

一般演題 1

母子糞便より分離されたビフィズス菌のPFGE解析と
好気・微好気環境での生残性試験PFGE Analysis and Survival Tests in Aerobic and Microaerobic
Environment of Bifidobacteria Isolated from Maternal and Neonatal Feces

○木島 彩¹, 吉田 優², 大澤 朗¹
神戸大学大学院・農学研究科¹, 医学研究科²

【目的】 偏性嫌気性グラム陽性桿菌であるビフィズス菌は、新生児腸内細菌叢において圧倒的多数を占める。その由来として、母親からの「垂直伝播」が示唆されているが、実際に母親由来ビフィズス菌が子の腸内に伝播しているという直接的な知見は未だ報告されていない。そこで本研究では、まず健康母親およびその新生児糞便より分離されたビフィズス菌について Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法による菌株識別を行うことにより、菌株レベルでの母から子への菌株の伝播の有無について検証した。次いで伝播経路の推測を行うため、「母子垂直伝播」が確認されたビフィズス菌株の好気及び微好気条件下、さらにヒトの手指に付着した場合の生残性を調べた。

【方法】 生後3日、1ヶ月時に母子糞便よりビフィズス菌を分離した。その中で *B. longum* subsp. *longum* は高頻度に分離され、さらに5組の母子より共通して分離されたため、この種についてPFGE法による菌株識別および系統解析を行った。さらに新生児糞便由来株とPFGEバンドパターンが完全に一致した母親糞便由来株について、好気・微好気条件下、MRS平板上での生残性試験を行った。好気条件下については、手指上および乾燥状態での生残性試験も行った。

【結果および考察】 5組中2組の母子より、生後3日目においてPFGEバンドパターンが完全に一致する菌株が確認された。さらに1組の母子からは、生後3日、1ヶ月目共にPFGEバンドパターンが完全に一致する菌株が確認された。一方他の母親と新生児、あるいは新生児間から、同系統の pulsotype に分類される菌株は確認されなかった。次いでMRS平板上での生残性試験では、好気条件下で6時間、微好気条件下で18時間、生残数が維持される結果となった。また、手指上では生残数が急速に減少し、3時間で全ての菌が死滅した一方、乾燥状態では生残数が緩やかに減少し、36時間で全ての菌が死滅した。以上の結果より、母から子へのビフィズス菌の垂直伝播が菌株レベルで確認されたとともに、その伝播は手指でなく、産道や環境を介して起こっていることが示唆された。

一般演題 2**定量的RT-PCR法による大便中*Clostridium difficile*定量法の構築****Development of Sensitive Quantification of
Intestinal *Clostridium difficile* by Quantitative RT-PCR**

○松田一乗, 辻 浩和, 朝原 崇, 野本康二
ヤクルト中央研究所

【目的】 *Clostridium difficile* は院内感染の原因菌として重要である。本菌の検出には、主に分離培養法、細胞毒性試験、免疫学的検査法が用いられているが、検出感度が低い、迅速性に欠けるなどの問題を有している。一方、一昨年度の本大会において我々は、細菌のrRNAを標的とした定量的RT-PCR法(1, 2)により大便中の*C. difficile*を高感度かつ迅速に定量可能であることを報告した。本報告では、*C. difficile*の増殖状態の違いが定量的RT-PCR法の検出感度および検出精度に及ぼす影響を解析し、これを培養による検出法と比較した。

【方法】 *C. difficile*の栄養細胞および芽胞を調製し、それぞれに対する定量的RT-PCR法の検出感度を解析した。次に、定量的RT-PCR法により純培養菌液および感染マウス糞便における*C. difficile*の菌数変化を経時的に解析し、これを培養法による結果と比較した。

【結果および考察】 定量的RT-PCR法により*C. difficile*の栄養細胞および芽胞はともに同等の感度で定量された。また、純培養菌液および感染マウス糞便中の*C. difficile*を調べたところ、選択培養法(エタノール処理した後CCMA培地にて培養)に比べて定量的RT-PCRにより高感度に定量され、特に増殖期の*C. difficile*を含む試料において両検出法間で顕著な差が認められた。本結果から、選択培養法では芽胞のみを検出し得るのに対して、定量的RT-PCR法は増殖状態に関わらず*C. difficile*の全体数を測定可能であり、感染菌の迅速かつ正確な検出において有効な手法であると考えられた。

<参考文献>

- (1) Matsuda K. et al. 2007. AEM. 73 : 32-39.
- (2) Matsuda K. et al. 2009. AEM. 75 : 1961-1969.

