Fig. 2. Spectra of Spot 1.

両氏に謝意を表明する。研究費の一部は文部省科学研究助成補助金に依つた。

- (1) SHERNDAL : *J. Am. Chem.*, 37, 165 (1915).
- (2) KREMER : *ditto*, 45, 717 (1923).
- (3) RUHEMANN *Ber.*, 60, 2459 (1927).
- (4) PLATTNER *et al.* : *C. A.*, 44, 3468 (1950)
- (5) PLATTNER *et al.* : *Helv. Chim. Acta.*, 19, 858 (1936).
- (6) KIRCHNER *et al.* *Anal. Chem.*, 23, 420 (1951).
- (7) 小幡, 福士 : 農化, 印刷中.
- (8) 小幡, 福士 : 農化, 26, 113 (1952).
- (9) 高岡, 安藤 : 日化, 72, 999 (1951).
- (10) 小幡, 福士 : 農化, 印刷中.
- (11) GORDON : *Chem. Rev.*, No. 1, 127 (1952).
- (12) TREIBS *et al.* : *Ann.*, 564, 43 (1949).

Summary

Separation and identification of blue campher azulene have been introduced by using adsorbent coated glass strips.

R_F Values.

Adsorbent coating	Silicic acid		Alumina petr. ether
	petr. ether	alcohol	
azulene	0.76	0.02	0.96
cadalene	0.88	0.61	0.98
1,6-dimethyl naphthalene	0.90	0.64	0.98

家蚕体内のビタミン B₁₂ について (第 1 報)

高 橋 重 作 (宇都宮大学農学部農芸化学教室)

昭和 27 年 12 月 26 日 受 理

Studies on Vitamin B₁₂ in Silk Worm. Part 1.

By Jusaku TAKAHASHI (Dept. of Agr., Faculty of Agr., Univ. of Utsunomiya)

著者は生体成分の paper chromatography による研究を行う機会を得、家蚕、桑葉のビタミン B₁₂ の測定を *Euglena gracilis* var. *bacillaris* によるバイオアッセイ法で行つたが、これに paper chromatography 分離, bioautography 等を繰返し、蚕体内にビタミン B₁₂ が存在し、桑葉内には存在しないことを確めた。なお研究すべき項目多きも一応大要をここに報告する。

実 験 の 部

1. 実 験 材 料

蚕は「夏蚕支 108 号」について幼虫 (熟蚕) より始め、各変態毎に逐次実験した。又桑は「改良鼠返」について 9 月上旬より 10 月中旬にわたつて数回実験した。

2. 実 験 方 法

(1) 試料の調製 蚕体 : 適宜細挫し、更に乳鉢内にて海砂と共に磨碎し、7~8 倍量の蒸留水と共に 70~80°, 30 分間熱水抽出を行い、濾過後透明液を供試液とした。

蚕卵 : 蚕体と同様に処理した。

桑葉 : 予備試験の結果 pectin 質多く、熱水処理困難のため ethyl alcohol 抽出を行つた。即ち桑葉 100 g をとり、細切後鉄製乳鉢内にて搗碎し、70% ethyl alcohol 5~6 倍量を注ぎ、70° に於いて 30 分処理して濾過し、残渣に対して以上の操作を 2 回反復し、濾液を 40~45° に於いて減圧濃縮し、更に ether にて 2~3 回処理し、chlorophyll, carotinoid 等の色素を除き、水層を供試液とした。以下これを ethyl alcohol-extracts と呼ぶ。なお、桑葉中微量の B₁₂ をも検出せんがため供試液を濃厚にする目的で benzyl alcohol 抽出

を行つた。その方法を下に記す。

上述の方法によつて供試液を約 5 倍の濃度とした。以下このものを benzyl alcohol-extracts と呼ぶ。

(2) ビタミン B₁₂ の定量法 既述の如く調製した供試液を適宜稀釈し、*Euglena* 法(上田氏の方法⁽¹⁾)によつて定量した。即ち各試験管に double strength medium 2.5 cc をとり、これに供試液を加えて全容 5 cc の培地とし、15 lbs に於いて 10 分間加圧滅菌

後、種菌を接種し、30° に於いて約 5 日間培養後 optical density を測定し、同時に行つた純粹 B₁₂ のそれと比較し、見掛けの B₁₂ の値 x とし、別に供試液を終濃度 0.2 *N* となるようにアルカリを加えて 30 分煮沸⁽²⁾し、上と同様に培養し、定量して得た値を y とし、 $x-y$ を以て B₁₂ の真値とした。

(3) Paper Chromatography によるビタミン B₁₂ の同定 濾紙は東洋濾紙 No. 2 (定性用) を使用した。これを 2 cm × 40 cm に切り、0.66 *M* K₂HPO₄ (pH 4.0) に浸漬風乾後供試液を原線上に点滴し、溶媒 AcOH-BuOH-H₂O (1:4:2) を飽和せしめた展開容器中に 1 夜懸垂し、翌朝降下法によつて室温にて展開⁽³⁾し、溶媒先端が原線より 23 cm 滲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、前記 medium 2.5 cc、蒸留水 2.5 cc 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 に標準液の *R_F* を定め、これと比較して試料中 B₁₂ の同定を行つた。なお各供試液を B₁₂ 定量時と同様にアルカリ分解したものを同時に展開して試料そのものと比較し、B₁₂ の存在を確認した。

実験成績

(1) 蚕体内ビタミン B₁₂ の含量 家蚕体内に於けるビタミン B₁₂ の定量値 ($x-y$) は Table 1 に示す通りである。なお、蛹及び卵について行つた paper chromatogram 及び bioautogram は Table 2, Fig. 1, 2 の如くである。

Table 1. Vitamin B₁₂ Content in Silk Worm.

