

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・研究協力者の報告書

#### 9. 日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討

分担協力者 渡邊敏明 兵庫県立大学 教授  
分担研究者 渡邊文雄 高知女子大学 教授  
研究協力者 福井 徹 病体生理研究所 室長

##### 研究要旨

わが国における母乳の水溶性ビタミン含量を明らかにするために、健常な授乳婦から得た母乳のビタミン B<sub>12</sub>、ナイアシン、パントテン酸、葉酸およびビオチンの 5 種類の含量を分析した。母乳は、妊娠ならびに出産が正常な経過で満期出産し、満月齢で 2~5 ヶ月の乳児を完全母乳哺育している日本人授乳婦 25 名から得た。母乳のビタミン B<sub>12</sub> 含量は  $0.28 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$  ( $0.21 \pm 0.11 \text{ nmol/L}$ ) であり、総ナイアシン含量は  $1.55 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$  ( $12.7 \pm 4.6 \text{ nmol/mL}$ )、遊離型ナイアシン含量は  $0.30 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$  ( $2.49 \pm 2.16 \text{ nmol/mL}$ ) で、遊離率は  $17.9 \pm 7.5\%$  であった。総パントテン酸含量は  $6.92 \pm 2.83 \mu\text{g/mL}$  ( $31.5 \pm 13.0 \text{ nmol/mL}$ )、遊離型パントテン酸含量は  $4.84 \pm 2.90 \mu\text{g/mL}$  ( $22.08 \pm 13.17 \text{ nmol/mL}$ ) で、遊離率は  $69.4 \pm 16.9\%$  であった。総葉酸含量は  $34.6 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$  ( $78.5 \pm 22.3 \text{ pmol/ml}$ ) であり、ビオチン含量は  $3.40 \pm 0.68 \text{ ng/ml}$  ( $13.9 \pm 2.8 \mu\text{mol/l}$ )、遊離型ビオチン量は  $0.87 \pm 0.31 \text{ ng/ml}$  ( $3.6 \pm 1.3 \mu\text{mol/l}$ ) で、遊離率は  $25.6 \pm 8.2\%$  であった。これらの値は、今後これらのビタミンの食事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。

## A. 目的

日本人の栄養所要量は、昭和45年に初回の策定が施行されて以来、日本人の体格、生活習慣などに合わせて、5年ごとに改定されている。平成11年(1999年)に第6次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-が策定された<sup>1)</sup>。この改定において、水溶性ビタミン6種類およびミネラル6種類の所要量がはじめて策定された。水溶性ビタミンでは、ビオチンおよび葉酸などの栄養所要量が算出された。栄養所要量の算出においては、これまでに報告されている多くの栄養疫学調査や出納試験の結果が基礎的なデータをして利用されている。さらに、乳幼児において水溶性ビタミンの栄養所要量を算出するためには、母乳中のビタミン含量が一つの指標として使用されている<sup>2)</sup>。

母乳にはタンパク質、炭水化物および脂肪ばかりでなくビタミンやミネラルなどの大部分の栄養素を含まれている。これらの栄養素は、消化、吸収の効率がよく、乳児にとってはバランスの取れた栄養源である。このため、一般に健康な母親の母乳で育てられている乳児には栄養欠乏症はほとんど見られない。これは、母乳には乳児の発育のために必要な栄養素が十分に含まれていることを示している。

このようにこれらのビタミンの所要量の策定においては、十分な検討がなされているとは云えない。とくに日本人を対象としたデータはほとんどなく、食生活が異なる欧米人でのデータを用いて、わが国の栄養所要量を策定している。そこで、本研究では、わが国の授乳婦から採取した母乳を利用して、5種類の水溶性ビタミン含量を分析し、これまでに得られている結果について報告する。

## B. 実験方法

### 1. 被験者

被験者は妊娠ならびに出産が正常な経過で満期出産し、満月齢で2~5ヶ月の乳児を完全母乳哺育している日本人授乳婦を対象とした。被験者は平均年齢31.1歳、平均体重52.8kg、平均身長158.7cmであった。児(男児15名、女児9名、不明1名)はすべて単胎児であり、在胎期間は全児38週以上、妊娠経過は概ね正常で、軽度の妊娠中毒症、

貧血が数名見られた以外に顕著な異常はなかった。被験者の在住地域は、東京都8名、静岡県8名、長野県3名、栃木2名、神奈川県1名、大阪府1名、愛知県1名、和歌山県1名であった。

被験者は、栄養に対する興味も高くバランスのとれた食事を摂取していることを前提とした。対象者の摂取している食事については、3日間の食事記録調査を行った。摂取エネルギーについてPFCバランスで見ると、P:F:C=14.8%:28.6%:55.4%であり、栄養に対する興味が高くバランスのとれた食事を行っていた。母乳は、本趣意に同意し体調の良いポランティアから採取した母乳25検体を使用した。

