一般演題 A-1

短鎖脂肪酸による心筋細胞肥大の抑制作用

Inhibitory action of short-chain fatty acids against cardiomyocyte hypertrophy

○梅井正彦，赤澤　宏，嵯峨亜希子，八木宏樹，
柳　青，門脇　裕，松岡　良，松永　紘，小室一成
東京大学大学院医学系研究科循環器内科

【目的】短鎖脂肪酸は宿主の疾病に対して保護的に作用する可能性がある腸内細菌代謝物の１つである．心不全患者においては腸内環境の悪化によって dysbiosis が生じた結果，短鎖脂肪酸が減少することが予想されており，その結果さらに心不全増悪を来すという悪循環，すなわち心腸連関病態機構が体内で機能している可能性がある．今回短鎖脂肪酸の分子メカニズムに着目し，心不全に対する保護的作用機序の探索を行った．

【方法】まず初めにマウスの心臓より単離した心筋細胞・非心筋細胞に対する一細胞解析を用いて心臓における既知の短鎖脂肪酸受容体の探索を行った．さらにラット新生仔心筋細胞に対してエンドセリン刺激による心肥大を誘発させた細胞に対して短鎖脂肪酸刺激を行い，心筋細胞肥大に対する保護的作用の探索と作用機序の解析を行った．

【結果】一細胞解析の結果，心臓組織において心筋細胞には既知の短鎖脂肪酸受容体の発現は認められず，血管平滑筋細胞に *Olfr78* が発現していることが明らかとなった．一方で，ラット新生仔心筋細胞培養において酪酸はエンドセリンによる心筋細胞肥大を抑制する作用を認めることが明らかとなった．また心筋細胞に対する酪酸刺激ではヒストンのアセチル化が認められ，心筋細胞に対して Histone Deacetylase（HDAC）阻害作用を有することが明らかとなった．同時にエンドセリン刺激によって上昇が認められる *Nppa*，*Acta1*，*Myh7* などの心肥大マーカーは酪酸によって抑制される結果が得られた．そしてその機序として酪酸は HDAC を抑制することで *Inpp5f* の上昇を介して心筋細胞肥大の抑制に寄与している可能性が考えられた．

【考察】心臓においては心筋細胞における短鎖脂肪酸受容体を介した作用機序の存在が否定的であった一方で，酪酸はエピジェネティック機構を介した心筋細胞の肥大抑制効果を示すことが明らかとなった．腸内細菌叢の dysbiosis が生じることで短鎖脂肪酸が減少し，心肥大が助長される可能性が示唆された．

一般演題 A-2

各種ヒト胆汁酸による腸内芽胞形成細菌の発芽誘導と分離培養

Germination and cultural isolation of spore forming bacteria in human feces by various bile acids

○鬼塚咲良，田中　優，中山二郎
九州大学大学院生物資源環境科学府

【目的】胆汁酸は宿主及び腸内細菌の共同代謝物であり，腸内フローラの制御に深く関連している．胆汁酸の 1 つであるタウロコール酸（TCA）が腸内細菌由来の芽胞に対して発芽誘導することが知られている（1）．一方，ヒトの腸管内では様々な胆汁酸が存在し，胆汁酸分子種ごとに発芽誘導活性が異なることが予想される．そこで本研究では，①様々な胆汁酸分子種の腸内芽胞菌の発芽誘導活性を調査し，②さらにその活性を用いて，ヒト腸内に多岐に存在する未培養・難培養細菌の分離培養を試みた．

【方法】糞便中の芽胞菌を回収するために被験者 7 名の糞便サンプルをエタノール処理し，栄養細胞を死滅させた．そこにヒト腸管内に存在する各種胆汁酸（タウリン抱合型，グリシン抱合型，遊離型の計15種）の胆汁酸をそれぞれ添加し，GAM 寒天培地で 72 時間，嫌気培養を行った．胆汁酸分子種ごとの発芽誘導活性を検証するために，寒天培地上に生育した細菌を回収し 16S rRNA アンプリコンによる群集解析を行った．同時に，生育したコロニーをランダムに釣菌し，GAM 培地を用いて液体培養したものに対して，16S rRNA 遺伝子全長配列による菌種同定を行った．

【結果】胆汁酸の発芽誘導能を検証した結果，TCA に加えて，グリコデオキシコール酸，グリコケノデオキシコール酸，タウロケノデオキシコール酸，グリココール酸は胆汁酸を添加しない場合と比較して有意にコロニー数の増加が観察された．生育したコロニーの 16S rRNA 配列解析の結果，*Lachnospiraceae* 科，*Oscillospiraceae* 科，*Clostridiaceae* 科に属する細菌種が検出され，特に，グリシン抱合型胆汁酸によって発芽誘導される細菌に多くの未培養な細菌が認められた．これらを単離培養，系統解析した結果，642 株から新規候補種 11 種を含む 98 種（芽胞サンプルから 72 種，新鮮便サンプルから 30 種，うち両方のサンプルから 4 種）が得られた．この 98 種は被験者 7 名の腸内細菌叢の 49.9% を占めていた．そして，そのうち今回芽胞画分から単離された菌種は 59.9% であった．

【考察】本研究により，腸内細菌の芽胞形成能に加えて胆汁酸の発芽誘導活性を用いることで，未分離・難培養菌種を含む腸内細菌を広く分離培養できることが実証された．特に，ヒト腸内フローラ中で質・量ともに重要な働きを有するにも関わらず，培養が困難で研究が遅れていた有胞子桿菌 *Clostridia* 綱細菌群の研究が加速すると期待される．

（1）Browne HP et al., Nature 533, 543–546（2016）

一般演題 A-3

Bifidobacterium adolescentis における抗炎症活性の比較解析

Comparison and genome analysis of anti-inflammatory activity among *Bifidobacterium adolescentis* strains

○藤原　慎[1]，田村　明[1]，馬場星吾[2]，川畑球一[3]
[1] 株式会社明治 乳酸菌研究所，[2] 株式会社明治フードマテリア 機能性素材事業部，
[3] 甲南女子大学医療栄養学部

【目的】フラボノイドの一つであるケルセチンは *Bifidobacterium adolescentis* の抗炎症活性を高めることが報告されているが（1），その分子メカニズムについては解明されていない．そこで，本研究では複数の *B. adolescentis* 株間において，ケルセチン反応性・抗炎症活性を評価するとともに，比較ゲノム解析により抗炎症活性に関与しうる遺伝子について考察した．

【方法】抗炎症性評価のため *B. adolescentis* 5 株それぞれとケルセチンを 37° C で 1–6 時間培養した．LPS で刺激した RAW264.7 細胞にこれらの培養上清を添加し 37° C で 24 時間培養した後，グリース法により培地中の NO 量を測定した．これらの株のゲノムを DFAST によりアノテーションした後，ケルセチン反応性・抗炎症活性が認められた株にのみ共通する遺伝子を OrthoFinder2.2.3 により抽出した．

【結果】*B. adolescentis* 5 株のうち 4 株の培養上清においてケルセチン添加による抗炎症効果が認められた（以降，活性株）一方で，1 株の培養上清では認められなかった（以降，不活性株）．また，これらの株の分離源を調べた結果，活性株はいずれもヒト糞便由来であったのに対し，不活性株はウシルーメン由来であった．活性株 3 株および不活性株 1 株の系統解析の結果，活性株でクラスターを形成した．不活性株に対して活性株に特徴的な遺伝子を 3 株それぞれで抽出した結果，244，309，260 個の遺伝子が認められた．これらの遺伝子のなかから 3 株に共通する遺伝子を抽出した結果，69 個の遺伝子が認められた．これらの遺伝子のなかで多くの遺伝子が属したカテゴリーはトランスポーター関連で 16 個，転写制御関連で 7 個であった．転写制御関連にアノテーションされた遺伝子のなかには，環境変化に応答して代謝調節を行う遺伝子も認められた．

【考察】ケルセチン添加による *B. adolescentis* の抗炎症活性はヒト由来株で保存された機能であることが示唆された．また，抗炎症活性にはトランスポーターあるいは環境変化に応答する転写制御因子が関与している可能性が考えられた．

【参考文献】

(1) Kawabata et al., Biosci Biotech Biochem 2015; 79: 799–807.

一般演題 A-4

小腸パイエル板組織内共生菌アルカリゲネスと樹状細胞の相互作用

A symbiotic relationship by intestinal lymphoid tissue resident *Alcaligenes* and dendritic cells

○細見晃司[1]，柴田納央子[2]，下山敦史[3]，宇戸智哉[3]，
長竹貴広[1]，東島陽子[1]，西野友美[1]，竹山春子[2]，
深瀬浩一[3]，清野 宏[4,5]，國澤 純[1,4,6,7]
[1]医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センター，[2]早稲田大学理工学術院，
[3]大阪大学大学院理学研究科，[4]東京大学大学院新領域創成科学研究科，
[5]カリフォルニア大学バークレー校，[6]大阪大学大学院医学系研究科・薬学研究科・歯学研究科，
[7]神戸大学大学院医学研究科

【目的】多くの腸内細菌が腸管管腔内に存在しているのに対して，小腸パイエル板組織内には管腔内とは異なるユニークな細菌叢が形成されている．その中で優占種として存在するアルカリゲネスは樹状細胞内に共生し，IgA 抗体産生など腸管免疫の制御に関わっている．本研究では，アルカリゲネスが樹状細胞内で共生できるメカニズムの解明を目的とする．

【方法】マウス骨髄細胞から GM-CSF を用いて分化させた樹状細胞とアルカリゲネス（*Alcaligenes faecalis*）の共培養系における樹状細胞の遺伝子発現，細胞内一酸化窒素（NO），エネルギー代謝，アポトーシス細胞死などをマイクロアレイやフラックスアナライザー，フローサイトメーターなどを用いて分析した．

【結果】アルカリゲネスを取り込んだ樹状細胞では細胞内 NO が産生されず，高いミトコンドリア呼吸が維持されており，アポトーシス細胞死がほとんど誘導されなかった．アルカリゲネスを取り込んだ樹状細胞を大腸菌 LPS で刺激すると，細胞内 NO 産生，ミトコンドリア呼吸の阻害，アポトーシス細胞死が誘導された．

【考察】アルカリゲネスは樹状細胞に取り込まれても，LPS の活性が低く，細胞内 NO 産生を誘導しないため，殺菌されずに樹状細胞内で共生できると考えられる．また，NO 障害を誘導しないため，樹状細胞は高いミトコンドリア活性を維持し，細胞死も誘導されない．このように，アルカリゲネスは樹状細胞の代謝機能を制御し，パイエル板組織内における共生関係を構築している．

一般演題 A-5

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の特性解明と腸内細菌評価系への応用

Characterization of small intestinal epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells and its applications as an evaluation tool of intestinal bacteria

