

一般演題 C-1**群集生態学的観点から細菌叢の比較分析を行うための新手法****A novel data analysis framework to compare microbiomes
as ecological communities**

○鈴木健大, 榊屋啓志

理化学研究所バイオリソース研究センター 統合情報開発室

【目的】 腸内細菌叢を始めとする細菌叢は生態学的な群集である。ある菌叢組成がどの程度普遍的にみられるか、時間の経過に対してどの程度安定であるかには、宿主との相互作用だけでなく菌種間の生態学的な相互作用が関わっている。すなわち、細菌叢がなぜその組成をもって現れるかを知るためには、一般的な菌叢解析で得られる組成情報のほか、菌種同士の相互作用、群集レベルの安定性の情報を統合的に理解することが重要である。

【方法】 本発表では、生物群集データの普遍的な解析手法となりうる「エネルギーランドスケープ解析」を、多様な環境の細菌叢データを含む earth microbiome project (EMP) データに適用した結果を示す。エネルギーランドスケープ解析は、物質科学や神経科学の分野で用いられており、現在発表者が群集生態学への応用を目的に開発を進めている新しいデータ解析手法である。次世代シーケンス解析を通じて得られるサンプルごとの菌種の在不在情報を利用し、細菌叢組成の安定性、菌種間の共起の背景にある相互作用構造を同時に推定することができる。共生細菌叢（哺乳類腸内、表皮など）と自由生活者の形成する細菌叢（湖沼、土壌など）の生態学的な群集としての違いを明らかにするため、エネルギーランドスケープ解析を EMP データに適用し分析を行った。

【結果】 共生細菌叢では少数種の集団が安定化する傾向がみられたのに対し、自由生活者が形成する細菌叢は、種数が多くなるほど安定化する傾向がみられた。また、共生細菌叢ではサンプル間の群集組成の類似性と相互作用パターンの類似性に強い相関関係があった（組成が似ているサンプルほど、同じ菌種同士に同じ相互作用が再現される可能性が高い）が、自由生活者の細菌叢ではそのような傾向は低かった。

【考察】 上記の結果より、共生細菌叢では宿主との関係性を維持するために小集団内で菌種間の関係性を固定化し、組成の再現性を高めている可能性が示唆された。一方、自由生活者の細菌叢形成においては、表現型の可塑性など他種との関係性を変えるメカニズムを通じ、組成の再現性よりも個々の生存が優先されている可能性が示唆された。こうした違いを宿主と細菌叢との「共進化」の結果と捉えると興味深い。本研究のフレームワークは、こうした基礎的な観点の研究だけでなく、疾患発症や薬物投与、摂食傾向の変化を通じて起こる細菌叢遷移現象などの包括的な理解・解明に利用できると考えている。

一般演題 C-2

乳酸菌培養上清中の細胞外小胞 (extracellular vesicle) の
characterization と生理活性Characterization and bioactivity of
extracellular vesicles derived from lactic acid bacteria○平 敏夫¹, 関口志津子¹, 成田督征², 亀田くるみ², 山口昭弘²¹ コスモ・バイオ株式会社札幌事業部,² 酪農学園大学 農食環境学群食と健康学類 応用微生物学研究室

【目的】細胞外小胞 (extracellular vesicle, 以下 EV) は多細胞生物, 単細胞生物を問わず, 細胞間コミュニケーションツールとして機能していることが最近の研究で明らかになってきている. 特に乳酸菌をはじめ腸内細菌が放つ EV が宿主である多細胞生物の体細胞にも情報を与えていることが徐々に明らかになってきている. 今回我々は, 乳酸菌株 4 種類の培養上清から EV を精製し, 各 EV の characterization とその生理活性を調べたので報告する.

【方法】乳酸菌株として野生株 2 種類と標準株 2 種類を MRS ブイヨン培地で培養し培養上清を得た. 上清を 0.22 μ m メンブランフィルターを用いて完全に除菌し, 超遠心法と限外濾過法を用いて EV 画分を濃縮精製した. 原液に対して 10 倍濃縮精製した EV 画分を調製し各菌種由来の EV の characterization として NanoSight による粒度分布測定, およびタンパク定量を行った. さらに体細胞として, ①マウスマクロファージ (RAW264.7) のアルギナーゼ活性と, ②ヒト皮膚由来線維芽細胞の well 当たりの細胞密度とコラーゲン量を指標として各 EV の生理活性を調べた. 対照として牛乳由来の EV (milk exosome) を添加した.

【結果】4 種の乳酸菌株培養上清にはいずれも大きさ平均粒度 200 nm とし, 50 nm ~ 200 nm で分布を持つ粒子が 10^9 個 / ml 程度で存在していることが分かった. 原液から超遠心法および限外濾過法, とともに EV を 10 倍密度に濃縮精製することができた. 各種 EV 画分と菌体を RAW264.7 に添加した結果, 菌体を添加した場合とは異なり, milk exosome と同様にアルギナーゼ活性上昇能は低かった. ヒト皮膚由来線維芽細胞への添加試験では, milk exosome 添加と同様に well 当たりの細胞数とコラーゲン量を上昇させた.

【考察】通常行われている乳酸菌の培養法でも 10^9 個 / ml 程度の EV を培地中に放出していることが今回の研究で明らかになった. 今後は EV 放出量をさらに高める培養方法を模索したい. また, 今回の研究から限外濾過法でも超遠心法と同様の活性を持つ EV 画分を精製することが可能であることが分かり, 医薬品原体 (DDS としての応用など), および化粧品原材料などへの産業応用への道が開かれたと思われる. 今後は乳酸菌株種をさらに増やしてより目的別に最適な菌種探索を進めていく予定である.

一般演題 C-3*Candida albicans* 経口摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響についてThe effects of *Candida albicans* oral ingestion on intestinal microbial flora

○長谷部晃, 佐伯 歩, 柴田健一郎

北海道大学大学院歯学研究院 口腔分子微生物学教室

【目的】 *Candida albicans* はヒトの口腔などに常在する真菌であり、口腔カンジダ症の原因ともなる。口腔カンジダ症患者は *C. albicans* を嚥下していることから、本菌が腸内細菌叢を変動させ、結果として全身状態に影響を与えているのではないかと考えた。そこで、本研究では *C. albicans* を持続的に口腔から摂取することにより、腸内細菌叢ならびに全身の健康状態がどのように変動するか検証することを目的とした。

【方法】 C57BL/6, 4 週齢の雌マウスの糞便中に *C. albicans* が存在しないことを確認後、AIN-93G を飼料として 2 週間与えた。その後 16 時間絶食させてから *C. albicans* (5×10^7 cfu/匹) を経口摂取した。摂取 2 週間後における *C. albicans* の定着を確認するため、糞便をカンジダ GS 培地に摂取した。*C. albicans* の有無による腸内細菌叢の変化は T-RFLP 法で調べ、糞便中の IgA は ELISA 法で調べた。また、腸内細菌叢の変動がデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) により誘導された腸炎に及ぼす影響を調べるため、2.0% DSS 含有の水あるいは通常の水を与え、*C. albicans* 経口摂取後から 25 日間の体重変化を調べた。

