

次頁に続く

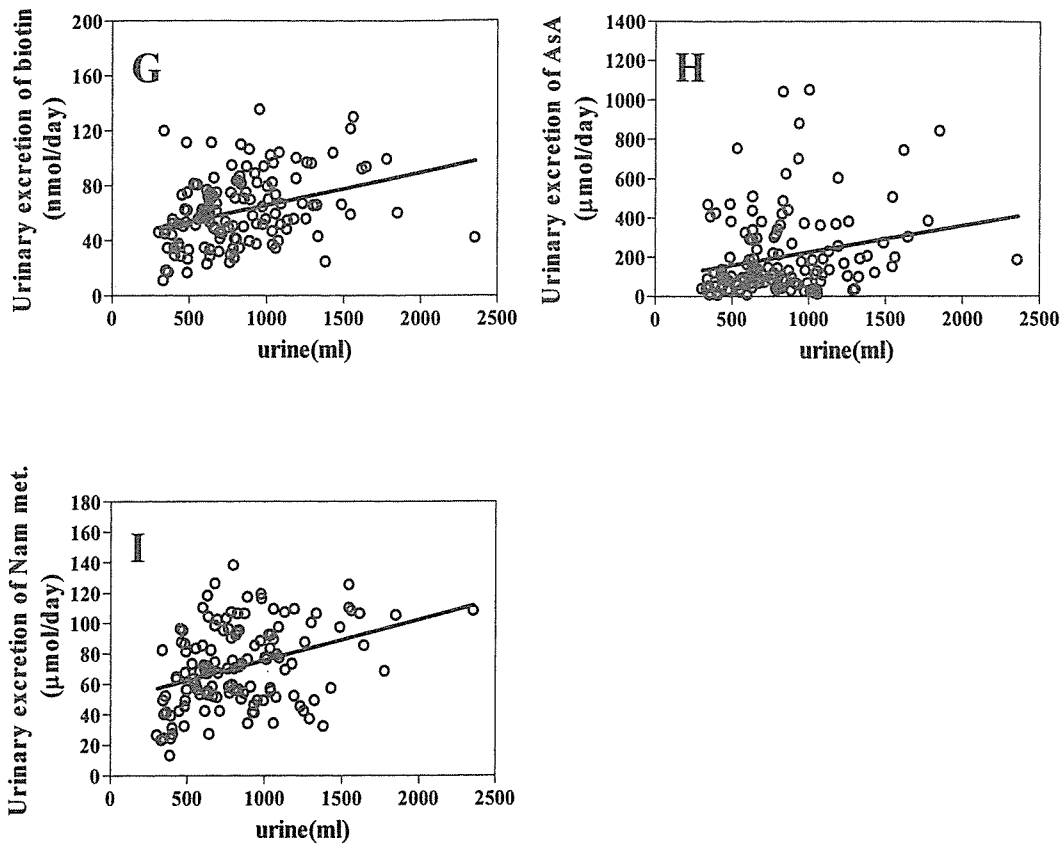
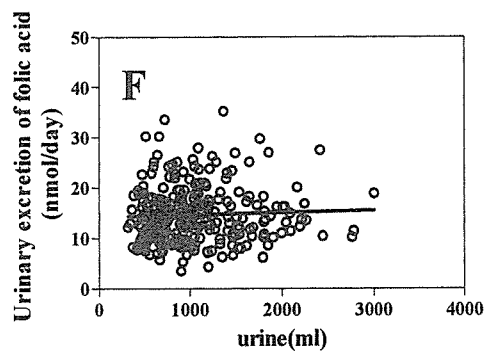
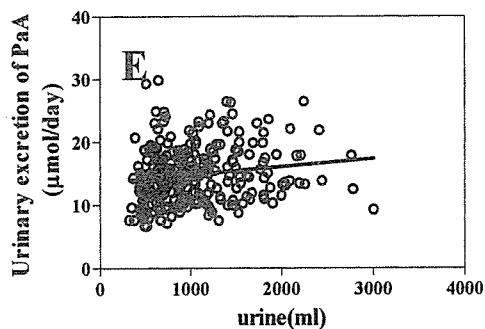
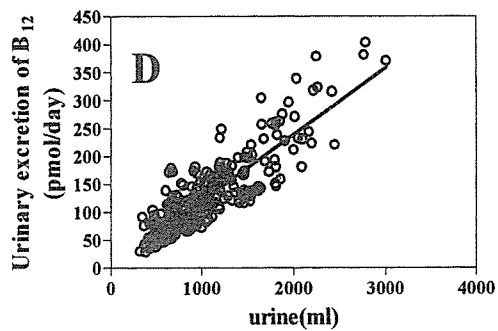
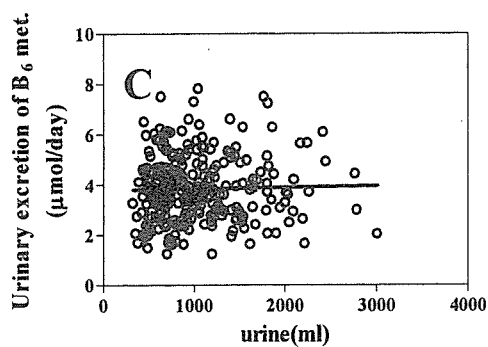
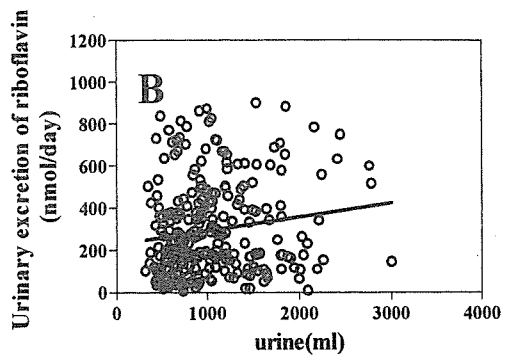
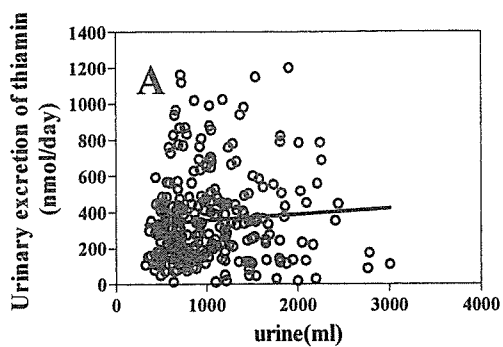