○今倉悠貴[1]，美馬伸治[1]，小椋　泉[1]，山崎奈穂[1]，後藤　俊[1]，
柿沼千早[1]，岩尾　岳洋[2]，松永民秀[2]，山田忠範[1]，畠賢一郎[1]
[1] 富士フイルム株式会社 R&D 統括本部バイオサイエンス & エンジニアリング研究所，
[2] 名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野

【目的】近年，腸内細菌はアルツハイマー病，がん，アレルギーや生活習慣病等の様々な疾患に関与することが見出され注目を集めている．腸内細菌やその代謝物が宿主に及ぼす影響を解析し，作用メカニズムを明らかにするためには，ヒト腸管の機能を再現した評価モデルが必要である．現在，ヒト結腸がん由来細胞である Caco-2 細胞やマウスを用いた動物実験が代替モデルとして使用されているが，ヒト生体腸管への外挿性が低いことが問題となっている．そこで本研究では，ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞を分化誘導し，腸内細菌がヒト腸管に与える影響を評価できる *in vitro* 評価モデルの構築を試みた．

【方法】既報（Iwao, et al. Drug Metab. Dispos. 2015）を基に新規の低分子化合物を加え，ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導方法を確立し，凍結細胞製品を開発した．得られたヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞について，種々の性能を評価し，ヒト腸管や Caco-2 細胞と比較した．

【結果】本細胞は，腸管上皮細胞のマーカー，代謝酵素およびトランスポーターの mRNA 発現がヒト生体小腸とほぼ同等であった．また吸収上皮細胞（Villin1）だけではなく，杯細胞（MUC2），内分泌細胞（REG4），パネート細胞（LYZ），M 細胞（GP2）やタフト細胞（DCLK1）等も含まれていることが明らかとなった．本細胞の腸内細菌に対する応答性を調べる目的で，Toll-like receptor（TLR）の発現と機能について評価したところ，TLR1-5 をヒト生体小腸同等に発現していること，また TLR2/1 および 4 のリガンドである Pam3CSK4，LPS の添加に応答して IL-8 産出量が上昇することが確認された．さらに，腸内細菌の代謝物である短鎖脂肪酸の受容体 GPR41，GPR43 等や，腸内細菌の生着と増殖に重要な FUT2 等についても，ヒト生体小腸同等の発現を示すことが明らかとなった．

【考察】以上の結果より，本細胞はヒト生体小腸と同様に種々の腸管上皮細胞を含み，腸内細菌との相互作用に関わる因子を発現していることがわかった．この細胞を用いた *in vitro* 評価モデルは，腸内細菌やその代謝物がヒト腸管に与える影響，およびその作用メカニズムの解明に極めて有用なツールとなることが期待される．

一般演題 A-6

RANKLを用いた*in vitro*ヒトM細胞モデルの改良

Modification of an *in vitro* human M cell model using RANKL

○大野達哉[1]，桝田和彌[2]，梶川揚申[3]，横田健治[1, 3]，五十君靜信[1, 3]
[1]東京農業大学大学院農学研究科農芸化学専攻，[2]昭和女子大学生活科学部，
[3]東京農業大学応用生物科学部

【目的】腸管粘膜免疫は主に腸管に存在するM細胞が，腸管管腔内の抗原を体内に取り込むことにより惹起される．そのため近年経口粘膜ワクチンの標的として注目されている．しかし，生体内での絶対数が少ないことや初代培養が困難なことから，M細胞を標的としたワクチンの評価が可能である，in vitroヒトM細胞モデルが求められている．既存のモデルよりもM細胞の分化効率が上昇したモデルを作成すれば，M細胞を標的とする経口粘膜ワクチンの開発や，ヒトM細胞の機能に関する基礎研究に貢献できると考え，本研究では培養細胞を用いて*in vitro*ヒトM細胞モデルの作成を行った．

【方法】参考にしたM細胞モデルは，セルインサート付きのウェルを用い，そのメンブレン上でCaco-2細胞のサブクローンであるC2BBe1細胞を，ウェル内でヒトバーキットリンパ腫由来であるRaji細胞を共培養させるモデルである．そのモデルにM細胞への分化に関わるタンパク質として知られているRANKL（receptor activator of NF-κB ligand）を合わせる新たなモデルを検討した．RANKLにGST（glutathione S-transferase）タグを結合させたGST-RANKLを作製し，C2BBe1細胞の基底膜側の培地に加え，共培養するモデルを作成した．共培養後，機能性評価として蛍光ビーズの透過量，M細胞マーカーであるsialyl Lewis A抗原の発現量を染色面積によって比較することでM細胞化の評価を行った．また，C2BBe1細胞培養時，Raji細胞を添加せずにGST-RANKLを加えるモデルの評価も行った．

【結果】GST-RANKLを培地に添加することで，過去の共培養モデルと比較してM細胞マーカー発現量の有意な上昇と，蛍光ビーズ透過量の上昇傾向がみられた．また，検討した条件下では一定の範囲内で濃度依存的にM細胞分化が誘導されていることを確認した．一方で，C2BBe1細胞単独培養時にGST-RANKLを培地へ添加したが，有意なM細胞の分化誘導はみられなかった．

【考察】共培養モデルにGST-RANKLを加えることで，既存のin vitroヒトM細胞モデルと比較してM細胞の分化誘導が促進される傾向がみられた．また，C2BBe1細胞単独培養時にGST-RANKLを添加したが，M細胞分化の有意な誘導は確認できなかった．この結果から，GST-RANKLがC2BBe1細胞のM細胞の分化誘導を促進するにはRaji細胞との共存が必要だということが示唆された．

一般演題 A-7

腸内環境評価に向けた便検体常温保存手法の開発

Development of a simplified stool storage method for intestinal environment evaluation

○西本悠一郎[1]，野間口達洋[1]，森　友花[1]，工藤　徹[1]，
山田拓司[1, 2]，福田真嗣[1, 3-5]
[1] 株式会社メタジェン，[2] 東京工業大学生命理工学院，
[3] 慶應義塾大学先端生命科学研究所，[4] 神奈川県立産業技術総合研究所，
[5] 筑波大学トランスボーダー医学研究センター

【目的】腸内環境を正しく評価することは健康維持・増進において有益であるものの，分析対象である便検体の取扱いについては十分な技術が開発されていないのが現状である．便検体の保管は，一般的には凍結か，もしくは保存用薬液に懸濁されて常温保存される．しかし，凍結保存では保存・輸送時のコストがかかり，一般家庭での採便では自宅の冷凍庫への保存が必須となるなど，心理的障壁も高いことが課題である．また，保存用薬液を用いた場合は，代謝物質の分析が困難になる点も課題である．そこで我々は，乾燥剤を用いることにより，腸内細菌叢および代謝物質を分析可能な状態で便検体を常温保存できる技術を開発した．本発表では，便検体を市販のキットで常温保存した場合と，乾燥剤を用いて保存した場合の細菌叢組成について報告する．

【方法】10 人の健常人ボランティアから便検体を採取し，市販の保存用薬液キット，組織保存用キット，および乾燥剤でそれぞれ便検体を処理し，7 日間の常温保存試験を実施した．比較対照として，新鮮便の凍結保存群および未処理保存群を準備した．乾燥剤による保存サンプルは，保存可能期間の検証のため 14 日間の常温保存試験も実施した．常温保存試験後に DNA を抽出し，16S rRNA 遺伝子のメタゲノム解析を実施した．比較解析には各サンプルの細菌叢系統組成やサンプル間の α および β 多様性指数を用いた．

【結果】各試験群における細菌叢プロファイルの距離指標を比較解析したところ，既存の手法と比較して乾燥剤で常温保存した際の細菌叢プロファイルは，採便直後に凍結保存した細菌叢プロファイルに最も類似することが明らかとなった．また，ヒト腸内における主要な細菌の相対存在比について，採取法内被験者順位を算出したところ，乾燥剤による常温保存は他手法と比較して多くの細菌の採取法内被験者順位を保存できることが明らかとなった．

【考察】本研究から，乾燥剤による常温保存は，①既存の手法と比較して採便直後の便中細菌叢プロファイルと類似すること，②主要な細菌群の内，多くの細菌の相対存在比について，採取法内被験者順位が保存されることが明らかとなった．以上の結果から，乾燥剤を用いた便検体の常温保存は，少なくとも 14 日間は安定的に腸内環境を評価可能であると考えられる．

一般演題 A-8

腸内細菌と腸管上皮細胞の共培養マイクロ流体デバイスの開発

Development of microfluidic device for co-culture of intestinal bacteria and intestinal epithelial cells

○小島　栞[1]，中澤壮浩[1]，進藤寛将[1]，玉井美保[1, 2]，藤山陽一[3]，小関英一[3]，
米田恭子[3]，長岡紀幸[4]，田川陽一[1]
[1] 東京工業大学生命理工学院，[2] 北海道大学大学院歯学研究院，
[3] 株式会社島津製作所，[4] 岡山大学医歯薬学総合研究科

【目的】腸内細菌―宿主の相互作用の有効な研究系として，マイクロ流体デバイスを用いた腸内細菌と腸管上皮細胞の共培養系の開発に注目が集まっている．そこで，腸管上皮細胞側と細菌側の 2 流路を有するマイクロ流体デバイスを設計・作製し，細菌が共存した腸管上皮細胞における薬物動態計測システムの確立を目指している．

【方法】上下流路の間に多孔質膜，上下流路に電極を配して，多孔質膜上に細胞を接着・培養したときの電気抵抗値（経上皮電気抵抗：TEER）を計測できるように，マイクロ流体デバイスを作製した．ヒト結腸がん由来腸管上皮細胞：C2BBe1 細胞をマイクロ流体デバイスの多孔質膜上に播種・培養し，TEER を経時的に計測した．大腸菌 pUC AmCyan/ *Escherichia coli* DH5α（以下 DH5α）や乳酸菌等のヒトの腸内細菌を上流路から投入した．播種後，流速条件下にて培養を行い，TEER 計測，CFU 測定，顕微鏡観察等を行った．

【結果】C2BBe1 細胞を多孔質膜上に培養したところ，TEER は上昇し，プラトーに達したため，密着結合が形成されたと考えられた．その後，上流路から DH5α を投入し，適切な流速条件下にて培養を行い，TEER 計測により C2BBe1 細胞の密着結合が 1 日維持できることが確認できた．また，デバイス内の観察ではコロニー形成が確認された．乳酸菌等では細菌投入後，数日間密着結合が維持されるものや TEER の上昇がみられる菌もあった．

【考察】マイクロ流体デバイスにおいて，新鮮な培地を供給することにより，過剰増殖した細菌を排出し培養環境を維持することで C2BBe1 細胞の密着結合を維持することに成功した．また，細菌と細胞の間では，生体内の腸と同様な相互作用がある可能性が示唆された．

一般演題 A-9

最新の 16S rRNA 解析パイプラインのヒト腸内細菌叢解析への適用

Application of updated data analysis pipeline for 16S rRNA sequences of human gut microbiome

