

極小未熟児における腸内フローラの形成：成熟新生児との比較

旭川医科大学小児科学教室

吉岡 一, 藤田 晃三
坂田 宏, 梯 仁志

研究目的

前年度は成熟児の腸内細菌叢の形成が、母乳と人工栄養児で相違のあることを報告した。今年度は搾母乳で育てられた極小未熟児の腸内細菌叢の形成過程を母乳栄養の成熟新生児のそれと比較検討した。

対象

対象は、旭川医科大学産科で出生し、小児科に入院した体重1,500g未満の未熟児7名でその概要を表1に示した。これらの児は、すべて経管によって、 -70°C に保存され投与直前に解凍された搾母乳が与えられ、その量が十分な量となるまで経静脈的補液が行われた。栄養は3時間毎に1~2mlの投与から開始され、4~6週かけて体重(kg)当り150~200ml/dayに増量した。

2例は臨床的に抗生物質投与が必要と考えられ、抗生物質が投与された日以後は検索から除外した。検体を採取した最終日である生後49日目の体重は、平均 $1,308 \pm 338$ gであった。

コントロールとしたのは、すべて母乳で哺育された経膈分娩成熟児6名で、当院産科で出生した。生下時体重は2,760~3,450gで平均3,071gである。

方法

糞便内フローラの検索は光岡の方法¹⁾に従って行い、使用した培地、培養方法、および、培養時間を表2に示した。

糞便は、成熟児では生後7日目まで、未熟児では生後49日目まで連日採取した。採取した便はただちに炭酸ガスで置換された輸送培地に入れ、 4°C に保存し、4時間以内に培養操作を開始した。約1gの便を秤量したあと攪拌して均一化し、炭酸ガスで置換した状態で 10^{-8} まで10段階稀

釈した。稀釈系列から0.05mlずつと平板寒天上に塗り拡げて培養し、生育したcolony数を数え糞便1g中の菌数を算定した。この方法で数え得た最低の菌数は糞便1g当り 10^2 個である。

結果

コントロールとした母乳栄養成熟新生児における各菌群の菌数を、糞便1g中の菌数の常用対数値として表3と図1に示した。最初1日目から優位な菌数として出現するのは、腸内グラム陰性桿菌と連鎖球菌群である。すべての児で、腸内グラム陰性桿菌群の主な菌は大腸菌であり、その菌数は生後2日目で $\log 9.9 \pm 0.4/g$ と最高となり、その後漸減して生後7日目には $\log 7.5 \pm 0.5/g$ であった。連鎖球菌群の動きは腸内グラム陰性桿菌群の菌数の動きと平行し、約10分の1の菌数で推移した。ビフィズス菌は生後2~3日目になって全例に出現し、その菌数は急激に増加、生後4日目には最優勢菌となった。ビフィズス菌の菌数はその後は $\log 10/g$ あるいはそれ以上の菌数となり、生後7日目には腸内グラム陰性桿菌群の約1,000倍の菌数であった。パクロイデス、クロストリディウム、乳酸菌は検出率も低く、菌数も少なかった。

極小未熟児の腸内フローラの動きを表4と図2に示した。成熟児と同様に最初に定着するのは腸内グラム陰性桿菌と連鎖球菌群であり、腸内グラム陰性桿菌群で主要な菌は4例で大腸菌、2例でクレブシエラ、1例はプロテウスであった。腸内グラム陰性桿菌と連鎖球菌群の菌数は生後49日目までほぼ同じ菌数で、それぞれ、 $\log 9.4 \sim 9.8/g$ と $\log 8.4 \sim 9.3/g$ であった。未熟児で最初にビフィズス菌が出現したのは生後8日目に7例中3例に、7例全例には生後14日目に出現し、ビフィズス菌の出現日は平均 10.5 ± 2.7 日目

であった。ビフィズス菌は生後12~35日目(平均 19.8 ± 8.9 日目)に腸内フローラの最優勢菌となったが、生後49日目でもビフィズス菌と腸内グラム陰性桿菌の菌数の比は10:1であった。経陰分娩児と帝切分娩児のビフィズス菌の出現日は、それぞれ平均、 10.7 ± 3.1 と 10.5 ± 2.9 日目で差を認めなかった。未熟児に与えられた搾母乳の量は、ビフィズス菌の出現した日で59~125(平均 69 ± 29) ml/kg/day、ビフィズス菌が最優勢菌となった日で84~140(平均 118 ± 23) ml/kg/dayであった。

未熟児ではブドウ球菌が生後まもなくから分離され、菌数も約 $\log 7/g$ と成熟児より多かった。バクテロイデス、クロストリディウム、乳酸菌の出現も未熟児では生後10日目以後であり、成熟児より遅れていた。