図 12. 施設-3 の女子学生の水溶性ビタミン尿中排泄量と尿量との関係

- A : ビタミン B<sub>1</sub> 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.09685$ ,  $p = 0.2693$ )
- B : ビタミン B<sub>2</sub> 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.3641$ ,  $p < 0.0001$ )
- C : ビタミン B<sub>6</sub> 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.3086$ ,  $p = 0.0003$ )
- D : ビタミン B<sub>12</sub> 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.6546$ ,  $p < 0.0001$ )
- E : パントテン酸尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.2035$ ,  $p = 0.0193$ )
- F : 葉酸尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.2433$ ,  $p = 0.0049$ )
- G : ビオチン尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.3345$ ,  $p < 0.0001$ )
- H : ビタミン C 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.2280$ ,  $p = 0.0085$ )
- I : ナイアシン異化代謝産物尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.3608$ ,  $p < 0.0001$ )



次頁に続く

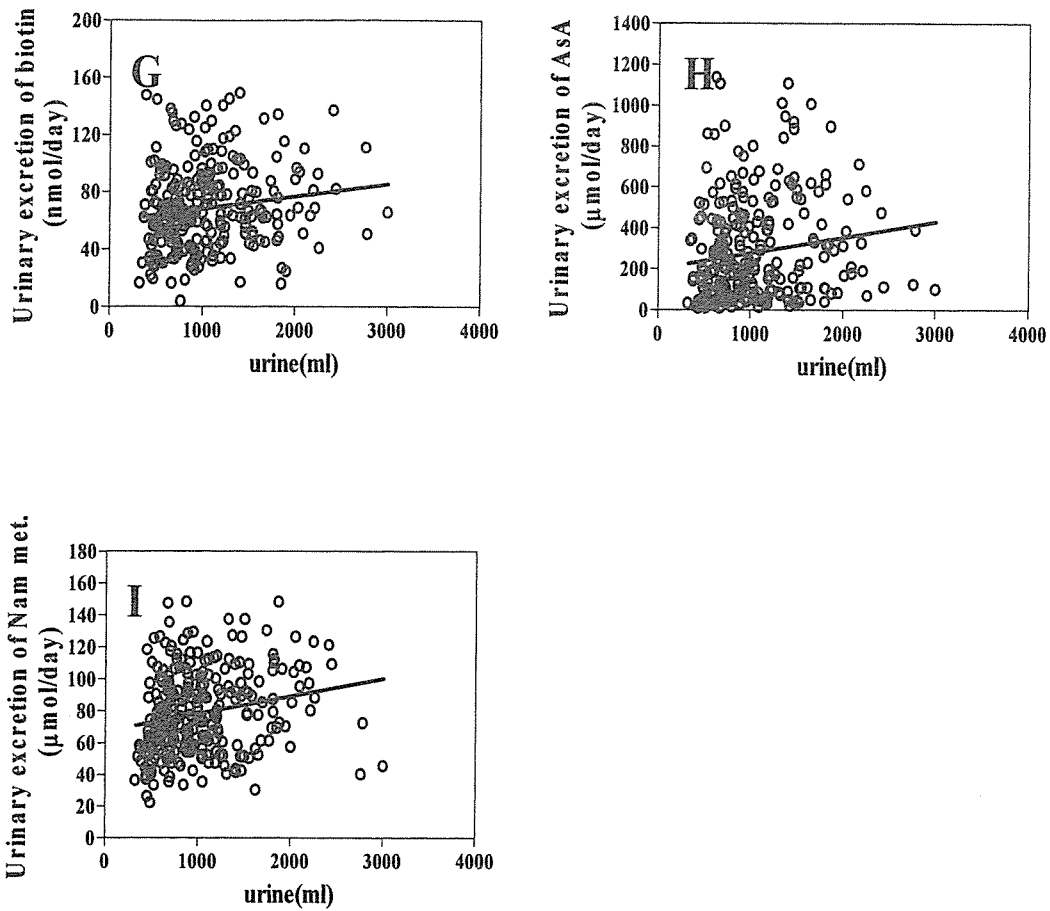


図 13. 施設-4 の女子学生の水溶性ビタミン尿中排泄量と尿量との関係

- A : ビタミン B<sub>1</sub> 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.06706$ ,  $p = 0.2776$ )
- B : ビタミン B<sub>2</sub> 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.1501$ ,  $p = 0.0147$ )
- C : ビタミン B<sub>6</sub> 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.02292$ ,  $p = 0.7108$ )
- D : ビタミン B<sub>12</sub> 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.8687$ ,  $p < 0.0001$ )
- E : パントテン酸尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.1483$ ,  $p = 0.0159$ )
- F : 葉酸尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.03779$ ,  $p = 0.5409$ )
- G : ビオチン尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.1457$ ,  $p = 0.0178$ )
- H : ビタミン C 尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.1537$ ,  $p = 0.0124$ )
- I : ナイアシン異化代謝産物尿中排泄量と尿量との関係 ( $r = 0.2077$ ,  $p = 0.0007$ )

## II. 主任研究者の報告書

### 7. 日本人の離乳開始前の哺乳量に関する調査

主任研究者	柴田 克己	滋賀県立大学	教授
研究協力者	廣瀬 潤子	滋賀県立大学	助手
研究協力者	成田 宏史	京都女子大学	教授
研究協力者	長尾 早枝子	長尾助産院	院長
研究協力者	水島 香苗	あわの産婦人科医院	婦長

#### 研究要旨

わが国における離乳開始前の乳児の哺乳量を明らかにするために、出生 4 日目、5 日目および 5 か月齢までの各満月齢日の 1 日哺乳量を測定した。1~5 か月齢までの平均哺乳量は、 $801.4 \pm 181.8$  ml (n = 127) であった。1 日哺乳量、1 日哺乳回数については、どの月齢についても個人差が 2 倍以上見られ、哺乳量と月齢、哺乳回数と月齢との間に相関関係はみられなかった。授乳時間帯別哺乳量では、0~6 時にかけてやや授乳の回数が少ない傾向はみられたが、1 回ごとの哺乳量は授乳時間帯との差はみとめられなかった。したがって、日本人の 0~5 か月の乳児の哺乳量として、800 ml を提言する。

## A. 目的

乳児期の母乳の摂取量は、乳児の栄養状態を判定するのに重要であるとともに、離乳期といった栄養素摂取量の測定の難しいその他の年齢層の食事摂取基準策定のために利用されるため、精度の高いデータが必要となる。しかしながら、離乳前乳児の哺乳量についてわが国での報告は少ない状況である<sup>1)</sup>。そこで本研究では、離乳開始前乳児の哺乳量について調査したので報告する。

## B. 実験方法

### 1. 調査対象

滋賀県立大学倫理審査委員会の承認を得た上で、本研究の主旨について説明し、参加同意の得られた完全母乳哺育中の母親、のべ157名を調査対象とした。対象者はすべて単胎児出産で、在胎期間37週以上、妊娠期間および出産経過は正常であった。母親の第一回測定開始日の年齢は $30.9 \pm 3.14$ 歳であった。対象者の在住地域は、関西在住者24名、北陸在住者19名であった。

