乳酸桿菌の栄養要求に関する研究

東京歯科大学微生物学教室(主任・米沢和一教授)
船員保険東京中央病院産婦人科(院長・篠田倫三博士)

小　　塙　　寛

(昭和30年12月9日受附)

(本文の要旨の一部は，昭和30年11月18日，第10回於東京，日本細菌学会関東支部総会で発表した)

Studies on the Nutritional Requirements of Lactobacilli.

Kan Kobanawa

Microbiological Department of Tokyo Dental College
(Prof. Waichi Yonezawa)
Gynaecological and Tocological Department of
Tokyo Central Hospital of Sailor Insurance
(Director : Rinzo Shinoda)

目　　次

第1章　新生児口腔内乳酸桿菌の分離と由来について

1．緒　　言

口腔内の乳酸桿菌は W. D. Miller[1] が最初齲食の主働菌の一つとして記載して以来幾多の研究がなされており，また腸内，膣内乳酸桿菌もそれぞれ正常菌群として認められ，その生理的意義が強調されてきた．

しかしこれらの乳酸桿菌の関係，すなわち新生児の口腔並びに腸内乳酸桿菌と膣内乳酸桿菌との関係については，在来膣桿菌が新生児に移行するのではないかという推定的見解が存在しているに過ぎず，その見解は必ずしも一致していなかつた．すなわち Noack[2]，勝野[3]，Jötten[4]，Witkowski[5] 等は殆んど全面的に膣内 Döderlein 桿菌が新生児腸内に侵入するものの如く考えているのに反し，Naujoks[7]，白土[8] 等は両者の相関関係について殆んど否定的見解を抱いている．教室の長谷川[6] は母子10組について，産婦の뛰瘍，膣と新生児大便の3種来源から乳酸桿菌を分離しその菌型，生物学的性状，免疫学的性状の比較から本問題に対しほぼ肯定的な結

論を述べた．また Salomon[9]，眞柄[10]，工藤[11]は單に部分的にのみ両者の関連性を認めているに過ぎない．もちろん膣内，腸内，口腔においては微生物の種類と量に多少の差異はあるであろうとしても，本論文では乳酸桿菌についてのみ討議してみたいと思う．さて全面的にその関連性を主張する者も多くは実験的根拠に乏しく，Noack の如きは，單に胎児が分娩時，膣内細菌を吸引することによつて時に Gastroenteritis 等を起すことがあるという事実からのみ両者の関連性を推定しているに過ぎない．また勝野は膣桿菌と口腔内乳酸桿菌との一般性状を比較し，両者は全く同一菌種であるから，膣桿菌は子々孫々に伝わるものであろうと考えている．これに反し Naujocks[7]，眞柄[10]等は，膣桿菌に対する新生児の口腔内の不良環境を强調し，前両者はこの点より，膣桿菌が新生児口腔内より腸内に侵入することはあり得ないと主張し，眞柄[10]等は膣桿菌は大部分新生児口腔内で発育を阻止せられ，唯一部分のみが腸内に侵入するものであろうと考えている．

私は，乳酸桿菌の栄養要求に関する研究を企てるにあたつて，これら諸家の見解に新らしい面から検討を加えるために，教室における長谷川の3種来源の研究[6]を更に進め，新生児の腸内にあわせて口腔内から乳酸桿菌を分離するという母体と計4種来源の乳酸桿菌を比較検討し，異つた環境とその部位における乳酸桿菌との間にどんな関係があるかについて実験にもとづく解釈を試み，これに新知見を加え得たと思うのでここに報告するわけである．

2．実　験　方　法

被験試料：船員保険東京中央病院産婦人科入院中の健常分娩母子15組を被験者とし，分娩直前の母体口腔液（齲食ある場合は齲窩）（以下 Mm と略す）及び膣分泌液（以下 Ms と略す）並びに分娩直後～1週間の新生児の口腔液（以下 Km と略す）及び大便（以下 Kk と略す）を材料として菌株を分離した．

本実験の症例はいずれも，出産に際し石鹸浣腸や外陰部消毒等通法に従つて前準備を行い，正常分娩を終つたもののみについて行つたものである．出産所要時間（破水より娩出まで）は，平均30分であつた．また新生児口腔の材料接種に際しては，無菌操作に殊に留意した．

材料採取法：母体口腔液はそのまま，膣分泌液の場合は外陰部を通法に従つて消毒した後，培養液を滅菌ピペットで子宮膣部へ注入し，よく膣全内容液と混合した後，これを再びピペットにとり培養した．新生児の口腔液は，滅菌食塩液の少量をピペットで口腔に注入し，膣の場合と同様処理し，大便は滅菌食塩液で適宜稀釈して接種材料とした．上記4種材料は，培養と同時にすべてグラム染色を施してこれを鏡検した．

培養法：直接平板分離法並びに液体培地による増菌培養後，平板に移し分離する両法を併用した．母体口腔液，膣液，新生児大便では直接塗布培養でよく菌を分離し得たが，新生児口腔液は，分離率が悪いため増菌培養を施し，しかも反復して頻繁に材料採取を行つた．また，いずれも1例について1株ずつ分離することとした．

培養基の組成は，表1に示した．

表1　分離培地処方

Beef infusion	1000 cc
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Glucose	20 g
B. C. G. sol. (0.04%)	50 cc
NaN_3	0.1 g
Agar	25 g

（注） pH 5.0 に修正

液体培地の場合は上記組成から寒天を除いたものを用いた．

3．実　験　成　績

塗布標本の所見：膣材料ではグラム陽性桿菌のみを見出したのが8例，グラム陽性球菌を混じたものが2例，グラム陰性桿菌を混じたものが1例，グラム陽性球菌，グラム陰性桿菌，白血球を混じたもの1例であり，母体口腔材料の所見では健常成人口腔細菌群の一般的な傾向との間に差異は認められなかつた．新生児口腔では乳酸桿菌のみの見られたものは2例で，球菌が大部分を占めて僅かに乳酸桿菌の見られるも

