

魚類の腸内細菌によるビタミン B 群の消長—VI

コイの腸内細菌による葉酸の生産*

柏田 研一・金沢 昭夫・手島 新一**

Studies on the Production of B-Vitamin by Intestinal Bacteria—VI

Production of Folic Acid by Intestinal Bacteria of Carp*

Ken-ichi KASHIWADA, Akio KANAZAWA,
and Shin-ichi TESHIMA**

Abstract

Succeeding to the previous experiment, the production of folic acid by intestinal bacteria of carp was studied. In the 1st experiment, 4 groups of carp were fed respectively on the following diets: (A) complete diet devised by HALVER, (B) diet deficient in both folic acid and *p*-aminobenzoic acid, (C) diet deficient in folic acid, and (D) diet supplementing 1% of sulfanilamide to the diet B. After being fed on the test diets for 10 days, the folic acid concentration in intestines was determined immediately after death, to the contrary, a part of intestine was incubated at 25°C for 6 hours, and similar determination was done. In the 2nd experiment, hourly fluctuation of folic acid content in the intestine was examined on the 4 groups.

In the 1st experiment, it was ascertained that the highest content of folic acid was observed in the intestines of carp fed on the diet A, while the less content in the other 3 groups: B, C, and D. Accordingly, the vitamin seems to be increased readily during incubation. As shown in the 2nd experiment, folic acid was present in intestinal canal after feeding 3 hours in all experimental groups, and its concentration reached a maximum after 6 hours. After being incubated for the more times, the vitamin content decreased markedly. From these results, it may be seen that folic acid is synthesized by intestinal bacteria of carp.

筆者らは、さきにコイについてその腸内細菌によるかなり顕著なビタミン B₁₂ の生産が見られたことを報告¹⁾したが、葉酸もまたコイの腸内で生産されることを認めたので、その結果を報告する。

これまで魚類の葉酸要求に関して行なわれてきた研究で、その欠乏症として HALVER²⁾ はマスノスケで成長不良、死亡率増大、貧血、不活発、尾鰭の脆弱化、体暗色化などを挙げ、PHILLIPS ら³⁾ はカワマスにおいて貧血を、また北村ら⁴⁾ はニジマスにおいて死亡率と比肝重の増大、貧血、尾鰭欠損、游泳不活発化、血球数値の低下を見ており、ニジマスの葉酸要求量として McLAREN ら⁵⁾ は体重 1 kg 当り 1 日量 0.02~0.1 mg を、HALVER⁶⁾ は 0.1~0.15 mg を挙げている。このように

* 1970年12月13日、日本水産学会九州支部大会で発表した。

** 鹿児島大学水産学部水産化学研究室 (Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

鮭鱒類については葉酸が必要とされているが、コイに対しては青江ら⁷⁾の行なった実験では葉酸の必要性は認められていない。すなわち氏等は HALVER 試験飼料から葉酸を除いた飼料で稚ゴイを16週間飼育した場合、葉酸を与えたものと同様よく成長して欠乏症状は見られず、筋肉および肝臓中の葉酸量も大差なく、また同じ飼料からパラアミノ安息香酸（以下 PABA と記す）を除いたもの、葉酸と PABA を除きスルファニルアミドを添加したものを与えて飼育した場合も同様で、飼料組成を変えた影響を見られていない。このようにコイには葉酸を与えなくても栄養上障害はない様であるが、これはコイが葉酸を必要としないのか、それとも腸内細菌による葉酸の生産があり、それによって需要が満たされているため葉酸を要求しないように見えるかについては明らかにされていない。人や犬、兎、鼠などでは腸内細菌による葉酸の合成がすでに知られており、コイにおいても充分その可能性が考えられるので、コイの腸内における葉酸の生産について実験した。

実験 I. コイ腸内細菌の葉酸生産性

完全飼料（HALVER 試験飼料）から葉酸その他を除き、組成を少しく変えた飼料でコイを飼育した場合における腸内の葉酸量を測定比較することによって、腸内細菌の葉酸生産性を調べた。

実験方法

鹿児島市内の養鯉場から購入した体重100g内外のコイを、環境と飼料に馴らせるため、HALVERの試験飼料を与えて1週間予備飼育し、次の2日間絶食させて試験に移った。30×45×35cmのコンクリート製水槽に前記のコイ10尾宛を入れ、毎分約1ℓの流速で水道水を流しつつ、20～25°Cで10日間、下記の試験用飼料を与えて飼育した。この間、飼育槽の微生物による汚染と、供試魚の発病を防ぐことに充分注意した。試験用飼料は Table 1 に示したように、(A) HALVER の試験飼料、(B) その中から葉酸と PABA を除去したもの、(C) 同じく葉酸のみを除去したもの、(D) (B) にサルファ剤（スルファニルアミド）を1%添加したものの4種類である。

Table 1. Composition of test diet.

