

海水のビタミン B_{12} に関する研究-I

海水中のビタミン B_{12} 定量について*

柏田 研一・柿本大壠・金沢昭夫

Studies on Vitamin B_{12} in Sea Water-I

On the Assay of Vitamin B_{12} in Sea Water

Ken-ichi KASHIWADA・Daiichi KAKIMOTO・Akio KANAZAWA

緒 言

ビタミン B_{12} が Animal protein factor の一つであることが明らかにされて以来、 B_{12} は今やビタミン界の花形として純化学ないし生化学に属する各分野で極めて活潑な研究が行われ、更にその応用についても着々研究が進められている。而して水産物を対象とする B_{12} については其の分布を始めとし、鮮度或は処理加工による変化の追及、鮮度とも関係ある事項として細菌類による B_{12} の合成、分解などの問題がいち早く取上げられ、我国でも橋本¹⁾、築瀬²⁾、森³⁾ その他の研究者により今日まで既に多くの報告が出されている。これら諸氏の研究により広く水産動植物体における B_{12} の存在が明らかにせられ、一方この B_{12} の根源については、動物体のものは餌料又は腸内微生物、藻類のものは主として海水に由来するものであらうと言われているが、この点未だ充分明らかではないようである。このうち海水中の B_{12} の消長はそこに棲息する生物の B_{12} と直接、間接関係をもっているのではないかと考えられるが、海水の B_{12} に関する研究は今日まで極めて少く、従つてこの間の消息について吾々はまだ殆んど何等の知見も与えられていない。ただ最近 DROOP⁴⁾ は既知の方法とは全く異なる生物学的新定量法を考案し、この方法によつて 1954 年 2 月及び 3 月、Keppel で採水した表面海水の B_{12} を定量し、5—10mγ/l なる測定値を得ているが、現在の所この方法が普及して多数の測定がなされるまでには至っていないと思われる。

上記の現状から見て海水のビタミン B_{12} に関する研究は早晚取上げられなければならない問題であり、この問題に関する知見を広めることは、やがては水産生物体における B_{12} の根本に触れるようになることが予測されるのでこの研究を始めた次第であるが、まず海水中の B_{12} 定量法について研究したところ、海水そのままを用いたのでは応用出来ないが、これに或る前処理を施せば従来の *Euglena* 法によつて定量し得ることを知つたのでその結果を報告する。

実 験 の 部

B_{12} の定量法としては周知の如く *Euglena* もしくは *Lactobacillus leichmannii* を用いる方法が最も一般的であり、後者は米国薬局方に採用されている方法であるが、定量用培地が複雑でその調製に要する経費が高く、又定量操作に多少の困難が伴うことを欠点とする。一方 *Euglena* 法は測定に長時間を要する欠点はあるが培地に要する経費が安く、実施が容易である等の長所をもっているので我国では現在この方法が広く行われており、従つて海水の B_{12} 定量

* 本研究は昭和 31 年度日本水産学会年会 (31 年 4 月、東京) に於て講演した。

もこの方法によることとした。然るに *Euglena* は淡水性原生動物であるため、その発育が海水中の塩類特に食塩によって阻害され、又後述するように海水中の塩類が培地中の物質と化学反応を起こし、定量不能となる等の欠陥が現われるので、これらの点が解決されない限り *Euglena* 法による定量は不可能であることを知った。依つてまずこれらの問題について研究し、ほぼ満足すべき一つの方法を案出することが出来た。

1. 海水中の Ca 及び Mg の影響を除去するための前処理

Euglena 法は上田、佐藤等²⁾によつて吟味せられた方法によることとしたが、この方法で決められている定量用基礎培地に海水を加えて加熱すると白濁を生じ比濁が不可能となる。この原因について調べた結果この白濁は海水中の Ca と Mg が基礎培地中の (NH₄)₂H₂PO₄ と Na-butyrate に作用して生ずることが分つたので、これらの磷酸塩と有機酸塩を夫々 KH₂PO₄, K₂HPO₄, K₃PO₄, Ca₃P₂O₈, Na₂HPO₄ 及び酢酸ソーダ、リンゴ酸ソーダ、乳酸ソーダ等で置換えて見たが沈澱の生成を阻止出来なかつた。なお培地と海水とを別々に加熱殺菌し冷却後無菌的に両者を混合する方法、酸性培地の使用についても試みたが何れも定量不能であつた。依つて次に上記 Ca (約 0.04%) と Mg (約 0.13%) の影響を除く方法として Disodium ethylene-diamine tetra-acetate (以下 EDTA と略記) の使用を試みた。