	Date of sampling	Sample (g)	Weight/body (fresh) (g)	Water content. (%)	V. B ₁₂ /100 g (fresh) (my)	V. B ₁₂ /1000 bodies (my)
Egg	Sept. 15, '52	10.01	6×10^{-4}	66.26	2.0	trace
Larva	July. 28, '52	56.01	3.73	80.15	2.0	75
Pupa	Aug. 1, '52	11.99	1.20	78.33	3.0	36
"	Aug. 4, '52	11.55	1.16	78.05	3.2	37
Moth	Aug. 12, '52	7.30	0.61	73.52	2.7	17

Table 2. Paper Chromatogram of Vitamin B₁₂-like Substance in Pupae and Eggs.

Distance travelled by solvent (cm)	Optical density					
	Pupa (I)			Egg (II)		
	Control (pure V. B ₁₂)	Sample	Alkali degradation products.	Control (pure V. B ₁₂)	Sample	Alkali degradation products.
0	0.069	0.084	0.060	0.131	0.066	0.041
1	0.058	0.054	0.113	0.124	0.046	0.051
2	0.025	0.075	0.084	0.050	0.116	0.041
3	0.016	0.057	0.072	0.060	0.066	0.052
4	0.021	0.063	0.066	0.051	0.093	0.052
5	0.051	0.099	0.080	0.180	0.040	0.056
6	0.074	0.164	0.114	0.407	0.164	0.100
7	0.117	0.178	0.071	0.456	0.184	0.066
8	0.186	0.155	0.068	0.512	0.172	0.086
9	0.177	0.155	0.113	0.577	0.207	0.100
10	0.208	0.229	0.116	0.387	0.127	0.072
11	0.238	0.154	0.096	0.229	0.094	0.073
12	0.173	0.153	0.110	0.142	0.045	0.068
13	0.154	0.129	0.066	0.051	0.036	0.076
14	0.067	0.094	0.080	0.046	0.071	0.061
15	0.026	0.118	0.074	0.051	0.062	0.071
16	0.037	0.108	0.081	0.046	0.045	0.077
17	0.027	0.049	0.061	0.054	0.066	0.062
18	0.030	0.013	0.078	0.051	0.045	0.065
19	0.022	0.089	0.077	0.057	0.072	0.072
20	0.030	0.016	0.020	0.056	0.101	0.110

21	0.031	0.106	0.066	0.064	0.096	0.125
22	0.040	0.022	0.097	0.064	0.110	0.155
23	0.037	0.114	0.108	0.052	0.147	0.155

Note: I) Spotted amount of B₁₂: ca. 0.2 my in the case of (I), ca. 3 my in the case of (II).

Spotted amount of Sample: ca. 0.1 g equivalent (in the case of (I)), ca. 0.1 g equivalent (in the case of (II)).

ii) Temperature during developing: In the case of (I) 19~21°, and in the case of (II) 13~15°.

Fig. 1. Bioautogram of pupae

1. Pure B₁₂
2. Sample
3. Alkali degradation products

1000 個体⁽⁴⁾ 当り、蚕卵のビタミン B₁₂ は殆ど痕跡にすぎないが、幼虫及び蛹に於いては前者は 75 my, 後者は 36~37 my 程度の含量に増加している。

(2) 桑葉中ビタミン B₁₂ の検索 蚕体内にビタミン B₁₂ が含有されていることが判明したので、その

給源を追求すべく桑葉⁽⁵⁾中 B₁₂ を paper chromatography によつて検索した。即ち 9 月上旬より 10 月中旬にわたり改良戻返の心葉より 10~20 葉位のもを採取し、既述の如く Ethyl alcohol-extracts 及び Benzyl alcohol-extracts を調製し、それぞれ室温に於いて展開し、更に bioautography によつて B₁₂ の有無を確かめた。その結果は Table 3 及び Fig. 3, 4 に示した。

Fig. 2. Bioautogram of eggs

1. Pure B₁₂
2. Sample
3. Alkali degradation products

Table 3. Paper Chromatogram of Vitamin B₁₂-like Substance in Mulberry Leaves.

