

一般演題 A-1**ヒト糞便 DNA 抽出法の違いによる腸内細菌叢解析への影響****Effects of different methods of DNA extraction
from human feces on microbiome analysis**

○緒方勇亮^{1,2}, 須田 亙^{2,3}, 高安侖奈², 黒川李奈², 三浦良子^{2,4}, 山下直子²,
進藤智絵², 飯岡恵里香², 田野倉真紀², 赤澤智宏¹, 服部正平^{2,5}

¹ 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科, ² 東京大学大学院新領域創成科学研究科,

³ 慶應義塾大学医学部, ⁴ (株)バイオジェノミクス, ⁵ 早稲田大学理工学術院先進理工学研究科

【目的】 ヒト腸内細菌叢は腸疾患をはじめ、様々な疾患との関連が指摘されている。サンプルの採取も比較的容易であるため、ヒト腸内細菌叢に関する研究報告は近年著しく増加している。しかし、多くの報告があるものの、糞便 DNA の抽出方法については研究ごとに異なっており、統一がされていない。抽出方法の違いが解析結果に影響を与える可能性は大いにあり、本研究では抽出方法の違いが解析に及ぼす影響を明らかにし、最適な方法の確立を目指すこととした。

【方法】 ボランティア 4 人より糞便を採取・凍結保存した。糞便を解凍・分割後、ビーズ破砕法・熱処理法・酵素法によってそれぞれ DNA を抽出した。MiSeq (Illumina 社) を用いてメタ 16S シークエンスとメタゲノムシークエンスを行い、菌組成等を解析した。

【結果】 酵素法の溶菌過程を解析すると、ほぼ全てのグラム陰性菌は SDS 処理で溶菌した。一方グラム陽性菌は SDS 処理のみでは溶菌せず、酵素処理によって初めて溶菌した。各方法で抽出された DNA 量は酵素法で最も多く、次いでビーズ破砕法となり、熱処理法では顕著に少なかった。また熱処理法で得られた菌組成は他の方法と大きく異なっていた。酵素法・ビーズ破砕法ではメジャーな菌種の組成に大きな違いは見られなかったが、酵素法でグラム陽性菌の占める割合が高かった。加えて OTU 数, chaol, ACE といった Richness を示す指標は酵素処理で優位に高かった。

【考察】 本研究で使用した方法の大半は SDS 処理を行っており、グラム陰性菌は溶菌できていると考えられ、グラム陽性菌の検出率は溶菌の指標として適している。DNA 量, グラム陽性菌検出率, Richness が高い酵素法はヒト糞便 DNA の抽出法として最も適していると考えられる。

一般演題 A-2**培養系ヒト腸管モデルを用いた難消化性食物繊維の腸内細菌群への影響****Effects of indigestible dietary fibers on human intestinal microbiota simulated in a single-batch fermentation system**○佐々木大介¹, 佐々木建吾¹, 生田直子², 近藤昭彦¹, 大澤 朗³¹ 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科, ² 神戸大学大学院医学研究科,³ 神戸大学大学院農学研究科

【目的】 機能性食品や医薬品の機能性は動物試験やヒト介入試験で評価されてきたが、ヒト腸管環境との齟齬や倫理的問題などがあった。これらを解消すべく、神戸大学では培養系ヒト腸管モデル (Kobe University Human Intestinal Microbiota Model [KUHIMM]) によるヒト糞便の培養により、個人ごとに異なる大腸内の細菌群集の菌数・全菌種の保持および短鎖脂肪酸 (SCFAs) 濃度のバランスを再現できるシステムを構築した。本システムにより、大腸内の細菌群と機能性食品・医薬品等の影響・効果について動的な解析が可能である。本研究では機能性食品として注目されている種々の難消化性食物繊維を用い、これらのヒト腸内細菌群への影響を評価することを目的とした。

【方法】 健康人 8 人から提供を受けた糞便を接種源とし、構造の異なる消化性・難消化性食物繊維 (消化性・難消化性デキストリン, 難消化性グルカン, デキストラン, α , β , γ -シクロデキストリン; 各 0.2 g/100 mL) の添加, 非添加で 30 時間の培養を行った。経時的な培養のモニタリングとサンプリングを実施し、次世代シーケンサー (NGS) を用いたメタ 16S による菌叢解析と代謝物解析を行い、個人ごとの結果を比較することで有効性を評価した。

