魚類の腸内細菌によるビタミン B 群の消長—I.

コイの腸内細菌によるニコチン酸・パントテン酸
およびビタミン B₁₂ の消長*

柏田 研一・手島 新一

(1966 年 7 月 26 日受理)

STUDIES ON THE PRODUCTION OF B VITAMINS BY INTESTINAL
BACTERIA OF FISH—I.
NICOTINIC ACID, PANTOTHENIC ACID AND VITAMIN B₁₂ IN CARP

Ken-ichi KASHIWADA and Shin-ichi TESHIMA**

It is a well-known fact that some of B vitamins are synthesized by intestinal bacteria in mammals. Knowledge on fish, however, is still lacking. The present study was planned to see the production of nicotinic acid, pantothenic acid and vitamin B₁₂ by intestinal bacteria of carp, *Cyprinus carpio*. Bacteria in the intestinal contents were incubated in different culture media and the vitamins were estimated periodically by the microbiological methods. The results obtained are as follows.

1. Production of nicotinic acid is inconsistent according to the culturing conditions (Fig. 1).
2. Pantothenic acid shows the increase only after a prolonged culture period (Fig. 3).
3. Unlike the above two vitamins, vitamin B₁₂ increases rapidly and markedly, especially at a higher temperature (Fig. 5).
4. Effect of the pH value of medium on the production of nicotinic and pantothenic acids is not significant (Figs. 2 and 4).

腸内細菌によるビタミンの合成、分解については、B₁、B₂を始めとし、多くのビタミン B 群について多数の研究があり、枚挙に暇ないほどであるが、これまでの研究はヒト、ネズミなどを対象としたものが多く、魚類の腸内細菌についての研究はあまりないようである。橋本¹⁾によると、コイに対するビタミン B₁₂ の投与は何ら生長促進効果を示さず、対照魚と大差なかつたが、これはコイが B₁₂ を自給していることを示しているもので、恐らく腸内細菌によつて必要量を満たすに足る合成が行なわれているものと推定している。このように腸内細菌によるビタミンの合成または分解は宿主動物のビタミン栄養に大きな影響を及ぼすばかりでなく、近年漸く解明されつつある魚類のビタミン要求の問題とも関係があると思われるので、現在まだよく知られていない魚類の腸内細菌によるビタミン B 群の消長について検討することとした。なお今回の実験は、腸内から単離した特定の細菌について行なつたものではなく、腸内菌の混合培養におけるビタミンの消長を調べたものである。第 1 報として、ニコチン酸、パントテン酸およびビタミン B₁₂ (以下それぞれ NiA, PaA, B₁₂ と略記) の消長を調べた結果を報告する。

実 験 方 法

腸内細菌も培養条件によつてその増殖、代謝の様相を異にし、ビタミンの消長も自ら異なつてくるものと思われる。今、魚類の腸内を細菌にとつての環境と考えた場合、温度、酸素、pH、Eh その他の化学的ある

* この研究の要は昭和 41 年 4 月、東京における日本農学大会水産部会で発表した。

** 鹿児島大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Kagoshima University, Kagoshima)

Table 1. Composition of the medium for the culture of intestinal bacteria.

Ingredients	Medium			
	1	2	3	4
Beef extract	10.0 g	4.0 g	— g	— g
Peptone	10.0	10.0	—	—
Acid hydrolyzed casein	—	—	5.0	—
L-Cystine	—	—	0.1	—
DL-Tryptophan	—	—	0.1	—
Asparagine	—	—	—	10.0
Malic acid	—	—	—	0.7
Yeast extract	—	—	5.0	—
Na-acetate	—	—	10.0	—
Na-phosphate (dibasic)	—	—	—	2.0
Na-carbonate	—	—	—	2.5
K-phosphate (monobasic)	—	—	0.5	—
" (dibasic)	—	—	0.5	—
Na-chloride	5.0	—	0.01	—
Mg-sulfate (7H ₂ O)	—	—	0.2	0.4
Ferrous sulfate (7H ₂ O)	—	0.2	0.01	—
Mn-sulfate (4H ₂ O)	—	—	0.01	—
Na-sulfite (anhydrous)	—	0.2	—	—
Na-hydrosulfite	—	0.08	—	—
Ca-carbonate	—	—	—	0.01
Glucose	—	10.0	10.0	20.0
Lactose	—	1.0	—	—
Distilled water	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
pH	6.8	6.8	6.8	6.8