のが8例，殆んど菌が見られないものが1例であつた．新生児大便材料ではグラム陽性桿菌のみのものは3例，グラム陰性桿菌を混じたもの4例，球菌を混じたもの3例，球菌及びグラム陰性桿菌を混じたもの1例であつた．(表2)新生児口腔菌群は出産後，日を追つて複雑化する傾向が見られた．

表2　4種来源塗布標本染色所見

来源	母体		新生児	
	口腔	腟	口腔	大便
6	○●△×⊡	○⊡	○●⊡	○
7	○●△×	○　△⊡	○⊡	○●
8	○●△×	○●	○●⊡	○　△
9	○●△×	○⊡	○●⊡	○
12	○●△×⊡◉	○⊡	○●⊡	○●
13	○●△⊡	○⊡	○●⊡	○●
14	○●△×	○⊡	○●	○
15	○●△	○⊡	○●⊡	○●△
19	○●△×	○⊡	○●⊡	○●
20	○●⊡	○●⊡◉	⊡	○　△
21	○●△	○⊡	○⊡	○　△

（注）　○：グラム(＋)桿菌
△：グラム(－)桿菌
●：グラム(±)球菌
◉：白　血　球
⊡：上　皮　細　胞
×：スピロヘータ・紡錘菌その他

培養所見．母体口腔1例の例外を除いて，1回ないし3回培養で全例に乳酸桿菌を証明した(表3)．

表3　15組母子4種来源からの微生物の分離成績

母子の組番号	母体				新産児(0～6日)			摘要(全員入院分娩)
	齲歯	口腔(齲歯は歯垢)	腟 清浄度	腟 分離菌	性別	口腔	大便	
6	＋	＋(C)	I	＋	♂	＋	＋	健，胎盤剝離手術
7	＋	＋(C)	II	＋(C)	♂	＋	＋	健，正常分娩
8	－	＋(C)	I－II	＋(C)	♂	＋	＋	健，同　上
9	＋	＋(C)	I	＋(C)	♀	＋	＋	妊娠浮腫，同上
10	－	－	I	＋	♀	＋	＋	同上，鉗子分娩術
11	＋	＋	I	＋	♀	＋	＋	妊娠腎，正常分娩
12	－	＋(C)	I	＋(C)	♂	＋	＋	健，　同　上
13	－	＋	I	＋	♂	＋	＋	健，　同　上
14	－	＋	I	＋	♂	＋	＋	妊娠浮腫，鉗子分娩術
15	＋	＋(C)	II	＋	♀	＋(C)	＋	健，正常分娩
16	＋	＋(C)	I	＋	♂	＋	＋(C)	健，同　上
18	＋	＋	I	＋	♀	＋	＋	健，同　上
19	－	＋	I	＋(C)	♀	＋	＋(C)	健，同　上
20	＋	＋	II－III	＋	♀	＋	＋	妊娠浮腫，同上
21	－	＋	I	＋	♂	＋※	＋※	健，同　上

（注）＋………乳酸桿菌分離，ただし齲歯の欄は齲歯の有無を示す
(C)……同時にカンジダ属を分離
※………腸球菌を証明

4. 考　　　按

塗布所見で乳酸桿菌と考えられるグラム陽性桿菌のみが，新生児口腔液材料に認められた2例があつた．新生児口腔乳酸桿菌の由来は，母体産道の他，術者，看護人，近親者等の口腔も考えられるのであるが，材料採取の時期が出産直後であり，かつ厳密に無菌的条件で操作したことから推して，明らかに母体産道由来のものと考えてよいと思う．私の1例は，後述の生物学的性状検査の結果，母子由来が一致した場合であり，共にL. acidophilusであつた．別の組で，膣液由来株は菌種不明であるが，新生児口腔株はL. acidophilusと同定されたものであつた．

乳酸桿菌の分離法としては，古くからHeim，Tarrozi等の処方する肝臓エキスを用いる培養基があり，また酸性Zeissler血液寒天等主として嫌気的条件下の培養に用いる培地がある．一般に，乳酸桿菌はmicroaerophileであるとされ，ロウソク培養又は黄燐燃焼法等によつて旺盛に発育するが，ブドウ糖を含んだ培地では好気的条件でもよく発育する．Hadley[12]は，Kulpのトマト汁培地を改良して唾液中乳酸桿菌数の好気的定量培養法を確立した．現在でもこの培養基は齲食活動性試験の標準法に広く採用されている．Difco Manual[13]によつても，乳酸桿菌の培地としてイーストエキス，脱脂乳等を含むものが多く記載され，教室の経験でも良好な結果を得ている．最近Diamond[14]はHadleyの培地に1万倍の比に窒化ナトリウムを加えて乳酸桿菌以外の菌種（グラム陰性桿菌及び眞菌）の発育を抑制して乳酸桿菌の分離を試みて好成績を得た．私共の教室でもこれを追試し良い成績を得ているが，私も常に随伴雑菌の汚染を避けることが出来た．

また最近Rogosa[15]等はSL培地なる半合成培地を発表しているが，私の本菌の栄養要求性追求の成績にも関連して興味あることと思う．

5. 小　　　括

1）妊婦の膣，口腔，新生児の口腔，大便中の乳酸桿菌を，分娩時を中心として分離し，同時に塗布標本によつてこれを比較検討した．

2）塗布標本所見中，新生児口腔内乳酸桿菌と産道の乳酸桿菌との関連性を思わしめるものが10例中2例あつた．

3）培地所見では，15組60例中，母体口腔の1株の例外を除いて，全例に乳酸桿菌を分離した．

第2章　乳酸桿菌の生物学とその同定について

1. 緒　　　言

私は，第1章において合計15組の母子から乳酸桿菌の選択的分離を試みたが，そのうち4種来源の11組資料から揃つて菌株を分離，継代することを得て，その生物学的諸性状を検討した．

