

图 1. 肝臟中 PMP/PNP oxidase 比活性 ( $P < 0.05$ )

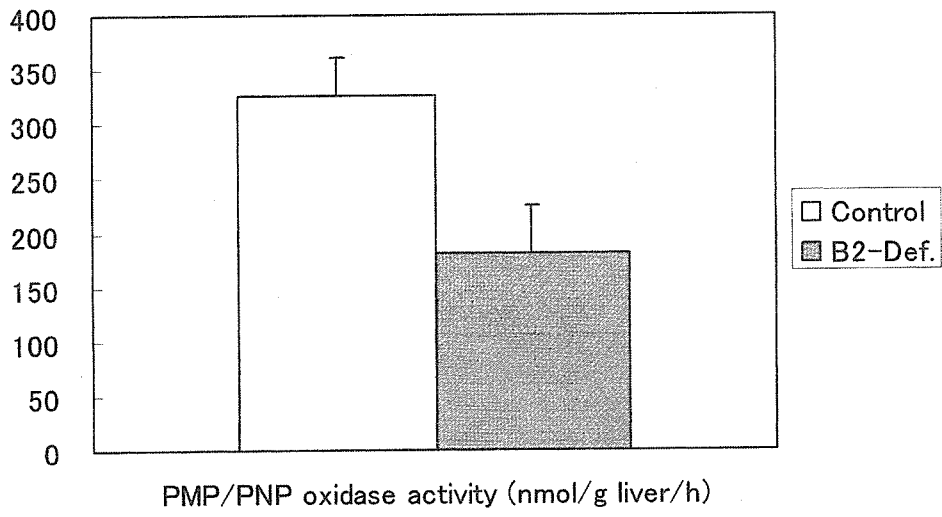


图 2. 肝臟中 PMP/PNP oxidase 活性 ( $P < 0.05$ )

