

原 著

## 日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討

<sup>1</sup> 兵庫県立大学環境人間学部食環境解析学教室\*, <sup>2</sup> カゴメ株式会社総合研究所, <sup>3</sup> 病体生理研究所研究室,  
<sup>4</sup> 高知女子大学生活科学部健康栄養学科, <sup>5</sup> 東邦大学医学部附属大橋病院, <sup>6</sup> 昭和女子大学大学院生活機構研究科,  
<sup>7</sup> 独立行政法人国立健康・栄養研究所, <sup>8</sup> 滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科

渡邊 敏明<sup>1</sup>, 谷口 歩美<sup>1</sup>, 庄子佳文子<sup>2</sup>, 稲熊 隆博<sup>2</sup>, 福井 徹<sup>3</sup>, 渡邊 文雄<sup>4</sup>  
宮本 恵美<sup>4</sup>, 橋詰 直孝<sup>5\*\*</sup>, 佐々木晶子<sup>6</sup>, 戸谷 誠之<sup>6</sup>, 西牟田 守<sup>7</sup>, 柴田 克己<sup>8</sup>

Vitamins(Japan), 79(12), 573-581(2005)

### The Concentraions of Water-Soluble Vitamins in Breast Milk of Japanese Women

Toshiaki WATANABE<sup>1</sup>, Ayumi TANIGUCHI<sup>1</sup>, Kayako SHOJI<sup>2</sup>, Takahiro INAKUMA<sup>2</sup>, Toru FUKUI<sup>3</sup>, Fumio WATANABE<sup>4</sup>,  
Emi MIYAMOTO<sup>4</sup>, Naotaka HASHIZUME<sup>5</sup>, Akiko SASAKI<sup>6</sup>, Masayuki TOTANI<sup>6</sup>, Mamoru NISHIMUTA<sup>7</sup>, Katsumi SHIBATA<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Department of Dietary Environment Analysis, School of Human Science and Environment, Himeji Institute of Technology, University of Hyogo, Himeji 670-0092, Japan, <sup>2</sup>Research Institute, Kagome Co., Ltd., Nasu, Tochigi 329-2762, Japan, <sup>3</sup>Clinical Laboratory, Byotai Seiri Laboratory, Itabashi, Tokyo 173-0025, Japan, <sup>4</sup>Department of Foods and Nutrition, Kochi Women's University, Kochi 780-8515, Japan, <sup>5</sup>Department of Laboratory Medicine, Ohashi Hospital, School of Medicine, Toho University, Meguro 153-8515, Japan, <sup>6</sup>Department of Food Science and Nutrition, Graduate School of Human Life Science, Showa Women's University, Setagaya, Tokyo 154-8533, Japan, <sup>7</sup>National Institute of Health and Nutrition, Shinjuku, Tokyo 162-8636, Japan, <sup>8</sup>School of Human Cultures, University of Shiga Prefecture, Hikone 522-8533, Japan

The concentrations of 5 water-soluble vitamins were determined in the mature milk of healthy Japanese women in this study. The average concentrations of these vitamins were  $0.28 \pm 0.14$  ng/ml ( $0.21 \pm 0.11$  pmol/ml) for vitamin B<sub>12</sub>,  $34.6 \pm 9.9$  ng/ml ( $78.5 \pm 22.3$  pmol/ml) for total folate, and  $3.40 \pm 0.68$  ng/ml ( $13.9 \pm 2.8$  pmol/ml) for total biotin in 25 milks, and  $1.55 \pm 0.56$   $\mu$ g/ml ( $12.7 \pm 4.6$  nmol/ml) for total niacin,  $6.92 \pm 2.83$   $\mu$ g/ml ( $31.5 \pm 13.0$  nmol/ml) for total pantothenic acid in 15 milk specimens, which are not sufficient levels. The free form of vitamins comprised 25.6 $\pm$ 8.2 %, 17.9 $\pm$ 7.5 %, 69.4 $\pm$ 16.9 % of total biotin, niacin and pantothenic acid, respectively. When the intakes of these vitamins by infants were estimated based on the concentration of each vitamin and the amount of breast milk intake by infants, daily intakes of folate, biotin and pantothenic acid in infants aged 0 through 5 months were lower than the respective levels of adequate intake recommended as Dietary Reference Intakes for Japanese, 2005. The present findings are important for establishing future Dietary Reference Intakes for these vitamins.

**Keywords:** water-soluble vitamins, mature milk, Japanese women, infants, Dietary Reference Intakes

(Received June 22, 2005)

\* 〒 670-0092 姫路市新在家本町 1-1-12

\*\* 現 和洋女子大学家政学部

## 緒 言

日本人の栄養所要量は、昭和45年に初回の策定が施行されて以来、日本人の体格、生活習慣などに合わせて、5年ごとに改定されている。平成11年(1999年)に第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—が策定された<sup>1)</sup>。この改定において、水溶性ビタミン6種類およびミネラル6種類の所要量をはじめ策定された。水溶性ビタミンでは、葉酸およびピオチンなどの摂取基準が算出された。摂取基準の算出においては、これまでに報告されている多くの栄養疫学調査や出納試験などの科学的なデータが利用されている。乳幼児における水溶性ビタミンの摂取基準を算出するためには、母乳中のビタミン含量が一つの指標として使用されている。

母乳にはタンパク質、炭水化物および脂肪ばかりでなくビタミンやミネラルなどの大部分の栄養素が含まれている。これらの栄養素は、消化、吸収の効率がよく、乳児にとってはバランスの取れた栄養源である。このため、一般に健康な母親の母乳で育てられている乳児には栄養欠乏症はほとんど見られない。これは、母乳には乳児の発育のために必要な栄養素が十分に含まれていることを示している。

わが国の母乳のビタミン分析については、井戸田ら<sup>2)</sup>が大規模な縦断的研究を行っている。著者らは、最近、全国の授乳婦から得た母乳のピオチン、パントテン酸およびナイアシンの含量を分析した<sup>3)</sup>。しかしながら、授乳婦の妊娠経過や乳児の発育などについて、十分に把握されていなかった。このように、これまで日本人を対象としたデータは少なく、わが国の食事摂取基準の策定においては、食生活が異なる欧米人でのデータが多く用いられている。このため、ビタミンの摂取基準の策定においても、わが国の食生活が十分に反映されているとは云えない。

そこで、本研究では、わが国の新しいデータを得るために、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の分析を総合的に行った。B<sub>6</sub>の分析結果については、本誌にすでに報告されている<sup>4)</sup>。今回は、これまでにまとめたB<sub>12</sub>、葉酸、ピオチン、ナイアシン、パントテン酸の5種類の水溶性ビタミン含量を分析した結果について報告する。なお、ナイアシンおよびパントテン酸については、サンプル数が十分でなく、参考データとした。

## 実験方法

### 1. 被験者

被験者としては、妊娠ならびに出産が正常な経過で満期出産し、満月齢で2-5ヶ月の乳児を完全母乳哺育している日本人授乳婦を対象にした。被験者は25名で、平均

年齢31.1歳、平均体重52.8 kg、平均身長158.7 cmであった。児(男児15名、女児9名、不明1名)はすべて単胎児であり、在胎期間は全児38週以上、妊娠経過は概ね正常で、軽度の妊娠中毒症、貧血が数名見られた以外に顕著な異常はなかった。被験者の在住地域は、東京都8名、静岡県8名、長野県3名、栃木県2名、神奈川県1名、大阪府1名、愛知県1名、和歌山県1名であった。

被験者は、栄養に対する興味も高くバランスのとれた食事を摂取していることを前提とした。被験者の摂取している食事については、3日間の食事記録調査を行った。摂取エネルギーについてPFCバランスで見ると、P:F:C=14.8%:28.6%:55.4%であり、バランスのとれた食事を摂っていた。母乳は、体調の良い25名の被験者から採取した。しかし、採取した母乳量が十分でないため、ナイアシンおよびパントテン酸の分析は15サンプルのみである。

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

### 2. 母乳採取

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

### 3. B<sub>12</sub>の分析

母乳に含まれる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>5)</sup>に準じて乳酸菌*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (旧名*L. leichimannii*) ATCC 7830を用いた微生物学的定量法で行った。なお、母乳に含まれるB<sub>12</sub>含量を考慮して母乳1.0 ml (あるいは0.5 ml)をサンプルとし、酢酸緩衝液、KCN溶液、メタリン酸溶液はマニュアルに記載されている容量の1/10量(あるいは1/20量)で抽出を行った。本定量菌は、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、これらをアルカリ耐性因子として別にアルカリ処理を行い、見かけのB<sub>12</sub>含量からアルカリ耐性因子含量を差し引き、母乳中の正確なB<sub>12</sub>含量を算出した。また、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て行った。

### 4. 葉酸の分析

母乳を解凍後、遠心分離してクリーム状の上層を取り除き、脱脂した。この試料に0.1Mリン酸緩衝液(pH6.1)を加えて、オートクレーブで加熱抽出した。冷却後、コ

ンジュガーゼ溶液(chicken pancreas, DIFCO社)を加え、恒温槽で37°C、2時間反応させた。酵素を失活させた後、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.1)を加え、ろ過したものを検液とした。葉酸の分析は、乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC 7469 を用いて行った。

#### 5. ビオチンの分析

採取したサンプルに1/15Mリン酸緩衝液を加えたものを測定用試料とした。検液は4.5N硫酸溶液で120°C、1時間加水分解し、4.5N水酸化ナトリウム溶液で中和した後に、ビオチン量を測定し、これを総ビオチン含量とした。サンプルを脱脂および除タンパクした後、硫酸による加水分解を行わないで測定したビオチン量を遊離型ビオチン量とし、総ビオチン量に対する遊離型ビオチン量の割合を遊離率とした。ビオチンの分析は、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法の一つである比濁法に従った<sup>6)7)</sup>。

