

## 無菌海狸に於ける乳酸菌群の定着現象と 大腸菌感染に対する拮抗現象について

千葉大学医学部衛生学教室（主任 谷川久治教授）

山 田 正 三  
SHOZO YAMADA

（昭和 35 年 5 月 13 日受付）

### 目 次

緒 論	第 4 章 無菌飼育海狸を用いた実験
第 1 章 文 献	第 1 節 <i>L. acidophilus</i> 単独投与の 場合
第 2 章 実 験 方 法	第 2 節 <i>L. acidophilus</i> , <i>E. coli</i> M <sub>1</sub> 同時混合投与の場合
第 1 節 無菌飼育装置 HMC-2 型及 び飼育方法	第 3 節 <i>L. acidophilus</i> , <i>E. coli</i> M <sub>1</sub> 隔日投与の場合
第 2 節 無菌試験並びにタンク内細 菌搬入方法	第 4 節 <i>Str. faecalis</i> , <i>E. coli</i> M <sub>1</sub> 隔日投与の場合
第 3 節 腸内に於ける細菌の定着・ 拮抗及び共生状況の観察	第 5 章 考察及び総括
第 4 節 使用菌の性状	第 6 章 結 論
第 3 章 予 備 実 験	主 要 文 献
第 1 節 自然飼育特定腸内菌	
第 2 節 試験管内菌拮抗現象	

### 緒 論

動物の腸管内に棲息する腸内細菌は、腸管内に於て菌相互間に、或は腸管粘膜との間に互に相互関係を保ち生体に何等かの影響を及ぼして居ることは充分考えられ、且つ多くの学者により研究論議されて居るところである。しかし、腸管内に於ける現象は種々複雑な条件が組合されて発現するため未だ充分な解明がなされていない。当教室に於ては 30 数年来腸内菌の研究がなされて居るが特に近年動物の無菌飼育の成功により一般の自然動物と違つて細菌感染という生体反応に大きな影響を与える修飾条件を除去し且つ飼育環境・飼料などを一定条件に保ち得て複雑な生体反応をかなり純粋な立場に於て観察し得る様になつた。1756 年に田波助教授等により製作された HMC-2 型無菌飼育装置<sup>(1)</sup>は小規模ではあるが最新の技術と、独特の構想のもとに設計され既に鷄雛、海狸の無菌飼育による多くの研究がなされて居るが、著者は谷川教授の命により腸内常在菌の研究の一環として乳酸菌群の定着現象と大腸菌感

染に対する拮抗現象について検討を試みたのでその結果をここに報告する次第です。

### 第 1 章 文 献

Tisser<sup>(2)</sup>(1900) により乳児糞便より *B. bifidus* を又同年 Moro<sup>(3)</sup>が天然栄養児の糞便より *L. acidophilus* を発見、その後 Methinikoff<sup>(4)</sup>(1908) は腸内菌の無用有害説を立て、特に腐敗菌による中間生産物の吸収により早老・動脈硬化を来すが *B. bulgaricus* の作用により之を避け得ると言い Yoghourt の飲用を奨めた。近年乳児下痢症と腸内菌叢の研究が旺んになり乳酸菌群のもつ役割が強調されて来た<sup>(5)</sup>。これ等に関するものとして Hull a. Rettger<sup>(6)</sup>(1915) は白鼠に牛乳・乳糖を与える時は嗜酸桿菌が増強し、人の実験に於ても嗜酸桿菌を証明せざる人にパン・牛乳を与える時は嗜酸桿菌が出現すると言ひ、Cannon a McNease<sup>(7)</sup>(1923) は白鼠に乳糖加食飼を与えたるに pH 酸性となり、嗜酸桿菌が優勢になり之れに反し蛋白を投与する時は pH は前者に比し上昇し *B. Welchii* 及び其の他の

菌叢の増殖を見たという。又 Goldon<sup>(8)</sup>(1924)は嗜酸桿菌を試食させたが腸内移殖は不可能にして、乳糖加食飼を与えたる所速かに嗜酸桿菌が増殖出来たと報告した。Schieblich<sup>(9)</sup>(1929)は蛋白質偏食を長期続けたるに乳酸菌は減少し腐敗菌の増殖を見た。Torry a Montu (1931)は人に肉食を持続する時は *B. Welchii* は増殖し嗜酸桿菌・腸球菌は著しく減少したという。我が国に於ける最近のものを見ると、詫摩・勝又<sup>(10)</sup>(1950)は基本食餌で腸内菌叢を一定にした白鼠に乳酸菌製剤を添加した食餌を与え糞便内菌数より乳酸菌の消長を検査し整腸作用が腸内菌叢の変調によると論じ、又 Biofermin 添加の群は、*B. bifidus* の出現が高く *L. acidophilus* は対照的に減少を示した。天児<sup>(11)</sup>(1952)は大黒ネズミ及び人体に乳酸菌を投与し、一時投与では盲腸以下にかなり長期棲息し連続投与では糞便中細菌が殆んど本菌で占められるに至つた。勝又<sup>(12)</sup>は(1954)乳酸菌製剤投与により健康人工栄養児では腸球菌が増加し大腸菌が減少したが、下痢症患者では其の傾向が著明に現われたとし、浜田等<sup>(13)</sup>(1953)は乳酸菌を人に与え糞便内細菌を検べ乳酸菌が腸内細菌の大半を占め此の状態が持続する事を知つた。又 Aneurinase 菌陽性患者に乳酸菌投与で20日後に Aneurinase 菌が陰性になつたと報告している。其の中村・吉田・反町・勝野・小嶋・児玉等々多くの業績があるが、これ等研究の基礎となる培地・菌数計算について本間<sup>(14)(15)</sup>(1952)等は詳細に報告している。

次に腸内細菌の拮抗に関し、矢吹<sup>(16)</sup>(1954)は文献的考察を行つて居るが、乳酸菌と他菌との拮抗性に関する報告例も多数ある。菱刈<sup>(17)</sup>(1925)は牛乳培地に於て長桿状乳酸菌と腸内病原菌、大腸菌、腸球菌、及び変形菌が拮抗作用のある事を認め、其の原因は産生する乳酸のみならず有毒成分或は栄養素の欠乏によるものかと論じた。川上<sup>(18)</sup>(1928)は乳児より分離した乳酸桿菌と腸内病原菌との拮抗作用を2%糖加 Bouillon に試みその作用のある事を知つた。野竿<sup>(19)</sup>(1924)は *B. bifidus* と腸内病原菌の拮抗作用を試験管内試験と動物の自然状態とでは一致しない事を認め、矢吹<sup>(16)</sup>(1954)は *acidophilus* 菌、大腸菌、腸球菌、*Bifidus* 菌の試験管内に於ける単独若くは混合培養の時の菌数の変化を選択培地を使用し、使用菌株に於ては腸球菌>*Bifidus* 菌>*Acidophilus* 菌>大腸菌の拮抗現象を認めた。

翻つて無菌飼育実験は Nuttel, Tiefelder<sup>(20)</sup>

(1895)によつて始められ Schottelius<sup>(21)</sup>(1899), Küster<sup>(22)</sup>(1912), Cohendy<sup>(23)</sup>(1912)によつて受けつがれ Glimstedt<sup>(24)</sup>(1932)により発展し Gustafsson<sup>(25)</sup>(1948)に受けつがれ更に Reyniers<sup>(26)</sup>(1946)により応用面の確立を見る様になつた。我が国に於ては、赤沢<sup>(27)</sup>(1942)が雛の無菌飼育に成功し以来当教室は一時中断されたが、名大病理学教室<sup>(28)</sup>と共に現在旺んに研究が行われ其の設備、規模共に充実し外国の研究者と連絡を保ちつつ新しい基礎医学の発展に努力して居る。特に当教室は無菌動物を使用し腸内細菌を研究して居るが、福島<sup>(29)</sup>(1957)は嗜酸桿菌につき、河合<sup>(30)</sup>(1955)は腸球菌を、齋藤<sup>(31)</sup>(1955)は大腸菌につき夫々鶏雛を使用して生理的意義を研究し嗜酸桿菌・腸球菌は有益に、大腸菌は有害に作用する事を認め、戸叶<sup>(32)</sup>(1958)は鶏雛・海狸を用いて菌感染による血清殺菌力の相違を報告している。富岡<sup>(33)</sup>(1959)、中村<sup>(34)</sup>(1959)は海狸による乳酸菌、大腸菌、腸球菌を単独或は混合経口投与の際のリンパ腺、腸管の変化を病理組織学的に研究して居るが詳細は考察で述べる事にする。

