ノート

ピリドキシン塩酸塩の大量摂取が幼若ラットの
成長と水溶性ビタミン排泄量におよぼす影響

(平成 20 年 6 月 4 日受理)

福 渡 努* 伊 東 景 子 柴 田 克 己

Effects of Excess Pyridoxine-HCl on Growth and Urinary
Excretion of Water-soluble Vitamins in Weaning Rats

Tsutomu FUKUWATARI*, Keiko ITOH and Katsumi SHIBATA

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of
Shiga Prefecture: 2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan; * Corresponding author

To determine the tolerable upper intake level of pyridoxine-HCl in humans, we investigated the effects of excess pyridoxine-HCl administration on body weight gain, food intake, tissue weight, and urinary excretion of water-soluble vitamins in weaning rats. The weaning rats were freely fed ordinary diet containing 0.0007% pyridoxine-HCl (control diet) or the same diet with 0.1%, 0.5%, 0.8% or 1.0% pyridoxine-HCl for 30 days. The body weight gain in the 0.8% and 1.0% groups, and the total food intake in the 1.0% group were significantly lower than those in the control group. The urinary excretion of pantothenic acid in the pyridoxine-HCl added groups were higher than that in the control group, while excessive pyridoxine-HCl intake did not affect the urinary excretion of other water-soluble vitamins. These results showed that the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) for pyridoxine-HCl was 0.1% in diet, corresponding to 90 mg/kg body weight/day, and lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) was 0.5% in diet, corresponding to 450 mg/kg body weight/day.

(Received June 4, 2008)

Key words: ピリドキシン pyridoxine; ビタミン B₆ vitamin B₆; 過剰 excess; 上限量 tolerable upper intake level: UL; 健康障害非発現量 (無毒性量) no-observed-adverse-effect-level: NOAEL; 最低健康障害発現量 (最小毒性量) lowest-observed-adverse-effect-level: LOAEL; 食事摂取基準 Dietary Reference Intake

緒 言

ビタミン B₆ は B 群ビタミンの 1 つである。ビタミン B₆ 活性を有する代表的な化合物として、ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミンの三形がある。この報告では、ビタミン B₆ という名称は、これら三形の総称名として使用する。これらの三形のビタミン B₆ は、体内では補酵素ピリドキサルリン酸に変換されたのち、アミノ酸の異化代謝ならびに、神経伝達物質である生理活性アミンの生成にもかかわっている。

近年、サプリメントの普及で手軽にビタミン B₆ 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。なお、ビタミン B₆ 製剤として市場に出回っている形は、ピリドキシンである。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。そこで、国民の健康維持のために、栄養素の必要量を策定している厚生労働省は、サプリメントの乱用を防ぐ目的で、上限量も「日本人の食事摂取基準 (2005 年版)」中で策定している¹⁾。なお、「日本人の食事摂取基準 (2005 年版)」¹⁾ での「上限量」とは、健康障害をもたらす危険がないとみなされる習慣的な摂取量の上限を与える量のことである。

ビタミン B₆ の過剰摂取による毒性報告としては、数 g/日のピリドキシンを数か月程度摂取したときに、感覚神経障害が発生したというものがある²⁾。食事摂取基準 (2005 年版) では 18 歳以上の男女の上限量 (tolerable upper intake level: UL) を 60 mg/日と定めている¹⁾。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 100~300 mg/日を 4 か月間投与しても、感覚神経障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、最低健康障害発現量 (lowest-observed-adverse-effect-level: LOAEL)

* 連絡先

滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科: 〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

Table 1. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on body weight gain and food intake

	Control	+0.1%	+0.5%	+0.8%	+1.0%
Initial body weight (g)	36.9±0.8	37.7±0.8	37.7±0.6	37.6±0.5	37.6±0.4
Final body weight (g)	229.4±4.5	235.6±3.6	211.8±6.8	203.1±6.7*	183.2±5.3*
Body weight gain (g/30d)	192.6±4.9	198.0±3.9	174.1±6.5	160.8±6.9*	140.9±4.4*
Food intake (g/30d)	407.8±15.0	402.6±7.7	369.2±10.5	366.5±8.0	339.7±7.1*

Each value is expressed as the mean±SEM ($n=4$). * $p<0.05$ versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

