

# *Bifidobacterium adolescentis* ATCC15703 の完全長ゲノム構造

The genome structure of *Bifidobacterium adolescentis* ATCC15703

鈴木徹<sup>1</sup>、加納規生<sup>3</sup>、津田佳寛<sup>3</sup>、永野さおり<sup>1</sup>、井上貴道<sup>1</sup>、田中香お里<sup>2</sup>、渡邊邦友<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・ゲノム研究分野

<sup>2</sup> 同・嫌気性菌実験分野、<sup>3</sup> 岐阜大学・応用生物科学研究科

【目的】ビフィズス菌は腸内細菌叢を形成する腸内細菌の一種であり、1899年に Tissier によって健康な母乳栄養時の糞便から嫌気性、グラム陽性、多形成桿菌として初めて分離された。ビフィズス菌は、下痢防止、便秘改善といった整腸作用、免疫活性化作用、皮膚アレルギー低減など多くの健康にプラスの作用を持つことが知られており、いわゆる善玉菌の代表格である。現在までに行なわれているビフィズス菌のゲノムプロジェクトはすべて *infantis* サブグループに関するものであり、ビフィズス菌の全体像をゲノムレベルで把握する上でその他のサブグループのゲノム解析が大変重要であると考えられる。*B.adolescentis* は、*catenulatum* サブグループに属し、1963年に Reuter によって、成人の糞便から分離された。初期の報告から、*B.longum* とともにヒト糞便中に優勢であるということが記載されている。また、プローブや定量 PCR 法を用いたヒト腸内フローラの解析において、*B.adolescentis* は、*B.longum* や *B.catenulatum* と並び、優勢種であることが示されている。ヒトの腸内フローラを理解する上でこれらの菌のゲノム情報は大変重要であると言える。我々は、これらの背景から *B.adolescentis* に注目し、基準株である ATCC15703 株のゲノム解析を行った。今回は、ほぼ完全長のゲノム配列が得られたので報告する。

【実験方法】シーケンシングは、2kbp に切断した DNA をインサートに持つライブラリーを作製し、ホールゲノムショットガン法で行なった。得られたデータのアセンブリには Phred/Phrap、編集には

Consed を用いた。

結果得られたコンティグの連結とコンティグ間の空白域の塩基配列を決定するために、新たに 35kbp に切断した DNA をインサートに持つ Fosmid ライブラリーを作製した。また、GC 含量が高く高次構造をとるような難解読領域については、転写シーケンス(CUGA)を使用してコンティグを連結した。アノテーション作業には三井情報開発の GenomeGambler、比較ゲノム解析にはザナジェン社の XanaGenome を用いた。

【結果と考察】 *B.adolescentis* のゲノム解析結果のまとめを示す。ゲノムサイズは 2.3Mbp で、推定 ORF 数は 2,094、53 個の tRNA、6 個の rRNA オペロンが存在した。推定された ORF の相同性解析からの機能予想の結果、Metabolism に関する ORF 数が 49%、Information storage and processing に関する ORF が 21%、Cellular processes に関する ORF が 14%それぞれ存在した。*B.longum* NCC2705 株のゲノム配列と比較すると *B.longum* には存在するが、*B.adolescentis* には存在しない配列や *B.longum* には全くないが、*B.adolescentis* には存在する配列も見つかった。現段階で、*B.adolescentis* ATCC15703 にしか存在しなかった遺伝子候補は、Information storage and processing に関する ORF が 19 個、Cellular processes に関する ORF が 17 個、Metabolism に関する ORF が 42 個そして Poorly characterized に関する ORF が 17 個あった。両菌株で大きな違いは見られなかったが、*B.longum* 同様さまざまな糖が利用できることを確認した。

ヒト糞便由来ビフィズス菌株の同種内における菌株レベルでの構成と常在性  
Intra-specific diversities and compositions of *Bifidobacterium* species in human feces  
and their long-term succession

大澤朗<sup>1)</sup>、小原友美<sup>1)</sup>、林幸子<sup>1)</sup>、西谷洋輔<sup>1)</sup>、濱塚樹里<sup>1)</sup>、益田義弘<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>神戸大学大学院自然科学研究科、<sup>2)</sup>コメックスバイオテック株式会社

【目的】個々の宿主はその腸内に常在しているビフィズス菌群(固有菌)を持っていると考えられ<sup>1)</sup>、これらの菌の菌種構成や菌株構成は長期間安定して存在し、宿主の健康維持に深く関係していると考えられる。本研究では、ヒト糞便由来ビフィズス菌株の同種内における菌株レベルでの構成とその変動を、68週間にわたるモニタリング試験において10人の成人糞便サンプルから優勢に検出された*B. longum*株と*B. catenulatum* group株に関して菌株レベルでの識別を行い固有菌が存在するのかを確認し、これらの固有菌が長期間にわたり宿主の腸管内に存在するのかを検証したので報告する。

【材料と方法】10代~20代の健康成人10人より2週間に1回、計12回(23週間)及び68週間後の合計13回、糞便を回収し、TOS寒天平板培地にてビフィズス菌様のコロニーを1糞便サンプルにつき10コロニー分離した。これらの菌株の種の同定を16S rDNAを標的としたPCR法にて行った上で、1週目、23週目、68週目のサンプルにおいて、*B. longum*および*B. catenulatum* groupであると同定された株について、PFGEによる系統解析を行い、各系統群(クラスター)の消長を調べた。

【結果】10人全ての被験者からビフィズス菌が分離され、そのうち最も多く分離された菌種は*B. longum*であり、次に多かったのは*B. catenulatum* groupであった。PFGEによる菌株レベルでの遺伝子解析を行ったところ、*B. longum*株、*B. catenulatum* group株ともに個人特有のPFGEバンドパターンを示し、他の被験者と同一のバンドパターンを示した株は存在しなかった。また、1週目、23週目、68週目のPFGE解析をもとにクラスター分類を行った結果、*B. longum*株では全ての被験者が複数クラスター(2~13)からの*B. longum*株を保有しており、同一のクラスターが長期間検出された被験者は10人中8人であった。一方、*B. catenulatum* group株ではモニタリングを通して単一系クラスターのみを保有していた被験者が10人中6人で、複数クラスター(2~3)の株を保有していた被験者は10人中4人であった。同一のクラスターが長期間検出された被験者は10人中7人であった。

【考察】菌株ごとのPFGE解析の結果、各人が個人特異的な菌株を保有していることが明らかとなった。また、同一クラスターの菌株が*B. longum*株では10人中8人、*B. catenulatum* group株では10人中7人の被験者において長期間存在していたことから、各宿主に対して固有の系統群で常在菌が存在することが示された。各個人に常在する菌株は系統的に同一でなくともその常在に寄与する何らかの表現型的特徴を共有しているのかもしれない。

【参考文献】1) Kimura *et al.*, (1997) *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3394 - 3398.