## 第2章 実験方法

### 第1節 無菌飼育装置 HMC-2 型及び飼育方法

#### (a) HMC-2 型

本装置は田波助教授<sup>(1)</sup>(1956)等の設計によるもので120°C、30分加圧蒸気滅菌可能なもので、種々の附属装置を有し無細菌、無ビールスの空気を送り適温・適湿に調節出来る。又飼料滅菌器を備え随時に水・飼料を滅菌して飼育タンク内に補充し且つ実験器具の出し入れが出来る。帝王切開手術・飼育実験操作はタンクに接続せる耐熱性ネオプレン製手袋により容易に行われる。尚本装置の詳細は田波助教授その他により報告されているので省略する。

#### (b) 動物及び飼育

当教室で自家交配を行つた近親系海狸<sup>(35)</sup>で近親交配6~7代のもので妊娠末期海狸を手術タンクに搬入帝王切開により幼獣を摘出し飼育タンクに移し小林飼料<sup>(36)</sup>；NG-27, NG-36を用い、更にVB<sub>1</sub>, VCの注射、適当量の水分補給をし時期に応じた湿度、温度に調節し1匹ごとに小ケージ内で飼育し敷ガーゼの交換を密にして、糞便、飼料の汚染を極力避ける様にし、20日飼育の健康な海狸を実験に使用した。又飼料の滅菌方法、タンク内搬入方法、投与方法の詳細については田波助教授<sup>(1)</sup>及び中村<sup>(34)</sup>の

報告があるので割愛する。

### (c) 飼料の調製

無菌動物をつくる事の困難性には種々の要因があるが、其の一つはいかにして動物を完全な栄養のもとに飼育するかである<sup>(42)</sup>。無菌飼料をつくるために滅菌操作が行われるため或る種の蛋白・ビタミンなどの破壊される危険があり之を如何に補充してやるかが容易でない。著者は長らく飼料を担当し色々組成を異にする教室独自の海猿飼料を作成して見たが其の結果は満足のものでなかつた。飼料の組成が完全に海猿飼料に適しても、嗜好を合せ又時期に応ずる硬度を保たせることもむずかしいことであつた。よつて小林飼料；NG-27, NG-36 を使用し無菌海猿飼料として最良のものである事を知り之れを使用している。飼料は調製上其の要領とも言うべき気付いた点を以下に述べる。

#### (a) NG-27

(1) 蒸留水を入れる容器は円型コルベンがよく飼料 300 cc 作製には 1000 cc 以上入るのがよい。

(2) 蒸留水は粉乳混和時 56~58°C に保ち粉乳を少量宛蒸留水中に入れ容器の底部に手をあて円を画く如く静かに振盪することにより容易に溶解する事が出来る。

(3) 大豆油は直接溶解された粉乳液中に入れ其の他は秤量後小乳鉢中にてよく乳棒で混和し、一滴宛適当量の粉乳液を其の中に移して更に混和を続けるとイーストエキス、肝臓エキスも完全に溶けて全体が薄茶褐色の液となるを待つて粉乳液中に全部を移し充分振盪すれば完全に均一化された飼料となる。

(4) 分注の際分注容器の上  $\frac{1}{5}$  は残して次の加圧滅菌操作の際、縮栓が抜けぬ様にする。

(5) 加圧滅菌時間を正確にし、減圧の際は徐々にすること。

#### (b) NG-36

(1) 大豆粉の混合は他の総てを充分混和してから少量宛これを加えて行くこと。

(2) 飼料滅菌タンク内で滅菌後完全に冷却する迄送気の方が飼料の乾燥がよい。

## 第 2 節 無菌試験並びにタンク内細菌搬入方法

### (a) 無菌試験

予め滅菌搬入してある飼育タンク内のチオグリコレート培地 (T. G. C. 培地) を試験管に分注しこれに可検物 (手術時の胎児羊膜、ガーゼ片、タンク内を擦拭したガーゼ滲出液、糞便、飼料等) を投入し

飼料滅菌器を用いて外界に搬出し 22°C, 30°C, 及び 37°C の恒温箱中に 24 時間保存したものを無菌箱中に移して次の各培養基に塗布又は搬入し細菌試験を実施する。

(1) 糞便・飼料は塗抹染色して顕鏡する。

(2) T. G. C. 培地, 1% 糖入ブイオン, 肝-肝ブイオンを用いる増菌試験を行う。

(3) ツァイスラー血液平板を用いる嫌気培養試験を行う。

### (b) タンク内に細菌を搬入する方法

当該菌を適宜の培地に培養し、無菌的に遠心して洗滌し、生理的食塩水に浮遊せしめた菌液を作製した。搬入には適当量の菌稀釈液を滅菌アンプル中に溶封し、ジャーミサイダルトラップを通して行い搬入菌量の推定は白金耳による生菌数の算定を基準にして稀釈法を用いて行い且つ浮遊液の濁度を測定して決定した。

## 第 3 節 腸内に於ける細菌の定着・拮抗及び共生状況の観察

無菌海猿に母獸糞便より分離した *L. acidophilus*, *Str. faecalis*, *E. coli* M<sub>1</sub> を経口投与して単独又は重感染を起さしめ単独菌の感染定着状況、重感染の場合の拮抗並びに共生現象について研究した。菌投与後の排出糞便は、極力飼料混入を避けるため敷布の交換を頻回に行い、糞便を籠下に備えたオスパン液 (200 倍稀釈液) 中に落とし込むようにした。定着状況は、糞便内菌数の算定と腸管各部 (空腸・廻腸・大腸) の絨毛間隙内<sup>(87)</sup>の菌数算定を行つて之を確めた。糞便内菌数の算定は検査すべき海猿の籠の敷布を更新し、排便をまつて直ちに之れを採取しタンク外に搬出し適宜稀釈後 *L. acidophilus* は本間培地平板嫌気培養 37°C, 5 日でコロニー数より, *Str. faecalis* は B. T. B. Azide Dextrose Broth<sup>(39)</sup> 37°C, 48 時間好気性培養で本間の変法 3 本法<sup>(44)</sup>の M. P. N. 値で, 又 *E. coli* M<sub>1</sub> は E. M. B. 培地 37°C, 24 時間好気性培養でコロニー数より夫々の菌数の算定をした。

腸管各部の絨毛間隙内菌数算定は、実験期間終了後タンクを開放し海猿を取り出し、心臓穿刺によつて採血を行つて死亡せしめ開腹して無菌的に腸管各部の一定長を切りとり腸管を縦に開き内容物を粘膜を損傷しない様に静かにピンセットを用いて取りのぞき、あらかじめ準備して置いた 10 cc 宛分注の中試験管内生理的食塩水で静かに洗滌し 3 本目の試験管の洗滌液が菌数 0 に近くなる様にし (この手技は

実験前要領を体得し、又本実験でも1, 2, 3の3本の試験管の洗滌液の菌数計算を実施した。腸管を無菌的に秤量し乳鉢内でよく磨砕し一定量の生理的食塩水を加え稀釈したものを糞便検査と同様培養・菌数計算をした。

#### 第4節 使用菌の性状

##### (1) *L. acidophilus*

母獣海狸糞便より得た菌株で形状、生理学的性状が Bergey<sup>(38)</sup>の記載に一致するものである。gram 陽性、長さ1.5~5 $\mu$ 、巾0.6~0.8 $\mu$ の長短種々の桿菌で直桿状両端鈍にして筏状又は時に連鎖状の配列をする。長く放置する時は、gram 染色性が悪くなり陰性になる事もある。芽胞形成なく又固有運動も認めぬ。普通寒天及び1%ブドウ糖寒天斜面培養で37°C、4日間で肉眼的に発育せず。Zeissler氏ブドウ糖血液寒天平板嫌気培養37°C、5日間でやや培地色を呈する表面扁平菊花状の中等度の集落をつくる。肝-肝ブイオン37°C、24時間培養で試験管中央部より管底にかけて白色糸状濁を認め48時間で全体やや濁管底に沈澱を生ず。ゲラチンを液化せず。ラクムス牛乳は5日で凝固、瓦斯産生(一)、脱色(一)、産生成(一)。醋酸鉛寒天の高層穿刺に於て硫化水素の産生なし。Salkowski-北里氏法にてIndolの産生を証明せず。1%ブドウ糖寒天高層穿刺37°C、4日間で瓦斯産生なし。Voges-Proskauerの反応及びMethred Testも共に(一)である。

糖分解性;

(a) 分解 Glucose, Saccharose, Lactose, Galactose, Mannose, Maltose, Dextrin,

(b) 非分解 Xylose, Arabinoss, Mannit, Raphinose.

