

一般演題 B-6

フィルターを用いたヒト腸内共生菌の単集落分離 Systematic Isolation of New Co-cultured Bacteria in Intestine as Single Colonies

○田中良紀^{1,2}, 西村昭子², 辨野義己²

¹バイオフェルミン製薬株式会社神戸研究所, ²理化学研究所辨野特別研究室

【目的】 ヒトの腸内常在菌の70%以上は未同定菌であり, 現在既知の腸内常在菌は20%強しかない. これらの未同定菌を単集落菌として分離・培養できれば, 新たなプロバイオティクスとして利用, 代謝産物の活用, 病気の予防や治療法の開発などが可能となる.

腸内常在菌の大部分が未分離・未同定のままである理由の一つとして, 腸内環境における腸内常在菌同士の共生関係の存在にあると考えられる. そこで本研究では, 複数の菌同士を上下の軟寒天培地内に挿入したフィルターを介して共培養することにより腸内環境における共生関係を再現することに成功した. それにより, これまで培養できなかった共生菌の単集落形成を可能にした.

【方法】 通常の1.5%寒天平板培地層上に0.4%軟寒天培地層(下層)を重層し, そこへ底部が孔径0.22 μmフィルターのリングを乗せ, リング内に0.4%軟寒天培地層(上層)を作製した. 各上下の軟寒天培地層へ, 予め菌を混釈することで両菌の共生環境を再現した.

【結果】 我々が分離した新規菌株 *Parabacteroides* sp.157 および *Phascolarctobacterium* sp. 377 は, 分離後の継代培養が困難であったが, 本システムを用いてフィルター上層軟寒天培地にそれぞれの菌を, 下層にはヒト糞便由来腸内常在菌懸濁液や *Bacteroides dorei*, *Bacteroides fragilis* を混釈し共培養を行ったところ, 上層のいずれの未同定菌株も肉眼で確認可能な大きさの単集落形成が認められた. さらに, *Bacteroides fragilis* は *Phascolarctobacterium* sp.377 の増殖を促進する一方で, 自身は新規菌株 *Sutterella* sp.252 により増殖が促進されることが明らかとなり, 腸内常在菌同士の多段階の共生関係が存在することを明らかとした.

【考察】 従来, 新規菌株を分離しても継代不可能な菌が多く存在したが, 本研究により, 継代可能とするシステムを開発した. これは腸内細菌に限らず広く利用可能である.

また, 他の細菌と共生関係を有する細菌を単集落形成させて分離可能にしたことは, 菌を個別に利用可能にすることを意味し, その意義は大きい.

一般演題 B-7

rRNAを標的とした定量的RT-PCR法による健常成人の
糞便中*Clostridium difficile*の定量Sensitive Quantification of *Clostridium difficile*
by Quantitative RT-PCR Targeting rRNA Molecule

○松田一乗¹, 辻 浩和¹, 朝原 崇¹, 高橋琢也¹, 久保田博之¹, 永田 智², 山城雄一郎², 野本康二¹
¹株式会社ヤクルト本社中央研究所, ²順天堂大・医

【目的】 *Clostridium difficile*は抗生剤誘導下痢症および腸炎の原因菌として重要である。本菌の検出には、主に選択培養法、細胞毒性試験、免疫学的検査法が用いられているが、検出感度が低い、迅速性に欠けるなどの問題を有している。一方、一昨年度の本大会において我々は、細菌のrRNAを標的とした定量的RT-PCR法(1-3)により糞便中の*C. difficile*を高感度に定量可能であることを報告した。本報告では、定量的RT-PCR法により健常成人糞便における*C. difficile*の分布を解析し、それを従来法による結果と比較した。

【方法】 高齢者施設の入所者83名(平均年齢 85±8歳)、同施設の従事者19名(同 36±10歳)、および一般生活者63名(同 41±11歳)から糞便を採取した。糞便から抽出された総RNAを鋳型として*C. difficile* 23S rRNAに特異的なプライマーを用いた定量的RT-PCR解析を行い、糞便中の*C. difficile*数を測定した。同検体を選択培養法および定量的PCR法により解析し、定量的RT-PCR法による測定結果と比較した。

【結果】 高齢者施設の入所者および従事者の糞便を調べた結果、定量的RT-PCR法によりそれぞれ43% (平均菌数 10^{4.0}個/g糞便)および16% (平均菌数 10^{2.2}個/g糞便)の被験者から*C. difficile*が検出され、この結果は選択培養法(入所者, 18%; 従事者, 5%)および定量的PCR法(入所者, 18%; 従事者, 0%)によるものよりも顕著に高かった。一般生活者グループにおいては、定量的RT-PCR法により13% (平均菌数 10^{4.9}個/g糞便)の被験者から本菌が検出された。

【考察】 定量的RT-PCR法は糞便中の*C. difficile*を従来法よりも高感度かつ正確に検出し得る方法であると考えられた。また、本手法を用いた解析により、高齢者施設入所者での*C. difficile*検出率は他の集団におけるそれよりも高頻度であることが示唆された。

【引用文献】

- 1) Matsuda et al. 2007. Appl Environ Microbiol 73 : 32-39.
- 2) Matsuda et al. 2009. Appl Environ Microbiol 75 : 1961-1969.
- 3) Kubota et al. 2010. Appl Environ Microbiol 76 : 5440-5451.

