

表3. 調製粉乳の摂取による血清ビタミンB12量および葉酸量への影響

対象者		栄養状態	対象者数	ビタミンB12量 pg/ml	対象者数	葉酸量 ng/ml
乳児	健常	母乳	6	375±147* <sup>b</sup>	6	21.6±12.3*
	健常	混合	4	470±162	4	12.0±6.7
	健常	人工	7	1202±563	6	47.7±14.8
	PKU	母乳	0	-	0	-
	その他 <sup>a</sup>	母乳	1	609	1	29.2
	PKU	人工	22	729±198	22	71.9±16.8*
	その他 <sup>a</sup>	人工	12	792±196	8	39.7±21.7##
幼児	PKU		21	884±546	21	69.1±22.8
	アルギニノコハク酸尿症		4	819±455	4	39.6±18.4#
	その他 <sup>a</sup>		11	597±167	9	18.0±21.2##
学童	PKU		23	849±394	21	63.7±20.1
	その他 <sup>a</sup>		10	570±151##	10	34.8±26.2##
成人	PKU		8	644±291	8	49.7±27.5
	その他 <sup>a</sup>		13	1241±304#	13	31.5±13.3##
基準値				249-938		2.4-9.8

<sup>a</sup>先天性代謝異常症.

<sup>b</sup>mean±SD.

\*p<0.01、健常な人工乳児との比較(Student's t-test).

#p<0.05、##p<0.01、それぞれのPKU患者との比較(Student's t-test).

表4. PKU患者が利用している食品に含まれるビオチン量

食品群別 番号	食品群	食品	ビオチン含量 μg/100g
1 穀類		こめ、精白米	17.6
		こめ、全かゆ	3.1
2 いも及びでん粉類		さつまいも	12.2
		じゃがいも	9.8
		でんぷん粉	6.8
		でんぷんうどん	9.5
		でんぷん米	18.6
3 砂糖及び甘味料		砂糖	0
4 豆類		豆腐、絹ごし	8.2
5 種実類			-
6 野菜類		きゅうり、生	3.2
		にんじん、生	8.2
		だいこん、生	2.0
7 果実類		りんご	5.0
		なし	4.2
		みかん	3.9
8 きのこと類			-
9 藻類		のり、つくだ煮	10.6
10 魚介類		えび、生	14.1
		さけ、水煮缶詰	15.7
11 肉類		なわとり、ささ身	6.6
		ぶた、ひき肉	8.5
		卵黄、生	67.7
12 卵類		卵白、生	3.1
		牛乳	1.3
13 乳類		牛乳	1.3
14 油脂類		サラダ油	0
15 菓子類		せんべい	17.0
16 し好飲料類			-
17 調味料及び香辛料類		しょうゆ	3.4
18 調理加工食品類			-

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

### Ⅲ. 分担研究者・研究協力者の報告書

#### 8. 健常成人における葉酸の必要量についての検討

分担協力者 渡邊敏明 兵庫県立大学 教授  
研究協力者 福井 徹 病体生理研究所 室長

#### 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、葉酸の所要量は食事から摂取可能な量として、成人で 200 $\mu$ g/日と策定された。しかしながら、この根拠となるわが国での科学的エビデンスは必ずしも十分でないので、私たち自身の新しいデータの蓄積と解析が求められている。そこで、健常な成人男女を対象にして、所要量に見合った水溶性ビタミンをサプリメントとして与え、葉酸の必要量を検討した。成人女性では、血清および尿中葉酸レベルが増加した。一方成人男性では血清葉酸の減少が見られたが、尿中葉酸排泄量は変化しなかった。このように、葉酸の必要量に性差がみられ、今回使用した葉酸量（200 $\mu$ g/日）は、男性ではやや不足しているかもしれないが、女性では必要量を十分に満たしているものと考えられる。

## A. 目的

葉酸は、N-ヘテロ環のプテリジンと p-アミノ安息香酸からなるプテロイル基、つまり 4-[(2-アミノ-4(3H)-オキソプテリジン-6-イル)メチル]アミノ]安息香酸に 1~7 個の L-グルタミン酸が結合したプテロイル (ポリ)グルタミン酸である。食品に含まれるのは、プテロイルポリグルタミン酸型であり、小腸粘膜でモノグルタミン酸型となり、吸収される<sup>1)2)</sup>。血漿や尿中では、モノグルタミン酸型、組織中ではポリグルタミン酸型としてタンパク質と結合した形で機能している。なお、小腸粘膜では、プテリジン環が還元されてテトラヒドロ型となり、さらにメチルテトラヒドロ型となる。還元型葉酸は、細胞内では補酵素として、ヌクレオチド類の生合成やメチル基の生成転換系などに関与している。また、アミノ酸やタンパク質の代謝などにも不可欠であり、グリシン、セリン、メチオニンの代謝やビタミン B<sub>12</sub> とともにホモシステインからメチオニンの生成などにも関与している。

葉酸の生理機能としては、正常な造血機能を保つために重要であるばかりでなく、成長や妊娠の維持にも欠かせないビタミンである。このため、欠乏症状としては、造血機能に異常が生じ、巨赤芽球性貧血や神経障害が知られている。最近、多くの疫学調査によって、葉酸が、胎児における神経管閉鎖障害の発症リスクの低減に効果があることが認められている<sup>3-7)</sup>。また、葉酸の摂取量が低下すると、血漿ホモシステインの上昇が見られ、動脈硬化症と関連がある血液凝固因子や血管内皮細胞に影響している<sup>8-10)</sup>。

葉酸の所要量は、わが国では食事から摂取可能な量として、成人で 200 $\mu$ g/日であるが、米国では 400 $\mu$ g/日となっている<sup>1)12)</sup>。なお、妊婦および授乳婦での付加量は、それぞれ 200 および 80 $\mu$ g/日となっている。葉酸の摂取量が、1日あたり 320 $\mu$ g 以上であれば、血漿のホモシステインレベルを一定に保つことができる。このことから、米国では穀類に葉酸を 140 $\mu$ g/100g 添加するように勧告している。わが国でも、1日に 350 g の野菜を摂取するように勧めている。許容上限摂取量は 1 mg/日となっているが、これ以上摂取すると葉酸過敏症 (発熱や蕁麻疹など) を起こすことがある。

このように、葉酸の栄養所要量を策定するために、その根拠となる科学的エビデンスは必ずしも十分でなく、わが国での新しいデ

ータの蓄積と解析が求められている。そこで、本研究では健常な成人男女を対象にして、所要量に見合った水溶性ビタミンをサプリメントとして与え、葉酸の出納を検討した。なお、葉酸が亜鉛の吸収を阻害するという報告があることから、血清亜鉛の測定も合わせて行った。

## B. 実験方法

### 1. 対象

被験者として、喫煙、飲酒の習慣がなく、朝食を食べるなどの規則正しい食習慣をもつ大学生のうち、生化学検査をうけ、健康であることが確認できた成人女性 20 名 (20.6 $\pm$ 1.11 歳)、成人男性 10 名 (20.4 $\pm$ 1.26 歳) を選択した。なお、本研究は独立行政法人国立健康・栄養研究所倫理委員会において承認を受け、対象者に内容を十分説明し、理解していただいた上で書面にて同意を得て、ヘルシンキ宣言の精神に則って行われたものである。

### 2. 試験期間

葉酸の出納試験として、成人女性を対象としたもの 2 回、成人男性を対象としたもの 1 回の計 3 回行った。成人女性では 2002 年 3 月 1 日~2002 年 3 月 8 日の期間と 2003 年 3 月 4 日~2003 年 3 月 11 日の期間、成人男性では 2002 年 8 月 27 日~2002 年 9 月 3 日の期間に実施した。それぞれ 2002 年女性、2003 年女性および 2002 年男性とした。

### 3. 生活条件

被験者の快適な生活環境の確保等に留意した。大学生の一般的な日常生活をモデルとした通学、講義、実験、運動等の活動から構成された 1 日のスケジュールを作成した。被験者はこのスケジュールに従って試験期間中生活をした。

### 4. 食事

食事は、第六次改定日本人の栄養所要量の生活活動強度 II に従い、女性は 1,800 kcal/日、男性は 2,300 kcal/日を摂取した。食事には、通常の食品を使用せずに、栄養素の含有量がはっきりしている半精製食品を利用した。なお、2002 年の結果から、2003 年女性においては、小麦粉 (薄力粉・1 等) を除いたほか、ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>12</sub> およびビタミン C の摂取量を所要量の 1.5 倍量とした。

