

一般演題 A-5

デキストラン硫酸ナトリウム誘導性腸炎マウスモデルにおける
Lactobacillus plantarum 22A-3 の腸管炎症抑制効果Oral administration of *Lactobacillus plantarum* 22A-3 alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in C57BL/6 mice○ Jarukan Lamubol¹, 西谷洋輔², 林多恵子³, 奥田 洋³, 水野雅史¹¹ 神戸大学大学院農学研究科, ² 神戸大学自然先端, ³ 丸善製薬(株) 研究開発本部

【目的】 プロバイオティクスである乳酸菌は腸炎緩和・抑制効果を持つと報告されている。しかし、プロバイオティクスの免疫学的効果は株特異的なものであり、作用機構も異なることが知られている。我々の研究室では *in vitro* 腸管炎症モデルを用いて、*Lactobacillus plantarum* 22A-3 が炎症性サイトカインである TNF- α 産生および IL-8 mRNA 発現を有意に抑制することから、抗炎症効果を持つ可能性を示した。また、*L. plantarum* 22A-3 の細胞壁構成成分は腸管上皮細胞において抗炎症性サイトカインである TGF- β mRNA 発現を誘導したことから、TGF- β の発現誘導が抗炎症効果に寄与しているのではないかと考えられた。本研究では、*in vivo* における効果を調べるため、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎マウスモデルを用いて、*L. plantarum* 22A-3 生菌体の経口投与による腸炎への影響を検討した。

【方法】 7週齢の C57BL/6 雌マウスを1週間予備飼育し、DSS 非投与群 (Con), *L. plantarum* 22A-3 生菌体を 1×10^8 cfu/mouse/day で経口投与した群 (22A-3), DSS を投与した群 (DSS), DSS と 22A-3 を投与した群 (DSS + 22A-3) の4群に分けた ($n = 8$)。蒸留水またはサンプルの経口投与を開始して7日後、2% DSS 水溶液を飲水として7日間自由摂取させた。DSS 飲水投与後、3日間蒸留水に切り替え飼育した後、マウスを頸椎脱臼で安楽死させた。実験期間中に体重変化および便性状の観察を行った。解剖後は結腸の長さを測定し、H&E 染色した結腸組織切片に対して病理組織学的解析を行った。

【結果および考察】 DSS 群は Con 群と比較して、DSS 投与開始から5日後に体重減少が見られ、軟便、血便が観察された。実験開始時の体重を100%とした時、実験終了時の Con 群、22A-3 群および DSS 群の体重は、各々105%、104%、79.1%であった。一方、DSS + 22A-3 群の体重は83.9%であり、DSS 群と比較して体重減少は有意に抑制された ($p < 0.05$)。結腸の長さにおいては、DSS 群が 4.6 ± 0.1 cm、DSS + 22A-3 群が 5.5 ± 0.1 cm であり、22A-3 株の投与により炎症による結腸の短縮が有意に改善された ($p < 0.01$)。さらに、結腸の組織学的スコアは DSS 群が 9.1 ± 0.3 、DSS + 22A-3 群が 7.9 ± 0.4 であり、22A-3 株の投与により炎症による組織の損傷が有意に改善されることが明らかとなった ($p < 0.05$)。以上の結果から、*L. plantarum* 22A-3 は DSS によって誘導される腸炎を緩和する効果があることが示唆された。今後は、*in vivo* において本菌株が TGF- β の発現に及ぼす影響を検討する予定である。

一般演題 A-6**乳仔ラット壊死性腸炎モデルにおける *Bifidobacterium breve* M-16V の影響****Effect of *Bifidobacterium breve* M-16V on neonate rat necrotizing enterocolitis model**

