

マウス腸粘膜肥厚症の発病要因に関する研究

伊藤喜久治

目 次	
	緒言 ————— 1
5	第1章. 発病と腸内菌叢 ————— 5
	1+1. 小序 ————— 5
	1+2. 材料と方法 ————— 6
	1+3. 成績 ————— 12
10	(1). 普通マウスと無菌マウスにお ける感染の比較 ————— 12
	(2). 普通マウスから作られた無菌 化したマウスでの感染 ————— 17
15	(3). 無菌マウスから普通化したマ ウスでの感染 ————— 18
	1+4. 考察 ————— 20
	1+5. 小括 ————— 24
	図表 ————— 27
20	第2章. 飼育環境と感受性 ————— 34

	2+1.	小序	34
	2+2.	材料と方法	34
	2+3.	成績	36
	(1).	S P F マウスおよび普通マウ	
5		スの感染の比較	37
	(2).	S P F あるいは普通マウスと	
		同居させ普通化した元無菌マ	
		ウスの感染	38
	2+4.	考察	40
10	2+5.	小括	42
		図表	44
	第3章.	系統と感受性	46
	3+1.	小序	46
15	3+2.	材料と方法	47
	3+3.	成績	49
	(1).	I C R 無菌マウスの感染	49
	(2).	I C R 無菌ならずに C F # 1 無	
		菌マウスでの原因大腸菌の腸	
20		上皮付着性の比較	51

	(3).	ICR無菌なSびにCF#1無	
		菌マウスを普通化した場合の	
		感染	53
	3+4.	考察	54
5	3+5.	小括	59
		図表	61
	第4章. 菌の粘膜上皮付着性と腸内菌		
		叢	64
10	4+1.	小序	64
	4+2.	材料と方法	65
	4+3.	成績	67
	(1).	SIPFあるいは普通マウスの	
		糞便投与により普通化した元	
15		無菌マウスの感染	67
	(2).	無菌マウスに大腸菌を感染さ	69
		せた後に普通化あるいは糞便	
		を投与した場合の影響	
	4+4.	考察	71
20	4+5.	小括	76

	図表	78
	総括	83
5	謝辞	91
	文献	92
	写真	105
10		
15		
20		

緒 言

1964年に武藤ら(41)によって報告されたマウス下痢症は、それまでに知られていたマウスの腸管感染症—サルモネラ病(69)、Tyzzer病(67)、腸球菌感染症(16)、ウイルス性幼仔下痢症(6, 49)、サイトロバクター—感染症(8)、megacolon(5)—とは、疫学、症状、病変がことなり、肉眼的には腸壁の肥厚を主徴とし、上皮細胞の過形成と粘膜絨毛の異常増殖が主体で炎症反応に乏しい病変の特徴からマウス腸粘膜肥厚症(megaenteron of mice)とよばれた。起因菌としては、特有の生物性状—運動性—、インドール—、ゼラチンの液化+を示す乳糖遅分解の大腸菌(*Escherichia coli* O115a,c:K(B))が中川ら(45)によって分離同定され再現実験により確認された。

これらの報告によれば本症は、自然発症例

(41), 実験感染例(45)とともに2〜3週齢⁽²⁾の乳のみマウスがともに感受性が高く, 下痢をともない死亡するが, 離乳後マウスではほとんど致死例はなく, 腸粘膜に肥厚があるにもかかわらず, 下痢を呈することなく耐過するとされていた。しかし, 1971年に著者の遭遇した東京大学医科学研究所の3つの研究室での本病の流行では, 乳のみマウスばかりでなく, 3週から23週に至る年齢のマウスが激しい下痢を伴い死亡し, これまでの武藤ら(41)の報告とは罹患マウスの年齢が著しく異なっていた。

1968年より1969年にかけて齊藤ら(55)によって行なわれたわが国の市販マウスの繁殖コロニーにおける E. coli O115 a, c:K(B) の分布調査では, 16繁殖場中11繁殖場より本菌が分離され, 繁殖場別の検出率は33.7%から1.8%にわたりがかなり広範囲に分布しているにもかかわらず, 腸粘膜肥厚病変が認められたのは高い検出率を示した1繁殖場からのマウス群

だけであつたという。以上の自然例の検索結果は本病の発病機構には起病菌の存在以外になんらかの要因が関与することを示唆していると考えられた。

本病の発病に関係ある要因として乳糖分解性の腸内細菌を保有しないマウスはこれを保有するマウスより感受性が高く、しかも個体によるバラツキが少ない(54)ことが報告されており、またマウスの週齢により感受性が異なるといわれていることもマウスの菌叢は出生後複雑な変化をへて3~4週齢ごろに完成する(24, 30, 59)ことを考えると腸内常在菌叢により強く修飾される可能性が示唆される。一方、マウスの系統によっても感受性に差がある(42)との報告があるが、その理由は全く明らかにされていない。

そこで著者は、*E. coli* 0115a,c:K(B)の感染に関与する要因を分析的に研究するため、腸管感染症の研究において有用な実験材料である無菌動物を用いることを企てた。まず、無菌マ

ウスと普通マウスを用いて感染の比較を行な⁽⁴⁾
い、腸内菌叢の影響を検討した。つづいて、
無菌動物に由来し微生物学的に隔離された環
境(バリヤー)で育成・繁殖されるSPF動
物(34)の常在菌叢は、成熟マウスでも単純
なパターンを示すことが多い(31, 72)とさ
れることから、種々の系統のSPFマウスと
普通マウスを用いて飼育環境ならずにマウス
の系統の違いによる感受性の違いを検討した
。ついで、マウスの系統による感受性の違い
について無菌マウスを用いてその機序を検討
し、最後にこれらの結果にもとづいて本病発
病機序の主要段階である起因菌の腸粘膜付着
性と腸内菌叢との関係を、主に無菌マウスに
腸内菌叢を定着させる方法を用いて検討を行
なった。

第1章. 発病と腸内菌叢

1. 小序

E. coli 0115a, c:K(B)によるマウスの腸粘膜肥厚症は、自然発症例は主に哺乳マウスにみられるとされているがその発病機序は複雑で条件によつては成熟マウスでも発病する。本症の発病機序に腸内菌叢が関与しているかどうかを検討するにあつて、無菌マウスの利用を考えた。

成熟した普通動物での経口感染では、その動物の保有する腸内常在菌叢により投与菌は腸内に定着しにくいのが、無菌動物では容易に投与菌が定着することがよく知られている(7, 13, 21, 46, 48, 56, 57, 65)。また、無菌動物での単独感染では、腸内菌叢という

(6)
感染への修飾因子のない状態で動物と投与菌
の関係を知ることが出来る(17)。

この章では、普通マウス(CVマウス)、
無菌マウス(GFマウス)ならびにGFマウ
スを普通化したマウス(GF+CVマウス)を
5 用いてE. coli 0115a,c:k(B)を経口投与して実験感
染を行ない、さらにGF+CVマウスを再び新
たに無菌化したマウス(GF+CV+GFマウス
)、およびGFマウスにGF+CVマウスの糞
便を投与したマウスを作出して感染に及ぼす
10 腸内菌叢の影響を検討した。

2. 材料と方法

15 マウス：無菌(GF)マウスは、武田薬品
工業株式会社光工場の宿田S(63)によつて
作出されたC#1を1969年に東京大学医科学
研究所が分与をうけ以後繁殖維持しているも
のを4~6週齢(雄、雌)で使用した。GF
20 マウスの飼育は(28)、2%過酢酸で滅菌し

たビニールアイソレーター，プラスチックケ
ージおよび高圧滅菌したエアフィルター，飼
料（オリエンタル酵母K.K.，Type NMF），
飲水，床敷を用いた。高圧滅菌は，前島ら（
33）の記載した方法に従った。つまり，飼料
5，床敷，エアフィルターは 121°C 30分，飲水
は 121°C 90分で滅菌を行なった。

GFマウスの無菌検査は，月に1回定期的
におよび実験直前に各アイソレーターにつき
2～3匹のマウスの新鮮糞便数個をチオグリ
10コール酸塩培地（TGC，栄研），クックド
ミート培地（CM，栄研），ハートインヒュ
ジョンブロス（HI，栄研），ポテトデキス
トロースブロス（PD，栄研）に接種し，T
15GCとCMは 37°C と室温，HIは 37°C ，PD
は室温で14日間観察し，また糞便を直接塗抹
してグラム染色をほどこした後，鏡検した。

普通化したGF（GF-CV）マウスは，上
記GFマウスをアイソレーターから出して（
20 ex-germfree（ex-GF）マウス）他の動物が飼

(8)
育されていらい動物室で飼育交配して得た1
ないし2代目の子孫を用いた。4~6週齢時
にアイソレーターから出されたextGFマウス
は、8週齢でケージ当り雄1匹と雌2匹を7
日間同居させ、再び1匹ずつ別のケージに移
した。仔マウスを3~4週齢で離乳させた後
再び雄雌を同居させた。この方法でそれぞれ
の雌から3腹づつ仔をとり、2回目に出産し
たグループを次の代の親とし、同様の方法で
さらに次の代のマウスを得た。GF-CVマウ
スは、滅菌したケージ、床敷、エサ(オリエ
ンタル酵母K.K., Type NMF)なすべに飲
水で飼育し、4~6週齢(雄,雌)で使用し
た。

対照として、上記CF#1-GFマウスと由来
を同じくする国立予防衛生研究所の普通環境
で飼育生産されたCF#1-CVの4~6週齢(雄,雌)を用いた。

GF-CVなすべにCVマウスは、E. coli O
115 a,c:K(B)による汚染のないうことを2週間に

9

1 度定期的に存するに実験直前につきの方法
で確認した。新鮮糞便を1mlの滅菌リン酸緩
衝液 (PBS, pH: 7.0) に懸濁させ, その1
白金耳をDHL寒天 (栄研) に塗抹し, 37°C
好氣的に1夜培養し, 発育したコロニー形態
5 を観察し, コロニー中心部が桃色濁 (ピンク
ポイント) を特徴あるコロニーの出現を調べ
た。疑わしいコロニーは E. coli 0115 a,c :K (B) の
Ex30株をクロムワクチンとしてウサギに免疫
して得た抗血清を用いスライド凝集反応 (23
10) を行なうと同時に生物性状検査 (45) を行
ない確認した。この検査で本菌に汚染した疑
いのあるものはなかった。また, 予研繁殖
場のCF#1コロニーでは本菌の汚染は認めら
れていないと連絡を受けた (中川, 私信)。

15 GF+CVマウスの無菌化 (GF+CV+GFマ
ウス) : GF+CVマウス雄1匹, 雌2匹から
なる13組を8週齢で同居させ7日間毎日朝と
夜に膣栓を調べ, 交尾を確認された雌マウス
20 を別ケージで1匹ずつ飼育した。交尾確認後

19日目(出産直前)に頸椎脱臼により殺し、
 2%過酢酸と70%アルコールで体表を滅菌し
 た後子宮を無菌的にとり出し、2%過酢酸の
 液槽を通してビニールアイソレーターに入れ
 胎仔を取り出した。過酢酸液槽とアイソレー
 ター底面は37°Cに保った。取り出した胎仔は
 哺乳中のGF-CF#1マウスに里子として育て
 させた。

ex-GFマウスの作出：ex-GFマウスは、GF
 FマウスにGF-CVマウスの糞便懸濁液ある
 いはそれをミリポアフィルターで伊過滅菌し
 たものを経口投与、またはGF-CVマウスと
 同居させて作出した。詳細は成績の項に記述
 した。

投与菌なすべに投与方法：われわれが腸粘
 膜肥厚症の自然発症例の盲腸内容物より分離
 したE. coli O115 a,c:K(B)のEx-30株を0.5%寒天
 加普通ライオンに突刺し、37°C 18時間培養し
 た小試験管を多数-20°Cに保存しておき、使
 用のために1本ずつ融かし、その1白金耳を

20

(11)

3 ml の普通ブイヨンに接種した。これを 37°C
1 夜培養し、その 0.5 ml を普通ブイヨン 4.5
ml に加え 37°C 2 時間半振盪培養した。この方
法で得られるブイヨン 1 ml あたりの生菌数は
5 ほぼ 3.5×10^8 コであった。この菌液をマウス当
り 0.2 ml ずつ 1 ml の注射筒にとり付けた金属性
胃カテーターを用いて経口投与した。

生菌数の算定：糞便，胃，小腸上部，小腸
下部，盲腸，直結腸，肝臓，脾臓，肺，腎臓
10 ，前腸間膜リンパ節および心血についで生菌
数を検索した。糞便以外の試料は、クロロホル
ムで麻酔し注射器で心血を採取したあとの
マウスから無菌的に各臓器を取り出した。試
料は、滅菌 PBS を加えてガラスホモジナイ
15 ザーで磨砕し、糞便は 1:100，その他の臓器
は 1:10 の乳剤とした。この乳剤をいしその
10 倍段階希釈したものの 0.1 ml を DHL 寒天平
板に塗抹し、37°C 18 ~ 24 時間培養後出現した
集落を数えた。

20 組織学的検索：消化管各部位，肝臓，脾臓

、肺、腎臓、前腸間膜リンパ節を10%ホルマリンPBS (pH: 7.0) で固定してパラフィン包埋の後4~5 μ mの組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色をほどこし鏡検した。

3. 成績

(1) CVマウス, GFマウス, GF+CVマウスにおける感染の比較

臨床症状: GFマウスとGF+CVマウス15匹ずつ, CVマウス10匹にEx-30株を経口投与して, 感染後GFを5匹にGF+CVマウスは28日間, CVマウスは10日間観察した。

CVマウスは全例感染後10日目まで臨床的に何の異常もみられず, 10日目に殺して剖検したが肉眼的に何らの異常もみられなかった。GFマウス(病原大腸菌単独投与)はCVマウス同様, 菌投与後28日まで全例何らの症

状も示さず生残したのに反し，GF-CVマウスでは全例激しい症状を示した。すなわち，菌投与7日後から肛門部の汚れや腫脹が目立ち，脱肛もみられるようになった。この状態は日を追ってひどくなり，立毛・削瘦した。10日目以降下痢・血便を排し，12日目までに15匹中8匹が，14日目までに残り全部が死亡した (Table 1)。

