号、健医地生発第 78 号、平成 12 年 12 月 28 日、厚生省自動家庭局母子保健課長、厚生

省保健医療局地域保険・健康増進栄養
課生活習慣病対策室長.

3. 厚生労働省ホームページ: 日本人の食事
摂取基準について.
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/11/h1122-2.html>
4. Food and Nutrition Board, Institute of
Medicine. The B vitamins and choline:
overview and methods. In: Institute of
Medicine. Dietary Reference Intakes: For
thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6,
folate, vitamin B12, pantothenic acid,
biotin, and choline. Washington, D. C.,
National Academy Press, 1998: 196-305.
5. Sinow RM, Johnson CS, Karnaze DS,
Siegel ME, Carmel R. (1987) Unsuspected
pernicious anemia in a patient with sickle
cell disease receiving routine folate
supplementation. Arch Intern Med,
147:1828-1829.
6. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金,
効果的医療技術の確率推進臨床研究事
業, 日本人の水溶性ビタミン必要量に
関する基礎的研究, 平成 15 年度 総
括・分担研究報告書, 主任研究者, 平
成 16 (2004) 年 4 月.
7. 柴田克己 (1990) ニコチンアミドの異化
代謝産物、 N^1 - メチルニコチンアミ
ドとそのピリドン体の排泄量比とアミ
ノ酸栄養との関係. ビタミン, 64:1-18.

表 1. 飼料組成

	群分け			
	Control 群	0.01%群	0.1%群	1.0%群
Casein	20(%)			
L-Methionine	0.2			
Gelatinized cornstarch	46.9			
Sucrose	23.4			
Corn oil	5			
Mineral mixture(AIN-93M MX)	3.5			
Vitamin mixture(AIN93-VX)	1			
Folic Acid(μ g/ 上記飼料 100g)	0.2	10.2	100.2	1000.2

表 2. 葉酸の大量投与がラットの臓器重量におよぼす影響

臓器	Control 群	0.01%群	0.1%群	1.0%群
脳	1.1 $\pm$ 0.08	1.1 $\pm$ 0.04	1.0 $\pm$ 0.03	1.2 $\pm$ 0.01
心臓	0.7 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.03
肝臓	8.8 $\pm$ 0.25	8.6 $\pm$ 0.50	8.8 $\pm$ 0.28	8.5 $\pm$ 0.42
腎臓	1.6 $\pm$ 0.01	1.6 $\pm$ 0.03	1.7 $\pm$ 0.03	1.6 $\pm$ 0.02
脾臓	0.7 $\pm$ 0.03	0.7 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.03
肺	1.2 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.04
精巣	2.0 $\pm$ 0.10	2.0 $\pm$ 0.09	2.0 $\pm$ 0.05	2.0 $\pm$ 0.05

値は平均値 $\pm$ SEM (n = 5)で示した.

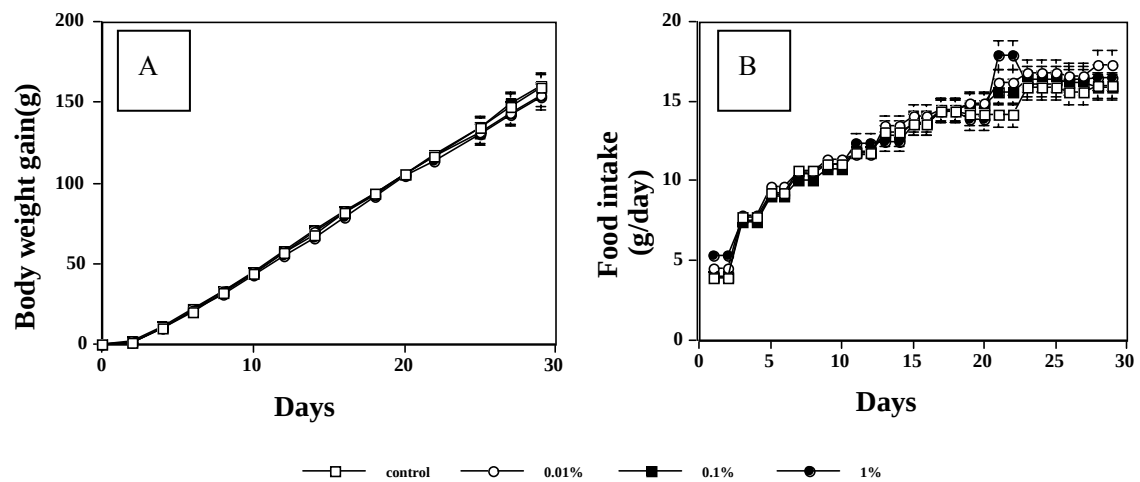


図1. 葉酸の大量投与が幼若ラットの体重増加量(A)と飼料摂取量(B)におよぼす影響. 数値は平均値±SEM (n = 5)で示した.

