

マウスのコレラ菌経口感染実験に対する
腸内大腸菌叢の影響

宇都宮 明 剛

長崎大学熱帯医学研究所臨床部 (主任 : 小張一峰教授)

(Received for Publication November 11, 1969)

The Influence of the Intestinal Coli Flora to the Infection
in Mice by Oral Challenge with *Vibrio Cholerae*

Akiyoshi UTSUNOMIYA

Department of Clinical Medicine, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

(Director : Prof. Kazumine KOBARI)

Abstract

The experimental cholera in infantile mice by oral challenge with El Tor Inaba type V86 which was investigated by Ujiye et al. (16), showed that the susceptibility to the infection was closely related to the day of life; in mice younger than 10 days old, a retention of fluid and multiplication of vibrios in the intestine were seen 24 hours after the challenge.

However, in 15 days old mice, no retention of fluid in the intestine was found and challenged vibrios were not so multiplied as in the younger; neither retention of fluid nor multiplication of vibrios was recognized in 30 days old mice.

Then, the infancy was considered one of the important host factors in the pathogenesis of experimental cholera of mice. It was supposed that the infancy would include various kinds of factors which should be related to the pathogenesis of experimental cholera. Among them, an intestinal flora, particularly coli flora was assumed to play significant role for the infection.

In the present investigation, coliform organisms appeared usually about 8 days after the birth in the intestine of mice and then, the intestinal flora was going to be gradually established.

It was observed that the number of coliform organisms decreased extremely and finally disappeared in the intestine of mice, when streptomycin was given continuously with drinking water. On the other hand, streptomycin-resistant strain of El Tor Inaba V86 was able to

be isolated as one step mutant on the streptomycin-containing medium.

Streptomycin-resistant V86 was orally challenged on mice, of which in the intestine, no or few coliform organisms were found. It was noticed that streptomycin-resistant V86 was multiplied in the intestine even in such adult mice, although no retention of fluid was seen in the intestine.

It was presumed that the coli flora in the intestine would play a protective role against the multiplication of vibrios which was orally administered into the intestine, although it could not be denied that the coli flora was only an indicator which revealed a particular condition changed by streptomycin.

The significance of the intestinal, particularly coli flora should be investigated in further studies.

目 次

| | |
|-----------------------------|--|
| 序 言 | VI SM経口投与による 腸内細菌叢, 特に大腸菌群の 消長 |
| I 実験材料と方法 | VII SM経口投与とマウスにおける SM耐性コレラ菌の 経口感染実験 |
| II 腸内細菌叢の生成過程, 特に大腸菌群の出現と定着 | a) 自然便におけるコレラ菌の増殖状態 |
| III コレラ菌ならびにマウス腸内大腸菌群の薬剤感受性 | b) 屠殺例の腸内増殖状態 |
| IV SM耐性コレラ菌の選択分離 | c) 屠殺例および死亡例の肉眼所見 |
| V SM耐性コレラ菌の幼若マウス経口感染における病原性 | 考 按 |
| —感受性菌との比較— | 要 約 |
| | 文 献 |

序 言

細菌性腸管感染症成立の機序解明において、先住常在菌叢の存在が、感染防禦の大きな要因であると考えられる。先住菌と侵入菌、および宿主との相関関係は、いろいろな組合せによって検討されねばならない。先住菌、特に大腸菌群を排除するために、抗生物質を投与する方法が行われ Dubos⁽¹⁾, Savage⁽¹²⁾, 田嶋ら⁽¹⁴⁾など多くの報告がある。マウスを用いた実験赤痢においては、Freter⁽⁴⁾, 岩田⁽⁵⁾, 小笠原⁽⁶⁾, 竹内⁽¹⁵⁾などの報告がある。

すなわちSM (ストレプトマイシン), EM (エリスロマイシン), CP (クロラムフェニコール) などをあらかじめマウスに経口投与したのち赤痢菌を感染し、実験期間中に SM, EM, CP 含有水を自由に飲ませる方法で、赤痢菌の定着に成功している。Freter⁽⁴⁾ は同様にして、SM 耐性コレラ菌でモルモット、マウスへの感染を試みている。

佐々木⁽¹⁰⁾は、腸管感染症の解析において、無菌動物 (Germ free), Gnotobiotics を用いて、人工菌叢

の作成とその安定性について検討し、種々の菌を腸管内で、増殖、定着させるのに成功している。またその重感染において、*Escherichia coli* が第二次侵入菌である場合には、多くの他の菌 (*Enterococci*, *Bacteroides*, *Clostridia*, *Lactobacilli*) と共存的に生棲するが、第一次菌であって、すでに定着したあとに第二次侵入菌 (*Shigella*, *Candida*) があつた場合には、その定着に対して阻害的であるとしている。

Ujiye et al. ⁽¹⁶⁾ は、幼若マウスを用いるコレラ菌経口感染実験において、接種菌が腸内で増殖し、また腸内に液体が貯溜してコレラ相似の症状が起るのを見ている。この実験系から、マウス日令の差と感染に対する感受性の関連を知った。すなわち、生後6日～8日令マウスを1日飢餓させて、エルトルコレラ菌を感染した場合に、24時間以後に腸管内、特に盲腸に白色ないし淡黄色の液体貯溜をみると共に、接種菌の著明な増殖をみた。ところが生後15日令マウスでは、液体貯溜がみられず、また腸管内での菌増殖も6日～

8日令マウスにくらべて軽度であることが認められた。さらに30日令マウスでは、コレラ菌感染後72時間にわたって、腸管内での菌増殖がまったく認められなかった。

また6日～8日令マウスでは、コレラ菌感染後72時間内に、多数の死亡例をみたが、15日令および30日令マウスでは死亡例はみられなかった。以上の結果から、生後10日～15日令を境として、コレラ菌感染に対する感受性の明らかな相違がみられた。

実 験

I 実験材料と方法

1) マウスおよび菌株：マウスは教室で維持しているICR系を用いた。コレラ菌株は、教室保存の *Vibrio cholerae* biotype *El Tor*, Inaba type V86および著者が薬剤で選択分離したV86のストレプトマイシン耐性菌を用いた。0.1%の Yeast extract (Difco) を最終濃度に加えた Davis の半合成寒天斜面培地で、37°C一夜培養した菌を経口感染に用いた。

2) 経口感染方法：幼若マウスの経口感染方法は、1日飢餓後、5%ブドウ糖溶液に浮遊した菌液を、ビニール管を接続した注射筒で10⁵・7/0.025mlを経口感染させた。感染後はただちに母乳を与えた。また成熟マウスにおいては、飢餓(水、飼料)することなく、生理食塩水に浮遊した菌液を10³/0.2ml同様な方法で経口感染させた。

3) 腸管内菌数検索方法：マウスを屠殺、開腹して全腸管または腸管各部位の菌数をみた。腸管分割は、小腸を二等分して小腸上部、小腸下部とし、盲腸と結腸はまとめて大腸とした。また実験により、小腸と大腸だけに二分した例もある。いずれの場合でも、各腸管に10mlの生理食塩水を加えて、ブレンダーでホモジネート(5,000r.p.m. 60sec.)して、その原液を生理食塩水で10倍段階希釈して、その0.1mlを培地に滴下し、コンラージ棒で塗抹培養した。

