

Bifidobacterium によるマウスの
腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染死抑制メカニズムの解明

吉村 和敏

目次

目次	i
緒言	1
第1章 <i>Bifidobacterium</i> の菌種・菌株によるマウスの腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染死抑制効果の比較	
序論	7
材料と方法	7
結果	11
考察	14
表及び図	18
第2章 OMICS 解析による <i>Bifidobacterium</i> 投与マウスの腸管組織遺伝子及びタンパク質の比較・解析	
序論	29
材料と方法	29
結果	34
考察	35
表及び図	39
第3章 <i>Bifidobacterium</i> によるマウス盲腸内における腸管出血性大腸菌 O157:H7 の志賀毒素産生抑制メカニズムの解明	
序論	47
材料と方法	47

結果	52
考察	55
表及び図	58
総括	66
謝辞	69
参考文献	70
培地等成分表	80

緒言

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は、志賀毒素 (Shiga-toxin: Stx) を産生する大腸菌であり、大腸に定着し、出血性腸炎、下痢、溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic uremic syndrome: HUS) や脳症を引き起こす世界的な規模で見られる腸管感染菌の一つである (Karmali et al. 1983, Yoshimitsu et al. 2011)。EHEC には様々な血清型があることが知られているが (Gyles 2007)、その中でも *E. coli* O157:H7 は、最も分離頻度の高い血清型であり、1982 年、アメリカ合衆国でヒトに腸炎を引き起こす食品媒介性の病原菌として、初めて分離、同定された (Remis et al. 1984)。日本では、学校給食に関連した *E. coli* O157:H7 の大規模な集団感染が、1996 年に大阪府堺市で発生し (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/17/198/tpc198.html>)、その後も、*E. coli* O157:H7 に感染した患者が毎年およそ 2000~3000 人報告されている (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/29/339.html>)。また、疫学的に乳児、高齢者が EHEC に対する感受性が高いことが知られている (Terajima et al. 1999、<http://idsc.nih.go.jp/iasr/31/364/graph/f3643.gif>)。

EHEC が産生する Stx は、1 分子の A サブユニットと 5 分子の B サブユニットから構成されている。B サブユニットが、腸管上皮細胞や内皮細胞表面に発現する Globotriaosylceramide (Gb3) と結合すると、A サブユニットが細胞内に送り込まれる。A サブユニットは、N-グリコシダーゼ活性を持ち、標的細胞の 28S リボソーム RNA に作用すると、4324 番目のアデノシンからアデニンを切り出す (Endo et al. 1988)。これにより、細胞はタンパク質の合成が阻害され、最終的にアポトーシスによって死滅する (Jones et al. 2000)。Gb3 は、腸管上皮細胞だけでなく、血管内皮細胞や神経細胞にも発現しており、血中へ移行した Stx により、腎臓や脳に障害が引き起こされる (Hughes et al. 2000, Rutjes et al. 2002)。Stx は *Shigella dysenteriae* の産生する志賀毒素と免疫学的、構造的に同一な Stx1 と異なる Stx2 に分類される (Scotland et al. 1985, Fraser et al. 2004)。Stx2 を産生する EHEC の方が、Stx2 を産生しな

い EHEC よりも EHEC 感染症の重症化に関係していると示唆されている (Kleanthous et al. 1990) が、詳しい理由は明らかにされていない。

EHEC 感染モデルとして、これまでに様々な動物モデルが開発されている。ノトバイオーツ (Gnotobiotic: GB) の子ブタを用いた *E. coli* O157:H7 感染モデルは広く使われている方法である。この感染モデルでは、下痢の他に、子ブタに平衡感覚の消失、捻転斜頸、運動失調といった中枢神経症状が見られるとともに、大脳において浮腫や壊死などの病変が観察された (Francis et al. 1986、Tzipori et al. 1988、1995)。さらに、腸管では *E. coli* O157:H7 の定着によって、絨毛の消失、杯細胞の減少などが引き起こされ (Francis et al. 1986、Tzipori et al. 1995)、菌の密着と微絨毛の縮退を特徴とする Attachment and effacement lesion (A/E lesion) も観察された (Jordan et al. 2005)。ウシは *E. coli* O157:H7 を保菌する動物であるため、雌ウシを用いたモデルでは、*E. coli* O157:H7 は腸管に低い菌数でしか定着することができず、感染初期にのみ、発熱や下痢を引き起こすが (Brown et al. 1997)、絶食させ、胃に挿管して高い菌数の *E. coli* O157:H7 を投与すると、腸管に障害を生じる (Dean-Nystrom et al. 1997)。ニワトリに *E. coli* O157:H7 を感染させた場合、*E. coli* O157:H7 は感染後、盲腸に長期間定着する (Schoeni and Doyle 1994、Berry et al. 1995)。盲腸に A/E lesion は見られたが、病変は盲腸の粘膜上皮と固有層に限局され、臨床症状は顕れなかった (Berry et al. 1995)。マカク属サルに *E. coli* O157:H7 を感染させたモデルでは、水様性の下痢がみられ、また、A/E lesion も観察された (Kang et al. 2001)。幼若ウサギでは、*E. coli* O157:H7 は腸管上皮表面に定着し、主に結腸において、Stx による絨毛の消失、陰窩の拡張などの組織学的な変化が観察された。また、ヒトで見られるような出血性の下痢は見られなかったが、*E. coli* O157:H7 を感染させたウサギは重篤な非出血性の下痢を起こした (Pai et al. 1986)。また、他の血清型の EHEC もマウスに同様の症状を引き起こすことが知られている (Sheoran et al. 2003)。このマウスのモデルでは、Stx2 が下痢および腸炎を引き起こす原因として重要な役割を果たしていることが示されているとともに、A/E lesion を形成することが示された (Shu and Gill 2001、Ritchie

et al. 2003)。マウスでは、ストレプトマイシンを経口投与したマウス、GB マウス、無菌 (GF) マウスを用いたモデルが広く利用されている。ストレプトマイシンを経口投与したマウスは、通性嫌気性グラム陰性菌を腸管から排除することで、*E. coli* などの腸内細菌科を定着しやすくしたマウスである (Rang et al. 1999)。これまでに、ストレプトマイシンを経口投与したマウスを用いて、*E. coli* O157:H7 の感染実験が行われており、経口的に感染した *E. coli* O157:H7 は腎臓の障害とマウスの死亡を引き起こしたが、腸管には障害を与えなかった (Wadolkowski et al. 1990a)。また、このモデルの場合、マウスの死亡には Stx2 が重要な役割を果たしていることが示された (Lindgren et al. 1993、Wadolkowski 1990b)。さらに、*E. coli* O157:H7 の経口投与と同時にマイトマイシンを腹腔内に投与し、Stx の産生量を増加させたストレプトマイシン投与マウスでは致死的な脳症も引き起こされた (Fujii et al. 1994)。GB マウスを用いた *E. coli* O157:H7 感染モデルでは、乳幼児由来の腸内細菌によって、*E. coli* O157:H7 が排除されることが報告されている (Momose et al. 2005)。一方、GF マウスに hyper-toxigenic な *E. coli* O157:H7 を定着させたマウスでは、腸炎、腎障害、脳病変などの様々な症状および死亡が観察されたが、下痢は観察されなかった (Taguchi et al. 2002)。GF マウスを用いたモデルでは、血清中の Stx の上昇がマウスの死亡と関連していることが示唆された (Aiba et al. 2002)。GF マウスでは、EHEC 感染により腸管から Stx の血中への移行がみられたと考えられる。

抗生物質の使用は、EHEC 感染に対する効果的な治療法の一つであるが、その一方で、抗生物質の不適切な使用は、菌体からの Stx の遊離を増加させ、HUS を引き起こす危険性を高めることが指摘されている (Wong et al. 2000)。実際に、シプロフロキサシンの投与により、*E. coli* O157:H7 を単独投与した GF マウスの盲腸内容物中の Stx の濃度は、シプロフロキサシンを投与しなかった場合に比べて高くなった (Jeon and Itoh 2007)。したがって、Stx に対するモノクローナル抗体 (Paton et al. 2001) や、Stx のレセプターである Gb3 を菌体表面に発現させた非病原性の大腸菌 (Sheoran et al. 2003) などの抗生物質に代わる治療法の検

討が行われている。

プロバイオティクスとは消化管内の細菌叢のバランスを改善し、宿主に有益な作用をもたらす生菌と定義されている。*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* を含むプロバイオティクスの投与は EHEC 感染に対する防御が期待される治療法・予防法の一つである。中でも、*Bifidobacterium* は乳児の腸内細菌叢における最優勢群であるが (Mitsuoka et al. 1965)、これまでに、乳児の腸内における *Bifidobacterium* の中でも特に *B. longum* subsp. *longum/infantis* に属する菌株は *E. coli* O157:H7 の定着の阻止において、重要な菌群であることが報告されている (Momose et al. 2005)。また、ストレプトマイシンを経口投与したマウスのモデルを用いた実験では、*Bifidobacterium* の菌種や菌株によって、マウスの *E. coli* O157:H7 感染死を防御できるもの (*B. breve* strain Yakult, *B. pseudocatenulatum* DSM20439) とできないもの (*B. bifidum* ATCC 15696, *B. catenulatum* ATCC27539^T) があることが報告されており (Asahara et al. 2004)、他にも、*B. lactis* HN019 (Shu and Gill 2001) や *B. thermacidophilum* (Gagnon et al. 2006) にも *E. coli* O157:H7 感染に対する防御作用があることが示されている。

GF マウスは、これまでに用いられてきたストレプトマイシンを経口投与したマウスや SPF マウスと比較すると、より確実に他の菌の影響を排除することができる。そこで、本研究では、*Bifidobacterium* が GF マウスにおける EHEC 感染どのように修飾するかを詳細に検討することにした。

第 1 章では、GF マウスに 6 菌種、9 菌株の *Bifidobacterium* を経口投与して作出した GB マウスに *E. coli* O157:H7 44^{Rf} (*E. coli* 44^{Rf}) を感染させ、GB マウスの生存率、糞便中の菌数、盲腸内容物中および血清中の Stx 濃度を分析した。その結果、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F) は、GB マウスの *E. coli* O157:H7 感染死を抑制したのに対し、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222^T (*B. infantis*^T) にはそのような効果は認められないことを明らかにした。さらに *B. infantis* 157F を投与した GB マウスを作出し、*E. coli* 44^{Rf} を感染させた後、それぞれの腸管内における菌および Stx2 の分布、盲腸内容物中の有機酸の組成およ

び濃度、*E. coli* 44^{Rf}の他の組織への転移、組織病変の比較を行い、*Bifidobacterium* の *E. coli* 44^{Rf} 感染に対する防御作用メカニズムの検討を行ったところ、*B. infantis* 157F は、*E. coli* 44^{Rf} の定着を阻止することはできなかったが、盲腸内での *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 の産生を抑制するとともに、盲腸内腔から血中への Stx2 の移行を直接的に妨げることによって、GB マウスの *E. coli* 44^{Rf} 感染死を抑制することができたと考えられた。

第2章では、*Bifidobacterium* による Stx の体内移行阻止メカニズムを解明するために、*E. coli* 44^{Rf} 感染死抑制効果を持つ *B. infantis* 157F と感染死抑制効果を持たない *B. infantis*^T を単独投与した GB マウスを作出し、盲腸および結腸組織の OMICS 解析を行った。その結果、*Coll6a1* 遺伝子が *B. infantis* 157F 投与マウスの盲腸で特異的に上昇していること、盲腸及び結腸ではアクチンおよびチューブリンのターンオーバーが抑制されていることが示された。これらの成績は腸管組織のバリア機能を高めることによって、Stx2 移行を阻害している可能性を示唆している。

第3章では、GF マウス、*B. infantis* 157F および *B. infantis*^T の単独投与マウスの盲腸内容物を利用した *in vitro* 実験系を構築し、盲腸内における *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生抑制メカニズムの解明を試みた。その結果、*B. infantis* 157F と *E. coli* 44^{Rf} のみが酸性多糖を代謝できること、前者が酸性多糖を競合的に利用するため、*E. coli* 44^{Rf} の利用可能な酸性多糖が減少することが明らかとなった。詳細な機構については不明だが、*E. coli* 44^{Rf} からの Stx2 産生は酸性多糖の利用可能性に依存しており、*B. infantis* 157F の存在により、その利用可能性が減少したことが盲腸内における Stx2 産生抑制を導いたものと考えられる。

第 1 章

Bifidobacterium の菌種・菌株による

マウスの腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染死抑制効果の比較

序論

百瀬らは乳児の腸内における *Bifidobacterium* の中でも特に *B. longum* subsp. *longum/infantis* に属する菌株は *E. coli* O157:H7 の定着の阻止において、重要な菌群であることを報告している (Momose et al. 2005)。本章では様々な菌種・菌株の *Bifidobacterium* を無菌マウスに経口投与して作出したノトバイオートマウス (GB) に *E. coli* O157:H7 を経口的に感染させるモデルを用いて、*E. coli* O157:H7 に対する感染防御能を持った *Bifidobacterium* を選別し、百瀬らの知見を実験的に確認することである。そこで、種々の *Bifidobacterium* を定着させた GB マウスを作出し、*E. coli* O157:H7 の感染を耐過するかどうかを観察した。感染防御能を持った *Bifidobacterium* を有する株を選別後、腸管各部位内容物中の菌数、Stx2 濃度、血清中の Stx2 濃度、盲腸内容物中の有機酸組成・濃度を測定し、感染防御能を示さない株の投与群と比較した。また、各臓器の病理組織学的な観察、bacterial translocation についても検討を行った。

材料と方法

動物

GF の BALB/c マウス (メス、8~13 週齢) を用いた。飼料は、50kGy で γ 線滅菌した市販の固形飼料 (CMF、Oriental Yeast Co. Ltd.、Japan) を、飲水はオートクレーブ滅菌したものを自由摂取させた。全ての *E. coli* O157:H7 感染実験は、GF マウスが維持されているビニールアイソレーターからオートクレーブ可能なステンレス製のアイソレーターにマウスを移動させて行った。動物実験の全てに関しては東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会により承認されており、法及び規制等に則って実施した。

菌株と培養

本章では、*Bifidobacterium* の菌株として、*B. adolescentis* JCM1275^T (*B. adolescentis*^T)、*B. bifidum* JCM1255^T (*B. bifidum*^T)、*B. bifidum* M、*B. breve* JCM1192^T (*B. breve*^T)、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222^T (*B. infantis*^T)、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F)、*B. longum* subsp. *longum* JCM1217^T (*B. longum*^T)、*B. longum* subsp. *longum* NCC2705 (*B. longum* NS)、*B. pseudocatenulatum* JCM1200^T (*B. pseudocatenulatum*^T) を用いた。*B. bifidum* M と *B. infantis* 157F は、健康な乳児の糞便から分離されたもので、*B. longum* NS は Nestlé から提供されたものである。それぞれの菌株は、保存用の EG 培地中に -80 °C で凍結保存されていたものを解凍し、BL 寒天培地 (Table 4.1) に接種した後、steel wool 法 (Mitsuoka et al. 1965) を用いて、37 °C で 48 時間、嫌気培養を行った。*E. coli* O157:H7 strain 44^{Rf} (Stx2) (*E. coli* 44^{Rf}) は、ウシの糞便由来の菌株にリファンピシン耐性をつけたものである。保存用 EG ブロス (Table 4.1) 中に -80 °C で凍結保存された菌株を TS 寒天培地上に接種し、37 °C で 24 時間、好気培養を行った。

菌の投与

BL 寒天培地上に発育した *Bifidobacterium* の集落を釣菌し、新しい BL 寒天培地に接種した後、37 °C で 24 時間、嫌気培養を行った。培養終了後、発育した集落をエーゼで 1 ループかき取り、CO₂ で気相置換を行いながら、嫌気性リン酸緩衝液 (嫌気性 PBS) (Table 4.2) に懸濁し、GF マウスに経口投与した。投与量は 0.5 ml であり、投与菌数は生菌で約 10⁸ CFU であった。また、TS 培地上に発育した *E. coli* 44^{Rf} のコロニーをエーゼで 1 ループかき取り、嫌気性 PBS に懸濁した。懸濁液を 10 倍階段希釈で 10⁻⁵ に希釈した後、GF マウスに経口投与した。投与量は 0.5 ml であり、投与菌数は生菌で約 10⁴ CFU であった。

E. coli 44^{Rf} の GF マウスへの経口投与は、それぞれの *Bifidobacterium* の菌株を経口投与してから 7 日後に実施した。

菌数の測定

マウスから採取した糞便サンプルから嫌気性 PBS を用いて 50 倍懸濁液を作成した。その後、10 倍階段希釈によって 10^{-7} まで希釈を行い、 10^{-6} と 10^{-7} を BL 寒天培地上に 0.05 ml ずつ接種した。また、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} を SMC 寒天培地 (Table 4.1) に 0.05 ml ずつ接種した。接種後、BL 寒天培地を steel wool 法を用いて、37 °C で 72 時間、嫌気培養し、SMC 寒天培地は、37 °C で 24 時間好気培養した。糞便並びに投与菌液の *Bifidobacterium* の菌数を測定するために、BL 寒天培地を用い、*E. coli* 44^{Rf} の菌数を測定するために SMC 寒天培地を用いた。

Stxの測定

盲腸内容物中の Stx2 の力価と濃度を、それぞれ 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。VTEC-RPLA は逆受身ラテックス凝集反応法によって Stx の力価を測定するキットであり、ノバパスベロ毒素 EIA は enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法によって、Stx を検出するためのキットである。盲腸内容物をそれぞれのキットに付属している希釈液を用いて 10 倍に希釈した。そして、それぞれの懸濁液を 10,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心し、上清を採取した。さらに、上清をシリンジフィルター (pore size: 0.45 µm) で濾過した後、キットの説明書に従い、Stx2 の力価を測定した。Stx2 の力価は、陽性が出た最も高い希釈段階で表した。また、ELISA 法 (ノバパスベロ毒素 EIA (BIORAD, USA)) は付属している説明書に従って行った。各試料の吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 630 nm で測定した。また、VTEC-RPLA のキットに同梱されている Stx2 の標準溶液 (100 ng/ml) を使用して検量線を作成し、各試料中に含まれている Stx2 の濃度を計算した。Vero 細胞は、アフリカミドリザルの腎上皮に由来する株化細胞であり、細胞表面に Gb3 を発現するために、

