

納豆中の水可溶性ビタミン K₂ 複合体について

池 田 ひ ろ

(京都女子大学家政学部)

平成3年6月17日受理

A Water Soluble Vitamin K₂ Complex in Natto

Hiro IKEDA

Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University, Higashiyama-ku, Kyoto 605

We have previously shown that *Bacillus subtilis* secreted menaquinone-7 into the incubation medium as a water soluble complex with a glycopeptide which was named vitamin-K₂-binding factor, KBF (*Eur. J. Biochem.*, 192, 219-224, 1990). Here we examined the gross properties of KBF found in natto which are boiled soybeans fermented by *Bacillus natto*, a different strain of *B. subtilis*. Most vitamin K₂ of natto synthesized by *B. natto* was found in the water extract whereas vitamin K₁ known to be contained in soybean itself was only water-washed natto, indicating that KBF in natto is responsible for solubilization of vitamin K₂. The elution profiles of the water extract by DEAE-chromatography and Sepharose 4B chromatography were similar to those obtained with KBF of *B. subtilis*, revealing that KBF in natto is acidic substance with apparent molecular mass of 100 kD. Examination of partially purified KBF by polyacrylamide gel disc electrophoresis showed that KBF is a glycopeptides stainable with both Coomassie brilliant blue and periodic acid/Schiff reagent and that vitamin K₂ was comigrated with KBF as a broad band. As vitamin K₂ of water soluble form rapidly decreased upon storage of natto, the stability of KBF was also examined under various storage conditions.

(Received June 17, 1991)

Keywords: vitamin K₂ ビタミン K₂, natto 納豆, binding factor 結合因子, glycopeptide 糖ペプチド, soluble complex 可溶性複合体, mixed micell 混合ミセル.

1. 緒 言

血液凝固に関与するビタミン (coagulation vitamin) としてデンマークの Dam¹⁾²⁾ によって見出されたビタミン K には、天然に存在するものとして、K₁ (phyloquinone) と K₂ (menaquinone) がある³⁾。前者は植物中に含まれ、中でも緑葉植物に多く、後者は細菌によって生合成される。ビタミン K₂ はメナキノンとも呼ばれ、その同族体は側鎖の数 ($n: 2 \sim 14$) により MK- n と略称され、細菌の種類によって生合成される側鎖の数が異なる⁴⁾。ビタミン K はプロトンビンや骨形成タンパク質の合成⁵⁾に関係するが、その必要量はごく微量である⁶⁾。新生児や生後2週間~2か月位の乳児が突然吐血・血便・嘔吐・頭蓋内出血などの出血傾向を示すことがあるが、それは血液凝固因子の不足、即ちビタミン K の不足が主な原因と考えられている^{7)~9)}。これらの症状は人

工栄養児に比べ母乳栄養児に多くみられるが、それは母乳よりも調整粉乳や牛乳などにビタミン K が多く含まれていること¹⁰⁾¹¹⁾と関連が深く、予防対策として新生児にビタミン K₂ を溶かしたシロップ液の投与による方法がとられている¹²⁾¹³⁾。妊婦にビタミン K を含む食事を摂らせることにより、新生児出血性疾患を予防できるとの報告¹⁴⁾がある。また糸引納豆 (以下納豆と略す) はビタミン K₂ (MK-7) を多く含む食品として¹⁵⁾知られているが、これを授乳中の母親に摂取させることにより、乳児の血液中の血液凝固能を高めることが認められている¹⁶⁾¹⁷⁾。またビタミン K₂ はビタミン K₁ より吸収され易いと言われている¹⁸⁾。

我々は *Bacillus subtilis* (IFO No. 3009) の生成するビタミン K₂ (MK-7) が脂溶性ビタミンであるにもかかわらず、その多く (40%) は水溶性の形で存在することを

見出し, その可溶化がビタミン K 結合性因子 (KBF) との非特異的な混合ミセル形成によることを示唆した¹⁹⁾.

今回我々は *B. subtilis* と異株である納豆菌によって作られる納豆中のビタミン K₂ も, 殆どが KBF と結合した形で水可溶化されることを見出したので KBF の部分的な精製, ビタミン K₂ 結合性及びビタミン K₂-KBF 複合体の安定性について検討したので報告する.

2. 実験方法

(1) 試料

市販糸引納豆.

