

2. 分析

血清中のトリグリセライド

血清は、全血 5 ml を室温にて 30 分放置後、室温にて、 $800 \times g$ 、10 分間、遠心分離した上清を測定用試料とした。血清中のトリグリセライドは、Triglyceride E テストワコー (GPO・DAOS 法, 和光純薬工業株式会社, 大阪) にて測定した。

血清中の総コレステロール

血清採集方法は、トリグリセライド同様である。血清中総コレステロールは、コレステロール E-テストワコー (コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法, 和光純薬工業株式会社, 大阪) にて測定した。

血清中の遊離脂肪酸 (NEFA)

血清採集方法は、トリグリセライド同様である。血清中遊離脂肪酸は、NEFA-HA テストワコー (ACS・ACOD 法, 和光純薬工業株式会社, 大阪) にて測定した。

血液中の遊離型パントテン酸

全血を 10 倍量の $50 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH 7.0) に加えよく混合し、 100°C の熱水浴中で 5 分間加熱処理した。そして、熱処理したホモジネートを氷水中にて 5 分間冷却した。次に、 4°C 、 $10,000 \times g$ で、5 分間遠心分離し、上清を得、この液を総パントテン酸測定用試料とした。定量は、Skeggs と Wright の方法である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014, American Type Culture Collection, USA) を用いた微生物学

的定量法を基に改変した方法で測定した²⁾。

肝臓および副腎中の総パントテン酸

肝臓と副腎を取り出し、乾燥を防ぐために、ラップで覆いをした状態で、 37°C の恒温槽内で約 6 時間放置することで自己消化を行い、臓器中の結合型のパントテン酸を遊離型のパントテン酸にした。その後、各々の臓器重量の 10 倍量の $50 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH 7.0) を加えたのち、DEGITAL HOMOGENIZER (アズワン株式会社, 大阪) を用いてホモゲナイズし、そのホモジネートを 100°C の熱水浴中で 5 分間加熱処理した。そして、熱処理したホモジネートを氷水中にて 5 分間冷却した。 4°C 、 $10,000 \times g$ で、5 分間遠心分離し、上清を得、この液を総パントテン酸測定用試料とした。定量は、Skeggs と Wright の方法である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014, American Type Culture Collection, USA) を用いた微生物学的定量法を基に改変した方法で測定した²⁾。

尿中の水溶性ビタミン

チアミン

尿をそのまま測定用試料とした。測定方法は、木村らによる HPLC 法を改変した福渡らの方法にて行い、蛍光検出器を装備した HPLC を用いた³⁾⁴⁾。詳細は II-6. に記載した。

リボフラビン

尿をそのまま測定用試料とした。測定方法は、Ohkawa らの方法にて行い、蛍光検出器を装備した HPLC を用いた⁵⁾。詳細は II-6. に記載した。

ビタミンB₆の異化代謝産物4-ピリドキン酸 (4-PIC)

尿をそのまま測定用試料とした。測定方法は、Gregory と Kirk の方法にて行い、蛍光検出器を装備した HPLC を用いた⁶⁾。詳細は II-6. に記載した。

ビタミンB₁₂

尿をそのまま測定用試料とした。測定方法は、Watanabe らの方法による *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (*L. leichimannii*) (ATCC 7830) を用いた微生物学的定量法にて測定した⁷⁾。詳細は II-3. に記載した。

ニコチンアミド異化代謝産物

尿をそのまま測定用試料とした。尿中ニコチンアミド、ニコチンアミドの異化代謝産物である *N*¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), *N*¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) は柴田らによる HPLC 法に従って測定した⁸⁾。尿中 *N*¹-メチルニコチンアミド (MNA) は柴田らによる方法に従って測定した⁹⁾。詳細は II-6. に記載した。

パントテン酸

尿をそのまま測定用試料とした。測定方法は Skeggs と Wright の方法である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014, American Type Culture Collection, USA) を用いた微生物学的定量法を基に改変した方法で測定した²⁾。以下にその方法を示す。

(1) 保存用寒天培地・継代用斜面寒天培地の作成方法

- ① 表 3 に示した一般乳酸菌接種用培地 (日本製薬株式会社, 東京) 3.96 g と寒天粉末 (和光純薬工業株式会社, 大阪) 1.5 g

を秤量し、ビーカーに入れ、水 90 ml を加えて沸騰水浴中で加熱溶解させた (通常 10 分程度)。

- ② 直ちに溶解させた培地を 50°C くらいまで自然放置した後、水で全容を 100 ml にした。
- ③ ② で作成した培地 (冷えすぎると固まる) をネジ口試験管 (16.5×105 mm, 丸底, 株式会社マルエム, 大阪) に 4 ml ずつ分注した。
- ④ オートクレーブ (121°C, 10 min) を用い滅菌した後、平面保存用寒天培地作成の場合はそのまま立てて室温に放置して固め、継代用斜面寒天培地作成の場合は斜めにして室温に放置して固めた。作成した両寒天培地は冷蔵庫中で保存した。

(2) 継代用液体培地の作成方法

- ① 表 3 に示した一般乳酸菌接種用培地 (日本製薬株式会社, 東京) 3.96 g を秤量し、ビーカーに入れ水 90 ml を加えて沸騰水浴中で加熱溶解させた (通常 10 分程度)。
- ② 直ちに溶解させた培地を氷水中にて 20°C 冷却した後、水で全容を 100 ml にした。
- ③ ② で作成した培地を試験管 (12×120 mm, 旭テクノグラス株式会社, 東京) に 5 ml ずつ分注し、アルミキャップをした。
- ④ オートクレーブ (121°C, 10 min) を用いて滅菌した後、氷冷した。作成した液体培地は冷蔵庫中で保存した。

(3) パントテン酸定量用培地の作成方法 (当日調製)

- ① 表 4 に示したパントテン酸定量用培地

(日水製薬株式会社, 東京) 7.7 g を秤量し, ビーカーに入れ水 90 ml を加えて沸騰水浴中で加熱溶解させた (通常 10 分程度).

- ② 直ちに溶解させた培地を氷水中にて 20°C 冷却した後, 水で全容を 100 ml にした.

(4) 使用菌株の継代方法と保存方法

- ① 使用菌株が植えてある保存用寒天培地から菌体を一白金耳とり, 継代用斜面寒天培地に塗布した. 菌を繁殖させるために 37°C で 18~24 時間培養した.
- ② 活力の高い菌を得るために, 培養した斜面寒天培地から菌体を一白金耳とり, 新しい斜面寒天培地に塗布した. 菌を繁殖させるために 37°C で 18~24 時間培養した.
- ③ 継代用液体培地に, 斜面寒天培地から菌体を一白金耳とり, 菌を繁殖させるために 37°C で 18~24 時間培養した.
- ④ 菌を保存する場合は, 液体培地で培養した菌体を一白金耳とって平面保存用寒天培地に尖刺し, 37°C で 18~24 時間培養した. 培養後は冷蔵し, 1 か月に 1 回植え継ぎした.