葉酸摂取量は、ビタミン混合物からサプリメントとして 1 日あたり 200 $\mu$ g であるが、小麦粉に葉酸化合物が 9 $\mu$ g/100g (五訂日本食品標準成分表) 含まれていることを考慮すると、

2002年男女の葉酸摂取量は1日当たり228.35 $\mu$ g/日となる。また、葉酸摂取量を考える場合には、食事性葉酸と比較して、葉酸サプリメントの体内利用率を1.7倍として、換算する必要がある。生体利用率を考慮して食事性葉酸当量(Dietary folate equivalents)として考えると、今回の葉酸摂取量は2002年男女で368 $\mu$ gDFEs/日、2003年女性で340 $\mu$ gDFEs/日となる<sup>12)</sup>。

ビタミン混合剤は、食事終了後、水で服用させた。給食比率は朝:昼:夕=3:4:3とした。水分は市販ペットボトル詰め軟水とし、自由に摂取させた。平均的な1日摂取量は2lである。

## 5. 試料の採取方法

### 5-1. 尿

尿は、第2尿(2002年男性は6時31分以降、2002年女性および2003年女性は7時01分以降)から翌朝第1尿(2002年男性は6時30分に排尿、2002年女性および2003年女性は7時00分に排尿)までの24時間尿を採取した。2002年女性は試験開始6日目のみ、2003年女性と2002年男性は試験開始1日目から7日目まで毎日採尿を行った。なお、2002年男性の7日目は、朝6時30分から翌日の8時30分までの間、飲料水をできるだけ多く摂取させ、1-6ステージ(それぞれ6:30-8:30, 8:30-12:30, 12:30-17:30, 17:30-22:30, 22:30-6:30, 6:30-8:30)に分けて採尿した。尿は、採尿中は冷蔵し、採尿後は-4 $^{\circ}$ Cで氷結保存した。

### 5-2. 血液

2002年女性は試験開始1, 3, 8日目の朝食摂取前9時00分に、2003年女性は試験開始1, 3, 5, 8日目の朝食前9時00分に、2002年男性は試験開始1, 3, 5, 8日目の朝食摂取前8時30分に採血を行った。採取後は遠心し、血清と分離した。血清は、-4 $^{\circ}$ Cで分析直前まで氷結保存した。

## 6. 葉酸の測定

血清および尿中の葉酸は、化学発光免疫測定法で分析した。測定機器としては、CentaurケミルミアナライザーACS180およびIMULIZE 2000を使用した。

サンプルをジチオスレイトールで処理し、タンパクから遊離させた後、分析に供した。本法の最小検出感度は0.5 ng/ml(1.1 pmol/ml)であり、プール血清で測定した葉酸値は5.77 ng/ml(13.1 pmol/ml)であった。尿中の葉酸については、正常参考値となるような参考資料などが無いので、血清と同じ測定条件で行

った。

## 7. 亜鉛の測定

血清250 $\mu$ lに6.25%トリクロロ酢酸を2.0 ml加え、混和した後、室温で10分間放置した。その後、3,000 rpmで10分間遠心をかけ、上清1 mlをとり、亜鉛を原子吸光光度計で測定した。

## 8. 統計処理

統計ソフトはStatView(SAS Institutes Inc., Cary) Ver.5.0を使用し、各群内の差および各群間の差の検定にはStudent's *t*-testを用いた。有意水準は $p < 0.05$ とし、分析値はすべて平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。

## C. 結果

血清葉酸量を比較したものが図1である。2002年女性の血清葉酸量は、試験期間を通して平均11.2-13.5 ng/ml(25.4-30.5 pmol/ml)の範囲にあった。血清葉酸量は、1日目と比較し、3日目以降に有意な増加が認められた。

2003年女性においても、1日目と比べ、すべての日で有意な増加がみられた。2002年女性と2003年女性の間には有意な差はみられなかった。一方、2002年男性では、血清葉酸量は平均6.9-9.8 ng/ml(15.6-22.2 pmol/ml)の範囲にあり、1日目と比較して3日目以降は減少傾向にあり、8日目では有意に減少した。

図2は、1日あたりの尿中葉酸排泄量およびクレアチニンで補正したものを示したものである。2003年女性では、尿中葉酸排泄量に増加が認められ、クレアチニン補正值でみると、1日目と比較し、2日目以降は全て増加し、5日目と7日目以外では有意に増加した。2002年男性はほとんど変化がみられなかった。2002年男性と2003年女性とを比較すると、女性がすべての日で有意に高値を示した(図2b)。

尿中葉酸排泄率(摂取量200 $\mu$ gとして)をみると、2002年男性で平均4.5%、2003年女性で平均4.6%、2002年女性は5.0%(6日目)であった。2003年女性では1日目と比較し、5日目と7日目以外で有意な増加がみられた(図3)。2002年男性では変化は認められなかった。また2002年男性と2003年女性の間には、大きな差異はみられなかった。

図4は、2002年男性における尿中葉酸排泄量の日内変動を示したものである。葉酸の排泄量は、午前中(ステージ2)に高い傾向を示したが、この時期以外では大きな変化は観察されなかった。

試験期間中の血清亜鉛の変化をみると、1

日目においては、各群で相違は認められなかった。また、各群とも経日的な変化はみられなかった。しかし、2003年女性では、8日目において、2002年女性および2002年男性と比較して、有意に低値を示した。

#### D. 考察

食事性葉酸の摂取量について、これまでの報告された栄養調査では、平岡・安田<sup>13)</sup>は女子学生を対象として食物摂取状況調査から、葉酸摂取量は平均190.6 $\mu$ g/日で、RDA(200g/日)に対する充足率は40.2%であると報告している。摂取量が200 $\mu$ g以下と以上では、血清葉酸量に有意な差異が認められている。この結果は、オランダのDNFCS調査(1992年)の結果と一致している<sup>14)</sup>。1-92歳を対象とした食品分析結果から算出した葉酸摂取量は189 $\mu$ g/日である<sup>15)</sup>。サプリメントを摂取している場合には344 $\mu$ g/日と高値である。なお、RDA(200 $\mu$ g/日)に対する充足率は、男女それぞれ42%および54%である。また成人(20-65歳)を対象にした調査では、食事からの葉酸摂取量は男性232 $\mu$ g/日、女性186 $\mu$ g/日と男女差がみられている。

著者らが行った東北地区における中高齢者120名の食事記録調査では、葉酸摂取量は平均447 $\mu$ g/日で季節変動が見られているが、男女差は観察されていない(未発表)。また平成13年度の国民栄養調査では、葉酸の摂取量は全平均で313 $\mu$ g/日で、年齢に依存して高く、女性で低値である<sup>16)</sup>。女子学生を対象に行なった食事調査でも、葉酸摂取量は五訂成分表を用いた場合には334 $\mu$ g/日となるのに対して、米国の成分表では197 $\mu$ g/日となる<sup>17)</sup>。このように葉酸摂取量が高値であるが、これは日本食品標準分析表に掲載されている葉酸値が高いことによるのかもしれない、と示唆されている。なお、米国Framingham調査の高齢者(67-90歳)では、葉酸摂取量が253 $\mu$ g/日以下では血漿ホモシステイン濃度が有意に増加する、との報告がある。しかしながら、ホモシステイン濃度は基準値14 $\mu$ mol/l以下である<sup>18)</sup>。これらの栄養調査から、摂取されている食事性葉酸の摂取量は、1日あたりおおよそ200-300 $\mu$ gである。食物摂取頻度調査の結果、食品を基礎として算出された非妊娠女性の所要量は、250 $\mu$ g/日とされている<sup>19)</sup>。

本研究においては、使用した葉酸量は1日あたり200 $\mu$ gであるが、半精製食品の原料となっている小麦粉315gに含まれる28.35 $\mu$ g

も関与しているため、総葉酸量は228.35 $\mu$ gとなっている。この食事をした結果、血清葉酸量は男女共にすべて基準値内にあった。女性成人では、試験期間後期において、開始日と比べて有意な増加が見られたが、男性成人では最終日に有意な減少がみられた。また尿中葉酸排泄量に男女差は認められなかったが、女性では試験期間に伴って有意な増加が観察された。男性では葉酸排泄量に変化は見られなかったが、クレアチニン補正すると女性と比べて有意に低値であった。これは筋肉量の違いによるものと考えられる。このように、今回の葉酸摂取量については、男性ではやや不足しているかもしれないが、女性では必要量を十分に満たしている、と考えられる。また、女性においては、2002年と2003年で血清葉酸量とその変化、尿中葉酸排泄量および排泄率に相違が見られなかった。このことは葉酸摂取量200 $\mu$ gと228.35 $\mu$ gに差異がないことを示している。

