



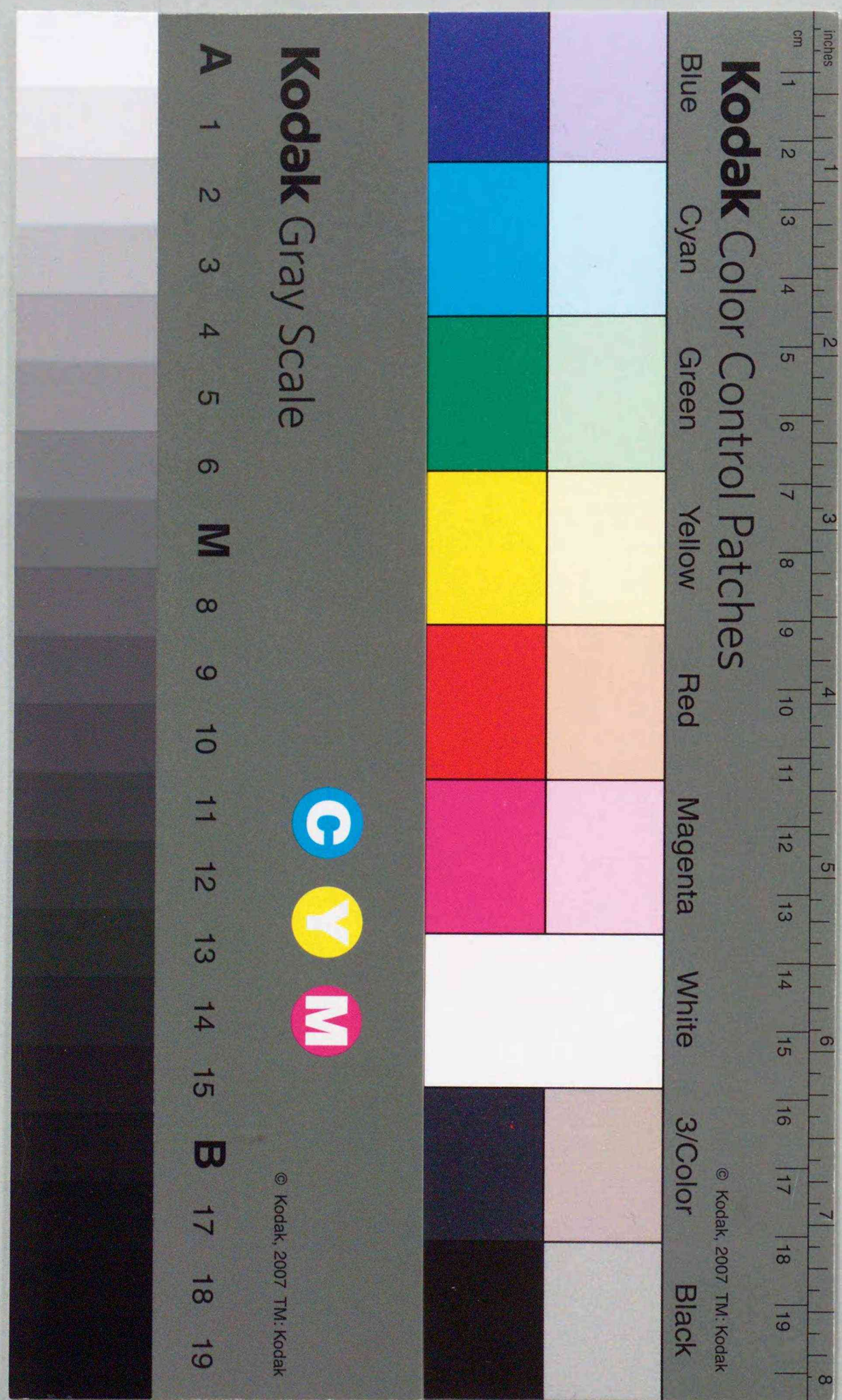
HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	放射線照射実験に使用するSPFマウスの腸管中におけるEnterobacter cloacaeの意義
Author(s)	松本, 恒弥
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第4122号
Issue Date	1992-06-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3089305
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51164
Type	doctoral thesis
File Information	000000251738.pdf



放射線照射実験に使用するSPFマウスの腸管中における
Enterobacter cloacaeの意義

松 本 恒 弥



①

放射線照射実験に使用するSPFマウスの腸管中における
Enterobacter cloacaeの意義

松本恒弥

目次

	頁
緒言	1
第1章 放射線照射マウスにおける <u>Enterobacter cloacae</u> の疾患発現作用	
1. γ 線全身照射による <u>Enterobacter cloacae</u> 汚染	
S P F マウスの早期死	3
はじめに	3
材料と方法	4
成績	
1) 骨髄死線量照射後30日間の死亡パターンの比較	6
2) <u>Enterobacter cloacae</u> 経口投与マウスにおける照射後死亡パターン	8
3) $LD_{50/30}$ 値の検討	10
4) 腸死線量照射後生存日数の比較	10
考察	12
2. 致死線量照射マウスの死亡パターンに対する低病原性腸内細菌の影響	15
はじめに	15
材料と方法	15
成績	
1) 骨髄死線量照射後死亡パターンの比較	17
2) $LD_{50/30}$ の比較	20
3) 腸死線量照射後生存日数の比較	20
考察	23

第2章 腸内細菌および <u>Pseudomonas aeruginosa</u> の腸管内定着におよぼす <u>Enterobacter cloacae</u> の影響	26
はじめに	26
材料及び方法	26
成績	
1) <u>Enterobacter cloacae</u> 陽性ノトバイオートマウスにおける <u>Escherichia coli</u> および <u>Pseudomonas aeruginosa</u> の腸管内定着	29
2) Limited floraマウスにおける <u>Escherichia coli</u> の腸管内定着	31
3) S P F マウスにおける <u>Escherichia coli</u> , <u>Escherichia coli</u> 0115 および <u>Pseudomonas aeruginosa</u> の腸管内定着	31
考察	35
第3章	
腹部放射線照射による肺転移抑制現象と <u>Enterobacter cloacae</u>	38
はじめに	38
材料と方法	38
成績	
1) 無菌及び抗生物質投与マウスにおけるAIRIMの発現	41
2) 腹部照射後S P Fマウスにおける細菌の挙動	42
3) AIRIMの発現に関わる腸内細菌の同定	46
4) <u>Enterobacter cloacae</u> の抗転移作用	46
考察	51
総括	54
謝辞	57

参考文献	58
英文抄録	67

結 言

実験動物を用いた放射線照射実験は、放射線影響研究はもとよりガンの放射線治療研究、免疫研究、骨髄移植研究等において広く行われている。動物に比較的高い線量の放射線を照射すると生体防御能は大きく低下し、一般的な病原体に感染しやすくなるだけでなく、不顕性感染の顕性化や日和見感染が起こることは良く知られている。このため、放射線照射実験には特定病原微生物が存在しないSPF動物が広く使用されている。

SPF動物は一般に無菌動物あるいはノトバイオートをいわゆるバリア施設で飼育することによって作出・維持される。この施設は動物と病原微生物との接触を防ぐことを目的として維持・管理されるため、ここでは必然的に病原微生物以外の微生物と動物の接触の機会も大幅に低下してくる。このため、バリア施設で飼育されているSPF動物の腸内菌叢はコンベンショナル動物に比べ、単純かつ不安定で変化しやすい。

放射線医学総合研究所（放医研）のSPFマウスも無菌マウスをSPF施設で飼育することによって作出され、腸内菌叢が自然定着したものである。このため、これらのマウスでは飼育開始から約3年間はFamily Enterobacteriaceae（腸内細菌科）に属する菌が存在しなかったが、その後、明らかな臨床症状なしにEnterobacter cloacae (E.cloacae) が腸内に侵入・定着した。本菌はヒトでは日和見感染の一原因であることが知られているが、下水や土壌中に広く分布し、健康な動物の糞便からもしばしば分離されることから、コンベンショナル動物にとって消化管内への侵入は臨床細菌学的には大きな意味を持たない(50)。しかし、先に記したように放射線を照射された動物では生体防御能が低下するため、低病原性の細菌であっても感染を起こし宿主に影響を与える場合がある。事実、本菌

が糞便から分離され始めた時期のSPFマウスを使用したところ、致死線量の γ 線照射後の生存曲線の変化や骨髄移植成績のバラツキが観察された。本菌に関し、私どもが調べた限りでは実験動物における一次感染発症例の報告はこれまでになく、日和見感染症として平賀(私信)は無菌ネコへE. cloacaeを単独投与すると致死的感染が起ると述べている。したがって、放射線照射実験に使用するマウスにおける本菌存在の意義はほとんど不明であると言ってよい。

本研究の目的は、放射線照射実験に使用する実験動物の腸内菌叢管理上、マウス腸管中におけるE. cloacaeの存在が放射線照射実験にどのように影響するかを明らかにするとともに、マウスにおける本菌存在の意義を考察しようとするものである。このため、E. cloacaeの疾患発現作用、生体防御作用さらに実験結果の修飾因子という面から、それぞれ1)放射線照射後の早期死について、2)病原菌などの腸管内定着阻止について、3)腹部放射線照射マウスの移植腫瘍の肺転移に及ぼす影響について検討した。

第1章 放射線照射マウスにおけるEnterobacter cloacaeの疾患発現作用

1. γ 線全身照射によるEnterobacter cloacae 汚染SPFマウスの早期死

はじめに

放医研のSPFマウスは生産開始後約三年間腸内細菌が存在しない状態で維持されていた。その後、一部のマウスの糞便から明かな臨床症状を伴うことなくE. cloacaeが分離されるようになり、時を同じくして骨髄死線量の γ 線を照射されたマウスの一部で早期死が認められたり、免疫抑制のために放射線を用いた骨髄移植成績のバラツキが観察されだした。早期死を起こしたマウス諸臓器の微生物検査から、これらのマウスはすべてE. cloacaeに汚染しており心臓血液(心血)から本菌が分離されたが、放射線照射後早期死の原因菌として広く知られているPseudomonas aeruginosa(P. aeruginosa) (10)はもとより他の腸内細菌(59)やマウスの一般的な病原微生物には汚染されていないことが明かとなった。これらの観察結果は、一般に非病原性とされているE. cloacaeが放射線照射後の早期死の原因となることを示唆している。

本研究の目的は、SPFマウスにおけるE. cloacaeの汚染と致死あるいは亜致死線量の放射線照射後30日間の生存時間との関係を明らかにすることにある。

材料と方法

マウス

8週齢の雄及び雌C57BLf/6JNrsマウスを使用した。これらのマウスは、無菌マウスを放医研のSPFマウス生産施設に搬入し、そこで維持・生産されているもので、菌叢は自然定着によって形成されたものである。これらのマウスは定期的な検査(26)で、*Salmonella* spp., *Pasteurella pneumotropica*, *Escherichia coli* 0115a.c:K(B), *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium kutscheri*, Tyzzer菌, *Mycoplasma pulmonis*, センダイウイルス, マウス肝炎ウイルス、および内外寄生虫は検出されていない。

マウスはオートクレーブ滅菌したアルミニウム製ケージに5匹ずつ入れ、温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、全新鮮濾過無菌空気が供給されているいわゆるバリア施設内で飼育した。飼料は高圧蒸気滅菌した市販固形飼料(船橋農場製MB-1)を自由摂取させ、飲水は塩素(10ppm)添加水に塩酸を加えPH3.0としたものをオートクレーブ滅菌した給水瓶に詰めて与え、それを週2-3回交換した。ケージは週1回床敷ごと滅菌済みのものと交換した。

本実験期間中、*E. cloacae*の汚染は生産施設の1部グループのマウスにのみ認められ、残りのマウスでは腸内細菌が存在しない状態が維持された。

放射線照射

マウスは10-11週齢時に、シールドタイプの ^{137}Cs γ線照射装置(東芝メディカル製、 ^{137}Cs 5000Ci、線量率 91-96R/min)により6.70-33.5Gyのγ線の一回全身照射を受けた。

糞便中腸内細菌の検査

検査マウスから新鮮糞便を無菌的に採取し、ブレインハートイン

フュージョンブイヨン培地(栄研科学-以下栄研)に接種、 37°C に一夜培養後、その一白金耳をDHL寒天平板培地(栄研)に塗抹し、 37°C に一夜培養し、発育したコロニーの形態から腸内細菌の有無を調べた。腸内細菌と思われたコロニーは5%ウマ血液加トリプチケースソイ寒天培地(栄研)に塗抹・純培養した。腸内細菌の同定は坂崎および波岡の方法(47)により行った。すなわち、クリグラ培地(栄研)で高層部が黄変、ガスの発生がみられ、斜面部は赤変、SIM培地(栄研)で、硫化水素およびインドールの産生が陰性、運動性は陽性、シモンズのクエン酸ナトリウム培地(栄研)でクエン酸を利用、尿素培地(栄研)で尿素を分解、ブドウ糖リン酸ペプトン培地(栄研)でフォーゲス・プロスカウエル(VP)試験が陽性、メチルレッド(MR)試験が陰性、リジン脱炭酸試験用培地(栄研)でリジン脱炭酸試験が陰性を示すものを*E. cloacae*とした。

上記の方法で糞便中の*E. cloacae*を検査し、マウスを*E. cloacae*陽性群と陰性群とに分けた。

死亡個体の細菌検査

マウスは放射線照射後30日間、毎日2回観察を行い、死亡個体は直ちに解剖し、盲腸内容と心血、また一部の個体ではさらに肝臓、腎臓および脾臓を無菌的に採取した。盲腸内容はその一白金耳量をDHL寒天平板培地に直接塗抹し、 37°C に18時間培養後、糞便検査と同様の方法で*E. cloacae*の有無を確認した。心血はその一白金耳量を臨床用チオグリコレート培地(栄研)に接種し 37°C に18-48時間培養後、その一白金耳量を5%ウマ血液加トリプチケースソイ寒天平板培地に塗抹、18-48時間培養後、発育したコロニーの生物性状を検査し菌の同定を行った。すなわち、グラム染色性、形態、運動性、空気中での増殖性、嫌気条件下での発育、カタラーゼテスト、チトクロームオキシダーゼテスト、ヒューレイフソン培地(栄研)による酸化還元テストを行いCowanの方法(13)によって同定した。チ

オグリコレート培地で細菌の発育が認められ、血液寒天培地で発育の見られなかったものは、滅菌毛細管ピペットでチオグリコレート培地から菌液を採取し、GAM寒天平板培地（日水製薬）に塗抹、ガスパック（BBL）法によって嫌気培養を行い、発育したコロニーの生物性状を血液平板の場合と同様に検査し、菌の同定を行った。肝臓、腎臓および脾臓は秤量後ガラスホモジナイザーにいれ、等量の滅菌生理食塩水を加えホモジナイズした。それを10倍段階希釈しその0.5mlを血液寒天平板培地とDHL寒天平板培地とに塗抹し37℃で一夜培養後、発育したコロニー数を測定した。

E. cloacaeの経口投与

SPFのC57BLマウスの糞便から分離し、先に記述した方法でE. cloacaeと同定され凍結保存されていた株（Ⅱ株）をハートインフュージョンブイヨン（Difco）で37℃に一夜培養後遠心し、沈澱した細菌を滅菌生理食塩水に浮遊させ比色法で 2×10^8 個/mlに調整した。その0.5mlを胃ゾンデを用いてマウスの胃内に直接投与した。

