

平成 27 年度 博士学位論文

感染症予防に向けた
免疫活性化物質の探索

指導教授 見明 史雄

福岡大学大学院 薬学研究科薬学専攻

所属研究室 微生物薬品化学

学籍番号 PD121001

氏名 上田 紗織

Saori Uyeda

目次

第1章 獲得免疫活性化物質の探索 ～新たなアジュバントの探索～	2
緒言	2
第1節 ミルセンの抗体産生誘導効果の検討	5
第2節 ミルセンの抗体産生誘導型の検討	8
第3節 ミルセンの Ag85B に対する抗体産生誘導効果の検討	12
第4節 小括	15
第2章 自然免疫活性化物質の探索 ～初期感染防御と獲得免疫の増強～	18
緒言	18
第1節 蚊の採集・乳酸菌の単離	21
第2節 Ohori 株の形態学的特徴	23
第3節 Ohori 株の生理・生学的特徴	25
第4節 Ohori 株の遺伝学的特徴	29
第5節 Ohori 株の自然免疫活性化作用の検討	35
第6節 小括	37
総括ならびに結論	43
実験の部	45
引用文献	74
謝辞	83

第 1 章 獲得免疫活性化物質の探索 ～新たなアジュバントの探索～

緒言

感染症は、人類が長年にわたり闘っている課題である。世界において、感染症は減少傾向にあるものの、死因の第 4 位が下気道感染症、6 位と 7 位が HIV/エイズ、および下痢性疾患であり、低所得国に限定すると、死因の第 1 位から 3 位を感染症が占めている[1]。日本でも、死因の第 3 位の肺炎の多くは感染症によるもので[2]、より効果的な対策が望まれている。

感染症の予防には、免疫の活性化が重要である。免疫には、感染初期に働く自然免疫と、抗原特異的防御を担う獲得免疫がある。病原体の侵入に対して即時的に働く自然免疫は、ナチュラルキラー細胞やマクロファージによる病原体の貪食、上皮細胞から分泌される抗菌ペプチドの働きにより[3]、病原体への攻撃や、病原体の体内へ侵入を防いでいる。自然免疫が、多くの動物が基本的に保有している免疫系であるのに対し、獲得免疫は、脊椎動物のみが保有し、抗原特異的に働く。獲得免疫では、まず、樹状細胞が病原体の一部を抗原としてヘルパー T 細胞に抗原提示する。そして、抗原提示されたヘルパー T 細胞により活性化したキラー T 細胞の働きや、ヘルパー T 細胞により活性化した B 細胞が産生する抗原特異的な抗体により、病原体への攻撃や、病原体の体内への侵入を防いでいる。以前は、哺乳類の免疫系において、獲得免疫が自然免疫に比べて高等で強力な免疫感染防御を行うと考えられてきた。しかし近年、自然免疫の活性化が獲得免疫の活性化に欠かせないということが分かってきた[4]。これらのことから、効果的な感染防御に必要なのは、自然免疫および獲得免疫、両免疫の活性化であると考えられる。自然免疫と獲得免疫の活性化は、免疫の起点である病原体のパターン認識受容体 Toll like receptor (TLR) を介することが知られている。TLR は、動物の細胞に広く発現しており、病原体の細胞壁の構成成分や、病原体内の DNA などを認識する受容体である[5]。病原体が TLR を介して認識されると、自然免疫が活性化され、マクロファージなどの自然免疫担当細胞が即時的な攻撃を行う。さらに、自然免疫を担う樹状細胞が、獲得免疫を担う T 細胞へ病原体の抗原提示を行うことで獲得免疫の活性化が起こる。これらのことから、TLR は自然免疫および獲得免疫、両免疫の活性化の起点として注目されている。本研究では、自然免疫および獲得免疫の活性化経路の一つに、TLR を介した経路を想定している。

天然物や乳酸菌などの有用細菌は、安全に使用できる物質として長年ヒトの健康に貢

献してきた。例えば、細菌が生成する抗菌物質は、いわゆる抗生物質として今日広く使用されているほか、植物由来の物質として、鎮痛薬のモルヒネや、抗マラリア薬のキニーネなどの、多くの医薬品が開発されてきた。また、プロバイオティクスとして承認された乳酸菌をはじめ[6]、枯草菌の一種である納豆菌、酪酸菌などは、医薬品、食品などに幅広く使用され、ヒトに有益な効果を与えている。そこで本研究では、自然免疫と獲得免疫を活性化し、さらにヒトに安全に使用できる天然物や有用微生物の探索・評価を行うことを目標として実験を行った。

ワクチン利用は最も効果的な感染症予防である。ワクチンは獲得免疫を活性化させて病原体特異的な抗体の産生を誘導することで感染を防いでいる。これまでにワクチンは、天然痘の撲滅や、ポリオ症例の劇的な減少など、多くの感染症で効果をもたらしてきた。表 1-1 に示すように、ワクチンには、弱毒化した病原体を使用した生ワクチンと、病原体を不活化し毒性を除去した不活化ワクチンがある[7]。生ワクチンは生きた病原体を使用するため、免疫誘導効果が強いが、重篤な副作用が起こる可能性がある。それに対して不活化ワクチンは病原体を不活化し、無毒化しているため、副作用の危険性は低い。しかし、生ワクチンと違って、強力な免疫活性化作用が得られないという欠点がある。

種類	特徴	ワクチン
生ワクチン	弱毒化した微生物 ワクチン効果が高い 重篤な副作用	BCG 麻疹風疹混合
不活化ワクチン	不活化した微生物 ワクチン効果弱い 副作用は少ない	DPT-IPV 肺炎球菌 インフルエンザ (H1N1)

表 1-1. ワクチンの種類と特徴

この欠点を補うために、不活化ワクチンの多くは、アジュバントを含んでいる。アジュバントとは、ワクチンと混合して、抗体産生能を上昇させる物質である。これまでに、肺炎球菌に対してアルミニウム塩の **Alum**、H1N1 型インフルエンザワクチンに対して **o/w** 型エマルジョンの **MF-59** などのアジュバントが承認されている[8]。しかし、表 1-2 に示すように、これらのアジュバントは場合によっては副作用が起こる[9]。さらに、獲得免疫の 2 つの活性型、細胞性免疫と体液性免疫の活性に偏りがあることが問題となっている。これら 2 種類の免疫活性型に偏りがあると、アレルギー反応など、特定の免疫反応が起こる可能性がある。

アジュバント	主な成分	細胞性免疫	体液性免疫	安全性
アルミニウム塩 (Alum)	塩化アルミニウム	△	○	△
o/w 型エマルジョン (MF59)	スクアレン	△	○	△

表 1-2. 現在使用されているアジュバントと問題点

このようなことから、安全で効果的な新しいアジュバントの開発が望まれている。そこで、ヒトに対して安全に使用できるアジュバントを、天然物から探索することに着目した。天然物は太古からさまざまな医薬品に応用されている[10]。さらに、我々の研究室では、テルペン構造を有する昆虫の幼若ホルモン (JH) の誘導体であるピリプロキシフェンが、抗体産生誘導効果を持つことを明らかにしている[11]。また、この抗体産生誘導効果は、TLR を介することで発現する予想している[11]。ピリプロキシフェンは、炭素数 C_{20} のテルペン類で、グラム陰性菌の内毒素 LPS の構成成分である Lipid A の炭素数 C_{12-16} と類似している。また、Lipid A は TLR4 を介して、獲得免疫を活性化することが分かっている[12]。よって、ピリプロキシフェンも Lipid A と同様の作用機序を持つということを予想している。

そこで、本章では、獲得免疫を活性化するアジュバントの候補として、ピリプロキシフェンと同じく、テルペン類の天然有機化合物であるミルセンに注目した。ミルセンは、オレンジの果皮など、200 種類以上の植物に含まれる炭素数 C_{10} の低炭素数のテルペン類である。これまでに、ミルセンは抗酸化作用および抗菌活性を持つことが知られており[13]、さらに、植物由来であることから、ミルセンが安全で効果的なアジュバントになることを予想した。そこで、本研究では、ミルセンの抗体産生誘導効果の有無について評価した。

第1節 ミルセンの抗体産生誘導効果の検討

本節では、ミルセンが抗原特異的な抗体産生を誘導するか否かを調べるために、マウスに、ミルセンと、一般的に抗原として用いられる ovalbumin (OVA) を投与し、血清中の OVA 特異的 IgG を測定することで、抗体産生誘導効果を評価した。また、ミルセンの抗体産生誘導効果がどのような特徴を持つかを調べるために、ミルセンと OVA の投与方法を3種類設定し、ミルセンの抗体産生誘導効果の特徴を確認した。

①実験方法

動物・投与量・投与方法

4週齢の BALB/c マウス (♀) に、0、3、6週目に抗原 (50 μ g/mL の ovalbumin (OVA) または 5 μ g/mL の抗酸菌分泌タンパク (Ag85B)) およびアジュバント (40 μ g/mL の Alum または 4.0mg/mL のミルセン) を1匹あたり 200 μ L 腹腔内投与し、投与後、任意の週において、血清中の抗体量と脾細胞中のサイトカイン産生量を測定した。投与群は、抗原のみを投与した群 (Control 群)、ミルセンのみ投与した群 ([ミルセン(抗原-)] 群)、Alum および抗原を投与した群 ([Alum(抗原+)] 群)、ミルセンおよび抗原を投与した群 ([ミルセン(抗原+)] 群) の4群とした。なお、以上の実験法は、本章における基本的な実験方法とした。

ミルセンの OVA 特異的 IgG 抗体産生誘導効果の検討

4週齢の BALB/c マウス (♀) に0、3、6週目に腹腔内投与した (図 1-1)。投与群は、Control 群、[ミルセン (OVA-)] 群、[Alum (OVA+)] 群、[ミルセン (OVA+)] 群とした。血清の回収は、3、5、7週に行った (図 1-1)。回収した血清から、ELISA 法を用いて、OVA 特異的 Total IgG 量を測定した。

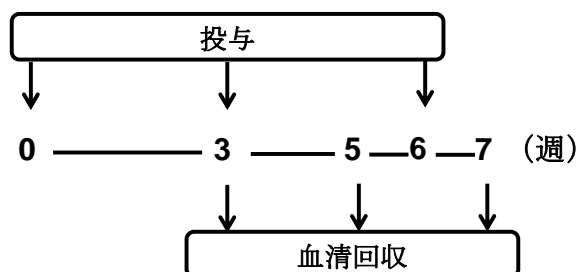


図 1-1. 投与スケジュール

ミルセンの抗体産生誘導作用の特徴の検討

投与は0、3、6週目に腹腔内投与で行った（図 1-2）。投与群は、Control 群、OVA とミルセンを混合して投与した群（混合投与）、OVA とミルセンを混合せずに同時に別々の箇所投与した群（個別投与（0 時間））、ミルセンを投与した 24 時間後に OVA を投与した群（個別投与（24 時間））を作成した。血清の回収は、初回投与後 8 週目に回収した（図 1-2）。回収した血清から、ELISA 法を用いて、OVA 特異的 Total IgG 量を測定した。

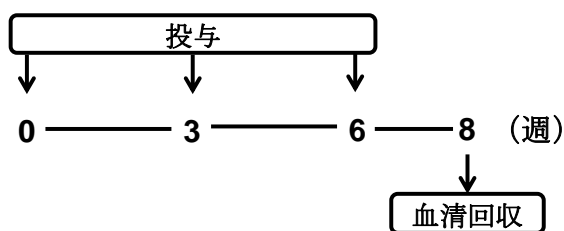


図 1-2. 投与スケジュール

②実験結果

ミルセンの抗体産生誘導効果の検討

【ミルセン（OVA-）】群は、初回投与後のすべての週において、OVA 特異的 IgG の産生誘導効果が見られなかった（図 1-3（A）、（B）、（C））。【ミルセン（OVA+）】群は、初回投与後 3 週目から、Control 群と比べて有意に OVA 特異的 IgG の産生誘導効果を示した（図 1-3（A））。一方、【Alum（OVA+）】群は、初回投与後 5 週目から Control 群と比べて抗体産生が観察されたものの（図 1-3（B））、緩やかに上昇し、7 週目で初めて Control 群と比べて明らかな抗体産生誘導効果を示した（図 1-3（C））。

