Euglena gracilis z を用いた食品中のビタミン B₁ の 新しい定量法

越 智 宏 倫^{*1}, 渡 辺 文 雄^{*2}, 重 岡 成^{*3}
中 塚 敏 之^{*4}, 中 野 長 久^{*5}, 北 岡 正 三 郎^{*5}

^{*1} 日本老化制御研究所

^{*2} 羽衣学園短期大学家政科

^{*3} 近畿大学農学部

^{*4} 島根女子短期大学家政科

^{*5} 大阪府立大学農学部

New Assay Systems for Vitamin B₁ Using *Euglena gracilis* z and their Application for Determining of the Vitamin Contents of Some Foods

Hiroto OCHI,^{*1} Fumio WATANABE,^{*2} Shigeru SHIGEOKA,^{*3}
Toshiyuki NAKATSUKA,^{*4} Yoshihisa NAKANO^{*5} and Shozaburo KITAOKA^{*5}

^{*1} Japan Geriatric Research Laboratory, Fukuroi 437-01

^{*2} Laboratory of Nutrition and Food Science, Hagoromo-gakuen Junior College, Sakai 592

^{*3} Department of Food and Nutrition, Kinki University, Higashiosaka 577

^{*4} Nutrition Laboratory, Shimane Women's Junior College, Matsue 690

^{*5} Department of Agricultural Chemistry, University of Osaka Prefecture, Sakai 591

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 41, 305~308 (1988)

New methods for vitamin B₁ assay were devised using *Euglena gracilis* z and compared with HPLC analysis in the determination of vitamin contents of certain foods. ¹⁴C-Vitamin B₁ dilution method; vitamin B₁ was assayed on the basis of the ¹⁴C-vitamin B₁ dilution effect by the addition of radio-inert vitamin B₁ during vitamin B₁ uptake by vitamin B₁-limited *Euglena* cells (assayable range; 3-500 ng). Vitamin B₁ bioassay using vitamin B₁-deficient *Euglena* cells; vitamin B₁ was assayed by estimating the increase in cell number 24 h after addition of vitamin B₁ to the deficient cells (assayable range; 6-70 ng). Each of the assay systems showed high sensitivity and good reproducibility, as with HPLC.

(Received March 14, 1988)

単細胞原生動物である *Euglena gracilis* z はビタミン B₁ を生育必須因子として要求し¹⁾, 培地に添加したビタミン B₁ をきわめて活発に細胞内へ取り込む²⁾。それゆえに *Euglena* のビタミン B₁ 制限および欠乏細胞を容易に調製でき, これら制限および欠乏細胞はビタミン B₁ 添加後速やかに取り込み, 急速な細胞増殖を行い 48 時間以内に正常細胞へと戻ることが報告されている¹⁾。

現存ビタミン B₁ の定量にはチオクロム蛍光法³⁾ が感度も良く優れた方法として広く用いられているが, 蛍光分光光度計等の機器を必要とする。そこでわれわれはこの蛍光法とは別のまったく新しいビタミン B₁ の定量法を *Euglena* のビタミン B₁ 制限および欠乏細胞を用いて検討した。さらにこれを用いて数種の食品中のビタミン B₁ を定量し, チオクロムプレラベル高速液体クロマトグラフィー法と比較検討を行った。

実験方法と材料

1. 生物および培養法

本実験には野生株である *Euglena gracilis* z 株を用い

^{*1} 〒437-01 静岡県袋井市春岡

^{*2} 〒592 堺市浜寺南町 1-89-1

^{*3} 〒577 東大阪市小若江 3-4-1

^{*4} 〒690 松江市乃木福富町 282-2

^{*5} 〒591 堺市百舌鳥梅町 4-804

Koren-Hutner 培地⁴⁾ (KH 培地: ビタミン B₁ 2.5 mg/l 含有) で培養した。Euglena のビタミン B₁ 制限細胞の調製は乾熱滅菌した 500 ml 容坂口コルベンに KH 培地からビタミン B₁ を除去した培地 (ビタミン B₁ 欠乏 KH 培地) を 150 ml 入れ 120°C, 2 気圧, 15 分間オートクレーブにて殺菌後, KH 培地で 5 日間前培養した Euglena 培養液 1.0 ml (20×10⁶ cells) を無菌的に接種し, 照度 2,000 lux, 27°C で 3 日間振盪培養した。この条件で培養した細胞をビタミン B₁ 制限細胞として用いた。Euglena のビタミン B₁ 欠乏細胞はこのビタミン B₁ 制限細胞培養液 1.0 ml (11×10⁶ cells) をさらにビタミン B₁ 欠乏 KH 培地 (150 ml) に接種し, 同様の条件で 4 日間振盪培養し調製した。

