

した。測定機器としては、イムライズ（ヤマトロン社，東京）を使用し、測定の手順は Fig.4 のとおりである。

3. 統計学的方法

栄養価計算には Excel 栄養君 Ver. 3.0 を使用し、各栄養素を算出した⁷⁾。分析値は正規確率紙法を用いて算出し、平均±標準偏差で表した。統計ソフトは stss excel v5.5 および Excel 統計 Statcel を使用し、各群内の差および各群間の差の検定には分散分析および多重比較検定(Fisher's PLSD)を用いた。なお、有意水準は 5%未満とした。

正規確率紙法とは、分析値のバラつきが大きい場合にかけ離れた値を統計学的に繰り返し削除する方法である。例えば、この分布 (Fig.5) では平均値が 2.5 であるが、正規確立紙法を用いると 3.8 となる。測定値の累積度数 (%) を確立紙にプロットし、累積度数 2.5 ~97.5%に相当する濃度を求め、この操作を繰り返し行い、測定値の数が減少しなくなった時の濃度を上限と下限とした。この範囲内の測定値の平均値と標準偏差、中心値、中央値を算出した。以下の結果は正規確率紙法を用いたものである。

C. 結果

葉酸の摂取量は、全体の年平均値では $435\pm 117\mu\text{g/day}$ であり、11 月で $473\pm 109\mu\text{g/day}$ と高値と、8 月が $405\pm 120\mu\text{g/day}$ と低値を示し、季節変動が観察された。Figure6 は葉酸の摂取量を男女別に示したものである。男女で比較すると、年平均で男性では $432\pm 118\mu\text{g/day}$ で、女性では $442\pm 119\mu\text{g/day}$ で、摂取量に差異はみられなかった。季節ごとでみると、11 月に男性で $470\pm 124\mu\text{g/day}$ 、女性で $478\pm 101\mu\text{g/day}$ と高値を示した。また、男性では 8 月に

$397\pm 110\mu\text{g/day}$ 、女性では 5 月に $406\pm 100\mu\text{g/day}$ と低値であった。なお、男女共に季節変動が観察された。

血中葉酸濃度は全体において年平均値では $6.8\pm 2.8\text{ng/mL}$ であり、2 月が $4.9\pm 1.5\text{ng/mL}$ と低値を、8 月が $8.8\pm 3.3\text{ng/mL}$ と高値を示し、季節変動が観察された。Figure7 は血清の葉酸濃度を男女別に示したものである。男女を比較すると、年平均で男性では $5.8\pm 2.2\text{ng/mL}$ で、女性では $7.8\pm 2.8\text{ng/mL}$ であり有意な相違がみられた。季節ごとでみると、2 月に男性で $4.4\pm 1.6\text{ng/mL}$ 、女性で $5.5\pm 1.1\text{ng/mL}$ と低値を示した。また、8 月に男性で $7.4\pm 2.4\text{ng/mL}$ 、女性で $10.1\pm 3.4\text{ng/mL}$ と高値を示した。なお、すべての季節において女性の方が有意に高値であった。

D. 考察

平岡および安田⁸⁾は女子学生を対象として食物摂取状況調査を行い、葉酸摂取量は平均 $190.6\mu\text{g/day}$ で、RDA ($200\mu\text{g/day}$) を充足している者は 40.2%と少なかったと報告している。オランダの DNFCs 調査⁹⁾では、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 $189\mu\text{g/day}$ である¹⁰⁾。またサプリメントを摂取している場合には $344\mu\text{g/day}$ と高値である。なお、RDA ($200\mu\text{g/day}$) に対する充足している者は、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 $232\mu\text{g/day}$ 、女性 $186\mu\text{g/day}$ と男女差がみられている。平成 14 年度の国民栄養調査では、葉酸の摂取量は男性の全平均で $315\mu\text{g/day}$ で、女性では $302\mu\text{g/day}$ で年齢に依存して高く、女性で低値である。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 $200\text{-}300\mu\text{g}$ である¹¹⁾。

葉酸の必要量については、食事由来の葉酸と葉酸サプリメントを組み合わせ、検討を行なわれている。これまでの報告から、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とされている。Milneら¹²⁾は、成人男性40名を対象に代謝室で食事性葉酸(200 μ g/day)の影響を調べている。また、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10ng/mL以上では、葉酸レベルの減少は見られていない。このようなことから、200 μ g/day(150-250 μ g/day)の葉酸摂取量で体内の葉酸を維持するために十分であることが示唆される。

著者らは、最近半精製食を用いて、健常成人における葉酸の必要量についての検討をした。葉酸摂取量は半精製食の原料となっている小麦粉200gに含まれる38 μ gも含め、238 μ gとなっている。この結果、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。従って、葉酸摂取量(238 μ g/day)については、男性ではやや不足しているが、女性では必要量を十分に満たしている、と考えられる¹³⁾。

今回の調査では、葉酸の摂取量は、年平均で男性では432 \pm 118 μ g/dayで、女性では442 \pm 119 μ g/dayで、文献値よりも高値であった。また、血中葉酸濃度は、男女とも冬期が低値で夏期が高値であり、季節変動が認められた。このように葉酸摂取量は男女間において差異はみられなかったが、血中葉酸量では男女間で有意な差が認められたことから、葉酸の生物有効性は性差が生じていることが考えられる。これらのデータから葉酸の推奨量の策定については男女差があることを考慮する

必要性が示唆された。

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

J. 引用文献

- 1) 糸川嘉則,柴田克己 ビタミン:栄養・健康科学シリーズ 栄養学総論 [改定第2版], pp.169-191, 南江堂, 東京 (1998)
- 2) 木村修一,小林修平監修 葉酸:最新栄養学 [第8版] -専門領域の最新情報-. pp.221-236, 建帛社,東京. (2002)
- 3) Halsred CH. Intestinal absorption of dietary folates. In: Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF, eds. Folic acid metabolism in health and disease. New York: Wiley-Liss, 1991:23-45
- 4) 厚生省 葉酸. 日本人の食事摂取基準 [2005版], pp.92-95, 厚生省保健医療局 地域保健・健康増進栄養課生活習慣病対策室, 東京 (1999)
- 5) Institute of Medicine 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. (2003)

養・食糧学会誌,59: (2006)

- 6) 厚生省 葉酸. 第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-, pp.103-105, 厚生省保健医療局地域保健・健康増進栄養課生活習慣病対策室, 東京 (1999)
- 7) 吉村幸雄エクセル栄養君 Ver.3.0, 建帛社, 東京. (2000)
- 8) 平岡真実,安田和人 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. (2000)
- 9) Melse-Boonstra A, de Bree A, Verhoef P, Bjorke-Monsen AL, Verschuren WMM 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. (2002)
- 10) Konings EJM, Roomans HHS, Dorant E, Goldbohm RA, Saris WHM, van den Brandt PA Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. Am J Clin Nutr 73: 765-776. (2001)
- 11) 健康・栄養情報研究会 国民栄養の現状. 平成 14 年度厚生労働省国民栄養調査結果. 第一出版,東京. (2002)
- 12) Milne DB, Johnson LK, Mahalko JR, Sandstead HH Folate status of adult males living in a metabolic unit: possible relationships with iron nutrition. Am J Clin Nutr 37: 768-773. (1986)
- 13) 渡邊敏明,大串美沙,前川紫,西牟田守,柴田克己,福井徹 (印刷中) 健康成人における葉酸の必要量についての検討. 日本栄

