

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：33708

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K22792

研究課題名（和文）腸管出血性大腸菌感染症における腸内細菌叢および粘膜免疫応答の役割について研究

研究課題名（英文）Research on role of intestinal flora and mucosal immune response in enterohemorrhagic Escherichia coli infection

研究代表者

所 俊志（Tokoro, Shunji）

岐阜医療科学大学・薬学部・講師

研究者番号：10551088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：同様の微生物環境において、隔離された集団およびその中の個体は、構成する菌種の数および均等性、並びに系統差（近縁・遠縁）にもとづく、特異な多様性をもった腸内細菌叢を保持する。正常細菌叢が存在するマウスの腸管内に、腸管出血性大腸菌（Enterohemorrhagic Escherichia coli, EHEC）0157:H7は、一時的に滞留するが、速やかに排出される。EHECの腸内への侵入は、腸内細菌叢の多様性を変動させる。多様性が急激に変動するような頑健性の低い菌叢、および特定の菌群の存在は、EHECの腸管内感染性を高める可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸内細菌叢の多様性と病原菌の感染性の関係を明らかにし、健康維持および疾病予防における重要な知見を提供する。特に、低い多様性や特定の菌群の存在が腸管出血性大腸菌0157:H7の感染リスクを高めることを示唆しており、腸内細菌叢の頑健性（構成菌種の数および均等性、並びに系統差が一定の範囲で維持され、変動しても元の状態に戻る性質）が感染症予防に寄与する可能性を示している。これにより、プロバイオティクス、プレバイオティクス、およびシンバイオティクスの利用や食生活の改善を通じた腸内環境の管理が、実践的な感染症対策として期待される。

研究成果の概要（英文）：In similar microbial environments, isolated populations and individuals within them maintain a unique diversity of gut microbiota. This diversity is characterized by the number and evenness of constituent bacterial species, as well as phylogenetic differences (relatedness and unrelatedness).

In the intestines of mice with a normal microbiota, Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) 0157 temporarily resides but is quickly expelled. The invasion of EHEC into the gut alters the diversity of the gut microbiota. It is suggested that low-resilience microbiota, which exhibit rapid changes in diversity, and the presence of specific bacterial groups, may enhance the infectivity of EHEC in the intestines.

研究分野：腸内細菌学、病原微生物学、生物多様性

キーワード：腸内細菌叢 腸管出血性大腸菌 腸内感染制御 生物多様性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内細菌叢は個々に異なり、構成する細菌の種類や各細菌の割合、量などがそれぞれ異なる。この違いは、内的要因と外的要因によって生じる。内的要因には、細菌同士の相互作用や、ヒトの免疫系と細菌との相互作用が含まれる。外的要因には、母体の子宮内環境、出産方法(自然分娩や帝王切開)、居住環境(都市と地方、家庭内衛生、家畜・ペットの有無)、文化的背景(伝統的な食習慣、宗教的慣習)、生活習慣(食事、運動、ストレス)、民族性(遺伝的背景)、医療水準や医薬品の利用率(抗生物質、OTC薬の使用)、地理的要因(気候、植生、土壌)などがある。

これらの複合的な要因により、腸内の細菌は多様で高密度に存在し、複雑な競合関係を保ちながらそれぞれの生態的ニッチを占有している。このように、腸内細菌叢は動的な平衡状態を維持しており、外来の微生物が腸内に定着して増殖するのを抑制する(colonization resistance)ことで、宿主の病原性細菌感染症の発症を軽減している。

腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)は、毎年散発的に発生する食中毒の原因菌であり、type III secretion system (TTSS)を用いて大腸上皮細胞に接着することでA/E病変を形成し、下痢や出血性腸炎を引き起こす。EHECは感染力が強く、重症化や死亡に至るケースがある一方で、EHECが腸管内に侵入しているにもかかわらず発症しないケースも存在する。その理由としては、腸内細菌叢や粘膜免疫応答による感染制御が関与していると推察されるが、具体的に何が感染の抑制や終息に寄与しているのかは特定できていない。そのため、有効な予防・治療法は確立されておらず、対症療法に留まっている。

申請者らは、マウスにおける腸管出血性大腸菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) O157:H7の腸管内感染を解析し、以下のことを報告した(引用文献)。