葉酸摂取量の指標をみると、米国においては、血清葉酸では<6.8 nmol/l、赤血球葉酸では<362 nmol/l、および血漿ホモシステインでは>16 $\mu$ mol/lが基準値として用いられている<sup>12)</sup>。しかしながら、他の国においては、ホモシステインの下限値として、12および14 $\mu$ mol/lも使用されている。これらの指標の中で、これまで一般的に用いられてきたものは血清葉酸レベルである。多くの分析データがあり、血液生化学的指標として用いられている。葉酸が不足すると、血清葉酸レベルが低下するとともに、ホモシステインが蓄積する。このため血清ホモシステインレベルが高くなり、尿中のホモシステイン排泄が多くなる。これらのことから、ホモシステインは感度の良い指標であることが示されている。

血清ホモシステインレベルは、血清葉酸レベルあるいは葉酸の摂取量と関連があるとの報告がある。またホモシステインは、詳細な発症メカニズムは不明であるが、動脈硬化症や神経管閉鎖障害の誘発に関わっている。このため、ホモシステインを葉酸必要量の指標として考えることは、科学的根拠に基づくもので、非常に有用かつ重要である。しかしながら、一炭素単位代謝系には、葉酸以外にもビタミンB<sub>12</sub>およびビタミンB<sub>6</sub>が関わっているため、これらのビタミンのうち1つでも不足していると、ホモシステインが増加することが考えられる。このようなことから、葉酸の必要量を考える場合には、ホモシステインのみでなく血清葉酸レベルも考慮して、評

価する必要がある。

米国の栄養所要量の策定では、葉酸の平均必要量は血清葉酸レベル、赤血球葉酸濃度、血漿ホモシステイン濃度、血液学的検査（赤血球数、網赤血球数、平均赤血球容積値、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度）を基準範囲に維持できる食事と定めている。わが国の第六次改定の所要量の策定で用いられた根拠は、欧米の多くの報告を基にしている。

ヒトを対象として葉酸の必要量を検討した代表的な論文として、著者らの知る限りでは、4編ある。試験には食事由来の葉酸と葉酸サプリメントを組み合わせて、検討を行っている。Milneら<sup>20)</sup>は、成人男性40名を対象に代謝室で食事性葉酸(200 $\mu$ g/日)の影響を調べている。この結果、血清葉酸量の変化は、試験開始時の葉酸の状態に依存している。つまり、血清葉酸量が10 ng/ml以下であれば、食事によって葉酸レベルの減少は見られなかった。このようなことから、体内の葉酸レベルを維持するためには、200 $\mu$ g/日(150-250 $\mu$ g/日)以上の葉酸摂取があれば、十分であるかもしれない。わが国では、葉酸が食品に強化されていないので、このデータはわが国で葉酸の食事摂取基準を考えるために重要な知見である。

食事とサプリメントの組み合わせを利用したものとして、O'Keefeら<sup>21)</sup>は、成人女性に低葉酸食事(30 $\mu$ g/日)に葉酸サプリメントを200, 300, 400 $\mu$ g/日を70日間与えて、葉酸の必要量を検討している。血清および赤血球の葉酸レベルをみると、200 $\mu$ gおよび300 $\mu$ g群では試験開始時に比べ、400 $\mu$ g群で有意に増加した。このことは、減少率でみても、400 $\mu$ g群と比べ、200 $\mu$ g群で有意であった。赤血球葉酸量については、300 $\mu$ gおよび400 $\mu$ g群で増加していることに比べ、200 $\mu$ g群では減少していた。一方、血漿ホモシステイン量については、200 $\mu$ g群で有意に増加したが、300 $\mu$ g群との差異は明確ではなかった。なお、200 $\mu$ g群では血漿ホモシステインと血漿、赤血球葉酸レベルと負の相関がみられた。この結果、これらの女性においては、葉酸200 $\mu$ gの摂取量では、葉酸状態を維持するためには不十分である、と示唆している。米国における食事摂取基準の策定においては、この結果が基準となっている。

このほか、葉酸欠乏状態にした後、各種濃度の葉酸を摂取させて必要量を検討する欠乏-添加試験を行なった報告がある。Sauberlichら<sup>22)</sup>は、成人女性10名を3群に

分けて代謝室で92日間検討した。まず28日間葉酸欠乏食を摂取した後、各種濃度の葉酸含有食を摂取し、血漿および赤血球中の葉酸の変化を調べた。欠乏食を摂取すると血漿葉酸は60%まで減少する。その後、天然由来の葉酸200 $\mu$ gを摂取すると血漿葉酸は減少せず、300 $\mu$ gではわずかながら上昇する。しかし、これらの濃度でも、赤血球葉酸は減少し続ける。このようなことから、成人女性の葉酸必要量は200-250 $\mu$ g/日と推定される。Jacobら<sup>23)</sup>は、成人男性10名を対象に代謝室で葉酸欠乏食と葉酸サプリメントを与えて、葉酸必要量を検討している。葉酸欠乏(25 $\mu$ g/日)期では、血漿葉酸が減少し、ホモシステインが増加した。葉酸添加期(99 $\mu$ g/日)では、血漿葉酸は増加するが、ホモシステインの低下はみられていない。この結果、現行の所要量(200 $\mu$ g/日)では十分でないことを示している。

葉酸の過剰摂取については、食事のみから多量に摂取することは困難であり、多くの場合サプリメントの利用によるものと考えられる。400 $\mu$ g/日のサプリメントによって、亜鉛の尿中への排泄量が低下することや糞便中の亜鉛量が増加することが報告されている<sup>24-26)</sup>。今回所要量に見合った葉酸サプリメントの摂取量では、試験期間中に血清亜鉛量の変化はみられなかった。しかしながら、ビタミンB<sub>1</sub>、B<sub>12</sub>、Cを増やした場合に血清亜鉛量の低下が認められた。葉酸のみでなく、これらのビタミンも腸管からの亜鉛吸収に影響しているのかもしれない。今後さらに検討する必要がある。

最後に、第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準において、葉酸の所要量が200 $\mu$ g/日とはじめて策定された。今回使用した葉酸摂取量は200 $\mu$ g/日であるが、生体利用率を考慮すると、368 $\mu$ gあるいは340 $\mu$ gDFEs/日となる。この結果では、男性ではやや不足しているかもしれないが、女性では必要量を十分に満たしているものと考えられる。これまでの報告でも葉酸摂取量が200 $\mu$ g/日で充足しているとする報告がある。わが国では、食品に葉酸が強化されていないため、葉酸の摂取量は食事から摂取可能な量として考える必要がある。現在、食事摂取基準の新たな改定が行なわれている。今回の結果は、今後葉酸の食事摂取基準を策定するための基礎的な知見として重要である。

#### 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) 岩井和夫他 (1980) 葉酸. ビタミン学会編, ビタミン学. pp.363-436, 東京化学同人, 東京

2) 小橋昌裕 (1996) 葉酸. 日本ビタミン学会編, ビタミンの事典, pp.283-294, 朝倉書店, 東京.

3) Daly S, Mills JL, Molloy AM, Conley M, Lee YJ, Kirke PN, Weir DG, Scott (1997) Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet* 350: 1666-1669

4) Czeizel AE, Dudas I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327: 1832-1835.

5) 渡邊敏明 (2002) 葉酸による先天異常の予防. 日本ビタミン学会編, ビタミン研究のブレイクスルー-発見から最新の研究まで-, pp.265-270, 学進出版, 吹田市.

6) Mills JL, Signore C (2004) Neural tube defect rates before and after food fortification with folic acid. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* Oct 4.

7) De Wals P, Rusen ID, Lee NS, Morin P, Niyonsenga T (2003) Trend in prevalence of neural tube defects in Quebec. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* 67: 919-923.

8) Ueland PM, Refsum H, Beresford SAA, Vollset SE (2000) The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 72: 324-332.

9) Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM (2002) Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin b6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention. *JAMA* 288: 973-979.

