2,3 のビタミン B₁₂ 資源について (第2報)

Studies on Sources of Vitamin B₁₂ (2)

(昭和 31 年 4 月 7 日受理)

高 橋 重 作
(Jusaku Takahashi)

著者はさきに種々の昆虫類、特殊食品、菌類、若干の淡水魚及び2,3の酸酵食品などのビタミン B₁₂ (以下単に B₁₂ と呼ぶ) 含量について報告¹⁾したが今回更に従来薬用とされていたサンショウウオ、マゴタロウムシ (ヘビトンボの幼虫) 等にかなり高濃度に B₁₂ が含まれていること、家蚕の繭習に B₁₂ が存在すること及びアオミドロ属に B₁₂ が相当量含まれ且つ該 B₁₂ が主体内合成されていること等を見たので、これらの結果について大要を報告する。

実 験 の 部

I. 実験方法

1. 供試液の調製: 各試料は homogenize 後, 100°C 30 分の熱水抽出を行い B₁₂ の溶出をはかり, 又は試料に対し trypsin 10%, phosphate-buffer (pH=7.0) 20 倍量を添加, toluol 被覆後 37°C 24 hrs の消化を行い, 以後熱水抽出法に準じて B₁₂ の抽出を行い, 何れも濾過後透明液をそれぞれ供試液とした。

2. 定量法²⁾: *Euglena gracilis* var. *bacillaris* による microbioassay によつた。即ち各試験管に倍造培地 2.5 cc を採り, これに前記供試液を加えて全容 5 cc の培地とし, 15 lbs, 12 分間の加圧滅菌後種菌を接種し, 30°C に於いて約5日間培養後, optical density を測定し, 同時に行つた純粋 B₁₂ のそれと比較し, 見掛けの値 x とし, なお供試液を終濃度が 0.2 N となるようにアルカリを加えて 30 分間煮沸³⁾し, 上と同様に培養し, 量定して得た値を y とし, $x-y$ を以て B₁₂ の真値とした。

3. Paper chromatography による B₁₂ の同定: ペーパークロマトグラフ用濾紙 No. 50 を 2 cm × 40 cm

に切り, 供試液を原線上に点滴し, 溶剤 *n*-butanol⁴⁾, 2,5) (水飽和) を飽和せしめた展開装置内に 1 夜懸垂し, 翌朝降下法により室温にて展開し, 溶剤先端が原線より 23 cm 浸透したところで展開を終り, 乾燥後原線より 1 cm 毎の切片に切り, それぞれ試験管に移し, 培地及び蒸留水を注ぎ 2 の場合と同様に処理し *Euglena* 法によつて定量し, 先ず B₁₂ 標準液の R_f を定め, これと比較して試料中 B₁₂ の同定を行つた。なお供試液のアルカリ分解液についても同様に操作して試料そのものと比較し, B₁₂ の存在を確認した。

4. アオミドロの純粋分離⁶⁾ 及び培養法

i) 分離法: 8 月中旬アオミドロの生体約 2 g をとり, 滅菌水 100 cc を注いで振盪後洗液を捨て, 本操作を約 20 回繰返し, ここに得た洗滌アオミドロの數片を白金針にて採り, 予め調製せる BENECKE 培地 (寒天 2% 含有) に接種し, ペトリ皿に流し以後常法の如く処理して, 日光の直射を避けつつ, 水道水の環流下に 25°C を目標に培養し, 純粋アオミドロを釣取した。

ii) 培養法: 300 cc 容 Erlenmeyer flash に BENECKE 培地を 150 cc 宛分注し, 純粋アオミドロを接種し, 12 月迄は昼間は直射日光を防ぎつつ屋外にて培養し, 夜間は 25°C の定温器内に納め, 2 燭光の電燈光線を接触照射しつつ培養した。

