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 Shirota 投与の影響について

代 田 稔 麻 生 健 治 岩 淵 明

ヤクルト研究所 (所長: 代田 稔)

[受付: 4月11日, 1966年]

緒 言

人の腸内細菌叢の構成因子としての乳酸菌群の意義についての見解は古く, Metschnikoff¹⁾ のブルガリア桿菌による長寿論にはじまる。しかし *L. bulgaricus* を中心とした乳酸菌の研究の行きづまりにより異論もでた⁵⁾⁶⁾ 18)19)。

近年 *L. bifidus* を中心にその研究が盛んとなり⁷⁾⁻³¹⁾ 等, 乳酸菌群の腸内における作用を *in vitro* にて解析するもの^{5)18)19), 29)}, また *in vivo* にて存在意義を評価するもの^{2)-4), 7)-17), 20)-23)} 等多数報告されるに至った。

しかし一方その作用に疑問をもち否定的なものも一部あるが⁵⁾⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾, Metschnikoff¹⁾ の説に基づく *L. bulgaricus* の *in vivo* での試験の結果, 腸内増殖を認められなかったもの¹⁸⁾, また *L. acidophilus* の腸内増殖には食餌との関係が強く, *L. acidophilus* の単独投与では増殖しないが, 乳糖投与を併用することによつて腸内増殖が認められる⁶⁾ 等, 否定的な意見の中にも, その観点が異なり, 必ずしも全ての乳酸菌群の意義を否定するものではない。

多くの業績は, 乳児を対象として *L. bifidus* の作用, すなわち *bifidus flora* の意義に関するものであつて^{2)3) 20)-23)26)} 等, いわゆる乳酸菌 (通性嫌気性乳酸菌群) に関するものは少ない²⁾⁻¹⁷⁾。

現今においては乳児の *intestinal-flora* として *L. bifidus* の存在意義については疑う余地はないところとなつたが, 報告の中には単に *bifidus flora* を示唆しているに過ぎないものもあれば, *L. bifidus* 投与による消化器疾患の臨床的效果を観察したもの等で, 腸内細菌叢としての細菌学的見地からの報告は比較的少ない。*L. bifidus* を対象とした報告を除いては, 腸球菌 (*Str. faecalis*)

の作用¹⁷⁾²⁰⁾, *L. acidophilus* の作用²³⁾⁻¹⁶⁾, *L. bulgaricus* の作用¹⁸⁾等の報告を見るのみであり, また, これ等の結果も必ずしも一致していない。

著者等は人における *intestinal-flora* および *Lactobacillus group* の, 人腸内細菌叢としての作用につき検討中であるが, これ等の菌群の作用を明確にする目的より今回は人の腸内より分離, 同定した *L. acidophilus* の1株 (*L. acidophilus* strain Shirota) を幼児に長期間投与し, 投与菌の消長, および既存腸内菌叢との関係につき細菌学的に検討を加えたので報告する。

実験材料および実験方法

1. 対象幼児

京都市の某施設に収容中の2~6歳の幼児約40名中, あらかじめ数回大便中の細菌数を測定して, 腸内菌叢の変動が比較的少ない幼児30名を選び, これを1週間週期の献立表にしたがい食餌管理を行ない, 年齢, 性別, 環境の状態より2分し, 15名に乳酸菌を投与し, 残りの15名を対照区として実験に供した。

2. 投与乳酸菌

人大便より分離, 同定した *Lactobacillus acidophilus* strain Shirota (以後 Shirota 株と略す) を用いて製造した発酵乳 (市販名クロレラヤクルト, 生菌数 $1 \sim 2 \times 10^8$ /ml) 50ml, を毎日 A. M 10時に市販牛乳 180ml とともに投与した。対照区は上記乳酸菌にて, 同一条件のもとに発酵させたものを, 80°C 30分加熱して菌を不活化後, ホモジナイズし実験区と同量, 牛乳とともに投与した。

