

機関番号	82603
研究種目	若手研究 (B)
研究期間	2008~2010
課題番号	20790346
研究課題名 (和文)	家禽における腸管内の細菌および原生動物の共生関係と病原性細菌の伝播機構の研究
研究課題名 (英文)	The study of symbiosis between bacteria and protozoa in intestinal environment, and mechanisms of transmission of pathogenic bacteria internalized with protozoal cyst
研究代表者	関塚 剛史 (TSUYOSHI SEKIZUKA) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター第三室
研究者番号	40462775

研究成果の概要 (和文) :

本研究は、動物の腸管内に存在する細菌と原虫の共生関係を理解する事を目的としている。本研究により、牛糞便内での新規の原虫（単細胞の寄生虫の仲間）の存在が明らかとなった。また、その休眠状態の原虫の中には、糞便中では低い存在比率である生きた細菌が、選択的に存在している事が示唆された。酸素を嫌うお腹の中の細菌の一部は、お腹の中の原虫を乗り物にして、自然環境中で酸素に触れることなく次の宿主へ伝播する機会を狙っているのかもしれない。

研究成果の概要 (英文) :

This study aims to understand the symbiosis between bacteria and protozoa in animal intestine. In this study, the new parasitic protozoa were detected from fecal sample of cattle. And then it was suggested that some viable intestinal bacteria selectively existed in the dormant protozoa, i.e. cyst condition, and these bacteria accounted for minor population in the whole feces. Some anaerobic intestinal bacteria maybe use the intestinal protozoa for a vehicle, and not only defend itself from oxygen at natural environment but also may watch for an opportunity to pass on to other hosts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	0	2,500,000
2009年度	500,000	0	500,000
2010年度	500,000	0	500,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：細菌叢、原生動物、共生、分子生物学、原虫

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物の腸管内では、細菌以外に種々の原生動物も腸管内に寄生している。近年になり、腸管内の細菌叢解析が行われるようになり、その全貌が解明されてきている。しかし、腸

管内に存在する原生動物のより詳細な解析は行われていない。

(2) 一部の細菌 (*Campylobacter jejuni* 等) は、自然環境中で自由生活型の原生動物内に内

特に、牛糞便の細菌叢解析の結果から、使用している試料に依存して、類似した細菌叢を構成することが示唆された。

また、食鶏盲腸便のフラグメント解析から、便全体中の約1.8%が *Campylobacter* 属であることが示唆され、*C. jejuni* が全盲腸便検体から分離された。しかし、牛糞便からはヒトに病原性を呈する細菌は検出されなかった。

② 食鶏盲腸便および牛糞便から原虫を検出するため、原虫の18S rRNA 遺伝子の増幅および顕微鏡観察を行った。食鶏盲腸便からは、原虫は検出されなかった(図3)。これは、生産管理された場所で養鶏されていたため、原虫が鶏腸管内に生息していなかったことが示唆される。一方、牛糞便からは全検体で増幅が確認された(図3)。また、牛糞便をエーテル抽出後、顕微鏡像の確認を行ったところ、50 x 65 μm ~ 60 x 70 μm の大型の栄養型の原虫、40 ~ 52 μm の大型のう子および25 ~ 30 μm のう子が確認された(図4)。最も多く存在していたのは、大型のう子であった。

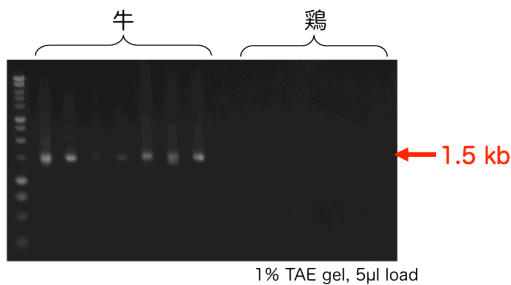


図3 原虫特異プライマーを用いたPCRによる検出

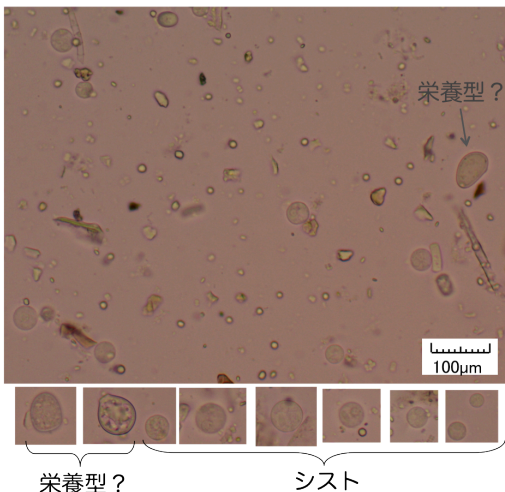


図4 牛糞便に存在する原虫の顕微鏡像(倍率x100)

