ビタミン B₂ の腸内合成と細菌叢に及ぼす 食餌成分の影響 (第 3 報)

The Influence of Diet Composition on the Intestinal Synthesis of Riboflavin and Intestinal Microflora (Report III)

糞中ビタミン B₂ 量と大腸菌数に及ぼす飼料中オーレオマイシンの影響

The Influence of Aureomycin in Diet on the Riboflavin Content in Feces and Coli Form Bacteria

国立栄養研究所 (The National Institute of Nutrition)

印 南 敏 (S. Innami)

As a mean of study on the mechanism of intestinal synthesis of riboflavin in rat, aureomycin was added in basal ration at the rate of 4 mg per 100 g diet.

The basal diet consisted of, in per cent, defatted soy bean powder 15, corn flour 27, dextrin 44.5, mineral mixture 4, liver oil 3, soy bean oil 5.5, and vitamin mixture 1.

The albino rats were fed on the basal diet added with aureomycin for 4 weeks.

Riboflavin excreted in feces decreased in 5th-7th day after aureomycin supplementation, but it seemed to increased slowly in 26th-27th day after supplementatation. Intestinal microflora in cecum after 4 weeks feeding was investigated.

It was remarkable that coli form bacteria increased by antibiotics supplementation.

Moreover, riboflavin excreted in feces decreased in 4th day after antibiotics supplementation, but coli form bacteria count increased immediately after aureomycin supplementation.

The biological properties of coli form bacteria isolated from the feces of rats supplemented or not with aureomycin were tested.

From the results of these experiments, the question was yet remained about the role of coli form bacteria in the riboflavin synthesis in rats.

¹⁾
緒言 著者は前報において、腸内 B₂ 合成を左右する因子として脂肪及び蛋白質を選び、その量を変えて試験したところ、脂肪及び蛋白質量を多くすると糞中排泄 B₂ 量は減少し、coli form bacteria は増加するような傾向を得た。

蛋白質含量の多い時糞中排泄 B₂ 量の少くなることは既に藤田、²⁾飯沼、³⁾安田等の認めていることである。一方加藤、井上等⁴⁾は蛋白性食餌の多い時には大腸菌群細菌数の増加することを報じている。之等のことから、著

者は単純に、シロネズミ腸内における大腸菌の B₂ 合成に対する役割について疑問をいだいてみた。今回はこの疑問を解決したいと考え、抗生物質の出現によつて可成り人為的に腸内細菌叢を変換出来るようになったのにかんがみ、抗生物質としてオーレオマイシンを選び、糞 B₂ 量と腸内細菌特に coli form bacteria の挙動を追求してみたので報告する次第である。

実験方法

1. 実験動物並びに飼料：動物はシロネズミを使用し、実験条件により生後4週間体重 40~50g のもの或は成熟したものを選んだ。

飼料組成は第1表、第2表の如くで脱脂大豆粉は高温処理した絞り粕を購入製粉した後60メツシュを篩過したもの。とうもろこしは黄色とうもろこしを製粉し同様60メツシュを篩過したもの。ビタミンA・Dは肝油から取り大豆油 8.5g の中に肝油 3g を加えた。オーレオマイシン (以下AM) は飼料 100g 中 4mg 投与した。カゼイン群は標準飼料群で脱脂大豆粉・とうもろこし群に対する対照群として観察した。

2. 糞尿中 B₂ 定量法：何れも前報の如くルミフラビン蛍光法を採用し、八木式蛍光光度計を使用した。

3. 細菌数測定法：試料は盲腸内容物及び新鮮便を用いた。細菌は前報同様総生菌数、coli form bacteria のみを採り上げ、いずれも前報所載の方法に準じて菌数計算 (乾燥物 1mg 当りの絶対生菌数 (対数値)) を行つた。coli form bacteria はAM投与前後の各期に E. C. 培地より遠藤平板に移し、各代表コロニーを分離して常法により生化学的性状を検し菌型を決定した。尚、E. C. 培地で 45°C で増殖したものは Evenson 等によれば E. coli type で、同培地で 37°C で増殖したものは coli form bacteria としているが、著者の使用した培地では 45°C で増殖した細菌は E. coli type ばかりでなく、多くの coli form をも含んでいたもので、区別せずに一括して coli form bacteria と呼ぶことにする。

