

9. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis : Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatments. *J Nutr Sci Vitaminol*, (1998) 44, 361-370.
10. Wright LD, Skeggs HR. Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* (1944) 56, 95-98.
11. 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* (1994) 40, 491-8.

平成 19 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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明－

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

12. 定量法の違いによる母乳中のビタミン B₆ 量

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

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、平成 17 および 18 年度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。母乳中のビタミン B₆ 含量を微生物定量法で測定すると、0.1 mg/L 前後という数値が得られた。この値は、日本人の食事摂取基準（2005 年版）の採用値 0.25 mg/L とは異なるものであった。日本人の食事摂取基準（2005 年版）では、HPLC 法で測定したデータが採用されている。本研究では、母乳中のビタミン B₆ 量の違いが定量法によるものであるのかを明らかにすることを目的として、同一の母乳サンプルを HPLC 法と微生物定量法で測定し、測定結果の違いが何に起因するのか検討した。母乳 81 検体を微生物定量法で測定すると 0.09 mg/L、HPLC 法で測定すると 0.23 mg/L という値が得られた。母乳に含まれるビタミン B₆ の形態は PLP が主であるが、微生物定量法の前処理である酸加水分解処理によって PLP は完全には遊離型には変換されなかった。すなわち、微生物定量法による測定結果が HPLC 法による測定結果よりも低値を示すのは、従来の処理法では PLP を酸加水分解することができず、ビタミン B₆ 要求株酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 を用いた微生物定量法では母乳中の遊離型ビタミン B₆ 量を定量していたことが明らかとなった。以上の結果は、母乳中のビタミン B₆ 量の定量には、微生物定量法ではなく HPLC 法を用いる必要があることを示している。

A. 目的

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、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) に関する研究」¹⁾ および平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) に関する研究」²⁾において、健康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。母乳中のビタミン B₆ 含量を微生物定量法で測定すると、0.1 mg/L 前後という数値が得られた。この値は、日本人の食事摂取基準 (2005 年版)³⁾の採用値 0.25 mg/L とは異なるものであった。日本人の食事摂取基準 (2005 年版)³⁾では、伊佐ら⁴⁾の報告による HPLC 法で測定したデータが採用されている。

本研究では、定量法の違いによる母乳中のビタミン B₆ 量の違いが何に起因するのか明らかにすることを目的として、同一の母乳サンプル中のビタミン B₆ 量を HPLC 法と微生物定量法によって測定した。

B. 実験方法

1. 母乳採取

滋賀県立大学倫理委員会の承認を得た上で、本研究の主旨について説明を行い、同意の得られた者から母乳を採取した。採取時間は指定せず、提供者が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) に母乳を採集し、直ちに -20°C 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た。到着後は、分析に使用するまで -20°C にて保存した。

2. 母乳の酸加水分解処理

りん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、遊離型に変換するため

の操作の概略図を図 1 に示した。五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアルに従い、酸加水分解を行った⁵⁾。すなわち、母乳 0.1 ml に 0.055 M HCl, 0.88 M HCl, 0.5 M H₂SO₄ のいずれかを 0.5 ml 加えてオートクレーブし、0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) と水酸化ナトリウムで中和し、マイクロフィルター (Millex-HV, 0.45 μm, 日本ミリポア株式会社, 東京) を通してろ過した。ろ液 20 μl もしくは、50 μl を HPLC システムに供した。

3. 分析

母乳中のビタミン B₆ として、ピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) とピリドキサール (PL) を測定した。測定は、Rybak と Pfeiffer⁶⁾ の HPLC 法を改変して行った。HPLC システムの分析条件を表 1 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

・0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)

酢酸 (Acetic Acid, MW = 60.05, 和光純薬工業株式会社, 室温保存) 5.747 ml に超純水を加えて 200 ml に定容し、0.5 M 酢酸溶液を調製した。酢酸ナトリウム (Sodium Acetate, MW = 82.03, 和光純薬工業株式会社, 室温保存) 20.508 g を秤量し、超純水を加えて 500 ml に定容し、0.5 M 酢酸ナトリウム溶液を調製した。pH 5.0 になるまで 0.5 M 酢酸ナトリウム溶液に 0.5 M 酢酸溶液を加えた。

・5%メタリン酸溶液

メタリン酸を 1 g 秤量し、超純水を 20 ml 加えた。

・反応液 (22 mM 亜塩素酸ナトリウム溶液)

NaClO₂ (Sodium Chlorite, MW = 90.44, 和光純薬工業株式会社, 室温保存) を 2 g 秤量し、超純水 1 L に溶解した。

・移動相 (5%アセトニトリルを含む 50 mM NaH₂PO₄ (pH 3.1) 溶液)

NaH₂PO₄ · 2H₂O (Sodium Dihydrogen-phosphate Dihydrate, MW = 156.01, 和光純薬工業株式会社, 室温保存) を 7.8 g 秤量し, 約 180 ml の超純水を加え溶解した. pH 3.1 になるようりん酸 (Phosphoric Acid, MW = 98.00, 和光純薬工業株式会社, 室温保存) を加えた. アセトニトリルを 50 ml 加えた後, 超純水で 1 L に定容した.

(2) 標準溶液の調製

・ PLP 標準溶液

PLP (Pyridoxal Phosphate Monohydrate, FW = 265.16, 和光純薬工業株式会社, 冷蔵保存) を 13 mg 秤量し, 超純水 10 ml に溶解した (5 mmol/l PLP) (冷凍保存). これを 0.1 ml 取り, 超純水を 4.9 ml 加えて希釈した (100 μmol/PLP). この吸光度を測定し, ε_{388 nm} = 3441 より正確な濃度を求めた. さらに超純水で 500 nmol/l となるように希釈し, これを PLP 標準溶液とした.

・ PL 標準溶液

PL (Pyridoxal Hydrochloride Standard, FW = 203.62, 和光純薬工業株式会社, 冷凍保存) を 10 mg 秤量し, 超純水 10 ml に溶解した (5 mmol/l PL) (冷凍保存). これを 0.1 ml 取り, 超純水を 4.9 ml 加えて希釈した (100 μmol/l PL). この吸光度を測定し, ε_{316 nm} = 5388 より正確な濃度を求めた. さらに超純水で 500 nmol/l となるように希釈し, これを PL 標準溶液とした.