### 2. 調査方法

調査は、平成17年6月から平成19年2月にかけて、出生4日目、15日目および満月齢5ヶ月までとし、母子の基礎情報（健康状態など）、乳児の24時間の哺乳量（1日哺乳量）について、出生4日目は産院での測定、それ以降は郵送による紙面調査を行った。

哺乳量調査は、出生4日目と15日目および、生後1～5か月については各満月齢日から3日前後の間に重量計算法で測定した。

また、得られた測定値は「日本人の食事摂取基準（2005年版）」<sup>2)</sup>との比較のため、五訂日本食品標準成分表<sup>3)</sup>の母乳の比重を用いて容量に換算した。

哺乳量は、指定された期間内の連続する24時間すべての授乳について授乳前後の乳児の体重を測定し、その差の合算より算出した。体重測定には、全対象者にタニタベビースケールBLB-2（最小表示値0～6kgは2g、6～12kgは5g、自動補正機能つき）を無償貸与し、測定値の均一化をはかった。

### 3. 統計処理

統計処理はMicrosoft Excel（マイクロソフト社、ワシントン）およびGraphPad Prism 4（GraphPad Software, Inc., San Diego CA, alifornia, USA）を用いて行った。

## C. 結果

### 1. 調査概要

調査対象児の内訳を表1に示した。出生4、15日目についてはそれぞれ16名と14名で対象者は全員北陸在住者であった。1か月齢以降は関西在住者24名、北陸在住者18名である。各月齢での児の男女数はほぼ同数である。

### 2. 乳児の身体状況

調査対象児の月齢別体重を表2に示した。厚生労働省による平成12年乳幼児身体発育調査の体重<sup>4)</sup>と比較した結果を図1-A（男児）と図1-B（女児）に示した。本調査対象児は、平成12年乳幼児身体発達調査の破線で示した3～97パーセンタイル値から大きく外れるものはなかった。また各月齢での平均体重は、男児の4、5か月以外は全国平

均を上回った。

### 3. 各月齢別 1 日哺乳量

各月齢の平均哺乳量の推移を図 2 に示した。また、出生 4 日 (0.13 か月)、15 日 (0.5 か月) および各月齢の 1 日哺乳量の度数分布を図 3 に示した。各月齢平均哺乳量 $\pm$ 標準偏差 (SD) は、0.13 か月  $420.2 \pm 151.0$  ml, 0.5 か月  $672.8 \pm 256.4$  ml, 1 か月齢  $748.1 \pm 169.6$  ml, 2 か月齢  $831.9 \pm 210.5$  ml, 3 か月齢  $827.9 \pm 166.3$  ml, 4 か月齢  $783.8 \pm 185.1$  ml, 5 か月齢  $796.9 \pm 171.3$  ml であった。0.13 か月の哺乳量は、他の月齢に比べ有意に低かった ( $p < 0.01$ )

### 4. 哺乳量と乳児の体重増加量

各月齢における 1 日哺乳量と前 1 か月間の体重増加量との関係を図 4 に示した。哺乳量測定 3 か月齢時と 5 か月齢時について、前 1 か月間の体重増加量と相関が認められた ( $p < 0.05$ )。

### 5. 哺乳量と哺乳回数との関係

月齢の進行と哺乳量・哺乳回数に変化するか否かを解析したが、図 5 のように月齢が進行しても哺乳量も哺乳回数も変動しなかった。また、1 日哺乳量と哺乳回数との関係を月齢ごとに分けて解析した結果を図 6 に示した。哺乳量と哺乳回数には、すべての月齢において有意な関係は認められなかった。

### 6. 哺乳時間と哺乳量

哺乳を行った時間とその哺乳時の哺乳量の関係を図 7 に示した。どの月齢においても、哺乳時間帯による哺乳量の規則だった傾向はみられなかった。

## D. 考察

日本人の食事摂取基準 2005 年版での 0~5 か月児哺乳量は 780 ml が採用されている (鈴木らの 1~5 か月齢哺乳量)。今回行った 1~5 か月齢での調査では  $801.4 \pm 181.8$  ml であった。月齢別平均哺乳量は 2 および 3 か月齢が多い傾向にあったが、どの月齢においても 2~3 倍の個人差が見られた。同様に哺乳回数もどの月齢も 2 倍以上と個人差が大きかった。

1 日哺乳量と前 1 か月の乳児の体重増加については、3 か月時および 5 か月時に相関が見られた。鈴木らの報告では月齢が大きくなるにつれ、哺乳量と体重増加量との正の相関が薄れるとの報告<sup>1)</sup>と矛盾する結果となった。この点についてはさらに検討が必要と考える。

哺乳時間帯と哺乳量についてみると、どの時間帯に摂取しても 1 回の哺乳量には大きな差は認められなかった。特に生後間もない 4 日目、15 日目および 1 か月齢は 0~6 時までの夜間にも摂取回数が多いため、乳児のエネルギーおよび栄養素摂取には夜間哺乳も重要であると考えられる。

以上の結果から、今回調査した 0~5 か月齢離乳前乳児の 1 日平均哺乳量は 801ml であった。したがって、日本人の 0~5 か月の乳児の哺乳量として 800 ml を提言する。

## E. 健康危機情報

特記する情報なし

## G. 研究発表

### 1. 発表論文

なし

## 2. 学会発表

廣瀬潤子, 長尾早枝子, 成田宏史, 福渡努, 柴田克己: 哺乳量および母乳中成分. 日本栄養改善学会近畿支部学術大会. 平成18年12月10日. 畿央大学.

## H. 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

## I. 引用文献

1. 鈴木久美子, 佐々木晶子, 新澤佳代, 戸谷誠之, 離乳前乳児の哺乳量に関する研究, 栄養学雑誌, 62, 369-372 (2004)
2. 日本人の食事摂取基準 (2005年版) (日本人の栄養所要量－食事摂取基準－策定検討会報告書) 平成16年10月 厚生労働省
3. 科学技術庁資源調査会 五訂日本食品標準成分表
4. 平成12年乳幼児身体発育調査報告書 平成13年 厚生労働省



表 1. 調査対象者(乳児)の内訳

月齢	0(4日)	0(15日)	1	2	3	4	5
調査数	16	14	21	29	28	24	25

表 2. 月齢別平均体重

	出生時	1か月	2か月	3か月	4か月	5か月
男児	3050	4517	5609	6445	6934	7529
女児	3143	4443	5666	6816	7135	7529

