

平成 17 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

5. ビタミンの上限量の検討 - ピリドキシン塩酸塩 -

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、ピリドキシン塩酸塩の上限量を考える際に必要な基礎データを得るために、ピリドキシン塩酸塩を継続的に大量摂取させた影響について、幼若ラットを用いて調べた。その結果、①ピリドキシン塩酸塩大量添加食（0.8%）において、幼若ラットの成長障害、試料摂取量の低下が認められた。②B 群ビタミン代謝では、パントテン酸においてピリドキシン塩酸塩の大量投与（0.1%添加食）による影響は認められたが、他の B 群ビタミンでは影響が認められなかった。③ラットにおいて、ピリドキシン塩酸塩を少なくとも 72mg/kg weight/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 72mg/kg weight /日以上であるといえた。④ラットにおいて、ピリドキシン塩酸塩を少なくとも 357mg / kg weight /日まで継続的に摂取させると悪影響は現れ、ラットの LOAEL は 357mg / kg weight /日以下であるといえた。

A. 目的

ビタミン B₆ は B 群のビタミンの一つである。ビタミン B₆ 活性を有する化合物として、ピリドキシン (PN)、ピリドキサーール (PL)、ピリドキサミン (PM) がある。アミノ酸代謝に関与しており、神経伝達物質である生理活性アミンの生成にも関わっている。

近年、サプリメントなどの普及で手軽にビタミン B₆ (ピリドキシン塩酸塩) を摂取できるようになり、不足を補うことができるようになった。その反面、知識の不足により、過剰に摂取してしまい、健康に悪影響を及ぼす危険性が懸念されている。

これまで、PN 大量摂取時 (数 g/日を数ヶ月程度) には、感覚神経障害という明確な悪影響が観察されており¹⁾、食事摂取基準 (2005 年版) では 18 歳以上の男女の UL を 60mg/日と定めている²⁾。この値の根拠となっているのは、手根幹症候群の患者 24 人に、ピリドキシン 100~300mg/日を 4 ヶ月間投与したが、感覚神経害は認められなかったという報告である³⁾。しかし、健常人を被験者としていないことや、LOAEL が不明なこと、また、成人に対する値しか定められていないなどの問題がある。

そこで、本研究では、ピリドキシンの NOAEL (健康障害非発現量) と LOAEL (健康障害最低発現量) を算出するための実験を開始した。ヒトに対して、ピリドキシンの大量投与実験を行うことは倫理的に不可能であるので、ラットに大量のピリドキシンを投与し、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総ビタミン B₆ 量から、ラットに対するピリドキシンの NOAEL、LOAEL を推定した。

B. 研究方法

動物飼育

〈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 4 匹ずつ 5 群に分けて、ラット用代謝ケージ (日本クレア株式会社 CT-10) に一匹ずつ入れた。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、test 群は 20% Casein 食にピリドキシン-塩酸塩 (PN-HCl) を 0.1%、0.5%、0.8%、1.0% 添加したもので飼育した。飼料と水は自由摂取とし、毎日新しいものに交換した。ラットの世話は午前 8 時~午前 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°C、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、飼育最終日前日にあたる Day 30 の 1 日尿 (Day 30 の午前 9 時~Day 31 の午前 9 時 : 24 時間) を集めた。尿は塩酸酸性下で採取し、-20°C で保存した。なお、アスコルビン酸測定のために、採取後、直ちに一部の尿を取り出し、10%メタリン酸で 2 倍希釈し、-20°C で保存した。

採尿終了後の Day 31 の午前 9 時~午前 10 時に断頭屠殺し、採血及び肝臓、腎臓、肺、心臓、精巣、脳、脾臓の摘出を行い、各臓器の重量を測定した。また、尿中の B 群ビタミン量と肝臓中のビタミン B₆ 量を測定した。

分析方法

・尿

Thiamin は、木村ら⁵⁾の方法で測定を行った。

Riboflavin は、riboflavin 自体が発する蛍光

を蛍光検出器付の HPLC で測定した⁶⁾。

SUM は、Nicotinamide (Nam), *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-Py), *N*¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide (4-Py), *N*¹-methylnicotinamide (MNA) の合計を示すものである。Nam, 2-Py, 4-Py は、柴田らの方法により測定した⁷⁾。MNA は、柴田らの方法により測定した⁸⁾。

ビタミン B₁₂ 量は、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. leichimannii*) ATCC 7830 を用いた微生物定量法を用いて、測定した⁹⁾。

葉酸量は、乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC 2773 を用いた微生物定量法を用いて、測定した¹⁰⁾。

