

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, 菅原裕祐, 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バイオチン, 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B₆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, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-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 B₆, Folate, Vitamin B₁₂, 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 B₁₂. 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 B₁₂. *Am J Clin Nutr* **47**, 89-92
- 14) Casterline JE, Allen LH, Ruel MT (1997) Vitamin B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₆, Folate, Vitamin B₁₂, 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 α -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-

- lations 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, Pispä 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, Dougarn J (1977) Determination of vitamin B₁₂ and vitamin B₁₂-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 B₁₂ 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 B₁₂ の分析

¹高知女子大学生生活科学部健康栄養学科, ²京都女子大学短期大学部生活科学科
³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¹, 橘高(桂)博美², 足達 理子³, 渡辺 文雄¹

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

Assay of Vitamin B₁₂ in Edible Bamboo Shoots

Emi MIYAMOTO¹, Hiromi KITTA-KATSURA², Satoko ADACHI³, Fumio WATANABE¹

¹Department of Health Science, Kochi Women's University, Kochi 780-8515, Japan,

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

³Department of Food and Nutrition, Ube Frontier College, Ube 755-8550, Japan

To verify whether edible bamboo shoots contain vitamin B₁₂ or not, vitamin B₁₂ 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 B₁₂, but some compounds showing the vitamin B₁₂-like activity (known as the alkali-resistant factor).

Keywords: vitamin B₁₂, bamboo shoots, alkali-resistant factor, bioassay

(Received November 12, 2004)

緒 言

ビタミン B₁₂(B₁₂)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 B₁₂ 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」¹⁾の中にたけのこの栄養分の特徴として B₁₂ 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²⁾Lactobacillus leichimannii ATCC7830 を用いた微生物学的定量法でたけのこ各部位の B₁₂ 含量を測定し報告している。しかし、ど

ちらも詳細な B₁₂ 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³⁾ではたけのこの B₁₂ 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 B₁₂ 分析法を用いてたけのこの B₁₂ 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、

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

³⁾ 〒755-8550 宇部市文京町5-40

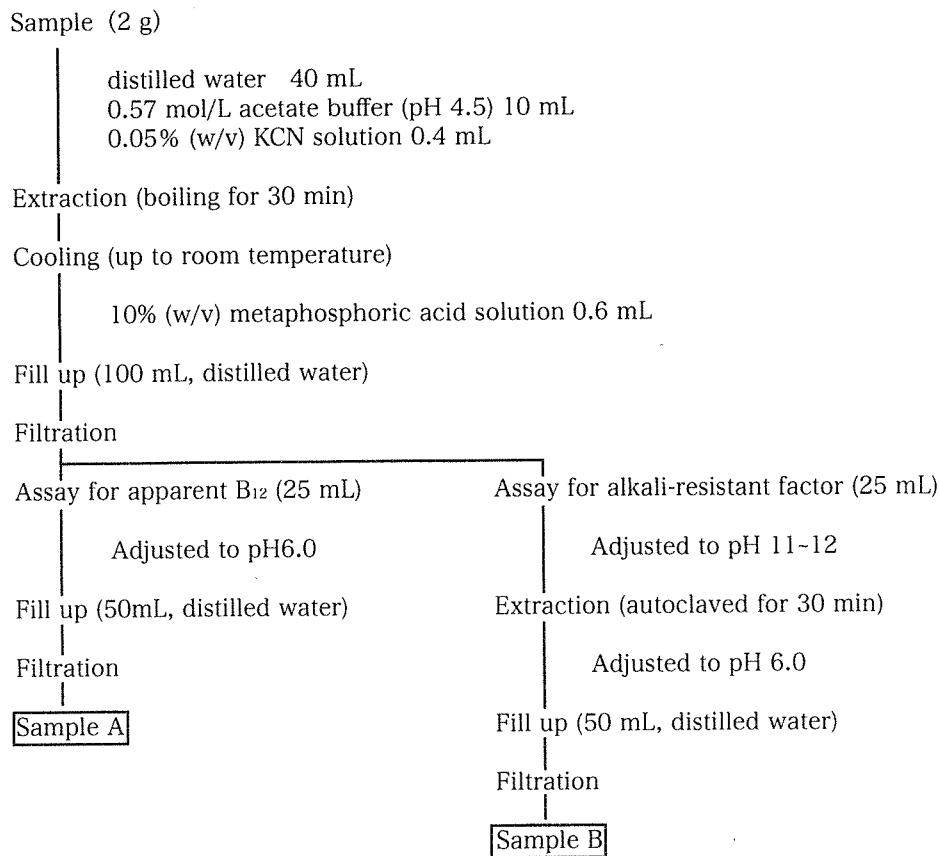


図 1. Summary of B₁₂ extraction and assay method.

