代謝における腸内細菌の関与—ラットの腸内細菌による 没食子酸プロピルの代謝—

(昭和 60 年 10 月 21 日受理)

新 村 寿 夫^{*1} 大谷千津子^{*1} 山 羽 力^{*2}

Participation of Intestinal Bacteria in Metabolism —Metabolism of Propyl Gallate by the Intestinal Bacteria in the Rat—

Toshio NIIMURA^{*1}, Chizuko OTANI^{*1} and Tsutomu YAMAHA^{*2}

(^{*1}Toyokogakuen Women's Junior College: 9-18, Todoroki 8-chome,
Setagaya-ku, Tokyo, Japan; ^{*2}National Institute of Hygienic
Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo Japan)

The metabolism of propyl gallate (PG) by the intestinal bacteria of rats was studied. In the anaerobic incubation of PG with fecal microorganisms, the formation of resorcinol (R) from PG was observed. One strain of *Klebsiella pneumoniae*, a PG-hydrolyzing bacterium, was isolated from the feces of rats. The strain hydrolyzed PG to gallated (G), and further decarboxylated G to pyrogallol (P). Seven strains of *Streptococcus faecalis* and two strains of *Enterobacter aerogenes* as G-decarboxylating bacteria were isolated from the feces of rats. All strains accumulated P in the medium from G. P-dehydroxylating bacteria could not be isolated as a pure culture. However, active mixed bacteria consisting of *Escherichia coli* and *Streptococcus* sp. were obtained by selective culture in medium containing P. The mixed bacteria showed an inducible P-dehydroxylating enzyme activity producing R from P. This activity was maintained in the dried cells.

These observations support the participation of intestinal bacteria in the metabolism of PG.

(Received October 21, 1985)

Key words: 没食子酸プロピル propyl gallate; 腸内細菌 intestinal bacteria; 没食子酸プロピルの代謝 metabolism of propyl gallate; 酸化防止剤 antioxidant; 没食子酸の脱炭酸 decarboxylation of gallic acid; ピロガロールの脱水酸化 dehydroxylation of pyrogallol

没食子酸プロピル (PG) は酸化防止剤として、食用油脂に使用されている。

経口的に摂取された没食子酸 (G) は遊離の G, 4-O-メチル没食子酸, ピロガロール (P) 及びそれらの抱合体として尿に排泄される^{1)~4)}。さらに微量代謝物としてレゾルシノール (R)²⁾ 及び 2-O-メチルピロガロール^{1), 2)} の排泄が報告されている。

PG の代謝に関しては G と同様に代謝されるとした Booth ら¹⁾ の報告があるのみで、しかもこれらの研究は

いずれも代謝物を定性的に確認しているにすぎない。それゆえ前報⁵⁾ では PG をラットに経口投与し、尿中代謝物を定量することにより、その代謝を研究した。その際 PG のグルクロニドの排泄を認めたので、ラット肝臓及び腎臓の分離細胞を用いて、PG の代謝をさらに研究したこと⁶⁾。

Scheline は G から P 及び R の生成について研究し、以下の結果を得た。P の尿中排泄はラットに G を経口投与したときに観察され、腹腔内投与では観察されないこと、抗生物質でラットを処理するときは G を経口投与しても、P の排泄が減少するか、あるいは排泄しなくなること²⁾、ラットの盲腸あるいは結腸の内容物と G を嫌

^{*1} 東横学園女子短期大学: 東京都世田谷区等々力 8-9-18

^{*2} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

氣的に培養するとき、P を生成すること⁷⁾、またPがラットの腸内微生物により容易にRに脱水酸化されること⁸⁾などである。そしてこれらの研究から、GからPへの脱炭酸及びPからRへの脱水酸化に腸内細菌が関与していることを予想している。

