

一般演題 A-9

乳酸菌の歯周病原細菌に対する抗菌成分の解析

Analysis of the antimicrobial constituent of lactic acid bacteria against periodontal pathogen

○河井智美¹, 大島朋子², 新 良一³, 水谷武夫³, 三浦竜介³, 五味一博¹, 前田伸子²

¹ 鶴見大学歯学部歯周病学講座, ² 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座,

³ 株式会社エイ・エル・エイ中央研究所

【目的】近年, 抗菌薬耐性菌が増加し, 化学療法の限界が顕在化してきたなか, 歯周病菌の抑制や口腔常在微生物叢の正常化に対するプロバイオティクスの有用性に注目が集まっている. 歯周病原細菌抑制に関しては, 臨床研究の報告はあるが口腔常在微生物叢へのプロバイオティクスの定着は難しいと思われる. そこでプロバイオティクスの産生する有効成分を用いたバイオジェニクスを予防及び治療法に応用する目的で, 歯周病原細菌に対する抗菌性の比較を行い, 抗菌成分の分析を行った.

【方法】ヒト口腔ならびに食品より分離した *Lactobacillus* 計 53 株を被検菌とした. 各菌株を MRS 培地で 24 ~ 48 時間嫌気培養し, その遠心上清を pH7 に調整して被検液とした. 指標菌には *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株を用い, 培養培地中に希釈した被検液を添加して 48 時間嫌気培養後, 増殖を抑制した最大希釈倍率を抗菌活性値とした. 抗菌物質の分画は, 被検液の溶媒抽出物を Sephadex G25 カラムで分子量分画を行い, 逆相系 C18 カラム HPLC にて分取, 精製した. 成分分析は, HPLC を用いてアミノ酸分析を行った.

【結果】53 株中, 強い抗菌活性を示した菌株は口腔由来株 *L. plantarum* 122 株 (以下 Lp122, 抗菌活性値 8), 食品由来株 *L. fermentum* ALAL020 株 (以下 Lf020, 抗菌活性値 16) の 2 株であった. 各々の抗菌物質分画の結果, Lp122 の抗菌性は乳酸の寄与が大きいと考えられた. 一方, Lf020 株は乳酸以外に分子量 1kDa 以下のペプチド様物質が抗菌性を示した.

【考察】*L. fermentum* の産生する抗菌物質については低分子ペプチドに関する報告は見当たらないことから, 新規物質である可能性が示唆された.

一般演題 A-10**マクロファージのインフルエンザウイルス増殖抑制効果を増強する
Lactobacillus gasseri SBT2055 成分の解析****Analysis of the components of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 enhancing
inhibitory effects against influenza A virus replication by macrophage**

○守屋智博¹, 浮辺 健¹, 小島英史¹, 山下舞重¹, 松原由美²,
馬場一信², 中川久子², 中山洋佑², 宮崎忠昭²

¹雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所, ²北海道大学遺伝子病制御研究所

【目的】 これまでに我々は, プロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) をマウスに経口投与するとインフルエンザ A 型ウイルス (IAV) 感染後の生存率が上昇し, 肺組織中でのウイルス増殖および感染に伴う炎症が抑制され, 予防効果が示されることを明らかにした. 昨年度本学会にて, マクロファージ様細胞株 RAW264.7 に LG2055 を添加すると, I 型インターフェロン (IFN) 遺伝子の発現が増強され, ウイルス増殖が抑制されることを発表した. そこで今年度は, 当系を用いてウイルス増殖抑制に働く LG2055 の成分を探索し, その作用メカニズムを解析したのでこれらの結果を発表する.

【方法】 RAW264.7 の培養液中に (a) LG2055 を添加し, Toll Like Receptor (TLR) 1-9 の発現変化を解析した. (b) LG2055 由来 RNA を添加し, ウイルス増殖抑制効果を評価した. (c) LG2055 とともに TLR9 阻害剤 iODN2088, あるいは LG2055 由来ゲノム DNA を添加し, ウイルス増殖抑制効果を評価した. (d) 超遠心分離法により LG2055 由来粗細胞壁画分を調製し, 抗 TLR2 抗体とともに添加し IFN β 遺伝子の発現変化を解析した. また RAW264.7 を用いて当画分のウイルス増殖抑制効果を評価した.

【結果】 (a) LG2055 添加により, TLR3 および TLR6 の発現が有意に亢進した. (b) LG2055 由来 RNA を添加したところ, ウイルス増殖抑制作用を示した. (c) iODN2088 の添加により LG2055 のウイルス増殖抑制効果が抑制され, その作用物質として当株由来 DNA が示唆された. そこで当株ゲノム DNA を添加したところ, ウイルス増殖抑制作用を示した. (d) LG2055 由来粗細胞壁画分の添加による IFN β 遺伝子の発現亢進は抗 TLR2 抗体添加により抑制された. また当画分はウイルス増殖抑制作用を示した.

