植物性食品中のビタミンB₁₂について

(昭和 38 年 11 月 12 日 受理)

古 武 彌 三* 小 野 忠 義*

Vegetable Foods and Vitamin B₁₂

Yazo KOTAKE and Tadayoshi ONO

(The Osaka Public Health Institute :

1, Morimachiminami, Higashinari-ku, Osaka)

Although it is considered that vitamin B₁₂ and its analogues are not contained in vegetable foods as are they often called "Animal Protein Factor", it was found that vitamin B₁₂ group was contained in such vegetables grown in the mud as arrow head (*Sagittaria sagittifolia* L. var. *sinensis* Makino), Lotus-rhizome (Rhizome of *Nelumbo nucifera*), *Brasenia schreberi*, and also in bamboo sprout grown in the soil, but these amounts were not so much.

(Received November 12, 1963)

I 緒 言

ビタミン B₁₂ 同族体は Animal protein factor の別名をもって呼ばれるごとく、動物性タンパク質には含まれるが、植物性タンパク質には含まれないものとされている。

B₁₂の作用について重要なものをあげるならば、まず第1は核酸合成作用^{1)~3)}である。とくに B₁₂ は thymidine らの riboside の合成に関与し、B₁₂が欠乏すると、血球は正常な成熟 maturation を遂げることができない。つぎに抗脂肪肝作用⁴⁾、メチル基転移作用⁵⁾、アミノ酸中間代謝賦活作用^{6) 7)}、SH 基活性化作用^{8) 9)}、内分泌機能調節作用^{10)~13)}等である。

Barker らは微生物あるいは動物の肝臓より adenylobamamide coenzyme^{14) 15)}、benzimidazolyl cobamide coenzyme、および dimethylbenzimidazolyl cobamide coenzyme 等の cobamide coenzyme^{16) 17)}を分離し、その作用を明らかにした。cobamide coenzyme の構造はなお充分明らかではないが、Cyano 基を含まず、adenine 分子が cyano 基によって占められていた co-ordination site で結合しているものと考えられる。したがって B₁₂ の実在形態は多種多様であり、その作用も生理的に重要なものが多く、不可欠なものであると考えられる。

ところが日本においても欧米においても 菜食主義

Vegetarianism なるものが存在し、ことに宗教的背景をもって行なわれる菜食主義のなかには嚴重なものもある。

この純菜食者を Vegan と唱えているが、長年月にわたる嚴重な菜食にもかかわらずなんらの症状を訴えないものもかなり存在している。

このような理由から B₁₂ の腸管内合成を唱える人もあるであろうが、腸の下部において微生物によって B₁₂ がたとえ合成されたとしても吸収利用されることには多少の難点があり、ことに B₁₂ の吸収利用には内因子^{18)~21)}を必要とする事実を考え合わせるとその困難さを想像することができる。

われわれはビタミン B₁₂ 同族体は植物にもわずかながら存在するものと考え、クワイ、レンコン、ジュンサイ、タケノコについて実験を進め、とくにタケノコにはかなりの B₁₂ 活性を有することを知ったので、ここに報告する次第である。

II 実験方法ならびに実験成績

(1) 植物性食品とくにクワイ、レンコン、ジュンサイ中のビタミン B₁₂ の定量

B₁₂の定量は米国薬局法²²⁾に準じて、*L. leichmannii* (ATCC 7830) を用いて微生物学的に行なったが、*L. leichmannii* に対しては、thymidine, pseudo-B₁₂、その他の物質が活性を有するので、活性の高いクワイについてはアルカリもしくは H₂O₂ 処理によって B₁₂ を不活性とし、なお残存する B₁₂ 以外の物質に基づく活性を補

* 大阪府立公衆衛生研究所：

大阪市東成区森町南1丁目

正し、 B_{12} 同族体に基づく活性のみを B_{12} として表わすことにした。

a) 検液の調製

レンコンは皮をむき、ジュンサイは市販ビン詰のものをそのままいづれも精密に秤量し、ホモジナイズして、これに M/15 リン酸塩緩衝液 (pH 6.5) を 10 ml 加え、100°で20分間抽出する。さらに蒸留水を加えて全量を 100 ml とする。つぎに遠沈して上清を蒸留水で2倍に希釈して検液とした。

