

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659266

研究課題名(和文)細菌付着性多孔質微粒子を用いた腸内細菌培養法の確立

研究課題名(英文)A new culture method using bacteria-adhesive particles

研究代表者

福島 浩平 (Fukushima, Kouhei)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：20271900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：好氣的、弱酸性の特殊培養下における腸内細菌組成の変化について、細菌DNAの定量解析やTerminal restriction length polymorphism (T-RFLP) 解析により知見を得た。好氣的環境下でも10%ウシ胎児血清含有ハンクス緩衝液中で、一部の腸内細菌は増殖した。腸内細菌を3日間培養すると、予想通り通性嫌気性菌の優位は増加し、偏性嫌気性菌は優位に減少したが死滅せず再増殖可能であった。T-RFLP解析では、好氣培養においてピーク数が優位に減少し腸内細菌の多様性が失われた。また、pH4.5に保つことにより、腸内細菌の増殖が抑制されpH調節が感染制御に役立つ可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated changes of bacterial composition before and after 3 days culture of fecal bacteria under the aerobic or acidic condition by the molecular methods. A part of intestinal bacteria was able to grow in Hank's balanced salt solution containing 10% fetal calf serum under the aerobic condition. As was expected we observed the significant increase of facultative anaerobes and decrease of obligate anaerobes. However, *Bacteroides fragilis*, an anaerobe, could regrow after 7 days aerobic culture. Terminal restriction length polymorphism analysis demonstrated the decreased number of peaks after the aerobic culture, suggesting loss of bacterial diversity. The maintenance at pH 4.5 in cultures resulted in the inhibition of bacterial growth, suggesting possible contribution of pH control to prevention of bacterial infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：細菌培養

## 1. 研究開始当初の背景

次世代シークエンサーの登場により、腸内細菌の解析が一挙に進み様々な疾患との関連が指摘されつつあった。今後、疾患関連性に加え新薬の開発や予防法の確立への進展が重要になるが、そのためには腸内細菌と宿主細胞との相互作用を詳細に解析し発症に至るメカニズムを解明することが必要であると考えられた。

腸内細菌と宿主細胞との相互作用解析には、両者が共存する培養系が重要であると考えられる。そのために、腸内細菌を生体内と同様の構成と機能を保つことのできる *in vitro* の培養システムを構築しなければならない。しかし、腸内細菌の約 70% が培養法の確立していない「難培養菌」であり、まして機能的に腸内環境との相同性を維持する培養システムは存在しない。

一方、腸内細菌の構成や遺伝子発現に基づく機能は、(計画と方法)の項で記述するように、我々の行ってきた分子生物学的手法を用いることによって解析が相当程度可能である。すなわち、新規培養法による細菌叢と腸内細菌叢を正確に比較し、培養法の妥当性を検証できる。

従来の消化管シミュレーションによる培養法は、食餌類似栄養基質、粘液(mucin)、胆汁酸などを含有し、pH 環境と嫌気状態を確保した培養液中での液相培養であった。しかし、実際の糞便では腸内細菌はセルロース束などの小塊に付着し小さな隙間に入り込みながら存在しており、土壌細菌などと同様微粒子の空隙で定着増殖するとされる。しかも重要なことは、細菌の存在状態(浮遊と付着)により、菌増殖能やその特性が大きく変化することである。単なる液相培養中の細菌叢が、粒塊が多数存在する腸内環境で生息する細菌と構成、性質が異なるのはある意味必然であるにも拘わらず、かかる視点が全く欠落していた。したがって、腸内細菌を何らかの支持体に固着させて培養することのシステムが重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、セルロース粒子、チャコール(活性炭)などの細菌付着性多孔質微粒子を培養系に加え、細菌の固着性を確保することにより腸内環境の再現を図り、腸内細菌の構成と機能を生体内と

