

論文の内容の要旨

論文題目 ノトバイオート技術を用いた動物種固有な腸内菌叢を保有する
SPF ウサギ、モルモットおよびラットコロニーの設立

氏名 矢鍋 誠

実験動物の SPF 化が進みその使用が一般的になるにつれ、生産者側では *Pseudomonas aeruginosa* の易定着性や動物の輸送時にみられる下痢症および死亡が、研究の場では、日和見感染症や実験成績への影響が大きな問題として生じてきた。これらの問題は、SPF 動物の保有する腸内菌叢が単純で動物種固有なものではないことを示唆する報告が多くあり、SPF 動物の腸内菌叢の標準化が強く望まれるようになった。この問題を解決する方法として、生理的に正常で日和見感染を起こす菌に対して拮抗作用をもつノトバイオートを作成し、それを種親として SPF 動物を作成することが考えられた。

ノトバイオート技術を用いることにより、必要最小限の菌種を定着させたノトバイオート動物を作成することが可能となり、これを種親としてふつう動物と類似の腸内菌叢を保有する生理的正常な SPF 実験動物を作成することが可能となった。この技術の研究は、マウスに始まりラット、モルモットおよびウサギについて検討され始められた段階である。この中で、伊藤らによって無菌マウスの *normalization* に最低限

必要な構成菌種が明らかにされ、SPF マウスの腸内菌叢の標準化の方法が確立した。本研究ではこれまでに構築されたノトバイオート技術を用い、第 1, 2, 3 章において腸内菌叢構成菌種、およびその役割が明確にされておらず、早急な検討が必要な SPF ウサギおよびモルモットの *normalization* について検討した。さらに、第 4 章で今までに報告のないラットの *normalization* について検討した。

第 1 章では、SPF ウサギ繁殖コロニーのための種親を作出する目的で子宮切断術で得た無菌ウサギにふつうウサギの盲腸より分離した腸内菌を投与して、9 群の *limited-flora* (LF) ウサギを作出した。2 ~ 3 週齢のふつうウサギより分離した 6 株の *Bacteroides* と 2 株の *Streptococcus* を前投与菌として用いた。LF ウサギの死亡率は前投与がない場合、無菌マウスの盲腸内容物の 10^{-5} 希釈したものを EG ならびに SM10 寒天培地に接種し嫌氣的に培養したコロニーを投与されたもので (CF) 71.4% ~ 94.4% であった。*Bacteroides* を前投与した群は CF 投与後も全て生残したが、*Bacteroides* と *Streptococcus* を前投与した群では 20.0% と 45.5% であった。また、*Bacteroides* だけを投与されたものでは 43% の死亡率であった。*Bacteroides* と CF, ふつうウサギの盲腸内容物を投与された元無菌マウスの盲腸内容物 (MF), ふつうウサギの盲腸内容物のクロロホルム処理液 (CHF) の組み合わせは全て生残したが、*Bacteroides*+CHF 群では健康状態は良好とは言えず、わずかに下痢ぎみであった。以上の結果から無菌ウサギの正常化には *Bacteroides* と CF または MF の組み合わせ投与が有効であった。ウサギにおいて前投与菌として *Bacteroides* が必須の要因であり、しかも *Bacteroides* は生後すぐに定着し成熟後も常に最優性菌として腸内に定着していることからウサギの腸内菌叢における Key となる菌種と考えられる。これは今まで知られているヒト、イヌ、ブタ、ニワトリ、マウスなど多くの哺乳動物にみられる乳酸産生菌を Key とする腸内菌叢とは大きく異なるものであった。

第 2 章では、2 種類の LF ウサギ (*Bacteroides*+CF または MF) を用いて SPF ウサギ繁殖コロニーを作出した。ふつうウサギ由来盲腸内菌叢を投与された 2 つの LF ウサギはそれぞれ別のバリア室に搬入され、一部の LF ウサギは腸内菌叢保存のためアイソレータ内で維持された。LF ウサギの盲腸内菌叢構成は長期間安定しており、*bacteroidaceae* が最優性で *clostridia* が優性菌であった。SPF ウサギからは *enterobacteriaceae* や *streptococci* などの LF ウサギにない菌群も低い菌数で検出された

が、LF ウサギの盲腸内菌叢の基本的構成は長期間変化しなかった。SPF ウサギの菌叢構成は徐々にふつうウサギの菌叢構成に類似したものとなった。繁殖率や離乳率は SPF ウサギとして満足できるものであった。また、作出した SPF コロニーは作出後 1 年以上にわたりウサギ固有の病原体は全てフリーであった。これらの結果から第 1 章で作出した LF ウサギは SPF コロニー作出のための種親として、きわめて有効であることが立証された。

