

ビタミン B₁ 分解菌の簡易検出法の開発

佐藤 彰 一

A Simple Technique for the Detection of Thiaminolytic Bacilli

Shoichi SATO

概 要

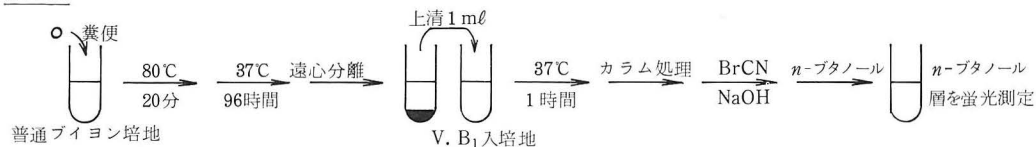
腸内細菌よりビタミン B₁ 分解菌の存在を見いだすには従来、試験管培養した後、カラム操作等数多くの煩雑な操作を必要としている。そこで、ビタミン B₁ を平板培地自体に混入し、培養後、残存ビタミン B₁ を染色し、分解菌の検出をする平板法の開発を試みた。染色法としてはビタミン B₁ をチオクロームとし、その蛍光をみるチオクローム法、さらに、*p*-アミノアセトフェノンジアゾニウム塩で、赤色化合物とする p-AAP 法を検討し、ビタミン B₁ 分解菌の簡易検出法を完成させた。

はじめに

脚気、多発性神経炎の原因がビタミン B₁ 不足によることは周知の事実である。現在は、血液中のビタミン B₁ 濃度の測定を行い¹⁾、欠乏の指針としているが TPP 効果を求めるほうがより正確なビタミン B₁ 欠乏性疾患の診断を得ることができるという。このビタミン B₁ 欠乏の原因として、ビタミン B₁ 摂取不足は当然であるが、摂取量が十分であっても腸内細菌による分解のための不足も考えられる。松川、三沢は人糞便中よりビタミン B₁ 分解作用の強い菌を単離し、*Bacillus thiaminolyticus* Mazukawa et Misawa (MM菌) と、命名している。さらに、木村、青山は⁴⁾、性状の異なるビタミン B₁ 分解菌を単離し、*Bacillus aneurinolyticus* Kimura et Aoyama (KA菌) と命名した。さらに嫌気性菌として、*Clostridium thiaminolyticus* Kimura et Liao (KL菌)⁵⁾ も単離している。糞便からのビタミン B₁ 分解菌の検出法は、従来は図 1 に示すごとくイオン交換カラム等煩雑な操作段階を必要とし、それにともない、検出に長時間を要する。そこで私達は、操作段階の省略化および時間の短縮を目的として、従来の試験管法を改め、シャーレ中でビタミン B₁ 分解菌の検出を行う平板法を、開発しようと試みた。従来の試験管法と同様にビタミン B₁ をチオクロームとし、その蛍光を観測する方法である。ビタミン B₁ 分解菌が存在する場合、そのコロニー周辺はほとんど蛍光を発せず、他の部分は残存しているビタミン B₁ がチオクロームとなり、蛍光を発し、分解菌の検出が出来る。

さらに、蛍光法においては、紫外線ランプおよび暗室が必要であるので、ビタミン B₁ を赤色

従来法



簡易法



図1 従来法と簡易法の比較

化合物とする *p*-アミノアセトフェノンジアゾ化法 (*p*-AAP 法)⁷⁾ を応用した方法も開発した。この場合は、ビタミン B₁ 分解菌のコロニーの周辺は、赤色に染まらない。

これら 2 つの検出法の開発にまつわる諸条件の検討を行ったので報告する。

1 試 薬

a) チオクローム蛍光法

1) 培地：栄研化学工業 K. K. 普通寒天培地 3.5g，および β -フェネチルアルコール 0.2 ml を水 100 ml に溶解しオートクレーブで滅菌後，和光純薬工業 K. K. チアミン塩酸塩 10 mg を混じり，シャーレに分注した。

2) BrCN 液：臭素 2 ml を水 100 ml に加え，臭素がなくなるまで 10g/dl チオシアン酸カリウム溶液を添加した。

3) 2mM 赤血塩溶液：赤血塩 658mg を水にとかし，1000 ml とした。

4) 10% NaOH 溶液：水酸化ナトリウム 10g を水にとかし 100 ml とした。

b) *p*-AAP 法

1) 培地：栄研化学工業 K. K. トリプトソイ寒天培地 4g および β -フェネチルアルコール 0.2 ml を水 100 ml にとかし，オートクレーブで滅菌後，和光純薬工業 K. K. チアミン塩酸塩 20 mg を混じり，シャーレに分注した。

