

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

| | | | |
|-------|--|--------------------------|----------------|
| 研究課題 | 上方配位子を考慮したビタミン B ₁₂ 同族体の定量 | | |
| 研究種別 | <input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人 | | |
| 研究組織 | 土居 幸雄(農学部・教授)研究代表者 岩川 裕美(農学部・准教授) 桂 博美(京都女子大学家政学部・准教授) | | |
| 研究期間 | <input type="checkbox"/> 1 年研究 <input type="checkbox"/> 2 年研究 | | |
| キーワード | (1) ビタミン B ₁₂ (4) 循環器疾患 | (2) コバラミン (5) ホモシステイン | (3) 高齢者 (6) |
| | | | |

1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

ビタミン B₁₂ は、生体内で葉酸と共に赤血球をつくりだす働きをもつ重要な栄養素である。欠乏症として悪性貧血がよく知られており、その多くは高齢者などでビタミン B₁₂ の体内吸収に必要とされる固有因子が不足するために起こる。ビタミン B₁₂ の化学構造はコリン環骨格の中心に金属コバルトを持つ複雑な構造の有機金属錯体で、コバラミンと呼ばれる。コバルト原子に結合する上方配位子の違いにより、食品中には4種の同族体(メチルコバラミン、アデノシルコバラミン、シアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン)が存在するが、生体内で補酵素として機能するのは、メチルコバラミンとアデノシルコバラミンである。サプリメントやビタミン B₁₂ 製剤として用いられるシアノコバラミンやヒドロキシコバラミンは、体内で補酵素型に代謝されて初めて活性を持つ。

食品中に存在するこれら4種の同族体の含有割合は食品によって異なると考えられているが、その詳細は不明である。その理由は、全ての同族体が体内で代謝され利用されるため、これまでの測定では化学的に安定なシアノコバラミンのみを定量してきたからである。また、上方配位子の違いを考慮した測定が困難であったためでもある。しかし最近の知見によれば、サプリメントなどで使用されるシアノ型は他の3種の同族体より生体利用効率が低いことがあきらかにされている。

本研究は、ビタミン B₁₂ の利用効率が、上方配位子の違いにより大きく異なる可能性があるため、各種食品に含まれるビタミン B₁₂ 同族体の割合を明らかにしようとするものである。食品中のビタミン B₁₂ の含量は非常に少なく、これまで、その同族体の定量は困難であった。今回の研究では、本学の高感度質量分析計(LCMS)を用いて、ビタミン B₁₂ の同族体の定量法の確立することとした。ビタミン B₁₂ の同族体の機能性に焦点を当て、利用効率の高い非シアノ型ビタミン B₁₂ を多く含む食品を同定することを目的とした。さらに、疾病患者におけるビタミン B₁₂ の摂取についても考察することとした。

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

背景

我が国の急速な高齢化に伴い、脳卒中・心臓発作などの循環器疾患は死因の第2位となっており、生活習慣の改善による疾患予防は喫緊の課題となっている。循環器疾患のリスク因子の一つに、血中ホモシステイン濃度の上昇があり、その原因として葉酸の摂取不足が良く知られている。しかし、血中ホモシステイン濃度上昇には、葉酸のみならずビタミン B₁₂ の関与も大きい。それは、血中ホモシステイン濃度の上昇は、葉酸依存性のメチオニン合成酵素の機能が十分に働かない場合に見られ、この酵素は補酵素としてメチルコバラミンを要求するからである。実際、高齢者の 15%はビタミン B₁₂ 不足(欠乏になる前段階の未病の状態)と報告されており、血中ホモシステイン濃度の上昇が見られる。我が国においても、70 歳代成人の約 25%で血清ビタミン B₁₂ 量の低値(350 ng/mL 以下)が報告されており、疾患リスクの上昇が危惧される。国民健康・栄養調査結果(平成 24 年)では、国民のビタミン B₁₂ 摂取量は高齢者平均で 7.4 μg/日であり、推奨量 2.4 μg/日(日本人の食事摂取基準 2015 年)を上回っているにもかかわらず、高齢者に多い萎縮性胃炎などのためビタミン B₁₂ 不足をきたしていると考えられている。

食品に含まれるビタミン B₁₂ は、微生物合成に由来し、植物性食品には含まれず、魚介類や動物性食品に多い。日本を含むアジア諸国ではビタミン B₁₂ 不足の高齢者はしばしばみられるが、一般的にはビタミン B₁₂ 欠乏患者はほとんど見られない。その要因の一つとして魚介類の摂取が挙げられている。そこで、本研究では、ビタミン B₁₂ の定量法を確立した後、日本人の主なビタミン B₁₂ 摂取源である、肉類と魚介類について、ビタミン B₁₂ の上方配位子を考慮に入れた定量を行った。

