市販固形飼料摂取によるカニクイザル 腸内フローラの加齢による変化

片山 純 男*, 三橋 重 之**, 大江 道 夫**

* 雪印乳業微生物科学研究所

** 同技術研究所

Changes in the Intestinal Microflora of *Macaca fascicularis* Fed Commercial Pellet with Aging

Sumio KATAYAMA,* Shigeyuki MITSUHASHI** and Michio OHUE**

*Research Institute of Life Science, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Shimotsuga-gun,
Tochigi, 329-05

**Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Shimotsuga-gun,
Tochigi, 329-05

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.) 39, 175~179 (1986)

Intestinal microflora of *Macaca fascicularis* fed with commercial pellets was studied. The monkeys were grown and bred in a controlled condition followed by being divided into five groups according to their age.

Total counts of microbes were around 10^{10} /g-feces in four groups ranging from group A (0.5-1 year old), group B (2-3 years old), group C (4-5 years old) to group D (6 years old). However, a slight decrease in the counts ($10^{9.7}$ /g-feces) was observed in group E (over 10 years old).

In general, Enterobacteriaceae, *Streptococcus*, *Eubacterium* and Bacteroidaceae were always predominant in all groups. In group A, major microbes were Bacteroidaceae, *Eubacterium* and *Bifidobacterium* which constituted almost 90% of total counts. In group B, *Streptococcus* was the most predominant species along with *Eubacterium* and Bacteroidaceae. Constitution of microflora in group C was almost the same as group B except for an increase in *Streptococcus*. In group D, *Eubacterium* and Bacteroidaceae increased again, with a decrease of *Streptococcus*, so that this group was different from group B or C. Group E was unique in which *Streptococcus* and *Megasphaera* were the least as compared with other groups, and *Eubacterium* and Bacteroidaceae remained predominant.

In view of the changes in the intestinal microflora, the monkeys are classified into four groups, namely 0.5-1 year old, 2-5 years old, 6 years old and over 10 years old of age groups.

It was concluded that *Macaca fascicularis* was a comparable animal to human in the nutritional and metabolic studies.

(Received October 9, 1985)

カニクイザル (*Macaca fascicularis*) は栄養代謝実験に用いられる実験動物の中でも、霊長類であることからヒトに近似した代謝系を有していると考えられ、近年各所で飼育されるようになった。カニクイザルは日本においてはそのほとんどが海外からの輸入動物であるため、その生物学的特性、とくに年齢、微生物汚染の状態や原疾患の有無など不明な点が多い。

われわれは海外から輸入したカニクイザルを一定環境

下で飼育ならびに自家繁殖をくり返し継代した結果、安定した生物学的特性をもつ動物を保持することに成功した。その結果、各種の栄養代謝試験において再現性のあるデータを収集することが可能となった。

今回、われわれは、平常飼育時におけるカニクイザルの生物学的特性の一つとして、腸内フローラに着目し、年齢変化による腸内フローラの変動をしらべ、基礎的知見を得ることを目的として以下の実験を行なった。

実験方法

1) カニクイザル 1967 年マレーシアから輸入した推定年齢 4～5 歳の雌雄 1 対を自家交配させ、以後継代、繁殖をくり返した。本実験ではこれらの動物の中から健康なものを 0.5～1 歳 (A 群), 2～3 歳 (B 群), 4～5 歳 (C 群), 6 歳 (D 群) および 10 歳以上 (E 群) の 5 群別に各群 3～4 頭を選別し実験に供した。用いたカニクイザルの生年月日, 体重, 性別を Table 1 に示した。飼育は室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 相対湿度 $60 \pm 2\%$, 照明時間 14 時間 (午前 6 時～午後 8 時) の条件下で実施した。

2) 飼料 サル用として市販されている固形飼料 (船橋農場, M-1) を用い, 自由摂食させた。飲料水は水道水を自由摂取させた。用いた飼料の一般分析値を Table 2 に示した。

3) 採便 7 日間隔で 2～3 回採便した。採便に際しては毎朝の清掃後に排出された新鮮便を無菌的に採取した。

4) フローラ分析 採取した便はただちに冷蔵し, 光岡¹⁾の方法により当日中に培養し解析した。

Table 1. Characteristics of experimental animals.