(2) 試薬

ビタミン K₁ およびビタミン K₂ (MK-4, MK-7) はエーザイ(株)より供与されたものを使用した.

また他のすべての試薬は市販特級品を使用した.

(3) 納豆のビタミン K の抽出および測定

納豆 (製造当日) 25 g に 200 ml の蒸留水を加えて緩やかに室温で 10 分間攪拌し, ガーゼでこし分け, 残った豆を 100 ml の蒸留水で洗って濾過し, これをさらに二度繰り返す. 濾液は集めて 8,000×g, 30 分間 5℃ で遠心分離し, 得られた抽出液について安部らの方法²⁰⁾に準じてビタミン K の抽出を行った. すなわち濾液 6 ml にイソプロパノール 8 ml を加えて充分混和後, *n*-ヘキサン 16 ml を加え激しく混合したのちヘキサン層 8 ml を正確に秤取する. N₂ 気流中 40℃ でヘキサンを留去し, 残渣にイソプロパノール 500 μl を加えて良く溶かし, その 20 μl を高速液体クロマトグラフィー (以後 HPLC と略す) に注入して測定し, それを水溶性ビタミン K 量とした. 一方不溶性のビタミン K 量は上記残渣および洗浄後の豆中のビタミン K を測定することによって求めた. 残渣は集めて水に懸濁し, 水抽出液と同様にイソプロパノールおよび *n*-ヘキサンを加えてビタミン K を抽出し, HPLC で測定し, 洗浄後の豆についてはその 5 g を磨砕し, 水 7.5 ml を加えて懸濁後, 上記と同様に抽出, 測定を行う.

納豆中の総ビタミン K 量は, 納豆 5 g を磨砕し水 7.5 ml を加えて懸濁後, 上記と同様にビタミン K を抽出し, HPLC で測定する. 以上の操作はすべて遮光中で行う.

HPLC は島津のシステム (ポンプ: LC-6A, 検出器: RF-530, データ処理装置: クロマトパック C-R3A) を使用し, 安部らの方法²⁰⁾に準じて以下の条件でビタミン K の測定を行った. カラムは島津シンパック ODS (0.6×15 cm) を使用し, 温度 50℃ で操作した. 移動相にはエタノール: 水 (97: 3) を用い, 流速 1.0 ml/min で行

った. 反応は分離後, カラムからの溶出液に反応液 (0.1 % NaBH₄ エタノール溶液, 流速: 0.5/ml) を加えて 0.8 mm×2 m のステンレスコイル中, オープン内 (50℃) で反応した後, 蛍光強度, 励起波長: 320 nm, 蛍光波長: 430 nm で測定した. 本条件における MK-4, ビタミン K₁ 及び MK-7 の保持時間はそれぞれ 6.3 分, 7.9 分, 10.8 分である.

(4) ほうれん草のビタミン K の抽出および測定

ほうれん草の緑葉の部分 10 g を磨砕後, 水 50 ml を加えてよく混合した後, 吸引濾過し, さらに濾液を 10,000×g で 30 分間遠心分離し, 水抽出液と残渣に分ける. 水抽出液並びに濾過および遠心分離で得られた残渣について先に述べた方法でビタミン K を抽出し, HPLC で測定する.

(5) 納豆の水抽出液のクロマトグラフィー

(3) で得た水抽出液を用いて既報¹⁹⁾と同様な方法で納豆中の KBF について検討を行った. すなわち, 納豆の水抽出液 400 ml を, あらかじめ 50 mM トリス塩酸バッファー (pH 8.0) で平衡化した DEAE-Sephacrose CL-6B (16.0 cm×3.2 cm) のカラムに加え, 同バッファーで洗った後, 0.2~0.8 M まで直線的に塩濃度を上げて溶出を行った. ビタミン K₂ を含む画分を集め, トリスバッファーに透析した後食塩の濃度勾配を変えて, さらに 2 回 DEAE によるイオン交換を行った. 2 回目は 14.5 cm×1.5 cm のカラムを用いて, 0.3~0.8 M NaCl の濃度勾配で, 3 回目は 3.5 cm×1.0 cm のカラムを用いて, 0.35~0.8 M NaCl の濃度勾配で行った. 溶出パターンはフラクション中のビタミン K₂ の測定並びに UV モニターによって得た. 3 回のイオン交換で得たビタミン K₂ 画分を透析・濃縮後 0.5 M NaCl を含むトリスバッファー中で Sepharose 4B (96 cm×1.2 cm) によってゲル濾過を行い, 得られた各フラクションについてビタミン K₂ を測定した.