* Shirota 株の生物学的, ならびに血清学的性状について Table 1, 2に示す。

Table 1 *L. acidophilus* stain Shirota の生物学的性状

形態的性状	菌形	桿菌, 幅 0.6×0.7 u 長さ 1.5×5 u				
	グラム染色	陽性				
培養的性状	鞭毛, 莢膜, 孢子	なし				
	連鎖	単独, 又は短連鎖				
培養的性状	培地	トマトジュース寒天, G.Y.B. agar, Lactic aga, LBS agar,				
	培養温度時間	37°C/2~3 日				
培養的性状	集落形状	円盤状又は扁平紡錘状				
	// 表面周辺	滑らか				
培養的性状	// 色調	乳白色又は灰白色				
生理学的性状	分離源	人腸内より分離				
	酸素要求	通性嫌気性又は微好気性				
生理学的性状	運動性	なし	硝酸塩還元	なし		
	生育温度(最低)	20°C	硫化水素生成	なし		
生理学的性状	// (最適)	37°C	尿素利用	なし		
	// (最高)	43°C	アンモニア	なし		
生理学的性状	生育 pH(限界)	3.5	色素生成	なし		
	// (最適)	6.8	インドール生成	なし		
生理学的性状	リトマス牛乳	48 時間で還元凝固	クエン酸ソーダ利用	なし		
	乳酸旋光性	d/ 乳酸を生成	レンネット生成	なし		
生理学的性状	カタラーゼ生成	なし	M. R 反応	—		
	ゼラチン液化	なし	V. P 反応	—又は±		
糖酸酵性	Fructose	+	Lactose	+	Dulcitol	—
	Mannose	+	Maltose	+	Trehalose	+
	Glucose	+	Raffinose	—	Melibiose	—
	Galactose	+	Salicin	+	Cellobiose	+
	Xylose	—	Sorbitol	+	Aesculin	+
	Arabinose	±	Inositol	—	Melzitose	±
	Sucrose	±	Mannitol	+	Rhamnose	—
					Inulin	—

3. 培地および培養法

(1) 大便中の Shirota 株および *Lactobacillus* group の検出培地は, LBS agar³⁴⁾³⁵⁾を用い 37°C, 48 時間平板混釈培養法によった。なお LBS agar は他の *Lactobacillus* の選択培地に比して性能がすぐれていることは確認されている³⁴⁾。また LBS 上で colony の性状より容易に Shirota 株を鑑別検出することができるが, 実験の信頼性を高めるために, Shirota 株の家兎抗血清にて, Shirota 株と他の *Lactobacillus* group との鑑別を行った。

(2) 大便中の anaerobic bacteria, 主として *Bifidobacterium* の検出には GYB 改変培地 I, および LBS 改変培地 I³⁴⁾の二種類を用いて, 平板混釈法による嫌気培

養法³⁴⁾(嫌気培養法は細谷式を改良した嫌気培養瓶にて水銀柱 20mm まで減圧後, 市ガスにて常圧とするガス置換法を用いた)にて 37°C 48 時間後に生育する colony の性状より分離測定した。

(3) *Enterobacteria* group の検出培地は MacConky agar “榮研”³⁴⁾を用いて平板培養法によつて 37°C 20±2 時間行なつた。本培地に生育する colony の性状より *E. coli*, *Klebsiella*, *proteus*, その他各 group として鑑別測定した。

(4) *Enterococcus* group の検出には, *Str. faecalis* group の分離培地として SF agar を用い, *Staphylococcus* group の検出培地としては Stap. No. 110 “榮研”, を用いてそれぞれ 37°C 48 時間平板培養を行なつた³⁴⁾。

Table 2 *L. acidophilus* strain Shirota と保存菌株との抗原構造について

抗 血 清 吸 収 抗 原 抗 原	L. acid. strain Shirota	L. acid IFO 3532	L. plant. IFO 3070	Z. casei IFO 3069	L. casei IFO 3494
	L. acid strain Shirota	L. acid IFO 3532	L. plant. IFO 3070	Z. casei FIO 3069	
<i>L. acidophilus</i> strain Shirota	5000 (—)	—	—	—	—
<i>L. acidophilus</i> IFO 3205	—	—	—	—	—
IFO 3532	100 (—)	4000 (—)	—	500 (200)	—
IAM 1084	—	—	—	200 (50)	—
<i>L. bulgaricus</i> 405	—	500 (500)	—	500 (500)	—
IAM 3493	—	—	—	—	200
IFO 3533	100 (—)	500 (200)	—	100 (50)	—
<i>L. casei</i> 411	—	—	—	*4000 (—)	*3000
IFO 3069	—	—	—	*4000 (—)	*3000
IFO 3494	—	—	—	*4000 (—)	*3000
<i>L. plantarum</i> IAM 417	200 (50)	—	2000 (500)	—	—
IFO 3070	—	—	* 5000 (—)	—	—
<i>L. arabinose</i> ATCC 8014	—	—	*10000 (—)	—	—
<i>L. bifidus</i> YA-1	—	—	—	—	—
<i>L. helveticus</i> IFO 3219	—	—	—	—	—
<i>L. thermophilus</i> IFO 3863	—	—	—	—	—
<i>L. wortmanii</i> IFO 3075	—	—	—	—	—
<i>L. delbrueckii</i> IFO 3534	500 (200)	—	—	—	—
<i>L. brevis</i> ATCC 3245	—	—	—	—	—
<i>L. fermenti</i> ATCC 3071	—	—	—	—	—

