

キュベーションした。そして、そこに超純水 1.5ml, 酢酸エチル 1.5ml を加え、5 分間は激しく振とうした後、遠心分離し、酢酸エチル層 600 μ l アシストチューブにとった。それを遠心エバポレーターで乾固させた。この乾固物にアセトニトリル 200 μ l 加え溶解させ、0.45 μ 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 11 に記載の方法に従った。

C. 結果

母乳に含まれるビタミン B₁ 含量の分析結果を図 10 に示す。母乳のビタミン B₁ 含量の平均値 \pm SD は 0.14 \pm 0.06 (μ g/ml), 0.03–0.39 (μ g/ml) の範囲であった。

母乳に含まれるビタミン B₂ 含量の分析結果を図 11 に示す。母乳のビタミン B₂ 含量の平均値 \pm SD は 0.27 \pm 0.08 (μ g/ml), 0.07–0.57 (μ g/ml) の範囲であった。

母乳に含まれるビタミン B₆ 含量の分析結果を図 12 に示す。母乳のビタミン B₆ 含量の平均値は 105.70 \pm 54.06 (ng/ml), 8.96–357.67 (ng/ml) の範囲であった。

母乳に含まれるビタミン B₁₂ 含量の分析結果を図 13 に示す。母乳のビタミン B₁₂ 含量の平均値 \pm SD は 0.94 \pm 0.52 (ng/ml), 0.32–2.60 (ng/ml) の範囲であった。

母乳に含まれる葉酸含量の分析結果を図 14 に示す。母乳の葉酸含量の平均値 \pm SD は 45.89 \pm 23.79 (ng/ml), 5.47–134.74 (ng/ml) の範囲であった。

母乳に含まれるビオチン含量の分析結果を図 15 に示す。母乳のビオチン含量の平均値 \pm SD は 2.9 \pm 1.6 (ng/ml), 0.3–6.9 (ng/ml) の範囲であった。

母乳に含まれるパントテン酸含量の分析結果を図 16 に示す。母乳のパントテン酸含量の平均値 \pm SD は 8.0 \pm 3.9 (μ g/ml), 1.9–20.4 (μ g/ml) の範囲であった。

母乳に含まれるナイアシン含量の分析結果を図 17 に示す。母乳ナイアシン含量の平均値 \pm SD は 1.02 \pm 0.37 (μ g/ml), 0.26–2.12 (μ g/ml) の範囲であった。

母乳に含まれるビタミン C 含量の分析結果を図 18 に示す。母乳ビタミン C 含量の平均値 \pm SD は 46.56 \pm 11.11 (μ g/ml), 19.94–79.34 (μ g/ml) の範囲であった。

D. 考察

ビタミン B₁ の 2005 年度版食事摂取基準の採用値は、0.15 (μ g/ml), 今回の測定値は 0.14 \pm 0.06 (μ g/ml) であった。

ビタミン B₂ の 2005 年度版食事摂取基準の採用値は、0.40 (μ g/ml), 今回の測定値は 0.27 \pm 0.08 (μ g/ml) であった。

ビタミン B₆ の 2005 年度版食事摂取基準の採用値は、250 (ng/ml), 今回の測定値は 105.70 \pm 54.06 (ng/ml) であった。

ビタミン B₁₂ の 2005 年度版食事摂取基準の採用値は、0.20 (ng/ml), 今回の測定値は 0.94 \pm 0.52 (ng/ml) であった。

葉酸の 2005 年度版食事摂取基準の採用値は、54 (ng/ml), 今回の測定値は 45.89 \pm 23.79 (μ g/ml) であった。

ビオチンの 2005 年度版食事摂取基準の採用値は、5.2 (ng/ml), 今回の測定値は 2.9 \pm 1.6 (μ g/ml) であった。

パントテン酸の 2005 年度版食事摂取基準の採用値は、5.0 (μ g/ml), 今回の測定値は 7.97 \pm 3.87 (μ g/ml) であった。

ナイアシンの 2005 年度版食事摂取基準

の採用値は、2.0 ($\mu\text{g/ml}$)、今回の測定値は 1.02 ± 0.37 ($\mu\text{g/ml}$) であった。

ナイアシンの 2005 年度版食事摂取基準の採用値は、50 ($\mu\text{g/ml}$)、今回の測定値は 46.56 ± 11.11 ($\mu\text{g/ml}$) であった。

2005 年度版食事摂取基準の値と比較すると、全体的に低い値となった。特に、ビタミン B₆、ビオチン、ナイアシンについては、食事摂取基準に対し、それぞれ、40%、60%、50%という低い値となった。そのほかでは、ビタミン B₁ についてはほぼ同じ結果となった。ビタミン B₁₂ については食事摂取基準に対し、245%と大きな差がでた。

次年度では、これらの原因を明らかにしたい。

E. 資料

産後日数と母乳中のビタミン含量との関係を、資料として図 19~27 に示した。これらの解析に関しては、今後行う。

各ビタミンの相関関係を資料として、図 28~63 に示した。これらの解析に関しては、今後行う。

F. 健康危機情報

特記する情報なし

G. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報(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

I. 引用文献

1. 日本人の食事摂取基準 2005 年度版, 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書, 厚生労働省, 平成 16 年 10 月
2. Kimura M, Fujita T, and Itokawa Y. Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29-31 (1982).
3. Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K. A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem. Int.*, **4**, 187-194 (1982).
4. 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) .
5. Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis, 15th ed., Helrich, K. ed. (AOCA, Inc., Arlington, VA, USA) , p. 1089 (1990).
6. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamazi R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, and Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂

- degradation product formed during microwave heating. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5177-5180 (1998).
7. 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.
 8. 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).
 9. Skeggs HR, and Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26 (1944).
 10. Shibata K, Kawada T, and Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28 (1988).
 11. 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).