Stx が細胞毒性を示す (Konowalchuk et al. 1977)。血清中の Stx2 の濃度を測定するために、Vero 細胞を用いた細胞毒性試験を行った。 2×10^4 の Vero 細胞を含んだ 200 μ l の増殖培地 (Table 4.5) を平底の 96 well のマイクロプレートに接種し、CO₂ 濃度 5 % で 37 °C、24 時間培養し、細胞をコンフルエントにした。カルシウム、マグネシウム不含 PBS (PBS (-)) (Table 4.2) を用いて、Stx2 標準溶液を 10 倍階段希釈し、各試料も 10 倍に希釈した。各懸濁液 10 μ l を、Vero 細胞を含んだ増殖培地 90 μ l に添加した。培地中に毒素溶液を添加した培地に交換した後、48 時間細胞を培養し、各 well の死細胞数を数え、検量線を Stx2 標準溶液から作成した。さらに、作成した検量線を用いて各試料中に含まれる Stx2 の濃度を算出した。

有機酸の測定

盲腸内容物中に含まれる有機酸の濃度の分析は、Ohmomo らのサイレージ中の有機酸定量法に準じて行った (Ohmomo et al. 1993)。各試料を、希釈液 (10 mM HClO : 1 N H₂SO₄ = 67 : 8) で 20 倍に希釈した。各懸濁液は 15,000 rpm、4 °C で 10 分間遠心を 2 回行い、上清をシリンジフィルター (pore size: 0.45 μ m) で濾過し、HPLC (L-7000、Hitachi, Japan) で分析した。カラムは長さ 300 mm の GL-C610H-S (Hitachi Chemical, Japan) を、ガードカラムは長さ 100 mm の GL-G-C600 (Hitachi Chemical, Japan) を用いた。移動相には、3 mM の過塩素酸水溶液を用いた。流速は、0.5 ml/min、カラムの温度は 60 °C で分析した。有機酸の検出には、カラムを通過した溶出液に 0.1 mM ブロモチモールブルー溶液 - 15 mM Na₂HPO₄ - 2mM NaOH 溶液 (pH 9.6) を流速 0.5 ml/min で混合し、UV 検出器で波長 440 nm における吸光度を測定し、ピークの高さにより、濃度を計算した。

病理組織学的な解析

マウスを *E. coli* 44^{Rf} 投与後 6 日目に、CO₂ ガスによって安楽死させて解剖し、小腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、脾臓、副腎、腎臓、脳を採取した。それぞれの臓器を 10 % の中性リン

酸緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィン中に包埋した。4 μm の切片を作製し、ヘマトキシリンとエオジンで染色した。

***E. coli* 44^{Rf}のbacterial translocation (BLT)**

E. coli 44^{Rf} 投与後 1、3、7 日目に GB マウスを CO₂ ガスによって安楽死させて、腸管から腹腔、腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node: MLN)、肝臓、脾臓へ移行した *E. coli* 44^{Rf} の菌数を Suzuki らの方法に従って測定した (Suzuki et al. 1997)。

統計解析

Bifidobacterium および *E. coli* 44^{Rf} の投与後の各日数で、糞便中の菌数、腸管各部位および血清中の Stx2 濃度、盲腸内容物中の有機酸濃度について、各 GB マウス間における有意差検定を Tukey-Kramer test を用いて行った。 $P < 0.05$ を有意差があると判定した。また、*E. coli* O157:H7 感染防御能を持つ *Bifidobacterium* を投与したマウスと持たないマウスの間で菌数、Stx2 濃度、および有機酸濃度について有意差を検定するときは Student's *t* test を用いた。

結果

***E. coli* 44^{Rf}を感染させたマウスの死亡数**

E. coli 44^{Rf} を感染させた後の GB マウスの死亡数の推移を Fig. 1.1 に示した。*E. coli* 44^{Rf} を単独投与した群と *B. bifidum*^T を投与後 *E. coli* 44^{Rf} を感染させた群では、感染後 7 日までに全例死亡した。*B. bifidum* M と *B. longum*^T を予め投与した群では、*E. coli* 44^{Rf} を単独投与した群と比較して、GB マウスは 4~5 日長く生存したが、最終的に全例死亡した。一方、*B. infantis* 157F と *B. longum* NS を投与した GB マウスは *E. coli* 44^{Rf} 投与後 21 日目までの観察期間中生残した。死亡した GB マウスでは死亡の 1~2 日前に被毛粗剛、うずくまり、後

肢の麻痺などの臨床症状が観察された。

B. longum^Tについては5回の実験のうち、2回の実験で解剖を行う14日目まで生存した。

糞便中の*Bifidobacterium*と*E. coli* 44^{Rf}の菌数

*Bifidobacterium*の菌数は、*B. adolescentis*^Tと*B. bifidum*^Tを投与した群を除いて、糞便1gあたり10¹⁰CFUに達した(Table 1.1)。*Bifidobacterium*の菌数は、観察期間中、およそ10¹⁰CFUに維持されていたが、*B. bifidum*^Tを投与した群では、*E. coli* 44^{Rf}の投与後菌数が減少し、最終的には検出できなくなった。

*Bifidobacterium*を投与した各GBマウスならびに*E. coli* 44^{Rf}単独投与マウスでの*E. coli* 44^{Rf}の菌数は、*E. coli* 44^{Rf}投与後1日目には、糞便1gあたり10⁸~10⁹CFUに達し、6日目には、糞便1gあたり10⁹~10¹⁰CFUに達した(Table 1.2)。*E. coli* 44^{Rf}投与後6日目では、*B. bifidum*^Tを投与した群と*B. infantis* 157Fと*B. longum* NSを投与した群で、*E. coli* 44^{Rf}の菌数に有意な差($P < 0.01$)が見られた。また、*E. coli* 44^{Rf}を単独投与した群と*B. infantis* 157Fと*B. longum* NSを投与した群では、*E. coli* 44^{Rf}の菌数に有意な差は見られなかった。

盲腸内容物中および血清中のStx2の濃度と力価

盲腸内容物中のStx2の力価を、VTEC-RPLAテストによって求めた。*E. coli* 44^{Rf}を単独投与した群では、*E. coli* 44^{Rf}投与後6日目に力価は160倍に達したが、これは、*Bifidobacterium*を投与した群と比べて有意に高くなっていた($P < 0.01$) (Table 1.3)。*B. infantis* 157Fを投与した群と他の*Bifidobacterium*を投与した群の間では、Stx2の力価に有意な差($P < 0.05$)は見られなかった。一方、*B. longum* NSを投与した群は、*B. adolescentis*^T、*B. bifidum*^T、*B. infantis*^T、*B. pseudocatenulatum*^Tを投与した群との間でStx2の力価に有意差($P < 0.01$)が見られた。ELISAでは、*E. coli* 44^{Rf}を単独投与後6日目のマウスの盲腸内容物中のStx2の濃度は、*Bifidobacterium*を事前に投与した群のマウスと比べて、有意に高くなった($P < 0.01$) (Table

1.3)。また、*E. coli* 44^{Rf} 感染を防御できる *Bifidobacterium* を投与した場合、マウスの盲腸内容物中の Stx2 濃度は、*E. coli* 44^{Rf} 感染を防御できない *Bifidobacterium* を投与した場合に比べて、低くなっていた。*B. infantis* 157F を投与した GB マウスの盲腸内容物中の Stx2 濃度は、*B. infantis*^T を投与した GB マウスの盲腸内容物中の Stx2 濃度に比べて有意に低くなった ($P < 0.05$)。また、*B. longum* Nestle を投与した GB マウスの盲腸内容物中の Stx2 濃度は、他の *Bifidobacterium* を投与した GB マウスの盲腸内容物中の Stx2 濃度に比べて、有意に低くなった ($P < 0.05$)。

E. coli 44^{Rf} 単独投与群の血清中の Stx2 濃度は、*E. coli* 44^{Rf} 投与後 1 日目で、他の群と比較して、顕著に高くなった (Table 1.4)。一方、*B. infantis* 157F と *B. longum* NS を投与した群では、他の *Bifidobacterium* の菌株を投与した群よりも血清中の Stx2 濃度が有意に低くなった ($P < 0.01$)。

腸管内における菌とStx2の分布

B. infantis^T と *B. infantis* 157F 投与群について比較を行った。*B. infantis* 157F を投与した群では、*E. coli* 44^{Rf} 投与後 6 日目で、小腸内の *Bifidobacterium* の菌数が *B. infantis*^T を投与した群よりも有意に高くなった ($P < 0.01$) (Table 1.5)。また、盲腸内においても、*B. infantis* 157F を投与した群では、*E. coli* 44^{Rf} 投与後 6 日目で、*Bifidobacterium* の菌数が *B. infantis*^T を投与した群よりも有意に高くなった ($P < 0.05$)。しかし、*E. coli* 44^{Rf} の菌数については、腸管各部位で両群に有意な差は見られなかった (Table 1.6)。その一方で、盲腸内における Stx2 の濃度は、*B. infantis* 157F を投与した群では、*B. infantis*^T を投与した群と比較して、有意に低くなった ($P < 0.05$) (Table 1.7)。

有機酸の測定

盲腸内容物中の有機酸の組成と濃度の分析は、HPLC を用いて行った。*E. coli* 44^{Rf} 感染を

防御できる *Bifidobacterium* の菌株と防御できない菌株について比較を行った。*Bifidobacterium* を単独投与したマウスの盲腸内容物中からは、乳酸と酢酸が検出されたが、両群で有意な差は見られなかった (Fig. 1.2)。 *E. coli* 44^{Rf} 投与後 6 日目では、これらの有機酸に加えて、コハク酸も検出されたが、両群で、有機酸の組成、濃度に有意な差は見られなかった (Fig. 1.3)。

E. coli 44^{Rf}の転移

Bifidobacterium の菌株を投与した全てのマウス群について、腹腔、MLN、肝臓、脾臓へ移行した *E. coli* 44^{Rf} は検出されなかった。

病理組織学的な解析

E. coli 44^{Rf} 感染を抑制できる *Bifidobacterium* の菌株と抑制できない菌株を投与した GB マウスに *E. coli* 44^{Rf} を投与させた後に、経時的に安楽殺をして、病理組織学的な比較を行った。腸管、肝臓、脾臓、副腎、脳の各部位では両群で病理組織学的な変化は見られなかった

考察

これまでに、*bifidobacteria* や *lactobacilli* を含むプロバイオティクスには、EHEC の感染に対する防御効果があることが報告されている。*B. lactis* HN019 を飼料中に添加することで、マウスの *E. coli* O157:H7 感染率が対照群と比較して減少し、また、末梢血中の白血球やマクロファージの貪食能が促進された (Shu and Gill 2001)。*B. thermacidophilum* RBL71 の経口投与により、*E. coli* O157:H7 感染による体重の減少や組織学的な変化の減少、*E. coli* O157:H7 に対する抗体産生の増加が見られた (Gagnon et al. 2006)。Asahara らは、ストレプトマイシンを経口投与したマウスを用いて、*E. coli* O157:H7 感染に対する防御効果が *Bifidobacterium*

の菌種、菌株によって異なることを示した (Asahara et al. 2004)。つまり、*B. breve* strain Yakult と *B. pseudocatenulatum* DSM20439 は、*E. coli* O157:H7 感染によるマウスの死亡を防御する一方で、*B. bifidum* ATCC 15696、*B. catenulatum* ATCC27539^T はマウスの死亡を防ぐことができなかった。今回の実験では、これまでに用いられてきた動物モデルよりも単純な GF マウスを用いて *Bifidobacterium* の *E. coli* O157:H7 感染に対する防御作用を比較したが、*B. breve*^T と *B. pseudocatenulatum*^T は *E. coli* O157:H7 感染によるマウスの死亡を防ぐことはできなかった。しかしながら、*B. infantis* 157F と *B. longum* NS は *E. coli* O157:H7 感染に対する対してあきらかな防御作用を示した。今回の実験により、*B. longum* subsp. *longum/infantis* に属する菌は他の *Bifidobacterium* に比べて、*E. coli* O157:H7 感染に対する高い防御効果があることが示されたが、*B. infantis*^T や *B. longum*^T に防御効果が無かったことから、この防御効果は *B. longum/infantis* に共通する性質ではなく、それぞれの菌株によって異なることが示唆された。

病原菌の腸管粘膜への定着の阻止は、宿主を防御する上で重要な要因の一つである。例えば、*Lactobacillus acidophilus* は、病原大腸菌の接着と侵襲を阻害する (Bernet et al. 1994)。また、幼若ウサギのモデルを利用した実験では、*Lactobacillus casei* strain Shirota の投与によって宿主の免疫応答が高まり、*E. coli* O157:H7 が排除された (Ogawa et al. 2001)。本研究では、使用した全ての *Bifidobacterium* の菌株は、*E. coli* O157:H7 の定着を阻止することができなかった。中でも、*B. bifidum*^T は *E. coli* O157:H7 投与後、菌数が減少し、最終的には検出されなくなった。これらの成績から、*B. infantis* 157F や *B. longum* NS は *E. coli* O157:H7 の定着阻止以外のメカニズムによって、マウスの死亡を防御していると考えられる。

Stx の中でも、Stx2 はマウスの *E. coli* O157:H7 感染死に深く関連している (Wadolowski et al. 1990b) とされている。Kobayashi らは、*E. coli* O157:H7 に感染したマウスの腸管内において、*Bifidobacterium* 菌株が抗生物質によって引き起こされる Stx の産生を抑制することを示した (Kobayashi et al. 2000)。また、*Bifidobacterium* と *Lactobacillus* の投与によって、*E. coli* O157:H7 に感染したマウスの盲腸内容物中の Stx 濃度は、*E. coli* O157:H7 単独投与群に比べ

て低くなったことが報告されている (Aiba et al. 2002)。今回の実験でも、これまでの報告と同様に、盲腸内における Stx2 の産生が *Bifidobacterium* の投与によって抑制されていたことから、盲腸内における Stx2 濃度の減少はマウスの *E. coli* O157:H7 感染死と深く関係していることが示唆された。盲腸内での Stx2 濃度の減少に加えて、*B. infantis* 157F と *B. longum* NS を投与した群では、血清中の Stx2 濃度が、他の群と比べて顕著に低くなっていた。GF マウスを用いたこれまでの報告でも、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* の経口投与は、*E. coli* O157:H7 感染による血清中の Stx の上昇を抑制することが知られている (Aiba et al. 2002)。今回の実験からは、*E. coli* O157:H7 感染死を抑制できる *Bifidobacterium* は、盲腸内の Stx 濃度をある一定の濃度以下に抑制し、腸管内腔から血流への Stx の移行を妨げていることが示唆される。

E. coli O157:H7 感染に対して防御作用を持つ *Bifidobacterium* と持たない *Bifidobacterium* について、腸管内の *Bifidobacterium*、*E. coli* O157:H7 および Stx2 の分布、盲腸内容物中の有機酸の組成と濃度、組織学的な病変、*E. coli* O157:H7 の BTL について調べた成績からも、盲腸における Stx2 濃度の違いがマウスの *E. coli* O157:H7 感染死抑制に重要な役割を果たしていると考えられた。

有機酸は、*E. coli* O157:H7 の病原性を抑制する上で、重要な役割を担っていると考えられている。*In vitro* の実験では、乳酸や酢酸の濃度の上昇に伴って、*E. coli* O157:H7 の増殖と Stx の産生が抑制される (Carey et al. 2008) ことが知られている。また、Asahara らは、Stx の産生において、有機酸の中でも酢酸が重要であると報告している (Asahara et al. 2004)。しかし、本研究では、*B. infantis* 157F および *B. longum* NS を投与した群とその他の *E. coli* O157:H7 感染を防御できない群との間で、盲腸内容物中の有機酸の組成および濃度に有意な差は見られなかった。乳酸と酢酸に加えて、*Bifidobacterium* の代謝産物が *in vitro* での Stx の産生を抑制することが報告されている (Kobayashi et al. 2001) が、今回の成績でも有機酸以外の *Bifidobacterium* の代謝産物、あるいは他のメカニズムが Stx の産生抑制およびマウス

の *E. coli* O157:H7 感染死の抑制に関係していることが示唆される。

E. coli O157:H7 感染によるマウスの病理組織学的な変化はこれまでも報告されており、ストレプトマイシンを経口投与したマウスでは、*E. coli* O157:H7 の感染によって、腎臓の病変とマウスの死亡が観察されている (Wadolkowski et al. 1990a)。また、無菌の IQI マウスに hyper-toxigenic な *E. coli* O157:H7 を投与することにより、結腸での炎症、腎臓の病変、脳の病変が見られたと報告されている (Taguchi et al. 2002)。嗜眠や麻痺といった臨床症状も観察されている (Aiba et al. 2002)。Namba らは無菌の BALB/c マウスを用いて、*E. coli* O157:H7 の感染試験を行っているが、腸管への病変は観察していない (Namba et al. 2003)。本章で用いたモデルでは、全ての投与群において、腸炎や腎臓の病変、脳の病変は観察されなかったが、その一方で、*Bifidobacterium* を事前に投与している群でも *E. coli* O157:H7 を単独投与した群でも、マウスが死亡する 1~2 日前に、被毛粗剛、うずくまり、後肢の麻痺などの臨床症状が観察された。したがって、組織病変が現れる前にマウスは死亡したと考えられる。また、*E. coli* O157:H7 の他の臓器への転移も *Bifidobacterium* 投与群では、認められなかった。これらのことから今回用いたモデルでも、他のモデルと同じように、血中に移行した Stx2 がマウスの *E. coli* O157:H7 感染死に関わっていることが示唆され、マウスが死亡しなかった場合は、血中への Stx の移行が妨げられていることが考えられる。

以上をまとめると、*B. longum* subsp. *longum/infantis* に属するいくつかの菌株はマウスの *E. coli* O157:H7 感染死を防御することが可能であり、また、これらの *Bifidobacterium* は、盲腸内容物中の Stx の産生を抑制することによって、あるいは、腸管内腔から血中への Stx2 の移行を直接的に妨げることによってマウスの *E. coli* O157:H7 による感染死を抑制しているものと考えられる。

Table 1.1 Numbers of *Bifidobacterium* in the feces of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and/or *E. coli* 44^{Rf}

<i>Bifidobacterium</i> strains	Days after <i>E. coli</i> 44 ^{Rf} infection			
	0 ¹ (n = 3)	1 (n = 3)	6 (n = 3)	14 (n = 2)
<i>B. adolescentis</i> ^T	9.4 ± 0.2a ²	9.9 ± 0.2a	10.0 ± 0.1a	N.T. ³
<i>B. bifidum</i> ^T	9.1 ± 1.6a	8.9 ± 0.2b	— ⁴	N.T.
<i>B. breve</i> ^T	10.7 ± 0.2b	10.4 ± 0.2c	10.4 ± 0.1b	N.T.
<i>B. infantis</i> ^T	10.2 ± 0.1	10.2 ± 0.2a,c	10.2 ± 0.2	N.T.
<i>B. infantis</i> 157F	10.6 ± 0.3	10.3 ± 0.1c	10.5 ± 0.2b	10.5 ± 0.0
<i>B. longum</i> ^T	10.3 ± 0.0	9.9 ± 0.1a	10.3 ± 0.1	N.T.
<i>B. longum</i> NS	10.3 ± 0.1	10.1 ± 0.0a,c	10.4 ± 0.1b	10.4 ± 0.1
<i>B. pseudocatenulatum</i> ^T	10.1 ± 0.1	10.0 ± 0.2a,c	10.3 ± 0.1	N.T.

