

未熟児の腸内菌叢に関する研究

第2編 天然栄養の未熟児糞便における細菌絶対数

昭和38年1月25日受付

信州大学医学部小児科学教室

(主任: 吉田 久教授)

藤 原 達 郎

Studies on the Intestinal Flora of Premature Infants

Part II Absolute Counts of Coliform Bacilli and
Enterococci found in Feces of Premature
Infants fed Breast Milk

Tatsuro Fujihara

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,
Shinshu University

(Director: Prof. H. Yoshida)

I 緒 言

未熟児の腸内菌叢の検討を行うに当り、著者は第1編^①に於いては、天然栄養の未熟児における腸内菌叢につき、各種細菌の出現率を百分率をもって示し検討したが、百分率の増減は必ずしも細菌の絶対数のそれと平行するとは限らない。即ち、腸内菌叢の検索には絶対数を知ることも重要である。然るに、手許の文献によつて、乳児の腸管内に生存する細菌絶対数につき検索した従来の研究^{②-④}をみると、何れも成熟児についてとあつて、未熟児を対象とした報告は見出し得なかつた。

そこで、本編に於ては、天然栄養の未熟児における糞便中各種細菌のうち、比較的正確に生菌数を求めうる Coliform bacilli (大腸菌群) 及び Enterococci (腸球菌) につき細菌の絶対数を検討したので茲に報告する。

II 検査材料及び検査方法

1) 検査材料

検査材料は、第1編において出現率を観察した材料と同じものを用いた。但し、未熟児に於ては1例を省略した為、検査材料は未熟児14例、健康な天然栄養の成熟児12例である。

2) 検査方法

i) 培養基

糞便中菌数計算法は、希釈法 M. P. N. (Most Probable Number) による Mc Crady 法^⑤の本間変法^⑥を用い、糞便 1mg (乾燥重量) 中の Coliform

bacilli 及び Enterococci の生菌を対象として絶対数を計算した。

M. P. N. により或る特定の菌数を計算するには、撰択培地が必要であるが、Coliform bacilli 及び Enterococci の撰択培地としては、Hajna^⑦による“EC”培地及び“SF”培地の変法培地^⑧を使用した。

ii) 実施方法

滅菌採便管でなるべく大量採便し、直ちに乳鉢に移し、よくすりつぶし、これに滅菌生理食塩水を加えて約20cc前後の均等な浮遊液をつくつた。その10ccを正確に秤量瓶に移し、孵卵器 (37°C) で完全に乾燥し、秤量した。乳鉢内に残つた浮遊液から正確に1ccとり、予め準備した中試験管に入れ、滅菌生理食塩水で10倍連続階段希釈した。次に、これら中試験管の内容を1ccづつ順次に培養基の入つた小試験管に移した。以上の操作が終つたら、これらの小試験管を直ちに孵卵器に収め (変法“EC”培地は37°C、変法“SF”培地は45°Cに保つ) 48時間後に判定した。

判定の基準は Coliform bacilli は培地の変色及びガス産生の有無により、Enterococci は培地の変色により (+), (-) を決定した。かくして、小試験管が何倍希釈まで何本陽性であるかをみれば M. P. N. の表^⑧と照合することにより、原液 100cc 中の生菌数が判明する。その生菌数を N とし、上述の10cc乾燥量が G mgであつたとすれば、糞便 1mg (乾燥重量) 中の生菌を対象とせる細菌絶対数は、 $\frac{N}{10 \times G}$ で示される。

III 予備実験

本法を用いて未熟児の糞便中生菌を対象に絶対数の

検索を行うに当たり、予め健康な天然栄養成熟児12例につき、糞便1mg(乾燥重量)中の Coliform bacilli 及び Enterococci の絶対数を検索した。

その結果を要約すれば、第1表の如くであつた。即ち、本菌数計算法によれば、Coliform bacilli は最小 10^4 、最大 10^6 の間に、Enterococci は最小 10^2 、最大 10^6 の間にあり、それぞれにつき対数の平均値を求めると、Coliform bacilli は 5.2680, Enterococci は 4.8666 であつた。

