

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670272

研究課題名(和文)腸管感染症のイムノターゲット・メタゲノミック診断

研究課題名(英文)Development of new enteropathogen detection system target at IgA

## 研究代表者

後藤 和義 (Gotoh, Kazuyoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20626593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管感染症においてIgAが結合している細菌を分離することで、次世代シーケンサーによる診断を容易にすることを目的とし、その分離・解析技術の確立を目指した。健康人のヒト糞便を材料とし、IgA結合細菌をセルソーターを用いて分離を試みたが、細菌核酸は得られなかった。代替法として磁気ビーズ法により分離したところ16S rDNA PCRに成功したが、次世代シーケンサーにより菌叢解析を行った結果IgA結合と非結合に差が見られなかった。蛍光顕微鏡下ではIgA結合細菌が観察されているのでレーザーマイクロダイセグレーション等の直接観察下で分離する手法が有効と考えられる。

研究成果の概要(英文)：When we detect nucleic acids of enteric pathogens from diarrheal stool normal gut microbiota, a dominant in fecal DNA pools, masks the low abundance of pathogens. To solve this problem we employed IgA-coated bacterial sorting technologies. First, we examined that IgA-coated cells were separated by a cell sorter from healthy human stool. DNA was extracted from sorting fraction. However, undetectable level DNA by PCR was obtained from low sorted cell count with our equipment. Because it was difficult to find other optimal conditions, I tried magnetic beads-based separation against IgA. Analysis of 16S rDNA deep sequencing using beads bound showed that no any significant differences was revealed between total and IgA-positive fractions despite the direct observation of IgA-positive bacteria by fluorescent microscopy.

We proposed that IgA-targeted separation should be carefully validated using microscopy although that technique has been published as successful experiences.

研究分野：細菌学

キーワード：IgA 腸内細菌叢 感染症診断

## 1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの登場以来、さまざまな応用が提唱されてきた。その中で研究代表者は、次世代シーケンサーを用いて、糞便のような下痢患者検体から病原体核酸を検出するシステムの開発を行ってきた。すなわち、糞便の核酸を抽出し、そこに存在する核酸を網羅的に解読し、blast を用いた相同性検索を行うことで核酸の由来を同定するものである。これまでの経験上、本検出システムは、1 検体あたり数万から数千万リードの配列を解読すると、その中の一部に病原体由来のリードが同定されているが、ウイルスに比べると細菌性病原体の方が起因微生物として同定されるリード数は少ない傾向があった。

患者糞便中に含まれる常在細菌叢由来の DNA は通常、病原体由来の核酸より圧倒的に多く、数万リードのうち 99% 以上を占めることもしばしばである。病原体の種類によって、発病に必要な菌数（またはウイルス量）は異なるが、多くの病原体は常在細菌数より圧倒的に少ないドーズで病気を起こすことができる。このように病原体の核酸がマスクされてしまうことは、本システムの解決すべき課題であった。

腸管粘膜免疫において、獲得免疫のエフェクターは分泌抗体である IgA であり、実際に感染防御において重要な役割を果たしていることが知られている。IgA による感染防御は、必ずしも免疫記憶を必要とせず、初めて感染した病原体にも効果があることが報告されている (Wijburg OL, *et al.*, 2006)。このことから、腸管病原体による急性感染において、たとえ初回感染であっても原因微生物が IgA の結合を受けている可能性が示唆される。研究代表者は、急性感染時に IgA が結合している微生物を峻別・濃縮することで、無数に存在する常在細菌の中から原因微生物を同定することができるのではないかと仮説を立てた。

IgA の機能不全マウスでは、腸内細菌叢が破綻するという報告が多数なされていることから、現に感染を起こしていない時でも正常な腸管粘膜免疫の維持に IgA の存在が必要であると考えられている。非感染時における IgA のターゲットとなる細菌については 2010 年に報告があった (Obata T, *et al.*, 2010)。この報告によると、マウス腸管内において、アルカリゲネス属の細菌に対する IgA が誘導されていた。このように、正常時でも IgA が特定の細菌種をターゲットとしている可能性があり、IgA の標的細菌を知ることが腸管粘膜免疫の解明に重要である。