## *Bacteroides* sp. と *Escherichia coli* による胆汁酸の7 $\alpha$ -水酸基に対する酸化還元反応の比較

Comparison of *Bacteroides* sp. and *Escherichia coli* in oxidation/reduction reaction of 7 $\alpha$ -hydroxyl bile acids

小倉嘉夫<sup>1</sup>、武居剛史<sup>1</sup>、山家誠夫<sup>1</sup>、伊藤喜久治<sup>2</sup>、山田一夫<sup>1</sup>、内田清久<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>鳥取大学医学部統合分子医化学分野、<sup>2</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科

[目的] 通性嫌気性菌である *Escherichia coli* K-12 と偏性嫌気性菌である *Bacteroides* sp. は共に7 $\alpha$ -脱水素変換活性をもっている。*E. coli* における7 $\alpha$ -脱水素変換については前々回の本学会で報告した。今回は、ヒト腸管内の嫌気条件での7 $\alpha$ -脱水素変換に対比させるべく、ヒト糞便より85種の嫌気性菌を分離し、それらの7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (7 $\alpha$ -HSDH) 活性をスクリーニングし、その中から活性の高い *Bacteroides* sp. を選び出し、この菌による胆汁酸の変換と *E. coli* による変換を嫌気条件で比較検討した。[方法] *Bacteroides* sp. および *E. coli* は胆汁酸 (0.5 mM) を添加した培地で1-4日間嫌氣的培養を行った。胆汁酸はコール酸 (CA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、7-オキシデオキシコル酸 (7=O-DCA)、7-オキシリトコル酸 (7=O-LCA)、ヒオコール酸 (HCA)、 $\alpha$ -ムリコル酸 ( $\alpha$ -MCA)、グリココル酸 (GCA) を用いた。胆汁酸の測定は内部標準として7 $\beta$ ,12 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid を用いガスクロマトグラフィー (GLC) で分析した。7 $\alpha$ -HSDH の粗酵素の抽出は Macdonald らの方法に従った。[結果] *Bacteroides* sp. は CA および CDCA に対して強い7 $\alpha$ -HSDH 活性を、HCA に対しては中程度の活性を示したが、 $\alpha$ -MCA に対しては活性を示さなかった。嫌気条件での *E. coli* の活性と比較すると、*Bacteroides* sp. の方が酸化活性、つまり7=O胆汁酸生成能が高く、還元反応は弱かった。GCA に対しては *E. coli* は抱合型のままで脱水素反応を示したが、*Bacteroides* sp. は脱抱合後に脱水素反応を示し、グリシン抱合型の7=O-DCA は認められなかった。一方、両菌種から7 $\alpha$ -HSDH の粗酵素を抽出し、NAD<sup>+</sup>を基質として活性を比較した結果、*Bacteroides* sp. では *E. coli* より比活性は低かった。[結語] 以上の成績から嫌気条件では *Bacteroides* sp. に7 $\alpha$ -HSDH 活性が強く認められたが、この菌も *E. coli* 同様に $\alpha$ -MCA に対しては活性を示さなかった。また、抱合胆汁酸に対する7 $\alpha$ -HSDH 活性は *E. coli* と異なり脱抱合後に脱水素化された。 $\alpha$ -MCA は7 $\alpha$ -OHを持つが7 $\alpha$ -HSDH で変換されない胆汁酸であった。

## 乳酸菌による植物リグナンの代謝

### Biotransformation of plant lignans by lactic acid bacteria

近藤直子<sup>1</sup>、中村憲夫<sup>1</sup>、吉村千秋<sup>2</sup>、増山明弘<sup>2</sup>、高野俊明<sup>2</sup>、服部征雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>富山大学和漢医薬学総合研究所資源開発部門薬物代謝工学分野、<sup>2</sup>カルピス基礎研究 FL

【目的】リグナンなどの潜在的エストロゲン様作用物質を摂取することで、更年期障害や骨粗鬆症の予防につながると期待される。リグナンは、動物に摂取された後、腸内細菌によりエストロゲン様作用をもつエンテロジオールやエンテロラクトンへと代謝される。ヒトの場合、腸内細菌叢には個人差があり、同じヒトであっても年齢や食生活、ストレス等の様々な要因により菌種や菌数に変動することから、それに応じてエストロゲン様作用物質の生成量に違いが生ずることが予想される。我々は、乳酸菌により予めリグナンを代謝させておくことで、腸内細菌叢の違いによる代謝能力の差を補えるのではないかと考え、種々のリグナンについて乳酸菌等の代謝活性を検討した。

【方法・結果】リグナンの代謝は、主として糖加水分解反応、脱メチル反応、脱水酸基反応、エーテル開環反応が組み合わされて進行する。本研究では、リグナンとして arctiin、arctigenin、dihydroxyenterolactone、pinoresinol を選択し、牛蒡子、杜仲より単離または化学的に誘導した。また、使用する菌株は *Lactbacillus* 属 (8 菌株)、*Enterococcus* 属 (2 菌株)、*Bacillus* 属 (2 菌株)、*Bifidobacterium* 属 (1 菌株) の 13 菌株とした。各菌株を、37 で 24 時間前培養したものを、液体培地に 1~3% 植菌後、リグナンのメタノール溶液 (終濃度 0.5 mM) と共に 37 で 4 日間培養し、経時的に HPLC, TLC で代謝を確認した。その結果、11 菌株に糖加水分解反応が見られたが、脱メチル化反応、脱水酸基反応は 14 菌株全てにおいて認められなかった。また *L. acidophilus* のみでエーテル開環反応が認められた。そこで *L. acidophilus* 10 菌株 (LA-1~LA-10) と *L. acidophilus* 類縁菌株 (*L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*) 5 菌株について、pinoresinol を用い同様にエーテル開環反応を調べた。その結果、類縁菌株では反応は見られなかったが、*L. acidophilus* では LA-9 を除く 9 菌株で活性が見られた。続いて pinoresinol と構造類似の syringaresinol, medioresinol, sesamin, asarinin についても、*L. acidophilus* がエーテル開環活性を示すかどうか検討したところ、syringaresinol, medioresinol では開環反応が見られたが、sesamin, asarinin では反応は見られなかった。さらに、pinoresinol, syringaresinol, medioresinol についてその反応経路と経時変化を検討し、いずれもエーテル環が 1 つ開環した中間体を經由して diol 体へと変換されることを明らかにした。

【考察】エーテル開環活性は、*L. acidophilus* では 10 菌株中 9 菌株で見られ、*L. acidophilus* 特有の性質であると考えられる。また、エーテル開環反応は pinoresinol, syringaresinol, medioresinol に見られ、sesamin, asarinin には見られないことから、開環反応にはリグナンのフェノール性水酸基の有無が関与していると考えられる。