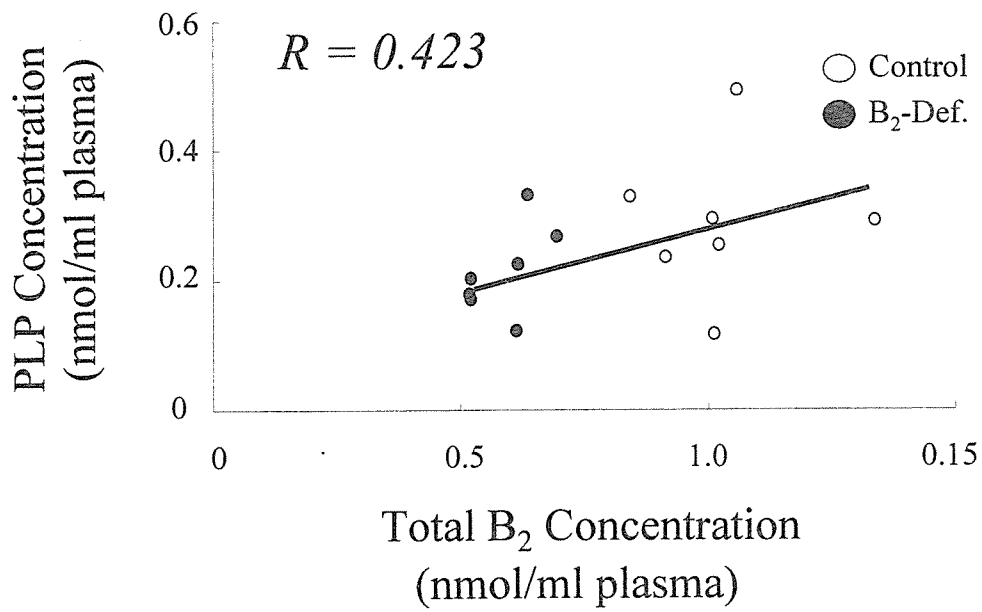


図3. 血漿ビタミンB<sub>2</sub>濃度とPLP濃度との相関性

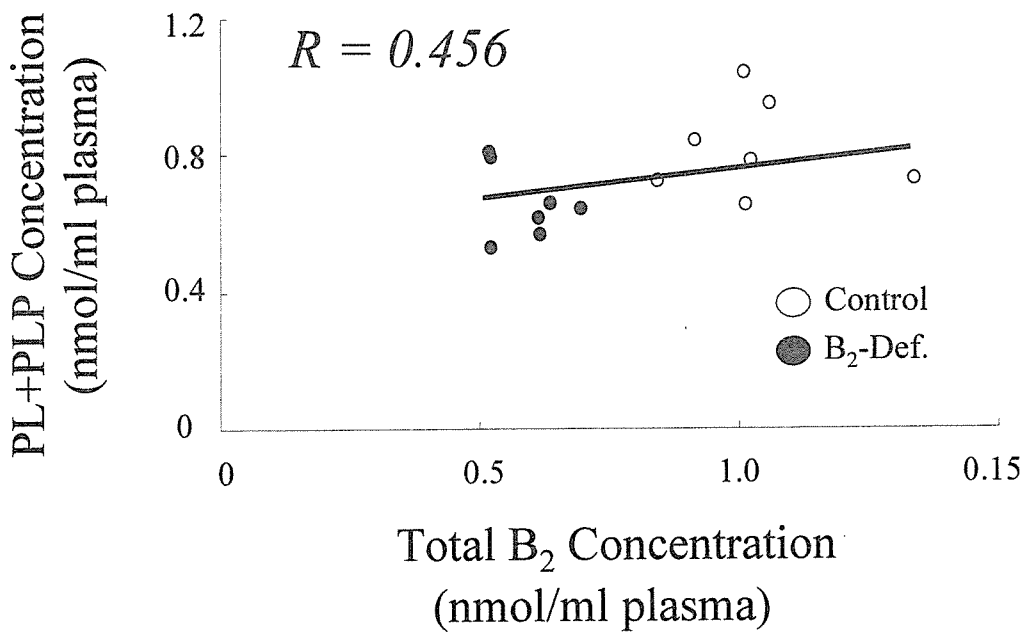


図4. 血漿ビタミンB<sub>2</sub>濃度とPL+PLP濃度との相関性

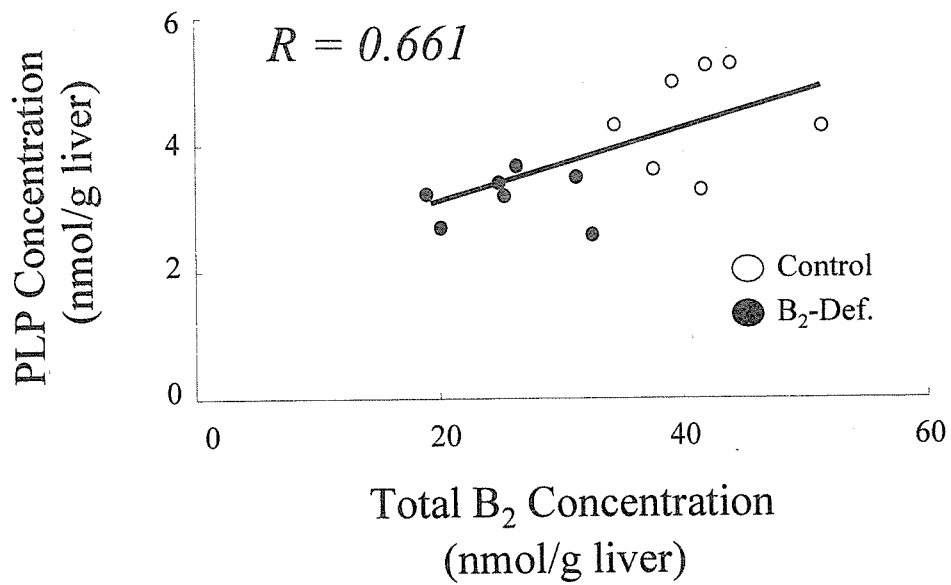


図5. 肝臓ビタミン B<sub>2</sub> 含量と PLP 含量との相関性 ( $P < 0.05$ )

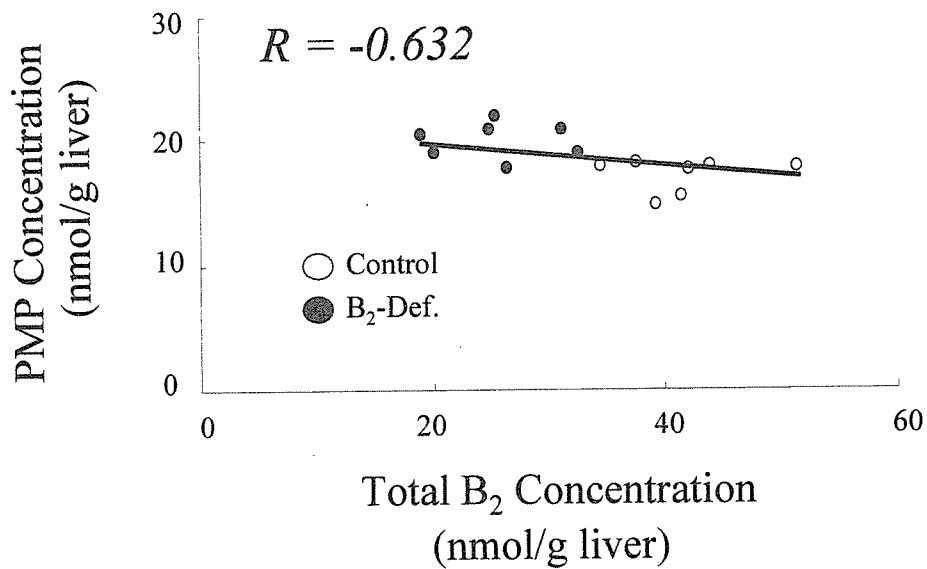


図6. 肝臓ビタミン B<sub>2</sub> 含量と PMP 含量との相関性 ( $P < 0.05$ )

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

#### 2. ビタミン B<sub>12</sub> の栄養評価に関する基礎的研究

分担研究者 渡辺 文雄 鳥取大学農学部教授

研究協力者 宮本 恵美 長崎国際大学健康管理学部講師

#### 研究要旨

①まぐろ魚肉に含まれるコリノド化合物を単離・同定した結果、ビタミン B<sub>12</sub> の大部分が血合肉に存在しており、ヒトにとって生理的に有効な真のビタミン B<sub>12</sub> であった。②煮干しに含まれるコリノド化合物の単離・同定した結果、ヒトにとって生理的に有効な真のビタミン B<sub>12</sub> であった。③日本固有の藍藻食品すいぜんじのりや栄養補助食品として利用される藍藻食品に含まれるコリノド化合物を単離・同定した結果、ヒトにとって生理的に不活性なシュードビタミン B<sub>12</sub> であった。④ビタミン B<sub>12</sub> 依存性大腸菌バイオオートグラフィーを用いた簡便な食品中の B<sub>12</sub> の定量法を検討した。

## I. まぐろ血合肉に含まれるコリノイド化合物の単離・同定

前年度の研究でかつおの血合肉に多量の B<sub>12</sub> が含まれていたことから、さらに大型の赤身魚であるまぐろに着目し、まぐろの血合肉に含まれる B<sub>12</sub> 含量とコリノイド化合物について検討した。

### 方法

#### 1) 試料

インド洋沖産のキハダマグロ血合肉は、高知市内の市場で購入した。

#### 2) 血合肉に含まれるコリノイド化合物の精製

キハダマグロの血合肉 (約 500 g) をフードプロセッサで破碎・均質化した後、0.5 g シアン化カリウムを含む 10 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 8 L を加えドラフト内で 30 分間加熱抽出した。

