

一般演題 B-1

シロアリ腸内原生生物共生細菌の機能的進化

Functional evolution of bacterial symbionts of termite gut flagellates

○大坪和香子^{1,2}, Jurgen F. H. Strassert², Aram Mikaelyan²,
Alice McHardy³, Susannah G. Tringe⁴, Andreas Burne²

¹ 東北大学大学院農学研究科, ² マックスプランク陸生微生物学研究所,

³ ハインリッヒハイネ大学, ⁴ 米国エネルギー省共同ゲノム研究所 (JGI)

【目的】 下等シロアリの腸内フローラは、セルロースを主とする木質糖の消化分解および酢酸生成に特化した代謝機能を有する。下等シロアリ腸内に存在する多種多様な原生生物は、木質糖の加水分解に重要な役割をもつが、同時に腸内細菌に快適な生息環境（ニッチ）を提供していると考えられている。本研究では、シロアリ腸内原生生物の細胞内に共生する細菌の生態を系統、形態学および生理学的視点から明らかにすることにより、腸内環境から細胞内共生へ移行した細菌の機能的進化を考察することを目的とした。

【方法】 ネバダオオシロアリの後腸を採取し、腸液中に存在する *Trichonympha* 属原生生物の細胞を単離回収し、共生細菌画分を調製した。画分から調製したDNAを用い、共生細菌の16S rRNA遺伝子による系統解析およびメタゲノム解析を行った。またそれぞれの細菌の共生形態を明らかにするため、16S rRNAを標的と蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 解析および透過型電子顕微鏡 (TEM) 解析を行った。

【結果】 シロアリ腸内に広く分布する *Trichonympha* 属原生生物の共生細菌画分には、複数種の共生細菌が見いだされた。これらの細菌は、シロアリ腸内に特異的であり、近縁種の多くが他の生物宿主の腸内環境由来であることが知られた。メタゲノム解析からは、新規のデルタプロテオバクテリア共生細菌 '*Candidatus Aditutrix intracellularis*' が、ホモ酢酸生成を行い、シロアリ腸内フローラの主要機能である酢酸生成能を有することが明らかとなった。また、'*Ca. Aditutrix intracellularis*' の近隣に共生する '*Desulfovibrio trichonymphae*' は、シロアリを含む昆虫、ヒトおよび家畜の腸内に共通して存在する硫酸還元細菌と共に、単系統群を形成することが明らかになった。

【考察】 酢酸生成および硫酸還元は、ヒトや家畜等においても免疫制御や疾病の要因として注目されている腸内フローラの機能である。昆虫とヒトでは生理学的機能に差はあるが、腸内フローラに注目すると、宿主生物に関わらず共通の系統および共通の機能を有する腸内細菌群が存在することを、我々の研究結果は示唆している。今後も、昆虫腸内フローラ研究がヒトや家畜の腸内細菌研究の発展に寄与することが期待される。

一般演題 B-2**イヌおよびネコの年齢による腸内菌叢構成の変化の解析****Transitions of intestinal microbiota of dogs and cats**嶋田広野¹, 安田知代², 清末正晴², 木村聖二², 山田章雄¹, ○平山和宏¹¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学教室, ² 日清ペットフード株式会社

【目的】 ヒトの腸内菌叢は、加齢とともに変化していくことが知られている。個体の老化とともに腸内菌叢も「老化」するため、腸内菌叢を健康な状態に維持しようとするプロバイオティクス製品などが開発され、利用されている。一方、ヒト以外の動物の腸内菌叢の加齢性変化は十分に研究されていない。近年、イヌやネコなどのコンパニオンアニマルも高齢化が進んでおり、腸内菌叢における「老化」の解明は、動物の健康維持、疾病予防、動物自身や飼い主の QOL 向上などの公衆衛生面において非常に重要である。本研究の目的は、イヌとネコの腸内菌叢構成を年齢別に解析し、ヒトと同じような腸内菌叢の加齢変化があるかどうかを解明することである。

【材料と方法】 北山ラベス株式会社で繁殖飼育されているビーグル犬およびネコについて、離乳前、離乳後および高齢期の各 10 頭、計 60 頭を対象にした。各個体から新鮮糞便を採取して嫌気状態で東京大学獣医公衆衛生学教室まで輸送し、培養法により腸内菌叢の構成解析を行った。

