11604

大腸菌のICRマウス静脈内感染と足蹠浮腫反応に対する乳酸産生菌 *Enterococcus faecalis* EF-2001 加熱死菌体摂食の効果

下橋　博隆　　岩佐　敏廣
柳沢　昊永　　鈴木　郁功
（バイオクイーン（株）研究所，日本ベルム（株）BRM研究所，鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療栄養学科）

Enterococcus faecalis（*En. faecalis*）EF-2001 加熱死菌体（EFH-201）の摂食効果を多面的に調べている過程[1]で，EFH-201 を餌に混ぜた 10% EFH-201 餌を 1 ヶ月間食べさせたマウスに，外来大腸菌を経口投与した場合，腸管から外来大腸菌を早期に排除する排除促進効果を EFH-201 は有していた[2]．そこで，今回はマウスの静脈内に投与した大腸菌の消長または皮下投与した大腸菌によるICRマウス足蹠浮腫反応に対する EFH-201 摂食の影響を調べた．さらに，EFH-201 の経口投与がICRマウスの腸内菌叢に与える影響を併せて調べた．

材料と方法

動物：日本SLC（株）から購入した4週齢のICR系雄マウスを1週間の予備飼育後，1群5-6匹で各実験に使用した．

被験物質：*En. faecalis* EF-2001 の加熱死菌体（EFH-201）粉末は日本ベルム（株）から供与された．その EFH-201 粉末を粉末飼料 CE-2（日本クレア（株））に 10% の割合で混合し，加圧により固形状にしてICRマウスに食べさせた．対照として与えた飼料 CE-2 も同様に固形状にした．また，水に懸濁させた EFH-201 粉末を動物の胃内に（経口）投与した．

細菌：使用した大腸菌 *Escherichia coli* NB-101 はヒトから分離し，日本ベルム（株）で保存していた菌株である．この菌株をブレインハート・インヒュージョン培地（日水製薬（株））で増菌し，生理食塩水で洗浄した後凍結乾燥した．動物には生理食塩水で洗浄した *E. coli* 菌液もしくは凍結乾燥した *E. coli* を生理食塩水に懸濁して投与した．

EFH-201 投与の効果：(1)アンピシリン（5mg/ml）とセファレキシン（3mg/ml）を飲料水に溶かして3日間ICRマウスに与えた後，EFH-201 粉末（1.5mg/日/マウス）を胃内に

English Title for No. 11604: Feeding effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 cells on an intravenous infection of *Escherichia coli* and on footpad edema induced by it in mice. **Hirotaka Shimohashi, Toshihiro Iwasa, Takaharu Yanagisawa and Ikukatsu Suzuki.** [Institute of Bio-Queen Co. Ltd., BRM institute of Nihon Berum Co., Ltd., Kokubunji and Departments of Clinical Nutrition, Faculty of Health Science, Suzuka University of Medical Science, Suzuka.] *Medicine and Biology.* 144(1): 1-6, January 10, 2002.
（著者校正）

13日間投与した．その間，ICRマウスの新鮮糞便を採取しその菌叢を光岡ら[3]の方法に従って検索した．(2) 10%EFH-201餌を14日間食べさせたICRマウスの腹腔内にサイクロホスファミド（CY，Sigma. Co.）5mg/マウスを注射し[1]，4日後尾静脈内に1×10^7/0.3mlの生菌 *E. coli* NB-101を投与した．なお，この期間もEFH-201餌を与えた．*E. coli* 投与後24，48，72時間目に肝臓中の *E. coli* 数をMacConkey寒天培地（栄研化学（株））で測定した．(3) 10% EFH-201餌を14日間食べさせたICRマウスの背部皮下に *E. coli* NB-101の凍結乾燥菌体0.5mg/0.3mlを注射した．さらに10日後，右足蹠の皮内に *E. coli* の菌体75 μg/0.03mlを注射し，左足蹠の皮内には生理食塩水（0.03ml）を注射した．そして，24時間後と48時間後の浮腫をノギスで測定し，*E. coli* 菌体による浮腫率を算出した[5]．その期間もひき続きEFH-201餌を与えた．5日後，それぞれのICRマウスから採血し，血清の *E. coli* 菌体に対