さて，乳酸桿菌の菌型決定には古くから，集落形態，菌形態，配列[16) 17) 18)]等によるもの，糖分解能によるもの[9)]，両者を併用するもの[6)]等がある．私はBergey's Mnual[45)]による菌種同定を行つた．Bergeyによつて同定を行つた報告は，最近1，2[21)]発表されているのみである．なお，産生された乳酸の旋光性検査は除外した．

2. 実　験　方　法

分離培地上の疑わしい集落を釣菌鏡検し，これを前述の分離培地から，NaN_3を抜いたブイヨンに移植，同じく寒天に塗布培養して弧立集落を形成させ，再びこれをブイヨンに投じて培養，以下同様操作を3回繰返して，乳酸桿菌の純粋分離と菌力増強を施した．また，菌株の保存にには高層培養基を用い，穿刺培養を施した（表4）．

ゲラチンの消化性，亜硝酸塩還元性，耐熱性，BTB加牛乳培地の発育状況等は，通法に従つて培養基を調製し，ブドウ糖加牛肉水ブイヨンの48時間培養液を接種して，それぞれ観察した．

さらに，ブイヨン培養から菌を移し，血液寒天平板

表4　保存培地処方

Yeast Extract (Difco)	5 g
Glucose	5 g
Na acetate	5 g
Polypepton	5 g
Solution A※	2.5 cc
Solution B※	5 cc
Aq. dest.	1000 cc
Agar	30 g

※ 表七参照

(無糖)に塗布培養して定型的集落を3回継代し，生理食塩液で 2Öse/cc の菌浮游液を調製して糖分解能検査用 inoculum とした．培地は Hiss 血清水を用い，これに各種炭水化物を1%の比に加え，BTB を標示薬として，酸産生度 (pH) を比色的に測定した．分解能の程度は培地を黄変しかつ凝固したものを＋，培地黄変のみのものを±とした．

なお血液平板上の集落所見や，これをロウソク培養した場合の所見，その他トマト汁寒天培地上の所見等に，その都度観察記録した．

3．実験成績

分離菌株の生物学的性状は表5に掲げた．

表5　分離菌株の生物学的性状

		グラム染色	形態	運動	カタラーゼ	亜硝酸塩	ゲラチン	耐熱性 60°15′	BTB牛乳 酸	BTB牛乳 凝固	含水炭素分解能 マルトーゼ	マルノーゼ	サッカローゼ	グルコーゼ	ラクトーゼ	アラビノーゼ	ラフィノーゼ	トレハローゼ	ガラクトーゼ	レブローゼ
6	Mm	＋	桿	−	−	−	−	−	＋	＋	−	−	＋	＋	＋	＋	＋	−	−	±
	Ms	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	±	±	＋	＋	＋	＋	＋	−	−	±
	Km	＋	〃	−	−	−	−	−	±	−	−	−	−	±	−	±	−	＋	−	±
	Kk	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	±	＋	−	＋	＋	＋	−	−	−	＋	＋
7	Mm	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	−	−	＋	＋	＋	−	＋	＋	−	＋
	Ms	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	＋	＋	＋	＋	＋	−	＋	＋	−	−
	Km	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	＋	＋	＋	＋	＋	−	−	＋	−	−
	Kk	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	−	−	−	＋	−	＋	−	−	−	−
8	Mm	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	＋	＋	＋	＋	＋	−	−	−	−	−
	Ms	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	＋	＋	±	＋	＋	＋	−	＋	−	−
	Km	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	−	−	−	＋	−	＋	−	＋	−	±
	Kk	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	＋	−	＋	＋	＋	−	−	＋	−	＋
9	Mm	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	−	−	−	＋	＋	±	−	−	−	−
	Ms	＋	〃	−	−	−	−	−	±	±	−	−	＋	＋	−	−	−	＋	−	−
	Km	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	±	±	−	−	±	−	＋	−	−	−	±
	Kk	＋	〃	−	−	−	−	−	±	−	−	−	＋	＋	−	−	−	−	−	−
12	Mm	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	±	−	−	−	＋	−	＋	−	−	±	＋
	Ms	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	−	−	−	＋	＋	＋	−	−	＋	−
	Km	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	±	±	＋	＋	＋	＋	±	−	±	±
	Kk	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	−	−	−	±	＋	＋	−	−	−	−
13	Mm	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	＋	−	＋	＋	＋	＋	＋	−	−	＋
	Ms	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	＋	−	＋	＋	＋	＋	−	−	−	＋
	Km	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	＋	−	＋	＋	＋	±	−	＋	＋	＋
	Kk	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	−	＋
14	Mm	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	±	＋	±	＋
	Ms	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	＋	−	＋	＋	＋	＋	−	−	−	±
	Km	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	−	−	±	＋	±	±	＋	−	−	−	±
	Kk	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	±	−	−	＋	＋	−	−	＋	−	＋	＋
15	Mm	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	−	−	＋	＋	＋	−	＋	＋	−	±
	Ms	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	±	＋	−	＋	＋	−	−	＋	＋	−	＋
	Km	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	±	＋	−	＋	＋	＋	＋	−	＋	＋	−
	Kk	＋	〃	−	−	−	−	−	＋	＋	−	−	＋	＋	＋	＋	−	−	−	±

19	Mm	+	〃	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	±	+	+	−	−	+	+
	Ms	+	〃	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	±
	Km	+	〃	−	−	−	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	±	−	−	±
	Kk	+	〃	−	−	−	−	−	±	±	+	−	+	+	−	−	−	−	±	±
20	Mm	+	〃	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	±	+	+	−	−	±	+
	Ms	+	〃	−	−	−	−	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+
	Km	+	〃	−	−	−	−	−	+	+	+	±	±	+	+	+	−	−	−	+
	Kk	+	〃	−	−	−	−	−	+	−	+	±	±	+	±	−	−	+	+	+
21	Mm	+	〃	−	−	−	−	−	+	+	+	±	+	+	+	−	+	+	+	+
	Ms	+	〃	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	±	+	+	−	±	−	+
	Km	+	〃	−	−	−	−	−	+	±	+	+	+	+	±	−	+	±	−	−
	Kk	+	〃	−	−	−	−	−	+	+	+	+	±	±	+	±	+	±	+	+

（注） Mm, Ms, Km, Kk ： 表6（注）に同じ.

