

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630383

研究課題名(和文) *in vivo* 培養システム：生体内に生息する未培養細菌の獲得と解明研究課題名(英文) *in vivo* cultivation: cultivation of microorganisms inhabiting in other organisms

研究代表者

青井 議輝 (Aoi, Yoshiteru)

広島大学・サステナブル・ディベロップメント実践研究センター・特任講師

研究者番号：40386636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物の体内(体表面)には多数の微生物(細菌・古細菌)が共生していることが知られているが、そのほとんどが分離培養困難なため生体内における常在細菌の機能や宿主への影響は十分に明らかになっていない。そこで、本研究は新しい分離培養手法(*in vivo*培養)を開発することで課題を解決すること具体的には生物の体内に挿入して操作可能なデバイスを開発し、効果を実証することを目的とした。複数の培養デバイスの構築に成功し、そのうち一つのデバイスの性能を検証した結果、*in vivo*培養法を用いた場合に培養性能が著しく高くなることが判明した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that extremely high diverse microorganism inhabit in the body of other living organisms such as animal, human, plant. However, most of them usually do not grow under artificial medium (unculturable). Our objective is to develop new cultivation methods (*in vivo* cultivation system) targeting such microorganisms inhabiting in other organisms, and show the advantage of newly designed methods compared with the conventional method. As a result, we succeeded to design and develop some of *in vivo* cultivation devices. We selected one of them and applied to the marine Sponges. Approximately 60 isolates were obtained from two methods (*in vivo* and standard agar plating), and comparatively analyzed their 16S rRNA gene. The diversity and the ratio of new species (sharing less than 97% of similarity to the cultivated species) are significantly higher in the isolates from *in vivo* cultivation.

研究分野：微生物生態学

キーワード：分離培養 難培養性微生物

1. 研究開始当初の背景

地球上には、ありとあらゆる環境中に膨大な数・種類の微生物(細菌・古細菌)が存在しているが、それら環境中の微生物の99%以上は未だ培養できないことが知られている。一方、ヒトの体内(体表面)にも同様に多数の微生物(細菌・古細菌)が共生し、功罪両面で健康や活動そのものへ直接的および間接的に大きな影響を与えていることが知られている。また、ヒトに限らず、様々な生物の体内には同様に多数の微生物が生息しており、それぞれの個体の生命活動に重要なインパクトを与えている。そこで、生物の体内に生息する細菌の生態や機能を理解・制御・利用することは幅広い分野(農林水産・環境・医薬)における重要課題の一つであると言える。

しかし、前述の通り、生体内に生息する微生物もそのほとんどが培養できないこと、特に生体内という特殊な環境に生息しているためそれらにアクセスして直接解析することが困難なことから、生体内における常在細菌の機能や宿主への影響は十分に明らかになっていない。

ところが、寒天平板培養法が登場してから、分離培養の方法論は150年前からさほど進展していない。手法自体は既存の方法論を基盤にしつつ様々な有効な工夫がなされてきたが(培地組成、ゲル化剤、ハイスルーブット操作など)、今日に至るまで平板培養法が主要な手法であり続けているのも事実である。すなわち、新規手法のほとんどが既存の手法をベースにした工夫の範囲に収まるものであり、新しいコンセプトに基づく手法開発は、培養費依存的な解析方法の進展に比較すると著しく少ないと言える(Aoi et al, MEM4 2015 [文献2])。さらに、またなぜ多くの微生物が培養できないかと言う理由も解明されていない。

一方、技術革新または新しいコンセプトに基づいた新規手法の開発はブレークスルーを起こすという観点において重要ではないかと考えられる。そこで革新的な培養方法の開発は難培養性細菌の培養化を導き、生体内細菌の機能解明という重要課題のブレークスルーになるのではないかと考えられる。

