Studies on Bacterial Flora of the Alimentary Tract of Dogs

III. Fecal Flora in Clinical and Experimental Cases of Diarrhea

Hisaaki ISHIKAWA

Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Chuo-ku, Tokyo 103

Eiichiro BABA

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai-shi, Osaka 591*

Haruyasu MATSUMOTO

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture,
Yamaguchi University, Yamaguchi-shi, Yamaguchi 753*

(Received for publication January 7, 1981)

Abstract. Fecal specimens taken from 29 dogs showing diarrhea and 8 dogs given a purgative, magnesium sulfate were examined for the bacterial floras. The results obtained are summarized as follows: 1) There was no significant difference in the total viable count between the fecal samples collected during diarrhea and those obtained after recovery. 2) The counts of *Lactobacillus* of diarrheal feces were markedly smaller than those of healthy ones and none was detected in a considerable number of diarrheal samples. *Bifidobacterium* also tended to decrease in number during diarrhea. 3) *Bacteroides* and *Enterobacteriaceae* tended to increase in number during diarrhea and predominated in many samples. 4) *Clostridium* and *Streptococcus* counts were not affected by diarrhea. 5) As a whole, the natural flora of diarrheal feces was similar to that of experimental diarrhea induced with the purgative. 6) It was recognized in both natural and experimental diarrhea that the flora persisted for sometime after disappearance of diarrhea.

犬の消化管内細菌叢に関する研究

Ⅲ. 下痢の臨床例と実験例における糞便内細菌叢

石川尚明

藤沢薬品工業株式会社特薬部

馬場栄一郎

大阪府立大学農学部家畜内科学教室

松本治康

山口大学農学部家畜内科学教室

消化管内細菌叢と疾病との関係、とくに下痢との関連は非常に興味のあるところである。下痢の原因としては微生物や寄生虫の感染症をはじめ、薬物中毒、代謝異常などさまざまである。下痢を呈している動物の腸管では腸内細菌叢にかなりの変化が起きているといわれており [11-13]、このことは腸内常在菌の変動が下痢の病因となり得ることを示唆している。しかし腸内細菌叢と下痢との因果関係については少しずつ解明されつつあるが [10]、まだ判然としない部分が多い。

我々は前2報 [6,7] において、成犬の腸管各部の細菌叢と出生後の仔犬における細菌叢の確立について報告した。今回は、臨床的に下痢を示す犬についてその糞便内細菌叢を調べ、前回の成績をもとに、腸内細菌叢と下痢との関連について考察を試みた。また、これらの成績を解析する一助として、健康犬において下剤投与による実験的下痢を起し、その糞便内細菌叢を経時的に検査した。

材料と方法

1. 臨床例からの材料

供試犬は、大阪府立大学附属家畜病院に下痢を主徴とする疾病で来院した患畜29例であり、それらの直腸内容を採取し、菌叢検査の培養に供した。またこれらの供試犬のうち、下痢の治癒後に糞便材料が得られた23例についても同様の検査を行った。

2. 下剤投与例からの材料

下剤投与に供した犬は、投与前20日間以上の観察飼育で、外観上健康と思われた成犬8頭である。使用した下剤は5%の硫酸マグネシウム溶液で、体重1kgあたり40mlを胃カテーテルで1日1回3日間連続投与した。直腸内容の採取は、初回投与前、初回投与

の翌日、3回投与の翌日、および3回投与から7日後の前後4回にわたって行った。

なお、硫酸マグネシウムが糞便内の常在菌に与える作用、とくに菌の発育に及ぼす影響についてあらかじめ検討したところ、*in vitro* においては5%の硫酸マグネシウムでも影響のないことを確認した。

3. 検査法

培養法、菌数検査法および同定法は前回 [6,7] と同じである。BL agar での菌数を総菌数とし、各菌種の菌数をそれぞれの選択培地での菌数で表現した。菌数は材料1gあたりの対数値で示した。下剤投与例の検査には、BL agar と、主要6菌種すなわち *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* の選択培地のみを用いた。

また、各糞便材料について、pH試験紙によるpHの測定を行った。

成 績

1. 臨床例における各菌種の菌数の増減

下痢時および回復後に検出された各菌種の菌数を求め、その対数値をもとに前回 [6,7] と同様に統計処理を行った [3]。各菌種別にそれらが検出された例数および菌数の平均値と標準偏差を Table 1. に示した。

