

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 14 年度博士課程 進学

氏名 百瀬 愛佳

指導教官 伊藤 喜久治

論文題目: 乳児腸内フローラの *Escherichia coli* O157:H7 排除機構に関する研究

腸管感染症の起因菌としては多くの病原菌が知られているが、志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin producing *Escherichia coli*: STEC) は、下痢症や出血性大腸炎を引き起こす重要な食品媒介性の病原菌として知られており、特に血清型が O157:H7 のものは、ヒトで腸炎を引き起こす主要な原因の一つである。*E. coli* O157:H7 感染に対する治療では、主に抗菌性物質が使用されており、早期の抗生物質治療は *E. coli* O157:H7 の排除と溶血性尿毒症症候群の予防に効果的であるが、症状が悪化した後の抗生物質の使用は、消化管内での志賀毒素の生成、遊離を助長し、症状の悪化や溶血性尿毒症症候群の危険性を高めると考えられている。そこで注目されているものの一つに、腸内フローラの生体防御因子としての腸管感染防御機能の利用がある。STEC 感染に対する感受性は成人では低く、乳幼児、子供、高齢者では高いが、その理由の一つとして、腸内フローラによる拮抗作用の欠如が考えられる。現在までに、腸内フローラが腸管感染症に対して拮抗的に働くことを示した論文は多く発表されているが、腸内フローラを構成するどの菌種、または菌種の組み合わせが腸管内で病原菌の定着、増殖を妨げているのかについては未だに明らかになっていない。

第一章では、*E. coli* O157:H7 の感染に感受性が高いヒト乳児の糞便懸濁液を無菌マウスに投与して baby-flora-associated (BFA) マウスを作出し、腸管からの *E. coli* O157:H7 排除能を比較した。また、異なる *E. coli* O157:H7 排除能を示した 2 群の BFA マウスの糞便より腸内菌を分離し、生物・生化学性状試験により菌種、生物型の同定を行って、それぞれの腸内フローラを構成する腸内菌の差異を比較した。さらに、その分離菌株を用いて様々なノト

バイオトマウスを作製し、*E. coli* O157:H7 排除に関わる菌群、菌種の解析を行った。

その結果、*E. coli* O157:H7 の排除能を示した BFA-3 マウスの腸内フローラは、健康な乳幼児で見られる腸内フローラ構成と類似しており、*E. coli* O157:H7 の排除能を示さずキャリアとなった BFA-4 マウスの腸内フローラはそれとは異なるものであった。また、BFA-3 マウスの腸内フローラを構成する菌群のうち、enterobacteriaceae が *E. coli* O157:H7 の腸管からの排除に不可欠であり、enterococci と bifidobacteria は enterobacteriaceae の役割を支持、補助する役割を担っていることが明らかとなった。Enterobacteriaceae や bifidobacteria の菌種または生物型の違い、及びその組み合わせにより *E. coli* O157:H7 の排除能に違いが見られることが示唆された。

第二章では、BFA-3 から分離した enterobacteriaceae、enterococci、bifidobacteria の 3 菌群投与により、*E. coli* O157:H7 排除能を持つノトバイオトマウス GB-3 を作製した。また、BFA-4 から分離した通性、偏性嫌気性菌群を投与して *E. coli* O157:H7 のキャリアとなるノトバイオトマウス GB-4 を作製した。GB-3 と GB-4 は、それぞれ BFA-3、BFA-4 と同等の *E. coli* O157:H7 排除能を示した。この 2 群のノトバイオトマウスに *E. coli* O157:H7 を経口投与して消化管各部位における *E. coli* O157:H7 の菌数を調べ、*E. coli* O157:H7 排除に関わる消化管の部位の特定を行った。また、GB-3 と GB-4 の盲腸内容物を採取して盲腸懸濁液を調整し、それぞれの盲腸懸濁液中での *E. coli* O157:H7 の発育速度を比較した。さらに、GB-3 と GB-4 の腸内環境の比較を行い、その差異が *E. coli* O157:H7 の動態に及ぼす影響についても解析を行った。