#### 6. ナイアシンの分析

母乳中のナイアシンは、総量と遊離型に分けて測定した。総ナイアシン量については、母乳150 µlに20 µg/ml イソニコチンアミド溶液(イソニコチンアミドは内部標準として使用)1,350 µlを加え、オートクレーブにて121°C、10分間処理を行った。この処理により、補酵素型がすべて遊離型のニコチンアミドとなる。冷却後遠心し、得られた上清1,200 µlに70%過塩素酸70 µlを加えてよく混合し、遠心上清1,000 µlを検液とした。測定は、HPLCによって行った<sup>8)</sup>。一方、遊離型ナイアシン量は、上記の操作においてオートクレーブ処理せずに測定した。

#### 7. パントテン酸の分析

母乳中のパントテン酸は、総量と遊離型に分けて測定した。総パントテン酸量については、母乳中の補酵素型を遊離型のパントテン酸にするために、アミダーゼ・ホスファターゼ処理を行った<sup>3)</sup>。処理後、定量菌として乳酸

菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いて、測定をした。一方、遊離型パントテン酸量は、上記の操作において酵素処理を行わずに測定した。

#### 8. 統計学的解析

母乳のビタミン含量は、すべて平均値±標準偏差(SD)、範囲(最小値-最大値)および変動係数(CV)で表した。単位としては、重量濃度(ng/ml, µg/ml)とモル濃度(pmol/ml, nmol/ml)を併記した。また母乳へ分泌されたビタミンの様子を知るために、B<sub>12</sub>、葉酸およびビオチンについては、それぞれの相関係数を算出し、関連を調べた。なお、統計学的解析には、すべて統計パッケージ StatView-J 5.0(SAS Institute Inc., Cary, NC)を用いて行った。

## 結 果

母乳に含まれるB<sub>12</sub>の分析結果を図1に示す。母乳のB<sub>12</sub>含量は、平均値0.28±0.14 ng/ml (0.21±0.11 pmol/ml)、範囲0.08-0.73 ng/ml, CV 50.6%であった。

母乳の総葉酸含量は、平均値34.6±9.9 ng/ml (78.5±22.3 pmol/ml)、範囲17.3-58.9 ng/ml, CV 28.6%であった(図2)。

母乳に含まれるビオチンの分析結果をまとめたものが図3である。分析した母乳の総ビオチン含量は、平均値3.40±0.68 ng/ml(13.9±2.8 pmol/ml)、範囲2.55-4.97 ng/ml, CV 20.1%であった。また、遊離型ビオチン含量は、平均値0.87±0.31 ng/ml (3.6±1.3 pmol/ml)であり、遊離率25.6±8.2%であった(図3)。

総ナイアシン含量は、平均値1.55±0.56 µg/ml (12.7±4.6 nmol/ml)、範囲0.95-2.81 µg/ml, CV 36.1%であった。また、遊離型ナイアシン含量は、平均値0.30±0.26 µg/ml (2.49±2.16 nmol/ml)であり、遊離率17.9±7.5%であった。

母乳の総パントテン酸含量は、平均値6.92±2.83 µg/ml

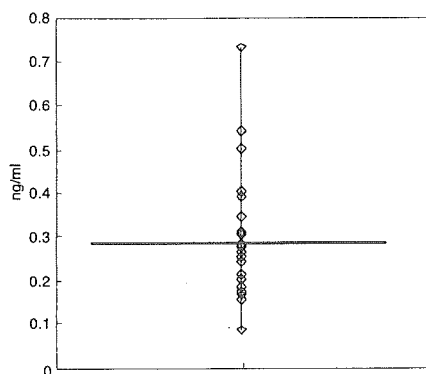


図1. 母乳のB<sub>12</sub>含量.

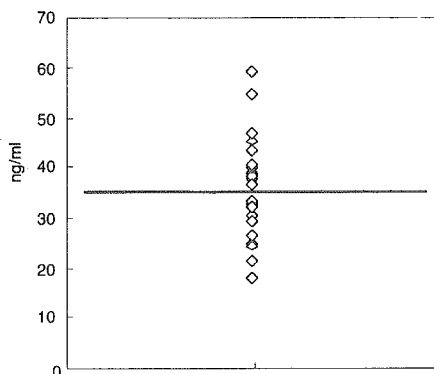


図2. 母乳の葉酸含量.

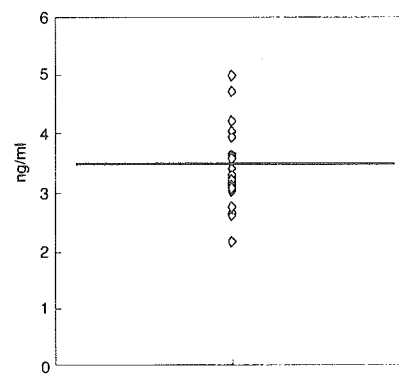


図3. 母乳のビオチン含量.

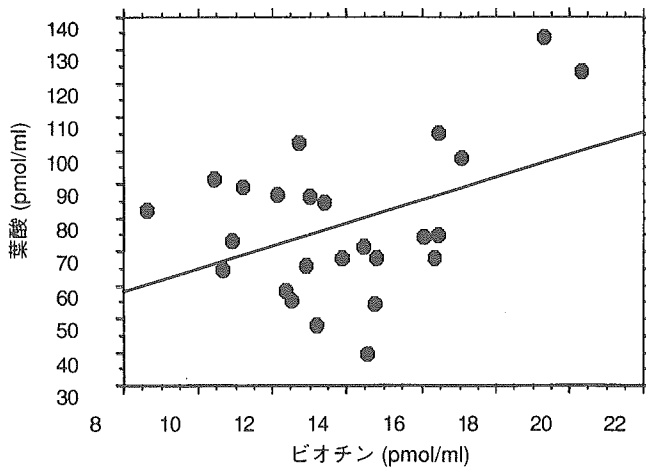


図4. 母乳のピオチン含量と葉酸含量との関連.

( $31.5 \pm 13.0$  nmol/ml), 範囲  $3.16$ - $14.15$   $\mu\text{g/ml}$ , CV 40.9%であった. また, 遊離型パントテン酸含量は, 平均値  $4.84 \pm 2.90$   $\mu\text{g/ml}$  ( $22.1 \pm 13.2$  nmol/ml)であり, 遊離率  $69.4 \pm 16.9$ %であった.

母乳への分泌されたビタミン間の関連を見ると, 葉酸とピオチン含量には有意な相関( $r=0.42$ ,  $p<0.035$ )が認められた(図4). しかし,  $B_{12}$ 含量は葉酸やピオチン含量と関連は見られなかった.

## 考 察

### 1. $B_{12}$

井戸田ら<sup>2)</sup>は日本人の健康な母親の母乳中の $B_{12}$ 含量を *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法で測定したところ, 母乳中の $B_{12}$ 含量は初乳または移行乳( $0.4$  ng/ml)から成熟乳( $0.2$  ng/ml)になるに従い減少し, その平均値は $0.2$  ng/mlであることを報告している. また, Trugo と Sardinha<sup>9)</sup>も初乳から成熟乳にかけ $B_{12}$ 含量が減少することを見出している. 井戸田ら<sup>2)</sup>が用いた定量菌は,  $B_{12}$ の構造に対してかなり特異性は高いが, アルカリ耐性因子を補正したとする記載がない. そこで, 今回アルカリ耐性因子を補正して母乳の $B_{12}$ 含量を算

出した結果, 日本人の健康な母親の母乳では $0.14$  ng/mlであった.

これまでに報告されている母乳中の $B_{12}$ 含量を示したものが表1である.  $B_{12}$ の定量法に関して, わが国と欧米では異なっているため, 単純に数値を比較することはできない. 井戸田ら<sup>2)</sup>および今回測定した日本人の母乳の $B_{12}$ 含量は, 欧米の報告と比べ低値を示したが, これが定量法の違いによるものなのか, 人種の差や食生活の違いによるものなのか明らかでない.

第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—では, 平均的な日本人の母乳の $B_{12}$ 含量 $0.2$   $\mu\text{g/l}$ , 哺乳量 $0.75$ l/日を用いて摂取量( $0.15$   $\mu\text{g/日}$ )を計算し,  $0$ - $5$ ヶ月の乳児の所要量を $0.2$   $\mu\text{g/日}$ と策定された<sup>1)</sup>. 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 $B_{12}$ 含量 $0.2$   $\mu\text{g/l}$ , 哺乳量 $0.78$ l/日を用いて摂取量( $0.156$   $\mu\text{g/日}$ )を算出し, 目安量を $0.2$   $\mu\text{g/日}$ と策定された<sup>10)</sup>. 一方, 米国の食事摂取基準において母乳中の $B_{12}$ 含量はわが国より高い値( $0.42$   $\mu\text{g/l}$ )が採用され, 哺乳量 $0.78$ l/日を用いて摂取量 $0.33$   $\mu\text{g/日}$ が算出され, 所要量を $0.4$   $\mu\text{g/日}$ としている<sup>11)</sup>. いずれもWHOの所要量(FAO/WHO1988)の $0.1$   $\mu\text{g/日}$ を上回っているが, その理由はWHOの所要量が $B_{12}$ 欠乏症の乳児の臨床症状の回復を指標として策定されているためである<sup>12)</sup>.