4) 自然便の菌数検索方法：1ケージに5匹ずつ収容した成熟マウスから毎日定時刻に自然便を採取した。直示天秤で秤量し、糞便重量の100倍量(V/W)の生理食塩水を加えて、ガラスホモジナイザーで懸濁液とした。原液を生理食塩水で10倍段階希釈し、その0.1mlを培地に滴下して、コンラージ棒で塗抹培養した。菌検索中、しきわらは毎日滅菌したものと交換し、体重を毎日測定した。

5) 使用培地：

i) コレラ菌検出用：pH8.6アルカリ寒天培地。

この日令の差を解明する生体側の条件の一つとして、マウスにおける大腸菌群を主とした腸内細菌叢の生成過程を、出産直後から追求し、さらにSMを投与した場合の大腸菌群の変動を観察し、SM投与中のマウスに、SM耐性コレラ菌の経口感染実験を行い、幼若あるいは成熟マウスの場合の経口感染実験の結果と対比して、マウスのコレラ感染発症あるいは腸管内菌増殖における正常腸内菌叢、特に大腸菌の影響について検討した結果を報告する。

TCBS寒天培地(栄研)。また特にSM耐性コレラ菌検出にはSM100mcg/ml含有普通寒天培地を用いた。

ii) 大腸菌群およびその他の細菌検出用：好気性菌にはDHL寒天培地(栄研)………*Enteric bacteric*検出用。SF寒天培地(SF培地“栄研”に1.5%に寒天を加えたもの)………*Streptococci* 検出用。嫌気性菌にはLBS寒天培地(B. B. L.)………*Lactobacilli* 検出用。NN寒天培地………*Clostridia* 検出用。変法NBGT血液寒天培地………*Bacteroides* 検出用。*Enteric bacteria* は37°C20時間、*Streptococci* は37°C48時間、嫌気性菌はアルカリ性ピロガロール法により、37°C72時間培養した。使用培地と培養時間は前島ら⁽⁶⁾の法によった。なお前島らは、変法NBGT血液寒天培地に馬血液を指定しているが、著者は入手困難のため牛血液を用いた。

6) 抗生剤(SM)投与方法：抗生剤は、結晶硫酸ジヒドロストレプトマイシン(SM)武田、1g力価を用いた。水道水で1,000mcg/mlまたは3,000mcg/mlに希釈して給水瓶から自由に飲ませた。給水は1日おきに更新し、毎日の摂取水量を計ると共に、体重の増減を測定した。

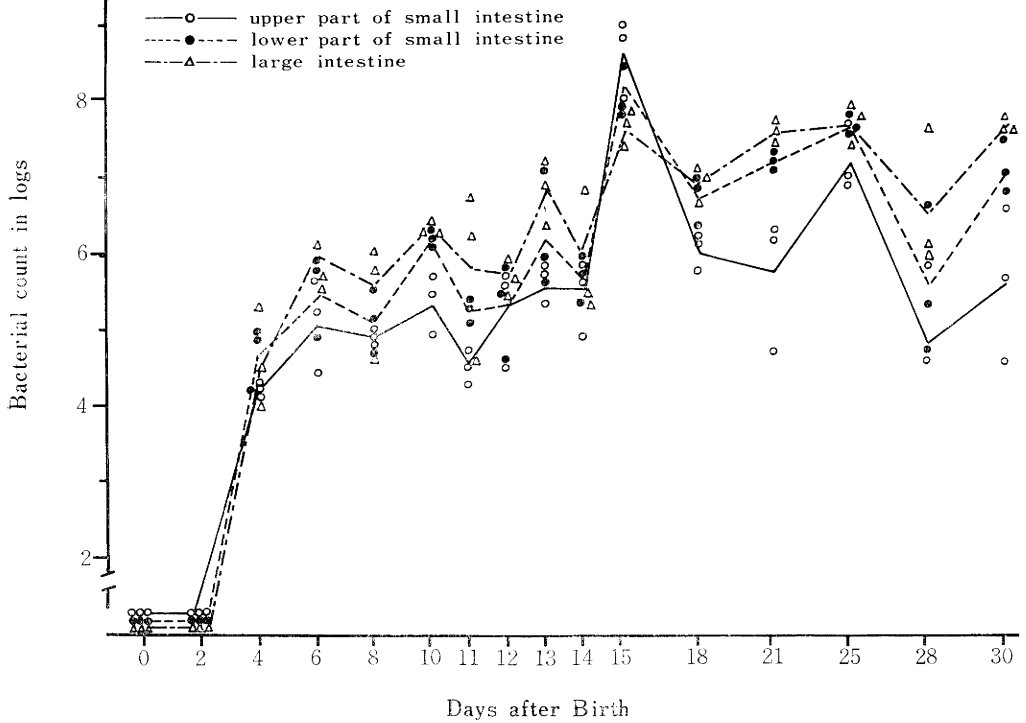
7) 菌の薬剤感受性試験：コレラ菌とマウス腸内からの検出菌のSM感受性試験は、平板寒天希釈法で行った。被検菌をpH7.2ペプトン水で37°C18時間前培養し、最終的にSMの100～0.39mcg/mlの2倍段階希釈濃度を含むハートインフュージョン寒天培地(栄研)に、前培養したペプトン水の一白金耳を画線塗抹して、37°C18時間培養して判定した。

8) 腸管の肉眼所見：屠殺例および死亡例について、腸管の肉眼的所見を記録した。

II 腸内細菌叢の生成過程、特に大腸菌群の出現と定着

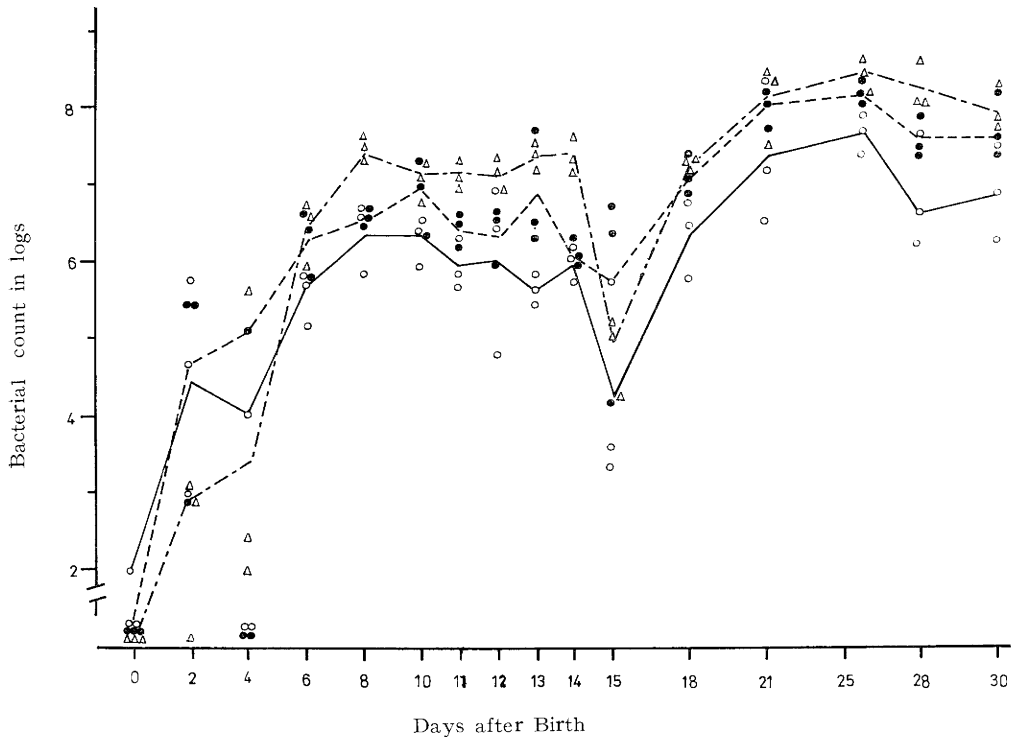
マウス日令とコレラ菌経口感染に対する感受性の密接な関連がみられるが、その原因として考えられるいくつかの因子のうちで、まずマウスの正常常在細菌叢