2) A 液：*p*-アミノアセトフェノン 0.6g を塩酸 9 ml にとかし，水を加えて 100 ml とした。

3) B 液：亜硝酸ナトリウム 28g を水にとかし 100 ml とした。

4) C 液 (アルカリ液)：水酸化ナトリウム 20g および，炭酸水素ナトリウム 28g を水にとかし，350 ml とした。

2 検出操作

a) チオクローム法

便を1白金耳とり、普通ブイヨン培地1mlに浮遊させ、80℃20分間加温し37℃4時間前培養する。これを10mg/dlビタミンB₁入り普通寒天培地に穿刺および塗布し、37℃48時間(あるいは、炭酸ガス通気法で24時間)培養する。この培地に赤血塩水溶液3mlを加え、さらに10%NaOH溶液1mlを加え、ビタミンB₁を、チオクロームとし、3~4分後液をすて、365nmの紫外線を当て、蛍光を観察する。ビタミンB₁分解菌が存在すれば、コロニーの周辺が蛍光を発しない(図2)。

b) p-AAP法

チオクローム法と、同様の前培養を行い、培養液を20mg/dlビタミンB₁入りトリプトソイ寒天培地に穿刺および塗布し、37℃、48時間(あるいは、炭酸ガス通気培養で24時間)培養する。この培地に、p-AAPジアゾ試薬(A液0.8ml、B液0.2mlおよび水10mlを混和し、さらにC液6mlを加えた液)を加え、ビタミンB₁を赤色化合物とする。3~4分後、液をすて、培地が赤色に呈色することを観察する(図3)。

3 結果および吟味

1) 培地の検討

ビタミンB₁分解菌に用いる培地としては、その発育が十分であり、しかも検出に用いる反応に阻害がないことが条件となる。ここで用いたビタミンB₁分解菌としては、農林省家畜衛生試験場より、分与していただいた、*Bacillus thiaminolyticus* Matzukawa et Misawa (MM菌)



図2 チオクローム蛍光法を用いた簡易検出法



図3 p-AAP法を用いた簡易検出法

NIAH461株である。

表1 各種培地の蛍光強度及びMM菌の発育状態(24時間 37℃)

	合成培地※	普通寒天培地	トリプトソイ寒天培地
蛍光強度	±	+	卅
M. M. 菌発育状態	+	卅	卅

※ 合成培地組成(1000mlあたり)

酵母エキス	2 g	ポリペプチド	10 g
NaCl	5 g	寒天	15 g

表1に示されるようにMM菌は普通寒天培地においても十分発育するが、トリプトソイ寒天培地ではさらによく発育する。しかし、普通寒天培地、とくにトリプトソイ寒天培地においては、培地自体にかなりの蛍光がみられるため、チオクローム蛍光法の培地としては、適当とはいえない。そこで蛍光物質の少ない培地の調製を試みたが、MM菌が普通寒天培地以上に発育する培地を調製することは出来なかった。以上のことより、チオクローム蛍光法では、培地自体に多少の蛍光は存在するが、十分ビタミンB₁が分解された部分の判定ができる普通寒天培地を用いることにした。また、p-AAP法においては、普通寒天培地および、トリプトソイ寒天培地ともビタミンB₁の呈色の阻害は、みられなかった。そこで、MM菌の発育のより良いトリプトソイ寒天培地を用いることにした。

2) チオクローム法におけるビタミンB₁濃度の検討

培地のチオクローム蛍光は、混入したビタミンB₁濃度に比例する。しかし、ビタミンB₁分解

表2 チオクローム蛍光法におけるVitamin B₁濃度の検討

V. B ₁ 濃度 (mg/dl)	1.0	2.5	5.0	10.0	20.0
蛍光強度	±	+	+	卅	卅
無蛍光部とのコントラスト	不良	不良	やや不良	良好	やや不良

菌により分解された範囲はビタミンB₁が少ないほうが広く、検出は容易となる。これら2つの条件のかねあいで、培地中のビタミンB₁濃度は10mg/dlが適当であることがわかった。

