

短 報
Short Communications

ラット普通糞と含水糞中の微生物叢

萩原友子*・黒澤 亮*・祐森誠司*・池田周平**・稲元民夫***・栗原良雄*

(平成 15 年 8 月 21 日受付/平成 15 年 12 月 10 日受理)

要約: 3 週齢の SD 系雄性ラット 12 匹を食糞行動を許容した対照区と食糞行動阻止区に 6 匹ずつ配し, 4 週間の飼育期間中に, 対照区からは普通糞を, 食糞行動阻止区からは含水糞を採取し, それぞれの糞の微生物数を測定した。普通糞では含水糞に比べ *Staphylococci* と *Veillonellae* が多く, *Streptococci* と *Bacteroidaceae* が少ないことが明らかとなった。普通糞と含水糞で微生物叢が異なることは, 含水糞に含まれるビタミン類の合成や消費に関わるものと考えられた。

キーワード: ラット, 含水糞, 微生物叢

緒 言

ラットの食糞行動における栄養学的意義についての研究報告は数多くあるが, ウサギの硬糞, 軟糞のように排泄糞を分類している例は少ない。KURIHARA らはラットを食糞行動阻止下で飼育した際に排泄される糞には普通糞と含水糞があり, このうち含水糞が食糞行動によって摂取されることを明らかにしている¹⁾。また, SUKEMORI らは, 含水糞は普通糞に比べて, ビタミン B₁₂ を約 3.4 倍, 葉酸を約 4.8 倍含むことを報告している²⁾。これらビタミンは核酸やタンパク質の合成に関与することから, 食糞行動を阻止したラットにおいて摂取不足により成長が遅延すると推測されている^{1,3-7)}。

水溶性ビタミンは腸内微生物によって合成されることが知られている。飼料に難消化性繊維を添加した際の糞や盲腸内容物の微生物叢に関する報告は数多くあるが, 普通糞と含水糞を区別して, 微生物叢を確認した例はみられない。先に述べたように, 普通糞と含水糞ではビタミン含量に大きな差があり, これら糞中に含まれる微生物叢は異なると考えられる。

そこで本試験は, 阻止ケージにより完全に食糞行動を阻止した際の普通糞と含水糞の糞中微生物叢の比較検討を目的として行った。

材料および方法

日本クレア(株)より購入した 3 週齢のコンベンショナル SD 系雄性ラット 12 匹を対照区(食糞行動許容区)と食糞行動阻止区の 2 区に 6 匹ずつ配分した。室温 23±1℃, 12 時間の明暗周期に設定した調温室内で 1 週間の予備飼育を行った。対照区のラットは市販の金属ケージで単飼したが, 食糞行動阻止区のラットについては, GEYER ら(1946)⁸⁾が考案し, さらに我々が改良を加えた⁹⁾, 筒型阻止

ケージに 1 匹ずつ収容し, 市販の金属ケージに頭の向きが逆になるように 2 匹ずつ吊して 4 週間の飼育試験を行った。供試飼料は日本クレア(株)の飼育繁殖用飼料 CE-2 を毎朝 9 時に給与した。飼料および水は自由摂取とした。

糞は両区ともにケージの下に準備した受け皿で, 尿やこぼした飼料の付着のないものを採取した。対照区からは食糞行動を許容して含水糞を摂取させた際の普通糞を, 食糞行動阻止区からは含水糞を各々採取し, それぞれの微生物数を測定した。

