

一般演題 B-1**TiO₂ ナノ粒子が腸内細菌叢に与える影響****The effect of TiO₂ nanoparticles on intestinal flora**

○徳本勇人, 木岡真理奈, 新居靖崇, 武藤明徳

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) は多くの食品に用いられるようになったが, その一方で安全性が懸念されている. 本研究では, 白色着色料である TiO₂ NPs に着目した. TiO₂ は胃酸を始めとする各種消化液には溶解しないため, 個体粒子が腸内に到達することになる. 既往の研究では, *B. subtilis* と *E. coli* に TiO₂ NPs を暴露して培養すると, 菌の成長が阻害されることが報告されている. そのため, TiO₂ NPs を摂取すると, 腸内細菌の生育に影響を与え, その結果, 腸内細菌叢の構成菌種が変化する可能性が推察される. そこで, 本研究では, TiO₂ 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】 飼料にアナターゼ型の TiO₂ NPs を混練してマウスに 4 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.

【結果・考察】 体重, 摂餌量, 飲水量, 糞の状態から, 経口投与の期間中, 健康状態に異常は見られなかった. 最も高い TiO₂ NPs 含有率の飼料を与えたマウスの腸内細菌叢を見ると, 投与期間中に, 腸内有害菌である *Clostridiales* 目が優勢化し, *Lactobacillaceae* 科, *Bifidobacteriaceae* 科が劣勢化した. この菌叢変化は, TiO₂ NPs により, *Lactobacillaceae* 科や *Bifidobacteriaceae* 科の生育が阻害され, *Clostridiales* 目が生育しやすくなり, 引き起こされたものだと考えられる. 投与終了後は, このような構成菌種の比率が, 投与前の比率に戻る傾向が見られた. この現象は, 投与を終了すると腸内の TiO₂ NPs が減少したために, *Lactobacillaceae* 科や *Bifidobacteriaceae* 科が生育しやすい状態になり, *Clostridiales* 目の, 異常な増殖が抑制されたと考えられる. 一般に, 細菌は負に帯電しているものが多く, TiO₂ は正に帯電していることから, TiO₂ NPs が細菌に吸着することで生育を阻害しているのではないかと考えられる.

一般演題 B-2

歯周病原菌代謝産物・酪酸の加齢促進作用と
アルツハイマー症誘導の可能性Butyric acid contributes to blood cell aging and possible link between
periodontitis and Alzheimer's disease○落合邦康¹, 塚原隆充^{2,3}, 落合智子⁴¹ 日本大学歯学部, ² 栄養病理学研究所, ³ 京都府立大学生命環境科学研究科,⁴ 日本大学松戸歯学部

【目的】 歯周病が種々の全身疾患や高齢者の認知症, 特にアルツハイマー型脳症 (AD) に関連する可能性が示唆されているが, 認知症との関連性については不明な点が多い. 我々は歯周病原菌の主要代謝産物・酪酸が歯周病患者歯肉溝内平均濃度 (5 mM, PDL-BA) において各種細胞に細胞死 (J. Dent. Res., 2008, J. Immunol., 2004, 2003 他), 血液細胞に強い酸化ストレス (Microb. Pathog., 2015, Cell Stress Chap., 2015, 2014, Anaerob., 2014 他) を誘導することを報告してきた. 近年, 酸化ストレスが加齢促進に関与することが報告されているが, 高濃度酪酸による酸化ストレスと加齢促進作用や認知症への影響については解明されていない. 今回我々は, PDL-BA が生体内, 特に脳にどのような影響を及ぼすかを検討した.

【方法】 ラット (20 週齢) 歯肉内に PDL-BA 接種 24 時間後, 麻酔下で血液を採取し, 血液細胞に及ぼす各種酸化ストレス関連シグナル (heme, hydrogen peroxide, catalase, NOX1, NOX2), 細胞死関連シグナル (calcium, CASP1, CASP3) および加齢関連マーカー (NAD, SIRT1, mTOR) を mRNA およびタンパク質レベルで測定し, 無処理ラット (40 週齢) の結果と比較検討した. また, PDL-BA 処理後の脳より海馬, 松果体, 視床下部, 小脳, 大脳をそれぞれ分離し, 酪酸の脳に及ぼす影響を検討した.