【考察】 RAW264.7 において LG2055 添加により, 当株の二重鎖 RNA および表層成分の認識に関与する TLR の発現が亢進した. これら TLR に当株の RNA, ゲノム DNA, 細胞壁成分が結合して IFN β 遺伝子の発現を誘導し, ウイルス増殖抑制効果を示したと考えられる. 現在, 最も強い抑制作用を示した粗細胞壁画分中の活性成分を解析中である.

一般演題 A-11

乳酸菌経口ワクチンを用いた子宮頸癌治療における
新たな抗原量調節技術の構築及びその評価Establishment and evaluation of novel antigen display adjustment
system for lactic acid bacteria delivery therapeutic vaccine
against cervical cancer○田中健一^{1,2}, 榊田和彌², 梶川揚申¹, 足立克之³, 山下亜紀³, 川名 敬³, 五十君静信^{1,2}¹東京農業大学大学院農学研究科, ²国立医薬品食品衛生研究所, ³東京大学大学院医学系研究科

【目的】近年, 子宮頸癌の前癌病変の治療を目的とした乳酸菌経口ワクチンの開発が行われている。子宮頸癌は human papillomavirus (HPV) の感染が関わっており, 発癌因子としてウイルスタンパク E7 が知られている。この E7 にかかわる抗原を乳酸菌表層に提示させ経口投与することで, 粘膜局所に E7 特異的免疫が誘導されるという報告があるが, その免疫誘導能は十分でないのが現状である。一般的にワクチンによる免疫誘導では最適な抗原量が存在すると考えられていることから, 乳酸菌に提示させる E7 抗原量の調節により治療効果の十分な製剤を得られると思われる。そこで本研究では, 乳酸菌に提示させる E7 抗原量を正確に調節する固定化技術を構築し, マウスを用いてその免疫誘導能の評価を行った。

【方法】本研究では, 大腸菌に発現させた弱毒化 E7 タンパク (E7Rb) を精製した後, 乳酸菌に固定化することで正確な固定量の調節を試みた。また, 乳酸菌表層への E7Rb の固定は, *Lactococcus lactis* 由来のアンカータンパク cA を E7Rb と融合 (cA=E7Rb) させることで行った。TCA 処理及び未処理の *Lactobacillus paracasei* IGM393 (旧 *L. casei* IGM393) を運搬体として用い, cA=E7Rb の固定を行った。異なる量の cA=E7Rb を固定化した TCA 処理及び未処理の *L. paracasei* IGM393 による免疫誘導能は C57BL/6 (H-2^b) マウスへの腹腔内投与後の粘膜リンパ球中における E7 特異的 IFN γ 産生細胞数で評価した。

【結果】TCA 処理及び未処理の *L. paracasei* IGM393 菌体表層の cA=E7Rb の固定化確認はフローサイトメーター及び蛍光顕微鏡にて行った。その結果, 未処理に対して TCA 処理をした *L. paracasei* IGM393 において cA=E7Rb の固定能が高く, より cA=E7Rb の添加量依存的な固定化が観察された。また, マウスへの腹腔内投与後における粘膜リンパ球中の E7 特異的 IFN γ 産生細胞数は, TCA 処理及び未処理のどちらにおいても cA=E7Rb の固定量依存的に増加していることが確認された。しかしながら, cA=E7Rb を同一量固定化した場合では未処理のものの方が E7 特異的 IFN γ 産生細胞の誘導能が高いことが明らかとなった。

【考察】アンカータンパク cA は乳酸菌表層へ提示させる抗原量を正確に調節するツールとして非常に有用であることが示唆された。また, 菌体の TCA 処理は cA の固定化を妨げる分子の除去により固定能を高める効果がある一方, 乳酸菌の表層に存在する免疫調節分子の脱落も引き起こす可能性のあることが示唆された。一方, 乳酸菌に固定化する E7 抗原量を制御することが可能となったことから, 今後この技術を用いて子宮頸癌の前癌病変の治療に最も有効と思われる製剤の作出が期待される。

一般演題 A-12**ヒト腸内細菌叢メタゲノムデータの国間比較解析****Large-scale comparative metagenomics of the human gut microbiomes across the countries**

○西嶋 傑¹, 須田 互^{1,2}, 飯岡恵里香¹, 木内美沙¹, 進藤智絵¹,
山下直子¹, 小宮恵子¹, 金 錫元³, 大島健志朗¹, 森田英利⁴, 服部正平¹