10) 渡邊敏明, 大川恵子 (2001) 葉酸代謝と動脈硬化症. *臨床検査* 45:1117-1122.

11) 厚生省 (1999)第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-.

12) Institute of Medicine (2003) Folate. In: *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. National Academy Press, Washington DC. pp. 196-305.

13) 平岡真実, 安田和人 (2000) 女子大学生のビタミン B12, 葉酸栄養状態について-血清ビタミン B12, 葉酸濃度の分布範囲-. *ビタミン* 74: 271-280.

14) Melse-Boonstra A, de Bree A, Verhoef P, Bjorke-Monsen AL, Verschuren WMM (2002) Dietary monoglutamate and polyglutamate folate are associated with plasma folate concentrations in Dutch men and women aged 20-65 years. *J Nutr* 132: 1307-1312.

15) Konings EJM, Roomans HHS, Dorant E, Goldbohm RA, Saris WHM, van den Brandt PA (2001) Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *Am J Clin Nutr* 73: 765-776.

16) 健康・栄養情報研究会 (2001) 国民栄養の現状. 平成 13 年度厚生労働省国民栄養調査結果. 第一出版, 東京.

17) 平岡真実, 安田和人 (2002) B 群ビタミンにおける各国の食品成分値の比較検討. *ビタミン* 76: 182-183. (抄録)

18) Selhub J, Jacques PF, Wilson PFW, Rush D, Rosenberg IH (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 270: 2693-2698.

19) Higgins JR, Quinlivan EP, McPartlin J, Scott JM, Weir DG, Darling MR (1999) The relationship between increased folate catabolism and the increased requirement for folate in pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 107: 1149-1154.

20) Milne DB, Johnson LK, Mahalko JR, Sandstead HH (1983) Folate status of adult males living in a metabolic unit: possible relationships with iron nutrition. *Am J Clin Nutr* 37: 768-773.

21) O'Keefe CA, Bailey LB, Thomas EA, Hofler SA, Davis BA, Cerda JJ, Gregory JF, III (1995) Controlled dietary folate affects folate status in nonpregnant women. *J Nutr* 125: 2717-2725.

22) Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC (1987) Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 46: 1016-1028



- 23) Jacob RA, Wu M-M, Henning SM, Swendseid ME (1994) Homocysteine increases as folate decreases in plasma of healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction. *J Nutr* 124: 1072-1080.
- 24) Milne DB, Canfield WK, Mahalko JR, Sandstead HH (1984) Effect of oral folic acid supplements on zinc, copper, and iron absorption and excretion. *Am J Clin Nutr* 39: 535-539.
- 25) Butterworth CE, Jr, Tamura T (1989) Folic acid safety and toxicity: a brief review. *Am J Clin Nutr* 50: 353-358.
- 26) Keating JN, Wada L, Stikstad EL, King JC (1987) Folic acid: effect on zinc absorption in humans and in the rat. *Am J Clin Nutr* 46: 835-839.

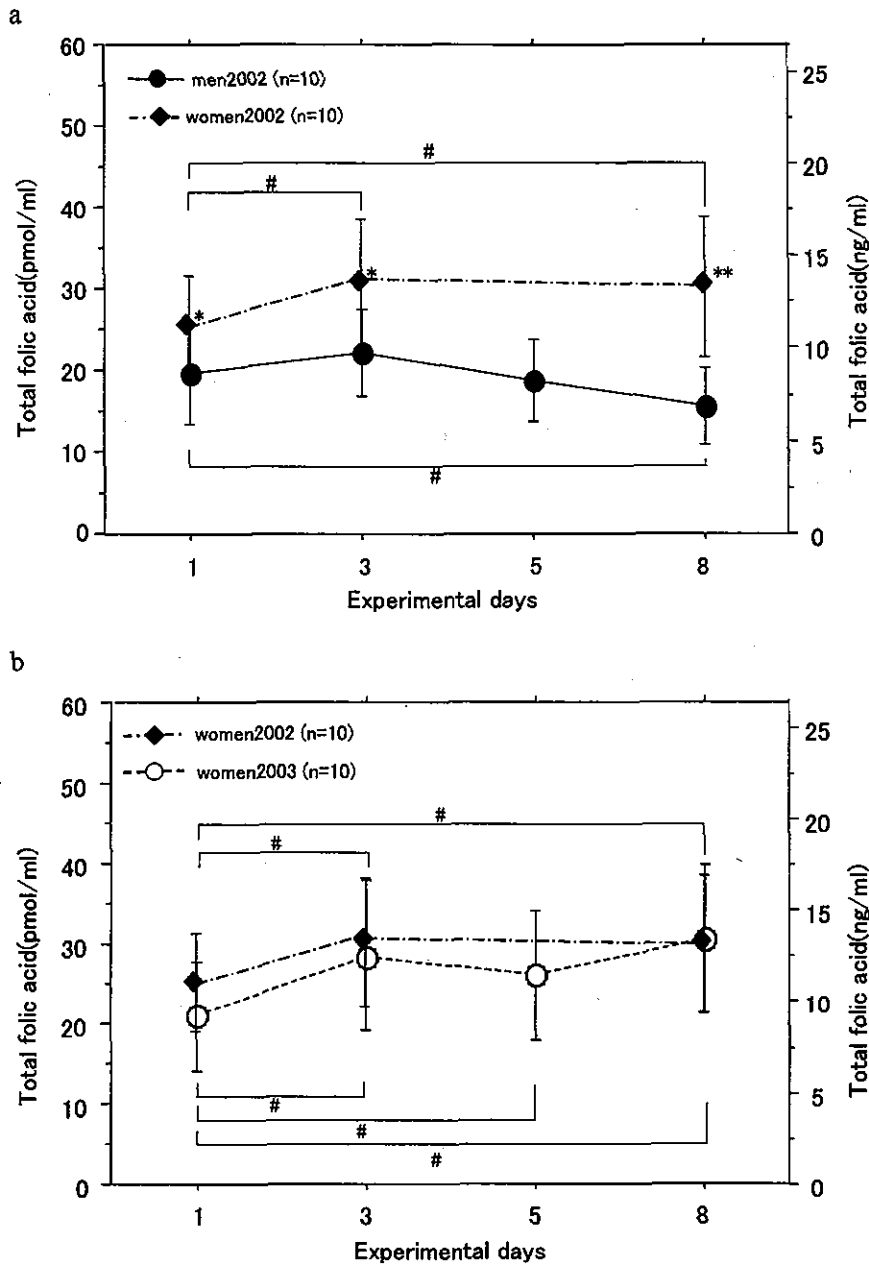


図1. 半精製食品を摂取した成人の血清葉酸量の変化

a 血清葉酸濃度 (2002年男性および女性)

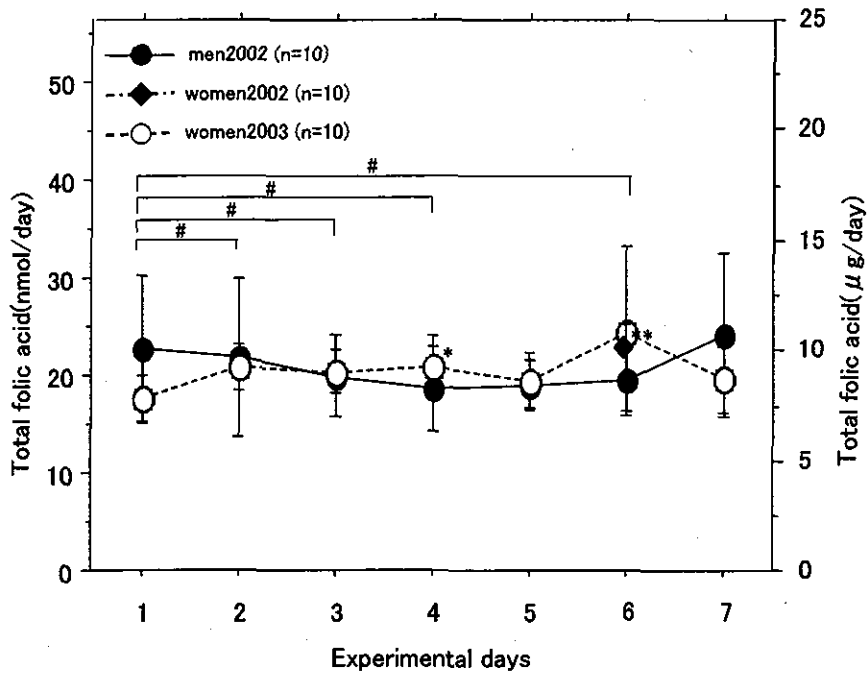
\* $p < 0.01$  (2002年男性との比較)