乳酸を酪酸に変換する腸内細菌のヒト糞便からの分離と *in vivo* における酪酸産生活性  
Butyrate Production in Rat Intestine by Lactate-utilizing, Butyrate-producing Bacteria  
Isolated from Human Feces

佐藤 直；松本 一政；奥村 剛一；内藤 栄一郎；吉田 康人；野本 康二；伊藤 雅彦；  
澤田 治司（ヤクルト中央研究所）

【目的】

健常成人の腸管内には乳酸を産生する細菌が多数認められるが、糞便中に乳酸は殆ど検出されない。一方、ヒト糞便に乳酸を添加すると短鎖脂肪酸が生成する。このことから、ヒト腸管内には乳酸を短鎖脂肪酸に変換する細菌が存在していると考えられる。ヒト腸内で産生される主な短鎖脂肪酸のうち、酪酸は大腸の機能および健康を維持するための重要な生理活性を有している。本研究では、乳酸を酪酸に変換する細菌をヒト糞便から分離し、分離菌のラット腸管内における酪酸産生能力を検証した。

【方法】

DL-乳酸を唯一のエネルギー源とする平板培地に健常成人 10 名から採取した新鮮排便の希釈液を塗抹し、嫌気培養を行った。この乳酸培地に生育したコロニーを同じ組成の液体培地に接種して嫌気培養を行い、培養液中の乳酸の消費量と酪酸の産生量を指標に乳酸を酪酸に変換する活性を持つ菌を選出した。得られた菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定して相同性検索を行った後、近縁種との間で DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い菌種を同定した。

5%ガラクトオリゴ糖水溶液を飲料水として与えたラットに、分離株の生食懸濁液 (*A. caccae* L2 ;  $3.9 \times 10^{10}$  cells/rat) を 1 日 1 回、5 日間連日胃内ゾンデ投与した。糞便および盲腸内容物を回収し、有機酸濃度と菌叢を調べた。

【結果と考察】

平板培地に生育した 288 コロニーの中から乳酸を酪酸に変換する能力が高い菌を 7 株分離した。これら分離株の菌種を同定した結果、これらの菌は *Anaerostipes caccae*、*Megasphaera elsdenii* および *Eubacterium limosum* であることが明らかになった。ガラクトオリゴ糖を摂取させて腸内の乳酸産生量を高めたラットにヒト糞便分離株である *A. caccae* L2 を経口投与した結果、オリゴ糖単独投与群と比較して腸管内の酪酸濃度が有意に増加した。このことから、*A. caccae* L2 が腸管内で乳酸を酪酸に変換したと考えられた。

乳児腸内フローラによる *Escherichia coli* O157:H7 排除機構の解析  
Analysis of the mechanism that control *Escherichia coli* O157:H7 population  
by infant indigenous flora

百瀬愛佳、平山和宏、伊藤喜久治  
(東京大学大学院農学生命科学研究科)

【目的】

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は腸管感染症の原因菌であり、中でも血清型が O157:H7 のものは人の腸炎の主要な原因菌として知られている。乳幼児は *E. coli* O157:H7 に対する感受性が高いが、その理由の一つに、腸内フローラによる感染防御機構がうまく働いていないことが考えられる。本研究では、異なる *E. coli* O157:H7 排除能を示す baby-flora-associated (BFA) マウス (*E. coli* O157:H7 排除能を持つ BFA-3、キャリアとなる BFA-4) を作出し、その BFA-3 と BFA-4 からの分離株を用いて、それぞれの排除能を反映するノトバイオームマウス (GB-3、GB-4) を作製し、*E. coli* O157:H7 排除機構の解析を行った。

【方法】

まず、GB-3 と GB-4 に *E. coli* O157:H7 を投与して消化管各部位を採取し、培養法を用いて *E. coli* O157:H7 菌数の分布を調べた。また、それぞれの盲腸内容物の 50% 懸濁液に *E. coli* O157:H7 を接種し、嫌気条件下での発育速度を調べた。次に、重層法と拡散法により *E. coli* O157:H7 に対する発育阻害物質の検索を行った。さらに、HPLC を用いて GB-3 と GB-4 の盲腸懸濁液中のアミノ酸含有量を解析し、その違いが盲腸懸濁液中での *E. coli* O157:H7 の発育速度に与える影響を調べた。また、BFA の enterobacteriaceae 分離株と *E. coli* O157:H7 との共培養を行い、アミノ酸の競合についても解析した。

【結果】

GB-3 と GB-4 の盲腸以降の部位における *E. coli* O157:H7 の菌数は、GB-3 で有意に低く、また、盲腸懸濁液中での *E. coli* O157:H7 発育速度は、GB-3 で培養初期の発育速度に低下が見られた。GB-3 と GB-4 の盲腸内容物中に、*E. coli* O157:H7 に対する発育阻害物質の存在は確認されなかった。GB-4 と比較して GB-3 の盲腸内容物中で最も含有量が少なかったアミノ酸はプロリンであり、GB-3 盲腸懸濁液中での *E. coli* O157:H7 の発育速度は、プロリンの添加によって促進した。また、BFA-3 から分離された enterobacteriaceae のうち、最も *E. coli* O157:H7 に対する発育阻害作用が認められたのは *E. coli* 1 であり、その阻害作用はプロリンの添加によって減弱した。

【考察】

GB-3 の腸管からの *E. coli* O157:H7 排除は、*E. coli* を始めとする腸内菌と *E. coli* O157:H7 の間でプロリンの競合が起こり、*E. coli* O157:H7 の発育速度を低下させていることがその理由の一つと考えられた。元の BFA-3 でも同様の排除機構が働いているものと考えられる。

## *Lactobacillus gasseri* SP 株の ECM 接着特性と黄色ブドウ球菌接着抑制作用

Adhesion of *Lactobacillus gasseri* SP to ECM and binding inhibition against *S.aureus*.

