閉鎖施設児童における腸内細菌，特に大腸菌 コリシン型の推移について

Enteric Bacteria in Children from Two Isolated Institutions ; with
Special Reference to the Variation in Colicin Types of *Escherichia*
coli and in Serotypes of *Clostridium welchii*

富山県衛生研究所

石 倉 康 宏・児 玉 博 英・城 野 晃
山 崎 茂 一・刑 部 陽 宅・久保田 憲太郎

Mitsuhiro Ishikura, Hirohide Kodama, Akira Jono, Shigeichi
Yamazaki, Yōtaku Gyobu and Kentaro Kubota

Institute of Hygiene and Medical Microbiology, Toyama

The present study was designed to perform a long term observation on the bacterial excretion in human feces with special reference to *Escherichia coli* and *Clostridium welchii*.

Fourteen children and 6 adult employees were chosen from 2 isolated institutions where mentally retarded child inmates were dwelling.

One institution (K) has had several epidemics of dysentery in the past 5 years, whereas dysentery has never been reported in the other institution (T). Feces were quantitatively cultivated for bacterial counts. Variation in bacterial counts, change in serotype of *Clostridium welchii*, and change in excretion of chloramphenicol-resistant or colicin-producing *Escherichia coli* were individually examined during the 10 month period.

1. No significant difference was observed between the 2 institutions in regard to the bacterial counts of *Escherichia coli*, *Clostridium welchii* and the *Enterococcus* group. Only the *Lactobacillus* counts (mainly *casei*) differed between the two, which probably could be attributed to the fact that inmates in Institution T had been drinking milk containing *Lactobacillus casei* (100 ml of approximately 10^8 cells/ml) daily. The antagonistic effect of the *Lactobacillus* from milk was not however evident against *Escherichia coli*, *Clostridium welchii* and the *Enterococcus* group.

2. Observations on individual variation in bacterial counts revealed that adults had the higher and the more stable *Escherichia coli* and *Enterococcus* counts in comparison to those in children.

3. Individual excretion state of the heat resistant *Clostridium welchii* was very unstable as indicated by frequent changes in the Hobbs serotype.

4. In contrast to *Clostridium welchii*, the excretion state of chloramphenicol-resistant *Escherichia coli* was individually characteristic, more long term carriers being seen in adults than in children.

5. Both resident and transient types of *Escherichia coli* were detected individually as indicated by colicin typing. Organisms having the same colicin type excreted at different times by the same person showed a similar O-antigenicity.

These results imply that colicin typing is an effective method for investigation into *Escherichia coli* as is found in intestinal flora.

精神薄弱児童の収容施設であるK学園においては、過去数回集団赤痢の発生をみており、特に昭和44年には10

月と12月の2回にわたり児童43名、職員8名、計51名のぼる患者を出し、学園の機能が麻痺する状態にいたっ

た。当時調査を担当した著者らは、その後の予防対策として、毎月1回赤痢菌，サルモネラ菌を対象に全員の保菌者検索を行なうことにした。著者らは以前より、このような閉鎖施設で生活している人達の腸内常在菌に興味をもっていたので、この機会に過去5年間1度も赤痢の発生がなく、しかも毎日乳酸飲料を飲用しているT学園を対照に選び、以下に示す実験を行なった。

①便の定量培養を同一人で長期間行ない、菌数に定量的な差がみられるかどうか、また菌数の変動はどうか。
②乳酸飲料の飲用による質的、量的な違いがあるかどうか。
③ウェルシー菌叢と大腸菌叢を施設別、個人別にみた場合どのようになっているかなどについて追究したので、その概要を報告する。

材 料 と 方 法

調 査 対 象

精神薄弱児童収容の2施設，K学園：児童数90名，過去5年間に6回赤痢の発生があり最終は昭和45年12月～3月，T学園：児童数40名，赤痢の発生はなく，この学園では脱脂粉乳で希釈した乳酸飲料（ヤクルト）を毎日100ml 飲用（希釈後の乳酸菌数は調査期間を通して、 $10^8/\text{ml}$ と一定数を示していた）しているのが特徴であった。両学園とも児童が園外に出て生活するのは、正月と盆に帰宅するだけであり、それ以外は園内で同一の食事をとり、共同生活する閉鎖施設である。職員は一部の人を除いて通勤であり、T学園での乳酸飲料の飲用は職員も園児と同様であった。

調査期間と採便

昭和45年6月～昭和46年3月まで，K学園では毎月，T学園では隔月，両学園とも児童14名（K学園においては連続3回～2回赤痢に罹患した園児も数名含む），職員6名を選びバックで採便した。

便の定量培養

ドルガルスキー寒天培地（栄研製，以下BTBと略），クロラムフェニコール加BTB寒天培地（クロラムフェニコール25 γ /ml，CM-BTBと略），エオジンメチレンブルー寒天培地（栄研製，以下EMBと略）腸球菌寒天培地（日水製，以下EFと略），カナマイシン加卵黄寒天培地（日水製，カナマイシン200 γ /ml以下KM-CWと略）変法乳酸菌選択寒天培地（BBL製，以下変法LBSと略）の6種の平板培地を用いた。バック中の新鮮便から1g秤量し、これを9mlの滅菌生理食塩液に入れ、滅菌ガラス棒で良くくだき、ついでサーモミキサーにかけ比較的均一な懸濁液とした。これを原液として、10倍段階に希