EDTA は周知の如く水の硬度測定に使用される外 Ca, Mg の定量その他ポーログラフへも応用せられているが、これを用うることによりほぼ所期の目的が達せられた。即ち海水に EDTA を加え (海水の Ca 及び Mg に対する所要計算量は 15 mg/cc), 約 37°C に 48 時間放置し生成した結晶性物質を濾別して供試液とする方法である。以上の処理を施した海水は *Euglena* 法に於ける培地に加えて殺菌した場合にも白濁を生ずることはないが、EDTA の使用は *Euglena* の発育に影響を及ぼさないかということが問題となる。第 1 図はこの問題に関する実験結果を示したものである。

この実験を行うに当り試料として海水そのままを用いたのでは B₁₂ 含量が少くて *Euglena* の発育に対する EDTA の影響を確実に観察し得ないことを予測し、B₁₂ を 0.1 mγ/cc の割で添加した海水を試料として用いた。即ちこの B₁₂ 添加海水に前記の方法で EDTA 処理を行い、その際 EDTA の添加量を変えた場合、処理海水の *Euglena* 発育に及ぼす影響を調べた結果である。本実験によると EDTA 使用量が海水 1 cc 当り 10—20 mg の場合 *Euglena* は正常の発育を遂げ又前記白色沈澱も生成しないが、EDTA 使用量がこれより少いと加熱によつて白濁を生じ、又これより多いと *Euglena* の発育が阻害される。依つて海水 1 cc 当り 15 mg の EDTA 使用が適量であろうと考えこの値を採用することとした。

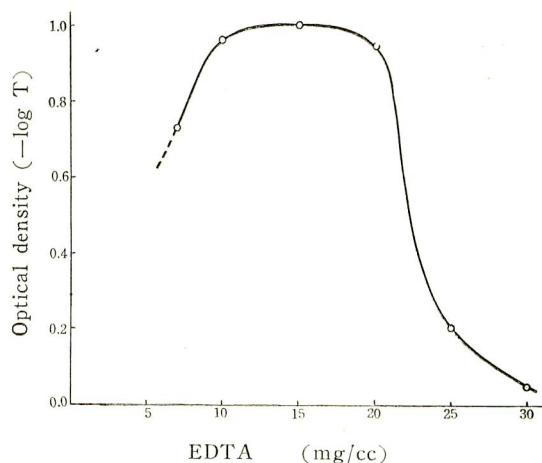


Fig. 1. Relation between the amount of EDTA added in the sea water and the growth of *Euglena*.

次にこの EDTA 使用量で処理時間を変えた場合、及び基礎培地に対するこれら各処理海水の添加量を変えた場合における *Euglena* 発育との関係を試験し、第1表の結果を得た。

Table 1. Influence of EDTA treated sea water on the growth of *Euglena*. (Turbidity: $-\log T$)

EDTA treated sea water in basal medium (cc per tube)	Time of EDTA treatment			Control (3% NaCl added)
	16 hrs	24 hrs	48 hrs	
0.5	0.22	0.80	0.96	0.93
0.8	0.10	0.40	0.60	0.62
1.0	0.05	0.32	0.48	0.46
1.5	0.02	0.24	0.32	0.28
2.0	0.02	0.10	0.12	0.05

即ち EDTA による処理時間は 24—48 時間が必要であり、供試液の食塩濃度が 3% の場合は tube (5cc) 当り 0.5 cc の添加量では殆んど影響が現われなかつたが、それ以上添加すると次第に *Euglena* の発育が阻害されることが分つた。これは食塩による阻害作用と考えられる。