(3) サンプルの調製

サンプルの調製法を図 2 に示した. ねじ口チューブ 2 ml に母乳 0.3 ml と 5% メタリン酸溶液 0.3 ml を加え, 5 分間振とうさせた. 振とう後, 15,000 × g, 4°C で 15 分間遠心し, 上清を新しいねじ口チューブ 2 ml に移した. ジクロロメタン 0.3 ml を加え, 2 分間振とうさ

せた. 15,000 × g, 4°C で 15 分間遠心し, 上清をマイクロフィルター (Millex-HV, 0.45 μm, 日本ミリポア株式会社, 東京) でろ過した. このろ液 20 μl を HPLC システムに注入した.

(4) 計算方法

PLP および PL 標準溶液 20 μl を HPLC に供し, 得られた面積から 1 pmol 当りの面積を求めた. 測定試料を HPLC に供し, 得られた面積と下記の計算式を用いて, 母乳中ビタミン B₆ 量を求めた. PLP 標準溶液, PL 標準溶液, 母乳サンプル, 酸加水分解処理した母乳サンプルのクロマトグラムを図 3 に示した.

PLP (μmol/L)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの PLP 標準面積) × 0.6^{*1} / 0.3^{*2} / 0.02^{*3} × 1000000^{*4} × (1/1000000)^{*5} × 希釈倍率

PL (μmol/L)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの PL 標準面積) × 0.6^{*1} / 0.3^{*2} / 0.02^{*3} × 1000000^{*4} × (1/1000000)^{*5} × 希釈倍率

母乳中の B₆ 量 (μmol/L)

= PLP (μmol/L) + PL (μmol/L)

*1: サンプル調製時に用いた母乳 0.3 ml と
メタリン酸 0.3 ml の合計

*2: サンプル調製時に用いた母乳 0.3 ml

*3: HPLC に注入した 20 μl

*4: 母乳 1 L あたりにするため

*5: 単位を pmol から μmol にするため

4. 統計学的解析

数値はすべて平均値 ± 標準偏差で表した. 測定方法の違いによる母乳中ビタミン B₆ 量の比較には, paired *t*-test を行い, *p* 値が 0.05 以下のとき, 統計的有意差があるものとした. 計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 4 を使用した.

C. 結果

1. HPLC 法と微生物定量法による母乳中ビタミン B₆ の定量

母乳 81 検体を HPLC 法で測定すると、 0.23 ± 0.06 mg/L という値が得られた。同じ 81 検体を微生物定量法で測定すると、 0.088 ± 0.039 mg/L であった。HPLC 法と微生物定量法との比較を図 4 に示した。

2. 酸加水分解による遊離型への変換

母乳 15 検体を塩酸、硫酸で酸加水分解し、HPLC 法によりビタミン B₆ 量を測定した。酸加水分解を行わずに測定した母乳中の PLP 量を 100% とすると、 0.055 M HCl 処理によって $72.4 \pm 7.7\%$ の PLP が分解されなかった。同様に、 0.88 M HCl 処理では $36.5 \pm 17.9\%$ の、 0.5 M H₂SO₄ 処理では $92.6 \pm 6.7\%$ の PLP が加水分解されなかった。それぞれの PLP の残存量を図 5 に示した。

D. 考察

本研究において、母乳 81 検体を HPLC 法によって測定すると、母乳中のビタミン B₆ 量は 0.23 ± 0.06 mg/L であった。この値は日本人の食事摂取基準 (2005 年版)³⁾ の採用値 0.25 mg/L と同値である。一方、同じ検体を微生物定量法で測定すると、 0.088 ± 0.039 mg/L という HPLC 法で得られた値より低値を示した。

HPLC 法によるビタミン B₆ の定量ではビタミン B₆ 類似体を同時定量することができるため、類似体の合計量をビタミン B₆ 量として表すことができる。一方、*Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 はりん酸エステル型を含めた結合型ビタミン B₆ を利用することができないため、定量に先立ち母乳を酸加水分解して遊離型に変換する操作

が必要となる。HPLC 法で母乳中ビタミン B₆ 量を測定すると、母乳中のビタミン B₆ の主要な化学形態は PLP であったことから、我々は酸加水処理が不十分であるために微生物定量法では低値が得られる可能性について考えた。五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアルには、動物性試料に 0.055 M HCl を加え、オートクレーブすることによって酸加水分解を行い、微生物定量法に供するとされている⁵⁾。我々は母乳も動物性試料とみなし、平成 17 および 18 年度は、検体をこの方法に従って酸加水分解処理し、微生物定量法によるビタミン B₆ 量を測定に供した。しかし、本研究によって、 0.055 M HCl を用いた酸加水分解処理では、母乳中の約 28% の PLP が遊離型に変換された。この結果は、従来の酸加水分解処理では母乳中の PLP をわずかにしか遊離型に変換することができず、その処理を行った母乳試料を微生物定量法に供しても、母乳中の遊離型ビタミン B₆ 量を定量しているために低値を示したことが明らかとなった。母乳中の PLP を完全に酸加水分解できることを期待して 0.88 M HCl および 0.5 M H₂SO₄ を用いた酸加水分解処理を行ったが、酸加水分解された母乳中の PLP はそれぞれ 64%、8% に過ぎなかった。この結果は、微生物定量法による母乳中のビタミン B₆ 量の測定を試みても、酸加水分解を十分に行えないために、正確なビタミン B₆ 量を求めることはできないことを示している。このため、母乳中のビタミン B₆ を測定するには、HPLC 法を用いるべきである。