第1表 天然栄養成熟児の糞便中 Coliform bacilli 並びに Enterococci の絶対数
—糞便1mg(乾燥重量)中—

菌種名	Coliform bacilli	Enterococci
平均値(log)	5.2680	4.8666
標準偏差	0.5544	1.2469

IV 検査成績

1) 未熟児の糞便中 Coliform bacilli 及

び Enterococci 絶対数

天然栄養の未熟児につき糞便1mg(乾燥重量)中の Coliform bacilli 及び Enterococci の絶対数を検索した成績を症例別に一括すれば第2表の如くなつた。即ち、Coliform bacilli は最小 10^4 、最大 10^7 の間にあり、Enterococci は最小 10^2 、最大 10^6 の間にあつた。何れもその分散の巾は広がつたが殊に Enterococci に著しかつた。各菌実数の対数をとリ、その平均値を求めると、Coliform bacilli は 6.4414, Enterococci は 4.1922 であつた。

2) 未熟児の糞便中 Coliform bacilli の絶対数と生下時体重、検査時体重及び月令

i) 生下時体重との関係

未熟児を生下時体重より 2kg 未満(5例, 1.79~1.98kg)と 2kg 以上(9例, 2.04~2.45kg)の2群に分け、それぞれの群における絶対数を比較した。

前者では $1.7 \times 10^6 \sim 1.9 \times 10^7$ の間に、後者では $3.2 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^7$ の間にあつた。それらの対数の平均値を比較すると第3表の如くなつた。即ち、前者(6.8378)は後者(6.2212)に比して増加しており、F

第2表 天然栄養未熟児の糞便中 Coliform bacilli 並びに Enterococci の絶対数
—糞便1mg(乾燥重量)中—

対象	菌種名						Coliform bacilli	Enterococci
	生下時体重(kg)	性別	月令	検査時体重(kg)	Coliform bacilli	Enterococci		
1	松 ○	2.260	男	1 20	3.220	2.4×10^6	1.4×10^6	
2	磯 ○	2.130	女	15	2.045	4.6×10^7	1.2×10^4	
3	磯 ○	1.790	女	15	1.605	1.9×10^7	1.1×10^3	
4	丸 ○	2.450	男	2	4.790	8.1×10^4	7.6×10^3	
5	青 ○	1.875	男	1 20	2.780	5.2×10^6	9.0×10^4	
6	牧 ○	1.980	女	25	2.220	1.7×10^6	1.3×10^6	
7	藤 ○	2.250	男	3	3.780	6.0×10^5	1.4×10^2	
8	平 ○	2.100	男	13	2.100	3.9×10^6	3.7×10^3	
9	鹿 ○	2.040	男	11	2.300	7.6×10^6	7.1×10^3	
10	原 ○	2.240	男	13	2.270	3.7×10^6	1.0×10^3	
11	吉 ○	1.960	男	2	4.100	1.0×10^7	1.2×10^6	
12	細 ○	1.900	女	1 20	3.790	9.2×10^6	2.1×10^1	
13	塚 ○	2.400	女	3	5.120	5.2×10^6	2.3×10^6	
14	川 ○	2.450	男	2	3.100	3.2×10^4	1.4×10^4	
平均値均 (log)							6.4414	4.1922
標準偏差							0.8659	1.5724

分布により推計学的検討を行つた(以下の推計学的検討は全て同じ)ところ、危険率5%において有意の差が認められた。

第3表 天然栄養未熟児の糞便中 Coliform bacilli の絶対数(対数)と生下時体重, 検査時体重及び月令

		平均値 (log)	標準偏差
生下時体重	2kg未満	6.8378	0.3938
	2kg以上	6.2212	0.9940
検査時体重	3kg未満	6.8469	0.4820
	3kg以上	6.0360	1.0043
検査時月令	1月未満	6.8687	0.5242
	1月以上	6.1210	0.9604

ii) 検査時体重との関係

未熟児を検査(採便)時体重より3kg未満(7例, 1.60~2.78kg)と3kg以上(7例, 3.10~5.12kg)の2群に分け, 同様の比較をした。前者では $1.7 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^7$ の間にあり, 後者では $3.2 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ の間にあつた。その対数の平均値は夫々6.8469, 6.0360であつた(第3表)。即ち, 前者は後者に比し増加しており, 推計学的に有意の差が認められた。

