

一般演題 A-1

メンブランフィルター法を用いた *Lactobacillus acidophilus* および *Bifidobacterium longum* のヒト腸内菌叢に及ぼす影響に関する研究Membrane filter method to study the effects
of *Lactobacillus acidophilus* and
Bifidobacterium longum on gut microbiota○清水秀憲^{1,2}, 辨野義己²¹日東薬品工業株式会社, ²独立行政法人理化学研究所 辨野特別研究室

【目的】 ヒト腸内における菌同士の共生関係を再現する目的で考案された簡易培養法である「メンブランフィルター法」(田中・辨野, 特開 2012-175973) を駆使し, ヒト腸内常在菌種構成に対するプロバイオティクス (以下 PB) 株の影響について検討した。

【方法】 嫌気条件下, 高緩衝能寒天培地層上に 0.4% 軟寒天培地と 10^5 倍希釈した PB 株 (日東保有菌株 *Lactobacillus acidophilus* NT, *Bifidobacterium longum* NT) と基準株 (*L. acidophilus* JCM1132^T, *B. longum* JCM1217^T) 各々混釈物 150 μ L (140:10) 接種し, そこへ滅菌メンブランフィルターを乗せ, フィルター上層に 0.4% 軟寒天培地 9 mL と 10^7 倍希釈したヒト大便試料 (30・60 代男性 2 名, 50 代女性 1 名) 100 μ L 混釈物を接種した。37°C, 7 日間嫌気培養後, フィルター上層出現集落約 50 菌株を釣菌し, 16S rRNA 遺伝子配列解析にて菌種同定を行い, PB 株非接種群との相違を確認した。なお, 菌種推定は BLAST 検索にて行い相同性 98% 以上のものを同定菌種とした。

【結果・考察】 本系の実験操作を全て嫌気条件下で行い, 培養日数を 7 日とすることで, 同ヒト大便試料から多様な偏性嫌気性菌の出現が見受けられた。本系ではヒト腸内常在菌と有用菌株を共培養することで菌同士の共生・拮抗関係を擬似的に再現しており, 対照とした PB 株非接種群と比較して PB 株及び基準株接種群 (*L. acidophilus*, *B. longum*) では *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques* および *Veillonella* spp. 出現菌数の有意な増加, *Sutterella wadsworthensis* 出現菌数の有意な減少が見受けられた。また基準株 (JCM1132^T, 1217^T) と比して, NT 株を用いた場合では *R. gnavus* のより有意な増加が見受けられた。一方, *S. wadsworthensis* は, *B. longum* NT 株・JCM1217^T ではほぼ同じ占有率を示したのに対し, *L. acidophilus* NT 株は JCM1132^T と比して有意な *S. wadsworthensis* の減少が見受けられた。本系を用いることでヒト腸内常在菌に対する接種菌株との共生・拮抗関係を見出すことが出来, 更に同菌種でも菌株レベルの相違により出現菌種占有率に差が得られることを明らかにした。今後, 様々な PB 株や基準株を用いて各々のヒト腸内常在菌種構成に与える効果の特性を明らかにする予定である。

一般演題 A-2**蛍光標識 L-グルコース誘導体による腸内細菌の細胞状態評価****Evaluation of enteric bacterial cell condition by a fluorescent-labeling L-glucose derivative**

○長友克広¹, 大塚祐治², 望月雅允², 山本哲也², 津田修吾², 山本敏弘², 豊島 正², 山田勝也¹
¹ 弘前大学大学院医学研究科統合機能生理学講座, ² 株式会社ペプチド研究所

【目的】 D-グルコースを緑色の蛍光基 NBD で標識した誘導体 2-NBDG (1) は, 生きた単一細胞の D-グルコースの取り込みの様子を可視化する目的で広く使用されている (2). しかし, 実際の検体には死細胞や, 死に至らないまでも, 生と死の中間状態にある細胞が多数存在しており, こうした細胞への 2-NBDG の非特異的な取り込みの評価は長年の課題であった. この課題の解決をめざし, 自然界にない L-グルコースを NBD で標識した L-グルコース誘導体 2-NBDLG, ならびに赤色蛍光基 Texas Red で標識した 2-TRLG を開発した (3, 4). 本研究では, 上記蛍光標識グルコース誘導体が, 死細胞や生と死の中間状態にある腸内細菌の状態評価に有効であるか調べることを目的とする研究を行った.

