

魚類の腸内細菌によるビタミンB群の消長—Ⅳ

コイの腸内細菌によるニコチン酸の生産*

手島新一・柏田研一**

Studies on the Production of B-Vitamins by Intestinal Bacteria of Fish-IV.

Production of Nicotinic Acid by Intestinal Bacteria of Carp*

Shin-ichi TESHIMA and Ken-ichi KASHIWADA**

Abstract

In order to determine how much intestinal bacteria synthesize nicotinic acid during growth, 209 strains of bacteria were isolated from intestinal canal of carp, and the production of this vitamin by these bacteria was examined. The results obtained were as follows.

1. Decrease of the nicotinic acid content in the medium was observed in 47 strains when they were cultivated in bouillon medium at 30°C for 24 hours. It was found that only a few bacteria could produce notable nicotinic acid under these conditions. All the 25 strains of bacteria, which can grow in Massen's medium, produced nicotinic acid in some extent. (Table 1, 2)

2. Accumulation of nicotinic acid in the medium surpassed that of bacterial body, and the acid concentration reached to a maximum at about 2 days of cultivation. (Table 3, 4)

ニコチン酸 (以下 NiA と略記) がマス^{1),2)}, サケ³⁾, コイ⁴⁾ にとって必要なビタミンの一つであって、これが欠けると、食欲喪失、生長不良、皮膚出血などの症状が現われ、死亡率の高まることも知られているが、一方 NiA が腸内細菌によって生産されることもまた明らかにされている^{5)~8)}。著者らは前報⁹⁾において、コイの腸内に NiA 生産菌および分解菌の存在することを推定したが、引続き生産菌の分離と、分離した菌による NiA の生産量、菌体内外における NiA の蓄積について実験したので、その結果を報告する。

実験方法

NiA 生産菌の分離と分離した菌による NiA 生産量

鹿児島市内の養鯉場から購入した体重約 800 g のコイを用い、前報¹⁰⁾と同じ方法で腸内細菌 209 株を分離した。これら各菌をグイオン培地と Massen 培地を用いて培養し、NiA の生産量を測定した。グイオン培地の場合は、径約 1.5 cm の試験管に 5 ml の培地をとって滅菌、冷却後各菌の 1 白金耳を接種し、綿栓をして 30°C で 24 時間静置培養した後、総 NiA 量、す

* 1967年11月26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)

なわち菌体を含むまま培養液中の NiA 量を *L. arabinosus* ATCC 8014 によるバイオアッセイ法で測定し、その値から菌を接種せず同様に処理したもの(対照)の NiA 量を差引いたものを菌によって生産された NiA とした。ブイヨン培地は、肉エキスとペプトン各 10.0g, NaCl 5.0g を水 1000 ml にとかし、pH を 6.8 に調整したものである。

次に Massen 培地の場合も同じくその 5 ml を試験管に採って滅菌し、各菌を 1 白金耳接種し、綿栓をして 37°C, 24 時間の静置培養で増殖の認められたもののみにつき引き続き計 72 時間培養した後、同様に NiA 量を測定した。この場合 37°C で培養したのは、第 1 報⁹⁾の実験で、この培地での腸内細菌による NiA の生産は低温(15°C, 25°C)におけるよりも高温(37°C)における方が多かったためである。この培地には NiA が含まれていないので対照区は設けず、上記の測定値を以て菌の生産した NiA とした。Massen 培地は、アスパラギン 10.0g, リンゴ酸 0.7g, Na₂HPO₄ 2.0g, Na₂CO₃ 2.5g, MgSO₄·4H₂O 0.4g, CaCO₃ 0.01g, グルコース 20.0g を水 1000 ml にとかし、pH を 6.8 に調整したものである。

菌体内外における NiA の蓄積

この実験には Massen 培地を用いた。この培地で増殖可能な腸内細菌のうち、NiA 生産量の多かった 5 株につき、菌体内外における NiA 蓄積量を調べた。すなわち試験管に採り滅菌した培地 5 ml に 1 白金耳の菌を接種し、37°C に 24 時間静置培養後、遠心沈澱によって集菌し、沈澱した菌体は滅菌生理食塩水で 2 回洗滌し、洗液は培地の方に加えた。菌体、培地の NiA 量を測定して夫々菌体内外の NiA 蓄積量とした。さらに 1 株については同様に実験して菌体内外における NiA 蓄積量の時間的消長を調べた。