E. 健康危機情報

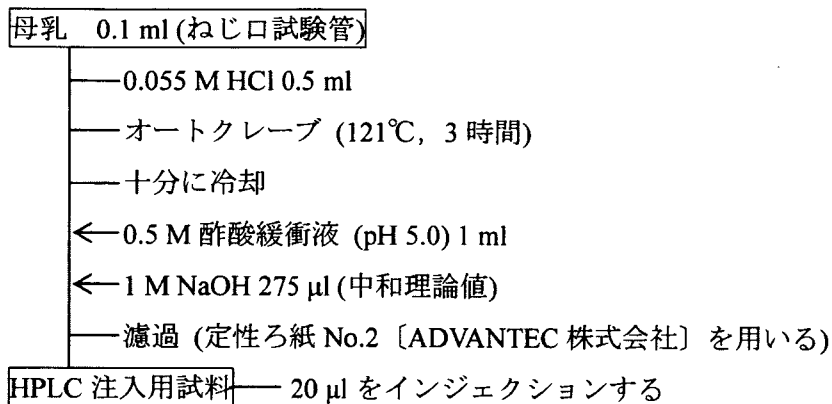
特記する情報なし

- 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. 柴田克己. 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金, 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) に関する研究, 平成 17 年度総括・分担研究報告書. 2006.
 2. 柴田克己. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金, 循環器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) に関する研究, 平成 18 年度総括・分担研究報告書. 2007.
 3. 厚生労働省. 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. 東京, 2004.
 4. 伊佐保香, 垣内明子, 早川享志. 日本人の母乳中ビタミン B₆ 含量. *ビタミン* (2004) 78, 369-372.
 5. 文部科学省 科学技術 学術審議会 資源調査分科会食品成分委員会 資料. 五訂増補 日本食品標準成分表 分析マニュアル. 2005.
 6. Rybak ME, Pfeiffer CM. Clinical analysis of vitamin B₆: Determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem* (2004) 333, 336-44.

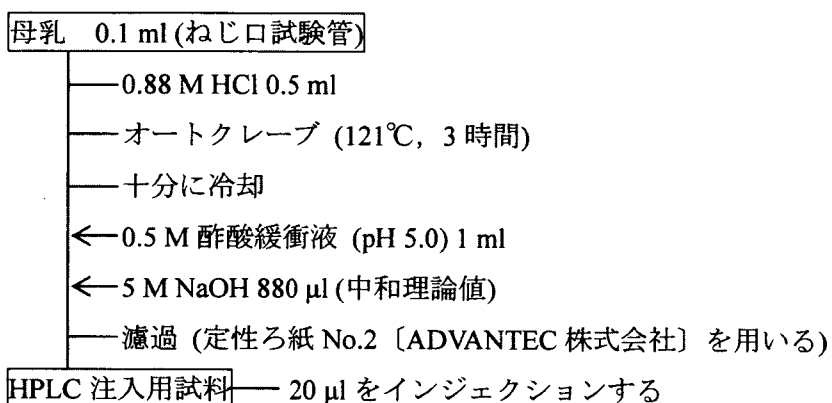
表 1. 母乳中のビタミン B₆ 定量用 HPLC システム

分析カラム	Tosoh ODS 80Ts (平均粒子直径, 5 μm ; 4.6 mm I.D. × 250 mm, 東ソー株式会社)
移動相流速	0.7 ml/min
反応液流速	0.1 ml/min
pressure	移動相 : 81 kg/cm ² , 反応液 : 6 kg/cm ²
検出波長	蛍光法, 励起波長 325 nm , 蛍光波長 425 nm
カラム温度	35°C
コイル温度	75°C
試料導入装置内温度	室温
試料注入量	20 μl
溶出時間	PLP : 9.7 min, PL : 8.7 min
終了時間	データプロセッサ : 15 min, オートインジェクター : 30 min
感度の設定	GAIN 1, SENS 2 (データプロセッサのアテニュエーション : 6)