ビタミン K₂ を含む画分を 5 mM トリスに透析後凍結乾燥し, KBF の試料とした.

(6) 電気泳動

ゲル濾過によって得られた KBF 画分について 5~30 %ポリアクリルアミドゲルを用いてスラブ電気泳動を行い, 25 %イソプロパノールと 10 %酢酸に溶かした塩基性色素のアクリジンオレンジで染色した後, クマジーブリリアントブルー (CB) でタンパク質を染色し, 糖の染色は過ヨウ酸シッフ染色法 (PAS) で行った²¹⁾.

納豆の KBF のビタミン K₂ 結合活性を調べるため電気泳動後のゲルを 0.5 cm 間隔に切り取り, 先に述べた

納豆中の水溶性ビタミン K₂ 複合体について

方法でビタミン K₂ を抽出・測定し、糖タンパクとビタミン K₂ の分布状態を調べた。

(7) 納豆の保存中におけるビタミン K₂ 量の変化

冷蔵庫内 (5℃) で 1～3 週間保存した納豆、冷凍庫 (-20℃・1 か月) で保存した納豆および凍結乾燥して保存 (1 か月) した納豆について、水溶性のビタミン K₂ 量を測定した。

3. 結 果

(1) 納豆中の水溶性および不溶性ビタミン K

Fig. 1 に HPLC による標準ビタミン K、納豆及びほうれん草のクロマトパターンを示した。この図に見られるように納豆についてはビタミン K₁ と MK-7、またほうれん草についてはビタミン K₁ のみのピークがそれぞれ認められた。すなわち納豆中のビタミン K₂ は全て MK-7 (以後ビタミン K₂ と表示) であることが分かる。

Table 1 には納豆の測定結果と共にほうれん草中のビタミン K の結果も示した。表から明らかなように納豆及びほうれん草中のビタミン K₁ は不溶性の形で存在するのに対し、*B. natto* によって生産されたビタミン K₂ の大部分は水抽出液中に認められた。このように納豆中のビタミン K₂ の殆どが水溶性の形で存在していることは、既に我々が報告したように¹⁹⁾、*B. subtilis* の培養液中のビタミン K₂ と同じ様に KBF により可溶化され分泌されていることを示すものである。即ちビタミン K₂ の殆どがビタミン K₂ 結合性因子 (KBF) と複合体の

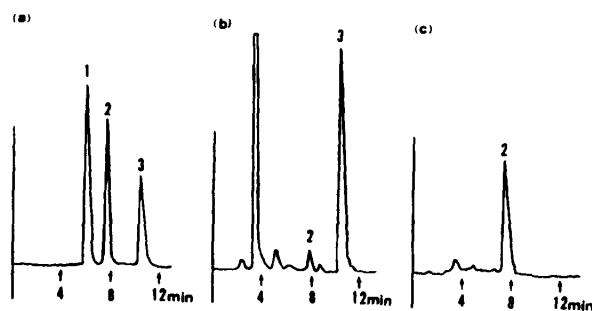


Fig. 1. HPLC patterns of standard vitamin K (a), hexane extract of 60% propanol-treated natto (b) and that of spinach (c)

Peak 1, 2 and 3 represent MK-4, vitamin K₁ and MK-7 respectively. HPLC was carried out under the condition specified below. Column: Shimazu Shimpach ODS (0.6 cm×15 cm); column temp: 50°C; mobile phase: C₂H₅OH-H₂O (97:3), flow rate: 1.0 ml/min; reagent: 0.1% NaBH₄ ethanol sol., flow rate: 0.5 ml/min; reaction coil: 0.8 mm×2 m; detection: fluorescence (E_x: 320 nm, E_m: 430 nm).

Table 1. Vitamin K contents in natto and spinach

	Vitamin K ₁ * (ng/g)	Vitamin K ₂ * (ng/g)
Natto		
Whole	78	6,240
Water extract	0	6,249
Residue	2	730
Washed natto	84	336
Spinach		
Whole	4,927	0
Water extract	84	0
Residue	4,846	0

* The contents were normalized wet-weight of natto and spinach respectively.

