

平成 17 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

13. 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 教授

研究協力者 宮本恵美 高知女子大学 助手

研究要旨

ビタミン B₁₂ の栄養評価について、①新規なビタミン B₁₂ 栄養状態の指標として血球ビタミン B₁₂ 酵素（活性およびタンパク質量）に着目し、ビタミン B₁₂ 欠乏ラットを用いてバイオマーカーとしての有効性を検討した。②中高年者から発症する食品タンパク質結合性ビタミン B₁₂ 吸収障害の分布について、日本人 70 歳代高齢者で予備調査を実施した。

食品分野について、①魚肉のビタミン B₁₂ 含量と各種加熱調理の影響について検討した結果、魚肉中のビタミン B₁₂ の大部分が血合肉に存在することが明らかとなった。また、魚肉加工食品中のビタミン B₁₂ 含量について検討した。②栄養補助食品として利用される藍藻（AFA）に含まれるコリノイド化合物を単離・同定した結果、ヒトにとって生理的に不活性なシュードビタミン B₁₂ であった。

栄養改善分野について、発酵食品めふんを用いた遊離型ビタミン B₁₂ の補完について検討した。市販マクロビオテクス料理本に記載されているメニューの栄養評価と改善法について検討した。

I. 栄養評価

I-1. 新規な B₁₂ 栄養状態の指標の検討：血球 B₁₂ 酵素

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 (バリン, 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)¹⁾ 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)²⁾ 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。

方法

1) 血球の調製法

B₁₂ 給与および欠乏ラットの血液 5 mL を 4℃ で 1500 × g 10 分間遠心分離した。沈殿画分を PBS(-) 10 mL で 2 回洗浄したものを実験に用いた。

2) 粗酵素液の調製法

血球 0.5 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) 0.5 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℃ で行った。

3) 血球 B₁₂ 酵素の Non-IR 高感度測定法

3-1. 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³⁾を改良して行った。また, Banerjee ら⁴⁾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 ヒドロキシ 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-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℃ 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℃ 10 分間酵素反応を行った。酵素反応終了後, 直ちに 100℃ 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℃, 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℃ 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℃, 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。

3-2. 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⁵⁾を改良して行った^{6, 7)}。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 μ M AdoB₁₂ (シグマ社製), 133.3 μ M (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 μ L 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 μ L 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 μ m, ミリポア社製) でろ過し, ろ過液 20 μ L 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-10Avvp UV-VIS 検出器を用いた。HPLC の分析条件は Cosmosil 5C18-AR-II (3.0 $\times$ 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。

3) ヒト組換えメチルマロニル CoA ムターゼ抗体

大阪府立大学大学院中野長久先生より譲渡されたものを用いた。

3) 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。

結果および考察

B₁₂ 供給および欠乏ラットの血球中のメチルマロニル CoA ムターゼおよびメチオニン合成酵素活性を HPLC 法で測定した結果を表 1 に示す。

血球中のメチルマロニル CoA ムターゼ活性は, B₁₂ 欠乏により, 約 9 倍の活性上昇が観察され, 血球サンプルの数ヶ月間の冷凍保存 (−80°C) による活性の消失は検出されなかった。一方, メチオニン合成酵素活性は, コントロールの B₁₂ 給与ラットにおいても非常に低値を示し, 冷蔵保存中に顕著な活性低下が観察された。

また, ヒト組換えメチルマロニル CoA ムターゼ抗体を用いたウェスタン・ブロット分析の結果を図 1 に示す。B₁₂ 給与ラットの血球抽出液において抗体と反応するものは観察されなかったが, B₁₂ 欠乏ラットにおいて免疫反応物を観察することができた。以上の結果から, 酵素の保蔵安定性, 活性測定法の簡便さなどから血球メチルマロニル CoA ムターゼが B₁₂ の栄養状態の指標の 1 つとして利用できる可能性が示唆された。

I-2. 母乳の B₁₂ 含量

平成 17 年度に採取された母乳 126 サンプルの B₁₂ 含量を測定した。

方法

B₁₂ 定量方法

母乳に含まれる B₁₂ の定量は, 五訂日本食品標準成分表で採用されている分析マニュアル⁸⁾ に準じて *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (旧名 *L. leichimannii*) ATCC7830 を用いた。なお, 母乳の量と母乳中に含まれる B₁₂ 含量を考慮して母乳 0.5 mL を試料とし, 酢酸緩衝液, KCN 溶液, メタリン酸溶液量はマニュアルに記載されている用量の 1/20 量で抽出を行った。本定量菌は B₁₂ 以外にヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチドにも活性を示すため, これら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 B₁₂ 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 B₁₂ 含量を算出した。また、定量には日水製薬株式会社製のライヒマニ保存用培地、ライヒマニ摂取用培地、ライヒマニ用 B₁₂ 定量基礎培地を用いて行った。

結果および考察

全試料中の B₁₂ 含量の分析結果を図 2 にまとめた。母乳 126 サンプルの B₁₂ 含量の平均は $0.943 \pm 0.531 \mu\text{g/L}$ ($0.696 \pm 0.392 \text{ nmol/L}$ 、平均値 $\pm$ 標準偏差)、 $0.22\text{--}2.70 \mu\text{g/L}$ ($0.16\text{--}1.99 \text{ nmol/L}$) の範囲、変動係数 (CV) は 56.3%、中央値は $0.785 \mu\text{g/L}$ (0.5792 nmol/L) であった。

これまでに報告されている母乳中の平均的な B₁₂ 含量をまとめたものが表 2 である。母乳中に含まれる B₁₂ の定量法として、我が国では微生物学的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。放射性同位体希釈法は血清 B₁₂ 含量の測定においては、微生物法より若干高い値 (約 1.3 倍) を示すことが報告されており、⁹⁾ これを母乳に単純にあてはめることはできないが、これまでの報告からは微生物学的定量法に比べて非常に高値であった。これは、定量法の違い、人種の差や食生活の違い等が起因すると思われるが、しかし、今回の結果は $0.943 \pm 0.531 \mu\text{g/L}$ とこれまでの日本人女性の母乳中 B₁₂ 含量の報告^{10, 11)} よりも顕著に高値であり、むしろ放射性同位体希釈法で分析を行った、Casterline ら¹²⁾ ($0.93 \mu\text{g/L}$) や Sandberg ら¹³⁾ ($0.97 \mu\text{g/L}$) の報告と近値であった。母乳中の B₁₂ 含量は初乳から成熟乳になるに従って減少するとの報告がある。^{10, 14)} 今回の試料については採乳時期や食事内容について検討がされていない無作為なものであるため、前回の報告と比較して高値を示した理由については何に起因するものか明らかにできなかった。

日本人の食事摂取基準 (2005 年版) では平均的な日本人の母乳の B₁₂ 含量 $0.2 \mu\text{g/L}$ 、哺乳量 $0.78 \mu\text{g/L}$ を用いて摂取量 ($0.156 \mu\text{g/day}$) を算出

し、目安量を $0.2 \mu\text{g/day}$ として策定され¹⁵⁾、米国の食事摂取基準においては母乳中の B₁₂ 含量は我が国より高い値 ($0.42 \mu\text{g/L}$) を採用し、哺乳量 $0.78 \mu\text{g/L}$ を用いて摂取量 $0.33 \mu\text{g/day}$ を算出し、所要量を $0.4 \mu\text{g/day}$ としている。このように日本の B₁₂ の食事摂取基準は米国の 1/2 であり、乳児の B₁₂ 欠乏症から臨床症状の回復を指標として策定されている WHO の所要量 (FAO/WHO1988) は $0.1 \mu\text{g/day}$ を上回ってはいない、¹⁶⁾ 非常に低いといえる。人種の違いや食生活の違いはあるが、今回の結果から考慮すると、日本人乳児の B₁₂ の食事摂取基準は次回の策定では再検討する必要がある。