分析に供するまで -20°C の冷凍庫で保存した。

2. B₁₂ の分析

たけのこに含まれる B₁₂ の定量は、五訂日本食品標準成分表で採用されている分析マニュアル⁴⁾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 B₁₂ 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 B₁₂ を抽出した。また、本定量菌は、B₁₂ 以外にヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチドにも B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 溶液 (1 ng/L) のそれぞれ 100 μL を HPLC [カラム; Wakosil-II 5C18RS, φ 4.6 × 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°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°C にて遠心エバポレーターで乾固

表 1. Amounts of apparent vitamin B₁₂ and alkali-resistant factor in bamboo shoots (raw). All values obtained represent mean ± SEM (n=7).

	Apparent B ₁₂ (Sample A)	Alkali-resistant factor (Sample B)
	(μg/100 g edible portion)	
Bamboo shoots, raw		
Upper portion	5.29±2.34	6.10±1.29
Lower portion	2.17±0.77	4.75±1.11

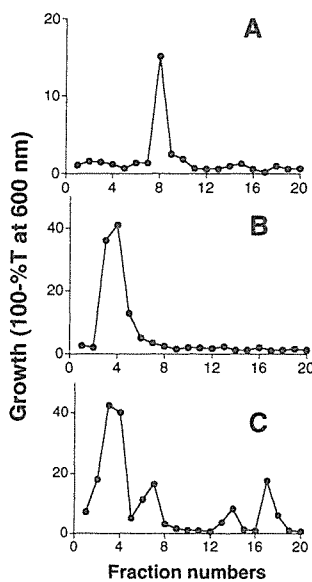


図2. HPLC patterns of B₁₂-activity of authentic B₁₂ [A], apparent B₁₂ fraction (sample A) [B], and alkali-resistant factor fraction (sample B) [C].

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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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、B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 画分) の B₁₂ 活性化化合物は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 B₁₂ 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 B₁₂ が含まれておらず、B₁₂ 以外の B₁₂ 活性化化合物 (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 B₁₂ 含量を測定した結果、見かけの B₁₂ 含量がかなり検出された。このことから、恐らく先行研究¹⁾²⁾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⁵⁾では、納豆、みそ類、魚介類、藻類および調味料類などでは B₁₂ 以外の B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ や土壌中の微生物が生産した B₁₂ を植物体が吸収・保持することが報告されており⁶⁾⁷⁾、植物性食品でも B₁₂ 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 B₁₂ 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、ふき、りょくとうもやし、モロヘイヤ、じゅんさいで微量の B₁₂ 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) B₁₂ 以外の B₁₂ 活性化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 B₁₂ が検出された植物性食品につい

表2. Corrected amounts of vitamin B₁₂ in some plant foods (raw). All represent mean values (n=3).

	Apparent B ₁₂	Corrected B ₁₂ (apparent B ₁₂ -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 B₁₂ 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 B₁₂ 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る.

(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, B₆, B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ (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 B₁₂, but not to inactive corrinoids. The vitamin B₁₂ found in Mefun was not derived from concomitant vitamin B₁₂-synthesizing bacteria, but had accumulated in the salmon kidney. Gel filtration experiments demonstrated that most of the vitamin B₁₂ found in Mefun was recovered in the free vitamin B₁₂ 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 B₁₂ (free form) source for elderly persons with food-bound vitamin B₁₂ malabsorption.

Keywords: Salted and fermented salmon kidney, HPLC, TLC, Vitamin B₁₂

INTRODUCTION

Many people with low serum vitamin B₁₂ (B₁₂) levels, but who do not have pernicious anemia, become malabsorptive for protein-bound B₁₂ (food-bound B₁₂ malabsorption).^[1] The food-bound B₁₂ malabsorption is found in persons with certain gastric dysfunctions, especially atrophic gastritis with low stomach acid secretion, which prevails in elderly people.^[2] Because the bioavailability of crystalline B₁₂ 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 B₁₂ or B₁₂-containing supplement.^[3]

The food containing the highest amount (327.6 µg/100 g) of B₁₂ among those described in the Japanese Standard Tables of Food Composition^[4] 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 B₁₂, it would be an excellent B₁₂ source for elderly persons with food-bound B₁₂ malabsorption.

