

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月24日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21500389
 研究課題名（和文） 各種実験動物における膣内細菌叢の生態に関する比較研究

研究課題名（英文） Ecology of vaginal flora in animals

研究代表者
 浦野 徹 (URANO TORU)
 熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授
 研究者番号：90101899

研究成果の概要（和文）：

霊長類の膣内細菌叢は、チンパンジー>ニホンザル>カニクイザル>アカゲザル>リスザル>ヨザル>コモンマーモセットの順に複雑な構成であり、膣内に共通する普遍的な主要な菌種は Streptococci であった。また、チンパンジー及びニホンザルについては、膣内細菌叢の構成が性周期に影響されるか否かを検討したところ、マウス・ラットと同様に、性ホルモンであるエストロゲンの影響を受け変動することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Vaginal flora in primate is complicated in order of chimpanzee > Japanese monkey > crab-eating monkey > rhesus monkey > squirrel monkey > owl monkey > common marmoset. The universal main bacterial kind to be common in vagina was Streptococci. It was suggested that the constitution of the vaginal flora of a chimpanzee and the Japanese monkey was affected by estrogen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：細菌叢・膣・膣内細菌叢・実験動物・霊長類・カニクイザル・コモンマーモセット・アカゲザル

1. 研究開始当初の背景

生体が外界と接する部位、すなわち、皮膚、鼻腔、口腔、消化管には、その部位の環境に適した細菌が常に生息して正常細菌叢を構

成しており、同様に、膣には膣内細菌叢が存在している。一方、ヒトの生殖器に膣炎などの病気を引き起こす病原微生物として、Gardnerella vaginalis、Neisseria

gonorrhoeae などの細菌、Candida albicans などの真菌、Trichomonas vaginalis、Chlamydia trachomatis などの原虫が知られており、これらの病原微生物の病原性などを検討する研究にはマウス、ラット及びサルなどの動物種を用いて活発に行われている。これらの病原微生物の感染及び増殖に対して、腔内細菌叢が感染防御的な役割を果たしている可能性があることはカニクイザルを用いた研究 (Herthelius, M. et al: J. Antimicrob. Chemother. 29, 329-340, 1992) で示唆されているがその報告例は少なく詳細は明らかではない。ヒトの腔内には lactobacillus を最優勢とする細菌叢が形成され (Reid, G., et al: Microbes. Infect., 4, 319-324, 2002.)、この腔内細菌叢が上述のような外部からの病原微生物の侵入及び増殖を防止していると考えられている。

各種動物の正常腔内細菌叢に関する報告は、これまでにラットあるいはウサギなどの一部の実験動物で報告されているが、いずれの報告も古く、実験動物として多く使用されているマウス、ハムスター、モルモット等の動物種についてはほとんど明らかにされていない。また、腔内細菌叢の報告があったとしても、腔内細菌のサンプリング方法や培養方法等が実験者ごとに異なっているため、これまでに得られた腔内細菌叢の成績を動物種間で比較することができない。さらに、ヒトの腔炎感染症に関する研究にどのような動物を用いれば適切であるかは明らかにされておらず、従来この種の研究成果を解析する場合の正確さも欠けると言っても過言ではない。

以上から、申請者は各種動物の正常腔内細菌叢に関する基礎的な資料を蓄積することが極めて重要であると判断し、これまでに、ふつうの環境下で飼育されたマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ及びチンパンジーの腔内細菌叢について、同一のサンプリング方法や培養方法により検体を採取し、腸内細菌叢の検索方法に準じた培養方法で分離する方法を用いての予備的な検討を行った。その結果、マウスでは好気性菌が嫌気性菌よりも優性、ラット及びイヌでは好気性菌数と嫌気性菌数がほぼ同じ、ハムスターでは嫌気性菌が最優性菌で菌数も他の動物に比較して高かったのに対して、ウサギではほとんどの個体から細菌が分離されないなどの成績を得た (Urano, T., et al: Comp. Med., 53, 404-412, 2003)。つぎに、チンパンジーの腔内細菌叢の構成菌種はヒトと類似しており、最優勢菌は streptococci、

lactobacilli 及び Bacteroidaceae で、しかも他の動物種と異なり、ヒトと同様に lactobacilli が最優勢菌のひとつとして腔内に存在していることを明らかにした (Urano, T., et al: Comp. Med., 54, 705-712, 2004)。

