

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻

平成 21 年度博士課程 入学

氏 名 吉村 和敏

指導教員名 山田 章雄

論文題目

Bifidobacterium によるマウスの腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染死抑制メカニズムの解明

腸管出血性大腸菌 (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 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腸管感染症原因菌である。EHEC には様々な血清型があることが知られているが、血清型が O157:H7 のものが、わが国において最も頻繁に分離されている。乳幼児や高齢者は *E. coli* O157:H7 に対する感受性が高く、腸炎だけではなく、溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic uremic syndrome: HUS) などの重篤な症状を起こしやすいことが知られており、EHEC の産生する志賀毒素 (Stx)、特に、Stx2 が HUS などの重篤な症状に深く関わっていることが知られている。腸管感染症の治療には、抗菌薬が使用されるが、抗菌薬の使用は、EHEC の Stx の産生を促進することから、新しい治療法や予防法が検討されている。EHEC 感染の予防に、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などの probiotics の効果が期待されており、様々な動物モデルを用いた研究がなされている。*Bifidobacterium* は乳幼児腸内細菌叢の最優勢細菌群であることから、特に、乳児の EHEC 感染予防に効果的であると考えられる。本研究では他の菌の影響を排除することができる無菌マウス (GF) を

用い *E. coli* O157:H7 感染防御能を有する *Bifidobacterium* を選抜し、感染防御の機構を明らかにすることを試みた。

第 1 章では、GF マウスに 6 菌種、9 菌株の *Bifidobacterium* を経口投与して作出したノトバイオート (GB) マウスに *E. coli* O157:H7 44^{Rf} (*E. coli* 44^{Rf}) を感染させ、*Bifidobacterium* の感染死抑制効果を比較する実験を実施し、*Bifidobacterium* の菌種や菌株の違いによって、*E. coli* 44^{Rf} に対するマウスの感染死抑制効果に違いがあることを示した。特に、同じ菌種・亜種であっても、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222^T (*B. infantis*^T) はマウスの *E. coli* 44^{Rf} 感染死抑制効果を持たない一方で、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F) は、*E. coli* 44^{Rf} のマウス腸内への定着を阻止できなかったものの、感染死を抑制する効果を持っていた。*B. infantis* 157F は、盲腸内での *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生を抑制するとともに、盲腸内腔から血中への Stx2 の移行を直接的に妨げることによって、ノトバイオートマウスの *E. coli* 44^{Rf} 感染死を抑制することができたと考えられた。

第 2 章では、*Bifidobacterium* が EHEC の定着を阻止しないにもかかわらずマウスの感染死を抑制するメカニズムを明らかにすることを目的とし、Stx2 の体内移行を *Bifidobacterium* が抑制するメカニズムおよびマウス盲腸内で *Bifidobacterium* が *E. coli* 44^{Rf} の Stx 産生を抑制するメカニズムを解明するために、以下の実験を行った。

B. infantis 157F による Stx2 の体内移行抑制が、マウス腸管における特定の遺伝子発現変化を反映している可能性を探るため、*B. infantis* 157F 定着マウスの盲腸および結腸組織に与える影響をトランスクリプトミクスやプロテオミクスの手法を用いて *B. infantis*^T と比較評価した。その結果、遺伝子発現レベルにおいて、*B. infantis* 157F を投与したマウスでは、*B. infantis*^T を投与したマウスと比較して、盲腸組織の *Coll16a1* の発現が有意に高くなっていたが、結腸では *Till3* を含む 18 遺伝子の発現が抑制されていた。*Coll16a1* の詳細な役割は現在のところ不明であるが、Stx2 の血中への移行阻止において重要な役割を果たしていると考えられた。一方、結腸における *Till3* の発現抑制はチューブリンのターンオーバーの抑制に

つながると推測された。また、タンパク質発現レベルでも、*B. infantis* 157F はアクチンやチューブリンなどのタンパク質発現に影響を与えており、それらのターンオーバーを抑制し、盲腸および結腸組織の細胞を安定化させることで、Stx2 の血中への移行を阻止していることが推察できた。

第3章では、マウス盲腸内における *B. infantis* 157F による *E. coli* 44^{Rf} の Stx 産生抑制メカニズムの解明を試みた。GF マウス盲腸内容物をエタノール沈殿法によって低分子分画と高分子分画に分画し、それぞれを培地に添加して *E. coli* 44^{Rf} の培養を行ったところ、高分子分画が *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生に重要であった。高分子分画には、多糖とタンパク質が含まれるが、*B. infantis* 157F 単独投与マウスと *B. infantis*^T 単独投与マウスの盲腸内容物中のタンパク質を 2 次元電気泳動法によって比較したところ、両者に差が見られなかったため、高分子分画に含まれる物質の中でも多糖が *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生に重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、GF マウス盲腸内容物中の多糖を、酸性多糖、アルカリ性多糖、不溶性多糖に分画し、各分画に対する *Bifidobacterium* および *E. coli* 44^{Rf} の分解性状を調べた。*E. coli* 44^{Rf} は全ての多糖分画を分解できたが、試験した全ての *Bifidobacterium* はアルカリ性多糖、不溶性多糖を分解できず、酸性多糖については、*E. coli* 44^{Rf} 感染死抑制効果を持つ *B. infantis* 157F と *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 だけが分解できた。さらに、GF マウス盲腸内多糖のうち、アルカリ性多糖、不溶性多糖の量は一定のまま、酸性多糖の量だけを減らし、*E. coli* 44^{Rf} を嫌氣的に培養した結果、*E. coli* 44^{Rf} の菌数に影響はなかった一方で酸性多糖量の減少と Stx2 濃度の減少には相関が見られた。また、*B. infantis*^T と *B. infantis* 157F 単独投与マウスの盲腸内酸性多糖量を比較すると、後者のほうが有意に少なかった。したがって、*B. infantis* 157F はマウス盲腸内の酸性多糖を消費し、*E. coli* 44^{Rf} と競合することにより、*E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生を抑制していると考えられる。

以上の結果から、*Bifidobacterium* 菌株がマウスの *E. coli* 44^{Rf} 感染死を抑制するメカニズムの第一として、盲腸および結腸組織におけるアクチンあるいはチューブリンのターンオー

バーを抑制することで、腸管腔から体内への Stx2 移行を抑制すると考えられた。また、その機構については不明であるが、盲腸における *Coll6a1* の発現量の上昇も Stx2 移行阻害に何かの形で関与していることが考えられる。第2のメカニズムとしては、*Bifidobacterium* がマウス盲腸内の酸性多糖を競合することによって *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生を抑制することが挙げられる。本研究の結果は、*E. coli* O157:H7 感染予防に対する *Bifidobacterium* の有用性を示し、プロバイオティクスとして利用できる *Bifidobacterium* 菌株の選抜や新たな有用遺伝子の探索などにつながると考えられる。