In each day, numbers with different alphabets are statistically different from each other ($P < 0.05$).

¹ Seven days after *Bifidobacterium* association.

² Mean ± SD (log₁₀CFU/g feces)

³ Not tested because of death.

⁴ Not detected.

Table 1.2 Numbers of *E. coli* 44^{Rf} in the feces of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and *E. coli* 44^{Rf}

<i>Bifidobacterium</i> strains	Days after <i>E. coli</i> 44 ^{Rf} infection		
	1 (n = 3)	6 (n = 3)	14 (n = 2)
<i>B. adolescentis</i> ^T	8.6 ± 0.3 ¹	9.5 ± 0.2a,c	N.T. ²
<i>B. bifidum</i> ^T	8.5 ± 0.1	10.1 ± 0.0b	N.T.
<i>B. breve</i> ^T	8.9 ± 0.2	9.4 ± 0.1c	N.T.
<i>B. infantis</i> ^T	8.9 ± 0.2	9.6 ± 0.2	N.T.
<i>B. infantis</i> 157F	8.9 ± 0.2	9.3 ± 0.3c	9.1 ± 0.2
<i>B. longum</i> ^T	8.9 ± 0.2	9.6 ± 0.1	N.T.
<i>B. longum</i> NS	8.8 ± 0.1	9.5 ± 0.1a,c	9.5 ± 0.3
<i>B. pseudocatenulatum</i> ^T	8.7 ± 0.2	9.4 ± 0.1a,c	N.T.
(<i>E. coli</i> 44 ^{Rf} only)	9.0 ± 0.2	10.0 ± 0.5b,c	N.T.

In each day, numbers with different alphabets are statistically different from each other ($P < 0.05$).

In day 6, the numbers of *E. coli* O157 44^{Rf} in the *B. bifidum*^T group were significantly higher than those in the *B. infantis* 157F and *B. longum* NS group. ($P < 0.01$)

¹ Mean ± SD (log₁₀CFU/g feces)

² Not tested because of death.

Table 1.3 Titers and concentrations of Stx2 in cecal contents of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and *E. coli* 44^{Rf}

<i>Bifidobacterium</i> strains	Titers ¹			Concentrations ²	
	Days after <i>E. coli</i> 44 ^{Rf} infection				
	1 (n = 3)	6 (n = 2 or 3)	14 (n = 2)	6 (n = 2 or 3)	14 (n = 2)
<i>B. adolescentis</i> ^T	<20	80 ± 0a,b ³	N.T. ⁴	N.D. ⁵	N.T.
<i>B. bifidum</i> ^T	50 ± 23	120 ± 57b	N.T.	N.D.	N.T.
<i>B. breve</i> ^T	<20	53 ± 23b,c	N.T.	N.D.	N.T.
<i>B. infantis</i> ^T	<20	80 ± 0a,b	N.T.	53.1 ± 3.2a	N.T.
<i>B. infantis</i> 157F	<20	53 ± 23b,c	60 ± 28	26.3 ± 14.3a,b	38.9 ± 21.7
<i>B. longum</i> ^T	<20	40 ± 0c	N.T.	N.D.	N.T.
<i>B. longum</i> NS	<20	40 ± 0c	40 ± 0	19.4 ± 4.1b	23.5 ± 5.7
<i>B. pseudocatenulatum</i> ^T	<20	80 ± 0a,b	N.T.	52.0 ± 9.3a	N.T.
(<i>E. coli</i> 44 ^{Rf} only)	107 ± 46	160 ± 0d	N.T.	202.0 ± 23.5c	N.T.

In each day, numbers with different alphabets are statistically different from each other ($P < 0.05$).

¹ The titers of Stx2 in cecal contents were determined by the VTEC-RPLA test.

² The concentrations (ng /ml) of Stx2 in cecal contents were determined by the ELISA test.

³ Mean ± SD

⁴ Not tested because of death.

⁵ Not done.

Table 1.4 Concentrations of Stx2 in the serum of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and *E. coli* 44^{Rf}

<i>Bifidobacterium</i> strains	Days after <i>E. coli</i> 44 ^{Rf} infection					
	1		6		14	
<i>B. adolescentis</i> ^T	0.7	± 0.2 (3/3) ¹	8.0	± 7.5a,b (3/3)	N.T. ²	
<i>B. bifidum</i> ^T	4.2	± 1.8a (3/3)	33.3	± 8.4c (2/2)	N.T.	
<i>B. breve</i> ^T	0.4	± 0.2b (3/3)	9.3	± 2.6b (3/3)	N.T.	
<i>B. infantis</i> ^T	0.2	± 0.2b (3/3)	6.9	± 5.0a,b (3/3)	N.T.	
<i>B. infantis</i> 157F	0.2	(1/3)	0.7	± 0.2a (3/3)	0.7	± 0.2 (3/3)
<i>B. longum</i> ^T	0.4	± 0.3 (2/3)	5.6	± 2.7a,b (3/3)	N.T.	
<i>B. longum</i> NS	0.3	± 0.0b (3/3)	0.5	± 0.2a (3/3)	0.5	± 0.1 (3/3)
<i>B. pseudocatenulatum</i> ^T	0.4	± 0.1 (3/3)	10.6	± 3.9b (3/3)	N.T.	
(<i>E. coli</i> 44 ^{Rf} only)	2.7	± 3.0 (3/3)	112	± 4.5d (3/3)	N.T.	

In each day, numbers with different alphabets are statistically different from each other ($P < 0.05$).

The concentrations of Stx2 in the serum were determined by the bioassay using Vero cells.

¹ Mean ± SD in pg /ml (no. detected/no. tested).

² Not tested because of death.

Table 1.5 Distributions of *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F in the gastrointestinal tract of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and *E. coli* 44^{Rf}

	<i>B. infantis</i> ^T				<i>B. infantis</i> 157F			
	Days after <i>E. coli</i> 44 ^{Rf} infection							
	1		6		1		6	
Stomach	9.3	± 0.5	(2/3) ¹	— ²	9.3	± 1.2	(2/3)	6.6 (1/3)
Small intestine	6.8	± 0.8	(3/3)	4.4 ± 0.1 ^{**} (3/3)	7.6	± 1.3	(3/3)	5.3 ± 0.2 ^{**} (3/3)
Cecum	10.0	± 0.2	(3/3)	10.2 ± 0.2 [*] (3/3)	10.5	± 0.3	(3/3)	10.7 ± 0.1 [*] (3/3)
Colon and rectum	10.2	± 0.2	(3/3)	10.2 ± 0.2 (3/3)	10.3	± 0.1	(3/3)	10.5 ± 0.2 (3/3)

¹ Mean ± SD in log₁₀CFU/g (no. detected/no. tested).

² detected (less than 6.0).

^{*} $P < 0.05$ between *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F groups.

^{**} $P < 0.01$ between *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F groups.

Table 1.6 Distributions of *E. coli* 44^{Rf} in the gastrointestinal tract of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and *E. coli* 44^{Rf}

	<i>B. infantis</i> ^T group				<i>B. infantis</i> 157F group			
	Days after <i>E. coli</i> 44 ^{Rf} infection							
	1		6		1		6	
Stomach	7.5	± 0.4	(2/3) ¹	— ²	8.1	± 0.6	(2/3)	7.5 (1/3)
Small intestine	6.4	± 0.3	(3/3)	8.6 ± 0.3 (3/3)	7.1	± 0.5	(3/3)	8.0 ± 0.3 (3/3)
Cecum	8.8	± 0.1	(3/3)	9.7 ± 0.2 (3/3)	8.7	± 0.1	(3/3)	9.4 ± 0.3 (3/3)
Colon and rectum	8.9	± 0.2	(3/3)	9.6 ± 0.2 (3/3)	8.9	± 0.2	(3/3)	9.3 ± 0.3 (3/3)

¹ Mean ± SD in log₁₀CFU/g (no. detected/no. tested).

² Not detected (less than 5.0).

Table 1.7 Concentrations of Stx2 in the gastrointestinal tract of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and *E. coli* 44^{Rf}

	<i>B. infantis</i> ^T group					<i>B. infantis</i> 157F group				
	Days after <i>E. coli</i> 44 ^{Rf} infection									
	1		6			1		6		
Stomach	— ¹		—			3.9	(1/3) ³	—		
Small intestine	—		26.1 ± 32.8 ²	(3/3)		—		5.7 ± 1.6	(2/3)	
Cecum	12.3 ± 2.5	(3/3)	53.1 ± 3.2 [*]	(3/3)		8.1 ± 2.2	(3/3)	26.3 ± 14.3 [*]	(3/3)	
Colon and rectum	7.6 ± 1.3	(3/3)	47.2 ± 4.3	(3/3)		5.1 ± 0.5	(2/3)	24.7 ± 18.8	(3/3)	

The concentrations of Stx2 in the gastrointestinal tract in each of the groups were determined by the ELISA test.

¹ Not detected.

² Mean ± SD (ng /ml)

³ No. of detected / no. of tested.

^{*} $P < 0.05$ between the *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F groups.

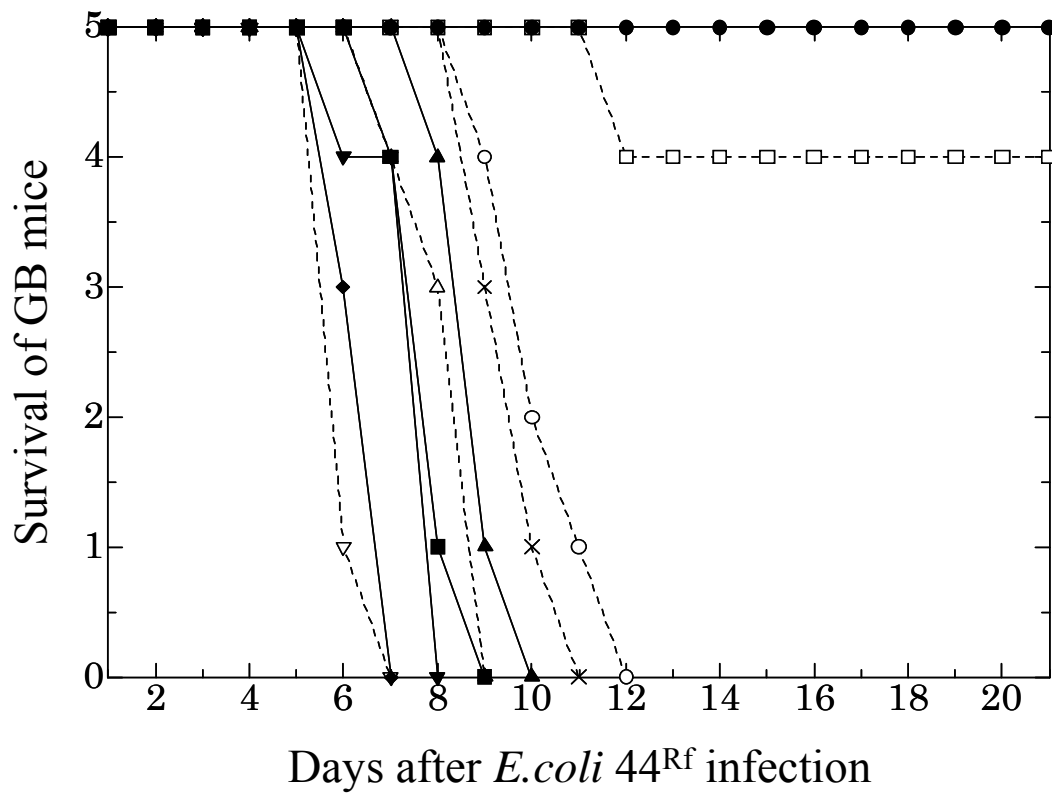


Fig. 1.1 Survival of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and *E. coli* 44^{Rf} after *E. coli* 44^{Rf} infection.

—△— *B. adolescentis*^T —▲— *B. bifidum* M —▽— *B. bifidum*^T -◇- *B. breve*^T
 -▼- *B. infantis*^T —□— *B. infantis* 157F -●- *B. longum* NS —○— *B. longum*^T
 —■— *B. pseudocatenulatum*^T —◆— *E. coli* 44^{Rf} only

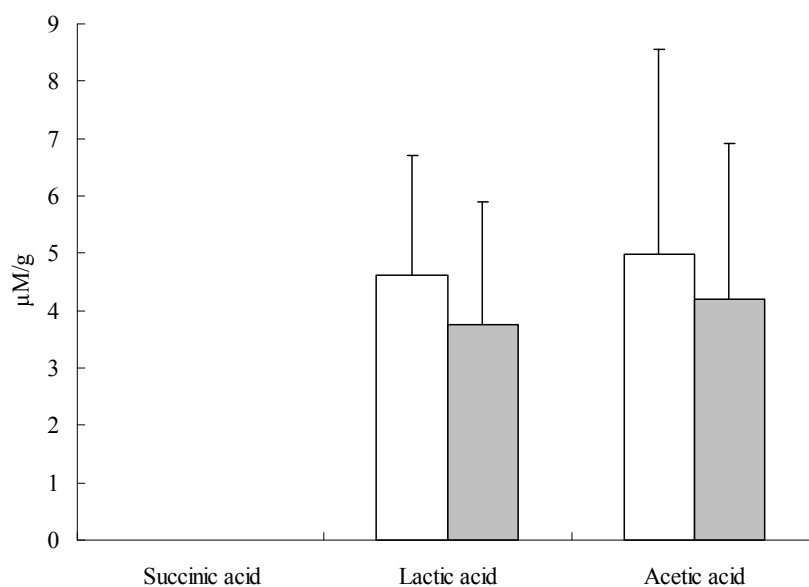


Fig. 1.2 Concentrations of VFA in the cecum of GB mice mono-associated with *Bifidobacterium* strains (n = 3).

Columns: *white*, *B. infantis* 157F; *grey*, *B. infantis*^T. Formic acid, succinic acid, propionic acid, n-butyric acid, iso-valeric acid, n-varelic acid, iso-capronic acid, and n-capronic acid were not detected in all of the groups. The error bars represent the standard deviation of the data.

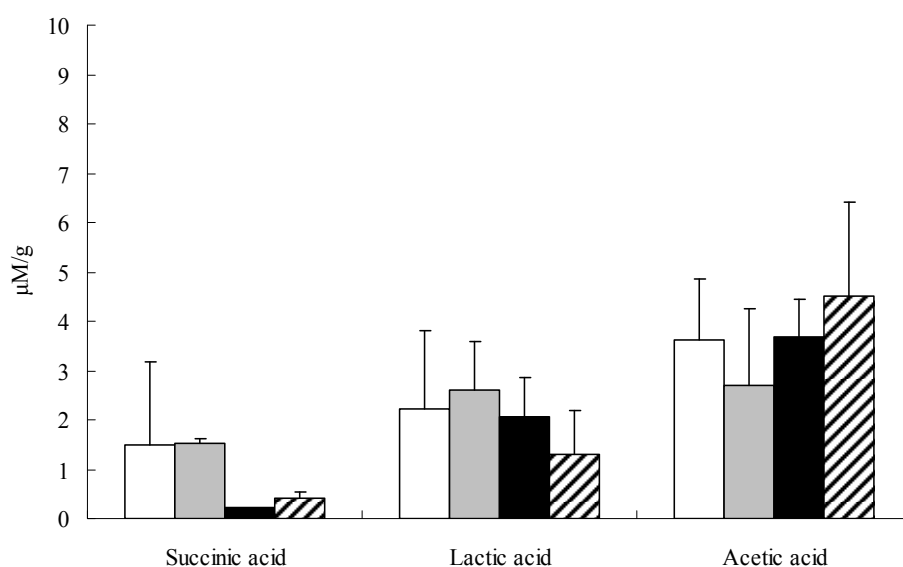


Fig. 1.3 Concentrations of VFA in the cecum of the GB mice associated with *Bifidobacterium* strains and *E. coli* 44^{Rf} six days after *E. coli* 44^{Rf} infection (n = 3).

Columns: *white*, *B. infantis* 157F; *grey*, *B. infantis*^T; *black*, *B. longum* NS; *slashed*, *B. pseudocatenulatum*^T. Formic acid, propionic acid, n-butyric acid, iso-valeric acid, n-varelic acid, iso-capronic acid, and n-capronic acid were not detected in all of the groups. The error bars represent the standard deviation of the data.