ベジタリアンの母親とその乳児において, 母乳の $B_{12}$ 含量が $0.49$  ng/ml以下のとき, 母乳栄養乳児の $B_{12}$ 欠乏の指標である尿中メチルマロン酸排泄量が増加している. これらの乳児は体内に十分な $B_{12}$ を貯蔵することなしに生まれてくるため, 平均摂取量 $0.24$   $\mu\text{g/日}$ は乳児の $B_{12}$ バランスを維持するのに不十分であると報告されている<sup>13)</sup>. また, 母乳の $B_{12}$ 含量が $0.49$  ng/ml以下のとき乳児の尿中メチルマロン酸排泄量が増加傾向を示すとの報告もある<sup>14)</sup>. 米国の食事摂取基準では乳児の $B_{12}$ 欠乏症を予防するだけでなく, 疾病予防のため $B_{12}$ の体内バランスを正常に維持するためには少なくとも $0.3$   $\mu\text{g/日}$ 以上の摂取量が必要であることを指摘している<sup>11)</sup>.

妊娠中から $2$ - $4$   $\mu\text{g/日}$ の $B_{12}$ サプリメントを摂取すると母乳中の $B_{12}$ 含量を高値(平均値 $0.91$  ng/ml)に維持する

表1. 母乳の $B_{12}$ 含量.

文献	被験者数 (サンプル数)	母乳葉酸量		採乳時期	分析法
		ng/ml	pmol/ml		
Areekul <i>et al.</i> , '77 <sup>43)</sup>	45	0.41		2-10日	放射性同位体希釈法
Sandberg <i>et al.</i> , '81 <sup>44)</sup>	19	0.97		2-3ヶ月	放射性同位体希釈法
Trugo and Sardinha, '94 <sup>9)</sup>	256	0.45		2ヶ月	放射性同位体希釈法
井戸田ら, '96 <sup>2)</sup>	2,279*	0.2		1-3ヶ月	微生物学的定量法
Casterline <i>et al.</i> , '97 <sup>14)</sup>	92	0.93		3ヶ月	放射性同位体希釈法
Present study	25*	$0.28 \pm 0.14$ (0.08-0.73)	$0.21 \pm 0.11$ (0.06-0.54)	2-5ヶ月	微生物学的定量法

mean  $\pm$  SD (min-max)

\* 日本女性

ことができる<sup>15)</sup>。母親の体内B<sub>12</sub>貯蔵量よりも食事から毎日摂取されるB<sub>12</sub>の方が母乳へのB<sub>12</sub>分泌量に重要な影響を与えると考えられる<sup>16)</sup>。このため母親が厳格なベジタリアンである場合はもとより、動物性食品の摂取が低くB<sub>12</sub>摂取量が不十分な場合は、母乳中のB<sub>12</sub>含量が低下する可能性があるので注意する必要がある。

## 2. 葉酸

母乳では、葉酸はモノグルタミン酸型で大量に含まれている。授乳婦における葉酸の摂取量の減少による母乳の葉酸含量の低下はほとんど見られず、母乳の葉酸レベルは保たれている。このため、たとえビタミン欠乏になっても、母乳栄養児で葉酸の欠乏による貧血は報告されていない<sup>17)18)</sup>。

これまでの報告で、母乳中の葉酸含量はコンジュガーゼ処理の有無によって異なっている(表2)。1980年以前の報告では、酵素処理をしない場合には、0.3-32 ng/mlであるのに対して<sup>19)20)</sup>、酵素処理をすると52-64 ng/mlであると報告されている<sup>21)22)</sup>。American Academy of Pediatrics<sup>23)</sup>においても、母乳の葉酸含量は2-50 ng/mlである、と示している。

わが国では、山田<sup>24)</sup>が、正常分娩した健康な授乳婦8名(26サンプル)から母乳を採取して、プロテアーゼ処理をして分析したところ、総葉酸含量は平均71.8 ng/mlとしている。その後、Tamuraら<sup>25)</sup>は、健康に发育している乳児(3-25週齢)を出産した39名の健康な日本人女性から母乳を採取して、葉酸含量をコンジュガーゼ処理して検討した。この結果、母乳中の総葉酸含量は平均141.4 ng/mlであり、遊離型葉酸含量は約40%であった。並行して、この内16名の女性にプテロイルモノグルタミン酸1 mg/日を4週間負荷した後、母乳を採取して、葉酸に与える影響を検討したが、葉酸の投与前後でそれぞれ130.2および136.6 ng/mlと、母乳中の葉酸含量に変化は見られなかった。なお、この結果から算出した場合、乳児の1日あたりの葉酸摂取量は57-165 μgと推定される。

Smithら<sup>26)</sup>の報告では、11名の授乳婦(23-38歳)から授乳後6週および12週で採取した132サンプルをコンジュガーゼによる酵素処理後に分析したところ、母乳の総葉酸含量は平均78.9 ng/mlであり、遊離型は58%であった。これらの授乳婦は妊娠中に葉酸0.8-1 mgが含まれているビタミンミネラルサプリメントを摂取してい

表2. 母乳の葉酸含量.

文献	被験者数 (サンプル数)	母乳葉酸量		採乳時期	分析法
		ng/ml	pmol/ml		
山田, '79 <sup>24)</sup>	8*(26)	18.4 ± 10.6		初乳 - 成乳	微生物学的定量法 ( <i>L. casei</i> ) 1 酵素法 (プロテアーゼ)
	8*(26)	71.8 ± 26.1		初乳 - 成乳	
Tamura <i>et al.</i> , '80 <sup>25)</sup>	39*	141.4 ± 47.9		3-25週	微生物学的定量法 ( <i>L. casei</i> ) 1 酵素法 (コンジュガーゼ)
	16	130.2 ± 45.9		葉酸摂取前	
	16	136.6 ± 41.2		葉酸摂取後	
Smith <i>et al.</i> , '83 <sup>26)</sup>	11(132)	45.6 ± 27.2		6, 12週	微生物学的定量法 ( <i>L. casei</i> ) 1 酵素法 (コンジュガーゼ)
		(6-146): 遊離型量 78.9 ± 44.7 (16-210): 総量			
Smith <i>et al.</i> , '85 <sup>27)</sup>	67	85		3週, 6ヶ月	微生物学的定量法 ( <i>L. casei</i> ) 1 酵素法 (コンジュガーゼ)
Salmenperä <i>et al.</i> , '86 <sup>45)</sup>		45.6 ± 27.2 (6-146): 遊離型量 78.9 ± 44.7 (16-210): 総量			
井戸田ら, '96 <sup>2)</sup>	2,434*(2,727)	32		分娩後 3-5日	HPLC法
		54		16-30日	
		40		241-482日	
Lim <i>et al.</i> , '98 <sup>28)</sup>	42	90.6 ± 3.5		3ヶ月	微生物学的定量法 ( <i>L. casei</i> ) 3 酵素法
		81.5 ± 3.5		6ヵ月後	
Mackey and Picciano, '99 <sup>29)</sup>	21	99	224.4 ± 11.6	3ヶ月	微生物学的定量法 ( <i>L. casei</i> ) 3 酵素法
		82	187.0 ± 11.9	6ヶ月	
Present study	25*	34.6 ± 9.9 (17.3-58.9)	78.5 ± 22.3 (39.3-133.5)	2-5ヶ月	微生物学的定量法 ( <i>L. casei</i> ) 3 酵素法

1979年以降  
mean ± SD (min-max)

\* 日本女性

た。この結果から乳児の摂取量を算出すると、6週齢および12週齢でそれぞれ45.5および50.5 μg/日となり、Tamuraら<sup>30)</sup>の報告と比べ低値である。

Smithら<sup>27)</sup>は満期産の乳児67名の葉酸について出生から1年間観察した。生後6週と3ヶ月目に採取した母乳の葉酸含量は平均85 ng/mlであった。これらの時期において、乳児14名の葉酸摂取量(約65および70 μg/日)は同じであったが、母乳からの葉酸摂取量は、6ヶ月(85 μg/日)では増加したが、9ヶ月(50 μg/日)では減少していた。Limら<sup>28)</sup>の報告においても、母乳の葉酸含量は授乳後3ヶ月と6ヶ月で差異は認められていない。

井戸田ら<sup>2)</sup>は、全国46地区に在住する17-41歳の授乳婦2,434名から得た母乳2,727サンプルの葉酸含量をHPLC法で分析した。母乳の葉酸含量は、採乳時期により平均32-54 ng/mlの範囲にあり、初乳から移行乳、成熟乳と増加し、その後減少することを示している。

MackeyとPicciano<sup>29)</sup>は、授乳婦42名に葉酸サプリメント0 mgあるいは1 mgを与え、分娩後3ヶ月と6ヶ月後に母乳や母親の葉酸の状態を検討した。これらの結果、サプリメントを摂取していない場合、母乳の葉酸含量は、3ヶ月に比べ、6ヶ月では有意に減少していた。しかしながら、葉酸サプリメントを与えている場合には母乳葉酸含量の減少は認められていない。なお、これらの葉酸含量から、3ヶ月および6ヶ月における母乳からの葉酸摂取量は、それぞれ62 μgおよび55 μg/日(母乳以外から14 μg)である。

第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—では、平均的な母乳の葉酸含量54 μg/l、哺乳量0.75l/日として、0-5ヶ月の乳児の所要量を40 μg/日としている<sup>9)</sup>。一方、日本人の食事摂取基準(2005年版)においては、日本人の成熟乳の葉酸含量として、54 μg/lが採用され、哺乳量0.78l/日から、目安量は0-5ヶ月の乳児で42 μg/日、6-11ヶ月の乳児で63 μg/日とされた<sup>10)</sup>。