# $p < 0.05$  (2002年男女のそれぞれ1日目との比較)

b 血清葉酸濃度 (2002年および2003年女性)

# $p < 0.05$  (2002年および2003年女性のそれぞれ1日目との比較)

a



b

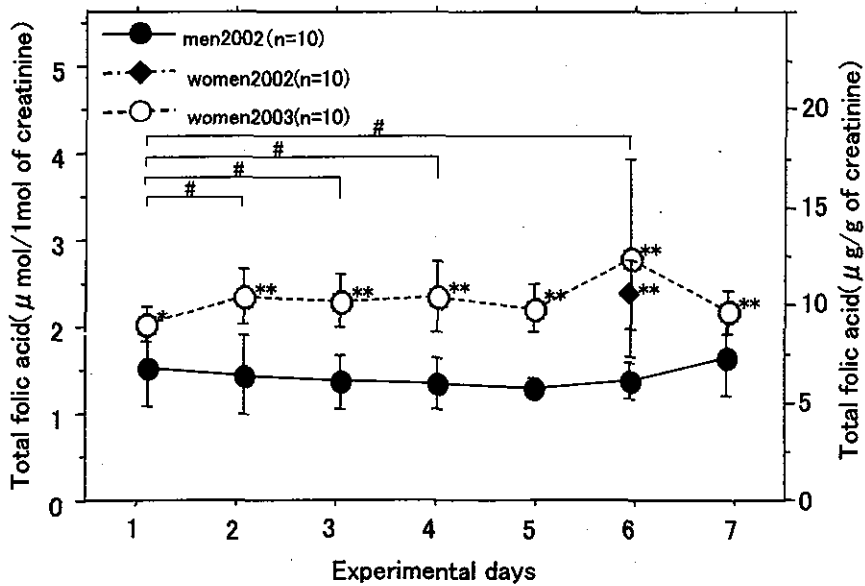


図2. 半精製食品を摂取した成人の尿中葉酸量の変化

a 尿中葉酸（1日あたり）の排泄量

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (2002年男性との比較)

# $p < 0.05$  (2003年女性の1日目との比較)

b 尿中葉酸濃度（クレアチニン補正）

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (2002年男性との比較)

# $p < 0.05$  (2003年女性の1日目との比較)

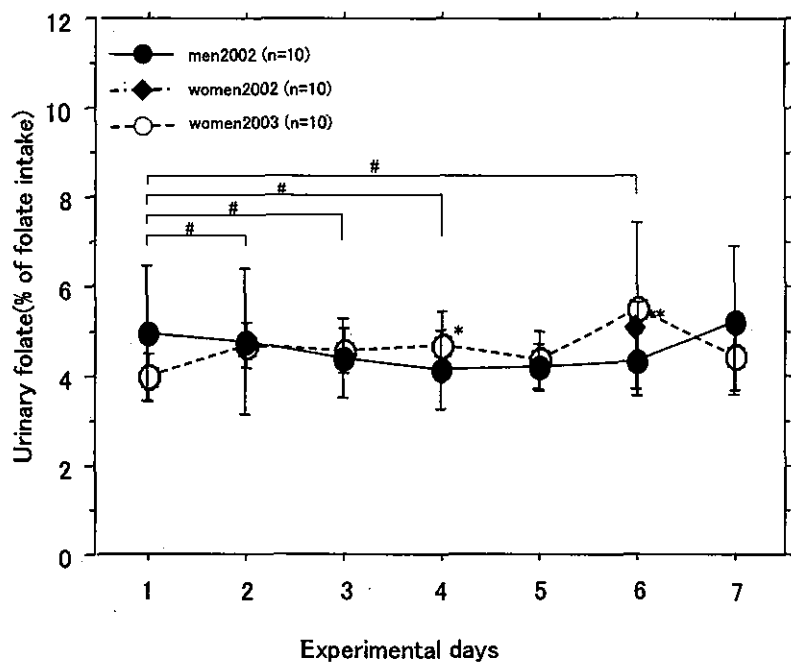


図3. 半精製食品を摂取した成人の葉酸排泄率（摂取量 200 $\mu$ g とした場合）の変化  
 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (2002年男性との比較)  
 # $p < 0.05$  (2003年女性の1日目との比較)

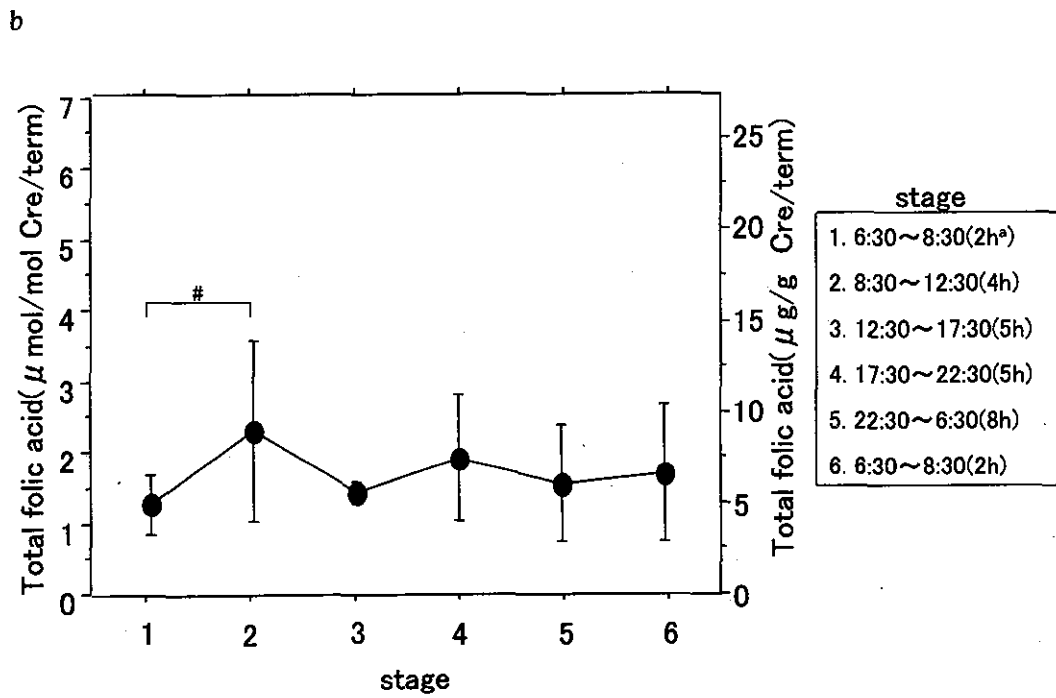
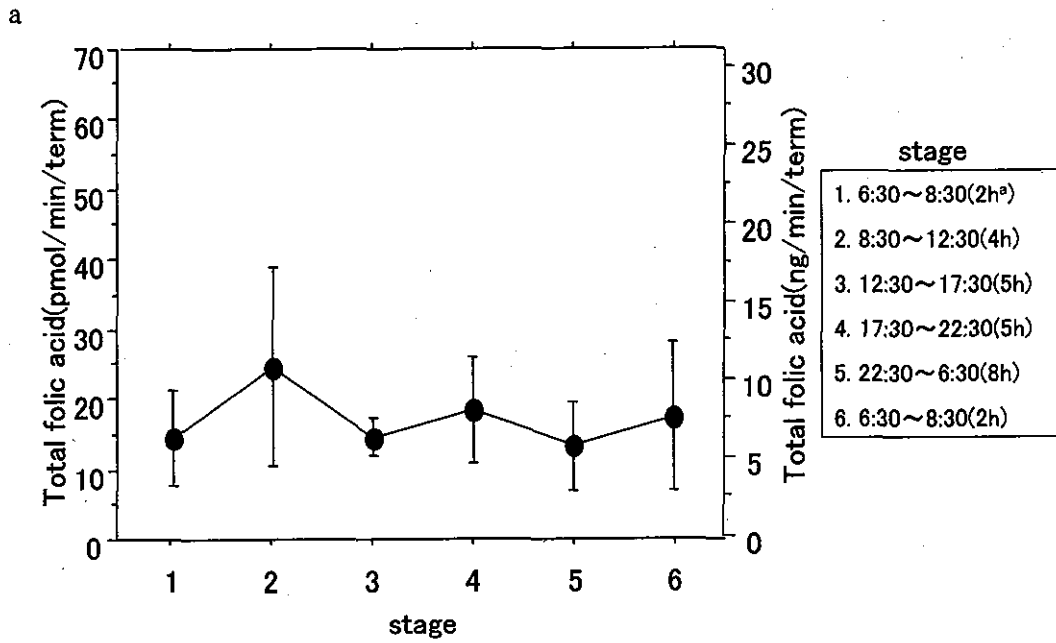


