自然水中のビタミン B₁₂ に関する研究—VI.水中における B₁₂ 量の変動について

柏田 研一・柿本 大壺・金沢 昭夫

(1959 年 12 月 15 日受理)

STUDIES ON VITAMIN B₁₂ IN NATURAL WATER—VI.
CHANGES OF VITAMIN B₁₂ CONTENT IN THE WATER

Ken-ichi KASHIWADA, Daiichi KAKIMOTO and Akio KANAZAWA*

It has already been described of that the vitamin B₁₂ content in natural water varies with the conditions of sampling the water to be analyzed, such as the season of year, the time of day and the depth of water, etc. Since said variation is though, to have distorted the data thus far published about vitamin B₁₂ content in natural water, a few confirmatory researches were made on this item, the following results being obtained.

- (1) When samples of natural water (sea-water, river-water and drain-water) were separately placed in vases and kept in a dark place, B₁₂'s in these samples increased, attaining to their maximum contents likewise in 2 or 3 days and decreasing afterwards (see Table 1). This is a general tendency and may perhaps be attributed to the work of bacteria originally contained in the sample waters.
- (2) Samples taken from upper layers (0~50m in depth) of the water of *Lake Ikeda*, when kept in the conditions the same as those under which the above samples were stored, uniformly showed noticeable changes of vitamin B₁₂ contents in first 7 days, while samples taken from deeper layers of said source (deeper than 50m) showed increases of B₁₂ only in first one day and decreased after that time to stational values which were not always strictly constant (see Table 3).
- (3) In order to confirm the decomposition degree of B₁₂ in sea-water by sun-light, the B₁₂ solution was put into a polyethylene bag, and the bag was suspended for about 10 hours at different depth-layers of the sea (Dec. 5, 1958) with the following results shown in Fig. 1.

In a nutshell, at the surface layer (0~20m) a considerable loss of B₁₂ was to be seen, while at the depth of 30m or more than that, hardly any was. Hereby it seems quite necessary for any researcher who attempts to examine B₁₂ content or to make water-sampling of it that he should take the loss of B₁₂ by sunlight effects into consideration.

さきに COWEY¹⁾は海水のビタミン B₁₂ (以下 B₁₂ と略記) 含量に季節的变化のあることを報告しており、著者ら²⁾も湖水、河水の B₁₂ 量が季節により、また時刻によつて異なり、さらに海水、湖水の B₁₂ 量が深度によつて異なることを見、自然水中の B₁₂ 量が様々の変動を見せることが知られた。このように水中の B₁₂ 量が変動することについて、その原因、さらに B₁₂ の起源、B₁₂ が水域の生産力におよぼす影響など、海洋化学、水産生物学あるいは水産資源学などの分野から研究を要する問題が少なくないが、これらの問題と密接な関係があり、ないしはその一部に触れると考えられる水中の B₁₂ の挙動について、二、三の実験を行つた。すなわち、まず自然水は天然状態において絶えず流動していて容易に成分変化の実態を掴み難いので、本実験では試水を貯蔵した場合、水中の B₁₂ 量がどのように変化するかを検索したところ、試水の種類によ

* 鹿児島大学水産学部 (Fac. Fish. Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan).

つて程度の差はあるが、いずれも相似た経過を辿つて変化することが判つた。つぎに B_{12} の安定性に関する事項として、海中各深度における B_{12} が日射によつて破壊される程度を測定し、表層部ではその著しいことが判つたので、以上の結果を報告する。

実験の部

前記のように自然水中の B_{12} が色々の条件によつて変動することは明らかにされているが、これらの変動は実際水中において B_{12} 量の増減があつたのか、それとも B_{12} 含有量の異なる水の交替、去来によるものか明らかでない。そこで自然水中における B_{12} の消長を知るために、試水を容器に入れて放置し、 B_{12} 量の増減を調べた。