室温まで冷却後、8,000 x g, 10 分間の遠心分離を行い、上澄み画分を抽出液とした。

あらかじめエタノールで洗浄後、蒸留水で平衡化させたアンバーライト XAD4 樹脂 (約 1 kg) をガラスカラム (5.0 x 80 cm) に充填した。上記抽出液を本カラムにかけコリノイド化合物を樹脂に吸着させた。蒸留水 2 L でカラムを洗浄後、80% (v/v) エタノール 2 L で樹脂に吸着したコリノイド化合物を溶出させた。溶出液は、エバポレーターで乾固した後、50 mL の蒸留水に溶解させた。この時生じた不溶性画分は、遠心分離により除去した。

あらかじめエタノールで洗浄後、蒸留水で平衡化させたコスモシル 140C18-OPN 樹脂をガラスカラム (2.4 x 18 cm) に充填した。上記溶出

液を本カラムにかけコリノイド化合物を樹脂に吸着させた。蒸留水 100 mL でカラムを洗浄後、10% (v/v) エタノール 100 mL と 20% (v/v) エタノール 100 mL を用いて樹脂に吸着したコリノイド化合物を溶出させた。溶出された赤色画分を回収し、エバポレーターで乾固した後、少量の蒸留水に溶解させた。この時生じた不溶性画分は、遠心分離により除去した。

この赤色溶液をシリカゲル 60 の薄層クロマトグラフィ (TLC) 用アルミニウムプレートに重層し、展開溶媒 2-プロパノール/アンモニア水/蒸留水 (7/2/1) を用いて室温・暗黒下で展開させた。展開した TLC プレートを風乾後、赤色スポットをハサミで切り取り、80% (v/v) エタノール 20 mL を加え 4°C で一晩放置することで赤色化合物を再抽出した。抽出液は減圧下、35°C にて遠心エバポレーターで乾固した後、100  $\mu$ L の蒸留水に溶解させた。

上記赤色溶液 100  $\mu$ L を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) [カラム, Wakosil-II 5C18RS ( $\phi$ 4.6 x 150 mm) ; 移動相, 1% (v/v) 酢酸を含む 20% (v/v) メタノール溶液 ; カラム温度, 35°C ; 流速, 1.0 mL/min ; 検出波長, 278 nm] で分離後、溶出液を 1.0 mL ずつフラクションコレクターで分画した。赤色画分を減圧下 35°C にて遠心エバポレーターで乾固させた後、50  $\mu$ L の蒸留水に溶解させ、精製標品として実験に用いた。

#### 3) コリノイド化合物の同定方法

まぐろ血合肉より精製したコリノイド化合物溶液ならびに標準の B<sub>12</sub> 溶液 (20  $\mu$ mol/L) をシリカゲル 60 の TLC アルミニウムプレートに重層し、展開溶媒 I [2-プロパノール/アンモニア

水蒸留水 (7/2/1)] ならびに展開溶媒II [1-ブタノール/2-プロパノール/蒸留水 (10/7/10)] を用いて室温・暗黒下で展開させた。展開した TLC プレートは風乾後、各赤色スポットの  $R_f$  値を測定した。

また、まぐろ血合肉より精製したコリノイド化合物溶液ならびに標準の  $B_{12}$  溶液 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 5  $\mu\text{L}$  をそれぞれ HPLC [カラム, Wakosil-II 5C18RS ( $\phi 4.6 \times 150 \text{ mm}$ ); 移動相, 1% (v/v) 酢酸を含む 20% (v/v) メタノール溶液; カラム温度, 35°C; 流速, 1.0 mL/min; 検出波長, 278 nm] で分析し、各画分の保持時間を測定した。

### 結果および考察

#### 1) まぐろ血合肉の $B_{12}$ 含量

五訂日本食品標準成分表で採用されている *L. delbrueckii subsp. lactis* ATCC7830 を用いた  $B_{12}$  定量法でまぐろ血合肉に含まれる  $B_{12}$  含量を測定した。可食部 100 g あたりの  $B_{12}$  含量は、 $52.9 \pm 8.9 \mu\text{g}$  であった。かつおの血合肉 (平均値 158.5  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) よりも  $B_{12}$  含量はかなり低く、他の魚の血合肉 (ぶり, 平均値 48.3  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ; さわら, 平均値 54.8  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ; ごまさば, 平均値 47.2  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) 同程度であった。

#### 2) まぐろ血合肉に含まれるコリノイド化合物の単離・同定

まぐろ血合肉に多量に検出される  $B_{12}$  が真の  $B_{12}$  であるかどうかを検討するために、まぐろ血合肉からコリノイド化合物を単離・同定した (図 1)。

まぐろ血合肉抽出液から各種クロマトグラフィーを用いて HPLC で単一のピークになるまで赤色化合物を精製した。まぐろ血合肉より精製

した赤色化合物の紫外・可視吸収スペクトル分析を行った結果 (図 2), コリノイド化合物特有の吸収スペクトルを示した。シリカゲル 60TLC 分析と逆相 HPLC 分析において、まぐろ血合肉より精製したコリノイド化合物と標準の  $B_{12}$  の挙動が完全に一致したことから (表 1, 図 3), まぐろ血合肉には真の  $B_{12}$  が多量に含まれていることが明らかとなった。

## II. 煮干しに含まれるコリノド化合物の単離・同定

煮干しは、かたくちいわしを蒸煮した後、乾燥させたもので、だし用として多用される他、カルシウムの供給源としてそのまま食されることもある。そこで、いわしを煮干しとして加工する工程で加熱および光照射など B<sub>12</sub> 分解物が生成する可能性が考えられる。そこで、煮干しからコリノド化合物を単離・同定することで、B<sub>12</sub> 分解物の存在の有無について検討した。