考 按

未熟児ではビフィズス菌の出現が遅れることは、Feldheimら²⁾やStarkら³⁾によって報告されているが、私たちの1,500g以下の未熟児の成績はそれを顕著に示しており、新生児とくに未熟児には大腸菌や連鎖球菌の感染症が多いことをうらづけるものである。

母乳は腸管内でのビフィズス菌の発育を促進することが知られているが^{4, 5)}、未熟児でビフィズス菌の出現が大幅に遅れる原因の1つはミルクの摂取量に関係があるものと考えられる。正常成熟新生児の母乳摂取量はおよそ 150 ml/kg/day と計算されるのに反し、極小未熟児ではビフィズス菌の出現時で平均 $69 \pm 29 \text{ ml/kg/day}$ 、ビフィズス菌が最優勢菌となった時点でも平均 $118 \pm 23 \text{ ml/kg/day}$ であった。しかし、極小未熟児では急速にミルクの投与量を増加することには耐えることはできず、ビフィズス菌の出現とビフィズスフローラの確立の遅れは必然的なものと考えられる。

Van der Waaijら⁶⁾は、嫌気性菌優位の腸内フローラが病原菌の定着と増殖を抑制する“colonization resistance”という概念を提唱している。私たちの成績は未熟児においてcolonization resistanceの低いことを示しており、成熟児に比較してより感染を受け易い

状態が長期に渡ることを示すものである。

結 論

1. 搾母乳で育てられた極小未熟児の腸内フローラの形成過程を母乳栄養成熟新生児のそれと比較検討した。
2. 成熟児と同様に、最初に定着するのは腸内グラム陰性桿菌と連鎖球菌群である。しかし、成熟児と異なり未熟児では腸内グラム陰性桿菌群の菌数が糞便1g中 10^9 前後で生後7週目まで持続する。また、連鎖球菌群も約10分の1の菌数で持続する。
3. 未熟児ではビフィズス菌優位のフローラの確立は遅れ、ビフィズス菌が出現するのは平均 10.6 ± 2.7 日目、最優勢菌となるのは平均 19.8 ± 8.9 日目であり、その菌数は生後3週以後は糞便1g中約 10^{10} である。
4. 成熟児ではビフィズス菌が生後2日目に出現し、4日目には最優勢菌となる。また、ビフィズス菌と腸内グラム陰性桿菌群の菌数の比は、成熟児では生後7日目で1,000対1であるのに、未熟児では生後7週目でも10対1である。
5. 未熟児の1日人乳投与量は、ビフィズス菌出現時点で平均 69 ml/kg 、最優勢菌となる時点で平均 118 ml/kg であり、ビフィズス菌優位のフローラ形成の遅れは人乳摂取量の少ないことが原因の1つと考えられる。
6. そのほかの菌では、一般にブドウ球菌の菌数が成熟児より未熟児に多い。また、バクテロイデス、クロストリディウム、乳酸菌などの出現が未熟児では遅れるが、数の上では大差を認めなかった。

文 献

1. 光岡知足：腸内菌の世界，叢文社，東京，1980。
2. Feldheim G, Schmidt EF, Haenel H : Über die Besiedlung des Meconiums, Zentralbl Bakt, I Abt Orig, 177:62-71, 1960.
3. Stark PL, Lee A : The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight

- neonates. *J Hyg (Lond)*, 89:59-67, 1982.
4. Rötimi VO, Duerden BI : The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol*, 14:51-62, 1981
5. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K : Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*, 72:317-321, 1983.
6. Van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk-Van der Wees JEC: Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J Hyg (Lond)*, 69: 405-411, 1971.

表1. 対象とした未熟児の概要

case	sex	gestational age(weeks)	birth weight(g)	type of delivery
1	M	28.6	1,235	C-section
2	M	27.6	1,100	vaginal
3	F	29.9	1,085	vaginal
4	M	34.7	1,115	C-section
5*	F	25.4	842	vaginal
6	F	29.6	810	C-section
7**	F	31.0	1,350	C-section