一般演題 3

16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法による
胆汁酸添加食摂取ラット腸内細菌叢の解析Analysis of the Effect of Cholic Acid-Supplemented Diet
on the Microbiota Composition of Rat Cecum
by Sequencing 16S rRNA Gene Clone Libraries

○K. B. M. Saiful Islam, 萩尾真人, 石塚 敏, 吹谷 智, 横田 篤
北海道大学大学院農学研究院

【目的】ヒトの主要な一次胆汁酸であるコール酸 (CA) は、腸内で *Clostridium* 属の一部の菌種により二次胆汁酸の一種であるデオキシコール酸 (DCA) に変換される。DCAは、実験動物において大腸癌発癌プロモーター活性を持つこと、ヒトにおいては発癌性物質となる可能性が報告されている。また、近年本邦において大腸癌が増加している理由として、食生活の欧米化による脂質摂取量の増加と、それに伴う腸内胆汁酸量の増加との関連が指摘されている。そこで本研究では、腸内胆汁酸量の増加が、胆汁酸組成と腸内細菌叢に与える影響を明らかにするため、CA添加食摂取ラットを用いて、胆汁酸組成と菌叢の変化を解析した。

【方法】WKAH/Hkm雄ラットを4日間予備飼育後、10日間試験飼育を行った。試験飼育は、コントロール群 (基本飼料)、低濃度群 (1.25 mmol CA/kg diet)、高濃度群 (5 mmol CA/kg diet) の3群に分け、各飼料を自由摂取させた。糞中の胆汁酸組成については、UPLC/ESI-MS法により網羅的に解析した (Hagio et al., J Lipid Res, 2009)。また盲腸内細菌叢については、盲腸内容物からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子クローンライブラリーの塩基配列解析により解析した。

【結果】CA添加食の摂取により、総胆汁酸量および二次胆汁酸量は大幅に増加した。特にDCAについては、コントロール群と比較して低濃度群において50倍、高濃度群においては132倍に増加した。このことから、腸内細菌によるCAからDCAへの変換反応が亢進していると考えられた。菌叢解析の結果、*Bacteroidetes* および *Actinobacteria* の急激な減少と、*Firmicutes* の増加が観察された。また高濃度群では、*Firmicutes* 内の *Clostridia* の増加が観察された。

【考察】ラットとヒトでは胆汁酸組成が異なるが、本研究においてCA添加食摂取によりDCAへの顕著な変換が観察されたことから、本実験系はヒト大腸におけるCA代謝のモデルとして有用と考えられる。また、一般にグラム陰性菌はグラム陽性菌に比べて胆汁酸耐性が高いことが知られているが、菌叢解析の結果は逆であり、非常に興味深い。DCA生成菌が属する *Clostridia* の増加が見られた点から、胆汁酸変換反応の影響がこの菌叢変化に寄与しているものと推察される。本研究により得られた知見は、ヒト大腸における胆汁酸の増加による菌叢・胆汁酸代謝の変化を知る上で、有用な基礎情報となるものと考えられる。

一般演題 4**食事誘導性肥満マウスにおけるラクト-N-ビオース (LNB) による
体重変動及び腸内菌叢に対する影響****Anti-Obesity Effects of Lacto-N-Biose (LNB) and its Relationship
with Intestinal Microbiota in Obese Mice**

○佐藤拓海¹, 近藤しずき¹, 高橋幸子¹, 小田巻俊孝¹, 清水金忠¹, 八重島智子¹, 岩附慧二¹, 北岡本光²
¹森永乳業食基研, ²農研機構食総研

【目的】 演者らは昨年の本学会において、母乳中に含まれるオリゴ糖の構成単位であるラクト-N-ビオース (LNB) が乳児に多く存在するビフィズス菌種に優先的に利用され、ビフィズス菌の増殖因子の作用を有すること、及びマウスに投与した場合に菌叢を改善する作用を有することを報告した。また、近年では腸内菌叢が肥満と密接に関係していることが動物及びヒトを対象にした研究から示されている。本研究では、食事誘導性肥満マウスを用い、LNB投与による体重変化や腸内菌叢への影響を調べた。