微生物の分離は, MITSUOKA *et al.*¹⁰⁾の方法に準拠して, 非選択培地 3 種(RGCA agar, TS agar (日水), EG agar (日水))ならびに選択培地 11 種を用いて行った。嫌気性菌用希釈液で 10 倍段階希釈した希釈液をそれぞれの選択培地, すなわち *Enterobacteriaceae* には DHL agar (日水), *Staphylococci* には PEES agar, *Streptococci* には TATAC agar, また酵母および糸状菌には PD agar を調製して塗抹し, TS agar とともに好氣的に 35℃, 24 時間培養した。また *Bifidobacteria* は BS agar, *Lactobacilli* は変法 LBS agar, *Veillonellae* は変法 VS agar, *Eubacteria* は ES agar, *Bacteroidaceae* は *Bacteroides* agar (日水), *Clostridia* は NN agar に塗抹して, EG agar とともにアネロバック(三菱ガス)で嫌氣的に 35℃, 48 時間培養した。*Selenomonads* は M agar に塗抹し, RGCA agar と共にロールチューブ法にてそれぞれ 35℃, 2 ないし 5 日間嫌気培養した。培養後にそれぞれの平板上に観察された典型的なコロニーをそれぞれの属とみなし, 各糞 1 g 当たりの生菌数(Colony forming unit: CFU)を算出した。統計処理は一元配置分散分析で検定した。この際の反復数は 6 とした。

結 果

好気培養菌数: 普通糞では *Enterobacteriaceae* が 5.37

* 東京農薬大学大学院農学研究科畜産学専攻

** 東京農薬大学農学部畜産学科

*** 秋田県立大学生物資源学部応用生物科学科

± 0.48 (log CFU/g), Staphylococci が 7.66 ± 0.54 (log CFU/g), Streptococci が 8.06 ± 0.34 (log CFU/g), 含水糞では Enterobacteriaceae が 4.48 ± 0.60 (log CFU/g), Staphylococci が 5.89 ± 0.36 (log CFU/g), Streptococci が 8.90 ± 0.12 (log CFU/g) となった。酵母と糸状菌はいずれの糞においても検出限界以下の数値であった。普通糞では含水糞に比べ Staphylococci が有意に高く、また有意の差は認められなかったが、含水糞では普通糞に比べ Streptococci が高くなる傾向を示した。

嫌気培養菌数：普通糞では、Lactobacilli が 8.67 ± 0.22 (log CFU/g), Bifidobacteria が 7.82 ± 0.28 (log CFU/g), Veillonellae が 6.62 ± 0.36 (log CFU/g), Eubacteria が

3.49 ± 0.45 (log CFU/g), Bacteroidaceae が 7.42 ± 0.34 (log CFU/g), Clostridia が 9.12 ± 0.20 (log CFU/g), Selenomonads が 5.78 ± 0.40 (log CFU/g), 含水糞では Lactobacilli が 8.46 ± 0.43 (log CFU/g), Bifidobacteria が 7.60 ± 0.12 (log CFU/g), Veillonellae が 5.78 ± 0.93 (log CFU/g), Eubacteria が 3.54 ± 0.29 (log CFU/g), Bacteroidaceae が 8.74 ± 0.40 (log CFU/g), Clostridia が 9.04 ± 0.19 (log CFU/g), Selenomonads が 4.98 ± 0.63 (log CFU/g) となった。有意の差は認められなかったが、普通糞では含水糞に比べ Veillonellae が高く、また含水糞では普通糞に比べ Bacteroidaceae が有意に高くなる傾向を示した。

考 察

ラットの含水糞にはタンパク質合成、核酸合成に関わるビタミンが多く含まれており、食糞行動にはそれらビタミンを摂取するという栄養学的意義があると考えられる。本試験は、普通糞と含水糞のビタミン含量が異なることから、普通糞と含水糞の微生物叢の比較検討を目的として行った。

含水糞中の生菌数は、普通糞に比べて、好気培養菌では Streptococci が高くなる傾向を示し、また嫌気培養菌では Bacteroidaceae が有意に高い数値を示した。この傾向は砂川ら¹¹⁾が報告しているラットの盲腸内容物の微生物叢と類似している。通常飼育下で、盲腸内容物と排泄糞（普