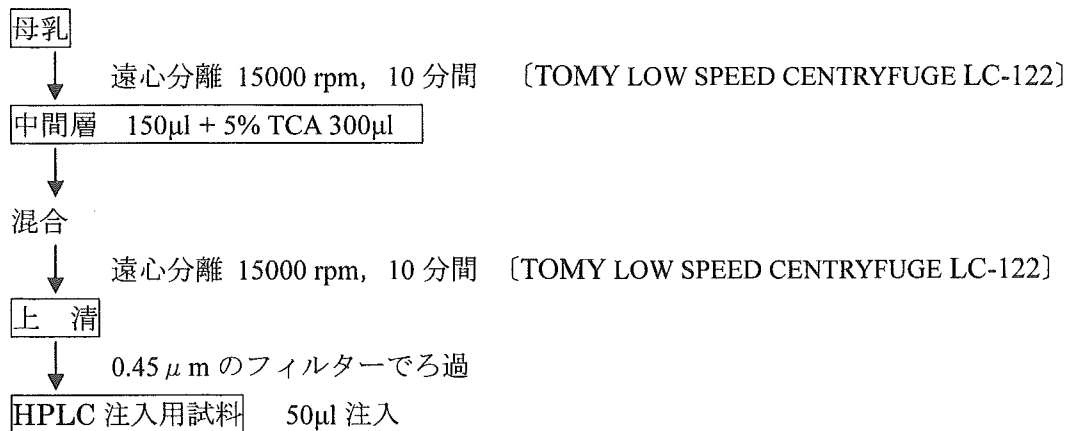


図 1. 母乳中のビタミン B₁ の HPLC 注入用試料の作成操作

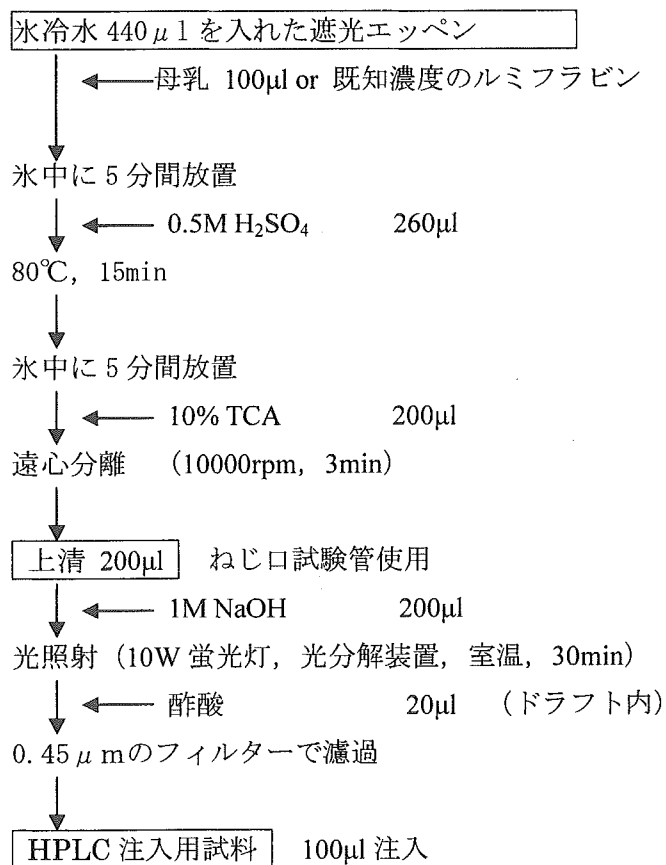


図 2. 母乳中のビタミン B₂ の HPLC 注入用試料の作成操作

*光分解装置

乾固チューブ底の液面から 20cm 離れた高さから、蛍光灯の光が当たる木の箱（縦 35cm × 横 25cm × 高さ 28cm）の内面をすべてアルミ製のシールで覆い、内部で蛍光灯の光が反射するようにした装置。

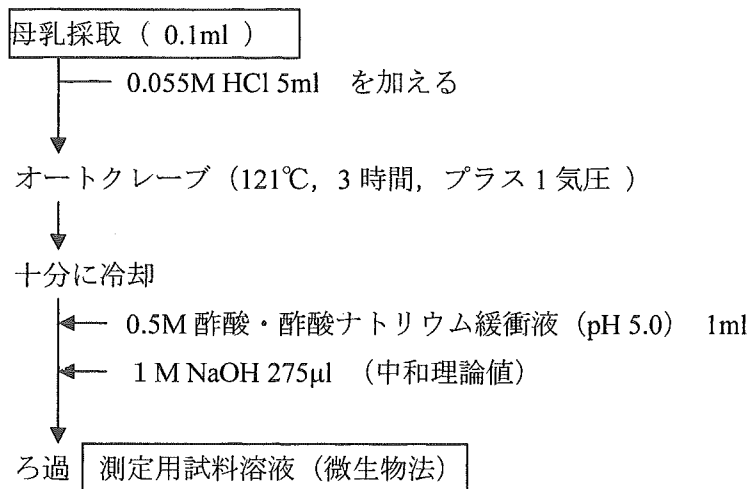


図 3. 母乳中のビタミン B₆ の測定用試料溶液の作成操作

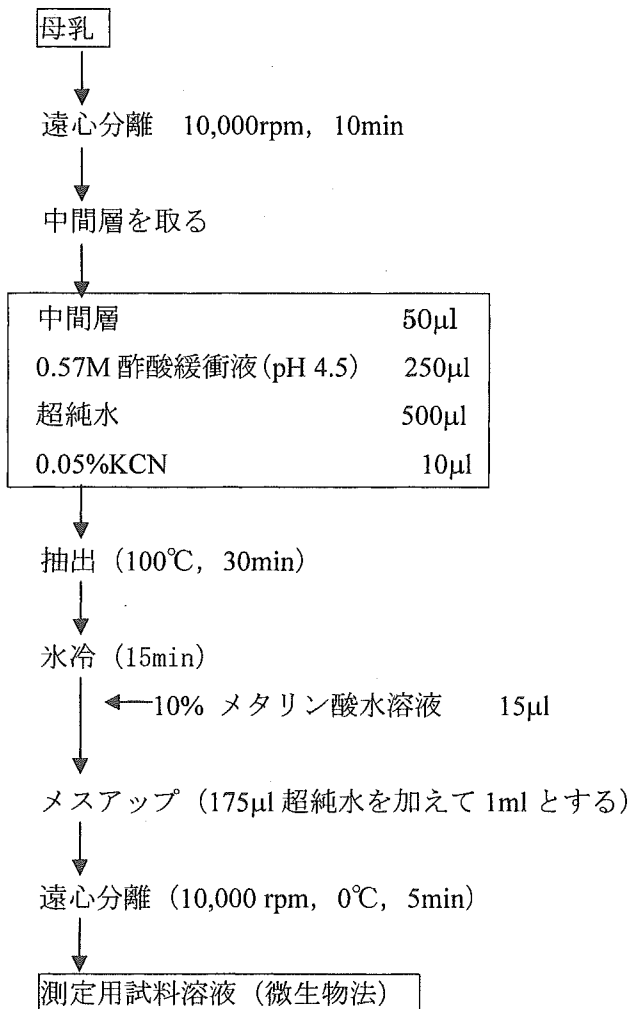


図 4. 母乳中のビタミン B₁₂ の測定用試料溶液の作成操作

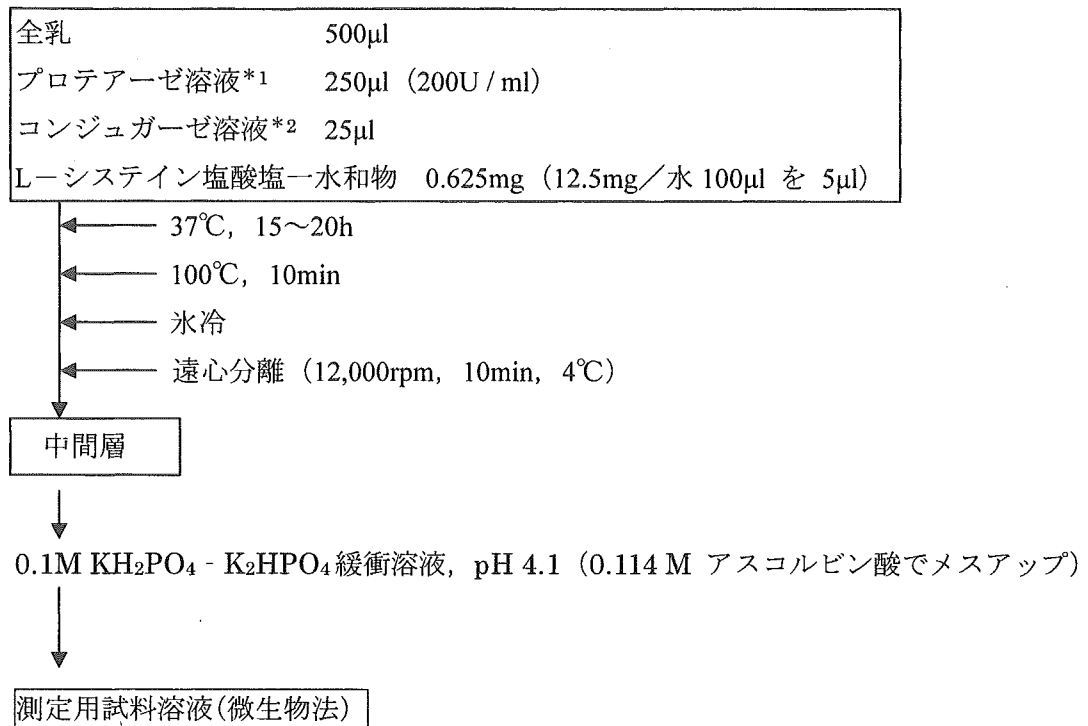


図 5. 葉酸測定用試料溶液の作成操作

***1 プロテアーゼ溶液** (200U/ml) ※当日調製

プロテナーゼMS (20,000U/0.5g包) (科研製薬, 室温保存)

プロテナーゼ0.5 g 包を水200mlに加え, 溶解させると, 200U/mlのプロテアーゼ溶液が調製できる.

*2 コンジュガーゼ溶液

コンジュガーゼ溶液の調製方法

図5-1にコンジュガーゼ溶液の調製方法を示した。

Kidney Acetone Powder (Sigma, Porcine, Type II, 冷凍保存) 1 g

0.02M シス테인塩酸塩溶液 (pH5.58) 15 ml

↓ 氷冷しながら攪拌 (2 時間)

↓ 冷却遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 10 分間)

上清

↓ 冷却遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 5 分間)

上清

↓← Dowex 1x8 (Cl⁻) (10g/100ml)

↓ 攪拌, 30 分間

↓ 冷却遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 10 分間)

↓ 濾過

濾液=コンジュガーゼ溶液 ※小分けして, -20°Cにて数年間保存可能

図 5-1. コンジュガーゼ溶液の調製方法

① イオン交換樹脂 (Dowex 1 X 8) ※当日調製

1) Dowex 1X8 (ムロマチテクノス株式会社)

Dowex 1X8 を10g秤量し, 1N HCl 100ml (Dowexの10倍量) で10分間攪拌し, 十分に水で洗いながら, 濾紙を用いて濾過する.

