

一般演題 A-1

臨床腸内菌叢解析を目指した糞便サンプルの保存条件の検討

Evaluation of storage methods of stool samples
for clinical gut microbiome analysis

○湯原悟志, 阿部公一, 内藤武志, 小見和也
合同会社みらか中央研究所

【目的】腸内細菌叢解析を将来的に臨床現場に応用していくためには、自宅等のサンプルを凍結保管することが難しい場所でも採取・保管できることが求められる。一方で、室温での保管中には細菌の増殖や死滅等を伴い、また、その程度は細菌種ごとに異なっているため、一定期間保管した後の糞便サンプルから取得した細菌叢データは、採取後に即時解析したものと比べて異なる可能性がある。そこで本研究では、市販の糞便採取キットを用いて、保存条件による解析結果への影響を調査した。

【方法】20人の健常人ボランティアから糞便サンプルを採取して糞便採取キットに懸濁、採取後即時凍結(0 day)、25℃で2日間(2 day)または7日間(7 day)静置した後に凍結した糞便サンプルからDNAを抽出した。抽出した細菌由来DNA中の16S rRNA配列V1-V2領域をターゲットとしたPCR後に、次世代シーケンサーを用いて塩基配列情報を取得した。得られた塩基配列情報を用いて、多様性指数、系統組成やサンプル間のUniFrac距離等を解析し比較した。

【結果】得られた塩基配列情報を用いて解析した結果、大きく分けて、1) 保管によってほとんど変動のないサンプル、2) 2 dayまであまり変動しないが7 dayで大きく変動するサンプル、3) 2 dayの時点で変動が始まっているサンプルの3パターンに分かれた。保管による細菌叢の変動が大きいサンプルでは、*Proteobacteria* 門の *Proteus* 属細菌と *Escherichia* 属細菌が増加することが示された。なお、*Proteus* 属細菌と *Escherichia* 属細菌は、0 dayではほとんど検出されず、保管に伴い急激に増加する傾向が見られた。

【考察】本研究から、保管による細菌叢の変動には個人差があること、その差は大きく分けて3パターンに分類されることが分かった。変動が見られたサンプルでは特徴的な菌の出現パターンが観察されたが、いずれも0 dayではその特徴が見られず、あらかじめ変動を推定することは難しいと考えられた。また、7 dayでは個人間の違いを超えた変動を示すサンプルも存在した。以上の結果から、安定的なデータの取得のためには、室温による保管は採取から2-3日以内に抑え、サンプルの凍結保存あるいは核酸抽出を実施することが望ましいと考えられた。

一般演題 A-2**潰瘍性大腸炎患者由来 *Fusobacterium varium* Fv113-g1 株の
ゲノム・トランスクリプトーム解析****Genomic and transcriptomic analyses of *Fusobacterium varium*
Fv113-g1 isolated from a patient with ulcerative colitis**○関塚剛史¹, 加藤公敏², 黒田 誠¹, 大草敏史³¹ 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター第三室,² 日本大学医学部医学研究企画・推進室, ³ 順天堂大学大学院腸内フローラ研究講座

【目的】 *Fusobacterium* 属細菌は口腔および腸管内に存在し、膵臓癌および大腸癌の危険因子としても注目されている。Ohkusa らは、潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の病変粘膜から分離した *F. varium* がその強い細胞障害性から UC の病因に関わる重要な細菌の 1 つであることを報告し、本菌を標的にした抗菌剤多剤療法を UC の新規治療法として報告してきた。本研究は、UC 患者の直腸生検組織検体より分離された *F. varium* Fv113-g1 株の特徴をゲノムレベルで明らかにすることとした。

【方法】 Fv113-g1 株の DNA を精製し、short および long read 用次世代シーケンサーによる解読、および、optical mapping 法による高分解制限酵素地図を作成し、完全長ゲノム配列を取得した。また、ブレインハートインヒュージョン (BHI) 培地および DMEM 液体培地にて本菌株を培養し、トランスクリプトーム解析を行った。

【結果】 本菌株は、約 3.97 Mb の染色体、約 90 kb および 68 kb のプラスミドを有していた。比較ゲノム解析の結果、本菌株は系統的には *F. varium* に属しているものの、*F. varium* ATCC 27725 および *F. ulcerans* ATCC 49185 のオーソログ遺伝子を保有していた。また、本菌株は、他の *Fusobacterium* 属菌より多くの V 型分泌装置 (T5SS)、*Fusobacterium* adhesin (FadA) および巨大な Haemagglutinin adhesin のパラログ遺伝子を保有していた。トランスクリプトーム解析の結果、本菌株は DMEM 培養での貧栄養条件下で、複数の T5SS および FadA パラログ遺伝子を含む、本菌株に特異的なアクセサリー遺伝子の発現が顕著に増加した。

【考察】 比較ゲノム解析の結果、本菌株は *F. varium* および *F. ulcerans* のオーソログ遺伝子を有し、また、本菌に特徴的なアクセサリー遺伝子も多く保有することから、*F. varium* の亜種と推定された。また、病原因子と予測される T5SS および FadA パラログ遺伝子の一部を含むアクセサリー遺伝子の発現量が、貧栄養環境に晒された際に増加することから、これら遺伝子は生存戦略に関与することが示唆された。

【参考文献】Ohkusa *et al.* Gut. 2003.Ohkusa *et al.* Am J Gastroenterol. 2010.