【結果】 被験群ラット血中の酸化ストレスおよび細胞死関連シグナルの著しい変動が見られ, ストレスが上昇していることが判明した. また, NAD, SIRT1 の低下に伴い, 加齢関連疾患マーカー mTOR が上昇した. 脳においては海馬への影響が最も顕著で Tau タンパク質の増加がみられた.

【考察】 酪酸を指標としたこれらの実験結果から, 慢性炎症性疾患歯周病は加齢プロセスを促進するとともに AD 発症に関与する可能性が示唆された. 今後, 長期間に及ぶ PDL-BA 処理が全身および脳に及ぼす影響とその機序の解明, さらに免疫組織学的な検討が必要と思われる.

一般演題 B-3**マウス消化管内でんぷん顆粒への細菌の集住****Microscale bacterial colonization onto starch granules in murine intestine**

○長柄雄介, 高田敏彦, 永田百合子, 角 将一, 久代 明
(株)ヤクルト本社中央研究所

【目的】 腸内細菌叢の医療への応用に大きな注目が集まっているが, 菌叢構成の変動および維持の機構には不明な点が多く, 菌叢の制御は依然として容易ではない. 全ての常在菌種は排泄による減少分を補う形で常に増殖していると考えられるが, 各菌種が消化管内で実際に利用する栄養因子については直接的な知見に乏しい. 本研究では, 細菌が自身の依拠する栄養因子の周囲に局在する可能性に注目し, 消化管内栄養因子への常在細菌の局在を探索した.

【方法】 C57BL/6Jd マウス (日本クレア) を 5 週齢で入荷後, MF 飼料 (オリエンタル酵母) を与えて 6 週間飼育し, 内容物を含む消化管組織のパラフィン切片を FISH により観察した. また, マイクロダイセクションにより採取した消化管内容物中の微小領域について, Illumina MiSeq および Qiime を用いたメタ 16S 菌叢解析を実施した. さらに, 局在を示した菌種について単離培養を行った.

【結果】 全ての細菌を標的とした FISH 観察の結果, 直径約 15 μm の顆粒に対する桿菌の集住が見出された. 形状と AB-PAS 染色性から顆粒はでんぷんと推定され, ルゴール染色によりこれが証明された. また, 菌群特異的 FISH 観察の結果, 集住細菌はほぼ全てが *Bifidobacterium* と同定され, この集住は空腸と結腸の両方で観察された. 結腸の切片から多数のでんぷん周囲領域 (直径 40 μm) とその他領域を回収してメタ 16S 菌叢解析に供した結果, ビフィズス菌として *B. pseudolongum* のみが検出され, その占有率はでんぷん周囲領域で有意に高かった (でんぷん周囲領域; 平均 21.7%, その他領域; 平均 4.6%). 同菌種による集住は, 新規に設計した種特異的 FISH プローブでも確認された. さらに, マウス糞便から単離した *B. pseudolongum* はでんぷん分解活性を示した.

【考察】 マウス内在性の *B. pseudolongum* は, 自身の栄養源であるでんぷん顆粒へ集住してこれを利用しているものと考えられた. 接着による栄養源の独占という, 同菌種の効率的な糖源獲得戦略が推定された. 我々は, 今回用いた細菌局在解析法を, 細菌が消化管内で実際に利用する栄養源を探索する強力なツールとして提案する.

