

論文の内容の要旨

論文題目 哺乳期ラットの腸内菌叢とバクテリアルトランスロケーション
に関する研究

氏名 矢島昌子

バクテリアルトランスロケーション (BT) は、腸管内腔から腸内細菌が生きのまま腸管粘膜を通過し、生体内に侵入することと定義されている。BT は敗血症の起因であり、免疫疾患や手術、熱傷、交通事故などで予後感染をおこす。新生児期の BT は、無菌であった胎児が出生後に腸内細菌叢を形成し始めるという点で、既に成立した菌叢を持つ成人に起こる BT とは、異なった発生要因を持つ。新生児の鼻腔や口腔、腸等の粘膜上皮に到達し定着を始める細菌は、自然免疫系を介して乳仔の獲得免疫の発達や、神経の発達に大きく関わり、必ずしも病態を惹起しない。一方で新生児の腸内に最優勢に検出される大腸菌群などの好気性細菌群は、新生児集中治療室における敗血症で高頻度に検出されるなど、腸内菌叢を構成する細菌群の種類や量は、BT の発生率に影響する可能性がある。

帝王切開出生児における腸内細菌定着プロセスは、自然分娩児とは明らかに異なっている。母乳で哺育された健常な自然分娩児の糞便中占有率は 99% が *Bifidobacterium* であるが、帝王切開出生児における *Bifidobacterium* の成立は母乳児に比べて遅い。近年、極小未熟児へ *Bifidobacterium* を投与することにより、壊死性腸炎の発症が軽減されたとの報告が相次いでいるなど、腸内細菌をコントロールして壊死性腸炎を発症予防できる可能性がある。

無菌動物を用いた研究から、定着させる菌が異なるとそれらに応答した T リンパ球の分化が異なることや、オーラルトレランスの誘導に乳児期の腸リンパ組織の発達が必要

であるなど、哺乳期の菌叢は離乳後の免疫応答に関与すると報告されている。これらの知見は、哺乳期における免疫系の発達に腸内細菌が重要な役割を担うことを示唆している。即ち、腸内菌叢は外的環境であり、菌叢を構成する個々の細菌群を、宿主に大きく影響を与える環境因子として捉えることができる。

新生児期は消化管の構造や機能が未発達である。ウサギでは新生仔期に自然発生的な BT が起こることが知られている。哺乳動物の腸内菌叢を構成する細菌群の中で、BT を起こし易い菌群や、それらが宿主に及ぼす影響に関しては、これまで詳細な検討はなされていなかった。

そこで、本論文では、哺乳期ラットに関して、自然発生的な BT を起こす細菌群を検出し、BT を起こしやすい背景、BT を起こした細菌群を排除する能力、および乳仔の栄養環境による違いの有無、即ち、母乳哺育仔と 母乳中の免疫関連因子をほとんど含まない人工乳哺育仔における BT の違い、等を、モデル動物を構築して検討した。これらの成果は乳児における免疫系の発達や応答を理解する一助になると考える。

本論文は、三つの章で構成されている。第一章では、哺乳期のラットにおいて、腸間膜リンパ節への BT が自然発生的に起こることを明らかにした。これらの結果は BT を起こした腸内細菌由来の LPS やペプチドグリカン、DNA などの菌体成分が粘膜上皮や M 細胞、樹状細胞、B 細胞に接着し取り込まれるなど Toll Like Receptor (TLR) のリガンドとして作用し、新生乳仔の免疫系の成熟に重要な情報源となる可能性を示唆している。一方、健常な母乳仔において、BT を起こし腸間膜リンパ節へ移行した菌群は、糞便や盲腸内容物中の菌叢を構成する菌群構成をそのまま反映していないことを明らかにした。BT を起こしやすい菌群として、大腸菌群や腸球菌、乳酸桿菌が多く検出された。また、staphylococci は BT 菌として高頻度に検出されたが、糞便中では 0.1 % 以下の占有率であった。staphylococci は新生児医療現場では最も検出頻度の高い病原菌である。ヒトでは、2 歳くらいまでは staphylococci に対する十分な抗体生成が起こらないとする報告がある。宿主の細胞性免疫機能による貪食殺菌の受け易さを左右する細菌側の要因として、capsule 多糖が知られている。例えば、*Staphylococcus aureus* の capsule 多糖陽性株は陰性株に比べて宿主による殺菌を受け難いことが報告されている。BT を起こしても貪食処理され難いことが、抗原応答の遅れを生じさせる可能性があると考えられる。これらのことは、新生仔期に形成される腸内細菌叢の構成細菌の種類や量の違いが BT の起こり易さに影響を与えるばかりでなく、生体側の抗原認識と貪食能の違いによっても、BT が異なることを示唆している。