* gentamicin and cefotiam were given on day 17

** gentamicin and cefotaxime were given on day 18

表2. 糞便内フローラの検索に用いた培地, 培養方法, および, 培養時間

Medium	Organisms usually enumerated	Incubation method	Incubation time(days)
Non-selective media			
Medium 10	Fastidious anaerobes	Plate-in-bottle method	5
EG agar	Anaerobes	} Steel wool method, replaced air with CO ₂	3
BL agar	Anaerobes		
Trypticase soy blood agar	Aerobes	Air	1-2
Selective media			
BS agar	Bifidobacterium	} Steel wool method, replaced air with CO ₂	3
ES agar	Eubacterium		
NBGT agar	Bacteroides		
VS agar	Veillonella		
Neomycin Nagler agar	Clostridium		
LBS agar	Lactobacillus	} Air	1-2
DHL agar	Enterobacteriaceae		
TATAC agar	Streptococcus		
PEES agar	Staphylococcus		
Potato dextrose agar	Yeast and Mold		
NAC agar	Pseudomonas		

表3. 母乳栄養成熟新生児の糞便内フローラ

Days of life	1	2	3	4	5	6	7
No. of specimens	6	6	6	6	6	6	6
<u>Bacteroidaceae</u>	N.D.	N.D.	5.5±0.8* (2)**	6.1±1.6 (2)	5.3±0.5 (2)	5.7±0.4 (3)	7.0±0.5 (4)
<u>Bifidobacterium</u>	N.D.	5.6±0.7 (3)	8.6±1.8 (6)	9.7±1.2 (6)	10.0±0.8 (6)	10.2±0.7 (6)	10.4±0.4 (6)
<u>Veillonella</u>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.4 (1)	5.5 (1)	6.1±0.4 (2)
<u>Clostridium</u>	6.0 (1)	6.3 (1)	7.1 (1)	7.5±0.2 (2)	7.1±0.4 (2)	6.1±0.5 (3)	5.7±0.8 (3)
<u>Lactobacillus</u>	N.D.	N.D.	5.9±1.1 (2)	6.2±0.9 (3)	6.0±0.6 (5)	4.9±1.1 (5)	5.0±1.1 (5)
Enterobacteriaceae	9.0±0.5 (6)	9.9±0.4 (6)	9.5±0.4 (6)	9.2±0.5 (6)	8.9±0.4 (6)	8.1±0.5 (6)	7.5±0.5 (6)
<u>Streptococcus</u>	8.1±0.8 (6)	8.6±0.4 (6)	8.9±0.5 (6)	8.5±0.5 (6)	8.1±0.3 (6)	7.7±0.7 (6)	7.1±0.7 (6)
<u>Staphylococcus</u>	4.8±1.0 (5)	4.7±1.0 (5)	5.2±0.7 (5)	4.6±0.8 (5)	4.6±0.7 (5)	4.4±0.7 (6)	4.3±0.8 (6)
Yeasts	5.2 (1)	4.0±0.9 (2)	4.0±0.7 (2)	4.0±0.3 (2)	4.1±0.5 (2)	4.0±0.1 (2)	4.0±0.1 (2)
<u>Pseudomonas</u>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

* Values are means±SD of log bacterial counts (when present).

** Number of infants with flora positive for the organism is shown in parenthesis.

N.D.= none detected (counts less than 2)

