

## Lactobacillus bifidus に関する研究

## 〔Ⅲ〕 各種条件下より分離せる菌株の性状

金沢大学医学部微生物学講座(主任 西田尚紀教授)

高 村 保 徳

(昭和43年8月22日受付)

前報<sup>1)</sup>で著者は種々の培地を用いて、この中でL. bifidusの顆粒体形成能力とその生存能との関係を検査すると共に、同一環境下でできるだけ多くの菌株を用いて、菌自体の顆粒体形成能力と生存能との関係を研究した。この実験のさなか、生物学的そして形態学的に生存能力に差のある種々の菌を得る目的で色々の条件下からこの菌を分離した。

そこで種々の年齢並びに栄養法別糞便におけるL. bifidusの初回分離時の性状の差異についてまず追求し、更に菌生存能との関係について考察を加えた。併せて各年齢・栄養法別糞便内の本菌の優勢度及び分布率についても検索したので報告する。

## 実 験 方 法

I. 実験対象：昭和40年2月より4月にかけて、農協高岡病院小児科を訪れた小児のうち健康な者を対象とした。糞便の採取にあたり検査日の1週間後にいかなる疾病にも罹患していない事を条件とした。尚参考の為、体重及び身長を測定し1日の排便回数を記録した。結局採便できたのは生後7日より1年未満の乳児36例(その内天然栄養児14例、混合栄養児10例、人工栄養児12例)、1～4年の幼児15例、5～9年の児童15例、10～14年の年長児6例の計72例であった。

糞便の性状：採取した糞便につき、形、色調、臭い等の性状を調べ同時に東洋試験紙(東洋濾紙k. k.)を用いpHを測定した。

菌の分離及び同定：なるべく新鮮な糞便を直ちに培養に供した。分離培地は20%母乳寒天培地<sup>2)</sup>を使用した。糞便約1g(大豆大)を滅菌生理的食塩水で $10^{-6}$ 及び $10^{-7}$ 迄希釈し、それぞれ0.1mlづつ培地の上に落し、滅菌コンラージ棒で均等に塗布した。その後ピロガロール、炭酸ソーダ法で嫌気性とし $37^{\circ}\text{C}$ で培養した。

48時間後分離培地に発生した集落の性状及びグラム染色により菌の形態を調べ、本菌と思われるものをB培地(前報I参照)に分離した。その同定法は前法<sup>1)</sup>に由った。

糖分解反応：前報にしたがって行った。但し糖分解による型区分はDehnert<sup>3)</sup>に従い分類した。

本菌の優勢度： $10^{-7}$ 稀釈糞便液0.1ml塗布した平板培地に発生した本菌集落を算定し、0の時(-)、1～9ケの時(+), 10～99ケの時(++)、100ケ以上の時(+++)と判定した。

本菌の分布率：腸内菌数中に占める本菌の分布率を調べる為、 $10^{-6}$ 稀釈糞便液0.1mlを塗布した平板培地に発生した全集落を算定し、その中に占める本菌集落の割合いを求めた。

## 実 験 成 績

I. 年齢栄養法別の初回分離時L. bifidusの形態別分類

初回分離時には種々の菌形態が見られたが、グラム染色の所見により次の3種類に分類した。

1. 尖鋭化した菌端と淡赤色の菌体の中に1～2ヶ黒紫色の核様体を有する線細な桿菌状をとるもの(前報Iの図4参照)。

2. 菌体は一様に黒紫色に染り桿菌状又はY字状の定型的な形態をとるもの(前報Iの図2参照)。

3. 黒紫色に染り棍棒状又は球状体形成をとるもの(前報Iの図3参照)。

結果は表1の如くであった。いづれの年齢層においても定型的なBの形態をとるものが一番多かった。天然栄養児及び混合栄養児においてのみ特にAの形態を認めたが、人工栄養児及びその他の小児においては、この形態を決して認めなかった。また栄養法の何如にかかわらず乳児では全く認められなかったCの形態が

Studies on *Lactobacillus Bifidus* [Ⅲ] Properties of the Strains Isolated from Different Sources. Yasunori Takamura, Department of Bacteriology (Director; Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

1年以上の小児においてかなり認められた。

II. 年令・栄養法別の分離 *L. bifidus* 菌株の糖分解能による分類

糖分解による分類については諸家<sup>4)</sup>の成績に多少の相違が認められるが、本実験では Dehnert に従い一応5群に分類した。即ち glucose, lactose はすべての群において分解陽性, arabinose, xylose, mannose のいずれも分解しないものをI/II群, 三者の中, mannose のみ分解するものをIII群, mannose 及び xylose を分解するものをIV群, 三者いづれをも分解するものをV群とした。

結果は表2の如くであった。1年未満乳児より分離した菌株ではV群が一番多く次いでVI群, III群の順であった。分類群と栄養法との間に特に関連性は認められなかった。また、1年以上の小児では大部分がV群で示められ, III群が少数あるにすぎなかった。尚同一平板より分離した菌株はすべて同一の糖分解能を示した。

III. 初回分離 *L. bifidus* 菌株の形態と糖分解能による分類群との関係

結果は表3の如くであった。定型的なBの形態はV

群において圧倒的に多く認められた。また、Aの形態をとるものはIII群に比較的多いようであった。Cの形態をとるものは大部分V群であった。

IV. 初回分離 *L. bifidus* 菌株の形態と糞便 pH との関係。

結果は表4の如くであった。Aの形態をとるものは pH が 6.0 以下の酸性の強い糞便から分離されたものにおいて認められた。B及びCの形態と糞便 pH とは特に関係は認められなかった。

V. 年令・栄養法別の糞便内 *L. bifidus* 菌株の優劣度,

表2 年令・栄養法別の分離 *L. bifidus* の糖分解能による分類

年令・ 栄養法別	分離 菌株 数	糖分解能による分類群				
		i) I/II	ii) III	iii) IV	iv) V	
0 ~ 12 月	天然栄養	20	0	3*	5	12
	混合栄養	15	0	3	5	7
	人口栄養	12	0	2	4	6
1~4年	23	0	0	0	23	
5~9年	21	0	2	0	19	
10~14年	9	0	2	0	7	
計	100	0	12	14	74	

i) I/II: A (-) X (-) M (-)

ii) III: A (-) X (-) M (+)

iii) IV: A (-) X (+) M (+)

iv) V: A (+) X (+) M (+)

(Aは arabinose, Xは xylose, Mは mannose を示す。また (-)は分解能陰性, (+)は分解能陽性を示す。)

\* 表中数字は該当菌株数を示す。

表1 年令・栄養法別の初回分離時, *L. bifidus* の形態別分類 (20% 母乳 寒天培地37°C 48時間嫌気性培養)

年令・栄養法別	分離菌 株数	初回分離時, 菌の 形態別分類			
		A i)	B ii)	C iii)	
0 ~ 12 月	天然栄養	20	5*	15	0
	混合栄養	15	3	12	0
	人工栄養	12	0	12	0
1~4年	23	0	19	4	
5~9年	21	0	16	5	
10~14年	9	0	7	2	
計	100	8	81	11	

i) A: 尖鋭化した菌端と淡赤色の菌体の中に1~2個黒紫色の核様体を有する線細な桿菌状を示すもの。

ii) B: 菌体は一様に黒紫色に染まり, 桿菌状或いはY字状の定型的な形態を示すもの。

iii) C: 黒紫色に染まり, 棍棒状或は球状体形成を示すもの。

(以上いずれもグラム染色所見)

\* 表中数字は該当菌株数を示す。

表3 初回分離 *L. bifidus* の形態と糖分解能による分類群との関係

分類群 菌形態	I/II	III	IV	V
A	0	5*	1	2
B	0	10	9	62
C	0	1	0	10

表中 A, B, C 及び I/II, III, IV, V はそれぞれ表1及び表2の註参照。

\* 表中数字は該当菌株数を示す。

結果は表5の如くであった。天然栄養児、混合栄養児、幼児及び年長児の全例より本菌を検出したが、人工栄養児の3例からのみ検出されなかった。天然栄養児及び混合栄養児では人工栄養児・幼児及び年長児に比較し明らかに優勢度は高かった。但し中には年長児でも天然栄養児に劣らぬ優勢度を示すものが認められた。

### 考 察

*L. bifidus* は栄養法の差により初回分離時既に種

表4 初回分離 *L. bifidus* の形態と  
糞便 pH との関係

菌形態 糞便 pH	A	B	C
5.4 ~ 5.6	6*	11	0
5.8 ~ 6.0	2	21	3
6.2 ~ 6.4	0	17	3
6.6 ~ 6.8	0	28	5
7.0 ~ 7.2	0	4	0

表中 A, B, C は表1の註参照。

\* 表中数字は該当菌株数を示す。

表5 年齢・栄養法別の糞便内  
*L. bifidus* の優勢度

年 令・ 栄養法別	例 数	糞便内 <i>L. bifidus</i> 菌の優勢度				
		i) (-)	ii) (+)	iii) (++)	iv) (+++)	
0 ~ 12 月	天然栄養	14	0	1	7	6
	混合栄養	10	0	1	4	5
	人工栄養	12	3*	2	6	1
1~4年	15	0	5	9	1	
5~9年	15	0	5	6	4	
10~14年	6	0	3	2	1	
計	72	3	17	34	18	

i) *Bifidus* 菌集落0の時、

ii) (+) 同じく1~9個の時

iii) (++) 同じく10~99個の時

iv) (+++) 同じく100個以上の時

(いずれも、 $10^{-7}$  稀釈糞便液 0.1 ml 塗布した20%母乳寒天培地に 37°C 48時間培養後発生した集落数を算定)

\* 表中数字は該当菌株数を示す。

々の形態をとったが、この事は根岸<sup>5)</sup>も報告している。天然栄養児の糞便よりしばしば検出されたグラム染色で淡赤色の菌体の中に核様体だけが黒紫色に染り菌端が尖鋭になった線細な桿菌様の菌株は、分離の際いち早く死滅するものが多く、このような形態は生存力のあまり強くないものと思われた。しかし、これらの菌株でも *brain heart infusion* 軟寒天培地に継代し長く保存し得たものでは、次第に定型的な菌形をとるようになりついに棍棒状或は球状を示すものも出現した。この club-shape 或は「oval granule」は幼児以上の者において初回分離時既に認められた。著者は前報IIにおいて耐久型顆粒としての「oval granule」が vegetative phase の顆粒部と異なる特異な細胞化学的体制を有する事を報告したが、以上の形態変化について見ても、環境の変化に伴い自らの生存を保持する為最もふさわしい形態として「oval granule」をとるのではないかと考えられた。

また、これと関連して、培養の過程で「oval granule」をとり易く、arabinose, xylose, mannose の三者いづれも分解する Dehnert 分類のV群に属する菌株は、その他の群に属する菌株に比較し生存力はかなり強いようであった。一般に糖分解能の差により菌株の生存能もそれぞれ相違があるように思われた。かって Weiss ら<sup>6)</sup>は天然栄養児由来のものは分岐が少なく継代により microaerophilic になり、arabinose, xylose, melezitose のいづれをも分解しないが、成人由来のものは継代により嫌気性を厳守し分岐性を失わず、前記糖のいづれをも分解すると報告した。また、Sundmann<sup>7)</sup>は各発育因子の basic demands と糖分解能により分類し、各型により特徴のある菌形態を指摘したが、その中で Type B<sub>1</sub> は Dehnerte 分類のV群に相当するが、これに属する菌の形態は even, stout rods (「oval granule」によく似ている) であると報告した。

さて本研究において *L. bifidus* の検出に先立ち対象小児の発育状態を検査したが、栄養状態良好で標準体重より大きな者は、その糞便内本菌優勢度もすぐれていた。しかし標準体重に達しない者でも栄養状態が良ければ優勢度も良好であった。従って本菌優勢度は体格の大小より現在の健康状態により左右されるものと思われた。

尚本実験では菌優勢度と糞便の pH とは特に関係は認められず、岡平<sup>8)</sup>の報告と同様であった。

所で著者は生後7日目の新生児糞便より既に多数の *L. bifidus* を検出したが、完全な bifidus flora に移行するのは少し遅れるようである。本間ら<sup>9)</sup>によ

れば天然栄養児では生後 8 週目頃であり、人工栄養児ではそれより 1 カ月程遅れると報告している。また、糞便菌叢内に占める本菌の分布率について、かつて諸橋<sup>10)</sup>は天然栄養児で 86.2%，人工栄養児で 23.7%と報告したが、著者の成績とは前者では大体一致し、後者では著者の方が高い値を示した。これは使用培地や実験方法並びに対象乳児群の相違にもよるものと考えられた。また、乳幼児及び年長児においても本菌の分布率は高い値を示したが、この事はこれら小児の腸管内においても乳児と同様非常に多数の *L. bifidus* が生息しているものと思われた。成人に関しては最近の Haenel ら<sup>11)</sup>の研究は非常に興味深い。即ち検出培地にトマトーソルビン酸寒天培地を使用している事にやや難はあるが、健康な成人の腸管内細菌叢は *L. bifidus* が大腸菌、腸球菌その他の菌に比べ、はるかに優位であったと報告している。従来、天然栄養児を除き正常腸内細菌叢は大腸菌や腸球菌が優位であるといわれてきたのであるが、今後新しい観点より再検討されるべき必要があるように思われる。

### 結 論

1. *L. bifidus* は初回分離時、年令及び栄養法の差異により種々の形態を示した。特に天然栄養児では人工栄養児及びその他の小児においては決して認められない形を認めた。この菌株は生存力が弱く切れ易いが軟寒天培地に穿刺培養し継代すると、グラム染色で様に染る定型的な *L. bifidus* 形態を示すようになり、更に棍棒状や球状体形成を示すものが出現した。これに反し幼児及び年長児では初回分離時すでに棍棒

状や球状を示すものがかなり認められた。

2. 乳児糞便内の *L. bifidus* 検索で、天然栄養児は人工栄養児に比較し明らかに優勢であった。また、幼児及び年長児糞便の検索でもその他の菌に比べ本菌ははるかに優勢であった。この事は正常腸内細菌叢の分布に関する従来の概念が再検討される必要があると考えられた。

終りに御指導と御校閲いただきました西田尚紀教授に衷心より御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 高村保徳：十全医誌，印刷中。 2)
- 門平 浩：日小会誌，66，284 (1963)。 3)
- Dehnert, J. : Zbl. Bkt., Abt. I, Orig., 169, 66 (1957)。 4) 本間 道・門平 浩・磯田 精康：日医新報，No. 2014, 10 (1962)。 5)
- 根岸 章：小児科臨床，16, 141 (1963)。
- 6) Weiss, J. E. & Rettger, L. F. : J. Infect. Dis., 62, 115 (1938)。 7) Sundmann, V., Björkstén, K. & Gyllenberg, H. G. : J. gen. Microbiol., 21, 371 (1959)。 8)
- 門平 浩：小児科診療，24, 1076 (1961)。
- 9) 本間 道・吉原照次・門平 浩・磯田精康：小児科臨床，16, 141 (1963)。 10)
- 諸橋健雄：日小会誌，57, 748 (1953)。
- 11) Haenel, H., Köhler, F., Mertsch, H. & Pardemann, Ch. : Zbl. Bkt., 177, 41 (1960)。

### Abstract

1. *Lactobacillus bifidus* strains of different morphological characters were observed immediately after they were isolated. Feces samples of infants fed with mother milk contained the organisms exhibiting an aberrant form. Those of the infants fed with powdered milk did not contain this form. The strains of the aberrant morphological character could not survive long, and, during serial subcultures, substrains with oval granules (or club-shape) appeared. The older the age of children, the more were the club-shaped *Lactobacillus bifidus* strains recovered therefrom.

2. *Lactobacillus bifidus* inhabits the intestines of the infants fed with mother milk definitely more than in those of the infants fed with powdered milk.

It should be remembered, however, that *L. bifidus* was one of the most predominant members in the intestines of childrens at much older ages as well.