釈し、各段階の希釈液を0.05ml ずつ各平板におとし、コンラージ棒でひろげ、37℃で培養した。変法LBS培地を用いての乳酸菌の培養は各段階希釈液の1ml をとり混釈培養を行ない、ウェルシー菌を対象とした嫌気培養は嫌気ジャーを用い、水素置換法で行なった。培養後の各平板からの菌数の算出はコロニーの性状により区別し、便1g当たりの菌数で表示した。

大腸菌のコリシン型別

定量培養したCM加BTB，EMB平板より大腸菌を疑うコロニーを検出した最高希釈の平板から3～4個のコロニーを釣菌した。分離菌は生物学的性状により大腸菌であることを確認後、コリシン型別に供した。コリシン産生用培地としては、5%牛血液，0.1%ブドウ糖加トリプトソイ寒天培地を使用した。型別は48時間割線培養し、コリシンを産生させ、最初は17，Row，Row/I，Row/E，Row/B，Row/Kの6種の指示菌^{1),2)}を用いてスクリーニングした。その後、コリシンを産生した菌株のみ、赤痢菌（ソネ菌）と同様の方法^{1),2)}でコリシンの型別を行なった。

赤痢菌コリシンに対する大腸菌の感受性

K学園における最終の集団赤痢から分離した，14型菌（ソネ菌）と昭和44年8月に県内の他の集団から分離した8型菌を用い、これら二種類の菌が産生したコリシンに対する分離大腸菌の感受性を検討した。

耐熱ウェルシー菌のHobbs型別

便の10倍希釈液1mlをクックドミート培地に入れ、100℃1時間加熱、37℃一夜培養後、KM加CW寒天平板に塗抹し、嫌気培養した。レンチナーゼ反応を示したコロニーについて抗血清の中和試験により同定した。抗血清は東芝製を用い、のせガラス凝集反応で型別を行なった。

抗 血 清

両学園より分離した大腸菌のうち、代表的ないくつかの菌株は家兎に対して免疫し、抗血清を得た。ワクチン作製のための大腸菌は0.3%酵母エキス加普通寒天平板全面に接種し、炭酸ガス孵卵器（5%CO₂）で37℃一夜培養した。培養平板は少量の生理食塩液を加えて菌をかきとり、生理食塩液に浮遊させ、遠心洗浄を3回繰り返した。100mg/mlに調整された菌液は、菌液の1/10量の1%クロムミョウバン水溶液と、1%の濃度になるようにホルマリンを加え、クローム処理を行なった。クローム処理ワクチンは菌量にして、70mgを家兎の静脈内に注射し、およそ20日後に採血した。

凝 集 反 応

凝集反応に用いた抗原はブレンハートインフュージョン培地で大腸菌を一夜培養後、遠心器で集菌し、10mlの生理食塩液に浮遊させ、120℃ 1時間加熱処理した。加熱菌液は再度遠心し、生理食塩液で OD=0.3 になるように調整した。凝集反応は血清希釈液 0.25ml に菌液 0.25ml を試験管に加え、37℃ で1時間反応させ、4℃ に一夜放置後判定した。凝集価は血清の最高希釈倍数の逆数で表示した。

実験成績

I. 定量培養の成績

a) 両学園における平均菌数

便の定量培養に関して、両学園の成績（延べ件数K学園：184件，T学園：90件）を対比してみると、以上の事実が判明した。

BTB 培地を用いた場合の乳糖分解または非分解の菌数，CM-BTB 培地を用いた場合の乳糖分解耐性菌（CM 25 γ /ml）の出現頻度およびその菌数等，両者の間に著明な差は認められなかった。腸球菌および非加熱の場合のウェルシー菌数も同様であった（表1）。両学園児童における唯一の違いは変法 LBS（培養時の pH 5.5）を用いた場合の乳酸菌数であり，K学園では 10⁴ 以下が43%認められたが，T学園ではすべて 10⁴ 以上，平均 10⁶ であり，そのほとんどが乳酸飲料由来の菌と同一のコロニー形状を示していた。

b) 同一個体での糞便内菌数の推移

ウェルシー菌の消長はT学園において，8月に菌数が高くなった園児が多数認められ，K学園のウェルシー菌とはいくぶん様子を異にしたパターンが得られたが，大腸菌，腸球菌では，両学園の間にこれといった特徴あるパターンを認めることが出来なかった。

図1はK学園の園児と職員（各6名）の大腸菌，腸球菌，ウェルシー菌の個体別の消長を示したものである。ウェルシー菌は変動が激しく，両者の間に特徴を認めることが出来なかったが，大腸菌，腸球菌では園児よりも職員の方が全般的に菌数が高く，菌数の変動も少ないことを示している。ウェルシー菌が10ヵ月を通して低かったK16（園児），K122（職員）について，大腸菌，腸球菌の菌数を経時的にみると，ウェルシー菌と同様に菌数が低く，このような傾向を示す個体は，T学園においても2人認められた。ウェルシー菌の消長で興味あることはK学園において，耐熱ウェルシー菌（100℃，60分）の分離された（図1では▲印）検体数46件中非加熱菌数が10⁴ 以下であった件数は10検体（10²：1件，10³：3件，