- (1) SPF (Specific pathogen free、特定の病原体に感染していないことが保証された)マウスにおいて、EHECを経胃接種しても、体重減少、下痢、腸炎を引き起こさない。
- (2) EHECの腸管内定着には系統差がある一方で、抗菌剤投与や無菌化により腸管内での菌量および定着期間が増加する。

この報告から、EHEC O157:H7による腸管内感染モデルは、病変が現れない条件下で、EHECの腸管内侵入から定着、感染成立、腸管からの排除、そして感染終息に至る過程における腸内細菌叢の影響を解析するのに有用であると考えた。このモデルは、colonization resistanceのメカニズム解明に役立つと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、EHECを経胃接種したマウスの糞便中における菌叢の組成と多様性を解析し、腸内細菌叢が腸内に侵入した病原体の定着をどのように抑制・制御し、排除を促すのか、その仕組み(colonization resistance)を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

日本エスエルシー株式会社(SLC Inc.)から以下のマウス系統を用いた:循環交配方式により維持・生産されているアウトブリードマウスであるICR、ならびに兄妹交配によって維持・生産されているインブレットマウスであるBalb/c、C57BL/6、C3H/HeN、C3H/HeJの4系統。各系統から異腹の雌性マウスを3匹ずつ、3週齢で搬入した。

### (2) 動物の飼育

実験に用いたマウスを、出生後から実験期間を通して、specific pathogen-free (SPF)環境で飼育した。

厳重な生産管理基準と環境の統制に基づきSPFを保証されたマウスをSLC Inc.から搬入した。当実験施設では、系統ごとにケージに分け、各ケージをバイオパック内において飼育した。バイオパックの特性により、(各ケージを独立したアイソレートチャンパーに入れることにより)ケージ間の相互汚染なく、(アイソレート状態のチャンパー内に、高性能フィルターパックを通して空気を取り入れることにより)外部からの汚染なしに飼育が可能であった。また、内部のマウスを外気にさらすことなく、アイソレートチャンパー単位で取扱いが可能であり、チャンパーごとに安全キャビネット内に持込み、その中でマウスへの実験的処置を行った。ケージ、床敷及び給水瓶をオートクレーブ滅菌(2気圧, 121℃, 20分)して用いた。水は、イオン交換及び蒸留した水をオートクレーブ滅菌後、次亜塩素酸ナトリウムを添加して残留塩素濃度10 ppmとして滅菌給水瓶に充填して用いた。餌は、個別包装された繁殖飼育用の放射線滅菌(照射線量30kGy)飼料をクリア株式会社から購入して用いた。ケージ、床敷、給水瓶、水及び餌を週2回交換した。

搬入から接種までの24日間、順化飼育した。

### (3) 接種菌株

志賀毒素 (Shiga toxin; Stx) に起因する病態の苦痛軽減及びマウスの死亡により実験目的を達成できない可能性を排除するために、腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC) 0157:H7 の *stx-1* 及び *stx-2* の両遺伝子破壊株 (GPU995) を用いた。

GPU995 は、EHEC 0157:H7 の 1996 年岐阜集団食中毒臨床分離株 (GPU96MM, Stx-1 及び Stx-2 両産生株) から、相同組換えにより、*stx-1* 遺伝子領域及び *stx-2* 遺伝子領域にそれぞれ、カナマイシン耐性遺伝子及びクロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入して *stx-1* 及び *stx-2* の両遺伝子を破壊することにより作製した。GPU995 については論文報告 (引用文献) され、以下の特性が記された。

- GPU995 は Stx-1 及び Stx-2 のいずれも産生しないことを ELISA により評価した。

- GPU995 の培養上清における HeLa 細胞に対する細胞毒性試験により、陰性対照と同様に毒性がないことが示された。

10%グリセロールストックとして液体窒素に保存した GPU995 を、50 µg/ml カナマイシン及び 20 µg/ml クロラムフェニコール含有 LB 培地に植菌し、37 °C、好気条件下で培養した。培養液を遠心して回収した菌体ペレットを滅菌 MilliQ 水に懸濁し、600 nm の吸光度に基づき、菌濃度を 10<sup>8</sup> cfu/mL に調製した。調製菌液の希釈液を LB 寒天培地に塗布して、菌濃度を確認した。

#### (4) 接種

胃酸の分泌を抑制し、GPU995 の腸管内定着を高める目的で、接種前 9-10 時間の絶飲食及び接種 15 分前のシメチジン腹腔内投与を行った。シメチジンの投与量は 25 mg/kg とした。接種菌量は 10<sup>9</sup> cfu/kg となるように調製した菌液の 10 mL/kg を経口ゾンデを用いて経胃接種した。接種後 1 時間の絶飲食を継続してから飲食を再開した。