なお 12 月以降は昼夜共定温器内に前記条件下に培養を行つた。

II. 実験結果

実験 1. 特殊食品中の B₁₂ 含量

マゴタロウムシ, サンショウウオ等の B₁₂ 含量を第 1 表に示した。

第 1 表 特殊食品中のビタミン B₁₂ 含量

和 名	学 名	水分 (%)	B ₁₂ 含量 [※] (mg%)	備 考
マゴタロウムシ (ヘビトンボの幼虫)	Prothohermes grandis Thumberg	9.69	1,625	齊川産 (乾燥品)
クロサンショウウオ	Hynobius nigrescens Stejneger	12.24	3,560	栃木県栗山産 (乾燥品)
マホヤ (筋肉)	Cynthia roretzi v. Drasche	—	163	仙台産 (新鮮物)

※ 100°C, 30 分の熱水抽出法による場合。

考察： サンショウウオ及びマゴタロウムシはそれぞれかなり高濃度に B_{12} を含んでいたが鹹水産のマホヤのそれは多くなかった。前二者は古来薬用資源とされてきたが B_{12} はそれらの有効成分の一つであることが明らかになった。 B_{12} の起源について前二者は主として食肉性^{7),8)}であり後者は雑食性⁷⁾を有するので、それぞれ食餌として摂取せるものより吸収、集積されたものと思われる。

実験 2. 家蚕繭の B_{12}

家蚕の絹糸腺に平均 $5.6\text{m}\gamma\%$ ⁹⁾ (熱水抽出時) 乃至 $9.5\text{m}\gamma\%$ (trypsin 消化時) の B_{12} が含まれている。依つて今蛾脱出後の繭層について B_{12} 含量を測定した結果第2表に示す如き結果を得た。

考察： 予想されたように、繭層からも B_{12} が検出された。従つて製糸工程に於ける繰糸処理廃液は B_{12} を含

むことが明らかになった。

実験 3. アオミドロ属¹⁰⁾ (Spirogyra) と B_{12}

接合植物に属するアオミドロ属のものについて B_{12} の測定を行つた結果、風乾物の trypsin 消化を行つたものに約 $1.8\gamma\%$ の B_{12} の存在が明らかになったので、その起源を追求すべく BENECKE 培地を用い、アオミドロの純粋分離及び B_{12} 生産試験を行つた。以上の結果を第3~4表及び第1図に示す。

考察： 橋本ら⁵⁾は green algae, brown algae 及び red algae 等について B_{12} の存在を報告し、又上野¹¹⁾は琵琶湖産藻類 (正しくは淡水産顕花植物¹²⁾) について同じく B_{12} 含量を報告しているが両者共 B_{12} の起源に関しては明かにされていない。著者は接合植物に属するアオミドロ属のものに相当の B_{12} が含まれていることを

第2表 家蚕繭層のビタミン B_{12} 含量

水分 (%)	$B_{12}\text{m}\gamma\%$		繭 50 個の繭層重量 (g)	$B_{12}\text{m}\gamma/\text{繭層 } 1,000 \text{ 個}$
	※ A	※※ B		
11.21	6.9	8.3	23.75	39.8

※A： 100°C , 30 分の熱水抽出法による。

※※B： Trypsin 10% を加え、pH 7.0 に於いて 37°C , 24 hrs の消化を行つた場合。

第3表 アオミドロ属のビタミン B_{12} 含量

採集月日	試料の 処理法	$B_{12}\text{m}\gamma\%$			備 考
		見掛けの値	耐アルカリ 因子	真 値	
1955年7月25日	※ A	1,085	73	1,010	水田産のものを1回水洗後電気乾燥 ($43\sim 48^{\circ}\text{C}$) を3日間行つたもので、水分含量 12.78%。
" 8月3日	※ A	1,125	77	1,048	旧陸軍飛行場跡コンクリート水槽より採取し、直射日光の下に $4\frac{1}{2}$ hrs, 次いで電熱乾燥 (45°C) を 2 hrs 行つたもので、水分含量 9.64%。
	※※ B	1,886	102	1,784	