クワイは皮をとり約 15 g 精密に秤量し、M/15 リン酸塩緩衝液 (pH 6.5) を 10 ml 加え、蒸留水で 100 ml とし、100°で20分間抽出する。つぎに trypsin (Merck), Takadiastase (三共) を各 20 mg 加え消化後、酵素を不活性化し、この抽出試料のろ液 5 ml ずつを 2 個の 100 ml フラスコにとる。

一方は全量を 100 ml にして B_{12} 活性を測定する。他のフラスコには B_{12} 同族体以外の残存活性を知るために、このろ液をアルカリ処理、あるいは H_2O_2 処理したのち活性を測定補正した。同時に対照として試料に加えた酵素と同量の酵素をとって、加水して 100 ml にしたものを作って B_{12} 活性を測定補正した。

アルカリ処理²³⁾の条件：前記の試料 5 ml に 0.2 N になるように NaOH を加え、100°で30分加熱する。ついで HCl で pH 6.5 に修正し蒸留水を加え 100 ml とし、その 1 ml をとって全量 5 ml の測定系で定量した。

なお実験条件を確かめるため B_{12} を 0.1 $m\mu\text{g/ml}$ になるように加えて同様のアルカリ処理を行ない、 B_{12} の分解を検査した。

H_2O_2 処理²⁴⁾の条件：試料 5 ml に HCl 1 ml と 30% H_2O_2 3 滴を加え、1時間放置後 NaOH で pH 6.5 に修正し、蒸留水を加えて全量を 100 ml とした。 H_2O_2 非処理の場合は試料 5 ml をとり、加水して 100 ml とした。

b) cyanocobalamin 標準液

ビタミン学会の cyanocobalamin を 1000 $m\mu\text{g/ml}$ になるように 25% アルコール溶液で希釈し、暗冷所に保存して用時さらに適宜に希釈した。

c) 基礎培地

ライヒマニ用のビタミン B_{12} 定量用基礎培地「ニッサン」または Difco を指定濃度に作成し、pH 6.5 に修正し、120°で20分滅菌して用いた。

d) 接種菌液

接種用培地に 20~24 時間培養したものを滅菌生理食塩水で菌体を 3 回洗浄し、遠心沈澱する。この操作で菌体表面の B_{12} を洗い落とし、最後に滅菌生理食塩水で原量の約 50 倍になるように菌体浮遊液をつくり、接種菌液とする。

e) 接種ならびに培養

試験管は微量の B_{12} や洗浄剤の痕跡にきわめて敏感であるから、完全に除去し 200°で2時間乾熱滅菌したもの

を用いた。検量線は第 1 図のように作成し、検体については調製試料 1 ml + 蒸留水 1.5 ml + 2 倍濃厚培地 2.5 ml とし、120°で5分間滅菌する。 B_{12} 溶液を添加しないものには菌接種をせずに、これをブランクとし、他の試験管には前記調製接種菌液を 1 滴ずつ加え 35~37°で 20~24 時間培養した。

f) 菌体増殖度の測定

コタキ光電比色計で 660 $m\mu$, cell 1 cm の条件下で透過率を求めた。

g) *L. leichmannii* に対する B_{12} 活性の定量例

試料の *L. leichmannii* に対する活性を比濁法によって定量した 1 例を示すとつぎのとおりである。検量線は第 1 図のようになる。

第 1 図 検 量 線

第 1 表 クワイの *L. leichmannii* 活性

番号	試 料	透 過 率 (T%)		
1	酵 素 だ け (対 照)	94.0	92.5	92.5
2	100°, 30 分 抽 出	90.0	89.5	88.5
3	酵 素 消 化 抽 出	66.0	66.0	66.0
4	(酵 素 消 化 抽 出 後 → H_2O_2 処理)	70.0	70.0	70.0
5	(酵 素 消 化 抽 出 後 → アルカリ処理)	64.5	64.5	
6	(酵 素 消 化 抽 出) → $+ B_{12}$ 0.05 $m\mu\text{g}$ アルカリ処理	63.5	65.0	64.5
7	(酵 素 消 化 抽 出 後 → アルカリ処理 → $+ B_{12}$ 0.05 $m\mu\text{g}$)	43.5	43.0	42.0