図4. 成人男性（2002年）の尿中葉酸量の日内変動

a 尿中葉酸排泄量（単位時間あたり），<sup>a</sup>hour

b 尿中葉酸濃度（クレアチニン比）

# $p < 0.05$ （1日目との比較），<sup>a</sup>hour

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

### Ⅲ. 分担研究者・研究協力者の報告書

#### 9. 日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討

分担協力者 渡邊敏明 兵庫県立大学 教授  
分担研究者 渡邊文雄 高知女子大学 教授  
研究協力者 福井 徹 病体生理研究所 室長

#### 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、健常な授乳婦から得た母乳のビタミン B<sub>12</sub>、ナイアシン、パントテン酸、葉酸およびビオチンの 5 種類の含量を分析した。母乳は、妊娠ならびに出産が正常な経過で満期出産し、満月齢で 2~5 ケ月の乳児を完全母乳哺育している日本人授乳婦 25 名から得た。母乳のビタミン B<sub>12</sub> 含量は  $0.28 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$  ( $0.21 \pm 0.11 \text{ nmol/L}$ ) であり、総ナイアシン含量は  $1.55 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$  ( $12.7 \pm 4.6 \text{ nmol/mL}$ )、遊離型ナイアシン含量は  $0.30 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$  ( $2.49 \pm 2.16 \text{ nmol/mL}$ ) で、遊離率は  $17.9 \pm 7.5\%$  であった。総パントテン酸含量は  $6.92 \pm 2.83 \mu\text{g/mL}$  ( $31.5 \pm 13.0 \text{ nmol/mL}$ )、遊離型パントテン酸含量は  $4.84 \pm 2.90 \mu\text{g/mL}$  ( $22.08 \pm 13.17 \text{ nmol/mL}$ ) で、遊離率は  $69.4 \pm 16.9\%$  であった。総葉酸含量は  $34.6 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$  ( $78.5 \pm 22.3 \text{ pmol/ml}$ ) であり、ビオチン含量は  $3.40 \pm 0.68 \text{ ng/ml}$  ( $13.9 \pm 2.8 \mu\text{mol/l}$ )、遊離型ビオチン量は  $0.87 \pm 0.31 \text{ ng/ml}$  ( $3.6 \pm 1.3 \mu\text{mol/l}$ ) で、遊離率は  $25.6 \pm 8.2\%$  であった。これらの値は、今後これらのビタミンの食事摂取基準を策定するための基礎的なデータとして重要である。

## A. 目的

日本人の栄養所要量は、昭和45年に初回の策定が施行されて以来、日本人の体格、生活習慣などに合わせて、5年ごとに改定されている。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<sup>1)</sup>。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策定された。水溶性ビタミンでは、ピオチンおよび葉酸など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<sup>2)</sup>。

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を含まれている。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。

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、本研究では、わが国の授乳婦から採取した母乳を利用して、5種類の水溶性ビタミン含量を分析し、これまでに得られている結果について報告する。

## B. 実験方法

### 1. 被験者

被験者は妊娠ならびに出産が正常な経過で満期出産し、満月齢で2~5ヶ月の乳児を完全母乳哺育している日本人授乳婦を封事にした。被験者は平均年齢31.1歳、平均体重52.8kg、平均身長158.7cmであった。児(男児15名、女児9名、不明1名)はすべて単胎児であり、在胎期間は全児38週以上、妊娠経過は概ね正常で、軽度の妊娠中毒症、

貧血が数名見られた以外に顕著な異常はなかった。被験者の在住地域は、東京都8名、静岡県8名、長野県3名、栃木2名、神奈川県1名、大阪府1名、愛知県1名、和歌山県1名であった。

被験者は、栄養に対する興味も高くバランスのとれた食事を摂取していることを前提とした。対象者の摂取している食事については、3日間の食事記録調査を行った。摂取エネルギーについてPFCバランスで見ると、P:F:C=14.8%:28.6%:55.4%であり、栄養に対する興味が高くバランスのとれた食事を行っていた。母乳は、本趣意に同意し体調の良いボランティアから採取した母乳25検体を使用した。

対象者にはあらかじめ研究の趣旨及び方法を文書で説明し、協力を依頼、同意を得た。また、今回の研究は、すべてヘルシンキ宣言に従って実施され、昭和女子大学における倫理委員会より承認を得て実施したものである(承認番号01-06 平成14年2月4日承認)。

### 2. 母乳採取

母乳は、ほぼ14時~16時の授乳後に、乳房をマッサージした後の後乳を採取して、冷凍母乳パック(カネゾン本舗社製)に保存し、分析に供するまで-20℃にて保存した。

### 3. ビタミンB<sub>12</sub>の分析

母乳に含まれるビタミンB<sub>12</sub>の定量は、五訂日本食品標準成分表で採用されている分析マニュアル<sup>3)</sup>に準じて*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (旧名*L. leichimannii*) ATCC7830を用いた微生物学的定量法で行った。なお、母乳に含まれるビタミンB<sub>12</sub>含量を考慮して母乳1.0mL(あるいは0.5mL)を試料とし、酢酸緩衝液、KCN溶液、メタリン酸溶液はマニュアルに記載されている容量の1/10量(あるいは1/20量)で抽出を行った。本定量菌は、ビタミンB<sub>12</sub>以外にヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチドにもビタミンB<sub>12</sub>活性を示すため、これらをアルカリ耐性因子として別にアルカリ処理を行い、見かけのビタミンB<sub>12</sub>含量からアルカリ耐性因子含量を差し引き、試料中の正確なビタミンB<sub>12</sub>含量を算出した。また、定量には日本製薬株式会社製のライヒマニ保存用培地、ライヒマニ接種用培地、ライヒマニ用ビタミンB<sub>12</sub>定量基礎培地を

用いて行った。

#### 4. ナイアシンの分析

母乳中のナイアシンは、総量と遊離型に分けて測定した。総ナイアシン含量については、まず採取した母乳 150 $\mu$ L に 20 $\mu$ g/mL イソニコチンアミド溶液 (イソニコチンアミドは内部標準として使用) 1350 $\mu$ L を加え、オートクレーブにて 121 $^{\circ}$ C、10 分間処理を行った。この処理により、補酵素型がすべて遊離型のニコチンアミドとなる。冷却後、遠心分離を行い、得られた上清 1200 $\mu$ L に 70%過塩素酸 70 $\mu$ L を加えてよく混合し、遠心上清 1mL を測定用試料とした。測定方法は、Shibata ら<sup>4)</sup>の HPLC を用いる方法によって行った。一方、遊離型ナイアシン含量は、上記の操作において、オートクレーブ処理を省いた方法にて測定した。

#### 5. パントテン酸の分析

母乳中のパントテン酸は、総量と遊離型に分けて測定した。総パントテン酸含量については、まず母乳中の補酵素型のパントテン酸を遊離型にするために、ホスファターゼとアミダーゼ処理を行った<sup>5)</sup>。処理後の液を *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を検定菌として、定量を行った。一方、遊離型パントテン酸含量は、上記の処理を酵素を添加せずに行ったものを検液とした。

#### 6. 葉酸の分析

母乳を解凍後、遠心分離してクリーム状の上層を取り除き、脱脂した。この試料に 0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.1) を加えて、オートクレーブで加熱抽出する。冷却後、酵素溶液を加え、恒温槽で 37 $^{\circ}$ C 2時間反応させる。酵素を失活させた後、0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.1) を加え、ろ過したものをサンプルとした。葉酸の分析は、乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC7469 を用いて行った。母乳の葉酸量は、 $\mu$ mol/l および ng/ml として表した。

#### 7. 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 $^{\circ}$ C 1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。サンプルを脱脂および除タンパクした後、測定したビオチン量を遊離型ビオチンとし、この割合をビオチン遊離率と