(5) 接種用菌の作成方法

- ① (4)-③の操作で得た液体培地にて培養した菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後, 遠心分離 (1000×g, 20°C, 10 min) し, 沈殿部分の菌体を得た.
- ② 菌体を 5 ml の 0.9 %滅菌 NaCl に懸濁し, 遠心分離 (1000×g, 20°C, 5 min) 後, 再び 5 ml の 0.9%滅菌 NaCl で洗浄した. この洗浄操作を計 3 回行った.

- ③ 最終的に集めた菌体を 5 ml の 0.9%滅菌 NaCl に懸濁させた. さらにその懸濁液 50 μl を 5 ml の 0.9%滅菌 NaCl に懸濁させ, これを接種用菌体液とした.

(6) 定量操作方法

- ① 表 5 に従って溶液を定量用試験管 (12 × 75 mm, 旭テクノグラス株式会社, 東京) に分注した. 検量線用のパントテン酸標準溶液にはパントテン酸カルシウム (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた. 検量線用, サンプル用共に 3 連で行ったが, No. 0 の 1 本には菌を接種しなかった (雑菌の繁殖がないことを確認するため).
- ② 分注した試験管に, 調製した接種用菌体液を 50 μl ずつ分注した.
- ③ 30°C で 21 時間培養した.
- ④ 分光光度計を 660 nm の波長にし, No. 0 の欠菌の試験管で吸光度の 0 合わせを行った.
- ⑤ 全ての試験管の吸光度を測定した. 標準溶液の吸光度から検量線を作成し, 未知試料中のパントテン酸濃度を算出した. 検量線は, 通常, 図 1 のようになる.

(7) 計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのパントテン酸量 (nmol / tube) を求めた. これを x , 分注した試料量を a (μl) とし, 尿中のパントテン酸量を, $x/a \times$ 希釈倍率 $\times 1000 \times$ 尿量 (ml) より尿中のパントテン酸量 (nmol / day) を求めた.

(8) サンプルの使用方法

尿は水にて適度に希釈したのち, 直接測定用試料とした. 通常, ヒト尿の場合は 10

倍希釈で、ラット尿の場合は 15 倍希釈したものを 50 μ l 使用すれば、検量線内に入る。

葉酸

尿をそのまま測定用試料とした。測定方法は、Tamura らの方法である乳酸菌 *Lactobacillus casei* (ATCC 27773, American Type Culture Collection, USA) を用いた微生物定量法を基に改変した方法で測定した^{10,11)}。以下にその方法を示す。

(1) 保存用寒天培地・継代用斜面寒天培地の作成方法

パントテン酸の分析方法に記載した方法と同様である。

(2) 継代用液体培地の作成方法

パントテン酸の分析方法に記載した方法と同様である。

(3) 葉酸定量用培地の作成方法(当日調製)

① 表 6 に示した Folic Acid Casei Medium (DIFCO, USA) 9.4 g とアスコルビン酸 0.05 g をビーカーに入れ、水 90 ml を加えて溶解した後、水にて全容を 100 ml とした。

② オートクレーブ (110°C, 5 min) を用いて滅菌し、終了後直ちに氷冷した。さらに定量用培地 100 ml に対して 1.0 mg / ml のクロラムフェニコールを 3 ml 加えた。この液を定量用 2 倍濃度基礎培地とした。

(4) 使用菌株の継代方法と保存方法

① 使用菌株が植えてある保存用寒天培地から菌体を一白金耳とり、継代用斜面寒天培地に塗布した。菌を繁殖させるために 37°C で 18~24 時間培養した。

② 活力の高い菌を得るために、培養した斜面寒天培地から菌体を一白金耳とり、新しい斜面寒天培地に塗布した。菌を繁殖させるために 37°C で 18~24 時間培養した。

③ 1.0 mg / ml クロラムフェニコールを 150 μ l 加えた継代用液体培地に、斜面寒天培地から菌体を一白金耳とり、菌を繁殖させるために 37°C で 18~24 時間培養した。

④ 菌を保存する場合は、液体培地で培養した菌体を一白金耳とって平面保存用寒天培地に尖刺し、37°C で 18~24 時間培養した。培養後は冷蔵し、1 か月に 1 回植え継ぎした。

(5) 接種用菌の作成方法

① (4)-③の操作で得た液体培地にて培養した菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後、遠心分離 (1000 \times g, 20°C, 10 min) し、沈殿部分の菌体を得た。

② 菌体を 5 ml の 0.9%滅菌 NaCl に懸濁し、遠心分離 (1000 \times g, 20°C, 5 min) 後、再び 5 ml の 0.9%滅菌 NaCl で洗浄した。この洗浄操作を計 3 回行った。

③ 最終的に集めた菌体を 5 ml の 0.9%滅菌 NaCl に懸濁した。さらにその懸濁液 50 μ l を 5 ml の 0.9%滅菌 NaCl に懸濁させ、これを接種用菌体液とした。

(6) 定量操作方法

① 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.1) をオートクレーブ (110°C, 5 min) し、氷冷しておいた。

② 表 7 に従って溶液を定量用試験管 (12 \times 75 mm, 旭テクノグラス株式会社, 東京)

に分注した。検量線用の葉酸標準溶液にはプテロイルモノグルタミン酸(和光純薬工業株式会社, 大阪)を用いた。検量線用, サンプル用共に3連で行ったが, No. 0 の1本には菌を接種しなかった(雑菌の繁殖がないことを確認するため)。

- ③ 分注した試験管に, 調製した接種用菌体液を50 μ l ずつ分注した。
- ④ 37°Cで22時間培養した。
- ⑤ 分光光度計を660 nmの波長にし, No. 0の欠菌の試験管で吸光度の0合わせを行った。
- ⑥ 全ての試験管の吸光度を測定した。標準溶液の吸光度から検量線を作成し, 未知試料中の葉酸濃度を算出した。検量線は, 通常, 図2のようになる。

(7) 計算方法

まず検量線より試験溶液あたりの葉酸量 (ng / tube) を求めた。これを x , 分注した試料量を a (μ l) とし, 尿中の葉酸量を, $x / a \times$ 希釈倍率 $\times 1000 / 441.4 \times$ 尿量 (ml) より尿中の葉酸量 (nmol / day) を求めた。

(8) サンプルの使用方法

尿は水にて適度に希釈したのち, 直接測定用試料とした。通常, ヒト尿の場合は5倍希釈で, ラット尿の場合は20倍希釈したものを50 μ l 使用すれば, 検量線内に入る。