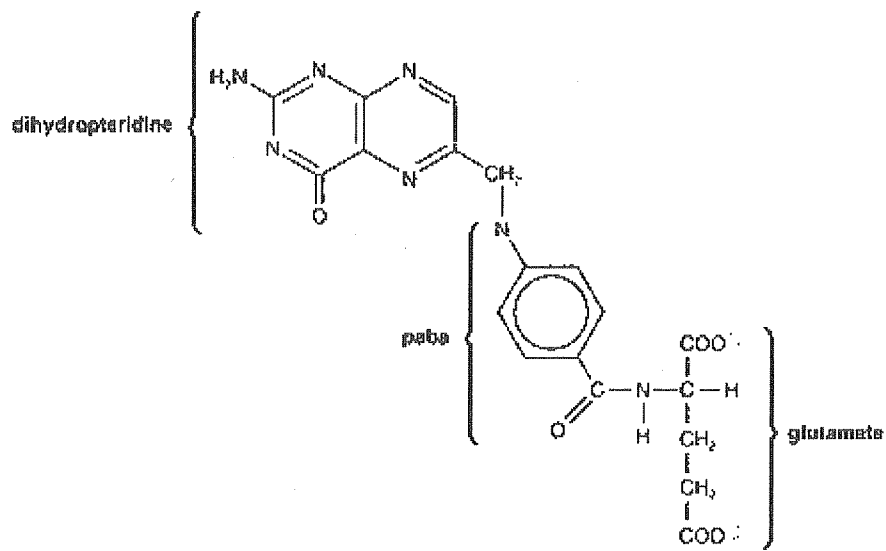


Fig. 1 葉酸の化学構造

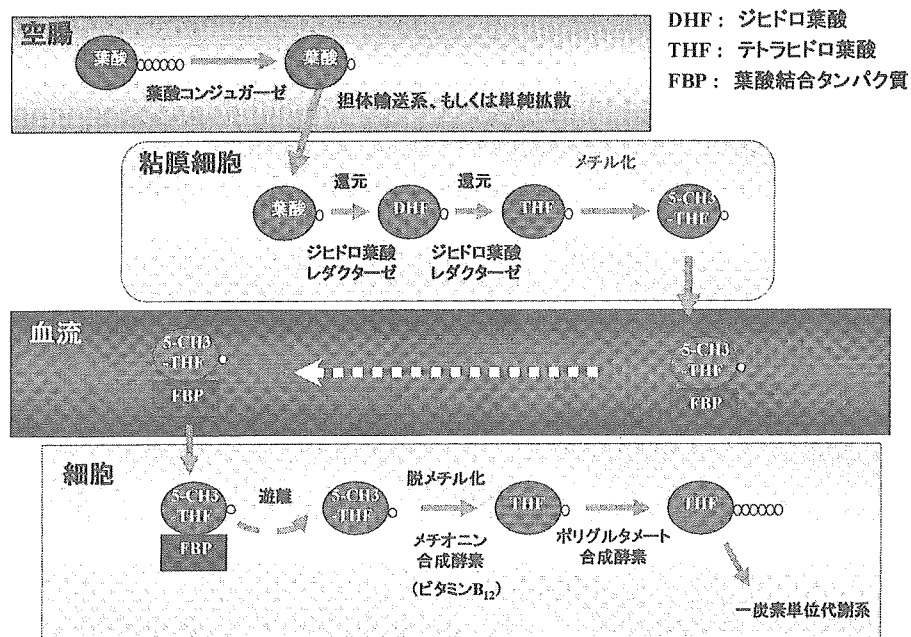


Fig. 2 葉酸吸収機構

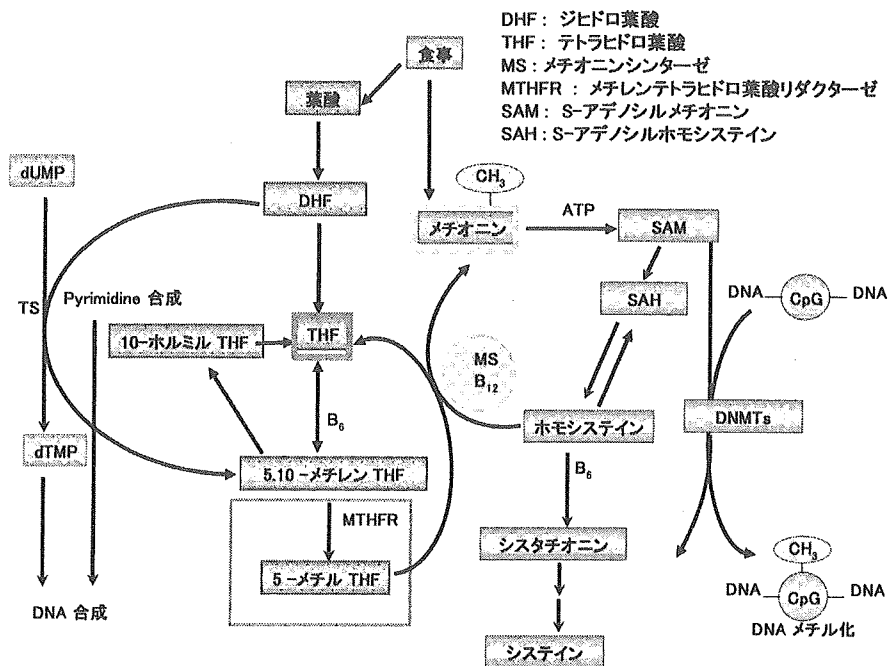


Fig. 3 葉酸の関与する代謝

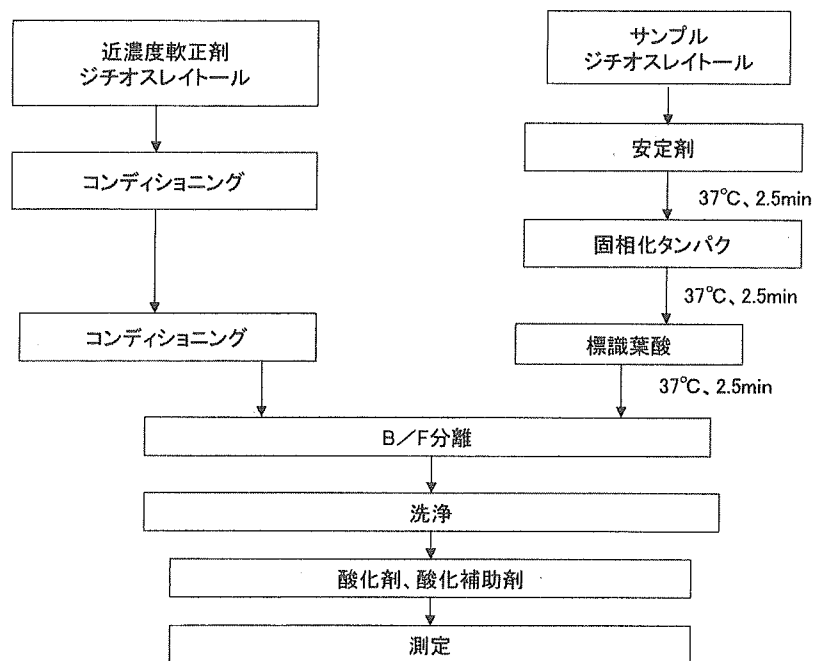
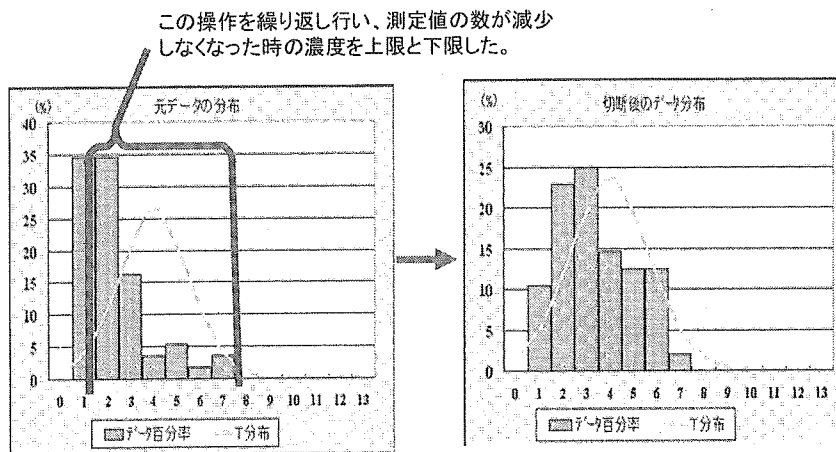


