

学位論文
Doctor's Thesis

実験動物の膣内常在細菌叢に関する研究
(Study on the normal vaginal flora of laboratory animals)

野口 和浩
Kazuhiro Noguchi

熊本大学大学院医学研究科博士課程生理系専攻薬理学第二

指導：西 勝英 前教授

紹介：佐谷 秀行 教授

2005 年度

学 位 論 文
Doctor's Thesis

論文題名：実験動物の膣内常在細菌叢に関する研究
(Study on the normal vaginal flora of laboratory animals)

著者名：野口 和浩
Kazuhiro Noguchi

指導教員名：西 勝英 前教授
紹介教員名：佐谷 秀行 教授

審査委員名：生体微細構築学担当教授 浴野成生
感染防御学担当教授 原田信志
婦人科学担当教授 片渕秀隆
微生物学担当教授 赤池孝章

2005 年度

目次

要旨	1
発表論文（関連論文およびその他の論文）	3
謝辞	5
略語一覧	6
第1章 研究の背景と目的	
1-1 常在（正常）細菌叢とその役割	
A. 常在（正常）細菌叢とは？	7
B. 腸内における常在細菌の種類とその分類	7
i) 嫌気性菌	9
ii) 通性嫌気性菌	9
iii) 好気性菌	10
1-2 ヒトの腸内細菌叢	
A. 新生児の腸内細菌叢の形成過程	12
B. 幼児および成人の腸内細菌叢	12
C. 老人の腸内細菌叢	12
1-3 動物の腸内細菌叢	15
1-4 腸内細菌叢が免疫系などの生体に与える影響（無菌動物での検討）	18
A. 無菌動物と CV 動物の形態的および解剖学的違い	18
B. 無菌動物と CV 動物の免疫学的違い	18
C. 結論	18
1-5 腔内細菌叢	
A. ヒトの腔内細菌叢	
i) デーデルライン桿菌	19
ii) その他の腔内細菌叢	20
iii) 腔内細菌叢に影響を及ぼす因子	20
B. 各種実験動物の腔内細菌叢	22
C. チンパンジーの腔内細菌叢	22
D. 実験動物の微生物学的統御が及ぼす腔内細菌叢への影響	
i) SPF、CV および wild ラットの腔内細菌叢	23
ii) ラットの腔内細菌叢に及ぼす SPF 環境の影響	24
第2章 腔内細菌叢の検索方法	
2-1 分離培地	25
2-2 分離培地の組成、作製方法およびその特徴	26

2-3	検体の採取方法	33
2-4	腔内細菌叢の分析方法	33
2-5	腔内細菌の分類	34
第3章 CVマウス、ラット、ハムスター、ウサギおよびイヌの腔内細菌叢		
3-1	材料と実験方法	
A.	実験動物	
i)	マウス	39
ii)	ラット	39
iii)	ハムスター	39
iv)	ウサギ	40
v)	イヌ	40
B.	検体採取のスケジュール	40
C.	性周期の各時期の決定	40
D.	検体の採取および腔内細菌叢の分析方法	41
3-2	結果	
A.	実験動物の性周期と腔内細菌叢との関係	42
B.	実験動物の腔内細菌叢の中に占める好気性菌と嫌気性菌の割合	42
C.	実験動物における腔内細菌叢の優勢菌種	42
D.	発情期と発情休止期（無発情期）における腔内細菌叢の違い	46
E.	発情期における腔内細菌叢の複雑さ	46
3-3	考察	48
3-4	まとめ	51
第4章 チンパンジー (<i>Pan troglodytes</i>) の腔内細菌叢		
4-1	材料および実験方法	
A.	実験動物	52
B.	年齢によるチンパンジーの分類	52
C.	チンパンジーの月経周期	52
D.	チンパンジーの飼育環境	54
E.	チンパンジーにおける検体の採取および腔内細菌叢の分析方法	56
4-2	結果	
A.	チンパンジーの腔内細菌叢の加齢に伴う変化	
i)	好気性菌および嫌気性菌の菌数の推移	57
ii)	各菌種群の分離頻度の推移	
①	好気性菌（通性嫌気性菌を含む）の場合	57
②	嫌気性菌の場合	57

iii) 優勢菌種群の菌数の推移	60
iv) 膣内細菌数への月経周期の影響	60
B. 性成熟チンパンジーにおける	
non-swelling phase と swelling phase の膣内細菌叢の比較	
i) 各菌種群の分離頻度について	60
ii) 各菌種群の細菌数について	64
4-3 考察	65
4-4 まとめ	70
第5章 実験動物の微生物学的統御が及ぼす膣内細菌叢への影響	
-SPF、CV および wild ラットでの検討-	
5-1 材料および実験方法	
A. 生産施設における SPF ラットコロニー確立の方法	71
B. 生産施設における SPF ラットの飼育環境	71
C. 生産施設における CV ラットの飼育環境	71
D. 実験動物	
i) SPF ラット	72
ii) CV ラット	72
iii) wild ラット	74
E. 検体の採取および膣内細菌叢の分析方法	74
5-2 結果	
A. SPF、CV および wild ラットの膣内細菌叢の比較	75
i) CV および wild ラットの膣内細菌叢	75
ii) SPF ラットの膣内細菌叢	75
B. ラットの膣内細菌叢に及ぼす SPF 環境の影響	77
5-3 考察	79
5-4 まとめ	82
第6章 総括と将来の展望	83
参考文献	84

要 旨

生体が外界と接する皮膚、鼻腔、咽頭、腸管および尿道などには、それぞれの環境に適応した細菌叢が形成され、腔内にも同様に腔内細菌叢が形成されている。ヒトの腔内には lactobacilli を最優勢とする細菌叢が形成され、この細菌叢が外部からの病原菌の侵入および増殖を防除していると考えられている。我々は、各種実験動物（マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌおよびチンパンジー）の腔内細菌叢を光岡らの腸内細菌叢検索に準じた方法を用いて定性的および定量的に調べ、腔内細菌叢の種差を検討した。その結果、各種実験動物の腔内細菌叢の優勢菌種は、マウスでは streptococci、ラットでは GNR、streptococci および *Bacteroidaceae*、ハムスターでは GNR、*Bacteroidaceae* および GPAC、イヌでは *Bacteroidaceae* であったことから、実験動物の腔内細菌叢は動物種によって異なることが示唆された。しかし、streptococci と *Bacteroidaceae* の分離頻度は、これらの動物種に関係なく共通して高い傾向にあったことから、この二つの細菌群は哺乳類の腔内細菌叢に普遍的な常在細菌である可能性が示唆された。

また、マウス、ラット、ハムスターおよびイヌの腔内細菌数は、性周期によって変化し、共通してエストロゲン濃度が最も高くなる発情期で最も高くなっていた。発情期では、腔内における粘液の分泌量が最も増加することが知られ、さらにこの粘液中に含まれるムチンが細菌のエネルギー源として利用され増殖に役立つことから、腔内における細菌数の増加はこの時期における粘液分泌量の増加によって引き起こされている可能性が示唆された。

ヒト腔内での最優勢菌は lactobacilli であるといわれているが、上述のマウス、ラット、ハムスターおよびイヌにおける lactobacilli の分離頻度および分離菌数は非常に低かった。しかし、系統発生的に最もヒトに近いチンパンジーの腔内細菌叢における優勢菌種は、streptococci、lactobacilli および *Bacteroidaceae* で、ヒトと同様に lactobacilli が優勢菌種のひとつとして腔内に存在していることがわかった。したがって、ヒトの腔内細菌叢、特に lactobacilli の役割を研究するための動物モデルとしては、今回調べた動物種の中ではチンパンジーが最も適しているのではないかと考えられた。また、チンパンジーの腔内細菌数も月経周期によって変化し、エストロゲン濃度が最も増加する swelling phase で最も高くなっていた。このことから、チンパンジーにおいても腔内細菌数が増加するメカニズムは上述の動物種と共通で、エストロゲンの分泌によって腔内細菌叢の増殖が引き起こされていると考えられた。

上述の動物種とは対照的に、ウサギの腔内からは細菌はほとんど検出されなかった。ウサギは、性周期の型が上述の動物種と異なり、明瞭な性周期がみられない交尾排卵動物で、通常実験に使用するウサギは粘液の分泌徴候がほとんどみられないとされる交尾前 (Precoitus) の状態である。したがって、ウサギの腔内はおそらく他の動物種でいう発情休止期の時期と類似の状態、粘液の分泌量が少なく細菌にとって増殖しにくい環境になっているのではないかと推察された。

現在、実験には SPF (specific pathogen-free ; 特定の病原微生物がない) 動物が頻繁に使用されているが、SPF 動物は、CV (conventional ; 普通) 動物とは異なり、人為的に作出された実験動物である。すなわち、まず帝王切開により無菌動物が作出され、その後その動物を外部環境からの微生物の侵入が厳しく制限されたバリア施設に移し、その施設の中で飼育・維持することによって確立されたものである。したがって、子供を自然分娩で出産し、普通環境あるいは外界で育った CV あるいは wild (野生) 動物と SPF 動物とでは、作出方法および飼育環境の 2 点において大きく異なっている。そこで、実験動物における微生物学的統御が腔内細菌叢にどのような影響を与えているかを明らかにするために、まず最初に微生物学的統御の異なる 3 種類のラット、つまり SPF、CV および wild ラットの腔内細菌叢の構成を調べた。その結果、CV および wild ラットの腔内細菌叢における優勢菌種は、共通して *Pasteurellaceae*、streptococci および *Bacteroidaceae* であったのに対して、SPF ラットにおける最優勢菌種は *Enterobacteriaceae* で、さらに SPF ラットの腔内からは嫌気性菌が全く検出されなかった。このことから、SPF ラットと CV および wild ラットの腔内細菌叢は全く異質であることがわかった。SPF ラットにおけるリンパ組織の発達は CV ラットよりも未発達で、しかも *Enterobacteriaceae* は免疫力が低下した時に増加傾向を示すことが知られている。したがって、SPF ラットの腔内における *Enterobacteriaceae* の増加は、SPF ラットの免疫機構の未熟さによって引き起こされていると推測された。

SPF ラットの腔内細菌叢が CV および wild ラットと著しく異なっていたことから、SPF 環境 (SPF 動物を維持するための特殊な環境) が腔内細菌叢に何らかの影響を及ぼしているのではないかと考え、野外から捕獲した wild ラットと wild ラットを SPF 環境下で維持し交配させることによって得た F1 および F2 の wild ラットの腔内細菌叢を調べ比較した。その結果、SPF 環境下で維持された F1 および F2 の腔内細菌叢の優勢菌種は、捕獲直後の wild ラットと同じで、SPF ラットの特徴であった *Enterobacteriaceae* の増加や *Pasteurellaceae*、*Bacteroidaceae* および嫌気性菌の消失といった現象はみられなかった。したがって、今回明らかとなった SPF ラットの特徴的な腔内細菌叢は、SPF 環境の要因だけでは引き起こされないことがわかった。以上より、SPF ラットの特徴的な腔内細菌叢の形成は、SPF 動物の作出過程から考察すると、帝王切開および新生児の汚染母親からの隔離といった作出の際に実施された人為的操作に起因している可能性が強いと考えられた。

以上の成績より、実験動物における腔内細菌叢は、性 (月経) 周期の影響を受け変化し、動物種間で異なることが明らかになった。さらに現在広く使用されている SPF ラットの腔内細菌叢は極めて特徴的であり、また SPF 動物は免疫学的にも CV 動物に比較して低下している可能性があることから、SPF ラットを用いてこれらの細菌叢や免疫系に関する研究を行う場合は、これらの特性を十分に考慮して実験する必要があると考えられた。

発表論文リスト

1. 関連論文

- 1) **Noguchi, K., K. Tsukumi, and T. Urano.** 2003. Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comparative Medicine.* **53**:404-412.
- 2) **Noguchi, K., K. Tsukumi, T. Uono, and T. Urano.** 2004. Normal vaginal flora in chimpanzees (*Pan troglodytes*): Qualitative and quantitative study. *Comparative Medicine.* **54**:705-712.

2. その他の論文

- 1) 崎尾 昇, 野口和浩, 中村直子, 春日龍起, 津久美清, 浦野 徹. 1991. 最近の熊本地区のイヌにおける *Brucella canis* の分離状況. *実験動物技術.* **26**:5-7.
- 2) 野口和浩, 蔣 観成, 浦野 徹, 坂本龍一郎, 藤本利夫, 淵上勝野. 1991. 水槽付き一方向気流方式のウサギ飼育装置からの緑膿菌の分離と本菌除去に関する検討. *実験動物技術.* **26**:59-62.
- 3) 野口和浩, 崎尾 昇, 津久美清, 浦野 徹. 1991. 実験動物由来緑膿菌に対する消毒薬の殺菌効果. *実験動物技術.* **26**:112-117.
- 4) 中村直子, 野口和浩, 蔣 観成, 浦野 徹. 1992. 動物実験施設内のマウス飼育室にみられた緑膿菌の疫学調査. *実験動物技術.* **27**:24-28.
- 5) 野口和浩, 中村直子, 春日龍起, 津久美清, 浦野 徹. 1993. ウサギの検収および検疫成績. *実験動物技術.* **28**:52-56.
- 6) 野口和浩, 中村直子, 春日龍起, 津久美清, 浦野 徹. 1993. 隔離・淘汰によるウサギコロニーからの *Pasteurella multocida* の排除の試み. *実験動物技術.* **28**:57-61.
- 7) **Nakamura, N., K. Noguchi, and T. Urano.** 1994. Elimination of *Pseudomonas aeruginosa* from an experimental nude mouse colony. *Experimental Animals.* **43**:191-197 (in Japanese with English summary).
- 8) **Noguchi, K., K. Tsukumi, and T. Urano.** 1995. Provocation of *Bacillus cereus* infection with irradiation in mice. *Journal of Experimental Animal Technology.* **30**:23-30 (in Japanese with English summary).
- 9) **Urano, T., K. Noguchi, G. Jiang, and K. Tsukumi.** 1995. Survey of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in human beings and laboratory animals. *Experimental Animals.* **44**:233-239.

- 10) **Noguchi, K. and T. Urano.** 1996. A study concerning the detection and control of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in an experimental animal facility. *Journal of Experimental Animal Technology.* **31**:145-160 (in Japanese with English summary).
- 11) **Noguchi, K. and T. Urano.** 1997. Incidence of cockroaches in an experimental animal facility. *Journal of Experimental Animal Technology.* **32**:147-154 (in Japanese with English summary).
- 12) 中山 賢, 宮下将彦, 藤田俊彦, 中邨 隆, 野口和浩, 大杉剛生, 浦野 徹. 2002. 湿式サイクロン脱臭方式の空調システムにおける脱臭および除菌効果について. *九州実験動物雑誌.* **18**:75-79.
- 13) **Noguchi, H., M. Ohta, S. Wakasugi, K. Noguchi, N. Nakamura, O. Nakamura, K. Miyakawa, M. Takeya, M. Suzuki, N. Nakagata, T. Urano, T. Ono, and K. Yamamura.** 2002. Effect of the intestinal flora on amyloid deposition in a transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. *Experimental Animals.* **51**:309-316.
- 14) **Kyuwa, S., T. Nishikawa, T. Kaneko, T. Nakashima, K. Kawano, N. Nakamura, K. Noguchi, T. Urano, T. Itoh, and N. Nakagata.** 2003. Experimental evaluation of cross-contamination between cryotubes containing mouse 2-cell embryos and murine pathogens in liquid nitrogen tanks. *Experimental Animals.* **52**:67-70.

謝 辞

この研究は、熊本大学生命資源研究・支援センターにおいて、熊本大学医学部附属動物実験施設長 西 勝英（前）教授、熊本大学生命資源研究・支援センター長 佐谷秀行 教授および熊本大学生命資源研究・支援センター病態遺伝分野 浦野 徹 教授のご指導の下で行いました。多くのご指導をいただき、深く感謝致します。

また、熊本大学大学院医学薬学研究部総合医薬科学部門生体微細構築学 浴野成生 教授には、投稿論文作成にあたり的確なご助言とご指導をいただきました。熊本大学生命資源研究・支援センター病態遺伝分野 大杉剛生 助教授にも同様にご指導をいただきました。ここに心から感謝の意を表します。

主論文の共著者である津久美 清 先生（現；（株）後藤孵卵場 病理診断室所属）には、膣内細菌叢検索のための検査および培養方法等を含む多くの技術指導および研究遂行にあたり多くのご助言をいただきました。また、同じく主論文の共著者である鶴殿俊史先生（（株）三和化学研究所 熊本霊長類パーク）には、チンパンジーからの検体採取に際してご協力とご指導を、さらに論文作成にあたり多くのご助言をいただきました。心から感謝致します。

熊本大学生命資源・研究支援センター病態遺伝分野の中村直子 氏には、使用した実験動物の微生物学的品質の確認検査にご協力していただきました。また、熊本大学生命資源研究・支援センター病態遺伝分野の崎尾 昇 氏をはじめとするスタッフの方々には、実験補助や動物の維持・管理等でご尽力いただきました。ここに、改めて心から感謝の念を表したいと思います。

略語一覽

BL agar : glucose liver blood agar

BS agar : bifidobacteria-selective agar

CFU : colony forming units

CV : conventional

DHL agar : deoxycholate hydrogen sulfide lactose agar

EG agar : Modified Eggerth-Gagnon agar

ES agar : eubacteria-selective agar

GNR : gram-negative rods

GPAC : gram-positive anaerobic cocci

GPAR : gram-positive anaerobic rods

LBS agar : modified lactobacilli-selective agar

NAC agar : nalidixic acid-cetrimide agar

NBGT agar : neomycin-brilliant green-taurocholate-blood agar

NN agar : neomycin-nagler agar

PD agar : potato dextrose agar

PEES agar : phenylethyl alcohol egg yolk suspension agar

SPF : specific pathogen-free

TATAC agar : triphenyltetrazolium chloride-acridine orange-thallosulfate-aesculin-crystal violet agar

TS agar : trypticase soy blood agar

VS agar : modified Veillonella-selective agar

第1章 研究の背景と目的

1-1 常在（正常）細菌叢とその役割

A. 常在（正常）細菌叢とは？

生体が外界と接する皮膚や鼻腔、口腔、咽頭、胃、腸管、膣および尿道などの粘膜には、多くの細菌がすみつき、それぞれの場所の条件に適応した集団として生体との間に安定した共存状態を維持している。このような細菌を常在細菌（indigenous bacteria）、その集団を常在細菌叢（indigenous bacterial flora）あるいは正常細菌叢（normal bacterial flora）と呼んでいる。さらに、それらは生体の部位あるいは年齢によって長期間にわたってすみついている特定菌種からなる定住菌叢（resident flora）と、数時間、数日間の短期間だけ皮膚や粘膜に存在する通過（一過性）菌叢（transient flora）とに分けられる。定住菌叢は、常在菌叢の主体をなし、宿主との間の長い進化の歴史の過程に高度に適応・馴化を勝ち得たもので、宿主特異性が強く、宿主の防御機構によって排除されることなく不即不離の密接な関係を保ち、一種の共生関係が成立している。通過菌叢は、周囲環境に由来する非病原性または潜在的病原性をもつ細菌で、定住菌叢のバランスが攪乱され、著しい変化が起こらない限りすみつくことはないと考えられている（吉川および笹川, 2001）。

常在細菌叢は、宿主の環境、食物、薬物、存在部位の生理状態やその部位への細菌の適応・馴化性などの種々の要因によって量的にも質的にも構成が左右される。したがって、必ずしも安定しているとは限らないが、通常宿主に目立った害を与えることなく、宿主との間ならびに細菌相互間に生態学的平行関係が維持されている。

これより以下では、生体の粘膜に生息している常在細菌叢のうち、細菌数やその種類が最も豊富で、生体との関わり合いが最も密接であると考えられる腸内細菌叢を例に、その役割等について若干説明する。

B. 腸内における常在細菌の種類とその分類

細菌の大きさを他の生物と比較したものを図1に簡単に示したが、細菌は1ミクロン（1/1000ミリ）前後の微小な生物である。細菌は、その形態から①球菌（coccus, 複数:cocci）、②桿菌（rodまたはbacillus, 複数:rodsまたはbacilli）および③らせん菌（spiral form）の3つに分けられるが、球菌には細胞分裂した後、娘細胞がすぐ離れて単在する単球菌や分裂した後も離れず細胞集団を作る双球菌、レンサ球菌、四球菌、八球菌、ブドウ球菌などがあり、大きさは直径0.6~1.0ミクロンぐらいである。桿菌は、円筒状をしていてその大きさも形も様々である。例えば、巨大桿菌など比較的大きなものは幅1.0~1.4ミクロン、長さ3.0~8.0ミクロンのものもあるが、大腸菌などは幅0.5ミクロン、長さ2.0~3.0ミクロンである。桿菌の形は、短桿菌、長桿菌、レンサ状桿菌、V・Y・L字形に配列するコリネ型菌、長さが直径の何十倍もある糸状菌、弓形に曲がったり短いらせん状のらせん菌、細長くらせんの数も多く柔軟なスピロヘータなどがある（光岡, 2002）。

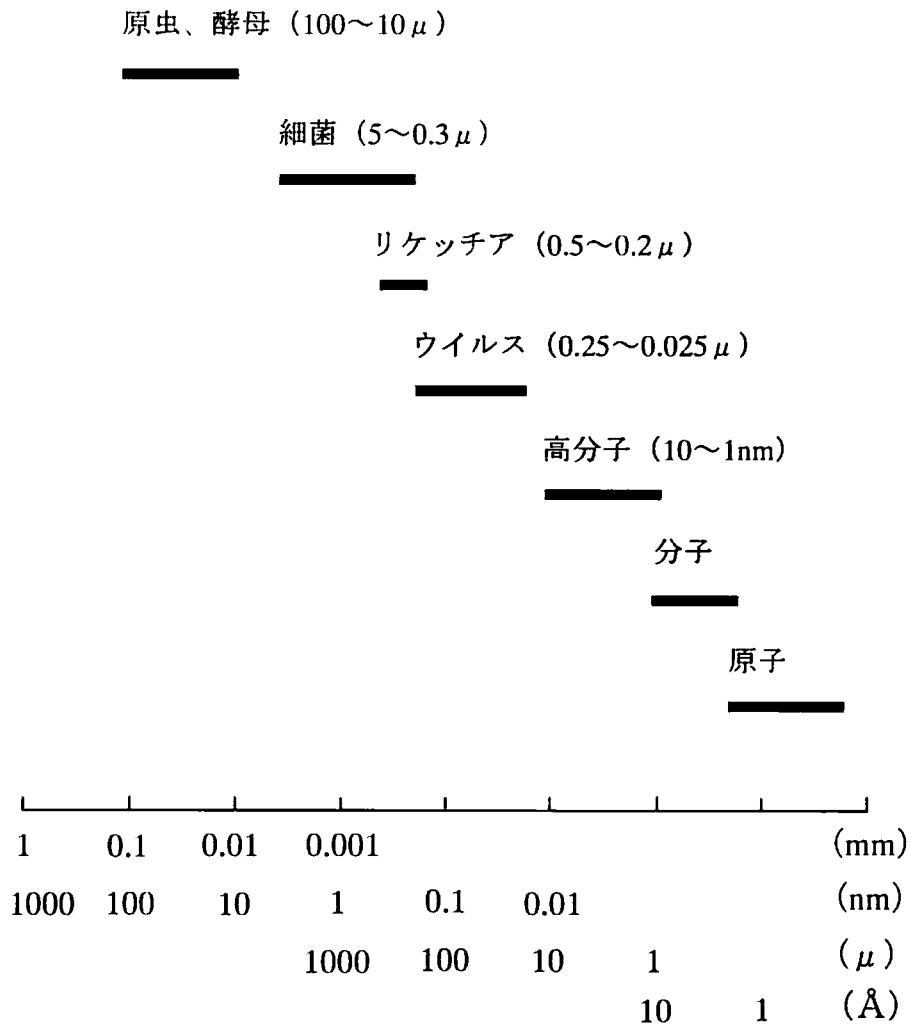


図1. 細菌の大きさ

つぎに、細菌は一般的にグラム染色によりグラム陽性菌とグラム陰性菌のふたつに分けられ、さらに、酸素に対する態度により次の3群に大別される。

i) 嫌気性菌 (Anaerobic bacteria, Anaerobes)

- ①嫌気性菌は、腸内細菌叢の中で最も数が多く、最優勢菌として存在し、免疫系によって排除されることなく、宿主と共生関係にあるといわれている (光岡, 1986)。
- ②光岡らは、正常腸内細菌叢を日齢に伴う推移のパターン、宿主との間に成立している関係から3つの菌群に分類しているが、嫌気性菌は光岡らが分類した菌群のうちI群を主に構成している (図2)。
- ③光岡らが分類した腸内細菌叢のI群とは、宿主との間の長い進化の歴史の過程で高度の適応・馴化をかちえたもので、以下のことを特徴とする菌群である。
 - (1)腸内細菌叢の中では、最優勢菌 ($10^9 \sim 10^{11}$ CFU/g) として存在している。
 - (2)宿主の防御機構によって排除されない。
 - (3)一生にわたって宿主と密接な関係を保ち、いわば共生関係まで成立している。
 - (4)動物特異性が強い。
- ④この菌群には、*Bacteroidaceae*、*Eubacterium*、*Bifidobacterium* および *Peptostreptococcus* などの嫌気性菌が含まれる。
- ⑤酸素がない状態でのみ増殖できる菌である。つまり、酸素が嫌気性菌の増殖に障害的に働き、酸素存在下で菌は死滅するか増殖できない。発酵によりエネルギー代謝を行う、または発酵および嫌氣的呼吸を行うものもある。

ii) 通性嫌気性菌 (Facultative anaerobic bacteria, Facultative anaerobes)

- ①通性嫌気性菌は、腸内細菌叢の中では、嫌気性菌の1/100以下の中程度の菌数で存在し、宿主の健康状態が悪くなった時に増加傾向を示すことが知られている (光岡, 1986)。
- ②通性嫌気性菌は、腸内細菌叢の中では、光岡らが分類したII群を主に構成する (図2)。
- ③光岡らが分類した腸内細菌叢のII群とは、以下のことを特徴とする菌群である。
 - (1)腸内細菌叢の中では、嫌気性菌の1/100以下の中程度の菌数 ($10^5 \sim 10^8$ CFU/g) で存在している。
 - (2)主に宿主の健康状態が悪くなった時 (免疫力が低下した時など) に増加する。
 - (3)免疫系やその他の腸内細菌叢の変化の影響を受ける
 - (4)出生後、II群を主に構成する通性嫌気性菌は急速に増加し最優勢菌叢を構成するが、その後、嫌気性菌 (I群) の増加とともに減少する。
- ④この菌群には、*Escherichia coli* や *Streptococcus* などが含まれる。
- ⑤通性嫌気性菌は、光岡らが分類したIII群に属する菌も含んでいる。(図2)。
- ⑥光岡らが分類した腸内細菌叢のIII群とは、以下のことを特徴とする菌群である。

- (1) III群に属する通性嫌気性菌は、腸内細菌叢の中での菌数は非常に少なく ($10^1 \sim 10^4$ CFU/g)、少数派である。
 - (2) III群は、病原菌の範ちゅうに属する菌群である。
 - (3) 宿主の防御機構を破ってこれまで存在しなかった場所に侵入し、いわゆる日和見感染 (opportunistic infection) を起こして病原性を発揮する。
- ⑦この菌群には、*Enterobacteriaceae* (病原株) および *Staphylococcus aureus* などが含まれる。
 - ⑧酸素の有無に関わりなく増殖できる菌である。エネルギー代謝の点では酸素の存在下では呼吸を、無酸素状態では発酵を行う菌と酸素の有無に関わりなく発酵のみを行う菌がある。

iii) 好気性菌 (Aerobic bacteria, Aerobes)

- ①好気性菌は、腸内細菌叢の中では、光岡らが分類したIII群 (上記参照)、つまり病原菌の範ちゅうに属し、日和見感染を起こして病原性を発揮する菌群である (図2) (光岡, 1986)。
- ②腸内細菌叢の中での好気性菌としては、*Pseudomonas aeruginosa* などがよく知られている。
- ③増殖に酸素を必要とする菌であり、好氣的呼吸によりエネルギー代謝を行う。

細菌の種類的大部分は上記に示した3種類に分類されるが、その他としてカンピロバクターのように酸素濃度が約5%でのみでしか増殖できない微好気性菌 (Microaerophilic bacteria) も存在している。

以上のように、腸内における主要な常在細菌はそのほとんどが嫌気性菌によって占められている。一方、生体に対して病原性を発揮する細菌として我々になじみの深い通性嫌気性および好気性の病原菌 (*Enterobacteriaceae* (病原株)、*Pseudomonas aeruginosa* および *Staphylococcus aureus* などの日和見感染菌) は、腸内の常在細菌叢の全体からみれば、ごく一部分にしかすぎない。したがって、これらの病原菌は、腸内から人工培地を用いて容易に分離することができることから、これまで優先的に研究されてきているが、腸内の常在細菌叢の果たす役割の全体からみれば、これら病原菌はそれほど重要ではないと考えられている。

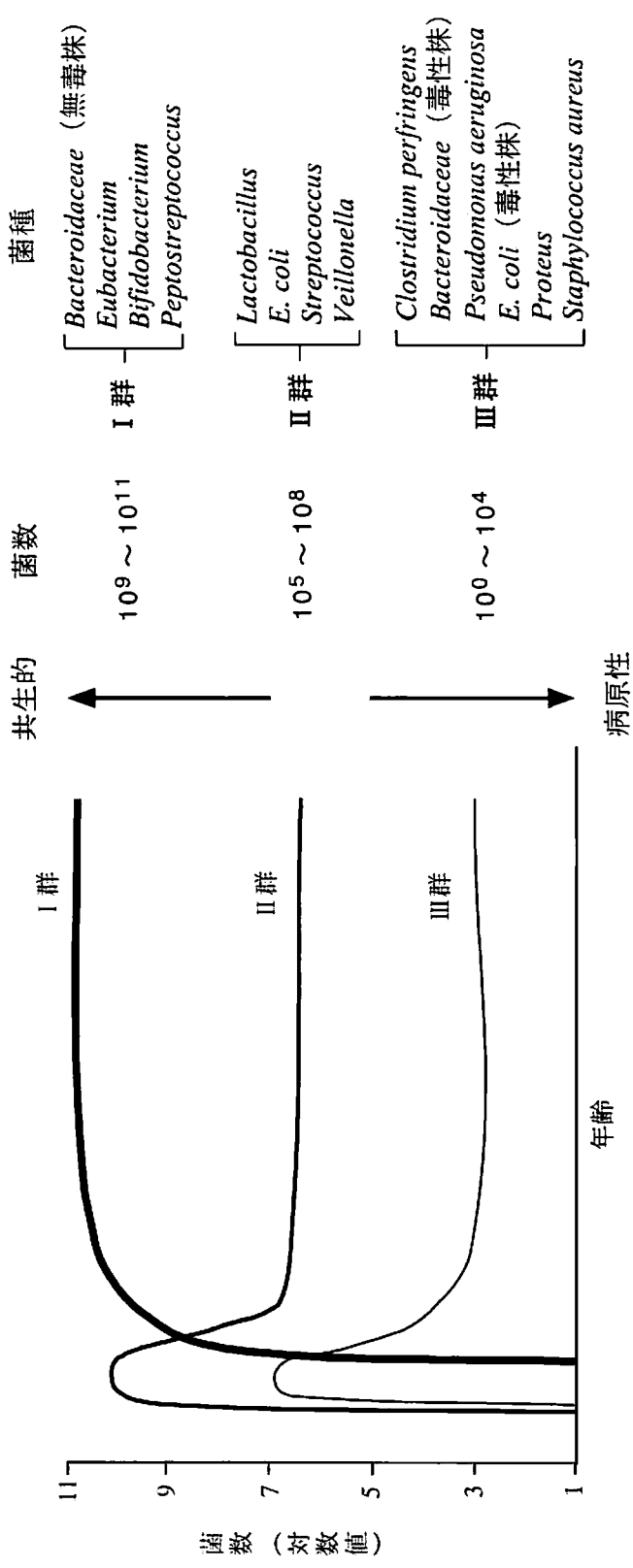


図2. 腸内細菌叢を構成する3菌群 (光岡, 1986)

正常な腸内細菌叢を構成する菌種は、日齢に伴う推移のパターン、宿主との間に成立している関係から次の3つに大別される。

① I 群：生後やや遅れて出現するが、正常腸内細菌叢の最優勢菌叢を構成する菌群で、宿主との間の長い進化の歴史の過程で高度の適応・馴化をかちえたもので、動物種特異性が強く、宿主の防御機構によって排除されることなく、一生にわたって宿主と密接な関係を保ち、いわば共生関係まで成立している。主な構成菌は、嫌気性菌である。

