

図2. 紫外線曝露前後の血清中の葉酸量の変化

数値は平均値±SEM (n=9) で示した.

\* Student-t 検定の結果,  $p < 0.05$  で有意な差異が認められた.

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

### 2. 食パンを主食としたときの水溶性ビタミンの生体利用率の検討

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

1 日食事に含まれる水溶性ビタミンの生体利用率を簡便に推測する新規な方法を提案する。生体利用率とは、消化・吸収率と体内利用率の両者を合わせた概念であり、1 日に摂取した水溶性ビタミン量と 1 日尿中に排泄された水溶性ビタミン量との関係から求めた。食パンを主食としたときの 1 日食事（試験食）中の水溶性ビタミンの生体利用率を、ヒトを用いて測定した。実験期間は 13 日間である。食事摂取基準に示された量の栄養素をほぼ含む試験食を 5 日間摂取させた（特に水溶性ビタミンには配慮した）。実験第 5 日の 1 日尿を採取し、水溶性ビタミンの分析を行い、データ 1 とした。実験第 6 日～7 日は、被験者の負担を軽減させるために自由食を摂取させた。但し、次の実験データを得るために、水溶性ビタミン混合剤を摂取させた。第 2 週目の第 1 日から第 5 日は試験食＋水溶性ビタミン混合剤を摂取させた。実験第 5 日の 1 日尿を採取し、水溶性ビタミンの分析を行い、データ 2 とした。生体利用率は次のように計算した。ビタミン B<sub>1</sub> を例に説明する。A = (データ 2 のビタミン B<sub>1</sub> 値 - データ 1 のビタミン B<sub>1</sub> 値) / 水溶性ビタミン混合剤のビタミン B<sub>1</sub> 量。B = (データ 1 のビタミン B<sub>1</sub> 値) / 試験食中のビタミン B<sub>1</sub> 量。生体利用率 (%) = (B/A) × 100 から計算した。

## A. 目的

学生を対象とした食事調査によれば、食パンは主要な糖質・たんぱく質供給源であると同時に、B群ビタミン（特に、ビタミンB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、ナイアシン、パントテン酸、ビオチン）の供給源ともなっている。五訂日本食品標準成分表の値は、食品中に含まれる結合型のB群ビタミンを *in vitro* において強制的に遊離型にした後、測定した値であり、生体利用率（消化率・吸収率などを考慮したもの）は全く考慮されていない。一方、食事摂取基準の値は生体利用率を考慮した値を策定する方向に動いている。「成分表」と「食事摂取基準」との間の整合性を保つことは、国民に質の高い健康・栄養をもたらすために必要・不可欠なことである。以前の研究で、平均的な混合食におけるビタミンB<sub>6</sub>の生体利用率は75%と報告されている<sup>1)</sup>。また、食事中のビタミンB<sub>12</sub>の吸収率は健康な人では約50%と評価されているが、大量投与（ $\geq 500\mu\text{g}$ ）されたとき、その吸収率は顕著に減少する<sup>2) 3)</sup>。また、食事中の葉酸の生体利用率は50%程度と評価されている<sup>4)</sup>。

そこで、食パンを主食としたときの水溶性ビタミンの生体利用率を、ヒトを被験者として調べた。

## B. 実験方法

### 1. 被験者

被験者は、あらかじめ実験内容の説明を受け、書類にて、実験への参加を希望した19歳～24歳の男子学生7名および22歳～25歳の女子学生10名で、喫煙、飲酒の習慣がなく、朝食など規則正しい食習慣をもつ者である。男性において、年齢は $20.7\pm 2.0$

歳（平均値 $\pm$ SD,  $n=7$ ）身長は $172\pm 6$  cm、体重は $63.3\pm 6.9$  kg、BMIは $21.5\pm 1.8$ であり、女性において、年齢は $22.7\pm 1.2$ 歳（平均値 $\pm$ SD,  $n=10$ ）、身長は $157\pm 4$  cm、体重は $49.4\pm 5.6$  kg、BMIは $20.0\pm 1.7$ であった。本研究は、滋賀県立大学倫理審査委員会および独立行政法人国立健康・栄養研究所倫理審査委員会において承認を受け、ヘルシンキ宣言の精神に則って行われたものである。

### 2. 実験期間

13日間である。男性においては、日本人の食事摂取基準（2005年版）の身体活動レベルI、18～29歳男性の食事摂取基準に従い、エネルギー2300kcalとなるような献立を作成し、それに基づいた食事を、被験者に摂取させた。用いた試験食とその栄養素量はTable 1に示したとおりである。全食品に対する食パンの比率は、エネルギーは52.9%、たんぱく質は43.7%、脂質は27.4%、炭水化物は68.9%であった。水溶性ビタミンにおいて、食パン由来が占める割合は、ビタミンB<sub>1</sub>が4.2%、ビタミンB<sub>2</sub>が15.9%、ビタミンB<sub>6</sub>が11.0%、ナイアシン当量が46.3%、パントテン酸が25.3%、葉酸が21.3%、ビオチンが12.2%、ビタミンCが0%であった。

また、女性においては、第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—の生活活動強度II、18～29歳女性の食事摂取基準に従い、エネルギー1800kcalとなるような献立を作成し、それに基づいた食事を、被験者に摂取させた。用いた試験食とその栄養素量はTable 2に示したとおりである。全食品に対するパンの比率は、エネルギーは59.4%、たんぱく質は50.4%、脂質は55.6%、

炭水化物は 61.7%であった。水溶性ビタミンにおいて、パン由来が占める割合は、ビタミン B<sub>1</sub>が 23.2%、ビタミン B<sub>2</sub>が 15.4%、ビタミン B<sub>6</sub>が 10.7%、ナイアシン当量が 38.2%、パントテン酸が 33.7%、葉酸が 22.5%、ビオチンが 42%、ビタミン C が 0%であった。

### 3. 実験計画

実験計画の概略を Fig. 1 に示した。実験開始日を Day 1 とした。1 日のスケジュールは、実験期間中、6 時起床、6 時 30 分～7 時に朝食、男性は 12 時から、女性は 13 時から昼食、男性は 18 時 30 分から、女性は 18 時から夕食、23 時就寝とし、間食の摂取時間は自由にさせた。水はミネラルウォーターを自由摂取とした。Day 1～Day 5 は Table 1, 2 に示した試験食を摂取させた。Day 6 と Day 7 は被験者の負担軽減を考慮し、自由食とした。ただし、Table 3, 4 に記載したビタミン混合剤を食後 3 回服用させた。Day 8～Day 12 は再び、Table 1, 2 に記載した試験食を摂取させ、引き続き、Table 3, 4 に記載したビタミン混合剤を食後 3 回服用させた。