肉眼病変：GFマウス20匹，GF-CVマウス25匹にEx-30株を投与し，GFマウスでは菌投与後1，3，5，7，14，28日に3～4匹を，GF-CVマウスでは1，3，5，7，10日に各5匹を殺して，肉眼病変の観察と後述の細菌学的検索に供した。

無症状に経過したGFマウスでも激しい症状を示したGF-CVマウスと同様，大腸に病変が認められた。しかしその程度は異っていた。肉眼病変の程度の判定は，大腸壁の肥厚の程度と範囲，大腸内容物の性状，粘膜面や漿膜面での出血，盲腸容積の減少を基準に4

段階(Ⅲ, Ⅱ, Ⅰ, 0)に分けた (Table 2)。

GF, GF-CVマウスとともに菌投与後5日から一部のマウスで大腸壁に肥厚がみられ, 病変は日を追って重くなり盲腸容積は縮少した (写真1)。GFマウスでは14日目には全例大腸壁の肥厚がみられたが, Ⅲの病変は認められなかった。28日目まで剖検したものでは病変は見られず, 菌投与前のGFマウスと肉眼的に違いはなかった。GF-CVマウスでは (写真2), 一部のマウスで7日目から病変はGFマウスに比べて著明に存り, Ⅲの病変, つまり盲腸容積の極度の縮少, 粘膜面や漿膜面の出血, 内容物の消失がみられた (Table 3)。

GF, GF-CVマウスとともに大腸以外には病変は認められなかった。

細菌学的検索: 上記10匹のCVマウスについて糞便中の投与菌数を経日的に検索した。投与菌数は投与後5日目に $10^6/g$ で最大となったのち減少消失した。Ex-30株投与前よりマウスに定着していた乳糖分解型の大腸菌は終始

$10^5 \sim 10^6/g$ 程度に検出された (Table 4)。

GF マウスでは，投与翌日に糞便および大腸から $10^8 \sim 10^9/g$ の菌が検出され，28日後まで大きく変動することはなかった。胃，小腸では個体差が著しいが，胃では $10^3 \sim 10^9/g$ ，小腸上部では $10^4 \sim 10^7/g$ ，小腸下部では $10^5 \sim 10^8/g$ が終始検出された。また，肝臓，脾臓，肺，前腸間膜リンパ節では菌投与5～7日を最高値として $10^3 \sim 10^4/g$ が検出され，28日にはほとんど検出されなかった。心血からは $10^1 \sim 10^2/ml$ が菌投与5～14日に検出され，腎臓からはまれに菌が検出されるだけであった。

GF-CV マウスでは，糞便および大腸での投与菌の検出はGF マウスより遅く，菌投与5日後に $10^8/g$ 以上の菌数となり，観察終了の10日まで持続した。消化管以外の臓器と血液からは菌投与5日目にほぼ全例より投与菌が検出され，10日目まで持続したが $10^5/g$ 以上に達することはなかった (Fig.1)。

組織学的検索：GF マウス18匹，GF-CV

マウス 15 匹に Ex-30 株を投与し、GF マウスは菌投与後 1, 3, 5, 7, 14, 28 日に、GF-CV マウスは 1, 3, 5, 7, 10 日にそれぞれ 3 匹づつを殺して病理組織学的検索を行った。

GF マウスでは、菌投与後 5 日から病変がみられ、粘膜上皮細胞の過形成および粘膜固有層、粘膜下織に軽度の好中球を主とした細胞浸潤がみられた。また粘膜下織に水腫もみられた。7 日後では菌苔の付着をともなって巣状に軽度の粘膜剝離がみられたが、病巣周囲の細胞反応はわづかであった(写真 3)。

14 日後にはなお瘰癧がみられたが、粘膜固有層や粘膜下織では線維芽細胞の増生が著明であった。28 日後では一部のマウスで粘膜下織に軽度の細胞浸潤がみられたが、上皮には異状は認められなかった。特に盲腸では、菌投与前のものと組織像でほとんど違いがみられなかった。

GF-CV マウスでも菌投与 5 日目から著し

(17)

い上皮細胞の過形成がみられたが、これに加
えて痙攣形成、粘膜固有層や粘膜下織に著明
な好中球を主とした細胞浸潤がみられた(写
真4)。7日目、10日目と病変は激しさを増
し、強度の痙攣が出現した。輪走筋層の肥厚
もGFマウスに比べて激しかった。一部のマ
ウスに潰瘍や筋層での出血や細胞浸潤もみら
れた。

(2) GF-CVマウスから作られたGF-CV
-GFマウスでの感染

GF-CVマウスの著しい病変の発現が、GF
-CVマウスに随伴している細菌叢に基づくも
のであるかどうかを知るため、GF-CVマウ
スを帝王切開で取り出しGFマウスとしたGF
-CV-GFマウス4匹、GFマウス4匹、GF
-CVマウス8匹にEx-30株 10^7 コを経口投与し
、7日後に2~3匹、残りを4週後に殺して
大腸病変と糞便、脾臓での投与大腸菌数を検

索した。

結果は Table 5 に示した。GF-CV-GFマウスとGFマウスは病原大腸菌投与に対してまったく同様の反応を示した。すなわち、菌投与7日目まで殺した2匹ずつの大腸病変は十か
 5 十で、糞便中の投与大腸菌数はいずれも $10^9/g$ で、脾臓では $10^4/g$ であった。28日目まで殺したGF-CV-GFならびにGFマウスでは、糞便中の投与菌数はいずれも $10^9/g$ であったが、脾
 10 臓では $10^2/g$ 以下となり、肉眼的に大腸の病変はみられなかった。また、観察期間の28日後まで臨床症状はみられなかった。

(3) GFマウスから普通化したマウス(ex-GFマウス)での感染

GF-CVマウスにみられる激しい症状なら
 15 びに病変が、GF-CVマウスのもつ腸内菌叢によるものであることをさらに確かめるため
 20 に、GFマウスにGF-CVマウスの糞便投与

(19)

あるいはGFマウスとGF-CVマウスを同居
させてex-GFマウスを作出し、Ex-30株に対す
る感受性を検討した。ex-GFマウスは次の3
群を作出した。(A)GF-CVマウスの糞便
を滅菌PBSで1:100倍液とし、その0.5mlを
GFマウスに経口投与したもの。(B)(A)の
投与物を10000rpm10分間遠心後上清を0.45 μ m
のミリポアフィルターで除菌し、その0.5mlを
経口投与したもの。(C)GF-CVマウス2
皿をGFマウスを収容しているアイソレータ
ーに入れて同居させたものの3群とした。糞
便投与や同居後21日目に各群6皿づつのex-GF
マウスにEx-30株 10^7 を経口投与した。対照
として各6皿づつのGFマウスとGF-CVマ
ウスにも同様にEx-30株を投与した。各群とも
感染後7日目に3皿づつ殺して大腸病変を観
察し、糞便内投与大腸菌数を算定した。残り
3皿は28日目まで死亡を観察した。

結果はTable 6に示すように、A群、C群の
マウスはGF-CVマウス同様7日目で殺した

もので激しい病変を示し、残りは10日目まで
 に死亡した。糞便の上清注射液投与のB群では
 7日目に殺したものではGFマウス同様大腸
 病変は軽度でGF-CVマウスのように激しく
 なかった。残りのマウスは病原大腸菌投与後
 28日まで生き残り、この間下痢などの症状は
 みられなかった。糞便内投与大腸菌数は、7
 日目で殺したものでいづれの群でも $10^8 \sim 10^{9/2}$
 の高い値を示した。

4. 考 察

腸管感染においては、動物のもつ腸内菌叢
 が感染を修飾し、ある場合には感染を防禦し
 たり(2, 3, 4, 7, 10, 12, 13, 18, 19
 20, 22, 39, 40, 46, 48, 58, 65)、これと
 は逆に感染を助長すること(27, 35, 36, 37
 , 51, 53, 66, 70)はよく知られている。腸
 粘膜肥厚症においても本菌の経口感染に際し

哺乳マウスや抗生物質投与マウスが感受性が高いことから、本症の感染成立には腸内菌叢の関与が考えられていた(45, 54, 55)。今回、著者のGFマウスを用いた実験では、離乳後のGFマウスでも武藤ら(41)が離乳後のCVマウスについて記載したと同じ特徴を備えた病変、すなわち、組織学的に炎症反応が弱く粘膜上皮細胞の過形成が主体であり、しかも病変は大腸に限られていた。この結果から *E. coli* O115d,c:K(B) 単独で腸粘膜肥厚症が起ることが明らかとなった。しかし、同時にきわめて興味あることに、病原大腸菌の単独感染では死亡は起らないことも明らかとなった。

GFマウスの腸管には投与病原大腸菌が定着し、糞便中に投与翌日から長期間大量に検出されたが、CVマウスでは定着せず、糞便中から一過性に検出されるに止まった。このようなCVマウス腸管からの投与菌の排除は、他の腸管感染症 - *Vibrio cholerae* (10),

shigellae (10, 12, 13, 18, 19, 20, 48, 65)
)、salmonellae (2, 3, 4, 38, 39, 40),
Candida (7, 22, 46) — すでに報告され
ているように腸内菌叢による拮抗作用で説明
できるように思われる。

CVマウスと異なり、GF-CVマウスは感
染前には盲腸の形状がCVマウスと変ること
なく、しかも腸内菌叢をもつにもかかわらず
激しい病変を形成し、致死性の感染であった
。GF-CVマウスはGFマウスを他の動物の
いない動物室に移して飼育した子孫であるた
め、GF-CVマウスとCVマウスでは腸内菌
叢に違いがあることが考えられる。GF-CV
マウスの腸内菌叢には、CVマウスの腸内菌
叢に含まれている病原大腸菌の感染を阻止す
る菌群が欠けている可能性がこの差異の1つ
の説明に存ると思われる。

また、GFマウスでの感染では剖検で腸管
壁の肥厚がみられるにもかかわらず何らの症
状も示さず経過し、病変は治癒してしまった

感染増悪因子は腸内菌叢である可能性を支持すると考えられた。

GFマウスやGF+CVマウスにおいて、投与大腸菌が肝臓、脾臓、肺、血中から検出されたが、これらの臓器に病変はみられなかった。前島ら(29)は、非病原大腸菌をGFマウスに経口投与した実験で腸管以外の臓器から投与菌が検出されたと報告しており、今回の著者の実験でみられたGFマウスやGF+CVマウスの腸管以外の臓器への菌の侵入は、*E. coli* 0115a,c:K(B)の特殊な病原性によるものとは考えられない。

5. 小 括

E. coli 0115a,c:K(B)をC#1系の普通マウス(CVマウス)、無菌マウス(GFマウス)、および、GFマウスを普通化して繁殖して得たマウス(GF+CVマウス)に経口投与すると、CVなSびにGFマウスは投与後無症状

て死亡例もなかったが、GF+C Vマウスでは
下痢便、血便を排出して全例が菌投与後14日
までに死亡した。

C Vマウスでは全例大腸粘膜の異常がな
かったが、GF+C Vマウスでは著明な粘膜肥厚
が見られ粘膜面・漿膜面に出血もみられた。

GFマウスは発症しなかったにもかかわら
ず、出血を除いてGF+C Vマウスとほぼ同じ程
度の病変がみられた。組織学的には、GFマ
ウス、GF+C Vマウスともに主病変は粘膜上
皮の過形成で、加えてGF+C Vマウスでは粘
膜上皮の剥離、固有層の強い炎症反応がみら
れた。

糞便中の投与菌数は、C Vマウスでは投与
5日後に $10^6/g$ となり以後減少消失したが、GF
マウスでは投与翌日に、GF+C Vマウスで
は投与5日後にそれぞれ $10^8/g$ に達し、この菌
数はGFマウスでは28日後まで、GF+C Vマ
ウスでは14日目に死亡するまで持続した。

GF+C Vマウスを帝王切開によりあらため

て無菌化したマウス(GF+CV-GFマウス)の反応はGFマウスとほぼ同様であった。また、GF+CVマウスの糞便をGFマウスに投与して作出したex+GFマウスでは、GF+CVマウスと同様の重い症状、病変を呈した。

以上の結果から、マウスの腸内菌叢の様相によって病原大腸菌感染の防禦あるいは増悪がもたらされることが示唆された。

10

15

20

Table 1. Clinical observations of GF and GF-CV mice inoculated with pathogenic E. coli

Mice	Days after inoculation												
	1-5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16-28	
GF Survivors	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Prolapse of the anus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarrhea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarrhea with hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GF-CV Survivors	15	15	15	15	15	15	13	8	3	2	0	.	.
Prolapse of the anus	0	0	7	10	13	12	8	4	2	0	.	.	.
Diarrhea	0	0	0	0	1	2	2	2	0	2	.	.	.
Diarrhea with hemorrhage	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	.	.	.

Mice were orally inoculated with 10^7 cells of E. coli O115a, c: K(B)

Table 2. Grading of macroscopic lesion

Grade	Severity and extension of lesion	Intestinal contents	Hemorrhage	Size of the cecum
-	No lesion	Normal	No	Normal
+	Mild and localized	Normal	No	Normal
++	Severe	Soft and decreased volume	No	Contracted
+++	Severe	Almost no contents	Yes	Severely contracted

Table 3. Macroscopic lesions of the intestine of GF and GF-CV mice inoculated with pathogenic E. coli

Mice		Days after inoculation						
		1	3	5	7	10	14	28
GF	No. of mice examined	4	3	3	3	0	3	4
	Grade of the lesions	-	4 ^{a)}	3	0	0	0	4
		+	0	0	1	0	0	0
		++	0	0	2	3	0	3
		+++	0	0	0	0	0	0
GF-CV	No. of mice examined	5	5	5	5	5	0	0
	Grade of the lesions	-	5	5	3	0	0	0
		+	0	0	2	1	0	0
		++	0	0	0	3	0	0
		+++	0	0	0	1	5	0

Mice were orally inoculated with 10^7 cells of E. coli O115a,c:K(B)

a) No. of mice showing the graded lesion

Table 4. Viable counts^{a)} of E. coli in the feces of CV mice after oral inoculation with pathogenic E. coli

	Days after inoculation				
	1	3	5	7	10
<u>E. coli</u> 0115a, c: K(B)	^{b)}	4.2	6.2	3.7	-
Nonpathogenic <u>E. coli</u>	5.7	4.8	5.5	5.1	6.1

Mice were orally inoculated with 10^7 cells of E. coli 0115a, c: K(B).