2) 1N NaOH 100ml (Dowexの10倍量) で再度10分間攪拌し, 1N HClで洗いながら濾過する.

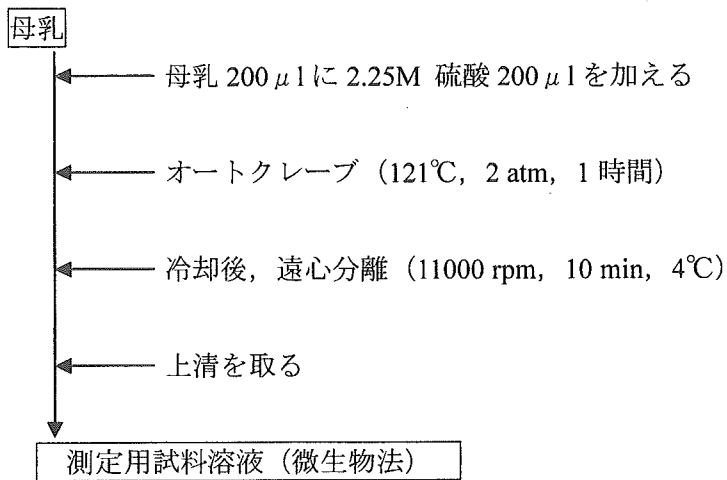
3) pH試験紙で確認しながら, 水で中性を示すまで洗う.

② 0.02Mシス테인塩酸塩溶液 (pH5.58)

L-シス테인塩酸塩一水和物= 175.64

(和光純薬株式会社, 室温保存)

L-シス테인塩酸塩一水和物0.351gを秤量し, 超純水を加え, 1N NaOHでpH5.58に調製した後に, 超純水で100mlにメスアップする.



適宜希釈し, 50 μ l を試料溶液として使用する

図 6. 母乳中のビオチンの測定用試料溶液の作成操作

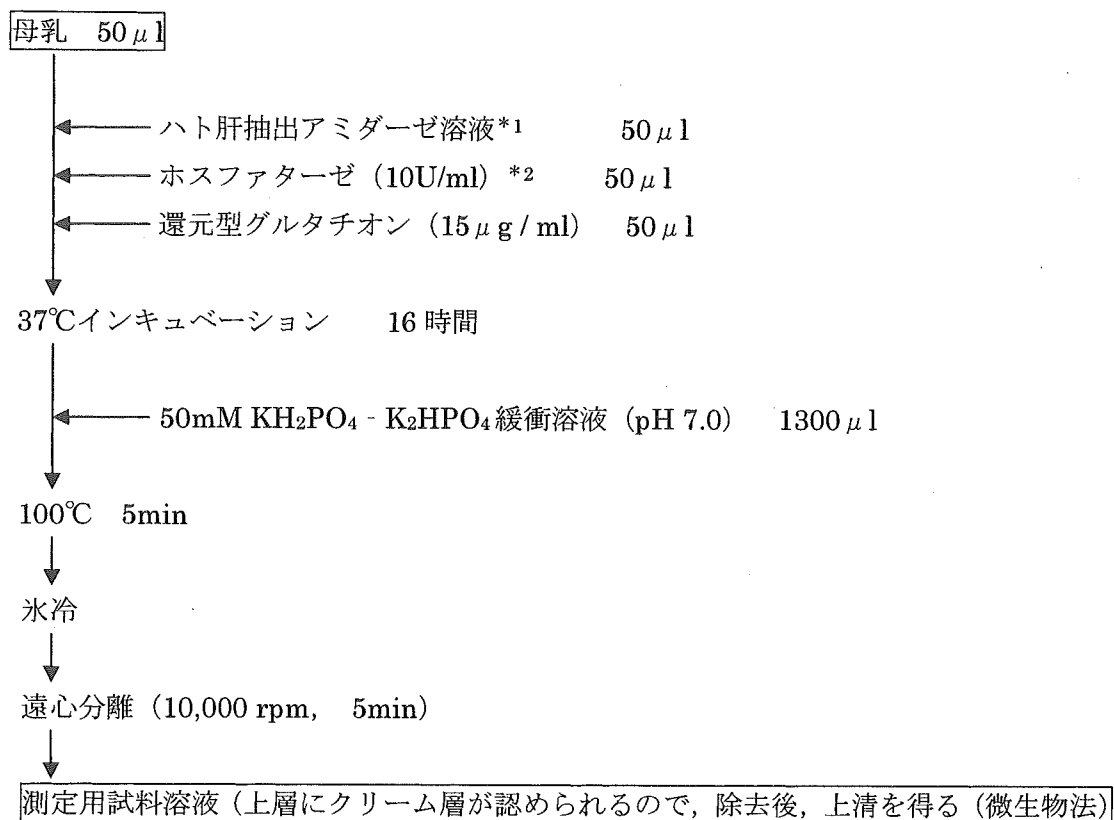


図 7. 母乳中のパントテン酸の測定用試料溶液の作成操作

***1 ハト肝抽出アミダーゼ溶液**

(Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376, 10 g, -20 °C)

作成方法を図 7-1 に示す.

Liver acetone powder from pigeon (SIGMA L8376)

Acetone powder 0.5 g を秤量瓶に入れ, 回転子を入れ氷冷

↓←10 倍量の 0.02 M KHCO₃ を入れる (5 ml)

静かに攪拌 (激しくすると泡立つ)

↓ 冷却遠心分離 15,000 rpm, 5 min, 4°C

上清

↓←Dowex 1x8 (Cl) ※ を添加 (1:1 vol/vol)

↓ 冷却遠心分離 15,000 rpm, 5 min, 4°C

上清をハト肝抽出アミダーゼ溶液として使用 *小分けし冷凍保存 (-20 °C)

図 7-1. ハト肝抽出アミダーゼ溶液の調製方法

***2 腸ホスファターゼ**

(Phosphatase, Alkaline from calf intestine, SIGMA P7923, 2000 units, 冷蔵)

- 1) 50 % glycerol, 1 ml を試薬容器に直接入れ静かに攪拌。(激しくすると泡立つ)
→2000 U/ml
- 2) さらに 10 倍希釈 : 酵素 10 μ l, 50 % glycerol 90 μ l → 200 U/ml
- 3) さらに 20 倍希釈 : 酵素 20 μ l, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.3) 380 μ l
→ 10 U/ml