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。

上限量を設定するには健康者を被験者とした実験が必要である。しかし、ヒトに過剰害が現れる可能性があるほどの大量のビタミンを投与することは、倫理的に不可能である。そこで、著者らは実験動物を用いてビタミンの健康障害非発現量 (no-observed-adverse-effect-level: NOAEL) を調べることを目的として、これまでにニコチンアミド⁴⁾、パントテン酸⁵⁾、ビオチン⁶⁾、葉酸⁷⁾の大量摂取が幼若ラットの成長と各ビタミンの体内動態に及ぼす影響について検討してきた。本研究では、幼若ラットに大量のピリドキシン塩酸塩を投与し、体重増加量と飼料摂取量、ビタミン B₆ の体内動態、尿中水溶性ビタミン排泄量を測定することにより、ラットに対するピリドキシン塩酸塩の NOAEL と LOAEL を推定した。

実験方法

1. 動物の飼育方法

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%前後に維持し、明暗サイクルは、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 匹を日本クレア株式会社より購入し、4 匹ずつ 5 群に分けた。0.0007% のピリドキシン塩酸塩を含有する 20% カゼイン食を対照食とし、対照食に 0, 0.1, 0.5, 0.8, 1.0% のピリドキシン塩酸塩を添加した飼料を与え、30 日間飼育した。飼育最終日の 1 日尿および 1 日糞を集めた。尿は塩酸酸性下で集め、採尿後、分析に供するまで -20℃ で保存した。採尿終了後、ラットを断頭屠殺し、採血および脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣の摘出を行い、各臓器重量を測定した。

2. 分 析

チアミン⁸⁾、リボフラビン⁹⁾、ピリドキサルリン酸 (PLP)¹⁰⁾、ビタミン B₆ 代謝産物 4-ピリドキシン酸 (4-PIC)¹¹⁾、アスコルビン酸¹²⁾ は HPLC 法により測定した。ニコチンアミド (Nam)¹³⁾、N¹-メチルニコチンアミド (MNA)¹⁴⁾、N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py)¹³⁾、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py)¹³⁾ は HPLC 法により測定し、これらの合計を総ニコチンアミド代謝産物とした。総ビタミン B₆¹⁵⁾、シアノコバラミン¹⁶⁾、パントテン酸¹⁷⁾、葉酸¹⁸⁾、ビオチン¹⁹⁾ は微生物学的

定量法により測定した。

3. 有意差検定

すべてのデータは平均値±SEM で示した。有意差検定は、まず一元配置の分散分析を行い、有意差が認められたときには、Tukey-Kramer の多重比較テストを行った。有意差は、 $p<0.05$ で判定した。なお、検定は、統計ソフト GraphPad Prism (version 5.01; GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いた。

結果および考察

1. 体重増加量、飼料摂取量、肉眼的所見

0.8% および 1.0% 添加群の体重増加量は対照群と比べて有意に低値を示した (Table 1)。1.0% 添加群の総飼料摂取量は対照群と比べて有意に低値を示した。飼育中、下痢をしているラットは認められなかった。これらを指標とした場合の最小健康障害発現量 (lowest-observed-adverse-effect level; LOAEL) を 0.8% 添加群、健康障害非発現量 (no-observed-adverse-effect level; NOAEL) を 0.5% 添加群とした。

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。

2. 臓器重量

体重 100 g 当たりの臓器重量を Table 2 に示した。0.8% と 1.0% 添加群の脳重量および腎臓重量は対照群より高値を示した。0.5% 以上の添加群の肝臓重量は対照群より高値を示した。心臓、脾臓、肺、精巣の重量については、対照群との間に差異の認められた群はなかった。これらの指標を基に判断すると、LOAEL は 0.5% 添加群、NOAEL は 0.1% 添加群となる。

3. 肝臓中総ビタミン B₆ 量と血漿中ピリドキサルリン酸含量

肝臓中の総ビタミン B₆ 量は、Fig. 1 に示したように、投与した飼料中のピリドキシン塩酸塩量に応じて増加した。補酵素型ビタミン B₆ であるピリドキサルリン酸の血漿中の含量は、0.1% 添加群で有意に増大し、これ以上のピリドキシン塩酸塩を摂取してもさらに増大することはなかった。

4. 尿中への 4-PIC 排泄量

ビタミン B₆ 異化代謝産物である 4-PIC の尿中排泄量は、Fig. 1C に示したように、ピリドキシン塩酸塩の添加量が多くなるにつれて増大した。しかし、その増加は直線

Table 2. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on tissue weights of rats