1. 海水、河水を貯蔵する場合の B_{12} の変化

試水としては本学部前の海岸から汲み取つた海水、鹿児島市内を流れる甲突川の水、本学部近くの放水路の水を用いた。No. 3 東洋呂紙で濾過したこれらの試水約 400 ml を 500 ml 容褐色瓶に入れ、暗室内で約 25°C の温度に貯蔵し、その中から毎日 1 回一定時刻に採水し、細菌濾過管（規格 L 3）で濾過したものにトルオールを添加して冷暗所に保管しおき、最後の採水を了えた後、一勢に全採取試水の B_{12} を定量した。 B_{12} の定量は *Euglena* 法によつたが、海水は筆者らのセロハン透析法によつて脱塩した後定量を行つた。

成績並びに考察

実験の結果は Table 1 の通りであつた。

COWEY¹⁾は海水中の B_{12} 含量の変動に関する研究の中で、海水を貯蔵するとその中の B_{12} 量が増加することを見、これを海水中の細菌による生産に帰しているが、筆者らの実験においては表に見られるように、貯蔵による B_{12} 量の変化は試料によつて程度の差はあるが、まず最初増加して（放水路の水では 1 日後やや減少したが）2~3 日後最高値を示した後減少するという一様の経過を辿っている。すなわち自然水を貯蔵する場合にはその中で B_{12} の生産が行われる反面、その分解あるいは消費も行われることが推定される。この増減両変化の分別吟味はしなかつたが、少なくとも貯蔵の初期においては生産が減耗を凌いでおり、その後生産が衰えるか、あるいは減耗が生産を凌ぐようになるかのいずれかと考えられる。すでにこれまで海水中から多くの B_{12} 生産菌が分離されているが³⁾、一方水産物の腐敗細菌に B_{12} 分解力の強いものの多いことも知られており⁴⁾、さらに同一の菌で始め B_{12} を生産するが、後これを分解するもののあることも報告されているので⁵⁾、自然水貯蔵の場合における B_{12} 量の変化にはこれら水中細菌の関与していることが想像される。

なお本実験では少量の試水をガラス瓶に入れて貯蔵したので、天然状態とはかなり異なつた条件に置かれていた訳である。ZO BELL, ANDERSON⁶⁾, LLOYD⁷⁾ らによれば海水を容器に入れて貯蔵する場合、その中で細菌の繁殖は水の容積が小さいほど旺盛であるので、上記 B_{12} 量の増減が水中細菌の起因するものとするれば、自然状態すなわち大量の水中における B_{12} 量の増減は本実験で示された値より遙かに低いであろうしまた野外では日光の影響も当然加味されるので、 B_{12} 量変化の様相はそれら各要因の集計された結果の現われとして別の形をとるものと考えられる。

2. 池田湖の水を貯蔵する場合の B_{12} 量の変化

池田湖では水の移動が甚だ緩慢で、ほとんど静止に近い状態にあり、この点で海や河とはかなり趣きを異

Table 1. Changes of vitamin B_{12} content in sea and river water stored in glass bottle at 25°C in the dark.

Time of storage (days)	Vitamin B_{12} (mγ/l)		
	Sea water	River water	Drain water
0	7.6	4.0	19.2
1	11.6	24.4	14.0
2	12.0	26.0	28.0
3	8.0	39.2	18.0
4	1.6	10.4	15.2
5	0.8	8.4	—
6	1.6	6.0	15.2
7	1.2	5.2	18.0

にしている。1959 年 8 月 19 日、湖心付近で各深度から採水し、水質調査の外、前と同様の方法、条件に処理して貯蔵中における B_{12} の消長を試験し、次表の結果を得た。

成績並びに考察

Table 2 に試水の温度、溶存酸素、pH、 B_{12} 量の垂直分布を示し、各試水を暗黒中約 25°C に貯蔵した場合における B_{12} 含量を Table 3 に示した。