### 方法

#### 1) 試料

煮干しは、高知市内の市場で購入した。

#### 2) 煮干しに含まれるコリノド化合物の精製

煮干し (約 1 kg) をフードプロセッサで破碎・均質化した後、0.5 g シアン化カリウムを含む 10 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5) 8 L を加えドラフト内で 30 分間加熱抽出した。室温まで冷却後、8000 x g 10 分間の遠心分離を行い、上澄み画分を抽出液とした。

あらかじめエタノールで洗浄後、蒸留水で平衡化させたアンバーライト XAD4 樹脂 (約 1 kg) をガラスカラム (5.0 x 80 cm) に充填した。上記抽出液を本カラムにかけコリノド化合物を樹脂に吸着させた。蒸留水 2 L でカラムを洗浄後、80% (v/v) エタノール 2 L で樹脂に吸着したコリノド化合物を溶出させた。溶出液は、エバポレーターで乾固した後、50 mL の蒸留水に溶解させた。この時生じた不溶性画分は、遠心分離により除去した。

あらかじめエタノールで洗浄後、蒸留水で平衡化させたコスモシル 140C18-OPN 樹脂をガラ

スカラム (2.4 x 18 cm) に充填した。上記溶出液を本カラムにかけコリノド化合物を樹脂に吸着させた。蒸留水 100 mL でカラムを洗浄後、10% (v/v) エタノール 100 mL と 20% (v/v) エタノール 100 mL を用いて樹脂に吸着したコリノド化合物を溶出させた。溶出された赤色画分を回収し、エバポレーターで乾固した後、少量の蒸留水に溶解させた。この時生じた不溶性画分は、遠心分離により除去した。

この赤色溶液をシリカゲル 60 の薄層クロマトグラフィー (TLC) 用アルミニウムプレートに重層し、展開溶媒 2-プロパノール/アンモニア水/蒸留水 (7/2/1) を用いて室温・暗黒下で展開させた。展開した TLC プレートを風乾後、赤色スポットをハサミで切り取り、80% (v/v) エタノール 20 mL を加え 4°C で一晩放置することで赤色化合物を再抽出した。抽出液は減圧下、35°C にて遠心エバポレーターで乾固した後、100  $\mu$ L の蒸留水に溶解させた。

上記赤色溶液 100  $\mu$ L を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) [カラム, Wakosil-II 5C18RS ( $\phi$ 4.6 x 150 mm); 移動相, 1% (v/v) 酢酸を含む 20% (v/v) メタノール溶液; カラム温度, 35°C; 流速, 1.0 mL/min; 検出波長, 278 nm] で分離後、溶出液を 1.0 mL ずつフラクションコレクターで分画した。赤色画分を減圧下 35°C にて遠心エバポレーターで乾固させた後、50  $\mu$ L の蒸留水に溶解させ、精製標品として実験に用いた。

#### 3) コリノド化合物の同定方法

煮干し精製したコリノド化合物溶液ならびに標準の B<sub>12</sub> 溶液 (20  $\mu$ mol/L) をシリカゲル 60 の TLC アルミニウムプレートに重層し、展開溶媒 I [2-プロパノール/アンモニア水/蒸留水

(7/2/1)] ならびに展開溶媒Ⅱ [1-ブタノール/2-プロパノール/蒸留水 (10/7/10)] を用いて室温・暗黒下で展開させた。展開した TLC プレートは風乾後、各赤色スポットの  $R_f$  値を測定した。

また、煮干しより精製したコリノイド化合物溶液ならびに標準の  $B_{12}$  溶液 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 5  $\mu\text{L}$  をそれぞれ HPLC [カラム, Wakosil-II 5C18RS ( $\phi 4.6 \times 150 \text{ mm}$ ); 移動相, 1% (v/v) 酢酸を含む 20% (v/v) メタノール溶液; カラム温度, 35°C; 流速, 1.0 mL/min; 検出波長, 278 nm] で分析し、各画分の保持時間を測定した。

#### 結果および考察

煮干し抽出液から各種クロマトグラフィーを用いて HPLC で単一のピークになるまで赤色化合物を精製した。煮干しより精製した赤色化合物の紫外・可視吸収スペクトル分析を行った結果 (図 4), コリノイド化合物特有の吸収スペクトルを示した。シリカゲル 60TLC 分析と逆相 HPLC 分析において、煮干しより精製したコリノイド化合物と標準の  $B_{12}$  の挙動が完全に一致したことから (表 2), 煮干しに含まれる  $B_{12}$  は、真の  $B_{12}$  であり、製造工程で  $B_{12}$  の分解がほとんど起こらないことが推定される。



### Ⅲ. 栄養補助食品 A.F.A. (Aphanizomenon flos-aquae) に含まれるコリノイド化合物の単離・同定

栄養補助食品スピルリナに含まれるコリノイド化合物のほとんどが7-アデニルシアノコバミド(シュード B<sub>12</sub>)であることを明らかにしてきた。スピルリナと同じ藍藻類である Aphanizomenon flos-aquae (A.F.A.) はビタミンやミネラルを豊富に含み、各社製品の成分表示では、通常の植物性食品にはほとんど含まれていない B<sub>12</sub> についても豊富に含むとされ、栄養補助食品として現在国内外で市販されている。

しかし、A.F.A.におけるコリノイド化合物についての知見はほとんど無く、真の B<sub>12</sub> であるとはまだ実証されていない。そこで、A.F.A.におけるコリノイド化合物について単離・同定を行った。また、B<sub>12</sub> 欠乏ラットを用いて回復実験を行いバイオアベイラビリティについても検討した。