Gの代謝に腸内細菌が関与することは事実と思われるが、各段階について詳細な研究はなされていない。またPGの腸内微生物による代謝の報告もみられない。

それゆえ著者らはラットの糞よりPG代謝の各段階に働く菌を分離し、それらの菌による代謝及びPG代謝における腸内細菌の関与について研究した。

実験方法

1. 試薬、培地及び機器

(1) 試薬類

没食子酸 (東京化成工業(株)製, TCI-EP), 没食子酸プロピル (東京化成工業(株)製, TCI-EP), ピロガロール (和光純薬工業(株)製, 特級), レゾルシノール (和光純薬工業(株)製, 特級), アルミシートシリカゲル G-60 (メルク社製), クロマロッド S II (ヤトロン(株)製)

(2) 培地

ペプトン (Bacto-peptone, Difco 社製) 0.5 g, ブドウ糖 0.5 g 及び酵母エキス 0.5 g を 0.1 M リン酸二ナトリウム-リン酸一カリウム緩衝液 (pH 7.2) 100 ml に溶かし、121°, 15 分間加圧滅菌した。(PGPY 培地)。この培地 10 ml に 10 mg の PG (または 1 mg), 10 mg または 5 mg の G あるいは P を少量のエタノールに溶かし、添加した。

(3) 機器

イアトロスキヤン (ヤトロン(株)製, TH-10)

2. 方 法

(1) 糞由来混合菌液の調製

ウイスター雄ラット (150~250 g, 日本生物材料センター) を 1 匹ずつ代謝ケージに入れ、市販の固形飼料 (オリエンタル酵母(株)製, マウスラット飼育用飼料 MF) で飼育した。1 夜に排泄した糞を集め、10 倍量の PGPY 培地を加えてホモジナイズした。これを 300×g で 1 分間遠心分離して、沈殿した食物残渣などを除き、その上清を 15,000×g で 20 分間遠心分離した。沈殿したペレットを PGPY 培地に懸濁し遠心分離する洗浄操作を 2 回繰返した。得られたペレットを糞 1 g/ml になるように PGPY 培地に懸濁し、これを菌液とした。

(2) 糞由来混合菌の培養

10 mg の PG (又は 1 mg), G あるいは P を含有する PGPY 培地 10 ml に糞由来混合菌液 1 ml を接種し、37° で窒素気流下及び空気下で数日間培養した。

(3) 没食子酸プロピル加水分解菌の分離

0.01% PG-PGPY 培地に糞由来混合菌を接種して、3~5 日間 37°, 窒素気流下で培養した。混合菌の PG 加水分解活性を確かめたのち、PG を 0.1 mg/ml 含有する

PGPY 寒天平板に塗布し、BBL 嫌気ジャー (水素+二酸化炭素) に入れ、37° で 3 日間培養した。平板に生じたコロニーから PG 加水分解活性を示したコロニーを選び、さらに平板に 3 回塗布して純粋培養を得た。

(4) 没食子酸脱炭酸菌の分離

0.05% G-PGPY 培地に糞由来混合菌を接種して 2 日間、37°, 窒素気流下で培養した。P の生成を確かめた後、G を 0.5 mg/ml 含有する PGPY 寒天平板に塗布し、BBL 嫌気ジャー (水素+二酸化炭素) に入れ、37°, 3 日間培養した。以下前記 PG 加水分解菌の分離と同様に行った。また G を含有する GAM ブイヨン (日水製薬製) 及び GAM 寒天 (日水製薬製) 平板を用いて嫌気的の分離も行った。

さらに G を含有するブレインハートインヒュージョン (日水製薬製) 及びハートインヒュージョン寒天 (日水製薬製) 平板を用いて、空気下での分離も行った。

(5) ピロガロール脱水酸化菌の集積培養

PG から R を生成した糞由来混合菌の培養 0.2~0.3 ml を 0.1% P-PGPY 培地 10 ml に移植し、2~5 日間、37°, 窒素気流下で培養した。R の生成を確認した後、その培養 0.2~0.3 ml を新しい P-PGPY 培地に移植、培養を 10 数回繰返した。その後 1 か月ごとに 0.05% P-PGPY 半流動培地及び 0.05% P-GAM 半流動培地に移植し、37°, 窒素気流下で 19~24 時間培養した。