形で存在していると考えられる。従って、イオン交換、ゲル濾過、電気泳動でビタミン K と共に溶出、ないしは泳動する部分に KBF が含まれているはずであり、これらの分離操作を繰り返すことによって、ビタミン K₂-KBF 複合体を分離することができ、同時にその安定性を調べることが出来る。

後述のように納豆中の KBF は、電気泳動において糖染色並びにタンパク質染色が可能であることから、*B. subtilis* の KBF と同様、一種の糖ペプチドであると考えられるが収量がきわめて少ないため、今回化学分析するには至らなかった。以下の実験では、KBF の分離精製を試みると同時に KBF のビタミン K₂ 結合活性並びにその複合体の安定性について検討した。

(2) 納豆の KBF の精製

Fig. 2 は納豆の水抽出液を、既報¹⁹⁾に従って DEAE-Sephacrose CL-6B を用いて繰り返し 3 回イオン交換クロマトグラフィーを行った結果である。3 回のイオン交換クロマトグラフィーにおいて、いずれの場合もビタミン K₂ は 0.5 M NaCl 濃度付近に鋭い 1 本のピークとして溶出され、合成培地で培養した *B. subtilis* のイオン交換クロマトグラフィーの場合と類似の溶出傾向を示した¹⁹⁾。

さらに Sepharose 4B でゲル濾過を行ったところ Fig. 3 に示したように、3 つのピークが得られたがビタミン K₂ は分子量 100 kD の位置に溶出されるピークに含まれており、この場合も *B. subtilis* の KBF と類似の溶出傾向を示した。この画分中に含まれるビタミン K₂ が KBF と結合していることを確認するために電気泳動を行った。

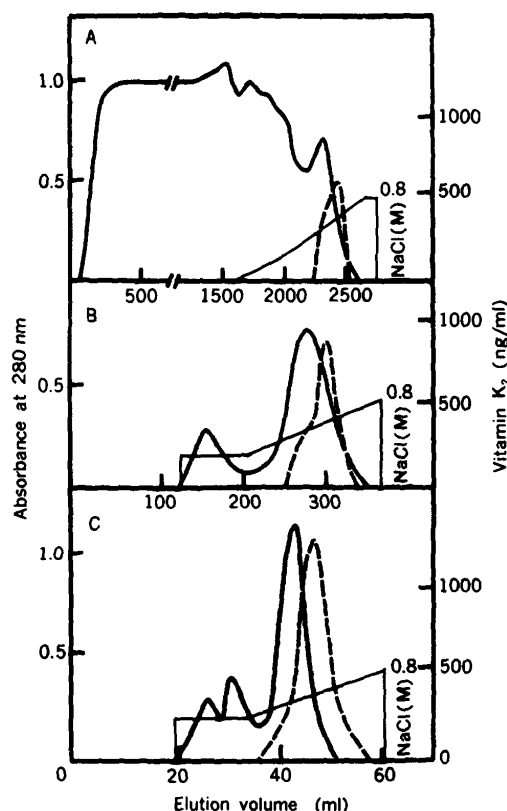


Fig. 2. Isolation of KBF by consecutive DEAE-Sephadex CL-6B chromatography

The water extract of natto was applied to the first DEAE-Sephadex column (16.5 cm $\times$ 3.2 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. After washing the column with the same buffer, a linear salt gradient was applied as indicated (A). The fractions containing menaquinone were pooled, dialyzed against 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and applied to the second DEAE column (14.5 cm $\times$ 1.5 cm) equilibrated with the same Tris buffer (B). The vitamin K_2 eluted at the same salt concentration was pooled, concentrated and subjected to a third DEAE chromatographic separation, which was carried out in the same manner as (B) on the smaller column (3.5 cm $\times$ 1 cm) (C). The elution of peptide was monitored by A_{280} (—) and the elution of vitamin K_2 (---) was followed by measuring its content by HPLC.

