

酪酸菌製剤投与による乳児腸内菌叢の変動

千葉大学医学部衛生学教室

小 林 茂 樹 ・ 田 波 潤 一 郎

SHIGEKI KOBAYASHI JUNICHIRO TANAMI

宮入菌剤研究所

北 村 哲 男

TETSUO KITAMURA

(昭和43年7月30日受付)

I. はじめに

近年、腸内細菌叢と腸管機能との関係の重要性が再認識されてきた¹⁾。腸内細菌叢の系統的研究によれば、哺乳期には *L. bifidus* が多いことが知られている²⁾³⁾⁴⁾。そういう時期に酪酸菌を投与して腸内の細菌叢の変化を追求した例は少ない¹²⁾。しかし、酪酸菌群およびこれらとその他の菌との関連性についての in-vitro の研究は多い。酪酸菌の性状⁵⁾、酪酸菌と腐敗菌との拮抗作用⁶⁾⁷⁾、酪酸菌と腸内病原菌および腸内菌との拮抗作用⁸⁾などが挙げられる。坂本⁹⁾によれば酪酸菌と *L. bifidus* との混合培養において、酪酸菌は最初やや減少するが、その後増加し、*L. bifidus* の発育曲線を加速したことが報告されている。すなわち、酪酸菌は *L. bifidus* と共生し、*L. bifidus* の増加を助ける作用を発揮するものと思われる。酪酸菌が発揮する *L. bifidus* 発育促進効果については、その後に行なった北城¹³⁾のデータがある。著者らはこの酪酸菌の作用について in-vivo で検討し、あわせて *E. coli* と *St. faecalis* との増減をも観察するために、9例の健康な人工乳栄養児と2例の母乳栄養児について酪酸菌製剤の一種ミヤリサン・アイシ A を投与する実験を行なったのでここに得られた結果を報告する。

II. 実験方法

1) 酪酸菌製剤

ミヤリサン・アイシ A (酪酸菌 4.5×10^9 /g) 粉末。

2) 実験対象 一実験 I—

- 第1例 Ir (人工乳) ♀ 生後6ヵ月
第2例 Ka (母乳) ♀ 生後3ヵ月

- 第3例 Na (人工乳) ♂ 生後3ヵ月
第4例 Naka (母乳) ♀ 生後3ヵ月

—実験 II—

- 第5例 Uti (人工乳) ♀ 生後2ヵ月
第6例 S (人工乳) ♂ 生後3ヵ月
第7例 H (人工乳) ♀ 生後3ヵ月
第8例 T (人工乳) ♀ 生後2ヵ月

—実験 III—

- 第9例 N (人工乳) ♀ 生後3ヵ月
第10例 Su (人工乳) ♂ 生後3ヵ月
第11例 O (人工乳) ♀ 生後3ヵ月

3) 投与期間ならびに採便日

各例の投与期間は実験 I では21日間、実験 II では12日間、実験 III では3日間であった。採便は、投与前後に2回、投与期間中3回これを行なった。ただし、第8例では2回行なった。

4) 採便方法

採便方法は自然排出した糞便を無菌シャーレに無菌的に2g以上移し密閉して氷を入れたジャーの中に保存し5~6時間以内に培養検査した。実験 III ではジャーの中に保存してから1~2時間後に培養した。

5) 投与方法

1日0.6gを3回に分けて実験期間中毎日投与した。

6) 培養方法および菌数計算

各菌の培地は、*L. bifidus* と *L. acidophilus* には本間⁹⁾の培地および LBS 培地 (選択培地)、その他 *E. coli* (選択培地、E. C 培地)、*St. faecalis* (選択培地、S. F 培地)を用いた。培養および菌数計算は吉江の行なった

方法¹⁰⁾に従った。酪酸菌は Zeissler の葡萄糖血液寒天平板培地で柳沢ほか¹¹⁾が改良した黄磷法により、37°C 48 時間嫌気培養した。実験 III においては水素ジャー（富永製作所）で同条件に嫌気培養をした。菌数は乾燥重量 1 g 当たりを算出した。

