

11496

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

柳沢 吾永 下橋 博隆 山川 敏郎

(東京薬科大学薬学部第二生化学教室, バイオクイーン株式会社微生物研究部)

乳酸産生菌 *Enterococcus faecalis* (*En. faecalis*) 加熱死菌体(菌体成分)の投与はマウスの好中球やマクロファージを活性化したり, TNF- α の産生を増強したり, 抗腫瘍作用を示すなどの免疫能増強効果についてはすでに報告されている¹⁾.

一方, 乳酸菌群における生菌の病原菌に対する感染防禦効果に関する報告は数多くあるが, *En. faecalis* の加熱死菌体や菌体成分による感染防御作用に関しては真菌 *Candida albican* に対する防御効果が示されている²⁾のみである.

そこで, われわれは *En. faecalis* EF-2001 株の加熱死菌体を飼料に混合して連日与えたマウスに, ヒト由来のストレプトマイシン (SM) 耐性大腸菌を経口投与してマウス腸管から SM 耐性大腸菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) の消長を糞便を介して調べた.

材料と方法

被験物質と餌の調整: 被験物質として *En. faecalis* EF-2001 の加熱死菌体乾燥粉末¹⁾ (EFH-201) は日本ベルム社(株)から供与された. この EFH-201 を粉末飼料 CE-2 (日本クレア(株)) に 0%, 5% もしくは 10% の割合で混合し, 圧力を加えて固形の飼料とした.

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

大腸菌の分離ならびに SM 耐性変異株の誘発と選出: *E. coli* NB-101 菌株は健康な成人の糞便を MacConkey 寒天培地(栄研化学(株))に画線塗抹し, 乳糖発酵性のコロニーを *E. coli* として分離した. そして, グルコースからのガス産生能と IMViC テスト³⁾により確認した.

E. coli NB-101 株のストレプトマイシン (SM, 明治製菓(株)) 耐性株を得るには, 対

English Title for No. 11496: Exclusive effect of heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 cells on exogenous *Escherichia coli* challenged. Takaharu Yanagisawa, Hirotaka Shimohashi and Toshio Yamakawa [Department of Second Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science and Department of Microbial Research, Bioqueen Co., Ltd., Tokyo.] *Medicine and Biology*. 140(3): 53-57, March 10, 2000.
(著者校正)

数増殖期の大腸菌を生理食塩水に懸濁 (3.0×10^6 cfu/ml) し、15WのUVランプ(ナショナル(株))直下約25cmの所にその懸濁液を置き、約15分間紫外線を照射した⁴⁾。照射懸濁液を1時間ずつ暗所明所に置いた後、SM 300 μg/ml 含有 MacConkey寒天培地表面に塗抹して培養し、形成されたコロニーのひとつから釣菌して *E. coli* NB-101 の SM 耐性株 (*E. coli* NB-101^{SMR})とした。SMに対する正確な耐性値はブイヨン希釈法⁵⁾でおこなうことにより得られた。

マウスにおけるEFH-201の大腸菌排除実験：被験物質EFH-201の混合した飼料(5% EFH-201もしくは10% EFH-201)を5週齢のマウスに与え、4週間自由に摂食させた。対照群には飼料のみ(0% EFH-201)を同様に与えた。次に、ブレイン・ハートインフュージョン液体培地(Sigma Co.)で1夜培養した *E. coli* NB-101^{SMR} を生理食塩水に懸濁し、その生菌 0.5ml (3.5×10^9 cfu) を1夜絶食させたマウスに経口投与した。そして、SM 耐性大腸菌投与前、投与後1, 2, 3, 4, 7日目に個々のマウス肛門から直接新鮮糞便を採取し、糞便中の SM 耐性 *E. coli* の菌数は SM 100 μg/ml 含有 MacConkey(SM-MacConkey) 寒天培地で形成したコロニー数を数えることによって算出した。対照群と被験物質投与群との間の統計処理は Student の *t*-テストによりおこない、*p*<0.05 を有意差とした。

