

葉酸の微生物定量について

西 田 幸 子*

I 緒 言

葉酸¹⁾ (Folic Acid : FA) は、現在では天然型、合成型の如何を問わず *Streptococcus faecalis* R 及び *Lactobacillus Casei* の発育因子の総称であると考えられ、自然界では動物質、特に肝臓、脾臓、腎臓、蚕蛹、酵母及び各種植物の葉、木の子等に比較的多く存在する水溶性 Vitamin B群に属し、自然物中では大抵 Glutamic acid が γ -peptide 結合して存し、又一部は遊離状態で存在する。

併て葉酸の生化学的作用²⁾ に関しては未だ明確でないが、動物組織内では Nuclei acid, Tyrosine の代謝或いは Choline—, Xanthine—, D-amino acid oxidase, Thionase の作用等に関与し、B₁₂ と相関連して Nuclei acid の生成に必要な Thymine 及び Purine の合成に密接な関係を行し、生体内の細胞核成分、生体内合成への解決の鍵を提供するものと考えられる。

葉酸の定量方法としては今日までに比色法、ポーログラフ法、蛍光法及び動物試験法(鼠、鶏試験)等が報告されているが、自然物中の葉酸の理化学的方法は未だ確立されておらず、現在のところ最も信頼し得る定量値を齎す方法は微生物による定量 (Microbioassay³⁾) であり、この方法は最近広く生化学的研究に応用されるに至つた。

微生物定量法は、微生物の栄養要求を基礎とするもので葉酸を必須栄養とする *Streptococcus faecalis* R の完全合成培地から定量せんとする葉酸のみを除いた合成培地を基礎培地 (Basal medium) とし、これに *Streptococcus faecalis* R を一定条件で培養する時はこの *S. faecalis* R は一定範囲内ではその基礎培地に加えられた葉酸量に対応する酸生成を行なう特性を利用する方法で、葉酸標準溶液について検定した検量曲線 (Dose response standard curve) と照し合わせることにより試料中の葉酸の定量を行なうのである。

J. Teply, Wieland⁴⁾ 氏等は動物組織 (牛, 鼠, 鶏, 兎, 豚) の肝臓において、又我が国では近藤⁶⁾, 岩井氏⁷⁾

等により植物組織における Microbioassay の研究がなされ、更に Bioautography の応用により、*S. faecalis* R の発育因子は、FA 又は FNA 及びその conjugates が主であることを明らかにし、その他未知因子の存在を指摘している。最近村田氏により重層法による定量が報告されているが、著者は *S. faecalis* R を使用して酸滴定により数種の植物組織中の遊離型並びに総葉酸の分離定量、試料酵素分解による抽出条件の検討並びに Bioautography により *S. faecalis* R の発育因子の検索を試みた。

II 実験の部

[I] 微生物定量

1. 試料

京菜, ちしや, 白菜 } 京都産, 市販のもの
椎茸, 占地茸 }
榎茸……長野県人工栽培のもの

2. 使用菌株 : *S. faecalis* "R" ATCC8043

3. 菌株保存 : 一般乳酸菌保存培地「ニッサン」を 60g/l の割合に加熱溶解後、予め沈降性 CaCO₃ を約 1g 入れた試験管に 10ml ずつ分注後綿栓を施し、Koch 滅菌釜で間歇滅菌した保存培地に穿刺培養 (30—33°C 24hrs) 後冷蔵庫に保存した。尚、菌の活性が落ちないように 1 週間に 1 度ずつ植え継いだ。

4. 定量に用いる試薬及び培地の調製

(1) 標準葉酸溶液の調製

純粋な葉酸 (合成品) 10mg を正確に秤取し alcohol 20% 含む 1/100N NaOH に溶解して 1 l にし、着色瓶に入れ光線を遮蔽して冷蔵庫に貯え、用時に原液を水で稀釈して 10mg/ml の溶液として使用した。

(2) 基礎培地の調製

葉酸定量用基礎培地「ニッサン」(1955年 A. o. A. c. 組成) を使用した。その成分組成は Table I. の如きである。

*本学特別研究生 (昭和35年度卒業生, 平教授指導)