A



B



C

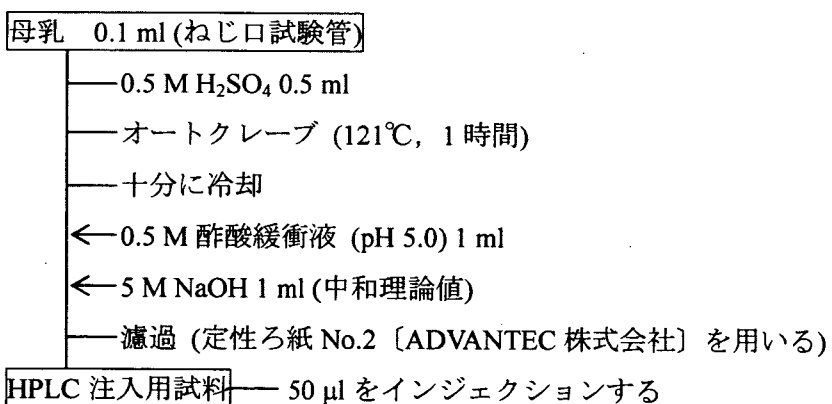


図 1. 0.055 M 塩酸 (A), 0.88 M 塩酸 (B), および 0.5 M 硫酸 (C) を用いた母乳中のビタミン B₆ の酸加水分解操作

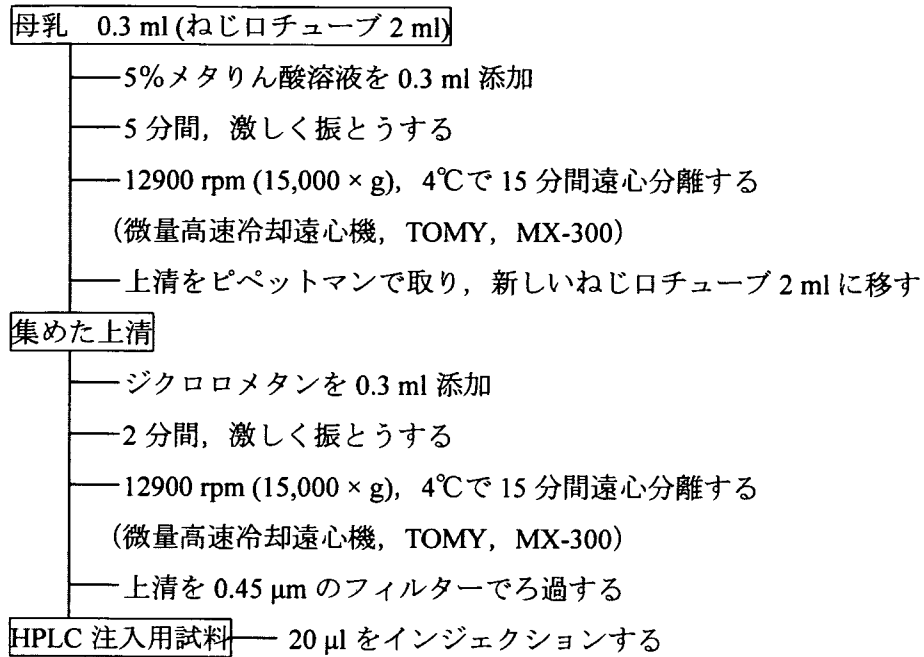


図 2. 母乳中のビタミン B₆ の HPLC 測定用試料溶液の作成操作

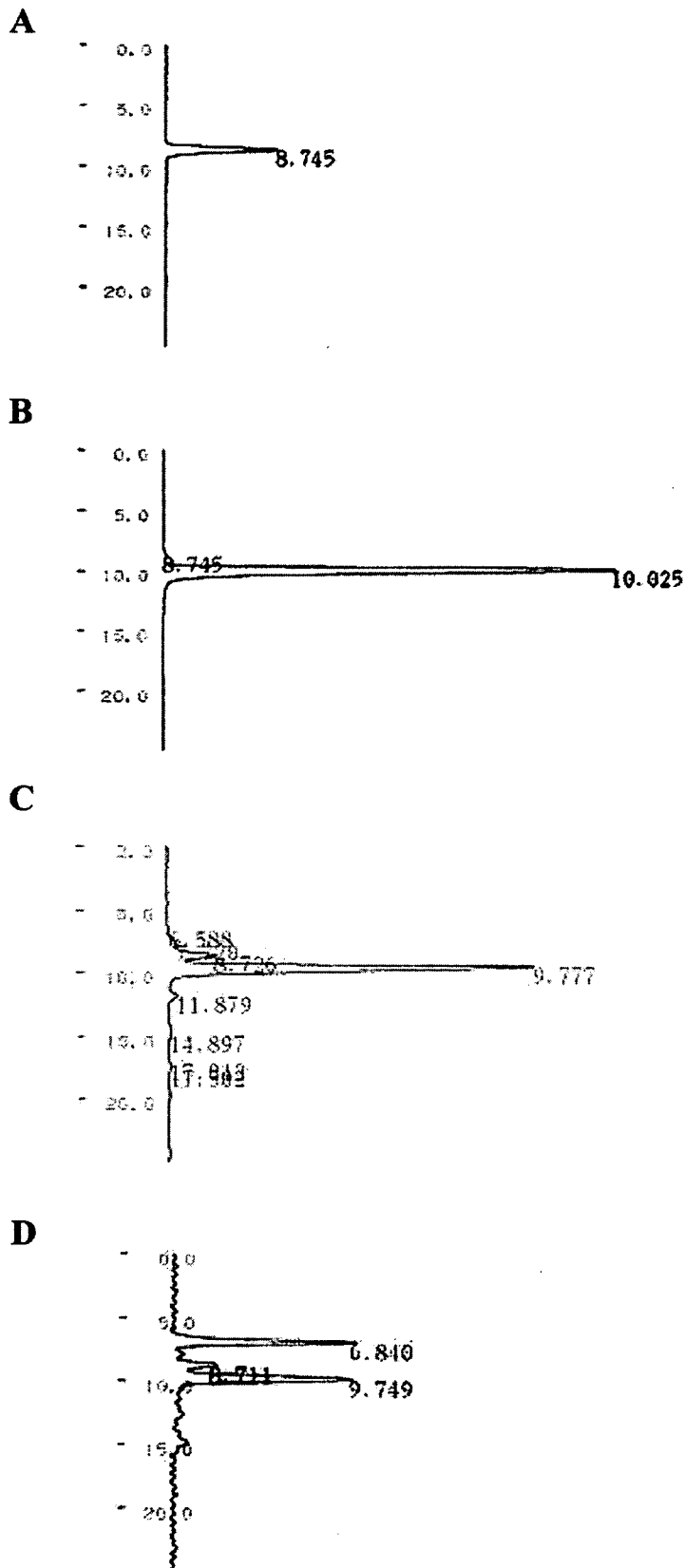


図3. PLP 標準溶液 (A), PL 標準溶液 (B), 母乳サンプル (C) および酸加水分解処理をした母乳サンプル (D) を HPLC に注入した時のクロマトグラム

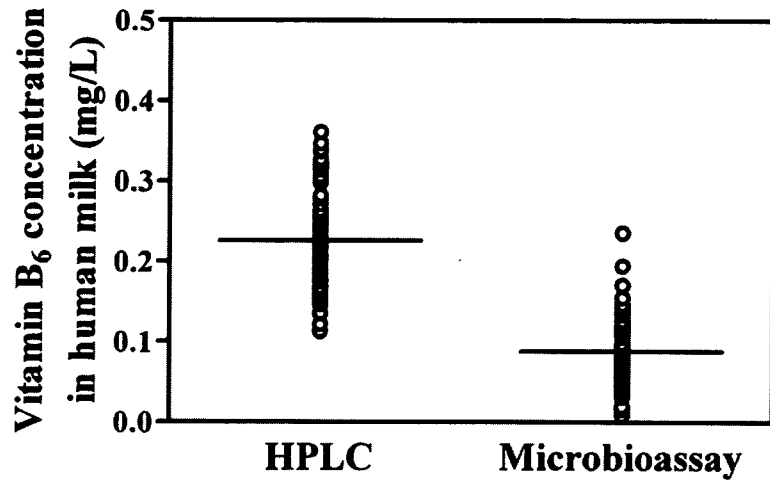


図5. HPLC法と微生物定量法による母乳中ビタミンB₆の測定値の比較
 横線は平均値を示す (n=81). ビタミンB₆量はピリドキシン量 (MW=169.18) として示した.