得られたPCR断片をクローニング後、192クローンを釣菌し、塩基配列を決定した。78

クローンが *Balantidium coli* に96%の相同性を示す18S rRNA 遺伝子であった。また、26クローンが *Blastocystis hominis* および *rattii* に92%の相同性を示す18S rRNA 遺伝子であった。近縁の原虫の配列を取得後、系統解析を行ったところ、どちらの配列もこれまでに報告の無い、新規の *Balantidium* 属および *Blastocystis* 属の配列であることが示唆された(図5および6)。顕微鏡観察と18S rRNA配列の結果から、今回供試験した牛糞便中には、主に新規 *Balantidium* 属原虫が存在してい

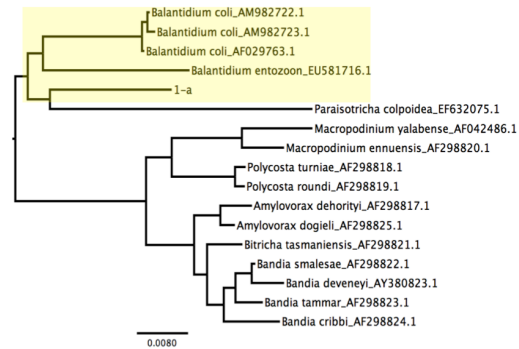


図5 *Balantidium* 属及び近縁の繊毛虫の18S rRNA 遺伝子の系統樹(1-aが今回得られた新規 *Balantidium* 属の配列)

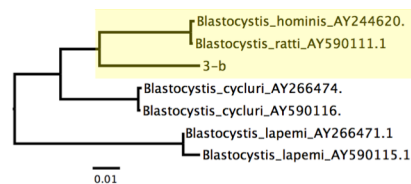


図6 *Blastocystis* 属の18S rRNA 遺伝子の系統樹(3-bが今回得られた新規 *Blastocystis* 属の配列)

ることが明らかとなった。

牛糞便中の原虫のロビンソン培地による培養も試みた。トリコモナス類と思われる鞭毛虫が2週間生存していたが、虫体数も少なく、増殖が確認されず、分離培養までに至らなかった。また、*Balantidium* 属原虫の増殖も確認されなかった。*Balantidium* 属原虫は糞便検体中の大部分がのう子状態であったため、培養が不可能であったことが示唆された。

③ 糞便中の原虫内に内在する細菌を効率的に回収する手法を考案した。尚、食鶏盲腸便からは原虫が検出されなかったため、以下の実験からは、牛糞便のみを供試した。原虫外に存在する細菌および細菌由来のDNAを除く必要が有るため、1. 遠心による洗浄、2. エーテル抽出による原虫のう子の回収、3. 溶

菌酵素および SDS を用いた細菌の溶菌、4. DNase による原虫外に存在する細菌由来 DNA の消化、5. フィルターを用いた原虫のう子の回収の手法を組み合わせを行った (図 1)。尚、原虫分画中ののう子は、溶菌酵素および SDS での処理中に、破壊されないことを顕微鏡化で確認している。全糞便、細菌分画、濾過後の濾液およびフィルター上の原虫濾物の DNA を回収後、16S および 18S rRNA 遺伝子の PCR を行った。目的の増幅断片 (共に、約 1.5 kb) をアガロース電気泳動にて確認することで、各分画に於ける細菌および原虫由来 DNA の状態を確認した (図 7)。細菌

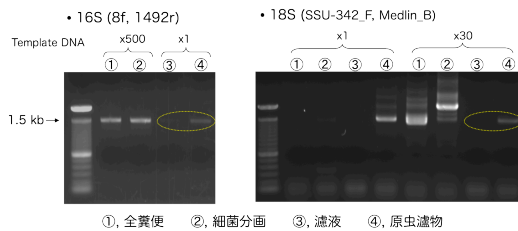


図 7 各分画に於ける細菌および原虫由来の DNA の PCR による定性的確認

由来の DNA は濾液からは検出されず、全糞便、細菌分画およびフィルター上にトラップされた濾物から検出された (図 7)。原虫由来の DNA は、細菌分画では目的のサイズの増幅断片 (約 1.5 kb) はあまり検出されておらず、濾液からは検出されなかったが、全糞便および濾物からは検出された。本手法によりフィルター上に効率よく原虫が回収されていることが示唆され、更に、原虫内に存在する細菌が効率よく回収されていることが示唆された。また、濾液から細菌由来の DNA が検出されなかったことから、溶菌処理および DNase 処理により、原虫外に存在する細菌は効率よく除去されたことが示唆される。

