

低い値を示した一方、C群は最も高い伸びを示した。0.1, 0.2, 0.3% Nam 食群はC群に比べてわずかに低かったが、各群で差はなかった。全飼料摂取量はNC群で109.0±6.0, C群で205.7±5.9, 0.1% Nam 群で188.3±9.2, 0.2% Nam 群で183.6±9.9, 0.3% Nam 群で176.0±9.8g/21dayであった。

(2) 尿中 Trp-ニコチンアミド転換経路異化代謝産物量

ニコチンアミドを過剰に添加しても、尿中 Trp-ニコチンアミド転換経路異化代謝産物 KA, AnA, XA, 3-HA には影響が現われなかった (Table 2)。一方、QA はニコチンアミドの過剰添加にともなって増加がみられた (Table 2)。

(3) 尿中ニコチンアミド異化代謝産物量

MNA, 2-Py, 4-Py はニコチンアミドの過剰摂取に依存して増加がみられた (Table 3)。

しかし、飼料中のニコチンアミド濃度への依存はみられなかった。ニコチン酸、ニコチヌル酸、ニコチンアミド *N*-オキシドはC群では検出限界以下であったが、ニコチンアミドの過剰摂取群においては検出された。中でもニコチヌル酸、ニコチンアミド *N*-オキシドは、飼料中のニコチンアミド濃度に依存して増加がみられた。よって、これらの代謝産物がニコチンアミド過剰摂取の指標として利用できる可能性が考えられる。

(4) 肝中および血中 NAD・NADP 含量

肝中 NAD 含量は、0.1% Nam 食群までは増加を示したが、0.1%以上で増加はみられなかった (Table 4)。しかし血中 NAD 含量は、ニコチンアミド濃度に依存して増加した。このことから、肝臓と血液では NAD の制御機構に違いがあることが示された。肝中、血中の NADP 含量は、どちらも群間の違いはほとんどなかった (Table 4)。

D. 考察

本実験は、ラットを用いてニコチンアミドを大量摂取したときに観察される化学的指標を検索することを目的として行った。その結果、ニコチンアミドの過剰投与によって、尿中総ニコチンアミド異化代謝産物量が増加した。特に、ニコチンアミド *N*-オキシド、ニコチン酸、ニコチヌル酸は、ニコチンアミド過剰投与群でのみ検出され、中でもニコチンアミド *N*-オキシドおよびニコチヌル酸の産生は、飼料中ニコチンアミド濃度に依存して増加した。しかし、MNA, 2-Py, 4-Py のような他のニコチンアミド異化代謝産物は、ニコチンアミド過剰投与群間で同様の値を示

した。0.1% Nam 食群および 0.3% Nam 食群において、尿中ニコチヌル酸排泄量の変動係数は非常に高く、0.1% Nam 食群で 66%、0.3% Nam 食群で 116% であり、このことからニコチン酸からニコチヌル酸への合成能力に個体差があることがわかる。その反応にはグリシン、ATP、CoA が必要であり、二つの酵素によって触媒される¹²⁾。これに反して、ニコチンアミドからニコチンアミド *N*-オキシドへの反応は一つの酵素によって触媒され、共通の基質を必要としない¹³⁾。ゆえにその反応は、ニコチンアミド摂取を除く他の要因によってほとんど影響を受けない。ニコチンアミド過剰群において、ニコチンアミド *N*-オキシドの量はニコチヌル酸よりも 4 倍高い値を示すので、ニコチンアミドの過剰摂取の化学的指標として、尿中のニコチンアミド *N*-オキシド排泄量の測定を提案する。

ニコチンアミドの生理活性化合物は NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH である。本実験で、肝臓・血中の NAD(NAD⁺+NADH) および NADP(NADP⁺+NADPH) に与えるニコチンアミド摂取の影響を調べた。過剰のニコチンアミドを含む飼料を摂取することにより、肝臓中 NAD 量は、有意差はないが 1.5 倍に増加し、さらに血中 NAD 量も増加した。フタル酸エステル添加飼料を与えることによる Trp-ニコチンアミド代謝の増加は、肝臓中 NAD 量を 1.5 倍に増加させる一方で血中 NAD 量には影響を与えない¹⁾。このことは、血中 NAD 量は、肝臓中のナイアシンプールが飽和したときに増加することを示している。それゆえ、血中 NAD の測定はナイアシンの過剰投与に対して有効かもしれない。肝臓・血中の NADP(NADP⁺+NADPH) 量はニコチンアミドを過剰に摂取しても変化はみられなかった。この結果は NADP 濃度は厳しく制御されており、NAD 濃度よりも重要であることを意味している可能性がある。

まとめとして、ラットにおけるニコチンアミド大量投与には、尿中ニコチンアミド *N*-オキシドおよびニコチヌル酸の産生が鋭敏に反応することがわかり、これがニコチンアミド過剰摂取の指標として利用できる可能性が示された。今後これらの指標をヒトに応用することにより、ニコチンアミド過剰摂取を予防できることが期待される。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

・Fukuwatari, T., Wada, H., Sasaki, R., and

Shibata, K. Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide *N*-oxide and nicotinuric acid in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2004) **68**(1), 44-50.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特許予定 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

H. 引用文献

- 1) Fukuwatari, T., Suzuki, Y., Sugimoto, E., and Shibata, K., Elucidation of toxic mechanism of the plasticizers, phthalic acid esters, a putative endocrine disrupter: effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 705-710 (2002).
- 2) Shibata, K., Kawada, T., and Iwai, K., Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28 (1988).
- 3) Shibata, K., and Murata, K., Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nutr. Int.*, **2**, 177-181 (1986).
- 4) Shibata, K., and Tanaka, K., Simple measurement of blood NADP and Blood levels of NAD and NADP in humans. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2941-2942 (1986).
- 5) Shibata, K., Ultramicro-determination of *N*¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)*, **61**, 599-604 (1987).
- 6) Shibata, K., Simultaneous measurement of nicotinic acid and its major metabolite, nicotinuric acid, in blood and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2973-2976 (1988).
- 7) Shibata, K., High-performance liquid chromatographic measurement of nicotinamide *N*-oxide in urine after extracting with chloroform. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1329-1331 (1989).
- 8) Shibata, K., Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **430**, 376-380 (1988).
- 9) Shibata, K., and Onodera, M., Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 974 (1992).
- 10) Shibata, K., and Onodera, M., Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 143-148 (1991).
- 11) Mawatari, K., Oshida, K., Iinura, F., and Watanabe, M., Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta*, **302**, 179-183 (1995).
- 12) Jones, K. M., The mechanism of nicotinuric acid synthesis. *Biochem. J.*, **73**, 714-719 (1959).
- 13) Murray, K. N., and Chaykin, S., The enzymatic reduction of nicotinamide *N*-oxide. *J. Biol. Chem.*, **241**, 2029-2034 (1966).

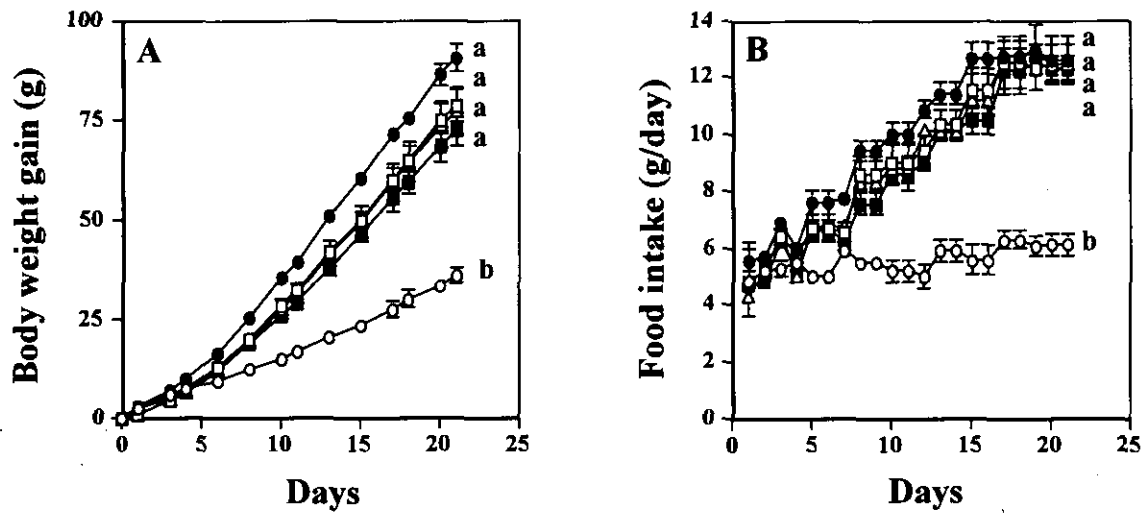


Fig. 1. Effects of Excessive Nicotinamide Supplementation to a Tryptophan-limited Diet on the Body Weight Gain (A) and Food Intake (B) of Weaning Rats. .