LD_{50/30}

6.70-8.62Gyの全身照射後、30日目の死亡率からプロビット図解法によってLD_{50/30}値およびその95%信頼限界を求めた。

成績

1) 骨髓死線量照射後30日間の死亡パターンの比較

E. cloacae陽性マウス103匹（雌67、雄36）および陰性マウス93匹（雌62、雄31）に8.62Gyのγ線を全身照射後、30日間毎生死を観察した。各群の死亡率の変化は図1に示した。照射後、E. cloac-

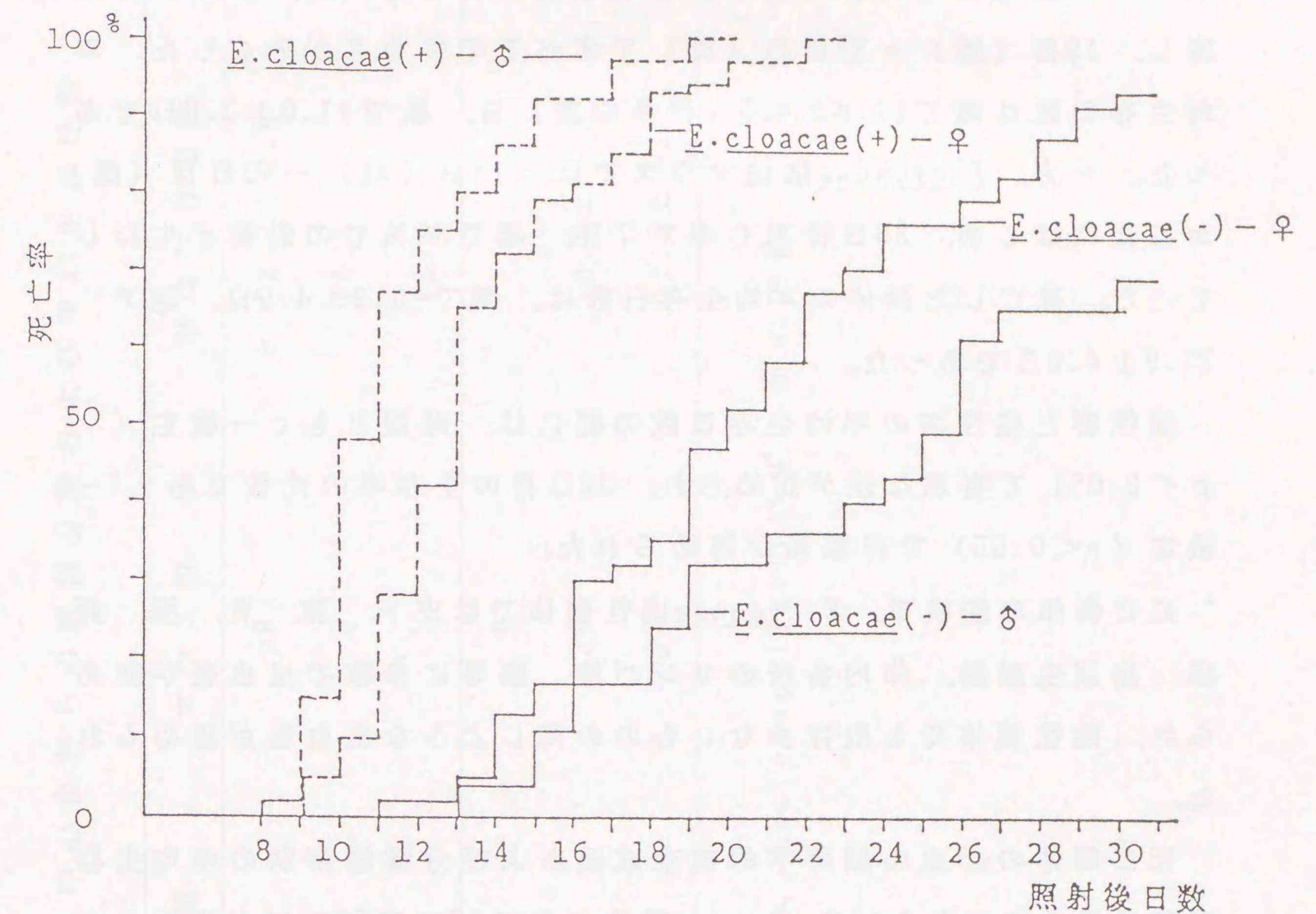


図1 8.62Gy全身照射 マウスの死亡パターン

ae陽性マウスの最初の死亡は8日目（雌）と9日目（雄）に観察され、その後死亡率は急速に上昇し13日目には雌で65%、雄で80%に達し、19日（雄）-23日目（雌）ですべてのマウスが死亡した。平均生存日数は雌で 12.6 ± 4.5 （標準偏差）日、雄で 11.0 ± 3.6 日であった。一方、E.cloacae陰性マウスでは、11日（雌）-13日目（雄）から死にはじめ、30日目でも雌で7%、雄で32%もの動物が生存していた。死亡した個体の平均生存日数は、雌で 20.2 ± 4.9 日、雄で 21.3 ± 4.9 日であった。

陽性群と陰性群の平均生存日数の間には、雌雄ともt-検定（ $p < 0.05$ ）で有意な差が認められ、30日目の生存率の比較でも χ^2 -検定（ $p < 0.05$ ）で有意差が認められた。

死亡個体の剖検で、E.cloacae陽性個体では皮下、肺、胃、腸、脾臓、泌尿生殖器、体内各所のリンパ節、脳等に多数の出血斑が認められ、陰性個体でも数は少ないものの同じような出血斑が認められた。

死亡個体の心血の細菌学的検査成績および分離細菌別の平均生存日数は表1に示した。E.cloacae陽性マウス67匹中59匹の心血からE.cloacaeが分離されたが陰性マウスからは分離されなかった。陽性マウス6匹と陰性マウス38匹の心血からはStreptococcus、StaphylococcusおよびLactobacillusが分離された。E.cloacae以外のグラム陰性桿菌はいずれのマウスからも分離されなかった。E.cloacaeが分離されたマウスの照射後平均生存日数は 13.3 ± 3.0 日であり、これは心血から他の細菌が分離されたマウスや現行の検査法では細菌が分離されなかったマウスのそれよりも明らかに短い値であった。

2) E.cloacae経口投与マウスにおける照射後死亡パターン

E.cloacae陰性雄マウス20匹に 10^8 個のE.cloacaeを経口投与し、4週後に8.62Gyのγ線で全身照射した。照射マウスは9日-16日の間にすべてが死亡し、その平均生存日数は 11.9 ± 2.0 日であった。死亡し

表1 8.62Gy照射後死亡したマウスの心血から分離細菌の平均生存日数

マウス	心血分離細菌	マウス数	平均生存日数 ²⁾
<u>E.cloacae</u> 陽性マウス	<u>E.cloacae</u>	59	13.3 ± 3.0
	他の細菌 ¹⁾	6	14.8
	陰性 ³⁾	2	18.0
<u>E.cloacae</u> 陰性マウス	<u>E.cloacae</u>	0	
	他の細菌	38	16.8 ± 7.3
	陰性	24	21.8 ± 5.1

- 1) Streptococcus, Staphylococcus, Lactobacillusのいずれかの細菌
 2) 平均±標準偏差
 3) 今回行った方法では菌分離陰性

たマウスの臓器からは *E. cloacae* が肝臓で $10^5 - 10^8$ 個、腎臓で $10^4 - 10^6$ 個、脾臓で $10^3 - 10^5$ 個また心血からは $10^2 - 10^4$ 個、分離された。剖検では、1) の実験の陽性例と同様の所見が得られた。

3) $LD_{50/30}$ 値の検討

照射後30日以内に半数のマウスが死亡する線量を明らかにするために、6.70-8.62Gyの γ 線の全身照射を *E. cloacae* 陽性雄マウス80匹、陰性雄マウス76匹に行った。図2に照射後30日目の死亡率のプロビットを示した。プロビット5が50%死亡率に相当する。陰性マウスの $LD_{50/30}$ は 8.22 ± 0.11 Gy ($\pm 95\%$ 信頼限界) であったが、陽性マウスでは 7.50 ± 0.096 Gy となり明らかに $LD_{50/30}$ は低下した。

4) 腸死線量照射後生存日数の比較

腸粘膜上皮の障害によってマウスが死亡する線量が照射された場合、*E. cloacae* の存在が照射後生存時間に影響するか否かを明らかにするために、*E. cloacae* 陽性マウス32匹、陰性マウス21匹にそれぞれ33.5Gyの全身照射を行った。*E. cloacae* 陽性マウスは32匹すべてが照射後6日目に死亡した。一方、陰性マウスでは21匹中20匹は7日目に、残り1匹は8日目に死亡した。

死亡個体の剖検で、小腸の拡張・弛緩、暗褐色の液状内容物の充満、および出血性下痢がすべてのマウスで観察された。心血の培養検査で、陽性マウスから多数の *E. cloacae* が分離されたが陰性マウスからは該菌は全く分離されなかった。

1) から4) の実験において、照射後死亡したマウスからは *P. aeruginosa* を含む病原体はもとより *E. cloacae* 以外の腸内細菌も分離されなかった。

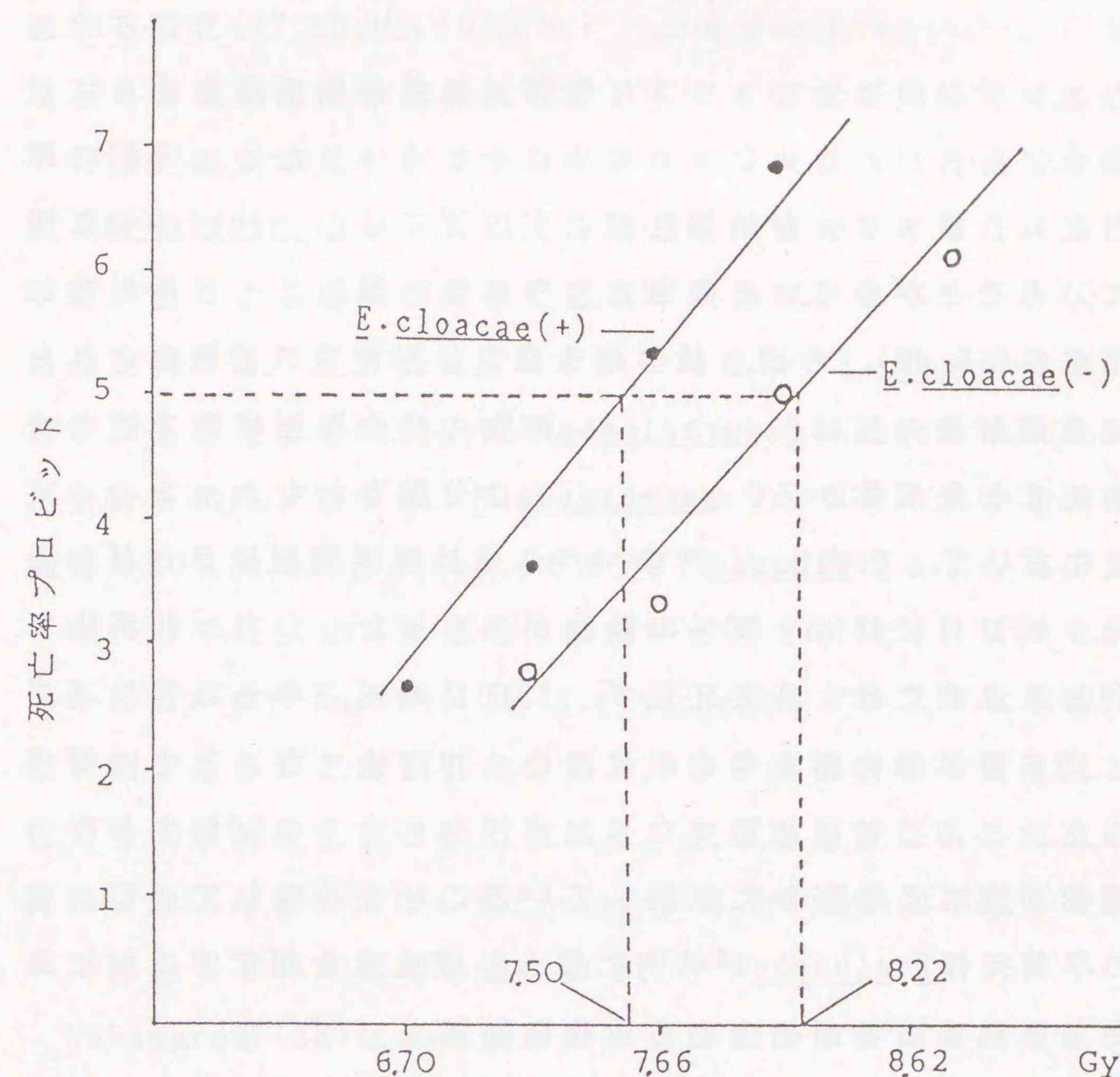


図2 γ 線照射後30日目の雄マウス死亡率のプロビット

考 察

健康なコンベンショナルマウスに骨髓死線量の放射線を全身に照射した場合、10日以内に死亡する個体は少ない。しかし、同様の線量が照射された後マウスが早期に死亡する例では *P.aeruginosa* に汚染されていることが多く、この場合マウスは一般に3-8日以内に敗血症死する(15,63)。今回、放医研生産SPFマウスで観察された骨髓死線量照射後の死は *P.aeruginosa* 汚染の場合ほど早期ではなく、もちろん死亡した個体から *P.aeruginosa* は分離されなかった。

本実験において、*E.cloacae* 汚染マウスは放射線照射後8日目から死に始め、13日目には65-80%の動物が死亡した。一方、非汚染マウスは11日目以前には1匹も死なず、13日目の死亡率も5%以下であった。13日目以降の死亡率曲線は汚染、非汚染マウスともほぼ同じであった。このことは汚染マウスと非汚染マウスの30日生存率の差は早期死が起こるか否かに原因していることを示唆している。また、この早期死は *E.cloacae* が体内に侵入し敗血症を起こすことによってもたらされることが表1から示唆された。

E.cloacae は、ヒトおよび各種動物の糞便、下水、土壌等から分離され、ときに腸間膜リンパ節、尿路、下痢便やその他の病的材料から分離されることがある腸内細菌の定義に一致する運動性菌である(48)。その生化学的性状は *Klebsiella* に類似しているが、運動性、グリセリンおよび可溶性デンプンの分解能、d-酒石酸塩利用能ならびにアミノ酸デカルボキシラーゼの分布の相違で *Klebsiella* と区別される(37)。本菌の血清学的研究は主として Sakazaki と Namioka(48) によって系統的に行われ、彼らは53のO抗原群、56のH抗原群および79の血清型を確立した。本菌は各種抗生物質に対し自然耐性傾向が強いので、ヒトでは化学療法の普及および免疫不全患者の増加などにより、近年その感染症が増加している(16)。しかし、実験動物では無菌ネコへの該菌単独投与によって致死感染が起こる

と平賀(私信)が述べているだけである。放射線照射動物の敗血症に関する研究(17,60,62,63)はいくつかあるが *Enterobacter* に関しては私どもが調べた限り行われておらず、本研究が初めてである。

骨髓死線量の放射線を全身照射されたマウスは白血球や血小板が減少するだけではなしに腸上皮細胞も障害をうけるため腸内に存在する細菌による感染が高率に起こり敗血症になりやすい(59)。私どもの実験では、放射線照射マウスの心血から *E.cloacae* の他に腸内容物中にも存在する *Staphylococcus*、*Streptococcus*、*Lactobacillus* が分離された。しかし、*E.cloacae* 汚染マウスの心血から分離された細菌の90%近くは *E.cloacae* であり、また本菌が心血から分離されたマウスの平均生存日数は他の細菌が分離されたマウスのそれより明らかに短かった。さらに、*E.cloacae* 陰性マウスでは敗血症にならない個体も多いことから考えると、放射線照射後の敗血症とそれにとまなう照射後生存日数の短縮は、放射線照射による宿主の生体防御能の低下だけではなしに *E.cloacae* 自身の侵襲力の強さや毒力に大いに関係しているものと思われる。