対象者にはあらかじめ研究の趣旨及び方法を文書で説明し、協力を依頼、同意を得た。また、今回の研究は、すべてヘルシンキ宣言に従って実施され、昭和女子大学における倫理委員会より承認を得て実施したものである(承認番号01-06 平成14年2月4日承認)。

### 2. 母乳採取

母乳は、ほぼ14時~16時の授乳後に、乳房をマッサージした後の後乳を採取して、冷凍母乳パック(カネソン本舗社製)に保存し、分析に供するまで-20°Cにて保存した。

### 3. ビタミンB<sub>12</sub>の分析

母乳に含まれるビタミンB<sub>12</sub>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<sup>3)</sup>に準じて*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (旧名*L. leichimannii*) ATCC7830を用いた微生物的定量法を行った。なお、母乳に含まれるビタミンB<sub>12</sub>含量を考慮して母乳1.0mL(あるいは0.5mL)を試料とし、酢酸緩衝液、KCN溶液、メタリン酸溶液はマニュアルに記載されている容量の1/10量(あるいは1/20量)で抽出を行った。本定量菌は、ビタミンB<sub>12</sub>以外にヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチドにもビタミンB<sub>12</sub>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い、見かけのビタミンB<sub>12</sub>含量からアルカリ耐性因子含量を差し引き、試料中の正確なビタミンB<sub>12</sub>含量を算出した。また、定量には日本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、ライヒマニ用ビタミンB<sub>12</sub>定量基礎培地を

用いて行った。

#### 4. ナイアシンの分析

母乳中のナイアシンは、総量と遊離型に分けて測定した。総ナイアシン含量については、まず採取した母乳 150μL に 20μg/mL イソニコチニアミド溶液（イソニコチニアミドは内部標準として使用）1350μL を加え、オートクレーブにて 121°C, 10 分間処理を行った。この処理により、補酵素型がすべて遊離型のニコチニアミドとなる。冷却後、遠心分離を行い、得られた上清 1200μL に 70%過塩素酸 70μL を加えてよく混合し、遠心上清 1mL を測定用試料とした。測定方法は、Shibata ら<sup>4)</sup>の HPLC を用いる方法によって行った。一方、遊離型ナイアシン含量は、上記の操作において、オートクレーブ処理を省いた方法にて測定した。

#### 5. パントテン酸の分析

母乳中のパントテン酸は、総量と遊離型に分けて測定した。総パントテン酸含量については、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、ホスファターゼとアミダーゼ処理を行った<sup>5)</sup>。処理後の液を *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を検定菌として、定量を行った。一方、遊離型パントテン酸含量は、上記の処理を酵素を添加せずに行ったものを検液とした。

#### 6. 葉酸の分析

母乳を解凍後、遠心分離してクリーム状の上層を取り除き、脱脂した。この試料に 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.1) を加えて、オートクレーブで加熱抽出する。冷却後、酵素溶液を加え、恒温槽で 37°C 2時間反応させる。酵素を失活させた後、0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.1) を加え、ろ過したものをサンプルとした。葉酸の分析は、乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC7469 を用いて行った。母乳の葉酸量は、μmol/l および ng/ml として表した。

#### 7. ビオチンの分析

採取したサンプルに 1/15M リン酸緩衝液を加えたものを測定用試料とした。試料は 4.5N 硫酸溶液で 120°C 1 時間加水分解し、4.5N 水酸化ナトリウム溶液で中和した後に、ビオチン量を測定した。これを総ビオチン量とした。サンプルを脱脂および除タンパクした後、測定したビオチン量を遊離型ビオチンとし、この割合をビオチン遊離率と

した。ビオチンの分析は、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 を用いた微生物学的定量法の一つである比濁法に従った<sup>6,7)</sup>。母乳のビオチン量は、μmol/l および ng/ml として表した。

#### 8. 統計学的解析

母乳に含まれるビオチンおよび葉酸含量の統計学的解析には、すべて統計パッケージ Statview Ver.5.5 を用いて行った。

#### C. 結果および考察

被験者 25 名の母乳に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 含量の分析結果を図 1 に示す。母乳のビタミン B<sub>12</sub> 含量の平均値は  $0.28 \pm 0.14 \mu\text{g/L}$  ( $0.21 \pm 0.11 \text{ nmol/L}$ )、 $0.08 \sim 0.73 \mu\text{g/L}$  の範囲、変動係数 (CV) は 50.6% であった。

被験者 15 名の母乳に含まれる総ナイアシン含量をまとめたものが図 2 である。分析した総ナイアシン含量は、平均すると  $1.55 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$  ( $12.7 \pm 4.6 \text{ nmol/mL}$  ; 平均値  $\pm$  SD)、 $0.95 \sim 2.81 \mu\text{g/mL}$  の範囲、変動係数 (CV) は 36.1% であった。また、遊離型ナイアシン含量は、平均  $0.30 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$  ( $2.49 \pm 2.16 \text{ nmol/mL}$ ) であり、遊離型率は  $17.9 \pm 7.5\%$  であった。