(6) P脱水酸化活性をもつ糞由来乾燥混合菌体の調製

1 L の三角フラスコに 0.05% P-PGPY 培地 500 ml をとり、これに 0.1% P-PGPY 培地 10 ml で集積培養した菌を接種し、37°, 窒素気流下で 19 時間培養した。15,000×g, 20 分間遠心分離して菌体を集め、0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) で菌体を 3 回洗浄した。この菌体を生菌とし、その生菌を無水リン酸上で 19 時間減圧乾燥した。これをただちに用いるか、又は使用するまで -20° に保存した。

(7) 分離菌株の保存

PG 加水分解菌 (ANPG-1): 0.01% PG-PGPY 半流動培地及び 0.01% PG-GAM 半流動培地に 37°, 窒素気流下で培養した。本菌は PG 分解速度が遅いので、培養期間は 1~2 日とし、冷蔵庫に保存して 1 か月ごとに移植した。

G 脱炭酸菌 (ANG-1~6, AG-1~3): G を嫌気的に脱炭酸する菌株を GAM 寒天穿刺 (GAM ブイヨンに寒天を添加), GAM 半流動 (1), (1) に G を添加した半流動 (2) 及び (2) を窒素置換した半流動以上 4 種の培養方法により 1 か月ごとに移植して 1 年間保存した。その後それぞれの脱炭酸活性を測定したところ、GAM 穿刺と GAM 半流動によって継代した菌株が最も高い活性を維持していた。それゆえ ANPG-1~6 株は GAM 半流動培地に 37° で 20~24 時間培養した後、冷蔵庫に保存

Table 1. Metabolism of Propyl Gallate, Gallic Acid and Pyrogallol by Rat Fecal Micro-organisms

Rat	Substrate (μ mole)	Incubation time (days)	Subst. & metabolites in medium (μ mole)			
			PG	G	P	R
A	PG (23.6)	7	6.4	ND	12	5.2
B	PG (23.6)	7	12	ND	Trace	1.7
C	PG (2.3)	8	ND	ND	ND	1.4
D	PG (2.3)	5	ND	ND	Trace	1.3
E	PG (2.3)	7	ND	ND	ND	2.1
F	PG (2.3)	7	ND	ND	ND	1.9
G	G (26.6)	5		ND	ND	26
H	P (39.6)	6			Trace	26
I	P (39.6)	6			ND	32

PG, propyl gallate; G, gallic acid; P, pyrogallol; R, resorcinol; ND, not detectable

Fecal microorganisms were cultivated in 10 ml of peptone-glucose-phosphate-yeast extract medium (PGPY medium) at 37°C under N₂.

Five ml of the medium incubated was used as the sample for the determination of PG, G, P and R.

し、1か月ごとに移植した。

AG-1~3株はハートインシュージョン寒天の斜面培地に37°で20~24時間培養した後、冷蔵庫に保存し、1か月ごとに移植した。

(8) 分析法

(a) 菌の増殖の測定

菌液に生理食塩水を加えて5倍に希釈し、650 nmにおける吸光度を分光光度計で測定した。

(b) 分析試料の調製

PG, GあるいはPを加えて培養した培養液5 mlを15,000×g, 15分間遠心分離した。その上清に塩酸を0.5 ml加えて酸性にし、塩化ナトリウム飽和後、エチルエーテル10 mlで3回抽出した。このエーテル抽出液に無水硫酸ナトリウム6 gを加え、30分間放置した。エーテル抽出液を傾斜してとり、無水硫酸ナトリウムはエーテルで3回洗浄して洗液をエーテル抽出液と一緒にした。次にエーテルが約1 mlになるまで減圧濃縮し、その抽出残留液に窒素を送って乾固した。蒸発残留物を0.5 mlのエタノールに溶かし、分析試料とした。

(c) TLCによる代謝物の定性

アルミシートシリカゲルG-60に分析試料3~5 μ lをスポットし、展開溶媒としてベンゼン-酢酸-メタノール-酢酸エチル(12:2:2:0.8)を用い、約12 cm展開した。検出は前報⁵⁾と同様Gibb's試液を用いた。

