

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

4. ビタミンB₁₂の栄養評価に関する基礎的研究

分担研究者 渡辺文雄 高知女子大学生生活科学部 教授
研究協力者 宮本恵美 高知女子大学生生活科学部 助手

研究要旨

①食品中のビタミン B₁₂の特性と栄養評価： 植物性食品（食用藻類，茶葉，野菜など）や微生物が関与する水産発酵食品（魚醤，めふん）に含まれるコリノイド化合物の特性や栄養価について検討し，B₁₂の食品分析法の改良の必要性を明らかにした． ②ビタミン B₁₂栄養状態の新規な指標の検討： B₁₂の栄養状態を特異的に且つ感度よく示す指標として血球中の B₁₂依存性酵素（メチオニン合成酵素とメチルマロニル CoA ムターゼ）活性が利用できるかどうかを検討した． ③食品タンパク質結合ビタミン B₁₂吸収障害への対策法の検討： 人工消化系を用いて胃酸の有無が B₁₂の消化に及ぼす影響について検討した結果，胃酸の低下により顕著に食品からの B₁₂の遊離が減少した．急速な高齢化を迎えるわが国において食品タンパク質結合性 B₁₂吸収不全症への予防・対応策として日常の食生活で利用しやすい B₁₂強化食品の開発を検討した．

I. 食品中のビタミン B₁₂ の特性と栄養評価

ビタミン B₁₂(B₁₂)は真紅の水溶性化合物であり、テトラピロール様構造を有するコリン環の中心にコバルト原子が結合したユニークな構造をしている(図—1)。B₁₂は細菌などの微生物で生合成され、植物にはB₁₂生合成能がないことが知られている^{1,2)}。細菌などで生合成されたB₁₂は食物連鎖により動物の各組織に蓄積されるため、動物性食品がB₁₂の主要な供給源であるが、食用藻類の中にB₁₂をかなり多量に含むものがある。五訂日本食品標準成分表によると乾燥アオノリ(31.8μg/100g)、乾燥アマノリ(7.6μg/100g)のB₁₂含量は、牛肝臓(52.8μg/100g)に匹敵する³⁾。また、栄養補助食品として流通している微細藻類のクロレラやスピルリナの乾燥錠剤にも多量のB₁₂が含まれていることが各社製品の成分表に記載されている。食用藻類(微細藻類を含む)に含まれるB₁₂の栄養価については、否定的な報告もあり^{4,5)}、定まっていない。また、我が国のマスメディアにおいて食用藻類以外の一部の動物性食品についてもB₁₂が豊富に含まれているとしばしば報道されるが、その科学的根拠は不十分である。そこで我々は植物性食品のB₁₂の特性や栄養価について検討したので、以下その概要をまとめた。

1) 食用藻類(微細藻類を含む)

市販されている数種類の食用藻類のB₁₂含量を五訂日本食品標準成分表に準じた微生物学的定量法⁶⁾で測定した結果、緑藻のスジアオノリ(四万十ノリ)と紅藻のスサビノリは多量のB₁₂(20-70μg/100g乾燥重量)を含有していた⁷⁾。また、スサビノリ⁸⁾やスジアオノリ⁹⁾の凍結乾燥藻体からコリノイド化合物を単離・同定した結果、真のB₁₂であった(表—1)。また、B₁₂欠乏ラットを用いてスサビノリに含まれるB₁₂のバイオアベイラビリティについて検討した結果、B₁₂欠乏ラットの尿中メチルマロン酸排泄(B₁₂欠乏症の指標)はノリ添加飼料投与後20日目で検出されなくなり、肝臓中のB₁₂含量(特に補酵素型B₁₂)は有意に増加していた¹⁰⁾。以上結果は、スサビノリがB₁₂のよい供給源となることを示唆している。

また、栄養補助食品として市販されているクロレラやスピルリナ錠剤ならびに乾燥ハプト藻に含まれるコリノイド化合物を単離・同定した。ハプト藻¹¹⁾やクロレラ錠剤¹²⁾から単離されたコリノイド化合物は真のB₁₂であったが、スピルリナ錠剤に含まれる主要なコリノイド化合物はシュードB₁₂であり、B₁₂の供給源にはならないことが明らかとなった¹³⁾(図—2)。

現在、スピルリナと異なり真のB₁₂を含んでいるとして市販されている藍藻由来の栄養補助食品A.F.A(*Aphanizomenon flos-aquae*)に含まれるコリノイド化合物を単離・同定を試みている。予備実験の結果(図—3, 図—4)、A.F.A.に含まれているコリノイド化合物はB₁₂でもシュードB₁₂でもなく、未同定のコリノイド化合物である可能性があり、NMR分析を含めた機器分析でその構造を明らかにする予定である。

食用藻類のB₁₂の起源については、植物細胞にはB₁₂の生合成系が存在しないため、藻体に付着しているB₁₂合成細菌に由来すると考えられているが、食用藻類や微細藻類においてB₁₂の取込み系が存在するという報告もある^{14,15)}。また、無菌培養したスサビノリを用いてB₁₂の生合成を示唆する実験結果も報告されている¹⁶⁾。一般的にスピルリナのような藍藻はコリノイド化合物(B₁₂を含む)の生合成能を有している¹⁷⁾。

2) 茶葉(茶葉抽出液)

種々の乾燥茶葉のB₁₂含量を五訂日本食品標準成分表に準じた微生物学的定量法を用いて測定したところ、すべての茶葉にB₁₂が含まれていた[100gあたりのB₁₂含量(アルカリ耐性因子を補正):緑茶(125-535ng)、青茶(525-528ng)、紅茶(663ng)、黒茶(493-1190ng)]¹⁸⁾。特に、黒茶の中で六堡茶とバタバタ茶にB₁₂含量が高かった。製造工程で微生物の関与するバタバタ茶には100g乾燥茶葉あたり0.4μg(100mL茶抽出物あたり2.0ng)のB₁₂が含まれていた。そこで乾燥バタバタ茶葉に含まれるコリノイド化合物を単離・同定した結果、真のB₁₂であった¹⁹⁾。B₁₂欠乏ラットを用いてバタバタ茶(抽出物)に含まれるB₁₂のバイオアベイラビリティについて検討した結果、B₁₂欠乏ラットの尿中メチルマロン酸排泄はバタバタ茶(1ng/日;50mL)投与後14日目で顕著に減少し、肝臓中のB₁₂含量は有意に増加していた¹⁹⁾。以上の結果は、バタバタ茶に含まれるB₁₂が生理的に有効であることを示唆している。また、最近の研究から緑茶においても同様な結果を得ている²⁰⁾。

日常的に摂取しているお茶(茶葉抽出物)の中に生理的に有効なB₁₂が含まれており、少なからず我々の健康維持・増進に貢献していることが示唆された。世界的にB₁₂欠乏症が広がりを見せる中²¹⁾本研究成果は、米国において特に注目されている²²⁾。

3) タケノコおよびその他の植物性食品

我が国のマスメディアにおいてタケノコの栄養価に関する報道の中で「タケノコは植物性食品としては珍しくB₁₂を豊富に含む」ことがしばしば

ば紹介されている。これの根拠となる文献は上田弘一郎著「竹と日本人」²³⁾の中にタケノコ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。一方、五訂日本食品標準成分表²⁴⁾ではタケノコのB₁₂含量は(0)と記載されており、植物性食品であるために測定されていない。そこで五訂日本食品標準成分表で採用されている微生物学的定量法を用いてタケノコのB₁₂含量を測定した。その結果、タケノコには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²⁵⁾。日本食品標準成分表では、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、見かけのB₁₂量からその値を差し引くことでB₁₂含量を求めることになっている²⁶⁾。タケノコには見かけのB₁₂含量がかなり検出されたことから、恐らく先行研究²⁰⁾ではアルカリ耐性因子量を補正していないことが推測される。

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^{27, 28)}(図—5)、植物性食品でもB₁₂を含む可能性があるため我々はタケノコ以外の植物性食品のB₁₂含量を測定した。その結果、見かけのB₁₂含量と補正值(μg/100g可食部)は大豆(0.018:0.009)、小豆(0.007:0.004)、枝豆(0.028:0.017)、えんどう豆(0.098:0.039)、ブロッコリー(0.971:0.068)、アスパラガス(0.138:0.088)、フキ(0.026:0.024)、緑豆もやし(0.077:0.011)、モロヘイヤ(0.063:0.029)、ジュンサイ(0.025:0.024)と微量のB₁₂を含むと評価された²⁴⁾。しかし、上述のスピルリナ錠剤のようなこともあるのでHPLC分析などにより精査する必要がある。概して野菜類や豆類に含まれるB₁₂含量は少なく、B₁₂供給源としての重要性は低いと思われる。

