

ビタミンB₂

尿中のビタミン B₂ は、リボフラビン (Rf) を測定した。測定方法は、Ohkawa らの方法³⁾による、蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については、表 3 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)

リン酸二水素カリウムを 6.8 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 500 ml とした。別にリン酸水素二カリウムを 8.7 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 500 ml とした。リン酸水素二カリウム溶液にリン酸二水素カリウム溶液を加えていき、pH を 7.0 に合わせた。

② 6 M 水酸化ナトリウム

水酸化ナトリウムを 24.0 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 100 ml とした。

③ 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5

リン酸二水素ナトリウム二水和物を 31.2 g 秤量し、水 170 ml に溶解した。6 M 水酸化ナトリウムを加えていき、pH を 5.5 に合わせた後、水を加えて全量を 200 ml とした。

④ HPLC 用の移動相

7 ml の 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5)、300 ml のメタノール及び 693 ml の水をよく混和した。

(2) 標準溶液の調製

① リボフラビン (分子量 376.36、和光純薬工業株式会社、大阪) を 10 mg 秤量し、10 ml の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加えてよく混和した。0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)

を対照として、この溶液の吸光度 (445 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{445\text{ nm}} = 12,500$ より正確な濃度 (μM) を求めた。この溶液を 0.1 ml 取り、0.9 ml の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加えて混和した。これをリボフラビン標準溶液とした。

(3) サンプルの使用方法

測定試料である尿は、10,000 rpm (9,100×g)、4°C で 5 分間遠心した後、マイクロフィルターを通してろ過した。ろ液 20 μl を HPLC システムに注入した。リボフラビン標準溶液はそのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にて希釈を行い測定試料とした。

(4) 計算方法

① リボフラビン標準溶液を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 尿を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

ラット・マウスの場合 (nmol / day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの Rf 標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1 / 1000)^{*1} × 希釈倍率

ヒト尿の場合 (nmol / day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの Rf 標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1 / 1000)^{*1} × 希釈倍率 × (10 / 9)^{*2}

*1: 単位を pmol から nmol にするため

*2: 尿を 1 M HCl (9 : 1, v / v) に処理を行い保存しているため

ビタミンB₆

ビタミン B₆ の尿中の測定には、異化代謝産物である 4-ピリドキシニン酸 (4-PIC) を測

定した。測定方法は、Gregory と Kirk の方法⁴⁾による、蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については、表 4 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)

リン酸二水素カリウムを 6.8 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 50 ml とした。別にリン酸水素二カリウムを 8.7 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 50 ml とした。リン酸水素二カリウム溶液にリン酸二水素カリウム溶液を加えていき、pH メータを用いて、pH を 7.5 に合わせた。pH を合わせた溶液 5 ml を取り、水を加えて全量を 1000 ml とした。

② 12.5 M 水酸化カリウム

水酸化カリウムを 50 g 秤量し、氷冷しながら約 50 ml の水で溶解した後、水を加えて全量を 100 ml とした。

③ HPLC 用の移動相

水 800 ml にリン酸 6.9 ml を添加し、次に 12.5 M 水酸化カリウムを加えて pH を 2.2 に合わせた後、水を加えて全量を 2700 ml とした。この緩衝液にメタノール 300 ml を加えてよく混和した。

(2) 標準溶液の調製

① 4-PIC (分子量 183.2。シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京) を 10 mg 秤量し、10 ml の 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を加えてよく混和した。5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を対照として、この溶液の吸光度 (316 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{316 \text{ nm}} = 5970$ より正確な濃度 (pmol) を求めた。この溶液を 0.1

ml 採り、0.9 ml の 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を加えて混和した。これを 4-PIC 標準溶液とした。

(3) サンプルの使用法

測定試料である尿は、10,000 rpm (9,100×g)、4°C で 3 分間遠心した後、マイクロフィルターを通してろ過する。ろ液 20 μl を HPLC システムに注入した。4-PIC 標準溶液はそのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とする。

(4) 計算方法

① 4-PIC 標準溶液を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 尿を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

ラット・マウスの場合 (nmol / day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの 4-PIC 標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1 / 1000)^{*1} × 希釈倍率

ヒト尿の場合 (μmol / day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの 4-PIC 標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1 / 1000000)^{*2} × 希釈倍率 × (10 / 9)^{*3}

*1: 単位を pmol から nmol にするため

*2: 単位を pmol から μmol にするため

*3: 尿を 1 M HCl (9 : 1, v/v) に処理を行い保存しているため

ビタミン B₁₂

尿は前処理を行い、測定用試料とした。尿中のビタミン B₁₂ 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 (American Type Culture Collection, USA) を用いた微生物

物学的定量法を基に改変した，以下に記す方法で測定した。

(1) 保存用寒天培地・継代用斜面寒天培地の作成方法

- ① 表 5 に示したライヒマニ保存用基礎培地 (日本製薬株式会社，東京) 4.97 g 秤量し，ビーカーに入れ，水 100 ml を加えて沸騰水浴中で加熱溶解させた (通常 20 分程度)。
- ② 直ちに溶解させた培地を 50℃ くらいまで自然放置した。
- ③ ② で作成した培地 (冷えすぎると固まる) をネジロ試験管 (16.5 mm × 105 mm，丸底，株式会社マルエム，大阪) に 4 ml ずつ分注した。
- ④ オートクレーブ (121℃，5 分) 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 6 に示したライヒマニ接種用培地 (日本製薬株式会社，東京) 3.47 g を秤量し，ビーカーに入れ，水 100 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℃ に冷却した。
- ③ ② で作成した培地を試験管 (12 × 120 mm，旭テクノガラス株式会社，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℃，5 分) 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) ビタミン B₁₂ 定量用培地の作成方法 (当

日調製)