iii) 検査時月令との関係

未熟児を検査時月令より1月未満(6例, 11~25日)と1月以上(8例, 1月20日~3月)の2群に分け, 同様の比較をした。前者では $1.7 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^7$ の間に, 後者では $3.2 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ の間にあつた。その対数の平均値は夫々6.8687, 6.1210であつた(第3表)。即ち, 前者は後者に比し高値であつたが, 推計学的に有意の差は認められなかつた。

3) 未熟児の糞便中 Enterococci の絶対数と生下時体重, 検査時体重及び月令

Enterococci につき2)述べた Coliform bacilli と同様の比較をした。各群における絶対数は, 生下時体重別には2kg未満: $2.1 \times 10^1 \sim 1.3 \times 10^6$, 2kg以上: $1.4 \times 10^2 \sim 2.3 \times 10^6$, 検査時体重別には3kg未満: $1.0 \times 10^8 \sim 1.3 \times 10^9$, 3kg以上: $2.1 \times 10^1 \sim 2.3 \times 10^6$, 検査時月令別には1月未満: $1.0 \times 10^8 \sim 1.3 \times 10^6$, 1月以上: $2.1 \times 10^1 \sim 2.3 \times 10^6$ の間にそれぞれあり, 対数平均値は第4表中示した如くなつた。即ち, Enterococci 絶対数の対数平均値と, 生下時体重, 検査時体重及び月令のそれぞれとの関係を見ると, 生下時体重の大きいもの並びに検査時体重, 月令の少ないもの

にそれぞれ絶対数は少なかつたが, 推計学的検討では何れにおいても有意の差を認めなかつた。

第4表 天然栄養未熟児の糞便中 Enterococci の絶対数(対数)と生下時体重, 検査時体重及び月令

		平均値 (log)	標準偏差
生下時体重	2kg未満	4.3022	2.0818
	2kg以上	4.1311	1.3563
検査時体重	3kg未満	4.0869	1.1155
	3kg以上	4.2975	2.0220
検査時月令	1月未満	3.9423	1.1470
	1月以上	4.3790	1.8878

V 総括並びに考按

未熟児は成熟児にくらべて, 形態的にも機能的にも異なるものであるが, 腸内菌叢の面においても, 各種細菌の出現率からみた場合, そのアンバランスが認められたことは第1編^①に於て報告した。

その際にも述べた如く, その変化の主体をなすものは L. bifidus の減少, Coliform bacilli の増加等であつたが, これは百分率からみた出現率の上の変化であつた。そこで本編に於ては, 細菌絶対数についての観察を行つた。

糞便中の各種細菌絶対数の検索を行うに当り, 第1編において述べた菌叢の各種細菌について総てこれを行うことは, 適切な撰択培地や手技の上で現在なお難があるため, 今回著者は Coliform bacilli 並びに Enterococci の2菌種について菌数計算を行つた。

糞便中の細菌数計算法については, 平板混釈法^④では動揺がはげしく, その上たとえば変形菌が混入したような場合には全く測定不能になる危険性がある。そこで本実験では, 稀釈法 M. P. N. による Mc Crady 法^⑦の本間変法^⑥を用いて, 糞便 1mg (乾燥重量)中の生菌を対象として絶対数を求めた。M. P. N. 法が平板混釈法よりも優れていること及び糞便中の含菌量は, 新鮮糞便よりも乾燥糞便の重量当りとして表わした方が, 多くの場合により妥当であることは桑原教授^⑩, 本間^⑨等によつて報告されている。

菌数計算には撰択培地が必要であり, Coliform bacilli 並びに Enterococci についても各種のもの^{⑫-⑭}が知られている。本実験に於て, 著者は Hajna^⑮の“EC”培地並びに“SF”培地の変法^⑯培地を使用した。これは乳児糞便中生菌を対象とした細菌数の検