図 7-2. 腸ホスファターゼ溶液の調製方法

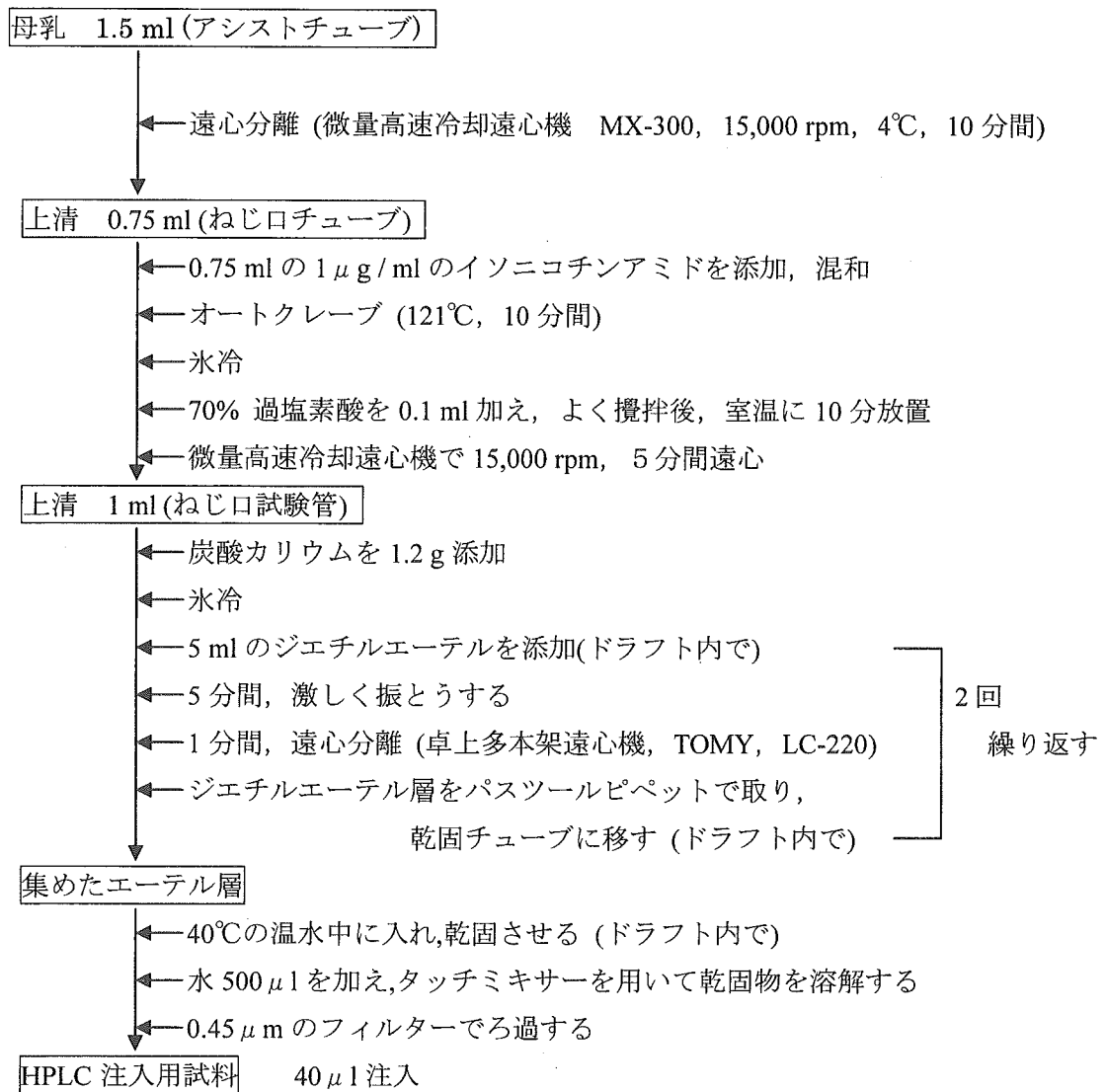


図 8. 母乳中のニコチンアミドの HPLC 注入用試料の作成方法

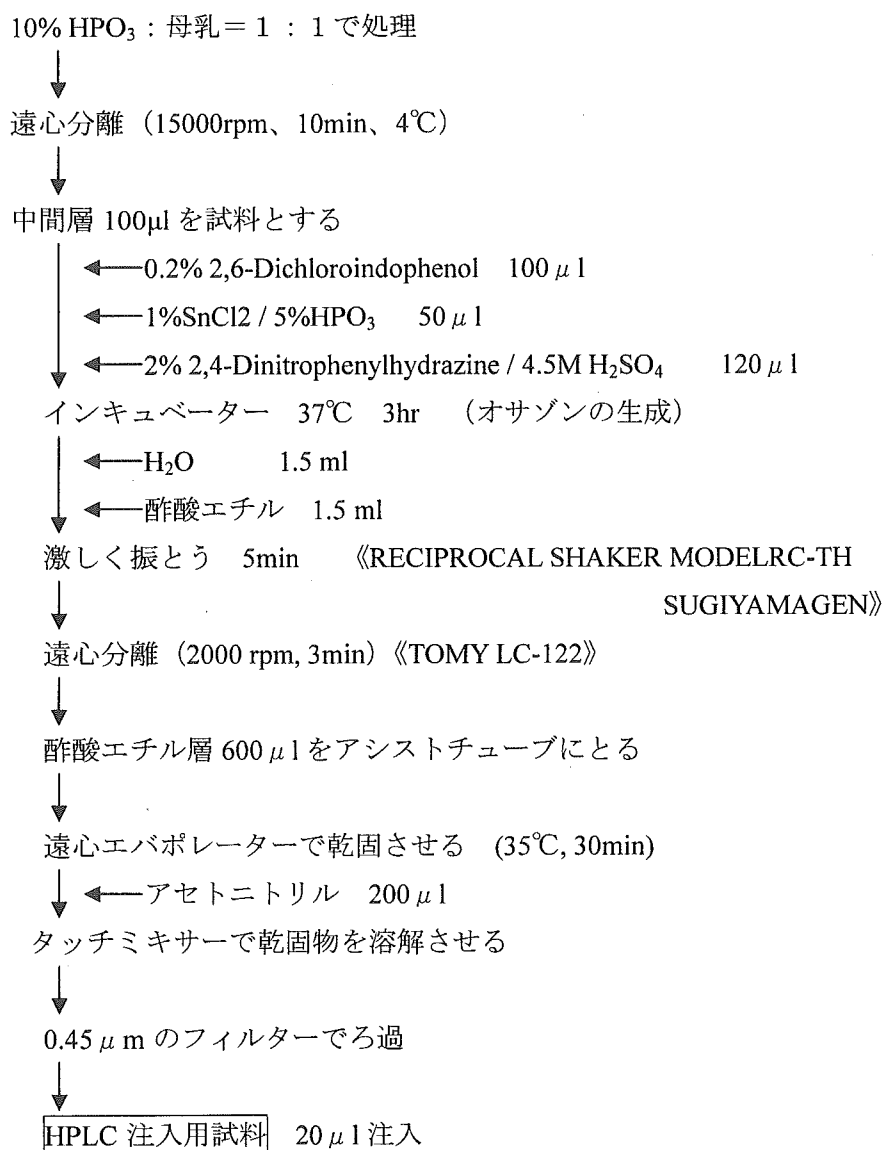


図 9. 母乳中のビタミン C の HPLC 注入用試料の作成方法

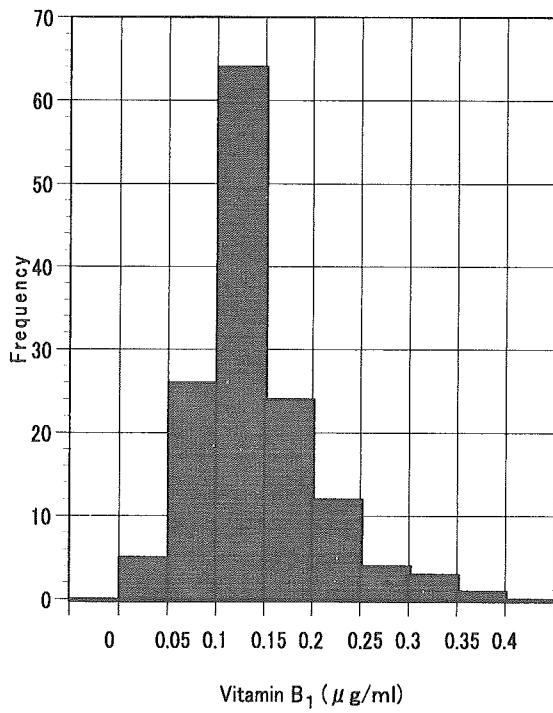


図 10. 母乳中に含まれるビタミン B₁ 含量の度数分布図

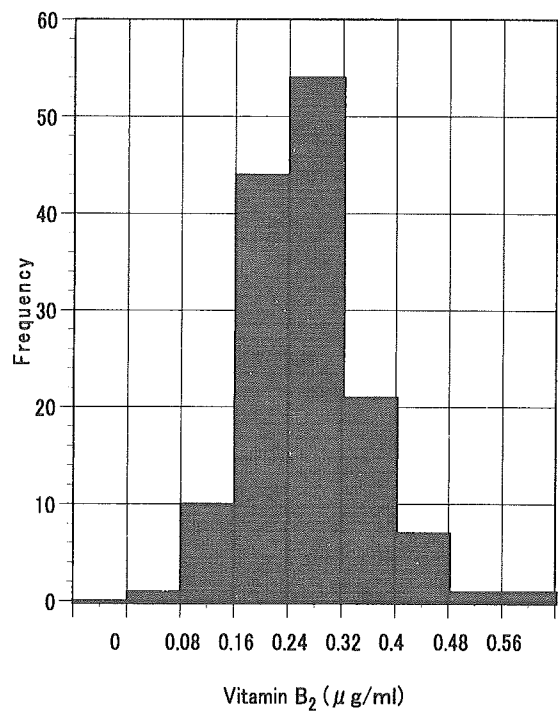


図 11. 母乳中に含まれるビタミン B₂ 含量の度数分布図

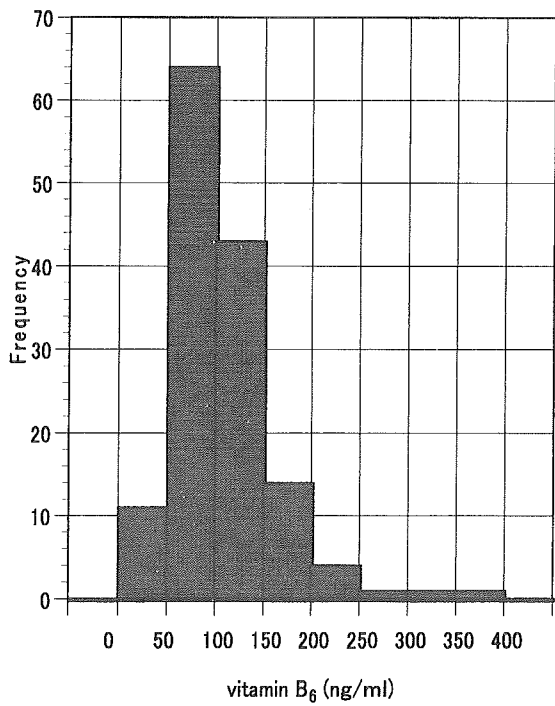


図 12. 母乳中に含まれるビタミン B₆ 含量の度数分布図