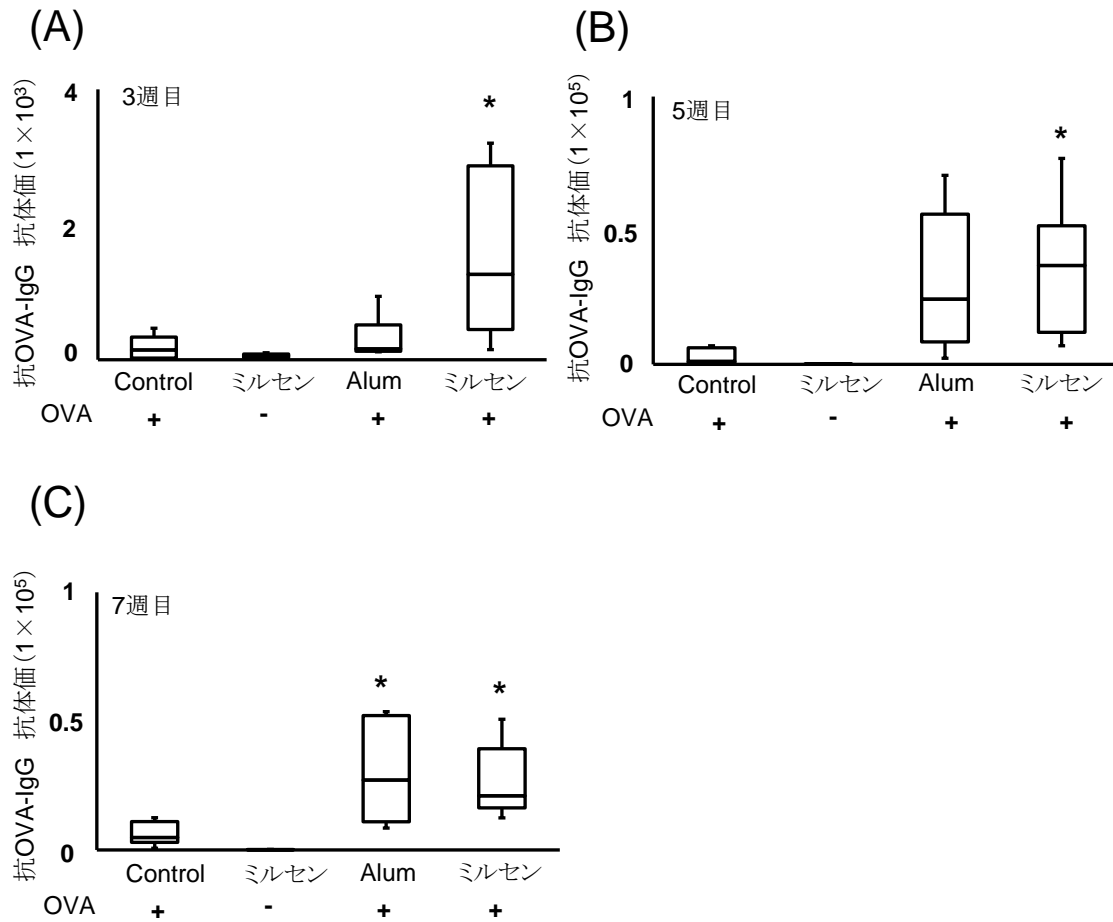


図 1-3. OVA 特異的 IgG の産生量 (* $P < 0.05$)

ミルセンのアジュバント効果が現れる条件の検討

初回投与後 8 週目に、血清中の OVA 特異的 IgG を測定したところ、ミルセンの抗体産生誘導効果は、OVA とミルセンを投与前に混合して投与した場合にのみ現れ、混合せずにミルセンと OVA を個別に 0 時間で投与した場合、あるいは、ミルセン投与 24 時間後に OVA を投与した場合には効果が現れなかった (図 1-4)。

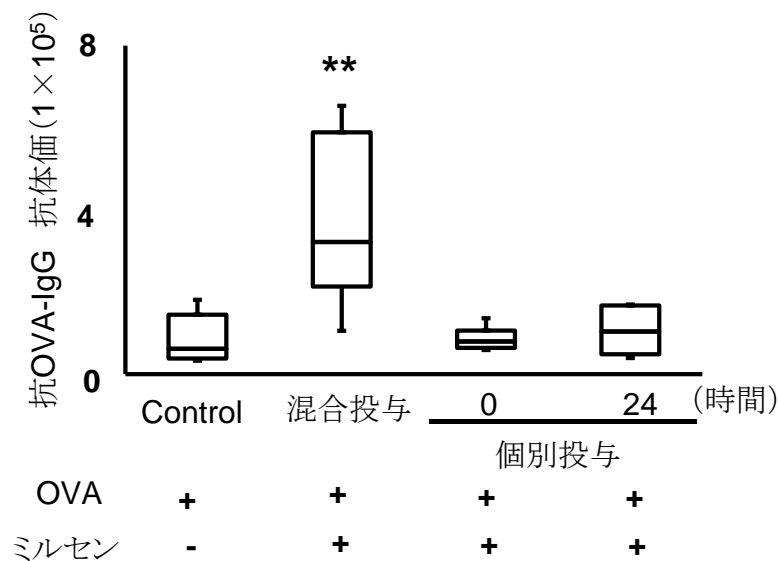


図 1-4. ミルセンと OVA の混合方法および投与方法の違いによる OVA 特異的 IgG の産生量の違い (** $P < 0.01$)

第 2 節 ミルセンの抗体産生誘導型の検討

図 1-5 に示すように、獲得免疫は、樹状細胞がヘルパーT 細胞に病原体（抗原）の情報を提示することで活性化される。ヘルパーT 細胞のうち、1 型 T 細胞（Th1 細胞）は、サイトカイン INF- γ を産生し、キラーT 細胞を活性化するだけでなく、INF- γ が B 細胞を刺激して、IgG2a の産生を誘導する（細胞性免疫活性型）。一方、2 型 T 細胞（Th2 細胞）は、サイトカイン IL-4 や IL-13 を産生し、これらは B 細胞を刺激して IgG1 の産生を誘導する（体液性免疫活性型）。そこで、使用するアジュバントの種類により、活性化されるヘルパーT 細胞に違いがあるかどうか、産生誘導されるサイトカインや IgG サブタイプを調べることで検討した。

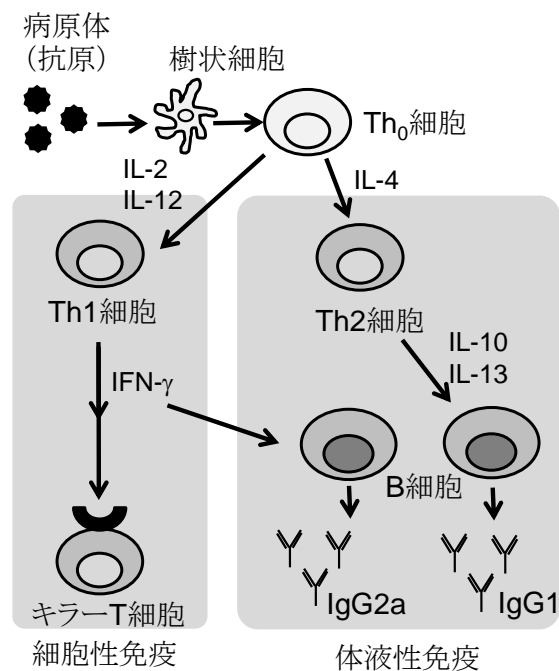


図 1-5. 獲得免疫のしくみ

①実験方法

脾細胞サイトカイン測定によるミルセンの免疫活性型の確認

4 週齢の BALB/c マウス (♀) に 0、3、6 週目に腹腔内投与した (図 1-6)。投与群は、Control 群、[ミルセン (OVA-)] 群、[Alum (OVA+)] 群、[ミルセン (OVA+)] 群とした。そして、初回投与後 3、8 週目に脾臓を摘出し、脾細胞を精製した。精製した脾細胞を培養し、OVA で再刺激した後、培養上清中のサイトカイン産生量をサンドウィッチ ELISA 法により測定した。

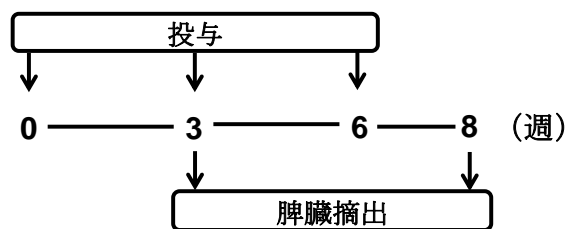


図 1-6. 投与スケジュール

IgG サブタイプの測定によるミルセンの免疫活性型の確認

4 週齢の BALB/c マウス (♀) に 0、3、6 週目に腹腔内投与した (図 1-7)。投与群は、

Control 群、[ミルセン (OVA-)] 群、[Alum (OVA+)] 群、[ミルセン (OVA+)] 群とした。そして、初回投与後 5、および 8 週目に血清を回収し (図 1-7)、ELISA 法を用いて、IgG1 および IgG2a の産生量を測定した。

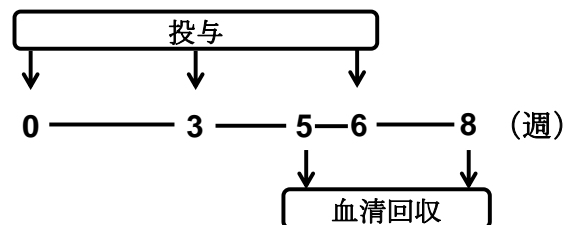


図 1-7. 投与スケジュール

②実験結果

サイトカインによる抗体産生誘導型の検証

INF- γ に関しては、[Alum (OVA+)] 群および [ミルセン (OVA+)] 群ともに初回投与後 3 週目および 8 週目に産生を観察したが、両方に大きな差はなかった (図 1-8 (A))。ただし、8 週目において、すべての群で INF- γ の産生量が減少したにも関わらず、[ミルセン (OVA+)] 群では、Control 群と比べて有意に INF- γ の産生量が増加したままであった (図 1-8 (A))。IL-4 に関しては、初回投与後 3 週目に比べて 8 週目に、[Alum (OVA+)] 群の IL-4 産生量が多かった (図 1-8 (B))。IL-13 に関しては、初回投与後 3 週目では、[ミルセン (OVA+)] 群の IL-13 産生量は上昇しなかったが、8 週目において IL-13 の産生量が著しく増加した (図 1-8 (C))。

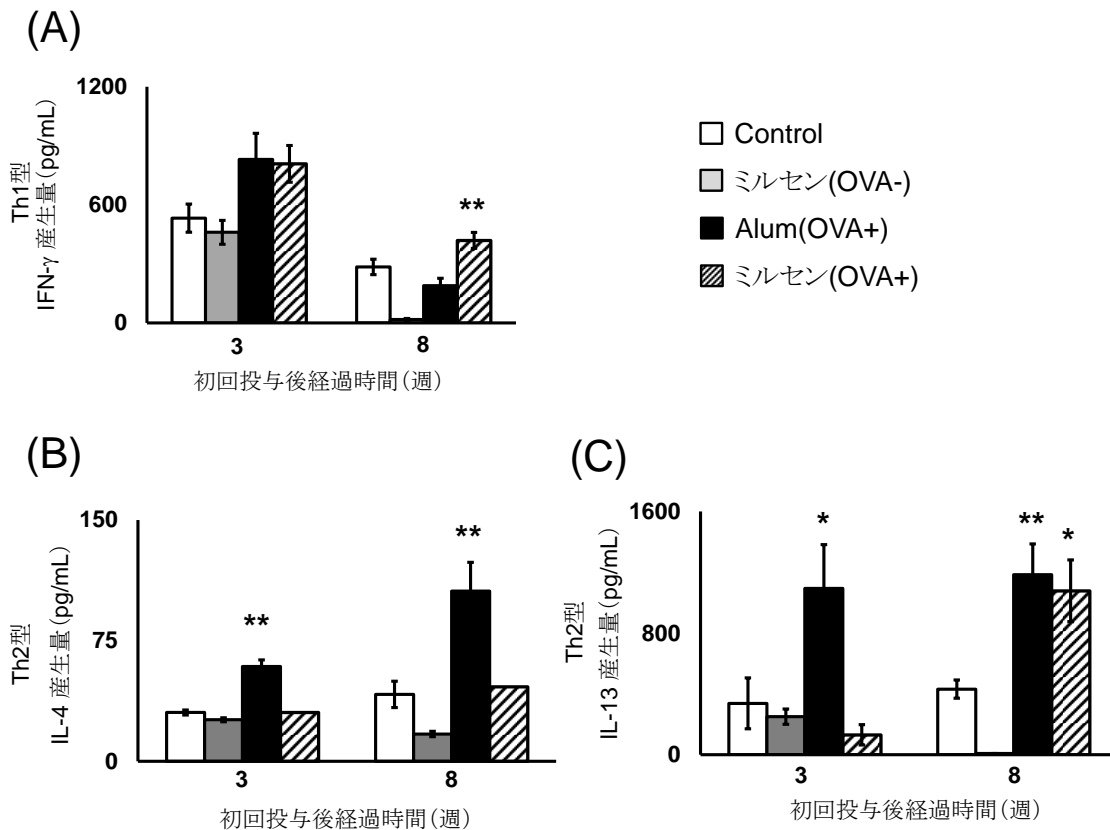


図 1-8. OVA が誘導するサイトカインの種類と産生量 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

IgG のサブタイプによる抗体産生誘導型の検証

[Alum (OVA+)] 群は、初回投与後 5 週目 (図 1-9 (A)) と 8 週目 (図 1-9 (B)) に IgG1 の産生誘導が確認され、Th2 を刺激することが分かった。また、[ミルセン (OVA+)] 群も、5 週目 (図 1-9 (A)) と 8 週目 (図 1-9 (B)) に、IgG1 の産生誘導が観察され、Th2 細胞を刺激することが分かった。このことから、Alum とミルセンは共に Th2 細胞を刺激することが分かった。さらに、[ミルセン (OVA+)] 群は、投与後 5 週目 (図 1-9 (C)) と 8 週目 (図 1-9 (D)) に IgG2a の産生誘導が観察され、Th1 細胞を刺激することが分かった。この効果は Alum では低い、ミルセンではきわめて強い作用を示した。

