

令和元年6月19日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07736

研究課題名(和文) 食品添加物によるビタミンB12不活性化機構と生体に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Inactivation mechanisms of vitamin B12 by food additives and physiological effects of the inactivated vitamin

研究代表者

渡辺 文雄 (WATANABE, Fumio)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30210941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の指定食品添加物リストに記載されている449種の中で次亜塩素酸水、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムがビタミンB12(B12)と顕著に反応した。次亜塩素酸水は速やかにB12と反応し、B12に特有な361 nmおよび550 nmの吸収を消失させた。一方、ピロ亜硫酸ナトリウムと亜硫酸ナトリウムにおいては著しい吸収スペクトルの変化は観察されなかったが、新たな反応生成物が検出された。実際に食品中のB12含量に及ぼす影響を検討した結果、遊離型である標準のB12とは異なり、食品中のB12はタンパク質と結合して存在しているため、食品添加物による影響が緩和された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の指定食品添加物リストに記載されている449種からビタミンB12(B12)と反応性を高い添加物(次亜塩素酸水、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム)を特定した。これら安全性の高い食品添加物であってもB12の構造を容易に変化させることが判明したことは学術的意義が大きい。しかし、実際の食品に含まれているB12はタンパク質に結合して存在するため、これら食品添加物の作用を受け難い結果となり、食品添加物が食品に含まれるB12の栄養価を低下させる可能性が低いことが示唆され、食品添加物の安全性を担保できたことは社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Vitamin B12 (cyanocobalamin, CN-B12) was significantly changed by the treatment of hypochlorous acid water, sodium pyrosulfite and sodium sulfite. When CN-B12 was treated with these food additives in a test tube, hypochlorous acid water rapidly reacted with CN-B12, whose maximum absorptions at 361 nm and 550 nm were disappeared. On the other hand, no significant changes in absorption spectra of CN-B12 were observed for sodium pyrosulfite and sodium sulfite, but certain reaction product was detected and identified as sulfito-cobalmain by HPLC analysis. When effects of these food additives on B12 content of red shrimp were determined, no significant differences in B12 content was found by the treatment of these food additives. These results suggested that these food additives could not react food B12 because most of B12 in red shrimp meats existed as protein-bound form of B12, but not free form of B12.

研究分野：ビタミン学

キーワード：ビタミンB12 食品添加物 次亜塩素酸 ピロ亜硫酸ナトリウム 亜硫酸ナトリウム

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B₁₂ (B₁₂) は、深紅の水溶性ビタミンであり、我が国の食事摂取基準では推奨量 2.4 μg/日と極めて微量で有効である。B₁₂ は微生物のみで合成され、自然界の食物連鎖により、動物組織へと蓄積されるため、動物性食品が B₁₂ の良い供給源となっている。これまで、私は我が国の主要な B₁₂ 供給源である食品に含まれる B₁₂ 化合物を液体クロマトグラフ質量分析で精密に分析した結果、微生物が生産した B₁₂ 構造類似体 (疑似 B₁₂ あるいは天然型 B₁₂ 同族体) が食品に多量に含まれていることを明らかにし、疑似 B₁₂ の生体に及ぼす影響を解明した (1-3)。この研究過程で加工食品に未同定の (天然には存在しない質量を有する) B₁₂ 化合物が多種類含まれていることを見だし、これら非天然型 B₁₂ 化合物の一種類をビタミン B₁₂ [c-ラクトン] と同定した。ビタミン B₁₂ [c-ラクトン] は広く利用されている有機塩素系抗菌剤クロラミン T と B₁₂ が反応して生成したことを世界ではじめて明らかにした (4-5)。また、予備実験において、食品添加物として安全性の高い抗菌剤で、食品や食器・調理器具の殺菌に広く利用されている微酸性次亜塩素酸水でも B₁₂ は非天然型 B₁₂ に不活性化されることを明らかにした。その他の食品添加物による B₁₂ の不活性化反応や生成物である非天然型 B₁₂ の種類ならびに生体に及ぼす影響については不明である。もし日常的に加工食品から非天然型 B₁₂ を摂取することが B₁₂ の吸収を妨げ、細胞内で B₁₂ の代謝系を阻害することになれば、上述の疑似 B₁₂ に加えて、加齢に伴う体内 B₁₂ 量の減少に拍車をかけ、今後、我が国の高齢者において B₁₂ 欠乏性神経障害の発症が深刻な社会問題となることが予測される (6,7)。超高齢社会へ向かう我が国において疾病予防の観点からも重要な研究課題である。