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

【目的】近年のバイオインフォマティクス技術の進歩にともない，マイクロバイオーム解析のためのソフトも改良されている．同様にマイクロバイオーム解析に重要なリファレンスゲノムデータベースもデータが増え続けている．そうしたなかでソフトウェアおよびデータベースによってはライセンス上の制約のため，常に最新のものが利用可能とは限らないという場合がある．

今回，メタゲノムデータベースの SILVA では release 138 よりライセンスが変更され，商用利用が可能となった．そこで，我々はさらなる解析結果の妥当性向上を目的に，新たな解析パイプラインによる解析を実施し，これまで用いていた解析結果との違いを検討した．

【方法】ウェブサービスを介して集めた日本人オンラインコホートの 16S rRNA データを用い，2 種類の解析パイプラインを用いて菌叢解析を実施した．解析パイプラインは QIIME（1.8.0）+ Greengenes（13_8）と QIIME 2（2019.4）+ SILVA（138）のものをそれぞれ用いた．

次に，菌叢解析結果と生活習慣などに関するアンケートを用い，内製ソフトによる検査サービス用のスコア計算を実施し，結果を比較した．

【結果】QIIME 2 + SILVA を用いることで，ビフィズス菌と年齢の関連性が，先行研究の報告内容とより一致する内容となり，検査結果の妥当性が増した．

【考察】QIIME 2 では代表配列の作成に DADA 2 の使用を推奨するように変更された．DADA2 はこれまでの OTU 作成手法と比較してアンプリコンシーケンスによる偽陽性をより考慮した代表配列の作成が可能となっている．これに加えて，Greengenes（13_8）の約 1.8 倍の数の taxonomy 情報を利用可能な SILVA（138）を用いたことによる検査結果の向上が見られたと考えられる．

一般演題 A-10

ミルクオリゴ糖，3′-sialyllactose を分解する細菌の乳飲期ラット腸内容物からの分離と同定

Isolation and identification of bacteria capable of degrading 3-sialyllactose from intestinal contents of suckling rats

○赤澤葉月[1]，辻川勇治[2]，福田伊津子[1]，向井孝夫[3]，鈴木喜博[3]，片山高嶺[4]，大澤　朗[1]
[1]神戸大学大学院科農学研究科，[2]株式会社伊藤園中央研究所，
[3]北里大学獣医学部，[4]京都大学大学院生命科学研究科

【目的】哺乳動物の乳中にはラクトース以外にミルクオリゴ糖と総称される糖が含まれているが，宿主消化管内に分泌される消化酵素に耐性であるため，ほとんど小腸で消化されずに大腸に達する．ヒト腸内由来のビフィズス菌の多くはこのミルクオリゴ糖を選択的に分解・資化できるので，乳児の腸内では生後間もなく本菌が優勢となり，これが乳児の保健に寄与すると考えられている．一方，他の哺乳動物での乳飲期におけるそのような特定の細菌属・種の勃興に関する情報は，今のところ非常に限定的である．そこで我々は，主たるミルクオリゴ糖が 3′-sialyllactose（3′-SL）であるラットに注目し，3′-SL を分解する細菌株を乳飲期ラット腸内容物から分離し，その同定を行ったのでここに報告する．

【方法】乳飲子ラットを検体とし，子ラット大腸内容物を 3′-SL 添加 GAM 糖分解用培地で培養し，薄層クロマトグラフィー（TLC）および HPLC にて 3′-SL を分解・資化する細菌群の有無を調べた．次に大腸内容物を 3′-SL 添加 GAM 糖分解用培地で段階希釈したものを培養し，TLC によって 3′-SL の分解が確認された最高希釈の培養液を GAM 寒天培地に画線塗抹・培養した．培養後平板上に形成されたコロニーを再び 3′-SL 添加 GAM 糖分解用培地に播種・培養し，TLC にて分解性を示した菌株の属・種同定を 16S rRNA 遺伝子配列と生化学性状に基づいて行った．

【結果】子ラット大腸内容物を 3′-SL 添加 GAM 糖分解用培地で培養し，培養上清について TLC と HPLC を行った結果，3′-SL が培地上清から消失していたことから，細菌叢の何らかの細菌・細菌群によって 3′-SL が分解されることが確認された．次に子ラット大腸内容物希釈系から単離された菌株群を 3′-SL 添加培地で培養した結果，計 4 株で 3′-SL の分解性が確認され，その 16S rRNA 遺伝子解析と生化学性状からすべて *Enterococcus gallinarum* と同定された．

【考察】本研究によって，ビフィズス菌以外の属・種である *E. gallinarum* が 3′-SL の分解能を有することが細菌学史上初めて明らかにされた．本菌がラット腸内で“ビフィズス菌的”な役割を担っていることが示唆されたが，本菌が 3′-SL の代謝産物としてラットの知能発達に資するとされるシアル酸を生成することから，ラットと本菌はヒトとビフィズス菌の共生の新たな「意義」を予見するうえで有用な実験モデルとなる可能性も示された．

一般演題 A-11

フラクトオリゴ糖による腸管および血清中 IgA 産生亢進と盲腸リンパ節の濾胞性ヘルパー T 細胞の調節

Dietary fructooligosaccharides promote intestinal and serum IgA production and modulate follicular helper T cells in the cecum

宇野直哉，○津田真人，岡田　開，細野　朗
日本大学生物資源科学部食品生命学科

【目的】フラクトオリゴ糖（FOS）は，腸内環境を改善することにより宿主に有益な作用をもたらすプレバイオティクスである．FOS はマウスやラットにおいて，腸管や唾液中の IgA 産生を促進することが報告されている．しかし，FOS による IgA 産生促進効果の中心的な作用部位とその免疫調節の機序は十分に明らかにされていない．本研究では，FOS の摂取が小腸と大腸組織中および血清中の IgA 産生に与える影響を解析した．さらに，FOS により腸内環境の変化が起こる主要な場と考えられる大腸部位に存在する腸管関連リンパ組織の細胞応答を解析した．

【方法】6 週齢雌性 BALB/c マウスを FOS 群と対照群の 2 群に分け，7.5% または 0%FOS 含有精製飼料を 2 週間自由摂取させた．各マウスから血清と腸管を採取し，腸管は 5 部位（小腸：上部，中部，下部，大腸：盲腸，結腸）に分けて組織抽出液を調製した．血清および腸管組織抽出液中の抗体（IgA，IgG1，IgG2a，IgM）量を ELISA 法により定量した．また，小腸と大腸の腸管関連リンパ組織（パイエル板：PP，盲腸リンパ節：Cep，結腸リンパ節：Cop）の細胞調製を行い，抗体産生を調節する濾胞性ヘルパー T（Tfh：$CD3^+CD4^+CXCR5^+PD\text{-}1^+$）細胞をフローサイトメトリーにより分取し，サイトカインの遺伝子発現を定量 PCR により解析した．また，抗 CD4 抗体またはコントロール抗体を実験飼料開始 1 日前から 3-4 日毎に腹腔内投与したマウスにおいて，FOS 摂取の影響を解析した．

【結果】FOS 摂取により小腸上部組織中の IgA 量が増加傾向を示し，盲腸組織中においては IgA 量の増加，IgM 量の減少が観察された．さらに，FOS 摂取により血清中 IgA 量の増加も認められた．一方，大腸の腸管関連リンパ組織（Cep と Cop）細胞中の Tfh 細胞の割合が FOS 摂取により有意に増加し，CeP の Tfh 細胞では IL-21 mRNA 発現の増加傾向も認められた．また，抗 CD4 抗体の投与により $CD4^+$ 細胞を除去したマウスに FOS を摂取させた際には，腸管組織および血清中の IgA 量の増加は観察されなかった．

【考察】FOS による腸管および血清中の IgA 産生促進作用の一部は，大腸部位の腸管関連リンパ組織の T 細胞依存経路の活性化を介した免疫調節作用であることが示唆された．

一般演題 A-12

食事因子による腸内細菌依存的な濾胞性ヘルパーT細胞誘導作用の検証

Dietary factors induce follicular helper T cells in the microbiota-dependent manner

○室井きさら，株本祐磨，朝岡華子，藤崎陽介，保科直美，高橋大輔，長谷耕二
慶應義塾大学院薬学研究科 生化学講座

【目的】濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞は小腸パイエル板に多く存在し，胚中心反応を促進して高親和性IgAの産生に寄与する．パイエル板Tfh細胞の一部は全身のリンパ組織へと移行し，自己免疫性関節炎を悪化させる．回腸パイエル板におけるTfh細胞の分化誘導には，セグメント細菌（segmented filamentous bacteria: SFB）の定着が重要であるが，食事因子の影響については明らかでない．そこで，本研究では食事因子がパイエル板のTfh細胞の分化誘導に与える影響を検証するとともに，関節リウマチモデルの病態に及ぼす影響を検証した．

【方法】AIN-93G精製飼料またはCE-2非精製飼料をマウスに4週間自由摂食させ，パイエル板における免疫担当細胞および回腸の腸内細菌叢を解析した．また，関節リウマチのマウスモデルであるコラーゲン誘発性関節炎（CIA）モデルに異なる飼料を与えて病態への影響を解析した．

【結果】CE-2摂食群では，AIN-93G摂食群と比較して，回腸パイエル板においてTfh細胞と胚中心B細胞の著明な増加が観察された．このような変化は，腸内細菌の少ない空腸や十二指腸のパイエル板では認められなかった．また，CE-2摂食群の回腸では，腸内細菌の総菌数と多様性が増加するとともに，Firmicutes/Bacteroidetes比の低下が顕著であった．さらに，CE-2摂食群ではSFBが顕著に増加していた．CIAモデル誘導時にCE-2を与えておくとAIN-93G摂食群と比較して自己抗体価が上昇し，関節炎の臨床スコアが有意に悪化した．

【考察】CE-2に含まれる食事成分は，SFBの増殖を促すことで，Tfh細胞の分化を誘導することが判明した．これにより，CIAモデルにおける自己抗体の産生が増加し病態が悪化したと考えられる．本研究は，食事因子が回腸における腸内細菌叢を介して免疫応答を修飾し，自己免疫疾患の進展に影響する可能性を示唆している．

一般演題 A-13

腸内環境が α-defensin isoform の殺菌活性に及ぼす影響

Influence of intestinal environment on bactericidal activity of α-defensin isoform

○篠崎竜我[1]，中村公則[2]，清水由宇[1]，綾部時芳[2]
[1] 北海道大学大学院生命科学院生命科学専攻，
[2] 北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞生物科学分野