○, tryptophan-limited and nicotinic acid-free diet (deficient diet); ●, tryptophan-limited and nicotinic acid-free diet + 0.003% nicotinamide (control diet); □, tryptophan-limited and nicotinic acid-free diet + 0.1% nicotinamide; ◻, tryptophan-limited and nicotinic acid-free diet + 0.2% nicotinamide; ■, tryptophan-limited and nicotinic acid-free diet + 0.3% nicotinamide. Weaning male rats of the Wistar strain purchased from Clea Japan were individually housed in galvanized metabolic cages and fed with *ad libitum* one of the diets listed in Table 1 and water throughout the experimental period. Each point is the mean \pm SEM for 4 rats; a different superscript letter on the last day means significant difference at $p < 0.05$, as calculated by the Student-Newman-Keuels multiple-comparison test.

Table 1. Composition of the Diets

	Tryptophan-limited, <i>nicotinic acid-free diet</i> (Deficient diet)	Deficient diet + 0.003% nicotinamide (Control diet)	Deficient diet + 0.1% nicotinamide	Deficient diet + 0.2% nicotinamide	Deficient diet + 0.3% nicotinamide
	%	%	%	%	%
Vitamin-free milk casein	9	9	9	9	9
Glycine	2	2	2	2	2
L-Threonine	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078
L-Cystine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sucrose	77.722	77.719	77.622	77.522	77.422
Corn oil	5	5	5	5	5
Mineral mixture ¹	5	5	5	5	5
Vitamin mixture ¹ (Niacin-free)	1	1	1	1	1
Nicotinamide	0	0.003	0.1	0.2	0.3

¹AIN 93 was used (Reeves, P. G., Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.*, **127**, 838S-841S (1997)).

Table 2. Effects of Excessive Nicotinamide Administration on the Urinary Excretion on the Upper Part of the Tryptophan-Nicotinamide Pathway

	Tryptophan-limited, nicotinic acid-free diet (Deficient diet)	Deficient diet + 0.003% nicotinamide (Control diet)	Deficient diet + 0.1% nicotinamide	Deficient diet + 0.2% nicotinamide	Deficient diet + 0.3% nicotinamide
Kynurenic acid	5.80 ± 0.27	6.68 ± 0.01	7.00 ± 0.58	6.50 ± 0.33	5.99 ± 0.12
Anthranilic acid	0.49 ± 0.08	0.52 ± 0.27	0.57 ± 0.01	0.54 ± 0.12	0.52 ± 0.04
Xanthurenic acid	11.8 ± 0.9	13.9 ± 1.3	13.6 ± 0.7	14.2 ± 1.8	12.3 ± 0.9
3-Hydroxyanthranilic acid	1.81 ± 0.06	1.60 ± 0.11	1.57 ± 0.15	1.51 ± 0.18	1.87 ± 0.20
Quinolinic acid	1.85 ± 0.65 ^a	1.91 ± 0.24 ^a	26.9 ± 2.5 ^b	36.8 ± 2.1 ^c	41.2 ± 2.4 ^c

Each value is expressed as nmol/g of the diet and the mean ± SEM for four rats; a different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$, as calculated by the Student-Newman-Keuels multiple-comparison test.

Table 3. Effects of Excessive Nicotinamide Administration on the Urinary Excretion of Nicotinamide Catabolites

	Tryptophan-limited, nicotinic acid-free diet (Deficient diet)	Deficient diet + 0.003% nicotinamide (Control diet)	Deficient diet + 0.1% nicotinamide	Deficient diet + 0.2% nicotinamide	Deficient diet + 0.3% nicotinamide
Nicotinamide	2.42 ± 0.71 ^a	10.1 ± 1.4 ^a	690 ± 28 ^b	1638 ± 198 ^c	3042 ± 194 ^d
MNA	14.3 ± 4.7 ^a	18.5 ± 3.5 ^a	3053 ± 473 ^b	4052 ± 272 ^{b,c}	4813 ± 181 ^c
2-Py	0.89 ± 0.34 ^a	2.09 ± 0.52 ^a	293 ± 29 ^b	264 ± 26 ^b	232 ± 25 ^b
4-Py	1.29 ± 0.44 ^a	22.1 ± 4.0 ^a	216 ± 51 ^b	220 ± 25 ^b	196 ± 14 ^b
Nicotinamide N-oxide	N.D.	N.D.	1422 ± 257 ^a	4128 ± 583 ^b	7908 ± 757 ^c
Nicotinic acid	N.D.	N.D.	38.5 ± 11.6	40.7 ± 21.0	37.2 ± 5.8
NuA	N.D.	N.D.	378 ± 124 ^a	760 ± 442 ^{a,b}	1901 ± 242 ^b
Total	19.3 ± 2.3 ^a	52.7 ± 2.9 ^a	6,061 ± 240 ^b	11,088 ± 308 ^c	17,565 ± 625 ^d
Total urinary excretion/nicotinamide intake (%)	-	21.6 ± 1.2 ^a	74.6 ± 3.0 ^b	68.2 ± 1.9 ^b	72.0 ± 2.6 ^b

Each value is expressed as nmol/g of the diet and the mean ± SEM for four rats; a different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$, as calculated by the Student-Newman-Keuls multiple-comparison test. N.D. means not detected. The detection limits in the present study were 2, 1 and 2 nmol/g of food for nicotinamide N-oxide, nicotinic acid and NuA, respectively.

Table 4. Effects of Excessive Nicotinamide Administration on the Contents of NAD and NADP in the Liver and Blood

	Tryptophan-limited, nicotinic acid-free diet (Deficient diet)	Deficient diet + 0.003% nicotinamide (Control diet)	Deficient diet + 0.1% nicotinamide	Deficient diet + 0.2% nicotinamide	Deficient diet + 0.3% nicotinamide
Liver NAD (nmol/g)	439 ± 35 ^a	777 ± 19 ^b	1011 ± 66 ^b	1018 ± 129 ^b	996 ± 41 ^b
Blood NAD (nmol/ml)	35.3 ± 2.3 ^a	60.0 ± 4.4 ^b	85.1 ± 3.7 ^c	106 ± 3 ^{c,d}	122 ± 8 ^d
Liver NADP (nmol/g)	287 ± 31 ^a	314 ± 19 ^{a,b}	399 ± 22 ^{b,c}	354 ± 21 ^{a,b,c}	419 ± 23 ^c
Blood NADP (nmol/ml)	9.28 ± 0.22	9.04 ± 0.91	10.08 ± 0.34	8.89 ± 0.41	11.35 ± 0.71

Each value is the mean ± SEM for four rats; a different superscript letter means significant difference at $p < 0.05$, as calculated by the Student-Newman-Keuels multiple-comparison test.