【結果】 *C. albicans* 経口摂取により胃粘膜に *C. albicans* が定着し、同部位における炎症性細胞の浸潤がみられた。糞便中の細菌叢については *C. albicans* 定着により通性嫌気性の *Lactobacillales* 目の割合が増加し、偏性嫌気性菌の割合が減少した。糞便中の IgA の量は *C. albicans* を経口摂取により増加していた。また DSS 水の飲水投与により誘導された腸炎による体重減少 *C. albicans* 経口摂取により有意に減少した。

【考察】 *C. albicans* の胃粘膜への定着により常時 *C. albicans* を摂取すると、腸内細菌叢の変化を誘導し、それにより腸炎を増悪することがわかった。このことは、ヒトの口腔カンジダ症においても腸内細菌叢の変化が生じていてそれにとまなう何らかの異常が起きている可能性があることを示唆している。

一般演題 C-4

腸内細菌と皮膚機能のインターアクションに関する解析
～老齢マウスを用いた解析～Study on interaction between gut microbiota and
skin function using aging mice

○五十嵐信智, 富樫拓己, 川崎 藍, 今 理紗子, 酒井寛泰, 亀井淳三

星薬科大学学生体分子薬理学研究室

【目的】近年、潰瘍性大腸炎や肥満、糖尿病の発症時に腸内細菌が大きく変動していることが報告され、これら疾患の発症における腸内細菌の重要性がクローズアップされている。また、アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患の発症においても、腸内細菌の関与が報告され始め、皮膚機能の維持における腸内細菌の役割にも注目が集まっている。しかしながら、皮膚機能に及ぼす腸内細菌の影響については、いまだ不明な点が多く残っている。本研究では、腸内細菌と皮膚機能とのインターアクションを解明するための基盤研究の一環として、加齢にともない腸内細菌叢が変動するとの報告をもとに、ノトバイオートマウスを作成し、検討した。具体的には、腸内細菌が存在しない germ free (GF) マウスに老齢マウスの糞を移植し、皮膚機能調節関連分子の発現量を解析し、その発現制御と腸内細菌との関わりについて調べた。

【方法】2ヶ月齢および15ヶ月齢のマウスをそれぞれ若齢マウスおよび老齢マウスとし、腸内細菌叢を解析した。また、腸内細菌が存在しない GF マウスにこれらマウスの糞を移植し、各種皮膚機能調節関連分子の発現量を調べた。

【結果】腸内細菌を門レベルで解析した結果、老齢マウスでは *Firmicutes* 門の腸内細菌量が有意に高かったのに対して、*Bacteroidetes* 門、*Proteobacteria* 門および *Actinobacteria* 門が有意に低いことが明らかとなった。また、次世代シーケンサーにより腸内細菌叢を網羅的に解析した結果、両者に相違が認められた。これらマウスの糞便懸濁液を GF マウスに投与したところ、老齢マウスの糞便移植により、皮膚におけるセラミド分解酵素 (Asah1)、セラミド合成酵素 (Sptlc1 および Sptlc2)、ヒアルロン酸分解酵素 (Hyal1)、コラーゲン (Colla1 および Colla2) およびアクアポリン 3 (Aqp3) の mRNA 発現量が、若齢マウスの糞便移植したマウスに比べて有意に増加することが明らかとなった。

【考察】本研究の結果から、加齢にともなって変化する腸内細菌が、皮膚機能を調節する遺伝子群の発現量をコントロールすることが明らかとなった。今後、これら遺伝子を変動させる腸内細菌やその原因物質を同定することにより、皮膚疾患に対する新たな治療戦略が提案できるものと考えられる。

一般演題 C-5**舌下の樹状細胞-T細胞クラスターと樹状細胞の口腔内分布****Sublingual dendritic cell (DC) - T cell clusters and distribution of DCs in the oral cavity**

植田都月¹, 楠本 豊¹, 竹内春香¹, 星田哲志^{2,3}, 改正恒康⁴, 邊見弘明⁴, 本田哲也⁵,
椛島健治⁵, 片岡宏介⁶, 池淵良洋^{1,7}, 守屋大樹¹, 西居亜希子¹, 〇戸村道夫¹

¹ 大阪大谷大学薬学部 免疫学講座,

² 理化学研究所 脳神経科学研究センター 細胞機能探索技術研究チーム,

³ 理化学研究所 光量子工学研究センター 生命光学技術研究チーム,

⁴ 和歌山県立医科大学先端医学研究所 生体調節機構研究部, ⁵ 京都大学医学研究科 皮膚科学教室,

⁶ 大阪歯科大学 口腔衛生学講座, ⁷ 日本学術振興機構

【目的】口腔粘膜は病原菌に対する防御の最前線である一方で、食物抗原および共生細菌に対する寛容維持、さらに無針ワクチン接種や舌下免疫療法（SLIT）等による人為的な免疫調節の標的として機能する。すなわち、口腔粘膜は口腔のみならず全身の免疫系の機能に重要な役割を果たしている。樹状細胞（DC）は粘膜免疫系を構成する重要な免疫細胞集団の1つであり、口腔粘膜に広く分布しているが、その正確な分布は分かっていない。また、皮膚の毛包や、免疫応答後の皮膚や膺にはT細胞を含むDCクラスターが形成され、これらは再感染防御や二次免疫応答に寄与することが分かっている。そこで本研究では、口腔内のDC分布の詳細を明らかにするとともにT細胞を含む口腔内DCクラスターを探索した。

【方法】樹状細胞特異的に黄色蛍光タンパク質（YFP）を発現するCD11c-YFPマウスの口腔組織を組織透明化後、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で観察した。凍結組織切片を、血球系細胞マーカーであるCD45、あるいはT細胞マーカーであるCD5に対する蛍光標識抗体で染色し観察した。

【結果】DCは口蓋、上顎の口蓋側歯肉では低密度で存在するのに対し、口腔前庭、頬粘膜、下顎歯肉、舌下表面、および口腔底では中～高密度で存在していた。DCの口腔内分布パターンの多様性は粘膜構造に関連しており、例えば、頬粘膜では単一のDCは表皮突起の基底層に存在していた。また、舌下粘膜では、DCが舌尖から舌の後方にかけて徐々に増加し、さらに主に後部領域に多数のDCが集積するDCクラスターが存在した。このクラスターは主に短い樹状突起を有するDCで構成され、構成するDCの一部はCD8⁺T細胞への抗原提示能を有することが知られているCD103⁺DCであることが示唆された。また、DCクラスター内には血球系細胞とともにT細胞も含まれることが分かった。