【方法】 C57BL/6Jマウスを高脂肪食で4週間飼育して肥満を誘導した後、高脂肪食に3%コーンスターチ(対照群)、0.3%、1%、3% LNB (LNB群) を添加して8週間摂取させ、経時的に体重の変動や解剖時に各組織重量を測定した。また、高脂肪食飼育前、試験食品摂取前及び試験終了時に糞便を回収し、定量PCRなどの手法により菌叢を解析した。

【結果】 LNBの投与により用量依存的に体重増加が抑制され、解剖時において白色脂肪組織重量(精巣上体周辺+腎臓周辺の脂肪組織)や肝臓重量の低下及び盲腸重量の増大などが認められた。普通食摂取と比べて、高脂肪食摂取では糞便菌叢における総菌量やFirmicutesは顕著に変化しなかったものの、Bacteroidetesが有意に減少し、Firmicutes/Bacteroidetes比が有意に上昇した。また、乳酸桿菌が有意に減少した。一方、LNBの投与により、Bacteroidetesの増加及びFirmicutes/Bacteroidetes比の低下が観察され、ビフィズス菌が有意に増加した。特に、Bacteroidetesが体重増加及び白色脂肪組織重量と有意な負の相関を示し、ビフィズス菌と盲腸重量の間に正の有意な相関が認められた。

【考察】 以上の結果からLNBによる抗肥満作用およびその作用が腸内菌叢を介していることが示唆された。

一般演題 5

上部消化管切除手術に伴う大腸内細菌叢の変化

Changes in the intestinal microflora after surgery
for gastric or esophageal cancer○十二村仁美¹，大内一智²，曾根輝雄¹，田中みち子¹，鶴丸昌彦²，浅野行蔵¹¹北海道大学大学院農学院，²順天堂大学医学部附属順天堂医院・がん治療センター／食道胃外科

【目的】食道や胃などの上部消化管を切除した場合，術後に腹部膨満感・排ガスの異常な増加・悪臭のある排ガスが出るなどの大腸機能に由来する腹部症状があらわれるケースが多く報告されており，患者のQOLの低下が問題となっている．しかし，上部消化管切除手術後に下部消化管である腸内の細菌叢に起こる変化や，腸内細菌叢の変化と術後の腹部症状との関連についてはあまり調べられておらず，不明な点が多い．よって本研究では，乳酸菌製剤の経口摂取により術後患者の腸内細菌叢を調整し，術後の腹部症状を軽減することを最終的な目標として，上部消化管切除手術を受けた患者の腸内細菌叢が術前と術後でどのように変化するかを調べた．

【方法】上部消化管切除手術を行なった胃がん患者28人，食道がん患者22人を対象とした．術前・術後の糞便サンプルからDNAを抽出し，細菌の16S rRNA遺伝子に基づいたPCR-DGGE法による菌叢解析を行なった．また，腹部膨満感・便秘異常等の有無についてのアンケートを行なった．

【結果】術前から術後にかけてのバンドパターンの変化や変化の大きさはそれぞれの患者によって違いがあり，がんの種類や術後のサンプリング時期に関連するはっきりとした傾向はみられなかった．しかし，術前では現れていないが術後に初めて現れたバンド，および術後になって完全に消えてしまったバンド数を数え，この数を細菌叢の変化の大まかな指標とし，これに基づいて患者を細菌叢の変化の大きさで分類した結果，中等度の変化および特に著しい変化をおこした患者数を合わせると全体の8割以上を占め，大部分の患者の術後の腸内細菌叢に比較的大きな変化が起こっていることが明らかとなった．また，種特異的なプライマーを用いて簡易的に調べた結果，約半数の患者において術後の糞便サンプルからのみ *Akkermansia muciniphila* が検出された．

【考察】手術の領域は胃や食道等の上部消化管に限られているにも関わらず，下部消化管である大腸内の細菌叢に変化の起こっている例が多かった．しかし，バンドパターンの変化の大きさや *A. muciniphila* の検出と腹部膨満感・便秘異常の有無との間には，必ずしも明確な関連性はみられなかった．今後は細菌叢の定量的解析と，腹部症状についての詳しいアンケートを患者に対して行なうことで，引き続き細菌叢と症状の関係性を調べていく．