尚、原虫濾物から得られた 18S PCR 断片をクローニング後、シーケンエスした結果、フィルター上にトラップされた原虫のう子は全て *Balantidium* 属原虫の物であった。

④ 上記手法で得られた検体を用いて、原虫内に存在する細菌および全糞便中の細菌叢を T-RFLP 法にて比較した (図 8)。全糞便検体および細菌分画のフラグメントパターンはほぼ共通したが、原虫濾物は全く異なるパターンを示していた。従って、上記のう子回収法により、原虫内に存在する細菌が検出され、その細菌は、全糞便中の細菌叢の構成とは大きく異なることが示唆された。より詳細に細菌の検出を行うため、次世代シーケンサーを用いて全糞便細菌叢および原虫内細菌の 16S 配列の可変領域を各々約 1000 万リ

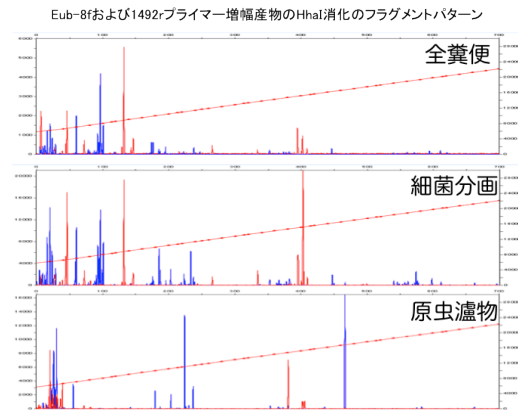


図 8 各分画における 16S rRNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 解析の比較

ード解読し、網羅的および定量的に属レベルでの比較を行った (図 9)。原虫内の細菌は、

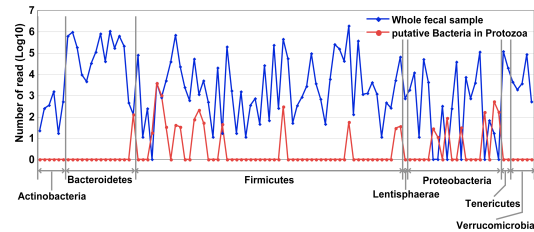


図 9 次世代シーケンサーを用いた全糞便細菌叢および原虫内細菌の全体像の比較図

Leuconostoc 属の配列の割合が最も多かったため、全糞便細菌叢で検出された同属のリード数に合わせて比較を行った。全糞便細菌叢に於いて最優位な細菌は、原虫内ではほとんど検出されなかった。また、全糞便細菌叢では検出限界以下であった細菌が、原虫内から検出されていた。原虫内に存在することが示唆された細菌は、Bacteroidetes に含まれる *Chryseobacterium*、Firmicutes の偏性嫌気性細菌および通性嫌気性細菌の一部、微好気性細菌の *Arcobacter*、通性嫌気性細菌の Beta および Gammaproteobacteria の一部であった (図 10)。主に、偏性嫌気性細菌および通性嫌気性細菌が検出されたことから、原虫のう子内の酸素分圧は非常に少ないことが示唆され、偏性嫌気性細菌が自然環境中で酸素に曝露されず生存することが可能であることが示唆される。また、のう子内の細菌は、糞便全体の細菌叢とは異なり、特異的な種類に限定されていたため、原虫内に内在可能な細菌は、細菌叢中の限られたものである可能性が示唆された。

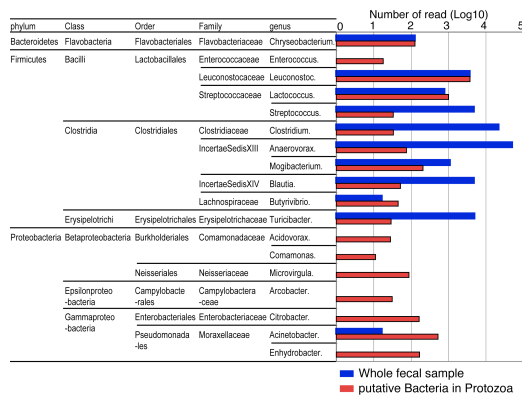


図 10 原虫内に存在した細菌と全細菌叢の属レベルの比較図

⑤ 原虫内に存在する細菌が生存しているかを確認するため、蛍光染色を行い、生菌の有無および原虫内での局在を観察した(図 11)。*Balantidium* 属の原虫のう子と思われる大型のう子の食胞状の形態内に CTC で染色された像が確認された。CTC は細胞の代謝活性に伴い産生される NAD(P)H により還元され、色素を生成し、生菌のみを染めることが可能であり、真核生物では染色されない。従って、う子の食胞状の形態内に生菌が存在することが示唆された。

