

## 一般演題 A-25

## ビフィズス菌由来挿入配列TLS143の転移機能の解析

Functional Analysis of Transposition of Insertion Sequence TLS143  
Isolated from *Bifidobacterium longum* 105-A○阪中幹祥<sup>1</sup>, 阿部光紗<sup>1</sup>, 平山洋佑<sup>1</sup>, 吹谷 智<sup>1</sup>, 加納康正<sup>2</sup>, 横田 篤<sup>1</sup><sup>1</sup>北海道大学大学院農学研究院, <sup>2</sup>京都薬科大学遺伝子工学教室

【目的】 ビフィズス菌は宿主との相互作用により, 宿主の健康を増進することが知られている. 一方, 宿主との相互作用に関わるビフィズス菌の遺伝子とその機能については不明な点が多い. 我々は, これらの遺伝子を特定するために, 挿入配列を利用したビフィズス菌ゲノムへのランダム変異導入法の開発を目指している. これまでに我々は, スクロース感受性を付与する *sacB* を転移マーカーとして, *Bifidobacterium longum* 105-A 由来の転移能を有する挿入配列 TLS143 を単離している. TLS143 は IS $\beta$  family に分類される. 本研究では, TLS143 のランダム変異導入法への適性を評価するために, TLS143 の転移に関わる機能 (転移活性, 挿入特異性など) を解析することを目的とした.

【方法】 大腸菌の接合伝達系を利用して, TLS143 の F プラスミドへの転移頻度とその挿入部位を解析した. 本実験系では, 転移マーカーとして, スペクチノマイシン (Sp) 耐性遺伝子を挿入した TLS143 (TLS143-Sp<sup>R</sup>) を使用した. TLS143-Sp<sup>R</sup> を保持するベクターを供与菌 (F<sup>+</sup>) に導入後, F プラスミドを受容菌 (F<sup>-</sup>) へ接合伝達させた. 供与菌内で TLS143-Sp<sup>R</sup> が F プラスミドへ転移すると, F::TLS143-Sp<sup>R</sup> が生じる. これが接合伝達された受容菌は, Sp 耐性試験によって検出可能となる. この系を用いて, 接合完了受容菌の総数に対する, F::TLS143-Sp<sup>R</sup> を保持する接合完了受容菌数の割合として, 転移頻度を算出した.

【結果・考察】 TLS143 の F プラスミドへの転移頻度は  $5.86 \times 10^{-5}$  であった. この値は, 同様の実験系で測定された大腸菌由来 IS629 (IS $\beta$  family) の値より 8 倍以上高かった. また, TLS143 は塩基配列の保存性が低い 3 もしくは 4 塩基を標的として, F プラスミドのランダムな部位に挿入されていた. これらの結果から, TLS143 はビフィズス菌ゲノムへのランダム変異導入法に適した挿入配列であることが示唆された. 現在, TLS143 の転移酵素をコードする ORF 領域を確定するために, 恒常発現型プロモーターを推定 ORF に連結した変異型 TLS143 を構築して, F プラスミドへの転移を確認中である.

**一般演題 A-26****近赤外分光法を用いたビフィズス菌のプロバイオティクス診断****Probiotics Diagnosis of Bifidobacteria using Near Infrared Spectroscopy**中井 薫<sup>1</sup>, ○小柴春樹<sup>1</sup>, 木下こづえ<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>2</sup>, 大澤 朗<sup>2</sup>, R. ツェンコヴァ<sup>1</sup><sup>1</sup>神戸大学農学研究科食料共生システム学, <sup>2</sup>神戸大学農学研究科資源生命科学

**【目的】** 糞便から分離されたビフィズス菌からプロバイオティクス作用をもたらす菌種を同定する方法として、従来ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法が用いられている。しかしながら、PCR法では前処理などに労力がかかること、結果を得るまでにおおよそ1週間ほどの時間を要することが問題とされている。そこで本研究では、迅速・簡便および試料に対して非破壊に測定可能な分光分析である近赤外分光法をこれに応用し、プロバイオティクス作用によるビフィズス菌の識別モデルの構築を行った。

**【方法】** 6種のビフィズス菌 (*B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, および *B. dentium*) を用いて、寒天培地上の単一コロニーから近赤外スペクトルを取得した。

試料作製：MRS 液体培地にて凍結乾燥された菌株を 37℃下で48時間培養した後、TOS プロピオン酸寒天培地に塗抹した。さらに37℃下で48時間培養し、これを試料とした。

