

一般演題 B-7

肝硬変患者における血中細菌プロファイルの検討

Characterisation of gut microbiota in patients with liver cirrhosis

○梶原幹生¹, 松本喜弘¹, 高倉一樹¹, 湯川豊一¹, 小田原俊一¹,
内山 幹¹, 小田巻俊孝², 小井戸薫雄¹, 大草敏史¹

¹東京慈恵会医科大学附属柏病院消化器・肝臓内科, ²森永乳業株式会社食品基盤研究所

【目的】腸管内には腸内細菌叢が形成されており, 生理的条件下において消化吸收機能を補うなど消化管機能に深く関与している。一方で肝硬変症では, 腸内細菌の異常増殖や, 腸管粘膜浮腫や細菌に対する粘膜防御能低下などにより, 生体への細菌叢の移動 (bacterial translocation; BT) が見られ, BT は特発性細菌性腹膜炎や敗血症などの肝硬変合併細菌感染症の原因として重要性が高い。一方で発熱を有した肝硬変患者に対して菌血症を疑って血液培養を行うも細菌が検出されないことも多く, これには菌数の少なさや菌種から培養困難であることによる。今回我々は肝硬変患者から採取した血液検体に対して細菌遺伝子の検出を行い, メタゲノム解析を利用して血中細菌の同定を試みた。

【方法】肝硬変患者 15 名 (平均年齢 71.4 歳; 男性 9 名, 女性 6 名) を対象として採血を行った。血液検体は PAXgene 採血管に採取し凍結保存, これらを融解した後に処理し全 RNA を抽出した。得られた全 RNA より cDNA を合成, 16S リボゾーム遺伝子のシーケンス解析を実施し, QIIME を用いて実験上の分類単位 (operational taxonomic unit; OTU) ごとに微生物の科ないし属レベルまでの同定を行って肝硬変患者における血中細菌プロファイルを検討した。健常者ボランティアを対象として同様の検索も試みた。

【結果】肝硬変患者全例で血中細菌 DNA が検出され, 1 例のみで検出された菌も含めると 156 もの細菌が同定された。OTU 比率で比較すると Family Enterobacteriaceae (中央値 21.5%), Genus *Veillonella* (10.4%), Genus *Klebsiella* (9.8%), Genus *Streptococcus* (7.1%), Genus *Lactobacillus* (6.9%), Genus *Staphylococcus* (4.6%), Genus *Enterococcus* (3.8%) などが高率であり, 肝硬変患者血液中における優勢菌と考えた。

【考察】肝硬変患者血中には多くの菌種が存在することが示唆され, 肝硬変合併感染症の発症に寄与している可能性が考えられた。また, エンドトキシンなどの細菌毒素やアンモニア, メルカプタンなどの細菌代謝産物の血中への流入が肝性脳症などの病態にも関与しているなど, BT は肝の種々の病態と密接な関連があり, 肝硬変患者に対する治療戦略を考える上で示唆に富む結果と考えた。治療的アプローチを考える上でより有効性の高い生菌製剤の開発など, プロバイオティクス研究の進歩を期待したい。

一般演題 B-8**抗菌剤投与による遺伝子変異から見たヒト腸内細菌の変化****Increase of antibiotics-resistant gene mutation by antibiotics therapy**○福島浩平^{1,2,3}, 神山篤史³, 斎藤 喬²¹ 東北大学大学院医学系研究科分子病態外科学分野,² 東北大学大学院医工学研究科消化管再建医工学分野, ³ 東北大学病院胃腸外科

【目的】 抗菌剤の使用により一過性の下痢をきたすことはあっても、免疫抑制状態や *Clostridium difficile* などの感染症でない限り、腸内細菌の耐性化は注目されない。潰瘍性大腸炎術後に発症する回腸囊炎は、原因不明の非特異性粘膜炎であり、時に難治化する。メトロニダゾールやシプロフロキサシン (CFX) などの抗菌剤が治療の第一選択薬であるが、耐性化などの問題点は不明である。DNA 複製や修復を担う細菌遺伝子 *gyrA* および *parC* はキノロン系抗生物質耐性化に深く関与し、特定箇所のアミノ酸変異により MIC は 100-1000 倍になるとされる。CFX 投与により、大腸菌数、*gyrA* および *parC* の遺伝子の量と耐性化を決定する核酸変異の出現頻度がどのように変化するかを定量的に検討すること。