Table 1. Summary of Quantitative Cultivation of Feces

Institution Culture Media	K Total numbers examined : 184	T Total numbers examined : 90
BTB		
Lactose + (<i>E. coli</i> etc.)	7.0(5-9)*	6.8(5-8)
Lactose - (<i>Proteus</i> etc.)	40% : <6.0 others 7.1(6-9)	46% : <6.0 others 7.0(6-8)
BTB-CM		
Lactose + (<i>E. coli</i> etc.)	54% : <2.0 others 4.3(2-7)	52% : <2.0 others 4.4(2-7)
Lactose - (<i>Yeast. Protheus</i>)	35% : <2.0 others 3.8(2-7)	49% : <2.0 others 3.7(2-7)
EMB (<i>E. coli</i> etc.)	6.4(4-8)	6.3(4-8)
EF		
<i>Str. fecalis</i>	28% : <3.0 others 4.9(3-8)	34% : <3.0 others 5.0(3-8)
<i>Str. fecium</i>	21% : <3.0 others 5.1(3-8)	10% : <3.0 others 5.0(3-9)
LBS (modified)		
Children	43% : <4.0 others 5.9(4-7) (large colony)	5.8(4-7) (small colony)
Adults	16% : <4.0 others 5.6(4-7) (large colony)	6.3(5-7) (large colony)
Nagler (<i>Cl. welchii</i>)	12% : <2.0 others 4.5(2-8)	14% : <2.0 others 4.0(2-7)

* log10 (range)

BTB : Drigalski agar

BTB-CM : Chloramphenicol Drigalski agar (chloramphenicol 25 μ g/ml)

BMB : Eosin methylene blue agar

EF : *Enterococcus* agar

LBS : *Lactobacillus* selective agar

Nagler : Kanamycin Nagler agar (Kanamycin 200 μ g/ml)

10⁴：6件）であり，残りの36検体は全て 10⁵ 以上の菌数を示し，耐熱菌が分離された時の糞便中の非加熱菌数は一般に高く，この傾向はT学園でも同様であった。

大腸菌，腸球菌，ウェルシー菌の菌数が季節によりどう変動するか，また両学園とも1月と8月に帰宅しているので，帰宅により菌数にどのような影響があるか検討するため，帰園した当日検索したが，前述のごとく，T学園において8月にウェルシー菌が増加した傾向を示した程度で，季節，帰宅等の影響はあまり認められなかった。

Fig. 1. Viable Cell Counts of Different Kinds of Bacteria in the Feces of Children and Adults During 10 Months (Institution-K)

II. ウェルシー菌と大腸菌の質的な面からの追究

a) 耐熱ウェルシー菌

i) 耐熱ウェルシー菌の分離状況

耐熱ウェルシー菌の分離状況を検索期間を通して観察すると、K学園では延べ件数184件中46件（25%）T学園では90件中18件（20%）が分離された。実施期間を通して耐熱ウェルシー菌の分離されなかった個体は、K学園で3名（園児：2名，職員：1名），T学園で7名（園児5名，職員：2名）であり，またK学園において，10回の検索のうち，連続して3回分離されたのは4名（園児2名，職員：2名）であり，2回連続は5名（園児：4名，職員：1名）であった。T学園は隔月で5回の検索をしているので，K学園での10回の検索中1回のみ耐熱菌が分離された4名を上述した3名に加えれば同数となり，耐熱ウェルシー菌の保菌状態の面からみても両学園に著しい違いは認められなかった。

ii) Hobbs の血清型別成績

両学園とも型別不能の菌が多く，型別されたものとしては，6, 13, 1型が比較的多く，両学園の間に特徴ある血

清型は認められなかった。2回あるいは3回連続して耐熱菌が検出された場合でも，Hobbs 型別で同一の菌型が連続する個体は1例も認められなかった。

b) 大腸菌

i) CM 耐性大腸菌の分離状況

K学園では延べ件数184件中93件（52.3%），T学園では90件中41件（45%）の率で分離された。調査期間を通して，CM 耐性大腸菌の検出されなかった個体は1例もなかった。調査期間を通して，CM 耐性菌の検出された個体はK学園で2名（職員），T学園で2名（職員，園児各1名ずつ）であり，4回連続で検出されたのはK学園で11名（職員：5名，園児：6名），T学園で2回連続は7名（職員：4名，園児：3名）であった。両学園とも園児よりは職員の方がCM 耐性大腸菌の保菌率が高かった。

ii) 分離大腸菌のソネ菌コリシンに対する感受性

EMB 平板より分離した大腸菌はいずれの型のコリシンに対しても6～10%程度の感受性しか示さず，両学園の間に感受性の差は認められなかった。CM 耐性大腸菌

ではK学園で201株中26株 (14型に対して5株で2.5%, 8型に対して21株で10.5%), T学園では, 93株中41株 (14型に対して19株で20.4%, 8型に対して22株で23.7%) であり, K学園よりもT学園の方が14型コリシンに対する感受性が高かった。K学園の赤痢の終熄は3月末であるので, 赤痢感染時にコリシンが大腸菌叢になんらかの影響を与えたとしたら, その影響は調査期間の前半に強く現われると考えて, 経時的に観察したが, 経時的な特徴は認められなかった。