近赤外スペクトル測定：近赤外分光器 SAIKA (雑賀技術研究所) を用いて単一コロニー (c = 103) に焦点を当て、暗室にて近赤外スペクトル測定を行った (波長領域660-960 nm)。各コロニーにつき5回連続でスペクトルを測定した (s = 515)。

スペクトル解析：多変量解析 Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) 法および Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) によってプロバイオティクス作用をもたらす2種 (*B. longum* および *B. breve*) の45コロニーとその他4種 (*B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, および *B. dentium*) の58コロニーとの識別を行った。解析には5回連続で測定したスペクトルの平均を用い、解析ソフトは Pirouette 4.0 (Infometrix 社) を使用した。

**【結果と考察】** SIMCA法および PLS-DAの両方において、75%以上の精度でプロバイオティクス作用をもたらす2種と他4種を正しく識別することができた (SIMCA法; モデルセット80%およびテストセット78%, PLS-DA; モデルセット81%およびテストセット75%)。また、識別においては796, 837-841, および898 nmの波長が大きく寄与していた。これらの波長はそれぞれ、水-ラクトース間の相互作用、水分子の振動、および乳酸濃度の予測に関与することが既存の研究から知られている<sup>1, 2, 3)</sup>。本研究の結果から、ビフィズス菌が代謝によって生成する乳酸の情報を近赤外スペクトルが得ることによって、迅速・簡便にプロバイオティクス作用をもたらす菌種を識別できる可能性が示唆された。

**【参考文献】**

1. R Tsenkova, J. 2009 Near Infrared Spectrosc., 17, 303-314.
2. LG Weyer, et al., 1985 Applied Spectroscopy Reviews, 21, 1-43.
3. S Sarannwong, et al., 2008 J. Near Infrared Spectrosc., 16, 497-504.

## 一般演題 A-27

## 肉牛糞便から分離した *Escherichia coli* における抗生物質耐性の解析 Analysis of Antimicrobial Resistance *Escherichia coli* Isolated from Beef Cattle

○山本詩織, 田中みち子, 北川 航, 曾根輝雄, 浅野行蔵  
北海道大学農学院応用生物科学専攻

**【目的】** 薬剤耐性菌は、抗生物質を用いた治療を困難とすることから、医療・食品衛生などの様々な分野において、深刻な問題となっている。畜産現場における幼牛の飼育では、一般的に抗生物質が使用されており、近年、抗生物質の使用による薬剤耐性菌の増加及び多剤耐性菌の出現が際立っている。先行研究では、日本における肉牛の糞便から分離された *E. coli* を用いて、薬剤耐性率及び多剤耐性率が諸外国よりも高い傾向にあることを明らかにした（投稿中）。同時に、多剤耐性菌も多く分離された。本研究では、分離菌の薬剤耐性の由来を明らかにすることを目的とし、薬剤耐性機構を解析した。

**【方法】** 肉牛291頭の糞便から分離した *E. coli* 3,147株のうち、1剤から11剤に耐性を示し、様々な耐性パターンを持つ16株を用いた。アルカリ抽出法によって抽出したプラスミドDNAを用いて、サザンハイブリダイゼーションにより、耐性遺伝子が染色体又はプラスミドのどちらに位置するかを特定した。PCRにより Incompatibility plasmid（以下、Inc プラスミド）を同定し、Inc プラスミド上に位置する耐性遺伝子を特定した。

**【結果】** プラスミドは、各菌株において少なくとも1～6つ保有され、16 kbp以上のプラスミドが1～3つ確認された。検出された16種類中15種類の耐性遺伝子はプラスミド上に位置し、それぞれ1～5つ保有されていた。多種類の耐性遺伝子が同一プラスミド上に位置し、多剤耐性プラスミドの存在を示した。検出した耐性遺伝子は、塩基配列から、既知の耐性遺伝子と高い類似性が見られた。いずれの菌株においても1～5つのInc プラスミドが検出され、15株はF、FIAおよびFIBのいずれかを保有していた。一方、Inc A/Cを保有している菌株は、11剤耐性株のみであった。

**【考察】** ほとんどの株は共通のInc プラスミドを保有していたが、保有するInc プラスミドの種類に多様性が見られ、Inc A/Cが多剤耐性と強く関連していることが推測された。しかし、検出された多剤耐性プラスミドは、必ずしもInc プラスミドではなかった。したがって、薬剤耐性の起源は近似していても、多剤耐性の派生は異なることが示唆された。すなわち、これは薬剤耐性の拡散のメカニズム解明へとつながる。

