

い、見かけの 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 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、ライヒマニ摂取用培地、ライヒマニ用 B<sub>12</sub> 定量基礎培地を用いて行った。

#### 結果および考察

全試料中の B<sub>12</sub> 含量の分析結果を図 2 にまとめた。母乳 126 サンプルの B<sub>12</sub> 含量の平均は  $0.943 \pm 0.531 \mu\text{g/L}$  ( $0.696 \pm 0.392 \text{ nmol/L}$ , 平均値  $\pm$  標準偏差),  $0.22\text{-}2.70 \mu\text{g/L}$  ( $0.16\text{-}1.99 \text{ nmol/L}$ ) の範囲, 変動係数 (CV) は 56.3%, 中央値は  $0.785 \mu\text{g/L}$  ( $0.5792 \text{ nmol/L}$ ) であった。

これまでに報告されている母乳中の平均的な B<sub>12</sub> 含量をまとめたものが表 2 である。母乳中に含まれる B<sub>12</sub> の定量法として、我が国では微生物学的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。放射性同位体希釈法は血清 B<sub>12</sub> 含量の測定においては、微生物法より若干高い値 (約 1.3 倍) を示すことが報告されており,<sup>9)</sup> これを母乳に単純にあてはめることはできないが、これまでの報告からは微生物学的定量法に比べて非常に高値であった。これは、定量法の違い、人種の差や食生活の違い等が起因すると思われるが、しかし、今回の結果は  $0.943 \pm 0.531 \mu\text{g/L}$  とこれまでの日本人女性の母乳中 B<sub>12</sub> 含量の報告<sup>10, 11)</sup> よりも顕著に高値であり、むしろ放射性同位体希釈法で分析を行った、Casterline ら<sup>12)</sup> ( $0.93 \mu\text{g/L}$ ) や Sandberg ら<sup>13)</sup> ( $0.97 \mu\text{g/L}$ ) の報告と近値であった。母乳中の B<sub>12</sub> 含量は初乳から成熟乳になるに従って減少するとの報告がある。<sup>10, 14)</sup> 今回の試料については採乳時期や食事内容について検討がされていない無作為なものであるため、前回の報告と比較して高値を示した理由については何に起因するものか明らかにできなかった。

日本人の食事摂取基準 (2005 年版) では平均的な日本人の母乳の B<sub>12</sub> 含量  $0.2 \mu\text{g/L}$ , 哺乳量  $0.78 \mu\text{g/L}$  を用いて摂取量 ( $0.156 \mu\text{g/day}$ ) を算出

し、目安量を  $0.2 \mu\text{g/day}$  として策定され<sup>15)</sup>、米国の食事摂取基準においては母乳中の B<sub>12</sub> 含量は我が国より高い値 ( $0.42 \mu\text{g/L}$ ) を採用し、哺乳量  $0.78 \mu\text{g/L}$  を用いて摂取量  $0.33 \mu\text{g/day}$  を算出し、所要量を  $0.4 \mu\text{g/day}$  としている。このように日本の B<sub>12</sub> の食事摂取基準は米国の 1/2 であり、乳児の B<sub>12</sub> 欠乏症から臨床症状の回復を指標として策定されている WHO の所要量 (FAO/WHO1988) は  $0.1 \mu\text{g/day}$  を上回ってはいない、<sup>16)</sup> 非常に低いといえる。人種の違いや食生活の違いはあるが、今回の結果から考慮すると、日本人乳児の B<sub>12</sub> の食事摂取基準は次回の策定では再検討する必要がある。

#### I-3. 尿中の B<sub>12</sub> 代謝物

平成 14 年度の日本人の食事摂取基準のための基礎研究において B<sub>12</sub> 推奨量 ( $2.4 \mu\text{g/day}$ ) を摂取した成人男女の尿中 B<sub>12</sub> 排泄量の日内変動を調べた結果<sup>17)</sup> においても尿中 B<sub>12</sub> 排泄量に有意な変化は認められず、体内 B<sub>12</sub> および B<sub>12</sub> 関連物質の顕著な日内変動は存在しないという結果<sup>18)</sup> と一致した。今回は、尿中に B<sub>12</sub> 代謝物の存在の有無を検討するためにスポット尿を用いてシリカゲル 60TLC・バイオオートグラム法により検討した。

#### 方法

##### 1) 尿:

B<sub>12</sub> を含むサプリメントを摂取していない健康な成人男女 6 名のスポット尿を採取した。

##### 2) 尿からの B<sub>12</sub> の抽出法

尿:	50 mL
(尿に沈殿物がある場合は、 $3000 \times \text{g}$ , 10 分間の遠心分離を行う。)	
0.1M 酢酸緩衝液, pH 4.8:	10 mL
蒸留水:	38 mL
0.025 g/100 mL KCN 水溶液:	1 mL

よく混和し、オートクレーブで  $120^\circ\text{C}$ , 5 分間加熱抽出を行う。冷却後、10% (w/v) メタリン酸

水溶液 (1 mL) を加える。3000×g, 10 分間遠心分離上澄画分を分離した。その後, 75%(v/v) エタノールで洗浄・蒸留水で平衡化させたセツパック C18 カートリッジ (5g) に尿抽出液全量を負荷させた。蒸留水 20 mL でカートリッジを洗浄後, 75%(v/v)エタノール 20 mL で吸着物を溶出させた。溶出液を減圧下でロータリエバポレーターを用いて乾固させた。乾固物を蒸留水 1 mL に溶解し, 沈殿物を遠心分離により除去し, 上澄液を分析サンプルとした。

### 3) B<sub>12</sub> 依存性大腸菌 *E. coli* 215 を用いたバイオオートグラフィー

上述の尿抽出液 1 - 2μL をシリカゲル 60 アルミニウムシート (10×10cm) にスポットし, 展開溶媒 2-プロパノール/アンモニア水/蒸留水 (7/2/1) を用いて室温・暗黒下で展開させた。展開後, TLC シートを完全に展開溶媒がなくなるまでドライヤーで風乾させた。その後, 定法により B<sub>12</sub> 依存性大腸菌 *E. coli* 215 を含んだ寒天培地 (角型シャーレ) の上に TLC シートを気泡がはいらないように重ね, 37°C で約 20 時間培養を行う。その後, TLC プレートを除去し, 寒天培地上に 4% (w/v) TTC エタノール溶液を噴霧し, 1 時間程度 37°C でインキュベートさせ, 大腸菌を赤色に染色した。

#### 結果および考察

成人男女 6 人のスポット尿を用いてシリカゲル 60TLC・バイオオートグラム法により尿中の B<sub>12</sub> 代謝物の存在の有無を検討した。その結果, 図 3 に示すように, 個々人により尿中 B<sub>12</sub> 含量にかなりの相違が観察された。また, 6 サンプル中 5 サンプルは標準の B<sub>12</sub> の R<sub>f</sub> 値よりも若干高値を示したが, 1 サンプルのみ顕著に標準 B<sub>12</sub> と R<sub>f</sub> 値の異なるものが存在した。HPLC 分析を行った結果も標準の B<sub>12</sub> の保持時間より, 両者ともブロードなピークを示し, 明らかに標準の B<sub>12</sub> と異なる構造を有することが示唆された。

現在, 尿中排泄量の多い試料を多量に集め,

B<sub>12</sub> 代謝物の詳細な情報を得よう検討している。

### I-4. 日本人高齢者における食品タンパク質結合性 B<sub>12</sub> 吸収障害の分布調査

50 歳以上の成人の 10~30% は胃酸分泌の低い萎縮性胃炎を患っており, 食品からの B<sub>12</sub> の生体利用率 (吸収率) が減少していると推測される<sup>19)</sup>。我が国において胃酸分泌の減少が B<sub>12</sub> 栄養状態に及ぼす影響について調査した報告がない。そこで, 今回, 日本人の 70 歳代成人男女の B<sub>12</sub> の栄養状態 (血清 B<sub>12</sub> 量) と胃酸分泌の減少 (血清ガストリン量) の関係を検討した。