Another salted and fermented fish product, fish sauce, has been reported to contain considerable amounts of B₁₂.^[5] which is an inactive or unidentified corrinoid compound.^[6] Certain bacteria can synthesize various corrinoid compounds, some of which are not active for humans, but are assayable in the B₁₂ determination systems.^[7,8] There is no information available on whether B₁₂ found in the salted and fermented fish product, Mefun, is true B₁₂ or inactive corrinoids for humans. Thus, a corrinoid compound is purified and characterized to clarify the bioavailability of B₁₂ found in Mefun.

EXPERIMENTAL

Materials

B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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.¹⁴¹ Since *L. delbrueckii* ATCC 7830 can utilize both deoxyribosides and deoxynucleotides (known as an alkali-resistant factor) as well as B₁₂, the amount of true B₁₂ was calculated by subtracting the values of the alkali-resistant factor from the values of total B₁₂.

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_4OH (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, $\varphi 4.6 \times 150$ 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 $10,000 \times g$ 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 \times 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_{12} fractions, which were estimated with blue dextran and authentic B_{12} by measuring absorbance at 600 and 551 nm, respectively, were pooled. B_{12} 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_4OH (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 μ L) of the purified compound and these cyanocobamides were analyzed with the reversed-phase HPLC column (Wakosil-II 5C18RS, ϕ 4.6 \times 150 mm; particle size, 5 μ 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^[9] 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 B₁₂ in a Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun." Substantial amounts (116.3 ~ 556.3 μ 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.^[4] To clarify bioavailability of B₁₂ 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 B₁₂ in a Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun". B₁₂ was assayed in triplicate in each Mefun sample ($n = 4$).

Mefun	Vitamin B ₁₂ concentration (μ 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

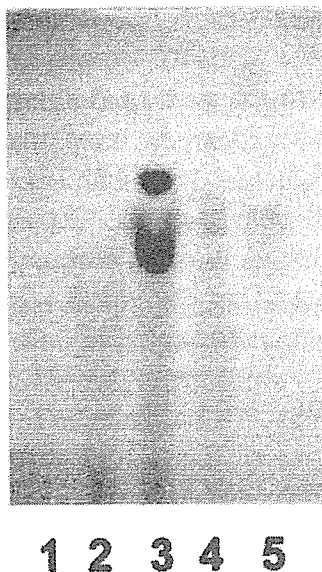


Figure 1. Silica gel 60 TLC patterns of corrinoid compound during Cosmosil 140C18-OPN column chromatography in the purification steps. The corrinoid compound (R_f value 0.6) was eluted with a stepwise gradient [0 (lane 1), 10 (lane 2), 20 (lane 3), 30 (lane 4), and 80% (v/v) (lane 5)] of ethanol. Data 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); λ_{\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

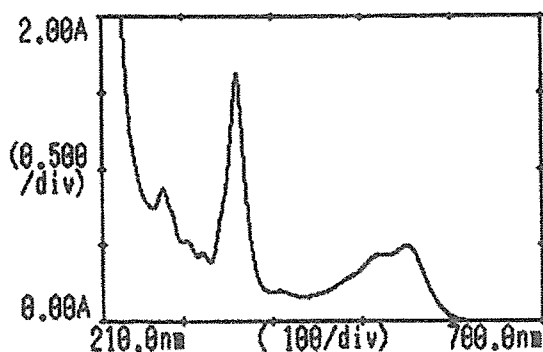


Figure 2. Ultraviolet-visible spectrum of the purified compound.

Table 2. R_f values and retention times of the purified compound, authentic B₁₂, 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 ₁₂	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 B₁₂.

Table 3 shows the bacterial counts in Mefun samples using two different salinity media. The bacterial counts varied (from 10² to 10⁴ 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 B₁₂, 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.^[10] 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 B₁₂ (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

considerably by the addition of salt, the B₁₂ contents of Mefun samples would be higher relative to those of the fresh salmon kidney. These results indicate that most of the B₁₂ found in Mefun is not derived from concomitant B₁₂-synthesizing bacteria, but has accumulated in the salmon kidney.

The Sephadex G-50 gel filtration of a homogenate of Mefun demonstrated that most (84.2%) of the B₁₂ was recovered in the free B₁₂ fractions; the remaining B₁₂ (15.8%) was associated with macromolecules.

Because approximately 30% of people older than 50 years are estimated to have atrophic gastritis with low stomach acid secretion and have decreased bioavailability of B₁₂ from food (food-bound B₁₂ malabsorption), the Institute of Medicine has recommended that most of the 2.4 µg of B₁₂ per day (RDA) should be obtained by consuming foods fortified with B₁₂ or B₁₂-containing supplement.¹³¹ The results presented here indicate that a Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun" would be an excellent free form B₁₂ source for elderly persons with food-bound B₁₂ malabsorption.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported in part by a grant for Comprehensive Research on Cardiovascular Diseases from Ministry of Health, Labor and Welfare (to F. W.).