Fig. 1 Development and Changes of Viable Count of *Streptococci* on SF-Agar

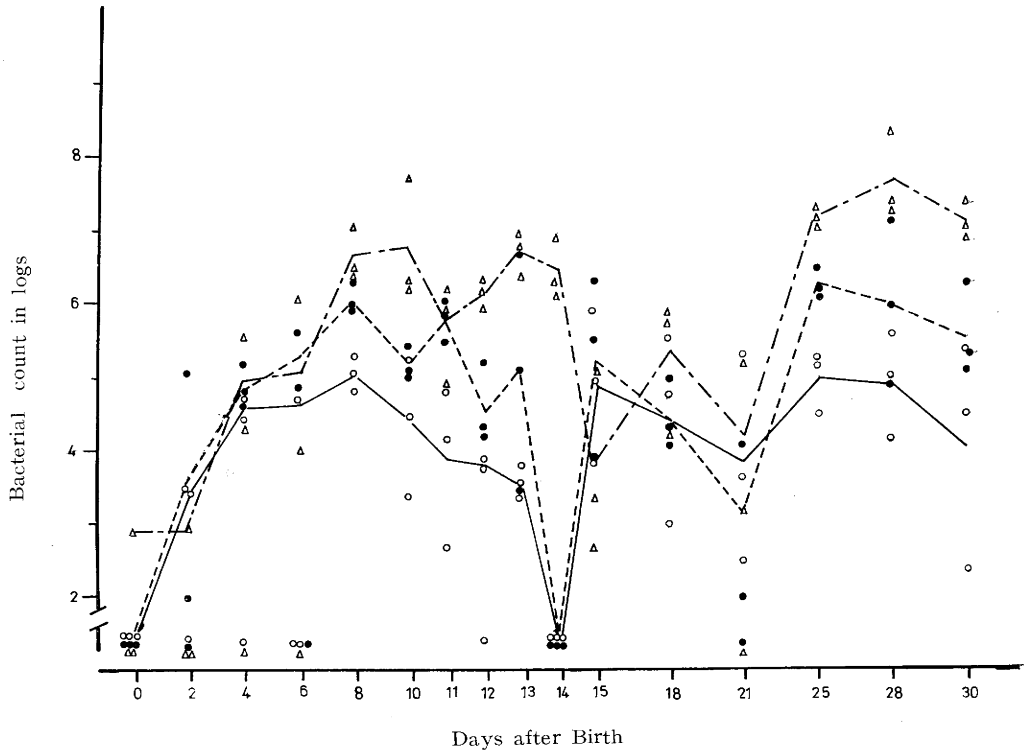


The data are recorded as the average of the \log_{10} of the number of bacteria per each tissue

Fig. 2 Development and Changes of *Lactobacilli* on LBS-Agar



See the legend and footnote in the Fig. 1

Fig. 3 Development and Changes of *Clostridia* on NN-Agar

See the legend and footnote in the Fig. 1

による影響について検討を試みた。第一段階としてマウス腸内細菌叢が、生後どのようにして生成、定着されるのかを検討するため、生後0日から30日までのマウスの腸内細菌叢を、Genusレベルについて定量的検索を行った。

1) *Streptococci* : *Streptococcus* (*Streptococcus faecalis*) の出現は(図-1)で示される。生後4日目に各腸管にはほぼ等量ずつ見られ、30日まで徐々に増加がみられた。腸管部位の差による量的な差は認められなかった。

2) *Lactobacilli* : *Lactobacillus* の菌数は(図-2)に示される。生後0日に3匹中1匹の小腸上部にみられ、2日には腸管各部に出現する。8日には 10^{6-7} の高値を示し、15日で減少するが、再び増加して 10^{7-8} となった。

3) *Clostridia* : *Clostridium* は(図-3)に示される。生後0日に大腸内において3匹中1匹に検出され、以後30日にかけて菌量の変動がみられた。菌量は *Streptococci*, *Lactobacilli* と比較すると低値であった。

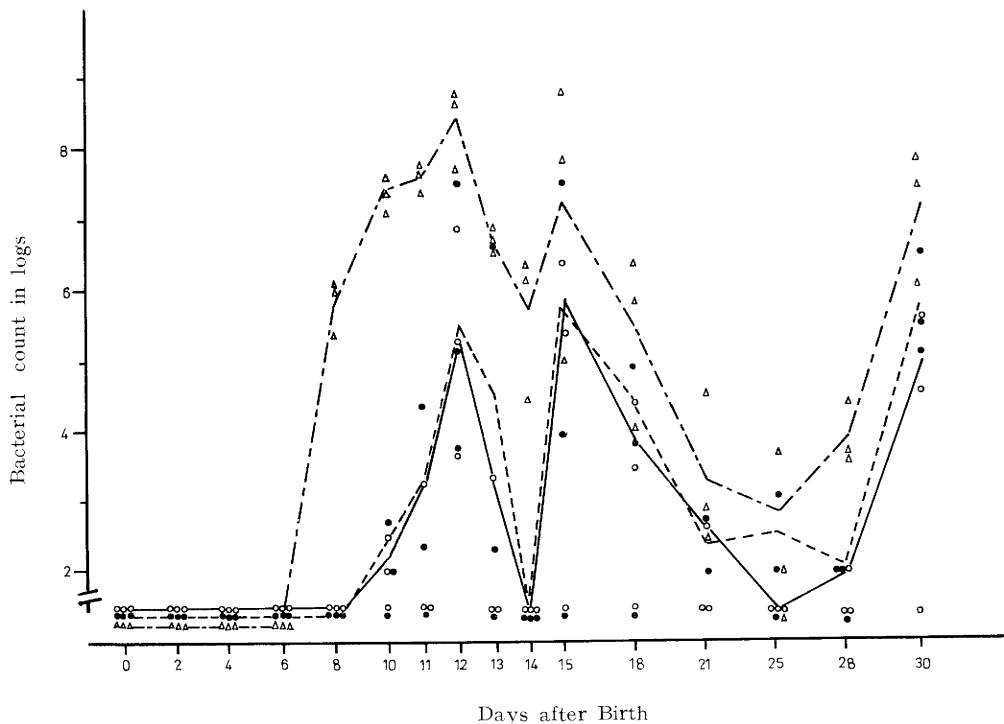
4) *Bacteroides* : 前島ら⁶⁾の変法NBGT血液寒天培地において、著者は馬血液の代りに牛血液を用いた