Nakamura等(36)はX線照射による造血器障害死の主因は血小板減少に伴う重要臓器の出血であるとし、Wilson(64)は放射線照射によりコンベンショナルマウスの血小板数は無菌マウスのそれよりもはるかに低い値に達することを報告するとともに、照射後コンベンショナルマウスの血液中に *E.coli* 由来の vasoactive な毒素(エンドトキシン)が生じ、それが血小板減少に関係しているとした。*E.cloacae* はグラム陰性桿菌であり、細胞壁にはエンドトキシンが存在する。このエンドトキシンには血管透過性や粘着性の昂進、白血球や血小板の減少そして白血球および血小板の血管内凝集等の作用があることが知られている(66)。放射線照射による *E.cloacae* 汚染マウスの早期死は、放射線照射による生体防御能の低下にとまなう腸管から血管内に侵入した *E.cloacae* およびそのエンドトキシンが、放射線照射によるマウスの出血傾向をさらに促進させ重要臓器の出血を早

めることによると説明されるかもしれない。

本実験で、十分な腸死線量を照射された *E. cloacae* 汚染マウスは非汚染マウスより明らかに早期に死亡した。哺乳動物では腸死線量の放射線をうけると線窩にある腸上皮幹細胞の死が起こり、上皮細胞の生産が停止された後も絨毛先端から上皮細胞が失われつづけ、粘膜下組織が露出し、そこから大量の水分と電解質を失い動物はショック状態で死亡する(30)とされている。腸死線量を照射された動物の平均生存時間と腸上皮細胞の寿命との間には正の比例関係があり、また腸上皮細胞の寿命は絨毛の先端から腸上皮細胞の失われる早さに依存していることが知られている(31)。腸管内の *E. cloacae* は腸上皮細胞の寿命を短縮させる方向に作用しているのかも知れない。

本研究から得られた成績は、腸管内における *E. cloacae* は放射線の照射を受けた宿主の状態を悪化させる方向で作用することを示している。致死線量の放射線照射を行う動物実験においては、再現性を確保するために、少なくとも、*E. cloacae* 陽性動物と陰性動物とが混在するような動物群は使用すべきではないといえよう。

S P F マウスを管理する際、放射線照射後早期死をもたらす *P. aeruginosa* の排除は飲水への塩素や塩酸の添加で比較的容易に行える(33,65)が、放医研の S P F マウスコロニーは塩素・塩酸水を飲水として与えていたにもかかわらず *E. cloacae* に汚染された。Serrano (53) も塩素添加水を与えている S P F マウスコロニーに *E. cloacae* が侵入したことを報告しており、*E. cloacae* の制御はこの様な方法では難しいものと思われる。S P F 動物管理に際し、日常的な微生物モニタリングの対象としてきた特定の病原微生物にのみに注意を払うのではなく、*E. cloacae* のような低病原性細菌の管理にも十分に意をそそぐ必要がある。

2. 致死線量照射マウスの死亡パターンに対する低病原性腸内細菌の影響

はじめに

前述の研究で著者は、腸内細菌が存在しない S P F マウスが何らかの原因で *E. cloacae* に汚染されると致死線量の放射線照射後の生存時間が短縮し、この早期死は *E. cloacae* に原因することを明らかにした(27)。

放射線照射後、低病原性腸内細菌が敗血症を引き起こす場合があることは良く知られている(11,16,34,60)。また、抗生物質投与によって大腸菌群が除去されたラットは非投与ラットより $LD_{50/30}$ 値が高くなることも報告されている(45)。これらのことは放射線が照射された動物の生存時間や生存率に対し低病原性腸内細菌の存在は大きな修飾因子となることを示している。

本研究の目的は、先に *E. cloacae* 陽性マウスでみられた放射線による早期死が *E. cloacae* に特異的な現象なのか、あるいは低病原性腸内細菌に一般的にみられる現象なのかを明らかにすることにある。このため、コンベンショナルマウスの糞便から分離した腸内細菌を該菌群不在の S P F マウスに投与し、 γ 線照射後の生存率の変化を非投与マウスの場合と比較検討した。

材料と方法

マウス

放医研生産 C57BL/6JNrs 雄の S P F マウスで、腸内細菌陰性のもの

と *E. cloacae* に既に汚染しているもの (*E. cloacae* 汚染マウス) の両方を使用した。これらの動物は前述の研究と同様の条件で飼育した。

細菌投与

腸内細菌陰性マウスに投与する細菌として *Escherichia coli* (No. 1 株), *Klebsiella pneumoniae* (No. 1 株), および *Proteus vulgaris* (No. 2 株) を使用した。これらの細菌は放医研で生産されたコンベンショナル C57BL/6JNrs マウスの糞便から分離されたものである。菌株は各々 5% ウマ血液寒天培地で 37℃ に一夜培養した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) に浮遊させ、 $10^8/0.5\text{ml}$ の生菌液を作製した。この生菌液 $0.5\text{ml}/\text{匹}$ を胃ゾンデを用いて経口的に 5-6 週齢の腸内細菌陰性マウスに投与し、該菌投与マウスとした。なお、5% ムチンとともにマウス腹腔内に投与されたこれら 3 種の細菌と *E. cloacae* の LD_{50} 値は、*E. coli* が $10^{5.95}$ 個、*K. pneumoniae* が $10^{6.0}$ 個、*P. vulgaris* が $10^{6.59}$ 個また *E. cloacae* が $10^{6.05}$ 個であった。

放射線照射

マウスは 8-9 週齢時 (菌投与後 3 週目) に先の実験と同一条件で 7.20Gy-33.5Gy の γ 線 1 回全身照射を受けた。

細菌学的検査

投与した細菌の定着を確認するため、放射線照射の 2 日前にすべてのマウスから個々に糞便を採取し DHL 寒天培地に直接塗抹した。37℃ に一夜培養後、培地上のコロニーを 5% 血液寒天培地で純培養した後、ミニテックシステム (BBL) によって同定した。

放射線照射後死亡したマウスから盲腸内容と心血を採取し、盲腸内容は DHL 寒天培地に直接塗抹し 37℃ に一夜培養した。心血は臨床用チオグリコレート液体培地 (栄研) に接種し、37℃ に 42 時間培

養後その一白金耳量を 5% ウマ血液寒天培地と GAM 寒天培地に塗抹し 37℃ に 24-48 時間、好気的およびガスパック (BBL) を用いて嫌氣的に培養した。これら培地上のコロニーは 5% 血液寒天培地または GAM 寒天培地で純培養した後、Cowan の方法 (13) によって同定した。

成績

1) 骨髄死線量照射後死亡パターンの比較

20 匹と 25 匹の 2 群のマウスに *E. coli* あるいは *K. pneumoniae* を各々投与し、菌投与後 3 週目に 8.62Gy を全身照射した。対照として腸内細菌陰性マウス 31 匹および *E. cloacae* 汚染マウス 36 匹にも 8 週齢時に同線量を照射した。なお、*P. vulgaris* 投与マウスについては実験期間中に給水瓶水漏れ事故が発生したため成績が得られなかった。

各群の照射後死亡パターンを図 3 に示した。*E. cloacae* 汚染マウスは照射後 9-18 日の間にすべて死亡したが、腸内細菌陰性マウスは 30 日をすぎても 10 匹 (32%) が生存していた。照射後 30 日以内に死亡したマウスの平均生存日数を表 2 に示した。*E. cloacae* 汚染マウス、*E. coli* 投与マウスおよび *K. pneumoniae* 投与マウスの平均生存日数はほぼ同じ値を示し、腸内細菌陰性マウスの値より明らかに短かった。

照射後死亡した動物の剖検で、腸内細菌陽性グループマウスの皮下、肺、消化管、泌尿生殖器、リンパ節、脳などに著しい出血性の病変が多数確認された。腸内細菌陰性マウスでも同様な病変が確認されたが出血箇所は少なくその程度も汚染マウスほど高くはなかつ

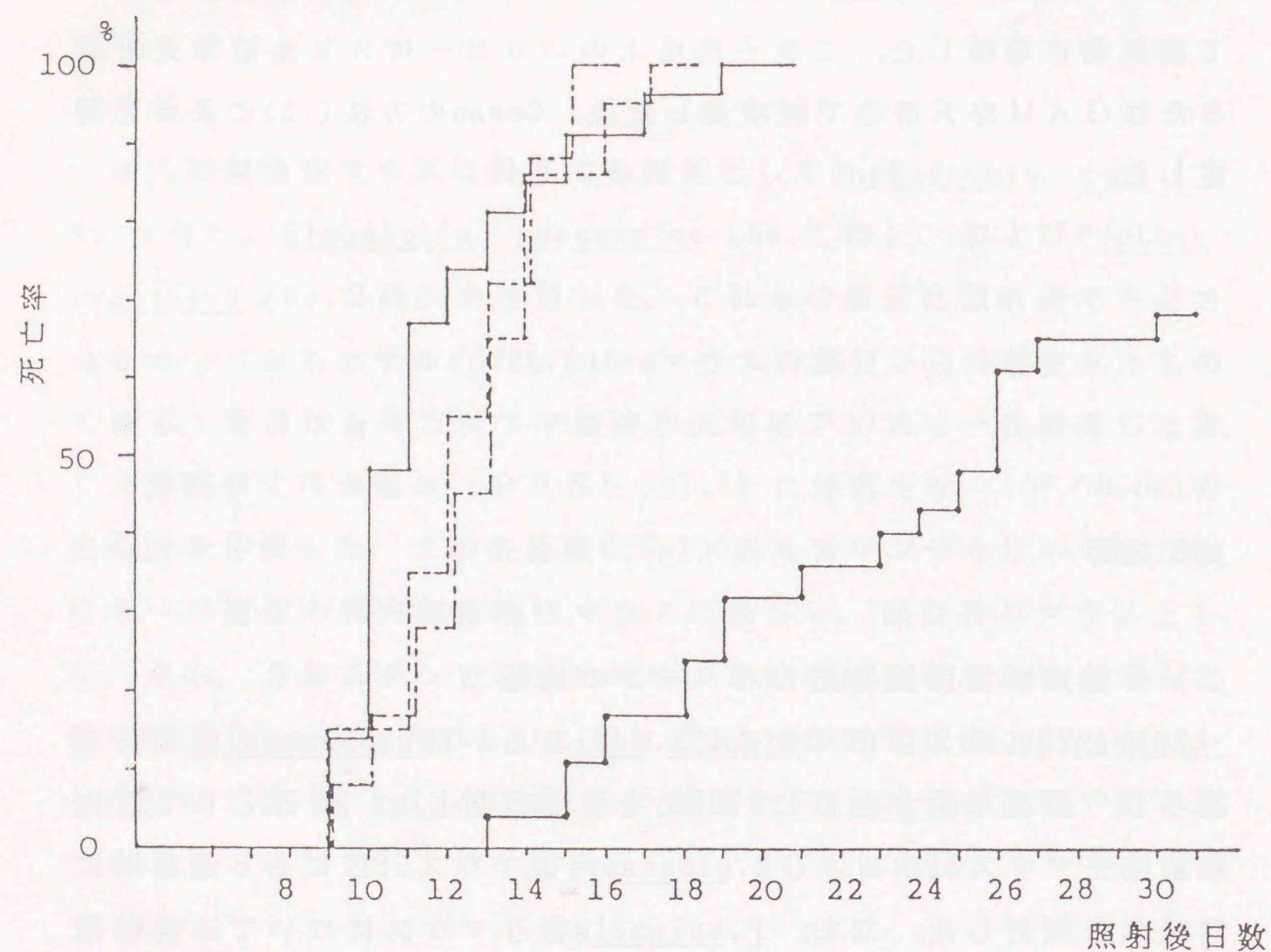


図3 8.62Gy全身照射後のマウス死亡パターン
 —●— : 腸内細菌 陰性マウス、 — : *E. cloacae*陽性マウス、
 : *E. coli*投与マウス、 - · - · - : *K. pneumoniae*投与マウス

表2 8.62Gy照射後30日以内に死亡したマウスの平均生存日数

マウス	照射マウス数	死亡マウス数	平均生存日数 ¹⁾
腸内細菌陰性マウス	31	21	21.3 ± 4.9
<i>E. cloacae</i> 汚染マウス	36	36	11.5 ± 2.5*
<i>E. coli</i> 投与マウス	20	20	11.9 ± 2.0*
<i>K. pneumoniae</i> 投与マウス	25	25	12.4 ± 1.8*

1) 平均±標準偏差

* 腸内細菌陰性マウスと比較し (t-検定、 $p < 0.05$) 有意差あり。

た。死亡した *E. cloacae* 汚染マウスのすべての心血から *E. cloacae* が分離された。同様に、*E. coli* 投与及び *K. pneumoniae* 投与マウスの心血からはそれぞれ *E. coli* および *K. pneumoniae* のみが分離された。一方、腸内細菌陰性マウスの心血からは *Streptococcus*、*Staphylococcus* および *Lactobacillus* が分離され、それ以外の細菌は今回用いた培地によっては分離されなかった。

2) LD_{50/30}の比較

全身照射後30日以内のLD₅₀を比較するため各グループのマウスにそれぞれ7.20-8.62Gy（1点は15匹-25匹）のγ線照射を行った。LD₅₀は照射後30日目の死亡率のプロビット値をプロットした図から求めた。腸内細菌陰性マウスのLD_{50/30}は8.22Gyであったが、*E. cloacae* 汚染マウス、*E. coli* 投与マウス、*K. pneumoniae* 投与マウス、*P. vulgaris* 投与マウスでは各々7.50Gy、7.64Gy、7.57Gyおよび7.70Gyであった（図4）。腸内細菌陽性4グループのLD₅₀はほぼ同じ値を示したが、これらの値は腸内細菌陰性マウスのそれよりも明らかに低かった。

死亡した *E. cloacae* 汚染マウスの心血からは *E. cloacae* が、*E. coli* 投与マウス、*K. pneumoniae* 投与マウスおよび *P. vulgaris* 投与マウスの心血からはそれぞれ *E. coli*、*K. pneumoniae* および *P. vulgaris* が分離された。

3) 腸死線量照射後生存日数の比較

腸死線量を照射されたマウスの生存時間に及ぼす投与細菌の影響を明らかにするために *E. coli* 投与マウス、*K. pneumoniae* 投与マウス、*P. vulgaris* 投与マウス、*E. cloacae* 汚染マウスおよび腸内細菌陰性マウスはそれぞれ9週齢時に33.5Gyのγ線を照射された。表3に示したように、腸内細菌陰性マウスは他のマウスより明らかに長く生存したが細菌投与マウスおよび *E. cloacae* 汚染マウスの生存時間の間に