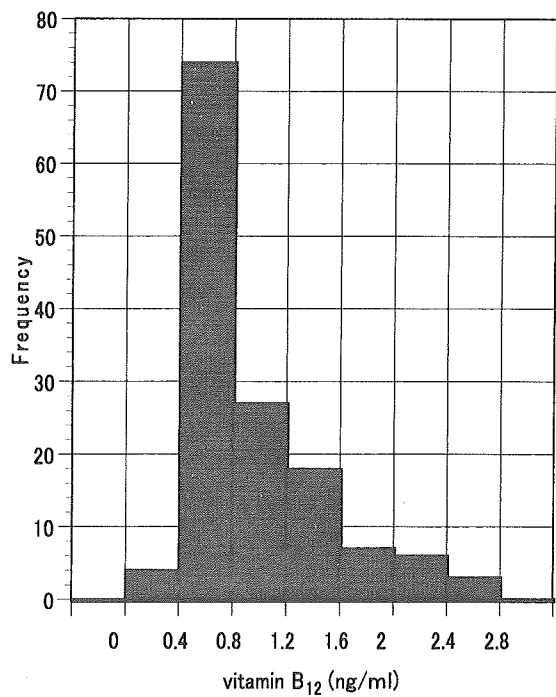


図 13. 母乳中に含まれるビタミン B₁₂ 含量の度数分布図

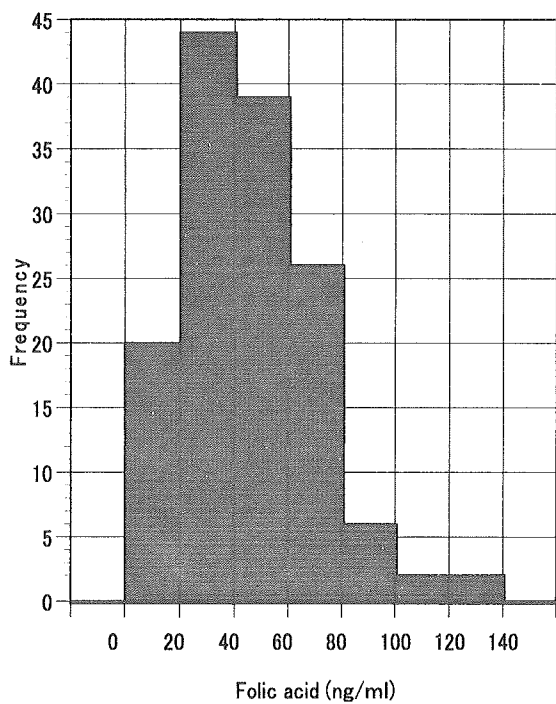


図 14. 母乳中に含まれる葉酸含量の度数分布図

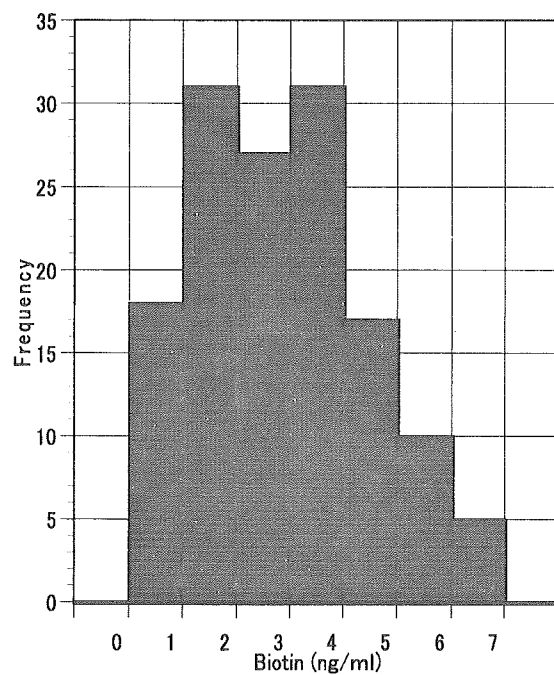


図 15. 母乳中に含まれるビオチン含量の度数分布図

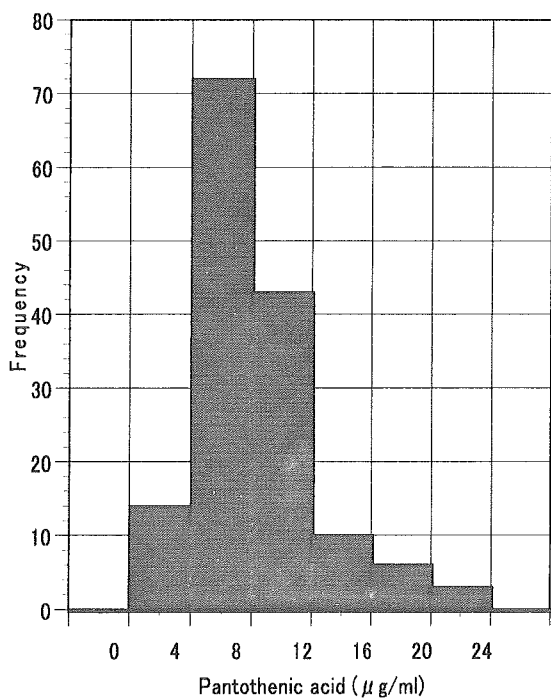


図 16. 母乳中に含まれるパントテン酸含量の度数分布図

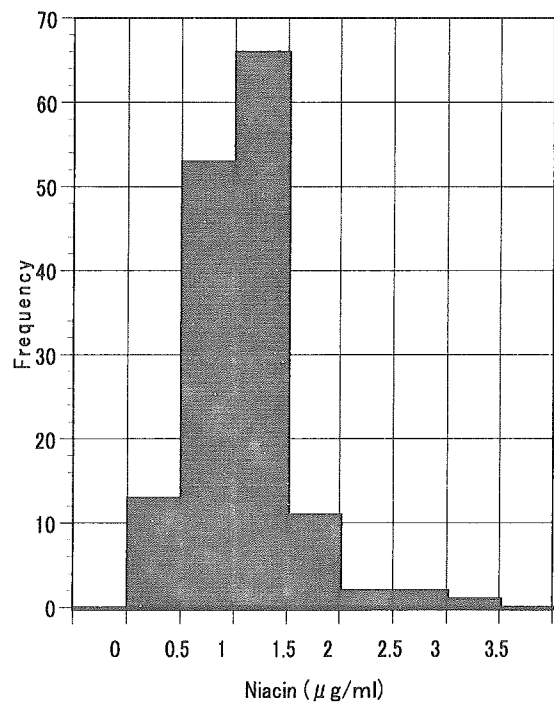


図 17. 母乳中に含まれるナイアシン含量の度数分布図

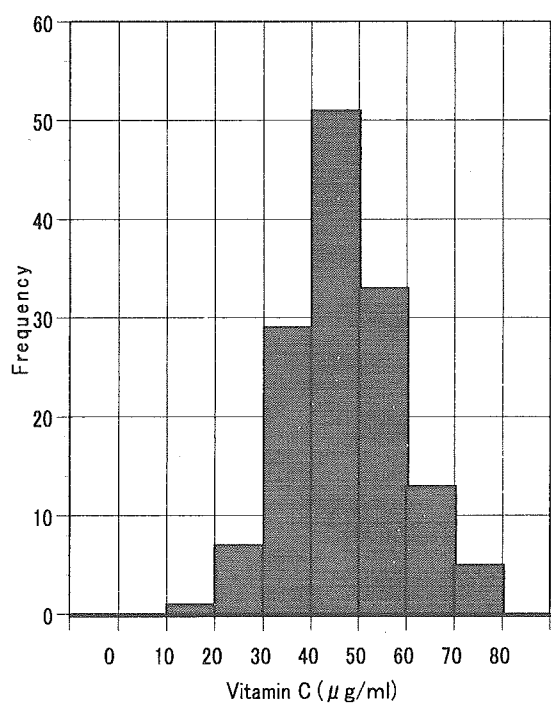


図 18. 母乳中に含まれるビタミン C 含量