ビオチン

尿をそのまま測定用試料とした。測定方法は, Wrightら, Fukuiらの方法である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014, American Type Culture Collection, USA) を

用いた微生物学的定量法を基に改変した方法で測定した¹²⁾¹³⁾。詳細はII-2.に記載した。

ビタミンC

尿に同量の10%メタリン酸を加えて処理したものを測定用試料とした。アスコルビン酸 (AsA), デヒドロアスコルビン酸, 2, 3-ジケトグルロン酸の総量を測定しその総量を尿中アスコルビン酸量とした。測定方法は, Kishidaらの方法にて行い, UV検出器を装備したHPLCを用いた¹⁴⁾。詳細はII-6.に記載した。

3. 統計処理

数値はすべて平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で表した。有意差検定には GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)を用いた。検定は, 実験1ではOne-way Analysis of Variance (ANOVA)により, 有意差が認められた場合は, Turkey-Kramer Multiple Comparisons Testで個々の群の間の有意差をみた。実験2では, t-test (unpaired t test)により, 2群間の有意差をみた。

C. 結果

実験1

1. 飼料中のパントテン酸量が飼料摂取量および体重増加量におよぼす影響

パントテン酸の栄養状態を示す指標として, 飼料摂取量の低下とそれに伴う体重増加の抑制が挙げられる。本実験では, 3週齢 Wistar 系雄ラットに0~0.00147%のパントテン酸を含む飼料を与えて28日間飼育した。この飼育期間において, 対照群 (0.00147%) と比較して, 0%群で飼料摂取

量および体重増加量が約 1/2 と有意に低値を示した (図 3)。また, 0.00037%群と 0.00074%群, 対照群 (0.00147%) の間において差異は認められなかった。これより, 0%群において, パントテン酸の栄養状態の悪化が認められた。

2. 飼料中のパントテン酸量が幼若ラットの臓器重量におよぼす影響

飼育最終日である Day 28 に脳, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣を摘出し, 各臓器重量を測定した (表 8)。対照群 (0.00147%) と比較して 0%群では, 脳以外の臓器重量が低値を示した。飼料摂取量の低下により, 臓器重量においても影響が認められた。

3. 飼料中のパントテン酸量が尿中のパントテン酸排泄量におよぼす影響

Day 28 の 1 日尿中パントテン酸排泄量を測定した (図 4)。尿中パントテン酸排泄量はパントテン酸摂取量依存的に増加し, 0%群においてパントテン酸はほとんど排泄されなかった。また, 0.00037%群においても, 尿中排泄量はかなり低値であり, 0%群と 0.00037%群の間に有意な差異は認められなかった。これらの結果より, この条件下 (5%脂肪食) におけるパントテン酸の必要量は 0.00037%にかなり近い値であることが示唆された。

4. 飼料中のパントテン酸量が肝臓および副腎中パントテン酸量におよぼす影響

Day 28 の肝臓および副腎に含まれる総パ

ントテン酸量を測定した (図 5)。肝臓, 副腎ともに対照群 (0.00147%) と比較して 0%群で低値を示した。0.00037%群, 0.00074%群では, 対照群 (0.00147%) との間に差異は認められなかった。

5. 飼料中のパントテン酸量が他の水溶性ビタミン尿中排泄量におよぼす影響

Day 28 の 1 日尿に含まれるチアミン, リボフラビン, 4-ピリドキシン酸, ビタミン B₁₂, ニコチンアミド異化代謝産物の総量, 葉酸, ビオチン, アスコルビン酸を測定した (図 6)。対照群 (0.00147%) と比較して 0%群で低値を示したビタミンはニコチンアミド異化代謝産物の総量であり, 高値を示したビタミンはビタミン B₁₂, アスコルビン酸であった。他のビタミンに差異は認められなかった。

実験 2

実験 1 より, 5%脂肪食 (通常食) におけるパントテン酸の必要量は 0.00037%にかなり近いことが分かった。そこで, 本実験では飼料中のパントテン酸量を 0.00037%とし, 高脂肪食投与における影響を調べた。

1. 高脂肪食が飼料摂取量および体重増加量におよぼす影響

パントテン酸の栄養状態を示す指標として, 飼料摂取量の低下とそれに伴う体重増加量の抑制が挙げられる。本実験では, 3 週齢 Wistar 系雄ラットに 0.00037%のパントテン酸, 脂肪含量 5%あるいは脂肪含量 30%の飼料を与えて 28 日間飼育した。この飼育

期間において、体重増加量は、対照群（5%脂肪食）と比較して30%脂肪食群で低値を示した（図7）。これは、パントテン酸の栄養状態の悪化を示している。

2. 高脂肪食が肝臓および副腎重量におよぼす影響

飼育最終日であるDay 28の肝臓、副腎を摘出し、各臓器重量を測定した（表9）。肝臓重量は、対照群（5%脂肪食）と比較して、30%脂肪食群で低値を示した。副腎重量では、対照群（5%脂肪食）と30%脂肪食の間に差異は認められなかった。

3. 高脂肪食が血清中トリグリセライド量、総コレステロール量、遊離脂肪酸量におよぼす影響

Day 28に血液を採集し、血清中トリグリセライド量、総コレステロール量、遊離脂肪酸量を測定した（図8）。全てにおいて、対照群（5%脂肪食）と30%脂肪食の間に差異は認められなかった。

4. 高脂肪食が尿中のパントテン酸排泄量におよぼす影響

Day 28の1日尿に含まれるパントテン酸量を測定した（図9）。5%脂肪食と30%脂肪食の間に差異は認められなかった。これは、対照群（5%脂肪食）と30%脂肪食群ともにパントテン酸の尿中排泄量が検出限界に近いことが原因であった。このように、0.00037%パントテン酸食ではパントテン酸が尿中へほとんど排泄されないため、高脂肪食による影響が認められなかった。

5. 高脂肪食が血液、肝臓および副腎中のパントテン酸量におよぼす影響

Day 28に採集した血液中の遊離型パントテン酸量、肝臓および副腎中の総パントテン酸量を測定した（図10）。対照群（5%脂肪食）と比較して30%脂肪食群では、血液、肝臓、副腎中パントテン酸量が低値を示した。これは、パントテン酸の栄養状態の悪化を示している。

6. 高脂肪食が他の水溶性ビタミン尿中排泄量におよぼす影響

Day 28の1日尿に含まれるリボフラビン、4-ピリドキシニン酸、ビタミンB₁₂、ニコチンアミド総代謝産物、葉酸、ビオチン、アスコルビン酸を測定した（図11）。対照群（5%脂肪食）と比較して30%脂肪食において低値を示したビタミンは、リボフラビンと4-ピリドキシニン酸であり、高値を示したビタミンは、ビタミンB₁₂と葉酸であった。他のビタミンに30%脂肪食による影響は認められなかった。