【目的】腸管では食物と常在する腸内細菌叢と宿主が複雑に相互作用することで腸内環境を形成し，その全長に渡り酸素分圧や pH，腸内細菌組成等の腸内環境因子が異なる．小腸陰窩基底部に存在する Paneth 細胞が分泌する抗菌ペプチド α-defensin は，自然免疫のエフェクターとして病原菌は殺し，共生菌は生かす選択的殺菌活性により腸内細菌叢を制御することで腸内環境の恒常性維持に貢献する．この α-defensin にはアミノ酸配列相同性の高い複数の isoform が存在し，小腸における局在が異なることが報告されている．また，α-defensin の殺菌活性は腸内環境因子の影響を受けることが示唆されている。したがって，多様な α-defensin isoform が腸内環境に対して異なる感受性を示すことで，発現する腸管各部位における腸内環境制御に最適化された役割を担うのではないかと考えた．しかし，生体内と同様に 3 本の S-S 結合を有する酸化型の α-defensin 各 isoform を効率的に得る方法が確立されていないため，isoform の機能は未だ不明である．そこで，本研究はまず初めに機能解析に使用可能な酸化型の α-defensin 各 isoform を効率的に作出する方法を確立し，さらに腸内環境因子が各 isoform の殺菌活性に与える影響を解析することで α-defensin isoform の腸内環境における役割の解明を目的とした．

【方法】ICR マウスが有する 6 種の α-defensin である cryptdin（Crp1–6）に対し，タンパク質へのジスルフィド（S-S）結合導入法として広く用いられる空気酸化法に DMF，Glutathione，Guanidine HCl を付加した．その後，試料を RP-HPLC により精製し，分子の高次構造を反映する Acid urea-PAGE に加え，遊離システイン残基へのアルキル化と MALDI-TOF MS 測定を組み合わせた S-S 結合導入評価を行った後，酸化型 Crp（oxCrp）の収率を算出した．機能評価として *Escherichia coli* ML35，*Staphylococcus aureus* に対する殺菌活性実験を実施した．酸素分圧が 21%（好気条件）と 1% 以下（嫌気条件）における oxCrp1，4 の *E. coli* ML35，*S. aureus* に対する殺菌活性を評価した．

【結果】新規手法により oxCrp の作出を，Crp1–4，6 では従来法である空気酸化法を超える収率で認め（Crp1: 64%，Crp2: 49%，Crp3: 60%，Crp4: 58%，Crp6: 52%），これまで報告がなかった Crp5（1%）では初めて作出した．空腸から回腸にかけて低くなる酸素分圧が Crp isoform の殺菌活性に与える影響を解析したところ，oxCrp1 の *E. coli* ML35 と *S. aureus* に対する殺菌活性は嫌気条件に比べ好気条件で高かった一方，oxCrp4 は酸素分圧によらず維持された．

【考察】新規手法で作出した oxCrp 各 isoform を機能解析に使用し，isoform の殺菌活性が酸素分圧に対して異なる感受性を示したことは，α-defensin isoform が腸管各部位に応じた機能を有する可能性を示す．

一般演題 A-14

遺伝子組換え大腸菌を用いた炎症性腸疾患治療

Probiotic effects of genetically modified bacteria with increased susceptibility to host defense

○大野将司[1, 2]，安藤　朗[1]，猪原直弘[2]
[1] 滋賀医科大学消化器内科，[2] ミシガン大学病理学部

【目的】炎症性腸疾患（IBD）にみられる dysbiosis の特徴として Enterobacteriaceae 科の細菌の増加が挙げられ，その増加を防ぐことで腸炎の改善が期待できる．我々は競合能力の高い大腸菌を単離して，それを無毒化することによって，Enterobacteriaceae 科の増加を防ぐプロバイオティクスが人工的に作れないか検討した．

【方法】マウスに抗生剤カクテルを投与して dysbiosis を誘導し，糞便中から競合能力の高い大腸菌を単離した．単離した大腸菌の全ゲノムを決定し，その特徴を調べた．さらに単離した大腸菌（WT 株）の遺伝子を組換えて，宿主の免疫系に感受性の高い株（*Δwzy* 変異株）を作製し，in vitro, in vivo で宿主免疫系への感受性の高い無毒な株がどうかを調べた．最後に，*Δwzy* 変異株を定着させたマウスにデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を投与して腸炎を誘発させ，腸炎に対する効果を検討した．

【結果】抗生剤カクテルを投与すると糞便中に Enterobacteriaceae 科が爆発的に増加した．単離した大腸菌の全ゲノム解析を行い，AIEC（adherent invasive e. coli）様の特徴を持つこと，colicin などの競合能に関わる因子を持つといった特徴をもつことが示された．遺伝子組換え技術を用いてこの大腸菌の *Δwzy* 株を作製し，in vitro, in vivo において *Δwzy* 変異株は WT 株と比べて宿主の免疫による排除を受けやすいことが示された．この変異菌を定着させたマウスは，DSS 腸炎の重症度が軽減した．

【考察】無毒化した競合能の高い大腸菌は，他の Enterobacteriaceae を排除することによりプロバイオティクスとして働くことが示唆され，IBD 治療への応用が期待される．

一般演題 A-15

Paneth 細胞の機能異常は腸内細菌叢の破綻を介して NASH 発症に関与する

Paneth cell dysfunction involved in development of nonalcoholic steatohepatitis through disruption of the intestinal microbiota

○中村駿太[1, 2]，中村公則[1, 3]，菊池摩仁[3]，横井友樹[1]，
大平修也[1]，清水由宇[1]，西田琢人[1]，綾部時芳[1, 3]
[1] 北海道大学大学院生命科学院生命科学専攻，
[2] 日東電工株式会社北海道研究所，
[3] 北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞生物科学分野

【目的】生活習慣の変化にともなって世界中で患者数が急増している非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis: NASH）は，肝硬変，肝がんへと進展する重篤な疾患であるが，その発症メカニズムは未だ不明である．近年，NASH 患者における腸内細菌叢の破綻（dysbiosis）と，それにともなう腸内細菌の血中への移行（bacterial translocation）が明らかとなり，NASH の病態進展と腸内環境との関連性に注目が集まっている．一方，小腸では，陰窩基底部に存在する Paneth 細胞が選択的な殺菌活性をもつ抗菌ペプチド α-defensin を分泌し，腸内細菌叢を制御することで，腸管恒常性の維持に貢献することが知られている．そこで，本研究は，NASH 発症と Paneth 細胞の機能異常との関連性の解明を目的とした．

【方法】6 週齢の C57BL/6 雄マウスに，コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食（CDAHFD）を摂取させて NASH を誘導した CDAHFD 群と標準食を摂取させた SD 群に対して，誘導 4 日から 12 週目にかけて，以下の項目を経時的に解析した．糞便中の α-defensin を ELISA により定量し，α-defensin 分泌量を評価した．免疫組織染色と電子顕微鏡観察により，Paneth 細胞の組織学的評価を行った．糞便を用いた 16S rRNA 遺伝子解析により，腸内細菌叢を評価した．腸管透過性亢進のバイオマーカーである血清中 zonulin 量の定量により腸管透過性を評価し，脾臓の懸濁液を LB 寒天培地にプレート後，生育したコロニー数を計測することで bacterial translocation を検討した．

【結果】CDAHFD 群は，誘導 3 週目から NASH の特徴である肝線維化を認めた．CDAHFD 群の α-defensin 分泌量は NASH 発症前の非常に早期から，SD 群より大きく低下し，また，α-defensin の分泌を担う Paneth 細胞の顆粒および小胞体の形態に異常を認めた．その後，CDAHFD 群の腸内細菌叢は SD 群と有意に異なる組成を示し，α- 多様性は SD 群に比べて低下した．さらに，腸内細菌叢の α- 多様性は α-defensin 分泌量と負の相関を示し，CDAHFD 群の dysbiosis への α-defensin 分泌量低下の関与が示された．肝線維化を認めた 3 週以降では，腸管透過性の亢進と bacterial translocation を認めた．

【考察】本研究によって，Paneth 細胞の異常にともなう α-defensin 分泌量低下が腸内細菌叢の組成の変化と多様性減少の dysbiosis を引き起こすことを示した．さらに，NASH 発症前の早期から α-defensin 分泌量が低下し，次に dysbiosis が起きて継続し，bacterial translocation に至ったという時系列から，α-defensin 分泌量低下が腸管恒常性の破綻を介して NASH を発症させることを示唆した．

一般演題 A-16

NASH モデルマウスの腸内細菌叢に対する大柴胡湯の作用

Modulating effect of Daisaikoto on the shape of microbiome in non-alcoholic fatty liver disease mouse model

○石澤　栞[1]，名畑美和[1]，山田ちひろ[1]，西　明紀[1]，飯塚生一[1]，藤塚直樹[1]，
西山光恵[1]，金子　篤[1]，山本雅浩[1]，河野　透[2,3]
[1]株式会社ツムラ ツムラ漢方研究所，[2]北海道大学大学院医学研究院 外科学分野消化器外科学教室Ⅰ，
[3]札幌東徳洲会病院先端外科センター

【目的】非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD）のうち，非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis; NASH）の一部は，炎症や線維化をともなって肝癌へと進展する．近年，NASH/NAFLD 発症のリスク因子として，脂質異常症や糖尿病のほか，腸内細菌叢の攪乱（dysbiosis）の関与が示唆されている．大柴胡湯は，脂質代謝異常に関わる疾患に効果をもつ漢方薬であるが，これまで NAFLD/NASH に対する作用や腸内細菌叢への影響についての詳細は明らかでない．そこで，本研究では大柴胡湯の NAFLD/NASH における腸内細菌叢への作用を検討する目的で，NASH モデルマウスにおける肝障害，糞便中胆汁酸および腸内細菌叢への作用を評価した．

【方法】生後 2 日目　の C57BL/6J マウスに低用量のストレプトゾトシンを投与し，4 週齢より高脂肪食を給餌することで NASH 病態を発症する STAM マウスを用い，大柴胡湯は STAM マウスに 6 週齢から 3 週間混餌投与した．9 週齢で肝臓組織の NAFLD activity score（NAS）評価，糞便の胆汁酸測定および，16S メタゲノム解析を行い，Normal マウス（非病態群），STAM マウス（STAM 群），大柴胡湯投与 STAM マウス（大柴胡湯群）を比較した．

【結果】大柴胡湯は STAM 群と比較し NAS を有意に減少させ，特に肝臓脂肪滴蓄積を改善した．糞便中の主要胆汁酸量は大柴胡湯群で STAM 群と比較し有意に増加した．特に，大柴胡湯により肝臓の保護作用を持つウルソデオキシコール酸（UDCA）が有意に増加していた．腸内細菌叢解析の結果，病態進行にともない α 多様性は STAM 群で有意に低下したが，大柴胡湯群では STAM 群と比較し多様性が維持された．β 多様性解析の結果，非病態群，STAM 群および大柴胡湯群はそれぞれ独自のクラスターを形成した．腸内細菌叢のプロファイルの詳細を解析した結果，STAM 群で認められた腸内細菌叢の変化は，大柴胡湯により非病態群の腸内細菌叢へとノーマライズされていた．