一般演題 A-3

ポリフェノール配糖体加水分解とその生体内吸収に対する
ビフィズス菌の効果Effect of bifidobacteria on polyphenol glycosides hydrolysis and their
absorption *in vivo*

○姚 瑞卿, 久原徹哉, 清水金忠
森永乳業株式会社基礎研究所

【目的】 Dietary polyphenols are currently receiving much attention due to their promising beneficial health effects in humans such as antioxidant and anti-inflammatory effects. Most polyphenols generally occur in glycosylated forms which limits their absorption in the small intestine. Usually, intestinal bacteria hydrolyze sugar chains and prompts absorption as an aglycone. Because inter-individual differences in the population of intestinal microbiota which are a result of the age, health and diet may affect the absorption of polyphenols, it is important to prepare intestinal environment with high ability to resolve glycosides in order to use polyphenols efficiently. The purpose of the present study was to evaluate the aglycone releasing activity of *Bifidobacterium* strains and confirm the effect of the selected strain *in vivo*.

【方法】 In the hydrolysis experiments, bifidobacteria were supplemented with 500 μ M polyphenol glycoside. After incubation at 37°C, ethyl acetate was used to extract aglycone from bifidobacteria culture. The aglycone amount was detected by TLC and digitalized by Image J, and the releasing-activity was calculated by quantitative values of test samples and aglycone standard. In the bio-availability experiments, *Bifidobacterium* strains were co-ingested with polyphenol glycoside and plasma were collected -2, 1, 2, 4, 8, 12, 24h, 48h after the last treatment. The aglycone amount in plasma was measured by LC/MS.

【結果】 Most strains were able to hydrolyze daidzin and trans-polydatin, in particular *Bifidobacterium breve* strains showed higher hydrolysis activity than other strains. These *B. breve* strains hydrolyzed over 50% of daidzin and trans-polydatin within 3h. Then, we screened *B. breve* strains with high activity from more than 100 strains, and selected several strains. Finally, two strains were selected by probiotic properties such as tolerance to gastric juice and bile acid and antibiotic resistance. The co-ingestion of polyphenol and selected *B. breve* strain promoted the absorption of polyphenol glycosides *in vivo*, which related to the increase of the number of *B. breve* strain.

【考察】 Many *Bifidobacterium* strains are used as probiotics to improve intestinal health, modulate immune function and regulate energy metabolism. We investigated the effects of bifidobacteria in the release of aglycones and screened the potential strains for promoting polyphenol absorption, which providing a new insight into the potential of bifidobacteria function. In future, the beneficial effect of selected strains in promoting polyphenol utilization to hosts will be investigated.

一般演題 A-4**嫌気性腸内細菌と培養細胞の共培養システムの開発****Development of co-culture system of anaerobic gut microbe
with cultured cell line**

○後藤愛那, 永田千夏, 加藤紀彦, 神戸大朋, 片山高嶺
京都大学大学院生命科学研究科

【目的】 腸内細菌と宿主の共生は、近年急速に注目され発展した重要な研究分野の1つである。様々な疾病との関わりが明らかになったばかりでなく、腸内細菌を疾病診断・予防・治療に積極的に利用しようとする試みも始まっている。しかしながら、こういった応用を効果的かつ低リスク・低コストで実現するためには、多くの課題が残されている。その理由の1つに、評価系の問題がある。嫌気性腸内細菌と好気性培養細胞それぞれ単独の *in vitro* 試験系、無菌マウス等を用いた *in vivo* 解析や疫学調査が重ねられていく一方、その間を埋める分子生物学・細胞生物学的評価、すなわち両者の共培養評価系による知見が少なく、分子レベルの解析を困難にしている現状がある。本研究は、この課題を解決すべく、嫌気性細菌と好気性培養細胞の新規共培養システムを開発することを目的とした。

【方法】 カルチャーインサート上で培養して単層膜を形成させた Caco-2 細胞を用い、基底膜側を密閉状態に保つ装置 iGOEMON-(intestinal germs on enterocytes-monitoring)-chamber を作成した。iGOEMON を嫌気チャンバー内に入れ、基底膜側側と、嫌気環境に晒された頂端膜側の酸素濃度の変化を評価した。また、Caco-2 細胞の状態（バリア機能、細胞障害、遺伝子発現）を分析した。さらに、頂端膜側に代表的な嫌気性腸内細菌を添加して共培養を行い、菌の生存や増殖についても評価した。