D. 考察

本研究では、高脂肪食がパントテン酸の必要量を高めることを証明するデータを得ることを目的として、実験1では、ラットにおける5%脂肪食（通常食）のパントテン酸必要量を求め、さらに実験2では、5%脂肪食のパントテン酸必要量下における高脂肪食投与により、高脂肪食がパントテン酸の必要量におよぼす影響について検討した。

飼料摂取量、体重増加量、臓器重量、臓

器中のパントテン酸量および尿中のパントテン酸排泄量は、パントテン酸の栄養状態を示す指標である。実験1において、飼料摂取量、体重増加量は対照群(0.00147%)と比較して0%群で約1/2と低値を示した。しかし、0.00037%群と0.00074%群は、対照群(0.00147%)と比較して差異は認められなかった。また、臓器重量、肝臓および副腎中パントテン酸量においても、対照群(0.00147%)と比較して0%群で低値を示した。しかし、0.00037%群と0.00074%群は対照群(0.00147%)と比較して差異は認められなかった。さらに、パントテン酸の尿中排泄量は、0%群、0.00037%群において検出限界にかなり近く、ほとんど排泄されなかった。これらの結果より、0%群においてパントテン酸の栄養状態の悪化に伴い、飼料摂取量の低下、体重増加の抑制などの欠乏症状が認められた。0.00037%群では、欠乏症状は認められなかったがパントテン酸の尿中排泄量がかかなり低値であることより、0.00037%が5%脂肪食(通常食)におけるパントテン酸の必要量にかなり近いと判断した。

そこで、実験2では、5%脂肪食(通常食)におけるパントテン酸の必要量を0.00037%とし、高脂肪食投与による影響を調べた。すると、体重増加量、肝臓重量が対照群(5%脂肪食)と比較して30%脂肪食群で低値を示し、高脂肪食投与の影響が認められた。また、血液、肝臓、副腎中のパントテン酸量においても同様に30%脂肪食群において低値を示したが、血清中のトリグリセライド量、総コレステロール量、遊離脂肪酸量

に差異は認められなかった。パントテン酸の尿中排泄量は実験1同様、0.00037%パントテン酸食投与下ではほとんど排泄されないため、対照群(5%脂肪食)と30%脂肪食群の間に差異は認められなかったが、より低値を示す傾向が認められた。これらの結果より、30%脂肪食群で観察された体重増加の抑制、臓器中パントテン酸含量の低下、パントテン酸の尿中排泄量の低下は、パントテン酸栄養状態の悪化を示している。つまり、高脂肪食がパントテン酸の必要量を高めたことにより、30%脂肪食におけるパントテン酸の必要量がパントテン酸の摂取量を上回り、パントテン酸の栄養状態が悪化したものと考えられる。

本研究における2つの実験より得られた結果から、高脂肪食がパントテン酸の必要量を高めることがはじめて栄養学的手法において明らかとなった。

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
- H. 引用文献
1. ラットにおける脂質摂取量と尿中パントテン酸量との関係. 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 平成17年度総括・分担研究報告書, 主任研究者 柴田克己, 99-109, 2006.
 2. Skeggs HR, Wright LD, The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* 156, 21-6, 1944.
 3. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. Liquid chromatographic determination of total thiamin content of blood. *Clin Chem*, 28, 29-31, 1982.
 4. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己 代謝攪乱物質ビスフェノールAのトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位. *食衛誌*, 45, 231-8, 2004.
 5. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem*, 258, 5623-8, 1983.
 6. Gregory JF 3rd, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*, 32, 879-83, 1979.
 7. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B12 degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem*, 46, 5177-80, 1998.
 8. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N1-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 424:23-8. 1988.
 9. Shibata K. Ultramicro-determination of N1-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* 61:599-604. 1987.
 10. Tamura T. Microbiological assay of folates. In *Folic Acid Metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol. 13 (Picciano, M.F., Stockstad, E.L.R., and Gregory, J.F., III, eds.), pp.121-37, Wiley-Liss, New York, USA, 1990.
 11. Tamura T. Determination of food folate. *J Nutr Biochem*, 9, 285-93, 1998.
 12. Wright LD, Skeggs HR. Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* 56, 95-8, 1944.
 13. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* 40,

491-8, 1994.

14. Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S,. Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. Anal Chem,64,1505-7, 1992.

表 1. 飼料組成 (実験 1)

	試験群			対照群
	0%	0.00037%	0.00074%	0.00147%
カゼイン			20	
L-メチオニン			0.2	
α-コーンスターチ			46.9	
ショ糖			23.4	
コーン油			5	
ミネラル混合 (AIN-93M-MX)			3.5	
ビタミン混合 (AIN-93-VX;PaA free)			1	
パントテン酸カルシウム	0	0.0004	0.0008	0.0016

値は%で示した.

表 2. 飼料組成 (実験 2)

	対照群	試験群
	5%	30%
カゼイン	20	20
L-メチオニン	0.2	0.2
α-コーンスターチ	46.9	46.9
ショ糖	23.4	15.1
コーン油	5	30
ミネラル混合 (AIN-93M-MX)	3.5	3.5
ビタミン混合 (AIN-93-VX;PaA free)	1	1
パントテン酸カルシウム	0.0004	0.0004

値は%で示した.

表 3. 一般乳酸菌接種用培地の組成 39.6g (1L) 分中

酵母エキス	5.5 g	硫酸マンガン	5.0 mg
酢酸ナトリウム	10.0 g	リン酸二水素カリウム	0.25 mg
ペプトン	12.5 g	硫酸第一鉄	5.0 mg
硫酸マグネシウム	0.1 g	リン酸一水素カリウム	0.25 mg
ブドウ糖	11.0 g		

表 4. パントテン酸定量用 2 倍濃度基礎培地の組成 (1L 分中)

カザミノ酸	14 g	ニコチン酸	1 mg
L-システイン	400 mg	塩酸ピリドキシン	800 μ g
DL-トリプトファン	200 mg	リン酸二水素カリウム	1 g
硫酸アデニン	20 mg	リン酸水素二カリウム	1 g
塩酸グアニン	20 mg	硫酸マグネシウム	400 mg
ウラシル	10 mg	硫化第一鉄	20 mg
塩酸チアミン	200 μ g	硫酸マンガン	20 mg
リボフラビン	400 μ g	酢酸ナトリウム (無水)	20 g
パラアミノ安息香酸	200 μ g	ブドウ糖	40 g
ビオチン	0.8 μ g		Final pH7.1 \pm 0.1