2. 研究の目的

食品添加物が B₁₂ に及ぼす影響を検討するため、我が国の指定食品添加物リスト (日本食品化学研究振興財団) に記載されている 449 種から動物性食品に使用されている添加物 11 種 (香料、着色料、脂溶性ビタミンを除く) を選別した。この 11 種のうち 3 種において B₁₂ と反応性を示すことが確認された。本研究では、一般的に安全であると言われている食品添加物が栄養素に及ぼす影響を B₁₂ の観点から評価することを目的とした。B₁₂ と反応性が確認された食品添加物 (次亜塩素酸水、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム) が B₁₂ の生物活性や化学構造に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 食品添加物によるビタミン B₁₂ (シアノコバラミン, CN-B₁₂) 反応生成物の紫外可視吸収スペクトル分析

有効塩素濃度測定キット (AQ-102P, SIBATA) を用いて有効塩素濃度 30 ppm に調整した次亜塩素酸水、0.01% (w/v) ピロ亜硫酸ナトリウム溶液、0.01% (w/v) 亜硫酸ナトリウム溶液を用いて、終濃度 10 μM CN-B₁₂ を調製し、それぞれ 0, 1, 24, 48 時間反応させた。添加物の種類毎に反応液の紫外可視吸収スペクトルを分光光度計 (UV-2550, SHIMADZU) を用いて測定した。

(2) CN-B₁₂ と次亜塩素酸水の反応生成物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析

有効塩素濃度 10 ppm の次亜塩素酸水を用いて終濃度 10 μM CN-B₁₂ 溶液を調製し、60 分間反応させた。あらかじめ 75% (v/v) エタノール 20 mL で洗浄後、蒸留水 20 mL で平衡化させた Sep-Pak® Plus C18 Cartridge (Waters Corp., MA, USA) に反応液を負荷した。蒸留水 20 mL で洗浄後、75% (v/v) エタノールで B₁₂ 化合物を溶出させた。溶出液はロータリーエバポレーターで乾固した後、ミリ Q 水に溶解させ、HPLC (SPD-10AV UV-Vis detector, SCL-10A VP system controller, DGU-20A₃ degasser, LC-10Ai liquid chromatograph, CTO-6A column oven) にて分析した。サンプル溶液 (30 μL) を逆相 HPLC カラム (wakocil- 5C18RS 4.6 mm × 150 mm) に注入し、移動相 A (20%メタノール 1%酢酸)、移動相 B (90%メタノール 1%酢酸) を用いて、移動相 B のグラジエント (0-20 min : 0-100%, 20-30 min : 100%) で溶出した。流速は 1 mL/min、分析波長は 361 nm で行った。

(3) CN-B₁₂ と次亜塩素酸水の反応生成物のバイオオートグラム分析

有効塩素濃度 10ppm の次亜塩素酸水を用いて終濃度 50 μg/L CN-B₁₂ 溶液を調製し、60 分間反応させた。この反応液を Sep-Pak® Plus C18 Cartridge (Waters Corp., MA, USA) を用いて上記と同様に濃縮した。

E. coli 215 の調製は寒天培地で培養した大腸菌コロニーを白金耳でかきとり、接種菌培養培地 [Pepton (4 g), Glucose (0.2 g), NaCl (0.5 g)] を蒸留水 (100 ml) で定容後、滅菌処理 (121 °C, 20 min) が 5 mL 入った滅菌試験管に移植した。37 °C で 8~12 時間振とう培養し、接種菌液とした。B₁₂ 定量基礎培地は [KH₂PO₄ (0.3 g), K₂HPO₄ (0.7 g), Na-Citrate 3H₂O (0.05 g), MgSO₄·7H₂O (0.01 g), (NH₄)₂SO₄ (0.1 g), NaCl (0.5 g), Glucose (0.3 g), Agar (1.5 g)] を蒸留水 (100 mL) で定容した。滅菌処理 (121 °C, 20 min) 後、クリーンベンチ内で 50 °C 程度になるまで放冷した。放冷後、調製した *E. coli* 215 接種菌液 100 μL を加えて軽く攪拌し角形プレー