第 2 章

OMICS 解析を用いた *Bifidobacterium* 投与マウスの 腸管組織遺伝子及びタンパク質発現解析

序論

第1章では無菌（GF）マウスに *Bifidobacterium* を単独投与したノトバイオート（GB）マウスに *E. coli* O157:H7 44^{Rf} 株を経口感染させる系を用いて、6 菌種・9 菌株の *Bifidobacterium* の中から、*E. coli* O157:H7 44^{Rf} (*E. coli* 44^{Rf}) に対する感染死抑制効果を持つ菌株として *B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F) と *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 を選抜した。*B. infantis* 157F は、健康な乳児の糞便から分離された菌株である。*B. infantis* 157F や *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 を事前投与することによって、マウスの *E. coli* 44^{Rf} 感染死を抑制できたことから、これらの菌は *E. coli* O157:H7 感染予防の新しい手段として期待される。一方、同じ菌種、同じ亜種であるにも関わらず、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222^T (*B. infantis*^T) と *B. infantis* 157F では、*E. coli* O157:H7 44^{Rf} に対する感染死抑制効果に違いが見られ、*B. infantis*^T では感染死抑制効果の誘導は認められなかった。*B. infantis* 157F 事前投与群では、血清中の Stx2 濃度は *B. infantis*^T 事前投与群と比較して、有意に低かったことから、*B. infantis* 157F 事前投与群では、腸管内腔から血中への Stx 体内移行が抑制されていると考えられた。この Stx2 体内移行抑制効果における違いには両菌株が誘導する腸管組織に微小環境の相違が関与していることが推測されたため、これら 2 株の *Bifidobacterium* を GF マウスに単独投与した GB マウスにおける盲腸並びに結腸のトランスクリプトーム及びプロテオーム比較解析を実施した。

材料と方法

動物

第1章に記載した無菌（GF）の BALB/c マウス（メス、8～13 週齢）を用いた。飼養条件

は第 1 章と同様である。*Bifidobacterium* の投与は、GF マウスが維持されているビニールアイソレーターからオートクレーブ可能なステンレス製のアイソレーターにマウスを移動させて行った。

菌の投与

第 1 章に記載した方法、投与菌数で *Bifidobacterium* を GF マウスに経口投与した。投与する *Bifidobacterium* として、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222^T (*B. infantis*^T)と *B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F)を用いた。

また、第 1 章に記載した方法、投与菌数でマウスに *E. coli* 44^{Rf}を経口感染させた。

腸管組織の採材

10 匹ずつの GF マウスに *B. infantis*^Tまたは *B. infantis* 157F を経口投与し、7 日後にマウスを解剖して盲腸および結腸の一部を採材した。盲腸は、結腸との吻合部から 10 mm のところから 15 mm のところにかけて採取した。結腸は、盲腸との吻合部から 5 mm のところから 10 mm の部分を採取した。各組織は採取後、すぐに切り開き、内容物をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffer saline; PBS) (Table 4.2) で洗浄した。RNA 抽出用の組織は、RNA later[®] (Ambion, USA) に浸漬し、4 °C で一晩静置後、余分な RNA later[®] を除去し、抽出操作を行うまで -80 °C で凍結保存した。タンパク質抽出用の組織は、洗浄後、液体窒素を用いて急速凍結した。急速凍結後、抽出操作を行うまで -80 °C で凍結保存した。

E. coli 44^{Rf} 経口感染後の試料は、*Bifidobacterium* を GF マウスに経口投与してから 7 日目に *E. coli* 44^{Rf} を経口感染させ、感染後 1 日目と 6 日目にマウスを解剖し、盲腸の上記部位を採取し、RNA 抽出用のサンプルとして用いた。

トランスクリプトミクス

組織 RNA の抽出

まず、採取した盲腸及び結腸組織 30mg を 600 μ l の Buffer RLT (QIAGEN, USA) 中でホモジナイズし、14,000 rpm で 3 分間遠心分離した上清を採取した。その後の抽出・精製操作は、All Prep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN, USA)を用いて行った。精製した RNA 濃度は NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA)によって測定した。RNA integrity numbers は RNA 6000 Nano LabChip kit と Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies Inc., USA)によって評価した。OD 260/280 比が 2.0 以上、Bioanalyser 28s/18s peak が 1.2 以上、RNA integrity numbers が 8.0 以上であった RNA をマイクロアレイに用いた。

マイクロアレイ

組織から抽出・精製した RNA は Low RNA Input Linear Amp Kit (Agilent Technologies Inc., USA)を用いて蛍光標識 RNA へ変換した。用いた精製 RNA 量は 500 ng で、キットの説明書に従って変換を行った。Cyanine 3-cytidine triphosphate (Cy3, PerkinElmer, USA)をサンプル RNA の標識に用い、Cyanine 5-CTP (Cy5, PerkinElmer, USA)はリファレンス RNA の標識に用いた。蛍光標識した RNA は RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, USA)によって精製し、NanoDrop で再び濃度を測定した。ハイブリダイゼーションは Mouse GE 4 \times 44K V2 Microarray Kit (Agilent technologies Inc., USA) を用いて行い、65 $^{\circ}$ C で 17 時間反応させた。

統計解析・データ解析

マイクロアレイのデータの解析は Bioconductor と統計ソフト R を用いて行った (Smyth 2005)。群間で比較したときに、発現量に 1.5 倍以上の差があり、かつ、modified p-value が 0.05 未満の遺伝子を有意差があった遺伝子として抽出した。2 群間での検定には Student's *t* test を用い、多群間の検定では、Tukey-Kramer 検定を行った。

定量的PCR

組織から抽出した RNA は、High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems Inc., CA) を用いて、cDNA に変換した。PCR 反応のマスターミックスとして、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Life technologies, USA)を用いた。PCR 反応は StepOnePlus[™] Real-time PCR System (Life technologies, USA)を用いて行い、 $\Delta\Delta CT$ 法 (Livak and Schmittgen 2001) によって発現量を算出した。用いたプライマーの一覧は Table 4.4 に示した。

プロテオミクス

組織タンパク質の抽出・精製

B. infantis^T 単独投与マウスおよび *B. infantis* 157F 単独投与マウスから採取した結腸および盲腸のサンプルを一つに集め、組織 1 g あたり 2 ml の lysis buffer (Table 4.3)を加え、冷却しながらガラスホモジナイザーで組織をホモジナイズした。その後、homogenates を室温で 30 分間振盪し、14,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。上清中のタンパク質は 2D-Quant Kit (GE healthcare, Sweden)を用い、キットの説明書にしたがって定量を行った。150 μ l のタンパク質溶液を 6 M、5 M、4 M、3 M、2 M、1 M、0.5 M の尿素溶液中で段階的に 60 分間ずつ透析（排除分子サイズ 3,000）し、遠心分離後、上清を回収し、再び濃度の定量を行った。

Isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ)法によるタンパク質の定量

B. infantis^T 単独投与マウスおよび *B. infantis* 157F 単独投与マウスの盲腸および結腸から抽出した 100 μ g のタンパク質を含む抽出液をチューブに移し、凍結乾燥した。その後、0.5 M の tetraammonium bicarbonate 溶液 (pH 8.5) に再溶解した。さらに、2 %ドデシル硫酸ナトリウム溶液と 100 mM のリン酸トリス (2-クロロエチル) 溶液を 1 μ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。その後、84 mM の iodoacetamide を 1 μ l 添加し、30 分間、遮光

下で振盪した。次に 1 mg/ml のトリプシン溶液 (Promega, USA) を添加後、37 °C で 24 時間酵素処理を行った。トリプシン消化物は iTRAQ reagent Multiplex kit (Applied Biosystems Inc., CA)を用いて、キットの説明書に従ってアイソトープ標識を行った。

アイソトープ標識したトリプシン消化物は、2 次元液体クロマトグラフィー (Two dimensional liquid chromatography: 2D-LC) によって分画を行った (Ultimate nanoflow HPLC, LC Packings, Holland) (Clerens S et al. 2010)。最初に、アイソトープ標識したトリプシン消化産物を loading solvent (Table 4.3) で 200 倍に希釈し、20 µl を Strong cation exchange (SCX) trapping column (20 mm, 500 µm, Sigma-Aldrich, USA) (SCX カラム)に流速 8 µl/min で注入した。この時、通過画分は C18 trap column (5 mm, 300 µm, Sigma-Aldrich) (C18 カラム)に送り込んだ。次に、SCX カラムを流路から遮断し、C18 カラムに loading solvent を通し、通過物を分析カラム (C18, 30 cm, 75 µm, Sigma-Aldrich) に移動させた。再度、SCX の流路を開通させ、loading solvent に引き続いて、同様の操作を 1 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、80 %、100 %の 1 M 塩化カリウム溶液 (Table 4.3) について順番に行った。

分析カラムを通過したペプチド断片は、stainless steel nanospray needle (Proxeon, Denmark) から Q-STAR Pulsar i mass spectrometer (Applied Biosystems inc., CA)に送られ、タンデム質量分析によってアミノ酸配列の決定を行った。

タンパク質の同定は、Mascot Server (Matrix Science, UK)によって行い、タンパク質の発現量の比較は、ピークの高さの比によって算出した。発現量に 1.5 倍以上差があったタンパク質を選別した。

データ解析

選別したタンパク質について、Ingenuity Pathway Analysis (IPA version 7.1; Ingenuity Systems Inc, USA)を用いて、ネットワークおよびパスウェイ解析を行った。

結果

各群間で発現量に有意差があった遺伝子、タンパク質

B. infantis^T および *B. infantis* 157F を単独投与したマウスの盲腸及び結腸組織から調整した mRNA をマイクロアレイに供し、両群間で発現量に有意差のあった遺伝子を Table 2.1 に示した。盲腸と結腸でそれぞれ 1 遺伝子、18 遺伝子の発現量に有意差が見られた。盲腸においては *Col16a1* だけに有意な発現量の差が見られ、*B. infantis* 157F 単独投与群の発現量は、*B. infantis*^T 単独投与群の発現量と比較して、1.8 倍だった。

結腸と盲腸において、両群で発現量に 1.5 倍以上の差が見られたタンパク質のうち差の大きいものから 10 個を並べたものを Table 2.2 に示した。盲腸と結腸でそれぞれ 106、115 のタンパク質の発現量に差が見られた。また、*Col16a1* についてはマイクロアレイでは発現量に違いが認められたのに対し、iTRAQ 法では発現量の差が検出されなかった。

定量的PCRによる盲腸組織*Col16a1* 発現量の比較

盲腸におけるマイクロアレイ解析では、唯一 *Col16a1* 遺伝子の発現量が *B. infantis*^T 単独投与群と比べて、*B. infantis* 157F 単独投与群の方で有意に高かった。この知見を確認する目的で、定量的リアルタイム PCR による *Col16a1* 発現量の定量を試みた。Fig. 2.1 に示すように *E. coli* 44^{Rf} 感染前では、*B. infantis*^T 投与群と比べて、*B. infantis* 157F 投与群の方が *Col16a1* の発現量が 1.76 倍と有意に高かった (Day 0)。また、*E. coli* 44^{Rf} 感染後 1 日目では、有意差は認められないものの、*Col16a1* の発現量は *B. infantis* 157F 投与群では *B. infantis*^T 投与群の 2.25 倍だった (Day 1)。*E. coli* 44^{Rf} 感染後 6 日目では、*B. infantis* 157F 投与群における *Col16a1* の発現量は *B. infantis*^T 投与群の 2.16 倍で、統計的に有意な差であった (Day 6)。

発現量に差のあったタンパク質のパスウェイおよびネットワーク解析

B. infantis^T および *B. infantis* 157F 単独投与群の、盲腸と結腸では 100 を超えるタンパク質の発現量に違いが見られた。そのうち発現量の差が大きかった 10 のタンパク質を Table 2.2 に示した。発現量に差が見られたタンパク質全てを用いて、パスウェイおよびネットワーク解析を行った。盲腸において発現量に差のあったタンパク質の多くは、細胞骨格に関わる 14-3-3-mediated Signaling、Actin Cytoskeleton Signaling、RhoA Signaling、ILK Signaling と関係があった (Table 2.3)。Actin Cytoskeleton Signaling のパスウェイ上のタンパク質は Fig. 2.2 に示した。このパスウェイ上のタンパク質は *B. infantis*^T 投与群の方が *B. infantis* 157F 投与群よりも発現が高かった。両群で差の見られたタンパク質は細胞内代謝に関わる Glycolysis/Gluconeogenesis、Valine, Leucine, and Isoleucine Degradation と関係があるものもあった。Germ Cell-Sertori Cell Signaling に関わるタンパク質 CTNNA1 (α カテニン) の発現量は、*B. infantis* 157F 投与群の方が *B. infantis*^T 投与群よりも高かった。これらのタンパク質は、ネットワークとして Cellular assembly and organization, cellular function and maintenance, dermatological and conditions や Carbohydrate metabolism, lipid metabolism, nucleic acid metabolism などに関連していた (Table 2.5)。結腸においても盲腸と同様に、両群で発現量に違いのあったタンパク質は、細胞骨格に関係するパスウェイである Actin Cytoskeleton Signaling、RhoA Signaling と関連していた (Table 2.4)。ネットワークとしても、Protein trafficking, RNA post-transcriptional modification, cellular assembly and organization などに関連していた (Table 2.5)。

考察

盲腸および結腸において、*B. infantis* 157F 投与群と *B. infantis*^T 投与群間で発現量に有意差のあった遺伝子数は、盲腸で 1 遺伝子、結腸で 18 遺伝子であり、発現量の異なる遺伝子数

と種類は盲腸と結腸に違いが見られた。盲腸においては *Col16a1* のみに有意な差があり、*B. infantis* 157F 投与群が *B. infantis*^T 投与群と比較して有意に発現量が高かった。*Col16a1* は、細胞外マトリックスの構成要素の 1 つで、fibril associated collagens with interrupted triple helices に分類され、線維性コラーゲンを修飾する。病態との関連では、クローン病の炎症のステージが進行するにつれて、結腸組織内筋線維芽細胞の限局的な接着斑において発現量が増加することが報告されている (Ratzinger et al. 2010)。しかしながら、その機能が病態の形成に関連するものか、病態に対する保護作用を持つものかは、現在のところ不明である。本実験では、*E. coli* 44^{Rf} に対する保護効果を持つ *B. infantis* 157F 投与群で、*B. infantis*^T 投与群よりも、*E. coli* 44^{Rf} の感染前後で *Col16a1* の発現量が高いことが明らかになった。結腸組織において 18 遺伝子の発現量に有意な差があったが、それらの多くは機能不明の遺伝子であった。しかしながら、*B. infantis* 157F 投与群において、細胞骨格を構成するチューブリン合成に関与する *Ttl3* の発現量が *B. infantis*^T 投与群と比較して有意に低かったことから、結腸においては、*B. infantis* 157F がチューブリン合成のターンオーバーを抑制している可能性が考えられる。

盲腸および結腸のプロテオミクスでは、*B. infantis* 157F 投与群におけるアクチンやチューブリンなどの細胞骨格を構成するタンパク質発現が *B. infantis*^T 投与群と比較して低下していた。また、アクチン重合を調節していることが報告されている (Gohla and Bokoch 2002) 14-3-3 タンパク質の発現量も *B. infantis* 157F 投与群が *B. infantis*^T 投与群と比較して明らかに低下していた。アクチンフィラメントはタイトジャンクションを構成する ZO-1 などのタンパク質と結合し、タイトジャンクションの機能を調節しており (Madara et al. 1987)、アクチンフィラメントの脱重合はタイトジャンクションの破壊を起こす (Nusrat et al. 1995)。そして、タイトジャンクションの破壊は、*Stx2* の腸管上皮細胞の通過を促進すると報告されている (Hurley et al. 2001)。従って、アクチンのターンオーバーを抑制することは *Stx2* の体内移行阻止において、重要であると考えられる。一方、チューブリンのターンオーバー

の頻度の高さがタイトジャンクションの分解と関連しているとの報告がある (Yap et al. 1995)。また、Anderson らは *L. plantarum* MB452 生菌がタイトジャンクションの完全性を司る遺伝子発現を通じて、Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗を上昇させることを報告しているが、彼らはまた、この菌がチューブリンをコードする遺伝子の発現を抑制することを示している (Anderson et al. 2010)。 α カテニン、 β カテニンを介して接着結合を構成するカドヘリンと相互作用していることが報告されている (Maiden and Hardin 2011)。*B. infantis* 157F 投与群における α カテニンの発現量が *B. infantis*^T 投与群よりも高かったことから、*B. infantis* 157F は接着結合にも何らかの影響を与えている可能性がある。マイクロアレイおよび iTRAQ 法ではタイトジャンクションを構成するタンパク質の両群における相違は認められなかったが、*B. infantis* 157F は、アクチンやチューブリンのターンオーバーを抑制し、腸管細胞を安定化させることにより、Stx2 の血中への移行阻止に働いている可能性がある。

本実験では、盲腸と結腸の両組織で発現に違いが見られた遺伝子の数とタンパク質の数に大きな差があり、トランスクリプトミクスとプロテオミクスでの結果に違いがあった。これまでに、トランスクリプトミクスとプロテオミクスの統合が様々な実験系で検討されているが、発現量に差のある遺伝子とタンパク質に相関が高い報告 (Koh et al. 2007) もあれば、その逆に両者の相関は低いという報告も行われている (Kuo et al. 2005、Zheng et al. 2005)。トランスクリプトミクスとプロテオミクスの結果に違いがある理由として、細胞核内で転写された mRNA は、細胞質内へ輸送され、リボソーム上でタンパク質へ翻訳されるが、その翻訳の過程、あるいは翻訳後に様々な生理的な影響を受ける (Day and Tuite 1998、Kornberg 1999) ことが考えられる。本研究においても、翻訳過程あるいは翻訳後の影響が遺伝子発現レベルとタンパク質発現レベルの違いをもたらした可能性が考えられるが、今後の詳細な検討が必要である。

現在、*Coll16a1* の腸管内における役割は全て明らかにされておらず、また、本実験において、iTRAQ 法では *Coll16a1* が検出されなかったものの *Bifidobacterium* による *E. coli* O157:H7

腸管感染死抑制のバイオマーカーとなる可能性があり、また、機序は不明だが、*Coll6a1* 遺伝子は *E. coli* 44^{Rf} 感染に保護的に働き、特に、Stx2 の血中への移行阻止において重要な役割を果たしている可能性がある。

Table 2.1 Differently expressed genes in the microarray analysis
between the *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F group.

