

一般演題 A-1

乳酸桿菌による自然免疫賦活化作用に関与する遺伝子の同定

Transposon mutagenesis of probiotic *Lactobacillus casei* identifies the asparagine synthetase gene *asnH* that contributes to activation of innate immunity

○ 伊藤雅洋¹, 金 倫基¹, 辻 浩和², 高橋琢也², 木脇真祐美², 野本康二², 檀原宏文¹, 岡田信彦¹
¹北里大学薬学部微生物学教室, ²(株)ヤクルト中央研究所

【目的】プロバイオティクスの有する有益作用のひとつに自然免疫賦活化作用が挙げられる。本研究では、本作用発現メカニズムを明らかにするため、免疫賦活化作用に関与する遺伝子の同定を試みた。

【方法】*L. casei* ATCC 27139 はマウスにおいて自然免疫賦活化作用を示すが、J1 フェージに対する耐性変異株では同作用が著しく低下していることが明らかにされている。本研究では、*L. casei* ATCC 27139 のトランスポゾン挿入変異株 9,408 株より J1 フェージ耐性変異株を選択分離し、トランスポゾン挿入部位の解析を行った。各遺伝子変異株についてマウスリステリア初期感染防御能および IL-12, TNF- α および IFN- γ 産生誘導能を調べ、自然免疫賦活化作用の有無を明らかにした。また、得られた免疫賦活化能欠失変異株のペプチドグリカン構造について、グラム染色像、リゾチーム感受性およびアミノ酸組成を解析し、野生株と比較した。

【結果】*L. casei* ATCC 27139 のトランスポゾン挿入変異株 9,408 株より J1 フェージ耐性変異株 9 株を選択し、同感受性を規定する3つの遺伝子 *asnH*, *dnaJ* および *dnaK* を同定した。得られた変異株のうち、*asnH* 変異株のみ感染防御作用およびサイトカイン産生誘導能は欠失しており、*asnH* 相補株では野生株と同程度に復帰した。*asnH* 変異株は野生株とは異なりリゾチーム感受性を示し、グラム染色像ではグラム陰性菌様の赤色を呈していた。ペプチドグリカンのアミノ酸組成解析では変異株においてアスパラギン酸モル比の減少が認められた。

【考察】*L. casei* ATCC 27139 の *asnH* 遺伝子は自然免疫賦活化作用に関与することが強く示唆された。AsnH は J1 フェージ感受性および自然免疫賦活化作用のみならず、ペプチドグリカンのペプチド合成に関与する可能性が示され、*asnH* 変異株では緻密なペプチドグリカン構造が失われ、細胞壁構造が大きく変化していることが示唆された。

一般演題 A-2

腸内細菌代謝産物を介した大腸上皮細胞の炎症応答抑制

Modulation of the epithelial inflammatory response
by commensals-derived metabolites

○大坂利文, 松浦 諒, 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】腸管上皮細胞は大多数の腸内細菌に対しては炎症応答を誘導しないが、病原性細菌に対して効率的な炎症応答を誘導する。つまり、腸内細菌と腸管上皮細胞との間には炎症応答を制限・抑制する機構が発達していることが考えられる。現在までに、乳酸菌やビフィズス菌のもつ抗炎症能が報告されてきたが、その他の腸内常在細菌においても強い抗炎症能を有する可能性が考えられる。そこで本研究では、糞便から分離した系統分類学的に多岐に渡る細菌 (ex. *Bacteroides* 属, *Bifidobacterium* 属, *Clostridium* 属, *Enterococcus* 属, *Eubacterium* 属, *Lactobacillus* 属, *Staphylococcus* 属など) から抗炎症細菌を探索し、抗炎症細菌と腸上皮細胞との相互作用について解析を試みた。

【方法】腸上皮細胞における NF- κ B の活性化をモニタリングするために、NF- κ B - Luc レポーター遺伝子を安定発現する腸上皮細胞株 (HT-29) を樹立した。この NF- κ B - Luc レポーター株を TNF- α (1 ng/ μ l) による単独刺激したときの NF- κ B 活性化値を基準に、熱処理菌体もしくは細菌培養上清の抗炎症能を評価した。さらに、GeneChip を用いて、強力な抗炎症能が見られた細菌培養上清を曝露したときの腸上皮細胞株 HT-29 の mRNA 発現動態の比較解析を行った。

【結果】供試した *Bifidobacterium* 属や *Clostridium* 属の熱処理菌体からは抗炎症細菌は見出されなかったが、*Bacteroides* 属, *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属の熱処理菌体に有意な NF- κ B 活性抑制能 (19 ~ 51%) が確認された。一方で、*Lactobacillus* 属, *Enterococcus* 属, *Staphylococcus* 属, *Bacteroides* 属, *Ruminococcus* 属および *Bifidobacterium* 属の培養上清は、強力な NF- κ B 活性抑制能 (49 ~ 99%) を有していた。現在までに、培養上清に含まれる熱安定な低分子物質 (3kDa 以下) が抗炎症応答のトリガーとなっていることが明らかとなった。また、抗炎症能が見出された 4 菌種 (*Ruminococcus* sp., *Enterococcus cecorum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bacteroides thetaiotaomicron*) の培養上清を曝露した HT-29 細胞を GeneChip 解析したところ、*Ruminococcus* sp. の培養上清を曝露した HT-29 細胞は、他の 3 菌種の培養上清を曝露した場合とは大きく異なる遺伝子発現プロファイルを示した。