REFERENCES

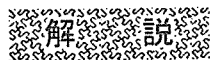
1. Carmel, R.; Sinow, R.M.; Karnaze, D.S. Atypical cobalamin deficiency. Subtle biochemical evidence of deficiency is commonly demonstrable in patients without megaloblastic anemia and is often associated with protein-bound cobalamin malabsorption. *J. Lab. Clin. Med.* **1987**, *109*, 454–463.
2. Carmel, R.; Sinow, R.M.; Siegel, M.E.; Samloff, I.M. Food cobalamin malabsorption occurs frequently in patients with unexpected low serum cobalamin levels. *Arch. Intern. Med.* **1988**, *148*, 1715–1719.
3. Institute of Medicine. Vitamin B₁₂. In *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*; Institute of Medicine, National Academy Press: Washington DC, 1998; 306–356.
4. Resources Council, Science and Technology Agency. In *Standard Tables of Food Composition in Japan*, 5th Ed.; Resource Council, Science and Technology Agency: Tokyo, 1984.
5. Areekul, S.; Boonyananta, C.; Matrakul, D.; Chantachum, Y. Determination of vitamin B₁₂ in fish sauce in Thailand. *J. Med. Assn. Thailand* **1972**, *55*, 243–248.
6. Watanabe, F.; Michihata, T.; Takenaka, S.; Kittaka-Katsura, H.; Enomoto, T.; Miyamoto, E.; Adachi, S. Purification and characterization of corrinoid compounds from a Japanese fish sauce. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **2004**, *27*, 2113–2119.
7. Watanabe, F.; Katsura, H.; Takenaka, S.; Fujita, T.; Abe, K.; Tamura, Y.; Nakatsuka, T.; Nakano, Y. Pseudovitamin B₁₂ is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4730–4741.

8. Schneider, Z.; Stroinski, A. Biosynthesis of vitamin B₁₂. In *Comprehensive B₁₂*; Walter de Gruyter: Berlin, 1987; 93–110.
9. Helrich, K. *Official Methods of Analysis*. Vol. 1, 15th Ed.; Association of Official Chemists, Inc.: Arlington, Virginia, 1990; 427.
10. Kuda, T.; Okamoto, K.; Yano, T. Population of halophilic bacteria in salted fish products made in the Loochoo Island, Okinawa and the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Fisheries Sci.* **2002**, *68*, 1265–1273.

Received December 1, 2004

Accepted December 13, 2004

Manuscript 6634I



健康を維持するための水溶性ビタミン量

—その計画と評価方法—

柴田 克己

日本人の寿命は世界一である。諸外国は日本人の食生活に高い関心を持っている。2005年に新しい食事摂取基準が厚生労働省から策定された。食事摂取基準は、健康者が生涯健康に生きるために必要な栄養素量が1日当たりの値として策定されている。日本人の栄養素必要量と栄養素バランスの基準を示したものであり、栄養食品学的な立場にたつ基準である。近年、生命科学の進歩により、栄養素を摂取したヒト側の立場に立った、つまり、栄養生化学的な立場から摂取した栄養素の生体利用率の評価が可能となりつつある。食品中の水溶性ビタミンの生体利用率の測定方法と水溶性ビタミンの栄養生化学的立場からの評価方法を紹介する。

キーワード：ビタミン，必要量，食事摂取基準，生体利用率

1 はじめに

日本人の寿命は男女ともに世界一である。世界中が日本の食生活に興味を持っている。ある外国人から、日本人が大食らいなのに、肥満者が少ないのは、豆腐の中に生大豆中の消化酵素阻害剤がまだ残っている。そのため消化が適度に抑制されているからだ、聞いたことがある。他国からみれば、日本人の食生活は理想的であるとみえている。ところが、日本では、やせたいという願望を持っている。日本人がもつ食生活の背景として、エネルギー源は十分摂っている。しかし、ビタミンやミネラルはもう少し多く摂った方がよい、と考えている。すなわち、エネルギー源となる糖質・脂質・タンパク質は十分量摂っているが、微量栄養素であるビタミン・ミネラルは少ないと考えている。つまり、栄養素バランスが悪いと考えているわけである。栄養素バランスの

悪さは、代謝性疾患である肥満、糖尿病、高血圧症、高脂血症、脳卒中、心臓病の原因となる。このような慢性疾患には一次予防が大切である。では、どのような栄養バランスがいいのであろうか。