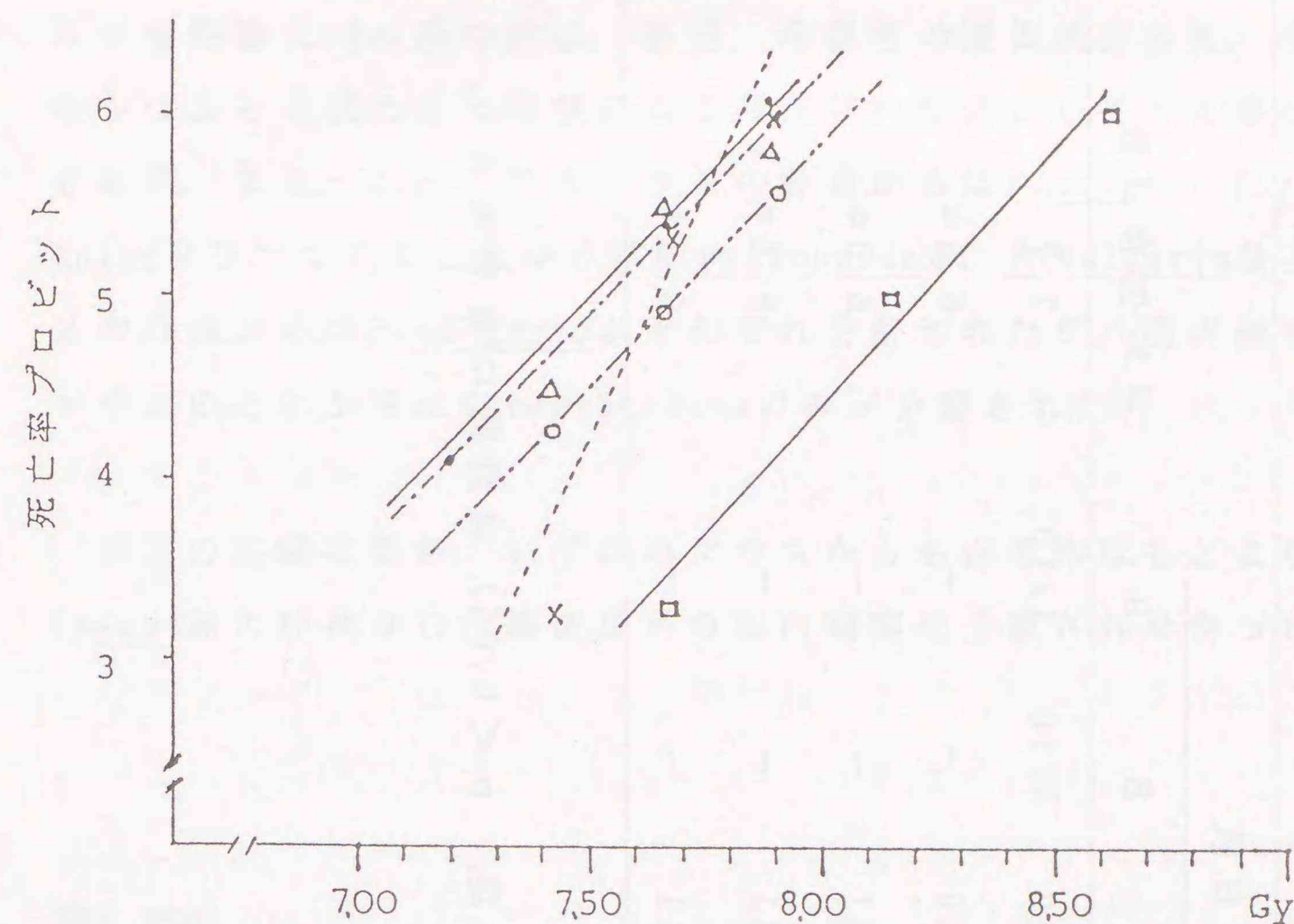


図4 γ線照射後30日目死亡率のプロビット

□ : 腸内細菌 陰性マウス、● : *E. cloacae* 陽性マウス
 × : *E. coli* 投与マウス、△ : *K. pneumoniae* 投与マウス
 ○ : *P. vulgaris* 投与マウス

表 3 33.5Gy全身照射後マウスの生存日数

マウス	照射後日数					平均生存日数
	5	6	7	8	9	
腸内細菌陰性マウス	0/10 ¹⁾	0/10	4/10	5/10	1/10	7.7
<i>E. cloacae</i> 汚染マウス	0/10	5/10	5/10	-	-	6.5*
<i>E. coli</i> 投与マウス	0/11	5/11	6/11	-	-	6.5*
<i>K. pneumoniae</i> 投与マウス	0/11	7/11	4/11	-	-	6.4*
<i>P. vulgaris</i> 投与マウス	0/11	5/11	6/11	-	-	6.5*

1) 死亡マウス数/検査マウス数と比較し (t-検定, $p < 0.05$) 統計的に有意差あり。
* 腸内細菌陰性マウス

は各々有意差は認めなかった。

剖検により、グループに関係なく死亡したマウスはすべて特徴的な出血性腸炎（小腸の拡張、弛緩、暗褐色の液体状内容物、血管系のうつ血と点状出血、粘膜表面の浮腫等）を起こしている事が確認された。また、*E. coli*投与マウスの心血からは*E. coli*が、*K. pneumoniae*投与マウスの心血からは*K. pneumoniae*が、*P. vulgaris*投与マウスの心血からは*P. vulgaris*がそれぞれ分離されたが、腸内細菌陰性マウスのそれからは*Streptococcus*のみが分離された。

以上の実験期間中、いずれのマウスからも病原体はもとより*E. cloacae*および投与した細菌以外の腸内細菌は分離されなかった。

考 察

本節の実験は、*E. coli*、*K. pneumoniae*あるいは*P. vulgaris*を経口的に投与されたSPFマウスが*E. cloacae*に汚染されたマウスと照射後同じ死亡パターンを示すか否かを明らかにするために行われた。これらの細菌を有するマウスは放射線照射後同様な死亡パターンを示したが、腸内細菌陰性マウスのそれとは明らかに異なっていた。細菌学的検査結果からみても、これら4種の細菌は致死線量を照射されたマウスに対しほぼ同じような起病力を持つことが示唆された。

亜致死から致死線量域の放射線を照射されたコンベンショナルマウスの大部分は敗血症で死亡するが、その原因菌の大部分は内在性細菌である(17)。特に*P. aeruginosa*は放射線照射後生存時間を大幅に短縮させ実験成績に誤差を生じさせるため(15,63)放医研では特定病原体の一つに指定している。しかし、内在性細菌の一つである腸内細菌の照射後生存時間や生存率への影響に関する研究はあまり多

くない。それらの中で、McLaughlinら(32)はX線照射E.coli単一汚染ノトバイオームマウスのLD_{50/30}は無菌マウスのそれよりも明らかに低下し、健康なコンベンショナルマウスのLD_{50/30}とほぼ同じになることを報告している。また、Onoueら(40)は無菌マウスに腸内菌叢を構成している菌をそれぞれ単独に投与したノトバイオームマウスを作成し、2KRのX線照射後平均生存日数を比較する実験を行い、Clostridium、BifidobacteriumあるいはLactobacillus単一投与マウスの平均生存日数は無菌マウスのそれより明らかに長くなり、Peptostreptococcus、S.epidermidis、BacteroidesあるいはEubacteriumを投与されたマウスのそれは無菌マウスの場合と同じになるが、Streptococcus faecalisあるいはE.coli単一投与マウスの平均生存日数は無菌マウスのそれより明らかに短くなりコンベンショナル化したマウスのそれと同じになることを報告している。これらの報告は、致死線量の放射線を照射されたP.aeruginosaの存在しない健康なコンベンショナルマウスの死亡パターン（照射後平均生存日数やLD_{50/30}）は腸内の特定の細菌、特にE.coliによって左右されることを示唆している。先に記したように、私どもの実験成績はマウスに対しE.coli、K.pneumoniae、P.vulgarisおよびE.cloacaeの4菌種はほぼ同じ様な起病力を持つことを示した。このことは、P.aeruginosaの存在しないコンベンショナルマウスの死亡パターンはE.coliのみならずK.pneumoniae、P.vulgarisおよびE.cloacaeによっても同じように左右される、換言すればマウス腸管内に1種類でもこれらの細菌が存在すれば放射線照射後の死亡パターンはP.aeruginosaの存在しないコンベンショナルマウスと同じになることを示唆している。

X線全身照射後、P.aeruginosa陰性コンベンショナルC57BL/6J雄マウスのLD_{50/30}は670±19cGyであった（早川 未公表）。また、X線（200kVp, 20mA, 0.5mmCu+0.5mmAlフィルタ）に対する¹³⁷Csのγ線の相対的生物効果比（RBE）は0.89である（早川 未公表）。

この値からγ線照射のLD_{50/30}をX線照射の場合に換算するとE.cloacae汚染マウス、E.coli投与マウス、K.pneumoniae投与マウスおよびP.vulgaris投与マウスのLD_{50/30}はそれぞれ6.68Gy、6.80Gy、6.74Gyおよび6.85Gyとなる。この値は早川が示したP.aeruginosa陰性コンベンショナルマウスのLD_{50/30}とほぼ同じである。このことは、先の示唆が正しいことを示している。

SPFマウスは一般に無菌動物から作出され、バリア施設内で維持される。このため、SPFマウスの腸内菌叢はコンベンショナルマウスに比較して単純・不安定でしばしば変化する(53,62)。腸内細菌フリーで維持されているSPFマウスコロニーの一部にEnterobacterやProteusが侵入したことをSerrano(53)は報告しているし、放医研でも3年間腸内細菌フリーで維持されていたSPFマウスコロニーの一部にE.cloacaeが侵入・定着した。前節で著者は腸内細菌陰性マウスがE.cloacaeに汚染されると致死線量照射後の生存時間の短縮やLD_{50/30}値の低下が起こりうることを明らかにし、放射線照射を行う動物実験では、再現性を確保するためE.cloacae陽性動物と腸内細菌陰性動物とが混在するような動物群は使用すべきでないことを示した。本節において、照射後生存時間の短縮やLD_{50/30}値の低下はE.cloacaeのみならず本実験で使用した腸内細菌4種でも同様に起こり、これらの細菌を1種類でも持つマウスは致死線量照射後P.aeruginosa陰性コンベンショナルマウスと同じ死亡パターンを示すことを明らかにした。これらのことは、放射線照射実験の成績の安定にとってマウス腸管内における低病原性腸内細菌の存在の重要性を示している。再現性ある放射線照射実験を行うためには使用するSPFマウスの作出に際し、本実験で用いた低病原性腸内細菌の一つを予め定着させておく必要があると考えられる。

第2章 腸内細菌および *Pseudomonas aeruginosa* の腸管内定着に およぼす *Enterobacter cloacae* の影響

はじめに

著者は放射線照射実験に使用する実験動物を管理する立場から、マウスの腸管内に定着した *E. cloacae* の影響を検討し、放射線照射実験を行う場合、再現性ある成績を得るためには腸内菌叢の安定（特に腸内細菌の有無）が重要な要因の一つであることを示した(27, 28)。

この研究を遂行する過程で、数種の腸内細菌を保有するコンベンショナルマウスが飼育されている環境下で *E. cloacae* 陽性および腸内細菌陰性 S P F マウスを飼育した場合、陰性マウスでは比較的短期間に *E. coli* などの腸内細菌が侵入、定着するにも関わらず、*E. cloacae* 陽性マウスでは *E. cloacae* 以外の腸内細菌の定着は困難であることに気づいた。嫌気性菌を中心とする常在菌叢が、新たに侵入してくる病原体の定着・増殖を抑える生物学的バリアーを構築していることは良く知られている(42)。*E. cloacae* 陽性マウスの腸内菌叢にもこのような作用があることが考えられる。

本研究の目的は、予め常在菌叢構成菌の一つとなっている *E. cloacae* が、他の腸内細菌および放射線照射実験において特に問題となる *P. aeruginosa* (15, 17, 60) の腸管内定着にどの様に影響するかを明らかにすることにある。

材料および方法

マウス

放医研生産の無菌 C3H/HeNrs 雄および C57BL/6JNrs の S P F 雄マウスを使用した。無菌、ノトバイオート、Limited flora（無菌動物に未同定のある種の菌叢を投与しアイソレータ内で維持されているもの）および S P F マウスにはオートクレーブ滅菌した固形飼料（船橋農場、MB-1）を与えた。飲料水として、無菌、ノトバイオートおよび Limited flora マウスにはオートクレーブ滅菌水を与えたが S P F マウスには塩素・塩酸水を与えた。無菌、ノトバイオートおよび Limited flora マウスの飼育は 2 % 過酢酸によって滅菌したビニールアイソレータにより常法(23)にしたがって行った。S P F マウスは前述の研究と同様の条件で飼育した。

細菌投与

無菌、ノトバイオートおよび S P F マウスに経口投与する細菌として、放医研で生産された健康な S P F およびコンベンショナルマウスの糞便から分離された *E. cloacae* (Ⅱ株)、低病原性 *E. coli* (No. 2株、以下 *E. coli*)、国立予防衛生研究所獣疫部から分与されたマウス腸粘膜肥厚症の原因菌 *E. coli* 0115, a. c. : K(B) (予研株、以下 *E. coli* 0115)、また放医研で全身放射線照射を受け敗血症を起こしたコンベンショナルマウスの心血から分離された *P. aeruginosa* (Ⅲ株) を使用した。各々の菌株は 5 % ウマ血液寒天培地で 37℃ に一夜培養し、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に浮遊させ、光電比色法によってそれぞれ目的とする濃度の生菌液を作製した。なお、それぞれの濃度（菌数）は成績の項に示した。この生菌液 0.5 ml を胃ゾンデを用いて経口的にマウス胃内に投与した。また、Limited flora マウスを作成するため腸内細菌陰性 S P F マウスの糞便を光岡の A 液(35)で 10^{-7} に希釈し、それを G A M 寒天培地（日水製薬）上に塗抹し、ガスパック (B B L) を用い 37℃ に 24 時間嫌気培養した

後、培地上のコロニー40個を高圧滅菌後急冷した5mlのPBSに混和し、その0.5mlを胃ゾンデを用いて無菌マウスに投与した。

選択培地及び細菌選択方法

糞便細菌の選択培地として、腸内細菌用としてはDHL寒天培地（栄研）、*P.aeruginosa*用としてはNAC寒天培地（栄研）を用いた。糞便をPBSで適当希釈後これらの培地に塗抹、37℃に一夜培養後、NAC寒天培地上のコロニーを*P.aeruginosa*とした。同様に、DHL寒天培地上で周辺部が透明で中心部がピンク色のコロニーを*E.coli* 0115とした。また、DHL培地上でコロニー全体が湿潤で明るいピンク色をしているものを*E.cloacae*とし、表面が乾燥気味で濃いピンク色をしたコロニーを*E.coli*としたが、これだけで*E.cloacae*と*E.coli*を正確に区別することは難しいため、これら2菌種の比較を行う場合には、DHL培地を45℃で培養し、発育したコロニーを*E.coli*とし(49)、0.05g/lクリスタルバイオレット加トリプチケートソイ寒天培地（栄研）上のコロニーを*E.cloacae*とした(51)。なお、以上の方法で各々の細菌が正しく分類されていることについては、予めこれらのコロニーを血液寒天培地で培養し、ミニテック（BBL）で同定する事により確認してある。腸内菌叢検索用として、前島らの方法(21)に準じLactobacillusおよび一部Bifidobacterium用としてLBS寒天培地（BBL）、Bacteroides用としてBacteroides寒天培地（日水製薬）、Clostridium用としてTSN寒天培（BBL）、総菌数用としてGAM寒天培地、腸内細菌用としてDHL寒天培地、*S.faecium*用としてSF寒天培地（栄研）、Staphylococcus用としてマンニット食塩寒天培地（栄研）、真菌用としてポテトデキストロース寒天培地（栄研）をそれぞれ用いた。

糞便細菌数の測定

マウスの肛門から直接採取した新鮮糞便1個を秤量後、滅菌ガラスホモジナイザーに入れ100倍量のPBSまたは光岡のA液（菌叢検索の時）を加えてホモジナイズしたものをPBSまたは光岡のA液で10倍階段希釈し、その0.1mlを上記の選択培地に塗抹した。37℃または45℃に1夜培養後、培地上のコロニー数を測定した。菌叢検索の場合、LBS寒天培地、Bacteroides寒天培地、TSN寒天培地、GAM寒天培地はガスパックを用いて嫌気培養し、他の培地は好気培養した。