Day 5 の 2 回目の尿～翌日の Day 6 の 1 回目までの尿を蓄尿し、これを Day 5 の 1 日尿とした（1 回ごとの尿は、氷中で保存した）。蓄尿終了後、容量を測定し、ビタミンごとに Table 5 に示した安定化操作を行い、使用するまで -20℃で保存した（この時に得られた尿中の水溶性ビタミン含量を測定し、Data 1 とした）。

Day 6 の 1 回目の尿を採取した後（この排尿時間は、朝食前で 6 時～7 時であった）、生体利用率を計算するデータを得るために、Table 3, 4 に示した水溶性ビタミン混合剤

を 1 日 3 錠、食後に 1 錠ずつ摂取させた。Day 12 に尿を採取し、Day 5 の尿と同じ操作を行った（この時に得られた尿中の水溶性ビタミン含量を測定し、Data 2 とした）。すなわち、Day 12 の 2 回目の尿～翌日の Day 13 の 1 回目の尿を採取した。Day 13 の 1 回目の尿の採取で実験終了とした。

### 4. 分析方法

(1) 食事中の水溶性ビタミンの測定用試料の作成方法

ビオチン以外は、五訂日本食品標準成分表分析マニュアル<sup>5)</sup>にしたがって行った。

(2) 尿中の水溶性ビタミンの測定試料の作成方法

1 日尿を採取した後、Table 5 に示した処理を行い、安定化させた。これらの尿を使用するまで -20℃で保存した。測定する際に、解凍し、その解凍した尿を、微生物を利用して測定したビタミンは直接使用した。HPLC を利用して測定したビタミンは、0.45 μm のフィルターでろ過したろ液を使用した。

(3) 測定方法

#### ビタミン B<sub>1</sub>

定量の標準品として使用したチアミン塩酸塩は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。食事中および尿中のビタミン B<sub>1</sub> は、文献 6 に示した HPLC 法で行った。

#### ビタミン B<sub>2</sub>

定量の標準品として使用したルミフラビンは Sigma から、リボフラビンは和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。食事中のビタミン B<sub>2</sub> の測定は、文献 7 に記載された方法により、ルミフラビンに変換した後、HPLC にて測定した。尿中のビタミン B<sub>2</sub> は、文献 8 に記載された HPLC 法に従っ

て測定した。

#### ビタミン B<sub>6</sub>

定量の標準品として使用したピリドキシン塩酸塩は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。 *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 9080 を用いた微生物定量法を用いて、食事中のビタミン B<sub>6</sub> 量を測定した<sup>9,10</sup>。

#### ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物 4-ピリドキシン酸

定量の標準品として使用した 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) は Sigma Chemical Company (米国) から購入した。 定量方法は文献 11 に記載された HPLC 法を用いて測定した。

#### ナイアシン

定量の標準品として使用したニコチン酸は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いて、食事中的ナイアシン含量を測定した<sup>12</sup>。

#### ナイアシンの異化代謝産物 MNA, 2-Py, 4-Py

*N*-メチルニコチンアミド (MNA) 定量の標準品として使用した MNA 塩酸塩は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。 尿中の MNA の定量は、MNA を強アルカリ性下でアセトフェノンと縮合させることにより蛍光物質に変換した後測定する HPLC 法を用いた<sup>13</sup>。

*N*-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py) 定量の標準品として使用した 2-Py は Pullman と Colowick<sup>14</sup> の方法にしたがって合成した。 *N*-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) 定量の標準品として使用した 4-Py は Shibata ら<sup>15</sup> の方法にしたがって合成した。 尿中の 2-Py および 4-Py

は弱アルカリ性下で、ジエチルエーテルで抽出後、HPLC で同時定量する方法を用いた<sup>15</sup>。

#### パントテン酸

定量の標準として利用したパントテン酸カルシウムは和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。 *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 を用いる微生物学的定量方法を用いた<sup>16</sup>。

#### 葉酸

定量の標準として利用したプテロイルモノグルタミン酸は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。 *Lactobacillus casei* ATCC 2773 を用いた微生物定量法を用いて測定した<sup>17</sup>。

#### ビオチン

定量の標準として利用した D-ビオチンは和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物定量法を用いて測定した<sup>18</sup>。

#### ビタミン B<sub>12</sub>

定量の標準として利用したシアノコバラミンは和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。 *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<sup>19</sup>。

#### ビタミン C

定量の標準として利用した L-アスコルビン酸は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。 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<sup>20</sup>。

### 5. 生体利用率の計算方法

化学合成した水溶性ビタミンは遊離型で

あるので、生体利用率を 100%とする。つまり、 $\{(Data\ 2 - Data\ 1) / \text{添加したビタミン量}\}$  の値を 100%とした。したがって、次式の

$$\frac{(Data\ 1 / \text{食品からのビタミン摂取量})}{\{(Data\ 2 - Data\ 1) / \text{付加したビタミン量}\}} \times 100$$
から、得られた値を生体利用率とした。

### C. 結果

Table 6 に、Tables 1, 2 に示した献立の食事を摂取させた時の水溶性ビタミンの生体利用率をまとめて示した。

#### 1. ビタミン B<sub>1</sub>

生細胞中のビタミン B<sub>1</sub> のほとんどは補酵素型のチアミン二リン酸 (Thiamin diphosphate = TDP) として存在し、酵素タンパク質と結合した状態で存在している。生細胞を加工して食する状態になった時に、何%が遊離型となっているかは不明であるが、かなりの量がそのままの状態であるものと推定される。したがって、血液中に吸収される前に、消化が必要である。例えば、食品中の総チアミン含量を測定するときには、食品を終濃度 0.1% タカジアスターゼ B (ホスファターゼの力価が強い) 溶液中で、37°C で 1 晩消化処理を行い、遊離型のチアミンに変換した後、測定する。つまり、食品中のビタミン B<sub>1</sub> がどの程度消化されるかによって、生体が利用できるビタミン B<sub>1</sub> の量が決まる。酵素タンパク質から遊離した TDP は消化管内ではホスファターゼによりピロリン酸がはずれ、遊離型のチアミンとなったのち、吸収される。しかしながら、この生体利用率を網羅的に検討した報告は見あたらない。