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

8. 水溶性ビタミンの食事摂取基準の妥当性の検討
-ナイアシン（高齢者）-

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、高齢者のナイアシン代謝は成人と差異はみられないと記載されている。しかしこれは、尿中のナイアシン量の調査のみから導かれた結果である。そこで、高齢者の血液中の NAD・NADP 含量を調べ、若年者との比較を行うことを目的とした。昭和 2-3 年生まれの高齢者を対象に、日常の食事摂取における血液を採取し、NAD・NADP 含量の測定を行った。その結果を学生の値と比較したところ、血液中のナイアシン補酵素レベルが高齢者において低い値を示すことはないことが明らかとなった。しかしながら、NAD 含量については分布が広いことから、個人差やサプリメント摂取などによる影響も考慮する必要がある。

A. 目的

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-には、高齢者と成人でナイアシン代謝上差異はみられなかったと記載されているが、これは尿中の値のみの結果から導かれた結果である。そこで、高齢者の血液中の NAD・NADP 含量を調べ、若年者との比較を行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1) 被験者

昭和 2 年生まれの高齢者（男女）を対象に新潟市で 6 月に実施されている「新潟市高齢者コホート調査」の受診者のうち、2001 年および 2003 年において血液サンプルの得られた人。

(2) 分析

全血中の NAD (NAD⁺+NADH) および NADP (NADP⁺+NADPH) 含量の測定を行った。

血液 20 μ l を 100 mM ニコチンアミド-50 mM KPB(pH 6.0) 40 μ l に加えてよく混合し、90°C で 15 分間加熱処理した後、遠心上清を血中 NAD 含量の測定に用いた。血中 NAD 含量の測定として、サンプル 10 μ l, 2.5 mg/ml MTT 溶液 10 μ l, 1 mg/ml PMS 溶液 80 μ l, 0.1 M ニコチンアミドと 0.5 M エタノールを含む 65 mM グリシルグリシン-NaOH 緩衝液 (pH7.4)150 μ l, 75 IU/ml ADH 溶液 50 μ l をよく混和し、37°C で 20 分間加温した後、570 nm

における吸光度を測定した。血中 NADP 含量の測定として、サンプル 20 μ l, 2.5 mg/ml MTT 溶液 10 μ l, 1 mg/ml PMS 溶液 80 μ l, 0.15 M ニコチンアミドを含む 0.15 M グリシルグリシン-NaOH 緩衝液(pH 7.4)80 μ l, 10 mM グルコース 6-リン酸溶液 60 μ l, 2 IU/ml G6PDH 溶液 50 μ l をよく混和し、37°C で 20 分間加温した後、570 nm における吸光度を測定した²⁾³⁾。

C. 研究成果

2001 年における 73, 74 歳の高齢者 61 名の血中 1 ml 当たりの NAD 含量の度数分布図を Fig. 1 に示した。平均値 \pm SD は 41.3 \pm 15.9 nmol/ml であった。また Fig. 2 に全血 1 ml 当たりの NADP 含量の度数分布図を示した。平均値 \pm SD は 12.5 \pm 1.7 nmol/ml であった。

2003 年における 75, 76 歳の高齢者 128 名の血中 1 ml 当たりの NAD 含量の度数分布図を Fig. 4 に示した。平均値 \pm SD は 43.2 \pm 7.6 nmol/ml であった。

D. 結論

20 歳前後の学生の値は NAD が 35 nmol/ml 程度、NADP が 10 nmol/ml 程度であることから、2001, 2003 年ともに NAD・NADP 量は高齢者のほうが若干高い値を示すことがわかった¹⁾。このことより、血液中のナイアシン補酵素レベルが高齢者において低い値を示すことはないことが明らかとなった。NAD/NADP 比は 3.5 \pm 1.4 であり (Fig. 3), この値は学生の値と同じであった。また特徴と

しては、NAD の値において分布が非常に広いということであった。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

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) Shibata K., Blood pyridine nucleotide levels reflect niacin equivalent intake in humans. *J.Clin.Biochem.Nutr.*, 3, 37-45 (1987)
- 2) Shibata, K., and Murata, K., Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nutr. Int.*, 2, 177-181 (1986).
- 3) Shibata, K., and Tanaka, K., Simple measurement of blood NADP and Blood levels of NAD and NADP in humans. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2941-2942 (1986).