- ① 表 7 に示したビタミン B₁₂ 定量用基礎培地 (日本製薬株式会社，東京) 8.3 g 秤量し，ビーカーに入れ，水 80 ml を加えて沸騰水浴中で加熱溶解させた (通常 20 分程度)。
- ② 直ちに溶解させた培地を氷水中にて 20℃ まで冷却した。
- ③ 添付のポリソルベート 80 溶液 2.0 ml を加え，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℃ 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℃ 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℃ 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して平面保存用寒天培地に尖刺し，37℃ 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培養してある菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後，遠心分離 (1,000 × g，20℃，5 分) し，沈殿部分の菌体を得た。
- ② 菌体を 0.9% 滅菌 NaCl 5 ml に懸濁し，遠心分離 (1,000 × g，20℃，5 分) 後，再び 0.9% 滅菌 NaCl 5 ml で洗浄した。この洗浄操作を計 5 回行った。

③ 最終的に集めた菌体を接種用菌体液とした。

(6) 定量操作方法

① 表 8 に従って溶液を定量用試験管 (12 × 75 mm, アズワン株式会社, 大阪) に分注した。検量線用のビタミン B₁₂ 標準溶液にはシアノコバラミン (分子量 1355.4, 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。

② 分注した試験管にキャップをし, オートクレーブ (110°C, 3 分) を用いて滅菌し, 終了後直ちに氷冷した。その後, (5)-③の試験管に, 調製した接種用菌体液を 20 μl ずつ分注した。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 37°C で 20 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, 未知試料中のビタミン B₁₂ 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ビタミン B₁₂ 量 (pg / tube) を求めた。これを x とし, 尿中のビタミン B₁₂ 量 (pmol / day) を, $\{x \text{ (pg / tube)} / \text{分注した試料量 (0.5 ml / tube)}\} \times (\text{希釈倍率}) \times \{1.8 \text{ (ml)}^{*1} / 0.9 \text{ (ml)}^{*2}\} \times \text{尿量 (ml)} / 1355.4^{*3}$ より求めた。

*¹: 尿中ビタミン B₁₂ をすべて遊離型にした後の量

*²: ビタミン B₁₂ をすべて遊離型にした時に用いた尿量

*³: シアノコバラミンの分子量

(8) サンプルの使用方法

尿の前処理について, 以下に示した。

① 尿 0.9 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.8) 0.18 ml, 水 0.68 ml, 0.025% KCN 0.02 ml をサンプルストックチューブ (2 ml, ビーエム機器株式会社, 東京) に分注した。

② キャップをし, オートクレーブ (120°C, 5 分) を用いて滅菌し, 終了後直ちに氷冷した。

③ 10% メタリン酸溶液 0.02 ml を加え, 遠心分離 (9,100 × g, 3 分) し, その上清を測定の見本とした。通常, ヒト尿の場合は 500 μl で, ラット尿の場合は 100 μl 使用すれば, 検量線内に入る。

ナイアシン

ナイアシンの尿中の測定には, 異化代謝産物であるニコチンアミド (Nam), N¹-メチルニコチンアミド (MNA), N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) を測定した。Nam, 2-Py, 4-Py の測定方法は, Shibata の方法⁶⁾による, UV 検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については, 表 9 に示した。また, MNA の測定方法は, Shibata の方法⁷⁾による, 蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については, 表 10 に示した。

Nam, 2-Py, 4-Py

(1) 試薬類の調製方法

① 1 M KH₂PO₄ (pH 3.0)

136.09 g の KH₂PO₄ を秤量し, 水を 800 ml 加え, 完全に溶解した。この液にリン酸を滴下し, pH メーターを使い, pH を 3.0 に調整した。そして, 水で 1000 ml にした。

② HPLC 用の移動相

水 990 ml に 1 M KH_2PO_4 10 ml を添加し、次にアセトニトリルを 41.7 ml を加えてよく混和した。

(2) 標準溶液の調製

① イソニコチンアミド標準

イソニコチンアミド (分子量 122.12. 和光純薬工業株式会社, 大阪) を 1.0 mg 秤量し、水 1 ml に溶解した。この液を内部標準として尿サンプルを処理する時に、使用した。またこの内部標準を、0.1 ml 取り、水を 4.9 ml 加え、50 倍希釈した。これを標準液として使用した。

② ニコチンアミド標準

ニコチンアミド (分子量 122.12. 和光純薬工業株式会社, 大阪) を 2.0 mg 秤量し、水 2 ml に溶解した。この溶液を 0.1 ml を取り、水を 4.9 ml を加えてよく混和した。水を対照として、この溶液の吸光度 (262 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{262\text{nm}} = 3,300$ より正確な濃度 (μM) を求めた。これをニコチンアミド標準溶液とした。

③ 2-Py 標準

2-Py (分子量 167.12. 和光純薬工業株式会社, 大阪) を 2.0 mg 秤量し、水 2 ml に溶解した。この溶液を 0.1 ml を取り、水を 9.9 ml を加えてよく混和した。水を対照として、この溶液の吸光度 (262 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{260\text{nm}} = 14,516$ より正確な濃度 (μM) を求めた。これを 2-Py 標準溶液とした。

(3) サンプルの使用法

図 3 に示した方法に従い、尿 1 ml に炭酸カリウム 1.2 g を添加した後、ジエチルエーテル 10 ml を加えてよく混合し、エーテル層を蒸発乾固させた。この乾固物を水 0.5 ml に溶解し、マイクロフィルターで濾過し、20 μl を HPLC システムに注入した。イソニコチンア

ミド、ニコチンアミド標準溶液及び、2-Py 標準溶液は、そのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については、用いた尿を 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とした。