### 3. ビオチン

これまでに報告されている欧米および本邦の母乳ビオチン含量をみると、まず母乳中のビオチンの生体利用率を知るために、Heardら<sup>30)</sup>は、母乳を限外ろ過膜にかけてビオチンの存在状態について検討した。この結果、母乳のビオチン含量は平均20.3 ± 2.0 ng/mlであり、限外分子量500Daの膜をとおしても、無処理および加水分解処理した母乳のビオチンの99%以上が回収された。このことは、母乳中のビオチンはタンパク質とは結合せずに、乳児に利用され易い状態で存在していることを示唆している。

分娩後の母乳中ビオチン含量の変化を見ると、分娩後1日目では2.95 ± 0.37 ng/mlであるのに対して、7日目および49日目では6.81 ± 0.58 ng/mlおよび12.46 ± 0.81

ng/mlと増加している<sup>31)</sup>。このように初乳に比べ、成熟乳では高いビオチン含量である。一方、授乳婦に1日あたり3 mgのビオチンサプリメントを与えると、摂取5日後および10日後には成熟乳中のビオチン含量が20-30倍に増加した。10日後のビオチン増加量は460 ng/mlで、哺乳量を1日あたり0.78lとするとビオチン分泌量は358 μg/日となり、これはビオチンサプリメントの12%に相当する。なお尿中ビオチン排泄量もビオチンサプリメント摂取10日後には16倍に増加していた。

Goldsmithら<sup>32)</sup>は母乳のビオチン含量は、初乳期、移行期、成熟期でそれぞれ平均0.7, 3.0, 4.7 ng/mlと増加していることを示している。Fordら<sup>33)</sup>の報告でも、満期産(39週以降)の母乳をみると、0.21, 2.21, 5.33 ng/mlと泌乳時期に伴って増加している。なお早期産(29-34週)の母乳でビオチン含量には大きな違いは見られていない。さらに出産後10日から6ヶ月の間に得た成熟乳でも、ビオチン含量は8.7 ± 4.2 ng/gであった<sup>34)</sup>。

Hiranoら<sup>35)</sup>は、日本人授乳婦を対象にして、母乳ビオチン含量を分析している。この結果でも、これまでの結果と同様に、泌乳時期に従ってビオチン含量が増加している。35名の成熟乳のビオチン含量は平均5.2 ± 2.1 ng/mlと欧米の報告と比べて差異は認められない。なお、遊離型ビオチンの割合が、初乳、移行乳および成熟乳でそれぞれ53.9, 64.0, 77.2%と増加している。一方、Heardら<sup>30)</sup>の報告では母乳ビオチン含量が高値を示し、サンプルや分析法の違いについて検討が必要である。

Salmenperäら<sup>36)</sup>はビオチン定量の前処理として、パバイン処理を用いている。出産後5日間ではほとんどの授乳婦で母乳中にビオチンは認められなかった。しかし、出産2ヵ月後ではビオチン含量は4.5 ng/mlに増加し、これ以降では変化は見られず一定である。また母乳中のビオチン含量と血漿中のビオチン濃度との間には有意な関連が認められている。

以上のように、これまでの報告では、初乳ではビオチン含量は多くの場合1 ng/ml以下である。しかし、移行乳から成熟乳へと増加し、成熟乳での総ビオチン含量は平均で約5 ng/mlである。このように母乳中のビオチン含量は、初乳に比べて成熟乳で高値を示している。また、人種差は認められず食生活による影響はあまりないものと考えられる。一致した結果が得られていないが、ビオチンの一部はタンパク質と結合しているものと思われる。

著者らが、前回測定した母乳ビオチン含量は、平均3.87 ng/mlであった<sup>3)</sup>。採取時期や季節によって大きな差異は認められなかった。しかしながら、これまでに報告されている成熟乳のビオチン含有量と比べ低値を示している。この相違については明らかではない。また季節変動はみられず、夏季と冬季での摂取している食事には影響されないこ

とが示唆される。

ビオチンは、第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—において、栄養所要量がはじめて策定された<sup>1)</sup>。これまでの各国における報告から、成熟乳のビオチン含量は平均6 µg/lである、としている<sup>11)</sup>。この値に基づき、一日の哺乳量が0.75lとして、0-5ヶ月乳児におけるビオチン摂取量を4.5 µg/日としている。0-5ヶ月の乳児で、5 µg/日、6-11ヶ月の乳児で6 µg/日とされた。しかしながら、平成12年(2002年)に改訂された五訂および五訂増補(2005年)日本食品標準成分表にはビオチンは記載されていない<sup>37)38)</sup>。また平成15年(2003年)に食品添加物として認可されたが、使用が栄養機能食品に限られている。つまり食品や調製粉乳への添加はいまだに許可されていない<sup>39)</sup>。日本人の食事摂取基準(2005年版)においては、日本人の成熟乳の値として、5.2 ng/ml (µg/l)が採用され、哺乳量0.78lから目安量は0-5ヶ月の乳児で4 µg/日、6-11ヶ月の乳児で10 µg/日とされた<sup>10)</sup>。

#### 4. ナイアシン

母乳のナイアシン含量は1.55 µg/mlであった。前回報告した平均値2.2 µg/mlと比較すると、低値であったが有意差は認められなかった<sup>3)</sup>。また、これまでの報告<sup>10)33)</sup>と比較しても、有意な差異は認められず、母乳のナイアシン含量は成熟乳では比較的一定に維持されているものと思われる。母乳のナイアシンの存在形態としては、今回の実験により、約20%が遊離型で約80%は補酵素型で存在しているものと推定された。なお、NADはそのままの形では吸収されず、消化管腔内でNADからニコチンアミドとADP-リボースに加水分解され、遊離型のニコチンアミドとなった後に吸収されるものと思われる<sup>40)</sup>。母乳中にそのままの形では吸収されない補酵素型のNADがなぜ多量に存在しているのか、この異議については、今後の課題である。

#### 5. パントテン酸

今回の測定では母乳の総パントテン酸含量は6.92 µg/mlであったが、前回の測定ではアミダーゼ・ホスファターゼ前処理法では4.7 µg/ml、パパイン・ジアスターゼ前処理法では3.6 µg/mlであった。またこれまでにJonhsonら<sup>41)</sup>はアミダーゼ・ホスファターゼ前処理法で6.70 µg/ml、Picciano<sup>42)</sup>はパパイン・ジアスターゼ前処理法で2.2-2.5 µg/mlと報告している。今回の値はJonhsonら<sup>41)</sup>の値に近いものであった。このように母乳中の総パントテン酸含量は、前処理方法の違いにより、値が大きく異なっている。なお、母乳の総パントテン酸含量と摂取パントテン酸量との間には関連があると報告されている。

### 総 括

わが国における母乳の水溶性ビタミン含量を明らかにするために、健常な授乳婦から得た母乳のB<sub>12</sub>、葉酸、ビオチン、ナイアシンおよびパントテン酸の5種類の含量を分析した。母乳は、妊娠ならびに出産が正常な経過で満期出産し、満月齢で2-5ヶ月の乳児を完全母乳哺育している日本人授乳婦25名から得た。母乳のB<sub>12</sub>含量は0.28 ± 0.14 ng/ml (0.21 ± 0.11 pmol/ml)であり、総葉酸含量は34.6 ± 9.9 ng/ml (78.5 ± 22.3 pmol/ml)であった。総ビオチン含量は3.40 ± 0.68 ng/ml (13.9 ± 2.8 pmol/ml)、遊離型ビオチン含量は0.87 ± 0.31 ng/ml (3.6 ± 1.3 pmol/ml)で、遊離率は25.6 ± 8.2%であった。総ナイアシン含量および総パントテン酸含量は、今回の分析データは参考データであるが、授乳婦15名でそれぞれ平均値1.55 ± 0.56 µg/ml (12.7 ± 4.6 nmol/ml)および6.92 ± 2.83 µg/ml (31.5 ± 13.0 nmol/ml)であった。母乳に含まれるビタミンの相互作用を解析すると、B<sub>12</sub>は他のビタミン含量と関連はみられなかった。しかし、ビオチンと葉酸含量との間には高い関連がみられた。

表3. 食事摂取基準との比較。

ビタミン		第六次改定 所要量		食事摂取基準(2005版) 目安量		本研究		
		0~(月)	6~(月)	0~(月)	6~(月)	母乳含有量 (/ml)	推定摂取量 <sup>a)</sup> (/日)	推定摂取量 <sup>a)</sup> (/日)
B <sub>1</sub>	mg	0.2	0.3	0.1	0.3	-	-	-
B <sub>2</sub>	mg	0.2	0.3	0.3	0.4	-	-	-
B <sub>6</sub>	mg	0.1	0.1	0.2	0.3	0.25ng <sup>b)</sup>	1.45nmol	0.2
B <sub>12</sub>	µg	0.2	0.2	0.2	0.5	0.28ng	0.21pmol	0.2
ナイアシン	mgNE	2	4	2	3	1.55µg	12.7nmol	1.2
パントテン酸	mg	1.8	2	4	5	6.29µg	31.5nmol	4.9
葉酸	µg	40	50	40	60	34.6ng	78.5pmol	27.0
ビオチン	µg	5	6	4	10	3.4ng	13.9pmol	2.7
C	mg	40	40	40	40	-	-	-

<sup>a)</sup> 母乳摂取量: 0.78l.

<sup>b)</sup> 伊佐ら, 2004<sup>4)</sup>.