- a) Mean of 3 mice (log/g).
 b) Negative (less than 10^3 /g).

Table 5. Susceptibility of GF mice obtained by hysterectomy from GF-CV mice against oral inoculation with pathogenic E. coli

Mice	Days after infection	Mortality	Microscopic intestinal lesions			Viable counts of inoculated <u>E. coli</u>	
						in feces	in spleen
GF-CV-GF	7	0/2	+ ^{a)}	++		9.4(9.2-9.5) ^{b)}	4.4(4.3-4.5)
	28	0/2	-	-		9.3(9.2-9.3)	> 2.0
GF-CV	7	0/3	+++	+++	+++	9.5(9.5-9.6)	5.1(4.8-5.2)
	28	5/5			N.D. ^{c)}	N.D.	N.D.
GF	7	0/2	++	++		9.5(9.4-9.5)	4.0(3.8-4.2)
	28	0/2	-	-		9.4(9.3-9.4)	> 2.0

Mice were orally inoculated with 10^7 cells of E. coli 0115a, c: K(B).

- a) Grade of the lesion (See Table 2) in individual mice.
- b) Average number (range) in log/g (N = 2 or 3).
- c) Not done because of death.

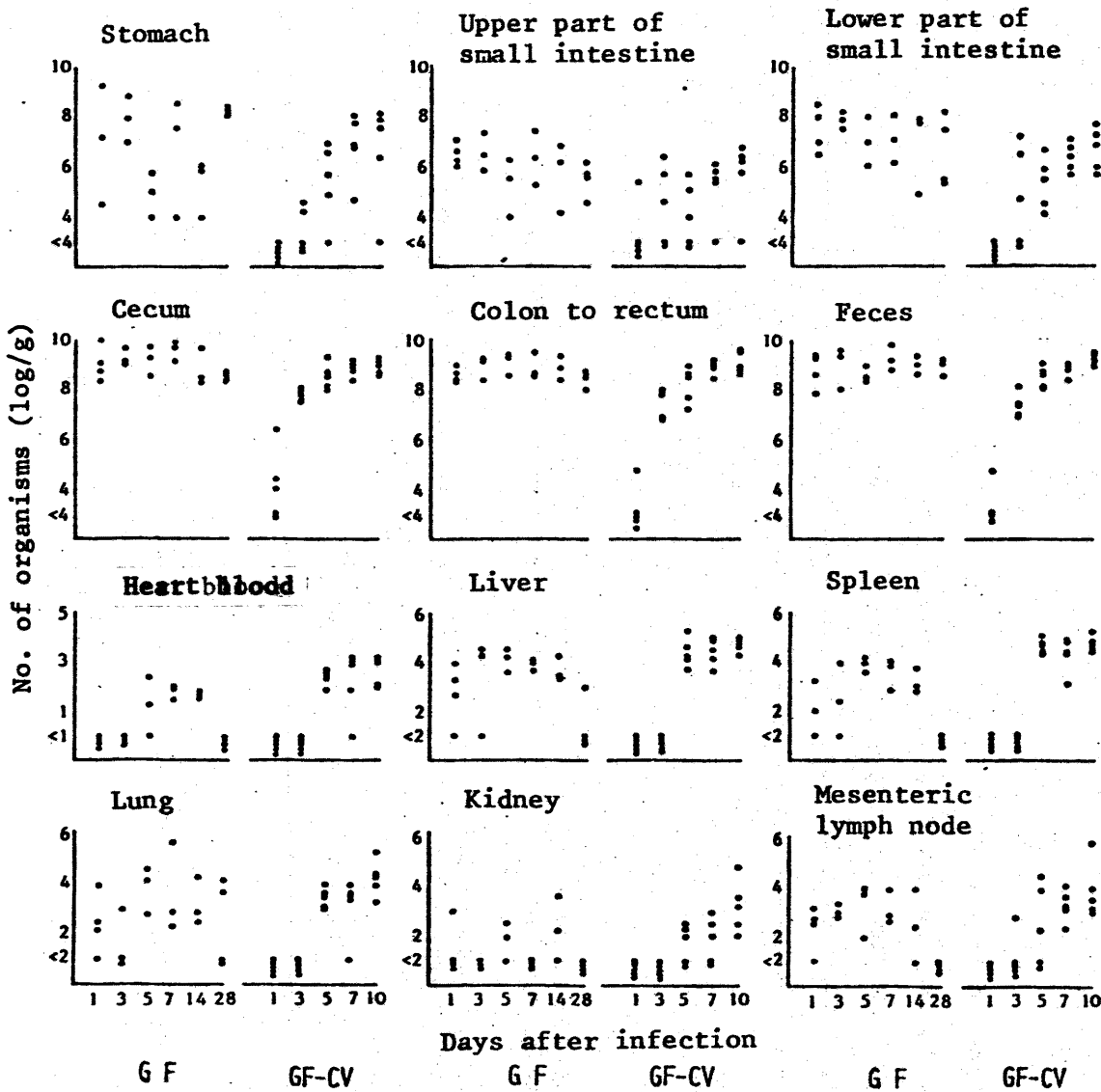


Fig. 1. Viable counts of the inoculated organism in various parts of GF and GF-CV mice. Mice were orally inoculated with 10^7 cells of *E. coli* O115a,c:K(B).

Table 6. Susceptibility of ex-GF mice contaminated with GF-CV mice against pathogenic E. coli infection

Group	Mice	Contamination procedures	Mice killed 7 days after infection			Viable counts of inoculated <u>E. coli</u> in feces	Time to death in days
			Intestinal lesions				
A	Ex-GF	Oral administration of homogenated feces	++ ^{a)}	++	++	8.8(8.0-9.3) ^{b)}	9.0(9.0-9.0) ^{c)}
B	Ex-GF	Oral administration of bacteria-free filtrate	+	+	+	9.0(8.9-9.2)	> 28.0
C	Ex-GF	Housing with GF-CV mice in isolator	++	++	++	9.2(9.0-9.4)	9.7(9.0-10.0)
D	GF	-	++	++	+	9.0(8.8-9.2)	> 28.0
E	GF-CV	-	++	++	++	9.2(9.0-9.4)	9.0(8.0-10.0)

Three weeks after contamination, mice were inoculated orally with 10^7 cells of E. coli 0115a, c: K(B).

a) Grade of the lesions (See Table 2) in individual mice.

b) Average number (range) in log/g (N = 3).

c) Average of 3 mice (day, N = 3).

第2章. 飼育環境と感受性

1. 小 序

前章では，マウスのもつ腸内菌叢が病原大腸菌の感染に対して，それまでに報告されていたような感染防御作用(45, 54)ばかりでなく，感染を増悪することもあることが明らかとなった。

この章では，マウス腸粘膜肥厚症の発病に影響を与える要因のうち飼育環境による感受性の違いを検討するために，SPF環境ならびに普通環境の種々の系統のマウスに病原大腸菌を投与して，感受性の比較を行なった。

2. 材料と方法

マウス：SPF環境(barrier system)で飼育された動物として，医科研で繁殖されたCF#1とDDD，静岡実験動物農場のSLC：ICR，日本クレアのJCL：ICRならびに三共株式会社袋井工場のRFVLを用いた。CV環境(open system)で飼育された動物として医科研ならびに予研のCF#1，医科研のDDDを用いた。マウスはそれぞれ4～8週齢(雄，雌)で実験に使用した。

各群10ないし20匹のマウスは消毒した動物室に搬入後フィルターキャップを被せたアルミケージに5匹ずつ分けて飼育した。ケージ，床敷，エサ(オリエンタル酵母K.K.，Type，NMF)ならびに飲水はGFマウス同様に高圧滅菌したものを与えた。

GFマウスは，前章と同様医科研で繁殖維持されているCF#1を用いた。

ex-GFマウスは，ビニールアイソレーター内に4～6週齢のGFマウス6匹と上記の種々の系統のSPFまたはCVマウス2匹を3

週間同居させて作出した。

G F ならびに ex-G F マウスの飼育は前章に記載した方法で行なった。

投与菌ならびに投与方法：前章同様に，腸粘膜肥厚症自然例の盲腸より分離した E. coli 0115a, c:K (B) の Ex-30 株を用いた。マウスへの投与は，普通グイヨン培養菌 $10^9/ml$ を胃カテテルを用いて 1 匹あたり 0.2 ml ずつ経口投与した。SPF と CV マウスは動物室に搬入後直ちに投与した。

生菌数の算定：直腸内容物または糞便中の投与菌数を前章同様 D H L 寒天培地を用いて算出した。

肉眼病変の検索：前章で記載したように，検索マウスの大腸壁の肥厚の程度，大腸内容物の性状，盲腸容積，大腸粘膜ならびに漿膜の出血により 卍，卍，十，一 の 4 段階として記録した。

3. 成績

(1) SPFマウスおよび普通マウスの感染
の比較

5 系統+飼育環境の異なるCF#1, DDD,
ICR, RFVLの8群のマウスに病原大腸
菌 5×30 株 10^7 を経口投与し、半数を投与後7
日目に、残り半数を14日目に殺して腸病変な
らばに糞便または直腸内容物中の投与大腸菌
10 数を検索した。なお14日目までに死亡したも
のについては、死亡後直ちに開腹し腸病変を
確認した。

15 結果はTable 7に示した。CF#1-SPFとD
DD+SPFでは病原大腸菌投与後14日まで生
残したものはなく、いずれも腸病変がみられ
糞便内投与大腸菌数も高かった。これに反し
て、CF#1-CVとDDD+CVでは死亡するも
のはなく、両系統とも腸病変はみられな
20 かった。投与大腸菌数はDDD+CVでは投与後7
日目, 14日目ともに $10^{5/8}$ 以下で、CF#1+CV

ても大部分 $10^5/g$ 以下でしかも 7 日目より 14 日
 目で菌数ならずに $10^5/g$ 以上を示す個体の比率
 は低くなり投与大腸菌は排除される傾向がみ
 られた。SPF環境で飼育されているにもか
 かかわらずSLC:ICRとJCL:ICRは
 投与後14日まで死亡するものはなく、SLC
 :ICRマウスの菌投与後7日目と14日目に
 1匹ずつ病変がみられた以外は病変は認めら
 れなかった。投与大腸菌数はJCL:ICR
 では投与7日目で $10^6/g$ であつたが、14日目で
 は $10^5/g$ 以下であつた。一方、SLC:ICR
 では 10^{11} ~ $10^8/g$ の菌数が投与後7日目、14日目
 とともに検出された。RFVL-SPFでもIC
 R-SPF同様に死亡例はなく、病変もみられ
 なかった。糞便中の投与大腸菌数ならずに 10^5
 $/g$ 以上の菌数を示す個体の比率は投与7日目
 より14日目で低下した。

(2) SPFあるいはCVマウスと同居させ
 普通化したextGFマウスの感染

4 ~ 6 週齡の C F # 1 - G F マウスに, C F # 1 - S P F, D D D - S P F, D D D - C V, J C L : I C R - S P F, R F V L - S P F の 5 種類
 のマウスをそれぞれ別々のアイソレーターで
 3 週間同居させて作出した各群 5 ~ 6 匹の ex - G F マウスに Ex-30 株を経口投与した。6 匹
 の C F # 1 - G F マウスを対照においた。

菌投与後の死亡率, 腸病変の程度ならびに
 糞便内投与大腸菌数を検索した結果を Table 8
 に要約した。J C L : I C R - S P F, C F # 1 - S P F, D D D - S P F と同居させた ex - G F
 マウスでは, 菌投与 7 日目で大腸に卍の病変
 がみられ, 糞便内投与菌数も高く 14 日目まで
 にほとんどが死亡した。D D D - C V 同居群で
 は, 菌投与 7 日目, 14 日目のどちらにも病変
 はみられず, 糞便内投与菌数も 7 日目で $10^{5/8}$
 , 14 日目で $10^{5/8}$ 以下となり結局排除された。
 R F V L - S P F 同居群では, 投与菌は定着し
 , 死亡例もみられたが, 腸病変は 7 日目で 1

(40)

／3例に十の病変がみられただけで残りの2
／3例では病変はみられなかった。14日目では全例卅の病変がみられた。

4. 考 察

無菌動物に由来し、微生物学的に制御された環境で飼育されるSPFマウスの腸内菌叢は、CVマウスに比べ単純な構成であることが報告されている(31, 72)。このような飼育環境の異なるマウスで、E. coli O115a,c:K(B)の感染に感受性の差がみられるかどうかを検討した。

その結果、SPF環境で飼育されたマウスはCV環境で飼育されたマウスより強い感受性を示した。この現象はC#1とDDDの2系統でみられ、これらの系統ではCVマウスでは投与菌が定着せず発病しなかったが、SPFマウスでは致死的な感染であった。しかしSPFでもICRとRFVLの2系統では

致死の感染はみられなかった。

CF#1-GFマウスからsex-GFマウスを作出して行なう実験で、SPFマウスと同居させたsex-GFマウスは、腸内菌叢の供給マウスが病原大腸菌に感受性を示さないJCL:ICRやRFVLの腸内菌叢を受けたマウスも含め全てGFマウスより激しい病変を示して死亡した。このことは、SPFでありながら病原大腸菌の感染に感受性を示さなかったICR系統のマウスは遺伝的にCF#1あるいはDD

一方、DDD-CVマウスと同居させたsex-GFマウスでは病原大腸菌の感染が成立しなかった。感受性の高かったDDD-SPFマウスはこの実験が行なわれる約1年前にDDD-CVマウスから帝王切開により作出されたものでDDD-CVとDDD-SPFとの間に遺伝的な違いが起ったことは考え難く、このDDD-CVとDDD-SPFマウスの感受性の違いは腸内菌叢の違いによるものと思われる。

5. 小 括

種々の系統のSPFマウスとCVマウス、
ならべに、これらのマウスと同居させたCF
5 #1+GFマウス(ex+GFマウス)に、E. coli O
115a,c:k(B)10¹¹コを経口投与して、感受性の比較
を行なった。