#### 方法

##### 1) 血清

日本人 70 歳代成人男女の血清サンプルは, 兵庫県立大学渡邊敏明先生から譲渡していただいた。

##### 2) 血清 B<sub>12</sub> 量およびガストリン量

1 回目の調査 (調査 I) では, 99 名分の血清サンプルを高知市の臨床検査会社に分析依頼し, 血清 B<sub>12</sub> 量 (CLIA 法) とガストリン量 (RIA 法) を測定した。

2 回目の調査 (調査 II) では, すでに血清 B<sub>12</sub> 量が測定済みの約 400 名分の血清サンプルを用いて, B<sub>12</sub> 欠乏群, B<sub>12</sub> 低値群, B<sub>12</sub> 正常群に分けた後, 血清ガストリン量 (RIA 法) を臨床検査会社に分析依頼した。

#### 結果および考察

調査 I において日本人の 70 歳代成人男女の血清サンプル (99 名分) の血清 B<sub>12</sub> 含量を分析した結果, B<sub>12</sub> 欠乏群に 4 名, B<sub>12</sub> 低値群に 22 名となり, 70 歳代成人の約 25% が血清 B<sub>12</sub> 含量の低い状態であることがわかった。また, 胃酸分泌減少との関係を調べるために血清ガストリン含量を測定した結果, B<sub>12</sub> 欠乏群および低値群で増加傾向を示したが (表 3), 有意差は認めら

れなかった。

調査 I において B<sub>12</sub> 欠乏群が非常に少なかったため、調査 II においては、すでに血清 B<sub>12</sub> 含量測定済みの約 400 名の血清サンプルの中から B<sub>12</sub> 含量を指標に 3 群にわけ、B<sub>12</sub> 含量と胃酸分泌減少との関係を調べるために血清ガストリン含量を測定した。その結果、B<sub>12</sub> 欠乏群と正常群の間で血清ガストリン含量の差がより明確になったが (表 4)、有意な結果は得られなかった。

## II. 食品

### II - 1. かつお魚肉の B<sub>12</sub> 含量と各種加熱調理が魚肉 B<sub>12</sub> 含量に及ぼす影響

日本は世界有数の魚介類の消費国であり、魚介類から 24.6%ものタンパク質を摂取しており、畜肉類の 16.6%を大きく上回っている<sup>19)</sup>。また、魚介類はその他の栄養素 (脂質、ビタミン、ミネラル) のよい供給源ともなっており<sup>19)</sup>、魚介類が日本人にとって重要な食品であることを示している。

B<sub>12</sub> は主に動物性食品に含まれており、一部の藻類や微生物が関与する発酵食品 (糸引き納豆<sup>20)</sup>、テンペ<sup>21)</sup>、後発酵茶<sup>22, 23)</sup>) を除き植物性食品にはほとんど含まれていない。<sup>24)</sup> 米国では、畜肉や牛乳が B<sub>12</sub> のよい供給源であるが、<sup>25)</sup> 我が国では魚介類が主要な供給源となっており<sup>26)</sup>、栄養学的に重要である。しかし、畜肉<sup>27)</sup> や牛乳<sup>28)</sup> に比べ、魚肉の B<sub>12</sub> 含量や化学的性質、ならびに加熱調理による B<sub>12</sub> の損失についての知見は非常に少ない。

そこで、比較的大型で血合肉も食する赤身魚としてかつおに着目し、魚肉各部位の B<sub>12</sub> 含量ならびに血合肉中に含まれるコリノイド化合物の同定を行った。また、かつおは、生で刺身やタタキとして食する機会が多いが、まぐろなど

の赤身魚のモデルとして各種加熱調理が魚肉 B<sub>12</sub> 含量に及ぼす影響を検討した。

### II - 2. 市販ふりかけおよび茶漬けの素中の B<sub>12</sub> 含量

B<sub>12</sub> のよい供給源である魚介類や藻類を用いた加工食品の中で、日本人が日常的に飯と共に食することができ、且つ五訂/day 本食品標準成分表に記載されていない食品としてふりかけと茶漬けの素に着目した。これら五訂日本食品標準成分表に未記載の加工食品中の B<sub>12</sub> 含量を測定し、数値を定めると共に、B<sub>12</sub> のよい供給源になりえるかどうかを検討した。

#### 方法

##### 1) 試料

市販のふりかけおよび茶漬けの素は、高知市内の市場で購入して実験に用いた。

##### 2) B<sub>12</sub> の抽出・定量法

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>29)</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、定量に用いる培地は、日水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 B<sub>12</sub> 定量基礎培地を用いた。

ふりかけおよび茶漬けの素 5~10g 程度をフードプロセッサーで粉碎後、分析試料 2g を正確に秤量し、定法によりシアン化カリウムを含む酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中で B<sub>12</sub> を加熱抽出した。

また、本定量菌は、B<sub>12</sub> 以外にデオキシリボースやデオキシリボヌクレオチドにも B<sub>12</sub> 活性を示すため、分析マニュアル<sup>29)</sup> に記載された以下の方法で補正した。

上記 B<sub>12</sub> 抽出液の一部に 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH を 11~12 に調整後、オー

トクレーブ (121°C, 30分) 処理を行い, B<sub>12</sub>を分解させた. その後, 1 mol/L 塩酸溶液で pH を 6 に調整・定容し, この溶液をアルカリ耐性因子画分として B<sub>12</sub>抽出液と同様に微生物学的定量法で B<sub>12</sub>含量を測定した.

B<sub>12</sub>抽出液画分に検出された B<sub>12</sub>含量からアルカリ耐性因子画分に検出された B<sub>12</sub>含量を差し引き, 試料中の正味の B<sub>12</sub>含量を算出した.

### 結果および考察

五訂日本食品標準成分表で採用されている *L. delbrueckii subsp. lactis* ATCC7830 を用いた B<sub>12</sub>定量法で市販ふりかけ中の B<sub>12</sub>含量を測定した

(表 5). その結果, かつお・小魚ふりかけ中の B<sub>12</sub>含量は, 2.39~10.88 μg/100g と比較的高く, 次のいでり・たまごのふりかけ (1.32~6.50 μg/100g) であった. 一方, さけ, たらこ, その他のふりかけの B<sub>12</sub>含量は, 低いものが多かった. 使いきりタイプの小包装では, 内容物の重量が 2 g 程度のものであったので, 一食あたりの摂取含量の目安として併記した. 今回測定した 26 種の市販ふりかけ中の B<sub>12</sub>含量の平均値は 3.84 μg/100g であり, 一食あたり約 0.1 μg が摂取できると思われる.

一方, 市販茶漬けの素中の B<sub>12</sub>含量において, 主要な素材の違いが B<sub>12</sub>含量へ及ぼす影響は, ふりかけほど大きくなかった (表 6). 内容物の重量が 8 g 程度のものであったので, 一食あたりの摂取含量の目安として併記した. 茶漬けの素中の B<sub>12</sub>含量の平均値は, 2.25 μg/100g となり, 一食あたり約 0.18 μg の B<sub>12</sub>が摂取できると推定される.

