

菅澤康幸より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2683 号

学位申請者 : すが 菅 さわ 澤 やす 康 ゆき 幸

学位審査論文 : Use of culture-independent analysis to reveal alteration of intestinal microflora by heat-killed *Lactobacillus pentosus* in a mouse model of endogenous sepsis

(内因性敗血症マウスモデルにおけるラクトバチルス・ペントーサス死菌投与による腸内フローラ変化の非培養的手法を用いた評価)

著 者 : Yasuyuki Sugasawa, Tomoo Saga, Soichiro Kimura, Yoshikazu Ishii, Keizo Yamaguchi, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Journal of infection and chemotherapy 19(4):673-676, 2013

論文内容の要旨 :

哺乳類宿主は自身の体にフローラ(微生物叢)を保有している。フローラの多様性やその変化が、宿主の健康状態や疾病に様々な点で関与していることが明らかにされつつあり、注目されている。腸内フローラは、偏性嫌気性菌が多くを占め、培養法での評価は原理的に困難であった。最近、培養によらず細菌の 16S リボゾーム RNA 遺伝子塩基配列に基づいてフローラを評価する方法が開発され、腸内フローラ解析にも応用されてきた。Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (末端標識制限酵素断片多型分析、以下 T-RFLP 法)法は、蛍光標識したユニバーサルプライマー(全細菌の 16S リボゾーム RNA 遺伝子に共通する配列を狙って設計されたプライマー)で増幅した PCR (polymerase chain reaction) 産物を制限酵素切断したものをキャピラリー電気泳動装置にてフラグメント解析し、フローラ組成を推定する手法である。また、検出対象細菌群に特異的に設計したプライマーを用いた Quantitative polymerase chain reaction (以下 qPCR 法)では、特定細菌群の定量評価が可能である。T-RFLP 法は、腸内細菌叢の各細菌群の大まかな占有率を示すのに有用であり、qPCR 法は、各細菌群をより高い感度で評価するのに適している。

プロバイオティクスは、ヒトに良い影響を及ぼす微生物の総称であり、乳酸菌 (*Lactobacillus spp.*) がその代表である。最近、*Lactobacillus pentosus* strain b0240 を加熱して作製した死菌(以下、HK-b0240)にサルモネラ属菌を用いたマウス消化

管感染モデル及び肺炎球菌を用いたマウス呼吸器感染モデルで防御効果があることが示された。(Tanaka et al, Lett Appl Microbiol 2011) (Ishikawa et al, Biosci Biotechnol Biochem 2010)。これらの機序として、HK-b0240 がマウスのパイエル版を刺激し、粘膜免疫で重要な役割を果たしている分泌型 IgA を増加させる作用が推測されている。(Yamahira et al, Jpn J Lactic Acid Bact 2006)。最近、segmented filamentous bacteria (SFB) と呼ばれる培養不能細菌の存在がマウスの免疫成熟に重要な役割を果たしていることが報告され注目されている。(Caselli et al, Gut Microbes 2010) 一方、HK-b240 投与がマウス腸内フローラに及ぼす変化、およびマウス内因性敗血症モデルにおける HK-b240 投与による防御効果は評価されていなかった。

本研究では、マウス内因性敗血症モデルにおける HK-b240 経口投与の効果を評価した。マウス内因性敗血症モデルは、ICR マウスに緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* strain D-4) を 1×10^7 CFU/ml に調整し、飲水ボトルに入れ 3 日間 (Day0 から Day2) 経口摂取させた後、cyclophosphamide を 150–200mg/kg で 2 回 (Day3 および Day7) 腹腔内投与して免疫抑制状態を誘導し、緑膿菌による内因性敗血症を引き起こす (Matsumoto et al, J Appl Microbiol 2009 をもとに一部改変)。HK-b240 投与群 (n=10) には、滅菌 0.45% 塩化ナトリウム溶液に HK-b240 を 10mg 懸濁したものを 1 日 1 回、内因性敗血症の誘導に先立つ 21 日間 (Day-21 から Day-1) に経食道投与した。非投与群には滅菌 0.45% 塩化ナトリウム溶液を同様に投与した。内因性敗血症モデル実施は 2 回実施し、マウス生存数の経時的変化を log-rank test で評価した。経過中のマウスの糞便を Day-21、Day0、Day4 および Day7 に採取し、ヒト腸内フローラ解析に対する方法に準じて DNA 抽出を行い、T-RFLP 法 (Nagashima et al, Appl Environ Microbiol 2003)、および緑膿菌 (Matsuda et al, Appl Environ Microbiol 2009)、乳酸菌 (Rinttila et al, J Appl Microbiol 2004)、SFB (Fuentes et al, Res Microbiol 2008) を検出対象として qPCR 法にて解析した。各菌種群の変化は、マウス個体ごとに処置前 (Day-21) の割合と比較し、群間の差は two-tailed unpaired t-test で $P < 0.05$ を有意と判定した。

その結果、HK-b240 投与によって有意な生存率改善結果は、観察されなかった。T-RFLP 法では、各検体に共通して、OTU (operative taxonomic unit; T-RFLP 法で検出されるフラグメントサイズによる細菌群分類) 657 (基準株の塩基配列情報から、主に乳酸菌に相当すると推察される)、OTU460 (同、*Bacteroides* spp に相当)、OTU166、OTU136、OTU106 が大部分を占めた。乳酸菌群は、T-RFLP 法での OTU657、qPCR 法のいずれにおいても、有意な変化を示さなかった。緑膿菌は T-RFLP 法および qPCR 法のいずれでも検出限界以下であった。一方、SFB については、T-RFLP 法で検出限界以下であったものの、qPCR 法では Day0 の時点 (HK-b240 を 21 日間投与後) で HK-b240 投与群で有意に高く、それ以降有意差は観察されなかった。