その結果、小腸における *E. coli* O157:H7 の菌数には GB-3 と GB-4 で有意差は認められなかったが、盲腸、大腸、糞便においては *E. coli* O157:H7 の菌数に投与後 1、7 日目で差が見られ、GB-3 で GB-4 と比較して有意に低い菌数が得られた。また、盲腸懸濁液中での *E. coli* O157:H7 の発育速度を比較したところ、GB-3 の盲腸懸濁液中で有意な初期の発育速度の低下が見られた。GB-3 と GB-4 の腸内環境を比較した結果、pH や胆汁酸組成、濃度に有意差は見られなかったものの、有機酸組成に明確な違いが認められ、GB-3 の下部消化管内容物からは酢酸と乳酸が、GB-4 からは酢酸とプロピオン酸が検出された。この有機酸組成の差異は、*in vitro* での *E. coli* O157:H7 の発育速度には影響を与えなかったが、酢酸と乳酸の組み合わせは、嫌気条件下において *E. coli* O157:H7 の運動性を低下させる作用があることが明らかとなった。

第三章では、GB-3 と GB-4 の盲腸懸濁液中での *E. coli* O157:H7 の発育速度の違いを決定する要因を検索した。GB-3 及び GB-4 の 2 群のノトバイオトマウスの盲腸内容物、及び BFA 分離菌株を用いて、拡散法と重層法により *E. coli* O157:H7 排除に関わる発育阻害物質の検索を行った。さらに GB-3 と GB-4 の盲腸内容物中のアミノ酸組成を比較し、その差異が *E. coli* O157:H7 の発育速度に及ぼす影響について検討した。また、enterobacteriaceae 分離株を用いて培養上清を調整し、その培養上清中での *E. coli* O157:H7 の発育を比較するとともに、enterobacteriaceae 分離株と *E. coli* O157:H7 の共培養を行って、栄養素の競合拮抗の検

討も行った。

その結果、GB-3、GB-4 どちらの盲腸内容物中にも *E. coli* O157:H7 の発育を阻害する物質の存在を確認することは出来なかった。GB-3、GB-4 の作製に使用した BFA 分離菌株の中にも、*E. coli* O157:H7 の発育を阻害する物質を産生すると思われる菌株は見つけれなかった。そこで、GB-3 と GB-4 の盲腸内容物中のアミノ酸含量、組成を比較したところ、プロリンの含量に最も大きな違いが見られ、GB-3 の盲腸懸濁液に GB-4 と同濃度になるようプロリンを添加すると、*E. coli* O157:H7 の GB-3 盲腸懸濁液中での発育速度は GB-4 と有意差がなくなった。また、enterobacteriaceae 分離株の培養上清中で *E. coli* O157:H7 を培養したところ、BFA-3 分離株の中でも特に *E. coli* 1 の上清中で *E. coli* O157:H7 の発育速度の低下が認められ、*E. coli* O157:H7 との共培養においても、*E. coli* 1 は *E. coli* O157:H7 の増殖を抑制した。また、*E. coli* 1 との共培養による *E. coli* O157:H7 の増殖抑制は、プロリン添加によって抑制の減弱が認められた。

以上より、GB-3 において enterobacteriaceae (特に *E. coli*) が *E. coli* O157:H7 と栄養素を競合して *E. coli* O157:H7 の初期発育速度を低下させ、さらに enterococci や bifidobacteria が作る腸内環境によって *E. coli* O157:H7 の運動性を低下させていることが、結果として腸管からの *E. coli* O157:H7 の排除につながっていると考えられた。*E. coli* O157:H7 と競合する栄養素として、特にプロリンを競合している可能性が示唆され、また運動性を低下させる腸内環境としては、嫌気条件下での酢酸と乳酸の組み合わせが重要であると考えられた。BFA-3 においても、GB-3 と同様のメカニズムによって *E. coli* O157:H7 が排除されているものと考えられる。

これらの結果は、臨床面において腸管系病原菌による感染を防ぐ予防手段を模索する上で、Probiotics や Synbiotics として用いる候補株の選択や、Prebiotics や Synbiotics として使用する成分の選択に大きく寄与するものとする。