以上の結果から飯にかけて食するふりかけや茶漬けの素の中には比較的高い B<sub>12</sub>含量を示すものもあったが, 推定される一食あたりの B<sub>12</sub>摂取量は/day 本人の食事摂取基準 (2005 年度版)<sup>15)</sup> の成人男女の推奨量 (2.4 μg) の 1/10 程度であった. しかし, B<sub>12</sub>を含まない飯をふりかけや

茶漬けの素と共に食することで少なからず B<sub>12</sub>を強化できることが明らかとなった.

### II-3. 市販かつお節およびいりこだしの素ならびに調製だしつゆ中の B<sub>12</sub>含量と特性

B<sub>12</sub>のよい供給源である魚介類あるいはその加工品の中で日本人が日常的に食している食品で, 且つ遊離型 B<sub>12</sub>を含むと思われる食品として, かつお節および煮干し (いりこ) の熱水抽出液であるだし汁に着目した. 市販されているかつお節およびいりこだしの素や濃縮 (あるいはストレート) だしつゆに含まれる B<sub>12</sub>含量とその特性を調べ, 食品タンパク質結合性 B<sub>12</sub>吸収不全症予防のためにこれらだしつゆが遊離型 B<sub>12</sub>の供給源になりえるかどうかを検討した.

#### 方法

##### 1) 試料

粉末・顆粒のかつお節およびいりこだしの素, 水で数倍に薄めて使用する多目的用濃縮だしつゆ, そのままで (ストレート) 使用するそうめんつゆおよびそばつゆならびにかつお削り節 (花かつお) および煮干しは, 高知市内の市場で購入し実験に用いた.

かつお削り節および煮干しのだし汁の調製法は, それぞれの製造会社の袋裏面に記載されている以下のような一般的な方法で行った.

かつお削り節からの一番だしの調製は, 600 mL の水を沸騰させ, 少し火を弱めてから約 20 g の削り節を入れ, 蓋をしないうで 2 分間煮出した. 火を止めてからそのままおき, かつお節が沈んだところでかつお節をすくい取った. また, 一番だしを取ったかつお節に 600 mL の水を加え火をかけ, 沸騰後 10 分間煮出し, 火を止めてかつお節を取り出すことで二番だしを調製した.

煮干しのだしの調製は, 煮干し 30 g を水 1 L に約 30 分間浸漬した後, 中火で蓋をせず沸騰し,

火を弱め約10分間加熱した。火を止め、少しおいてから煮干しを取り除いた。

## 2) B<sub>12</sub>の抽出・定量法

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>29)</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、定量に用いる培地は、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 B<sub>12</sub> 定量基礎培地を用いた。

粉末・顆粒だしの素 2 g を正確に秤量し、定法によりシアン化カリウムを含む酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中で B<sub>12</sub> を加熱抽出した。濃縮およびストレートだしつゆは、40 g を正確に秤量し、抽出を行った。

本定量菌は、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 B<sub>12</sub> 活性を示すため、これら化合物をアルカリ耐性因子として別に測定後、アルカリ耐性因子量を差し引き、試料中の B<sub>12</sub> 含量を算出した。

## 3) 遊離型 B<sub>12</sub> の分離法

濃縮およびストレートだしつゆ中に含まれる B<sub>12</sub> が遊離型 B<sub>12</sub> であるかどうかを検討するため、各試料 1.0 mL をセントリコン 10 (アミコン社製) 遠心限外ろ過器でろ過した。ろ過液 (分子量 10,000 以下) を遊離型 B<sub>12</sub> 画分として上述した同様な条件下で B<sub>12</sub> を抽出・定量した。

### 結果および考察

#### 1) 市販だしの素およびだし汁中の B<sub>12</sub> 含量

五訂日本食品標準成分表で採用されている *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を用いた B<sub>12</sub> 定量法で市販だしの素、濃縮およびストレートだしつゆ中の B<sub>12</sub> 含量を測定した (表 7)。

かつお削り節から調製した一番だしの B<sub>12</sub> 含量は非常に低く、煮出し時間が多い二番だしでも B<sub>12</sub> 含量は 0.01 μg/100 mL に留まった。また、煮干しだし中に B<sub>12</sub> を検出することはできな

かった。この結果は、B<sub>12</sub> が血合肉や内臓に比較的多量に存在すると思われるが、通常のだしの取り方では B<sub>12</sub> の抽出が不十分であると考えられる。

市販かつお節およびいりこだしの素 (粉末・顆粒) から調製しただしつゆ中の B<sub>12</sub> 含量もかなり低く、上述したかつお削り節から調製しただしつゆの B<sub>12</sub> 量とほぼ同レベルであった。

一方、多目的に利用される濃縮だしつゆやストレートで利用するそうめんつゆやそばつゆ中の B<sub>12</sub> 含量は、0.15~1.19 μg/100 mL とかなり高かった。これらの調製だしつゆ中には風味原料や調味料としてまぐろエキス、魚醤、タンパク質分解物などが含まれており、これらの添加物が B<sub>12</sub> の供給源となっているものと思われる。

また、調製だしつゆ中の B<sub>12</sub> 含量は、B<sub>12</sub> のよい供給源のひとつである普通牛乳の B<sub>12</sub> 含量

(0.3 μg/100 g) よりも高かった。牛乳に含まれる B<sub>12</sub> は、すべてタンパク質と結合しているが<sup>10)</sup>、

だしつゆは加熱抽出液であり遊離型の B<sub>12</sub> が含まれると思われる。

そこで、濃縮およびストレートだしつゆ (F~L) 中に含まれる B<sub>12</sub> が遊離型 B<sub>12</sub> であるかどうかを検討するためセントリコン 10 を用いて限外ろ過した結果、調製だしつゆ F~L に含まれる B<sub>12</sub> のすべてが、低分子量のろ過液画分に回収された。この結果は、濃縮およびストレートだしつゆ中に含まれる B<sub>12</sub> が遊離型 B<sub>12</sub> であることを示している。

以上の結果から熟年からはじまる食品タンパク質結合性 B<sub>12</sub> 吸収不全症の予防のために濃縮およびストレートだしつゆは遊離型 B<sub>12</sub> のよい供給源になりえることが明らかとなった。

## II-6. 栄養補助食品 AFA (*Aphanizomenon flos-aquae*) に含まれるコリノイド化合物の単離・同定

栄養補助食品スピルリナに含まれるコリノイド化合物のほとんどが7-アデニルシアノコバミド(シュード B<sub>12</sub>)であることを明らかにしてきた。<sup>30)</sup> スピルリナと同じ藍藻類である *Aphanizomenon flos-aquae* (A.F.A.) はビタミンやミネラルを豊富に含み、各社製品の成分表示では、通常の植物性食品にはほとんど含まれていない B<sub>12</sub> についても豊富に含むとされ、栄養補助食品として現在国内外で市販されている。しかし、A.F.A.におけるコリノイド化合物についての知見はほとんど無く、真の B<sub>12</sub> であるとはまだ実証されていない。そこで、A.F.A.におけるコリノイド化合物について単離・同定を行った。また、B<sub>12</sub> 欠乏ラットを用いて回復実験を行いバイオアベイラビリティについても検討した。

### Ⅲ. 栄養改善

#### Ⅲ-1. 発酵食品めふんを用いた遊離型 B<sub>12</sub> の補完

Adachi らは<sup>31)</sup>、めふんに含まれているコリノイド化合物が真の B<sub>12</sub> であることを報告しているが、食品タンパク質結合性 B<sub>12</sub> 吸収不全症への予防のためには、胃酸分泌減少条件下でもめふんから B<sub>12</sub> が十分に消化・遊離できる必要がある。そこで、本章では、めふんに遊離型 B<sub>12</sub> がどの程度含まれているのかを明らかにすると共に、人工消化系を用いて胃酸分泌減少条件下でもめふんから B<sub>12</sub> がどの程度消化・遊離することができるのかを検討した。