2. 研究の目的

(1) これまでの申請者の予備的な研究によって、実験動物として用いられているマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ及びチンパンジーにおける腔内細菌叢は、動物種により異なることが明らかとなった。さらに、ヒトの腔内細菌叢、特に lactobacilli の役割を研究するための動物モデルとしては、これまでに調べた動物種の中ではチンパンジーが最も適しているのではないかと考えられた。チンパンジーは系統発生学的には最もヒトに近い動物種であることから実験動物としては極めて有用と位置づけられるが、反面、絶滅の恐れのある野生動物の保護を目的としたワシントン条約等の規制により種々の制約を受けるなど、動物実験に用いることが極めて困難な動物種でもある。そこで、今回の研究はこれまでに検討したマウス、ラットなどの動物種のみならず、チンパンジーよりも動物実験に使用しやすく、解剖学的構造や生理機能がヒトに近い霊長類にも対象を広げ、またこれらの動物の条件 (年齢、性周期、系統、飼育環境など) の違いによる腔内細菌叢も明らかにすることを目的とした。

(2) 申請者によってこれまでに明らかにされたマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ及びチンパンジーにおける腔内細菌叢の成績において、同一のサンプリング方法や培養方法を用いての一連の研究は、国内外を問わず皆無であり、学術的に極めて特色のある独創的なしかも着実な研究と考えられる。本研究より得られる成績は、各種実験動物の腔内細菌叢の生態を解明する上で重要な知見となるのみならず、実験動物を用いた腔内細菌叢に関連するさまざまな研究に対して有用な基礎的成績となり、特にヒトの腔炎感染症に及ぼす腔内細菌叢の影響などの研究に大きく寄与すると位置付けられる。

3. 研究の方法

(1) 申請者のこれまでの研究では、対象動物の腔内を洗浄した洗浄液を採取して1時間以内に細菌数を調べており、この時間内で培養すれば菌数に変動がないことを確認し

ている。しかし、本研究対象のひとつである霊長類は、申請者の研究室（腔内細菌叢を培養する実験室）からは車で3時間以内の距離のコロニーで飼育しているため、まず初めに、腔内から検体を採取して研究室まで輸送後に培養に供するまでの輸送用洗浄液に関する予備的な実験を行う必要がある。これらの予備実験は、霊長類を安楽死させて検討するのは困難であるため、チンパンジーほどではないが比較的複雑な腔内細菌叢をもつハムスターを用いて行う。

①ハムスターから採取した腔をホモジネートし、その乳剤中の細菌叢を定量培養する。この菌数値が腔内細菌叢としての正確な値と判断する。

②ハムスターの腔内を生理食塩水、リン酸緩衝食塩水、輸送用培地添加洗浄液などの各種洗浄液にて洗浄したのち、それらを室温、4℃、冷凍で保存し、1、2、3、4時間後にそれぞれの温度で保存した洗浄液中の細菌叢を検索する。

③①と②で得られた成績を検討して、霊長類の腔内細菌叢を検索するにあたり、検体採取から培養に供するまでの輸送用洗浄液に関する方法を確立する。以後の霊長類についての実験は、ここで確立した方法を用いて行う。霊長類以外の動物種でも、検体採取から培養に供するまで輸送する必要がある場合は、この方法に準じて行う。

(2) 3ヶ所のコロニーについて、カニクイザル、アカゲザル、ブタオザル、コモンマーモセットを対象として、種々の年齢、それぞれの性周期を確認しながら腔内細菌叢を検索する。

(3) 腔内細菌叢の検索方法は、光岡らによって既に確立されている腸内細菌叢の検索方法 (Mitsuoka, T., et al: Zbl. Bakt, Hyg., I. Abt. Orig. A, 234, 219-233, 1976.) に準じて、そして、実際の腔内細菌叢の検索方法は、申請者が既に報告 (Urano, T., et al: Comp. Med., 53, 404-412, 2003) した以下の*印の方法に従った。