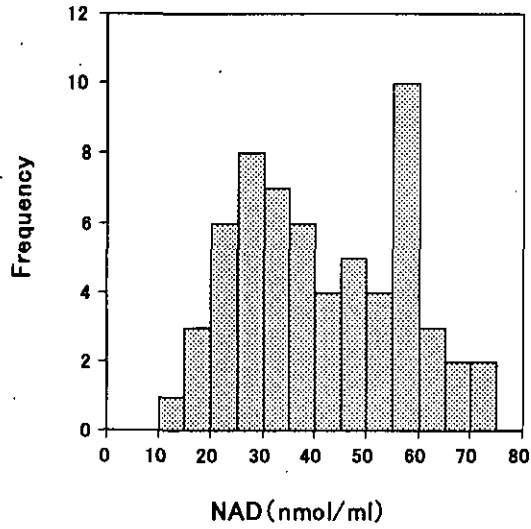


Fig. 1. 高齢者 (73-74 歳の男女) の全血中の NAD 含量の度数分布表

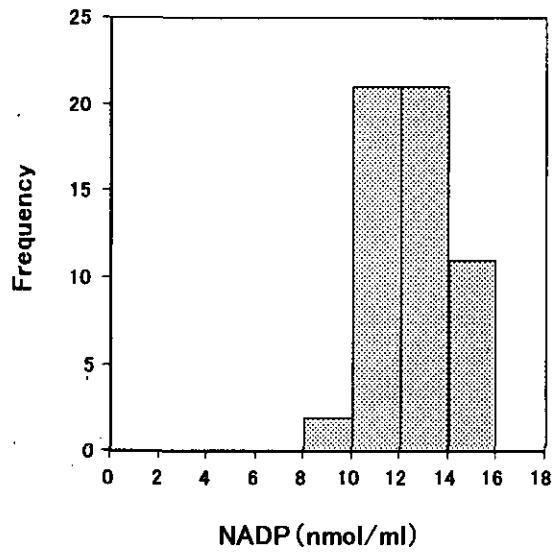


Fig. 2. 高齢者 (73-74 歳の男女) の全血中の NADP 含量の度数分布表

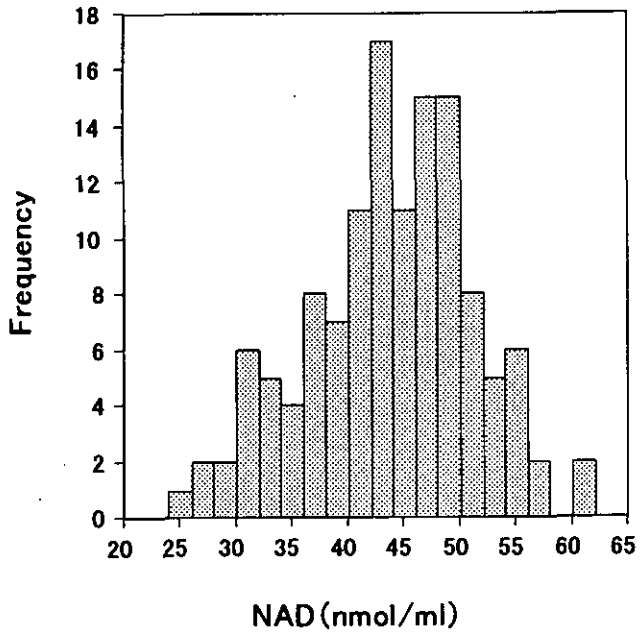


Fig. 3. 高齢者 (75-76 歳の男女) の全血中の NADP 含量の度数分布表

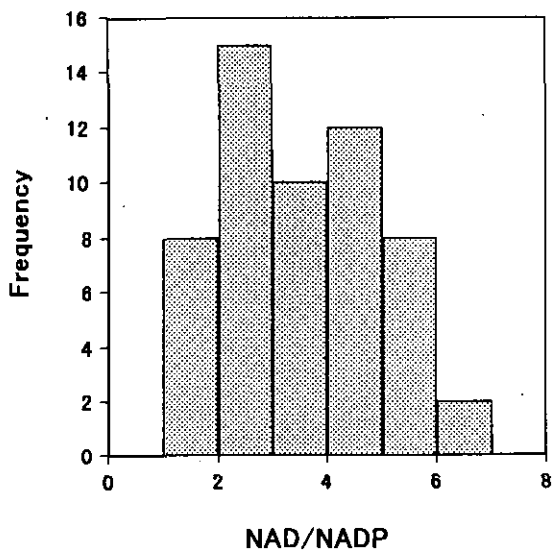


Fig. 4. 高齢者 (73-74 歳の男女) の全血中の NAD/NADP の度数分布表

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

9. 雄ラットの発育に伴うビタミンB₁₂欠乏状態の精子形成に及ぼす影響

分担研究者 渡邊 敏明 姫路工業大学 教授

研究要旨 Vitamin B₁₂ is an important nutrient for maintaining normal fertility in males. We have previously demonstrated that vitamin B₁₂ deficiency during pregnancy may induce irreversible damage in the germ cells of rat embryos, and affect the maturation of spermatozoon. However, its mechanism and biological significance remain unclear. Therefore, to evaluate the role of cobalamin on spermatogenesis, the effect of dietary vitamin B₁₂ deficiency on early spermatogenesis was examined in embryos and F1 males. There was no difference in the number of primordial germ cells and supporting cells in embryos and F1 males on 0 day of age between vitamin B₁₂-deficient and control groups. However, on 21 days of age, numerous TUNEL positive cells were located in spermatocytes of the spermatogenic epithelium. The incidence of seminiferous tubules with apoptosis was 51.5% in the vitamin B₁₂-deficient group. On 60 days of age, aplasia of spermatids and sperms were detected in the vitamin B₁₂-deficient group. Spermatogenesis in F1 males was not sufficiently recovered in the vitamin B₁₂-deficient group even if the control diet was given after weaning. From these findings, vitamin B₁₂ deficiency during pregnant and lactating period may affect the germ cells, and especially damage spermatocytes in F1 male rats, which indicate that vitamin B₁₂ may be an essential constituent in meiosis of spermatogenesis.

A. はじめに

ビタミン B₁₂ は、メチオニン合成酵素やメチルマロニル CoA ムターゼの補酵素として知られている。ビタミン B₁₂ の生理機能としては、骨髄における細胞の分化や中枢神経の維持などにおいて重要な役割を果たしている。とくにビタミン B₁₂ は、DNA 合成に不可欠である葉酸の代謝と深く関わりを持っている。このためビタミン B₁₂ が欠乏すると、ホモシステインが上昇し、神経系や血管系に影響を及ぼすことが示唆されている。

ビタミン B₁₂ の欠乏症状としては、貧血によるめまい、動悸、息切れ、易疲労性、集中力減退、全身倦怠感などの他に、舌炎、口内炎、脱毛などが知られている。また血液学的には、DNA 合成が抑制されて、赤血球細胞の分裂が進行しないため、骨髄では巨赤芽球が特徴的に認められる。近年、乏精子症患者にビタミン B₁₂ の大量投与を行うと精子形成の改善がみられ、妊娠が認められることが報告されている^{1),2)}。しかし、この詳細な機序については明らかにされていない。

著者ら^{3),4)}は、これまでに実験動物を用いて、妊娠中ビタミン B₁₂ 欠乏にすると、出産児において、成熟後精子の数および運動能の低下、精子の形態異常の増加することを明らかにした。そこで、今回はビタミン B₁₂ 欠乏状態の

精子形成に及ぼす影響を、胎生期から成熟までの発育段階において検討した。

B. 実験方法

1. 材料および実験方法

実験に供したのは、成熟雌ラット (kwl:Wistar) であり、室温 23°C、相対湿度 60% の動物飼育室で飼育した。交配 3 週間前からビタミン B₁₂ 欠乏飼料 (欠乏群)、ビタミン B₁₂ 添加飼料 (添加群) あるいは一般固形飼料 (CRF-1) (対照群) を与え、正常雄ラットと交配させた。実験群の設定およびサンプルの採取などは、図 1 に示したとおりである。妊娠動物から妊娠 16 日齢の雄胎児、生後 0 日齢、21 日齢および 60 日齢に雄ラット F1 児を得た。なお、生後 21 日齢から、F1 児の一部に、欠乏群では添加飼料 (欠乏-添加群) を、また添加群では欠乏飼料 (添加-欠乏群) を与えた。これらの動物から精巣を摘出し、精細管の発育および精子形成の様子を病理組織学的および免疫組織化学的に観察した。使用したビタミン B₁₂ 欠乏飼料の組成は、表 1 のとおりである。また、妊娠 16 日齢胎児の雌雄は、性染色質の有無によって判定した。なお、動物実験は、すべて山形大学医学部動物実験指針に従って行った。

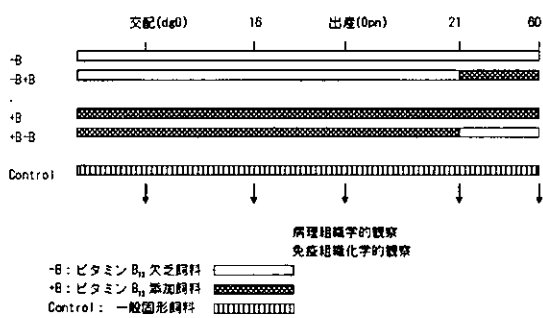


図1. 実験手順

表1. ビタミンB₁₂欠乏飼料

組成	g/kg飼料
脱脂大豆*	400
グルコース	443
大豆油	100
無機塩混合物	50
ビタミン混合物 ^b	5
塩化コリン	2

*粗タンパク質約50%

^bシアノコバラミンを除去

ビタミンB₁₂添加飼料: シアノコバラミン5 μg/kg飼料を添加.

2. 組織学的観察

摘出した精巣は、常法に従い、ブアン固定、脱水、パラフィン包埋の後、4μm厚の切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジンにて染色をした。精細管の直径、管壁の厚さなどを計測した。パラフィン切片の一部は、必要に応じて、TUNEL染色をして、DNA切断による細胞死を検出した。

3. 統計学的解析

得られたデータの統計学的解析については、スチューデントt検定およびχ²検定によってビタミンB₁₂添加群と欠乏群とを比較した。またデータの解析には統計ソフトStatView 5.5 (Abacus Concepts社) を用いた。

C. 結果

妊娠16日齢の雄胎児におけるビタミンB₁₂欠乏状態の影響をみると、生殖巣の形成および始原生殖細胞の増殖に変化は観察されなかった。また、生後0日齢のF₁児においては、ビタミンB₁₂欠乏によって、精細管の発育および精細管にみられる始原生殖細胞や支持細胞(セルトリ細胞)の数に差異はみられな

った。

表2は、生後21日齢のラットF₁児におけるビタミンB₁₂欠乏状態の精子形成に及ぼす影響をまとめたものである。離乳直後の未成熟なF₁児においては、ビタミンB₁₂添加群では、分裂中期像をもつ精子産生細胞(精原細胞および精母細胞)が多数観察され、減数分裂の開始も認められた。一方、ビタミンB₁₂欠乏群では、精細管の発育の抑制がみられ、精原細胞は半数以

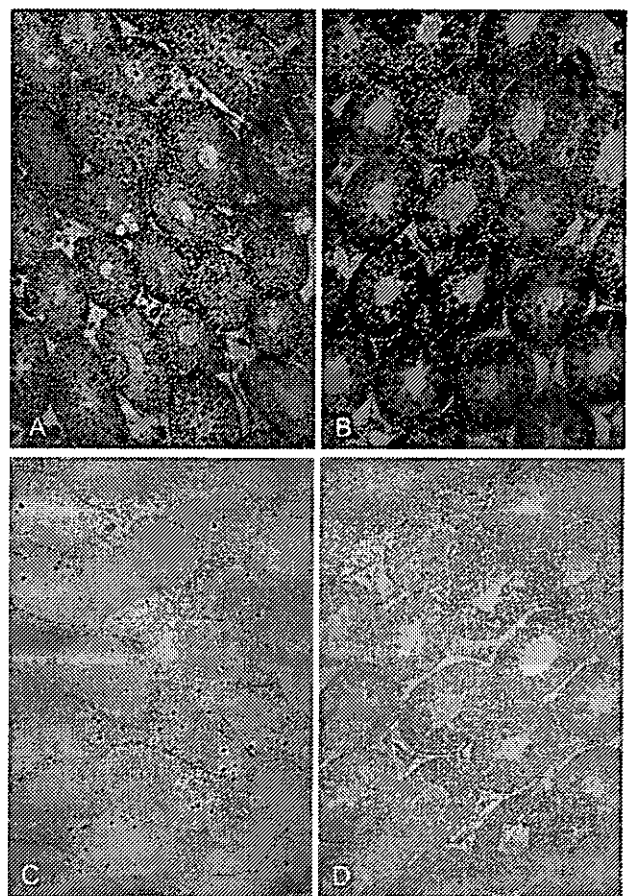


図2. 生後21日齢のF₁ラットの精巣の病理組織像

- A: ビタミンB₁₂欠乏(HE染色)
- B: ビタミンB₁₂添加(HE染色)
- C: ビタミンB₁₂欠乏(TUNEL染色)
- D: ビタミンB₁₂添加(TUNEL染色)