【結果】 非添加培養時の pH の変遷は個人ごとに異なり、さらに難消化性食物繊維添加時は種類によって個人ごとにその変遷が異なった。SCFAs (主に酢酸, プロピオン酸, 酪酸) の変遷も食物繊維の種類や個人で異なった。SCFAs の統計検定から難消化性デキストリン, デキストラン, α -シクロデキストリン添加時と非添加の有意差が検出されたため、これらの細菌群集の構造を NGS により解析した。結果、実際に難消化性食物繊維の摂取によって割合が増加すると報告のある Bacteroidetes 門に属する細菌群の増加が、難消化性食物繊維添加時にプロピオン酸濃度が上昇した検体において観察された。

【考察】 KUHIMM への難消化性食物繊維添加により、個人ごとに異なる代謝プロファイル (pH・SCFAs) およびその変化に対応した細菌群の変遷が予測できる可能性が示された。現在、顕著な結果が得られた検体提供者を対象にしたヒト介入試験を準備しており、KUHIMM の結果と比較を行う予定である。将来的には、機能性食品や医薬品のヒト介入試験に先立つ機能・安全性のプレ評価技術として、KUHIMM の有用性を示していきたい。

一般演題 A-3

クロライドチャネル活性化能を有するビフィズス菌抽出液の
排便促進効果についてEffect of *Bifidobacterium* extract activating chloride channel on
gastrointestinal transit

○前田彩子, 卷崎 寛, 田中良紀, 嶋川真木, 大野裕史
バイオフェルミン製薬株式会社 R&D センター

【目的】高齢者は、慢性便秘を呈する割合が多く、今後の高齢社会の中でさらなる患者数の増加が予想されており、習慣性や副作用のない長期間服用可能な便秘治療薬が求められている。腸管腔内への水分分泌は、腸内容物の腸管内輸送性を高め、排便を促進させる可能性が高い。そこで、腸管内の水分分泌を引き起こすクロライドチャネルを活性化させる乳酸菌およびビフィズス菌をスクリーニングし、排便促進効果を持つ菌株を特定した。

【方法】クロライドチャネル活性化能を有する菌株のスクリーニングは、*Bifidobacterium* 47 株、*Lactobacillus* 35 株の菌体および菌体をさらに Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) で 37°C、24 時間インキュベートして得られた上清（菌抽出液）を調製し、Ussing Chamber System を用いて評価した。すなわち、単層となったヒト腸管上皮細胞 T84 細胞を Ussing Chamber にセットし、被検成分を T84 細胞膜の粘膜側に添加し、短絡電流変化値 (ΔI_{sc}) を測定した。また、排便促進効果の指標として全腸管輸送時間、すなわち SD ラットに被検成分とマーカーとしてカルミン色素を同時投与した際の、カルミン色素の排出時間を調べた。

【結果】Ussing Chamber System を用いた菌株スクリーニングの結果、*Bifidobacterium longum* CLA8013 株 (CLA8013) の菌抽出液において ΔI_{sc} が最も高い値となった。しかしながら、CLA8013 菌体での短絡電流の変化は認められなかった。この CLA8013 菌抽出液による短絡電流の変化は、CFTR クロライドチャネル阻害剤 (CFTR_{inh}-172) により約 60% 抑制された。また、ラット全腸管輸送時間は、対照群の約 8 時間に対し、CLA8013 菌抽出液 2 ml/kg 投与群では約 1.5 時間短縮され、その効果は、クロライドチャネルアクチベーターであるルビプロストン 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群における排便促進作用と同程度であった。

【考察】CLA8013 菌抽出液は、腸管上皮のクロライドチャネル活性化を主とした腸管内の水分分泌促進作用により排便を促進する可能性が示唆された。

一般演題 A-4**定量プロテオミクスを用いた腸内細菌叢の変動が薬物動態および糖・脂質代謝におよぼす影響の解明****Elucidation of effect of intestinal flora on the pharmacokinetics of drugs, and glucose and lipid metabolism using quantitative proteomics**○久野琢矢¹, 伊藤慎悟^{2, 3, 4}, 大槻純男^{2, 3, 4}¹大塚製薬株式会社徳島研究所, ²熊本大学大学院薬学教育部,³熊本大学大学院生命科学研究部, ⁴AMED-CREST