○瀬戸泰幸<sup>1)</sup>、Jenni Antikainen<sup>2)</sup>、Ritva Virkola<sup>2)</sup>、Timo Korhonen<sup>2)</sup>、中島肇<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>雪印乳業(株)技術研究所 <sup>2)</sup>Helsinki University

### 【目的】

*Lactobacillus gasseri* SP 株は、ヒト腸内に長期間滞在でき、摂取中に腸内の有害菌が減少することが認められている。これらの現象を科学的に裏づけするために、本菌株の ECM 接着特性を調べ、黄色ブドウ球菌の接着抑制作用について検討した。

### 【方法】

スライドガラス上に固定した ECM の上に、*L. gasseri* SP 株の洗浄菌体の懸濁液を重層後、洗浄し、接着性を評価した。また、*L. gasseri* SP 株の表層抽出物をいくつかの方法で調製し、蛍光ビーズにコーティングした後、菌体と同様な方法で ECM への接着性を評価した。接着性が認められた表層抽出物を持ちいて、黄色ブドウ球菌の接着抑制作用について検討を行った。

### 【結果】

ラミニン、コラーゲン I、コラーゲン IV、フィブロネクチンのうちガセリ菌 SP 株はフィブロネクチンに最も高い接着性を示した。菌の表層に接着に関わる分子があると考えられるため、いくつかの方法で表層抽出を試み、抽出物を蛍光ビーズにコーティングして、ECM への接着性を評価した。その結果、ムタノリシンによる表層抽出物が菌体と同様にフィブロネクチンに接着することがわかった。フィブロネクチンに接着する有害菌としては黄色ブドウ球菌がよく知られている。そこで、このムタノリシン抽出物を用いて、黄色ブドウ球菌のフィブロネクチン接着抑制作用が認められるかどうか検討した。その結果、抽出物の濃度に応じて黄色ブドウ球菌の接着菌数が減少し、本抽出物が黄色ブドウ球菌の接着抑制にも働くことが示された。

多剤耐性 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 マウス腸管感染モデルに  
おける、各種乳酸桿菌の経口投与による感染防御作用の比較  
Comparison of anti-infectious activity among *Lactobacillus* strains against multi-drug  
resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in mice

朝原 崇、清水 健介、野本 康二  
ヤクルト中研

【目的】多剤耐性 *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 (DT104)のマウス腸管感染モデルを用いて、種々の乳酸桿菌の感染防御効果を調べた。

【材料と方法】サルモネラ菌の感染；ホスホマイシン (FOM)飲水投与下 (5 mg/ml)の BALB/c (SPF)マウスに、 $10^9$  CFU の DT104 T980023 株 (FOM; MIC 39  $\mu$ g/ml)株を経口感染させた。乳酸桿菌 (FOM 自然耐性);FOM 投与開始翌日から  $1 \sim 3 \times 10^8$  CFU の *L. brevis* ATCC 14869<sup>T</sup>、*L. casei* シロタ株、*L. casei* ATCC 334<sup>T</sup>、*L. plantarum* ATCC 14917<sup>T</sup>、*L. salivarius* ATCC 11741<sup>T</sup>、あるいは *L. rhamnosus* ATCC 7469<sup>T</sup>を感染 21 日目まで 1 日 1 回連日経口投与した。感染防御効果の検討；感染マウスの生存率、体重、盲腸内および脾臓、腸間膜リンパ節に侵襲した DT104 の生菌数、さらに盲腸内の pH、有機酸濃度を測定した。

【結果と考察】DT104 感染対照群では、感染 5 日目以降著しく体重が減少し、9 日目に全マウスが斃死した (n=8)。感染後の腸管内 DT104 菌数は急激に増加し、感染 7 日目には全例で脾臓や腸間膜リンパ節へ DT104 の侵襲が認められた。*L. brevis* ATCC 14869<sup>T</sup>、*L. casei* シロタ株、および *L. casei* ATCC 334<sup>T</sup>投与群では、DT104 感染後の体重減少は全く認められず、感染 21 日目においても生存率は 60%以上であり、感染対照群に比べて感染菌の腸管内増殖や生体内侵襲は顕著に抑制されていた。一方で *L. plantarum* ATCC 14917<sup>T</sup>、*L. rhamnosus* ATCC 7469<sup>T</sup>、*L. reuteri* JCM 1112<sup>T</sup>、あるいは *L. salivarius* ATCC 11741<sup>T</sup>といった乳酸菌株には上記のような感染防御作用は全く認められなかった。感染対照群では腸内環境の攪乱 (pH の上昇、総有機酸、酢酸および乳酸濃度の低下)が顕著であった。一方、感染防御作用が認められた乳酸桿菌株投与群においてのみ、腸内環境の有意な改善が認められた。

【結論】乳酸桿菌の DT104 に対する感染防御作用のメカニズムとして、乳酸桿菌による腸内環境の改善作用に基く DT104 の腸管内増殖、さらにはその生体内侵襲の抑制が重要であると考えられた。

## サルモネラ鞭毛抗原を発現する組換え乳酸菌による感染防御免疫の誘導

Recombinant lactic acid bacteria expressing *Salmonella* flagellin elicit protective levels of immune responses in a murine model

梶川揚申<sup>1)</sup>, 佐藤英一<sup>2)</sup>, 山崎学<sup>1)</sup>, 金台運<sup>1)</sup>, 天野富美夫<sup>3)</sup>, 山本茂貴<sup>1)</sup>, 五十君静信<sup>1)</sup>

1) 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

2) 東京農業大学 応用生物科学部

3) 大阪薬科大学 薬学部

### 【背景】

鶏卵の汚染および食中毒の原因となる *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) の制御は食品衛生における重要な課題である。SE は腸管から体内に侵入し、全身性感染症を起こすことが知られているため、その感染防御には粘膜および全身性の免疫を誘導できる経口ワクチンが有効であると考えられる。本研究では抗 SE 血清と培養細胞を用いた解析から防御抗原を検索し、その抗原たんぱく質を発現する組換え乳酸菌の構築、および作出した組換え乳酸菌のマウスへの経口投与による防御免疫の誘導を試みた。

### 【方法・結果・考察】

SE 死菌体の免疫によって得られた抗血清を用い、Caco-2 細胞への接着・侵入阻害効果を調べたところ、抗血清共存下において明らかな SE の侵入阻止がみられた。この抗血清が認識する SE たんぱく質をウェスタンブロットによって検出した結果、50 kDa 付近に最も強いシグナルが検出された。そこで、このたんぱく質の N 末端解析を行なったところ、鞭毛を構成する flagellin (FliC) であることが確認された。抗 flagellin 抗体を血清から単離し、同様の侵入阻害試験を行なったところ、抗 flagellin 抗体が SE の侵入を阻止したのに対し、抗 flagellin 抗体を除いた血清では効果が見られなかった。この結果から、flagellin を用いた免疫が SE 感染防御に有効である可能性が示された。

次に、flagellin を発現する乳酸菌を作製した。菌体表面発現ベクター pLP401 に鞭毛抗原をコードする遺伝子 *fliC* を挿入し、*Lactobacillus casei* ATCC 393 の形質転換を行なった。FliC の発現および菌体表面固定はウェスタンブロットとフローサイトメトリー解析によって確認した。この組換え乳酸菌は Caco-2 細胞からの IL-8 産生を誘導した。