※A： 100°C , 30 分の熱水抽出法による。

※※B： Trypsin 10% を加え、pH 7.0 に於いて、 37°C , 24 hrs の消化を行つたもの。

第4表 アオミドロ属のビタミン B_{12} 合成試験

区 分	培 地	色 相	pH	$B_{12}\text{m}\gamma/100 \text{ cc (broth)}$			実 験 期 間
				見掛けの値	耐アルカリ 因子	真 値	
Control	BENECKE	無 色	6.0	0	0	0	1955年8月20日～ 1956年2月3日
I	BENECKE	緑 色	5.6	1.6	0.6	1.0	
II	BENECKE + Co^{++} 1 ppm	"	5.6	3.2	0.6	2.6	
III	BENECKE + Co^{++} 1 ppm + glucose 0.2%	"	5.5	4.7	0.8	3.9	

第 1 図 アオミドロ trypsin 消化液のバイオオートグラム

前記 Euglena 法によつて測定したので、更に Paper chromatography 及び bioautography^{4), 2), 5)} を繰返し、 B_{12} の同定を行い、その存在を確認した。なお、該 B_{12} の生体内合成を予想し、この点を追求する目的でアオミドロの純粋培養を企図し、 B_{12} 皆無の培地から B_{12} が生合成¹⁴⁾ されることを確認した。この際 precursor として培地に Co^{++} (1 ppm) の添加により 2.6 倍に、 Co^{++} 及び glucose の添加により 3.9 倍に B_{12} 生産は上昇^{14), 15)} した。本植物は従来水田の雑草として嫌悪されてきたものであるが、以上の知見からして、沼沢地などの利用によつて、アオミドロの生産、飼料化、食料化（水洗後乾燥したものは芳香がある）について、今後研究の必要があるように思われるので、これらの点について検討中である。

総 括

Euglena 法によつて、 B_{12} 資源の検索を行つた結果

- 1) 古来菜用資源とされていたサンショウウオ、マゴタロウムシなどに、かなり高濃度 (3.6~1.6%) に B_{12} が含まれていることを確めた。
- 2) 家蚕の繭層からも B_{12} が検出された。
- 3) 接合植物に属するアオミドロ属のものに相当量の B_{12} (1.8%) が含まれており、該 B_{12} はアオミドロの生体内で合成されることを確認した。

終りに臨み、本研究に当り種々御助言を賜つた東大、応微研、箕形政之学士並びに試料蒐集に御尽力頂いた栃木県栗山中学校教官赤沢千嘉雄氏及び実験に御協力頂いた鈴木健治、蒲生栄治の両君に感謝いたします。

文 献

- 1) 著者： 栄養と食糧，8，2，25 (1955)。
- 2) 上田喜一，横 文郎，佐藤 裕： ビタミン 4，191 (1951)。
- 3) C. E. Hoffman, E. L. R. Stocksted, E. L. Hutching, A. C. Dornbush, T. H. Jukes: J. Biol. Chem., 181, 635 (1949)。
- 4) J. C. P. Picken, W. R. Bauriedel: Proc. Soc. Exy. Biol. Med., 75, 511 (1950)。
- 5) Yoshiro Hashimoto, Yasuhiko Maeda: Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 19, 141 (1953)。
- 6) 宇佐見正一郎： 植物生理実習書，養賢堂 111 頁 (1955)。
- 7) 内田清之助： 日本動物図鑑，北隆館 272~287 頁，533 頁 (1949)。
- 8) 石井 悌： 日本昆虫図鑑，北隆館，386~388 頁 (1950)。
- 9) 著者： 農化 29, 711 (1955)。
- 10) 池野成一郎： 植物系統学，160~177 頁，裳華房 (1906)。
- 11) 上野幸子： ビタミン，9，45 (1955)。
- 12) 牧野富太郎： 日本植物図鑑，北隆館，578 頁，288 頁，883 頁，888 頁，295 頁 (1949)。
- 13) 佐橋佳一： 農化，30，総説 A5 (1956)。
- 14) D. Hendlin, M. L. Ruger: Science 111, 541 (1950)。
- 15) 著者： 農化，28, 103 (1954)。