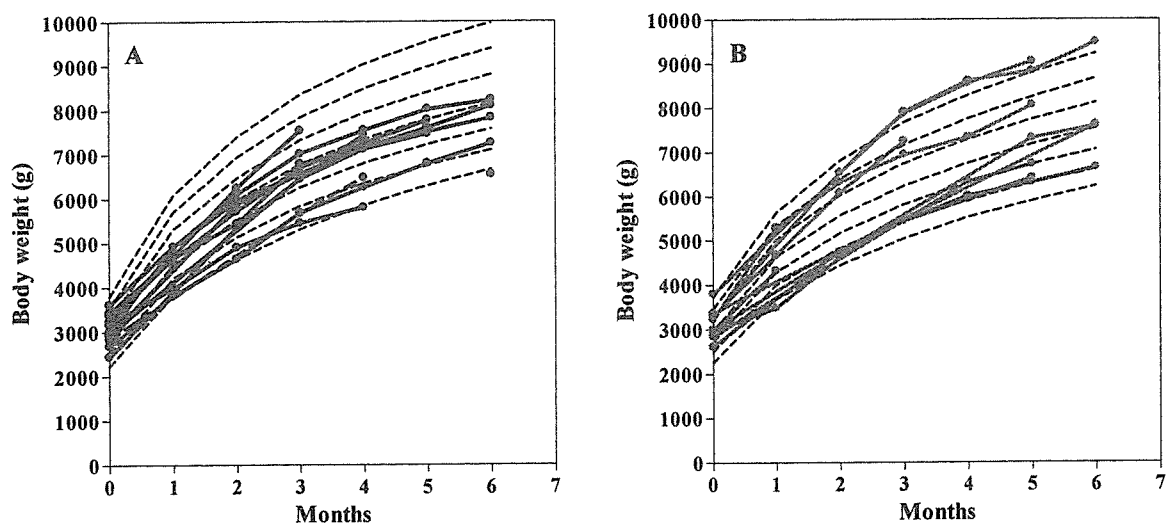


図 1. 乳児体重変化

A, 男児 ; B, 女児

破線で示しているのは平成 12 年度乳幼児発達調査結果である

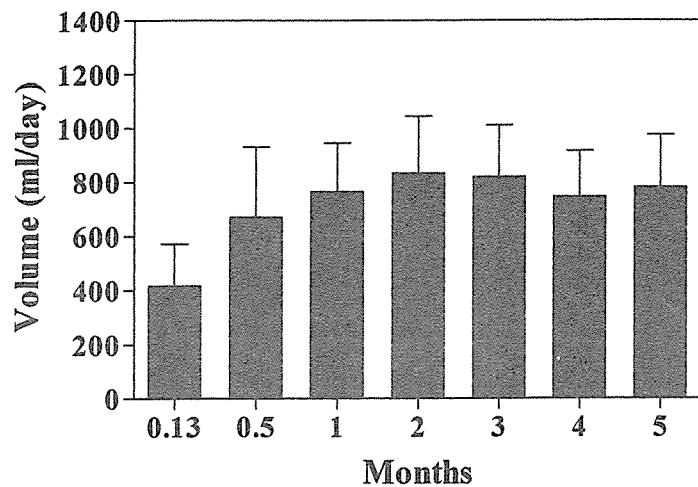


図 2. 月齢別平均 1 日哺乳量の推移

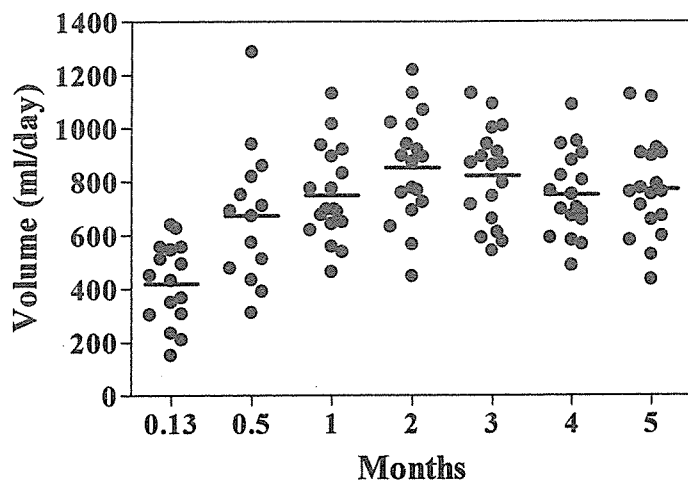


図 3. 各月齢別 1 日哺乳量の分布

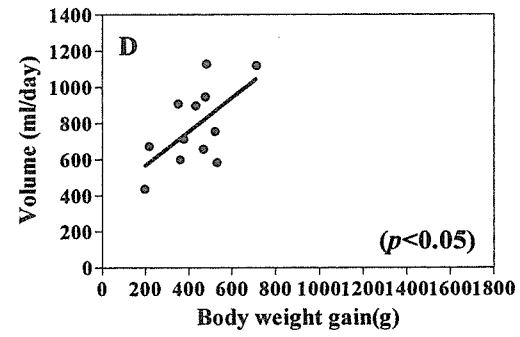
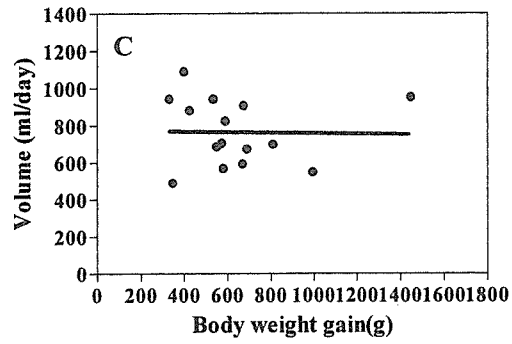
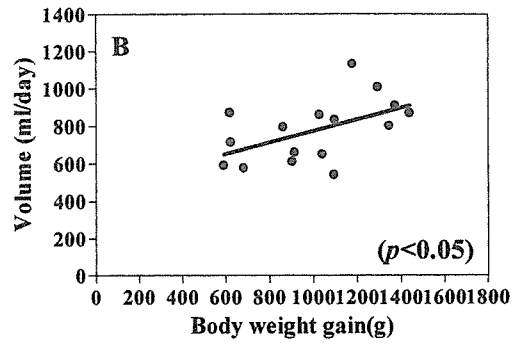
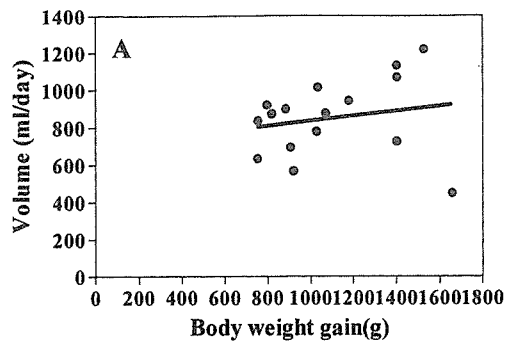


図4. 哺乳量と乳児の体重増加量との関係

- A. 1～2 か月間の体重増加量と2 か月時の1日哺乳量との関係
- B. 2～3 か月間の体重増加量と3 か月時の1日哺乳量との関係
- C. 3～4 か月間の体重増加量と4 か月時の1日哺乳量との関係
- D. 4～5 か月間の体重増加量と5 か月時の1日哺乳量との関係