## 一般演題 A-28

## 野生ゴリラ糞便から単離されたペニシリン高度耐性菌

Isolation of *Enterobacteriaceae* Highly Resistant to Penicillin G  
from Wild GorillaP.P. Mbehang Guema<sup>1</sup>, 土田さやか<sup>2</sup>, 塚原隆充<sup>2,3</sup>, 藤田志歩<sup>4</sup>, ○牛田一成<sup>2</sup><sup>1</sup>ガボン共和国熱帯生態研究所, <sup>2</sup>京都府立大学大学院生命環境科学,<sup>3</sup>栄養・病理学研究所, <sup>4</sup>鹿児島大学農学部

ガボン共和国ムカラバ・ドゥドゥ国立公園では、西ローランドゴリラの観察を中心としたエコツーリズムの導入が企画されている。一部のゴリラグループは、京都大学によって最近の5年間あまりで人付けがなされており、行動や生態以外に、人の接近が与えるストレスの評価など生理的研究も進められている。われわれは、人との接触が増えることによって人からゴリラなどに伝播する可能性がある細菌をゴリラやチンパンジーの糞便由来の抗生物質耐性菌を検索することで評価しようとしている。

現在まで、およそ50株の主としてペニシリンG高度耐性菌 (MIC > 128 ug/ml) を単離している。今回は、初回の採材 (2010年度) に得られた22菌株のうちの3菌株について報告する。

当該国立公園内のブチアナ地区を回遊するグループからゴリラ新鮮糞便試料を採取した。採取後、キャンプに戻ってDHL寒天平板およびBL血液寒天平板に塗抹した。平板培地をポリスチレンの箱内に収用しUshida et al. (2010a) の方法で培養した。キャンプの作業環境が劣悪なため、コロニーの発生が認められたあと採材期間が終了するまで常温保存であった。その後、熱帯生態研究所で単離操作を行い、DNA試料とした。

DNA試料をもとに、16S rDNAの配列から種を同定した。Ushida et al. (2010b) の方法に従い、Real-time PCRアレイ法を用いて抗生物質耐性遺伝子を検索した。その結果にもとづき抗生物質を選択して耐性の程度を確認した。

Real-time PCRアレイによって5菌株由来のDNAにアミノグリコシド系、βラクタム系、テトラサイクリン系抗生物質に対する耐性遺伝子の存在が示唆された。そこで、一旦、培養実験を行ったところ3菌株にペニシリンGに対する高度耐性 (MIC > 128 ug/ml) が認められた。

これら3菌株は、*Enterobacter asburiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* に近縁で、それぞれクラスC (SHV), クラスA (AmpC), そしてクラスA (AmpC) とC (SHV) に属する耐性遺伝子を持つことが示唆された。これらの遺伝子に基づく耐性は比較的古く1960年代から発生が報告されており、今回の結果からムカラバ・ドゥドゥ国立公園の野生ゴリラはすでに高度耐性菌によって汚染されていることが判明した。その汚染経路について今後検討の予定である。

本研究は、JST地球規模課題対応国際科学技術協力プロジェクト (代表 山極寿一) によって実施した。

Ushida et al. (2010a) J.Gen. Appl.Microbiol., 56, 57-60

Ushida et al. (2010b) J.Gen. Appl.Microbiol., 56, 43-52.

## 一般演題 A-29

## 抗生物質の服用による腸内フローラの変動

## Gut Microbiota is Affected by the Antibiotic Administration

谷川加奈<sup>1</sup>, 五味 淳<sup>1</sup>, 曾根春恵, 宮崎幸司<sup>1</sup>, 大草敏史<sup>2</sup>, 狩野光芳<sup>1</sup>, 松木隆広<sup>1</sup><sup>1</sup>株式会社ヤクルト中央研究所, <sup>2</sup>東京慈恵会医科大学附属柏病院

【目的】抗生物質治療は腸内フローラにも影響を与えているものと考えられるが、詳細な解析の報告はごく僅かに限られている。そこで、本研究では抗生物質の服用による腸内フローラの変化を明らかにすることを目的として、以下の試験を行った。

【方法】*H. pylori*陽性健常成人10名に対して1週間、抗生物質であるアモキシシリン、クラリスロマイシンとプロトンポンプ阻害剤であるランソプラゾールを用いた3剤併用療法を行った。抗生物質の服用前、服用中、服用終了4週間後の計3回採便を行い、DAPIカウントによる便中総菌数測定、菌属・菌群特異的プライマーおよび*Bifidobacterium*菌種特異的プライマーを用いた定量的PCRによる菌数測定、便中pHと有機酸濃度の測定を行った。