## 2. 研究の目的

最終的には、糞便から IgA の標的となっている細菌を分離することで、次世代シーケンサーを用いた下痢原因細菌の同定を容易にすることが目標であるが、そのために解決

すべき小課題を設定した。本研究では以下に挙げる課題を解明することを目標とした。

### (1) IgA 結合細菌の分離法の確立

まず、対象となる健常ヒト糞便試料中に IgA 結合性細菌が存在することを蛍光顕微鏡により確認する。その後、セルソーターを用いて IgA 結合細菌の分離を試みる。分離の精度を評価することで最適な条件を検討する。

### (2) IgA 結合細菌の菌種同定

IgA 結合細菌が分離できた場合は、そこから核酸を抽出し、16S rDNA ユニバーサルプライマーを用いた PCR を行う。これを次世代シーケンサーを用いて菌叢解析し、菌種を同定する。

### (3) 病原体検出モデル

マウスの腸管感染症モデルを用いて、実際に IgA 結合細菌を分離することで起因菌の診断が可能であるか検討する。また、可能であることが証明されれば、実際のヒト患者検体を用いて検討を続行する。

## 3. 研究の方法

### (1) 糞便試料の調製

糞便は採便後ただちに 4% パラホルムアルデヒドで固定し、真核細胞や食物残渣といったデブリを除去するため 100  $\mu\text{m}$  と 20  $\mu\text{m}$  メッシュのナイロンフィルターで濾過した。すぐに使用しない場合は  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保管した。

### (2) 蛍光顕微鏡観察

固定後の糞便をプレパラートに塗抹し、1 次抗体として市販の抗ヒト IgA 抗体または抗マウス IgA 抗体を反応させ、2 次抗体として FITC 標識抗ヤギ抗体を反応させた。DNA 染色として DRAQ5 を用いた。蛍光顕微鏡はキーエンス BZ-9000 を用い FITC の蛍光を発する細菌の観察を行った。

### (3) セルソーティング

固定および濾過した糞便を On-chip 標準サンプルバッファーに懸濁し、ソーティングに用いた。セルソーターは、株式会社オンチップバイオテクノロジーの FISHMAN-R を用いた。本セルソーターは、ディスポーザブルの流路系を用いるという特徴があるため、クロスコンタミネーションの防止や病原体安全の点を考慮し、本機種を選択した。

### (4) マウス感染モデル

ICR マウス ( $n = 9$ ) に  $2 \times 10^9$  cfu の *Citrobacter rodentium* NBRC105723 を経口投与し、感染後 2 日と 7 日後の糞便をそれぞれ採取した。糞便をマッコンキー寒天培地に摂取し、培養後のコロニーを計数することで糞便中に含まれる *C. rodentium* の量を見積もった。

#### (5) 16S rDNA シークエンシング

DNA 精製には、微量核酸の抽出が可能である NucleoSpin Tissue XS (Takara) を用いた。抽出核酸を鋳型とし、16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーである 784F と 1061R を用い PCR を行った。PCR 産物は、次世代シーケンサー Ion PGM (Life Technologies) を用いて配列解析した。得られた配列は QIIME パイプラインを用いてトリミング、フィルタリングを行い、菌叢の構成を解析した。

#### (6) 磁気ビーズによる分離

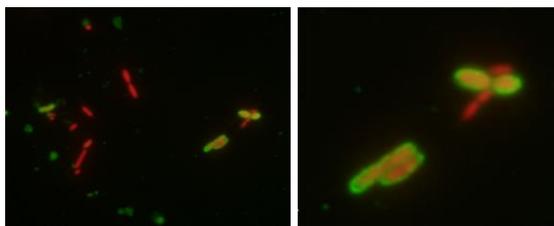
固定後の糞便を抗 IgA 抗体およびビオチン標識 2 次抗体と反応させ、PBST で洗浄した。洗浄後の試料をストレプトアビジン標識磁気ビーズ Dynabeads (ベリタス) と混和し、磁気スタンドで分離した。

### 4. 研究成果

#### (1) IgA 結合細菌のソーティング

まず、健康ヒトボランティアから提供を受けた糞便中の IgA 結合細菌を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、いずれのドナーにおいても IgA が表層にコートされた桿菌様の細菌が観察された (図 1)。

