

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や B_{12} 以外の化合物(いわゆるアルカリ耐性因子)にも作用する場合があります。誤った成分表示により栄養摂取量に影響を与え、健康被害に発展する可能性がある。

B_{12} は、主に動物性食品に含まれているが、タケノコなどの一部の植物性食品にも豊富に含まれているとマスコミなどで報道される場合がある。しかし、タケノコに含まれる B_{12} を詳細に分析した結果、タケノコで B_{12} として評価された乳酸菌増殖活性は、アルカリ耐性因子によることが明らかとなり、アルカリ耐性因子の補正を怠ったことに起因するものであった。また、栄養補助食品などに利用されている藍藻由来食品において食品分析では多量に B_{12} を含むにもかかわらず、ヒトの生体利用性が顕著に低いことが多数報告されていた。そこで、この原因を解明するために複数の食用藍藻からコリノイド化合物を単離・同定した結果、これら藍藻食品に含まれる主要なコリノイド化合物は、ヒトに対して生理的に不活性なシュード B_{12} であった。従来法では、 B_{12} の下方配位子の塩基の微細な構造変化を分別することができないことに起因していた。

各種食品からコリノド化合物を単離・同定する作業は、長時間を要し、煩雑な作業であるため、アルカリ耐性因子や不活性なコリノイド化合物が混在する食品中で真の B_{12} を簡便で安価な方法で分析する必要がある。

そこで今回、乳酸菌よりも B_{12} に対する構造特異性は低いですが、菌の安定性や操作性ならびに培地の経済性に優れた B_{12} 依存性大腸菌 *E. coli* 215 を定量用菌として着目した。大腸菌の B_{12} 構造特性の低さは、食品抽出液をシリカゲル 60 薄層クロマトグラフィーで分離することで克服し、バイオオートグラム法で可視化することで食品中のコリノイド化合物の分析を行った。その結果、本法では、10 pg の B_{12} から赤色スポットとして検出でき、薄層クロマトグラフィーの R_f 値とスポットの面積比から同定と定量を同時に行うことができた。現在、従来法と本法で定量値を比較検討している。

〔論 議〕

岩井顧問 微生物定量法において最も問題となるのは特異性の問題ですが、それを確認するにはバイオオートグラフィ (Bioautography) による同定が良い方法であることを私どもは約 40 年前に提示しました。しかし、残念ながらなかなか一般には活用されてきませんでした。今回の発表では、この Bioautography との併用により慎重な検討を進められてきておられるわけで当を得たものと思います。今後のご研究の進展を期待しています。

渡辺文雄委員 ご指摘のようにバイオオートグラムでは簡便にチェックできますので、特に、食品分析分野で

普及させていきたいと考えます。ありがとうございます。

永津会友 ビタミン B_{12} の微生物法による測定の特異性は、化学測定法で確認されているのでしょうか。

渡辺文雄委員 食品のビタミン B_{12} 含量は低く、直接 HPLC などの機器分析で定量することはできませんが、HPLC や TLC で分離後、バイオオートグラムで確認しています。

5. ビタミンCの特異的分析法の開発とそれに基づく酸化ストレス評価とデヒドロアスコルビン酸の生理活性

奈良女子大学 小城 勝相

食品中のビタミンC(C)は貯蔵や調理で容易にデヒドロアスコルビン酸(DHA)に酸化される。Cの正確な測定法の無かった数十年前の実験によって、経口投与したDHAの生理活性はCと同等と結論され、現在でもそのように考えられている。我々は特異的、高感度な測定法¹⁾を用いて、経口投与したDHAのC活性を評価した。

遺伝的にCを合成できないODSラット(雄、6週齢)を5群に分け、それぞれに異なる濃度のCを含む水で飼育した。正常な発育をする0.1% C、低濃度の水として0.03% C、0.01% C、さらにCが0%の欠乏群を用意した。3週間後、12臓器のCを測定した。その結果、12臓器について、0.1%-Cで飼育した対照群の臓器全C量を100%としたときの各群のC量の相対値を比較すると、0.1%-DHAで飼育した群のC濃度は、0.1%-C群(対照群)や0.03%-C群に比べて有意に低く、全12臓器で有意差が無かったのは0.01%-C群であったことから、経口投与のDHAのC活性はCの10%であることが判明した²⁾。

Cの酸化ストレス指標としての意味を探るため、化学物質による肝障害をモデルとしていくつかの酸化ストレス指標と細胞死の関係を検討した結果、肝臓のCが最も鋭敏に酸化ストレスを反映することがわかった。これをMAPK活性化機構の検討に用いた。増殖、分化、細胞死などの基本的な細胞活動にMitogen activated protein kinase (MAPK)カスケードが重要な役割を果たすことが最近明らかにされている。これらの研究はほとんどが培養細胞を用いる研究である。また酸化ストレスによりMAPKの活性化が起こるとされているが、実際に酸化ストレスとMAPK活性化の関係を動物組織で検討した例はなかった。

酸化ストレスによって広汎にアポトーシスや壊死を起こすことが判明しているD-ガラクトサミン(D-Galn)³⁾を用いた。D-Galn(1g/kg体重)を腹腔内投与すると、6時間後から血漿GOT、GPT活性が有意に上昇し、肝臓で壊死が起こる。血漿GOT、GPT活性は24時間後には最高値に達した。肝臓での最も鋭敏な酸化ストレス指標である