	Control	+0.1%	+0.5%	+0.8%	+1.0%
Brain	0.51±0.03	0.52±0.01	0.59±0.03	0.61±0.01*	0.66±0.02*
Heart	0.34±0.01	0.34±0.01	0.36±0.01	0.36±0.01	0.36±0.01
Liver	4.83±0.12	5.06±0.08	5.84±0.12*	6.96±0.14*	7.31±0.08*
Kidney	0.76±0.00	0.77±0.02	0.79±0.01	0.85±0.01*	0.89±0.01*
Spleen	0.35±0.05	0.31±0.01	0.35±0.01	0.41±0.02	0.43±0.02
Lung	0.63±0.05	0.52±0.01	0.64±0.02	0.62±0.01	0.71±0.02
Testis	0.97±0.02	0.97±0.05	1.02±0.02	1.04±0.04	1.07±0.03

Each value is expressed as g/100 g body weight and represents the mean±SEM ($n=4$). * $p<0.05$ versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

Table 3. Summary of the NOAEL's and the LOAEL's of pyridoxine-HCl (PN-HCl) determined from various indices of rats

Indices	NOAEL	LOAEL
Body weight and food intake	0.5% PN-HCl group	0.8% PN-HCl group
Organ weights	0.1% PN-HCl group	0.5% PN-HCl group
Urinary excretion		
catabolic ability of PN	>0.1% PN-HCl	0.1% PN-HCl group
B-group vitamins	<1.0% PN-HCl group	—
ascorbic acid	0.8% PN-HCl group	1.0% PN-HCl group
catabolic ability of Nam*	0.1% PN-HCl group	0.5% PN-HCl group

* Nam = nicotinamide.

Fig. 1. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on vitamin B₆ content in the liver (A), the PLP concentration in blood (B), urinary excretion of 4-PIC (C) and the urinary excretory ratio of 4-PIC/pyridoxine-HCl (D)

Each value is expressed as the mean±SEM ($n=4$). * $p<0.05$ versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

的ではなく、双曲線状となり、0.5%添加食群ではほぼ飽和状態となっていた。

一方、4-PIC排泄量/ピリドキシン塩酸塩摂取量として示した4-PIC排泄率はピリドキシン塩酸塩の摂取量に応じて有意に低下し、Fig. 1Cに示した尿中4-PIC排泄量と逆の双曲線状を示した。このことは、ラットでは、0.1%ピリドキシン塩酸塩添加食によってピリドキシンの異化代謝反応系がほぼ飽和した状態となったことを意味している。このピリドキシン→ピリドキサル→4-PICの異化代謝能力から判断すると、LOAELは0.1%添加食群、NOAELはそれ以下となる。

5. B群ビタミンの尿中排泄量

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、アミノ酸代謝にかかわっているので、ピリドキシン塩酸塩の大量摂取により、他のビタミン代謝の均衡を崩す恐れがある。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顕著な影響は認められなかった

(Fig. 2)。パントテン酸の尿中排泄量は0.1%ピリドキシン塩酸塩添加群で急激に増加したが、それ以上に摂取してもさらなる増加は認められず、濃度依存性は認められなかった。ビオチンにおいては、0.8%添加食群のみが対照食に対して有意に増大した。ピリドキシン塩酸塩の大量摂取が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、その機構は不明である。パントテン酸もビオチンも濃度依存性が認められなかったことから、尿中のB群ビタミンの排泄量を指標にしたNOAELは1.0%添加食群以上であると判断した。

6. アスコルビン酸の尿中排泄量

アスコルビン酸はラットではグルコースから合成できるため、ビタミンではないが、測定したところ、1.0%ピリドキシン塩酸塩添加食の尿中排泄量が、対照食群と比較して有意に増大していた (Fig. 2H)。

7. ナイアシン代謝産物の尿中排泄量および排泄量比

ナイアシンの異化代謝はさまざまな栄養因子によって影

Fig. 2. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on urinary excretions of thiamin (A), riboflavin (B), vitamin B₁₂ (C), nicotinamide (Nam) metabolites (D), pantothenic acid (PaA) (E), folic acid (F), biotin (G) and ascorbic acid (AsA) (H). Each value is expressed as the mean $\pm$ SEM ($n=4$). * $p < 0.05$ versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

Fig. 3. Effects of excess pyridoxine-HCl administration on urinary excretions of nicotinamide (Nam) (A), MNA (B), 2-Py (C) and 4-Py (D), and the urinary excretory ratio of (2-Py+4-Py)/MNA (E). Each value is expressed as the mean $\pm$ SEM ($n=4$). * $p < 0.05$ versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

響を受けることが明らかにされている²⁰⁾。そこで、個々の異化代謝産物量に及ぼす影響を Fig. 3 に示した。ピリドキシン塩酸塩摂取量の増加に伴い、MNA と 2-Py 排泄量は増大した。4-Py 排泄量には影響は認められなかった。合計量は Fig. 2D に示したようにピリドキシン塩酸塩摂取の影響を受けなかった。