【結果】 Bifidobacteria は、イヌでは離乳前後の若齢犬でもヒトのように優勢菌ではなく、成犬では検出されなくなった。ネコではいずれの年齢群においてもほとんど検出されなかった。Lactobacilli は、イヌでは加齢性に菌数が減少し、ネコでは離乳前には 50% の個体から検出されたものの、離乳後にはほとんど検出されなくなった。Enterobacteriaceae はイヌ、ネコともに加齢性に菌数が減少した。Enterococcus を含む streptococci はネコにおいて離乳後に菌数が有意に減少し、イヌにおいても離乳後に減少する傾向が見られた。

【考察】 イヌとネコも、腸内菌叢の構成は加齢性に变化することが明らかとなった。とりわけヒトにおいて健康の維持に重要であると考えられ、加齢とともに減少する bifidobacteria や乳酸菌群はイヌとネコでも加齢性に減少することが示された。ただし、イヌおよびネコにおいては、bifidobacteria はヒトのように重要ではなく、イヌでは lactobacilli、ネコでは streptococci が主要な乳酸菌群であることが示唆された。さらに、イヌとネコのいずれにおいても、ヒトでは加齢とともに菌数が増加する Enterobacteriaceae が年齢とともに減少した。以上の結果は、イヌやネコにおいても腸内菌叢が「老化」することを示唆しているが、その年齢による変化はヒトの場合とは異なっており、コンパニオンアニマルにおいて腸内菌叢の「老化」を予防または改善し、健全な状態に保つためには、ヒトとは違ったアプローチを考える必要があることを示している。

一般演題 B-3

マウス妊娠期腸内細菌叢の攪乱は
仔の中樞神経系の発生発達に影響を与えるPerturbation on the maternal gut microbiota during pregnancy affects the
development of the fetal and neonatal central nervous system

○栃谷史郎, 松崎秀夫

福井大学子どものこころの発達研究センターこころの形成発達研究部門

【目的】1980年代以降の精神神経分野の発達障害の増加は健全な脳の発育における環境要因の重要性を示唆する。健全な腸内細菌叢は妊娠期母体の重要な環境の一つである。妊娠期母体腸内細菌叢が胎児の中樞神経系の発生においてどのような寄与をするのかを明らかにする。

【方法】妊娠マウス（C57BL/6J系統）に対し妊娠9日目から16日目にかけて、非吸収性抗生剤（5 mg/ml neomycin, 5 mg/ml bacitracin, 1.25 μ g/ml pimaricin）を飲水投与する。このような方法で腸内細菌叢を攪乱した妊娠マウスに通常通り出産させ、仔マウスを養育させる。生後23日目に離乳し、生後4週に行動実験を行う。

【結果】非吸収性抗生剤投与4日目の妊娠マウス糞便に含まれる腸内細菌量は抗生剤投与群において、対照群の0.115%であり、また両群で腸内細菌叢の構成に差異が観察され、抗生剤投与が母体腸内細菌叢に大きな影響を与えることが明らかになった。さらに抗生剤投与期間前後における妊娠マウスの体重増加量は抗生剤投与群において有意に少なく、妊娠期の腸内細菌の攪乱が母体に大きな影響を与えることを示唆した。また、生後7日目、生後28日目のいずれにおいても抗生剤投与群の仔マウスの体重が対照群の仔マウスに比べ、有意に小さかった。ただし、生後24日目の対照群の仔マウスと抗生剤投与群の仔マウスの間での糞便に含まれる腸内細菌の比較解析においては、腸内細菌量、腸内細菌の構成ともに明白な差異は観察されなかった。これらの仔マウスに生後4週において行動試験を行ったところ、ホームケージ活動試験の結果、24時間周期の概日リズム活動のうち暗期（マウスにとっての活動期）の活動低下が観察された。またオープンフィールド試験により新奇環境における活動低下及び不安傾向の亢進が観察された。

【考察】以上の結果は妊娠期における腸内細菌の攪乱が仔の中樞神経系の発生発達に負の影響を与え、仔の行動異常を引き起こすこと、妊娠期において健全な母体腸内細菌叢を保持することが仔の脳の健全な発達の基礎の1つとなることを示唆する。

一般演題 B-4**腸管恒常性維持における腸管神経の役割について****Role of enteric neurons in regulation of intestinal homeostasis**

○藤村理紗¹, 小原由紀子², 大崎敬子³, 神谷 茂³, 幡野雅彦⁴

¹千葉大学バイオメディカル研究センター, ²千葉大学大学院医学研究院小児外科学,

³杏林大学医学部感染症学講座, ⁴千葉大学大学院医学研究院疾患生命医学

【目的】 腸管において, 腸炎と dysbiosis は密接に関連しており, 相互作用によって両者が悪化するといわれている. 本研究では, 腸管神経が過剰に存在する Ncx-KO マウスを用いて, 腸管神経による腸内細菌の恒常性に対する影響および, 腸炎との関わりについて明らかにすることを目的とする.