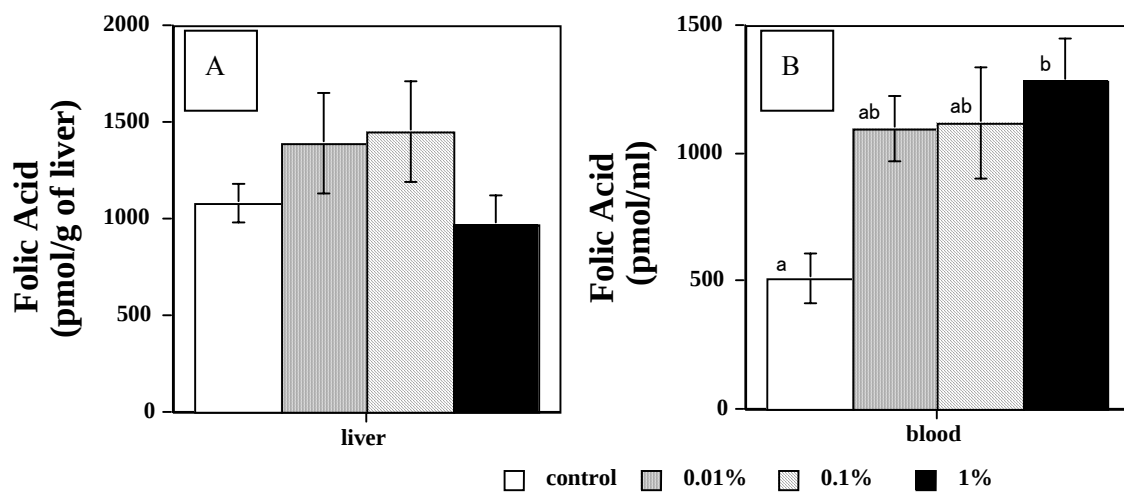


図2. 葉酸の大量投与がラット肝臓中と血液中の葉酸含量に及ぼす影響. 数値は平均値±SEM (n = 5)で示した.

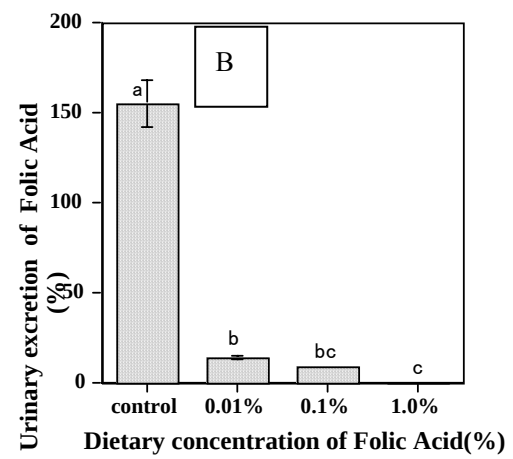
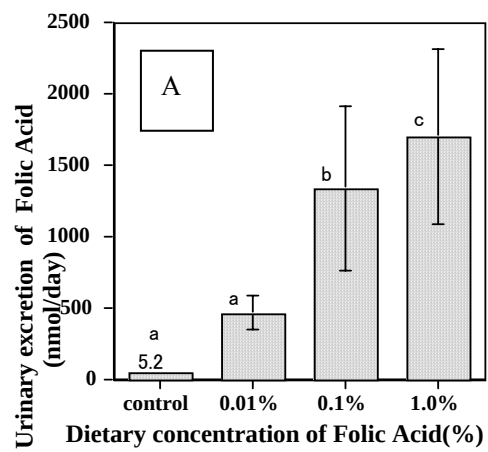


図 3. 葉酸の大量投与が尿中への葉酸排泄量におよぼす影響
数値は平均値±SEM (n = 5)で示した.