【考察】大柴胡湯は STAM マウスの病態を改善した．さらに大柴胡湯により糞便中の主要胆汁酸量が増加したことから，大柴胡湯が胆汁酸の排出を促進している可能性が考えられた．また大柴胡湯は NASH モデルの腸内細菌叢に影響を与えることにより，胆汁酸プロファイルを変化させ，特に UDCA を増やす可能性が示唆された．このことから，大柴胡湯の NASH 抑制効果に腸内細菌叢と胆汁酸の変化が関与している可能性が考えられた．

一般演題 A-17

出生早期からの Paneth 細胞発達により制御される腸内細菌定着機構

Mechanisms of microbial colonization regulated by Paneth cell development from early postnatal period

○西田琢人[1]，中村公則[2]，横井友樹[1]，綾部時芳[2]
[1] 北海道大学大学院生命科学院生命科学専攻，
[2] 北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞生物科学分野

【目的】腸内細菌叢の破綻（dysbiosis）は様々な疾患に関与することが知られている．腸内細菌の定着時期である新生児期に抗生物質投与等による dysbiosis が起こると，肥満やアレルギーなど様々な疾患の発症リスクが上昇することが報告されており，腸内細菌叢定着が腸管恒常性を介した生涯の健康に重要であることも示唆されている．私たちは小腸陰窩基底部に存在する Paneth 細胞の α-defensin 分泌による腸内細菌叢制御をこれまで示してきた．また，異なる殺菌活性スペクトラムを示す α-defensin isoform の mRNA を発現する Paneth 細胞 subset が小腸の部位によって異なる局在を示すことが報告され，α-defensin isoform の腸内細菌叢制御への密接な関与が示唆されている．しかし，新生児期の Paneth 細胞発達過程と Paneth 細胞の腸内細菌叢定着への関与はいまだ不明である．本研究は，新生児期から離乳期，成体に至るまでの Paneth 細胞 α-defensin の発現，顆粒形成過程および分泌された α-defensin とその isoform の違いが腸内細菌叢に与える影響と，Paneth 細胞の発達に腸内細菌が果たす役割を組織学的手法で解析することで，Paneth 細胞の発達メカニズムおよび腸内細菌叢定着への関与を明らかにする．

【方法】通常環境および無菌環境下で飼育された 0-6 の各週齢および 15 週齢の ICR マウス小腸を，近位端（jejunum），中央部（middle），遠位端（ileum）の 3 部位に分けて摘出し，マウス α-defensin，cryptdin (Crp)-1 抗体および Crp4 抗体を用いた免疫染色を行った後，透明化処理をしてサンプルを作成した．その後，共焦点レーザー顕微鏡により 3D 画像を取得し，Crp1 と Crp4 の発現優位性に基づいて Paneth 細胞数を計測した．さらに，明視野観察により取得した画像から Paneth 細胞の顆粒数および顆粒径を計測した．

【結果】通常マウスにおいては，Paneth 細胞は 1 週齢から出現し，離乳期に急増して jejunum で Crp1 優位，ileum で Crp4 優位な Crp isoform 発現を示した．無菌マウスでは，jejunum における Paneth 細胞数は，すべての週齢において差がなかったものの，middle において成体の 15 週齢で Crp4 優位発現 Paneth 細胞数の減少，ileum で離乳後 3 週齢からの Paneth 細胞数減少を認めた．また，ileum において離乳後から Paneth 細胞の顆粒径が著しく減少した．

【考察】本研究により，腸内細菌が Paneth 細胞の発達に離乳後から顕著な影響を与えることを初めて明らかにするとともに，正常な Paneth 細胞の発達が α-defensin isoform の分泌を介した腸内細菌叢とのクロストークによって腸管恒常性を維持して，疾患の潜在リスク低下に関与していることが示唆された．

一般演題 A-18

腸内細菌代謝物のノンターゲットリピドミクス

Untargeted lipidomics of gut microbial metabolites

○岡橋伸幸[1, 2]，安田　柊[1]，上田政宏[1]，津川裕司[1]，池田和貴[1]，有田　誠[1, 3, 4]
[1] 理化学研究所生命医科学研究センター，[2] 大阪大学情報科学研究科，
[3] 横浜市立大学生命医科学研究科，[4] 慶応義塾大学薬学研究科

【目的】宿主の持たない代謝酵素遺伝子を有する腸内細菌は，多様な構造の代謝物を産生することで，宿主の生体恒常性の維持や疾患に関与することが示唆されている．しかし，腸内細菌代謝物のリファレンス情報が乏しいことが，代謝物の網羅的同定を困難としていた．そこで本研究では，ノンターゲットリピドミクスを用いてマウスの糞便中脂質のマススペクトル情報を収集し，その構造および産生菌の推定を行った．

【方法】抗生物質単剤もしくは 4 剤カクテルを投与し，腸内細菌を死滅させた野生型マウスの糞便中 DNA と脂質を抽出し，16S アンプリコン解析とノンターゲットリピドミクスを行った．

【結果】抗生物質投与群で 10 分の 1 以下に減少する代謝物群を見出した．それらの構造を推定したところ腸内細菌によって産生される 2 次胆汁酸やリノール酸代謝物であったことから，本実験系が妥当であることが確認された．続いて，抗生物質投与群で減少する未同定代謝物の構造を推定するため，マススペクトルの類似性に基づいてピークを分類した．その結果，水酸化脂肪酸含有セラミド，スルフォノリピッド，イノシトールリン酸やエタノールアミンリン酸を極性頭部に持つセラミド，エーテル結合を有するモノグリコシルジアシルグリセロールなど，宿主では産生酵素が報告されていない代謝物であることが明らかとなった．さらに，菌叢と代謝物の相関解析を行ったところ特定の菌群が強い相関を示した．

【考察】強い相関を示す菌が上記代謝物の産生菌であることが示唆された．推定された菌種の中には，既報で産生経路が知られている菌種が含まれていたことから，解析結果は妥当であると考えられた．

一般演題 A-19

好中球減少時の反応性好中球造血における腸内細菌叢の役割

Intestinal microbiota plays a critical role in reactive granulopoiesis in response to neutropenia

○陳　炫仲，橋本大吾，江端　浩，高橋秀一郎，早瀬英子，横山絵美，
荒　隆英，大東寛幸，長谷川裕太，菊池　遼，張　紫璇，豊嶋崇徳
北海道大学大学院医学院血液内科学

【目的】骨髄における好中球造血は，必要に応じて顆粒球の供給量を調節することができる。重症細菌感染は緊急時好中球造血を引き起こし，顆粒球の数が定常状態の数倍に増加し，感染微生物を排除することができる。反応性好中球造血は明らかな感染症の無い状態での好中球造血の亢進であり，造血幹細胞移植や抗がん剤投与後の好中球減少等によって引き起こされるが，そのメカニズムは未だ解明されていない。本研究では，マウスの造血幹細胞移植後または化学療法後の好中球減少時の反応性好中球造血のメカニズムを，特に腸内細菌叢の役割に着目して検討した。

【方法】B6 レシピエントに放射線照射（10Gy）を行い，B6-CD45.1 マウスの骨髄から純化した 7,500 個の造血幹細胞（LSK 細胞）と 20,000 個の granulocyte-macrophage progenitors（GMPs）を day0 に輸注した。腸内殺菌のため，day-7 から抗生剤カクテル（ABPC/SM/VCM）を投与した。

【結果】まず我々は，day+18 に血漿 IL-17A と G-CSF が上昇していることを発見した。IL-17A の役割を検討するため，IL-17A 欠損（IL-17A-KO）レシピエントに移植を行ったところ，day +18 の骨髄 GMP 数が野生型に比較して有意に減少し，好中球の回復も有意に遅れていた。RAG1-KO マウスをレシピエントとして使用すると，血漿 IL-17A レベルが大幅に低下し，好中球回復が有意に遅れており，移植後の反応性好中球造血には T 細胞が産生する IL-17A が重要であることが判明した。RAG1-KO または IL-17A-KO レシピエントに，6×10^6 個の T 細胞を day0 に輸注すると，好中球回復が有意に促進することも判明し，T 細胞からの IL-17A 産生の重要性が確認された。野生型レシピエントで腸内殺菌を行うと，IL-17A の上昇と好中球の回復が有意に抑制され，反応性好中球造血に腸内細菌叢が重要であることが判明した。最後に，5-FU 投与後の好中球回復は，腸内殺菌を行ったマウスや IL-17A-KO マウスで有意に遅れることが判明した。

【考察】我々は，造血幹細胞移植後や化学療法後の反応性好中球造血における，腸内細菌叢の重要性を初めて明らかにした。

一般演題 A-20

日本人地域一般住民における痩せ・肥満と腸内細菌叢との関連：The DOSANCO Health Study

Association between lean, obesity and gut microbiota in a general Japanese population: The DOSANCO Health Study

○木村尚史[1]，山村凌大[2]，檜森亮吾[2]，鵜川重和[3]，中村幸志[4]，中川貴史[5]，今江章宏[6]，國弘忠生[7]，朴 鐘旭[8]，Attayeb Mohsen[8]，川島 和[8]，清水由宇[9]，中村公則[10]，綾部時芳[10]，玉腰暁子[1]
[1]北海道大学大学院医学研究院，[2]北海道大学大学院医学院，[3]大阪市立大学大学院生活科学研究科，
[4]琉球大学大学院医学研究科，[5]医療法人北海道家庭医療学センター 栄町ファミリークリニック，
[6]医療法人北海道家庭医療学センター 寿都町立寿都診療所，[7]株式会社テクノスルガ・ラボ，
[8]国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所，[9]北海道大学大学院生命科学院，
[10]北海道大学大学院先端生命科学研究院

【目的】日本人地域一般住民を対象に，痩せ・肥満と腸内細菌叢との関連を検討することを目的とした．

【方法】2015年に北海道S町の全住民のうち，3歳以上の自宅に居住する住民2,638名に参加を依頼した．質問票調査に回答し，かつ便検体の提供のあった523名を本研究の解析対象者とした．body mass index（BMI）は，集合型調査会場にて測定した身長と体重より算出した．エネルギー摂取量は，簡易型自記式食事歴法質問票を用いて推定した．腸内細菌叢の解析は，16S rRNA遺伝子のV3－V4領域のシークエンスを行った後，QIIME 1.9.1を用いて行った．対象集団を痩せ群（BMI18.5未満），標準群（BMI18.5以上25.0未満），肥満群（BMI 25.0以上30.0未満），高度肥満群（BMI 30.0以上）の4群に分類し，腸内細菌叢の菌種組成や多様性指数を比較した．