4) 水産発酵食品

5訂食品標準成分表でB₁₂を最も多く含む食品はサケ腎臓塩辛めふんであり、可食部100gあたり327.6μgのB₁₂が含まれている。このB₁₂含量は、牛肝臓のB₁₂含量の約6倍であり、めふんを0.8g摂取するだけで成人の所要量を満たすことができるためB₁₂供給源として優れている。そこで、めふんに多量に含まれるB₁₂化合物が生理的に有効なB₁₂化合物であるかどうかについて検討した²⁹⁾。

めふんは、新潟産、青森産、北海道産のものを購入して実験に用いた。B₁₂は*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC7830を用いたバイオアッセイで定量した。めふんからB₁₂化合物をアンバーライトXAD4およびコスモシル5C18OPNカラムクロマトグラフィー、逆相HPLCで精製し

た。

新潟産、青森産、北海道産のめふんのB₁₂含量を表—2に示した。北海道産めふん500gから各種クロマトグラフィーを用いてB₁₂化合物を精製した。精製標は赤色を呈し、紫外可視吸収スペクトルから典型的なコリノイド化合物であることが示された(図—6)。シリカゲル60TLCのR_f値や逆相HPLCの保持時間から精製標品は真のB₁₂であった(表—3)。実験に用いた各めふんサンプル中の生菌数は非常に少なく、また、生のサケ腎臓中多量のB₁₂含量が検出されたため(表—2)めふん中のB₁₂はサケ腎臓に蓄積されたB₁₂に由来することが示唆された。めふん破砕液をセファデックスG-50でゲルろ過を行ったところ、めふんに含まれるB₁₂の約85%が低分子画分に溶出されたことから、めふん中には遊離のB₁₂が多量に含まれていることが明らかとなった。この結果は、熟年からはじまる食品タンパク質結合性B₁₂吸収障害に対してB₁₂のよい供給源となりうることを示している。

魚醬にもかなりのB₁₂が含まれておりタイなど東南アジア諸国では、B₁₂のよい供給源と考えられている³⁰⁾。魚醬に含まれるB₁₂が真のB₁₂であるかどうかを検討した結果、各種魚醬には未同定のコリノイド化合物が含まれており^{31, 32)}、また1日あたりの摂取量も低く、魚醬はB₁₂の供給源とはならないと考えられる。

II. ビタミンB₁₂栄養状態の新規な指標の検討

これまでB₁₂栄養状態の指標として用いられたバイオマーカー及び検討中のものを表—4にまとめた³³⁾。いずれのバイオマーカーも問題点があり、B₁₂の栄養状態を特異的に且つ感度よく示す指標の検索が急務である。

そこで今回、B₁₂栄養状態の新規な指標として血球中のB₁₂依存性酵素活性が利用できるかどうかを検討した。

ヒトを含む高等動物において2種類のB₁₂依存性酵素の存在が知られている。生体内で奇数鎖脂肪酸やアミノ酸(パリン、イソロイシン、スレオニン)の代謝に関与するAdoB₁₂依存性メチルマロニルCoAムターゼ(EC5.4.99.2)³⁴⁾(表—5)と5-メチルテトラヒドロ葉酸とホモシステインからメチオニンの合成に関与するMeB₁₂依存性メチオニンシンターゼ(EC2.1.1.13)³⁵⁾である。今回は予備実験としてラビットを用いて血球中に両B₁₂依存酵素活性が存在するかどうかをNon-IR高感度酵素活性測定法を用いて検討した。

血球の調製法

ラビット血液15mLを4℃で1500xg10分間遠心分離した。沈殿画分をPBS(-)10mLで2回洗

浄したものを実験に用いた。

粗酵素液の調製法

血球 0.2 mL に 10% (w/v) ショ糖を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mL を加えポリトロンを用いて破碎した。その血球破碎液を粗酵素液として実験に用いた。全ての操作は 2-4°C で行った。

血球ビタミン B₁₂ 酵素の Non-IR 高感度測定法

1) ビタミン B₁₂ 依存性メチオニン合成酵素活性の測定法

本酵素活性の測定は Huang らの方法³⁶⁾を改良して行った。また, Banerjee ら³⁷⁾の半嫌氣的酵素活性測定法に準じて酵素反応液を調製した。酵素反応液の組成は, 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0), 152 μM S-アデノシルメチオニン (シグマ社製), 50 mM ヒドロキソ B₁₂ (シグマ社製), 25 mM アスコルビン酸, 25 mM ジチオスレイトール, 500 μM L-ホモシステイン (シグマ社製), 25 μM 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (シグマ社製), 粗酵素液とし全容量を 1.0 mL とした。酵素反応液は, 5-メチルテトラヒドロ葉酸を含まない反応液を予め調製し, 37°C 5 分間保温し, 本酵素を還元的に活性化させた。

その後, 基質 5-メチルテトラヒドロ葉酸を加え, 37°C 10 分間酵素反応を行った。酵素反応終了後, 直ちに 100°C 2 分間の加熱処理により酵素反応を停止させた。酵素反応液は氷中で 5 分間冷却した後, 遠心分離により変性タンパク質を除去した。この遠心分離上清液をメンブレンフィルター (Millex-LH, 0.45 μm, ミリポア社製) でろ過し, ろ過液 10 μL を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の試料とした。

HPLC 分析システムは島津社製 SCL-10Avp システムコントローラー, LC-10ADvp HPLC ポンプ, DGU-12A デガッサー, CTO-10Avp カラムオーブン, C-R6A クロマトパック, 分光蛍光光度計 RF-5000 を用いた。HPLC の分析条件は TSK-GEL ODS-120A (4.6×250 mm, 東ソー社製) カラムを用い, カラム温度 30°C, 移動相 7.0% (v/v) アセトニトリルを含む 33 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 3.0) を用い, 流速 0.5 mL/min で分析した。酵素反応により生成したテトラヒドロ葉酸を励起波長 290 nm, 蛍光波長 356 nm で測定した。また, 本酵素活性は対照の反応液 (予め 100°C 5 分間加熱処理した粗酵素液を用いて上述の反応液を調製し, 直ちに 100°C 2 分間の加熱処理を行った後, 5-メチルテトラヒドロ葉酸を添加した反応液) 中のテトラヒドロ葉酸量を差引き求めた。

2) ビタミン B₁₂ 依存性メチルマロニル CoA ムターゼ活性の測定法

本酵素活性の測定は Gaire らの方法³⁸⁾を改良し

て行った^{39, 40)}。酵素反応液の組成は, 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0), 33.3 μM AdoB₁₂ (シグマ社製), 133.3 μM (R,S)-メチルマロニル CoA (シグマ社製), 粗酵素液とし全容量を 150 μL とした。酵素反応液は, (R,S)-メチルマロニル CoA を含まない反応液を予め調製し, 37°C 5 分間保温し, 本酵素をホロ化させた。その後, 基質(R,S)-メチルマロニル CoA を加え, 35°C 10 分間酵素反応を行った。酵素反応終了後, 直ちに 10% TCA を 50 μL 添加することにより酵素反応を停止させた。酵素反応液を遠心分離により変性タンパク質を除去した。この遠心分離上清液をメンブレンフィルター (Millex-LH, 0.45 μm, ミリポア社製) でろ過し, ろ過液 20 μL を HPLC の試料とした。

HPLC 分析システムは島津社製 SCL-10Avp システムコントローラー, LC-10ADvp HPLC ポンプ, DGU-12A デガッサー, CTO-10Avp カラムオーブン, C-R6A クロマトパック, SPD-10Avp UV-VIS 検出器を用いた。HPLC の分析条件は Cosmosil 5C18-AR-II (3.0×150 mm, ナカライ社製) カラムを用い, カラム温度 40°C, 移動相 A : 100 mM 酢酸を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) と移動相 B : 18%(v/v)メタノールを含む移動相 A を用い, 流速 1.0 mL/min で 7 分間移動相 A:B 比 (50 : 50) から移動相比 (0 : 100) のリニアグラジェントで分析した。酵素反応により生成したスクシニル CoA を 254 nm で測定した。また, 本酵素ホロ活性は AdoB₁₂ 無添加の酵素反応液を用いて測定し, アポ活性は AdoB₁₂ を添加した反応液を用いて測定した全活性から上記のホロ活性を差引き求めた。