佐藤拓海¹, 和泉裕久², ○岩淵紀介¹, 小田卷俊孝¹, 清水(肖)金忠¹, 阿部文明¹
¹森永乳業(株)食基研, ²森永乳業(株)栄科研

【目的】 我が国における低出生体重児の出生率は増加傾向にある。低出生体重児は乳児期における感染症のリスクや致死性の高い壊死性腸炎 (NEC: Necrotizing enterocolitis) の罹患リスクを上昇させるとされている。*Bifidobacterium breve* M-16V (M-16V) には乳児におけるアトピー性皮膚炎の改善などの抗アレルギー作用や、低出生体重児における感染症発生の抑制効果など乳児にとって有益な作用をもたらすことが確認されている。本研究では乳仔ラット NEC モデルにおける M-16V の効果を検討した。

【方法】 妊娠 SD ラットを用い、自然分娩の前日にあたる妊娠 20 日目に帝王切開により摘出したラットを早産仔ラットとした。得られた早産仔ラットはラットの母乳に近い組成の人工乳 (Pet-Ag 社 Esbilac canine milk (犬用) 75 ml に Abbott 社 Similac 60/40 (ヒト用) を 15 g 混合したものを 150 μ l \times 3 回/日で投与し 96 時間 (4 日) 哺育した。また人工乳投与前に低酸素 (5% O₂) に 10 分間 \times 3 回/日曝すことで NEC を誘導した。NEC を誘導した早産仔ラットに対して M-16V を人工乳に懸濁したものを 6 \times 10⁶ CFU/日, 6 \times 10⁷ CFU/日になるように投与した。96 時間後、解剖を行い、回腸組織を採取し組織切片の観察、遺伝子発現解析を行うことで NEC への影響を評価した。

【結果】 組織切片観察の結果、M-16V 投与群では用量に関わらず、非投与群と比べ有意な症状スコアの改善が観察された。また炎症性サイトカインである TNF- α , IL-6 の発現も M-16V 投与群で有意に減少していた。さらに TLR2 と TLR4 の発現解析を行ったところ、M-16V 投与群では、非投与群と比べ TLR2 の有意な発現上昇と TLR4 の有意な発現抑制が観察された。

【考察】 TLR4 を欠損させた新生仔マウスにおいて、NEC が発症しないことが報告されており、TLR4 下流の炎症反応が NEC 発症の原因因子として推定されている。

TLR4 の下流シグナルには NF- κ B の活性化を介した TNF- α , IL-6 の産生経路が存在する。今回の試験結果から、M-16V 投与は TLR4 の下流シグナルに抑制的に作用し、症状スコア改善をしている可能性が推察された。

一般演題 A-7

本邦における *Clostridium perfringens* の病原遺伝子保有状況Detection of virulence genes of *Clostridium perfringens* in Japan

○和田薫子¹, 高橋志達^{1, 2}, 大崎敬子², 花輪智子², 蔵田 訓², 米澤英雄²,
岡健太郎¹, 田口晴彦³, 稲松孝思⁴, 神谷 茂²
¹ミヤリサン製薬(株), ²杏林大学医学部感染症学講座,
³杏林大学保健学部免疫学研究室, ⁴東京都健康長寿医療センター

【目的】 *Clostridium perfringens* は腸内細菌叢の一構成菌である一方、食中毒、抗菌薬誘導下痢症、ガス壊疽、壊死性腸炎 (NE) 等の疾患の原因菌であり、これらの疾患は、*C. perfringens* が産生する様々な毒素によって誘導されることが知られている。NE については α , β および $\beta 2$ 毒素が特に関連があると言われているが、近年、欧米を中心に NE を惹起するのに重要な病原因子として新規毒素 NetB が報告されている。しかし、日本における NetB 陽性 *C. perfringens* の検出に関する報告はほとんどない。そこで我々は、日本各地より収集した家畜由来またはヒト臨床検体由来の *C. perfringens* 株または DNA をサンプルとして、NetB を含む *C. perfringens* の病原遺伝子の検出を試みた。