実験成績

1. 糞中排泄 B₂ 量に及ぼす AM の影響：生後4週間体重約 40~50g の試験動物を約1カ月飼育し、この間投与直後5~7日目と26~27日目の糞便中の排泄 B₂ 量を測定した結果を示すと第3表の如くである。表より

第1表

飼料	組成(%)
脱脂大豆粉	15.0
とうもろこし粉	27.0
デキストリン	44.5
塩類混合	4.0
大豆油	8.5
ビタミン混合	1.0

第2表

ビタミ	飼料 100g 中の mg
B ₁	0.5
B ₂	0.5
B ₆	0.4
ニコチン酸	2.0
パントテン酸カルシウム	2.0
パラアミノ安息香酸	10.0
イノシトール	10.0
コリン塩酸塩	100.0
葉酸	0.2
トコフェロール	10.0
アスコルビン酸	10.0
K ₃	0.3

第3表 糞中排泄 B₂ 量に及ぼす AM の影響

食餌の種類	動物数	投与後 5 ~ 7 日				投与後 26 ~ 27 日			
		摂取 B ₂ 量 γ/日	糞量 g/日	排泄 B ₂ 量 γ/日	排泄 B ₂ 量 γ/g	摂取 B ₂ 量 γ/日	糞量 g/日	排泄 B ₂ 量 γ/日	排泄 B ₂ 量 γ/g
カゼイン群	3	72.1	1.5	25.1	17.0	110.1	2.0	29.0	14.5
基本飼料群	4	63.2	1.7	25.3	14.8	109.9	3.0	41.6	13.9
基本飼料 + A. M	4	64.9	3.4	15.8	4.6	118.0	3.2	32.9	10.3

明かなように糞便 1 日量及び単位重量当りの B_2 含量において AM 投与群が対照群よりも低い値を示した。殊に投与直後に著しいが約 1 カ月後にはほぼ対照群に近い値にまで戻つて来た。

2. 盲腸内細菌数に及ぼす AM の影響：AM 投与 1 カ月後の盲腸内細菌数を測定した結果は第 4 表の通りで、総生菌数は各群の間に余り差を認めないが、coli form bacteria はカゼイン群及び対照群に少く、投与

第 4 表 盲腸内菌数に及ぼす AM の影響

食餌の種類	動物数	盲腸内容物重量	盲腸内容物 pH	総生菌数 (log)	Coli form bacteria (log)
カゼイン群	4	3.2	5.8	6.5	1.0
基本飼料群	5	2.8	5.7	6.3	1.6
基本飼料 + A.M	4	7.2	6.2	6.1	3.5

群では増加を示した。盲腸重量が投与群はカゼイン群や対照群の 2 倍以上あることからみて coli form bacteria の増加は特に著しいことが推察出来る。

3. AM 投与直後の糞中排泄 B_2 量と細菌数の変化：AM 投与直後何日目位から B_2 の減少或は細菌数の変化があらわれるものかを知りたいと考

第 5 表 AM 投与直後の排泄 B_2 量と細菌数の変化

AM	日数	糞量	排泄 B_2 量 γ /日	排泄 B_2 量 γ /g	総生菌数 (log)	coli form bacteria (log)
投与前		3.8	57.7	15.0	6.4	2.2
投与後	1	2.4	46.8	19.5	7.5	3.8
"	2	4.9	30.6	6.2	6.8	3.5
"	3	5.4	37.9	7.0	6.5	3.2
"	4	3.1	25.2	8.1	—	4.8
"	5	3.5	43.3	12.3	—	—

え、成熟シロネズミを用い実験を行つた。

第 5 表によれば、糞便 B_2 量はほぼ 2～4 日目頃に減少し、細菌数は特に coli form bacteria の増加が著しかった。

4. 糞尿中排泄 B_2 量及び糞便細菌数に及ぼす AM 長期投与の影響：次に成熟シロネ

ズミに AM を投与して約 1 カ月間飼育し、糞尿中 B_2 量と糞便細菌数との変化を 5 回にわたり調べた。この場合 1 日尿、1 日糞便とし摂取量のみはその前後 2 日間の平均とした。之等の結果を第 6 表、第 7 表に示した。AM の摂取量は飼料 100g 中 4mg であるから 1 日ほぼ 0.8mg 前後摂取していることになる。