生菌の毒力は体重15gのMaus 5匹を用い其の腹腔内に本菌の肝-肝ブイオン37°C、4日間培養せるもの夫々0.3cc, 0.5ccを注射し1週間観察するも何等変化を認めなかつた。

##### (2) *Str. faecalis*

母獣海狸由来の菌株で Bergey<sup>(38)</sup>の記載に一致するもので那須<sup>(39)</sup>の方法で検出す。gram 陽性、帽円形双球菌で莢膜を形成せず、1%ブドウ糖加斜面寒天培地37°C、24時間培養で点状灰白色半透明の集落を形成す。B. T. B. Azide Dextrose Broth 37°C、48時間培養で黄色環状集落をつくり培地を黄変する。ゲラチンを液化せず。エスクリン加ブイオンに移植60°C、30分加温後45°C、48時間培養で黒変発育す。又40%胆汁加ブドウ糖寒天、0.1%

Methylenblau に対し耐性あり、6.5% NaCl pH 9.6のブドウ糖ブイオン中に発育する。ラクムス牛乳48時間で凝固、脱色する。Sorbitol, Glycerol, Mannitol を分解する。又 Mause に本菌löse を生理的食塩水に浮遊、腹腔内に注射するも罹患斃死させる事は無かつた。

##### (3) *E. coli* M<sub>1</sub>

母獣海狸糞便より分離したもので血清学的に0-104に一致するものであるが詳細は菅沼<sup>(40)</sup>により報告されている。

### 第3章 予備実験

#### 第1節 自然飼育特定腸内菌

自然飼育海狸について、糞便内総菌数と、大腸菌、*L. acidophilus*, *Str. faecalis* の糞便内及び絨毛間隙内菌数を調べて見た。

(1) 実験動物: 当教室で自然飼育母獣海狸より自然娩出の生後20~30日の母仔多数同棲の仔海狸6匹を使用した。

(2) 飼料: 農業技術研究所処方飼料(玉蜀黍50%, 魚粉10%, 大豆糟14.5%, 麩15%, 脱脂米糠8%, CaCO<sub>3</sub> 2%, NaCl 0.49%, MgSO<sub>4</sub> 0.01%, 蛋白質含有量22%)を用い緑餌としてキャベツを与え自由摂取させ又適時母乳を呑める様にした。

(3) 培地及び検査方法: 糞便内総菌数は好気性菌は2%ブドウ糖寒天平板37°C、24及び48時間培養で嫌気性菌はZeissler氏血液寒天37°C、5日間嫌気性培養をし、絨毛間隙内菌数は第2章第3節で述べた要領で実施した。大腸菌は、E. M. B. 平板培地及びE. C. 培地を併用し、*L. acidophilus* は本間の乳酸菌培地第7を、又 *Str. faecalis* は B. T. B. Azide Dextrose Broth を用い、好氣的、又は嫌氣的にそれぞれの培地に依じて実施し、経験的に疑わしいコロニーは更に精査し、コロニー数より糞便・腸管1g中の菌数を計算した。

(4) 実験成績:

(a) 糞便内菌数 表1に示す如く総菌数に於ては、好気性菌・嫌気性菌共に10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup>で平均値が嫌気性菌が僅かに多く1.4×10<sup>8</sup>で好気性菌が6.6×10<sup>7</sup>であつた。又大腸菌はどの海狸からも殆んど同数程度に検出され平均値が2.4×10<sup>4</sup>であつたが、*L. acidophilus* は僅か1例に1.3×10<sup>1</sup>検出されたのみである。*Str. faecalis* は全例に検出されたが、大腸菌に比して菌数が少なく、平均値が4.5×10<sup>2</sup>であつた。

〔表 1〕 自然飼育海猿糞便内菌数 (糞便 1 g 中)

糞便内菌数	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均
好気性菌総菌数	$1.0 \times 10^8$	$5.2 \times 10^7$	$3.6 \times 10^6$	$1.1 \times 10^8$	$4.8 \times 10^7$	$8.3 \times 10^7$	$6.6 \times 10^7$
嫌気性菌総菌数	$4.1 \times 10^6$	$4.2 \times 10^8$	$1.9 \times 10^7$	$3.9 \times 10^6$	$3.2 \times 10^8$	$7.4 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$
大腸菌	$2.1 \times 10^4$	$3.0 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$9.5 \times 10^4$	$6.0 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$
L. acid.	0	0	$1.3 \times 10^1$	0	0	0	
Str. fae.	$3.2 \times 10^2$	$2.6 \times 10^2$	$3.6 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	$1.1 \times 10^1$	$2.7 \times 10^2$	$4.5 \times 10^2$

〔表 2〕 自然飼育海猿絨毛間隙内菌数

部位	菌種	番号		No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均
		No. 1	No. 2					
空腸	大腸菌	$1.4 \times 10^1$	0	0	$2.7 \times 10^1$	0	$0.7 \times 10^1$	
	L. acid.	0	0	0	0	0	0	
	Str. fae.	0	$0.9 \times 10^1$	$0.7 \times 10^1$	$1.1 \times 10^1$	0	$0.2 \times 10^1$	
廻腸	大腸菌	$2.1 \times 10^2$	$1.5 \times 10^1$	$0.7 \times 10^1$	$4.1 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2$	$3.1 \times 10^2$	$1.8 \times 10^2$
	L. acid.	0	0	$0.3 \times 10^1$	0	0	0	
	Str. fae.	$1.6 \times 10^2$	$1.7 \times 10^2$	$2.9 \times 10^2$	$8.9 \times 10^2$	$0.9 \times 10^1$	$9.5 \times 10^1$	$2.7 \times 10^2$
大腸	大腸菌	$3.6 \times 10^3$	$1.8 \times 10^2$	$2.6 \times 10^2$	$1.6 \times 10^3$	$1.3 \times 10^2$	$3.5 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$
	L. acid.	0	0	$0.2 \times 10^1$	0	0	0	
	Str. fae.	$1.5 \times 10^2$	$1.7 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$	$7.5 \times 10^2$	$1.0 \times 10^1$	$2.1 \times 10^2$	$2.7 \times 10^2$

(b) 絨毛間隙内菌数 大腸菌は空腸で 6 匹中 3 匹に  $10^1$  程度であるが、廻腸・大腸では全例に検出され、菌数も廻腸で  $1.8 \times 10^2$ 、大腸で  $1.0 \times 10^3$  と平均値でやや大腸に多く検出された。L. acidophilus は空腸からは検出されず、廻腸・大腸に夫々  $0.3 \times 10^1$ 、 $0.2 \times 10^1$  と僅かに検出された。又 Str. faecalis は空腸で 6 匹中 4 匹に  $10^1$  程度又廻腸・大腸からは殆んど同数程度に全例より検出され平均値が共に  $2.7 \times 10^2$  であつた。以上の結果は表 2 の如くである。

(5) 小括：自然飼育海猿の腸内細菌の報告例を見るに、他の動物に比して腸内常住菌がやや不定のようである。其の報告も研究者により異つているが越智・光岡<sup>(41)</sup>(1958) は之等報告例を総括的に発表しているが、一般的に大腸菌及び腸球菌が少ない事で好気性培養では枯草菌・ブドウ球菌属が、嫌気性培養では B. bifidus 及び人由来の L. acidophilus 類似菌であるとしている。著者も実験成績以外に糞便内より本実験用菌株を得るため多数の海猿について調べて見たが大体報告例と同様の結果であつた。又絨毛間隙内菌数に関する報告は見当らなかつた。著者の実験成績を小括すれば次の通りである。

(1) 好気性菌と嫌気性菌が大体同数程度に糞便

内より検出された。

(2) 大腸菌及び Str. faecalis が全例より糞便内から検出された。

(3) 絨毛間隙内に於て大腸菌は腸管下部に行くにつれて菌数が多くなり、Str. faecalis は廻腸・大腸共に同数程度検出された。

(4) L. acidophilus は菌数甚だ少なく、証明されない例が多かつた。

以上の実験は一時期を区切つて行われたもので更に検討を要する事である。

## 第 2 節 試験管内菌拮抗現象

(1) 使用菌：既述の E. coli M<sub>1</sub>、L. acidophilus、Str. faecalis を使用する。

(2) 培地及び実験方法：基礎培地は 2% ブドウ糖加肝臓ブイオンを、E. coli M<sub>1</sub> は E. C. 培地(本間氏変法)、L. acidophilus は本間氏 acidophilus 培地を、又 Str. faecalis は B. T. B. Azide Dextrose Broth を用いた。基礎培地は 10 分間沸騰浴にて充分脱気し急冷後可検菌を接種し流動パラフィンを重ね嫌気培養を行つた。基礎培地に Str. faecalis 及び E. coli M<sub>1</sub> は 24 時間、L. acidophilus は 48 時間、夫々 37°C に嫌気培養し其の一定量を取り 1 種類宛基礎培地に接種培養或は 2 種類宛同時に混合培養を行い、接種時、培養後 6, 12, 24,