Table I. 基礎培地成分組成 (1 l分)

| 組 成 | 1 l中の量 | 組 成 | 1 l中の量 |
|---------------------------------------|--------|--|---------|
| カザミノ酸 「ニッサン」 | 10g | ウラシル | 10mg |
| l-システイン | 500mg | キサンチン | 20mg |
| dl-トリプトファン | 400mg | グルタチオン | 5 mg |
| l-アスパラギン | 600mg | ビタミン B ₁ | 400γ |
| 硫酸アデニン | 10mg | ク B ₂ | 1 mg |
| 塩酸グアニン | 10mg | ク B ₃ | 4 mg |
| ニコチン酸 | 800γ | ビオチン | 20γ |
| パラアミノ 安息香酸 | 1 mg | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 20mg |
| パントテン酸 カルンウム | 800γ | MnSO ₄ · 4H ₂ O | 215.3mg |
| K ₂ HPO ₄ | 6.2g | クエン酸 ナトリウム | 51.5g |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 400mg | ブドウ糖 | 40g |
| | | ポリマー ソルベート 80 | 100mg |

上記粉末基礎培地を少量の水で1分間煮沸後、pH = 6.8に調節後、滅菌蒸留水を正確に規定通り溶解後予め滅菌した試験管に 10ml 宛正確に分注した。

(3) 接種菌用培地の調製

一般乳酸菌接種培地「ニッサン」を規定通り 40g/l (pH=6.8) の割合に水で加熱溶解後、試験管に 10ml 宛分注後綿栓を施し間歇滅菌後、冷蔵所に貯蔵した。

(4) 接種用菌液の調製

純穿刺培養した菌体(移植後1週間以内のもの) 1白金針を接種培地に移植し、30—33°Cに 16—24hrs 培養したものを予め滅菌した遠心管に移し遠心して上清を除き、これに滅菌生理食塩水10ml を加えてよく振盪し菌体を懸濁させて洗浄し、次に遠心して洗液を除き、再び滅菌生理食塩水 10ml を加えて懸濁し、その 1ml を滅菌生理食塩水 10ml に注加してよく振盪し接種菌液とした。

(5) Conjugaseの調製

i) 豚腎臓 Conjugase

豚の新鮮な腎臓を3倍量の水で homogenize 後、遠沈し上清を Hyflosuper cel で濾過したものを豚腎臓 Conjugase とした(帯紅色)

ii) 鶏肝臓 Conjugase

新鮮な鶏の肝臓100g (25羽分) を0.1M-Phosphate buffer sol. (pH=7.0) と共に homogenize し、toluol を加えて30—30°Cで 24hrs autolyse させた。然る後これを遠心

し沈降残渣と脂層との中間の灰褐色の水層をとり、等容の 0.1M Ca₃(PO₄)₂ のゲル懸濁液を加え、よく攪拌した。次に遠心して得られた上清を5°C以下に保ちつつ予め氷冷した等容の ethanol を攪拌しながら滴下し、一夜冷蔵庫に保ち生成した白色沈澱は遠心して集め、0.1M-Phosphate buffer sol. (pH7.0) 100ml によく懸濁し遠心して得た上清液を鶏肝臓 Conjugase とした。両 Conjugase には toluol を加えて冷蔵庫に貯えた。尚、両 Conjugase 1 ml 中の葉酸含量は Table II の如きであり、この両 Conjugase に由来する葉酸量を定量値から差引いた。

Table II. 両 Conjugase 中の葉酸含量

| Conjugase 1 ml | 生酸量 (ml) | 葉酸 (mg/ml) |
|----------------|--------------|--------------|
| 鶏肝臓 Conjugase | 3.87 3.92 | 3.90 1.64 |
| 豚腎臓 Conjugase | 2.85 2.90 | 2.88 1.20 |