被験者 15 名の母乳に含まれる総パントテン酸含量をまとめたものが図 3 である。分析した総パントテン酸含量は、平均すると  $6.92 \pm 2.83 \mu\text{g/mL}$  ( $31.5 \pm 13.0 \text{ nmol/mL}$  ; 平均値  $\pm$  SD)、 $3.16 \sim 14.15 \mu\text{g/mL}$  の範囲、CV は 40.9% であった。また、遊離型パントテン酸含量は、平均  $4.84 \pm 2.90 \mu\text{g/mL}$  ( $22.08 \pm 13.17 \text{ nmol/mL}$ ) であり、遊離型率は  $69.4 \pm 16.9\%$  であった。

図 4 は、母乳に含まれる葉酸の葉酸の分析結果をまとめたものである。分析した母乳の総葉酸量は、平均値  $34.6 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$  ( $78.5 \pm 22.3 \text{ pmol/ml}$ )、範囲  $17.3 \sim 58.9 \text{ ng/ml}$ 、CV は 28.6% であった。

被験者 25 名の母乳に含まれるビオチンの分析結果をまとめたものが図 5 である。分析した母乳のビオチン含量は、平均すると  $3.40 \pm 0.68 \text{ ng/ml}$  ( $13.9 \pm 2.8 \mu\text{mol/l}$ )、 $2.55 \sim 4.97 \text{ ng/ml}$  の範囲、CV は 20.1% であった。また遊離型ビオチン量は、平均  $0.87 \pm 0.31 \text{ ng/ml}$  ( $3.6 \pm 1.3 \mu\text{mol/l}$ ) であり、遊離率は平均  $25.6 \pm 8.2\%$  であった。

## D. 考察

### 1. ビタミンB<sub>12</sub>

井戸田ら<sup>8)</sup>は日本人の健康な母親の母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を*L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830を用いた微生物学的定量法で測定したところ、母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量は初乳または移行乳 (0.4μg/L) から成熟乳 (0.2μg/L) になるに従い減少し、その平均値は0.2μg/Lであることを報告している。また、Trugoら<sup>9)</sup>も初乳から成熟乳にかけビタミンB<sub>12</sub>含量が減少することを見出している。また、井戸田らが用いた定量菌は、ビタミンB<sub>12</sub>の構造に対してかなり特異性は高いが、ビタミンB<sub>12</sub>以外にアルカリ耐性因子（スクレオチドやデオキシリボスクレオチド）にもビタミンB<sub>12</sub>活性を示す。そのため見かけのビタミンB<sub>12</sub>含量からアルカリ耐性因子含量を差し引き、正確なビタミンB<sub>12</sub>含量を算出する必要があるが、井戸田ら<sup>8)</sup>が用いた方法にはアルカリ耐性因子を補正したとする記載がない。そこで、今回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<sup>3)</sup>に準じた微生物学的定量法を用いてアルカリ耐性因子を補正した母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を算出した結果、日本人の健康な母親25名の母乳に含まれるビタミンB<sub>12</sub>含量の平均値は0.28±0.14μg/Lとなつた。

これまでの報告をみると、母乳中に含まれるビタミンB<sub>12</sub>の定量法に関して、我国では微生物学定量法が用いられているが、欧米では放射性同位体希釈法が主流である。血清ビタミンB<sub>12</sub>含量の測定において放射性同位体希釈法は微生物学的定量法より若干高い値（約1.3倍）を示すことが報告されており<sup>10)</sup>、単純に数値を比較することはできない。井戸田ら<sup>8)</sup>および今回測定した日本人の母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量は、他のものに比べ低値を示したが、これが定量法の違いによるものなのか、人種の差や食生活の違いによるものなのか明らかでない。

第六次改定食事摂取基準では、平均的な日本人の母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を0.2μg/L、泌乳量0.75L/日を用いて摂取量（0.15μg/日）を計算し、0～5ヶ月の乳児の所要量を0.2μg/日と策定された<sup>11)</sup>。食事摂取基準（2005年度版）では平均的な日本人の母

乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を0.2μg/L、泌乳量0.78L/日を用いて摂取量（0.156μg/日）を計算し、目安量を0.2μg/日と策定されている<sup>12)</sup>。一方、米国の食事摂取基準において母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量は我国より高い値（0.42μg/L）が採用され、泌乳量0.78L/日を用いて摂取量（0.33μg/日）が計算され、所要量を0.4μg/日としている<sup>13)</sup>。いずれもWHOの所要量（FAO/WHO1988）の0.1μg/日を上回っているが、その理由はWHOの所要量がビタミンB<sub>12</sub>欠乏症の乳児の臨床症状の回復を指標として策定されているためである。<sup>14)</sup>