なお海水に EDTA の結晶を加えると pH が約 3.4 になるが、そのままの状態では放置、作用せしめることが必要で、第2表に示したように中性近く又はアルカリ性に調整すると結晶性物質が生成せられず、又このように処理した海水を用うと前記の白濁は生じないが *Euglena* の発育が著しく阻害せられる。

Table 2. Relation between the treating condition of sea water by EDTA and the growth of *Euglena*. (Turbidity: $-\log T$)

Treating condition			Growth of <i>Euglena</i>	Formation of crystalline substance	Turbidness by heating
pH	Temp.	Time			
3.4	100°C	5 mins.		—	卅
"	37	24 hrs.	0.98	卅	—
6.0	"	"	0.00	—	—
10.0	"	"	0.05	—	—

2. 供試海水の Cl 除去のための前処理

Euglena は淡水性原生動物であるから食塩によつてその発育が阻害されることは前記の通りである。第2図は培地における食塩濃度と *Euglena* の発育との関係を試験した結果を示したもので、食塩濃度の増加につれて *Euglena* の発育は漸次衰えるが、その程度は 0.15% 位では殆んど影響がなく、0.4% 位までは阻害程度が比較的軽微であるがそれ以上になると急激に著しくなることが分る。従つて assay に当つては 0.15% 程度まで食塩濃度を減少せしめることが必要となるが、5 cc assay に於て 0.5 cc の海水を使用すれば培地における食塩濃度は約 0.3% となり、この場合食塩含量低下の操作が望ましいこととなる。依つてその方法としてイオン交換樹脂による Cl 除去効果について実験した。即ち 3% の食塩溶液 4 cc に Amberlite IR 4B を夫々 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 g 加え、室温に 20 分間振盪後濾過したものにつき残存食塩量を測定した結果は第3図に示した如く、5 g の樹脂使用によつて食塩濃度は約 1.5% となり測定の際の培地ではこの食塩濃度は更に 1/10 に稀釈されるので約 0.15% となる。

次にこの操作によつて B₁₂ が吸着されないかについて実験した。即ち 0.1mγ/cc の B₁₂ 溶液 4cc を用い、前記食塩水で行つたと同じ方法によつて樹脂処理を行つた試料について B₁₂ assay を行つたが、上の使用量では B₁₂ は全く吸着されないことが証明された。

なお 5 cc assay において試料として海水 0.5cc を使用する場合には、食塩濃度は約 0.3% となるが、これは第2図から知られるように *Euglena* に対しては有害作用の少ない範囲内であるから脱塩操作を省略し、その代りにこれと食塩濃度が等しくなるように食塩を加えた培地を用いて作成した標準曲線を使用して測定するという便法を採こととしたが、これによつて定量操作は可成り簡略化され、而かも測定結果の精度を落さずに定量することが出来た。併し 0.5cc 以上の海水を使用しようとする場合には IR 4B による脱塩操作が必要となつて来ることは勿論である。

以上 *Euglena* 法を行うための海水前処理の方法を総括すれば次の通りである。

海水 5 cc に 75 mg (15 mg/cc) の EDTA 結晶を加えて約 37°C に 48 時間放置し、生成した沈澱を濾別する。この濾液を試料とし *Euglena* 法によつて B₁₂ を定量するのであるが、その際 5 cc assay に試料を 0.5 cc (或はそれ以下) 使用する場合はそのまま用い、試験区と同一食塩濃度になるように食塩を添加した培地を用いて作成した標準曲線によつて測定する。又 0.5 cc 以上の試料を使用する場合には上記 EDTA 処理液を更に Amberlite IR 4B によつて処理し、食塩が *Euglena* の發育を阻害しない濃度になるまで脱塩した海水を用いなければならない。

この方法により海水に既知量の B₁₂ を加えた試料を用いて定量した場合の回収率は 81.4—87.1 平均 84.2% を示し、又本学部裏 (錦江湾) 接岸海水の B₁₂ 含量は 27.5mγ/l であつた。