これらの母乳のビタミン含量を基に、乳児におけるビタミン摂取量を推定すると(表3)、葉酸、ビオチン、ナイアシンは、日本人の食事摂取基準(2005年版)と比較して、低値を示していた。これらの値は、今後これらのビタミンの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。

#### 謝 辞

本研究は平成13-15年度の厚生労働科学研究費補助金(研究課題名:日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究)を受けて行ったものである。研究を行うにあたり、ご協力を頂いた関係各位に深謝いたします。

(平成17.6.22 受付)

#### 文 献

- 1) 厚生省(1999)第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—。平成11年6月
- 2) 井戸田 正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則文, 前田忠男(1996)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雑誌 **10**, 11-20
- 3) 渡邊敏明, 谷口歩美, 福井 徹, 太田万理, 福渡 努, 米久保明得, 西牟田 守, 柴田克己(2004)日本人女性の母乳中ビオチン, パントテン酸およびナイアシンの含量。ビタミン **78**, 399-407
- 4) 伊佐保 香, 垣内明子, 早川享志, 佐々木晶子, 新澤佳代, 戸谷誠之, 柘植治人(2004)日本人の母乳中のビタミンB<sub>6</sub>含量。ビタミン **78**, 437-440
- 5) 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
- 6) Wright LD, Skeggs HR (1944) Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* **56**, 95-98
- 7) Baker H, Sobota H (1962) Microbiological assay methods for vitamins. *Ad Clin Chem* **5**, 173-235
- 8) Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **424**, 23-28
- 9) Trugo NM, Sardinha F (1994) Cobalamin and cobalamin-binding capacity in human milk. *Nutr Res* **14**, 22-33
- 10) 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
- 11) 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, pp. 306-356
- 12) 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
- 13) Specker BL, Miller D, Norman EJ, Greene H, Hayes KC (1988) Increased urinary methylmalonic acid excretion in breast-fed infants of vegetarian mothers and identification of an acceptable dietary source of vitamin B<sub>12</sub>. *Am J Clin Nutr* **47**, 89-92
- 14) Casterline JE, Allen LH, Ruel MT (1997) 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
- 15) Donangelo CM, Trugo NM, Koury JC, Barreto Silva MI, Fretias LA, Feldheim W, Barth C (1989) Iron, zinc, folate and vitamin B<sub>12</sub> nutritional status and milk composition of low-income Brazilian mothers. *Eur J Clin Nutr* **43**, 253-266
- 16) Luhby AL, Cooperman JM, Donnenfeld AM, Herrero JM, Teller DN, Wenig JB (1958) Observations on transfer of vitamin B<sub>12</sub> from mother to fetus and newborn. *Am J Dis Child* **96**, 532-533
- 17) O'Connor D, Green L, Picciano MF (1997) Maternal folate status and lactation. *J Mammary Gland Neoplasia* **2**, 279-289
- 18) Institute of Medicine (2000) 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, pp. 196-305
- 19) Lawrence JM, Herrington BL, Maynard LA (1945) Human milk studies. XXVII. Comparative values of bovine and human milks in infant feeding. *Am J Dis Child* **70**, 193-199
- 20) Williams RJ, Cheldelin VH, Mitchell HK (1942) The B vitamin content of milk from animals of different species. in studies on the vitamin content of tissues, II, Publication 4237. University of Texas. 97
- 21) Matoth Y, Prinkas A, Sroka C (1965) Studies on folic acid in infancy. III. Foliates in breast fed infants and their mothers. *Am J Clin Nutr* **16**, 356-359
- 22) Ford JE, Scott KJ (1968) The folic acid activity of some milk foods for babies. *J Dairy Res* **35**, 85-88
- 23) American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition (1981) Nutrition and lactation. *Pediatrics* **68**, 435-443
- 24) 山田雅子(1979)乳汁中の葉酸量について。ビタミン **53**, 221-227
- 25) Tamura T, Yoshimua Y, Arakawa T (1980) Human milk folate and folate status in lactating mothers and their infants. *Am J Clin Nutr* **33**, 193-197
- 26) Smith AM, Picciano MF, Deering RH (1983) Folate supplementation during lactation: Maternal folate status, human milk folate content, and their relationship to infant folate status. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2**, 622-628
- 27) Smith AM, Picciano MF, Deering RH (1985) Folate intake and blood concentration of term infants. *Am J Clin Nutr* **41**, 590-598
- 28) Lim H-S, Mackey AD, Tamura T, Wong SC, Picciano MF (1998) Measurable human milk folate is increased by treatment with  $\alpha$ -amylase and protease in addition to folate conjugase. *Food Chem* **63**, 401-407
- 29) Mackey AD, Picciano MF (1999) Maternal folate status during extended lactation and the effect of supplemental folic acid. *Am J Clin Nutr* **69**, 285-292
- 30) Heard GS, Redmond JB, Wolf B (1987) Distribution and bioavailability of biotin in human milk. *Fed Proc* **46**, 897 (Abstract)
- 31) Hood RL, Johnson AR (1980) Supplementation of infant for-mu-



- la-tions with biotin. *Nutr Rep Internat* **21**, 727-731
- 32) Goldsmith SJ, Eitenmiller RR, Feeley RM, Barnhart HM, Maddox FC (1982) Biotin content of human milk during early lactational stages. *Nutr Res* **2**, 579-583
- 33) Ford JE, Zechalko A, Murphy J, Brooke OG (1983) Comparison of the B vitamin composition of milk from mothers of preterm and term babies. *Arch Dis Child* **58**, 367-372
- 34) Friend BA, Shahani KM, Long CA, Vaughn LA (1983) The effect of processing and storage on key enzymes, B vitamins, and lipids of mature human milk I. Evaluation of fresh samples and effects of freezing and frozen storage. *Pediatr Res* **17**, 61-64
- 35) Hirano M, Honma K, Daimatsu T, Hayakawa K, Oizumi J, Zaima K, Kanke Y (1992) Longitudinal variations of biotin content in human milk. *Internat J Vit Nutr Res* **62**, 281-282
- 36) Salmenpera L, Perheentupa J, Pispala JP, Siimes MA (1985) Biotin concentrations in maternal plasma and milk during prolonged lactation. *Internat J Vit Nutr Res* **55**, 281-285
- 37) 食品成分研究調査会編 (2001) 五訂日本食品標準成分表. 医歯薬出版, 東京
- 38) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会 (2005) 五訂増補日本食品標準成分表. 国立印刷局, 東京
- 39) 渡邊敏明, 米久保明得, 桑田 有, 山口修一, 小林昭夫, 吉田一郎, 岡野善行, 大浦敏博, 大和田 操, 松田一郎, 多田啓也, 大浦敏明, 青木菊麿, 北川照男, 福井 徹 (2005) 人工栄養児および母乳栄養児におけるビオチンの栄養状態に関する検討. *ビタミン* **79**, 445-452
- 40) Gross CJ, Henderson LM (1983) Digestion and absorption of NAD by the small intestine of the rat. *J Nutr* **113**, 412-420
- 41) Johnson L, Vaughan L, Fox HM (1981) Pantothenic acid content of human milk. *Am J Clin Nutr* **34**, 2205-2209
- 42) Picciano MF (1995) Vitamins in milk. Water-soluble vitamins in human milk. *Handbook of Milk Composition*. Academic Press
- 43) Areekul S, Oumarum K, Douglass J (1977) Determination of vitamin B<sub>12</sub> and vitamin B<sub>12</sub>-binding protein in human and cow's milk. *Mod Med Asia* **13**, 17-23
- 44) Sandberg DP, Begley JA, Hall CA (1981) The content, binding, and forms of vitamin B<sub>12</sub> in milk. *Am J Clin Nutr* **34**, 1717-1724
- 45) Salmenperä L, Perheentuna J, Siimes MA (1986) Folate nutrition is optimal in exclusively breast-fed infants but inadequate in some of their mothers and in formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenter Nutr* **5**, 283-289

## ノ ー ト

たけのこのビタミン B<sub>12</sub> の分析

<sup>1</sup> 高知女子大学生生活科学部健康栄養学科, <sup>2</sup> 京都女子大学短期大学部生活科学科  
<sup>3</sup> 宇部フロンティア大学短期大学部食物栄養学科

宮本 恵美<sup>1</sup>, 橋高(桂)博美<sup>2</sup>, 足達 理子<sup>3</sup>, 渡辺 文雄<sup>1</sup>

Vitamins(Japan), 79(7), 329-332(2005)

Assay of Vitamin B<sub>12</sub> in Edible Bamboo Shoots

Emi MIYAMOTO<sup>1</sup>, Hiromi KITAKA-KATSURA<sup>2</sup>, Satoko ADACHI<sup>3</sup>, Fumio WATANABE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Health Science, Kochi Women's University, Kochi 780-8515, Japan,

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University, Kyoto 605-8501, Japan,

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Ube Frontier College, Ube 755-8550, Japan

To verify whether edible bamboo shoots contain vitamin B<sub>12</sub> or not, vitamin B<sub>12</sub> was assayed by the microbiological method authorized in the standard tables of food composition in Japan (5th Edition), and by a reversed-HPLC. The results indicate that edible bamboo shoots do not contain vitamin B<sub>12</sub>, but some compounds showing the vitamin B<sub>12</sub>-like activity (known as the alkali-resistant factor).