タンパク質定量法

タンパク量はオボアルブミンを標準タンパク質としてバイオ-ラッド社製プロテインアッセイ試薬を用いて定量した。

血球 B₁₂ 含量の測定

1) 血球からの B₁₂ の抽出法

血球	0.2 mL
0.1M 酢酸緩衝液, pH 4.8:	0.1 mL
蒸留水	0.68 mL
0.025 g/100 mL KCN 水溶液:	0.01 mL

よく混和し, オートクレーブで 120°C, 5 分間加熱抽出を行う。冷却後, 10% (w/v)メタリン酸水溶液 (0.01 mL) を加える。3000 x g 10 分間遠心分離上澄画分を定量まで冷蔵庫内で保存する。全量 1.0 mL (5 倍希釈)を微生物学的定量法の分析試料としてテストチューブへ 50 ~100 μL 添加する。

2) 定量操作

B₁₂標準溶液

B₁₂ (シグマ社製) 標準結晶を 25% (v/v) エチルアルコールに溶解し、1 μg/mL 溶液として冷蔵庫に保存する。使用前に 1 ng/mL に希釈する。

培地

ライヒマニ保存用培地「ニッスイ」(日水製薬社製)、ライヒマニ接種用培地「ニッスイ」、ライヒマニ用 B₁₂ 定量用基礎培地「ニッスイ」を用いる。

接種菌液の調製

定量用菌株として *L. delbrueckii* ATCC7830 を使用する。定量前日に保存培地(寒天培地)から接種用液体培地に接種し、37°C で 20~24 時間培養する。これを 160 x g 5 分間遠心分離し、遠心管底の菌体を静かに振とうし、培地と同量の滅菌生理食塩水で菌体を 3 回洗浄する。分光光度計(波長 660 nm)で透過率(T%)が 70%になるように菌体を滅菌生理食塩水で希釈する。

定量手順

定量用デイスポザブルポリプロピレン試験官(18 x 180 mm)に標準系列として、B₁₂ 標準液 10~100 μL、定量用基礎培地 1.5 mL を加え、さらに総量が 3.0 mL となるように蒸留水 0~1.5 mL を加える。同様に被検液系列として B₁₂ 抽出液 0.1~0.5 mL、定量用基礎培地 1.5 mL を加え、さらに総量が 3.0 mL となるように蒸留水 0.5~1.5 mL を加える。デイスポザブルポリプロピレンキャップ(滅菌栓)をした後、オートクレーブで 120°C、3 分間滅菌し、冷却後、希釈菌体液を滅菌ピペットで 10 μL ずつクリーンベンチ内で接種する。37°C で 17~20 時間培養した後、各試験官の菌の増殖度を分光光度計(波長 660 nm)で T% を測定し、検量線より B₁₂ 抽出液中のビタミン B₁₂ 含有量を求め、それに希釈倍数をかけて単位試料あたりの B₁₂ 量を計算する。

1) ラビット血球を用いた予備実験

ラビット血球中のメチルマロニル CoA ムターゼ活性を HPLC 法で測定した結果(図-7)、全活性は 196 fmol/min/mg protein (300 pmol/min/mg PE)、ホロ活性は 29 fmol/min/mg protein (45 pmol/min/mg protein) となり、ほとんどがアポ活性であった。

一方、B₁₂ 依存性メチオニン合成酵素を HPLC 法で測定した結果(図-8)、1.7 pmol/min/mg protein (2.6 nmol/min/mg PE) であった。

また、血球の B₁₂ 量は 4800 pg/mL PE であった。

Non-IR 高感度測定法を用いて血球中の両 B₁₂ 酵素活性の測定が可能となったので、今後 B₁₂ 欠乏ラットを用いた実験を行うことで B₁₂ の栄養状態と血球両 B₁₂ 酵素活性の関係を検討する必要がある。その基礎研究の結果を踏まえて B₁₂ 欠乏症

患者での有効性試験やさらに簡便に両 B₁₂ 酵素量を評価するためにヒト B₁₂ 依存性メチオニン合成酵素およびメチルマロニル CoA ムターゼ抗体の作成をする予定である。

III. 食品タンパク質結合ビタミン B₁₂ 吸収障害への対策法の検討

50 歳以上の成人の 10~30% は胃酸分泌の低い萎縮性胃炎を患っており、食品からの B₁₂ の生体利用率(吸収率)が減少していると推測される⁴¹⁾

(図-9)。一方、結晶 B₁₂ の吸収率は萎縮性胃炎患者においても減少しないので、米国食事摂取基準では 50 歳以上の成人において所要量(2.4 μg/日)のほとんどを B₁₂ 強化食品あるいは B₁₂ を含むサプリメントから摂取することを推奨している。実際、米国では、B₁₂ 強化シリアル(コーンフレークス)は女性と高齢者において B₁₂ のよい供給源となっていることが報告されている。急速な高齢化を迎えるわが国においても食品タンパク質結合性 B₁₂ 吸収不全症への予防・対応策は重要な検討課題であると考えられる(図-10)。わが国の食文化を考慮し日常の食生活で利用しやすい B₁₂ 強化食品の開発が急務であると思われる。

1) 人工消化系を用いて胃酸の有無がビタミン B₁₂ の消化に及ぼす影響

胃酸の分泌の低下がどの程度 B₁₂ の消化(食品タンパク質から B₁₂ の遊離)に影響を及ぼすのかを明らかにし、胃酸分泌減少下でもより多くの B₁₂ を遊離しやすい食品の検索や調理・加工方法を検討することを目的とする。

今回実験に用いた食品は、日本人の栄養調査で B₁₂ のよい供給源である魚肉(さけの切り身)をグリルで焼いたものを用いた。図-11 に実験で用いた人工消化系をまとめた。

実験結果を表-6 に示す。胃酸(HC1)の減少に伴い吸収可能な遊離 B₁₂ は顕著に減少したことから食品タンパク質結合性 B₁₂ 吸収障害への対策の重要性が確認された。

今後は人工消化に要する時間の影響やその他食品からの B₁₂ の遊離について検討する必要がある。また、同じ食品であっても調理・加工法の相違により B₁₂ の遊離しやすさが異なることも考えられ今後検討する必要がある。

2) B₁₂ 強化食品の調製

今回、B₁₂ 強化糸引き納豆を調製し、人工消化試験を用いて胃酸分泌の低下でも遊離しやすい B₁₂ 強化食品の開発を検討した。

糸引き納豆の製造は、食品加工学実験書などに記載されている一般的な方法で行った(図-12)。B₁₂ の強化方法として大豆浸漬液に B₁₂ を添加する方法と加熱処理を避けるため水浸漬・煮沸

後の大豆に B₁₂ 溶液を納豆菌と同時添加する方法を用いた。糸引き納豆に含まれる B₁₂ の測定は、五訂日本食品標準成分表で採用されている *L.delbrueckii* ATCC7830 を用いた微生物学的定量法で行った。

大豆浸漬液に B₁₂ 溶液を用いた場合は、浸漬液中の B₁₂ 濃度に比例して大豆中の B₁₂ 含量は増加せず、浸漬液中の B₁₂ のロスが大きかったが（表—7）、大豆の蒸煮処理による B₁₂ の分解は微小（約 10%）であった。一方、納豆菌と B₁₂ 溶液を同時添加した場合は、添加 B₁₂ のロスがほとんどなかった。人工消化実験において胃酸の pH が中性であっても納豆菌と同時添加した方法で B₁₂ を強化した納豆からはほとんどの B₁₂ が遊離することができた（図—1 3）。

3) その他（関連の予備実験）

ビタミン B₆, B₁₂, 葉酸強化食品を開発するために先ず強化ビタミンの同時定量法について検討した。ビタミン強化食パンを調製後、蒸留水にて強化ビタミンを抽出した後 HPLC で分析した（図—1 4）。その結果、本法により B₆ と葉酸についてはピークが分離でき同時定量が可能であったが、B₁₂ は添加量が少量のため濃縮して分析したが不純物のピークと分離できなかった。

また、ブロッコリーを用いて食品中に存在する葉酸関連化合物を蛍光 HPLC 法で分析した。その結果、テトラヒドロ葉酸と 5 - メチルテトラヒドロ葉酸の定量が可能であったが（図—1 5）、精度よく分析するためには葉酸関連化合物を特異的に濃縮する方法を検討する必要がある。現在、食品中の葉酸関連化合物を特異的に抽出・濃縮する方法を葉酸結合タンパク質（およびその抗体）を用いて検討している。

