(東女医大誌 第 30 巻 第 3 号) 百 419——426 昭和 35 年 3 月)

Escherichia coli 及び Klebsiella pneumoniae の Cahdrda albrcans に対する括抗作用

東京女子医科大学細菌学教室(主任 平野憲正教授)

松田小風子

(受付 昭和34年12月14日)

I 緒 言

Candida albicans は日常健康者に常在する菌 であるが、Sulfamin 剤や抗生物質の治療普及に より, 菌交代現象が起る。すなわち抗生物質によ り腸内細菌が減少もしくは消失すると、 Candida が増殖して Candida 症を起す。本症発生の原因 を追求するために多数の研究が発表され、その多 発を見るにいたつた原因についてFoley(1949)⁶⁾, Harris (1950)7, Meads (1950)8, Zimmerman (1950)⁹⁾ Woods (1951)¹⁰⁾, 美甘 (1951)¹⁾, Seligman (1952) ¹⁴⁾, Kligman (1952) ¹⁶⁾, 久保 (1952)5), などの研究報告がある。可能性として 次のようなことが考えられる。① 抗生物質が通 常存在する口腔、鼻咽腔、消化管の細菌に直接作 用し減少又は消失させる。② 抗生物質投与によ る腸内細菌の栄養阻害をきたす。③ 抗生物質が Candida 属を直接刺戟する。

以上のことから消化管内の Candida 及び Coli が抗生物質を使用した際, Candida の発育が制限 又は促進される事実について試験管内で大腸菌及 Candida を共棲培養し Candida の発育が抑制される実験を Pairie ¹⁵, 老木^{2) 5}, 近藤 ⁴, Gale ¹⁷, らは行つている。著者は Escherichia と Klebsiella, 及 Shigella sonnei について本菌と Candida との関係を実験した。

Ⅱ 実験方法と成績

実験材料 実験に使用した菌株

Escherichia coli

03

Candida albicans

Klebsiella

11. 1002 Shigella sonnei

A) 大腸菌と Candida との関係

大腸菌及び Candida の1白金耳を普通ブイヨ ン(pH7.2修正)にうえ、大腸菌は37°C, Candida は 25°C の孵卵器中に共に22時間培養した後大 腸菌培養液 0.2 cc に普通ブイヨン 19.8 cc, Candida 培養液 1.0 cc に普通ブイヨン 19.0 cc を加 え, ほかに大腸菌培養液 0.2 cc に Candida 培養 液 1.0 cc 普通ブイヨン 18.8 cc を加えた。これ らの菌液を各々 50 cc コルベンに入れ Candida は 25°C の孵卵器中に大腸菌と Candida 混合液 は37°Cの孵卵器中に培養した。22時間後,以上 を原液として次の実験を行つた。3列の滅菌試験 管各々に生理食塩水 4.5 cc を入れ, 1列には大 腸菌培養液 $0.5 \, \mathrm{cc}$ を加え $10^{-1} \sim 10^{-8}$ まで稀釈 し, 2 列には Candida 培養液を 0.5 cc 加え10⁻¹ $\sim 10^{-6}$ まで、3列には混合液を 0.5 cc 加え充分 混和して 10⁻¹~10⁻⁷ まで稀釈した。その内第1 列では $10^{-6} \sim 10^{-8}$ まで, 第2列では $10^{-3} \sim 10^{-6}$ まで, 第3列では 10⁻³~10⁻⁷ まで, 夫々 0.1 cc をとり Sabouraud 培地に流し、コンラジー棒に て平均に塗抹し, それを 37°C及び25°C の孵卵 器中に48時間培養し集落数を算定した。同一の実 験を培養後第4日目及び第8日目にも行つた。そ の結果は表1,2,に示すように、第1日目では対 照の Candida のみのものに比し、混合液におい ては大腸菌は無数に発育したが、 Candida の 発 育は悪く,第4日目には殆んど発育をみとめず,第 8日目には全然発育しなかつた。これに反して対 照の Candida は第1日目より第4日目において

Soyoko MATSUDA (Department of Bacteriology, Tokyo Women's Medical College): Antagonistic effect of escherichia coli and klebsiella pneumoniae on candida albicans.