#### 方法

国内で現在栄養補助食品として市販されている A.F.A.カプセル(A.F.A.粉末 550 g)を KCN 存在、酸性(pH4.5)下で加熱抽出によりコリノイド化合物をシアノ化して抽出し実験に用いた。コリノイド化合物は、五訂日本食品標準成分表で用いられている *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (旧名 *L. leichimannii*) ATCC7830 を用いた微生物法<sup>8)</sup> および B<sub>12</sub> と特異性が高い内因子 IF を用いたケミルミ法で定量を行った。コリノイド化合物の単離にはアンバーライト XAD-4、コスモシル-140C18-OPN カラム、シリカゲル 60TLC および C<sub>18</sub>-HPLC の各種クロマト

グラフィーにより分画を行い、精製標品を得た。精製標品の同定はシリカゲル 60TLC、C<sub>18</sub>-HPLC、吸収スペクトルおよび<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) により判定を行った。バイオアベイラビリティの検討には B<sub>12</sub> 欠乏 Wister 系雄ラット (18 週令) を B<sub>12</sub> 欠乏群、B<sub>12</sub> (100 µg/kg) 添加食 (B<sub>12</sub> 欠乏回復) 群、A.F.A. (16.7 g/kg) 添加食群の 3 群に分け 2 週間後、肝臓中の B<sub>12</sub> 含量を微生物法で定量した。A.F.A.の添加量は微生物法で得られた値が B<sub>12</sub> 添加食群と B<sub>12</sub> 含量が同量になるように調製した。

#### 結果および考察

A.F.A.のコリノイド化合物含量を測定した結果、微生物法では、A.F.A.にはほとんどアルカリ耐性因子が存在しておらず、コリノイド化合物の含有量は 616.3 ± 30.3 µg/100 g と市販のスピルリナ錠剤 (244.3 µg/100 g) と比較しても非常に多量のコリノイド化合物を含有していた。一方、生体内で利用できる B<sub>12</sub> をより正確に測定できるとされているケミルミ法では、32.7 µg/100 g と微生物法の 5.3% の B<sub>12</sub> 含量でしかなかった。これは、これまでに報告されているスピルリナと同様の結果であり、A.F.A.が生体内で利用できない B<sub>12</sub> を多量に含むものである可能性が示唆された。

単離した A.F.A.のコリノイド化合物は赤色であり、精製標品の吸収スペクトルは、コリノイド化合物特有のスペクトルを示した(図5)。精製標品および自然界に存在するコリノイド化合物数種類のシリカゲル 60TLC の R<sub>f</sub> 値および C<sub>18</sub>-HPLC の保持時間の結果、A.F.A.のコリノイド化合物は、CNB<sub>12</sub> の動態とは異なっており、

シュード B<sub>12</sub> の動態と近似していた。また、<sup>1</sup>H-NMR による結果は図 6 に示した様に精製標品と標準のシュード B<sub>12</sub> と非常によく一致していた。これらの結果より、A.F.A. に含まれるコリノイド化合物のほとんどは、スピルリナと同様にシュード B<sub>12</sub> であった。

スピルリナに含まれるシュード B<sub>12</sub> は哺乳動物に生理的に不活性であるという報告がある。実際にシュード B<sub>12</sub> を多量に含む A.F.A. を用いた B<sub>12</sub> 欠乏ラットによる回復実験の結果は、A.F.A. 添加食群の肝臓中の B<sub>12</sub> 含量は、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏群の肝臓 B<sub>12</sub> 含量とほとんど差がみられず、欠乏から回復していなかった (表 3)。

このことから、A.F.A. に含まれるコリノイド化合物はスピルリナと同様にシュード B<sub>12</sub> であり、真の B<sub>12</sub> の供給源とはならない。また、これらは哺乳動物には生理的に不活性であることから AFA を B<sub>12</sub> 欠乏予防・回復の観点からは利用することは望ましくなく、現在の製品の成分表示や広告内容を B<sub>12</sub> 欠乏予防・回復に利用されないように改善する必要がある。

#### IV. 日本固有の藍藻由来食品すいぜんじのりに含まれるコリノド化合物の単離・同定

すいぜんじのりは、日本固有の淡水産藍藻由来の食品であり、五訂日本食品標準成分表にも掲載されている。現在は、主に福岡県甘木地区で養殖されたものが栄養補助食品として流通している。これまで我々は、食品分析で B<sub>12</sub> を多量に含むとされる藍藻由来の栄養補助食品スピルリナや AFA (Aphanizomenon flos-aquae) からコリノド化合物を単離・同定した結果、ヒトにおいて生理的に不活性なシュード B<sub>12</sub> であることを明らかにした。市販されているすいぜんじのり乾燥粉末にもかなり多量の B<sub>12</sub> が含まれていることが記載されているため、すいぜんじのりに含まれるコリノド化合物を単離・同定を行い、すいぜんじのりに真の B<sub>12</sub> が含まれているかどうかを検討した。

#### 方法

市販されているすいぜんじのり (粉末 600 g) を KCN 存在・酸性 (pH 4.5) 下でコリノド化合物を加熱抽出した。この抽出液からアンバーライト XAD-4 カラム、コスモシル-C<sub>18</sub>-OPN カラム、シリカゲル 60TLC および C<sub>18</sub>-HPLC を用いてコリノド化合物を単離した。コリノド化合物は、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を用いたバイオアッセイで定量した。

#### 結果および考察

すいぜんじのり乾燥粉末中のコリノド化合物の含有量は 200 µg/100 g であり、市販のスピルリナ錠剤 (244.3 µg/100 g) と同程度であった。すいぜんじのり乾燥粉末より単離されたコリノ

ド化合物は、シリカゲル 60TLC の R<sub>f</sub> 値や C<sub>18</sub>-HPLC の保持時間などからシュード B<sub>12</sub> と同定された (図 7, 表 3)。これらの結果から、すいぜんじのりは、B<sub>12</sub> の供給源として利用することができないことが明らかとなった。