¹ 東京大学大学院新領域創成科学研究科, ² 慶應義塾大学医学部,
³ 理化学研究所統合生命医科学研究センター, ⁴ 麻布大学獣医学部

【目的】 近年の次世代シーケンサー (NGS) 技術の発達により, 腸内細菌叢を構成する菌種やそれらの遺伝子機能・代謝経路の網羅的な評価が可能となった。しかし, 異なる人種・国間においてのヒト腸内細菌叢の類似性や多様性は明らかでない。そこで, 本研究では日本人と外国人の腸内細菌叢のメタゲノムデータの比較解析を行い, 各国に特徴的な菌種・遺伝子機能の探索等の解析を行った。

【方法】 106 人の健康な成人日本人腸内細菌叢のメタゲノムデータを, 454, Ion PGM/Proton, MiSeq シーケンサーを用いて収集した。ついで, これらの日本人メタゲノムデータと, 既に公開されている 8 カ国の 900 人以上の被験者のメタゲノムデータとの比較解析を, 様々な情報学及び統計手法を用いて行った。

【結果】 日本人の腸内細菌叢からトータルで約 350 Gb の配列データを取得し, 約 480 万の非重複 (ユニーク) 遺伝子を同定した。これら日本人データと 8 カ国のデータを用いた比較解析の結果, 異なる国間の被験者同士の方が, 同じ国内の被験者同士よりも菌叢構造の類似度が有意に低いことが判明した。また, ランダムフォレストの予測モデルにより, 各被験者の菌種組成から約 87% の正解率でそれぞれの被験者の国を予測することができ, 腸内細菌叢の高い国特異性が示唆された。なお, 日本人の腸内細菌叢の特徴として, 1) 高い *Bifidobacterium* および *Blautia* 属の組成比, 2) それと関連した豊富な炭水化物代謝系の遺伝子群の存在, 3) 少ない古細菌 *Methanobrevibacter* の保持者とそれに関連したメタン生成関連遺伝子の存在等が明らかとなった。さらに, これら各国の特徴的な菌叢構造と食事・抗生物質使用量等の様々な環境因子との関連解析から, 各国の腸内細菌叢が一部の食事摂取量と相関性を示すとともに, 抗生物質使用量とも強い相関性を示すことが明らかとなった。

【考察】 国内・外の比較解析および予測モデルによる解析から, ヒト腸内細菌叢が高い国特異性を有することが強く示唆された。また, 今回の解析で得られた国特異性は, 人種や国間距離にはほとんど依存せず, むしろ抗生物質使用量が大きく関与することが示唆された。これらの結果から, わずか約 60 年前に実用化された抗生物質が, 今日のヒト腸内細菌叢の構造変遷 (国特異性) に急速かつ大きく影響していることが強く示唆される。

一般演題 A-13

健康日本人 3,220 名の腸内常在菌構成と生活特性の関連

Associations between gut microbiota and
lifestyle characteristics in 3,220 healthy Japanese adults

○當山むつみ, 中村 睦, 伴野太平, 辨野芳子, 辨野義己

独立行政法人理化学研究所イノベーション推進センター辨野特別研究室

【目的】近年、培養を介さない手法による腸内常在菌解析により、その全容が明らかになってきた。その研究成果は健康・予防医学への応用が期待されているが、その応用は発展途上である。本研究では、腸内常在菌の健康・予防医学への応用の第一歩として、健康者の腸内常在菌構成と生活特性の関連性を解明することを目的とし、健康日本人 3,220 名の腸内常在菌構成と生活特性の関連性を検討した。

【方法】35F と 1492R のプライマーセットと制限酵素 *Alu* I, *Msp* I による Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 解析を行い、各腸内常在菌を便宜的分類単位 (Operational taxonomic unit, 以下 OTU) の相対量で表し、クラスター解析を行った。各クラスターにおける OTU 平均値および性別、年齢、BMI、食生活等の 27 項目の生活特性を有する被験者の存在割合を比較し、クラスターの腸内常在菌および生活特性の特徴について検討を行った。続いてカイ二乗検定、オッズ比により OTU と 27 項目の生活特性の関連性を検索した。