2. ビタミン B₁ の定量法

1) ¹⁴C-ビタミン B₁ を用いたラジオアイソトープ希釈法 本定量法にはビタミン B₁ 制限細胞を用いて行い, Euglena 細胞の ¹⁴C-ビタミン B₁ の取込みに対する非放射的放射性ビタミン B₁ およびそのリン酸エステルによる希釈効果により求めた。Euglena 細胞のビタミン B₁ 取込み実験は重岡ら²⁾ の方法に準じて行った。すなわち光照射下 3 日間培養したビタミン B₁ 制限細胞を 2,000×g, 5 分間室温で遠心分離し細胞を集め, 20 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 8.0) で細胞を 2 回洗浄後, 同緩衝液に再懸濁し (10⁷ cells/ml), 27°C 光照射下で 12 時間振盪した。この操作により遠心で運動性の低下した細胞が元の状態に復帰する。この細胞を用いて Table 1 に示す全容量 1 ml の反応系で 30°C, 10 分間反応後, ただちにメンブレンフィルター (TM-4P) により濾過し, 十分に生理食塩水で細胞を洗浄した。その後メンブレンフィルターを乾燥し液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC 903) により細胞内に取り込まれた ¹⁴C-ビタミン B₁ 量を測定した。

2) ビタミン B₁ 欠乏細胞を用いたバイオアッセイ法 試験管 (2.0×18 cm) に上述のビタミン B₁ 欠乏 KH 培地 (4 ml) を入れ, 120°C, 2 気圧, 15 分間殺菌後, 70% エタノールに溶解させた既知量のビタミン B₁ およびそのリン酸エステルを無菌的に添加した。その後あらかじめ, 光照射下で 4 日間培養したビタミン B₁ 欠乏細胞培養液 1.0 ml (10⁶ cells/ml) を接種し, 27°C, 2,000 lux の光照射下で 24 時間振盪培養した。その添加ビタミン B₁ に応じて増殖した細胞数をヘマトメーターで測定した。

3) HPLC 法 HPLC によるビタミン B₁ の定量は重岡ら³⁾ の方法に従って行った。すなわちブロムシアンでチオクロム化した試料を Li Chrosorb-NH₂ カラム (10 μm, Merck 社製, 250×4.6 mm i.d.), 移動相はアセトニトリルを含んだ 90 mM リン酸カリウム緩衝液

Table 1. Reaction mixture for ¹⁴C-vitamin B₁ dilution method.

Vitamin B ₁ -limited cells	10 ⁶ cells
Tris/acetate buffer (pH 8.0)	100 mM
¹⁴ C-vitamin B ₁	0.1 μM (33.7 ng)
Sample or authentic vitamin B ₁ analogues	2-674 ng
Total volume	1.0 ml

(pH 7.5) (60 : 40 v/v) を用いてビタミン B₁ を分離後, E_x 365 nm, E_m 430 nm の蛍光強度を測定することにより定量した。また HPLC は島津 LC-5A を, 検出器は島津分光蛍光スペクトロモニター RF-530 を用い, 流速 2 ml/分, カラム温度は室温で分析を行った。なお標準ビタミン B₁ の保持時間は 1.4 分であった。

3. 食品からのビタミン B₁ の抽出

食品としてウシ肝臓, マアジ (筋肉), 牛乳, ホウレン草 (葉), はっさく (果肉) を試料とした。各試料からのビタミン B₁ の抽出は各試料 2g を正確に秤量し, カミソリ刃で細かく切断した後, 等量の海砂を加え乳鉢を用いて 10% メタリン酸溶液 10 ml 中でホモジナイズし, 遠沈管に入れ, 10,000×g, 10 分間遠心分離した。なお牛乳についてはホモジナイズの操作を省略し, 10% メタリン酸を加えてボルテックスミキサーでよく攪拌することにより抽出した。各遠心上清画分を別の容器に移し, 各沈殿に 3% メタリン酸を 5 ml 加え, よく攪拌, 混和したのち遠心分離し, 上清を合わせた。これら抽出液に 4M 酢酸ナトリウム溶液を加えて pH を 4.5 前後に調整した。総ビタミン B₁ 量を測定するためにはビタミン B₁ のリン酸エステル類をビタミン B₁ に変換させる必要がある。そこで上記の各抽出液にタカジアスターゼを 0.05% になるように添加し, さらに防腐の目的でトルエン約 0.1 ml を加えて 37°C で 12 時間反応させた。このタカジアスターゼ処理した各抽出液を測定法に応じて希釈しビタミン B₁ の定量に用いた。