みかけの B_{12} 総量 386 $m\mu\text{g}\%$

H_2O_2 処理後の残存活性 293 $m\mu\text{g}\%$

B_{12} 同族体 93 $m\mu\text{g}\%$

われわれが行なうアルカリ加熱処理の条件下で B_{12} が完

全に破壊されるかどうかを調べるための実験として第1表の6, 5を比較してみた。すなわちクワイの酵素消化抽出したものに B₁₂ を加えてアルカリ処理したものと、クワイの酵素消化抽出したそのものをアルカリ処理して B₁₂ を破壊した場合とを比較すると全く透過率が同じであることから添加した B₁₂ は完全に分解されることが確認された。したがって非処理の活性からアルカリ処理の値をひいたものが補正值すなわち B₁₂ 同族体の活性値である。

しかし実際にはアルカリ処理を行なった場合には多少着色し、誤差の原因となるので濁度よりも酸度滴定によるか H₂O₂ 処理を行なった方が便利であり、H₂O₂ 処理によっても B₁₂ 同族体の活性は容易に消失するのでもっぱら H₂O₂ 処理を行なった。

第2表 *L. leichmannii* に対する B₁₂ 活性の
定量値 (数字は B₁₂ としての mμg%)

試料	みかけの B ₁₂	アルカリ処理の活性	H ₂ O ₂ 処理の活性	補正值	備考
レンコン	1	* 150			比濁
	2	* 60			比濁
ジュンサイ		* 18			比濁
ク	1	* 150			比濁
	2	450	320	120	酸度
	3	402	268	134	比濁
ワ	4	775	520	255	"
	5	810	420	390	"
イ	6	386	293	93	"
	7	1,350	1,070	280	"

* 酵素消化を行なわない場合

2) B₁₂ 活性物質のペーパークロマトグラフィーによる検討

L. leichmannii については B₁₂ の他に 2, 3 の生育因子²⁵⁾ が知られているので、われわれも B₁₂ 活性の位置を明らかにするためにペーパークロマトグラフィーを行なった (使用ロ紙は東洋ロ紙 No. 50)。

使用標準液の濃度:

- (1) ビタミン B₁₂ 標準液 1000 μg/ml
- (2) チミジン溶液: Nutritional Biochemicals Co. のチミジンを 3 mg/ml の濃度に 50% エタノールに溶解したもの

原点にスポットした標準液量と検体量

微生物定量法に用いたクワイ試料の酵素消化抽出液を減圧下で約10倍に濃縮し、毛細ピペットで 0.006 ml を原点に帯状につけ、対照のチミジン溶液は 0.004 ml を B₁₂ 標準液は 0.002 ml を原点につけ、できるだけ広がらないように注意した。

展開条件

(イ) 展開剤は *n*-ブタノール 100 ml, 水酢酸 20 ml, 蒸留水 40 ml で 19 時間室温で展開した。

(ロ) 展開剤は水飽和 *n*-ブタノールで室温で 17 時間展開した。

活性位置の検出

原点から 1 cm ずつロ紙片を切りとり、直径 1 cm の無菌試験管に入れ、*L. leichmannii* を用いて 1 ml 系の測定法 (培地: Difco B₁₂ 定量用培地) で 24 時間 37° で培養し、コタキ光電比色計 660 mμ, 0.5 cm の cell で濁度を測定し、増殖位置を求めた。

(イ) 第2図のようにクワイ抽出液の増殖位置は 3 か所であり、一番濃く現われる位置は B₁₂ のスポットよりやや原点に近い。またその後の実験においてクワイあるいはタケノコの抽出液に B₁₂ を添加した場合には B₁₂ 単独の場合より Rf が少し異なってくることを経験したので、この成績のみをもって、クワイ中の B₁₂ 活性物質は cyanocobalamin とは相違する物質であるともいいえない。チミジンの活性位置は Rf 0.6 であってクワイ抽出液からはこれに合致する Rf 0.58 の位置に活性が認められる。

第2図 クワイ抽出液のペーパークロマトグラフィー

展開剤 { *n*-ブタノール 100
酢酸 20
蒸留水 40

(ロ) 第3図のように B₁₂ 自体は原点にとどまったまま全然動かなかった。クワイの活性は Rf 0.23 と 0.50 の位置にも現われたが、原点に最も濃いスポットが残った。

チミジンのスポットは Rf 0.49 であったが、これは多くの研究者によって報告された結果にほぼ一致し、Rf 0.5 の活性に相当するものと考えられる。

第3図 クワイ抽出液のペーパークロマトグラフィー
展開剤 水飽和 *n*-ブタノール

3) クワイ抽出液アルカリ処理後のペーパークロマトグラフィー

クワイ試料を酵素消化抽出したろ液 5 ml に 2 N-NaOH 0.55 ml を加えて 100° で 30 分加熱し、HCl で pH 6.5 に中和する。次いで乾涸するまで水浴上で乾燥し、無水エチルアルコール 5 ml を加えてろ過し、ろ液を濃縮乾涸し、0.25 ml の水を加えて溶かす。この液 0.006 ml をロ紙に帯状につけ、対照にはアルカリ処理しないで同様に操作した液をつける。また端のロ紙には B₁₂ をスポットして目印とした。