第 3 章では、SPF モルモット生産コロニーを設立する目的で、ふつうモルモットの盲腸内に生息する腸内菌を子宮切断術由来の無菌モルモットに投与して、腸内菌叢構成が異なる 6 グループの LF モルモットを作出した。ふつうモルモット腸内から分離した *Bifidobacterium magnum* (Bif) を前処置菌として使用した。Bif のみを投与した LF モルモットの死亡率は 75% であった。Bif とクロロホルム処理した盲腸内容物 (CHF) あるいは Bif と CHF さらにふつうモルモットの盲腸内容物より分離した 32 菌株を投与したグループでは 40 から 66.7% の死亡率であった。これらのグループは、健康状態不良で粘液性の腸炎様下痢症状を伴っていた。しかし、 10^{-5} 希釈の盲腸内容物を EG 培地で嫌気培養された投与物 (CF)、あるいはそれに Bif を加えたものを投与したグループでは 6.3 と 15% の死亡率であった。これらのグループは健康状態良好であったため各々のバリア施設に搬入した。一部は、SPF モルモット作出のための種ストックとしてアイソレータで維持した。これらのグループの盲腸内菌叢構成は、bacteroidaceae と peptococcaceae が最優勢菌として、clostridia, fusiform-shaped bacteria そして bifidobacteria が優性菌として長期間安定していた。SPF モルモットからは環境由来菌と考えられる菌種も検出された。しかし、嫌気性菌を主体とする盲腸菌叢の基本構成は長期間変化せず、この菌叢構成は、ふつうモルモットのものに類似のものであった。モルモットはウサギと異なり前投与菌は必ずしも不可欠な処置ではなかった。

第 4 章においては、ラット SPF コロニーを設立するための種動物としてノトバイオート Wistar ラットを、マウスで確立されているノトバイオート技術を用いて作出した。腸内菌叢供給源としてふつうラットから *Escherichia coli* 1 株、bacteroidaceae 28 株 (B-strains), *Lactobacillus* 3 株 (L-strains), そしてクロロホルム処理したふつうラットの糞便 (CHF, clostridia) を得た。最初に、*E.coli* と B-strains そして *E.coli* と CHF を子

宮切断術由来の無菌ラットに投与し 2 グループの LF ラットを作出した。L-strains は - 80 °C で保存した。CHF グループに *C.difficile* が検出されないことを確認後、ノトバイオラットを作出した。菌叢の合成は B-strains グループが飼育されているアイソレータの中に CHF グループの 2 匹を搬入、保存しておいた L-strains を経口投与することで行った。ノトバイオラットは、緑膿菌排除能力を獲得し、糞便内大腸菌数は $10^5 - 10^6$ /g であった。バリア施設に搬入したノトバイオラットの盲腸菌叢の基本構成は、長期間 bacteroidaceae, clostridia, fusiform-shaped bacteria, lactobacilli で構成された。また、36 ヶ月の試験期間中 *P.aeruginosa* の汚染はみられなかった。そして最終的にふつうラットの腸内菌叢構成と類似したものとなった。ラットではマウスで用いられたノトバイオ技術をそのまま利用することで SPF ラットコロニーの種親としてのノトバイオを作出することができた。

今回の研究でウサギ、モルモット、ラットの SPF コロニーの種親を嫌気性を中心とした LF 動物、ノトバイオ動物として作出し、それを用いて作出された SPF コロニーの腸内菌叢のモニタリング、病原微生物のモニタリングにより種親動物の腸内菌叢の有効性を確認できたものとする。つまり種親の腸内菌叢は生理的に正常な状態を維持し、外来病原菌の排除能を有する必要最小限の菌種構成だが、SPF コロニーでは最終的にふつう動物の腸内菌叢と類似のものとなった。さらに動物の移動や飼育環境の変化にともなう下痢などの異常や *P.aeruginosa* や *Staphylococcus aureus* の定着といった問題も起こっていない。

SPF 動物の腸内菌叢の標準化の研究を進めるなかで、どのような菌種が腸内菌叢全体のバランスを整え、各動物種特有の菌叢を構成するか、また外来菌がどのようにして腸内に定着するか、もしくは排除されるかを研究するための手段としてノトバイオ技術は重要な役割を担っており、ノトバイオ動物は腸内菌叢の標準化に必要な不可欠なものである。今回行ったウサギとモルモットではマウス、ラットで行われたようなノトバイオ動物のレベルまでは検討できなかったが、今後さらに菌種レベルでの組み合わせまで明らかにすることで菌株としての保存、つまり腸内菌叢の Bacterial Cocktail の作出も可能になるものとする。ノトバイオ技術を用い、この研究で得られた知見が今後の腸内菌叢の標準化に寄与するものとする。