C⁴⁾の濃度変化を調べると、D-Galn 投与3時間後には有意に低下した。この結果は3時間後に肝臓での酸化ストレスが亢進することを示している。その後、肝臓のCは低レベルを維持した。リン酸化されたJNKとERKはD-Galn投与後3時間で有意に増加し、6～12時間の間、活性化状態が持続した。p38 MAPKのリン酸化は投与後6時間で有意に増加した。

これらの結果は、酸化ストレスの亢進とMAPKの活性化はほぼ同時に起こることを示す。これまで培養細胞を用いた研究でも両者の時間関係を調べたものは少なく、単純に酸化ストレスがMAPKを活性化するとされている。もし酸化ストレスがMAPK活性化を引き起こすとしても、両者の間には時間的にも緊密な関係が存在することから、何らかの情報伝達機構の存在が窺える⁵⁾。

ヒトへの応用を考えるため、粥状動脈硬化症を取り上げる。動脈硬化発症の鍵を握るのは、低密度リポタンパク質(LDL)の酸化反応であるとされている。従来、LDLの酸化反応の研究は、ほとんど脂質過酸化に関するものである。我々は最近、LDLのタンパク部分であるアポリポタンパク質B-100〔アポB：分子量512 kDa〕が銅イオンによるラジカル反応により、断片化及び架橋していくこと、同様の分解は血漿のラジカル反応でも起こることをWestern blot法を用いて証明した⁶⁾。

血漿を酸化すると、アルブミンやトランスフェリンが全く変化しない時期にアポBはすでに完全に分解していた。即ち、アポBの反応性はビタミンE(E)と同程度で、他の血漿タンパク質に比べて異常に高い⁷⁾。早くから粥状硬化症とLDLの関係が注目されてきた理由の1つが、酸化反応に対するアポBの異常な高反応性のためであろう。

断片化および架橋したアポBはヒト血清に存在する。そこで三重県K町における健康診断で、文書で同意を得た住民の血清をSDS-PAGEのあと、抗ヒトアポB抗体を用いてWestern blotを行った。画像をスキャナーで取り込み、バンドの積分を行った。そして(架橋+断片化アポB)量をとってB-oxと命名した。B-oxは各個人の酸化生成物の量なので、これが大きいほど酸化ストレスが強いことを意味する。

B-oxは頸動脈内膜中膜複合体肥厚度(IMT)、LDLコレステロール、総コレステロール、トリグリセリド、年齢と有意な正の相関を示した。また、HDLコレステロールとCとは有意な負の相関を示した⁸⁾。この結果は動脈硬化予防におけるCの重要性を示す。

文 献

- 1) Kishida, K, Nishimoto, Y, Kojo, S (1992) Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* **64**, 1505-1507

- 2) Ogiri, Y, Sun, F, Hayami, S, Fujimura, A, Yamamoto, K, Yaita, M, Kojo, S (2002) Very low vitamin C activity of orally administered L-dehydroascorbic acid. *J Agric Food Chem* **50**, 227-229
- 3) Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Sakaguchi N, Kakuta Y, Tokumaru S, Kojo S (2003) Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by D-galactosamine in rat liver. *Biochem Pharmacol* **65**, 101-107
- 4) Kojo S (2004) Vitamin C, Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress *Curr Med Chem* **11**, 1041-1064
- 5) Nishioka, H, Kishioka, T, Iida, C, Fujii, K, Ichi, I, Kojo, S (2006) Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) during D-galactosamine intoxication in the rat liver. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 3019-3022
- 6) Tanaka K, Iguchi H, Taketani S, Nakata R, Tokumaru S, Sugimoto T, Kojo S (1999) Facile degradation of apolipoprotein B by radical reactions and the presence of cleaved proteins in serum. *J Biochem (Tokyo)* **125**, 173-176
- 7) Hashimoto R, Narita S, Yamada Y, K. Tanaka K, Kojo S (2000) Unusually high reactivity of apolipoprotein B-100 among proteins to radical reactions induced in human plasma. *Biochim Biophys Acta* **1483**, 236-240
- 8) Matsukawa, N, Nariyama, Y, Ogiri, Y, Hamagawa, E, Tanaka, K, Usui, Y, Nakano, S, Maruyama, T, Kyotani, S, Tsushima, M, Kojo, S (2002) Evaluation of apolipoprotein B-100 fragmentation and cross-link in the serum as an index of atherosclerosis. R. Hashimoto, *Biochim Biophys Acta* **1584**, 123-128

6. 食品中B₆ビタマーの実用的分別定量方法 —植物性食品に注目を—

高知大・農・生物資源 八木 年晴

食品中には、ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミンならびにそれらのリン酸エステル計6種類のビタミンB₆化合物が含まれている。また、これら以外に、植物食品中には配糖体であるピリドキシン-β-グルコシドが存在する。現在、食品中のこれらビタミンB₆化合物と配糖体は、微生物定量法によって、総量として定量され、食品成分表に記載されている。しかしながら、これら6種のビタミンB₆化合物は栄養機能として等価であるが、この配糖体については、その栄養価はビタミンB₆化合物より低く、総量の中に含まれるのは問題がある。さらに、最近、これら天然型ビタミンB₆化合物の各々が特有の生理・薬理機能を示すことが明らかにされているため、食品中のビタミンB₆化合物を分別定量定量することが必要になってきている。特に、ピリドキサミンは、抗活性カルボニル作用を示し、糖尿病合併症の予防・治療効果を有することが分かった。したがって、食品中のピリドキサミンとピリドキサミン5'-リン酸含有量を把握することは、さまざまな分野で有益であると思われる。

これまで様々なビタミンB₆定量法が考案されてきたが、食品中の全ビタミンB₆分別定量法として、実用可能