〔表 3〕 *L. acidophilus*, *Str. faecalis*, *E. Coli M<sub>1</sub>* の単独、  
混合試験管内に於ける発育状況

		Vor	6	12	24	48	72
<i>L. acid.</i> 単 独	pH	2.24×10 <sup>5</sup> 7.2	1.34×10 <sup>7</sup> 6.2	8.9×10 <sup>7</sup> 6.2	2.56×10 <sup>8</sup> 5.6	7.45×10 <sup>6</sup> 5.4	3.77×10 <sup>6</sup> 5.2
<i>Str. fae.</i> 単 独	pH	1.34×10 <sup>6</sup> 7.2	4.19×10 <sup>8</sup> 5.6	2.24×10 <sup>9</sup> 5.2	3.77×10 <sup>9</sup> 5.2	6.32×10 <sup>8</sup> 4.6	7.45×10 <sup>7</sup> 4.2
<i>E. coli M<sub>1</sub></i> 単 独	pH	4.19×10 <sup>5</sup> 7.2	1.41×10 <sup>8</sup> 6.2	7.45×10 <sup>9</sup> 5.8	4.19×10 <sup>8</sup> 5.4	3.77×10 <sup>7</sup> 5.2	1.34×10 <sup>7</sup> 5.2
<i>L. acid.</i> <i>E. coli M<sub>1</sub></i> 混 合	<i>L. acid.</i> <i>E. coli M<sub>1</sub></i> pH	2.24×10 <sup>5</sup> 4.19×10 <sup>5</sup> 7.2	3.77×10 <sup>6</sup> 3.23×10 <sup>8</sup> 5.6	4.19×10 <sup>7</sup> 2.64×10 <sup>7</sup> 5.4	9.4×10 <sup>6</sup> 1.51×10 <sup>6</sup> 5.0	2.02×10 <sup>6</sup> 1.96×10 <sup>5</sup> 5.0	1.34×10 <sup>5</sup> 1.41×10 <sup>4</sup> 4.8
<i>Str. fae.</i> <i>E. coli M<sub>1</sub></i> 混 合	<i>Str. fae.</i> <i>E. coli M<sub>1</sub></i> pH	1.34×10 <sup>6</sup> 4.19×10 <sup>5</sup> 7.2	4.7×10 <sup>8</sup> 1.41×10 <sup>7</sup> 5.6	4.19×10 <sup>9</sup> 7.45×10 <sup>6</sup> 5.2	9.4×10 <sup>8</sup> 1.34×10 <sup>3</sup> 5.2	1.53×10 <sup>7</sup> (-) 4.4	3.77×10 <sup>6</sup> (-) 4.2

48, 72 の各時間毎に其の一部を採り M. P. N. 3 本法により 2% ブドウ糖加肝臓ブイオン 10 cc 中の生菌数を計算した。

(3) 実験成績:

(a) *L. acidophilus* 単独の場合

接種後 6 時間にかなり急速な増加が認められるが其の後は徐々に増加して 24 時間で最高に達し、48 時間では急に減少したが 72 時間でも割合減少しなかつた。又 pH も割合緩徐に下降し 5.2 に停まつた。

(b) *Str. faecalis* 単独の場合

発育良好で 12 時間で最高に近く 24 時間で最高になり其の後の減少も少なかつたが pH は 72 時間で 4.2 迄下降を示した。

(c) *E. coli M<sub>1</sub>* 単独の場合

初期の増殖が特に著明で 12 時間で最高に達した。又 pH は 24 時間以後の下降が緩徐であつた。

(d) *L. acidophilus* と *E. coli M<sub>1</sub>* 混合の場合

両菌とも単独の場合より増殖が悪く特に、*E. coli M<sub>1</sub>* に著明で 12 時間では既に減少を示した。pH も単独の場合 72 時間で 5.2 であつたのに比べ下降し 4.8 となつた。

(e) *Str. faecalis* と *E. coli M<sub>1</sub>* 混合の場合

*Str. faecalis* は単独の場合と同様の増殖を示したが、*E. coli M<sub>1</sub>* の増殖は悪く 24 時間で接種時より減少し 48 時間以後は検出されなかつた。又 pH は *Str. faecalis* 単独の場合と同様の下降が見られた。以上の結果は表 3 の如くである。

(4) 結論:

(a) 単独試験管内発育状況は各菌の間に特に著明の差は認め得ないが、*L. acidophilus* の発育速度が一番遅く、又 pH に於て *Str. faecalis* の下降が顕著であつた。

(b) 混合試験で *L. acidophilus* と *E. coli M<sub>1</sub>* の間に拮抗的な共生現象を示し、又 *Str. faecalis* と *E. coli M<sub>1</sub>* の間には拮抗現象が見られた。

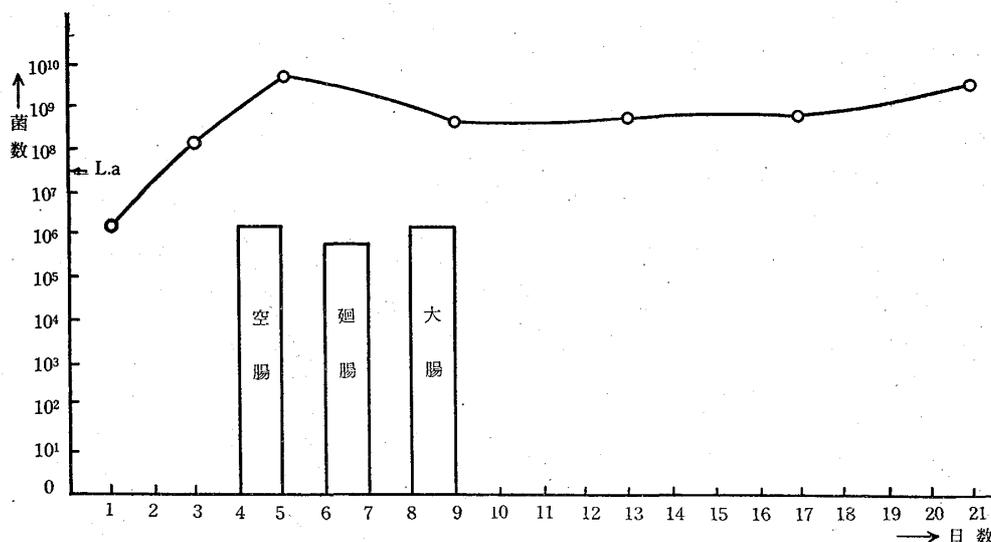
#### 第 4 章 無菌飼育海猿を用いた実験

本実験の実験方法は第 2 章で既に述べたが次の各群について実験が行われた。

##### 第 1 節 *L. acidophilus* 単独投与の場合

生後 20 日の無菌海猿 6 匹に *L. acidophilus* 約 4×10<sup>7</sup> を経口投与し、以後糞便内菌数を投与後 1, 3, 5 の各日、以後 4 日間隔で検査して見た所初期は緩徐に増加し投与後 5 日で最高の平均値が 7.93×10<sup>9</sup> となり以後多少の増減は見られるが 10<sup>9</sup> に近い菌が検出され腸内に菌がよく定着した。菌投与後 21 日に心臓穿刺で採血後殺し絨毛間隙内菌数を見ると空腸、廻腸、大腸の各部分より 10<sup>6</sup> 程度の菌が検出され僅かに大腸に多かつたが有意の差は認められなかつた。詳細は図 1 及び表 4, 5 の通りである。又実験期間中の一般状態、体重増加率も対照の無菌海猿より良好で特に毛<sup>(42)</sup>の発育が良好であつた。但し菌投与後 24 時間の間、全例に於て軟便が認められたが粘液その他異常はなかつた。又解剖所見でも肉眼的に全く異常を認めなかつた。

〔図 1〕 *L. acidophilus* 経口投与の場合の糞便及び絨毛間隙内菌数



〔表 4〕 *L. acidophilus* 経口投与による糞便内菌数 (糞便 1 g 中)