Group	No.	Date of birth	Sex	Weight (kg)
A	55	'83. 2. 9	F	1.40
	56	'83. 3. 13	M	1.68
	57	'83. 9. 14	M	1.18
	58	'83. 9. 27	M	1.03
B	49	'81. 7. 13	F	2.40
	50	'81. 7. 29	M	2.80
	51	'81. 11. 4	M	2.07
	52	'81. 12. 29	M	2.90
C	43	'79. 6. 26	M	5.80
	44	'80. 6. 25	F	4.60
	46	'80. 9. 15	F	3.80
D	32	'78. 1. 3	M	6.80
	34	'78. 5. 26	M	5.50
	40	'78. 8. 14	F	3.50
	41	'78. 9. 22	M	4.60
E	5	'76. 4. 23	M	7.45
	9	'76. 3. 23	M	6.05
	11	'76. 3. 23	F	4.00
	12	'76. 3. 23	F	3.30

A, 0-1 year old; B, 2-3 years old; C, 4-5 years old; D, 6 years old; E, over 10 years old.

Data are based on April 1st, 1984.

F and M denote female and male, respectively.

結果および考察

Table 3 に各群の糞便を培養して得られた腸内フローラについて, 菌種および菌数を示した。なお, 菌数については糞便 1 g あたりの菌数の対数で示した。() 内の数値は検出率である。Fig. 1 には各群のフローラの構成比率を示した。Table 3 および Fig. 1 からわかるように, E 群を除いて各群とも総菌数には大差がみられず, 対数変換値で糞便 1 g あたり $10.01 \sim 10.40$ であった。E 群では 9.71 とやや減少した。

カニクイザルの腸内フローラは年齢別に特徴ある構成を示している。すなわち, 各群ともに共通して多くみられるのは, Bacteroidaceae と *Eubacterium* であった。

Table 2. Composition of pellet for experimental animals.*1

Ingredients	Unit	Content
Moisture	g	6.00
Crude protein	g	28.24
Crude fat	g	5.31
Crude ash	g	6.02
Crude fiber	g	2.15
Soluble NIFEX*2	g	52.98
Energy	kcal	372.7
Vitamin A	IU	4,000
Vitamin D	IU	—
Vitamin D ₃	mg	800
Vitamin E	mg	28
Vitamin K ₃	mg	—
Vitamin K ₄	mg	1
Vitamin B ₁	mg	3
Vitamin B ₂	mg	3
Vitamin B ₆	mg	1
Vitamin B ₁₂	mg	0.005
Vitamin C	mg	300
Niacin	mg	10
Pantothenate	mg	10
Choline	mg	150
Folic acid	mg	0.2
Inositol	mg	80
Biotin	mg	0.03
PABA*3	mg	7.5

per 100 g.

*1 Quoted from Tajima.²⁾

*2 Nitrogen free extract.

*3 *p*-Amino benzoic acid.

Table 3. Fecal microflora of *Macaca fascicularis* in each group.