研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許予定

なし

3. 実用新案登録

なし

4. その他

なし

引用文献

1) 渡辺文雄：ビタミン B₁₂ の細胞内代謝に関する比較生化学的研究，日本農芸化学会誌，73，807—815（1999）。

- 2) 渡辺文雄，中野長久：特集臨床ビタミン学：化学構造，生理機能，代謝—ビタミン B₁₂，日本臨床，57，2205—2210（1999）。
- 3) 科学技術庁資源調査会編：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—。大蔵省印刷局，東京，pp.152-153（2000）。
- 4) Dagnelie, P. C., van Staveren, W. A., & van den Berg, H.: Vitamin B₁₂ from algae appears not to be bioavailable. Am. J. Clin. Nutr., 53, 695-697 (1991).
- 5) Herbert, V.: Vitamin B₁₂: plant sources, requirements, and assay. Am. J. Clin. Nutr., 48, 852-858(1988).
- 6) 財団法人日本食品分析センター編集：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。中央法規，東京，pp.178-183，（2002）
- 7) Watanabe, F., Takenaka, S., Katsura, H., Zakir Hussain Masumder, S. A. M., Abe, K., Tamura, Y., & Nakano, Y.: Dried green and purple lavers (nori) contain substantial amounts of biologically active vitamin B₁₂ but less of dietary iodine relative to other edible seaweeds. J. Agric. Food Chem., 47, 2341-2343 (1999).
- 8) Watanabe, F., Takenaka, S., Katsura, H., Miyamoto, E., Abe, K., Tamura, Y., Nakatsuka, T., & Nakano, Y.: Characterization of a vitamin B₁₂ compound in the edible purple laver, *Porphyra yezoensis*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2712-2715 (2000).
- 9) Watanabe, F., Katsura, H., Miyamoto, E., Takenaka, S., Abe, K., Yamazaki, Y., & Nakano, Y.: Characterization of vitamin B₁₂ in an edible green laver (*Enteromorpha prolifera*). App. Biol. Sci., 5, 99-107 (1999).
- 10) Takenaka, S., Sugiyama, S., Ebara, S., Miyamoto, E., Abe, K., Tamura, Y., Watanabe, F., Tsuyama, S., & Nakano, Y.: Feeding dried purple laver (nori) to vitamin B₁₂ deficient rats significantly improves vitamin B₁₂ status. Brit. J. Nutr., 85, 699-703 (2001).
- 11) Miyamoto, E., Watanabe, F., Ebara, S., Takenaka, S., Takenaka, H., Yamaguchi, Y., Tanaka, N., Inui, H., & Nakano, Y.: Characterization of a vitamin B₁₂ compound from unicellular coccolithophorid alga (*Pleurochrysis carterae*). J. Agric. Food Chem., 49, 3486-3489 (2001).
- 12) Kittaka-Katsura, H., Fujita, T., Watanabe, F., & Nakano, Y.: Purification and characterization of a corrinoid compound from *Chlorella* tablets as an algal health food. J. Agric. Food Chem., 50, 4994-4997 (2002).
- 13) 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.*, 47, 4736-4741 (1999).
- 14) Yamada, S., Sasa (Kamasuzu), M., Yamada, K., & Fukuda, M.: Release and uptake of vitamin B₁₂ by asakusanori (*Porphyra tenera*) seaweed. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 42, 507-515 (1996).
- 15) Miyamoto, E., Watanabe, F., Takenaka, H., & Nakano, Y.: Uptake and physiological function of vitamin B₁₂ in a photosynthetic unicellular coccolithophorid alga, *Pleurochrysis carterae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 195-198 (2002).
- 16) Takenaka, S., Takubo, K., Watanabe, F., Tanno, T., Tsuyama, S., Nakano, Y., & Tamura, Y.: Occurrence of coenzyme forms of vitamin B₁₂ in a cultured purple laver (*Porphyra yezoensis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2480-2482 (2003).
- 17) Watanabe, F., Miyamoto, E., & Nakano, Y.: Inactive corrinoid-compound significantly decreases in *Spirulina platensis* grown in a cobalt-deficient medium. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5685-5688 (2001).
- 18) Kittaka-Katsura, H., Watanabe, F., & Nakano, Y.: Occurrence of vitamin B₁₂ in green, blue, and black tea leaves. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, in press.
- 19) Kittaka-Katsura, H., Ebara, S., Watanabe, F., & Nakano, Y.: Characterization of corrinoid compounds from a Japanese black tea (Batabata-cha) fermented by bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 909-911 (2004).
- 20) Kittaka-Katsura, H., Nakao, M., Watanabe, F., & Nakano, Y.: Bioavailability of vitamin B₁₂ compounds from a Japanese green tea extract. *Abstracts of The 2004 International Conference on O-CHA (tea) Culture and Science*, 122 (2004).
- 21) Stabler, S. P., & Allen, R. H.: Vitamin B₁₂ deficiency as a worldwide problem. *Ann. Rev. Nutr.*, 24, 299-326 (2004).
- 22) Raloff, J.: Bacteria brew a B vitamin boost. *Science News Online*, 165 (2004) [<http://www.sciencenews.org/articles/2004013/food.asp>]
- 23) 上田弘一郎: 竹と日本人. 日本放送出版協会, 東京, pp. 41-44 (1979).
- 24) 科学技術庁資源調査会編: 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—. 大蔵省印刷局, 東京, pp. 94-95 (2000).
- 25) 宮本恵美, 橘高(桂)博美, 足達理子, 渡辺文雄: たけのこのビタミン B₁₂ の分析, ビタミン学会誌, 印刷中
- 26) 科学技術庁資源調査会編: 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—. 大蔵省印刷局, 東京, pp. 99-114 (1995).
- 27) Mozafar, A.: Enrichment of some B-vitamins in plants with application of organic fertilizer. *Plant Soil*, 167, 305-311 (1995).
- 28) Mozafar, A., & Oertli, J. J.: Uptake of a microbially-produced vitamin B₁₂ by soybean roots. *Plant soil*, 139, 23-30 (1992).
- 29) Adachi, S., Miyamoto, E., Enomoto, T., Kuda, T., Hayashi, M., Nakano, Y. & Watanabe, F.: Purification and characterization of corrinoid compound from a Japanese salted and fermented salmon kidney "Mefun". *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, in press.
- 30) Areekul, S., Boonyananta, C., Matrakul, D. & Chantachum, Y.: Determination of vitamin B₁₂ in fish sauce in Thailand. *J. Med. Assoc. Thai*, 55, 243-248 (1972).
- 31) Takenaka, S., Enomoto, T., Tsuyama, S. & Watanabe, F.: TLC analysis of corrinoid compounds in fish sauce. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 26, 2685-2689 (2002).
- 32) 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. Chromatogr. Rel. Technol.*, 27, 2113-2119 (2003).
- 33) 渡辺文雄, 宮本恵美 (2003) 水溶性ビタミンの食事摂取基準の妥当性の検討—ビタミン B₁₂—, 日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書 (厚生科学研究費補助金 21 世紀型医療開拓推進研究事業), 66-84.
- 34) Miyamoto, E.: Characterization and physiological functions of corrinoid-compounds in edible microalgae. *Dr thesis of Osaka Prefecture University* (2004)
- 35) 谷岡由梨, 宮本恵美, 渡辺文雄: *Euglena gracilis* Z の生育に伴うビタミン B₁₂ 依存性メチオニン合成酵素活性の変動. 高知女子大学紀要生活科学部編, 54, 17-21 (2005)
- 36) Huang, L., Zhang, J., Hayakawa, T. & Tsuge, H.: Assays of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase activities by monitoring 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrofolate using high-performance

- liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Biochem.*, 299, 253-259 (2001).
- 37) Banerjee, R., Chen, Z. & Sumedha, S.: Methionine synthase from pig liver. *Methods Enzymol.*, 281., 189-196 (1997).
- 38) Gaire, D., Sponne, I., Droesch, S., Charlier, A., Nicolas, J. D. & Lambert D.: Comparison of two methods for the measurement of rat liver mentylmalonyl-coenzyme A mutase activity: HPLC and radioisotopic assays. *J. Nutr. Biochem.*, 10, 56-62 (1999).
- 39) Miyamoto, E., Watanabe, F., Yamaji, R., Inui, H., Sato, K. & Nakano, Y.: Purification and characterization of methylmalonyl-CoA mutase from a methanol-utilizing bacterium, *Methylobacterium extorquens* NR-1. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48, 242-246 (2002).
- 40) Miyamoto, E., Watanabe, F., Charles, T., Yamaji, R., Inui, H. & Nakano, Y.: Purification and characterization of homodimeric methylmalonyl-CoA mutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.*, 180, 151-154 (2002).
- 41) 渡辺文雄, 宮本恵美, 池一美: 高齢化社会とビタミン B₁₂強化食品. *New Food Industry*, 45, 39-43 (2003).