**Keywords:** vitamin B<sub>12</sub>, bamboo shoots, alkali-resistant factor, bioassay

(Received November 12, 2004)

## 緒 言

ビタミン B<sub>12</sub>(B<sub>12</sub>)は主に動物性食品に含まれており、一部の藻類や糸引き納豆のような微生物が関与する発酵食品を除き植物性食品にはほとんど含まれていない。しかし、たけのこの栄養価に関するホームページやテレビ番組などで「植物性食品としては珍しくたけのこには B<sub>12</sub> が豊富に含まれている」ことがしばしば紹介されている。これの根拠となる文献、上田弘一郎著「竹と日本人」<sup>1)</sup>の中にたけのこの栄養分の特徴として B<sub>12</sub> を豊富に含むことが測定データと共に記載されている。また、小野も<sup>2)</sup>Lactobacillus leichimannii ATCC7830 を用いた微生物学的定量法でたけのこ各部位の B<sub>12</sub> 含量を測定し報告している。しかし、ど

ちらも詳細な B<sub>12</sub> の抽出・測定方法に関する記述がない。一方、五訂日本食品標準成分表<sup>3)</sup>ではたけのこの B<sub>12</sub> 含量は測定されていないが、文献等により含まれていないと推定している。このような状況を正すために五訂日本食品標準成分表で採用されている B<sub>12</sub> 分析法を用いてたけのこの B<sub>12</sub> 含量を測定した。

## 実 験 方 法

## 1. 試料

たけのこは京都府産(4本)および高知県産(3本)のもうそう竹のたけのこ(可食部が 20 cm 程度のもの)を市場で購入して実験に用いた。たけのこ可食部の長さを測定後、中間点より 2 分割し、先端部を上部、残りを下部として、

<sup>1</sup> 〒 780-8515 高知市永国寺町 5-15, <sup>2</sup> 〒 605-8501 京都市東山区今熊野北日吉町 35 番地,

<sup>3</sup> 〒 755-8550 宇部市文京町 5-40

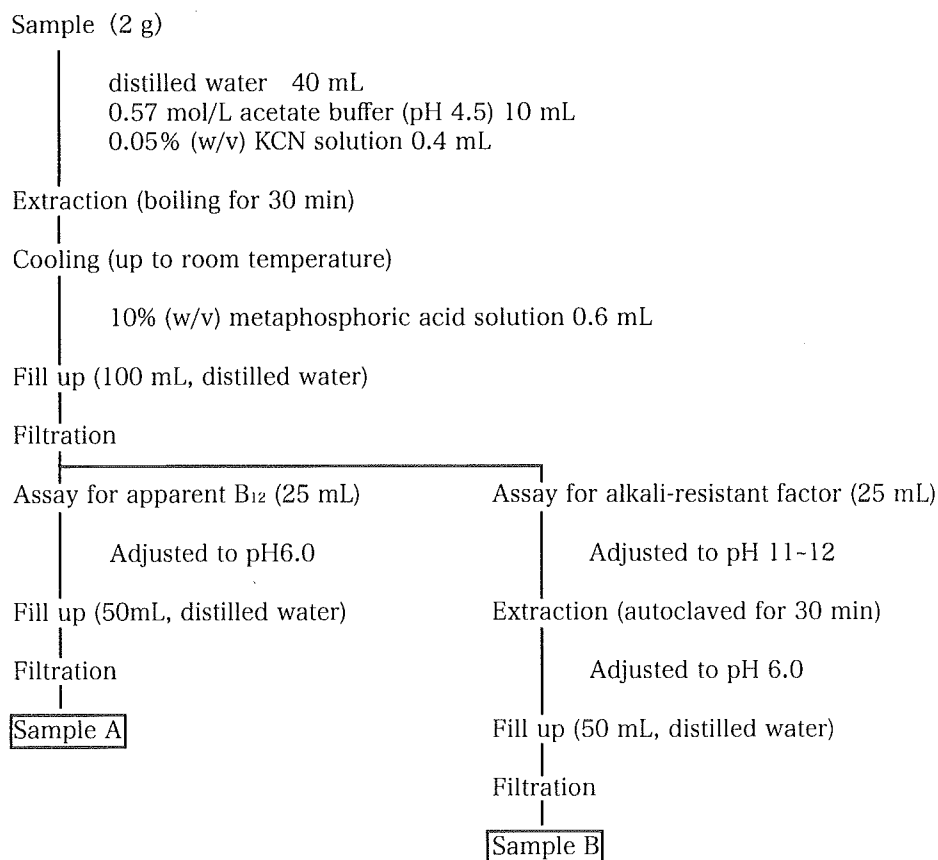


図 1. Summary of B<sub>12</sub> extraction and assay method.

分析に供するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保存した。

## 2. B<sub>12</sub> の分析

たけのこに含まれる 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>4)</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。

凍結したたけのこ試料をミキサーにより破碎後、2 g を正確に秤量し図 1 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、これらをアルカリ

耐性因子として別にアルカリ処理を行った。Sample A (試験試料液 A) より求めた見かけの B<sub>12</sub> 量から Sample B (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. HPLC 分析

上記の試験試料液 A および試験試料液 B 中に含まれる B<sub>12</sub> 活性化化合物の溶出パターンを調べるために、各試験試料溶液および標準 B<sub>12</sub> 溶液 (1 ng/L) のそれぞれ 100  $\mu\text{L}$  を HPLC [カラム; Wakosil-II 5C18RS,  $\phi$  4.6  $\times$  150 mm; 移動層; 1% (v/v) 酢酸を含む 20% (v/v) メタノール溶液; カラム温度; 35 $^{\circ}\text{C}$ ; 流速; 1.0 mL/min] で分離後、溶出液を 1.0 mL づつフラクションコレクターで分画した。溶出液画分を減圧下、35 $^{\circ}\text{C}$  にて遠心エバポレーターで乾固

表 1. Amounts of apparent vitamin B<sub>12</sub> and alkali-resistant factor in bamboo shoots (raw). All values obtained represent mean  $\pm$  SEM ( $n=7$ ).

	Apparent B <sub>12</sub> (Sample A) ( $\mu\text{g}/100$ g edible portion)	Alkali-resistant factor (Sample B)
Bamboo shoots, raw		
Upper portion	5.29 $\pm$ 2.34	6.10 $\pm$ 1.29
Lower portion	2.17 $\pm$ 0.77	4.75 $\pm$ 1.11

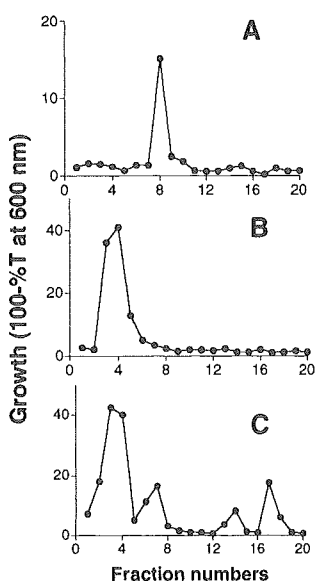


図2. HPLC patterns of B<sub>12</sub>-activity of authentic B<sub>12</sub> [A], apparent B<sub>12</sub> fraction (sample A) [B], and alkali-resistant factor fraction (sample B) [C].

させた後、0.05%(w/v)KCNを含む10 mmol/L酢酸緩衝液(pH 4.8)を1.0 mL加え、暗黒下で一晩放置した。その後、微生物学的定量法を用いてB<sub>12</sub>活性画分を検出した。

## 結 果

表1にたけのこ(生)の上部(先端部)および下部に含まれる見かけのB<sub>12</sub>含量とアルカリ耐性因子含量を示した。その結果、たけのこに含まれる見かけのB<sub>12</sub>含量からアルカリ耐性因子含量を差し引くと、上部・下部とも値は負になり、B<sub>12</sub>は含まれていないことが示された。また、図2に示す各画分のHPLC分析の結果、標準B<sub>12</sub>の保持時間が8分であるのに対してたけのこ上部の試験試料液A(見かけのB<sub>12</sub>画分)のB<sub>12</sub>活性化合物は4分に単一のピーク

を示した。一方、試験試料液B(アルカリ耐性因子画分)では保持時間4分のメインのピークに加えて、新たに7分、14分、17分にマイナーなピークが検出された。このことは、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くと値が負になる結果とよく一致していた。

以上の結果からたけのこにはB<sub>12</sub>が含まれておらず、B<sub>12</sub>以外のB<sub>12</sub>活性化合物(アルカリ耐性因子)を多量に含むことが明らかとなった。

## 考 察

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に準じてたけのこのB<sub>12</sub>含量を測定した結果、見かけのB<sub>12</sub>含量がかなり検出された。このことから、恐らく先行研究<sup>1)2)</sup>ではアルカリ耐性因子量を測定し、補正していないことが推測される。日本食品標準成分表<sup>5)</sup>では、納豆、みそ類、魚介類、藻類および調味料類などではB<sub>12</sub>以外のB<sub>12</sub>活性物質(アルカリ耐性因子)を測定し、その値を差し引くことでB<sub>12</sub>含量を求めたとなっている。今回のようなこともあるのですべての食品においてアルカリ耐性因子量を測定し補正する必要があると思われる。

有機肥料中のB<sub>12</sub>や土壌中の微生物が生産したB<sub>12</sub>を植物体が吸収・保持することが報告されており<sup>6)7)</sup>、植物性食品でもB<sub>12</sub>を含む可能性がある。著者らは予備実験でたけのこ以外の植物性食品のB<sub>12</sub>含量を測定した結果、だいず、あずき、えんどう、えだまめ、ブロッコリー、アスパラガス、ふぎ、りょくとうもやし、モロヘイヤ、じゅんさいで微量のB<sub>12</sub>を含んでいると評価された(表2)。一方、キャベツ、しゅんぎく、ほうれんそう、セロリー、ゆりね、さといもではたけのこ同様に補正值が負となった。この結果は、たけのこの場合と同様に(図2C)B<sub>12</sub>以外のB<sub>12</sub>活性化合物がアルカリ処理により変化を受け活性が増大したものであると思われるが、詳細は不明である。

また、表2に示すB<sub>12</sub>が検出された植物性食品について

表2. Corrected amounts of vitamin B<sub>12</sub> in some plant foods (raw). All represent mean values (n=3).