Microflora	Group				
	A	B	C	D	E
Enterobacteriaceae	7.48±0.75 (100)	5.77±2.07 (100)	5.61±1.52 (100)	5.85±1.72 (100)	7.16±0.95 (100)
<i>Streptococcus</i>	6.89±0.99 (100)	9.55±0.79 (100)	9.94±0.32 (100)	9.18±0.48 (100)	7.75±1.30 (100) *
<i>Staphylococcus</i>	4.60±1.75 (100)	4.68±1.19 (100)	4.15±0.89 (100)	3.73±0.66 (100)	3.60±1.59 (87.5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.41±1.67 (83.3)	0.33±0.92 (12.5)	0.86±1.35 (33.3)	1.88±2.20 (50.0)	0.66±1.24 (25.0)
<i>Bacillus</i>	1.37±3.22 (16.7)	0	0	0	0.51±1.44 (12.5)
Yeasts	3.74±1.31 (91.7)	0.29±0.81 (12.5)	0.87±1.36 (33.3)	0.56±1.28 (25.0)	0
<i>Lactobacillus</i>	6.83±1.73 (100)	8.44±0.86 (100)	8.52±1.17 (100)	7.40±2.34 (100)	5.76±3.28 (87.5)
<i>Bifidobacterium</i>	7.77±2.77 (91.7)	7.13±2.95 (87.5)	8.90±0.73 (100)	7.33±3.09 (87.5)	6.08±3.85 (75.0)
<i>Eubacterium</i>	9.73±0.33 (100)	9.50±0.45 (100)	9.62±0.27 (100)	9.43±0.35 (100)	9.12±0.79 (100)
<i>Veillonella</i>	0	0	0	1.04±2.94 (12.5)	0
<i>Megasphaera</i>	0.51±1.81 (8.3)	3.83±4.12 (50.0)	6.87±3.47 (83.3)	7.82±0.94 (100)	3.76±4.08 (50.0) *
Bacteroidaceae	9.89±0.38 (100)	9.23±0.40 (100)	9.55±0.39 (100)	9.35±0.68 (100)	9.19±0.31 (100)
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	0.55±1.54 (12.5)	0.88±1.62 (26.0)
<i>Clostridium</i> -other	2.97±4.39 (33.3)	3.37±4.68 (37.5)	1.66±4.05 (16.7)	2.21±4.09 (25.0)	0.92±2.61 (12.5)
Peptococcaceae	3.57±4.47 (41.7)	7.02±2.91 (87.5)	7.15±3.52 (83.3)	5.08±4.31 (62.5)	7.76±0.93 (100)
Curved rods	1.83±3.41 (25.0)	0	0	0.79±2.23 (12.5)	0
Spirillaceae	0.72±2.48 (8.3)	1.04±2.93 (12.5)	1.58±3.87 (16.7)	0	0
Total counts	10.26±0.24	10.14±0.48	10.40±0.23	10.01±0.40	9.71±0.46

A, 0-1 year old; B, 2-3 years old; C, 4-5 years old; D, 6 years old; E, over 10 years old.

Values are log (Numbers/g) ±S.D.

Values in parentheses are frequency of occurrence (%).

* denotes significant difference from group D ($p<0.05$).

Fig. 1. Constitution of fecal microflora in each age group.

A, 0-1 year old; B, 2-3 years old; C, 4-5 years old; D, 6 years old; E, over 10 years old.

Bifidobacterium は A~D 群で上位を占めているが、E 群では減少した。*Megasphaera* は A 群ではきわめてわずかであったが、B~D 群では加齢とともに増加し、E 群で再び減少した。Enterobacteriaceae は A 群および E 群でかなり多くみられるが、B~D 群では必ずしも多くはなかった。これとは逆に、*Streptococcus* は A, E 両群では B~D 群よりも少ない傾向がみられた。また、*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* および Yeasts は A 群以外ではまったくみられないか、きわめてわずかであった。*Streptococcus* と *Staphylococcus* は年齢の推移とはほとんど無関係に、ほぼ同数存在していた。