さらに、胃内へカニューレを装着し人工乳哺育を行ったラット乳仔 (AR 仔) ならびに胃カニューレ装着の手術後、カニューレを抜去して母乳で哺育した乳仔 (Sham 仔) の糞便菌叢と BT を、無処置の母乳哺育仔 (MR 仔) と比較した。胃カニューレ装着術により、健常な MR 仔では検出されない肝臓への BT が Sham 仔と AR 仔で検出された。AR 仔では、糞

便中の enterobacteriaceae 菌数が MR 仔に比べて多く、Sham 仔に比べて肝臓への BT が長期に持続した。AR 仔では、MR 仔に比べて、腸粘膜へ付着する菌数が有意に多く Sham 仔は両者の中間的な菌数であったこと、AR 仔の糞便中の enterobacteriaceae 菌数は、哺乳期間ばかりでなく離乳後も多いままであったのに比べて、MR 仔と Sham 仔では離乳期を境に成獣レベルに低下したことが報告されている。このことは、AR 仔では Sham 仔に比べて BT が長期に持続したことと矛盾しない。即ち、腸粘膜への付着菌数が多いことは、腸内細菌が腸管上皮に接触する頻度を高め、BT の頻度を高めていると推察できる。AR 仔における腸粘膜付着菌が多い理由に関しては説明されていないが、人工乳中には、母乳由来の IgA や TGF など乳中の生理活性物質が欠如していることや、常に高濃度の 大腸菌が接触していたことによる大腸菌トレランスの成立の可能性など考えられる。これらを説明するためには、更に多くの検討が必要である。

第二章では、AR 仔で Sham 仔に比べて BT が長期に持続したことの背景について検討した。生体内へバクテリアルトランスロケーションを起こした細菌を捕まえ、貪食殺菌する作用が、Sham 仔では MR 仔と同程度であったのに比べて、AR 仔では低下していることを明らかにした。

また、Sham 仔と AR 仔の肝臓に BT を起こした細菌群の中では、enterobacteriaceae が最優勢であったことから、MR 仔の腹腔内に *E. coli* 由来のリポ多糖 (LPS) を投与後、腹腔内へ誘導した多形核白血球 (PMNL) のラテックスビーズ貪食活性を測定し、PMNL の貪食活性は LPS の濃度依存的に低減されることを明らかにした。

第三章では、PMNL の貪食活性や LPS 炎症に及ぼす母乳中因子の影響に関し検討した。ラットの母乳中に 0.2 %含まれているラクトフェリン (LF) には、腫瘍壊死因子 (TNF) の産生を抑制するなど、抗炎症作用があることが報告されていることから、LF を添加した人工乳で哺育した乳仔における PMNL の貪食活性を、LF を添加しない人工乳で哺育した AR 仔、母乳で哺育した Sham 仔ならびに MR 仔の活性と比較し、LF を添加した人工乳で哺育した乳仔では、AR 仔に比べて PMNL の貪食活性が高いことを明らかにした。

さらに LPS を腹腔に投与することにより MR 仔に LPS 炎症を惹起させ、腹腔内への蛋白質貯留や血中の血小板数に及ぼす LF の影響を検討した。

ヒト型 LF (hLF) は、LPS 投与の 18 時間前に予防的に投与することにより、LPS 投与の直前 (15 分前) や 1 時間後に投与された場合に比べて、より強く LPS 炎症を抑制した。即ち hLF を予防的に投与することにより、TNF の産生が抑制され、PMNL の貪食活性の低下が回避されたばかりでなく、LPS によって誘発される腹腔への腹水やアルブミンの貯留が回避された。しかし、LPS による PMNL の貪食活性の低下と腹水の貯留は、ラットの TNF 抗体を LPS 投与の直前に投与しても抑制されなかった。このことから、hLF によるこれら炎症抑制作用は、LF の抗炎症作用としてこれまでに報告されている LPS 結合蛋白質と LF との直接的な分子間拮抗阻害作用とは異なった機作である可能性が示唆された。また、同様に検討したウシ型 LF には効果が認められなかった。両 LF ともラット

の異種蛋白質であることから、これらの違いを説明するためには、分子構造の違い等更なる検討が必要と思われる。

今回検討していないが、BTの消失がSham群でAR群に比べて促進されたことの要因の一つとして、母乳中の免疫関連因子が人工乳中に含まれないことの他に、母獣によるケアの影響を考えなければならない。ラットの母乳を無菌的にかつ十分量、凍結なしに準備することは実際的ではないため、今実験では母乳をカニユーレで人口哺乳する群を設けなかった。Barreauらは生後14日齢までに母子分離ストレスを与えると、与えない場合に比べて、生育後12週齢における炎症ストレス応答が異なっていたと報告しており、外傷ストレス以外にも、精神的なストレスを極力排除した哺育系で比較する必要があると考える。

以上、新生仔期の腸内細菌叢の形成過程とBTについて検討し、*enterobacteriaceae*などのグラム陰性細菌の占有率を低下させて、より良い腸内環境を形成することが、乳児期の感染を防ぎ、健康の維持に重要であることを示した。