ビオチン量は、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物定量法を用いて分析した¹¹⁾。

ビタミン B₆ は、異化代謝産物である 4-Pyridoxic acid (4-PIC) をそれ自体が発する蛍光を、蛍光検出器付の HPLC で測定した¹²⁾。

パントテン酸量は、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8041 を用いた微生物定量法を用いて測定した¹³⁾。

ビタミン C は、アスコルビン酸・デヒドロアスコルビン酸・2,3-ジケトグルン酸を、これらの総称である総アスコルビン酸の量で測定した¹⁴⁾。

・肝臓

ビタミン B₆ の試験溶液作成法は図 1 に示す。*Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 を用いた微生物定量法を用いて分析した^{15,16)}。

統計処理

結果はすべて平均値±標準偏差 (SEM) で表した。有意差検定には InStat software Ver.

2.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。値を常用指数に変換し、One-way Analysis of Variance (ANOVA) により、有意差が認められた場合は、Turkey-Kramer Multiple Comparisons Test で個々の群の間の有意差をみた。

C. 結果と考察

◆ 体重増加量, 飼料摂取量, 肉眼的所見

体重増加量・飼料摂取量を示した (図 1)。体重増加量・飼料摂取量、ともに Control 群に比べ、0.1%、0.5%、0.8% 添加群では影響が認められなかったが、1.0% 添加群で有意な減少が認められた。飼育中、下痢をしているラットは認められなかった。これらを指標にすると、1.0% 添加群を LOEL、0.8% 添加群を NOAEL とした。

なお、毛並み、臓器は、肉眼的所見において異常は認められず、行動異常も認められなかった。

◆ 臓器重量

100g 当たりの相対臓器重量を表 2 に示した。脳は control 群と比べ、0.8% と 1.0% 添加群で増大した。腎臓では、Control 群と 0.1%、0.5% 添加群間では差異は認められなかったが、0.8% と 1.0% 添加群との間に、差が見られた。脾臓では、対照群を基準にして比較すると、すべての群間において差異は認められなかったが、0.1% 添加群と 1.0% 添加群の間には差異がみられた。肝臓は、0.1% 添加群では差異は認められなかったが、0.5% 添加群以上では、差異が認められた。これらを指標にすると、0.5% 添加群を LOEL、0.1% 添加群を NOAEL とした。

◆ 肝臓中ビタミン B₆ 量

肝臓中のビタミン B₆ 量は、Control 群・

0.1%添加群では Control 群との間には差異は認められなかったが、0.5%添加群以上では有意に高い値を示した(図3)。図3に示したように、肝臓中ビタミン B₆量は試料中のピリドキシン量に応じて増加した。水溶性ビタミンは貯蔵されにくいと考えられているが、ピリドキシンは特殊な水溶性ビタミンであるかもしれない。これらを指標にすると、0.5%添加群を LOAEL、0.1%添加群を NOAEL とした。

◆尿中の 4-PIC 排泄量

尿中 4-PIC 排泄量は Control 群に対して添加群で有意に増加したが、0.5%添加群以上からの増加量は少なく、ピリドキシン→→4-PIC の反応が 0.1%添加食でなるものと推定された(図4)。

また、4-PIC 排泄率は、PN-HCl の摂取量に応じて有意に低下した(図5)。Control 群に比べ 0.1%群では排泄率が大きく低下し、それ以上は大きな低下は見られなかった。

つまり、ラットでは、PN-HCl 0.1%添加食で、代謝障害が起こったものと思われた。

これらを指標にすると、0.1%添加群を LOAEL とした。この指標では、NOAEL を特定することができなかった。

◆B 群ビタミンの代謝

ビタミン B₆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協同作業を行っているので、PN-HCl 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。しかし、パントテン酸を除いて、他の B 群ビタミンの尿中排泄量に影響は認められなかった(図5)。パントテン酸の尿中排泄量は、PN-HCl 0.1%添加群で急激に増加し、それ以上の摂取では有意に増加しなかった。したがって、PN-HCl

の大量摂取により、パントテン酸の代謝に何らかの影響を与えることは明らかであるが、増加の理由ははっきりしない。これらを指標にすると、0.1%添加群を LOAEL、とした。0.1%添加群を LOAEL とする。

◆PN-HCl の大量投与がナイアシン代謝産物尿中排泄量におよぼす影響

Nam, MNA, 2-Py, 4-Py, それぞれで有意に差が現れた(図7)。PN-HCl 摂取量の増加に伴い、MNA と 2-Py では増加傾向がみられ、0.8%添加群で有意に増加した。0.8%添加群を LOAEL とする。この指標では、NOAEL を特定することができなかった。

