Summary

The formation of spores in the so-called spore-bearing *Lactobacillus* is observed only under specific conditions of cultivation. Conditions for the spore-formation in P 43 strain were examined and a process for abundant spore formation was found to be a shaking culture in a specific bouillon medium, practicable for industrial method. The spore-bearing cells of this P 43 were used to prepare powders in which the presence of living cells was found to be extremely good and its use for making marketable product seemed possible.

(Received March 2, 1955)

濱田小彌太, 和辻 要: いわゆる有孢子乳酸菌の製剤学的研究 (第3報*)

Koyata Hamada and Kaname Watsuji: Pharmaceutical Studies on the So-called Spore-bearing Lactic Acid Bacteria. III.

(Research Laboratory, Biofermin Co., Inc.)

前報ではいわゆる有孢子乳酸菌に属する P 43 の製剤化が可能であることを述べたが、本報では主としてかかる試製剤の人及び実験動物に対する経口投与試験を実施した。

即ち健康人腸内に自然的常在性である *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus* の 3 種乳酸菌に対する P 43 の共棲状況を試験管中観察したところ、べつだんの拮抗現象を認めず、また P 43 生活細胞が人工胃液及び同腸液中にて長時にわたり生存し得ることも知つたので、先ず本菌の生活細胞そのままを製剤としたものをラッテに経口投与したところ意外にも本菌の腸内における定着性は芳しくなかつた。しかるに本菌の有孢子細胞による試製剤を人及びラッテに投与すればこのものの腸内定着性はよろしく、更に本菌は試験管中アノイリナーゼ菌 (松川・三沢), 大腸菌, 変形菌, 緑膿菌, 枯草菌及び寺島株の各種細菌に対して対照に用いた正常乳酸菌 *Str. faecalis* 程には強い抗菌作用を示さなかつたが、それにも拘わらずアノイリナーゼ症患者 2 例に投与した成績では約 2 週でアノイリナーゼ菌を腸内より全く駆逐した。またかかるアノイリナーゼ症患者はその糞便内 ammonia-like N 量の見地からすれば例外なく腸内腐敗症であるといわれる¹⁾が、上記患者の最初高値であつたその量は本試製剤の連続投与によつて健康者並の値 ($23.37 \pm 16.31 \text{ mg\%}$)²⁾ となり、投与中止後も少くとも観察を続けた 2 週まではその状態を続けた。

実 験 の 部

P 43 株と腸内常在性乳酸菌との共棲 *Str. faecalis*, *L. acidophilus*, *L. bifidus* なる 3 種乳酸菌との関係につき別々にしらべたが 2%ブドウ糖を含む普通ブイヨンに P 43 とこれらの菌とを 3 通りの方法で接種, 37° と 45° の 2 通りの温度で 24 時間培養し (*L. bifidus* の場合のみは嫌氣的に) その培養液各 1 滴を採つて鏡検により両菌の多寡を観察したところ Table I, II, III の成績を得た。

Table I. Growth of P 43 Strain and *Str. faecalis* in their Mixed Culture

Treatment	Incubated temp. (°C)	Bacterial growth	
		P 43	<i>Str. faecalis</i>
Simultaneous inoculation of both strains	37	+	++
	45	++	++

* 第 74 回日本薬学会年会 (1954) に発表。

1) 高頭: ビタミン 5, 358 (1952).

2) 浜田: ビタミン 6, 951 (1953).