総菌数はほとんどの個体で9.0~11.0であり、それらの平均値については下痢時と回復後との間に差が認められなかった。下痢時における各菌種の菌数の平均値をみると、*Bacteroides* および *Enterobacteriaceae* が8.3で最も高く、*Bifidobacterium*, *Clostridium* および *Streptococcus* はそれらより低く、7.5~7.7であった。*Lactobacillus* は6.3とさらに低く、*Staphylo-*

Table 1. Fecal microflora of dogs with diarrhea and after recovery*

Organisms	Fecal sample			
	Diarrheal :	29 dogs**	Recovered :	23 dogs
Total bacteria/g	9.7±0.6	29***	9.7±0.5	23 (2)
<i>Lactobacillus</i>	6.3±2.0	18 (2) ****	7.5±1.4	18
<i>Bifidobacterium</i>	7.6±0.9	20	8.5±0.9	15
<i>Clostridium</i>	7.7±0.9	25	7.9±1.1	22
<i>Bacteroides</i>	8.3±1.3	28	8.4±1.1	21
<i>Enterobacteriaceae</i>	8.3±1.5	29	7.8±0.9	23
<i>Streptococcus</i>	7.5±1.3	29	8.0±1.0	22
<i>Staphylococcus</i>	5.4±0.9	19 (1)	5.1±1.0	17 (2)
<i>Veillonella</i>	4.7±0.9	3	4.9±0.6	3
Yeasts and Molds	5.0±0.7	9 (1)	5.7±1.7	8 (1)

* Total bacteria were counted on BL agar and each species of organisms on a respective selective medium. Each value is the mean viable counts ± SD in logarithm to the base 10.

** Number of dogs examined.

*** Number of dogs yielding the organism was detected.

**** The number in parentheses is that of dogs which seemed to have less than 10⁴ organisms from statistical analysis.

coccus および真菌は 5.0~5.4 であった。これらの下痢の値を回復後の値と比較すると、*Lactobacillus* がかなり低く、*Bifidobacterium* および *Streptococcus* も低かったが、逆に *Enterobacteriaceae* は高い傾向がみられた。また *Clostridium* および *Bacteroides* については目立った増減は認められなかった。*Veillonella* は下痢時および回復後において 3 例ずつから検出されたのみで、その菌数はいずれも低く 4.0~5.0 の間にあった。

下痢時および回復後における最優勢菌種をその例数でみると、下痢時においては *Bacteroides* が 12 例で最も多く、ついで *Enterobacteriaceae* が 9 例であった。回復後においても *Bacteroides* の最優勢な例は多かったが、*Enterobacteriaceae* の例数は減少し、これに代って *Streptococcus*, *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* の例数が増加していた。

2. 下剤投与例における各菌種の菌数の増減

検査時ごとに各菌種の平均値および標準偏差を求め、Table 2. に示した。

総菌数はすべての採取時を通じて 9.4~9.7 であり、ほとんど変化がなかった。下剤投与前においては *Lactobacillus* の菌数が 8.2 と最も多く、*Bifidobacterium* がこれにつぎ、以下 *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* の順であった。初回投与後では *Lactobacillus* が著明な減少を示し、*Clos-*

tridium も減少したが、*Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* および *Streptococcus* はいずれも増加の傾向を示した。3 回投与後では *Lactobacillus* はさらに減少したが、*Clostridium* は逆に増加する傾向を示した。一方 *Bacteroides* は初回投与後に比べてさらに増加したが、*Enterobacteriaceae* と *Streptococcus* には変化がなかった。この時期では、*Bacteroides* の菌数が 8.6 で最も高く、ついで *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* の順であり、*Lactobacillus* は 6.3 と最も低い値になっていた。投与後 7 日目における菌叢をみると、*Bacteroides* および *Streptococcus* は増加した状態にとどまり、*Bifidobacterium* は減少の状態にとどまっていたが、*Lactobacillus* および *Enterobacteriaceae* はそれぞれ増加および減少の傾向を示し、投与前のレベルに回復しつつあることを示していた。

3. 糞便材料の pH 値の変化

臨床例の下痢便の pH は多くの場合 5~9 の間にあって、ばらつきが大きかったが、回復後には 5~7 付近に集まる傾向を示した。下剤投与例においては、pH の平均が投与前 5.8 であったものが、初回投与後には 8.5 と急上昇した。3 回投与後に 7.7 はとやや低くなり、投与後 7 日目には 6.5 と投与前の値に近づくことが観察された。