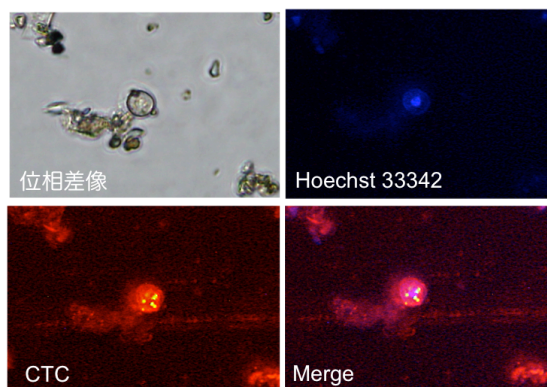


図 11 原虫のう子内の生菌の蛍光顕微鏡像

⑥ 以上の結果から、家禽および家畜の細菌叢は、主に牧場や飼料に依存して同様な構成を示すことが明らかとなった。また、今回供試した放牧されている牛の腸管内には、これまでに報告の無い、新規の *Balantidium* 属原虫が存在しており、糞便中にはその原虫のう子が多く存在していることが明らかとなった。更に、*Balantidium* 属原虫のう子には、腸管内細菌叢の組成比率とは大きく異なった、偏性嫌気性および微好気性細菌を含む限られた種類の細菌が存在しており、蛍光顕微鏡観察の結果、それら細菌はう子の食胞状の形態内で生存していることが明らかとなっ

た。酸素の曝露により死滅し易い細菌が、自然環境中で酸素に曝されず、原虫のう子内で生存することが可能であることが示唆され、それら細菌は原虫のう子をベクターとして利用し、次の宿主へと伝播する可能性があることが示唆された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究により、放牧された牛の糞便から、これまで国内外でも報告の無い新規の *Balantidium* 属原虫を検出したことは、寄生動物学の分野に於いて非常にインパクトが高いと思われる。また、腸管内の細菌が腸管内の原虫を“乗り物”として、次の宿主へと伝播することが可能であることを見いだしたことは、細菌の新たな伝播機構の解明へと繋がることと思われ、細菌学と寄生動物学との融合が期待されるものと思われる。

(3) 今後の展望

腸管内は、細菌だけが“フローラ”を構成している訳ではない。従って、腸管内に於ける細菌と原虫の相互関係および共生関係をより詳細に解明し、それら両者がどのように宿主に影響を及ぼすかを明らかにする必要性がある。最終的には三者間の相互関係を理解し、“真の共生関係”を理解する必要性がある。それに伴い、下記の案件をまずは解明して行く必要性がある。

① のう子内に内在する細菌には、自然環境中では生存し難い種類の細菌が検出された。これら細菌の、う子をベクターとした新規伝播機構を解明するため、う子内の細菌が新たな個体の腸管内に定着が可能かを解明する必要性がある。

② 腸管内にはこれまで報告の無い新規原虫がまだ多数存在する事が示唆されたため、より詳細な腸管内の原虫の検出および存在比率を理解する必要性がある。メタゲノム解析等による、網羅的な解析も必要であるが、未だ塩基配列が全く不明な原虫も多く、メタゲノム解析により得られた配列が、どの原虫の配列由来なのかを見極めるのは不可能である。そのため、新規原虫の分離培養のための新たな手法を考案し、分離された原虫のゲノム解析を多数行い、塩基配列データベースの充実化を図る必要性もある。

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)

[学会発表] (計 4 件)

関塚剛史、井上智、黒田誠、動物腸管内の細

菌叢および原生動物叢の検出・同定、第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 13 日、名古屋

関塚剛史、黒田誠、illumina GAII による 16S rDNA 配列を用いた網羅的且つ定量的な細菌叢解析、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 28 日、横浜（口頭発表）

関塚剛史、黒田誠、Meta 16S ribosomal DNA direct short read sequencing: a novel comprehensive and quantitative approach for microbial flora analysis using next-generation sequencer、BMB2010、2010 年 12 月 8 日、神戸

関塚剛史、黒田誠、動物腸管内の原生動物に内在する細菌と細菌叢と原生動物叢の共生関係、第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会、2011 年 7 月 17 日、東京（口頭発表）

※備考；2011 年 3 月 29 日に執り行われる予定であったが、東日本大震災の影響で 2011 年 7 月 17 日に延期された。

6. 研究組織

(1)研究代表者

関塚 剛史 (SEKIZUKA TSUYOSHI)
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官
研究者番号：40462775

(2)研究分担者

(3)連携研究者