◆尿中(2-Py + 4-Py)/MNA

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¹⁶⁾。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。尿中の(2-Py + 4-Py)/MNA 比は Control 群と比べ 0.1%と 0.5%添加群では差異は認められなかったが、0.8%と 1.0%添加群では有意に減少した(図8)。これらを指標にすると、0.8%添加群を LOAEL、0.5%添加群を NOAEL とした。0.8%添加群を LOAEL、0.5%添加群を NOAEL とする。

LOAEL を 0.5%添加群、NOAEL を 0.1%添加群とする。

以上のことから、ラットにおいて、PN-HCl 代謝能は、0.1%添加群において、飽和に達していることが分かった。そして、LOAEL を 0.5%添加群、NOAEL を 0.1%添加群とする。0.5%添加群の飼育最終日の平均体重は 211.8g であり、PN-HCl の摂取量の平均が 75.63mg/日であったため、{75.63 /

211.8×1000= 357.1 mg/kg weight /日} より、
LOAEL は 357.1 mg/kg weight /日とする。また、
0.1%添加群の飼育最終日の平均体重は
235.6g であり、PN-HCl の摂取量の平均が
16.98 mg / 日であったため、{235.6/16.98 ×
1000 = 72.1 mg/kg weight/日} より、NOAEL
は 72.1 mg/kg weight/日とする。

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. Schaumburg H, Kaplan J, Windebank A, Vick N, Rasmus S, Pleasure D and Brown MJ. Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. *N Eng J Med* ,309, 445-8 (1985).
2. 日本人の食事摂取基準（2005年版）
（日本人の栄養所要量－食事摂取基準－策定検討会報告書），厚生労働省 平成 16 年 10 月
3. Del Tredici AM, Bernstein AL, Chinn K.

Carpal tunnel syndrome and vitamin B₆ therapy. In: Reynolds RD, Leklem JE, (eds). Vitamin B₆: Its role in health and disease. Current topics in nutrition and disease. Alan R. Liss, New York. 1985: 459-62.

4. Kimura, M Fujita and T Itokawa, Y Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Chin.Chem.*, **28**,1 9-31(1982).
5. Roughead Z, K., McCormick, and D.B. Urinary riboflavin and its metabolites: effects of riboflavin supplementation in healthy residents of rural Georgia (USA). *Eur. J. Clin. Nutr.*, **45**, 299-307(1991).
6. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.*, **424**, 23-28 (1988).
7. Shibata K. Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins(Japan)*, **61**,599-604 (1987).
8. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamazi R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M and Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5177-5180 (1998).
9. Herbert V. Minimal daily adult folate requirement. *Arch. Int. Med.* , **110**, 649-653 (1962).

10. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J and Izumi Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 491-498 (1994).
11. Gregory, J. F., Kirk, J. R., Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*,**32**,879-883 (1979).
12. Skeggs HR and Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem*,**156**, 21-26 (1994).
13. Shigeoka S, Yokota A, Nakano Y and Kitaoka S. The effect of illumination on the L-ascorbic acid content in *Euglena gracilis* z. *Agric. Biol. Chem.*, **43**,2053-2058 (1979).
14. 岩井和夫：マイクロバイオアッセイ，基礎分析化学講座 29,日本分析化学会編，共立出版,東京，(1965).
15. Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis, 15th ed ., (AOAC ,Inc., Arlington, VA USA,1089 (1990).
16. 柴田克己，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 (1990).

表 1. 飼料組成(%)

	Control diet	Test diet			
		0.1%群	0.5%群	0.8%群	1.0%群
Casein	20	20	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9
Sucrose	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4
Corn oil	5	5	5	5	5
Mineral mixture(AIN-93M MX)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture(AIN93-VX)	1	1	1	1	1
PN-HCl (mg/上記飼料 100g)	0.6	100.6	500.6	800.6	1000.6
PN-HCl 添加量(%)	0	0.1	0.5	0.8	1.0

表 2. PN-HCl の大量投与がラットの臓器重量におよぼす影響(g /100g body weight)

	control 群	0.1%添加群	0.5%添加群	0.8%添加群	1.0%添加群
脳	0.51 ± 0.03 ^a	0.52 ± 0.01 ^{a,b}	0.59 ± 0.03 ^{a,c}	0.61 ± 0.01 ^{b,c}	0.66 ± 0.02 ^c
心臓	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.01
腎臓	0.76 ± 0.00 ^a	0.77 ± 0.02 ^a	0.79 ± 0.01 ^a	0.85 ± 0.01 ^b	0.89 ± 0.01 ^b
肺	0.63 ± 0.05 ^a	0.52 ± 0.01 ^b	0.64 ± 0.02 ^a	0.62 ± 0.01 ^a	0.71 ± 0.02 ^a
脾臓	0.35 ± 0.05 ^{a,b}	0.31 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.01 ^{a,b}	0.41 ± 0.02 ^{a,b}	0.43 ± 0.02 ^b
精巣	0.97 ± 0.02	0.97 ± 0.05	1.02 ± 0.02	1.04 ± 0.04	1.07 ± 0.03
肝臓	4.83 ± 0.12 ^a	5.06 ± 0.08 ^a	5.84 ± 0.12 ^b	6.96 ± 0.14 ^c	7.31 ± 0.08 ^c

数値は平均値±SEM (n=4)で示した.