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 を 4-Py に変換する酵素活性が低下するために、4-Py の排泄量が減少する¹⁹⁾。したがって、尿中の (2-Py+4-Py)/MNA 比は栄養状態の悪化を知る上でよい指標となる。Fig. 3E に示したように、尿中の (2-Py+4-Py)/MNA 比は、ピリドキシン塩酸塩添加量依存的に低下していった。このデータを指標にすると、LOAEL が 0.5% 添加群、NOAEL が 0.1% 添加群となる。

8. ま と め

飼料摂取量, 体重増加量, 臓器重量および尿中へのビタミン排泄量を健康障害の指標とすると, LOAEL を 0.5% 添加群, NOAEL を 0.1% 添加群とするのが妥当であると判断した. 0.5% 添加群のピリドキシン塩酸塩摂取量は 450 mg/kg weight/日, 0.1% 添加群のピリドキシン塩酸塩摂取量は 90 mg/kg weight/日であった.

謝 辞 本研究は, 平成 16 年度～平成 18 年度の厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) 策定に関する研究」(主任研究者: 柴田克己) の成果の一部である. 関係各位に謝意を表する.

文 献

- 1) Schaumburg, H., Kaplan, J., Windebank, A., Vick, N., Rasmus, S., Pleasure, D., Brown, M. J. Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. *N. Eng. J. Med.*, **309**, 445–448 (1985).
- 2) 厚生労働省 (2004). 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— 策定委員会報告書, 2004 年 10 月.
- 3) Del Tredici, A. M., Bernstein, A. L., Chinn, K. Carpal tunnel syndrome and vitamin B₆ therapy. In: Reynolds, R. D., Leklem, J. E. (eds.). *Vitamin B₆: Its role in health and disease. Current topics in nutrition and disease.* Alan R. Liss, New York, 1985, p. 459–462.
- 4) Fukuwatari, T., Wada, H., Sasaki, R., Shibata, K. Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide N-oxide and nicotinuric acid in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 44–50 (2004).
- 5) Shibata, K., Takahashi, C., Fukuwatari, T., Sasaki, R. Effects of excess pantothenic acid administration on the other water-soluble vitamin metabolisms in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 385–391 (2005).
- 6) Sawamura, H., Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2977–2984 (2007).
- 7) Fukuwatari, T., Shibata, K. Effects of excess folic acid on growth and metabolism of water-soluble vitamins in weaning rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **49**, 51–55 (2008).
- 8) Fukuwatari, T., Toriochi, M., Ohta, M., Sasaki, R., Shibata, K. Metabolic disturbance of tryptophan-nicotinamide conversion pathway by putative endocrine disruptors, bisphenol A and styrene monomer. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **45**, 1–7 (2004).
- 9) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623–5628 (1983).
- 10) Rybak, M. E., Pfeiffer, C. M. Clinical analysis of vitamin B₆: Determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite post column derivatization. *Anal. Biochem.*, **333**, 336–344 (2004).
- 11) Gregory, J. F. 3rd, Kirk, J. R. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879–883 (1979).
- 12) Kishida, K., Nishimoto, Y., Kojo, S. Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **64**, 1505–1507 (1992).
- 13) Shibata, K., Kawada, T., Iwai, K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23–28 (1988).
- 14) Shibata, K. Ultramicro-determination of N¹-methyl-nicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins*, **61**, 599–604 (1987).
- 15) Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 15th ed., AOAC, Inc., Arlington, VA, USA, 1990, p. 1089.
- 16) Watanabe, F., Abe, K., Katsura, H., Takenaka, S., Mazumder, Z. H., Yamaji, R., Ebara, S., Fujita, T., Tanimori, S., Kirihata, M., Nakano, Y. Biological activity of hydroxy-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5177–5180 (1998).
- 17) Skeggs, H. R., Wright, L. D. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21–26 (1944).
- 18) Aiso, K., Tamura, T. Trienzyme treatment for food folate analysis: Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **44**, 361–370 (1998).
- 19) Fukui, T., Iinuma, K., Oizumi, J., Izumi, Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 491–498 (1994).
- 20) Shibata, K. Relationship between the ratio of the excreted by-products of niacin metabolism, N¹-methyl-2-pyridon-5-carboxamide + N¹-methyl-4-pyridon-3-carboxamide/N¹-methylnicotinamide and amino acid intake. *Vitamins*, **64**, 1–18 (1990).