(3) ビタミン K_2 -KBF 複合体の電気泳動と泳動ゲル中のビタミン K_2 の分布状態

B. subtilis の KBF は酸性アミノ酸を多く含んでいるため、通常の染色法では染色されないことが分かっている¹⁹⁾. *B. natto* の KBF の場合も、直接 CB で染色することが出来なかったため、電気泳動後、あらかじめ酸性物質を強く染色するアクリジンオレンジでゲルを染色したのち、CB でタンパク質を染色し (Fig. 4-b), 糖は

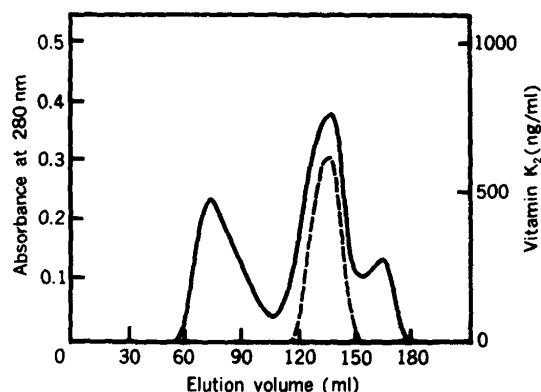


Fig. 3. Sepharose 4B chromatography of the third DEAE fraction

The third DEAE fraction (6.8 mg) was applied to a sepharose 4B column (90 cm $\times$ 1.2 cm) and eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.5 M NaCl, at a flow rate of 6 ml/hr. Peptide elution was monitored by the absorbance at 280 nm (—). Vitamin K_2 content (---) was determined by HPLC.

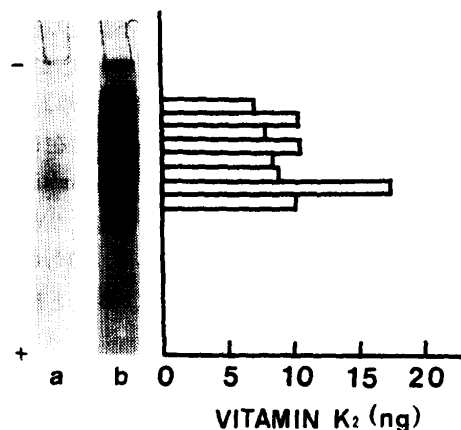


Fig. 4. Polyacrylamide disc electrophoresis of the sepharose 4B fraction and the distribution of menaquinone-7 in the gel

The Sepharose 4B fraction (272 μ g) was applied to a gradient polyacrylamide gel (5–30%). The gel was stained for carbohydrate by the periodic acid/Schiff reagent (lane a) and for peptide by acridine orange followed by coomassie brilliant blue (lane b). The unstained gel was sliced at 0.5 cm intervals, and each slice was extracted with isopropyl alcohol/water (50:50) for determination of the menaquinone-7 content.

PAS によって染色した (Fig. 4-a). Fig. 4 から明らかなように、ビタミン K_2 とタンパク質および糖を含む成分の分布は完全に重なっていること、並びに泳動パターンが *B. subtilis* のそれと比べて類似していることから、両者は類似の糖ペプチドであると考えられる。

納豆中の水可溶性ビタミン K₂ 複合体についてTable 2. Changes of vitamin K₂ contents in water extracts of natto by storage conditions

Storage conditions		Vitamin K ₂ content in water extracts*	
		(ng/g)	(%)
Intact		6,249	100.0
Refrigeration	1 week	3,430	54.9
	2 weeks	3,512	56.2
	3 weeks	3,449	55.2
Freezing		5,543	88.7
Freeze-drying		1,981	31.7

* The contents were normalized for wet-weight of intact natto.

B. subtilis の KBF と同様に不均一な糖染色パターンを与えるが、これは前報¹⁹⁾で指摘したように糖ペプチドの糖含量の不均一性によるものと思われる。

(4) 納豆中のビタミン K₂-KBF 複合体の保存中における変化

納豆の保存中における水可溶化形のビタミン K₂ 量の変化を見るため、冷蔵保存 1 週間、2 週間、3 週間および冷凍保存 1 か月、凍結乾燥保存 1 か月の各納豆の水抽出液のビタミン K₂ 量の測定結果を Table 2 に示した。水可溶化形のビタミン K₂ は冷蔵保存では 1 週間以内の減少が著しく、製造当日納豆に比べ約 45 % も減少したが、その後は殆ど減少しなかった。冷凍保存ではビタミン K₂ 量の減少は冷蔵保存に比べて少なく、その減少率は約 11 % であった。また、凍結乾燥保存では約 68 % とその減少率は高くなる傾向を示した。