が、*Bacteroides* の検出はできなかった。

5) *Enteric bacteria* : 大腸菌群の出現と定着は(図-4)で示される。大腸菌群は *Streptococci*, *Lactobacilli*, *Clostridia* より遅れて8日目に大腸に出現する。18日までは 10^{6-8} の高値を示し、21日~25日に減少したが、30日には 10^{6-7} に回復した。小腸では大腸より遅れて10日目に出現し、菌量の増減は大腸と平行する。小腸上部と小腸下部では、はっきりした差はみられなかった。乳糖非分解の *Proteus* およびその他の乳糖非分解菌は散発的にみられた。

以上のようにマウス腸内細菌叢は、生後0日で *Lactobacilli*, *Clostridia* が出現し、ついで4日目には *Streptococci* が現われる。そして大腸菌群は8日目に大腸に出現し、ついで小腸にあらわれる。その後マウスが生育するにしたがって、それぞれの菌種はかならずしも一定しないが、8日目に現われた大腸菌群は、いずれのマウスにおいても相当菌数定着するのが認められた。その他の菌については、必ずしも全部が完全に同定できたわけではないが、*Streptococcus faecalis*, *Lactobacilli*, *Clostridia* がいずれのマウスにおいても、

Fig. 4 Development and Changes of Viable count of *Enteric Bacteria* on DHL-Agar



See the legend and footnote in the Fig. 1

小腸から大腸にかけて相当菌数認められた。

III コレラ菌ならびにマウス腸管内細菌のSM感受性

SM投与実験に関連して実験に用いるコレラ菌、ならびにマウス腸内から分離された大腸菌群、および *Streptococcus faecalis* のSM感受性をみた。(表-1)で示されるように、エルトール V86は12.5mcg/ml感受性であった。一方マウスから分離された大腸菌群は感受性値に幅がみられたが、12.5mcg/ml感受性であり、*Streptococcus* はそれよりもやや高く 50mcg/ml感

受性であった。マウス腸内菌叢の SM感受性試験は、好気性菌のみについて行ったが、マウス腸内で高度なSM耐性を示すものはなかった。

IV SM耐性コレラ菌の選択分離

実験に用いているエルトールV86は、SM 12.5mcg/ml感受性であった。この菌からSM耐性菌を分離するために、次の実験を行った。2段階的に100mcg/ml ~3.12mcg/ml SM含有普通寒天培地の系列を作成し、そのおのにおに濃厚なV86菌液を塗抹した。

Table 1. Streptomycin Sensitivity Test on the Intestinal Bacteria isolated from Mouse Intestine and EI Tor V86

| Bacteria | | Total Number | MIC (mcg/ml) | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|------|------|------|------|------|----|----|-----|------|
| | | | <0.39 | 0.78 | 1.56 | 3.12 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | >100 |
| Enteric bacteria | Lactose Fermenters | 54 | | | 13 | 21 | 19 | 1 | | | | |
| | Lactose Nonfermenters | Proteus | 10 | | | | | 2 | 8 | | | |
| | | Others | 16 | 2 | 8 | 6 | | | | | | |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | | 18 | | | | | 6 | 6 | 6 | | | |
| EI Tor V86 | | 5 | | | | | | 5 | | | | |

Fig. 5 Distribution of SM-Resistance of *El Tor* V86

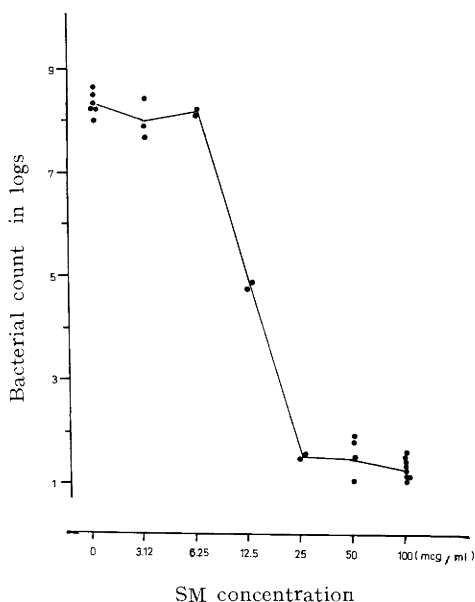


Table 2. Biochemical Characteristics of the SM-Resistant V86

| | |
|---------------------------|-----------|
| Indol | Negative |
| Methyl Red | Negative |
| Voges-Proskauer | Positive |
| Simmons' Citrate | Positive |
| Jordan's D-Tartaric acid | Positive |
| Glucose | Positive |
| Gas from Glucose | Negative |
| H ₂ S(Kligler) | Negative |
| Lactose | Negative* |
| Mannitol | Positive |
| Sucrose | Positive |
| L-Lysin Decarboxylase | Positive |
| Cytochrome oxydase | Positive |
| Motility | Positive |
| Haemolysin(Greig test) | Positive |

*Positive delayed 3 days

24時間培養の結果は(図-5)で示されるが、12.5 mcg/mlを境として菌数が激減した。しかし25, 50, 100mcg/ml含有のSM培地でも少数の集落がみられ、その大部分はSM100mcg/ml以上の完全耐性を示した。マウスへの感染実験にはSM100mcg/ml含有平板寒天培地に発育したものを分離して使用したが、この株はSM10,000 mcg/ml以上の耐性を示した。またSMを含有しない培地にも良好に発育して、このSM耐性コ

レラ菌がSM依存菌でないことを確認した。

SM耐性菌の生化学性状は(表-2)で示されるように諸生化学性状、ヒツジ赤血球溶血反応(Greig Test)ともに原株との相違はみられなかった。

V SM耐性コレラ菌の幼若マウス経口感染における病原性

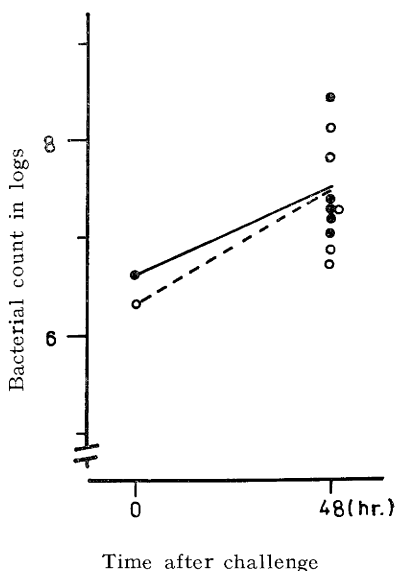
—感受性菌との比較—

SM耐性コレラ菌の幼若マウスにおける病原性を、経口感染実験においてSM感受性菌との比較実験を行った。

1) 腸管内菌増殖：生後6日令の幼若マウスを1日飢餓させたあと、SM耐性菌およびSM感受性菌を経口感染させて、感受性を比較した。接種量はそれぞれ $4.48 \times 10^6/0.025\text{ml}$, $2.65 \times 10^6/0.025\text{ml}$ であった。