()内は吸収試験の成績 * は同一 type と同定する。

(5) Yeast, Candida group の検出培地としては Potato glucose agar³⁴⁾を用いて 37°C 3 日平板培養法にて行つた。

4. 実験方法

大便中の細菌検索は、自然排便の約 2～3g を排便後なるべく速かにガラスホモジナイザーに採取し (そのとき不消化物は除く)、よく均質化後、その 0.5g の精秤し、滅菌生食水 49.5 ml にて混釈して 100 倍原液を作る。以後 10 進法にて釈秤し、各稀釈液から前記の分離培地にて平板混釈培養をおこなつた。

大便 pH の測定は、細菌検査に用いた残りの 100 倍稀釈原液を pH メーターにて測定した。

その他大便の性状、また幼児の健康管理をあらかじめ健康調査書を作り毎日調査した。

実験成績

1 健康幼児の腸内細菌叢と、Shirota 株投与による影

響

(1) Lactobacillus group の分布と、Shirota 株投与による投与菌の大便中の消長。

幼児大便中には $10^3 \sim 10^6$ 平均 $10^5/g$ に Lactobacillus flora がある (Fig. 1 の対照区)。この Lactobacillus group の約 6 割が *L. acidophilus* type に属し (しかし ATCC, IAM, IFO の保存菌株とは、血清学的にも、一部生物学的にも異なつた性状を示す)、また約 1 部が *L. plantarum* の性状を有し、その他 *L. casei* の性状を示すものおよび分類困難な菌株等約 2 割、また 1～2 割にヘトロ発酵菌株を得た。また投与とは無関係に Shirota 株と同一のものが幼児中約 2 割に検出された。

以上のごとき Lactobacillus flora を構成する幼児に連日牛乳とともに $5.0 \sim 10 \times 10^9$ の Shirota 株を投与すると、投与菌は経日的に上昇し、約 1 週目にて $10^6 \sim 10^8$ 平均 $2.0 \times 10^8/g$ (大便) と上昇し、2 週目で $6 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 平均 $2.0 \times 10^8/g$ と個体差は大きいが一様に上昇し、

以後投与期間中はほぼこの値を維持する (Fig. 1 の投与区, Fig. 3 の Shirota 株に示す)。

Fig. 1 *L. acid. strain Shirota* 投与と投与菌の消長

ROGOSA (1953) の L.B.S. agar を改変した L.B.S. 改変 1 (日細誌, 17.12.1962) によって *Lactobacillus* group 及び投与 *Shirota* 菌の変動を示す。

投与中止によって速やかに減少するが, 中止 3 日目まで平均 $5.0 \times 10^7/g$ に投与菌が検出され, 1 週目で投与区の 15 人中 13 人に $10^5 \sim 10^8/g$ に検出された, しかし 2 週目では 15 人中 4 人に $10^6 \sim 10^7/g$ の程度に検出されたのみで, 3 週目では投与区全員に投与菌が検出されなかった。

(2) *Enterobacteria* group の分布と, それにおよぼす *Shirota* 株の影響。

グラム陰性桿菌群は $10^6 \sim 10^9$ 平均 $10^8/g$ 程度であるがそのうち *E. coli* type が圧倒的に多く, 次いで MR (-), インドール (-) の *Klebsiella* type, また一部 *Proteus* type の増加している者もあったが, 鑑別不完全なため, これ等を一括して *Enterobacteria* group として示した (Fig. 2 対照区, Fig. 6 の *coli* group の対照区)。