表より明かな如く、糞中排泄 B_2 量は投与後 4 日目に最低を示し、日を経るに従つて漸増しほぼ 1 カ月後には投与前の値を凌駕した。尿中 B_2 量には AM 投与による影響が余り見られなかつたが、之は摂取 B_2 量の多かつたためかも知れない。糞便細菌数についてみるに総生菌数には顕著な変動なく、coli form bacteria では

第 6 表 糞尿中排泄 B_2 量の変化に及ぼす AM 投与の影響

AM	日数	体重 g	飼料摂取量 g	摂取 B_2 量 γ /日	尿中排泄 B_2 量 γ /日	糞量 g/日	糞中排泄 B_2 量 γ /日	糞中排泄 B_2 量 γ /g
投与前	5	155	19.2	111.3	72.9	6.4	84.3	13.1
"	2		17.4	102.9	84.0	5.5	99.5	18.1
投与後	4		17.1	100.9	79.0	5.0	44.4	8.9
"	11		20.8	122.7	98.0	5.6	67.8	12.1
"	18		20.6	121.7	89.6	5.3	78.9	14.8
"	29	301	22.3	131.7	101.1	4.5	110.3	24.5

第7表 糞便細菌数に及ぼすAMの影響

AM	日数	総生菌数 (log)	Coli form bacteria (log)
投与前	2	6.5	2.6
投与後	4	7.1	3.8
"	11	7.1	3.6
"	18	6.9	3.1
"	29	7.0	3.1

投与直後における増加が認められた。

この結果は第4表、第5表のそれとほぼ一致した成績である。従つて之等一連の三つの実験からAM投与による腸内細菌の変動殊に coli form bacteria の増加を確認した。

5. AM投与動物糞便より分離した coli form bacteria の性状について：AM投与前の対照期、投与後4日、同29日の3回にわたり夫々の試験動物より新鮮便を採り出し、前述の方法に従つて E. C. 培地に45°C 48時間培養して細菌数測定したものの中より、陽性最高のもの、或は之に近いものを更に3回

E. C. 培地のみにて植えつぎを繰返したものより遠藤平板培養を行い、この中の定型的なコロニーより概ね2株宛分離し夫々の性状を検討した。

糖発酵性は分離後3月後に検したものであるが、分離菌株は一般にグリセリン、サリシンの利用が悪いようであつた。一応 Bergey に従つて菌型を調べた結果、無投与対照群では9株中 E. coli var. neapolitana 7株、E. coli 1株、E. coli var. communior 1株で投与群では14株中 E. coli var. neapolitana 6株、E. coli var. communior 5株、E. coli 2株で両群を通じて E. coli var. neapolitana が多く出現した。尙この試験により、著者の用いた 45°C 培養の E. C. 培地は E. coli のみに撰取的でなく、他の coli form bacteria をも増殖せしめることが判つた。

⁷⁾ 考察 Guggenheim 等は抗生物質投与後3～5週間後のシロネズミ糞尿中 B₂ 量を測定し、飼料中の B₂ が低濃度の時はペニシリン、オーレオマイシンにより排泄 B₂ 量の増加することを報告している。⁸⁾ 八木等はオーレオマイシンの経口投与により、犬の糞便中の B₂ 量はほぼ6日目に最低値を示し、以後低値を続けるとのべ⁹⁾ ている。高居はシロネズミでの実験でオーレオマイシン飼料 100 g 中 8 mg 含有食餌の給与により、投与後3日目に糞便 B₂ 量をもつとも減少することを認め以後漸次回復増加すると報じている。