微生物が実際に生育している環境を模擬

することは培養条件として重要だと考えられるが、その認識に基づいて近年、実環境を高度に模擬する分離培養手法が大きく着目されている。環境中の微生物は単独に生育しているわけではなく様々な微生物同士で高度なネットワークを形成して異種間・同種間において相互作用を伴いながら生息していることが推察される。そして、それらが微生物の増殖に必要な1つの要素である可能性は高い。しかし、従来の培養技術でそういった環境を再現することは不可能であった。一方で、新しい培養手法のコンセプトとして *in situ* 培養が挙げられる。*in situ* 培養とは膜を利用したデバイスを用いて実環境中で分離培養を行う方法であり、Diffusion Chamber という手法などが挙げられる。本手法では環境微生物を接種したアガロースゲルを孔径 $0.03 \mu\text{m}$ のポリカーボネート製のメンブレン2枚の間に挟みこみ、この Chamber をサンプルソースの環境内で培養する。外側の環境は多種類の微生物が雑多に存在しており、多孔性メンブレンを介して実際の環境で起こっている様々な微生物間相互作用を再現可能にしている。また、中空糸膜を利用した培養手法(Hollow fiber membrane chamber)も有効な手法である。本手法では孔径 $0.1 \mu\text{m}$ の1本の中空糸膜を培養器として内部で微生物の培養を行う。装置自体を実際の環境に設置して培養を行うことが可能であり、多孔性膜を介して分子・イオンなどは移動可能であるため、微生物間相互作用や基質供給を含めた高いレベルでの環境条件の再現が可能になっている。類似したコンセプトに基づいて他にも既にいくつかの手法が提案され、本手法を適用することで、特定の微生物との共培養時のみ、従来のプレート培養で培養できるようになる微生物の存在も確認されている(9-11)。

2. 研究の目的

そこで本研究では *in situ* 培養のコンセプトを拡大して、大型生物の体内またはその細胞との共培養が可能なデバイスを開発し、実証することを目的とした。

- 1) 生物の体内に設置して操作可能な、微生物の分離培養デバイスを開発する。具体的には *in situ* 培養のコンセプトを応用

してメンブレンをと微小ゲル粒子 Gel Micro Droplet を組み合わせた培養方法（ハイスルーブット in vivo 培養手法）確立する。メンブレンには中空糸膜を利用することで装置全体をコンパクトにすることが可能となり、様々な生体内に設置可能になると見込まれる。

- 2) 他の生物の細胞と共培養可能な分離培養デバイスを開発する。メンブレンを利用することで、ヒト細胞など他の細胞と共培養可能なデバイスを作成する。
- 3) 生物の体内へ設置して培養を行いその効果を実証する。本研究ではカイメンに着目し、カイメンの内部に上記デバイスを挿入、設置して培養を行う。その際、構造的かつ強度的に十分耐えられるかどうか、実際に微生物を培養できるかどうか、獲得された分離株の多様性や新規性の点で検証を行い、デバイスのタイプや構造を変更しながら性能の向上を行う。
- 4) 上記の検討で確定した in vivo 培養デバイスを用いて 50~100 株程度分離株を獲得する。16S rRNA の遺伝子解析を行い、従来の培養法と獲得できた分離株とその新規性や多様性を比較する。

3. 研究の方法

(1) ハイスルーブット in vivo 培養デバイスの開発

微生物細胞を所望の密度で混入させて作成した微小ゲル粒子（低融点アガロースゲルで作成）と 0.8% のアルギンサンナトリウムをゾル状態で体積比 1:2 の割合で混合する。次に、事前にエタノールと水置換を通じて親水化処理を施した孔径 0.1 μm の多孔性中空糸膜（PDVF 製）の内部にその混合物を注射針お

よびシリンジを用いて注入する。その後、2% 塩化カルシウム溶液に浸漬させて、アルギン酸ナトリウムをゾル状態からゲル状態に移させる。サンプルを回収する際は、EDTA 溶液に浸漬させた後、シリンジで回収する。

(2) 細胞と共培養可能な分離培養デバイスを開発

厚さ 1 mm 程度のシリコン樹脂の枠組みと孔径 0.1 μm のポリカーボネートメンブレン（isopore membrane, Millipore）、注射針（27G）、低融点アガロースゲル微粒子（Sea Plaque）、アルギン酸ナトリウムゲルを用いて作成した。