成績

1) *E.cloacae*陽性ノトバイオートマウスにおける*E.coli*および*P.aeruginosa*の腸管内定着

*E.cloacae*単一陽性ノトバイオートマウスを用い、*E.coli*および*P.aeruginosa*の腸管内定着性について検討した。すなわち、4-5週齢の無菌C3H/He雄マウスに 10^7 個の*E.cloacae*を経口投与し*E.cloacae*単一陽性マウスとした。その4週後に糞便内*E.cloacae*数を測定したのち、 $10^{5.3}$ 個あるいは $10^{8.9}$ 個の*E.coli*をゾンデで胃内に投与した。*E.coli*投与後7日ごとに35日目まで糞便中の*E.coli*数を測定した。比較のため無菌マウスに同様の方法で*E.coli*を投与し5週後の糞便細菌数を測定した。その成績は表4に示した。*E.coli*は実験期間中*E.cloacae*単一陽性マウスでは投与菌数に関わりなく糞便から 10^9-10^{10} 個/gの高い値で安定して分離された。この値は無菌マウスに*E.coli*を投与したノトバイオートマウスの35日目の糞便中の*E.coli*数より少なかったが有意差はなかった。同様な実験を*P.aeruginosa*

表4 E.cloacae単一陽性ノトバイオートマウスへE.coliまたはP.aeruginosaを投与後の糞便内菌数の変化

マウス	投与細菌		投与後日数と投与細菌の糞便内菌数 (log/g 平均±標準偏差)						
	菌種	菌数(log)	n	1	7	14	21	28	35日
<u>E.cloacae</u> 単一陽性 ¹⁾	<u>E.coli</u>	5.3	5	8.2±0.3	9.8±0.1	9.6±0.3	10.0±0.1	10.1±0.2	9.8±0.1
	<u>E.coli</u>	5.3	5	NT ²⁾	NT	NT	NT	NT	9.9±0.1
<u>E.cloacae</u> 単一陽性	<u>E.coli</u>	8.9	5	9.7±0.1	10.0±0.1	9.7±0.3	9.6±0.3	9.5±0.4	9.4±0.3
	<u>E.coli</u>	8.9	5	NT	NT	NT	NT	NT	9.7±0.2
<u>E.cloacae</u> 単一陽性	<u>P.aeruginosa</u>	8.0	5	7.9±0.1	6.5±0.2	7.6±0.1	7.5±0.1	7.5±0.2	7.3±0.1
	<u>P.aeruginosa</u>	8.0	5	NT	NT	NT	NT	NT	7.9±0.2

1) 無菌マウスに10⁷E.cloacaeを投与後4週間経過したもの、糞便菌数は10.4-10.5(log)/g

2) 検査せず

* t-検定 p<0.01で有意差あり

について行った。すなわち、上記の実験と同様にして作成したE.cloacae単一陽性マウスに10⁸個のP.aeruginosaを経口的に胃内に投与し、35日間糞便中のP.aeruginosa数を測定した。表4に示したように、投与1週目にP.aeruginosaはやや減少したがその後は10^{7.5}個前後で安定した値を示した。この値は無菌マウスにP.aeruginosaを投与したものの糞便内細菌数より有意に少なかったが、その差は大きくなかった。

2) Limited floraマウスにおけるE.coliの腸管内定着

6週齢でSPFマウスの糞便から分離した嫌気性菌40コロニーを経口投与したLimited floraマウスを用い上記実験と同様な検討をE.coliについて行った。なお、このマウス糞便からはLactobacillus、Bifidobacterium、Bacteroidesのみが分離された。7週齢でマウスを2群に分け、一方には10⁸個のE.cloacaeを経口投与しE.cloacae(+)マウスとした。他方は対照とした。10週齢時にこれら2群のマウスに10^{8.5}個のE.coliをゾンデを用いて胃内に投与し、4週間糞便中のE.coli数を測定した。表5に示したように、投与翌日では2群の間に差を認めなかったが1週目以降は明らかにE.cloacae(+)マウスの方が低い値を示した。

3) SPFマウスにおけるE.coli、E.coli 0115および

P.aeruginosaの腸管内定着

より複雑な腸内菌叢を有するSPFマウスについて上記と同様な検討を行った。すなわち、腸内細菌陰性SPFマウスを5-6週齢時に2群に分け、一方には10⁶個のE.cloacaeを経口投与しE.cloacae陽性マウスとした。他方は陰性対照とした。9-10週齢時にこれら2群のマウスに10^{5.6}-10⁸個のE.coli、E.coli 0115あるいはP.aeruginosaを経口投与し、約1か月間糞便内の投与細菌の消長を調べた。成績は表6に示した。10^{5.6}個のE.coliを投与した場合、

表5 Limited flora マウスへ投与したE.coliの糞便内菌数の変化

マウス	投与細菌		投与後日数と糞便内E.coli数(log/g 平均±標準偏差)					
	菌種	菌数(log)	n	1	7	14	21	28
E.cloacae (+) ¹⁾	E.coli	8.5	8	9.4±0.2	9.2±0.3	8.8±0.3	9.2±0.3	9.2±0.2
E.cloacae (-) ¹⁾	E.coli	8.5	7	9.5±0.2	9.7±0.2	9.9±0.1	9.8±0.2	9.7±0.1

¹⁾ E.cloacae (+) マウスはLimited floraマウスに1 O⁷ E.cloacaeを投与後3週間経過したもの、
糞便内E.cloacae数は9.6±0.1(log/g)、
E.cloacae (-) マウスはE.cloacaeを投与しないLimited floraマウス、

* t-検定 p<0.01で有意差あり、

S P Fマウスに投与した細菌の糞便内菌数変化

マウス ¹⁾	投与細菌		投与後日数と投与細菌の糞便内菌数 (log/g 平均±標準偏差) 、投与菌陽性動物数							
	菌種	菌数(log)	n	1	7	14	20	28(25) ⁴⁾		
E.cloacae (+)	E.coli ⁵⁾	5.6	9	4.1±1.0 (3/9) ²⁾	<3 (0/9)	NT ³⁾	<3 (0/9)	<3 (0/9)		
E.cloacae (-)	E.coli	5.6	9	4.1±1.1 (4/9)	4.7 (2/9)	<3 (0/9)	<3 (0/9)	NT NT		
E.cloacae (+)	E.coli	7.6	9	5.3±0.8 (9/9)	5.0 (1/9)	NT	<3 (0/9)	<3 (0/9)		
E.cloacae (-)	E.coli	7.6	9	4.1±0.6 (9/9)	3.9±0.8 (7/9)	4.0±1.1 (3/9)	5.2±0.6 (3/9)	4.9±0.7 (3/9)		
E.cloacae (+)	E.coli 0115 ⁵⁾	6.0	5	<3 (0/5)	5.3 (1/5)	<3 (0/5)	<3 (0/5)	NT		
E.cloacae (-)	E.coli 0115	6.0	5	4.3±0.2 (5/5)	3.2 (2/5)	5.9±0.4 (4/5)	5.7±0.3 (4/5)	NT		
E.cloacae (+)	E.coli 0115	8.0	5	4.6±0.4 (5/5)	4.8±0.3 (3/5)	<3 (0/5)	<3 (0/5)	NT		
E.cloacae (-)	E.coli 0115	8.0	4	6.6±0.7 (4/4)	3.9 (2/4)	4.7±0.9 (4/4)	5.3±1.3 (4/4)	NT		
E.cloacae (+)	P.aeruginosa	8.0	8	6.0±1.0 (8/8)	3.7 (2/8)	4.8±0.1 (3/8)	4.3 (2/8)	<3 (0/8)		
E.cloacae (-)	P.aeruginosa	8.0	8	6.3±0.3 (8/8)	5.6±1.2 (5/8)	3.8 (2/8)	4.7±0.9 (5/8)	4.3±1.6 (5/8)		

1) E. cloacae (+) マウス: E. cloacae陽性マウス、腸内細菌陰性SPFマウスに 10^6 E. cloacaeを経口投与し3週間経過したもの、
糞便内E. cloacae数は 4.4 ± 0.3 (Log)

E. cloacae (-) マウス: 腸内細菌陰性SPFマウス

2) 糞便から 10^3 個以上投与細菌が分離された動物数/検査動物数

3) 検査せず

4) () は P. aeruginosa投与の場合の日数

5) E. coliは低病原性E. coli (No. 2株)、E. coli 0115は病原性E. coli 0115, a.c.K(B)

E. cloacae陽性マウスおよび陰性マウスとも14日以内に投与細菌は 10^3 以下になったが、 $10^{7.6}$ 個を投与した場合にはE. cloacae陽性マウスでは20日以内に 10^3 以下になったにもかかわらず陰性マウスでは1か月以上にわたって1/3のマウスから投与細菌が分離され続けた。また、E. coli 0115を投与した場合には、E. cloacae陽性マウスでは 10^6 および 10^8 個投与とも14日以内に 10^3 以下となったが、陰性マウスでは7日目に1度半数以上のマウスが 10^3 以下になったにもかかわらず、その後再び大部分のマウスから投与細菌が分離されるようになった。さらに、E. cloacae陽性マウスに 10^8 個のP. aeruginosaを投与した場合、20日-28日の間にほとんどのマウスにおける該菌数は 10^3 以下となったが陰性対照マウスではこの間も定着し続けるものが多かった。なお、E. cloacae陰性マウスの糞便からはBifidobacteriumを含むLactobacillusが $10^{5.56-9.83}$ 個、Bacteroidesが $10^{8.62-9.13}$ 個、Streptococcusが $10^{5.51-7.41}$ 個、Staphylococcusが $10^{3-4.51}$ 個分離され、他の細菌は分離されなかった。

考 察

病原性E. coliやP. aeruginosaの腸管内定着に腸内菌叢の状態が関係しているという報告は多数(19,44,57,58)ある。特に、P. aeruginosaの定着に関してはItohら(20)がノトバイオートやLimited flora マウスを使用して詳細な検討を行い、本菌の定着抑制には嫌気性菌、特にClostridiumの存在が重要であることを明らかにした。私どもの実験では、無菌マウスから作成されたE. cloacae単一陽性ノトバイオートマウスはその後投与されたE. coliやP. aeruginosaの定着を抑制することではなく、またE. cloacae陽性Limited floraマウ

スでも *E. coli* の定着抑制は認められなかった。腸管内における *E. cloacae* の存在は、その後に侵入してきた *E. coli* や *P. aeruginosa* の定着に直接には関係しないことを、このことは示唆している。 *E. cloacae* 単一陽性ノトバイオームウスでは投与された *E. coli* の増殖抑制も認められていない。しかし、 *E. cloacae* 単一陽性ノトバイオームウス中の *P. aeruginosa* 数は無菌マウスに該菌を投与したときよりも明らかに減少していた。 Itohら(20)は、 *E. coli* 単独投与ノトバイオームウスに *P. aeruginosa* を投与すると、無菌マウスに該菌を投与したときよりも糞便内菌数は減少することを示している。これは単に、先に定着した細菌による物理的障害によるものではない。なぜなら、 *E. cloacae* 単一陽性ノトバイオームウスでは *E. coli* の増殖抑制は認められていない。また、予め無菌マウスに投与された *E. coli* はその後投与した *Shigella* の増殖を強く抑制するとの報告もある(41)。腸管内における *E. cloacae* や *E. coli* は *P. aeruginosa* の増殖に拮抗するものと思われる。

前述のように Itohらはノトバイオームウスや Limited flora マウスを用いて腸内菌叢構成菌と *P. aeruginosa* の定着抑制に関して詳細な検討を行っている。彼らは、 *P. aeruginosa* の定着抑制に関しもっとも重要な菌叢構成菌は偏性嫌気性菌、特に *Clostridium* であるとし、腸内細菌との関係には特に注目していない。また、 *Clostridium* は *E. coli* の腸管内における増殖を抑制していることも報告している。

Ducluzeauら(14)も *Shigella* とある種の *Clostridium* について、同様なことが起こるとしている。私どもが使用した Limited flora マウスや S P F マウスからはガスパック法で培養可能な *Clostridium* は分離されていない。それにもかかわらず、 *E. cloacae* 陽性 Limited flora マウスに投与した *E. coli* の増殖は明らかに抑制された。 *E. cloacae* には少なくとも Limited flora マウスが持っていた *Lactobacillus*、*Bifidobacterium*、*Bacteroides* などの存在下で *E. coli* に拮抗する作用があるのかもしれない。また、少なくとも Limited flora マウスよ

りは複雑な腸内菌叢を持っている *E. cloacae* 陽性 S P F マウスに投与した *E. coli*、 *E. coli* 0115 および *P. aeruginosa* は、陰性 S P F マウスの場合とは異なり、腸管内に定着する事はなかった。このことは、乳糖分解性腸内細菌科の菌を保有するマウスはそれらを保有しないマウスよりも *E. coli* 0115 が定着し難いという斉藤らの報告(46)とも一致する。

ここに示した実験成績は、比較的複雑な菌叢を持つマウスにおいて、その構成菌としての *E. cloacae* には *E. coli* や *P. aeruginosa* の定着を阻止する作用があることを示唆している。菌叢の安定ということは長期にわたり構成菌種が変化しないということとそれら菌種間のバランスが変化しないというふたつの意味を持つが、前者の意味で考えれば放医研生産 S P F マウスにおいて *E. cloacae* は腸内菌叢の安定に深くかかわっていると思われる。

第3章 腹部放射線照射による肺転移抑制現象と *Enterobacter cloacae*

はじめに

安藤ら(2)は、腹部を放射線で照射したマウスに同系の線維肉腫細胞を静脈内(i.v.)に投与すると腹部を照射しない場合より肺転移数が減少することを明らかにし、この現象をA I R I M (Abdominal Irradiation-induced Inhibition of Lung Metastases)と名付けた。肺転移数が最も顕著に減少するのは、マウスの腹部を12Gyで照射後7日目に腫瘍細胞をi.v.投与した場合である。私どもは本現象の発現には腸管、特に盲腸の照射が必須であること、また無菌動物では腹部を照射しても転移抑制現象は起こらないことを示した(3)。これらの観察から、A I R I Mは腹部照射によって腸管が障害を受け、何らかの腸内菌叢構成細菌が腸上皮から体内部に侵入することによって引き起こされるものと仮定した。

本研究の目的は、無菌マウスや抗生物質投与マウスを用いることにより、上記の仮説を証明するとともにA I R I M発現にとって必須な腸内菌叢構成細菌を明らかにする事にある。

材料と方法

マウス

放医研生産C3Hf/HeNrsマウスで、9-16週齢のSPF及び無菌の雄を使用した。SPFマウスおよび無菌マウスは前述の方法と同様の条件下で飼育した。ただし、無菌マウスには50kGy放射線滅菌飼料(船橋農場、MB-1)を与えた。SPFマウスの糞便には少なくとも *Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Clostridium*、

Enterobacter、*Staphylococcus*、*Streptococcus*そしてfusiform bacteriaが存在する。なお、*Enterobacter*としては *E. cloacae*、*Streptococcus*としては *Streptococcus faecium*だけが分離された。*Bacillus*、*P. aeruginosa*および真菌は分離されなかった。

腫瘍細胞

腫瘍細胞としてC3Hf/Kamマウスに自然発生し、液体窒素の中で保存している17世代目の線維肉腫(NFSa)を使用した。この腫瘍は以下の方法で単一細胞浮遊液にした。すなわち、腫瘍を細切した後、0.2%トリプシン(Difco、1:250)、0.02%パンクレアチングレードIV(Sigma)および5mgデオキシリボヌクレアーゼIグレードII(Boehringer)を含むDulbeccoの溶液20mlに入れ35℃に5分間振とう、上清液を捨て、新たにこの蛋白分解酵素を含む溶液20mlを加え、さらに20分間振とうした。この後、#80のステンレスメッシュを通し、10%ウシ血清を含んだHank's液を加えて酵素を中和させた後、さらに#200のステンレスメッシュを通過させ10%ウシ血清を含むHank's液に浮遊させて単一細胞浮遊液とした(4)。この浮遊液中の細胞の生存率は95%以上であった。