iii) コリシン産生大腸菌の分離状況

K学園では, 分離した大腸菌 (CM 耐性菌も含む) 677株中251株 (31.8%), T学園では354株中131株 (37.8%) がコリシンを産生し, 両学園とも, 同じ割合で分離された。経時的にコリシン産生大腸菌の保有率をみると, 両学園とも, 6月~8月では10~30%程度を示していたが10月以降は50~80%と保有率が高くなった。

iv) 大腸菌のコリシン型別成績

大腸菌をソネ菌の方法で型別すると, ソネ菌のパターンに一致するもの, 少しパターンの異なるもの, 完全に違ったパターンを示すものの3つに区別された。パターンの近似したものには?の記号を, 完全に異なったパターンを示すものにはUTとして表示した (表3)。両学園とも比較的多い型は1A, 7, 14型であり, K学園では3A, 5, 11型が分離されたのに反して, T学園ではこれらの型は分離されず, 8?, 10?型が分離された。1A, 1B, 3, 3Aの合計と, E因子を持つ5, 6, 8, 9A?, 10?14型 (他の指示菌でE因子を持つことを確認した) の合計で比較すると, K学園では87 (40.5%), 49 (22.8%), T学園では33 (25%), 71 (53.8%) であり両学園に差が認められた。

v) 同一個体での大腸菌コリシン型の推移

個体別に大腸菌のコリシン型の推移をみると, 4ヵ月連続で同型のコリシンを産生する菌が優勢であったり, 2~3ヵ月でコリシン型がかわるもの, 一度消失した型が数ヵ月後に再び咲くもの, 実験期間を通して, 全然コリシン産生菌の認められない個体, 1回の検索で2種のコリシン型を認めた個体等が観察された。コリシン型から個体別の大腸菌叢をみると, 大腸菌叢は施設別特徴より個体別に個性があることがわかった。

vi) コリシン型とO抗原の関係

コリシン型の異なる6種の大腸菌から得られた抗血清を用い, 両学園より分離したコリシン産生大腸菌100株との間で凝集反応を行ない, コリシン型とO抗原の関係を追究した。

I因子を持つ大腸菌はO抗原とかなり関係がありそうな成績が得られたが, 他の型の間ではO抗原との関係は認められなかった (表5)。一方個人別にO抗原とコリシン型の関係をみると, 同一のコリシン型を示す大腸菌は凝集価が等しく, 血清学的にも同一の菌であることが判明した (表6)。

考 察

便の定量培養の結果をみると, 著者らが調べた範囲内ではK, T両学園の児童の間には乳酸菌以外菌数に顕著な差は認められなかった。このことは生活環境, 食事の違い, 乳酸菌の飲用 (乳酸菌のみに影響) 等が腸内常在菌数に強い影響をおよぼしていないことが伺われる。しかしながら, 最近光岡⁹⁾が指摘しているように大腸菌, 腸球菌よりも優勢な菌叢を形成しているといわれている無芽胞性偏性嫌気性菌など, もっと広範囲に検索すれば両施設の間に菌数, 菌叢に差が認められたかもしれない。

Table 2. Type of Colicin from *Escherichia coli*

Type	1A (K)	1B (K+I)	3 (X+I)	3A (?)	4 (1b)	5 (K+E1+I)	6 (E1)	6? (E)?	7 (?)	8? (E2+?)	9A? (E)?	10? (K+E2+I)?	11 (?)	14 (E1+I)	UT
Institution															
K	27 12.6 %	27 12.6 %	20 9.3 %	13 6.1 %	25 11.6 %	6 2.8 %	6 2.8 %	8 3.7 %	28 13.0 %	0 0 %	5 2.7 %	0 0 %	14 6.5 %	24 11.2 %	12 5.6 %
	*49(22.8%)														
T	21 15.9 %	3 2.3 %	9 6.8 %	0 0 %	7 5.3 %	0 0 %	13 9.8 %	0 0 %	14 10.6 %	8 6.1 %	9 6.8 %	23 17.4 %	0 0 %	18 13.6 %	7 5.3 %
	*71(53.8%)														

* Except for number of strains producing type 7 and 11 colicins.

? Similar to Abbot's type but identical.

() Colicinogenic factor.