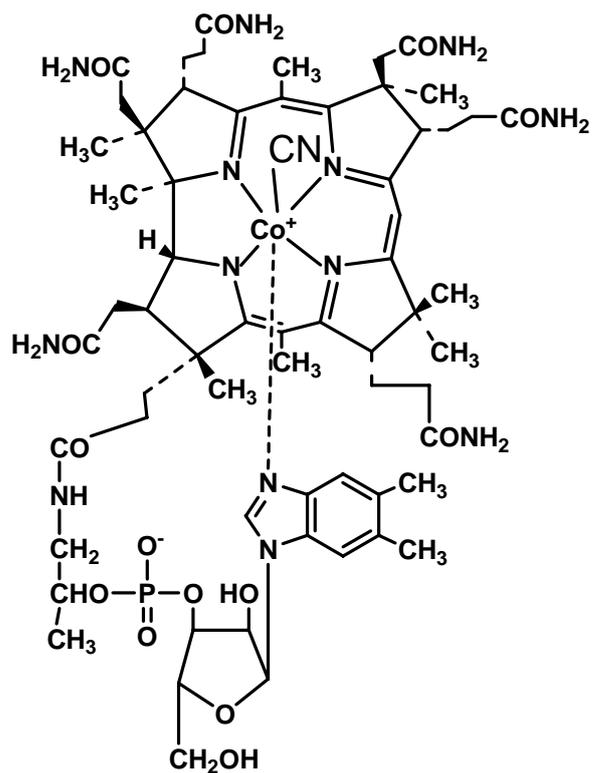


図-1 ビタミンB₁₂の構造式

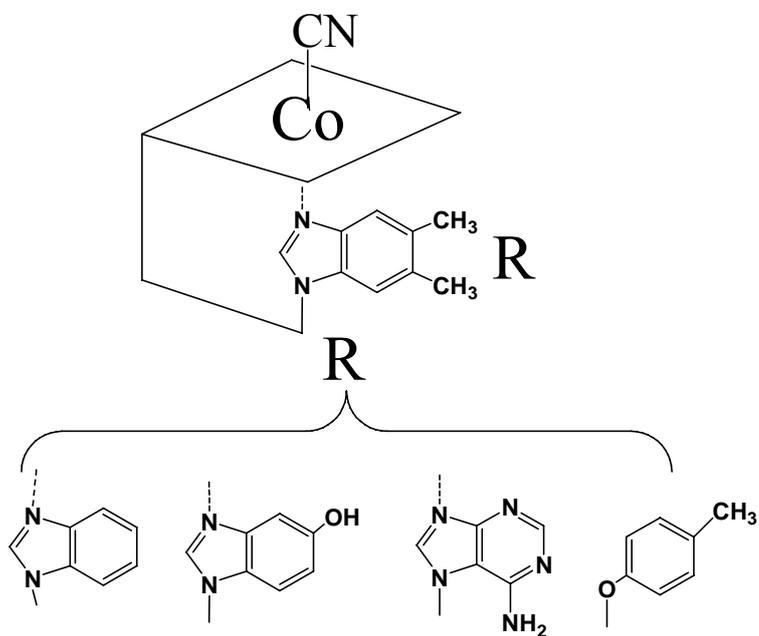


図-2 天然に存在するコリノイド化合物の構造式

- 1 Bezimidazolyl CN-Cba
- 2 5-Hydroxylbenzimidazolyl CN-Cba
- 3 7-Adenyl CN-Cba (Pseudovitamin B12)
- 4 pra-Cresolyl CN-Cba

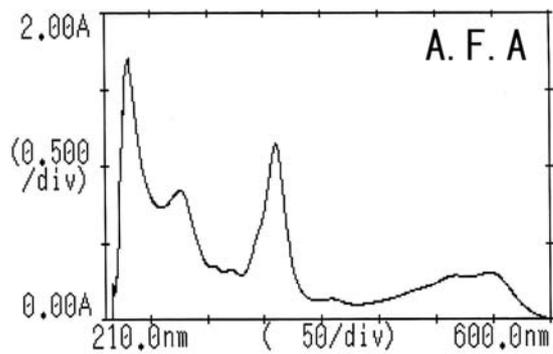
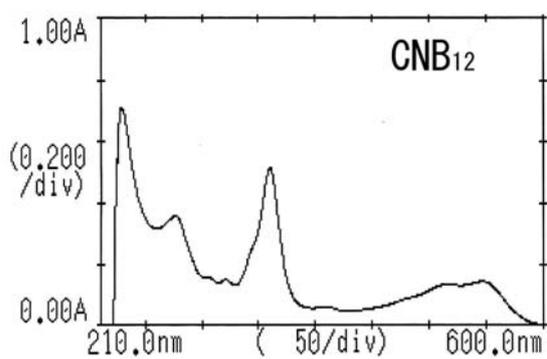


図-3 栄養補助食品 A.F.A から単離したコリノイド化合物の紫外可視吸収スペクトル

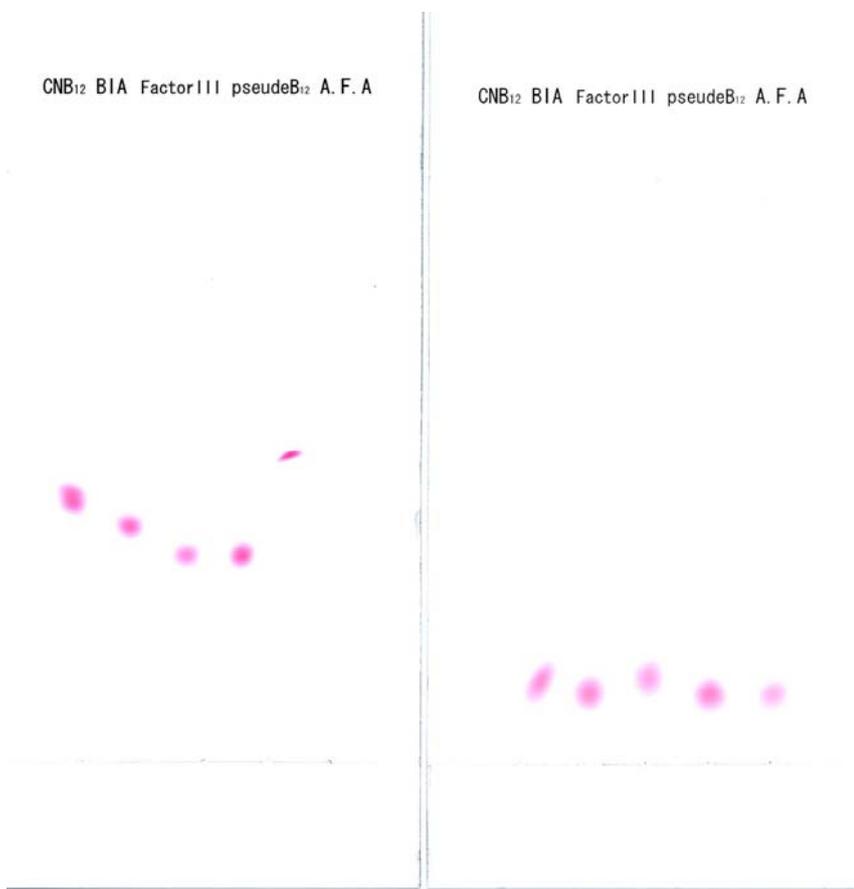
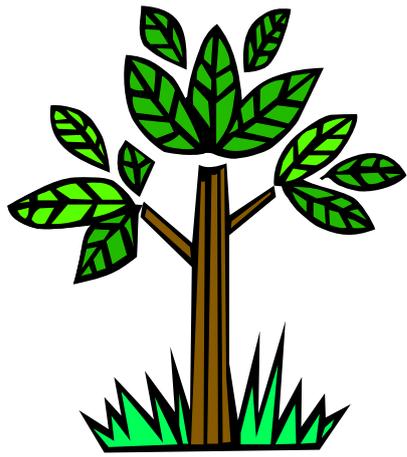


図-4 栄養補助食品 A.F.A から単離したコリノイド化合物のシリカゲル 60TLC 分析



有機肥料 (B₁₂)
土壤 {
微生物 (B₁₂)