DDDとCF#1のSPFマウスでは全例が
10 投与後14日までに死亡したが、同系のCVマ
ウスは発病せずに投与菌は定着しなかった。

しかし、ICRとRFVLのSPFではDD
D、CF#1のSPFマウスにくらべて感受性
が低かった。このように同量の菌の経口接種

15 後の反応について見ると、低感受性のICR

やRFVLのSPFマウスと同居させてえた

CF#1+ex+GFマウスはDDD・CF#1のSP

Fマウスと同居させてえたex+GFマウスと同

様、激しい症状を示して死亡したが、DDD

20 のCVマウスと同居させてえたCF#1+ex+GF

マウスは発病せず菌は定着しなかった。

以上の結果から、SPF環境で飼育されたマウスの腸内菌叢はCV環境で飼育されたマウスの腸内菌叢と異なり、病原大腸菌の感染を防禦できず重い症状、病変をもたらすことが示唆された。

10

15

20

Table 7. Susceptibility of mouse strains from barrier sustained (SPF) or conventional (CV) source against pathogenic E. coli strain

Strains	Mice Status	Source	Days after infection	Mortality	Intestinal lesions	Viable counts of pathogenic <u>E. coli</u> in the feces
CF#1	SPF	I.M.S.	7	0 / 5 ^{a)}	5 / 5 ^{b)}	8.5 ± 0.3 ^{e)} (100) ^{e)}
			14	5 / 5	5 / 5	N.D. ^{d)}
CF#1	CV	I.M.S.	7	0 / 5	0 / 5	< 6.5 (80)
			14	0 / 5	0 / 5	< 5.1 (20)
CF#1	CV	N.I.H., Japan	7	0 / 5	0 / 5	< 5.9 (40)
			14	0 / 5	0 / 5	< 5.0 (0)
DDD	SPF	I.M.S.	7	0 / 10	9 / 10	8.2 ± 1.2 (100)
			14	10 / 10	10 / 10	N.D.
DDD	CV	I.M.S.	7	0 / 10	0 / 10	< 5.0 (0)
			14	0 / 10	0 / 10	< 5.0 (0)
JCL:ICR	SPF	CLEA	7	0 / 10	0 / 10	< 5.9 (70)
			14	0 / 10	0 / 10	< 5.0 (0)
SLC:ICR	SPF	Shizuoka	7	0 / 10	1 / 10	7.5 ± 0.6 (100)
			14	0 / 10	1 / 10	7.9 ± 0.9 (100)
RFVL	SPF	Sankyo	7	0 / 4	0 / 4	< 7.5 (75)
			14	0 / 5	0 / 5	< 6.2 (60)

Mice were inoculated with 10^7 cells of E. coli O115a,c:K(B).

- a) No. dead / no. tested
- b) No. positive / no. tested
- c) Mean ± S.D. (log / g)
- d) Not done because of death
- e) Mean with % positive at 10^{-5} dilution in parenthesis

Table 8. Susceptibility to infection with pathogenic E. coli in ex-germfree mice cage-mated with SPF or conventional mice

Donor mice of flora		Days after infection	Mortality	Intestinal lesions	Viable counts of pathogenic <u>E. coli</u> in feces
Strains	Status				
CF#1	SPF	7	0 / 3 ^{a)}	+++ , +++ , +++ ^{b)}	8.7 (8.1 - 9.4) ^{c)}
		14	3 / 3	+++ , +++ , +++	N.D. ^{d)}
DDD	SPF	7	0 / 3	+++ , +++ , +	8.7 (8.0 - 9.0)
		14	3 / 3	+++ , +++ , +++	N.D.
DDD	CV	7	0 / 2	- , -	5.0 (4.6 - 5.5)
		14	0 / 3	- , - , -	< 5.0
JCL:ICR	SPF	7	0 / 3	+++ , +++ , +++	9.0 (8.7 - 9.3)
		14	2 / 3	+++ , +++ , +++	8.9
REVL	SPF	7	0 / 3	+ , - , -	7.7 (7.3 - 8.0)
		14	1 / 3	+++ , +++ , +++	9.6 (9.3 - 10.0)
-	-	7	0 / 3	++ , ++ , ++	9.4 (9.2 - 9.5)
		14	0 / 3	++ , ++ , ++	9.4 (9.4 - 9.5)

Germfree mice were cage-mated with SPF or conventional mice in an isolator and 3 weeks later orally inoculated with E. coli O 115a, c: K(B).

- a) No. dead / no. tested
- b) Grade of the lesions
- c) Mean number (range) in log/g (N: 2 or 3)
- d) Not done because of death

第3章. 系統と感受性

1. 小序

前章において、病原大腸菌の感染に対する感受性がマウスのもつ腸内菌叢ばかりでなくマウスの系統による個々の感受性によっても異なることが示唆された。しかし、腸粘膜肥厚症の発病が腸内菌叢によりいろいろに修飾されることも同時に明らかにされたので、S P H や C V マウスのように腸内菌叢を保有するマウスを用いて系統による感受性の比較を行なうのは困難であり、マウス個々の感受性を検討するには、腸内菌叢をもたないG H マウスでの研究が必要と考えられる。

そこでこの章では、前章において低い感受性を示したICRと高い感受性を示したCH

#1のGFマウスに病原大腸菌を投与して感受性の違いを比較し、腸粘膜上皮への病原大腸菌の付着性という観点から感受性の違いを検討した。

2. 材料と方法

マウス：GFマウスは、医科研で繁殖維持しているCF#1と日本クレアより購入したICRを4～6週齢（雄，雌）で使用した。ex-GFマウスは、第1章で記載したCF#1-GFマウスを普通化して繁殖維持しているGF-CVマウスをビニールアイソレーター内でCF#1-GFまたはICR-GFと同居させて作出した。GFマウスならびにex-GFマウスはビニールアイソレーター内で飼育し、エサ（オリエンタル酵母K.K., Type NMF）、飲水は第1章に記載した方法で高圧滅菌したものを与えた。

投与菌ならびに投与方法：腸粘膜肥厚症自

然発症例の盲腸より分離した *E. coli* 0115 a, c: K(B) の Ex-30 株を用いた。この株の普通グイヨン培養液 ($10^8/ml$) を胃オテールを用いてマウス 1 匹あたり 0.2 ml ずつ経口投与した。

投与菌の検索：感染マウスの消化管各部位、肝臓、脾臓、腎臓、肺、前腸間膜リンパ節、心血、糞便の生菌数を第 1 章に記載した方法に従って検索した。大腸壁の菌数は、マウスをクロロホルムで麻酔後開腹し盲腸と直結腸に分けて切開しそれぞれ約 40 ml の滅菌 PBS (pH: 7.0) で内容物を洗い落した。これを 3 回くり返した後余分な水分を滅菌した濾紙で軽く吸いとり秤量して PBS を加え、ガラスホモジナイザーで磨碎して 10 倍液としたものを試料原液とした。

病理学的検索：肉眼病変は、第 1 章に記載したように病変の程度を 4 段階 (卅, 卅, 十, -) に分けた。

消化管各部位、肝臓、脾臓、肺、腎臓、前腸間膜リンパ節を 10% 中性ホルマリン PBS

(49)

(pH:7.0)で固定してパラフィンに包埋の後
4~5 μ mの組織標本を作製し、ヘマトキッリ
ン・エオジン染色ならびに1.5%カルボール・
千オニン染色をほどこした。

5 蛍光抗体法: Ex+30株のクロムワク4ンをウ
サギに接種して作製した抗 *E. coli* 0115a,c:K(B)
ウサギ血清に川村の方法(26)に従って flu-
orescein-isocyanate (FITC) をラベルし
た。グロブリンによる直接法で行った。大
10 腸を冷アセトンで凍結しクリオスタットで4
~5 μ mの切片としたものをFITCでラベ
ルした抗 *E. coli* 0115a,c:K(B)血清に4°Cで18
~24時間反応させた。これを3回PBSで洗
ったのち、蛍光顕微鏡で観察した。

3. 成績

(1) ICR-GFマウスでの感染

18 ICR-GFマウス15匹に病原大腸菌Ex+30株

を投与し、投与後28日まで観察したが下痢、死亡はみられなかった。

次いでICR-GFマウス18匹にEx+30株を投与して、投与後1, 3, 5, 7, 14, 28日に各3匹ずつ殺して肉眼病変を調べるとともに消化管各部位ならびにその他の臓器の生菌数を検索した。投与後5, 7, 14日目には盲腸の一部にのみ腸壁の肥厚がみられたが(写真5), 28日目には何ら変化がみられなかった。Fig. 2に示したように、菌投与翌日から糞便、大腸での投与大腸菌数は $10^8 \sim 10^9/g$ に達し、この菌数は28日後まで持続した。大腸以外の消化管での菌数は、実験期間の28日を通して、胃では $10^5 \sim 10^8/g$ 、小腸上部では $10^3 \sim 10^7/g$ 、小腸下部では $10^4 \sim 10^7/g$ であった。肝臓、前腸間膜リンパ節、脾臓、心血では投与3~7日後に一部のマウスで $10^2 \sim 10^3/g$ の菌が検出されたが、腎臓と肺からはまったく検出されなかった。

つづいて、12匹のICR-GFマウスに病原

大腸菌を投与し、さきの実験と同じ間隔で2匹ずつ殺して組織病変を検索した。投与後5, 7, 14日目に殺したもので肉眼的に壁の肥厚のみられた盲腸の一部にのみ弱い炎性反応をともなう粘膜上皮細胞の過形成がみられた(写真6)。

(2) ICR-GFなすべにCF#1+GFマウスでの病原大腸菌の腸上皮付着性の比較

ICR-GFマウス30匹とCF#1+GFマウス30匹に病原大腸菌を経口投与して、投与後1, 3, 5, 7, 14, 28日に各3匹ずつ殺し大腸内容物ならびに盲腸, 直・結腸壁の投与大腸菌数を検索した。

ICR-GF, CF#1+GFマウスともに内容物の菌数は28日間を通じて $10^8 \sim 10^9/g$ を維持した。ともに病変のみられた盲腸壁の菌数は両者に差はみられず、投与後3~7日目に $10^8 \sim 10^9/g$, 14日と28日には $10^6 \sim 10^7/g$ であった。直

・結腸壁の菌数は、直・結腸に病変のみされた C F # 1 - G F マウスと病変のみされなかった I C R - G F マウスとに差がみられ、前者では盲腸壁と同様に投与後 3 ~ 7 日で $10^8 \sim 10^9/g$ 、14 日で $10^7 \sim 10^8/g$ 、28 日で $10^6/g$ であった。後者では、投与後 1 ~ 3 日で $10^7/g$ 、5 ~ 7 日で $10^8/g$ 、14 ~ 28 日で $10^6 \sim 10^7/g$ であった (Fig. 3)。

また、日を追って 2 匹ずつ殺し、盲腸なすべに直・結腸上皮への投与病原大腸菌の付着をキオニン染色と蛍光抗体法を用いて検索した。C F # 1 - G F マウスでは、菌投与 3 日後に管腔に面した上皮細胞に菌体の付着がみられた (写真 7)。投与 7 日後では、絨毛の根部にまで菌体の付着がみられた (写真 8, 9)。

このように菌体が上皮細胞に付着した像は、壁の生菌数が低い値を示した投与後 14 と 28 日ではみられなかった。I C R - G F マウスでは、病変のみされなかった直・結腸壁で菌投与 1 ~ 28 日の間、菌体の上皮細胞への付着像はみられなかった。

(3) ICR-GFなすびにCF#1-GFマウス
を普通化した場合の感染

ICR-GFマウス10匹とCF#1-GFマウス
9匹を同一アイソレーター内で、GF-CVマ
ウスと21日間同居させて作出したex-GFマウ
スに、病原大腸菌を経口投与した。投与後7
日目に両群とも5匹ずつ、残りのマウスは4
日目に殺して糞便内投与菌数と肉眼病変を検
索した。

Table 9に示すように、CF#1-ex-GFマウス
では菌投与7日目で殺したもので3例に $\#$ 、
2例に $\#$ の病変がみられ、糞便中の投与大腸
菌数は $10^9/g$ であった。菌投与14日までに残り
の4匹は死亡し、腸病変は全て $\#$ であった。
これに反してICR-ex-GFマウスでは菌投与
7日と14日に殺した各5匹に大腸病変はみら
れなかった。また、糞便中の投与大腸菌数は
投与7日目には $10^8/g$ であったが、14日目では

$10^6 \sim 10^{7/2}$ に減少した。

4. 考 察

武藤ら(42)は、哺乳中のCVマウスを用いた実験で、われわれは前章に記したように離乳後のSPFマウスを用いた実験で、E. coli 0115 a, c. K(B)の感染はマウスの系統により感受性が異なることを見出したが、しかしその差異を説明しうる知見は得られていなかった。今回は、まず腸内菌叢の影響を受けないGFマウスを用いて、系統による感受性の違いを検討した。

今回の研究で、病原大腸菌はICR-GFマウス、CF#1-GFマウスのどちらの腸管にも定着できるが、病変形成の範囲が両者で違いがみられた。つまり、CF#1-GFマウスでは大腸全域に腸壁の肥厚を示す病変がみられたが、ICR-GFマウスではこの特徴的病変が盲腸の一部に限局されていた。このような両

者の病変部の広がりの違いが、腸管以外の臓器での菌数の違いに反映しているように思えた。ICR-GFマウスでは第1章に記載したCF#1-GFマウスに比べ脾臓や肝臓での菌数が低く、その他の臓器を含めて検出率が著しく低かった。

大腸壁の菌数を検索したところ、病変のみられたCF#1-GFマウスの盲腸と直・結腸、ICR-GFマウスの盲腸では、大量のPBSで壁を強く洗って内容物を取り除いたあとでも高い菌数が検出されたが、病変のみられなかったICR-GFマウスの直・結腸では、壁を洗って内容物を取り除いたあとでは低い菌数しか検出されなかった。これと一致してキオニン染色と蛍光抗体法を用いた組織学的検索においても、高い菌数の検出されたCF#1-GFマウスの盲腸と直・結腸ならびにICR-GFマウスの盲腸の粘膜上皮への菌の付着がみられた。しかし、ICR-GFマウスでは菌の付着が盲腸粘膜上皮の一部に限られ、培