Inoculation of P 43 8 hrs. after that of <i>Str. faecalis</i>	{	37	+	##
		45	+	##
Inoculation of <i>Str. faecalis</i> 8 hrs. after that of P 43	{	37	+	+
		45	++	+

Table II. Growth of P 43 Strain and *L. acidophilus* in their Mixed Culture

Treatment	Incubated temp. (°C)	Bacterial growth	
		P 43	<i>L. acidophilus</i>
Simultaneous inoculation of both strains	{ 37	+	++
	45	+	+
Inoculation of P 43 8 hrs. after that of <i>L. acidophilus</i>	{ 37	+	##
	45	+	++
Inoculation of <i>L. acidophilus</i> 8 hrs. after that of P 43	{ 37	+	+
	45	++	-

Table III. Growth of P 43 Strain and *L. bifidus* in their Mixed Culture*

Treatment	Incubated temp. (°C)	Bacterial growth	
		P 43	<i>L. bifidus</i>
Simultaneous inoculation of both strains	{ 37	+	+
	45	+	+
Inoculation of P 43 8 hrs. after that of <i>L. bifidus</i>	{ 37	+	++
	45	+	+
Inoculation of <i>L. bifidus</i> 8 hrs. after that of P 43	{ 37	+	+
	45	++	+

* Anaerobic by pyrogallol method.

P 43 生活細胞の人工胃液及び同腸液中における生存 胞子形成の全くないことを鏡検により確認した P 43 の培養菌体約 2 mg を処定の人工胃液及び同腸液各 10 cc 中に懸濁させて 37° に放置, 一定時間毎にその 1 白金耳を採って別の普通フイヨン 5 cc に接種し菌の生死をしらべたが人工胃液では少なくとも 2 時間, 人工腸液では 20 時間以内は生存するを認めた。

P 43 株試製剤の健康動物に対する経口投与試験 本菌の試製剤は第 2 報に掲げたと同様に澱粉及び乳糖を賦形薬とし, その 1 g 中に本菌の生活細胞の場合には約 5 億, 有胞子細胞の場合には約 2 億を含有するように 2 種を区別して調製した。また実験動物の糞便または腸内容物について本菌の検索確認を行うためには P 43 のウサギ免疫血清を調製したが, その凝集価は本菌株に対して 16,000 倍以上であつたが, 第 1 報に記した P 186, B 102, B 111 の 3 菌株に対しては 1,000 倍以下であり P 32, B 125 の 2 菌株に対しては全く凝集をしなかつた。

さて P 43 の 2 種試製剤 2 g を別々のラッテに対して 1 回限り投与し, それより 24 時間後に消化管各部を解剖の上腸内容物につき本菌の分布状態を検索した成績は Table IV の如くであつた。

Table IV. Distribution of P 43 Strain in Intestinal Canal of Rats by Temporary Oral Administration of the Bacteria

Type of P 43 given to rat	No. of rats	Existence of P 43 and pH value of intestinal content					
		Duodenum	Jejunum	Ileum	Cecum	Colon	Rectum
Vegetative cells	No. 1	- 6.2	- 6.4	- 6.4	- 6.8	- 6.6	- 6.4
	No. 2	- 6.2	- 6.2	- 6.2	- 6.8	- 6.6	- 6.2
Sporangia	No. 3	- 6.4	+ 6.4	+ 6.8	## 6.8	++ 6.6	## 6.6
	No. 4	- 5.6	- 6.0	+ 6.6	## 6.6	++ 6.2	++ 6.4
Control (not given)	No. 5	- 6.2	- 6.4	- 6.4	- 6.6	- 6.6	- 6.6

つぎに同じくラッテに対して試製剤 1 日 2 g ずつの連日投与を行つたが, P 43 の生活細胞を用いた成績は Table V, 有胞子細胞を用いた成績は Table VI に示した如くであり, また健康人 2 例に有胞子細胞を用いた試製剤 1 回 5 g ずつ 1 日 3 回連続投与した成績は Table VII に示した如くであつた。

P 43 株の他種細菌に対する抗菌作用 抗生物質力価検定用のカップ法を準用した。すなわちアノイリナーゼ菌 (松川・三沢), 大腸菌, 變形菌, 緑膿菌, 枯草菌及び寺島株を接種したそれぞれの普通フイヨン平板寒天上に外径 8 mm の処定カップを立てこの中へ予じめそれぞれの至適条件で 24 時間の培養をした P 43 株並びに対照とした *Str. faecalis* の培養液を充たして 37° に 24 時間培養をなしカップの周縁に生じた各菌発育阻止円の直径を測定したところ Table VIII に示す成績を得た。