【考察】当研究により明らかとなった口腔内における粘膜構造に関連したDC分布の口腔細菌叢変化や炎症による影響の解明は、口腔免疫応答の理解を深めると考えられる。さらに、当研究により初めて見出した舌下粘膜に存在するT細胞を含むDCクラスターの詳細解析は、口腔粘膜内の局所免疫調節機構の解明とともに、共生細菌や無針ワクチン、SLITによる口腔免疫系を介した全身免疫制御機構の解明につながると考えられる。

一般演題 C-6

腸内細菌叢の変動を介した歯周病の NAFLD への影響

Periodontal disease exacerbates NAFLD via dysbiosis of gut microbiota

○山崎恭子^{1, 2}, 中島麻由佳², 竹内麻衣², 原 実生³, 都野隆博^{1, 2},
松岸 葵^{1, 2}, 松川由実², 佐藤圭祐², 高橋直紀², 多部田康一²,
坪井裕理⁴, 菊地 淳⁴, 加藤 完⁵, 大野博司⁵, 山崎和久¹

¹ 新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔保健学分野,

² 新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野,

³ 高度口腔機能教育研究センター,

⁴ 理化学研究所環境資源科学研究センター環境代謝分析研究チーム,

⁵ 理化学研究所生命医科学研究センター粘膜システム研究チーム

【目的】 歯周病はメタボリックシンドロームの一員である 2 型糖尿病, 動脈硬化性疾患や関節リウマチなど様々な疾患のリスク因子であることが知られているが, 関連メカニズムについては十分明らかになっていない. 我々はこれまでにマウスに歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* を経口投与すると, 嚥下された *P. gingivalis* が腸内細菌叢を変動させるとともに全身性の炎症を誘導し全身疾患のリスクを高めることを報告した. そこで実際の疾患モデルにおける歯周病原細菌経口投与の影響を調べるため, メタボリックシンドローム関連疾患である nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) モデルマウスを用いて, 歯周病原細菌嚥下による NAFLD 病態進行への影響を調べることにした.

【方法】 6 週齢の C57BL/6 マウスを普通餌 (NC)・非感染, コリン・メチオニン欠乏高脂肪食 (HFD)・非感染, HFD・*Prevotella intermedia* または *P. gingivalis* 感染の 4 群に分けた. 細菌感染は週 5 回計 3 週間口腔より投与し, 投与開始 1 週間後より NC 継続群と HFD 転換群にわけ, 細菌感染とともに 2 週間継続した. 肝臓のトリグリセリド, ヒドロキシプロリン量測定および, 組織学的解析を行った. また肝臓における遺伝子発現の網羅的解析を行い real time PCR 法にて確認した. さらに採取した糞便の DNA を抽出し, 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を増幅した後イルミナ社 Miseq プラットフォームにてシーケンス解析を行った. 血清メタボローム解析は NMR spectrometer を用いて解析を行った.

【結果】 感染群において肝臓組織中のトリグリセリド, ヒドロキシプロリン量の上昇, 肝線維化, 腫瘍関連遺伝子発現の上昇, および組織学的解析により脂肪変性, 線維化の亢進が認められた. さらにエンドトキシンレベルの上昇が感染群において認められた. いずれの結果も *P. intermedia* 感染群と比較して *P. gingivalis* 感染群において有意な上昇および上昇傾向が認められた. また, 感染群において腸内細菌叢, 血清メタボライトの変動が認められ, 特に *P. gingivalis* 感染群で顕著であった.

【考察】 歯周病原細菌, 特に *P. gingivalis* 経口投与により腸内環境が変化し, 細菌あるいは菌体成分が肝臓に移行することで, 遺伝子発現や代謝に影響を及ぼし NAFLD 病態形成が進行および重症化する可能性が示唆された.

一般演題 C-7

幼少期の抗菌薬摂取が胆汁酸シグナル伝達系に及ぼす影響

Effect of antibiotic treatment in early life on bile acid signaling

○富本 麗, 今 理紗子, 五十嵐信智, 酒井寛泰, 亀井淳三

星薬科大学 生体分子薬理学研究室

【目的】 抗菌薬は、感染症に対して幼少期から広く用いられており、感染症治療において必要不可欠な薬剤の一つである。一方、乳児期に抗菌薬を使用すると、成人期において肥満やアレルギー疾患の発症リスクが上昇することなども報告され、ヒトの健康を考えるうえでも幼少期における抗菌薬使用の是非が議論されている。しかしながら、幼少期に使用した抗菌薬が成熟個体にどのような影響を及ぼすのか、その詳細については不明な点が多く残っていた。本研究では、この点を明らかにする目的の一環として、疾病との関わりが深い胆汁酸シグナル伝達系および腸内細菌に焦点をあて、幼少期の抗菌薬摂取が成熟個体に及ぼす影響について調べた。

【方法】 離乳直後の C57BL/6J 系雌性マウスを 3 群にわけ、精製水、アモキシシリン (25 mg/kg/day) あるいはタイロシン (50 mg/kg/day) を 3 週間投与し、その後 16 週間通常飼育した。それぞれのマウスから、小腸および糞便を採取し、FXR (Farnesoid X Receptor) 標的遺伝子および腸内細菌を調べた。

【結果および考察】 離乳直後からアモキシシリンあるいはタイロシンを 3 週間投与したマウスの体重および摂餌量は、コントロール群と比べて変化がみられなかった。また、脂肪重量、血中グルコース濃度およびコレステロール濃度にも差は認められなかった。タイロシンを投与したマウスの小腸における OST α , OST β および ASBT の mRNA 発現量は、いずれもコントロール群と比べて有意に増加した。また、タイロシンを投与した際の糞便中の腸内細菌量を解析したところ、Actinobacteria 門が有意に増加していたのに対して、Proteobacteria 門は有意に低下することがわかった。さらに、属レベルでは *Bifidobacterium* 属および *Streptococcus* 属が有意に増加していた。一方、アモキシシリンを投与したマウスの小腸における OST α , OST β , ASBT の mRNA 発現量および糞便中の腸内細菌量に変化は認められなかった。以上のことから、小児期に一定期間、抗菌薬を摂取すると成人期において腸内細菌叢が変化し、これにより胆汁酸シグナル伝達系に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、この作用は抗菌薬の種類によって異なることがわかった。このメカニズムならびに疾病との関わりについては目下検討中である。

一般演題 C-8

食品成分, 腸内細菌および腸内細菌代謝産物の共刺激が
IgA 産生に与える影響The effects of co-stimulation by food components, commensal bacterium
and its metabolites on IgA production○柴崎涼太¹, 古川凱斗¹, 津田真人¹, 高野智弘²,
戸塚 護³, 八村敏志², 細野 朗¹¹ 日本大学生物資源科学部 食品生命学科,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 日本獣医生命科学大学応用生命科学部 食品科学科