表 5. パントテン酸定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	終パントテン酸濃度 (nmol/ tube)	1nmol / ml パントテン酸溶液 (μ l)	H ₂ O (μ l)	0.5M リン酸カリウム緩衝液 pH7.0 (μ l)	パントテン酸定量用 2 倍濃度基礎培地 (ml)	Total (ml)
0	0.000	0	800	200	1	2
1	0.025	25	775	200	1	2
2	0.050	50	750	200	1	2
3	0.075	75	725	200	1	2
4	0.100	100	700	200	1	2
5	0.125	125	675	200	1	2
6	0.150	150	650	200	1	2
7	0.200	200	600	200	1	2
試料	x	a	800- a	200	1	2

表 6. 葉酸定量用 2 倍濃度基礎培地の組成 94.0 g (1 L) 分中

胨消化物カゼイン	10.0 g	キサンチン	20.0 mg
デキストロース	40.0 g	塩化ナトリウム	20.0 mg
酢酸ナトリウム	40.0 g	硫化鉄	20.0 mg
リン酸水素二カリウム	1.0 g	硫化マンガン	15.0 mg
リン酸水素カリウム	1.0 g	硫化アデニン	10.0 mg
L-アスパラギン	0.6 g	グアニン塩酸塩	10.0 mg
L-システイン塩酸塩	0.5 g	ウラシル	10.0 mg
マグネシウム硫酸塩	0.2 g	グルタチオン塩酸塩	5.0 mg
DL-トリプトファン	0.2 g	ピリドキシン塩酸塩	4.0 mg
ポリソルベート 80	0.1 g	パラアミノベンゾイル酸	2.0 mg
リボフラビン	1.0 mg	パントテン酸カルシウム	800 µg
ニコチン酸	800 µg	チアミン塩酸塩	400 µg
ビオチン	20 µg		
Final pH 6.7 ± 0.1			

表 7. 葉酸定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	終プテロイルモノグルタミン酸濃度 (ng / tube)	1ng / ml プテロイルモノグルタミン酸 (µl)	H ₂ O (µl)	0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (µl)	葉酸定量用 2 倍濃度基礎培地 (ml)	Total (ml)
0	0.00	0	800	200	1	2
1	0.025	25	775	200	1	2
2	0.05	50	750	200	1	2
3	0.10	100	700	200	1	2
4	0.15	150	650	200	1	2
5	0.20	200	600	200	1	2
6	0.25	250	550	200	1	2
7	0.30	300	500	200	1	2
8	0.35	350	450	200	1	2
試料	<i>x</i>	<i>a</i>	800- <i>a</i>	200	1	2

表 8. 飼料中のパントテン酸量が臓器重量におよぼす影響 (実験 1)

	試験群			対照群
	0% PaA 群	0.00037% PaA 群	0.00074% PaA 群	0.00147% PaA 群
脳 (g)	1.14 ± 0.041	1.14 ± 0.020	1.18 ± 0.010	1.05 ± 0.124
肺 (g)	0.89 ± 0.020 ^a	1.29 ± 0.074 ^b	1.28 ± 0.029 ^b	1.24 ± 0.045 ^b
心臓 (g)	0.55 ± 0.027 ^a	0.80 ± 0.039 ^b	0.79 ± 0.084 ^{a,b}	0.83 ± 0.063 ^b
肝臓 (g)	7.5 ± 0.38 ^a	10.6 ± 0.13 ^b	11.3 ± 0.31 ^b	10.8 ± 0.39 ^b
脾臓 (g)	0.37 ± 0.030 ^a	0.62 ± 0.030 ^b	0.71 ± 0.030 ^b	0.68 ± 0.043 ^b
腎臓 (g)	1.38 ± 0.077 ^a	1.79 ± 0.025 ^b	1.91 ± 0.053 ^b	1.85 ± 0.084 ^b
副腎 (g)	0.035 ± 0.0018 ^a	0.042 ± 0.0030 ^{a,b}	0.044 ± 0.0016 ^b	0.044 ± 0.0009 ^b
精巣 (g)	1.92 ± 0.081 ^a	2.19 ± 0.035 ^{a,b}	2.22 ± 0.053 ^{a,b}	2.30 ± 0.098 ^b

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 4) として示した。異なる添え字は $p < 0.05$ の有意差が認められたことを示す。

表 9. 高脂肪食が臓器重量におよぼす影響 (実験 2)

	対照群	試験群
	5%脂肪食群	30%高脂肪食群
肝臓 (g)	10.7 ± 0.24	8.6 ± 0.18 *
副腎 (g)	0.042 ± 0.0014	0.038 ± 0.0017

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 5) として示した。* は $p < 0.05$ で有意差が認められたことを示す。

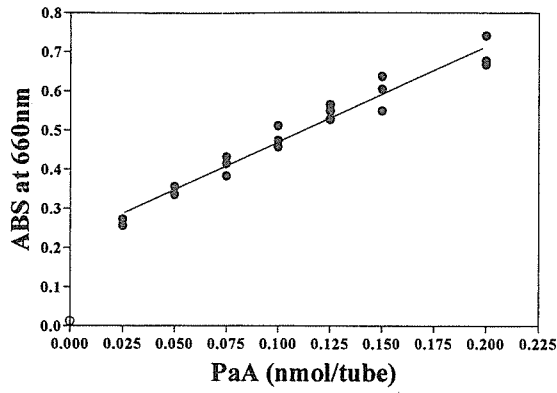


図1. パントテン酸濃度に対する *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) のレスポンスの一例