【目的】 抗菌薬の服用および腸内細菌叢の変動はともに肝臓の薬物代謝酵素の発現, 2型糖尿病および肥満の発症に影響する可能性が近年の研究で示されている. 薬物動態および糖・脂質代謝には複数の分子が関与するため, その全容を解明するには機能分子であるタンパク質の量的変化を網羅的に測定することが重要となる. 本研究では, 定量プロテオミクスを用いて抗菌薬服用時の腸内細菌叢の変動が薬物動態および糖・脂質代謝に与える影響およびその制御メカニズムを明らかにすることを目的とした.

【方法】 腸内細菌を有さない無菌マウス, および5日間非吸収性抗菌薬を経口投与したマウスを腸内細菌叢変動モデルマウスとし, 採取した組織に対しLC-MSでの定量プロテオミクスを行った.

【結果】 肝臓では薬物代謝酵素であるCyp2b10およびCyp3a11が無菌マウスでそれぞれSPFマウスの0.04および0.17倍, 抗菌薬マウスで媒体マウスの0.45および0.12倍に減少した. さらに, 両モデルマウスのCyp2b活性も減少した. 薬物トランスポーターでは, 無菌マウスの肝臓および腎臓でOatp1a1が, 両モデルマウスの肝臓でBcrp1が0.5倍以下に減少した. 抗菌薬マウスの小腸ではPept1, Mdr1a, Mrp2が約2倍に増加した.

PXR等の核内受容体は薬物代謝酵素の発現および糖・脂質代謝に関わることから, その基質となる腸内細菌によって産生される二次胆汁酸の関与を調べた. 抗菌薬マウスでは二次胆汁酸産生菌が減少し, 肝臓の二次胆汁酸濃度も減少した. 抗菌薬マウスの血中グルコースおよびトリグリセリド濃度は, それぞれ媒体マウスの64および43%に減少したが, 二次胆汁酸の併用投与によってそれらの減少は回復した. さらに, 肝臓において, 血糖値に関わるグリコーゲン合成もしくは分解を担うタンパク質の細胞内局在およびCyp2b10, 3a25, 51a1の発現量が二次胆汁酸濃度によって変動した.

【考察】 腸内細菌叢の変動によって発現量が変動する薬物動態に関わるタンパク質が明らかになったことから, 腸内細菌叢はそれらの基質となる薬の薬効もしくは副作用に影響する可能性が考えられる. 加えて, 肝臓のCypタンパク質の発現, さらに血中グルコースおよびトリグリセリド濃度への二次胆汁酸の関与が示唆されたことから, 二次胆汁酸産生菌は代謝疾患の治療標的となる可能性が見出された.

一般演題 A-5

ユーグレナおよびその貯蔵多糖パラミロンの摂取による
排便および腸内細菌叢に対する影響の検討Modulation of gut microbiota and defecation by
Euglena gracilis or paramylon ingestion○中島綾香¹, 澤村弘美², 虞蒼 静², 鈴木健吾¹, 渡邊敏明³¹株式会社ユーグレナ, ²兵庫県立大学環境人間学部, ³大阪青山大学健康科学部

【目的】近年、腸内フローラと疾患の関係についての研究が進み、腸内フローラが、肥満症およびメタボリックシンドローム等の疾患に關与する環境要因の1つであることが明らかになってきており、腸内フローラに着目した、肥満症およびメタボリックシンドローム等の疾患の予防に關心が集まっている。例えば、プレバイオティクス等の機能性食品によって、腸内フローラを改善する試みがなされ、有用細菌である乳酸菌やビフィズス菌を増殖させる機能性食品が開発されている。

一方、ユーグレナは、微細藻類に分類される単細胞の微生物である。植物と動物両方の性質を兼ね備えていることから、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、脂肪酸等さまざまな栄養素を含んでおり、栄養補助食品として活用されている。さらに、ユーグレナには β -1, 3-グルカンの貯蔵多糖パラミロンが含まれている。これまでに、ユーグレナが、乳酸菌の生育を促進することが明らかになっているが、経口摂取での腸内細菌叢への影響については、十分な検討が成されてこなかった。