以上の分布を示す幼児に *Shirota* 株を投与すると, 投与 *Shirota* 菌の上昇に応じて *coli* group が減少する明確な拮抗現象を認めた (Fig. 2 の投与区)。

その減少は投与によって経目的に減少し, 2~3 週目

に $10^4 \sim 10^7$ 平均 $10^6/g$ を示し最低となる, 以後投与期間中はほぼこの値を維持する。投与中止によって急速に

Fig. 2 *L. acid. strain Shirota* 投与と *Coli* group の消長

MacConkey agar 上にて検出される *Coli* group の変動を示したものである。

Fig. 3 *L. acid. strain Shirota* 投与による *Shirota* 菌と *Coli* group との拮抗現象

Fig. 1, 2 にて説明した如く, *Shirota* 菌による *Coli* group の拮抗作用を経目的に調査し, その現象を明示した成績 (8~10 人の平均値) である。

coli group の数は上昇し復帰するが, その復帰の状態も投与菌の減少に応じて上昇する。 *Shirota* 株投与による

Fig. 4 L. acid. strain Shirota 投与と Str. faecalis group の消長

SF agar 上に検出される Enterococcus group の変動を示す。

Fig. 5 L. acid. strain Shirota 投与と Anaerobic Bacteria "B" group の消長

LBS 改変 1, GYB 改変 1 agar の嫌気培養にて生育する colony で、分枝した Bifidobacterium 様の菌群の変動を示す

Fig. 6 L. acidophilus strain Shirota 投与と腸内細菌叢

前記 4 つの group の菌群につき、検体 30 名 (投与区 15 名非投与区 15 名) の平均値につき示した成績である。

健康幼児の大便菌叢と Shirota 菌投与による菌叢の変化を総合的に解析する。

- ① 嫌気性菌で L. acidophilus の性状を示す菌群
- ② " Bifidobacterium の性状を示す菌群

投与菌の経日的上昇と coli group の減少する拮抗現象については Fig. 3 に示す。

(3) Enterococcus group の分布とこれにおよぼす Shirota 菌の影響。

本菌群については Staphylococcus group と Streptococcus group とについて検索したが、Stap. group は $10 \sim 10^4$ 平均 $10^2/g$ order の分布で、ときに $2 \sim 3 \times 10^6/g$ を示すものが 1 ~ 2 回あったが、一般には低い order であった。Str. group は $10^4 \sim 10^7$ 平均 10^6 の分布を示した (Fig. 6 の対照区に示す)。

以上の分布を示すものに Shirota 株を投与すると、Str. group は経日的に減少する拮抗現象を認めた、この現象は投与 1 週目にて $10^2 \sim 10^3/g$ (平均 10^4) で、以後投与中はほぼこの値を維持し、投与中止によつて徐々に復帰する。(Fig. 4 の投与区、Fig. 6 の Enterococcus group の投与区に示す)。Stap. group については数値が

Table 3 Anaerobic Bacteria "A" "B" group の一般性状

型		L. Bifidus Strain Penn.	* I (B)	* II (B)	* III (A)
性 状	グ ラ ム 染 色	陽 性	陽 性	陽 性	陽 性
	形 態	直線又は曲	直線又は曲	直線又はラケット状	直 線
	分 岐	有	有	無	無
	運 動 性	無	無	無	無
培 養 的 性 状	培 養 コ ロ ニ ー	嫌 気 性 半透明, 小	嫌 気 性 灰白, 半透明	嫌 気 性 灰白, 円盤状	嫌 気 性 黄褐色, 円盤状
	形 態	/	正 円 (0.1~0.2 mm)	(0.7 mm)	(0.2~0.4 mm)
	人乳必要性	有	無	無	無
	乳糖必要性	有	ブドウ糖でも良い	ブドウ糖でも良い	ブドウ糖でも良い
	ガ ス 発 生	無	無	無	無
そ の 他	pH	6.0 以下では 発育悪い	6.0 以下では 発育悪い	6.0 以下では 発育悪い	5.0 以下では 発育悪い
	システイン加 牛 乳 培 地	/	凝 固	凝 固	凝 固
	異 染 小 体	有	有	有	無
	棍 棒 型 酸 度	有 /	有 1.8 ml	有 1.0 ml	無 1.2 ml
備 考		György の 分類による Var. Penn.	◎ 幼児分離株 I (本株が最も多い)	幼児分離株 II	幼児分離株 III