【方法】 大腸菌 DH5 α , およびヒト糞便中の腸内細菌を検体とし, 緑色および赤色蛍光標識糖誘導体混合液を投与した. 対照には, エタノールで殺菌処理した菌体を用いた. 菌体をスライドガラスに封入後, 共焦点顕微鏡を用いて観察を行った.

【結果】 培養した菌株 DH5 α では, 取り込みの程度に大きなばらつきがあるものの, ほぼ全ての菌体が 2-NBDG を取り込んだ. 一方, 殺菌処理をした死菌では, 2-NBDG を投与し十分洗い流した後の蛍光信号は, ほぼ自家蛍光レベルに低下したが, 全ての菌体が 2-TRLG を取り込んでいた. 生きた細胞から成る検体では, 検体中にあり細胞状態の悪化した菌体に様々な程度に 2-TRLG が取り込まれた一方, 2-TRLG を全く取り込まない, すなわち健全な細胞膜を有する生きた菌体の存在も明瞭で, 2-NBDG を単独で用いる場合より, 非特異取り込みに関する正確な評価が可能であった.

【考察】 生から死にいたる腸内細菌の細胞状態を蛍光で可視化して評価するツールとして, 2-NBDG と 2-TRLG の組み合わせが有効である可能性が示された.

- (1) Yoshioka K, et al. Biochim Biophys Acta. 1996.
- (2) Yamada K, et al. Nature Protocols. 2007.
- (3) Yamamoto T, et al. Tetrahedron Lett. 2008.
- (4) Yamamoto T, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2011.

一般演題 A-3

ランチビオティクス耐性に關与する *Streptococcus mutans* の
新規二成分制御系因子 NsrRS と LcrRS の同定Involvement of the novel two-component NsrRS and
LcrRS systems in distinct resistance pathways against lantibiotics
in *Streptococcus mutans*○松尾美樹¹, 大貝悠一¹, 善藤威史², 小椋義俊³, 林 哲也³, 園元謙二², 小松澤均¹¹ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科口腔微生物学分野,² 九州大学大学院農学研究院 微生物工学研究室,³ 宮崎大学フロンティア科学実験総合センター

【目的】口腔内には600種以上の細菌が常在し、共存・拮抗しながら自らの生存領域を確保している。細菌の口腔内常在化に必要な因子の一つとして、他の細菌が産生するバクテリオシンに対し耐性を持つことが重要であると考えられる。本研究では、口腔内常在菌であり、う蝕原性菌である *Streptococcus mutans* のバクテリオシン耐性機構の解明に当たり、外環境適応に重要な役割を果たす細菌特有の情報伝達系である二成分制御系 (TCS) に着目した。

【方法】*S. mutans* の持つ15組すべてのTCS欠損株を用いて、種々の細菌の産生するバクテリオシン感受性を網羅的に検証した。さらに、遺伝子発現解析により、TCSの標的因子の検証を行った。共培養試験により、バクテリオシン産生菌との共存におけるTCSの関与を検証した。