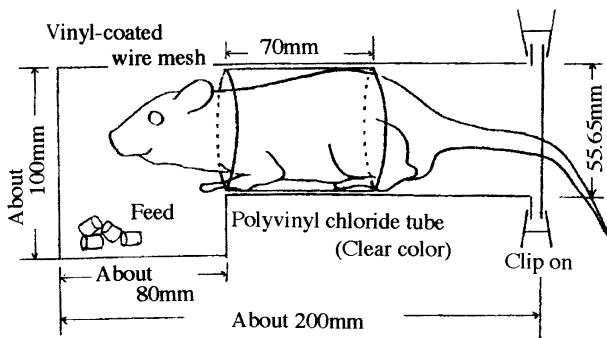


Fig. 1 Coprophagy-prevented tube cage

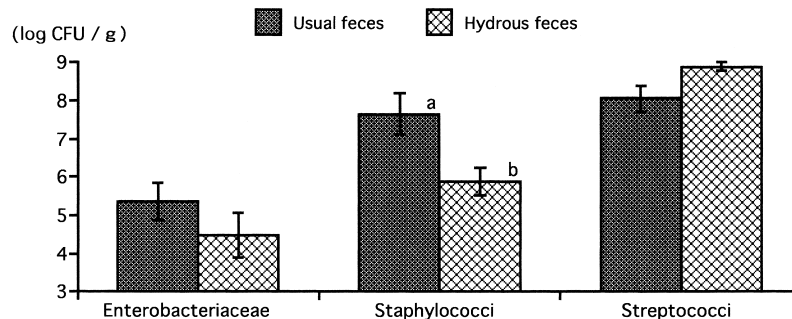


Fig. 2 Comparison of aerobic-cultured bacteria in each feces

Significant difference was recognized between the different superscript letters (n=6, P<0.05).

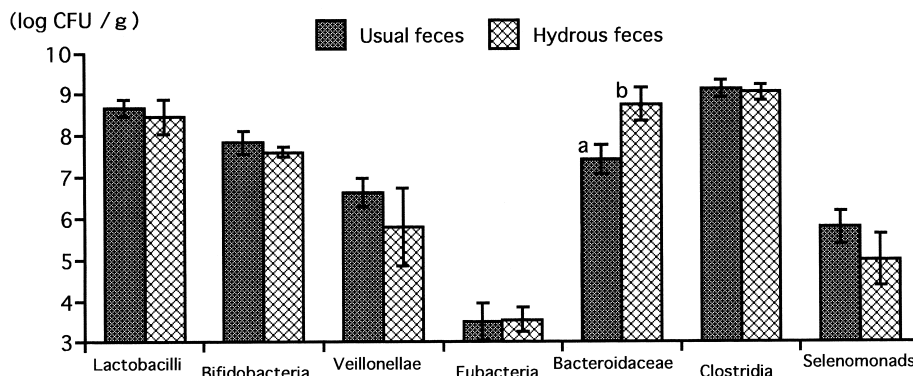


Fig. 3 Comparison of anaerobic-cultured bacteria in each feces

Significant difference was recognized between the different superscript letters (n=6, P<0.05).

通糞)では優勢な微生物群は異なるが、含水糞中の優勢な微生物群は盲腸内容物と類似であったことから、含水糞は微生物学的には盲腸内容物が殆ど変化を受けない状態で排泄されており、ラットは食糞行動において盲腸内容物を摂取していると考えられる。これは、KENAGY と HOYT¹²⁾、TAKAHASHI と SAKAGUCHI¹³⁾ が、他の齧歯目で盲腸内容物を摂取しているという報告と一致した。