【結果】フローラ解析の結果、*Bifidobacterium*は抗生物質の服用により有意に減少することがわかった。*Bifidobacterium*のうち*B. adolescentis*の菌数は抗生物質の服用中および服用終了4週間後も殆どの被験者で検出限界値 ( $10^5$  cells/g feces) 以下だった。また、*Atopobium* cluster, *Fusobacterium*, *Veillonella*は抗生物質の服用により減少傾向がみられた。*Enterobacteriaceae*は10名中5名で菌数が10倍以上増加したが、3名では10分の1以下に減少しており、抗生物質への応答が個人ごとに異なることが示唆された。*Lactobacillus*を始めとするその他の菌群は今回用いた抗生物質の影響をほとんど受けなかった。一方、便中有機酸濃度を測定した結果、4名の被験者でコハク酸濃度が顕著に上昇していることが明らかになった。

【考察】*H. pylori*の除菌を目的とした抗生物質の服用によって腸内フローラが変動することが確認され、特にその影響を受けやすい菌群、菌種が同定された。これまで抗生物質による腸内フローラ構成の変化の解明はごく少数の被験者についての報告があるのみで、特定の菌群の変化は明らかにされていなかった。本研究は、抗生物質服用時の腹部の不快感の軽減や腸内フローラに及ぼす長期的な影響を考察する上で基礎的な知見を与えられたい。今後は、*H. pylori*の除菌に伴う*Bifidobacterium*の減少が腸内環境に与える影響の解明や、腸内フローラが回復するまでに要する期間についての更に詳細な解析を行いたい。

## 一般演題 A-30

データマイニングによる乳酸菌製剤の違いと抗菌薬投与時の  
血中菌検出の予防的効果の比較解析Comparison Analysis of Blood Stream Infection Prevention  
between *Lactobacillus* Therapy and Antibiotics Therapy  
by using Data Mining System○松岡喜美子<sup>1</sup>, 横山茂樹<sup>2</sup>, 田尻 仁<sup>1</sup><sup>1</sup>大阪府立急性期・総合医療センター小児科, <sup>2</sup>ケーディーアイコンズ株式会社

【はじめに】抗菌薬投与に対して、耐性菌が、菌の抵抗作用の結果発生する。一方、プロバイオティクス活用の目的は、菌との共生により、治療の安全性（セーフティー）に寄与し、予防効果を期待することである。そこで、当センターでは、1990年初頭から、NSTに先駆けて感染予防の目的で乳酸菌製剤を活用している。

【目的】血中菌検出に関し、抗菌薬投与と乳酸菌製剤の併用効果、さらに乳酸菌製剤の違いによる予防効果に対する乳酸菌投与群と非投与群の2群をデータマイニングで比較解析。

【対象】2005年～2007年の血液培養検査データと患者病態情報、乳酸菌製剤投与、抗菌薬投与情報を以下の群で検討した。

- (1) 乳酸菌投与群：血液培養採取日5日以内の乳酸菌製剤を摂取群と非摂取群
- (2) 抗菌薬投与群：血液培養採取日の抗菌薬投与群と非投与群
- (3) コントロール群：それらを接種しない群

【方法】(1) データマイニング（決定木、If-thenルール）、ロジスティック回帰分析、 $\chi^2$ 検定、オッズ比、調整化残差で比較解析

(2) 解析にはICONS Miner<sup>®</sup>（ケーディアアイコンズ社製）を使用

【結果】(1) 決定木解析：血流感染防止に乳酸菌製剤が最有意の因子として抽出され、ロジスティック回帰分析も最も影響する因子は、「乳酸菌投与有無」で、血流感染予防に効果的である可能性が判明した。

(2) 乳酸菌製剤投与群：特に嫌気性菌が有意に少なかった。

(3) 抗菌薬投与時の血中菌検出時のA乳酸菌製剤 (*Streptococcus faecalis* 3BR含有製剤)、B乳酸菌製剤 (*Streptococcus faecalis*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus mesentericus*) で最も使用頻度が多く、使用頻度が同程度であったこれら二種類の乳酸菌製剤の比較：乳酸菌投与なし群では、嫌気性菌の検出が多く、B菌製剤投与群では、腸内細菌群とブドウ球菌群が検出され、A菌製剤投与では、ブドウ球菌群のみが検出された。