表2 生後21日齢のラットF1児におけるビタミンB₁₂欠乏状態の精子形成に及ぼす影響

	ビタミンB ₁₂ 欠乏群	ビタミンB ₁₂ 添加群	対照群
分析した精細管数	20	20	20
精細管の直径(μm)	110.7±5.95 ^{a,*}	128.5±7.31	129.3±5.52
精子産生細胞数	73.2±10.7 [*]	172.0±16.9	164.4±21.0
アポトーシス率(%) ^b	51.5(35/68) [#]	4.2(3/70)	6.4(7/109)

平均値±標準偏差(精細管あたり)

アポトーシスを持つ精細管の割合

^{*}p<0.01, [#]p<0.01(ビタミンB₁₂添加群との比較)

表3 生後60日齢のラットF1児におけるビタミンB₁₂欠乏状態の精子形成に及ぼす影響

	ビタミンB ₁₂ 欠乏群	ビタミンB ₁₂ 添加群	対照群
分析した精細管数	20	20	20
精細管の直径(μm)	141.4±11.9 ^{a,*}	293.0±19.7 [#]	282.0±17.0 [#]
細胞層(μm)	23.0±9.7 [*]	78.0±11.1 [#]	66.8±12.5 ^{*,#}
精子産生細胞数	64.6±15.9 [*]	336.4±79.2 [#]	352.8±70.16 ^{#4}

欠乏-添加群	添加-欠乏群
20	20
162.2±17.4 ^{*,#}	289.8±20.3 [#]
40.5±21.6 ^{*,#}	64.8±10.7 ^{*,#}
133.4±69.2 ^{*,#}	331.6±83.3 [#]

^a平均値±標準偏差(精細管あたり)

^{*}p<0.01(ビタミンB₁₂添加群との比較)

[#]p<0.01(ビタミンB₁₂欠乏群との比較)

下に減少し、精母細胞はほとんど認められなかった。また精母細胞には、核が濃染された細胞が高率(精細管の51.5%)に観察された。これらは、図2に示すとおり、TUNEL染色によって陽性を示し、アポトーシスによるものであることが明らかになった。

生後60日齢の成熟ラットF1児においては、ビタミンB₁₂添加群では、精細管に多数の精原細胞、精母細胞および成熟精子が認められた(表3)。一方、ビタミンB₁₂欠乏群では、精細管が顕著に萎縮し、精細管に成熟精子は

まったく観察されなかった。また、精母細胞もほとんど認められなかった。ビタミンB₁₂欠乏飼料を与えていたF1児に、生後21日後からビタミンB₁₂添加飼料を与えたが、生後60日までに、精細管の発育や精子産生細胞の増殖に十分な回復はみられなかった。一方、生後21日後から、ビタミンB₁₂欠乏飼料を与えても、生殖器官や精子形成への影響は観察されなかった。

D. 考察

精子形成過程に及ぼす因子として栄養、ホルモンや温度などが明らかにされている。微量栄養素としては、ビタミンA, E, あるいはB群ビタミンが欠乏すると精子形成が障害されることが知られている。B群ビタミンについては、乏精子症を合併した悪性貧血患者にビタミンB₁₂を投与すると、貧血の正常化とともに、精液所見の改善がみられることから、ビタミンB₁₂が乏精子症の治療に用いられている⁵⁾。しかしながら、その詳細な機序については明らかにされていない。

実験動物においては、これまでに、Kawataら^{6,7)}が、ビタミンB₁₂欠乏ラットにおいて、精細管の萎縮に伴って、精子産生細胞の脱落を観察している。著者ら³⁾の観察では、妊娠前から妊娠期間をとおしてビタミンB₁₂欠乏状態にすると、出産児においては、成熟しても生殖器官の発育が著しく抑制され、精巣上体にはほとんど精子が観察されなかった。また、これらの精子については、生存率および運動能の著しい低下がみられ、精子の形態異常が高率にみられた。今回の結果では、生後21日齢においては、ビタミンB₁₂欠乏群では精原細胞の増殖はみられたが、精母細胞に多数のアポトーシスが認められた。このことが、ビタミンB₁₂欠乏状態における精子形成障害と関連があるものと考えられる。また、これらの結果では、離乳後に、栄養生理学的、つまり通常量(5μg/kg飼料)のビタミンB₁₂を含む添加飼料を与えても精子形成の回復は認められなかった。しかしながら、薬理学的な大量のビタミンB₁₂を与えると、ヒトと同じように精子形成の回復がみられるのかもしれない。

以上より、妊娠前からビタミンB₁₂欠乏状態にすると、雄ラットにおいては、精母細胞にアポトーシスによる細胞死がされた。つまり、ビタミンB₁₂欠乏状態では、精母細胞の減少などが主な原因とみられる精子形成障害の誘発されることが明らかになった。このことは、ビタミンB₁₂が、精子形成、とくに精母細胞の分裂に不可欠な栄養因子であることを示唆している。

E. 結論

- 1)母体のビタミンB₁₂欠乏によって、胎児および生後0日齢のF1児において、生殖細胞への影響はみられなかった。
- 2)生後21日齢のF1児では、ビタミンB₁₂欠乏によって、精原細胞の増殖はみられたが、精母細胞が著しく減少し、精母細胞に多数のアポトーシスが認められた。

3)生後60日齢のビタミンB₁₂欠乏F1児では、精細管に精母細胞および成熟精子は全くみられなかった。

4)ビタミンB₁₂は精子形成に不可欠であり、とくに精母細胞の分裂や精子の成熟に参与していることが示唆された。

F. 文献

- 1) Watson, A.A. (1962) Seminal vitamin B₁₂ and sterility. *Lancet* ii: 644.
- 2) Sharp, A.A. and L.J. Witts (1962) Seminal vitamin B₁₂ and sterility. *Lancet* ii: 779.
- 3) 山川めぐみ, 渡辺敏明, 渡辺皓, 榎原周平, 中野長久 (2000) ビタミンB₁₂欠乏によるラット精巣の形態学的変化. *微栄研* 17: 75-82.
- 4) Watanabe, T., K. Ohkawa, S. Kasai, S. Ebara, Y. Nakano, and Y. Watanabe (2003) The effects of dietary vitamin B₁₂ deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. *Congenital Anom.* 43: 57-64.
- 5) 渡辺敏明, 島田和彦, 大川恵子 (2001) 乏精子症におけるビタミンB₁₂の効果についての評価. *ビタミン* 75: 128-131.
- 6) Kawata, T., T. Takada, F. Morimoto, N. Fujimoto, N. Tanaka, K. Yamada, M. Wada, T. Tadokoro and A. Maekawa (1992) Effect of vitamin B₁₂-deficiency on testes tissue in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 38: 305-316.
- 7) Kawata, T., A. Tamiki, A. Tahiro, K. Suga, S. Kamioka, K. Yamada, N. Wada, N. Tanaka, T. Tadokoro and A. Maekawa (1997) Effect of vitamin B₁₂-deficiency on testicular tissue in rats fed by pair-feeding. *Res. J. Vit. Nutr. Int.* 67: 17-21.