Table 2 によると B_{12} 量そのものは少ないが、その垂直分布の形およびそれが溶存酸素のそれと類似していることは従来の調査結果と同様で、別に新現象は見られない。30m 以浅では深度による温度差が大きい、これをすべて約 25°C の画一した温度に貯蔵した場合における B_{12} 量の変化を Table 3 によって見ると、多少例外的と見える数値のふれはあるが、30m 以浅の表層部の水では共通した増減の傾向は見られない。しかし、50m 以深の水では 1 日後にやや増加し、2 日後には再び始めの量に近い値まで減少してその後はあまり変化がないという相似た増減経過を辿っている。なお池田湖の水、少なくとも本試験に用いた試水においては貯蔵による B_{12} 量の増減が、海水や河水に較べて遙かに少なかったことが注目される。池田湖の周辺には人家も少なく排水その他汚水の流入も少ないために、細菌数が海水や河水より少ないのか、その原因は池田湖の水に

Table 2. Vertical distributions of water temperature, oxygen, pH and vitamin B_{12} content in the water of Lake Ikeda. (Aug. 19, 1959)

Time of sampling	Depth (m)	Water temperature (°C)	O ₂ (mg/l)	pH	Vitamin B_{12} (mγ/l)
10.00	0	28.8	7.39	7.4	0.34
10	5	27.9	7.66	7.5	0.40
17	10	27.0	7.70	7.4	0.46
24	15	23.7	9.00	7.5	1.04
31	20	16.0	9.15	7.2	1.32
38	25	14.0	8.30	6.8	0.84
48	30	12.4	7.98	6.8	0.64
58	50	11.4	7.44	6.7	0.40
11.10	75	11.0	7.24	6.5	0.45
21	100	10.9	7.03	6.4	0.40
30	125	10.9	6.86	6.4	0.63
39	150	10.9	6.67	6.5	0.52
50	200	10.8	6.14	6.4	0.53

Table 3. Changes of vitamin B_{12} content in the water of Lake Ikeda, stored in glass bottle at 25°C in the dark. (mγ B_{12} per litre of water)

Depth (m)	Time of storage (days)						
	0	1	2	3	4	5	6
0	0.34	0.48	0.48	0.36	0.44	0.28	0.29
5	0.40	0.36	0.28	0.30	0.27	0.31	0.28
10	0.46	0.64	0.52	0.36	0.57	0.36	0.40
15	1.04	1.08	0.84	0.40	0.82	0.80	0.82
20	1.32	1.28	0.94	1.22	1.08	0.90	1.05
25	0.84	1.04	0.94	0.97	0.76	0.80	0.80
30	0.64	0.67	0.48	0.92	0.44	0.59	0.57
50	0.40	0.96	0.40	0.46	0.44	0.42	0.43
75	0.45	0.68	0.62	0.41	0.61	0.56	0.50
100	0.40	0.80	0.50	0.52	0.54	0.51	0.52
125	0.63	0.92	0.52	0.32	1.24	0.72	0.63
150	0.52	0.88	0.76	0.53	0.70	0.73	0.62
200	0.53	1.02	0.68	0.57	0.52	0.68	0.71

B_{12} 量の少ないことの原因とともに研究問題になると思われる。

3. 水面下における B_{12} の安定性

B_{12} は日光に不安定で、筆者ら⁸⁾ もこのことについてさきに報告しているが、自然状態において日光がどの程度水中の B_{12} を分解し、またその分解作用は水面下どれ程の深さにまでおよぶものであるかについては未だ報告を見ない。このことは自然水中の B_{12} を論じ、あるいは B_{12} 定量のための試水の採取についても関連があるので、海中における B_{12} の安定性を知るためつぎの実験を行った。

実験方法

試料として武田製薬製プレスミンを原液として調製した B_{12} 水溶液をポリエチレンの袋に 100ml 宛入れ

Fig. 1. Decomposition of vitamin B_{12} at different depths of the sea.