図-5 植物性食品のビタミンB₁₂の由来

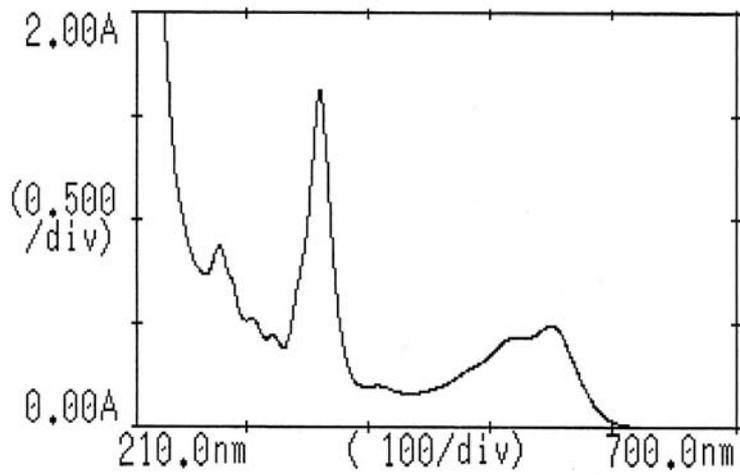


図-6 めふんから単離されたコリノイド化合物の紫外可視吸収スペクトル

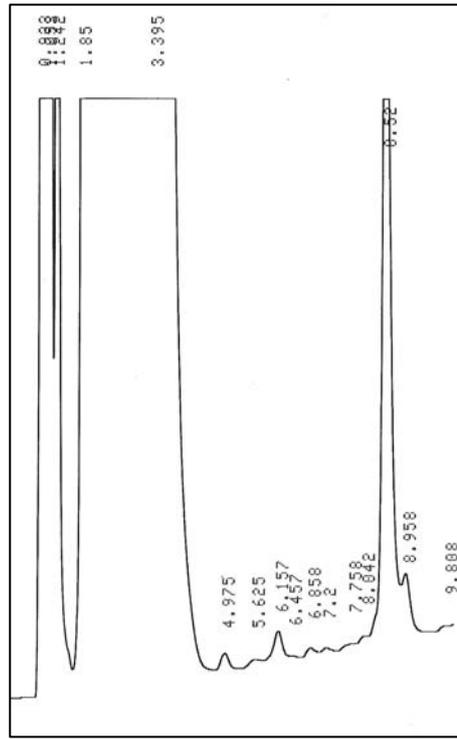
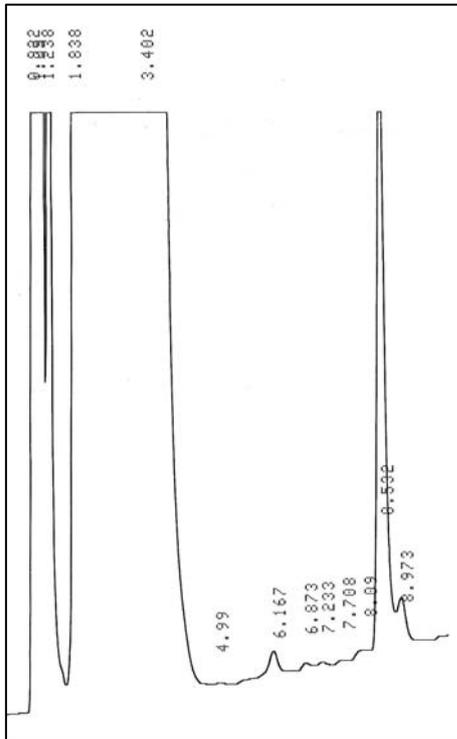


図-7 メチルマロニル CoA ムターゼ活性測定のための HPLC のクロマトグラム

A) 空白活性 (反応液に AdoB12 を添加しない)

B) 全活性 (反応液に AdoB12 を添加)

アポ活性 = 全活性 - 空白活性

矢印は、スクシニル CoA のピーク

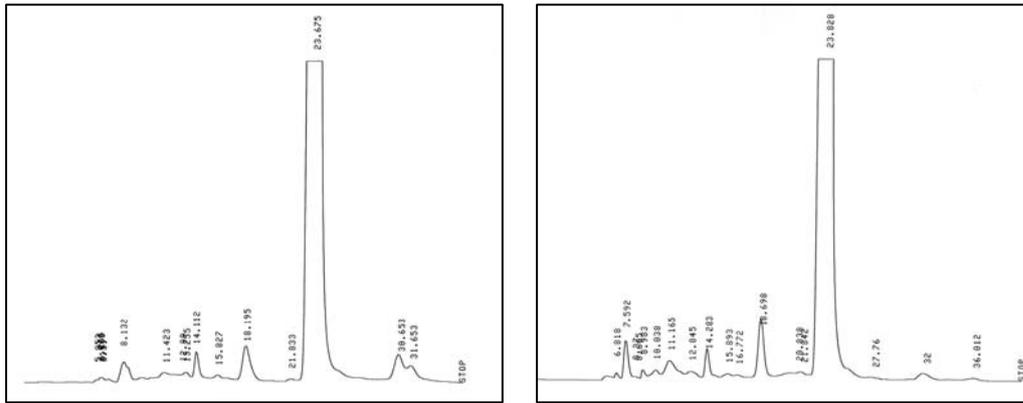


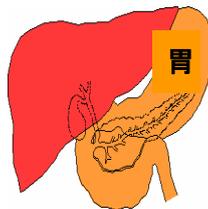
図-8 ビタミン B₁₂ 依存性メチオニン合成酵素活性測定の HPLC のクロマトグラム

A) 対照 (反応液に加熱失活させた酵素を添加)

B) 酵素反応生成物

酵素活性=酵素反応生成物-対照

矢印は、テトラヒドロ葉酸のピーク



胃の機能が低下
萎縮性胃炎



胃酸の分泌が減少

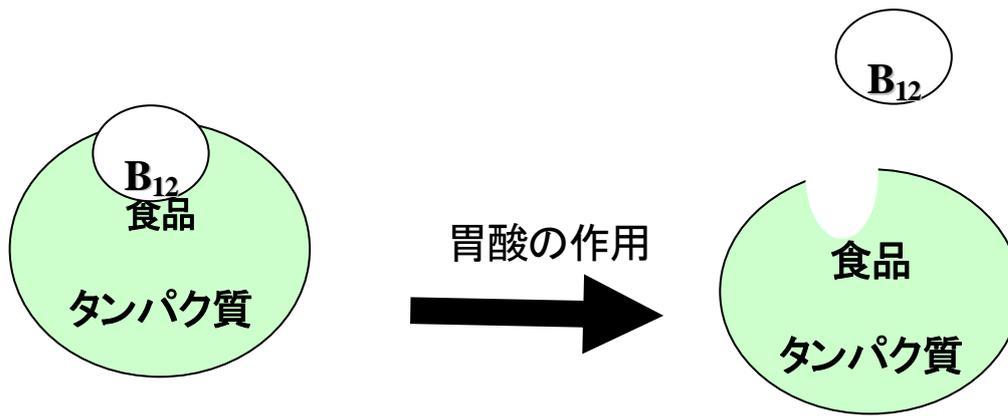
米国の調査

60歳以上の成人の10 - 15%がビタミンB₁₂欠乏症 (顕著な欠乏症状を示さない場合もある)

●33% 感覚障害 (知覚障害、しびれ、歩行困難)

図-9 熟年 (50 歳) からのビタミン B₁₂ 吸収障害

(食品タンパク質結合ビタミン B₁₂ 吸収障害)



食品タンパク質結合ビタミン B_{12} 吸収障害への対策

- ・50歳までに十分に B_{12} を体内(肝臓)に貯蔵しておく。
- ・ B_{12} (遊離型)強化食品を摂取する。
- ・胃酸が非存在下でも遊離しやすい B_{12} を含む食品の検索する。
- ・胃酸が非存在下でも B_{12} が遊離しやすい調理・加工方法を検討する。

図-10 食品タンパク質からビタミン B_{12} の遊離

-人工消化系

-口：試料を乳鉢・乳棒で細かく破碎

胃：試料に蒸留水を加え、HClでpHを2.0に調整

ペプシン溶液を添加

37°Cの浴槽中に2時間、120ストローク/分で振とう

腸：胃消化物にNaHCO₃を添加し、pHを5.0に調整

パンクレアチンを添加し、pHを6.5に調整

37°Cの浴槽中に2時間、120ストローク/分で振とう

遠心分離

①上澄み液画分、②沈殿物画分

①上澄み液画分をセントリコン10(分子量10,000)で限外ろ過

③膜透過(低分子量)画分、④膜不透過(高分子量)画分を実験試料として

B₁₂含量を測定した。

図-11 人工消化系を用いて胃酸(HCl)の有無がビタミンB₁₂の消化(食品からの遊離)に及ぼす影響を検討

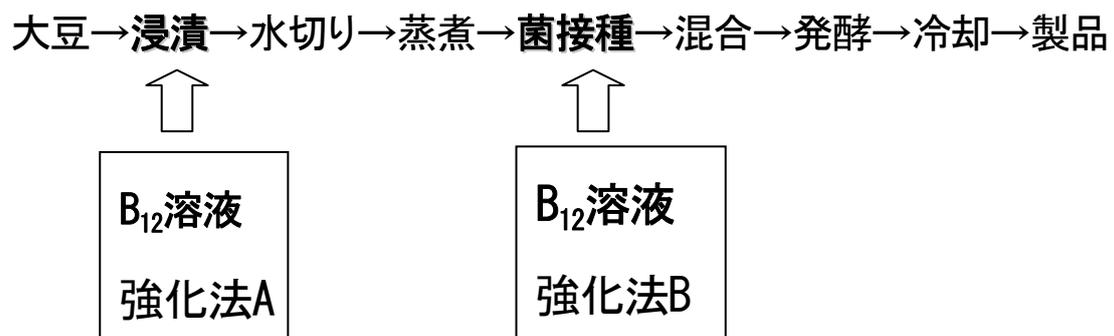


図-12 ビタミンB₁₂強化納豆の調製法



A

B

A: B₁₂溶液に浸漬させて調製したB₁₂強化納豆

(B₁₂量 6.5 μg/100g)