ト(7.5 cm×22.5 cm×1.3 cm)に培地を流し入れ固めた。

サンプルと 50 µg/L CN-B₁₂ 溶液をペーパーディスク(8 mm)に 2 µL ずつ負荷し風乾させた後、ディスクを基礎培地上に置き、37 °C で一晚培養した。培養後ディスクを取り除き、4% (w/v) 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム/メタノール溶液を培地上に噴霧し、37 °C で 1 時間保温し、増殖した大腸菌を赤色に染色した。

(4) スルフィトビタミン B₁₂ (SO₃⁻-B₁₂)の合成方法

Na₂SO₃ 溶液 (266 mM) 130 µL を MES buffer (pH 6.0)に溶解させた Hydroxycobalamin hydrochloride (HO-B₁₂·HCl, 40.6 mg)溶液 (0.4 mL)に滴下し、2 時間水中で反応させた。アセトン (-20 °C) 20 mL 中に滴下し沈殿させた後、アセトン (-20 °C) 20 mL、ジエチルエーテル (-20 °C) 20 mL で洗浄し一晚凍結乾燥した。

(5) CN-B₁₂とピロ亜硫酸ナトリウムの反応生成物の同定

ピロ亜硫酸ナトリウム 0.01% (w/v) 溶液を用いて終濃度 10 µM CN-B₁₂ 反応液を調製し、48 時間反応させたものをサンプル溶液とし、HPLC (SPD-20A UV-Vis detector, SCL-10A VP system controller, DGU-20A_{3R} degassing unit, LC-20AB liquid chromatograph, CTO-20AC column oven) にて分析した。サンプル溶液 (50 µL)、合成した SO₃⁻-B₁₂ (10 µL) をそれぞれ逆相 HPLC カラム (wakocil- 5C18RS 4.6 mm×150 mm) に注入し、カラム温度 40 °C で移動相 20%メタノール 1%酢酸を用いて溶出した。流速は 1 mL/min、分析波長は 361 nm で行った。

(6) 赤エビに含まれる B₁₂の抽出と定量

有効塩素濃度 30 ppm の次亜塩素酸水、0.1% (w/v) ピロ亜硫酸ナトリウム溶液、0.1% (w/v) 亜硫酸ナトリウム溶液各 1 mL を、すり鉢ですり潰し均等化した赤エビのすり身 10.0 g に添加しよくかき混ぜた。約 3×3×1 cm のパテを形成し、冷暗所 (4 °C) で 48 時間静置したものをサンプルとして用いた。サンプル (2.0 g) に蒸留水 40 mL、0.57 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 10 mL、0.05% (w/v) シアン化カリウム溶液 0.4 mL を加えた後、30 分間加熱して B₁₂ 化合物を抽出した。冷却後、10% (w/v) メタリン酸 0.6 mL を加え、蒸留水で 100 mL に定容後、ろ紙でろ過した。

B₁₂ の定量は、日本食品標準成分表 2015 年版分析マニュアルに準じて *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. delbrueckii*) ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法で行った。本定量菌は B₁₂ を必須栄養素として要求する乳酸菌であるが、ヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチドにも B₁₂ 活性を示すため、これら化合物をアルカリ耐性因子として測定し、見かけの B₁₂ 量から差し引き補正 B₁₂ 含量を算出した。

4. 研究成果

食品添加物が B₁₂ に及ぼす影響を検討するため、我が国の指定食品添加物リスト (日本食品化学研究振興財団) に記載されている 449 種から動物性食品に使用されている添加物 11 種 (香料、着色料、脂溶性ビタミンを除く) を選別した。この 11 種のうち 6 種において B₁₂ と反応性を示すことが確認されたが、特に反応性が高かった 3 種類の食品添加物 (次亜塩素酸水、ピロ亜硫酸ナトリウムと亜硫酸ナトリウム) について検討した。

(1) CN-B₁₂と食品添加物の反応生成物の紫外可視吸収スペクトル分析

CN-B₁₂ と次亜塩素酸水反応液の紫外可視吸収スペクトルは、0 時間より B₁₂ 特有の 278 nm の吸収極大が消失し、361 nm は 365 nm に、550 nm は 586 nm へと吸収極大の長波長側へのシフトと吸光度の顕著な減少が確認できた。1 時間が経過すると、これら特徴的な吸収極大はいずれも消失した。ピロ亜硫酸ナトリウム反応液では、278 nm と 361 nm の吸光度は時間の経過に伴いわずかに増加したが、その後は減少した。また、48 時間反応させた場合は 550 nm から 548 nm への短波長側へのシフトが確認できた。亜硫酸ナトリウム反応液も同様の挙動を示した。

