熊胆など数種の動物胆および各種胆汁酸の腸管系細菌の発育におよぼす影響

宇 治 昭

樋屋製薬株式会社¹⁾

Effect of Some Animal Galls such as Bear Gall and Various
Bile Acids on Growth of the Intestinal Bacteria

AKIRA UJI

Hiya Pharmaceutical Co., Ltd.¹⁾

(Received October 26, 1974)

Effect of bear, ox, pig, and wild boar galls, in which bile acid components had been analyzed quantitatively, and various bile acids on growth of intestinal bacteria was investigated.

1) Free deoxycholic, chenodeoxycholic, and ursodeoxycholic acids showed strong antibacterial activities, whereas the antibacterial activities of their conjugated acids decreased distinctively.

2) Chenodeoxycholic acid has antibacterial potency as strong as that of deoxycholic acid on anaerobic *Clostridium butyricum* and *Bacteroides fragilis*.

3) *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* were not inhibited in the medium containing 1% (w/v) of any of the bile acids and animal galls tested.

4) *Streptococcus faecalis* was affected by free deoxycholic and chenodeoxycholic acids and a certain sample of bear gall. Growth of *Bacteroides fragilis* was inhibited by every free bile acid tested, and that of *Clostridium butyricum* was inhibited by all the free bile acids except cholic acid.

5) The results obtained from the tests of ox and pig gall suggest that these galls contain a component responsible for overcoming the antibacterial activities of bile acids on anaerobic bacteria.

著者は先に、熊胆および2・3の動物胆の胆汁酸組成を、ガスクロマトグラフィーおよび水素炎イオン化検出器付薄層自動検出装置を用いて、定量的に比較検討し、熊胆は3種類のグループに分類されること、各グループおよび豚胆、牛胆、猪胆は、それぞれ特長的な胆汁酸組成をもち、タウリンおよびグリシン抱合型の含有比においても、それぞれ特異なパターンを示すことを報告した。²⁾ これら動物胆を構成する胆汁酸のうち、熊胆および豚胆の特異成分である ursodeoxycholic acid (UDCA)

および hyodeoxycholic acid 以外、すなわち cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), および deoxycholic acid (DCA) はヒトを含む哺乳動物の胆汁中に、もっとも普遍的に存在する胆汁酸であり、これら胆汁酸の生理的意義、ことに腸内細菌叢との関連性は興味ある問題である。胆汁および胆汁酸の各種細菌の発育におよぼす影響については、微生物による胆汁酸代謝の問題、菌種の同定さらに赤痢菌などの病原性の発現、などの諸問題との関連からすでに多くの報告^{3,4)} がみられ

1) Location: 1-5 Temmabashi-suji, Kita-ku, Osaka (大阪市北区天満橋筋1-5)。

2) 宇治 昭, 生薬, **29** (1975), 掲載予定。

3) T. D. Mahony, et al., *Nucl. Sci. Abst.*, **21**, No. 14772 (1967); T. Midtvedt, A. Norman, *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, **71**, 629 (1967); 山田保雄, 日細菌, **23**, 13 (1968); 佐々木正吾, 日細菌, **25**, 79 (1970); 佐々木正吾, “腸管と感染” 朝倉書店, 東京, 1971, pp. 38-71.

4) a) K. Shimada, V. L. Sutter, S. M. Finegold, *Appl. Microbiol.*, **20**, 737 (1970); b) F. H. Martin, G. William, E. Sylvia, S. M. Howard, *Gastroenterology*, **61**, 228 (1971) [C. A., **75**, 95780 q (1971)].

