ビフィズス菌と腸管粘膜との相互作用

佐藤 仁*・望月 一雄*・本間 道**

独協医科大学臨床病理学教室*・小児科教室**

〒 321-02 栃木県下都賀郡壬生町大字北小林

Interaction between Bifidobacterium and mucosal epithelial cell of small intestines.

Jin Sato*, Kazuo Mochizuki* and Naoshi Homma**

Department of Clinical Pathology* and Department of Pediatrics**, Dokkyo University School of Medicine.
Mibu, Shimotsuga, Tochigi 321-02

(Received Aug. 10, 1979)

Interaction between Bifidobacterium (Bacteria) and mucosal epithelial cell of small intestines (Cell) was examined. It was employed *Bif. infantis* ss *infantis*. Cell obtained from pig embryo were cultivated with Eagle MEM. Bacteria were treated with antiserum (rabbit) against Bacteria, with pre-immunized rabbit serum and with saline solution, respectively. In the case of Bacteria treated with pre-immunized rabbit serum or treated with saline solution, junction between Bacteria and Cell was observed. And no junction was shown at Bacteria treated with antiserum vs Cell. On the other hand, Cell treated with polysaccharide obtained from Bacteria was observed higher affinity than intact Cell. Owing to influence of interaction between Bacteria and Cell, the gram staining property of Bacteria was changed to gram negative. These evidences suggest that interaction between Bifidobacterium and mucosal epithelial cell of small intestines is mediated by polysaccharide obtained from cell wall of Bacteria and also both phenomena, junction of Bacteria vs Cell and denature of bacterial cell wall may be effected each other.

一般に、ヒトの腸内細菌叢でのビフィズス菌 (*Bifidobacterium*) の占める割合は大きく¹⁾, とくに母乳栄養児では、その占有率は 75% 以下であるとされている²⁾. このように、ビフィズス菌がヒトの腸内細菌叢で大勢をしめている bifidusflora になるためには、腸内でのビフィズス菌の発育などに必要な多くの因子や条件などは重要な因子となる. 一方、ビフィズス菌が他の腸管内常住細菌に比較して、腸管粘膜に対する強い親和性や定着性があることも推定される.

本間らのビフィズス菌の腸管粘膜に対する定着性に関する一連の研究のうちで、マウス胎仔回腸下部の腸管粘膜第2層細胞を培養した細胞系による種々の腸管内常住細菌に対する親和性を検討した報告³⁾によると、ビフィズス菌は、他の腸管内常住細菌に比較して、もっとも腸管粘膜細胞に付着されやすいものであることが明らかに

された.

ビフィズス菌は培養の条件によっては、粘度の非常に高い粘液性の物質を菌体内から分泌させ、培養器のガラス壁にビフィズス菌を包み込みなよろ付着させる現象がみられる. 著者らは、ビフィズス菌から分泌される粘液性の物質は主として酸性ムコ多糖であるとし、それがビフィズス菌の腸管粘膜細胞への親和性を高めている因子の一つであるものと考えた. この仮定をあきらかにする目的で、ブタ胎仔の回腸下部の腸管粘膜第2層細胞を初代培養をした細胞を用い、種々な条件で処理をしたビフィズス菌と腸管粘膜細胞との相互作用について検討を加え、ビフィズス菌体多糖の作用についても検討を行なった.

材料・方法

ビフィズス菌 菌株は *Bif. infantis* SS *infantis* で、寒天を除いた TGC 培地で 48 時間、37°C で培養したビフィズス菌を遠沈して集菌をし、生理食塩水で 3 回、菌を洗浄し、その菌を生理食塩水で 10^9 /ml の菌液になるように調製し、直ちに実験に供した。

抗ビフィズス菌ウサギ抗血清 ビフィズス菌の生菌浮遊液 (10^8 /ml) の 1ml を週 2 回の間隔でウサギに 10 回静注し、最終注射から 2 週間後に全採血し、抗血清を得た。この抗血清の抗体価は 1:32 であった。

多糖溶液 ビフィズス菌液をアセトンで脱水し、乾燥させる。乾燥菌体を 10 倍容の 2% 苛性ソーダ溶液に浮遊させ、37°C で一夜抽出する。抽出液を 0.5 規定塩酸で pH 7.0 近辺に中和してから、トリクロール酢酸を終濃度として 5% になるように加えて除タンパクをする。精製水を透析外液として数日間、透析外液を日に 2 回交替しながら 4°C で透析をする。限外濃縮をして 5% の多糖溶液を調製し、以下の実験に用いた。

試薬 FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) は Hoechst 社のものを使用した。このものの F/P 比は 1.1 である。その他の試薬も市販品を用いた。