Fig. 4 血清葉酸の測定手順



平均値
 標準偏差
 中心値 : 95%信頼区間を元に平均 \pm 2SD(パラメトリック)。
 中央値 : 95%信頼区間を元に2.5%~97.5%としたときの中央値
 (ノンパラメトリック)。

Fig. 5 データ解析法 (正規確立紙法)

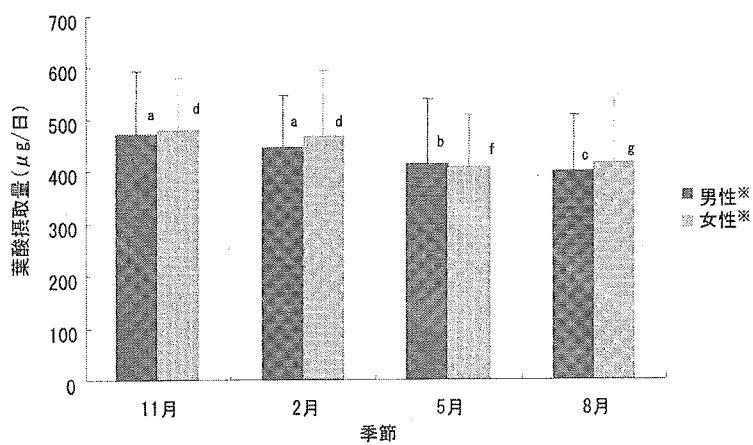


Fig. 6 葉酸摂取量の季節変化

mean \pm SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

ANOVA : * $p < 0.01$

Fisher's PLSD : ^{a-c, d-f}, $p < 0.05$

n=60

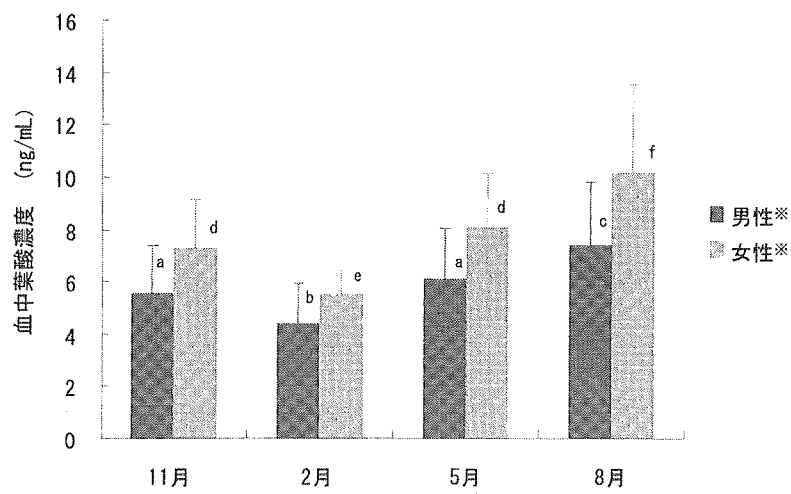


Fig. 7 血中葉酸濃度の季節変化

mean±SD (ng/mL)

ANOVA : * $p < 0.01$

Fisher's PLSD : ^{a-c, d-f}, $p < 0.05$

男性 n=60

女性 n=60

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

Ⅲ. 分担研究者・研究協力者の報告書

12. 日本人におけるビオチン摂取量の推定についての検討

分担協力者 渡邊敏明 兵庫県立大学 教授
研究協力者 榎原周平 兵庫県立大学 助手
研究協力者 福井徹 病体生理研究所 室長

研究要旨

ビオチンは、種々の食品に広く分布している。しかし、ビオチンは、五訂日本食品標準成分表にはいまだ記載されていない栄養素である。また、わが国のビオチン摂取量に関しても、データはほとんど存在しない。そこで、本研究では、日本人におけるビオチン摂取量に関する最近の報告の中から、著者らの前報および東京都TDSでのビオチン摂取量の推定値を利用して、ビオチン摂取量についての検討をおこなった。著者らの前報に関しては、これまでの食品101品目の分析に加えて、新たに136品目の分析をおこなった。これらの食品を98食品群に分類し、ビオチン分析値と国民栄養調査結果（2002年度版）を利用して、日本人における1日あたりのビオチン摂取量を算出した。その結果、ビオチン摂取量は58.4 μ gと推定された。一方、東京都TDSから算出した各食品群のビオチン含量を2002年度国民栄養調査を利用して再計算したところ59.5 μ gであり、本研究値と一致した。これらの方法は、ビオチンのように食品中の含量が未知である栄養素の摂取量の推定において、有効な手段であることが期待される。また、TDSは化学物質だけでなく、ビタミンやミネラルなどの微量栄養素の摂取量の推定においても利用が可能であるといえる。

A. 目的

水溶性ビタミンであるビオチンは、種々の食品に広く分布している栄養素である^{1) 2)}。特にローヤルゼリー、レバー、卵黄に多く含まれている。ビオチンは、2000年の第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-で、所要量がはじめて策定された。また、2003年から食品添加物としてサプリメントに利用できるようになった。しかし、ビオチンは、日本食品標準成分表には未だに収載されておらず、食品中の含量や存在状態、調理や加工による変化、生体利用率など、ほとんど明らかにされていない。

わが国のビオチン摂取量に関して、著者らの知る限りでは、これまでに3編の報告がある。まず、著者らは、わが国で日常的に摂取されている主な食品101品目に含まれるビオチン量を分析した³⁾。この分析結果を18食品群に分けて、2001年度国民栄養調査結果⁴⁾を利用し、わが国の成人の1日あたりのビオチン摂取量を算出すると、男性で109.8 μ g、女性で92.3 μ gとなった。また、東北地方の中高齢者を対象に陰膳方式で分析したビオチン摂取量は、季節ごとの平均値で29.8-33.3 μ g/dayであった⁵⁾。一方、1999年に東京都で行われたトータルダイエツト調査(TDS, Total Diet Study)では、食品中のビオチン含量を13食品群別に分けて分析し、この分析結果と東京都民の栄養調査結果を利用して、ビオチン摂取量を算出している⁶⁾。この結果では、東京都民のビオチン摂取量は45.1 μ g/dayと推定されている。また、著者らは、これまでにトータルダイエツト調査によるビオチンの摂取量の推定について検討してきた⁷⁾。

このように、ビオチン摂取量は調査・算

出方法によって約3倍の差異がある。そこで、本研究では、これらのビオチン摂取量に大きな差が生じた原因およびビオチン摂取量の算出方法について考察し、日本人のビオチン摂取量について再解析した。