これら全菌株はグラム陽性，不動性，中等大の桿菌で，カタラーゼ反応陰性であつた.

亜硝酸塩還元性は全株陰性であつた．ゲラチン培地では，殆んど発育するものはなく，液化は全然認めず．耐熱性試験では60°C 15分で全株死滅した.

本菌の大部分は非溶血性であつたが，馬血液加寒天平板上の集落は，人血液加寒天平板上のそれに比し，やや緑色溶血環を示すものが多く，特にロウソク培養した場合には集落が大となり，緑色傾向が甚だしかつた．しかし本菌による溶血は極めて弱く，緑色レンサ球菌中でもStr. mitis のそれに似た程度のものが，ある条件で出現するのみで，その本体は酸溶血であると見てよい[33]．トマト汁培地では，発育は一般に良好であるが，菌株によつては発育不良のもの，あるいは，殆んど発育しないものが多かつた．ただ，8 Ms株のみは他のいずれの培地上におけるよりも tomato-juice agar 上に旺盛な発育を示した.

BTB 加牛乳培地内でたいていの菌株は発育し酸を産生するが，凝固，ペプトン化を示すものは比較的少い．糖分解能試験の成績では，グルコーゼは全菌株，サッカローゼ，マルトーゼ並びにガラクトーゼは，殆んど全菌株分解しているが，ラクトーゼを分解しない菌株は10株を数えた.

産生された乳酸，その他の代謝産物の性状等の細部は追求しなかつたが，以上の成績から Bergey によつて同定を行つてみたところ，Lactbacillus acidophilus と同定されるべき菌種は5株，同じく近似の性状を有するもの6株であつた．また L. plantarum 近似菌種と同定されたもの8株，L. delbrückii 近似のもの3株，L. leichmanii 近似菌2株，L. brevis 近似菌2株であり，いずれの菌種とも同定し得なかつた菌株は計18株であつた.

この結果によつて，母子4種来源分離株で類縁関係にあると認められたものは4組であつた．すなわち，症例7の母体の口腔，膣由来株及び新生児口腔由来株はいずれもL. acidophilus あるいはその近似種と同定さるべき菌種であり，症例8と21の母体口腔及び新生児大便ないし口腔由来株は L. acidophilus 近似種であつた．また，症例13の母体口腔及び新生児大便由来株は，いずれも L. plantarum 近似の菌種と同定された(表6).

4．考　按

今日，微生物の菌種同定は，Bergey's Manual によることが通念であるが，乳酸桿菌の多数新鮮分離株について本法に従い同定を行つた報告は極めて少い．在来報告されたところでは，集落型によつて分類した Bunting[16] 森下[17]，岡本[20]等の3～4型の分類があるが，本研究の目的とするところには沿い得ない．また長谷川[6]，岡本[20]，中田[18]．春木[8]等の報告したように，糖分解成績，免疫学的諸性状により型別をそれぞれ独自に分けているが，私は，国際的規約に従つた普遍的分類法に従い確実な分類を行うことを目的とし，かつ本文第3章で述べんとする

表6　菌　株　同　定

		Identification			Identification
6	Mm	L. plantarum (?)	14	Mm	L. plantarum (?)
	Ms	L. plantarum (?)		Ms	不　明
	Km	不　明		Km	不　明
	Kk	L. acido. (?)		Kk	L. delbrückii (?)
7	Mm	L. acido. (?)	15	Mm	L. acido.
	Ms	L. acido.		Ms	L. leichmanii (?)
	Km	L. acido.		Km	不　明
	Kk	L. brevis (?)		Kk	不　明
8	Mm	L. acido. (?)	19	Mm	不　明
	Ms	L. plantarum (?)		Ms	不　明
	Km	L. brevis (?)		Km	L. plantarum (?)
	Kk	L. acido. (?)		Kk	L. delbrückii (?)
9	Mm	不　明	20	Mm	不　明
	Ms	L. leichmanii (?)		Ms	不　明
	Km	不　明		Km	不　明
	Kk	L. delbrückii (?)		Kk	L. acido.
12	Mm	不　明	21	Mm	L. acido.
	Ms	不　明		Ms.	不　明
	Km	L. plantarum (?)		Km	L. acido. (?)
	Kk	不　明		Kk	不　明
13	Mm	L. plantarum (?)			
	Ms	不　明			
	Km	L. acido. (?)			
	Kk	L. plantarum (?)			

(注) Mm：母体口腔，Ms：母体膣，Km：新生児口腔，Kk：新生児大便，

本菌の栄養要求と菌種との類縁関係の決定に役立てた．

白土等は膣由来菌と齲食由来菌との間に沈降反応による免疫学的差異があるといつているが，これは成人の場合についてであつて当然のことと考えられる．私が栄養要求性に目を向けたのは，一つにはこうした先人の業績を顧みてのことである．

私と殆んど同時に，白土[21]等は齲食及び口腔液からの新鮮分離菌の本法による分類につき報告している．氏等によれば，L. acidophilus 及びその類似のものは87株中34株（39.1%）であり，L. delbrückii 近似菌3株，L. leichmanii 類似菌2株，L. lactis 類似菌2株，L. brevis 2株，L. fermenti 5株，同類似菌5株，同定不能22株であるという．