一般演題 B-8

ビフィズス菌における遺伝子破壊法の構築

Targeted Gene Knockout Method in *Bifidobacterium longum*

○坂口広大¹, 賀 建龍¹, 船岡宣孝², 保母阿也², 谷 沙織³, 加納康正⁴, 光永 徹³, 鈴木 徹¹

¹岐阜大学大学院連合農学研究科, ²岐阜大学応用生物科学部,

³岐阜大学大学院応用生物科学研究科, ⁴京都薬科大学

【目的】 *Bifidobacterium longum* NCC2705や*B. adolescentis* ATCC15703をはじめ数種の菌株においてゲノム情報が解析されている。遺伝子機能解析を行うためにはシャトルベクター、効率的な形質転換法、遺伝子発現および遺伝破壊法などの遺伝子組換えツールを用いた逆遺伝学的なアプローチが必要である。シャトルベクター、効率的な形質転換法、選択マーカーなどが報告されているが、効率的な遺伝子組換え技術は未だ利用できる状況になく、遺伝子破壊に成功した報告は少ない。そこで、簡便かつ効率的に遺伝子破壊株を作出するために、本研究では効率的な遺伝子破壊法の構築を試みた。

【方法・結果】 1. *pyrE* 選択マーカーを利用した遺伝子破壊法：プラスミドを介した相同組換えにより *B. longum* 105-Aの *pyrE* 遺伝子破壊を行った結果、5-FOA^rを示す *pyrE* 遺伝子破壊株 ($\Delta pyrE$) を取得することができた。MRS培地を用いて $\Delta pyrE$ 株の表現型試験を行ったが、ウラシル要求性を確認することはできなかった。作製した最少培地BMMを用いて同様に試験したところ、ウラシル要求性を判別することができた。作製した $\Delta pyrE$ 株および選択マーカーとして *pyrE* 遺伝子を利用して標的遺伝子の遺伝子破壊を行った結果、簡便かつ短期間に遺伝子破壊株を作出することができた。

2. 温度感受性 (*Ts*) プラスミドを利用した遺伝子破壊法：エラープローンPCR法による変異導入を行い、*B. longum* 105-Aの *Ts* プラスミドの作製を行った。スクリーニングを行った結果、42℃では生育できない温度感受性変異株を取得することができた。変異株から抽出した *Ts* プラスミドを pKO403 とした。効率的な遺伝子破壊を行うために、*Ts* プラスミドを用いて相同組換えの頻度を測定したところ、相同配列が長くなるにつれて、相同組換えの頻度が指数関数的に増加するという結果が得られた。この結果に基づき、標的遺伝子の遺伝子破壊を行ったところ、破壊株を1.8%の高効率で取得することができた。

【考察】 ビフィズス菌において効率的な遺伝子破壊を行うことができない原因の一つとして、相同組換え頻度の低さが挙げられる。*Ts* プラスミドを用いた相同組換え頻度の測定実験から、およそ1.0 kbの相同配列を用いることで相同組換え体を十分な頻度 (10^{-3} integrations per cell) で取得できたことから効率的な遺伝子破壊が望めた。

本研究で構築した遺伝子破壊法を用いることで、他のビフィズス菌株における遺伝子破壊株の作出、ならびに選択マーカーをリサイクルすることで連続的な遺伝子破壊を行うことができると思われる。

一般演題 B-9**ラットを宿主としたセグメント細菌に対する免疫応答****Immunological Responses to Segmented Filamentous Bacteria
in Ex-germfree Rats**長森 隆^{1,2}, 今岡明美¹, 安藤 稔¹, 瀬戸山裕美¹, 石川英司¹, 〇梅崎良則¹¹株式会社ヤクルト中央研究所, ²麻布大学

〔目的〕 マウスにおけるセグメント細菌 (SFB, Segmented filamentous bacteria) の定着は種々の免疫応答を誘導し, その中にはTh17細胞誘導も含まれる. 我々はすでにマウスとラットからSFBを分離し (それぞれmSFBとrSFB), 単独定着動物として維持している. これらmSFBとrSFBの全ゲノム塩基配列はすでに決定されたが (Cell Host & Microbe, 10: 273, 2011), SFBがどのような機構で免疫システムを誘導するかについては依然として不明な点が多い. しかしSFBの免疫誘導には宿主特異性が認められ, このことは免疫誘導機構を解析する一つの手掛かりになると期待し研究を進めている. マウスを宿主にしたmSFBとrSFBのTh17を含む免疫誘導の違いについては昨年の本学会シンポジウムで発表した, 今回はラットを宿主にしたときの両SFBの定着と免疫応答について報告する.