【考察】腸上皮細胞の炎症制御は、腸内共生菌の菌体成分と腸上皮細胞との直接的な接触を介した相互作用だけでなく、系統分類学的に多岐に渡る細菌が産生する多様な代謝産物も腸管の恒常性維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

一般演題 A-3

ガラクトオリゴ糖は腎不全モデルラットの腸内細菌を変化させ
尿毒素減量と腎機能・組織障害改善をもたらす

Galacto-oligosaccharide modifies the gut microbiota of CKD model rat,
lowers the serum concentration of uremic toxins and
improves the renal dysfunction and tissue injury

○鶴沼 智¹, 大瀬貴元¹, 城 愛理¹, 重久 晃²,
川上幸治², 松木隆広², 長南 治², 南学正臣¹
¹ 東京大学腎臓・内分泌内科, ²(株)ヤクルト本社中央研究所

【目的】慢性腎障害の中心となる病態は尿細管間質障害である。我々はこれまで、腎不全で蓄積する尿毒素それ自体が酸化ストレスや小胞体ストレスを介して尿細管障害を引き起こすことを報告してきた。今回、代表的尿毒素のインドキシル硫酸 (IS) や *p*-クレジル硫酸 (PCS) を産生する腸内細菌に注目し、腎不全での腸内細菌叢の変化と、ビフィズス菌の増殖効果が報告されているガラクトオリゴ糖 (GOS) 投与による細菌叢への介入が腎機能に及ぼす影響を調べた。

【方法】慢性腎障害のモデルである 5/6 腎摘ラットを疾患惹起 2 週後に通常飼料群と GOS 飼料群に分け、2 週間の GOS 投与後に尿毒素、盲腸内細菌叢、腎機能、腎障害を評価した。

【結果】腎機能の指標となる血清尿素窒素 (BUN) は、通常飼料疾患群より GOS 群で有意に低下した。盲腸内容物中の IS の前駆体であるインドールは通常飼料疾患群より GOS 群で有意に低下し、血中 IS、PCS も通常飼料疾患群より GOS 群で有意に低下した。腎組織では通常飼料疾患群より GOS 群で有意に炎症細胞とマクロファージは減少し、線維化は改善した。腸内細菌叢を定量的 PCR 法で評価した 13 菌群のうち、*Bifidobacterium* が sham 群より疾患群で減少傾向が見られ、GOS 投与により有意に増加していた。

【考察】5/6 腎摘ではビフィズス菌群の減少を認めたが、GOS 投与で回復した。GOS 投与による腸内環境の改善で血中の尿毒素が減少し、尿蛋白が改善、腎組織の障害も改善したと考えられる。

一般演題 A-4**免疫抑制剤による下痢症に対するプロピオン酸菌 ET-3 株の効果****The effect of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 against the diarrhea induced by immunosuppressant**

○利光孝之, 北純子, 古市圭介, 池上秀二, 伊藤裕之
(株)明治研究本部食機能科学研究所

【目的】 免疫機能の低下を介した腸内菌叢の乱れは過敏性腸症候群 (IBS) の原因の 1 つであると考えられており, 免疫抑制剤の投与によって下痢が誘発されることがわかっている. また, プロピオン酸菌およびその発酵物には整腸作用が示されており, IBS を改善するプロバイオティクスとしての可能性が期待される. そこで, 本研究では, 免疫抑制剤によって下痢を誘発したマウスにプロピオン酸菌を投与し, 腸内菌叢や免疫機能の変動を調べることを目的とした.

【方法】 免疫抑制剤である FK-506 をマウスに 2 週間腹腔内投与し, 同時にプロピオン酸菌 *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 株 (ET-3) の生菌体を 2 週間経口投与した. マウスは個別飼育し, 4 段階の便性スコアを毎日記録することにより下痢症状の程度を評価した. 解剖時に採血を行い, 血中 LPS 濃度およびサイトカイン濃度を測定した. また, 結腸, 回腸, および空腸の内容物を採取し, q-PCR 法による菌叢解析および sIgA 濃度の測定を行った. さらに, 脾臓細胞の免疫機能や腸管のバリア機能に関わるマーカーについても解析を行った.

【結果】 FK-506 をマウスの腹腔内に投与することにより, 慢性的な下痢が誘導されることが確認され, ET-3 の共投与によって下痢症状が緩和された. FK-506 の投与により腸管各部の菌叢が変動することが確認され, 腸管の機能に影響を及ぼしている可能性が考えられた. しかし, ET-3 の投与による腸内菌叢への有意な影響は見られなかった. 一方で, FK-506 の投与により血中の LPS 濃度は有意に増加し, 血中の Th1 型サイトカイン濃度は有意に減少したが, ET-3 の投与によってこれらの変動が抑制された. また, ET-3 の投与によって腸管の sIgA 濃度が有意に増加し, 腸管のバリア機能の指標であるタイトジャンクション構成因子の発現も有意に増加した.

【考察】 免疫機能低下による IBS のモデルとして, FK-506 を投与した動物が利用できる可能性が示唆された. また, プロピオン酸菌発酵物の整腸作用は IBS 患者を対象としたヒト試験でも確認されており, これは免疫機能の改善や腸管バリア機能の強化を介した効果である可能性が示唆された.