放射線照射

腹部照射のため、シールドタイプの ^{137}Cs γ線照射装置(線量率0.75Gy/min.)およびX線照射装置(島津製作所、信愛、200KVp、フィルター-0.5mmCu+0.5mmAl FSD 81.3cm、線量率0.45Gy/min.)を使用した。ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール)50mg/kg腹腔内(i.p.)投与でマウスに全身麻酔をかけ、γ線照射の場合には50mm、X線照射の場合には5mmの鉛で腹部以外(2)を遮蔽し、腹部のみを照射した。この方法による腹部以外の照射量は腹部照射量の8%以下である。

*E. cloacae*を殺菌するための照射は当研究所に設置してある ^{60}Co γ

線照射装置を用い、線量率60.3Gy/min.で行った。

抗生物質投与

腹部照射2日前に、蒸留水に3種類の抗生物質を溶解させた液(chlortetracycline 2g/l, gentamicin 40mg/l, kanamycin 1g/l) 0.5ml、またはgentamicin (40mg/l) 溶解液0.5mlを胃ゾンデを用いてマウスに投与し、以後、肺摘出時まで各々の抗生物質溶解液を飲料水として与え続けた。

細菌検査

マウス腹部照射後、経時的無菌的に種々の臓器(肺、肝臓、脾臓、腎臓、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節)を摘出するとともに心血を採取した。臓器は直ちに滅菌ガラスホモジナイザーに入れ5mlの臨床用チオグリコレート培地(栄研)を加えて無菌的に攪拌した後、さらに5mlのチオグリコレート培地を加え滅菌アルミホイルで蓋をして37℃に2昼夜培養した。その0.1mlをGAM寒天培地(日水製薬)に塗抹、37℃に18時間好気的および嫌氣的(ガスパック法)に培養し、発育したコロニーをCowanの方法(13)によって同定した。血液は直接チオグリコレート培地に加え同様に培養し、菌の同定を行った。

また、腹部照射後、経時的に盲腸を摘出し、内容物をPBSで10倍階段希釈するとともに、内容物を取り出した盲腸を50mlのPBSに入れ十分に振り、洗浄した。これを新しいPBSで5回行った後、ガラスホモジナイザーに入れ10倍量のPBSを加えてホモジナイズし、10倍階段希釈を行った。各々適当希釈のもの0.1mlをDHL寒天培地およびLBS寒天培地上に塗抹、DHL寒天培地は好気的にLBS寒天培地は嫌氣的(ガスパック法)に培養した。DHL寒天培地上のコロニーはEnterobacterとしてカウントし、LBS寒天培地上のコロニーはBifidobacterium+Lactobacillusとしてカウントした。

単一細菌投与ノトバイオートマウスの作成

ノトバイオートマウスを作成するため、放医研生産SPFマウスの糞便から分離し私どもが維持しているE.cloacae(Ⅱ株)、S.faecium(Ⅰ株)、B.adolescentis(Ⅰ株)、および健康なコンベンショナルマウスの糞便から分離したE.coli(No.1株)を使用した。上記した細菌のいずれか1種をPBSで 10^8 個/0.5mlの濃度に調整し、胃ゾンデを用いて無菌マウスに投与、3-4週間後に糞便培養で投与細菌の定着を確認し、単一細菌投与ノトバイオートマウスとした。

肺転移数の測定

マウスにNFSa細胞を尾静脈に投与後、10-11日目にエーテル麻酔下でマウスを安楽死させ、肺を摘出しブアン液で固定した。肺表面の腫瘍結節数を肉眼的に測定し転移結節数とした。なお、私どもは肺転移結節数は投与した細胞数に比例して変化するがAIRIMの程度は投与細胞数とは無関係であることを既に報告している(2,3)。

成績

1) 無菌及び抗生物質投与マウスにおけるAIRIMの発現

AIRIMの発現に腸内菌叢が関わっているか否かを明らかにするために以下の実験を行った。初めに、SPFマウスと無菌マウスを比較した。すなわち、各々のマウスの腹部を10.2GyのX線で照射し7日目に 5×10^4 または 2×10^5 のNFSaをi.v.投与し、その10日後に肺の転移結節数を測定した。その成績は表7に示した。無菌

マウスでは腹部照射による転移抑制効果は認められず、むしろ転移数は増加した。

次に、腸管非吸収性抗生物質を経口投与し腸内の細菌を除去したSPFマウスと非投与SPFマウスについて上記と同様な検討を行った。SPFマウスにgentamicinを含む3種類の抗生物質またはgentamicinを単独投与した。AIRIMは3種抗生物質処置で多種類の腸内の細菌を除去した場合だけではなく、gentamicin単独投与の場合でも発現しなかった(表8)。抗生物質投与マウスの糞便細菌検査においてgentamicin単独投与マウスでは*E.cloacae*と*S.faecium*が除去されていた。

2) 腹部照射後SPFマウスにおける細菌の挙動

12Gyのγ線による腹部照射後マウス体内の細菌の挙動を明らかにするため、まず盲腸内容と盲腸壁の細菌数の変化を調べた。その成績は図5に示した。腹部照射前BifidobacteriumとLactobacillusは内容物中でも腸管壁でも*E.cloacae*より100-10000倍も多かった。照射後BifidobacteriumとLactobacillusは減少しはじめ3-7日目にかけて最も低い値を示し、14日目にこれらの細菌の値は照射前のレベルに戻った。一方、*E.cloacae*は照射後3-7日にかけて大幅に増加し、BifidobacteriumとLactobacillusよりも高い値を示したが、14日目には照射前の値に戻った。

次に12Gy腹部照射後体内諸臓器からの細菌分離を経時的に行った。麻酔殺した非照射SPFマウスの諸臓器からの菌分離は陰性であった。しかし、腹部を照射したマウスでは照射後5日目と7日目に腸間膜リンパ節から*E.cloacae*が分離され、14日目には同部位からBifidobacteriumが分離された。この間、その他の臓器からは何も分離されなかった(表9)。8.5Gy腹部照射マウスでも同様な検討を行ったが、いずれの臓器からも細菌は分離されなかった。

表 7 無菌マウスとSPFマウスにおけるAIRIM発現の差

マウス	投与NFSA数	腹部照射	マウス数	肺結節数 (平均±標準誤差)	
SPF	5×10 ⁴	+	8	44.9±6.7	** ¹⁾
無菌		+	7	6.3±1.4	
			5	41.6±4.9	NS ²⁾
			5	59.6±11.1	
SPF	2×10 ⁵	+	7	138.9±14.5	**
無菌		+	8	12.5±2.4	
			5	143.6±16.6	NS
			5	170.6±18.8	

1) Wilcoxonの順位検定で統計的に有意差あり (** p<0.01)。
2) "有意差無し。

表 8 腫瘍細胞 i.v. 投与後、肺転移に対するマウス抗生物質処理の効果

実験	投与抗生物質	投与 NFSa 数	腹部照射	マウス数	平均肺結節数 (最小 - 最大)	
実験 1	非投与	2×10^5	-	7	149.0 (88-194)	* ¹⁾
	3 種抗生物質	2×10^5	+	7	29.1 (13-58)	
		2×10^5	-	7	141.9 (59-193)	NS ²⁾
		2×10^5	+	7	96.7 (65-158)	
実験 2	非投与	1×10^5	-	8	80.5 (18-134)	*
	3 種抗生物質	1×10^5	+	7	19.7 (5-52)	
		1×10^5	-	8	77.4 (24-114)	NS
		1×10^5	+	8	85.6 (31-133)	
	ゲンタマイシン	1×10^5	-	8	85.2 (19-149)	NS
		1×10^5	+	8	80.8 (19-159)	

1) Wilcoxon の順位検定で統計的に有意差あり ($p < 0.01$)。
2) " 有意差無し。

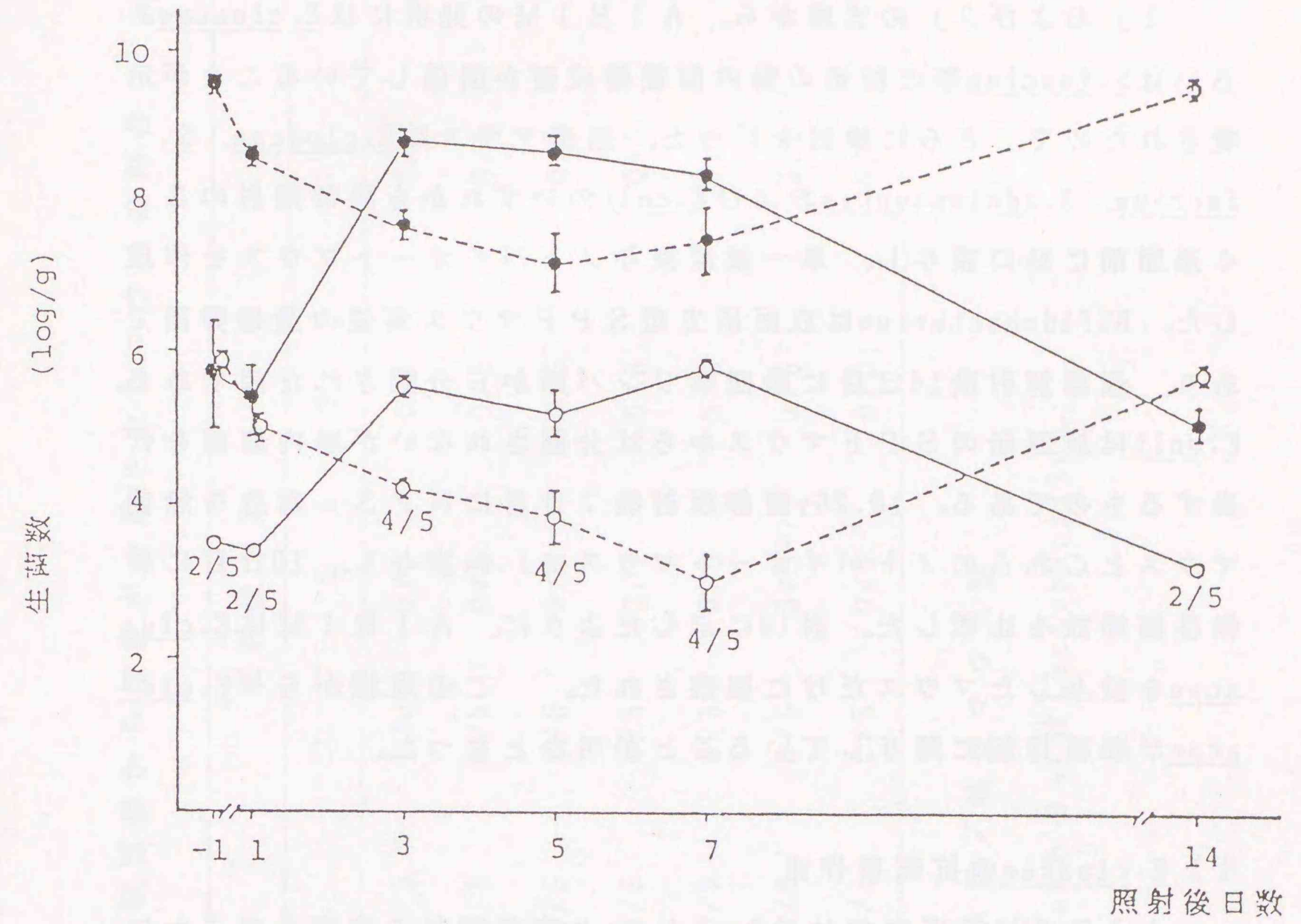


図 5 12Gy腹部照射後、盲腸内容および盲腸壁中の細菌数

— : E. cloacae, - - - : Bifidobacterium + Lactobacillus
● : 盲腸内容 ○ : 盲腸壁 平均値 ± 標準誤差

図中の数字は 細菌陽性マウス数 / 検査マウス数

3) AIRIMの発現に関わる腸内細菌の同定

1) および2)の実験から、AIRIMの発現には*E. cloacae*あるいは*S. faecium*等の特定の腸内菌叢構成菌が関係していることが示唆されたので、さらに検討を行った。無菌マウスに*E. cloacae*、*S. faecium*、*B. adolescentis*および*E. coli*のいずれかを腹部照射の3-4週間前に経口投与し、単一細菌投与ノトバイオームマウスを作成した。*Bifidobacterium*は放医研生産SPFマウス糞便の最優勢菌であり、腹部照射後14日目に腸間膜リンパ節から分離された菌である。*E. coli*は放医研のSPFマウスからは分離されないが腸内細菌を代表するものである。10.2Gy腹部照射後7日目にNF Sa細胞を無菌マウスとこれらのノトバイオームマウスにi.v.投与し、10日目に肺転移結節数を比較した。表10に示したように、AIRIMは*E. cloacae*を投与したマウスだけに観察された。この成績から、*E. cloacae*が転移抑制に関与していることが明かとなった。

4) *E. cloacae*の抗転移作用

AIRIM発現における*E. cloacae*と腹部照射の役割を明らかにするため、以下の実験を行った。無菌マウスに*E. cloacae*を経口投与し*E. cloacae*単一投与ノトバイオームマウスを作成した。このマウスを用い腹部照射の有無による肺転移の変化を無菌マウスを対照として比較した。その成績は表11に示した。腹部を照射しなくても単一投与マウスの肺転移数は対照よりも明らかに減少し、腹部を照射すると減少率はさらに大きくなった。臓器の細菌検査を行うと、SPFマウスでは何も分離されなかったが、単一投与マウスでは腸間膜リンパ節から腹部照射の有無に関わらず*E. cloacae*が分離された。

次に、SPFマウスに腹部照射を行わず*E. cloacae*をi.v.またはi.p.投与し、7日後にNF Saをi.v.投与して肺転移数の変化を見た。表12に示したように 10^7 *E. cloacae*を投与されたマウスでは肺転移は明らかに抑制され、 10^4 投与でも転移抑制効果が認められた。

表9 12 Gy腹部照射後、各種臓器から細菌が分離されたマウスの割合

臓器	照射後日数				
	1	3	5	7	14
肺	0/10 ¹⁾	0/5	0/5	0/5	0/5
肝臓	0/10	0/5	0/5	0/5	0/5
脾臓	0/10	0/5	0/5	0/5	0/5
腎臓	0/10	0/5	0/5	0/5	0/5
下顎リンパ節	0/10	0/5	0/5	0/5	0/5
腸間膜リンパ節	0/10	0/5	5/5 ²⁾	3/5 ²⁾	5/5 ³⁾
心臓血液	0/10	0/5	0/5	0/5	0/5

- 1) 臓器から細菌が分離されたマウス数/検査マウス数
 2) 分離された細菌は*E. cloacae*のみ。
 3) 分離された細菌は*Bifidobacterium*あるいは*Lactobacillus*。

表 1 0 腹部照射後、ノトバイオートマウスにおけるi.v.投与腫瘍細胞の肺転移数

マウス ¹⁾	投与細胞数	マウス数	肺転移結節数 (平均±標準誤差)
無菌 S P F	5×10 ⁴ 5×10 ⁴	5 7	59.6±11.1 6.3±1.4
無菌 <u>E.cloacae</u> 単一投与	1×10 ⁵ 1×10 ⁵	5 5	117.6±17.7 17.2±6.5
無菌 <u>B.adolescentis</u> 単一投与	1×10 ⁵ 1×10 ⁵	5 5	159.4±16.8 125.8±17.8
無菌 <u>S.faecium</u> 単一投与	5×10 ⁴ 5×10 ⁴	4 7	39.8±6.9 37.1±5.1
無菌 <u>E.coli</u> 単一投与	5×10 ⁴ 5×10 ⁴	7 8	58.9±7.5 35.6±9.6

1) マウスは10.2GyのX線で腹部照射後、7日目に腫瘍細胞を投与された。

2) Wilcoxonの順位検定で有意差あり (*; p<0.05、**; p<0.01)。

3) "