〔方法〕 BALB/cマウス及びF344ラット由来のSFBをそれぞれ既報のごとく調製した. これらのSFBを無菌ラット (F344) に単独定着させ, 上皮細胞のMHCクラスII発現は免疫組織化学, TCR α IELの増加とIgAの分泌量は常法にしたがい解析した. SFBの密度はPCR法, 腸上皮細胞への接着は走査顕微鏡で観察した.

〔結果と考察〕 両SFBを無菌ラットに経口投与すると, mSFBの場合もrSFBと同様に便中に高密度で排出されてくるが, その排出量がMaxに達する時間はrSFBの方が早く, rSFBのほうが生理的宿主であるラットには早く定着すると推定された. 排出量がMaxになった時点 (4週後) で腸各部位のSFB密度を調べると, 両者に顕著な違いは認められなかった. 免疫応答を調べると, mSFB定着でもrSFBよりひどいものの腸内でのIgA応答が認められ, 4週後のTCR α IELの増加や小腸上皮細胞のMHCクラスII分子の発現はほぼ同じであった. 一方, すでにマウスにおいてはrSFBはコロナイズするが小腸上皮細胞への強い接着が認められず, Th17をはじめとする免疫誘導も認められないことより, 上皮細胞への強い接着が免疫誘導の引き金になっていると推定している. あらたにラットにおいて小腸上皮細胞へのSFBの接着を調べたところ, rSFBの強い接着のみでなく, mSFBも頻度は極めて少ないものの上皮細胞への強い接着が認められたことより, ラットでの上皮細胞のMHC II発現, TCR α IELとIgAの増加についてもSFBの上皮細胞への強い接着が関与していると推定した. Th17誘導については現時点で不明であり, 今後に残された課題である.

〔結論〕 ラットにおいては, mSFBも頻度は少ないが上皮細胞への強い接着を伴ってコロナイズし, IELのリクルートやIgA産生を誘導した.

一般演題 B-10

DSS腸炎マウスの病態形成過程における腸内細菌由来TLRs刺激能の動態

Characterization of TLRs -stimulatory Potential of
Colonic Microflora during Colitis Progression

○大坂利文, 早崎淳貴, 三木硬介, 常田 聡

早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻

【目的】炎症性腸疾患の発症機序解明および病態制御を行う上で、腸内環境因子と宿主の相互作用の解明は重要な位置づけにある。大腸炎モデルマウスのひとつであるデキストラン硫酸塩（DSS）腸炎モデルマウスは、DSS投与の中止とともに、腸炎から回復するという特徴を持つ。しかし、病原細菌センサーとして知られるToll様受容体（TLRs）からのシグナル伝達が不能になったマウスや抗生物質により常在細菌を排除したマウスでは、DSS投与休止後も大腸炎が回復することなく、重篤化することが報告されている。つまり、常在細菌のTLRsを介した免疫刺激が大腸炎の緩解誘導・維持に重要な役割を果たすことが示唆される。そこで本研究では、腸内細菌叢の違いが腸炎の病態と細菌由来の自然免疫刺激能に与える影響を評価した。

【方法】2% DSSにより大腸炎を誘導したマウス（C57BL/6, 日本クレア）に対して、様々な抗生物質を投与することで、腸内細菌叢の違いが腸炎の病態に与える影響を評価した。腸炎の病態が異なるマウスから採取した糞便について、16S rRNA遺伝子を指標とした腸内細菌叢の解析、および腸内細菌由来のTLRs刺激能の動態解析を行った。TLRs刺激能は、NF- κ Bレポーター細胞株を用いて評価した。

【結果】投与した抗生物質の種類により、DSS腸炎の病態の進展に大きな違いが見られた。メトロニダゾール投与群では大腸炎の抑制効果は見られなかったに対し、バンコマイシン投与群やリンコマイシン投与群では、大腸炎の進行が抑制された。細菌叢解析の結果、腸炎の重篤化抑制群では高力価LSPをもつ *Enterobacteriaceae* 科の細菌が顕在化していることを確認した。RAW264- NF- κ Bレポーター細胞株を用いて、腸内細菌叢が有する自然免疫刺激能を評価したところ、腸炎の重篤化抑制群の糞便に強い自然免疫刺激能が確認された。

【考察】DSS大腸炎の病態形成は、急性炎症を主体とすることから、腸内細菌による強い自然免疫刺激が大腸炎の重篤化を導くことを想定していたが、予想に反して大腸炎の重篤化を免れたマウス群の腸内細菌に強い自然免疫刺激能（とくに、TLR4刺激能の増加）を確認した。つまり、この強い自然免疫刺激性を介した細菌-宿主間の相互作用が、大腸炎の抑制に寄与することが示唆される。