

一般演題 B-1**ヒト腸内菌叢のケルセチン代謝の解析****Analysis of the quercetin metabolism of the human microbiota**

○田村 基¹, 堀 幸子¹, 星 千草¹, 高橋俊輔², 富田順子², 寺尾純二³

¹ 国立研究開発法人農研機構食品総合研究所, ² 株式会社テクノスルガ・ラボ,

³ 徳島大学大学院医歯薬学研究部

【目的】 ケルセチンが西洋型食で誘導されるマウスの肥満及びメタボリックシンドロームを改善することや疫学調査において、ケルセチンの摂取量が多いほど虚血性心疾患による死亡率が低かったことなどが報告されていて、ケルセチンの生活習慣病予防効果が期待されている。ケルセチンを代謝する腸内細菌の報告はあるものの、腸内菌叢のケルセチンの代謝性や食事との関連性についての報告は少ない。そこで、ヒト糞便菌叢のケルセチン代謝性と食事内容との関連性について検討した。

【方法】 成人女性 3 人と成人男性 7 人から新鮮糞便の提供を受けた。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 0.2 ml に 40 μg のケルセチンを添加し、24 時間嫌気培養を行った。培養終了後、培養液を抽出し、培養物のケルセチン濃度を測定した。糞便の DNA を抽出し、Pro341f Pro806r プライマー (PLoS One 9, e105592) を用いて PCR を行い、次世代シーケンス解析によって糞便検体に含まれる微生物群集解析を行った。また、糞便提供者の採便直前一週間の食事情報を食物摂取頻度調査 (FFQg) によって調査した。

【結果と考察】 糞便希釈液のケルセチンの 24 時間培養において、ケルセチンのほとんどが代謝されるヒトが多かった。ケルセチン分解性の比較的低いヒトも存在した。今回の培養条件においては、ケルセチンは糞便菌叢によって代謝分解されやすいフラボノイドである可能性が示唆された。食事調査において、脂質エネルギー比とケルセチン分解性には負の相関が認められ、炭水化物エネルギー比とケルセチン分解性には正の相関が認められた。食事内容が腸内菌叢のケルセチン代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された。糞便希釈培養液中のケルセチン濃度と正の相関を示す腸内細菌が複数存在した。

一般演題 B-2

Lactobacillus gasseri の aggregation-promoting factor は
宿主への定着と *Campylobacter jejuni* の競合阻害に寄与するCell surface-associated aggregation-promoting factor
from *Lactobacillus gasseri* facilitates host colonization and
competitive exclusion of *Campylobacter jejuni*○西山啓太¹, 瀬戸泰幸², 岡田信彦¹, 山本裕司³, 向井孝夫³¹北里大学薬学部, ²雪印メグミルク(株) ミルクサイエンス研究所, ³北里大学獣医学部

【目的】 *Campylobacter jejuni* は、細菌性食中毒の原因菌の一つである。 *C. jejuni* は、家畜や家禽に広く常在しているが、鶏肉が主要な感染源であり、ニワトリの保菌率の低下が感染リスク低減の鍵を握っていると考えられる。我々は、乳酸菌を用いた感染予防の観点から、 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) による *C. jejuni* の感染阻害に取り組んできた。その結果、LG2055 は新生雛における *C. jejuni* の定着を顕著に抑制すること、さらに、本現象には LG2055 に特徴的な付着性または *C. jejuni* との共凝集性が関与すると示唆された (1)。本研究では、これらの表現型に寄与すると推測される細胞表面タンパク質 aggregation-promoting factor (APF) に着目し、感染阻害における APF の役割の評価を目的とした。

【方法】 LG2055 の APF は、2つのホモログ (APF1, APF2) が存在する。各 *apf* 欠損株を作成し、これを供試菌株とした。白色レグホーンの新生雛に *C. jejuni* を感染後、14日間にわたり LG2055 を投与し、盲腸内における *C. jejuni* の菌数を評価した。また、ヒト腸上皮由来 Int407 細胞をモデルとして、 *C. jejuni* の細胞侵入性をゲンタマイシン防御試験により評価した。さらに、APF 組換えタンパク質を用いて、表面プラズモン共鳴による APF のレセプター解析を試みた。

【結果】 新生雛を用いた感染試験では、LG2055 野生株と $\Delta apf2$ 投与群において定着抑制効果が認められたが、 $\Delta apf1$ 投与群では顕著に低下した。また、Int407 細胞への *C. jejuni* の侵入性も、野生株と $\Delta apf2$ 添加区のみで抑制効果が認められた。一方、 *C. jejuni* との共凝集性は APF1 と APF2 が関与するが、LG2055 の付着性には APF1 のみが関与した。さらに、APF1 がフィブロネクチンに対して特異な結合性を示すことを見出した。

【考察】 LG2055 による感染阻害には、APF1 を介した LG2055 の付着性が重要であり、APF1 を介した *C. jejuni* との付着部位の競合現象が生じている可能性が考えられた (2)。

(1) Nishiyama et al. PLoS One, 2014; 9(9): e108827.