② II 群：動物の出生後まもなく出現して、一度最優勢菌叢を構成するが、まもなく次に出現する I 群の菌と交代するかのよう減少し、以後中程度の菌数に留まる菌群である。主な構成菌は、通性嫌気性菌で、宿主の健康状態が悪くなると増加傾向を示す *E. coli* などが含まれる。

③ III 群：腸内細菌叢の中では、少数派で、はつきり病原菌の範ちゅうに属する菌で構成されており、宿主の防御機構を破ってこれまで存在しなかった場所に侵入し、いわゆる日和見感染を起こして病原性を発揮することのある菌群である。

1-2. ヒトの腸内細菌叢

A. 新生児の腸内細菌叢の形成過程

ヒトは、母体の体内では無菌の環境で育つ。しかし、新生児として生まれると間もなく皮膚や気道、消化管などの粘膜で細菌が増殖してくる。出生後初めて排泄される胎便は通常無菌であるが、その3～4時間後には通性嫌気性菌である *Escherichia coli* や *Streptococcus* などが出現し、哺乳後、細菌数は急速に増加する。生後1日目にはほとんどの新生児の糞便内に *E. coli*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Clostridium*、*Staphylococcus* が認められるようになり、総細菌数は 10^{11} CFU/g 以上に達する。その後、普通の新生児では、生後3～4日目ごろから嫌気性菌である *Bifidobacterium* が出現し始め、前に出現していた *E. coli*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Clostridium* は減少し、生後5日目ごろには *Bifidobacterium* が最優勢となり、通性嫌気性菌である *E. coli* や *Streptococcus* は *Bifidobacterium* の 1/100 程度までに減少し、腸内細菌叢のバランスはほぼ安定する (図3) (加藤, 1996)。

Dubos (1980) によれば、上記に述べた、出生後、腸内細菌科に属する細菌 (*Enterobacteriaceae*) が急激に増加し、その後減少するという事実は、これらの細菌が腸内で感染を起こし、やがて回復してしまうことを示唆する、つまり、出生直後の *Enterobacteriaceae* の一過性の増加は、新生児期における免疫機構の未熟さによって引き起こされ、またその後に見られるこの菌種群の急速な抑制は免疫機構の発達によって引き起こされた結果ではないかと考えられている。

B. 幼児および成人の腸内細菌叢

離乳期以降から乳児の腸内細菌叢は、複雑になり、嫌気性菌優位の安定した構成になる。幼児と成人の腸内細菌叢には、構成上顕著な相違は認められない。また、通性嫌気性菌群のレベルは、嫌気性菌群のそれに比して 1000 分の 1 以下である。通常、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Eubacterium*、*Peptostreptococcus* といった嫌気性菌群が大便 1 g あたり 10^{10} ~ 10^{11} レベルで認められ、通性嫌気性菌群の *Enterobacteriaceae*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Staphylococcus* などは 10^3 ~ 10^8 /g レベルにすぎない (図4)。また、この時期の腸内細菌叢は極めて安定であり、極端な食事組成の変化でも容易に変動しない (加藤, 1996)。

C. 老人の腸内細菌叢

高齢になると腸内細菌叢は明らかに変化し、最優勢菌の一角を占めた *Bifidobacterium* は減少し、有害菌の代表ともみなされる *Enterobacteriaceae* や *Clostridium* は明らかに増加する (図4)。また、*Lactobacillus* は加齢とともに増加し、高齢者で最も細菌数が高い。一般的に生体防御能が低下している高齢者において、ヒト消化管内での有用細菌の代表と考えられる *Bifidobacterium* が減少しても、他方で *Lactobacillus* が増加する点は、有用細菌相互の一種の代償作用と考えられている (加藤, 1996)。

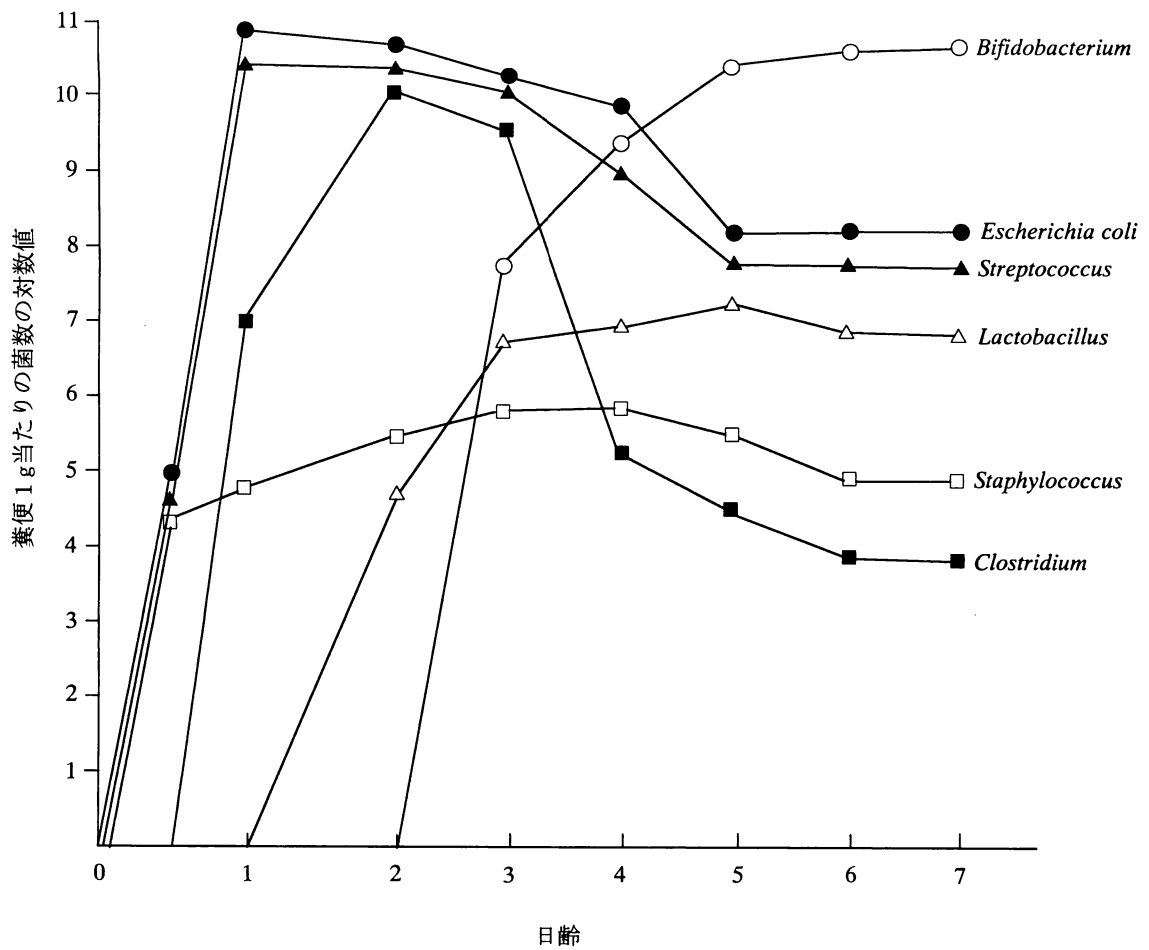


図3. 新生児の生後7日目までの腸内細菌叢の推移 (Mitsuoka, et al., 1972)

出生後、*E. coli*および*Streptococcus*などの通性嫌気性菌が急激に増加し、生後4日目ぐらいまで最優勢菌として存在する。しかし、生後3～4日目頃より嫌気性菌である*Bifidobacterium*が出現しはじめ、生後5日目以降、*E. coli*などの通性嫌気性菌にかわって最優勢菌となる。通性嫌気性菌は、*Bifidobacterium*の1/100程度にまで減少し、腸内細菌叢のバランスはほぼ安定する。

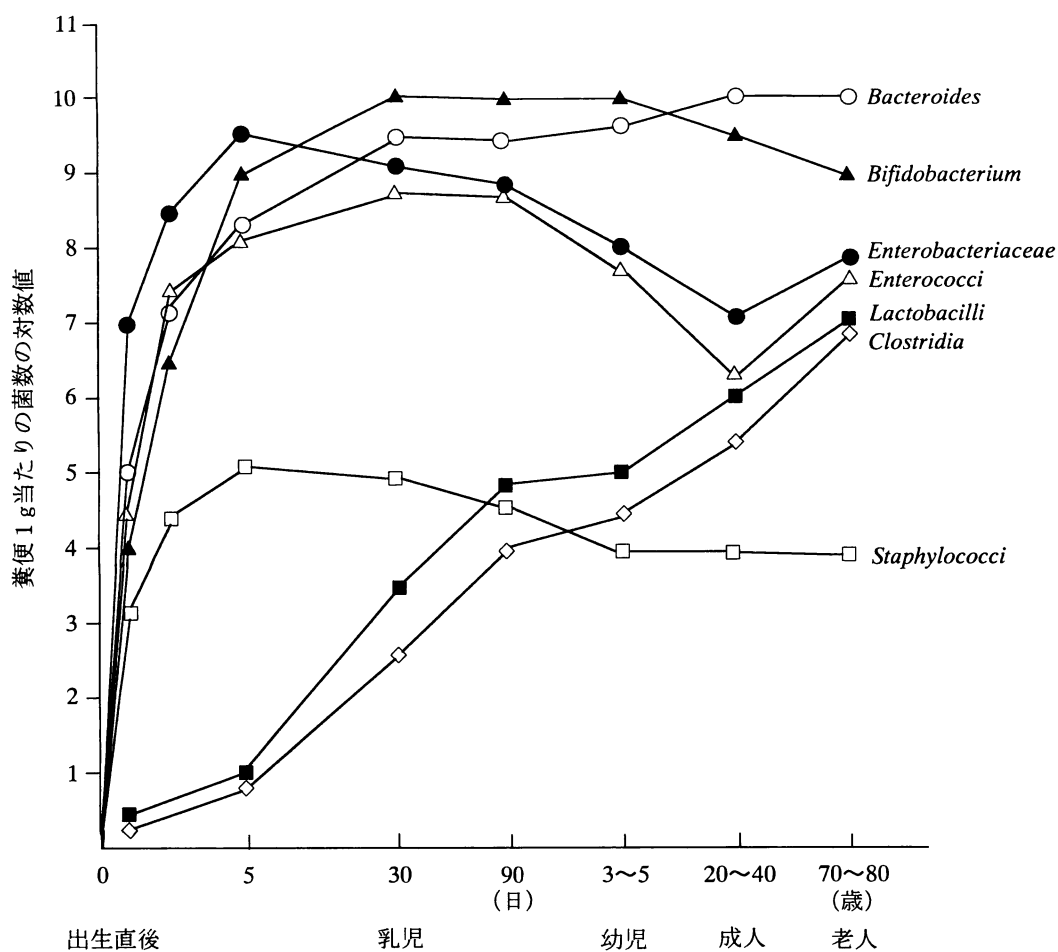


図4. ヒトの腸内細菌叢の加齢に伴う変化 (加藤延夫, 1996)

出生直後から*Enterobacteriaceae*が急激に増加するが、年齢の増加とともに減少傾向を示し、中程度のオーダーで安定する。その後老人期で再び増加傾向がみられる。*Bacteroides*および*Bifidobacterium*などの嫌気性菌は、*Enterobacteriaceae*に若干遅れて増加し、ヒトの腸内細菌叢の主要な構成菌となる。

1-3 動物の腸内細菌叢

各種動物の腸内細菌叢に関しては、光岡らが極めて強い嫌気度を要求する嫌気性菌も培養できる方法（光岡らの腸内細菌検索法；後述）を用いて調べ、その成績を報告している（表1および表2）（光岡, 1997）。動物の腸内細菌叢は、ほとんどの動物種において、*Bacteroidaceae*、*Eubacterium*、*Peptococcaceae*、*Anaerobic curved rods* などの偏性嫌気性菌と *Lactobacillus* または *Bifidobacterium* が最優勢菌叢を構成し、大腸菌を含む *Enterobacteriaceae* と腸球菌を含む *Streptococcus* は、中等度の菌数しか出現しない。このような腸内細菌叢の特徴、すなわち嫌気性菌が腸内細菌叢の主要をなし、*Enterobacteriaceae* などの通性嫌気性菌は中程度でしか存在しないという事実は、ヒトや動物に共通してみられる大きな特徴のひとつとなっている。

動物の腸内細菌叢は、乳酸菌の *Lactobacillus* と *Bifidobacterium* の構成バランスから三つのタイプに分けられる。乳酸菌として *Bifidobacterium* が最優勢となるヒト、サル、モルモットおよびニワトリ、*Lactobacillus* が最優勢となり *Bifidobacterium* の菌数が少ないブタ、マウス、ラット、ハムスター、ウマおよびイヌ、*Bifidobacterium* および *Lactobacillus* が少数しか検出されないウサギ、ウシ、ネコおよびミンクの3群に分けられる（表1および表2）。これらの動物種の腸内細菌叢の違いは、摂取する食餌成分との関係が深いと考えられている（光岡, 1997）。

また、マウスでは、腸内細菌叢に及ぼす微生物学的統御の影響についても検討されている。すなわち、人為的に帝王切開により作出され、その後特殊な環境で飼育・維持することによって確立された SPF マウスと自然分娩と普通環境で維持されている CV マウスの腸内細菌叢を比較した結果、SPF マウスにおける *Enterobacteriaceae* の菌数は、CV マウスよりも有意に高く、また SPF マウスの腸内細菌叢における嫌気性菌の構成は、CV マウスよりも単純であることがすでに報告されている（Itoh, et al., 1983）。

動物の腸内細菌叢に関する研究は、これらの他に、消化管の各部位別の比較や加齢に伴う変化など、様々な基礎的研究がそれぞれの動物種ごとにすでに行われている。

表 1. 各種動物の糞便菌叢 (1) (Mitusoka and Kaneuchi, 1977)

Bacterial groups	Monkeys	Chickens	Pigs	Dogs	Cats	Minks
N	5	5	5	5	5	5
Aerobes/facultative anaerobes						
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.2 ± 1.0 (5)*	7.0 ± 0.4 (5)	7.3 ± 0.1 (5)	7.6 ± 0.8 (5)	7.9 ± 0.4 (5)	9.6 ± 0.1 (5)
<i>Streptococcus</i>	7.3 ± 1.4 (5)	7.1 ± 0.4 (5)	7.9 ± 1.0 (5)	9.8 ± 0.9 (5)	8.5 ± 0.4 (5)	9.2 ± 0.3 (5)
<i>Staphylococcus</i>	4.2 ± 0.5 (5)	6.8 ± 0.7 (5)	6.6 ± 1.1 (3)	4.7 ± 0.7 (5)	6.8 (1)	5.7 ± 0.8 (4)
<i>Corynebacterium</i>	<	8.6 (2)	6.5 ± 0.5 (2)	8.7 ± 0.1 (2)	<	<
<i>Bacillus</i>	6.6 (5)	6.4 ± 1.2 (5)	6.4 ± 0.9 (5)	5.4 (1)	<	<
<i>Lactobacillus</i>	8.9 ± 0.7 (5)	9.5 ± 0.5 (5)	8.3 ± 0.4 (5)	9.3 ± 1.3 (5)	5.2 ± 1.5 (4)	6.1 ± 0.1 (5)
Yeasts	4.5 ± 1.4 (5)	4.2 ± 1.1 (5)	2.9 ± 0.1 (2)	5.0 ± 0.7 (5)	3.4 ± 1.6 (2)	5.7 ± 0.4 (5)
Anaerobes						
<i>Bacteroidaceae</i>	10.1 ± 0.4 (5)	10.6 ± 0.2 (5)	9.3 ± 0.8 (5)	10.1 ± 0.5 (5)	9.7 ± 0.4 (5)	7.6 ± 1.5 (5)
<i>Veillonella</i>	5.5 ± 1.9 (2)	<	<	5.9 (1)	<	<
<i>Peptococcaceae</i>	9.8 ± 0.4 (5)	9.9 ± 0.1 (5)	8.9 ± 0.3 (5)	9.7 ± 0.4 (5)	9.6 ± 0.1 (5)	<
<i>Bifidobacterium</i>	9.8 ± 0.5 (5)	9.1 ± 0.9 (5)	7.6 ± 0.5 (5)	6.6 ± 2.7 (4)	<	<
<i>Eubacterium</i>	10.0 ± 0.6 (5)	10.2 ± 0.3 (5)	8.1 ± 1.3 (5)	9.9 ± 0.4 (5)	9.4 ± 0.5 (5)	8.4 ± 0.1 (5)
<i>Spirillaceae</i>	9.4 ± 0.2 (2)	<	8.9 ± 0.7 (5)	<	9.0 (1)	<
Spirochaetes	10.2 (1)	<	4.2 ± 0.8 (3)	<	7.3 (1)	<
<i>Clostridium</i>	<	<	7.9 ± 1.0 (4)	9.1 ± 0.7 (5)	9.2 ± 0.4 (5)	7.4 ± 1.1 (5)
Total count	10.7 ± 0.4 (5)	10.9 ± 0.2 (5)	9.8 ± 0.4 (5)	10.8 ± 0.2 (5)	10.2 ± 0.2 (5)	9.8 ± 0.2 (5)

*糞便 1g 当たりの菌数の対数値の平均 ± 標準偏差、カッコ内は検出個体数。

表2. 各種動物の糞便菌叢 (2) (Mitusoka and Kaneuchi, 1977)

Bacterial groups	Mice	Rats	Hamsters	Guinea pigs	Rabbits	Horses
	N 5	5	5	5	5	5
Aerobes/facultative anaerobes						
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.5 ± 0.7 (5)*	5.3 ± 1.4 (5)	6.3 ± 0.7 (5)	6.4 ± 1.6 (5)	3.5 ± 1.3 (4)	5.5 ± 1.0 (5)
<i>Streptococcus</i>	5.9 ± 1.6 (5)	8.2 ± 0.6 (5)	5.7 ± 1.5 (5)	6.9 ± 1.8 ()	3.6 ± 0.6 (3)	8.5 ± 0.8 (5)
<i>Staphylococcus</i>	4.4 ± 0.6 (3)	5.8 ± 1.3 (5)	4.8 ± 0.6 (5)	7.3 ± 0.7 (2)	3.4 (1)	3.8 ± 0.6 (5)
<i>Corynebacterium</i>	8.3 (1)	<	<	8.3 ± 0.2 (4)	4.6 ± 0.4 (2)	3.9 ± 0.4 (2)
<i>Bacillus</i>	4.5 ± 0.5 (5)	0 (0)	4.4 (1)	7.9 ± 0.4 (5)	<	6.1 ± 1.0 (5)
<i>Lactobacillus</i>	8.9 ± 0.3 (5)	9.6 ± 0.3 (5)	9.7 ± 1.2 (5)	8.2 ± 0.7 (5)	<	7.7 ± 0.5 (5)
Yeasts	<	<	<	2.4 (1)	4.3 (1)	2.8 ± 0.2 (4)
Anaerobes						
<i>Bacteroidaceae</i>	9.9 ± 0.4 (5)	9.9 ± 0.2 (5)	9.9 ± 0.4 (5)	8.5 ± 0.7 (5)	9.6 ± 0.2 (5)	7.2 ± 1.6 (5)
<i>Veillonella</i>	3.3 (1)	4.5 ± 0.3 (5)	4.5 ± 0.5 (5)	2.6 ± 0.3 (3)	<	4.6 ± 0.4 (5)
<i>Peptococcaceae</i>	7.8 ± 1.1 (2)	9.3 ± 0.3 (5)	9.7 ± 0.2 (5)	9.1 ± 0.3 (5)	8.3 ± 1.0 (5)	6.8 ± 2.4 (5)
<i>Bifidobacterium</i>	7.8 ± 2.8 (3)	8.2 ± 0.8 (5)	9.0 ± 0.3 (5)	8.8 ± 0.3 (5)	7.8 (1)	2.3 (1)
<i>Eubacterium</i>	8.5 ± 1.5 (5)	9.5 ± 0.3 (5)	<	8.1 ± 0.4 (5)	5.6 ± 1.0 (2)	7.7 ± 0.3 (3)
<i>Spirillaceae</i>	8.6 (1)	9.5 ± 0.4 (5)	9.2 ± 0.5 (5)	8.7 (1)	8.6 ± 0.3 (5)	8.3 ± 0.4 (5)
Spirochaetes	<	<	<	<	<	7.6 ± 0.5 (5)
<i>Clostridium</i>	3.3 (1)	6.0 (1)	<	<	2.3 (2)	7.5 ± 0.4 (5)
Total count	10.2 ± 0.4 (5)	10.4 ± 0.2 (5)	10.3 ± 0.2 (5)	9.5 ± 0.2 (5)	9.7 ± 0.2 (5)	9.0 ± 0.4 (5)

*糞便 1g 当たりの菌数の対数値の平均 ± 標準偏差、カッコ内は検出個体数。

1-4 腸内細菌叢が免疫系などの生体に与える影響（無菌動物での検討）

無菌動物は、常在細菌叢欠損動物であるが、この動物の開発によって腸内細菌叢の生体への影響がどのようなものであるかが明らかになった（ルネ・デュボス, 2000 ; 光岡, 2002）。

A. 無菌動物と CV 動物の形態的および組織学的違い

無菌動物では、CV（普通）動物と比較して以下のような形態的および組織学的違いがみられる。

- ①消化管、呼吸器、胸腺、脾臓、リンパ節などの重量（体重比）は、無菌動物の方が CV 動物よりも有意に軽い。
- ②無菌動物の盲腸重量は、CV 動物よりも約 4 倍程度重い。盲腸内内容物中の水分含量も増加している。
- ③組織学的に、無菌動物の小腸粘膜および粘膜固有層は CV 動物の場合よりも薄い（腸壁は未分化の状態のままで止まる傾向を示す）。

無菌動物の上述したような異常は、細菌との接触により速やかに正常にもどることが確認されている。このように、腸内細菌叢は形態的および組織学的にはっきりした影響を及ぼすことがすでに明らかとなっている。

なお、現在実験には SPF 動物が頻繁に使用されているが、この SPF 動物の腸内細菌叢は、CV 動物の場合よりも単純で無菌動物ほどきわだっていないが、無菌動物と同様の腸粘膜の異常が確認されている。

B. 無菌動物と CV 動物の免疫学的違い

実験的にある種の細菌を無菌動物に感染させた場合、無菌動物は抵抗性を示さないことから以下のことがいわれている。

- ①リンパ組織の発達が貧弱である。
- ②血清のガンマ・グロブリン濃度が低い。
- ③細網内皮細胞系の貪食能の低さ。

このように無菌動物では、一般的な防御機構が正常に発達していないと考えられるが、無菌動物でも若いうちに CV（普通）環境におけば、CV 動物と同様に胸腺リンパ節、脾臓および骨髄などの防御組織の発達がみられ、正常の抵抗性をもつようになる。これらの事実は、腸内細菌が宿主の免疫能にまで影響を及ぼしていることをよく物語っている。

C. 結論

以上、常在細菌叢の代表として腸内細菌叢を例にとって良い点を中心に概説した。しかし、一方では腸内細菌叢が食餌成分を発ガン物質に変換するなど、宿主にとって腸内細菌がむしろ有害に働いていることも明らかにされている。これらの知見から、腸内細菌叢は、生体に対して様々な点で非常に大きな影響を与えていることがわかる。このように、宿主と生体の粘膜に生息している常在細菌叢は様々な点で密接な関係にあることから、これらの常在細菌叢を研究することは非常に重要であると考えられる。

1-5 膣内細菌叢

A. ヒトの膣内細菌叢

i) デーデルライン桿菌

成人の膣内細菌叢の最優勢菌は、*Lactobacillus* であるといわれている (Bartlett and Polk, 1984; Fujisawa, et al., 1992 ; Johnson, et al., 1985; Larsen and Galask, 1980; Masfari, et al., 1986 ; Redondo-Lopez, et al., 1990 ; Reid and Burton, 2002; Sautter and Brown, 1980; Wilks and Tabaqchali, 1987)。ヒト膣内での最優勢の *Lactobacillus* は、別名デーデルライン桿菌 (*Lactobacillus acidophilus* を主とする数種類の *Lactobacillus* の総称) とも呼ばれ、*L. acidophilus* や *L. gasseri* などが含まれる。このデーデルライン桿菌は、ヒトの膣内の清浄化に重要な働きをしていると考えられており (Eschenbach, et al., 1989 ; Larsen and Galask, 1980 ; McGroarty, 1993 ; Yoshimura and Okamura, 2001 ; Reid and Burton, 2002 ; Mackowiak, 1982)、これまで多くの研究が行われている。

まず、ヒトの膣内細菌叢は、*Lactobacillus* を中心に構成されているが、その細菌叢は女性ホルモン、特にエストロゲンの影響を強く受けているといわれている。そこで、ヒトの膣内における *Lactobacillus* 増殖の機序を簡単に説明する。

①エストロゲンが存在すると膣粘膜上皮細胞内にグリコーゲンが貯えられる。



②*Lactobacillus* は、剥脱し自己融解をおこした膣粘膜上皮細胞中に含まれるグリコーゲンを酵素の作用で分解して単糖類を遊離させ、発酵して乳酸を産生する。



③その結果、膣内 pH は、4.0~4.5 の強酸性に保たれる。



④上記の *Lactobacillus* の増殖による膣内環境の酸性化は、膣への外部からの病原菌の侵入を阻止し、上部性器への感染を防止していると考えられている (膣の自浄作用)。

したがって、新生児の膣は、母親のホルモンの影響を受けていることから、*Lactobacillus* 優勢の細菌叢になっている。しかし、それ以後から思春期の前までの時期は、母親のホルモンの影響が消失してくることから、膣内 pH は中性に近づき、これに伴って、通性嫌気性菌である *Enterobacteriaceae*、*Streptococcus*、*Staphylococcus* および *Corynebacterium* などが多く検出されるようになる。

その後、思春期の時期になると再び女性ホルモンの影響により *Lactobacillus* 優勢の膣内細菌叢へと変化し膣内 pH は酸性となる。閉経後は、女性ホルモンの分泌が著しく減少するため思春期前の時期の細菌叢に戻り、膣内 pH は再び中性に近づくと考えられている (加藤, 1996)。

ii) その他の膣内細菌叢

成人の女性の膣内からは、*Lactobacillus* のほか、*Streptococcus*、*Peptococcaceae*、*Eubacterium*、*Bifidobacterium*、*Staphylococcus*、*Bacteroides*、*Enterobacteriaceae*、*Clostridium*、*Gardnerella vaginalis*、*Ureaplasma vaginalis* および *Candida* などが検出され、ときに *Trichomonas vaginalis* も検出されることが知られている。

表 3 には、これまでに報告されたヒトの膣内細菌叢の成績 (Levison, et al., 1977 ; Bartlett, et al., 1977 ; Linder, et al., 1978 ; Bartlett and Polk, 1984 ; Cook, et al., 1984 ; Wilks, et al., 1984) をまとめて示したが、これまでの報告は、研究者ごとに検体の採取方法や培養方法などがそれぞれ異なっている。そのため、その成績を単純に比較することはできない。しかし、これらの報告は、*Enterobacteriaceae* の分離頻度が低く、*Lactobacillus* や *Bacteroidaceae* などの嫌気性菌の分離頻度が高い傾向にあるという点では一致していた。

また、ヒトの月経周期は大きく卵胞期と黄体期に分けることができるが、1967 年に Morris らは大腸菌が、1973 年に Neary らは *Bacteroides* の検出率がともに卵胞期で高かったことを報告している。一方、1977 年に Corbishley および Sparks らはともに卵胞期と黄体期における細菌の検出率には差がなかったことを報告している。これらの成績は検出率を中心とした報告であったが、1992 年に Fujisawa らは光岡らの腸内細菌叢に準じた方法でヒトの膣内細菌叢を検討した結果、膣内総細菌数は卵胞期よりも黄体期で高いことを報告している。さらに、加齢に伴い *Lactobacillus* の菌数が減少することも併せて報告している。また、膣炎を伴うヒトの膣内細菌叢は、無症候性のヒトのそれと異なることが報告されている (Levison, et al., 1979 ; Wilks, et al., 1984 ; Linder, et al., 1978 ; Hammill, 1989)。

iii) 膣内細菌叢に影響を及ぼす因子

以上のように、膣内細菌叢は、腸内細菌叢とは異なり、女性ホルモンの影響を強く受けることから、性周期によって変動しているものと思われる。近年、ヒトの膣炎の感染モデルとして実験動物が使用されているが、ヒトと実験動物は、解剖学的にも生理学的にも異なっており、さらに実験動物の性周期は一定ではなく動物種ごとに異なっている。したがって、ヒトの膣のモデルとして実験動物を用いて研究をおこなっても、その成績がヒトに適用できるかどうかはわからない。そのため、実験動物の膣内細菌叢の動物種差あるいは性周期による変動等の基礎的研究を行うことは非常に重要であると考えられる。

表 3. ヒトの腔内細菌叢 - 文献による比較 -

Bacterial groups	Levison (1977)*	Bartlett (1977)	Linder (1978)	Bartlett (1984)	Cook (1984)	Wilks (1984)
N	7	22	50	78	52	20
Aerobes/facultative anaerobes						
<i>Enterobacteriaceae</i>	<	6.4 (9)	6.6 (6)	5.6 (8)	5.8 (6)	5.1 (15)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	7.8 (43)**	<	<	<	7.7 (17)	6.2 (20)
<i>Streptococcus</i>	5.6 (14)	6.8 (59)	7.7 (10)	6.5 (48)	4.9 (25)	7.3 (20)
<i>Staphylococcus</i>	<	7.6 (46)	8.0 (10)	6.1 (55)	<	7.2 (65)
<i>Corynebacterium</i>	<	7.2 (31)	8.1 (8)	6.1 (46)	4.2 (37)	7.0 (60)
<i>Enterococcus</i>	<	7.0 (27)	<	6.3 (14)	<	6.9 (15)
<i>Lactobacillus</i>	7.5 (71)	8.7 (50)	8.6 (80)	8.1 (58)	7.2 (87)	7.4 (90)
<i>Mycoplasma hominis</i>	<	<	<	<	3.7 (14)	<
Yeasts	<	<	7.2 (16)	5.8 (13)	4.2 (14)	<
Anaerobes						
<i>Bacteroidaceae</i>	7.5 (43)	9.1 (73)	8.3 (4)	7.7 (73)	5.8 (14)	8.2 (90)
<i>Veillonella</i>	6.0 (29)	7.6 (9)	<	<	<	<
GPAC	7.0 (71)	8.3 (41)	7.8 (4)	7.8 (80)	8.4 (27)	6.7 (25)
<i>Bifidobacterium</i>	7.9 (14)	8.6 (5)	<	<	6.3 (6)	8.1 (15)
<i>Eubacterium</i>	<	8.4 (36)	<	8.3 (20)	6.9 (8)	8.0 (10)
<i>Propionibacterium</i>	<	8.6 (14)	<	<	5.2 (4)	<
<i>Clostridium</i>	<	8.5 (18)	<	6.9 (7)	<	6.5 (5)
<i>Ureaplasma</i>	<	<	<	<	5.0 (54)	<

*参考文献 (発表年)、** 分離菌数の対数値、カッコ内は分離頻度 (%)、< : 検出限界以下を示す。

GPAC : gram-positive anaerobic cocci.