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

10. 日本人女性の母乳中ビオチン、パントテン酸およびナイアシンの含量

分担研究者 渡邊敏明 姫路工業大学 教授

研究要旨

わが国における母乳の水溶性ビタミン含量を明らかにするために、健常授乳婦人から得た母乳のビオチン、パントテン酸およびナイアシンの含量を分析した。母乳の採取は、授乳後 21-89 日間および 90-180 日間で夏季と冬季に採取した。ビオチンおよびパントテン酸は乳酸菌を利用した微生物学的定量法で測定し、ナイアシンは、HPLC 法で測定をした。母乳のビオチン含量は平均 $3.8\mu\text{g}/100\text{ml}$ とこれまでに報告されている値と比較して低値を示した。パントテン酸の含量は平均 $5.0\text{mg}/100\text{ml}$ であり、この値は第六次改定で採用された値の約 2 倍の値であった。一方、ナイアシンの含量は、 $222\mu\text{g}/100\text{ml}$ とこれまでの値と比較して、とくに差異は観察されなかった。これらの値は、今後これらのビタミンの栄養所要量を策定するための基礎的なデータとして重要である。

A. 緒言

わが国においては、平成 11 年（1999 年）に第 6 次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準が策定された¹⁾。この改定において、水溶性ビタミン 6 種類およびミネラル 6 種類の所要量をはじめに策定された。ビオチン、パントテン酸およびナイアシンの栄養所要量が算出された。栄養所要量の算出においては、これまでに報告されている多くの栄養疫学調査や出納試験の結果が基礎的なデータをして利用されている。さらに、乳幼児において水溶性ビタミンの栄養所要量を算出するためには、母乳中のビタミン含量が一つの指標として使用されている。

母乳にはタンパク質、炭水化物および脂肪ばかりでなくビタミンやミネラルなどの大部分の栄養素が含まれている。これらの栄養素は、消化、吸収の効率がよく、乳児にとってはバランスの取れた栄養源である。このため、一般に健康な母親の母乳で育てられている乳児には栄養欠乏症はほとんど見られない。これは、母乳には乳児の発育のために必要な栄養素が十分に含まれていることを示している。

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準において、乳児におけるビオチン、パントテン酸、およびナイアシンの所要量策定は下記のとおりである¹⁾。母乳のビオチン量は、初乳ではわずかであるが、授乳に伴って徐々に増加し、成熟乳では血清のビオチン量より

も高い値を示している。これまでの各国における報告では、成熟乳のビオチン量は $3.9\text{-}12.7\mu\text{g}/\text{l}$ の範囲にあり、平均 $6\mu\text{g}/\text{l}$ である²⁾。この値から乳児におけるビオチン摂取量を $4.5\mu\text{g}/\text{日}$ としている。

母乳に含まれるパントテン酸量を分析した報告は多数ある。Song ら³⁾は、初乳に比べて成熟乳のパントテン酸量が高いことを示している。母乳のパントテン酸量は、 $1.4\text{-}6.7\text{mg}/\text{l}$ とばらつきがあるが、英国では概ね $2.2\text{-}2.7\text{mg}/\text{l}$ の範囲にある。わが国の成熟乳のパントテン酸量は $2.1\text{-}3.5\text{mg}/\text{l}$ である。これらの値から母乳のパントテン酸量を $2.4\text{mg}/\text{l}$ とし、所要量を $1.8\text{mg}/\text{l}$ としている。

母乳のナイアシン含量は $0.2\text{mg}/100\text{g}$ ($0.21\text{mg}/\text{dl}$)、トリプトファン含量は 15mg あるいは $21\text{mg}/100\text{g}$ (15.5mg あるいは $22\text{mg}/\text{dl}$) と報告されている²⁾。乳児におけるトリプトファン-ナイアシン転換率の研究は見あたらない。実験動物のデータに基づき、乳児ではトリプトファンからナイアシンの供給はないものとして、乳児の所要量はナイアシン量として 2mg としている。

このようにこれらのビタミンの所要量の策定においては、十分な検討がなされているとは云えない。とくに日本人を対象としたデータはほとんどなく、食生活が異なる欧米人でのデータを用いて、わが国の栄養所要量を策定している。そこで、著者らは、わが国の授乳婦から採取した母乳を利用して、水溶性

ビタミン含量を分析した。今回はこれまでにまとまっているデータの一部を報告する。

B. 実験方法

1. 被験者

1998年7月-9月(夏季)および1998年12月-1999年3月(冬季)に日本全国47都道府県で4,234検体の母乳が授乳中の母親から提供され、凍結保存された。このうち、授乳婦の条件として、喫煙習慣がないこと、ビタミン剤を服用していないこと、食べ物の好き嫌いがなく、母乳採取時の年齢が40歳未満、また、乳児の条件として、出生児体重が2,500g以上、アレルギーの既往のないこと、を分析試料の条件とした。

対象者にはあらかじめ研究の趣旨を説明し、協力を依頼、口頭で同意を得た。研究の遂行にあたっては、すべてヘルシンキ宣言に従って行なった。

2. 母乳採取

母乳を、泌乳期別に泌乳1-5日、6-10日、11-20日、21-89日、90-179日、180-365日に分類した。これらの試料のうち泌乳21-89日と90-179日の母乳を測定対象とし、夏季および冬季の試料が同数となるように、また母乳量がなるべく多いものを選定した。

選定された母乳試料は、泌乳21-89日(夏季)22検体、(冬季)21検体、泌乳90-179日(夏季)18検体、(冬季)17検体、総計78検体であった。なお、凍結保存された検体は、分配するために解凍され、超音波処理により均一化した。分配された検体は、それぞれのビタミン分析の直前まで凍結保存しておいた。

3. ビオチンの分析

採取したサンプルに1/15Mリン酸緩衝液を加えたものを測定用試料とした。試料は4.5N硫酸溶液で120°C1時間加水分解し、4.5N水酸化ナトリウム溶液で中和した後に、ビオチン量を測定した。これを総ビオチン量とした。ビオチンの分析は、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 を用いた微生物学的定量法の一つである比濁法に従った⁴⁾⁵⁾。試料のビオチン量は、 $\mu\text{mol/L}$ および ng/mL として表した。

4. パントテン酸の分析

母乳100 μl に10 IU/mlのホスファターゼ(Alkaline from calf intestine, SIGMA P7923)溶液(50 mM Tris-HCl, pH 8.3に溶解)を50 μl 、ハト肝アセトンパウダー(Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376)より、調製したパントテン酸フリーアマダーゼ溶液

(Fig. 1を参照)50 μl 、15 $\mu\text{g/ml}$ 還元型グルタチオン溶液(50 mM Tris-HCl, pH 8.3に溶解)を加えた。この混合液を37°Cで2時間インキュベーションを行うことで、CoA、ホスホパンテテイン、パンテテインを遊離型のパントテン酸とした。反応を止めるために、2.25 mlの50 mM KPB(pH 7.0)を加え、さらに、100°Cの熱湯中に、反応管を5分間放置した。水中で5分間以上放置して、十分に冷却した後、10,000 $\times g$ で5分間遠心分離を行った。その結果得られた上清を適当に水にて希釈して、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014を検定菌として、微生物学的に定量を行った。

5. ナイアシンの分析

採取したサンプル150 μl に20 $\mu\text{g/ml}$ イソニコチンアミド溶液1350 μl を加え、オートクレーブにて121°C、10分間加熱した。遠心上清1.2 mlに70%過塩素酸70 μl を加えてよく混合し、遠心上清1 mlを測定用試料とした。測定用試料1 mlに炭酸カリウムを1.2 g加えた後、ジエチルエーテル10 mlで抽出し、乾固させた抽出物を水0.5 mlに溶解させた。HPLCを用いてニコチンアミド量を測定し⁶⁾、総ニコチンアミド量をナイアシン量とした。

6. 統計学的解析

母乳に含まれるそれぞれのビタミン含量は、スチューデントt検定およびノンパラメトリックのマン・ホイットニーU検定を用いて、2群間の比較を行った。有意確率が $p < 0.05$ の場合、有意な差異があると判定した。統計学的解析には、すべて総計パッケージStatview Ver.5.5を用いて行った。

C. 結果

1. ビオチン

母乳に含まれるビオチンの分析結果をまとめたものがTable 1である。分析した78名の母乳のビオチン含量は、全体で平均すると $3.87 \pm 1.31 \text{ ng/ml}$ ($15.9 \pm 5.3 \text{ pmol/ml}$)であった。さらに母乳の採取時期で比較すると、授乳21-89日の成熟乳では $4.09 \pm 1.53 \text{ ng/ml}$ ($16.7 \pm 6.3 \text{ pmol/ml}$)であるのに対して、授乳90-179日の成熟乳では $3.61 \pm 0.92 \text{ ng/ml}$ ($14.8 \pm 3.8 \text{ pmol/ml}$)と低値ではあったが、有意な差異は認められなかった。また夏季と冬季で比較しても、母乳ビオチン含量に相違は見られなかった。

2. パントテン酸

Table 2は母乳中に含まれるパントテン酸の分析結果をまとめたものである。分析した総パントテン酸含量は、全体で平均すると $24.16 \pm 5.98 \text{ nmol/ml}$ ($5.30 \pm 1.44 \mu\text{g/ml}$)で