(4) A菌製剤とB菌製剤の血中菌検出率の比較：

①A菌製剤投与により血中菌検出率が低減する菌群は、ブドウ球菌群、嫌気性菌群、腸内細菌群、腸球菌群であった。一方、B菌製剤投与では、ブドウ球菌群、腸内細菌群、腸球菌群が増加するリスクが見られた。

②A菌製剤とB菌製剤の血中菌検出有無のオッズ比：B菌製剤投与群の方が、A菌製剤投与群に比較しオッズ比で1.49倍のリスクが見られた。

③A菌製剤とB菌製剤の血中耐性菌検出有無の比較：B菌製剤投与群とA菌製剤投与群に、有意差は見られなかった。

## 一般演題 A-31

乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー発症の関連性に関する  
コホート調査研究Retrospective Cohort Study on the Correlation between Intestinal  
Microbiota in Early Infancy and Later Allergic Development

○伊佐佳菜子<sup>1</sup>, 是則有季<sup>1</sup>, 鷲尾昌一<sup>2</sup>, 小林貴子<sup>1</sup>, 清原千香子<sup>3</sup>, 古賀泰裕<sup>4</sup>,  
三上克央<sup>4</sup>, 柴田瑠美子<sup>5</sup>, 園元謙二<sup>1</sup>, 中山二郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>聖マリア学院大, <sup>3</sup>九大院・医, <sup>4</sup>東海大・医, <sup>5</sup>国立病院機構福岡病院

【目的】近年、乳幼児のアレルギー罹患率の増加の一因として、乳幼児の腸内フローラの偏倚が疑われている。そこで我々は乳幼児の糞便細菌叢と生後2年間のアレルギー発症の関連性を調査するコホート研究を行ってきた。特に、糞便細菌叢解析に、新しい手法であるピロシーケンサーによる大量16S rRNA遺伝子配列解析をベースとした菌叢解析法を導入し、精密な細菌叢データを蓄積し、アレルギー罹患群と非罹患群との間に有意に存在比の異なる細菌群を見出したので発表する。

【方法】久留米市聖マリア病院にて出生した新生児62人の生後1, 2, 6, 12ヶ月の糞便細菌叢と生後2年間のアレルギー発症（食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、喘息）に関する追跡調査と、福岡市井植病院にて出産した65人の生後1ヶ月の細菌叢と生後2年間のアレルギー発症に関する調査を行った。細菌叢については、糞便より全細菌DNAを抽出し、それを鋳型に、真正細菌を対象とするユニバーサルプライマー（サンプルタグ付き）によるPCRにて、便中の細菌16S rRNA遺伝子を網羅的に増幅させ、そのアンプリコンを次世代型ピロシーケンサーによって大量に解析することで、各細菌群の占有率を求めた。両群間の有意差検定はマンホイットニーU検定を中心に行った。

【結果】聖マリア病院の食物アレルギー罹患群（n=16）は生後1ヶ月時において*Bacteroides*属細菌の占有率がアレルギー非罹患群（n=34）より有意に高く（ $4.68 \pm 8.20\%$  vs.  $0.18 \pm 1.79\%$ ,  $p=0.009$ ）、生後2ヶ月時においては、Proteobacteria門の占有率が有意に低かった（ $16.0 \pm 21.8\%$  vs.  $31.3 \pm 23.9\%$ ,  $p=0.012$ ）。また、生後2年間に何らかのアレルギーを発症した全アレルギー罹患群（n=28）も同様の有意差を示した。さらに、井植病院出生児コホートも加えて解析した結果も同様の傾向が示され、全アレルギー罹患群（n=71）で非罹患群（n=56）に比べて、*Bacteroides*属の占有率が有意に高く（ $3.97 \pm 7.89\%$  vs.  $1.48 \pm 7.64\%$ ,  $p=0.001$ ）、また*Escherichia*属の占有率が有意に（ $4.58 \pm 15.5\%$  vs.  $7.18 \pm 16.6\%$ ,  $p=0.028$ ）低かった。

【考察】生後1ヶ月という早期に*Bacteroides*属細菌が優占種として定着するフローラは後のアレルギー発症に対する危険シグナルであるかもしれない。一方、乳児期のProteobacteria門の定着はアレルギー発症の回避に寄与している可能性がある。ビフィズス菌を主体とする安定した細菌叢が形成される前の新生児期の腸内フローラの偏倚が後のアレルギー発症に寄与している可能性を示す本コホート調査のデータは大変興味深い。