(4) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い、定量は内部標準であるイソニコチンアミドのピーク面積から回収率を求め、ニコチンアミド、2-Py、4-Py 量を以下の式により算出した。

① 回収率を計算した。

回収率 (%) = 試料のイソニコチンアミド検出 AREA / イソニコチンアミド標準 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の 20 μl 検出 AREA $\times 100$

② 各標準溶液を HPLC に流し、1 nmol あたりの面積を計算した。

③ 尿を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

(検出 AREA / おおのこの 1 nmol 当たりの AREA) \times (500 $\mu\text{l}/20 \mu\text{l}$) \times (1 日の尿量 (ml) / 1 ml) \times (100 / 回収率 (%))

MNA

(1) 試薬類の調製方法

① 1 M KH_2PO_4 (pH 3.0)

136.09 g の KH_2PO_4 を秤量し、水を 800 ml 加え、完全に溶解した。この液にリン酸を滴下し、pH メーターを使い、pH を 3.0 に調整した。そして、水で 1000 ml にした。

② 100 mM EDTA-2Na

EDTA-2Na を 0.372 g 秤量し、10 ml の水に溶かした。

③ 6 M 水酸化ナトリウム

水酸化ナトリウムを 120 g 秤量し、250 ml 程度の水で溶かした。(このとき、刺激臭と熱を発生するのでドラフト内で水で冷やしながら行なった。) メスシリンダーにて水で 500 ml にした。

④ 100 mM アセトフェノン in エタノール
アセトフェノンを 2.4 g 秤量し、エタノールにて 200 ml にした。

⑤ 1 M Isonicotinamide
イソニコチンアミドを 1.22 g 秤量し、水にて 10 ml にした。

⑥ HPLC 用の移動相
超純水 969 ml に、1 M KH_2PO_4 (pH 3.0) 30 ml と、100 mM EDTA-2Na 1 ml と、1-Heptane-sulfonic acid sodium salt 1 g と、アセトニトリルを 290 ml を加えてよく混和した。

(2) 標準溶液の調製

① MNA 標準

MNA (分子量 172.61, 東京化成工業株式会社, 東京) は MNA-Cl を 0.002 g 秤量し、水を 2 ml 加えて溶解した。

② ①の溶液を 0.1 ml を取り、水を 4.9 ml を加えてよく混和した。水を対照として、この溶液の吸光度 (265 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{264.6 \text{ nm}} = 4,940$ より正確な濃度 (μM) を求めた。これを MNA 標準溶液とした。

(3) サンプルの使用法

図 4 に示した方法に従い、尿 0.1 ml, 水 0.7 ml, 1 M イソニコチンアミド溶液 0.2 ml, 0.1 M アセトフェノン溶液 0.5 ml を混合した後、6 M NaOH 溶液 1 ml を加えて 10 分間氷冷し、99%ギ酸 0.5 ml を加えて 15 分間室温で放置した。沸騰水浴中で 5 分間放置した後、十分に氷冷し、遠心上清をマイクロフィルターで濾過し、20 μl を HPLC システムに注入した。MNA 標準溶液は、そのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については、用いた尿を 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とした。

(4) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い、定量

は MNA 量を以下の式により算出した。

① 20 μl と 40 μl の標準より、1 pmol 当たりの AREA を計算し、平均を取る。

1) 20 μl の標準: 標準の濃度 (mol/l) $\times 20 \times 10^{-6}$ (L) = a (pmol)

この液が 3 ml 中に含まれるので、HPLC に注入した 20 μl 中には

$a \times (20 / 3000) = \underline{A}$ が含まれていることになる。

2) 40 μl の標準: 標準の濃度 (mol/l) $\times 40 \times 10^{-6}$ (L) = b (pmol)

この液が 3 ml 中に含まれるので、HPLC に注入した 20 μl 中には

$b \times (20 / 3000) = \underline{B}$ が含まれていることになる。

② 検出 AREA / 1 pmol 当たりの AREA $\times 3000^{*1} / 20^{*2} \times 1$ 日の尿量 (ml) / $0.1^{*3} \times 10^{-3} =$ _____ nmol / day

*1 : 全量

*2 : インジェクションした量

*3 : 使用した尿量

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⁸⁾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。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 11 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水で全容を 100 ml にした.
3. 1. で作成した培地 (冷えすぎると固まる) をネジロ試験管 (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 分) 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 11 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 分) 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 12 に示したパントテン酸定量用培地 (日本製薬株式会社, 東京) 11.55 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 16 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 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)-2 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 (3,000 rpm, 20°C, 10 分) 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 (3,000 rpm, 20°C, 5 分) 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 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. 表 13 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 μ l ずつ分注した。
3. 30°C で 20~24 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 5 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 (μ l) 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) / 1000 より尿中のパントテン酸量 (μ mol / day) を求めた。

(8) サンプルの使用法

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 10 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

葉酸は、Aiso ら⁹⁾の報告による、葉酸要求株である乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 (American Type Culture Collection, USA) を用いた微生物定量法を基に改変した以下に記す方法で測定した。

(1) 保存用寒天培地・継代用斜面寒天培地の作成方法

- ① 表 11 に組成を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) 2.0 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 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 \times 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 分) 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) 継代用液体培地の作成方法

- ① 表 11 に組成を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 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 \times 120 mm) 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 分) 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) 葉酸定量用培地の作成方法 (当日調製)

- ① 表 14 に組成を示した 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 分) 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 µl 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) 定量操作方法

(5)-1. 接種用菌の作成方法

- ① 4-③の操作で得た液体培地に培養してある菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後、遠心分離(3,000 rpm, 20°C, 10分)し、沈殿部分の菌体を得た。
- ② 菌体を0.9% 滅菌 NaCl 5 ml に懸濁し、遠心分離(3,000 rpm, 20°C, 5分)後、再び0.9% 滅菌 NaCl 5 ml 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0.9% 滅菌 NaCl 5 ml に懸濁させた。さらにその懸濁液50 µl を0.9% 滅菌 NaCl 5 ml に懸濁させ、これを接種用菌体液とした。