Levison (1977) : Calibrated loop にて検体を採取 (cfu/ml of secretions) ; Bartlett (1977) : Weighted swabs にて検体を採取 (cfu/g of secretions) ;

Linder (1978) : Slime sucker にて検体を採取 (cfu/ml of secretions) ; Bartlett (1984) : Weighted swabs にて検体を採取 (cfu/g of secretions) ;

Cook (1984) : Washings (2ml)にて検体を採取 (cfu/ml of washings) ; Wilks (1984) : Weighted loop にて検体を採取 (cfu/g of secretions)。

B. 各種実験動物の腔内細菌叢

実験動物の腔内細菌叢に関する報告は、これまでラット (Larsen, et al., 1976, 1976, 1977 ; Yamada, et al., 1983)、ウサギ (Jacques, 1986)、ネコ (Clemetson and Ward, 1990 ; Howard, et al., 1993)、イヌ (Baba, et al., 1983 ; Bjurstrom and Linde-Forsberg, 1992 ; Noguchi, et al., 2003 ; Van Duijkeren, 1992 ; Watts, et al., 1996)、ブタ (Bara, et al., 1993)、アカゲザル (Doyle, et al., 1991)、ヒヒ (Skangalis, et al., 1979)、チンパンジー (Boncyk and Kalter, 1972)、ヒツジ (Marshall, et al., 1983 ; Moorthy and Singh, 1982)、ウシ (Alam, et al., 1995 ; Amin, et al., 1996 ; Otero, et al., 2000)、ウマ (Hinrichs, et al., 1988 ; Scott, et al., 1971) 等についてみられる。しかし、腔内細菌叢に関するこれらの報告は、検体の採取方法や培養方法などの分析方法が、各実験者ごとに異なっていることから、各実験者間で得られた実験成績を単純に比較することができない。また、これまでの報告から実験動物の腔内細菌叢の構成は、動物種間で異なることが示唆されるが、現段階ではこの違いが本当の動物種間による違いなのか、あるいは腔内細菌叢の分析方法による違いなのかどうかはわからない状況にあった。

また、実験動物は、腔内細菌叢の感染防御的役割を証明するためのモデルとして (Herthelius, et al., 1989 ; Herthelius-Elman, et al., 1992 ; Redondo-Lopez, et al., 1990)、あるいはヒトの腔炎の感染モデル (Cox, 1982 ; Fidel, et al., 1996 ; Johnson, et al., 1989 ; Mardh, et al., 1984 ; Meysick and Garber, 1992 ; Patton, et al., 1996) として使用されている。しかし、実験動物の腔内細菌叢に関する基礎的知見がヒトの場合と比較すると非常に乏しいため、実験の成果を十分に解析できないだけでなく、実験目的にあった適切なモデル動物の選定が極めて困難であった。

そこで、これらの点を明らかにするために、まず最初に我が国で一般的に広く使用されている実験動物、すなわち CV マウス、ラット、ハムスター、ウサギおよびイヌの腔内細菌叢を最も感度が高い同一の分析方法 (Mitsuoka, et al., 1965 ; Mitsuoka, et al., 1976) で調べ、その成績を比較・検討した (Noguchi, et al., 2003)。

C. チンパンジーの腔内細菌叢

チンパンジーは、分類学的にヒトに最も近い動物種であり (Kennedy, et al., 1997)、さらにチンパンジーの生殖器は解剖学的にヒトと非常に類似している (Gould and Martin, 1981 ; Wislock, 1932)。また、チンパンジーの月経周期はホルモン学的にもヒトと非常に類似していることが確認されている (Graham, et al., 1972 ; Graham, et al., 1973 ; Winter, et al., 1980)。したがって、チンパンジーはヒトの生殖器の生理学的研究の優れた動物モデルとして広く認知されている (Graham, 1976 ; Graham, 1981 ; Hobson, et al., 1976)。これらのことから、チンパンジーの腔内細菌叢は、ヒトと類似している可能性が十分に考えられるが、これまでチンパンジーの腔内細菌叢に関する詳細な報告は、ほとんどみられない。

そこで、上述した実験動物の動物種に加えて、今回チンパンジーの腔内細菌叢についても同様の分析方法を用いて検討した (Noguchi, et al., 2004)。

D. 実験動物の微生物学的統御が及ぼす腔内細菌叢への影響

i) SPF、CV および wild ラットの腔内細菌叢

SPF（特定の病原菌がない）動物が確立される（日本では 1970 年代）以前においては、一般的に CV（普通）動物が実験に使用されていた。この CV 動物は、野生動物由来で、一般的にオープンシステム、つまりケージ等の飼育器材、餌、飲水および飼育室内の空気などは全く微生物学的統御がなされていない状態で飼育・維持されていた。したがって、以前は *Pasteurella pneumotropica* などの日和見感染菌による病気の発生がしばしば観察されていた（Casillo and Blackmore, 1972 ; Flynn, et al., 1968）。

そこで、これらの病原菌をもっていない動物、つまり SPF 動物の確立が急務になってきたが、そのためには、上述したような病原菌を動物個体から取り除く必要があった。

これらの病原菌は、母子感染、すなわち出産に伴う腔からの汚染あるいは授乳によって汚染することが知られていることから、妊娠した CV 動物から胎児を帝王切開することにより取り出し、人工乳で育てるという人為的操作により、まず最初に無菌動物の作出が試みられた。これにより上述のすべての病原菌の除去が行われた。

つぎに、この方法により作出された無菌動物を、SPF 動物だけを維持するための特殊な施設、すなわち持ち込まれる飼育器材等はすべて滅菌され、飼育室内には除菌された正常な空気が常時供給され、滅菌飼料および塩素添加飲水で飼育・維持されるという、外部からの細菌の侵入が非常に制限されたバリア施設で維持し、その飼育環境の中で繁殖された（Bleby and Lacey, 1969 ; Foster, et al., 1963 ; Hurni, 1981 ; Kappel, et al., 1969 ; Parrott and Eveleigh, 1970 ; Syukuda, 1979）。このような方法で確立されたのが、SPF 動物である。

このように、SPF 動物と CV 動物は、出産方法を含む作出過程と維持される飼育環境の 2 点において大きく異なっていることから、SPF 動物は人為的操作が加えられた特殊な動物であるということがいえる。

そのため、腸内細菌叢の分野では、すでに SPF 動物と CV 動物との間での比較検討がなされ、SPF 動物における腸内細菌叢の構成が CV 動物と異なっていることがすでに知られている（Coloe, et al., 1984 ; Itoh, et al., 1984 ; Itoh, et al., 1983 ; Itoh, et al., 1983 ; Walburg, et al., 1965 ; Yanabe, et al., 2001）。すなわち、SPF 動物の腸内細菌叢における嫌気性菌の分離菌数および分離頻度は、CV 動物よりも低く、また SPF 動物における *Enterobacteriaceae* の菌数は、逆に CV 動物よりも有意に高いことが知られている。

したがって、腔内細菌叢も腸内細菌叢と同様に、実験動物の微生物学的統御の違いによって異なることが十分に考えられる。

そこで、微生物学的統御の異なる SPF および CV および wild の 3 種類のラット、すなわち SPF ラットは帝王切開由来、SPF 環境で育成、CV ラットは普通分娩で出産、CV 環境で育成、wild ラットは普通分娩で出産、野生環境で育成、の異なる 3 種類のラットの腔内細菌叢の構成を調べ、比較・検討した。

ii) ラットの腔内細菌叢に及ぼす SPF 環境の影響

上述したように、SPF 環境では、使用される飼育器材は全て滅菌され、供給される空気も除菌された清浄な空気が供給されている。したがって、SPF 環境は CV 環境と比較して、環境からの細菌負荷 (bacterial load) が非常に少ない、つまり特殊な環境であるといえることができる。しかしながら、この SPF 環境が腔内細菌叢に対して、どのような影響を及ぼしているのかはわからないというのが実情であった。

そこで、今回はまず最初に、野外から捕獲した wild ラットを当施設内の SPF 環境で飼育した場合、その腔内細菌叢がどのように変化するか、すなわち、捕獲直後の wild ラットの腔内細菌叢と wild ラットを当施設内の SPF 環境で維持し交配させることによって得た F1 および F2 の wild ラットの腔内細菌叢を比較することにより、人工的に作り上げられた特殊な環境である SPF 環境がラットの腔内細菌叢にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

第2章 腔内細菌叢の検索方法

腔内細菌叢の分析方法は、基本的に光岡らの腸内細菌叢の検索方法に準じて行った (Mitsuoka, et al., 1965 ; Mitsuoka, et al., 1976)。具体的な方法をこれより以下に示した。

2-1 分離培地

この研究では、好気性菌あるいは通性嫌気性菌を培養するために1種類の非選択分離培地と5種類の選択分離培地を、また嫌気性菌を培養するために2種類の非選択分離培地と6種類の選択分離培地の合計14種類の培地を使用した。表4には、使用した培地の種類を簡単にまとめて示した。

各々の選択分離培地には、特定の細菌の増殖を促進する、あるいは特定の細菌以外の増殖を抑制する働きのある物質が加えられている。しかし、その目的のために培地に加えられた抗生物質等の物質は、目的とする細菌以外のすべての細菌を抑制できるわけではない。したがって、今回の研究では、選択分離培地に発育したすべてのコロニーを拾いあげ、それをグラム染色し、顕微鏡下での細菌の形態をコロニー別に調べることによって、ひとつひとつのコロニーの同定を行い、各グループの細菌数を算出した (Mitsuoka, et al., 1965 ; Mitsuoka, et al., 1976)。

表4. 分離培地およびその培養条件

培地	分離される細菌の種類	培養方法*	培養時間 (days)
Non-selective media			
EG agar	Anaerobes	A	3
BL agar	Anaerobes	A	3
TS agar	Aerobes	B	1-2
Selective media			
NBGT agar	<i>Bacteroidaceae</i>	A	3
BS agar	Bifidobacteria	A	3
ES agar	Eubacteria	A	3
VS agar	<i>Veillonellaceae</i>	A	3
NN agar	Clostridia	A	3
LBS agar	Lactobacilli	A	3
DHL agar	<i>Enterobacteriaceae</i>	B	1-2
TATAC agar	Streptococci	B	2
PEES agar	Staphylococci	B	2
PD agar	Yeasts, molds	B	2
NAC agar	<i>Pseudomonas</i> sp.	B	2

*A=Steel wool method replaced air with CO₂ ; B=Air.

2-2 分離培地の組成、作製方法およびその特徴

① TS blood agar

[組成]

Trypticase soy agar (BBL)	40g
精製水	1,000ml
ウマ脱繊維血	50ml

[培地の作り方]

Trypticase soy agar (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md, USA ; BBL) を添加した精製水を加温・溶解後、115°C, 20分オートクレーブ滅菌する。滅菌後50°Cに冷やし、市販のウマ脱繊維血（滅菌済）を無菌的に加え、シャーレに分注して平板とする。

[培地の特徴]

TS blood agar は、好気性菌および通性嫌気性菌を培養するための非選択分離培地である。

② DHL agar

[組成]

DHL agar (Eiken)	63g
精製水	1,000ml

[培地の作り方]

DHL agar を加えた精製水を加温・溶解後、115°C, 20分オートクレーブ滅菌し50°Cに冷やしたのち無菌的にシャーレに分注して平板とする。

[培地の特徴]

DHL agar (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan ; Eiken) は、*Enterobacteriaceae* を培養するための選択分離培地である。

培地中に含まれるデオキシコール酸ナトリウム (Sodium deoxycholate) によってグラム陽性菌の増殖が抑制される。

③ TATAC agar

[組成]

Bact Peoptone (Difco)	15g
Tryptone (Difco)	10g
Yeast extract (Difco)	10g
Saccharose (Nacalai Tesque)	1g
Esculin (Tokyo Kasei)	1g
Agar (Difco)	16g
精製水	1,000ml

pH 7.6~7.8

ウマ血清	50ml
TATAC 添加液 I	22ml
TATAC 添加液 II	20ml

[TATAC 添加液の作り方]

添加液 I

100ml の滅菌メスフラスコにアジ化ナトリウム (sodium azide ; Wako Pure Chemical Industries. Ltd, Osaka, Japan ; Wako) 0.45g および L-グルタミン酸ナトリウム (sodium L(+)-glutamate ; Wako) 30g を攪拌しながら入れ、滅菌精製水に溶解、総量を 100ml とした後、100°C, 30 分加温したのち、冷蔵保存する。

添加液 II

100ml の滅菌メスフラスコにアクリジンオレンジ(acridine orange ; Tokyo Kasei Ind., Tokyo, Japan ; Tokyo Kasei) 0.01g、塩化 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム (TTC ; 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride ; Wako) 0.1g、硫酸タリウム(thallous sulfate ; Tokyo Kasei) 1.65g およびクリスタルバイオレット (crystal violet ; Wako) 0.0065g を滅菌精製水に溶解し、総量を 100ml とした後、冷蔵保存する。

[培地の作り方]

ウマ血清および添加液を除く基礎培地成分を加温しながら溶解し、pH を修正、115°C 20 分オートクレーブ滅菌した後、50°C まで冷やし、市販のウマ血清、添加液 I および II を無菌的に加えて混和後、平板とする。

[培地の特徴]

TATAC agar は、streptococci を培養するための選択分離培地である。

添加液に含まれるアジ化ナトリウムによってグラム陰性菌や staphylococci の増殖が抑制され、クリスタルバイオレットによって *Escherichia coli* の増殖が抑制される。

④ PEES agar

[組成]

Staphylococcus No.110 agar (Nissui)	149g
LiCl (Wako)	5g
Phenylethyl alcohol (Kanto Chemical)	2.5ml
精製水	1,000ml
卵黄液 (50%液)	20ml

[卵黄液の作り方]

新鮮卵をヨードチンキで消毒後、滅菌シャーレに取り出し、10ml の滅菌ピペットで卵黄膜を破り、卵黄だけを吸い取り、滅菌ビンに移し、等量の滅菌生理食塩液を加えてよく

混和し、冷蔵保存する。

〔培地の作り方〕

精製水に Staphylococcus No.110 agar (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan ; Nissui)、LiCl (塩化リチウム) および Phenylethyl alcohol (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan ; Kanto Chemical) を既定量入れたのち加温溶解し、115°C, 20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、卵黄液を無菌的に加え、シャーレに分注して平板とする。

〔培地の特徴〕

PEES agar は、staphylococci を培養するための選択分離培地である。

培地中に含まれる高濃度 (7.5%) の塩化ナトリウム (sodium chloride) によって staphylococci 以外の細菌の増殖が抑制される。また、Phenylethyl alcohol によってグラム陰性菌の増殖が抑制される。

⑤ PD agar

〔組成〕

Potato dextrose agar (Difco)	39g
精製水	1,000ml
10% Tartaric acid (Wako)	14ml

〔培地の作り方〕

市販の Potato dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA ; Difco) を精製水で加温溶解し、115°C, 20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、10% Tartaric Acid を無菌的に添加してシャーレに分注して平板とする。

〔培地の特徴〕

PD agar は、Yeasts と Molds を培養するための選択分離培地である。

培地に添加される Tartaric acid (酒石酸) によって細菌の増殖が抑制される。また、培地中に含まれる Potato extract によって真菌の増殖が促進される。

⑥ NAC agar

〔組成〕

NAC agar (Eiken)	35.8g
精製水	1,000ml

〔培地の作り方〕

市販の NAC agar を添加した精製水を加温溶解し、115°C, 20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、無菌的にシャーレに分注して平板とする。

〔培地の特徴〕

NAC agar は、Pseudomonas を培養するための選択分離培地である。

培地中に含まれる Cetrimide によってグラム陽性菌および Pseudomonas 以外のグラム陰性菌の増殖が抑制される。

⑦ EG agar

〔組成〕

EG agar (Eiken)	40.7g
精製水	1,000ml
ウマ脱繊維血	50ml

〔培地の作り方〕

市販の EG agar を添加した精製水を加温・溶解し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、ウマ脱繊維血を無菌的に加え、シャーレに分注して平板とする。

〔培地の特徴〕

EG agar は、嫌気性菌を培養するための非選択分離培地である。

⑧ BL agar

〔組成〕

BL agar (Eiken)	60g
精製水	1,000ml
ウマ脱繊維血	50ml

〔培地の作り方〕

市販の BL agar を添加した精製水を加温・溶解し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、ウマ脱繊維血を無菌的に加え、シャーレに分注して平板とする。

〔培地の特徴〕

BL agar は、嫌気性菌を培養するための非選択分離培地である。

⑨ LBS agar

〔組成〕

LBS agar (BBL)	84g
Lab-lemco (Oxoid)	8g
精製水	1,000ml
酢酸 (Wako)	3.7ml

〔培地の作り方〕

市販の LBS agar を添加した精製水を加温溶解し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、無菌的に酢酸を加え攪拌後シャーレに分注して平板とする。

〔培地の特徴〕

LBS agar は、lactobacilli を培養するための選択分離培地である。

培地中に含まれるクエン酸アンモニウム (ammonium citrate) および酢酸ナトリウム (sodium acetate hydrate) によって streptococci、真菌および lactobacilli 以外の細菌の増殖が抑制される。また、酢酸添加により培地中の pH を下げることによって lactobacilli 以外の細菌の増殖が抑制されている。

⑩ NBGT agar

〔組成〕

EG agar (Eiken)	40.7g
精製水	1,000ml
ウマ脱繊維血	50ml
NBGT 添加液	20ml

〔NBGT 添加液の作り方〕

100ml の滅菌メスフラスコにタウロコール酸ナトリウム (sodium taurocholate ; Difco) 5.0g をとり、約 90ml の滅菌精製水にゆっくり加温しながら溶解した後、ブリリアント緑 (brilliant green ; Wako) 0.5% 溶液 1.0ml と硫酸フラジオマイシン (fradiomycin sulfate ; Wako) 1.0g を加え、10%NaOH を透明な緑色液となるまで加え、総量を精製水で 100ml とし、冷蔵保存する。

〔培地の作り方〕

市販の EG agar を添加した精製水を加温・溶解し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、ウマ脱繊維血と NBGT 添加液を無菌的に加え混和後、シャーレに分注して平板とする。

〔培地の特徴〕

NBGT agar は、*Bacteroidaceae* を培養するための選択分離培地である。

NBGT 添加液に含まれる硫酸フラジオマイシンによって *Bacteroidaceae*、*Bifidobacteria*、*Eubacteria* および *Clostridium* を除く大部分のグラム陽性菌とグラム陰性菌の増殖が抑制される。また、添加液に含まれるブリリアントグリーンによって *Escherichia coli* の増殖が抑制される。

⑪ BS agar

〔組成〕

BL agar (Eiken)	60g
Sodium propionate (Tokyo Kasei)	15g
精製水	1,000ml
ウマ脱繊維血	50ml

BS 添加液

50ml

[BS 添加液の作り方]

100ml の滅菌メスフラスコに約 80ml の精製水を入れ塩化リチウム (lithium chloride ; Wako) 6g を徐々に入れながら攪拌溶解する。溶解後、硫酸パロモマイシン (paromomycin sulfate ; 商品名アミノサイジン注 ; Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) 0.1g、硫酸フラジオマイシン (fradiomycin sulfate ; Wako) 0.4g を加え溶解後、精製水で総量を 100ml とし、冷蔵保存する。

[培地の作り方]

市販の BL agar と Sodium propionate を添加した精製水を加温・溶解し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、ウマ脱繊維血と BS 添加液を無菌的に加え混和後、シャーレに分注して平板とする。

[培地の特徴]

BS agar は、Bifidobacteria を選択的に培養するための選択分離培地である。

BS 添加液に含まれる硫酸フラジオマイシンによって *Bacteroidaceae*、Bifidobacteria、Eubacteria および Clostridium を除く大部分のグラム陽性菌とグラム陰性菌の増殖が抑制される。また、同様に硫酸パロモマイシンによってグラム陰性菌の増殖が抑制される。

⑫ ES agar

[組成]

EG agar (Eiken)	40.7g
Sodium propionate (Tokyo Kasei)	15g
精製水	1,000ml
ウマ脱繊維血	50ml
ES 添加液	50ml

[ES 添加液の作り方]

100ml の滅菌メスフラスコに硫酸フラジオマイシン (fradiomycin sulfate ; Wako) 0.4g、コリマイシン (colimycin ; Kayaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) 0.02g および硫酸ストレプトマイシン (streptomycin sulfate ; 明治製菓) 1g を入れ、約 80ml の滅菌精製水で溶解し、総量を 100ml とし、冷蔵保存する。

[培地の作り方]

市販の EG agar と Sodium propionate を添加した精製水を加温・溶解し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌後、50°C まで冷やし、ウマ脱繊維血と ES 添加液を無菌的に加え混和後、シャーレに分注して平板とする。

[培地の特徴]

ES agar は、Eubacteria を培養するための選択分離培地である。

ES 添加液に含まれる硫酸フラジオマイシンによって *Bacteroidaceae*、*Bifidobacteria*、*Eubacteria* および *Clostridium* を除く大部分のグラム陽性菌とグラム陰性菌の増殖が抑制される。また、同様にコリマイシンによって *Escherichia coli* の増殖が抑制される。

⑬ VS agar

〔組成〕

Veillonella agar (Difco)	36g
Tween 80 (Wako)	1g
精製水	1,000ml
ウマ脱繊維血	50ml
VS 添加液	3ml

〔VS 添加液の作り方〕

100ml の滅菌メスフラスコにマトロマイシン (matromycin ; Phizer Pharmaceuticals Inc., Tokyo, Japan) 1g を入れ、100ml の滅菌精製水で溶解し、冷蔵保存する。

〔培地の作り方〕

市販の *Veillonella* agar と VS 添加液溶液を除く基礎培地成分を加温しながら溶解し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌した後、50°C まで冷やし、ウマ脱繊維血と VS 添加液を無菌的に加えて混和後、平板とする。

〔培地の特徴〕

VS agar は、*Veillonellaceae* を培養するための選択分離培地である。

VS 添加液中に含まれるマトロマイシンによってグラム陽性菌の増殖が抑制される。

⑭ NN agar

〔組成〕

Bacto peptone (Difco)	40g
Na ₂ HPO ₄ (Wako)	5g
KH ₂ PO ₄ (Wako)	1g
NaCl (Wako)	2g
MgSO ₄ (7H ₂ O) (Wako)	0.2g
Glucose (Wako)	2g
Agar (Difco)	25g
精製水	1,000ml
	pH 7.6~7.8
卵黄液 (50%液)	100ml
NN 添加液	10ml

[NN 添加液の作り方]

100ml の滅菌メスフラスコに硫酸フラジオマイシン (fradiomycin sulfate ; Wako) 2g を入れ、100ml の滅菌精製水で溶解し、冷蔵保存する。

[培地の作り方]

卵黄液および NN 添加液を除く基礎培地成分を加温しながら溶解し、pH を調整し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌した後、50°C まで冷やし、卵黄液と NN 添加液を無菌的に加えて混和後、平板とする。

[培地の特徴]

NN agar は、Clostridia を培養するための選択分離培地である。

NN 添加液に含まれる硫酸フラジオマイシンによって *Bacteroidaceae*、*Bifidobacteria*、*Eubacteria* および *Clostridium* を除く大部分のグラム陽性菌とグラム陰性菌の増殖が抑制される。

2-3 検体の採取方法

実験動物の膣口周辺部をアルコール綿 (70%エチルアルコール含有) で消毒後、滅菌生理食塩水を吸引した滅菌済パスツールピペットあるいは駒込ピペットを膣内に挿入し、膣内洗浄を数回繰り返したものを検体 (採取原液 ; 10^{-0}) とした。なお、マウス、ラットおよびウサギでは 2 ml、イヌでは 5 ml、チンパンジーでは 10ml の滅菌生理食塩水で膣内洗浄をおこなった。

2-4 膣内細菌叢の分析方法

膣内細菌叢の分析方法は、基本的に光岡らの腸内細菌叢の検索方法に準じて行った (Mitsuoka, et al., 1965 ; Mitsuoka, et al., 1976)。すなわち、採取した膣の検体は、直ちに気相部を 100%の二酸化炭素で置換し密栓後、嫌気性グローブチャンバー内 (窒素 85%、二酸化炭素 5%、水素 10% ; ICM Co. Ltd., Tsukuba. Japan) に移し、その中で嫌気性希釈液を用いて 100 倍段階希釈列を作成した。

嫌気性希釈液は、精製水 1,000ml に tripticase soy broth without dextrose (BBL) 27.5g、炭酸ナトリウム (anhydrous sodium carbonate ; Wako) 0.84g、L-システイン塩酸塩 (L-cysteine hydrochloride monohydrate ; Wako) 0.5g、Bact-agar (Difco) 0.5g を入れ加温溶解した後、ネジ付き試験管に 9.9ml ずつ分注し、115°C、20 分オートクレーブ滅菌終了後、直ちに試験管を水道水で急冷したのち、嫌気性グローブボックス内に入れ試験管の気相部を混合ガス (N_2 ; 85%、 H_2 ; 10%、 CO_2 ; 5%) で置換後、ネジを締めて使用時まで嫌気性グローブボックス内で保管して使用した。

作成した検体の希釈列は、密栓後、直ちに嫌気性グローブチャンバーの外に搬出し、光岡らの腸内細菌培養方法に従って、培養および同定を行った。すなわち、各々の検体 (10^{-0} ~ 10^{-6}) の 0.05ml を 14 種類の培地に塗抹した (表 4)。非選択培地として、嫌気性菌分離用の EG agar および BL agar、好気性菌分離用の TS blood agar の 3 種類、あるいは選択分離培地として、BS agar (Bifidobacteria 分離用)、ES agar (Eubacteria 分離用)、NBGT agar (*Bacteroidaceae* 分離用)、NN agar (Lecithinase-positive clostridia 分離用)、VS agar (Veillonellae and megasphaerae 分離用)、LBS agar (lactobacilli 分離用)、TATAC agar (Enterococci and streptococci 分離用)、PEES agar (Staphylococci and micrococci 分離用)、PD agar (Yeasts and molds 分離用)、DHL agar (*Enterobacteriaceae* 分離用)、NAC agar (*Pseudomonas* 分離用) の 11 種類に塗抹した。

検体を培地に塗抹乾燥後、TS blood agar および DHL agar の 2 種類の寒天培地は、37°C で 24 時間、TATAC agar、PEES agar、PD agar および NAC agar の 4 種類の寒天培地は、37°C で 48 時間、好气的条件下で培養をおこなった。また、EG agar、BL agar、BS agar、NBGT agar、ES agar、NN agar、VS agar および LBS agar の 8 種類の寒天培地は、嫌気性培養ジャー (Hirayama Manufacturing Corporation., Tokyo., Japan) の中に入れ、炭酸ガスの注入およびスチールウール法によりジャーの中を嫌気状態にした後、37°C で 72 時間培養をおこなった。図 5 には、これまで述べた検体の採取から培養までの手順を簡単にまとめて示した。

なお、予備実験で、実験動物の腔内細菌の培養結果を嫌気性グローブチャンバーと嫌気性培養ジャーによる方法で比較検討したところ、分離された細菌の種類および細菌数に違いがみられなかったことから、今回は培地の出し入れなど取り扱いが比較的簡単な嫌気性培養ジャーによる方法を用いて嫌気性菌の検索をおこなった。

2-5 腔内細菌の分類

腔内から採取した検体から分離された細菌の分類は、光岡らの腸内細菌叢の分類 (Mitsuoka, et al., 1965 ; Mitsuoka, et al., 1976) に準じて行った。光岡らは、腸内から分離される細菌を、細菌のいろいろな性状、つまり好気性か嫌気性か、グラム染色性、球菌か桿菌か、芽胞の有無、細菌の配列や細かい形状、集落の性状、などによって表 5 および表 6 のような細菌群に分けている。

今回の研究では、表 5 および表 6 で分類されている細菌群の種類を、さらに以下のように大別した。

・ Gram-positive anaerobic cocci (GPAC) :

嫌気性のグラム陽性球菌である *Peptococcus*、*Peptostreptococcus*、*Ruminococcus*、*Coprococcus*、*Sarcina*、*Streptococcus* および *Gemmiger* を含む (表 5)。

・ Gram-positive anaerobic rods (GPAR) :

嫌気性のグラム陽性桿菌である *Bifidobacterium*、*Propionibacterium*、*Actinomyces*、

Eubacterium、*Lactobacillus* および *Lachnospira* を含む (表 5)。

• ***Veillonellaceae*** :

嫌気性のグラム陰性球菌である *Megasphaera*、*Acidaminococcus* および *Veillonella* を含む (表 5)。

• ***Bacteroidaceae*** :

嫌気性のグラム陰性桿菌である *Bacteroides*、*Fusobacterium*、*Prophyromonas*、*Leptotrichia*、*Desulfomonas*、*Butyrivibrio*、*Succinimonas*、*Anaerobiospirillum*、*Wolinella*、*Selenomonas*、*Anaerovibrio*、*Pectinatus*、*Acetovibrio* 及び *Lachnospira* を含む (表 5)。

• ***Spirochaetaceae*** :

嫌気性のグラム陰性のらせん状の桿菌である *Treponema* 及び *Borrelia* を含む (表 5)。

• ***Vibrionaceae*** :

通性嫌気性のグラム陰性桿菌の *Aeromonas* および *Vibrio* を含む (表 6)。

• ***Pasteurellaceae*** :

通性嫌気性のグラム陰性桿菌の *Actinobacillus*、*Pasteurella* および *Haemophilus* を含む (表 6)。

なお、以下に示す第 3 章および第 4 章における実験の結果では、*Enterobacteriaceae* を除く好気性および通性嫌気性菌のグラム陰性桿菌を gram-negative rods (GNR)、第 5 章では *Enterobacteriaceae* および *Pasteurellaceae* を除く好気性および通性嫌気性菌のグラム陰性桿菌を other gram-negative rods (other GNR) と表記して示した。

分離された細菌のいろいろな性状に基づき分類された上述の細菌群の菌数は、最も希釈の高いところで発育したコロニー数を数えることによって決定し、 \log_{10} colony forming units (CFU) /ml of specimen (vagina) に換算して示した。また、総細菌数は、分離された各菌種ごとの菌数の値をプラスすることによって算出した。

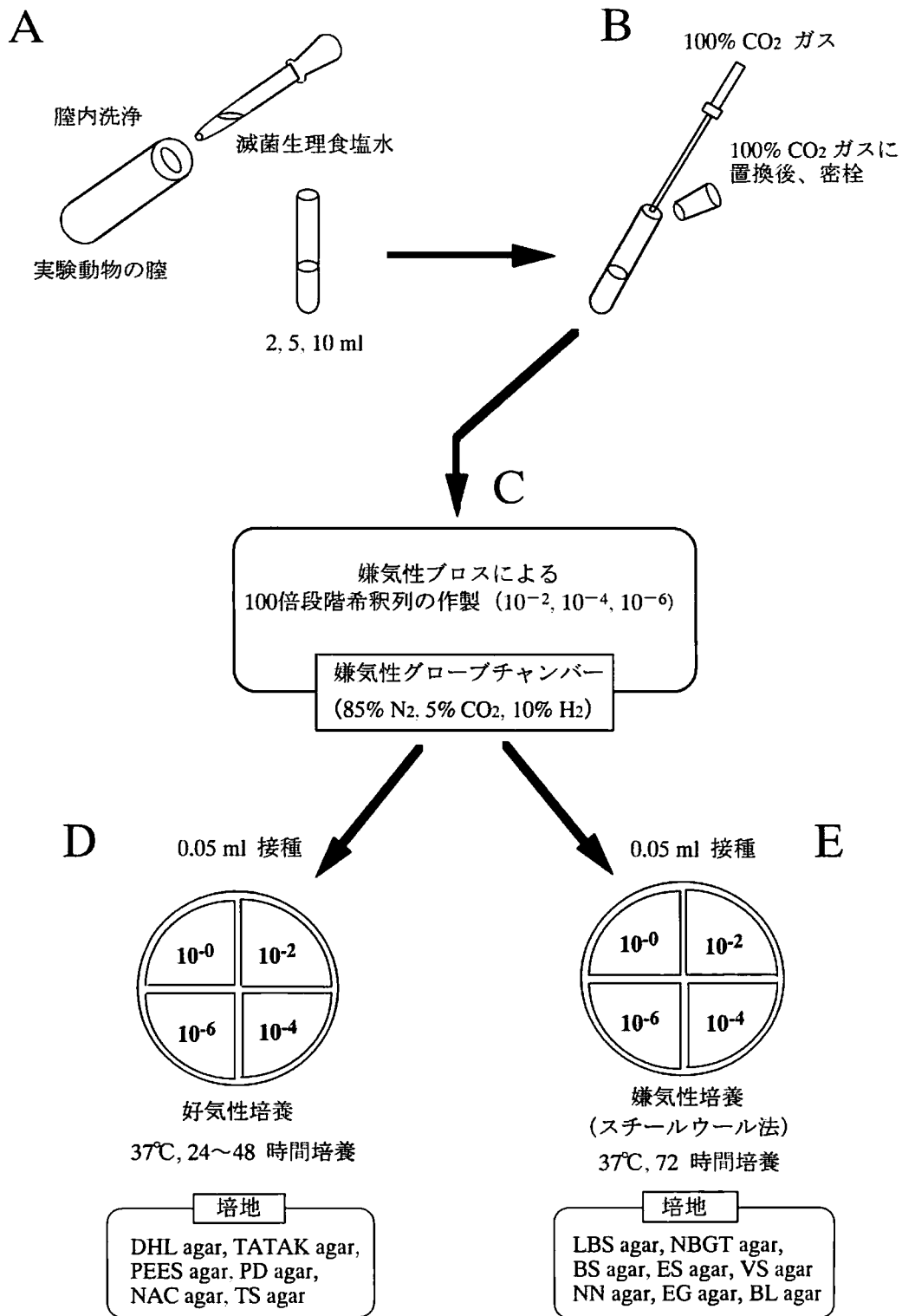


図5. 膣内細菌叢検索のための検体の採取から培養までの手順

A: 膣内からの検体の採取、B: 気相部の100%炭酸ガスへの置換、C: 嫌気性グローブチャンパー内での検体の希釈列の作製、D: 好気性培養用培地への検体の接種、E: 嫌気性培養用培地への検体の接種 (スチールウール法)