【方法】本研究では、ユーグレナおよびパラミロンの経口摂取が排便および腸内細菌叢にどのような影響を及ぼすかを検討した。3週齢のWistar系雄ラットにユーグレナおよびパラミロンを5%含んだ飼料を4週間経口摂取させ、それぞれ摂取開始2週目、4週目の消化管通過時間、糞の性状観察、4週間目の盲腸内容物の重量測定およびpH測定、有機酸測定、腸内細菌叢の解析を行った。

【結果と考察】摂取4週間目では、ユーグレナおよびパラミロンの摂取が、無繊維食の摂取と比較して、消化管通過時間を有意に縮めた。また、無繊維食の摂取と比較して、ユーグレナおよびパラミロンの摂取により、糞の乾燥重量および糞の水分量が有意に増加した。食物の消化管通過時間については、一般に糞の重量の増加と糞の保水性が高まると消化管通過時間が短縮することが報告されている。また、適度な水分含量は糞のカサを増す効果があると言われている。

一方、盲腸内容物の重量はユーグレナおよびパラミロンの摂取により、増加傾向となった。盲腸内容物のpHに大きな変化は見られなかったが、特にユーグレナの摂取によって、糞便中の乳酸含量が多くなった。また、腸内細菌叢解析については、ユーグレナおよびパラミロンの摂取により、ラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属の占有率が無繊維食摂取よりも増加する傾向が認められた。

一般演題 A-6**離乳前の腸内細菌叢の攪乱が腸管炎症制御におよぼす影響解析****Effect of neonatal microbiota disturbance on the regulation of intestinal inflammation**○森美穂乃¹, 大坂利文^{2, 1}, 常田 聡¹¹早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻,²東京女子医科大学医学部微生物学免疫学教室

【目的】 乳幼児期の腸内細菌叢は、免疫系の発達や制御系の構築において重要な役割を担っていると考えられる。近年、乳幼児期に対する抗生物質の投与は、食物アレルギー、喘息、肥満などの疾患リスク因子である可能性が示唆されている。さらに、乳幼児期の腸内細菌叢の攪乱が、成人期における様々な慢性炎症疾患の発症にも関連している可能性が考えられる。腸内細菌叢は加齢により大きく変遷することが知られている。出生後早期に大腸菌や腸球菌などの通性嫌気性細菌が腸内に定着したあと、多種多様な偏性嫌気性細菌が主要構成種となっていく。本研究ではマウスを用いて、離乳前における自然免疫刺激性の強い常在性大腸菌の定着の有無が、腸管炎症の病態制御に与える影響について解析することを目的とした。

【方法】 野生型マウス C57BL/6J (日本クレア) の交配時から離乳までの期間、グラム陰性細菌に対する抗菌作用を有するポリミキシン B (PMB, 0.25 g/L) を自由飲水により投与し、仔マウスの腸内における大腸菌を含めたグラム陰性細菌の除去を試みた。PMB の投与は離乳後に停止した。その後、8 週齢の雌マウスに対して、デキストラン硫酸塩溶液 (分子量 50,000, 2.5% w/v) を投与することで大腸炎を誘発し、離乳前の PMB 投与の有無が腸炎の病態形成に与える影響を観察した。

【結果および考察】 11 日齢のマウス糞便の細菌叢を解析したところ、PMB 非投与群では Enterobacteriaceae 科細菌の割合が優勢種として検出されたのに対し、PMB 投与群では検出されなかった。つまり、PMB 投与によって離乳前の Enterobacteriaceae 科細菌の定着を阻害することができた。また、離乳前の PMB 投与が成獣期の DSS 誘導性腸炎の病態形成に与える影響は認められなかった。しかしながら、PMB 投与によって、腸炎発症後のリンコマイシン (LCM) 投与による腸炎の重篤化抑制効果が消失した。離乳前の Enterobacteriaceae 科細菌の定着阻害が、これまでに我々が報告してきた腸炎誘導後の LCM 投与で認められた腸炎の重篤化抑制機構や常在性 Enterobacteriaceae 科細菌の優勢化 (1) などに影響を与えている可能性が示唆された。

参考文献

- (1) 大坂利文, 早崎淳貴, 三木硬介, 常田聡. 腸内細菌学雑誌. 2012; 26(2): 127.