7) 糞便 pH

pH メーター Model M-3 (堀場工業) を用いて測定し、実験 III ではサンプルが少量のため pH 試験紙 (東洋濾紙 KK) を用いた。

III. 実験成績

A. 実験 I

図 1, Ir 例において、糞便 pH は酪酸菌投与中止直前で最高になり pH 8.3 であった。腸内菌叢では *E. coli* の場合、投与前後において増加の傾向が見られた。*St. faecalis* は投与前から増加し、投与期間の中間において最低となり再び増加した。*L. acidophilus* の場合投与後しだいに増加した。*L. bifidus* は投与してからしだいに増加し、投与中止直前に最高になり、中止後減少した。

図 2 の Ka 例において、糞便 pH は図 1 の Ir 例と同じく投与中止直前で pH 6.7 の最高値を示した。腸内菌叢は *L. acidophilus* では投与開始直後に減少し、投

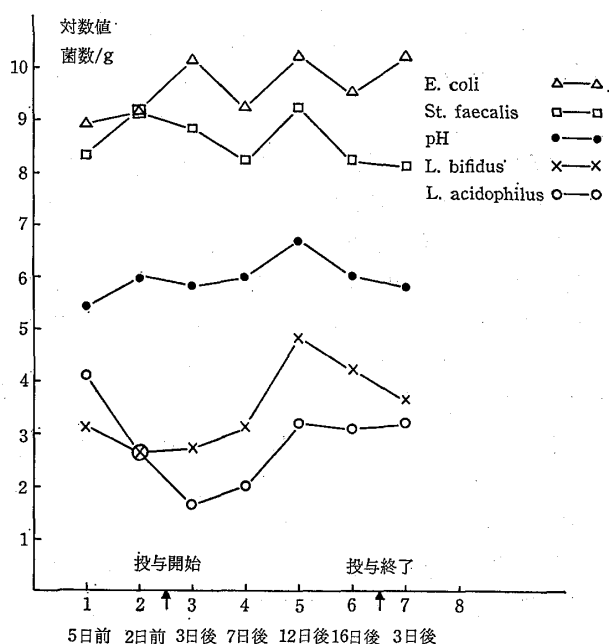


図 2. 第 2 例 Ka (母乳)

与中止前に再び出現して $2 \times 10^3/g$ となり、中止後も同量の菌数となった。

L. bifidus は投与開始後しだいに増加して投与中止前に最高 $8 \times 10^4/g$ となり、中止後は減少した。*E. coli* および *St. faecalis* とも投与前後において著明の変化を認めなかったけれども、その変動は糞便 pH のカーブと類似していた。

図 3 の Na 例において、糞便 pH は投与開始してか

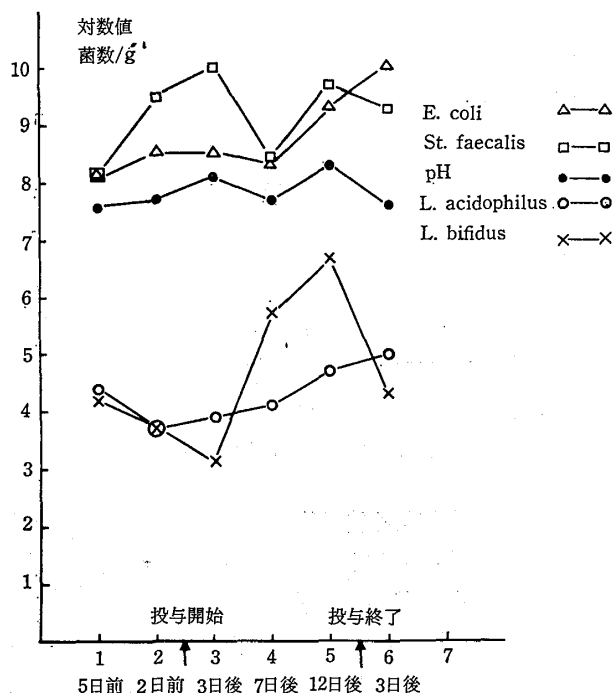


図 1. 第 1 例 Ir (人工乳)