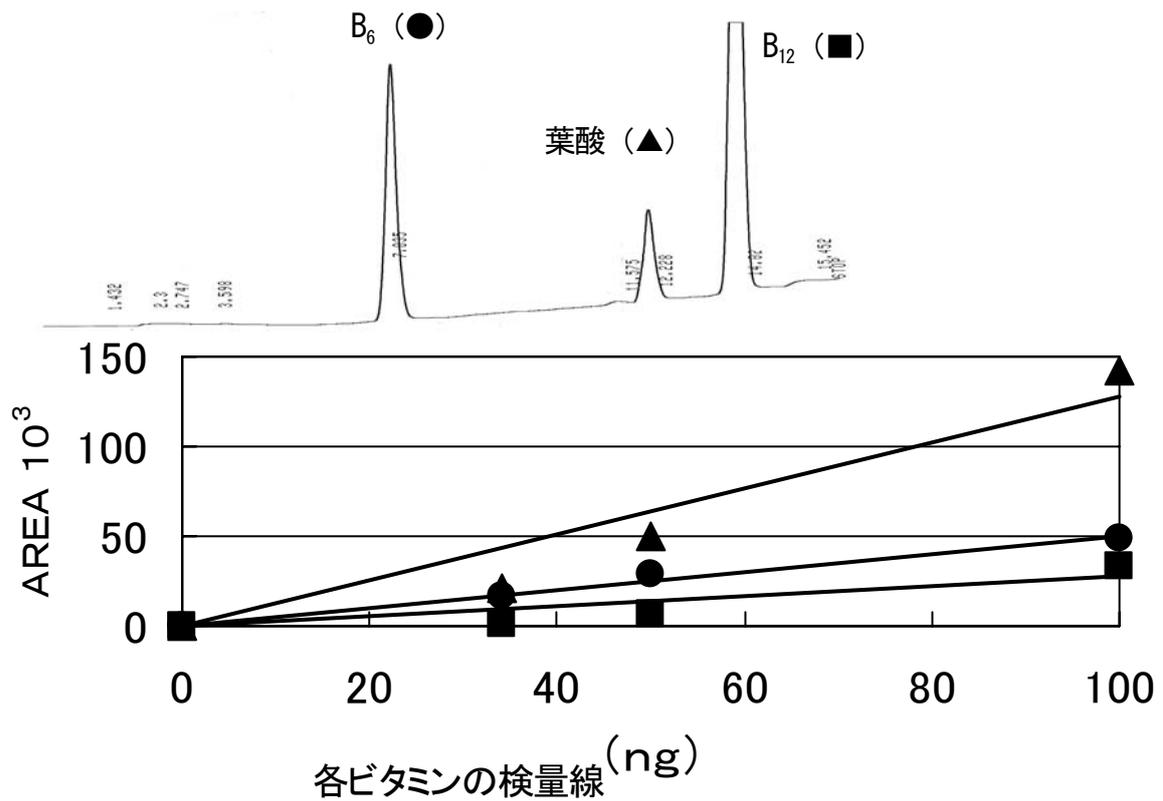
B: 納豆菌添加時にB₁₂溶液を添加して調製したB₁₂強化納豆

(B₁₂量 10.7 μg/100g)

*100%遊離型のB₁₂であった。

胃画分の pH	pH2.0	pH7.0
B ₁₂ 強化納豆A ①上澄み液画分	64.6%*	46.0%*
B ₁₂ 強化納豆A ②沈殿画分	35.4%	54.0%
B ₁₂ 強化納豆B ①上澄み液画分	93.4%*	92.9%*
B ₁₂ 強化納豆B ②沈殿画分	6.6%	7.1%

図-13 ビタミン B₁₂ 強化納豆の人工消化試験



HPLC分析条件

カラム : Wakosil-II 5C18 RS (4.5 x 150 mm)

カラム温度 : 40°C

検出波長 : 278 nm

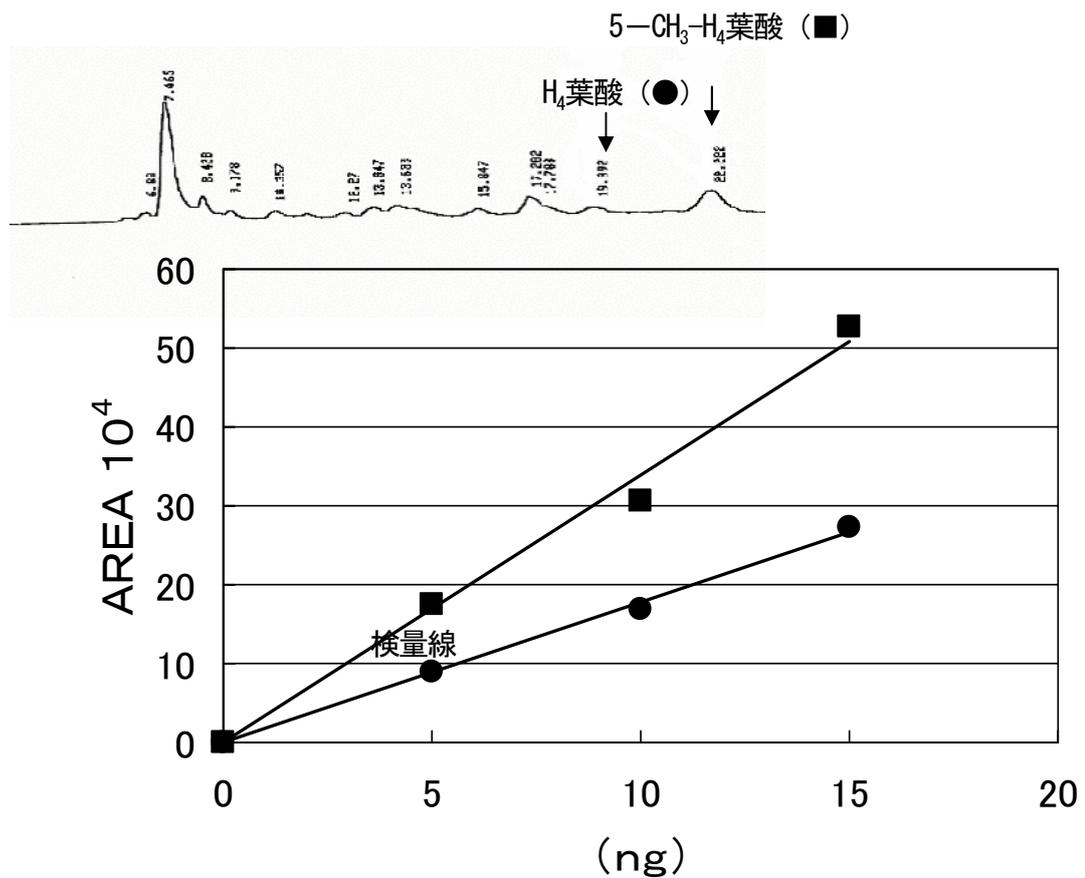
流速 : 1 mL/min

移動層 : 移動相A (50 mM KH₂PO₄ pH 4.5) と移動相B (メタノール: 移動相 A = 50:50) を用いて17分間のメタノールのリニアグラジエントにより溶出

ビタミン強化食パンの分析結果 (100gあたり)