#### (5) 糞便採取

EHEC 0157 定量および菌叢解析のための糞便を別々の 1.5 mL エピペンドルフチューブに、経時的に採取した。保定したマウスの肛門から直接に、糞便をチューブに移し取った。定量用糞便を氷上に保管し、実験に供するまで、4 °C 以下に保管した。菌叢解析用糞便を採取直後に DNA/RNA Shield 中に浸漬し、懸濁した後に -20 °C に保管した。採取前後のチューブの重量差から糞便重量を算出した。

#### (6) 糞便中 EHEC 0157 定量

糞便を 10 倍量の滅菌 PBS に浸漬し、ホモジナイザーペッスルを用いて懸濁した。糞便懸濁液のフラッシュ遠心後の上清の 10 µL を 20 µg/ml ノボピオシン及び 0.1 µg/ml セフィキシム含有または 50 µg/ml カナマイシン及び 20 µg/ml クロラムフェニコール含有ソルビトールマッコンキー寒天培地 (日水製薬) に塗布した。37 °C、好気条件下で 18-20 時間培養した。半透明のコロニーについて、病原大腸菌免疫血清「生研」単味血清 0157 との混合による凝集を確認し、計測数から糞便 1 g の EHEC 0157 量を算出した。

#### (7) 16S rRNA アンプリコンシーケンス

DNA 抽出: DNA/RNA Shield に懸濁し、-20 °C に保管した糞便から、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) のマニュアルに従って行った。

16S rRNA 遺伝子の可変領域 V6 プライマーは、V6 の両端の定常部領域に設計したプライマー (フォワード: 5' -MWACGCGARGAACCTTAC-3'、リバーズ: 5' -ACAACACGAGCTGACGAC-3') (引用文献) にアダプター (5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') およびバーコード (検体を識別するための 13-15 の塩基) 配列を付した。

PCR 反応は KOD-Plus-Neo (TOYOBO) のマニュアルに従った。MiniAmp サーマルサイクラー (Thermo Fisher) を用いた。サイクル条件は、94 °C で 2 分間の初期変性、98 °C で 10 秒間の変性、68 °C で 6 秒間のアニーリング・伸長を 30 サイクルとした。PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動し、バンドを切り出し、Wizard SV Gen PCR Clean-Up System (Promega) を用いて抽出・精製した。Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて、PCR 産物の精製度および濃度を測定した。

シーケンスは、マニュアルに従い Ion OneTouch 2, Ion OneTouch ES, Ion Proton により行った。

#### (8) 16S メタゲノムデータ解析

IonReporter 5.x (Thermo Fisher) を用いた。以下のパラメーターに設定した workflow を作成し解析を行った。

Primer(s) Detected ; Value : Single end

Read Length Filter ; Value : 78

Minimum Alignment Coverage ; Value : 90.0

Read Abundance Filter ; Value : 10

Genus Cutoff ; Value : 97.0

Species Cutoff ; Value : 99.0

各マウスの腸内細菌叢の生物の多様性を評価するために、次の4つの指標を用いた。

Chao1 (稀少種の存在を考慮した種の総数の推定値)

Observed Features (実際に観察された種の数)

Faith PD (系統樹に基づいた系統的多様性の値)

Shannon (種の豊富さと均等さを組み合わせた多様性の値)

Bray-Curtis 距離により、各マウス間の細菌叢の相違度合いを定量的に評価した。

QIIM2 において実装されているアルゴリズム (ANCOM) により、群間で占有率に統計的有意差がある菌種を検出した。

#### 4. 研究成果

(1) 同様の微生物環境において、隔離された系統集団およびその中の個体は、特異な腸内細菌叢多様性を形成する。

搬入後、当実験施設で系統ごとに隔離して飼育した。24日間飼育し、接種前のそれぞれの系統(隔離された同じケージ内)のマウスの間で、菌叢の多様性を評価した。Observed Features より、ICR、C3H/HeN、C3H/HeJ、および C57BL/6 において、菌叢の種の数にバラツキがみられた。Faith PD より、ICR の系統において、系統的多様性にバラツキがみられた。Shannon より、ICR、C3H/HeN、C57BL/6、および Balb/c において、種の豊富さと均等性にバラツキがみられた。