表5. 細菌の分類(1) - 嫌気性菌 -

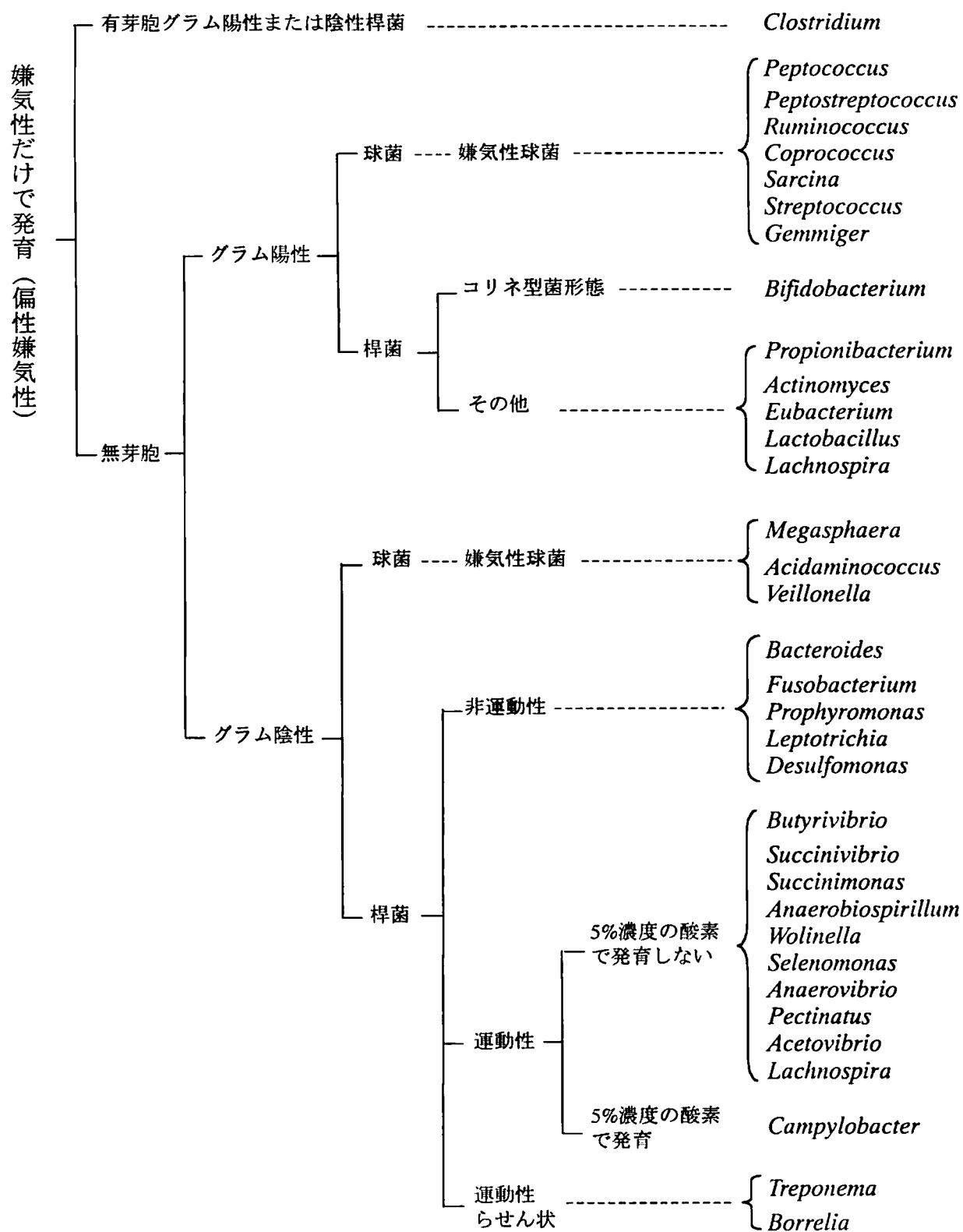
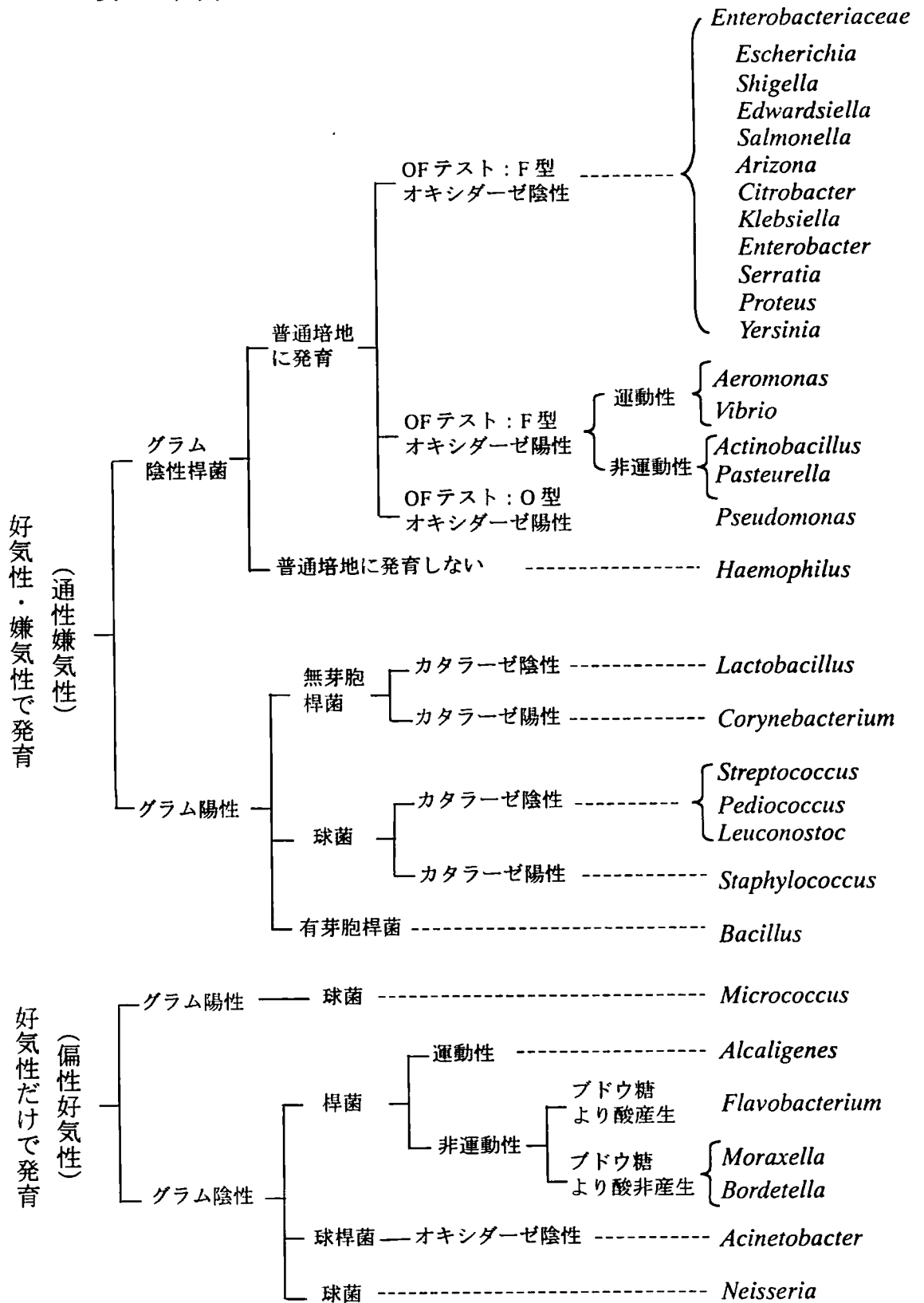


表6. 細菌の分類(2) -好気性・通性嫌気性菌-



第3章 CVマウス、ラット、ハムスター、ウサギおよびイヌの腔内細菌叢

3-1 材料および実験方法

A. 実験動物

i) マウス

九動 (Kyudo Co., Ltd., Kumamoto, Japan) より購入した 12 週齢のコンベンショナル (CV)、バージン、雌の ICR/Kud マウス 7 匹を使用した。これらのマウスは、coronavirus、Sendai virus (HVJ)、*Citrobacter rodentium*、*Clostridium piliformis*、*Corynebacterium kutscheri*、*Mycoplasma pulmonis*、*Pasteurella pneumotropica*、*Pseudomonas aeruginosa* および *Salmonella* spp. が陰性であった。

これらのマウスは、購入後、熊本大学生命資源研究・支援センターの動物資源開発研究施設 (動物施設) 内の SPF 環境下で維持された。すなわち、マウスは滅菌済みの床敷 (Iwakura Co. Ltd., Hokkaido, Japan) が入れられたステンレス製の蓋の着いた滅菌済 TPX 製ケージ (CLEA Japan, Inc., Tokyo; CLEA) に 3 ないし 4 匹収容され、ラミナーフローベンチ (Tokiwa Kagaku Kikai Co. Ltd., Tokyo, Japan; Tokiwa) で飼育・維持された。また、飼料は市販の固型飼料 (CE-2; CLEA) を、飲水は自動給水装置 (Tokiwa) にてフィルターで濾過後、紫外線照射された水を給与し、それぞれ自由摂取させた。ケージ交換は、週 1 回の頻度で行われた。飼育室内の環境条件は、温度 22 ± 2 °C、湿度 50~70%、明暗周期 12 時間 (明: 7~19 時、暗: 19~7 時) であった。飼育室内の床面は、毎日清掃され、床面およびラミナーフローラックの棚面は、50ppm の次亜塩素酸ナトリウムで消毒された。

ii) ラット

清水実験材料 (Shimizu laboratory Supplies, Kyoto, Japan) より購入した 12 週齢の CV、バージン、雌の Wistar/Siz ラット 7 匹を使用した。これらのラットは、coronavirus、Sendai virus (HVJ)、*C. rodentium*、*C. piliformis*、*C. kutscheri*、*M. pulmonis*、*P. pneumotropica*、*P. aeruginosa* および *Salmonella* spp. が陰性であった。

これらのラットは、購入後、滅菌済 TPX 製のケージ (CLEA) に 2~3 匹の割合で収容され、飼育室内環境はマウスと同じ条件下で飼育・維持された。

iii) ハムスター

アークリソース (ARK Resource Co., Ltd., Kumamoto, Japan) より購入した 9 週齢の CV、バージン、雌のシリアンハムスター 9 匹を使用した。これらのハムスターは、Sendai virus (HVJ)、lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus、*C. piliformis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Bordetella bronchiseptica*、*P. multocida*、*P. pneumotropica*、*P. aeruginosa*、*Salmonella* spp.、*Yersinia pseudotuberculosis*、dermatophytes および ectoparasites が陰性、*Spironucleus muris* が陽性であった。

これらのハムスターは、購入後、滅菌済 TPX 製のケージ (CLEA) に 3 匹ずつ収容され、飼育室内環境はマウスと同じ条件下で飼育・維持された。

iv) ウサギ

九動 (Kyudo Co., Ltd., Kumamoto, Japan) より購入した 8 ヶ月齢の CV のバージン、雌の New Zealand White rabbits 6 匹を使用した。これらのウサギは、*B. bronchiseptica*、*P. multocida*、*Salmonella* spp.、*Psoroptes cuniculi* および ectoparasites が陰性、*Eimeria* spp. が陽性であった。

これらのウサギは、購入後は、滅菌済の FRP (fiber reinforced plastics ; Tokiwa) 製のケージに 1 匹ずつ収容され、自走式の飼育架台にて飼育・維持された。飼料は、市販の固型飼料 (RM-4 ; Funabashi Farm, Chiba, Japan) を、飲水は自動給水装置 (Tokiwa) にてフィルターで濾過された水を給与し、それぞれ自由摂取させた。ケージ交換は、週 1 回の頻度で行われた。飼育室内の環境は、マウスと同じ条件に設定され飼育・維持された。

v) イヌ

Covance Research Products Inc., Cumberland, Va. から譲り受けた 12 あるいは 18 ヶ月齢の CV、バージン、雌のビーグル 9 匹を使用した。

イヌは、ステンレス製のケージに 1 匹ずつ収容され、飼育・維持された。飼料は未滅菌の固型飼料 (ED-1 ; Sanwa Kagaku Co., Ltd., Nagoya, Japan) を給与し、飲水は自動給水装置 (Tokiwa) にてフィルターで濾過された水を、それぞれ自由摂取させた。飼育室内の環境は、マウスと同じ条件に設定され飼育・維持された。

B. 検体採取のスケジュール

各種実験動物の性周期は、マウスおよびラットが 4 日あるいは 5 日 (Allen, 1922 ; Baker, et al., 1979)、ハムスターが 4 日 (Kita, et al., 1979)、イヌが 7~11 ヶ月 (Bell, et al., 1973) といわれている。しかし、ウサギについては、マウスやラットでみられるような明瞭な性周期を示さないとされている。これらの実験動物の性周期の詳細を表 7 に示した。

以上のような実験動物の性周期を考慮に入れて、検体採取のスケジュールは、マウスおよびラットでは連続 5 日間、ハムスターでは連続 4 日間、ウサギでは 2 日間隔で 3 回、1 日に 1 回の頻度で検体の採取をおこなった。また、イヌでは連続 11 ヶ月間、1 ヶ月に 1 回の頻度で検体の採取をおこなった。

C. 性周期の各時期の決定

各々の実験動物の性周期の各時期は、採取した検体の一部を用いて作製した塗抹標本をギムザ染色し、顕微鏡で角化上皮細胞、有角上皮細胞および白血球等を観察することによって決定した。

なお、マウス、ラットおよびハムスターの性周期は、発情前期 (Proestrus)、発情期 (Estrus)、発情後期 (Metestrus) および発情休止期 (Diestrus) の4つに分けられる。イヌでは、マウス・ラットでみられる発情後期の時期がなく、発情前期、発情期、発情休止期および無発情期 (Anestrus; イヌのみ) の4つに分けられる。また、イヌでは他の動物種とは異なり発情前期の時期に赤血球 (出血) がみられることが特徴となっている。ウサギについては、マウス・ラットでみられるような明瞭な性周期がみられないため、検査時期を交尾前 (Precoitus) に統一して示した。また、今回の研究では、それぞれの動物種における発情期の検体数は、発情休止期あるいは無発情期の検体数と比較すると非常に少なかった。これは、表7に示すようにそれぞれの動物種における発情期の期間が発情休止期あるいは無発情期と比較して非常に短いことが原因である。

表7. マウス、ラット、ハムスターおよびイヌにおける性周期の各時期の長さ

動物種	性周期の時期				
	発情前期	発情期	発情後期	発情休止期	無発情期
マウス・ラット	0.5 日	0.5 日	0.5 日	2.5 日	NP
ハムスター	0.4 日	0.3 日	0.7 日	2.6 日	NP
イヌ	6-10 日	8-14 日	NP	2 ヶ月	4-8 ヶ月

NP = Not present.

D. 検体の採取および腔内細菌叢の分析方法

検体の採取は、それぞれの実験動物の腔口周辺部をアルコール綿 (70%エチルアルコール含有) で消毒後、準備した 2ml (マウス、ラット、ハムスターおよびウサギ) あるいは 5ml (イヌ) の滅菌生理食塩水の一部を吸引したパスツールピペットを腔内に挿入し、腔内洗浄を数回繰り返すことによって得た。採取した検体は、直ちに気相部を 100%の炭酸ガスで置換し密栓後、嫌気性グローブチャンバー内 (窒素 85%、二酸化炭素 5%、水素 10%; ICM Co., Ltd., Tsukuba, Japan) に移し、その中で嫌気性希釈液を用いて 100 倍段階希釈列を作成し、光岡らの腸内細菌叢の検索方法 (第2章参照) に準じて、CV マウス、ラット、ハムスター、ウサギおよびイヌの腔内細菌叢の分析を行った。

3-2 結果

A. 実験動物の性周期と膣内細菌叢との関係

マウス、ラット、ハムスターおよびイヌにおける膣内総細菌数は、性周期の各時期によって変化し、共通して発情期に最も高くなった。これらの動物種の発情期における総細菌数を発情休止期あるいは無発情期と比較したところ、発情期の分離菌数は発情休止期あるいは無発情期のそれよりも有意に高かった ($P < 0.0001$) (図 6)。

ウサギは、交尾排卵動物で、マウス・ラットのような明瞭な性周期をもっていない。したがって、通常動物実験施設に搬入され維持されているウサギは交尾前 (Precoitus) の状態である。この交尾前のウサギの膣から分離される細菌の種類およびその分離菌数は、ともに非常に少なかった。このことから、交尾前におけるウサギの膣内の状態は、マウス、ラットおよびハムスターの発情休止期あるいはイヌの無発情期の時期と非常に類似した状態であると考えられた (図 6)。

B. 実験動物の膣内細菌叢の中に占める好気性菌と嫌気性菌の割合

表 8 および表 9 には、各種実験動物の発情期と発情休止期あるいは無発情期の膣内細菌叢の構成を示したが、膣内細菌の総細菌数はそれぞれの動物種に共通して発情期で最も高くなり、発情休止期あるいは無発情期で最も低くなる傾向が認められた。

そこで、膣内総細菌数が最も高くなる時期と最も低くなる時期、すなわち発情期と発情休止期あるいは無発情期における膣内細菌叢の中に占める好気性菌 (通性嫌気性菌を含む) と嫌気性菌の割合を調べた。その結果、マウスの発情期では、総好気性菌数は総嫌気性菌数よりも高かった。ラットとイヌの発情期では、総好気性菌数と総嫌気性菌数の割合はほぼ同等であった。それに対して、ハムスターの発情期では、総嫌気性菌数が総好気性菌数よりも高かった (表 8)。発情休止期あるいは無発情期における好気性菌と嫌気性菌の割合は、発情期の場合とほとんど同じであったが、発情休止期あるいは無発情期における分離菌数は発情期よりも顕著に低かった (表 9)。

なお、他の動物種における発情休止期あるいは無発情期とほぼ同等と考えられるウサギの交尾前の時期 (Precoitus) では、分離菌数は非常に少なかったが、好気性菌と嫌気性菌の割合は、ほとんど同じであった (表 9)。

C. 実験動物における膣内細菌叢の優勢菌種

各種実験動物における膣内細菌叢の優勢菌種は、膣内細菌数が最も高くなる発情期の成績を中心にその決定を試みた (表 8)。

マウスでは、streptococci の分離頻度が最も高く (100%)、分離菌数は $10^{5.6}$ (CFU/vagina) であった。ラットでは、GNR、streptococci および *Bacteroidaceae* の分離頻度は 100% で、その分離菌数はそれぞれ $10^{7.3}$ 、 $10^{5.9}$ および $10^{6.9}$ (CFU/vagina) で、これらの中では GNR

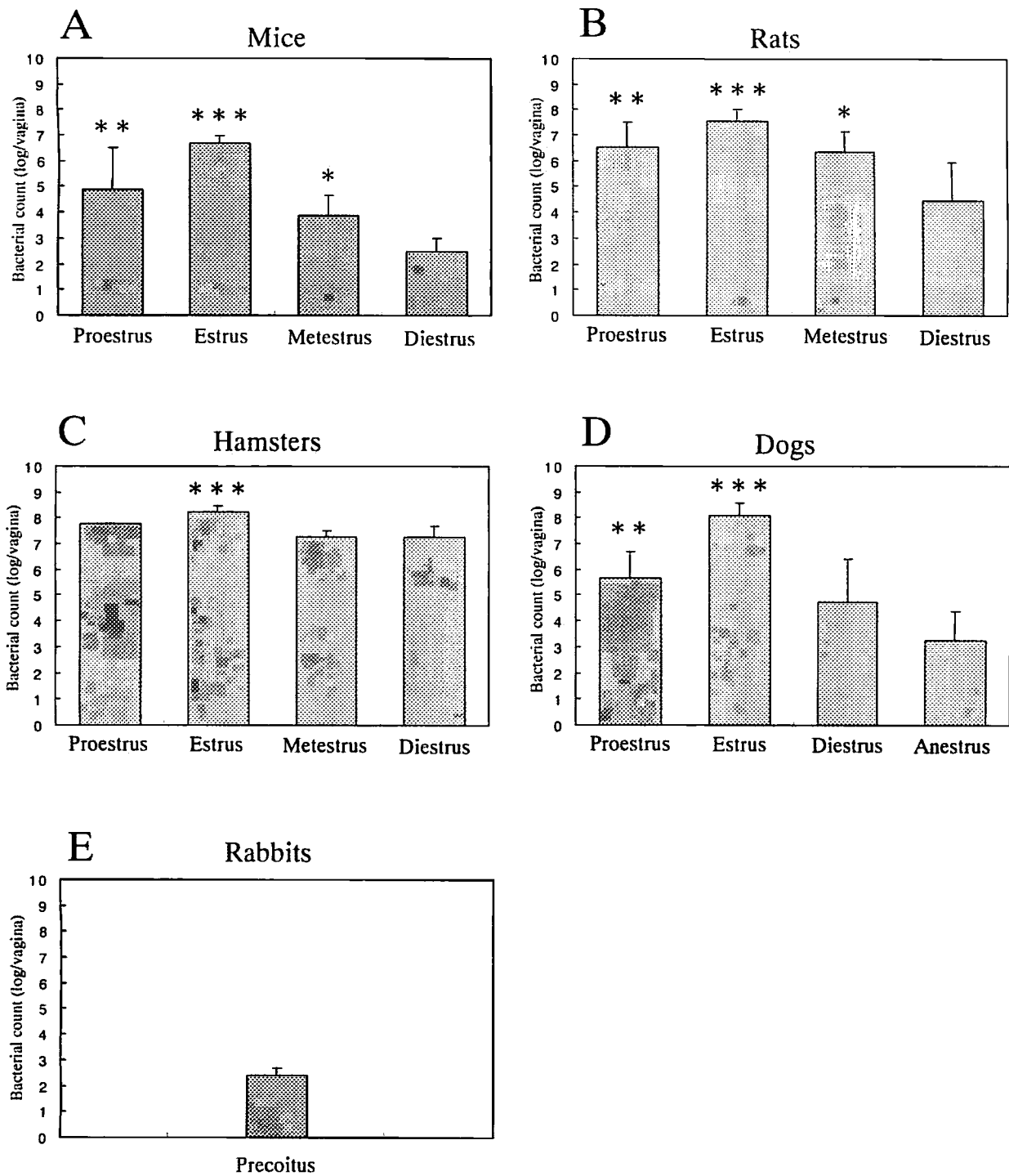


図6. 実験動物の性周期と膣内細菌叢との関係

図には、CVマウス (A)、ラット (B)、ハムスター (C)、イヌ (D) およびウサギ (E) におけるそれぞれの性周期の各時期の細菌数が示してある。性周期は、マウス、ラットおよびハムスターでは発情前期 (proestrus)、発情期 (estrus)、発情後期 (metestrus) および発情休止期 (diestrus) に、イヌでは発情前期 (proestrus)、発情期 (estrus)、発情休止期 (diestrus) および無発情期 (anestrus) に分けられる。ウサギは、交尾排卵動物でマウス・ラットでみられるような明瞭な性周期がみられないため性周期の時期を交尾前 (precoitus) に統一して示した。

図中のそれぞれのカラムは、性周期の各時期における平均分離菌数 (\log_{10} scale) を、vertical barsは標準偏差 (SD) を示している。統計処理は、Scheffe's F testで行った。有意差：発情休止期あるいは無発情期と比較して * $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0001$ で有意差がある。

表 8. 発情期における各種実験動物の膣内細菌叢

Bacterial group	Mice (4) ^{a)}	Rats (7)	Hamsters (8)	Rabbits (0)	Dogs (6)
N					
Total bacteria	6.7 ± 0.3 ^{b)} (100) ^{c)}	7.6 ± 0.5 (100)	8.2 ± 0.3 (100)	ND ^{d)}	8.1 ± 0.5 (100)
Total aerobes	6.7 ± 0.3 (100)	7.3 ± 0.5 (100)	6.3 ± 1.0 (100)	ND	7.6 ± 0.6 (100)
Total anaerobes	3.7 ± 1.3 (50)	6.9 ± 0.7 (100)	8.2 ± 0.3 (100)	ND	7.0 ± 1.9 (100)
Aerobes/facultative anaerobes					
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.0 ± 0.0 (25)	3.6 ± 0.4 (29)	4.1 ± 3.5 (25)	ND	6.8 ± 0.6 (67)
Gram-negative rods	6.7 ± 0.2 (50)	7.3 ± 0.5 (100)	5.2 ± 1.8 (100)	ND	7.4 ± 1.0 (67)
Streptococci	5.6 ± 0.7 (100)	5.9 ± 1.3 (100)	4.8 ± 1.5 (63)	ND	5.9 ± 2.2 (83)
Staphylococci	2.7 ± 0.0 (25)	1.6 ± 0.5 (29)	3.0 ± 0.0 (13)	ND	5.6 ± 3.1 (33)
Bacillus	< ^{e)}	<	<	ND	<
Corynebacterium	<	<	6.4 ± 0.7 (25)	ND	<
Lactobacilli	3.3 ± 1.9 (50)	2.2 ± 0.0 (14)	2.7 ± 1.0 (38)	ND	2.5 ± 0.4 (67)
Yeast	<	<	<	ND	<
Anaerobes					
<i>Bacteroidaceae</i>	2.8 ± 0.0 (25)	6.9 ± 0.7 (100)	7.9 ± 0.2 (100)	ND	6.7 ± 1.8 (100)
Veillonella	<	<	6.9 ± 0.3 (50)	ND	<
Gram-positive anaerobic cocci	4.6 ± 0.0 (25)	4.4 ± 2.2 (86)	7.7 ± 0.3 (100)	ND	7.6 ± 0.5 (67)
Gram-positive anaerobic rods	<	<	7.5 ± 0.7 (38)	ND	<
Clostridium	<	<	<	ND	<

a) 検索数。

b) 数値は、mean ± SD log₁₀ bacterial numbers/vagina を示している。

c) 分離頻度：陽性検体数/総検索数 (%)。

d) 細菌の検出限界は、マウス、ラット、ハムスターおよびウサギでは <10^{1.6}、イヌでは <10^{2.0} CFU/vagina である。

e) ND：ウサギでは明瞭な性周期がみられず、通常交尾前 (precoitus) の状態である。

表 9. 発情休止期あるいは無発情期における各種実験動物の腔内細菌叢

Bacterial group	Mice (23) ^{a)}	Rats (12)	Hamsters (16)	Rabbits (18)	Dogs (85)
Total bacteria	2.5 ± 0.5 ^{b)} (65) ^{c)}	4.5 ± 1.5 (100)	7.3 ± 0.4 (100)	2.4 ± 0.3 (11)	3.3 ± 1.1 (75)
Total aerobes	2.4 ± 0.5 (65)	4.3 ± 1.2 (92)	5.5 ± 0.9 (100)	2.3 ± 0.1 (11)	3.2 ± 1.1 (71)
Total anaerobes	2.2 ± 0.5 (39)	4.4 ± 1.4 (92)	7.3 ± 0.4 (100)	2.3 ± 0.0 (6)	2.6 ± 0.9 (48)
Aerobes/facultative anaerobes					
Enterobacteriaceae	1.8 ± 0.3 (22)	3.1 ± 1.6 (25)	3.0 ± 1.7 (38)	<	3.3 ± 1.4 (18)
Gram negative rods	3.0 ± 0.0 (4)	4.0 ± 1.3 (92)	4.4 ± 1.0 (100)	<	3.1 ± 1.1 (26)
Streptococci	2.3 ± 0.4 (52)	3.1 ± 1.4 (100)	5.6 ± 0.9 (88)	2.3 ± 0.1 (11)	3.0 ± 1.1 (44)
Staphylococci	1.6 ± 0.0 (17)	2.6 ± 0.4 (17)	2.9 ± 0.7 (38)	<	3.1 ± 0.8 (33)
Bacillus	< ^{d)}	<	<	<	2.0 ± 0.0 (1)
Corynebacterium	<	<	3.3 ± 1.1 (19)	<	3.0 ± 1.1 (26)
Lactobacilli	1.9 ± 0.2 (35)	2.7 ± 1.3 (33)	2.4 ± 1.0 (38)	<	2.3 ± 0.4 (32)
Yeast	<	<	<	<	<
Anaerobes					
Bacteroidaceae	2.1 ± 0.4 (35)	4.3 ± 1.4 (92)	7.0 ± 0.5 (100)	2.3 ± 0 (6)	3.3 ± 1.7 (16)
Veillonella	<	<	6.3 ± 0.5 (69)	<	<
Gram positive anaerobic cocci	2.0 ± 0.5 (17)	3.8 ± 1.1 (50)	6.7 ± 0.6 (100)	<	3.0 ± 1.0 (5)
Gram positive anaerobic rods	2.1 ± 0.0 (4)	2.3 ± 0.0 (8)	5.9 ± 0.9 (8)	<	2.3 ± 0.3 (9)
Clostridium	<	<	<	<	2.1 ± 0.2 (8)

a) 検索数。

b) 数値は、mean ± SD log₁₀ bacterial numbers/vagina を示している。

c) 分離頻度：陽性検体数/総検索数 (%)。

d) 細菌の検出限界は、マウス、ラット、ハムスターおよびウサギでは<10^{1.6}、イヌでは<10^{2.0} CFU/vagina である。

の分離菌数が最も高かった。

ハムスターでは、GNR、*Bacteroidaceae* および GPAC の分離頻度が 100%で、そのうち *Bacteroidaceae* および GPAC の分離菌数は $10^{7.9}$ および $10^{7.7}$ (CFU/vagina) と最も高かった。イヌでは、*Bacteroidaceae* の分離頻度が最も高く (100%)、*Enterobacteriaceae*、GNR、streptococci、lactobacilli および GPAC の分離頻度は 67%あるいは 83%と中程度であった。また、分離菌数は *Enterobacteriaceae*、GNR、streptococci、*Bacteroidaceae* および GPAC で、それぞれ $10^{6.8}$ 、 $10^{7.4}$ 、 $10^{5.9}$ 、 $10^{6.7}$ および $10^{7.6}$ (CFU/vagina) であった。しかし、lactobacilli の分離菌数は、 $10^{2.5}$ (CFU/vagina) とその他の分離菌数と比較すると顕著に低かった (表 8)。

ウサギでは、交尾前 (Precoitus) の時期に採取した検体のうち約 10%から streptococci および *Bacteroidaceae* が低い菌数で分離されただけであった (表 9)。

これらの結果から、これらの実験動物における膈内細菌叢の最優勢菌は、マウスでは streptococci、ラットでは GNR、streptococci および *Bacteroidaceae*、ハムスターでは GNR、*Bacteroidaceae* および GPAC、イヌでは *Bacteroidaceae* であることが示唆された。

D. 発情期と発情休止期 (無発情期) における膈内細菌叢の違い

マウス、ラット、ハムスターおよびイヌにおける膈内総細菌数は、発情期で発情休止期あるいは無発情期よりも約 $10^1 \sim 10^5$ (CFU/vagina) 増加した。これらの動物種の中では、ハムスターでの増加幅が最も小さかった。これらの動物種でみられた発情期における膈内総細菌数の増加は、それぞれの動物種の優勢菌種の菌数の増加によって引き起こされていた。

マウスおよびラットの GPAR、イヌの Bacilli、corynebacteria、GPAR および clostridia は、発情休止期あるいは無発情期では検出されていたが、発情期では検出されないなど、発情休止期あるいは無発情期と発情期の 2つの時期で違いがみられた。しかし、ハムスターの膈内細菌叢の構成は、発情期と発情休止期との間に大きな違いはみられなかった。(表 8 および表 9)。

これらの結果から、それぞれの動物種において発情期で細菌数が増加し、かつこの発情期で優勢な菌種群が膈内の常在細菌 (indigenous bacteria) ではないかと推察された。

E. 発情期における膈内細菌叢の複雑さ

発情期に検出される細菌の菌種数を各動物種ごとに調べた (図 7) ところ、ハムスターにおける平均分離菌種数は 5.5 菌種と最も多く複雑であった。その他の動物種の平均分離菌種数は、イヌで 5.0 菌種、ラットで 4.6 菌種およびマウスで 3.0 菌種であった。これらの結果から、これらの実験動物の膈内細菌叢は、ハムスター>イヌ>ラット>マウスの順に複雑であることが示唆された。