【結果】ランチビオティクスである乳酸菌が産生するナイシンと *Staphylococcus warneri* が産生するヌカシンに対し、各々耐性を担う2組のTCS (NsrRS, LcrRSと命名) が明らかになった。DNAマイクロアレイ、ならびに定量PCRによる遺伝子発現解析から、ナイシン作用時、NsrRSは機能未知の膜タンパク *nsrX* 発現を誘導すること、ヌカシン作用時、LcrRSはABCトランスポーターである *lctFEG* 発現を誘導することが明らかになった。機能解析の結果、NsrXはナイシン吸着性を持つことが明らかになった。共培養試験の結果、*nsrRS* 欠損株はナイシン産生型乳酸菌との共培養時に、*lcrRS* 欠損株はヌカシン産生型 *S. warneri* との共培養時に各々著しい生存率の低下が認められた。本研究から、*S. mutans* では、同じlantibioticであり、構造が異なるナイシンとヌカシンに対し、2組のTCSにより耐性を獲得していることが明らかになった。

【考察】口腔内常在菌でありう蝕細菌である *S. mutans* において、新規のTCSであるNsrRS, LcrRSがナイシン、ヌカシンに対する耐性に關与していることが明らかになった。これら2組のTCSによる耐性機構は異なることも明らかにした。また、共培養試験の結果から、TCSはバクテリオシン産生菌との共存に重要な役割を果たすことが示唆された。本研究から、バクテリオシンは口腔内を含む生体の常在菌叢形成において重要な役割を担うこと、さらに、バクテリオシン非産生細菌は、TCSを介した耐性機構を獲得することでバクテリオシン産生菌との共存を可能にしていることが示唆された。

一般演題 A-4**ヒト腸管培養モデルを用いたイヌリン型フルクタンの
プレバイオティクス効果の検証****Analysis of prebiotic potential of inulin-type fructans in the human
intestinal simulation model**○高木理沙¹, 野本竜平², 福田伊津子¹, 大澤 朗¹¹ 神戸大学大学院農学研究科, ² 神戸大学自然科学系先端融合研究環

【目的】 近年, ヒトの健康に有益とされる機能性成分を含んだ食品が市場に多く流通しているが, 経口摂取された食品成分は宿主細胞や腸内細菌などにより様々な代謝を受けることが知られており, 機能性成分のヒト体内での動態を把握することは重要である. 一般に, 食品成分の機能性評価は, 実験動物への経口投与試験にて行われているが, 腸内細菌叢を含む実験動物の体内はヒトと大きく異なるため, 実験結果をそのままヒトについても得られる結果と翻訳することが困難である. 今回我々はヒトの腸内細菌叢のバランスを培養器の中で再現し, そこに種々の機能性成分を投入することで簡便に腸内細菌叢の変動や, 代謝変換などをモニターできる「ヒト腸管培養モデル」を確立した. 本モデルの有用性を検証するため, 有用細菌の増殖を特異的に向上させるプレバイオティクスであるイヌリン型フルクタン (ITF) に着目した. 重合度の異なる種々の ITF を上記のモデルに投入し, 主要な有用細菌であるビフィズス菌数の変動を調べることで, ITF の有益効果についての調査を試みた.

【方法】 ヒト腸管培養モデルは, GAM 培地を基礎培地として, ある種の有機酸を添加した. そして, 培養器内に窒素ガス及び炭酸ガスを曝気することで嫌気状態を保ち, pH は一定にコントロールした. 本モデルに, 健康な成人の糞便のみを投入したコントロール, および糞便とスクロース (DP: 2), 1-ケストース (DP: 3), フラクトオリゴ糖 (DP: 3-5), 短鎖イヌリン (DP: 3-30), イヌリン (DP: 3-60), アガベイヌリン (DP: 3-180) をそれぞれ投入した対象群において, 0, 3, 6, 9, 24, 30 時間後の培養液を採取し, 定量 PCR 法によるビフィズス菌を含めた腸内細菌叢の菌数測定を行った.

【結果】 コントロールにおいては, 投入した糞便の細菌叢の組成に近似していた. また, 対象群においては, スクロースを添加した場合と他の糖を添加した場合とではビフィズス菌の増殖率に大きな違いがみられた.

【考察】 コントロールの結果より, 本モデルはヒトの腸内細菌叢を再現できているといえる. また対照群の結果より, ITF において高い有益効果が得られることが示唆された. よって本モデルはヒト介入試験に先立った試験に有用であることが示唆された. 今後, サンプル数を増やして本検証を行っていく予定である.