一般演題 B-4

ビフィズス菌発酵上清液の抗炎症作用の検討

Study of the anti-inflammatory activity in supernatants
of *Bifidobacterium*-fermented cultures

○久原徹哉, 田中あづさ, 密山恵梨, 菅原宏祐, 小田巻俊孝, 清水金忠
森永乳業(株) 基礎研究所

【目的】 ビフィズス菌, 乳酸菌には整腸作用や免疫調節作用などさまざまな保健機能が知られており, 発酵乳や凍結乾燥菌体として広く利用されている。一方, これら菌の発酵上清液にも菌由来の機能性成分が豊富に含まれており, 機能性素材としての利用が期待される。本研究では, ビフィズス菌や乳酸菌の発酵上清液について, 抗炎症作用を *in vitro* および DSS 誘導マウス大腸炎モデルで比較検討した。

【方法】 各菌株を食品グレードの培地で発酵した上清液について, 炎症 pathway の negative regulator を誘導する TLR2 ligand 活性を測定, 比較した。続いて DSS 誘導マウス大腸炎モデルを用いて, 発酵上清液による抗炎症作用の評価を行った。マウスに 3% DSS を飲水として 10 日間飲用させ, 被験試料は DSS 投与 7 日前から連続経口投与した。抗炎症作用としてマウスの体重減少, 大腸長縮小および Disease Activity Index を用いて評価した。

【結果】 発酵上清液の TLR2 ligand 活性は, 相対的にビフィズス菌の発酵上清液が乳酸菌と比較して高い活性を示した。DSS 誘導マウス大腸炎モデルにおいて各種乳酸菌発酵上清液にも抗炎症作用が認められたが, 総じてビフィズス菌発酵上清液の方がより強い作用を示した。ビフィズス菌のなかでも, *B. infantis* M-63 および *B. breve* B-3 の発酵上清液では特に強い症状改善が認められた。また, 一部のビフィズス菌について調べたところ, 生菌末 (1×10^9 cfu/匹) 投与群と比較して, その発酵上清液 (10 μ l/g 体重, 生菌末相当量) 投与群ではより顕著な症状緩和作用が確認された。これらの活性は, 透析処理で有機酸などの低分子成分を除いても維持されていた。DSS 処理により大腸粘膜組織において誘導された炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-23) の遺伝子発現は, M-63 と B-3 発酵上清液の投与により抑制された。炎症 pathway negative regulator として機能する MKP-1 や Muc-1 の遺伝子発現も発酵上清液投与により増加した。盲腸・結腸内容物の菌叢解析を行い, 発酵上清投与による抗炎症作用発現に伴う菌叢変化について評価した。

【考察】 ビフィズス菌の発酵上清液は, 抗炎症効果を有し, 菌種菌株によって活性に大きな違いがあることが判明した。これらビフィズス菌の発酵上清液の機能を詳細に解析することにより, 菌体のみではなく発酵産物の機能性素材としての有効利用が期待される。

一般演題 B-5

マウス周産期母体腸内細菌叢の攪乱は
仔の腸内細菌叢の定着に影響を与えるPerturbation on maternal gut microbiota during the perinatal period
influences colonization of gut microbiota of the offspring in mice○ 栃谷史郎^{1, 2}, 塚原隆充^{3, 4}, 松崎秀夫², 井上 亮³

¹ 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部, ² 福井大学子どものこころの発達研究センター・脳機能発達研究部門,
³ 京都府立大学生命環境科学研究科・動物機能学研究室, ⁴ 株式会社栄養・病理学研究所

【目的】 母親の常在菌叢を第一のソースとして子の腸内細菌叢は定着していく。周産期において母体常在菌叢を攪乱する因子としては食事の内容, ストレス, 感染症等が知られる (栃谷, 2017)。周産期母体腸内細菌叢の変容は子の腸内細菌叢の定着に大きな影響を与えることが容易に想像できるが, これまで母親の腸内細菌叢の攪乱が子の腸内細菌叢にどのような影響を与えるかは十分には検討されていない。我々が開発した母体腸内細菌攪乱モデルマウス (Tochitani *et al.*, 2016) を利用し, 母体腸内細菌の攪乱が仔マウスの腸内細菌叢の定着へ与える影響を検討する。

【方法】 妊娠マウス (C57BL/6J 系統) に対し妊娠 9 日目から 16 日目にかけ, 非吸収性抗生剤 (neomycin, bacitracin, pimaricin) を飲水投与した。このような方法で, 腸内細菌叢を攪乱した妊娠マウスに通常通り出産させ, 仔マウスを養育させ生後 23 日目に離乳した。この間, 母親の糞便, 仔の腸 (直腸, 大腸, 盲腸) 内容物 (生後 23 日目の仔に関しては糞便) を定期的に取り出し, 16S rRNA に基づく細菌量の測定と腸内細菌叢構成種の網羅的解析を行った。腸内細菌叢構成種については属レベルまでの同定を行った。