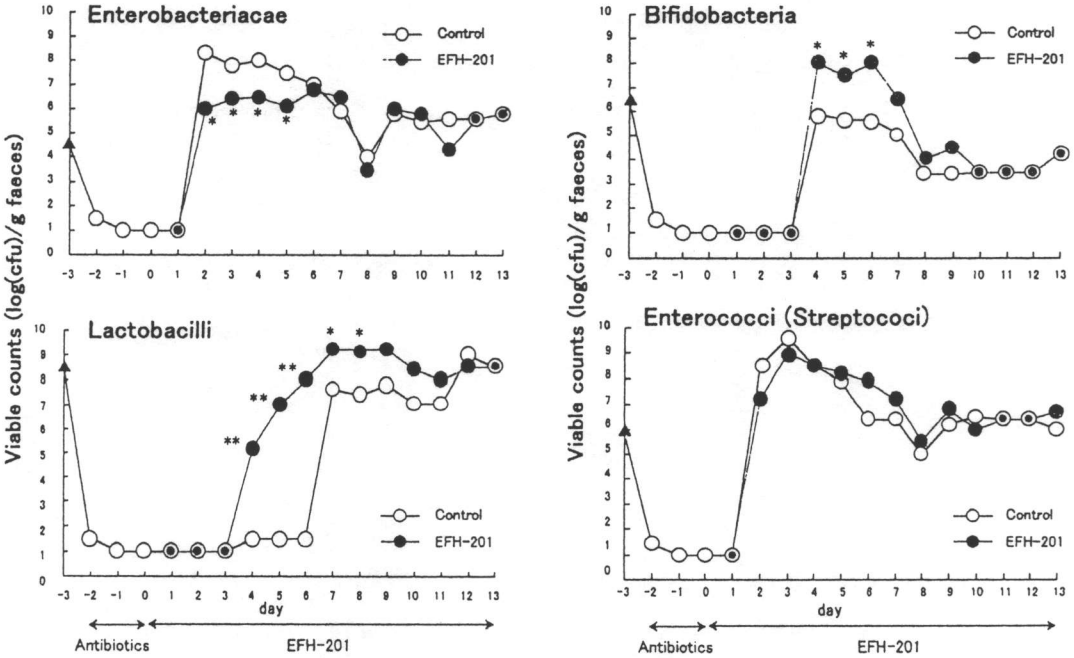

図1　抗生物質投与により消失した腸内細菌叢の再構築に与えるEFH-201経口投与の効果
▲ 抗生物質投与前の菌数，*$p < 0.05$，**$p < 0.01$，$n = 5$

する凝集素価を調べた．

統計学的処理：各動物実験群で得られたデータは平均±標準誤差で示し，対照群と被験物質投与群との間の統計学的検定はStudent *t* テスト法で処理し，$p < 0.05$（危険率5％以下）を有意差があるとみなした．

結果

1）抗生物質投与後の腸内菌叢回復に与えるEFH-201経口投与の効果

通常ICRマウスに10% EFH-201餌を1ヶ月間食べさせ，その糞便菌叢を培養法で調べた結果，対照群と比較してその菌属構成になんの変化も観察する事ができなかった．

そこで，2種類の抗生物質アンピシリンとセファレキシンを飲料水に入れて自由に飲ませたICRマウスは，3日間以内に糞便菌叢が検出できなくなった．その時点で抗生物質投与を止め，EFH-201（1.5mg/日/マウス）を経口投与して糞便菌叢の回復状況を属レベルで調べた（図1）．EFH-201群では対照群に比べて*Lactobacillus*は早期にしかも高い菌数で，*Bifidobacterium*は高菌数で出現し，*Enterobacteriaceae*は逆に低菌数で出現した．しかし，10−13日頃までには両群の間に差が見られなくなった．*Enterococcus*と*Bacteroidaceae*の出現には両群間に差

表1　免疫抑制IRCマウス静脈内投与*E. coil* NB-101の肝臓中菌数に与えるEFH-201摂食の効果

Group of mice	Cyclophpsphamide treatment	Number of *E. coli* in livers (log/g)		
		Time (hour) after administration of *E. coli*		
		24hr	48hr	72hr
Control	+	6.3 ± 0.7	6.9 ± 0.6	6.2 ± 0.5
EFH-201	+	4.8 ± 0.8	4.5 ± 0.5 *	4.4 ± 0.6 *
Conventional	−	4.2 ± 0.4 *	2.7 ± 0.3**	ND

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, n=6, ND（検出限界以下）

表2　*E. coli*誘発ICRマウス足蹠浮腫に与えるEFH-201摂食の軽減効果

Group	Swelling of footpad (%)	
	24hr	48hr
Control	59.5 ± 7.0	48.3 ± 1.9
EFH-201	35.7 ± 3.9 *	23.0 ± 3.1**