(d) イアトロスキャンによる代謝物の定量

イアトロスキャンによる定量方法は前報⁵⁾と同様に行ったが、内部標準は使用せずに、すべて積分曲線の高さにより定量した。

常法の展開溶媒としてベンゼン-酢酸-アセトン(30:20:0.5)を用いた。しかしこの展開溶媒ではGが原点に比較的近いという欠点があったので、PGかPのどちら

かが存在しない場合はベンゼン-酢酸-アセトン-酢酸エチル(32:4:1:1)を用いた。またRが存在しない場合にはベンゼン-酢酸-アセトン-酢酸エチル-水(20:2.5:2.5:1:0.35)を用いた。この水を加えた展開溶媒を使用する場合は、クロマロッドに試料をスポットした後、そのクロマロッドを40~60分間減圧乾燥した。なお展開溶媒は各溶媒混合後ただちに展開槽に入れ、4~5分後に使用した。

結果及び考察

1. 糞由来混合菌によるPG, G及びPの代謝

腸内細菌によるPGの代謝は報告されていないが、類似化合物である没食子酸メチルは盲腸に存在する混合菌との嫌気培養により、加水分解されるといわれている⁸⁾。またGからP及びRの生成が腸内細菌によるものと考えられるので^{2), 7)~9)}、PG, GあるいはPと糞由来混合菌との培養実験を行った。

腸内の大部分は嫌気状態で、微生物の多くは嫌氣的に発育しているが、腸壁近くは大気の1/4の酸素分圧があり、一部の微生物は腸内においても酸素を利用している可能性がある。従ってPGPY培地における培養は嫌気、好気の両条件で行った。

嫌氣的に培養した結果をTable 1に示す。

6匹のラット(A~F)から調製したすべての糞由来微生物が、PGを代謝しておもにRを蓄積した。この場合6匹中3匹(A, B, D)の糞由来混合菌の培養にPが存在した。しかしGは検出されなかった。またGあるいはPを基質とした場合(G, H, I)も主としてRを蓄積した。

空気の下でPG, GあるいはPと糞由来混合菌を培養した場合も、代謝物の回収率は低下したが、同様の結果であった。これらのことからPGの加水分解、Gの脱炭酸及びPの脱水酸化に関与する微生物は通性嫌気性

菌と思われた。

腸内微生物により PG は容易に G 及び P を経て R に代謝されたが、PG をラットに投与した前報⁵⁾の排泄実験では、主要代謝物は 4-O-メチル没食子酸及び G であった。なお P が多くのラットの尿に微量検出されたが、R は絶食ラット 5 匹中の 1 匹にこん跡程度検出されたのみであった。これは PG あるいは G の吸収が速いため⁵⁾、排泄経路として胆汁排泄が重要でないため²⁾、G の腸内細菌に接する量が少ないためと思われる。

2. PG 加水分解菌及び G 脱炭酸菌の分離

実験法記載の方法を用いて、糞由来混合菌より嫌氣的に PG を G に加水分解し、さらに P に脱炭酸する ANPG-1 株を分離した。

また同様に糞由来混合菌より G を P に脱炭酸する菌として、嫌氣的に ANG-1~6 株、及び好氣的に AG-1~3 株を分離した。

ANPG-1 株はグラム陰性の通性嫌気性桿菌で非運動性であり、ブドウ糖から酸及びガスを産生した。またカタラーゼ、ウレアーゼ、リジンデカルボキシラーゼ、シアン化カリウム抵抗性、VP テスト、クエン酸及びマロン酸塩の利用、及び乳糖からの酸生成は、いずれも陽性を示した。チトクロムオキシダーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、フェニルアラニン脱アミノ、メチルレッドテスト及び TSI 培地における硫化水素の産生は、いずれも陰性を示した。これらのことなどから、この菌株は *Klebsiella pneumonia* と同定された^{10), 11)}。