5. 試料検液の調製

新鮮な試料 10g を秤取し、少量の 0.1M-Phosphate buffer sol. と共に湯浴上で 5 min. 加熱後、同 buffer sol で十分に搗碎抽出しガーゼで繊維質を除き 50ml に充す。遊離型葉酸の定量には、このうち 5 ml を 50ml に充し、又総葉酸の定量にはこのうち 5 ml を試験管にとり、前述した豚腎臓 Conjugase、鶏肝臓 Conjugase 各 1 ml ずつ及び Cysteine 5 mg を加え、toluol の存在のもとに 30—33°Cで24hrs 保温後、酵素作用を止めるために 3 min 加熱後濾過し濾紙を十分に洗滌し、その濾液を 50ml に充したものをそれぞれ検液とした。以上の検液の稀釈は予備実験でその 0.05—1 ml が葉酸を 0.0—3.5mg 含有するよに按配して調製した。

6. 試料検液中の葉酸の定量

基礎培地 10ml ずつに標準葉酸溶液を加え、葉酸

※ Na₃PO₄·12H₂O 7.6g を 100ml の水に溶解した液と CaCl₂·6H₂O 6.75g を 100ml の水に溶解した液とを強く攪拌しながら一挙に加え生成する白色沈澱は遠心して集め、更に混在する NaCl を除去するために洗液に Cl⁻ のなくなるまで10数回水洗を反復し水で 100ml にした。これを固く密栓した容器に入れ冷蔵庫に保存し使用時懸濁して使用した。

含量をそれぞれ0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mγとし別に対照用とし0 mγ計8段階、各段階につき2組の標準系列を調製した。又前述の如き調製した試料検液を検量曲線の有効定量範囲に相当する葉酸濃度の培地を3段階、各段階につき3組の検液系列を調製し、更に回収率をみるために検液と標準葉酸溶液(1 mγ/10ml)の既知量とを加えて2段階、各段階につき2組調製した。然る後、各試験管の内容をよく混和しキャップを

施し常圧で15min 滅菌後急冷し、これに前述の接種菌液を無菌箱の中で液面に正確に滴下するように注射器で1滴接種後、30—33°Cで72hrs 培養後、B. T. B.をindicatorとして1/10N NaOHで滴定し、標準系列の酸度(Table III)より検量曲線(Fig 1)を描き、検液系列の酸度を挿入して葉酸含量を読みとり、試料1 g当りの葉酸含量を算出した(Table IV)。

Table III. 標準系列酸度

| 葉酸濃度 | 0.5mγ | 1.0mγ | 2.0mγ | 4.0mγ | 6.0mγ | 8.0mγ | 10.0mγ |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| N/10NaOH消費ml数 | 1.19 | 3.54 | 7.26 | 10.30 | 11.70 | 11.80 | 11.70 |
| 平均値 | 1.35 | 3.39 | 7.16 | 10.60 | 11.53 | 11.85 | 11.85 |

Fig 1. 検量曲線

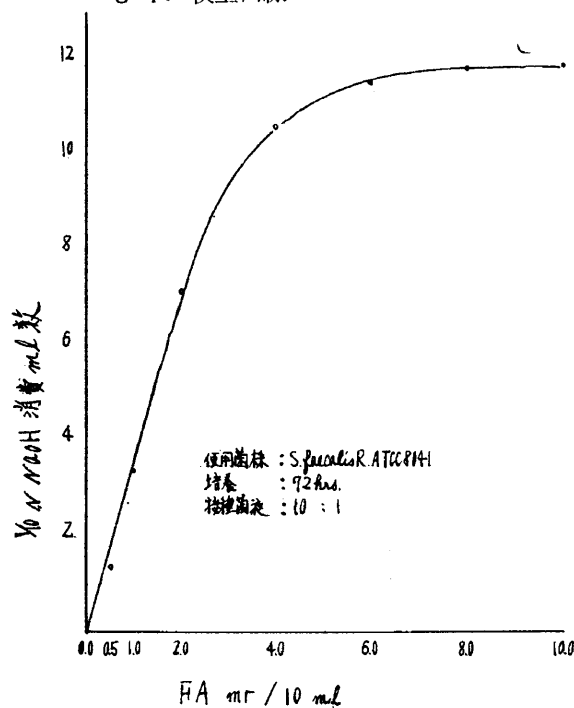


Table IV.