【結果】対象集団は，痩せ群21名（4.0%），標準群317名（59.9%），肥満群163名（30.8%），高度肥満群28名（5.3%）であった．4群間で腸内細菌叢の門レベルでの存在割合を比較すると，BMI上昇とともにFirmicutes門の存在割合が上昇し，Bacteroidetes門，Proteobacteria門は低下する傾向を示した．性，年齢，推定摂取エネルギーを調整すると，Actinobacteria門は標準群と他の群とのあいだに存在割合に違いがなかった．Bacteroidetes門は，標準群と比べ肥満群で存在割合が有意に低かった．Proteobacteria門は，統計学的に有意では無いがBMIが増加するにつれ存在割合が減少傾向を示した．Firmicutes門は，標準群と比較し肥満群，高度肥満群で有意に存在割合が高かった．α多様性の指標であるShannon，Simpson指数は，標準群と比較し痩せ群で有意に低かった．

【考察】本研究では，肥満度の上昇にともないFirmicutes門の割合が増大しており，先行研究の結果も合わせ，肥満者における腸内細菌叢の“dysbiosis”の原因の一つである可能性が示唆された．また，痩せ群では標準群と比較し腸内細菌叢のα多様性の有意な低下が確認され，肥満，高度肥満群だけでなく痩せ群においても腸内細菌叢の“dysbiosis”が起きているのかもしれない．

一般演題 A-21

日本人地域一般住民におけるアーキアと肥満との関連：The DOSANCO Health Study

Association between archaea and obesity in a general Japanese population: The DOSANCO Health Study

○山村凌大[1]，鵜川重和[2]，中村幸志[3]，木村尚史[4]，中川貴史[5]，今江章宏[6]，國弘忠生[7]，
朴　鐘旭[8]，Attayeb Mohsen[8]，川島　和[8]，清水由宇[9]，中村公則[10]，綾部時芳[10]，玉腰暁子[4]
[1]北海道大学大学院医学院，[2]大阪市立大学大学院生活科学研究科，[3]琉球大学大学院医学研究科，
[4]北海道大学大学院医学研究院，[5]医療法人北海道家庭医療学センター 栄町ファミリークリニック，
[6]医療法人北海道家庭医療学センター 寿都町立寿都診療所，[7]株式会社テクノスルガ・ラボ，
[8]国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所，[9]北海道大学大学院生命科学院，
[10]北海道大学大学院先端生命科学研究院

【目的】日本人地域一般住民を対象に，糞便中のアーキアの有無と肥満指標との関連を検討することを目的とした．

【方法】2015 年に北海道 S 町の全住民のうち，3 歳以上の自宅に居住する住民 2,638 名に参加を依頼した．質問票調査に回答し，かつ便検体の提供のあった 523 名を本研究の解析対象者とした．body mass index（BMI）は，集合型調査会場にて測定した身長と体重より算出し，fat mass index（FMI）は，身長と体組成計により測定した体脂肪量より算出した．エネルギー摂取量は，簡易型自記式食事歴法質問票を用いて推定した．腸内細菌叢の解析は，16S rRNA 遺伝子の V3 − V4 領域のシークエンスを行った後，QIIME 1.9.1 を用いて行った．対象者を糞便中のアーキアの有無により二群（キャリア群，非キャリア群）に分け，BMI，体脂肪率，FMI，菌種組成および α 多様性指数の平均値の差を Student の t 検定，および性，年齢，エネルギー摂取量を交絡因子とした最小二乗法により比較した．β 多様性指数の差は PERMANOVA 検定を用いて比較した．PICRUSt 解析により予測した腸内細菌叢の機能遺伝子組成割合の差は，LEfSe 解析により比較した．

【結果】本研究の対象者のうち，アーキアキャリア群は 61 名（11.7%）であった．非キャリア群と比較し，キャリア群では有意に女性の割合が高く，年齢が高かった．交絡因子を調整し比較すると，キャリア群は非キャリア群と比較して体脂肪率と FMI が有意に低く，BMI は，有意ではなかったが低い傾向があった．キャリア群では，非キャリア群と比較して Actinobacteria 門の存在割合が有意に低く，α 多様性 6 指数はすべて有意に高値であった．両群の β 多様性を比較した結果，両群の菌種組成は有意に異なっていた．腸内細菌叢の機能遺伝子組成を比較すると，キャリア群では非キャリア群と比較して，エネルギー代謝に関する機能遺伝子の組成割合が有意に高かった．

【考察】本研究より，アーキアキャリア群は，非キャリア群と異なる腸内細菌叢を持つことが示された．さらに，キャリア群では特にエネルギー代謝に関する機能遺伝子が多く発現していることが明らかとなった．キャリア群の腸内細菌叢は，これらの機能を通して宿主の肥満抑制に寄与している可能性が示唆された．

一般演題 A-22

ヒトの腸内環境は日常的な食事の変化に対して頑健性を有する

Ecological robustness of the human intestinal environment in response to daily dietary fluctuation

○石井千晴[1, 2]，鈴木みゆき[3]，副島義臣[4]，冨田　勝[1, 2, 5]，福田真嗣[1, 2, 6-8]
[1] 慶應義塾大学先端生命科学研究所，[2] 慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科，[3] 下北沢病院，
[4] ロート製薬株式会社，[5] 慶應義塾大学環境情報学部，[6] 筑波大学トランスボーダー医学研究センター，
[7] 神奈川県立産業技術総合研究所，[8] 株式会社メタジェン

【目的】腸内細菌叢からは多種多様な代謝物質が産生されており，それらは恒常性維持に寄与する一方で，様々な疾患の発症や増悪にも関与することが報告されている．そのため，腸内細菌叢を介した疾患予防・治療のためには，代謝物質を含めて腸内環境全体を理解する必要がある．しかし，ヒト腸内代謝物質プロファイルの個人間の差異や，日常的な食事の変化にともなう同一個人内での腸内代謝物質プロファイルの変動については十分な知見が無い．そこで本研究では，日常的な食事の変化にともなう腸内代謝物質の変動について解析を行った．

【方法】食事内容の制限を行わない期間（7日間），毎食異なる内容の提供された被験者間で共通の食事を摂取する期間（7日間），および毎食同じ内容の食事を摂取する期間（5日間）の3つの異なる食事条件下において，被験者の便を採取し，次世代シーケンサーを用いた細菌叢解析と質量分析装置を用いたメタボローム解析を実施した．

【結果】各食事タームで3回以上便を採取できた7名分のデータを用いて，腸内細菌叢の構成菌種，細菌叢構造，腸内代謝物質プロファイルについて，同一個人内と異なる個人間での類似度を比較解析した．その結果，いずれも各個人内での類似度が個人間での類似度よりも高く，各個人が異なった腸内環境の特徴を有しており，それが食事条件によらず維持されることが明らかとなった．また，各食事条件下での腸内細菌叢の構成種，構造，腸内代謝物質の構成の頑健性について解析を行ったところ，6名の被験者は日常的な食事条件の変動に対して頑健性を有することが示唆されたが，1名のみ頑健性が低く，この被験者は7名の被験者の中で最も細菌叢のα多様性が低かった．

【考察】これらの結果から，腸内代謝物質プロファイルは細菌叢構造と同様に個人差があるが，日常的な食事に対しては多くの場合頑健性を有していた．しかしその頑健性には個人差があり，腸内細菌叢の多様性と関連する可能性が示唆された．腸内細菌叢のα多様性が高い場合，様々な食事成分を代謝できる可能性があることから，食習慣と腸内細菌叢，および腸内代謝物質プロファイルには密接な関係があると考えられた．

一般演題 A-23

ラオス北部における山岳民族の腸内細菌叢と近代化

Characteristics of gut microbiota of mountain tribes in northern Laos under different modernization

○増岡弘晃[1]，水野佑紀[2]，木部未帆子[2]，高安伶奈[2,3]，須田　亙[3]，小坂理子[2]，夏原和美[4]，
Nouhak Inthavong[5]，Sengchanh Kounnavong[5]，富田晋介[6]，服部正平[3,7]，梅崎昌裕[2]，平山和宏[1]
[1] 東京大学大学院農学生命科学研究科，[2] 東京大学大学院医学系研究科，
[3] 理化学研究所生命医科学研究センター，[4] 東邦大学看護学部，
[5]Lao Tropical and Public Health Institute，[6] 名古屋大学大学院環境学研究科，
[7] 早稲田大学理工学術院

【目的】ラオス北部の山岳地域の村落では焼畑農耕や野生動植物の採集などの伝統的な生活が続けられている．一方，都市部では近年国境を接する中国の影響を強く受け，エネルギー密度の高い動物性食品の摂取が多い近代的な食生活が増えつつある．我々は都市・中間地点・山岳地域の近代化の度合いが異なる 3 地点で糞便をサンプリングし，それぞれの地点に暮らす人々の腸内細菌叢の解析および比較を行った．

【方法】近代化が異なる 3 地点に住む健康成人の男女 226 名から採取したサンプルは，RNAlater に保存し，ラオス政府の正式な許可を受けた上で日本へと輸送した。各サンプルは酵素法で DNA 抽出を行い，得られた DNA を次世代シーケンサー（MiSeq）による 16S amplicon 解析に供した．菌叢の多様性（observed OTUs，Chao1，ACE，Shannon's index）や門・属レベルでの菌種組成を算出し評価を行った．また，聞き取り調査から得られた食物の摂取頻度との相関性を canonical correlation analysis（CCA）にて解析した．

【結果】腸内細菌叢解析の結果から，山岳地域の全ての多様性指標は他地域と比較して有意に高いことが明らかとなった．属レベルでの解析においては *Prevotella* 属を始めとした 9 の菌属が豊富であり，*Bacteroides* 属を始めとした 15 の菌属に乏しいことが示された．また，CCA 解析にて riverweed（*Spirogyra* 属の淡水藻類）や bitter bamboo shoot（*Indosasa* 属のタケノコ）といった野生由来の植物摂取によって菌属構成の説明がなされることが示唆された．

【考察】本研究にて，山岳地域とその他の地域の人々では腸内細菌叢に大きな違いが見られることが分かった．riverweed や bitter bamboo shoot といった野生由来の植物にはファイトケミカルと言われる物質が多く含まれることが想定されており，ファイトケミカルが山岳民族の腸内細菌に作用，あるいはその代謝物が作用することにより山岳民族の特徴的な細菌叢を形成している可能性がある．今後，メタゲノム解析を用いたより詳細な解析を用いることで細菌叢が食餌成分の代謝において果たす機能を解明する必要がある．