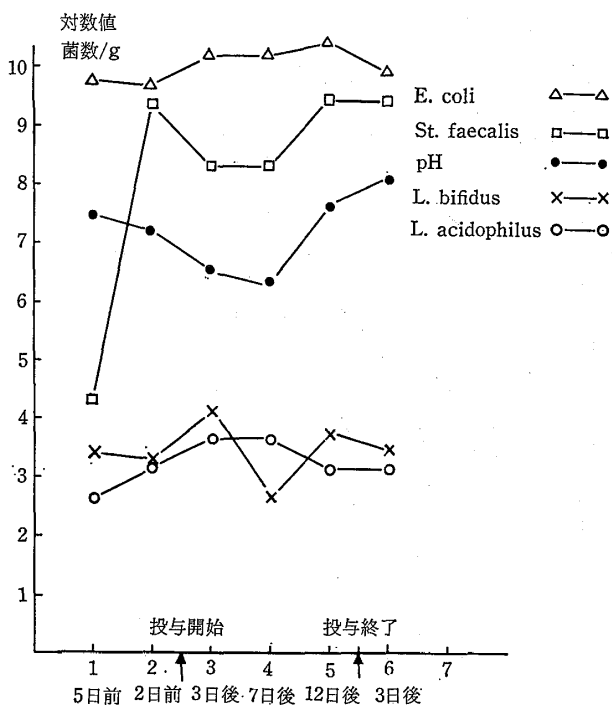


図 3. 第 3 例 Na (人工乳)

らしだいに低下して最低 pH 6.2 を記録し、その後上昇した。腸内菌数の場合 *L. acidophilus* は投与後第1日に最高 $6 \times 10^3/\text{g}$ であったが、投与前後で大きな変化を認めなかった。*L. bifidus* も同様投与後第1日に最高 $1 \times 10^4/\text{g}$ であったが投与前後で大きな変化がなかった。*E. coli* もまた投与前後で大きな変化がなかった。*St. faecalis* も投与後大きな差がなかった。

図4の NaKa 例において、糞便 pH は投与開始後低下し、第3日最低 pH 4.7 を示したが、投与中止後再び上り pH 5.9 を示した。このカーブは図3例とほぼ同様の傾向を示した。腸内菌叢では *St. faecalis* は投与開始してからしだいに増加し、投与中止直後最高 $8 \times 10^9/\text{g}$ であった。*E. coli* は大きな変化は見られなかった。*L. bifidus* では投与開始してからしだいに増加して投与中止直後に $7 \times 10^5/\text{g}$ であった。*L. acidophilus* は投与開始直後低下しその後再び投与前の同量の菌数が出現した。

B. 実験II

図5の Uti 例において酪酸菌投与前に pH 7.3 で投与による差をほとんど認めなかった。腸内菌叢では *L. bifidus* において投与前 $10^8/\text{g}$ が投与後 $10^4/\text{g}$ に減少し、それから増加して $5 \times 10^6/\text{g}$ になった。*L. acidophilus* は投与後少なくなり $5 \times 10^7/\text{g}$ となりさらに投与終了後 $2 \times 10^4/\text{g}$ に減少した。*St. faecalis* は投与前 $10^9/\text{g}$ で投与後は $10^8/\text{g}$ に少なくなり、さらに投与終了後 $10^6/\text{g}$ に減少した。*E. coli* は最高 $4 \times 10^8/\text{g}$ で投与前後で大差を認めなかった。

図6の S 例において、糞便 pH は投与前 pH 6.7 を

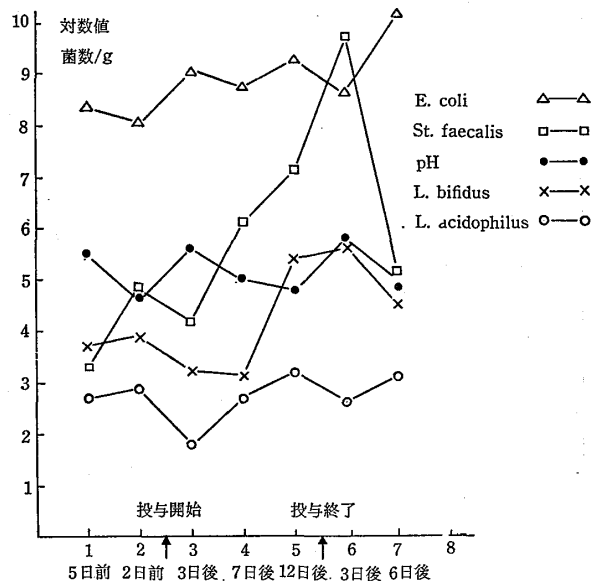


図4. 第4例 Naka (母乳)