| 試料 | 各検液 ml | N/10 NaOH 消費 ml ※ | 葉酸含量 mγ/g | 葉酸平均含量 mγ/g ※※ | 回収率 % | |
|----------------------|--------|-------------------|-----------|----------------|---------|--------|
| 京菜 (Kyo-na) | 総 | 0.05 | 4.06 | 1160.00 | 1101.05 | 94.91 |
| | | 0.10 | 7.26 | 1155.00 | | 95.08 |
| | | 0.15 | 9.41 | 996.67 | | — |
| | 遊 | 0.20 | 3.72 | 262.50 | 247.22 | 100.87 |
| | | 0.30 | 5.12 | 241.67 | | 98.33 |
| | | 0.50 | 8.17 | 245.00 | | — |
| ちしや (Unheated) | 総 | 0.10 | 2.35 | 375.00 | 323.41 | 96.11 |
| | | 0.30 | 5.85 | 308.00 | | 97.47 |
| | | 0.50 | 9.71 | 298.00 | | — |
| | 遊 | 0.50 | 0.95 | 30.00 | 26.64 | 100.00 |
| | | 0.70 | 1.15 | 26.00 | | 98.53 |
| | | 1.00 | 1.45 | 23.50 | | — |
| 白菜 (Chinese cabbage) | 総 | 0.10 | 2.10 | 335.00 | 285.70 | 90.05 |
| | | 0.30 | 5.25 | 276.67 | | 100.00 |
| | | 0.50 | 8.66 | 251.00 | | — |
| | 遊 | 0.20 | 2.30 | 192.50 | 178.66 | 95.95 |
| | | 0.40 | 4.45 | 177.50 | | 96.69 |
| | | 0.60 | 6.22 | 164.17 | | — |
| 椎茸 (Shiitake) | 総 | 0.10 | 0.81 | 115.00 | 110.02 | 103.79 |
| | | 0.20 | 1.51 | 115.00 | | 123.29 |
| | | 0.40 | 2.92 | 105.63 | | — |
| | 遊 | 0.20 | 1.08 | 80.00 | 77.50 | 58.55 |
| | | 0.40 | 1.90 | 70.00 | | 104.61 |
| | | 0.60 | 3.39 | 82.50 | | — |
| 占地茸 | 総 | 0.20 | 0.77 | 55.00 | 51.05 | 95.90 |
| | | 0.40 | 1.15 | 43.75 | | 92.59 |
| | | 0.60 | 2.49 | 60.00 | | — |

| | | | | | | |
|--------------------|---|------|------|-------|-------|--------|
| (Simeji-take) | 遊 | 0.10 | 0.23 | 25.00 | 23.70 | 95.24 |
| | | 0.30 | 0.50 | 26.67 | | 92.57 |
| | | 0.50 | 0.88 | 26.00 | | — |
| 榎茸 (Enoki-take) | 総 | 0.10 | 0.56 | 85.00 | 83.31 | 103.41 |
| | | 0.20 | 1.07 | 87.50 | | 111.85 |
| | | 0.30 | 1.66 | 83.00 | | — |
| | 遊 | 0.20 | 0.63 | 40.00 | 34.58 | 89.83 |
| | | 0.40 | 0.88 | 33.75 | | 112.60 |
| | | 0.60 | 1.27 | 30.00 | | — |

※：算術平均値(3本)

※※：総葉酸定量値より2.84を引いた値

総：総葉酸 遊：遊離型葉酸

〔Ⅱ〕試料酵素分解による抽出条件の検討

著者は本実験で試料分解に豚腎臓Conjugase, 鶏肝臓 Conjugase に cysteine を添加したが, 両Conjugase がそれぞれ単独で用いられている場合もある。著者は結合型葉酸が完全に遊離化されることを希望するので抽出条件を変え, 両 Conjugase の効力を比較した。その要領は次の如くである。