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<sup>6)</sup>。母乳のビオチン量は、 $\mu$ mol/l および ng/ml として表した。

#### 8. 統計学的解析

母乳に含まれるビオチンおよび葉酸含量の統計学的解析には、すべて統計パッケージ Statview Ver.5.5 を用いて行った。

#### C. 結果および考察

被験者 25 名の母乳に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 含量の分析結果を図 1 に示す。母乳のビタミン B<sub>12</sub> 含量の平均値は 0.28 $\pm$ 0.14 $\mu$ g/L (0.21 $\pm$ 0.11 nmol/L), 0.08–0.73 $\mu$ g/L の範囲、変動係数 (CV) は 50.6%であった。

被験者 15 名の母乳に含まれる総ナイアシン含量をまとめたものが図 2 である。分析した総ナイアシン含量は、平均すると 1.55 $\pm$ 0.56 $\mu$ g/mL (12.7 $\pm$ 4.6 nmol/mL ; 平均値 $\pm$ SD), 0.95~2.81 $\mu$ g/mL の範囲、変動係数 (CV) は 36.1%であった。また、遊離型ナイアシン含量は、平均 0.30 $\pm$ 0.26 $\mu$ g/mL (2.49 $\pm$ 2.16nmol/mL) であり、遊離型率は 17.9 $\pm$ 7.5%であった。

被験者 15 名の母乳に含まれる総パントテン酸含量をまとめたものが図 3 である。分析した総パントテン酸含量は、平均すると 6.92 $\pm$ 2.83 $\mu$ g/mL (31.5 $\pm$ 13.0 nmol/mL ; 平均値 $\pm$ SD), 3.16~14.15 $\mu$ g/mL の範囲、CV は 40.9%であった。また、遊離型パントテン酸含量は、平均 4.84 $\pm$ 2.90 $\mu$ g/mL (22.08 $\pm$ 13.17nmol/mL) であり、遊離型率は 69.4 $\pm$ 16.9%であった。

図 4 は、母乳に含まれる葉酸の葉酸の分析結果をまとめたものである。分析した母乳の総葉酸量は、平均値 34.6 $\pm$ 9.9ng/ml (78.5 $\pm$ 22.3pmol/ml)、範囲 17.3–58.9 ng/ml、CV は 28.6%であった。

被験者 25 名の母乳に含まれるビオチンの分析結果をまとめたものが図 5 である。分析した母乳のビオチン含量は、平均すると 3.40 $\pm$ 0.68ng/ml (13.9 $\pm$ 2.8 $\mu$ mol/l)、2.55–4.97ng/ml の範囲、CV は 20.1%であった。また遊離型ビオチン量は、平均 0.87 $\pm$ 0.31ng/ml (3.6 $\pm$ 1.3 $\mu$ mol/l) であり、遊離率は平均 25.6 $\pm$ 8.2%であった。



## D. 考察

### 1. ビタミンB<sub>12</sub>

井戸田ら<sup>8)</sup>は日本人の健康な母親の母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を*L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830を用いた微生物学的定量法で測定したところ、母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量は初乳または移行乳(0.4μg/L)から成熟乳(0.2μg/L)になるに従い減少し、その平均値は0.2μg/Lであることを報告している。また、Trugoら<sup>9)</sup>も初乳から成熟乳にかけビタミンB<sub>12</sub>含量が減少することを見出している。また、井戸田ら<sup>8)</sup>が用いた定量菌は、ビタミンB<sub>12</sub>の構造に対してかなり特異性は高いが、ビタミンB<sub>12</sub>以外にアルカリ耐性因子(ヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチド)にもビタミンB<sub>12</sub>活性を示す。そのため見かけのビタミンB<sub>12</sub>含量からアルカリ耐性因子含量を差し引き、正確なビタミンB<sub>12</sub>含量を算出する必要があるが、井戸田ら<sup>8)</sup>が用いた方法にはアルカリ耐性因子を補正したとする記載がない。そこで、今回五訂日本食品標準成分表で採用されている分析マニュアル<sup>3)</sup>に準じた微生物学的定量法を用いてアルカリ耐性因子を補正した母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を算出した結果、日本人の健康な母親25名の母乳に含まれるビタミンB<sub>12</sub>含量の平均値は0.28±0.14μg/Lとなった。

これまでの報告をみると、母乳中に含まれるビタミンB<sub>12</sub>の定量法に関して、我国では微生物学定量法が用いられているが、欧米では放射性同位体希釈法が主流である。血清ビタミンB<sub>12</sub>含量の測定において放射性同位体希釈法は微生物学的定量法より若干高い値(約1.3倍)を示すことが報告されており<sup>10)</sup>、単純に数値を比較することはできない。井戸田ら<sup>8)</sup>および今回測定した日本人の母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量は、他のものに比べ低値を示したが、これが定量法の違いによるものなのか、人種の差や食生活の違いによるものなのか明らかでない。

第六次改定食事摂取基準では、平均的な日本人の母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を0.2μg/L、泌乳量0.75L/日を用いて摂取量(0.15μg/日)を計算し、0~5ヶ月の乳児の所要量を0.2μg/日と策定された<sup>11)</sup>。食事摂取基準(2005年度版)では平均的な日本人の母

乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を0.2μg/L、泌乳量0.78L/日を用いて摂取量(0.156μg/日)を計算し、目安量を0.2μg/日と策定されている<sup>12)</sup>。一方、米国の食事摂取基準において母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量は我国より高い値(0.42μg/L)が採用され、泌乳量0.78L/日を用いて摂取量(0.33μg/日)が計算され、所要量を0.4μg/日としている<sup>13)</sup>。いずれもWHOの所要量(FAO/WHO1988)の0.1μg/日を上回っているが、その理由はWHOの所要量がビタミンB<sub>12</sub>欠乏症の乳児の臨床症状の回復を指標として策定されているためである。<sup>14)</sup>

ベジタリアンの母親とその乳児の研究において、母乳のビタミンB<sub>12</sub>含量が0.49μg/L以下のとき、母乳栄養乳児の尿中メチルマロン酸排泄量(ビタミンB<sub>12</sub>欠乏の指標)が増加した<sup>15)</sup>。これらの乳児は体内に十分なビタミンB<sub>12</sub>を貯蔵することなしに生まれてくるが、平均摂取量0.24μg/日は乳児のビタミンB<sub>12</sub>バランスを維持するのに不十分であると報告されている<sup>15)</sup>。また、母乳のビタミンB<sub>12</sub>含量が0.49μg/L以下のとき乳児の尿中メチルマロン酸排泄量が増加傾向を示す報告もある。米国の食事摂取基準では乳児のビタミンB<sub>12</sub>欠乏症を予防するだけでなく、疾病予防のためビタミンB<sub>12</sub>の体内バランスを正常に維持するためには少なくとも0.3μg/日以上摂取量が必要であることを指摘している<sup>15)</sup>。

妊娠中から2~4μg/日のビタミンB<sub>12</sub>サプリメントを摂取すると母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を高値(平均値0.91μg/L)に維持することができた<sup>13)</sup>。母親の体内ビタミンB<sub>12</sub>貯蔵量よりも食事から毎日摂取されるビタミンB<sub>12</sub>の方が母乳へのビタミンB<sub>12</sub>分泌量に重要な影響を与えると考えられるので<sup>14)</sup>、母親が厳格なベジタリアンである場合はもとより、動物性食品の摂取が低くビタミンB<sub>12</sub>摂取量が不十分な場合は母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量が低下する可能性があるので注意する必要がある。

### 2. ナイアシン

渡邊ら<sup>5)</sup>が、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ので今回は省略する。今回は、さらに、日本人の母乳中のナイアシン含量のデータを取得するために行ったが、今回の平均値は

1.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。前回、我々が報告した値 (2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度) と比較すると平均値では、若干低いように思われるが、有意差は認められず、また、他の報告<sup>8,18)</sup>の値と比較しても、有意な差異は認められず、母乳中のナイアシン含量は成熟乳では比較的一定に維持されているものと思われた。母乳中のナイアシンの存在形態であるが、今回の実験により、20%程度が遊離型で80%程度は補酵素型で存在しているものと推定された。NAD はそのままの形では吸収されず、消化管腔内で  $\text{NAD} \rightarrow \text{ニコチンアミド} + \text{ADP-リボース}$  に加水分解され、遊離型のニコチンアミドとなった後に吸収されるものと思われる<sup>19)</sup>。この意義については、今後の課題である。