ANG-1~4 株及び AG-1~3 株はグラム陽性、無芽胞性、非運動性及び通性嫌気性の球菌で、カタラーゼ及びチトクロムオキシダーゼは陰性を示し、ブドウ糖を発酵的に分解した。また 10°, 45°, pH 9.6, 40% 胆汁, 6.5% 塩化ナトリウム溶液, 0.1% メチレンブルーミルク及び 0.04% 亜テル酸塩、それぞれにおける発育テスト, 0.01% テトラゾリウムの還元, 60°, 30 分間の加熱における生残及びエスクリンの加水分解は、いずれも陽性を示した。これらのことなどから、ANG-1~4 株及び AG-1~3 株はいずれも *Streptococcus faecalis* と同定された^{10), 11)}。

ANG-5 及び 6 株はグラム陰性の通性嫌気性桿菌で、運動性があり、ブドウ糖から酸及びガスを産生した。またカタラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、クエン酸塩、マロン酸塩及び酢酸塩の利用、シアン化カリウム抵抗性、VP テスト、エスクリン加水分解、リジン脱炭酸、グリセリン及びイノシトールからガス産生及びソルビトールから酸産生は、いずれも陽性を示した。チトクロムオキシダーゼ、インドール産生、メチルレッドテスト、アルギニン加水分解及び TSI 培地からの硫化水素産生は、いずれも陰性を示し、ゼラチンをゆっくり液化した。これらのことなどから、ANG-5 及び 6 株は *Enterobacter aerogenes* と同定された^{10), 11)}。

Fig. 1. Relationship between the consumption of propyl gallate, the accumulation of pyrogallol, and the growth in strain ANPG-1 (*Klebsiella pneumoniae*)

△---△, bacterial growth; ×---×, consumption of propyl gallate; ○—○, pyrogallol accumulated in broth

The cells were transferred into 100 ml of 0.01% propyl gallate-PGPY medium in a 200 ml Erlenmeyer flask, and incubated at 37°C under N₂.

Bacterial growth was measured by turbidity after 5-fold dilution with 0.9% saline.

3. PG 加水分解菌の増殖と代謝物の蓄積

PG を含有する PGPY 培地に分離した ANPG-1 を接種し、14 日間嫌氣的に培養した。その結果を Fig. 1 に示す。

ANPG-1 はすみやかに増殖し、1 日で最高の増殖に達したが、PG の減少速度は遅く、培地中の PG が 4 日間で約 50%, 14 日間ではほぼ全量が消失する程度であった。G の蓄積は TLC によりその存在は確認されたが、定量できるほど蓄積されなかった。そして G のさらに脱炭酸された P が、PG の消失に対応して蓄積した。

Scheline は、没食子酸メチルはラットの盲腸に存在する混合菌により加水分解されたと報告している⁸⁾。しかし腸内に生息する 9 属 12 株の細菌について行った研究では、このエステル加水分解菌は同定されなかった¹²⁾。

本報において、PG 加水分解菌 (ANPG-1 株) が分離されたが、その分解速度は遅かった。一方、ヒトや動物の消化管全般の粘膜にはエステラーゼが存在するうえ、前報⁵⁾では分離肝細胞により PG が容易に加水分解された。これらのことから、ヒトや動物の PG 代謝において、腸内細菌による PG の加水分解はそれほど重要ではないと思われる。

4. G 脱炭酸菌の増殖と代謝物の蓄積

G を含有する PGPY 培地に ANG-1 を接種し、120 時間嫌氣的に培養した。その結果を Fig. 2 に示す。

Table 2. Gallate-decarboxylating-activity of Isolated Strains

Strain	Condition of incubation	After incubation for 3 days		Decarboxylation (%)
		G remained (μ mole)	P formed (μ mole)	
ANG 1	AN	4.0	20.3	84
ANG 2	AN	4.9	11.3	70
ANG 3	AN	7.6	13.4	63
ANG 4	AN	6.2	10.7	63
ANG 5	AN	5.0	20	80
ANG 6	AN	6.0	16	73
AG 1	A	15.7	4.4	22
AG 2	A	6.6	12.7	66
AG 3	A	7.6	11.9	61

G, gallic acid; P, pyrogallol; AN, anaerobic culture (under N_2); A, aerobic culture (under air)

Strains: ANG-1~4, AG-1~3, *Streptococcus faecalis*; ANG-5, 6, *Enterobacter aerogenes*

Culture condition and the sample for the determination of G and P were the same as Table 1.