京菜葉片10gを摺鉢で0.1M-Phosphate buffer sol.と共に充分搗碎後ガーゼで濾過し繊維質を除き50mlに充しその5mlを試験管にとりTable V に示した如き処理を施し, 更に50mlに充しその0.2mlを検液とし前述と同様な方法に従って試料1g当りの葉酸含量を算出しその効力を比較した。その結果はTable Vの如きであった。

Table V. 両 Conjugase の効力比較

- A: 豚腎臓 Conjugase
- B: 鶏肝臓 Conjugase
- C: Cysteine 5 mg

| | 試料処理方法 * | N/10 NaOH 消費ml** | 葉酸含量 mγ/g |
|-----|-----------------------------|------------------------|--------------|
| I | 検液 5min. 加熱 | 3.50 | 367.50 |
| II | Iの検液 + A 2ml. | 6.28 | 647.60 |
| III | Iの検液 + 2ml | 7.04 | 731.72 |
| IV | Iの検液 + A 1ml + B 1ml | 6.96 | 724.60 |
| V | Iの検液 + A 2ml + C | 6.72 | 695.10 |
| VI | Iの検液 + B 2ml + C | 6.12 | 738.16 |
| VII | Iの検液 + A 1ml + B 1ml + C | 7.34 | 759.22 |

| | | | |
|------|-------------------------|------|--------|
| VIII | 検液 | 6.54 | 680.00 |
| IX | 検液 + C | 6.98 | 724.60 |
| X | 検液 + A1ml + B1ml + C | 7.40 | 765.66 |

* I~Xの処理を施し30—33°Cで24hrs.保温。

** 2本算術平均値。

Table Vによれば豚腎臓, 鶏肝臓 Conjugase は単独では遊離化を充分になし得なく, この両 Conjugase に Cysteine を添加した場合, 最高の定量値 (VII, X) を示し, 本法は最も効果的であることが確認出来た。又 I, VIIIの定量値の差は, この試料中にも Conjugase が存在し, しかもIXからこの Conjugase がCysteine により活性化されたものと考えられる。しかしこれによつて結合型から完全に抽出されることは認め難いがVIIの処理法による本定量は満足すべき値であると考え

る。京菜1g当りの葉酸含量が前実験値と異なるのは試料がことなつていたためと考える

〔Ⅲ〕Bioautography.⁹⁾

Paperchromatography と Microbioassay とを併用し, 試料の発育因子の検索を行つた。

1. Paperchromatography 一次元上昇法

- (1) 東洋濾紙: No.50. 2×40cm
- (2) 展開液: 0.1M—Phosphate buffer sol. (pH=7.0).
- (3) 対照液: 葉酸 10γ/ml.
- (4) 試料調製

試料10gを0.1M—Phosphate buffer sol. (pH=7.0) と共に摺鉢で搗碎抽出後, ガーゼで濾過繊維質を除き g/ml の溶液としその5mlに豚腎臓, 鶏肝臓 Conjugase 各 1mlに Cysteine 5mg を加え 30—33°C 24hrs. 保温後加熱し濾過した。対照葉酸と共に濾紙に10—20回 spot, 室温暗所で展開した。又両Conjugase も同様に spotし展開した。

3. Microbioassay.

滅菌した基礎培地 (200ml) に一級寒天を2%加え均一に溶解し放冷して手で触れ得る程度 (45—47°C)になつたならば, 別に培養して調製した接種用菌体 (未稀釈) を培地の4%前後加えよく振盪し直ちに予め70%alcohol で滅菌した大型シャーレに流し込み均一の厚さに固らした。この寒天基礎培地の上に別に作成した Paperchromatogram を静かに乗せ30min. 後に取り除き30—33°C, 24—40hrs. 保温した。その結果 Table VI の所にはつきりした