(2) CN-B₁₂と次亜塩素酸水の反応生成物の HPLC 分析

CN-B₁₂ (10 µM) と有効塩素濃度 10 ppm 次亜塩素酸水を 60 分間反応させた後、Sep-Pak® Plus C18 Cartridge を用いて濃縮し、HPLC にて分析した結果、保持時間 11 分、12.4 分、15.9 分、17 分に生成物のピークが検出された。これら反応生成物を B₁₂ 依存性大腸菌 *E. coli* 215 を用いてバイオオートグラム分析を行った結果、B₁₂ 依存性 *E. coli* 215 の生育円が確認できず、B₁₂ としての生物活性を有していないことが明らかになった。

(3) CN-B₁₂とピロ亜硫酸ナトリウムの反応生成物の同定

CN-B₁₂ とピロ亜硫酸ナトリウムを 48 時間反応後、生成物を HPLC 分析した。その結果、保持時間 27 分にスルフィト B₁₂ (SO₃⁻-B₁₂) の保持時間と一致する新たなピークが検出された。ピロ亜硫酸ナトリウムと CN-B₁₂ が反応すると、B₁₂ の上方配位子のシアン化物イオンが亜硫酸イオンに置換することが明らかになった。SO₃⁻-B₁₂ は天然に存在する B₁₂ 化合物の一種であるため、栄養

価が減少しないと推察される。

(4)各食品添加物処理が赤エビの B₁₂ 含量に及ぼす影響

コントロールと比較して、各種添加物を処理した赤エビの B₁₂ 含量は全体的に減少傾向にあったが、いずれの食品添加物処理群も B₁₂ 含量に有意な減少は見られなかった。B₁₂ と食品添加物を直接反応させた場合よりも B₁₂ へ及ぼす影響は少なかった。食品中の B₁₂ は、遊離型 B₁₂ とは異なり、タンパク質と結合して存在しているため、食品添加物による影響が緩和されたものと推察される。

以上の結果から、次亜塩素酸水は遊離型 B₁₂ と瞬時に反応し、生理作用を消失させたが、実際の食品に含まれているタンパク質に結合している B₁₂ に対しては、ほとんど作用しなかった。また、ピロ亜硫酸ナトリウムと亜硫酸ナトリウムは遊離型 B₁₂ と反応し、SO₃⁻-B₁₂ に変換させた。SO₃⁻-B₁₂ は天然に存在し、ヒトにおいて生理活性を有する B₁₂ 化合物の一種であるので、栄養価は減少しないと推察される。

[引用文献]

F. Watanabe (2007) Vitamin B₁₂ source and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, 232, 1266-1274.

F. Watanabe, Y. Yabuta, Y. Tanioka and T. Bito (2013) Biologically active vitamin B₁₂ compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6769-6775.

F. Watanabe and T. Bito (2016) Corrinoids in food and biological samples. *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 2, 229-244.

F. Teng, T. Bito, S. Takenaka, Y. Yabuta, and F. Watanabe (2014) Vitamin B₁₂[c-lactone], a biologically inactive corrinoid compound, occurs in cultured and dried lion's mane mushroom (*Hericium erinaceus*) fruiting bodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1726-1732.

T. Bito, F. Teng, N. Ohishi, S. Takenaka, E. Miyamoto, E. Sakuno, K. Terashima, Y. Yabuta, and F. Watanabe (2014) Characterization of vitamin B₁₂ compounds in the fruiting bodies of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and bed logs after fruiting of the mushroom. *Mycoscience*, 55, 464-468.

渡辺文雄 (2009) ビタミン B₁₂ と高齢者. *ビタミン*, 83, 370-374.

渡邊文雄 (2017) ビタミン B₁₂ と葉酸の摂取量についての一考察. *ビタミン*, 91, 595-602.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

F. Watanabe and T. Bito (2018) Determination of cobalamin and related compounds in foods. *Journal of AOAC International*, 101, 1308-1313. 査読有

[学会発表](計2件)

岡本菜穂, 日裏七海, 山本彩夏, 美藤友博, 藪田行哲, 渡邊文雄, 食品添加物が食品中のビタミン B₁₂ に及ぼす影響, 日本農芸化学会大会, 2019

渡邊文雄, 山本彩夏, 岡本菜穂, 美藤友博, 藪田行哲, 食品添加物が食品中のビタミン B₁₂ に及ぼす影響, 日本ビタミン学会大会, 2018

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。