(a)



(b)

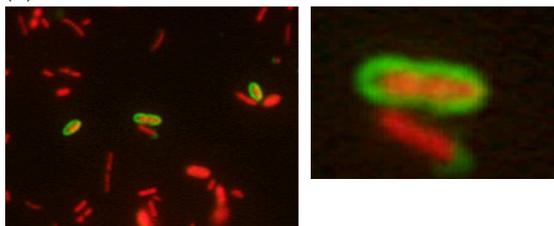


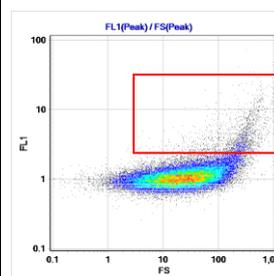
図 1. 糞便中の IgA 結合細菌 (DNA : 赤色、IgA : 緑色). (a) と (b) とで糞便のドナーが異なる。

IgA 結合細菌の比率を顕微鏡下で計数したところ、ドナー間でばらつきはあるものの全体のおよそ 0.1–1% 程度が IgA 陽性と見積もられた。

次に同じ資料をセルソーターに供した。FACS 解析によると IgA 陽性のシグナルが観察されたためこれをソートした (図 2)。その結果、およそ 200 カウント程度が得られ、微量核酸抽出を行った。抽出核酸の濃度を高感度な蛍光法で測定したが、測定不能であった。また、抽出核酸を鋳型とし、16S rDNA PCR を

行ったが、バンドが得られなかった。このことから、ソート画分は必ずしも細菌ではなく FITC の蛍光を発するデブリである可能性が示唆された。セルソーター開発元であるオンチップバイオテクノロジーの藤村研究員と最適なソート条件を検討したが、IgA 結合細菌を得ることはできなかった。

(a)



(b)

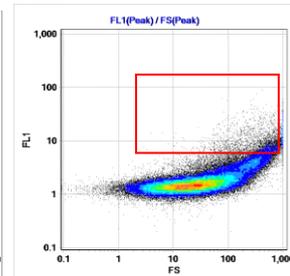


図 2. 糞便細菌の FACS 解析. 縦軸 (FL1) は IgA のシグナル、横軸は FS を示す. (a), (b) はドナーが異なる. 赤枠を IgA 結合性画分と定義した。

#### (2) 磁気ビーズ法による分離

セルソーティングの代替法として、磁気ビーズにより IgA 結合細菌を分離する手法を試みた。その結果、IgA 結合性画分から得られた核酸を鋳型とした 16S rRNA PCR でバンドを認めた (図 3)。

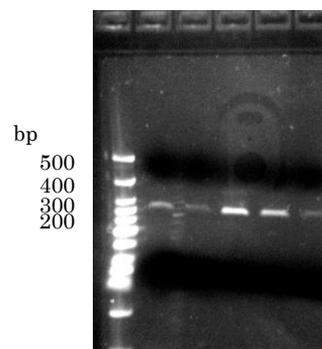


図 3. 磁気ビーズ分離により得られた IgA 結合性画分由来核酸の 16S rDNA PCR. レーン 1 は 100 bp ラダーマーカー、レーン 2–6 はドナーの異なる糞便からの抽出核酸. 理論上の PCR 産物のサイズは 284 bp である。

得られた PCR 産物を用いて、次世代シーケンサーによる菌叢解析を行った結果、磁気ビーズ法による分画前後で菌叢に優位な差を認めなかった (図 4)。細菌のビーズへの非特異的吸着が考えられたため、次に異なる表面の物性をもつビーズで細菌の非特異的吸着を検討した。検討にはリアルタイム PCR を用いた。その結果、親水基、疎水基いずれのビーズと細菌を混和した場合でもビーズ吸着画分から細菌由来の DNA を検出した。ビーズの表面によらずごく僅かな細菌が非特異的に吸着していると考えられ、0.1% 程度存在する IgA 結合細菌はたとえ微量な非特異的吸