Table V. Existence of P 43 in Feces of Rats by Successive Oral Administration of Vegetative Cells

Period examined	Rat No. 6		Rat No. 7	
	Direct*	Enriched**	Direct	Enriched
Before administration	—	—	—	—
Administered period	1st day	—	—	—
	2nd "	—	—	—
	3rd "	±	±	—
	4th "	—	—	—
	5th "	+	+	—
	6th "	+	+	—
Stopped period	1st "	—	—	—
	2nd "	+	—	—
	3rd "	—	—	—

* Bacterial existence was examined directly with watery extract of feces.

** Ditto with enriched broth culture of feces.

Table VI. Existence of P 43 in Feces of Rats by Successive Oral Administration of Sporangia

Period examined	Rat No. 8		Rat No. 9	
	Direct	Enriched	Direct	Enriched
Before administration	—	—	—	—
Administered period	1st day	+	+	+
	2nd "	+	+	+
	3rd "	+	+	+
	1st "	+	+	+
Stopped period	2nd "	+	+	+
	3rd "	+	+	+
	4th "	—	—	+
	5th "	—	—	—

Table VII. Existence of P 43 in Feces of Healthy Adults by Successive Oral Administration of Sporangia

Period examined	Subject No. 1 (♂ 23)		Subject No. 2 (♀ 27)	
	Direct	Enriched	Direct	Enriched
Before administration	—	—	—	—
Administered period	1st day	—	—	—
	2nd "	—	—	+
	3rd "	—	+	+
	5th "	+	+	+
	7th "	+	+	+
	9th "	+	+	+
	11th "	+	+	+
Stopped period	1st "	+	+	+
	2nd "	+	+	+
	3rd "	±	+	+
	4th "	—	—	—

Table VIII. Bacteriostatic Action of P 43 Strain and another by Cup Method

Passive organism	Inhibition zone in mm. by	
	P 43	<i>Str. faecalis</i>
<i>B. thiaminolyticus</i> (M. M.)	11.2	21.6
<i>Escherichia coli</i>	none	8.2
<i>Proteus vulgaris</i>	9.7	14.0
<i>B. pyocyaneus</i>	11.5	17.8
<i>B. subtilis</i>	8.0	8.5
<i>Staph. aureus</i> Terashima	8.6	11.3

P 43 株試製剤のアノイリナーゼ症患者に対する経口投与試験 本菌の有孢子細胞を含有させた先述の試製剤を 1 回量 3 g の割で 1 日 3 回にわたりアノイリナーゼ症患者 2 例に対して 4 週連続経口投与を行つたが、

投与中止後もさらに2週にわたりその期間における患者糞便内アノイリナーゼ菌(松川・三沢)の消長をバイオ増菌法²⁾によつて観察した糞便内 Ammonia-like N 量を高頭¹⁾の方法の変法²⁾によつて測定した。その成績は Fig. 1 の如くである。

Fig. 1. Administration of P 43 Strain Sporangia to Two Patients with Thiaminase Disease

Full line: Administered period.

Broken line: not administered period.

+ or - : existence or not of "Aneurinase Bacteria" in feces.

ビオフェルミン製薬株式会社研究部

Summary

A strain, P 43, of the so-called spore-bearing *Lactobacillus* was examined *in vitro* and it was found to be strongly resistant to synthetic gastric and enteric juice. It was able to co-exist with the *Lactobacillus* commonly present in human intestines but its antibacterial action against aneurinase, coli, proteus, pyogenes, and subtilis bacilli was not very marked. *In vitro* test of this bacillus, by oral administration in man and rats, revealed somewhat different reaction. Enteric fixation of this bacillus was found to require spore-bearing cells and administration of such cells in thiaminase patients was found to have effected complete elimination of thiaminase bacillus shortly after administration and marked decrease of intestinal fermentation.

(Received March 2, 1955)