FliC 発現乳酸菌による SE に対する防御免疫の誘導を評価するため、C3H/HeJ マウスへの胃内投与による免疫を行なった。精製した flagellin を投与した群では、明らかな FliC 特異的な血中 IgG 抗体価の上昇がみられ、分泌型 IgA が確認された個体もあったのに対し、組換え乳酸菌投与群ではわずかに血中 IgG が検出される程度であった。しかし、SE の胃内投与による感染実験では、FliC 発現乳酸菌で免疫したマウスにおいて、脾臓中の SE 菌数が有意に減少していた。これらの結果から、FliC 発現 *L. casei* の経口 (胃内) 投与は SE に対する防御免疫を誘導することが示された。また、本実験において FliC 特異的抗体価と感染防御効果に相関が認められなかったことから、この防御免疫は主に細胞性免疫によるものであることが示唆された。

# ヒト腸管上皮細胞における $\alpha$ -ディフェンシン 2 産生に及ぼすビフィズス菌の影響

## Effect of *Bifidobacterium* on $\alpha$ -Defensin 2 Production in Human Intestinal Epithelial Cell

柴田剛、矢島昌子、寺原正樹、佐野真梨枝、澤田安奈、竹友直生、矢島高二  
明治乳業(株) 研究本部 食機能科学研究所

### 【背景・目的】

ヒトの腸管ではディフェンシンやカテリシジンといった分泌性抗菌ペプチドが、病原細菌に対する自然免疫として重要な働きをしている。ディフェンシンは s-s 結合の位置の違いから、 $\alpha$ -ディフェンシン、 $\beta$ -ディフェンシンなどに分類される。ヒトの腸管では、パネート細胞や好中球から  $\alpha$ -ディフェンシンが、上皮細胞から  $\beta$ -ディフェンシンが分泌される。ヒトの腸管上皮細胞においては、 $\alpha$ -ディフェンシン 2 (hBD2) が、大腸菌やサルモネラなどによって誘導的に産生されている。本研究では、ヒト結腸上皮由来の培養細胞である HT-29 において、ビフィズス菌が hBD2 産生に及ぼす影響について検討した。

### 【方法】

大腸菌 *Escherichia coli* JCM1649T 及びビフィズス菌 (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. pseudolongum*) をそれぞれ培養後、60 60 分処理し死菌体を調製した。96 穴プレートに HT-29 細胞を培養し、各菌体溶液と共培養後、培養上清中の hBD2 濃度を ELISA 法により測定した。

### 【結果及び考察】

*E. coli* JCM1649T 及びビフィズス菌の死菌体溶液 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) を調製し、HT-29 と共培養したところ、*E. coli* JCM1649T でのみ hBD2 産生が誘導され、ビフィズス菌では hBD2 産生はほとんど誘導されなかった。次にビフィズス菌を HT-29 と 5 時間共培養し、ビフィズス菌を洗浄除去後、*E. coli* JCM1649T と共培養した。その結果、HT-29 培養上清中の hBD2 産生は、*E. coli* JCM1649T 単独で培養した場合に比べ、ビフィズス菌で前もって共培養した場合に、強く促進された。特に *B. bifidum* OLB6378 と *B. bifidum* OLB6374 は、hBD2 産生を強く促進した。HT-29 における *E. coli* JCM1649T による hBD2 産生への TLR-4 の影響を調べるため、*E. coli* JCM1649T と抗 TLR-4 抗体を共に HT-29 と培養したところ、抗 TLR-4 抗体濃度依存的に hBD2 産生量が減少し、TLR-4 による *E. coli* JCM1649T の認識が HT-29 における hBD2 産生に重要であることが示唆された。現在、*B. bifidum* による hBD2 産生促進の機作について検討中である。

*Bifidobacterium longum* BB536 の摂取が高齢者の感染防御に及ぼす影響について  
-インフルエンザウイルス感染を中心として-

Effect of ingestion of *Bifidobacterium longum* BB536 on the phylaxis to influenza virus infections in the elderly.

難波和美、旗野美智子、八重島智子、石橋憲雄、高瀬光徳、鈴木邦彦<sup>1)</sup>

(森永乳業・栄養科学研究所、<sup>1)</sup>志村大宮病院)

【目的】高齢者においては、加齢に伴う免疫力の低下が種々の疾患の引き金となるものと考えられる。今回、冬季に問題となるインフルエンザウイルスを含めた感染症に焦点をあて、*Bifidobacterium longum* BB536(以下 BB536)摂取の影響を検討した。

【方法及び結果】茨城県内の介護老人保健施設に入居している 65 歳以上の高齢者 27 名(平均年齢 86.2 ± 5.4 歳)を対象に、無作為化二重盲検並行二群間比較試験を実施した。

試験は 1 包 2g 当り 1,000 億 ( $10^{11}$ ) 個の BB536 を含有する粉末を全員に摂取させ、3 週目にインフルエンザワクチンを接種した。6 週目に被験者をインフルエンザ抗体価に基づいて 2 群(BB536 群及びプラセボ群)に分け、各食品を 14 週間摂取させ、感染症の発症、発熱、抗生剤の投与記録を調査するとともにインフルエンザワクチン抗体価、好中球貪食能・殺菌能、NK 細胞活性等を測定した。その結果、14 週間の観察期間中、BB536 群ではプラセボ群と比較して、インフルエンザの発症数が 0 名対 5 名、発熱者が 2 名対 8 名、抗生剤を使用した人数(延べ人数)が 2 名対 8 名と、各項目ともに有意に低値であった( $p < 0.05$ )。また、BB536 摂取前と BB536 摂取 5 週目の NK 細胞活性と好中球殺菌能が BB536 摂取により有意に上昇( $p < 0.01$ )するとともに、BB536 群では試験終了の 20 週目までその状態を維持したが、プラセボ群では 20 週目には低下した。一方、インフルエンザワクチン抗体価は、BB536 群とプラセボ群間において経時的な差異は認められなかった。