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, n=5

が認められなかった．また，総菌数でみた場合も両群の間に差異はみられなかった．

2）免疫抑制ICRマウスの静脈内に感染させた大腸菌に与えるEFH-201摂食の効果

CYを投与することにより抵抗力減弱状態にしたICRマウスの静脈内に*E. coli*懸濁液を投与した後，肝臓と脾臓の大腸菌菌数を調べて，CY投与前後に摂食させたEFH-201の大腸菌感染に対する効果をみた．その結果，肝臓における大腸菌数は表1に示したように，対照群に比べてEFH-201群の48，72時間で有意に低値であった．しかし，CYを投与せず，EFH-201を摂食させない通常ICRマウス

ではそれ以上の低値を示した.

脾臓における *E. coli* 数（log 値 /g）は大腸菌投与後 24，48，72 時間の EFH-201 群では 4.1 ± 0.2，3.5 ± 0.3，3.3 ± 0.2 であり，対照群では 4.5 ± 0.4，3.7 ± 0.4，3.2 ± 0.3 と，両群間の脾臓の大腸菌数に差異は見られなかった.

3） 大腸菌で誘導した ICR マウスの足蹠浮腫に対する EFH-201 摂食の影響

10% EFH-201 餌を食べさせることが，*E. coli* NB-101 の生菌で誘発した ICR マウスの足蹠浮腫にいかなる影響を及ぼすかを調べたのが表 2 である．EFH-201 群の足蹠浮腫率平均は対照群の浮腫率平均に比較して，24 時間目で 40.0%，48 時間後で 52.4%の減少を示した.

足蹠浮腫を測定して 5 日後の ICR マウスから採血し，その血清の *E. coli* NB-101 生菌に対する凝集素価を測定した（図 2）．10% EFH-201 餌を 24 日間与えたマウスの血清でも，EFH-201 を全く与えなかった ICR マウス血清でも，*E. coli* に対する凝集素価（1：320）に変化が見られなかった.

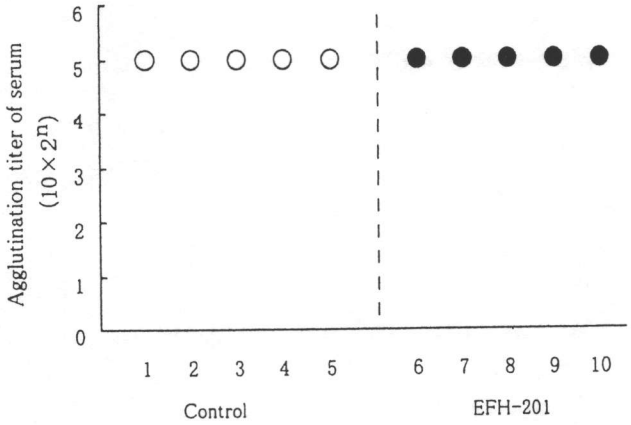

図 2　*E. coli* 誘発足蹠浮腫 ICR マウス血清の *E. coli* 菌体に対する凝集反応における EFH-201 摂食の影響

考察

前回の実験で，経口投与した外来大腸菌の排除促進効果を明らかに示すには 10% の割合で EFH-201 を混合した餌を食べさせる必要があった[2]．通常 ICR マウスに 10% EFH-201 餌を与えても腸内菌叢における変化を見出すことはできなかったが，抗生物質投与により腸内菌叢を排除させた後の菌叢の再構築（回復）には EFH-201（1.5mg/ 日 / マウス）の経口投与が有効であった．特に，マウスの最優勢菌属である *Lactobacillus* の再出現時[3] に最も効果的であり，*Enterobacteriaceae* や *Bifidobacterium* の再出現にも効果を認めた.