第4図 クワイ抽出液アルカリ処理後のペーパークロマトグラフィー

展開剤	{	n-ブタノール	100
		氷 酢 酸	20
		蒸 留 水	40

その結果第4図のようにアルカリ非処理の場合には Rf 0.075 に活性が現われるが、アルカリ処理の場合には現われなかったもので、アルカリ処理によって、この位置にあった活性物質は破壊されたことを示す。他の活性位置については非処理の場合と同様に処理した場合でも同じ位置に活性が現われた。したがって Rf 0.075 の活性物質が B₁₂ 同族体ではないかと考えられる。

4) タケノコの B₁₂ 活性

われわれは多数の植物性食品について B₁₂ を測定したが、そのうちタケノコは最も活性の強いものの1つであった。ハチクおよびモウソウの2種のタケノコを入手し皮を取り去り、上部、中部、下部の3部位に分け、ホモジナイズし抽出したが、タケノコの場合はクワイの場合と異なり、酵素消化を行っても酵素消化を行わなくても B₁₂ 活性は変化しなかったもので、酵素消化を省略した。成績は第3表に示すとおりであった。

第3表 タケノコの種類、部位別の B₁₂ 活性(mμg%)

種類	部位	みかけ上の B ₁₂	B ₁₂ 同族体による活性
ハチク	上部	3,690	1,570
	中部	2,600	1,420
	下部	700	100
モウソウ	上部	3,010	960
	中部	570	140
	下部	300	100

ハチク、モウソウともに発育盛んな上部は中部、下部に比べて *L. leichmannii* に対する B₁₂ 活性は強く、B₁₂ 同族体による活性として補正された値を掲げたが、この値から見ても上部は下部の10~15倍の活性がある。

タケノコの産地によっては人糞肥料を施すところがあるといわれるが、実験に使用したタケノコは肥料としてもっぱら硫安と尿素が使われていた。

つぎに京都府乙訓郡長岡天神の農業会よりやや多量のタケノコを買い入れ B₁₂ 活性物質の濃縮分離を試み、つぎのような処理を行なった。

タケノコ 1.5 kg をホモジナイズ、加水全量

10 L とする

↓
100°, 40分間熱抽出

↓
吸引ろ過、残渣を除去

↓
活性炭 50 g を加えて1時間かきまぜ

↓
吸引ろ過

↓
ろ液に再度活性炭を加えて同様に操作

↓
炭末を集め、NH₄OH で pH 8.0 に修正

↓
50%アセトン 400 ml を加え、1時間かきまぜ

↓
吸引ろ過

↓
ろ液は減圧濃縮、アセトン、水分除去

(活性収率 約80%)

ここに得た B₁₂ 活性物質の濃縮液について *L. leichmannii* に対する値を測定したところ、

みかけ上の B₁₂ 値 5,824 mμg%

B₁₂ 同族体による活性値 2,016 mμg%

の成績を得た。われわれは日本ビタミン学会から *Ochromonas malhamensis* の譲渡を受けて実験していたが当時の *Ochromonas malhamensis* の感受性はよくなかったので放置していたため死滅させ困却していたところ、東京歯大の上田教授のお世話によって Dr. Hutner の所有する原虫の分譲を得たので、上記タケノコの濃縮液について実験し

Ochromonas malhamensis 値 50 mμg%

になる値を得た。目下のところでは *L. leichmannii* 値と *O. malhamensis* の値の間の大きな差異を説明することは困難で、他日の研究によって解決したいと考えている。

III 考察

Gray および Daniel²⁶⁾ は米国 Georgia 州の Blairsville 地方産カブラ葉に B₁₂ の含有されることを報告し、*Ochromonas* の増殖によると 7 mμg/g であるという。

われわれは泥のなかに生育するクワイ、レンコン、ジュンサイ等にビタミン B₁₂ 活性の含まれることを明らかにした。

活性汚泥^{27)~30)}中に多量の B₁₂ を含むことは多くの研

究者によって明らかにされたが、クワイ、レンコン等の生育する普通の泥にどのぐらいの B₁₂ が含まれるかは明らかでない。しかし普通の泥に多少存在したとしても不思議はないであろう。