I-3. 尿中の B₁₂ 代謝物

平成 14 年度の日本人の食事摂取基準のための基礎研究において B₁₂ 推奨量 ($2.4 \mu\text{g/day}$) を摂取した成人男女の尿中 B₁₂ 排泄量の日内変動を調べた結果¹⁷⁾ においても尿中 B₁₂ 排泄量に有意な変化は認められず、体内 B₁₂ および B₁₂ 関連物質の顕著な日内変動は存在しないという結果¹⁸⁾ と一致した。今回は、尿中に B₁₂ 代謝物の存在の有無を検討するためにスポット尿を用いてシリカゲル 60TLC・バイオオートグラム法により検討した。

方法

1) 尿：

B₁₂ を含むサプリメントを摂取していない健康な成人男女 6 名のスポット尿を採取した。

2) 尿からの B₁₂ の抽出法

尿： 50 mL

(尿に沈殿物がある場合は、 $3000 \times g$ 、10 分間の遠心分離を行う。)

0.1M 酢酸緩衝液、pH 4.8: 10 mL

蒸留水: 38 mL

0.025 g/100 mL KCN 水溶液: 1 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 (1 mL) を加える。3000×g, 10 分間遠心分離上澄画分を分離した。その後, 75%(v/v) エタノールで洗浄・蒸留水で平衡化させたセップパック C18 カートリッジ (5g) に尿抽出液全量を負荷させた。蒸留水 20 mL でカートリッジを洗浄後, 75%(v/v)エタノール 20 mL で吸着物を溶出させた。溶出液を減圧下でロータリエバポレーターを用いて乾固させた。乾固物を蒸留水 1 mL に溶解し, 沈殿物を遠心分離により除去し, 上澄液を分析サンプルとした。

3) B₁₂依存性大腸菌 *E. coli* 215 を用いたバイオオートグラフィー

上述の尿抽出液 1 - 2μL をシリカゲル 60 アルミニウムシート (10×10cm) にスポットし, 展開溶媒 2-プロパノール/アンモニア水/蒸留水 (7/2/1) を用いて室温・暗黒下で展開させた。展開後, TLC シートを完全に展開溶媒がなくなるまでドライヤーで風乾させた。その後, 定法により B₁₂ 依存性大腸菌 *E. coli* 215 を含んだ寒天培地 (角型シャーレ) の上に TLC シートを気泡がはいらないように重ね, 37°C で約 20 時間培養を行う。その後, TLC プレートを除去し, 寒天培地上に 4% (w/v) TTC エタノール溶液を噴霧し, 1 時間程度 37°C でインキュベートさせ, 大腸菌を赤色に染色した。

結果および考察

成人男女 6 人のスポット尿を用いてシリカゲル 60TLC・バイオオートグラム法により尿中の B₁₂ 代謝物の存在の有無を検討した。その結果, 図 3 に示すように, 個々人により尿中 B₁₂ 含量にかなりの相違が観察された。また, 6 サンプル中 5 サンプルは標準の B₁₂ の R_f 値よりも若干高値を示したが, 1 サンプルのみ顕著に標準 B₁₂ と R_f 値の異なるものが存在した。HPLC 分析を行った結果も標準の B₁₂ の保持時間より, 両者ともブロードなピークを示し, 明らかに標準の B₁₂ と異なる構造を有することが示唆された。

現在, 尿中排泄量の多い試料を多量に集め,

B₁₂ 代謝物の詳細な情報を得るよう検討している。

I-4. 日本人高齢者における食品タンパク質結合性 B₁₂ 吸収障害の分布調査

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¹⁹⁾。我が国において胃酸分泌の減少が B₁₂ 栄養状態に及ぼす影響について調査した報告がない。そこで, 今回, 日本人の 70 歳代成人男女の B₁₂ の栄養状態 (血清 B₁₂ 量) と胃酸分泌の減少 (血清ガストリン量) の関係を検討した。

方法

1) 血清

日本人 70 歳代成人男女の血清サンプルは, 兵庫県立大学渡邊敏明先生から譲渡していただいた。

2) 血清 B₁₂ 量およびガストリン量

1 回目の調査 (調査 I) では, 99 名分の血清サンプルを高知市の臨床検査会社に分析依頼し, 血清 B₁₂ 量 (CLIA 法) とガストリン量 (RIA 法) を測定した。

2 回目の調査 (調査 II) では, すでに血清 B₁₂ 量が測定済みの約 400 名分の血清サンプルを用いて, B₁₂ 欠乏群, B₁₂ 低値群, B₁₂ 正常群に分けた後, 血清ガストリン量 (RIA 法) を臨床検査会社に分析依頼した。

結果および考察

調査 I において日本人の 70 歳代成人男女の血清サンプル (99 名分) の血清 B₁₂ 含量を分析した結果, B₁₂ 欠乏群に 4 名, B₁₂ 低値群に 22 名となり, 70 歳代成人の約 25% が血清 B₁₂ 含量の低い状態であることがわかった。また, 胃酸分泌減少との関係を調べるために血清ガストリン含量を測定した結果, B₁₂ 欠乏群および低値群で増加傾向を示したが (表 3), 有意差は認めら

れなかった。

調査ⅠにおいてB₁₂欠乏群が非常に少なかったため、調査Ⅱにおいては、すでに血清B₁₂含量測定済みの約400名の血清サンプルの中からB₁₂含量を指標に3群にわけ、B₁₂含量と胃酸分泌減少との関係を調べるために血清ガストリン含量を測定した。その結果、B₁₂欠乏群と正常群の間で血清ガストリン含量の差がより明確になったが(表4)、有意な結果は得られなかった。

Ⅱ. 食品

Ⅱ-1. かつお魚肉のB₁₂含量と各種加熱調理が魚肉B₁₂含量に及ぼす影響

日本は世界有数の魚介類の消費国であり、魚介類から24.6%ものタンパク質を摂取しており、畜肉類の16.6%を大きく上回っている¹⁹⁾。また、魚介類はその他の栄養素(脂質、ビタミン、ミネラル)のよい供給源ともなっており¹⁹⁾、魚介類が日本人にとって重要な食品であることを示している。

B₁₂は主に動物性食品に含まれており、一部の藻類や微生物が関与する発酵食品(糸引き納豆²⁰⁾、テンペ²¹⁾、後発酵茶^{22, 23)})を除き植物性食品にはほとんど含まれていない。²⁴⁾ 米国では、畜肉や牛乳がB₁₂のよい供給源であるが、²⁵⁾ 我が国では魚介類が主要な供給源となっており²⁶⁾、栄養学的に重要である。しかし、畜肉²⁷⁾や牛乳²⁸⁾に比べ、魚肉のB₁₂含量や化学的性質、ならびに加熱調理によるB₁₂の損失についての知見は非常に少ない。

そこで、比較的大型で血合肉も食する赤身魚としてかつおに着目し、魚肉各部位のB₁₂含量ならびに血合肉中に含まれるコリノイド化合物の同定を行った。また、かつおは、生で刺身やタタキとして食する場合が多いが、まぐろなど

の赤身魚のモデルとして各種加熱調理が魚肉B₁₂含量に及ぼす影響を検討した。

Ⅱ-2. 市販ふりかけおよび茶漬けの素中のB₁₂含量

B₁₂のよい供給源である魚介類や藻類を用いた加工食品の中で、日本人が日常的に飯と共に食することができ、且つ五訂/day 本食品標準成分表に記載されていない食品としてふりかけと茶漬けの素に着目した。これら五訂日本食品標準成分表に未記載の加工食品中のB₁₂含量を測定し、数値を定めると共に、B₁₂のよい供給源になりえるかどうかを検討した。