#### 方法

##### 1) 試料

めふんは青森県産、新潟県産および北海道産のもの(各5個)を市場で購入して実験に用いた。

北海道産の生のさけの腎臓は、宮崎大学林雅弘助教授から譲渡されたものを用いた。めふんおよびさけ腎臓は、実験に供するまで-20℃の冷凍庫で保存した。

##### 2) 試薬

B<sub>12</sub> の定量には、日水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 B<sub>12</sub> 定量基礎培地を用いた。B<sub>12</sub>、ペプシン、パンクレアチンはシグマ社製を用いた。その他の試薬は、すべて市販の特級試薬を用いた。

##### 3) B<sub>12</sub> 抽出・定量法

めふんに含まれる B<sub>12</sub> の定量は、五訂/day 本食品標準成分表で採用されている分析マニュアル<sup>29)</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。

めふん試料をミキサーにより破碎後、2 g を正確に秤量し図 5 に示すような方法で B<sub>12</sub> を抽出した。また、本定量菌は、B<sub>12</sub> 以外にデオキシリボシドやデオキシリボスクレオチドにも 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った。試験試料液 A より求めた見かけの B<sub>12</sub> 量から試験試料液 B より求めたアルカリ耐性因子量を差し引き、試料中の B<sub>12</sub> 含量を算出した。

##### 3) ゲル濾過法

北海道産めふん(およびさけ腎臓) 1g に 0.2mol/L KCL 溶液を含む 10 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 10mL を加え、ワーリングブレンダー(日本精機製作所社製)を用いて破碎した。この破碎液を 10,000×g、10 分間の遠心分離を行い、この上澄液をめふん抽出液として実験に用いた。めふん抽出液 1.0mL を 0.2mol/L 塩化カリウムを含む 10mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化させた Sephadex G-50 カラム (1.4×25cm) に重層し、同緩衝液で流速 1.0mL/min で溶出させた。カラムからの溶出液は、バイオラド社製フラクションコレクターを

用いて 1.0mL ずつ分画した。高分子量画分と遊離 B<sub>12</sub> 画分は、ブルーデキストランと標準 B<sub>12</sub> 溶液を用いて、それぞれ 600nm と 551nm の吸光度を測定することで算出した。溶出液中の B<sub>12</sub> は上述のバイオアッセイによって定量した。

#### 4) 人工消化法

人工消化法は、Laparra らの方法<sup>32)</sup>に準じて行った。約 20 g のめふん（および焼いたさけ切り身）を乳鉢・乳棒で細かく破碎した（口腔画分）。破碎物 5g を秤量し、300mL 容三角フラスコに移し、蒸留水 90mL を加え、6 mol/L HCl で pH を 2.0 に調整した。15 分後に再度 pH を確認した後、新しく調製したペプシン溶液（0.1mol/L HCl 1mL に 0.1 g のペプシンを溶解）0.1mL を加えた。この溶液に蒸留水を加え重量を 100g に調製した。この溶液を 37°C の浴槽中に 2 時間、120 ストローク/分で振とうさせた（胃画分）。

振とう後、胃画分の pH を 1mol/L NaHCO<sub>3</sub> を添加して pH 5.0 に調整した。新しく調製したパンクレアチン溶液（0.2 g のパンクレアチンを 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 50mL に溶解）0.7mL を加えた。この溶液の pH が 6.5 になるように調整した後、37°C の浴槽中に 2 時間、120 ストローク/min で振とうさせた（腸画分）。

振とう後、この溶液の pH を 0.5mol/L NaOH で 7.2 に調整した。この人工消化溶液すべてを遠心チューブに入れ、4°C、15000×g で 30 分間遠心分離を行った。遠心分離上澄画分の一部（2mL）をセントリコン 10（分子量 10000 の限外ろ過膜）を用いて低分子量（分子量 10000 以下）画分と高分子量（分子量 10000 以上）画分を分離した。人工消化処理前の試料ならびに人工消化処理後の試料（低分子量画分および高分子量画分）に含まれる B<sub>12</sub> を上述のバイオアッセイで定量した。

胃酸分泌減少の条件として胃画分の pH を 4.0 および 7.0 に調整して同様の消化実験を行った。

#### 結果および考察

#### 1) 各種めふんに含まれる B<sub>12</sub> 含量

日本の代表的な産地のめふんに含まれる B<sub>12</sub> 含量を五訂日本食品標準成分表で採用されているバイオアッセイで測定した（表 8）。その結果、いずれのめふんにも多量の B<sub>12</sub>（116.3～556.3μg/100g）が含まれており、これら三産地のめふんの B<sub>12</sub> 含量の平均値（346.1μg/100g）は五訂日本食品標準成分表の数値と同程度であった。また、以後の研究には、B<sub>12</sub> 含量が最も高かった北海道産のめふんを用いた。

#### 2) めふんに含まれる遊離型 B<sub>12</sub> の存在比

食品タンパク質結合性 B<sub>12</sub> 吸収不全症への予防のためには、胃酸分泌減少条件下でもめふんから B<sub>12</sub> が十分に消化・遊離できる必要がある。そこで、めふんに遊離型 B<sub>12</sub> がどの程度含まれているかを Sephadex G-50 のゲル濾過を用いて検討した。めふんの原料である生のさけ腎臓中に含まれる B<sub>12</sub> の約 60% は遊離型 B<sub>12</sub> として存在していたが、めふんでは遊離型 B<sub>12</sub> が 84% に増加していた（表 9）。この結果から、めふんは遊離型 B<sub>12</sub> のよい供給源として利用できることが明らかとなった。

#### 3) 胃酸分泌減少条件下でのめふんからの遊離型 B<sub>12</sub> の生成率

人工消化系を用いて胃酸分泌減少条件下でもめふんから B<sub>12</sub> が遊離することができるかどうかを検討した（表 10）。

さけ切り身（焼き）を対照として人工消化実験を行った時、正常な胃酸分泌条件下（胃画分の pH が 2.0）では、76.5% の B<sub>12</sub> が遊離することができたが、胃酸分泌減少条件下（胃画分の pH が 4.0 および 7.0）では、20～30% に減少した。この結果は、胃酸分泌量が B<sub>12</sub> の腸管吸収に重要な影響を与えていることを示している。一方、めふんの人工消化実験の結果、胃酸分泌の状態（胃画分の pH）に関係なくすべての B<sub>12</sub> が遊離することができた。

日本の代表的な産地からめふんを購入して

B<sub>12</sub>含量を測定した結果、いずれのめふんにも多量のB<sub>12</sub> (116.3~556.3μg/100g) が含まれていたが、製造産地によりB<sub>12</sub>含量に顕著な相違があった。めふんは、さけの腎臓を伝統的方法で塩漬けにした発酵食品であるため、めふんに含まれるB<sub>12</sub>含量は、発酵に関与する微生物の影響を大きく受ける可能性が考えられた。しかし、Adachiらは<sup>31)</sup>、各種めふん中の生菌数が非常に少ないことや生のさけ腎臓にも多量(128.5μg/100g)のB<sub>12</sub>が含まれていることから、めふんのB<sub>12</sub>が微生物由来でない可能性を報告している。魚類のB<sub>12</sub>代謝における腎臓の役割についての情報は皆無であるが、生体内B<sub>12</sub>の貯蔵に関与している可能性が考えられ、さけのB<sub>12</sub>栄養状態の指標になるかもしれない。