SFB は培養不能菌であるため、今回培養によらない手法を用いてはじめてその割合変化を評価することができた。他のマウスモデルにおける HK-b240 の効果から推測すると、HK-b240 投与によって免疫成熟に関与する SFB の割合増加が観察されたことは、投与によって起こったマウス腸内フローラの変化の一端を捉えることができた可能性が示唆される。しかし HK-b240 と SFB 増加の機序は現時点では判明しておらず、今後の検討が必要と考えられる。HK-b240 投与で感染防御効果が観察された他のマウスモデルと比較して、本モデルでは有意な感染防御効果が見られなかった要因として、免疫抑制導入に用いた cyclophosphamide の作用が考えられる。すなわち本モデルでは、cyclophosphamide による好中球減少による免疫における作用が、分泌型 IgA の増加効果を上回ったこと、および cyclophosphamide が B 細胞系リンパ球に作用したことが推察された。また qPCR 法で緑膿菌が検出限界以下であったことは、マウス内因性敗血症モデルにおける緑膿菌のバクテリアル・トランスロケーションが成立する際に、腸管フローラに緑膿菌が多く存在する必要はないということを示唆した。

従来の培養法に基づく解析では、評価できなかったフローラの変化を本研究で活用した培養によらない方法で解析することで、感染症をはじめとした種々の疾患の原因となるようなフローラの変化を見出すことが可能になると考えられる。T-RFLP 法は、菌種群の大づかみな解析に向く一方で検出フラグメントから菌種群そのものを推定することは難しく、qPCR 法では対象菌群以外の評価ができない、この両検出法の特性を生かした活用が期待される。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2683 号	氏 名	菅 澤 康 幸
学位審査担当者	主 査	草 地 信 也
	副 査	澁 谷 和 俊
	副 査	中 嶋 均
	副 査	宮 崎 修 一
	副 査	瓜 田 純 久
<p>学位審査論文の審査結果の要旨：</p> <p>近年、細菌の 16S リボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列を解析することによって腸内の細菌叢を同定とその菌量を評価する方法が開発された。今回用いられた RFLP 法は、腸内細菌叢の各細菌群の大まかな占有率を示すのに有用であり、qPCR 法は、各細菌群をより高い感度で評価するのに適しているとされている。最近、いわゆるプロバイオティクスと呼ばれる <i>Lactobacillus pentosus</i> strain b0240 を加熱して作製した死菌（以下、HK-b0240）にサルモネラ属菌を用いたマウス消化管感染モデル及び肺炎球菌を用いたマウス呼吸器感染モデルで防御効果があることが示された。これらの機序として、HK-b0240 がマウスのパイエル版を刺激し、粘膜免疫で重要な役割を果たしている分泌型 IgA を増加させる作用が推測されている。さらに、従来培養されていなかった segmented filamentous bacteria (SFB) がマウスの免疫成熟に重要な役割を果たしていることが報告され注目されている。そこで、本研究は、マウス内因性敗血症モデルを用いて HK-b240 経口投与の効果の評価した。マウス内因性敗血症モデルは、ICR マウスに緑膿菌 (D-4) を経口摂取させた後、cyclophosphamide を腹腔内投与して免疫抑制状態を誘導し、緑膿菌による内因性敗血症を引き起こした。このモデルで、HK-b240 投与群と非投与群で比較した。その結果、HK-b240 投与によって有意な生存率改善効果は観察されなかった。腸内細菌叢は、T-RFLP 法では、各検体に共通して、OTU (operative taxonomic unit; T-RFLP 法で検出されるフラグメントサイズによる細菌群分類)、657 (基準株の塩基配列情報から、主に乳酸菌に相当すると推察される)、OTU460 (同、Bacteroides spp に相当)、OTU166、OTU136、OTU106 が大部分を占めた。乳酸菌群は、T-RFLP 法での OTU657、qPCR 法のいずれにおいても、有意な変化を示さなかった。緑膿菌は T-RFLP 法および qPCR 法のいずれでも検出限界以下であった。一方、SFB については、T-RFLP 法で検出限界以下であったものの、qPCR 法では Day 0 の時点 (HK-b240 を 21 日間投与後) で HK-b240 投与群で有意に高く、それ以降有意差は観察されなかった。SFB は培養不能菌であるため、今回培養によらない手法を用いてはじめてその割合変化を評価することができた。本モデルでは、Cyclophosphamide による好中球減少による免疫における作用が、分泌型 IgA の増加効果を上回ったこと、および Cyclophosphamide が B 細胞系リンパ球に作用したことが推察された。また qPCR 法で緑膿菌が検出限界以下であったことは、マウス内因性敗血症モデルにおける緑膿菌のバクテリアル・トランスロケーションが成立する際に、腸管フローラに緑膿菌が多く存在する必要はないということが示唆された。</p> <p>プレゼンテーションの後にいくつかの質問があげられた。実験方法に関し、HK-b240 の投与量の意義、ICR マウス以外の動物による実験の有用性、敗血症モデルマウスの死亡原因に解析、従来の培養法でと本法の違い、について討論が行われた。また、本試験で用いた死菌の腸内細菌叢に対する影響に関する質問、本研究の発展性につき、申請者より明快な回答が得られた。</p> <p>申請者は本研究内容はもとより、腸内細菌叢の基本的および関連する最新の知見について十分な知識を有し、学位授与に値することが主査、副査の全員が賛成した。</p>		