【方法】 腸内細菌叢の安定する回腸囊機能後約 1 年以上を経過した症例のうち、CFX 投与歴のある (+) 群 15 例と投与歴の無い (-) 群 32 例より糞便 DNA を抽出、大腸菌数、大腸菌 *gyrA* と *parC* の遺伝子量をリアルタイム PCR により定量した。また、PCR 産物をクローニングしアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の概要を調べた後、制限酵素を用いた遺伝子変異を定量的に評価するシステムを構築し検討した。

【結果】 (+) 群と (-) 群では、大腸菌数、*gyrA* および *parC* の遺伝子量いずれも差を認めなかった。PCR 産物を組み込んだ 62 クローンを調べたところ耐性化に重要な各遺伝子それぞれ 2 箇所の配列のうち、*gyrA* では TCG (Ser) → TTG (Leu) が 61% に、GAC (Asp) → AAC (Asn) が 6% に、*parC* では AGT (Ser) → ATT (C) (Ile) が 45% に、GAA (Glu) → GTA (Val) が 21% に認められた。定量システムを構築した *gyrA* 遺伝子 2 箇所、*parC* 遺伝子 1 箇所の変異遺伝子率をみると、(+) 群ではそれぞれ 70%、79%、50%、(-) 群では 12%、11%、5% でありいずれも著明な有意差が認められた。

【考察】 *gyrA* および *parC* 遺伝子の変異遺伝子率の上昇は、菌数や遺伝子量で変化が無いとしても、CFX 耐性化が生じている可能性を示唆するものと考えられた。抗菌剤使用によって、臨床的にあるいは菌種の構成に問題がないように見える場合でも、腸内細菌叢の実態は大きく影響を受ける可能性が考えられた。

一般演題 B-9

ヒト腸内菌叢のダイゼイン代謝に及ぼすセロオリゴ糖摂取の影響 Effects of cellooligosaccharides intake on daidzein metabolism by human intestinal microbiota

○田村 基¹, 堀 幸子¹, 星 千草¹, 滝埜昌彦², 田中藍子³, 西平 順³, 町田 誠⁴
¹独立行政法人農研機構食品総合研究所, ²アジレント・テクノロジー株式会社,
³北海道情報大学, ⁴日本製紙株式会社

【目的】大豆イソフラボンの一つであるダイゼインからは腸内菌叢の代謝によりもとのダイゼインよりもエストロゲン活性の強い equol が産生される。セロオリゴ糖は、セルロース由来の糖質で、ヒトの消化酵素で分解されにくい難消化性オリゴ糖である。しかし、セロオリゴ糖摂取が、ヒト腸内菌叢の equol 産生に及ぼす影響は検討されていない。そこで、セロオリゴ糖摂取が、ヒト糞便菌叢のダイゼイン代謝性に及ぼす影響について検討した。

【方法】北海道江別市在住の成人女性を20人募集し、ヒト試験を行った。被験者を二群に分けた。第一群は試験物質セロオリゴ糖5gを毎日2週間摂取した。また、被験物質摂取後3週間のウォッシュ期間を置き、デキストリン5gを毎日2週間摂取した。第二群は、デキストリン5gを毎日2週間摂取した。また、デキストリン摂取後3週間のウォッシュ期間を置き、試験物質セロオリゴ糖5gを毎日2週間摂取した。採便は被験物質の摂取前後、デキストリンの摂取前後の計4回行った。新鮮糞便は、嫌気度を保ちつつ輸送を行い、嫌気培養液で希釈した。この新鮮糞便の希釈液にダイゼインを添加し、嫌気培養を行った。培養終了後、培養液を抽出し、培養物のイソフラボン類濃度を測定した。また、食物摂取頻度調査 (FFQg) によって食事情報を調査した。

【結果と考察】20名の参加者のうちで equol 産生者は13名であった。セロオリゴ糖摂取期間とデキストリン摂取期間のいずれにおいても equol 産生者は非産生者に比べてBMI値が低い傾向が認められた。セロオリゴ糖摂取により equol 産生者13名中7名の糞便菌叢の equol 産生性が向上した。デキストリン摂取では equol 産生者13名中4名の糞便菌叢の equol 産生性が向上した。また、セロオリゴ糖摂取期間とデキストリン摂取期間とでは幾つかの食品摂取量に違いが認められた。試験食の違いが被験者の食品摂取に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

一般演題 B-10**乳酸菌発酵成分配合流動食およびプレバイオティクスが経管栄養患者のインフルエンザワクチン抗体価に及ぼす影響****Enhanced vaccination effect against influenza by prebiotics and enteral formula containing fermented milk products in enterally-fed patients**