Distance travelled by solvent (cm)	Ethyl alcohol-extracts (III)			Benzyl alcohol-extracts (IV)		
	Control pure (V. B ₁₂)	Sample	Alkali degradation products	Control pure (V. B ₁₂)	Sample	Alkali degradation products
0	0.066	0.066	0.113	0.222	0.062	0.077
1	0.071	0.046	0.125	0.258	0.050	0.074
2	0.046	0.042	0.070	0.138	0.051	0.070
3	0.046	0.046	0.060	0.114	0.042	0.078
4	0.075	0.039	0.093	0.219	0.061	0.081
5	0.040	0.069	0.085	0.627	0.120	0.167
6	0.052	0.092	0.125	0.622	0.244	0.237
7	0.205	0.120	0.089	0.620	0.190	0.137
8	0.538	0.074	0.085	0.721	0.136	0.134
9	0.569	0.063	0.087	0.656	0.136	0.107
10	0.611	0.058	0.140	0.515	0.132	0.102
11	0.618	0.057	0.152	0.475	0.115	0.095
12	0.582	0.077	0.144	0.375	0.154	0.082
13	0.553	0.070	0.134	0.200	0.117	0.103
14	0.298	0.076	0.159	0.180	0.088	0.046
15	0.184	0.058	0.106	0.124	0.093	0.102
16	0.116	0.070	0.091	0.131	0.102	0.102
17	0.070	0.080	0.103	0.130	0.114	0.098
18	0.037	0.071	0.071	0.150	0.087	0.088
19	0.038	0.071	0.081	0.135	0.108	0.097
20	0.056	0.076	0.074	0.120	0.097	0.100
21	0.041	0.081	0.054	0.107	0.167	0.104
22	0.034	0.086	0.073	0.096	0.114	0.114
23	0.040	0.055	0.072	0.075	0.155	0.119

Note: i) Spotted amount of B₁₂: ca. 4 my (in the case of (III)), ca. 5 my (in the case of (IV)). Spotted amount of sample: ca. 0.15 g equivalent (in the case of (III)), ca. 1 g equivalent (in the case of (IV)).

ii) Temperature during developing: in the case of (III) 20~22°, in the case of (IV) 15~17°.

Fig. 3. Bioautogram of mulberry leaves (Ethyl alcohol-extracts).

1. Pure B₁₂
2. Sample
3. Alkali degradation products.

Fig. 4. Bioautogram of mulberry leaves (Benzyl alcohol-extracts).

1. Pure B₁₂
2. Sample
3. Alkali degradation products.

- i) Ethyl alcohol-extracts の場合, R_F 0.3 の附近に白色沈澱を認めたが B₁₂ は陰性であった。
- ii) Benzyl alcohol-extracts の場合, 桑葉として約 1g の量を供試したが R_F 0.26 の位置に耐アルカリ性の 1 *Euglena* 因子を認めたのみで B₁₂ は陰性である。要するに桑葉中にビタミン B₁₂ は殆ど存在しないものと思われる。

総 括

- 1) 蚕体内ビタミン B₁₂ 含量を定量した結果幼虫, 蛹内には相当の存在を確めた。
- 2) 桑葉には B₁₂ に極めて酷似せるもの存在するも paper chromatography, アルカリ処理 B₁₂ 分解検法などを繰返し, 全く陰性であることを確めた。
- 3) なお卵中の B₁₂ も定量したが 1 個体から見て, 生理的移行関係は僅少で痕跡と見做すことが妥当であろうと思われる。

以上の実験から, 蚕体内 B₁₂ は蚕体自ら組織によつて生合成するか, 或は消化管内 *Microflora* の生産に依存するか何れかであろうと思われるが, 今後一層詳細にその機構を明かにする考えである。

この研究は東京大学に内地研究員として派遣中に行つたもので種種御指導を賜つた東京大学農学部佐橋教授同研究室員箕形政之学士並びに貴重な試料を分与せられた農林省蚕糸試験場技官清水正徳の諸氏に対し, 深甚なる謝意を表する。

本報告は昭和 27 年 11 月 26 日第 6 回 A.P.F. 総合研究委員会に於いて発表のものである。

- (1) 上田喜一, 槇文郎, 佐藤裕: ビタミン, 4, 191 (1951).
- (2) C. E. HOFFMAN, E. L. R. STOCKSTAD, B. L. HUTINGS, A. C. DORNBUSH, T. H. JUKES: *J. Biol. Chem.*, 181, 635 (1949).
- (3) H. B. WOODRUFF, J. C. FOSTER: *J. Biol. Chem.*, 183, 569 (1950).
- (4) 竹森金次郎: 佐久良会雑誌 (蚕試), 2 (1917).
- (5) 平塚英吉: 蚕試報, 2, 4 (1917).

Summary

Recently, the author attempted to study a biochemical chain-relation of vitamin B₁₂ nutrition in silk worms and mulberry leaves.

1) At first, the content of vitamin B₁₂ in silk worms was estimated by the *Euglena* assay, and the results were obtained as shown in Table 1, 2, and Fig. 1, 2.

2) Then, the relation between vitamin B₁₂ nutrition in silk worm and mulberry leaves were studied. The detective experiments of vitamin B₁₂ were repeated by paper chromatography, bioautography etc., but all results were completely negative (Table 3 and Fig. 3, 4).

It might be safe to assume that vitamin B₁₂ in the silk worm are being produced by some organ of its body or by the microflora which is found in its intestinal organs.