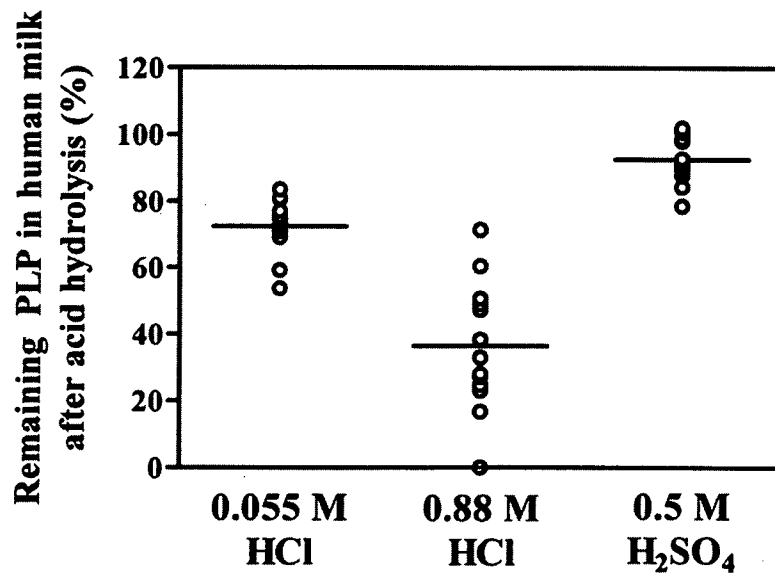


図6. 0.055 M 塩酸 (A), 0.88 M 塩酸 (B), 0.5 M 硫酸 (C) を用いた酸加水分解処理後の母乳中 PLP 残存量の比較
 横線は平均値を示す (n=15). 酸加水分解処理を行わずに HPLC 法で測定した母乳中の PLP 量を 100%とした.

平成 19 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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

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

13. 母乳中のビタミン B₁₂ の安定性について

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

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、平成 17 および 18 年度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。母乳 254 検体のビタミン B₁₂ 量は $0.84 \pm 0.40 \mu\text{g/L}$ であり、この結果は日本人の食事摂取基準（2005 年版）の採用値 $0.2 \mu\text{g/L}$ の約 4 倍を示す高値であった。一般に、母乳の栄養素量を測定する際、母乳を採乳後、測定するまで凍結保存していた。ビタミン B₁₂ 量の測定結果が大きく異なった理由の一つとして、母乳の長期凍結保存によってビタミン B₁₂ 量が減少した可能性が考えられた。本研究では 2 年間凍結保存した母乳中のビタミン B₁₂ 量を測定し、長期凍結保存が母乳中のビタミン B₁₂ の安定性におよぼす影響について検討した。2 年間の凍結保存を行う前の母乳 19 検体のビタミン B₁₂ 量は $0.61 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$ 、保存後は $0.67 \pm 0.18 \mu\text{g/L}$ であった。以上の結果から、母乳中のビタミン B₁₂ は長期凍結保存しても安定であることが明らかとなった。

A. 目的

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、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準（栄養所要量）に関する研究」¹⁾ および平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準（栄養所要量）に関する研究」²⁾において、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。母乳 254 検体のビタミン B₁₂ 量は 0.84 ± 0.40 μg/L であり、この結果は日本人の食事摂取基準（2005 年版）の採用値 0.2 μg/L³⁾ の約 4 倍を示す高値であった。日本人の食事摂取基準（2005 年版）では、井戸田ら⁴⁾の報告が採用されている。母乳中のビタミン B₁₂ 量を測定するに際し、我々と伊戸田らは同じ検体処理法および定量法を行ったため、処理法や定量法の違いによって約 4 倍もの異なる測定結果が得られたとは考えにくい。一般に、母乳の栄養素量を測定する際、母乳を採乳後、測定するまで凍結保存しておく。ビタミン B₁₂ 量の測定結果が大きく異なった理由の一つとして、母乳の長期凍結保存によってビタミン B₁₂ 量が減少した可能性が考えられた。本研究では 2 年間凍結保存した母乳中のビタミン B₁₂ 量を測定し、長期凍結保存が母乳中のビタミン B₁₂ の安定性におよぼす影響について検討した。

B. 実験方法

1. 母乳採取

滋賀県立大学倫理委員会の承認を得た上で、本研究の主旨について説明を行い、同意の得られた者から母乳を採取した。採取時間は指定せず、提供者が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）に母乳を採集し、直ちに -20°C 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た。到着後は、分析に使用するまで -20°C にて保存した。さらに 2 年間 -20°C にて保存した後、分析を行った。

2. 分析

ビタミン B₁₂ の分析は、Watanabe ら⁵⁾ の報告によるビタミン B₁₂ 要求株である乳酸菌 *Lactobacillus leichmanii* (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-21 に示す。

(1) 母乳中のビタミン B₁₂ のシアノコバラミンへの変換

操作の概略を図 1 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、中間層から採った 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、100°C にて 30 分間、加熱抽出した。冷却後、10% メタリン酸 15 μl 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。

(2) 計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのビタミン B₁₂ 量 (pg/tube) を求めた。これを x とし、母乳 1L 中のビタミン B₁₂ 量 (μg) を、 $\{x \text{ (pg/tube)} / \text{分注した試料量 (0.3 ml/tube)}\} \times \text{希釈倍率} \times \{1000 \text{ (}\mu\text{l)}^{*1} / 50 \text{ (}\mu\text{l)}^{*2}\} \times 1000^{*3} / 1000000^{*4} \times 0.83^{*5}$ より求めた。

*1: 母乳中間層中ビタミン B₁₂ をすべてシアノコバラミンにした後の量

*2: ビタミン B₁₂ をすべてシアノコバラミン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

3. 統計学的解析

数値はすべて平均 ± 標準偏差で表した。長期凍結保存前後の母乳中ビタミン B₁₂ 量の比較には, paired *t* - test を行い, *p* 値が 0.05 以下のとき, 統計的有意差があるものとした。計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 4 を使用した。