方法

1) 試料

市販のふりかけおよび茶漬けの素は、高知市内の市場で購入して実験に用いた。

2) B₁₂の抽出・定量法

B₁₂の定量は、五訂日本食品標準成分表で採用されている分析マニュアル²⁹⁾に準じて*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (旧名 *L. leichimannii*) ATCC7830を用いた微生物学的定量法で行った。なお、定量に用いる培地は、日水製薬株式会社製のライヒマニ保存用培地、ライヒマニ接種用培地、ライヒマニ用B₁₂定量基礎培地を用いた。

ふりかけおよび茶漬けの素5~10g程度をフードプロセッサーで粉碎後、分析試料2gを正確に秤量し、定法によりシアン化カリウムを含む酢酸緩衝液(pH4.5)中でB₁₂を加熱抽出した。

また、本定量菌は、B₁₂以外にデオキシリボースやデオキシリボヌクレオチドにもB₁₂活性を示すため、分析マニュアル²⁹⁾に記載された以下の方法で補正した。

上記B₁₂抽出液の一部に1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加え、pHを11~12に調整後、オー

トクレーブ (121℃, 30 分) 処理を行い, B₁₂ を分解させた. その後, 1 mol/L 塩酸溶液で pH を 6 に調整・定容し, この溶液をアルカリ耐性因子画分として B₁₂ 抽出液と同様に微生物学的定量法で B₁₂ 含量を測定した.

B₁₂ 抽出液画分に検出された B₁₂ 含量からアルカリ耐性因子画分に検出された B₁₂ 含量を差し引き, 試料中の正味の B₁₂ 含量を算出した.

結果および考察

五訂日本食品標準成分表で採用されている *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を用いた B₁₂ 定量法で市販ふりかけ中の B₁₂ 含量を測定した

(表 5). その結果, かつお・小魚ふりかけ中の B₁₂ 含量は, 2.39~10.88 μg/100g と比較的高く, 次のいでり・たまごのふりかけ (1.32~6.50 μg/100g) であった. 一方, さけ, たらこ, その他のふりかけの B₁₂ 含量は, 低いものが多かった. 使いきりタイプの小包装では, 内容物の重量が 2 g 程度のものが多かったので, 一食あたりの摂取含量の目安として併記した. 今回測定した 26 種の市販ふりかけ中の B₁₂ 含量の平均値は 3.84 μg/100g であり, 一食あたり約 0.1 μg が摂取できると思われる.

一方, 市販茶漬けの素中の B₁₂ 含量において, 主要な素材の違いが B₁₂ 含量へ及ぼす影響は, ふりかけほど大きくなかった (表 6). 内容物の重量が 8 g 程度のものが多かったので, 一食あたりの摂取含量の目安として併記した. 茶漬けの素中の B₁₂ 含量の平均値は, 2.25 μg/100g となり, 一食あたり約 0.18 μg の B₁₂ が摂取できると推定される.

以上の結果から飯にかけて食するふりかけや茶漬けの素の中には比較的高い B₁₂ 含量を示すものもあったが, 推定される一食あたりの B₁₂ 摂取量は/day 本人の食事摂取基準 (2005 年度版)¹⁵⁾ の成人男女の推奨量 (2.4 μg) の 1/10 程度であった. しかし, B₁₂ を含まない飯をふりかけや

茶漬けの素と共に食することで少なからず B₁₂ を強化できることが明らかとなった.

II-3. 市販かつお節およびいりこだしの素ならびに調製だしつゆ中の B₁₂ 含量と特性

B₁₂ のよい供給源である魚介類あるいはその加工品の中で日本人が日常的に食している食品で, 且つ遊離型 B₁₂ を含むと思われる食品として, かつお節および煮干し (いりこ) の熱水抽出液であるだし汁に着目した. 市販されているかつお節およびいりこだしの素や濃縮 (あるいはストレート) だしつゆに含まれる B₁₂ 含量とその特性を調べ, 食品タンパク質結合性 B₁₂ 吸収不全症予防のためにこれらだしつゆが遊離型 B₁₂ の供給源になりえるかどうかを検討した.

方法

1) 試料

粉末・顆粒のかつお節およびいりこだしの素, 水で数倍に薄めて使用する多目的用濃縮だしつゆ, そのままで (ストレート) 使用するそうめんつゆおよびそばつゆならびにかつお削り節 (花かつお) および煮干しは, 高知市内の市場で購入し実験に用いた.

かつお削り節および煮干しのだし汁の調製法は, それぞれの製造会社の袋裏面に記載されている以下のような一般的な方法で行った.

かつお削り節からの一番だしの調製は, 600mL の水を沸騰させ, 少し火を弱めてから約 20 g の削り節を入れ, 蓋をしないで 2 分間煮出した. 火を止めてからそのままおき, かつお節が沈んだところでかつお節をすくい取った. また, 一番だしを取ったかつお節に 600mL の水を加え火にかけ, 沸騰後 10 分間煮出し, 火を止めてかつお節を取り出すことで二番だしを調製した.

煮干しのだしの調製は, 煮干し 30 g を水 1 L に約 30 分間浸漬した後, 中火で蓋をせず沸騰し,

火を弱め約 10 分間加熱した。火を止め、少しおいてから煮干しを取り除いた。

2) B₁₂ の抽出・定量法

B₁₂ の定量は、五訂日本食品標準成分表で採用されている分析マニュアル²⁹⁾ に準じて *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (旧名 *L. leichimannii*) ATCC7830 を用いた微生物学的定量法で行った。なお、定量に用いる培地は、日水製薬株式会社製のライヒマニ保存用培地、ライヒマニ接種用培地、ライヒマニ用 B₁₂ 定量基礎培地を用いた。

粉末・顆粒だしの素 2 g を正確に秤量し、定法によりシアン化カリウムを含む酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中で B₁₂ を加熱抽出した。濃縮およびストレートだしつゆは、40 g を正確に秤量し、抽出を行った。

本定量菌は、B₁₂ 以外にヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチドにも B₁₂ 活性を示すため、これら化合物をアルカリ耐性因子として別に測定後、アルカリ耐性因子量を差し引き、試料中の B₁₂ 含量を算出した。

3) 遊離型 B₁₂ の分離法

濃縮およびストレートだしつゆ中に含まれる B₁₂ が遊離型 B₁₂ であるかどうかを検討するため、各試料 1.0 mL をセントリコン 10 (アミコン社製) 遠心限外ろ過器でろ過した。ろ過液 (分子量 10,000 以下) を遊離型 B₁₂ 画分として上述した同様な条件下で B₁₂ を抽出・定量した。

結果および考察

1) 市販だしの素およびだし汁中の B₁₂ 含量

五訂日本食品標準成分表で採用されている *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を用いた B₁₂ 定量法で市販だしの素、濃縮およびストレートだしつゆ中の B₁₂ 含量を測定した (表 7)。

かつお削り節から調製した一番だしの B₁₂ 含量は非常に低く、煮出し時間が多い二番だしでも B₁₂ 含量は 0.01 μg/100 mL に留まった。また、煮干しだし中に B₁₂ を検出することはできな

かった。この結果は、B₁₂ が血合肉や内臓に比較的多量に存在すると思われるが、通常のだしの取り方では B₁₂ の抽出が不十分であると考えられる。

市販かつお節およびいりこだしの素 (粉末・顆粒) から調製しただしつゆ中の B₁₂ 含量もかなり低く、上述したかつお削り節から調製しただしつゆの B₁₂ 量とほぼ同レベルであった。