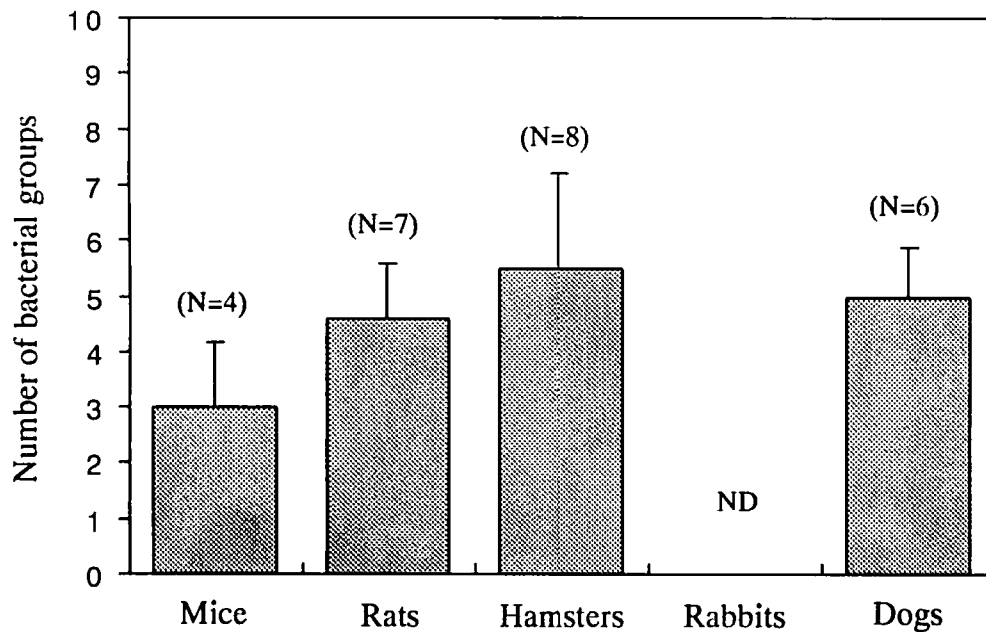


図7. 各種実験動物の発情期における膣内細菌叢の複雑さ

今回は、分離された細菌の種類を13のグループ、すなわち好気性菌および通性嫌気性菌の8つのグループ：*Enterobacteriaceae*、gram-negative rods、streptococci、staphylococci、bacilli、corynebacteria、lactobacilliおよびyeast、嫌気性菌の5つのグループ：*Bacteroidaceae*、*Veillonellaceae*、gram-positive anaerobic cocci、gram-negative anaerobic rods およびclostridiaに分けてその平均分離菌種数を比較した。

それぞれのカラムは平均分離菌種数を、vertical barsは標準偏差 (SD) を示している。
N：検体数、ND：検索せず。

3-3 考察

今回の研究の結果、実験動物の腔内細菌叢は、それぞれの動物種で異なることが明らかとなった。マウスでは、分離菌数および分離頻度の両者において、腔内細菌叢に占める割合は好気性菌が嫌気性菌よりも優勢であった。ラットおよびイヌでは、好気性菌と嫌気性菌の占める割合はほぼ同等であった。一方、ハムスターでは、マウス、ラットおよびイヌと異なり、腔内細菌叢に占める割合は嫌気性菌が好気性菌よりも優勢であった。また、これらの動物種における腔内細菌叢に占める好気性菌と嫌気性菌の割合は発情期と発情休止期の間において大きな変化はみられなかった。これらの動物種に対して、ウサギの腔内からは交尾前 (Precoitus) の時期に streptococci と *Bacteroidaceae* の2つの菌種群が低い菌数で散発的に分離されるにすぎなかった (表8および表9)。

今回、腔内総細菌数は、性周期によって影響を受け変化することが明らかとなった。すなわち、マウス、ラット、ハムスターおよびイヌの発情期における腔内細菌数は、性周期の他の時期よりも高かった (図6)。腔内細菌叢は、pH、酸化還元電位、細胞の構成、ホルモン、ムチンの存在、抗菌物質の存在およびその含量、生化学的状態などの要因によって影響を受けることが示唆されている (Fujisawa, et al., 1992 ; Larsen, et al., 1977 ; Narushima, et al., 1997)。また、子宮頸部の腺から分泌される粘液量は発情期に最大になることから (Centola, 1978 ; Corbeil, et al., 1985 ; Fawcett, 1994 ; Holderegger, 1980 ; King, 1983)、腔内におけるムチンの量は発情期に最も増加すると考えられる。したがって、腔内細菌叢の増殖は、子宮から分泌される粘液量の増加によって引き起こされている可能性が示唆された。なぜなら、粘液中に含まれる一種の多糖体であるムチンが一種の培地としての役割を果たすからである (Savage, 1972)。腸内では、ある種の腸内細菌が一種の多糖体であるムチンを炭素源として利用することから、ムチンの分泌は腸内細菌の増殖を促進すると考えられ、実際に腸粘膜表面や腸管腔内に存在するムチンで、腸内細菌が集団を作ったり、増殖していることが観察されている (光岡, 1990)。

腸内細菌叢は、大別すると約 10~13 種類の細菌のグループから構成され、マウス、ラット、ハムスター、ウサギおよびイヌにおける腸内細菌叢の優勢菌種は、*Bacteroidaceae*、GPAR (bifidobacteria) および GPAC などの嫌気性菌と lactobacilli であることが知られている (Balish, et al., 1977 ; Hagen, et al., 1965 ; Itoh, et al., 1983 ; Morishita and Miyaki, 1979 ; Weber, et al., 1974)。一方、腔内細菌叢では、今回調査した実験動物の発情期の腔内から検出された細菌の菌種数は、平均約 3.0~5.5 菌種で、腸内細菌叢と比較すると顕著に少なかった (図7)。

ヒトの膣内細菌叢においては、嫌気性菌が好気性菌よりも優勢であり、膣内総細菌数は $10^8 \sim 10^9$ (CFU/ml) と実験動物の場合よりも高いことが報告されている (Hammann, et al., 1987)。今回調査した動物種のうちマウス、ラットおよびイヌでは、膣内細菌叢の中に占める嫌気性菌の割合は好気性菌よりも少ないか、あるいは同等であった。しかし、唯一ハムスターでは嫌気性菌の割合が高く、膣内総細菌数も $10^{8.2}$ (CFU/vagina) とこれらの動物種の中では最も高かった (表 8)。しかも、これらの動物種の中ではハムスターの膣内細菌叢が最も複雑であった (図 7)。したがって、今回調査した動物種の中では、ハムスターがヒトの膣内細菌叢に最も近いのではないかと考えられた。ただし、ヒトの膣内で最優勢である lactobacilli の分離菌数および分離頻度 (Fujisawa, et al., 1992) は、ヒトとハムスターでは大きな違いがみられている。

今回の調査でウサギの膣内から検出された細菌の種類およびその分離菌数は、他の動物種と比較すると極めて少なかった (表 9)。ウサギは、性周期の型が他の動物種と異なり、交尾排卵動物で明確な性周期はみられず、通常実験に使用するウサギは交尾前 (Precoitus) の状態である。Barberini ら (1991) は、交尾前のウサギの膣内は粘液の分泌徴候はほとんどみられないが、交尾後はその直後から分泌徴候が顕著に現れることを報告している。したがって、通常実験に使用する交尾前のウサギの膣内は、おそらく他の動物種でいう発情休止期あるいは無発情期の時期と類似した状態で、粘液の分泌量が少なく細菌にとって増殖しにくい環境になっていると推察された。また、Jacques ら (1986) は、4~5カ月齢の成熟した雌ウサギの膣をホモジナイズして膣内細菌叢を定性的に調べた結果、ウサギの膣内細菌叢の構成は非常に単純であることを報告している。彼らの成績と我々のウサギの成績は、基本的に一致している。しかし、彼らが検出した細菌の種類は、coagulase-negative staphylococci、streptococci、micrococci、corynebacterium および non-fermentative bacilli (Pseudomonads) などで、検出された細菌の種類は今回調査した結果よりも多かった。通常、ヒトを含む哺乳動物の膣内は重層扁平上皮で構成されているが、ウサギの場合は、これらの動物種と全く異なり、膣の上部 2/3 が子宮と類似した単層円柱上皮で構成されている (Barberini, et al., 1991)。したがって、彼らはこの円柱上皮内にもぐりこみ密接な関係にあった細菌 (洗浄法により取り出すことのできない) を、ウサギの膣をホモジナイズすることにより検出したことによって、結果に差が生じたのではないかと考えられた。

今回、実験動物の膣内細菌叢を検索した結果、発情期で分離頻度の高かった菌種は、マウスでは streptococci、ラットでは GNR、streptococci および *Bacteroidaceae*、ハムスターでは GNR、*Bacteroidaceae* および GPAC、イヌでは *Bacteroidaceae* であった。また、それぞれの動物種におけるこれらの菌種は、発情期と発情休止期あるいは無発情期の両方で検出され、しかも分離菌数も非常に高かった。したがって、上記に示した菌種群がそれぞれの動物種の膣内における優勢菌であり、いわゆる常在細菌ではないかと推察された。

膣炎などの疾患をもっていない健康で性周期が規則的なヒトの正常膣内細菌叢に関しては、すでにいくつか報告されている (Bartlett and Polk, 1984 ; Fujisawa, et al., 1992 ; Johnson, et al., 1985 ; Larsen and Galask, 1980 ; Sautter and Brown, 1980 ; Wilks and Tabaqchali, 1987)。それによれば、ヒトの膣内細菌叢の主要な構成菌は、lactobacilli であり、この菌種がヒトの膣内において非常に重要な役割を果たしていると考えられている。すなわち、lactobacilli が膣内 pH を強酸性に保持することにより病原微生物の増殖を抑制していると考えられている (Larsen and Galask, 1980)。今回の研究でも、マウス、ラット、ハムスターおよびイヌの膣内から lactobacilli が検出されたが、その分離菌数および分離頻度はヒトでの成績と比較すると著しく低かった (表 8 および表 9)。したがって、膣内環境を正常な状態で維持・コントロールしている重要な役割をもっている細菌の種類は、ヒトとこれらの実験動物とは異なっているのかもしれないと考えられた。

膣内の pH に関する報告は、ヒトと一部の実験動物ですでに報告されている。健康なヒトの膣内は pH 4.0~5.0 (Hanna, et al., 1985 ; Larsson and Platz-Christensen, 1990) であるのに対して、マウスでは平均 pH 6.5 (Meysick and Garber, 1992)、ラットでは平均 pH 7.0 (Larsen, et al., 1976 ; Koiter, et al., 1977)、ハムスターでは pH 6.75~6.9 (Pratt, et al., 1987)、ウサギでは pH 7.2 (Jacques, et al., 1986) およびイヌでは pH 6.9 (Van Duijkeren, 1992 ; Hoyme, et al., 1978) であることが報告されていることから、実験動物の膣内は、強酸性であるヒトの膣内とは異なり、pH 7 前後の中性である。これらの成績から、膣内への lactobacilli の定着の度合いの差が膣内 pH に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。今後、実験動物の膣内 pH への lactobacilli の影響についてさらに検討する必要があると考えられた。

膣内細菌叢を定量的に検索するための検体の採取方法としては、洗浄 (lavage) 法、スワブ (swab) 法、ループ (loop) 法などの方法が知られている (Redondo-Lopez, et al., 1990) が、今回我々は一定量の滅菌生理食塩水で膣内腔をパスツールピペットで数回洗浄するという洗浄法を用いておこなった。滅菌生理食塩水は、検体の採取の際にできるだけ膣内細菌叢そのものに影響を及ぼさないために使用した。また、洗浄法というサンプリング方法は、実験動物の種類によって膣内腔の大きさがかなり異なることから、実験動物の種類に関係なく膣内腔に存在する細菌をできるだけ正確に検体に反映させるために選択した。Narushima ら (1997) は、アフリカミドリザルでの検討で、スワブ法における細菌の分離菌数および分離頻度が洗浄法での成績よりも高かったことから、アフリカミドリザルの膣内細菌叢を検索する方法として洗浄法は不適切であることを報告している。しかし、これは、検体の採取を極めて少ない液量 (0.2ml)で行っていることから、膣内腔を十分に洗うことができず、さらに膣内を洗浄した液体を再回収できなかったとが原因かもしれないと考えられた。一方、Larsen ら (1977) は、洗浄法を用いてラットの膣内細菌叢の検索を

行ったところ、培養可能な腔内細菌の 90%以上がこの洗浄法によって回収可能であることを報告している。これは、腔内細菌の多くが上皮の表面に位置し、洗浄によって溶離しやすいためではないかと推察している。また、Larsen ら (1976) および Yamada ら (1983) も洗浄法は再現性の高い検査方法であることを報告している。このことから、今回検体の採取に用いた洗浄法は、実験動物の腔内細菌叢を定量的に把握するための有用な方法のひとつではないかと考えられた。

今回の研究では、各々の動物種についてひとつの系統 (strain) しか調査しなかった。腸内細菌叢の分野では、マウスの系統によっては腸内細菌叢が著しく異なることがすでに報告されていることから、腔内細菌叢においても腸内細菌叢と同様に実験動物の系統間で異なる可能性が十分に考えられる。しかしながら、これまでに SPF のマウス・ラットにおいて、いくつかの系統の腔内細菌叢を調べたところ、系統間に大きな差は認められなかった (未発表データ) ことから、腔内細菌叢では系統間にそれほど大きな差はみられないのではないかと推察している。しかし、我々が知る限りにおいて、実験動物の系統間で腔内細菌叢を比較検討した報告がないことから、今後実験動物の腔内細菌叢の系統間による差についての研究も実施する必要があると考えられた。

3-4 まとめ

今回の研究の結果、実験動物の腔内細菌叢はそれぞれの動物種で異なり、さらに性周期によって影響を受け、腔内総細菌数はそれぞれの動物種に共通して発情期で最も高くなることが明らかになった。また、一種の培地としての役割を果たす子宮頸部の腺から分泌される粘液は性周期のうち発情期で最も増加することから、子宮頸部から分泌される粘液が腔内細菌叢の増殖に非常に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この仮説を証明するために、今後さらに腔内細菌叢と粘液との関係を研究する必要があると考えられた。

第4章 チンパンジー (*Pan troglodytes*) の腔内細菌叢

4-1 材料および実験方法

A. 実験動物

今回の研究では、三和化学研究所熊本霊長類パーク (Kumamoto Primate Research Park of Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., Japan ; KPRP) で飼育・維持されている 38 匹のチンパンジーを使用した。この 38 匹のチンパンジーのうち 11 匹は、当時の日本の厚生省によって「B 型肝炎ワクチン開発に関する特別研究」のために西アフリカから米国を経由して輸入され (Koshimizu, et al., 1977)、その後実験終了後に熊本霊長類パークに移送され、飼育・維持されたものである。残りの 27 匹のチンパンジーは、熊本霊長類パークのコロニーの中での繁殖によって産まれたものである。熊本霊長類パークのチンパンジーは、日常的に生理学的検査 (肉眼所見、聴診、触診および外部寄生虫検査) が行われていると同時に、それらのチンパンジーの血液および血清生化学的検査が年 1 回の頻度で定期的に行われている。血液検査としては、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、血小板数および白血球百分率が、血清の生化学検査としては、総タンパク、アルブミン、グロブリン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、尿素窒素、クレアチニン、総ビリルビン、グルコース、コレステロール、トリグリセライド、アルカリホスファターゼ、GOT、GPT、 γ -GTP および乳酸脱水素酵素がそれぞれ測定されている。なお、この研究には異常の徴候がみられない健康なチンパンジーを使用した。

B. 年齢によるチンパンジーの分類

今回の研究では、0~22 歳のチンパンジーを使用した。Goodall (1983) の分類に準じて以下の 5 つのグループに分けた。すなわち、0~2 歳 (early infancy group ; n=12)、3~4 歳 (late infancy group ; n=10)、5~7 歳 (juvenile group ; n=4)、9~16 歳 (younger mature group ; n=7) および 17~22 歳 (elder mature group ; n=5) の 5 つのグループに分けて検討を行った。チンパンジーの規則的な月経周期は、9 歳頃から始まるといわれているが、この熊本霊長類パークのコロニーでは、チンパンジーの月経周期はその動物の性皮の腫脹および月経による出血を視覚的に監視することによって行われ、規則的な月経周期が確認されたチンパンジーを性成熟 (mature) として分類されていた。

C. チンパンジーの月経周期

Young and Yerkes (1943) および Lang (1967) によれば、チンパンジーの月経周期は、平均約 37 日であることが報告されている (図 8)。また、チンパンジーの月経周期の区分は、これまでのマウス・ラット等とは異なり外陰部周囲の性皮と呼ばれる部分の腫脹 (swelling) と月経を指標として 4 つの時期に分けられる (Graham, 1970 ; Graham, 1981 ; Keeling and Roberts, 1972)。すなわち、月経周期は、pre-swelling phase (月経の停止から

swelling の開始までの 7 日間)、swelling phase (swelling 開始後、最大になった性皮が退縮を開始するまでの 17 日間)、post-swelling phase (性皮の退縮開始後から月経が始まるまでの 10 日間) および menstruation phase (月経期間の 3 日間) の 4 つに分けられる (図 8)。また、チンパンジーの外陰部の腫脹は、その程度により 0 ; complete detumescence、1/4 ; partial tumescence、2/4 ; labial occlusion、3/4 ; pronounced tumescence、4/4 ; maximal tumescence の 5 つに分けられる (Dahl, et al., 1991) (図 8)。熊本霊長類パークでは、チンパンジーの外陰部は毎日調べられ、それぞれの個体ごとに評価され、上記の 1 ~ 5 段階に分けて記録されている。

今回の研究では、月経周期の時期による違いを検討するため、チンパンジーの臍からの検体の採取を性皮の腫脹が最大となる時期 (約 11 日間) の swelling phase (図 8 ; B2) とそれ以外の性皮の腫脹が完全に減退する時期 (約 14 日間) の non-swelling phase (図 8 ; A, C2 および D) でおこなった。なお、チンパンジーの swelling phase は、エストロゲン濃度の上昇により性皮の腫脹が起こることから、他の動物種 (マウス、ラット、ハムスター およびイヌ) でいう発情期に相当するものと考えられる。また、その他の時期の non-swelling phase では、swelling phase との違いを明らかにするために性皮の腫脹が完全に減退している時期、つまり pre-swelling phase、menstruation および post-swelling phase の一部の時期から検体を採取した (図 8 ; A, C2 および D)。そのため、移行期、すなわち完全な腫脹減退から最大腫脹になるまでの時期 (図 8 ; B1) あるいは最大腫脹から腫脹が完全に減退するまでの時期 (図 8 ; C1) (合計約 12 日間) における検体の採取は、今回実施しなかった。

D. チンパンジーの飼育環境

熊本霊長類パークでは、チンパンジーはおり形式 (den type) とケージ形式 (cage type) のふたつのタイプによる飼育・維持が行われている (表 10)。おり形式は、屋内 (indoor) と屋外 (outdoor) のふたつの区画からなり、チンパンジーはそこでグループによる飼育が行われていた。屋内の飼育室の床面はコンクリート製、屋外の大型ワイヤーケージの床面は土製でできており、屋内と屋外のふたつの区域はギロチンドアが設置された通路によってつなぐられ、チンパンジーはそこを自由に往来することができるようになっている。また、屋外の大型ワイヤーケージ内には、チンパンジーが登り降りして遊ぶための建造物が設置されている。一方、ケージ形式では、チンパンジーは十分にゆとりのある大きさのケージの中で個別飼育されていた。屋内の飼育室およびケージの設置してある飼育室の室内温度は、最低 20°C 以上で維持され、人工照明は明暗 12 時間周期で行われていた。チンパンジーには市販の固型飼料 (PS ; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan あるいは Monkey Bit ; Nosan Corporation, Yokohama, Japan) が給与され、補助的にフルーツや野菜も給与された。また水も自由に摂取できるようになっていた。

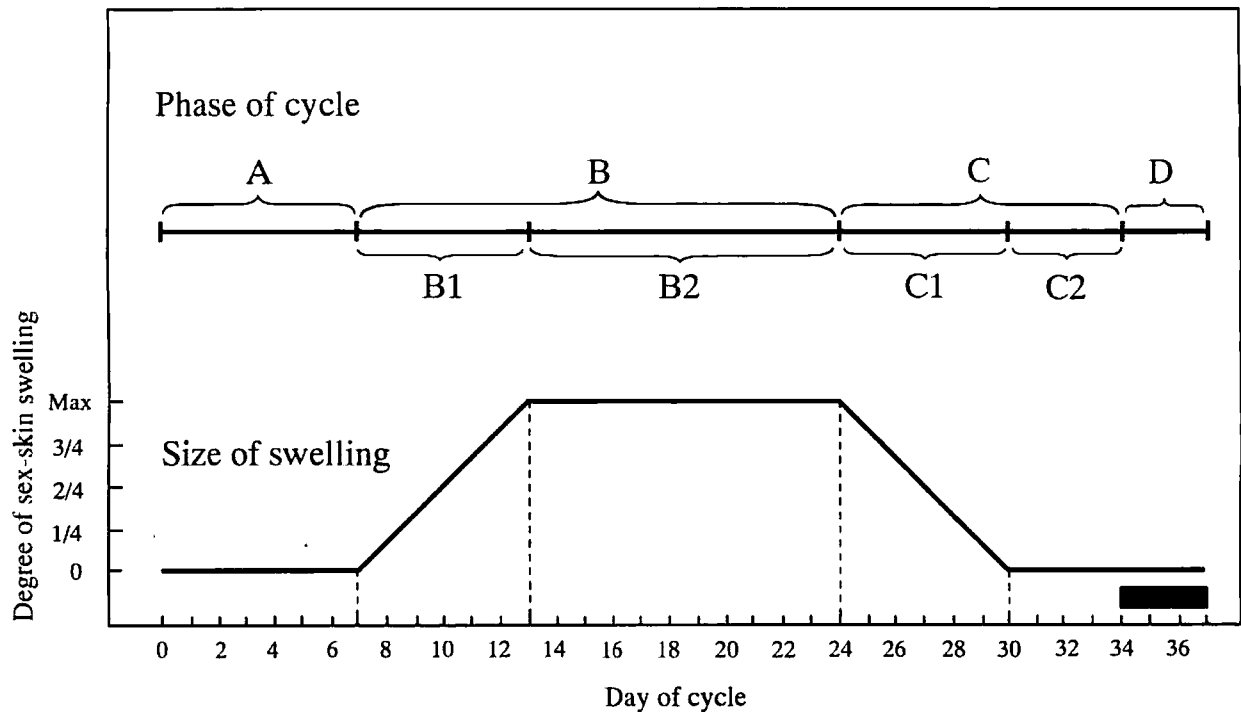


図8. チンパンジーにおける月経周期と性皮の腫脹との関係

チンパンジーの月経周期の期間は、平均約37日である (Young and Yerkes, 1943)。典型的なチンパンジーの月経周期は (A) pre-swelling phase (約7日間)、(B) swelling phase (約17日間)、(C) post-swelling phase (約10日間) および (D) menstruation phase (約3日間) の4つの時期に分けられる。さらに、swelling phaseは (B1) tumescent (約6日間) と (B2) maximal tumescence (約11日間) に、post-swelling phaseは (C1) detumescent (約6日間) と (C2) post-tumescent (約4日間) に分けられる。なお、pre-swelling phase (A) は月経の停止からswellingの開始まで、swelling phase (B) はswellingの開始から最大になった性皮の腫脹の退縮が始まるまで、post-swelling phase (C) は性皮の退縮開始から月経が始まるまで、menstruation phase (D) は膣内から出血が観察される時期をいう。Dahlら (1991) によれば、チンパンジーにおける性皮の腫脹は、その程度により以下の5段階に分けられる (0, complete detumescence ; 1/4, partial tumescence ; 2/4, labial occlusion ; 3/4, pronounced tumescence ; 4/4 (Max) , maximum tumescence)。

今回の実験では、膣内細菌叢の性皮の腫脹による違いを明らかにするために性皮の腫脹が最大になる時期と完全に減退する時期、すなわちswelling phase (B2) とnon-swelling phase (A, C2およびD) の2つの時期から検体を採取した。したがって、移行期の時期であるswelling phaseのB1の時期とpost-swelling phaseのC1の時期からの検体の採取は行わなかった。

表10. 熊本霊長類パークにおけるチンパンジーの飼育室の種類とその広さ

Type of animal room	Floor area	Height	Rearing
Den (including two compartments)			
1) Large group			
Indoor	4.0 m ² (2.0 m wide × 2.0 m long)	2.7 m	Reared individually (1/den)
Outdoor	121.0 m ² (11.0 m wide × 11.0 m long)	3.5 m	Reared in groups (10/den)
2) Small group			
Indoor	7.0 m ² (3.5 m wide × 2.0 m long)	2.6 m	Reared in pairs (2/den)
Outdoor	9.0 m ² (4.5 m wide × 2.0 m long)	2.6 m	Reared in pairs (2/den)
Cage	2.9 m ² (1.2 m wide × 2.4 m long)	2.2 m	Reared individually (1/cage)

E. チンパンジーにおける検体の採取および腔内細菌叢の分析方法

チンパンジーからの検体の採取は麻酔下で行われた。すなわち、ドロペリドール (doperidol : Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan ; Sankyo) を体重当たり 0.15 mg/kg 投与したのち、塩酸ケタミン (ketamine hydrochloride : Sankyo) を 7 mg/kg 筋肉内接種後に実施された。

検体の採取は、腔口周辺部をアルコール綿 (70%エチルアルコール含有) で消毒後、準備した 10 ml の滅菌生理食塩水の一部を吸引した駒込ピペットを腔内に挿入し、腔内洗浄を数回繰り返すことによって得た。採取した検体は、直ちに液相部分に 100%炭酸ガスを直接吹き込ませ泡立たせた。これは、熊本霊長類パークから熊本大学医学部の私の所属する研究室までの検体の輸送中における検体内の嫌気性菌の減少を避けるために実施した (Mitsuoka, et al., 1976)。なお、熊本霊長類パークから熊本大学医学部の研究室までは、車で約 45 分を要する。この処置の結果、採取した検体を含む試験管内の液相および気相部分は、常に 100%炭酸ガスで満たされていることになる。

その後、検体の入った試験管は、4°C の容器内に保管された。これは、輸送中における好気性菌および通性嫌気性菌の増殖を避けるために実施した。採取された検体は輸送後、直ちに我々の施設の研究室に設置されている嫌気性グローブチャンバー内 (窒素 85%、二酸化炭素 5%、水素 10% ; ICM) に移し、その中で嫌気性希釈液を用いて 100 倍段階希釈列が作製され、光岡らの腸内細菌叢の検索方法 (第 2 章参照) に準じて腔内細菌の分析が行われた。

なお、すべての検体の処理 (検体の採取後からそれぞれの培地への接種までの培養処理が終了するまで) は、約 3 時間以内で行われた。

4-2 結果

A. チンパンジーの膣内細菌叢の加齢に伴う変化

i) 好気性菌および嫌気性菌の菌数の推移 (図9)

好気性菌 (通性嫌気性菌を含む) の総細菌数は、5~7歳で急激に増加し (3~4歳時よりも約 $10^{2.7}$ CFU/vagina 増加)、その後プラトーに達していた。一方、嫌気性菌の総細菌数は、年齢の増加とともに徐々に増加し、9~16歳でプラトーに達していた。したがって、好気性菌は、嫌気性菌よりも早い段階で性成熟チンパンジーと同等のレベルに達していた。また、チンパンジーの膣内においては、年齢のどの時期においても総好気性菌数が総嫌気性菌数よりも高かった。

ii) 各菌種群の分離頻度の推移

① 好気性菌 (通性嫌気性菌を含む) の場合 (図10-A)

streptococci の分離頻度は、3~4歳で80%であったが、それ以外の時期 (0~2、5~7、9~16 および 17~22歳) では100%であった。lactobacilli の分離頻度は、0~2歳で50%であったが、3~4歳で90%、5~7歳および17~22歳で100%、9~16歳で86%と3~4歳の比較的早い時期に増加しその後引き続き高い状態で維持されていた。一方、この二つの菌種群に対してその他の菌種群 (GNR、corynebacteria、staphylococci、Enterobacteriaceae および yeasts) の分離頻度は、年齢の各時期に関係なく80%以下であった。また、最も年齢の高い17~22歳のグループでは、streptococci および lactobacilli の分離頻度は100%であったのに対して、その他の菌種群の分離頻度は60%以下であった。

これらの成績から、チンパンジーの膣内細菌叢における好気性の優勢菌種は、streptococci および lactobacilli であることが示唆された。

② 嫌気性菌の場合 (図10-B)

Bacteroidaceae の分離頻度は、加齢と共に増加し、5~7歳で100%に達していたが、その他の嫌気性菌群 (GPAR、Veillonellaceae、GPAC および clostridia) では、Bacteroidaceae の分離頻度よりも低く、5~7歳時ですべて75%以下であった。性成熟チンパンジー (9~16 および 17~22歳) においては、Bacteroidaceae の分離頻度は85%以上と安定して高い値を示していたが、その他の嫌気性菌群の分離頻度は60%以下であった。

これらの成績から、チンパンジーの膣内細菌叢における嫌気性の優勢菌種は、Bacteroidaceae であることが示唆された。

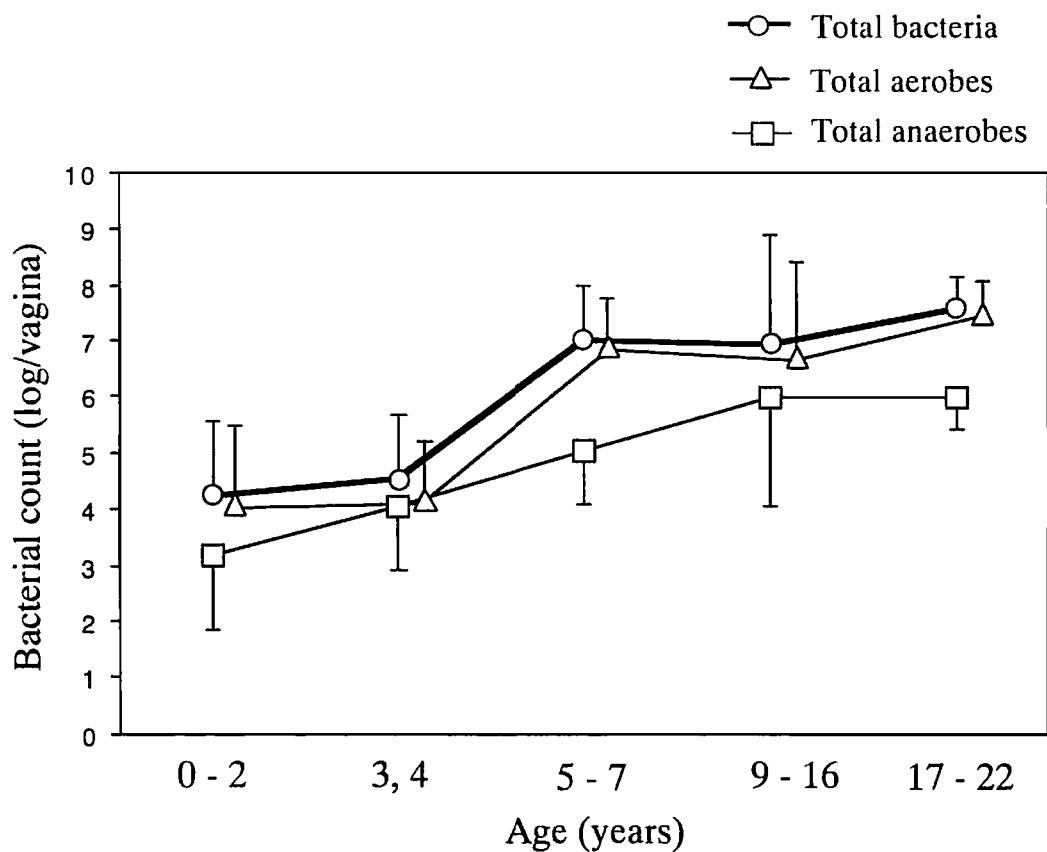


図9. チンパンジーにおける膣内細菌数の加齢に伴う変化

今回調べられたチンパンジーの数は、0～2歳が12頭、3～4歳が10頭、5～7歳が4頭、9～16歳が7頭および17～22歳が5頭である。折線グラフのそれぞれのポイントは、平均の総細菌数、総好気性菌数および総嫌気性菌数を、vertical barsは平均の標準偏差（SD）を示している。