また、生のさけ腎臓中に含まれるB<sub>12</sub>の約60%は遊離型B<sub>12</sub>として存在していたが、めふんでは遊離型B<sub>12</sub>が84%に増加していた。この結果は、発酵中にさけ腎臓細胞の自己消化や微生物の生産するタンパク質分解酵素の作用で腎臓細胞のタンパク質が分解されたことに起因すると推定される。発酵食品のめふんは遊離型B<sub>12</sub>のよい供給源として利用できることが明らかとなった。

加齢とともに胃酸の減少や萎縮性胃炎の発症などのため生体内のB<sub>12</sub>レベルが低下する<sup>33)</sup>ことが報告されているが、B<sub>12</sub>の腸管吸収に及ぼす胃酸の影響が実際にどの程度であるかの情報はほとんどない。そこで、人工消化系を用いて食品に含まれるB<sub>12</sub>の消化・遊離に及ぼす胃酸(塩酸)の影響についてさけ切り身(焼き)を用いて検討した結果、胃酸分泌の減少(胃液分のpHの上昇)がB<sub>12</sub>の腸管吸収に重要な影響を与える可能性のあることを実験的に立証できた。また、胃酸分泌減少条件下でも遊離型B<sub>12</sub>を多量に含むめふんからは、すべてのB<sub>12</sub>が遊離することができた。この結果は、50歳代から発症する食品タンパク質結合性B<sub>12</sub>吸収不全症の予

防に発酵食品めふんは、天然に存在する遊離型B<sub>12</sub>の供給源として利用できることが明らかとなった。

しかし、現在めふんは、珍味として主に酒の肴として食されているのみであり、遊離型B<sub>12</sub>のよい供給源としてめふんを広く利用できるように、めふん及びめふんパウダー(凍結乾燥粉末)を調味料として使った料理及び献立を検討した。

### III-2 めふんおよびめふんパウダーをもちた料理・献立の作成

B<sub>12</sub>含量が最も高かった北海道産めふん及びそれから調製しためふんパウダーを用いた。

めふんパウダーの調製法は、北海道産めふん約500gに少量の水を加え、ミキサーで破碎した。破碎液は、平底バットに移し、-80℃の冷凍庫で凍結させた。凍結試料は、凍結乾燥機を用いて完全に水分が無くなるまで乾燥させた。凍結乾燥品は、ミルを用いて粉碎し、めふんパウダーを調製した。めふんパウダーは、シリカゲルの入った容器に入れ、冷蔵庫で保藏した。

#### 方法

##### 1)めふん及びめふんパウダーを用いた料理作成の基本事項

使用する食材については、一般にB<sub>12</sub>の供給源とされる肉類・魚介類・卵類・乳類は用いなかった。調理方法としては、焼く・揚げる・煮る・蒸す・汁物・炒める・生のまま加える・和えるといった基本的な調理方法に加え、和食料理・洋食料理・中華料理を各々3~4品作成した。また、食事1回あたりIFのB<sub>12</sub>飽和量は、およそ1.5~2.0μgと推定されており<sup>34)</sup>、また、食事摂取基準(2005年版)の成人男女の推奨量が2.4μg/dayであることから<sup>15)</sup>、今回作成するめふん料理では、一品あたりのB<sub>12</sub>含量を2.0μg程度を含むように配慮した。



なお、めふん及びめふんパウダーを調味料として使用した料理の作成に用いた食材や調理方法は、全て後述するレシピの中に栄養データと共に記載した。

#### 2)めふんを用いた料理（主菜・副菜・汁物・デザート）の作成

めふんの形態が長細い袋状であるため、調理作成上扱い難い場合は、すりこぎで磨り潰したものを使用した。また、めふんは加熱すると溶解するため、めふん自身を食材に直接混ぜるか、包む料理とした。基本的にめふん（あるいは磨り潰したもの）0.8gを秤量し、一人分の調味料として料理に用いた。めふんの生臭さを抑えるために香味野菜、生姜、酒、豆乳などを用いた。また、めふんの色調を隠すため、砂糖は全て黒砂糖を使用した。また、基本的に食塩は使用しなかった。

#### 3)めふんパウダーを用いた料理（主食・主菜・副菜・汁物・デザート）の作成

めふんパウダー0.25gを秤量し、一人分の調味料として料理に用いた。めふんパウダーは、めふん特有の色調や臭いが顕著に減少し、且つ塩味もマイルドになったが、料理作成上基本的に上述のめふん同様の配慮をした。

#### 4)栄養計算

各種料理・献立の栄養計算には栄養計算ソフト（エクセル栄養君 ver4.0 吉村幸雄 筑波恒男 2005.8.1 株式会社 建帛社）を使用した。

#### 結果および考察

現在、めふんは珍味として食されているのみであり、遊離型 B<sub>12</sub> のよい供給源としてめふんを広く利用できるように、めふん及びめふんパウダー（凍結乾燥粉末）を使った料理及び献立を検討した。

めふんの調理特性として特有の生臭さや褐色の色調を有しているが、塩味は風味があり、食塩に比べ濃厚である。そのため調味料として食塩や醤油の代わりに使用するのが適していると

考えられる。また、めふんは、加熱すると溶解するため調理性が向上し、多様な料理に用いることができる。めふん特有の臭いは、豆乳や牛乳のような臭いを包み込む食品や香味野菜・ごまなどを用いることで抑えることができた。また、めふん特有の褐色の色調は、色の濃い野菜・果物や黒糖を用いることで抑えることができた。

めふんの利用性を向上させるために、めふんパウダーを調製した。その結果、めふん特有の色調や臭いが顕著に減少し、且つ塩味もマイルドになった。めふんパウダーは、調味料として食塩の代わりに多様な料理に用いることができることが明らかとなった。例えば、小麦粉に添加してケーキやパンの製造やゼリー菓子などデザートの製造にも利用することができた。また、サラダ用のフレンチドレッシングや飯にかけて食するふりかけの原料など加工食品の原料としても利用することができた。

めふんは、これまで珍味として利用のみであったが、今回作成しためふん及びめふんパウダーを利用した料理（主食、主菜、副菜、汁物、デザート）のレシピは、78種類に及び、めふん料理のレシピ集としての活用も期待できる。

B<sub>12</sub>の栄養面からは、食事1回あたりIFのB<sub>12</sub>飽和量は、およそ1.5~2.0μgと推定されており<sup>34)</sup>、また、食事摂取基準（2005年版）の成人男女の推奨量が2.4μg/dayであることから<sup>15)</sup>、今回作成しためふん料理では、一品あたりのB<sub>12</sub>含量を2.0μg程度を含むように配慮した。そのため、萎縮性胃炎患者のみならず熟年からの食品タンパク質結合性B<sub>12</sub>吸収不全症によるB<sub>12</sub>欠乏症の予防のためにも全年齢階層において毎dayの通常の食事にめふん料理を一品加えることで吸収されやすい遊離型B<sub>12</sub>を補完することができる。