S. faecalis Rの発育帯 Fig II を認めた。

Table III. 各試料の *S. faecalis* R発育因子 Rf 値

| 試料名 | 葉酸 Rf 値 | 不明因子 Rf値(I) | 不明因子 Rf値(II) |
|------------|---------|-------------|--------------|
| 葉酸 (対照) | 0.40 | — | — |
| 京 菜 | 0.34 | 0.59 | 0.83 |
| ち し や | 0.39 | — | 0.79 |
| 白 菜 | — | 0.59 | 0.86 |
| 椎 茸 | — | 0.52 | 0.81 |
| 占 地 茸 | — | 0.54 | 0.78 |
| 榎 茸 | — | — | 0.83 |
| 両Conjugase | — | — | — |

Fig II. 各試料の *S. faecalis* R. の発育帯

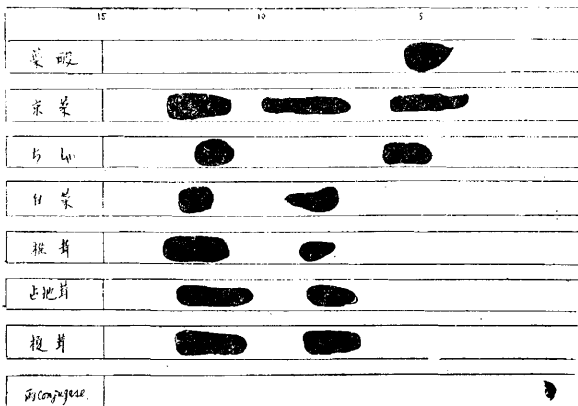


Table III 及び Fig II より、京菜、ちしや等に於いて葉酸 (FA) Rf値0.40の所にはつきりした発育帯をも認めたが白菜及び木の子類に於いては認め得ず、その他に平均 Rf 値 0.81 及び 0.55 の2個の発育帯を認め、この因子が何であるか確認するまでに至らなかつたが前者は文献Rf値 (0.7—0.80) よりFNAであるか又岩井氏らが報告しているRf値 (0.8—0.9) の未知因子のいずれかであろうと推定する。又両 Conjugase に於いては全く発育帯を認めなかつたのでこれらの発育帯は Conjugase により起因したものとは考えられない。

III. 要 約

1. 葉酸定量用基礎培地「ニツサン」、菌株 *S. faecalis* “R” ATCC 8043 を用い10ml培養、酸滴定による本法の有効定量範囲は0.0—3.5mgで回収率は89.83—123.29%であつた。尚検液の各段階の定量誤差は15%で検液量を増加するに従い良い定量値を得られる様に考えられるが、本法では逆に減少値示したのでこの点を検討する必要がある。

2. 葉酸は自然物中では結合型、遊離型の二態をなしで存在していることを再確認した。
3. 結合型の葉酸は豚腎臓、鶏肝臓 Conjugase に活性化剤 Cysteine を加えた場合に最も遊離化され最高の定量値をもたらす、単独では遊離化を充分になし得ないことを認めた。
4. Bioautography により *S. faecalis* R の発育因子は葉酸 (FA) 及びその結合型のみならず多様性であることを認めた。
5. 本定量はあくまで特定の方法であり、正確さを出すためには菌株、培養量を種々変えて検討する必要がある。

この論文を終えるに当り、この研究に終始親切に御指導下さいました平友恒教授並びに研究室の皆様深く感謝すると共に菌株を提供下さつたニツサン株式会社へ厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1)2) ビタミン学, 桑田智 572p, 592p
- 3) 農芸化学実験書, 京大農学部出版 387p
- 4) Tepy, L. J. and Elvem, C. A; J. Biol. chem. 157, 303 (1945).
- 5) Wieland, O. P, Hutchings B. L., Williams J.H: Arch. Biochem Biophys., 40, 205 (1952).
- 6) 京大食研科報告書13号, 67p
- 7) 京大食研科報告書17号, 34p
- 8) ビタミン学実験法, 日本ビタミン学会編, 377p
- 9) 農芸化学実験書, 京大農学部出版, 592p

その他

- 標準生化学実験, 江上不二夫
- 微生物ハンドブック
- 続クロマトグラフィー, 桑田智
- ビタミン三・四巻, 日本ビタミン学会編 197p
- 実験農芸化学, 上巻, 東大農学部編