結果・考察

1. LCMS によるビタミン B₁₂ の定量

高感度 LCMS によるビタミン B₁₂ の定量はこれまで報告が少なく、特に、上方配位子の差に注目した定量法は確立されていない。4種類のコバラミンをサブ・ナノグラムで精度良く定量するために、種々の測定条件を検討した結果、以下のような条件で同族体を分離定量できることが分かった。HPLC:カラム: Shim-Pack XR-ODS II(4 X 150), 溶離液 A:0.1%ギ酸含有 5 mM ギ酸アンモニウム, 溶離液 B:アセトリル, 流速:0.1 mL/min, 溶出濃度勾配, A 液 5%→B 液 100%, MS 条件:イオン化モード, ESI(+); 印加電圧, +2.0 kV; 検出モード, MRM (Multiple reaction monitoring)。4種の同族体いずれにおいても、良好な検量線を作成でき、1 ng 以下のコバラミンを定量できた。これまでの研究で用いてきた ATCC7830 株 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*)の増殖活性を利用する微生物法における検出限界は、1 ml あたり数十 pg の範囲であり、これとほぼ同程度の感度検出できることを確認した。

2. 肉類の同族体定量

肉類食品では、ビタミン B₁₂ 含量が多く、摂取量の多いのは副生物であることから、市販の豚レバーおよび心臓、鶏レバーおよび心臓について定量した。結果を表1に示す。

表1 豚および鶏の肝臓・心臓に含まれるビタミン B₁₂ 同族体の割合

| 試料 | ビタミン B ₁₂ 同族体 (μg/100g) | | | | |
|------|------------------------------------|------|-------|------|------|
| | アデノシル | メチル | ヒドロキソ | シアノ | 合計 |
| 豚 肝臓 | 17.3 | 3.4 | 1.96 | 0.13 | 22.8 |
| 豚 心臓 | 2.61 | 0.02 | 0.04 | 0.01 | 2.68 |
| 鶏 肝臓 | 19.0 | 8.13 | 4.10 | 3.19 | 34.4 |
| 鶏 心臓 | 2.13 | 0.32 | -* | 1.57 | 4.01 |

* -: 検出限界以下

この結果から、アデノシル型のビタミン B₁₂ 含有量が、豚鶏とも肝臓で最も高く、メチル型ビタミン B₁₂ がそれに続いた。ヒドロキソ型やシアノ型も含まれているが、両者をあわせてもメチル型と同程度の含量であった。アデノシル型とメチル型では、いずれの動物においてもアデノシル型の方が高く、肝臓と心臓の比較では心臓の方がアデノ型/メチル型の比が高かった。

結論として、豚や鶏の肝臓や心臓には、補酵素型のビタミン B₁₂ 同族体の含有量が多いことが判明した。高齢者のビタミン B₁₂ 不足解消には、シアノ型 B₁₂ を含むサプリメントよりも、これらの食品の利用が推奨される。

日本食品標準成分表を利用し、栄養成分の代謝経路を考慮した時ビタミン B₁₂ と関連性の高い

と考えられる成分 12 項目を選び、牛、豚、鶏の副生物（肝臓・腎臓・心臓）に含まれるそれらの成分値間の相関性を検討した。その結果、ビタミン B₁₂ とビタミン B₆、および、ビタミン B₁₂ と葉酸間には非常に強い正の相関が見られ、ビタミン B₁₂ と脂質、およびビタミン B₁₂ とビタミン B₆ 間には緩やかな負の相関が見られた。このことは、動物の臓器に含まれるビタミン B₁₂ の二つの補酵素型の代謝経路での働き方や存在量の違いを反映している可能性があると考えた。つまり、奇数鎖脂肪酸やアミノ酸代謝に必要となる L-メチルマロニル Co-A ムターゼで必要となるアデノシル型は、DNA, RNA 合成やたんぱく質のメチル化に必要なメチオニン合成酵素の補酵素であるメチル型と比較した場合、肝臓に多い可能性がある。また、心筋におけるミトコンドリア含量は肝細胞よりも高いために、ミトコンドリアに存在するアデノシル型ビタミン B₁₂ は、細胞質に存在するメチル型ビタミン B₁₂ よりも心臓で多い。今回の結果は、この考察と矛盾しなかった。