食糞行動を阻止することによる微生物叢への影響について GUSTAFSSON と FITZGERALD の食糞行動阻止により糞や盲腸内容物中の乳酸菌量が減少したという報告¹⁴⁾とは逆に、LEV *et al.*¹⁵⁾ は糞中の Lactobacilli 数は食糞行動の許容または阻止により左右されないことを報告している。上述した報告では糞を分別することなく、採取した糞を均一と考え微生物定量を行っているのに対し、本試験では、KURIHARA の報告¹⁾に基づき糞の分別を行っている。よって本試験の結果において、含水糞が普通糞に比べ Streptococci や Bacteroidaceae を多く含んでいたことは、食糞行動を阻止することによって、これら微生物数に差が生じたのではなく、機序はまだ明らかでないが、普通糞と含水糞が形成される過程の違いによるものと考えられる。また BROWN *et al.*¹⁶⁾ はラットやウサギにおける食糞行動は、ムラミルペプチドの一種で、細菌細胞壁の構成分子である Factor S (FS) の効果的な摂取手段であると述べている。今回 FS については確認を行っていないが含水糞中に水溶性ビタミンが多いことは SUKEMORI ら²⁾により報告されており、さらに、ヒトの糞便でも、結腸に存在する細菌により合成されたビタミン B₁₂ は 1 日の必要量以上に含まれている¹⁷⁾ が、ヒトは糞食でもしない限り、このビタミンを利用できないとする報告¹⁸⁾もある。今回、含水糞中に多いと判断された Bacteroidaceae ならびに Streptococci とビタミン合成および消費に関して、Bacteroidaceae はビタミン類 (B₁, B₂, B₆, B₁₂, K, E, ニコチン酸, ビオチン, 葉酸など) を合成して、宿主に利用させることが広く知られている。また Streptococci は、アミノ酸やビタミンなどを要求する場合が多いといわれている。さらに光岡¹⁹⁾は葉酸を合成する *Escherichia coli* と、これを必要とする *Streptococcus faecalis* とのビタミン合成の面での共生を示唆している。従って、ビタミン B₁₂, 葉酸を合成する Bacteroidaceae が含水糞中に多く含まれることは、含水糞にこれらビタミンが多く含まれることを裏付ける結果と考えられた。しかし、これらビタミンを消費する側にある Streptococci が多く含まれるのはビタミン合成の面での共生のためではないかと考えられる。このことから今後、Bacteroidaceae のみを抑制する抗菌剤を投与するなどして葉酸量と Streptococci 数の推移を見極めて判断する必要があると思われる。