るが、これらの報告は使用した胆汁の胆汁酸組成の明らかなものは少なく、胆汁酸についても CA および DCA がおもなものである。今回著者は組成の明らかとなった各グループの熊胆、豚胆、牛胆、猪胆ならびにそれらを構成している各種遊離および抱合胆汁酸について、腸管細菌の発育におよぼす影響を検討したので報告する。

実験の部

実験材料

各種動物胆 熊胆の各グループの代表的な胆汁酸組成をもったもの1検体ずつ(No. 1—3 と称す)、豚胆、猪胆各1検体および牛胆3検体を用いた。豚胆、牛胆はデシケーター(五酸化リン)で24時間以上乾燥し、粉末としたものを用いた。それぞれの胆汁酸組成は Table I のとおりである。

遊離および抱合胆汁酸 CA は和光純薬製を70% EtOH で2回再結晶したもの(mp 202—205°), DCA は Difco Lab. 製を EtOH で2回再結晶したもの(mp 175—179°), CDCA は CA から Fieser らの方法⁵⁾により合成し, EtOAc・ether・石油エーテル混液で再結晶したもの(mp 138—140°, 文献値⁵⁾ 139—141°), UDCA は東京化成製を50% EtOH より再結晶したもの(mp 204—206°)を用いた。

Sodium taurodeoxycholate (TDC) (mp 183—190°), glycodeoxycholic acid (GDC)(mp 210—215°) は Sigma Chem. 製を用いた。Sodium taurocholate (TC) (mp 221—227°), sodium taurochenodeoxycholate (TCDC)

(183—190°), tauroursodeoxycholic acid (TUDC) (mp 188—197°), glycocholic acid (GC) (mp 198—200°), glyoursodeoxycholic acid (GUDC) (mp 202—211°) は Norman ら⁶⁾の方法により合成した。

菌株 *Salmonella enteritidis* No. 11 株, *Escherichia coli* COM 株, *Streptococcus faecalis* BIO 株, *Clostridium butyricum* MB 株および *Bacteroides fragilis* 2271 (Werner) 株を用いた。また, *S. enteritidis*, *E. coli* は普通ブイヨンに, *S. faecalis* は2%乳糖ブイヨンに, 嫌気性菌はチオグリコレート培地に18時間培養して用いた。

培地 Thioglycolate medium w/o indicator「BBL」(以下 TGC) および GAM 半流動高層培地「ニッサン」(以下 GAM) を用いた。TGC は 1.3×10.5cm の試験管に 6.3ml を, GAM は 1.0×9.0cm の試験管に 4.5ml を分注した。

抗菌試験

各種の動物胆および胆汁酸を, 1N NaOH 液および減菌蒸留水を用いて10% (w/v) 溶液(No. 2 および3の牛胆のみ20%(w/v)溶液)とし, 以下蒸留水により2倍階段希釈系列液をつくり, それぞれ TGC および GAM に1/9量ずつを加え, 10ポンド10分または 100°において間欠減菌を施した。なお, 一部のものについては培地を減菌後, 各濃度の溶液を無菌的に加えた。各菌液の接種は, TGC には 0.05ml を, GAM には白金線を用いて接種し, 37°で培養した。判定は24時間培養後, 胆汁酸

TABLE I. Bile Acid Components of Galls

Gall	Amount (%) of bile acid in gall								
	CA	DCA	GC	GDC	GCDC	TC	TDC	TCDC	TUDC
Bear No. 1	—	—	—	—	—	trace	—	4.7	84.6
Bear No. 2	1.2	0.8	8.0	6.6	trace	+	3.4	trace	—
Bear No. 3	trace	—	—	—	—	69.8	trace	5.0	trace
Ox No. 1	2.2	2.0	10.4	7.0	3.6	13.3	7.0	3.6	—
Ox No. 2	trace	trace	12.2	8.3	2.8	14.8	8.5	2.9	—
Ox No. 3	trace	trace	11.0	7.3	3.4	12.6	7.2	3.4	—
Pig ^{a)}	—	—	trace	8.5	11.0	—	trace	trace	—
Wild boar	trace	—	4.7	trace	trace	8.3	6.0	trace	—

Each value was determined by means of gas chromatography and TLC-autodetector.

a) Pig gall contains about 17 per cent of glycohyodeoxycholic acid as the characteristic component, additionally. Mark + indicates an amount under 3 per cent of the acid expected from the chromatogram.

Abbreviation: CA: cholic acid, DCA: deoxycholic acid, GC: glycocholic acid, GDC: glycodeoxycholic acid, GCDC: glycochenodeoxycholic acid, TC: taurocholic acid, TDC: taurodeoxycholic acid, TCDC: taurochenodeoxycholic acid, TUDC: tauroursodeoxycholic acid.