Bioautography による確認

この実験で *L. arabinosus* によって定量された NiA 活性物質が真の NiA であるか否かを知るため、Bioautography を行なった。すなわち NiA 生産量の比較的多かった菌株 No. 10 の 1 白金耳を 500ml の Massen 培地に接種し、37°C に 72 時間培養後、遠心分離して菌体を除いた培地を減圧下 50°C 以下の温度で約 20 ml に濃縮し、水飽和ブタノールで東洋沱紙 No. 51 に展開後、1 cm 間隔に細断した沱紙片に含まれる NiA 活性をバイオアッセイによって調べ、同様に展開した市販の純 NiA のそれと比較した。

結果と考察

分離した腸内細菌をブイヨン培地で培養した場合の NiA 含量は、試験管 1 本中最低 17.3 mγ, 最高 37.0 mγ であったが、対照区が 26.0 mγ であったので、培地中の NiA を減少せしめた細菌もあった訳である。Table 1 は NiA 生産量による菌株数の分布を示したものである。

分離した 209 株の細菌のうち、培地中の NiA を減少せしめたものは 47 株であった。それ以外の細菌を 2 mγ 間隔の NiA 生産量で区分して見た前表によると、6 mγ までにはほぼ均等に各区に分散しているが、それ以上になると急に菌株数が少なくなり、腸内細菌のうち前記の培養条件で NiA 生産量の比較的多かった細菌は少数に過ぎないことがわかった。Massen 培

地に培養した場合における NiA 生産量をとりまとめた結果を Table 2 に示した。

Table 1. Production of nicotinic acid by intestinal bacteria of carp, grown at 30°C for 24 hours in bouillon medium.

Produced nicotinic acid during growth	Number of strain
-9.0 ~ -0.1 mγ	47
0.0 ~ 2.0	41
2.1 ~ 4.0	50
4.1 ~ 6.0	47
6.1 ~ 8.0	17
8.1 ~ 11.0	7

Table 2. Production of nicotinic acid by intestinal bacteria of carp, grown at 37°C for 72 hours in Massen's medium.

Produced nicotinic acid during growth	Number of strain
15 ~ 20 mγ	6
21 ~ 25	6
26 ~ 30	7
31 ~ 35	1
36 ~ 40	2
41 ~ 45	3

この培地に接種した場合、37°C、24 時間培養で混濁状態から繁殖の認められた細菌は 25 株であったが、前記の条件で生産された NiA 量は試験管 1 本中最低 14.5mγ、最高 43.0mγ、平均 22.7mγ で、この場合はいずれの細菌によっても NiA の生産が見られたが、ブイヨン培地の場合とは培養温度や時間などが異なっているので、NiA 生産に対する培地組成の影響をこの値から比べることはできない。なお比較的 NiA 生産量の多かった 5 株の細菌は、いずれもグラム陰性の孢子形成の認められない桿菌であった。

この 5 株の細菌について、前記の方法で菌体内外における NiA 蓄積量を調べた結果を Table 3 に示した。

Table 3. Accumulation of nicotinic acid in the medium and in bacterial cells.

Strain No.	Accumulated nicotinic acid	
	in the medium	in bacterial cells
10	39.5 mγ	6.3 mγ
33	32.0	5.0
70	34.8	5.3
120	32.7	5.0
202	20.3	4.8

Each strain was grown at 37°C for 72 hours in the test tube containing 5 ml of Massen's medium.

37°C, 72 時間の培養で蓄積される NiA 量は, どの細菌の場合も菌体内よりも菌体外, すなわち培養液中における方が遙かに多く, 5 株中 4 株は両者の比が 5 倍以上であった. 宿主動物に利用されるビタミンは菌体外に存在するものと考えられるので, これらの腸内細菌によって生産される NiA は, コイに対する NiA の補給に役立つ部分が多いと考えられる.

次に No. 120 の細菌を Massen 培地で 37°C に 72 時間にわたって培養した場合, 菌体内外に蓄積される NiA 量の消長を調べた結果を Table 4 に示した.

Table 4. Accumulation of nicotinic acid in the medium and in bacterial cells during growth of intestinal bacteria.