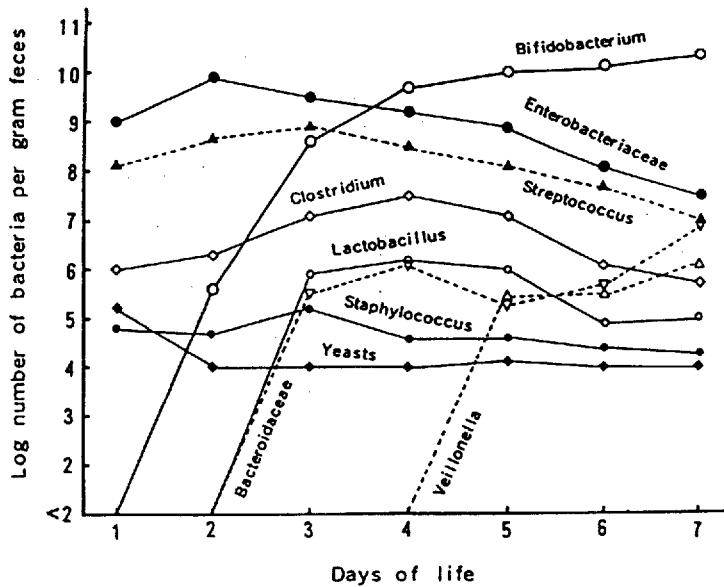


図1. 母乳栄養成熟新生児の糞便内フローラの変化

表4. 搾母乳で育てられた極小未熟児の糞便内フローラ

Days of life	1	5	8	11	14	18	21	35	49
No. of specimens	7	7	7	7	7	5	5	5	5
<u>Bacteroidaceae</u>	8.5 (1)	10.9 (1)	10.5 (1)	10.5 (1)	8.3±2.2* (2)**	7.0±1.1 (2)	7.1±1.5 (2)	6.3±1.7 (3)	6.7±1.5 (3)
<u>Bifidobacterium</u>	N.D.	N.D.	5.4±0.9 (3)	8.6±0.6 (5)	7.9±1.9 (7)	9.6±1.0 (5)	10.1±0.9 (5)	10.3±0.2 (5)	10.4±0.2 (5)
<u>Veillonella</u>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.3 (1)	4.0 (1)	5.3±0.1 (2)	6.8±0.4 (3)
<u>Clostridium</u>	N.D.	N.D.	N.D.	6.0 (1)	6.7±1.1 (2)	6.7±0.7 (2)	6.9±0.6 (2)	7.9±0.6 (4)	8.3±0.2 (4)
<u>Lactobacillus</u>	N.D.	N.D.	N.D.	6.0 (1)	4.9 (1)	5.1±1.3 (3)	5.7±1.9 (3)	7.3±0.4 (4)	6.9±0.6 (4)
<u>Enterobacteriaceae</u>	8.8±1.3 (7)	9.4±0.8 (7)	9.6±0.3 (7)	9.5±0.4 (7)	9.7±0.4 (7)	9.8±0.4 (5)	9.5±0.2 (5)	9.7±0.5 (4)	9.4±0.3 (4)
<u>Streptococcus</u>	8.7±0.6 (7)	9.2±0.4 (7)	9.0±0.9 (7)	8.8±0.5 (7)	9.0±0.4 (7)	9.3±0.6 (5)	8.9±0.3 (5)	8.4±1.0 (5)	8.8±0.3 (5)
<u>Staphylococcus</u>	7.2±1.8 (3)	7.1±1.6 (3)	7.1±1.2 (5)	7.0±0.9 (5)	6.4±0.7 (6)	6.1±1.0 (5)	6.6±0.5 (5)	5.8±0.6 (5)	5.7±1.2 (5)
<u>Yeasts</u>	7.1 (1)	5.5±2.5 (2)	5.6±1.6 (2)	5.1±1.0 (2)	6.2±0.8 (2)	4.3±1.0 (2)	4.0±1.0 (2)	3.6±0.4 (3)	4.2±0.7 (2)
<u>Pseudomonas</u>	N.D.	8.8 (1)	4.5±0.4 (2)	3.7 (1)	3.2 (1)	3.6 (1)	4.0±0.4 (2)	2.9 (1)	3.0 (1)

* Values are means±SD of log bacterial counts (when present).

** Number of infants with flora positive for the organism is shown in parenthesis.

N.D.= none detected (counts less than 2)

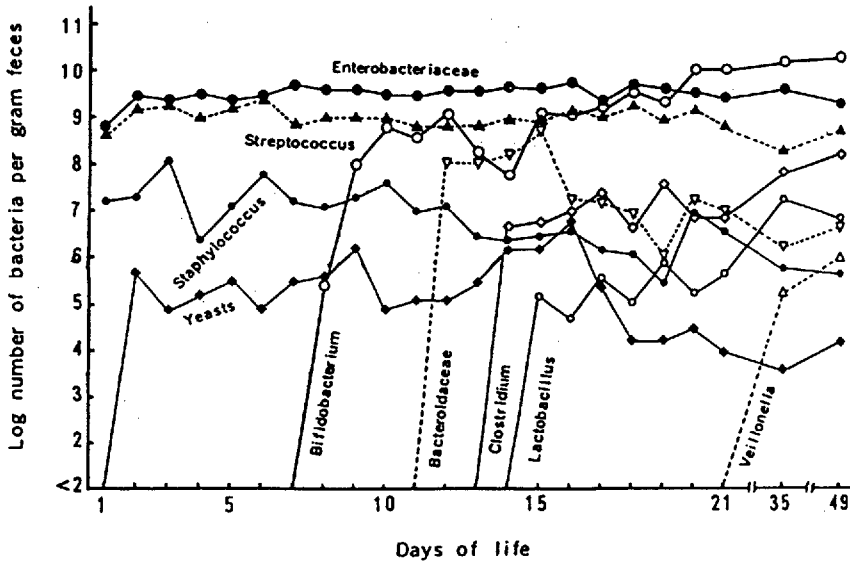
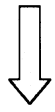
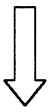


図2. 搾母乳で育てられた極小未熟児の糞便内フローラの変化



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

前年度は成熟児の腸内細菌叢の形成が、母乳と人工栄養児で相違のあることを報告した。今年度は搾母乳で育てられた極小未熟児の腸内細菌叢の形成過程を母乳栄養の成熟新生児のそれと比較検討した。