(図-6)に示されるように、48時間後の全腸管あたりの菌数は、pH8.6 アルカリ寒天培地においてSM耐性菌、SM感受性菌ともに菌増殖がみられ、また盲腸内の液体貯溜も認められた。SM耐性菌感染では、SM

Fig. 6 Differences on Multiplication of SM-Resistant V86 and SM-Sensitive V86 in the Intestine of 7-day-old Mice



Challenged dose :
 $4.48 \times 10^6/0.025\text{ml}$ (SM-R V86)
 $2.65 \times 10^6/0.025\text{ml}$ (SM-S V86.)

Table 3. Deaths within 5 days after oral challenge on 6-day-old Mice. Comparison between SM-Resistant V86 and SM-Sensitive V86

| Strain | Challenged Dose | Total Number | Numbers of Death | | | | | | | | Mortality |
|----------|----------------------------------|--------------|------------------|-------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----------|
| | | | 9hr. | 12hr. | 1d. | 30hr. | 2d. | 3d. | 4d. | 5d. | |
| SM-R V86 | $2.2 \times 10^7/0.025\text{ml}$ | 24 | • | • | 5 | 4 | 5 | • | 1 | • | 63% |
| | 1.8×10^5 | 20 | • | • | 2 | • | 5 | 4 | 3 | 1 | 75% |
| SM-S V86 | 1.7×10^7 | 18 | • | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 77% |

100mcg/ml 含有普通寒天培地を併用したが、菌量の差はみられなかった。

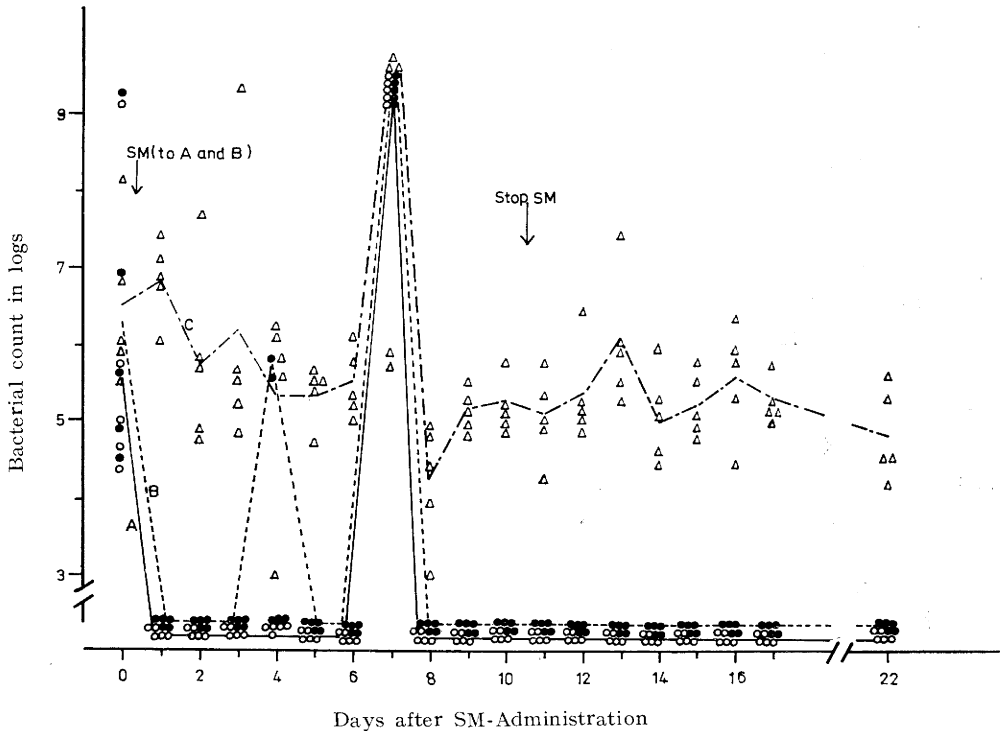
2) 死亡率：生後 6 日令の幼若マウスに SM 耐性菌、SM 感受性菌を経口感染させて、5 日間の死亡をみた。(表一三) に示されるように、SM 耐性菌感染例において、 $2.2 \times 10^7/0.025\text{ml}$ 接種では 15/24 (63%)、 $1.8 \times 10^5/0.025\text{ml}$ 接種では 15/20 (75%)、SM 感受性菌 $1.7 \times 10^7/0.025\text{ml}$ 接種では 14/18 (78%) が死亡した。

以上のように one step で分離した SM 耐性菌が、幼若マウスの経口感染に対して、病原性の強いことが確かめられた。

VI SM 経口投与による腸内細菌叢、特に大腸菌群の消長

SM 経口投与による大腸菌群の消長を知るために、生後 4 週令のオマウスの自然便を採取して、糞便 g あたりの菌数を毎日観察した。第一日の糞便採取後に、

Fig. 7 Changes of the Viable Numbers of *Escherichia coli* in the Feces of 4-week-old Mice with Administration of Streptomycin



Streptomycin solution was given with drinking water in concentration 1,000mcg/ml to Group A, 3,000 mcg/ml to B, and tap water was given to C. After 10 days, streptomycin solution was changed to tap water.

The data are recorded as the average of the log₁₀ of the number of bacteria per gram of feces.

SMを経口投与して以後、毎日定時刻に糞便を採取した。

(図-7)に示されるように、SM1,000mcg/ml, 3,000mcg/ml 投与群は、投与後24時間で菌が消失した。($10^3/g$) 3,000mcg/ml 投与群では4日後に、5匹中2匹に 10^4 の菌がみられ、7日目には両群とも全部のマウスで (> 10^9) の排菌が認められた。しかし SM100mcg/ml 含有ブイヨンで、37°C48時間培養でも発育せず、この菌の耐性獲得は認められなかった。そして8日目には、両群とも再び消失した。対照群では常に 10^{5-6} の排菌があり、SM投与群との間に明らかな差が認められた。

SM投与後10日目にこれを中止して、水道水に切り換えたが、SM投与群であったものは、その後12日間でも大腸菌群の回復はみられなかった。またSM投与期間中のSM含有水の1日平均の摂取水量は、1,000mcg/ml投与群で27ml, 3,000mcg/ml投与群で29mlであった。