ベジタリアンの母親とその乳児の研究において、母乳のビタミンB<sub>12</sub>含量が0.49μg/L以下のとき、母乳栄養乳児の尿中メチルマロン酸排泄量（ビタミンB<sub>12</sub>欠乏の指標）が増加した<sup>15)</sup>。これらの乳児は体内に十分なビタミンB<sub>12</sub>を貯蔵することなしに生まれてくるが、平均摂取量0.24μg/日は乳児のビタミンB<sub>12</sub>バランスを維持するのに不十分であると報告されている<sup>15)</sup>。また、母乳のビタミンB<sub>12</sub>含量が0.49μg/L以下のとき乳児の尿中メチルマロン酸排泄量が増加傾向を示す報告もある。米国の食事摂取基準では乳児のビタミンB<sub>12</sub>欠乏症を予防するだけでなく、疾病予防のためビタミンB<sub>12</sub>の体内バランスを正常に維持するためには少なくとも0.3μg/日以上の摂取量が必要であることを指摘している<sup>13)</sup>。

妊娠中から2～4μg/日のビタミンB<sub>12</sub>サプリメントを摂取すると母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量を高値（平均値0.91μg/L）に維持することができた<sup>13)</sup>。母親の体内ビタミンB<sub>12</sub>貯蔵量よりも食事から毎日摂取されるビタミンB<sub>12</sub>の方が母乳へのビタミンB<sub>12</sub>分泌量に重要な影響を与えると考えられるので<sup>14)</sup>、母親が厳格なベジタリアンである場合はもとより、動物性食品の摂取が低くビタミンB<sub>12</sub>摂取量が不十分な場合は母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量が低下する可能性があるので注意する必要がある。

### 2. ナイアシン

渡邊ら<sup>5)</sup>が、これまでに報告されている母乳中のナイアシン含量についてまとめたので今回は省略する。今回は、さらに、日本人の母乳中のナイアシン含量のデータを得るために行ったが、今回の平均値は

1.55 $\mu$ g/mL であった。前回、我々が報告した値 (2.2 $\mu$ g/mL 程度) と比較すると平均値では、若干低いように思われるが、有意差は認められず、また、他の報告<sup>8,18)</sup>の値と比較しても、有意な差異は認められず、母乳中のナイアシン含量は成熟乳では比較的一定に維持されているものと思われた。母乳中のナイアシンの存在形態であるが、今回の実験により、20%程度が遊離型で 80%程度は補酵素型で存在しているものと推定された。NAD はそのままの形では吸収されず、消化管腔内で NAD → ニコチンアミド + ADP-リボースに加水分解され、遊離型のニコチンアミドとなった後に吸収されるものと思われる<sup>19)</sup>。この意義については、今後の課題である。

### 3. パントテン酸

前報<sup>5)</sup>において、報告したように、母乳中の総パントテン酸含量は、補酵素型のパントテン酸を検定菌である *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 が利用可能な形であるパントテン酸に変換する処理方法の違いにより、値が大きくことなることを明らかにした。今回、母乳中の遊離型のパントテン酸含量を測定し、遊離型率を求めた結果、約 60%が遊離型として存在していることを明らかにした。前報<sup>5)</sup>では、遊離型の占める割合は約 70%であった。従来法のパパイン・ジアスター前処理法を用いた方法では、著者らが用いたアミダーゼ・ホスファターゼ前処理法に比べ、約半分の値を示したことから、母乳中のパントテン酸誘導体はパパイン・ジアスター前処理ではほとんどが遊離型のパントテン酸に変換されていないことを意味する。これまでに報告されている母乳中の総パントテン酸含量と比較すると、今回の値は、6.9 $\mu$ g/mL であり、Jonhson ら<sup>20)</sup>の値に近いものであった。Jonhson ら<sup>20)</sup>は、母乳中の総パントテン酸含量と摂取パントテン酸量とは相関関係があると報告している。

### 4. 葉酸

母乳では、葉酸はモノグルタミン酸型で大量に含まれている。授乳婦における葉酸の減少による母乳の葉酸含量の低下はほとんど見られず、母乳の葉酸レベルは保たれている。このため、たとえビタミン欠乏になっても、母乳栄養児で葉酸の欠乏による

貧血は報告されていない<sup>21,22)</sup>。

これまでの報告で、母乳中の葉酸量はコンジュガーゼ処理の有無によって異なっている。1980 年以前の報告では、酵素処理をしない場合には、0.3-32ng/ml であるのに対して<sup>23,24)</sup>、酵素処理をすると 52-64ng/ml であると報告されている<sup>25,26)</sup>。American Academy of Pediatrics<sup>27)</sup>においても、母乳の葉酸濃度は 2-50ng/ml である、と示している。

酵素処理を行なう場合には、コンジュガーゼのみと、コンジュガーゼに加え、 $\alpha$ -アミラーゼとプロテアーゼを組み合わせることがあり、この方法を 3 酵素処理法と呼ばれている。Lim ら<sup>28)</sup>は、42 名の健康な女性を対象として、授乳 3 ヶ月後と 6 カ月後に母乳を採取し、酵素処理の違いによる分析法を比較している。この結果、3 酵素処理では、葉酸コンジュガーゼ単独処理と比較して、85%の葉酸の増加が得られている。つまり、母乳中の葉酸濃度は授乳後 3 ヶ月と 6 ヶ月で差異は認められず、単独処理では平均  $46.5 \pm 2.3$  ng/ml であったが、3 酵素処理では  $86.0 \pm 2.5$  ng/ml であり、3 酵素処理の有用性を示唆している。