【方法】 Dextran Sodium Sulfate 誘導腸炎モデルを作製し, 生存曲線, 体重増減, 血便の有無を評価した. マウス糞便について, GAM および MacConkey 培地を用いて培養を行い, コロニーの計測を行った. さらに糞便 DNA の抽出を行い, 菌属菌群特異的プライマーを用いた Real Time PCR 法により, 腸内細菌叢の定量解析を行った.

【結果】 DSS 誘導腸炎モデルにおいて, Ncx-KO マウスは高い致死率と著しい体重減少を認め, 高率に血便を呈した. しかし, 抗生物質投与によって症状が改善されたことから, Ncx-KO マウスの腸管では, dysbiosis が起きていると考えられた. マウス糞便について, GAM 培地を用いて発育した細菌数は, 野生型と Ncx-KO マウスでは差を認めなかった. 一方で, MacConkey 培地を用いて発育した細菌数は, Ncx-KO マウスでは, 野生型と比較して, 10-1000 倍増加した. さらに, Ncx-KO マウスの糞便 DNA では, 腸内細菌科の菌が 10-1000 倍増加した. 以上から, Ncx-KO マウスの腸管では dysbiosis が起きていると示唆された. 一方で, Ncx-KO マウスの大腸組織では, 神経系由来 NO 合成酵素 (nNOS) の発現が亢進していることから, NO の腸内細菌叢への影響が考えられた. NO 還元酵素 *norV* をもつ細菌は, 脱窒反応を行い, ATP を合成し, 嫌気条件において生育する. マクロファージは病原細菌を貪食すると, 殺菌のために NO を産生するが, *norV* を持つ大腸菌は, マクロファージ由来 NO による増殖抑制を受けないことが報告されている. そこで, 糞便 DNA を用いて, *norV* 遺伝子について解析し, Ncx-KO マウスでは多くの個体が高い *norV* 遺伝子の含有を示した. 以上の結果から, Ncx-KO マウスの腸管では, 過剰な NO の環境下の結果, *norV* 遺伝子を持った腸内細菌科の菌が増加していると考えた.

【考察】 腸管神経過剰である Ncx-KO マウスを用いた解析から, 腸管神経由来 NO が腸内細菌叢の組成に影響を与えていることが示唆された.

一般演題 B-5

HIV-1 由来エピトープを S-layer タンパク質上に提示する組換え
Lactobacillus acidophilus の経粘膜投与による特異的免疫の誘導Mucosal immunogenicity of genetically modified *Lactobacillus acidophilus* expressing an HIV-1 epitope within the surface layer protein○梶川揚申¹, Lin Zhang², Alora LaVoy², Sara Bumgardner³, Todd Klaenhammer⁴, Gregg Dean²¹東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科,²Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, USA,³Center for Comparative Medicine and Translational Research, North Carolina State University, USA,⁴Department of Food, Bioprocessing, & Nutrition Sciences, North Carolina State University, USA

【目的】 ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症を予防するワクチンの開発が難航する中、遺伝子組換え技術を応用した様々なアプローチが検討されている。これまでの知見から、HIV の感染防御には粘膜局所において広域反応性抗体を誘導できるコンポーネントワクチンが有効と考えられる。演者らは経口投与における安全性と抗原性を併せ持つ乳酸菌を媒体とした粘膜ワクチンの開発を試みている。*Lactobacillus acidophilus* NCFM はヒト腸管由来で、その表層は S-layer タンパク質 (SlpA) で覆われている。SlpA は菌体表層に高頻度で存在するため、効率的な抗原ディスプレイプラットフォームとして期待されている。本研究では、SlpA に HIV-1 由来エピトープを導入し、その組換え体の経粘膜投与における抗原性を評価することを目的とした。