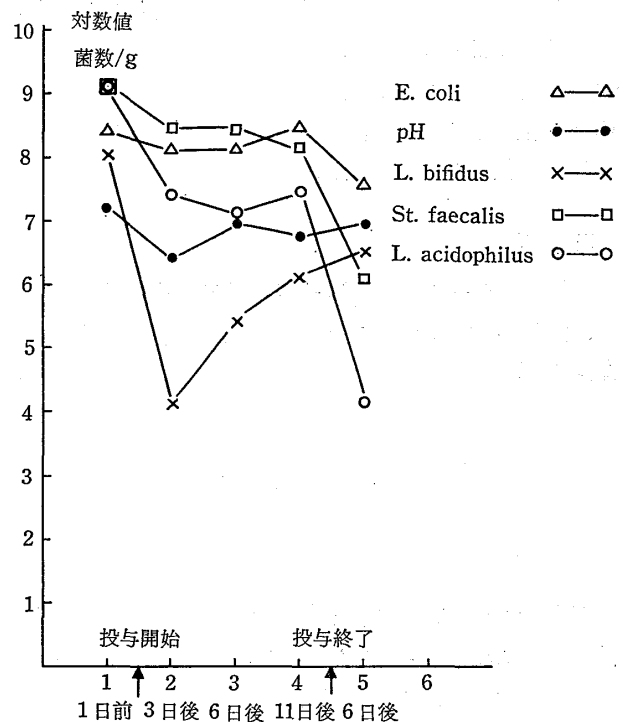


図5. 第5例 Uti (人工乳)

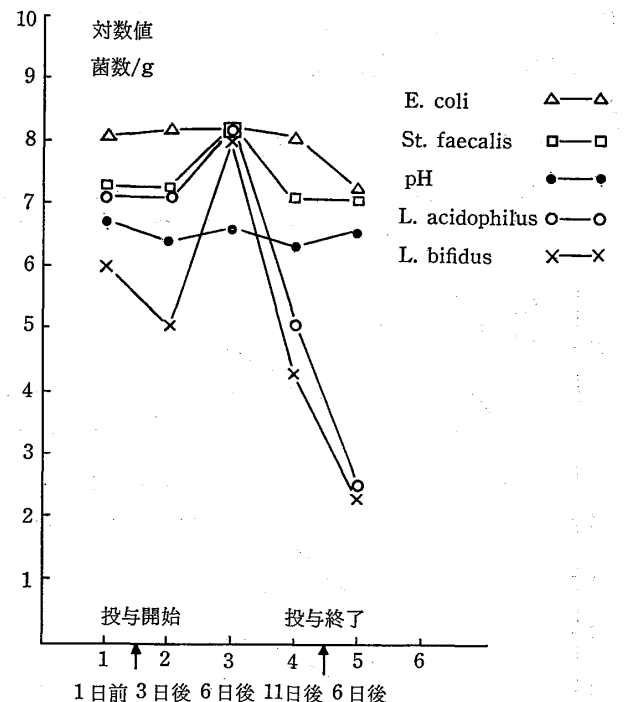


図6. 第6例 S (人工乳)

示し投与中も大差なく終了後 pH 6.6 を示した。腸内菌叢では *L. bifidus* において投与後第2日に最高 $10^8/\text{g}$ になり、投与終了後 $5 \times 10^2/\text{g}$ に減少した。*L. acidophilus* も投与後第2日に最高 $10^8/\text{g}$ になり、*L. bifidus* と同じような傾向を示した。*St. faecalis* は投与後2日に $10^8/\text{g}$ を示したが投与前後で差を認めなかった。*E.*

coli は投与前 10^8 /g で投与中も差が認められなかった。投与終了後 2×10^7 /g に低下した。

図7のH例において、糞便 pH は投与前 pH 7.7 を示し投与中は大きく終了後は pH 6.7 を示した。L. bifidus では投与前 4×10^4 /g が投与後第1日最高 10^7 /g で増加を示し、終了後は減少して 10^3 /g となった。L. acidophilus は投与後第3日最高 4×10^7 /g で、投与終了後は L. bifidus と同じく減少した。St. faecalis は投与前 10^6 /g がしだいに少なくなり、投与後 10^4 /g になった。E. coli では投与前後に大差なく他の3菌より多く出現した。

