

学 位 論 文 題 名

放射線照射実験に使用する SPF マウスの腸管中における

Eeterobacter cloacae の意義

学位論文内容の要旨

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事は最も重要な事である。本研究はこのような観点に立ち、マウスの内なる環境因子として、腸管内の *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) が放射線照射実験にどのような影響を与えるかを 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及び半数致死線量の変化との関係について検討した。骨髓致死線量である 8.62Gy の γ 線を全身照射すると、*E. cloacae* 陽性マウスは 30 日以内にすべてが死亡したが、腸内細菌陰性マウスでは 7-32% が 30 日目でも生存していた。照射後平均生存時間も明らかに陽性マウスの方が短かった。照射後死亡した *E. cloacae* 陽性マウスの大部分の心血から *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} 値を比較したところ *E. cloacae* 陽性マウスでは陰性マウスより明らかにこの値は低下していた。腸死線量の全身照射後、該菌陽性マウスは陰性マウスより明らかに早期に死亡した。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本菌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、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 *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* あるいは *Proteus vulgaris* を経口投与したマウスの致死線量照射後の死亡パターンと LD_{50/30} について比較検討した。骨髓致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、緑膿

菌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、予め腸内細菌構成菌の一つとなっている *E. cloacae* が他の腸内細菌及び *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) の腸管内定着にどの様に影響するか検討した。*E. cloacae* 単一汚染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なく、*E. cloacae* 陽性リミテッドフロラマウスでも *E. coli* の定着抑制は認められなかった。しかし、*E. cloacae* ノトバイオートに投与された *P. aeruginosa* や *E. cloacae* 陽性リミテッドフロラ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* には病原・非病原性 *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、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に腸内菌叢、特に *E. cloacae* がどの様にかかわっているかについて検討した。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なかった。*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、他の腸内菌叢構成菌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管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. 投与する事によっ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って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。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 藤 文 昭

副 査 教 授 波 岡 茂 郎

副 査 教 授 清 水 悠紀臣

副 査 教 授 小 沼 操

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事は最も重要な事である。マウスの内なる環境因子として、腸内細菌が、放射線影響を修飾することが知られている。申請者は腸管内の *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) の有無が、放射線照射実験にどのような影響を与えるかについて研究を行い、その成績を本論文にまとめた。本論文は和文71頁よりなり、参考論文14編を付している。

申請者は、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及び半数致死線量の変化との関係について検討した。骨髓死線量である8.62Gyの γ 線を全身照射すると、*E. cloacae* 陽性マウスは30日以内にすべてが死亡したが、腸内細菌陰性マウスでは7-32%が30日目でも生存していた。照射後平均生存時間も明らかに陽性マウスの方が短かった。照射後死亡した *E. cloacae* 陽性マウスの大部分の心血から *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。 $LD_{50/30}$ 値を比較したところ *E. cloacae* 陽性マウスでは陰性マウスより明らかにこの値は低下していた。腸死線量の全身照射後、該菌陽性マウスは陰性マウスより明らかに早期に死亡した。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らかとなった。

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本菌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、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 *Escherichia coli* (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* あるいは *Proteus vulgaris* を経口投与したマウスの致死線量照射後の死亡パターンと $LD_{50/30}$ について比較検討した。骨髓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

ことが明らかとなった。

さらに予め腸内細菌構成菌の一つとなっている *E. cloacae* が他の腸内細菌及び *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) の腸管内定着にどの様に影響するか検討した。*E. cloacae* ノトバイオートに投与された *P. aeruginosa* や *E. cloacae* 陽性リミテッドフローラ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*, *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* には病原・非病原性 *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、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に腸内菌叢、特に *E. cloacae* がどの様にかかわっているかについて検討した。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なかった。*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、他の腸内菌叢構成菌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管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静脈内投与する事によっ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、体内に侵入し生体防御細胞が活性化されることによるものと考えられる。

以上のように申請者は、SPF マウスを用いて、*E. cloacae* による放射線急性死の修飾機構を明らかにすると共に、同菌が *P. aeruginosa* や *E. coli* の腸管内定着を抑制することを見い出した。さらに *E. cloacae* が移植腫瘍の肺転移を抑制する機序解明のための重要な知見を提供した。よって審査員一同は、申請者松本恒弥氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。