	Apparent B <sub>12</sub>	Corrected B <sub>12</sub> (apparent B <sub>12</sub> -alkali-resistant factor) (µg/100 g edible portion)
Soybeans	0.018	0.009
Adzukibean	0.007	0.004
Peas	0.098	0.039
Edamame	0.028	0.017
Broccoli	0.971	0.068
Asparagus	0.138	0.088
Japanese butterbur	0.026	0.024
Mug bean sprouts	0.077	0.011
Tassa jute	0.063	0.029
Water shield	0.025	0.024

てたけのこの場合と同様に HPLC 分析を行った結果, アスパラガスのみが標準 B<sub>12</sub> と同一の保持時間にもピークを示した. この結果からアルカリ耐性因子量を補正した値が真の B<sub>12</sub> 含量であるとも限らず, すべての食品において HPLC 分析を併用して精査する必要があると思われる.

#### 謝 辞

本研究は平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患等総合研究; 研究課題名: 日本人の食事摂取基準(栄養所要量)の策定に関する研究)を受けて行ったものである. また, 本研究にご協力下さった高知女子大学吉本瑞穂さんと京都女子大学中島千晶さんに感謝の意を表す.

(平成 16. 11. 12 受付)

#### 文 献

- 1) 上田弘一郎 (1979) 竹と日本人, pp. 41-44, 日本放送出版協会, 東京
- 2) 小野忠義 (1986) 農産物とビタミン—筆者の研究事例を交えて—. 大阪農技セ研報 **23**, 1-4
- 3) 科学技術庁資源調査会編 (2000) 日本食品標準成分表の改訂に関する調査報告—五訂日本食品標準成分表—, pp. 94-95, 大蔵省印刷局, 東京
- 4) 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
- 5) 科学技術庁資源調査会編 (1995) 四訂日本食品標準成分表のフォローアップに関する調査報告VI—日本食品ビタミン K, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> 成分表—, pp. 99-114, 大蔵省印刷局, 東京
- 6) Mozafar A (1995) Enrichment of some B-vitamins in plants with application of organic fertilizer. *Plant Soil* **167**, 305-311
- 7) Mozafar A, Oertli J J (1992) Uptake of a microbially-produced vitamin B<sub>12</sub> by soybean roots. *Plant soil* **139**, 23-30

## **Purification and Characterization of a Corrinoid Compound from a Japanese Salted and Fermented Salmon Kidney “Mefun”**

**Satoko Adachi**

Department of Food and Nutrition, Ube Frontier College, Ube, Japan

**Emi Miyamoto and Fumio Watanabe**

Department of Health Science, Kochi Women's University, Kochi, Japan

**Toshiki Enomoto and Takashi Kuda**

Department of Food Science, Ishikawa Prefectural University, Ishikawa, Japan

**Masahiro Hayashi**

Department of Biological Production and Environmental Science,  
University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

**Yoshihisa Nakano**

Graduate School of Agriculture and Biological Sciences,  
Osaka Prefecture University, Sakai, Japan

**Abstract:** Significant amounts of vitamin B<sub>12</sub> (about 116.3 ~ 556.3 µg/100 g) were determined in a Japanese salted and fermented salmon kidney “Mefun.” A corrinoid compound was purified to homogeneity from Mefun and partially characterized. TLC and HPLC patterns of the purified corrinoid compound were identical to those of authentic vitamin B<sub>12</sub>, but not to inactive corrinoids. The vitamin B<sub>12</sub> found in Mefun was not derived from concomitant vitamin B<sub>12</sub>-synthesizing bacteria, but had accumulated in the salmon kidney. Gel filtration experiments demonstrated that most of the vitamin B<sub>12</sub> found in Mefun was recovered in the free vitamin B<sub>12</sub> fractions.

Address correspondence to Fumio Watanabe, Department of Health Science, Kochi Women's University, Kochi 780-8515, Japan. E-mail: watanabe@cc.kochi-wu.ac.jp

These results indicate that Mefun would be an excellent vitamin B<sub>12</sub> (free form) source for elderly persons with food-bound vitamin B<sub>12</sub> malabsorption.

**Keywords:** Salted and fermented salmon kidney, HPLC, TLC, Vitamin B<sub>12</sub>

## INTRODUCTION

Many people with low serum vitamin B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>) levels, but who do not have pernicious anemia, become malabsorptive for protein-bound B<sub>12</sub> (food-bound B<sub>12</sub> malabsorption).<sup>[1]</sup> The food-bound B<sub>12</sub> malabsorption is found in persons with certain gastric dysfunctions, especially atrophic gastritis with low stomach acid secretion, which prevails in elderly people.<sup>[2]</sup> Because the bioavailability of crystalline B<sub>12</sub> is not altered in people with atrophic gastritis, the Institute of Medicine has suggested that most of the recommended dietary allowance (RDA) (2.4 µg/day) should be obtained by consuming foods fortified with B<sub>12</sub> or B<sub>12</sub>-containing supplement.<sup>[3]</sup>

The food containing the highest amount (327.6 µg/100 g) of B<sub>12</sub> among those described in the Japanese Standard Tables of Food Composition<sup>[4]</sup> is a Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun," which has a delicate flavor. Feeding of only 0.8 g of Mefun can supply the RDA (2.4 µg/day) for adults. If Mefun contains substantial amounts of true and free B<sub>12</sub>, it would be an excellent B<sub>12</sub> source for elderly persons with food-bound B<sub>12</sub> malabsorption.

Another salted and fermented fish product, fish sauce, has been reported to contain considerable amounts of B<sub>12</sub>,<sup>[5]</sup> which is an inactive or unidentified corrinoid compound.<sup>[6]</sup> Certain bacteria can synthesize various corrinoid compounds, some of which are not active for humans, but are assayable in the B<sub>12</sub> determination systems.<sup>[7,8]</sup> There is no information available on whether B<sub>12</sub> found in the salted and fermented fish product, Mefun, is true B<sub>12</sub> or inactive corrinoids for humans. Thus, a corrinoid compound is purified and characterized to clarify the bioavailability of B<sub>12</sub> found in Mefun.

## EXPERIMENTAL

### Materials

B<sub>12</sub> and a reversed-phase high pressure liquid chromatography (HPLC) column (Wakosil-II 5C18RS, φ4.6 × 150 mm; particle size, 5 µm) were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Cosmosil 140C18-OPN was obtained from Nacakai Tesque (Kyoto, Japan). A B<sub>12</sub> assay medium for *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *lactis* (formerly *L. leichmannii*) ATCC7830 was obtained from Nissui (Tokyo, Japan). Silica gel 60 thin layer chromatography (TLC) aluminium sheets were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Amberlite XAD-4 was obtained from

Japan Organo Co. (Tokyo, Japan). Cyanocobamides (5-hydroxybenzimidazolylcyanocobamide, benzimidazolylcyanocobamide, and 7-adeninylcyanocobamide) isolated from bacteria were kindly provided by Dr. E. Stupperich, Ulm University, Germany. All other reagents used were of the highest purity commercially available. The tested samples of the Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun" were provided from a local market in Niigata-, Aomori-, and Hokkaido-prefectures, Japan.

A visible spectrophotometer (Ultrospec 10 pro, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) was used for measuring the turbidity of *L. delbrueckii* test cultures in the microbiological B<sub>12</sub> assay method. A Shimadzu (Kyoto, Japan) UV-visible spectrophotometer (UV-1600) was used for spectral analysis of the purified corrinoid compound.

## Methods

### Extraction and Assay of Vitamin B<sub>12</sub> in Mefun

After about 50 g of each Mefun sample was homogenized with a mixer (MX-X51-H, National, Osaka, Japan), a portion (2 g) of each homogenate was used for the sample. Total B<sub>12</sub> was extracted with boiling at acidic pH and assayed by the microbiological method with *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *lactis* ATCC 7830, according to the method described in the Japanese Standard Tables of Food Composition.<sup>141</sup> Since *L. delbrueckii* ATCC 7830 can utilize both deoxyribosides and deoxynucleotides (known as an alkali-resistant factor) as well as B<sub>12</sub>, the amount of true B<sub>12</sub> was calculated by subtracting the values of the alkali-resistant factor from the values of total B<sub>12</sub>.

### Purification of Corrinoid Compound from Mefun

About 500 g of Mefun (made in Hokkaido-Prefecture) was homogenized with the mixer (National) and added to 4 L of 10 mmol/L acetate buffer, pH 4.8, containing 10 mmol/L KCN. Corrinoid compound was extracted from the solution by boiling for 30 min at 98°C in the dark. The extraction procedures were done in a Dalton (Tokyo, Japan) draught chamber with a fume hood. The boiled solution was cooled to room temperature (25°C) and centrifuged at 10,000 × g for 10 min. The supernatant fraction was put onto a column (5.0 × 45.0 cm) of Amberlite XAD-4 resin which had been washed with 5 L of methanol and equilibrated with distilled water. After the column was washed with 2 L of distilled water, the corrinoid compound was eluted with 1.5 L of 80% (v/v) ethanol. The 80% (v/v) ethanol eluant was pooled, evaporated to dryness under reduced pressure, and dissolved in 30 mL of distilled water. The solution was put onto a column (24 × 150 mm) of Cosmosil 140C18-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) which had been washed with 75% (v/v) ethanol solution and equilibrated with distilled



water. The corrinoid compound was eluted with a stepwise gradient (0, 10, 20, 30, and 80% v/v) of ethanol. These five fractions were separately evaporated to dryness under reduced pressure, and dissolved with a small amount of distilled water. Each concentrated solution was purified by silica gel 60 TLC, which was developed with 2-propanol/NH<sub>4</sub>OH (28%)/water (7:1:2 v/v) as the solvent, in the dark, at room temperature (25 °C). A spot with red-tint on the dried TLC sheet was collected, extracted with 80% (v/v) methanol, evaporated to dryness under reduced pressure, and dissolved in a small amount of distilled water. The concentrated solution was purified by HPLC using a Shimadzu HPLC apparatus (LC-6A Pump, SPD-6A Spectrophotometer, CTO-6A column oven, C-R6A Chromatopac). The sample (100 µL) was put onto a reversed-phase HPLC column (Wakosil-II 5C18RS,  $\phi$ 4.6 × 150 mm; particle size, 5 µm) equilibrated with 20% (v/v) methanol solution containing 1% (v/v) acetic acid at 35 °C. The flow rate was 1.0 mL/min. The compound with the red-tint was isocratically eluted with the same solution, monitored by measuring absorbance at 278 nm, and collected at 1.0 mL with a Bio-Rad Laboratories fraction collector (model 2110). The fractions with the red-tint were pooled, evaporated to dryness under reduced pressure, and dissolved in a small amount of distilled water. The concentrated solution was further purified by HPLC under the same conditions. The peak fraction of the eluant with the red-tint was evaporated to dryness under reduced pressure, and dissolved in 100 µL of distilled water, and used as a purified corrinoid compound.