【目的】近年, 食品成分としてのポリフェノール類が, 高脂肪食条件下で糞便中の IgA 量を増加させることなど, 免疫系に対する作用について注目されている。また, 腸内細菌の代謝産物としての短鎖脂肪酸が免疫系細胞応答を修飾するはたらきがあることから, 腸内細菌とその代謝産物, および食品成分が腸管免疫応答に協調的に作用することが考えられる。本研究では, 腸管免疫系の IgA 産生に対する, 腸内細菌, 短鎖脂肪酸およびポリフェノールの作用に注目し, これらの協調作用を明らかにすることを目的とした。

【方法】BALB/c マウスの小腸からパイエル板 (PP) を採取した。調製した PP 細胞を丸底 96 well プレートにマウスの腸内優勢菌である *Bacteroides acidifaciens* type A43 (BA) の加熱死菌体 (終濃度 0, 10 mg/ml), 短鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸および L-乳酸 (各終濃度 1 mM)), クルクミン (終濃度 0, 2.5, 10 μ M) とともに 7 日間培養した。そして, 培養上清を回収し, ELISA により IgA 産生量を測定した。

【結果・考察】酢酸とプロピオン酸は, 1 mM で BA 菌体との協調作用により PP 細胞の IgA 産生を増強する作用が観察されたが, 酪酸は同濃度でも BA の刺激下において IgA 産生を抑制する傾向がみられた。一方クルクミン 2.5 μ M は酢酸との共刺激によって IgA 産生を増加させる傾向がみられたが, プロピオン酸との共刺激ではその作用は認められなかった。さらに, クルクミンは 10 μ M での刺激においては, IgA 産生量が 2.5 μ M より低い特徴がみられた。以上のことから, 腸内細菌, 短鎖脂肪酸, およびポリフェノールの協調作用により IgA 産生が変化し, 酢酸とプロピオン酸, 酪酸はそれぞれ腸内細菌およびクルクミンとの協調作用の機序が異なっている可能性が考えられた。

一般演題 C-9**ガレクチン-3 は腸内細菌叢に影響し、NSAIDs による
小腸潰瘍の増悪因子として働く****Galectin-3 affects intestinal microbiota, exacerbating NSAIDs-induced
intestinal ulcer**

○朴 雅美, 尾村誠一, 佐藤文孝, 藤田 貢, 角田郁生

近畿大学医学部微生物学講座

【目的】非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）は鎮痛や抗血液凝固などの目的で広く服用されているが、副作用の1つである胃・小腸潰瘍の発生頻度は高い。胃潰瘍は胃粘膜保護剤などの併用によって軽減が可能であるが、小腸潰瘍に対しては効果的な治療法がない。これは NSAIDs による小腸潰瘍が ①腸管バリア機能の低下、②それにともなう細菌の侵入と③炎症反応、と複数の因子によるためである。ガレクチン-3（Gal3）は、ガラクトースに結合特異性を持つタンパク質ガレクチンファミリーの1つで、マクロファージ（Mf）と腸管上皮細胞で高い発現が認められる。活性化 Mf が産生する Gal3 は、免疫の活性化に寄与しており、大腸炎モデルなどで免疫病理増悪因子になりうるということが報告されてきた。一方、我々はこれまで Gal3 が特定の細菌の糖鎖と結合し、その増殖や感染を抑えることを明らかにしてきた。Gal3 が腸内細菌叢の組成と Mf 活性化に影響を及ぼす可能性があるため、Gal3 が小腸潰瘍治療の新たなターゲット分子になりうるかを検討した。

【方法】未処置の野生型（WT）と Gal3 欠損（Gal3KO）マウスの小腸内容物を回収し、小腸内細菌叢を解析した。WT と Gal3KO マウスに NSAIDs の1つであるインドメタシン（Indo）を経口投与し、小腸潰瘍レベルを組織学的に解析した。WT マウスに抗菌薬ポリミキシン B による腸内細菌除菌、またはクロドロネイトによる Mf 抑制を行い Indo による小腸潰瘍の軽減作用を調べた。

【結果】無処置の WT マウスと Gal3KO マウスの小腸細菌叢を目レベルで比較すると、両者とも 70% 以上は *Lactobacillales* 目であったが、それ以外の細菌では WT マウスでは *Bacteroidales* 目の、Gal3KO マウスでは *Clostridiales* 目の細菌が高い比率を示し、Gal3 の存在が腸内細菌叢に影響を及ぼすことが証明された。次に Indo 小腸潰瘍は Gal3KO マウスで軽減されたため、Gal3KO による細菌叢の変化あるいは Mf への影響が寄与していると考えられた。そこで Indo 投与前に WT マウスの腸内細菌除菌、または Mf 抑制を行ったところ、小腸潰瘍スコアの改善がみられた（未治療群、スコア 4; 抗菌剤群、スコア 2; Mf 抑制群、スコア 3）。

【考察】Gal3 は NSAIDs による小腸潰瘍の促進因子であり、治療のターゲットになりうることが示唆された。抗菌薬投与で潰瘍が軽減されること、WT と Gal3KO マウスで小腸細菌叢が異なることから、小腸細菌叢の違いが潰瘍重症度に関与している可能性が考えられた。抗菌薬投与と Mf 抑制剤の併用治療あるいは Gal3 阻害剤による治療が小腸潰瘍の新たな治療戦略として考えられた。

一般演題 C-10

Small intestinal hyperpermeability is associated with increased primary 12 α -hydroxylated bile acids in the enterohepatic circulation

○ Liu Hongxia, Ohji Kohmoto, Satoshi Ishizuka

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan

【Purpose】 A diet rich in fat deteriorates gut barrier function. Excessive dietary fat intake increases biliary secretion of taurocholic acid (TCA), a primary 12 α -hydroxylated (12 α OH) bile acid (BA), that facilitate lipid absorption in small intestine. Some of the BAs are reabsorbed in ileum, while the remaining are converted into secondary BAs by microorganisms in large intestine. Major secondary BAs are hydrophobic and induce barrier disruption in large intestine. Considering such constant exposure of the ileal mucosa to high concentration of primary 12 α OH BAs, those are potent barrier disruptor in small intestine. The present study aimed to investigate the role of primary 12 α OH BAs in epithelial hyperpermeability in small intestine.

【Methods】 Male WKAH/HkmSlc rats were randomly assigned to four groups fed control (AIN-93G diet) or cholic acid (CA)-supplemented diet (CA diet; 0.5 g/kg diet) in combination with or without vancomycin (VCM) in drinking water (200 mg VCM/L) for 6 weeks. Alteration of BA composition was evaluated in blood, liver, intestinal contents and feces in response to different diet by using UHPLC-MS. Assessment of intestinal permeability was conducted both *in vivo* and *ex vivo* as follows. In the *in vivo* study, percentage of urinary chromium (Cr) excretion was determined at 24 h post-administration of Cr-EDTA solution orally. In the *ex vivo* study, serosal permeation of fluorescent reagent was measured after incubation of jejunum or ileum segments together with 40 mM of TCA and fluorescent reagent at mucosal side in Ussing chamber.