	Gene name	Gene symbol	Log ₂ FC ^a
Cecum	(1 gene)		
	Collagen, type XVI, alpha 1	<i>Col16a1</i>	0.87
Colon	(18 genes)		
	Predicted gene 885	<i>Gm885</i>	-0.63
	Uncharacterized protein C1orf54 homolog Precursor	<i>ENSMUST00000036360</i>	-0.60
	Novel protein	<i>ENSMUST00000104938</i>	-0.68
	RIKEN cDNA 1010001N08 gene	<i>1010001N08Rik</i>	-0.73
	Unknown	<i>A_55_P2158281</i>	-0.84
	Hypothetical Leucine-rich repeat	<i>ENSMUST00000108263</i>	-0.70
	RIKEN cDNA 6330406I15 gene	<i>6330406I15Rik</i>	-0.69
	WD repeat domain 34	<i>Wdr34</i>	-0.61
	2 days neonate thymus thymic cells cDNA	<i>AU018505</i>	-0.63
	13 days embryo head cDNA	<i>4632427E13Rik</i>	-0.72
	tubulin tyrosine ligase-like family, member 3	<i>Ttll3</i>	-0.93
	tetratricopeptide repeat domain 38	<i>Ttc38</i>	-0.91
	RIKEN cDNA 2810417H13 gene	<i>2810417H13Rik</i>	-0.70
	RIKEN cDNA A730011L01 gene	<i>A730011L01Rik</i>	-0.69
	Similar to leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 3	<i>LOC100044531</i>	-0.66
	Unknown	<i>A_55_P2157838</i>	-0.77
	Synergisin, gamma, transcript variant 2	<i>Synrg</i>	-0.66
	Visual cortex cDNA	<i>C81189</i>	-0.95

^a FC means fold change. The positive values mean that the genes of the *B. infantis* 157F group were expressed higher than those of the *B. infantis*^T group. The negative values mean that the genes of the *B. infantis*^T group were expressed higher than that of the *B. infantis* 157F group.

Table 2.2 The top 10 proteins differently detected in the iTRAQ analysis between the *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F group.

Protein name	ID	Log ₂ FC ^a
Cecum		
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 26344914	-3.05
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 74141821	-2.95
mKIAA1705 protein [Mus musculus]	gi 37360514	-2.93
cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial precursor [Mus musculus]	gi 46593021	-2.66
tropomyosin alpha-1 chain isoform h [Rattus norvegicus]	gi 78000201	-2.63
beta-2-globin [Mus musculus]	gi 4760588	-2.54
beta-globin [Mus pahari]	gi 261873689	-2.51
tropomyosin alpha-1 chain isoform g [Rattus norvegicus]	gi 78000199	-2.36
alpha-tubulin [Homo sapiens]	gi 32015	-2.32
Chain A, 1.8 Angstroms Molecular Structure Of Mouse Liver Class Pi Glutathione S-Transferase Complexed With S-(P-Nitrobenzyl) Glutathione And Other Inhibitors	gi 576133	-2.26
Colon		
14-3-3 protein gamma [Mus musculus]	gi 3065929	-2.63
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 74141821	-2.56
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 26344914	-2.50
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide, isoform CRA_a [Mus musculus]	gi 148674410	-2.48
zinc finger protein 462 [Mus musculus]	gi 114431238	-2.09
zinc finger protein 462 [Mus musculus]	gi 148670321	-2.01
zinc finger protein 462 [Mus musculus]	gi 85740499	-1.94
alpha-tubulin [Homo sapiens]	gi 32015	-1.91
beta-globin [Mus pahari]	gi 261873689	-1.89
beta-2-globin [Mus musculus]	gi 4760588	-1.86

^aFC means fold change. The positive values mean that the protein of the *B. infantis* 157F group was expressed higher than that of the *B. infantis*^T group. The negative values mean that the protein of the *B. infantis*^T group was expressed higher than that of the *B. infantis* 157F group.

Table 2.3 The top 10 canonical pathways made from molecules that are different in the cecum between *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F group.

Pathway	-log(<i>P</i> -value)	Ratio	Molecules
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	1.18E+01	8.98E-02	TUBB2C,ACTB,TUBA4A, <u>CTNNA1</u> ,IQGAP1, TUBB4,TUBB,ACTG1,TUBA1B,Actg2,TUBA1A, TUBA8,ACTG2,ACTN4,ACTN1
14-3-3-mediated Signaling	1.12E+01	1.08E-01	YWHAG,YWHAЕ,YWHAH,TUBB2C,YWHAB, YWHAZ,TUBA4A,VIM,TUBB4,TUBB,TUBA1B, TUBA1A,TUBA8
Actin Cytoskeleton Signaling	6.96E+00	5.04E-02	Myl9,MYLK,Actg2,PFN1,EZR,ACTB,MYH11, ACTG2,ACTN4,IQGAP1,ACTG1,ACTN1
ILK Signaling	5.72E+00	5.18E-02	Actg2,FLNB,KRT18,ACTB,VIM,MYH11,ACTG2, ACTN4,ACTG1,ACTN1
RhoA Signaling	5.66E+00	7.14E-02	Myl9,MYLK,Actg2,PFN1,EZR,ACTB,ACTG2, ACTG1
Glycolysis/Gluconeogenesis	5.18E+00	5.22E-02	PGK1,ALDH1B1,HK1,GPI,ALDH1A1,ENO1, ALDOA
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	4.94E+00	5.66E-02	ALDH1B1,ALDH1A1,HMGCS2,ACAA2, HADHA,ACADS
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	4.64E+00	1.02E-01	YWHAG,YWHAЕ,YWHAH,YWHAB,YWHAZ
VEGF Signaling	4.21E+00	6.06E-02	YWHAЕ,ACTB,ACTG2,ACTN4,ACTG1,ACTN1
Virus Entry via Endocytic Pathways	4.13E+00	6.00E-02	Actg2,FLNB,ACTB,CLTC,ACTG2,ACTG1

Molecules with underline were detected higher in the *B. infantis* 157F group than in the *B. infantis*^T group.

Table 2.4 The top 10 canonical pathways made from molecules that are different in the colon between *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F group.

Pathway	-log(<i>P</i> -value)	Ratio	Molecules
14-3-3-mediated Signaling	1.29E+01	1.00E-01	YWHAG,TUBA8,YWHAE,YWHAH,TUBB2C, YWHAB,YWHAZ,TUBA4A,VIM,TUBB4, TUBB,TUBA1B
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	1.13E+01	7.19E-02	Actg2,TUBA8,TUBB2C,ACTB,TUBA4A,ACTG2, ACTN4,TUBB4,TUBB,ACTG1,TUBA1B,ACTN1
Actin Cytoskeleton Signaling	6.36E+00	3.78E-02	Myl9, <u>MYLK</u> ,Actg2,EZR,ACTB,ACTG2, ACTN4,ACTG1,ACTN1
RhoA Signaling	6.26E+00	6.25E-02	Myl9, <u>MYLK</u> ,Actg2,EZR,ACTB,ACTG2,ACTG1
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	5.83E+00	1.02E-01	YWHAG,YWHAE,YWHAH,YWHAB,YWHAZ
VEGF Signaling	5.61E+00	6.06E-02	YWHAE,ACTB,ACTG2,ACTN4,ACTG1,ACTN1
Myc Mediated Apoptosis Signaling	5.19E+00	8.20E-02	YWHAG,YWHAE,YWHAH,YWHAB,YWHAZ
ERK5 Signaling	5.08E+00	7.81E-02	YWHAG,YWHAE,YWHAH,YWHAB,YWHAZ
Protein Kinase A Signaling	5.06E+00	2.75E-02	Myl9,MYLK,YWHAG,Calm1 (includes others), YWHAE,YWHAH,YWHAB,YWHAZ,RYR1
Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	4.89E+00	7.25E-02	Actg2,ACTB,LAMB1,ACTG2,ACTG1

Molecules with underline were detected higher in the *B. infantis* 157F group than in the *B. infantis*^T group.

Table 2.5 Network analyses using proteins differently detected
in each part of the intestine between the *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F group.

Networks	Score
Cecum	
Cellular assembly and organization, cellular function and maintenance, dermatological and conditions	60
Carbohydrate metabolism, lipid metabolism, nucleic acid metabolism	43
Cancer, reproductive system disease, neurological disease	40
Cellular development, cellular growth and proliferation, hair and skin development and function	33
Connective tissue disorders, dermatological diseases and conditions, development disorder	32
Colon	
Cancer, reproductive system disease, neurological disease	57
Protein trafficking, RNA post-transcriptional modification, cellular assembly and organization	52
Genetic disorder, skeletal and muscular disorders, cellular development	22
Lipid metabolism, small Molecule biochemistry, endocrine system disorders	20
Carbohydrate metabolism, molecular transport, small molecule biochemistry	13

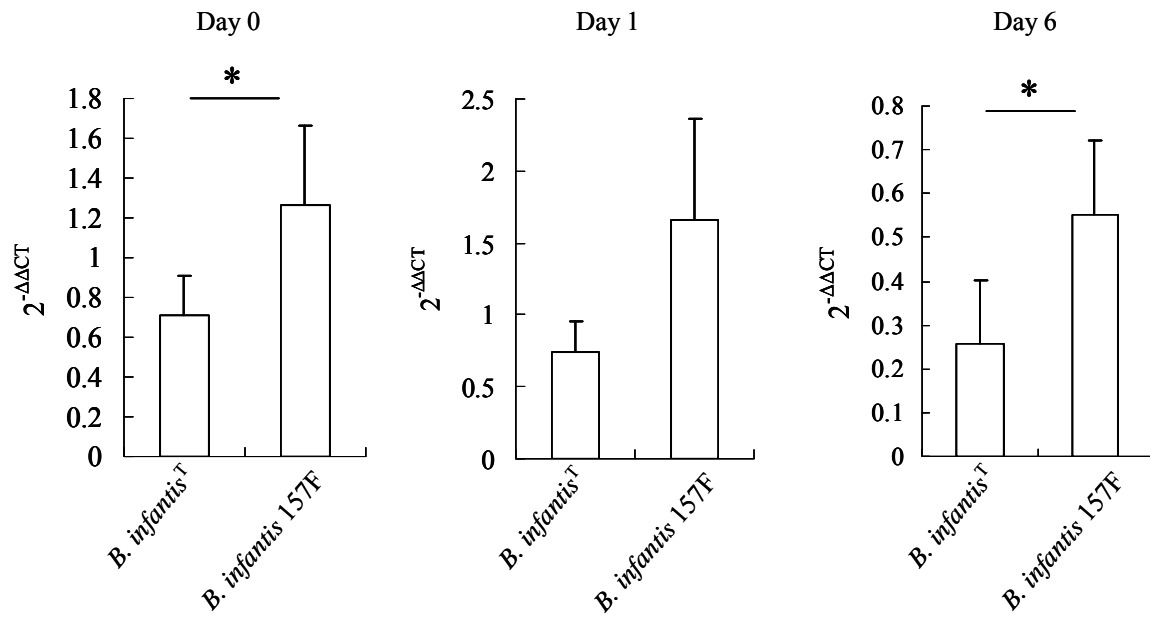


Fig. 2.1 Relative expressions of *Col16a1* in the cecum of GB mice associated with *Bifidobacterium* strains with or without *E. coli* 44^{Rf}.

* There were significant differences in the expression of *Col16a1* between the *B. infantis*^T and *B. infantis* 157F group. Day 0 (n = 6), day 1 (n = 3), and day 6 (n = 4), respectively

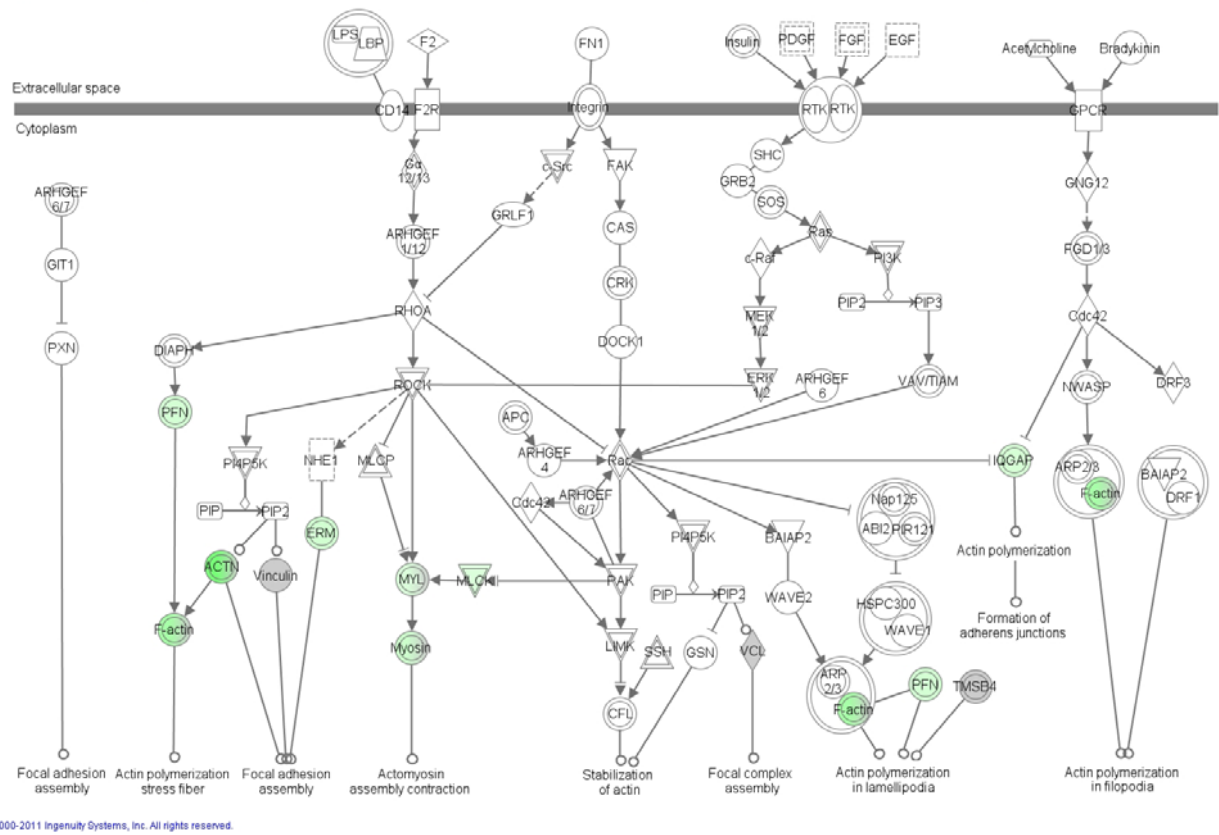


Fig. 2.2 Actin cytoskeleton signaling pathway contains the differently detected proteins between the

B. infantis^T and *B. infantis* 157F group.

The molecules with green color were expressed higher in the *B. infantis*^T group than in the *B. infantis* 157F group.

第 3 章

Bifidobacterium によるマウス盲腸内における
腸管出血性大腸菌 O157:H7 の
志賀毒素産生抑制メカニズムの解明

序論

第 1 章において、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 と *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 がノトバイオートマウスの *E. coli* O157:H7 感染によるマウスの死亡を阻止するメカニズムの一つとして、盲腸内において *E. coli* O157:H7 による志賀毒素 (Shiga toxin: Stx) の血中移行阻止ならびに Stx2 の産生抑制が重要であることを示唆してきた。第 2 章では Stx2 の血中移行阻害の機構についてトランスクリプトミクスならびにプロテオミクス解析により、その解明を試み、Stx2 の体内移行阻害はこれらの菌株により誘導される細胞骨格系のターンオーバーの抑制が関与していることを明らかにした。第 3 章では、マウス盲腸内における *Bifidobacterium* による *E. coli* O157:H7 の Stx 産生抑制メカニズムの解明を試みた。マウス盲腸内容物に *E. coli* O157:H7 からの Stx2 産生を抑制する物質があるかどうかを知るために、*in vitro* 系を構築し、感染防御能のある菌株投与マウスと防御能を持たない菌株を投与したマウスで、盲腸内容物の Stx2 産生に及ぼす影響を比較した。その結果、マウス盲腸内容物に含まれる多糖、特に酸性多糖の代謝能の違いが *E. coli* O157:H7 による Stx2 産生抑制における *Bifidobacterium* 株間の差に反映されることを明らかにした。

材料と方法

動物

第 1 章に記載した無菌 (GF) の BALB/c マウス (メス、8~13 週齢) を用いた。飼養条件は第 1 章と同様である。*Bifidobacterium* の投与は、GF マウスが維持されているビニールアイソレーターからオートクレーブ可能なステンレス製のアイソレーターにマウスを移動させて行った。

菌の投与

第 1 章に記載した方法、投与菌数で *Bifidobacterium* を GF マウスに経口投与した。投与菌として、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222^T (*B. infantis*^T)と *B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F)を用いた。

盲腸抽出液の作製

マウス盲腸内での *E. coli* 44^{Rf} の毒素産生抑制メカニズムを検討するために、マウス盲腸抽出液 (Momose et al. 2008) を作製した。*B. infantis*^T または *B. infantis* 157F を GF マウスに経口投与してから 7 日後に盲腸内容物を採取した。採取した盲腸内容物と等量の蒸留水を添加し、攪拌後、3,000 rpm で 10 分間遠心した上清に Na₂CO₃ が 0.084 %、L-cystein・HCl・H₂O が 0.05 %になるように添加した。115 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌を行った後、嫌気性チャンバー内に搬入し、2 日間放置して酸素を除去した。

エタノール沈殿法による盲腸内容物の分画

GF マウス盲腸内容物に等量の蒸留水を加え、懸濁液にした。この懸濁液 1 容量に対して、2 容量の 99.5 %エタノールを添加し、3,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を低分子分画、沈殿を高分子分画とし、凍結乾燥させた粉末を実験に使用した。