Ⅲ-2. 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

食生活が多様化している現代、食生活を見直そうとする動きが盛んである。その中で近年、欧米諸国の知識層や国内にも広がりを見せているものにマクロビオティックス食事法がある。マクロビオティックス食事法は桜沢如一（1893～1966）が石塚左玄の食養法を基にし、禅や東洋の易学等の思想を含めた食事法として海外に広めたもので、近年では桜沢を師事した久司道夫が、桜沢のマクロビオティックからさらに発展させたクシマクロビオティックが世界的な普及活動を行っている<sup>35, 36, 37)</sup>。マクロビオティックス食事法は菜食主義の一種で、穀物、野菜、豆類、海藻を主体とした食事であり、動物性食品や砂糖をさけるように推奨している。以前から B<sub>12</sub> は一部の植物性食品を除き動物性食品にしか含まれていないことから、マクロビオティックスを含むベジタリアンにおいては B<sub>12</sub> 欠乏に陥りやすいとの報告が多数なされている<sup>38, 39, 40)</sup>。マクロビオティックスの料理本によっても B<sub>12</sub> 不足にならないように積極的に海藻を摂取することを推奨しているものも存在しているが、書き方が曖昧であり、料理本によってはのりを一枚食べれば B<sub>12</sub> が不足することがないとするものもある<sup>41, 42)</sup>。クシマクロビオティックにおいては、文献によって多少異なるが、月に数回または地域によって週に数回魚介類（青、赤身の魚は除く）を1割から2割程度はとることを認めている<sup>35, 36, 42)</sup>。しかし、現在国内で市販されているマクロビオティックス料理本は動物性食品を使用していないものがほとんどであり、動物性食品を使用した料理を掲載した料理本においても動物性食品を使用した料理は極めて数が少ない。また、積極的な摂取が謳われている海藻についても、海藻によっては B<sub>12</sub> がほとんど含まれていないものや真の B<sub>12</sub> として証明されていないものもあり、一概に海藻の摂取によりビタミン B<sub>12</sub> 不足を補えるものかを危惧する

ところである。そこで、これらのマクロビオティックス料理本を使用して献立を立てた場合に摂取できる B<sub>12</sub> 含量について検討し、マクロビオティックス食事法において B<sub>12</sub> が不足しないための食事の提案を行った。

#### 方法

現在日本で入手可能なマクロビオティックス料理本 8 冊<sup>37, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47)</sup> について、それぞれのレシピに基づいて料理ごとに栄養計算を行った。栄養計算は五訂増補日本食品標準成分表対応、日本人の食事摂取基準（2005 年版）対応エクセル栄養君 Ver4.0<sup>48)</sup> を使用した。レシピによって重量以外で記載されている分量については、資料<sup>49, 50, 51)</sup> で概算、または実際にその分量ごとに重量を測定し、栄養計算に用いた。また、料理本に記載されている料理を用いてマクロビオティックスの基本（菜食穀類食）に基づいて成人の1日3食1ヶ月（30日）分の献立を作成した。別に一部のマクロビオティックスで認められている魚介類を週に数回程度取り入れた献立を作成し、それらの比較を行った。

#### 結果および考察

マクロビオティック料理本に掲載されている料理 495 品について栄養計算を行った結果 B<sub>12</sub> を 0.1μg 以上含むものは 32 品であり、残りの料理は全く B<sub>12</sub> を含んでいなかった。料理本によっては掲載されている料理で B<sub>12</sub> を含むものがないものも存在していた。これらの料理本で使用されている藻類は、あおのり、あまのり（焼きのり）あらめ、いわのり、こんぶ、ひじき、ふのり、もずく、わかめ（めかぶわかめ含む）であった。このうち五訂増補日本食品標準成分表<sup>56)</sup> で、あらめ、こんぶ、ひじき、ふのり、もずく、わかめには B<sub>12</sub> がほとんど含まれていないか、全く含まれていない。そのためこれらの料理本中で B<sub>12</sub> の主な供給源となっている藻類は、あまのり、いわのり、あおのりであった。料理本に使用されていた魚介類からの B<sub>12</sub> 供給

量は、あまり、たらおよびまだいのみであった。これらの料理本を用いてマクロビオティックの基本に基づいて作成した1ヶ月の献立で摂取できるB<sub>12</sub>量は1ヶ月の合計が18.4 µgであり、1日平均では0.6 µgしか摂取できていなかった。日本人の食事摂取基準(2005年版)で示されている日本人成人男女のB<sub>12</sub>推奨量は1日あたり2.4 µgであり多くのマクロビオティック料理本に記されている料理のみで摂取した場合B<sub>12</sub>が不足するが予想される。一部のマクロビオティック料理本で認められている魚介類を週に2回程度魚介類を含むように立てた献立では、1日の平均B<sub>12</sub>含量は2.6 µgとなり推奨量を満たすことができた。マクロビオティックス食事法でよく用いられているあまのりやいわのりはB<sub>12</sub>を非常に多く含んでいる食品ではあるが、実際に料理に使用する量はそれほど多くない。よほど注意して毎日それらを多く摂取するようにしない限りはB<sub>12</sub>の推奨量を満たすことは難しい。一方、魚介類は一般的な量を週に2回程度取り入れることでB<sub>12</sub>の推奨量を満たすことが可能であることから、マクロビオティック食事法を行う上で、完全に魚介類を取り除かないで適度に摂取することが必要である。しかし、市販の料理本にはB<sub>12</sub>をほとんど含まない料理を掲載していることがほとんどであり、料理本を使用する場合に注意を要する。

#### 引用文献

- 1) Miyamoto E: Characterization and physiological functions of corrinoid-compounds in edible microalgae. Dr thesis of Osaka Prefecture University (2004)
- 2) 谷岡由梨, 宮本恵美, 渡辺文雄: *Euglena gracilis* Zの生育に伴うB<sub>12</sub>依存性メチオニン合成酵素活性の変動. 高知女子大学紀要生活科学部編, **54**, 17-21 (2005)
- 3) Huang L, Zhang J, Hayakawa T. & Tsuge H: Assays of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase activities by monitoring 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrofolate using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Biochem.*, **299**, 253-259 (2001).
- 4) Banerjee R, Chen Z. & Sumedha S: Methionine synthase from pig liver. *Methods Enzymol.*, **281**, 189-196 (1997).
- 5) Gaire D, Sponne I, Drosch S, Charlier A, Nicolas JD. & Lambert D: Comparison of two methods for the measurement of rat liver mentylmalonyl-coenzyme A mutase activity: HPLC and radioisotopic assays. *J. Nutr. Biochem.*, **10**, 56-62 (1999).
- 6) Miyamoto E, Watanabe F, Yamaji R, Inui H, Sato K. & Nakano Y: Purification and characterization of methylmalonyl-CoA mutase from a methanol-utilizing bacterium, *Methylobacterium extorquens* NR-1. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **48**, 242-246 (2002).
- 7) Miyamoto E, Watanabe F, Charles T, Yamaji R, Inui H. & Nakano Y: Purification and characterization of homodimeric methylmalonyl-CoA mutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.*, **180**, 151-154 (2002).
- 8) 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
- 9) Arnaud J, Cotisson A, Meffre G, Bourgeay-causse M, Augert C, Favier A, Vuillez JP, Ville G: Comparison of three commercial kits and a microbiological assay for the determination of vitamin B<sub>12</sub> in serum. *Scand. J. Clin. Invest.*, **54**, 235-240 (1994).
- 10) 井戸田正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則