【Results】 The dietary CA supplementation raised the concentration of 12 α OH BAs, especially TCA in the enterohepatic circulation and deoxycholic acid in cecal and fecal contents. The VCM treatment suppressed secondary BA productions in the large intestine. Urinary Cr excretion in the CA-fed rats remained higher than that of control rats regardless of the VCM treatment. Additionally, the concentration of primary 12 α OH BAs in portal plasma was positively correlated with the urinary Cr excretion ($r = 0.765$, $P < 0.001$). TCA was considered to be the most responsible molecule among primary 12 α OH BAs. In the *ex vivo* study, serosal concentration of the permeation marker increased significantly in the presence of TCA at the apical side of ileal mucosa, whereas no significant difference was observed in case of jejunum.

【Discussion】 Contributions of secondary BAs to gut barrier disruption have received much attention. A high concentration of deoxycholic acid induced by excessive energy retention impairs barrier integrity in colon, mainly due to its hydrophobic nature. On the other hand, contributions of primary 12 α OH BAs, which predominate in enterohepatic circulation, to leaky gut has been failed to notice so far. We here performed both *in vivo* and *ex vivo* model to investigate the role of primary 12 α OH BAs in gut barrier and the data clearly indicate that an increase in TCA concentration even in a physiological range enhances ileal permeability. In conclusion, this study implies that gut leakage can occur not only in large intestine but also in small intestine under a high energy retention, as intestinal epithelium is simultaneously exposed to high concentrations of primary and secondary 12 α OH BAs.

一般演題 C-11**大腸における水チャネルの発現に及ぼす腸内細菌の影響****Effect of gut microbiota on water channel in rat colon**

○今 理紗子, 富本 麗, 五十嵐信智, 酒井寛泰, 亀井淳三

星薬科大学 生体分子薬理学研究室

【目的】近年, 腸内細菌が種々の疾患の原因になり得るものと考えられており, なかでも, 過敏性腸症候群や潰瘍性大腸炎, 慢性便秘症など消化器疾患の発症や重症度に深く関与していることが報告されている. このように, 腸内細菌と下痢/便秘の発症には密接な関係があるものと考えられるが, その詳細については不明な点が多く残っていた. このようななか, 我々はこれまでに大腸の粘膜上皮細胞には水チャネル aquaporin-3 (AQP3) が優位に発現していること, 便の水分調節機構において AQP3 が重要な役割を担っていることを明らかにした. 本研究では, 腸内細菌が便濃縮および大腸 AQP3 の発現に及ぼす影響について種々検討した.

【方法】8 週齢の雄性 F344/Nslc (specific-pathogen-free; SPF) ラットおよび F344/N (germ-free; GF) ラットの排便状況を解析するとともに, 大腸における AQP3 の発現量を解析した. また, 8 週齢の雄性 Wistar ラットにスペクトルの異なる抗菌薬 (シプロフロキサシン, クラリスロマイシン, バンコマイシン) を 6 日間投与し, 排便状況および大腸 AQP3 の発現量を調べた.

【結果および考察】GF ラットの糞中水分量は, SPF ラットに比べて有意に高く, このときの大腸 AQP3 のタンパク質発現量は, SPF ラットと比べて約 60% 低かった. なお, GF ラットの大腸において器質的な変化はみられなかった. ラットにクラリスロマイシンを投与した場合には, 糞中水分量および大腸 AQP3 の発現量に有意な差は認められなかった. 一方, シプロフロキサシンおよびバンコマイシンを投与した際には, 糞中水分量が有意に増加し, この際, 大腸 AQP3 の発現量が有意に低下した. また, これらラットの糞便中の腸内細菌叢パターンを解析したところ, 抗菌薬の種類により腸内細菌叢の変動パターンが大きく異なることがわかった. 本研究の結果から, 腸内細菌あるいはその代謝物が大腸 AQP3 の発現量を制御し, 下痢や便秘の発症に寄与している可能性が示唆された.

一般演題 C-12

膵癌初期発生における膵腸相関

Organ interplay between intestine and pancreas during early-phase of pancreatic tumorigenesis

○小野裕介^{1, 3}, 中村公則², 清水由宇², 横井友樹², 杉本理菜², 早川祐子¹,
佐藤裕基³, 水上裕輔^{1, 3}, 綾部時芳², 奥村利勝³

¹ 札幌東徳洲会病院医学研究所,

² 北海道大学大学院 先端生命科学研究院 生命機能科学部門・細胞生物科学分野 自然免疫研究室,

³ 旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

【目的】膵癌発生と、膵液消化の場である小腸の免疫環境変化にはクロストークが存在する可能性がある。本研究では、膵特異的に変異型 KRAS を発現する遺伝子改変マウスを用いて、小腸の形態および腸内細菌叢の変化を評価し、膵癌前駆病変の進展との関連を調べた。

【方法】生後 8-10 週齢の Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D} (以下, KC) マウスにセルレインを腹腔内投与し (50 mg/kg を 1 時間間隔で 6 回, 2 日間), 8 週後に膵臓と小腸を摘出し組織学的解析を行った。また, セルレイン投与開始前と 8 週後のマウスの糞便より細菌の DNA を抽出し, 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅後, 次世代シーケンサーにより得られた配列データから菌叢解析を行った。

【結果】KC マウス (PBS 投与; 16 週齢) では膵腺房の脱分化にともなう化生病変 acinar-to-ductal metaplasia (ADM) が多発していた。一方, セルレイン投与群では, ADM から膵癌前駆病変である pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) への移行がみられ, 病変の分布がより広範であった。これら KC マウスと, 同系の野生型 (Pdx1-Cre, または LSL-Kras^{G12D}) における小腸の全長を比較したところ, セルレイン投与 KC マウスでは, PBS 投与 KC マウスおよび野生型個体よりも有意に延長していた。小腸の組織学的解析では, KC マウスは野生型と比べ小腸クリプトの位置が深く, さらにセルレイン投与群では絨毛長の延長が認められた。菌叢解析においては, セルレイン投与群において *Bifidobacterium*, および *Paraprevotellaceae* の占有率が有意に多かった。また, セルレイン投与群では, PBS 投与群に比較して α 多様性 (OTU 数および PD whole tree) の有意な低下を認めた。さらに, Weighted UniFrac 距離に基づく β 多様性解析では, セルレイン投与群と PBS 投与群間, および KC マウスと野生型マウス間においていずれも差がみられた。

【考察】膵癌の初期発生 (ADM から PanIN 形成が見られる過程) において, 小腸上皮の形態学的変化および腸内細菌叢の変化が確認された。膵組織の変化と, 腸管恒常性維持機構の変化には相互作用関係があり, それが発癌プロセスにおける加速因子として機能する可能性がある。

一般演題 C-13

PTEN ノックアウト前立腺癌マウスモデルにおいてラード食は
全身炎症と腸内細菌叢の変化を介して前立腺癌進展を促進するLard diet promotes prostate cancer development
with systematic inflammation and gut microbiota alteration
in a Pten-deficient mouse model