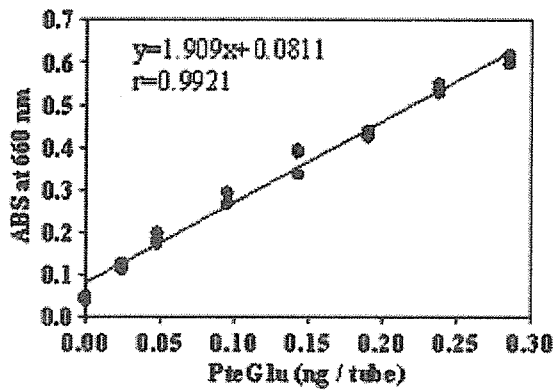


図2. プテロイルモノグルタミン酸濃度に対する *Lactobacillus casei* (ATCC 27773) のレスポンスの一例

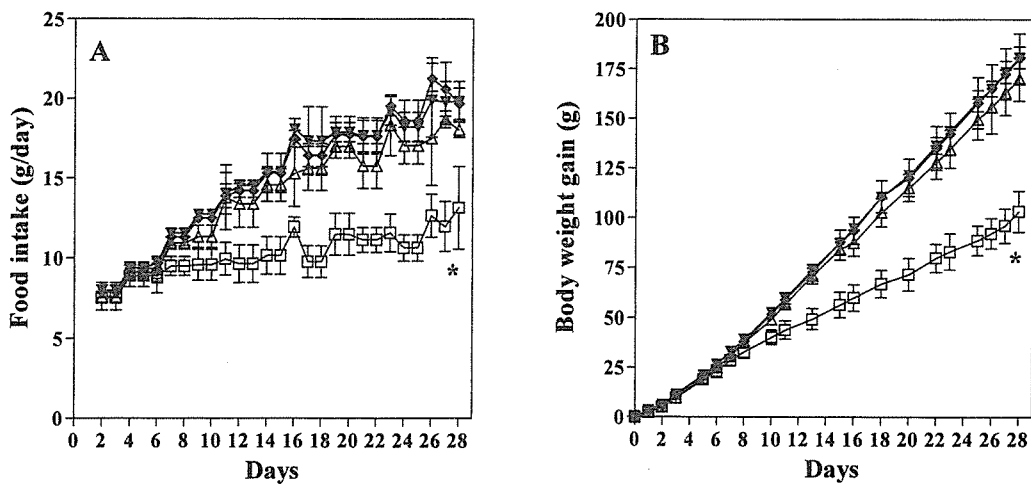


図3. 飼料中のパントテン酸量が飼料摂取量 (A) および体重増加量 (B) におよぼす影響 (実験1). □, 0%群; △, 0.00037%群; ▼, 0.00074%群; ◆, 0.00147%群. 値は平均値 ± 標準誤差 (n=4) として示した. 異なる添え字は $p < 0.05$ の有意差が認められたことを示す.

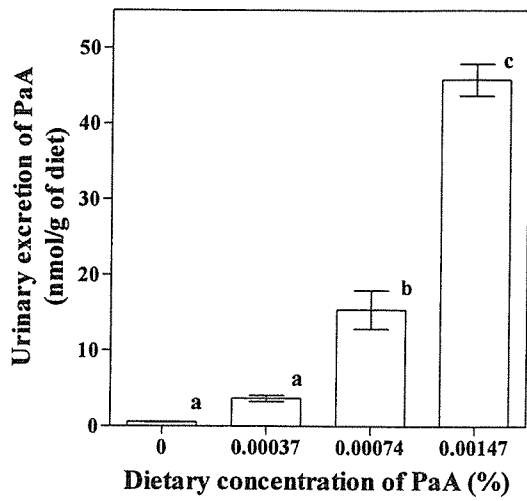


図 4. 飼料中のパントテン酸量が尿中のパントテン酸排泄量におよぼす影響 (実験 1). 値は平均値 ± 標準誤差 (n=4) として示した. 異なる添え字は $p < 0.05$ の有意差が認められたことを示す.

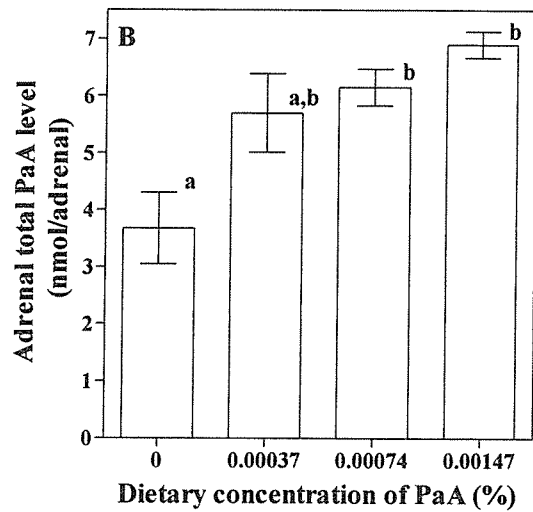
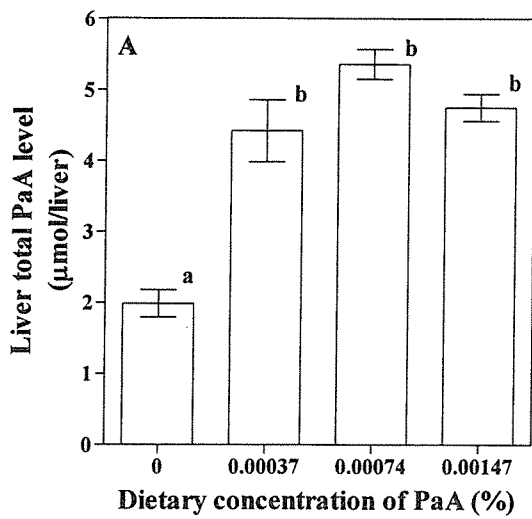


図 5. 飼料中のパントテン酸量が肝臓 (A) および副腎 (B) のパントテン酸量におよぼす影響 (実験 1). 値は平均値 ± 標準誤差 (n=4) として示した. * は $p < 0.05$ の有意差が認められたことを示す.