これらの結果から明らかなように、カニクイザルの腸内フローラは年齢群別に特徴がみられる。すなわち、A 群は Bacteroidaceae, *Eubacterium* および *Bifidobacterium* の 3 種が主たるフローラで、全菌数の 89.1% を占める。そのほかに Enterobacteriaceae や *Streptococcus* がみられた。B 群は *Streptococcus*, *Eubacterium*, Bacteroidaceae の 3 種が主であり、全菌数の 80.5% を占めた。*Lactobacillus* は A 群よりも増加し、*Bifidobacterium* は A 群とはほぼ同数が存在する。C 群では *Bifidobacterium* と *Lactobacillus* の順位が逆転しているが、上位 3 菌種は B 群と同じであり、構成比率もこの 3 種で全菌数の 76.9% を占め、B 群とはほぼ同じパターンを示した。しかし、*Megasphaera* は B 群よりも少ないなど、B 群とは若干のちがいがみられた。D 群は *Eubacterium*, Bacteroidaceae, *Streptococcus* の上位 3 種の構成比は全菌数の 82.5% を占めるが、3 フローラの構成比は B, C 群とはかなり異なっていた。また、*Megasphaera* は 5 群中でもっとも多くなっている。E 群は Bacteroidaceae および *Eubacterium* が優勢であることは A~D 群と共通であるが、一方、これらの群で常に優勢であった

Streptococcus が明らかに減少していること、また *Megasphaera* についても A~D 群でみられるような加齢とともに増加する傾向が明らかに逆転していることなどから、特徴ある群を構成している。

カニクイザルの哺乳期間は 6~8 か月、性成熟期到達は雄で 4.5 年、雌で 3.5 年、また最長飼育期間は 15.5 年といわれている²⁾。これから考えると本実験で用いた A 群 (0.5~1 歳) は幼仔期、B, C 群 (2~5 歳) は成年期、D 群 (6 歳) は壮年期、E 群 (<10 歳) は老年期に相当すると考えられる。本実験の結果から、カニクイザルの腸内フローラは幼仔期、成年期、壮年期および老年期の各期ごとに変化することがわかったが、これは加齢による動物の生理学的状態の変化によるものと考えられる。

Sakazaki ら³⁾ は 40 頭のサル (種類不詳) の腸内フローラについてしらべた結果を報告しているが、それによれば糞便 1 g あたり大腸菌群 $10^4 \sim 10^8$ 個、*Streptococcus* 10^4 個、*Lactobacillus* $10^8 \sim 10^9$ 個、腐敗菌 $10^7 \sim 10^9$ 個、真菌 $10^2 \sim 10^5$ 個がみられたという。また、Smith⁴⁾ は 3 頭のカニクイザルの糞便についてしらべ、1 g あたり Coli group $10^{5.5}$ 個、*Streptococcus* 10^8 個、*Lactobacillus* $10^{7.8} \sim 10^9$ 個、酵母 $10^{5.1} \sim 10^{5.8}$ 個および *Clostridium perfringens* $10^{1.7} \sim 10^{2.4}$ 個を検出している。また Mitsuoka ら⁵⁾ はサル 5 頭の糞便を分析し総菌数 10.7 ± 0.4 、Bacteroidaceae 10.1 ± 0.4 、*Eubacterium* 10.0 ± 0.6 、*Bifidobacterium* 9.8 ± 0.5 、*Streptococcus* 7.3 ± 1.4 (いずれも菌数の対数値) などを検出した。これらの結果と今回われわれが得た結果とは必ずしも同一ではないが、これはサルの種類、年齢、飼料、飼育条件の差などによるものと考えられる。

ヒトの腸内フローラ、とくに乳児や健康成人の、また

消化管部位別のフローラについてはこれまでにいくつかの報告^{6)~9)}がある。また、光岡¹⁰⁾らは加齢によるヒトの腸内フローラの変化について詳しくしらべており、それによれば Bacteroidaceae, *Eubacterium*, 嫌気性連鎖球菌は離乳期までに急激に増加し、以後老年期に至るまではほぼ一定に推移する。*Lactobacillus* と *Clostridium perfringens* は離乳期以後、成年期まではほぼ一定に推移し老年期で再び増加する。また、大腸菌、腸球菌は出生直後に急増するが、離乳期までにかかなり減少し、以後は *Lactobacillus* や *Clostridium perfringens* と同様の推移を示す。一方、*Bifidobacterium* は出生直後急増し、成年期まではほぼ一定に推移するが、老年期にはいと漸減する傾向がみられたという。