日	1	3	5	9	13	17	21
No. 1	$6.32 \times 10^5$	$8.25 \times 10^7$	$1.47 \times 10^{10}$	$6.98 \times 10^8$	$1.25 \times 10^9$	$2.75 \times 10^8$	$4.97 \times 10^9$
No. 2	$2.75 \times 10^6$	$6.52 \times 10^7$	$9.24 \times 10^9$	$8.45 \times 10^8$	$1.00 \times 10^9$	$2.91 \times 10^8$	$1.32 \times 10^9$
No. 3	$5.86 \times 10^5$	$1.65 \times 10^8$	$9.67 \times 10^9$	$7.44 \times 10^8$	$4.45 \times 10^8$	$2.23 \times 10^8$	$7.86 \times 10^9$
No. 4	$1.14 \times 10^6$	$7.42 \times 10^7$	$7.78 \times 10^9$	$1.51 \times 10^8$	$1.56 \times 10^9$	$1.35 \times 10^9$	$4.03 \times 10^9$
No. 5	$3.35 \times 10^6$	$4.13 \times 10^8$	$5.23 \times 10^9$	$1.45 \times 10^9$	$4.45 \times 10^8$	$3.08 \times 10^9$	$7.14 \times 10^9$
No. 6	$3.71 \times 10^5$	$5.62 \times 10^7$	$9.52 \times 10^8$	$7.26 \times 10^8$	$3.26 \times 10^8$	$6.57 \times 10^8$	$2.23 \times 10^9$
平均	$1.47 \times 10^6$	$1.41 \times 10^8$	$7.93 \times 10^9$	$7.69 \times 10^8$	$8.38 \times 10^8$	$9.79 \times 10^8$	$5.64 \times 10^9$

〔表 5〕 *L. acidophilus* 経口投与による絨毛間隙内菌数

番号	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均
空腸	$1.18 \times 10^6$	$5.21 \times 10^5$	$3.84 \times 10^6$	$5.49 \times 10^5$	$4.78 \times 10^4$	$1.81 \times 10^5$	$1.05 \times 10^6$
廻腸	$1.98 \times 10^5$	$8.81 \times 10^5$	$1.26 \times 10^6$	$5.71 \times 10^5$	$1.53 \times 10^6$	$3.81 \times 10^5$	$8.03 \times 10^5$
大腸	$5.21 \times 10^6$	$1.41 \times 10^6$	$4.45 \times 10^6$	$1.72 \times 10^6$	$9.14 \times 10^5$	$4.63 \times 10^5$	$3.19 \times 10^6$

第 2 節 *L. acidophilus*, *E. coli* M<sub>1</sub> 同時混合投与の場合

生後 20 日の健康無菌海猿 4 匹に *E. coli* M<sub>1</sub> は約  $3 \times 10^8$  を又 *L. acidophilus* は約  $4 \times 10^7$  を同時混合経口投与した。投与後 4 時間にして全例に下痢症状が現われ漸次症状は増強し 2 例は粘液・血便次で脱肛を来し更に腹部膨満食慾欠損、歩行困難となり菌投与後 3 日、4 日に夫々死亡した。他の 2 匹は 3 日目頃より全身状態も好転し下痢も消失し食慾も平常となつた。糞便内菌数は図 2 及び表 6 に示す通り 48 時間迄は両菌共に増加し、以後死亡の 2 例は *E. coli* M<sub>1</sub> の増加と *L. acidophilus* の急激な減少をし、又他の 2 例は *L. acidophilus* の増加と

*E. coli* M<sub>1</sub> の減少を示した。死亡した 2 例の解剖肉眼的観察では、腸管全域に著明な炎症々状があり特に廻腸以下に強かつた。炎症は濾胞中心で濾胞の表面は壊死となり周囲に充血・出血が著明であつた。他の 2 例は菌投与後 5 日で殺し解剖して見ると、やはり出血性腸炎の症状が見られたが前者に比べれば甚だ軽度のもだつた。即ち同一条件のもとに行われた実験で全く違つた結果が得られた事は興味ある事である。

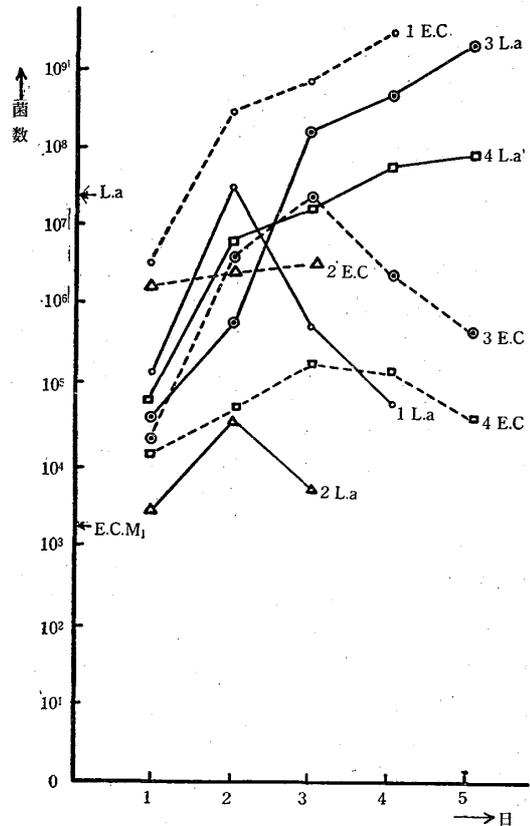
第 3 節 *L. acidophilus*, *E. coli* M<sub>1</sub> 隔日投与の場合

生後 20 日の健康無菌海猿 6 匹に *L. acidophilus* 約  $4 \times 10^7$  経口投与後 24 時間して *E. coli* M<sub>1</sub> 約

3×10<sup>3</sup> を経口投与した。L. acidophilus 投与後 24 時間の間は L. acidophilus 単独投与の場合と全く同様に軟便であつたが、E. coli M<sub>1</sub> 投与により粘液を含む下痢便となり食欲も僅か減退したが 24~48 時間で其の症状も消失し、以後は一般状態に著変は認められなかつた。糞便内菌数を菌投与後 1, 4, 6, 10 日と日を逐つて観察すると L. acidophilus は単独経口投与の場合と殆んど同様の菌数で初期は段々増加して 6 日で最高となり以後多少の増減はあるがよく 10<sup>9</sup> 前後の菌が検出された。又 E. coli M<sub>1</sub> も段々増加しやはり実験開始 6 日で最高の 10<sup>8</sup> 程度となり以後 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> の菌数が持続した。

絨毛間隙内菌数は実験開始後 20 日で殺し検査して見ると L. acidophilus は空腸、廻腸、大腸の順に菌数増加が見られ、E. coli M<sub>1</sub> は空腸、大腸、廻腸の順に多く検出された。又両菌の間の関係は空腸が両菌とも最も少く且つほぼ同数で廻腸ではやや E. coli M<sub>1</sub> が又大腸では L. acidophilus がやや多く検出された。又腸管の肉眼的所見も L. acidophilus 単独経口投与の場合と殆んど同じであつた。尚糞便内菌数並びに絨毛間隙内菌数は図 3, 表 7, 8 の通りである。

[図 2] L. acidophilus, E. coli M<sub>1</sub> 同時混合経口投与の場合の糞便内菌数



[表 6] L. acidophilus 及び E. coli M<sub>1</sub> 同時混合経口投与の場合の糞便内菌数 (糞便 1g 中)

番号	日		1	2	3	4	5
	菌種						
No. 1	L. acido.		1.12×10 <sup>5</sup>	6.31×10 <sup>7</sup>	8.76×10 <sup>5</sup>	8.92×10 <sup>4</sup>	
	E. coli M <sub>1</sub>		5.67×10 <sup>6</sup>	5.5×10 <sup>8</sup>	9.87×10 <sup>8</sup>	3.21×10 <sup>9</sup>	
No. 2	L. acido.		4.32×10 <sup>3</sup>	5.37×10 <sup>4</sup>	7.71×10 <sup>3</sup>		
	E. coli M <sub>1</sub>		2.57×10 <sup>6</sup>	4.4×10 <sup>6</sup>	5.32×10 <sup>6</sup>		
No. 3	L. acido.		5.68×10 <sup>4</sup>	8.75×10 <sup>5</sup>	2.23×10 <sup>8</sup>	7.16×10 <sup>9</sup>	2.69×10 <sup>9</sup>
	E. coli M <sub>1</sub>		3.54×10 <sup>4</sup>	6.33×10 <sup>6</sup>	3.42×10 <sup>7</sup>	4.25×10 <sup>6</sup>	7.84×10 <sup>9</sup>
No. 4	L. acido.		7.65×10 <sup>4</sup>	8.37×10 <sup>6</sup>	2.27×10 <sup>7</sup>	8.17×10 <sup>7</sup>	9.87×10 <sup>7</sup>
	E. coli M <sub>1</sub>		2.81×10 <sup>4</sup>	7.39×10 <sup>4</sup>	3.78×10 <sup>5</sup>	2.67×10 <sup>5</sup>	7.56×10 <sup>4</sup>