一方、多目的に利用される濃縮だしつゆやストレートで利用するそうめんつゆやそばつゆ中の B₁₂ 含量は、0.15~1.19 μg/100 mL とかなり高かった。これらの調製だしつゆ中には風味原料や調味料としてまぐろエキスを、魚醬、タンパク質分解物などが含まれており、これらの添加物が B₁₂ の供給源となっているものと思われる。

また、調製だしつゆ中の B₁₂ 含量は、B₁₂ のよい供給源のひとつである普通牛乳の B₁₂ 含量

(0.3 μg/100 g) よりも高かった。牛乳に含まれる B₁₂ は、すべてタンパク質と結合しているが¹⁰⁾、

だしつゆは加熱抽出液であり遊離型の B₁₂ が含まれると思われる。

そこで、濃縮およびストレートだしつゆ (F~L) 中に含まれる B₁₂ が遊離型 B₁₂ であるかどうかを検討するためセントリコン 10 を用いて限外ろ過した結果、調製だしつゆ F~L に含まれる B₁₂ のすべてが、低分子量のろ過液画分に回収された。この結果は、濃縮およびストレートだしつゆ中に含まれる B₁₂ が遊離型 B₁₂ であることを示している。

以上の結果から熟年からはじまる食品タンパク質結合性 B₁₂ 吸収不全症の予防のために濃縮およびストレートだしつゆは遊離型 B₁₂ のよい供給源になりえることが明らかとなった。

II-6. 栄養補助食品 AFA (*Aphanizomenon flos-aquae*) に含まれるコリノイド化合物の単離・同定

栄養補助食品スピルリナに含まれるコリノイド化合物のほとんどが7-アデニルシアノコバミド（シュード B₁₂）であることを明らかにしてきた。³⁰⁾ スピルリナと同じ藍藻類である *Aphanizomenon flos-aquae* (A.F.A.) はビタミンやミネラルを豊富に含み、各社製品の成分表示では、通常の植物性食品にはほとんど含まれていない B₁₂ についても豊富に含むとされ、栄養補助食品として現在国内外で市販されている。しかし、A.F.A.におけるコリノイド化合物についての知見はほとんど無く、真の B₁₂ であるとはまだ実証されていない。そこで、A.F.A.におけるコリノイド化合物について単離・同定を行った。また、B₁₂ 欠乏ラットを用いて回復実験を行いバイオアベイラビリティについても検討した。

Ⅲ. 栄養改善

Ⅲ-1. 発酵食品めふんを用いた遊離型 B₁₂ の補完

Adachi らは³¹⁾、めふんに含まれているコリノイド化合物が真の B₁₂ であることを報告しているが、食品タンパク質結合性 B₁₂ 吸収不全症への予防のためには、胃酸分泌減少条件下でもめふんから B₁₂ が十分に消化・遊離できる必要がある。そこで、本章では、めふんに遊離型 B₁₂ がどの程度含まれているのかを明らかにすると共に、人工消化系を用いて胃酸分泌減少条件下でもめふんから B₁₂ がどの程度消化・遊離することができるのかを検討した。

方法

1) 試料

めふんは青森県産、新潟県産および北海道産のもの（各5個）を市場で購入して実験に用いた。

北海道産の生のさけの腎臓は、宮崎大学林雅弘助教授から譲渡されたものを用いた。めふんおよびさけ腎臓は、実験に供するまで-20℃の冷凍庫で保存した。

2) 試薬

B₁₂ の定量には、日水製薬株式会社製のライヒマニ保存用培地、ライヒマニ接種用培地、ライヒマニ用 B₁₂ 定量基礎培地を用いた。B₁₂、ペプシン、パンクレアチンはシグマ社製を用いた。その他の試薬は、すべて市販の特級試薬を用いた。

3) B₁₂ 抽出・定量法

めふんに含まれる B₁₂ の定量は、五訂/day 本食品標準成分表で採用されている分析マニュアル²⁹⁾ に準じて *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*（旧名 *L. leichimannii*）ATCC7830 を用いた微生物学的定量法で行った。

めふん試料をミキサーにより破碎後、2 g を正確に秤量し図 5 に示すような方法で B₁₂ を抽出した。また、本定量菌は、B₁₂ 以外にデオキシリボシドやデオキシリボヌクレオチドにも B₁₂ 活性を示すため、これらをアルカリ耐性因子として別にアルカリ処理を行った。試験試料液 A より求めた見かけの B₁₂ 量から試験試料液 B より求めたアルカリ耐性因子量を差し引き、試料中の B₁₂ 含量を算出した。

3) ゲル濾過法

北海道産めふん（およびさけ生腎臓）1g に 0.2mol/L KCL 溶液を含む 10 mmol/L リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）10mL を加え、ワーリングブレンダー（日本精機製作所社製）を用いて破碎した。この破碎液を 10.000×g、10 分間の遠心分離を行い、この上澄液をめふん抽出液として実験に用いた。めふん抽出液 1.0mL を 0.2mol/L 塩化カリウムを含む 10mmol/L リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化させた Sephadex G-50 カラム（1.4×25cm）に重層し、同緩衝液で流速 1.0mL/min で溶出させた。カラムからの溶出液は、バイオラド社製フラクションコレクターを

用いて 1.0mL ずつ分画した。高分子量画分と遊離 B₁₂ 画分は、ブルーデキストランと標準 B₁₂ 溶液を用いて、それぞれ 600nm と 551nm の吸光度を測定することで算出した。溶出液中の B₁₂ は上述のバイオアッセイによって定量した。

4) 人工消化法

人工消化法は、Laparra らの方法³²⁾に準じて行った。約 20 g のめふん（および焼いたさけ切り身）を乳鉢・乳棒で細かく破碎した（口腔画分）。破碎物 5g を秤量し、300mL 容三角フラスコに移し、蒸留水 90mL を加え、6 mol/L HCl で pH を 2.0 に調整した。15 分後に再度 pH を確認した後、新しく調製したペプシン溶液（0.1mol/L HCl 1mL に 0.1 g のペプシンを溶解）0.1mL を加えた。この溶液に蒸留水を加え重量を 100g に調製した。この溶液を 37°C の浴槽中に 2 時間、120 ストローク/分で振とうさせた（胃画分）。

振とう後、胃画分の pH を 1mol/L NaHCO₃ を添加して pH 5.0 に調整した。新しく調製したパンクレアチン溶液（0.2 g のパンクレアチンを 0.1 mol/L NaHCO₃ 50mL に溶解）0.7mL を加えた。この溶液の pH が 6.5 になるように調整した後、37°C の浴槽中に 2 時間、120 ストローク/min で振とうさせた（腸画分）。

振とう後、この溶液の pH を 0.5mol/L NaOH で 7.2 に調整した。この人工消化溶液すべてを遠心チューブに入れ、4°C、15000×g で 30 分間遠心分離を行った。遠心分離上澄画分の一部（2mL）をセントリコン 10（分子量 10000 の限外ろ過膜）を用いて低分子量（分子量 10000 以下）画分と高分子量（分子量 10000 以上）画分を分離した。人工消化処理前の試料ならびに人工消化処理後の試料（低分子量画分および高分子量画分）に含まれる B₁₂ を上述のバイオアッセイで定量した。

