血液のビタミン B₁₂ に関する研究 (第 1 報)血液中のビタミン B₁₂ の定量について*

岩 本 喜 一, 林 淳 三 (滋賀農業短期大学生物化学研究室)

昭和 28 年 11 月 4 日

Studies on Vitamin B₁₂ in Blood. Part 1. The Determination of Vitamin B₁₂ in Blood.

By Kiichi IWAMOTO and Junzo HAYASHI (Biochem. Lab., Shiga Agr. College)

悪性貧血患者にビタミン B₁₂(V. B₁₂) を投与するとき、網状赤血球、赤血球及び血色素の陽性反応で治療効果があることは既に R. WEST⁽¹⁾ 以来多数報告されている。又著者の 1 人岩本は V. B₁₂ の投与によつて家畜の B₁₂ 栄養障害と牛のエネルギー代謝に就いて、赤血球数の増加と赤血球径の正常復帰の効果を報告した⁽²⁾⁽³⁾。このように V. B₁₂ の人間及び他の動物に対する投与が、それらの血液に変化を及ぼすこと、即ち血液中の B₁₂ の量と、貧血(大赤血球性貧血)及び赤血球数の減少或いは赤血球径の変化と関係があるということは、どのような作用機構によるものであるか、興味深い問題である。これらに関連した問題として血液中の B₁₂ の存在状態を知る必要があるであらう。著者等はこれらを追究する前提として、先ず血液中の V. B₁₂ の定量より着手した。

血液中の V. B₁₂ の定量は J. R. COUCH 等⁽⁴⁾、W. H. PFANDER 等⁽⁵⁾ などによつて行われているが、いずれも *L. leichmannii* assay や *L. L. D.* assay で値も一定していないようである。*Euglena* assay は日数を要する短所以外では *L. leichmannii* assay や *L. L. D.* assay よりも比較的精密であることが最近酒井等⁽⁶⁾によつて報告されている。しかし血液の *Euglena* assay は僅か G. I. M. ROSS⁽⁷⁾ が serum について行つたのみで全血液についてはまだ発表がないようである。

著者等は *Euglena* assay によつて血液中の V. B₁₂ の定量を試み、大体一定の値を得るに至つたので此処に報告する。尚使用した菌種は *Euglena gracilis* var. *bacillaris* PRINGSHEIM であり、HUTNER, S. H. 等⁽⁸⁾ の原法通りの培地で 10 cc scale とした。

実

験

(1) 血液凝固阻止剤 血液凝固阻止剤の使用は *Euglena* 培地に变化を与える如く思われるので検討を加えた。通常使用せられている蓚酸ソーダ、クエン酸ソーダにつきその各 10 mg をもつて血液 5 cc 宛を処理した時には、その両者いずれを用いても *Euglena* assay による値には影響を認めなかつた。なお又これら血液凝固阻止剤の使用出来得る量的範囲は血液 5 cc 当り 5~50 mg までは可能なことを確認した。

(2) 酵素処理の効果 動物組織の V. B₁₂ の定量には数種の酵素の使用がその値を高めるとされているが、血液に於ては J. R. COUCH 等⁽⁴⁾ は pancreatin 処理の効果を述べている。著者等は Taka-diastase, papain, papain-diastase (2:1), trypsin, pancreatin につき各血液 1 cc 当り 3 mg を使用し、pH 5 及び pH 6.5 で 37°, 45 hr. incubate を行い比較検討を加えた (Table 1)。

以上に使用した酵素はいずれも血液中の V. B₁₂ の値を高め、一応その効果を認め得る如く思われるが、しかし各の酵素自体に *Euglena* の生育を促進する因子の存在も考えられるので Table 2 の如き Blank test を行つた。これら Table (1), (2) より papain-diastase (2:1) の pH 6.5 の使用が非常に高い値を得ることを確認

Table 1. Vitamin B₁₂ Content in the Blood by Dealing with Various Enzymes (37°, 45 hr.)

Enzyme	mg*	B ₁₂ found (mg/cc)	
		pH 5	pH 6.5
None	—	0.64	0.71
Taka-diastase	3	0.76	0.78
Papain	3	—	0.80
Papain-diastase (2:1)	3	0.81	0.85
Trypsin	3	0.80	—
Pancreatin	3	0.80	0.80

* Weight in 1 cc of the blood (weight per tube=0.3mg)

Table 2. Blank Test of *Euglena* Activity of Various Enzymes.