それぞれの系統(隔離された同じケージ)内の個体間の多様性のバラツキにおいて、系統の特徴を評価した。ICR は、種の数が多いが、均等性が低く、系統学的に遠縁の種が含まれる個体が存在した。C3H/HeN および C57BL/6 は、近縁の種で構成され、種の数および均等性に変動が大きかった。C57BL/6 は、均等性が低かった。C3H/HeJ は、近縁の種で構成され、種数が少なく変動が大きいが、種の均等性は保たれていた。Balb/c は、近縁の種で構成された、種数が多く、均等性の高い菌叢であり、その多様性は比較的個体間で類似していた。

これらの結果から、同じ微生物環境において、系統により菌叢の多様性に傾向がみられるが、個体独自の多様性が維持されることが示唆された。

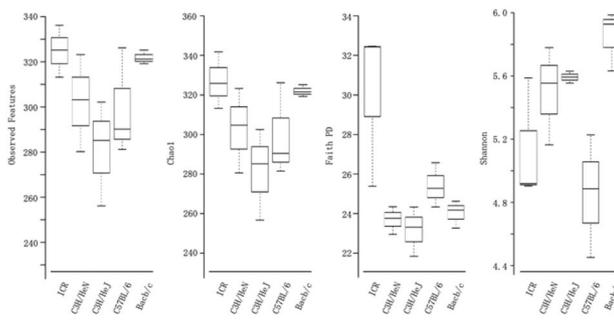


図1 隔離飼育した種々の系統マウスの腸内細菌叢の多様性評価  
マウス系統: ICR、C3H/HeN、C3H/HeJ、C57BL/6、Balb/c  
検体: 搬入後、当実験室で系統ごとに24日間隔離飼育したマウスの糞便 (n=3)  
多様性指標: Observed Features, Chao1, Faith PD, Shannon  
グラフ形式: 箱ひげ図

(2) EHEC 接種後、系統間で糞便排菌に違いがみられたが、正常細菌叢の存在下では EHEC は速やかに腸管内から排除される。

EHEC 0157 接種 24 時間後の糞便において、ICR では 3 匹中 3 匹に、Balb/c 及び C57BL/6 では 3 匹中 2 匹に、C3H/HeN 及び C3H/HeJ では 3 匹中 1 匹に EHEC 0157 が検出された。糞便 1g 中の EHEC 0157 量は、ICR では  $1.0 \times 10^4 \sim 2.96 \times 10^5$  cfu, Balb/c では  $2.0 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4$  cfu, C57BL/6 では  $6.0 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$  cfu, C3H/HeN では  $2.0 \times 10^3$  cfu, C3H/HeJ では  $2.6 \times 10^4$  cfu であった。系統別に連日測定した餌の重量を匹数で割ることで、各系統 1 匹の 1 日当りの食餌量を見積もった。接種の時期における食餌量は、ICR では 4.4 g/匹/日, Balb/c では 3.1 g/匹/日, C57BL/6 では 2.3g/匹/日, C3H/HeN では 2.4 g/匹/日, C3H/HeJ では 2.5 g/匹/日であった。接種 24 時間後の糞便 1g 中の EHEC 0157 量を、食餌量に当てはめて、腸内の EHEC 0157 量を見積もった。ICR では  $8.7 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^6$  cfu, Balb/c では  $6.1 \times 10^3 \sim 4.3 \times 10^4$  cfu, C57BL/6 では  $1.4 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^4$  cfu, C3H/HeN では  $4.9 \times 10^3$  cfu, C3H/HeJ では  $6.6 \times 10^4$  cfu と評価された。接種日の体重は、ICR では 34.20~34.52 g, Balb/c では 20.50~22.57 g, C57BL/6 では 17.75~18.48 g, C3H/HeN では 19.87~20.94 g, C3H/HeJ では 20.00~22.38 g であった。接種菌量を  $10^9$  cfu/kg として、ICR では  $3.0 \times 10^7$  cfu, Balb/c では  $2.0 \times 10^7$  cfu, C57BL/6N では  $1.8 \times 10^7$  cfu, C3H/HeN では  $2.0 \times 10^7$  cfu, C3H/HeJ では  $2.0 \times 10^7$  cfu を接種した。これらの結果から、接種 24 時間後において、系統間で EHEC 0157 の腸管内定着及び糞便排菌量に違いがみられたが、接種菌量と腸内 EHEC 0157 量との比較から、接種された EHEC 0157 は、腸管内で増殖することなく、速やかに排泄されると考えられる。