一般演題 A-5

腸管炎症制御に関与する常在細菌—TLRsの相互作用

Interaction between commensal bacteria and
TLRs for regulating gut inflammation○上田統悟¹, 大坂利文^{1,2}, 常田 聡¹¹早稲田大学大学院先進理工学部生命医科学専攻, ²東京女子医科大学微生物学免疫学教室

【目的】腸炎モデルマウスを用いた研究により, 腸内細菌は腸管炎症の発症だけでなく, 制御性 T 細胞の分化誘導などの炎症の抑制的制御にも重要な役割を果たしていることが知られるようになった。本研究では, 腸管炎症の抑制制御機構として, 腸炎の進行に伴い出現する常在性細菌と宿主間の相互作用が潜在しているのではないかと考えた。特に, ヒトやマウスの腸管炎症期に出現する Enterobacteriaceae 科細菌に着目し, 腸管炎症の抑制制御への関与を検証することを目的とした。

【方法】SPF 環境下で飼育した C57BL/6J マウス (日本クレア) に 2% Dextran Sodium Sulfate (DSS) を投与することで大腸炎を誘導した後に, 腸内細菌叢を Enterobacteriaceae 優勢とした。リンコマイシン投与により腸炎病態が抑制されたマウスの結腸粘膜固有層細胞におけるマクロファージサブセットの割合をフローサイトメトリーにより解析した。また, 結腸粘膜固有層細胞の機能解析として, LPS 刺激に対する応答性を評価した。

【結果および考察】フローサイトメトリーの解析結果から, 腸炎の進行に伴い, 結腸粘膜固有層へ好中球およびマクロファージの浸潤が確認された。また, 腸炎の重篤化が起こる DSS 単独投与群と, 腸炎の抑制が起こるリンコマイシン共投与群との比較から, 単球/マクロファージの遊走に有意な差は認められなかった。以上の結果から, 腸内細菌叢の改変により, DSS 腸炎の病態進展に寄与する炎症性細胞の機能的変化が生じているのではないかと考えた。例えば, リンコマイシン共投与により優勢なポピュレーションとなった Enterobacteriaceae 科細菌の増大により, 腸管内に一過的に強い自然免疫刺激が炎症性単球などに作用し, エンドトキシン・トレランス様の表現型となり過剰な炎症応答を抑制しているのではないかと仮説を立てた。本講演では, 異なる腸炎の病態を呈した各実験群における大腸粘膜固有層細胞の LPS 等のエンドトキシン応答性評価の結果についても報告する。

一般演題 A-6**腸管関連リンパ組織における濾胞ヘルパー T 細胞についての解析****Analysis of T follicular helper cells in gut-associated lymphoid tissues**

○上滝隆太郎¹, 於 鉄崢², 糸賀翔大¹, 畑井俊哉², 石井俊祐², 輪島隼一¹,
芝原恭子¹, 高橋恭子², 上野川修一², 細野 朗², 八村敏志¹

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科・食の安全研究センター,

² 日本大学生物資源科学部食品生命学科

【目的】 腸管免疫系による腸内細菌制御に関わる因子として免疫グロブリン A (IgA) が挙げられる。小腸と大腸とでは産生されている IgA の抗原特異性が異なることから、各部位にそれぞれ抗原特異的な IgA を産生する B 細胞を誘導する機能が備わっていると予想される。抗原特異的な B 細胞のクローン選択や親和性成熟には、濾胞ヘルパー T (T_{FH}) 細胞が中心的な働きをする。そこで本研究では、腸管における T_{FH} 細胞の局在部位を調べた。また、この T_{FH} 細胞の分化誘導に樹状細胞 (DC) の Toll 様受容体 (TLR) を介した応答が関わると考え、DC の TLR 応答が T_{FH} 細胞を誘導し得るか調べた。