#### Gel Filtration Experiment

One gram of Mefun was homogenized in 10 mL of 10 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.2 mol/L KCl by the use of a universal homogenizer (Nihon Seiki Seisaku-Sho Co., Tokyo, Japan), and centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min. The supernatant was used for a homogenate of Mefun. A portion (1.0 mL) of the homogenate was placed onto a column (1.4 × 25 cm) of Sephadex G-50 which had been equilibrated with 10 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.2 mol/L KCl. The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 1.0 mL/min. The eluate from the column was fractionated at 1.0 mL. The macromolecular and free B<sub>12</sub> fractions, which were estimated with blue dextran and authentic B<sub>12</sub> by measuring absorbance at 600 and 551 nm, respectively, were pooled. B<sub>12</sub> was extracted from these fractions under the same conditions and assayed by the microbiological method.

#### Analytical TLC and HPLC

Concentrated solutions (2 µL) of the purified compound and cyanocobamides (benzimidazolyl, 5-hydroxybenzimidazolyl, and 7-adeninyl cyanocobamides) were spotted onto silica gel 60 TLC sheets and developed with 1-butanol/2-propanol/water (10:7:10 v/v) and 2-propanol/NH<sub>4</sub>OH (28%)/water

(7:1:2 v/v) as solvents I and II, respectively, in the dark, at room temperature (25 °C).

In the case of HPLC, the concentrated solutions (2  $\mu$ L) of the purified compound and these cyanocobamides were analyzed with the reversed-phase HPLC column (Wakosil-II 5C18RS,  $\phi$ 4.6  $\times$  150 mm; particle size, 5  $\mu$ m) and the Shimadzu HPLC apparatus. The corrinoids were isocratically eluted with 20% (v/v) methanol solution containing 1% (v/v) acetic acid at 35 °C, and monitored by measuring the absorbance at 278 nm. The retention times of these corrinoids were determined at a flow rate of 1.0 mL/min.

#### Ultraviolet-Visible Spectrum

The purified preparation was dissolved in 0.1 mL of distilled water. The spectrum was measured with a Shimadzu spectrophotometer (UV-16000) at room temperature (25 °C). Super micro quartz cuvettes (0.1 mL,  $d = 1$  cm) were used.

#### Bacterial Counts

The colony forming units (c.f.u.) as the number of viable counts were estimated with the agar surface plating method<sup>[9]</sup> with GAM agar (Nissui, Tokyo, Japan) containing 0 or 20% (w/v) NaCl. Samples were diluted with saline containing 0.1% (w/v) agar and plated on the agar plates. The agar plates were then incubated at 30 °C for 6 days with or without the AnaeroPack system (Mitsubishi Gas, Tokyo, Japan).

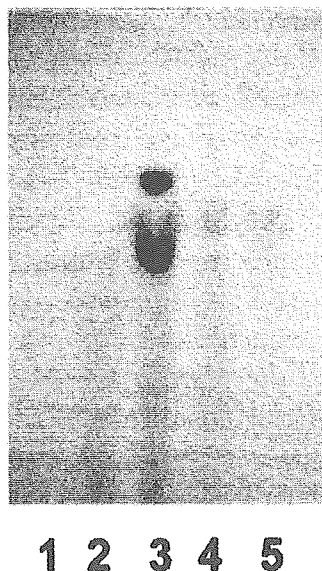
## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the amounts of B<sub>12</sub> in a Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun." Substantial amounts (116.3 ~ 556.3  $\mu$ g/100 g) were found in three samples of Mefun; the values were similar to those described in Standard Tables of Food Composition in Japan.<sup>[4]</sup> To clarify bioavailability of B<sub>12</sub> found in Mefun, a corrinoid compound was purified and characterized.

Figure 1 shows silica gel 60 TLC patterns of corrinoid compound during Cosmosil 140 C18 OPN column chromatography in the purification steps. The

*Table 1.* Amounts of vitamin B<sub>12</sub> in a Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun". B<sub>12</sub> was assayed in triplicate in each Mefun sample ( $n = 4$ ).

Mefun	Vitamin B <sub>12</sub> concentration ( $\mu$ g/100 g)
Sample 1 (made in Niigata Prefecture, Japan)	116.3 $\pm$ 13.4
Sample 2 (made in Aomori Prefecture, Japan)	365.7 $\pm$ 80.7
Sample 3 (made in Hokkaido Prefecture, Japan)	556.3 $\pm$ 91.85

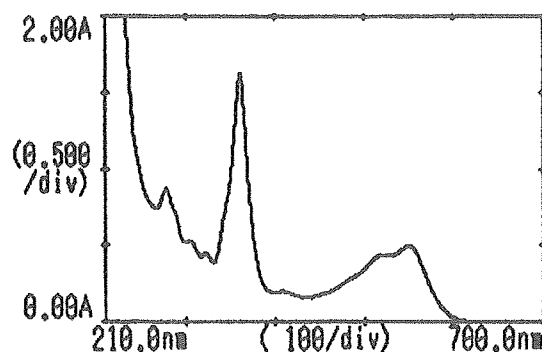


**Figure 1.** Silica gel 60 TLC patterns of corrinoid compound during Cosmosil 140C18-OPN column chromatography in the purification steps. The corrinoid compound ( $R_f$  value 0.6) was eluted with a stepwise gradient [0 (lane 1), 10 (lane 2), 20 (lane 3), 30 (lane 4), and 80% (v/v) (lane 5)] of ethanol. Data present a typical migration pattern of the corrinoid compounds on the chromatography from three experiments.

spot with the red-tint (corrinoid compound) was found only in the 20% (v/v) ethanol fraction. The spot with the red-tint compound was easily purified with silica gel 60 TLC and reversed-phase HPLC.

The ultraviolet-visible spectrum of the purified compound showed a typical absorption of cobalt-containing corrinoid compound (Fig. 2);  $\lambda_{\max}$  nm (absorption) was at 550.5 (0.497), 521.0 (0.441), 361.0 (1.631), and 279.0 (0.880).

The purified compound, authentic  $B_{12}$ , and cyanocobamides (7-adeninyl-, 5-hydroxybenzimidazolyl-, and benzimidazolyl-cyanocobamides) which occur in bacteria were analyzed by silica gel 60 TLC and reversed-phase HPLC (Table 2). The  $R_f$  values of the purified compound were identical to the values of authentic  $B_{12}$ , of which the retention time was also identical to



**Figure 2.** Ultraviolet-visible spectrum of the purified compound.

**Table 2.**  $R_f$  values and retention times of the purified compound, authentic B<sub>12</sub>, and cyanocobamides on TLC and HPLC

	TLC ( $R_f$ )		HPLC (min)
	Solvent I	Solvent II	
Purified compound	0.24	0.61	9.4
Vitamin B <sub>12</sub>	0.24	0.61	9.4
Benzimidazolylcyanocobamide	0.18	0.57	7.3
5-Hydroxybenzimidazolylcyanocobamide	0.20	0.49	7.0
7-Adeninylcyanocobamide	0.14	0.48	7.7

that of the purified compound in reversed-phase HPLC. These results indicate that Mefun contains substantial amounts of true B<sub>12</sub>.

Table 3 shows the bacterial counts in Mefun samples using two different salinity media. The bacterial counts varied (from 10<sup>2</sup> to 10<sup>4</sup> c.f.u./g) among samples. The high salinity-tolerant bacteria (halophilic bacteria) were detected in only one sample (sample 3). Although this sample showed the highest content of B<sub>12</sub>, the number of bacteria was not as high, compared with one of other fermented foods. The halophilic-anaerobic bacteria were not detected in any Mefun samples (containing about 15% (w/w) NaCl). Kuda et al.<sup>[10]</sup> reported that the halophilic lactococci *Tetragenococcus*, which can grow in anaerobic conditions, is dominant in some salted fish products.

In preliminary experiments, a fresh salmon kidney also contained substantial amounts of B<sub>12</sub> (128.5 ± 4.9 µg/100 g). As Mefun is dehydrated

**Table 3.** Bacterial counts in a Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun" (log colony forming units/g)

Mefun	Media			
	NaCl 0% (w/w)		NaCl 15% (w/w)	
	Aerobe	Anaerobe	Aerobe	Anaerobe
Sample 1 (made in Niigata Prefecture, Japan)	—	—	—	—
Sample 2 (made in Aomori Prefecture, Japan)	4.09	2.95	—	—
Sample 3 (made in Hokkaido Prefecture, Japan)	3.15	—	2.70	—

\* < 2.0