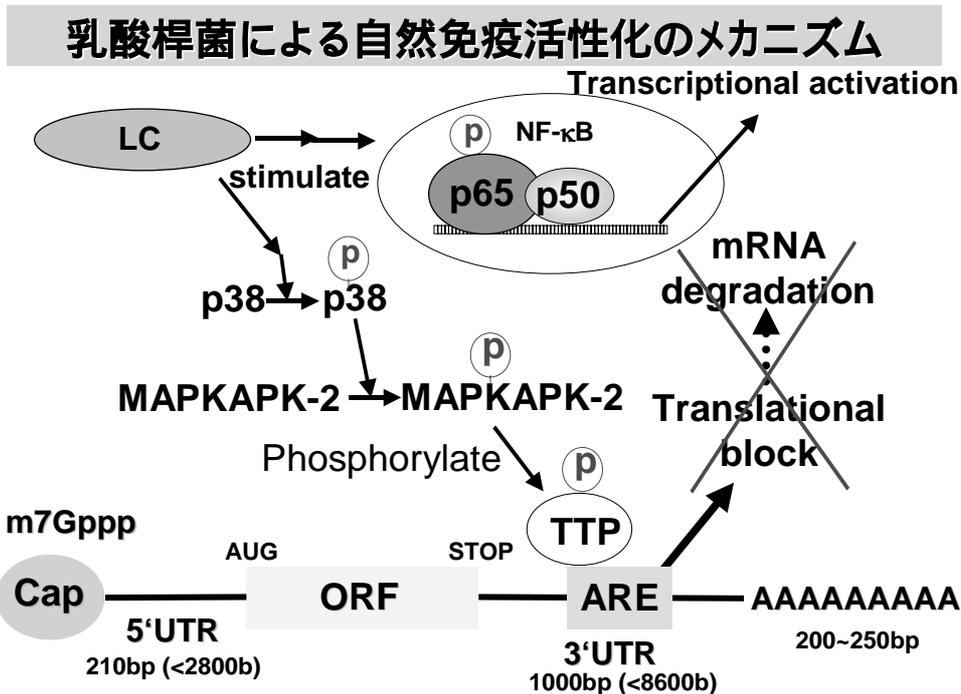
以上のことから、BB536 は自然免疫(Innate immunity)を活性化させることによりインフルエンザ感染を防ぐことが示唆された。

# 乳酸桿菌の自然免疫系賦活作用の解析

## Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase signaling pathways

金 倫基<sup>1,2</sup>、高橋 琢也<sup>3</sup>、太田 俊久<sup>3</sup>、野本 康二<sup>3</sup>、横倉 輝男<sup>3</sup>、岡田 信彦<sup>1</sup>、檀原 宏文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北里大・薬、<sup>2</sup>ミシガン大学、<sup>3</sup>ヤクルト中央研究所)

一部の乳酸桿菌は自然免疫を賦活化することが知られている。強い自然免疫賦活能を有する *Lactobacillus casei* ATCC27139 株 (LC) および LC を変異誘発剤(MNNG)処理して得られた自然免疫賦活能を失った変異株 (LC-J1R) について、自然免疫活性化に関するサイトカインの発現レベルおよびその調節機構に与える影響の差異を比較した。LC の静脈内投与により、マウス脾臓中の TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-18、IFN- $\gamma$ 、TLR2、Nod2 各分子の mRNA や蛋白発現量が増加したが、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-18、IFN- $\gamma$  たん白質は LC 投与群のみで産生され、LC-J1R 投与群では全く産生されなかった。さらに、サイトカイン mRNA の発現上昇や安定性に関する NF- $\kappa$ B、p38 MAPK 系の活性化を比較したところ、LC 投与群では NF- $\kappa$ B p65、p38 およびその下流の MAPKAPK-2(MK2)のリン酸化が持続的に亢進した。一方、LC-J1R 投与群では NF- $\kappa$ B p65 は持続的にリン酸化されていたものの、p38 のリン酸化は一過的であり、MK2 はほとんどリン酸化されなかった。以上の結果から、LC による自然免疫賦活には p38 MAPK 系の活性化が重要であることが示唆された。



## 無菌マウス由来腸管免疫系細胞の抗原特異的なサイトカイン応答に対するマウス常在細菌刺激の影響

The effects of murine commensal bacteria on antigen-specific cytokine production by the intestinal immune cells from germ-free mice.

津田真人<sup>1</sup>、細野朗<sup>1</sup>、柳橋努<sup>1</sup>、八村敏志<sup>2</sup>、平山和宏<sup>3</sup>、梅崎良則<sup>4</sup>、伊藤喜久治<sup>3</sup>、上野川修一<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 日本大学生物資源科学部食品科学工学科、<sup>2</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻、<sup>3</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻、<sup>4</sup> ヤクルト本社中央研究所

### 【目的】

腸管免疫系の発達に腸内細菌が重要な働きをしていることが知られている。特に、無菌マウスでは経口免疫寛容が誘導されにくいことから、腸内細菌は腸管免疫系の抗原特異的な免疫応答の調節に働いていると考えられるが、その詳細は明らかではない。そこで、腸内細菌による刺激が、腸内細菌に未感作な腸管免疫系の免疫系細胞の抗原特異的な免疫応答に与える影響について解析することを目的とした。特に、マウス腸内細菌の中で優勢の細菌種である *Lactobacillus* 属菌と *Bacteroides* 属菌が誘導するサイトカイン応答の比較を行った。

### 【実験方法】

マウス腸内細菌由来の *Lactobacillus* 3 株と *Bacteroides* 3 株をそれぞれ、UV 照射死菌体として調製した。無菌環境で飼育された卵白オボアルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体トランスジェニック (OVA23-3) マウスから、腸管免疫系のリンパ組織であるパイエル板 (PP)、腸間膜リンパ節 (MLN) と脾臓 (SPL) 細胞を採取、調製した。これらの細胞を、それぞれの腸内細菌について、細菌菌体のみ、または OVA を併せて共培養したときのサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p40) 産生量を ELISA 法により測定した。

### 【結果と考察】

細菌刺激のみによるサイトカイン産生について比較したところ、IL-12p40 はいずれの細胞も *Lactobacillus* 刺激の方が *Bacteroides* 刺激に比べて高い産生を示したが、IL-6 は *Lactobacillus* 刺激よりも *Bacteroides* 刺激の方が高産生する傾向がみられた。しかし菌体と OVA 刺激を併せて行ったところ、IL-6 と IL-12p40 の産生においては細菌の違いによる影響はみられず、OVA 特異的 IL-6 と IL-12p40 産生に与える菌体の特異性はみられなかった。一方で、SPL と MLN 細胞においては、細菌菌体みの刺激では *Bacteroides* が *Lactobacillus* に比べて IL-10 を高産生したが、OVA 特異的 IL-10 産生は *Lactobacillus* 刺激の方が強く誘導される傾向がみられた。このことから、SPL と MLN 細胞においては *Lactobacillus* の刺激が抗原特異的な T 細胞応答の調節に強く関与していることが推察された。

*Lactobacillus casei* シロタ株の腸炎粘膜固有層細胞に対する IL6 産生抑制機序における菌体細胞壁成分の解析

Roles of cell wall components in *Lactobacillus casei* Shirota on the down-regulation of IL6 production in colitic lamina propria mononuclear cells

松本 敏<sup>1</sup>、長岡正人<sup>1</sup>、木村一雅<sup>1</sup>、三毛明人<sup>1</sup>、原 妙子<sup>1</sup>、今岡明美<sup>1</sup>、島龍一郎<sup>1</sup>、光山慶一<sup>2</sup>、梅崎良則<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ヤクルト中央研究所、<sup>2</sup>久留米大学医学部第2内科