## V. いしくらげ (*Nostoc commune*) に含まれる コリノイド化合物の単離・同定

いしくらげは、陸生の藍藻由来の食品であり、調理特性・栄養価・機能性因子などが検討されている。現在は、主に乾燥藻体を栄養補助食品の素材として流通している。これまで我々は、食品分析で B<sub>12</sub> を多量に含むとされる藍藻由梨の栄養補助食品スピルリナや AFA (*Aphanizomenon flos-aquae*) からコリノイド化合物を単離・同定した結果、ヒトにおいて生理的に不活性なシュード B<sub>12</sub> であることを明らかにした。そこで、栄養補助食品素材として流通しているいしくらげ乾燥粉末に含まれるコリノイド化合物を単離・同定を行い、いしくらげに真の B<sub>12</sub> が含まれているかどうかを検討した。

### 方法

栄養補助食品素材として利用されているいしくらげ乾燥粉末 (約 1 kg) を KCN 存在・酸性 (pH4.5) 下でコリノイド化合物を加熱抽出した。この抽出液からアンバーライト XAD-4 カラム、コスモシル-C<sub>18</sub>-OPN カラム、シリカゲル 60TLC および C<sub>18</sub>-HPLC を用いてコリノイド化合物を単離した。コリノイド化合物は、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を用いたバイオアッセイで定量した。

### 結果

いしくらげ乾燥粉末中のコリノイド化合物の含有量は 96 µg/100 g であり、市販のスピルリナ錠剤 (244.3 µg/100 g) より顕著に低かった。いしくらげ乾燥粉末より単離された 2 種類 (メイン・マイナー) のコリノイド化合物は、シリカ

ゲル 60TLC の R<sub>f</sub> 値や C<sub>18</sub>-HPLC の保持時間などからそれぞれシュード B<sub>12</sub> と B<sub>12</sub> に同定された (図 8, 9)。

いしくらげ乾燥粉末から 2 種類のコリノイド化合物が単離され、真の B<sub>12</sub> も少量 (約 12%) 含まれているが、そのほとんどはヒトに対して生理的に不活性なシュード B<sub>12</sub> であった。このことからいしくらげは、特に菜食主義者において B<sub>12</sub> の供給源として利用することができないことが明らかとなった。

## VI. B<sub>12</sub>依存性大腸菌バイオオートグラフィーを用いた簡便な食品中のB<sub>12</sub>の定量法

五訂日本食品標準成分表（食品成分表）で採用されている B<sub>12</sub> の定量は，*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*（旧名 *L. leichimannii*）ATCC7830 を用いた微生物学的定量法で行われている。本定量菌は，ヒトにとって生理的に不活性なコリノイド化合物にも感応する場合があります。食品中に不活性なコリノイド化合物が含まれているかどうかを簡便な方法で分析する必要があります。そこで，シリカゲル 60TLC・バイオオートグラム法を用いて食品中のコリノイド化合物の分析を行った。

### 方法

B<sub>12</sub> の抽出は，食品成分表で採用されている KCN 加熱抽出法で行った。抽出液 1~2 μL をシリカゲル 60TLC アルミニウムシートで展開・風乾後，*E. coli* 215 を含む寒天培地に重層した。これを 37°C で約 20 時間培養した後，寒天培地から TLC シートを除去し，4% TTC 溶液を噴霧して大腸菌を染色した。

### 結果および考察

本法では，10 pg の B<sub>12</sub> から赤色スポットとして検出できた。これまで食品中のコリノイド化合物の分析には，食品からコリノイド化合物を単離・同定する必要があったが，本法を使用することで抽出液のみで簡便に検出・同定することができた。（図 1 0，図 1 1）

参考文献

E. Miyamoto, Y. Tanioka, T. Nakao, F. Barla, H. Inui,  
T. Fujita, F. Watanabe, Y. Nakano. (2006)

Purification and characterization of a  
corrinoid-compound in an edible cyanobacterium  
*Aphanizomenon flos-aquae* as a nutritional  
supplementary food. *J. Agric. Food Chem.*, 54,  
9604-9607.

F. Watanabe, E. Miyamoto, T. Fujita, Y. Tanioka, Y.  
Nakano. (2006) Characterization of a corrinod  
compound in the edible (blue-green) algae,  
*suiizenji-nori*. (2006) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,  
70, 3066-3068.

M. Nishioka, Y. Tanioka, E. Miyamoto, T. Enomoto,  
F. Watanabe. TLC analysis of a corrinod compound  
from dark muscle of the yellowfin tuna (*Thunnus  
albacares*). *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* in press.

F. Watanabe, Y. Tanioka, E. Miyamoto, T. Fujita, H.  
Takenaka, Y. Nakano. Purification and  
characterization of corrinoid-compounds from the  
dried powder of an edible cyanobacterium, *Nostoc  
commune* (Ishikurage). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* in  
press.



Sample extract  
Authentic B<sub>12</sub>

図1 まぐろ血合肉抽出液の  
バイオオートグラム

表1 まぐろ血合肉から精製したコリノイド化合物の同定

	TLC ( <i>R<sub>f</sub></i> )		HPLC (min)
	Solvent I	Solvent II	
Purified compound	0.25	0.63	11.5
Authentic B <sub>12</sub>	0.25	0.63	11.5

Solvent I: 1-butanol/2-propanol/water (10: 7: 10).