2 食事摂取基準策定の目的と用途

「日本人の食事摂取基準」という厚生労働省からの報告書がある¹⁾。この報告書の市販本も販売されている²⁾。この報告書は、健康な個人または集団を対象として、国民の健康の維持・増進、エネルギー・栄養素欠乏症の予防、生活習慣病の予防、過剰摂取による健康障害の予防を目的とし、エネルギー及び各栄養素摂取量の基準を示すものである。簡単にいえば、日本人の最適な栄養素バランスが書いてある報告書である。この用途は、国および地域における栄養計画の策定、栄養指導、給食基準、食品の栄養表示基準などである。この報告書は、平成17年度か

Suitable Intakes of Water-soluble Vitamins for Maintaining QOL (Quality of Life) -Its Planning and the Method of Assessment
 Katsumi SHIBATA 滋賀県立大学人間文化学部 生活文化学科 食生活専攻 教授 農学博士
 (〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500)

ら平成 21 年度までの 5 年間、使用されるものである。なぜ、5 年間だけというと、栄養学領域はまだ、完成されたものではなく、発展段階にあるからである。つまり、5 年ごとに改定されるのは、最新の科学的知見、国際的動向への対応をはかるとともに、人口構造の変化、生活環境の変化、食生活の変化、疾病構造の変化等に対応しうるようにするためである。

3 食事摂取基準とは

食事摂取基準とは、日本人が健康に過ごすために必要な栄養素量とエネルギー量を、男女ごと、年齢区分ごと、妊婦、授乳婦に分けて、1 日当たりで示したものである^{1,2)}。表 1 に示したように、食事摂取基準は 6 つの指標からなるものである。この中で、推定エネルギー必要量は名前のごとく、エネルギー必要量にのみ関係する指標である。他の 5 つの指標は、すべての栄養素に関わる指標である。しかし、すべての栄養素にこれら 5 つの指標の数値がすべて策定されているわけではない。5 つの指標の中で、

表 1 食事摂取基準の指標

推定平均必要量	ある対象集団において測定された「必要量」の分布に基づき、母集団における必要量の平均値の推定値を示す。
推奨量	ある対象集団において測定された「必要量」の分布に基づき、母集団に属するほとんどの人 (97~98%) が不足していない量
目安量	「推定平均必要量」を求めることができない場合 (理由: 欠乏の指標を特定できないため) 特定の集団における、ある一定の栄養状態を維持するのに十分な量
目標量	生活習慣病の一次予防を専らの目的として、特定の集団において、その疾患のリスクや、その代理指標となる生体指標の値が低くなると考えられる栄養状態を達成する量
上限量	過剰摂取による健康障害に罹患しない栄養素摂取量の最大値
推定エネルギー必要量	エネルギーは多くても少なくとも不適切となる確率が増大するため、エネルギーの食事摂取基準には、他の栄養素で用いられている食事摂取基準の概念を適用することができない。

最も重要な指標は「推定平均必要量」である。

4 推定平均必要量とは

文字通り、平均必要量を推定したものである。この推定平均必要量を求めるには、実験を行う必要がある。

図 1 に例をあげる。実際の実験結果ではない、理想的な結果を示している。推定平均必要量の概念の説明のための仮想データである。「栄養素 A」の必要量を求めるための実験をした。被検者は 18~29 歳の女性 (妊婦ではない、授乳婦ではない) 306 名である。結果として、図 1 に示した栄養素 A の必要量の分布が得られた。実験に参加してくれた 18~29 歳の女性の「栄養素 A」の 1 日当たりの必要量は、3.4~6.2mg に分布していることがわかる。3.4mg で必要量を満たした被検者がいる、一方、6.2mg も摂らないと必要量を満たすことができない被検者もいた。ほぼ同じ年齢、同じ人種、同じ食事を摂取しても、約 2 倍も必要量が違ったのである。実際の実験でも微量栄養素の必要量は 2 倍程度異なるものもある。図 1 より、この集団の「栄養素 A」の平均必要量は 4.8mg であった。さて、この集団から 18~29 歳の日本人女性全員の「栄養素 A」の必要量を推定するわけである。この年齢階層の正確な人数は知らないが、700 万人程度であろう。306 名の「栄養素 A」の平均必要量から約 700 万人の平均必要量を推定するので、「推定平均必要量」という名称となるのである。