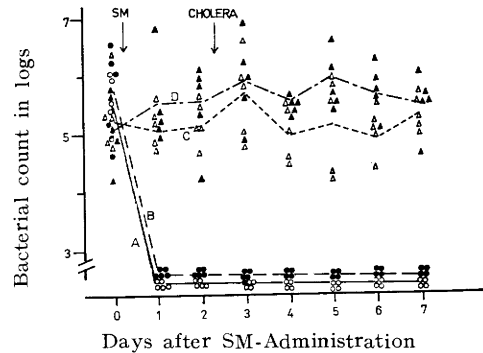
SM投与における体重の変化は、SM投与群と対照群での有意差はなく、体重におよぼすSMの影響は認められなかった。

VII. SM投与マウスにおけるSM耐性コレラ菌の経口感染

前章の実験でSM投与後24時間で、大腸菌群が消失することを認めたが、SM耐性コレラ菌の感染は更に1日SMを投与したのちに行うこととして、以下の実験を行った。

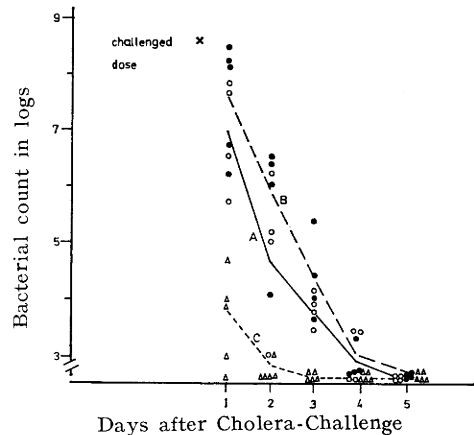
a) 自然便におけるコレラ菌の増殖状態：生後4週令の♂マウスを4群にわけ、A) SM 1,000mcg/ml 投与一コレラ菌感染群、B) SM 3,000mcg/ml 投与一コレラ菌感染群、C) SM非投与一コレラ菌感染群、D) SM非投与一コレラ菌非感染群とした。SM投与後48時間に、飢餓を行うことなくA)~C)群にSM耐性コレラ菌を $3.8 \times 10^8/0.2ml$ 経口感染して、コレラ菌および大腸菌群の消長をみた。(図-8, 9) SM投与群では、SM投与後1日で大腸菌群が消失し、7日まで菌の回復はみられなかった。SM投与後2日目にSM耐性コレラ菌感染を行ない糞便中のgあたりのコレラ菌数をみると、24時間ではSM1,000mcg/ml 投与群では 10^{5-7} , 3,000mcg/ml 投与群で 10^{6-8} が検出された。しかし経目的に菌は減少し、コレラ菌感染後5日には検出されなかった。コレラ菌感染後1日にA群で1匹、2日目にはB群で1匹の死亡がみられた。死亡したA群の1例は小腸に 3.2×10^7 , 大腸には 1.4×10^8 の菌がみられ、B群の1例は小腸に 1.2×10^5 , 大腸には 2.3×10^6

Fig. 8 Changes of the Viable Count of *Escherichia coli* in the Feces of Mice.



Streptomycin solution was given with drinking water in concentration 1,000 mcg/ml to Group A, 3,000mcg/ml to B, and tap water was given to C and D. After the 2 days of experiment, SM-R V86 was challenged to Group A, B and C. The data are recorded as the average of the \log_{10} of the number of bacteria per gram of feces.

Fig. 9 Excretion of Streptomycin-resistant V86 in the Feces of Mice. (counted on SM-100mcg/ml containing nutrient agar)

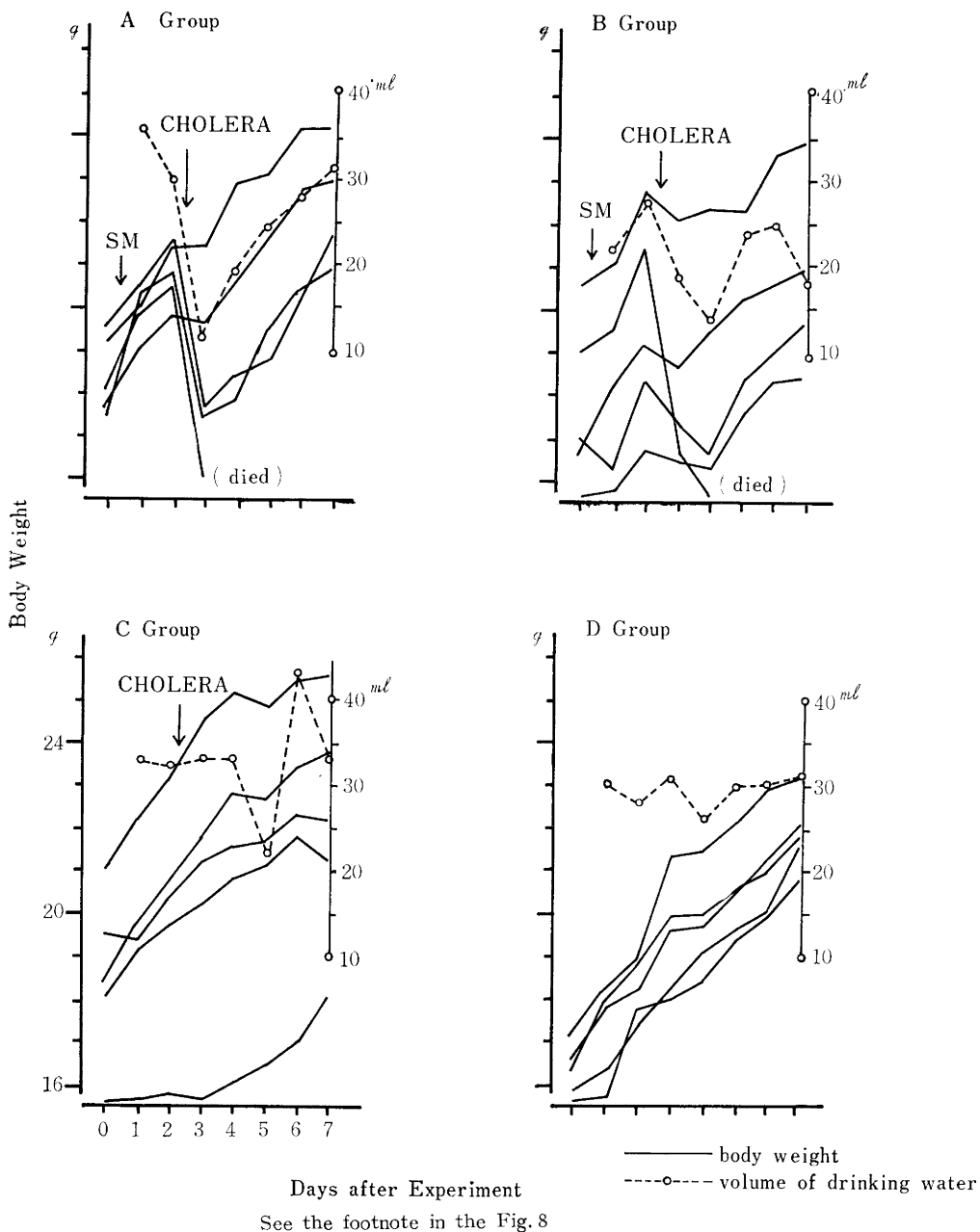


Challenged dose was $3.8 \times 10^8/0.2ml$. See the footnote in the Fig. 8.