B. 実験方法

1. 食品の選択

著者ら³⁾がこれまでにビオチン含量の分析をおこなった主要食品101品目は、五訂日本食品標準成分表⁸⁾に記載されているものから選択した。これらの食品は、摂取頻度の特に高いものや、ビオチンが多く含まれていることが既にわかっているものが中心であり、食品群が十分に考慮されていなかった。そこで、今回、摂取頻度の高いものを中心に、18食品群から平均的に136品目を選択した。現在、わが国で実施されている国民栄養調査は、2001年度に大幅に改訂された。食品の分類方法としては、基本的に日本食品標準成分表に準じて18食品群に分類され、さらに98食品群に分類されている。そこで、食品の選択においては、98食品群分類にもできる限り考慮した。

分析した食品はすべて姫路市内で市販されているもので、2005年9月から10月に購入した。また、サンプルには国内産のもののみでなく、外国産のものも含まれている。

2. ビオチンの定量

食品は、五訂日本食品標準成分表分析マニュアル⁹⁾を参考にして処理した。食品に適量の超純水を加えて十分にホモジナイズした後定容量にし、よく攪拌したものをサンプル溶液とした。これらのサンプル溶液は、ビオチン分析時まで-40 $^{\circ}$ Cで凍結保存

し、分析時に酸加水分解処理をおこない、測定用試料とした。

ビオチンの定量は、ビオチン要求株である乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法^{10),11)}に従い、比濁法で測定した。なお、測定はすべて四重測定でおこない、ビオチン含量は $\mu\text{g}/100\text{g}$ として示した。

3. データベースの選択

本研究では、前報の主要食品 101 品目のビオチン分析値³⁾、東京都 TDS⁶⁾、国民栄養調査結果 (1999 および 2002 年度版)^{12),13)} および東京都栄養調査結果 (1999 および 2002 年度版)^{14),15)} を使用した。

4. 解析方法

2 種類の方法に従って、ビオチン摂取量を算出した。

第 1 に、前報の結果³⁾に、今回分析をおこなった食品を加えた合計食品 237 品目のデータを用いた。これらを国民栄養調査食品群別表¹³⁾に従って、18 食品群および 98 食品群に分類して、各食品群のビオチン含量の平均値の算出をおこなった。これらの値と国民栄養調査結果 (2002 年度版) および東京都栄養調査結果 (2002 年度版) の各食品群の食品摂取量を利用して、1 日あたりのビオチン摂取量を算出した。

第 2 に、東京都 TDS⁶⁾ を利用した。東京都 TDS では、食品は 13 食品群に分類され、食品群ごとのビオチン摂取量と食品摂取量がまとめられているが、各食品群のビオチン含量が記載されていない。そこで、これらの値からビオチン含量を再計算し、各食品群の『推定ビオチン含量』とした。また、国民栄養調査結果^{12),13)}を 18 食品群から 13 食品群に分類し直し、全国民の成人男女

におけるビオチン摂取量を算出した。さらに、東京都民の『推定ビオチン含量』と、東京都栄養調査 (2002 年度) および国民栄養調査 (2002 年度) からビオチン摂取量を算出した。なお、東京都の TDS では、食品群およびデータの表記を英語でおこなっているため、そのまま利用した。

5. 統計処理

データの集計・解析には Excel 2003 (Microsoft) を用いた。また、統計学的解析には StatView Ver.5.0 (SAS Institute, Cary, NC) を用いた。

C. 結果

1. 18 食品群および 98 食品群を利用したビオチン摂取量

食品 237 品目のビオチン分析データを、18 食品群に分類し、各食品群の平均値を求め、ビオチン摂取量を算出した (表 1)。国民栄養調査結果 (2002 年度版) を用いて、1 日あたりのビオチン摂取量を算出すると、 $80.4\mu\text{g}$ であり、男女別では男性で $87.2\mu\text{g}$ 、女性で $74.3\mu\text{g}$ であった。また、98 食品群に分類し、各食品群の平均値を算出した。18 食品群の場合と同様にして、国民栄養調査 (2002 年度版) および東京都栄養調査 (2002 年度版) ビオチン摂取量を用いて、1 日あたりのビオチン摂取量を算出すると、国民で $58.4\mu\text{g}$ 、都民で $60.1\mu\text{g}$ であった。

2. 東京都 TDS (13 食品群) を利用した場合の摂取量

東京都の TDS⁶⁾ をもとに、13 食品群それぞれの『推定ビオチン含量』を算出した (表 3)。推定ビオチン含量がもっとも高いのは、XI 群の Meats and Eggs で $11.2\mu\text{g}$ であり、次に V 群の Pulses で $7.2\mu\text{g}$ であった。このほ

かの食品群は、2~3 μg であった。

国民栄養調査結果（1999年度版）をTDSに従って13食品群に分類し、国民1日あたりのビオチン摂取量を推定したところ44.8 μg であり、都民の45.2 μg と差異は認められなかった。一方、2002年度の国民および東京都調査結果から1日あたりのビオチン摂取量を推定すると、国民で59.5 μg 、都民で61.4 μg であり、国民と都民の間には差異はなかった（表3）。しかし、1999年度の推定量と比較すると、それぞれで1.33および1.36倍の値であった。

D. 考察

著者らの結果³⁾と東京都TDS⁶⁾を比較検討すると、ビオチン摂取量の推定値に約2倍の大きな差がある。また、これらの推定方法はそれぞれ一長一短であり、改良が必要といえる。そこで、本研究では、それぞれの方法について、以下のように検討した。

著者ら³⁾がおこなった18食品群からビオチン摂取量を算出した方法は、非常に簡易的に栄養素の摂取量を算出することができる点で優れている。しかし、ビオチンに関しては、ビオチン摂取量は実際よりも高く見積もられていることが考えられる⁷⁾。この理由として、まず、分析食品101品目は食品成分表に記載されている全食品の約5%で、十分な数のデータであるとはいえない。また、これまでの分析食品には、ビオチン含量が高いと報告されているものを含んでいる。さらに、種実類やきのこ類などでは、多くの食品で食形態や可食部分が類似している、食品群によってはそうでない。例えば、穀類や豆類では、「小麦とパン」や、「大豆と豆腐、みそ、納豆」などのように

原材料と加熱等を施した加工食品が含まれている。また、肉類では筋肉と内臓ではビオチン含量はまったく異なっている。ビオチンは摂取重量の多い筋肉には少なく、摂取量の少ない内臓に多く含まれるために、肉類では、分類の仕方を考慮しなければ、精度の高い結果を得ることはできない。

前報³⁾では、食品101品目に含まれるビオチンのデータを18食品群に分類し、各食品群の平均値と2001年度国民栄養調査結果を用いて、国民1日あたりのビオチン摂取量を求めた。その結果、男性で109.8 μg 、女性で92.8 μg であった。そこで、本研究では、新たに分析をおこなった食品を加えた合計237品目（五訂日本食品標準成分表に収載されている食品1,866品目（ただし調理加工食品類は省く）の12.7%に相当。）のビオチンのデータと2002年度の国民栄養調査結果を用いて、ビオチン摂取量の算出をおこなった。その結果、日本人の1日あたりにおけるビオチン摂取量は80.4 μg （男性87.2 μg 、女性74.3 μg ）と、前報³⁾と比較して、低値となった。これは、分析食品数を237品目に増やしたことで、食品群によってはビオチン含量の平均値が低下したためである。

また、本研究では237品目の食品中のビオチン含量のデータを利用し、さらにビオチン摂取量の算出方法について検討した。これまでは食品数が僅少であったため、ビオチン摂取量の算出にあたっては、食品を18食品群に分類していた。しかし、今回は、種類や形状の近い食品ごとに、より詳細に分類されている98食品群分類法を用い、国民栄養調査（2002年度版）および東京都栄養調査（2002年度版）ビオチン摂取量を用