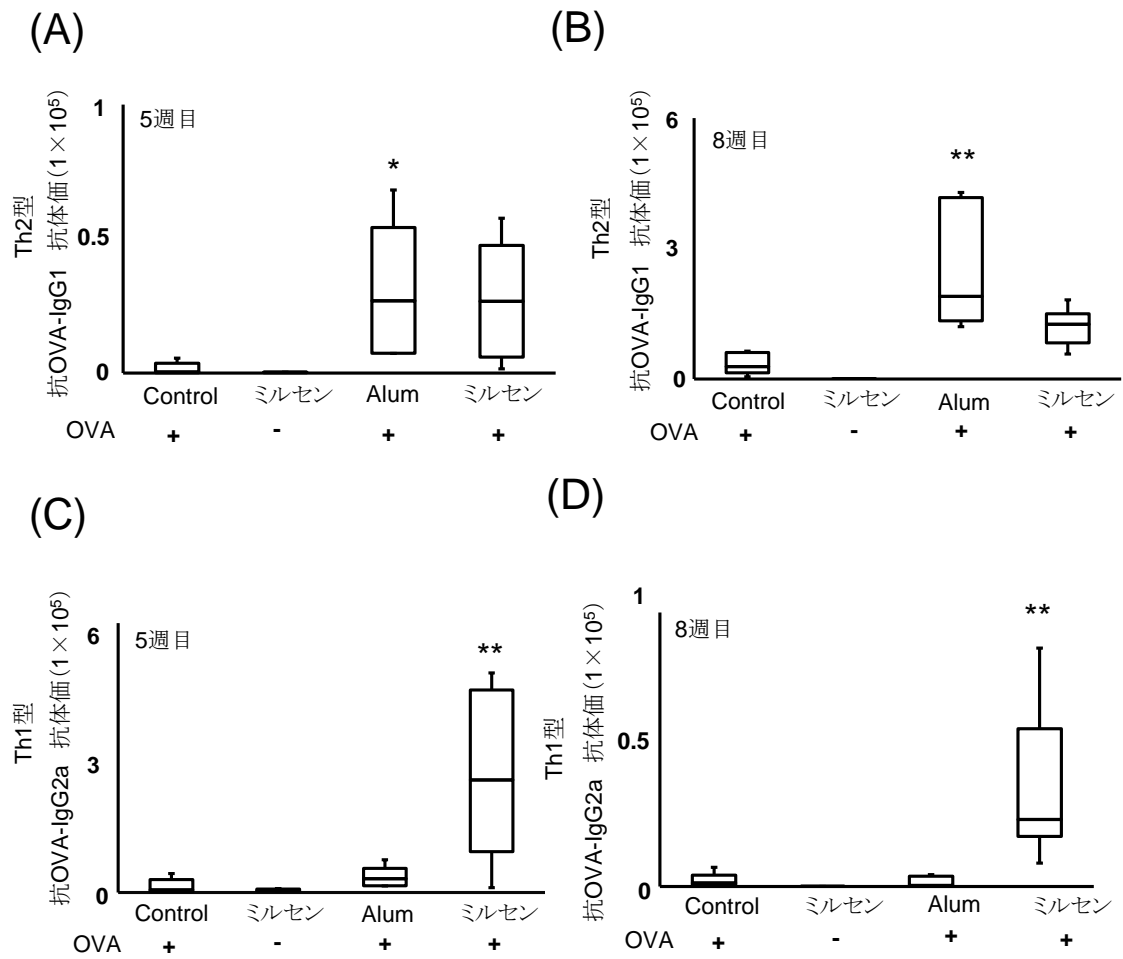


図 1-9. OVA 特異的 IgG サブタイプの産生量 (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)

第 3 節 ミルセンの Ag85B に対する抗体産生誘導効果の検討

前節までの研究で、ミルセンが OVA 特異的な IgG 抗体産生誘導効果を持つことを明らかにした。そこで本節では、ミルセンが今後臨床応用できるか否かを調べるために、結核菌の抗原である抗酸菌分泌タンパク質 Ag85B を使用して、ミルセンの抗体産生誘導効果を検討した。

①実験方法

ミルセンの結核菌抗原 Ag85B に対する抗体産生誘導効果の検討

4 週齢の BALB/c マウス (♀) に 0、3、6 週目に腹腔内投与した (図 1-10)。投与群

は、Control 群、[ミルセン (Ag85B -)] 群、[Alum (Ag85B+)] 群、[ミルセン (Ag85B+)] 群とした。血清の回収は、3、5、7 週に行った (図 1-10)。回収した血清から、ELISA 法を用いて、OVA 特異的 Total IgG 量を測定した。

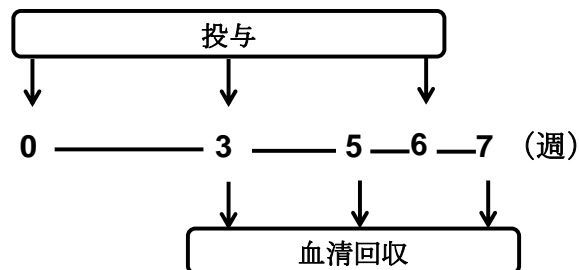


図 1-10. 投与スケジュール

②実験結果

ミルセンの結核菌抗原 Ag85B に対する抗体産生誘導効果の検討

[Alum (Ag85B+)] 群および [ミルセン (Ag85B+)] 群は両群ともに、初回投与 3 週目では、Control 群および [ミルセン (Ag85B -)] 群に比べて、抗体誘導効果は観察されなかった (図 1-11 (A))。しかし、[ミルセン (Ag85B+)] 群は、初回投与後 5 週目で、Control 群と比べて有意に Ag85B 特異的 IgG の産生誘導効果を示した (図 1-11 (B))。一方、[Alum (Ag85B+)] 群では、初回投与後 5 週目および 7 週目においてこの効果が現れた (図 1-11 (B)、(C))。

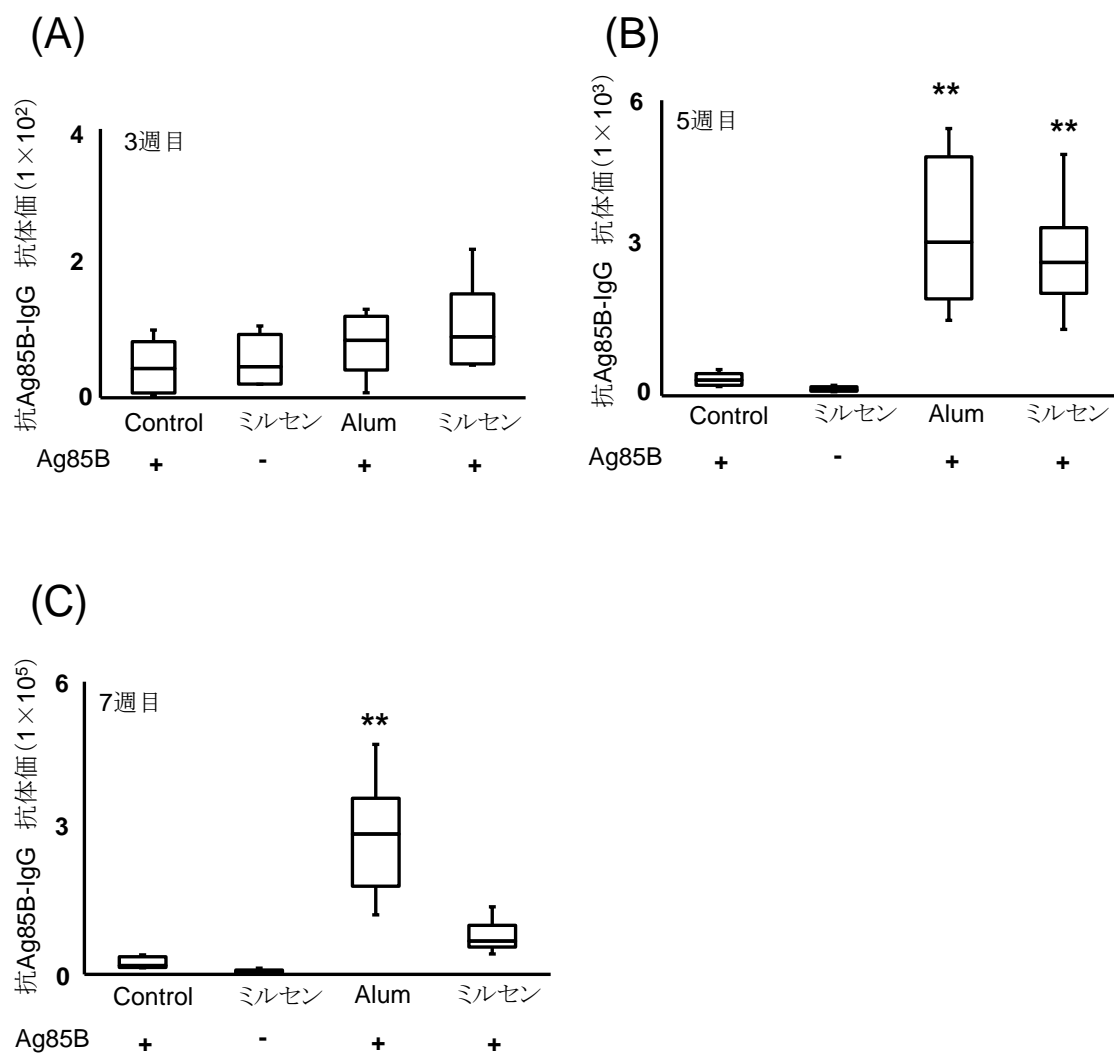


図 1-11. Ag85B 特異的 IgG の産生量 (** $P < 0.01$)

第4節 小括

本章では、天然物の中から、獲得免疫を活性化する物質を探索することを目的として、研究を行った。そして、植物由来のテルペン類化合物であるミルセンに着目し、ミルセンが獲得免疫を活性化して、抗体産生誘導効果を示すか否かを検討した。まず、ポジティブコントロールとして使用した Alum の結果が、これまで報告されている通り、Th2 細胞を刺激して体液性免疫を活性化し抗体産生誘導効果を行ったことから[14]、本研究の実験方法は問題ないことが証明できた。さらに、本実験で、ミルセンの抗原特異的抗体誘導効果を確認することができた。まず、[ミルセン (OVA+)] 群は、OVA 特異的 IgG の産生を上昇させた (図 1-3)。そして、[Alum (OVA+)] 群が初回投与後 7 週目で初めて Control 群と比べて有意な抗体産生誘導を示したのに対し (図 1-3 (C))、[ミルセン (OVA+)] 群の抗体産生誘導効果は、初回投与 3 週目から Control 群に比べて有意な抗体産生誘導効果を示した (図 1-3 (A))。このことから、ミルセンは、Alum よりも速やかな抗体産生誘導効果を持つことがわかった。また、ミルセンの抗体産生誘導効果は、抗原とミルセンを混合して投与したときのみ現れ、ミルセンと OVA を混合せずに投与した場合 (個別投与 0 時間)、ミルセンを投与して 24 時間後に OVA を投与した場合 (個別投与 24 時間)、いずれにおいても OVA 特異的 IgG 抗体の産生上昇は見られなかった (図 1-4)。ピリプロキシフェンの場合、抗原と混合せずに投与した場合でも、抗体産生誘導作用が現れたため[11]、ミルセンとピリプロキシフェンでは、作用機序が異なることが考えられる。ミルセンには、 α -ミルセンと β -ミルセンが存在する。今回の研究では、両者の混合物を薬剤として使用した。 β -ミルセンは室温で放置すると重合体を形成することが知られている[15]。したがって、 β -ミルセンの重合が、抗体産生誘導に関与したことが考えられる。これは、カルボキシビニルポリマー (CVP) と似たような作用機序であると考えられる[16]。この研究では、重合体の CVP を抗原と混合すると、混合液の粘度が高まり抗原提示能力が上昇し、その結果、免疫の活性化につながると報告している[16]。今回の結果より、ミルセンも CVP と同様に抗原提示能が上昇したことで、抗体産生誘導効果を示したことが予想できる。

次に、ミルセンの抗体産生誘導効果の活性型について、Alum と比較することで評価した。獲得免疫は、Th1 細胞の刺激を介して活性化される細胞性免疫活性型と、Th2 細胞の刺激を介して活性化される体液性免疫活性型の 2 種類がある。細胞性免疫活性型と体液性免疫活性型の活性に偏りがあると、特定の免疫反応が起こる可能性がある。よって、理想的なワクチンおよびアジュバントとは、Th1 細胞および Th2 細胞の両方を刺

激し、細胞性免疫および体液性免疫の両方の免疫を活性化するものである。そこで、ミルセンの抗体産生誘導効果は、どのような免疫活性型を介しているかを確かめた。まず、脾細胞中のサイトカインを測定したところ、[ミルセン (OVA+)] 群と[Alum (OVA+)] 群は、Th1 型のサイトカインである INF- γ の産生が上昇した。この効果は、[ミルセン (OVA+)] 群と[Alum (OVA+)] 群間で大きな差はなかった。ただし、この効果は、初回投与後 8 週目にすべての群で減少したにもかかわらず、[ミルセン (OVA+)] 群のみ産生レベルが衰えず、Control 群に比べて有意な上昇が観察された (図 1-8 (A)、(B))。また、Th2 型のサイトカイン IL-4 について、ミルセンは、IL-4 を上昇させなかったが、[Alum (OVA+)] 群では IL-4 の産生が上昇した (図 1-8 (C)、(D))。一方、Th2 型のサイトカイン IL-13 について、[ミルセン (OVA+)] 群では、初回投与後 3 週目に比べて 5 週目に IL-13 の産生量が著しく上昇した (図 1-8 (C))。これらのことから、ミルセンと Alum では、産生誘導するサイトカインの種類に違いがあることが分かった。次に、血清中の IgG サブタイプの測定を行った。[ミルセン (OVA+)] 群と[Alum (OVA+)] 群では、IgG1 の産生が上昇し、Th2 細胞を刺激することが分かった (図 1-9 (A))。さらに、[ミルセン (OVA+)] 群では IgG2a の産生が著しく上昇した。一方で[Alum (OVA+)] 群では IgG2a の産生誘導効果はなかった (図 1-9 (B))。これらの結果より、ミルセンは、Alum と異なり、Th1 細胞と Th2 細胞、両方を刺激することで、細胞性免疫および体液性免疫の活性化するということが分かった。ミルセンは、炭素数 C₁₀ の低炭素数のテルペン類であり、細菌の構成成分 Lipid A の炭素数 C₁₂₋₁₆ に類似している。これまでに Lipid A は TLR4 を介して Th1 細胞を刺激し、体液性免疫を活性化することが知られている[12]。さらに、カルボキシビニルポリマーを使用したポリマー体のアジュバントは Th1 細胞および Th2 細胞を刺激して獲得免疫を活性化することがわかっている[16]。これらのことから、ミルセンの抗体産生誘導には、TLR を介する作用と、ポリマー体の形成による抗原提示能の上昇作用の 2 つがあると考えた。以上の結果より、ミルセンは、Alum を含む現在使用されているアジュバントと異なり、細胞性免疫および体液性免疫の両方の免疫型を活性化する効果的なアジュバントになることが期待できる。今回の実験では、血清中の IgG サブタイプを測定して免疫活性型を検討したが、今後、脾細胞に含まれるキラーT 細胞数の変動を調べることで、Th1 型、つまり細胞性免疫が活性化されているか否かをより確実に実証できるであろう。さらに、今回の実験では、BALB/c マウスを使用した。BALB/c マウスは、遺伝子がホモ性で Th2 型の免疫応答が強い系統であることが知られている。今後、ICR マウスなど、ヒトと同じように遺伝子