今回検討した食事メニューにおける生体利用率は、遊離型のチアミンの生体利用率を 100% とすると、男性で  $72.2 \pm 20.3\%$ 、女性で  $59.5 \pm 23.8\%$  であった。

#### 2. ビタミン B<sub>2</sub>

生細胞中のリボフラビンは、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) あるいはフラビンモノヌクレオチド (FMN) として補酵素タンパク質に結合している。生細胞を加工して食する状態になった時に、何%が遊離型となっているかは不明であるが、かなりの量がそのままの状態であるものと推定される。食品中の総リボフラビン含量を測定するときには、食品抽出液に光照射を行い、リボフラビン、FMN、FAD をルミフラビンに分解した後、測定する。実際の消化管内では、胃酸環境下で、酵素タンパク質の変性にともない FAD は遊離する。一部の FAD はリン酸がとれて FMN となるが、脱リン酸は、小腸粘膜の非特異的ピロホスホリラーゼやホスファターゼにより小腸腔内で FMN を経由し加水分解され、遊離のリボフラビンとなり吸収される。生体利用率については、特に参考となる資料はない。

今回検討した食事メニューにおける生体利用率は、遊離型のリボフラビンの生体利用率を 100% とすると、男性で  $30.3 \pm 11.1\%$ 、女性で  $52.0 \pm 21.5\%$  であった。

#### 3. ビタミン B<sub>6</sub>

動物の生細胞中に含まれるビタミン B<sub>6</sub> の多くは、リン酸化体であるピリドキサルリン酸 (PLP) やピリドキサミンリン酸 (PMP) である。この生細胞を加工して食する状態になった時に、何%が遊離型となっているかは不明であるが、かなりの量がそのままの状態であるものと推定される。

食品中の総ビタミン B<sub>6</sub>を測定するときには、塩酸酸性化で3時間、オートクレーブすることにより、PLPやPMPのリン酸基を切断し、遊離型にした後、測定する。実際の消化管内では、これらは、小腸粘膜のホスファターゼにより遊離のピリドキサル(PL)、ピリドキサミン(PM)となる。一方、植物に含まれるピリドキシン5'-β-グルコシド(PNG)は、消化管内で一部が加水分解を受け、ピリドキシン(PN)を遊離する。これら遊離のビタミン B<sub>6</sub>は吸収された後 PLキナーゼによりリン酸化型に変換される。ピリドキシンリン酸(PNP)とPMPは、さらにPNP/PMPオキシダーゼによりPLPに変換される。PLPは血液中では、アルブミンに結合しておりホスファターゼによる脱リン酸化を免れているが余剰分については脱リン酸化を受けPLとなる。PLはアルデヒドオキシダーゼにより4'-ピリドキシン酸(4-PIC)に変換される。4-PICは、ビタミン B<sub>6</sub>効力を持たず、あとは排泄されるのみである。PNGはPNの供給源であり、そのままでも吸収されるが、生体内での加水分解は僅かであり、尿中へも排泄される。PNGの生体利用率は、人においては50%と見積もられている<sup>21)</sup>。

今回検討した食事メニューにおける生体利用率は、遊離型のピリドキシンの生体利用率を100%とすると、男性で109.2±16.0%、女性で79.5±19.0%であった。

#### 4. ビタミン B<sub>12</sub>

ビタミン B<sub>12</sub>は動物性食品に含まれ、タンパク質と結合している。この生細胞を加工して食する状態になった時に、何%が遊離型となっているかは不明であるが、かなりの量がそのままの状態であるものと推定

される。食品中のビタミン B<sub>12</sub>を測定するときには、食品抽出液中の補酵素型のビタミン B<sub>12</sub>をシアン化カリウムでシアノコバラミンとして安定化した状態で抽出操作を行い、測定している。実際の消化管内では、胃酸や消化酵素の作用で遊離し、胃から分泌される内因子(intrinsic factor)と結合して消化管から吸収される。高齢者などの胃酸分泌の低い者<sup>22,23)</sup>、消化管切除者では食品からの生体利用率が減少する。ビタミン B<sub>12</sub>は胆汁を介して糞便へ排泄されるが、胆汁中に排泄されたビタミン B<sub>12</sub>は腸肝循環により再吸収される<sup>24)</sup>。今回の実験方法では、ビタミン B<sub>12</sub>の生体利用率を求めることはできないので、実施しなかった。

#### 5. ナイアシン

ナイアシンは生細胞内では主に補酵素型のNAD(P)として存在するが、細胞の死にともない、急激な速度で分解される。食品として摂取するときにはNAD(P)が分解され、動物性食品ではニコチンアミド、植物性食品ではニコチン酸として存在する。食品中の総ナイアシンを測定するときには、食品抽出液を中性条件で10分間、オートクレーブしたのち、測定する。実際の消化管内では、食品中にNAD(P)が残っていたとしてもニコチンアミドに分解される。ニコチンアミド、ニコチン酸は小腸で受動拡散によって吸収される。穀物中のナイアシンの多くは難消化性の結合型ナイアシン(ナイアシチンとよばれている)として存在する<sup>25)</sup>。

今回検討した食事メニューにおける生体利用率は、遊離型のニコチンアミドの生体利用率を100%とすると、男性で73.7±15.1%、女性で57.1±20.9%であった。

## 6. パントテン酸

生細胞中のパントテン酸の存在形態は遊離型のパントテン酸よりコエンザイム A (CoA) やパンテテイン誘導体のような補酵素型が多い。したがって、食事として摂取するパントテン酸は、主として CoA やパンテテイン誘導体の形が多い。食品中の総パントテン酸を測定するときには、食品抽出液をホスファターゼ・葉酸パンテテイナーゼ処理を行ったのち、測定する。実際の消化管内でも、ホスファターゼとパンテテイナーゼによって、パントテン酸に加水分解された後吸収される。しかしながら、パントテン酸の生体利用率に関する報告が十分でない。