○佐藤博美¹, 成田伸太郎¹, 山本竜平¹, 小泉 淳¹, 奈良健平¹, 神田壮平¹,
沼倉一幸¹, 齋藤 満¹, 井上高光¹, 佐藤 滋², 吉岡年明³, 羽瀧友則¹

¹ 秋田大学大学院医学系研究科 腎泌尿器科学講座,

² 秋田大学医学部附属病院 腎疾患先端医療センター,

³ 秋田大学大学院医学系研究科 保健学専攻 作業療法学講座

【目的】 高脂肪食と肥満は前立腺癌の発症・進展に関与することが知られている。全身炎症の関与が考えられているがその詳細な機序は未だ不明である。今回、PTEN (Phosphatase and tensin homolog) ノックアウト前立腺癌マウスを用いて、高脂肪食による前立腺癌発症・進展における全身性の炎症と腸内細菌叢変化の関連について評価した。

【方法】 免疫応答性の PTEN ノックアウト前立腺癌マウスを、等カロリーで脂肪の組成のみが異なる 2 種類の食餌 (ラード食群または魚油食群、各群 10 匹ずつ) に群分け・飼育し、肥満の状態を評価し、糞便を採取した。マウスは 28 週齢でと殺し、血清・脂肪組織・前立腺を採取した。病理形態の評価は 1 名の病理医が行い、免疫染色で、Ki67 発現やアポトーシスの評価も行った。糞便を用いて 16S rRNA アンプリコン解析を行い、2 群間の門と属レベルの腸内細菌叢プロファイルと比較した。また、2 群間の血清 lipopolysaccharide (LPS) および前立腺内の網羅的な RNA 発現変化を比較した。

【結果】 魚油群と比較しラード群で有意に体重が増加し (46.0 g vs. 38.7 g, $p < 0.01$)、前立腺重量が大きき傾向にあった (1,620 mg vs. 707 mg, $p = 0.06$)。前立腺癌の発症はラード群のみで観察され (10 匹中 3 匹)、前立腺における Ki67 陽性率がラード群で有意に高率であった (18% vs. 10%, $p < 0.01$)。血清 LPS 平均値はラード群で高い傾向にあり (9.4 vs. 6.7 ng/ml, $p = 0.09$)、血清 LPS 値は有意にマウス重量と相関した ($p < 0.01$, $r = 0.78$)。2 群間で腸内細菌の構成は大きく異なっており、LPS の主要な供給源とされる *Proteobacteria* 門 (*Helicobacter* 属) の割合がラード群で有意に高かった (13% vs. 6%, $p = 0.02$)。マイクロアレイ解析では、ラード群で 203 個の遺伝子と 2 つの炎症関連経路を含む 30 の経路が有意に発現上昇・低下していた。

【考察】 ラード食は、PTEN ノックアウト前立腺癌マウスにおいて、血清 LPS の増加、腸内 *Proteobacteria* 門の増加によって前立腺癌の発症・進展を促進した。ラード食は、全身性の炎症反応および腸内細菌叢の変化を通じて腫瘍微小環境を変化させることにより、前立腺癌発症・進展に関わる可能性がある。

一般演題 C-14

LC-MS/MS によるニホンライチョウ糞便中の代謝物測定

Fecal metabolomics of *Lagopus muta japonica* by LC-MS/MS

○服部考成¹, 土田さやか², 川名修一¹, 緒方是嗣¹, 渡辺 淳¹, 小林 篤³,
中村隼明⁴, 中村浩志⁵, 牛田一成²

¹ 株式会社島津製作所 分析計測事業部, ² 中部大学創発学術院, ³ 東邦大学理学部,
⁴ 広島大学大学院生物圏科学研究科, ⁵ 中村浩志国際鳥類研究所

【目的】近年、ニホンライチョウの個体数が減少し、2000 年代には 1,700 羽あまりに減少したと推定され、絶滅が危惧されている。域外で人工飼育したニホンライチョウを野生復帰させる際、解決すべき課題が多い。近年、腸内細菌が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになり、腸内細菌叢に関する研究が注目されている。腸内細菌叢による宿主への影響を解明する手段として、腸内細菌叢が産生する代謝物を網羅的に解析する質量分析計を用いたメタボローム解析等が行われている。本研究では、野生および人工飼育ニホンライチョウの腸内細菌叢が産生する代謝物の違いを調べるために、ライチョウ糞便から代謝物を抽出し、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）で測定した結果を報告する。

【方法】排泄後、直ちに現場で凍結したニホンライチョウ糞便を前処理し、測定用サンプルとした。LC-MS/MS では、LCMS-8060（島津製作所）、分離カラムは PFPP カラムを用い、0.1% ギ酸水溶液と 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液を移動相としてグラジエントにて分析を行った。

【結果】野生および人工飼育ニホンライチョウ由来の糞便を LC-MS/MS で測定した結果、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシドや TCA サイクルに関わる有機酸等それぞれ平均 56, 60 の代謝物が検出された。測定結果を主成分分析した結果、野生・人工飼育ニホンライチョウ糞便が明確に分類された。フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、チロシン、メチオニン等のアミノ酸が人工飼育ニホンライチョウ糞便に多く含まれ、一方で、野生ニホンライチョウ糞便には、ウリジン、アデニン、シチジンが多く含まれることがわかった。

【考察】LC-MS/MS を用いて野生・人工飼育ニホンライチョウ糞便中の代謝物を網羅的に測定することにより、それぞれのニホンライチョウ糞便に特徴的な代謝物を特定できた。野生個体では、腸内で核酸の代謝産物が目立つことから、窒素栄養について非タンパク態窒素の利用が進んでいることが伺われた。

一般演題 C-15

犬の炎症性腸疾患に対する糞便微生物移植による
腸内細菌叢の変化と治療効果The effect of treatment and the change of fecal microbiome by fecal
microbiota transplantation in dogs with inflammatory bowel disease○新名彩加¹, 木邊量子², 鈴木亮平¹, 手嶋隆洋¹, 松本浩毅¹, 小山秀一¹¹ 日本獣医生命科学大学 獣医内科学教室² 日本獣医生命科学大学 獣医微生物学教室

【目的】犬の炎症性腸疾患（IBD）は、近年増加傾向にあるにも関わらず、未だ病因が不明確な消化器疾患である。既存の研究により、腸内細菌叢の菌種構成や菌種数・菌数の異常と本疾患との関連が明らかになってきており、治療として、糞便微生物移植（FMT）が選択され始めている。しかし、FMT に対する報告は少なく、効果については明確ではない。本研究の目的は、IBD 罹患犬に対して FMT を行い、治療効果を明らかにすることである。