C. 結果

2年間凍結保存した母乳19検体のビタミン B₁₂ 量は $0.67 \pm 0.18 \mu\text{g/L}$ であった。同じ検体を長期凍結保存する前の測定値は $0.61 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$ であった。この結果の比較を図2に示した。

D. 考察

日本人の食事摂取基準 (2005 年版)³⁾における母乳中のビタミン B₁₂ 量は, 井戸田ら⁴⁾の報告結果を採用している。我々が測定した結果はこの採用値の約 4 倍の高値であった^{1,2)}。検体の処理法, 定量法に違いがないことから, 我々は検体の保存状態によって母乳中のビタミン B₁₂ 量の変動する可能性を考えた。しかし, 2年間の長期凍結保存前後の測定結果は一致するものであり, 母乳中のビタミン B₁₂ は -20°C で保存すれば安定であることが明らかとなった。

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) に関する研究」¹⁾および平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) に関する研究」²⁾において, 母乳 254 検体のビタミン B₁₂ 量は $0.84 \pm 0.40 \mu\text{g/L}$ であった。この値は, 日本人の食事摂取基準 (2005 年版)³⁾の採用値の約 4 倍であることから, 食事摂取基準の採用値を考え直す必要があると

考える。Watanabe ら日本人から得た母乳 126 検体のビタミン B₁₂ 量を測定しており, その測定結果は $0.94 \pm 0.53 \mu\text{g/L}$ であった⁵⁾。これは我々の測定結果と近似値である。我々の測定した 254 検体の値と Watanabe らが測定した 126 検体の値から, 日本人の母乳中ビタミン B₁₂ 量の平均値は $0.87 \mu\text{g/L}$ である。暫定的な値として, 母乳中のビタミン B₁₂ 量にはシアノコバラミン換算量として $0.87 \mu\text{g/L}$ を提案する。

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. 柴田克己. 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金, 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) に関する研究, 平成 17 年度総括・分担研究報告書. 2006.
2. 柴田克己. 平成 18 年度厚生労働科学研究

費補助金，循環器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）に関する研究，平成 18 年度総括・分担研究報告書，2007.

3. 厚生労働省．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．東京，2004.
4. 井戸田正，菅原牧裕，矢賀部隆史，佐藤則文，前田忠夫．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* (1996)10, 11-20.
5. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamazi R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, and Nakano Y, Biological activity of hydroxo-vitamin B12 degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* (1998) 46, 5177-80.

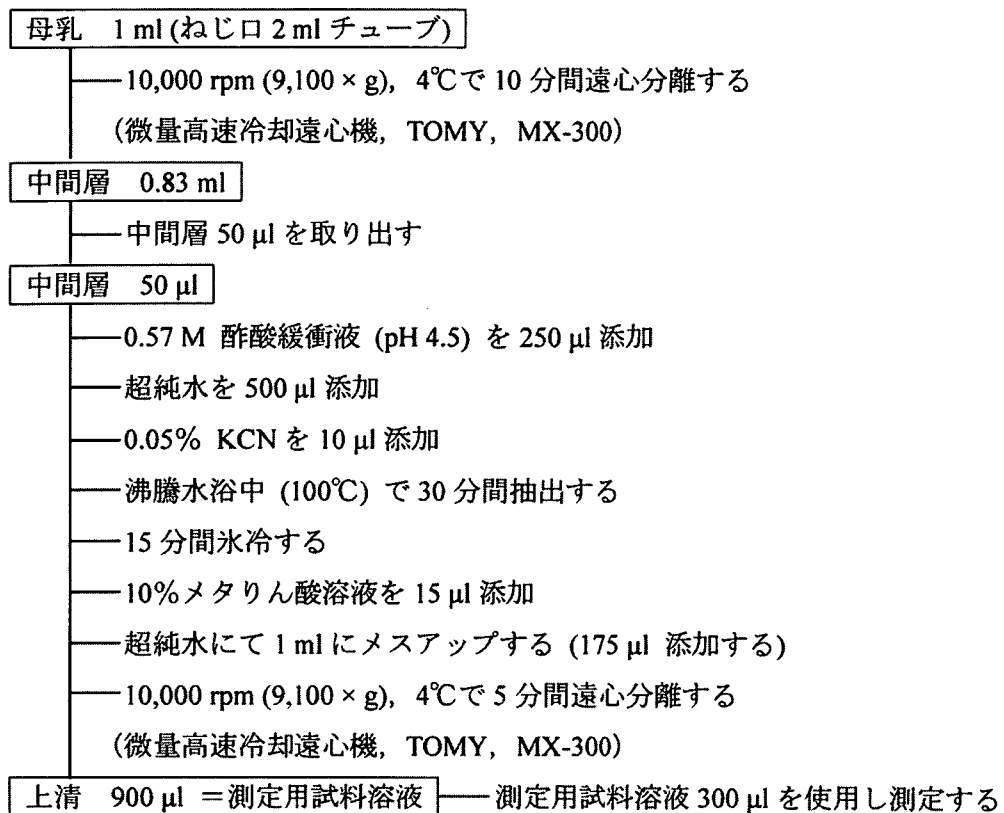


図 1. 母乳中ビタミン B₁₂ をシアノコバラミンへ変換するための操作

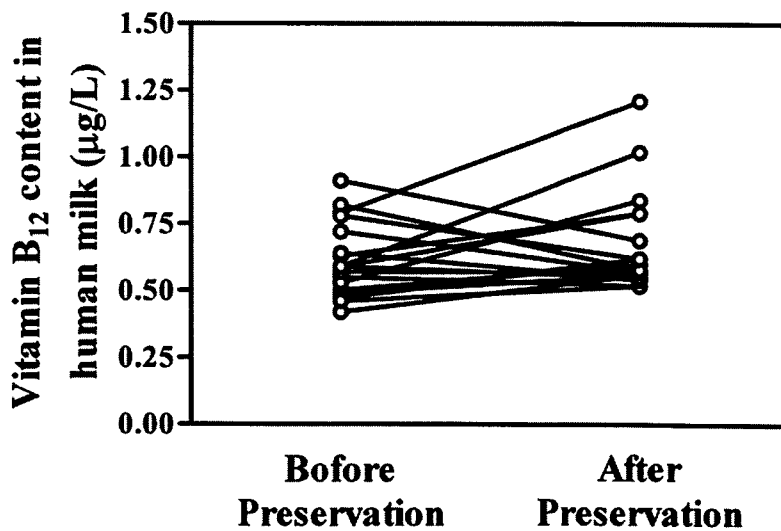


図 2. 2 年間の凍結保存が母乳中ビタミン B₁₂ 量におよぼす影響

各検体のビタミン B₁₂ 量の変動を線で結んだ (n = 19). ビタミン B₁₂ 量はシアノコバラミン換算量として示した.