あった。さらに、母乳の採取時期で比較すると、授乳 21-28 日の成熟乳では 26.30 ± 6.59 nmol/ml (5.76 ± 1.44 μ g/ml) であるのに対して、授乳 90-179 日の成熟乳では 21.55 ± 5.54 nmol/ml (4.72 ± 1.21 μ g/ml) と有意に低値を示した。一方、夏季と冬季における差異は、授乳期間に関わらず有意な差異は認められなかった。母乳中における遊離型と補酵素型の割合は Table 2 に示したように、遊離型が約 7 割、補酵素型が約 3 割の比率で存在していた。

母乳中の総パントテン酸含量を測定するには、補酵素型を遊離型にする前処理が必要である。この方法に関して、二通りの方法が報告されているので、この二つの前処理方法によって、同じ母乳中の総パントテン酸含量に差異が認められるか否かを検討した。その結果は、Table 3 に示したように、パパイン・ジアスターゼ前処理法の場合の総パントテン酸含量は 16.42 ± 1.82 nmol/ml (3.6 ± 0.4 μ g/ml, $n=7$) であったのに対し、アミダーゼ・ホスファターゼ前処理法では 21.44 ± 3.19 nmol/ml (4.7 ± 0.7 μ g/ml, $n=7$) であり、アミダーゼ・ホスファターゼ前処理法の方が有意に高い値を示した。遊離型のパントテン酸含量は、Table 3 に示した様に、両方法には差異は認められなかった。一方、母乳中に補酵素型として含まれていると推定されるパントテン酸量は Table 3 に示したように、パパイン・ジアスターゼ前処理法が顕著に低い値を示した。

パパイン・ジアスターゼ前処理法：母乳 1 ml に蒸留水 9 ml を加えオートクレーブにて 121°C 、10 分間加熱後、冷却。ジアスターゼ (和光純薬株) 20 mg, パパイン (和光純薬株) 20 mg, 2.5 M 酢酸ナトリウム溶液を 0.4 ml 添加し攪拌した後、1 N 塩酸で pH 4.5 に調整し 37°C 、18 時間保温。その後 100°C 湯浴中 10 分間加熱し、冷却後 10% メタリン酸溶液 60 μ l を加え、1N 水酸化ナトリウム溶液で pH 6.8 に調整。濾過後、蒸留水で 20 ml とし、微生物定量法に供す。

3. ナイアシン

Table 4 に母乳中のナイアシン含量を測定した結果を示した。分析した 78 名の母乳中のナイアシン濃度の平均は 18.2 ± 5.3 nmol/ml (2.22 ± 0.65 μ g/ml) であった。授乳 21-89 日の成熟乳では 19.1 ± 5.7 nmol/ml (2.33 ± 0.70 μ g/ml), 授乳 90-179 日の成熟乳では 17.2 ± 4.6 nmol/ml (2.10 ± 0.57 μ g/ml) であり、母乳の採取時期による相違は認められなかった。また、

夏季と冬季で比較しても、母乳ナイアシン含量に相違は認められなかった。

D. 考察

1. ビオチン

これまでに報告された本邦および欧米の母乳ビオチン含量をまとめたものが Table 5 である。まず母乳中のビオチンの生物有効性を知るために、Heard ら⁷⁾は、母乳を限外濾過膜にかけてビオチンの存在状態について検討した。母乳を無処理、酸加水分解処理あるいは限外濾過した後放射化学分析によってビオチンを定量した。この結果、母乳のビオチン濃度は平均 20.3 ± 2.0 ng/ml であり、限外分子量 500Da の膜をとおしても、無処理および加水分解処理した母乳ビオチンの 99% 以上のビオチンが回収された。このようなことから、母乳中のビオチンはタンパク質とは結合せずに、乳児に利用され易い状態で存在していることを示唆している。

Hood と Johnson⁸⁾は、同位体希釈法を利用して、母乳を酸加水分解した後ビオチン量を分析した。分娩後の母乳中ビオチン量の変化を見ると、分娩後 1 日目では 295 ± 37 ng/100ml であるのに対して、7 日目および 49 日目では 681 ± 58 ng/100ml および 1246 ± 81 ng/100ml と増加がみられた。このように初乳に比べ、成熟乳では高いビオチン濃度である。一方、授乳婦に 1 日あたり 3mg のビオチンサプリメントを与えると、摂取 5 日後および 10 日後には成熟乳中のビオチン量が 20-30 倍に増加した。10 日後でのビオチン増加量は 46 μ g/100ml で、泌乳量を 1 日あたり 780ml とするとビオチン分泌量は 358 μ g/日となり、これはビオチンサプリメントの 12% に相当する。なお尿中ビオチン排泄量もビオチンサプリメント摂取 10 日後には 16 倍に増加していた。

ビオチンの定量法として一般的に乳酸菌による微生物学的定量法が使用されている。この方法で、Goldsmith ら⁹⁾は母乳を酸加水分解した後ビオチン量を pH4.5 で測定している。母乳のビオチン含量は、放射化学分析法と比べ低値であるが、初乳期、移行期、成熟期でそれぞれ平均 0.07, 0.3, 0.47 μ g/100ml と増加している。Ford ら¹⁰⁾の報告でも、満期産 (39 週以降) の母乳をみると、0.21, 2.21, 5.33 ng/ml と泌乳時期に伴って増加している。なお早期産 (29-34 週) の母乳でビオチン濃度にも大きな違いは見られていない。さらに出産後 10 日から 6 ヶ月の間に得た成熟乳でも、ビオチン含量は 0.87 ± 0.42 μ g/100g であっ

た¹¹⁾。

Hirano ら¹²⁾は、日本人授乳婦を対象にして、微生物学定量法の 1 つであるプレート法¹¹⁾で母乳ビオチン量を分析している。この結果でも、これまでの結果と同様に、泌乳時期に従ってビオチン量が増加している。35名の成熟乳のビオチン含量は平均 $5.2 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ と欧米の報告と比べて差異は認められない。また、これらの報告は、乳酸菌を用いて測定したものであるが、測定法の違いによる差異は認められない。なお、遊離型ビオチンの割合が、初乳、移行乳および成熟乳でそれぞれ 53.9, 64.0, 77.2%と増加しているが、これは Heard ら⁷⁾の結果とは異なり、今後の検討が必要である。

ビオチン定量の前処理として、ビオチンを遊離型にするため一般に強酸性溶液による酸加水分解が用いられているが、Salmenpera ら¹⁴⁾はパペイン処理を用いている。母乳では、出産後 5 日間ではほとんどの授乳婦でビオチンは認められなかった。しかし、出産 2 ヶ月後ではビオチン量は $4.5 \mu\text{g/l}$ に増加し、これ以降では変化は見られず一定である。また母乳中のビオチン量と血漿中のビオチン量との間には有意な関連が認められている。

以上のように、これまでの報告では、初乳ではビオチン濃度は多くの場合 $0.1 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 以下である。しかし、移行乳から成熟乳へと増加し、成熟乳での総ビオチン含量は平均で約 $0.5 \mu\text{g}/100\text{ml}$ である。このように母乳中のビオチン量は、初乳に比べて成熟乳で高値を示している。また、人種差は認められず食生活による影響はあまりないものと考えられる。一致した結果が得られていないが、ビオチンの一部はタンパク質と結合しているものと思われる。

今回測定した母乳ビオチン含量については、平均 $3.9 \mu\text{g/ml}$ であった。採取時期や季節によって大きな差異は認められなかった。しかしながら、これまでに報告されている成熟乳のビオチン含有量と比べ低値を示している。この相違については明らかではない。なお、血清中のビオチン濃度は季節によって変動することが報告されている¹⁵⁾が、母乳では季節変動はみられず、夏季と冬季での摂取している食事には影響されないことが示唆される。

ビオチンは、第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—において、栄養所要量がはじめて策定された¹⁾。0-5 ヶ月の乳児で、 $5 \mu\text{g}/\text{日}$ 、6-11 ヶ月の乳児で $6 \mu\text{g}/\text{日}$ とされた。