Table 2. Fecal microflora of 8 dogs administered with the purgative*

Organism	Fecal sample			
	Before administration	1 day after the first administration	1 day after the third administration	7 days after the third administration
Total bacteria/g	9.4±0.4	9.5±0.2	9.4±0.3	9.7±0.3
<i>Lactobacillus</i>	8.2±0.9	7.3±0.7	6.3±0.5	7.4±1.2
<i>Bifidobacterium</i>	7.9±1.0	7.9±0.6	7.5±0.7	7.3±0.8
<i>Clostridium</i>	7.3±0.3	6.9±0.5	7.1±0.5	7.5±0.5
<i>Bacteroides</i>	7.3±1.2	8.2±1.6	8.6±1.2	8.5±1.3
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.0±1.1	7.8±0.5	7.7±0.7	7.5±1.3
<i>Streptococcus</i>	7.6±1.3	8.3±0.7	8.3±0.6	8.4±1.2

* A 5% solution of magnesium sulfate was administered orally in a dose of 40 ml per kilogram of body weight once a day for 3 consecutive days. Total bacteria were counted on BL agar and each species on a respective selective medium. Each value is expressed the mean viable counts $\pm$ SD in logarithm to the base 10.

考 察

今回検査した臨床例については、いろいろな原因や経過の下痢が含まれていたと考えられる。しかしそれらの下痢時の菌叢は、共通して総菌数には変動がみられないが、*Lactobacillus* が減少し、*Bacteroides* が最優勢であるという特徴的な変化のあることが判明した。下剤投与例においても同様の成績が得られた。

総菌数は臨床例および下剤投与例においてともに材料採取時期による差がみられず、さきに報告した健康犬の値 [6] と一致していた。したがって下痢を起しても総菌数は変動しないと考えられる。

糞便内の *Lactobacillus* は健康犬では優勢に検出され、その菌数も多い [1, 6, 7]。しかし今回の下痢例では菌数が少なく、検出されない個体も多くみられた。また *Bifidobacterium* も減少する傾向がみられた。このように健康時に優勢な両菌種が下痢時に減少することは、他の動物についても同様の報告があり [8, 13]、哺乳類にある程度共通している現象と考えられる。

これに対して、*Bacteroides* と *Enterobacteriaceae* は下痢時に増加する傾向を示した。臨床例においては、*Bacteroides* が最優勢である個体が最も多く、とくに予後不良例の下痢時にその傾向が著明であった。下剤投与例においても、下痢時に *Bacteroides* の菌数が増加し、回復後も持続する傾向がみられた。これらの成績は、下痢時に増加した *Bacteroides* がかなり長期間にわたって高い菌数を維持することを示してい

る。これに関連して、下痢豚では *Bacteroides* が減少するという報告 [13] や、ヒトの下痢では変化がみられないという報告 [2] があり、*Bacteroides* の変動については動物種によって様相が異なるように思われる。*Bacteroides* の犬に対する病原性については明らかでないが、今後この点について検討する必要があると考えられる。また *Enterobacteriaceae* も下痢時にかなり増加する傾向がみられ、臨床例では最優勢である個体が多かった。出現菌株のほとんどは大腸菌であった。豚 [9] や小児 [5] においても下痢時に腸内で大腸菌が増加するといわれており、腸内細菌叢としての大腸菌は下痢との関係を考える上で重要であろう。

Clostridium については下痢による変動がほとんど認められず、その菌数値は健康例における成績 [6] とほぼ一致していた。菌種についても健康犬 [6] の場合と同様に *Cl. perfringens* が大部分を占めていた。*Clostridium* と下痢との関係が問題になっているが [10]、今回の検査結果からは下痢との関連は低いと考えられる。*Streptococcus* の場合も菌数の変動は比較的小さく、個体別にみても下痢時における菌数の増減傾向は明らかではなかった。やはり、*Streptococcus* も下痢との関連は低いと思われる。

臨床例における下痢便の pH は酸性からアルカリ性にわたって広く分布していたが、下剤投与例においては投与例全例がアルカリ性に移行した。下痢の原因や病勢により糞便の pH が変化するという報告があり [4]、今回の臨床例にもいろいろな型の下痢が含まれているものと思われる。下剤投与例では、糞便の pH が