Test diet	Composition
A	Complete diet*
B	Diet deficient in folic acid and <i>p</i> -aminobenzoic acid
C	Diet deficient in folic acid
D	Diet B+Sulfanilamide (1.0%)

* Vitamin-test diet devised by HALVER

各飼料は水分含量が50%になるように水を加えて練り合せ冷蔵庫に保管した。給餌量は1日1尾当たり体重の7%相当量を3回に分けて給与した。最終回の飼料を与えた2時間後、全供試魚から無菌的に腸管を摘出し、各区供試魚の半数について直ちに腸内容物中の葉酸量を測定し、残りの半数については摘出した腸管そのままを予め滅菌しておいた小試験管に入れ、この小試験管を、管内が乾燥しないよう少量の水を入れた大型試験管に入れて密栓し、25°Cに6時間インキュベートした後、腸内容物中の葉酸量を測定した。これは腸管内の葉酸が魚体の代謝系から隔離された状態においた、すなわち体外排出も体内吸収もなくした場合、どのように変化するかを調べようとするのが目

的で、前報¹⁾では摘出した腸管を緩衝液に入れてインキュベートしたが、今回はこの方法を改めて一層魚体内の状態に近づけた条件に置いてみた。なお葉酸の定量は *Streptococcus faecalis* を用いるバイオアッセイ法によった。

結 果 と 考 察

実験の結果は Table 2 のとおりであった。

Table 2. Folic acid concentration in the intestinal contents of carp fed on different diets and variation of the vitamin when incubated at 25°C for 6 hours.

Test diet	Folic acid concentration in the intestinal contents (μg)	
	Before incubation	After incubation
A	1.56	3.84
B	0.28	0.62
C	0.30	0.59
D	0.23	0.41

表中、葉酸含量はすべて供試魚4尾についての平均値で示した。摘出直後の腸内容物中、葉酸総量の最も多かったのはA区、すなわち HALVER の試験飼料を与えたもので、この飼料には葉酸が配合されているので含有量の多いのは当然と思われる。B, C, D の飼料を与えたコイの腸内容物中にも相当量の葉酸が含まれていたが、これらの各飼料には葉酸は加えられていないので、この葉酸は腸内細菌によって生産されたものであろうと考えられる。A から葉酸と PABA を除いた飼料 (B) を与えたコイと、葉酸のみを除いた飼料 (C) を与えたコイとでは、後者の方の腸内に葉酸が多いので、飼料中の PABA が腸内細菌による葉酸の生産に役立ったものと解される。腸内細菌による葉酸の生産を阻害するためにサルファ剤を添加した飼料 (D) を与えたコイの腸内にも B, C 区に比べ、それほど劣らない量の葉酸が存在していたことは予期に反する結果で、その原因は明らかでない。

次に摘出した腸管を、6時間インキュベートして葉酸量の変化を調べたが、これは前記のように生活中の魚体にあつては一方で腸内細菌による葉酸の生産があつても、他方でこれが排泄されたり、あるいは腸壁を通して吸収されたりすれば生産の実態がつかめなくなるので、後者のルートによる腸内からの減少を断つて見たものであるが、その結果は前表のとおりで、各区とも腸内の葉酸量は6時間のインキュベートによって約2倍量に増加した。このことによってコイの腸管内で細菌による葉酸生産の行なわれることは一層明らかにされたが、この場合もサルファ剤の飼料への添加は葉酸の生産に対し特に阻害的には働いていないことがわかる。

実験 II. 摂餌後における腸内葉酸量の変化

実験 I によって、コイにおいては腸内細菌によって葉酸の生産されることがほぼ明らかになったと思われるので、次に飼料摂取後、腸内でどのような経過で葉酸が生産されるかについて実験した。

実 験 方 法

実験 I にほぼ準じた方法で行なった。すなわち体重 100~150 g 程度のコイを 2 日間絶食せしめた後、HALVER の試験飼料を与えつつ 7 日間予備飼育した後、再び 3 日間絶食せしめ、実験 I と同じ A, B, C, D 4 種の飼料を 1 回給与する。この時点から 3 時間目、6 時間目、12 時間目および 24 時間目に各試験水槽から任意に試験魚 3 尾宛を取り上げ、直ちに開腹、摘出した腸内容物中の葉酸含量を測定し、摂餌後時間の経過による腸内容物中の葉酸の消長を調べた。

結 果 と 考 察

実験の結果は Table 3 のとおりであった。

Table 3. Change of folic acid concentration in the intestinal contents of carp after feeding.