¹⁰⁾ 一方、Johanson 等はネズミの飼育実験でオーレオマイシンはビタミン B₁₂、メチオニン低濃度の合成飼料のときには発育促進効果があつたが、普通食餌（完全食）のときは効果がなかつた。オーレオマイシン添加の場合、糞便中の Lactobacilli は減少し、Enterococci は増加した。またデキストリン含有食餌の際にはオーレオマイシンは coli form bacteria を増加せしめたが、蔗糖含有食餌では coli form bacteria を変動せしめなかつたという。

¹¹⁾ Guzman-Garcia 等はペニシリンは蔗糖食餌で coli form bacteria を増大せしめることを報告している。¹²⁾ また Anderson 等はペニシリン、¹³⁾ March, Bieleley 等はオーレオマイシンがヒナで coli form bacteria を増加させ、Lactobacilli を減少せしめることを報告している。

著者の実験成績によれば、糞 B₂ 量は投与直後に減少し、以後は日を経るに従つて漸次増加してゆくこと、尿中 B₂ 量には投与による変動の少いこと。糞便 coli form bacteria は投与直後に増加し、以後余り変動のないことを認めた。

尿中 B₂ 量に変動の見られなかつたのは、飼料中の B₂ 量の豊富なためかも知れない。

このようにオーレオマイシン投与直後の糞便 B₂ 量の変化と coli form bacteria の変化とが一致せず、シロネズミにおける coli form bacteria の腸内 B₂ 合成に対する役割について従来の推論と矛盾する結果¹⁴⁾ を得た。一方、林は腸内細菌に関する著書の中で次のように述べている。即ち、サルファ剤経口投与の際出現

第 8 表 Coli form bacteria の生物学的性状

Group	Isolated strain	Endo plate	Morphology	Gram strain	Spore formation	Motility	IMVIC system				Fermentation							Bacteria type
							Indol production	Methyl red test	Voges-Proskauer test	Citrate utilization	Lactose	Sucrose	Mannite	Dulcitate	Adonite	Glycerin	Salicin	
A M 無 投 与 群	No. 2, C-1	Red Rod	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	A ¹ g ⁴	A ² G ³	E. coli var. neapolitana	
	No. 3, C-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	A ¹ g ⁴	a ¹ G ³	"	
	No. 3, C-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	A ¹ g ³	A ¹ G ³	"	
	No. 5, C-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	A ⁴ G ⁴	A ² G ³	"	
	No. 5, C-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	A ¹ g ³	a ¹ g ³	"	
	No. 80, C-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	—	AG	A ² g ²	—	A ⁴ g ⁴	A ² G ²	E. coli	
	No. 80, C-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	A ² G ²	—	A ⁴ G ³	A ² G ²	E. coli var. neapolitana	
	No. 81, C-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	A ² g ²	—	A ⁴ g ⁴	A ² G ²	"	
No. 81, C-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	A ² G ²	—	A ⁴ G ³	—	E. coli var. communior		
A M 投 与 群	No. 2, 4D-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	a ⁴ g ¹	a ³ g ³	E. coli var. neapolitana	
	No. 2, 4D-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	a ⁴ g ³	A ² g ¹	"	
	No. 2, 29D-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	a ¹ g ⁴	A ² G ³	"	
	No. 2, 29D-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	A ² G ²	—	a ¹ g ³	—	E. coli var. communior	
	No. 3, 4D-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	a ⁴ G ⁴	—	"	
	No. 3, 4D-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	a ⁴ g ³	A ⁴ G ³	E. coli var. neapolitana	
	No. 3, 29D-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	a ² G ²	—	a ¹ g ¹	A ³ G ⁴	"	
	No. 5, 4D-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	—	AG	—	—	AG	—	E. coli var. acidi lactici	
	No. 5, 29D-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	—	AG	a ² G ²	—	A ⁴ G ⁴	A ³ G ³	E. coli	
	No. 5, 29D-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	—	AG	A ² G ²	—	A ² G ²	A ² G ³	"	
	No. 6, 4D-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	A ² G ²	—	A ⁴ G ⁴	—	E. coli var. communior	
	No. 6, 4D-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	A ² G ²	—	A ⁴ g ³	—	"	
	No. 7, 29D-1	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	A ² G ²	—	A ⁴ G ⁴	A ⁴ G ³	E. coli var. neapolitana	
	No. 7, 29D-2	" "	—	—	—	+	+	+	—	AG	AG	AG	A ² G ²	—	A ⁴ g ³	—	E. coli var. communior	