私の成績では，L. acidophilus に関しては44株中11株（25%）であり，他についても，およそ同様の傾向を示すが，私の場合 L. plantrum 近似のものと同定されるもの8株を得，白土等はこの菌種を分離せず，L. fermenti 及びその類似菌を10株分離している点が異る．本実験では上述の保存培地に菌を穿刺継代中，ガスを産生する菌株は1株も見出されなかつたし，糖分解試験でブドウ糖を分解するが，ガスを産生する菌株は1株もなかつた．これに反して，農林省食糧研究所から分与された Bioassay 用標準菌株たる “L. fermenti 36” は，多量のガスを産

生した．この点は Bergey's Manual に記載はなく，本法による分類の場合一つの盲点となるのではないかと考えられるが，L. fermenti を用いた対照の成績から推して，私の成績は大過ないものと思う．

成沢[22]は膣乳酸桿菌を分類して Catalase 反応陽性の Microbacterium 属の多いことを强調しているが，私は Microbacterium の1株も分離出来なかつた．いずれにせよ本分類法に従つて多数菌株を検査した結果，人体から分離され得る菌種の概略を把握し得た点は，私の研究の一つの成果とも言い得る．

ただし，母子間の分離菌株の類縁関係について，確実に成績の一致した症例は僅か3組であつた．この点については分娩所要時間や，菌分離の時期との関係について更に研究を要するものと考える．

5．小　　括

1）私は母子4種来源の資料から分離したカタラーゼ陰性，グラム陽性，不動性の中等大桿菌すなわち乳酸桿菌と考えられる11組44株の菌株につき，Bergey's Manual に従つて分類同定を試みた．

2）その結果 Lactobacillus acidophilus と同定されたもの5株，同類似菌6株，L. plantarum 類似菌8株，L. delbrückii 類似菌3株，L. brevis 類似菌2株，L. leichmanii 類似菌2株，同定不能18株を得た．

3）母子4種来源菌株のうち2種以上の菌株にその生物学的性状の類縁関係が認められたのは，11組中4組であつた．

第3章　乳酸桿菌のビタミン要求性について

1．緒　　言

乳酸桿菌の栄養要求に関しては，Snell & Strong[23]によつて発表された L. casei の発育におよぼすリボフラビン及びその誘導体の影響に関する研究が最初であつて，ついで，Landy & Dicken[24]が合成培地を用いてビタミンやアミノ酸の生物学的定量法を確立してから，多数の研究が発表されている．L. acidophilus は，Peterson[25]によれば，ビオチン，リボフラビンだけについて記載し，その両者を要求すると報告している．さらに氏は，その他の乳酸桿菌についてもその要求性を報告しているが，ある物質が，ある細菌に必須のものか，あるいは補助的なものかという区別はつけていない．また同じ菌種についても，菌株による差は問題にしていない．

すなわち，L. delbrückii に関しては，パントテン酸，$V \cdot B_6$，$V \cdot B_1$ は発育に有効であるとし，また L. leichmanii は $V \cdot B_2$ のみについてこれを有効であるとしている．また L. plantarum は $V \cdot B_2$ のみについて論じ，これを不要としている．

Weisberger & Johnson[26]は，口腔から分離した L. acidophilus の1株について，その酸産生量におよぼす V・B の影響を検し，サイアミン，ニコチン酸，パントテン酸の3者を必須であるとし，Dreizen[30]は，氏の分離菌株はサイアミン，ニコチン酸，パントテン酸及びビオチンの4者が必須物であつたと結論している．

私は，新生児及び産婦の乳酸桿菌について，本文第1・2章で既に詳述した．そして4種来源より得た乳酸桿菌は，L. acidophilus，L. delbrückii，L. brevis，L. leichmanii，L. plantarum 等，広範囲にわたつていることを指摘した．

そこで，類縁関係のある分離菌の栄養要求をとりあげ，V・B 群について実験した．以下これについて記載する．

2．実験方法と実験成績

培地：:Landy & Dicken の処方（表7）に従つて完全合成培地を調製した．

すなわち，まず Tryptophane は，適当量の温湯で溶解し，Cystine は 1/10NHCl 中で加熱溶解しておく．Guanine, Adenine, Xanthine 及び Uracil を 0.1g 宛秤量後，75cc の 1/1HCl 中

表7　合成完全培地処方

Casein hydrolysate	5 g
Salt solution A※	10 cc
Salt solution B※※	10 cc
Glucose	20 g
Sodium acetate	10 g
Asparagine	500 mg
Tryptophane	200 mg
Cystine	200 mg
Guanine hydrochloride	10 mg
Adenine sulfate	10 mg
Xanthine	10 mg
Uracil	10 mg
Pyridoxine hydrochloride	800 μg
Riboflavin	400 μg
Calcium pantothenate	400 μg
Nicotinic acid	400 μg
Thiamine hydrochloride	200 μg
Folic acid	20 μg
Biotin	10 μg

※	K_2HPO_4	500 mg/l
	KH_2PO_4	500 mg/l
※※	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200 mg/l
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg/l
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10 mg/l
	NH_4Cl	3 g/l
	NaCl	10 mg/l

（注） 1/10 N NaOH で培地を pH 6.8 に修正する．

に入れて加熱し，溶解するまで濃塩酸を加え，冷却後 100cc のメスコルベンで定容し，この 10 cc を使用した．Calcium pantothenate は 50%エタノールで，リボフラビン，サイアミン，ピリドキシンはそれぞれ 0.04N 酢酸で，葉酸は 1/100 N NaOH の 20%エタノール溶液で，50%ビオチンは，エタノールで，またニコチン酸は，24時間眞空デシケータで乾燥した結晶無水ニコチン酸を50%エタノールで溶解して，それぞれ使用した．

800cc の蒸溜水中に上記のものを，その他のものと共に加えて溶解し，濾過後 1/10NNaOH 溶液で pH 6.8 に修正して 1 l に定容し，これを 10cc 宛清浄中試験管に分注し，110°C 10分間滅菌した．

上記完全合成培地より 1 種ずつビタミンを抜いて各ビタミン欠培地として使用した．

Casein hydrolysate は，Difco，V・B 群と有機塩基はミノフアーゲン製薬，あるいは東京化成の製品であり，うち Adenine sulfate は東大医学部薬学教室より分与されたものである．