Fig. 2. Relationship between the consumption of gallic acid, the accumulation of pyrogallol, and the growth in strain-ANG-1 (*Streptococcus faecalis*)

△---△, bacterial growth; x---x, consumption of gallic acid; ○—○, pyrogallol accumulated in broth

Growth medium: 0.05% gallic acid-PGPY medium

Culture condition and measurement of bacterial growth were the same as Fig. 1.

ANG-1 はすみやかに増殖し、約 25 時間で最高の増殖に達した。その間に G の約 50% が、またほぼ 100% が 120 時間でそれぞれ消費され、G の消費に対応して P が培地中に蓄積した。

AG-1 を空気存在下で培養した場合も、ほぼ同様に増殖につれて G が消費され、対応する P が培地中に蓄積した。

嫌気及び好氣的に分離したすべての菌株 (ANG-1~6, AG-1~3) は増殖につれて G が消費され、対応する P が蓄積した。これら 9 株を G 含有 PGPY 培地に接種し、37° で 3 日間嫌気及び好氣的に培養して、各菌株の脱炭酸活性を比較した。その結果を Table 2 に示す。

G から P への転換率は、嫌氣的に分離した菌株 (ANG-1~6) 及び好氣的に分離した菌株 (AG-1~3) で、それぞれ 63~84% 及び 22~66% であった。

腸内に最も普通にみられる細菌では *Aerobacter aerogenes*¹²⁾ (この菌の属名はすでに廃棄されている) 及び *Klebsiella aerogenes*¹³⁾ が G, パラオキシ安息香酸, gentisic acid, protocatechuic acid などを非酸化的に脱炭酸することが報告されている。腸内の優勢菌である *Streptococcus faecalis* による G の脱炭酸は報告されていない。

Grant と Patel¹³⁾ によれば *Klebsiella aerogenes* の G 脱炭酸酵素は誘導酵素ではなく、構成酵素であるとしている。このことは著者らの分離した G 脱炭酸菌株の活性維持に G を必要としないことと一致している。

G を P に脱炭酸する菌は腸内の常在菌であり、脱炭酸の速度も遅くはない。しかし前報⁹⁾ のラットに PG を投与した尿中排泄の研究では、P の排泄を認めたが、その量は僅少であった。これは G の吸収が速いためと思われる。

前報⁹⁾ の肝及び腎の分離細胞による PG あるいは G の代謝研究で、P の生成がみられなかったこと、及びこれまでの結果は、G から P への脱炭酸に腸内細菌が関与するとして Scheline^{2),7)} の考えを支持した。

5. P 脱水酸化菌の分離及び脱水酸化活性

PG から R を生成した糞由来混合菌を 0.1% P-PGPY 培地で約 1 年間集積培養を繰返しているうちに、その混合菌は *Streptococcus* sp. と *Escherichia coli* 2 種の混合^{10),11)} になった。

この 2 種混合菌から P を R に脱水酸化する菌を分離するために、種々の方法を試みたが、活性のある状態で菌を純粋に分離することができなかった。また dihydrocaffeic acid の脱水酸化にはヒトの糞から分離した *Es-*

Table 3. Dehydroxylation-activity of Intact and Dried Cells of Fecal Bacteria

Cells	Pyrogallol remained (μ mole)	Resorcinol produced (μ mole)	Specific activity R (μ mole)/dried cells (mg)
Intact cells	10	12	0.26
Dried cells	Trace	22	0.48
Dried cells (100°, 15 min)	18	ND	—
Dried cells (sonicated for 1 min)	7	15	0.33

Cells: mixture of *Escherichia coli* and *Streptococcus* sp.

The cells were cultivated for 19 hr in anaerobic condition, and dried over P_2O_5 in a vacuum for 19 hr.

