

厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：動物由来細菌性腸管感染症の再興に向けた感染制御に関する研究

研究分担者 山田章雄 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授  
研究協力者 平山和宏 東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授  
吉村和敏 東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨：腸管出血性大腸菌 ( EHEC ) による腸炎の治療における抗菌薬投与は EHEC からの志賀毒素 ( Stx2 ) の産生を促進することから、勧められていない。われわれは乳児の糞便を無菌 ( GF ) マウスに経口投与して作出したノトバイオート ( GB ) マウスにおいて、EHEC 感染に抵抗性を示す GB マウスの存在を明らかにしてきた。本研究では GF マウスに EHEC 感染に対する抵抗性を付与できる機構の解析を試みた。その結果乳児の糞便に存在する *Bifidobacterium* の菌種や菌株の中に EHEC による感染死を抑制する効果を有するものがあることが明らかになった。特に同じ菌種・亜種であっても、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222T ( *B. infantis* T ) は抑制効果を持たないが、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 ( *B. infantis* 157F ) には抑制効果があることを明らかにした。

A. 研究目的：

腸管出血性大腸菌症は年間 3000 から 5000 人の患者ならびに数例の死亡が報告されており、動物由来感染症としては極めて重要な疾患である。通常細菌性腸炎の治療には抗菌薬投与が行われるが、抗菌薬投与は EHEC からの Stx2 産生を促し、溶血性尿毒症 ( HUS ) などの重篤な合併症につながる可能性があり、慎重な使用が求められている。われわれは乳児の糞便を無菌 ( GF ) マウスに経口投与して作出したノトバイオ

オート ( GB ) マウスにおいて、EHEC 感染に抵抗性を示す GB マウスの存在を明らかにしてきた。本研究では GF マウスに EHEC 感染に対する抵抗性を付与できる機構の解明を目的とする。

B. 研究方法：

1) 動物

当教室で繁殖維持している無菌 Balb/c マウスを 8~13 週齢で実験に供与した。

2) 菌株

以下の 6 菌種 9 菌株を使用した。 *B. adolescentis* JCM1275T (*B. adolescentis* T)、*B. bifidum* JCM1255T (*B. bifidum* T)、*B. bifidum* M、*B. breve* JCM1192T (*B. breve* T)、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222T (*B. infantis* T)、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F)、*B. longum* subsp. *longum* JCM1217T (*B. longum* T)、*B. longum* subsp. *longum* NCC2705 (*B. longum* NS)、*B. pseudocatenulatum* JCM1200T (*B. pseudocatenulatum* T)。 EHEC は *E. coli* O157:H7 strain 44<sup>Rf</sup> (Stx2) (*E. coli* 44<sup>Rf</sup>) を使用した。

3) *Bifidobacterium* の経口投与7日後に *E. coli* 44<sup>Rf</sup> を同様に経口投与した。 Stx2 は VTEC-RPLA キット (Denka、Japan) とノバパスベロ毒素 EIA キット (BIORAD、USA) を用いて測定した。

(倫理面からの配慮について)

マウスにおける全ての感染実験は東京大学農学生命科学研究科動物実験委員会による審査を経て承認されている。

C. 結果：

1. 上記 9 菌株を GF マウスに経口接種し作出した GB マウスに *E. coli* 44<sup>Rf</sup> を感染させた後のマウスの生残を図 1 に示す。図から明らかなように *B. infantis* 157F と *B. longum* NS を投与した GB マウスは *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 感染を耐過したが、*Bifidobacterium* 未投与対象群並びにこ

れら以外の 7 菌株の接種で作出した GB マウスはすべて *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 感染により死亡した。

2. これら GB マウス糞便中の *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 菌数を経日的に測定し比較したところ、GF マウスに予め *Bifidobacterium* を投与しても *E. coli* 44<sup>Rf</sup> の糞便中への排泄に差は認められず、腸管内への定着には影響がないと考えられた。
3. 表 1 に示すように *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 感染 6 日後における盲腸内容物中の Stx2 濃度は *B. infantis* 157F と *B. longum* NS 接種した GB マウスでは他の *Bifidobacterium* 投与群と比較して低いことが明らかになった。また、マウス血清中の Stx2 濃度を測定したところ、感染抵抗性を示した GB マウスでは血清中 Stx 濃度が優位に低いことが明らかになった。

D. 考察：

以上の成績は *B. longum* subsp. *longum/infantis* に属する特定の菌には、他の *Bifidobacterium* に比べて、*E. coli* O157:H7 感染に対する高い防御効果を示すものが存在することを示している。さらにその防御効果は *E. coli* O157:H7 の腸管粘膜への定着を阻害することによるものではなく、腸管内での Stx2 産生の抑制及びその体内への移行を阻害することによるものであることが示唆された。今後は防御効果の機構について詳細に解析したい。