(5)-2. 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分)し、氷冷しておいた。
- ② 表15に従って溶液を定量用試験管(12×75 mm)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(分子量441.4, 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 µl 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6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葉酸量 (ng / tube) を求めた。これを x とし、尿中の葉酸量を、 $x /$ 分注した試料量 (50 µl) \times 希釈倍率 $\times 1000 \times$ 尿量 (ml) $\times 10 / 9 / 441.4$ (プテロイルモノグルタミン酸の分子量) より尿中の葉酸量 (nmol / day) 求めた。

(7) サンプルの使用方法

尿は水にて適度に希釈し、直接測定の試料にした。通常、ヒト尿の場合は5倍希釈、ラット尿の場合は20倍希釈したものを50 µl 使用すれば、検量線内に入る。

ビオチン

尿中のビオチンは、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法^{10,11)}を基に改変した方法で測定した。以下にその方法を示す。

(1) 保存用培地及び斜面培地の作成

- ① 表11に組成を示した「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 をビーカーに秤量し、水 90 ml を加え、沸騰水浴中で加熱溶解した (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させた後、水にて全容を 100 ml にした。

③ ②の液 (冷えすぎると固まる) をねじ口試験管 (16.5 mm × 105 mm, 丸底, 株式会社マルエム, 大阪) 4 ml ずつに分注し、軽くふたをした。

④ オートクレーブ (121°C, 10 分) 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) 接種用液体培地の作成

① 表 11 に組成を示した「一般乳酸菌接種用培地」3.96 g に水 90 ml を加え、沸騰水浴中で加熱溶解した (通常 10 分程度)。

② 直ちに溶解させた培地を 20°C くらいまで冷却した後、水にて全容を 100 ml にした。

③ ②で作成した培地を試験管 (12 × 120 mm) 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 分) 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) ビオチン定量用培地の作成 (当日調製)

ビオチン定量用基礎培地 (日水製薬株式会社, 東京) の組成を表 16 に示した。ビオチン定量用培地 7.7 g を秤量し、水を 90 ml 加え、沸騰水浴中で 10 分間加熱溶解した。直ちに氷水中で冷却後、水にて全容を 100 ml にした。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 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (American Type Culture Collection, USA) が植えてある「保存用平面寒天培地」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 時間培養した。

② 活力の高い菌を得るために、培養した「継代用斜面寒天培地」から新しい「継代用斜面寒天培地」に塗布し、菌を繁殖させるために 37°C で 20 時間培養した。

③ 液体培地に「継代用斜面寒天培地」から一白金耳とり、菌を繁殖させるために 37°C で 20 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) 定量操作方法

(5)-1 接種用菌の作成方法

① (4)-③の操作で得た菌浮遊溶液を 1,000 × g, 20°C で 5 分間遠心分離し、沈殿部分の菌体を得た。

② 菌体を 0.9 % 滅菌 NaCl 5 ml に懸濁し、遠心分離 (1,000 × g, 20°C, 5 min) 後、再び 0.9 % 滅菌 NaCl 5 ml 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に滅菌生理食塩水 5 ml を加えた菌懸濁液 (660 nm の吸光度が 1.0 になるように調製すること) から 50 μl 取り、滅菌生理食塩水 5 ml を加えた液を接種菌溶液とした。

(5)-2 定量方法

① 表 17 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。検量線用のビオチン標準溶液には (+)-ビオチン (分子量 244.3, 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.

② 試験管にアルミキャップをしてオートクレーブで 121°C, 5 分間, 加熱滅菌した.

③ ただちに氷水中で冷却後, 各試験管に接種菌溶液を 50 μ l ずつ無菌的に分注した. ビオチン標準溶液 0 μ l のうち一本は欠菌とし, 接種菌溶液を分注しなかった.

④ 37°C で 21 時間培養した.

⑤ 分光光度計を 660 nm の波長にし, 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. (ビオチン標準溶液 0 μ l (有菌) の吸光度が 0 であることを確認すること). 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 7 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オチン量 (ng / tube) を求めた. これを x とし, 尿中のビオチン量を, x / 分注した試料量 (50 μ l) \times 希釈倍率 \times 1000 / 244.3 (ビオチンの分子量) \times 尿量 (ml) より尿中ビオチン量 (nmol / day) を求めた.

(7) サンプルの使用法

尿は水にて適宜希釈し, そのまま測定用試料とした. 通常, ヒト尿の場合は 20 倍希釈, 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.

ビタミン C

尿中アスコルビン酸 (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¹²⁾による, UV 検出器を装備した HPLC にて行った.

HPLC システムの分析条件については, 表 18 に示した.

(1) 試薬類の調製方法

① 5% メタリン酸溶液

メタリン酸を 135.14 g 秤量し, 水を加えて溶解した後, 全量を 1000 ml とした.

② 1% 塩化すず / 5% メタリン酸溶液

塩化すずを 0.1 g 秤量し, 10 ml の 5% メタリン酸溶液にて溶解した. 用時調製とした. また, 使用するまで氷冷した.

③ 0.2% Indophenol 溶液

2,6-Dichlorophenol-indophenol sodium salt dihydrate を 0.1 g 秤量し, 水を加えて溶解した後, 全量を 50 ml とした. 調製後は遮光した上で冷蔵保存し, 1 週間以内に使用した.

④ 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン / 4.5 M 硫酸溶液

18 M 硫酸 44 ml と水 56 ml を混合し, 4.5 M 硫酸を調製した. 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを 2 g 秤量し, 調製した 4.5 M 硫酸 100 ml に加えて溶解した. 調製後は遮光して室温に保存し, 1 か月以内に使用した.