ブタ胎仔腸管粘腸第 2 層細胞 分娩予定日の約 30 日前の母親ブタを屠殺後、直ちに胎盤内の胎仔を、無菌的に分取するために胎盤から外界に出さないようにして、2~3 頭の胎仔を羊水と共に胎盤で包み込み、できるだけ無菌的に実験室に搬入した。以後の操作はクリンベンチ内で行なった。胎仔を胎盤内から取り出し、開腹して回腸下部の腸管を採取し、ダルベッコの PBS (ニッスイ) に浮遊させる。その PBS 中で、血管や表層粘膜などを除去し、粘膜第二層細胞を分別採取する。ダルベッコの PBS で数回洗ってから、新しい PBS 中でできるだけ細かく細断し、組織を細胞までにはぐす。遠沈して細胞塊を集め、PBS で数回洗い、イーグル培地 (ニッスイ) に浮遊させ、30 分間静置する。その後、イーグル MEM 培地で、37°C、2 カ月間培養する。培養液は 7~10 日に 1 回、取替えて培養した。

ビフィズス菌の前処理 10^9 /ml のビフィズス菌浮遊液に、等容量の生理食塩水か、10 倍に希釈した免疫前の家兔血清または 10 倍希釈の抗ビフィズス菌ウサギ抗血清を加え、37°C、30 分間静置する。その後それぞれのビフィズス菌を生理食塩水で 3 回洗い、 10^9 コ/ml の菌液に生理食塩水で再調製した。

初代培養細胞の前処理 粘膜第 2 層細胞を培養するとき

に、培養瓶の底に 1×4 cm の大きさに細断したカバーグラスを数個入れて細胞を培養すると、そのカバーグラス表面に細胞が付着して増殖する。そのようにして、細胞が付着したカバーグラスを 2 群に分け、一つの群には生理食塩水、他の群は 5% 多糖溶液を 0.1 ml ずつ上面にのせ、湿箱に入れて 37°C、30 分間静置する。その後、多糖溶液をのせたものは、生理食塩水で数回洗い過剰の多糖を除き、生理食塩水処理群とともに以下の操作を行なった。

培養細胞と菌体の親和性実験 多糖細胞と対照の生理食塩水処理細胞のそれぞれの群に、抗血清などで処理をした 3 群のビフィズス菌液を 0.1 ml のせ、湿箱中で 37°C、30 分間反応させる。反応後、生理食塩水でカバーグラスを洗い、付着しなかったビフィズス菌を洗い流す。それをグラム染色または次に述べる免疫ケイ光法による染色をしてから検鏡する。

免疫ケイ光法 親和性実験を行なった細胞が付着しているカバーグラスに、抗ビフィズス菌抗血清 (ウサギ) 1:10 希釈液 0.1 ml をのせ、湿箱に入れて 37°C 30 分間反応させる。対照として免疫前家兔血清 1:10 希釈液を用いた。反応終了後、生理食塩水で細胞を 3 回洗い、未反応の血清を洗い流す。つぎに、FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体溶液 0.1 ml のせ、湿箱内に入れて 37°C、30 分間反応させる。反応終了後、生理食塩水で細胞を 3 回洗い、反応しないケイ光抗体を洗い流す。風乾させてからケイ光顕微鏡で検鏡する。

結果

ブタ胎仔腸管粘腸第 2 層細胞の初代培養細胞に、ビフィズス菌を反応させて、親和性を検討した成績を Table 1 に示した。グラム染色をして、1,000 倍に拡大して検鏡した結果、ビフィズス菌を抗血清で処理をしたものには親和性はみとめられないが、免疫前家兔血清や生理食塩水で処理をしたビフィズス菌には親和性がみとめられる。培養細胞に多糖を作用させたものは、無処理の細胞よりも親和性大きいことが知られる。

培養細胞に親和性を示したビフィズス菌は免疫前家兔血清での処理菌、生理食塩水での処理菌などは無関係に、グラム染色性が陰性に変化していた。この染色性の変化は、培養細胞に多糖を作用させたものでも、生理食塩水を作用させた細胞でも、いずれれでも親和性を示したビフィズス菌に共通した現象であった。また、培養した細胞ばかりでなく、新鮮な小腸粘膜の第 2 層細胞と親和性を示したビフィズス菌でも、グラム陰性化の現象がみとめ

Fig. 1 Results of immunofluorescence method using FITC labeled anti-rabbit IgG antibody. ($\times 1000$) A is polysaccharide-treated mucosal epithelial cell. B is treated mucosal epithelial cell plus *Bifidobacterium*.

られた。しかし、親和性を示さなかったビフィズス菌と
か、実験に使用した同一ロットの菌はいずれもグラム陽
性であった。

Fig. 1 は多糖類を作用させた培養細胞そのもの(A)
と、その細胞に生理食塩水処理のビフィズス菌を反応さ
せたもの(B)について、免疫ケイ光法を行なった 1,000

Table 1 Affinity* of *Bifidobacterium* to mucosal epithelial cell of small intestines.