養で低い菌数しか検出されなかった直・結腸
では菌の付着はみられなかった。腸管感染の
病原菌では感染成立の第1段階として粘膜上
皮に付着するという多くの報告(52, 58, 64
5)があり, 他の腸管感染や尿路感染でも感受
性の高い動物の粘膜上皮細胞には病原菌がよ
く付着すると報告されている(14, 61)。マ
ウス腸粘膜肥厚症においても感染の成立には
腸粘膜への病原大腸菌の付着が重要であると
考えられる。また, 中川ら(44)は病変形成
10には粘膜上皮での病原大腸菌の増殖が必要で
あると報告している。病原大腸菌が付着する
腸粘膜部位が限局されていることがICR-G
Hマウスの低い感受性と関係していることは
充分考えられよう。マウスの週齢による病原
15大腸菌に対する感受性の違いは, 大腸菌が付
着可能な部位の広さによることも考えられよ
う。つまり, 高い感受性を示す哺乳マウスで
は小腸と大腸に病変が形成されるが感受性の
低い成熟マウスでは大腸のみに病変を形成す
20

る(41)ことへの1つの仮説として、マウスの成長に伴う腸管粘膜上皮の病原大腸菌の付着をゆるぎ性質の変化が挙げられるように思われる。他の病原大腸菌で研究されている粘膜上皮細胞のレセプター(1, 15, 47)など

菌投与14日目ではCF#1-GF, ICR+GFマウスともに大腸に病変がみられ糞便中には高い菌数で大腸菌が検出されるにも関わらず盲腸壁の菌数は14日目で急激に減少した。

病理組織学的検索で菌投与14日目では粘膜上皮への菌の付着はみられず、粘膜固有層や粘膜下織に線維芽細胞の増生がみられた。Vibrio cholerae (11, 60)やブタの病原大腸菌(43)の実験感染で、免疫されていない動物では投与菌が腸管粘膜上皮に付着するが免疫された動物では付着はみられない。しかし腸管内容物中の投与菌数は両者に違いがないと報告されている。今回のCF#1-GFとICR-GFマウスの病原大腸菌の感染では免疫学

的な検討を十分には行なっていないが、菌投
 与14日目と28日目には血清中に抗大腸菌抗体
 が検出できる。粘膜上皮からの菌の遊離には
 免疫学的な機序が関与している可能性がある
 と思える。

GF-CVマウスと同居させて得たCF#1-ex
 -GFマウスは感染がCF#1-GFマウスに比
 べて増悪されたが、同じGF-CVマウスと同
 居させて得たICR-ex-GFマウスでは感染が
 増悪されることなく投与病原大腸菌は容易に
 定着できずむしろ排除される傾向にあった。

JonesとRutter(25)は、無菌ブタの腸管粘
 膜上皮に付着できないう菌は普通ブタに投与し
 てもその動物のもつ腸内菌叢により定着でき
 ずに排除されると報告している。ICRマウ
 スの場合、普通化するにより定着した腸
 内菌叢があとから投与された病原大腸菌が盲
 腸粘膜上皮の一部に限局された感受性部位へ
 付着することを阻止したと考えられる。一方
 CF#1-ex-GFマウスではこの系統のマウスの

5

10

15

20

(59)

もつきわめて広範な感受性部位が他の菌種が
存在するにもかかわらず病原大腸菌が粘膜上
皮に付着する機会をより多く提供して、その
ためICR+GFマウスでみられたような阻
止機構は十分に発揮されなかったのではない
かと考えられる。

5. 小 括

ICR+GF, CF#1+GFマウスに病原大腸
菌 *E. coli* O115a:c:k(B)10⁷ ユ を経口投与してその感
受性を比較検討した。CF#1+GFマウスは重
い症状、病変を示したが、ICR+GFマウス
では、病変が盲腸の一部に限局し、消化管以
外の臓器からはほとんど投与大腸菌が検出さ
れなかった。

投与菌の腸粘膜付着性を検討すると、CF
#1+GF, ICR+GFマウスともに大腸内容物
は常に高い菌数を維持した。病変陽性のCF
#1+GFマウスでは盲腸壁と直・結腸壁が、I

(60)
C R-G F マウスでは盲腸壁が、投与後3~7
日に高い菌数を示し14日以降では低かった。
腸壁の菌数が高いときには粘膜上皮への菌の
付着が組織学的にも確認された。これに反し
て、病変陰性のI C R-G F マウスの直・結腸
壁では菌数は常に低く、粘膜上皮への菌の付
着はみられなかった。

C F #1-G F マウスを高感受性のG F-C V マ
ウスと同居させて腸内菌叢を定着させた後接
種すると、重い病変の形成を見たが、同様に
してえたI C R-ex-G F マウスでは接種後病変
が形成されず死亡例もなかった。

以上の結果から、マウス系統による感受性
の差は、病原大腸菌が付着する腸粘膜の範囲
により規定され、このような系統差は腸内菌
叢の影響を受けるものと考えられた。

Fig. 3. Viable counts of *E. coli* O115a,c:K(B) in contents and walls of large intestine of two infected GF strains.

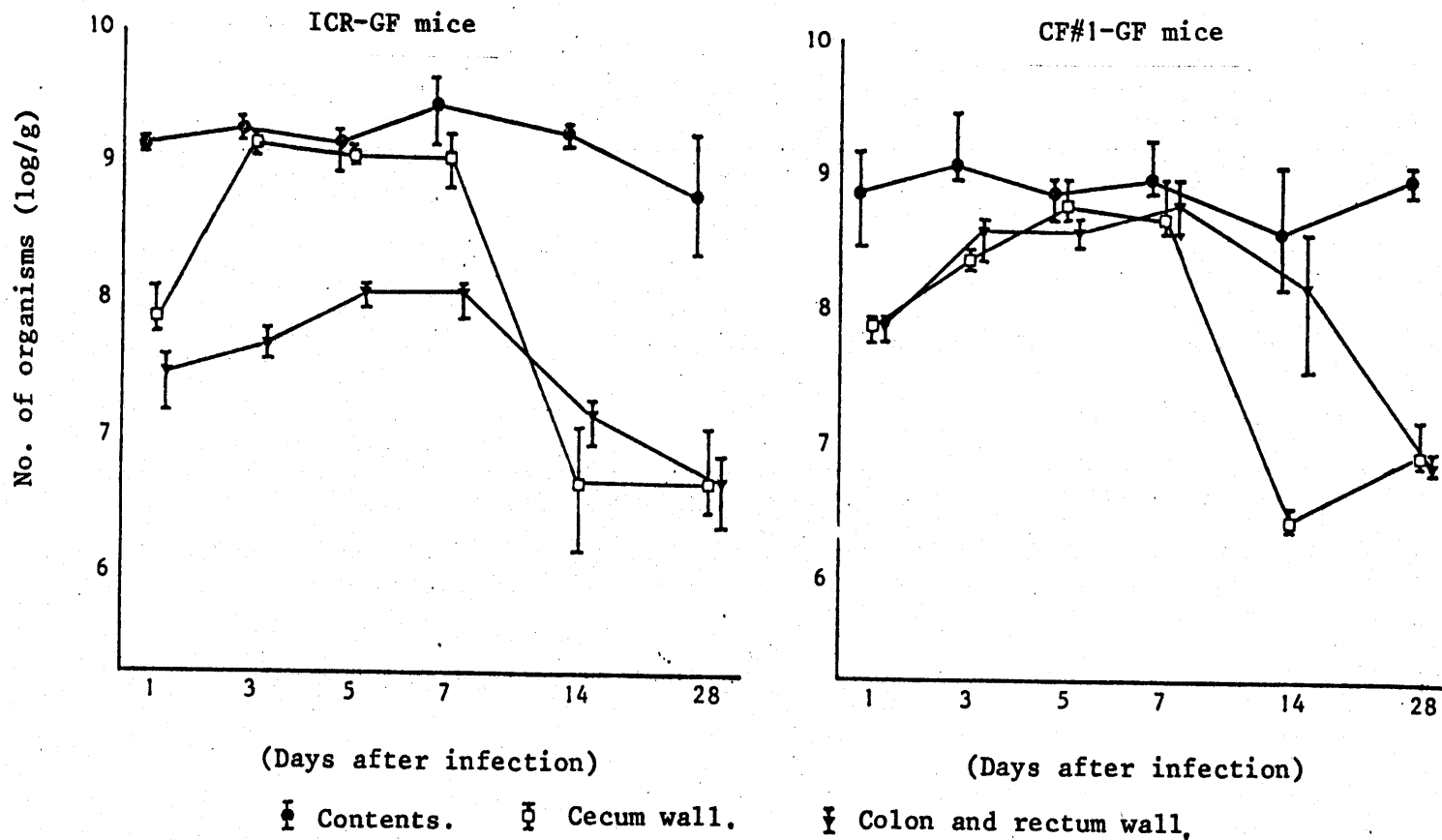


Table 9. Response of two ex-GF strains after cage-mating with GF-CV mice to oral infection with pathogenic E. coli

Mice	Days after infection ^{a)}	Mortality	Intestinal lesions ^{b)}	Viable counts of pathogenic <u>E. coli</u> in feces
ICR-ex-GF	7	0/5	- - -	8.2 ± 0.5 ^{c)}
	14	0/5	- - -	6.9 ± 1.3
CF#1-ex-GF	7	0/5	++ ++ ++	9.1 ± 0.2
	14	4/4	++ ++ ++ ++	N.D. ^{d)}

a) Mice were orally inoculated with 10^7 cells of E. coli O115a,c:K(B).

b) Grade of the lesion in individual mice examined at 7 and 14 days postinfection.

c) Mean ± S.D. (log/g).

d) Not done because of death.

第4章. 菌の粘膜上皮付着性と腸内菌叢

1. 小序

第1章において、マウス腸粘膜肥厚症ではマウスのもつ腸内菌叢が起因病原大腸菌の感染を修飾し、ある場合には大腸菌の定着を阻止して発病を防ぎ、また他の場合にはこれとは逆に激しい病変を形成して下痢を起させ死亡させることを明らかにした。第2章、第3章において本症はマウスの系統により感受性が異なり、これには腸内菌叢の影響以外に、マウスの系統による恐らく遺伝的な感受性の差異がありその性質は大腸粘膜上皮への病原大腸菌の付着部位の拡ガリの違いによることを明らかにした。

この章では、病原大腸菌感染の第一段階が

腸管粘膜上皮への菌の付着にあることが前章
 で推測されたので、この過程を腸内菌叢がど
 のように修飾しているかを検討した。まず、
 病原大腸菌感染に抵抗性である DDD-CV と
 感受性の DDD-SPF のそれぞれの糞便投与
 後に病原大腸菌を経口投与し、腸壁と腸内容
 の菌量と病変の発現を比較した。つぎに感受
 性系 GF マウスの CF#1-GF マウスを用いて
 、病原大腸菌投与後種々の時期に感染マウス
 をアイソレーターから出して普通化あるいは
 糞便投与を行なってその影響を調べた。

2. 材料と方法

マウス：GF マウスは、医科研で繁殖維持
 している CF#1 マウスを 4~8 週齢（雄、雌）
 ）で使用した。

ex-GF マウスは、医科研の DDD-CV ある
 いは DDD-SPF マウスの糞便を PBS (pH
 :7.0) で 100 倍液としたものをマウス 1 匹あ

たり0.5mlずつ胃カテーテルを用いて経口投与して作出した。ex-GHマウスの飼育はGHマウスの飼育方法と同様に行なった。

病原大腸菌を単独投与したGHマウス(E-GBマウス)の普通化は、ビニールアイソレーターから取り出して他のC#1のCVマウスのいる動物室に搬入して行なった。搬入後の飼育はCVマウスと同様に行ない、滅菌した床敷の入ったアルミケージでエサ、飲水は滅菌することなく自由に与えた。

投与菌ならびに投与方法：E. coli 0115 a, c: K(B)のEx30株の普通ブイヨン培養菌10⁹/mlを胃カテーテルを用いてマウス1匹あたり0.2mlずつ経口投与した。菌の培養は第1章に記載した方法で行なった。

投与菌の検索：糞便中の投与菌数は第1章に記載した方法に従って検索した。

内眼病変の検索：第1章に記載したように病変の程度を4段階(卍, 卐, 十, 一)に分けた。

(67)

腸内菌叢の検索：前島ら(32)の記載した方法に従って、Enterobacteriaceae、Streptococcus、Staphylococcus、Lactobacillus、Bacteroidesならびに酵母を選択培地を用いて菌数を算出した。大腸壁の検索は、第3章に記載した方法で内容物を洗い落したあと行なった。

3. 成績

(1) DDD-SPFあるいはDDD-CVマウスの糞便投与により作出したex-GFマウスでの感染

GFマウスと同居させるとそのex-GFマウスが病原大腸菌の感染を阻止するようになる。DDD-CVマウスの糞便、これとは逆に感染を増悪するようになるDDD-SPFマウスの糞便を各10匹ずつのCF#1-GFマウスに投与し、21日後に病原大腸菌を投与した。Table 10は

病原大腸菌投与後7日目に各群5匹ずつを殺して大腸の内容物ならびに壁の菌叢を検索した結果を示した。病原大腸菌はD D D-C V マウスの糞便を投与した群では内容物、大腸壁とともに $10^4 \sim 10^5/g$ 、D D D+S P F マウスの糞便を投与した群ならびに糞便を投与しない対照群では内容物、大腸壁とともに $10^8 \sim 10^9/g$ の菌数であった。病原大腸菌以外の大腸菌群もD D D+S P F マウスの糞便を投与した群ではD D D-C V マウスの糞便を投与した群に比べて高い菌数であったが、病原大腸菌と異なりどちらの群も糞便中の菌数が大腸壁の菌数の約100倍であった。大腸菌群以外に菌群では両群のマウスに差はみられなかったが、いずれの菌群でも非病原大腸菌群同様に糞便中の菌数が大腸壁の菌数の約100倍の値であった。

残りの各群5匹ずつを病原大腸菌投与後4日まで観察したところ、Table 11に示すようにD D D+C V マウスの糞便を投与して作出したex+G F マウスでは病原大腸菌は十分に定着で

きず、軽い肉眼病変のみられる個体もあつた
 が下痢などの症状はみられず死亡するものも
 なかった。DDD-SPFマウスの糞便を投与
 して作出したex-GFマウスでは激しい病変を
 形成して病原大腸菌投与後14日までに全例下
 痢を呈して死亡した。病原大腸菌単独投与マ
 ウスでは投与菌は定着し病変もみられたが下
 痢などの症状はみられず死亡するものもなか
 った。

(2) 病原大腸菌投与GF(E+GB)マウス
 の普通化ならびに糞便投与の影響

GFマウス42匹にEx-30株を投与後1, 3,
 5, 7, 14, 28日に6匹または8匹を1群と
 してアイソレーターから取り出して(普通化
)その生死を普通化後21日まで調べた。結果
 はTable 12に要約した。病原大腸菌投与後1~7
 日の間に普通化したE+GBマウスではいづれ
 も普通化後4.3~5.1日で下痢を呈して死亡した

が、病原大腸菌投与後14日または28日に普通化したマウスは全て21日まで生残した。これらの生残マウスは投与病原大腸菌は排除され他の菌種が腸内に定着した(Table 13)。

次に、病原大腸菌投与後5日と14日に、D D D-C VならびにD D D-S P Fマウスの糞便を投与して生死を調べ、糞便投与7日後に殺して大腸病変と糞便内病原大腸菌数を検索した。各群の糞便投与の時期を同じにして、1つの糞便試料から分けて投与した。また各群とも対照に糞便を投与しないE-G Bマウスをおいた。各群5匹づつのマウスを用いた。病原大腸菌投与後5日目に糞便を投与したE-G Bマウスでは投与した糞便の由来にかかわらず、病原大腸菌単独投与マウスに比べ激しい症状を呈した。D D D-C Vマウスの糞便を投与したE-G Bマウスは糞便投与7日後までに全例死亡し、D D D-S P Fマウスの糞便を投与したE-G Bマウスは糞便投与7日後まで1匹死んだだけだったが、生残した4匹も下痢を

(11)
呈し、人死の状態であった。これとは逆に、
病原大腸菌投与後14日目に糞便を投与したE
-GBマウスでは、投与した糞便の由来にか
かわらず病原大腸菌数は減少し、いずれのマ
ウスも下痢、死亡はみられなかった(Table 14).