胃酸分泌減少の条件として胃画分の pH を 4.0 および 7.0 に調整して同様の消化実験を行った。

結果および考察

1) 各種めふんに含まれる B₁₂ 含量

日本の代表的な産地のめふんに含まれる B₁₂ 含量を五訂日本食品標準成分表で採用されているバイオアッセイで測定した（表 8）。その結果、いずれのめふんにも多量の B₁₂（116.3～556.3μg/100g）が含まれており、これら三産地のめふんの B₁₂ 含量の平均値（346.1μg/100g）は五訂日本食品標準成分表の数値と同程度であった。また、以後の研究には、B₁₂ 含量が最も高かった北海道産のめふんを用いた。

2) めふんに含まれる遊離型 B₁₂ の存在比

食品タンパク質結合性 B₁₂ 吸収不全症への予防のためには、胃酸分泌減少条件下でもめふんから B₁₂ が十分に消化・遊離できる必要がある。そこで、めふんに遊離型 B₁₂ がどの程度含まれているかを Sephadex G-50 のゲル濾過を用いて検討した。めふんの原料である生のさけ腎臓中に含まれる B₁₂ の約 60% は遊離型 B₁₂ として存在していたが、めふんでは遊離型 B₁₂ が 84% に増加していた（表 9）。この結果から、めふんは遊離型 B₁₂ のよい供給源として利用できることが明らかとなった。

3) 胃酸分泌減少条件下でのめふんからの遊離型 B₁₂ の生成率

人工消化系を用いて胃酸分泌減少条件下でもめふんから B₁₂ が遊離することができるかどうかを検討した（表 10）。

さけ切り身（焼き）を対照として人工消化実験を行った時、正常な胃酸分泌条件下（胃画分の pH が 2.0）では、76.5% の B₁₂ が遊離することができたが、胃酸分泌減少条件下（胃画分の pH が 4.0 および 7.0）では、20～30% に減少した。この結果は、胃酸分泌量が B₁₂ の腸管吸収に重要な影響を与えていることを示している。一方、めふんの人工消化実験の結果、胃酸分泌の状態（胃画分の pH）に関係なくすべての B₁₂ が遊離することができた。

日本の代表的な産地からめふんを購入して

B₁₂ 含量を測定した結果、いずれのめふんにも多量の B₁₂ (116.3~556.3 μ g/100g) が含まれていたが、製造産地により B₁₂ 含量に顕著な相違があった。めふんは、さけの腎臓を伝統的方法で塩漬けにした発酵食品であるため、めふんに含まれる B₁₂ 含量は、発酵に関与する微生物の影響を大きく受ける可能性が考えられた。しかし、Adachi らは³¹⁾、各種めふん中の生菌数が非常に少ないことや生のさけ腎臓にも多量 (128.5 μ g/100g) の B₁₂ が含まれていることから、めふんの B₁₂ が微生物由来でない可能性を報告している。魚類の B₁₂ 代謝における腎臓の役割についての情報は皆無であるが、生体内 B₁₂ の貯蔵に関与している可能性が考えられ、さけの B₁₂ 栄養状態の指標になるかもしれない。

また、生のさけ腎臓中に含まれる B₁₂ の約 60% は遊離型 B₁₂ として存在していたが、めふんでは遊離型 B₁₂ が 84% に増加していた。この結果は、発酵中にさけ腎臓細胞の自己消化や微生物の生産するタンパク質分解酵素の作用で腎臓細胞のタンパク質が分解されたことに起因すると推定される。発酵食品のめふんは遊離型 B₁₂ のよい供給源として利用できることが明らかとなった。

加齢とともに胃酸の減少や萎縮性胃炎の発症などのため生体内の B₁₂ レベルが低下する³³⁾ことが報告されているが、B₁₂ の腸管吸収に及ぼす胃酸の影響が実際にどの程度であるかの情報はほとんどない。そこで、人工消化系を用いて食品に含まれる B₁₂ の消化・遊離に及ぼす胃酸(塩酸)の影響についてさけ切り身(焼き)を用いて検討した結果、胃酸分泌の減少(胃画分の pH の上昇)が B₁₂ の腸管吸収に重要な影響を与える可能性のあることを実験的に立証できた。また、胃酸分泌減少条件下でも遊離型 B₁₂ を多量に含むめふんからは、すべての B₁₂ が遊離することができた。この結果は、50 歳代から発症する食品タンパク質結合性 B₁₂ 吸収不全症の予

防に発酵食品めふんは、天然に存在する遊離型 B₁₂ の供給源として利用できることが明らかとなった。

しかし、現在めふんは、珍味として主に酒の肴として食されているのみであり、遊離型 B₁₂ のよい供給源としてめふんを広く利用できるように、めふん及びめふんパウダー(凍結乾燥粉末)を調味料として使った料理及び献立を検討した。

III-2 めふんおよびめふんパウダーをもちた料理・献立の作成

B₁₂ 含量が最も高かった北海道産めふん及びそれから調製しためふんパウダーを用いた。

めふんパウダーの調製法は、北海道産めふん約 500g に少量の水を加え、ミキサーで破碎した。破碎液は、平底バットに移し、-80℃の冷凍庫で凍結させた。凍結試料は、凍結乾燥機を用いて完全に水分が無くなるまで乾燥させた。凍結乾燥品は、ミルを用いて粉碎し、めふんパウダーを調製した。めふんパウダーは、シリカゲルの入った容器に入れ、冷蔵庫で保蔵した。

方法

1) めふん及びめふんパウダーを用いた料理作成の基本事項

使用する食材については、一般に B₁₂ の供給源とされる肉類・魚介類・卵類・乳類は用いなかった。調理方法としては、焼く・揚げる・煮る・蒸す・汁物・炒める・生のまま加える・和えるといった基本的な調理方法に加え、和食料理・洋食料理・中華料理を各々 3~4 品作成した。また、食事 1 回あたり IF の B₁₂ 飽和量は、およそ 1.5~2.0 μ g と推定されており³⁴⁾、また、食事摂取基準(2005 年版)の成人男女の推奨量が 2.4 μ g/day であることから¹⁵⁾、今回作成するめふん料理では、一品あたりの B₁₂ 含量を 2.0 μ g 程度を含むように配慮した。

なお、めふん及びめふんパウダーを調味料として使用した料理の作成に用いた食材や調理方法は、全て後述するレシピの中に栄養データと共に記載した。

2)めふんを用いた料理（主菜・副菜・汁物・デザート）の作成

めふんの形態が長細い袋状であるため、調理作成上扱い難い場合は、すりこぎで磨り潰したものを使用した。また、めふんは加熱すると溶解するため、めふん自身を食材に直接混ぜるか、包む料理とした。基本的にめふん（あるいは磨り潰したもの）0.8gを秤量し、一人分の調味料として料理に用いた。めふんの生臭さを抑えるために香味野菜、生姜、酒、豆乳などを用いた。また、めふんの色調を隠すため、砂糖は全て黒砂糖を使用した。また、基本的に食塩は使用しなかった。

3)めふんパウダーを用いた料理（主食・主菜・副菜・汁物・デザート）の作成

めふんパウダー0.25gを秤量し、一人分の調味料として料理に用いた。めふんパウダーは、めふん特有の色調や臭いが顕著に減少し、且つ塩味もマイルドになったが、料理作成上基本的に上述のめふん同様の配慮をした。

4)栄養計算

各種料理・献立の栄養計算には栄養計算ソフト（エクセル栄養君 ver4.0 吉村幸雄 筑波恒男 2005.8.1 株式会社 建帛社）を使用した。

結果および考察

現在、めふんは珍味として食されているのみであり、遊離型 B_{12} のよい供給源としてめふんを広く利用できるように、めふん及びめふんパウダー（凍結乾燥粉末）を使った料理及び献立を検討した。