接種菌は，第 2 章で記載した全分離菌44株中の32株である．10cc の 2 %糖加ブイヨン（無修正）48時間培養液を滅菌生理食塩液で 3 回遠沈洗滌し（4,000 r.p.m. 各25分），菌体を 10cc の滅菌生理食塩液に再浮遊して，その 1 白金耳を inoculum とした．判定は 72時間培養後，培養液 1cc を10倍稀釈し，これを 1/10N NaOH で起始 pH 6.8 まで滴定した．要求性の判定としては，complete medium の滴定酸度と比較し，0%のものを ++，0～20% を +，21～50% を ±，51%以上のものを − とした．

実験成績は表 8 ～14に一括した．

表8　滴　定　酸　度

		Complete Medium	Riboflavin less	Folic acid less	Pyridoxine less	Biotin less	Thiamine less	Pantothenic acid less	Nicotinic acid less	Identification
6	Mm	1.27	1.13	1.29	1.26	0.26	0.16	0.13	0.17	L. Plantarum ?
7	Km	1.02	1.16	0.70	1.04	0.20	0.14	0.12	0.16	L. acidophilus
	Mm	0.99	0.13	1.10	0.96	0.61	0.19	0.12	0.32	L. acidophilus ?
	Kk	1.25	0.87	0.77	1.02	0.17	0.22	0.12	0.17	L. brevis ?
	Ms	1.38	0.97	0.49	1.21	0.12	0.15	0.12	0.18	L. acidophilus
8	Mm	1.37	1.13	1.43	1.28	0.20	0.12	0.13	0.16	L. acidophilus ?
	Ms	0.34	0.20	0.19	0.18	0.16	0.13	0.13	0.18	L. plantarum ?
	Kk	0.98	0.28	0.28	0.82	0.19	0.81	0.12	0.16	L. acidophilus ?
	Km	1.00	1.22	0.93	0.91	0.30	0.21	0.12	0.18	L. brevis ?

9	Ms	1.34	1.20	1.52	0.34	0.52	0.21	0.17	0.19	L. leichmannii ?
	Mm	1.32	1.34	0.19	1.02	0.20	0.14	0.16	0.17	不明
	Km	1.28	1.27	1.31	1.22	0.42	0.13	0.13	0.18	不明
	Kk	0.89	0.34	0.25	0.71	0.30	0.14	0.12	0.18	L. delbrückii ?
12	Ms	1.38	0.34	1.31	0.91	0.19	0.19	0.18	0.15	不明
	Mm	1.18	1.04	1.02	0.25	0.17	0.13	0.12	0.15	不明
	Km	1.45	0.33	0.25	0.42	0.12	0.17	0.16	0.16	L. plantarum ?
	Kk	1.37	0.12	0.73	0.64	0.14	0.12	0.15	0.16	不明
13	Km	1.34	0.33	0.26	1.34	0.18	0.15	0.18	0.15	L. acidophilus ?
	Mm	1.32	1.05	0.18	0.33	0.20	0.19	0.18	0.19	L. plantarum ?
	Ms	1.32	1.08	0.65	0.62	0.40	0.13	0.17	0.16	不明
14	Kk	1.34	0.18	0.69	0.20	0.18	0.15	0.20	0.15	L. delbrückii ?
	Km	1.36	0.14	0.23	0.21	0.16	0.18	0.18	0.15	不明
15	Ms	1.21	0.17	1.39	1.17	0.17	0.17	0.15	0.16	L. leichmannii ?
	Mm	1.34	1.31	1.00	0.18	0.13	0.18	0.16	0.20	L. acidophilus
	Kk	1.46	1.34	1.32	1.42	0.22	0.18	0.16	1.19	不明
	Km	1.25	0.53	0.98	1.26	0.21	0.20	0.12	0.17	不明
19	Km	1.35	0.17	0.25	0.18	0.20	0.30	0.22	0.16	L. plantarum ?
	Mm	0.84	1.13	0.90	0.65	0.22	0.14	0.13	0.17	不明
	Kk	1.05	0.36	0.19	0.18	0.21	0.15	0.15	0.17	L. delbrückii ?
20	Kk	1.28	0.83	0.18	0.17	0.24	0.10	0.12	0.15	L. acidophilus
21	Km	1.62	1.39	1.37	0.94	0.33	0.14	0.13	0.17	L. acidophilus ?
	Kk	0.25	0.18	0.18	0.19	0.20	0.12	0.11	0.16	不明
Blank		0.14	0.14	0.18	0.18	0.18	0.14	0.18	0.16	

（注） 数字は滴定に要した 1/10N NaOH 量 (ml) を示す.
Mm, Ms, Km, Kk ： 表6（注）に同じ.

表9 L. acidophilus とその類似菌のビタミンB要求性

		Complete	Riboflavin	Folic acid	Pyridoxine	Biotin	Thiamine	Pantothenic acid	Nicotinic acid
7	Km	1.02	−	−	−	+	++	++	++
	Mm	0.99	++	−	−	±	++	++	+
	Ms	1.38	−	±	−	++	++	++	++
8	Mm	1.37	−	−	−	+	++	++	++
	Kk	0.98	+	+	−	+	−	++	++
13	Km	1.34	±	±	−	++	++	++	++
15	Mm	1.34	−	−	++	++	++	++	++
20	Kk	1.28	−	++	++	+	++	++	++
21	Km	1.62	−	−	−	+	++	++	++

（注） { Mm, Ms, Km, Kk ： 表6（注）に同じ
数字は表8（注）参照

表10　L. plantarum 類似菌のビタミンB要求性

		Complete	Riboflavin	Folic acid	Pyridoxine	Biotin	Thiamine	Pantothenic acid	Nicotinic acid
6	Mm	1.27	−	−	−	+	++	++	++
8	Ms	0.34	+	++	++	++	++	++	++
12	Km	1.45	±	+	±	++	++	++	++
13	Mm	1.32	−	++	+	+	++	++	++
19	Km	1.35	++	+	++	+	+	+	++