2 次元電気泳動法

B. infantis^T または *B. infantis* 157F を単独投与したマウス 10 匹から 100 mg ずつ盲腸内容物を回収し、総量を 1 g とした。Lysis Buffer を 2 ml 加え、冷却しながらガラスホモジナイザーでホモジナイズした。その後、懸濁液を室温で 30 分間振盪し、14,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。上清中のタンパク質は 2D-Quant Kit を用いて定量した。Rehydrate

solution (Table 4.4) でタンパク質溶液を 1 mg/ml に調整し、Immobiline dry strip NL 3 – 11 18 cm (GE Healthcare, Sweden) を再水和した。最初の分離は、Protean IEF (BIORAD, USA)内で行い、合計で 83,590 kW の電圧をかけた。次の分離は、2 mm × 18 cm × 18 cm の 12.5 % トリス-グリシンポリアクリルアミドゲル (Table 4.4) を用いて、Protean II xi tank (BIORAD, USA) 内で、250 V、50 mA、15W の条件で 6 時間かけて行った。スポットは、Coomassie Blue G250 (Sigma-Aldrich, USA)を用いて、検出した。

菌体外多糖の分離

Bifidobacterium が産生する菌体外多糖の分離は、Salazar らの方法 (Salazar et al. 2008) を用いて行った。まず、BL 寒天培地上で発育した *Bifidobacterium* の集落を釣菌し、0.25 % の L-cystein · HCl · H₂O を添加した MRS 培地上 (Table 4.1) に接種した後、37 °C で 5 日間、嫌気培養を行った。培養終了後、発育した *Bifidobacterium* の集落をプレート 1 枚について、2 ml の MilliQ 水に懸濁した。菌体懸濁液に等量の 2 M の NaOH 溶液を加え。振盪させながら、室温で 24 時間、菌体外多糖の分離を行った。その後、15,000 rpm で 5 分の遠心分離によって菌体を除去した後に、2 倍量の 99.5 % エタノールを添加した。4 °C で 48 時間静置した後、3,000 rpm で 10 分間の遠心分離を行い、菌体外多糖を回収した。回収した菌体外多糖は、凍結乾燥後、水に再溶解させ、Amicon[®] Ultra (3 K) (Millipore, USA)によって脱塩操作を行った。脱塩した菌体外多糖を再び、凍結乾燥させ、0.5 % w/v の濃度になるように、GF マウス盲腸抽出液に溶解させた。

多糖の抽出と精製

マウス盲腸内多糖抽出は Kokean らの方法に基づいて行った (Kokean et al. 2004)。まず、凍結乾燥させた GF マウス、*B. infantis*^T 単独投与マウス、*B. infantis* 157F 単独投与マウスの盲腸内容物を乳鉢で粉碎した。乾燥粉末 1 g あたり 5 ml のクロロホルム : メタノール = 1 :

1 溶液を加え、50 °C で 30 分間振とう後、3,000 rpm で 10 分間遠心を行った。残渣についてこの操作を 2 回繰り返した。次に、同様の操作をエタノール : ジエチルエーテル = 1 : 1 溶液で行った後、残渣を 42 °C で乾燥させ、脱脂を行った。0.5 M の水酸化ナトリウム溶液を脱脂乾燥粉末 1 g あたり 10 ml 加え、攪拌後、50 °C で 1 時間抽出した。その後、3,000 rpm で 10 分間遠心を行い、その上清を酸性多糖 (Acidic polysaccharides: ACP) とした。沈殿のアルカリ不溶分画に 1 M 塩酸を 5 ml 加え、攪拌後、50 °C で 1 時間抽出した。その後、3,000 rpm で 10 分間遠心を行い、その上清をアルカリ性多糖 (Alkali polysaccharides: ALP) とした。このときに得られた沈殿は不溶性多糖 (Non-soluble polysaccharides: NSP) とした。ACP と ALP については中和後、2 倍容量の 99.5 %冷エタノールを添加し、生成した沈殿を遠心分離によって回収した。回収後、75 %エタノールによって洗浄を 2 回行った。NSP についても蒸留水を加え、中和後、遠心分離を行い、沈殿を回収した。回収した各多糖分画は凍結乾燥後、トリプシン (Wako) を 50 mg/ml 含んだ 10 mM トリス塩酸緩衝液に懸濁した後、37 °C で 24 時間の除タンパクを行った。その後、95 °C で 10 分間の加熱処理でトリプシンを失活させた後、再び 2 倍量の 99.5 %冷エタノールを添加し、生成した沈殿を遠心分離によって回収した。回収された沈殿を再び凍結乾燥し、得られた粉末を各実験に用いた。また、GF マウスの ACP、ALP、NSP の乾燥重量を測定し、湿重量 1 g に占める各多糖分画の割合を測定した。

糖分解性状試験

本章では、*Bifidobacterium* の菌株として、*B. adolescentis* JCM1275^T (*B. adolescentis*^T)、*B. bifidum* JCM1255^T (*B. bifidum*^T)、*B. breve* JCM1192^T (*B. breve*^T)、*B. infantis*^T、*B. infantis* 157F、*B. longum* subsp. *longum* JCM1217^T (*B. longum*^T)、*B. longum* subsp. *longum* NCC2705 (*B. longum* NS)、*B. pseudocatenulatum* JCM1200^T (*B. pseudocatenulatum*^T) を用いた

マウス盲腸から抽出した多糖に対する各 *Bifidobacterium* の分解性状の違いは Mitsuoka の

方法に基づいて行った (Mitsuoka 1969)。BL 寒天培地上に発育した *Bifidobacterium* のコロニーを、アスコルビン酸システイン溶液を 4.5 ml あたり 0.05 ml 添加した Briggs liver broth に接種し、37 °C で 24 時間の嫌気培養を行った。その後、再び同培地に *Bifidobacterium* の菌液を接種し、37 °C で 24 時間の嫌気培養を行った。4 °C、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、菌体を沈降させた。上清を捨てた後、0.1 %チオグリコール酸ナトリウムと 0.1 % L-cystein・HCl・H₂O を含む生理食塩水を 2.25 ml 加えて菌体を再浮遊させたものを接種菌液として用いた。ACP、ALP、NSP を基礎培地に 0.5 % w/v になるように加えた後に、115 °C で 20 分間のオートクレーブ滅菌した糖分解試験用培地は、菌液を接種する直前に 100 °C で 5 分間の脱気を行い、培地 1 ml に対し、0.03 ml の菌液を接種した。菌液接種後のすべての培地には滅菌した流動パラフィンを 0.3 ml ずつ重層し、37 °C で培養した。判定は培養開始から 4 日目と 10 日目に基礎培地に加えられていた pH 指示薬の色調を読み取り、糖を接種していない陰性対照との比較によって行い、酸を産生したものを陽性とした。

E. coli 44^{Rf} の多糖分解性状試験は OF 試験 (Hugh and Leifson 1953) により行った。各多糖について OF 培地 (Table 4.1) を分注した試験管を 2 本用意し、培地に TS 培地上に発育させた *E. coli* 44^{Rf} を穿刺した。1 本は好気培養し、もう 1 本は流動パラフィンを重層し、嫌気培養した。2 日間の培養後、判定を行った。

多糖添加培地およびマウス盲腸抽出液中での *E. coli* 44^{Rf} の培養

TS 培地を基礎培地として各多糖を添加したものおよびマウス盲腸抽出液中で *E. coli* 44^{Rf} を培養した。保存用 EG ブロス中で -80 °C に凍結保存された *E. coli* 44^{Rf} を TS 寒天培地上に接種し、37 °C で 24 時間、好気培養を行った。TS 培地上に発育した *E. coli* 44^{Rf} のコロニーを 1 ループかき取り、4.5 ml の PBS(-) に懸濁した。懸濁液を 10 倍階段希釈後、培地中での菌数が 10⁴ CFU/ml になるように嫌気性チャンバー内で *E. coli* 44^{Rf} を接種した。*E. coli* 44^{Rf} を接種した 24 時間後、培地を回収し、菌数の測定と産生された Stx の定量を行った。菌数

の測定は、培養液を 0.075 %寒天加 PBS(-)で 10^{-6} まで希釈し、TS 寒天培地に 10^{-5} と 10^{-6} を 0.05 ml ずつ接種して、37 °C で 24 時間、好気培養をして行った。

Stx2 の測定

E. coli 44^{Rf} の培養後、各培地を 4 °C 、15,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。さらに、上清をシリンジフィルター (pore size: 0.45 µm、Acrodisc、Pall、USA) で濾過した。培養上清中に含まれる Stx2 の濃度は ELISA 法 (オーソ VT1/VT2 (Ortho Clinical Diagnostics, Japan)) を用い、キットの説明書にしたがって測定した。スタンダードとして、VT2 溶液 (VTEC-RPLA, Denka, Japan) を用いた。

統計解析

各群間の有意差を検定するために、Tukey-Kramer test を行い、*P* 値が 0.05 未満を有意差ありと判定した。

結果

盲腸内容物中の高分子物質が*E. coli* 44^{Rf}のStx2 産生に与える影響

GF 盲腸内容物をエタノール沈殿法によって分画し、得られた分画を終濃度が 0.5 %となるように TSB broth に添加し、その中で *E. coli* 44^{Rf} を嫌気培養した。Fig. 3.1 に示すように、高分子分画を加えた培地で *E. coli* 44^{Rf} を培養した場合に、有意に高い濃度の Stx2 が検出された。この成績は高分子分画に Stx2 産生を促す物質が存在することを示している。

GFおよびGBマウス盲腸抽出液中での*E. coli* 44^{Rf}のStx2 産生

次に、GF マウス、*B. infantis*^T 単独投与マウス、*B. infantis* 157F 単独投与マウスの盲腸内容物から作製した盲腸抽出液中で *E. coli* 44^{Rf} の嫌気培養を行い、37 °C、24 時間培養後の各培地中での *E. coli* 44^{Rf} の菌数と Stx2 濃度を測定した。菌数には有意な差は見られなかったものの、Fig. 3.2 から明らかなように、*B. infantis* 157F 投与マウスから作製した盲腸抽出液では、他の 2 群と比較して、Stx2 の濃度が有意に低かった。(Fig. 3.2) これらの成績は、*B. infantis* 157F を投与したマウスの盲腸内には *E. coli* 44^{Rf} からの Stx2 産生を促す物質が欠如している可能性を示唆している。

盲腸内容物の二次元電気泳動

一方、*B. infantis* 157F を投与したマウスの盲腸内に *E. coli* 44^{Rf} による Stx2 産生の抑制につながるタンパク質の誘導があるかどうかを検討するために、*B. infantis*^T および *B. infantis* 157F 単独投与マウス盲腸内容物からタンパク質を抽出し、2 次元電気泳動法によって比較を行った。その結果を Fig 3.3 に示したが、*E. coli* 44^{Rf} に対して感染防御能を持つ *B. infantis* 157F 投与群に特異的なスポットは検出されなかった。

盲腸内の各多糖画分に対する *Bifidobacterium*、*E. coli* 44^{Rf} の分解性状の違い

Bifidobacterium は菌体外にタンパク質以外に多糖を分泌することが知られている。そこで、菌体外多糖を抽出し、*E. coli* 44^{Rf} による Stx2 産生に対する効果を検討したところ、菌体外多糖による Stx2 産生の抑制は認められなかった (Fig. 3.4)。これらの成績は、*B. infantis* 157F 投与マウスで認められた *E. coli* 44^{Rf} 産生の抑制は、盲腸内容物中に存在する阻害物質に起因するのではなく、耐熱性でエタノール添加によって沈殿する物質が欠如していることによる可能性を強く示唆している。この物質が耐熱性でエタノール添加によって沈殿する物質であることから、多糖である可能性を検討することにした。GF マウスから多糖を酸性多糖 (ACP)、アルカリ多糖 (ALP) および不溶性多糖 (NSP) に分画し、各分画を定量した成

績を Table 3.1 に、各分画が *Bifidobacterium* 菌株および *E. coli* 44^{Rf} によって利用されるか否かを検討した成績を Table 2.2 に示した。試験したすべての *Bifidobacterium* 菌株のうち、マウスの *E. coli* 44^{Rf} 感染に対する防御能を持った菌株である *B. infantis* 157F と *B. longum* NS のみが ACP を分解することが明らかとなった。一方、*E. coli* 44^{Rf} についてはすべての多糖分画を酸化的、嫌氣的に分解した。

盲腸内容物中の酸性多糖量が*E. coli* 44^{Rf}のStx2 産生に与える影響

ACP の量に依存して、Stx2 産生が抑制されるかどうかを検討するため、ALP と NSP の量は一定に保ち、ACP の量のみを変化させた場合の Stx2 産生を調べた。ALP と NSP は Table 3.1 に示した GF マウスにおける量（3 及び 3.5 %）に固定し、ACP を GF マウスにおける量から希釈した。Fig 3.5 に示すように、ACP 量の減少に伴って、Stx2 濃度は明らかに減少した。しかし、ACP 量を減じても、*E. coli* 44^{Rf} の菌数に有意な差は認められなかった。以上の成績は、盲腸内の ACP を *E. coli* 44^{Rf} と *B. infantis* 157F が競合することにより、*E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生抑制を導くことを強く示唆している。

マウス盲腸内の酸性多糖量

次に、*B. infantis* 157F の事前投与がマウス盲腸内の ACP 量の変化をもたらすかどうかを検討した。GF マウス、*B. infantis*^T および *B. infantis* 157F 単独投与マウスの盲腸内容物から ACP を抽出し、3 群で湿重量 1 g に占める ACP の割合を比較した。*B. infantis* 157F 単独投与マウスでは、他の 2 群と比較して ACP の割合が有意に低くなっていたことが明らかになった (Fig 3.6)。

考察

E. coli O157:H7 の Stx をコードする遺伝子は溶原化している Stx 転換ファージのゲノム上に存在している (Wagner and Waldor 2002)。Stx1 と Stx2 の転写のメカニズムは異なっており、Stx1 は上流近傍に存在する Stx1 プロモーターから転写され、Stx2 は Stx2 転換ファージの後期ファージプロモーターから転写される (Calderwood et al. 1987)。Stx1 プロモーターは、鉄イオン濃度によって活性が変化する転写調節因子 Fur によって負に調節されるので、Stx1 の発現は、低鉄イオン条件で増加する (Calderwood and Mekalanos 1987)。一方、Stx2 をコードする遺伝子上流近傍には、独自のプロモーターは存在していない (Wagner and Waldor 2002)。Stx2 転換ファージを溶原化している *E. coli* O157:H7 では、マイトマイシン C (Al-Jumaili et al. 1992) や UV 照射 (Fuchs et al. 1999) などの DNA に損傷を与えるような条件によって SOS 応答が誘起されると、RecA プロテアーゼが活性化され、溶原化を維持する *ci* リプレッサーが分解された結果、ファージ誘導が起こり、Stx2 の産生が増強される (Muhldorfer et al. 1996)。また、各種抗生物質による処理 (Herold et al. 2005, Ohara et al. 2002)、特定の大腸菌が産生する DNase コリシン処理 (Toshima et al. 2007)、好中球との共培養による過酸化水素刺激 (Wagner et al. 2001) によっても EHEC の Stx2 産生は促進される。その一方で、SOS 応答の構成要素である RecA に非依存的な Stx2 転換ファージの誘起が EDTA やクエン酸によって引き起こされることも報告されている (Imanovic and Muniesa 2012)。したがって、*in vitro* や *in vivo* において Stx2 産生に関わる SOS 応答以外のメカニズムが今後さらに明らかにされる可能性がある。

本章では、まず GF マウス盲腸内容物を高分子と低分子に分画し、*E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生に必要な分画の特定を試みた。エタノール沈殿による分画の結果から、盲腸内容物中に存在する高分子の多糖やタンパク質が *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生に必要であることが示された。また、両 *Bifidobacterium* 菌株投与マウスの盲腸内容物中のタンパク質の 2 次元電気泳動法

パターンに差が見られなかったことから、マウス盲腸内での *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生に関しては、タンパク質以外の物質、すなわち、多糖が重要であることが示唆された。

Bifidobacterium が *E. coli* O157:H7 の Stx 産生を抑制するメカニズムとして、有機酸が重要であることが報告されてきた。Asahara らは、ストレプトマイシン投与マウスを用いた *E. coli* O157:H7 感染モデルにおいて、*B. breve* Yakurt 株が産生した酢酸とその産生に伴う低 pH によって、マウス盲腸内における Stx1 および Stx2 の濃度が他の *Bifidobacterium* 菌株を投与したときと比較して、有意に低下することを示した (Asahara et al. 2004)。また、*in vitro* においても、酢酸及び乳酸の濃度上昇と pH 低下に伴って、Stx2 のサブユニット A をコードする遺伝子の発現が低下したことが示されている (Carey et al. 2008)。しかし、筆者が第 1 章で示したように、*E. coli* 44^{Rf} に対する感染防御能を持つ *Bifidobacterium* 菌株を事前投与した GB マウスと、*E. coli* 44^{Rf} に対する感染防御能を持たない *Bifidobacterium* 菌株を事前投与した GB マウスにおける盲腸内容物中の有機酸濃度と組成には、*E. coli* 44^{Rf} 感染後に有意差は認められていない。したがって、両群盲腸内容物中での Stx2 濃度の相違には有機酸の関与はないか、あっても極めて僅かであると考えられる。

一方、本章で得られた GF、GB マウス盲腸抽出液中での *E. coli* 44^{Rf} 培養の結果からは、*B. infantis* 157F 単独投与マウス盲腸内容物中に Stx2 産生抑制に関わる何らかの因子が存在することが示唆された。酢酸と乳酸に加えて、有機酸以外の *Bifidobacterium* の代謝産物が *E. coli* O157:H7 の Stx2 の産生抑制に関連していることも示されている (Kobayashi et al. 2001)。*Bifidobacterium* 以外では、*Bacteroides thetaiotaomicron* の産生する分子量 3,000 以下の画分が *E. coli* O157:H7 の Stx の産生を抑制したと報告されている (de Salbe et al. 2009)。*Bifidobacterium* が分泌する物質として、タンパク質や菌体外多糖 (Abdad-Andaloussi et al. 1995) が知られている。タンパク質については、*B. infantis*^T と *B. infantis* 157F 単独投与マウスの盲腸内容物の 2 次元電気泳動法による比較で、*B. infantis* 157F 投与群だけに特異的なスポットは検出されなかったことから、その関与の可能性は極めて低いと考えられる。また、

データは示していないが、それぞれの *Bifidobacterium* から抽出した菌体外多糖について、*E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生抑制効果は確認されなかったことから、*B. infantis* 157F 投与マウスの盲腸内に *E. coli* 44^{Rf} からの Stx2 産生を阻害する因子が存在する可能性については否定的である。*E. coli* 44^{Rf} から Stx2 が産生されるためには、GF マウスの盲腸抽出液あるいはその高分子（HM）分画が必要であったことから、HM 分画に濃縮される多糖が *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生に重要ではないかと考えた。そこで、GF マウス盲腸内の多糖を酸性多糖、アルカリ性多糖、不溶性多糖に分画し、*Bifidobacterium* および *E. coli* 44^{Rf} を用いた糖分解性状試験に供した。ほとんどの *Bifidobacterium* 菌株が GF マウス盲腸内多糖を分解できないのに対し、*E. coli* O157:H7 による感染死を防ぐことのできる菌株である *B. infantis* 157F と *B. longum* NS だけが酸性多糖を利用できることが示された。*E. coli* 44^{Rf} はすべての多糖を利用できた。そこで、GF マウス盲腸内多糖のうち、アルカリ性多糖、不溶性多糖の量は一定のままで、酸性多糖の量だけを減らし、*E. coli* 44^{Rf} を嫌氣的に培養するという系を用いた結果、*E. coli* 44^{Rf} の菌数には有意な差が見られなかったが、酸性多糖量の減少と Stx2 濃度の減少に相関が見られた。また、*B. infantis*^T と *B. infantis* 157F 単独投与マウスの盲腸内酸性多糖量を比較すると、後者のほうが有意に少なかった。これらの結果から、マウス盲腸内容物中の酸性多糖を *Bifidobacterium* 菌株が消費することによって、*E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生が競合的に抑制されると推測された。

本実験では、今回抽出された酸性多糖の構成糖や構造の解析にまでは至らなかったが、これらが解明されれば、プロバイオティクスとして利用する *Bifidobacterium* 菌株の選抜や EHEC による疾病を制御するための新たな有用遺伝子の探索などにつながると考えられる。また、*E. coli* O157:H7 の腸内での Stx2 産生メカニズムの解明について新しいプロモーターの発見などにもつながる可能性がある。

Table 3.1 The percentages of each polysaccharide
in the wet cecal contents of GF mice (n = 3).