Table 3a. Individual Type of Colicin from *E. coli*; Institution-K

Month		6		7		8		9		10		11		12		1		2		3	
		CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM
Individual	K 2	0	0	0	0	0	0	0	7 (?)	0	0	0	1B (K+I)	0	0	1B UT	0	9A? (E?)	—	9A? 1A 14(E1+I)	
	K 5	0	0	—	0	4 (Ib)	3 (X+I)	—	—	0	0	—	0	—	1A (K)	0	1A	—	—		
	K 11	NT		UT	3A (?)	0	0	0	3A	—	3 (X+I)	7 (?)	—	—	3	—	3	—	3	—	
	K 13	0	0	0	0	0	0	0	0	—	6 (E1)	UT	—	6 (E1)	6 ² (E+?)	—	6 ²	—	6 ²		
	K 16	0	0	0	0	NT	0	0	0	0	0	7 (?)	0	0	NT	0	—	—	NT		
	K 29	4 (Ib)	0	0	7 (?)	0	11 (?)	0	11	0	—	7	0	0	0	4	NT	—	1A (K)		
	K 31	0	0	0	—	0	0	0	7 (?)	—	7	4 (Ib)	—	—	4	—	1B (K+I)	—	1B		
	K 40	0	4 (Ib)	0	0	0	0	0	—	0	1A (K)	7 (?)	—	—	0	—	NT	—	0		
	K 44	3A (?)	0	0	0	—	0	7 (?)	7	—	1B (X+I)	0	—	—	0	—	1B	—	1B		
	K 50	0	0	—	4 (Ib)	—	0	—	0	—	3 (X+I)	0	—	—	0	—	0	—	0		
	K 62	0	0	—	0	0	0	0	0	0	7 (?)	0	1A (K)	—	1A	—	0	—	1B (K+I)		
	K 73	—	0	—	0	0	0	0	0	0	6 (E1)	14 (E1+I)	—	7 (?)	14	—	14	—	14		
K 76	0	0	0	0	NT	0	—	0	—	NT	0	—	7 (?)	7	NT	NT	—	0			
K 82	0	0	0	0	—	0	—	0	—	7 (?)	0	—	—	11 (?)	NT	NT	—	NT			
K101	0	0	0	0	0	0	0	7 (?)	0	0	3A (?)	—	3A	—	11 (?)	—	11	—	3A		
K102	0	14 (E1+I)	—	0	0	0	—	1B (K+I)	—	4 (Ib)	—	—	1A (K)	—	0	—	1A	—	1A		
K106	0	14 (E1+I)	0	0	0	0	0	0	0	7 (?)	7	0	0	0	0	0	0	0	0		
K107	1A (K)	14 (E1+I)	4 (Ib)	0	0	0	0	0	0	14	0	14	NT	NT	—	5 ² (E1+K+I)	—	5 ²			
K111	1A (K)	0	0	4 (Ib)	0	0	0	0	0	7 (?)	—	—	4 (?)	0	0	—	0	—	0		
K122	0	1A (K)	0	0	NT	0	0	4 (Ib)	0	3 (X+I)	4	0	0	0	0	—	0	0	0		

CM : Isolated from Drigalski plate strains, 25 μ g/ml chloramphenicol. EM : Isolated from EMB plate.

0 : No colicinogenic strains (0 type)

— : No chloramphenicol resistant *E. coli*

() : Colicinogenic factor

NT : Not tested

? : Similar to Abbott's type but not identical

Table 3b. Individual Type of Colicin from *E. coli*; Institution-T

Month Individual	6		8		10		1		3	
	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM
T 1	0	UT	0	0	0	0	—	3(X+I)	—	3
T 2	0	0	0	0	0	9A(E)?	0	0	0	9A?
T 7	1A(K)	6(E1)	NT		0	14(E1+I)	—	0	0	0
T12	—	0	—	0	7(?)	7	—	8(E2+?)?	—	8?
T13	—	0	—	0	0	0	NT		—	0
T15	—	0	—	0	NT		—	0	—	0
T18	—	0	—	UT	0	0	NT		—	8(E2+?)
T19	NT		—	UT 1A(K)	—	1A	0	0	—	UT
T22	0	0	—	0	—	10 (K+E2+I)?		10?	—	10?
T27	1A(K)	0	—	0	0	7(?)	NT		—	1B(K+I)
T28	—	0	0	0	0	7(?)	—	10(K+E2+I)	—	10?
T31	—	0	0	6	—	1A(K)	—	1A	—	1A 14(E1+I)
T33	0	6(E1)	0	0	—	1A(K)	—	0	—	0
T39	0	6(E1)	0	3(X+I)	6	3	—	10(K+E+I)?		10?
T40	7(?)	14	—	14(E1+I)	UT	1A(K)	—	4(Ib)	—	4
T42	0	14(E1+I)	0	4	4 (Ib)	14 6(E1)	—	14	—	14
T49	7(?)	0	0	0	0	6(E1) 1A(K) 7	—	9A(E)	—	9A
T48	—	0	0	9A(E)	0	0	—	7(?)	—	0
T52	0	0	0	0	7(?)	1A(K) 7	0	0	0	0

生体内では赤痢菌、大腸菌、腸球菌などの菌と、乳酸菌の間に拮抗現象があることはよく知られるが、腸管内での乳酸菌の効果については、乳児を対象とした *bifidus flora* の意義に関する報告が多く、乳酸菌の投与による効果についてはかならずしもはっきりした成績は得られていない。柏崎ら⁹⁾は無菌ブタに *L. acidophilus* (ブタ由来) を先行定着させた後、大腸菌を投与すると、乳酸菌による抑制現象は認められないことを指摘している。一方田代ら¹⁰⁾は健康幼児に *L. acidophilus Shirota* 株 (人由来) を牛乳とともに毎日投与 (10⁸/ml, 180ml) し、一週間で大腸菌群 (1/100), 腸球菌群 (1/100) の菌数の減少を認めている。著者らの成績では田代らのような顕著な効果を認めることはできなかった。この理由として、投与量、賦形剤の相違 (牛乳と脱脂乳) が考えられるが、それ以外に、投与菌の活性、食餌性、年齢の菌叢の違い等