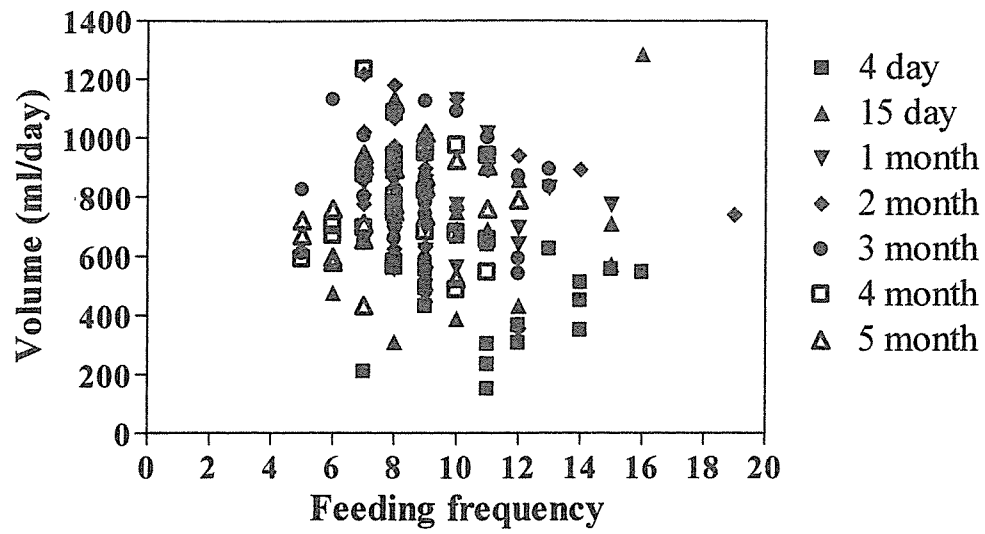


図 5. 月齢ごとの 1 日哺乳回数と 1 日哺乳量との関係

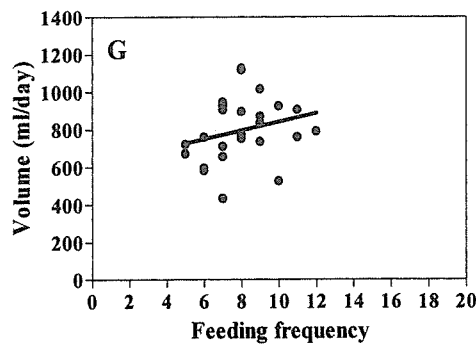
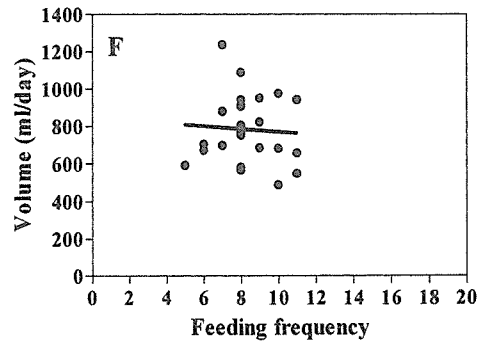
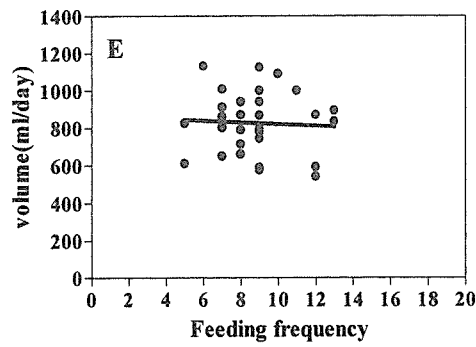
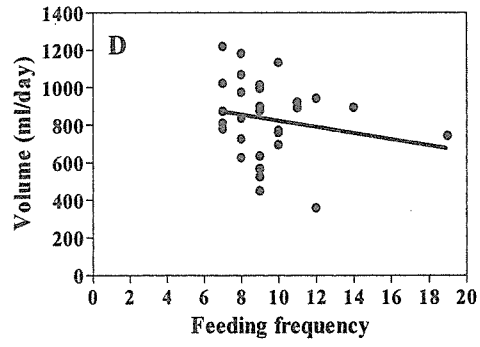
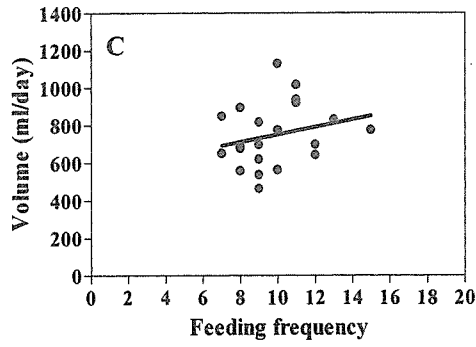
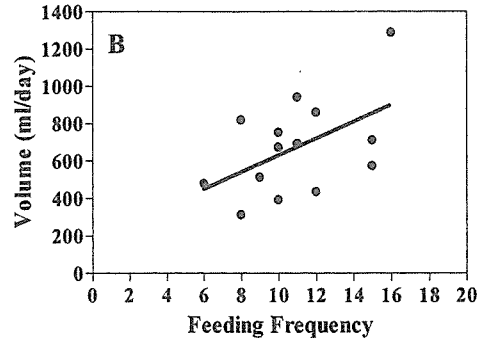
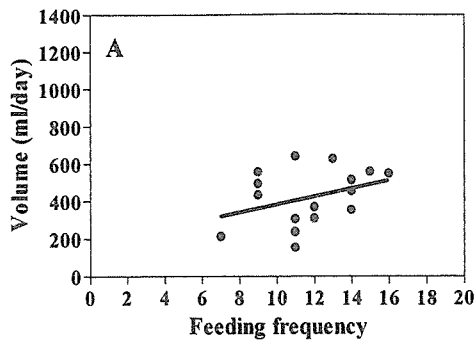