図8のT例において、糞便 pH は投与前と投与中は pH 7.5 で投与終了後 pH 6.1 となった。腸内細菌で、L. bifidus は投与前 10^8 /g でしだいに低下し投与終了後 2×10^4 /g となった。L. acidophilus は投与前と投与中で変化なく 5×10^7 /g で、投与終了後 10^6 /g に減少した。St. faecalis では投与前 5×10^8 /g で、投与後減少し 2×10^7 /g となり、投与終了後やや増加した。E. coli は投与前 5×10^8 /g で、一旦減少したが、投与中増加して最高 5×10^9 /g となった。

C. 実験Ⅲ

図9のN例において、L. bifidus は増加傾向を示し最高 1.6×10^8 /g になった。L. acidophilus も増加傾向を示し最高 1.5×10^7 /g となった。St. faecalis も増加傾向を示し、投与中最高 9.3×10^7 /g となり、E. coli も増

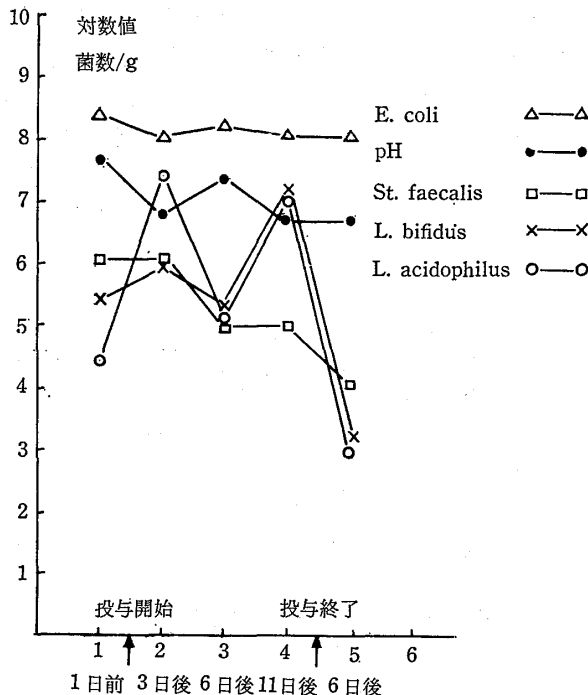


図7. 第7例 H (人工乳)

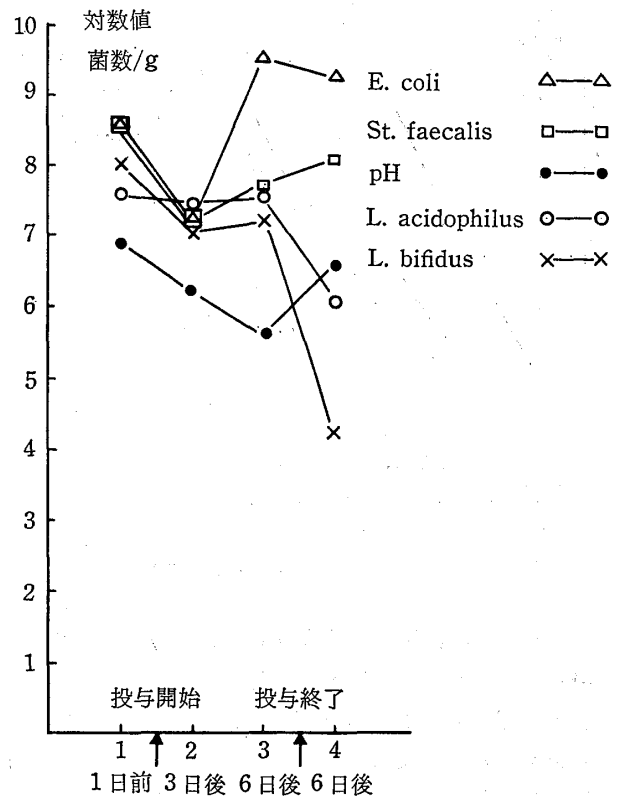


図8. 第8例 T (人工乳)