のコレラ菌が検出された。腸管の肉眼的所見では、小腸下部に黄色液体の貯溜があり、やや腫脹していた。また腸管内に固形便がなく下痢症状であった。

SM非投与一コレラ菌感染群では、大腸菌群は実験期間中 10^5 の一定値を保った。コレラ菌は感染後1日では5匹中4匹に検出されたが、 10^{3-4} と低値を示し、感染後2日では5匹中1匹だけにしか検出されず、3日後からはまったく検出されなかった。対照のD群での大腸菌群は、 10^{5-6} の菌数であった。

Fig. 10 Changes of the Body Weight and the volume of drinking water caused by the Streptomycin-administration and Challenge with Streptomycin-Resistant V86



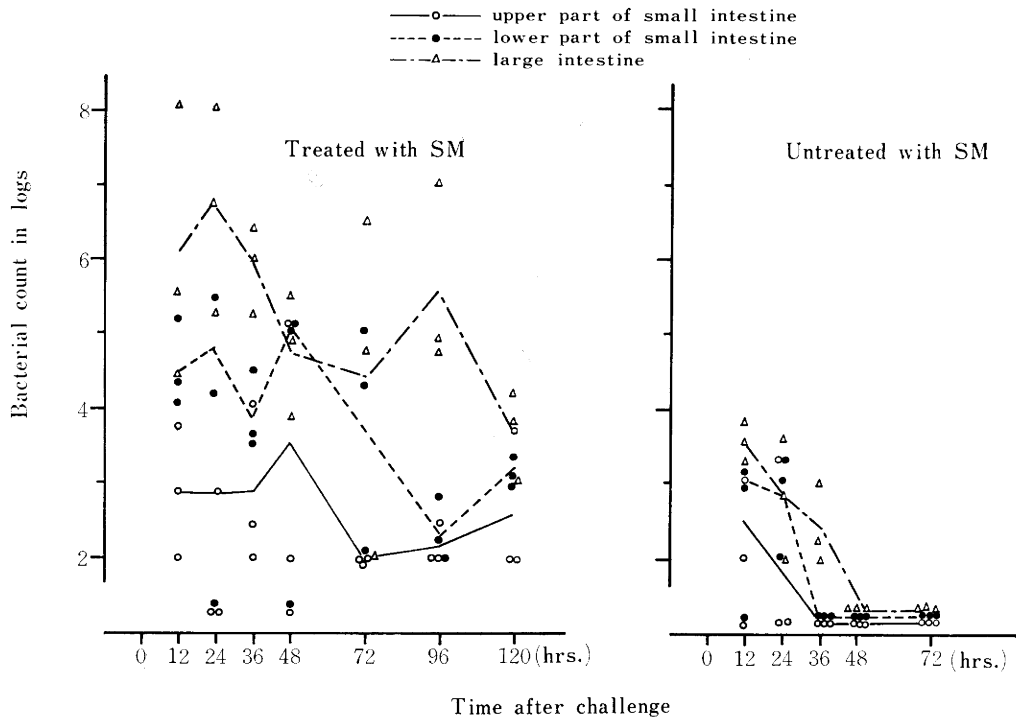
See the footnote in the Fig. 8

またこの実験期間中の各群の体重の変化と1ケージ5匹あたりの摂取水量は(図一10)で示される。A群、B群はSM投与によつての体重の特徴的な変化はみられなかった。しかしコレラ菌感染により全部のマウスに体重の著しい減少がみられ、摂取水量も低下した。しかし次の日から体重は回復した。C群ではコレラ菌

感染を行つても、体重の減少はみられなかった、対照のD群では、体重の増加・摂取水量も一定値であつた。

以上のように糞便中の菌数において、SM投与を行つたA群、B群はSM投与をしないC群と比較して、コレラ菌の菌数も多く、また長時間にわたつて検出された。

Fig. 11 Multiplication of Streptomycin-Resistant V86 in the Intestine of 4-week-old Mice. (counted on SM -100mcg/ml containing nutrient agar)



Streptomycin solution was given with drinking water in concentration 3,000 mcg/ml for 7 days duration. After 2 days of experiment, streptomycin-resistant V86 was challenged to streptomycin-treated group and streptomycin-nontreated group. Challenged dose was $1.6 \times 10^8/0.2\text{ml}$. The data are recorded as the average of the \log_{10} of the number of bacteria per each tissue.

b) 屠殺例での腸内増殖状態：生後4週令合マウスをSM投与群と非投与群にわけた。3,000mcg/ml投与2日後に、 $1.6 \times 10^8/0.2\text{ml}$ のSM耐性コレラ菌を感染して、経時的に腸管内のコレラ菌を検索した。

(図-11)に示されるようにSM投与群ではコレラ菌感染12時間後、腸管各部にコレラ菌が検出された。小腸では48時間後、大腸では24時間後に菌数の最大値をみたが、感染後5日では各腸管部位とも、 10^{2-3} と低値であった。SM非投与群では、コレラ菌感染後12時間でも 10^{2-3} と低値であり、48時間後には各腸管部位のどこにも検出できなかった。この群での大腸菌群は実験期間中、大腸で 10^{4-5} であった。コレラ菌感染後24時間で、SM投与群で2匹、SM非投与群で1匹が死亡

したが、菌数検索は行わなかった。

以上の実験において、糞便中の菌検索と同様な結果が得られた。すなわちSM投与群は、SM非投与群と比較してコレラ菌数も多くなり、かつ長時間マウス腸内に生存した。

c) 屠殺例および死亡例の肉眼所見：SM投与群では、屠殺例・死亡例とも盲腸内にガスがみられ、上行結腸の腫脹がみられたが、コレラ菌感染前に飢餓を行なわなかったため、腸管内に固形便が多く、液体の貯溜は明らかでなかった。SM非投与群の死亡例では、盲腸内にわずかのガスがみられたが、SM投与群のそれとくらべて少なく、また結腸の腫脹はみられなかった。

考 按

実験動物のコレラ菌感染実験において、ヒトにみられるコレラと相似の症状を動物に惹起させる点について、幼若ウサギ⁽²⁾、猿⁽³⁾、犬⁽⁹⁾などを用いた報告がある。Ujiye et al. は幼若マウスにコレラ菌を経口的に感染させることによって、腸管内での接種菌の増殖、液体貯溜を認め、かつ接種菌量によっては、3日以内に死亡することを認めた。そして幼若マウスのコレラ菌経口感染に対する感受性は、生後日数と密接に関連することを報告した⁽¹⁰⁾。