一般演題 A-7

「低タンパク質適応」における腸内細菌叢の役割

The roles of intestinal microbiota in “Low protein adaptation”

○増岡弘晃¹, 梅崎昌裕², 須田 互³, 富塚江利子⁴, 山田章雄¹, 平山和宏¹

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学研究室,

² 東京大学大学院医学系研究科生態人類学教室,

³ 慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室, ⁴ 新潟薬科大学薬学部衛生化学教室

【目的】 パプアニューギニア (PNG) 高地人はサツマイモを主食とし, 動物性タンパク質の摂取量が少ない. タンパク質摂取量は現代栄養学の想定する必要量を大幅に下回っているにもかかわらず, タンパク質欠乏症状は見られず, むしろ筋骨逞しい肉体をしている. この PNG 高地人における「低タンパク質適応」には腸内細菌が関連していることが指摘されている. 本研究では, 無菌マウスに PNG 高地人の腸内細菌叢を移植することにより, 実験室内で「低タンパク質適応」を再現し, 「低タンパク質適応」における腸内細菌の役割を解明することを試みた.

【方法】 無菌 BALB/cA マウスに PNG 高地人の糞便を投与した群と対照として日本人の糞便を移植した群を作製し, それぞれの群に 3% タンパク質食 (PNG3% 群, JPN3% 群) または 12% タンパク質食 (PNG12% 群, JPN12% 群) を与えた. 4 週間飼育を行った後, 体重や筋肉量, 肝臓, 血清 Alb などと比較した. また, 食餌変更前と実験終了時のマウス糞便について 16S rRNA 遺伝子を用いた菌叢解析を行った.

【結果】 PNG 群, JPN 群いずれにおいてもタンパク質 3% 食では体重が減少したが, PNG3% 群では JPN3% 群と比較して, 体重の減少が有意に小さかった. PNG3% 群では JPN3% 群と比較して, 血清 Alb 濃度が高い傾向にあった. また, PNG3% 群では肝臓の相対重量が有意に高かった. 菌叢解析では, PNG3% 群では他の 3 群とは異なる変化が見られ, 特に *Enterococcus* 属, *Ruminococcus* 属, *Faecalibacterium* 属などの菌属に含まれる細菌の割合が増加していた.

【考察】 PNG 高地人の糞便を投与したマウスは, タンパク質含有量の少ない餌を与えた際の体重減少が JPN 群と比較して軽度であった. 菌叢の解析からは, PNG3% 群では ATP 産生菌とウレアーゼ産生菌の割合が増加していることが示唆され, 尿素再利用能の亢進によりタンパク質の低供給を解決している可能性が考えられた. 本実験で作製した PNG 高地人 HFA (ヒトフローラ定着) マウスを利用することにより, さらに詳細な解析や特殊な活性を持った菌株の分離を行うことで「低タンパク質適応」のメカニズムの解明につながることを期待される.

一般演題 A-8

Fe₂O₃ ナノ粒子が腸内細菌叢に与える影響The effect of Fe₂O₃ nanoparticles on intestinal flora

○新居靖崇, 木岡真理奈, 武藤明徳, 徳本勇人

大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻化学工学分野

【目的】食品添加物ナノ粒子 (NPs) が幅広く利用される一方, 健康面への影響が懸念される. 本研究では, 赤色着色料である Fe₂O₃ NPs に着目した. 鉄は腸内では遊離鉄の形でほとんど存在しない. しかし, 胃酸で Fe₂O₃ NPs の一部が溶解して遊離鉄となり腸内に流入すると, 活性酸素による酸化ストレスで一部の菌種が死滅する場合や, 逆に, 鉄を獲得した微生物種が優勢化する可能性が考えられる. 腸内細菌叢は生体活性に密接に関わっており, 菌叢構造が変化すると, 下痢や腸炎等の疾病に繋がる. そこで, Fe₂O₃ NPs をマウスに経口投与して糞を採取し, 腸内における菌叢構造の変化について, 16S rRNA を指標として解析することを研究目的とした.