今回、われわれが得た結果を Mitsuoka ら⁹⁾の報告と比較すると、老年期までの全期間を通じて *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus* の3種は生菌数が低く、一方 *Lactobacillus* は高い生菌数を示した。しかし、その他の菌種については変動はあるものの、比較的近似した値を示している。これは摂取する食事の内容がヒトとサルとではかなりの差があることや、消化機能および代謝機能の加齢による変化が動物種によって異なることが原因であると考えられる。しかし、離乳期から成年期においては、カンクイザルのおもな腸内フローラはヒトに近似しており、菌数の変化もほぼ一定していることから、この時期のカンクイザルはヒトのモデルとして十分使用しうるものと考えられる。

要 約

自家繁殖、継代飼育したカンクイザルにサル用市販固形飼料を給餌し、年齢別に腸内フローラの変化をしらべた。糞便 1gあたりの総菌数は 0.5~1 歳 (A群), 2~3 歳 (B群), 4~5 歳 (C群), 6 歳 (D群) の4群では 10^{10} 個に推移したが、10 歳以上 (E群) では $10^{9.7}$ とやや減少した。

A~E群のいずれについても、腸内フローラ中 Bacteroidaceae, *Eubacterium* および *Streptococcus* の3種が優勢で主たるフローラを構成していた。

A群ではこれらの主たるフローラのほか、*Bifido-*

bacterium が多くみられた。B群では *Bifidobacterium* はA群とはほぼ同数存在するが、*Lactobacillus* がA群よりも増加した。C群では *Megasphaera* が増加し、*Clostridium* が減少したが、全体としてはB群とはほぼ同じ傾向を示した。D群では主たるフローラの構成比率がB群およびC群とかなり異なっているほか、*Megasphaera* が全群中でもっとも多かった。E群は主たるフローラの中で *Streptococcus* が他の群よりも明らかに減少していた。また、*Megasphaera* も同様に他の群よりも減少した。

これらの結果から、カンクイザルの腸内フローラは加齢により変化すること、さらにこの変化からカンクイザルを 0.5~1 歳, 2~5 歳, 6 歳および 10 歳以上の4群にわけることができると考えられた。

ヒトの腸内フローラをしらべた他の報告と比較して若干のちがいがみられるが、カンクイザルをヒトのモデルとして栄養、代謝実験に使用しうるものと考えられた。

本研究についてご指導をいただいた東京大学農学部光岡知足教授に厚くお礼申し上げます。また動物飼育と糞便の採取に協力いただいた雪印乳業株式会社技術研究所の山田新治氏に感謝します。

文 献

- 1) 光岡知足：腸内菌の世界，53(1980)，叢文社（東京）
- 2) 田嶋嘉雄編：実験動物学各論，255（1972），朝倉書店（東京）
- 3) Sakazaki, R. and Tanaka, T.: *Primates*, 3, 72 (1961)
- 4) Smith, H.W.: *J. Pathol. Bacteriol.*, 89, 95(1965)
- 5) Mitsuoka, T. and Kanauchi, C.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 30, 1799 (1977)
- 6) Haenel, H.: *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.*, 195, 385 (1965)
- 7) 大西正男：日本細菌学雑誌，20, 168 (1965)
- 8) Seeliger, H.P.R. and Werner, H.: *Ann. Inst. Pasteur.*, 105, 911 (1963)
- 9) Zubrzycki, L.H.E.: *J. Bacteriol.*, 83, 968(1962)
- 10) 光岡知足：腸内細菌の話，81（1972），岩波書店（東京）

(昭和 60 年 10 月 9 日受理)