註：酸度 Cystein 加 10 % S. milk 5 日培養, N/10 NaOH/ml,

* I (B) : György による *L. bifidus regular* 株に類似する

* II (B) : 糖の醗酵性より本間等の *L. bifidus* V 型に類似する

* III (A) : 嫌気性菌で *L. acidophilus* の性状を示す

低いため、その拮抗現象については観察できなかった。

(4) Anaerobic bacteria group (Bifidobacterium group) の分布と、それにおよぼす Shirota 株の影響。

本菌群は $10^7 \sim 10^{10}$ 平均 $10^9/g$ と極めて高い値を示し、幼児大便中の主フローラをしめるものは本菌群である (Fig. 5, Fig. 6 に示す)。しかもこの菌群は、一般的性状より Bifidobacterium に類似し、3 つの type があつた、その内 1 type は György³²⁾ の *L. bifidus regular* 株に類似し、他の 1 type は本間等³¹⁾ の糖分解能による分類中の V 型に類似するという興味ある結果を得た (本菌群の一般性状につき Table 3 に示す)。

以上の構成を有する幼児に Shirota 株を投与したが、本菌群の動態には有意差は見られなかった (Fig. 5, Fig. 6 の投与区)。

(5) その他 Yeast, Candida group についても観察した。本菌群は $10 \sim 10^4/g$, ときに $10^5 \sim 10^6/g$ を示すものもあつたが、特に今回はその分布について検索しなかつた。

また Shirota 株投与による影響は見られなかった。

2 健康幼児の大便 pH と、Shirota 株投与の影響。

実験の部に記した方法により大便の pH を測定したが一般に幼児の大便 pH は 6.7~8.7 平均 7.5 と、個体差は大きい弱アルカリを示すものが多かつた (Fig. 7, 8 の対照区)。この幼児に Shirota 株を投与すると pH は徐々に降下し、投与 1 週目で、pH 6.2~7.5 平均 6.7 となる。以後投与期間中ほぼこの値を維持し、投与中止によつて徐々に上昇し、細菌叢の変動に応じた変化を確認した (Fig. 7, 8 投与区)。

3 幼児の健康調査

実験期間中、大便性状および健康調査を行つたが、この間大便性状には幾分の相異を見たが、1 人の健康異常者も見られなかった。

Fig. 7. *L. acid. strain Shirota* 投与と大便 pH

大便 pH の変化を測定する目的にて、100に倍稀釈した大便を pH メーターにて測定した成績である。

Fig. 6 *L. acid. strain Shirota* 投与と大便 pH

Fig. 7 に示す大便 pH の 30 名 (投与区 15 名, 非投与区 15 名) の平均値を示す。

考 察

従来母乳児の主フローラを構成するものは *Bifidobacterium* であることは古くから多くの研究者によつて証明された²⁾³⁾²⁰⁾⁻²³⁾等。

著者等は健康幼児 (年齢 2 ~ 6 歳) の腸内細菌叢として大便菌叢を長期間観察した結果、主フローラを形成する菌群として $10^7 \sim 10^{10}$ 平均 $10^9/g$ の偏性嫌気性菌群を得た。この菌群は生物学的性状より György³²⁾, 本間等³¹⁾の分類からも *Bifidobacterium* に属し、しかも本菌群には 3 型あつて、乳幼児よりしばしば高い order に分離される菌型とは異なる性質を有した。この点について成人の嫌気性菌群は *Bacteroides* group であるという報告もあり³³⁾, また母乳栄養児には *L. bifidus* var. *pen* が生存し、幼児、人工栄養児には *L. bifidus* regular および *L. parabifidus* が生存するという報告³²⁾, また学童、成人からも多数の *Bifidus* 菌を検出した報告¹³⁾²⁴⁾⁻²⁸⁾ におおむね一致する。

嫌気性菌群に次いで、高い order を示すものは、グララ陰性桿菌群で $10^6 \sim 10^8$ 平均 $10^8/g$ を示し、その分布は *E. coli* type が 90% 以上を占め、次いで MR(-), インドール (-) の菌群で、また時に *proteus* type の増加を見た。これ等の結果は数多くの先人の報告とほぼ一致するものと思われる。