(2) Nishiyama et al. Molecular Microbiology, 2015; 98(4): 712-726.

一般演題 B-3

乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849 による
濾胞性ヘルパー T 細胞誘導機構の解析Induction of T follicular helper cells by *Lactobacillus paracasei* MCC1849

糸賀翔大¹, 新井 聡², 岩淵紀介², 上滝隆太郎¹, 佐藤風太¹,
芝原恭子¹, 清水金忠³, 阿部文明², 〇八村敏志¹

¹ 東京大学農学生命科学研究科・食の安全研究センター, ² 森永乳業(株) 素材応用研究所,
³ 森永乳業(株) 基礎研究所

【目的】 IgA 抗体は腸管における感染防御や腸内共生菌の制御に重要な役割を果たしている。濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) は、胚中心に局在し B 細胞と相互作用することにより抗体産生の誘導に関わる T 細胞である。腸管の IgA 産生にも Tfh 細胞が関与し、これに腸内細菌が関与することが知られているが、経口摂取した乳酸菌の Tfh 細胞への影響は明らかにされていなかった。当研究グループでは乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849 (MCC1849) をマウスに経口投与することにより抗原特異的 IgA 抗体産生が誘導され、その際小腸パイエル板 (PP) において Tfh 細胞が増加することを見出した。さらに、*in vitro* における樹状細胞, T 細胞, B 細胞の共培養系において、CpG オリゴデオキシヌクレオチド存在時に MCC1849 を添加することで Tfh 様 (CXCR5⁺PD-1^{high}) CD4⁺T 細胞誘導が促進されることも明らかにしている。本研究では、*in vitro*, *in vivo* の系を用いて MCC1849 による Tfh 細胞誘導機構について検討した。

【方法】 BALB/c マウス PP より樹状細胞として CD11c⁺ 細胞, 脾臓 (SPL) より B 細胞として IgM⁺ 細胞, また DO11.10TCR トランスジェニックマウス SPL より CD4⁺T 細胞をそれぞれ MACS により分離し、これら細胞を卵白アルブミン (OVA) 抗原ペプチド, CpG および MCC1849 菌体の存在下で共培養した。mRNA 発現を定量 RT-PCR 法, 細胞サブセットをフローサイトメトリー, 培養上清中のサイトカイン量を ELISA によりそれぞれ解析した。またマウスへの投与実験は、MCC1849 殺菌体含有飼料または通常飼料を 2 週間投与したマウスに、OVA とコレラトキシンを 1 週間毎に 3 回経口投与することで経口免疫を行った。PP 等腸管組織の細胞サブセット, mRNA 発現を解析した。

【結果】 PP 樹状細胞, SPL T 細胞, SPL B 細胞の CpG 存在下での共培養に MCC1849 を添加することにより、B220⁺IgA⁺B 細胞, CXCR5⁺PD-1^{high}CD4⁺T 細胞が誘導された。このとき、Tfh 細胞の機能を司る転写因子である Bcl-6 の mRNA 発現量, また、Tfh 細胞誘導に関わる可能性のあるサイトカインである IL-6, IL-12p40 産生量が上昇した。MCC1849 含有飼料を摂取したマウスの PP では Tfh 細胞の割合が増加が認められ、IL-12 p40, IL-21, Bcl-6 の mRNA 発現量が増加していた。

【考察】 MCC1849 菌体の摂取は、PP の Tfh 細胞を誘導することにより IgA 産生を促進することが示唆された。また、その誘導には IL-6 や IL-12 が関与する可能性が示唆された。

一般演題 B-4

Effect of probiotic *Bifidobacterium lactis* BI-04 on host immune responses to experimental rhinovirus infection and concomitant gut microbiota in healthy adults

Ronald B. Turner¹, ○ Anna Lyra², Ashley Hibberd³,
Sampo Lahtinen², Markus J. Lehtinen²

¹University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, USA,

²DuPont Nutrition & Health, Kantvik, Finland, ³DuPont Nutrition & Health, Madison, USA

Purpose 【目的】

Probiotics have been reported to significantly reduce the risk of upper respiratory tract illnesses in a number of recent studies. One study in healthy active adults found that supplementation with *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BI-04 (BI-04) reduced the risk of respiratory illness episodes by 27% over 5 month winter season. The mechanism of this effect is not known. The purpose of this study was to determine the effect of administration of BI-04 on host responses to experimental rhinovirus (RV39) challenge and to assess changes in gut microbiota due to treatment or viral challenge.

Method 【方法】

One-hundred fifty-two seronegative volunteers who had been treated for 28 days, 73 probiotic and 79 placebo, were challenged with RV39. Administration of study treatment was then continued for five days during collection of specimens for assessment of host response, infection, and symptoms. Fecal samples were collected at three time-points; baseline (Day -28), after treatment (Day 0) and after viral challenge (Day 21-28) and analysed by quantitative PCR for BI-04 and by Illumina MiSeq platform sequencing of 16S rRNA gene V4 region for microbiota composition.