【結果】 iGOEMON を用いることで、基底膜側の酸素濃度を3日間、60%程度に保つことができた。Caco-2 細胞も死滅せず、バリア機能も保たれた状態で培養することが可能であった。また、Caco-2 細胞と嫌気性細菌の共培養が可能であること、共培養することで菌の増殖が促進されることが明らかとなった。

【考察】 iGOEMON で培養した Caco-2 細胞は、基底膜側からの酸素供給のみでも、好気培養条件に近い状態を保つことが可能であった。また、共培養実験の結果から、腸内細菌と宿主細胞の間に物質の授受あるいはシグナル伝達があることが推察された。本システムは、薬物動態解析や難培養性細菌の単離にも展開可能であると考えられる。

一般演題 A-5

TiO₂ 粒子が腸内細菌叢に与える影響の解析Analysis of the effect of TiO₂ nanoparticles on intestinal flora

○倉橋健介¹, 下田 舞², 新居靖崇³, 木岡真理奈⁴, 吉原静恵⁵, 徳本勇人⁵

¹大阪府立大学工業高等専門学校環境物質化学コース,

²大阪府立大学生命環境科学域, ³大阪府立大学大学院工学研究科,

⁴大阪府立大学工学域, ⁵大阪府立大学大学院理学系研究科

【目的】 粒子製造技術の発展に伴い、微細な食品添加物粒子が様々な食品に用いられるようになったが、その有害性については不明な点が多い。本研究では、白色着色料である TiO₂ 粒子に着目した。TiO₂ 粒子は胃酸を始めとする各種消化液には溶解せずに、固体粒子がそのまま腸内に到達する。また、同一体積中に存在する粒子は粒径が小さくなると、その個数濃度が増加して反応界面積が増大し、劇的に反応性が向上する。既往の研究では、*Bacillus subtilis* と *Escherichia coli* に TiO₂ ナノ粒子を曝露して培養すると、菌の成育が阻害されることが報告されている。そのため、TiO₂ 粒子を摂取すると、腸内細菌叢の構成菌種が変化する可能性があり、そのリスクが懸念される。そこで、TiO₂ 粒子をマウスに経口投与して糞を採取し、TiO₂ 粒子が腸内細菌叢の変化に及ぼす影響について、16S rRNA を指標とした菌叢構造変化の解析を行った。

【方法】 TiO₂ 粒子を飼料に混練して、マウスに 4 週間経口投与した。排出された糞を腸内細菌叢として採取した。採取した糞から 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。

【結果・考察】 3 種類の TiO₂ 粒子（粒径：17 μm, 600 nm, 21 nm）を含有率 0.15%（g-粒子/g-飼料）でマウスに経口投与した場合、腸内細菌叢の構成菌種の優劣に変化は見られなかった。一方、粒径が 600 nm の TiO₂ 粒子の含有率を変化させて投与すると、含有率が高くなるにつれて、*Clostridiales* が優勢化し、*Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae* の劣勢化することが観察された。また、TiO₂ 粒子の投与を止め、腸内の TiO₂ 粒子が減少させれば、逆に、*Lactobacillaceae* や *Bifidobacteriaceae* が優勢化し、*Clostridiales* が劣勢化した。一般に、細菌は負に帯電し、弱酸性の腸内で TiO₂ 粒子は正に帯電する。そのため、腸内に到達した TiO₂ 粒子は静電的に細菌に付着すると推察される。以上より、より微細な TiO₂ 粒子を多く摂取すると、特定の細菌の生育が阻害され、腸内細菌叢を構成する優勢種が変化するのではないかと考えられる。

一般演題 A-6**大腸部位の腸管関連リンパ組織における
T 細胞分化の特徴と腸内細菌の影響**

T cell differentiation in gut-associated lymphoid tissue located
in the large intestine is largely influenced by intestinal microbiota

○津田真人¹, 石濱史也¹, 小島菜月¹, 小熊俊生¹, 村木悠平¹, 於 鉄崢¹,
八村敏志², 高橋宜聖³, 高橋恭子¹, 上野川修一¹, 細野 朗¹

¹日本大学生物資源科学部, ²東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター,

³感染研国立感染症研究所免疫部

【目的】 腸管関連リンパ組織は腸管腔内の抗原に対する特異的免疫応答の誘導組織であり, 小腸にはパイエル板 (PP), 大腸部位は盲腸リンパ節 (CeP), 結腸リンパ節 (CoP) などが存在している. 腸内に存在する環境因子の量や種類は, 腸管の部位ごとにより大きく異なっていることから, 各リンパ組織の機能やその中に存在する免疫担当細胞の環境因子との相互作用はそれぞれ異なることが推察されるがその詳細は十分に明らかにされていない. 本研究では大腸部位の腸管関連リンパ組織における T 細胞分化の特徴と腸内細菌による影響を無菌マウスを用いて解析した.

【方法】 通常または無菌環境下で飼育した BALB/c マウス (8-12 週齢) から小腸および大腸部位の腸管関連リンパ組織である PP, CeP, CoP の単一細胞を調製した. フローサイトメトリーにより分化したエフェクターおよび制御性の CD4⁺T 細胞サブセットに関連する細胞表面分子, 細胞内転写因子, 細胞内サイトカインの発現を解析した.