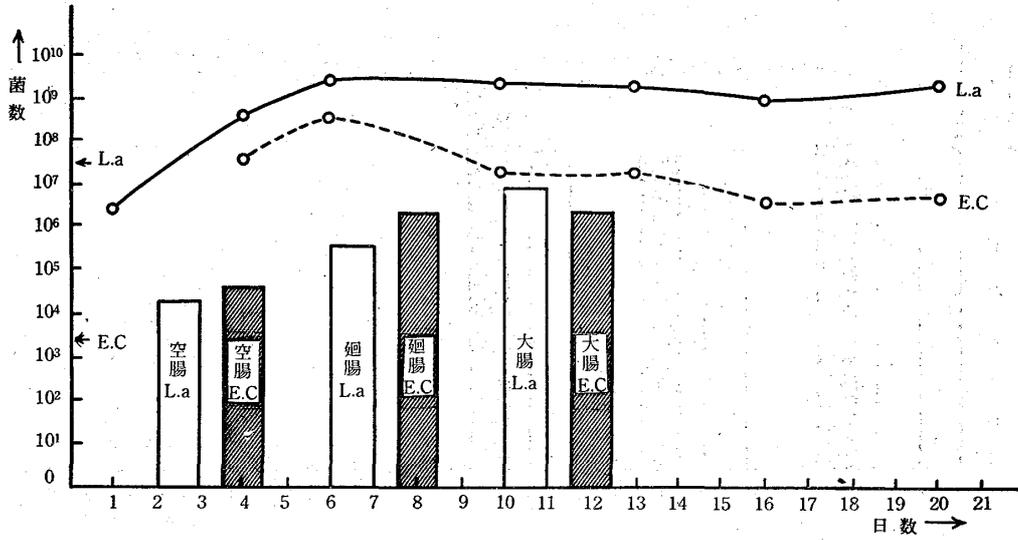
第4節 Str. faecalis, E. coli M<sub>1</sub> 隔日投与の場合

生後 20 日の健康無菌海猿 6 匹について行われ、Str. faecalis 約 4×10<sup>7</sup> 経口投与後 24 時間して E. coli M<sub>1</sub> 約 3×10<sup>3</sup> を経口投与した。一般状態は第 3 節の L. acidophilus 投与後 E. coli M<sub>1</sub> 投与の場合と殆んど同様で E. coli M<sub>1</sub> 投与によつても E. coli M<sub>1</sub> を無菌海猿に単独経口投与の場合に見られる様の激しい粘血便、脱肛、腹部膨隆、食欲欠

損などは見られなかつた。又糞便内菌数及び絨毛間隙内菌数は図 4, 表 9, 10 に示す通りで糞便内菌数は日を逐つて観察するに両菌とも平均値に於て割合早期に 10<sup>8</sup> 以上の菌が定着し以後 10<sup>9</sup> 前後の菌が持続した。

又実験開始後 20 日で殺し絨毛間隙内菌数を見ると両菌とも予想外に多く平均値に於て 10<sup>6</sup> 以上で特に大腸には E. coli M<sub>1</sub> が 10<sup>9</sup> も検出された。Str. faecalis は廻腸、大腸、空腸の順に多く、E. coli

〔図 3〕 L. acidophilus 経口投与後 E. Coli M<sub>1</sub> 経口投与の場合の糞便内及び絨毛間隙内菌数



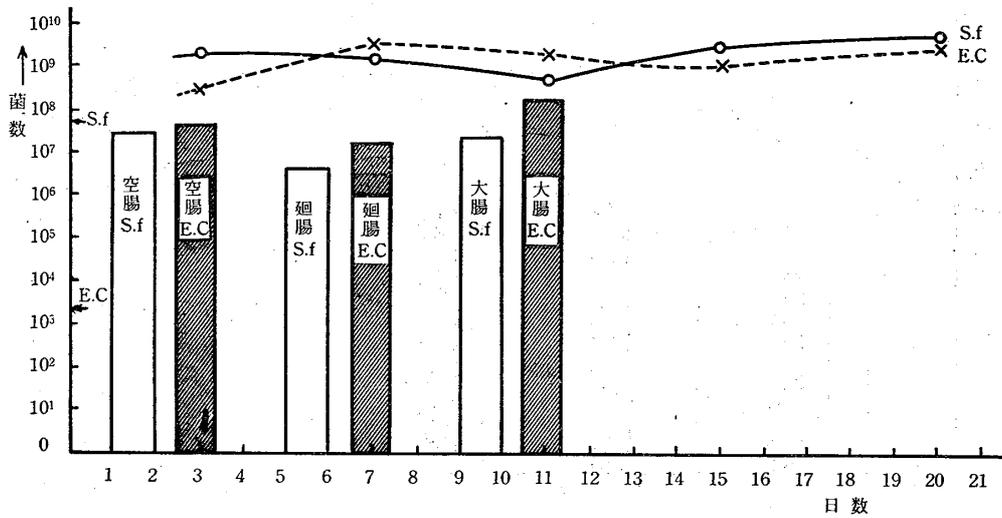
〔表 7〕 L. acidophilus 経口投与後 E. coli M<sub>1</sub> 経口投与の場合の糞便内菌数 (糞便 1g 中の菌数)

番号	菌種	1	4	6	10	13	16	02
No. 1	L. acid.	$5.82 \times 10^5$	$6.78 \times 10^8$	$3.75 \times 10^9$	$1.24 \times 10^9$	$8.63 \times 10^8$	$1.74 \times 10^9$	$4.12 \times 10^9$
	E. C. M <sub>1</sub>		$8.56 \times 10^6$	$5.14 \times 10^8$	$7.27 \times 10^6$	$8.38 \times 10^6$	$9.13 \times 10^6$	$8.64 \times 10^6$
No. 2	L. acid.	$3.08 \times 10^6$	$8.92 \times 10^8$	$4.76 \times 10^9$	$5.31 \times 10^9$	$5.37 \times 10^9$	$9.27 \times 10^8$	$1.56 \times 10^9$
	E. C. M <sub>1</sub>		$5.44 \times 10^7$	$3.69 \times 10^8$	$3.21 \times 10^6$	$4.08 \times 10^6$	$4.43 \times 10^6$	$3.81 \times 10^6$
No. 3	L. acid.	$1.47 \times 10^9$	$7.43 \times 10^7$	$9.13 \times 10^8$	$8.86 \times 10^8$	$6.59 \times 10^8$	$8.42 \times 10^8$	$1.04 \times 10^9$
	E. C. M <sub>1</sub>		$2.19 \times 10^7$	$1.06 \times 10^8$	$5.73 \times 10^7$	$4.73 \times 10^7$	$4.45 \times 10^6$	$5.17 \times 10^6$
No. 4	L. acid.	$2.23 \times 10^6$	$4.77 \times 10^8$	$4.64 \times 10^9$	$5.36 \times 10^9$	$4.75 \times 10^9$	$3.85 \times 10^9$	$2.27 \times 10^9$
	E. C. M <sub>1</sub>		$1.88 \times 10^8$	$6.47 \times 10^8$	$1.72 \times 10^6$	$3.45 \times 10^6$	$2.23 \times 10^6$	$3.51 \times 10^6$
No. 5	L. acid.	$8.67 \times 10^5$	$9.76 \times 10^7$	$1.37 \times 10^9$	$2.71 \times 10^9$	$9.43 \times 10^8$	$1.14 \times 10^9$	$2.61 \times 10^9$
	E. C. M <sub>1</sub>		$5.89 \times 10^6$	$4.17 \times 10^8$	$8.34 \times 10^6$	$9.66 \times 10^6$	$5.27 \times 10^6$	$6.33 \times 10^6$
No. 6	L. acid.	$6.78 \times 10^6$	$5.68 \times 10^8$	$2.8 \times 10^9$	$2.05 \times 10^9$	$8.19 \times 10^8$	$8.94 \times 10^8$	$1.17 \times 10^9$
	E. C. M <sub>1</sub>		$4.76 \times 10^7$	$5.63 \times 10^8$	$3.88 \times 10^6$	$4.16 \times 10^6$	$2.63 \times 10^6$	$3.47 \times 10^6$
平均	L. acid.	$2.28 \times 10^6$	$4.65 \times 10^8$	$3.04 \times 10^9$	$2.93 \times 10^9$	$2.23 \times 10^9$	$9.88 \times 10^8$	$2.11 \times 10^9$
	E. C. M <sub>1</sub>		$5.44 \times 10^7$	$4.36 \times 10^8$	$1.36 \times 10^7$	$1.28 \times 10^7$	$4.69 \times 10^6$	$5.15 \times 10^6$