一般演題 A-24

大腸がんの治療前後における腸内環境の変化の解析

Gut microbiome and metabolome alteration after treatment for colorectal cancer

○城間博紹[1]，水谷紗弥佳[1]，谷内田真一[2]，山田拓司[1]
[1]東京工業大学生命理理工学院，[2]大阪大学大学院医学系研究科

【目的】大腸がん治療前後の患者を対象に，治療前後で腸内環境がどのように変化しているのかを明らかにし，その変化と再発との関連性を明らかにする．

【方法】39人の大腸がん患者から，治療前と治療から約1年後に便を取得した．その便からDNAを抽出後，whole genome shotgunシーケンスを行った．メタゲノム解析を行い，腸内細菌の系統や遺伝子の組成を取得した．また，CE-TOFMSを用いて便中の代謝産物の量を定量した．まず，治療前後で腸内環境が異なるのかを確認するため，治療前後間の非類似度を算出し評価した．次に，治療前後で異なる細菌やその遺伝子，代謝産物を統計学的な手法で探索した．最後に，機械学習法を用いて大腸がんの潜在的なリスクの評価を行った．具体的には，健常者と大腸がん患者の系統組成データを用いて，それらを分類する判別器を作成し，その判別器に治療前後の患者の系統組成データを適用することで，大腸がんの潜在的なリスクの評価を行った．

【結果】治療前後間の非類似度は，大腸がんの進行に従って高くなることが確認された．また，大腸がん患者やその前がん病変である多発性腺腫で量が多かった細菌や代謝産物の多くは治療後に減少することが確認された．しかし，外科的に治療した場合でのみ，治療後に硫化水素の生成菌や二次胆汁酸の増加が確認された．機械学習法を用いた大腸がんの潜在的なリスクの評価をした結果，治療後にそのリスクが減少することが確認されたが，減少後も大腸がんの前がん病変である多発性腺腫と同程度であった．

【考察】大腸がんの進行に従って非類似度が高くなることから，大腸がんと関連する細菌や代謝産物が治療後に変化することが示唆された．また，治療後に大腸がんと関連する細菌や代謝産物の多くが減少することから，治療により大腸がんが取り除かれたためこれらの変化が生じたのではないかと推察した．外科的に治療した場合でのみ増加した硫化水素の生成菌や二次胆汁酸は，手術による腸管の変化を反映している可能性があると考えられる．これらは，大腸がんの進行に関与している可能性が高いと報告されており，これらが治療後の再発やポリープの再発にも関与している可能性があると考えられる．大腸がんの潜在的なリスクは，治療前後間の比較では治療後に減少したが，治療後の患者では多発性腺腫の患者と同程度であったため，治療後の患者でも大腸がんの潜在的なリスクが高いことが考えられる．

一般演題 A-25

クローン病における腸内細菌叢の性差

Sex differences in intestinal microbiota in Crohn's disease

○太田圭祐[1]，中岡慎治[2]
[1] 北海道大学大学院生命科学院生命科学専攻，[2] 北海道大学大学院先端生命科学研究院

【目的】炎症性腸疾患（IBD）の一種で知られるクローン病（CD）は，腸内細菌叢の乱れと関与することが示唆されている．CD において回腸炎や肛門周辺病変が男性に表れる傾向があることから，我々は患者の菌叢に性差があるという仮説を立て，その検証を目的とした．

【方法】IBD Multi'omics Database に公開されている回腸・直腸生検の 16S rRNA 遺伝子 PCR アンプリコン解析データに対し，多変量解析（ANCOM および ALDEx2）による CD 群と対照群の比較を各性別で実施した．一連の解析は菌叢解析パッケージ Qiime2 で実行した．

【結果】ANCOM で菌叢を比較した結果，女性の CD 群では対照群と比べて存在率に差のある細菌は存在しなかった（基準：$W < 3$）．一方男性の CD 群では，直腸で *Christensenellaceae* R-7 group 群および *Ruminococcaceae* UCG-002 群の存在率が低く（基準：$W > 185$），回腸で *Lachnospiraceae* 科に属する *Lachnospira* 属および GCA-900066575 群の存在率が低かった（基準 $W > 170$）．また PICRUSt2 による菌叢の代謝活性予測を ALDEx2 で比較した結果，男性の回腸・直腸でのみ CD 群における *Escherichia* 属（または *Shigella* 属）の代謝活性が統計的有意に高かった（基準：$p < 0.05$）．

【考察】近年，CD における性ホルモンの低下が示唆されている．さらに健康な男女の糞便細菌叢において，テストステロンが低い男性では *Ruminococcaceae* 科の存在率が低い一方で，エストラジオールが低い女性では *Christensenellaceae* 科や *Lachnospiraceae* 科の存在率が高いことが報告されている．先行研究によると，これらの細菌は抗炎症作用を有し，CD の腸内細菌叢において減少することが示唆されている．

以上から，男性患者の直腸における *Ruminococcaceae* UCG-002 群の減少はテストステロンの低下と同調し，女性患者の直腸や回腸における *Christensenellaceae* 科や *Lachnospiraceae* 科の減少はエストラジオールの低下にともなって軽減する可能性が推測された．
また先行研究で，前立腺細胞における尿路感染性 *Escherichia coli* の定着はテストステロンによって抑制されることが報告されている．したがって，男性患者の回腸や直腸における *Escherichia* 属の増加はテストステロンの低下によって許容される可能性が示唆された．

一般演題 A-26

クローン病患者における低カルボキシル化オステオカルシンの血清レベルに影響を与える腸内微生物叢の多様性

Diversity of gut microbiota affecting serum level of undercarboxylated osteocalcin in patients with Crohn's disease.

○我妻康平[1]，山田 聡[2]，青 未空[3]，松浦 稔[2]，辻 秀美[4]，飯田智哉[1]，
宮本健太郎[5]，岡健太郎[5]，高橋志達[5]，田中 清[6]，仲瀬裕志[1]
[1]札幌医科大学消化器内科学講座，[2]京都大学医学部消化器内科
[3]京都女子大学食物栄養学科，[4]神戸女子大学家政学部
[5]ミヤリサン製薬株式会社東京R&Dセンター，[6]神戸学院大学栄養学部

【目的】これまでの報告で，ビタミンKの血漿レベルの低下と骨密度のあいだに関連があること，腸内細菌がビタミンKの維持に寄与することが示唆されている．また，クローン病患者の腸内微生物叢は健常者の腸内細菌叢とは組成および比率が異なること，クローン病患者はいくつかの要因でビタミンKが減少することが知られている．しかし，クローン病患者における腸内細菌叢とビタミンKの関連性に関する研究はこれまでみられない．本研究では，クローン病患者における腸内細菌叢とビタミンK欠乏の代替指標の関係を検討した．

【方法】臨床的に非活動性のクローン病患者26人の糞便を収集した．糞便中の腸内細菌からDNAを抽出し，16S rRNA遺伝子V3-V4領域をpolymerase chain reactionにより増幅した．生成されたpolymerase chain reaction産物は，Illumina Miseq platformによる16S rRNAアンプリコン解析アプローチを使用して分析した．血清undercarboxylated osteocalcin ≧ 4.5 ng/mLをビタミンK欠乏の代替指標として用いた．

【結果】臨床的寛解（Crohn's Disease Activity Index ＜150）のクローン病患者では，血清undercarboxylated osteocalcinと平均Chao1 indexのあいだに有意な負の相関を認めた．ビタミンK欠乏群はビタミンK正常群よりもα多様性が低く，腸内微生物叢の多様性が有意に低下していた．また，ビタミンK欠乏群では*Firmicutes*特に*Ruminococcaceae*や*Lachnospiraceae*などの短鎖脂肪酸を生産する細菌が有意に減少していた．

【考察】ビタミンK欠乏群の腸内細菌叢は既報における活動性クローン病患者の腸内細菌叢と同様の傾向であった．一方で，非炎症性腸疾患患者における骨密度低下症例の腸内細菌叢とは異なる傾向を示した．今回の検討結果から，(1) 臨床的に非活動性のクローン病患者において腸内細菌叢のdysbiosisが存在すること，(2) ビタミンK状態を改善させるためにはmicrobiome解析結果に基づく治療介入が必要であることが示唆された．

一般演題 A-27

パーキンソン病患者の腸内細菌叢異常のメタ分析と予後因子

Meta-analysis of gut dysbiosis in parkinson's disease and prognostic factors

○西脇　寛[1]，伊藤美佳子[1]，石田智大[2]，浜口知成[1]，前田哲也[3]，柏原健一[4]，坪井義夫[5]，
上山　純[2]，島村鉄平[6]，森　宙史[7]，黒川　顕[7]，平山正明[2]，大野欽司[1]
[1] 名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報，[2] 名古屋大学医学系研究科病態解析学講座，
[3] 岩手医科大学医学部内科学講座神経内科・老年科分野，[4] 岡山旭東病院神経内科，
[5] 福岡大学医学部神経内科，[6] 名古屋大学医学系研究科システム生物学，
[7] 国立遺伝学研究所ゲノム進化研究室

【目的】パーキンソン病は腸管から発症するという仮説があり，実際に便秘症状は運動障害が発症する前から始まる．我々はメタ解析を行って，国の違いを超えてパーキンソン病に共通する特徴的な菌を同定することを目的とする．また，同定された菌がパーキンソン病の予後因子となりえるかを検討する．

【方法】メタ解析に用いたデータは，我々のデータ（patients 330 人，controls 130 人），アメリカ，フィンランド，ドイツ，ロシアの計 5 つである．percentile normalization という手法により batch effects を取り除いた．permutational multivariate analysis of variance（PERMANOVA）を用いて腸内細菌層全体に与える confounding factor の影響を調べた．また generalized linear model（GLM）を使って個々の confounding factor の影響を調べた．また，初年度と 2 年後のパーキンソン病の重症度のスコアを比較して stable group と worsened group に分けて同定された菌の相対比率の大きさによって 2 年後の予後が予測できるかを調べた．

【結果】メタ解析の結果からパーキンソン病では *Akkermansia*（属），*Akkermansiaceae*（科），*Corynebacteriaceae*（科）が増加し，*Faecalibacterium*（属），*Roseburia*（属）が減少することがわかった．2 年後の臨床スコアの変化から，*Akkermansia*（属）の相対比率が高いとパーキンソン病の予後が悪く，*Faecalibacterium* の相対比率が低いとパーキンソン病の予後が悪いとわかった．

【考察】パーキンソン病の病態にはムチン分解菌である *Akkermansia* によるムチン層の減少と SCFA 産生菌の減少による SCFA（short chain fatty acid）の低下が関係していると思われる．また，*Akkermansia* と *Faecalibacterium* はパーキンソン病の予後因子になりえると考えられる．

一般演題 A-28

大腸杯細胞は抗菌分子 Lypd8 依存性に同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病を抑制する

Intestinal goblet cells play a protective role against GVHD via Lypd8 dependent manner after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

○荒　隆英[1]，橋本大吾[1]，早瀬英子[1]，Clara Noizat[1]，菊池　遼[1]，
長谷川祐太[1]，奥村　龍[2]，竹田　潔[2]，豊嶋崇徳[1]
[1] 北海道大学大学院医学研究院 内科系部門 内科学分野 血液内科学教室，
[2] 大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学 免疫学フロンティア研究センター粘膜免疫学教室