【方法】 *slpA* 遺伝子に HIV-1 由来 gp41 膜近傍領域 (MPER) 断片をコードする塩基配列を導入し、温度感受性プラスミド依存的に複製する pTRK1053 を作製した。これを用いて *L. acidophilus* NCK1910 の *slpA* 遺伝子を MPER 挿入型 *slpA* 遺伝子に置換し、MPER 特異的モノクローナル抗体 (2F5) を用いた Western blot および FACS 解析により評価した。次に、この組換え体を Balb/c マウスの胃内へ反復投与し、粘膜および血中における特異的抗体産生の有無を ELISA, ELISpot により検出した。

【結果】 *slpA* 遺伝子の置換により、MPER 挿入型 SlpA 発現 *L. acidophilus* (La SlpA-MPER) が構築された。La SlpA-MPER は 2F5 抗体により認識され、エピトープが菌体表層に露出していることも確認された。動物実験において、La SlpA-MPER の経粘膜投与により MPER または SlpA 特異的な血中 IgG と粘膜 IgA が検出された。

【考察】 組換え *L. acidophilus* の HIV-1 エピトープ挿入 SlpA は経粘膜投与において免疫原性を有し、粘膜および血中における特異的抗体産生を誘導し得ることが示された。HIV-1 の主な侵入経路である下部消化管および膈粘膜において HIV-1 抗原特異的抗体の産生が見られたことから、乳酸菌の S-layer タンパク質が HIV-1 に対するワクチンのプラットフォームとして利用できる可能性が示された。

一般演題 B-6**MLST 法による新生児糞便および母乳から分離された
ビフィズス菌の菌株識別****Multilocus sequence typing of bifidobacterial strains isolated
from infant's feces and human milk**

○牧野 博¹, Rocio Martin³, 石川英司¹, Agata Gawad², 久保田博之¹,
酒井隆史¹, 大石憲司^{1,2}, Kaouther Ben Amor³, Jan Knol^{3,4}, 久代 明¹
¹(株)ヤクルト本社中央研究所, ²ヤクルトヨーロッパ研究所,
³Danone Nutricia Research, ⁴ワーヘニンゲン大学

【目的】 母乳に含まれる菌が腸内菌叢形成に関与するかが議論されている。本試験では、特定のビフィズス菌株が新生児の腸内と母乳の間で共有されているかどうかを菌株レベルで検証した。

【方法】 102 名の健康な妊婦から母乳（出産前・初乳・出産 7 日後・出産 30 日後）を、各々の子供からは糞便（胎便・出生 7 日後・出生 30 日後）を採取した。これらのサンプルについて、TOS プロピオン酸培地を用いてビフィズス菌株を単離し、16S rDNA 塩基配列を基に菌種を同定した。母乳と新生児の糞便の両者から共通に同一のビフィズス菌種が検出された場合、MLST (Multilocus Sequencing Typing) 法により菌株レベルの同一性を検証した。解読した 7 遺伝子の塩基配列が完全に一致した場合、同一系統株とみなした。

【結果】 新生児の糞便とその母親の母乳から共通に分離されたビフィズス菌は、*B. bifidum*, *B. breve* および *B. longum* subsp. *longum* の 3 菌種であった（総計 283 株；*B. bifidum* 24 菌株, *B. breve* 175 菌株, *B. longum* subsp. *longum* 84 菌株）。出産前の乳汁や初乳からビフィズス菌は全く分離されず、ビフィズス菌が母乳から検出されたのは出生 7 日目以降であった。一方、新生児からは最初の糞便である胎便よりビフィズス菌の検出が確認された例もあった。MLST 法を用いて、分離株の同一性検証を実施した結果、新生児糞便および母乳において同一の *B. bifidum* が 3 系統, *B. breve* が 10 系統, *B. longum* subsp. *longum* が 5 系統認められた。これら同一系統株の分離時期を精査した結果、いずれも母乳よりも先に、あるいは母乳と同時期に新生児糞便から分離されていたことが判明した。一方、母乳から先に分離された同一系統株は 1 例も確認されなかった。

【考察】 ビフィズス菌株が新生児と母乳の間で伝播していることを確認した。現時点では、母乳から分離されたビフィズス菌がどこから来たのかという問いに対する明確な解答は得られていない。しかしながら、授乳開始前および開始直後の母乳中からはビフィズス菌が 1 株も検出されず、また同一系統株が母乳よりも先に新生児の糞便から分離されたことから、授乳開始後に母乳から新生児へ伝播したのではなく、新生児の口腔から母乳へ伝播した可能性が高いのではないかと考えられた。