がヘテロ性のマウスを用いて免疫活性型を検討することで、ヒトに応用した際の反応をより正確に予測できるであろう。

最後に、ミルセンが実際の病原体由来の抗原においても抗体産生誘導効果を持つか調べた。抗原として、結核菌抗原である抗酸菌分泌タンパク質 **Ag85B** を使用した。この実験で、ミルセンは、初回投与後 5 週目で **Ag85B** 特異的な **IgG** 抗体の産生を上昇させた (図 1-11 (B))。しかし、この効果は初回投与後 5 週目および 7 週目で抗体産生を上昇した **Alum** よりも弱かった (図 1-11 (B)、(C))。このことから、ミルセンは、**Alum** よりも効果が低いものの、結核菌抗原 **Ag85B** の誘導効果を持つことが分かった。現在、結核菌のワクチンは生ワクチンを使用しており、今後、不活化ワクチンに移行することが考えられる。そして **Ag85B** は、結核菌ワクチンの抗原として期待されている。今回の結果は、ミルセンが今後、結核菌抗原 **Ag85B** のアジュバントとして臨床応用できる可能性を示唆している。

一方、ミルセンの臨床応用を検討する上で、安全性も詳しく調べる必要がある。本研究では、腹腔内投与を行ってミルセンの抗体産生誘導効果を検討した。今後、皮下投与あるいは皮内投与を行い、潰瘍形成の有無などを検討することで、今回確認することが難しかったミルセンの安全性を検討できるであろう。

本章の研究により、ミルセンが現在使用されている **Alum** よりも効果的な天然物由来アジュバントとして利用できる可能性があることを明らかにした。このことは、今後の感染症対策の改善に貢献できると考える。

第2章 自然免疫活性化物質の探索 ～初期感染防御と獲得免疫の増強～

緒言

第一章で述べたように、感染症の防御には、ワクチンによる獲得免疫の活性化を通じた防御が効果的である。一方、自然免疫は初期感染防御を担っており、主に白血球やマクロファージ、樹状細胞を活性化することで、病原体の侵入を防いでいる[4]。自然免疫を活性化することは、病原体の侵入を初期に防御することでその後の重大な症状を防ぐために重要な免疫機構である。さらに、自然免疫は、初期免疫防御に働くだけでなく、獲得免疫の活性化にも関与している。Aoshi T.らの報告によると、自然免疫を活性化することで、獲得免疫が活性化され、抗体産生が促進される[17]。これらのことから、自然免疫を活性化することは、初期感染防御と獲得免疫の増強の両方の効果があると考えられる。さらに、自然免疫の活性化は、TLR を活性化することで行われていることが報告されている[17]。前章の結果より、ミルセンは、結核菌抗原 Ag85B に対して抗体誘導効果が低かった（図 1-11）。そこで、日常的に自然免疫を活性化することで、ミルセンの抗体誘導効果をさらに上昇させることができると考えた。そこで、継続して摂取可能な有用微生物である乳酸菌に注目した。グラム陽性菌である乳酸菌は、腸内細菌の構成細菌であることが知られている。20 世紀初頭に、Metchnikoff によって乳酸菌が腸内細菌の中でも安全で、有益な細菌と提唱されてから、乳酸菌は、有用細菌としての研究が進められてきた[18]。腸内の乳酸菌は、 β -galactosidase などの酵素を利用して、ヒトが分解できない糖質を分解して栄養源として提供する働きや、コレステロールの合成や血液や肝臓からのコレステロールの再分配を減少させる働きがある[19]。また、近年では、乳酸菌が免疫を調節する機能を持つことが知られており、炎症性腸疾患[20]や、感染性下痢症[21]、アトピー性疾患の治療[22]などに乳酸菌が使用する例が増えている。これらのことから、乳酸菌は人体に良い影響を与える微生物、プロバイオティクスと呼ばれ、WHO においても、ヒトにおいて継続的に摂取しても問題のない有用な細菌であることが承認されている[6]。このように、乳酸菌は、食料品や医薬品などに使用され、ヒトの健康に貢献している[23]。さらに、乳酸菌の免疫活性化作用は TLR を介して行われていることが知られている[24]。例えば、乳酸菌の *Lactobacillus* 属が TLR2 を活性化してマクロファージの活性化など、自然免疫を活性化することや[25]、健康なマウスに乳酸菌を摂取させると、マウスの腸管上皮細胞において、TLR2、TLR4、TLR9 の発現が上昇し、さらにそれに伴い自然免疫に関する TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 などのサイトカイ

ンの産生も上昇することが分かっている[26]。このようなことから、乳酸菌は、日常的に自然免疫を活性化させることができる有用微生物と考えた。そこで、自然免疫活性化作用の強い乳酸菌の探索を試みた。

本研究では、自然免疫活性化作用の強い乳酸菌の候補として、昆虫の乳酸菌に注目した。近年、ヒトだけでなく、昆虫にも腸内細菌が存在することが報告されている。そして、例えば、ハチにおいて腸内細菌が、ハチの栄養摂取や、感染防御に有効であることや[27]、シロアリにおいて、多糖や芳香性化合物の分解に腸内細菌が関与していることが示されている[28]。また、これらの昆虫の腸内細菌には、乳酸菌が含まれていることが証明されている。近年、ハチやシロアリにおいて、腸内細菌の構成細菌を単離する研究が進められている。そして、ハチにおける、*Bifidobacterium bomb*[29]や、シロアリにおける *Pilibacter termitis*[30]など、乳酸菌の単離も進められている。獲得免疫が哺乳類などの脊椎動物が進化の過程で獲得したのに対して、自然免疫はすべての動物に基本的に備わった免疫である。そして昆虫も、自然免疫のみで感染症を防御している生物のひとつである。これらの知見から、昆虫に存在する乳酸菌は自然免疫を活性化する作用が強いことを予想した。さらに、近年、昆虫と哺乳類の自然免疫の活性化経路が類似していることが報告された[31]。実際、TLR はショウジョウバエの Toll 受容体の類似体として発見されたものである[31]。Toll 受容体は、昆虫において病原体を認識して、自然免疫を活性化していることがわかっている[31]。これらのことから、昆虫の自然免疫活性化の機構がヒトでも応用できることを予想した。また、近年、ハチの乳酸菌をヒトが摂取したところ、IgA 抗体の産生を誘導することが証明された[32]ことから、昆虫由来の乳酸菌がヒトにおいて自然免疫の活性化を行うことができると考えた。そして、その作用は昆虫の免疫機構に Toll 受容体が関わっているのと同様に、ヒトの TLR を介する考えた。そこで、より自然免疫活性化作用が強い乳酸菌を探索すべく、昆虫の中でも蚊が保有する乳酸菌に注目した。蚊は、ハエ科糸角亜目カ科 (Culicidae) の昆虫である。主に、花の蜜や樹液などの糖分をエネルギーに生活し、メスのみが産卵時の栄養補給として吸血する[33]。日本には、2014 年話題になったデング熱を媒介する蚊として知られているヒトスジシマカ[34]をはじめ、アカイエカやチカイエカなどが生息している[35]。近年、他の昆虫と同様に、蚊の腸内細菌叢について遺伝学的手法を用いた網羅的な解析が行われており、乳酸菌が構成細菌に含まれることが報告されている[36]。また、蚊の腸内細菌は、デングウイルスなどの病原性の高いウイルスを含むアルボウイルス群が宿主へ侵入するのを抑制していることがわかった[37]。これらのことから、病原性の高い

微生物に対して抵抗性を示す蚊の体内に存在する乳酸菌は、自然免疫を活性する能力が高いと考えた。そこで、蚊から乳酸菌を単離し、自然免疫活性化作用について評価した。

自然免疫を担う物質に抗菌ペプチドがある。抗菌ペプチドは、感染初期に上皮細胞や免疫担当細胞から分泌され、グラム陰性菌・陽性菌や真菌、ウイルスに至るまで、幅広い抗菌活性を示す[3]。さらに、抗菌ペプチドは上皮から分泌されることで病原体が宿主に侵入するのを防御している。このように、抗菌ペプチドは自然免疫の活性化を介した初期感染防御において重要な役割を果たしている。このことから、自然免疫の活性化を評価する上で、抗菌ペプチドの誘導効果を評価することは有用であると考えた。これまでに、*Lactobacillus* 属をはじめとする乳酸菌と免疫との関連が報告されている[38, 39]。さらに近年、乳酸菌が抗菌ペプチドの誘導を介して免疫の活性化に関与していることが報告されている。これまでに、乳酸菌の混合物が **Caco-2** 細胞において、抗菌ペプチド遺伝子の発現や分泌を誘導すること[40]、実験動物において、乳酸菌の接種が抗菌ペプチドの発現を誘導することが報告されている[41, 42]。これらのことから、乳酸菌の免疫活性化作用として、抗菌ペプチドの誘導を介した自然免疫の活性化があることが考えられる。そこで、本研究では、蚊の腸管から乳酸菌を単離して、自然免疫の一つである抗菌ペプチドの誘導作用の有無を検討した。

第1節 蚊の採集・乳酸菌の単離

本節では、自然免疫活性化作用の強い乳酸菌を探索するべく、蚊から乳酸菌を単離することを試みた。蚊は、日蔭で涼しい水辺に多く生息する。そこで、そのような環境条件が整った場所として、福岡市の大濠公園を選択した。

①実験方法

2012年9月13日に大濠公園（北緯33度、東経130度、福岡、日本）（図2-1（A）、（B））にて、人囃法（図2-1（C））で蚊を採集した。その時の天候条件は、晴れ、気温は30-31℃であった。

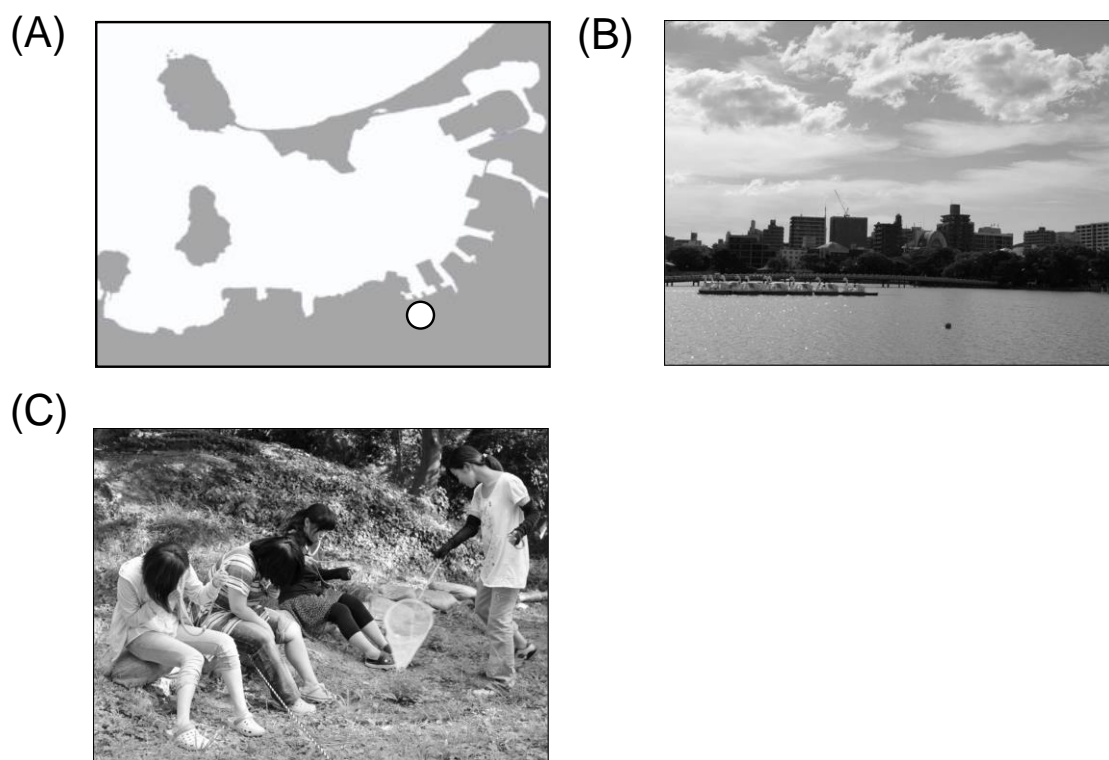


図2-1. 蚊の採集場所と採集方法（A）大濠公園の位置、（B）大濠公園、（C）人囃法で蚊の採集をしている様子

採集した蚊は、15mL チューブに入れ、水中で保存することで、氷麻酔にかけた。次に、蚊を実体顕微鏡下で観察し、蚊の種類を同定した。次に、同定した蚊から、実体顕微鏡下で中腸（図2-2）を摘出した。