注：4D, 29D—AM投与後の日数

A—acid; G—gas; 右肩の小数字は日数を示す

するビタミン欠乏症は薬剤投与で腸内のビタミン合成者の大腸菌の減少, ビタミン消費者 Lactobacilli

(Tittsler)らの余り減少しないことで、一応説明がついたとのべ、更に抗生剤の場合は上述のように腸内菌叢の変化はサルファ剤の経口投与の場合と逆の現象、すなわち *Lactobacilli* の減少、大腸菌の増加が常に認められる訳ではないというのである。

しかし乍ら、従来の成績は抗生物質投与の際のビタミン含量にしても、細菌数にしても夫々別個に測定されたものが多く、いずれも推論の域を出ず、且つその多くは長期間飼育した後のものについての測定が大部分であり、投与直後からの両者を測定したものは余り見当らない。この観点からすれば、著者の実験はより一層実証に近づいた訳であるが、糞便 B₂ 量は吸収、破壊、消費をまぬかれたものであり、糞便 *coli form bacteria* にしても腸内における細菌数そのものではないので、この点からすれば致命的な欠陥を持っている。殊にシロネズミ腸内におけるビタミン合成は主として盲腸内において行われるもので、糞便を対象とせずに盲腸内B₂量と細菌数を対象とすべきである。更にオーレオマイシンは生体内において B₂ のエステル化を抑制するとの報告もあり、オーレオマイシンのある濃度では細菌の増殖には適するが、B₂合成には抑制的に働くのではないかと考えられる。又耐性菌の B₂ 合成能を調べる必要もあろう。いずれにせよ、今回の実験はもつとも単純な考えにもとづいて行つたものであり、糞便そのものは複雑な要因が多いので尙多くの研究を必要とする。

要約 シロネズミに飼料 100g 中 4mg のAMを投与し、糞尿中排泄 B₂ 量及び細菌数を測定した。

- 1) AM投与により投与後4日目に排泄 B₂ 量は最低値を示し、以後漸次回復増加し約1ヵ月後には投与前の値を凌駕した。
- 2) B₂ を含有する飼料の場合、尿中排泄 B₂ 量にはAM投与による変化は見られなかった。
- 3) *coli form bacteria* は投与直後4日目に増加し、以後は大きな変動が認められなかった。
- 4) 分離した *coli form bacteria* の生物学的性状を検した。
- 5) AM投与直後の糞便 B₂ 量と *coli form bacteria* の挙動より *coli form bacteria* のシロネズミ腸内における B₂ 合成に対する役割についての疑問を解決し得なかった。

文 献

- 1) 印南：栄養学雑誌, 16, 1, 21 (1958).
- 2) 飯沼：ビタミン, 5, 96 (1952).
- 3) 安田：ビタミン, 6, 13 (1953).
- 4) 加藤・井上：栄養研究所報告, 7, 1 (昭9)
- 5) 八木：ビタミン, 6, 528 (1953).
- 6) Evenson, A., McCoy, E., Geyer, B. R., Elvehjem, C. A. : J. Bact., 51, 513 (1946).
- 7) Guggenheim, K., Halevy, S., Hartmann, I, and R. Zamir : J. Nutr. 50, 245 (1953).
- 8) 青山・岸川・八木外7名：日本医事新報, 1606, 24 (1955).
- 9) 高居：栄養学雑誌, 15, 3, 115 (1957).
- 10) Johansson, K. R., Peterson, G. E., Dick, E. C. : J. Nutr., 49, 171 (1953).
- 11) Guzman-Garcia, J., Sarles, W. B., Baumann, C. A. : J. Nutr., 49, 647 (1953).
- 12) Anderson, G. W., Cunningham, J. D., Slinger, S. J. : J. Nutr., 47, 175 (1952).
- 13) March, B., Biely, J. : J. Poultry Science, 31, 177 (1952).
- 14) 林：栄養学ハンドブック, 腸内細菌より, 251 (1958).

(受付：昭和34年8月11日)