今回検討した食事メニューにおける生体利用率は、遊離型のパントテン酸カルシウムの生体利用率を 100%とすると、男性で  $118.6 \pm 41.9\%$ 、女性で  $98.7 \pm 25.5\%$ であった。

## 7. 葉酸

生細胞中の葉酸（プテロイルモノグルタミン酸）のほとんどは補酵素型のテトラヒドロ葉酸のポリグルタミン酸型として存在し、酵素タンパク質と結合した状態で存在している。生細胞を加工して食する状態になった時に、何%が遊離型となっているかは不明であるが、かなりの量がそのままの状態であるものと推定される。食品中の総葉酸を測定するときには、食品抽出液をアミラーゼ・プロテアーゼ・葉酸コンジュガーゼ処理をおこなったのち、測定する。実際の消化管内では、酵素タンパク質から遊離した THF 空腸刷子縁膜に存在する葉酸コンジュガーゼまたはプテロイルポリグルタメートか水分が酵素によって、モノグルタミン酸型となった後、吸収される。

今回検討した食事メニューにおける生体利用率は、遊離型の葉酸（プテロイルモノグルタミン酸）の生体利用率を 100%とすると、男性で  $46.6 \pm 30.1\%$ 、女性で  $60.2 \pm 29.3\%$ であった。

## 8. ビオチン

生細胞中のビオチンはほとんどがリジンと結合（ビオシチン,  $\epsilon$ -N-Biotinyl-L-lysine）し、さらに他のアミノ酸とのペプチド結合によってタンパク質に結合した形で存在する。生細胞を加工して食する状態になった時に、何%が遊離型となっているかは不明であるが、かなりの量がそのままの状態であるものと推定される。食品中の総ビオチンを測定するときには、食品抽出液を硫酸酸性化で 1 時間オートクレーブしたのち、測定する。実際の消化管内では、タンパク質結合型ビオチンはまずタンパク質分解を受け、ビオシチンやビオチニルペプチドとなり、これらが最終的に膵臓由来のビオチニダーゼによって加水分解され、ビオチンが遊離し、吸収される。しかしながら、食品の消化率、ビオチン遊離率、腸管吸収率などを系統的に検討したデータはない。

今回検討した食事メニューにおける生体利用率は、遊離型のビオチンの生体利用率を 100%とすると、男性で  $88.5 \pm 37.4\%$ 、女性で  $98.8 \pm 24.3\%$ であった。

## 9. ビタミン C

ビタミン C は、消化管から吸収されて速やかに血中に送られる。食事から摂取したビタミン C もサプリメントから摂取したビタミン C も、その生体利用率に差異はなく、その吸収率は、30~180mg/日程度までは 70~90%と高く<sup>26)</sup>、摂取量が 1g/day 以上になると、吸収率は 50%以下になる。



今回検討した食事メニューにおける生体利用率は、遊離型のビタミンCの生体利用率を100%とすると、男性で119.6±28.3%、女性で101.9±18.0%であった。

#### D. 考察

食パンを主食とした時の水溶性ビタミンの生体利用率を、尿中に排泄されるビタミン量から求めた。ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>の生体利用率を求めた報告は見あたらないが、ビタミンB<sub>1</sub>は、男女とも一般的に想像していた数値である60~70%程度であった。

ビタミンB<sub>2</sub>は、男女とも一般的に想像していた数値である70%程度よりも低い数値であった。さらに、被験者の性別、年齢階層を変えた実験が必要である。

ビタミンB<sub>6</sub>は、2005年度から2009年度にかけて使用される「日本人の食事摂取基準(2005年版)」では75%という数値が採択されたが<sup>27)</sup>、今回の実験では、男性では109.2±16.0%程度と高い値であり、女性では79.5±20.9%程度とほぼ同じ値が得られた。

葉酸に関しては、同じく50%という数値が採択されたが<sup>27)</sup>、今回は、男性では46.6±30.1%、女性では60.2±29.3%という数値であり、ほぼ同じ値であった。

ナイアシンは、男性で73.7±15.1%、女性で57.1±20.9%の生体利用率であった。

パントテン酸、ビオチン、ビタミンCの生体利用率は、食品を起源としても、遊離型、いわゆるサプリメント型のビタミンと変わらず、約100%であった。

#### E. 健康危険情報

特記する情報はない。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 口頭発表  
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. Tarr JB, Tamura T, and Stokstad EL, Availability of vitamin B<sub>6</sub> and pantothenate in an average American diet in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 1328-1337 (1981).
2. Heyssel RM, Bozian RC, Darby WJ, and Bell MC, Vitamin B<sub>12</sub> turnover in man. The assimilation of vitamin B<sub>12</sub> from natural foodstuff by man and estimates of minimal daily dietary requirements. *Am. J. Clin. Nutr.*, **18**, 176-184 (1966).
3. Boddy K and Adams JF, Excretion of cobalamins and coenzyme B<sub>12</sub> following massive parenteral doses. *Am. J. Clin. Nutr.*, **21**, 657-664 (1968).
4. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. The B vitamins and choline: overview and methods. *In: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: For thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B<sub>6</sub>, folate, vitamin B<sub>12</sub>, pantothenic Acid, biotin, and choline.* National Academy Press, Washington, DC. 1998, 196-305.

5. 科学技術庁資源調査会食品成分部会編, 五訂日本食品標準成分表分析マニュアル, 社会法人資源協会, 東京, 1997.
6. Kimura M, Fujita T, and Itokawa Y, Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29-31 (1982).
7. Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K, A simple method for micro-determination of flavin in human and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem. Int.*, **4**, 187-194 (1982).
8. Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K, New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628 (1983).
9. 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) .
10. Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis, 15<sup>th</sup> ed., Helrich, K. ed. (AOCA, Inc., Arlington, VA, USA) , p. 1089 (1990).
11. Gregory JF 3<sup>rd</sup> and Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.* , **32**, 879-883 (1979).
12. Taguchi H, Ohshima N, and Shibata K, Relative activity of pyridine nucleotides to nicotinic acid as niacin nutriture in *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 164-165 (1996).
13. Shibata K, Ultramicro-determination of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins*, **61**, 599-604 (1987).
14. Pullman ME, Colowick SP. Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide *J. Biol. Chem.*, **206**, 121-127 (1954).
15. Shibata K, Kawada T, and Iwai K, 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 (1988).
16. Skeggs HR and Wright LD, The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26 (1944).
17. Tamura T, Microbiological assay of folates. In *Folic Acid Metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol. 13 (Picciano MF, Stolstad ELR, and Gregory JF, III, eds) pp. 121-137, Wiley-Liss, New York, USA, 1990.
18. 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).
19. 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 B<sub>12</sub> degradation product formed during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5177-5180 (1998).
20. Kishida K, Nishimoto Y, and Kojo S,

- Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **64**, 1505-1507 (1992).
21. Gregory JF 3<sup>rd</sup>, Bioavailability of vitamin B<sub>6</sub>. *Eur J Clin Nutr*, **51**., S43-S48 (1997).
  22. Krasinski SD, Russell RM, Samloff IM, Jacob RA, Dallal GE, McGandy RB and Hartz SC, Fundic atrophic gastritis in an elderly population. Effect on hemoglobin and several serum nutritional indicators. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **34**, 800-806 (1986).
  23. Scarlett, JD, Read H, and O'Dea K, Protein-bound cobalamin absorption declines in the elderly. *Am. J. Hematol.*, **39**, 79-83 (1992).
  24. el Kholty S, Gueant, JL, Bressler L, Djalali M, Boissel P, Gerard P, and Nicolas JP, Portal and biliary phases of enterohepatic circulation of corrinoids in humans. *Gastroenterology*, **101**, 1399-1408 (1991).
  25. Carter EG, Carpenter KJ. The bioavailability for humans of bound niacin from wheat bran. *Am. J. Clin. Nutr.*, **36**, 855-861 (1982).
  26. Kallner A, Hartmann D, and Hornig D, Steady-state turnover and body pool of ascorbic acid in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 530-539 (1979).
  27. 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，平成16年10月，厚生労働省

Table 1 試験食と栄養素摂取量 (男性)

|                                       |  |       |        |       |        |
|---------------------------------------|--|-------|--------|-------|--------|
| 朝食                                    | 食パン (120g), マーガリン, 野菜ジュース, ミニトマト, ハム, ゆで卵            |       |        |       |        |
| 昼食                                    | 食パン (120g), イチゴジャム, おろしハンバーグ, キャベツ, ゆで卵              |       |        |       |        |
| 夕食                                    | 食パン (120g), マーガリン, ホタテのトマトスープ, ほうれん草の炒め物, 温州ミカン, ゆで卵 |       |        |       |        |
| 間食                                    | 食パン (120g), ブルーベリージャム, グレープフルーツジュース                  |       |        |       |        |
| 栄養素摂取量                                | 朝食   | 昼食    | 夕食     | 間食    | 総計     |
| エネルギー (kcal)                          | 604.4  | 625.3 | 736.5  | 431.5 | 2397.6 |
| たんぱく質 (g)                             | 25.2   | 28.3  | 35.8   | 13.0  | 102.2  |
| 脂質 (g)                                | 22.2   | 22.8  | 26.6   | 5.6   | 77.2   |
| 炭水化物 (g)                              | 74.9   | 74.1  | 91.8   | 84.6  | 325.5  |
| 脂溶性ビタミン                               |  |       |        |       |        |
| ビタミン A (μg)                           | 300  | 106   | 1243   | 48    | 1697   |
| ビタミン D (μg)                           | 2  | 2     | 3      | 0     | 6      |
| ビタミン E (mg)                           | 3.4  | 1.8   | 8.9    | 1.5   | 15.6   |
| ビタミン K (μg)                           | 15   | 41    | 342    | 0     | 398    |
| 水溶性ビタミン <sup>1</sup>                  |  |       |        |       |        |
| ビタミン B <sub>1</sub> (mg チアミンとして)      | 0.17   | 0.21  | 0.19   | 0.32  | 0.90   |
| ビタミン B <sub>2</sub> (mg リボフラビンとして)    | 0.48   | 0.52  | 0.53   | 0.19  | 1.72   |
| ビタミン B <sub>6</sub> (mg ピリドキシンとして)    | 0.27   | 0.19  | 0.45   | 0.06  | 0.98   |
| ビタミン B <sub>12</sub> (μg シアノコバラミンとして) | 1.70   | 1.34  | 8.17   | 0     | 11.21  |
| ナイアシン当量 <sup>2</sup> (mg)             | 5.24   | 5.67  | 8.56   | 3.01  | 22.49  |
| D-パントテン酸 (mg)                         | 4.01   | 3.68  | 8.05   | 1.54  | 17.28  |
| 葉酸 (μg プテロイルモノグルタミン酸として)              | 65.19  | 77.19 | 174.79 | 26.18 | 343.35 |
| D-ビオチン (μg)                           | 20.03  | 22.13 | 26.03  | 2.15  | 70.34  |
| ビタミン C (mg L-アスコルビン酸として)              | 28.47  | 49.14 | 0.36   | 51.99 | 129.96 |
| ミネラル                                  |  |       |        |       |        |
| Na (mg)                               | 1019   | 1310  | 1668   | 603   | 4601   |
| K (mg)                                | 399  | 511   | 1710   | 528   | 3149   |
| Ca (mg)                               | 76   | 104   | 188    | 59    | 427    |
| Mg (mg)                               | 42   | 59    | 151    | 47    | 300    |
| P (mg)                                | 324  | 320   | 131    | 533   | 1309   |
| Fe (mg)                               | 2.1  | 3.0   | 5.4    | 1.0   | 11.5   |
| Zn (mg)                               | 2.2  | 3.0   | 4.9    | 1.0   | 11.1   |
| Cu (mg)                               | 0.23   | 0.29  | 0.59   | 0.24  | 1.35   |

<sup>1</sup> 水溶性ビタミンは実測値である。他の栄養素は五訂日本食品標準成分表を用いて計算した。

<sup>2</sup> ナイアシン当量は、たんぱく質中のトリプトファン含量が 1.1%, トリプトファン・ナイアシン転換率を重量比で 1/60 として計算した。