表3 チオクローム蛍光法におけるVitamin B₁酸化剤の検討

BrCN 濃度 (g/dl)	2.0						
蛍光強度	卅						
HgCl ₂ 濃度 (mM)	50.0	70.0	100.0				
蛍光強度	±	+	卅				
赤血塩濃度 (mM)	0.5	1.0	2.0	3.0	5.0	10.0	20.0
蛍光強度	卅	卅	卅	卅	卅※	卅※	卅※

※ 蛍光に黄色味をおびる

3) チオクローム蛍光法における酸化剤の検討

表3にみられるように三種類の酸化剤について検討を行った。チオクローム蛍光の強さだけを比較すればBrCN液が最も適した酸化剤といえる。塩化第二水銀の場合は蛍光が弱いばかりでなく、反応時に沈殿を生じやすくコロニーの状態が観察しにくく適当とはいえなかった。赤血塩液はBrCN液より若干の蛍光の低下はみられるが、BrCN液が特有の刺激臭をもち、調製には臭素を用いることなど、安全性および調製の容易さを考慮すると、この平板法に用いる酸化剤としては、赤血塩が最も適当なものであると判断した。

また、赤血塩液を用いる場合1mM以上では蛍光強度に差はみられなかったが、5mM以上では、蛍光に黄色味を帯びるため、反応は2mM液を用いることにした。

4) p-AAP法におけるビタミンB₁濃度の検討

表4 p-AAP法におけるVitamin B₁濃度の検討

V ₁ B ₁ 濃度(mg/dℓ)	10	20	30	40	50	60
色調	淡赤色	赤色	赤色	赤色	赤褐色	褐色
阻止円直径(mm)	9.0	5.5	0.0	0.0	0.0	0.0

チオクローム蛍光法と同様にビタミンB₁濃度は小さい方が分解された範囲が広く、ビタミンB₁分解菌の検出は容易であるが、p-AAP法においては表4のように10mg/dℓでは十分な発色がみられなかった。色調および、ビタミンB₁分解範囲の点から20mg/dℓとした。

5) p-AAP法における反応条件の検討

表5 p-AAP法における至適反応条件

B液(mℓ) \ A液(mℓ)	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
0.4	+	≡	≡	≡	≡
0.3	+	+	≡	≡	≡
0.2	+	++	++	≡	≡
0.1	+	+	+	≡	≡

+ うすいピンク色
 ++ 赤色
 ≡ オレンジがかった赤色

p-AAP法に用いるA、B、C液の調製法は、村田の方法⁷⁾に準じて行った。表5は、A液とB液の液量を変化させ、ビタミンB₁入トリプトソイ寒天培地の呈色を検討したものである。この結果、色調および、呈色の強さの点でA液は0.8mℓ、B液は0.2mℓが適当であった。

また、C液は5mℓ以下ではオレンジ色が強くなり、7mℓ以上であると呈色がそれにつれて

表6 p-AAP法 アルカリ液量と培地の色調の関係

アルカリ液量 (mℓ)	4	5	6	7	8	9	10
色調	橙 ≡	橙 ≡	赤 ≡	赤 ++	赤 +	赤 +	赤 +

弱くなるため、6mlが至適条件であるとした。

6) 遊走阻止剤の検討

表7 各種遊走阻止剤含有培地における遊走性の比較

試薬名	濃度(%)	M. M. 菌		Proteus mirabilis	
		発育	遊走性	発育	遊走性
Phenol	0.05	+	なし	+	強
"	0.10	-	なし	+	なし
α -Naphthol	0.10	-	なし	-	なし
p-Amino phenol	0.10	-	なし	-	なし
p-Nitrophenol	0.10	-	なし	-	なし
o-Toluidine	0.10	+	なし	+	強
Boric acid	0.10	+	なし	+	強
Benzoic acid	0.10	-	なし	+	なし
β -phenetyl alcohol	0.05	+	なし	+	強
"	0.10	+	なし	+	弱
"	0.15	+	なし	+	なし
"	0.20	+	なし	+	なし
"	0.25	+	なし	±	なし
3-IAA*	0.05	+	なし	+	強
"	0.10	+	なし	+	強
"	0.15	-	なし	+	弱
"	0.20	-	なし	-	なし
"	0.25	-	なし	-	なし