腸球菌群としては *Streptococcus* group が $10^4 \sim 10^8$ 平均 $10^5/g$ を示し、*Staphylococcus* group は、稀れに $10^4 \sim 10^5/g$ に検出する程度であつた。

Lactobacillus group は $10^3 \sim 10^6$ 平均 $10^5/g$ で、内 *L. acidophilus* type が約 60%, *L. plantarum* 10%, その他 *L. casei* 10%, また 10 ~ 20% がヘテロ発酵菌株であつた。この点については Lerche³⁾ の成人の腸内乳酸桿菌の報告にほぼ一致する結果である。

著者等は以上のごとき構成を示す健康幼児に連日牛乳とともに *Shirota* 株を投与するとき、既存菌群との間に明確な拮抗現象を認めた。すなわち投与 *Shirota* 菌は投与翌日より検出され、経日的に増加し、ほぼ 1 週目で最高となり、以後投与中は $2 \sim 3 \times 10^8/g$ の菌数を維持する。これに対して *Enterobacteria* group および *Streptococcus* group は経日的に減少を示し、前者は投与 1 週目にて投与前の $1/100$ に、後者は $1/50$ に減少した。

L. acidophilus と *Enterobacteria* group との間の拮抗現象は、in vitro の実験によると、一様に認められるところである。しかし in vivo における乳酸菌群の腸内増殖に関しては異論もあるが⁵⁾⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾, 最近 Lerche 等³⁴⁾ は乳酸菌の経口投与によつて腸内増殖を実験的に証明している。また *L. acidophilus* を単独投与した時は増殖を認めなかつたが、乳糖とともに与えることによつて増殖を認めている⁶⁾¹⁸⁾。また *L. acidophilus* milk の投与によつて腸内乳酸菌の増加の報告¹¹⁾もあり、また Chr-

raz²⁾ は *L. acidophilus* 投与5日後に大便中より大量の投与菌を分離している。その他必ずしも乳酸菌を投与しなくても、多量の乳糖投与によつて腸内 *L. acidophilus* の増加をみると主張するものもある⁹⁾¹⁴⁾¹⁶⁾。in vivo における乳酸菌と腸内細菌群との拮抗現象については、急性消化不良症に *L. acidophilus* を投与して腸内菌叢の乱れ特に大腸菌の増殖抑制を示唆した臨床的報告²³⁾⁴⁾¹²⁾ もあるが、Armin¹⁶⁾ はマウスを用いて *L. acidophilus* の増加による *Salmonella* 感染の防禦効果を実験的に証明している。有滝等¹⁰⁾ は、生後2~5カ月の乳児にて著者等と同じ Shirota 菌を投与して、*L. acidophilus* の大便中の増加と、グラム陰性菌群の減少を認め、また菊地³⁰⁾等も Shirota 菌を用いて成人の大腸菌群の減少を認めている。Lerche³¹⁾ は成人、幼児(3歳以下)を対象に、*L. acidophilus* milk を投与して、大便中の出現率を調査し、成人より幼児の出現率は高く、またその order も高いことを示している。

乳酸菌が大腸菌群、腸球菌群に示す拮抗作用の本態については、一般には乳酸菌の増殖に際しての代謝産物である乳酸の作用が考えられているが、乳酸の作用の他に乳酸菌と腸内病原菌との栄養要求の差が腸内病原菌の増殖抑制の1因子であるとする考えもある²⁰⁾²⁹⁾。また疋田²³⁾は酸の作用の他に乳酸菌の菌体内に抗菌作用をもつ何らかの物質の存在を認めている。著者等は Shirota 菌投与によつて大便 pH の降下の点から、酸の作用も考えられるが、この他に Shirota 菌のもつ抗菌的物質による作用も示唆できる所見を得ている。

次に投与乳酸菌の定着性については、一般に短期間で7~10日間には投与前の菌叢にもどり、乳酸菌の腸内増殖は一過性であると考えられている¹⁰⁾²¹⁾²²⁾等。著者等の成績も先人の報告にほぼ一致した、しかしこの定着性の問題も個人差が大きく、われわれの成績では15日まで15人中2人に order は低いが検出された。