表11　L. leicmanii 類似菌のビタミンB要求性

		Complete	Rivoflavin	Folic acid	Pyridoxine	Biotin	Thiamine	Pantothenic acid	Nicotinic acid
9	Ms	1.24	−	−	±	±	+	++	++
15	Ms	1.21	++	−	−	++	++	++	++

表12　L. delbrückii 類似菌のビタミンB要求性

		Complete	Rivoflavin	Folic acid	Pyridoxine	Biotin	Thia mine	Panto thenic acid	Nicotinic acid
9	Kk	0.89	±	±	±	++	++	++	++
14	Kk	1.34	++	±	++	++	++	++	++
19	Kk	1.05	±	++	++	++	+	++	++

表13　同定不明乳酸桿菌のビタミンB要求性

		Complete	Riboflavin	Folic acid	Pyridoxine	Biotin	Thiamine	Pantothenic acid	Nicotinic acid
9	Mm	1.32	−	++	−	+	++	++	++
	Km	1.28	−	−	−		++	++	++
12	Ms	1.38	+	−	−	++	++	++	++
	Mm	1.18	−	−	+	++	++	++	++
	Kk	1.37	++	±	±	++	++	++	++
13	Ms	1.32	−	±	±	+	++	++	++
14	Km	1.36	++	+	+	+	++	++	++
15	Kk	1.46	−	−	−	+	++	++	++
	Km	1.25	±	±	−	+	+	++	++
19	Mm	0.84	−	−	±	+	++	++	++
21	Kk	0.25	++	++	++	++	++	++	++

表14 L. brevis 類似菌のビタミンB要求性

		Complete	Riboflavin	Folic acid	Pyridoxine	Biotin	Thiamine	Pantothenic acid	Nicotinic acid
7	Kk	1.25	−	−	−	+	+	++	++
8	Km	1.00	−	−	−	±	+	++	++

3. 考按

来源別に見ると菌株数が少いためか，あまり差異は認められない．菌種別に総体的に見ると，L. acidophilus では，サイアミン，パントテン酸，ニコチン酸を必須とし，リボフラビン，葉酸，ピリドキシンは2，3の例外を除いてあまり必要でない．ビオチンを欠いても全菌株共僅かな発育を示すが，その酸産生量は complete medium の3.7%のみである．これは全菌種についても同様のことが見られる．この点に関して，Weisberger[25] はビオチンを必要としないとし，Dreizen[30] は5%程度の酸産生を報告し，その必要性を强調している．L. acidophilus を菌株別に見ると，7 Km (新生児口腔由来株) 及びこれと一連の 7 Ms (同一系産婦膣株)，7 Mm (同一系産婦口腔株) は，リボフラビンの例外を除いてよく一致した必須性を示している．7 Km，21Km は，いずれも症例の異る新生児口腔に由来したものであるが，必要性の全く一致している点誠に興味深い．

L. plantarum 類似のものについては (表10)，比較的要求性の強いことが强調されてよかろう．表9の 8 Ms は，complete medium 中でも酸産生量は他菌平均の約30%であり，もちろん各ビタミン欠培地に発育が見られないが，糖寒天，人血液加培地よりも tomato-juice agar によく発育している点等を考え合せると，いわゆる Tomato fector を必要とするものと考えられる．このことは 21 Kk 株についてもいえる．L. acidophilus である 8 Mm 株と，L. plantarum である 6 Mm 株はいずれも産婦口腔に由来するものであるが，V・B 必要性はよく一致している．

L. leichmanii 類似のものについては2株のみであるが (表11)，9 Ms 株は要求性があまりないのに反し，15 Ms 株はかなりきびしいようである．L. delbrückii の3株は共に栄養要求性がきびしい．

L. brevis (表14) は，L. acidophilus によく似ていて，リボフラビン，葉酸，ピリドキシンはいずれも要求しない．同定し得ない11菌株については成績 (表13) がまちまちであつて，結論的なことは何も引用せない．ビオチン，$V \cdot B_1$，パントテン酸，ニコチン酸等の要求性は前述のすべての菌株と同様極めて強い．

使用培地中アミノ酸の含量はすべて共通しているが，これらの量的関係がビタミン要求性におよぼす影響，$V \cdot B_6$ としてのピリドキサミン，ピリドキサール等のピリドキシン代替作用等に関する研究は将来にまちたい．

4. 小括

以上本実験の成績を総括すると

1) 産婦の口腔，膣，及び新生児の口腔，大便の 4種来源から分離した32株の乳酸桿菌の V・B 要求性を検した．

2) 乳酸桿菌の栄養要求は菌株特異性が強かつた．

3) 一般的にいえば，ニコチン酸，パントテン酸，$V \cdot B_1$ をそれぞれ要求し，ビオチンの要求がこれに次ぐことを知つた．

4) また本実験で，4種来源分離菌株のうち，L. acidophilus と同定された母子の1組(3株)では，ビタミン要求性にかなりの類似点が見られた．

第4章　総括と結論

新生児口腔，腸管細菌群の由来については，古くから主として母子産道に由来するものといわれてきた．しかしこの間の実験的な裏付けについては研究者によつて多少の見解の相違があつた．あるものは，母体産道の細菌群が全面的に，あるいは部分的に新生児口腔に移行し，かつこれが嚥下され腸管に定着するという．しかしこれらの実験的根拠を得ることに失敗し，否定的見解を表明するものもあつた．また分娩時という重大な実験条件を無視して両者の比較検討を行つた結果，両者は明らかに無関係であるとしたものもある．私はこれらの実験的研究を仔細に検討し，先人がいずれも未だ試みていない Bergey's Manual に従つて母子4種来源一連の分離菌の分類と同定を行い類縁関係を明らかにせんとし若干の見るべき成果を得た．すなわち，4種来源乳酸桿菌は多菌種類にわたつていること，母子11組中4組に類縁関係を見出したこと等である．さらに，菌形態，集落形態，糖分解性を主とする生物学的性状，免疫学的性状の在来の業績では不充分な点を，菌の栄養要求性の検討という新らしい面から追求して，上述の類縁関係の認められたもののうち，いずれも L. acidophilus と同定された母子1組(3株)ではかなりの類似性が認められた．