表 1 *E. coli* NB-101 株とその変異株のストレプトマイシン(SM)耐性

菌株	SM 濃度 (μg/ml)									
	800	400	200	100	50	25	12	6	3	1.5
<i>E. coli</i> NB-101	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+
NB-101 ^{SMR}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : 充分な増殖、± : 少量増殖、- : 増殖なし

結果

ヒト腸管から新たに分離した大腸菌 *E. coli* NB-101 をマウスに経口投与したのでは、マウス腸管に原住している大腸菌と区別がつかない。そこで、NB-101 株からその SM 耐性変異株 (NB-101^{SMR}) を誘発し選出した。

1. *E. coli* NB-101 株と変異株の SM 耐性度

E. coli NB-101 の菌数 3×10^6 cfu/ml から 1×10^5 cfu/ml を殺菌させる紫外線量を照射する条件で、SM (300 μg/ml) 含有 MacConkey 培地に形成する SM 耐性コロニー数は 3~5 個 (/ml) であった。その変異株 (NB-101^{SMR}) と野生株の SM に対する耐性度合いを調べたのが表 1 である。

野生株 NB-101 に対する SM の最大阻止濃度 (MIC) は $3 \sim 6$ μg/ml であり、その SM 耐性変異株の MIC は 800 μg/ml 以上であり、NB-101^{SMR} 株は、SM に対してかなり強力な耐性を獲得していた。

2. EFH-201 摂食マウスにおける *E. coli* NB-101^{SMR} の排除

EFH-201 (*En. faecalis* の加熱死菌体) 粉末を 5% もしくは 10% の割合で餌に混ぜて 4 週間食べさせたマウスに *E. coli* NB-101^{SMR} を経口投与し、糞便を介して排泄される SM 耐性大腸菌数を SM-MacConkey 寒天培地に増殖するコロニー数により調べた (表 2)。

NB-101^{SMR} 株投与前のマウス糞便中には SM-MacConkey 寒天培地にコロニーを形成できる細菌群は全く見られなかった。NB-101^{SMR} 株の投与後 1 日目の糞便には 10^7 cfu/g の SM 耐性大腸菌が存在したが、対照群と EFH-201 群との間に有意差は見られなかった。2 日目、3 日目では糞便中の耐性大腸菌数は 3 群で漸次減少し、特に 10% EFH-201 群の大腸菌数は対照群と比較して有意に低下していた。4 日目の糞便で、SM 耐性大腸菌は 10% EFH-201 群で 6 匹のマウス中 2 匹か

表 2 EFH-201 摂食マウスに経口投与した SM 耐性大腸菌 (*E. coli* NB-101^{SMR}) の糞便中の菌数 (対数値/g 糞便)

群	SM 耐性大腸菌投与後日数				
	1	2	3	4	7
対照	7.5±0.2	6.3±0.3	5.3±0.2	4.8±0.4	4.6±0.2 (n=5) (n=3)
5% EFH-201	7.4±0.3	6.1±0.4	4.9±0.4	4.5±0.5	4.2 (n=3) (n=2)
10% EFH-201	7.2±0.3	4.8±0.2**	4.2±0.5*	4.3	3.2 (n=2) (n=1)

菌数 : 対数値の平均±標準誤差 (n=6)。SM 耐性大腸菌投与前のマウス糞便から SM 耐性菌は検出されない。*p<0.05, **p<0.01

ら検出され、5% EFH-201 群では 3 匹のマウスから検出されるのみであったが、対照群では 5 匹のマウスから検出された。耐性大腸菌が検出されなくなったマウスは、前日の糞便検査で耐性大腸菌の菌数の低い動物であった。7 日目になると、SM 耐性大腸菌数は 10% EFH-201 群では 1 匹のマウス糞便から検出されるのみであり、5% EFH-201 群では 2 匹のマウス糞便から検出され、対照群では 3 匹のマウスに検出された。このように、経口投与した外来(SM 耐性)大腸菌は 10% EFH-201 群のマウス糞便に最も少ない菌数で存在しつ糞便から早期に消失し、5% EFH-201 群のマウス糞便から次に早く消失した。そして、対照群の糞便には多い菌数でしかも遅くまで投与大腸菌が残っていた。