同様に維持・培養する *in vitro* のシステムを構築すること、また、固着培養菌の性質を調べることであった。

## 3. 研究の方法

### 細菌付着性多孔質微粒子の選択:

粒子の材質としては、天然高分子であるセルロース、活性炭と腸内細菌の吸着性を検討した。そのために、液相培養系にこれらの粒子を加え、振盪培養した。

### 培養条件の設定:

培養液として Molly らの方法に準じ、arabinogalactan, pectin, xylan, starch, glucose, yeast extract, proteose pepton, mucin, cysteine, 10 種の trace element, 8 種の vitamin とした。

### 腸内細菌液の調整:

健常成人ボランティアより採便後直ちにリン酸緩衝液を 100mg/ml になるように加え滅菌ガラスビーズ(2mm)を加えボルテックスした。低速で遠心したのち、上清を採取しそれを菌液とした。また、リファレンス細菌として、利権バイオリソースセンターより提供された *Escherichia coli* (JCM1649)、*Staphylococcus aureus* (JCM2413)を用いた。

### 細菌付着性多孔質微粒子への付着性の検討:

粒径 4mm で統一したセルロース粒子(レンゴー)、活性炭粒子(以上和光純薬)への付着性を検討した。培養後、ホルマリン固定し切片を作成、グラム染色を施行した後、光学顕微鏡下で観察した。

### 細菌 DNA の抽出:

Guanidine EDTA Sarcosyl 溶液とガラスビーズにより細菌を破碎した。フェノールクロロホルム処理の後、イソプロパノールを加え沈殿させた後、70%エタノールで洗浄、乾燥後 TE 緩衝液に溶解した。DNA の濃度は、260nm 吸光度測定により算出した。

### 細菌の定量:

SYBR Green Realtime PCR Master Mix (東洋紡)、Eagle Master Mix Kits (Roche Applied Science) を用い、ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により定量した。スタンダ

ード用プラスミドは、PCR クローニングにより調整しシーケンスにより塩基配列を確認した。

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)法による解析：Phusion Bacterial Profiling Kit を用い、Microbiota Profiler (InfoCom T-RFLP Database & Analysis Software, InfoCom) を用いてクラスター解析を行った。

#### 4. 研究成果

生体内で見られるような細菌の接着期待される足場材料を選択し、生体内との類似環境において培養しうるシステムの構築が、研究の成否を握る鍵であると報告した。この点に関連し、嫌氣的培養環境の維持、培養液組成、pH の制御が特に重要であったが、それらを満足するシステムは構築できなかった。

糞便より採取した腸内細菌、リファレンス細菌として *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus* を前記培養液中で各種条件下足場粒子と1週間培養し、粒子への接着性をグラム染色により検討した。固定後であっても洗浄により多くの細菌は遊離してしまい、強固な付着は確認されなかった。

特殊な実験条件ではあるが、腸内細菌組成が好氣的培養環境化においてどのように変化するのか、また、pH を弱酸性に保つことによってどのような効果があるのかについて、予定していた細菌 DNA を用いた定量解析や Terminal restriction length polymorphism (T-RFLP) 解析により知見を得ることができた。

(1) 好氣的環境下で血清を用いた培養 Hank's balanced salt solution にウシ胎児血清を添加する(5~20%) ことにより、好氣的環境下においても一部の腸内細菌は増殖する。糞便から調整した腸内細菌を3日間培養すると、予想通り通性嫌氣性菌である *Escherichia coli*、*Enterococcus species*、*Enterococcus faecalis*、*Lactobacillus species*、などが統計学的に有意の増加を示し、偏性嫌氣性菌である *Clostridium coccoides*、*Clostridium leptum*、*Bacteroides fragilis*、*Prevotella species*、*Bifidobacterium species* など有意に減少した。しかし、少なくとも一部の嫌氣

性菌は好氣的環境においても必ずしも死滅するわけではなく、7日間培養後においても *Bacteroides fragilis* は選択培地を用いた嫌氣培養によって再増殖が可能であった。