謝辞：終わりに、本報告を作成するにあたり御校閲を賜りました、鹿江雅光博士ならびに本試験の実施にあたり御協力を賜りました、黒澤利江氏に深謝致します。

参考文献

- 1) KURIHARA, Y., IKEDA, S., SUKEMORI, S. and ITOH, S. 1997. Hydrous Feces Induced Coprophagy in Rat., *Jpn. J. Livest. Management*, **32** (3), 91-98.
- 2) SUKEMORI, S., IKEDA, S., KURIHARA, Y. and ITO, S. 2002. Amino acid, mineral and vitamin levels in hydrous feces obtained from coprophagy-prevented rats., *J. Anim. Physiol. a Anim. Nutr.*, **87**, 213-220.
- 3) BARKI, V.H., DERSE, P.H., COLLINS, R.A. HART, E.B. and ELVEHJEM, C.A. 1949. The influence of coprophagy on the biotin and folic acid requirements of the rat., *J. Nutr.*, **37**, 433-456.
- 4) BARNES, R.H. and FIALA, G. 1958a. Effect of the prevention of coprophagy in the rat. I. Growth studies., *J. Nutr.*, **64**, 533-540.
- 5) BARNES, R.H., FIALA, G. and KWONG, E. 1963. Decreased growth rate resulting from prevention of coprophagy., *Federation Proc.*, **22**, 125-128.
- 6) DAFT, F.S., MCDANIEL, E.G., HERMAN, L.G., ROMINE, M.K. and HEGNER, J.R. 1963. Role of coprophagy in utilization of B vitamins synthesized by intestinal bacteria., *Federation Proc.*, **22**, 129-133.
- 7) 池田周平・祐森誠司・栗原良雄・伊藤澄彦, 2001. 食糞行動の阻止時間の相違がラットの成長におよぼす影響, *東京農業大学農学集報*, **46**, 2, 124-129.
- 8) GEYER, R.P., GEEYER, B.R., DERSE, P.H., ZINKIN, T., ELVEHJEM, C.A. and HART, E.B. 1946. Growth studies with rats kept under conditions which prevent coprophagy., *J. Nutr.*, **33**, 129-142.
- 9) SUKEMORI, S., IKEDA, S., KURIHARA, Y. and ITO, S. 2000. Comparison of Three Types of Equipment for Preventing Coprophagy in Rats., *Jpn. J. Livest. Management*, **36** (2), 69-75.
- 10) MITSUOKA, T., OHNO, K., BENNO, Y., SUZUKI, K. and NAMBA, K. 1976. Die Faekalflora bei Menschen. IV. Mitteilung. Vergleich des neu entwickelten Verfahrens mit dem bisherigen üblichen Verfahren zur Darmfloraanalyse., *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg., I. Abt. Orig.*, **A234** : 219-233.
- 11) 砂川武史・青山祐美・松山 惇・新井千秋・清澤 功, 2001. プロピオン酸トリグリセリドのラット糞便および盲腸内容物のマイクロフローラと有機酸組成に及ぼす影響, *日本栄養・食料学会誌*, **54**, 2, 71-80.
- 12) KENAGY, G.J. and HOYT, D.F. 1980. Reingestion of feces in rodents and its daily rhythmicity., *Oecologia*, **44**, 403-409.
- 13) TAKAHASHI, T. and SAKAGUCHI, E. 2000. Role of the furrow of the proximal colon in the production of soft and hard feces in nutrias, *Myocastor coypus*., *J. Comp. Physiol. B*, **170**, 531-535.
- 14) GUSTAFSSON, B.E. and FITZGERALD, R.J. 1960. Alteration in intestinal microbial flora of rat with tail cups to prevent coprophagy., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **104**, 319-322.
- 15) LEV, M., ALEXANDER, R.H. and LEVENSON, S.M. 1966. Stability of the *Lactobacillus* Population in Feces and Stomach Contents of Rats Prevention from Coprophagy., *J. Bacteriol.*, **92**, 1, 13-16.
- 16) RICHARD, B., PRICE, R.J. KING, M.G. and HUSBAND, A.J. 1988. Autochthonous Intestinal Bacteria and Coprophagy: A Possible Contribution to the Ontogeny and Rhythmicity of Slow Wave Sleep in Mammals., *Medical Hypotheses*, **26**, 171-175.

- 17) GIRDWOOD, R.H., 1960. The intestinal content in pernicious anemia of factors for the growth of *Streptococcus faecalis* and *Lactobacillus leichmanni*, *Blood*, 5, 1009–1016.
- 18) 矢島高二, 1990. 栄養素の補給, 光岡知足編, 腸内細菌学, 朝倉書店, 東京, 307–313.
- 19) 光岡知足, 1978. 腸内細菌と家畜の生産性, 日獣会誌, 31, 259–267.

Microflora in Usual Feces and Hydrous Feces of Rats

By

Tomoko HAGIWARA*, Akira KUROSAWA*, Seizi SUKEMORI*, Shuhei IKEDA**, Tamio INAMOTO*** and Yoshio KURIHARA*

(Received August 21, 2003/Accepted December 10, 2003)

Summary : Hydrous feces were ingested by rats in coprophagous behavior. Twelve healthy male Sprague-Dawley strain rats (3 weeks old) were divided into a control group (coprophagy-allowed) of 6 rats and a coprophagy-prevented group of 6 rats. The usual feces from the control group and the hydrous feces from the coprophagy-prevented group were collected during 4 weeks of the experimental period. The viable number of microorganisms in the feces was estimated. The numbers of Staphylococci and Veillonellae, in the usual feces were higher than those of the hydrous feces. Furthermore, the numbers of Streptococci and Bacteroidaceae in the usual feces were lower than those of the hydrous feces. The differences of microflora between the usual feces and hydrous feces seemed to relate to the synthesis and consumption of vitamins in hydrous feces.

Key Words : rat, hydrous feces, microflora

* Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

*** Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University