有意差なし。

表 1 1 腹部照射の有無によるE.cloacae単一投与ノトバイオートマウスの肺転移抑制

マウス	投与細胞数	腹部照射	マウス数	肺転移結節数 (平均±標準誤差)
無菌 S P F	5×10 ⁴ 5×10 ⁴	- -	5 8	41.6±4.9 44.9±6.7
無菌 <u>E.cloacae</u> 単一投与	1×10 ⁵ 1×10 ⁵	- -	8 9	116.1±13.4 51.2±19.1
無菌 <u>E.cloacae</u> 単一投与	1×10 ⁵ 1×10 ⁵	- -	6 5	153.2±25.0 39.4±14.0
<u>E.cloacae</u> 単一投与	1×10 ⁵	+	5	4.6±1.9

1) Wilcoxonの順位検定で統計的有意差なし。

2) "有意差あり (*; p<0.05)。

表 1 2 マウスにおけるE.cloacae菌体の抗転移活性¹⁾

マウスの処置	菌体投与ルート	マウス数	肺転移結節数 (平均±標準誤差)
無処置		8	63.1±11.8
腹部照射 ²⁾		8	2.9±1.2 *** ³⁾
生理食塩水	i.v.	6	82.8±7.3
10 ⁴ E.cloacae生菌	i.v.	7	52.6±4.5 *
10 ⁷ E.cloacae生菌	i.v.	7	2.9±1.6 **
生理食塩水	i.p.	6	48.8±6.7
10 ⁷ E.cloacae生菌	i.p.	6	14.8±4.1 **
生理食塩水	i.v.	8	56.6±11.2
10 ⁷ E.cloacae死菌	i.v.	8	2.3±0.6 **

- 1) S P F マウスにE.cloacae投与後 7 日目に5×10⁴のNFSa細胞をi.v.投与した。
 2) S P F マウスに腹部照射後 7 日目に5×10⁴のNFSa細胞をi.v.投与した。
 3) Wilcoxonの順位検定で統計的な有意差あり (*; p<0.05, **; p<0.01)。

放射線で殺菌したE.cloacaeを投与した場合でも生菌投与と同程度の転移抑制効果が認められた。

考 察

S P F マウスではA I R I Mが観察されたが、無菌マウスでは腹部照射による転移抑制効果は認められなかった。また、3種類の抗生物質を投与されたマウスのみならずgentamicinだけが投与され、E.cloacaeとS.faeciumが除去されたS P F マウスでもA I R I Mは観察されなかった。このことは、E.cloacaeとS.faeciumの両方または一方が本現象に関係していることを示唆しているが、ノトバイオートマウスを使用した実験結果から、A I R I Mに強く関わっている腸内細菌はE.cloacaeであることが明かとなった(29)。

12Gy腹部照射後、腸粘膜の上皮細胞やリンパ球系細胞は強く障害され(2)、盲腸内容物中のE.cloacaeは増殖し、腸粘膜に付着するとともに腸管壁から腸間膜リンパ節に侵入する(図5、表9)。この経過は安藤ら(2)が先に示したA I R I M発現のそれとミラーイメージの関係にある。なお、Bifidobacteriumが腹部照射後14日目に腸間膜リンパ節から分離されているが、この時期にはA I R I Mは発現しない(2)。8.5Gy照射の場合、E.cloacaeの腸間膜リンパ節への侵入は観察されなかったが、この線量では腸上皮細胞の障害は軽度であり(30)また腹部照射による転移抑制効果がほとんどないことが報告されている(2)。これらの事から、A I R I Mは腹部照射によって腸上皮細胞が傷害され腸内容中のE.cloacaeが腸粘膜から内部に侵入することによって引き起こされると推察した。すなわち、腹部照射はE.cloacaeが体内に侵入するための誘引であると考えた。無菌マウス

に経口的に細菌を投与すると、他の処置をしなくても投与細菌は腸管から腸間膜リンパ節に侵入する(9)ので、先の推察が正しければ、E. cloacae単一投与ノトバイオートでは腹部を照射しなくても肺転移は抑制されるはずであり、また腹部照射の代わりにSPFマウスにE. cloacaeの生菌をi.v.あるいはi.p.投与することによっても転移は抑制されるはずである。表11と表12はこのような考えで行われた実験であり、その成績はこの考えが正しかったことを示している。表11の実験で、腹部を照射されたノトバイオートマウスは非照射のものより強く転移が抑制された。これは、腹部照射によって腸粘膜の上皮細胞やリンパ球系細胞が傷害され、より多数の細菌が体内に侵入したためであると考えられる。この考えは、非照射のSPFマウスにE. cloacaeをi.v.投与したとき、投与菌量を増やすとより強く転移が抑制されたこと(表12)からも明らかである。さらに、E. cloacae死菌の投与によっても生菌と同様に転移が抑制されたことから、本現象はE. cloacaeの菌体成分が体内に存在することによって引き起こされることが強く示唆された。

E. cloacaeはグラム陰性桿菌であり、細胞壁にはエンドトキシン(LPS)が存在する。細菌性エンドトキシンはin vivoで、生体防御能の活性化(43,54,56)、すなわちマクロファージの活性化(1,18)、腫瘍壊死因子(TNF)やインターフェロン産生の誘導(8,12,24,39)等、各種の抗腫瘍作用を発揮することが知られており、これが転移抑制因子である可能性が高い。しかし、E. cloacaeと同じ腸内細菌であるE. coliが投与されたノトバイオートマウスではAIRIMが観察されず(表10)、Brucella abortusのエンドトキシンには転移抑制作用がないという報告(52)もある。さらに、Mycobacterium、Nocardia、Corynebacterium(6)、Propionibacterium(7)の細胞壁成分やBacillus megateriumのペプチドグリカン(38)、Mycobacterium bovis(BCG)のDNA(55)等にも同系腫瘍に対する抗腫瘍活性が認められており、LPS以外の細菌成分が本現象に関係している

ことも考えられる。いずれにもせよ、本現象を導くE. cloacaeの菌体成分の同定が今後の研究課題となる。このため、E. cloacae菌体を乾燥菌体、細胞外膜、内膜およびLPSに分離し、これをC3H/HeマウスとLPS低応答性マウスであるC3H/HeJに静注しその後に投与された腫瘍細胞の転移率を比較する実験を私どもは開始した。

血管内に侵入した腫瘍細胞による転移が成立するためには、該細胞がリンパ球、NK細胞、活性化マクロファージ等の生体防御系や血流による物理的障害を逃れ、微小血管壁への着床、血管壁の通過、転移臓器実質内での発育という複雑な過程を経る必要があり、転移抑制の機構もまた複雑である。私どもは、シリカや抗アジアロGM₁抗体を投与されたマウスではAIRIMが発現しないことを明らかにし、転移抑制諸因子の中でマクロファージまたはNK細胞の存在が重要であることを示した(5)。腹部照射後、腸管壁を通過し腸間膜リンパ節に侵入した細菌がマクロファージまたはNK細胞を刺激し、それが腫瘍細胞を攻撃するものと推察されるので、その解明も今後の研究課題となる。私どもはLPS低応答性でNK細胞活性が極端に低下しているC3H/HeJ-bgマウスを米国から導入するとともにこのマウスにnu遺伝子(T細胞欠損)を導入したコンジェニックマウスを作成し、これらのマウスを用いて転移抑制機構を解明しようとして計画している。さらに、本現象には腫瘍特異性があるのか否かを明らかにすることも、今後の重要な研究課題であると考えている。

総括

実験動物管理にとって、動物をとりまく環境をできるだけ一定にし、実験結果の再現性を確保するということが最も重要なことであり、放射線照射実験に使用するマウスの場合も例外ではない。このような観点にたち、マウスの内なる環境因子として、腸管内のE. cloacaeが照射実験にどのような影響を与えるかを、該菌の疾患発現作用、生体防御作用さらに実験成績の修飾因子という面から、それぞれ1) 放射線照射後の早期死、2) 病原菌などの腸管内定着阻止、3) 腹部放射線照射マウスの移植腫瘍の肺転移に及ぼす影響について検討した。

はじめに、SPFマウスにおけるE. cloacae汚染と致死線量放射線照射後の生存時間および半数致死線量の変化との関係について検討した。骨髄死線量である8.62Gyの γ 線を全身照射すると、E. cloacae陽性マウスは照射後30日以内にすべてが死亡し、平均生存日数は雌で 12.6 ± 4.5 日、雄で 11.0 ± 3.6 日であった。しかし、腸内細菌陰性マウスでは照射後30日目でも7%の雌と32%の雄が生存しており、死亡した個体の平均生存日数は雌で 20.2 ± 4.9 日、雄で 21.3 ± 4.9 日であった。死亡したE. cloacae陽性マウスの88%の心血からE. cloacaeが分離された。E. cloacae経口投与マウスの死亡パターンは該菌陽性マウスの場合とほぼ同じであった。 $LD_{50/30}$ 値を求めたところ、E. cloacae陰性マウスは 8.22 ± 0.11 Gyであったが、該菌陽性マウスでは 7.50 ± 0.096 Gyとなり明らかにこの値は低下した。腸死線量である33.5Gy全身照射後、E. cloacae陽性マウスは照射後6日目に全個体が死亡したが陰性マウスでは7-8日目に死亡した。これらの実験期間中P. aeruginosaはいずれのマウスからも分離されなかった。これらの成績から、E. cloacaeは致死線量照射後マウスの敗血症の原因菌となり生存時間の短縮や $LD_{50/30}$ 値の低下をもたらすこ

とが明かとなった。

次に、E. cloacae陽性マウスでみられた放射線照射による早期死はE. cloacaeに特異的な現象なのか、あるいは低病原性腸内細菌に一般的にみられる現象なのかを明らかにするために、腸内細菌陰性マウス、E. cloacae陽性マウス、腸内細菌陰性マウスにE. coli、K. pneumoniaeあるいはP. vulgarisを経口投与したマウスの致死線量照射後死亡パターンと $LD_{50/30}$ について比較検討した。骨髄死線量あるいは腸死線量照射後、腸内細菌陽性マウスはいずれも陰性マウスより明らかに早期に死亡したが腸内細菌陽性マウス間では差を認めることができなかった。腸内細菌陽性マウスそれぞれの $LD_{50/30}$ 値はほぼ同じでありP. aeruginosa陰性コンベンショナルマウスのそれと差を認めなかった。以上の成績から、ここで用いた4種の腸内細菌は致死線量を照射されたマウスに対し同様な作用を及ぼすことが明かとなった。

生体防御作用のうえから、予め腸内菌叢構成菌の一つとなっているE. cloacaeが他の腸内細菌およびP. aeruginosaの腸管内定着にどのような影響するか検討した。E. cloacae単一汚染ノトバイオームマウスはその後に投与されたE. coliやP. aeruginosaの定着を抑制することではなく、E. cloacae陽性Limited floraマウスでもE. coliの定着抑制は認められなかった。しかし、E. cloacae単一陽性ノトバイオームマウスに投与されたP. aeruginosaやE. cloacae陽性Limited floraマウスに投与されたE. coliの増殖は抑制された。E. cloacae陽性SPFマウスに投与されたE. coli、E. coli 0115、P. aeruginosaは、E. cloacae陰性SPFマウスの場合とは異なり、腸管内に定着しなかった。これらの成績から、比較的複雑な菌叢を持つマウスにおいて腸内菌叢構成菌としてのE. cloacaeにはE. coliやP. aeruginosaの定着を阻止する作用があることが示唆された。

最後に、実験成績の修飾因子という面から、腹部を放射線で照射されたマウスに同系線維肉腫細胞を静脈投与すると肺転移が抑制さ

れる現象 (AIRIM) に腸内菌叢、特に *E. cloacae* がどの様にかかわっているかを無菌マウス、ノトバイオートマウス、抗生物質投与および無処置 SPF マウスを用いて検討した。無菌マウスと抗生物質投与 SPF マウスでは腹部照射による転移抑制作用は認められず、*E. cloacae* 単一投与ノトバイオートマウスでは腹部照射効果が認められたが、*S. faecium*、*B. adlesentis* および *E. coli* 単一投与ノトバイオートマウスではこの効果は認められなかった。SPF マウスの腹部照射後、*E. cloacae* は盲腸内容物中で増加し、盲腸粘膜に付着するとともに盲腸壁から腸間膜リンパ節に侵入することが観察された。*E. cloacae* 単一投与ノトバイオートマウスでは腹部を照射しなくても転移は抑制され、照射すると転移抑制効果はさらに大きくなった。腹部照射を行わずに *E. cloacae* の生菌あるいは死菌を i.v. 投与しても肺転移は抑制された。これらの成績から、本現象は腹部照射により障害を受けた腸管から *E. cloacae* あるいはその菌体成分が体内に侵入することにより引き起こされることが明かとなった。

以上の実験成績は、*E. cloacae* がマウスの腸内菌叢の安定とそれに基づく放射線照射実験成績の安定すなわち再現性の確保に重要な役割を担っていることを示している。放射線照射実験に使用するマウスの生産とその飼育管理という立場からみると、本菌は無菌マウスから SPF マウスを作出する際に予め投与しておく細菌の一つに加える必要があろう。

謝辞

本稿の終わりにあたり、本研究の遂行に終始変わらぬ御指導、御助言、暖かい励ましをいただいた北海道大学獣医学部教授佐藤文昭先生ならびに慶応義塾大学医学部実験動物センター教授前島一淑先生に深く感謝するとともに第3章の研究の御指導をいただいた放射線医学総合研究所臨床研究部第4研究室長安藤興一博士、共同研究者の臨床研究部小池幸子主任研究官、技術部松下悟主任研究官に心から感謝いたします。

SPF マウスと無菌マウスの生産・供給とその管理を行ってくれた放医研動植物管理課の多くの方々、培地の作製や器具の洗浄等を献身的に行って下さった中村弘子さん、丸山優子さん、光本明美さん、佐藤義子さんに謝意を表します。

さらに、本論文の御校閲・御指導をいただいた北海道大学獣医学部波岡茂郎教授、清水悠紀臣教授、小沼操教授に深謝いたします。

参考文献

1. Allison, A. C., Davies, P., and Page, R. C. Effects of endotoxin on macrophages and other lymphoreticular cells. *J. Infect. Dis.*, 128:(Suppl.): 212-219, 1973.
2. Ando, K., Hunter, N., and Peters, L. J. Inhibition of artificial lung metastases in mice by pre-irradiation of abdomen. *Br. J. Cancer*, 41, 250-258, 1980.
3. Ando, K., Peters, L. J., Hunter, N., Jinnouchi, K., and Matsumoto, T. Inhibition of artificial spontaneous lung metastases by pre-irradiation of abdomen II. Target organ and mechanism. *Br. J. Cancer*, 47, 73-79, 1983.
4. Ando, K., Koike, S., Fukuda, N., and Kanehira, H. Independent effects of a mixed-beam regimen of fast neutrons and gamma rays on a murine fibrosarcoma. *Radiat. Res.*, 98, 96-106, 1984.
5. Ando, K., Koike, S., and Matsumoto, T. Mechanisms of abdominal irradiation-induced inhibition of lung metastases. In: *Treatment of Metastases: Problems and Prospects: Proceedings*, K. Hellmann and S.A. Eccles (ed.), pp. 141-144, Taylor and Francis, London, 1985.
6. Azuma, I., Taniyama, T., Hirano, F., and Yamamura, Y. Antitumor activity of cell-wall skeletons and peptidoglycolipids of Mycobacteria and related microorganisms in mice and rabbits. *Gann*, 65, 493-505, 1974.