横列間の異なるアルファベット間で有意差有り (p<0.05) .

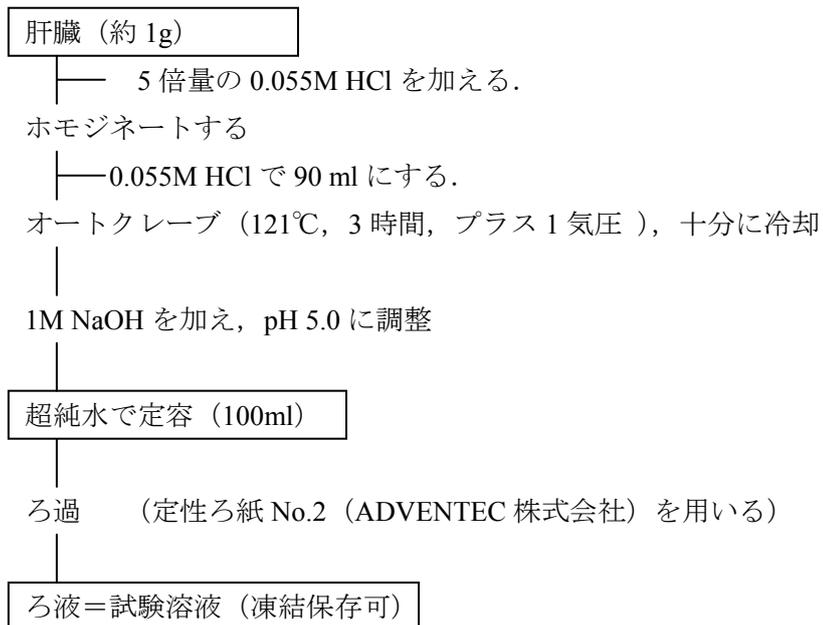


図 1. ビタミン B₆ 測定用の試験溶液の作成

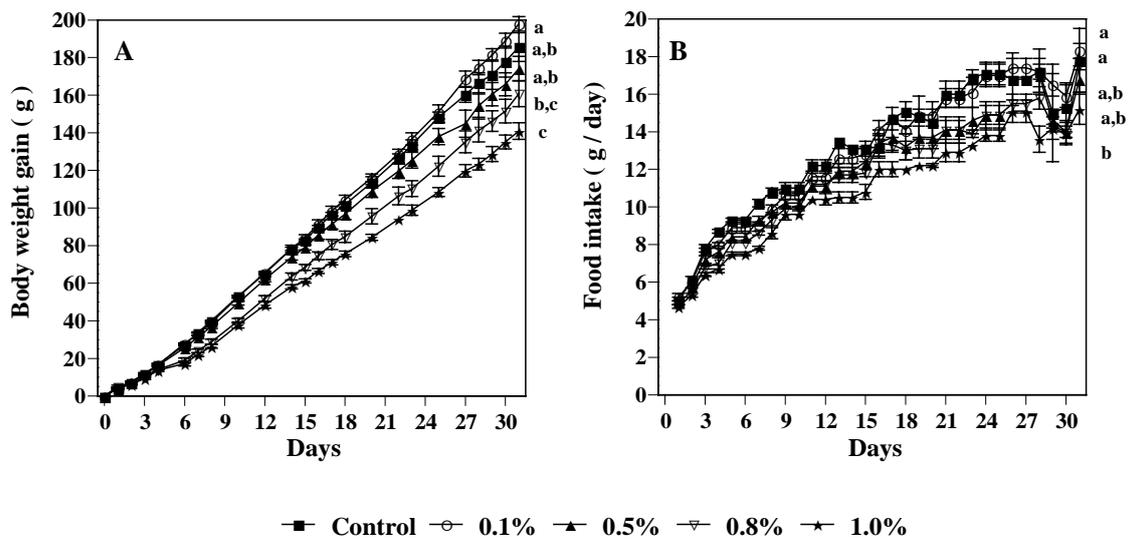


図2. PN-HClの大量投与が幼若ラットの体重増加量(A)と飼料摂取量(B)におよぼす影響. 数値は平均値±SEM (n=4)で示した. 異なるアルファベット間で有意差有り (p<0.05).