3. 魚介類の同族体定量

我が国における主要なビタミン B₁₂ 源である魚介類のうち、サバ、カツオおよびその加工品についてビタミン B₁₂ の同族体割合を決定した。これらの食品は、その食品自体で多様な形態があり、食品を実際に食す際には、調理加工されているので、調理加工済みの食品についてもビタミン B₁₂ 同族体割合を知ることが重要となる。そこで、マサバでは魚全体と血合い肉、普通肉に分けて調べた。カツオでも同様に、血合いと普通肉を分け、さらにカツオ節とだしエキスについて調べた。また参考として、カキエキスについても調査した。結果は表 2 に示す。

表 2

| 食品名 | 調理・加工等 | ビタミン B ₁₂ 同族体の割合 (%) | | | | 総ビタミン B ₁₂ (μ g/100g) |
|-----|----------------------|---------------------------------|-----|-------|-----|--|
| | | アデノシル | メチル | ヒドロキソ | シアノ | |
| マサバ | 生 | 31 | 7 | 58 | 4 | 8.0 |
| | 生 (血合い) *1 | 91 | 3 | 6 | 0 | 115.2 |
| | 生 (普通肉) *1 | 76 | 5 | 19 | 0 | 11.3 |
| カツオ | 冷凍カツオたたき (血合い) *1 | 72 | 0 | 27 | 1 | 97.5 97.5 |
| | 冷凍カツオたたき (普通肉) *1 | 30 | 6 | 58 | 6 | 11.5 |
| | カツオ節だし*2 | 24 | 13 | 46 | 17 | 1.7 |
| | エキス | 35 | 0 | 0 | 65 | 60.4 |
| カキ | エキス | 45 | 0 | 0 | 55 | 37.8 |

*1 サバ生および冷凍カツオたたき (血合い肉・普通肉) の同族体の割合は LC-MS 分析の結果を示した。他は微生物定量法の結果を示した。

*2 カツオ節だしは、カツオ節 3g を 100ml の湯に投入して抽出した。

これらの結果より、サバ (生) や生に近いカツオのたたき (冷凍) に含まれるビタミン B₁₂ は主に、アデノシル型とヒドロキソ型である。肉類と異なりメチル型が少ないことが分かった。また、生サバやカツオのたたきでは、非シアノ型の同族体 (アデノシル+メチル+ヒドロキソ) 割合が 94~100% と非常に高いことが分かる。一方、長時間加熱を行っているカツオエキスでは、シアノ型が非常に多い。カキエキスでも同様の傾向であり、生試料に含まれていた非シアノ型同

族体が加工によりシアノ化されたと考えられる。加熱加工のどの段階でシアノ化されたかは不明であるが、食品中に極微量に存在したニトリル化合物との反応で化学的に安定なシアノコバラミンが生じたと思われる。

一方で、茹でてから骨や皮を除いて乾燥・燻煙したカツオ節を削ったカツオ節からとっただし（抽出液）では、非シアノ型ビタミン B₁₂ 割合がたたきと同程度であり、加工の条件によってはシアノ化起こりにくいことがわかる。長期間保存できることを考え併せるとカツオ節の加工方法は魚介類のビタミン B₁₂ 利用を考える上で優れた方法であると言える。

カツオの総ビタミン B₁₂ 量は、煮、蒸し、炒め、揚げの加熱調理操作によって 92~98% は残存することが既に報告されており、カツオ魚肉中のビタミン B₁₂ は熱に対して安定である。しかし、これらの食品中に含まれるビタミン B₁₂ の同族体量（および割合）が調理・加工によってどのように変化するかについては、これまで検討されていない。今回の結果は、ビタミン B₁₂ 同族体間において加熱調理等の操作の影響が異なる可能性があることを示している。通常の調理操作とは大きく異なる方法で濃縮された抽出液（エキス）においては、補酵素型に代謝され難いシアノ型割合が高いことが明らかにされた。

また今回、冷凍のカツオのたたきの解凍後（冷蔵庫、暗所で 24 時間）における総ビタミン B₁₂ の変化を調べたところ、総ビタミン B₁₂ は有意に減少した。また、生のマサバにおいても同様な減少が見られた。従って、冷凍の魚においては解凍後できるだけ早く、また、冷蔵の魚についてもすみやかに食すことが望ましい。缶詰の水煮サバに含まれるビタミン B₁₂ は、缶詰製造直後から 2 ヶ月で約 40% のビタミン B₁₂ が減少することを我々は以前報告した。ビタミン B₁₂ の安定性を考えた時、生鮮食品であるか加工食品であるかにかかわらず、できるだけ早い摂取が望ましい。