考察

病原性大腸菌が腸管に感染し発病するためには、腸管に侵入した大腸菌が腸管

粘膜に付着し増殖する必要がある⁶⁾. そしてその間に毒素を産生したり、腸管粘膜組織に侵襲したりする。この外来病原大腸菌の付着と増殖を阻止する要因として、常在細菌の拮抗現象⁷⁾や代謝産物、胆汁酸やリゾチームの殺菌作用^{8,9)}、腸管の免疫系の細胞群による非特異的・特異的免疫¹⁰⁾などがあげられている。それらのことを総合的に検討するためには動物を使用する必要がある。

病原細菌を用いて動物への感染実験を行う感染実験動物棟をわれわれは持っていない。そこで、病原大腸菌に限らず侵入した外来細菌の定着を許さず、すばやく体外に排除する物質を探査するモデル動物系と本実験を考えることもできる。マウスに対する外来細菌としてヒトから分離した大腸菌を原株とし、そのSM耐性変異株 (*E. coli* NB-101^{SMR}) を動物に投与した。被験物質はヒトの常在菌叢を構成している腸球菌の1種 *En. faecalis* EF-2001 株の加熱死菌体 (EFH-201) である。

表2で示したように10% EFH-201群において、特に2日、3日目のマウス糞便で対照群と比較してSM耐性大腸菌の菌数が明らかに低下していた。しかも4日、7日目でこの大腸菌が検出されるマウス数が少ないということは、*E. coli* NB-101^{SMR}の投与後1日目の糞便採取までの間に対照群よりも10% EFH-201群でSM耐性大腸菌の糞便への排除菌数が多かったので、2日目以後腸管ならびに糞便中に残存しているSM耐性大腸菌数が減少しかつ、早期に糞便から検出されなくなったと考える。もしくは、10% EFH-201群の腸管内において投与大腸菌の増殖率が何らかの原因で、対照群よりも悪かったためのどちらかである。そのどちらにしても、EFH-201は腸管に侵入した外来大腸菌に対して排除促進効果をもっていることになり、その機序は現在検討中である。

結語

En. faecalis EFH-2001の加熱死菌体を長期(1ヶ月)間食べさせたマウスは、経口投与した外来大腸菌に対して排除促進効果を示した。

1) 柳沢晃永、他：乳酸産生菌 *Enterococcus faecalis* EF-2001 加熱死菌体の血清学的確認法。本誌 139 : 39-44 1999 —2) Satonaka, K., et al.: Prophylactic effect of *Enterococcus faecalis* FK-23 preparation on experimental candidiasis in mice. *Microbiol Immunol* 40 : 217-222 1996 —3) 緒方幸雄：A. 腸内細菌科、岩田和夫、他(編)医学歯学・微生物学。医歯薬出版 1985 174-183 —4) 石和浩美、桜井稔三：乳酸菌溶解酵素およびテンペレートファージの产生条件について。農化 46 : 245-251 1972 —5) 東京大学学友会編：9. 抗菌作用の測定法、微生物学実習提要、丸善 1988 106-112 —6) Cheng, K. J., Irvin, R. T. & Costerton, J. W.: Autochthonous and pathogenic colonization of animal tissues by bacteria. *Canad J Microbiol* 27 : 461-490 1981 —7) Abrams, G. D.: Effect of the indigenous microbial flora on mechanisms of host resistance. In resistance to infectious disease, (eds) R. H. Dunlop & H. W. Moon, Modern Press Saskatoon 1970 129-139 —8) Judith, M. B., et al.: Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile acid hydrolase

activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Appl Environ Microbiol* 61 : 1147-1149 1995 —9) Oreg, R. G. & Lois, M. T.: Potential role of lysozyme in bactericidal activity of an in vitro-acquired salivary pellicle against *Streptococcus faecium* 9790. *Infect Immun* 54 : 846-854 1986 —10) Namioka, S., Sasaki, T. & Maeda, Y.: Immunopotentiation of the small intestine of weaning piglets by peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Bifidobacteria Microflora* 10 : 1-9 1991

(受付: 2000年1月13日)

[通信先 柳沢晃永：東京薬科大学薬学部第二生化学教室,
東京都八王子市堀之内1432-1(〒192-0392)]