めふんの調理特性として特有の生臭さや褐色の色調を有しているが、塩味は風味があり、食塩に比べ濃厚である。そのため調味料として食塩や醤油の代わりに使用するのが適していると

考えられる。また、めふんは、加熱すると溶解するため調理性が向上し、多様な料理に用いることができる。めふん特有の臭いは、豆乳や牛乳のような臭いを包み込む食品や香味野菜・ごまなどを用いることで抑えることができた。また、めふん特有の褐色の色調は、色の濃い野菜・果物や黒糖を用いることで抑えることができた。

めふんの利用性を向上させるために、めふんパウダーを調製した。その結果、めふん特有の色調や臭いが顕著に減少し、且つ塩味もマイルドになった。めふんパウダーは、調味料として食塩の代わりに多様な料理に用いることができたことが明らかとなった。例えば、小麦粉に添加してケーキやパンの製造やゼリー菓子などデザートの製造にも利用することができた。また、サラダ用のフレンチドレッシングや飯にかけて食するふりかけの原料など加工食品の原料としても利用することができた。

めふんは、これまで珍味として利用のみであったが、今回作成しためふん及びめふんパウダーを利用した料理（主食、主菜、副菜、汁物、デザート）のレシピは、78種類に及び、めふん料理のレシピ集としての活用も期待できる。

B_{12} の栄養面からは、食事1回あたり IF の B_{12} 飽和量は、およそ $1.5 \sim 2.0 \mu\text{g}$ と推定されており³⁴⁾、また、食事摂取基準（2005年版）の成人男女の推奨量が $2.4 \mu\text{g/day}$ であることから¹⁵⁾、今回作成しためふん料理では、一品あたりの B_{12} 含量を $2.0 \mu\text{g}$ 程度を含むように配慮した。そのため、萎縮性胃炎患者のみならず熟年からの食品タンパク質結合性 B_{12} 吸収不全症による B_{12} 欠乏症の予防のためにも全年齢階層において毎 day の通常の食事にめふん料理を一品加えることで吸収されやすい遊離型 B_{12} を補完することができる。

III-2. 市販マクロビオテックス料理本に記載されているメニューの栄養評価と改善法

食生活が多様化している現代、食生活を見直すとする動きが盛んである。その中で近年、欧米諸国の知識層や国内にも広がりを見せているものにマクロビオティックス食事法がある。マクロビオティックス食事法は桜沢如一（1893～1966）が石塚左玄の食養法を基にし、禅や東洋の易学等の思想を含めた食事法として海外に広めたもので、近年では桜沢を師事した久司道夫が、桜沢のマクロビオティックスからさらに発展させたクシマクロビオティックスが世界的な普及活動を行っている^{35, 36, 37)}。マクロビオティックス食事法は菜食主義の一種で、穀物、野菜、豆類、海藻を主体とした食事であり、動物性食品や砂糖をさけるように推奨している。以前から B₁₂ は一部の植物性食品を除き動物性食品にしか含まれていないことから、マクロビオティックスを含むベジタリアンにおいては B₁₂ 欠乏に陥りやすいとの報告が多数なされている^{38, 39, 40)}。マクロビオティックスの料理本によっても B₁₂ 不足にならないように積極的に海藻を摂取することを推奨しているものも存在しているが、書き方が曖昧であり、料理本によってはのりを一枚食べれば B₁₂ が不足することがないとするものもある^{41, 42)}。クシマクロビオティックスにおいては、文献によって多少異なるが、月に数回または地域によって週に数回魚介類（青、赤身の魚は除く）を 1 割から 2 割程度はとることを認めている^{35, 36, 42)}。しかし、現在国内で市販されているマクロビオティックス料理本は動物性食品を使用していないものがほとんどであり、動物性食品を使用した料理を掲載した料理本においても動物性食品を使用した料理は極めて数が少ない。また、積極的な摂取が謳われている海藻についても、海藻によっては B₁₂ がほとんど含まれていないものや真の B₁₂ として証明されていないものもあり、一概に海藻の摂取によりビタミン B₁₂ 不足を補えるものかを危惧する

ところである。そこで、これらのマクロビオティックス料理本を使用して献立を立てた場合に摂取できる B₁₂ 含量について検討し、マクロビオティックス食事法において B₁₂ が不足しないための食事の提案を行った。

方法

現在日本で入手可能なマクロビオティックス料理本 8 冊^{37, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47)} について、それぞれのレシピに基づいて料理ごとに栄養計算を行った。栄養計算は五訂増補日本食品標準成分表対応、日本人の食事摂取基準（2005 年版）対応エクセル栄養君 Ver4.0⁴⁸⁾ を使用した。レシピによって重量以外で記載されている分量については、資料^{49, 50, 51)} で概算、または実際にその分量ごとに重量を測定し、栄養計算に用いた。また、料理本に記載されている料理を用いてマクロビオティックスの基本（菜食穀類食）に基づいて成人の 1 日 3 食 1 ヶ月（30 日）分の献立を作成した。別に一部のマクロビオティックスで認められている魚介類を週に数回程度取り入れた献立を作成し、それらの比較を行った。

結果および考察

マクロビオティックス料理本に掲載されている料理 495 品について栄養計算を行った結果 B₁₂ を 0.1μg 以上含むものは 32 品であり、残りの料理は全く B₁₂ を含んでいなかった。料理本によっては掲載されている料理で B₁₂ を含むものがないものも存在していた。これらの料理本で使用されている藻類は、あおのり、あまのり（焼きのり）あらめ、いわのり、こんぶ、ひじき、ふのり、もずく、わかめ（めかぶわかめ含む）であった。このうち五訂増補日本食品標準成分表⁵⁰⁾ で、あらめ、こんぶ、ひじき、ふのり、もずく、わかめには B₁₂ がほとんど含まれていないか、全く含まれていない。そのためこれらの料理本中で B₁₂ の主な供給源となっている藻類は、あまのり、いわのり、あおのりであった。料理本に使用されていた魚介類からの B₁₂ 供給

量は、あさり、たらおよびまだいのみであった。これらの料理本を用いてマクロビオティックの基本に基づいて作成した1ヶ月の献立で摂取できるB₁₂量は1ヶ月の合計が18.4 µgであり、1日平均では0.6 µgしか摂取できていなかった。日本人の食事摂取基準（2005年版）で示されている日本人成人男女のB₁₂推奨量は1日あたり2.4 µgであり多くのマクロビオティック料理本に記されている料理のみで摂取した場合B₁₂が不足するが予想される。一部のマクロビオティック料理本で認められている魚介類を週に2回程度魚介類を含むように立てた献立では、1日の平均B₁₂含量は2.6 µgとなり推奨量を充たすことができた。マクロビオティックス食事法でよく用いられているあまのりやいわのりはB₁₂を非常に多く含んでいる食品ではあるが、実際に料理に使用する量はそれほど多くない。よほど注意して毎日それらを多く摂取するようにしない限りはB₁₂の推奨量を充たすことは難しい。一方、魚介類は一般的な量を週に2回程度取り入れることでB₁₂の推奨量を充たすことが可能であることから、マクロビオティック食事法を行う上で、完全に魚介類を取り除かないで適度に摂取することが必要である。しかし、市販の料理本にはB₁₂をほとんど含まない料理を掲載していることがほとんどであり、料理本を使用する場合に注意を要する。