【方法】飼料に Fe₂O₃ NPs を混練してマウスに 3 週間経口投与を行い, 排出された糞を腸内細菌叢として採取した. 採取した腸内細菌叢から DNA を抽出し, 16S rRNA 遺伝子の可変領域である V3-V4 領域を増幅させた. 続いて, 次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢の構成菌種を同定した. また, 腸内細菌叢中で存在比率が変化した種については, 典型種を購入し, 単一菌で嫌気培養し, ここへ Fe₂O₃ NPs を暴露して, 代謝産物から菌の増殖挙動について検討を加えた.

【結果・考察】粒径の小さな Fe₂O₃ NPs を, 過剰に経口投与した条件では, マウスが下痢を発症し, 経口投与を中止すれば, 症状が自然治癒した. 下痢を発症した腸内細菌叢の構成菌種の割合を見ると, 原因菌とされる腸内腐敗菌の *Clostridiaceae* が全体の 40% にまで優勢化していた. 一方, 症状が自然治癒した菌叢では, *Clostridiaceae* の存在比率は 2% にまで減少し, 他方, 下痢の原因菌の成長を阻害する *Lactobacillaceae* が全体の 40% に優勢化していた. また, 単一菌に対する Fe₂O₃ NPs の暴露試験では, *Lactobacillaceae* による乳酸生成量に変化が見られないのに対し, *Clostridiaceae* の代謝産物である水素生成量が, 対照の 20% 以上も増加していた. この結果から, Fe₂O₃ NPs の存在下で, *Clostridiaceae* が増殖できる可能性が示唆された. 今後は, この *Clostridiaceae* の増殖に対して *Lactobacillaceae* を共培養させ, どのような挙動が見られるのか検討を加える.

一般演題 A-9

ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (BBG9-1) による
制御性 T (Treg) 細胞および制御性 B 細胞 (Breg) の誘導と
アレルギー性気道炎症に及ぼす影響Effects of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (BBG9-1) on induction of
regulatory T cells and regulatory B cells, and allergic airway inflammation○松田将也¹, 森榮勇貴¹, 田中良紀², 嶋川真木², 大野裕史², 奈邊 健¹¹ 摂南大学薬学部薬効薬理学研究室, ² ビオフェルミン製薬株式会社

【目的】 制御性 T (Treg) 細胞や制御性 B (Breg) 細胞は、過剰な免疫反応を制御するリンパ球であり、免疫の恒常性を維持していると考えられている。これらの制御性リンパ球を生体内で誘導すれば、過剰な免疫反応を抑制することが出来ると考えられる。本研究では、ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (BBG9-1) を経口投与することで、Treg 細胞および Breg 細胞が生体内で誘導され、アレルギー性の気道炎症を抑制出来るか否か検討した。

【方法】 5 週齢の Balb/c マウスに卵白アルブミン (OVA)+Al(OH)₃ を 2 回腹腔内投与することで感作を行った。初回感作より 35, 36 および 37 日後に OVA 溶液を気管内投与することにより反応惹起を行った。BBG9-1 は、初回感作より 15 ~ 40 日後まで 10⁹ cfu/animal/time/day の用量で連日経口投与した。初回感作より 40 日後に気管支肺胞洗浄液 (BALF), 腸間膜リンパ節および縦隔リンパ節を採取した。採取した BALF 中の各細胞は Diff-Quik 染色を行いカウントした。リンパ節中の CD3⁺ CD4⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ 細胞 (Foxp3⁻ Treg 細胞), CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞 (Foxp3⁺ Treg 細胞), B220⁺ IL-10⁺ 細胞 (Breg 細胞) を、flow cytometry によりそれぞれ検出した。

【結果】 1) 抗原の気管内投与による反応惹起を繰り返すことで、BALF 中の総細胞数, 単核球数, 好酸球数および好中球数が有意に増加した。BBG9-1 の経口投与は、総細胞数および好酸球をわずかに減少させる傾向にあった。2) 感作マウスに OVA 溶液を反復気管内投与すると腸間膜リンパ節における Foxp3⁻ Treg 細胞, Breg 細胞ならびに Foxp3⁺ Treg 細胞がいずれも減少する傾向にあった。一方、BBG9-1 を投与したマウスでは、反応惹起により認められたこれらの制御性リンパ球の減少が回復する傾向にあった。3) 一方、縦隔リンパ節においては、BBG9-1 の経口投与による Foxp3⁻ Treg 細胞, Breg 細胞ならびに Foxp3⁺ Treg 細胞の増加は認められなかった。