⑤ 10% トリエチルアミン溶液 (pH 3.0)

トリエチルアミンを 10 g 秤量し, 約 80 ml の水を加えて溶解した. これに, リン酸を少量ずつ添加して pH を 3.0 に調整した後, 水を加えて全量を 100 ml とした. 調製後は冷蔵保存した.

⑥ HPLC 用の移動相

10% トリエチルアミン溶液を 6 ml に, 水を加えて全量を 600 ml とし, 0.1% トリエチルアミン溶液を調製した. アセトニトリル 500 ml に, 0.1% トリエチルアミン溶液を加えて全量を 1000 ml とした.

(2) AsA 標準溶液の調製

AsA (分子量 176.13. 和光純薬工業株式会

社, 東京) を 35 mg 秤量し, 5% メタリン酸溶液 10 ml に溶解した. この AsA 標準溶液を 50 μ l 取り, 5% メタリン酸溶液 4.95 ml を加えて混合した. その混合した溶液を 2.5 ml 取り, 5% メタリン酸 7.5 ml を加えて攪拌した. 5% メタリン酸溶液を対照として, この溶液の吸光度 (243 nm) を測定し, 分子吸光係数 $\epsilon_{243 \text{ nm}} = 10,000$ より正確な濃度 (μ M) を求めた. これを検量線用 AsA 標準溶液①とした.

検量線用 AsA 標準溶液①0.25 ml に 5% メタリン酸溶液 0.75 ml を加え混合した. これを検量線用標準溶液②とした.

検量線用 AsA 標準溶液①0.5 ml に 5% メタリン酸溶液 0.5 ml を加え混合した. これを検量線用標準溶液③とした.

検量線用 AsA 標準溶液①0.75 ml に 5% メタリン酸溶液 0.25 ml を加え混合した. これを検量線用標準溶液④とした.

(3) サンプルの使用方法

(2) で調製した検量線用 AsA 標準溶液①~④, 測定試料の各 100 μ l について, 以下の処理を行い, 最終試料の 20 μ l を HPLC システムに注入した.

- ① 0.2% Indophenol 溶液 100 μ l を加えて混和した.
- ② 1% 塩化すず / 5%メタリン酸溶液 50 μ l を加えて混和した.
- ③ 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン / 4.5 M 硫酸溶液 120 μ l を加えて混和した.
- ④ 50°Cに設定したインキュベーターにて 1.5 時間加温した.
- ⑤ 水 1 ml を加えて混和した.
- ⑥ 酢酸エチル 1 ml を加えた.
- ⑦ 振とう機にて, 5 分間振とうした.
- ⑧ 780 \times g で 1 分間遠心した.
- ⑨ 酢酸エチル層 600 μ l を別の容器に分取し

た.

⑩ 遠心エバポレータで乾固させた (35°C, 30 分間).

⑪ アセトニトリル 200 μ l を添加し, タッチミキサーで攪拌して, 乾固物を溶解した.

⑫ ミクロフィルターにてろ過し, 最終試料とした.

(注意事項)

遠心エバポレータは, 使用 1 時間前に冷却トラップを作動させておいた.

濃度の高い試料については, 5% メタリン酸溶液にて希釈を行い測定試料とした.

(5) 計算方法

① 検量線用 AsA 標準溶液①~⑤を HPLC に流し, 1 pmol あたりの面積を計算した.

② 測定試料 (尿) を HPLC に流し, 面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた.

尿中 AsA 濃度 (μ mol / day)

$$= \text{測定試料の面積} / (1 \text{ pmol あたりの AsA 標準面積}) \times (1000 \mu\text{l} / 600 \mu\text{l}) \times \{200 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l} (\text{HPLC 試料注入量})\} \times (1 \text{ 日の尿量 ml} / 0.05 \text{ ml}) \times (1/10^6)^{*1} \times \text{希釈倍率}$$

*1: 単位を pmol から μ mol にするため

尿中キノリン酸、クレアチニンの定量方法

キノリン酸

尿中のキノリン酸測定方法は、Mawatariらの方法¹³⁾による、蛍光検出器を装備したHPLCにて行った。HPLCシステムの分析条件については、表19に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 0.2 M クエン酸溶液

クエン酸一水和物 2.10 g を秤量し、水にて 50 ml にした。

② 1 M KH₂PO₄ (pH was adjusted to 3.8 by 0.2 M citric acid)

136.09 g の KH₂PO₄ を秤量し、水を 800 ml 加え、完全に溶解した。この液に 0.2 M クエン酸溶液を滴下し、pH メーターを使い、pH を 3.8 に調整した。そして、水で 1000 ml にした。

③ HPLC 用の移動相

1 M KH₂PO₄ (pH was adjusted to 3.8 by 0.2 M citric acid) 50 ml, 過酸化水素を 40 ml, 15% TMA 30 μl を超純水で 1000 ml とした。

(2) キノリン酸標準溶液の調製

① キノリン酸 (分子量 167.12, 東京化成工業株式会社, 東京) を 0.1 g 秤量し、水を 10 ml 加えて溶解した。

② ①の溶液を 0.1 ml を取り、水を 0.9 ml を加えてよく混和した。

③ ②の溶液を 0.5 ml を取り、水を 4.5 ml を加えてよく混和した。

④ ③の溶液を 2 ml を取り、水を 8 ml を加えてよく混和した。水を対照として、この溶液の吸光度 (275 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{275 \text{ nm}} = 4,040$ より正確な濃度 (μM) を求めた。これをキノリン酸標準溶液とした。