を見逃すことは出来ない。このことは腸管内での乳酸菌の他菌種に対する拮抗作用が *in vitro* のように決して単純でないことを示唆している。

経時的に各菌種の菌数の変動をみると、2回の帰宅による影響がT学園で、ウェルシー菌においていくぶん認められる程度であった。興味あることは職員と園児で糞便中菌数の推移をみると、ウェルシー菌は、赤真ら¹¹⁾の報告のように、両方とも菌数に変動が激しいが、大腸菌腸球菌では園児よりも職員の方が全般的に菌数が高く、変動も少なく、光岡¹²⁾, Smith ら¹³⁾が指摘しているように年齢による差か、あるいは精神薄弱児童という特殊な生体側の条件によるものか不明である。

赤真ら¹¹⁾は健康人の常在ウェルシー菌を検索し、常時菌数の低い個体のあることを報告している。著者らも同様に、菌数の低い個体が存在するのを見い出すことが

Table 4. Relationship between Individual Patterns of Colicin Type and Agglutinin titer

Month	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
Individual										
K 2			7* <40**			1B (K+I)*** <40		1B (K+I) 40	9A? (E?) 640	9A? † (E?) 640
K11	UT 3A 160 160			3A <160	3 (X+I) 2, 560	7 <160	3 (X+I) 2, 560	3 (X+I) 2, 560	3 (X+I) 2, 560	3 (X+I) 2, 560
K31				7 <160	7 <160	4 (Ib) 5, 120	4 (Ib) 5, 120	4 (Ib) 5, 120	1B (K+I) <160	1B (K+I) <160
K44	3A 160		7 <160	7 <160	1B (K+I) 5, 120			UT <160	1B (K+I) 5, 120	1B (K+I) 5, 120
K73					6 (E1) 160	14 (E1+I) 80	7 <40	14 (E1+I) 640	14 (E1+I) 640	14 (E1+I) 640
T 1	UT <40							3 (X+I) 320		3 (X+I) 320
T39		6 (E1) <160	3 (X+I) <160	6 (E1) <160	3 (X+I) <160 10? (E2+K+I)? 1, 280			10? (E2+K+I)? 1, 280		10? (E2+K+I)? 1, 280

* Colicin type (Abbott's type)

** Agglutination titer

*** Colicinogenic factor

† Strains used for immunization

Table 5. Cross-Agglutination Among Strains Producing Different Types of Colicin

Anti-H 114 serum (type 4, Ib)*		
Titer	No. Strain	Colicin type
2,560-5,120	9	ty 4(Ib)**-9
640	3	ty 14(E1+I)-3
160- 320	5	ty 4(Ib)-2, ty 1B(K+I)-2, ty 3A(?) -1, ty 11(?) -1
<160	83	
Anti-I 15 serum (type 3, X+I)		
2,560-5,120	6	ty 3(X+I)-6
160- 320	9	ty 1B(K+I)-2, ty 7(?) -3, ty 9A(E)?-2, ty 11(?) -1, UT-1
<160	85	
Anti-J 40 serum (type 10, E2+K+I)		
1,280-2,560	9	ty 10(E2+K+I)?-6, ty 8(E2+?)?-2, ty 1A(K)-1
160	2	ty 7(?) -2
<160	89	

Anti-J 87 serum (type 1B, K+I)

2,560-5,120	10	ty 1B(K+I)-5, ty 3(X+I)-2, ty 7(?) -3
320- 640	4	ty 1A(K)-1, ty 3A(?) -1, ty 4(Ib)-1, ty 14(E1+I)-1
<160	86	

Anti-J 95 serum (type 14, E1+I)

320- 640	11	ty 14(E1+I)-7, ty 5(E1+I+K)?-2, ty 6(E1)-1, ty 1B(K+I)-1
80	12	ty 6(E1)-3, ty 3(X+I)-3, ty 1A(K)-1, ty 6(E)?-2, ty 14(E1+I)-3
<80	77	

Anti-I 21 serum (type 9A, E)

640	6	ty 9A(E)?-3, ty 11(?) -2, ty 7(?) -1
80	9	ty 3(X+I)-4, ty 6(E1)-1, ty 14(E1+I)-3, ty 7(?) -1
<80	85	

() * : Abbott's type and colicinogenic factor

() ** : Colicinogenic factor

? : Similar to Abbott's type but not identical

出来た。このように常時ウェルシー菌が低い理由として赤真ら⁹⁾は大腸菌との拮抗現象で説明しているが、このような個体の大腸菌、腸球菌の菌数をみると、これらの菌数も常に低く(図1)、拮抗作用のみでは説明しにくく、これらの個体はもっと広範囲の菌を検索し、解析する必要がある。また耐熱ウェルシー菌が分離された時に、非加熱菌数が多いことは赤真ら⁹⁾も報告しているが、この現象はよくわからない。耐熱ウェルシー菌の保菌状態は個体別にみてもかなり不定であり、また同一個体で2ヵ月、3ヵ月連続で排菌されている耐熱菌でも、同一のHobbsの血清型を示すものは1例もなく、赤真ら⁹⁾が指摘しているように、検索の不備も考えられるが、人腸管におけるウェルシー菌叢はかなり激しく変動することが示唆される。これに反し、CM耐性大腸菌の保菌状態は個人別に特徴あるパターンが得られ、また、長期保菌を示す個体は園児より職員の方が多くことは、抗生剤との接触の頻度、年齢による菌叢の違い等から考えると興味深い。