4. 考 察

ほうれん草中のビタミン K₁ は水抽出液中には含まれず、不溶性の形で存在しているのに対し (Table 1)、納豆中のビタミン K₂ の殆どは水抽出液中に水溶性の形で存在している。本研究の結果は本来脂溶性ビタミンであるビタミン K₂ が、*B. subtilis* の培養液のビタミン K₂ と同様に糖ペプチドと複合体を形成することによって可溶化されていることを示している。ただ、*B. subtilis* の場合 (40 % が水溶性) と異なって、納豆の場合は 80 % 以上のビタミン K₂ が水溶性の形で存在する。これは菌の種類の違いというよりもむしろ、培養条件によって KBF の生成量及びそのビタミン K₂ 複合体の安定性の差によるものと考えられる。事実 *B. subtilis* の培養液の組成により水可溶化形のビタミン K₂ の比率が変動す

る (未発表データ)。

納豆の KBF は水抽出液をイオン交換・ゲル濾過及び電気泳動において *B. subtilis* のそれと比べて類似した挙動を示す。納豆の KBF がイオン交換において 0.5 M の高い食塩濃度で溶出されることは、CB で直接染色できないことと相まって、それが酸性アミノ酸を多く含むことを示唆している (*B. subtilis* の場合: Asp 14.5 %, Glu 19.2 %)。

Sephacrose 4B によるゲル濾過において溶出されるビタミン K₂ のピークの位置は *B. subtilis* の場合と一致した。*B. subtilis* の KBF は、ゲル濾過によって約 100 kD を持つと推定されるが、SDS 電気泳動では分子量約 2 kD を示すこと、またそのペプチド構成は特異的で 4 種類のアミノ酸 (酸性アミノ酸: Glu 19.2 %, Asp 14.5 %, 疎水性アミノ酸: Leu 43.6 %, Val 13.3 %) から成っており、糖の存在 (約 20 %) も認められていることから、混合ミセルを形成することによってビタミン K₂ を可溶化していると考えられる¹⁹⁾。

納豆の KBF は、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過などの結果とあわせて考えると、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において *B. subtilis* の KBF と相似した泳動図を示し、かつ糖の存在やビタミン K₂ 結合活性を示すことから、先に我々が見付けた *B. subtilis* の KBF と同一或は類似の糖ペプチドと考えられる。

白幡ら²²⁾および Shearer²³⁾らは、妊婦においてビタミン K、とりわけビタミン K₁ は胎盤を通じて移行されにくいと述べている。これは、ビタミン K₁ の体内への吸収率が低いことによるものと考えられる。授乳中の母親に納豆を摂取させることにより乳児の血液凝固能が高まることが知られているが¹⁶⁾¹⁷⁾、このことは、ビタミン K₂ が納豆中に水溶性の形で存在しているため体内に吸収され易いことと関連している可能性が考えられる。ビタミン K₁ の場合、動物体内で phytyl 基が geranyl-geranyl 基と置き換わりビタミン K₂ に変化してから利用されるのに対し、ビタミン K₂ はその過程を必要とせず²⁴⁾そのまま利用されるため、利用率が高くなり乳汁中への分泌が高まるものと思われる。

納豆は栄養価の高い食品であり、またビタミン K₂ の給源としても望ましい食品である。しかし納豆は購入したあとすぐに食べられるとは限らない。納豆の保存期間は冷蔵庫で 1 週間位と言われているが購入者によっては 1 週間以上保存した後、食することも考えられる。そこで保存方法の違いによる納豆中の水溶性ビタミン K₂ 量の変化について検討を行った。冷蔵庫で 1~3 週間保存

した場合、冷凍庫保存および凍結乾燥保存した場合の水溶性ビタミン K_2 量の変化を見てみると (Table 2), 製造直後の納豆中の水溶性ビタミン K_2 量は 6,249 ng/g であったものが、1週間冷蔵保存すると 3,430 ng/g と約 1/2 に著しく減少したがその後は殆ど減少しなかった。この水溶性ビタミン K_2 量の減少はすなわち KBF-複合体の減少と考えられる。納豆中で混合ミセルの形をとってビタミン K_2 を安定化していた KBF はペプチターゼやプロテアーゼなどの酵素によって糖ペプチド鎖が切れ、ビタミン K_2 が遊離して不安定な状態となって減少することが考えられる。また冷凍保存した場合のビタミン K_2 の減少は約 11% と少ないが、これは凍結により先に述べた酵素の活性が抑制され、KBF への影響が少なく、従ってビタミン K_2 の減少も少なくなるためと思われる。一方、凍結乾燥保存ではビタミン K_2 の減少は約 68% と著しいが、これは凍結乾燥によって納豆中に含まれている脂質の酸化に伴う KBF の変性が原因かもしれない。以上のことからビタミン K_2 摂取の点から考えると納豆は購入直後に食した方が好ましいが、購入してすぐに食さない場合は冷凍庫内での保存が望ましいことが分かる。