4. 考 察

腸内菌叢の病原大腸菌の感染に及ぼす修飾
作用を腸粘膜上皮への病原大腸菌の付着性へ
の影響という観点から検討した。今回行なっ
た大腸壁と内容物の菌数の比較で、感染を防
禦する腸内菌叢をもったマウスでは壁、内容
物とも病原大腸菌数は低くおさえられ、感染
を防禦できなかつたマウスでは壁、内容物と
も多量の病原大腸菌が検出された。しかし他
の菌群と違って壁と内容物の菌数に著しい差
がなく感染が防禦されたマウスでもわずかに
はあるが上皮細胞への病原大腸菌の付着があ
ったものと思われる。内容物中での菌数を低

くおさえることで壁の菌数が低くなるのか、
それとも壁の菌数をおさえることで内容物中
の菌数が低くなるのかは不明である。また前
章のGFマウスへの病原大腸菌の単独投与の
場合に壁と内容物の菌数はかならずとも一致
せず、病変形成には壁の菌数が高いことが必
要であったことを考えると、腸内菌叢による
病原大腸菌感染の防禦には病原大腸菌の粘膜
上皮への付着ならびに増殖を他の菌が阻止す
ることによることが強く示唆されたと思われ
る。しかし、DDD-CVマウスの糞便の病原
大腸菌の感染阻止にはDDD-SPFマウスに
は存在しない特定の菌種の関与が考えられる
が、この点は今後の問題として残された。

つぎに、病原大腸菌感染の経過のどの時期
に腸内菌叢の影響が現われるかを知るため、
あらかじめ病原大腸菌を投与されたE-GBマ
ウスを時期をかえて普通化することを試み、
また病原大腸菌投与前にGFマウスに投与し
ておくとその感染を阻止するDDD-CVマウ

5 スの糞便や感染を増悪するD D D-S P H マウス
スの糞便を病原大腸菌投与後に時期を変えて
投与して、感染への影響を検討した。

5 G H マウスへ病原大腸菌を単独投与した場合、粘膜上皮に菌の付着がみられる菌投与7
日目までに普通化したE-G B マウスは全例死
亡したが、菌の付着のみられなくなる菌投与
14日以後に普通化したE-G B マウスは全例生
残し、糞便中の病原大腸菌数は著しく減少し
た。これらのE-G B マウスはアイソレーター
10 から取り出したのち同じ動物室で普通化され
たもので、死亡した群と生残した群とで異な
った菌叢が定着したとは考えにくく、むしろ
病原大腸菌が粘膜上皮に付着して病変が形成
15 されているときに他の菌が定着した場合に病
状が増悪され、粘膜上皮への付着がみられな
くなり病変が治癒に向っているときには他の
菌が定着し病原大腸菌が排除されたものと思
われる。どのような種類の菌がこの場合の感
20 染増悪に働くかはわからないが、病原大腸菌

(74)
投与前にGFマウスに投与すれば感染を阻止
するDDD+CVマウスの糞便でも増悪作用が
みられたので、特定の種類の菌によるもので
はないのではないかと思われる。これとは逆
に前投与すると感染を増悪させるDDD+SP
5 GFマウスの糞便でも、病原大腸菌が付着しな
くなくなった時期に投与すれば病原大腸菌は排除
され、腸内菌叢の作用は病原大腸菌が粘膜に
付着する時点でのみ修飾作用を示すことが示
唆された。

10 病原大腸菌投与14日目以後に普通化あるいは
は糞便を投与されたE-GBマウスにみられる
病原大腸菌の排除は、Vibrio cholerae (62)
や Salmonella typhimurium (68) の感染など
15 で報告されている腸内菌叢による拮抗作用と
前章で指摘した特異免疫成立の共同作用で説
明できるものと思われる。

20 腸内菌叢による感染増悪の機序について考
えてみると、第1章で行なった実験から腸内
菌叢をもたないGFマウスでは軽度の粘膜上

皮細胞の剝離と弱い炎症反応がみられるが主
病変は腸管粘膜上皮細胞の過形成で正常時に
は crypt にしかみられない未分化な細胞が粘
膜上皮の大部分を占める。このようなGFマ
ウスでは下痢などの症状は示さず死亡するも
5 のもない。これに反して腸内菌叢をもつGF
-CVマウスではGFマウスにみられた病変
の他に激しい粘膜上皮細胞の剝離と強度の炎
性反応がみられ、下痢をして死亡する。つま
り、激しい粘膜剝離や下痢の発現に腸内菌叢
10 が関与していると考えられた。今回行なった
実験では、粘膜上皮細胞に病原大腸菌が付着
して上皮細胞の過形成が進行している時期に
E-GBマウスを普通化したり糞便を投与する
と、GF-CVマウス同様の激しい症状ならべ
15 に病変を形成して死亡することが示された。
この結果から、病原大腸菌が粘膜上皮に付着
することによりたんに上皮細胞の過形成が起
るのみでなく、過形成上皮細胞じたいも正常
時には crypt にしかみられない未分化な形態
20

を示す細胞に変わっており、このような異常な状態の細胞が腸内菌叢により傷害を受けやすいため、粘膜剥離や下痢の発現になったという推定が可能のように思われる。

5

5. 小 括

本病発病機序において重要な粘膜付着性と腸内菌叢との関係をCF#1+ex+GFマウスを用いて検討した。抵抗性のD/D+CVマウスの糞便を投与したex+GFマウスでは、大腸壁の病原大腸菌数は低かったが、症状・病変の重いD/D+S/Pマウスの糞便を投与したex+GFマウスでは大腸壁の菌数は高い値を示し、腸内菌叢の存在によって大腸壁での病原大腸菌の増殖がおさえられるように思われた。また、CF#1+GFマウスに病原大腸菌を単独投与後普通化したところ、投与後7日までに普通化したGFマウスはすべて死亡したが、投与後14日に普通化したGFマウスは生残し、

10

15

20

(77)

投与菌は排除されていた。これに加えて、菌
投与後5日目のC#1+GFマウスにDDD+S
PFあるいはDDD+CVマウスの糞便を接種
すると、重い感染がおこったが、投与後14日
目に糞便を接種したGFマウスでは病原大腸
菌は排除された。このように、病原大腸菌の
腸粘膜付着時に腸内菌叢が存在すると、感染
が増悪することが示唆された。

10

15

20

20×20

Table 10. Comparison of fecal organisms in contents and wall of large intestine of ex-GF mice on day 7 after inoculation with pathogenic E. coli

Donor of feces	Sample	Viable counts of floral organisms						
		<u>E. coli</u>	<u>Enterobacteriaceae</u>	<u>Streptococcus</u>	<u>Staphylococcus</u>	Yeasts	<u>Lactobacillus</u>	<u>Bacteroides</u>
CV mice	Contents	4.9±0.8 ^{a)}	4.7±0.5	6.3±0.4	3.9±0.6	- ^{b)}	8.8±0.5	8.9±0.4
	Wall	<5.0(4) ^{c)}	<3.0(2) ^{d)}	3.8±0.4	-	-	6.6±0.3	7.0±0.4
SPF mice	Contents	9.5±0.4	8.5±0.6	7.7±0.5	4.4±0.6	-	8.1±0.6	9.1±0.8
	Wall	8.8±0.2	6.3±0.6	5.6±0.6	<3.8(1) ^{d)}	-	5.6±0.5	7.5±0.2
NO feces	Contents	9.5±0.1	-	-	-	-	-	-
	Wall	8.9±0.1	-	-	-	-	-	-

a) Mean ± S.D. (log/g, N=5)

b) Negative (less than $10^3/g$)

c) Mean (No. of positive culture in 10^{-5} g-feces)

d) Mean (No. of positive culture in 10^{-3} g-feces)

Table 11. Susceptibility of ex-GF mice against pathogenic E. coli infection

Donor of feces	Mortality	Grade of the lesions				Viable counts of inoculated <u>E. coli</u> in feces
		-	+	++	+++	
CV mice	0/5 ^{a)}	3 ^{b)}	2	0	0	7.0 ± 0.6 ^{c)}
SPF mice	5/5	0	0	0	5	N.D. ^{d)}
-	0/5	0	0	5	0	9.1 ± 0.3

a) No. death/No. tested.

b) No. of mice.

c) Mean ± S.D. (log/g).

d) Not done because of death.

Table 12. Mortality of E-GB mice after conventionalization.

	Days of conventionalization after inoculation					
	1	3	5	7	14	28
Mortality	8/8 ^{a)}	8/8	8/8	6/6	0/6	0/6
Time to death after inoculation	6.5 ^{b)}	8.9	10.1	11.3	35<	49<
Time to death after conventionalization	5.5	5.1	5.1	4.3	21<	21<

a) No. death / No. tested.

b) Mean (days).

Table 13. Fecal flora of conventionalized E-GB mice

Days of conventionalization after inoculation	Days after conventionalization	Viable counts of floral organisms						
		<u>Pathogenic E. coli</u>	<u>Enterobacteriaceae</u>	<u>Streptococcus</u>	<u>Staphylococcus</u>	Yeasts	<u>Lactobacillus</u>	<u>Bacteroides</u>
14	7	5.6 ± 0.9 ^{a)}	- ^{b)}	6.6 ± 0.2	7.0 ± 0.6	-	8.2 ± 0.3	7.4 ± 0.6
	14	<3.5 (2) ^{c)}	-	5.5 ± 0.2	5.2 ± 0.1	-	8.0 ± 0.3	8.5 ± 0.3
28	7	<3.4 (2)	N ^{d)}	N	N	N	N	N
	14	-	N	N	N	N	N	N

a) Mean ± S.D. (log/g, N = 3).

b) Negative in 10⁻³g-feces of all mice.

c) Mean with no. of positive culture in 10⁻³g-feces.

d) Not examined.

Table 14. Susceptibility of E-GB mice against inoculation with feces from SPF or CV mice

Days of inoculation with feces after infection	Donor of feces	Mortality	Grade of the lesions				Viable counts of pathogenic <u>E. coli</u> in feces
			-	+	++	+++	
5	CV mice	5/5 ^{a)}	0 ^{b)}	0	0	5	N.D. ^{c)}
	SPF mice	1/5	0	0	0	5	8.8 ± 0.6 ^{d)}
	-	0/5	0	0	5	0	9.2 ± 0.3
14	CV mice	0/5	2	0	3	0	<7.0
	SPF mice	0/5	2	3	0	0	5.6 ± 0.4
	-	0/5	0	3	2	0	8.8 ± 0.1

a) No. death/No. tested.

b) No. of mice.

c) Not done because of death.

d) Mean ± S.D. (log/g).