(3) サンプルの使用法

測定試料である塩酸処理した尿は、10,000

rpm (9,100 × g), 4°C で 5 分間遠心した後、ミクロフィルターを通してろ過した。ろ液 20 μl を HPLC システムに注入した。キノリン標準溶液はそのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とした。

(4) 計算方法

① キノリン酸標準溶液を HPLC に流し、1 nmol あたりの面積を計算した。

② 尿を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

ラット・マウスの場合 (μmol / day)

= 測定試料の面積 / (1 nmol あたりのキノリン酸標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1 / 1000)^{*1} × 希釈倍率

ヒト尿の場合 (μmol / day)

= 測定試料の面積 / (1 nmol あたりのキノリン酸標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1 / 1000)^{*1} × 希釈倍率 × (10 / 9)^{*2}

*1: 単位を nmol から μmol にするため

*2: 尿を 1 M HCl (9 : 1, v / v) に処理を行い保存しているため

クレアチニン

尿はそのまま測定試料とした。尿中のクレアチニンは、以下に記す方法で測定した。以下にその方法を示す。

(1) 定量操作方法

① 表 20 に従って溶液を 1.5 ml チューブに分注し、攪拌後、37°C で加温した。検量線のクレアチニン標準溶液には作成にはクレアチニン (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。

② 正確に 20 分後、分光光度計を 500 nm の

波長にし、No.0のチューブで吸光度の0
合わせを行った。

- ③ 全て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
クレアチニン濃度を算出した。検量線は、
通常、図8のようになる。

(2) 計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのクレア
チニン量 ($\mu\text{g}/\text{tube}$) を求めた。これを x とし、
尿中のクレアチニン量 (g/day) を、 $\{x(\mu\text{g}/\text{tube})/\text{分注した試料量}(0.004\text{ ml}/\text{tube})\} \times \text{尿}$
量 (ml)/1000000^{*1} より求めた。

*1: 単位を μg から g にするため

(3) サンプルの使用方法

尿は直接測定試料とした。通常、ヒト尿の
場合は $4\ \mu\text{l}$ 使用すれば、検量線内に入る。

血液中水溶性ビタミンの定量方法

ビタミン B₁

ビタミン B₁ の血中測定は、全血中のチアミン、TMP、TDP の合計である総チアミンを測定した。測定方法は、尿中のチアミンの定量方法と同様である。チアミン・TMP・TDP 標準溶液の調製とサンプルの使用方法のみ以下に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 5% TCA 溶液

TCA (トリクロロ酢酸, 分子量 163.39) を 10 g 秤量し、水を 160 ml 加え溶解し、200 ml にメスアップした。

(2) 標準溶液の調製

チアミン標準溶液

① チアミン (Thiamin Hydrochloride, 分子量 337.27) を 16.9 mg を秤量し、5% TCA 溶液 10 ml に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。

③ ②を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。

④ ③を 1 ml 採り、9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。これをチアミン標準溶液とした。

TDP 標準溶液

① TDP (Thiamin pyrophosphate chloride, 分子量 460.8) を 23 mg を秤量し、5% TCA 溶液 10 ml に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。

③ ②を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。

④ ③を 1 ml 採り、9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。これを TDP 標準溶液とした。

TMP 標準溶液

① TMP (Thiamin monophosphate chloride, 分子量 416.8) を 20.8 mg を秤量し、5% TCA 溶液 10 ml に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。

③ ②を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。

④ ③を 1 ml 採り、9 ml の 5% TCA 溶液を加えてよく混和した。これを TMP 標準溶液とした。

(3) サンプルの使用方法

測定試料である全血 150 μ l に 5% TCA 溶液 300 μ l を加え混合した。この混合溶液を 10,000 rpm (9,100 \times g), 4°C で 5 分間遠心した後、上清をマイクロフィルターを通してろ過した。ろ液 50 μ l を HPLC システムに注入した。各標準溶液はそのまま各 50 μ l を HPLC に注入した。

(4) 計算方法

① 各標準溶液 50 μ l を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 測定試料 50 μ l を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき各濃度を求めた。

チアミン, TDP, TMP (pmol / ml)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの各標準面積) \times 0.3 ml^{*1} / (HPLC 試料注入量 0.05 ml) / 0.15^{*2}

*1 : 血液 150 μ l + 5% TCA 溶液 300 μ l の上清

*2 : 全血 1 ml あたりに換算

総チアミン (pmol / ml)

= チアミン + TDP + TMP

ビタミン B₂

ビタミン B₂ の血中測定は、リボフラビン、FMN, FAD をルミフラビンに光分解し、ル

ミフラビン量を測定することにより総リボフラビン量とした。測定方法は、尿中のリボフラビンの定量方法と同様である。ルミフラビン標準溶液の調製とサンプルの使用方法のみ以下に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 0.5 M H₂SO₄ 溶液

水 972.2 ml に H₂SO₄ (Sulfuric Acid, 18 M) 27.8 ml を少しずつ加え、混合した。

② 10% TCA 溶液

TCA (トリクロロ酢酸, 分子量 163.39) を 10 g 秤量し、水を 160 ml 加え溶解し、100 ml にメスアップした。

③ 1 M 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウムを 40 g 秤量し、水を加え溶解した後、全量を 100 ml とした。

(2) 標準溶液の調製

ルミフラビン標準溶液

① ルミフラビン (分子量 256.3) を 1.0 mg 秤量し、10 ml の水に溶解した。

② ①を 0.5 ml 採り、9.5 ml の水を加えてよく混和した。水を対照として、この溶液の吸光度 (441 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{441 \text{ nm}} = 10,900$ より正確な濃度 (μM) を求めた。この溶液を 0.02 ml 取り、1.180 ml の水を加えて混和した。これをルミフラビン標準溶液とした。