大腸菌叢に関する研究は古くから報告があり^{9)~12)}、特にKauffmannら¹³⁾が大腸菌の抗原構造を発表して以来、血清型を指標にして多くの研究がなされ^{14)~20)}、大腸菌の生態学の研究を促進させてきた。Searsら^{21)~23)}は健康成人、乳児(双生児)の大腸菌叢を血清型を指標にして同一個体を長期間にわたり検索し、長期間その個体に滞り、かつ数的にも優勢を占める一種まれには二種の血清型を示す菌と、腸管を出たり入ったりし、数日あるいは一週間程度しか腸管にとどまらない菌があることを観察し、前者をresident、後者をtransientと名づけている。またresidentは安定であり、生後10日ぐらいで家族等の接触により形成されることも観察している。

著者らは、同一環境、同一の食事、しかも閉鎖施設に生活する園児の大腸菌叢は施設別にかなり同一性を示すものと考えて、コリシン型を指標にして検索したところ、施設別に特に特徴ある菌叢は認められず、むしろ個人別に特徴あるパターンが得られ、Searsらのいうresidentとtransientの関係が明瞭に示された。さらに、同一個体から排菌され、同一のコリシン型を示す菌は、抗原的にも同一であることから一層明らかとなった。このことは、施設別に特徴ある菌叢はresidentよりもtransientを対象に検索した方がよいのかもしれない。というのはresidentは園児が入園する以前にすでに形成されているからであり、今回の検索では菌数において優勢を示す大腸菌のみを対象にコリシン型別を行なったので、施設別に特徴ある大腸菌叢をとらえることはできなかったもの

と考える。また人腸管内での大腸菌とウェルシー菌の生態系を比較すると、対照的であり、大腸菌はウェルシー菌よりも腸内への定着性が強いように思われる。

コリシンの腸管での作用についてIkariら²⁴⁾は無菌マウスを用いて実験し、in vitroのような効果は認められないことを報告し、一方Cookeら²⁵⁾はコリシン産生大腸菌をvolunteerに与え、腸内でのコリシンの影響をみているが、はっきりした成績は得られていない。著者らは赤痢発生・非発生の両施設より分離した大腸菌のソネ菌コリシンに対する感受性を調べたが、CM耐性大腸菌のみに両施設の間に感受性の差を認めた。どうしてCM耐性大腸菌のみに感受性の差があるかこの問題はよく理解できないので今後の研究に待ちたい。

大腸菌のコリシン型とO抗原の関係をみると、I因子を持つ菌はO抗原とかなり関係があると考えられる。換言すれば、I因子は伝達性のあるコリシン因子¹⁾であり伝達のためには菌の表面のレセプターが関与することは十分考えられる。I因子の伝達され易い菌は表面の抗原構造も似かよったものが多いと考えれば、興味もたれる。

最後に、今回大腸菌叢の研究に、コリシン型を利用した。これまでに大腸菌のコリシン型は疫学にかなり応用されているが^{26)~28)}、大腸菌叢の研究、特に最近光岡⁹⁾という腸内菌叢の動物特異性、日令特異性などの生態型を解析する手段としてCookeら²⁵⁾も指摘しているように血清型とともに充分応用可能だと考える。

総 括

閉鎖施設である精神薄弱児童収容の2施設(K学園：過去連続して赤痢が多発、T学園：毎日乳酸飲料を飲用)より、園児16名、職員6名を選び、便の定量培養を長期間行ない、菌数の違い、同一個体での菌数の変動、ウェルシー菌叢、CM耐性大腸菌の保菌状態、およびコリシン型を利用しての大腸菌叢などを検討した。

1. 両施設において、大腸菌、腸球菌、ウェルシー菌の菌数に差は認められず、乳酸菌数にのみ差が認められた。また乳酸飲料を飲用しているグループ(T学園)において、大腸菌、腸球菌、ウェルシー菌との間に顕著な拮抗現象は認められなかった。

2. 個人別に糞便内の菌数を経時的にみると、大腸菌、腸球菌は園児より職員の方が菌数も高く、且つ変動も少なかった。

3. 耐熱ウェルシー菌の保菌状態は極めて不定であり、その際Hobbs型別による菌型も不定であった。

4. CM 耐性大腸菌の保菌状態は耐熱ウェルシー菌とは異なり，個人別に特徴あるパターンが得られ，長期保菌者は園児より職員の方が多かった。

5. コリシン型を指標として，大腸菌叢を調べたところ，施設別に顕著な特徴は認められず，各人が固有のパターンを示し，いわゆる resident と transient の関係を知ることができた。同一個体が排菌し，同一のコリシン型を示す大腸菌は抗原的にも同一であり，，I のコリシン因子を持つ菌はO抗原との間に関連性が認められた。このように大腸菌叢の究明のために，コリシン型が充分応用できることが確認された。