また微生物によるビタミン，アミノ酸等の微量定量法として乳酸桿菌群による定量法が盛んに研究，応用されている現今，限られた少数の標準菌株の要求性に関する研究に，多数菌株による成績を提示し得た点，在来の報告に見られなかつたところである．

今回の私の研究成績からは，古来いわれて来たような産婦産道の乳酸桿菌群の新生児消化管への全面的移行を認めることは出来なかつた．しかし菌種別同定成績並びにビタミンB群要求性についての検討の結果，これらの実験的裏付けのもとに，私は母子細菌群の類縁関係は部分的なものであると結論したい．

稿を終るに当りご校閲を賜つた金沢大学医学部，谷友次教授，またご指導を賜つた米沢和一教授ならびに篠田倫三院長に対し深謝すると共に，ご協力をいただいた森山徳長・高添一郎の両氏を始め東京歯科大学微生物学教室員一同に謝意を表します．

参考文献

1) **Miller, W. D., :** Microorganisms of the human mouth (1890). 2) **Noack, F., :** Zsch. Geburtsh. u. Gyn. 72 (1912), 11. より引用. 3) **勝野邦雄 :** 慶応医学, 7, 1999, 2011(昭2). 4) **Jötten, K. W., :** Arch. Hyg. 91 (1922), 11. より引用. 5) **Witzkowski :** Zbl. f. Bakt., 133 : 5/6 (1935) ; 米沢・大藤訳：日本之歯界 188, 7 (昭10). 6) **長谷川慶藏 :** 歯科学報, 42 : 643, 742, 812, 883 ; 43 : 18 (昭11, 12). 7) **Naujoks, H., :** Zbl. bact. Orig, 86 (1921). 8) **春木保彦 :** 口腔衛生学会雑誌, 1, 85, (昭28). 9) **Salomon, R., :** Zsch. Geburtsh. u. Gyn. 85 (1922). 10) **真柄・小島・小豆畑 :** 実験医学雑誌, 16 : 183 (昭7). 11) **工藤博爾 :** 千葉医学会雑誌, 29 : 450 (昭29). 12) **Hadley :** J. Dent. Res., 13 : 415 (1933) 13) Difco Manual 9th Ed. (1953). 14) **Diamond, B. E., :** J. Dent. Res., 29 : 8 (1950). 15) **Rogosa, M., Mitchel, J. A., and Weiseman, R. F., :** J. Dent. Res., 30 : 682 (1951). 16) **Bunting, R. W., and Palmerlee, F., :** J. A. D. A., 12 : 381 (1925). 17) **Morishita, T., :** J. Bact., 18 : 186 (1929). 18) **中田尚 :** 金沢大学結核研究所年報，第8年下巻, 130 (昭25). 19) **中井武一郎 :** 歯科学報, 34 : 899 (昭4). 20) **岡本俊次郎 :** 十全会誌, 40 : 822, (1452) 21) **白土寿一他 :** 第6回日本歯科医学会総会口演, (昭30). 22) **成沢亀一郎 :** 日本産

婦人科学会雑誌，7：191（昭30). 23) **Snell, E. E., and Strong, F. M., :** Enzymologia, 6 : 186 (1939). 24) **Landy & Dickens :** J. Lab. and Clinical Med., 27 : 1086, (1942). 25) **Peterson, W. H., and Peterson, M. S., :** 医学のあゆみ，2：377 (1946)· 26) **Weisberger, D., and John, F. G., :** J. Dent. Res., 25 : 35(1946) 27) **Weisberger, D., :** J. Dent. Res. 25 : 83 (1946). 28) **Hill, T. J., and Kniesner, A. H., :** J. Dent. Res., 21 : 467 (1942).
29) **Snell, E. E., Tatum, E. L., and Peterson, W. H., :** J. Bact., 33 : 207, (1937).
30) **Dreizen, S, and Spies, T. D., :** J. Dent. Res., 32 : 65 (1953) 31) **谷友次：** 医学微生物学，第4版，南山堂，(昭30).
32) **米沢和一：** 口腔細菌学，第4版，永末書店，(昭29). 33) **米沢和一訳：** 新編臨床歯科細菌学，永末書店，(昭30). 34) **中井武一郎・米沢和一・長谷川慶藏：** 東京医事新誌，2954；2820（昭10). 35) **Pederson, C. S., :** J. Bact., 31 : 217 (1936). 36) **Snell, E. E., :** Bacterial Nutrition, 214—255, Academic Press Inc., New York 37) **Symposium on lactic acid bacteria :** Bact. Rev., 16 : 227 (1952). 38) **Rudolph M. Tomarelli, R. F., et al :** J. Biol. chem., 187, 197 (1950). 39) **Norris, R. F., et al :** J. Bact., 60, 681 (1950). 40) **György, R., et al :** Am. J. Dis. Child., 84, 484 (1952). 41) **Harrison, W., et al :** Am. J. Obst. Gynec., 65, 352 (1953).
42) **赤堀四郎・水島三一郎：** 蛋白質化学1，共立出版，(昭29). 43) **M. Stephenson** 原著，**田中正三・鈴木遠雄共訳：** 細菌の代謝，丸善（昭30). 44) **東大農学部発酵学教室：** 発酵学の進歩1，産業図書，(昭25).
45) **島薗順雄：** ビタミンB群とビタミンB_1，日本医学雑誌KK，(昭25). 46) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 6th Ed. (1948). 47) **森田秀夫：** お茶の水学会誌，1：24（昭24).