【結果】 無菌マウスの CeP と CoP では末梢での免疫応答の抑制にはたらく誘導性制御性 T (Foxp3⁺Neuropilin-1⁻CD4⁺) 細胞と抗体産生に関わる濾胞性ヘルパー T (CXCR5⁺PD-1⁺CD4⁺) 細胞の割合が通常マウスに比べて有意に低かった. 無菌マウスの PP では誘導性制御性 T 細胞の割合は通常マウスと同程度であり, 濾胞性ヘルパー T 細胞の割合は通常マウスよりも低かったが, 大腸部位のリンパ組織よりもこれらの T 細胞が高い割合で存在していた. また, 無菌マウスの CeP と CoP における Th1 (IFN- γ ⁺CD4⁺) 細胞の割合は通常マウスに比べて低い傾向があるのに対して, 無菌マウスの PP では通常マウスと同程度であった. 一方で, 無菌マウスの PP では通常マウスに比べて Th2 (IL-4⁺CD4⁺) 細胞の割合が増加していた.

【考察】 大腸部位の腸管関連リンパ組織のエフェクターおよび制御性 T 細胞の分化および活性化は主に腸内細菌に依存して調節されるのに対して, PP の T 細胞は腸内細菌以外の要因によっても分化や活性化が調節されている可能性が示唆された.

一般演題 A-7

食餌によるメトトレキサート毒性の増強

Dietary factors modulate gastrointestinal adverse effects of methotrexate

○樋口貴士¹, 吉村美郁¹, 岡 笑美^{1,2}, 川崎 綾¹, 蕨 栄治³, 水野聖哉⁴,
小野栄夫⁵, 高橋 智⁶, 當間重人², 土屋尚之¹, 古川 宏^{1,2}

¹筑波大学医学医療系分子遺伝疫学, ²国立病院機構相模原病院臨床研究センター,

³筑波大学医学医療系環境医学, ⁴筑波大学生命科学動物資源センター資源管理分野,

⁵国立病院機構水戸医療センター, ⁶筑波大学医学医療系解剖学・発生学

【目的】葉酸拮抗薬メトトレキサート (MTX) は関節リウマチ治療のアンカードラッグとして最も高頻度に用いられている。高脂肪食や肥満が MTX の副作用に関与している可能性は古くから指摘されているが、一貫した結論は得られていない。そこで、本研究では高脂肪高シヨ糖食 (HFHSD) の MTX 毒性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】7～11 週齢 C57BL/6 雄マウスに通常食または HFHSD を 2 週間与えた後、3 mg/kg MTX を 14 日間連続で経口投与した。

【結果】MTX+ 通常食群と比べて、MTX+HFHSD 群は生存率が著しく低下した。MTX+HFHSD 群では空腸の腸絨毛に上皮傷害を認めた。MTX+HFHSD 群では、血漿中 MTX 濃度に変化はなかったが、便中 MTX 排泄量は減少していた。MTX+HFHSD 群に folic acid を投与すると生存率が改善した。HFHSD から脂肪を減らした餌を給餌すると、MTX+HFHSD 群と比べて生存率がやや改善したが、HFHSD からシヨ糖を減らした餌を給餌しても、生存率に大きな変化はなかった。HFHSD のカゼインを大豆由来蛋白質に置き換えた餌を給餌すると、MTX+HFHSD 群と比べて生存率が改善した。MTX+ 通常食群にバンコマイシンを投与すると生存率が低下した。HFHSD を 13 日間与えた後、通常食へ変更した群では、肥満は起きても、生存率は改善した。HFHSD を時間制限給餌した群では、肥満を抑えることができて、生存率に大きな変化はなかった。MTX+HFHSD 群に ω 3 脂肪酸を投与したところ、生存率の改善傾向が認められたが、統計的な差は認められなかった。

【考察】HFHSD が MTX の腸管からの吸収亢進を引き起こし、MTX の葉酸拮抗作用によって腸絨毛が傷害され、低栄養による餓死を引き起こしたと考えられる。食餌が MTX の副作用を増強する場合があることが明らかになったが、腸内細菌叢・腸内代謝産物などが MTX による消化管傷害増強に関与している可能性が示唆される。

一般演題 A-8

食事脂質による脂肪酸受容体を介したエネルギー代謝制御

Dietary fat and free fatty acid receptors in host energy regulation

○向山広美¹, 宮本潤基^{1,2}, 岸野重信³, 入江潤一郎^{2,4}, 菅原達也³, 有田 誠^{5,6},
小川 順³, 伊藤 裕^{2,4}, 木村郁夫^{1,2}

¹東京農工大学大学院農学研究院, ²AMED-CREST, ³京都大学大学院農学研究科,
⁴慶應義塾大学医学部, ⁵理化学研究所メタボローム研究チーム, ⁶慶應義塾大学薬学部