培養日数

1

4

8

10~6

 10^{-7}

 10^{-8}

pH

10~3

 10^{-4}

10-5

 10^{-6}

 10^{-7}

 10^{-8}

pΗ

				- 224 F-1
稀釈及び	集		落	数
pН	Candida	Candida	+ Coli	Coli
10-3	733	59. 8	∞	
10~4	82	5.2	融合	
10-5	8.1	0.6	融合	
10-6	1.0	0	284	245
10-7		0	37. 3	36. 6
10 ⁻⁸				1.9
pН	7.4	7.4		7.4
10-3	∞	0.05	∞ ∞	
10-4	290	0	融合	
10-5	28.8	0	148.5	

16.5

1.3

00

合

融

161

12.1

1.3

14

1.4

0

12.9

1.8

8.6

8.6

0

0

0

0

0

0

0

8.6

8.6

表1 Candida, Coli 及び Candida + Coli を 37°C に培養した場合

盐	生装粉は	Sahourand	拉萊	10	松の巫ీであ	Z

8.2

2.9

7.8

141

14.5

1.4

増殖旺盛であり、第8日目にも4日目と大差がなかつた。培養温度は37°Cでも25°Cでも大体同様の成績が得られた。培養期間中におけるpHの変化は大腸菌と Candida を混合して培養したものにおいては、第1日目pH7.4、第4日目8.6、第8日目8.6 であつたが、Candidaのみのものでは第1日目7.4、第4日目7.8、第8日目8.2であつた。従つてpHの変化によつて Candidaの発育が不良となつたとは考えられない。

B) Klebsiella と Candida との関係

Klebsiella 及び Candida の1白金耳を前回同 様普通ブイヨンに移殖し共に 22 時間培養し, こ れらを 前回の 実験と 同様に、Klebsiella 培養液 0.2 cc に普通ブイヨン 19.8 cc, candida 培養液 1.0 cc に普通ブイヨン 19.0 cc, Klebsiella 培養液 0.2 cc に Candida 培養液 1.0 cc と普通ブイヨン 18.8 cc を加えて、各々 50 cc コルベンに培養し、Candida は 25°C, Klebsiella と Candida との混合液は 37°C の孵卵器中に培養し、22 時間後、以上を原液として前実験と同様に処置し、Klebsiella 培養液の Candida への影響を観察した。表3に示すように Candida のみの培養では第1日目に 1:1000 に稀釈したものに 663 という集落を認めたが、Candida に Klebsiella を加

表 2 Candida, Coli 及び Candida + Coli を 25°C に培養した場合

培養日数	稀釈及び		集	落	X
数	pН	Candida	Candida	+ Coli	Coli
	10-3	750	48	∞ .	
	10-4	94	7	融合	
	10-5	9	0.5	融合	
1	10-6	0.5	0	300	236
	10-7		0	25	54
	10 ⁻⁸				1
	рН	7.4	7. 4		7.4
	10-8	∞	0.5	∞	
	101	336	0	融合	
	10^{-5}	32	0	127	
4	10-6	2	0	30	3.
	10-7		0	0.5	1
	10^{-8}				1
	pН	7.6	8.6		8.6
	10-3	∞	0	∞	
	10-4	320	0	融合	
	10^{-5}	30	0	240	
8	10-6	1	0	2 5	4
	10 7		0	0	0
	10 ⁻⁸				0
	рН	8.2	8.6		8.6

註 集落数は Sabouraud 培養 10 枚の平均である

えて培養したものにおいては 1:1000 稀釈には 88 の集落を認めたのみであつた。培養 4 日目においては 88 Candida のみの培養では 1:1000 稀釈で無数であつたが,Candida に Klebsiella を加えたものでは 1:1000 稀釈で集落 43 を算したのみであった。培養 4 日目においても Candida のみの培養では 4:1000 稀釈では 無数であつた。しかるに Candida に Klebsiella を加えたものでは 4:1000 倍で 4:1000 であつた。以上の実験によつて大腸菌及び Klebsiella と Candidaを共棲せしめると Candida の発育は著しく阻害されることは明かである,かかる作用が培養濾液

にも証明されるかを知るため次の実験を行つた。

C) Candida に対する大腸菌培養濾液の作用大腸菌を普通ブイヨンに7日以上培養し、それをザイツ濾過器で濾過し、濾液19.0cc に Candida 培養液 1.0 cc を,濾液19.8 cc に大腸菌培養液0.2 cc を加え、また100°C で10 分間加熱した大腸菌培養濾液19.8 cc に Candida 培養液0.2 cc を加えたもの及び普通ブイヨンを pH8.8~9.2 に修正し、それの19.0 cc に Candida 培養液1.0 ccを加えたものについて実験を行い、大腸菌濾液が Candida に作用するか否かを検討した。その成績は表4,5,6 に示すように、大腸菌の9日培養

表3 Candida Klebsiella 及び Candida + Klebsiella を 37°C に培養した場合

培養日数	稀釈		集	落	ά :
数	pН	Candida	Candida	+ Klebsiella	Klebsiella
	10 -3	663	88	∞ ′	
	10 -4	74	6.1	融合	
	10 -5	6.6	0.5	融合	
1	10 -6	0.5	0	137	169
	10 -7		0	16.3	17.5
	10 -8				3. 0
	pН	7.4	7.4		7.4
	10 -3	∞	42	∞	
	10 -4	178	5. 9	融合	
	10 -5	17	0.2	405. 8	
4	10 -6	1	0	52	57.1
	10 -7		0	3. 5	5. 8
	10 -8				0.6
	pН	7.8	8. 4		8.4
	10 -3	∞	0.5	∞	ļ
	10 -4	116	0	融合	
	10 -5	11.5	0	82. 5	
8	10 -е	2	o	8.3	10.5
	10 -7		0	0.5	1.5
	10 ⁻⁸				0
	pH	8.2	8.8		8.8

註 集落数は Sabouraud 培養 10 枚の平均である

濾液においても Candida の発育は認められなかった。しかし, 2 週間培養の濾液において初めてその作用を証明することもあつた。かように同一大腸菌においても,時と場合によつてその作用は必ずしも一様ではない。同一条件の濾液に大腸菌を培養すると増殖する。大腸菌培養濾液を 100° Cで 10 分間加熱したものに Candida を培養すると表 5 に示すように, Candida の発育は抑制される。しかし大腸菌を培養した場合には僅かながら発育する。大腸菌濾液は長期間培養すると pH $8.8 \sim 9.2$ 程度のアルカリ性となるため対照として,普通ブイョンを pH9.2 に修正し,その液に

Candida を培養したところ、表6にしめす如く、 その発育は不良であつた。それ故に Candida の 発育が抑制されるのは pH のためばかりではない と思う。

D) Candida に対する Klebsiella 濾液の作用 Klebsiella を普通ブイヨンに移植し、37°Cの 孵卵器中で7日以上培養しそれをベルケフェルド 濾過器にて濾過し、その濾液に Candida 培養液を加えた。培養濾液に Candida を加えてから培養24時間、4日目、及び8日目のものについて Candidaの有無を検した。その方法は大腸菌培養 濾液の場合と同様である。その成績は表7に示す

表4 Coli 培養濾液に Candida を培養した場合

第

回の実験

			衣 4	Con
培養礦	液稀积	えて	培養 indida か i ・ か i ・ 時	うの
		2 4	時	間
	10^{-3}		2	
7 日	10^{-4}		0	
培養	10-5		0.	
-ц,ж	10^{-6}		0	
	рН	8.6		
	10-3		1	
8 目	10^{-4}		0	
培養	10^{-5}		0	
-пре	10^{-6}		0	
	pН	8.6		
	10-3		0	
9 目	10-4		0	
培養	10^{-5}		. 0	
11 304.	10^{-6}		0	
	рН	8.8		PA-LANGEN TERRETOR
	10 ⁻³		0	
10日	10-4		0	
培養	10-5		0	
· 11 ,126,	10-6		0	
	pH	8.8		

培養爐液稀釈		Coli 培 養 濾 液 に Candida を加えてからの 培 養 日 数				
		24 民	前間	4	Ħ	
	10-3	7.	. 5		0	
13日	10^{-4}	0			0	
培養	10^{-5}	0			0	
· LI JAC	10^{-6}	0			0	
	pН	8.8		8.8		
	10^{-3}	0			0	
14 日	10^{-4}	0			0	
培養	10^{-5}	0			0	
~LI BE	10^{-6}	0			0	
	pН	9.2	.,	9.2		
	10^{-8}	0			0	
17日	10-4	0			0	
培養	10^{-5}	0			0	
一口处	10^{-6}	0			0	
	pН	9.0		9.0		

註 集落数は Saboureud 培養 8 枚の平均である。

うに、7日培養濾液に Candida を移植した場合 に1:1000 稀釈で集落 209、8日目でも191.5を算 した。16日培養濾液に Candida を加えたものに おいては、培養後 24 時間のものにおいては Candida の集落は1:1000 で 39,5 個、4日目で は0となり、23日培養濾液では24時間ですでに Candida の発育が見られなかつた。

E) Shigella sonnei と Candida との関係

Shigella sonnei を普通ブイョンに 14 日間 37°C で培養しその培養液をベルケフェルド濾過器で濾過し、その 培養液に 前回と 同様の 方法で Candida 培養液と 混和し大腸菌の 場合と同様の

実験を行つた。その結果によると Shigella sonnei 培養濾液の中には Candida の発育を抑制する因子はないようである。

Ⅲ 考 按

老木,近藤らは大腸菌と Candida とは試験管内において栄養物摂取の競り合いで、大腸菌発育旺盛な時は Candida の発育は悪く、大腸菌増殖が悪くなると Candida の発育が良くなるとのべている。本実験においては普通ブイヨンを使用したが大腸菌の発育旺盛な時は Candida の発育悪く、その後全く発育を見ず、ただ大腸菌のみが発育した。これは Candida が大腸菌により発育を

	,	(5 1/ 月间培養*	せる大肠菌濾液に	——————————————————————————————————————	で行送した場合	
培养	稀釈		集	落	数	
培養日数	及 び pH	対 照 Candida	100°で加熱せる Coli 培養濾液+ Candida	100°で加熱せる Coli 培養濾液+ Coli	Coli 培養礦液+ Coli	Coli 培養濾液+ Candida
	10-3	∞ .	0			0
	10-4	51	0			. 0
	10^{-5}	4	0			0
1	10^{-6}	o	0	9. 5	12	0
	10-7			0.5	2.5	
	10 ⁻⁸			0	0	
	pH	7.4	9.0	9.0	9.0	9.0
	源液		0		-	0
	10 ⁻⁸	∞	0			0
	10-4	128	0	; 		0
	10^{-5}	10	0	·		. 0
4	10-6	0.5	0	1.5	22	0
	10^{-7}			0	2.0	
,	10^{-8}		· :	0	0	
	рН	7.8	9.0	9.0	9. 0	9. 0

表 5 17 日間培養せる大腸菌濾液に Candida 及び Coli を培養した場合

表 6 pH 9.2 に修正せる普通ブイヨンに Candida を培養した場合

培養日数	稀 双 び	集 落 数
数	pH	Candida
	10^{-8}	133
	10^{-4}	14
1.	10^{-5}	. 1
	10 ⁻⁶	0.3
	pН	9.4
	10 ⁻⁸	82
	10^{-4}	6
4	10^{-5}	0.8
	10-6	0
	pН	9.6
	10-8	8
	10^{-4}	0.5
8	10-5	0
ĺ	10^{-6}	0
	pН	9.6

註 集落数は Sabouraud 培養6枚の平均である

おさえられているか、或は大腸菌が Candida の 発育を抑制する物質を産生するからであると考え られる。大腸菌培養濾液を使用した場合も同様で 培養9日以上の培養濾液に Candida は全く発育 しないか、又は、僅かに発育するのみである。

この成績は近藤4の実験と一致していて、大腸菌の培養日数の経過とともに Candida の発育抑制作用は著明となり、又加熱によつてもその作用はあまり減少しない。従つてこの作用は耐熱性因子によると考えられる。Candida の発育しない大腸菌培養濾液に大腸菌を培養した場合には発育がみられる。故に濾液中に未だ発育に必要な栄養源が残存していることは明かである。著者はKlebsiella の培養濾液中にも Candida の発育を阻止する作用のあることを証明することができた。大腸菌及び Klebsiella の培養濾液に証明されるの因子の本態について研究したが思わしい成績は得られなかつた。Shigella sonnei と Candida との間には拮抗作用は証明されない。

IV 結 論

① 大腸菌代謝産物は Candida の増殖を抑制す

表7 Klebsiella 培養濾液に Candida を培養した場合

培養	培養。	培養濾液にの 培	Candida を 養	加えてから 日 数
日数	稀釈	24 時 間	4 日	8 日
	10 -3	209	256	191.5
	10 -4	22	23.1	25
7	10 -5	0.7	1	0.5
Ħ	10 -6	0 -	0	0
	10 -7	0	0	0
	pH	8. 2	8. 6	8. 4
	10 -в	214	211	247
	10 -4	16	20	34
8	10 -5	0.5	1	1.5
Ħ	10 -е	0	0	0
	10 -7	0	0	0
	pН	8. 0	8.6	8. 4
	10 -з	29. 5	0	0
	10 -4	1	0	0
16	10 -5	0.5	0	0
日	10 -6	0	0	0
	10 -7	0	0	0
	pН	8. 6	8.6	8.6
	10 -з	0	0.	0
	10 -4	0	0	0
23	10 -5	0	. 0	0
月	10 -е	0	0	0
	10 -7	0	0	. 0
	рН	8.8	8. 6	8.6

註 集落数は Sabouraud 培養 4枚の平均である

- る。この作用は耐熱性である。
- ② Candida の発育しない大腸菌濾液に大腸菌は 発育する。
- ③ 大腸菌の Candida に対する発育抑制作用は pH とは無関係である。
- ④ Klebsiella も大腸菌と同様に Candida の発育を抑制する。しかしその作用は大腸菌のそれに比して稍弱い。

表 8 Shigellasonnei 培養濾濾液に Candida 及 Coli を培養した場合

培	稀积	集	落	数
養日数	及び pH	Candida	Shigella sonnei 培養礦液+ Candida	Shigella sonnei 培養爐液+ Coli
	10 -3	539	477	
	10 -4	76	67. 5	
	10 -5	9	4.5	
1	10 -6	0	0.5	230
	10 -7		0	16
	10 ⁻⁸			2
	pН	7.4	6.6	7.4
	10 -3	∞	S	
	10 -4	178	314	
	10 -5	19	32	
4	10 -6	1.5	4	147
	10 -7		0	13
	10 ^{-s}			1.5
	pН	7.8	7.2	8.2
	10, -3	co	362	
	10 -4	150	199	
	10 -5	16	20	-
8	10 -е	1.5	2	38
	10 -7		0.7	12
	10 -s			1
	pН	8. 2	8, 2	8.6

註 集落数は Sabouraud 培養 10 枚の平均である

⑤ Shigella sonnei 培養濾液中には Candida の発育を抑制する作用は証明されなかつた。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導御校閲を賜つ た平野憲正教授並びに中西清子助教授に心より感謝致 します。なお教室員諸姉に感謝の意を表します。さら に,菌株をご分与戴いた順天堂医大土屋教授,北里研 究所広木博士,国立予防衛生研究所に感謝 いた しま す。

文 献

- 1) 美甘義夫・上塚 昭:結核, 25 513 (1951)
- 2) 老木英男: Chemotherapy, **2** 166 (1954)
- 3) 老木英男: Chemotherapy, **3** 46 (1955)

- 4) 近藤淳一: 日伝染会誌, 30 938 (1957)
- 5) 久保郁哉:臨床, 5 (11) 1 (1952)
- 6) Foley, G.E. and Winter, W.D.: J. Infect. Dis., 85 268 (1949)
- 7) **Harris**, **H.J**.: J. Am. Med. Asoc., **142** 161 (1950)
- 8) Meads, M., Rowe, W.P. and Haslam, N.M.: Arch. Int. Med., 87 533 (1951)
- 9) **Zimmerman**, **L. E.**: Arch. path., **50** 591 (1950)
- 10) Woods, J.W., Manning, Jr. I.H. and Patterson, C.N.: J.Am. Med. Asoc., 145 207 (1951)

- 11) Moore, M.: J. Lab. & Clin. Med., 37 703 (1951)
- 12) Tomaszewski. T.: Brit. Med. J., 1 388 (1951)
- 13) Pappsenfort, Jr. R.B. and Schnall, E. S.: Arch. Int. Med., 88 729 (1951)
- 14) Seligmann, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 79 481 (1952)
- 15) Paine, T.F.: Antibiotics. 2 653 (1952)
- 16) Kligman, A.M.: J. Am. Med. Asoc. 149 979 (1952)
- 17) Gale, D. and Sandoval, B.: J. Bacteriology,73 616 (1957)