(2) T-RFLP 解析を用いた解析 T-RFLP 解析においても、好氣的環境においてピーク数が優位に減少し腸内細菌の多様性が失われる傾向であった。また、クラスター解析でも培養前と後で集団を形成した。

(3) 弱酸性 (pH4.5) での培養 pH を弱酸性 (pH4.5) に保つことにより、腸内細菌の増殖を抑制されることから、腸内細菌感染創における pH 調節が感染コントロールに役立つ可能性が考えられた。

本研究では、腸内細菌が固着するような適切な基材を見出しえなかったが、血清を用いた好氣的環境での培養という特殊環境下での知見を得ることができた。生理的には考えにくい状況ではあるが、たとえば消化管手術で適応となる人工肛門周囲の環境はこれと類似していると考えられる。日常生活でストーマからの排泄物を溜め置くディスポーザブルの袋 (パウチ) と皮膚の接着部に皮膚保護剤が使われているが、感染を防止する術として、この皮膚保護剤は排泄物や消化液による pH 変化を緩衝して皮膚 pH (4.5~6.5) に近く保つ、また通気性を付与するなど多面的に細菌感染や皮膚炎を防ぐ仕組みとなっている。本研究の結果は、これらの臨床実態に合致する。見方を変えれば、本研究で行ったさまざまな手法が、新たな臨床機材を生み出す際の有力な手段となる可能性を示している。

腸内環境とる支持した腸内細菌培養システムの構築を目指して、更なる研究が必要とされるものと考えられる。

#### 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6件)

1. 福島 浩平、渡辺和弘、神山篤史、長尾宗紀、舟山裕士、高橋賢一、佐々木健吾、齋藤 喬. 回腸嚢炎 成人病と生活習慣病 44: 335-339, 2014 (査読なし)
2. Kazuhiro Watanabe, Iwao Sasaki,