**【目的】***Lactobacillus casei* シロタ株 (LcS)菌体が大腸炎由来大腸粘膜固有層単核細胞 (mIBD-LPMCs)及び IBD 症例由来末梢血単核細胞 (IBD-PBMCs)からの IL6 産生を抑制し、SAMP1/Yit 系統や慢性 DSS 大腸炎などの慢性腸炎の病態を軽減させる(1)。mIBD-LPMCs に対する LcS の IL6 産生抑制能を他の *Lactobacillus* 菌株と比較した結果、LcS は *L. rhamnosus* ATCC53103(Lr)株等他の *Lactobacillus* 菌株に比して高い IL6 産生抑制活性があった。また、LcS の mIBD-LPMCs や IBD-PBMCs に対する IL6 産生抑制機序には、LcS の細胞壁構成成分である多糖ペプチドグリカン複合体(PSPG)が関与することもわかっている(1)。本実験では、LcS の IL6 産生抑制活性機構を明らかにする目的で LcS 及び Lr 菌株から調製した細胞壁成分(ICW 及び PSPG)の IL6 産生抑制を比較した。また、LcS- PSPG より分画した PSPG-I 及び PSPG-II の IL6 産生抑制機序への関与を解析した。**【方法】**LcS 及び Lr 株を実験に用いた。1. LcS 及び Lr 株より、ICW 及び PSPG 分画を常法により調製し、LPS 刺激 IBD-PBMCs の IL6 産生に対する影響を比較した。また、両菌株より調製した PSPG を添加した mIBD-LPMCs のリン酸化 NF- $\kappa$ B をウエスタン・ブロット法で調べた 2. LcS の PSPG-I 及び PSPG-II 分画と両分画から PG 部分を取り除いた PS-I 及び PS-II 分画物の LPS 刺激マウス IBD-LPMCs 及び RAW 細胞の IL6 産生に対する抑制効果を解析した。3. PSPG-I の IL6 産生抑制活性に対する PSPG-I の糖鎖領域の認識抗体(L8 抗体:Fab2 分画)による PS-I のマスキングの影響を調べた。**【結果】**1. LcS 由来 ICW と PSPG は、IBD-PBMCs に対して IL6 産生抑制活性を示したが Lr 株由来 ICW と PSPG の IL6 産生抑制活性は低かった。また、PSPG の添加により LPS 刺激 mIBD-LPMCs の NF- $\kappa$ B のリン酸化が抑制された。2. LcS より調製した PSPG-I 及び PS-I 分画物に mIBD-LPMCs に対する IL6 産生抑制活性が観察された。一方、PSPG-II 及び PS-II においては IL6 産生抑制活性が認められなかった。3. PSPG-I の IL6 産生抑制活性は、L8 抗体を用いた糖鎖領域のマスキングにより消失した。**【結論】***L. casei* シロタ株細胞表層に存在する PSPG-I の糖鎖が炎症細胞からの IL6 産生抑制機序に重要な役割を果たしていることが推定された。

1. Clin Exp Immunol 2005 v140 p417

## 花粉症関連血中マーカーのシーズン変動および *Bifidobacterium longum* BB536 摂取による花粉症症状および血中マーカーに対する影響

Change of some blood markers during and out of pollen season and effect of *Bifidobacterium longum* BB536 intake on the subjective symptoms and blood markers in subjects of Japanese cedar pollen allergy

○高橋典俊<sup>1</sup>、清水(肖)金忠<sup>1</sup>、近藤しずき<sup>1</sup>、柳澤尚武<sup>2</sup>、小田巻俊孝<sup>1</sup>、岩淵紀介<sup>1</sup>、宮地一裕<sup>1</sup>、岩附慧二<sup>1</sup>、富樫秀生<sup>3</sup>、榎本雅夫<sup>4</sup>

(1 森永乳業食総研、2 森永乳業栄科研、3 とがしクリニック、4 日赤和歌山医療センター)

【目的】我々は 2004 年のスギ花粉シーズンにおいて BB536 配合ヨーグルト摂取による花粉症の自覚症状や血中マーカーの改善作用を見出した。そこで、BB536 による花粉症改善作用およびその作用機序を検証するため、2005 年の春に BB536 菌末を用いた臨床試験を実施した。また、花粉症に関連する血中マーカーの変動を調べるため、スギ花粉非飛散期を含めて通年にわたって採血検査した。

【方法】花粉飛散シーズンにおいて軽中等症の花粉症患者 44 名をランダムに 2 群に割付け、二重盲検により BB536 菌末(500 億/1 包)またはプラセボ粉末を 1 日 2 包計 13 週間(1 月 20 日～4 月 20 日)摂取させた。同時期にスギ花粉症歴を有しないスギ花粉特異的 IgE(JCP-IgE)陰性の健常者 14 名にプラセボ粉末を摂取させた。摂取期間中は鼻アレルギー診断ガイドラインに基づいて毎日の自覚症状や花粉症対策の調査を行い、毎月の採血・採便を行った。さらに、花粉非飛散シーズン(8 月および 12 月)に採血検査を行った。

【結果・考察】花粉飛散に伴い花粉症患者群では全ての被験者が症状を発症した。試験期間中、症状が重くなり花粉症薬を摂取して脱落した被験者数は、プラセボ群 9 名に対し、BB536 摂取群では 2 名で有意に少なかった。1 週目の症状スコアをベースラインにして脱落者を欠測データとし Repeated measures of ANCOVA ミクスモデルを用いて花粉飛散期での各被験者の各自覚症状スコアを群間比較した結果、プラセボ群に対して BB536 摂取群では水状鼻汁、鼻閉の症状が有意に改善され、鼻・目・のどの 6 つの症状を総合した総スコアも有意に低かった。花粉症患者では花粉飛散に伴い血中 IFN- $\gamma$  (Th1 マーカー)が著しく減少、TARC(Th2 マーカー)が有意に上昇、炎症性マーカーである好酸球比が有意に上昇、総 IgE および JCP-IgE が著しく増加した。BB536 を摂取することによって、血中 IFN- $\gamma$  の減少や好酸球比および JCP-IgE の上昇は抑制される傾向にあり、2 月および 3 月において TARC の上昇が有意に抑制され、TARC / IFN- $\gamma$  の比率が有意に改善された。一方、健常者群では好酸球比の変動はなかったものの、IFN- $\gamma$  や TARC が花粉症患者と同様な動きを示し、一部の健常者の JCP-IgE は陰性から陽性に变化した。花粉非飛散期(8 月および 12 月)では、IgE を除くほかの血中マーカーが花粉飛散開始前のレベルに戻ったが、JCP-IgE は 12 月になっても試験開始前のレベルに戻らなかった。