Tamura ら<sup>29)</sup>は、健康に発育している乳児 (3-25 週齢) を出産した 39 名の健常な日本人女性から母乳を採取して、葉酸量をコンジュガーゼ処理して検討した。この結果、母乳中の総葉酸量は平均 141.4ng/ml であり、遊離型葉酸は約 40% であった。並行して、この内 16 名の女性にプロテロイルモノグルタミン酸 1mg/日を 4 週間負荷した後に母乳を採取して、葉酸の影響を検討したが、葉酸を投与前後でそれぞれ 130.2 および 136.6ng/ml と、母乳中の葉酸濃度に変化は見られなかった。なお、この濃度から算出した場合、1 日あたりの摂取量は 57-165 $\mu$ g と推定される。

Smith ら<sup>30)</sup>の報告では、11 名の授乳婦 (23-38 歳) から授乳後 6 週および 12 週で採取した 132 サンプルの 1 酵素処理で分析したところ、母乳の総葉酸量は平均 78.9ng/ml であり、遊離型は 58% であった。なおこれらの授乳婦は妊娠中に葉酸 0.8-1mg が含まれているビタミンミネラルサプリメントを摂取していた。なお、この結果から乳児の摂取量を算出すると、6 週齢および 12 週齢でそれぞれ 45.5 および

50.5 $\mu$ g/日となり、Tamura らの報告と比べ低値である。

Smith ら<sup>31)</sup>は満期産の乳児 67 名の葉酸について出生から 1 年間観察した。生後 6 週と 3 ヶ月において採取した母乳の葉酸量は平均 85 $\mu$ g/ml であった。これらの時期において、乳児 14 名の葉酸摂取量（約 65 および 70 $\mu$ g/日）は同じであったが、母乳からの葉酸摂取量は、6 ヶ月（85 $\mu$ g/日）では増加したが、9 ヶ月（50 $\mu$ g/日）では減少していた。

井戸田ら<sup>8)</sup>は、全国 46 地区に在住する 17-41 歳の授乳婦 2,434 名から得た母乳 2,727 サンプルの葉酸量を HPLC 法で分析した。母乳の葉酸濃度は、採乳時期により平均 3.2-5.4ng/ml の範囲にあり、初乳から移行乳、成熟乳と増加し、その後減少することを示している。

Mackey および Picciano<sup>32)</sup> は、授乳婦 42 名に葉酸サプリメント 0mg あるいは 1mg を与え、分娩後 3 ヶ月と 6 ヶ月後に母乳や母親の葉酸の状態を検討した。これらの結果、サプリメントを摂取していない場合、母乳葉酸量は、3 ヶ月に比べ、6 ヶ月では有意に減少していた。しかしながら、葉酸サプリメントを与えている場合には母乳葉酸量の減少は認められていない。なお、これらの葉酸量から 3 ヶ月および 6 ヶ月における母乳からの葉酸摂取量は、それぞれ 62 $\mu$ g および 55 $\mu$ g/日（母乳以外から 14 $\mu$ g）である。

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-では、平均的な母乳の葉酸量を 54 $\mu$ g/l、平均母乳量を 0.75l/日として、0-5 ヶ月の乳児の所要量を 40 $\mu$ g/日としている<sup>1)</sup>。一方、食事摂取基準 2005 年においては、日本人の成熟乳の葉酸値として、54 $\mu$ g/l が採用され、哺乳量 0.78 l から、目安量は 0-5 ヶ月の乳児で 42 $\mu$ g/日、6-11 ヶ月の乳児で 63 $\mu$ g/日とされた。

## 5. ビオチン

これまでに報告された本邦および欧米の母乳ビオチン含量をみると、まず母乳中のビオチンの生物有効性を知るために、Heard ら<sup>33)</sup>は、母乳を限外濾過膜にかけてビオチンの存在状態について検討した。母乳を無処理、酸加水分解処理あるいは限外濾過した後に放射化学分析によってビオチンを定量した。この結果、母乳のビオチン濃度は

平均 20.3 $\pm$ 2.0ng/ml であり、限外分子量 500Da の膜をとおしても、無処理および加水分解処理した母乳ビオチンの 99% 以上のビオチンが回収された。このようなことから、母乳中のビオチンはタンパク質とは結合せずに、乳児に利用され易い状態で存在していることを示唆している。