Incubation time	Accumulated nicotinic acid	
	in the medium	in bacterial cells
24 hrs	31.5 μ g	6.6 μ g
48	35.5	9.5
72	35.0	10.0

No. 120 strain of bacteria was incubated at 37°C in Massen's medium.

この培養条件では, 培養開始後 48 時間で菌体内外とも NiA の蓄積量は最高値に達したが, 24 時間でほぼこの水準に達することがわかる.

以上の各実験で定量された NiA 活性物質が真の NiA であるか否かを確認するために No. 10 菌の生産した NiA 活性物質について行なった Bioautography の結果を Fig. 1 に示した.

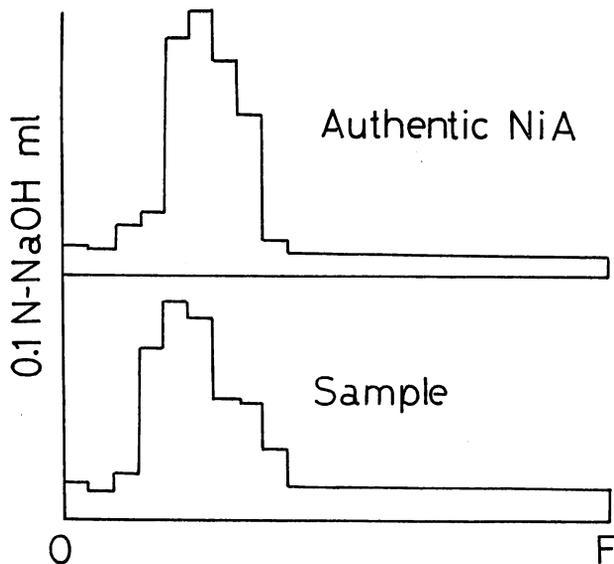


Fig. 1. Bioautography of NiA synthesized by intestinal bacteria (strain No. 10).

ただ 1 種の細菌について得られた結果ではあるが, 図に見られるように No. 10 の菌株によって生産された NiA 活性物質はペーパークロマトグラフィーにおける移動度が NiA のそ

れに一致しているとみなし得るので、前者は真の NiA であると判定される。

摘 要

コイの腸内から 209 株の細菌を分離し、それらによる NiA の生産について実験した。

1. プイオン培地を用い、30°C で 24 時間静置培養した結果、209 株中 47 株の細菌は培地中の NiA を減少せしめ、NiA 生産力の比較的強いと認められる細菌は少数にすぎなかった。Massen 培地中に繁殖し得た細菌は 209 株中 25 株に過ぎなかったが、これら 25 株の細菌はいずれも NiA を生産した。

2. 培養中の NiA の蓄積は菌体内におけるよりも菌体外における方が遙かに多く、Massen 培地による 37°C の培養では、NiA 蓄積量が最高値に達したのは培養開始 2 日後であったが、1 日後でほぼこの水準に達した。

3. この実験で定量された NiA 活性物質は、Bioautography による試験の結果、真の NiA と推定された。

この研究が本学部金沢昭夫助教授の援助と、西村健一、福永洋子両氏の協力を得て行なわれたことを附記し、深謝の意を表する。

文 献

- 1) McLAREN, B. A., E. KELLER, D. J. DONNELL and C. A. ELVEJEM (1957): *Arch. Biochem.*, **15**, 169-178.
- 2) PHILLIPS, A. M., JR and D. R. BROCKWAY (1957): *Prog. Fish-cult.*, **19**, 119-123.
- 3) HALVER, J. E., (1957): *J. Nutrition*, **62**, 225-243.
- 4) 青江 弘・益田 績・高田俊子(1967): 日水誌., **33**, 681-685.
- 5) BENESCH, R. (1945): *Lancet*, **1**, 718-719.
- 6) HUFF, J. W. and W. A. PERLZWEIG (1941): *J. Biol. Chem.*, **142**, 410-416.
- 7) ELLINGER, P., R. A. COULSON and R. BENESCH (1945): *Nature*, **154**, 270.
- 8) CARROLL, F. D., H. GOSS and C. E. HOWELL (1949): *J. Animal Sci.*, **8**, 290-299.
- 9) 柏田研一・手島新一(1966): 日水誌., **32**, 961-966.
- 10) 手島新一・柏田研一(1967): 日水誌., **33**, 979-983.