Vitamin B_{12} solution was put in a polyethylene sack and was submerged at different depths of the sea from sunrise to sunset for about 10 hours. (Dec. 5, 1958, at Kagoshima bay)

これを下端に錘をつけたロープに結着して早朝日出前、海中各所定の深さに沈め、夕刻日没後に取揚げで B_{12} を定量した。同じ試料を暗所に同一時間放置したものを対照とした。この実験は 1958 年 12 月 5 日に行い、試料を海中に沈めたのが午前 7 時、日出 7 時 18 分、日没午後 5 時 2 分、5 時 30 分に試料を引揚げたが、天候は静穏快晴であつたので試料は約 10 時間それぞれの深さで日射を受けたわけである。実験は鹿児島湾で行つたが、その結果は Fig. 1 のごとくであつた。

前記対照区の B_{12} 量は 52.5mg/l で、この値を基準として各試料における B_{12} の減少量を % で算出、 B_{12} 破壊率として図示したが、この実験によると水面における破壊率が勿論最大で約 81% に達し水深 20m 以浅の破壊率は 50% 以上に達した。それ以深では急に破壊率が低下し 25m では約 31%, 30m では約 9% であつた。この値が時季、天候、海水の透明度などによつて変化することは当然考えられるが、各深度における照度や透明度は測定しなかつた。要するに自然状態においては水中の B_{12} が日中かなり破壊されていることは確かで、一方においては前記のように B_{12} の生産が行われる反面、他

方この種の要因による B_{12} の減少も起り、殊に表層に近い水域ではその作用も強大であることが判る。

摘 要

自然水中におけるビタミン B_{12} 量の変動を知るため水を暗所に貯蔵する場合における B_{12} 量の変化と、昼間海中で起る B_{12} の破壊について実験し、つぎのことを明らかにした。

(1) 海水、河水を瓶に入れ暗所で約 25°C に貯蔵すると B_{12} は増加して 2~3 日後最高値を示し、後再び減少した。増減の程度は Table 1 に見られるように試水によつて異なる。

(2) 池田湖の各深度の水を同様に貯蔵した場合の B_{12} の増減は Table 3 に見られるように海水、河水に較べて僅少であつた。表層部の水では一定した増減の傾向は見られなかつたが、深層部 (50m 以深) の水では貯蔵 1 日後に増加し、その後再び始めの含量程度に減少した。

(3) B_{12} 溶液を昼間約 10 時間、海中各深度に保持して日光による B_{12} の破壊率を測定したところ、20m 以浅では 50% 以上の破壊率を示したが、それ以深では比較的 low、30m では約 9% の破壊率であつた。

本研究は昭和 33 年度農林漁業試験研究費から経費の一部を支弁して行つた研究の一つである。海中における B_{12} の安定性に関する実験を行うに当つては、かごしま丸岑一等航海士外、乗組員諸氏の協力を得、また B_{12} の定量は主として吉峯絃君を煩わした。以上関係各位に対し深甚の謝意を表する。

附 記 海水透析用セロハン紙について

筆者らは海水の B_{12} を定量する場合の脱塩方法としてセロハン紙による透析法を提唱したが、市販のセロハン紙は質、孔径が必ずしも均一ではない。筆者らは専ら米国 VISKING 会社製 Seamless cellulose tubing (大阪市、白井松器械舗発売) を使用し、直径 21.4 mm (薄手) のものを用いる場合 3 時間の透析で支障なく Bioassay を行っている。本品を使用すれば満足すべき成績が得られるので参考のため附記する。

文 献

- 1) C. B. COWEY: *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **35**, 609~620 (1956).
- 2) 柏田研一・柿本大壺・金沢昭夫: 本誌, **22**, 637~640 (1957); 本誌, **23**, 450~453 (1957); 鹿大水産学部紀要, **7**, 199~205 (1959).
- 3) L. E. ERICSON and L. LEWIS: *Arkivf. Kemi.* **6**, 427 (1953).
- 4) 森 高次郎・橋本芳郎・前田安彦: APF 委員会記事録, No. 9 (1953).
- 5) 五十嵐久尙: 総合研究報告 (農学篇), No. 14, 72 (1954).
- 6) C. E. ZO BELL and D. Q. ANDERSON: *Biol. Bull. Woods Holl*, **71**, 324~342 (1936).
- 7) LLOYD: *J. R. Tech. Coll. Glasg.* **4**, 173 (1937).
- 8) 柏田外 4 名: 本誌, **24**, 591~594 (1958).