The reaction mixture contained 2.5 mg of pyrogallol, 48 mg of dried cells and 0.05 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH 7.2 in a total volume of 5 ml. The reaction was carried out for 19 hr at 37°C under N_2 .

Table 4. Changes in the Activity of Dehydroxylation of the Cell during Growth on PGPY Medium

Growth periods (hr)	Dried cells (mg)	Pyrogallol remained (μ mole)	Resorcinol produced (μ mole)	Specific activity R (μ mole)/dried cells (mg)
(19)	46	Trace	22	0.48
(42)	42	3	21	0.50
(67)	37	10	12	0.32
(91)	27	19	Trace	—

The cells were cultivated for 19 hr, 42 hr, 67 hr and 91 hr in anaerobic condition. The other conditions were similar to that described in Table 3.

Fig. 3. Relationship between the consumption of pyrogallol, the accumulation of resorcinol, and the growth in fecal bacteria subcultivated with pyrogallol

Δ --- Δ , bacterial growth; x --- x , consumption of pyrogallol; o — o , resorcinol accumulated in broth

Fecal bacteria: mixture of *Escherichia coli* and *Streptococcus* sp.

Inocula: subcultivated in 0.05% pyrogallol-PGPY medium

Growth medium: 0.05% pyrogallol-PGPY medium

Culture condition and measurement of bacterial growth were the same as Fig. 1.

Fig. 4. Relationship between the consumption of pyrogallol, the accumulation of resorcinol, and the growth in fecal bacteria subcultivated without pyrogallol

Δ --- Δ , bacterial growth; x --- x , consumption of pyrogallol; o — o , resorcinol accumulated in broth

The experimental conditions were the same as Fig. 3 except that the inocula were subcultivated without pyrogallol

Escherichia coli と *Streptococcus faecalis* var. *liquifaciens* からなる混合菌との培養が必要で、どちらか一方の単独菌では脱水酸化の起こらないことが報告されている¹⁴⁾。それゆえ P との集積培養で *E. coli* と *Strepto-*

coccus sp. の2種にまで菌種の減少した糞由来混合菌を用いて、Pの脱水酸化を検討した。

この混合菌を P-PGPY 培地及び PGPY 培地で前培養し、それぞれの培地に増殖した菌を接種菌として、P-PGPY 培地に移植して 30° で 30 時間、窒素気流下で培養した。その結果を Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。

P の存在下で前培養した混合菌を接種した場合は菌の増殖につれて P が消費され、ただちに対応する R が蓄積した (Fig. 3)。一方 P 不含の PGPY 培地で前培養した混合菌を接種した場合は菌が増殖しても約 8 時間は R の蓄積はみられなかった (Fig. 4)。このことから脱水酸化に関与する酵素は P の存在により誘導されるものと思われた。

次にリン酸緩衝液中で生菌あるいは乾燥菌を P とインキュベーションした結果を Table 3 に示す。

生菌と乾燥菌体の活性を比べると、乾燥菌体の比活性は生菌の約 2 倍高かった。これは乾燥することにより膜が破壊され、基質の透過性がよくなったためと思われる。同様の結果が別に行った生菌の凍結融解を反復することによっても得られた。

脱水酸化活性が乾燥に耐えたので、これに関与する酵素は比較的安定な酵素と思われたが、超音波処理では比活性が低下した。

培養時間の異なる乾燥菌体の脱水酸化活性を Table 4 に示す。

乾燥菌体の脱水酸化活性は 1~2 日間培養が高く、3 日間培養で低下し、4 日間培養で失活した。これは Fig. 3 が示すように、P から R への転換が約 1.5 日で終了するので、P が消失すると共にその脱水酸化活性が失われるものと思われる。

乾燥菌体による P から R 生成のタイムコースを Fig. 5 に示す。P の減少量に相応する R が時間の経過につれて生成した。

経口投与されたフェノール酸が腸内細菌によって脱水酸化されることを示した研究は多くなされているが、純粋な分離株による脱水酸化の研究は非常に少ない。その一つに caffeic acid を脱水酸化する菌として *Pseudomonas* sp. がラットの糞から分離されている¹⁵⁾。そして caffeic acid の脱水酸化は微生物によってのみなされることが germ-free ラットを用いて確かめられている⁹⁾。