高田、酒井沢³¹⁾が大根を用いて砂栽培を行ない B₁₂ の吸収を調べたところ、B₁₂ を投入したものとししないものとは B₁₂ 含量の差が著しく、根部の B₁₂ はあたかも浸透作用によって植物体に入ったかの感があると述べている。

したがって泥のなかで細菌、Protozoa, Zoogloea 等によって合成された B₁₂ がこれらの植物に浸透または吸収されたのではないかという考え方もできる。

ところがタケノコの場合は土壌の B₁₂ あるいは B₁₂ 含有肥料から B₁₂ が移行したとは考えがたい。したがって植物でも種類によっては B₁₂ を合成しうるのではないかと考えられる。

もしも植物に B₁₂ が完全に含まれていないものならば、嚴重な菜食者は巨赤芽球性の貧血を起こし、健康を維持しえないであろうが、菜食者に障害が起こったとしてもその障害が知覚異常 (Paresthesia)、あるいは脊椎分離症 (Spondylolysis) に近似した Poker back³²⁾ あるいは Vegan back と呼ばれる脊の痛みを訴える程度にとどまるのは、植物にも B₁₂ を含有している証拠であろうと考えられる。

IV 結 論

B₁₂ 同族体は Animal protein factor と呼ばれ、植物性食品には含有されないように考えられているが、量的には少ないが、泥中に育つくワイ、レンコン、ジュンサイ、土壌に育つものではタケノコのなかに含まれることを明らかにした。

最後に東京歯大の上田喜一教授に謹して感謝の意を表す。

文 献

- W. Shive et al.: J. Biol. Chem. **176**, 991 (1948).
- I. A. Rose et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **79**, 541 (1952).
- C. C. Ungley: Brit. Med. J. ii, 1370 (1940).
- P. György: Liver Disease, Ciba Foundation 81 (1951).
- J. A. Stekol et al.: J. Biol. Chem. **186**, 343 (1950).
- 市原: 第 6 回ビタミン学会特別講演昭和 29 年.
- 内田、横田: ビタミン **6**, 645 (昭和 28 年).
- J. W. Dubnoff: Arch. Bioch. **27**, 466 (1950).
- C. T. Ling, B. F. Chow: J. Biol. Chem. **202**, 445 (1953).
- J. Meites: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **75**, 195 (1950).
- F. Gassner et al.: ibid. **75**, 630 (1950).
- 井上、他: ビタミン **3**, 103, 236, 238, 310 (1950); **4**, 147, 203, 212 (1951).
- 松岡: 日血会誌. **14**, 4 号 (1951).
- H. A. Barker et al.: Proc. Acad. Sci. **44**, 1093 (1958); **45**, 521 (1959).
- H. A. Barker et al.: J. Biol. Chem. **235**, 181 (1960).
- H. A. Barker et al.: ibid. **235**, 480 (1960).
- H. Weissbach, J. I. Toohey, H. A. Barker: Proc. Nat. Acad. Sci. **45**, 521 (1959).
- L. Berk et al.: New Engl. J. Med. **239**, 911 (1948).
- B. E. Hall: Proc. Staff Meeting Mayo Clinic **24**, 99 (1949).
- T. D. Spies et al.: South Med. J. **42**, 528 (1949).
- F. H. Bethell et al.: Univ. Hosp. Bull. Ann. Arbor. Milch **15**, 49 (1949).
- United States Pharmacopoeia XV, 885 (1955).
- C. E. Hoffmann et al.: J. Biol. Chem. **181**, 365 (1949).
- 上久保: ビタミン **8**, 64 (1955).
- W. A. Winsten et al.: J. Biol. Chem. **181**, 109 (1949).
- L. F. Gray, L. J. Daniel: J. Nutrition **67**, 623 (1959).
- S. R. Hoover et al.: Science **114**, 213 (1951).
- S. R. Hoover et al.: Sewage & Industrial Waste **24**, 38 (1952).
- 上久保、高田: ビタミン **6**, 581 (1953).
- 高橋: B₁₂ と APF, 124 南江堂.
- 高田、酒井沢: ビタミン **9**, 443 (1955).
- F. Wokes, J. Badenoch, H. M. Sinclair: Am. J. Clin. Nutrition **3**, 375 (1955); Voeding **16** 590 (1955).