(3) 最適な in vivo デバイスの選択

中空糸膜を用いたデバイス、Gel Microdroplet を用いた手法、および Diffusion Chamber（低融点アガロースゲル）を比較した。

(4) in vivo 培養の実証試験

海水をかけ流しながら飼育している海洋性カイメンの一部を切り取り、すりつぶしてサンプルとした。サンプルを希釈し低融点アガロースと混合、Diffusion Chamber（メンブレン：孔径 0.1 μm のポリカーボネートメンブレン、枠：0.1 幅 1.5 cm 長さ 4 cm 厚さ 5 mm のシリコン樹脂）内部に流し込み冷却してゲル化させた。植菌した in vivo 培養デバイス（Diffusion Chamber）はカイメンに切り込みを入れてその内部に挿入した。設置後 1 週間程度そのままの状態を保ち、その後、カイメンからデバイスを取り出して、2 次培養に供試した。2 次培養には寒天平板培養を行い、その培地には R2A および人工海水を用い、ゲル化剤は 1.5% Agar を用いた。その後出現したコロニーをピックアップし、さらに純化させた。

同時にカイメンサンプルから直接上記の培地（寒天平板）に植菌した培養系も用意し、

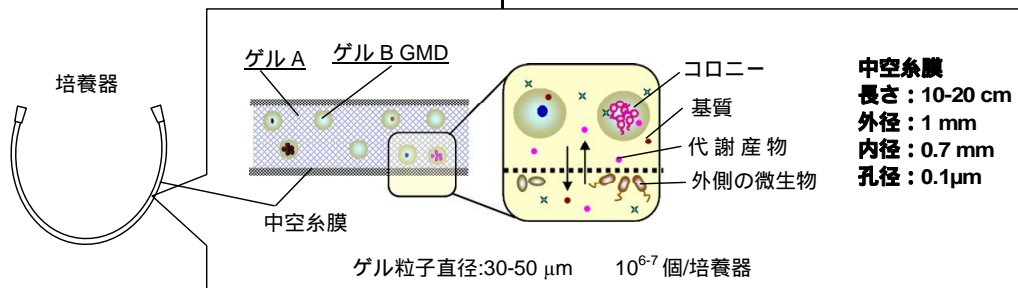


図1 ハイスルーブット in vivo 培養デバイス

同様にコロニーを出現させてその後ピックアップしそれをさらに純化させた。

それぞれのコロニーに対して、ユニバーサルプライマー（27F-1492R）を用いて直接PCRを行い、16S rRNA 遺伝子を増幅、DNA シーケンス解析を行った。

4. 研究成果

(1) ハイスループット in vivo 培養デバイスの開発

研究の方法の項目で記載した構造のデバイスを実際に作成し、さらに同デバイスを用いて微生物が分離培養可能なことを確認した(図1)。

(2) 細胞と共培養可能な分離培養デバイスを開発

研究の方法の項目で記載した構造のデバイスを実際に作成し、さらに同デバイスを用いて外側・内部両面で無菌操作が可能であることを確認し、原理的に細胞との共培養を通じて微生物を分離培養可能なことを確認した(図2)。

(3) in vivo 培養デバイスの選択

複数のデバイス(ハイスループット in vivo 培養、中空糸膜を用いた方法、平型のデバイスなど)を試行した結果、平型かつ長方形の Diffusion Chamber(メンブレン:孔径 0.1 μ m のポリカーボネートメンブレン、枠:0.1 幅 1.5 cm 長さ 4 cm 厚さ 5 mm のシリコン樹脂)タイプのデバイスおよび方法が最もカイメン内部に設置するデバイスとして適してい