【結果】 腸内細菌攪乱を受けた母親マウスの腸内細菌量は, 妊娠 16 日目までの抗生剤投与期間中は対照群の 100 分の 1 程度までに減少していたが, 妊娠 18 日目には対照群と同レベルにまで回復し, 出産後 2 日目 (本マウス系統は通常妊娠 19 日目に出産) 以降には対照群の 10–100 倍の量の細菌量が観察された。腸内細菌攪乱を受けた母親マウスの腸内細菌叢の網羅的解析の結果, *Clostridium* 属の優占が観察され, α 多様性の低下が認められた。腸内細菌攪乱群の仔と対照群の仔の間では出生後を通じ, 腸内細菌量には明らかな差は観察されなかった。対照群の仔の腸内細菌叢においては *Enterococcus* 属, *Lactobacillus* 属が優占種を構成し, 出生後次第に α 多様性は増大していたが, 腸内細菌攪乱群の仔の腸内細菌叢においては *Clostridium* 属が優占種を構成し, 出生後 23 日目まで α 多様性は低下したままであった。

【考察】 周産期母体腸内細菌叢の攪乱は仔の腸内細菌叢の定着に著明な影響を与え, 母体腸内細菌叢の多様性や優占種は仔の腸内細菌叢の構成に明瞭に反映されることが明らかになった。

一般演題 B-6

ヒト糞便から分離された新菌種 *Faecalimonas umbilicata**Faecalimonas umbilicata* gen. nov., sp. nov., isolated from human feces○坂本光央^{1,2}, 飯野隆夫¹, 大熊盛也¹¹ 理研 BRC-JCM, ² 日本医療研究開発機構; PRIME

【目的】我々はヒト腸内から未分離・未分類の細菌（難培養微生物）を単離し、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うことを目的として研究を進めている。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ことを目的とした。

【方法】健康成人 1 名のヒト糞便材料から種々の血液寒天培地を用いて新規な微生物株の単離を試みた。分離された菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、その配列の比較から既知種あるいは新菌種であるかを判定した。新菌種の候補である菌株に対しては、さらに詳細な生理生化学的性状を調べた。

【結果】健康成人の糞便から中心がくぼんだ特徴的なコロニー形態を示す菌株 2 株（EGH7 および TSAH33）が分離された。分離株 2 株はいずれも、偏性嫌気性、無芽胞のグラム陽性球桿菌であり、16S rRNA 遺伝子配列による解析から、*Lachnospiraceae* 科内に既存の属とは独立したクラスターを形成した。最も近縁な菌種は *Eubacterium contortum* JCM 6483^T であった（塩基配列の類似度が 95%）。この結果は *hsp60* 遺伝子配列の解析からも支持された。分離株 2 株と *E. contortum* JCM 6483^T の主要な菌体脂肪酸 (>10%) は C_{18:1ω9c}, C_{16:0} および C_{18:1ω9c} DMA であったが、分離株 2 株の菌体脂肪酸組成中の割合では C_{18:1ω9c} が一番多いのに対して *E. contortum* JCM 6483^T は C_{18:1ω9c} DMA が一番多かった。また、分離株 2 株は *E. contortum* JCM 6483^T と比較して硫化水素を産生し、エスクリンを加水分解する点などで異なっていた。分離株はグルコースからの代謝産物として酢酸を産生した。

【考察】分離株 2 株はその特徴的なコロニー形態や、16S rRNA 遺伝子および *hsp60* 遺伝子配列の解析結果、主要な菌体脂肪酸などから既知種とは異なっていると考えられた。以上の結果より、これら分離株を新属・新菌種 *Faecalimonas umbilicata* (基準株 EGH7 = JCM 30896) として命名提案した (1)。

(1) Sakamoto *et al.* (2017) *Int J Syst Evol Microbiol.* 67: doi: 10.1099/ijsem.0001790.