ACP	3.95	±	0.06 ^a
ALP	3.12	±	0.07
NSP	3.44	±	0.07

^a Mean ± SD (%)

ACP means acidic polysaccharides. ALP means alkali polysaccharides. NSP means non-soluble polysaccharides.

Table 3.2 Metabolism of the polysaccharides extracted from cecal contents of GF mice by each *Bifidobacterium* strain and *E. coli* 44^{Rf}

	ACP	ALP	NSP
<i>Bifidobacterium</i>			
Protective strains			
<i>B. infantis</i> 157F	+	-	-
<i>B. longum</i> NS	+	-	-
Non-protective strains			
<i>B. adolescentis</i> ^T	-	-	-
<i>B. bifidum</i> ^T	-	-	-
<i>B. breve</i> ^T	-	-	-
<i>B. infantis</i> ^T	-	-	-
<i>B. longum</i> ^T	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i> ^T	-	-	-
<i>E.coli</i> 44^{Rf}	+	+	+

^a Plus means that the color of the media turned yellow. Minus means that the color of the media did not change during the experimental period.

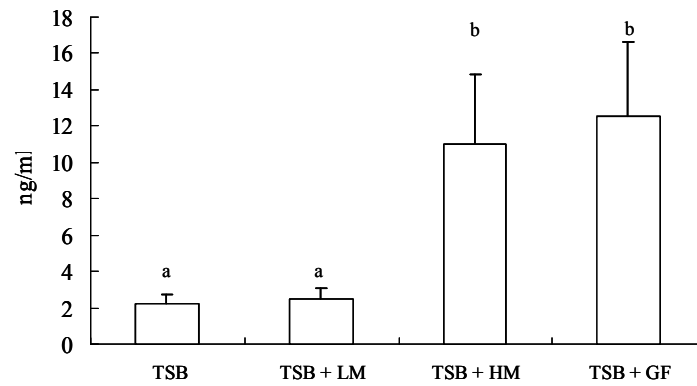


Fig. 3.1 Concentrations of Stx2 in the TSB broth with low molecular fraction of the GF cecal contents (LM), high molecular fraction of the GF cecal contents (HM), and the whole GF cecal contents (GF) (n=3).

There were no significant differences in the number of *E. coli* 44^{Rf} among these three groups. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$). The error bars represent the standard deviation of the data.

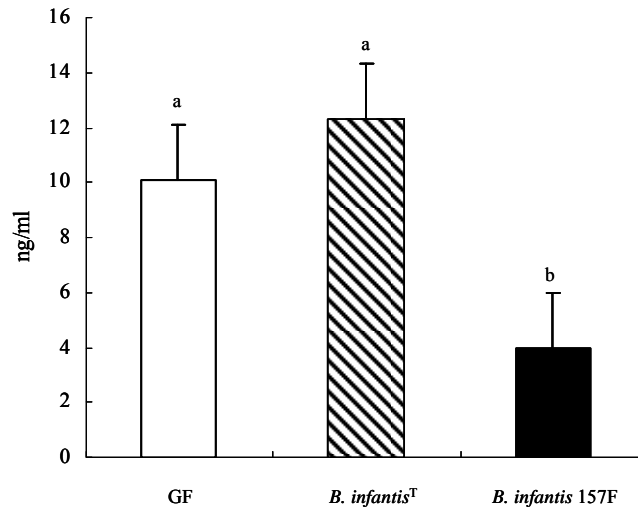


Fig. 3.2 Concentrations of Stx2 in the cecal extracts made from the cecal contents of the GF and GB mice. (n = 3)

There were no significant differences in the number of *E. coli* 44^{Rf} among these three groups. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$). The error bars represent the standard deviation of the data.

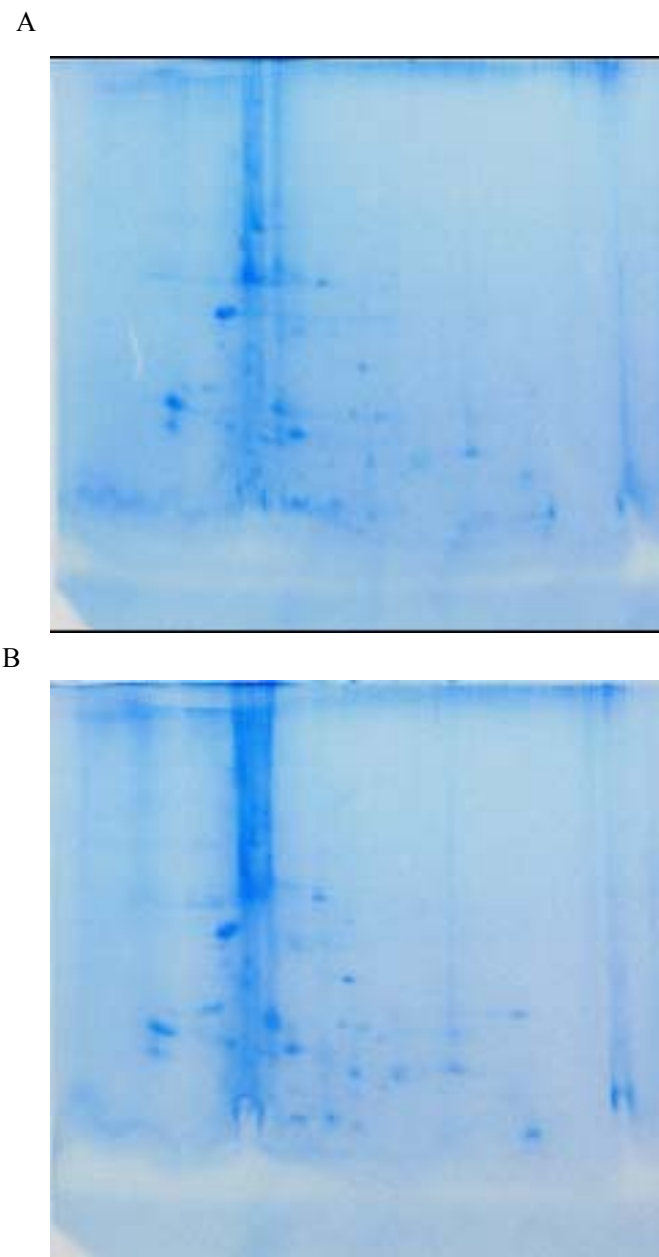


Fig. 3.3 Protein maps of the cecal contents of each *Bifidobacterium* mono-associated mouse group.

A: *B. infantis*^T mono-associated mice. B: *B. infantis* 157F mono-associated mice.

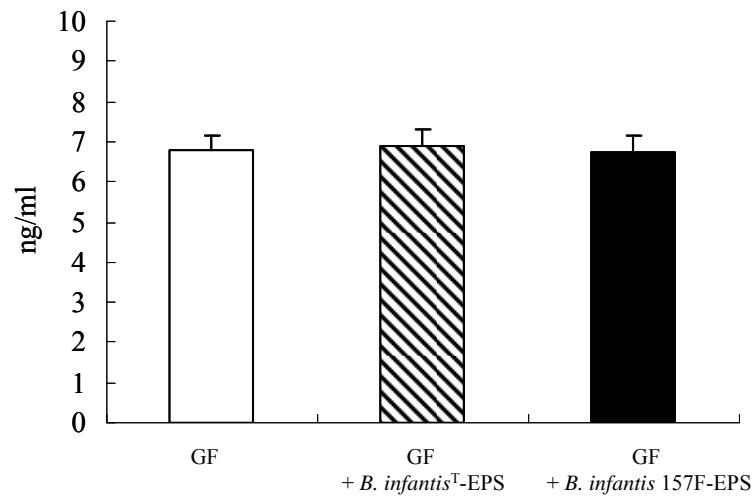


Fig. 3.4 Concentrations of Stx2 in the cecal extracts of GF mice with or without exopolysaccharides (EPS) produced by *Bifidobacterium* strains.

There were no significant differences in the number of *E. coli* 44^{Rf} among these three groups. The error bars represent the standard deviation of the data.

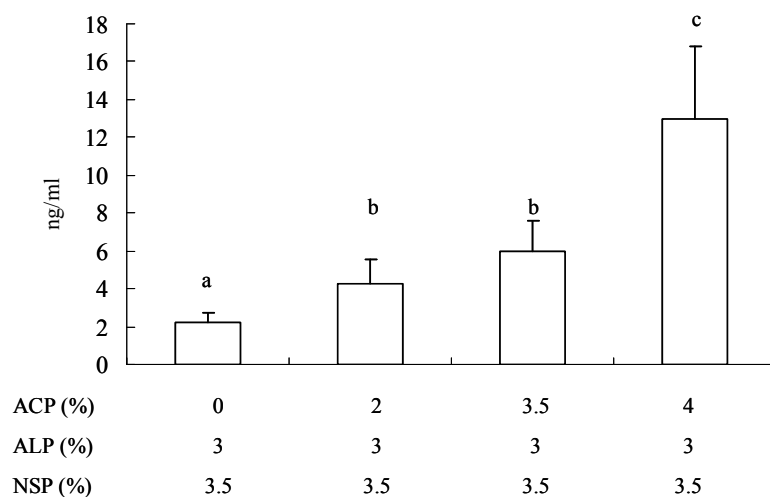


Fig. 3.5 Concentrations of Stx2 in the media with different ACP concentrations.

There were no significant differences in the number of *E. coli* 44^{Rf} among these three groups. ACP means acidic polysaccharides. ALP means alkali polysaccharides. NSP means non-soluble polysaccharides. The concentration of ACP in the wet cecal contents of GF mice was approximately 4 %. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$). The error bars represent the standard deviation of the data.

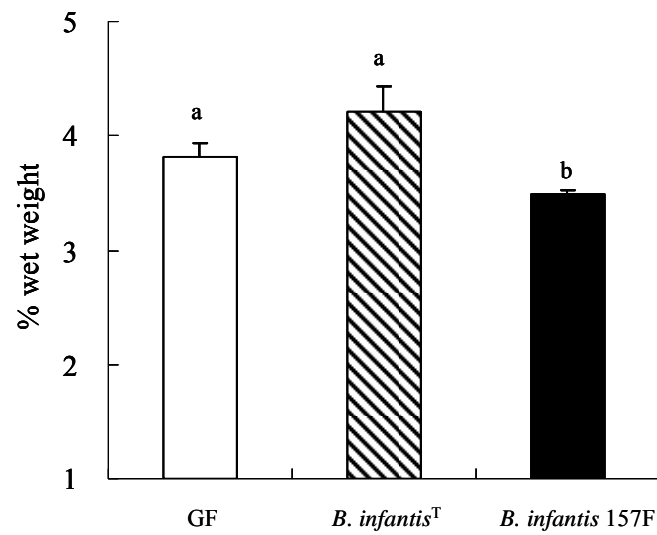


Fig. 3.6 Percentages of the ACP in each mouse group. (n = 3)

Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$). The error bars represent the standard deviation of the data.

総括

第1章では、GF マウスに *E. coli* O157:H7 を経口感染させるとマウスが感染後7日以内に突然死すること、*E. coli* O157:H7 の投与に先立ってある種の *Bifidobacterium* 菌株を定着させておくと *E. coli* O157:H7 による感染死を防げる場合があることを見出した。さらに、6菌種、9菌株の *Bifidobacterium* 菌株を経口投与して作出したノトバイオートマウスに *E. coli* O157:H7 44^{Rf} (*E. coli* 44^{Rf}) を感染させたところ、*Bifidobacterium* の菌種や菌株の違いによって、*E. coli* 44^{Rf} に対するマウスの感染死抑制効果に違いがあり、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F) と *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 は感染死抑制効果を示すことを明らかにしてきた。また、同じ菌種・亜種であっても、*B. infantis* 157F は感染死を抑制できるのに対し、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222^T (*B. infantis*^T) は感染死抑制効果を示さないことを報告してきた。しかし、感染死を抑制した *B. infantis* 157 も *E. coli* 44^{Rf} の定着は阻止することとはできず、感染死抑制効果は盲腸内での *E. coli* 44^{Rf} の Stx の産生の抑制あるいは盲腸内腔から血中への Stx2 の移行の抑制によるものであることを示唆してきた (Yoshimura et al. 2010)。そこで本研究では、*Bifidobacterium* がマウスの *E. coli* 44^{Rf} 感染死を抑制するメカニズムを明らかにするため、産生された Stx2 の体内への移行およびマウス盲腸内における *E. coli* 44^{Rf} の Stx 産生の抑制に関与する因子を解明することを目的とした。

第2章では、*B. infantis* 157F がマウス盲腸および結腸組織に与える影響をトランスクリプトミクスやプロテオミクスの手法を用いて評価し、*E. coli* 44^{Rf} 感染死抑制効果を持たない *B. infantis*^T の影響と比較した。その結果、*B. infantis* 157F を投与したマウスでは、*B. infantis*^T を投与したマウスと比較して、盲腸における *Col16a1* 遺伝子の発現が有意に上昇している一方、結腸では *Till3* などの発現が抑制されていた。タンパク質発現レベルの解析結果からは、*B. infantis* 157F はアクチンやチューブリンなどのターンオーバーを抑制し、盲腸および結腸組織の細胞を安定化させることで、Stx2 の血中への移行を阻止していると推察される。

Col16a1 の詳細な役割は現在のところ不明であるが、Stx2 の血中への移行阻止において重要な役割を果たしている可能性がある。

第3章では、マウス盲腸内における *B. infantis* 157F による *E. coli* 44^{Rf} の Stx 産生抑制メカニズムの解明を試みた。無菌マウス盲腸内容物をエタノール沈殿法によって、低分子分画と高分子分画に分画を行ったところ、高分子分画が *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生に重要であった。高分子分画には、多糖とタンパク質が含まれるが、*B. infantis* 157F 単独投与マウスと *B. infantis*^T 単独投与マウスの盲腸内容物中のタンパク質を2次元電気泳動法によって比較したところ、両者に差が見られなかったため、高分子分画に含まれる物質の中でも多糖が *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生に重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、GF マウス盲腸内容物中の多糖を、酸性多糖、アルカリ性多糖、不溶性多糖に分画し、各分画に対する *Bifidobacterium* および *E. coli* 44^{Rf} の分解性状を調べたところ、*E. coli* 44^{Rf} は全ての多糖分画を分解できることが明らかになったが、試験した全ての *Bifidobacterium* はアルカリ性多糖、不溶性多糖を分解できず、酸性多糖については、*E. coli* 44^{Rf} 感染死抑制効果を持つ *B. infantis* 157F と *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 だけが分解できた。さらに、GF マウス盲腸内多糖のうち、アルカリ性多糖、不溶性多糖の量は一定のままで、酸性多糖の量だけを変化させて *E. coli* 44^{Rf} を嫌氣的に培養した結果、酸性多糖量が減少しても *E. coli* 44^{Rf} の菌数に変化は見られなかったが、Stx2 濃度は減少することが明らかになった。また、*B. infantis*^T と *B. infantis* 157F 単独投与マウスの盲腸内酸性多糖量を比較すると、後者のほうが有意に少なかった。したがって、*B. infantis* 157F はマウス盲腸内の酸性多糖を消費し、*E. coli* 44^{Rf} と競合することによって、*E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生を抑制していると考えられる。

以上の結果から、*B. infantis* 157F は、マウスの盲腸および結腸組織と *E. coli* 44^{Rf} の Stx2 産生の両者に影響を与えることによってマウスの感染死を防いでいると考えられる。本研究の成果は、*E. coli* O157:H7 感染予防に対する *Bifidobacterium* の有用性を示し、プロバイオティクスとして利用できる *Bifidobacterium* 菌株の選抜や新たな有用遺伝子の探索などにつ

ながると考えられる。

謝辞

本研究を完成させるに当たりまして、御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科、山田章雄教授、平山和宏准教授に厚く御礼申し上げます。実験を進めていく上で、多くの御助言を頂きました伊藤喜久治前教授にも深謝しております。