しかしながら、平成 12 年 (2002 年) に改訂された五訂日本食品標準成分表にはビオチンは記載されていない。また平成 15 年 (2003 年) に食品添加物として認可されたが、使用が栄養機能食品に限られている。つまり食品や調製粉乳への添加はいまだに許可されていない。

わが国の調製粉乳に含まれる総ビオチン量は、一般調製粉乳、いわゆる育児用およびフォローアップ粉ミルクでは平均 $1.04 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ であり、治療用特殊ミルクでは平均 $0.40 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ である¹⁶⁾。これは、分析数は少ないが、米国の粉ミルクのビオチン含量 $2.3 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ 、米国小児科学会 (AAP) および FAO/WHO の推奨値 $1.5 \mu\text{g}/100\text{kcal}$ に比較して低値である¹⁷⁾¹⁸⁾。

わが国における人工栄養児のビオチン摂取量を推定すると、1 日に 750ml の粉ミルクを摂取した場合に、一般調製粉乳では平均 $5.2 \mu\text{g}/\text{日}$ となる。もっともビオチン含量が少ない粉ミルクの場合には $2.3 \mu\text{g}/\text{日}$ である。一方、治療用特殊ミルクの場合には、平均で $2.3 \mu\text{g}/\text{日}$ 、もっともビオチン含量が少ないミルクではわずかに $0.2 \mu\text{g}/\text{日}$ である¹⁶⁾。治療用特殊ミルクを使用していた乳児で、ビオチン欠乏症が発症した症例のビオチン摂取量は $0.75 \mu\text{g}$ および $0.4 \mu\text{g}/\text{日}$ と、わが国の乳児の所要量と比べ、著しく低値であった¹⁹⁾²¹⁾。

このためビオチン含量が少ない調製粉乳、とくに治療用特殊ミルクを与えられている乳児で、ビオチン欠乏症の誘発が報告されている。今後、乳幼児において、とくに食事管理が必要とされている患者のビオチン摂取量について注意が必要であろう。

2. パントテン酸

第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—では、井戸田ら²²⁾の日本人の母乳中のデータを尊重し、 $0.24 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ という採用されている¹⁾。一方、五訂日本食品標準成分表では、この表を編集した科学技術庁資源調査会独自のデータから $0.5 \text{ mg}/100\text{g}$ の値が採用されている。この両者の値の違いは、母乳中の総パントテン酸を測定するために行う前処理方法の違いに起因しているものと思われる。井戸田ら²²⁾は、母乳をパペイン・ジアスターゼ前処理法で行っている。一方、五訂日本食品標準成分表に示されている数値の前処理方法は、本論文で示した方法のアミダーゼ・ホスファターゼ法である。

そこで、補酵素型パントテン酸処理方法の違いによる母乳中パントテン酸含量測定値

への影響を調べるため、ハト肝臓由来アミダーゼ・牛小腸ホスファターゼ法とパパイン・ジアスターゼ法を行った。その結果は Table 3 に示した通りであるが、アミダーゼ・ホスファターゼ法の結果がパパイン・ジアスターゼ法より高い値を示した。Table 3 に示したように、パパイン・ジアスターゼによる前処理法は、母乳中の補酵素型パントテン酸に対しては、有効な方法ではないことが明らかとなった。したがって、日本人の母乳中の総パントテン酸含量としては、著者らが Table 3 に示した値と五訂日本食品標準成分表の値から、 $5.0\mu\text{g/ml}$ が妥当であると判断した。

事実、Johnson ら²³⁾も、著者らが用いている方法と同じ方法で測定した結果、 $6.70\mu\text{g/ml}$ という値を報告している。一方、パパイン・ジアスターゼ法で測定した Picciano ら²⁴⁾は、 $2.2\text{-}2.5\mu\text{g/ml}$ という値を報告している。

著者らの結果では、21-89 日に得られた人乳と 90-179 日に得られた人乳の間で有意な差異が認められたが、彼らの報告では差異は報告されていない。井戸田ら²²⁾の報告では、分娩後 3-30 日乳では $36\mu\text{g/ml}$ 程度、31-240 日乳では $28\mu\text{g/ml}$ 程度であり、差異が認められている。これが、日本人と米国人による差異か、食生活による差異かは今後機会があれば明らかにしたい。なお、Song ら³⁾は、早産の授乳婦の総パントテン酸含量は、満期出産の授乳婦よりも高い値を示したと報告している。しかしながら、早期出産あるいは満期出産においても、初期乳と成熟乳との間に、総パントテン酸含量に差異は認められなかったと報告している。

わが国の調製粉乳に含まれる総パントテン酸量は、ある会社の資料によれば²⁵⁾、一般調製粉乳で、製品 100g 当たり $2000\mu\text{g}$ ($400\mu\text{g}/100\text{ kcal}$ 、あるいは 14%調乳液 100 ml 当たり $280\mu\text{g}$) である。この人工乳を 1 日 750 ml 飲むと、 2.1mg /日のパントテン酸が摂取できることになる。この値は、第六次改定日本人の栄養所要量の値 ($1.8\text{mg}/\text{日}$) にほぼ相当する。しかしながら、もし、第七次改定で、 $5.0\mu\text{g/ml}$ という値が採用されれば、乳児 (0-5 ヶ月) のパントテン酸所要量は $3.5\text{ mg}/\text{日}$ 程度の値となるであろうと推定される。そのようになれば、調製粉乳中のパントテン酸含量は増加させる必要があるであろう。しかしながら、従来の調製粉乳を飲んでいた人工栄養児で、パントテン酸欠乏が生じたという報告は見あたらない。これは、エネルギー代謝、特に脂肪酸代謝に必須であるパントテン

酸が欠乏しないように、内的にも外的にも守られる防御調節機構があることに起因しているものと思われる。事実、成人では、パントテン酸をほとんど含まない食事を 9 週間連続投与しても、欠乏症状が認められなかったことが報告されている²⁶⁾。

結論として、日本人の母乳中の総パントテン酸含量の値としては、 $5.0\mu\text{g/ml}$ が妥当である。

3. ナイアシン

Table 6 は、これまでに報告されている母乳中のナイアシン含量についてまとめたものである。Ford ら¹⁰⁾は、イギリス人授乳婦 18-24 名を対象として、微生物学的定量法により母乳ナイアシン含量を分析した。分娩後の母乳ナイアシン含量の平均値は、分娩後 1-5 日では $0.50\mu\text{g/ml}$ 、6-15 日では $1.42\mu\text{g/ml}$ 、16-244 日では $1.82\mu\text{g/ml}$ と増加が見られた。

井戸田ら²¹⁾は、日本人授乳婦を対象として、HPLC 法により母乳ナイアシン含量を調べている。母乳ナイアシン含量の平均値は、授乳 3-5 日で $0.7\mu\text{g/ml}$ 、授乳 6-10 日で $0.12\mu\text{g/ml}$ 、授乳 11-15 日で $2.4\mu\text{g/ml}$ 、31-60 日で $2.3\mu\text{g/ml}$ 、61-120 日で $1.9\mu\text{g/ml}$ 、121-240 日で $1.8\mu\text{g/ml}$ であった。Ford ら¹⁰⁾の報告と同様に、母乳ナイアシン含量は初乳から移行乳、成乳へと増加し、成乳では一定のレベルを保つことを示している。

一般に食品中のナイアシン含量を測定する場合は、酸性溶液中で試料をオートクレーブ処理し、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に供する。穀類にはタンパク質や糖質と結合した結合型ナイアシンが多く存在しており、微生物が利用できるよう結合型ナイアシンを遊離型のニコチン酸にするための操作である。ヒトでは摂取したニコチン酸は、補酵素型である NAD を介して、すぐにニコチンアミドに転換され、またヒトはニコチン酸→ニコチンアミド反応がきわめて弱いため、母乳中のナイアシンはニコチンアミドあるいは NAD、NADP として存在する。微生物学的定量法を用いた Ford ら¹⁰⁾の報告と HPLC 法を用いた井戸田ら²²⁾の報告とを比較すると、測定法の違いによる差異は認められない。本研究では、オートクレーブ処理により NAD および NADP をニコチンアミドに分解し、HPLC を用いてニコチンアミド量を測定し、総ニコチンアミドをナイアシン量とした。

今回測定した母乳ナイアシン含量は平均 $2.22\mu\text{g/ml}$ であり、日本人を対象とした 2.3