索に本培地が充分使用し得ることが諸家^{⑩-⑬}の成績によつて明かとされていたによる。

予備実験として、天然栄養成熟児について行つた糞便中生菌を対象とせる細菌数(糞便乾燥重量1mg中)の検索成績は、Coliform bacilliでは $10^4 \sim 10^6$ の間で平均値(対数)5.2680, Enterococciは $10^2 \sim 10^6$ の間で平均値(対数)4.8666であつた。健康天然栄養児についての諸家の成績をみると、Olsen^⑫は大腸菌をE. M. B.培地で、又Enterococciを酢酸加カゼイン消化酵母培地で菌数計算した結果、新鮮糞便1g中において大腸菌では大部分が $10^6 \sim 10^{10}$ の間にあり、Enterococciは $10^5 \sim 10^9$ の間にあつたと述べ、又根岸^⑬は、Coliform bacilliを遠藤培地で、Enterococciを腸球菌拮抗培地^⑭で測定し、糞便1mg(新鮮重量)中においてColiform bacilliでは平均値(対数)4.3682, Enterococciは3.9475であつたと述べている。しかし、これらの成績は、何れも平板法によるもので、しかも新鮮糞便重量当りの菌数であるため著者の得た成績とは比較が困難である。

著者と同様の方法(稀釈法 M. P. N.)で、糞便1mg(乾燥重量)中の生菌につき細菌数を計算した報告によれば、諸橋^⑩は、平均値(対数)としてColiform bacilli 5.2494, Enterococci 5.2329であつたと述べ、高橋^⑪は、夫々5.1314, 4.7058なる成績を報告したが、今回著者が上記の予備実験で得た成績も略々これらに近似したものであり、本法が著者の研究目的に適するものと思われた。

未熟児の糞便中細菌絶対数(生菌並びに死菌共)を検索した成績は、手許の文献では見出すことが出来なかつたが、著者が14例の未熟児糞便について本法により生菌を対象として検索した結果、その対数平均値は、Coliform bacilli 6.4414, Enterococci 4.1922であつた。しかし、各個体間にはかなりの動揺があり、殊にEnterococciに於て著しかつた。この成績を月令に差はみられるが、予備実験で行つた成熟児についての成績と比較してみると、未熟児ではColiform bacilliが推計学的有意差をもつて増加し、又Enterococciは、推計学的には有意でなかつたが、減少の傾向がみられた。即ち第1編に於て各種細菌の出現率から論じた場合と等しく、未熟児の腸内菌叢は絶対数からみた際も、成熟児に比べアンバランスの状態にあると考えられよう。かくの如く方法論的に相異なる2種の検討の何れによつても同一の結果となつたことは未熟児腸内菌叢の特長の一つとして注目された。なほ本編の各対象は第1編と同一であつた。そこで両者の成績を各対象毎に対比すると、一見一致せざるが如

き点も見られ、例えば出現率0%(第1編参照)なるに係らず絶対数においては相当数、即ち 7.6×10^6 (症例9), 3.7×10^6 (症例10)のColiform bacilliを認めている場合があるが、これは検討法の差に伴う必然的な結果と解された。又未熟児においてColiform bacilliがEnterococciに比し多かつたことは成熟児に関する著者の予備実験並びに上記諸家の成績と軌を一にし、後者の動揺の巾が前者に比して大きかつたことに就ても、予備実験における同様の傾向、乳児^⑩のほかに成人に就てもSlanetz,^⑳ Loh^㉑が同様の成績を得ている点から、何れも未熟児に特有のものとは考え難つた。

次に著者は、未熟児間に於て、生下時体重、検査時体重、検査時月令を指標としてColiform bacilli, Enterococciの絶対数を比較した。その結果、Coliform bacilliは生下時体重の少なかつたもの、検査時体重の少なかつたものに、他群に比して菌数が多く、推計学的にも有意であつた。Enterococciでは、推計学的有意の差はみられなかつたが、概してColiform bacilliとは逆の傾向がみられた。即ち、等しく未熟児においても、幼若例にColiform bacilli増加、Enterococci減少の程度が著しい傾向、換言すればこの意味における腸内菌叢のアンバランスの著しい傾向がみられた。なお、両種の細菌中Enterococciにより明瞭でない結果をえたのは、上述した本菌に於て変動の巾が、より大きかつたことによつても説明されるであろう。