総括

大腸菌 *Escherichia coli* O115a,c:K(B) を原因とする
マウス腸粘膜肥厚症の発病に關与する要因に
5 ついては、系統による感受性の違いや、環境
とくに腸内菌叢の影響が考えられているが、
十分に解明されていない。本症は、2～3週
齡の乳のみマウスに多発し、下痢をともな
致死的であるが、マウスの週齡が進むにつれ
10 て発病率は低下し、発病しても死亡するもの
はほとんどないとされていた。著者は激しい
下痢をともな、て死亡する離乳後マウスでの
本症の流行に遭遇し、発病要因について無菌
動物を用いて検討し、発病機構の解明を行な
15 った。

まず、*E. coli* O115a,c:K(B) を C/H#1 系の普通マ
ウス (C/V マウス)、無菌マウス (GF マウ
ス)、および、GF マウスを普通化して繁殖
20 して得たマウス (GF+C/V マウス) に経口投

与すると、CVならびにGFマウスは投与後無症状で死亡例もなかったが、GF+CVマウスでは下痢便、血便を排出して全例が菌投与後14日までに死亡した。

CVマウスでは全例大腸粘膜の異常がなかったが、GF+CVマウスでは著明な粘膜肥厚が見られ粘膜面・漿膜面に出血もみられた。GFマウスは発症しなかったにもかかわらず、出血を除いてGF+CVマウスとほぼ同じ程度の病変がみられた。組織学的には、GFマウス、GF+CVマウスとともに主病変は粘膜上皮の過形成で、加えてGF+CVマウスでは粘膜上皮の剝離、固有層の強い炎症反応がみられた。

糞便中の投与菌数は、CVマウスでは投与5日後に $10^8/g$ となり以後減少消失したが、GFマウスでは投与翌日に、GF+CVマウスでは投与5日後にそれぞれ $10^8/g$ に達し、この菌数はGFマウスでは28日後まで、GF+CVマウスでは14日目に死亡するまで持続した。

20

GF+CV マウスを帝王切開によりあらためて無菌化したマウス (GF+CV+GF マウス) の反応はGF マウスとほぼ同様であった。また、GF+CV マウスの糞便をGF マウスに投与して作出したex+GF マウスでは、GF+CV マウスと同様の重い症状、病変を呈した。

以上の結果から、マウスの腸内菌叢の様相によって病原大腸菌感染の防禦あるいは増悪がもたらされることが示唆された。

つぎに、種々の系統のSPF マウスとCV マウス、ならびに、これらのマウスと同居させたCF#1+GF マウス (ex+GF マウス) に、*E. coli* 0115a,c:K(B)10⁷ を経口投与して、感受性の比較を行なった。

DDD と CF#1 の SPF マウスでは全例が投与後14日までに死亡したが、同系のCV マウスは発病せずに投与菌は定着しなかった。しかし、ICR と RFVL の SPF ではDDD, CF#1 の SPF マウスにくらべて感受性が低かった。このように同量の菌の経口接種

20

後の反応について見ると、低感受性のICR
 やRFVLのSPFマウスと同居させてえた
 CF#1+ex+GFマウスはDDD, CF#1のSP
 Fマウスと同居させてえたex+GFマウスと同
 様、激しい症状を示して死亡したが、DDD
 のCVマウスと同居させてえたCF#1-ex+GF
 マウスは発病せず菌は定着しなかった。

以上の結果から、SPF環境で飼育された
 マウスの腸内菌叢はCV環境で飼育されたマ
 ウスの腸内菌叢と異なり、病原大腸菌の感染
 を防禦できず重い症状、病変をもたらすこと
 が示唆された。

つぎに、マウスの系統による感受性の違い
 を検討するために、ICR+GF, CF#1-GF
 マウスに病原大腸菌 *E. coli* 01150, c:K(B)10⁷ を経
 口投与してその感受性を比較検討した。CF
 #1+GFマウスは重い症状、病変を示したが、
 ICR+GFマウスでは、病変が盲腸の一部に
 限局し、消化管以外の臓器からほとんど投与
 大腸菌が検出されなかった。

投与菌の腸粘膜付着性を検討すると、CF#1+GF、ICR+GFマウスとともに大腸内容物は常に高い菌数を維持した。病変陽性のCF#1+GFマウスでは盲腸壁と直・結腸壁が、ICR+GFマウスでは盲腸壁が、投与後3~7日に高い菌数を示し4日以降では低かった。腸壁の菌数が高いときには粘膜上皮への菌の付着が組織学的にも確認された。これに反して、病変陰性のICR+GFマウスの直・結腸壁では菌数は常に低く、粘膜上皮への菌の付着はみられなかった。

CF#1+GFマウスを高感受性のGF+CVマウスと同居させて腸内菌叢を定着させた後接種すると、重い病変の形成を見たが、同様にしてえたICR+ex+GFマウスでは接種後病変が形成されず死亡例もなかった。

以上の結果から、マウス系統による感受性の差は、病原大腸菌が付着する腸粘膜の範囲により規定され、このような系統差は腸内菌叢の影響を受けるものと考えられた。

最後に、本病発病機序において重要な病原大腸菌の粘膜付着性と腸内菌叢との関係をC#1-extGFマウスを用いた検討した。抵抗性のDDD+CVマウスの糞便を投与したex-GFマウスでは、大腸壁の病原大腸菌数は低かったが、症状、病変の重いDDD+SPFマウスの糞便を投与したex-GFマウスでは大腸壁の菌数は高い値を示し、腸内菌叢の存在によって大腸壁での病原大腸菌の増殖がおさえられるように思われた。

C#1+GFマウスに病原大腸菌を単独投与後普通化したところ、投与後7日までに普通化したGFマウスはすべて死亡したが、投与後14日に普通化したGFマウスは生残し、投与菌は排除されていた。これに加えて、菌投与後5日目のC#1+GFマウスにDDD+SPFあるいはDDD+CVマウスの糞便を接種すると、重い感染がおこったが、投与後14日目に糞便を接種したGFマウスでは病原大腸菌は排除された。このように、病原大腸菌の腸

(89)
粘膜付着時に腸内菌叢が存在すると、感染が
増悪することが示唆された。

以上の事実から、マウスの保有する腸内菌
叢の様相によって、E. coli 0115a,c:K(B)の感染発
病を阻止、あるいは増悪することが明らかに
された。また無菌マウスを用いた実験で、感
受性はマウスの系統によっても違いがあるこ
とも明らかにされ、この違いは大腸粘膜上皮
への菌の付着と関連があると思われた。腸内
菌叢のうちでどのような菌種が感染阻止ある
いは感染増悪に関与しているのか、また、粘
膜上皮のシセプターはどのようなものかにつ
いては今後の問題として残された。

今回得られた結果から、マウス腸粘膜肥厚
症の発病には、まず病原大腸菌が腸粘膜上皮
に付着・増殖する段階が重要であり、それは
腸内菌叢、マウス系統によって異なる腸管粘
膜上皮の病原大腸菌付着部位の範囲、あるい
は免疫機構の関与などにより左右されるよう

に思われる。一方、本症に特徴的な粘膜上皮細胞の過形成は、菌が粘膜上皮に付着後十分増殖した場合に起こるが、この場合正常時には crypt にしかみられないような未分化な細胞で粘膜面がおおわれるため、腸内菌叢による障害を受けやすく、剥離性の重い病変、症状を呈して死にいたると考えられる。

10

15

20

謝 辞

稿を終るにあたり、終始、御懇篤なる御指導を戴いた東京大学医科学研究所・藤原公策教授に深く謝意をあらわす。そして、この研究に御指導と御援助をいただいた東京大学医科学研究所・上田雄幹助教授ならびに慶応義塾大学医学部・前島一淑助教授に深く感謝する。また、無菌動物作出の技術的指導ならびに多くの御援助をいただいた鈴木潔助教授（東京大学医科学研究所実験動物研究施設）、本研究の遂行にあたり多くの御助言、御援助をいただいた中川雅郎博士ならびに武藤健博士（国立予防衛生研究所獣疫部）に感謝する。この研究は、主に東京大学医科学研究所獣医学研究部員の協力によってすすめられたことを明記し、各位に感謝をあらわす。

文 献

- [1] Aronson, M., Medalia, O., Schori, L., Mirelman, D., Sharon, N., and Ofek, I. (1979). Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl α -D-mannopyranoside. *J. Infect. Dis.*, 139, 329-332.
- [2] Bohnhoff, M., Drake, B.L., and Miller, C.P. (1954). Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental salmonella infection. *P.S.E.B.M.*, 86, 132-137.
- [3] Bohnhoff, M., Miller, C.P., and Martin, W.R. (1964). Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental salmonella infection. I. Factors which interfere with initiation of infection by oral inoculation. *J. Exp. Med.*, 120, 805-816.
- [4] Bohnhoff, M., Miller, C.P., and Martin, W.R. (1964). Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental salmonella infection. II. Factors responsible for its loss following streptomycin treatment. *J. Exp. Med.*, 120, 817-828.
- [5] Brennan, P.C., Fritz, T.E., Flynn, R.J., and Poole, G.M. (1965). *Citrobacter freundii* associated with diarrhea in laboratory mice. *Lab. Anim. Care*, 15, 266-275.

- [6] Cheever, F.S., and Mueller, J.H. (1947). Epidemic diarrheal disease of suckling mice. I. Manifestations, epidemiology, and attempts to transmit the disease. *J. Exp. Med.*, 85, 405-416.
- [7] Clark, J.D. (1971). Influence of antibiotics or certain intestinal bacteria on orally administered *Candida albicans* in germ-free and conventional mice. *Infect. Immun.*, 4, 731-737.
- [8] Derrick, E.H., and St. George-Grambauer, B.M. (1957). Megacolon in mice. *J. Pathol. Bacteriol.*, 73, 569-571.
- [9] Dykstra, D.D., and Reid, W.M. (1978). Effects on anaerobic bacteria on *Eimeria tenella* infection in bacteria-free, monofloral, and conventional chickens. *Poult. Sci.*, 57, 85-89.
- [10] Freter, R. (1956). Experimental enteric shigella and vibrio infections in mice and guinea pigs. *J. Exp. Med.*, 104, 411-418.
- [11] Freter, R. (1969). Studies on the mechanism of action of intestinal antibody in experimental cholera. *Texas Rep. Biol. Med.*, 27 (Suppl.) 299-316.
- [12] Freter, R., and Abrams, G.D. (1972). Function of various intestinal bacteria in converting germfree mice to normal state. *Infect. Immun.*, 6, 119-126.
- [13] Formal, S.B., Dammin, G., Spring, H., Kundel, D., Schneider, H.

- Horowitz, R.E., and Forbes, M. (1961). Experimental shigella infections. V. Studies in germ-free guinea pigs. J. Bacteriol., 82, 284-287.
- [14] Fowler, J.E.Jr., and Stamey, T.A. (1977). Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence. J. Urol., 117, 472-476.
- [15] Gibbons, R.A., Jones, G.W., and Sellwood, R. (1975). An attempt to identify the intestinal receptor for the K88 adhesin by means of a haemagglutination inhibition test using glycoproteins and fractions from sow colostrum. J. Gen. Microbiol., 86, 228-240.
- [16] Gledhill, A.W., and Rees, R.J.W. (1952). A spontaneous enterococcal disease of mice and its enhancement by cortisone. J. Exp. Pathol., 33, 183-189.
- [17] Gordon, H.A., and Pesti, L. (1971). The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. Bacteriol. Rev., 35, 390-429.
- [18] Hentges, D.J. (1967). Inhibition of Shigella flexneri by the normal intestinal flora. I. Mechanisms of inhibition by Klebsiella. J. Bacteriol., 93, 1369-1373.

- [19] Hentges, D.J., and Fulton, M. (1964). Ecological factors influencing the relationships between *Klebsiella* and *Shigella* in mixed culture. *J. Bacteriol.*, 87, 527-535.
- [20] Hentges, D.J., and Maier, B.R. (1970). Inhibition of *Shigella flexneri* by the normal intestinal flora III. Interactions with *Bacteroides fragilis* strains in vitro. *Infect. Immun.*, 2, 364-370.
- [21] Horton, R.E., Madden, D.L., and McCullough, N.B. (1970). Pathogenicity of *Clostridium perfringens* for germfree guinea pigs after oral ingestion. *Appl. Microbiol.*, 19, 314-316.
- [22] Huppert, M., Cazin, J.Jr., and Smith, H.Jr. (1955). Pathogenesis of *Candida albicans* infection following antibiotic therapy. III. The effect of antibiotics on the incidence of *Candida albicans* in the intestinal tract of mice. *J. Bacteriol.* 70, 440-447.
- [23] 医科学研究所学友会編(1958), 細菌学実習提要, 丸善, 東京, 207.
- [24] Iwai, H., Ishihara, Y., Yamanaka, J., and Ito, T. (1973). Effects of bacterial flora on cecal size and transit rate of intestinal contents in mice. *Japan. J. Exp. Med.*, 43, 297-305.

- [25] Jones, G.W., and Rutter, J.M. (1972). Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immune.*, 6, 918-927.
- [26] Kawamura, A. Jr. (1976). Fluorescent antibody techniques and their applications, 2nd ed, University of Tokyo Press and University Park Press, Tokyo and Baltimore.
- [27] Margard, W.L., and Peters, A.C. (1964). A study of gnotobiotic mice monocontaminated with *Salmonella typhimurium*. *Lab. Anim. Care*, 14, 200-206.
- [28] 前島一淑, 柏崎守, 上村文雄, 浦野徹, (1978) 滅菌操作. "実験動物のための無菌動物技術", 前島一淑, 柏崎守, 上村文雄編, ソフトサイエンス社, 東京, 45-74.
- [29] 前島一淑, 木内吉寛, 森田茂男, 田嶋嘉雄, 二木力夫, 川島由次, 岩井宏 (1970). 大腸菌単一汚染マウス (gnotobiot) における血清凝集抗体価; ならびに, 各臓器の組織像について. *実験動物*, 19, 141-148.

- [30] 前島一淑, 前島房子, 田嶋嘉雄, 奥木実
(1967). マウスの消化管内細菌に関する
検索. Ⅲ. 発育にともなう糞便菌数の変
化. 実験動物, 16, 20-25.
- [31] 前島一淑, 前島房子, 田嶋嘉雄, 野村達
次(1968). Gnotobiotic, SPF ならびに
Conventional ICR マウスの糞便菌そう
の検索, 実験動物, 17, 17-21.
- [32] 前島一淑, 前島房子, 武田善直, 田嶋嘉
雄(1966). マウスの消化管内細菌に関す
る検索. I. 培地の検討, 実験動物, 15,
54-67.
- [33] 前島一淑, 鈴木潔, 小林理造, 須藤カツ
子, 伊藤喜久治(1973). 東京大学医科学
研究所動物センター繁殖室に設置された
オートクレーブの滅菌条件に関する検討.
実験動物, 22, 31-36.
- [34] 前島一淑, 田嶋嘉雄, 野村達次(1970).
SPF. “実験動物学総論”, 田嶋嘉雄編,
朝倉書店, 東京, 257-267.