Hood と Johnson<sup>34)</sup> は、同位体希釈法を利用して、母乳を酸加水分解した後にビオチン量を分析した。分娩後の母乳中ビオチン量の変化を見ると、分娩後 1 日目では 295 $\pm$ 37ng/100ml であるのに対して、7 日目および 49 日目では 681 $\pm$ 58 ng/100ml および 1246 $\pm$ 81 ng/100ml と増加がみられた。このように初乳に比べ、成熟乳では高いビオチン濃度である。一方、授乳婦に 1 日あたり 3mg のビオチンサプリメントを与えると、摂取 5 日後および 10 日後には成熟乳中のビオチン量が 20-30 倍に増加した。10 日後のビオチン増加量は 46 $\mu$ g/100ml で、泌乳量を 1 日あたり 780ml とするとビオチン分泌量は 358 $\mu$ g/日となり、これはビオチンサプリメントの 12% に相当する。なお尿中ビオチン排泄量もビオチンサプリメント摂取 10 日後には 16 倍に増加していた。

ビオチンの定量法として一般的に乳酸菌による微生物学的定量法が使用されている。この方法で、Goldsmith ら<sup>35)</sup>は母乳を酸加水分解した後にビオチン量を pH4.5 で測定している。母乳のビオチン含量は、放射化学分析法と比べ低値であるが、初乳期、移行期、成熟期でそれぞれ平均 0.07、0.3、0.47 $\mu$ g/100ml と増加している。Ford ら<sup>36)</sup>の報告でも、満期産（39 週以降）の母乳をみると、0.21、2.21、5.33ng/ml と泌乳時期に伴って増加している。なお早期産（29-34 週）の母乳でビオチン濃度にも大きな違いは見られていない。さらに出産後 10 日から 6 ヶ月の間に得た成熟乳でも、ビオチン含量は 0.87 $\pm$ 0.42 $\mu$ g/100g であった<sup>37)</sup>。

Hirano ら<sup>38)</sup> は、日本人授乳婦を対象にして、微生物学定量法の 1 つであるプレート法<sup>39)</sup>で母乳ビオチン量を分析している。この結果でも、これまでの結果と同様に、泌乳時期に従ってビオチン量が増加している。35 名の成熟乳のビオチン含量は平均 5.2 $\pm$ 2.1ng/ml と欧米の報告と比べて差異は認められない。また、これらの報告は、乳

酸菌を用いて測定したものであるが、測定法の違いによる差異は認められない。なお、遊離型ビオチンの割合が、初乳、移行乳および成熟乳でそれぞれ 53.9、64.0、77.2%と増加しているが、これは Heard ら<sup>33)</sup>の結果とは異なり、今後の検討が必要である。

ビオチン定量の前処理として、ビオチンを遊離型にするため一般に強酸性溶液による酸加水分解が用いられているが、Salmenpera ら<sup>40)</sup>はパパイン処理を用いている。母乳では、出産後 5 日間ではほとんどの授乳婦でビオチンは認められなかった。

しかし、出産 2 カ月後ではビオチン量は 4.5 μg/l に増加し、これ以降では変化は見られず一定である。また母乳中のビオチン量と血漿中のビオチン量との間には有意な関連が認められている。

以上のように、これまでの報告では、初乳ではビオチン濃度は多くの場合 0.1 μg/100ml 以下である。しかし、移行乳から成熟乳へと増加し、成熟乳での総ビオチン含量は平均で約 0.5 μg/100ml である。このように母乳中のビオチン量は、初乳に比べて成熟乳で高値を示している。また、人種差は認められず食生活による影響はあまりないものと考えられる。一致した結果が得られていないが、ビオチンの一部はタンパク質と結合しているものと思われる。

今回測定した母乳ビオチン含量については、平均 3.9 μg/ml であった。採取時期や季節によって大きな差異は認められなかった。しかしながら、これまでに報告されている成熟乳のビオチン含有量と比べ低値を示している。この相違については明らかではない。なお、血清中のビオチン濃度は季節によって変動することが報告されている<sup>15)</sup>が、母乳では季節変動はみられず、夏季と冬季での摂取している食事には影響されないことが示唆される。

ビオチンは、第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、栄養所要量がはじめて策定された<sup>1)</sup>。これまでの各國における報告から、成熟乳のビオチン量は平均 6 μg/l である、としている<sup>2)</sup>。この値に基づき、一日の哺乳量が 750ml として、0 ～ 5 ケ月乳児におけるビオチン摂取量を 4.5 μg/日 としている。0-5 ケ月の乳児で、5 μg/日、6-11 ケ月の乳児で 6 μg/日 とされた。し

かしながら、平成 12 年（2002 年）に改訂された五訂日本食品標準成分表にはビオチンは収載されていない。また平成 15 年（2003 年）に食品添加物として認可されたが、使用が栄養機能食品に限られている。つまり食品や調製粉乳への添加はいまだに許可されていない。食事摂取基準 2005 年においては、日本人の成熟乳の値として、5.2 μg/1 が採用され、哺乳量 0.78 l から目安量は 0-5 ケ月の乳児で 4 μg/日、6-11 ケ月の乳児で 10 μg/日 とされた。

#### 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. 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. Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic acid, Biotin, and Choline. National Academy Press, Washington DC
3. 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
4. Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 424, 23-28.