5) L. Fieser, S. Rajagopalan, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5530 (1950).

6) S. Bergström, A. Norman, *Acta Chem. Scand.*, **7**, 1126 (1953); A. Norman, *Arkiv för Kemi*, **8**, 331 (1955).

無含有培地（対照）と同程度の発育を示した各胆汁酸および動物胆の最高濃度（培地中の w/v %）をもって、それぞれの最高発育許容濃度とした。

結 果

各種胆汁酸の腸管系細菌の発育におよぼす影響

各胆汁酸の *S. enteritidis*, *E. coli*, *S. faecalis*, *C. butyricum* および *B. fragilis* に対する最高発育許容濃度を Table II に示した。

一般に、各胆汁酸は 1 % (w/v) において、*S. enteritidis* にはまったく抗菌性（発育抑制）を示さず、嫌気性菌（*C. butyricum* および *B. fragilis*）に対して抗菌性が認められた。その中で、CDCA, DCA が特に強い抗菌力を有し、UDCA, GDC, TDC がこれらに次ぐものと考えられる。また、TUDC, GC には、いずれの菌に対しても、ほとんど抗菌作用が認められなかった。さらに、抱合酸に比して遊離酸が強い抗菌力を示すことが明らかとなった。抱合酸について、タウリンおよびグリシン抱合型による差は特に認められなかった。

一方、菌種間の感受性（各胆汁酸による発育抑制）の差をみると、*S. enteritidis* はほとんどすべての胆汁酸によって、まったく発育は抑制されず、対照培地に比してむしろ増殖が促進されていることが認められた。これ

に比して、同じく腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) に属する *E. coli* も、ほとんどすべての胆汁酸に対して、1 % (w/v) 濃度においても感受性が認められなかったが、増殖は助長されることなく、*S. enteritidis* と態度を異にしている。*S. faecalis* は、使用した胆汁酸のうち、DCA, CDCA に対して比較的強い感受性が認められた。嫌気性菌 *C. butyricum* および *B. fragilis* は共に、上記の 3 菌種に比して感受性が大であることが認められたが、CA, GDC に対して *B. fragilis* が比較的強い感受性を示したことを除いて、各胆汁酸に対する感受性について、両菌種間に差はほとんど認められなかった。

また、使用培地による抗菌力の差は、一部のもの、すなわち UDCA, TDC, GUDC において、*E. coli* または *C. butyricum* の値に大幅な差が認められた。

各種動物胆の腸管系細菌の発育におよぼす影響

各種動物胆の腸管系細菌に対する最高発育許容濃度を Table III に示した。

各動物胆が、*S. enteritidis* に対し、1 % (w/v) の濃度において、まったく抗菌性を示さなかったことは、胆汁酸の場合と同様であるが、*E. coli* にも、すべての動物胆がまったく抗菌性を示さなかった。No. 2 の熊胆および猪胆が、嫌気性菌 *C. butyricum* および *B. fragilis*

TABLE II. Antibacterial Activities^{a)} of Bile Acids

Bile acid	Medium	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
CA	{TGC	>1.0	≥1.0	≥1.0	≥1.0	0.125
	{GAM	>1.0	≥1.0	≥1.0	≥1.0	0.125
DCA	{TGC	>1.0	≥1.0	0.25	0.03	0.015
	{GAM	>1.0	≥1.0	0.06	0.015	0.03
CDCA	{TGC	>1.0	≥1.0	0.06>	0.015	0.015
	{GAM	>1.0	≥1.0	0.06	0.06	0.06
UDCA	{TGC	>1.0	0.125	≥1.0	0.06	0.06
	{GAM	>1.0	≥1.0	≥1.0	0.06	0.125
GC	{TGC	>1.0	≥1.0	≥1.0	0.5	≥1.0
	{GAM	>1.0	≥1.0	≥1.0	≥1.0	0.5
GDC	{TGC	>1.0	≥1.0	≥1.0	0.25>	0.06
	{GAM	>1.0	≥1.0	≥1.0	0.5	0.125
GUDC	{TGC	≥1.0	≥1.0	≥1.0	0.06	≥1.0
	{GAM	≥1.0	≥1.0	≥1.0	≥1.0	1.0>
TC	{TGC	>1.0	≥1.0	≥1.0	≥1.0	0.5>
	{GAM	>1.0	≥1.0	0.5	0.5	0.5
TDC	{TGC	>1.0	N. D. ^{b)}	≥1.0	≥1.0	0.06
	{GAM	>1.0	N. D.	≥1.0	0.125	0.125
TCDC	{TGC	>1.0	≥1.0	≥1.0	1.0>	≥1.0
	{GAM	>1.0	≥1.0	0.5	≥1.0	0.5>
TUDC	{TGC	>1.0	≥1.0	≥1.0	0.5	0.5—1.0
	{GAM	>1.0	≥1.0	≥1.0	≥1.0	≥1.0