【方法】 BALB/c マウスの小腸パイエル板 (PP), 盲腸リンパ節 (CeP), 結腸リンパ節 (CoP), 腸間膜リンパ節, 尾部リンパ節, 脾臓からリンパ球を分画し、フローサイトメトリーにより細胞表面分子を解析し、T_{FH} 細胞の有無を調べた。また、*in vitro* での T_{FH} 細胞の誘導を調べるため、BALB/c マウスより PP CD11c⁺ 細胞 (DC), SPL IgM⁺ 細胞 (B 細胞), DO11.10 マウスより SPL CD4⁺ 細胞 (T 細胞) を MACS 法によって精製し、抗原ペプチドおよび TLR リガンド存在下で培養し、培養後の細胞をフローサイトメトリーにより解析した。

【結果】 T_{FH} 細胞 (TCR β ⁺CD4⁺CD8-PD-1^{hi}CXCR5⁺ 細胞) は PP, CeP, CoP に多く存在していた。このことから、定常状態での抗原特異的な抗体応答は、主にこれらの組織で起こっていることが示唆された。この T_{FH} 細胞の誘導に DC の TLR 応答が関わっている可能性を調べるため、DC, T 細胞, B 細胞を抗原および TLR リガンド存在下で培養し、培養後の T 細胞の PD-1 および CXCR5 の発現を解析した。その結果、特に ODN1668 (TLR9 リガンド) 刺激によって T_{FH} 細胞様の表現型 (PD-1^{hi}CXCR5⁺) をもつ T 細胞が高い割合で誘導された。

【考察】 腸内細菌などに対する特異的な IgA 応答は、主に PP, CeP, CoP で起こっていると考えられる。また、これらの組織における T_{FH} 細胞の誘導には腸内細菌による TLR 刺激を受けた DC が関わっている可能性が示唆された。

一般演題 A-7

歯周炎モデルマウスにおける腸内細菌叢の変動と免疫応答への影響

Alteration of gut microbiota in experimental periodontitis model mice

○高橋直紀^{1,2}, 有松 圭^{1,2}, 中島麻由佳^{1,2}, 松田由実^{1,2}, 佐藤圭祐^{1,2},
多部田康一², 中島貴子³, 加藤 完⁴, 大野博司⁴, 山崎和久¹

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔保健学分野,

²新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野,

³新潟大学大学院医歯学総合研究科歯学教育研究開発学分野,

⁴理化学研究所統合生命医科学研究センター

【目的】歯周炎は、動脈硬化疾患や糖尿病などのメタボリックシンドローム関連疾患のリスク因子であることが、これまでの疫学的調査および動物実験により明らかにされている。そのメカニズムとして、歯周炎組織を介した菌血症や、局所で産生された炎症性サイトカインにより惹起された全身の軽微で持続的な炎症の影響などが考えられているが、いずれも決定的であるとは言えない。一方、腸内細菌叢の変動がメタボリックシンドローム関連疾患の発症や進行に関わっていることが近年明らかになりつつある。我々はこれまでに、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* の口腔内投与による歯周炎モデルマウスを用いて、嚥下された *P. gingivalis* が腸管の細菌叢を変化させ、それに伴う代謝性内毒素血症を引き起こすことを明らかにし、歯周病原細菌が腸内細菌叢の変動を介してメタボリックシンドローム関連疾患に影響を及ぼすことを報告した (Arimatsu K et al., Sci Rep. 2014)。今回、更なる詳細なメカニズムの解明を目的として、腸管における免疫応答に注目して検討を行った。

【方法】6週齢雄の C57BL/6 マウスにカルボキシメチルセルロースに懸濁した *P. gingivalis* W83 株 1×10^9 CFU を口腔よりフィーディングニードルを用いて3日に1回、計10回投与した。最終投与から24時間後に大腸および小腸の粘膜固有層およびパイエル板からリンパ球を分離し、フローサイトメトリーを用いてヘルパー T 細胞のサブセット解析を行った。また、糞便中の総免疫グロブリン (IgA) 量と *P. gingivalis* 特異的 IgA 産生量を ELISA 法にて測定した。