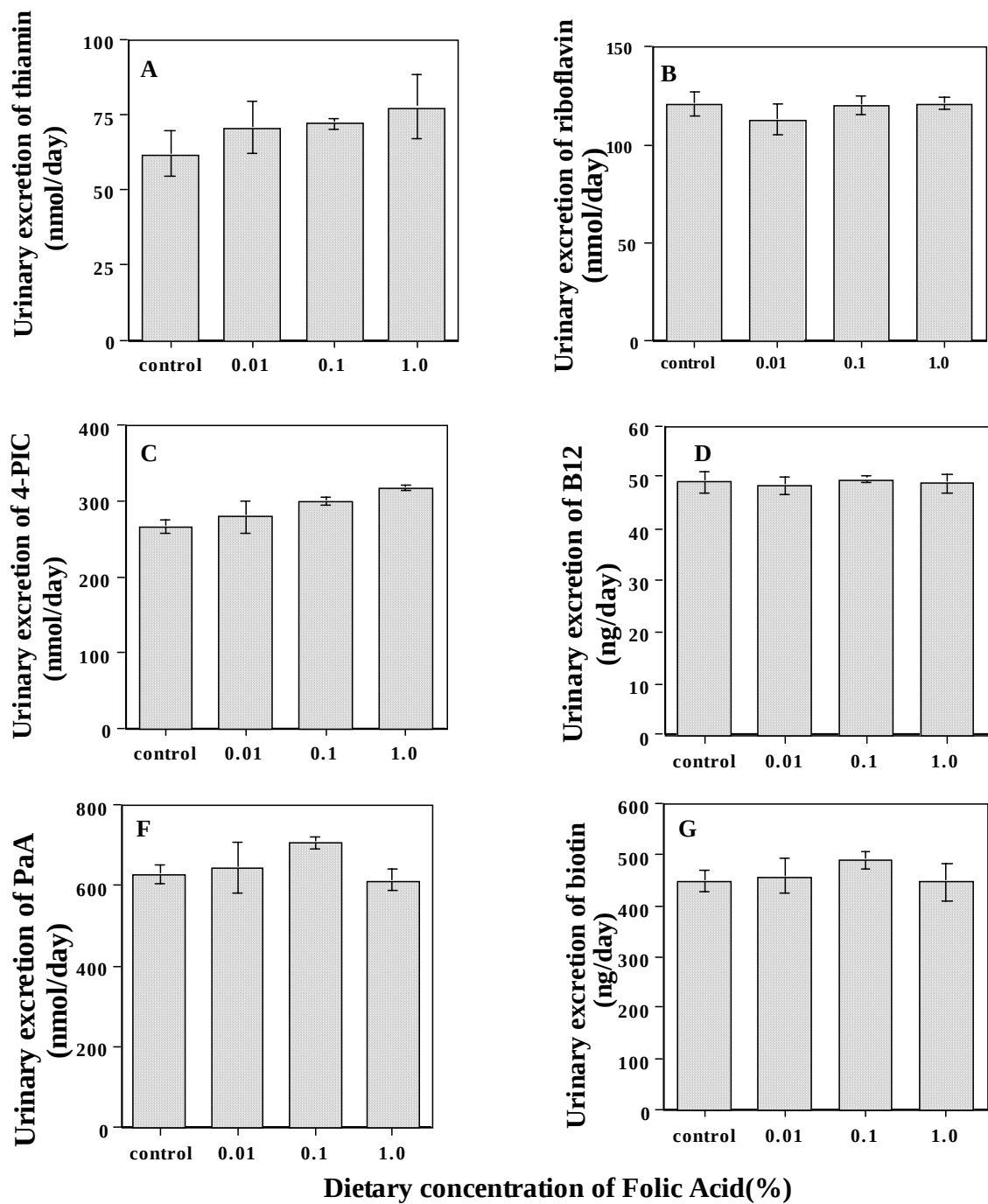


図4. 葉酸の大量投与がB群ビタミン代謝に及ぼす影響
数値は平均値±SEM (n = 5)で示した。

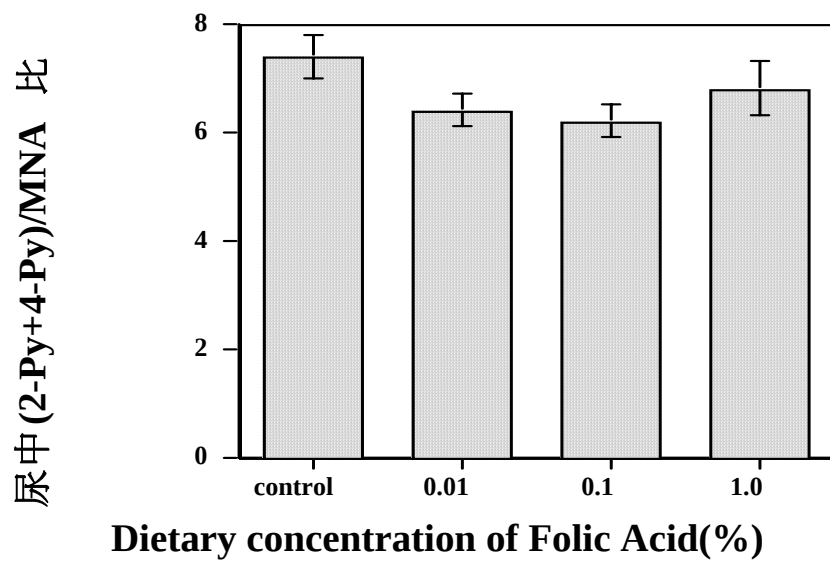


図 5. 葉酸の大量投与がナイアシン異化代謝産物排泄量比, (2-Py + 4-Py)/MNA におよぼす影響

値は平均値±SEM (n = 5)で示した.