いは生物学的など複雑な環境要素の中で細菌は生活しているわけである。そこで今回は培地組成、温度、pHを異にして腸内細菌を培養した場合のビタミンの消長を研究することにより、生活中的魚類の腸内における様相を推定しようとした。供試魚としては鹿児島市内の養魚場から購入した体長約 30 cm、体重約 800 g のコイを用い、麻酔したもののから腸内容物を無菌箱の中で無菌的に採取し、培地への接種試料とした。

腸内細菌の培養 まず培地組成とビタミンの消長との関係を知るため、取出した腸内容物 2g を Table 1 に示した各培養液 (pH 6.8) 500 ml に均一に懸濁した後、あらかじめ培養液約 40 ml を入れ殺菌しておいた試験管 (内径 3 cm、高さ 20 cm) に 10 ml ずつ分注し、同じ培養液で全容を 50 ml とし、よく混和した後、15°, 25°, 37°C のふ卵器中に静置培養を行なった。これを所定時間毎に取出し、沸騰水中に 10 分間保ち、菌の繁殖を止めた後、菌懸濁状態で培養液中のビタミンを定量した。培地の pH の影響を知るための実験はブイヨン培地 (Table 1 の培地 1) を用い、その pH を NaOH で 6.0,

6.8, 8.0 の 3 段階に調整し、上記の方法に準じて実験した。

ビタミンの定量 すべて微生物定量法によつた。NiA の定量²⁾は試料 5 ml に N-H₂SO₄ 1 ml を加え、120°C に 30 分間加熱したものにつき、*L. arabinosus* ATCC 8014, 基礎培地 NFX (1955) を用い酸滴定法によつて行ない、PaA の定量³⁾は Mylase P で分解した試料につき上と同一の菌、基礎培地 USP XV 組成を用い酸滴定法によつて行ない、B₁₂³⁾は KCN 抽出法によつた試料につき *L. leichmannii* ATCC 7830, 基礎培地 USP XV 組成を用い比濁法によつて行なった。すなわち培養した液に上記の処理を施してビタミンを遊離型に変えると同時に溶液中に抽出したものを供試料とし、さらにこれを適当濃度にうすめた後、NiA と PaA は 2 ml assay, B₁₂ は 5 ml assay を行なったが、この実験ではビタミン量増減の傾向がわかれば目的を達するので、便宜上、上記 assay tube 中のビタミン量で表わすこととした。

結果および考察

ニコチン酸の消長

腸内細菌を培地 1, 2, 3, 4 で培養した場合における NiA の消長を Fig. 1 に示した。培地 1 (ブイヨン培地) において NiA はかなりの消長を示し、12 時間後に増加したものが 36 時間後には減少し、培養温

Fig. 1. Variations of nicotinic acid in the culture media containing intestinal bacteria of carp.

Fig. 2. Variations of pantothenic acid in the culture media containing intestinal bacteria of carp.

x—x Incubated at 15°C.
 ●—● " 25°C.
 ○—○ " 37°C.

度による時間的ずれは見られるが、その後においても増加、減少を繰り返し、その変動の幅は培養温度の高いものほど大きい。ブイオン培地は多くの細菌にとって好適な培地となり得るので、この場合も大多数の腸内細菌が増殖したものと考えると、このような NiA の増減が見られることは、コイの腸内に NiA 合成菌と分解菌両者の存在を推定せしめる。培地 2 と 3 とでは菌の繁殖に伴う NiA 増減の幅が培地 1 のそれに比べてかなり狭くなっているが、培地組成上の主な差異は、培地 2 はグルコースを含有すること、また培地 3 は窒素源がアミノ酸その他であること、グルコースを含有すること、無機塩を補足した点などである。このような組成の培地では NiA の合成と分解とが比較的均衡のとれた状態になるように菌の増殖が行なわれるのではあるまいか。次に培地 4（マーサン氏液）は他の 3 培地と異なり、ビタミンを欠き、また他の栄養源も乏しく細菌にとっては貧栄養培地であるが、 NiA の消長も特異的で 72 時間までは減少の過程は見られず、高温培養の場合の NiA 増加は特に顕著である。これは培地の組成上 *Heterotrophic* のビタミン要求菌は増殖し得ず、*Autotrophic* のビタミン非要求菌のみ増殖し、 NiA の合成が行なわれた結果かと考えられる。この培地においてのみ NiA の周期的増減がないのは、 NiA 分解菌が合成菌に比べて栄養要求が厳しく、合成菌による NiA の増加を見たにもかかわらず、他の栄養源の不足のため分解菌が増殖できなかったためとの想像もできるが、このことについては今後の実験によつて確かめたい。

次に腸内の pH は魚種や生理状態によつて変動することが知られているので、pH を異にした培地におけ

Fig. 3. Variations of vitamin B_{12} in the culture media containing intestinal bacteria of carp.