【目的】 食事脂質に豊富に含まれるリノール酸や α -リノレン酸, 魚油のEPAやDHAは人間が生命を維持するために重要な必須脂肪酸であると同時に, 細胞膜上の脂肪酸受容体を介することで, 単なるエネルギー源としてだけではなくシグナル伝達分子としてエネルギー代謝制御に重要な役割を果たすことが明らかにされている (1)。また, 腸内細菌学の発展に伴い, 食事と腸内細菌叢変化が宿主のエネルギー代謝制御に深く関与する結果, 肥満や糖尿病などの病態に影響を及ぼすことが示されている。さらに, 腸内細菌依存的な食事脂質由来多価不飽和脂肪酸の代謝経路が見出され (2), 我々はこの代謝物群が腸管バリア保護作用に寄与することを明らかにした (3)。この過程で, リノール酸の初期代謝物であるHYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid) がリノール酸よりも長鎖脂肪酸受容体に対して高い親和性を示すことを確認した。我々は次なる検討として, 食事脂質とその腸内細菌代謝物群による長鎖脂肪酸受容体を介したエネルギー代謝制御機構の解明を目的として検討を行った。

【方法】 食事脂質由来多価不飽和脂肪酸あるいは, その腸内細菌代謝物をマウスに投与することで, *in vivo* における各種代謝パラメータへの影響とその分子メカニズムを検討した。

【結果】 腸内細菌代謝物を投与したマウスでは高脂肪食誘導性肥満が抑制され, エネルギー代謝制御に寄与していることが確認された。さらに, 遺伝子改変マウスや無菌マウスを用いた検討により, 脂肪酸受容体が栄養素認識受容体として作用するだけでなく, 腸内細菌代謝物に対する受容体として作用することも示された。

【考察】 食事と腸内細菌, そして宿主の脂肪酸受容体が相互に作用しあうことにより腸内細菌代謝物が宿主のエネルギー代謝を制御する。今後, 既存の食用油に代わる機能性油の創出, さらには創薬応用も視野に入れた肥満や糖尿病予防・治療への脂肪酸代謝物応用を目指す。

(1) Ichimura *et al.*, 2012. *Nature*.

(2) Kishino *et al.*, 2013. *PNAS*.

(3) Miyamoto *et al.*, 2015. *J Biol Chem*.

一般演題 A-9

 α -グルコシダーゼ阻害剤による腸内細菌修飾を介した肥満制御作用の解明Gut microbiota influences anti-obesity effect of α -glucosidase inhibitor○関 夏実¹, 服部航也¹, 福田真嗣², 金 倫基¹, 長谷耕二¹¹慶應義塾大学薬学研究科生化学講座, ²慶應義塾大学先端生命科学研究所

【目的】肥満とは、食生活・運動習慣・精神的要因などにより、体脂肪が過剰に蓄積した身体状況を指す。肥満は近年増加傾向にあり、II型糖尿病や高血圧症など、さまざまな生活習慣病を誘発することが知られている。そのため、肥満の制御は多くの疾患を予防することに繋がると考えられる。近年、腸内細菌叢が肥満の制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、腸内細菌による肥満制御の詳細なメカニズムについては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、抗肥満作用を有し、腸内細菌叢を変化させることが知られている α -グルコシダーゼ阻害剤(α -GI)を用いて、その肥満制御が腸内細菌を介するものであるかの検証を行った。

【方法】高脂肪食負荷マウスに、 α -GIおよび抗菌スペクトラムの異なる抗生物質を飲水投与した。高脂肪食負荷後の体重増加量、耐糖能、および脂肪・肝臓重量を観察した。さらに、糞便サンプルの16S rDNA シークエンス法による菌叢解析や、盲腸内容物中のメタボローム解析を行った。

【結果】高脂肪食負荷マウスに α -GIを投与すると、体重や脂肪重量・肝臓重量の増加抑制、耐糖能の改善が観察され、肥満者において高い傾向を示す Firmicutes/Bacteroidetes 比が低下した。さらに、ある特定のスペクトラムを持つ抗生物質を併用した場合、 α -GIによる抗肥満作用が増強された。そこで、両剤併用マウスの糞便中の細菌叢を解析したところ、Enterobacteriaceae や, Verrucomicrobiaceae, Lactobacillaceae 科菌などの増加がみられた。また、盲腸内容物のメタボローム解析の結果から、肥満と負の相関を示す代謝産物を複数見出した。

【考察】 α -GI投与による抗肥満作用や腸内細菌叢の変化は、小腸で吸収されなかった多糖や二糖が大腸まで到達し、これらが腸内細菌によって資化されたことに起因すると考えられる。また、抗菌スペクトラムの異なる抗生物質投与により α -GIの抗肥満作用が変化したことから、肥満制御に腸内細菌が関与している可能性と、特定の細菌種への糖の供給が肥満の抑制に働いている可能性が示唆された。さらに、盲腸内代謝産物と体重増加・脂肪重量との間の相関解析により、肥満と負の相関を示す代謝産物が絞り込まれた。これらの代謝産物が抗肥満に働いている可能性が考えられる。