図6. 1日哺乳量と哺乳回数との関係

A. 生後4日目； B. 生後15日目； C. 1か月； D. 2か月； E. 3か月； F. 4か月； G. 5ヶ月

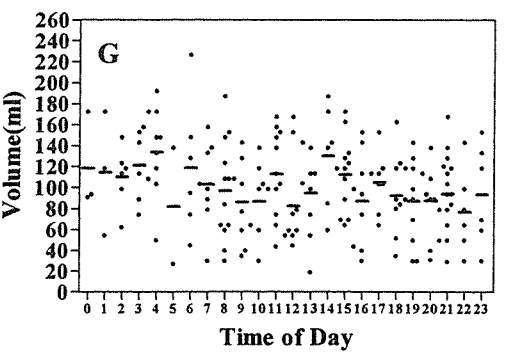
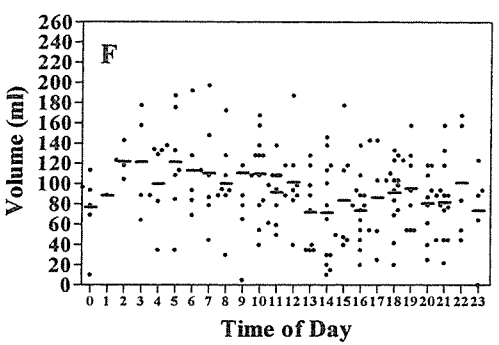
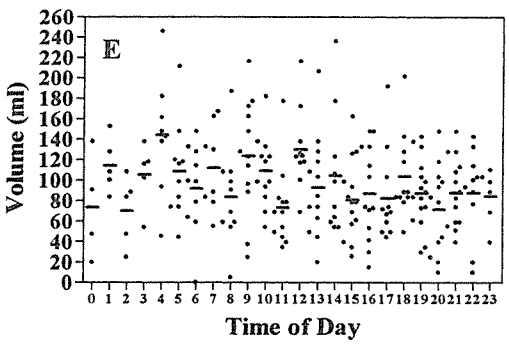
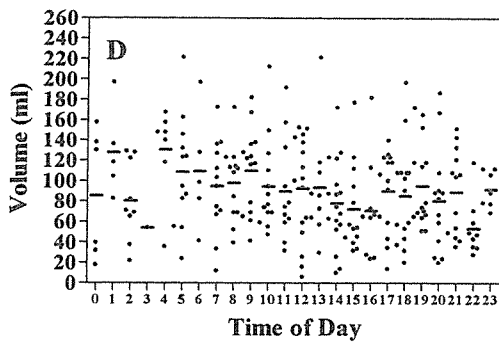
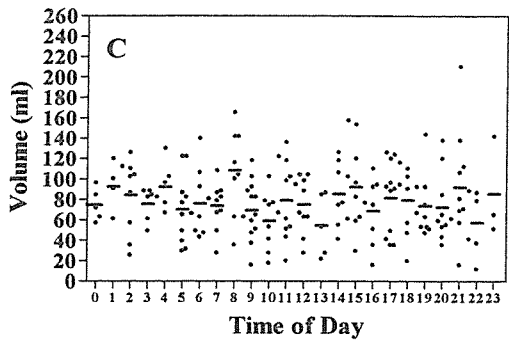
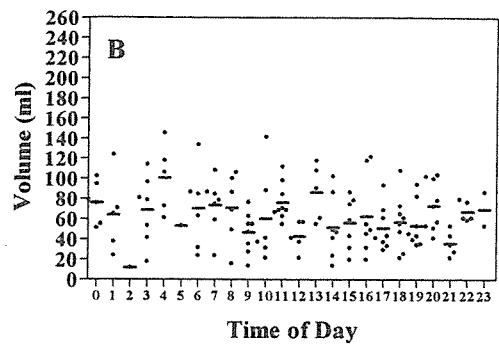
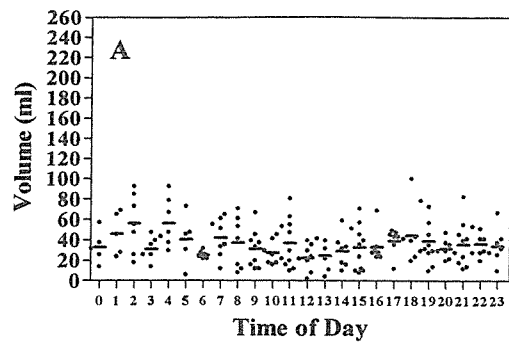


図 7. 哺乳時間と哺乳量との関係

A. 生後 4 日目 ; B. 生後 15 日目 ; C. 1 か月 ; D. 2 か月 ; E. 3 か月 ; F. 4 か月 ; G. 5 か月

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

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

## II. 主任研究者の報告書

### 8. 乳児におけるビタミン必要量の精度向上に関する研究

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

昨年度、我々はわが国における母乳中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中の水溶性ビタミンの含量を分析した。その結果、ビタミン B<sub>6</sub> と B<sub>12</sub> の母乳中含量に関して 2005 年版食事摂取基準の採用値と大幅な差異が認められた。そこで本年度は、その 2 つのビタミンの母乳中含量を測定し、新たにデータを追加した。また、ビオチンとナイアシンについてもその母乳中含量を測定した。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 0～5 か月の乳児を完全哺育している日本人授乳婦 58 名から得た。母乳の収集地域は長崎・千葉・広島・神奈川県 の 4 か所である。母乳中のビタミン B<sub>6</sub> 含量は  $0.086 \pm 0.039$  (mg/L) , ビタミン B<sub>12</sub> 含量は  $1.3 \pm 0.3$  (μg/L) , ビオチン  $4.9 \pm 2.0$  (μg/L) , ナイアシン  $1.4 \pm 0.5$  (mg/L) であった。ビタミン B<sub>6</sub>、ビオチン、ナイアシンについては昨年度の報告値とほぼ同じ値であった。ビタミン B<sub>12</sub> については、昨年度の報告値の約 2 倍の測定結果となった。

## A. 目的

日本人の食事摂取基準 (2005 年版)<sup>1)</sup> において、0~5 か月の乳児のビタミンの必要量は母乳 1L 中のビタミン含量×1 日平均哺乳量 (0.78L) という値から算定するという考え方が採用されており、我々もこの考え方を支持する。ところが、母乳中のビタミンの値は、試料数が少ない、データが古い、測定法の特異性が低いといった問題点がある。

そこで、この数値をより精度の高いものにするのが本研究の目的である。また、精度の高い値が得られれば、他のライフステージの食事摂取基準の外挿値の基準として用いることもできると考えられる。

我々は平成 15 年度ビタミンの測定方法の改良を試み、成果を上げてきた。さらに昨年度、わが国の授乳婦から採取した母乳中の水溶性ビタミン含量を分析した。その結果、ほとんどのビタミンは食事摂取基準での採用値と同じ値だったが、ビタミン B<sub>6</sub> と B<sub>12</sub> に関しては測定値が大きく異なった (表 1)。

H17 年度に収集した母乳は収集地域が近畿地方のみであり、また産後 0 か月齢のサンプルが少なかった。そこで本実験では、これらの点を考慮し昨年度の本研究室での測定結果と食事摂取基準での採用値が大きく異なった母乳中のビタミン B<sub>6</sub> と B<sub>12</sub> について新たにデータを追加し、また、ビオチンとナイアシン含量についても測定したので報告する。

## B. 実験方法

被験者は、妊娠ならびに出産が正常な経過で満期出産し、満月齢で 0~5 か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。