4. 試 薬

¹⁴C-ビタミン B₁ [(thiazole-2-¹⁴C)thiamine hydrochloride, 26 mCi/mmol] は Amersham International 社より購入した。ビタミン B₁ およびチアミンピロリン酸は半井化学薬品より, チアミンモノリン酸は Sigma 社より購入した。メンブレンフィルター (TM-4P, 0.2 μm) は Advantec 社より購入した。

実験結果および考察

1. 生 育

Euglena のビタミン B₁ 供給細胞, ビタミン B₁ 制限

および欠乏細胞の生育曲線を Fig. 1 に示す。その結果ビタミン B₁ 供給細胞では 4 日間の培養で 20×10^6 cells/ml に達するが、ビタミン B₁ 制限細胞では 11×10^6 cells/ml、ビタミン B₁ 欠乏細胞になると 10^6 cells/ml までしか生育せず、このことは *Euglena* がビタミン B₁ を生育必須因子として要求し、容易にビタミン B₁ 欠乏状態になることを示している。このような細胞を以下の実験に用いた。

2. ¹⁴C-ビタミン B₁ を用いたラジオアイソトープ希釈法

Euglena gracilis z の ¹⁴C-ビタミン B₁ の取込み量を添加した非放射性ビタミン B₁ およびそのリン酸エステル量に対してプロットしたものを Fig. 2 に示す。¹⁴C-ビタミン B₁ の細胞内への取込み量は添加された非放射性ビタミン B₁ 量の増加に応じて直線的に減少した。この結果は、3~500 ng/ml まで定量可能であることを示している。この定量範囲については 3 回検討を加えたが非常に良い再現性が得られた。一方、チアミンモノリン酸およびチアミンピロリン酸は ¹⁴C-ビタミン B₁ の取込み活性にまったく影響を与えなかった。*Euglena* はチアミンモノリン酸およびチアミンピロリン酸をそのままの型では取り込めず細胞表面に存在するホスファターゼで脱リン酸化された後、ビタミン B₁ として取り込まれることが見だされている²⁾。またこれらのエステル型ビタミン B₁ は遊離のビタミン B₁ の取込みを拮抗的に阻害するが、その K_i 値はチアミンモノリン酸が 260 nM、チアミンピロリン酸が 3.7 μM と非常に高いことが報告されている²⁾。この知見は、本実験においてもエステル型ビタミン B₁ により ¹⁴C-ビタミン B₁ の取込みが阻害されなかった結果を支持している。

以上の結果を利用して遊離のビタミン B₁ の定量が可能であることが明らかとなった。さらにチアミンモノおよびピロリン酸をエステラーゼ処理あるいは酸加水分解を行ってから同様にビタミン B₁ 定量を行うことにより総ビタミン B₁ 量が測定可能である。また実際に標準のチアミンモノリン酸およびピロリン酸を 37°C、12 時間タカジアスターゼ処理を行った結果、 $99.5 \pm 0.3\%$ で標準 B₁ の場合と同一の挙動を示した。

上述したように本実験条件においてエステル型ビタミン B₁ (約 680 ng まで) が ¹⁴C-ビタミン B₁ の取込みを阻害しなかったことから試料中のビタミン B₁ とエステル型を分別定量することも可能であると考えられるが、エステル型ビタミン B₁ を高濃度を含む生体試料においてはその B₁ エステルによる阻害を防ぐために希釈等の注意が必要であり、さらにビリチアミンやオキシンチアミンなどのビタミン B₁ 同族体によってビタミン B₁ の取込みが強く阻害されることから²⁾、これらを含む試

Fig. 1. Growth of vitamin B₁-sufficient, limited and deficient *Euglena* cells.

●, vitamin B₁-sufficient cells; ■, vitamin B₁-limited cells; ▲, vitamin B₁-deficient cells.

Fig. 2. Effects of concentrations of the added radio-inert vitamin B₁ and its phosphate esters on ¹⁴C-vitamin B₁ uptake with vitamin B₁-limited cells.

●, vitamin B₁; ■, thiamine monophosphate; ▲, thiamine pyrophosphate.

料の場合はあらかじめ取り除く必要がある。

3. ビタミン B₁ 欠乏細胞を用いたバイオアッセイ法

Euglena ビタミン B₁ 欠乏細胞にビタミン B₁ を添加すると急激な細胞増殖が起こり、48 時間以内に正常細胞へと戻ることが報告されている¹⁾。この性質を利用しビタミン B₁ 欠乏細胞に既知量のビタミン B₁ およびそのリン酸エステルを加え 24 時間後の細胞数を測定することにより、ビタミン B₁ の定量を検討した。その結果ビタミン B₁ 添加量に依存して細胞数が増加し、ビタミン B₁ 添加量を 24 時間後の細胞数に対してプロットすると検討した 6~66 ng まで直線関係が得られた (Fig. 3)。定量実験ごとに標準曲線と比較する必要があるが、この定量範囲内でビタミン B₁ の添加量に比例した細胞増殖が常に得られた。しかしチアミンモノおよびピロリン酸の場合はまったく増殖しなかった。この結果は前述したようにチアミンモノおよびピロリン酸がビタミン B₁ の

Table 2. Comparison of vitamin B₁ content determined by the different assay systems in some foods.