一般演題 A-10**マウスにおける高脂肪高ショ糖食の摂取のタイミングが腸内菌叢と脂肪性肝疾患のリスクに及ぼす影響****The timing of high-fat high-sucrose diet intake affects gut microbiota and fatty liver disease in mice**○森木美里¹, 森本悠里¹, 櫻井明子², 片岡佳子²¹ 徳島大学大学院保健科学教育部,² 徳島大学大学院医歯薬学研究部微生物・遺伝子解析学

【目的】 腸内菌叢と生活習慣病との関連が近年注目されている。特に肥満により誘導される脂肪性肝疾患では、腸内において *Clostridium* clusterXI などが増加することとの関連が報告されている。そこで本研究では、マウスに高脂肪高ショ糖食 (HFHSD) を与えるモデルを用いて、HFHSD を開始する週齢が異なる場合や HFHSD 摂取のタイミングによって、腸内菌叢と脂肪性肝疾患にどのような影響が見られるかについて検討を行った。

【方法】 4 週齢, 8 週齢 (成熟), 老齢の C57BL/6J マウス (♂) に HFHSD を自由摂取させた群と、対照として通常食を自由摂取させた群を 16 週間飼育した。また、成熟マウスに HFHSD を 1 週間のうち 1 日のみ絶食させた群, HFHSD と通常食を 8 日ごとに切り替えた群も同時に飼育した。体重, 空腹時血糖値を経時的に測定した。腸内菌叢は各マウスから採取した糞便中の DNA を抽出し, T-RFLP 法にて解析した。飼育 16 週間後, マウス肝臓内の脂質量と血清中の肝障害マーカーを測定し, 腸内菌叢との関連性を検討した。

【結果】 HFHSD 摂取群では全ての週齢において体重や空腹時血糖値, 肝障害が高い傾向が見られたが, HFHSD を 1 週間に 1 日のみ絶食させた群, HFHSD と通常食を 8 日ごとに切り替えた群では体重, 空腹時血糖値, 肝障害が低い傾向にあった。T-RFLP 法で解析した腸内菌叢をクラスター分析した結果, 実験開始前では週齢により形成されていたクラスターが, 16 週間後では HFHSD 摂取により大きな別のクラスターを形成し, その中でも 4 週齢から HFHSD を開始したマウスは成熟, 老齢マウスの場合とは異なる腸内菌叢であった。また, 食餌のタイミングの異なる群はそれぞれ別のクラスターを形成し, HFHSD と通常食を 8 日ごとに切り替えた群は, 通常食を与え続けた群に似た腸内菌叢を示した。

【考察】 HFHSD を食べ始める時期が腸内菌叢の形成に関与しており, その時期が早いとより影響を受けやすいことが推察された。また, 食餌方法によっても腸内菌叢の構成が変化し, 脂肪性肝疾患の発症が抑えられる可能性が考えられる。現在, これらの群における腸内菌叢の相違について, 次世代シーケンサーにより詳細に解析中である。

一般演題 A-11

食餌因子と腸内細菌間相互作用による
Clostridium difficile 感染制御機構の解析Interplay between diet and gut microbiota mediates colonization
resistance against *Clostridium difficile*

○矢加部恭輔, 金 倫基, 長谷耕二
慶應義塾大学大学院薬学研究科生化学講座

【目的】 *Clostridium difficile* は芽胞形成性グラム陽性偏性嫌気性細菌であり, 院内感染による下痢症の主な原因菌として知られている. *C. difficile* は, 抗菌薬投与などによる腸内細菌叢の攪乱により大腸内で増殖し, 毒素を放出することで下痢などの軽い症状から偽膜性大腸炎, 中毒性巨大結腸症, 腸穿孔などの重い症状まで様々な症状を引き起こす. *C. difficile* 感染 (CDI) に対しては, 抗菌薬治療に加え, 便微生物移植が非常に有効であることから, 腸内細菌が CDI 制御に重要であると考えられる. また, 食餌が腸内細菌叢やその代謝産物を変化させることや, CDI に対する感受性に影響を与えることも知られている. そのため, 食餌が腸内細菌を介して CDI の病態を左右している可能性が考えられた. そこで本研究では, 食餌-腸内細菌間相互作用という観点から CDI 制御の可能性を検証した.

【方法】 コンベンショナル環境下で, 固形飼料を与えた 5 週齢の C57BL/6 雌マウスに cefoperazone を 10 日間投与した後, 通常水に交換するとともに, 固形飼料または精製飼料摂食群に分けた. その 2 日後に, *C. difficile* の芽胞 1×10^4 CFU/匹を経口感染させ, 10 日間生存率を観察した. また, 各飼料摂食群の *C. difficile* 感染直前の糞便を採取し, 細菌の DNA を抽出後, 腸内細菌叢の構成を 16S rDNA シークエンス法により解析した. また, 無菌飼育した IQI 雌マウスにも同様に 2 種類の飼料を摂取させ, *C. difficile* を感染させた.