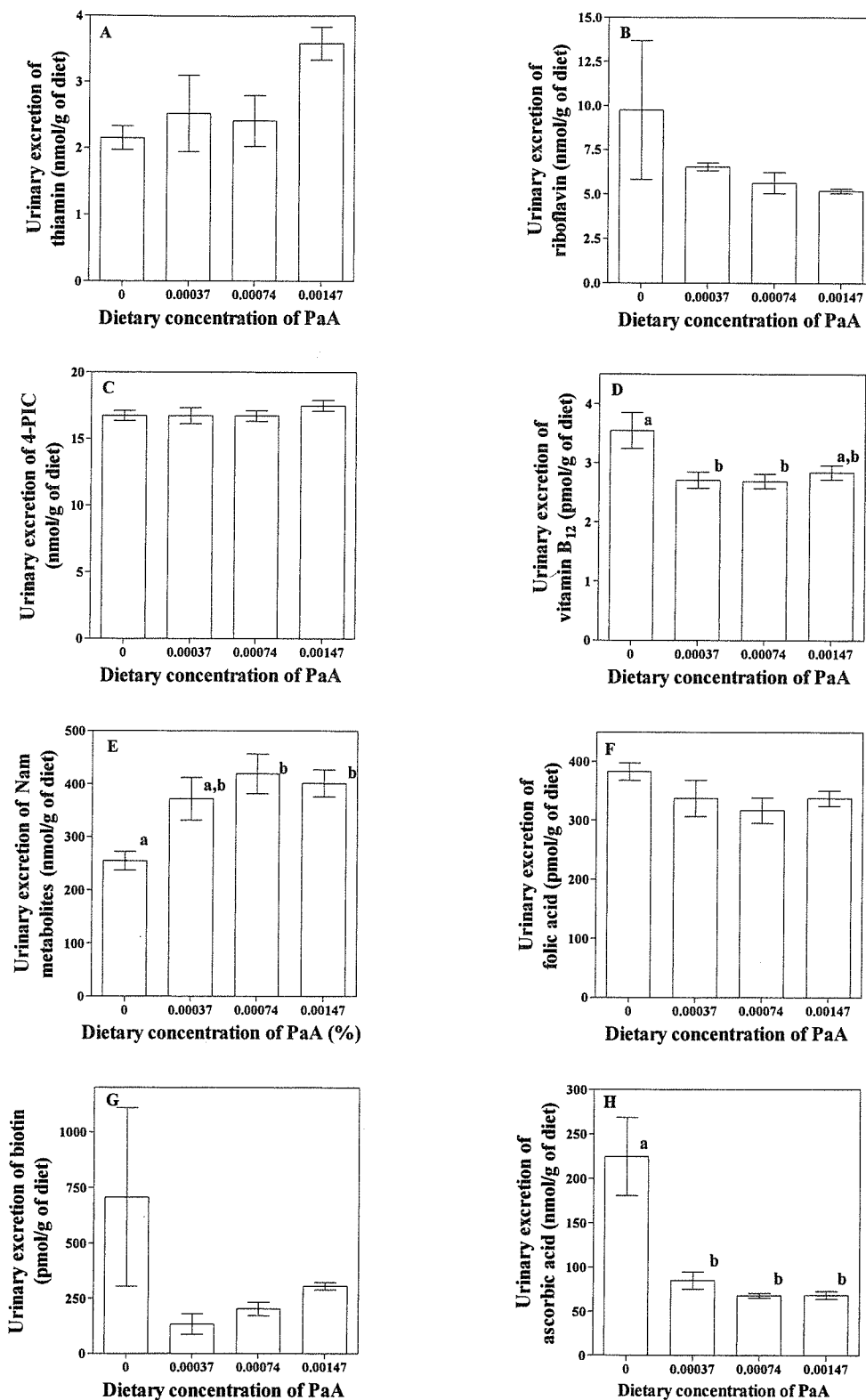


図 6. 飼料中のパントテン酸量がチアミン (A), リボフラビン (B), 4-ピリドキシン酸 (C), ビタミン B₁₂ (D), ニコチンアミド総代謝産物 (E), 葉酸 (F), ビオチン (G), アスコルビン酸 (H) の各尿中排泄量におよぼす影響 (実験 1). 値は平均値 ± 標準誤差 (n = 4) として示した. 異なる添え字は $p < 0.05$ の有意差が認められたことを示す.

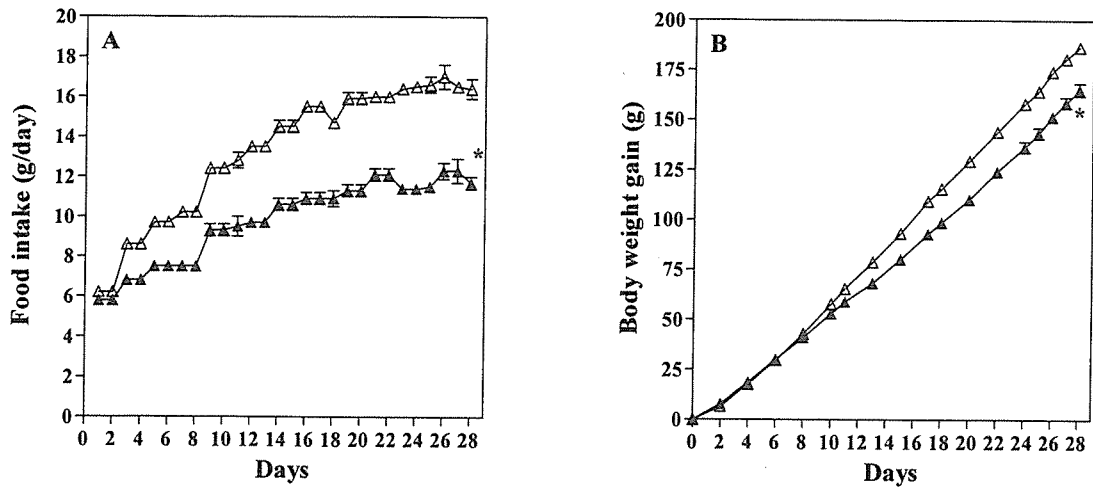


図 7. 高脂肪食が飼料摂取量 (A) および体重増加量 (B) におよぼす影響 (実験 2). \triangle , 5% 脂肪食群; \blacktriangle , 30% 脂肪食群. 値は平均値 \pm 標準誤差 ($n = 5$) として示した. * は $p < 0.05$ で有意差が認められたことを示す.

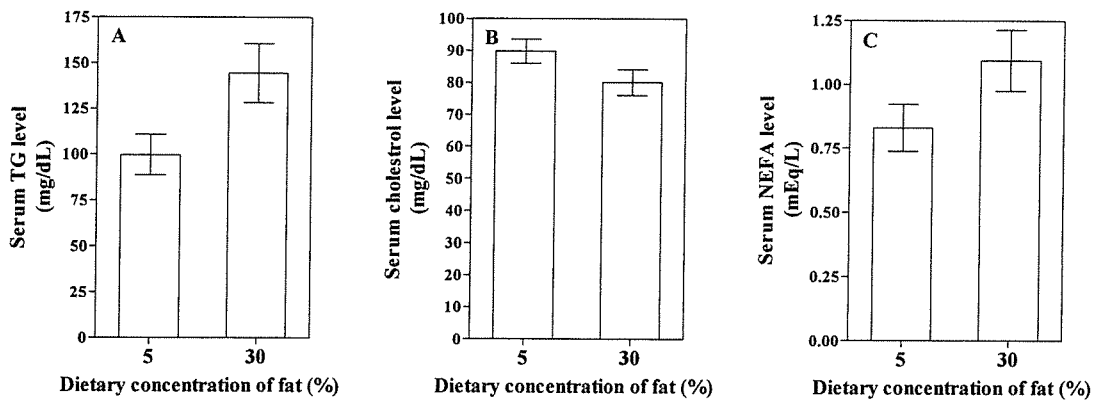


図 8. 高脂肪食が血清中トリグリセライド量 (A), 総コレステロール量 (B), 遊離脂肪酸量 (C) におよぼす影響 (実験 2). 値は平均値 \pm 標準誤差 ($n = 5$) として示した.