【結果および考察】被験者 3,220 名の腸内常在菌構成は 8 つのクラスター (C1 ~ C8) に分けられ、C4, C5 以外の 6 クラスターは、特徴となる OTU、生活特性を持つことが明らかとなった。即ち C1 では OTU A477 (*Ruminococcus*) と M465 (*Clostridium* XIVb, *Ruminococcus*) が「60 歳以上、便通頻度が週 4 回未満、便秘と感じる」ということと有意に関連していた。C2 では 4 OTU と「女性、便通が週 4 回未満、便秘と感じる、便性状が普通以外、牛乳を週 4 回以上摂取する、飲酒習慣が無い」ということと関連し、C3 では 2 OTU と「女性、軟便傾向が無い、緑黄野菜を週 4 回以上摂取する、喫煙習慣が無い」ことと関連していた。C6 では 1 OTU と「59 歳以下」が関連していた。C7 では他のクラスターに比して最多の 5 OTU と 6 種類の生活特性「男性、60 歳以上、パン・肉の摂取頻度が週 4 回未満、過去および現在の飲酒・喫煙習慣あり」が関連し、C8 では 3 OTU と「男性、BMI が 25 以上、飲酒習慣あり」ということが関連していた。以上の結果から、腸内常在菌が生活特性の指標となりうることが示唆され、今後の健康・予防医学への寄与が期待される。

一般演題 A-14**冠動脈疾患患者に特徴的な腸内細菌叢の同定****The characteristics of gut microbiota in coronary artery disease**

○江本拓央, 山下智也, 佐々木直人, 林 友鴻, 笠原和之,
淀井景子, 松本卓也, 溝口泰司, 平田健一
神戸大学医学部循環器内科

【目的】 近年, 腸内細菌叢が免疫や代謝と深く関わっていることが明らかになってきている. 疾患との関係についても, 肥満や2型糖尿病については, 腸内細菌叢との関係性が相次いで報告されている. しかし, 冠動脈疾患をはじめとする動脈硬化性疾患と腸内細菌叢との関連を調査した報告はほとんどない. そこで, 我々は冠動脈疾患患者における腸内細菌叢が健常者と比べて異なるのかを比較検討することとした.

【方法】 冠動脈疾患を持っている患者群 (coronary artery disease (CAD)) 39 名と冠動脈疾患は持たないが, 冠動脈疾患のリスクファクターと言われる, 血圧, 脂質異常症, 糖尿病をもつ患者群 (control (Ctrl)) 30 名, 健診会場でリクルートした, 既往歴, 内服歴のない健常者群 (Healthy volunteer (HV)) 50 名について, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP 法) を用いて, 腸内細菌叢を比較した.

【結果】 CAD 患者において, Ctrl 群や HV 群 と比較して, Lactobacillales 目菌が多く (CAD 群, Ctrl 群 vs. HV 群; $13.6 \pm 12.0\%$, $6.2 \pm 7.7\%$ vs. 4.09 ± 5.89 ; $p < 0.001$), *Bacteroides* 属菌と *Prevotella* 属菌を足した Bacteroidetes 門菌が少なかった (CAD 群, Ctrl 群 vs. HV 群; $35.5 \pm 11.6\%$, $43.9 \pm 11.2\%$ vs. 47.4 ± 11.5 ; $p < 0.001$). また, 従来報告の Enterotype (Arumugam M et.al, Nature. 2011; 473 (7346): 174-180) を分類すると *Bacteroidetes* 属, *Prevotella* 属の少ない, Enterotype 'others' (III) に属する方が多いと考えられる. また, Lactobacillales 目菌については, 冠動脈病変が多枝病変になるほど, その割合が大きい傾向にあった (single-vessel vs. multi-vessels, $6.3 \pm 6.1\%$ vs. $16.5 \pm 12.6\%$; $p = 0.02$).

【考察】 ヒトにおいて, 肥満や糖尿病とは独立した, CAD に特徴的な腸内細菌叢が明らかになった. 今回は T-RFLP 法という簡易の菌叢の検査であるので, より詳細に, 次世代シーケンサーを用いたヒト腸内細菌の検討を行い, 動脈硬化性疾患発症に関連する菌の種類を同定したい. 最終的には, 臨床応用可能な腸内細菌に介入する冠動脈疾患予防法の開発を目指す.

一般演題 A-15

肉食時の腸内細菌叢変化に対する *Bifidobacterium longum* BB536
含有ヨーグルト摂取の影響Effect of ingestion of yogurt supplemented with *Bifidobacterium longum*
BB536 on the gut microbiota disturbance caused by animal-based diet