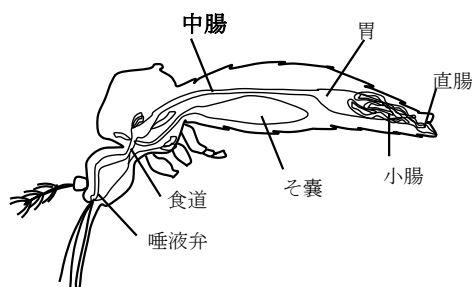


図 2-2. 蚊の解剖図

摘出した中腸を 1 匹ごとに PBS で希釈した 40%グリセリン入れた 1.5mL チューブに入れホモジナイズした。最後に、中腸のホモジナイズ溶液を GYP 白亜寒天培地に塗付し、通常培養で、30°C、48-96 時間培養した。GYP 白亜寒天培地は、培地中に炭酸カルシウムを混合しているため白濁している。そして、乳酸菌が単離された場合は、乳酸菌の産生する乳酸によって水に不溶な炭酸カルシウムが水に易溶な乳酸カルシウムに変化することで、培地が透明になる（ハローの形成）（図 2-3）。培地が透明になるか否かを確認することで乳酸菌か否かを評価した。

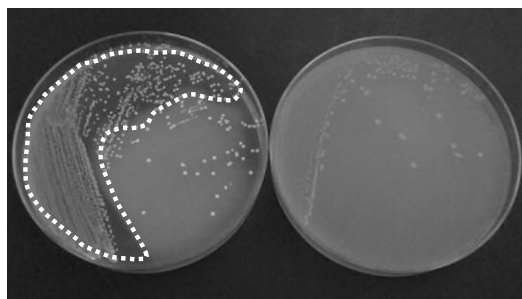


図 2-3. GYP 白亜寒天培地による乳酸菌の選択（培地が透明になっている点線部分内がハロー）

②実験結果

採集とその後の蚊の同定の結果、20 匹の *Aedes* (*Ae.*) *albopictus* (♀) を採集した。培地が培養後、20 個の採集した蚊のサンプルのうち、ハローを形成したサンプルが 3 つ選択できた。今後の研究では、その中から一つ菌株を選び、Ohori と命名して解析を行った。単離した Ohori 株は、実験に使用するまで、M17 培地に 40% (w/v) となるようにグリセロールを加えた保存培地を使用して、-80°C で保存した。

第2節 Ohori 株の形態学的特徴

今後の実験で、今回蚊から単離した Ohori 株を使用するにあたり、Ohori 株の同定を行った。細菌の同定および特徴の解析は一般的に、形態学的解析、生理・生化学的解析、遺伝学的解析を行う[43]。そこで、Ohori 株に対してこれらの 3 種類の解析を行った。まず、Ohori 株の形態学的特徴を解析した。

①実験方法

形態観察に使用するために、Ohori 株を、M17 寒天培地で 34℃、48 時間培養した。まず、Ohori 株のコロニーの、大きさ、形、色、表面の形態を肉眼で観察した。また、培養したコロニーを使用してグラム染色を行い、細胞の染色様式、細胞の配列、細胞形態を顕微鏡下で観察した。さらに、Ohori 株を M17 培地で一晩培養し、培養後の菌液を、M17 培地で $OD_{600}=0.05$ となるように希釈して、10 時間本培養した。培養した菌液から菌体を回収した後、電子顕微鏡による形態観察を行った。

②実験結果

Ohori 株のコロニーは、正円形、淡黄色、平滑で光沢があり、コロニーサイズは 1.5mm であった (図 2-4)。細胞の染色様式はグラム陽性、配列は短連鎖であり、細胞形態は、卵型球菌、2 つの細胞が対を成す双型であった (図 2-5)。電子顕微鏡写真では、Ohori 株の細胞の直径は、約 1 μ m であった (図 2-6)。また、細胞分裂面は直線状であった。さらに、形態的特徴として、細胞の両端が少し曲がった形をしており、先端に突起が見られた (図 2-6)。

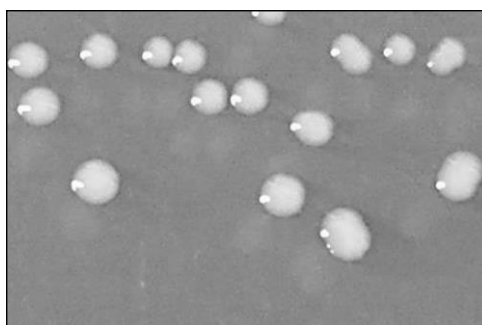


図 2-4. Ohori 株のコロニー

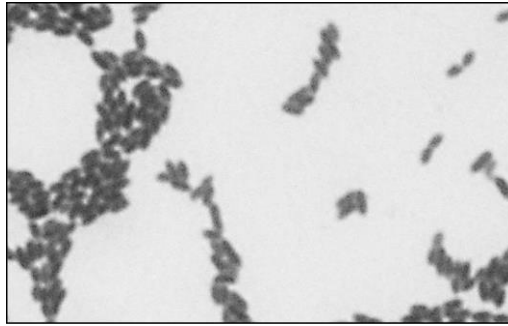


図 2-5. Ohori 株のグラム染色

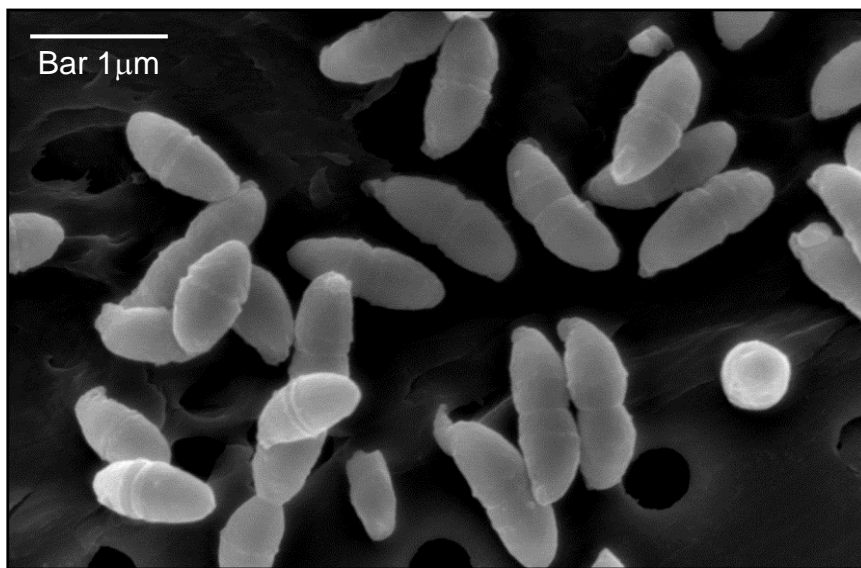


図 2-6. Ohori 株の電子顕微鏡写真

第3節 Ohori 株の生理・生学的特徴

形態学的性質の解析により、Ohori 株は乳酸球菌であることが考えられた。続いて、Ohori 株の生理・生化学的性質を解析した。本節の解析にあたり、Ohori 株と近縁種の生理・生化学的性質を比較するために、まず、Ohori 株の 16S rRNA 遺伝子の部分配列を解析した。16S rRNA は、細菌の同定に有用であることが報告されており、多くの新規細菌はこの手法を利用して同定されている[44]。図 2-7 に示すように、細菌の 16S rRNA 遺伝子は、可変領域と保存領域が交互に位置している。その中でも、第 3 および第 10 可変領域が細菌によって変化が多い部分と言われている[45]。配列決定は、16S rRNA の全長約 1500bp のうち、細菌の属によって変化に富んだ領域（V3 領域）の約 500bp を対象に行った。その結果、Ohori 株は、*Enterococcus* 属に含まれることが分かった。さらに、*Enterococcus silesiacus* (*E. silesiacus*)、*Enterococcus termitis* (*E. termitis*) と近縁であることが分かった。しかし、完全に 16S rRNA 遺伝子の部分配列の相同性が一致することはなかった。このことから、Ohori 株は、既知種にない特徴があると考えた。本節では、Ohori 株の生理・生化学的特徴を調べるとともに、既知種と考えられた *E. silesiacus* および *E. termitis*、さらに、これらの近縁種が属するグループの代表株である *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) を使用して、Ohori 株との相違点を明らかにした。

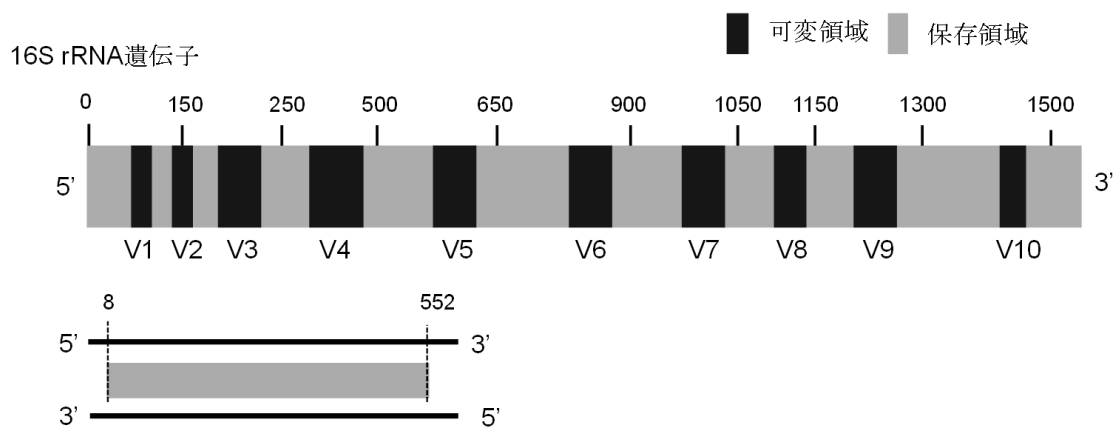


図 2-7. 細菌の 16S rRNA 遺伝子と標的にした領域

①実験方法

培地の違いによる増殖の有無の確認

Ohori 株と *E. termitis*、*E. silesiacus*、および *E. faecalis* を Todd-Hewitt 寒天培地、brain heart infusion (BHI) 寒天培地、および MRS 寒天培地に接種し 37°C、48 時間

培養し、コロニー形成の有無を確認した。

エスクリン加水分解作用および塩化テトラゾリウム還元作用の有無の確認

Enterococcus 属の同定において、エスクリン加水分解反応を示すか否かが条件の一つになっている[46]。Ohori 株を *E. termitis*、*E. silesiacus*、および *E. faecalis* を *Enterococcus* 属判定培地の Bile/aesculin 寒天培地、Kanamycin/aesculin/azide 寒天培地に接種して、それぞれ 37°C、35°C で 48 時間培養し、培地にコロニーを形成し、かつ周りに黒色のハローを形成するか否かを確認することで、エスクリン加水分解作用の有無を判断した。また、各乳酸菌を *Enterococcus* 属判定培地 Slanetz-Bartley 寒天培地に接種し、35°C、48 時間培養した。そして、培地に赤色または栗色のコロニーを形成するか確認することで塩化テトラゾリウム還元作用の有無を判断した。

カタラーゼ試験

Ohori 株と *E. termitis*、*E. silesiacus*、および *E. faecalis* について、5%馬脱繊維血液を添加した BHI 寒天培地と添加していない BHI 寒天培地で培養した。培養後、コロニーに過酸化水素を滴下し、気泡が発生した場合をカタラーゼ陽性、気泡が発生しない場合をカタラーゼ陰性とした。

発育条件の検討

培養温度、培地の pH、および NaCl 濃度が Ohori 株の発育に与える影響を検討した。Ohori 株を M17 液体培地で 10-61°C で、10 時間本培養した。pH、NaCl 濃度が与える影響の検討は、10% HCl または 10N NaOH で pH 4.1-9.7 に、および NaCl 濃度を 0-15%になるように調製した M17 液体培地で、34°C、24 時間培養した。各検討における Ohori 株の増殖の有無は、培養後に OD₆₀₀ 値を測定することで確認した。

DNA 塩基組成

全塩基のうち、グアニン (G) とシトシン (C) の和のモル比率は、染色体によって固有の値を持つため、細菌の分類に有効であるとされている[47]。そこで、Ohori 株の DNA 塩基組成を測定した。Ohori 株の、デオキシリボ核酸混合試料を作製し HPLC により、アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G) とシトシン (C) の 4 塩基を分離した。そして、試料に含まれるそれぞれの拡散のピーク面積から G+C 含有量を算出し

た。

生化学的性質の解析

Ohori 株と *E. termitis*、*E. silesiacus*、および *E. faecalis* の生化学的性質は、API 50CH および API 20 ストレップを使用して解析した。すべての菌株を M17 液体培地で一晚培養し、キットのプロトコールに従い解析・評価を行った[48]。