E. 結論

*Bifidobacterium* 投与により作出した GB マウスを用いて、*Bifidobacterium* の *E. coli* O157:H7 感染に及ぼす影響を調べたところ特定の菌株には明らかな感染防御効果があることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

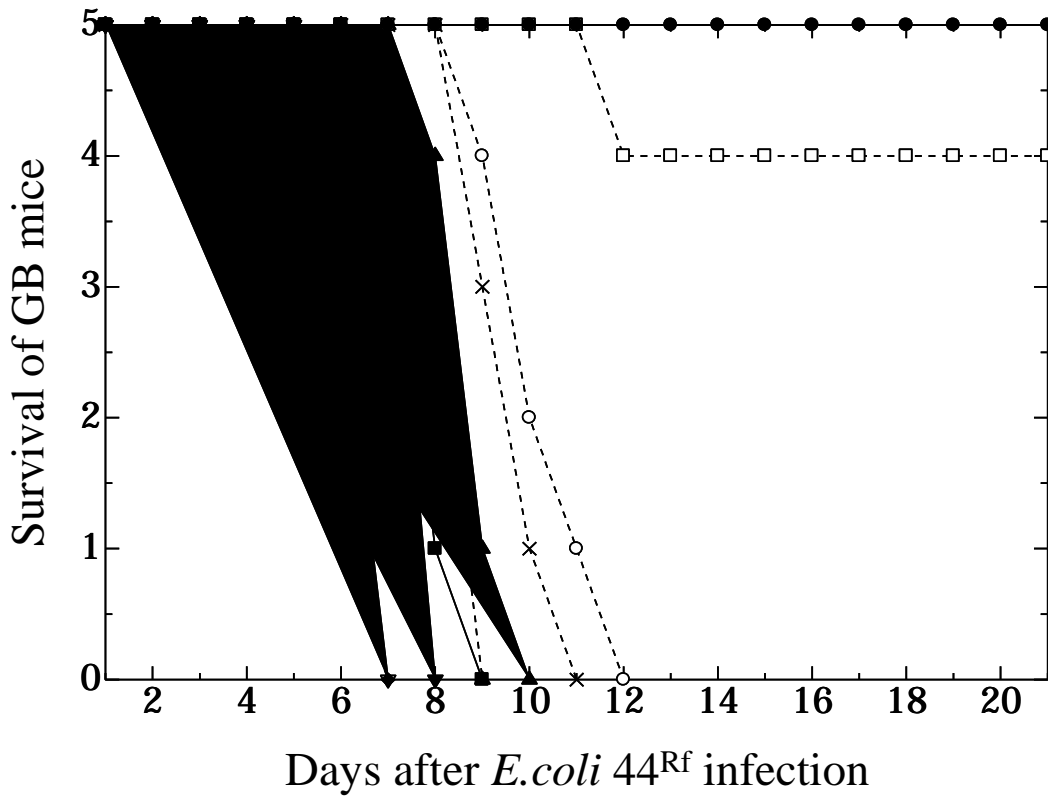
表 1. 盲腸内容物中の Stx2 濃度

<i>Bifidobacterium</i> strains	days after <i>E. coli</i> 44 <sup>Rf</sup> infection		
	1	6	14
<i>B. adolescentis</i> <sup>T</sup>	8.6	9.5	NT
<i>B. bifidum</i> <sup>T</sup>	8.5	10.1	NT
<i>B. breve</i> <sup>T</sup>	8.9	9.4	NT
<i>B. infantis</i> <sup>T</sup>	8.9	9.6	NT
<i>B. infantis</i> 157F	8.9	9.3	9.1
<i>B. longum</i> <sup>T</sup>	8.9	9.6	NT
<i>B. longum</i> NS	8.8	9.5	9.5
<i>B. pseudocatenulatum</i> <sup>T</sup>	8.7	9.4	NT
( <i>E. coli</i> 44 <sup>Rf</sup> only)	9	10	NT

*Bifidobacterium* の経口投与 7 日後に *E. coli* 44<sup>Rf</sup> を同様に経口投与した。

盲腸内容物中の Stx2 は VTEC-RPLA キット (Denka, Japan) とノバパスペロ毒素 EIA キット (BIORAD, USA) を用いて測定した。

図1. *Bifidobacterium* の9菌種のノトバイオームマウスの *E. coli* 44<sup>Rf</sup> 感受性



△ *B. adolescentis* T    ▲ *B. bifidm* M    ▼ *B. bifidm* T    ◇ *B. breve* T  
 ▼ *B. infantis* T    □ *B. infantis* 157F    ● *B. longum* NS    ○ *B. longum* T  
 ■ *B. pseudocatenulatum* T    ● *E. coli* 44<sup>Rf</sup> only