- [35] Meyer, R.C., Simon, J., and Byerly, C.S. (1974). The etiology of swine dysentery. I. Oral inoculation of germ-free swine with *Treponema hyodysenteriae* and *Vibrio coli*. *Vet. Pathol.*, 11, 515-526.
- 5 [36] Meyer, R.C., Simon, J., and Byerly, C.S. (1974). The etiology of swine dysentery. II. Effect of a known microbial flora, weaning and diet on disease production in gnotobiotic and conventional swine. *Vet. Pathol.*, 11, 527-534.
- 10 [37] Meyer, R.C., Simon, J., and Byerly, C.S. (1975). The etiology of swine dysentery. III. The role of selected gram-negative obligate anaerobes. *Vet. Pathol.*, 12, 46-54.
- [38] Meynell, G.G. (1963). Antibacterial mechanisms of the mouse gut. II. The role of Eh and volatile fatty acids in the normal gut. *Br. J. Exp. Pathol.*, 44, 209-219.
- 15 [39] Meynell, G.G., Subbaiah, T.V. (1963). Antibacterial mechanisms of the mouse gut. I. Kinetics of infection by *Salmonella typhimurium* in normal and streptomycin-treated mice studied with abortive transductants. *Br. J. Exp. Pathol.*, 44, 197-208.
- 20 [40] Miller, C.P., and Bohnhoff, M. (1963). Changes in the mouse's enteric microflora associated with enhanced susceptibility to

- Salmonella infection following streptomycin treatment. J. Infect. Dis., 113, 59-66.
- [41] Muto, T., Nakagawa, M., Isobe, Y., Saito, M., Nakano, T., and Imaizumi, K. (1969). Infectious megaenteron of mice. I. Manifestation and pathological observation. Japan. J. Med. Sci. Biol., 22, 363-374.
- [42] 武藤健, 斎藤学, 中野建司, 今泉清 (1966). マウスの腸粘膜肥厚症に関する研究. Ⅲ. 感染実験. 日獣誌, 28, 469-470.
- [43] Nagy, L.K., Bhogal, B.S., and Mackenzie, T. (1976). The effect of colostrum or past colibacillosis on the adhesion of *Escherichia coli* to the small intestine of the pig. Res. Vet. Sci., 21, 303-308.
- [44] 中川雅郎, 斎藤学, 武藤健, 今泉清, 小河秀正 (1970). マウス腸管内における *Escherichia coli* O115a,c:K(B) (マウス腸粘膜肥厚症原因菌) の増殖態度について. 日細菌誌, 25, 676.
- [45] Nakagawa, M., Sakazaki, R., Muto, T., Saito, M., Hagiwara, T.,

- and Imaizumi, K. (1969). Infectious megaenteron of mice. II. Detection of coliform organisms of an unusual biotype as the primary cause. Japan J. Med. Sci. Biol., 22, 375-382.
- [46] Nishikawa, T., Hatano, H., Ohnishi, N., Sasaki, S., and Nomura, T. (1969). Establishment of Candida albicans in the Alimentary tract of the germ-free mice and antagonism with Escherichia coli after oral inoculation. Japan. J. Microbiol., 13, 263-276.
- [47] Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N. (1977). Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature, 265, 623-625.
- [48] Osawa, N., and Mitsuhashi, S. (1964). Infection of germfree mice with Shigella flexneri 3a. Japan. J. Exp. Med., 34, 77-80.
- [49] Pappenheimer, A.M., Enders, J.F. (1947). An epidemic diarrheal disease of suckling mice. II. Inclusions in the intestinal epithelial cells. J. Exp. Med., 85, 417-422.
- [50] Phillips, A.W., and Balish, E. (1966). Growth and invasiveness of Candida albicans in the germ-free and conventional mouse after oral challenge. Appl. Microbiol., 14, 737-741.
- [51] Phillips, B.P., and Wolfe, P.A. (1959). The use of germfree guinea pigs in studies on the microbial interrelationships in

- amoebiasis. Ann. New York Acad. Sci., 78, 308-314.
- [52] Reed, W.P., and Williams, R.C.Jr. (1978). Bacterial adherence: First step in pathogenesis of certain infections. J. Chron. Dis., 31, 67-72.
- [53] Rutter, J.M., and Beer, R.J.S. (1975). Synergism between *Trichuris suis* and the microbial flora of the large intestine causing dysentery in pigs. Infect. Immun., 11, 395-404.
- [54] 斉藤学, 中川雅郎, 武藤健, 今泉清 (1969). マウスの腸粘膜肥厚症に関する研究. V. *Escherichia coli* 0115a,c:K? の腸内定着に及ぼすマウスの年齢及び腸内菌叢の影響. 日獣誌, 31, 30.
- [55] 斉藤学, 中川雅郎, 武藤健, 今泉清 (1970). 市販マウスにおける腸粘膜肥厚症原因菌 (*Escherichia coli* 0115a,c:K(B)) の検索成績. 実験動物, 19, 153-156.
- [56] 佐々木正五 (1971). 感染における腸内常在菌叢の役割. "腸管と感染", 佐々木正五編, 朝倉書店, 東京, 38-71.
- [57] Sasaki, S., Onishi, N., Nishikawa, T., Suzuki, R., Maeda, R.,

- Takahashi, T., and Usuda, M. (1970). Monoassociated with bacteria in the intestines of germfree mice. *Keio J. Med.*, 19, 87-101.
- [58] Savage, D.C. (1972). Survival on mucosal epithelia, epithelial penetration and growth in tissues of pathogenic bacteria. In *Microbial pathogenicity in man and animals*, Smith, H., and Pearce, J.H. (eds), Cambridge Publ., London, 25-57.
- [59] Schaedler, R.W., Dubos, R., and Costello, R. (1965). The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J. Exp. Med.*, 122, 59-66.
- [60] Schrank, G.D., and Verwey, W.F. (1976). Distribution of cholera organisms in experimental *Vibrio cholerae* infections: Proposed mechanisms of pathogenesis and antibacterial immunity. *Infect. Immun.*, 13, 195-203.
- [61] Sellwood, R., Gibbons, R.A., Gones, G.W., and Rutter, J.M. (1975). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: The existence of two pig phenotypes. *J. Med. Microbiol.*, 8, 405-411.
- [62] Shedlofsky, S., and Freter, R. (1974). Synergism between ecology and immunologic control mechanisms. *J. Infect. Dis.*,

- 129, 296-303.
- [63] Shukuda, Y., Fuhii, S., and Shibuki, M. (1973). Establishment of a new colony of germ-free mice by hand-feeding. *Exp. Anim.* 22, 331-320.
- [64] Smith, H. (1977). Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol. Rev.*, 41, 475-500.
- [65] Spring, H., Kundel, D.W., Dammin, G.J., Horowitz, R.E., Schneider, H., and Formal, S.B. (1961). The response of the germ-free guinea pig to oral bacterial challenge with *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Am. J. Pathol.*, 39, 681-695.
- [66] Stefański, W., and Przyjalkowski, Z. (1966). Effect of alimentary tract microorganisms on the development of *Trichinella spiralis* in mice. Part II. *Exp. Parasitol.*, 18, 92-98.
- [67] 高垣善男, 岩田正え, 藤原公策, 田嶋嘉雄 (1961). マウスの Tyzzer 病に関する研究. I. 自然発生例についての検索. *実験動物*, 10, 75-86.
- [68] Tannock, G.W., and Savage, D.C. (1976). Indigenous microorganisms prevent reduction in cecal size induced by *Salmonella*

typhimurium in vaccinated gnotobiotic mice. Infect. Immun.,
13, 172-179.

[69] Tuffery, A.A., and Innes, J.R.M. (1963). Diseases of laboratory
mice and rats. In Animals for research, Lane-Petter, W. (ed),
London and New York, Academic press, 47-108.

[70] Visco, R.J., and Burns, W.C. (1972). Eimeria tenella in
bacteria-free and conventionalized chicks. J. Parasitol., 58,
323-331.

[71] Visco, R.J., and Burns, W.C. (1972). Eimeria tenella in
monoflora and diflora chicks. J. Parasitol., 58, 576-585.

[72] Walburg, H.E.Jr., Mynatt, E.I., Cosgrone, G.E., Tyndall, R.L.,
and Robie, D.M. (1965). Microbiological evaluation of an
isolation facility for the production of specific-pathogen-free
mice. Lab. Anim. Care, 15, 208-216.

(105)



写真 1. E. coli 0115a,c:K(B) 感染 7 日後の CF#1-GF
マウスの肉眼病変. 大腸壁の肥厚,
盲腸容積の縮少.

(106)



写真 2. E. coli 0115a,c:K(B) 感染 7 日後の GF-CV マウスの肉眼病変. 大腸壁の肥厚, 盲腸容積の縮少. 漿膜面の出血(矢印).

(107)

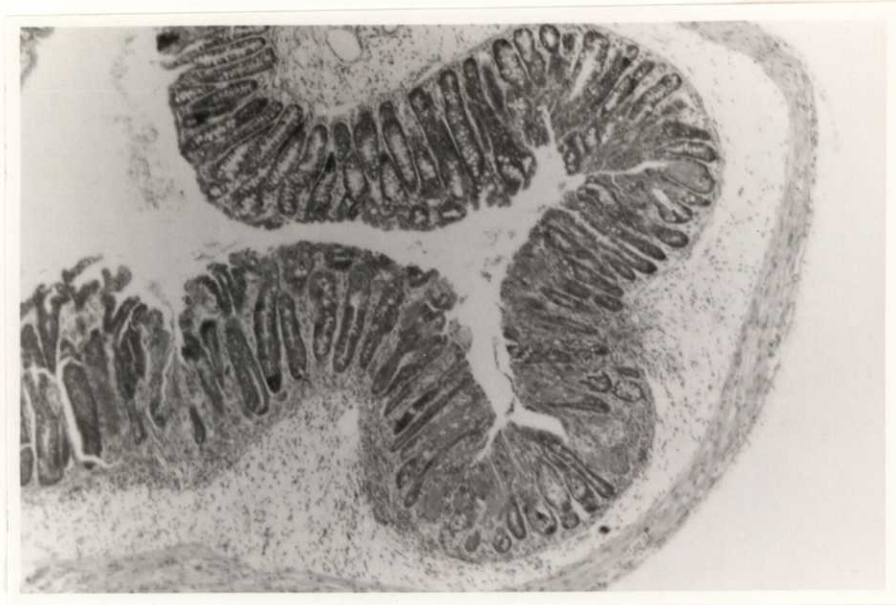


写真 3. E. coli 0115a,c:K(B) 感染 7 日後の CF#1-GF
マウスの結腸. 粘膜上皮での crypt タ
イプの細胞の過形成, 水腫, 粘膜固
有層や粘膜下織での弱い炎症性の反
応. Hematoxylin-eosin 染色. X 50.

(108)

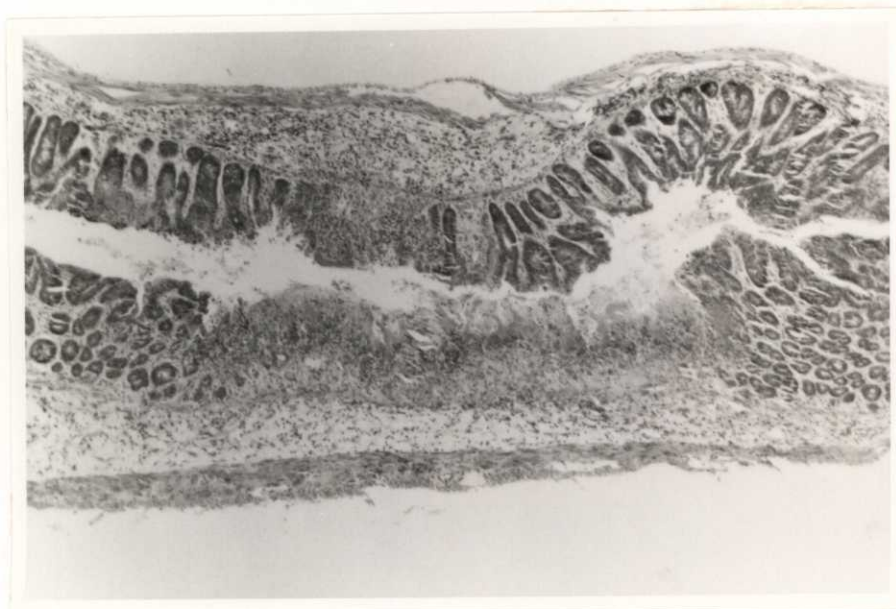


写真 4. E. coli 0115a,c:K(B) 感染 7 日後の GF-CV マウス の 結腸. crypt タイプ の 細胞 の 過形成, 粘膜 上皮 細胞 の 激しい 剥離, 粘膜 固有 層 や 粘膜 下 織 での 強い 炎症 性 の 反応. Hematoxylin-eosin 染色. X 50.

(109)



写真 5. *E. coli* 0115d,c:K(B) 感染 7 日後の ICR-GF
マウスの肉眼病変。肥厚は盲腸の一
部に限局(矢印)。



写真 6. E. coli 0115a,c:K(B) 感染 7 日後の ICR-GF
マウスの盲腸. crypt タイプの細胞の
過形成, 粘膜固有層や粘膜下織での
弱い炎症性の反応. Hematoxylin-eosin 染
色. X 100.

(111)

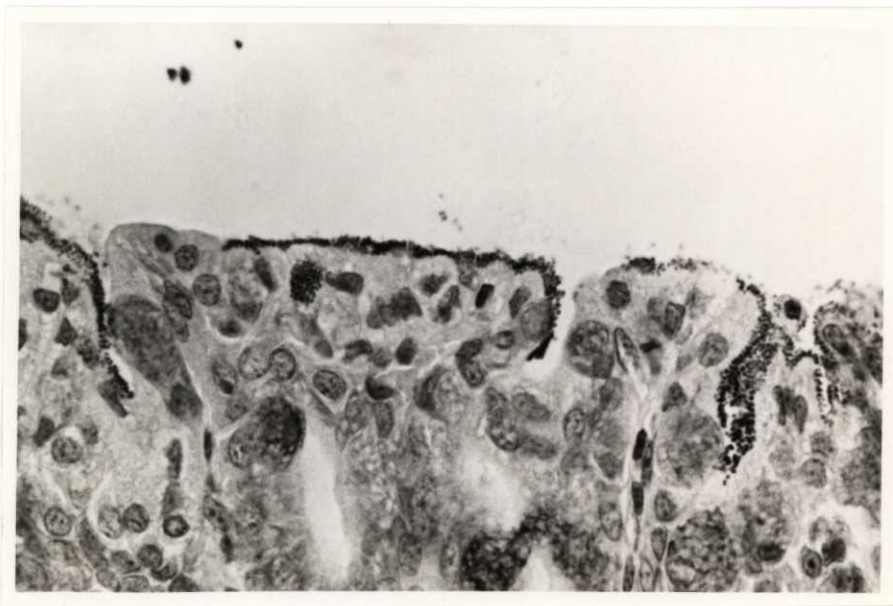


写真 7. E. coli 0115a,c:K(B) 感染 3 日後の CF#1-GF
マウスの盲腸. 上皮細胞の表面に菌
体の付着. 千オニン染色. X 400.

(112)



写真 8. E. coli 0115a,c:K(B) 感染 7 日後の CF#1-GF
マウスの盲腸。絨毛表面全体に菌体
の付着。千才ニン染色。X 400.

(113)



写真 9. E. coli 0115a,c:K(B) 感染 7 日後の CF#1-GF
マウスの盲腸. crypt にまで菌体の付
着. 螢光抗体法. X 100.