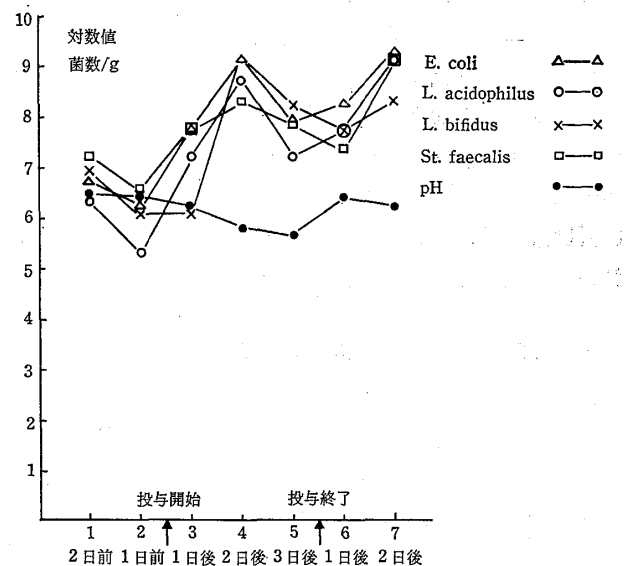


図9. 第9例 N (人工乳)

加して投与中最高 9.3×10^7 /g となった。糞便 pH は投与前後に大差を認めなかったが、投与前 pH 6.4 が投与中の最低 pH 5.6 となり、投与後ふたたび投与前と同じ pH 6.4 にもどった。

図10のSu例において L. bifidus は投与中増加傾向を示し最高 7.3×10^4 /g となり、L. acidophilus は大差を認めなかったが、pH の変化と似た変化を示した。St.

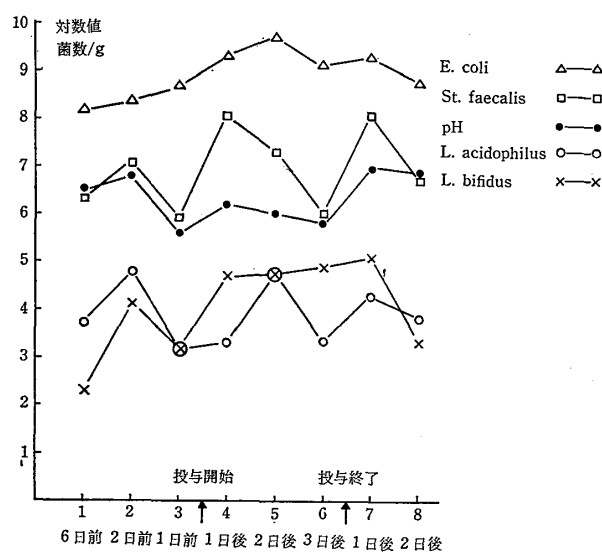


図 10. 第 10 例 Su (人工乳)

faecalis は酪酸菌投与後第 1 日に最高 10^8 /g となり再び下降して投与後第 3 日に最低 10^6 /g となったが、pH の変化と類似している。E. coli においては、増加傾向を示し最高 2.7×10^9 /g となっている。糞便 pH は投与後最低 pH 5.8 であったが、投与終了後は投与前にもどり pH 7 になった。

図 11 の O 例において、L. bifidus は増加傾向を示し投与中最高 2.8×10^8 /g を示した。投与終了後 2 日に再び投与前と似た菌数値を示した。L. acidophilus は酪酸菌投与後減少傾向を示し、投与中最低 2×10^7 /g で投与終了後再び投与前と同じレベルに出現した。St. faecalis と E. coli は投与開始前より少なくなり投与終了後再び投与前にもどっている。糞便 pH は投与前後において変化なく pH 6.5 近辺であった。

D. 酪酸菌製剤投与前後における糞便性状
これを表示すれば表 1, 2, 3 のようになる。

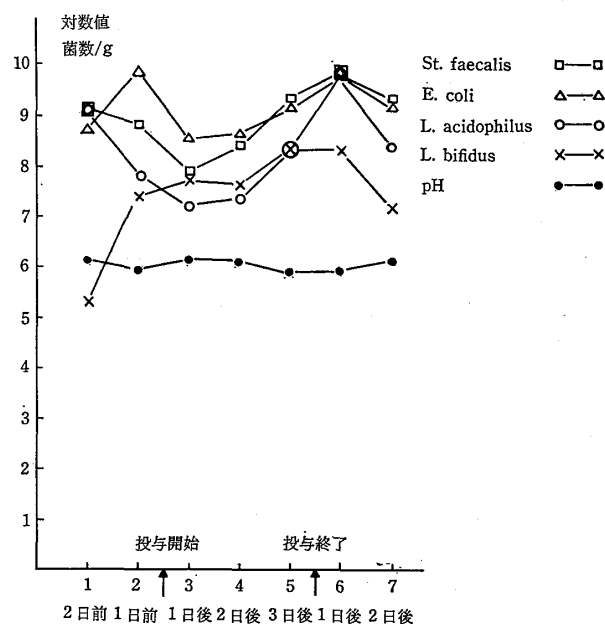


図 11. 第 11 例 O (人工乳)