### 3. パントテン酸

前報<sup>5)</sup>において、報告したように、母乳中の総パントテン酸含量は、補酵素型のパントテン酸を検定菌である *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 が利用可能な形であるパントテン酸に変換する処理方法の違いにより、値が大きくことなることを明らかにした。今回、母乳中の遊離型のパントテン酸含量を測定し、遊離型率を求めた結果、約60%が遊離型として存在していることを明らかにした。前報<sup>5)</sup>では、遊離型の占める割合は約70%であった。従来法のパイン・ジアスターゼ前処理法を用いた方法では、著者らが用いたアミダーゼ・ホスファターゼ前処理法に比べ、約半分の値を示したことから、母乳中のパントテン酸誘導体はパイン・ジアスターゼ前処理ではほとんどが遊離型のパントテン酸に変換されていないことを意味する。これまでに報告されている母乳中の総パントテン酸含量と比較すると、今回の値は、6.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、Jonhson ら<sup>20)</sup>の値に近いものであった。Jonhson ら<sup>20)</sup>は、母乳中の総パントテン酸含量と摂取パントテン酸量とは相関関係があると報告している。

### 4. 葉酸

母乳では、葉酸はモノグルタミン酸型で大量に含まれている。授乳婦における葉酸の減少による母乳の葉酸含量の低下はほとんど見られず、母乳の葉酸レベルは保たれている。このため、たとえビタミン欠乏になっても、母乳栄養児で葉酸の欠乏による

貧血は報告されていない<sup>21,22)</sup>。

これまでの報告で、母乳中の葉酸量はコンジュガーゼ処理の有無によって異なっている。1980年以前の報告では、酵素処理をしない場合には、0.3-32 $\text{ng}/\text{ml}$ であるのに対して<sup>23,24)</sup>、酵素処理をすると52-64 $\text{ng}/\text{ml}$ であると報告されている<sup>25,26)</sup>。American Academy of Pediatrics<sup>27)</sup>においても、母乳の葉酸濃度は2-50 $\text{ng}/\text{ml}$ である、と示している。

酵素処理を行なう場合には、コンジュガーゼのみと、コンジュガーゼに加え、 $\alpha$ -ミラーゼとプロテアーゼを組み合わせることがあり、この方法を3酵素処理法と呼ばれている。Lim ら<sup>28)</sup>は、42名の健康な女性を対象として、授乳3ヶ月後と6ヶ月後に母乳を採取し、酵素処理の違いによる分析法を比較している。この結果、3酵素処理では、葉酸コンジュガーゼ単独処理と比較して、85%の葉酸の増加が得られている。つまり、母乳中の葉酸濃度は授乳後3ヶ月と6ヶ月で差異は認められず、単独処理では平均46.5 $\pm$ 2.3 $\text{ng}/\text{ml}$ であったが、3酵素処理では86.0 $\pm$ 2.5 $\text{ng}/\text{ml}$ であり、3酵素処理の有用性を示唆している。

Tamura ら<sup>29)</sup>は、健康に発育している乳児 (3-25週齢) を出産した39名の健常な日本人女性から母乳を採取して、葉酸量をコンジュガーゼ処理して検討した。この結果、母乳中の総葉酸量は平均141.4 $\text{ng}/\text{ml}$ であり、遊離型葉酸は約40%であった。並行して、この内16名の女性にプレロイルモノグルタミン酸1 $\text{mg}/\text{日}$ を4週間負荷した後に母乳を採取して、葉酸の影響を検討したが、葉酸を投与前後でそれぞれ130.2 および136.6 $\text{ng}/\text{ml}$ と、母乳中の葉酸濃度に変化は見られなかった。なお、この濃度から算出した場合、1日あたりの摂取量は57-165 $\mu\text{g}$ と推定される。

Smith ら<sup>30)</sup>の報告では、11名の授乳婦 (23-38歳) から授乳後6週および12週で採取した132サンプルの1酵素処理で分析したところ、母乳の総葉酸量は平均78.9 $\text{ng}/\text{ml}$ であり、遊離型は58%であった。なおこれらの授乳婦は妊娠中に葉酸0.8-1 $\text{mg}$ が含まれているビタミンミネラルサプリメントを摂取していた。なお、この結果から乳児の摂取量を算出すると、6週齢および12週齢でそれぞれ45.5 および

50.5 $\mu$ g/日となり、Tamuraらの報告と比べ低値である。

Smithら<sup>31)</sup>は満期産の乳児67名の葉酸について出生から1年間観察した。生後6週と3ヶ月において採取した母乳の葉酸量は平均85 $\mu$ g/mlであった。これらの時期において、乳児14名の葉酸摂取量(約65および70 $\mu$ g/日)は同じであったが、母乳からの葉酸摂取量は、6ヶ月(85 $\mu$ g/日)では増加したが、9ヶ月(50 $\mu$ g/日)では減少していた。

井戸田ら<sup>8)</sup>は、全国46地区に在住する17-41歳の授乳婦2,434名から得た母乳2,727サンプルの葉酸量をHPLC法で分析した。母乳の葉酸濃度は、採乳時期により平均3.2-5.4ng/mlの範囲にあり、初乳から移行乳、成熟乳と増加し、その後減少することを示している。

MackeyおよびPicciano<sup>32)</sup>は、授乳婦42名に葉酸サプリメント0mgあるいは1mgを与え、分娩後3ヶ月と6ヶ月後に母乳や母親の葉酸の状態を検討した。これらの結果、サプリメントを摂取していない場合、母乳葉酸量は、3ヶ月に比べ、6ヶ月では有意に減少していた。しかしながら、葉酸サプリメントを与えている場合には母乳葉酸量の減少は認められていない。なお、これらの葉酸量から3ヶ月および6ヶ月における母乳からの葉酸摂取量は、それぞれ62 $\mu$ gおよび55 $\mu$ g/日(母乳以外から14 $\mu$ g)である。

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-では、平均的な母乳の葉酸量を54 $\mu$ g/l、平均母乳量を0.75l/日として、0-5ヶ月の乳児の所要量を40 $\mu$ g/日としている<sup>1)</sup>。一方、食事摂取基準2005年においては、日本人の成熟乳の葉酸値として、54 $\mu$ g/lが採用され、哺乳量0.78lから、目安量は0-5ヶ月の乳児で42 $\mu$ g/日、6-11ヶ月の乳児で63 $\mu$ g/日とされた。

## 5. 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みると、まず母乳中のビオチンの生物有効性を知るために、Heardら<sup>33)</sup>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 $\pm$ 2.0ng/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Johnson<sup>34)</sup>は、同位体希釈法を利用して、母乳を酸加水分解した後に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 $\pm$ 37ng/100mlであるのに対して、7日目および49日目では681 $\pm$ 58ng/100mlおよび1246 $\pm$ 81ng/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 $\mu$ 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 $\mu$ 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<sup>35)</sup>は母乳を酸加水分解した後にビオチン量を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 $\mu$ g/100mlと増加している。Fordら<sup>36)</sup>の報告でも、満期産(39週以降)の母乳をみると、0.21、2.21、5.33ng/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 $\pm$ 0.42 $\mu$ g/100gであった<sup>37)</sup>。

Hiranoら<sup>38)</sup>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<sup>39)</sup>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 $\pm$ 2.1ng/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<sup>33)</sup>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<sup>40)</sup>はパ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ヵ月後ではビオチン量は4.5μg/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0.1μg/100ml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0.5μg/100ml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3.9μg/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<sup>15)</sup>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<sup>1)</sup>。これまでの各国における報告から、成熟乳のビオチン量は平均6μg/lである、としている<sup>2)</sup>。この値に基づき、一日の哺乳量が750mlとして、0~5ヶ月乳児におけるビオチン摂取量を4.5μg/日としている。0-5ヶ月の乳児で、5μg/日、6-11ヶ月の乳児で6μg/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収載されていない。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。食事摂取基準2005年においては、日本人の成熟乳の値として、5.2μg/lが採用され、哺乳量0.78lから目安量は0-5ヶ月の乳児で4μg/日、6-11ヶ月の乳児で10μg/日とされた。

#### 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. 厚生省(1999)第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-平成11年6月
2. Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic acid, Biotin, and Choline. *National Academy Press*, Washington DC
3. 財団法人日本食品分析センター編集(2002)分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説. pp.178-183, 中央法規, 東京
4. Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 424, 23-28.