Solvent II: 2-propanol/NH<sub>4</sub>OH (25%)/water (7: 1: 2)

HPLC mobile phase: 20% (v/v) methanol solution containing 1% (v/v) acetic acid

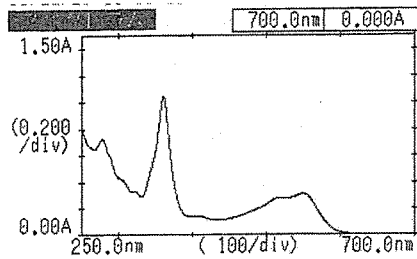


図2 まぐろ血合肉から精製した  
コリノイド化合物の紫外可視吸収  
スペクトル

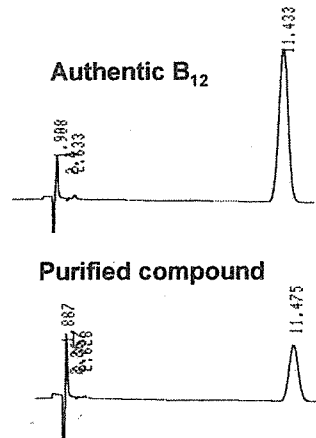


図3 まぐろ血合肉から精製した  
コリノイド化合物のHPLCパターン

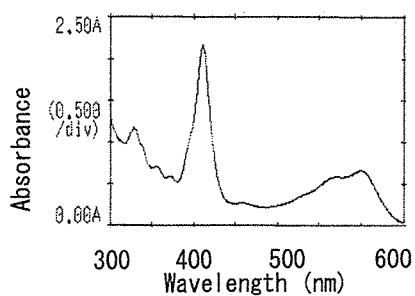


図4 煮干しから精製したコリノイド化合物の紫外可視吸収スペクトル

表2 煮干しから精製したコリノイド化合物の同定

	TLC ( $R_f$ )		HPLC (min)
	Solvent I	Solvent II	
Purified compound	0.25	0.63	9.5
Authentic B <sub>12</sub>	0.25	0.63	9.5

Solvent I: 1-butanol/2-propanol/water (10: 7: 10).

Solvent II: 2-propanol/NH<sub>4</sub>OH (25%)/water (7: 1: 2)

HPLC mobile phase: 20% (v/v) methanol solution containing 1% (v/v) acetic acid

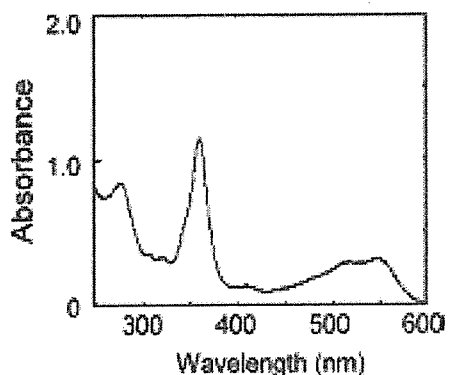


図5 AFAから精製したコリノイド化合物の紫外可視吸収スペクトル

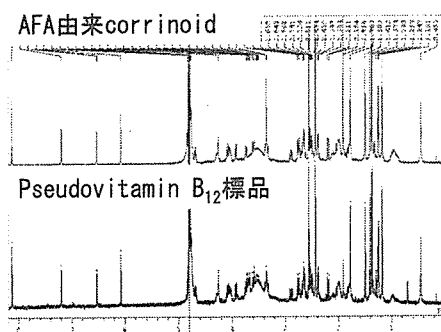


図6 AFAから精製したコリノイド化合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル



表3 AFA添加飼料で飼育されたラットの肝臓ビタミンB<sub>12</sub>含量

Groups	Vitamin B <sub>12</sub> concentration ( $\mu\text{g}/100\text{ g wet tissues}$ )
B <sub>12</sub> -supplemented rats	14.23 $\pm$ 4.56 a
AFA-supplemented rats	7.17 $\pm$ 1.00 b
B <sub>12</sub> -deficient rats	6.27 $\pm$ 1.37 b

The mean values a column with different superscript letters are significantly different (n=3 rats/group), p<0.05, One-way ANOVA; Tukey' s multiple comparison test

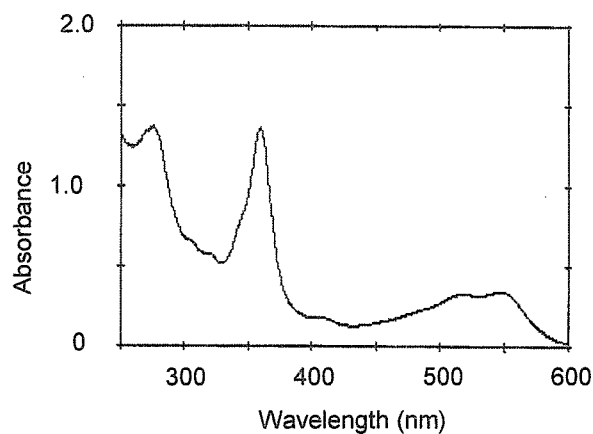
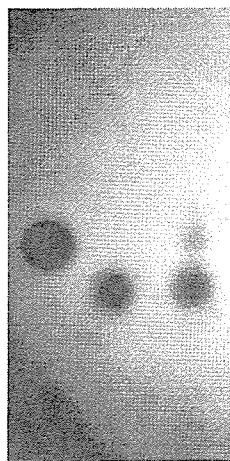


図7 すいぜんじのりから精製したコリノイド化合物の紫外可視吸収スペクトル

表3 すいぜんじのりから精製したコリノイド化合物の同定

	TLC ( $R_f$ )		HPLC (min)
	Solvent I	Solvent II	
Purified compound	0.14	0.48	6.7
Authentic B <sub>12</sub>	0.24	0.61	7.9
Pseudo B <sub>12</sub>	0.14	0.48	6.7



Authentic B<sub>12</sub>      Authentic pseudo-B<sub>12</sub>      Sample extract