(3) サンプルの使用方法

水 440 μl を氷冷した遮光エッペンに入れ、測定試料である全血 100 μl を加えタッチミキサーで攪拌した。この混合溶液を氷中に 5 分間放置後、0.5 M H₂SO₄ 溶液 260 μl 加え、80°C で 15 分間反応させた。その後、氷中に 5 分間放置後、10% TCA 溶液 200 μl 加え、10,000 rpm (9,100 \times g), 4°C で 3 分間遠心した。遠心後、上清 200 μl をねじ口試験管に入れ、1 M

水酸化ナトリウム溶液 200 μl と混合し、室温で 30 分間光分解装置にて光照射させた。光照射後、酢酸 20 μl をドラフト内で加え、混合し、マイクロフィルターを通してろ過した。ろ液 100 μl を HPLC システムに注入した。各標準溶液はそのまま各 100 μl を HPLC に注入した。

また、転換率を求める為、既知濃度のリボフラビン標準溶液を測定試料として用いた。

(4) 計算方法

① ルミフラビン標準溶液 100 μl を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 転換率の算出

転換率 (%)

= 既知濃度リボフラビンの検出面積 / (1 pmol あたりのルミフラビン標準面積) / 4.76 μl $\times 100$

*1 : HPLC に注入された 100 μl 中に含まれる血漿量。もしくはリボフラビン量。

4.76 μl = 100 (全血量 μl) / 1000 (全試料量 μl) / 200 (光照射に用いた量 μl) $\times 100$ (注入量 μl) / 420 (光照射された全試料量 μl)

③ 測定試料 100 μl を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき各濃度を求めた。
総リボフラビン量 (pmol / ml)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの各標準面積) $\times 1000 \mu\text{l}^{*2}$ / 4.76 μl^{*1} $\times \{100 / \text{転換率} (\%) \}$

*2 : 全血 1 ml あたり

ビタミン B₆

ビタミン B₆ の血中測定は、血漿中のピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を測定した。測定方法は、Michael と Christine ら¹⁴⁾の報告による、蛍光検出器を装備した HPLC システムを基に改変して行った。HPLC システムの分

析条件については、表 21 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 5%メタリン酸溶液

メタリン酸を 1 g 採り超純水を 20 ml 加えた。

② HPLC 用の反応液 (22 mM 亜塩素酸ナトリウム溶液)

NaClO₂ (Sodium Chlorite, 分子量 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 1000 ml で溶解した。

③ HPLC 用の移動相 (5%アセトニトリルを含む 50 mM NaH₂PO₄ (pH 3.1) 溶液)

NaH₂PO₄·2H₂O (Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate, 分子量 156.01, 和光純薬工業株式会社, 室温保存) を 200 ml ビーカーに 7.8 g 秤量し, 超純水 180 ml 加え溶解した。その後, pH 3.1 になるようりん酸 (Phosphoric Acid, 分子量 98.00, 和光純薬工業株式会社, 室温保存)を加えた。最後にアセトニトリルを 50 ml 加え, 超純水で 1 L に定容した。

(2) 標準溶液の調製

① PLP 標準溶液

1. PLP (Pyridoxal Phosphate Monohydrate, 分子量 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) (冷凍保存)

2. 1 を 0.1 ml 取り, 超純水を 4.9 ml 加えて希釈した。この吸光度を測定し, $\epsilon_{388\text{ nm}} = 3441$ より正確な濃度を求めた。(100 $\mu\text{mol/l}$)

3. 2 を 0.1 ml 取り, 超純水を 0.9 ml 加えて希釈した。(10 $\mu\text{mol/l}$)

4. 3 を 0.1 ml 取り, 超純水を 0.9 ml 加えて希釈した。(1 $\mu\text{mol/l}$)

5. 4 を 0.5 ml 取り, 超純水を 0.5 ml 加え希釈し, これを標準液とした。(500 nmol/l)

(3) サンプルの使用方法

図 9 に示した方法に従い, 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 を HPLC システムに注入した。

(4) 計算方法

① PLP 標準溶液を HPLC に流し, 1 pmol あたりの面積を計算した。

② 測定試料 20 μl を HPLC に流し, 面積より以下の計算式に基づき各濃度を求めた。

PLP (nmol / ml)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの PLP 標準面積) × (0.6:血漿量 + 5%メタリン酸溶液量) ml / (0.3:血漿量) ml / (0.02:HPLC 試料注入量) ml × (1)^{*1} × (1/1000)^{*2} × 希釈倍率

*1: 血漿 1 ml あたりにするため

*2: 単位を pmol から nmol にするため

ビタミン B₁₂

ビタミン B₁₂ の血中測定は, 血漿中のシアノコバラミンを測定した。測定方法は, 尿中のビタミン B₁₂ の定量方法と同様である。サンプルの使用方法のみ以下に示した。

(1) サンプルの使用方法

① 血漿 50 μl , 0.57 M 酢酸緩衝液 (pH4.5) 250 μl , 水 500 μl , 0.05% KCN 10 μl をサンプルストックチューブ (2 ml, ビーエム機器株式会社, 東京) に分注した。

② 沸騰水中で 30 分間抽出を行い, 終了後

15 分間氷冷した。

- ③ 10%メタリン酸溶液 15 μl を加え、水 175 μl を加え 1 ml にした。
- ④ 遠心分離 (9,100 $\times g$, 5 分) し、その上清を測定の試料とした。通常、300 μl 使用すれば、検量線内に入る。

(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、血漿中のビタミン B₁₂ 量 (pmol / ml) を、 $\{x$ (pg / tube) / 分注した試料量 (0.3 ml / tube) $\} \times \{1$ (ml)^{*1} / 0.05 (ml)^{*2} $\} / 1355.4$ ^{*3} より求めた。