の度数分布図

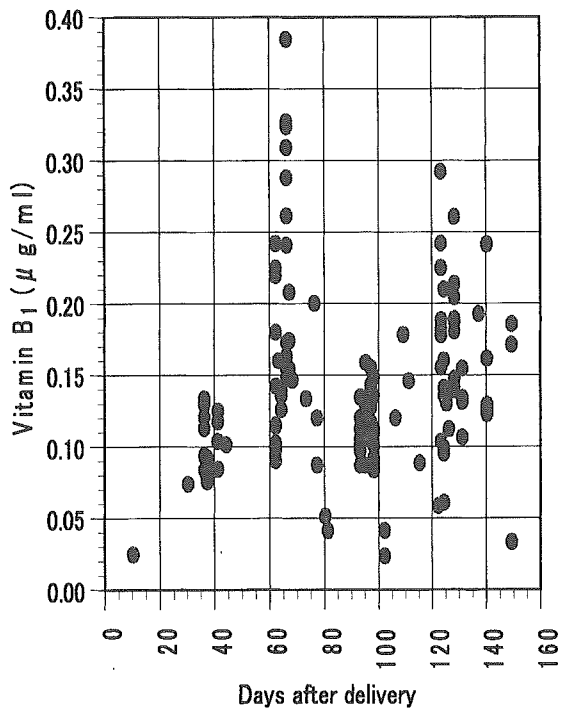


図 19. 産後日数と母乳中のビタミン B₁ 含量の関係

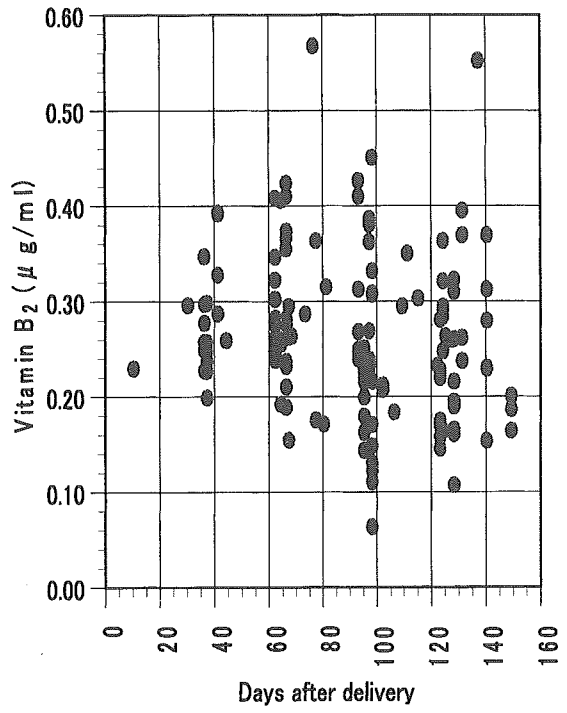


図 20. 産後日数と母乳中のビタミン B₂ 含量の関係

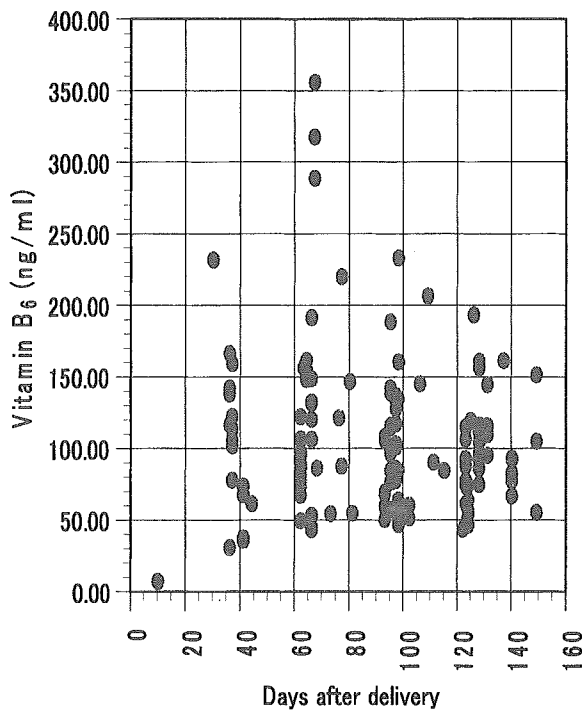


図 21. 産後日数と母乳中のビタミン B₆ 含量の関係

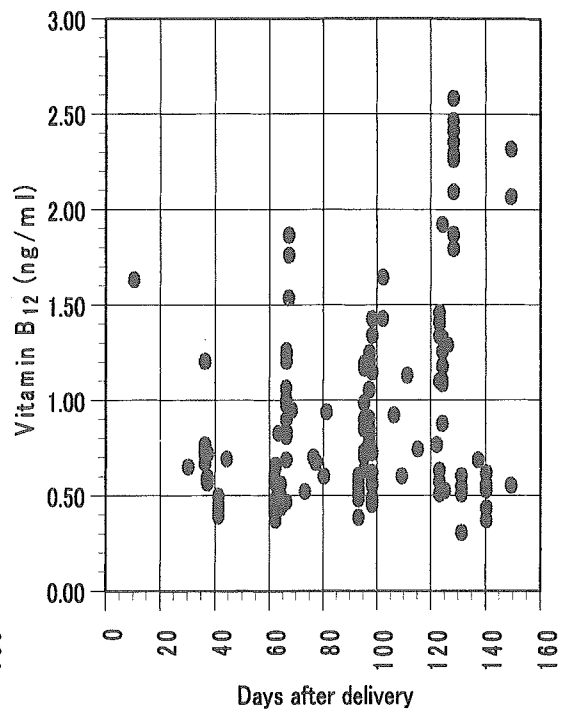


図 22. 産後日数と母乳中のビタミン B₁₂ 含量の関係

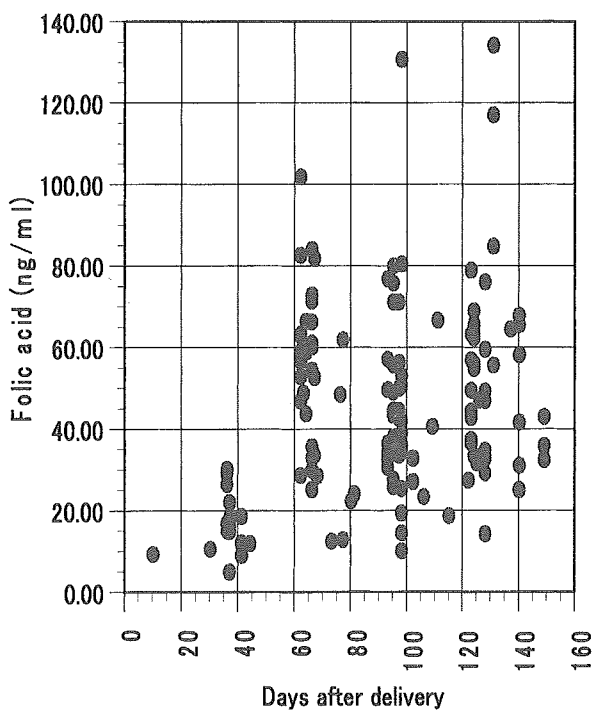


図 23. 産後日数と母乳中の葉酸 含量の関係

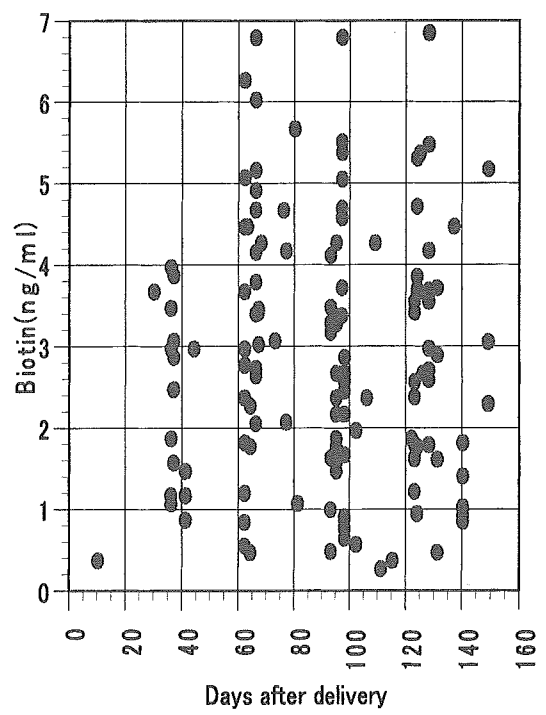


図 24. 産後日数と母乳中のビオチン 含量の関係

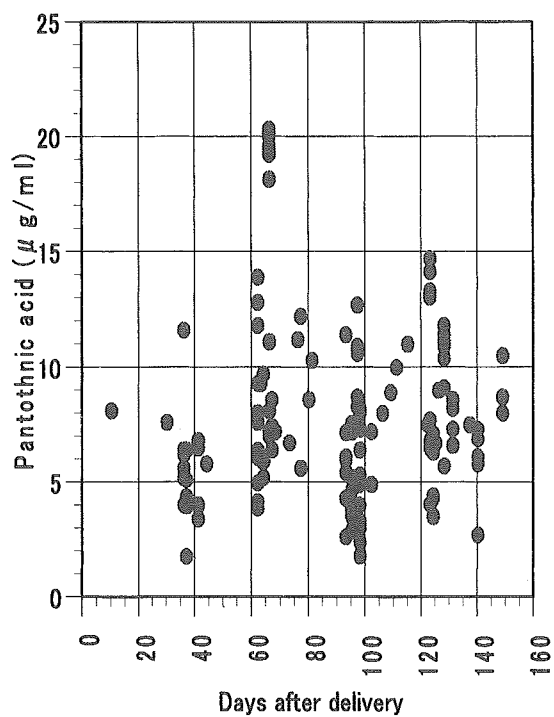


図 25. 産後日数と母乳中のパントテン酸
含量の関係

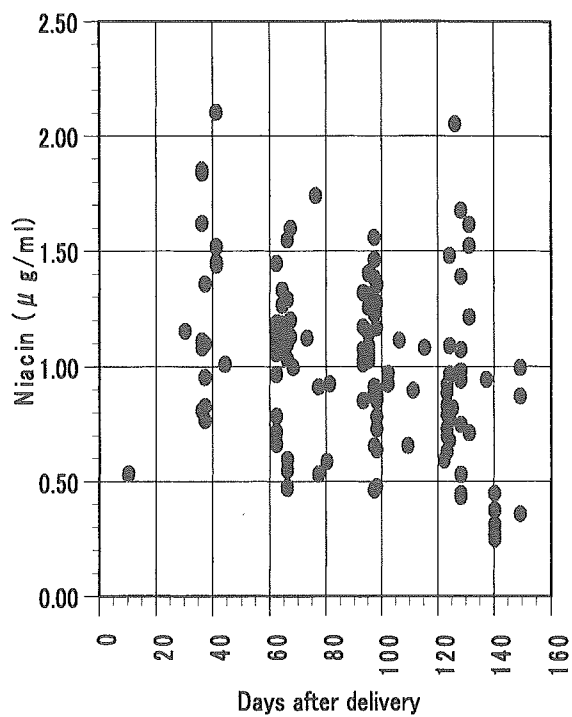


図 26. 産後日数と母乳中のビタミン B₂
含量の関係

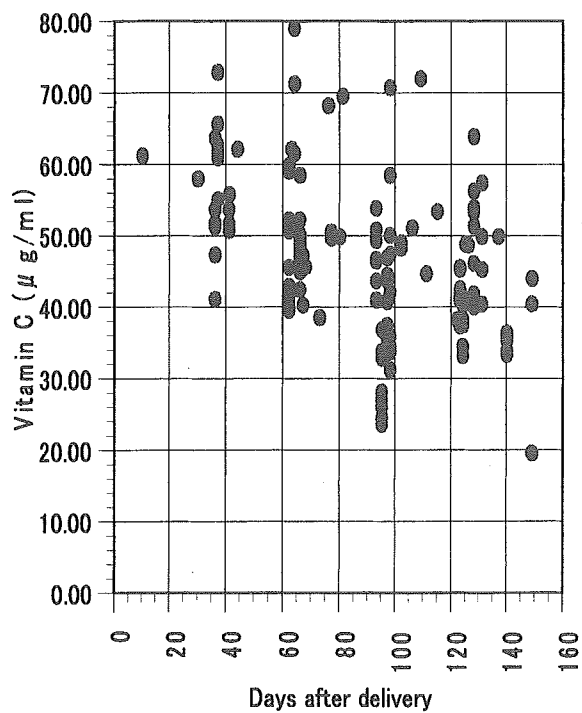


図 27. 産後日数と母乳中ビタミン C
含量の関係

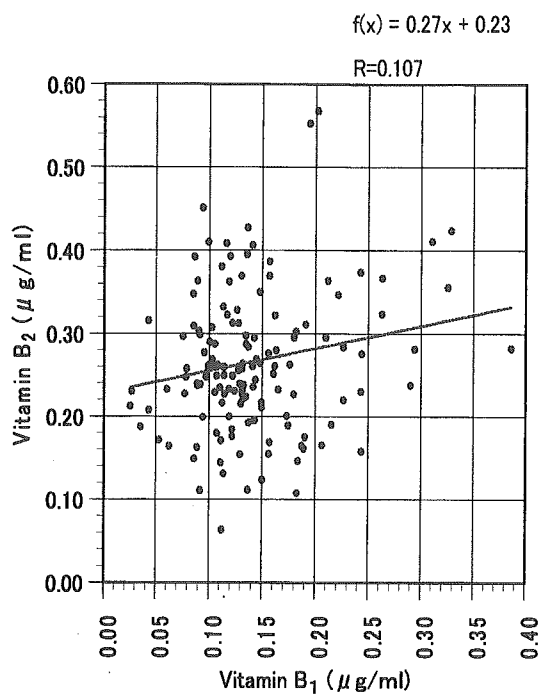


図 28. 母乳中のビタミン B₁ とビタミン B₂ 含量の関係

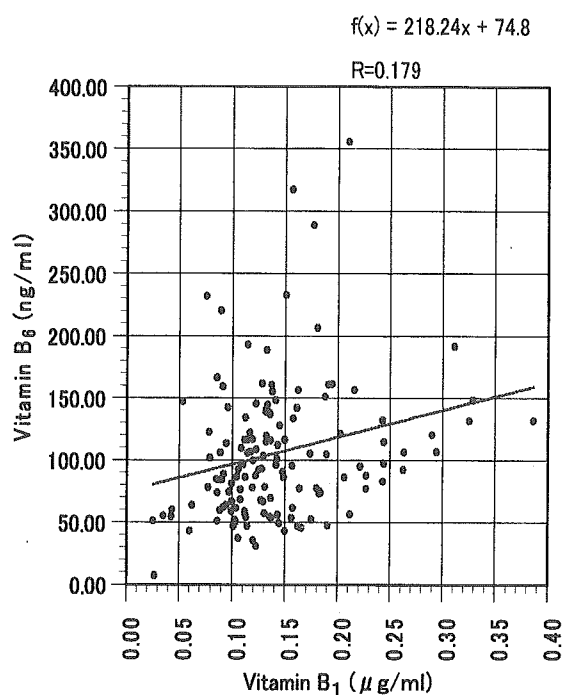


図 29. 母乳中のビタミン B₁ とビタミン B₆ 含量の関係

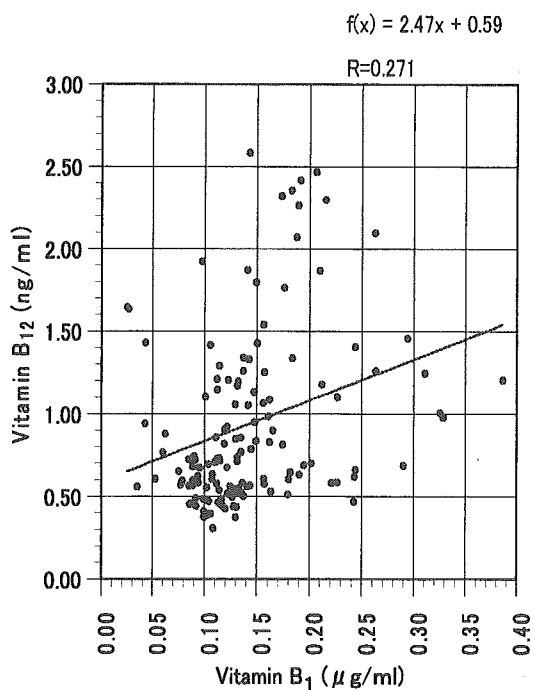


図 30. 母乳中のビタミン B₁ とビタミン B₁₂ 含量の関係

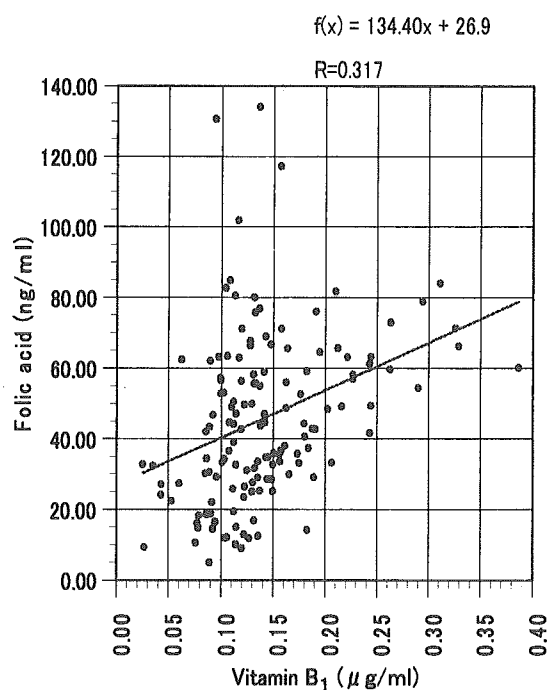


図 31. 母乳中のビタミン B₁ と葉酸 含量の関係

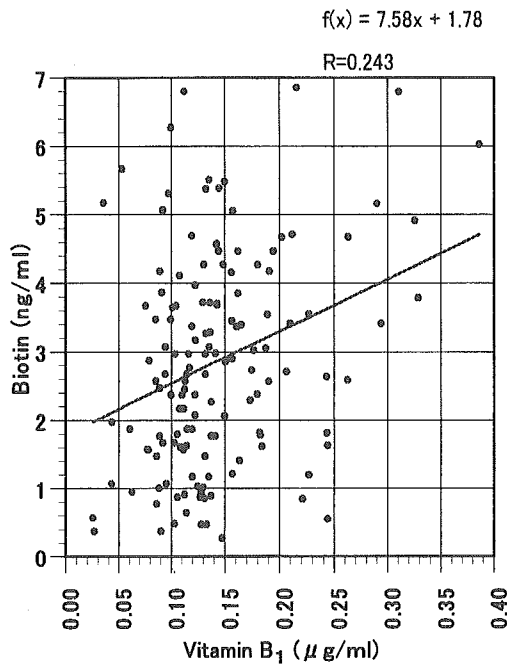


図 32. 母乳中のビタミン B₁ とナイアシン
含量の関係

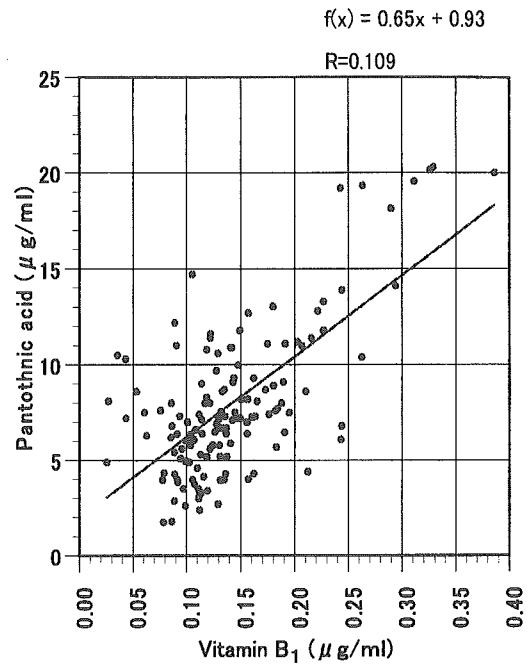


図 33. 母乳中のビタミン B₁ とビタミン C
含量の関係

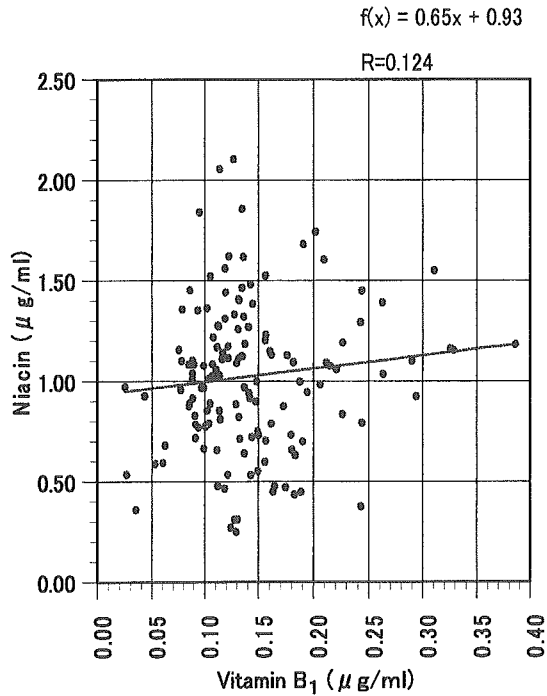


図 34. 母乳中のビタミン B₁ とナイアシン
含量の関係

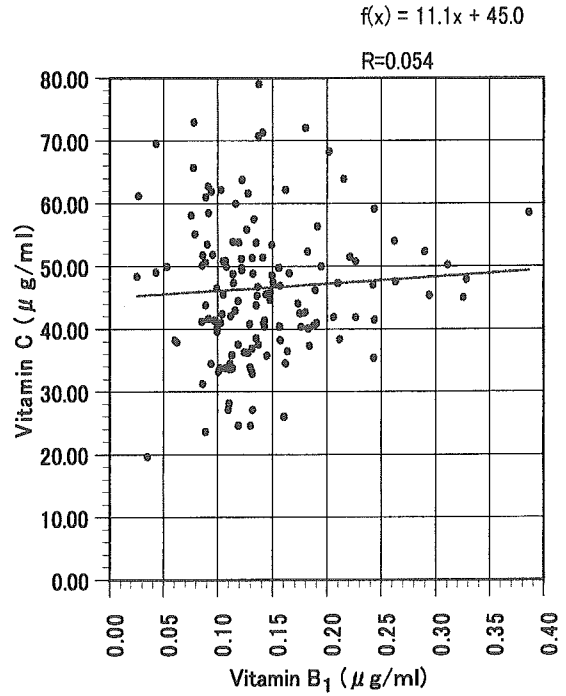


図 35. 母乳中のビタミン B₁ とビタミン C
含量の関係