5. 渡邊敏明, 谷口歩美, 福井徹, 太田万里, 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ビオチン, パントテン酸およびナイアシンの含量. ビタミン 78, 399-407.
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. 井戸田正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則文, 前田忠男 (1996) 最近の日本人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誌, 10, 11-20.
9. Trugo, N. M., Sardinha, F. (1994) Cobalamin and cobalamin-binding capacity in human milk. *Nutr. Res.*, 14, 22-33.
10. Arnaud, J., Cotisson, A., Meffre, G., Bourgeay-causse, M., Augert, C., Favier, A., Vuillez, J. P., Ville, G. (1994) Comparison of three commercial kits and a microbiological assay for the determination of vitamin B<sub>12</sub> in serum. *Scand. J. Clin. Invest.*, 54, 235-240.
11. 健康・栄養情報研究会 (1999) 第六次改定日本人の栄養所要量 食事摂取基準 第一出版社, 96-98.
12. 食事摂取基準 (2005 年度版)
13. Vitamin B<sub>12</sub> (1998) In: Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington DC, p 306-356.
14. Food and agriculture organization/world health organization (1988) Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub>. FAO food and nutrition series No23, pp62-73.
15. Specker, B. L., Miller, D., Norman, E. J., Greene, H., Hayes, K. C. (1988) Increased urinary methylmalonic acid excretion in breast-fed infants of vegetarian mothers and identification of an acceptable dietary source of vitamin B<sub>12</sub>. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47, 89-92.
16. Donangelo, C. M., Trugo, N. M., Koury, J. C., Barreto Silva, M. I., Fretias, L. A., Feldheim, W., Barth, C. (1989) Iron, zinc, folate and vitamin B<sub>12</sub> nutritional status and milk composition of low-income Brazilian mothers. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 43, 253-266.
17. Luhby, A. L., Cooperman, J. M., Donnenfeld, A. M., Herrero, J. M., Teller, D. N., Wenig, J. B. (1958) Observations on transfer of vitamin B<sub>12</sub> from mother to fetus and newborn. *Am. J. Dis. Child.*, 96, 532-533.
18. 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.
19. Gross CJ, Henderson LM (1983) Digestion and absorption of NAD by the small intestine of the rat. *J Nutr* 113, 412-420.
20. Johnson L, Vaughan L, Fox HM (1981) Pantothenic acid content of human milk. *Am J Clin Nutr* 34, 2205-2209.
21. O'Connor D, Green L, Picciano MF (1997) Maternal folate status and lactation. *J Mammary Gland Neoplasia* 2, 279-289.
22. 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, D.C.
23. Lawrence JM, Herrington BL, Naynard LA () Human milk studies. XXVII. Comparative values of bovine and human milks in infant feeding. *Am J Dis Child*
24. Wiilliams 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.
25. Matoth Y, Prinkas A, Sroka C (1965) Studies on folic acid in infancy. III. Folates in breast fed infants and their mothers. *Am J Clin Nutr* 16, 356-359.
26. Ford JE, Scott KJ (1968) The folic acid activity of some milk foods for babies. *J Dairy Res* 35, 85-88.
27. American Academy of pediatrics, Committee on Nutrition (1981) Nutrition and lactation. *Pediatrics* 68, 435-443.
28. Lim H-S, Mackey AD, Tamura T, Wong SC, Picciano MF (1998) Measurable human milk folate is increased by

- treatment with  $\alpha$ -amylase and protease in addition to folate conjugase. *Food Chem* 63, 401-407.
29. Tamura T, Yoshimura Y, Arakawa T (1980) Human milk folate and folate status in lactating mothers and their infants. *Am J Clin Nutr* 33, 193-197.
  30. 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 Pedatr Gastroenterol Nutr* 2, 622-628.
  31. Smith AM, Picciano MF, Deering RH (1985) Folate intake and blood concentration of term infants. *Am J Clin Nutr* 41, 590-598.
  32. Mackey and Picciano (1999)
  33. Heard GS, Redmond JB, Wolf B (1987) Distribution and bioavailability of biotin in human milk. *Fed Proc* 46, 897. (Abstract)
  34. Hood RL, Johnson AR (1980) Supplementation of infant formulations with biotin. *Nutr Rep Internat* 21, 727-731.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. 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.
  39. 福井徹
  40. Salmenpera L, Perheentupa J, Pispa JP, Siimes MA (1985) Biotin concentrations in maternal plasma and milk during prolonged lactation. *Internat J Vit Nutr Res* 55, 281-285.