* 3-Indol acetoacetic acid

p-AAP法でビタミンB₁分解菌の検出を行っている時、シャーレ全体が赤色に呈色しない菌を検出した。菌の同定を行うと、Proteus mirabilisであることが判明した。この現象は菌の遊走がある場合に観察されたので、遊走性のあるProteus菌として、Proteus mirabilis, Proteus vulgarisのビタミンB₁分解能を、試験管法で検討してみた。試験管法は5mg/dlビタミンB₁入合成培地5mlに1白金耳検体を加えた後、37°C、48時間培養した。3000rpm 30分遠心し、上清液20 μ lをとり、これに0.2mM赤血塩液2.5ml、5%NaOH液2mlを加え、さらにn-ブタノール2mlを加えよく混和した。このブタノール層のチオクロームによる蛍光を蛍光光度計で測定した。その結果、MM菌は完全にビタミンB₁を分解していることが判明したが、Proteus mirabilis および Proteus vulgarisと

表8 試験管法による各種細菌のVitamin B₁残存率

	M. M. 菌	Proteus mirabilis	Proteus vulgaris
残存率(%)	0	78	98

(チオクローム蛍光法による)

もビタミンB₁がほとんど残っており、分解していないことがわかった。そこで、この遊走を阻止し、また、ビタミンB₁分解菌の発育を阻害しない条件とするため、表8の検討を行った。種類の試薬の検討を行ったが、Proteus mirabilisの遊走を阻止し、かつMM菌の発育を阻害しな

いものは、 β -フェネチルアルコールおよび 3-インドールアセト酢酸だけであった。この2つの試薬の至適濃度を検討したところ、3-インドールアセト酢酸では遊走を完全に阻止し、かつMM菌の発育を阻害しない濃度は存在しないことがわかった。 β -フェネチルアルコールにおいては、0.2%濃度の場合のみが遊走を阻止し、MM菌の発育をさまたげなかった。

以上のことより、遊走阻止剤として、 β -フェネチルアルコールを用い、その濃度は0.2%とした。

7) 培養条件

トリプトソイ寒天培地においてMM菌を培養する場合、白金線で穿刺した場合のコロニーは、48時間で直径がほぼ1mmとなった。しかし、炭酸ガス通気培養法で行うと24時間でほぼ同程度の大きさのコロニーとなった。したがって、MM菌のみの検出には、炭酸ガス通気培養の方が優れた方法といえよう。しかし、他のビタミンB₁分解菌については検討を行っていないので、培養条件としては、37℃、48時間、好氣的条件での培養を用いることにした。

8) 糞便よりのビタミンB₁分解菌の検出

健常者の便より、p-AAP法でビタミンB₁分解菌の検出を行った結果、610例中ビタミンB₁分解菌の存在の可能性があると思える例が、22例あった。この便について、分離培養を行い、ビタミンB₁分解菌の同定を行ったところ、*Proteus vulgaris*が3例、*Proteus mirabilis*が19例であった。これらの菌は、試験管法では、ビタミンB₁を分解していないことが判明したので、現在のところ、便よりのビタミンB₁分解菌は、検出されていない。

結 論

ビタミンB₁を赤血塩でチオクローム化し、その蛍光を観察するチオクローム法、および、p-アミノアセトフェノンジアゾニウム塩で赤色化合物とする、p-AAP法による検出法を応用し、糞便中からのビタミンB₁分解菌検出の簡易法の開発を試み、従来の試験管法にくらべ、はるかに簡略な平板法の開発をした。

謝 辞

本法を完成するにあたり、終始御指導を、賜りました高知医科大学教授佐々木匡秀先生に厚く感謝いたします。また、本研究について絶大なる御協力を下さった方々に心から、厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 佐藤彰一：血液中総ビタミンB₁定量法の微量化への試み，川崎医学会誌，7：6-11，1980.
- 2) 岡田正：Transketolase にかんする研究（I）ビタミンB₁とTransketolase 活性との関係，ビタミン，35：279-289，1967.
- 3) 松川男児，三沢博人：糞便アノイリナーゼの研究，ビタミン，2：137-137，1949.
- 4) 木村廉，青山寿一：新しいアノイリナーゼ菌株について，ビタミン，4：366-366，1951.
- 5) 木村廉，廖道雄，林良二，中山英男：アノイリナーゼ菌に関する研究Ⅷ，ビタミン，5：521，1952.
- 6) 水口茂：人腸内嫌気性アノイリナーゼ菌の簡便な平板分離培養，ビタミン，32：344-346，1965.
- 7) 村田希久：化学の領域増刊，34，東京，南江堂，1964，pp. 203-210.