著者らは P を脱水酸化する菌を純粋に分離することはできなかったが、腸内の常在菌である *E. coli* と *Streptococcus* sp. の混合菌によって P が R に脱水酸化されることを示した。これは P から R の生成にも腸内細菌が関与していることを支持する事実である。

P の脱水酸化はどちらかの菌種単独で行われるのかもしれないし、2 種の菌が関与しているのかもしれない。2 種の菌が関与していることを証明するためには、分離した菌株の単独培養では P の脱水酸化が起こらず、両者

Fig. 5. Formation of resorcinol from pyrogallol by dried cells of fecal bacteria
×---×, consumption of pyrogallol;
○—○, resorcinol formed

Experimental procedure was the same as Table 3 except that 46 mg of the dried cells were used.

を混合培養することにより、はじめて脱水酸化が起こることを立証することが必要である。それにはさらに研究が必要である。

総 括

ラットの腸内細菌による PG の代謝を研究した。

1. ラットの糞由来混合菌を PG と嫌気培養したとき、培地中に R を蓄積した。好気培養でもほぼ同様の結果であった。

2. PG を加水分解する菌として、ラットの糞から *Klebsiella pneumoniae* 1 株を分離した。この株は PG を G に加水分解し、さらに脱炭酸して P を培地中に蓄積した。

3. G を P に脱炭酸する菌として *Streptococcus faecalis* 7 株及び *Enterobacter aerogenes* 2 株をラットの糞から分離した。

4. P を R に脱水酸化する菌を純粋分離できなかったが、糞由来の *Escherichia coli* と *Streptococcus* sp. の混合菌は P を R に脱水酸化した。脱水酸化に関与する酵素は誘導酵素と推定され、その活性は乾燥菌体にも維持された。

これらの結果は PG の代謝過程のうち、G から P への脱炭酸及び P から R への脱水酸化に腸内細菌が関与するとした Scheline の推定を支持した。

終わりに、実験に協力された倉辺美智恵及び前原 泉の両氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Booth, A. N., Masri, M. S., Robbins, D. J., Emerson, O. H., Jones, F. T., DeEdes, F.: *J. Biol. Chem.* **234**, 3014~3016 (1959).
- 2) Scheline, R. R.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **24**, 275~285 (1966).
- 3) Watanabe, A., Oshima, Y.: *Agric. Biol. Chem.* **29**, 90~93 (1965).
- 4) Potter, D. K., Fuller, H. L.: *J. Nutr.* **96**, 187~191 (1968).
- 5) 新村寿夫, 兼俊明夫, 中島久男, 山羽 力: 食衛誌. **24**, 166~173 (1983).
- 6) 新村寿夫, 兼俊明夫, 土屋利江, 山羽 力: 同上. **24**, 174~180 (1983).
- 7) Scheline, R. R.: *J. Pharm. Pharmac.* **18**, 664~669 (1966).
- 8) Scheline, R. R.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **26**, 332~342 (1968).
- 9) Scheline, R. R., Midtvedt, T.: *Experientia* **26**, 1068~1069 (1970).
- 10) 坂崎利一訳: “医学細菌同定の手びき” (“Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria”, 2nd ed.) p. 63~75, p. 105~150 (1974) 近代出版.
- 11) Buchanan, R. E., Gibbon, N. E.; “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”, 8th ed., p. 290~340, p. 490~509 (1974) Williams Wilkins Co., Baltimore.
- 12) Soleim, H. A., Scheline, R. R.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **31**, 471~480 (1972).
- 13) Grant, D. J. W., Patel, J. C.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **35**, 325~343 (1969).
- 14) Peppercorn, M. A., Goldman, P.: *J. Bact.* **108**, 996~1000 (1971).
- 15) Perez-Silva, G., Rodriguez, D., Perez-Silva, J.: *Nature* **212**, 303~304 (1966).