Enzyme	weight per tube	Galvanometer reading
None	—	90.5
Taka-diastase	0.3 mg	86.0
Papain	0.3 mg	90.5
Papain-diastase (2:1)	0.3 mg	90.0
Trypsin	0.3 mg	81.0
Pancreatin	0.3 mg	82.5

* 本研究の一部は日本農芸化学会大会 (1953, 4月 東京) 及び日本ビタミン学会 (1953, 5月 名古屋) にて講演発表した。

した。しかしながら Blank test に於て Taka-diastase が比較的 *Euglena* の生育を促進するので papain-diastase も多量の使用はかかる生育因子に影響されることが考えられる。従つて Table 3 の如き検討を行い 1 試験管当り 0.4 mg 迄は使用可能なことを知つた。

なお酵素分解を 37° で行う場合、その時間的差異による定量値の影響は、佐藤⁽⁹⁾が魚肉では 24 時間と 72 時間分解物の間にその値の差を認めなかつたと報告しているが、著者等の血液に於ては Table 4 の如く 45 時間

Table 3. Influence of Papain-diastase for *Euglena* Growth.

Papain-diastase (2:1)(per tube)	Galvanometer reading
None	90.0
0.1 mg	89.5
0.2 "	90.0
0.3 "	90.5
0.4 "	89.5
0.5 "	78.0
0.7 "	68.0
1.0 "	64.0

に於て始めて大体一定の値となつた。

Table 4. Relation between Incubating Time and V. B₁₂ found.

Time (h.)	B ₁₂ found (my/cc)
0	0.65
25	0.81
45	0.89
75	0.89
100	0.88

(3) 加熱処理 加熱処理の効果については ROSS⁽⁷⁾ が serum についてその大いなる効果を報告しているが、H. L. ROSENTHAL 等⁽¹⁰⁾ も指摘しているように pH に充分考慮をはらっていないようである。そこで著者等は pH を 4.8~5.0 に補正した後、Table 5 の如く boiling water bath によつて加熱処理を行つた処、

Table 5. Relation between Heating Time and V. B₁₂ found.

Time (min)	B ₁₂ found (my/cc)
0	0.59
5	0.60
10	0.70
20	0.72
30	0.75
40	0.74
60	0.75

30分間で適当と思われる一定の値に達した。

(4) 除蛋白剤の *Euglena* 生育阻害作用 熱処理を行つたままでは処理液は幾分着色しているので、

Euglena assay の比濁測定に支障を来すこととなる。そこで除蛋白を行い完全無色な澄清液として使用する必要がある。除蛋白剤については種種検討を加えたが、メタ磷酸が最も秀れている如く思われた。しかし多量のメタ磷酸の使用はメタ磷酸自体が *Euglena* の

生育抑制をなし、又直接その処理液の使用は *Euglena* 培地を酸性化させる危険性がある。そこで 10% メタ磷酸液を各試験管に量を変えて採り、なお pH を KOH 液で 6.5 に補正した場合と、全く補正しない場合について *Euglena* のメタ磷酸に対する阻害作用を検し、Fig. 1 の結果を得た。この際の pH のみの影響を見るため

Fig. 1. Inhibitive Activity of meta-Phosphoric Acid for *Euglena* Growth.

Each tube added B₁₂ 0.5 mg.

—○— pH 6.5 adjust

---●--- pH not adjust

-.-△-.- pH curve (no adjust)

Fig. 2. Influence of pH for *Euglena* Growth.

pH adjusted with HCl or KOH.
V. B₁₂ 0.1 mg per tube.

に HCl 及び KOH にて pH を変え *Euglena* の生育状態も併せ観察した (Fig. 2). その結果 pH を補正しない場合はメタ磷酸が多量に存在すると培地自体が酸性化して *Euglena* の生育を阻害するが、pH を補正したものでも 1 試験管当り 0.3 cc 以上では *Euglena* の生育を抑制した。しかし 10% メタ磷酸液 0.2 cc (1 ———) 以下の使用は可能なことを確認した。

(5) 定量法及び回収率 以上の検討によつて血液凝固阻止剤の使用、酵素処理、熱処理、除蛋白の諸条件

を定め Table 6 の如き定量法を行い、牛血及び山羊血に於て Table 7 の如く平均 95.8% 及び 93.3% の回収率を得た。

Table 6. The Determination of V. B₁₂ in the Blood.