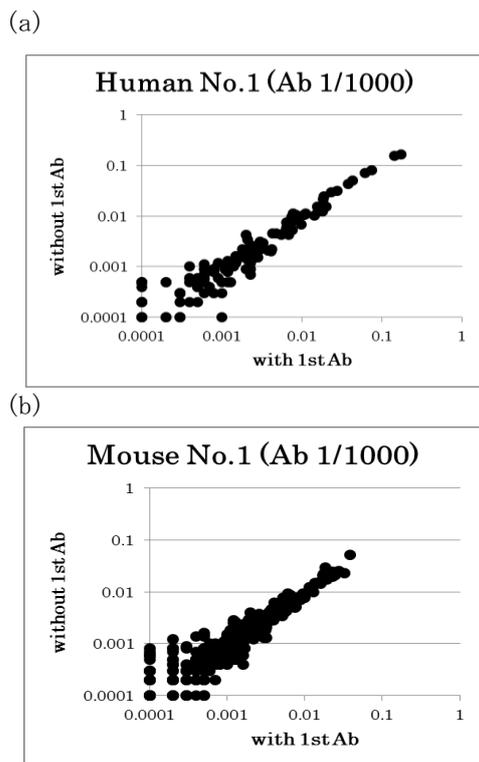


図 4. 磁気ビーズ法により得られた IgA 結合性画分の菌叢解析. 1つのドットが1つの OTU を示す. 縦軸は抗 IgA 抗体を加えない非結合コントロール、横軸は IgA 結合性のそれぞれ菌叢中での OTU の存在比率を示す。

着でもマスクされてしまう可能性が考えられた。

### (3) 感染検体での検証

実際に感染を起こしている検体で IgA が起因菌に結合しているかどうか確かめるため、マウスのシトロバクター感染モデルを用いた。シトロバクターの経口投与後 2 日で糞便 1 g あたりおよそ  $10^7$  cfu のシトロバクターが検出された。その後 7 日目までシトロバクターは定着していた (図 5a)。そこで、感染前と感染後の糞便中に含まれる IgA 結合性細菌を蛍光顕微鏡で観察した。その結果感染前には、ヒトと同様に桿菌様の細菌に IgA が結合している像が観察された (図 5b)。もし、シトロバクターに IgA が結合すれば、FITC の蛍光を発する桿菌が多数観察されるはずであるが、感染後 2 日、7 日では IgA 結合性の細菌はほとんど観察されなかった。かわりに FITC の蛍光を発するデブリが多数観察された (図 5c)。

ヒトボランティアの急性下痢便でも同様に IgA 結合性細菌を観察したところ、DNA のシグナルを含まない FITC のみの蛍光を発するデブリ様の球体が多数観察された (図 5d)。これらのことから、下痢症発症時には必ずしも起因菌が IgA と結合しているとは限らないことが考えられた。