いて、国民および東京都民における 1 日あたりのビオチン摂取量を算出した。その結果、国民で 58.4 μ g、都民で 60.1 μ g となった。

TDS は、一般的に「マーケット・バスケット調査」とも呼ばれる食事調査の 1 つであり、食品に含まれる残留農薬、環境ホルモン、食品添加物などの微量な化学物質について、食事からの摂取量を推定するために利用されている^{16),17)}。TDS は栄養素の摂取量の調査にも適していると考えられており、主にミネラルの調査に用いられているが^{18),19)}、これまでに多くの報告はない。近年、TDS を利用したビタミン摂取量の調査も散見されるようになったが^{6),20)21)}、食品数や食品の選択方法などについての基礎的な検討が必要である。

国民栄養調査は、2001 年度より改定され、調査方法が大きく変化した。2000 年の五訂日本食品標準成分表の導入に伴い、厚生労働省は調査における食品の分類を、国民栄養調査用に独自に作成していた「食品番号表」から、18 食品群に準じた分類に改定した。また、調理による変化を加味するようになり、食品摂取量では、それまでの調理前の重量から調理後の重量へと変更された。例えば、「米・加工品」の米は、調理後の「めし」・「かゆ」の重量を用いることになった。この改定により、以前と異なる食品群に分類された食品もある。なお、都民の食事摂取量に関するデータは、国民栄養調査の都民分をまとめた結果である。よって、調査方法としては国民栄養調査の方法に準じておこなわれている。したがって、東京都栄養調査においても 2001 年度から調査方法が新しくなっている。

東京都 TDS⁶⁾によると、都民のビオチン

摂取量の算出には、東京都栄養調査結果（1999 年度版）を使用している。これは、改定前の調査方法であり、調査結果に記載されている摂取重量は調理前のものである。しかし、TDS では調理後の食品に含まれるビオチンを分析しているため、結果として、実際のビオチン摂取量よりも少なく見積もられていると考えられる。そこで、東京都 TDS に関しては、調理を加味するために、調査方法が改定された後の 2002 年度の調査結果を用いて再計算した。これら方法から得られた結果を比較すると、2002 年度調査から算出した 1 日あたりのビオチン摂取量の推定値は、東京都 TDS では、国民で 59.5 μ g、都民で 61.4 μ g であり、これらは、1999 年度調査からの算出値の約 1.5 倍であった。ちなみに、東京都の 2003 年度調査を使用すると 60.7 μ g であった⁷⁾。また、これらの値は、本研究の 98 食品群分類からで算出した摂取量と一致した。

これらの 2 種類の方法は、ビオチンのように食品中の含量が未知である栄養素の摂取量の推定において、有効な手段であることが期待される。また、TDS は、化学物質だけでなく、ビタミンやミネラルなどの微量栄養素の摂取量を推定できるといえる。わが国では、現在、TDS によって地域ごとに残留農薬の摂取量の調査がおこなわれているが^{16),17)}、それらの食品サンプルを利用して同時に栄養素の摂取量を算出することも可能である。

ビオチンの摂取量について、外国のデータをみると、Hoppner ら²²⁾ は、カナダの一般的な食事の調査をした結果、計算値で 62 μ g/day、測定値で 60 μ g/day の値を得ている。これは、本結果とほぼ一致する値であ

る。一方、Lewis および Buss²³⁾ は英国で 6,925 世帯を対象にした調査で 1 日あたりのビオチンの平均摂取量は 37.5 μ g であり、そのうち 50%以上を卵類および乳類から摂取していることを報告している。しかし、本研究でのビオチン摂取率は卵類 (15.6%)、穀類 (12.2%)、野菜類 (12.0%)、嗜好飲料類 (12.0%) で高く、乳類からの摂取率は 6.7% に過ぎない。このことから、ビオチン摂取量の差異は、調査方法のみでなく、食文化や食生活の違いにも影響されていることが考えられる。また、わが国の陰膳法を用いた食事調査では、東北地方の中高齢者では 29.8-33.3 μ g/day であり、本研究と比較して低値である⁵⁾。これは、代表値の算出のために幾何平均値を利用しており、算術平均では 54.3 μ g/day となる。

ビオチンの摂取量をより正確に推定するためには、さらなる検討が必要である。しかし、これらの方法を用いて得られた栄養素の摂取量のデータは、わが国の食事摂取基準を策定するための基礎的な資料として有用である。

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) 渡邊敏明 ビオチン: ビタミンの事典, pp299-323, 朝倉書店, 東京. (1996)
- 2) Hardinge MG, Crooks H Lesser known vitamins in foods. *J Am Diet Assoc.* **38** : 240-245(1961)
- 3) 谷口歩美, 大串美沙, 武智隆祐, 渡邊敏明 わが国の食品に含まれるビオチン量の分析. *日本栄養・食糧学会誌* **58**: 185-198. (2005)
- 4) 健康・栄養情報研究会国民栄養の現状 (平成13年厚生労働省国民栄養調査結果), 第一出版, 東京. (2003)
- 5) 渡邊敏明, 大串美沙, 福井徹 わが国の実年者におけるビオチンの体内動態についての検討. *生物試料分析* **27**: 403-408. (2004)
- 6) 齋東由紀, 牛尾房雄 トータルダイエツト調査による東京都民のビオチン, ビタミンB₆, ナイアシンの一日摂取量の推定. *栄養学雑誌* **62**: 165-169. (2004)
- 7) 渡邊敏明, 谷口歩美 トータルダイエツト調査によるビオチン摂取量の推定についての検討. *日本臨床栄養学会雑誌* **27**: 304-312. (2005)
- 8) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会五訂増補日本食品標準成分表, 国立印刷局, 東京. (2005)
- 9) 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

- ル, 社会法人資源協会, 東京. (1997)
- 10) 日本ビタミン学会編ビオチンおよび関連化合物の定量法: ビタミン学実験法 [II] 水溶性ビタミン, pp.481-499, 東京化学同人, 東京. (1985)
 - 11) Fukui T, Iinura K, Oizumi J, Izumi Y Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol*. **40**: 491-498. (1994)
 - 12) 健康・栄養情報研究会国民栄養の現状 (平成11年厚生労働省国民栄養調査結果), 第一出版, 東京. (2001)
 - 13) 健康・栄養情報研究会国民栄養の現状 (平成14年厚生労働省国民栄養調査結果), 第一出版, 東京. (2004)
 - 14) 東京都衛生局編東京都民の健康・栄養状況 (平成11年国民健康・栄養調査 東京都・区実施分集計結果), 東京都, 東京. (2000)
 - 15) 東京都衛生局編東京都民の健康・栄養状況 (平成14年国民健康・栄養調査 東京都・区実施分集計結果), 東京都, 東京. (2003)
 - 16) 細貝祐太郎, 松本昌雄監修 食品安全セミナー2 食品添加物, pp.83-97, 中央法規出版, 東京. (2001)
 - 17) 食品添加物研究会編あなたが食べている食品添加物—食品添加物1日摂取量の実態と傾向—, pp67-82, 日本食品添加物協会, 東京. (2001)
 - 18) van Dokkum W, de Vos RH, Cloughley FA, Hulshof KFAM, Dukel F, Wijsman JA Food additives and food components in total diets in The Netherlands. *Br J Nutr* **48**:223-231. (1982)
 - 19) de Vos RH, Van Dokkum W, Olthof PDA, Quirijns JK, Muys T, Van der Poll JM Pesticides and other chemical residues in Dutch total diet samples (June 1976-July 1978). *Food Chem Toxicol* **22**: 11-21. (1984)
 - 20) Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA Dihydro-vitamin K₁: Primary food sources and estimated dietary intakes in the American diet. *Lipids* **31**:715-720. (1996)
 - 21) Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA Food sources and dietary intakes of vitamin K₁ (phylloquinone) in the American diet: Data from the FDA total diet study. *J Am Diet Assoc* **96**: 149-154. (1996)
 - 22) Hoppner K, Lampi B, Smith DC An appraisal of the daily intakes of vitamin B₁₂, pantothenic acid and biotin from a composite Canadian diet. *Can Inst Food Sci Technol J* **11**:71-74. (1978)
 - 23) Lewis J, Buss DH Trace nutrients.5.Minerals and vitamins in the British household food supply. *Br J Nutr* **60**: 413-424. (1988)

表1 18食品群を利用したビオチン摂取量の推定

日本食品 群別番号	日本食品群	食品摂取量 g/日		ビオチン含量 μg/100g	ビオチン摂取量 ^a μg/日			
		国民栄養調査 ^b			国民			
		全体 ^c	男性 ^d		女性 ^e	全体	男性	女性
1	穀類	353.6	417.9	297.1	1.2	4.2	5.0	3.6
	米類							
	その他	106.9	113.8	100.7	3.6	3.8	4.1	3.6
2	いも及びでん粉類	62.5	62.8	62.3	2.1	1.3	1.3	1.3
3	砂糖及び甘味料	7.2	7.2	7.1	1.4	0.1	0.1	0.1
4	豆類	58.9	60.9	57.1	6.7	3.9	4.1	3.8
5	種実類	2.3	2.4	2.2	34.8	0.8	0.8	0.8
6	野菜類	88.9	88.5	89.2	6.4	5.7	5.6	5.7
	緑黄色野菜							
	その他	180.8	188.2	174.4	2.2	4.0	4.2	3.9
7	果実類	124.3	110.4	136.6	1.2	1.5	1.3	1.6
8	きのこ類	14.9	15.3	14.5	11.0	1.6	1.7	1.6
9	藻類	14.6	14.9	14.4	6.2	0.9	0.9	0.9
10	魚介類	88.2	97.9	79.7	6.5	5.7	6.3	5.2
11	肉類	77.5	90.2	66.3	23.7	18.4	21.4	15.7
12	卵類	36.5	38.9	34.3	23.7	8.6	9.2	8.1
13	乳類	168.5	161.7	174.4	2.5	4.2	4.0	4.3
14	油脂類	10.9	12.1	9.9	0.3	0.0	0.0	0.0
15	菓子類	26.5	22.5	29.9	2.0	0.5	0.4	0.6
16	嗜好飲料類	531.6	596.2	474.8	1.7	8.8	9.8	7.8
17	調味料及び香辛料類	87.5	95.4	80.5	7.1	6.2	6.7	5.7
	合計	2042.1	2197.2	1905.4		80.4	87.2	74.3

^a ビオチン摂取量(合計)は、食品群ごとに食品摂取量とビオチン含量の積を算出した後、各食品群の総和を求めたものである。

^b 2002年。 ^c 11,491人。 ^d 5,377人。 ^e 6,114人。

表2 98食品群を利用したビオチン摂取量の推定

食品群分類			食品摂取量 g/日		ビオチン含量		ビオチン摂取推定量* μg/日			
大分類(18食品群)	中分類(33食品群)	小分類(98食品群)	国民 ^b		東京都民 ^c		国民		東京都民	
			国民 ^b	東京都民 ^c	μg/100g	国民	東京都民			
穀類	米・加工品	米	348.5	297.6	1.4	5.0	4.3			
		米加工品	5.2	3.6	0.6	0.0	0.0			
	小麦・加工品	小麦類	31.6	39.6	1.1	0.3	0.4			
		パン類	5.7	5.3	2.1	0.1	0.1			
		菓子パン類	39.4	46.5	1.2	0.5	0.6			
		うどん、中華めん類	4.0	2.9	2.4	0.1	0.1			
		即席中華めん	8.5	15.1	3.3	0.3	0.5			
		パスタ類	5.1	9.4	3.2	0.2	0.3			
		その他の小麦加工品	5.5	8.7	3.8	0.2	0.3			
		そば加工品	0.4	1.0	4.3	0.0	0.0			
	その他の穀類・加工品	とうもろこし加工品	3.0	0.3	10.2	0.3	0.0			
		その他の穀類	7.7	6.2	3.5	0.3	0.2			
いも類	いも加工品	さつまいも加工品	30.2	28.7	1.8	0.5	0.5			
		じゃがいも加工品	22.8	16.3	1.3	0.3	0.2			
		その他のいも加工品	1.8	1.3	2.9	0.1	0.0			
砂糖・甘味料類	砂糖・甘味料類	砂糖	7.2	6.3	1.4	0.1	0.1			
		甘味料	2.0	1.3	21.9	0.4	0.3			
豆類	大豆加工品	大豆(全粒)加工品	38.2	32.4	4.5	1.7	1.4			
		豆腐	7.9	6.6	4.2	0.3	0.3			
		油揚げ類	6.9	6.5	11.7	0.8	1.0			
		納豆	2.3	2.0	2.5	0.1	0.0			
		その他の大豆加工品	1.8	1.1	7.0	0.1	0.1			
		その他の豆加工品	2.3	2.0	34.8	0.8	0.7			
野菜類	緑黄色野菜	トマト	13.1	20.7	1.7	0.2	0.4			
		にんじん	20.2	21.5	3.5	0.7	0.8			
		ほうれん草	19.0	16.0	6.2	1.2	1.0			
		ピーマン	3.5	3.7	1.2	0.0	0.0			
		その他の緑黄色野菜	33.1	32.3	2.7	0.9	0.9			
		キャベツ	20.0	21.7	3.2	0.6	0.7			
	その他の野菜	きゅうり	9.3	11.3	1.7	0.2	0.2			
		大根	36.5	35.1	0.7	0.2	0.2			
		たまねぎ	28.9	28.9	1.0	0.3	0.3			
		はくさい	19.8	15.6	3.0	0.6	0.5			
		その他の淡色野菜	42.4	48.4	3.8	1.6	1.8			
		野菜ジュース	5.7	13.5	3.9	0.2	0.5			
漬物類	漬物類	漬物	6.5	7.5	0.0	0.0	0.0			
		たくあん・その他の漬物	11.7	15.0	1.4	0.2	0.2			
果実類	生果	いちご	0.1	0.3	2.2	0.0	0.0			
		柑橘類	34.3	29.6	0.8	0.3	0.2			
		バナナ	11.5	10.8	2.5	0.3	0.3			
		りんご	27.1	30.5	1.1	0.3	0.3			
		その他の生果	36.7	38.5	0.6	0.2	0.2			
		ジャム	0.9	1.1	0.5	0.0	0.0			
きのこ類	きのこ類	果汁・果汁飲料	13.7	17.8	1.1	0.2	0.2			
		きのこ類	14.9	14.2	11.0	1.6	1.6			
魚介類	魚介類	鰯類	14.6	13.4	7.6	1.1	1.0			
		あじ、いわし類	11.5	9.0	3.5	0.4	0.3			
		さけ、ます	3.8	3.8	9.3	0.4	0.4			
		たい、かれい類	6.9	4.0	4.4	0.3	0.2			
		まぐろ、かじき類	6.6	8.6	2.6	0.2	0.2			
		その他の生魚	10.0	6.0	8.3	0.8	0.5			
		貝類	4.1	6.3	11.5	0.5	0.7			
		いか たこ類	6.6	6.6	2.9	0.2	0.2			
		えび、かに類	7.0	6.6	2.5	0.2	0.2			
		魚介(凍蔵・生干し、乾物)	17.6	15.0	9.9	1.7	1.5			
		魚介加工品	1.9	2.5	0.7	0.0	0.0			
		肉類	畜肉	魚介(缶詰)	0.4	0.3	-	-	-	
魚介(佃煮)	11.4			10.1	0.4	0.0	0.0			
魚介(練り製品)	0.5			0.4	1.8	0.0	0.0			
魚肉ハム、ソーセージ	14.7			13.7	1.1	0.2	0.2			
牛肉	31.2			34.7	1.7	0.5	0.6			
豚肉	10.0			12.3	5.3	0.5	0.7			
肉類	鳥肉	ハム、ソーセージ類	0.2	0.0	-	-	-			
		その他の畜肉	19.5	18.9	2.4	0.5	0.5			
		鳥肉	0.1	0.2	-	-	-			
		肉類(内臓)	1.6	1.7	141.0	2.3	2.4			
卵類	卵類	肉類(内臓)	0.0	0.0	-	-	-			
		その他の肉類	0.0	0.0	-	-	-			
卵類	卵類	鰾類	36.5	32.7	24.9	9.1	8.1			
		牛乳	101.4	99.0	2.5	2.5	2.4			
		チーズ	2.3	2.5	2.9	0.1	0.1			
		発酵乳・乳酸菌飲料	27.8	37.1	2.1	0.6	0.8			
乳類	その他の乳類	その他の乳製品	37.0	7.0	2.1	0.8	0.1			
		その他の乳類	0.0	0.0	-	-	-			
油脂類	油脂類	バター	1.1	1.7	0.5	0.0	0.0			
		マーガリン	1.1	1.3	0.1	0.0	0.0			
		植物油	8.6	9.4	0.1	0.0	0.0			
		動物性油脂	0.1	0.1	-	-	-			
		その他の油脂	0.0	0.0	-	-	-			
菓子類	菓子類	和菓子類	12.1	12.5	1.8	0.2	0.2			
		ケーキ・ペストリー類	7.6	8.1	1.4	0.1	0.1			
		ビスケット類	1.9	1.6	1.7	0.0	0.0			
		キャンデー類	0.2	0.2	1.3	0.0	0.0			
		その他の菓子類	5.1	5.7	5.3	0.3	0.3			
嗜好飲料類	アルコール飲料	日本酒	14.2	18.3	0.1	0.0	0.0			
		ビール	59.2	68.1	0.6	0.4	0.4			
		洋酒・その他	19.6	29.1	0.2	0.0	0.1			
		茶	310.3	302.0	3.0	5.6	9.1			
調味料および香辛料類	その他の嗜好飲料	コーヒー・ココア	64.8	123.7	1.1	0.7	1.4			
		その他の嗜好飲料類	63.5	72.3	0.4	0.3	0.3			
		ソース	2.3	2.4	5.7	0.1	0.1			
		しょうゆ	18.7	17.5	12.7	2.4	2.2			
調味料および香辛料類	調味料	塩	1.5	1.6	-	-	-			
		マヨネーズ	3.1	3.2	0.8	0.0	0.0			
		味噌	12.9	11.6	19.2	2.5	2.2			
		その他の調味料	48.7	59.5	0.8	0.4	0.5			
		香辛料・その他	0.2	0.3	15.0	0.0	0.0			
		合計	2042.1	2082.6	-	58.4	60.1			

* ビオチン摂取推定量(合計)は、食品群ごとに食品摂取量とビオチン含量の積を算出した後、各食品群の総和を求めたものである。

^b 2002年, 11,491人。 ^c 2002年, 665人。 - 算出不可。

表3 TDSを利用したビオチン摂取量の推定

Food group	Ingredient	食品摂取量 g/日		推定ビオチン含量 ^a $\mu\text{g}/100\text{g}$	ビオチン摂取量 ^b $\mu\text{g}/\text{日}$	
		国民	東京都栄養調査 ^c		国民	東京都民
I	Rice	353.6	301.2	1.6	5.5	4.7
II	Cereals, Nuts, Seeds and Potatoes	171.7	186.7	2.7	4.6	5.0
III	Sugars, Sweeteners and Confectioneries	29.7	34.3	3.1	0.9	1.1
IV	Fats and Oils	10.9	12.5	2.6	0.3	0.3
V	Pulses	58.9	51.9	7.2	4.2	3.7
VI	Fruits	124.3	128.7	0.9	1.1	1.2
VII	Green and yellow vegetables	88.9	94.3	2.3	2.1	2.2
VIII	Other vegetables, Mushrooms and Seaweeds	210.3	224.4	2.0	4.2	4.5
IX	Seasonings and Beverages	619.1	709.5	3.0	18.5	21.2
X	Fishes and shellfishes	88.2	79.3	3.3	2.9	2.6
X I	Meats and Eggs	114.0	114.3	11.2	12.8	12.8
X II	Milks	168.5	145.6	1.3	2.3	2.0
X III	Other food	-	-	5.6	-	-
	Total	2038.1	2082.7		59.5	61.4

^a1999年度の東京都TDS調査結果をもとに算出したものである。

^bビオチン摂取量(Total)は、食品群ごとに食品摂取量とビオチン含量の積を算出した後、各食品群の総和を求めたものである。

^c2002年, 11,491人。 ^d2002年, 665人。 — 算出不可。

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

III. 分担研究者の報告書

13. ビタミン B₁₂ の栄養評価に関する基礎的研究

分担研究者 渡辺文雄 高知女子大学 教授

研究協力者 宮本恵美 高知女子大学 助手

研究要旨

ビタミン B₁₂ の栄養評価について、①新規なビタミン B₁₂ 栄養状態の指標として血球ビタミン B₁₂ 酵素（活性およびタンパク質量）に着目し、ビタミン B₁₂ 欠乏ラットを用いてバイオマーカーとしての有効性を検討した。②中高年者から発症する食品タンパク質結合性ビタミン B₁₂ 吸収障害の分布について、日本人 70 歳代高齢者で予備調査を実施した。

食品分野について、①魚肉のビタミン B₁₂ 含量と各種加熱調理の影響について検討した結果、魚肉中のビタミン B₁₂ の大部分が血合肉に存在することが明らかとなった。また、魚肉加工食品中のビタミン B₁₂ 含量について検討した。②栄養補助食品として利用される藍藻（AFA）に含まれるコリノイド化合物を単離・同定した結果、ヒトにとって生理的に不活性なシュードビタミン B₁₂ であった。

栄養改善分野について、発酵食品めふんを用いた遊離型ビタミン B₁₂ の補完について検討した。市販マクロビオテックス料理本に記載されているメニューの栄養評価と改善法について検討した。

I. 栄養評価

I-1. 新規な B₁₂ 栄養状態の指標の検討：血球 B₁₂ 酵素

B₁₂ 栄養状態の新規な指標として血球中の B₁₂ 依存性酵素活性が利用できるかどうかを検討した。

ヒトを含む高等動物において 2 種類の B₁₂ 依存性酵素の存在が知られている。生体内で奇数鎖脂肪酸やアミノ酸 (バリン, イソロイシン, スレオニン) の代謝に関与する AdoB₁₂ 依存性メチルマロニル CoA ムターゼ (EC5.4.99.2)¹⁾ と 5-メチルテトラヒドロ葉酸とホモシステインからメチオニンの合成に関与する MeB₁₂ 依存性メチオニンシンターゼ (EC2.1.1.13)²⁾ である。今回は予備実験としてラビットを用いて血球中に両 B₁₂ 依存酵素活性が存在するかどうかを Non-IR 高感度酵素活性測定法を用いて検討した。

方法

1) 血球の調製法

B₁₂ 給与および欠乏ラットの血液 5 mL を 4°C で 1500 × g 10 分間遠心分離した。沈殿画分を PBS(-)10 mL で 2 回洗浄したものを実験に用いた。

2) 粗酵素液の調製法

血球 0.5 mL に 10% (w/v) ショ糖を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.5 mL を加えポリトロンを用いて破碎した。その血球破碎液を粗酵素液として実験に用いた。全ての操作は 2-4°C で行った。

3) 血球 B₁₂ 酵素の Non-IR 高感度測定法

3-1. B₁₂ 依存性メチオニン合成酵素活性の測定法

本酵素活性の測定は Huang らの方法³⁾を改良して行った。また, Banerjee ら⁴⁾の半嫌氣的酵素活性測定法に準じて酵素反応液を調製した。酵素反応液の組成は, 100 mM リン酸カリウム緩衝液

(pH7.0), 152 μM S-アデノシルメチオニン (シグマ社製), 50 mM ヒドロキソ B₁₂ (シグマ社製), 25 mM アスコルビン酸, 25 mM ジチオスレイトール, 500 μM-ホモシステイン (シグマ社製), 25 μM 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (シグマ社製), 粗酵素液とし全容量を 1.0 mL とした。酵素反応液は, 5-メチルテトラヒドロ葉酸を含まない反応液を予め調製し, 37°C 5 分間保温し, 本酵素を還元的に活性化させた。

その後, 基質 5-メチルテトラヒドロ葉酸を加え, 37°C 10 分間酵素反応を行った。酵素反応終了後, 直ちに 100°C 2 分間の加熱処理により酵素反応を停止させた。酵素反応液は氷中で 5 分間冷却した後, 遠心分離により変性タンパク質を除去した。この遠心分離上清液をメンブレンフィルター (Millex-LH, 0.45 μm, ミリポア社製) でろ過し, ろ過液 10 μL を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の試料とした。

HPLC 分析システムは島津社製 SCL-10Avp システムコントローラー, LC-10ADvp HPLC ポンプ, DGU-12A デガッサー, CTO-10Avp カラムオーブン, C-R6A クロマトパック, 分光蛍光光度計 RF-5000 を用いた。HPLC の分析条件は TSK-GEL ODS-120A (4.6×250 mm, 東ソー社製) カラムを用い, カラム温度 30°C, 移動相 7.0% (v/v) アセトニトリルを含む 33 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 3.0) を用い, 流速 0.5 mL/min で分析した。酵素反応により生成したテトラヒドロ葉酸を励起波長 290 nm, 蛍光波長 356 nm で測定した。また, 本酵素活性は対照の反応液 (予め 100°C 5 分間加熱処理した粗酵素液を用いて上述の反応液を調製し, 直ちに 100°C, 2 分間の加熱処理を行った後, 5-メチルテトラヒドロ葉酸を添加した反応液) 中のテトラヒドロ葉酸量を差引き求めた。

3-2. B₁₂ 依存性メチルマロニル CoA ムターゼ活性の測定法
本酵素活性の測定は Gaire らの方法⁵⁾を改良して行った^{6, 7)}。酵素反応液の組成は, 100 mM リ

ン酸カリウム緩衝液 (pH7.0), 33.3 μ M AdoB₁₂ (シグマ社製), 133.3 μ M (R, S)-メチルマロニル CoA (シグマ社製), 粗酵素液とし全容量を 150 μ L とした。酵素反応液は, (R, S)-メチルマロニル CoA を含まない反応液を予め調製し, 37°C 5 分間保温し, 本酵素をホロ化させた。その後, 基質(R, S)-メチルマロニル CoA を加え, 35°C 10 分間酵素反応を行った。酵素反応終了後, 直ちに 10% TCA を 50 μ L 添加することにより酵素反応を停止させた。酵素反応液を遠心分離により変性タンパク質を除去した。この遠心分離上清液をメンブレンフィルター (Millex-LH, 0.45 μ m, ミリポア社製) でろ過し, ろ過液 20 μ L を HPLC の試料とした。

HPLC 分析システムは島津社製 SCL-10Avp システムコントローラー, LC-10ADvp HPLC ポンプ, DGU-12A デガッサー, CTO-10Avp カラムオーブン, C-R6A クロマトパック, SPD-10Avp UV-VIS 検出器を用いた。HPLC の分析条件は Cosmosil 5C18-AR-II (3.0 \times 150 mm, ナカライ社製) カラムを用い, カラム温度 40°C, 移動相 A : 100 mM 酢酸を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) と移動相 B : 18%(v/v)メタノールを含む移動相 A を用い, 流速 1.0 mL/min で 7 分間移動相 A:B 比 (50 : 50) から移動相比 (0 : 100) のリニアグラジェントで分析した。酵素反応により生成したスクシニル CoA を 254 nm で測定した。また, 本酵素ホロ活性は AdoB₁₂ 無添加の酵素反応液を用いて測定し, アポ活性は AdoB₁₂ を添加した反応液を用いて測定した全活性から上記のホロ活性を差引き求めた。

3) ヒト組換えメチルマロニル CoA ムターゼ抗体

大阪府立大学大学院中野長久先生より譲渡されたものを用いた。

3) タンパク質定量法

タンパク量はオボアルブミンを標準タンパク質としてバイオ-ラッド社製プロテインアッセイ試薬を用いて定量した。

結果および考察

B₁₂ 供給および欠乏ラットの血球中のメチルマロニル CoA ムターゼおよびメチオニン合成酵素活性を HPLC 法で測定した結果を表 1 に示す。

血球中のメチルマロニル CoA ムターゼ活性は, B₁₂ 欠乏により, 約 9 倍の活性上昇が観察され, 血球サンプルの数ヶ月間の冷凍保存 (-80°C) による活性の消失は検出されなかった。一方, メチオニン合成酵素活性は, コントロールの B₁₂ 給与ラットにおいても非常に低値を示し, 冷蔵保存中に顕著な活性低下が観察された。

また, ヒト組換えメチルマロニル CoA ムターゼ抗体を用いたウェスタン・ブロット分析の結果を図 1 に示す。B₁₂ 給与ラットの血球抽出液において抗体と反応するものは観察されなかったが, B₁₂ 欠乏ラットにおいて免疫反応物を観察することができた。以上の結果から, 酵素の保藏安定性, 活性測定法の簡便さなどから血球メチルマロニル CoA ムターゼが B₁₂ の栄養状態の指標の 1 つとして利用できる可能性が示唆された。

I-2. 母乳の B₁₂ 含量

平成 17 年度に採取された母乳 126 サンプルの B₁₂ 含量を測定した。

方法

B₁₂ 定量方法

母乳に含まれる B₁₂ 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⁸⁾ に準じて *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (旧名 *L. leichimannii*) ATCC7830 を用いた。なお, 母乳の量と母乳中に含まれる B₁₂ 含量を考慮して母乳 0.5 mL を試料とし, 酢酸緩衝液, KCN 溶液, メタリン酸溶液量はマニュアルに記載されている用量の 1/20 量で抽出を行った。本定量菌は B₁₂ 以外にヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチドにも活性を示すため, これらアルカリ耐性因子として別にアルカリ処理を行