CY は白血球，特に好中球を減少させ，免疫系を抑制[4] することが知られている．そこで，CY を投与した ICR マウスに *E. coli* を静脈内注射した後，肝臓中の大腸菌数は対照群よりも 10% EFH-201 摂食群で顕著に低値を示した．しかし，通

常ICRマウスほどではなかった．このことはEFH-201摂食が貪喰能を主とする好中球の回復を速めている[6]ことを示唆している．脾臓中の*E. coli*菌数は相対的に低く，両群間に菌数の差はみられなかった．また，*E. coli*の静脈内投与後3日以内にこの実験は終了するので，*E. coli*に対する抗体価は測定しなかった．

次に遅延型過敏反応であるマウス足蹠浮腫を*E. coli*菌体で誘発し，浮腫形成に対するEFH-201摂食の影響を検討した．対照群に比べてEFH-201群の浮腫率は40-52%減少し，10% EFH-201摂食は遅延型過敏反応を抑制することを示した[7]．この実験系のマウスは背部皮下に*E. coli*菌体を注射し，10日後さらに同じ菌体を少量ではあるが足蹠皮下に注射しているので*E. coli*菌体に対する抗体が血清中に産生されているものと考えられる．そこで，EFH-201群と対照群のICRマウスの血清の凝集素価を測定したところ，凝集素価は1：320とそれぞれのICRマウス血清で同じ値を示し，*E. coli*に対する血清抗体価にEFH-201摂食の影響は認められなかった．

*En. faecalis*と*E. coli*との間に共通抗原の存在は知られていない．そして，乳酸菌の経口投与は免疫を増強させると報告[8,9]されている．しかし，EFH-201は凝集反応で調べた限り，*E. coli*に対する血清抗体価に影響を与えず，遅延型過敏反応を抑制する因子を含むことになる．これらの作用は本試験に用いた*E. coli* NB-101に特有な現象か，もしくは他の日和見病原菌に対しても生じる現象なのかを確認してから次の段階（免疫系の細胞への影響やアレルギーの軽減，類似抗原を含めた免疫学的考察）へ進む予定である．

結語

1．抗生物質を投与することにより腸内菌叢を排除したICRマウスに，*En. faecalis* EF-2001加熱死菌体（EFH-201）1.5mg/日/マウスを経口投与して菌叢回復状態を分析した時，EFH-201群では対照群に比べてICRマウスで最優勢菌*Lactobacillus*は早期に高い菌数で，*Bifidobacterium*は高菌数で再出現し，*Enterobacteriaceae*は逆に低菌数で再出現した．

2．CY投与により抵抗力減弱ICRマウスの静脈内に*E. coli*を投与した後，肝臓の大腸菌数を調べて，CY投与前後に摂食させた10% EFH-201の大腸菌感染に対する効果をみた．*E. coli*投与後48，72時間で肝臓における大腸菌数は，対照群に比べてEFH-201群が有意に低値であった．

3．*E. coli* NB-101の生菌で誘発したICRマウスの足蹠浮腫率平均は10% EFH-201摂食群で対照群の浮腫率平均に比較して惹起注射後24時間目で40.0%，48時間後で52.4%の減少を示し，遅延型過敏反応を抑制した．

1）鈴木郁功 他：乳酸産生菌*Enterococcus faecalis* EF-2001加熱死菌体由来水溶性抽出物の抗腫瘍効果．本誌143（3）：113-118 2001　—2）柳沢昊永，下橋博隆，山川敏郎：

乳酸産生菌 *Enterococcus faecalis* EF-2001 加熱死菌体による外来大腸菌の排除促進作用．本誌 140 (3) : 53-57 2000 —3) 光岡知足：腸内細菌とその意義．臨床と細菌 2 : 55-97 1975 —4) Balow, J. E., Hurley, D. L. & Fauci, A. S.: Cyclophosphamide suppression of established cell-mediated immunity. Quantitative vs. qualitative changes in lymphocyte populations. *J Clin Invest* 56 : 65-70 1975 —5) 中村玲子，木ノ本雅通：遅延型過敏症反応（DTH）．藤原大美，淀井淳司（編）免疫研究法ハンドブック（2 版），中外医学社 1996 220-225 —6) Hasegawa, T., et al.: Effect of orally administered heat-killed *Enterococcus faecalis* FK-23 preparation on leukopenia in mice treated with cyclophosphamide. *J Vet Med Sci* 56 : 1203-1206 1994 —7) Nakamura, N. & Tokunaga, T.: Non H-2 linked difference in delayed-type hypersensitivity in mice. *Immunol Lett* 2 : 87-89 1980 —8) Takada, H., et al.: Molecular and structural requirements of a lipoteichoic acid from *Enterococcus hirae* ATCC 9790 for cytokine-inducing, antitumor, and antigenic activities. *Infect Immun* 63 : 57-65 1995 —9) Wagner, R. D., et al.: Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 66 : 4165-4172 1997

（受付 2001 年 11 月 14 日）

［通信先　下橋博隆：バイオクイーン（株）研究所，
東京都国分寺市東恋ヶ窪 2-29-8（〒 185-0014）］