×—× Incubated at 15°C.
 ●—● " 25°C.
 ○—○ " 37°C.

るコイの腸内細菌による NiA の消長を知るため、前記のような pH に調整したブイヨン培地を用いて実験した結果は Fig. 1 の左に示した。培地の pH によつて NiA の変動する幅および周期に多少の相違は見られるが、増加、減少を繰り返すという現象には変わりがない。

以上の実験結果から、コイの腸内細菌による NiA の消長は培地の組成によつてかなりその様相を異にするが、培地の pH の影響は少なく、またある種の培地では NiA の増加が見られるので、腸内細菌は NiA の自給にあまり関与しない場合もあると同時に、例えば餌料の種類、温度など条件如何によつては NiA の自給にある程度の役割を果たすこともあり得るように考えられる。

パントテン酸の消長

NiA の消長を測定したのと同じ試料(菌体を含む培地)で PaA を定量し、その消長を調べた結果を Fig. 2 に示した。図の右側は培地組成の影響を示したものであり、左側はブイヨン培地を用い、pH の影響を実験した結果である。ブイヨン培地においては 48 時間以後に急に増加しているが、pH が小さくなると増加が多少早く現われるようである。しかし他の 3 培地では変動の幅が小さい。ブイヨン培地において、かなり長時間たたないと PaA が増加を示さない理由はよくわからない。このように PaA の増加に長時間を要するということは、コイに対してその腸内細菌は PaA 補給にあまり寄与するところがなく、コイが PaA を必要とするものであれば、それは食物によつて補給されなければならないのではあるまいか。

ビタミン B₁₂ の消長

NiA と PaA を定量したのと同じ試料(培地 3 は除く)について B₁₂ を定量し、その消長を Fig. 3 に示した。まずブイヨン培地では初めから B₁₂ の増加が見られるが、その増加は温度が高いほど顕著である。また培地 2 と 4 とでは一旦増加した後に減少するという他のビタミンに似た現象が見られ、B₁₂ の絶対量は少ないが増減の比率はかなり高く、温度の影響もまたかなり顕著である。このように B₁₂ はいずれの培地においてもかなり顕著な増加過程の見られることから考えて、コイの腸内には相当有力な B₁₂ 合成菌の存在することが推定され、一方、分解菌もまた存在するようである。コイの B₁₂ 要求量が解明されるまでは何とも言えないが、B₁₂ が何倍かに増加するということは腸内細菌がコイの B₁₂ 自給に関与することを暗示する。

要 約

腸内細菌が魚類のビタミン栄養に果たす役割を究明するために、コイの腸内細菌によるニコチン酸、パントテン酸およびビタミン B₁₂ の消長について実験した。組成、pH を異にした培地を用い、種々の温度で腸内細菌を混合培養した結果

1. コイの腸内には上記ビタミンの合成菌、分解菌両者の存在が推定された。
2. ニコチン酸は条件如何により、腸内細菌によつて増加する場合とそうでない場合があるようで、前者の場合には、ある程度のビタミン自給も予想されよう。
3. パントテン酸については、合成菌、分解菌の勢力もしくは合成、分解能力に強弱の差が少なく、パントテン酸が腸内細菌によつて供給されることは少ないように考えられる。
4. B₁₂ は前二者と異なり、腸内細菌による合成がかなり顕著であり、コイに対する B₁₂ 補給に寄与する可能性が大きいように考えられる。
5. ビタミンの消長は、実験した範囲では高温における方が概して顕著であつたが、培地の pH の影響は特に著しいものではなかつた。

この研究は昭和 40 年度文部省科学研究費によつて行なつた。記して感謝の意を表明する。また実験に協力された清水謙一、南慧昭、福永洋子、舞田翠の各氏に対しても深謝の意を表する。

文 献

- 1) 橋本芳郎：本誌，19，899～904 (1953).
- 2) 新村寿夫：ビタミン，12，106～114 (1957).
- 3) 上久保 正：ビタミン，11，328～338 (1956).