如何なる理由によつて未熟児は、糞便中生菌を対象とせる場合細菌の絶対数に上述の所見を呈するかは、興味ある課題と思われる。その本体については、更に詳細な検索にまたねばならないが、第1編で述べた如く消化管内pH、各種分泌液、就中酵素あるいはLysozymなどにおける未熟児の特異性が考慮されるべきであろう。なお、Coliform bacilliの増加に対してEnterococciは減少傾向を示したこと、L. bifidus出現率%の減少していたこと(第1編記載)などは、大腸菌がEnterococci並びにL. bifidusとの間に、それぞれ拮抗作用のあること^{㉒-㉓}が証明されている点からみて興味深く、このことから未熟児糞便中生菌数の変動には、菌叢内の細菌間における拮抗作用も一役かつていると考えられる。

未熟児の糞便中生菌を対象として、絶対数より斯様な所見を示したことの意義については、腸内菌叢が乳児の栄養代謝^{㉔-㉕}や、腸管感染症^{㉖-㉗}と関係すること、又大腸菌と腐敗作用についての多くの知見^{㉘-㉙}等に徴し、未熟児の広義の機能と結んで注目すべき

であらう。

目黒^⑨は未熟児の腸内腐敗が、成熟児に比し亢進しているとなし、馬場^⑩は未熟児における蛋白摂取量と腐敗の関係を述べているが、何れも今回著者の得た Coliform bacilli の変化と考え合せ興味深い。

腸管内大腸菌が、乳児下痢症と密接な関係があることは申すまでもないが、近年重視されている病原大腸菌^{⑪-⑬}や、毒性大腸菌^{⑭⑮}の問題とは別に、大腸菌数の腸管内増殖も又乳児下痢症の発生に重要な意義を有すると云われている^{⑯-⑰}。諸橋^{⑱⑲}は天然栄養児において、下痢準備素因と糞便中 Coliform bacilli 絶対数増加との因果関係について述べたが、これらの報告に徴すれば、今回著者が未熟児において得た成績は、未熟児の下痢易罹性性の本体を解明する所見の一つとしても重視されるべきと思われる。

VI 結 語

Mc Crady 法 (本間変法) を用い、天然栄養成熟児につき糞便 1mg (乾燥重量) 中の Coliform bacilli 並びに Enterococci の細菌絶対数を検索せるに、前者は $10^4 \sim 10^6$ の間に、後者は $10^2 \sim 10^6$ の間にあつた。対数平均値ではそれぞれ 5.2680 と 4.8666 であつた。本法により天然栄養の未熟児 14例につき糞便 (同前) 中細菌絶対数を検索し、次の結果をえた。

1) Coliform bacilli は $10^4 \sim 10^7$ の間にあり、対数平均値では 6.4414 であつた。

2) Enterococci は $10^1 \sim 10^6$ の間にあり、対数平均値では 4.1922 であつた。

3) 兩種細菌の絶対数と未熟児の生下時体重、検査時体重、月令との関係を検討し、Coliform bacilli は体重又は月令の少いものに多く、反対に Enterococci は検査時体重又は月令の少いものに少い傾向を認めた。

稿を終るに臨み御指導と御校閲を賜つた吉田教授、諸橋助教授並びに種々御教示頂いた本学細菌学教室田崎教授に深謝致します。

本論文の要旨は第 121 回日本小児科学会東京地方会 (昭和35年 1月) において発表した。

文 献

①藤原達郎：信州医誌，11：403，昭37。②Olsen, E.: Studies on the intestinal flora of infants, Copenhagen: E. Munksgaard, 1949。③Frisell, E.: Acta Paediat., 40: Suppl. 80. 1, 1951。
④Haenel, H.: Z. Kinderheilk. 78: 592, 1956。
⑤諸橋健雄・他：小児科臨床，9：900，昭31。⑥根