②実験結果

培地の違いによる増殖の有無および *Enterococcus* 属乳酸菌の特徴の確認

Ohori 株は、表 2-1 に示すように M17、BHI、および Todd-Wewitt 寒天培地においてコロニーを形成した。しかし、MRS 寒天培地においてコロニーを形成しなかった。また、*E. termitis* は Ohori 株と同じ結果となった。しかし、*E. silesiacus* は、Todd-Wewitt 寒天培地でコロニーを形成せず、一方、*E. faecalis* は、すべての培地においてコロニーを形成した。

	Ohori	<i>E. termitis</i>	<i>E. silesiacus</i>	<i>E. faecalis</i>
Todd-Hewitt	○	○	×	○
BHI	○	○	○	○
MRS	×	×	×	○
Kanamycin/aesculin/azide	○	○	×	○
Bile/aesculin	○	○	○	○
Slanetz-Bartley	○	○	○	○

表 2-1. Ohori 株と近縁種における培地による発育の違い

エスクリン加水分解作用および塩化テトラゾリウム還元作用の有無の確認

表 2-1 に示すように、Ohori 株は、Kanamycin/aesculin/azide 寒天培地、Bile/aesculin 寒天培地において、エスクリン加水分解反応陽性であった。また、Slanetz-Bartley 寒天培地において塩化テトラゾリウム還元反応陽性であった。*E. termitis*、*E. faecalis* は、Ohori 株と同様の結果を示したが、*E. silesiacus* は Kanamycin/aesculin/azide 寒天培地においてコロニーを生成しなかった。

カタラーゼ試験

Ohori 株は、5%馬脱繊維血液を添加した BHI 寒天培地と、添加していない BHI 寒天培地のどちらで培養した場合も、カタラーゼ反応陰性であった。

培養条件の検討

M17 培地による培養において、Ohori 株は 34°C で一番増殖した（図 2-8 (A)）。また、10°C で、弱いながらも発育したが、45°C でほとんど増殖しなかった。また、培地の pH は 5.2 から増殖し始め、9.6 でも増殖した（図 2-8 (B)）。さらに、NaCl 濃度は 4%以上から急激に増殖が阻害され、6.5%では増殖しなかった（図 2-8 (C)）。

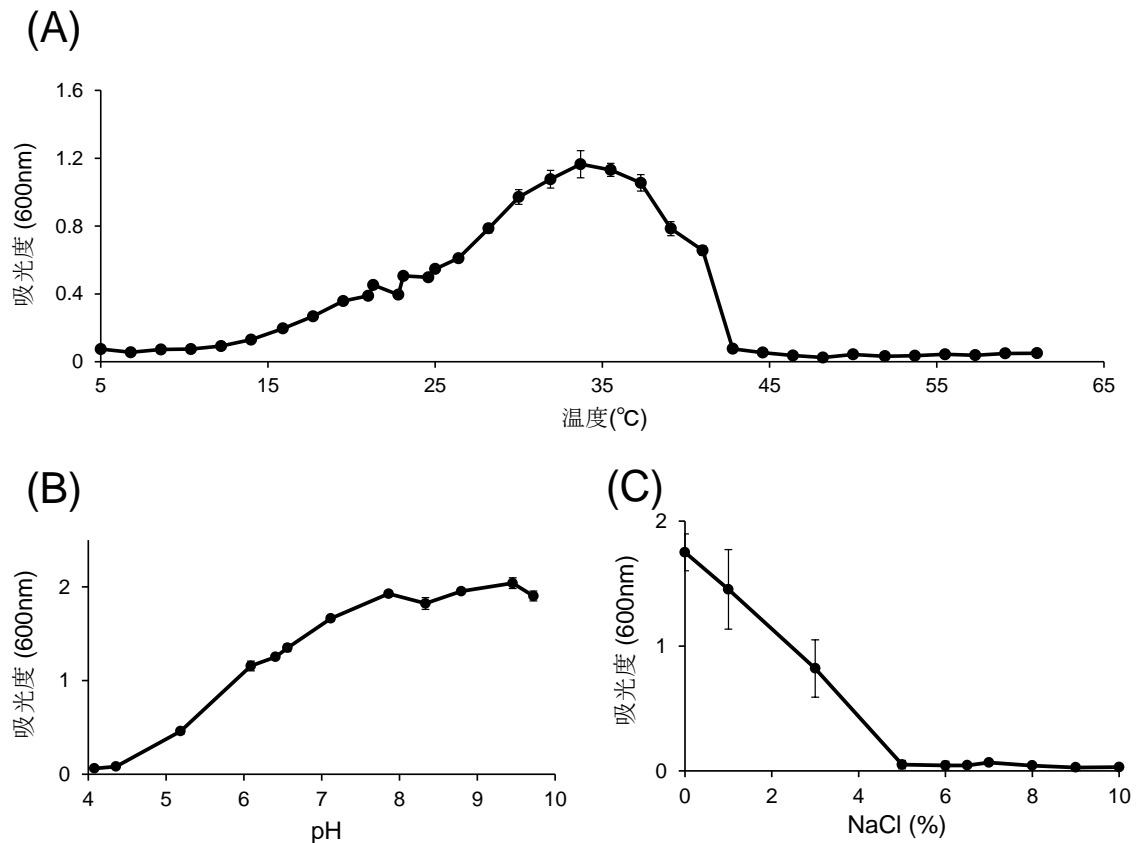


図 2-8. Ohori 株の培養温度 (A)、培地の pH (B)、NaCl 濃度 (C) の違いによる発育の違い

DNA 塩基組成

Ohori 株の G+C 含有量は、39.2mol%であった。この値は、*Enterococcus* 属と改訂される前の *Streptococcus* 属の G+C 含有率、34mol%-46mol%の範囲[47]に入っていた。

生化学的性質の解析

生化学的性質の解析により、他の *Enterococcus* 属と同様に、エスクリン加水分解反応陽性であった。Ohori 株は、アセトイン産生、馬尿酸加水分解反応に対して陽性であった。また、L-ロイシン-2-ナフチルアミドを産生した。さらに、Ohori 株は、D-タガトース、ピロリドニル-2-ナフチルアミドから酸を産生した。

	Ohori 株	<i>E. termitis</i>	<i>E. silesiacus</i>	<i>E. faecalis</i>
エスクリン加水分解	+	+	+	+
ロイシンアミノペプチダーゼ	+	-	+	+
アセトイン産生	+	-	+	+
馬尿酸ナトリウム加水分解	+	-	+	-
ピロリドニルアリルアミダーゼ	+	-	-	+
糖分解能				
D-タガトース	+	-	-	+
D-キシロース	-	+	+	-
グルコネート	-	+	-	-
メレジトース	-	+	-	+
メチル α -D-グルコピラノシド	-	+	-	-

表 2-2. Ohori 株と近縁種の生化学的性質

第 4 節 Ohori 株の遺伝学的特徴

本節までの、形態学的特徴および生理・生化学的特徴より、Ohori 株は *Enterococcus* 属の特徴を持つものの、既知種と異なる性質を持つことが分かった。そこで、遺伝学的特徴を調べることで Ohori 株が遺伝学的に近縁種と違うか否かを確認した。

①実験方法

塩基配列の解読

本節では、16S rRNA 遺伝子の全長配列を決定した。さらに、*Enterococcus* 属乳酸菌の詳細な同定に有効とされている *pheS* 遺伝子配列[49]も決定した。各細菌を培養し、

ゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA から、16S rRNA 遺伝子および *pheS* 遺伝子の配列を、それぞれの遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR 法を用いて増幅した。増幅した PCR 産物について、シーケンサーを用いて解読した。

相同性解析

16S rRNA および *pheS* 遺伝子について、決定した遺伝子の全長配列をもとに BLAST (NCBI) で相同性検索を行い、Ohori 株と相同性の高い既知種を選んだ。また、決定した 16S rRNA および *pheS* 遺伝子配列と、既知の *Enterococcus* 属の配列について、GENETYX Ver.11.1.0 を用いて、相同性 (%) を算出した。

系統樹の作製

決定した Ohori 株の 16S rRNA 遺伝子の完全長配列および *pheS* 遺伝子の部分配列を使用して、系統樹を作成し、既知の *Enterococcus* 属と比較した。系統樹の作成には、MEGA 6 ソフトウェアを使用した。系統解析の際、進化距離の算出には Jukes–Cantor evolutionary model、系統樹の構築には近隣接合法を用いた。さらに、Bootstrap の反復回数は、1000 回で行った。

DNA-DNA ハイブリダイゼーション

全染色体での DNA 塩基配列の相同性、特に近縁と考えられる微生物株同士で同一種であることを確かめるために使用され、現在、細菌において種を決定する最も重要な情報となっている[47]。Ohori 株と、相同性および系統解析の結果、近縁だと考えられた乳酸菌について、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる相同性比較を行った。DNA-DNA ハイブリダイゼーションは、マイクロプレート法を用いて行った[50]。検出した蛍光値に基づき、Ohori 株と近縁種について相同性を算出した。

②実験結果

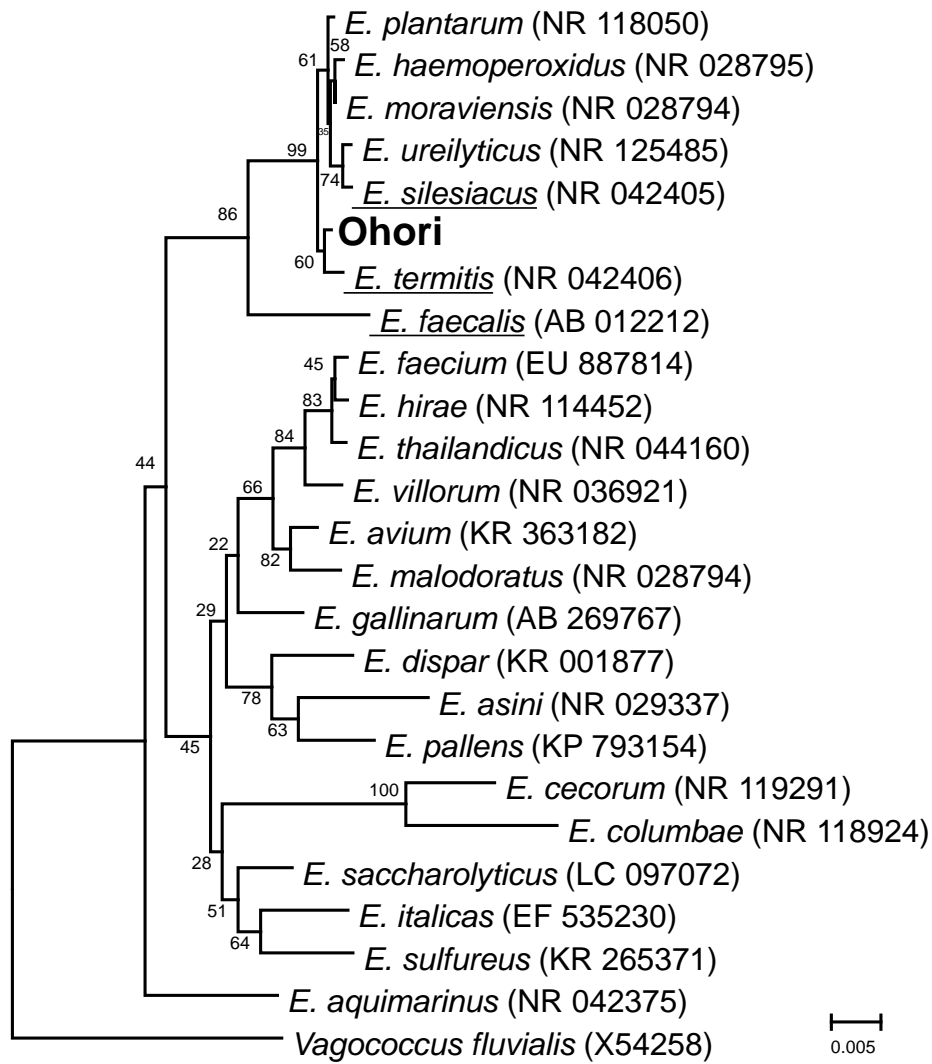
16S rRNA 遺伝子・*pheS* 遺伝子配列の解析

本研究により 16S rRNA 遺伝子の 1443bp を決定した。そして、16S rRNA 遺伝子の配列解析より、Ohori 株は *Enterococcus* 属に属した。また、16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹は、Ohori 株が *Enterococcus faecalis* グループに含まれることを示した (図 2-9 (A))。また、相同性検索の結果、一番相同性が高かった *E. termitis* や、*E. silesiacus*

と系統樹は分岐した(表 2-3) (図 2-9 (A))。また、Ohori 株と近縁種である *Enterococcus termitis*、*Enterococcus silesiacus* とそれぞれ、99.5、99.2%の相同性を示した。それ以外の *Enterococcus* 属乳酸菌を含めると表のような結果となった(表 2-3)。

さらに、本研究で、400bp の *pheS* 遺伝子の配列を決定した。*pheS* 遺伝子に基づく系統樹は、Ohori 株が他の近縁種と分岐して、独立した枝を形成することを示した (図 2-9 (B))。また、*pheS* 遺伝子の配列解析より、Ohori 株は、*E. silesiacus*、*E. termitis* とそれぞれ、87.2、85.7%の相同性を示した(表 2-3)。

(A)



(B)