〔表 8〕 L. acidophilus 経口投与後 E. coli M<sub>1</sub> 経口投与の場合の絨毛間隙内菌数

部位	菌種	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均
空腸	L. acid.	$3.78 \times 10^3$	$3.63 \times 10^4$	$4.16 \times 10^4$	$1.17 \times 10^5$	$2.27 \times 10^3$	$5.73 \times 10^4$	$4.30 \times 10^4$
	E. C. M <sub>1</sub>	$1.43 \times 10^5$	$3.82 \times 10^4$	$2.16 \times 10^3$	$8.72 \times 10^4$	$4.87 \times 10^3$	$6.92 \times 10^4$	$5.74 \times 10^4$
廻腸	L. acid.	$5.68 \times 10^5$	$9.12 \times 10^4$	$6.71 \times 10^5$	$6.86 \times 10^5$	$8.16 \times 10^4$	$7.62 \times 10^5$	$4.77 \times 10^5$
	E. C. M <sub>1</sub>	$9.73 \times 10^6$	$8.76 \times 10^5$	$2.73 \times 10^6$	$7.25 \times 10^6$	$4.49 \times 10^5$	$3.37 \times 10^6$	$4.08 \times 10^6$
大腸	L. acid.	$3.86 \times 10^7$	$2.13 \times 10^6$	$8.47 \times 10^6$	$2.71 \times 10^6$	$8.97 \times 10^5$	$4.33 \times 10^6$	$9.52 \times 10^6$
	E. C. M <sub>1</sub>	$6.62 \times 10^6$	$5.54 \times 10^5$	$3.18 \times 10^6$	$5.48 \times 10^5$	$4.20 \times 10^5$	$3.12 \times 10^6$	$2.42 \times 10^6$

〔図4〕 Str. faecalis 経口投与後 E. Coli M<sub>1</sub> 経口投与の場合の糞便内及び絨毛間隙内菌数



〔表9〕 Str. faecalis 経口投与後 E. coli M<sub>1</sub> 経口投与の場合の糞便内菌数（糞便1g中の菌数）

番号	菌種	日	3	7	11	15	20
No. 1	Str. fae.		3.56×10 <sup>9</sup>	2.46×10 <sup>9</sup>	5.42×10 <sup>8</sup>	3.73×10 <sup>9</sup>	5.36×10 <sup>9</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		7.13×10 <sup>8</sup>	4.71×10 <sup>9</sup>	3.95×10 <sup>9</sup>	1.71×10 <sup>9</sup>	2.33×10 <sup>9</sup>
No. 2	Str. fae.		2.63×10 <sup>9</sup>	1.44×10 <sup>9</sup>	3.64×10 <sup>8</sup>	3.82×10 <sup>9</sup>	4.47×10 <sup>9</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		3.57×10 <sup>8</sup>	2.45×10 <sup>9</sup>	2.27×10 <sup>9</sup>	1.53×10 <sup>9</sup>	2.48×10 <sup>9</sup>
No. 3	Str. fae.		1.12×10 <sup>9</sup>	7.33×10 <sup>8</sup>	1.21×10 <sup>8</sup>	1.64×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>9</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		2.18×10 <sup>8</sup>	7.45×10 <sup>8</sup>	1.35×10 <sup>9</sup>	9.05×10 <sup>9</sup>	6.23×10 <sup>8</sup>
No. 4	Str. fae.		5.94×10 <sup>8</sup>	4.31×10 <sup>8</sup>	3.63×10 <sup>8</sup>	2.18×10 <sup>9</sup>	3.78×10 <sup>9</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		5.33×10 <sup>8</sup>	1.51×10 <sup>9</sup>	1.79×10 <sup>9</sup>	6.15×10 <sup>8</sup>	5.72×10 <sup>8</sup>
No. 5	Str. fae.		2.77×10 <sup>9</sup>	2.00×10 <sup>9</sup>	2.46×10 <sup>9</sup>	5.97×10 <sup>9</sup>	3.77×10 <sup>9</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		3.32×10 <sup>8</sup>	1.82×10 <sup>8</sup>	1.39×10 <sup>9</sup>	1.74×10 <sup>9</sup>	5.86×10 <sup>8</sup>
No. 6	Str. fae.		4.39×10 <sup>8</sup>	3.86×10 <sup>8</sup>	2.47×10 <sup>8</sup>	5.1×10 <sup>8</sup>	1.53×10 <sup>9</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		5.75×10 <sup>7</sup>	4.18×10 <sup>8</sup>	1.48×10 <sup>9</sup>	3.87×10 <sup>8</sup>	1.55×10 <sup>9</sup>
平均	Str. fae.		1.85×10 <sup>9</sup>	1.24×10 <sup>9</sup>	6.83×10 <sup>8</sup>	2.98×10 <sup>9</sup>	3.4×10 <sup>9</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		3.68×10 <sup>8</sup>	1.67×10 <sup>9</sup>	2.04×10 <sup>9</sup>	2.51×10 <sup>9</sup>	1.36×10 <sup>9</sup>

〔表10〕 Str. faecalis 経口投与後 E. coli M<sub>1</sub> 経口投与の場合の絨毛間隙内菌数

部位	菌種	日	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均
空腸	Str. fae.		3.75×10 <sup>7</sup>	1.53×10 <sup>7</sup>	1.12×10 <sup>7</sup>	9.31×10 <sup>7</sup>	4.6×10 <sup>7</sup>	9.07×10 <sup>6</sup>	3.54×10 <sup>7</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		4.5×10 <sup>7</sup>	5.52×10 <sup>7</sup>	2.36×10 <sup>7</sup>	2.64×10 <sup>7</sup>	7.71×10 <sup>7</sup>	4.38×10 <sup>7</sup>	4.51×10 <sup>7</sup>
廻腸	Str. fae.		5.03×10 <sup>6</sup>	3.22×10 <sup>6</sup>	7.16×10 <sup>6</sup>	4.43×10 <sup>6</sup>	1.44×10 <sup>7</sup>	2.55×10 <sup>6</sup>	6.13×10 <sup>6</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		9.46×10 <sup>6</sup>	9.75×10 <sup>6</sup>	1.74×10 <sup>7</sup>	7.42×10 <sup>6</sup>	2.49×10 <sup>7</sup>	3.18×10 <sup>6</sup>	1.2×10 <sup>7</sup>
大腸	Str. fae.		1.04×10 <sup>7</sup>	9.46×10 <sup>6</sup>	1.76×10 <sup>7</sup>	2.1×10 <sup>7</sup>	5.75×10 <sup>6</sup>	1.23×10 <sup>7</sup>	1.28×10 <sup>7</sup>
	E. C. M <sub>1</sub>		1.13×10 <sup>8</sup>	1.3×10 <sup>8</sup>	8.55×10 <sup>7</sup>	9.45×10 <sup>7</sup>	1.83×10 <sup>8</sup>	1.99×10 <sup>8</sup>	1.31×10 <sup>8</sup>

M<sub>1</sub> は廻腸、空腸、大腸の順に多く検出された。又解剖所見には異常を認めなかつた。

### 第 5 章 考察及び総括

自然飼育動物は腸内初感染並びに発病機転の本態を把握するのに、腸管内に多数の種類の菌が生棲して居り且つ生体に影響を及ぼし乍ら時々刻々変動して居り加うるに生体は夫々固有の体質的素因或は生後の環境条件、又は栄養条件等々色の因子により困難である。

此の意味に於て無菌飼育動物を使用する事は複雑な条件をかなり単純化した状態で腸内菌叢を観察する事が出来る。近年抗生物質の発達にともない抗生物質の腸内菌叢に及ぼす影響が論議され、腸内菌叢の変化に基づく乳児下痢症の問題が小児科領域<sup>(43)</sup>で大きな課題になつて居るが大腸菌群、乳酸菌群の単感染、重感染の研究は意義あるものと思われる。今細菌の腸管内初感染の感染成立要因を考えると (a) 生体の条件として遺伝、栄養、環境の問題があり (b) 細菌の条件として質的条件即ち腸管と細菌との親和性或は菌体内及び菌体外毒素との関係があり又菌数、接触時間の反覆、更に重感染の排反・共生現象の問題が考えられる。(c) 生体の細菌感染による反応として体液性変化即ち抗体産生、補体、血清殺菌力、白血球食菌能があり、組織細胞性変化に病理学的又は生化学的所見があり、又全身機能の変化に発病・予防の問題がある。

ここで主役を演ずる菌株 *E. coli* M<sub>1</sub> は母獣海狸より分離の大腸菌で普通飼育海狸に経口投与或は皮下接種の場合に所謂菌体内及び菌体外毒素の作用を認めないが無菌海狸に経口投与すれば、敗血症々状を呈せしめるものであつた。

従来腸内細菌の拮抗性を調べる方法として試験管内培養による拮抗性を検査して居るものが多いが本成績より試験管内に於て *L. acidophilus* と *E. coli* M<sub>1</sub> は拮抗的な共生現象を、又 *Str. faecalis* と *E. coli* M<sub>1</sub> は拮抗性を有し、無菌飼育海狸では *L. acidophilus* と *E. coli* M<sub>1</sub> の間にやはり拮抗的な共生現象を呈したが、*Str. faecalis* と *E. coli* M<sub>1</sub> の間には共生現象が認められた。又絨毛間隙内菌数も自然飼育の場合と総てに於て一致するものではなかつた。