Foods	(μg/g wet weight)*		
	¹⁴ C-vitamin B ₁ dilution method	Bioassay using <i>Euglena</i> cells	HPLC
Bovine liver	1.9±0.2	2.0±0.2	2.1±0.1
Bovine milk	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1
Spinach leaves	1.4±0.1	1.4±0.2	1.4±0.1
Horse mackerel	1.1±0.1	1.3±0.2	1.2±0.1
Hassaku (citrus fruit)	0.4±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1

* Data are expressed as mean±SD (n=3).

取込みに対し高い *K*₁ 値をもち、さらにこれらのリン酸エステル脱リン酸化が取込みの律速になっていることを示唆している。以上の結果は本法によりビタミン B₁ の定量が可能であることを示している。

4. 各定量法による食品中のビタミン B₁ 含有量の比較

そこで上述した *Euglena* のビタミン B₁ 制限および欠乏細胞を用いた定量法とチオクロムブレラベル HPLC 法により数種の食品中のビタミン B₁ 含量を比較検討した (Table 2)。その結果、定量したすべての食品について HPLC 法と *Euglena* 細胞を用いたアイソトープ希釈法およびバイオアッセイ法で得られた結果は誤差範囲内で一致した。また試料をタカジアスターゼ処理前後のビタミン B₁ 量の差よりエステル型ビタミン B₁ の存在比を求めようとしたが、上記のように総ビタミン B₁ 量においては大きな変動は認めなかったが、エステル型ビタミン B₁ 量は顕著な誤差が生じた。

この結果は本実験に用いた食品の鮮度によるものと考えられ、そのために正確なエステル型ビタミン B₁ の存在比は求められなかった。また既報の *Phycomyces blakesleeanus* や *Staphylococcus aureus* を用いたビタミン B₁ のバイオアッセイ法⁵⁾と本法を比較すると *Euglena* 細胞を用いたほうが定量操作が簡単であり、さらに *Euglena* は *S. aureus* と異なり病原性がなく取扱いが安全である。以上の結果から *Euglena* の細胞を用いた定量法はいずれも HPLC 法と同様に感度良く、しかも他の微生物定量法と比べ非常に簡便に一度に多数の試料を処理し、定量可能であることを示している。

要 約

ビタミン B₁ を生育必須因子とする *Euglena gracilis* z を用いて簡便なビタミン B₁ の定量法について検討した。

1) ¹⁴C-ビタミン B₁ を用いたラジオアイソトープ希釈法はビタミン B₁ 制限細胞を用いて ¹⁴C-ビタミン B₁ の細胞内取込み量を非放射性ビタミン B₁ による希釈効果を利用した定量法で 3~500 ng まで定量可能である。

Fig. 3. Effects of concentrations of the supplemented vitamin B₁ and its phosphate esters on growth of vitamin B₁-deficient *Euglena* cells after 24 h.

●, vitamin B₁; ■, thiamine monophosphate; ▲, thiamine pyrophosphate.

2) ビタミン B₁ 欠乏細胞を用いたバイオアッセイ法はビタミン B₁ 欠乏細胞にビタミン B₁ を添加し、24 時間後の細胞増殖度によるビタミン B₁ の定量法で 6~70 ng までは定量可能である。

3) これら *Euglena* 細胞を用いた定量法で食品中のビタミン B₁ 量を定量した結果は HPLC 法で得られた値とよく一致しており、いずれも感度および再現性がよく、しかも非常に簡便な方法である。

文 献

- 1) Shigeoka, S., Onishi, T., Nakano, Y. and Kitaoka, S.: *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 25 (1987)
- 2) Shigeoka, S., Onishi, T., Maeda, K., Nakano, Y. and Kitaoka, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **929**, 247 (1987)
- 3) 日本ビタミン学会(編): ビタミン学実験法 [II], **59** (1985), 化学同人(東京)
- 4) Koren, L.E. and Hutner, S.H.: *J. Protozool.*, **14**, 17 (Suppl.) (1967)
- 5) 藤田秋治: ビタミン定量法, **270** (1952), 南江堂(東京)

(1988年3月14日受理)