Table 2 試験食と栄養素摂取量 (女性)

| 朝食                                    | クロワッサン (65 g), 野菜ジュース, ミニトマト                |      |      |      |       |
|---------------------------------------|---|------|------|------|-------|
| 昼食                                    | 食パン (112.5 g), イチゴジャム, ツナ, おろしハンバーグ, キャベツ   |      |      |      |       |
| 夕食                                    | 食パン (112.5 g), ホタテのトマトスープ, ほうれん草の炒め物, 温州ミカン |      |      |      |       |
| 間食                                    | 食パン (75 g), ブルーベリージャム, グレープフルーツジュース         |      |      |      |       |
| 栄養素摂取量                                | 朝食  | 昼食   | 夕食   | 間食   | 総計    |
| エネルギー (kcal)                          | 388   | 527  | 545  | 325  | 1785  |
| たんぱく質 (g)                             | 9.7   | 19.5 | 27.0 | 8.6  | 64.8  |
| 脂肪 (g)                                | 19.2  | 16.3 | 13.5 | 3.6  | 52.6  |
| 炭水化物 (g)                              | 44.9  | 74.3 | 83.3 | 67.3 | 269.8 |
| 脂溶性ビタミン                               |   |      |      |      |       |
| ビタミン A (μg)                           | 111   | 22   | 478  | 1    | 612   |
| ビタミン D (μg)                           | 0   | 0    | 1    | 0    | 1     |
| ビタミン E (mg)                           | 2.0   | 1.1  | 6.5  | 1.3  | 10.9  |
| ビタミン K (μg)                           | 4   | 34   | 331  | 0    | 368   |
| 水溶性ビタミン <sup>1</sup>                  |   |      |      |      |       |
| ビタミン B <sub>1</sub> (mg チアミンとして)      | 0.22  | 0.15 | 0.37 | 0.13 | 0.87  |
| ビタミン B <sub>2</sub> (mg リボフラビンとして)    | 0.09  | 0.14 | 0.33 | 0.04 | 0.60  |
| ビタミン B <sub>6</sub> (mg ピリドキシンとして)    | 0.12  | 0.20 | 0.58 | 0.10 | 1.00  |
| ビタミン B <sub>12</sub> (μg シアノコバラミンとして) | 0.1   | 0.2  | 6.6  | 0    | 6.9   |
| ナイアシン当量 <sup>2</sup> (mg)             | 5.2   | 6.8  | 11.0 | 2.8  | 25.8  |
| D-パントテン酸 (mg)                         | 0.88  | 2.15 | 4.80 | 1.77 | 9.6   |
| 葉酸 (μg プテロイルモノグルタミン酸として)              | 11  | 35   | 99   | 16   | 161   |
| D-ビオチン (μg)                           | 11.1  | 9.9  | 15.8 | 4.2  | 41    |
| ビタミン C (mg L-アスコルビン酸として)              | 16  | 7    | 45   | 36   | 104   |
| ミネラル                                  |   |      |      |      |       |
| Na (mg)                               | 574   | 1075 | 1253 | 378  | 3280  |
| K (mg)                                | 242   | 425  | 1569 | 534  | 2771  |
| Ca (mg)                               | 20  | 73   | 146  | 45   | 284   |
| Mg (mg)                               | 20  | 49   | 139  | 38   | 246   |
| P (mg)                                | 129   | 199  | 412  | 94   | 834   |
| Fe (mg)                               | 0.7   | 1.9  | 4.2  | 0.7  | 7.4   |
| Zn (mg)                               | 0.7   | 2.1  | 4.0  | 0.6  | 7.5   |
| Cu (mg)                               | 0.10  | 0.24 | 0.52 | 0.17 | 1.03  |

<sup>1</sup> 水溶性ビタミンは実測値である。他の栄養素は五訂日本食品標準成分表を用いて計算した。

<sup>2</sup> ナイアシン当量は、たんぱく質中のトリプトファン含量が 1.1%, トリプトファン-ナイアシン転換率を重量比で 1/60 として計算した。

Table 3 使用したビタミン剤のビタミン含量 (男性)

| ビタミン名         | 1錠中の含量<br>(朝, 昼, 夕食後に服用.<br>1日では計3錠を服用) | 1日当たりの摂取量 |
|---------------|---|-----------|
| チアミン          | 0.63 mg                                 | 1.89 mg   |
| リボフラビン        | 1.27 mg                                 | 3.81 mg   |
| ピリドキシン        | 0.98 mg                                 | 2.94 mg   |
| ニコチンアミド       | 18.16 mg                                | 54.48 mg  |
| D-パントテン酸      | 11.1 mg                                 | 33.3 mg   |
| プテロイルモノグルタミン酸 | 0.25 mg                                 | 0.75 mg   |
| D-ビオチン        | 0.0296 mg                               | 0.0888 mg |
| L-アスコルビン酸     | 30 mg                                   | 90 mg     |

Table 4 使用したビタミン剤のビタミン含量 (女性)

| ビタミン名         | 1錠中の含量<br>(朝, 昼, 夕食後に服用.<br>1日では計3錠を服用) | 1日当たりの摂取量 |
|---------------|---|-----------|
| チアミン          | 0.52 mg                                 | 1.56 mg   |
| リボフラビン        | 1.14 mg                                 | 3.42 mg   |
| ピリドキシン        | 0.98 mg                                 | 2.94 mg   |
| ニコチンアミド       | 18.8 mg                                 | 56.4 mg   |
| D-パントテン酸      | 6.3 mg                                  | 18.9 mg   |
| プテロイルモノグルタミン酸 | 0.19 mg                                 | 0.57 mg   |
| D-ビオチン        | 0.023 mg                                | 0.069 mg  |
| L-アスコルビン酸     | 24 mg                                   | 72 mg     |

Table 5 尿中ビタミン測定のための安定化処置

| ビタミン名  | 安定化処置  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● ビタミン B<sub>1</sub></li> <li>● ビタミン B<sub>2</sub></li> <li>● ビタミン B<sub>6</sub> 異化代謝産物 (4-ピリドキシン酸)</li> <li>● ナイアシン異化代謝産物 (MNA, 2-Py, 4-Py)</li> </ul> | <p>1 mol/L HCl 0.9 ml を入れた凍結保存可能な試験管に採取した尿を 8.1 ml 加え, 混合後, -20°C で保存.</p>       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● パントテン酸,</li> <li>● ビオチン</li> <li>● ビタミン B<sub>12</sub></li> </ul>   | <p>凍結保存可能な試験管に採取した尿を 9 ml 加え, -20°C で保存.</p>                                     |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● 葉酸</li> </ul>   | <p>1 mol/L L-アスコルビン酸 0.9 ml を入れた凍結保存可能な試験管に採取した尿を 8.1 ml 加え, 混合後, -20°C で保存.</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● ビタミン C</li> </ul>   | <p>10%メタリン酸 4 ml を入れた凍結保存可能な試験管に採取した尿を 4 ml 加え, 混合後, -20°C で保存.</p>              |