*腔内細菌叢の分析方法

採取した腔の検体（腔内洗浄を数回繰り返した検体）は、直ちに気相部を100%の二酸化炭素で置換し、嫌気性グローブチャンバー内にて処理後、以下の分離培地に塗抹して37℃一定時間好気性あるいは嫌気性条件下にて培養後分類した。

*分離培地（括弧内は分離される細菌の種類）。

EG agar (Anaerobes), BL agar (Anaerobes), TS agar (Aerobes), NBGT agar

(Bacteroidaceae), BS agar (Bifidobacteria), ES agar (Eubacteria), VS agar (Veillonellaceae), NN agar (Clostridia), LBS agar (Lactobacilli), DHL agar (Enterobacteriaceae), TATAC agar (Streptococci), PEES agar (Staphylococci), PD agar (Yeasts, molds), NAC agar (Pseudomonas sp.)

4. 研究成果

腔内細菌叢の検体の輸送方法については、腔内を滅菌生理食塩水で洗浄した検体を嫌気性輸送培地に等量混合し氷冷保存するという方法によれば問題ないことが確認された。また、腔内細菌叢の検索方法については、FISH法を用いる場合は培養法との併用が望ましいと考えられた。

以上の方法を用いて腔内細菌叢の検索を試みた結果、腔内細菌叢はカニクイザルが最も複雑で、アカゲザルおよびリスザルが中程度、ヨザルおよびコモンマーモセットは非常に単純であることが明らかとなった。また、ヒトの腔内で非常に重要な役割を果たしていると考えられる lactobacilli (乳酸菌) について、アカゲザルでは分離頻度はそれほど高くなかったものの分離菌数はヒトやチンパンジーと同様に高い値を示していたことから、今後さらに詳細な検討を行うことにより、ヒト腔内における lactobacilli を研究するためのモデル動物としての有用性について検討する必要があると考えられた。以上のように、腔内細菌叢はマウス・ラット等の実験動物の動物種ばかりでなく、霊長類の種類によっても異なることが示唆された。今後さらに原始的な原猿類やそれから進化した真猿類に属する霊長類の腔内細菌叢を調査することにより、腔内における lactobacilli の系統発生的な起源についても検討したいと考えている。

つぎに、ニホンザルの腔内細菌叢について月経周期を踏まえて詳細に検討したところ、Streptococci, Corynebacteria, Bacteroidaceae 及び GPAC がニホンザルの腔内における主要な構成菌種であることが示唆された。また、総菌数はエストロゲン濃度が高くなる卵胞期で最も高くなる傾向を示した。

以上から、霊長類の腔内細菌叢は、チンパンジー>ニホンザル>カニクイザル>アカゲザル>リスザル>ヨザル>コモンマーモセットの順に複雑な構成であり、霊長類の腔内細菌叢に共通する普遍的な主要な菌種は Streptococci であること、またチンパンジーやニホンザルといった霊長類の腔内細菌叢もマウス・ラットと同様に性ホルモンであるエストロゲンの影響を受け変動することが示唆された。

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 3 件)

- ① 野口和浩、浦野 徹、園田佳世子、浴野 成生：細菌叢検索のための細菌定量法：FISH 法と培養法の違い、日本実験動物技術者協会第 45 回全国総会、2011. 9. 30、盛岡. 森岡市民文化ホール
- ② 野口和浩、劉 艶薇、浦野 徹：霊長類の腔内細菌叢、第 28 回九州実験動物研究会総会、2010. 10. 23、福岡. 福岡大学
- ③ 野口和浩、劉 艶薇、浦野 徹：カニクイザル、アカゲザルおよびコモンマーモセットの腔内細菌叢に関する検討、第 44 回日本実験動物技術者協会総会、2010. 9. 3、旭川. 旭川市民文化会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦野 徹 (URANO TORU)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：90101899

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者