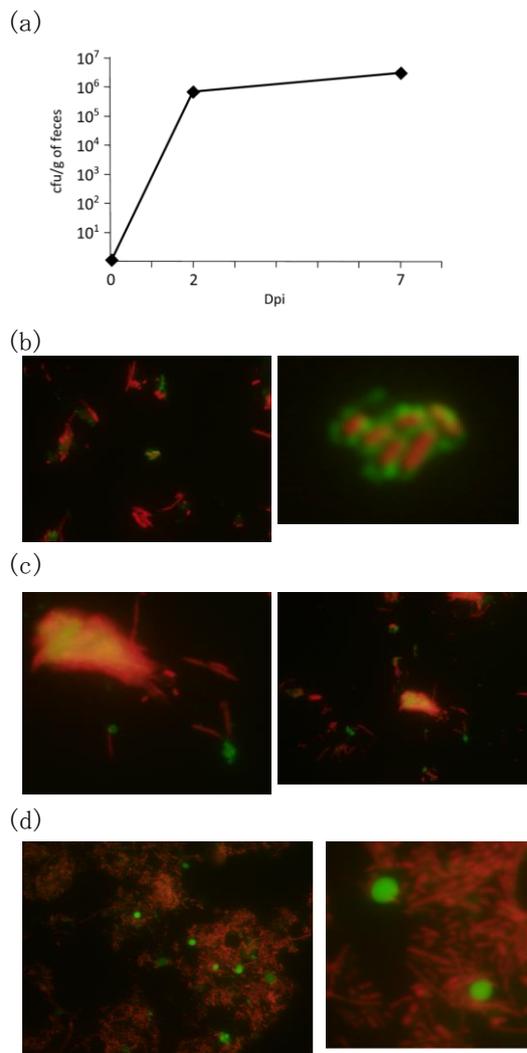


図 5. シトロバクター感染モデルにおける糞便中のシトロバクター菌数 (a) および下痢症時の IgA 結合細菌の観察 (b, c, d). (b, c) はマウスのシトロバクター感染モデル、(d) はヒトの急性下痢症例. 赤色は DNA、緑色は IgA のシグナルを示す。

### (4) 考察

2014 年から 2015 年にかけて他のグループから、セルソーターにより IgA 結合細菌を分離し、次世代シーケンサーで菌叢解析を行った論文が報告された。たしかに IgA 結合性とコントロールで菌叢に差はあるものの、やはり蛍光顕微鏡等で直接確認しなければ、分離精度が確保できているかについては蛍光顕微鏡で観察するべきであると提案したい。現在研究代表者の研究グループでは、精度に疑問のあるセルソーティングや磁気ビーズ法に代わって、直接顕微鏡下で IgA 結合細菌を観察しながら分離するレーザーマイクロダイセクション法を検討中である。

本研究を計画するにあたり、感染性の急性下痢症時には起因菌に対して IgA が結合しているとの仮説を立てたが、この仮説は必ずしも正しくない可能性が示唆された。感染時の糞便では IgA は DNA を含まない高輝度シグナ

ルを発するデブリとして観察された。下痢発症時に IgA 結合細菌が観察されなくなるメカニズムについては未だ不明であるが詳細について検討しているところである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ①Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani S, Nakamura S, Kurakawa T, Kikuta K, Gotoh K, et al. (2014) Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch, Nature Communications. 3704 (査読あり)  
DOI: 10.1038/ncomms4704
- ②Imai A, Gotoh K, Asano Y, et al. (2013) Comprehensive metagenomic approach for detecting causative microorganisms in culture-negative infective endocarditis, Int J Cardiol. 172: 288-289 (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.12.197
- ③Cavalcanti GS, Gregoracci GB, dos Santos EO, Silveria CB, Meirelles PM, Longo L, Gotoh K, Nakamura S, et al. (2013) Physiologic and metagenomic attributes of the rhodoliths forming the largest CaCO<sub>3</sub> bed in the South Atlantic Ocean, ISME J. 8:52-62 (査読あり)  
DOI: 10.1038/ismej.2013.133
- ④Seki M, Gotoh K, Akeda Y, et al. (2013) Fatal sepsis caused by an unusual *Klebsiella* species that was misidentified by an automated identification system, J Med Microbiol. 62:801-803 (査読あり)  
DOI: 10.1099/jmm.0.051334-0

[学会発表] (計 5 件)

#### 2014 年

- ①後藤和義、倉川尚、飯田哲也。虫垂が腸内細菌叢の形成に果たす役割。第 67 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2014. 10. 5, 徳島
- ②Gotoh K, Motooka S, Nakamura S, et al. Dynamics of fecal microbiota in Bangladeshi children. 48<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Sciences Program Conference on Cholera and Other Bacterial Infections. 2014. 2. 14, Dhaka, Bangladesh

#### 2013 年

- ①後藤和義、元岡大佑、中村昇太、飯田哲也。バングラデシュにおける小児糞便細菌叢のダイナミクス。第 47 回腸炎ビブリオンポジウム, 2013. 11. 15, 広島
- ②後藤和義、元岡大佑、中村昇太、飯田哲也、堀井俊宏。次世代シーケンサーを用いた

- 病原体の網羅的診断法。第 25 回臨床微生物迅速診断研究会総会, 2013. 7. 6, 東京
- ③Gotoh K, Monira S, Nakamura S, et al. Dysbiosis of gut microbiota during cholera and recovery. The Annual Medical Sciences Conference 21<sup>st</sup>, 2013. 6. 17, Nonthaburi, Thai

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

後藤 和義 (GOTOH KAZUYOSHI)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 20626593

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: