

酪酸菌 (*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588株)

による腸管病原菌抑制作用

¹⁾ 琉球大学医学部細菌学教室²⁾ 琉球大学医学部地域医療研究センター黒岩 豊秋¹⁾ 小張 一峰²⁾ 岩永 正明¹⁾²⁾

(平成1年6月26日受付)

(平成1年7月28日受理)

Key words : *Clostridium butyricum*, Biological therapy,
Enteric infection

要 旨

生菌性整腸剤の効果に対する作用機序解明並びに実験的評価を目的として、各種腸管病原菌と酪酸菌 MIYAIRI 588株を混合培養し、経時的に菌数の増減を測定した。腸管病原菌はいずれも患者由来株を使用し、37℃嫌気培養を行った。

混合培養において酪酸菌は、コレラ菌・ナグビブリオ・アエロモナス・赤痢菌の発育を強く抑制した。酪酸菌は主として消化管下部において発芽増殖するので赤痢菌との関連を更に追求し、次のような結果を得た。①赤痢菌を BHI broth で嫌気培養すると培養終了時に培地の pH は5.2程度まで下がったが、菌は順調に発育した。②酪酸菌と混合培養すると pH は5.6程度で留まったが、赤痢菌の発育は強く抑制された。③酪酸菌24時間培養液は pH 5.5前後であり、この上清中で赤痢菌は全く増殖できなかった。④この上清を NaOH で pH 7.2に調製すると赤痢菌は新鮮培地におけると同様に増殖した。⑤培養中の pH を6.0以上に維持させるため緩衝液を加えた BHI broth でも混合培養によって赤痢菌の増殖は抑制された。この様な結果から、酪酸菌による赤痢菌の発育抑制は、培地の pH、代謝産物など単一の要因によるものではなく、その両者及び酪酸菌そのものの存在が作用しあっているものと考えられた。

はじめに

消化管内には極めて多種多様の微生物が棲息しており、微生物間の相互作用及び宿主の生理の影響を受けながら一定のバランスを維持し、いわゆる腸内細菌叢を形成している。これら腸内細菌叢は、同一個人で一定のパターンを有しており、健康である場合にはそのパターンはかなり安定しており、バランスがくずれることはあまりないといわれている¹⁾。腸内細菌叢はこの安定性のために、外部からある種の病原菌が侵入してきても排除さ

れるという、生物学的バリアーの一面を有し、腸管感染症に対する生体防御機構の一つとして重要な役割を担っていると考えられている²⁾。

一方、腸内細菌叢を変動させる要因としては、食物、薬物(抗菌の化学療法剤、抗癌剤など)、病原微生物、気候、宿主の生理(消化管内の pH、還元電位、腸蠕動、酵素、胆汁、粘液、抗体など)、疾病などが挙げられている¹⁾²⁾。この様に、消化管内には極めて多数の因子が混在しており、その環境の中で宿主寄生体関係が成立しているものと思われる。

また、各種下痢疾患時には腸内細菌叢の著しい変動が起こることがわかっているが³⁾⁴⁾、腸管感染

別刷請求先：(〒903-01) 沖縄県中頭郡西原町字上原
207 琉球大学医学部細菌学教室

黒岩 豊秋

症と腸内細菌叢との関連性については未だ不明の点が多い。

酪酸菌 MIYAIRI 株は、1935年宮入⁵⁾により人の糞便から分離された偏性嫌気性有芽胞酪酸菌であり、胃液に対する安定性⁶⁾⁷⁾、腸内での増殖性⁸⁾、種々の病原菌に対する抗菌作用⁹⁾、腸内細菌叢の正常化作用¹⁰⁾、安全性¹¹⁾などから生菌性整腸剤として、臨床的に広く使用されている¹⁰⁾¹²⁾。この酪酸菌を含め生菌性整腸剤の作用機序として、その代謝産物である各種脂肪酸の病原菌に対する抗菌作用、腸内細菌叢の正常化作用などが報告されているが⁹⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁴⁾、消化管内の多数の因子の混在などと考え合わせても、生菌性整腸剤の効果・作用を単一の要因に限定してすべてを説明することは困難であると思われる。

今回、我々は各種腸管病原菌と酪酸菌MIYAIRI 588株¹⁵⁾を混合培養し、その抑制作用について検討した。

材料と方法

使用菌株：*Escherichia coli* LE62 (non-Pathogenic), *E. coli* F10(enterotoxigenic), *E. coli* KNH32 (enteropathogenic: serotype O143:K×1), *Klebsiella pneumoniae* K474, *K. oxytoca* LK70, *Salmonella typhimurium* 5, *Shigella flexneri* 1b KNH77, *S. flexneri* 2a KNH101, *Vibrio cholerae* O1 BT22 (El Tor・Ogawa), *V. cholerae* non-O1 S7, *Aeromonas hydrophila* Ae5, *A. hydrophila* Ae3, 以上7種12株(いずれも下痢便から分離)、およびミヤリサン株式会社から分与された *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (以後酪酸菌 M588とする)を使用した。

培地と培養法：培地は GAM broth (日水製薬) および Brain heart infusion broth (Difco) を使用した。培養は37°C、嫌気条件下で行い、嫌気性装置として嫌気性グローブボックス (株式会社ヒラサワ ANX-1) と混合ガス (N₂:H₂:CO₂=80:10:10) を使用した。

培地50mlを三角コルペンに分注しオートクレーブにて滅菌後、培地中の嫌気度を一定に保つためグローブボックス中に12時間以上おいてから

菌を接種した。

酪酸菌 M588は GAM 寒天平板、他の菌は好気的に普通寒天平板でコロニーを開き、そのコロニーを GAM broth または BHI broth で前培養した。この菌をそれぞれ最終菌量が10³~10⁴/mlとなるように50mlの新鮮培地へ接種し、経時的に各々の生菌数を測定した。その他菌の増殖に対する pH と酪酸菌代謝産物の影響を調べるため、20 mM に磷酸緩衝液を加えた BHI broth 及び酪酸菌 M588の培養上清(無菌)を用いて菌の増殖を検討した。

増殖曲線と培養液の pH: 菌接種後、0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24時間目に培養液から0.5mlをサンプリングし、生菌数と pH を測定した。生菌数の測定には常法どおり10倍段階希釈による colony forming unit (CFU) として算定し供試菌の増殖曲線を作成した。酪酸菌 M588のコロニーカウントは GAM 寒天 (日水製薬) 平板で行い、他の菌については普通寒天 (栄研化学) 平板で好気条件下の培養を行った。培養液の pH は微小ガラス電極を使用した pH メーターで測定した。以上の実験操作において、酪酸菌 M588以外の菌数測定及び pH の測定は好気条件下で作業を行ったが、他の作業は全て嫌気条件下にて行った。

酪酸菌 M588の培養上清: M588株を BHI broth にて24時間嫌気培養し、その培養液を10,000rpm, 20分間遠心後、上清をミリポアフィルターで濾過し、無菌であることを確認した。

結果

E. coli, *Klebsiella*, *Salmonella*: これらの菌を酪酸菌 M588と混合培養すると、単独培養に比べて8時間目以後の菌数がやや低めに抑えられたが、酪酸菌 M588は単独・混合両培養において殆ど同一の増殖曲線を描いた。*E. coli* LE62の結果を Fig. 1 に示した。

Vibrio・*Aeromonas*: *Vibrio* ではコレラ菌及びナグビブリオ、また *Aeromonas* は *A. hydrophila* 2株の計4株を検査した。酪酸菌 M588と混合培養により、この4株はいずれも対数増殖期の中間で発育が抑制されその後急速に生菌数は減少した。*V. cholerae* は単独培養の場合12時間まで増殖を

Fig. 1 Growth curve in mixed culture (*E. coli* and *C. butyricum* M588). A: *E. coli* LE62, B: *C. butyricum* M588. Media: GAM broth. —: Control (single culture), ---: Mixed culture.

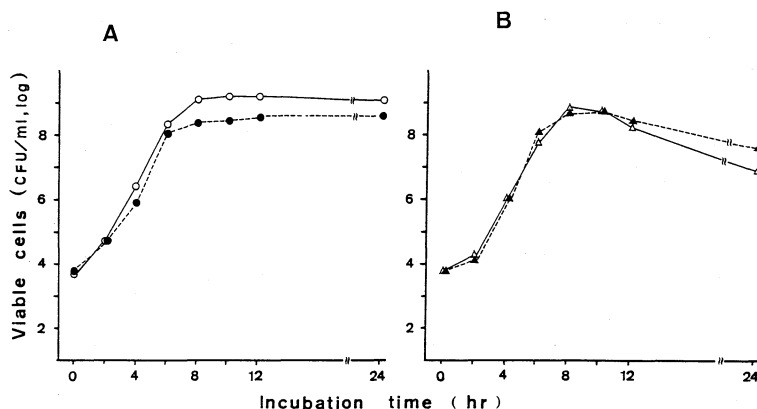
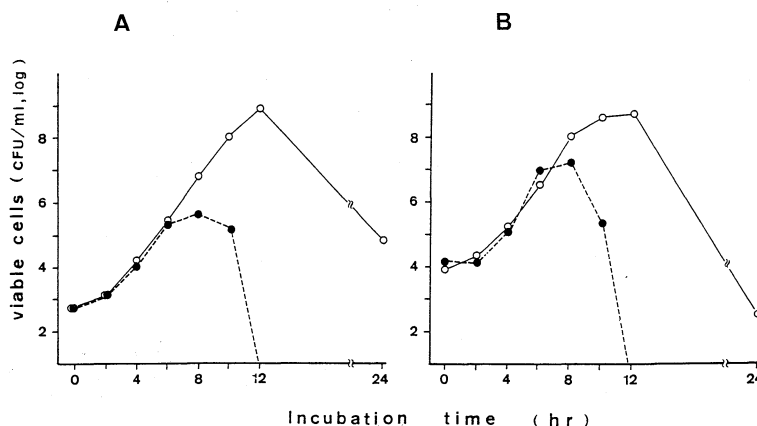


Fig. 2 Growth curve in mixed culture (*V. cholerae* O1 or *V. cholerae* non-O1 with *C. butyricum* M588). A: *V. cholerae* O1 BT22, B: *V. cholerae* non-O1 S7. Media: GAM broth. —: Control (single culture), ---: Mixed culture.



続け菌数は $10^8 \sim 10^9$ /mlに達したが、混合培養の場合12時間目で *V. cholerae* の生菌は検出されなくなっていた (Fig. 2). *Aeromonas* の2株もだいたい同様の傾向を示したが、生菌の消失は *V. cholerae* よりもやや遅れていた (Fig. 3). 酪酸菌 M588は単独・混合培養法において増殖曲線に差はみられなかった。

Shigella flexneri: 血清型1b及び2aの2株を用い、両株とも酪酸菌 M588との混合培養により6~8時間以後の増殖は完全に抑えられたが菌数はほぼ一定に保たれていた (Fig. 4). 培養時間の経

過と共に培養液の pH は低下したが、単独培養で赤痢菌はビブリオ科の4株と異なり、24時間目までゆっくりと増殖し続けた。Fig. 4に示した赤痢菌 (*S. flexneri* 1b, 2a) の場合、単独培養で24時間目における培養液の pH は5.2まで低下していたが菌数は減少しなかった。混合培養で赤痢菌の増殖は抑えられたが、その pH は単独培養の時より高い5.6であった。酪酸菌 M588の増殖曲線は、赤痢菌との混合培養でも影響を受けなかった。

赤痢菌に対する増殖抑制因子の検討: Fig. 4に示した結果から、赤痢菌の増殖抑制に対する

Fig. 3 Growth curve in mixed culture (*A. hydrophila* and *C. butyricum* M588). A: *A. hydrophila* Ae3, B: *A. hydrophila* Ae5. Media: GAM broth. —: Control (single culture), ---: Mixed culture.

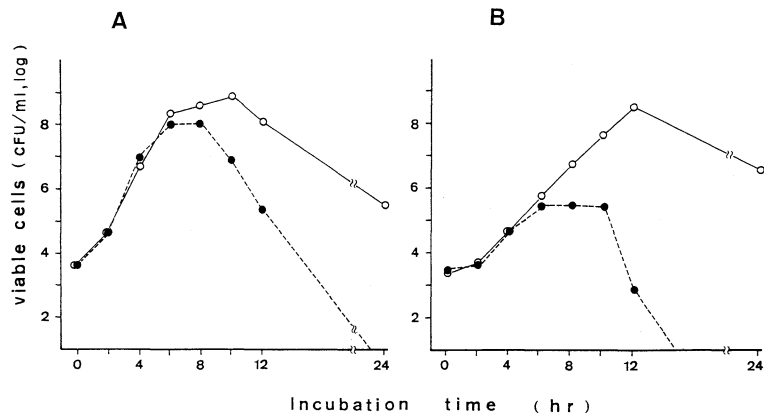
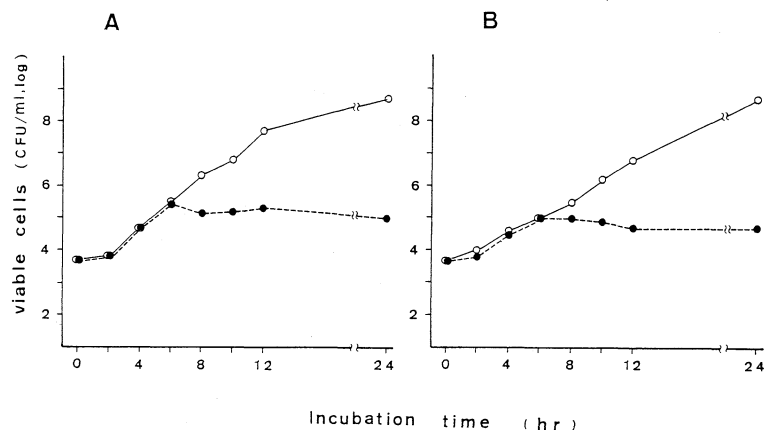


Fig. 4 Growth curve in mixed culture (*S. flexneri* and *C. butyricum* M588). A: *S. flexneri* 1b, B: *S. flexneri* 2a. Media: BHI broth. —: control (single culture), ---: mixed culture.



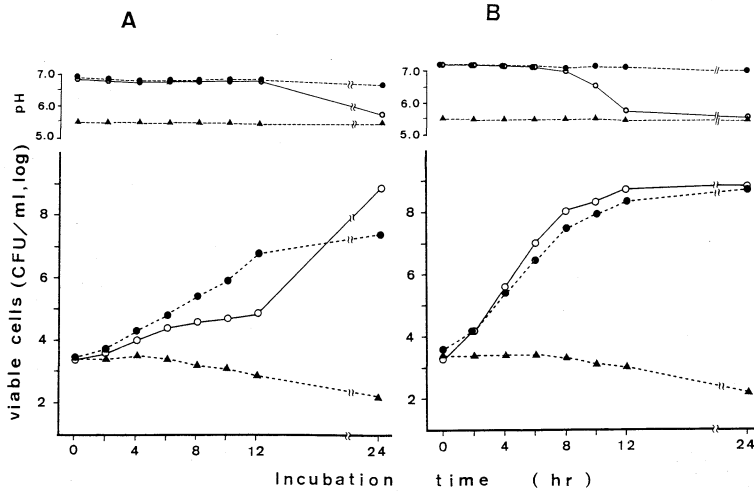
pHの影響は少ないように思われたが、確認のため、①緩衝液によって培養中のpHを安定化させた培地および、②酪酸菌M588の培養無菌上清における赤痢菌の増殖について検討した。

まず20mM 磷酸緩衝液 (pH 7.2) を含む BHI broth で赤痢菌と酪酸菌 M588 を混合培養すると培地の pH は最後まで6.0以上に保たれたが、赤痢菌の増殖は Fig. 4 に示したものと同様に抑制された。一方赤痢菌の単独培養では、緩衝液を加えた培地を使用したにも拘らず最終 pH は5.6まで低下し、しかも菌の増殖を妨げなかった。酪酸菌

M588の増殖にも変化はみられなかった。

次に各種脂肪酸などの酪酸菌代謝産物による影響をみるため、酪酸菌 M588 の培養上清 (無菌) 中で赤痢菌を培養した (Fig. 5)。これは赤痢菌単独培養であるため、大気中および嫌気ボックスの両条件下で培養を行ったが、この上清中で赤痢菌は全く増殖せず、徐々に死滅する傾向を示した。この上清の pH は5.5であったので10%NaOH (2.5-N) により pH を7.2に調製したものに赤痢菌を接種したところ、赤痢菌は勢いよく増殖した。即ちここでは混合培養の結果に反して pH の影響

Fig. 5 Growth curve of *S. flexneri* 2a in culture supernatant of *C. butyricum* M588. A: In anaerobic condition, B: In aerobic condition. ▲---▲: Cell free culture supernatant of *C. butyricum* M588 (The organisms were cultured in BHI broth at 37°C for 24hr), ●---●: The supernatant adjusted pH at 7.2, ○---○: Fresh BHI broth (control).



が著明に現れた。

ビブリオ科の菌に対する増殖抑制因子：ビブリオ科の菌に対する増殖抑制因子を検討するため赤痢菌の場合と同じ方法を用いた。

酪酸菌培養上清中におけるビブリオ科菌の増殖は赤痢菌の増殖とほとんど同じパターンを示したが、燐酸緩衝液で pH を安定化した培地における混合培養では増殖抑制がやや弱く、増殖に及ぼす pH の影響が赤痢菌よりも強く現れた。

考 察

今回行った酪酸菌 M588 と種々細菌 (7 種 12 株) の混合培養において、ビブリオ、アエロモナス、赤痢菌などの腸管病原菌 (3 種 6 株) は、その増殖が強く抑制された。酪酸菌 M588 の増殖は混合培養の全例において全く影響を受けず、単独培養の時と同じ増殖曲線を形成した。

ビブリオ及びアエロモナスは小腸で増殖し、そこで病変を起こすので、腸管内において酪酸菌がこれらの病原菌を抑制するためには、酪酸菌芽胞 (製剤) が小腸において発芽増殖する必要があると思われる。この点は、特にヒトの小腸内における酪酸菌 M588 の動態について、未解決の問題が多

い。ビブリオ及びアエロモナスの増殖抑制は pH の低下によるところが大であったことから考えると、腸管内の pH が 6.0 以下に下り得るかという問題も検討しなければならない。

酪酸菌製剤服用後、糞便中に現れる酪酸菌 M588 は 50% 以上が栄養型であることから、少なくともその菌が大腸では発芽増殖するはずである (未発表データ)。赤痢菌は大腸に病変を起こすので、今回の実験結果は生体内における抑制効果のメカニズムを何らかの形で表現しているかも知れない。酪酸菌 M588 との混合培養において赤痢菌の発育が抑制されたとき、培養液の pH は最終的に 5.0 前後まで低下していたが、燐酸緩衝液によって培地の pH を 6.0 以上に安定させても赤痢菌の発育は同様に抑制された。従って赤痢菌の発育抑制に対する pH の影響は少ないように思われた。このことは赤痢菌を BHI broth で単独培養したとき pH の著しい低下がみられるにもかかわらず赤痢菌の発育が順調であることによっても支持されるものである。従って赤痢菌の増殖を抑制しているものは酪酸菌 M588 の代謝産物ではないかと考えられた。酪酸菌 M588 の 24 時間培養液から菌

体と芽胞を除いた上清中に赤痢菌を接種しても全く増殖しなかったため、代謝産物による赤痢菌の増殖抑制というメカニズムは確かにあり得ることである。しかし、その上清のpHを7.0前後に上げてやると赤痢菌は勢いよく増殖した。従ってここではpHが重大な影響を及ぼしていたことになる。pHを上げても酪酸菌M588が存在すると赤痢菌の発育は抑制されたわけだから、その抑制には酪酸菌そのものが必要であるともいえる。以上の結果から考えると、この混合培養における赤痢菌の抑制はpHの低下あるいは酪酸菌の代謝産物例えば酪酸、酢酸などといった単因子によるものではなく、酪酸菌々体そのものを含めた多くの因子が作用しているものと思われる。

酪酸菌MIYAIRI株と赤痢菌との関係について、小張ら¹⁶⁾、および宮入¹⁷⁾は、*in vitro*においてフレキシネル型及びソッネ型赤痢菌と酪酸菌の混合培養を行い、酪酸菌が十分に増殖しているときは、赤痢菌に対して発育阻止作用を示すことを報告している。また、前田ら¹⁸⁾は、フレキシネル赤痢菌の抗生物質多剤耐性株を使用して酪酸菌との混合培養を行い、酪酸菌を1,000倍菌量添加したときに、赤痢菌の発育抑制が認められ、酪酸菌の主要代謝産物である酪酸に、その作用の要因があることを示唆している。

今回、我々は嫌気性環境下で赤痢菌と酪酸菌の混合培養を行ったが、両菌とも $10^3 \sim 10^4$ CFU/mlという少ない菌量をそれぞれ同量に接種したときにおいても赤痢菌の発育抑制が観察された。

近年、感染症に対する抗生物質・抗菌物質の使用頻度は極めて高く、その治療効果もまた著明なものがある。一方、これらの化学療法剤使用による耐性菌の出現、それに伴う治療効果の減弱、antibiotic-induced enterocolitis (抗生物質関連性腸炎)の出現、opportunistic infection (日和見感染)¹⁹⁾、肝・腎障害なども増加の傾向にあるものと思われる。

生菌性整腸剤は古くから医薬品として、また家庭の常備薬として一般に親しまれていることからみても、何らかの効果を有することは確かであると思われる。その効果を証明する詳細な治験報告

は数少ないが、最近倉田らは抗生剤投与に続く小児下痢の防止効果について報告し¹⁰⁾、また我々は海外旅行者に酪酸菌製剤を旅行期間中服用させることによって下痢の発症頻度が低くなるという知見を得ているが生体内におけるその効果のメカニズムを明らかにすることは容易なことではない。

今日抗生剤使用の弊害は医療上のみならず畜産業界においても強く認識されている。感染症の治療と予防に対して自然界の生態系に影響を及ぼすことの少ない生物学的対処法が今こそ見直されるべき時期であると思われる。

本論文の要旨は、第63回日本感染症学会総会(平成元年4月)において発表した。

文 献

- 1) 光岡知足：腸内菌の世界。p. 13—41, 叢文社, 東京, 1980.
- 2) 田爪正気, 小沢 敦, 佐々木正五：常在菌とそのバランス機能。日本臨床, 39: 2252—2259, 1981.
- 3) 中谷林太郎, 福田一男, 千田俊雄, 岡村 登, 大草敏史：ヒトの下痢症と腸内フローラ。腸内フローラと感染症(光岡知足編), p. 13—42, 学会出版センター, 東京, 1986.
- 4) 坂崎利一：下痢—腸炎と腸内菌叢。最新医学, 33: 2030—2033, 1978.
- 5) 宮入近治：糞便より分離せる一新芽胞菌の性状に就いて。千葉医会誌, 13: 2311—2315, 1935.
- 6) 永瀬一郎：医薬品に供せられる *Clostridium butyricum* と *Lactobacillus bifidus* の胃酸抵抗性に関する研究。薬剤学, 28: 331—332, 1968.
- 7) 下山 孝, 里見匡迪, 大野忠嗣, 檜林 尚, 西上隆之, 西村正二, 谷田憲俊, 堀 信治, 筋師 満, 池村辰夫, 黒岩豊秋, 西山洋周：腸管腔内相の変化。総合臨床, 26: 1051—1066, 1977.
- 8) 小林章男, 有田正明, 天野喜美子, 山口 豊：*Clostridium butyricum*, Miyairi 株経口投与による腸内細菌叢の変化。千葉医会誌, 52: 121—125, 1976.
- 9) 坂本一夫：乳児下痢症に対する酪酸菌製剤の応用。千葉医会誌, 25: 33, 1950.
- 10) 倉田 晋, 滝 芳樹, 井上賢治, 宮川恭一：抗生物質投与時の下痢に対する活性酪酸菌製剤(ミヤBM)の予防効果。小児科臨床, 41: 2409—2414, 1988.
- 11) 湯沢隆義, 小林厚子, 井上博之, 榎本 眞：宮入菌(*Clostridium butyricum* Miyairi)末のラットにおける12カ月慢性毒性試験。応用薬理, 33: 683—694, 1987.
- 12) 武田英二, 阿達恒一, 山下和子, 田中 弘, 水井

- 三雄, 宇山祐子, 林 弘治, 元木碎香, 井上 清, 伊勢和子, 加藤雅子, 乙成孝俊: 酪酸菌製剤 (ミヤ BM) の使用経験. 新薬と臨床, 25: 1505-1509, 1976.
- 13) 田中隆一郎, 渡辺幸一, 高山博夫, 矢島昌子, 関口幸子, 新井静子, 桜井稔三, 務台方彦, 堀田昌宏, 山下直哉, 老川忠雄: 抗生物質投与に伴う小児難治下痢症に対するビフィズス菌製剤の投与効果. 腸内フローラと感染症 (光岡知足 編), p. 43-64, 学会出版センター, 東京, 1986.
- 14) 中村 肇, 松尾雅文, 村上龍助, 松尾 保, 公文康, 山下昌之, 羽田野守: セファレキシン投与時の糞便菌叢の正常維持ならびに改善に及ぼすビオフィェルミン R の併用効果. 小児科臨床, 37: 2181-2188, 1984.
- 15) Ikeda, T., Benno, Y., Fujisawa, T. & Mitsuoka, T.: Phenotypic characteristics in distinguishing *Clostridium butyricum* from *Clostridium beijerinckii*. Bifidobacteria Microflora, 7: 57-60, 1988.
- 16) 小張一峰, 川上 稔: 宮入菌並びに乳化キノホルムの赤痢菌に対する抗菌試験成績. 新薬と臨床, 11: 175-176, 1962.
- 17) 宮入 慧: 宮入菌の赤痢菌に対する抗菌試験. 新薬と臨床, 11: 177-178, 1962.
- 18) 前田暁男, 田口信洋, 音在清高, 三上 襄, 新井正: 酪酸菌 Res 1 株の食中毒原因菌, 多剤耐性赤痢菌との相互作用. 日細菌誌, 42: 318, 1987.
- 19) 小澤 敦: 日和見感染症をめぐって. 日細菌誌, 37: 739-756, 1982.

Inhibition of Enteropathogens by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588

Toyoaki KUROIWA¹⁾, Kazumine KOBARI²⁾ & Masaaki IWANAGA^{1,2)}

Department of Bacteriology¹⁾ and Research Institute of Comprehensive Medicine²⁾,
University of the Ryukyus School of Medicine

The inhibitory effect of *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 against various enteropathogens was investigated in mixed cultures. It was observed that *C. butyricum* M588 inhibited the growth of *Vibrio cholerae* O1, *V. cholerae* non-O1, *Aeromonas hydrophila*, and *Shigella flexneri*. Considering that the interaction between *C. butyricum* and *Shigella* is especially important because of their proliferation site in the lower intestine, further examinations were carried out on *Shigella* in particular. Results were as follows:

- 1) In BHI broth culture of *Shigella*, the pH of culture fluid went down to 5.2, but the growth of *Shigella* was not inhibited.
- 2) In the mixed culture of *Shigella* and *C. butyricum*, the growth of *Shigella* was inhibited, nevertheless the pH of the culture fluid was 5.6.
- 3) In the mixed culture with phosphate buffered BHI maintaining the pH higher than 6.0, the growth of *Shigella* was inhibited.
- 4) In case of pure culture of *C. butyricum* in BHI broth, the pH of culture fluid indicated 5.5, and *Shigella* failed to grow in the cell free culture supernatant.
- 5) The growth of *Shigella* was not inhibited in the culture supernatant when the pH was adjusted at 7.2.

These results suggested that the inhibition of *Shigella* in the mixed culture with *C. butyricum* was not due to a single factor such as pH or fatty acid etc. but due to multifactors including live cells of *C. butyricum*.