以上のごとく、先人の多くの報告また著者等の結果からも、投与乳酸菌が腸内にて増殖し、大腸菌を中心としたグラム陰性菌群、腸球菌群との間の拮抗作用が明確に認められる事実より、腸内細菌叢の乱れを改善することによつて、大腸菌群による異常発酵の防禦、また病原性腸内細菌による細菌性疾患の防禦効果等が示唆される。しかしその効果を望むには、用いる乳酸菌種、菌株の問題、投与菌量(菌数)、投与菌の活性等の問題、および乳酸菌と同時に投与する賦形剤または食餌性の問題、年齢的菌叢の相異等の問題が検討されなければならない。

結 論

1. 健康幼児の腸内細菌叢の構成。

大便中の腸内細菌叢を長期間観察した効果、主フローラは *Bifidobacterium* group で $10^7 \sim 10^{10}$ 平均 $10^9/g$ (大便)を示し、かつこれに3型を認めた。

Enterobacteria group は $10^6 \sim 10^9$ 平均 $10^8/g$ を示し、*E. coli* group が圧倒的優位をしめ、次いでインドール(-), MR (-) 菌群、および少数に *Proteus* group を検出した。

Lactobacillus group は $10^8 \sim 10^6$ 平均 $10^5/g$ と大便中に低い order であつたが、*L. acidophilus* type が6割をしめる。これらは ATCC, IAM, IFO の保存菌株とは血清学的にも、また一部生物学的にも性状を異にした。その他 *L. Plantarum*, *L. casei*, がそれぞれ1割、またヘテロ発酵菌および分類困難な菌株が約2割あつた。

Enterococcus group としては、*Str. faecalis* type $10^4 \sim 10^7$ 平均 $10^6/g$ を示し、*Stap. group* が $10 \sim 10^4$ を示し *Yeast*, *Candida* group は $10 \sim 10^4$ と低い order であつた。

2. 健康幼児に Shirota 株を投与した場合の腸内細菌叢への影響。

$5 \sim 10 \times 10^9$ の Shirota 菌を 180ml の牛乳とともに連日投与した結果、Shirota 菌は経日的に増加するのに比して、*Enterobacteria* group, *Enterococcus* group は減少し、明確な拮抗体作用を証明し得た。すなわち投与 Shirota 菌は、投与1週目で平均 $10^6 \sim 10^8$ 平均 $2.0 \times 10^8/g$ を示し、投与期間中はほぼこの値を維持し、投与中止によつて3日目以後経日的に減少する。その定着期間は個人差はあるが、7~14日間であつた。

また Shirota 株投与により *Enterobacteria* group は投与開始1~2週目で最低となり、平均 $1/100$ に、*Streptococcus* type は $1/50$ に減少し、Shirota 菌の抑制作用が明らかに認められた。これ等の菌群は投与中止によつて投与菌の消失にほぼ比例して復帰した。その他 *Bifidobacterium* はわずかに上昇する傾向を示したが、これが差であるかについては今後の研究の必要がある。

Stap. group, *Yeast*, *Candida* group は order も低くその影響を観察することはできなかった。

3. 大便 pH について

健康幼児の大便 pH は 6.7~8.7 平均 7.5 を示したが Shirota 株投与1週目には平均 6.8 に低下した。投与中止によつて徐々に復帰するが、その現象は bacteria の動