Results 【結果】

Fifty-eight probiotic and 57 placebo-treated volunteers met protocol defined criteria for analysis. Analysis of nasal lavage IL-8 concentration as the primary outcome variable revealed significantly higher concentrations of IL-8 on Day 0 prior to virus challenge in the probiotic-treated volunteers (97 versus 58 pg/mL, respectively, $p=0.04$). In contrast, the IL-8 response (change in IL-8 compared to day 0 over days 1-5) to RV39 challenge was significantly reduced in the probiotic-treated group (geometric mean ratio for change, probiotic: placebo=0.65, $p=0.03$). The administration of probiotic was associated with a reduction in nasal lavage virus titer and the proportion of subjects with virus shedding was lower in the probiotic-treated subjects (76% in the probiotic group, 91% in the placebo group, $p=0.04$). There was no effect of probiotic treatment on symptom severity, lower respiratory inflammation (assessed by eNO) or serum antibody responses to the study virus. On Day 0, the supplemented probiotic strain BI-04 was detected in 69% of active group participants and none of the placebo group participants. The overall composition and diversity of intestinal microbiota remained stable through treatment and viral challenge. Assessment of blinding and compliance revealed no differences between the probiotic and placebo groups. Adverse events were recorded for all subjects who were randomized to study treatment (95 probiotic, 95 placebo). Gastrointestinal adverse events occurred only in the probiotic group (13 occurrences in 9 subjects).

Discussion 【考察】

This study demonstrates that ingestion of probiotic has an effect on the baseline state of innate immunity in the nasal mucosa and on the subsequent response of the host to rhinovirus challenge. The gut microbiota appears resilient to both probiotic treatment and viral challenge. These findings provide first evidence in humans on the potential mechanisms behind reduced upper respiratory illness risk in healthy active adults by the probiotic BI-04.

一般演題 B-5

潰瘍性大腸炎寛解維持に対する probiotics 投与の検討

The effect of probiotics for maintenance therapy to patients with ulcerative colitis conducted by multicenter clinical study

○中村健太郎¹, 福田勝之², 吉村直樹³, 勝野達郎⁴, 鈴木康夫¹

¹ 東邦大学医療センター佐倉病院内科学講座, ² 聖路加国際病院消化器内科,

³ 東京山手メディカルセンター消化器内科・炎症性腸疾患内科,

⁴ 千葉大学柏の葉診療所東洋医学センター

【目的】潰瘍性大腸炎 (UC) の病態に腸内細菌叢を介した腸管免疫機能異常が強く関与していることが推測され, 腸内細菌叢の是正を介し治療効果を発揮する probiotics 投与は UC に対して治療効果を発揮することが期待される. 当施設におけるプラセボと probiotics の二重盲検無作為投与臨床試験で, 糞便中細菌叢の T-RFLP 法分析に基づくクラスター解析で患者糞便菌叢は大きく 3 つの cluster に分類されるが, *Bifidobacterium* 属が少ない cluster I に属する患者はその他の cluster II, III に分類される患者に比べ probiotics 投与によって高い寛解維持効果を有する傾向が認められた. そこで多施設共同で, T-RFLP 法により便中細菌叢の cluster I に分類される症例群を抽出し, プラセボとの二重盲検無作為投与試験を実施し probiotics の UC に対する長期寛解維持効果を検討した.

【方法】4 施設において標準的治療で臨床的寛解を維持している UC 患者 251 症例中 T-RFLP 法にて cluster I に属する 100 症例中 76 例が同意した. ラクトミン (*Streptococcus faecalis* T-110) 2 mg, 酪酸菌 (*Clostridium butyricum* TO-A) 10 mg, 糖化菌 (*Bacillus mesentericus* TO-A) 10 mg, バレイシヨデンプン及び乳糖からなる probiotics 製剤とプラセボとを無作為に割り付け, 1 年間投与し, 臨床症状の推移と糞便中細菌叢解析を行った. 糞便内細菌叢の解析は T-RFLP 法に基づいておこない, 臨床統計学的解析は両群間における 1 年間の寛解維持率 (寛解維持患者数/総患者数; %) を Kaplan-Meier 法で比較した.

【結果】試験に同意した症例のうちプラセボ群に 37 例, probiotics 群に 39 例が無作為に割り付けられた. 12 か月までの寛解維持率について Kaplan-Meier 法にて観察したところ, 再燃した患者はプラセボ群 11 例 (寛解維持率: 70.3%), probiotics 群 10 例 (寛解維持率: 74.4%) で, log-rank 検定を行ったところ有意差は認めないものの probiotics 群で高率な傾向があった. 年齢層別に解析したところ 47 歳以下の 40 症例の 12 か月後の再燃数は, プラセボ投与群 7 例 (寛解維持率: 58.8%), probiotics 群 4 例 (寛解維持率: 82.6%) で有意に高率であった. 47 歳以下の probiotics 投与群で寛解維持された症例の T-RFLP 法による投与前後の腸内細菌叢を観察したところ, 特徴のある菌群の変動が観察された.

【考察】47 歳以下の患者で標準的治療で早期に寛解導入された症例に対しては probiotics 投与が長期寛解維持に有効であり, 腸内細菌叢を介した作用であることが示唆された.