(3) EHEC 接種後に腸内細菌叢の多様性が変動する。

成果(2)に記述したように、すべてのICRはEHEC接種24時間後の糞便中にEHECが検出された。つまり、他の系統と比較してICRの腸管内に、EHECは一時的に滞留しやすいことが示唆された。そこで、EHECの接種の前(day0)と1日後(day1)との間で腸内細菌叢の多様性を比較評価した。day0と比較してday1で、Observed Features および Faith PDが、ICRでは減少したのに対して、それ以外の系統では大きな変化はみられなかった。一方、Shannonはいずれの系統においても減少した。つまり、ICRは、遠縁の菌種を含めた多数の菌種が減少し、菌の均等性も減少する。一方、ICR以外の系統では、菌の数は維持されるが、菌の均等性は減少する。これらの結果から、EHEC接種後に腸内細菌叢の多様性が減少する。一方で、菌種間の相対的な割合が変化し、菌の均等性が減少しても、互いの相対関係を維持し、菌の数を保つことのできる菌叢が、感染に対して抵抗性を示す可能性が示唆された。

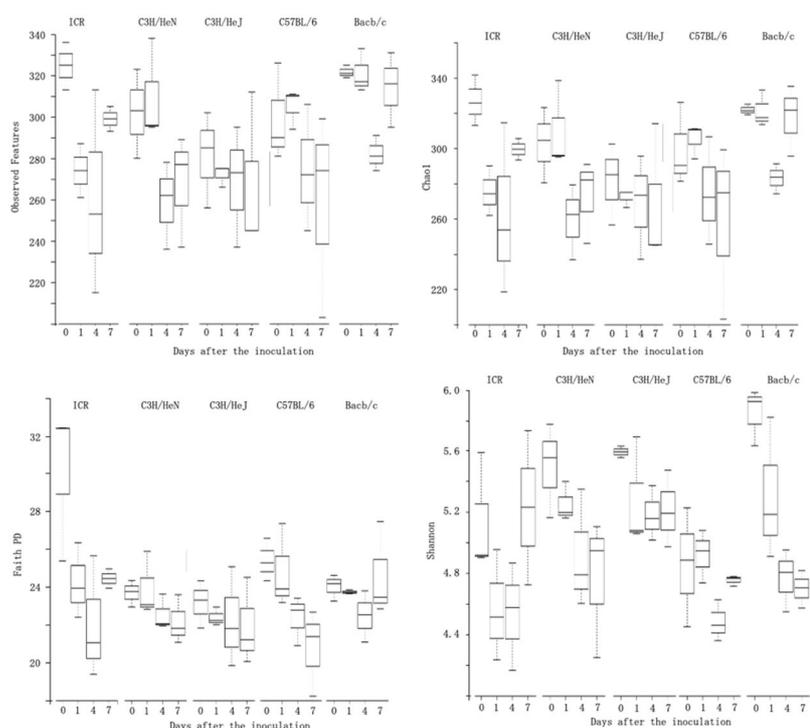


図2 EHEC接種における腸内細菌叢の多様性評価  
 マウス系統：ICR、C3H/HeN、C3H/HeJ、C57BL/6、Balb/c  
 検体：系統ごとに隔離飼育したマウスのEHEC接種前後の糞便 (n=3)  
 多様性指標：Observed Features、Chao1、Faith PD、Shannon  
 グラフ形式：箱ひげ図

(4)接種後に一時的なEHECの腸内滞留がみられるICRにおいて、他の系統と比較して占有率の高い菌群が検出された。

ANCOMから、他の系統と比較して、ICRの腸内細菌叢はラクノスピラ科の細菌の占有率が高かった。ラクノスピラ科はウシ(EHEC保菌動物)の第一胃において豊富な科である。この結果は、特定の病原体の腸管内定着に關与する菌群の存在の有無が感染感受性に關連していることを示唆している。

<引用文献>

Microbiol. Immunol., 47, 125-132., Biol. Pharm. Bull. 37 409-416  
 Yokoyama S, J. Clin. Biochem. Nutr., 30, 33-42, 2001  
 PLoS Biol. 2008 Nov 18;6(11); PLoS One. 2010 Aug 12;5(8); Ann Epidemiol. 2016 May;26(5):348-54.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------