Bifidobacterium treated with	mucosal epithelial cell	
	intact cell	treated with poly saccharide
antiserum against Bifidobacterium	—	—
pre-immunized rabbit serum	+	++
saline (native <i>Bifidobacterium</i>) +		++
affinity* : (—) no junction, (+) junction (++) strong junction.		

倍でのケイ光顕微鏡写真である。いずれもケイ光がみとめられ、抗血清が抗原抗体反応を示していることが知られる。対照として免疫前家兎血清を作用させたものはケイ光がみとめられず、家兎血清の非特異的反応がないことが知られた。培養細胞を多糖で作用させたものと、生理食塩水で作用させた細胞についての親和性では多糖を作用させた細胞がより強い親和性を示していた。

考 察

一般に細胞の表面は、それぞれの細胞に特有の酸性多糖で被われており、その糖衣が高度に分化したものが細胞壁であるとする考えがある。グラム陽性菌の細胞壁は、ペプチドグリカンによる3次構造物で出来ており、それが細胞壁の1/2から2/3を占めているものとされている^{5,6)}。グラム陽性桿菌であるビフィズス菌もペプチドグリカンを主成分とし、その性状などについても詳細に検討されている⁷⁾。他方、腸管粘膜も酸性多糖が多い組織であるとされている⁴⁾。

腸管粘膜とビフィズス菌はともに糖衣が発達していて、酸性多糖を多く分泌しているものとし、それぞれの糖衣がおたがいの酸性多糖に対して強い親和性を示すものとすれば、腸管粘膜細胞とビフィズス菌細胞がたがいに親和性を発揮出来るものと推定される。そこでビフィズス菌から分離した多糖を用いて親和性の増強作用を検討したところ、Table 1に示してあるように、多糖を介して親和性が強められていることが知られる。さらに Fig. 1(A)に示されているように、ビフィズス菌の多糖は、初代培養をした粘膜細胞に付着することから、腸管粘膜細胞の表面のある物質と親和性があることが知られる。

ビフィズス菌体の表面を、抗ビフィズス菌抗血清と反応させ、抗体分子で菌体表面を被ってしまうと、Table 1に示したようにそのビフィズス菌は腸管粘膜に対する親和性を消失してしまう。このことは、ビフィズス菌体表面にあり、腸管粘膜細胞との親和性に関係のある、ある物質が抗体分子によって被われてしまうことによる親和性の消失と考えられる。

グラム染色性は、グラム反応をした色素がアルコールによって脱色されるか否かによって区別されており、これは細胞壁の色素透過性に由来するものとされている⁸⁾。粘膜細胞と親和性を示したビフィズス菌は、すべての菌でグラム染色性に変化を示したことは、グラム反応をした色素の細胞壁透過性が亢進したことを示唆している。すなわち、ビフィズス菌が腸管粘膜の細胞と親和性を示すことによって、ビフィズス菌の細胞壁がある種類の変化をもたらし、その結果色素の透過性が亢進してグラム染色性が陰性化したものと推定される。

以上のことから、腸管粘膜にビフィズス菌が定着するためには、ビフィズスの多糖が大きく関与していることが示唆される。また、ビフィズス菌腸管粘膜細胞との相互作用によって、ビフィズス菌細胞壁中の多糖の配位が、部分的にもせよ多少でも変動するために、グラム染色性などを含めたビフィズス菌の細胞壁の物質透過性の変化がみられるものと解釈される。このような物質透過性の変化は、ビフィズス菌の腸管粘膜への定着についての生理的目的によるものと推定されるが興味ある現象である。

ビフィズス菌の菌株を分与して頂いた理研、光岡知足博士に、またブタ胎仔を無菌的に採取し供給して頂いた栃木県食肉衛生検査所の関係者に対して謝意を呈します。

文 献

- 1) Mitsuoka, T.: *Zbl. f. Bakt. I. Orig.*, **210**, 52 (1969)
- 2) 本間 道：ビフィズス菌（本間道、光岡知足、編）p. 160, (株)ヤクルト本社、東京 (1978)
- 3) Homma, N., Isoda, K., Asaka, T.: *Paediat. Univ. Tokyo*, **18**, 45 (1970)
- 4) 太田行人、岡田節人、岡田善雄編：細胞の構造と機能 I（岩波講座、現代生物科学3）p. 24 岩波書店、東京 (1975)
- 5) Salton, M. R. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 495 (1956)
- 6) Kent, L. H.: *Biochem. J.*, **67**, 59 (1957)
- 7) Kandler, O., Lauer, E.: *Zbl. Bakteriolog. Hyg., I. Abt. Orig., A.* **228**, 29 (1974)
- 8) Salton, M. R. J.: *The Bacterial Cell Wall*, American Elsevier Publishing Co., New York, (1964)