引用文献

- 1) Miyamoto E: Characterization and physiological functions of corrinoid-compounds in edible microalgae. Dr thesis of Osaka Prefecture University (2004)
- 2) 谷岡由梨, 宮本恵美, 渡辺文雄: *Euglena gracilis* Zの生育に伴う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)
- 3) 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).
- 4) Banerjee R, Chen Z. & Sumedha S: Methionine synthase from pig liver. *Methods Enzymol.*, **281**, 189-196 (1997).
- 5) Gaire D, Sponne I, Drosch S, Charlier A, Nicolas JD. & Lambert D: Comparison of two methods for the measurement of rat liver methylmalonyl-coenzyme A mutase activity: HPLC and radioisotopic assays. *J. Nutr. Biochem.*, **10**, 56-62 (1999).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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
- 9) Arnaud J, Cotisson A, Meffre G, Bourgeay-causse M, Augert C, Favier A, Vuillez JP, Ville G : Comparison of three commercial kits and a microbiological assay for the determination of vitamin B₁₂ in serum. *Scand. J. Clin. Invest.*, **54**, 235-240 (1994).
- 10) 井戸田正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則

- 文, 前田忠男. 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誌, **10**, 11-20 (1996) .
- 11) 渡邊敏明, 谷口歩美, 庄子佳文子, 猪熊隆博, 福井徹, 渡邊文雄, 宮本恵美, 橋詰直孝, 佐々木晶子, 戸谷誠之, 西牟田守, 柴田克己. 日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討, ビタミン, **79**, 573-581, (2005)
 - 12) Casteline JE, Allen LH, Ruel MT. Vitamin B₁₂ deficiency is very prevalent in lactating Guatemalan women and their infants at three months postpartum. J. Nutr., **127**, 1966-1972 (1997).
 - 13) Sandberg DP, Begley JA, Hall CA. The content, binding, and forms of vitamin B₁₂ in milk. Am. J. Clin. Nutr., **34**, 1717-1724 (1981).
 - 14) Turugo NM, Sardinha F. Cobalamin and cobalamin-binding capacity in human milk. Nutr. Res. **14**, 22-23 (1994).
 - 15) 厚生労働省 (2004) 日本人の食事摂取基準 (2005 年版) 平成 16 年 10 月
 - 16) Food and Agriculture Organization/World Health Organization (1988) Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B₁₂. FAO food and nutrition series No. 23, pp. 62-73
 - 17) 渡辺文雄, 宮本恵美. 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—厚生労働科学研究費補助金効果的医療技術の確立推進臨床研究事業「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 66-84 (2003).
 - 18) Hvas AM, Gravholt CH, Nexø E. Circadian variation of holo-transcobalamin (holo-TC) and related markers. Clin Chem Lab Med **43**, 760-764 (2005).
 - 19) 健康・栄養情報研究会編 (2003) 「国民栄養の現状 平成 13 年厚生労働省国民栄養調査結果」, 第一出版, 東京, 28-43.
 - 20) 三谷璋子 (2000) 納豆の栄養成分に関する研究 (第 7 報) 納豆のビタミン B₁₂ の形態. 福山市立女子短期大学紀要, 26, 131-134.
 - 21) Okada N, Hadjoetomo RS, Nikkuni S, Katoh K, Ohta T. Vitamin B₁₂ content of fermented foods in the tropics. Rept Natl Food Res Inst, 43, 126-129 (1983).
 - 22) 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).
 - 23) Kittaka-Katsura H, Watanabe F, Nakano Y. Occurrence of vitamin B₁₂ in green, blue, red, and black tea leaves. J Nutr Sci Vitaminol, 50, 438-440 (2004).
 - 24) 科学技術庁資源調査会編 (2000) 「五訂日本食品標準成分表」, 大蔵省印刷局, 東京, 30-303.
 - 25) Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, National Academy Press, Washington DC, 306-356.
 - 26) Kimura N, Fukuwatari T, Sasaki R, Hayakawa F, Shibata K. Vitamin intake in Japanese women college students. J Nutr Sci Vitaminol, 49, 149-155 (2003).
 - 27) Bennink M.R, Ono K. Vitamin B₁₂, E and D content of raw and cooked beef. J Food Sci, 47, 1786-1792 (1982).
 - 28) Watanabe F, Abe K, Fujita T, Goto M, Hiemori M, Nakano Y. Effects of microwave heating on the loss of vitamin B₁₂ in foods. J Agric Food Chem, 46, 206-210 (1998).
 - 29) 財団法人日本食品分析センター編(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」中央法規, 東京, 178-183.
- 30) Watanabe F., Katsura H., Takenaka S., Fujita T., Abe K., Tamura Y., Nakatsuka T., Nakano Y. (1999) Pseudovitamin B₁₂ is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *J Agric Food Chem*, **47**, 4736-4741.
 - 31) Adachi S, E Miyamoto, F Watanabe, T Enomoto, T Kuda, M Hayashi, Y Nakano (2005) Purification and characterization of a corrinoid compound from a Japanese salted and fermented salmon kidney “mefun”. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **28**, 2561-2569.
 - 32) Laparra JM, Vealez D, Montoro R, Barberaa R, Farrea R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6080-6085 (2003).
 - 33) Van Asselt DZ, van den Broek WJ, Lamers CB, Corstens FH, Hoefnagels WH. Free and protein-bound cobalamin absorption in healthy middle-aged and older subjects. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **44**, 949-953 (1996).
 - 34) Scott JM. Bioavailability of vitamin B₁₂. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **51** Suppl 1:S49-S53 (1997).
 - 35) 久司道夫著, 久司道夫のマクロビオティック四季のレシピ, pp.1-158, 東洋経済新報社 (2004).
 - 36) Kushi Institute, Kushi Institute HP, <http://www.kushiinstitute.org/index.html>
 - 37) 日本 CI 協会監修, マクロビオティック体の内側から美しくなる玄米と野菜のレシピ 105 品, pp.1-126 日本実業出版社 (2004)
 - 38) van Dusseldop M, Schneede J, Refsum H, Ueland PM, Thomas CMG, de Boer E, and van Staveren WA. Risk of persistent cobalamin deficiency in adolescents fed a macrobiotic diet in early life. *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**:664-671, (1999).
 - 39) Dwyer J. Convergence of plant-rich and plant-only diets. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**(suppl):620s-622s, (1999).
 - 40) Louwman MWJ, van Dusseldop M. van de Vijer FJR. Thomas CMG, Schneede, J, Ueland PM, Refsum H, and van Staveren WA, Signs of impaired cognitive function in adolescents with marginal cobalamin status. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**:762-769, (2000).
 - 41) オレンジページムック, シンプルマクロダイエツト玄米でおうちやくダイエツト, pp.1-98 オレンジページ, 東京 (2004)
 - 42) クロワッサン特別編集 Dr.クロワッサン健康マクロビオティック料理体の中からきれいになる食べ方, pp.1-126, マガジンハウス (2005)
 - 43) 西野柳季子著, マクロビオティック和のレシピ, pp.1-111, サンマーク出版, (2004)
 - 44) オレンジページムックマクロビオティックおしゃれレシピ, pp.1-66, オレンジページ, (2004)
 - 45) 尾形妃樺怜著, 毎日のマクロビオティックレシピ 140, pp.1-111, 河出書房新社 (2004)
 - 46) 日本 CI 協会監修, マクロビオティック食べて元気になるレシピ, pp.1-127, 永岡書店 (2005)
 - 47) ローラ小林著, マクロビオティック 30 分 de フルコース, pp.1-95, ビジネス社 (2005)
 - 48) 吉村幸雄, 五訂増補日本食品標準成分表対応, 日本人の食事摂取基準(2005 年版)対応エクセル栄養君 Ver4.0, 建帛社 (2005)
 - 49) 「栄養と料理」家庭料理研究グループ, 調理のためのベーシックデータ, pp.1-153, 女子栄養大出版 (1990)
 - 50) 鈴木吉彦, 塩澤和子, 目で見える 80 キロカロリー食品ガイド, pp1-223, 主婦の友社