高いほど *Lactobacillus* の菌数が少ない傾向がみられたが、臨床例においては糞便の pH と菌叢との関連性は明らかにならなかった。

下剤投与例においては、下痢回復後に直ちに正常時の菌叢に復帰せず、また臨床例においても菌叢の復帰は下痢症状の回復よりも遅れていた。さらに、下剤投与例と臨床例の菌叢が下痢時に極めてよく類似しているという点は、このような腸内細菌叢の変化は下痢の原因となるのではなく、むしろ下痢の結果として起こるものと考えられる。

下痢時の菌叢の変化は、下痢の原因によってその様相が異なることが推測される。今回供試された症例には種々の原因によるものが含まれているにもかかわらず、それらの菌叢を一括して検討したので、おのおの特異的变化が十分に把握されないおそれがあった。従って、各種の実験的下痢についてその菌叢を調べ、下痢と細菌叢との関連を究明する必要があると思われる。

要 約

下痢を主徴とする犬の臨床例29頭についてその糞便内細菌叢を検査した。さらに硫酸マグネシウム溶液投与による実験的下痢犬8頭について同様の検査を試みた。それらの成績を過去における健康犬の成績と比較し、次のような結果を得た。1. 総菌数は下痢時において変化がみられなかった。2. *Lactobacillus* の菌数は下痢時に著明な減少を示し、検出されない個体も多くみられた。*Bifidobacterium* も下痢時に減少する傾向を示した。3. *Bacteroides* および *Enterobacteriaceae* は下痢時に増加する傾向がみられ、それらの菌種が最優勢である個体が多かった。4. *Clostridium* は下痢時にほとんど変化がみられず、*Streptococcus* の菌数の増減傾向は一定しなかった。5. 臨床例における下痢時の菌叢の変化を総合的にみると、硫酸マグネシウム投与による下痢時の菌叢とよく類似していた。6. 臨床例および下剤投与例の継続的な菌叢の検査成績において、下痢の終息と正常菌叢への復帰は時間的に一致せず、菌叢の回復が遅れることが認められた。

文 献

- [1] Balish, E., Cleven, D., Brown, J., and Yale, C. E. (1977). Nose, throat and fecal flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 207-221.
- [2] Cooke, E. M. (1967). A quantitative comparison of the faecal flora of patients with ulcerative colitis and that of normal persons. *J. Pathol. Bacteriol.* **94**, 439-444.
- [3] Cramér, H. (1963). In *Mathematical Methods of Statistics*, 10th ed., Princeton University Press, Princeton, 247-248.
- [4] 石野 英 (1959). 犬の下痢の病態生理. 日獣会誌 **12**, 503-507.
- [5] Keller, W. (1953). Zur Systematik der sogenannten akuten Ernährungsstörung des Säuglings. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **78**, 623-628.
- [6] 松本治康・馬場栄一郎・石川尚明 (1972). 犬の消化管内細菌叢に関する研究. I. 腸管各部における菌叢について. 日獣誌 **34**, 255-261.
- [7] 松本治康・馬場栄一郎・石川尚明・甫立八洲 (1976). 犬の消化管内細菌叢に関する研究. II. 出生後の子犬の糞便内細菌叢について. 日獣誌 **38**, 485-494.
- [8] 中尾 啓 (1962). 各種条件下に於ける腸内菌叢ならびに窒素電解質代謝の変動に関する研究. 主として腸管性諸要因の影響. 臨床小児医 **10**, 271-299.
- [9] 波岡茂郎・村田昌芳・長田 久・石沢武彦・黒岡良治 (1965). 母乳による初生豚の腸内菌叢ならびに従来の人工乳および低蛋白人工乳が腸内菌叢に与える影響について. 日獣誌 **27**, 221-231.
- [10] 坂崎利一 (1978). 下痢-腸炎と腸内菌叢. 最新医学 **33**, 2030-2033.
- [11] Smith, H. W., and Halls, S. (1967). Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.* **93**, 499-529.
- [12] Smith, H. W., and Jones, J. E. T. (1967). Observations on experimental oral infection with *Salmonella dublin* in calves and *Salmonella choleraesuis* in pigs. *J. Pathol. Bacteriol.* **93**, 141-156.
- [13] 鈴木邦夫・南本実俊・豊 純子 (1967). 哺乳豚の下痢症に関する研究. I. 消化管内細菌叢について. 日獣誌 **29** (学会号), 59-61.