この日令の差は、感染実験を成立させるための生体側の条件の一つと考えることができるが、その意味するものを分析すると

- (1) 腸内細菌叢が生後、完全に形成されていない
- (2) 新生マウスの腸の吸収能力などの機能的相違
- (3) 腸管上皮細胞の動態について細胞の新生時間 (turn over time) が、新生時期においては遅延すること
- (4) 腸管上皮細胞の形態学的にみた未熟さ
- (5) 胆汁その他の消化液が分泌機能未熟のために、外来の病原菌に対する無防禦状態
- (6) 全身的にみて外界からの異物に対する無抵抗性などが考えられる。ここにあげた諸条件の内第一の問題に挙げた腸内細菌叢が、侵入するコレラ菌に対してどのような影響を与えるかを、いくつかの実験の系列において検討したのがこの報告である。

腸内細菌叢の生成過程を、完全に理解することは極めて困難である。著者は腸内細菌叢の中で、大腸菌の演ずる役割の重大さを考えて、特に大腸菌群を重視し、生後これらの菌叢はいつ現われ、どのように菌叢を形成するのかに重点をおいて検討した。

Escherichia coli については、すでに Mushin⁽⁷⁾、Shaedler⁽¹³⁾、佐々木⁽¹¹⁾などの実験から、外来の病

原菌に対する影響が重視されているが、著者の実験においては、大腸菌群は生後8日目にはじめて大腸、ついで小腸に出現し、以後成熟にいたるまで定着することを認めた。

著者は従来の Ujiye et al.⁽¹⁰⁾ の成績では感染を起さなかった成熟マウスに、SMを投与しながらSM耐性コレラ菌を経口感染させると、感染菌の腸内定着延長およびある範囲内での腸内増殖が起るのを認めた。SM投与によって、マウス腸内の大腸菌群が消失し、SM耐性コレラ菌がマウス腸内で定着できたのに対し、SM非投与群ではコレラ菌の定着ができず、大腸菌群が優勢であった。

SM投与によるマウス腸内正常細菌叢の変動は、大腸菌群のみについて検討をし、他の好気性菌および嫌気性菌の変動の検索は行わなかったため、大腸菌群の変動がコレラ菌のマウス腸内での定着に直接の影響を与えるということは、以上の実験だけでは断定できない。

しかしマウス日令の差による感受性⁽¹⁰⁾とマウス腸内での大腸菌群の出現、定着の関係について検討してみると、コレラ菌に極めて感受性を示した生後10日以内の幼若マウスには、大腸菌群の出現がみられていない。これに対し、感受性を示さなかった生後15日令、30日令においては、大腸菌群はマウス腸内に 10^{6-7} の高値で定着している。

SM投与により大腸菌群が消失した成熟マウスにコレラ菌を感染させると、侵入したコレラ菌の増殖・定着がみられる。この事實は、SM投与がコレラ菌の増殖を可能とする条件を具備するものと考えられる。その際の大腸菌の消長は、単にその条件の指標であるのか、特に外界からの侵入菌に対して、防禦作用を演ずるかどうかは、今後の研究課題としたい。

要 約

マウス腸内細菌群の生成過程において、生後0日に *Lactobacilli*, *Clestridia* が出現し、4日後に *Streptococci*, 8日目には大腸菌群が出現して、漸次定着していくことが観察された。

成熟マウスに連続的にSMを与えて腸内大腸菌群を消失させたのちに、SM耐性としたコレラ菌を経口的に接種すると、腸管内で感染菌が増殖・定着すること

が認められた。

マウスにおけるコレラ菌感染の影響の検討において、コレラ菌に対しての大腸菌存在の意義が検討された。

なお本稿を終るにあたり、終始懇切な御指導と御校閲を賜った小張一峰教授に、深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) **Dubos, R., Schaebler, R. W. and Mallory :** The Effect of Antibacterial Drugs on the Fecal Flora of Mice. *J. Exp. Med.* 117(2) : 231-243, 1963
- 2) **Dutta, N. K. and Habbu, M. K. :** Experimental Cholera in Infant Rabbits, A Method for Chemotherapeutic Investigation. *Brit. J. pharmacol.* 10 : 153-159, 1955
- 3) **Felsenfeld, O., Greer, W. E. and Felsenfeld, A. D. :** Cholera Toxin Neutralization and some Cellular Sites of Immune Globulin Formation in *Cercopithecus aethiops*. *Nature (London)* 213(5082) : 1249-1251, 1967
- 4) **Freter, R. :** The Fatal Enteric Cholera Infection in the Guinea Pig, Achieved by Inhibition of Normal Enteric Flora. *J. Infect. Dis.* 97(1) : 57-65, 1955
- 5) 岩田和夫, 本江博子, 福永昇 : 赤痢菌の実験的感染に関する研究 第1報 諸種の処置による赤痢菌のマウス感染成立の試み, *日細菌誌*, 17(6) : 434-442, 1962
- 6) 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(2) : 54-67, 1966
- 7) **Mushin, R. and Dubos, R. :** Colonization of the Mouse Intestine with *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 122(4) : 745-757, 1965
- 8) 小笠原一夫, 武田善直 : マウスにおける赤痢感染の実験的研究, *日細菌誌*, 16(8) : 715-716, 1961
- 9) **Sack, R. B., Carpenter, C. C. J., Steenberg, R. W. and Pierce, N. F. :** Experimental Cholera, A Canine Model. *Lancet* 2 : 206-207, 1966
- 10) 佐々木正五 : Germ free, Gnotobiotics を用いての微生物学的研究, 人工菌叢の作製とその安定性, *日細菌誌*, 23(8) : 550~552, 1968
- 11) 佐々木正五, 橋本一男, 杉山太規子, 大西信彦, 鈴木亮子, 西川武二, 前田良三, 高橋とし子, 三間孝, 野村達次, 齊藤宗雄, 松崎哲也, 関根義一, 五十嵐紀美子, 合田朗 : 無菌マウスを用いた腸管感染症の解析, *日細菌誌*, 22(7) : 395-396, 1967
- 12) **Savage, D. C. and Dubos, R. :** Alterations in the Mouse Cecum and its Flora produced by Antibacterial Drugs. *Exp. Med.* 128(1) : 97-110, 1968
- 13) **Shaedler, R. W. and Dubos, R. J. :** The Fecal Flora of Various Strains of Mice, Its Bearing on their Susceptibility to Endotoxin. *J. Exp. Med.* 115(6) : 1149-1159, 1962
- 14) 田嶋嘉雄, 前島一淑, 滝沢隆安, 坂崎利一, 高松泰人, 倉益茂実, 神園稔, 今村泰久, 三浦四郎, 佐藤儀平, 安藤重春, 吉村昌吾, 友安夫 : 各種動物における抗生物質耐性菌の出現検索ならびにマウスについての抗生物質投与実験, *日獣会誌*, 21(7), 277-287, 1968
- 5) 竹内和子 : 実験赤痢に関する研究, 赤痢菌のマウス腸内増殖性と腸内菌叢について, *日伝染会誌*, 42(11) : 299-306, 1969
- 16) **Ujiye, A., Nakatomi, M., Utsunomiya, A., Mitsui, K., Sogame, S., Iwanaga, M. and Kobari, K. :** Experimental Cholera in Mice I. First Report on the Oral Infection. *Trop. Med.* 10(2) : 65-71, 1968