以上の結果から、花粉飛散に伴い、花粉症患者ならびに健常者でも血中 Th1/Th2 のアンバランス化が起きていることが判明した。また、2005 年のスギ花粉の大量飛散によって著しく上昇した JCP-IgE は花粉飛散開始前のレベルに戻り切らず、高値のままで次のシーズンを迎えることとなった。BB536 摂取によってこれら血中マーカーの変動が抑えられ、花粉症症状が改善された。

スギ花粉症患者の腸内細菌叢変動に対する *Bifidobacterium longum* BB536 の抑制効果

Effect of *Bifidobacterium longum* BB536 on change of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during pollen season

○小田巻俊孝<sup>1</sup>、清水(肖)金忠<sup>1</sup>、近藤しずき<sup>1</sup>、坂本光央<sup>2</sup>、宮地一裕<sup>1</sup>、岩附慧二<sup>1</sup>、辨野義己<sup>2</sup>  
(1 森永乳業食総研、2 理研・BRC/JCM)

【目的】我々は昨年、花粉症患者の腸内細菌叢、中でも *Bacteroides fragilis* (以下 *B. fragilis*) グループが花粉の飛散に伴い変動していることを報告した。2005 年の春は健常者との比較を併せ BB536 摂取による腸内細菌叢への影響を解析し、花粉症改善効果の作用機序解明を試みた。

【材料・方法】スギ花粉症患者 44 名を対象に BB536 またはプラセボ粉末を用いた無作為割り付け二重盲検並行 2 群比較試験を実施した (1/20 ~ 4/20)。同時期に健常者 (非花粉症) 14 名はプラセボ粉末を摂取し、毎日の自覚症状調査、毎月の採血・採便を行った。腸内細菌叢の解析には T-RFLP 法及び定量 PCR 法を用いた。T-RFLP 法は 2 組のプライマーセット (27F or 529F +1492R) と 5 種類の制限酵素組合せ (*Hha* I, *Msp* I, *Alu* I, *Hae* III, *Rsa* I+*Xsp* I) により腸内細菌叢の全体像を、グループ特異的プライマーと *Xsp* I+*Hae* III の組合せにより *B. fragilis* グループ解析した。

【結果・考察】BB536 の継続摂取により、花粉症症状の改善効果が認められた。T-RFLP データに基づく主成分分析を実施したところ、花粉の飛散終了時にプラセボ群と健常者群の腸内細菌叢は異なる傾向が観察され、BB536 群はどちらにも重なる分布をしていた。プラセボ群に寄与するピークをデータベースである PAD-HCM 及び TAP-T-RFLP により推定したところ、いくつかの菌種が観察され、昨年変動が認められた *B. fragilis* グループも含まれていた。そこで定量 PCR を実施したところ、昨年同様花粉の飛散に伴い花粉症患者の本菌群は増加したが、健常者では変化が認められず、BB536 摂取群では増加が有意に抑制された。増加が顕著だった花粉飛散終了時の占有率と、自覚症状及び血中スギ特異的 IgE との間には有意な正の相関が認められ、本菌群の花粉症への関与が推察された。*B. fragilis* グループに属する菌種レベルでの解析を行うためにグループ特異的な T-RFLP を実施し主成分分析したところ、本菌群の菌種構成により被験者の花粉症症状は異なることが示唆された。本菌群の変動は花粉症発症の原因とも結果とも取れるが、*in vitro* でのサイトカイン産生パターンが Th2 系に偏っていることから、BB536 摂取による *B. fragilis* グループの増加抑制は、花粉症改善効果の作用機序の一端を担っていると推測している。

## The correlation between GI-tract microbiota and allergy in Japanese infants by molecular analysis

Prapa Songjinda<sup>1</sup>, Jiro Nakayama<sup>2</sup>, Shigemitsu Tanaka<sup>1</sup>, Atsushi Tateyama<sup>1</sup>, Chikako Kiyohara<sup>3</sup>, Taro Shirakawa<sup>4</sup>, Kenji Sonomoto<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Bioresource and Environmental Sciences, Kyushu Univ., <sup>2</sup>Dept. of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., <sup>3</sup>Dept. of Preventive Medicine, Division of Social Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu Univ., <sup>4</sup>Dept. of Health Promotion and Human Behavior, Kyoto University Graduate School of Public Health, <sup>5</sup>Bio-architecture Centre, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.

**Background & Aim:** Colonization of the gastrointestinal tract of the newborn starts immediately after birth and has great influence on the initial development of immune system. However, it has been suggested that increased sanitation and hygiene lifestyles reduced microbial exposure in early life and facilitated the rise in children's allergy in the developed country. In order to realize the correlation between microbiota and allergy crisis in infant, we monitored bacterial composition in feces of a number of infant subjects under epidemiological investigation.

**Methods:** Fecal samples were collected daily until day 5 and monthly until 2 months after birth from 86 infant subjects. Microbial composition was analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) combining with cloning and sequencing methods and a real-time PCR, both targeting 16S rRNA gene in bacterial community.

**Results and Conclusions:** The composition of the predominant bacterial community was quite host specific. However, the dominant bacteria belonging to enterobacteria, streptococci, enterococci, staphylococci and strictly anaerobic bifidobacteria, clostridia commonly presented in fecal bacterial community of tested infants. In some cases of infants without antibiotic treatment in a first few days of life, even though they harbored high levels and various species of bifidobacteria in early life, they developed allergy. But they harbored lower levels of *Enterobacteriaceae* group particularly in a first week of life, which is an important dominant groups found generally in early life. On the other hand, five infants with antibiotic treatment during a first few days of life showed decreased level of bifidobacteria and some other gram-positive bacteria, but higher level of *Enterococcus faecium*, and *Enterobacteriaceae* especially *Escherichia coli*, and two of them subsequently developed food allergy. Furthermore, *Clostridium difficile* was detected in one allergic infants, and bacteria closely related to *Streptococcus equinus* were detected in three allergic infants, but these bacteria were not found in non-allergic tested infants. In addition, in one case of food allergy infant *Bacteroides thetaiotaomicron* was detected highly in earlier. These beginning observations suggested that the gut microbiota composition was different between allergic and non-allergic infants, and even among allergic infants. The antibiotic use in early life not only alters microbiota composition but also may correlate with the development of allergy in some infants. Moreover, the lack of stimulation of LPS from *Enterobacteriaceae* group in early life might be one of the important factors in directing the maturation of immune system in some allergic infants.

Since it is suspected that each bacteria member colonizing the neonatal intestine modulates immune system in different ways, the balance and timing of their colonization would be important for the development of normal immune system. To realize this point, the larger scale of epidemiological study with this kind of microbiota molecular monitoring would be necessary.

---