ビタミン	B ₆ (mg)	葉酸 (μg)	B ₁₂ (μg)
添加量	3.5	460	5.8
分析結果	3.5	430	—

図-14 強化ビタミンのHPLC分析



抽出バッファー : 10 mMメルカプトエタノール・10 mMアスコルビン酸
を含む0.1 M KPB(pH 6.0) 溶液

抽出条件

- ① ブロッコリーに抽出バッファーを加えてホモジナイズ
- ② 酵素(アミラーゼ、プロテアーゼ、コンジュガーゼ) 処理
- ③ 遠心分離上澄をHPLCの試料

HPLC分析条件

カラム : TOSOH TSK-GEL ODS-120A (4.6 x 250 mm)

カラム温度 : 30°C

蛍光波長 : 356 nm

図-15 食品中の葉酸関連化合物のHPLC分析

表-1 食用藻類に含まれるビタミンB₁₂含量と形態のまとめ
 (M) 微生物法, (C) 化学発光法で測定した時のビタミンB₁₂含量

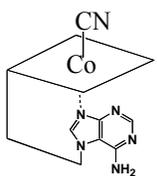
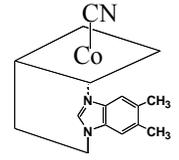
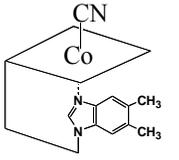
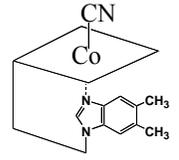
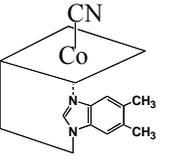
食用藻類	乾燥スサビノリ	乾燥スジアオノリ	スピルリナ錠剤	乾燥ハプト藻	クロレラ錠剤	A.F.A
ビタミン B ₁₂ 含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	54.5(M) 58.6(C)	63.6(M) 69.2(C)	127.2(M) 6.2(C)	130.5(M) 125.4(C)	223.2(M) 205.5(C)	616.3(M)
単離・同定されたコ リノイド化合物	 ビタミン B ₁₂	 ビタミン B ₁₂	 シュードビタミン B ₁₂	 ビタミン B ₁₂	 ビタミン B ₁₂	未同定のコリノイド 化合物
ビタミンB ₁₂ の由来	不明 (合成?)	不明	生合成	外界からの取込み	外界からの取込み	

表-2 めふんに含まれるビタミンB₁₂含量

	ビタミンB ₁₂ 含量 (μg/100g)
新潟産めふん	116.3±13.4
青森産めふん	365.7±80.7
北海道産めふん	556.3±91.85
五訂 日本食品標準成分表	327.6
さけ生腎臓 (北海道)	128.5

表-3 めふんから単離されたコリノイド化合物の TLC および HPLC 分析

	シリカゲル 60TLC		C ₁₈ -HPLC (保持時間：分)
	溶媒 I (R _f 値)	溶媒 II (R _f 値)	
標準ビタミン B ₁₂	0.24	0.61	9.2
精製標品	0.24	0.61	9.2

溶媒 I : 1-ブタノール : 2-プロパノール : 水 = 10 : 7 : 10

溶媒 II : 2-プロパノール : アンモニア水 : 水 = 7 : 1 : 2

表—4 ビタミンB₁₂栄養状態の指標

指標	概要
血液学的検査	平均赤血球容積 (MCV) は正確に測定できるが、赤血球の長命が 120 日であるために B ₁₂ 摂取に対するレスポンスに長時間を要するので、MCV の有効性は限定されている。また、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値も同様である。
血清 B ₁₂ 量	血清 (血漿) の B ₁₂ 濃度は B ₁₂ 摂取と貯蔵の両方を反映している。その最低限界は成人でおよそ 120 から 180 pmol/L (170 から 250 pg/mL) と考えられているが、分析に用いる方法や機器により一定でない。欠乏症が進行するとき、組織に貯蔵された B ₁₂ が血中に供給されることで血清 B ₁₂ 値は一定に保たれると考えられる。そのため、カットオフ値以上の血清 B ₁₂ 値が必ずしも適切な B ₁₂ 状態を示しているとは限らない。
血清 (血漿) メチルマロン酸 (MMA) 量	血清 MMA に関する基準値は 73 から 271 nmol/L である。B ₁₂ が不足するとき血清中の MMA 濃度は上昇する。血清 MMA 濃度は B ₁₂ 欠乏症に非常に特異的であるので、B ₁₂ の栄養状態を示すよりよい指標となる。しかし、EAR の基礎となるような B ₁₂ 摂取と MMA 濃度の関係を直接に調べた研究がない。また、測定法の改良が顕著であるので古い研究からの血清 MMA 値は最近得られた MMA 値と比較できない可能性もある。
血清 (血漿) ホモシステイン量	葉酸あるいは B ₆ (あるいは両方) の不足もまた血清 (血漿) ホモシステイン濃度を上昇させる。この指標は特異性が低く、EAR を策定するのに有効な指標とならない。
ホロトランスコバラミン II 量	3 種の血漿 B ₁₂ 結合タンパク質の中でトランスコバラミン II (TCII) は標的細胞へ受容体を介しての B ₁₂ の取込みに関与している。しかし、血漿 B ₁₂ の 10 から 20% のみが TCII-B ₁₂ 複合体として存在しており、この画分をホロ TCII と呼び、B ₁₂ のよい指標であることが最近認識されつつある。最近、ホロ TCII 量の信頼できる測定法が開発されたが、臨床応用されるにはまだかなりの時間を要する。

表-5 各種生物種におけるメチルマロオニル CoA ムターゼの性質とまとめ

	Anaerobic bacteria	Aerobic bacteria		Protozoan	Coccolithophorid alga	Intestinal	Mammal	
	<i>P. shermanii</i>	<i>M. extorquens</i>	<i>S. meliloti</i>	<i>E. gracilis</i> Z	<i>P. carterae</i>	worm	Sheep liver	
Optimum pH		7.6	7.5	7.5	7.0	7.0	7.5	
temperature (°C)		30	37	35	37	-	-	
K _m for (M)			- NH ₄ ⁺ +NH ₄ ⁺					
MM-CoA	8.9 × 10 ⁻⁵ (R)	3.1 × 10 ⁻⁵ (R,S)	1.3 × 10 ⁻⁴	1.1 × 10 ⁻⁴ (R,S)	5.6 × 10 ⁻⁵ (R,S)	5.9 × 10 ⁻⁵ (R,S)	4.2 × 10 ⁻⁵ (R,S)	2.4 × 10 ⁻⁴ (R)
Succinyl-CoA	2.9 × 10 ⁻⁴	2.9 × 10 ⁻⁴	3.9 × 10 ⁻⁴		3.5 × 10 ⁻⁴	5.5 × 10 ⁻³		6.2 × 10 ⁻⁴
AdoB ₁₂	3.8 × 10 ⁻⁸	3.1 × 10 ⁻⁸	8.6 × 10 ⁻⁶	6.4 × 10 ⁻⁷	2.3 × 10 ⁻⁸	1.3 × 10 ⁻⁵		2.1 × 10 ⁻⁸
Molecular Mass (kDa)	165 79;67(ab)	150 87;70(ab)	165 80(aa)	149 75(aa)	150 75(aa)	147 75(aa)	165 77.5(aa)	
Active site	1	1	(2)	2	(2)	2	2	
Metal ions								
holo-enzyme		insensitive	activate	insensitive	insensitive			
apo-enzyme		insensitive	activate	sensitive	insensitive			
SH-inhibitors								
holo-enzyme	insensitive	insensitive	sensitive	insensitive	sensitive	insensitive	sensitive	
apo-enzyme		insensitive	sensitive	sensitive	sensitive		sensitive	

表-6 胃酸減少が食品からのビタミンB₁₂の遊離に及ぼす影響

胃画分の pH	pH 2.0	pH 4.0	pH 7.0
①上澄み液画分	90%	82%	50%
②沈殿画分	10%	18%	50%
③膜透過 (低分子量) 画分	85%	29%	60%
④膜不透過 (高分子量) 画分	15%	71%	40%
吸収可能なビタミンB₁₂量	76.5%	23.8%	30%

表-7 ビタミンB₁₂強化納豆中のビタミンB₁₂含量

浸漬液中のビタミンB ₁₂ 含量 (µg/250 ml)	浸漬大豆中の推定ビタミンB ₁₂ 含量 (µg/100 g)	納豆中のビタミンB ₁₂ 含量 (µg/100 g)
0	0	検出限界以下
125	26.9	6.5 (24.2%)
250	54.8	11.7 (21.4%)

大豆 100 g を水 (あるいはビタミンB₁₂溶液) 250 ml 中で 24 時間浸漬し、大豆の吸水量から強化されるビタミンB₁₂量を推定した (ビタミンB₁₂は水と共に均一に吸収されると仮定した)。