【結果と考察】 固形飼料摂食群と比較して, 精製飼料摂食群において *C. difficile* 感染後の生存率の延長, 腸管組織傷害の軽減, 糞便中 *C. difficile* の CFU 減少が確認された. 各飼料摂食群における CDI 病態の違いは, 無菌マウスでは確認されなかったことから, 精製飼料による CDI の制御には腸内細菌が関与していることが示唆された. 腸内細菌叢解析の結果, 精製飼料摂食群では OTU544419 と OTU288680 の腸内細菌が全体の約 90% 近くを占めていた. 以上の結果より, これらの腸内細菌が *C. difficile* の増殖 (または定着) 抑制に関与している可能性が考えられた.

一般演題 A-12

Bacteroides は腸内細菌の LPS 産生を制御し動脈硬化を抑制する
Bacteroides protects against atherosclerosis by regulating gut microbial lipopolysaccharide production

○吉田尚史¹, 山下智也¹, 江本拓央¹, 渡邊日佳流², 林 友鴻¹,
田畑諭子¹, 小澤元希³, 山田拓司², 平田健一¹

¹ 神戸大学大学院医学研究科内科学講座循環器内科学分野,

² 東京工業大学生命理工学院生命理工学系, ³ 株式会社テクノスルガ・ラボ

【目的】 動脈硬化性疾患は死因第 2 位を占め、健康寿命社会を実現するために策定された「脳卒中と循環器病克服 5 カ年計画」においても、動脈硬化性疾患の代表例である冠動脈疾患に対する新規予防法・治療法の開発が課題となっている。こうした社会背景の中、我々は腸から動脈硬化を予防する研究を行っており、*Bacteroides* 属が冠動脈疾患患者の腸内細菌叢において減少していることを明らかとした。そこで本研究では、冠動脈疾患発症に寄与する *Bacteroides* を種レベルで同定し、その種と冠動脈疾患発症の機序を明らかとすることを目的とした。

【方法】 神戸大学附属病院に入院された、冠動脈疾患患者 30 名と非冠動脈疾患患者 30 名の腸内細菌叢を、MiSeq にて V3-4 領域を標的とした 16S メタゲノム解析により種レベルの差異を同定した。冠動脈疾患患者で有意にその割合が低下している腸内細菌種を同定し、その菌株を動脈硬化モデルマウスに経口投与することで、腸内細菌種と冠動脈疾患の因果関係と発症機序を解明する、トランスレーショナルリサーチを行った。

【結果】 冠動脈疾患患者の腸内細菌叢において、*Bacteroides* X の割合が有意に低下していた。*Bacteroides* X を動脈硬化モデルマウスに投与した結果、動脈硬化巣は有意に減少し、動脈硬化巣に集積したマクロファージや CD4 陽性 T 細胞数も減少傾向であった。血中 lipopolysaccharide (LPS) 値や炎症性サイトカイン濃度は、*Bacteroides* X 投与群で有意に低下していた。*Bacteroides* X 投与後の腸内細菌叢はコントロール群と比して大きく変化し、PICRUST を用いて遺伝子群を推定した結果、*Bacteroides* X 投与群では LPS 合成に関わる遺伝子発現が有意に低下していた。さらに糞便 LPS 値は、*Bacteroides* X 投与群で有意に低下していた。

【考察】 冠動脈疾患患者で減少していた *Bacteroides* X を動脈硬化モデルマウスに投与すると動脈硬化が抑制されたことから、*Bacteroides* X と冠動脈疾患発症の因果関係を証明した。*Bacteroides* X は糞便 LPS 値を低下させることで、血中 LPS 値を低下させ、動脈硬化抑制に繋がったと考察された。

一般演題 A-13

分娩様式と栄養方法が新生児の腸内細菌叢に及ぼす影響

Effect of mode of delivery and nutrition on the gut microbiota
in healthy Japanese neonates

○赤川翔平^{1,2}, 大沼竹紫¹, 山口 正^{1,2}, 山岸 満^{1,2}, 赤川友布子¹,
山内壮作¹, 木全貴久¹, 關谷真一郎^{1,2}, 大橋 敦^{1,2}, 辻 章志¹,
橋谷田真樹³, 赤根 敦³, 金子一成¹

¹ 関西医科大学小児科学講座, ² 泉大津市立病院新生児内科, ³ 関西医科大学法医学講座

【目的】帝王切開分娩で出生した新生児は経膈分娩で出生した新生児と比較して、肥満、アレルギー疾患、炎症性腸疾患、糖尿病などの発症リスクが高く、腸内細菌叢の dysbiosis の関与が示唆されている。そこで分娩様式および栄養方法が新生児期の腸内細菌叢に与える影響を明らかにすることを目的に検討を行った。