7. Azuma, I., Yamawaki, M., Yosimoto, T., Saiki, I., Uemiya, M., Tanio, Y., Tokuzen, R., Yasumoto, K., and Yamamura, T. Antitumor activity of cell-wall skeleton of Propionibacterium acnes C7 in mice and guinea pigs. *Gann*, 70, 737-748, 1979.
8. Berendt, M. J., North, R. J., and Kirstein, D. P. The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression. *J. Exp. Med.*, 148, 1560-1569, 1978.
9. Berg, R. D., and Garlington, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.*, 23, 403-411, 1979.
10. Boone, I. U., Woodward, K. T., Harris, P. C. Relation between bacteria and death in mice following X-ray and thermal column exposures. *J. Bacteriol.*, 71, 188-195, 1956.
11. Brook, I. Use of antibiotics in the management of postirradiation wound infection and sepsis. *Radiat. Res.*, 115, 1-25, 1988.
12. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72, 3666-3670, 1975.
13. Cowan, S. T. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Cambridge University Press,

Cambridge, 1974.

14. Ducluzeau, R., Ladire, M., Callut, C., Raibaud, P., and Abrams, G.D. Antagonistic effect of extremely oxygen-sensitive clostridia from the microflora of conventional mice and Escherichia coli against Shigella flexneri in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Infect. Immun.*, 17, 415-424, 1977.
15. Flynn, R.J. Pseudomonas aeruginosa infection and radiobiological research at Argonne National Laboratory: effects, diagnosis, epizootiology, control. *Laboratory Animal Care*, 13, Part 2, 25-35, 1963.
16. 船田久. 日和見感染、臨床検査. 27, 1338-1347, 1983.
17. Hammond, C.W., Tompkins, M., and Miller, C.P. Studies on susceptibility to infection following ionizing radiation. 1. The time onset and duration of the endogenous bacteremia in mice. *J. Exp. Med.*, 99, 405-410, 1954.
18. Hibbs, J.B., Jr. Heterocytolysis by macrophages activated by Bacillus Calmette-Guerin: lysosome exocytosis into tumor cells. *Science*, 184, 468-471, 1974.
19. Itoh, K., Maejima, K., Ueda, K., Fujiwara, K. Difference in susceptibility of mice raised under barrier-sustained (SPF) or conventional condition to infections. *Microbiol. Immunol.*, 23, 909-913, 1979.
20. Itoh, K., Urano, T., and Mituoka, T. Colonization resistance

against Pseudomonas aeruginosa in gnotobiotic mice. *Lab. Animals*, 20, 197-201, 1986.

21. 前島一淑、前島房子、武田善直、田嶋嘉雄. 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, 1966.
22. Maejima, K., Maejima, F., and Tajima, Y. Viable count of various bacteria in the digestive tract of mice. IV. Enumeration of organisms in the stomach and different regions of the intestine. *Exp. Animals*, 17, 142-149, 1968.
23. 前島一淑、柏崎守、上村文雄. 実験動物のための無菌動物技術、ソフトサイエンス社、1978.
24. Maehara, N., and Ho, M. Cellular origin of interferon induced by bacterial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 15, 78-83, 1974.
25. Mastromarino, A., and Wilson, R. Antibiotic radioprotection of mice exposed to supralethal whole-body irradiation independent of antibacterial activity. *Rad. Res.*, 68, 329-338, 1976.
26. 松本恒弥. 放射線医学総合研究所におけるバリア施設とその運用、松本恒弥、中川雅郎、鍵山直子編 実験動物施設の微生物コントロールと実際、清至書院、pp.3-31, 1984.
27. Matsumoto, T. Early deaths after irradiation of mice contaminated by Enterobacter cloacae. *Lab. Animals*, 14, 247-249, 1980.
28. Matsumoto, T. Influence of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Proteus vulgaris on the mortality pattern of

- mice after lethal irradiation with gamma rays. Lab. Animals, 16, 36-39, 1982.
29. Matsumoto, T., Ando, K., Koike, S. Significance of bacterial flora in abdominal irradiation-induced inhibition of lung metastases. Cancer Res., 48, 3031-3034, 1988.
30. 松沢大樹. 腸上皮. 菅原努・山田正篤・江上信雄・堀川正克編 放射線細胞生物学. 朝倉書店. pp.129-329. 1968.
31. Matsuzawa, T., and Wilson, R. Intestinal mucosa of germfree mice after whole-body X-irradiation with 3 kiloroentgens. Rad. Res., 25, 15-24, 1965.
32. McLaughlin, M.M., Dacquist, M.P., Jacobus, D.P., and Horowitz, R.E. Effects of the germfree state on responses of mice to whole-body irradiation. Rad. Res., 23, 333-349, 1964.
33. McPherson, C.W. Reduction of Pseudomonas aeruginosa and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. Lab. Animal Care, 13, 737-744, 1963.
34. Miller, C.P., Hammond, C.W., Tompkins, M., and Shorter, G. The treatment of post-irradiation infection with antibiotics: an experimental study on mice. J. Lab. Clin. Med., 39, 462-479, 1952.
35. 光岡知足編 腸内細菌学. 朝倉書店. pp.473-480. 1990.

36. Mushin, R., and Dubos, R. Colonization of the mouse intestine with Escherichia coli. J. Exp. Med., 122, 745-757, 1965.
37. Nakamura, W., Kojima, E., Minamizawa, H., Kankura, T., Kobayashi, S., and Eto, H. Role of thrombocytopoietic system in radiation induced hematopoietic death. In: Comparative cellular and species radiosensitivity, Bond, V.P. and Sugahara, T. (ed.), pp.202-210, Igakusyoin, Tokyo,
38. 波岡茂郎. 腸内細菌科. 平戸勝七編 獣医微生物学. 養賢堂. pp.272-292. 1971.
39. Nauciel, C., and Goguel, A.F. Inhibition of tumor growth by the peptidoglycan from Bacillus megaterium. J. Natl. Cancer Inst., 59, 1723-1725, 1977.
40. Nowtony, A., Golub, S., and Key, B. Fate and effect of endotoxin derivatives in tumor bearing mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136, 66-69, 1971.
41. Onoue, M., Uchida, K., Yokokura, J., Takahashi, T., and Mutai, M. Effect of intestinal microflora on the survival time of mice exposed to lethal whole-body gamma irradiation. Rad. Res., 88, 533-541, 1981.
42. 小沢敦. 大西信彦. 生貝初. 田爪正気. 沢村貞昭. 渡辺慶一. 和泉伸一. 腸内フローラの感染防御機構をめぐって. 光岡知足編 腸内フローラと生体防御. 学会出版センター. pp.191-211. 1982.
43. 小沢敦. 常在細菌叢と生体. 小沢敦・坂崎利一・玉熊正悦・波岡茂郎・松本文夫編 臨床細菌学 講義編. 講談社. pp.24-33. 1977.

44. Parr, I., Wheeler, E., and Alexander, P. Similarities of the anti-tumor actions of endotoxin, lipid A and double-stranded RNA. Br. J. Cancer, 27, 370-386, 1973.
45. Rosoff, C.W. The role of intestinal bacteria in the recovery from whole body radiation. J. Exp. Med., 118, 935-943, 1963.
46. 斉藤学、中川雅郎、武藤健、今泉清。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、1970.
47. 坂崎利一、波岡茂郎。腸内細菌検索法、納屋書店、1956.
48. Sakazaki, R., and Namioka, S. Serological studies on the Cloaca(aerobacter) group of enteric bacteria. Jpn.J.M.Sc & Biol., 13, 1-12, 1960.
49. 坂崎利一。腸内細菌用培地、培地学各論(2)、近代医学社。
50. Sakazaki, R. Genus VII Enterobacter. In: Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., R.F.Buchanan and N.E.Gibbons (ed.), pp. 324-325, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
51. 坂崎利一。選択的抑制物質、培地学総論、近代医学社、pp.47-49、1965.
52. Schultz, R.M., Pavlidis, N.A., and Chirigos, M.A. Macrophage involvement in the antitumor activity of *Brucella abortus* ether extract against experimental lung carcinoma metastases. Cancer Res., 38, 3427-3431, 1978.

53. Serrano, L.J. Defined mice in a radiobiological experiment. In: Defining the Laboratory Animal, pp. 12-43, National Academy of Sciences, Washington, 1971.
54. Strausser, H.R., and Borber, L.A. Inhibition of tumor growth and survival of aged mice inoculated with Moloney tumor transplants and treated with endotoxin. Cancer Res., 32, 2156-2159, 1972.
55. Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., Makiguchi, N., and Sugimura, T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity. J. Natl. Cancer Inst., 72, 955-962, 1984.
56. Tripodi, D., Hollenbeck, L., and Pollack, W. The effect of endotoxin on the implantation of a mouse sarcoma. Int. Arch. Allergy, 37, 575-585, 1970.
57. 浦野徹、前島一淑、伊藤喜久治、光岡知足。Limited-floraマウスにおける緑膿菌の消化管定着について、日本細菌学雑誌、33、767-769、1978.
58. 浦野徹、前島一淑。緑膿菌のマウス体内分布、実験動物、27、263-269、1978.
59. Van Bekkum, D.W. Radiation biology. In: The Germfree Animal in Research, M.E.Coates (ed.), pp.237-267, Academic Press, London, New York, 1968.
60. Vincent, J.G., Veomett, R.C., and Riley, R.F. Relation of the

indigenous flora of the small intestine of the rat to post-irradiation bacteremia. J. Bacteriol., 69, 38-44, 1955.

61. Walburg, H.E.Jr., Mynatt, E.I., Cosgrove, G.E., Tyndall, R.L., and Robit, D.M. Microbiological evaluation of an isolation facility for the production of specific-pathogen free mice. Lab. Animal Care, 15, 208-216, 1965.
62. Wensinck, F. The origin of endogenous Proteus mirabilis bacteremia in irradiated mice. J. Pathol. Bacteriol., 81, 395-400, 1961.
63. Wensinck, F. The origin of induced Pseudomonas aeruginosa bacteremia in irradiated mice. J. Pathol. Bacteriol., 81, 401-408, 1961.
64. Wilson, R., Barry, T.A., and Bealmear, P.M. Evidence for a toxic substance of bacterial origin in the blood of irradiated mice. Rad. Res., 41, 89-103, 1970.
65. Woodward, J.M. Pseudomonas aeruginosa infection and control in the radiobiological research program at Oak Ridge National Laboratory. Laboratory Animal Care, 13, 20-24, 1963.
66. 吉岡守正. 内毒素の血管作用、本間 遜・齊藤和久・河西信彦・丹羽 允編 細菌内毒素、講談社、pp.328-343、1973.

Significance of Enterobacter cloacae in the intestine of SPF mice in radiation research

The purpose of present study is to analyze significance of Enterobacter cloacae(E.cloacae) in the intestine of SPF mice in radiation research. The author studied (1) the pathogenicity of E.cloacae in mice after whole body irradiation, (2) the inhibition by E.cloacae against the colonization of pathogenic or non-pathogenic bacteria in the intestine of mice, and (3) the influence of E.cloacae on the inhibition of artificial lung metastases induced by abdominal irradiation to mice.

Both 103 mice excreting E.cloacae in their feces and 93 mice being free of Enterobacteriaceae were irradiated with 8.62 Gy. E.cloacae-positive mice died earlier than negative ones. All the positive mice died by 30 days after irradiation, but 7-32% of the negative mice survived 30 days or over. E.cloacae was isolated from the post-mortem samples of heart blood in 57/67 positive mice, but was not in any of the negative mice. Pseudomonas aeruginosa(P.aeruginosa), which is usually associated with the unexpectedly early deaths after irradiation, was not detected in dead mice. The LD_{50/30} of E.cloacae-positive mice was 7.5±0.1 Gy, whereas that of the negative mice was 8.22±0.11

Gy. After irradiation with 33.5 Gy, all E.cloacae-positive mice died on day 6, whereas no negative ones died by day 6. The negative mice of 20 out of 21 died on day 7 and the remaining 1 on day 8. It is concluded that contamination with E.cloacae is a potential modifier in experiments to measure radiation lethality.

The author analyzed the significance in radiation lethality experiments of colonization with the non-pathogenic Enterobacteriaceae; that is, Escherichia coli (E.coli), Klebsiella pneumoniae (K.pneumoniae) and Proteus vulgaris (P.vulgaris).

Whole-body irradiation with 8.62 Gy or 33.5 Gy was delivered to mice having 3 different flora; i.e. mice free from Enterobacteriaceae, mice contaminated with E.cloacae, and mice inoculated with E.coli, K.pneumoniae or P.vulgaris. The mortality pattern of Enterobacteriaceae-negative mice showed a marked difference from all the 3 contaminated ones. No clear differences were observed among the infected groups. The LD_{50/30} of Enterobacteriaceae-negative mice was 8.22 Gy, whereas those of E.cloacae-, E.coli-, K.pneumoniae-, P.vulgaris-positive mice were 7.50, 7.64, 7.57 or 7.70 Gy, respectively. LD_{50/30} of Enterobacteriaceae-positive mice was similar to that of conventional mice. All 4 non-pathogenic

Enterobacteriaceae had very similar detrimental effects on mice after lethal irradiation.

Bacterial species in intestinal flora possess two opposite functions; i.e., hazardous pathogenicity to host animals and protective barrier against other pathogenic or non-pathogenic bacteria. The author investigated barrier effects of E.cloacae against the colonization of Enterobacteriaceae or P.aeruginosa in the intestine of SPF mice.

First, E.cloacae-monoassociated gnotobiotic mice were orally inoculated with non-pathogenic E.coli or P.aeruginosa. E.cloacae did not inhibit the colonization of these bacteria. Second, E.cloacae-positive limited flora mice were inoculated with E.coli. The inoculated organisms successfully colonized in the intestine. The number of the organisms in feces was, however, less than that in E.cloacae-negative limited flora mice. Third, the colonization resistance executed by E.cloacae was further examined in the complicated intestinal flora. Enterobacteriaceae-negative or E.cloacae-positive SPF mice were inoculated with pathogenic or non-pathogenic E.coli and P.aeruginosa. All the organisms inoculated to negative mice successfully colonized in the intestine over a month, whereas the organisms inoculated to positive mice were eliminated from the intestine within 2-3 weeks. From these results, it was

suggested that E.cloacae in the complicated flora inhibited the colonization of E.coli and P.aeruginosa.

We have previously reported that abdominal irradiation prior to i.v. injection of syngeneic fibrosarcoma(NFSa) cells reduced metastases in lung. The phenomenon is termed abdominal irradiation-induced inhibition of lung metastases, or AIRIM. The author defined an intestinal organism that is specific for AIRIM, and investigated the role of abdominal irradiation against the inhibition of tumor metastasis.

Abdominal irradiation failed to inhibit lung metastases in germ-free mice while lung metastases were inhibited by abdominal irradiation in normal SPF mice. To identify enteric bacteria inducing the phenomenon, SPF mice received either gentamicin alone or a cocktail of 3 antibiotics. In the intestine of SPF mice, gentamicin eliminated E.cloacae and Streptococcus faecium(S.faecium). Either of these antibiotic treatments abolished AIRIM, suggesting that E.cloacae and S.faecium are indispensable for AIRIM. Germ-free mice were monoassociated with one of the following bacteria 3-4 weeks before abdominal irradiation; E.cloacae, S.faecium, Bifidobacterium adolescentis, E.coli. AIRIM was observed only in mice monoassociated

with E.cloacae. From these results, it became clear that E.cloacae was the organism inducing AIRIM.

In SPF mice that received 12 Gy of abdominal irradiation, E.cloacae multiplied in cecal contents, adhered to mucous membranes, invaded the cecal wall, and translocated to the mesenteric lymph nodes. E.cloacae-monoassociated gnotobiotic mice developed fewer metastases than germ-free mice, and the reduction was further enhanced by abdominal irradiation. When SPF mice were injected with viable or killed E.cloacae in place of abdominal irradiation, the number of lung metastases was significantly reduced. The author concluded that abdominal irradiation caused the invasion of E.cloacae from the mucous membrane of the intestine, which in turn inhibited formation of the lung metastases.

These data presented here indicate that E.cloacae is playing important roles in the field of radiation research. It is suggested that E.cloacae should be given to the mice in the early stage after birth, when SPF mice are produced from germ-free stock.