表 2 の 4 例と表 3 の N 例において、投与開始 3 日と投与開始 2 日にそれぞれ軟便化しているが、投与終了後は投与前の硬さにもどっていた。他の例では大きな差が見られなかった。

IV. 考 察

L. bifidus については、11 例の中 7 例において投与前後に増加の傾向が見られた。これは酪酸菌の代謝産物の中に L. bifidus 増殖因子があるものと考えられる現象である。この事は坂本⁹⁾の in-vitro の実験と一致しているように思われる。糞便内菌数をもって腸内菌叢のおよその状態を知ろうとする際、連続する数回の試験の結果が一つの傾向線を示すような場合を除いては、はたして、2 試験の結果に示される菌数が有意の差をもつもの

表 1 実験 I

氏 名	栄 養	月 令	性別	投 与 前 日 5		投 与 前 日 2		投与開始 3 日		投与開始 7 日後		投与開始 12 日後		投与終了 3 日後		投与終了 6 日後	
				硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色
Naka	母 乳	3 カ月	♀	軟	黄	軟	黄	軟	黄	軟	黄	軟	黄緑	軟	淡黄	軟	黄
Ka	母 乳	3 カ月	♀	軟	黄緑	軟	黄	軟	黄	軟	黄	やや硬	黄	軟	黄	—	—
Na	人工乳	3 カ月	♂	有形	淡黄	有形	有形	有形	淡黄	やや硬	淡黄	やや硬	淡黄	やや硬	淡黄	—	—
Ir	人工乳	6 カ月	♀	有形	淡黄	有形	有形	有形	淡黄	やや硬	淡黄	やや硬	淡黄	やや硬	淡黄	—	—

表 2 実験 II

氏 名	栄 養	月 令	性別	投 与 前 日		投与開始日		投与開始日		投与開始日		投与終了日	
				硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色
Uti	人工乳	2 ヲ月	♀	有形	淡黄	やや軟	黄	有形	黄	有形	黄	有形	緑黄
T	人工乳	2 ヲ月	♀	有形	黄	やや軟	黄	やや軟	黄	—	—	有形	黄
S	人工乳	3 ヲ月	♂	有形	淡黄	やや軟	黄	有形	淡黄	有形	淡黄	有形	淡黄
H	人工乳	3 ヲ月	♀	有形	淡黄	やや軟	淡黄	有形	淡黄	有形	淡黄	有形	淡黄

表 3 実験 III

氏 名	栄 養	月 令	性別	投 与 前 日		投 与 前 日		投与開始日		投与開始日		投与開始日		投与終了日		投与終了日	
				硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色	硬さ	色
N	人工乳	3 ヲ月	♀	硬	黄緑	硬	黄緑	硬	黄緑	やや軟	黄緑	やや軟	黄	やや軟	黄緑	硬	黄緑
Su	人工乳	3 ヲ月	♂	硬	黄	軟	黄緑	軟	黄緑	硬	黄	硬	黄	硬	黄	硬	黄
O	人工乳	3 ヲ月	♀	やや軟	黄緑	やや軟	黄	やや軟	黄	硬	黄	やや軟	黄	軟	黄	やや軟	黄緑

かどうかの判定はなかなか難しい。これは、①その時に採便した糞便がはたして平均状態を示しているものかどうか？ ②採便時の量はどのくらいあり、その糞便のどこの場所から試料を採取したか？ ③糞便の硬さ、すなわち含水量（含粘液など）はどうであったか？ この条件の差によって、乾燥重量対の菌数と湿潤重量対の菌数との間に大きな差が出てくる。また、採便から菌培養にいたる間の実験条件では、④試料運搬保存の条件は？ ⑤菌培養までの保存時間は？ ⑥分離培養方法は？ というような点が吟味される必要がある。著者らが行ってきた同種の多数例の経験からして、上述の6点にできるだけ考慮を払っても、臨床実験の場合の精度は限られており、菌数 10^2 以下の差は一般的に有意でないと考えられる。