【目的】同種造血幹細胞移植（Allo-SCT）の成功には，移植片対宿主病（GVHD）の病態生理の理解とその予防が必須である．GVHD では大腸杯細胞が減少するが，GVHD における杯細胞の役割は明らかでない．大腸杯細胞は抗菌分子を豊富に含む粘液層を形成し，細菌の侵入を防ぐ．本研究ではマウス SCT モデルを利用し，GVHD の病態生理における大腸杯細胞の役割を，特に大腸特異的な抗菌分子 Lypd8 に着目して検討した．

【方法】放射線照射後のマウスに，MHC 不適合ドナーからの骨髄・脾細胞を day0 に静注した（Allo 群）．IL-25 投与は，0.3 μg/day を day-6 ～ 0 に腹腔内投与した．

【結果】大腸杯細胞は Allo 群で有意に減少していたが，GVHD を発症しない同系移植後（Syn 群）は保たれていた．Muc2 の蛍光免疫染色では Allo 群で粘液層の二層構造が破綻しており，粘膜固有層への細菌の侵入が，Q-PCR 法（16S rRNA 遺伝子定量）や FISH 法で確認された．杯細胞増殖因子である IL-25 を Allo-SCT 前に投与すると，移植後の杯細胞傷害が軽減され，粘膜固有層への細菌侵入が抑制され，GVHD が軽減された．これらの結果から，大腸杯細胞は粘液層形成により GVHD を抑制しており，GVHD による大腸杯細胞の傷害のため，粘液バリアが破綻し GVHD が増悪していることが示された．粘液層に豊富に存在する Lypd8 の蛍光免疫染色では，Allo 群のみで腸粘液層の菲薄化にともない Lypd8 が減少しており，IL-25 投与により粘液層菲薄化が軽減され Lypd8 染色も保たれていた．Lypd8 の欠損マウス（*Lypd8-KO*）をレシピエントにすると，野生型に比較して，粘膜固有層への細菌の侵入が著明に増加して GVHD が増悪し，IL-25 投与も抗 GVHD 作用を示さなかった．最後に，Allo-SCT を施行した患者の大腸生検標本を解析したところ，消化管 GVHD 診断例で特異的に大腸杯細胞は減少し，その他の原因の下痢では減少していなかった．その減少の程度は消化管 GVHD の重症度と移植後の生存に有意に相関した．

【考察】大腸杯細胞は粘液層を形成し，Lypd8 依存性に細菌の侵入を抑制し，GVHD を抑制していることが判明した．大腸杯細胞や Lypd8 は GVHD の新規治療標的として有望である．

一般演題 A-29

豚鞭虫卵内服療法が腸内細菌叢に及ぼす影響について

Influence of *Trichuris suis* ova therapy on intestinal microbiota

○エン子丹[1]，保科斉生[2]，山田恭央[1]，櫻井達也[3]，
石渡賢治[4]，堀　誠治[2]，長谷耕二[1]，嘉糠洋陸[3, 4]
[1] 慶應義塾大学薬学部生化学講座，[2] 慈恵医科大学医学部感染制御部，
[3] 慈恵医科大学医学部実験動物研究施設，[4] 慈恵医科大学医学部熱帯医学講座

【目的】豚鞭虫卵内服療法は，人為的な寄生虫感染により免疫系の制御を目指すものである．欧米では医療用豚鞭虫卵（*Trichuris suis* ova: TSO）製剤が開発され，炎症性疾患やアレルギー疾患などへの効果が検証されている（MH Jouvin et al., J Allergy Clin Immunol, 130, 3–10, 2012）．動物実験において，寄生虫感染が腸内細菌叢に影響を及ぼすことも知られていることから，安全性の観点から TSO がヒト腸内細菌叢へ与える影響を解析し，その治療効果や有害事象との関連を調べる必要がある．そこで我々は TSO 製剤の内服後における腸内細菌叢を経時的に解析した．

【方法】12 人の被験者（健康な日本人成人男性）は TSO 製剤（虫卵 1,000 個，2,500 個，7,500 個のいずれか）またはプラセボを 1 回内服した．製剤内服前，内服 28 日後，56 日後に糞便検体を採取した．その後，16S rRNA 遺伝子領域を標的とした次世代シーケンスアンプリコン解析，Qiime2 パイプラインおよび Silva Database を用いて，腸内細菌叢の多様性と TSO 製剤内服前後の変化を解析した．また，消化器症状や好酸球増多などの有害事象との関係について解析した．

【結果】TSO 製剤内服後，観察期間中に下痢症状と好酸球増加を示した被験者が 1 例認められた．各被験者の腸内細菌叢に対して主座標分析を行なった結果，TSO 製剤内服後約 50 日より数日間，有害事象が顕著に見られた被験者にて，*Akkermansia* 属の増加など，細菌組成の変化が観察された．ただし，有害事象を発生しなかった被験者のなかにも，同程度かそれ以上の変化が認められた事例があったことから，TSO 製剤内服前後での一定した傾向を見出すことはできなかった．また，病原性細菌の増殖など，TSO 製剤内服にともなう細菌学的観点からの有害事象は認められなかった．

【考察】今回の試験の被験者は健康な成人に限られており，その腸内環境は傷病者に比べて頑健性に長けていると考えられた．そのため，TSO 製剤内服による腸内環境の変化よりも，個々人の食生活・生活習慣の差異による腸内環境の差異の方が大きいと推察される．これらの要因によって，TSO 製剤内服による腸内細菌叢への影響が明確には認められず，下痢症状および好酸球上昇についても明確な関連性を見出すことはできなかったと考えられた．今後，さらに被験者数を増やすことで，腸内環境における TSO の安全性を確認したい．

一般演題 A-30

ICU 患者における下痢便中 IgA 値

Fecal immunoglobulin A in diarrheal patients in the ICU

○村津有紗，清水健太郎，兒嶋　嵩，小倉裕司，嶋津岳士
大阪大学医学部附属病院高度救命救急センター

【目的】消化管内の IgA は消化管の粘膜固有層に存在する形質細胞から分泌され，選択的に病原体に付着し，毒素を中和すると報告されている．集中治療患者においてはしばしば下痢症を認め，腸内細菌叢も悪化するといわれるが，免疫応答としての IgA の分泌についてはこれまでほとんど報告がない．侵襲病態においては，嫌気性菌が減少し病原菌が増加すると報告されているが，腸内細菌叢に関する適切なマーカーは明らかとなっていない．今回の研究では，病原菌と宿主の反応をみるために便中 IgA と腸内細菌が産生するエンドトキシン値を評価した．

【方法】当院 ICU 入院中の下痢症を認める患者に対し，便中の IgA およびエンドトキシン値を後方視的に評価した．下痢症は，ブリストル便性状スケールで 5 から 7 の排便が 24 時間以上持続するものと定義した．便中の IgA は ELISA 法を用い評価し，敗血症の有無における便中 IgA 値とエンドトキシン量を比較した．

【結果】46 人の下痢症を認める患者が参加し，年齢中央値は 72.5（60-83.2）で，男性が 41.3％であった．来院時病名として最も多かったのは敗血症（n＝28）で，次いで来院時心肺停止（n＝7），外傷（n＝6）であった．初回下痢便中 IgA 値の中央値は 52.0（13.5–230.7）μ g/ml で，エンドトキシン値の中央値は 26755（256.7–373800）pg/ml であった．敗血症患者における便中 IgA 最大値は敗血症でない患者と比較し有意に高かった．一方で，最小エンドトキシン値は敗血症患者で有意に低かった．主な原因菌は *Enterococcus*（n＝9）で，次いで *Candida*（n＝6），*Klebsiella species*（n＝5）であった．

【考察】下痢症患者の便中 IgA 最大値は敗血症患者において高かった．一方で便中エンドトキシンの最小値は敗血症患者において低かった．この事象は腸内細菌叢の変化に対する免疫応答を示しているかもしれない．

一般演題 A-31

がん再発不安と腸内細菌叢の関連：探索的横断研究

Impact of chemotherapy on the association between fear of cancer recurrence and the gut microbiota in breast cancer survivors

○大久保亮[1]，木下貴之[2]，勝又紀子[3]，清水金忠[3]，松岡　豊[4]
[1] 国立精神・神経医療研究センタートランスレーショナル・メディカルセンター，
[2] 国立病院機構東京医療センター乳腺外科，[3] 森永乳業株式会社基礎研究所，
[4] 国立がん研究センター社会と健康研究センター 健康支援研究部

【目的】がんサバイバーの半数ががん再発不安に苦痛を感じ，約 1 割は重篤ながん再発不安のため生活の質や社会機能が低下する．がん再発不安に対しては対症的に薬物療法が施行されているが，がんサバイバーは身体症状や脆弱性を有していることが多く，薬物療法以外の予防法が期待されている．そのため本研究では，今後機能性食品などによる介入法を開発することを目指し，腸内細菌叢とがん再発不安の関連を探索的に検討することを目的とした。

【方法】20 歳以上の国立がん研究センター中央病院に外来治療中である乳がんサバイバーで，1 年以上前に浸潤性乳がんと診断され，研究開始時点でホルモン治療以外のがん治療を終えた人を対象とした．メタ 16S 解析法を用いて腸内細菌叢組成を算出し，concerns about recurrence scale（CARS）を用いてがん再発不安，その他診療録と質問紙を用いて不安抑うつ症状・食事内容・背景情報・がん及び他の身体疾患罹患情報を収集した．占有率（腸内細菌層全体の中で当該細菌が占める割合）が 1 %を超え，解析対象者の 95%以上から検出された細菌（属レベル）のみを解析対象とした．

【結果】腸内細菌叢組成と CARS 総得点の関連について重回帰分析を用いて検討し，Bacteroides 属のみで有意な関連が認められた（beta＝0.180，p＝0.03）．さらに腸内細菌叢組成と CARS 総得点の関連について，化学療法の有無で層別して検討した．化学療法既往なしの群（n＝69）では腸内細菌叢のすべての項目で CARS 総得点と有意な関連は認められなかった．しかしながら，化学療法既往ありの群（n＝57）では，*Bacteroides*（beta＝0.297，p＜0.01），*Lachnospiraceae*（beta＝－0.253，p＝0.03），*Ruminococcus*（beta＝－0.298，p＝0.02），Shannon diversity index が CARS 総得点と有意な関連を認めた（beta＝－0.244，p＝0.04）．

【考察】本研究は，がん再発不安と腸内細菌叢の関連を調べた世界初の研究である（R. Okubo et al., Brain Behavior Immunity, 2019）．再発不安と有意な関連が認められたのは，化学療法による変化が報告されている腸内細菌であり，腸管粘膜保護作用や抗酸化作用のある酪酸産生菌との負の関連，腸内細菌の多様性指標と正の関連を認めた．これらの結果から，化学療法により腸内細菌叢の変化が起こり，それが腸管粘膜保護機能を低下させ，全身性の炎症を増加させ，結果的に再発不安に影響している可能性が示唆された．