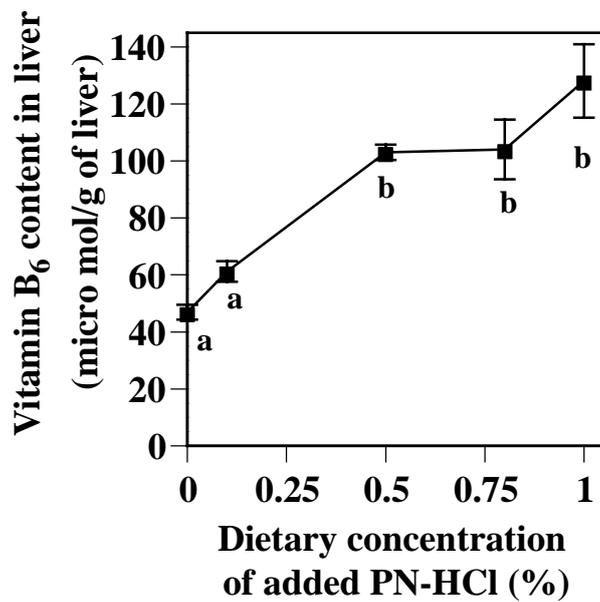


図3. PN-HClの大量投与が幼若ラットの肝臓中B₆量におよぼす影響. 数値は平均値±SEM (n=4)で示した. 異なるアルファベット間で有意差有り (p<0.05).

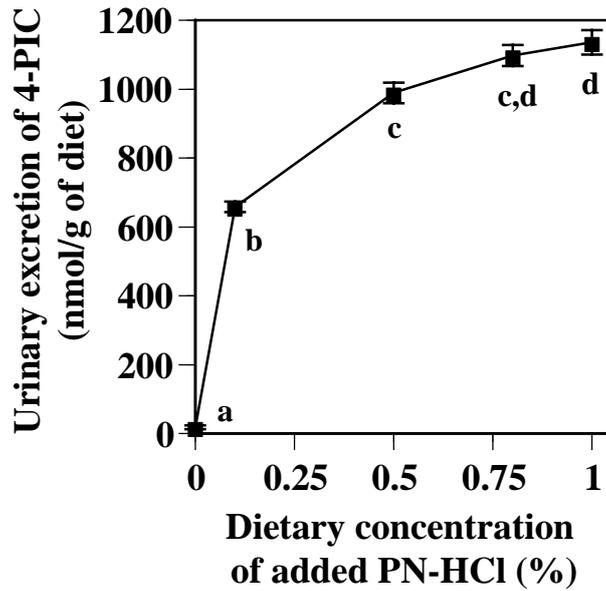


図 4 . PN-HCl の大量投与が幼若ラットの尿中 4-PIC 排泄量におよぼす影響.
 数値は平均値±SEM (n=4)で示した. 異なるアルファベット間で有意差有り (p<0.05) .