この判定基準に従えば、全 11 例中の 4 例において、すなわち、第 2、第 4、第 9、第 11、の各例において有意差をもって *L. bifidus* が発育したものといえる。その他の例では、単にその傾向が示唆されるに過ぎない。明らかに *L. bifidus* 数の低下を示している第 8 例は、投与期間が短く、例外的なものである。

L. bifidus 菌以外の菌で *L. acidophilus* については、人工乳栄養児と母乳栄養児とを比較すると母乳栄養児 2 名とも酪酸菌投与直後下降しているが、人工乳栄養児ではこの現象は見られなかった。花沢¹²⁾は雛にミヤリサン

5% 餌料対を投与したが *L. acidophilus* の数は対照群と相違が見られなかったと述べている。

St. faecalis は母乳栄養児 1 例と人工乳栄養児 2 例が増加傾向を示し、他の 8 例は変化が見られなかったが、大腸菌 $\geq$ 腸球菌の傾向がある。花沢¹²⁾は雛でミヤリサン 5% 投与区では大腸菌 $\geq$ 腸球菌の状態を示すようになると述べている。

E. coli は全例を通じて優位を示していたが、この現象は何を意味するか不明である。

X. ま と め

生後 2 ヲ月ないし 6 ヲ月の乳児に、酪酸菌製剤を投与し、排便を採取し、その中に含まれる *L. bifidus*, *L. acidophilus*, *E. coli* および *St. faecalis* の菌数上の変動を調べ、次のような結果を得た。

1) 酪酸菌投与によって、糞便内菌叢に動揺が起こった。すなわち、*L. bifidus*, *L. acidophilus*, *St. faecalis* における一時的減少と、その後に起こる増加傾向とである。

2) 動揺を起こしがたいものは *E. coli* であった。

3) 動揺を起こし易いものは *L. bifidus*, *L. acidophilus*, *St. faecalis* であった。

4) *L. bifidus* では、投与期間の短い1例を除いて、10例に増加の傾向が認められ、特にそのうちの4例では明らかに菌数の増加現象が認められた。

5) *L. acidophilus* については、大体において *L. bifidus* と似た傾向を示した。

6) *St. faecalis* においては増減の動揺が激しく、一定の傾向が認められなかった。

酪酸菌製剤投与による糞便 pH の変化には一定の傾向が見られなかった。また、一部では、投与に伴う軟便化が認められ、また、便色の黄化が認められた。しかし例数が少ないので全体的傾向を把握するには至らなかった。

稿を終わるに臨み、有益なる御助言を賜った桜井助教授に感謝致します。

引用文献

- 1) Donaldson, R. M. Jr.: Normal bacterial population of the intestine and their relation to intestinal function. *New England J. Med.* 270, 938-994, 994-1001, 1050-1056, 1964.
- 2) 島田英一: 千葉医学会誌. 16, 2929-2984, 1938.
- 3) 海宝紋之助: 千葉医学会誌. 12, 2354-2391, 昭9.
- 4) 磯田精康: 日児会誌. 69, 77-82, 昭40, 70, 103-109, 110-116, 昭41.
- 5) 宮入近治: 千葉医学会誌. 13, 1102-1157, 昭10. 13, 2141-2161, 昭10, 13, 2311-2315, 昭10.
- 6) 相磯和嘉・畠中 靖: 腐敗研究所報告. 1, 27-40, 昭23.
- 7) 畠中 靖: 腐敗研究所報告. 1, 41-53, 昭23.
- 8) 坂本一夫: 千葉医学会誌. 25, 33, 昭25.
- 9) 本間 道: 日児会誌. 56, 389-394, 1952, 57, 918-923, 1953.
- 10) 吉江俊夫: 千葉医学会誌. 32, 38-52, 昭31.
- 11) 柳沢利喜雄・藤川 昊・柳沢朝一郎: 千葉医学会誌. 11, 1002-1005, 昭8.
- 12) 花沢 清: 千葉医学会誌. 33, 393-408, 昭32.
- 13) 北城俊男・宮入 保: 日本細菌学会(演). 昭42.