【考察】 BBG9-1 の経口投与は、腸管での抑制性免疫機序を増強する可能性が示唆された。

一般演題 A-10

Wilms' tumor 1 タンパク質発現ビフィズス菌を用いた
経口癌ワクチンの抗腫瘍免疫誘導効果に関する検討Anti-tumor immune responses induced by oral cancer vaccine using
recombinant *Bifidobacterium* displaying Wilms' tumor 1 protein北川孝一¹, ○辰巳真帆², 五ノ井玲菜², 齊藤大樹¹, 橋井佳子³, 片山高嶺⁴, 白川利朗^{1, 2}¹ 神戸大学大学院医学研究科, ² 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科,³ 大阪大学大学院医学系研究科, ⁴ 京都大学大学院生命科学研究科

【目的】 Wilms' tumor 1 (WT1) 遺伝子は造血器腫瘍や種々の固形癌で高発現しており, 癌ワクチン療法のターゲットとして注目されている. 現在は樹状細胞やペプチドを用いた WT1 ワクチンが臨床研究や自費診療に使用されているが, 接種時の痛みや接種部位の紅斑や瘢痕化等の副作用が報告されている. 本研究ではより低侵襲で効果の高い癌ワクチンの開発を目指し, WT1 タンパク質を発現するビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum*) を作製し, マウス担癌モデルを用いてその抗腫瘍免疫誘導効果を検討した.

【方法】 ビフィズス菌 - 大腸菌シャトルベクター pJW420 を用いて, *B. longum* 由来の GNB/LNB 基質結合膜タンパク質 (GL-BP) に WT1 遺伝子を連結させた GL-BP-WT1 融合タンパク質を発現する *B. longum*-105A 株, *B. longum* 420 を作製した. *B. longum* 420 の WT1 特異的免疫誘導効果を調べるため, C57BL/6N マウスに 1×10^9 CFU の *B. longum* 420, *B. longum* 2012 (空ベクター導入) または PBS を週 5 日, 4 週間経口投与した. 免疫後に脾臓細胞を用いたサイトカイン測定, 細胞内サイトカイン染色, MHC テトラマーを用いた WT1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の検出および CTL 活性の測定を行った. 癌治療効果の評価のため, 1×10^6 cells の WT1 タンパク質発現 C1498-WT1 白血病細胞をマウスに接種し皮下腫瘍を形成し, 上記治療を実施した.

【結果】 *B. longum* 420 の経口投与により, マウス脾臓細胞の IFN- γ , IL-2 および TNF- α の産生量が他治療群と比較し有意に上昇し, これらを産生する CD4T および CD8T 細胞も有意に増加した. また脾臓細胞中には WT1-CTL エピトープ特異的 CD8T 細胞が有意に増加し, その CTL 活性は有意に上昇した. *B. longum* 420 の経口投与により C1498-WT1 腫瘍の増殖が有意に抑制された, 治療による明らかな副作用は認められなかった.

【考察】 *B. longum* 420 の経口投与により WT1 特異的 CTL を介した細胞性免疫が誘導され, かつ抗腫瘍効果が示された. 本研究により, *B. longum* 420 の安全かつ効果的な経口癌ワクチンとしての有用性が示された.

一般演題 A-11

離乳前の腸内細菌叢攪乱が食物アレルギー感受性に与える影響解析

The analysis of relationship between neonatal microbiota dysbiosis and susceptibility to food allergy

○菊池脩太¹, 大坂利文^{2, 1}, 常田 聡¹¹早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻,²東京女子医科大学医学部微生物学免疫学教室

【目的】ヒトを対象とした研究から、食物アレルギーと腸内細菌叢の間に関連性があることが報告されてきた。また、腸内細菌叢は宿主免疫系の発達・制御に重要な役割を持っていることが知られている。そこで本研究では、食物アレルギーモデルマウスを用いて、宿主免疫系の発達期にあたる離乳前の腸内細菌叢の攪乱が、食物アレルギー感受性に与える影響の検証を目的とした。