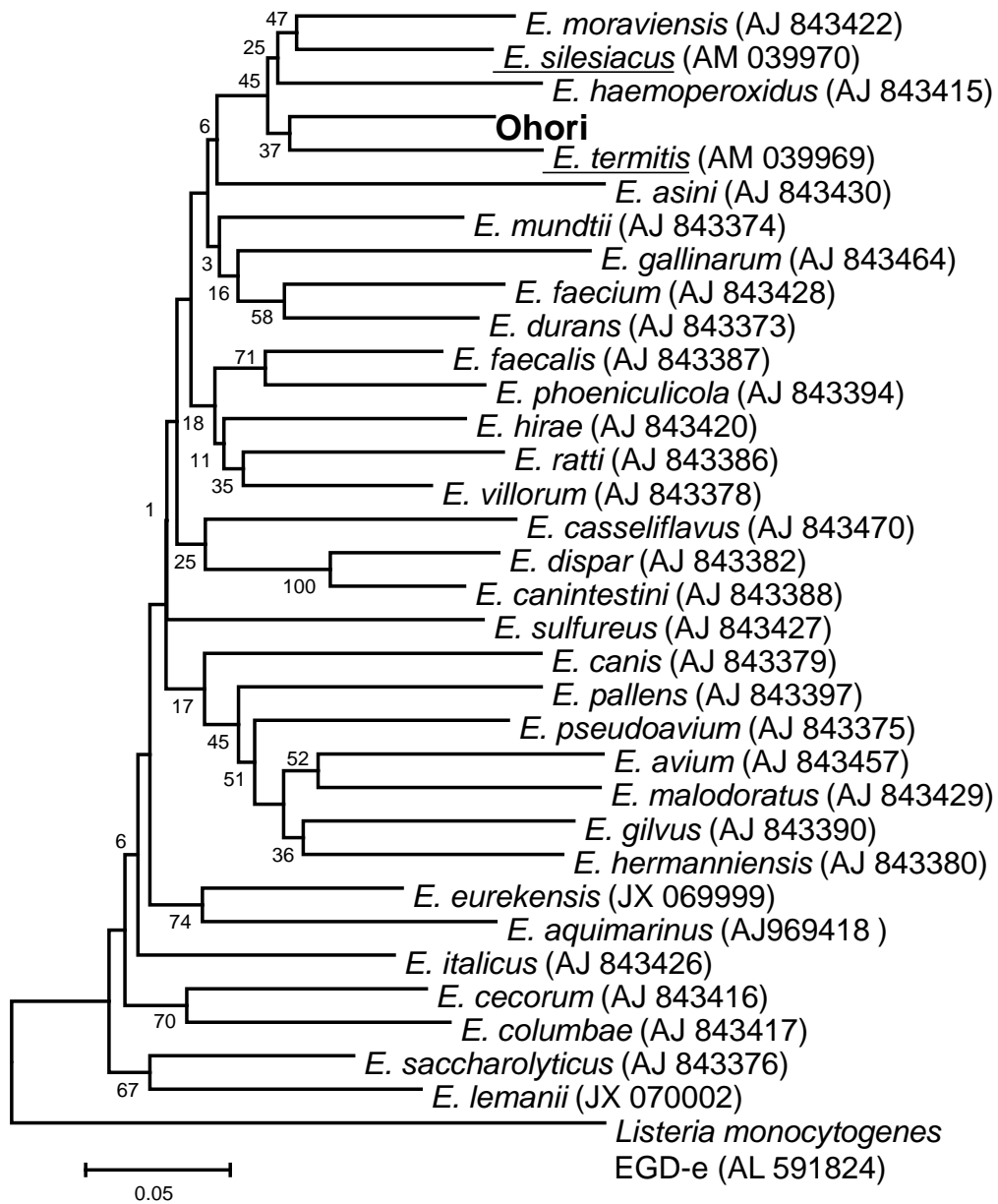


図 2-9. Ohori 株と近縁種における 16S rRNA 遺伝子 (A)、*pheS* 遺伝子 (B) に基づく系統樹

16S rRNA 遺伝子	
近縁種	相同性 (%)
<i>E. termitis</i>	1435 / 1442 (99.5%)
<i>E. haemoperoxidus</i>	1434 / 1443 (99.4%)
<i>E. moraviensis</i>	1433 / 1443 (99.3%)
<i>E. silesiacus</i>	1432 / 1443 (99.2%)
<i>E. faecalis</i>	1410 / 1443 (97.7%)
<i>pheS</i> 遺伝子	
近縁種	相同性 (%)
<i>E. silesiacus</i>	321 / 368 (87.2%)
<i>E. termitis</i>	343 / 400 (85.7 %)
<i>E. haemoperoxidus</i>	341 / 400 (85.2 %)
<i>E. faecalis</i>	339 / 400 (84.7 %)
<i>E. moraviensis</i>	335 / 400 (83.7 %)

表 2-3. Ohori 株と近縁種における 16S rRNA 遺伝子、*pheS* 遺伝子の相同性

DNA-DNA ハイブリダイゼーション

DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果より、Ohori 株は、系統学的に近い存在である *E. termitis*、*E. silesiacus*、および属するグループの *E. faecalis* とそれぞれ 14.0%、11.1%、9.4%の相同性を示した（表 2-4）。

		相同性 (%)
Ohori 株 対	<i>E. termitis</i>	14.0
	<i>E. silesiacus</i>	11.1
	<i>E. faecalis</i>	9.4

表 2-4. Ohori 株と近縁種の DNA-DNA ハイブリダイゼーション

第 5 節 Ohori 株の自然免疫活性化作用の検討

これまでの実験によって、蚊の腸管から単離した細菌 Ohori 株は、*Enterococcus* 属乳酸菌であることが明らかになった。そこで、Ohori 株が自然免疫を担う抗菌ペプチドの発現を誘導するか否かを調べることにより、Ohori 株が自然免疫を活性化できるかを評価した。

①実験方法

死菌化の条件決定

Ohori 株を 34°C で 10 時間本培養した後、50°C、60°C、70°C にそれぞれ設定した恒温槽で 10 分間熱処理した。熱処理した菌液を M17 寒天培地に塗布し、34°C、48 時間培養した。培養後、生菌数を測定し、死菌体になる温度を確認した。本培養した Ohori 株を熱処理した後、生菌数を計測したところ、60°C、10 分の熱処理で死菌体となった。このことから、今後の実験では、Ohori 株を 60°C、10 分の熱処理したものを死菌体として使用した。

Caco-2 細胞の生存に影響を与えない濃度条件の決定

24 well plate に Caco-2 細胞 (2×10^5 cells/500 μ L/well) を播種し、一晚培養した。一晚培養した Caco-2 細胞に、それぞれ 1.0×10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} CFU/mL の濃度に調製した Ohori 株の生菌および死菌体を曝露し 24 時間培養した。24 時間後、Premix WST-1 試薬を加えた MEM を添加し、インキュベートした後、培養上清の OD₄₅₀ と OD₆₃₀ における OD 値を測定した。そして、その値から Caco-2 細胞の生存率を算出した。Caco-2 細胞に Ohori 株の死菌体を 24 時間曝露した結果、 1.0×10^{10} CFU/mL は、培養中に細胞がプレートからはがれて死滅し、実験を終了することができなかった。しかし、生菌体、死菌体ともに 1.0×10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL の曝露では、Caco-2 細胞の生存に影響を与えなかった。このことから、生菌体および死菌体ともに 1.0×10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL を Caco-2 細胞に曝露することとした。

乳酸菌の曝露と Total RNA の抽出

Caco-2 細胞を 6well プレートに 7.0×10^5 cells/well となるように播種し、24 時間培養した。その後、 1.0×10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL の濃度に調製した Ohori 株の生菌体、および 60°C、10 分で熱処理した死菌体を曝露して、6 時間インキュベートした。インキュ

ベート後、細胞培養上清を破棄し、PBS で洗浄した。そして、Caco-2 細胞から total RNA を抽出し、精製した後、逆転写を行い、cDNA を調整した。

real-timePCR 法を用いた抗菌ペプチド遺伝子発現量の定量

作製した cDNA について、real-time PCR を使用して、インターカレーション法により、抗菌ペプチドの発現量を定量した。real-time PCR で定量する遺伝子は、human β -defensin 2 (HBD-2) とし、ハウスキーピング遺伝子として、RPL13A を使用した。発現量の算出は、 $\Delta\Delta C_t$ 法で行った。

②実験結果

Caco-2 細胞に Ohori 株の生菌および死菌を曝露したところ、生菌ではどの濃度でも HBD-2 の発現を誘導しなかった (図 2-10 (A))。一方、死菌を曝露したところ、HBD-2 の発現が誘導された。また、この誘導は、 1.0×10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL の曝露でそれぞれ、control の 6.69 倍、7.90 倍、8.78 倍と有意に増加した (図 2-10 (B))。

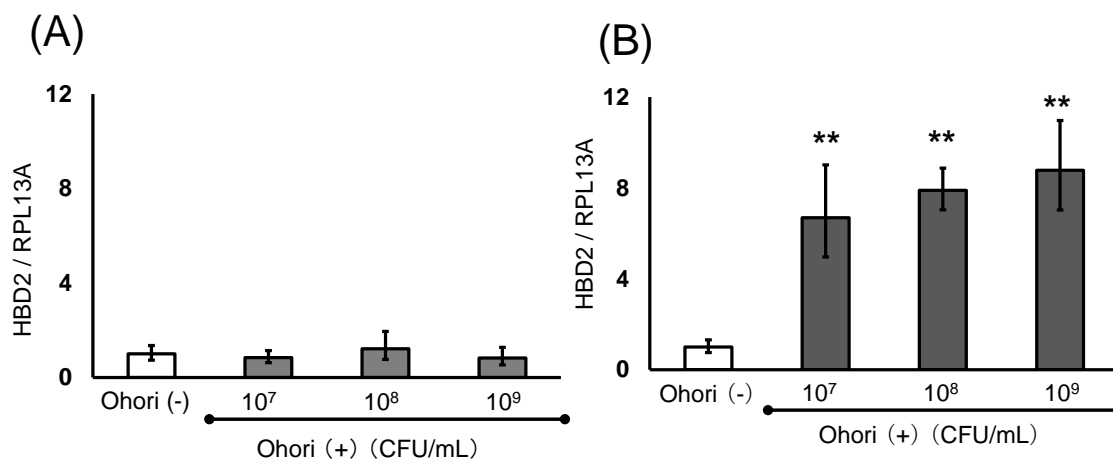


図 2-10. Ohori 株を曝露した Caco-2 細胞における HBD-2 遺伝子の発現誘導効果 (** $P < 0.01$)

第6節 小括

自然免疫は、病原体に即時的に働くだけでなく、獲得免疫の活性化を助ける働きを持っている。前章で検討したミルセンの抗体誘導効果をさらに上昇させるためには、自然免疫を持続的に活性化することが重要であると考えた。そこで本章では、日常的に自然免疫を活性化する物質として、昆虫の中でも蚊の保有する乳酸菌を単離して、自然免疫の活性化作用の有無を検討した。そこで、まず、蚊の腸管から乳酸菌を単離し、特徴を解析した。これまでに、ハチやシロアリから乳酸菌を単離した例は報告されており、MRS 培地、MSS 培地、Todd-Hewitt 培地や[30, 51]、GYP 白亜寒天培地を使用した乳酸菌の選択的培養も行われている[52, 53]。今回の結果により、蚊から乳酸菌を単離する際にも GYP 白亜寒天培地を使用した方法が適用できることを証明した。さらに、本研究では、通常培養を行ったが、さらに乳酸菌を選択的に増殖させるためには、嫌気培養して、乳酸菌以外の通性嫌気性菌の増殖を抑制させることも有効な方法であると考えられる。実際に、シロアリやハチからの乳酸菌単離では嫌気培養で単離を行って、良好な結果が得られている[29, 30, 52]。今回の実験では、20 匹分の蚊のサンプルから 3 個のコロニーを単離したが、これらの方法を採用することによって、今後より多くの乳酸菌を単離できるかもしれない。

本研究で単離した細菌 Ohori 株について、同定と特徴の解析を行った。単離した Ohori 株について、コロニーの観察やグラム染色など、形態学的特徴を観察すると、乳酸球菌の特徴を持ち合わせていた (図 2-4、2-5)。また、細胞の分裂面が直線状になっていることから、*Enterococcus* 属の特徴を持っていることが考えられた。さらに、電子顕微鏡写真では、Ohori 株が独特の形態を有していることがわかった (図 2-6)。次に、この Ohori 株について生理・生化学的解析および遺伝学的解析を行った。そして、これらの解析の際に、近縁種と比較するために、先行実験として 16S rRNA 遺伝子の部分配列を解読し、相同性解析を行った。これまでに蓄積された細菌同定に関する研究より、16S rRNA 遺伝子の 300 塩基程度を決定すれば同定が可能であることが報告されている[44]。今回は、細菌の属間で変化に富む V3 領域の 500bp 程度を同定した。その結果、Ohori 株が *Enterococcus* 属に属する乳酸菌であることがわかった。また、*E. silesiacus* が近縁種であると考えられたが、相同性 (%) が 100%一致しなかった。この結果より、相同性検索の結果近縁と考えられた種、*E. silesiacus*、そして、*E. silesiacus* の近縁である *E. termitis*、および *E. silesiacus* が属するグループの代表株 *E. faecalis* を使用して、Ohori 株とこれらの菌の生理・生化学的性質、および遺伝学的性質を比較した。