○永渕真也¹, 栗原リナ², 奥田研爾², 高杉 諭¹, 山地健人¹,
高見正雄¹, 山本孝之², 丸山光生³, 赤津裕康^{2,4}

¹ 株式会社明治, ² 医療法人さわらび会福祉村病院,

³ 国立長寿医療センター研究所老化機構研究部, ⁴ 名古屋市立大学大学院医学研究科

【目的】 乳酸菌発酵成分配合流動食およびプレバイオティクス（ガラクトオリゴ糖およびプロピオン酸菌（*Propionibacterium freudenreichii* ET-3）による乳清発酵物）を高齢の経管栄養患者に投与し、腸内菌叢とインフルエンザワクチン接種後のワクチン抗原に対する抗体価等の推移を検討した。

【方法】 高齢の経管栄養患者を2群に分け、汎用流動食（対照群：11名）、あるいは乳酸菌発酵成分配合流動食およびプレバイオティクス（介入群：12名）を10週間投与した。試験開始後4週目でインフルエンザワクチンを接種し、接種前、接種後2週および6週のA/H1N1, A/H3N2, Bの3種の抗原に対する抗体価を赤血球凝集抑制試験（HI法）で調べた。HI法による抗体価が40以上を感染防御に有効な抗体価（中和抗体価）として中和抗体価の保有率を2群間で比較した。また、ビフィズス菌などの腸内菌叢をリアルタイムPCRで分析した。

【結果】 ビフィズス菌数（対数値）の試験開始前後の推移は、対照群ではほとんど変化なかったのに対して、介入群では増加傾向が見られた。インフルエンザワクチンに対する抗体価に関しては、介入群では、ワクチン接種前に比べて接種後2週目と6週目でA/H1N1とA/H3N2に対する抗体価が有意に上昇した。一方、対照群では、ワクチン接種後2週目のみでしかこの上昇が見られなかった。また、ワクチン接種後6週目のA/H3N2抗原に対する中和抗体価の保有率は介入群の方が対照群より有意に高い値を示した。

【考察】 経管栄養患者への乳酸菌発酵成分配合流動食およびプレバイオティクスの同時投与により、汎用流動食と比べて、インフルエンザワクチン接種後の抗体価および中和抗体価の保有率がより長期間高く維持された。このことから、乳酸菌発酵成分配合流動食およびプレバイオティクスの同時投与が獲得免疫系に対して免疫賦活効果を示す可能性が示唆された。

一般演題 B-11*Lactobacillus gasseri* OLL2809 がアスリートの免疫指標および
コンディションに及ぼす効果Effects of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on immune function and
condition in athletes

○田村 明¹, 清水和弘², 花岡裕吉², 鷲谷浩輔², 竹村雅裕²,
古川拓生², 宮本俊和², 渡部厚一², 赤間高雄³

¹ 株式会社明治, ² 筑波大学, ³ 早稲田大学

【目的】 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 (OLL2809) は, インターロイキン -12 誘導活性を指標に選抜された菌株である. 本株は Th1 型の免疫機能を亢進し, スギ花粉症や子宮内膜症の改善効果を示すことが報告されている. さらに, 日常的に運動を行う大学生において, OLL2809 の摂取は高強度運動後の血中ナチュラルキラー細胞活性の低下を抑制した. 一方, 高強度運動トレーニングを行うアスリートは免疫機能が低下しやすく, 風邪等の上気道感染症に罹患しやすい. この原因の一つとして唾液中分泌型免疫グロブリン A (SIgA) の低下が報告されている. そこで, OLL2809 が合宿期間中を含むアスリートの免疫機能およびコンディションに与える効果について検討した.

【方法】 本試験はプラセボ対照二重盲検並行群間試験で実施した. 男子大学ラグビー選手 67 名を唾液中 SIgA 分泌速度により OLL2809 群とプラセボ群に分けた. 試験期間は 9 週間とし, 試験開始 4 週目から 9 週目を合宿期間とした. OLL2809 群には OLL2809 加熱菌体を 2 錠あたり 100 mg 含むタブレットを毎日摂取させた. プラセボ群には OLL2809 の培地成分を含むタブレットを同様に摂取させた. 試験開始 0, 2, 4, 6, 8, 9 週目に唾液を採取し, ELISA 法にて SIgA 濃度を測定し, SIgA 分泌速度を算出した. また, 日誌により期間中の風邪症状の有無および睡眠状況等について調査した.