また、トランスクリプトミクスを用いた実験につきましては、ニュージーランド、AgResearch, Grasslands の Nicole C Roy 博士、Wayne Young 博士、Don Otter 博士の丁寧なご指導に深謝しております。またプロテオミクスを用いた実験については、AgResearch, Lincoln の Jolon M Dyer 博士、Stefan Clerens 博士、Jeffery E Plowman 博士、Santanu Deb-Choudhury 博士の丁寧なご指導に深謝しております。ノトバイオート動物室での作業にご協力して頂いた藤原雅子さんにも深く御礼を申し上げます。最後になりましたが、本研究を完成させるに当たり、東京大学獣医公衆衛生学教室の方々にも御礼を申し上げます。

参考文献

- Abdad-Andaloussi S, Talbaoui H, Marczak R, Bonaly R (1995): Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. Appl Microbiol Biotechnol 43:995-1000
- Aiba Y, Ishikawa H, Shimizu K, Noda S, Kitada Y, Sasaki M, Koga Y (2002): Role of internalization in the pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in gnotobiotic murine model. Microbiol Immunol 46:723-731
- Al-Jumaili I, Burke DA, Scotland SM, Al-Mardini H, Record CO (1992): A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 72:121-125
- Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC (2010): *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation BMC Microbiol 10:316
- Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y (2004): Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 72:2240-2247
- Bernet MF, Brassart D, Nesser JR, Servin AL (1994): *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut 35:483-489
- Berry JT, Doyle MP, Higley NA (1995): Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Infect Immun 49:310-315
- Brown CA, Harmon BG, Zhao T, Doyle MP (1997): Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. Appl Environ Microbiol 20:1-9

- Calderwood SB, Auclair F, Donohue-Rolfé A, Keusch GT, Mekalanos JJ (1987): Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci USA* 84:4364-4368
- Calderwood SB, Mekalanos JJ (1987): Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J Bacteriol* 169:4759-4764
- Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S (2008): The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods* 73:125-132
- Clerens S, Cornellison CD, Choudhury SD, Thomas A, Plowman JE, Dyer JM (2010): Developmending the wool proteome. *J Proteomics* 73:1722-1731
- Day DA, Tuite MF (1998): Post-transcriptional gene regulatory mechanism in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol* 157:361-371
- Dean-Nystrom E, Bosworth BT, Cray WC Jr, Moon HW (1997): Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun* 65:1842-1849
- de Salbe T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, Martin C (2009): Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 77:783-790
- Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K (1988): Site of action of Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *Eur J Biochem* 171:45-50
- Francis DH, Collins JE, Duimstra JR (1986): Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect Immun* 51:953-956
- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, James MN

- (2004): Structure of shiga toxin type 2 from *Escherichia coli* O157:H7 J Biol Chem 279:27511-27517
- Fuchs S, Muhldorfer I, Donohue-Rolfe A, Kerenyi M, Emody L, Alexiev R, Nenkov P, Hacker J (1999): Influence of RecA on *in vitro* virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. Microb Pathol 27:13-23
- Fujii J, Kita T, Yoshida S, Takeda T, Kobayashi H, Tanaka N, Ohsato K, Mizuguchi Y (1994): Direct evidence of neuron Impairment by oral infection with Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. Infect Immun 62:3447-3453
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H (2011): Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection. Nature 469:543-549
- Gagnon M, Kheadr EE, Dabour N, Richard D, Fliss I (2006): Effect of *Bifidobacterium thermacidophilum* probiotic feeding on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in BALB/c mice. Int J Food Microbiol 111:26-33
- Gohla A, Bokoch GM (2002): 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. Current Biol 12:1704-1710
- Gyles CL (2007): Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. J Anim Sci 85:E45-E52
- Herold S, Siebert J, Huber A, Schmidt H (2005): Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. Antimicrob Agents Chemother 49:931-944
- Hubert T, Grimal S, Ratzinger S, Mechaly I, Grassel S, Fichard-Carroll A (2007): Collagen $\alpha 1$ is a neural component of the developing and regenerating dorsal root ganglia extracellular matrix. Matrix Biol 26:206-210
- Hugh R, Leifson E (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism

- of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J Bacteriol* 66:24-26
- Hughes AK, Stricklett PK, Schemid D, Kohan DE (2000): Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells. *Kidney Int* 57:2350-2359
- Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DWK (2001): Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun* 69:6148-6155
- Imanovic L, Muniesa M (2012): Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-endocoding phages by EDTA treatment. *PLOS One* 7:2
- Jeon B, Itoh K (2007): Production of Shiga toxin by a *luxS* mutant of *Escherichia coli* O157:H7 O157:H7 *in vivo* and *in vitro*. *Microbiol Immunol* 51:391-396.
- Jones NL, Istur A, Haq R, Mascarenhas M, Karmali MA, Perdue MH, Zanke BW, Sherman PM (2000): *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 278:G811-819
- Jordan DM, Sperandio V, Kaper JB, Dean-Nystrom EA, Moon HW (2005): Colonization of gnotobiotic piglets by *luxS* mutant strain of *Escherichia coli* O157:H7 *Infect Immun* 73:1214-1216
- Kang G, Pulimood AB, Koshi R, Hull A, Acheson D, Rajan P, Keusch GT, Mathan VI, Mathan MM (2001): A monkey model for enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *J Infect Dis* 184:206-210
- Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C (1983): Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1 619-620
- Kleanthous H, Smith HR, Scotland SM, Gross RJ, Rowe B, Taylor CM, Milford DV (1990): Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985-8: association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2: Microbiological aspects. *Arch Dis Child* 65:722-727

- Kobayashi I, Muraoka H, Matsuzaki K, Saika T, Mishida M, Akita H, Iwata A, Sato Y, Sunakawa K (2000): Inhibitory effect of the oral administration of bifidobacteria on Norfoxacin-induced Verotoxin production in germ-free mice infected with *Escherichia coli* O157:H7. *Bioscience Microflora* 19:27-33
- Kobayashi I, Muraoka K, Saika T, Nishida M, Akita H, Iwata S, Sato Y, Sunakawa K (2001): Inhibitory effect of bifidobacteria on the *in vitro* production of verotoxins by *Escherichia coli* 157:H7. *Bioscience Microflora* 20:81-84
- Koh CH, Peng ZF, Ou K, Melendez A, Manikandan J, Qi RA, Cheung NS (2007): Neuronal apoptosis mediated by inhibition of intracellular cholesterol transport: microarray and proteomics analyses in cultured murine cortical neurons. *J Cell Physiol* 211:63-87
- Kokean Y, Yamazaki E, Osamu K, Nakabayashi T, Tsubouchi K (2004): Development of functional food material from natural carbohydrates (I) – physiochemical and physiological properties of polysaccharides from Moroheiya and Tsurumurasaki 三重県科学技術振興センター工業研究部研究報告 29:1
- Konowalchuk J, Speirs JL, Stavric S (1977): Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18:775-779
- Kornberg RD (1999): Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol* 9:M46-M49
- Kuo CC, Kuo CW, Liang CM, Liang SM (2005): A transcriptomics and proteomics analysis of the effect of CpG-ODN on human THP-1 monocytic leukemia cells. *Proteomics* 5:894-906
- Lindgren SW, Melton AR, O'Brien AD (1993): Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect Immun* 61:3832-3842
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408
- Madara JL, Moore R, Carlson S (1987): Alternation of intestinal tight junction structure and

- permeability by cytoskeletal contraction. *Am J Physiol* 253:C854-C861
- Maiden SL, Hardin J (2011): The secret of α -catenin: Moonlighting in morphogenesis. *J Cell Biol* 195:543-552
- Mitsuoka T (1969): Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren (Zugleich die Beschreibung von *B. thermophilum* nov. spec. und *B. pseudolongum* nov. spec.) *Zentralbl Bakteriol Orig* 210:52-64
- Mitsuoka T, Segi T, Yamamoto S (1965): Eine verbesserte methodik der qualitativen und quantitativen analyse der darmflora von menschen und tieren *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig* 195:455-469
- Momose Y, Hirayama K, Itoh K (2005): Antagonism of intestinal bacteria from human infants against *Escherichia coli* O157:H7 infection in gnotobiotic mice. *Microbial Ecol Health Dis* 17:9-14
- Momose Y, Hirayama K, Itoh K (2008): Competition for proline between indigenous *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E. coli* O157:H7 *Antonie van Leeuwenhoek* 94:165-171
- Muhldorfer I, Hacker J, Keusch GT, Acheson DW, Tschape H, Kane AV, Ritter A, Olschlager T, Donohue-Rolfé A (1996): Regulation of the Shiga-like toxin σ operon in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 64:495-502
- Namba K, Yaeshima T, Ishibashi N, Hayasawa H, Yamazaki S (2003): Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biosci Microflora* 22:85-91
- Nusrat A, Giry M, Tumer JR, Colagan SP, Parkos CA, Cames D, Lemichez E, Boquet P, Madara JL (1995): RhoA protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in

- polarized epithelia. *Proc Nat Acad Sci USA* 92:10629-10633
- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto M, Takahashi M, Watanuki M, Tanaka R, Tanaka T, Hamabata T, Yamashita S, Takeda Y (2001) Protective effect of *Lactobacillus casei* strain shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infect Immun* 69:1101-1108
- Ohara T, Kojio S, Taneike I, Nakagawa S, Gondaira F, Tamura Y, Gejyo E, Zhang HM, Yamamoto T (2002): Effects of azithromycin on shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3478-3483
- Ohmomo S, Tanaka O, Kitamoto H (1993): Analysis of organic acids in silage by high-performance liquid chromatography. *Bull Natl Grassl Inst* 48:51-56
- Pai CH, Kelly JS, Meyers GL (1986): Experimental infection of infant rabbits with Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Imuun* 51:16-23
- Paton AW, Morona R, Paton JC (2001): Neutralization of Shiga toxins Stx1, Stx2c, and Stx2e by recombinant bacteria expressing mimics of globotriose and globotetraose. *Infect Immun* 69:1967-1970
- Rang CU, Light TR, Midtvedt T, Conway PL, Chao L, Krogfelt KA, Cohen PS, Molin S (1999): Estimation of growth rates of *Escherichia coli* BJ4 in streptomycin-treated and previously germfree mice by *in situ* rRNA hybridization. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:434-436
- Ratzinger S, Eble JA, Pasoldt A, Opolka A, Rogler G, Grifika J, Grässel S (2010): Collagen □□ induces formation of focal contact on intestinal myofibroblasts isolated from the normal and inflamed intestinal tract. *Matrix Biol* 29:177-193
- Remis RS, MacDonald KL, Riley LW, Puhf ND, Wells JG, Davis BR, Blake PA, Cohen ML (1984): Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Ann Intern Med* 101:624-626

- Ritchie JM, Thorpe CM, Rogers AB, Waldor MK (2003) Critical roles for *stx2*, *eae*, and *tir* in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits. *Infect Immun* 71:7129-7139
- Rutjes WPR, Bennington BA, Smith CR, Maloney MD, Lingwood CA (2002): Differential tissue targeting and pathogenesis of verotoxins 1 and 2 in the mouse animal model. *Kidney Int* 62:832-845
- Schoeni JL, Doyle MP (1994): Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl Environ Microbiol* 60:2958-2962
- Scotland SM, Smith HR, Rowe B (1985): Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. *Lancet* 2:885-886
- Sheoran AS, Chapman S, Singh P, Donohue-Rolfe A, Tzipori S (2003): Stx2-specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with *Escherichia coli* expressing stx2 variant. *Infect Immun* 71:3125-3130
- Shu Q, Gill HS (2001): A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 189:147-152
- Smyth G (2005): Limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solution using R and Bioconductor*. Edited by Gentleman R, Carey V, Dubois S, Inzarry R, Huber W. New York: Springer; 397-420
- Suzuki T, Itoh K, Kaneko T, Suzuki H (1997): Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*. *J Vet Med Sci* 59:665-659
- Taguchi H, Takahashi M, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Fujioka A, Kamiya S (2002): Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohemorrhagic

- Escherichia coli* O157:H7, strain 6. J Med Microbiol 51:336-343
- Terajima J, Izumiya H, Wada A, Tamura K, Watanabe H (1999): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. Emerg Infect Dis 5:301-2
- Toshima H, Yoshimura A, Arikawa K, Hidaka A, Ogasawara J, Hase A, Masaki H, Nishikawa Y (2007): Enhancement of Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. Appl Environ Microbiol 73:7582-7588
- Tzipori S, Chow CW, Powell HR (1988): Cerebral infection with *Escherichia coli* O157:H7 in humans and gnotobiotic piglets. J Clin Pathol 41:1099-1103
- Tzipori S, Gunzer F, Donnenberg MS, De Montigny L, Kaper JB, Donohue-rolfe A (1995): The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complication in a gnotobiotic piglet model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Infect Immun 63:3621-3627
- Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD (1990a): Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 58:2438-2445
- Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, Samuel JE, O'Brien AD (1990b): Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. Infect Immun 58:3959-3965
- Wagner PL, Acheson DW, Waldor MK (2001): Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun 69:1934-1937
- Wagner PL, Waldor MK (2002) Bacteriophage control of bacterial virulence. Infect Immun 70:3985-3993
- Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI (2000): The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. N Eng J Med 342:1930-1936
- Yap AS, Stevenson BR, Abel KC, Cragoe EI, Manley SW Jr (1995): Microtubule integrity is

necessary for the epithelial barrier function of cultured thyroid cell monolayers. *Exp Cell Res* 218:540-550

Yoshimitsu M, Hayashi N, Kaneko Y, Doyama H (2011): An adult case of combined encephalopathy and hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 108:74-79

Yoshimura K, Matsui T, Itoh K (2010): Prevention of *Escherichia coli* O157:H7 infection in gnotobiotic mice associated with *Bifidobacterium* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97:107-117

Zheng PZ, Wang KK, Zhang QY, Hunag QH, Du YZ, Zhang QH, Xiao DK, Shen SH, Imbeaud S, Eveno E, Zhao CJ, Chen YL, Fan HY, Waxman S, Auffrey C, Jin G, Chen SJ, Chen Z, Zhang J (2005): Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. *Proc Nat Acad Sci USA* 102:7653-7658

Table 4.1 (Materials for bacterial cultures)

BL agar plates		
BL (Nissui, Japan)		58 g
D.W.		1000 ml
Horse blood		50 ml
TS agar plates		
Trypticase soy agar (BBL, USA)		40 g
D.W.		1000 ml
SMC agar plates		
Sorbitol MacConkey agar (Oxoid, USA)		51.5g
D.W.		1000 ml
MRS agar plates		
Lactobacilli MRS agar		70 g
D.W.		1000 ml
TSB broth		
Trypticase soy broth without dextrose (BBL, USA)		1.375 g
L-cystein·HCl·H ₂ O		0.025 g
Na ₂ CO ₃		0.042 g
D.W.		50 ml
EG broth for preservation of bacteria		
Lab lemco powder		1.2 g
Proteose Peptone No.3		5.0 g
Yeast extract		2.5 g
Na ₂ HPO ₄		2.0 g
D(+)-Glucose		0.75 g
Soluble starch		0.25 g
L-Cystine		0.1 g
L-Cystein·HCl·H ₂ O		0.25 g
Agar		0.25 g

Tween 80	0.15 g
Dimethylsulfoxide	50 ml
D.W.	up to 500 ml

Briggs-liver broth

Tomato juice extract	400 ml
Neopeptone (Difco, USA)	15 g
Yeast extract (Difco, USA)	6 g
Liver extract (Kyokuto, Japan)	75 ml
Soluble starch	0.5 g
NaCl	5 g
Tween 80	1 g
L-Cystein•HCl•H ₂ O	0.25g
D.W.	525 ml

Medium for carbohydrates fermentation tests

Bacto liver extract (Difco, USA)	1000 ml
Proteose peptone No.3 (BBL, USA)	10 g
Trypticase (Difco, USA)	5 g
Yeast extract	3 g
Tween 80	1 g
Salt solution	5 ml
(MgSO ₄ •7H ₂ O 10 g, FeSO ₄ •7H ₂ O 0.5 g, NaCl 0.5 g, MnSO ₄ 0.337 g for D.W. 200 ml)	
0.2 % Bromocresolpurple solution	20 ml
Bacto agar (Difco, USA)	1.5 g

pH was adjusted to 7.2

OF medium

Trypticase	2 g
Yeast extract	1 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
Bromothymol blue	0.08 g
Bacto agar	2.5 g
Carbohydrates	10 g

Table 4.2 (Diluents)

Phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (PBS)	
NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.1 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
D.W.	1000 ml
Anaerobic PBS	
KH ₂ PO ₄	4.5 g
Na ₂ PO ₄	6.0 g
L-cystein•HCl•H ₂ O	0.5 g
Tween 80	0.5 g
Agar	0.75 g
D.W.	1000 ml

Table 4.3 (Solutions for proteomics)

Lysis buffer	
Urea	42 g
Thiourea	15.2 g
Dithiothreitol	1 g
D.W.	up to 100 ml
Loading solvent	
Formic acid	0.2 ml
Acetonitrile	2 ml
HPLC-grade water	up to 100 ml
KCl solution	
KCl	7.46 g
Formic acid	0.2 ml
Acetonitrile	2 ml
HPLC-grade water	up to 100 ml
Rehydrate solution	
Urea	8.4 g
Thiourea	3.04 g
1 % Orange G	80 µl
CHAPS	0.8 g
Pharmalyte 3 - 10 (GE Healthcare, USA)	100 µl
Hydroxyethylidisulfide	240 µl
D.W.	20 ml
A 12.5 % Tris-glycine gel (2mm × 18 cm × 18 cm format)	
40 % acrylamide Bis solution (BIORAD, USA)	31.2 ml
1.5 M Tris solution (pH 8.8)	25 ml
10 % ammonium persulfate solution	1 ml
10 % sodium dodecyl sulfate solution	1 ml
Tetramethylethylenediamide	0.04 ml
D.W.	41.7 ml

Table 4.4 (Primers for gene expression assays)

Genes		Reference
<i>GAPDH</i>		Fukuda et al. 2011
Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	
Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	
<i>Col16a1</i>		Hubert et al. 2007
Forward	AGTGACCCAACCAACTCGAC	
Reverse	AGACCTTGCCCTCTGTCTGA	

Table 4.5 Growth media for cell culture

Dulbecco's modified eagle medium (GIBCO, USA)	500 ml
Fatal bovine serum	50 ml
Penicillin streptomycin solution (GIBCO, USA)	5 ml