- 文, 前田忠男. 最近の日本人乳組成に関する全国調査 (第十報) —水溶性ビタミン含量について—, 日本小児栄養消化器病学会誌, **10**, 11-20 (1996).
- 11) 渡邊敏明, 谷口歩美, 庄子佳文子, 猪熊隆博, 福井徹, 渡邊文雄, 宮本恵美, 橋詰直孝, 佐々木晶子, 戸谷誠之, 西牟田守, 柴田克己. 日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討, ビタミン, **79**, 573-581, (2005)
- 12) Casteline JE, Allen LH, Ruel MT. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency is very prevalent in lactating Guatemalan women and their infants at three months postpartum. *J. Nutr.*, **127**, 1966-1972 (1997).
- 13) Sandberg DP, Begley JA, Hall CA. The content, binding, and forms of vitamin B<sub>12</sub> in milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 1717-1724 (1981).
- 14) Turugo NM, Sardinha F. Cobalamin and cobalamin-binding capacity in human milk. *Nutr. Res.* **14**, 22-23 (1994).
- 15) 厚生労働省 (2004) 日本人の食事摂取基準 (2005年版) 平成 16 年 10 月
- 16) Food and Agriculture Organization/World Health Organization (1988) Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub>. FAO food and nutrition series No. 23, pp. 62-73
- 17) 渡辺文雄, 宮本恵美. 水溶性ビタミンの食事摂取基準の妥当性の検討—ビタミン B<sub>12</sub>— 厚生労働科学研究費補助金効果的医療技術の確立推進臨床研究事業「日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究」平成 14 年度総括・分担研究報告書 66-84 (2003).
- 18) Hvas AM, Gravholt CH, Nexø E. Circadian variation of holo-transcobalamin (holo-TC) and related markers. *Clin Chem Lab Med* **43**, 760-764 (2005).
- 19) 健康・栄養情報研究会編 (2003) 「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, 28-43.
- 20) 三谷璋子 (2000) 納豆の栄養成分に関する研究 (第 7 報) 納豆のビタミン B<sub>12</sub> の形態. 福山市立女子短期大学紀要, **26**, 131-134.
- 21) Okada N, Hadioetomo RS, Nikkuni S, Katoh K, Ohta T. Vitamin B<sub>12</sub> content of fermented foods in the tropics. *Rept Natl Food Res Inst*, **43**, 126-129 (1983).
- 22) Kittaka-Katsura H, Ebara S, Watanabe F, Nakano, Y. Characterization of corrinoid compounds from a Japanese black tea (Batabata-cha) fermented by bacteria. *J Agric Food Chem*, **52**, 909-911 (2004).
- 23) Kittaka-Katsura H, Watanabe F, Nakano, Y. Occurrence of vitamin B<sub>12</sub> in green, blue, red, and black tea leaves. *J Nutr Sci Vitaminol*, **50**, 438-440 (2004).
- 24) 科学技術庁資源調査会編 (2000) 「五訂日本食品標準成分表」, 大蔵省印刷局, 東京, 30-303.
- 25) 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, 306-356.
- 26) Kimura N, Fukuwatari T, Sasaki R, Hayakawa F, Shibata, K. Vitamin intake in Japanese women college students. *J Nutr Sci Vitaminol*, **49**, 149-155 (2003).
- 27) Bennink M.R, Ono K. Vitamin B<sub>12</sub>, E and D content of raw and cooked beef. *J Food Sci*, **47**, 1786-1792 (1982).
- 28) Watanabe F, Abe K, Fujita T, Goto M, Hiemori M, Nakano Y. Effects of microwave heating on the loss of vitamin B<sub>12</sub> in foods. *J Agric Food Chem*, **46**, 206-210 (1998).
- 29) 財団法人日本食品分析センター編(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」中央法規, 東京, 178-183.
- 30) Watanabe F., Katsura H., Takenaka S., Fujita T., Abe K., Tamura Y., Nakatsuka T., Nakano Y. (1999) Pseudovitamin B<sub>12</sub> is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *J Agric Food Chem*, **47**, 4736-4741.
- 31) Adachi S, E Miyamoto, F Watanabe, T Enomoto, T Kuda, M Hayashi, Y Nakano (2005) Purification and characterization of a corrinoid compound from a Japanese salted and fermented salmon kidney “mefun”. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **28**, 2561-2569.
- 32) Laparra JM, Vealez D, Montoro R, Barberaa R, Farrea R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6080-6085 (2003).
- 33) Van Asselt DZ, van den Broek WJ, Lamers CB, Corstens FH, Hoefnagels WH. Free and protein-bound cobalamin absorption in healthy middle-aged and older subjects. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **44**, 949-953 (1996).
- 34) Scott JM. Bioavailability of vitamin B<sub>12</sub>. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **51** Suppl 1:S49-S53 (1997).
- 35) 久司道夫著, 久司道夫のマクロビオティック四季のレシピ, pp.1-158, 東洋経済新報社 (2004).
- 36) Kushi Institute, Kushi Institute HP, <http://www.kushiinstitute.org/index.html>
- 37) 日本 CI 協会監修, マクロビオティック体の内側から美しくなる玄米と野菜のレシピ 105 品, pp.1-126 日本実業出版社 (2004)
- 38) van Dusseldop M, Schneede J, Refsum H, Ueland PM, Thomas CMG, de Boer E, and van Staveren WA. Risk of persistent cobalamin deficiency in adolescents fed a macrobiotic diet in early life. *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**:664-671, (1999).
- 39) Dwyer J. Convergence of plant-rich and plant-only diets. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**(suppl):620s-622s, (1999).
- 40) Louwman MWJ, van Dusseldop M. van de Vijer FJR. Thomas CMG, Schneede, J, Ueland PM, Refsum H, and van Staveren WA, Signs of impaired cognitive function in adolescents with marginal cobalamin status. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**:762-769, (2000).
- 41) オレンジページムック, シンプルマクロダイエツト玄米でおうちやくダイエツト, pp.1-98 オレンジページ, 東京 (2004)
- 42) クロワッサン特別編集 Dr.クロワッサン健康マクロビオティック料理体の中からきれいになる食べ方, pp.1-126, マガジンハウス (2005)
- 43) 西野椰季子著, マクロビオティック和のレシピ, pp.1-111, サンマーク出版, (2004)
- 44) オレンジページムックマクロビオティックおしゃれレシピ, pp.1-66, オレンジページ, (2004)
- 45) 尾形妃樺怜著, 毎日のマクロビオティックレシピ 140, pp.1-111, 河出書房新社 (2004).
- 46) 日本 CI 協会監修, マクロビオティック食べて元気になるレシピ, pp.1-127, 永岡書店 (2005)
- 47) ローラ小林著, マクロビオティック 30 分 de フルコース, pp.1-95, ビジネス社 (2005)
- 48) 吉村幸雄, 五訂増補日本食品標準成分表対応, 日本人の食事摂取基準(2005 年版)対応エクセル栄養君 Ver4.0, 建帛社 (2005)
- 49) 「栄養と料理」家庭料理研究グループ, 調理のためのベーシックデータ, pp.1-153, 女子栄養大出版 (1990)
- 50) 鈴木吉彦, 塩澤和子, 目で見る 80 キロカロリー食品ガイド, pp1-223, 主婦の友社

(1995)

- 51) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査  
分科会, 五訂増補日本食品成分表 (2005)

表1 新規なビタミンB<sub>12</sub>栄養状態の指標の検討血球ビタミンB<sub>12</sub>酵素について  
ラット血球画分のB<sub>12</sub>依存性酵素活性 (n=3)

	B <sub>12</sub> 給与ラット (pmol/min/mg protein)	B <sub>12</sub> 欠乏ラット
メチルマロニルCoAムターゼ (MCM)	0.78±0.2	6.79±3.56
メチオニンシンターゼ (MS)	0.001	ND

図1 ラット血球画分のメチルマロニルCoAムターゼのウエスタン・プロット分析  
(ヒト組換えMCM抗体を使用)

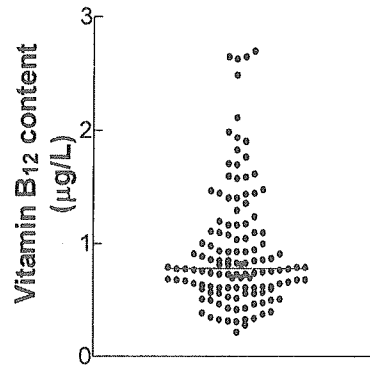
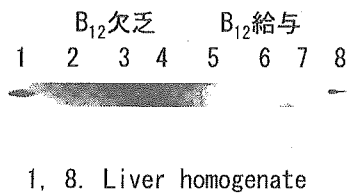
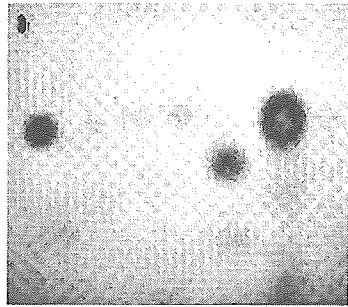