【方法】野生型 BALB/c (日本クレア) が離乳する 3 週齢まで、グラム陰性菌を標的とする抗生物質ポリミキシン B (PMB 群) またはグラム陽性菌を標的とする抗生物質バンコマイシン (VCM 群) を飲み水に含ませ投与することで、腸内細菌叢を攪乱させた。3 週齢になり離乳し、離乳後は抗生物質の投与を中止した。その後、6 週齢から卵白アルブミン (OVA) 食物アレルギーを誘導した。まず day 0, 7, 21 に OVA 50 μ g と水酸化アルミニウム 2 mg を腹腔内投与した。その後、day 35 から 2-3 日に 1 回の間隔で OVA 50 mg を経口投与した。経口投与の 4 時間以上前には餌を抜いた状態にした。経口投与をしたときの体温変化と下痢を指標に食物アレルギー感受性を評価した。また、IonPGM 装置を用いて、各実験群の乳幼児期と食物アレルギー誘導時の糞便中の細菌叢のメタ 16S rRNA 解析を行った。

【結果および考察】VCM 群は、抗生物質を投与していないマウス (Water 群) や PMB 群よりも食物アレルギーに対する感受性が高いことが示唆された。また、腸内細菌叢解析の結果、離乳前の Water 群と PMB 群の糞便中では、Streptococcaceae 科細菌と Lactobacillaceae 科細菌が主な細菌であった。一方、乳幼児期の VCM 群では Enterobacteriaceae 科細菌と Lactobacillaceae 科細菌が主な細菌となっており、VCM 投与によって乳幼児期の腸内細菌叢が攪乱されていることが示された。また、アレルギー誘導時の腸内細菌叢は Water 群、PMB 群、VCM 群で細菌種に大きな差はなかった。以上の結果から、バンコマイシン投与による離乳前の腸内細菌叢の攪乱が食物アレルギーに対する感受性を高めることが示唆された。

一般演題 A-12**加齢に伴う腸内細菌変動に対する IgA の反応性の評価****Evaluation of IgA responsiveness against age related change
of gut microbiota**

○菅原宏祐¹, 岡井晋作², 加藤久美子¹, 密山恵梨¹,
清水(肖)金忠¹, 小田巻俊孝¹, 新藏礼子²

¹ 森永乳業株式会社基礎研究所, ² 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

【目的】 加齢に伴い腸内細菌叢の構成が変化することが知られている。しかし、その変化に関連する要因についてはよく知られていない。腸管免疫は加齢に伴い変化し、抗原特異的な免疫グロブリンの反応が加齢で減衰することが知られている。腸内環境において免疫グロブリン A (IgA) は主要な型の抗体であり、腸内細菌を制御する上で重要な役割を果たすと考えられる。本研究では加齢に伴う腸内細菌の変動と、IgA の反応性の関連を評価した。

【方法】 30 代の健常成人と自立した生活を送っている 70 歳以上の健常高齢者それぞれ 20 名より糞便を提供してもらい、16S メタゲノム解析を実施することにより腸内細菌構成を解析した。また、ELISA 法による糞便中の IgA 濃度とフローサイトメトリーによる IgA 結合細菌の割合をそれぞれ評価した。さらに、セルソーターと次世代シーケンサーを組み合わせた IgA-seq を実施することにより、個別の細菌群に対する IgA の反応性の指標として用いられる IgA-index を算出し、健常成人と健常高齢者における IgA の反応性を比較した。

【結果】 加齢に伴う腸内細菌の変動として、健常成人と比べて健常高齢者で Bifidobacteriaceae が減少し、Clostridiaceae と Enterobacteriaceae が増加することを見出した。糞便中の IgA の濃度および糞便中の IgA 結合細菌の割合に有意な差が認められなかったため、個別の細菌群に対する IgA の反応性を評価した。IgA-index を比較した結果、Bifidobacteriaceae に関して違いは見られなかったものの、健常高齢者における Clostridiaceae と Enterobacteriaceae に対する IgA-index は、健常成人と比較して有意に低い値を示した。

【考察】 Clostridiaceae と Enterobacteriaceae にはそれぞれ病原性を示す細菌種が属している。これらの菌群に対する IgA の反応性が健常成人と比較して高齢者で減少したことから、加齢によりこれらの菌群に対する IgA の反応性が低下し、腸管内における占有割合が増加する可能性が考えられた。