【方法】健康犬と IBD 罹患犬における腸内細菌叢の違いを、次世代シーケンスにより調査した。さらに、健康犬由来糞便を用いて 6 頭の IBD 罹患犬に対して、浣腸法による FMT を実施した。FMT 前後の糞便から腸内細菌数の変化を定量 PCR 法により解析した。同時に、臨床症状の変化を犬炎症性腸症活動性指標（CIBDAI）と Waltham 糞便スコアにより評価した。

【結果】次世代シーケンス解析の結果、IBD 罹患犬では、全体的に菌種の多様性が低く、特に Proteobacteria の占める割合が多く、一方で Fusobacteria が有意に低い割合を示した。定量 PCR 解析の結果、post-FMT では *Proteobacterium* 属は減少し、一方で *Faecalibacterium* 属と *Fusobacterium* 属は増加を認めた。臨床状態の変化として、CIBDAI の平均は、8.0 から 5, Waltham 糞便スコアの平均は、5 から 2.5 へとどちらの指標でも低下しており、有意な改善が認められた。

【考察】IBD 罹患犬に対して FMT を行った結果、ドナーの腸内細菌叢と類似することが明らかとなり、同時に、臨床状態の改善が確認された。これらのことから、FMT により IBD 罹患犬の腸内細菌叢の正常化が起こり、FMT の治療効果が得られたと考えられた。今後、FMT は犬の IBD に対する治療法として、さらなる検討に値する方法であると考えられる。

一般演題 C-16

LC-MS/MS による屋久島ニホンザル糞便中の代謝物測定

Fecal metabolomics of Japanese macaques in Yakushima by LC-MS/MS

○國澤研大¹, 土田さやか², 澤田晶子², 服部考成¹, 緒方是嗣¹, 渡辺 淳¹, 牛田一成²¹株式会社島津製作所 分析計測事業部, ²中部大学創発学術院

【Background and Purpose】16S rRNA gene sequence analysis, so-called microbiome, became popular in the wildlife sciences. It is powerful tool to distinguish one group of animals such as under captive individuals from other groups such as its wild counterparts. However, the microbiome analysis is based only on bacterial phylogenetic information that does not reveal any nutritional and biochemical information of the gut environment. Recently, increasing attention has been devoted to the metabolomics to find the gut environment. In this study, we analyzed fecal metabolome of Japanese macaques in Yakushima using liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS) and liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOFMS).

【Methods】Five feces of Japanese macaques in Yakushima island were collected from two different locations. Feces were immediately frozen by the aide of dry ice and transported to the laboratory. After being thawed, feces were mixed with phosphate-buffered saline and extracted according to Matsumoto et al. (*Sci Rep* 2: 233). The upper portion was centrifuged and the supernatant was centrifugally filtered. The LC-MS/MS analysis was performed using a NexeraTM X2 system coupled with a LCMSTM-8060 (Shimadzu Corporation). The LC-QTOFMS analysis was performed using a NexeraTM Series system coupled with a LCMSTM-9030 (Shimadzu Corporation).

【Results and Discussion】We analyzed 97 metabolites in feces of Japanese macaques by LC-MS/MS. As results of LC/MS/MS analysis, 63 components including free amino acids, nucleic acid metabolites such as nucleotides, nucleosides, and nucleobases, and organic acids involved in the TCA cycle were detected. PCA analysis clarified that the clusters were separated into three groups according to the sampling site and freshness. The amount of hydrophilic compounds was affected by standing for 1 day and unaffected by standing for 1 hour. In LC-QTOFMS analysis, around 5,000 and 7,000 substances were detected respectively in positive mode and in negative mode in each sample. Particular difference was observed between two monkey groups in the concentrations of plant secondary metabolites such as cyanogenic glycosides, flavonoids and phenolics. It was suggested that feces analysis by metabolomics using LC-MS/MS and LC-QTOFMS could be applied to research nutritional and biochemical information of wild animals.

一般演題 C-17**ヒト糞便からの細菌叢長鎖 DNA 抽出装置の開発****Development of a high molecular weight microbiome DNA extraction system from human gut feces**

○横井崇秀¹, 緒方勇亮², 須田 互², 甲斐田薫², 佐保山友加里³, 濱里史明³, 服部正平^{2, 4}

¹ 株式会社日立製作所 研究開発グループ, ² 理化学研究所生命医科学研究センター,

³ 株式会社日立ハイテクノロジーズ イノベーション推進本部, ⁴ 早稲田大学理工学術院

【目的】近年の次世代シーケンサによる遺伝子解析能力の向上により, 細菌叢研究は急速な発展している. しかし, Costea らの論文 (Nat Biotechnol. 2017) にみられるように細菌叢から遺伝子を取り出す DNA 調製技術が未成熟であり, 用いる試薬やキットによって計測結果に違いが発生すること, 操作する技術者による差異が発生することが比較研究の大きな妨げとなっており, 相互比較可能な細菌叢データの蓄積に向け DNA 調製技術の自動化が望まれている. 本研究は長鎖 DNA の回収が可能な酵素法 (Kim et al., DNA Res. 2013) の自動化に向け, 自動装置の作製と検証を行った.

【方法】糞便の菌体精製回収から DNA 抽出まで 6 試料並列処理する装置を試作した. 本装置の性能検証試験として, ヒト糞便 4 検体を材料としてマニュアル操作と本装置それぞれについて $n = 6$ の DNA 抽出を行った. 抽出 DNA 溶液について 16S rRNA 遺伝子解析 (16S 解析) を用いた菌組成の比較を行った.

【結果】自動装置によって 100 μg の試料より得られた DNA 量は 3.6~12 μg であり, マニュアル操作に対し, $< 1/5$ と DNA 収量の低下がみられた. 一方, 16S 解析結果は Alpha-diversity, bacterial composition (phylum, genus-level), UniFrac の解析において, マニュアル操作によるゲノム DNA 試料とほぼ同等の値が得られた. また, 本装置による抽出操作は再現性を有することが確認された.

【考察】DNA 収量の低下がみられたものの, 16S 解析およびメタゲノムシーケンスを実行可能な DNA 収量であることが確認された. また, マニュアル操作と同等の菌叢組成が確認されたことから, 本装置の有用性が示された.