(1995)

- 51) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査
分科会, 五訂増補日本食品成分表 (2005)

表 1 新規なビタミンB₁₂栄養状態の指標の検討血球ビタミンB₁₂酵素について
ラット血球画分のB₁₂依存性酵素活性(n=3)

	B ₁₂ 給与ラット (pmol/min/mg protein)	B ₁₂ 欠乏ラット
メチルマロニルCoAムターゼ (MCM)	0.78±0.2	6.79±3.56
メチオニンシンターゼ (MS)	0.001	ND

図 1 ラット血球画分のメチルマロニルCoAムターゼのウエスタン・プロット分析
(ヒト組換えMCM抗体を使用)

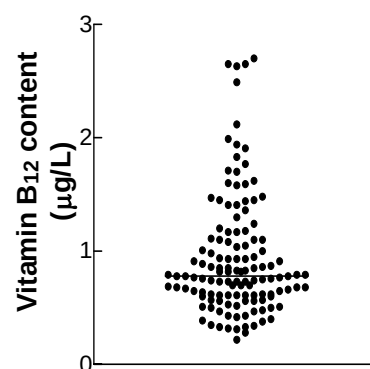
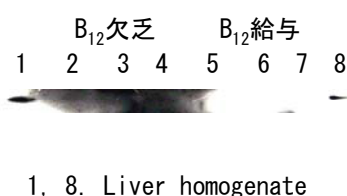
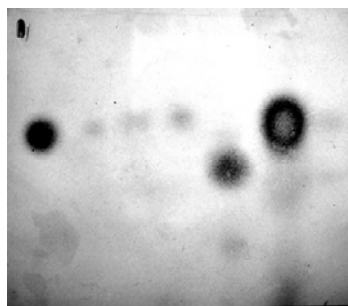


図 2 母乳B₁₂含量の平均値

表2 母乳のB₁₂含量のまとめ

Reference	Sampling time	Sample numbers	Mean values of B ₁₂		Assay method
			μg/L	nmol/L	
井戸田ら ³⁾	1~3 mo	2279	0.2		Microbiological assay
Trugo <i>et al.</i> ⁷⁾	2 mo	256	0.45		Radioisotope dilution assay
Areekul <i>et al.</i> ¹⁰⁾	2~10 d	45	0.41		Radioisotope dilution assay
Casterline <i>et al.</i> ⁵⁾	3 mo	92	0.93		Radioisotope dilution assay
Sandberg <i>et al.</i> ⁶⁾	2~3 mo	19	0.97		Radioisotope dilution assay
渡邊ら ⁴⁾	2~5 mo	25	0.28 ± 0.14	0.21 ± 0.11	Microbiological assay
Present study		126	0.94 ± 0.14	0.70 ± 0.39	Microbiological assay



B₁₂ 1 2 3 4 5 6
尿サンプル

図3 シリカゲル60TLC・バイオオート
グラム法による尿中ビタミンB₁₂の分析

表3 日本人70歳代成人の血清ガストリン含量とビタミンB₁₂含量の関係（調査Ⅰ）

	Deficient B ₁₂ < 230 pg/mL	Marginal B ₁₂ 230-350 pg/mL	Normal B ₁₂ >350 pg/mL	Overall
N	4	22	73	99
Serum B ₁₂ (pg/mL)	197.0 ± 23.7 ^a	297.5 ± 33.2 ^a	686.3 ± 323.3 ^b	580.1 ± 330.7
Serum gastrin (pg/mL)	442.8 ± 764.8 ^a	423.6 ± 560.4 ^a	290.3 ± 338.1 ^a	326.1 ± 415.8

表4 日本人70歳代成人の血清ガストリン含量とビタミンB₁₂含量の関係（調査Ⅱ）

	Deficient B ₁₂ < 230 pg/mL	Marginal B ₁₂ 230-350 pg/mL	Normal B ₁₂ >350 pg/mL	Overall
N	8	57	68	133
Serum B ₁₂ (pg/mL)	212.6 ± 18.2 ^a	310.5 ± 34.1 ^a	720.2 ± 161.3 ^b	514.1 ± 242.9
Serum gastrin (pg/mL)	556.8 ± 737.1 ^a	352.7 ± 480.1 ^a	232.0 ± 247.3 ^a	303.2 ± 106.4

Tukey's Multiple comparison test

BML基準値

B₁₂: 233~914 pg/mL

Gastrin: 30~150 pg/mL

表 5 市販ふりかけ中のビタミンB₁₂含量

種類	ビタミンB ₁₂ 含量	
	(μ g/100 g)	(μ g/2 g)
かつお・小魚など		
A	9.14	0.18
B	2.39	0.05
C	9.02	0.18
D	7.04	0.14
E	10.88	0.22
F	8.59	0.17
G	8.95	0.18
H	7.67	0.15
のり・たまご		
I	3.55	0.07
J	3.00	0.06
K	2.40	0.05
L	1.32	0.03
M	6.50	0.13
たらこ（めんたいこを含む）		
N	4.59	0.09
O	0.44	0.01
P	1.15	0.02
さけ		
Q	0.23	<0.01
R	0.48	0.01
S	2.26	0.05
その他		
T	3.14	0.06
U	0.20	<0.01
V	2.87	0.06
W	1.30	0.03
X	0.35	<0.01
Y	1.60	0.03
Z	0.80	0.02

表6 市販お茶漬け中のビタミンB₁₂含量

種類	ビタミンB ₁₂ 含量	
	($\mu\text{g}/100\text{g}$)	($\mu\text{g}/8\text{g}$)
A	3.05	0.24
B	1.80	0.14
C	2.25	0.18
D	4.60	0.37
E	5.25	0.42
F	1.15	0.09
G	1.50	0.12
H	2.00	0.16
I	0.90	0.07
J	0.25	0.02
K	1.95	0.16

表8 めふんに含まれるビタミンB₁₂含量

	ビタミンB ₁₂ 含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
新潟産めふん	116.3 $\pm$ 13.4
青森産めふん	365.7 $\pm$ 80.
北海道産めふん	556.3 $\pm$ 91.85
食品成分表めふん	327.6

平均値 $\pm$ SE (n=5)

表7 市販だしの素および濃縮
(あるいはストレート) だしつゆ中の
ビタミンB₁₂含有量

	ビタミンB ₁₂ 含量* ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)
かつお削り節	
一番だし	<0.01
二番だし	0.01
煮干し	ND
粉末・顆粒	
かつお	
A	<0.01
B	0.06
C	<0.01
いりこ	
D	0.08
E	0.02
濃縮液 (多目的用)	
F	0.52
G	0.15
H	0.39
ストレート	
そうめん用	
I	0.28
J	0.54
そば用	
K	1.19
L	0.26

* 粉末・顆粒のだしの素および濃縮だしつゆは、各社指定した方法通りに調製した時のだしつゆ中のビタミンB₁₂含量として記した。

表9 Sephadex G-50ゲル濾過による遊離ビタミンB₁₂の存在比

	ビタミンB ₁₂ の存在比	
	高分子画分	低分子 (遊離型B ₁₂) 画分
さけ生腎臓	40%	60%
めふん	16%	84%

3回の実験の平均値を示した

表10 胃画分における各種 pH条件下での遊離型ビタミンB₁₂の生成率

胃画分の pH	さけ切り身 (焼き) [遊離型ビタミンB ₁₂ (%)]*	めふん
pH 2	76.5	117.8
pH 4	30.0	119.2
pH 7	23.8	115.7

*消化処理前のビタミンB₁₂含量を100%としたときの相対値



めふんパウダー