- Kouhei Fukushima, Kitaro Futami, Hiroki Ikeuchi, Akira Sugita, Riichiro Nezu, Tsunekazu Mizushima, Shingo Kameoka, Masato Kusunoki, Kazuhiro Yoshioka, Yuji Funayama, Toshiaki Watanabe, Hisao Fujii, Mamoru Watanabe. Long-term incidence and characteristics of intestinal failure in Crohn's disease: A multicenter study. J Gastroenterol. 49: 231-238, 2014 (査読あり)  
DOI 10.1007/s00535-013-0797-y
3. Kaori Sasaki, Martha Igarashi, Manami Hinata, Yuna Komori, Kouhei Fukushima. Simulation of drug release from PLGA particles in vivo. J Drug Delivery 1: 1-8, 2013 (査読あり)  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/513950>
  4. Araki T, Okita Y, Uchino M, Ikeuchi H, Sasaki I, Funayama Y, Fukushima K, Futami K, Maeda K, Itabashi M, Hase K, Motoya S, Kitano A, Mizushima T, Maeda K, Kobayashi M, Mohri Y, Kusunoki M. Risk factors for surgical site infection in Japanese patients with ulcerative colitis: a multicenter prospective study. Surg Today Published on Line 2013 (査読あり)  
DOI 10.1007/s00595-013-0809-9
  5. 渡辺和宏、柴田 近, 小川 仁, 長尾宗紀, 羽根田 祥, 工藤 克昌, 神山篤史, 鈴木 秀幸, 三浦 康, 内藤 剛, 鹿郷 昌之, 田中 直樹, 大沼 忍, 佐々木 宏之, 海野 倫明, 福島 浩平 炎症性腸疾患の経過 潰瘍性大腸炎の術後経過. 胃と腸 48: 731-736, 2013 (査読なし)
  6. M Hinata, A Kohyama, H Ogawa, S Haneda, K Watanabe, H Suzuki, C Shibata, Y Funayama, K Takahashi, I Sasaki, K Fukushima. A Shift from Colon- to Ileum-Predominant Bacteria in Ileal-Pouch Feces Following Total Proctocolectomy. Dig Dis Sci 57: 2965-2974, 2012 (査読あり)  
DOI 10.1007/s10620-012-2165-9
- [学会発表](計6件)
1. 高橋賢一, 舟山裕士, 徳村弘実, 豊島隆, 武者宏昭, 西條文人, 松村直樹, 野村良平, 武藤満完, 安本明浩, 松村勝, 山田佳緒里, 福島浩平, 小川仁, 羽根田祥, 渡辺和宏, 鈴木秀幸, 佐々木巖 Surgical Site Infection 予防最新プラクティス 炎症性腸疾患手術例における切開創手術部位感染予防 有効な予防策と問題点の検討. 第 112 回日本外科学会 2013/11/28 福岡
  2. 荒木 俊光, 大北 喜基, 内野 基, 池内 浩基, 佐々木 巖, 舟山 裕士, 福島 浩平, 二見 喜太郎, 前田 清, 飯合 恒夫, 板橋 道朗, 小林 美奈子, 毛利 靖彦, 楠 正人 潰瘍性大腸炎に対する多施設共同手術部位感染症サーベイランス 第 26 回日本外科感染症学会 2013/11/25 神戸
  3. 高橋 賢一, 舟山 裕士, 生澤 史江, 西條 文人, 福島 浩平, 小川 仁, 羽根田 祥, 渡辺 和宏, 神山 篤史, 鈴木 秀幸 難治性潰瘍性大腸炎の治療選択(寛解導入と寛解維持) タクロリムスとインフリキシマブの登場は潰瘍性大腸炎の外科治療移行のタイミングや手術成績に影響を与えたか? 第 68 回日本大腸肛門病学会 2013/11/15 東京
  4. 虻川 大樹, 村山 晶俊, 梅林 宏明, 阿部 弘, 稲垣 徹史, 三浦 克志, 天江 新太郎, 佐藤 智行, 中村 恵美, 武山 淳二, 福島 浩平, 武田 弘明, 磯部 秀樹 とともに大腸全摘に至った重症潰瘍性大腸炎の父子例 第 40 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2013/11/1 東京
  5. 高橋 賢一, 舟山 裕士, 生澤 史江, 徳村 弘実, 豊島 隆, 武者 宏昭, 西條 文人, 松村 直樹, 武藤 満完, 安本 明浩, 福島 浩平, 小川 仁, 羽根田 祥, 渡辺 和宏, 鈴木 秀幸, 佐々木 巖 Crohn 病症例の大腸(亜)全摘術における HALS の適応と成績 第 25 回日本内視鏡外科学会 2012/12/6 横浜
  6. 高橋 賢一, 舟山 裕士, 生澤 史江, 徳村 弘実, 豊島 隆, 武者 宏昭, 西條 文人, 鈴木 洋, 松村 直樹, 武藤 満完, 安本 明浩, 又吉 信貴, 澤田 健太郎, 柴原 みい, 福島 浩平, 小

川 仁, 渡辺 和宏, 羽根田 祥, 鈴木  
秀幸, 佐々木 巖 炎症性腸疾患手術  
例に対する術前の完全静脈栄養の栄  
養アセスメント蛋白改善効果に関す  
る検討 第49回日本外科代謝栄養学会  
2012/7/5 浦安

〔図書〕(計2件)

1. 福島浩平、羽根田祥、佐々木巖。「大腸全摘術後残存象徴の適応現象について」佐々木巖、杉田 昭、二見喜太郎編, 炎症性腸疾患外科治療のすべて MEDICAL VIEW 社 東京 118-121, 2013
2. 福島浩平、渡辺和宏、佐々木巖。「回腸囊炎(pouchitis)」佐々木巖、杉田昭、二見喜太郎編, 炎症性腸疾患外科治療のすべて MEDICAL VIEW 社 東京 99-101, 2013

〔その他〕

ホームページ等

[www.fukushimalab.med.tohoku.ac.jp](http://www.fukushimalab.med.tohoku.ac.jp)

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 浩平 ( FUKUSHIMA, KOUHEI )  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：20271900