図2 母乳B<sub>12</sub>含量の平均値

表2 母乳のB<sub>12</sub>含量のまとめ

Reference	Sampling time	Sample numbers	Mean values of B <sub>12</sub>		Assay method
			µg/L	nmol/L	
井戸田ら <sup>3)</sup>	1~3 mo	2279	0.2		Microbiological assay
Trugo <i>et al.</i> <sup>7)</sup>	2 mo	256	0.45		Radioisotope dilution assay
Areekul <i>et al.</i> <sup>10)</sup>	2~10 d	45	0.41		Radioisotope dilution assay
Casterline <i>et al.</i> <sup>5)</sup>	3 mo	92	0.93		Radioisotope dilution assay
Sandberg <i>et al.</i> <sup>6)</sup>	2~3 mo	19	0.97		Radioisotope dilution assay
渡邊ら <sup>4)</sup>	2~5 mo	25	0.28 ± 0.14	0.21 ± 0.11	Microbiological assay
Present study		126	0.94 ± 0.14	0.70 ± 0.39	Microbiological assay



B<sub>12</sub> 1 2 3 4 5 6  
尿サンプル

図3 シリカゲル60TLC・バイオオート  
グラム法による尿中ビタミンB<sub>12</sub>の分析

表3 日本人70歳代成人の血清ガストリン含量とビタミンB<sub>12</sub>含量の関係(調査I)

	Deficient B <sub>12</sub> < 230 pg/mL	Marginal B <sub>12</sub> 230-350 pg/mL	Normal B <sub>12</sub> >350 pg/mL	Overall
N	4	22	73	99
Serum B <sub>12</sub> (pg/mL)	197.0 ± 23.7 <sup>a</sup>	297.5 ± 33.2 <sup>a</sup>	686.3 ± 323.3 <sup>b</sup>	580.1 ± 330.7
Serum gastrin (pg/mL)	442.8 ± 764.8 <sup>a</sup>	423.6 ± 560.4 <sup>a</sup>	290.3 ± 338.1 <sup>a</sup>	326.1 ± 415.8

表4 日本人70歳代成人の血清ガストリン含量とビタミンB<sub>12</sub>含量の関係(調査II)

	Deficient B <sub>12</sub> < 230 pg/mL	Marginal B <sub>12</sub> 230-350 pg/mL	Normal B <sub>12</sub> >350 pg/mL	Overall
N	8	57	68	133
Serum B <sub>12</sub> (pg/mL)	212.6 ± 18.2 <sup>a</sup>	310.5 ± 34.1 <sup>a</sup>	720.2 ± 161.3 <sup>b</sup>	514.1 ± 242.9
Serum gastrin (pg/mL)	556.8 ± 737.1 <sup>a</sup>	352.7 ± 480.1 <sup>a</sup>	232.0 ± 247.3 <sup>a</sup>	303.2 ± 106.4

Tukey's Multiple comparison test

B<sub>12</sub>基準値

B<sub>12</sub>: 233~914 pg/mL

Gastrin: 30~150 pg/mL



表5 市販ふりかけ中のビタミンB<sub>12</sub>含量

種類	ビタミンB <sub>12</sub> 含量	
	( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	( $\mu\text{g}/2\text{g}$ )
かつお・小魚など		
A	9.14	0.18
B	2.39	0.05
C	9.02	0.18
D	7.04	0.14
E	10.88	0.22
F	8.59	0.17
G	8.95	0.18
H	7.67	0.15
のり・たまご		
I	3.55	0.07
J	3.00	0.06
K	2.40	0.05
L	1.32	0.03
M	6.50	0.13
たらこ (めんたいこを含む)		
N	4.59	0.09
O	0.44	0.01
P	1.15	0.02
さけ		
Q	0.23	<0.01
R	0.48	0.01
S	2.26	0.05
その他		
T	3.14	0.06
U	0.20	<0.01
V	2.87	0.06
W	1.30	0.03
X	0.35	<0.01
Y	1.60	0.03
Z	0.80	0.02

表6 市販お茶漬け中のビタミンB<sub>12</sub>含量

種類	ビタミンB <sub>12</sub> 含量	
	( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	( $\mu\text{g}/8\text{g}$ )
A	3.05	0.24
B	1.80	0.14
C	2.25	0.18
D	4.60	0.37
E	5.25	0.42
F	1.15	0.09
G	1.50	0.12
H	2.00	0.16
I	0.90	0.07
J	0.25	0.02
K	1.95	0.16

表7 市販だしの素および濃縮(あるいはストレート)だしつゆ中のビタミンB<sub>12</sub>含有量

	ビタミンB <sub>12</sub> 含量*
	( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )
かつお削り節	
一番だし	<0.01
二番だし	0.01
煮干し	ND
粉末・顆粒	
かつお	
A	<0.01
B	0.06
C	<0.01
いりこ	
D	0.08
E	0.02
濃縮液(多目的用)	
F	0.52
G	0.15
H	0.39
ストレート	
そうめん用	
I	0.28
J	0.54
そば用	
K	1.19
L	0.26

表8 めふんに含まれるビタミンB<sub>12</sub>含量

	ビタミンB <sub>12</sub> 含量
	( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
新潟産めふん	116.3±13.4
青森産めふん	365.7±80.
北海道産めふん	556.3±91.85
食品成分表めふん	327.6

平均値±SE (n=5)

\*粉末・顆粒のだしの素および濃縮だしつゆは、各社指定した方法通りに調製した時のだしつゆ中のビタミンB<sub>12</sub>含量として記した。

表9 Sephadex G-50ゲル濾過による遊離ビタミンB<sub>12</sub>の存在比

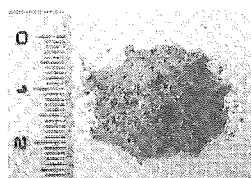
	ビタミンB <sub>12</sub> の存在比	
	高分子画分	低分子(遊離型B <sub>12</sub> )画分
さけ生腎臓	40%	60%
めふん	16%	84%

3回の実験の平均値を示した

表10 胃画分における各種 pH条件下での遊離型ビタミンB<sub>12</sub>の生成率

胃画分の pH	さけ切り身 (焼き) [遊離型ビタミンB <sub>12</sub> (%) ]*	めふん
pH 2	76.5	117.8
pH 4	30.0	119.2
pH 7	23.8	115.7

\*消化処理前のビタミンB<sub>12</sub>含量を100%としたときの相対値



めふんパウダー

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

IV. 研究協力者の報告書

1. 岡山県の小学校児童におけるビタミン B<sub>12</sub>・葉酸摂取量

研究協力者 河田哲典 岡山大学 教育学部 教授

研究要旨

岡山県内の小学校高学年児童のビタミン B<sub>12</sub>・葉酸摂取量を調査した。その結果を下の表に示した。

		ビタミン B <sub>12</sub> (μg)	葉酸 (μg)
総数		6.9±4.3	347±110
男性	平日 (n=73)	6.0±4.4a	362±137a
	休日 (n=76)	7.6±6.4a	339±143a
女性	平日 (n=56)	6.2±5.2a	333±104a
	休日 (n=59)	7.6±7.0a	354±141a
P 値	男女	0.9181	0.6643
	平日休日	0.0339	0.9458
	男女*平日休日	0.8922	0.1870