従来乳酸菌による拮抗現象は乳酸菌の産生する乳酸によるとする報告が多いが、本実験からは定着の仕方即ち *L. acidophilus* 又は *Str. faecalis* が先きに定着する事によりあとから定着する *E. coli*

M<sub>1</sub> に対して腸管粘膜は発育阻止的に作用する様に思われる。又 *L. acidophilus* と *E. coli* M<sub>1</sub> を同時に経口投与した時に見られた全く相反する 2 通りの結果が得られた事であるが、腸管粘膜の個体差による菌の親和性によるかは今後更に検討を要する事である。

今本実験海狸の病理組織学的研究を行つた富岡<sup>(33)</sup>、中村<sup>(34)</sup>の文献を参考にして見ると、*L. acidophilus* 単独経口投与の場合のリンパ節は、明中心、充実結節は無菌海狸と同様全く認められぬが全体の発育は無菌海狸よりやや良好であり、腸粘膜の病理所見では細網細胞が比較的多く白血球の遊走も少数認められるけれど、毛細血管の発育はよくなく絨毛部固有層の発育は無菌群に比して多少良好になつて居り、*L. acidophilus* と *E. coli* M<sub>1</sub> 同時投与の場合 *L. acidophilus* が優位のもの、*L. acidophilus* 投与後 *E. coli* M<sub>1</sub> 投与のもの、更に *Str. faecalis* 投与後 *E. coli* M<sub>1</sub> 投与のものもリンパ節並びに腸粘膜の病理所見が *L. acidophilus* を単独経口投与の場合と類似していた。又 *L. acidophilus* と *E. coli* M<sub>1</sub> 同時経口投与で *E. coli* M<sub>1</sub> 優位のもの *E. coli* M<sub>1</sub> 単独経口投与に見られる所見即ちリンパ節は二次小節出現の暇のない細胞変性像に近い状態で又腸管は充血、出血、白血球の浸潤、粘膜の剝離、エロゾオンなど多彩の変化があり、粘膜固有層の結合織も烈しい変性崩壊像、出血、充血、白血球の浸潤などで覆われて居る。

これらの事からして *E. coli* M<sub>1</sub> が侵入すれば、血液中に於て増殖するか、又はエロゾオンを起した粘膜面から引続き *E. coli* M<sub>1</sub> の侵入を受けて海狸は死亡するが、最初に乳酸菌群の粘膜上皮下に影響を与えるとその組織及びリンパ節の構造が充実化され後から感染した *E. coli* M<sub>1</sub> の体内侵入を防禦する作用を現わすものと思われる。

以上の如く乳酸菌群の定着現象と大腸菌感染に対する拮抗現象が、リンパ節及び腸管粘膜の病理所見の上で生体防禦に関し同一の結果が得られた事は興味ある事である。

### 第 6 章 結 論

著者は HMC-2 型無菌飼育装置により海狸の乳酸菌群経口投与による定着現象並びに大腸菌との拮抗現象を糞便内菌数及び絨毛間隙内菌数より之を観察し、併せて自然飼育仔海狸の腸内菌及び試験管内菌拮抗現象と比較検討した。其の結果を要約すれば次の通りである。

(1) *L. acidophilus* は自然飼育の仔海獣の腸内並びに糞便内には比較的証明し難い。

(2) 無菌飼育海獣は *L. acidophilus* の腸管内増殖は緩徐であるが一度定着すればよく腸管内で増殖を継続した。

(3) 無菌飼育海獣は *L. acidophilus* 及び *Str. faecalis* が経口投与された場合一過性に腸管過敏性を呈し軽い下痢症状を起した。

(4) 無菌飼育海獣は *L. acidophilus* 又は *Str. faecalis* が定着すると腸管粘膜並びにリンパ組織は *E. coli* M<sub>1</sub> に対して生体防禦反応を呈し *E. coli* M<sub>1</sub> の有害作用を阻止し、拮抗的な共生現象若くは共生作用をなし得た。

(5) *Str. faecalis* と *E. coli* M<sub>1</sub> の拮抗現象は試験管内試験と無菌飼育海獣とでは、一致しないで共生現象を呈した。

(6) 無菌飼育海獣は *L. acidophilus* 又は *Str. faecalis* が腸管の何れの部位にもよく定着した。

以上の結果より、*L. acidophilus* 及び *Str. faecalis* は生体防禦に大きな役割を果すものと考えられ、いわゆる非病原菌の腸内初感染による生体に及ぼす意義の一部が解明されたものと思う。

稿を終るに臨み御懇篤なる御指導と御校閲を賜わつた恩師谷川教授に深甚なる感謝を捧げ、併せて実験指導に当られた田波助教授に感謝する。又無菌飼育に協力下さつた教室員各位に厚く御礼申し上げると共に、特殊飼料を寄贈下された森永乳業株式会社並びに同社普及課太田主任に謝意を表する。

#### 主要文献

- (1) 田波潤一郎：千葉医会誌，35，1，1，1959.
- (2) Tissier, H.: Studies on the Intestinal Flora of Infants by E. Olsen.
- (3) Moro, E.: Jb Kinderhk 52, 38, 1900, Wien. klin. Wschr., 13, 114, 1900.
- (4) Methnikoff: Ann. Inst. Pasteur. Par., 22, 929, 1908.
- (5) 詫摩武人：日医新報，1560号，13，(昭29)
- (6) Hull u. Rettger: J. Bact., 2, 47, 1917; Zbl. Bakt., 1, Abt. Orig. 75, 219, 1915.
- (7) Cannon, a Mc Nease: J. Infect. Dis. 32, 175, 1923.
- (8) Goldon: J. Infect. Dis. 34, 459, 1924.
- (9) Schieblich: Zbl. Bact. 1, Abt. Orig., 112, 1, 2, 3, 4, mitt. 188, 206, 497, 505, 1929.
- (10) 詫摩・勝又：児臨，3，3，38，1950.
- (11) 矢児民博：医学と生物学，23，4，131，1952.
- (12) 勝又俊太郎：日児会誌，58，11，955，1954.
- (13) 浜田他：薬学研究，25，11~12，770，1953.
- (14) 本間 道：日児会誌，56，389，1952.
- (15) 本間 道：日児会誌，57，918，1953.
- (16) 矢吹晋一：日児会誌，58，10~11，871，876，956，1954.
- (17) 菱刈：日微生物会誌，18，1925.
- (18) 川上：民衛，5，1928.
- (19) 野竿：民衛，1，8，大正13.
- (20) Nuttal, G. H. F. u. Thierfelder, H.: Z. physiol. Chemie, 21, 109, 1895.
- (21) Schottelius, M.: Arch. Hyg, 34, 210, 1899.
- (22) Küster, E.: Zbl. Bakt. 54, 55, 1912.
- (23) Cohendy, M.: Ann. Inst. Pasteur, 26, 106, 1912.
- (24) Glimstedt, G.: Verh. Anat. Ges. Anat., 75, 78, 1932.
- (25) Gustaffson, B.: Acta Path. Microbiol. Scand., Suppl. LXXIII, 1948.
- (26) Reyniers, J. A.: LOBUND Report 1, 1946.
- (27) 赤沢喜三郎：千葉医会誌，20，9，1942.
- (28) 宮川正澄：名古屋医会誌，64，237，1950.
- (29) 福島 俊：千葉医会誌，33，3，459，1957.
- (30) 河合正太郎：千葉医会誌，31，2，168，1955.
- (31) 斎藤佐文：千葉医会誌，31，1，107，1955.
- (32) 戸叶公明：千葉医会誌，34，2，392，1958.
- (33) 富岡清海：千葉医会誌，35，1，347，1959.
- (34) 中村順二郎：千葉医会誌，35，2，803，1959.
- (35) 安藤・田島：動物実験法，261，昭31.
- (36) 小林龍吉：日病会誌，40，総会号，438，昭29.
- (37) 本間 道：児臨，7，3，182，1954.
- (38) Bergey: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6. ed. 352, 325, 1948.
- (39) 那須照夫：日衛誌，8，173，1954.
- (40) 菅沼知久：未刊行，無菌海獣に於ける大腸菌群定着現象に関する研究，第353回千葉医学会例会発表。
- (41) 越智・光岡：日獣医会誌，1，1，昭33.
- (42) 宮川正澄：日新医学，42，10，553，1955.
- (43) 中村仁吉：日児会誌，58，10，879，1954.