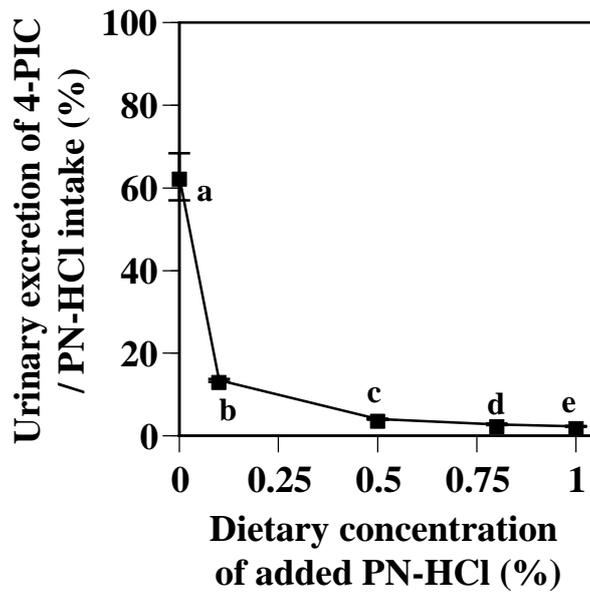
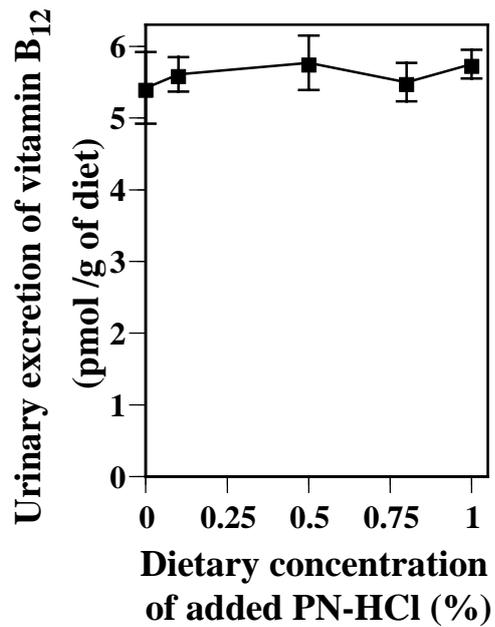
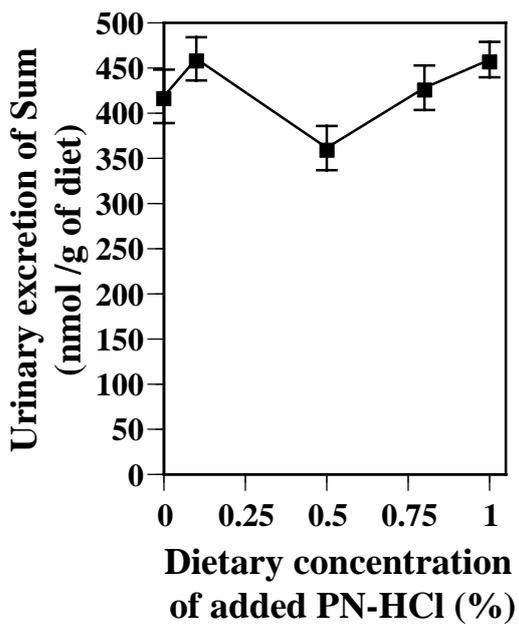
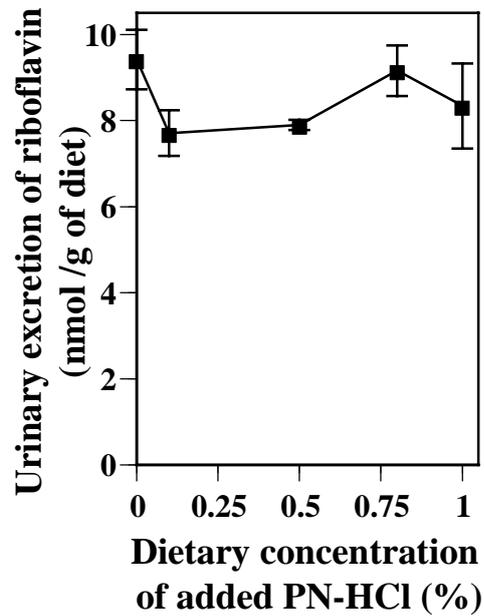
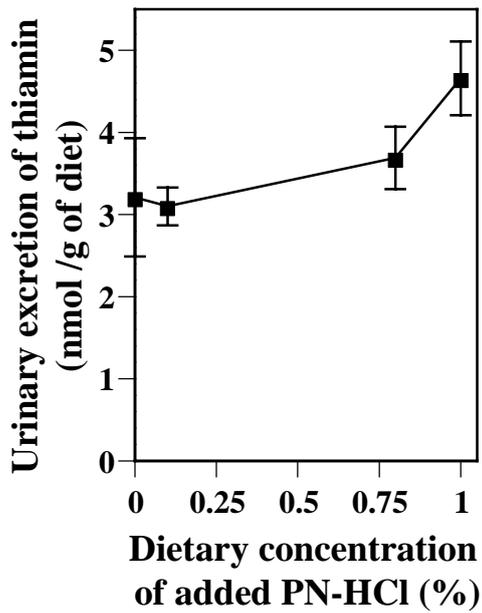


図 5. PN-HCl の大量投与が幼若ラットの尿中 4-PIC 排泄率におよぼす影響.
 数値は平均値±SEM (n=4)で示した. 異なるアルファベット間で有意差有り (p<0.05) .