本研究で検討した魚介類に含まれる非シアノ型ビタミン B₁₂ の割合の高さと、既に報告しているビタミン B₁₂ の吸収のしやすさ（胃内消化試験後の遊離型ビタミン B₁₂ 割合の高さ）とを合わせて、ビタミン B₁₂ 供給源としての総合評価を行うと、以下のような結論になる。カツオ節だしは、ビタミン B₁₂ も高く（1.7 μg/100g）、非シアノ型が 80% 以上と多い。また、胃内消化後の遊離型ビタミン B₁₂ 割合も 90% と大変高く、吸収もされやすいことが分っているので、常用量 150g（汁椀 1 杯分）で 1 回の食事において非シアノ型ビタミン B₁₂ が 2 μg 程度摂取できることになる。一方、ビタミン B₁₂ のヒトでの最大吸収量は胃で分泌される固有のたんぱく質（IF）の飽和量（約 2 μg）で決まり、それ以上は吸収されない。従って、非シアノ型遊離ビタミン B₁₂ が多いカツオ節のだしは、高齢者などにとって最も適切な供給源の 1 つである。同様に、生サバは非シアノ型割合が 96%~100% で、胃内消化試験後の遊離型の割合が 71% である事から、常用量では IF 飽和量の 2 倍以上の非シアノ型遊離ビタミン B₁₂ を含む。カツオ節のだし同様サバはビタミン B₁₂ の有望供給源である。一方で、カツオエキスやカキエキスなど長時間加熱によって濃縮された食品については、シアノ型ビタミン B₁₂ 割合が多く、ビタミン B₁₂ 供給源としての総合評価は、サバやカツオ節より劣ることが示唆された。

4. 高齢2型糖尿病患者におけるビタミン B₁₂ の摂取と吸収

高齢の2型糖尿病患者の食事記録と血中および尿中水溶性ビタミンを測定したこれまでの結果を分析した。ビタミン B₁₂ に関しては、健常対象者と比較して摂取量は多く、血中ビタミン B₁₂ 濃度は有意に高値であったが、尿中排泄量は低値であった。この結果を、患者および健常者間の様々な交絡因子（年齢、性別などの違い）を考慮して統計解析した結果、両者に有意差は検出できなかった。しかし、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ナイアシンおよび葉酸に関しては有意差が検出され、十分なビタミン摂取のために、臨床的に問題を抱える高齢者における食品の選択などについて注意が必要であると結論した。

5. 潰瘍性大腸炎患者におけるビタミン B₁₂ の摂取と吸収

潰瘍性大腸炎患者の食事記録と血中および尿中水溶性ビタミンを測定したこれまでの結果を分析した。ビタミン B₂、ビタミン C、ナイアシン及び葉酸に関しては、健常対象者と比較して血中ビタミン濃度が有意に低値であり、ビタミン B₁、ビタミン C、ビタミン B₁₂ および葉酸については尿中排泄量が有意に高値であった。この結果を、患者および健常者間の様々な交絡因子（年齢、性別などの違い）を考慮して統計解析した結果、ビタミン B₁₂ に関しては両者に有意差は検出できなかった。しかし、ビタミン B₂、ビタミン C、ナイアシン、および葉酸に関しては患者で有意に低値であった。ナイアシンの低値は尿からの再吸収不足の可能性が示唆された。また他のビタミンに関しては、潰瘍性大腸炎患者の慢性病状によるビタミン代謝の

亢進が低値の理由と考えられた。いずれにしろ、これらのビタミンの十分な摂取のために、臨床的に問題を抱える高齢者における食品の選択などについて注意が必要であると結論した。

まとめ

ビタミン B₁₂ は古くから知られたビタミンではあるが、その上位配位子による栄養学的、生理的影響についてはまだ議論の分かれるところである。この研究では、幾つかの食品に含まれるビタミン B₁₂ の上方配位子の違いを明らかにした。高齢者では十分な摂取をしてもビタミン B₁₂ が不足している状況が明らかになっており、今後上方配位子との関連を明らかにしてゆきたい。

3. 収支報告

(非公開)

4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

<学会発表>

2017年1月11日に実施された2016年度新春技術セミナーにおいて一部を発表した。

<発表論文(査読有り)>

Concentrations of Water-Soluble Vitamins in Blood and Urinary Excretion in Patients with Diabetes Mellitus, H. Iwakawa, Y. Nakamura, T. Fukui, T. Fukuwatari, S. Ugi, H. Maegawa, Y. Doi & K. Shibata. Nutrition and Metabolic Insights. 9, 85–92 (2016).