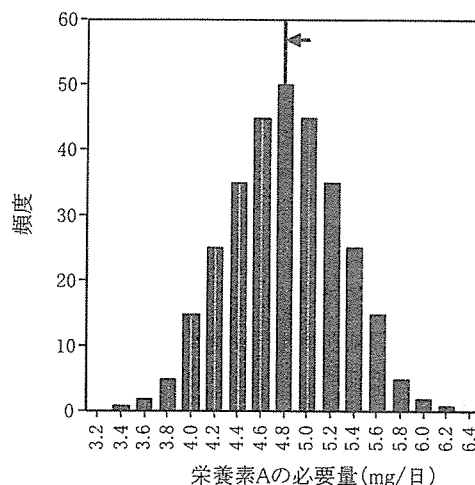


図 1 栄養素 A の必要量の個人間変動の分布

5 健康を維持するための栄養計画のために

栄養バランスのとれた食事をするのが、生活習慣病の一次予防であることは述べた。「日本人の食事摂取基準(2005年版)」^{1,2)}の中に、どれだけの栄養素を摂れば良いかが記載してある。例として、表2に、ナイアシンの食事摂取基準を示した。なお、ナイアシンはB群ビタミンの一つである。では、栄養計画をたてるためには、表2のどれをみればよいのか。①自分の年齢を探す。50～69歳をみる。②性別をみる。男性。③推奨量をみる。

なぜ推奨量をみるのか?その解説:推定平均必要量, 推奨量, 上限量に数値が記載されている。上限量にはかっこの内の数値も記載されている。目安量には「-」がはいっている。個人の栄養計画のためには、推奨量をみればよい。推奨量は表1に示したように、母集団に属するほとんどの人が不足しない量である。4で説明したように、必要量を定めるための実験に参加していなければ、自分が図1の必要量

の分布のどこに位置するのかわからない。真ん中の平均必要量(表2の推定平均必要量に相当)の摂取量では、必要量に達している可能性は50%である。個人の栄養計画では、必要量が摂れているのかいないのか、という確率が50%では、不安である。そこで、母集団に属するほとんどの人が不足していない量として策定された推奨量をみる。

④14mgNEという数値となる。

NEとはniacin equivalent=ナイアシン当量, の略である。NE(mg)=食品成分表のナイアシン(mg)+1/60トリプトファン(mg)から計算する。簡便式として、NE(mg)=食品成分表のナイアシン(mg)+{1/6×食品成分表のたんぱく質(g)}がある。

他の栄養素の摂取量もこのようにして、栄養計画をたてる。

栄養素の摂取量計画, 推定エネルギー量の栄養計画をたてたならば、⑤実際に、食品成分表を使用して献立を作成し、食事を作る。

表2 ナシアシンの食事摂取基準 (単位はmgNE)

性別	男 性				女 性			
	推定平均必要量	推奨量	目安量	上限量 ^{*1}	推定平均必要量	推奨量	目安量	上限量 ^{*1}
0～5(月)	- ^{*2}	-	2	-	-	-	2	-
6～11(月)	-	-	3	-	-	-	3	-
1～2(歳)	5	6	-	-	4	5	-	-
3～5(歳)	7	8	-	-	6	7	-	-
6～7(歳)	8	10	-	-	7	9	-	-
8～9(歳)	9	11	-	-	9	10	-	-
10～11(歳)	11	13	-	-	10	12	-	-
12～14(歳)	13	15	-	-	11	13	-	-
15～17(歳)	13	16	-	-	11	13	-	-
18～29(歳)	13	15	-	300 (100)	10	12	-	300 (100)
30～49(歳)	13	15	-	300 (100)	10	12	-	300 (100)
50～69(歳)	12	14	-	300 (100)	9	11	-	300 (100)
70以上(歳)	9	11	-	300 (100)	7	9	-	300 (100)
妊婦(付加量)								
初期					+0	+0	-	-
中期					+1	+1	-	-
末期					+2	+3	-	-
授乳婦(付加量)					+2	+2	-	-

^{*1} 上段はニコチンアミド,()内はニコチン酸。 ^{*2} -は策定されていない

6 食品成分表の値と食事摂取基準の値との乖離

両者に記載されているビタミンの数値の乖離の概念図を図2として示した。

食品成分表の値は文部科学省の科学技術・学術審議会・資源調査分科会が担当している。食品中の栄養素を資源としてとらえている。食品中の栄養素、特に微量栄養素は、食品中の高分子と結合した状態で存在している。そのため、食品中のビタミンは遊離型のビタミンに比べて安定である。しかし、人が利用するためには、タンパク質・脂質・糖質と同じく消化という操作が必要である。この消化過程は、完全ではないし、食品の種類、食品の組み合わせ、調理方法によっても異なる。食品中のビタミンを定量するためには、食品中の種々の高分子と結合しているビタミン、いわゆる結合型ビタミンを遊離型にする操作が必要である。食品成分表のビタミンの値は、食品を試験管内で徹底的に消化操作を行った後に、定量操作を行った値である。つまり、その食品の資源としての最大値を示しているとも考えることができる。一方、食事摂取基準に示されている値は、我々が、人を用いて、栄養素の必要量を求める場合、栄養素の管理が容易であることから、遊離型の栄養素を用いるので、遊離型を摂取した時の値となる。簡単にいえば、栄養素のみからなる精製食を用いる。