Table 6 食パンを主食とした時の水溶性ビタミンの生体利用率

| ビタミン                | 生体利用率(%) (男性)<br>(mean±SD) | 生体利用率(%) (女性)<br>(mean±SD) |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| ビタミン B <sub>1</sub> | 72.2±20.3                  | 56.3±22.7                  |
| ビタミン B <sub>2</sub> | 30.3±11.1                  | 49.8±21.5                  |
| ビタミン B <sub>6</sub> | 109.2±16.0                 | 79.7±20.1                  |
| ナイアシン               | 73.7±15.1                  | 57.0±22.2                  |
| D・パントテン酸            | 118.6±41.9                 | 99.2±27.0                  |
| 葉酸                  | 46.6±30.1                  | 53.1±20.1                  |
| D・ビオチン              | 88.5±37.4                  | 97.1±25.1                  |
| ビタミン C              | 119.6±28.3                 | 103.0±18.7                 |

\* ビタミン B<sub>12</sub> の主要な排泄経路は尿中ではないため、尿中への排泄量の水溶性ビタミン付加前後の値を比較して、生体利用率を計算することはできないため、今回の実験では、ビタミン B<sub>12</sub> の生体利用率を求めることはできなかった。なお、参考値であるが、ビタミン B<sub>12</sub> の尿中排泄量は、食事性ビタミン B<sub>12</sub> の摂取量 1 $\mu$ g 当たり、男性で 7.5 pmol/日程度、女性で 40 pmol/日程度であった。排泄率（1日尿中へのビタミン B<sub>12</sub> 排泄量/1週間のビタミン B<sub>12</sub> 摂取量の1日当たりの平均値）は、男性で 1%程度、女性で 6%程度であった。



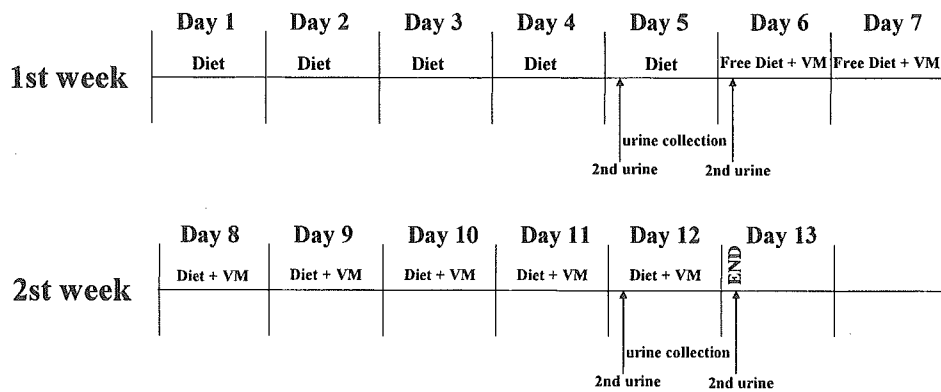


Fig. 1 実験計画の概略

Day 1 (月) ~ Day 5 (金) は Table 1 に示した試験食のみを摂取させた. Day 6 (土) と Day 7 (日) は自由食としたが, Table 2 に示したビタミン混合剤 (VM) を食後 3 回服用させた. Day 8 (月) ~ Day 12 (金) は再び Table 1 に示した試験食を摂取させ, さらに Table 2 に示したビタミン混合剤 (VM) を食後 3 回服用させた. 採尿は矢印で示したように, Day 5 (金) の 2 回目から Day 6 (土) の 1 回目の尿を蓄尿した. また, Day 12 (金) の 2 回目の尿から Day 13 (土) の 1 回目の尿を蓄尿した. 実験は, Day 13 (土) の 1 回目の採尿をもって終了とした.

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

### 3. 日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究協力者 廣瀬潤子 滋賀県立大学 助手

研究協力者 成田宏史 京都女子大学 教授

研究協力者 長尾早枝子 長尾助産院 院長

#### 研究要旨

わが国における母乳中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中の水溶性ビタミンの含量を分析した。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1～5ヶ月の乳児を完全哺育している日本人の母乳のべ139検体から得た。母乳中の母乳のビタミン B<sub>1</sub> 含量は  $0.14 \pm 0.06$  ( $\mu\text{g/ml}$ )、ビタミン B<sub>2</sub> 含量は  $0.27 \pm 0.08$  ( $\mu\text{g/ml}$ )、ビタミン B<sub>6</sub> 含量は  $105.70 \pm 54.06$  (ng/ml)、ビタミン B<sub>12</sub> 含量は  $0.94 \pm 0.52$  (ng/ml)、葉酸  $45.89 \pm 23.79$  (ng/ml)、ビオチン  $2.9 \pm 1.6$  (ng/ml)、パントテン酸  $8.0 \pm 3.9$  ( $\mu\text{g/ml}$ )、ナイアシン  $1.02 \pm 0.37$  ( $\mu\text{g/ml}$ )、ビタミン C  $46.56 \pm 11.11$  ( $\mu\text{g/ml}$ )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

乳児において、水溶性ビタミンの目安量を算出するためには、母乳中のビタミン含量が用いられている<sup>1)</sup>。

母乳にはたんぱく質、炭水化物および脂肪ばかりではなくビタミンやミネラルなどすべての栄養素が含まれている。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みられない。

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、水溶性ビタミン含量を分析し、乳児の食事摂取基準の資料とすることを目的として、実験を行い、一定の成果を得たので報告する。

## B. 実験方法

1. 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1~5ヶ月の乳児を完全母乳哺育している日本人母乳139検体を対象にした。

### 2. 母乳採取

時間は指定せず、子どもに授乳後または助産院に診察に来た際、母乳パック(カネソン本舗社製)に採取して、直ちに家庭用冷凍庫にて凍結した。この冷凍母乳を、凍結状態のまま、滋賀県立大学に送付してもらった。到着後は、分析に使用するまで $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