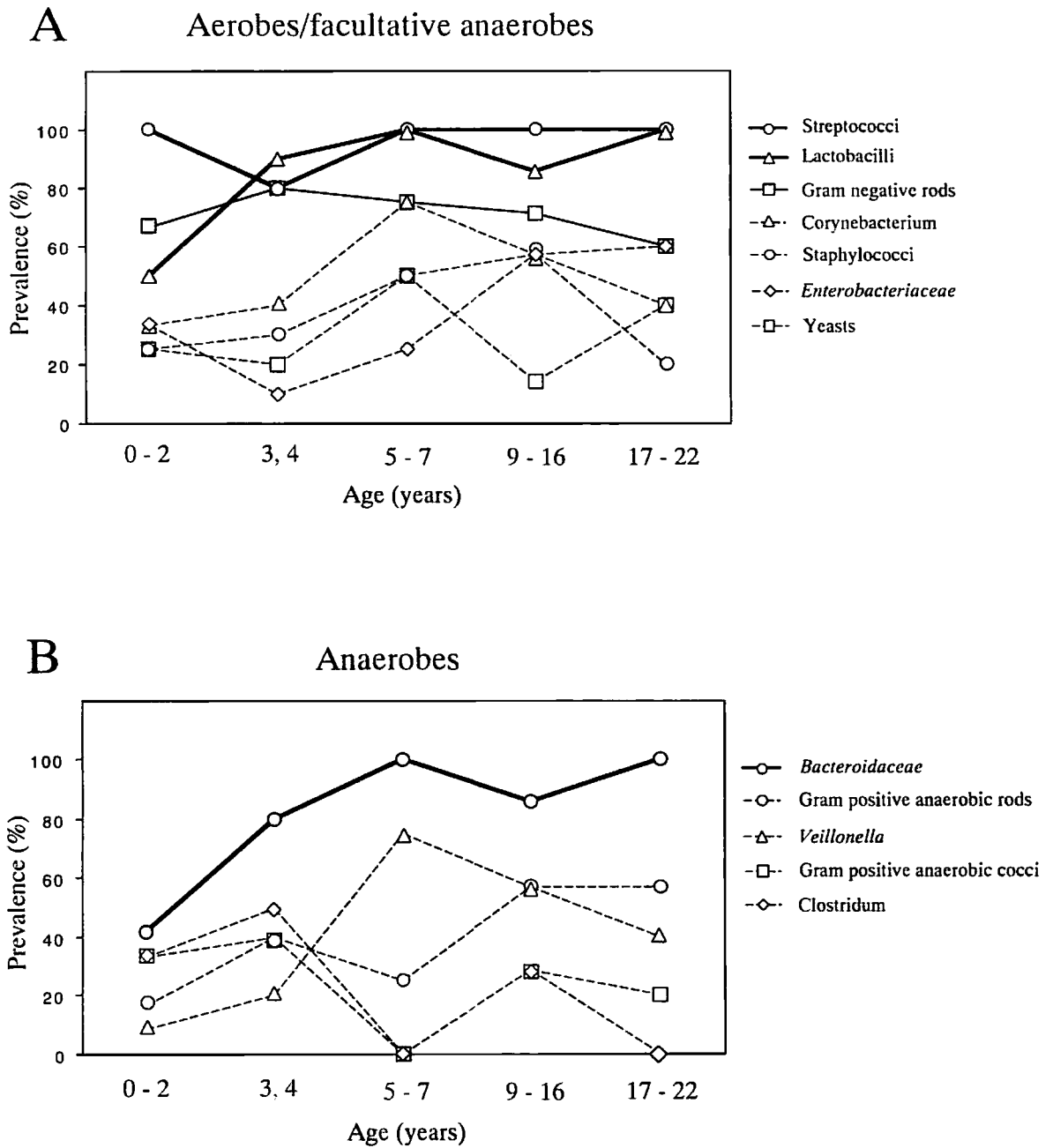


図10. チンパンジーにおける各菌種群の分離頻度の加齢に伴う変化

この研究では、以下に示す12のグループの分離頻度について検討した：(A) 7つの好気性菌および通性嫌気性菌群：streptococci、lactobacilli、gram-negative rods、corynebacteria、staphylococci、*Enterobacteriaceae*およびyeasts、(B) 5つの嫌気性菌群：*Bacteroidaceae*、gram-positive anaerobic rods、*Veillonella*、gram-positive anaerobic cocciおよびclostridia。調べられたチンパンジーの数は、0～2歳が12頭、3～4歳が10頭、5～7歳が4頭、9～16歳が7頭および17～22歳が5頭である。折線グラフのそれぞれのポイントは、それぞれの菌種群における分離頻度をしめしている。

iii) 優勢菌種群の菌数の推移 (図 11)

チンパンジーの膣内における細菌の分離頻度を調べたところ、streptococci、lactobacilli および *Bacteroidaceae* の分離頻度が顕著に高かったことから、今度はこれらの菌種群における細菌数の加齢に伴う変化を調べた。その結果、これらの3つの優勢菌種群の細菌数は、加齢と共に増加し、5~7歳でプラトーに達していた。そのうち特に、streptococci および lactobacilli の細菌数は、5~7歳で3~4歳時よりもそれぞれ $10^{2.1}$ および $10^{2.4}$ (CFU/vagina) 増加していた。この結果から、これらの3つの優勢菌種群は、5~7歳の性成熟直前の早い時期にすでに性成熟チンパンジーと同レベルに達すること、さらに5~7歳時でみられた総好気性菌数の急激な増加は、主に streptococci と lactobacilli の菌数増加によって引き起こされていたことが示唆された。

性成熟したチンパンジー (9~16 および 17~22 歳) における streptococci、lactobacilli および *Bacteroidaceae* の平均分離菌数は、それぞれ $10^{6.8}$ 、 $10^{5.8}$ および $10^{5.2}$ CFU/vagina であった。したがって、性成熟チンパンジーの膣内細菌叢における優勢菌種は、streptococci > lactobacilli > *Bacteroidaceae* の順に優勢であることが示唆された。

iv) 膣内細菌数への月経周期の影響 (図 12)

性成熟したチンパンジー (9~16 および 17~22 歳; 合計 12 頭) について、non-swelling phase と swelling phase における膣内の細菌数を調べた。その結果、総細菌数、総好気性菌数および総嫌気性菌数は、月経周期のうち swelling phase で最も高い値を示していた。そのうち、総細菌数および総好気性菌数は non-swelling phase での成績よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。これらの結果から、月経周期のうち swelling phase の時期は、膣内細菌の増殖に適した環境を提供しているように思われた。

B. 性成熟チンパンジーにおける non-swelling phase と swelling phase の膣内細菌叢の比較

i) 各菌種群の分離頻度について (表 11)

streptococci の分離頻度は、non-swelling phase および swelling phase の両方の時期において 100% と最も頻繁に検出された。Lactobacilli および *Bacteroidaceae* の分離頻度は non-swelling phase で 83% であったが、swelling phase では 100% になっていた。その他の菌種群の分離頻度は non-swelling phase で 67% 以下、swelling phase で 83% 以下と、streptococci、lactobacilli および *Bacteroidaceae* と比較すると低かった。しかし、その他の菌種群の分離頻度は、基本的に swelling phase で増加するか、あるいは non-swelling phase 時と同じかのいずれかであり、swelling phase での減少はみられなかった。唯一、non-swelling phase で 33% と比較的低い値を示していた clostridia は、swelling phase で消失していた。

したがって、streptococci、lactobacilli および *Bacteroidaceae* の3つの菌種群の分離頻度は、non-swelling phase および swelling phase の両時期において他の菌種群よりも高かった。

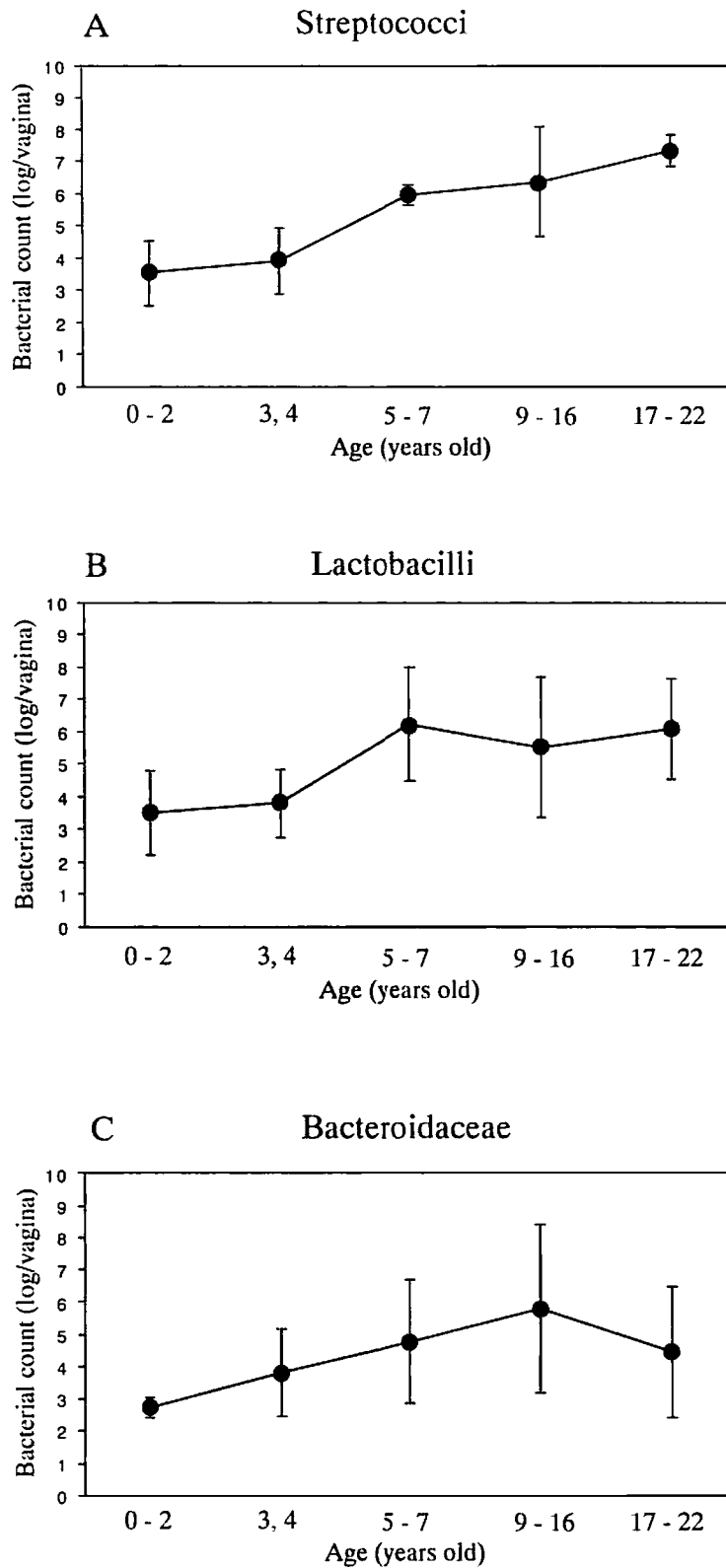


図11. チンパンジーにおける優勢菌種群の細菌数の加齢に伴う変化

調べられたチンパンジーの数は、0～2歳が12頭、3～4歳が10頭、5～7歳が4頭、9～16歳が7頭および17～22歳が5頭である。折線グラフのそれぞれのポイントは、それぞれの年齢における平均分離菌数を、vertical barsは平均の標準偏差 (SD) を示している。

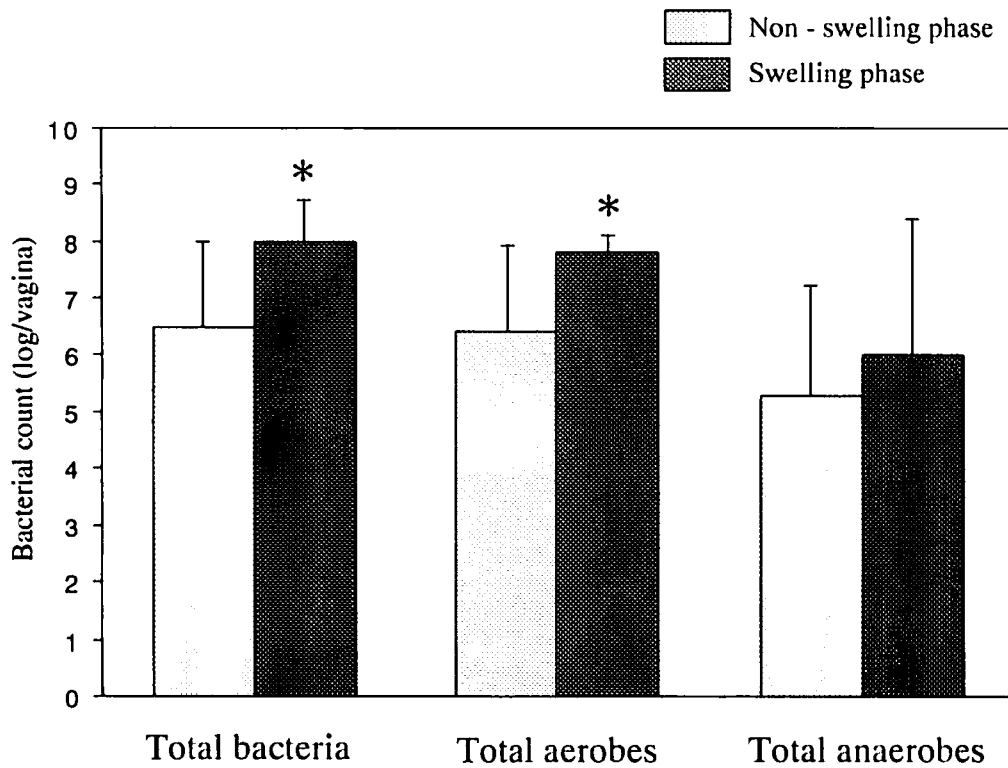


図12. チンパンジーにおける月経周期の腔内細菌数への影響

swelling phaseおよびnon-swelling phaseにおいて、性成熟チンパンジーの各々6頭ずつを調べた。模様のカラムはnon-swelling phase、クロードのカラムはswelling phaseの成績を示している。図中のそれぞれのカラムは、月経周期の各時期における平均の総細菌数、総好気性菌数および総嫌気性菌数 (log₁₀ scale) を、vertical barsは標準偏差 (SD) を示している。統計処理は、Mann-Whitney's U testで行った。* (星印) は、P < 0.05で有意差があることを示している。

表 11. 性成熟チンパンジーにおける non-swelling phase と swelling phase の膣内細菌叢の比較

Bacterial group N	Menstrual cycle	
	Non-swelling phase 6 ^{a)}	Swelling phase 6
Aerobic/facultative anaerobic bacteria		
<i>Enterobacteriaceae</i>	50 ^{b)} (2.9 ± 0.4) ^{c)}	67 (4.3 ± 0.8)
Gram-negative rods	67 (4.9 ± 2.1)	67 (5.3 ± 2.0)
Streptococci	100 (6.0 ± 1.7)	100 (7.5 ± 0.4)
Staphylococci	17 (2.9 ± 0.0)	67 (3.3 ± 1.0)
Corynebacterium	17 (2.3 ± 0.0)	83 (5.1 ± 1.5)
Lactobacilli	83 (4.8 ± 1.5)	100 (6.5 ± 1.8)
Yeasts	17 (2.3 ± 0.0)	33 (2.8 ± 0.0)
Anaerobic bacteria		
<i>Bacteroidaceae</i>	83 (4.1 ± 2.2)	100 (6.1 ± 2.2)
Veillonellae	50 (4.2 ± 2.3)	50 (3.5 ± 1.0)
Gram-positive anaerobic cocci	17 (2.6 ± 0.0)	33 (5.6 ± 1.1)
Gram-positive anaerobic rods	50 (5.9 ± 1.2)	83 (5.0 ± 2.0)
Clostridia	33 (2.5 ± 0.2)	< ^{d)}
Total bacteria	100 (6.3 ± 1.6)	100 (8.1 ± 0.7)

a) 検索数。

b) 分離頻度：陽性検体数/総検索数 (%)。

c) 数値は、mean ± log₁₀ bacterial numbers/vagina を示している。

d) チンパンジーにおける検出限界は、<10^{2.3} CFU/vagina である。

ii) 各菌種群の細菌数について (表 11)

性成熟チンパンジーの swelling phase における総細菌数は、non-swelling phase 時よりも $10^{1.8}$ (CFU/vagina) 増加した。swelling phase における streptococci、lactobacilli および *Bacteroidaceae* の細菌数は、それぞれ $10^{7.5}$ 、 $10^{6.5}$ および $10^{6.1}$ (CFU/vagina) で、その他の菌種群の値よりも高く、これら 3 菌種群の swelling phase での細菌数は、non-swelling phase 時より $10^{1.5} \sim 10^{2.7}$ (CFU/vagina) 増加していた。したがって、性成熟チンパンジーの swelling phase における総細菌数の増加は、これらの 3 菌種群 (streptococci、lactobacilli および *Bacteroidaceae*) によって引き起こされていた。その他の菌種群では、基本的に swelling phase での菌数増加が認められたが、*Veillonellaceae* および GPAR のように swelling phase でわずかに減少するケースや clostridia のように swelling phase で消失するケースも認められた。

以上のように、streptococci、lactobacilli および *Bacteroidaceae* の 3 菌種は、分離頻度、分離菌数ともに非常に高い値を示していたことから、これらの 3 つの菌種群は、チンパンジーの膣内細菌叢における常在細菌であることが強く示唆された。

4-3 考察

微生物は、外部環境と接するあるいは外部環境にさらされている組織の上皮表面にコロニーを形成している。これらの微生物の集団は、一般的に正常細菌叢 (normal microflora) と呼ばれているが、膣内の上皮や粘膜にも細菌叢が形成されている (vaginal flora) (Mackowiak, 1982 ; Redondo-Lopez, et al., 1990)。ヒトの膣内においては、lactobacilli が最も優勢に存在しており (Fujisawa, et al., 1992) (表 12)、この lactobacilli が膣内の泌尿生殖器の感染症の原因菌の侵入を阻止し、感染症の発生を防止しているなど、ヒトの膣内において lactobacilli は非常に重要な役割を果たしていると考えられている (Boris, et al., 1998 ; Reid and Burton, 2002)。一方、実験動物における膣内細菌叢に関する研究は、これまでにマウス (Meysick and Garber, 1992 ; Noguchi, et al., 2003)、ラット (Larsen, et al., 1976, 1976, 1977 ; Noguchi, et al., 2003 ; Yamada, et al., 1983)、ハムスター (Noguchi, et al., 2003)、ウサギ (Jacques, 1986 ; Noguchi, et al., 2003)、ネコ (Clemetson and Ward, 1990 ; Howard, et al., 1993)、イヌ (Baba, et al., 1983 ; Bjurstrom and Linde-Forsberg, 1992 ; Noguchi, et al., 2003 ; Van Duijkeren, 1992 ; Watts, et al., 1996)、ブタ (Bara, et al., 1993)、ヤギ (Fasanya, et al., 1987)、ヒツジ (Marshall, et al., 1983 ; Moorthy and Singh, 1982)、ウシ (Alam, et al., 1995 ; Amin, et al., 1996 ; Otero, et al., 2000) およびウマ (Hinrichs, et al., 1988 ; Scott, et al., 1971) 等について報告されているが、これらの動物種の膣内においては、lactobacilli は優勢に存在していなかった。したがって、これらの実験動物は、ヒトの膣における lactobacilli の役割を研究するための適したモデル動物になりうるとは考えられなかった。

チンパンジーは、ヒトにおける月経周期の研究において非常に有用なモデル動物として広く認められている。なぜなら、チンパンジーの子宮頸部を含む生殖器は、ヒトの場合と解剖学的に非常に類似しており、さらに卵胞の発達や卵巣の排卵の生理機能もまたヒトと非常に類似しているためである (Gould and Martin, 1981 ; Graham, 1981)。したがって、チンパンジーの膣内細菌叢は、その他の動物種よりもヒトに類似しているのではないかと考え、この考えを明らかにするために今回チンパンジーの膣内細菌叢の検索を行った。私の以前の研究において (Noguchi, et al., 2003)、lactobacilli の分離菌数は、マウス、ラット、ハムスターおよびイヌで $10^{2.2} \sim 10^{3.3}$ (CFU/vagina) とヒトでの成績 ($10^{9.2}$ CFU/g of vaginal specimens) (Fujisawa, et al., 1992) と比較すると非常に低かったが、今回検索したチンパンジーにおける lactobacilli の分離菌数およびその分離頻度は swelling phase で $10^{6.5}$ (CFU/vagina) および 100% と他の動物種よりも非常に高く優勢菌種のひとつであった (表 11 および表 12)。これらの結果から、チンパンジーの膣内細菌叢は、これまでに検討した動物種の中ではヒトに最も近いと同時に、チンパンジーはヒトの膣における lactobacilli の役割を研究するための適した実験動物であることが示唆された。

表 12. ヒトと4種類の実験動物およびチンパンジー間における腔内細菌叢の比較

Bacterial group N	Mice 4 ^{a)}	Rats 7	Hamsters 8	Dogs 6	Chimpanzees 6	Human beings 25
Reference	[Noguchi, 2003]	[Noguchi, 2003]	[Noguchi, 2003]	[Noguchi, 2003]	[Noguchi, 2004]	[Fujisawa, 1992]
Aerobes/facultative anaerobes						
<i>Enterobacteriaceae</i>	25 ^{b)} (7.0) ^{c)}	29 (3.6)	25 (4.1)	67 (6.8)	67 (4.3)	16 (5.3)
Gram-negative rods	50 (6.7)	100 (7.3)	100 (5.2)	67 (7.4)	67 (5.3)	36 (6.7)
Streptococci	100 (5.6)	100 (5.9)	63 (4.8)	83 (5.9)	100 (7.5)	64 (5.3)
Staphylococci	25 (2.7)	29 (1.6)	13 (3.0)	33 (5.6)	67 (3.3)	56 (4.2)
Corynebacterium	< ^{d)}	<	25 (6.4)	<	83 (5.1)	44 (5.8)
Lactobacilli	50 (3.3)	14 (2.2)	38 (2.7)	67 (2.5)	100 (6.5)	72 (9.2)
Yeasts	<	<	<	<	33 (2.8)	28 (7.0)
Anaerobes						
<i>Bacteroidaceae</i>	25 (2.8)	100 (6.9)	100 (7.9)	100 (6.7)	100 (6.1)	64 (6.5)
Veillonellae	<	<	50 (6.9)	<	50 (3.5)	4 (3.8)
Gram-positive anaerobic cocci	25 (4.6)	86 (4.4)	100 (7.7)	67 (7.6)	33 (5.6)	52 (5.4)
Gram-positive anaerobic rods	<	<	38 (7.5)	<	83 (5.0)	36 (8.1)
Clostridia	<	<	<	<	<	4 (3.0)
Total bacteria	100 (6.7)	100 (7.6)	100 (8.2)	100 (8.1)	100 (8.1)	100 (9.5)

表中には、マウス、ラット、ハムスターおよびイヌでは発情期、チンパンジーでは swelling phase およびヒトでは黄体期の成獣が示してある。これらの実験動物およびヒトの腔内細菌叢は、同じ培養方法によって分析された。

- a) 検体数。
- b) 分離頻度：陽性検体数/総検体数 (%)。
- c) 数値は、平均分離菌数 (log₁₀ bacterial numbers/vagina) を示している。
- d) 細菌の検出限界は、マウス、ラットおよびハムスターでは <10^{1.6}、イヌでは <10^{2.0}、チンパンジーでは <10^{2.3} (CFU/vagina)、ヒトでは <10^{2.0} (CFU/g of vaginal specimens) である。

霊長類の膣内細菌叢に関しては、これまでに7種類の霊長類について定性的に検討した成績が報告されている。まず、ブタオザル (pig-tailed macaques) (Patton, et al., 1996) では、膣内から最も頻繁に検出される細菌は *Prevotella* species, diphtheroids および streptococci で、lactobacilli の検出率は73%であった。ヒヒ (baboons) (Skangalis, et al., 1979) では、膣内から最も頻繁に検出される細菌は *Bacteroidaceae*, corynebacteria および streptococci で、lactobacilli の検出率は47%であった。アフリカミドリザル (African green monkeys) (Narushima, et al., 1997) では、膣内から最も頻繁に検出される細菌は *Bacteroidaceae*, corynebacteria および streptococci で、lactobacilli の検出率は性周期の時期に関係なく非常に低かった。アカゲザル (rhesus macaques) (Doyle, et al., 1991)、サバンナモンキー (grivet monkeys) (Mardh, et al., 1984)、ホエザル (howler monkeys) (Claver, et al., 1984) およびリスザル (squirrel monkeys) (Street, et al., 1983) では膣内から lactobacilli は検出されなかった (検出限界以下)。このように、上記の霊長類では、lactobacilli は膣内に優勢菌として存在していなかった。したがって、チンパンジーの膣内細菌叢は、これらの霊長類よりもよりヒトの膣内細菌叢に近いと考えられた。

ヒトや実験動物の膣内細菌叢に関する報告はいくつかみられるが、膣内細菌叢の培養方法が各実験者ごとに異なっていたことから、その成績を単純に比較することができないばかりでなく、ヒトのモデルとしての適切な実験動物の選定もできない状況にあった。そこで、同じ培養方法によって調査された実験動物、すなわち、マウス (Noguchi, et al., 2003)、ラット (Noguchi, et al., 2003)、ハムスター (Noguchi, et al., 2003)、イヌ (Noguchi, et al., 2003) およびチンパンジー (Noguchi, et al., 2004) とヒトの膣内細菌叢 (Fujisawa, et al., 1992) の成績を表12にまとめて示した。ヒトでは、月経周期のうち黄体期 (luteal phase) で、マウス、ラット、ハムスターおよびイヌでは発情期 (estrus stage) で、チンパンジーでは swelling phase でそれぞれ膣内総細菌数が最も高くなることから、これらの時期における膣内細菌叢の構成を比較した。実験動物では分離頻度が100%を示した菌種群を、ヒトでは分離頻度が60%以上を示した菌種群をそれぞれ優勢菌種として定義した。その結果、マウス、ラット、ハムスターおよびイヌの膣内における優勢菌種は、ヒトの場合 (streptococci, lactobacilli および *Bacteroidaceae*) と異なっていた。それに対して、チンパンジーでは、lactobacilli の分離菌数はヒトの場合よりも低かったけれども、チンパンジーの膣内細菌叢の優勢菌種 (streptococci, lactobacilli および *Bacteroidaceae*) は、ヒトの場合と全く同一であった (表12 および表13)。つぎに、それぞれの実験動物およびヒトにおける優勢菌に注目してみると、*Bacteroidaceae* はラット、ハムスター、イヌ、チンパンジーおよびヒトの膣内における優勢菌種であった。また、streptococci はマウス、ラット、チンパンジーおよびヒトの膣内における優勢菌種で、それ以外のハムスターおよびイヌにおいてもその分離頻度はそれぞれ63%および83%と比較的高い値を示していた (表12)。したがって、

表13. ヒトと実験動物の腔内細菌叢における優勢菌種の比較

Bacterial group	Mice	Rats	Hamsters	Dogs	Chimpanzees	Human beings
Aerobes/facultative anaerobes						
<i>Enterobacteriaceae</i>						
Gram-negative rods		PB	PB			
Streptococci	PB*	PB		PB		PB
Staphylococci						
<i>Colynebacterium</i>						
Lactobacilli					PB	PB
Yeasts						
Anaerobes						
<i>Bacteroidaceae</i>		PB	PB	PB	PB	PB
<i>Veillonella</i>						
Gram-positive anaerobic cocci			PB			
Gram-positive anaerobic rods						
<i>Clostridia</i>						

* 優勢菌種：マウス、ラット、ハムスター、イヌおよびチンパンジーでは、100%の分離頻度を示した菌種群を、ヒトでは、60%以上の分離頻度を示した菌種群を優勢菌種と定義した。

Bacteroidaceae と streptococci は、哺乳類の膣内細菌叢に普遍的な共通の常在細菌である可能性が示唆された。

今回の研究で、性成熟チンパンジー（9～16 および 17～22 歳）の swelling phase における膣内総細菌数は、non-swelling phase 時よりも有意に高かった。内因性のエストロゲンの分泌の増加は、性皮の腫脹（sexual swelling）を引き起こし（Graham, et al., 1972）、さらには子宮頸部の腺から分泌される粘液の増加を引き起こす（McArthur, et al., 1972）ことがすでに報告されている。また、ムチン（粘液中に含まれる多糖類）は腸内細菌の増殖を引き起こすことが知られている（Savage, 1972）。これは、腸内細菌が一種の多糖類であるムチンをエネルギー源として利用するからである。したがって、swelling phase における膣内細菌叢の増殖は、分泌される粘液の増加によって引き起こされているのではないかと考えられた。これまでに実施したマウス、ラット、ハムスターおよびイヌでの検討においても、膣内総細菌数はエストロゲン濃度が最も高くなる発情期で最も高くなることを確認している（Noguchi, et al., 2003）。これらの結果を総合して考えると、膣内細菌叢の総細菌数の増加は、内因性のエストロゲンの分泌によって影響されているようにみえる。

今回の研究の結果、チンパンジーにおける膣内総細菌数は、加齢とともに増加傾向を示し、性成熟直前の 5～7 歳の時期にすでに性成熟チンパンジー（9～22 歳）と同レベルに達していた。Winter ら（1980）によれば、チンパンジーの血清中のエストラジオール（estradiol）濃度は性成熟前に増加し始めることから、今回観察された性成熟直前における膣内総細菌数の増加は、性成熟前でのエストロゲン濃度の増加によって引き起こされたのではないかと考えられた。Yamada ら（1986）は、ラットにおける膣内総細菌数の減少は卵巣の摘出によって引き起こされ、卵巣を切除されたラットの膣内総細菌数は無処置ラットの発情休止期の成績とほぼ同等であることを報告している。しかしながら、卵巣が切除されたラットに外因性のエストロゲンを投与すると膣内総細菌数は増加し、無処置ラットの発情期の成績とほぼ同等の値を示すことをさらに報告している。これらの成績は、卵巣から分泌される内因性のエストロゲンの分泌がラットの膣内細菌叢の増殖を引き起こすことを示唆している。

ヒトにおけるエストロゲンの分泌は、膣の粘膜上皮の増殖とともに膣粘膜上皮中へのグリコーゲンの蓄積を引き起こす（Larsen and Galask, 1980 ; Yoshimura and Okamura, 2001）。また、lactobacilli は膣の粘膜上皮中に含まれるグリコーゲンを酵素の作用で分解し単糖類を遊離させ発酵して乳酸を生じさせるため、膣内を強酸性に保ち、膣内での病原菌の増殖を阻止していると考えられている（Eschenbach, et al., 1989 ; Redondo-Lopez, et al., 1990）。Claver ら（1984）によれば、ホエザル（howler monkeys）の膣内から lactobacilli が検出さ

れなかった理由は、このサルの膣内の粘膜上皮中にグリコーゲンが存在しないことが大きな要因のひとつであることを示唆する報告をしている。したがって、膣内での lactobacilli の増殖には粘膜上皮内のグリコーゲン量が密接に関係していると考えられた。なぜなら、膣内においては lactobacilli は膣内に存在するグリコーゲンを栄養源として必要とするからである。チンパンジーの膣内上皮内におけるグリコーゲンの量に関しては、我々の知る限りにおいては報告されていない。したがって、実験動物の膣の粘膜上皮内に含まれるグリコーゲン量と膣内での lactobacilli の増殖との関係を明らかにするためには、さらなる研究が必要であると考えられた。

腸内細菌叢の総細菌数は、約 10^{10} ~ 10^{11} (CFU/g) であることが報告されている (Balish, et al., 1977 ; Barnes, et al., 1972 ; Benno, et al., 1986, 1987 ; Hagen, et al., 1965 ; Itoh, et al., 1983 ; Morishita and Miyaki, 1979) が、膣内細菌叢の総細菌数は、菌数が最も高くなる発情期でも約 10^6 ~ 10^8 (CFU/vagina) (Noguchi, et al., 2003) と腸内細菌叢の場合よりも少なかった。膣内においては、細菌増殖の栄養源となる様々な物質、つまり食べ物の残渣、胆汁およびムチンなど多くの物質を含んでいるが、膣内では細菌の増殖の栄養源として含まれるのは剥脱性の上皮細胞やムチンだけである。したがって、今回観察された腸内と膣内における総細菌数の菌数の違いは、細菌が増殖するために必要な栄養源の差によって引き起こされているのではいかと考えられた。

4-4 まとめ

lactobacilli は、チンパンジーの膣内細菌叢における優勢菌種のひとつであった。しかし、他の実験動物、すなわちマウス (Meysick and Garber, 1992 ; Noguchi, et al., 2003)、ラット (Larsen, et al., 1976, 1976, 1977 ; Noguchi, et al., 2003 ; Yamada, et al., 1983)、ハムスター (Noguchi, et al., 2003)、ウサギ (Jacques, 1986 ; Noguchi, et al., 2003)、ネコ (Clemetson and Ward, 1990 ; Howard, et al., 1993)、イヌ (Baba, et al., 1983 ; Bjurstrom and Linde-Forsberg, 1992 ; Noguchi, et al., 2003 ; Van Duijkeren, 1992 ; Watts, et al., 1996)、ブタ (Bara, et al., 1993)、ヤギ (Fasanya, et al., 1987)、ヒツジ (Marshall, et al., 1983 ; Moorthy and Singh, 1982)、ウシ (Alam, et al., 1995 ; Amin, et al., 1996 ; Otero, et al., 2000)、ウマ (Hinrichs, et al., 1988 ; Scott, et al., 1971)、ブタオザル (Patton, et al., 1996)、ヒヒ (Skangalis, et al., 1979)、アフリカミドリザル (Narushima, et al., 1997)、アカゲザル (Doyle, et al., 1991)、サバンナモンキー (Mardh, et al., 1985)、ホエザル (Claver, et al., 1984) およびリスザル (Street, et al., 1983) では lactobacilli は優勢菌種ではなかった。このことから、ヒトの lactobacilli の役割を研究するためのモデル動物としては、これらの動物種の中ではチンパンジーが最も適していると考えられた。

れなかった理由は、このサルの膣内の粘膜上皮中にグリコーゲンが存在しないことが大きな要因のひとつであることを示唆する報告をしている。したがって、膣内での lactobacilli の増殖には粘膜上皮内のグリコーゲン量が密接に関係していると考えられた。なぜなら、膣内においては lactobacilli は膣内に存在するグリコーゲンを栄養源として必要とするからである。チンパンジーの膣内上皮内におけるグリコーゲンの量に関しては、我々の知る限りにおいては報告されていない。したがって、実験動物の膣の粘膜上皮内に含まれるグリコーゲン量と膣内での lactobacilli の増殖との関係を明らかにするためには、さらなる研究が必要であると考えられた。

腸内細菌叢の総細菌数は、約 $10^{10} \sim 10^{11}$ (CFU/g) であることが報告されている (Balish, et al., 1977 ; Barnes, et al., 1972 ; Benno, et al., 1986, 1987 ; Hagen, et al., 1965 ; Itoh, et al., 1983 ; Morishita and Miyaki, 1979) が、膣内細菌叢の総細菌数は、菌数が最も高くなる発情期でも約 $10^6 \sim 10^8$ (CFU/vagina) (Noguchi, et al., 2003) と腸内細菌叢の場合よりも少なかった。膣内においては、細菌増殖の栄養源となる様々な物質、つまり食べ物の残渣、胆汁およびムチンなど多くの物質を含んでいるが、膣内では細菌の増殖の栄養源として含まれるのは剥脱性の上皮細胞やムチンだけである。したがって、今回観察された腸内と膣内における総細菌数の菌数の違いは、細菌が増殖するために必要な栄養源の差によって引き起こされているのではいかと考えられた。

4-4 まとめ

lactobacilli は、チンパンジーの膣内細菌叢における優勢菌種のひとつであった。しかし、他の実験動物、すなわちマウス (Meysick and Garber, 1992 ; Noguchi, et al., 2003)、ラット (Larsen, et al., 1976, 1976, 1977 ; Noguchi, et al., 2003 ; Yamada, et al., 1983)、ハムスター (Noguchi, et al., 2003)、ウサギ (Jacques, 1986 ; Noguchi, et al., 2003)、ネコ (Clemetson and Ward, 1990 ; Howard, et al., 1993)、イヌ (Baba, et al., 1983 ; Bjurstrom and Linde-Forsberg, 1992 ; Noguchi, et al., 2003 ; Van Duijkeren, 1992 ; Watts, et al., 1996)、ブタ (Bara, et al., 1993)、ヤギ (Fasanya, et al., 1987)、ヒツジ (Marshall, et al., 1983 ; Moorthy and Singh, 1982)、ウシ (Alam, et al., 1995 ; Amin, et al., 1996 ; Otero, et al., 2000)、ウマ (Hinrichs, et al., 1988 ; Scott, et al., 1971)、ブタオザル (Patton, et al., 1996)、ヒヒ (Skangalis, et al., 1979)、アフリカミドリザル (Narushima, et al., 1997)、アカゲザル (Doyle, et al., 1991)、サバンナモンキー (Mardh, et al., 1985)、ホエザル (Claver, et al., 1984) およびリスザル (Street, et al., 1983) では lactobacilli は優勢菌種ではなかった。このことから、ヒトの lactobacilli の役割を研究するためのモデル動物としては、これらの動物種の中ではチンパンジーが最も適していると考えられた。

第5章 実験動物の微生物学的統御が及ぼす腔内細菌叢への影響

－SPF、CV および wild ラットでの検討－

5-1 材料および方法

A. 生産施設における SPF ラットコロニーの確立方法

実験動物の生産施設においては、SPF ラットコロニーは通常帝王切開由来の動物を用いて確立されている (Kappel, et al., 1969 ; Parrott and Eveleigh, 1970)。その手順を簡潔に述べると、まず出産直前の妊娠ラットの胎児の入った子宮を無菌的に切除し、直ちに無菌の手術用ビニールアイソレータ内に無菌的に搬入する。つぎに、子宮およびその内膜を破ることによって胎児を取り出し、滅菌ガーゼでマッサージすることにより体を乾燥させ、呼吸を誘発させる。この方法によって作出されたラットの胎児は、滅菌された人工乳によってビニールアイソレータ内で育てられる。したがって、ビニールアイソレータで維持されているこのラットは離乳するまで無菌の状態に維持されることになる。離乳後このラットは、無菌の環境であるビニールアイソレータ内から SPF 動物を飼育・維持するための特殊な飼育区域 (バリア施設) に搬出・移動させられ、そのバリア施設の動物飼育室内で交配させることによって動物数が増やされる。このようにして得られたラットが SPF ラットとして研究者などのユーザーに供給されている。

B. 生産施設における SPF ラットの飼育環境

今回の実験には、日本国内の実験動物の生産施設で市販されている SPF および CV のラットを使用した。生産施設における SPF ラットは、上述したように帝王切開由来の動物で、バリア施設 (barrier system) で飼育・維持されている。バリア施設内では、SPF ラットはオートクレーブ滅菌された飼育器材 (ケージ、蓋および床敷等) によって飼育・維持され、エサはオートクレーブ滅菌あるいは γ 線照射滅菌された固型飼料、飲水はフィルター処理された塩素添加水がそれぞれ給与されている。また、動物飼育室内には HEPA (high efficiency particulate air) フィルターによって $0.3\mu\text{m}$ 以上の微粒子が除去された微生物学的に清浄な空気が常に供給されている。動物飼育室内は、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50~70% の条件で維持され、照明は明暗周期 12 時間 (明 : 7~19 時、暗 : 19~7 時) に設定されている。これらの施設で飼育・維持されている SPF ラットは、月に 1 回あるいは 2 回の頻度で実験動物の微生物学的状態の検査確認が実施されている。

C. 生産施設における CV ラットの飼育環境

今回の実験で使用した CV ラットを維持している生産施設では、CV ラットは自然分娩によって継代され、バリア施設とは異なり開放形式の施設 (open system) で飼育・維持されている。この施設内では、CV ラットは未滅菌の飼育器材で維持され、エサは未滅菌の固型飼料、飲水は未滅菌の水道水が給与されている。動物飼育室内の空気は、フィルター

処理などを行われず自然換気されており、室内温度は 22 ± 4 °C で維持され、照明は明暗周期 12 時間（明：7～19 時、暗：19～7 時）に設定されている。ただし、室内の湿度は機械的なコントロールは全く行われていない。また、この施設で維持されている CV ラットの微生物学的状態は、年に 1 回の頻度で検査確認が実施されている。表 14 には、以上述べた SPF、CV および Wild ラットにおける飼育環境の比較をまとめて示した。

D. 実験動物

i) SPF ラット

12 週齢の SPF、バージン、雌の Wistar ラット 32 匹を下記に示す 5 つの業者より購入し使用した。すなわち、①日本エスエルシー（Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan）の Wistar/Slc ラット 13 匹、②チャールスリバー（Charles River Japan, Inc., Shiga, Japan）の Wistar/Crj ラット 4 匹、③日本クレア（CREA Japan, Inc., Tokyo, Japan）の Wistar/Jcl ラット 6 匹、④セアック吉富（Seac Yoshitomi, Inc., Fukuoka, Japan）の Wistar/Sea ラット 4 匹および⑤九動（Kyudo Co., Ltd., Kumamoto, Japan）の Wistar/Kud ラット 5 匹の合計 32 匹を使用した。これらのラットは、各々の生産場で微生物学的品質管理が行われており、共通して以下に示す微生物、すなわち Sendai virus、sialodacryoadenitis virus、hantavirus、*Mycoplasma* spp.、*Clostridium piliforme*、*Corynebacterium kutscheri*、*Streptococcus pneumoniae*、*Bordetella bronchiseptica*、*Pasteurella pneumotropica*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella* spp.、*Syphacia* spp. および *Aspicularis tetraptera* がすべて陰性であった。

これらのラットは、購入後、熊本大学生命資源研究・支援センターの動物資源開発研究施設（動物施設）内の SPF 環境下で維持された。すなわち、購入した SPF ラットは、滅菌済みの床敷（Iwakura Co. Ltd., Hokkaido, Japan）が入れられたステンレス製の蓋の着いた滅菌済 TPX 製ケージ（CLEA Japan, Inc., Tokyo : CLEA）に 2 ないし 3 匹収容され、ラミナーフローベンチ（Tokiwa Kagaku Kikai Co. Ltd., Tokyo, Japan ; Tokiwa）で飼育・維持された。また、飼料は、市販の固型飼料（CE-2 ; CLEA）を、飲水は自動給水装置（Tokiwa）にてフィルターで濾過され紫外線照射された水を給与し、それぞれ自由摂取させた。ケージ交換は、週 1 回の頻度で行った。飼育室内の環境条件は、温度 22 ± 2 °C、湿度 50～70%、明暗周期 12 時間（明：7～19 時、暗：19～7 時）であった。飼育室内の床面は、毎日清掃にされ、床面およびラミナーフローラックの棚面は、50ppm の次亜塩素酸ナトリウムで消毒された。

ii) CV ラット

清水実験材料（Shimizu laboratory Supplies, Kyoto, Japan）より購入した 12 週齢の CV、バージン、雌の Wistar/Siz ラット 7 匹を使用した。これらのラットは、Sendai virus (HVJ)、sialodacryoadenitis virus、hantavirus、*C. piliformis*、*C. kutscheri*、*Mycoplasma pulmonis*、*B. bronchiseptica* および *Salmonella* spp. が陰性であった。これらの CV ラットは、購入後、滅

表 14. SPF、CV および wild ラットにおける飼育環境条件の比較

Factor	Rearing environment		
	SPF	CV	Wild
Delivery	Hysterectomy*	Vaginal	Vaginal
Rearing system	Barrier	Open	NC
Air conditioning	HEPA-filtered air**	Ventilated unfiltered air	NC
Room temperature	22 ± 2 °C	22 ± 4 °C	NC
Room humidity	60 ± 10 %	NC***	NC
Drinking water	Filtered, chlorinated	Tap water	NC
Diet	Sterilized pellets	Non sterilized pellets	NC
Rearing equipment (cage, etc.)	Sterilized	Non sterilized	NC
Bedding	Sterilized wood chips	Non sterilized wood chips	NC
Microbiological monitoring	Monthly/bimonthly	Annual	NC

*SPF ラットコロニー確立時における出産方法。

**HEPA : high efficiency particulate air filter (0.3 μm 以上の微粒子を保持する)。

***NC : コントロールされず。

菌済 TPX 製のケージ (CLEA) に 2～3 匹の割合で収容され、熊本大学の動物施設内の SPF 環境下 (SPF ラットと同じ条件) で飼育・維持された。

iii) wild ラット

熊本大学生命資源研究・支援センターの動物施設の周辺環境からワイヤー製のトラップを用いて捕獲した wild ラット 9 匹を使用した。野外から捕獲された直後のラットを wild ラットとして分類した。捕獲された wild ラットは、熊本大学の動物施設内の SPF 環境下 (SPF および CV ラットと同じ条件) で飼育・維持された。さらに、今回は捕獲された wild ラットを当施設の SPF 環境下で雄と雌を交配させることによる継代を試み、wild ラットの産子、つまり第 1 世代 (F1) を得、さらにこの F1 の雄と雌を兄妹交配させることにより第 2 世代 (F2) を得た。なお、この時の産子は自然分娩と母親からの授乳によって育てられた。実験には、当施設の SPF 環境下で生まれ、その後もこの環境で維持し続けられたこの F1 と F2 ラットの 12～14 週齢の雌の各々 6 匹も使用した。以上の 3 種類の野生ラット、すなわち捕獲直後の wild ラット、F1 および F2 ラットを対象として微生物検査を実施したところ、Sendai virus (HVJ)、sialodacryoadenitis virus、*M. pulmonis*、*C. piliforme*、*C. kutscheri*、*S. pneumoniae* および *Syphacia* spp. は陰性であったが、*P. pneumotropica* は陽性であった。

E. 検体の採取および腔内細菌叢の分析方法

これまでに実験した成績から、ラットの腔内細菌叢は性周期の影響を受け、腔内総細菌数は性周期のうち発情期で最も高くなる (Noguchi, et al., 2003 ; Noguchi, et al., 2004) ことから、今回の SPF、CV、wild、F1 および F2 ラットにおける腔内細菌叢の比較は、細菌数が最も高くなる発情期の成績で行った。

検体の採取は、ラットの腔口周辺部をアルコール綿 (70%エチルアルコール含有) で消毒後、準備した 2ml の滅菌生理食塩水の一部を吸引したパスツールピペットを腔内に挿入し、腔内洗浄を数回繰り返すことによって得た。採取した検体は、直ちに気相部を 100% の炭酸ガスで置換し密栓後、嫌気性グローブチャンバー内 (窒素 85%、二酸化炭素 5%、水素 10% ; ICM) に移し、その中で嫌気性希釈液を用いて 100 倍段階希釈列を作成し、光岡らの腸内細菌叢の検索方法 (第 2 章参照) に準じて、SPF、CV、wild、F1 および F2 ラットの腔内細菌叢の分析を行った。

ただし、今回の腔内細菌叢の分析では、新たに *Pasteurellaceae* (*Pasteurella pneumotropica*) の同定を行った。すなわち、TS agar 上に発育した典型的なコロニー (灰白色、涙滴状) を純分離した後、グラム染色による顕微鏡下での菌の形態の確認とオキシダーゼおよびカタラーゼ試験を行い、さらに市販されている同定用キット (API20NE ; bioMerieux Japan Ltd., Tokyo) を用いることにより *Pasteurella pneumotropica* かどうかの判定を行った (Brennan, et al., 1965 ; Hayashimoto, et al., 2005 ; Hoag, et al., 1962 ; Saito, et al., 1981)。

5-2 結果

A. SPF、CV および wild ラットの膣内細菌叢の比較

SPF、CV および wild ラットの膣内総細菌数は、性周期によって変化し、性周期のうち発情期で最も高くなることから、それぞれのラットの発情期の成績を比較した（表 15）。また、SPF ラットについては、5つの異なる生産場のラットの膣内細菌叢を調べたが、その成績に大きな違いが認められなかったことから、これらの生産場の異なるラットの成績をひとつにまとめて SPF ラットの成績として表 15 に示した。

i) CV および wild ラットの膣内細菌叢

wild ラットでは、*Pasteurellaceae*、streptococci および *Bacteroidaceae* の分離頻度および分離菌数は、それぞれ 100% および $10^{7.5}$ (CFU/vagina)、100% および $10^{6.4}$ (CFU/vagina)、100% および $10^{6.7}$ (CFU/vagina) であった。また、CV ラットでは、*Pasteurellaceae*、streptococci および *Bacteroidaceae* の分離頻度および分離菌数は、それぞれ 100% および $10^{7.3}$ (CFU/vagina)、100% および $10^{6.0}$ (CFU/vagina)、100% および $10^{6.9}$ (CFU/vagina) であった。このように、wild ラットと CV ラットの膣内細菌叢における優勢菌の種類は同じで、さらにそれらの分離頻度および分離菌数もほぼ同等であった（表 15）。したがって、wild ラットと CV ラットの膣内細菌叢の常在細菌は、ほとんど同じ種類で構成されていると考えられた。しかし、CV ラットでは、wild ラットで検出されていた other GNR および corynebacteria の 2 種類の菌種群が検出されていなかったことから、CV ラットの膣内から検出される菌種群の数は、wild ラットの場合よりも少ないという違いが両者の間でみられた。

ii) SPF ラットの膣内細菌叢

SPF ラットの膣内における優勢菌種は、*Enterobacteriaceae* および streptococci であった。そのうち、最も頻繁に検出されたのは *Enterobacteriaceae* で、その分離頻度および分離菌数は、それぞれ 100% および $10^{6.9}$ (CFU/vagina) であった（表 15）。しかし、CV および wild ラットにおける *Enterobacteriaceae* の分離頻度および分離菌数は、それぞれ 56% および $10^{4.7}$ あるいは $10^{5.1}$ (CFU/vagina) であったことから、SPF ラットの膣内における *Enterobacteriaceae* は、CV および wild ラットと比較して分離頻度も極めて高く、かつ分離菌数も約 100 倍高いことがわかった。それ以外としては、SPF ラットの膣内からは、CV および wild ラットで優勢菌種であった *Pasteurellaceae* および *Bacteroidaceae* の二つの菌種群と嫌気性菌が全く検出されていなかったことが特徴的であった。このように、膣内細菌叢の構成は SPF ラットと CV および wild ラット間で大きな違いがみられたが、膣内総細菌数は SPF ラットと CV および wild ラットではほぼ同等であり、両者の間に大きな違いはみられなかった。

表 15. SPF、CV および wild ラットにおける腔内細菌叢の比較

Bacterial group	Wild rats	CV rats	SPF rats
N	9	16	32
Aerobes/facultative anaerobes			
<i>Enterobacteriaceae</i>	56 ^{b)} (4.7 ± 2.2) ^{c)}	56 (5.1 ± 1.6)	100 (6.9 ± 1.0)*
<i>Pasteurellaceae</i>	100 (7.5 ± 0.6)	100 (7.3 ± 0.4)	<
Other gram-negative rods ^{a)}	33 (5.0 ± 1.9)	<	34 (6.7 ± 1.0)
Streptococci	100 (6.4 ± 1.2)	100 (6.0 ± 1.1)	97 (6.3 ± 1.1)
Staphylococci	44 (2.5 ± 1.1)	6 (1.2 ± 0.0)	6 (1.6 ± 0.0)
Corynebacteria	11 (2.4 ± 0.0)	<	<
Lactobacilli	< ^{d)}	25 (2.0 ± 0.3)	3 (1.9 ± 0.0)
Yeast	<	< ^{d)}	<
Anaerobes			
<i>Bacteroidaceae</i>	100 (6.7 ± 0.9)	100 (6.9 ± 0.6)	<
<i>Veillonellaceae</i>	<	<	<
Gram-positive anaerobic cocci	33 (6.3 ± 0.5)	31 (5.0 ± 2.3)	<
Gram-positive anaerobic rods	44 (4.5 ± 1.2)	13 (4.6 ± 0.3)	<
Clostridia	<	<	<
Total bacteria	100 (7.8 ± 0.7)	100 (7.6 ± 0.4)	100 (7.3 ± 0.6)
Number of bacterial groups	9	8	5

a) この菌種群は、*Enterobacteriaceae* および *Pasteurellaceae* 以外の gram-negative-rods を示している。

b) 分離頻度：陽性検体数/総検体数 (%)。

c) 数値は、mean ± SD log₁₀ bacterial numbers/vagina を示している。

d) ラットにおける細菌の検出限界は <10^{1.6} CFU/vagina である。

* 検出された細菌数を SPF ラットと wild および CV ラット間で統計処理 (Scheffe's F-test) による比較を行った所、SPF ラットの *Enterobacteriaceae* の菌数は、wild および CV ラットよりも P<0.005 で有意に高かった。

B. ラットの腔内細菌叢に及ぼす SPF 環境の影響

ラットの腔内細菌叢に SPF 環境（SPF 動物を飼育・維持するための特殊な環境）がどのような影響を与えているのかどうかを明らかにするために、外界から捕獲した Wild ラットを当施設内の SPF 環境下で維持し、その SPF 環境下で F1 および F2 を作出し、捕獲した直後の wild ラットと SPF 環境下で維持された F1 および F2 ラットの腔内細菌叢を比較・検討した。

その結果、F1 および F2 ラットの腔内細菌叢における優勢菌種は、CV および wild ラットと同様に *Pasteurellaceae*、streptococci および *Bacteroidaceae* であった。また、F1 および F2 ラットにおけるこれらの3つの優勢菌種の分離頻度および分離菌数は、wild ラットの場合とほぼ同等であった。それに加えて、F2 ラットにおける *Enterobacteriaceae* の分離頻度および分離菌数は、CV および wild ラットと有意な差は認められなかった。また、F2 ラットの腔内から検出された嫌気性菌の分離頻度および分離菌数は、CV および wild ラットの場合とほぼ同等であった（表 16）。以上のように、SPF ラットでみられたような *Enterobacteriaceae* の増加や *Pasteurellaceae* および嫌気性菌群の欠如は、F2 ラットの腔内では観察されなかった。ただし、other GNR および corynebacteria の菌種群が F2 ラットから検出されなくなったことから、F2 ラットの腔内から検出される菌種群の数は wild ラットの場合よりも少なかった。

これらの成績から、wild ラットの腔内細菌叢における優勢菌種および嫌気性菌群は、SPF 環境下で少なくとも第2世代まで継続的に飼育することによって影響されなかった。しかしながら、F2 ラットの腔内から優勢菌種以外の2菌種が検出されなくなったことから、F2 ラットの腔内細菌叢の構成は、CV ラットと類似したものになったが、SPF ラットとは明らかに異なり、類似性は全く認められなかった。

表 16. Wild, F1 および F2 ラットにおける腔内細菌叢の比較

Bacterial group	Wild rats	F1 generation	F2 generation
N	9	6	6
Aerobes/facultative anaerobes			
<i>Enterobacteriaceae</i>	56 ^{b)} (4.7 ± 2.2) ^{c)}	17 (6.4 ± 0.0)	67 (5.7 ± 2.4)
<i>Pasteurellaceae</i>	100 (7.5 ± 0.6)	100 (7.2 ± 0.6)	100 (7.2 ± 0.2)
Other gram-negative rods ^{a)}	33 (5.0 ± 1.9)	50 (6.3 ± 0.8)	<
Streptococci	100 (6.4 ± 1.2)	100 (6.2 ± 0.4)	100 (6.3 ± 0.3)
Staphylococci	44 (2.5 ± 1.1)	<	17 (1.6 ± 0.0)
Corynebacteria	11 (2.4 ± 0.0)	33 (2.7 ± 0.4)	<
Lactobacilli	< ^{d)}	17 (1.6 ± 0.0)	<
Yeast	<	<	<
Anaerobes			
<i>Bacteroidaceae</i>	100 (6.7 ± 0.9)	100 (6.3 ± 0.9)	100 (6.1 ± 1.0)
<i>Veillonellaceae</i>	<	<	<
Gram-positive anaerobic cocci	33 (6.3 ± 0.5)	17 (6.2 ± 0.0)	33 (6.7 ± 0.7)
Gram-positive anaerobic rods	44 (4.5 ± 1.2)	83 (3.4 ± 1.1)	67 (2.7 ± 1.5)
Clostridia	<	<	<
Total bacteria	100 (7.8 ± 0.7)	100 (7.5 ± 0.3)	100 (7.5 ± 0.1)
Number of bacterial groups	9	9	7

a) この菌種群は、*Enterobacteriaceae* および *Pasteurellaceae* 以外の gram-negative-rods を示している。

b) 分離頻度：陽性検体数/総検体数 (%)。

c) 数値は、mean ± SD log₁₀ bacterial numbers/vagina を示している。

d) ラットにおける細菌の検出限界は <10^{1.6} CFU/vagina である。

5-3 考察

腸内細菌叢の分野では、SPF ラットにおける *Enterobacteriaceae* の菌数は CV ラットよりも有意に高く、また SPF ラットにおける嫌気性菌の構成は CV ラットよりも単純であることが知られている (Itoh, et al., 1984 ; Itoh, et al., 1983 ; Yanabe, et al., 2001)。これらの事実を鑑みて、今回の研究では、膣内細菌叢を SPF ラットと CV あるいは wild ラット間で比較し、さらに膣内細菌叢への SPF 環境 (SPF 動物を維持するための特殊な環境) の影響を調べるために、wild ラットを SPF 環境で飼育・維持することによって得られた F1 および F2 ラットの膣内細菌叢の変化について調べた。

SPF ラットの膣内細菌叢は、CV および wild ラットと比較して以下に示すような特徴的な違いがみられた (表 15)。すなわち、第 1 に、SPF ラットでは *Enterobacteriaceae* の分離頻度および分離菌数の増加が認められ、*Enterobacteriaceae* が SPF ラットの膣内における最優勢菌種であった。SPF ラットにおける *Enterobacteriaceae* の菌数は CV および wild ラットの場合よりも約 100 倍高かった。第 2 に、SPF ラットの膣内からは嫌気性菌が全く検出されなかった。第 3 に、CV および wild ラットの膣内で優勢菌種であった *Pasteurellaceae* および *Bacteroidaceae* が SPF ラットの膣内からは検出されなかったという違いが認められた。

今回の研究の結果、SPF ラットと CV あるいは wild ラットにおける *Enterobacteriaceae* の菌数は、それぞれ約 10^7 (CFU/vagina) と約 10^5 (CFU/vagina) で、SPF ラットにおける *Enterobacteriaceae* の菌数は CV あるいは wild ラットよりも有意に高いことが明らかとなった。Itoh ら (1983 および 1984) によれば、腸内細菌叢の場合、SPF および CV マウスにおける *Enterobacteriaceae* の菌数は、それぞれ $10^{6.0}$ (CFU/g feces) および $10^{4.6}$ (CFU/g feces)、同様に SPF および CV ネコでは、それぞれ $10^{9.1}$ (CFU/g feces) および $10^{6.0}$ (CFU/g feces) であることが報告されている。このように、腸内細菌叢の場合も、*Enterobacteriaceae* の増加は SPF マウスおよび SPF ネコに共通してみられている。しかし、腸内細菌叢における *Enterobacteriaceae* の増加の明確な原因はわかっていない。

その一方で、Hoshi ら (1992) は、SPF ラットのパイエル板におけるリンパ小節内の胚中心は CV ラットのそれよりも未発達であり、さらに SPF ラットにおける全膝窩リンパ節における胚中心を含むリンパ小節の数は CV ラットと比較すると極めて少ないことを報告している。このように、飼育環境からの抗原負荷 (antigen load) の減少は、リンパ組織の発達を抑制する。

さらに、Horsfall ら (1978) は、SPF マウスにおける血清中の免疫グロブリンのレベルは CV マウスの場合よりも低く、SPF マウスのコンベンショナル化 (conventionalization) によって、IgM を除く全ての免疫グロブリンの血清中濃度の増加が引き起こされ、コンベ

ンショナル化された SPF マウスにおける血清中の免疫グロブリン濃度は CV マウスの場合とほぼ同等であることを報告している。これらの結果は、SPF 環境（SPF 動物のための特殊な環境）は免疫機構の未発達を引き起こすことを示唆している。

さらに、Itoh ら（1979）によれば、SPF マウスは腸病原性の *Escherichia coli* による感染に対して CV マウスよりも免疫学的に脆弱であることが報告されている。これらの結果から、SPF 動物の腸内細菌叢における *Enterobacteriaceae* の増加は免疫機構の未発達によって引き起こされていると推察するのが論理的であるように思われた。

それに加えて、健康な動物の腸内においては、*Enterobacteriaceae* の菌数は出生直後から急速な増加が認められるが、その後減少し一定の低いレベルで維持されることが知られている（Dubos, 1980）。この出生直後の *Enterobacteriaceae* の菌数の一過性の増加は、新生児期における免疫機構の未成熟さによって引き起こされ、またその後に見られる *Enterobacteriaceae* の菌数の急速な抑制は免疫機構の発達によって引き起こされるのではないかと考えられている（Dubos, 1980）。

これらの結果を総合的に考察すると、SPF 動物における免疫機構の未成熟さが腸内細菌叢ばかりでなく腔内細菌叢における *Enterobacteriaceae* の増加を引き起こしているのではないかと推測された。

今回、CV および wild ラットで優勢菌種であった *Pasteurellaceae* は、SPF ラットの腔内からは全く検出されなかった（表 15）。そこで、CV および wild ラットから検出された *Pasteurellaceae* の同定を試みたところ、その大部分は *Pasteurella pneumotropica* であった。この *P. pneumotropica* はグラム陰性の桿菌で、マウス・ラットなどの齧歯類の実験動物から共通に検出される日和見性の病原菌である（Ueno, et al., 2002 ; Weigler, et al., 1996）。したがって、SPF ラットコロニーを確立するためには、この *P. pneumotropica* を動物個体から取り除くことが必須条件であるが、*P. pneumotropica* は、鼻咽頭、口腔、上部気道、結膜、膀胱、皮膚、乳腺、生殖器および腸管内などの体腔の粘膜のあらゆる箇所に生息している（Goelz, et al., 1996 ; Manning, et al., 1991 ; Moore, et al., 1973 ; Needham, et al., 1975 ; Saito, et al., 1981 ; Wang, et al., 1996 ; Ward, et al., 1978 ; Weigler, et al., 1996）。そのため、汚染された母親から *P. pneumotropica* 感染を避けるために、帝王切開および新生児の汚染母親からの隔離が実行された。これらの処置を行った結果、*P. pneumotropica* フリーの SPF ラットコロニーの作出に成功し（Lindsey, et al., 1991）、当然の結果として、SPF ラットの腔内から *P. pneumotropica* が除去された。

したがって、SPF ラットの腔内細菌叢における *P. pneumotropica* の欠如は、SPF コロニーの作出の際に実施された帝王切開と汚染母親からの新生児の隔離という人為的な操作によって引き起こされたのではないかと考えられた。

SPF ラットの腔内からは、嫌気性菌はまったく検出されなかった（表 15）が、その理由はわからない。ラットの腔は、解剖学的に肛門と非常に近い所に開口していることから、SPF ラットの腔内に糞便由来の嫌気性菌が侵入し、その腔内で増殖してもおかしくないように思える。しかしながら、SPF ラットの腔内における嫌気性菌の増殖は今回全く観察されなかった。これは、帝王切開という人為的な操作によって腔内細菌叢の常在細菌を母親から受け継ぐ機会を奪われ、さらに糞便中には腔内で常在細菌と成りうるような菌種が含まれていないことが原因かもしれないと考えられた。したがって、SPF ラットの腔内から嫌気性菌が検出されなかったという現象は、腔特有の常在細菌叢が母親から受け継がれなかったことが大きく影響しているのではないかと考えられた。

SPF 環境（SPF 動物を維持するための特殊な環境）は、実験動物を病原微生物による汚染から守るために考案された特殊な環境である。SPF 環境では、使用される飼育器材等はすべて滅菌され、また飼育室内には除菌された極めて清浄な空気が送風されることから、飼育室内環境からの細菌負荷はコンベンショナル環境と比較すると著しく減少している。しかしながら、この SPF 動物を維持するために作りだされた特殊な環境が実験動物の腔内細菌叢にどのような影響を与えるかについてはこれまで全くわかっていなかった。そこで、この点を明らかにするために野外から捕獲した wild ラットを SPF 環境下で第 2 世代まで飼育・維持し、その腔内細菌叢の変化を研究した。その結果、F2（wild ラットの第 2 世代）ラットの腔内細菌叢の優勢菌の種類は、捕獲された直後の wild ラットのそれと全く同じであった。つまり、腔内細菌叢の優勢菌は、SPF 環境によって影響を受けなかった（表 16）。また、F2 ラットにおける *Enterobacteriaceae* の分離頻度および分離菌数は、wild ラットとほぼ同等であった。つまり、SPF 環境は *Enterobacteriaceae* の分離頻度および分離菌数の増加を引き起こさなかった。さらに、F2 ラットにおける嫌気性菌の各菌種群の分離頻度および分離菌数は wild ラットと類似しており、腔内からの嫌気性菌の消失は観察されなかった。つまり、腔内からの嫌気性菌の消失は SPF 環境だけの要因では引き起こされなかった。これらの成績は、SPF 環境だけの要因では wild ラットの腔内細菌叢に大きな影響を及ぼさないことを示唆している。我々は予備的研究において、CV ラットを当施設の SPF 環境下で 6 ヶ月以上の飼育によっても、腔内細菌叢には大きな変化がみられないことをすでに確認している（未発表データ）。要約すると、これらの結果は、SPF 環境はラットの腔内細菌叢の優勢菌種に影響を与えないことを示唆している。したがって、SPF ラットの特徴的な腔内細菌叢の発達は、SPF 環境によって引き起こされたのではなく、SPF ラットコロニー確立の過程から考察すると、その際に実行された帝王切開と新生児の汚染母親からの隔離という人為的な操作が非常に重要な役割をはたしているのではないかと推測された。

今回の研究で、wild ラットの腔内から検出されていた other GNR および corynebacteria の2菌種は、wild ラットを SPF 環境下で第2世代まで飼育することによって検出されなくなった（検出限界以下）（表 16）。このように、SPF 環境は wild ラットの腔内細菌叢からの other GNR と corunebacteira の消失を引き起こした。したがって、これらの菌種群は、wild ラットにおける腔内細菌叢の常在細菌の一部というよりむしろ環境から汚染された一過性の細菌であるように思われた。

5-4 まとめ

SPF ラットにおける腸内細菌叢と腔内細菌叢の構成は、CV ラットと異なることが明らかとなった。それに加えて、SPF ラットの免疫機構は、CV ラットよりもより未成熟であると考えられる（Horsfall, et al., 1978 ; Hoshi, et al., 1992 ; Itoh, et al., 1979）。したがって、研究者は、これらの細菌叢や免疫機構に関する研究を SPF ラットを用いて行う場合は、SPF ラットのこれらの特性を十分に考慮して実験する必要があると考えられた。

第6章 総括と今後の展望

今回、実験動物の腔内細菌叢に関する研究を行った結果、ヒトの腔内細菌叢はかなり特殊であることが明らかになってきた。唯一、チンパンジーの腔内細菌叢がヒトに類似して lactobacilli が腔内で優勢に存在していることがわかったが、現実的には世界的に希少動物であるチンパンジーを実験に使用することは非常にむずかしい状況にある。したがって、ヒトの腔の病気の疾患モデル動物として、今後、別の種類の実験動物での検討を試みるか、あるいはヒト型の腔内細菌叢をもつマウス・ラット等のモデル動物の開発を行う必要があると考えられた（腸内細菌叢の分野ではすでに作製が試みられている）。そのためには、腔内での lactobacilli 増殖の条件を知る必要があるので、今後ヒトの腔内細菌叢についても詳しく調べてみる必要があるかもしれない。

また、腔内細菌叢もまた腸内細菌叢と同様に感染防御的役割があるのではないかと考えられていることから、今後腔内細菌叢の感染防御能に関する研究も行う必要があると考えられた。これにより、もし感染防御的役割をもつ腔内細菌叢の構成を明らかにすることができれば、感染防御能をもった腔内細菌の付与によるヒトの腔内感染症の予防に役立つのではないかと考えられた。

しかしながら、実験動物の腔内細菌叢に関する基礎データはまだまだ非常に乏しいといわざるを得ない。したがって、上記の研究とは別に実験動物の腔内細菌叢の系統差、加齢に伴う変化などの基礎データを今後さらに蓄積するとともに、腔内細菌叢と性ホルモン、粘液およびグリコーゲンとの関係などの腔内細菌叢に関する基礎的研究も平行して行っていく必要があると考えられた。

参考文献

- Alam, M. G. S., J. U. Ahmed, M. B. Rahman, and M. M. Rahman.** 1995. Occurrence of bacterial flora in the genital tract of female buffaloes. *Bangladesh. Vet. J.* **29**:71-74.
- Allen, E.** 1922. The oestrous cycle in the mouse. *Am. J. Anat.* **30**:297-348.
- Amin, J. D. , L. T. Zaria, and R. M. Malgwi.** 1996. Vaginal aerobic bacterial flora of apparently healthy cattle in various stages of the reproductive cycle in the Sahel region of Nigeria. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afri.* **44**:15-18.
- Baba, E., H. Hata, T. Fukata, and A. Arakawa.** 1983. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. *Am. J. Vet. Res.* **44**:606-609.
- Baker, H. J., J. R. Lindsey, and S. H. Weisbroth.** 1979. Reproduction and breeding, p. 154-168. *In* E. J. Baker (ed.), *The laboratory rat, vol. 1. Biology and diseases.* Academic press, New York.
- Balish, E., D. Cleven, J. Brown, and C. E. Yale.** 1977. Nose, throat, and fecal flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**:207-221.
- Bara, M.R., M. R. McGowan, D. O'boyle, and R. D. A. Cameron.** 1993. A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stages of the reproductive cycle. *Aust. Vet. J.* **70**:256-259.
- Barberini, F., S. Correr, F. De Santis, and P. M. Motta.** 1991. The epithelium of the rabbit vagina : a microtopographical study by light, transmission and scanning electron microscopy. *Arch. Histol. Cytol.* **54**:365-378.
- Barnes, E. M., G. C. Mead, D. A. Barnum, and E. G. Harry.** 1972. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br. Poult. Sci.* **13**:311-326.
- Bartlett, J. G., A. B. Onderdonk, E. Drude, C. Goldstein, M. Anderka, S. Alpert, and W. M. McCormack.** 1977. Quantitative bacteriology of the vaginal flora. *J. Infect. Dis.* **136**:271-277.
- Bartlett, J. G., and B. F. Polk.** 1984. Bacterial flora of the vagina: quantitative study. *Rev. Infect. Dis.* **6**:S67-S72.
- Bell, E. T., J. B. Bailey, and D. W. Christie.** 1973. Studies on vaginal cytology during the canine oestrous cycle. 1973. *Res. Vet. Sci.* **14**:173-179.
- Benno, Y., K. Itoh, Y. Miyao, and T. Mitsuoka.** 1987. Comparison of fecal microflora between wild Japanese monkeys in a snowy area and laboratory-reared Japanese monkeys. *Jpn. J. Vet. Sci.* **49**:1059-1064.

- Benno, Y., K. Suzuki, K. Narisawa, W. R. Bruce, and T. Mitsuoka.** 1986. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol. Immunol.* **30**:521-532.
- Bjurstrom, L. and C. Linde-Forsberg.** 1992. Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *Am. J. Vet. Res.* **53**:665-669.
- Bleby, J. and A. Lacey.** 1969. The establishment of a specific pathogen free cat (*felis catus*) colony. *J. small. Anim. Pract.* **10**:237-248.
- Boncyk, L. H. and S. S. Kalter.** 1972. Aerobic bacterial flora of chimpanzees - A four-year study. *J. Med. Prim.* **1**:333-343.
- Boris, S., J. E. Suarez, F. Vazquez, and C. Barbes.** 1998. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immun.* **66**:1985-1989.
- Brennan, P. C., T. E. Fritz, and R. J. Flynn.** 1965. *Pasteurella pneumotropica*: cultural and biochemical characteristics, and its association with disease in laboratory animals. *Lab. Anim. Care.* **15**:307-312.
- Casillo, S. and D. K. Blackmore.** 1972. Uterine infections caused by bacteria and *Mycoplasma* in mice and rats. *J. Comp. Path.* **82**:477-482.
- Centola, G. M.** 1978. Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during the oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy. *J. Anat.* **127**:553-561.
- Claver, J. A., O. J. Colillas, and B. L. Travi.** 1984. Histological and microbiological aspects of the vagina in captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Primates.* **25**:110-116.
- Clemetson, L. L., and A. C. S. Ward.** 1990. Bacterial flora of the vagina and uterus of healthy cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**:902-906.
- Coloe, P. J., T. J. Bagust, and L. Ireland.** 1984. Development of the normal gastrointestinal microflora of specific pathogen-free chickens. *J. Hyg. Camb.* **92**:79-87.
- Cook, R. L., G. W. Tannock, and R. J. Meech.** 1984. The normal microflora of the vagina. *Proceedings of the University of Otago Medical School.* **62**:72-74.
- Corbeil, L. B., A. Chatterjee, L. Foresman, and J. A. Westfall.** 1985. Ultrastructure of cyclic changes in the murine uterus, cervix and vagina. *Tiss. Cell.* **17**:53-68.
- Corbishley, C. M.** 1977. Microbial flora of the vagina and cervix. *J. Clin. Pathol.* **30**:745-748.
- Cox, F.** 1982. Prevention of group B streptococcal colonization with topically applied lipoteichoic acid in a maternal-newborn mouse model. *Pediatr. Res.* **16**:816-819.

- Dahl, J. F., R. D. Nadler, and D. C. Collins.** 1991. Monitoring the ovarian cycles of *Pan troglodytes* and *P. paniscus*: a comparative approach. *Am. J. Primatol.* **24**:195-209.
- Doyle, L., C. L. Young, S. S. Jang, and S. L. Hillier.** 1991. Normal vaginal aerobic and anaerobic bacterial flora of the rhesus macaque (*Macacca mulatta*). *J. Med. Primatol.* **20**:409-413.
- Dubos, R.** 1980. The indigenous microbiota, p. 110-146. *In* R. Dubos (ed.), *Man adapting*. Yale University press, New Haven and London.
- Eschenbach, D. A., P. R. Davick, B. L. Williams, S. J. Klebanoff, K. Young-Smith, C. M. Critchlow, and K. K. Holmes.** 1989. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Micro.* **27**:251-256.
- Fasanya, O. O. A., D. S. Adegboye, E. C. I. Molokwu, and N. I. Dim.** 1987. Microbiology of the genitalia of nulliparous and postpartum savanna brown goats. *Vet. Res. Commun.* **11**:191-198.
- Fawcett, D. W.** 1994. Female reproductive system, p. 816-860. *In* D. W. Fawcett and Raviola (ed.), *A Textbook of Histology*. Chapman and Hall, One Penn Plaza Press, New York.
- Fidel, P. L. Jr., J. L. Cutright, L. Tait, and J. D. Sobel.** 1996. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J. Infect. Dis.* **173**:425-431.
- Flynn, R. J., R. C. Simkins, P. C. Brennan, and T. E. Fritz.** 1968. Uterine infection in mice. *Z. Versuchstierk.* **10**:131-136.
- Foster, H. L., S. J. Foster, and E. S. Pfau.** 1963. The large scale production of caesarean-originated, barrier-sustained mice. *Lab. Anim. Care.* **13**:711-718.
- Fujisawa, T., Y. Benno, and T. Mitsuoka.** 1992. Effect of menstrual cycle and different age on vaginal microflora of healthy women. *Bifidobacteria. Microflora.* **11**:33-38.
- Goelz, M. F., J. E. Thigpen, J. Mahler, W. P. Rogers, J. Locklear, B. J. Weigler, and D. B. Forsythe.** 1996. Efficacy of various therapeutic regimens in eliminating *Pasteurella pneumotropica* from the mouse. *Lab. Anim. Sci.* **46**:280-285.
- Goodall, J.** 1983. Population dynamics during a 15 year period in one community of free-living chimpanzees in the Gombe national park, Tanzania. *Z. Tierpsychol.* **61**:1-60.
- Gould, K. G., and D. E. Martin.** 1981. The female ape genital tract and its secretions, p. 105-124. *In* C. E. Graham (ed.), *Reproductive biology of the great apes*. Academic Press, New York.
- Graham, C. E.** 1970. Reproductive physiology of the chimpanzee. p. 183-220. *In* S. Karger (ed.), *The chimpanzee: a series of volumes on the chimpanzee*. Karger, Basel.

- Graham, C. E.** 1976. The chimpanzee: A unique model for human reproduction, p. 29-38. *In* Th. Antikatzides, S. Erichsen and A. Spiegel (ed.), *The laboratory animal in the study of reproduction*. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Graham, C. E.** 1981. Menstrual cycle of the great apes, p. 1-43. *In* C. E. Graham (ed.), *Reproductive biology of the great apes: Comparative and biomedical perspectives*. Academic Press, New York.
- Graham, C. E., D. C. Collins, H. Robinson, and J. R. K. Preedy.** 1972. Urinary levels of estrogens and pregnanediol and plasma levels of progesterone during the menstrual cycle of the chimpanzee: Relationship to the sexual swelling. *Endocrinology*. **91**:13-24.
- Graham, C. E., M. Keeling, C. Chapman, L. B. Cummins, and J. Haynie.** 1973. Method of endoscopy in the chimpanzee: Relations of ovarian anatomy, endometrial histology and sexual swelling. *Am. J. Phys. Anthropol.* **38**:211-216.
- Hagen, C. A., A. M. Shefner, and R. Ehrlich.** 1965. Intestinal microflora of normal hamsters. *Lab. Anim. Care*. **15**:185-193.
- Hammann, R., A. Kronibus, N. Lang, and H. Werner.** 1987. Quantitative studies on the vaginal flora of asymptomatic women and patients with vaginitis and vaginosis. *Zbl. Bakt. Hyg. A* **265**:451-461.
- Hammill, H. A.** 1989. Normal vaginal flora in relation to vaginitis. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* **16**:329-336.
- Hanna, N. H., D. Taylor-robinson, M. Kalodiki-Karamanoli, J. R. W. Harris, and I. R. Mcfadyen.** 1985. The relation between vaginal pH and the microbiological status in vaginitis. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **92**:1267-1271.
- Hayashimoto, N., T. Aiba, K. Itoh, M. Kato, E. Kawamoto, S. Kiyokawa, Y. Morichika, T. Muraguchi, T. Narita, Y. Okajima, A. Takakura, and T. Itoh.** 2005. Identification procedure for *Pasteurella pneumotropica* in microbiologic monitoring of laboratory animals. *Exp. Anim.* **54**:123-129.
- Herthelius, M., S. L. Gorbach, R. Mollby, C. E. Nord, L. Pettersson, and J. Winberg.** 1989. Elimination of vaginal colonization with *Escherichia coli* by administration of indigenous flora. *Infect. Immun.* **57**:2447-2451.
- Herthelius-Elman, M., R. Mollby, C. E. Nord, and J. Winberg.** 1992. The effect of amoxycillin on vaginal colonization resistance and normal vaginal flora in monkeys. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**:329-340.

- Hinrichs, K., M. R. Cummings, P. L. Sertich, and R. M. Kenney. 1988. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **193**:72-75.
- Hoag, W. G., P. W. Wetmore, J. Rogers, and H. Meier. 1962. A study of latent *Pasteurella* infection in a mouse colony. *J. Infect. Dis.* **111**:135-140.
- Hobson, W., F. Coulston, C. Faiman, J. S. D. Winter, and F. Reyes. 1976. Reproductive endocrinology of female chimpanzees: A suitable model of humans. *J. Toxicol. Environ. Health.* **1**:657-668.
- Holderegger, C. 1980. Ultrastructural study of the mucification of the stratified epithelium of the mouse vagina. *Cell. Tiss. Res.* **213**:475-482.
- Horsfall, D. J., J. McA. Cooper, and D. Rowley. 1978. Changes in the immuneoglobulin levels of the mouse gut and serum during conventionalisation and following administration of *Salmonella typhimurium*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **56**:727-735.
- Hoshi, H., H. Aijima, K. Horie, H. Nagata, T. Kaneko, and T. Ikeda. 1992. Lymph follicles and germinal centers in popliteal lymph nodes and other lymphoid tissues of germ-free and conventional rats. *Tohoku. J. Exp. Med.* **166**:297-307.
- Howard, J., L. Munson, D. McAloose, M. Kriete, M. Bush, and D. E. Wild. 1993. Comparative evaluation of seminal, vaginal, and rectal bacterial flora in the cheetah and domestic cat. *Zoo. Biology.* **12**:81-96.
- Hoyme, U., A. Baumueller, and P. O. Madsen. 1978. Antibiotics excretion in canine vaginal and urethral secretions. *Invest. Urol.* **16**:35-38.
- Hurni, H. 1981. SPF-cat breeding. *Z. Versuchstierk.* **23**:102-121.
- Itoh, K., K. Maejima, K. Ueda, and K. Fujiwara. 1979. Differences in susceptibility of mice raised under barrier-sustained (SPF) or conventional conditions to infectious megaenteron. *Microbiol. Immunol.* **23**:909-913.
- Itoh, K., T. Mitsuoka, K. Maejima, C. Hiraga, and K. Nakano. 1984. Comparison of faecal flora of cats based on different housing conditions with special reference to *Bifidobacterium*. *Lab. Anim.* **18**:280-284.
- Itoh, K., T. Mitsuoka, K. Sudo, and K. Suzuki. 1983. Comparison of fecal flora of mice based upon different strains and different housing conditions. *Z. Versuchstierk.* **25**:135-146.

- Itoh, K., T. Mitsuoka, K. Sudo, and K. Suzuki.** 1983. Comparison of fecal lactobacilli in mice of different strains under different housing conditions. *Z. Versuchstierk.* **25**:193-200.
- Jacques, M., M. E. Olson, A. M. Crichlow, A. D. Osborne, and J. W. Costerton.** 1986. The normal microflora of the female rabbit's genital tract. *Can. J. Vet. Res.* **50**:272-274.
- Johnson, A. P., M. Tuffrey, and D. Taylor-Robinson.** 1989. Resistance of mice to genital infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Med. Microbiol.* **30**:33-36.
- Johnson, S. R., C. R. Petzold, and R. P. Galask.** 1985. Qualitative and quantitative changes of the vaginal microbial flora during the menstrual cycle. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* **9**:1-5.
- Kappel, H. K., J. P. Kappel, S. H. Weisbroth, and C. K. Kozma.** 1969. Establishment of a hysterectomy-derived pathogen-free breeding nucleus of BLU: (LE) rats. *Lab. Anim. Care.* **19**:738-741.
- Keeling, M. E., and J. R. Roberts.** 1972. Breeding and reproduction of chimpanzees, p. 127-152. In G. H. Bourne and S. Karger (ed.), *Histology, reproduction and restraint*. Karger, Basel and University Park Press, Baltimore.
- Kennedy, R. C., M. H. Shearer, and W. Hildebrand.** 1997. Nonhuman primate models to evaluate vaccine safety and immunogenicity. *Vaccine.* **15**:903-908.
- King, B. F.** 1983. Ultrastructure of the nonhuman primate vaginal mucosa: epithelial changes during the menstrual cycle and pregnancy. *J. Ultrastr. Res.* **82**:1-18.
- Kita, M., H. Kobayashi, T. Ino, and K. Nakata.** 1979. Vaginal smear cycle in 4-day chinese hamsters, *Cricetulus griseus*. *Exp. Anim.* **28**:11-16.
- Koiter, T. R., M. P. Hazenberg, and P. V. D. Schoot.** 1977. Regulation of the bacterial microflora of the vagina in cyclic female rats. *J. Exp. Zool.* **202**:121-1288.
- Koshimizu, K., T. Magaribuchi, M. Ito, K. Uchizono, and T. Shikata.** 1977. Rearing and management of chimpanzees for experimental infection with Hepatitis B virus. *Exp. Anim.* **26**:51-64 (in Japanese with English summary).
- Lang, C. M.** 1967. The estrous cycle of nonhuman primates: A review of the literature. *Lab. Anim. Care.* **17**:172-179.
- Larsen, B. and R. P. Galask.** 1980. Vaginal microbial flora: practical and theoretic relevance. *Obstet. Gynecol.* **55**:100s-113s.

- Larsen, B., A. J. Markovetz, and R. P. Galask.** 1976. Quantitative alterations in the genital microflora of female rats in relation to the estrous cycle. *J. Infect. Dis.* **134**:486-489.
- Larsen, B., A. J. Markovetz, and R. P. Galask.** 1976. The bacterial flora of the female rat genital tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **151**:571-574.
- Larsen, B., A. J. Markovetz, and R. P. Galask.** 1977. Relationship of vaginal cytology to alteration of the vaginal microflora of rats during the estrous cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:556-562.
- Larsson, P.G. and J. J. Platz-Christensen.** 1990. The vaginal pH and leucocyte/epithelial cell ratio vary during normal menstrual cycles. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **38**:39-41.
- Levison, M. E., I. Trestman, R. Quach, C. Sladowski, and C. N. Floro.** 1979. Quantitative bacteriology of the vaginal flora in vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **133**:139-144.
- Levison, M. E., L. C. Corman, E. R. Carrington, and D. Kaye.** 1977. Quantitative microflora of the vagina. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **127**:80-85.
- Linder, J. G. E. M., F. H. F. Plantema, and J. A. A. Hoogkamp-Korstanje.** 1978. Quantitative studies of the vaginal flora of healthy women and of obstetric and gynaecological patients. *J. Med. Microbiol.* **11**:233-241.
- Lindsey, J. R., G. A. Boorman, M. J. Collins, C. K. Hsu, G. L. Van Hoosier, and J. E. Wagner.** 1991. *Pasteurella pneumotropica*, p. 187-190. In National Research Council (ed.), Infectious diseases of mice and rats, National Academy press, Washington, D. C.
- Mackowiak, P. A.** 1982. The normal microbial flora. *N. Engl. J. Med.* **307**:83-93.
- Manning, P. J., D. DeLong, R. Gunther, and D. Swanson.** 1991. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of chronic subclinical *Pasteurella pneumotropica* infection in mice. *Lab. Anim. Sci.* **41**:162-165.
- Mardh, P. A., E. Holst, and B. R. Moller.** 1984. The grivet monkey as a model for study of vaginitis. Challenge with anaerobic curved rods and *Gardnerella vaginalis*. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* **86**:201-205.
- Marshall, M. M., J. G. Songer, C. J. Chilelli, and J. C. deVos.** 1983. Isolations of aerobic bacteria from wild desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni* and *O. c. mexicana*) in Arizona. *J. Wildl. Dis.* **19**:98-100.
- Masfari, A. N., B. I. Duerden, and G. R. Kinghorn.** 1986. Quantitative studies of vaginal bacteria. *Genitourin. Med.* **62**:256-263.

- McArthur, J. W., J. Ovadia, O. W. Smith, and J. Bashir-Farahmand.** 1972. The menstrual cycle of the bonnet monkey (*Macaca radiata*): Changes in cervical mucus secretion, vaginal cytology, sex skin and urinary estrogen excretion. *Folia. primat.* **17**:107-121.
- McGroarty, J. A.** 1993. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* **6**:251-264.
- Meysick, K. C., and G. E. Garber.** 1992. Interactions between *Trichomonas vaginalis* and vaginal flora in a mouse model. *J. Parasitol.* **78**:157-160.
- Mitsuoka, T. and C. Kaneuchi.** 1977. Ecology of the bifidobacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **30**:1799-1810.
- Mitsuoka, T., K. Ohno, Y. Benno, K. Suzuki, and K. Namba.** 1976. The fecal flora of man IV. Communication: comparison of the newly developed method with the old conventional method for the analysis of intestinal flora. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **234**:219-233.
- Mitsuoka, T., T. Segal, and S. Yamamoto.** 1965. Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **195**:455-469.
- Moore, T. D., A. M. Allen, and J. R. Ganaway.** 1973. Latent *Pasteurella pneumotropica* infection of the gnotobiotic and barrier-held rats. *Lab. Anim. Sci.* **23**:657-661.
- Moorthy, A. R. S., and S. P. Singh.** 1982. Studies on the bacterial flora of the female genital tract of sheep. *Bull. Anim. Health. Prod. Afr.* **30**:15-18.
- Morishita, Y. and K. Miyaki.** 1979. Effects of age and starvation on the gastrointestinal microflora and the heat resistance of fecal bacteria in rats. *Microbiol. Immunol.* **23**:455-470.
- Morris, C. A. and D. F. Morris.** 1967. Normal vaginal microbiology of women of childbearing age in relation to the use of oral contraceptives and vaginal tampons. *J. Clin. Pathol.* **20**:636-640.
- Narushima, S., K. Itoh, T. Sankai, M. Takasaka, I. Otani, and Y. Yoshikawa.** 1997. Changes in normal vaginal flora of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) during the menstrual cycle. *Exp. Anim.* **46**:47-52.
- Neary, M. P., J. Allen, O. A. Okubadejo, and D. J. Payne.** 1973. Preoperative vaginal bacteria and postoperative infections in gynaecological patients. *Lancet.* **8**:1291-1294.
- Needham, J. R. and J. E. Cooper.** 1975. An eye infection in laboratory mice associated with *Pasteurella pneumotropica*. *Lab. Anim.* **9**:197-200.

- Noguchi, K., K. Tsukumi, and T. Urano.** 2003. Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comp. Med.* **53**:404-412.
- Noguchi, K., K. Tsukumi, T. Udono, and T. Urano.** 2004. Normal vaginal flora in chimpanzees (*Pan troglodytes*): Qualitative and quantitative study. *Comp. Med.* **54**:705-712.
- Otero, C., L. Saavedra, C. Silva de Ruiz, O. Wilde, A. R. Holgado, and M. E. Nader-Macias.** 2000. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**:251-4.
- Parrott, R. F. and J. R. Eveleigh.** 1970. A method of planning hysterectomies and its use in establishing a specific pathogen free colony of inbred mice and rats. *J. Inst. Anim. Tech.* **21**:161-166.
- Patton, D. L., G. G. Kidder, Y. C. Sweeney, L. K. Rabe, A. M. Clark, and S. L. Hillier.** 1996. Effects of nonoxynol-9 on vaginal microflora and chlamydial infection in a monkey model. *Sex. Transm. Dis.* **23**:461-464.
- Patton, D. L., Y. C. Sweeney, L. Rabe, and S. L. Hillier.** 1996. The vaginal microflora of pig-tailed macaques and the effects of chlorhexidine and benzalkonium on this ecosystem. *Sex. Transm. Dis.* **23**:489-493.
- Pratt, N. C., U. W. Huck, and R. D. Lisk.** 1987. Offspring sex ratio in hamsters is correlated with vaginal pH at certain times of mating. *Behav. Neural. Biol.* **48**:310-316.
- Redondo-Lopez, V., R. L. Cook, and J. D. Sobel.** 1990. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* **12**:856-872.
- Reid, G., and J. Burton.** 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes. Infect.* **4**:319-324.
- Saito, M., K. Kohjima, J. Sano, K. Nakayama, and M. Nakagawa.** 1981. Carrier state of *Pasteurella pneumotropica* in mice and rats. *Exp. Anim.* **30**:313-316.
- Sautter, R. L., and W. J. Brown.** 1980. Sequential vaginal cultures from normal young women. *J. Clin. Microbiol.* **11**:479-484.
- Savage, D. C.** 1972. Associations and physiological interactions of indigenous microorganisms and gastrointestinal epithelia. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**:1372-1379.
- Skangalis, M., C. E. Swenson, C. J. Mahoney, and W. M. O'Leary.** 1979. The normal microflora of the baboon vagina. *J. Med. Primatol.* **8**:289-297.

Scott, P., P. Daley, G. G. Baird, S. Sturgess, and A. J. Frost. 1971. The aerobic bacterial flora of the reproductive tract of the mare. *Vet. Rec.* **88**:58-61.

Sparks, R. A., B. G. Purrier, P. J. Watt, and M. Elstein. 1977. The bacteriology of the cervix and uterus. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **84**:701-704.

Street, D. A., D. Taylor-Robinson, and C. M. Hetherington. 1983. Infection of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) with *Trichomonas vaginalis* as a model of trichomoniasis in women. *Br. J. Vener. Dis.* **59**:249-254.

Syukuda, Y. 1979. Rearing of germfree guinea pigs and establishment of an SPF guinea pig colony. *Exp. Anim.* **28**:49-56.

Ueno, Y., R. Shimizu, R. Nozu, S. Takahashi, M. Yamamoto, F. Sugiyama, A. Takakura, T. Itoh, and K. Yagami. 2002. Elimination of *Pasteurella pneumotropica* from a contaminated mouse colony by oral administration of enrofloxacin. *Exp. Anim.* **51**:401-405.

Van Duijkeren, E. 1992. Significance of the vaginal bacterial flora in the bitch: a review. *Vet. Rec.* **131**:367-369.

Walburg, H. E. Jr., E. I. Mynatt, G. E. Cosgrove, R. L. Tyndall, and D. M. Robie. 1965. Microbiological evaluation of an isolation facility for the production of specific-pathogen-free mice. *Lab. Anim. Care.* **15**:208-216.

Wang, R. F., W. Campbell, W. W. Cao, C. Summage, R. S. Steele, and C. E. Cerniglia. 1996. Detection of *Pasteurella pneumotropica* in laboratory mice and rats by polymerase chain reaction. *Lab. Anim. Sci.* **46**:81-85.

Ward, G. E., R. Moffatt, and E. Olfert. 1978. Abortion in mice associated with *Pasteurella pneumotropica*. *J. Clin. Microbiol.* **8**:177-180.

Watts, J. R., P. J. Wright, and K. C. Whithear. 1996. Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *J. Small. Anim. Pract.* **37**:54-60.

Weber, A., M. Christ-Victor, and T. Schliesser. 1974. Studies on bacterial intestinal flora of young rabbits in relation to diet and age. *Zentralbl Bakteriol.* **229**:109-116.

Weigler, B. J., J. E. Thigpen, M. F. Goetz, C. A. Babineau, and D. B. Forsythe. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction assay for molecular epidemiologic investigation of *Pasteurella pneumotropica* in laboratory rodent colonies. *Lab. Anim. Sci.* **46**:386-392.

Wilks, M. and S. Tabaqchali. 1987. Quantitative bacteriology of the vaginal flora during the menstrual cycle. *J. Med. Microbiol.* **24**:241-245.

- Wilks, M., R. N. Thin, and S. Tabaqchali. 1984. Quantitative bacteriology of the vaginal flora in genital disease. *J. Med. Microbiol.* **18**:217-231.
- Winter, J. S. D., C. Faiman, W. C. Hobson, and F. I. Reyes. 1980. The endocrine basis of sexual development in the chimpanzee. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **28**:131-138.
- Wislock, G. B. 1932. On the reproductive tract of the gorilla, with a comparison of that of other primates. *Contr. Embryol. Instn.* **23**:163-204.
- Yamada, S., E. Baba, and A. Arakawa. 1983. Proliferation of *Pasteurella pneumotropica* at oestrus in the vagina of rats. *Lab. Anim.* **17**:261-266.
- Yamada, S., J. Mizoguchi, and T. Ohtaki. 1986. Effect of oestrogen on *Pasteurella pneumotropica* in rat vagina. *Lab. Anim.* **20**:185-188.
- Yanabe, M., M. Shibuya, T. Gonda, H. Asai, T. Tanaka, K. Sudou, T. Narita, and K. Itoh. 2001. Establishment of specific pathogen-free (SPF) rat colonies using gnotobiotic techniques. *Exp. Anim.* **50**:293-298.
- Yoshimura, T., and H. Okamura. 2001. Short term oral estriol treatment restores normal premenopausal vaginal flora to elderly women. *Maturitas.* **39**:253-257.
- Young, W. C., and R. M. Yerkes. 1943. Factors influencing the reproductive cycle in the chimpanzee; the period of adolescent sterility and related problems. *Endocrinology.* **33**:121-154.
- 加藤延夫. 1996. 人体常在細菌叢., p. 260-266. *In* 吉村文信 (ed.), 医系微生物学 (第2版). 朝倉書店, 東京.
- 東 国伸, 小熊恵二. 1998. 細菌の増殖., p. 18-29. *In* 中村信一 (ed.), シンプル微生物学 (改訂第2版). 南江堂, 東京.
- 光岡知足. 1980. 腸内菌の生態., p. 13-39. *In* 光岡知足 (ed.), 腸内菌の世界—嫌気性菌の分離と同定—. 叢文社, 東京.
- 光岡知足. 1986. 腸内菌叢の構成と形成., p. 51-149. *In* 光岡知足 (ed.), 腸内菌叢の分類と生態. 食生活研究会, 東京.
- 光岡知足. 1997. 環境と腸内菌叢., p. 132-136. *In* 伊藤喜久治 (ed.), 腸内細菌学. 朝倉書店, 東京.
- 光岡知足. 1997. 腸内菌叢の変動を起こす要因., p. 107-125. *In* 早川邦彦 (ed.), 腸内細菌学. 朝倉書店, 東京.

光岡知足. 1997. 動物の腸内菌叢., p. 136-145. *In* 伊藤喜久治 (ed.), 腸内細菌学. 朝倉書店, 東京.

光岡知足. 2002. 腸内細菌を培養する., p. 19-37. *In* 光岡知足 (ed.), 腸内細菌の話. 岩波書店, 東京.

光岡知足. 2002. 腸内細菌を分類する., p. 39-58. *In* 光岡知足 (ed.), 腸内細菌の話. 岩波書店, 東京.

光岡知足. 2002. 腸内細菌と栄養., p. 118-134. *In* 光岡知足 (ed.), 腸内細菌の話. 岩波書店, 東京.

光岡知足. 2002. 腸内細菌と免疫., p. 135-145. *In* 光岡知足 (ed.), 腸内細菌の話. 岩波書店, 東京.

ルネ・デュボス (木原弘二訳). 2000. 第V章 体内細菌., p. 87-117. *In* ルネ・デュボス (ed.), 人間と適応 —生物学と医療— (第2版). みすず書房, 東京.

吉川昌之介, 笹川千尋. 2001. 細菌のエコロジー., p. 247-258. *In* 辨野義己 (ed.), 医科細菌学 (改訂第3版). 南江堂, 東京.