*1: 血漿中ビタミン B₁₂ をすべてシアノ化した後の量

*2: 使用した血漿量

*3: シアノコバラミン分子量

ナイアシン

ナイアシンの血中測定は、全血中のニコチンアミド、2-Py、4-Py の合計である総ニコチンアミドを測定した。測定方法は、尿中のニコチンアミド、2-Py、4-Py の定量方法と同様である。サンプルの使用法のみ以下に示した。

(1) サンプルの使用法

- ① 2 $\mu\text{g/ml}$ イソニコチンアミド 1.425 ml が入った、ねじロエッペンに全血 75 μl を加え混合した。
- ② オートクレーブ (120°C, 10 分) を用いて滅菌し、終了後直ちに氷冷した。
- ③ 遠心分離 (9,100 $\times g$, 10 分) し、その上清 1.2 ml を新しいねじロエッペンに分注し、70%過塩素酸 70 μl を加え混合した。
- ④ 5 分放置後、遠心分離 (9,100 $\times g$, 3 分) し、その上清を 1 ml をニコチンアミド、

2-Py、4-Py 定量の試料として使用した。

(2) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い、定量は内部標準であるイソニコチンアミドのピーク面積から回収率を求め、ニコチンアミド、2-Py、4-Py 量を以下の式により算出した。

① 回収率を計算した。

回収率 (%) = 試料のイソニコチンアミド 検出 AREA / イソニコチンアミド標準 (20 $\mu\text{g/ml}$) の 20 μl 検出 AREA $\times 100$

② 各標準溶液を HPLC に流し、1 nmol あたりの面積を計算した。

③ 尿を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

(検出 AREA / おおのこの 1 nmol 当たりの AREA) \times (500 μl ^{*1} / 20 μl ^{*2}) \times 1.5 ml^{*3} / 1 ml^{*4} \times 1.0 ml^{*5} / 0.075 ml^{*6} \times (100 / 回収率 (%))

*1: 全血量

*2: 注入量

*3: NAD, NADP を Nam に変換した処理後の全体量

*4: HPLC 注入試料に用いた量

*5: 全血 1 ml あたり

*6: NAD, NADP を Nam に変換した処理に用いた全血量

パントテン酸

パントテン酸の血中測定は、血漿中のパントテン酸を測定した。測定方法は、尿中のパントテン酸の定量方法と同様で、サンプルの血漿を直接測定の試料とし、血漿 20 μl を使用した。

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 (pmol / tube) を求めた。これを x とし、血漿中のパントテン酸量を、 x / 分注

した試料量 (20 μl) $\times 1000$ より血漿中のパントテン酸量 (pmol / ml) 求めた。

葉酸

葉酸の血中測定は、血漿中の葉酸を測定した。測定方法は、尿中の葉酸の定量方法と同様である。サンプルの血漿を直接測定を試料とした。通常、ヒトの場合は 10 μl 使用すれば、検量線内に入る。ラットの場合は水にて 20 倍希釈したものを 20 μl 使用すれば、検量線内に入る。

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 とし、血漿中の葉酸量を、 $x /$ 分注した試料量 (10 μl) \times 希釈倍率 $\times 1000 / 441.4$ (プテロイルモノグルタミン酸の分子量) $\times 1000$ より血漿中の葉酸量 (pmol / ml) 求めた。

ビオチン

ビオチンの血中測定は、血漿中のビオチンを測定した。測定方法は、尿中のビオチンの定量方法と同様である。サンプルの血漿を直接測定を試料とした。通常、50 μl 使用すれば、検量線内に入る。

計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのビオチン量 (ng / tube) を求めた。これを x とし、血漿中のビオチン量を、 $x /$ 分注した試料量 (50 μl) \times 希釈倍率 $\times 1000 / 244.3$ (ビオチン分子量) より血漿中ビオチン量 (nmol / ml) を求めた。

ビタミンC

ビタミンCの血中測定は、血漿中のアスコルビン酸 (AsA)、デヒドロアスコルビン酸、

2,3-ジケトグルコン酸の合計の総アスコルビン酸量を測定した。測定方法は、尿中のアスコルビン酸の定量方法と同様である。

ただし、サンプルの使用方法中に記載してある、尿 100 μl の代わりに、血漿 150 μl と 10% メタリン酸 150 μl を混合し、遠心させた上清 100 μl を使用した。また (3)の⑤、⑥の水を 1.5 ml に酢酸エチルを 1.5 ml にした。

計算方法

血漿中 AsA 濃度 (nmol / ml)

$$= \text{測定試料の面積} / (1 \text{ pmol あたりの AsA 標準面積}) \times (1500 \mu\text{l}^{*1} / 600 \mu\text{l}^{*2}) \times \{200 \mu\text{l}^{*3} / 20 \mu\text{l} (\text{HPLC 試料注入量})\} / 0.05 \text{ ml}^{*4} \times (1 / 10^3)^{*5}$$

*1 : 有機層全量

*2 : 使用した有機層量

*3 : 使用した水の量

*4 : 使用した血漿量

*5 : 単位を pmol から nmol にするため

引用文献

1. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. Lipid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, (1982) 28, 29-31.
2. 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* (2004) 45, 231-238.
3. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol. Chem* (1983) 258, 5623-5628.
4. Gregory JF, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr* (1979) 32, 879-883.
5. 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* (1998) 46, 5177-5180.
6. Shibata K, Kawada T, Iwai K. 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* (1988) 424, 23-28.
7. Shibata K. Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.
8. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol. Chem* (1944) 156, 21-26.
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.
12. Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S. Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* (1992) 64, 1507.
13. Mawatari K, Oshida K, Iinuma F, and Watanabe M. *Anal. Chem. Acta.* (1995) 302, 179-183.
14. 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.