一般演題 C-18

腸内菌叢研究の発展に貢献するためのバイオリソース整備

Maintain of microbial resources to contribute to the development
of intestinal microbiota research○坂本光央^{1, 2}, 大熊盛也¹¹ 理研 BRC-JCM, ² 日本医療研究開発機構, PRIME

【目的】 ヒト腸内の微生物の多くがこれまでに未培養あるいは未同定の微生物であるということは今日では周知の事実である。ヒト微生物叢の研究をこれまで以上に発展させるためには、難培養性の微生物を種ごとに分離・培養し、微生物の本質を理解することが重要である。我々はここ5年間、ヒト腸内から新規微生物を単離し、その分類学的研究を行うとともに、微生物資源の確保およびその利用の観点からバイオリソースの整備を行っている。本研究では、新たに単離された菌株の分類学的位置を明確にするとともに、研究者および他機関より収集した菌種を新たに公開することを目的とした。

【方法】 健常成人 14 名の糞便サンプルから種々の血液寒天培地などを用いて嫌気条件下で菌株の分離を試みた。また、メンブランフィルター法や培養支持菌株との共培養系での単離も実施した。分離された菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、既知種あるいは新菌種であるかを判定した。

【結果】 これまでに 4,494 株を分離した。分離株は 192 種に分類され、数多くの *Bacteroides* 属や *Bifidobacterium* 属菌種とともに、*Akkermansia muciniphila* のような既知種ではあるが注目されている菌種も分離された。また、分離株のなかには 41 種の新規な微生物も検出された。既に *Alistipes communis*, *Alistipes dispar*, *Alistipes onderdonkii* subsp. *vulgaris*, *Dialister hominis*, *Faecalimonas umbilicata*, *Lawsonibacter asaccharolyticus*, *Mesosutterella multiformis*, *Parolsenella catena* および *Sutterella megalosphaeroides* を正式に新種発表した。また *Faecalibacterium prausnitzii*, *Coprococcus* 属および *Roseburia* 属菌種などを新たに公開した。

【考察】 提供数の推移から公開した菌株の重要性を再認識した。

一般演題 C-19**ヒト便試料の保存条件とメタボローム変動の NMR 解析****Impact of sample storage conditions
on NMR-based human fecal metabolomics**

○宋 子豪¹, 包 克非¹, 北田直也¹, 清水由宇², 菊池摩仁², 熊本康裕²,
大西裕季², 塚本 卓¹⁻³, 菊川峰志¹⁻³, 出村 誠¹⁻³, 中村公則²,
綾部時芳², 山村凌大⁴, 中村幸志^{5, 6}, 玉腰暁子⁵, 相沢智康¹⁻³

¹ 北海道大学大学院生命科学院, ² 北海道大学大学院先端生命科学研究院,

³ 北海道大学・国際連携研究教育局, ⁴ 北海道大学大学院医学院,

⁵ 北海道大学大学院医学研究院, ⁶ 琉球大学大学院医学研究科

【Purpose】 Metabolomic analysis of human feces has been increasingly studied over the past decade. However, few studies have focused on evaluating the stability of the metabolome in fecal sample. Therefore, we investigated and evaluated the effects of storage conditions on human fecal metabolome by ¹H NMR, in order to give an insight into the alteration of fecal metabolome under different conditions.

【Methods】 Crude feces samples from 19 donors were homogenized and divided into four aliquots of ~80 mg. One aliquot was extracted with a 1:10 (w/v) ratio of phosphate buffer containing 10% D₂O and 0.5 mM TSP as fecal water and measured immediately while the other were preserved under three conditions (room temperature, chilled and frozen) for 1 day and extracted. Then, proton NMR analyses were performed on the water extraction of each fecal samples. The spectra were acquired on a 600 MHz NMR spectrometer by using a noesyprld pulse sequence, followed by spectra processing, metabolite identification, quantification and multivariate statistical analysis.

【Results】 A total of 28 metabolites were identified and quantified. The result of PCA analysis showed a clear clustering of donors, which indicated that the dominate source of difference is individual difference. The impact of difference storage condition on fecal metabolome can be evaluated according to PCA analysis. Firstly, it was stable enough to retain most metabolites in fecal samples within each donor when samples were extracted immediately after collection and stored at 4°C for 1 d, which demonstrated a high stability and reliability of fecal water. On the other hand, crude feces stored at 4°C, -20°C and 25°C exhibited metabolomic alternation after 1 day. Overall, three patterns were observed in metabolites: 1) stable in all conditions; 2) stable at -20°C and 4°C but significantly changed at 25°C; 3) metabolites changed more significantly under -20°C than 4°C and 25°C. The PCA loading plot showed that the alteration was mainly caused by the increase of branched amino acids, short chain fatty acids (SCFAs) and fumarate.

【Discussion】 The upward trend of metabolites in fecal sample stored at -20°C is considered to be the consequence of disruption of microbes and leakage of intercellular components during freeze-thawing before extraction. Alteration of metabolites at 25°C may due to the continuous microbial activity. Correlation analysis of metabolome and microbiota exhibited that there is no clear correlation between metabolites and microbial species, which suggested that the alteration of metabolites is not caused by a specific bacterium directly, but by various microbes and other factors. This study gave an insight into alteration of metabolome under different storage conditions and the results suggested the storage conditions of fecal sample should be considered when interpreting metabolomics data.

一般演題 C-20

アレルギー症状と便秘症を合併している花粉症患者に
特徴的な腸内細菌組成の探索Characteristics of human gut microbiota in association
with comorbidity of seasonal allergic rhinitis and constipation

○渡辺諭史, 福島崇芳, 沢井 悠, 栗山 実, 西田暁史, 亀岡章一郎,
篠崎夏子, 久保竜一, 竹田 綾
株式会社サイキンソー

【目的】花粉症を代表とするアレルギー疾患は、長期にわたり生活の質を低下させ、社会的、経済的にも影響を与える。発症に関与する原因は、花粉やPM2.5といった大気汚染物質などの環境要因、食事・喫煙・運動などの生活習慣などの疫学的要因などが複雑にからみあい、個人によっても寄与度はさまざまである。抗生物質の使用や食生活の変化にともない腸内細菌叢が攪乱され、正常な免疫寛容が行われなくなるという「腸内細菌叢仮説」も提唱され、腸内細菌叢とアレルギー疾患との関連性が示唆されている。本研究は、花粉症患者のうち、便秘症状を合併している患者に特徴的な腸内細菌組成を探索し、便秘を合併する花粉症のバイオマーカーを特定することを目的とした。

【方法】ウェブサービスを介して集めた日本人のオンラインコホートのうち、便秘症を合併している花粉症罹病者と花粉症を含むI型アレルギー症状を発症していない便秘症患者を対象とした。生活習慣などの疫学的要因の質問票調査と糞便中の腸内細菌検査を実施した。花粉症罹病者と非罹病者を判別する判別分析を行った。線形モデルと非線形モデルの2種類のモデルで判別性能を評価し、両モデルで共通して判別寄与率の高い菌属を探索した。

【結果】ロジスティック回帰モデルでの判別性能は中程度未満（ROC 曲線下面積 = 0.615）で、決定木モデルでの判別性能は中程度（ROC 曲線下面積 = 0.763）であった。両者のモデルで共通して判別寄与率の高い菌属として4つの菌属が抽出された。

【考察】花粉症と腸内細菌の関連について、他のアレルギー症状および便秘症の合併という要因を加えて、腸内細菌組成を検証した結果、便秘症を有する患者の花粉症罹病の有無を判別し得る4つの菌属を特定することができた。これらの菌属の腸内における増殖／減少が花粉症症状の発症に関与している可能性がある。したがって、これらの4菌属は、花粉症の診断マーカーおよび個別化治療のマーカーとして利用可能になることが期待される。