【結果】 プラセボ群の唾液中 SIgA 分泌速度は試験期間中ほとんど変化しなかった. 一方, OLL2809 群の唾液中 SIgA 分泌速度は, プラセボ群あるいは 0 週目と比較して, 試験開始 6 週目で有意に高い値となった. 試験期間中の風邪の罹患回数に両群で有意な差は認められなかったが, 風邪の罹患日数において OLL2809 群はプラセボ群と比較して有意に短くなった. また, OLL2809 群で 0 週目と比較して睡眠の質の改善が認められた.

【考察】 OLL2809 の摂取によりアスリートの合宿期間中の唾液中 SIgA 分泌速度が上昇し, 風邪の罹患日数が短くなった. これらの効果は, OLL2809 の Th1 型免疫機能の亢進によるものだと考えられた. 以上の結果より, OLL2809 の摂取は高強度運動トレーニングを行うアスリートのコンディション維持に有用であると考えられた.

一般演題 B-12*Lactobacillus gasseri* CP2305 株：Paraprobiotics としての
整腸効果の検証Regulatory effect of paraprobiotic *Lactobacillus gasseri* CP2305
on gut function澤田大輔¹, 菅原智詞², 〇相原浩太郎², 藤原 茂²¹カルピス(株) 商品開発センター, ²カルピス(株) 発酵応用研究所

【目的】 *L.gasseri* CP2305 株（以下 CP2305 株）が脳腸相関に影響を与えていることが明らかとなった。動物試験においては、CP2305 殺菌体が大腸機能を調節する骨盤神経の健全性を保つと共に、実際に生菌体・殺菌体の示す整腸効果自身も同等であった。これらは脳腸相関を介する可能性が高く、一昨年の本大会において報告している。未だに Probiotics に比べ報告例は少ないものの、殺菌乳酸菌の機能は Biogenics ないし Paraprobiotics として定義されており、流通や取扱いの容易さ等からも大きな魅力をもつ。殺菌乳酸菌の整腸効果については、球菌で少数ながら検証例がある。一方、桿菌での報告例は殆ど見当たらない。脳腸相関を通じて生体機能調節の可能性を持つ CP2305 株の Paraprobiotics としての応用性を探索する目的のため、二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を企画し、殺菌した CP2305 株のヒトでの整腸効果を検証した。

【方法】 排便回数が少ない傾向にあるボランティア（週 5 回以下）、排便回数の多い傾向にあるボランティア（11 回以上）各 20 名を半数の 10 名ずつ、均等に 2 群に割り付けた。1 群には、乳酸で酸度調整した擬似発酵乳（10%脱脂乳）約 13 g を原材料として調製した乳性飲料 190 g を、他群には、CP2305 株で発酵させた発酵乳約 13 g を原材料として調製した乳性飲料 190 g を、1 日 1 回、3 週間連続して摂取させ、期間を通じた排便習慣・便性・腸内代謝および腸内細菌叢の変化を調べた。

【結果】 殺菌した CP2305 株により、便性（BSS 評価）は正常化した ($p < 0.01$)。排便回数の調整作用は明確ではなかったが、便性と排便回数との有意な相関 ($p < 0.05$) が得られ、排便回数自体も調整される可能性が示された。また、色調の淡色化 ($p < 0.01$)、すっきり感の改善 ($p < 0.05$) も認められた。腸内代謝に関し、腐敗物質には有意な変化は見られなかったが、短鎖脂肪酸の有意な増加が見られ、腸内環境の改善が明らかとなった。プロピオン酸は増加傾向 ($p < 0.10$) であったが、酪酸 ($p < 0.05$) および吉草酸 ($p < 0.05$) の有意な増加が示された。腸内細菌叢では、*Clostridium* cluster IV の有意な増加 ($p < 0.05$) が認められた。層別解析により、初期排便回数の少ないサブグループで大きな増加 ($p < 0.05$) が明らかとなった。定量 PCR により、*Faecalibacterium prausnitzii* の増加が示されている。

【考察】 生菌発酵乳の整腸効果は、通常 1 日 100 g 摂取にて評価される。CP2305 は約 13 g の殺菌発酵乳が含む菌体 (1×10^{10} 個) が強い整腸効果を示した。乳酸以外の微量な代謝物が寄与する可能性も残るが、以後検討したい。今後、関与成分とその作用メカニズムの解明が必要となるが、その先に見える景色はこれまでと異なったものになると思われる。