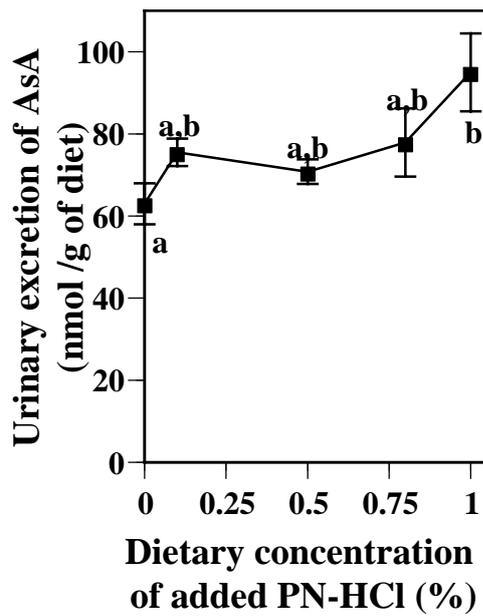
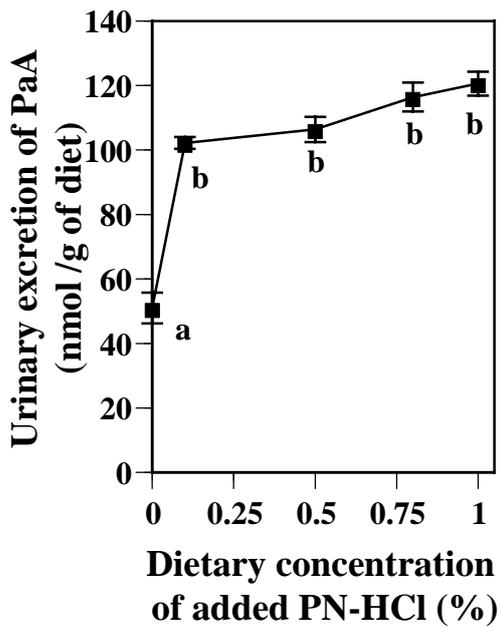
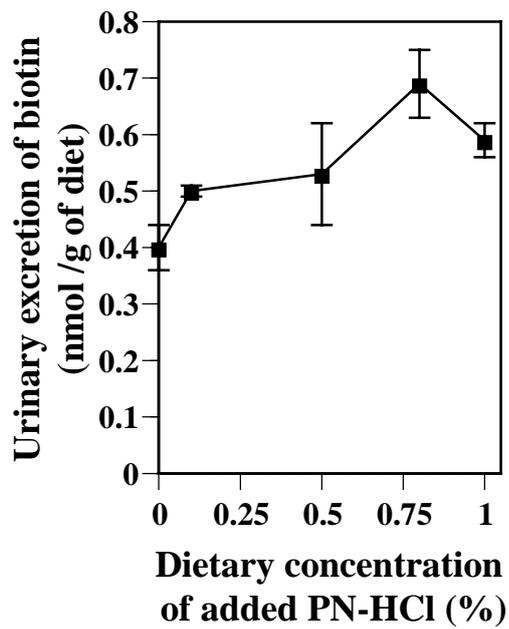
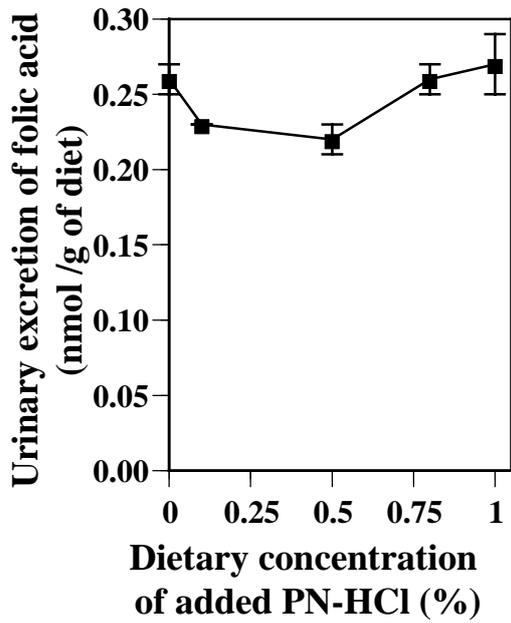


図 6. PN-HCl の大量投与が B 群ビタミン尿中排泄量に及ぼす影響

数値は平均値±SEM (n=4)で示した. 異なるアルファベット間で有意差有り (p<0.05).