【結果】*P. gingivalis* 感染群の大腸および小腸の粘膜固有リンパ球は、対照群に比較して、Foxp3 陽性細胞および IL-17A 陽性細胞が有意に多く、Foxp3 陽性細胞と IL-17A 陽性細胞の比率にも変化が認められた。総 IgA 産生は、対照群に比較して *P. gingivalis* 感染群で有意に増加した。その一方、*P. gingivalis* 特異的 IgA 産生は両群間で差は認められなかった。

【考察】嚥下された歯周病原細菌が腸管の免疫応答に影響を及ぼす可能性が示されたが、歯周病原細菌による腸内細菌の変動のメカニズム、および変化した腸管での免疫応答がメタボリックシンドローム関連疾患に及ぼす詳細なメカニズムに関しては今後更なる検討が必要である。

一般演題 A-8

クローン病モデルマウス SAMP1/YitFc の病態形成における
Paneth 細胞の関与Involvement of Paneth cells in pathological processes in SAMP1/YitFc,
a murine model of Crohn's disease○吉井彩季¹, 櫻木直也^{1,2}, 中村公則^{1,2}, 綾部時芳^{1,2}¹北海道大学理学部, ²北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞生物科学分野

【目的】クローン病 (Crohn's disease, CD) は, 回腸を中心に潰瘍や筋層肥厚に伴う狭窄などを生じる原因不明の炎症性腸疾患で患者数は年々増加している. 小腸陰窩基底部の Paneth 細胞は, 抗菌ペプチド α -defensin を分泌し腸内細菌叢を制御すると共に腸管自然免疫に寄与する. CD 患者に Paneth 細胞の形態異常や顆粒形成不全がみられ, また腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis) が起きることが報告された. Paneth 細胞 α -defensin が dysbiosis を介して CD の病態形成に関与する可能性があるが, その関与については未だ明らかでない. 本研究は, CD 類似腸炎を自然発症するモデルマウス SAMP1/YitFc を用いて, 病態形成における Paneth 細胞の関与を解明することを目的とした.

【方法】SAMP1/YitFc マウス (n=39) を 20 週齢まで飼育した. 4, 6, 10, 15, 20 週齢の回腸から組織切片を作製し, Alcian Blue 染色と HE 染色を行って Alcian Blue 好染性粘液とエオジン好性顆粒を持つ intermediate (IC) 細胞を解析した. さらに, HE 切片を用いて, Paneth 細胞と IC 細胞の数, 筋層厚, 陰窩長, 絨毛長を測定した. 核が一層に並んで見える絨毛陰窩軸において, エオジン好性顆粒を指標に細胞数, 筋層厚を計測した.

【結果】SAMP1/YitFc 回腸に IC 細胞の出現を認めた. 10 週齢から IC 細胞を含む Eosin 好性顆粒を持つ細胞数の有意な増加 (6 週齢: 4.1 ± 1.3 個, 10 週齢: 6.3 ± 2.3 個, $p < 0.01$), 15 週齢から有意な筋層肥厚を認め (10 週齢: $47 \pm 23 \mu\text{m}$, 15 週齢: $102 \pm 73 \mu\text{m}$, $p < 0.01$), 両者の間に正の相関を認めた ($r = 0.734$, $p < 0.001$). 絨毛の長さや陰窩の深さは共に 10 週齢にかけて有意に増加した. さらに, Eosin 好性顆粒を持つ細胞数は, 絨毛の長さとの間に相関はなかったが, 陰窩の深さと正の相関を認めた ($r = 0.773$, $p < 0.001$).

【考察】IC 細胞の有意な増加や陰窩の伸長等は, Paneth 細胞と共にニッチを形成する幹細胞の分化や増殖の異常に起因し, dysbiosis が起き, 病態形成に寄与する可能性が考えられる.