a) Maximum concentration (%) of the bile acid in the medium which allows the bacterial growth.

b) N. D.: not done

Abbreviation: CDCA: chenodeoxycholic acid, UDCA: ursodeoxycholic acid, GUDC: glyoursodeoxycholic acid, CA, DCA, GC, GDC, TC, TDC, TCDC, TUDC: See Table I.

TABLE III. Antibacterial Activities^{a)} of Animal Galls

Gall	Medium	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
Bear No. 1	{TGC {GAM	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0
Bear No. 2	{TGC {GAM	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	0.25 0.5	0.015 0.015	0.125 0.25
Bear No. 3	{TGC {GAM	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0
Ox No. 1	{TGC {GAM	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0
Ox No. 2	{TGC {GAM	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 2.0 ≥ 2.0	≥ 2.0 ≥ 2.0	≥ 2.0 ≥ 2.0
Ox No. 3	{TGC {GAM	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 2.0 ≥ 2.0	≥ 2.0 ≥ 2.0	≥ 2.0 ≥ 2.0
Pig	{TGC {GAM	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	0.125 0.125	≥ 1.0 ≥ 1.0
Wild boar	{TGC {GAM	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	≥ 1.0 ≥ 1.0	0.06 0.125	0.125 0.125

a) Maximum concentration (%) of the gall in the medium which allows the bacterial growth.

に対し、比較的強い抗菌力を示したが、そのうち No. 2 の熊胆が *C. butyricum* に対し、もっとも低い濃度の発育許容濃度 ($\leq 0.015\%$ w/v) を示した。豚胆は、*S. faecalis* および *B. fragilis* に対し 1% (w/v) 濃度においても、抗菌力が認められず、*C. butyricum* に対してのみ抗菌力が認められた。これらのことから、2種の嫌気性菌に対する抗菌力の強さは、ほぼ No. 2 の熊胆、猪胆、豚胆の順であると考えられる。*S. faecalis* に対しては、使用した動物胆のうち、No. 2 の熊胆のみが抗菌力を示し、他の動物胆は 1% (w/v) 濃度 (No. 2, 3 の牛胆は 2% w/v) においても、抗菌力を認めなかった。No. 1, 3 の熊胆、牛胆には、すべての菌に対して試験した濃度において、まったく抗菌力が認められなかった。また、胆汁酸の標品の一部にみられたような培地による差はほとんど認められなかった。

考 察

Salmonella に対して胆汁および DCA が増殖を抑制しないことは、古くから認められており、⁷⁾ Hajna のテトラチオネート培地などの *Salmonella* 増殖培地や、SSカンテン培地のような *Salmonella* 分離培地の組成に、ながく利用されている。今回の実験で *S. enteritidis* は DCA のみならず、使用したすべての胆汁酸および動物胆の 1% (w/v) 含有培地において、まったく発育抑制を受けないことが明らかとなった。腸球菌 (*S. faecalis*) が胆汁に対し感受性を示さないことは、各種レンサ球菌中の D 群 レンサ球菌または腸球菌群の特長とされてい