態にほぼ一致した。

稿を終るにあたり御懇篤なる御指導、御校閲を賜った
東京大学名誉教授、秋葉朝一郎先生に深謝致します。又
本研究に御協力頂いた京大 小児科笹谷博士並びに指月
寮の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Metschnikoff: Ann. Inst. Pasteur Par., 22, 929, 1908.
- 2) Stark, et al: Am. J. Pubul. Health., 24, 470, 1934.
- 3) Rettger, L. & Weinstein, W.: L. acido. and ito Therap. Applic., Yole Univ., 1935.
- 4) Rafsky et al: Am. J. Gastroentoal, 24, 87, 1955.
- 5) Hanneberg: Archiv. Kinderh, 119, 85, 1940.
- 6) Golden: J. Int Dis., 34, 459, 1924.
- 7) Chrraz, M., et al: C. R. Soc. Biol., 152, 1958.
- 8) Lerche, M., Reuter, G.: Zbl. f. 1 Orig., 185, 1962.
- 9) Haenel, H., Müller-Beuthow, W.: Zbl. f. Bakt. 1, Orig., 172, 1958.
- 10) 有滝, 石川: 日小誌, 66, 125, 1962.
- 11) Carraz, M. und Moulin, A.: Zbl. f. Bakt. 1 Ref., 173, 1959.
- 12) Hoffmann: Medizinisch, 36, 296, 1959.
- 13) Haenel, H.: Zbl. f. Bakt. 1, Orig., 188, 219 1962.
- 14) Rettger, L. F. Chellin. H. A., : Yele Univ. Press, New Haven, 1921 (Haenel¹⁵⁾より).
- 15) Haenel, H., Feldheim, W. 等: Zbl. f. Bakt. 1 Orig., 173, 1958.
- 16) Arminpeter: Zbl. f. 1, Orig., 182, 1961.
- 17) 勝又: 日小誌, 58, 893, 1954.
- 18) 大橋: 軍医団誌, 209, 1672, 1930.
- 19) 吉岡: 千葉医誌, 21, 321, 1943.
- 20) 詫摩, 本間, 西郷, 久保: 日医新報, 1564, 3, 1954.
- 21) 諸橋等: 小児科臨床, 12, 145, 1959.
- 22) 高桑等: 臨床小児医, 7, 134, 1959.
- 23) 疋田: 小児科診療, 21, 1368, 1958.
- 24) Haenel, H. Z. Kinderheilk, 78, 592, 1956.
- 25) Haenel, H., Müller-Beuthow, W.: Zbl. f. Bakt 1, Orig, 169, 1957.
- 26) Lerche, M. und Reuter, G.: Zbl. f. 1, Orig., 182, 1961.
- 27) 本間, 吉原, 門平, 磯田: 小児科臨床, 16, 2, 1963.
- 28) Orla-Jensen 他: Dansky Videnskab Selskab Biol. Skrifter, 3, 1, 1945 (27より).
- 29) 矢吹: 日小誌, 85, 956, 1956.
- 30) 菊地: 通信医学, 14, 7, 1962.
- 31) 本間, 吉原, 磯田: 臨床検査, 7, 5, 1963.
- 32) György, P., Norris, R. F., Rose, C. S.: Arch. Bioch. Bioph., 48: 193, 1954.
- 33) Miller, C. P. & Bohnhoff M.: J. inf. Dis., 113, 1959.
- 34) 代田, 麻生, 岩淵: 日細誌, 17, 12, 1962.
- 35) Rogosa, M. Mitchll, J. A. & Wiseman, R. F.: J. Bact., 62, 132, 1951.

Study on Microflora of Human Intestine

I. The Alteration of the Constitution of Intestinal Flora by Oral Administration of *L. Acidophilus* Strain Shirota to Healthy Infants

Minoru SHIROTA, Kenji ASO and Akira IWABUCHI

YAKULT Institute for Microbiological Research, Yoshida-Shimooji, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

50 ml of fermented milk, containing 1 to 2×10^8 /ml of live *Lactobacillus acidophilus* strain Shirota (LAS) and 180 ml of market milk were orally administration daily to healthy infants (2-6 years) for 35 days, and its effect on the constitution of microflora in feces was investigated, using appropriate selective media.

In control group, normal microflora in one gram of feces was found to consist of 10^8 - 10^{10} of Bifidobacterium classified to three physiological type, 10^6 - 10^9 of enterobacteria group in which *E. coli* was predominant, 10^3 - 10^5 of lactobacillus group consisting of 60 % of *L. acidophilus* and other lactobacilli (*L. plantarum*, *L. casei* and heterofermentives), 10^4 - 10^7 of enterococci, and 10 - 10^4 yeasts.

During the first 7 days of administration, lactobacillus in feces increased to 10^6 - 10^8 /gram and this level persisted during the whole administration period. This lactobacillus was serologically identified to be LAS. In contrast, enterobacterial group and enterococci decreased by a factor of $\frac{1}{100}$ and $\frac{1}{50}$, respectively. When administration was stopped, LAS decreased gradually and one to two weeks after became undetectable, while the suppressed groups recovered to original level. Concomitant with this change, the pH of the feces rose from 5.0-7.5 to original value, 6.7-8.7. Other members in feces were not significantly affected through the period of experiment.

These results led to the conclusion that LAS survives in human intestinal tract though it does not establish permanent residence, and alter the constitution of microflora, being especially antagonistic against *E. coli* and enterococci. The antagonistic activity of LAS is discussed.