摘 要

海水中のビタミン B₁₂ 定量方法につき研究し、海水に適當の前処理を施せば従来の *Euglena* 法により定量し得ることを知つた。

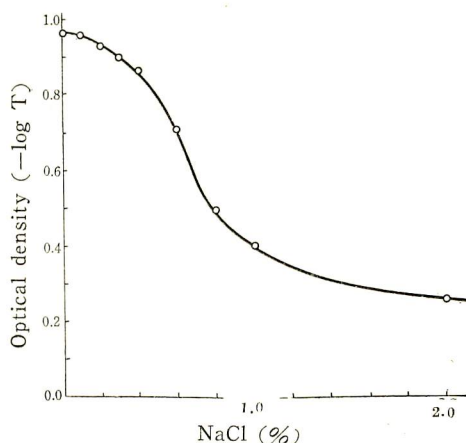


Fig. 2. Relation between the concentration of NaCl in basal medium and the growth of *Euglena*.

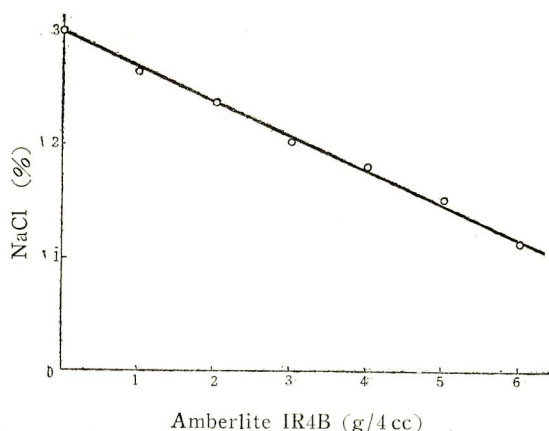


Fig. 3. Adsorption of Cl by Amberlite IR4B.

即ち海水中の Ca と Mg は基礎培地中の成分と反応して白色沈澱を生じ比濁を不可能とするが海水 1 cc 当り 15 mg の EDTA を加え、約 37°C に 48 時間放置して生じた沈澱を除くことによつてこの欠陥を無くすることが出来る。又 *Euglena* の發育を阻害する海水中の Cl は EDTA 処理海水を更に Amberlite IR 4B で処理することによつて除くことが出来る。併し培地に於ける食塩濃度が低い場合（例えば 0.3 % 以下）には脱塩操作を省略し、試験区と等濃度になるように食塩を添加した培地を用いて作成した標準曲線によつて測定することも一法である。

終りに実験に協力された本多徳行氏に謝意を表する。

Résumé

Recent paper have reported on the content of vitamin B₁₂ in the fishes, many other aquatic animals and seaweeds, but we have as yet very little informations as to this vitamin in sea water. The present investigation was undertaken to study the method of determination of vitamin B₁₂ in sea water. As the result of this study, it was found that the content of vitamin B₁₂ in sea water may be measured by microbiological assay using *Euglena* as the test organism, when sea water was treated prior to its application with EDTA and Amberlite IR 4B, for the purpose of eliminating the disturbing effect of Ca, Mg and Cl in the sample.

文 献

- 1) 橋本芳郎, 山田茂英, 森 高次郎: 日水誌, **19**, 135 (1953)
橋本芳郎, 前田安彦: 日水誌, **19**, 141 (1953)
橋本芳郎, 佐藤篤司: 日水誌, **19**, 987 (1954)
- 2) 築瀬正明: 日水誌, **17**, 389 (1952); **18**, 629 (1953); **18**, 636 (1953); **19**, 1200 (1954), **21**, 194 (1955); **21**, 197 (1955)
- 3) 森 高次郎, 橋本芳郎, 前田安彦: 日水誌, **19**, 991 (1954); **20**, 604 (1954)
- 4) DROOP, M. R.: J. Mar. biol. Ass. U. K. **34**, 435 (1955)
- 5) 上田喜一, 槇文郎, 佐藤裕: ビタミン, **4**, 191 (1951)
佐藤 裕: ビタミン, **6**, 200 (1953)