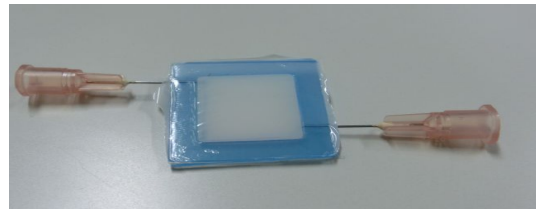


図2 共培養用デバイス

ることが判明した。

(4) in vivo 培養の実証試験

in vivo 培養を通じて獲得した分離株および直接平板に植菌した培養法(平板法)で獲得した分離株をそれぞれ約60株比較して16S rRNA 遺伝子解析を行ってそれぞれの多様性および新規性について従来法と in vivo 培養法の比較を行った。その結果、手法ごとに獲得された分離株の種類は大きく異なることが判明した。それぞれから取得された60株のうち両方の手法から獲得された種類は1種類だけであった。さらに in vivo 培養手法、特に Diffusion Chamber 法および連続集積培養を通じて獲得された分離株は、多様性および新規性の高い菌株(既存株に対する 16S rRNA 遺伝子の相同性が97%以下)の割合が従来法のそれと比べて著しく高いことが判明した(図3)。平板培養ほうでは1菌株だけが既存株との相同性が97%以下であったのに対して、in vivo 培養法では18株が97%以下の相同性を示した。

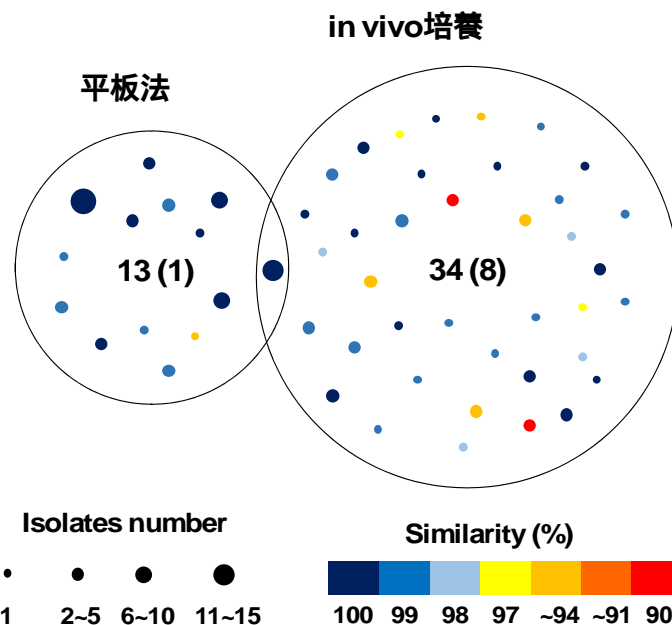


図3 in vivo 培養と寒天平板培養法で得られた分離株の比較、小さな円の数はそれぞれの培養手法で得られた種類数を意味し、円の大きさは分離株の数を意味する。また色によって既存株との相同性を表現した。

(5) まとめおよび今後の展望

生物の体内で微生物を分離培養できるデバイスの開発を目指して検討を重ねた結果、複数のデバイスを開発するに至った。実際に一つのデバイスを選択して生体内(カイメン)で分離培養を行ったところ、従来法と比較して分離培養性能が著しく高いことが判明した。

したがって本研究成果は微生物の新しい有効な分離培養手法として提案できるだけでなく、宿主と微生物の相互作用を解明するツールとして用いることも可能である。

今後は、得られた結果を精査すべくスケールを上げてかつ複数の手法を平行して評価解析する必要がある。また異なる生物への適用性を評価していくことが考えられる。

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0件)

[学会発表](計2件)

2. Yoshiteru Aoi, Innovation for cultivating unculturables, 2nd Hiroshima International Symposium on Sustainability Sciences, Nov.6, 2014, Hiroshima, Japan.

1. Yoshiteru Aoi, New methods for cultivation of unculutreds, Aoi, International workshop on in-situ enrichment of marine microbes (IEMM), Nov. 5, 2013, Xiamen, China

[その他]

広島大学 研究者総覧:

<http://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.4589d6839899bfc5520e17560c007669.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青井 議輝 (AOI YOSHITERU)
広島大学・サステナブルディベロップメント実践研究センター・特任講師
研究者番号: 40386636

(2) 研究分担者

金本 大成 (KANAMOTO TAISEI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20260755