

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 百瀬 愛佳

志賀毒素産生性大腸菌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であり、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菌の一つである。乳幼児や子供は本菌感染に対する感受性が高いが、腸内フローラによる拮抗作用の欠如がその理由の一つと考えられる。腸内フローラが腸管感染症に対して拮抗的に働くことはよく知られているが、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病原菌の腸管内定着、増殖を妨げているのかについては明らかになっていない。

本論文では、乳児の腸内菌構成要因のうち *Escherichia coli* O157:H7 の腸管からの排除に関わる菌種・菌群を特定し、その排除機構を明らかにすることを目的にしている。本論文は三つの章で構成されている。

第一章では、複数の乳児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 マウスの糞便より菌を分離同定し、ノトバイオームマウスを作製して *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 では enterobacteriaceae が *E. coli* O157:H7 の腸管からの排除に不可欠であり、enterococci と bifidobacteria は補助的な役割を担っていることが明らかとなった。Enterobacteriaceae や bifidobacteria の菌種の違い、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 と BFA-4 の分離株それぞれを用いて、BFA と同等の *E. coli* O157:H7 排除能を示すノトバイオームマウス GB-3 と GB-4 を作製した。GB-3 と GB-4 の比較により *E. coli* O157:H7 排除に関わる消化管部位の特定を行い、また、GB-3 と GB-4 の腸内環境の差が *E. coli* O157:H7 に及ぼす影響についても解析を行った。その結果、投与 *E. coli* O157:H7 の菌数は GB-3 の盲腸以降の部位において有意に低く、また、GB-3 の盲腸懸濁液中で *E. coli* O157:H7 の初期の発育速度の有意な低下が見られた。GB-3 の盲腸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、この有機酸組成の差は *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た。

第三章では、GB-3 と GB-4 の盲腸内容物及び BFA 分離株を用いて *E. coli* O157:H7 に対する発育阻害物質の検索を行った。さらに enterobacteriaceae 分離株と *E. coli* O157:H7 との栄養素の競合拮抗の検討も行った。その結果、*E. coli* O157:H7 の発育を阻害する物質、または

菌株の存在は確認出来なかった。GB-3 と GB-4 の盲腸内容物中のアミノ酸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 の盲腸懸濁液にプロリンを添加すると、*E. coli* O157:H7 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の *E. coli* O157:H7 発育速度の解析、及び enterobacteriaceae 分離株と *E. coli* O157:H7 との共培養試験において、BFA-3 分離株の中でも特に *E. coli* 1 が *E. coli* O157:H7 の増殖を抑制した。*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減弱が認められた。

以上より、enterobacteriaceae (特に *E. coli*) がプロリンを始めとする栄養素を競合して *E. coli* O157:H7 の初期発育速度を低下させ、さらに嫌気条件下での酢酸と乳酸の存在が *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。

以上、本論文は、腸管系病原菌感染に対する予防手段を検討する上で重要な知見を与え、Probiotics、Prebiotics や Synbiotics として用いる菌株や成分の選択にも大きく寄与するものと考えられる。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。