### 1. 母乳採取

時間は指定せず、助産院に診察に来た際、50 ml 遠心チューブ (住友ベークライト株式会社、東京、MS-56500) に採集して、直ちに家庭用冷蔵庫にて凍結した。この冷凍母乳を、凍結状態のまま、滋賀県立大学に送付してもらった。到着後は、分析に使用するまで -20°C にて保存した。

### 2. 分析

#### ビタミン B<sub>6</sub>

ビタミン B<sub>6</sub> は、AOAC International<sup>2)</sup> の報告による、ビタミン B<sub>6</sub> 要求株である酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 を用いた微生物定量法を基に改変した方法を用いた。その詳細を以下に記した。

#### (1) 平面保存用寒天培地・継代用斜面寒天培地の作成方法

- ① 表 2 に示した一般乳酸菌接種用培地 (日水製薬株式会社、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 mm × 105 mm, 丸底, 株式会社マルエム, 大阪) に



- 4 ml ずつ分注し、軽くふたをした。
- ④ オートクレーブ (121°C, 10 min) を用いて滅菌した後、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) ビタミン B<sub>6</sub> 定量用培地の作成方法 (当日調製)
- ① 表 3 に示したビタミン B<sub>6</sub> 定量用培地 (日水製薬株式会社, 東京) 13.0 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 5 分程度)。
- ② 直ちに溶解させた培地を氷水中にて冷却した後、水で全容を 100 ml にした。この液を定量用基礎培地とした。
- (3) 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 20~24 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 20~24 時間培養した。
- ③ 菌を保存する場合は、②で培養した菌体を一白金耳として平面保存用寒天培地に尖刺し、37°C で 20~24 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。
- (4) 接種用菌の作成方法
- ① (3)-②の操作で得た斜面寒天培地に培養してある菌体を白金耳で 2~3 度取り、5 ml の 0.9% 滅菌 NaCl に懸濁し、タッチミキサーでよく混ぜた。
- ② ①で得た懸濁液の 660 nm における透過率が 60~90% 範囲内にあるのを確認し、これを接種用菌体液とした。
- (5) 定量操作方法
- ① 表 4 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。検量線用のビタミン B<sub>6</sub> 標準溶液にはピリドキシン塩酸塩標準品 (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 分注した試験管にアルミキャップをし、オートクレーブ (121°C, 10 min) を用いて滅菌し、終了後直ちに氷冷した。その後、(4)-②にて調製した接種用菌体液を 30 μl ずつ分注した。
- ③ 37°C で 20 時間振とう培養した。
- 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、未知試料中のビタミン B<sub>6</sub> 濃度を算出した。検量線は、通常、図 1 のようになる。
- (6) 計算方法
- まず検量線より試験溶液あたりのビタミン B<sub>6</sub> 量 (ng / tube) を求めた。これを  $x$  (ng / tube) とし、母乳 1L 中のビタミン B<sub>6</sub> 量を、

$\{ x \text{ (ng / tube)} / \text{分注した試料の量 (0.3 ml / tube)} \} \times (\text{希釈倍率}) \times \{ 6.375 \text{ (ml)}^{*1} / 0.1 \text{ (ml)}^{*2} \} \times (1/ 1000000)^{*3} \times (1000)^{*4}$  より求めた。

\*1: 母乳中のビタミンB<sub>6</sub> をすべて遊離型にした後の量

\*2: ビタミンB<sub>6</sub> をすべて遊離型にした時に用いた母乳量

\*3: 単位を ng から mg にするため

\*4: 母乳 1 ml 中の値を母乳 1L の値に換算するため

#### (7) サンプルの使用方法

母乳中のビタミンB<sub>6</sub> をすべて遊離型にしたのち、測定用の試料にした。通常、母乳の場合は遊離型にした試料溶液 0.3 ml 使用すれば、検量線内に入る。

#### (8) 母乳サンプルの処理方法

操作の概略図を図 2 に示した。

母乳 0.1 ml に 0.055 M HCl 5 ml を加え、オートクレーブにて 121°C、3 時間処理を行った。この作業により、リン酸エステル型を含む母乳中の結合型誘導体を加水分解し、遊離型に変換した。その後、0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を 1 ml、1 M 水酸化ナトリウム 275 μl を加え中和し、濾過した後、測定用試料溶液とした。

#### ビタミンB<sub>12</sub>

ビタミンB<sub>12</sub>の分析は、Watanabeら<sup>3)</sup>の報告による、ビタミンB<sub>12</sub>要求株である乳酸菌 (*Lactobacillus delbrueckii* susp. *Lactis* [*L.leichimannii*] ATCC 7830) を用いた微生物定量法を基に改変した。定量方法の詳細はII-3.の報告参照

※母乳サンプルの処理方法

操作の概略を図 3 に示した。

母乳を遠心分離して、クリーム状の上層を取り除き、得られた中間層 50 μl に、0.05% KCN 10 μl、0.57 M 酢酸緩衝溶液 (pH 4.5) 250 μl、超純水 500 μl を加え、加熱抽出 (100 °C、30 分間) した。冷却後、10 % メタリン酸 15μl を加え、超純水にて全量を 1 ml とした後、遠心分離し、上清を測定用試料溶液とした。

※計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのビタミンB<sub>12</sub>量 (pg / tube) を求めた。これを x とし、母乳 1L 中のビタミンB<sub>12</sub>量 (μg) を、 $\{ x \text{ (pg / tube)} / \text{分注した試料量 (0.3 ml / tube)} \} \times (\text{希釈倍率}) \times \{ 1000 \text{ (μl)}^{*1} / 50 \text{ (μl)}^{*2} \} \times 1000^{*3} / 1000000^{*4} \times 0.83^{*5}$  より求めた。

\*1: 母乳中間層中ビタミンB<sub>12</sub>をすべて遊離型にした後の量

\*2: ビタミンB<sub>12</sub>をすべて遊離型にした時に用いた母乳量

\*3: 単位を ml から L にするため

\*4: 単位を pg から μg にするため

\*5: 母乳中間層中から全母乳中にするため

#### ビオチン

ビオチンの分析は、Wrightら<sup>4)</sup>や福井ら<sup>5)</sup>の報告による、ビオチン要求株である乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法を基に改変した。定量方法の詳細はII-2.の報告参照

※母乳サンプルの処理方法

操作の概略を図 4 に示した。

母乳 300 μl に、2.25 M 硫酸溶液 300 μl を加え、オートクレーブにて 121°C で 1 時間処

理を行った。冷却後、遠心分離し、上清をとり、水にて4倍に希釈したものを測定用試料溶液とした。

#### ※計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのニコチン量 (ng / tube) を求めた。これを  $x$  とし、母乳 1L 中のニコチン量 ( $\mu\text{g}$ ) を、 $x$  (ng / tube) / 分注した試料量 (50  $\mu\text{l}$  / tube) }  $\times$  (希釈倍率)  $\times 1000000$  <sup>\*1</sup>  $\times 510$  ( $\mu\text{l}$ ) <sup>\*2</sup> / 300 ( $\mu\text{l}$ ) <sup>\*3</sup> より求めた。