岸 章：日児誌，63：187，昭34。⑦Mc Crady, M. H.: J. Inf. Dis. 17: 183, 1915。⑧本間 道・他：日児誌，56：389，昭27。⑨Hajna, A. A. et al: Am. J. Pub. Health., 33: 550, 1943。⑩細菌学実習提要 (伝染病研究所学友会編) 164, 丸善, 昭34。
⑪桑原章吾・他：日本臨牀，15：793，昭32。⑫細菌学実習提要 (伝染病研究所学友会編) 488, 丸善, 昭26。⑬Difcomanual of dehydrated culture media and reagents, 9 th. ed. 50, 1953。
⑭Litsky, W. et al: Am. J. Pub. Health, 43: 873, 1953。⑮堀江 進・他：日本水産学会誌，26: 623, 昭35。⑯中村仁吉：日児誌，58：879，昭29。
⑰高橋恒夫：日児誌，59：783，昭30。⑱青木 久：日児誌，63：132，昭34。⑲諸橋健雄・他：日児誌，57：753，昭28。⑳Slanetz, L. W. et al: J. Bact. 74:591, 1957。㉑Loh, W. P. et al: Arch. Internal Med. 95: 74, 1955。㉒矢吹晉一：日児誌，58：956，昭29。㉓Adam, A.: Jb. Kinderheilk. 110: 186, 1925。㉔諸橋健雄・他：小児科診療，21：1377，昭33。㉕岩井千之：日本細菌学雑誌，475：641，昭10。㉖Thurau, R.: Mschr. Kinderheilk. 103: 176, 1955。㉗諸橋健雄・他：小児科臨床，13：363，昭35。㉘西沢義人：小児科診療，23：1213，昭35。㉙Liebscher, S.: Z. Kinderheilk. 85:265, 1961。㉚Meyer, J. B.: Ergeb. inn. Med. Kinderheilk. 7: 429, 1956。
㉛Stransky, E. et al: Z. Kinderheilk. 43: 717, 1927。㉜Reichelt, E.: Mschr. Kinderheilk. 63: 138, 1935。㉝Bessau, G.: Ref. Med. Wschr. 84: 712, 1937。㉞Gale, E. F.: Biochem. J. 34:392, 1940, 38: 232, 1944, 39: 52, 1945。㉟Stephenson, M. et al: Biochem. J. 31: 1316, 1937。㊱平井金三郎：細菌によるアミノ酸の分解，日本医書，東京，昭25。㊲Guggenheim, M.: Die Biogene Amine, Karger, 1940。㊳加藤英夫・他：小児科臨床，12:745，昭34。㊴目黒洗子：日児誌，63:1984，昭34。㊵馬場実：小児科診療 (投稿中) ㊶Bray, J.: J. Path. Bact. 47: 239, 1945。㊷Ocklitz, H.: Die Bedeutung Pathogener Colistämme für die akuten Durchfallserkrankungen des Säuglings. Ferdinand Enke, Stuttgart, 1954。㊸Juntke, C.: Mschr. Kinderheilk. 103:253, 1955。㊹Rolle, M.: Deut. Tierarztl. Wschr. 59: 81, 1952。㊺坂崎利一：小児科臨床，15：1，昭37。㊻Moros, E.: Münch. Med. Wschr. 40: 1134, 1919。㊼Bessau, G.: Mschr. Kinderheilk. 22: 33, 1921。㊽小山武夫：

児科雑誌, 415: 1904, 昭9. ④高橋次郎: 日本臨床, 9: 18, 昭26. ⑤本間 道: 小児科臨床, 4: 1, 昭26. ⑥諸橋健雄・他: 小児科臨床, 9: 678, 昭31.

ABSTRACT

Absolute counts of coliform bacilli and enterococci found in feces of premature infants fed breast milk were examined after preliminary examinations in those of matured breast-fed infants.

The ranges for coliform bacilli and for enterococci were respectively from 10^4 to 10^7 (the mean: $\log 6.4414$) and 10^1 to 10^6 (the mean: $\log 4.1922$) per 1 mg of dried feces.

The lower their body weight examined and age of month was encountered, the more increased counts of coliform bacilli and in contrast, the more decreased counts of enterococci were observed.