平成 19 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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

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

14. 母乳中ビタミン濃度に影響を与える栄養因子の検索

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

平成 17, 18 年度に行われた、ヒトの母乳を用いて母乳中栄養素含量を求めた実験がある。その結果では、母乳中ビタミン濃度は個人間の変動が大きかった。同一人物内でも日内変動がみられた。これは母親のビタミン摂取量に起因するのではないかと考え、解析をおこなったが関係はみられなかった。そこで、母乳中ビタミン濃度に影響を及ぼす栄養因子を検索するために、ラットを用い、ビタミン摂取量を変化させ、母乳中ビタミン濃度に影響を及ぼすかラットを用いて実験を行った。その結果、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂ ではビタミン摂取量が少ないときに、母乳中ビタミン濃度も低くなった。ナイアシン、パントテン酸、ビオチンではビタミン摂取量に対して母乳中ビタミン濃度は濃度依存的に増加した。以上のことから、葉酸を除く 7 種類のビタミンでは摂取量が母乳中ビタミン濃度に影響を与えているが、葉酸では摂取量は影響を与えないことが明らかとなった。

A. 目的

平成 17, 18 年度に採集したヒトの母乳を用いて、母乳中水溶性ビタミン濃度を求めた。その結果、母乳中ビタミン濃度は個人間の変動が大きいことがわかった。このことから、ビタミン摂取量の違いが原因ではないかと考え、母親のビタミン摂取量と母乳中濃度との間に相関があるのか確かめるため解析を行ったが、相関はみられなかった。

そこで、過去に人を対象として、ビタミン摂取量と母乳中ビタミン濃度に関する論文があるか検索した。その結果、例えば、ビタミン B₁ では摂取量が増加すると母乳中濃度も増加するという報告と、反対に変化しないという報告があり、結果は様々であった。これは、人が対象であり、管理が難しかったためだと考え、管理のしやすい動物を用いて同じような研究が行われていないか検索した。

その結果、ナイアシン、パントテン酸に関する報告がないこと、そして、全ての水溶性ビタミンで同時に行われた研究がないことに着目した。

以上のことから、大きな目的を母乳中ビタミン濃度に影響を与える栄養因子の検索とした。中でも、本研究ではその栄養因子として、最も関連があると思われる水溶性ビタミンに焦点をあて、その摂取量が母乳中濃度に影響をおよぼすのか明らかにするため、実験を行った。

B. 実験方法

1. 動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は 22°C 前後、湿度は 50% 前後、午前 6 時～午後 6 時を明、午後 6 時～午前 6 時を暗とした。3 週齢の Wistar

系オスラット 7 匹、メスラット 22 匹を日本クレア (株) より購入した。オスラットは種付けとし、継続して飼育した。メスラットは 0.2% ビタミン混合食群 7 匹、1.0% ビタミン混合食群 8 匹、4.0% ビタミン混合食群 7 匹にわけた。試料組成を表 1 に示した。今回、低い群設定を 0.2% ビタミン混合食群にしたのは、過去に行われたビタミン添加実験の際に、0.2% ビタミン混合食群で飼育したラットに成長障害がみられたため、軽度の欠乏状態である 0.2% ビタミン混合食群で飼育することにした。一方、高い群設定を 4.0% ビタミン混合食群にしたのは、食事の影響をみるため、過剰症が出ない範囲内で非常に大きな値にするためである。

飼育方法として、はじめの 1 週間は環境に慣れさせるため飼育した。その後、1 週間の交配期間の後、メスラットのみ出産用ケージに移動させ、出産させた。出産後、子ラットの数による影響をなくすため、出産翌日に 1 匹の母親に対し、子ラットを 6 匹ずつにそろえた。

2. 搾乳方法

搾乳は出産した日を出産後 1 日目と数え、出産後 4, 9, 13, 17, 21 日目に行った。まず、搾乳当日の午前 9 時、母ラットの母乳をためるため母ラットと子ラットを離し、別々のケージで飼育した。その際に子ラットは体重を測定した。そして、午後 3 時頃から搾乳を行った。搾乳の方法を以下に示す。

- ①母ラットにネンブタール (劇薬 全身麻酔剤 2.5g / 50 ml 入り 室温保存 大日本住友製薬株式会社) を約 100 μ l、腹空内注射した (ラットの体重や麻酔にかかりやすい体質かどうかによって随時、微調整した)。
- ②母ラットにオキシトシン ($C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$)

FW1007.19 lyophilized power, ~50IU / mg solid (Prepared from oxytocin) 500 IU SIGMA 2 - 8°C保存) を 2.5 IU / 約 200 µl を腹腔内注射した。

- ③麻酔がかかり動かなくなった後、母ラットの乳房を生理食塩水で拭いた (乳房についての飼料や糞を取り除くため)。
- ④搾乳装置 (Automatic milker 実験動物用搾乳装置 WAT-2001 有限会社 リトルレオナルド) を用いて、乳房を指で軽くマッサージしながら搾乳した。全部で12個ある乳房から均等に搾乳し、計2ml程度集めた。
- ⑤搾乳した母乳は生理食塩水にて2倍希釈 (搾乳量が少なかった場合は3倍希釈) し、ねじロマイクロチューブに500 µl ずつ入れ、-20°Cにて冷凍保存した。
- ⑥母ラットは搾乳後、子ラットのもとへ返し、翌朝、通常通り世話をしていることを確認した。