5. 要 約

(1) 納豆中のビタミン K_2 はその殆どが水抽出液中に水溶性の形で存在したが、植物性由来のビタミン K_1 は不溶性の形で存在した。

(2) 納豆のビタミン K_2 は既報の *B. subtilis* と同様に一種の糖ペプチドと複合体を形成し、可溶化された形で存在していることを確認した。

(3) 納豆中のビタミン K_2 は納豆を冷蔵庫で保存した場合、1週間以内の変化が著しく約 1/2 に減少するのに対し、冷凍保存した場合ビタミン K_2 の減少は約 11% と少なかった。しかし、凍結乾燥によってビタミン K_2 は著しく減少 (68%) した。

最後に本研究にあたり、ご指導頂きました本学謝名堂昌信教授、土居幸雄助教授ならびにビタミン K_1 およびビタミン K_2 (MK-4, MK-7) をご提供頂きましたエーザイ株式会社に感謝致します。

引 用 文 献

- 1) Dam, H.: *Biochem. Z.*, **215**, 475 (1929)
- 2) Dam, H. and Schonheyder, F.: *Biochem. J.*, **28**, 1355 (1934)
- 3) 日本ビタミン学会編: ビタミン学 [I] 脂溶性ビタミン, 東京化学同人, 東京, 226 (1980)
- 4) Bishop, D.H.L., Pandya, K.P. and King, H.K.: *Biochem. J.*, **83**, 606 (1962)
- 5) Stenflo, J. and Ganrot, P.O.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 98 (1973)
- 6) Truswell, A.S., Irwin, T., Beaton, G.H., Suzue, R., Haenel, H., Hejda, S., Hou, X.-C., Leveille, G., Morava, E., Pedersen, J. and Stephen, J.M.L.: *Nutr. Abstr. Rev., Ser. A.*, **53**, 993 (1983)
- 7) 中山健太郎: 周産期医学, **12**, 1029 (1982)
- 8) Owen, C.A. and Walter, B.E.J.: *Haemostasis*, **7**, 189 (1978)
- 9) Iizuka, A. and Nagao, T.: 医学のあゆみ, **105**, 946 (1978)
- 10) Haroon, Y., Shearea, M.J., Rahim, S., Gunn, W.G., McEnery, G. and Barkhan, P.: *J. Nutr.*, **112**, 1105 (1982)
- 11) 宮地良和: 日児誌, **86**, 1320 (1982)
- 12) 進 純郎, 佐藤喜一, 仁志田博司, 周産期医学, **12**, 1067 (1982)
- 13) 鈴木重統, 稲川 昭, 真木正博, 白川光一, 寺尾俊彦: 周産期医学, **12**, 1071 (1982)
- 14) 城井美子, 岡田明美: 周産期医学, **12**, 1113 (1982)
- 15) 坂野俊行, 野津本茂, 長岡忠義, 森本 厚, 藤本恭子, 増田佐智子, 鈴木由紀子, 平内三政: ビタミン, **62**, 393 (1988)
- 16) 梁 茂雄, 馬場一男: 周産期医学, **11**, 1191 (1981)
- 17) 梁 茂雄: 周産期医学, **12**, 1101 (1982)
- 18) 三浦みどり, 平池秀和, 木村美恵子, 糸川嘉則: ビタミン, **64**, 459 (1990)
- 19) Ikeda, H. and Doi, Y.: *Eur. J. Biochem.*, **192**, 219 (1990)
- 20) 阿部皓一, 広島 修, 石橋恭子, 大前雅彦, 阿部靖, 勝井五一郎: 薬学誌, **99**, 192 (1979)
- 21) Zacharius, R.M., Zell, T., Morrison, J.H. and Woodlock, J.J.: *Anal. Biochem.*, **39**, 148 (1969)
- 22) 白幡 聡, 中村外士雄: 血液と脈管, **16**, 148 (1985)
- 23) Shearer, J.M., Rahim, S., Barkhan, P. and Stimmler, L.: *Lancet*, **28**, 460 (1982)
- 24) 上原喜八郎: 代謝, **10**, 942 (1973)