【方法】2015年9月から2016年8月に単一施設で出生し、両親が日本人である正期産、正常体重の新生児36名を対象とした。生後4日と生後1か月時の糞便から細菌DNAを抽出し、Ion PGM System (Thermo fisher scientific 社) を用いてメタ 16S リボソーム RNA 解析を行った。分娩様式（経膈分娩または帝王切開分娩）および栄養方法（母乳栄養または人工乳栄養）により対象を4群に分け、Shannon Index と便中の微生物構成割合（%）を菌目別に比較した。栄養法については1か月時までの総哺乳量の8割以上が母乳の場合を母乳栄養、8割以上が人工乳の場合を人工乳栄養とした。統計学的解析には Kruskal-Wallis 検定, Mann-Whitney U 検定を用い $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】経膈分娩出生/母乳栄養群は10例、経膈分娩出生/人工乳栄養群は10例、帝王切開分娩出生/母乳栄養群は10例、帝王切開分娩出生/人工乳栄養群は6例で、4群間で性別、出生体重、在胎週数に差を認めなかった。生後4日目において、経膈分娩で出生した新生児 (n=20) は帝王切開分娩で出生した新生児 (n=16) に比して有意に Lactobacillales 目, Bacillales 目の割合が低く、Enterobacteriales 目, Bacteroides 目の割合が高かったが、生後1か月時には Bacteroides 目以外の菌目では4群間で有意差を認めなかった。また Shannon Index も生後4日目では経膈分娩で出生した新生児が有意に高かったが ($p=0.04$)、生後1か月時には4群間で有意差を認めなかった。

【考察】生後4日目では分娩方法による腸内細菌叢の違いが明らかであったが、生後1か月時には群間の差は小さくなっていた。今回の検討では人工乳栄養の新生児も全例、毎日多少の母乳を摂取しており、少量でも母乳を摂取することで帝王切開分娩による dysbiosis を是正できる可能性が示唆された。

一般演題 A-14**加齢による口腔内細菌叢と腸内細菌叢の関連性の変化****Relationship between oral and gut microbiota in elderly people**

○岩内めぐみ¹, 堀米綾子², 石川健太郎¹, 三國 文¹, 密山恵梨²,
中野 学³, 小田巻俊孝², 清水金忠², 弘中祥司¹

¹ 昭和大学歯学部スペシャルニーズ口腔医学講座口腔衛生学部門,

² 森永乳業株式会社基礎研究所, ³ 森永乳業株式会社素材研究所

【目的】 我々の腸内細菌は加齢にともない構成が変化することが知られており, その一部には口腔内に生息する属と同一の細菌が含まれていると報告がある. そこで本研究では健常成人と高齢者における腸内細菌と口腔内細菌の関連性について検討を行った.

【方法】 健常成人 30 例および特別養護老人ホーム入居者 30 例を対象に口腔内細菌叢, 口腔内総菌数, 腸内細菌叢, 口腔内状況を評価した.

1. 舌苔中の細菌叢

被験者の舌中央部の舌苔約 2 cm² から滅菌済みスワブで細菌を回収, DNA を抽出し, PCR- インベーター法で総菌数および歯周病の原因菌とされる *Porphyromonas gingivalis* 数を測定した. また, 定量 PCR や 16S rRNA メタゲノム解析による細菌叢解析を行った.

2. 歯肉縁下プラーク中の細菌数

各被験者の歯周ポケットの最深箇所滅菌ペーパーポイントを挿入して細菌を含む浸潤液を回収し, 舌苔からの回収サンプル同様の細菌叢解析を行った.

3. 腸内細菌叢

採便キットを用いて糞便を採取後, 糞便より DNA を抽出し, 定量 PCR や 16S rRNA メタゲノム解析による細菌叢解析を行った.

4. 口腔内評価

残存歯数, 義歯の使用状況, 歯周ポケット, 歯周病重症度について評価した.

【結果】 既報通り, 成人と高齢者では口腔内・腸内ともに様々な細菌種について有意な差が認められた. また, 各被験者における口腔内と腸内における細菌叢の類似性を評価するため UniFrac 距離を算出したところ, 成人よりも高齢者で口腔内細菌叢と腸内細菌叢の相同性が有意に高いことが認められた. 口腔内から検出された菌属のうち, 同一被験者の腸内でも同菌属が検出された被験者の割合を計算したところ, 高齢者では 18 属について成人よりも有意に高い検出率を示した. 一方で成人が高齢者よりも高い検出率であったのはわずか 4 属であった. *P. gingivalis* については高齢者での検出率が高い傾向にあった (成人 10.0%, 高齢者 27.6%, $p=0.1$). しかしながら, 歯周病重症度と *P. gingivalis* の検出率の間には相関性はみられなかった.

【考察】 仮説通り高齢者群では成人群よりも口腔内細菌叢と腸内細菌叢の相同性が高いことが示されたことから, 高齢者における口腔のケアは, 成人における口腔のケアよりも腸内細菌叢のバランスに影響を与える可能性が考えられた.