\*1: 単位を  $\mu\text{l}$  から L にするため

\*2: 処理によって得られた上清の全量

\*3: 処理に使用した全母乳の量

#### ナイアシン

ナイアシンは、Shibata ら<sup>6)</sup>による、HPLCを用いた定量法を基に改変した。定量方法の詳細はII-6.の報告参照。

#### ※母乳サンプルの処理方法

操作の概略を図5に示した。

母乳 1.5 ml を遠心分離し、上層のクリーム層を取らないように注意しながら中間層を 150  $\mu\text{l}$  取り、ねじ口チューブに入れた。1  $\mu\text{g}$  / ml のイソニコチンアミドを 1.35 ml 加え、混和後、121 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間オートクレーブした。これは、NAD などの補酵素型のニコチンアミドを遊離の形にするために行なう操作である。

オートクレーブ終了後、氷冷し、十分に冷却後、完全に除タンパクするために 70% 過塩素酸を 0.1 ml 加え、よく攪拌し、室温に 10 分間放置した。微量高速冷却遠心機で 20,000  $\times g$  で 5 分間、遠心分離を行った。

得られた上清から 1 ml を取り出し、アルカリ性ジエチルエーテルで選択抽出した後、

0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、その濾液を直接 HPLC に注入した。

#### ※測定条件

移動相: 1MKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.0) 10 ml

超純水 990 ml

アセトニトリル 41.7 ml

PRESSURE: 60 kgf / cm<sup>2</sup>

流速: 1.0 ml / min

ポンプ: SHIMADZU LC-10ADvp

カラム: CHEMCOSORB 7-ODS-L

( $\phi 4.6 \times 250$  mm)

カラム温度: 25 $^{\circ}\text{C}$

カラムオーブン: SHIMADZU CTO-10Avp

検出器: SHIMADZU SPD-10Avp

検出方法: 紫外分光光度計 (260 nm)

データプロセッサ: SHIMADZU C-R8A

オートインジェクター: SHIMADZU

SIL-10ADvp

#### ※計算方法

1) ニコチンアミド標準を流し、1 nmol 当たりの面積を計算した。

2) 回収率を計算した。

まず、イソニコチンアミド標準 (1  $\mu\text{g}$  / ml) の 20  $\mu\text{l}$  検出 AREA を  $a$  とし、100% 回収できた場合の AREA を、 $a \times (1350$  <sup>\*1</sup> / 20 <sup>\*2</sup>)  $\times$  (1.0 <sup>\*3</sup> / 1.5 <sup>\*4</sup>)  $\times$  (20 <sup>\*5</sup> / 500 <sup>\*6</sup>) より求めた。

\*1: 添加したイソニコチンアミド標準 (1  $\mu\text{g}$  / ml) の量

\*2: イソニコチンアミド標準 (1  $\mu\text{g}$  / ml) の HPLC 注入量

\*3: 使用した測定用試料の分量

\*4: 測定用試料の全量

\*5: 注入用試料の HPLC 注入量

\*6: HPLC 注入用試料の全量

試料のイソニコチンアミドの AREA を  $b$  とし、回収率 (%) を  $(b / 100\% \text{回収できた場合の AREA}) \times 100$  より求めた。

3) 母乳中のニコチンアミド量を計算した。

母乳 1L 中のニコチンアミド含量 (mg) を、  
(検出 AREA / 1 nmol 当たりの AREA)  $\times$   
(500  $\mu\text{l}$ <sup>\*1</sup> / 20  $\mu\text{l}$ <sup>\*2</sup>)  $\times$  (1 / 1 ml<sup>\*3</sup>)  $\times$  (100 /  
回収率 (%))  $\times$  (1.5<sup>\*4</sup> / 0.15<sup>\*5</sup>)  $\times$  122.12<sup>\*6</sup> /  
1000<sup>\*7</sup>  $\times$  0.83<sup>\*8</sup> より求めた。

\*1: HPLC 注入用試料の全量

\*2: 注入用試料の HPLC 注入量

\*3: 測定用試料の使用量

\*4: 測定用試料の全量

\*5: 処理に使用した母乳の中間層の分量

\*6: ニコチンアミドの分子量

\*7: 母乳 1 ml 中から母乳 1 L 中に換算

\*8: 母乳中間層中から全母乳中にするため

### 3. 統計学的解析

数値はすべて平均値  $\pm$  標準偏差 (SD) 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、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。

#### C. 結果

母乳に含まれるビタミン B<sub>6</sub>、B<sub>12</sub>、ビオチン、ナイアシンの分析結果と、昨年度の分析結果、食事摂取基準での採用値を表 5 に示した。

母乳のビタミン B<sub>6</sub> 含量の平均値  $\pm$  SD は  $0.086 \pm 0.039$  (mg/L) であった。母乳に含まれるビタミン B<sub>6</sub> の地域差を図 6 に示した。

ビタミン B<sub>6</sub> の母乳中含量に地域差は認められなかった。また、母乳に含まれるビタミン B<sub>6</sub> の産後月数による変動を図 7 に示した。ビタミン B<sub>6</sub> の母乳中含量は、産後 0 か月の母乳では他の月齢の約 2 分の 1 と低い値をとり、産後 1 か月以降は同じぐらいの値を推移した。

母乳のビタミン B<sub>12</sub> 含量の平均値  $\pm$  SD は  $1.3 \pm 0.3$  ( $\mu\text{g/L}$ ) であった。母乳に含まれるビタミン B<sub>12</sub> の地域差を図 8 に示した。ビタミン B<sub>12</sub> の母乳中含量に地域差は認められなかった。母乳に含まれるビタミン B<sub>12</sub> の産後月数による変動を図 9 に示した。ビタミン B<sub>12</sub> の母乳中含量に、産後の月数による変動はみられなかった。

母乳のビオチン含量の平均値  $\pm$  SD は  $4.9 \pm 2.0$  ( $\mu\text{g/L}$ ) であった。母乳に含まれるビオチンの地域差を図 10 に示した。ビオチンの母乳中含量に地域差は認められなかった。母乳に含まれるビオチンの産後月数による変動を図 11 に示した。ビオチンの母乳中含量は、産後の月数による変動はみられなかった。

母乳のナイアシン含量の平均値  $\pm$  SD は  $1.4 \pm 0.50$  (mg/L) であった。母乳に含まれるナイアシンの地域差を図 12 に示した。ナイアシンは、広島と神奈川の間で有意な差が認められたが、個人差が大きいため誤差範囲であると言える。母乳に含まれるナイアシンの産後月数による差を図 13 に示した。ナイアシンの母乳中含量に、産後の月数による変動はみられなかった。

#### D. 考察