図8 いしくらげ抽出液の  
バイオオートグラム

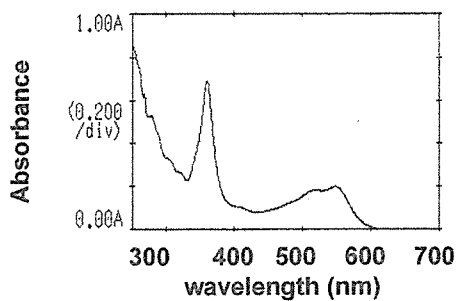


図9 いしくらげから精製したコリ  
ノイド化合物の紫外可視吸収スペ  
クトル

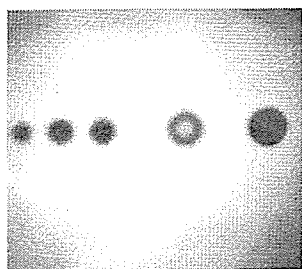


図10 標準ビタミンB<sub>12</sub>溶液  
のバイオオートグラム

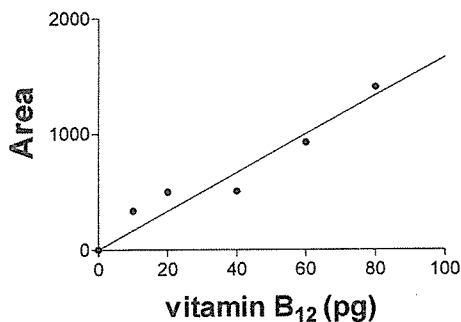


図11 検量線

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

#### 3. 食事葉酸の必要量に関する基礎的検討

分担研究者 梅垣 敬三 （独）国立健康・栄養研究所

#### 研究要旨

食事葉酸による染色体損傷抑制作用と葉酸の摂取量ならびに組織内濃度の関連について検討した。種々の葉酸食（低，基本，高）を投与したマウスに X 線を全身照射する実験系で検討したところ，低葉酸食の負荷では組織内葉酸濃度が低下し，X 線照射により惹起した骨髄染色体損傷の増加が認められた。しかし，基本食の 20 倍もの葉酸食を負荷しても，骨髄や肝臓の葉酸濃度は飽和しているため，高葉酸食負荷の影響は認められなかった。葉酸が十分に存在している状況で，さらに葉酸を負荷しても染色体損傷抑制が認められないことは，健康な男性に葉酸を負荷して末梢リンパ球で染色体損傷度を評価した試験系においても確認できた。以上の結果は体内葉酸が飽和する以上の量を摂取しても意味がないこと，すなわち葉酸の必要量には上限があることを示唆した。一方，葉酸は非常に不安定であるが，その安定性は *in vivo* においてはあまり評価されていない。そこでマウスに X 線を全身照射して酸化ストレスを負荷し，体内葉酸濃度を抗酸化ビタミンであるビタミン C や E と比較した。その結果，血漿等の葉酸濃度はビタミン E や C よりも著しく低下することを確認した。この結果は，酸化ストレスが負荷された条件では葉酸の必要量が増加する可能性を示した。

## A. 研究目的

生体構成成分の酸化損傷は、がんや動脈硬化などの種々の疾病の発症だけでなく、老化の過程にも関連することが示されている。そのため生体成分の酸化損傷を抑制する作用が期待できる食品中の抗酸化成分が注目されている。生体成分の酸化損傷の中でも、特にDNAの損傷は、細胞の機能に大きく影響するため注目できる。水溶性B群ビタミンの1つである葉酸はDNAの合成や修復に関与しており、不足すると染色体が不安定になることが報告されている。これまでに、葉酸を含まない飼料をマウスに与えた後、カフェインやヒ素を投与すると、低葉酸状態では染色体損傷が増強されたとの報告がある。このようなことから葉酸の摂取量、組織内濃度と染色体損傷の関連に興味をもたれる。

一方、葉酸は生体内で重要な働きを持つが、非常に不安定であるという特徴がある。実際に、葉酸を分析する際には、その分解を防ぐためアスコルビン酸やメルカプトエタノールを添加している。また、*in vitro*の実験では葉酸がhydroxyl radicalや紫外線照射によって分解されることが報告されている。このような*in vitro*で認められた葉酸の不安定性が*in vivo*ではどのようになるかについて注目される。特に生体に対する酸化ストレスの負荷は、先に述べたように種々の疾病に関連しているため、葉酸の必要量を考える上では、その体内における安定性を評価することが求められる。

そこで、本研究では、種々の葉酸含量の

飼料をマウスに与えた後、X線を全身照射して体内葉酸レベルの変化と染色体損傷度との関連について検討した。葉酸投与と染色体損傷度の関連は被検者に葉酸を投与し、その末梢リンパ球を用いる実験系においても検討した。一方、X線照射が体内に明確な酸化ストレスを負荷できることから、マウスにX線を全身照射して酸化ストレスを負荷し、体内葉酸濃度の変化を照射後の時間と線量との関連で検討した。

## B. 研究方法

1. 葉酸の摂取量と体内濃度、ならびに染色体損傷の抑制作用に関する検討

### 1-1 動物実験

日本クレア(東京)から購入した4週齢ICR系雄マウスを個別にプラスチック製のケージに入れ、室温(23 ± 1°C)、12時間の明暗サイクル(明期:7:00~19:00)の動物室内で飼育した。マウスは3群に分けた後、AIN-93G組成を基本に調製した低葉酸食(葉酸無添加)、基本食(葉酸2 mg/kg飼料)、高葉酸食(葉酸40 mg/kg飼料)の3種類の固形飼料を自由摂取させた。飼料の組成は表1に示した通りである。それぞれの飼料を摂取させて4週間経過後、各飼料群の半数のマウスにX線(0.5 Gy)を無麻酔下で全身照射して骨髄染色体損傷を誘発した。なお、X線はアルミ(0.2 mm)、銅(0.1 mm)を通過させて軟X線として照射した。X線照射による骨髄染色体損傷が検出しやすい照射2日後、小核試験のために尾動脈血(約5 µL)を採取した。その後、マウス