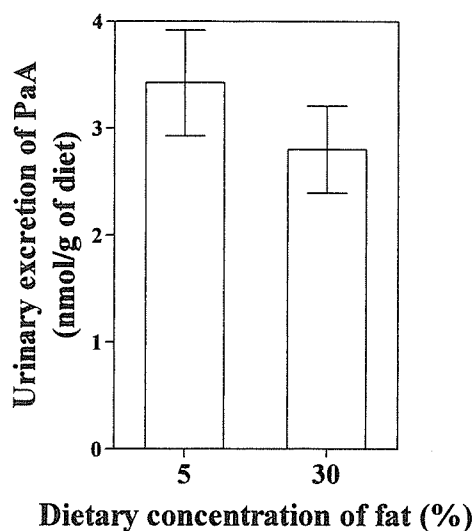


図 9. 高脂肪食が尿中のパントテン酸排泄量におよぼす影響 (実験 2). 値は平均値 \pm 標準誤差 (n=5) として示した.

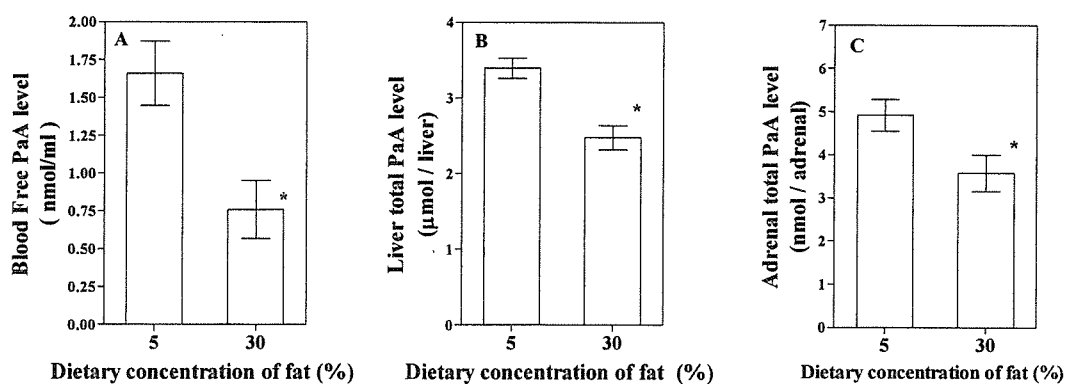


図 10. 高脂肪食が血液 (A) 肝臓 (B) および副腎 (C) のパントテン酸量におよぼす影響 (実験 2). 値は平均値 \pm 標準誤差 (n=5) として示した. * は $p < 0.05$ で有意差が認められたことを示す.

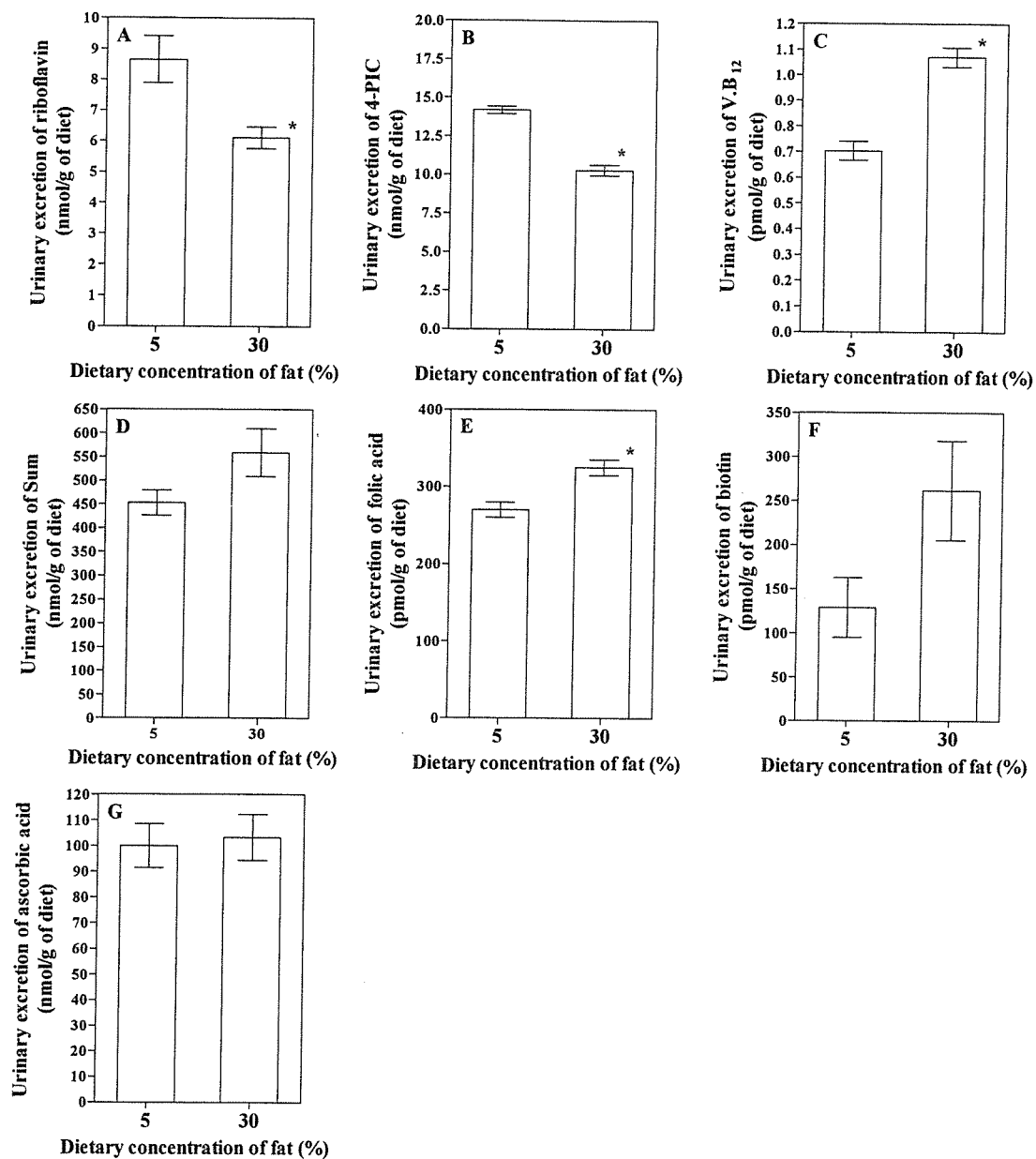


図 11. 高脂肪食がリボフラビン (A), 4-ピリドキシン酸 (B), ビタミン B₁₂ (C), ニコチンアミド総代謝産物 (D), 葉酸 (E), ビオチン (F), アスコルビン酸 (G) の各尿中排泄量におよぼす影響 (実験 2). 値は平均値 ± 標準誤差 (n=5) として示した. * は $p < 0.05$ で有意差が認められたことを示す.