【方法】 食肉鶏、産卵鶏およびブタの糞便 113 検体より、カナマイシン含有 CW 寒天基礎培地 (日水製薬) を用いて、合計 68 株の *C. perfringens* を単離した。さらに、産卵鶏の分離株 9 株、ブタの *C. perfringens* 陽性糞便から抽出した DNA 53 検体、ブタ由来株の DNA 5 検体、ヒトの臨床分離株 33 株を加えた全 168 検体を本研究に用いた。ターゲットとした病原遺伝子は、NE との関連が報告されている *cpa*, *cpb*, *cpb2*, *netB* および *tpeL* の各毒素遺伝子で、その検出は既報のプライマーを用いた PCR により実施した。

【結果および考察】 食肉鶏、産卵鶏およびブタの便検体における *C. perfringens* の検出率は、それぞれ 34% (15/44), 94% (48/51) および 28% (5/18) であった。*C. perfringens* 分離株または *C. perfringens* 陽性検体において、*cpa* の検出率は 99% (167/168) であった。*cpb* は既報の通りブタでのみ検出された (13%, 8/63)。*cpb2* の検出率は産卵鶏 21% (21/48)、ブタ 62% (39/63) およびヒト 21% (7/33) であり、食肉鶏からは検出されなかった。*netB* 検出率は、食肉鶏 13% (2/15)、産卵鶏 37% (21/57) およびブタ 30% (19/63) であったが、ヒト臨床分離株は全て陰性 (0/33) であった。*tpeL* は、全ての検体から検出されなかった。*cpb*, *cpb2* および *netB* の検出率を比較すると、その分布は農場ごとに異なっていた。本結果は、飼育環境や、農場で使用している飼料の抗生物質の違いにより菌の構成が変わり、毒素の検出率に影響していると考えられた。以上の結果から、今回収集した検体において、毒素パターンは、畜種やヒトで異なることが示唆された。また、日本国内においても、*netB* 陽性株が家畜を中心に広範に分布していることが確認された。今後は、感染宿主の種類と毒素パターンの違いや、NE との関連性について更なる検討が必要である。

一般演題 A-8**口腔の健康な成人の口腔常在フローラの構成****Salivary microbiome in orally healthy subjects**

○竹下 徹¹, 深水 薫¹, 嶋崎義浩¹, 古田美智子¹, 柴田幸江¹, 清原 裕², 山下 喜久¹
¹九州大学大学院歯学研究院口腔予防医学分野, ²医学研究院環境医学分野

【目的】 口腔は腸管とともに膨大な数の細菌が生息する複雑な常在微生物叢の一つである。う蝕や歯周病をはじめとする口腔感染症の病原細菌もこの常在微生物叢の一員であり、取り巻く常在細菌との相互作用も疾患発症に強く関わっていると考えられる。一方で疾患を発症しにくい口腔常在フローラの構成については未だはっきりと定義されているとは言い難い。そこで本研究では口腔健康状態の良好な成人の口腔フローラの構成を詳細に解析し、「健康な」口腔常在フローラの特定を目指した。

【方法】 対象は 2007 年に福岡県久山町で行われた 40 歳以上を対象とした町民一斉健診の受診者のうち、24 歯以上の現在歯を有し、未処置う蝕歯、4 mm 以上の歯周ポケット、5 mm 以上のアタッチメントロスおよびプロービング時の出血部位が認められない口腔の健康な者 166 名とした。採取した唾液について 16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を利用した barcoded pyrosequencing 法を用い、細菌構成の解析を行った。

【結果】 166 名の検体に対し 798,232 リードの塩基配列が得られ、97% 以上の配列の一致を同一菌種 (operational taxonomic unit, OTU) とみなすと 11,952 OTU が検出された。Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria の 5 菌門がフローラの大勢を占めており、Streptococcus 属をはじめとする 13 菌属が全ての被験者から検出された。年齢の高い被験者ほど構成細菌の系統学的多様性 (Phylogenetic diversity) が低く、特に Granulicatella 属の構成比率の減少が認められた。

【考察】 本研究により、口腔の健康な成人の口腔常在フローラの構成が明らかになり、口腔フローラへ加齢の与える影響が示唆された。本結果は今後口腔常在フローラを対象とした新たな口腔疾患予防法の開発に向けて礎になると考えられる。