本論文の要旨は，第45回日本細菌学会総会（仙台市）において発表したものである。

文 献

- 1) 薬剤耐性赤痢研究会：コリシン型別部会編，赤痢菌のコリシン型別に関する研究（1968）。
- 2) 岡田正次郎，芦田博之，宮崎瑤子：ソネ菌コリシン型別の基礎的問題について，メデヤサークル，13，1-23（1968）。
- 3) 光岡知足：動物とヒトにおける腸内細菌叢とその成立，日医会誌，67，132-148（1970）。
- 4) 柏崎 守，波岡茂郎，赤波洋三：Gnotobiot 豚における乳酸菌および大腸菌の腸管内菌数について，日細誌，22，500-504（1967）。
- 5) 代田 稔，麻生健治，岩淵 明：腸内細菌叢の研究，1. 健康幼児の腸内菌叢の構成と *L. acidophilus* Strain Shiota 投与の影響について，日細誌，21，274-283（1966）。
- 6) 赤真清人，大谷 昌，亀山昭一，伊藤明治，村田良介：健康人糞便中常在菌としてのウェルシー菌に関する研究，第1報，総菌数と耐熱性菌数，日細誌，21，619-625（1966）。
- 7) Smith, H. W. and Crabb, W. E.: The faecal bacterial flora of animals and man; Its development in the young, J. Path. Bact., 82, 53-66（1961）。
- 8) 赤真清人，大谷 昌，伊藤明治，亀山昭一，村田良介：健康人糞便中常在菌としてのウェルシー菌に関する研究，第2報，Hobbs型菌の分布と実態，日細誌，21，651-660（1966）。
- 9) Kauffmann, F. and Perch, B.: Über die Coliflora des gesunden Menschen, Acta. Path. Microbiol. Scand., 20, 201-220（1943）。
- 10) Wallick, H. and Stuart, C. A.: Antigenic relationships of *Escherichia coli* isolated from one individual, J. Bact., 45, 121-126（1943）。
- 11) Perch, B.: Weitere Untersuchungen über die Coliflora des gesunden Menschen, Acta. Path. Microbiol. Scand., 21, 239-247（1944）。
- 12) Bray, J.: Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli* neapolitanum from summer diarrhoea of infants, J. Path. Bact., 57, 239-247（1945）。
- 13) Kauffmann, F.: The serology of the coli group, J. Immunol., 57, 71-100（1947）。
- 14) Taylor, J.: Host specificity and enteropathogenicity of *Escherichia coli*, J. Appl. Bact., 24, 316-325（1961）。
- 15) Ewing, W. H.: Sources of *Escherichia coli* cultures that belonged to O-antigen groups associated with infantile diarrheal disease, J. Infect. Dis., 110, 114-120（1962）。
- 16) Turck, M., Petersdorf, R. G. and Fourier, M. R.: The epidemiology of non-enteric *Escherichia coli* infections; Prevalence of serological groups, J. Clin. Invest., 41, 1760-1765（1962）。
- 17) Vosti, K. L., Goldberg, L. M., Monts, A. S. and Rants, L. A.: Host-parasite interaction in patient with infections due to *Escherichia coli*, 1. The serogrouping of *E. coli* from intestinal and extraintestinal sources, J. Clin. Invest., 43, 2377-2385（1964）。
- 18) McGeachie, J.: Serological grouping of urinary *Escherichia coli*, J. Clin. Path., 18, 428-431（1965）。
- 19) 田波 洋，松本顕樹，田崎忠勝，中村 進：尿路感染症患者尿から分離された大腸菌の抗原分布とR因子保持について，日細誌，22，10-17（1967）。
- 20) 佐々木正吾：正常腸内細菌叢と腸管内感染防御，日医会誌，66，1023-1034（1971）。
- 21) Sears, H. J., Brownlee, I. and Uchiyama, J.: Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man, J. Bact., 59, 293-301（1949）。
- 22) Sears, H. J. and Brownlee, I.: Further observation on the persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man, J. Bact., 63, 47-57（1952）。

- 23) Sears, H. J., Janes, H., Saloum, R., Brownlee, I. and Lamoreaux, L. F.: Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in man and dog under varying condition, J. Bact., 71, 370-372 (1956).
- 24) Ikari, N. S., Kenton, D. M. and Young, V. M.: Interaction in the germfree mouse intestine of colicinogenic and colicin-sensitive microorganism, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 130, 1280-1284 (1969).
- 25) Cooke, E. M., Hettiaratchy, I. G. T. and Buck, A. C.: Fate of ingested *Escherichia coli* in normal persons, J. Medical Microbiol., 5, 361-369 (1972).
- 26) Linton, K. B.: The colicine typing of coliform bacilli in the study of cross-infection in urology, J. Clin. Path., 13, 163-167 (1960).
- 27) 亀田三男, 原田寛治, 松山達夫: ソンネ菌のコリシン型とR因子型について, 日細誌, 23, 343-347 (1968).
- 28) 戸川利子, 石倉康宏, 城野 晃, 白濁智旨, 児玉博英: 集団保菌者検索において分離した大腸菌群のコリシン産生について, 富山県公衛誌, 4, 12-13 (1970).

(受付1972年12月4日)