る。⁷⁾ この点についても、著者の実験結果とはほぼ一致するが、特に今回 DCA, CDCA および No. 2 の熊胆に対しては、明らかに感受性を示すことが認められ、重要な知見と考えられる。また、*B. fragilis* が DCA に感受性を示すことは、Shimada ら、^{4a)} Martin ら^{4b)} によっても報告されているが、DCA 以外の遊離胆汁酸や DCA の抱合酸に対しても感受性を示すことが明らかとなった。さらに、同じ嫌気性菌の *C. butyricum* も、CDCA, DCA, UDCA および GDC に感受性を示すことが判明した。

各種胆汁酸の抗菌力については、従来 DCA がもっとも著明な作用を示すといわれてきたが、⁷⁾ 著者の成績では CDCA にも同程度の強い抗菌力が認められ、また、一般に抱合酸の抗菌力が弱いことを明らかにすることができた。

抗菌性を有する物質の抗菌力を測定する場合、その値が使用した培地によって大きく変動することは、しばしば指摘されている。今回の実験においては、TGC および GAM の 2 培地を使用したのが、一部のもの (UDCA, TDC, GUDC) に培地による差が認められ、考慮すべき問題点であると考えられる。

一方、各種動物胆の腸管系細菌に対する発育許容濃度の比較においても、嫌気性菌 (*C. butyricum*, *B. fragilis*) が比較的強い感受性を示す傾向をもっていることが、判明したが、腸球菌が No. 2 の熊胆に感受性を示したことは、興味深い知見である。

7) G. S. Wilson, A. A. Miles (eds.), "Principle of Bacteriology and Immunity," 5th ed., Edward Arnold Ltd., London, 1966, p. 700, 727, 871.

No. 2 の熊胆は嫌気性菌にも抗菌力が認められ、使用した動物胆中もっとも強い抗菌力を有するものと考えられるが、このものは Table I に示したように、DCA の遊離および抱合酸などを含む複雑な胆汁酸組成をもっている。No. 1 および 3 の熊胆は、1% (w/v) 濃度において抗菌性がまったく認められなかったが、これらは TUDC または TC を主成分とし、遊離胆汁酸をほとんど含有しない。従って、これらの熊胆全体としての抗菌力の強さと、その胆汁酸組成および先の胆汁酸の標品の実験結果を総合して考察すると、熊胆の抗菌作用は含有胆汁酸を主要因子として、効力を発現していると推察し得る。同様に、2 種の嫌気性菌が感受性を示した猪胆の抗菌作用についても、含有胆汁酸が主要因子になっていると考えられる。

Shimada ら⁴⁰⁾は、*B. fragilis* が牛胆にほとんど感受性を示さず、さらに発育抑制量の DCA を牛胆に添加しても感受性を示さないことを報告し、牛胆中に胆汁酸の抗菌作用を打ち消す何らかの物質が存在することを示唆している。著者が今回の実験に使用した牛胆は Table I に示したように、DCA の遊離および抱合酸を含む複雑な胆汁酸組成をもち、No. 2 の熊胆と同様の *B. fragilis* に対する抗菌力が予測されたが、3 検体共 1 または 2%

(w/v) 濃度においても、まったく抗菌性が認められず、Shimada らの結論を支持する結果となった。また、牛胆は *C. butyricum* に対しても抗菌性を示さず、さらに豚胆も *B. fragilis* に抗菌性を示さなかったことは、これら動物胆中に *B. fragilis* または *C. butyricum* の発育に関して、胆汁酸の作用に拮抗する物質の存在を示唆しているものと考えられる。

以上の結果、それぞれの腸管系細菌は、各胆汁酸および動物胆に対する感受性に大幅な差があり、また、各胆汁酸および動物胆の *S. faecalis*, *C. butyricum* および *B. fragilis* に対する抗菌作用にも大差があることが明らかとなった。本研究に使用した胆汁酸の大部分は、ヒトの胆汁にも含まれるものであり、また動物胆は臓器薬物として用いられるもので、これらの腸管系細菌に対する抗菌性は、腸管内細菌叢を構成する菌種とその比率をコントロールする因子として、微生物による胆汁代謝の問題とも関連して、重要な生理的意義をもつものと考えられる。

謝辞 本研究に際し、実験材料をご恵与いただき、実験の 1 部にご協力いただきました大阪府池田市目黒研究所の皆様に感謝いたします。