3. 分析

3-1. ビタミン B₁ の分析方法

操作の概略図を図 1-1, 測定方法を図 1-2 に示した。

母乳を遠心分離して、クリーム状の上清を取り除いた。この試料 150 µl に 5% TCA 300 µl を加えて、遠心分離し、タンパク質を除去した。得られた上清を 0.45 µm のフィルターでろ過し、そのろ液を、直接 HPLC に注入した。福渡らの方法¹⁾による蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。

3-2. ビタミン B₂ の分析方法

操作の概略を図 2 に示した。

母乳中のビタミン B₂ は Lumiflavin 法にて測定した。まず、氷冷水 440 µl に母乳 100 µl を加え、80°C, 15 分間加熱した。冷却後、10%

TCA 200 µl を加え、遠心後、上清 200 µl をとり、1 M NaOH 200 µl 加えアルカリ性にした後、光照射 (10W, 30 分間, 常温) し、Lumiflavin にかえた。酢酸 20 µl を加え安定にさせた後、0.45 µm のフィルターでろ過し、そのろ液を、直接 HPLC に注入した。Ohkawa らの方法²⁾による蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。

3-3. ビタミン B₆ の分析

操作の概略図を図 3-1, 測定条件を図 3-2 に示した。

ねじロエッペンに母乳 0.3 ml と 5% メタリン酸溶液 0.3 ml を加え、5 分間振とうさせた。振とう後、12,900 rpm (15,000 × g), 4°C で 15 分間遠心し、上清を新しいねじロエッペンに移した。その後、ジクロロメタン 0.3 ml を加え、2 分間振とうさせた。振とう後、12,900 rpm (15,000 × g), 4°C で 15 分間遠心し、上清を 0.45 µm のフィルターでろ過した。ろ液 20 µl を HPLC システムに注入した。

3-4. ビタミン B₁₂ の分析方法

操作の概略を図 4 に示した。

Lactobacillus leichmanii ATCC 7830 を用いた微生物定量法を用いて、ビタミン B₁₂ 量を測定した³⁾。母乳を遠心分離して、クリーム状の上層を取り除いた。この試料 50 µl に、0.57 M 酢酸緩衝溶液 (pH 4.5) 250 µl, 超純水 500 µl, 0.05% KCN 10 µl を加え、加熱抽出 (100°C, 30 分間) する。冷却後、10% メタリン酸 15 µl を加え、遠心分離後の上清を測定用試料溶液とした。

3-5. 葉酸

操作の概略を図 5 に示した。

乳酸菌 *Lactobacillus rhammosus* ATCC 27773 を用いた微生物定量法を用いて、葉酸量を測定した⁴⁾。母乳 20 µl に生理食塩水 1000 µl

とプロテアーゼ溶液 500 μ l を加え、37°C で 48 時間反応させ、100°C で 10 分間熱し、冷却した。そして、コンシュガーゼ溶液 50 μ l、L-システイン塩酸塩一水和物 1.25 mg を加え、37°C で 15 時間反応させる。酵素を失活させた後、氷冷し、遠心分離して上清をとり、測定用試料溶液とした。

3-6. ビオチンの分析方法

操作の概略を図 6 に示した。

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物定量法を用いてビオチン量を分析した⁵⁾。母乳 200 μ l に 2.25 M 硫酸溶液 200 μ l 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、適宜希釈したものを測定用試料溶液とした。

3-7. パントテン酸の分析

操作の概略を図 7-1、ハト肝パントテイナーゼの調製方法を図 7-2 に示した。

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 を用いた微生物定量法を用いてパントテン酸量を測定した⁶⁾。まず母乳中の補酵素型のパントテン酸を遊離型にするために、母乳 100 μ l にハト肝パントテイナーゼ 100 μ l、10U/ml ホスファターゼ 100 μ l、15 μ g/ml 還元型グルタチオン 100 μ l を加え、インキュベーションを 37°C、15-24 時間行った。そこへ、50 mM KPB (pH 7.0) 600 μ l 加え、100°C、5 分間加熱し、氷冷後、遠心分離した。その中間層を測定用試料溶液とした。

3-8. ナイアシンの分析方法

操作の概略を図 8 に示した。

母乳 1.5 ml を遠心分離し、クリーム層を取らないように注意しながら上層を 0.15 ml 取り、ねじロチューブに入れる。1 μ g/ml のイソニコチンアミドを 1.35 ml 加え、混和後、

121°C、10 分間オートクレーブする。これは、NAD などの補酵素型のニコチンアミドを有利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、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 分間放置した後、遠心分離した。

この上清を 1 ml 取り、炭酸カリウム 1.2 g を加え、ジエチルエーテルで抽出した後、乾固させ、超純水 500 μ l で溶解、0.45 μ m のフィルターでろ過し、そのろ液を直接 HPLC に注入した。HPLC の分析は Shibata ら⁷⁾ の方法に従った。なお、ニコチン酸はアルカリ性ジエチルエーテルでは抽出されない。

C. 結果

1. ビタミン摂取量の違いが出産に与える影響

表 2 に出産前後の母ラットの数を示した。出産に用いたメスラットの数と搾乳することができた子ラットの数からその割合を求めた。ビタミン摂取量が多くなると、搾乳することができるラットの数が多くなった。

2. ビタミン摂取量の違いが子ラットの成長に与える影響

図 9 にビタミン摂取量の違いが子ラットの成長に与える影響を示した。母ラットのビタミン摂取量に変化しても、子ラットの成長には影響はみられなかった。

3. ビタミン摂取量の違いが母乳中ビタミン濃度に与える影響

ラットの母乳中水溶性ビタミン濃度を測定した。その結果、ビタミン摂取量の違いが母乳中ビタミン濃度に及ぼす影響の現れ方によって、3 つに分類することができた。

① ビタミン摂取量が少ない (0.2% ビタミ