○加藤久美子, 小田巻俊孝, 菅原宏祐, 清水金忠, 阿部文明
森永乳業株式会社食品基盤研究所

【目的】 極度に偏った肉や卵中心の食事は、腸内環境を悪化させる大きな要因であり、腸内細菌叢のバランスも短期間に変化させることが報告されている (1)。本研究では肉食時における腸内細菌叢変化を解析するとともに、*Bifidobacterium longum* BB536 含有ヨーグルト (以下 BB536 ヨーグルト) 摂取の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】 20～50歳の健常成人33名を3群(A, B, C群)に分けたオープンランダム化試験を実施した。すべての被験者は7日間の通常食摂取期間のあと、卵と肉、肉加工品のみを摂取する肉食期間を5日間設け、その後栄養バランスの優れた食事を14日間(後観察期間)摂取した。試験期間中、試験食品以外のヨーグルト等の摂取は禁止したが、A群は肉食期間と後観察期間を含む19日間、200gのBB536ヨーグルトを、B群は後観察期間の14日間、A群と同量のBB536ヨーグルトを毎日摂取した。C群は試験期間中にヨーグルトを摂取しなかった。試験開始前、肉食期間開始時、後観察期間開始時、試験期間終了時に糞便を回収し、MiSeqを用いた16S rRNAのV3-V4領域を標的としたメタゲノム解析にて、腸内細菌叢を評価した。

【結果】 肉食期間中、B, C群では *Bilophila* 属, *Odoribacter* 属, *Dorea* 属, *Ruminococcus* 属 (*Lachnospiraceae* 科) の割合が有意に増加した一方で、*Bifidobacterium* 属の割合は有意に減少した。*Ruminococcus* 属を除き、肉食期間中もBB536ヨーグルトを摂取したA群ではこの有意な変化は観察されなかった。後観察期間後も、C群では *Bifidobacterium* 属の割合が肉食期間前よりも低い傾向 ($p=0.08$) のままであったが、B群ではその有意差傾向が認められなかった。

【考察】 肉食摂取により有意に増加した菌群は、いずれも宿主への悪影響を示唆する報告がなされているが、中でも硫化水素を産生する *Bilophila* 属は腸管の炎症への関与が示唆されており、以前の報告 (1) ととも一致する肉食摂取中の挙動を示した。以上の結果より、極端に偏った肉食は腸内細菌叢へ好ましくない影響を与えると同時に、BB536ヨーグルトを併せて摂取することでその影響をある程度抑制できることが示唆された。

(1) David, et al. Nature. 2014, 23: 505: 559-563.

一般演題 A-16*Bifidobacterium bifidum* YIT 10347 を含む乳酸菌飲料の
飲用による胃不定愁訴改善効果Health benefits of fermented milk containing *Bifidobacterium bifidum*
YIT 10347 on gastric symptoms in adults

○五味 淳¹, 松本一政¹, 飯野 透¹, 野中千秋², 宮崎幸司¹, 石川文保¹
¹(株)ヤクルト本社中央研究所, ²(株)ヤクルト本社開発部

【目的】 *B. bifidum* YIT 10347 は、これまでに胃傷害抑制効果、ピロリ菌活性抑制効果や炎症抑制効果が認められ、胃に対する効果が期待されるプロバイオティクスである。そこで今回、一般成人を対象として *B. bifidum* YIT 10347 を含む乳酸菌飲料の胃不定愁訴改善効果および腸内環境改善効果を検証することを目的に、二重盲検プラセボ対照クロスオーバー形式の対人試験を実施した。

【方法】 お腹が気になるが服薬および通院を行っていない健常成人 30 名を対象に、*B. bifidum* YIT 10347 を含む乳酸菌飲料またはプラセボ飲料をクロスオーバー法で 1 本 (100 mL)/日、2 週間継続飲用させ、各飲用期の飲用前、飲用 7 日目、14 日目に胃症状についてアンケート調査を行った。また、飲用前後の便の腸内菌叢解析、腸内腐敗産物の測定を行った。

【結果】 層別解析の結果、飲用前に何らかの不定愁訴を持つ被験者において、*B. bifidum* YIT 10347 群では飲用後に胃の不定愁訴が有意に改善された。一方、プラセボ群では変化が見られなかった。また、全被験者を対象とした解析の結果、*B. bifidum* YIT 10347 群では、*Enterobacteriaceae* の減少と腸内腐敗産物 (Ammonia と Indole) の有意な低下が認められた。

【考察】 日本人の 4 人に 1 人は胃痛や胃もたれなどの上腹部症状に悩まされていると言われている。胃に不快感があっても、約 4 割の人は通院や服薬をしないという調査結果もあり、多くの人が胃の不調を抱えながら生活していると推測される。本研究では、*B. bifidum* YIT 10347 を含む乳酸菌飲料の継続飲用によって、胃の不定愁訴が改善されるとともに、腸内フローラの変化を伴う腸内腐敗産物の低下が観察された。これらの結果は、一般成人における胃の不調に伴う負担の軽減、QOL の向上、医療費の削減に繋がるものと考えられる。