Test diet	Times after feeding (hrs)	Weight of intestinal contents (g)	Folic acid in the intestinal contents (μg)
A	3	1.22	1.81
	6	1.82	2.90
	12	2.18	0.10
	24	0.89	0.14
B	3	0.87	0.13
	6	1.02	0.21
	12	1.37	0.11
	24	1.09	0.15
C	3	1.24	0.43
	6	2.67	0.63
	12	1.05	0.10
	24	1.18	0.21
D	3	1.37	0.25
	6	2.59	0.54
	12	1.43	0.14
	24	0.67	0.22

腸内容物中、葉酸量の最も多いのは実験 I の場合と同様、葉酸を含む HALVER 飼料 (A) を与えたコイであったが、葉酸を含まない B, C, D 3 飼料を与えた区のコイにも投餌後 3 時間で相当量の葉酸が腸内に検出された。PABA を含んだ飼料 C を与えたものの方が、PABA を含んでいない飼料 B を与えたものより葉酸量の多かったことは実験 I の結果と一致している。次にこの葉酸量はいずれの飼料を与えたものも摂餌 6 時間後には一勢に増加し、腸内における葉酸の生産が漸次盛んになることを示しているが、この現象は実験 I で、体外に取り出した腸管内で見られたことと一致する。このように 6 時間後に蓄積量の増加した葉酸は、その後各区とも例外なく明らかに減少しているが、この減少が体外への排出によるものか、腸壁を通して吸収されたことによるものか、それともこの両方によるものかなどその原因については差当り明らかでないが、ある程度の吸収が行

なわれたであろうことは想像に難くない。また飼料に添加したサルファ剤が葉酸生成に対して阻害的作用を示していないことも実験Iの場合と同様であるが、要するにこの両実験によれば、コイにおいては腸内で葉酸の生産が行なわれることは明らかで、少なくともその幾分かはコイによって吸収利用されるであろうと考えられる。青江らの実験で、16週間葉酸欠飼料で飼育したコイに欠乏症状が現われなかったばかりか、その肝臓および筋肉中の葉酸量が、葉酸を与えたコイのそれと大差が認められなかったとすると、コイ自体が葉酸を合成するか、腸内細菌によって生産された葉酸が供給源になったかのいずれかによるものであろうが、後者の可能性の方が大きいのではあるまいか。

要 約

コイの腸内細菌によるBビタミン生産に関する研究の一環として葉酸の生産について実験した。

まず腸内細菌の葉酸生産性を知るため、コイに(A)完全飼料(HALVERの試験飼料)、(B)完全飼料から葉酸とPABAを除いたもの、(C)完全飼料から葉酸を除いたもの、(D)B飼料にスルファニルアミド1%を添加したものを給与して10日間飼育した後、腸管を摘出し、その一部で腸内容物中の葉酸量を測定し、他の一部はそのまま25°Cに6時間インキュベート後、同様に腸内容物中の葉酸を定量した。その結果、飼料Aを与えたものに葉酸が最も多かったが、B、C、Dを与えたコイの腸内にも前者の十数%に当る葉酸が存在し、この葉酸は腸管を6時間インキュベートすることによって約2倍量またはそれ以上に増加した。(Table 2)

次に摂餌後、腸管内における葉酸量の変化を見るため、2日間絶食せしめ、次で7日間完全飼料による予備飼育を行なった後、再び3日間絶食せしめて前記A、B、C、Dの飼料を与え、その3、6、12および24時間後に腸内容物中の葉酸を定量した結果、摂餌3時間後の腸内容物中の葉酸総量はAを与えたものが最も多かったが、Bにもその約18%、Cには約68%、Dには約22%の葉酸が存在し、摂餌6時間後には1.5倍(B)ないし3.4倍(A)に増加したが、摂餌12時間後には各区とも著しく減少した。また摂餌24時間後は12時間後と大差ないが、幾分増加した区もあった。(Table 3)

以上の実験によってコイの腸内で葉酸が生産されることがわかり、少なくともその一部はコイによって吸収利用されるであろうことが推定された。

この研究が本学部佐藤洋次、高木一郎両学生の協力を得て行なわれたことを附記し、深謝の意を表す。

文 献

- 1) 柏田研一・手島新一・金沢昭夫(1970): 日水誌, 36, 421-424.
- 2) HALVER, J. E. (1957): J. Nutrition, 62, 225-243.
- 3) PHILLIPS, A. M. JR., et al. (1961): Cortland Hatchery Report, No.29, 58-60.
- 4) 北村佐三郎・諏訪富雄・大原脩平・仲川憲一(1967): 日水誌, 33, 1120-1125.
- 5) McLAREN, B. A., E. KELLER, D. J. O'DONNELL and C. A. ELVEHJEM. (1947): Arch. Biochem., 15, 169-178.
- 6) HALVER, J. E. (1961): U. S. Trout News, Nov.-Dec., 8-9 and 15.
- 7) 青江 弘・増田 績・齊藤孝士・高田俊子(1967): 日水誌, 33, 1968-1071.