遊離型の栄養素の生体利用率は、食品中に含まれている栄養素よりも高い。食品化学的に対して、人間化学的あるいは生命科学的という。したがって、食品成分表の数値と生命化学的な値が記載してある食事摂取基準との数値は直接比較できない。

7 食品に含まれる栄養素の生体利用率の解明

食品成分表の値は資源的な値、食品化学的な値である。これを生体側の値にするには、食べたものの中に含まれる栄養素を、人がどれだけ利用できたかを調べなければならない。これは、大変難しい。考慮する要因が多すぎるからである。

7.1 方法論の構築

食品中に含まれている栄養素の生体利用率を求める方法論は確立されていない。我々が、開発中の簡便な方法を紹介する。水溶性ビタミンに限った話である。被験者の拘束期間は13日間である。実験方法の概略を図3に示した。1週目の1日から5日と2週目の8日から12日は、朝、昼、夜と1種類の指定の食事をする。これらの指定の食事は、「日本人の食事摂取基準(2005年版)」^{1,2)}を基にして作成する。この食事の水溶性ビタミン含量を実測する。一定の食事を摂取した時に尿中に排泄される水溶性ビタミン量を測定するために、5日の2回目の尿から6日の1回目の尿を集める。水溶性ビタミンの代謝は4日間程度で平衡に達するので、この程度の期間、同じ食事を摂ってもらうだけでよい。このときに蓄尿した尿中の水溶性ビタミンの分析を行う。これをデータ1とする。6日と7日は被験者の負担を軽減するために、被験者が自由に食事を選択しても良い日とする。但し、所定の水溶性ビタミン混合(表3)を朝、昼、夜と食後に服用してもらう。2週目の8日から12日まで、再び1週目と同じ食事をしてもらうと同時に朝、昼、夜と夕食後に所定の水溶性ビタミン混合を服用してもらう。そし

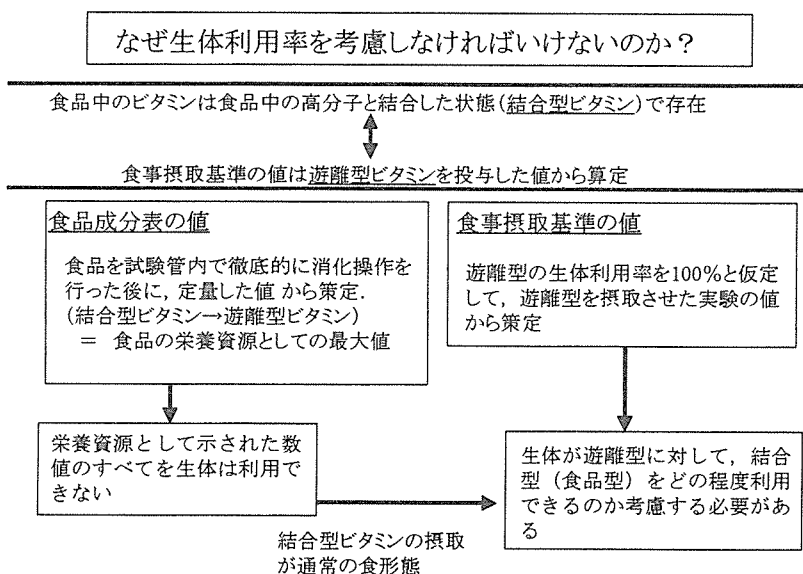


図2 生体利用率を考慮すべき理由

同じ食事を摂ってもらうだけでよい。このときに蓄尿した尿中の水溶性ビタミンの分析を行う。これをデータ1とする。6日と7日は被験者の負担を軽減するために、被験者が自由に食事を選択しても良い日とする。但し、所定の水溶性ビタミン混合(表3)を朝、昼、夜と食後に服用してもらう。2週目の8日から12日まで、再び1週目と同じ食事をしてもらうと同時に朝、昼、夜と夕食後に所定の水溶性ビタミン混合を服用してもらう。そし

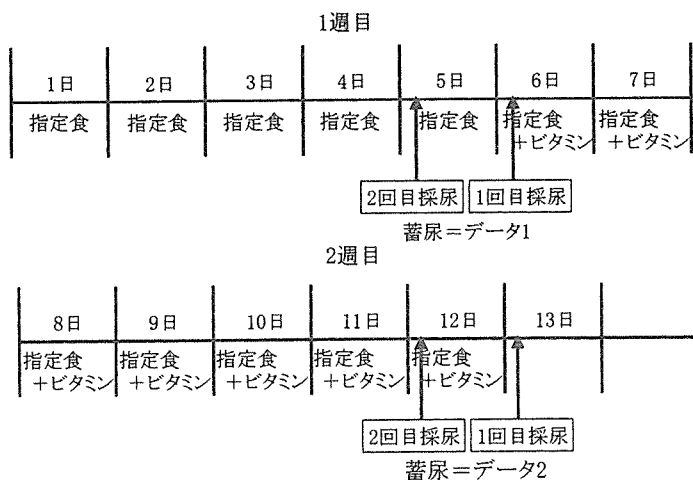


図3 生体利用率を求めるための実験計画の一例

表3 試用した水溶性ビタミン混合

ビタ ミ ン	含 量	
	(mg/錠)	(mg/日)
チアミン (ビタミン B ₁)	0.52	1.56
リボフラビン (ビタミン B ₂)	1.14	3.42
ニコチンアミド (ビタミン B ₃)	18.8	56.4
パントテン酸 (ビタミン B ₅)	6.3	18.9
ピリドキシン (ビタミン B ₆)	0.98	2.94
プテロイルモノグルタミン酸 (葉酸: ビタミン M)	0.19	0.57
ビオチン (ビタミン H)	0.023	0.069
アスコルビン酸 (ビタミン C)	24	72

て、12日の2回目の尿から13日の1回目の尿を蓄尿する。水溶性ビタミン量を測定する。これをデータ2とする。

7.2 生体利用率の計算方法

パントテン酸を例とした場合の、生体利用率の計算方法を表4に記した。この計算方法が成立する前提条件は、「被験者が健康者であることである」。これは、「日本人の食事摂取基準(2005年版)」が健康者を対象として策定されたものであるためである。健康者が、寿命の限界まで健康であるための、適正栄養素摂取量を提言している。

7.2.1 1週目の食事のパントテン酸と5日の尿中のパントテン酸量から計算

被験者の食事からのパントテン酸(食事性パントテン酸)摂取量(実測値)は43.79 μmol/日(パントテン

酸の分子量は219.2であるので、9.60mg/日)であり、被験者 No.1 の尿中排泄量が 26.47 μmol/日であった。仮に被験者 No.1 が 1mol の食事性パントテン酸を摂取した時に尿中に排泄されるパントテン酸量を計算すると、表4に示したように、0.60mol/日という数値となる。

7.2.2 2週目の服用した水溶性ビタミン混合中のパントテン酸と12日の尿中のパントテン酸量から計算

被験者 No.1 の12日の尿中排泄量が 81.60 μmol/日であった。

この値は、食事性パントテン酸と服用した水溶性ビタミン混合中のパントテン酸の含量である 124.99 μmol/日(28.50mg/日)摂取した値である。水溶性ビタミン混合剤からのパントテン酸摂取量は、86.20 μmol/日(18.90mg/日)である。データ2の尿中パントテン酸排泄量は、食事性パントテン酸由来のパントテン酸量が含まれているので、81.60 μmol/日からデータ1の値=26.47 μmol/日を引かなければならない。つまり、増大したパントテン酸排泄量、すなわち、服用した水溶性ビタミン混合に由来するパントテン酸排泄量は 55.13 μmol/日(81.60-26.47)となる。仮に被験者 No.1 が 1mol の遊離型のパントテン酸を摂取した時に尿中に排泄されるパントテン酸量を計算すると、表4に示したように、0.64mol/日という数値となる。

7.2.3 生体利用率=遊離パントテン酸と食事性パントテン酸を当量摂取した時に尿中に排泄されるパントテン酸排泄率の比率

データ1から求めた0.60とデータ2から求めた0.64の比較から、表4に示したように94.50%という値が求められる。被験者 No.1 の場合、摂取させた食事のパントテン酸の生体利用率は94.50%であったということになる。

この実験をすれば、水溶性ビタミン(①チアミン、②リボフラビン、③ニコチンアミド、④パントテン酸、⑤ピリドキシン、⑥プテロイルモノグルタミン酸、⑦ビオチン、⑧アスコルビン酸)8種類の生体利用率を求めることが可能である。シアノコバラミン(ビタミン B₁₂)は、吸収量が厳密に調節されてい