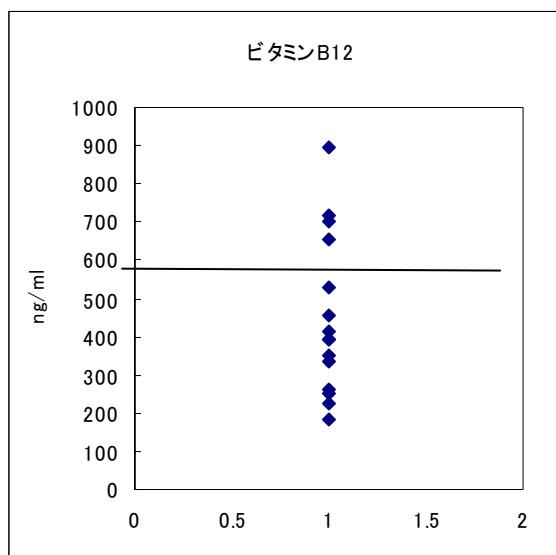


図 1 母乳中のビタミン B<sub>12</sub> 含量

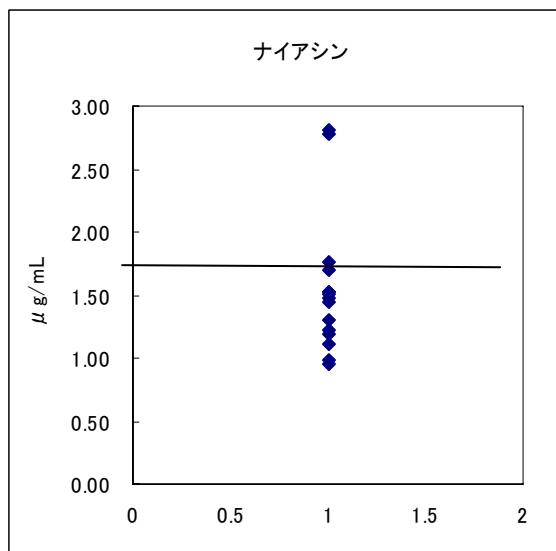


図 2 母乳中のナイアシン含量

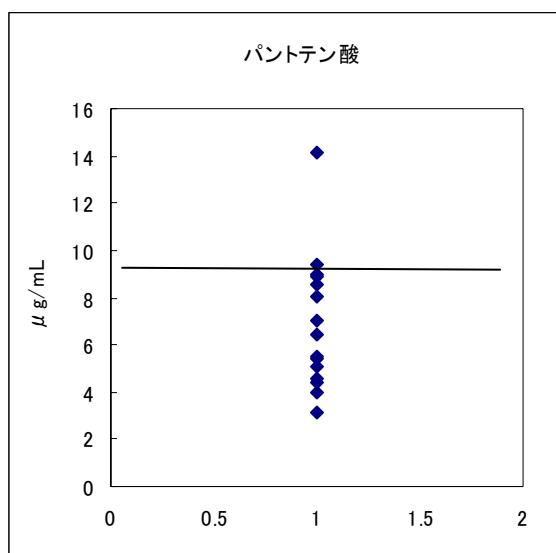


図3 母乳中のパントテン酸含量

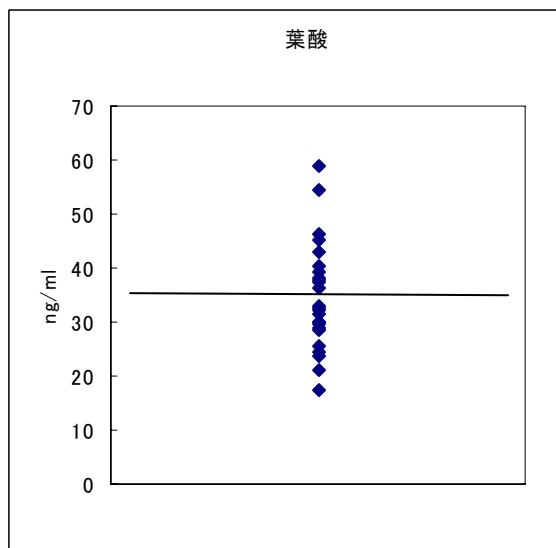


図4 母乳中の葉酸含量

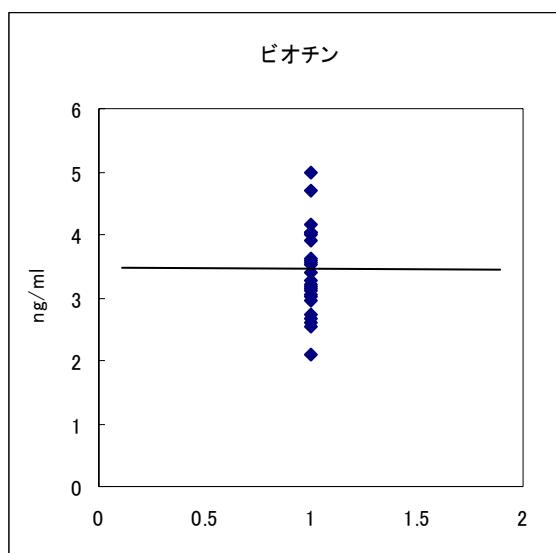


図5 母乳中のビオチン含量