Blood 5 cc
↓ Sodium oxalate 10 mg
1 cc
↓ Phosphate buffer (pH 6.5) 15 cc
Papain-diestase (2:1)(10 mg/cc) 0.3 cc Tolulen 1cc
Incubate (37°, 45 h)
↓ pH 4.8 adjust
Heating
↓ in boiling water bath 30 min.
Cooling
↓ 10% meta-Phosphoric acid 0.3 cc
Make up to 20 cc
↓
Centrifuge (Separation of Protein)
↓
Supernatant
↓ pH 6.5 adjust
<i>Euglena</i> assay

Table 7. V. B₁₂ Content and Recovery.

Blood	B ₁₂ content (my/cc)	B ₁₂ added (my)	B ₁₂ recovery		
			(my)	(%)	
Cow	No. 1	0.82	0.10	0.09	90.0
		0.84	0.10	0.10	100.0
		0.89	0.10	0.09	90.0
	No. 2	0.69	0.20	0.21	105.0
		0.69	0.20	0.19	95.0
		0.74	0.20	0.19	95.0
			Average	95.8	
Goat		0.60	0.10	0.09	90.0
		0.64	0.10	0.09	90.0
		0.61	0.10	0.10	100.0
			Average	93.3	

総 括

Euglena assay によつて血液中のビタミン B₁₂ の定量法を検討した

- (1) 血液凝固阻止剤として蓂酸ソーダを用い、量的に広範囲の使用が出来ることを知つた。
- (2) 酵素処理は血液に於ては効果的であり、特に papain-diastase (2:1) の pH 6.5 に於ける使用がすぐれ、その適量と処理の最適条件を検討した。
- (3) 加熱処理は boiling water bath で 30 分間が最も効果的であつた。
- (4) メタ磷酸を除蛋白剤として用いたが多量の使用は *Euglena* の生育を阻害するものでその適量を定めた。
- (4) 以上の諸条件のもとに牛血及び山羊血の B₁₂ を定量し、回収試験で 93~95% の回収率を得た。

本研究に當つて種種御指導を頂きました東京大学佐橋教授に厚く感謝致します。尙本研究の一部は文部省科学研究費によつた併せ記して感謝します

(1) R. WEST : <i>Science</i> , 107, 398 (1948).	(6) 酒井等 : 農化, 27, 377 (1953).
(2) 岩本 : 農化, 27, 218 (1953).	(7) G. I. M. ROSS : <i>Nature</i> , 166, 270 (1950).
(3) Y. SAHASHI and K. IWAMOTO : <i>Proc. Jap. Acad.</i> , 29, 33 (1953).	(8) L. PROVSOLI, <i>et al.</i> : <i>Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.</i> , 69, 279 (1948); <i>ibid.</i> , 70, 118 (1949).
(4) J. R. COUCH, <i>et al.</i> : <i>Am. J. Physiol.</i> , 163, 77 (1950).	(9) 佐藤 : ビタミン, 6, 200 (1953).
(5) W. H. PFANDER, <i>et al.</i> : <i>Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.</i> , 79, 219 (1952).	(10) H. L. ROSENTHAL, <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 199, 433 (1952).

Summary

Authors studied the determination of the content of vitamin B₁₂ in blood by *Euglena* assay.

- (1) We used sodium oxalate as the anticoagulant of blood and determined its proper quantities.
- (2) Enzymatic treatment was found to be satisfactory and 3 mg of papain-diastase per 1 cc of blood was the optimum quantity.
- (3) Heating of blood in a boiling water bath for 30 minutes was found to be most effective in result.
- (4) We used meta-phosphoric acid to remove proteins in the sample, but the large amount of this reagent inhibited the growth of *Euglena*. The adequate quantities to be used were sought.
- (5) Under the conditions, which are mentioned above we determined the contents of vitamin B₁₂ in blood of cattle and goat. Results of recovery were 93~95%.