### 3. 分析方法

#### 3-1. ビタミンB<sub>1</sub>の分析

操作の概略図を図1に示した。

母乳を遠心分離して、クリーム状の上清を取り除いた。この試料 $150\mu\text{l}$ に5% TCA $300\mu\text{l}$ を加えて、遠心分離し、タンパク質を除去した。得られた上清を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、そのろ液を、HPLCに

注入した。HPLCの分析方法は、文献2に記載の方法に従った。

#### 3-2. ビタミンB<sub>2</sub>の分析

操作の概略を図2に示した。

母乳中のビタミンB<sub>2</sub>はLumiflavin法にて測定した。まず、氷冷水 $440\mu\text{l}$ に母乳 $100\mu\text{l}$ を加え、 $80^{\circ}\text{C}$ 、15分間加熱した。冷却後、10% TCA $200\mu\text{l}$ 加え、遠心後、上清 $200\mu\text{l}$ をとり、1 M NaOH $200\mu\text{l}$ 加えアルカリ性にした後、光照射(10W、30分間、常温)し、Lumiflavinにかえた。酢酸 $20\mu\text{l}$ を加え安定にさせた後、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、そのろ液を、HPLCに注入した。HPLCの分析方法は、文献3に記載の方法に従った。

#### 3-3. ビタミンB<sub>6</sub>の分析

操作の概略図を図3に示した。

*Sacharomyces cerevisiae* ATCC 9080を用いた微生物定量法を用いて、総B<sub>6</sub>量を測定した<sup>4)5)</sup>。母乳 $0.1\text{ml}$ に $0.055\text{ M HCl}$  $5\text{ml}$ を加え、オートクレーブにて $121^{\circ}\text{C}$ 、3時間処理を行った。この作業により、リン酸エステル型を含む母乳中の結合型誘導体を加水分解し、遊離型に変換した。その後、 $0.5\text{ M}$  酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)を $1\text{ml}$ 、1 M 水酸化ナトリウム $275\mu\text{l}$ を加え中和し、測定用試料溶液とした。

#### 3-4. ビタミンB<sub>12</sub>の分析方法

操作の概略を図4に示した。

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. leichimannii*) ATCC 7830を用いた微生物定量法を用いて、ビタミンB<sub>12</sub>量を測定した<sup>6)</sup>。母乳を遠心分離して、クリーム状の上層を取り除いた。この試料 $50\mu\text{l}$ に、0.05% KCN $10\mu\text{l}$ 、 $0.57\text{ M}$  酢酸緩衝溶液(pH 4.5) $250\mu\text{l}$ 、超純水 $500\mu\text{l}$ を加え、

加熱抽出 (100°C, 30 分間) する。冷却後, 10% メタリン酸 15  $\mu$ l を加え, 遠心分離後の上清を測定用試料溶液とした。

### 3-5. 葉酸

操作の概略を図 5 に示した。

乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC 2773 を用いた微生物定量法を用いて, 葉酸量を測定した<sup>7)</sup>。母乳 500  $\mu$ l に 200U/ml プロテアーゼ溶液 250  $\mu$ l, コンジュガーゼ溶液 25  $\mu$ l, L-システイン塩酸塩一水和物 0.625mg を加え, 37°C で 15~20 時間反応させる。酵素を失活させた後, 氷冷し, 遠心分離して中間層をとる。それに 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$  緩衝溶液 (pH 4.1, 0.114 M アスコルビン酸) を加えたものを測定用試料溶液とした。

### 3-6. ビオチンの分析

操作の概略を図 6 に示した。

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物定量法を用いてビオチン量を分析した<sup>8)</sup>。母乳 200  $\mu$ l に, 2.25 M 硫酸溶液 200  $\mu$ l を加え, オートクレーブにて 120°C で 1 時間処理を行った。冷却後, 遠心分離し, 上清をとり, 適宜希釈したものを測定用試料溶液とした。

### 3-7. パントテン酸の分析

操作の概略を図 7 に示した。

*Lactobacillus plantarum* ATCC 8041 を用いた微生物定量法を用いてパントテン酸量を測定した<sup>9)</sup>。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, ハト肝抽出アミダーゼ溶液 50  $\mu$ l, 10U/ml ホスファターゼ 50  $\mu$ l, 15  $\mu$ g/ml 還元型グルタチオン 50  $\mu$ l を加え, インキュベーションを 37°C, 16 時間行った。そこへ, 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$  緩衝溶液 (pH 7.0)

1300  $\mu$ l 加え, 100°C, 5 分間加熱し, 氷冷後, 遠心分離した。その中間層を測定用試料溶液とした。

### 3-8. ナイアシンの分析

操作の概略を図 8 に示した。

母乳 1.5 ml を遠心分離し, クリーム層を取らないように注意しながら上層を 750  $\mu$ l 取り, ねじ口チューブに入れる。1  $\mu$ g/ml のイソニコチンアミドを 750  $\mu$ l 加え, 混和後, 121°C, 10 分間オートクレーブする。これは, NAD などの補酵素型のニコチンアミドを遊離の形にするために行なう操作である。

オートクレーブ終了後, 氷冷し, 十分に冷却後, 完全に除タンパクするために 70% 過塩素酸を 0.1 ml 加え, よく攪拌し, 室温に 10 分間放置する。微量高速冷却遠心機で 15,000 rpm で 5 分間, 遠心分離を行なう。

この上清を 1 ml 取り, アルカリ性ジエチルエーテルで選択抽出した後, 0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過し, そのろ液を HPLC に注入した。HPLC の分析は, 文献 10 に記載の方法に従った。

### 3-9. ビタミン C の分析

操作の概略を図 9 に示した。

母乳中のビタミン C は, アスコルビン酸・デヒドロアスコルビン酸・2,3-ジケトグルロン酸を, これらの総称である総アスコルビン酸の量で測定した。まず, 母乳 150  $\mu$ l に 10% メタリン酸 150  $\mu$ l を加え, よく攪拌した。これを遠心分離し, 中間層を試料とした。この中間層 100  $\mu$ l に 0.2% 2,6-Dichloroindophenol 100  $\mu$ l, 1%  $\text{SnCl}_2/5\%\text{HPO}_3$  50  $\mu$ l, 2% 2,4-Dinitrophenylhydrazine 120  $\mu$ l を順に加え, よく攪拌した後, 37°C で 3 時間イン