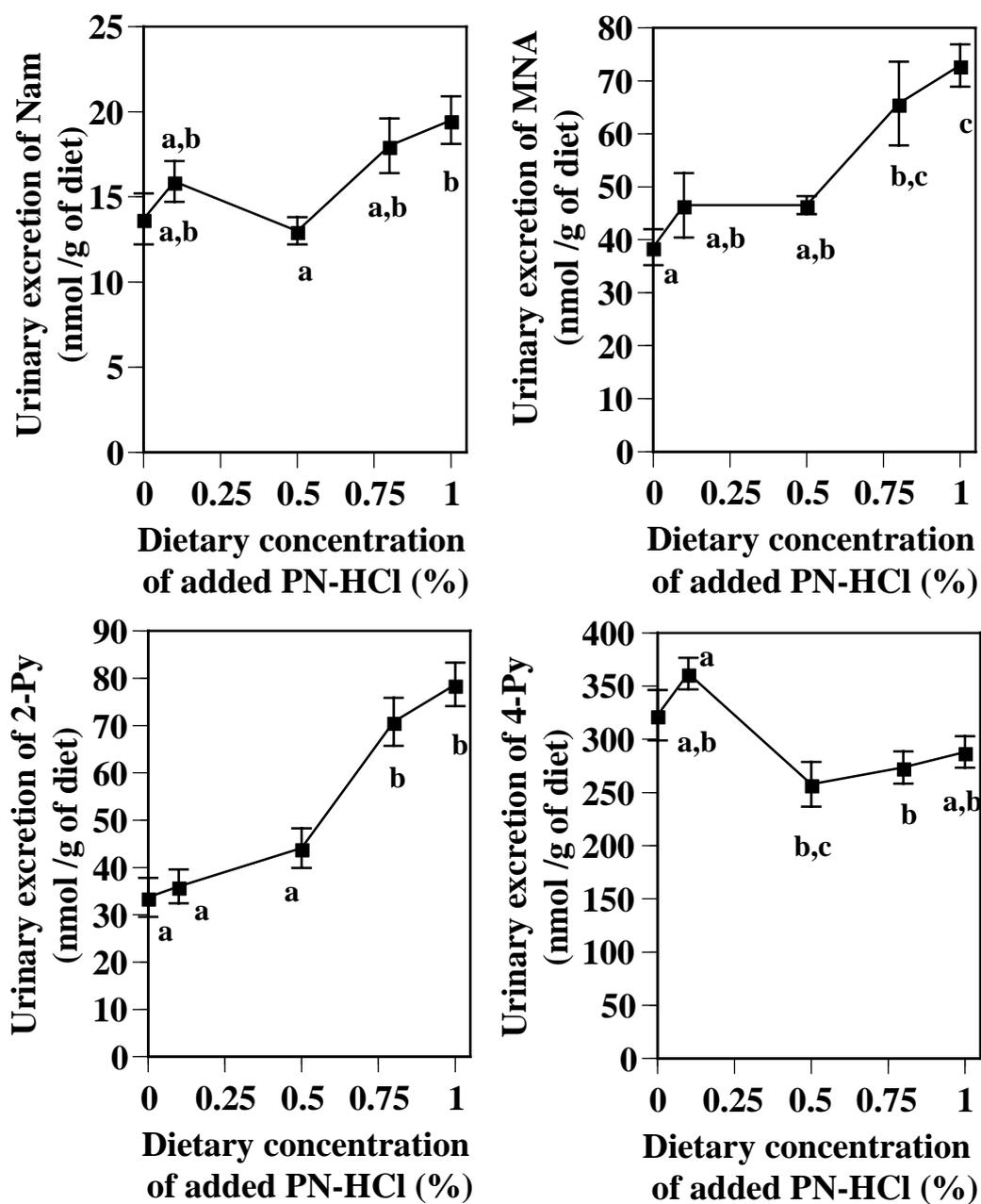


図 7. PN-HCl の大量投与が尿中ナイアシン代謝産物量に及ぼす影響
 数値は平均値±SEM (n=4)で示した. 異なるアルファベット間で有意差有り (p<0.05).

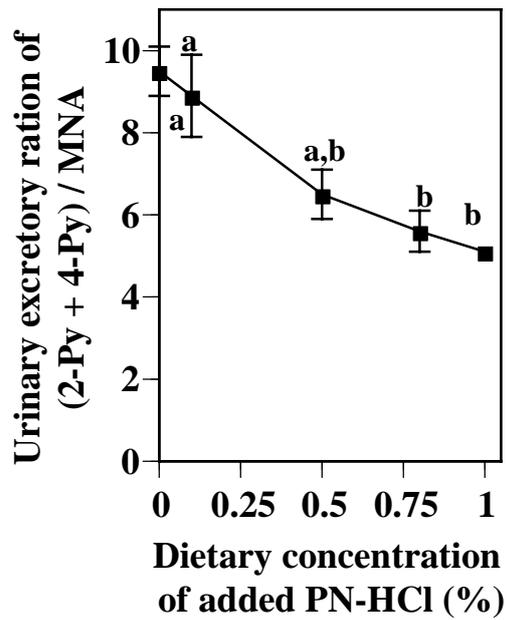


図 8. PN-HCl の大量投与が尿中 (2-Py+4-Py) / MNA 比に及ぼす影響
 数値は平均値±SEM (n=4)で示した。
 異なるアルファベット間で有意差有り