まず、Ohori 株は、レンサ球菌選択培地である Todd-Hewitt 培地や、BHI 培地で発育することが分かった。しかし、乳酸桿菌選択培地の MRS 培地では発育しなかった。さらに、*Enterococcus* 属乳酸菌選択培地である Kanamycin/aesculin/azide 培地、Bile/aesculin 培地、Slanetz-Bartley 培地で発育したことから、Ohori 株が *Enterococcus* 属乳酸菌の特徴を持っていることが分かった。さらに、このことは、Ohori 株がカタラーゼ反応陰性であったこと、DNA 塩基組成の測定によって得られた G+C 含有量が *Enterococcus* 属の範囲内に含まれたことから裏付けられた。Ohori 株について、培地の温度や pH、NaCl 濃度を変化させて培養したところ、Ohori 株は 10°C での発育は弱く、45°C で発育しないこと、また、6.5%NaCl で発育せず、pH9.6 で発育することが分かった (図 2-8 (A))。 *Enterococcus* 属の特徴として、6.5%NaCl および pH9.6 で発育することが報告されている[46]。今回、6.5%NaCl 下で発育しなかったこと一般的な *Enterococcus* 属の特徴とは異なった (図 2-8 (B)、(C))。しかし、近縁種であると考えられた *E. silesiacus* は、45°C で発育しないこと、さらに 6.5%NaCl および pH9.6 での発育が弱いことが知られており[54]、Ohori 株は *E. silesiacus* と似た特徴を持つことが考えられる。一方で、*E. termitis* は、10°C、45°C で発育し、また、6.5%NaCl および pH9.6 で発育することが報告されており[54]、Ohori 株と異なる性質が多く見られた。さらに、API を使用した生化学的解析について、Ohori 株と *E. termitis*、*E. silesiacus* が異なる項目に注目したところ (表 2-2)、酵素反応において *E. termitis* と 4 つの項目で違いがあった。また、糖の分解能においても、5 つの糖質において違いが見られた (表 2-2)。一方で、これらの項目において *E. silesiacus* とは、酵素反応で 1 項目、糖の分解能で 2 項目しか違いがなかった (表 2-2)。これらのことから、Ohori 株は、近縁種と生理・生化学的性質に違いがあることが分かった。これまでの結果より、Ohori 株が他の近縁種と性質が異なる点があったため、Ohori 株と近縁種の遺伝学上の違いを詳細に調べるために、16S rRNA 遺伝子の全配列を決定することにした。さらに、*Enterococcus* 属の詳細な同定に使用される遺伝子である *pheS* 遺伝子の配列も解析した。これまでに *E. faecalis* や *E. termitis*[54]だけでなく、*Enterococcus bulliens*[55]やその他の *Enterococcus* 属乳酸菌の同定にこの遺伝子を使用して解析が行われている[56]。16S rRNA 遺伝子と *pheS* 遺伝子の遺伝子配列をもとにした系統樹を作成したところ、Ohori 株は既知種と枝を分岐した (図 2-9)。また、Ohori 株の 16S rRNA 全配列は、*E. silesiacus* と、99.5%、*E. termitis* と 99.2%の相同性を示した。16S rRNA 遺伝子の全配列を決定して、3%以上異なる場合は別種で、2%未満である場合は、DNA-DNA ハイブリダイゼ

ーションで同一種か確認する必要があるとされている[57]。そこで、Ohori 株と近縁種について、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行うこととした。また、*pheS* 遺伝子は、*Enterococcus* 属の同定に有効であるとされ、異なる種との相同性は最大 86%であると報告されている[49]。*pheS* 遺伝子に関しても、Ohori 株と *E. silesiacus* の相同性は、87.2%と基準値を上回っていたが（表 2-3）、系統樹は分岐しており（図 2-9（B））、Ohori 株は、独立した枝を形成していたため、*E. silesiacus* と異なると判断した。また Ohori 株は、*E. termitis* との相同性が 86%以下であり（表 2-3）、系統樹も分岐したため（図 2-9（B））、Ohori 株と *E. termitis* は、異なる種であると考えた。また、Ohori 株と *E. silesiacus*、*E. termitis* および *E. faecalis* の DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる全塩基の比較した結果、その相同性は系統樹で近縁と考えられた種と比較して非常に低い値となった（表 2-4）。DNA-DNA ハイブリダイゼーションの相同性の数値と分類の基準を以下に示す（図 2-11）[47]。このように、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの相同性が、20%以下の場合、新種であると考えることができる。また、これまで単離された新規乳酸菌の報告では、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果は 20%以下であり[54, 58, 59, 60]、今回の結果は、Ohori 株が新規乳酸菌であると評価するにふさわしい結果であった。以上、本章で検討した Ohori 株の形態学的、生理・生化学的、および遺伝学的特徴により、蚊の腸管から単離した乳酸菌 Ohori 株は、*Enterococcus* 属の新種であると考えた。

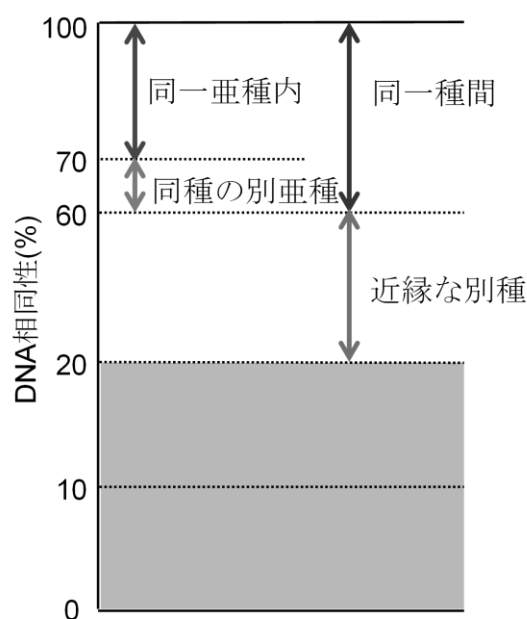


図 2-11. DNA-DNA ハイブリダイゼーションの相同性と分類

今回の研究により、蚊の腸内から *Enterococcus* 属乳酸菌を単離・同定することができた。蚊の腸内細菌叢のメタゲノム解析により、蚊の腸内細菌叢には *Enterococcus* 属が含まれていることが分かっている[36]。また、Ohori 株の近縁であった *E. silesiacus* が、水から単離されたことが報告されている[54]。今回、Ohori 株を単離した蚊は、福岡市の大濠公園で採集した。大濠公園は、総面積が約 39 万 8 千平方メートルあり、うち約 22 万 6 千平方メートルの池を有した公園である[61]。そのため、公園内に生息し、公園内の池で飲水や産卵を行った蚊の腸内に池の水に存在する乳酸菌が取り込まれ、腸管に定着していったことが考えられる。実際、昆虫の細菌は、環境中から取り込まれて腸内に定着すると考えられている[62]。このような結果より、蚊の腸内細菌は、蚊が生息している周囲の環境に影響されて形成されていることが考えられる。また、当研究室でこれまでに行ってきた蚊からの乳酸菌の単離実験において、多くの蚊から乳酸球菌が単離されている (data not shown)。そして、これまでの研究でシロアリから乳酸菌を単離した場合、その多くは乳酸球菌であることが報告され [63]、一方で、ハチにおいては、*Lactobacillus* 属などの乳酸桿菌の単離が多く報告されている[27, 64]。このように、昆虫の種類によって、腸内細菌叢を構成する乳酸菌に違いがあることが考えられる。そして、蚊の腸管は、シロアリと同様に、乳酸球菌が存在しやすい環境なのかもしれない。今後、さらに蚊が保有する乳酸菌の単離・同定を進め、乳酸菌の種類や特徴を調べることで、蚊由来乳酸菌の特徴が解明されると考える。また、新規乳酸菌である Ohori 株について、蚊の腸内に定着した乳酸菌であることを証明するために、再度同じ場所で蚊を採集し、乳酸菌を単離して、同じ Ohori 株が単離できるか確認する必要がある。それによって、今回単離した乳酸菌 Ohori 株が、蚊の腸内に存在する新規乳酸菌であることを証明できるであろう。

さらに本研究では、蚊の腸管から単離した乳酸菌 Ohori 株のヒトに対する抗菌ペプチド誘導作用について検討した。その結果、ヒト腸管細胞由来の Caco-2 細胞において、抗菌ペプチド human β -defensin (HBD-2) の発現量が誘導された (図 2-10)。 β -defensin (HBD) は、腸管全体の腸管上皮から分泌される抗菌ペプチドで[65]、代表的なサブタイプに HBD-1 から HBD-4 がある[66]。そして、HBD-2、3、4 は、健常な腸管細胞から恒常的に分泌される HBD-1 と異なり、通常の状態ではほとんど発現がないが、感染時に産生量が増加することが知られている[66, 67]。HBD-2 は、これらの感染時分泌型のサブタイプの中で最も代表的な抗菌ペプチドであり、これまでに多くの研究が進められている。さらに、Caco-2 細胞において、プロバイオティクス乳酸菌を曝露したところ、

HBD-2 の分泌が誘導されることが知られている[40]。今回の結果より、Ohori 株が Caco-2 細胞において、HBD-2 遺伝子の発現を誘導したことで、Ohori 株は、HBD-2 の発現誘導を介して自然免疫を活性化し、初期感染を防御できる可能性がある。

今回、Ohori 株の死菌体のみで抗菌ペプチド誘導効果が現れた。これまでの報告で、乳酸菌の菌体外、および菌体内成分が免疫の活性化を担っていることが報告されている[68]。また、それらの免疫効果は TLR を介していることが知られている[42]。今後の研究で、どの TLR ファミリーが抗菌ペプチドの誘導を介した自然免疫の活性化を行っているか特定する必要がある。今回使用した Caco-2 細胞は、TLR2、3、4、9 が発現していることが分かっている。したがって、これらの TLR ファミリーのリガンドを標的とした検討を進めていくことができると考える。さらに、TLR ファミリーを特定する上で注目できるのが、Ohori 株のゲノム DNA である。今回、Ohori 株の死菌体でのみ抗菌ペプチドの発現誘導が見られた。この効果が起こった理由として、熱処理をすることで、細胞壁および細胞膜が破壊され、菌体内成分が細胞外に漏出したことが考えられる。そして、漏出した菌体内成分が TLR を介して抗菌ペプチドの発現を誘導したことが考えられる。これまでの研究で、*Lactobacillus* 属乳酸菌を 65°C で 15 分熱処理したことで、乳酸菌の菌体内成分であるゲノム DNA が細胞外に漏出したことが分かっており（論文投稿中）、今回 Ohori 株に行った 60°C、10 分の熱処理でも同様に菌体の破壊とゲノム DNA を含む菌体成分の漏出が起こったことが予測できる。そして、これまでの研究で、乳酸菌のゲノム DNA が、免疫の活性化および抑制などに関与しており、その効果は特定の塩基配列によって制御されていること、さらに TLR9 を介していることが報告されている[69, 70]。さらに、これまでの当研究室において、乳酸菌の死菌体が Caco-2 細胞において抗菌ペプチドを誘導すること、さらに、その乳酸菌から抽出したゲノム DNA も同様に抗菌ペプチド誘導作用を示すことが証明された（論文投稿中）。よって、今回の結果より、熱処理によって細胞外に流出した Ohori 株のゲノム DNA が、TLR9 を介して Caco-2 細胞に作用したことが予想できる。今後は、Caco-2 細胞に乳酸菌のゲノム DNA のみを暴露して、今回の結果と同様の効果が見られるか確認する必要がある。

本研究より、蚊の腸管から単離した乳酸菌 Ohori 株の菌体内成分が、Caco-2 細胞の抗菌ペプチドの発現を誘導し、初期の感染防御に貢献していることを示唆した。当研究室の検討により、Ohori 株の死菌体と近縁種の *E. silesiacus* の死菌体の抗菌ペプチド遺伝子の誘導作用を検討したところ、Ohori 株では、抗菌ペプチドの遺伝子の発現を誘導したにもかかわらず、*E. silesiacus* の死菌体は、この効果を全く示さなかったことが分

かった。そして、*E. silesiacus* は、水由来の乳酸菌であることが分かっている[54]。このことから、Ohori 株が蚊の腸内において変化して、水由来の乳酸菌は保有していない自然免疫活性化作用を獲得したことが予想できる。現在、当研究室では、Ohori 株について、次世代シーケンスを用いたゲノム配列の解析を進めている。今後、Ohori 株のゲノム DNA が保有する自然免疫活性化に関連する配列の特定などを検討していくことが必要である。

本章の結果より、蚊から単離した新種の *Enterococcus* 乳酸菌は、抗菌ペプチドの誘導を介して自然免疫を活性化する可能性がある。そして、自然免疫が活性化されることで、獲得免疫の活性化にもつながり、前章で検討したミルセンのアジュバント効果を増強できるかもしれない。

総括ならびに結論

本研究では、感染症を予防することを目的に、自然免疫と獲得免疫を活性化する免疫活性物質を探索した。ヒトに使用する免疫活性化物質は効果的かつ安全であることが重要である。そこで、ヒトの健康に貢献している天然物や有用微生物から免疫活性化物質を探索することを目標とした。

第一章 獲得免疫活性化物質の探索 ～新たなワクチンアジュバントの探索～

ワクチンによる免疫活性化は現在感染症予防で最も効果があるとされている。現在、多くのワクチンは、不活化した微生物を使用した不活化ワクチンに移行しつつあるが、免疫効果が弱いため、アジュバントと呼ばれる免疫活性化を誘導する物質と抗原を混合している。しかし、使用できるアジュバントが限定されているほか、副作用が出る場合もあるため、ヒトに対して安全で効果的なアジュバントの探索が望まれている。そこで、本章の研究では、天然物より新たなアジュバント効果を探索することを目標とした。テルペン類の天然有機化合物であるミルセンは、**OVA** と混合して接種した場合、**OVA** 特異的な **IgG** 抗体の産生誘導効果を示した。また、ミルセンの抗体誘導効果は、既存のアジュバントである **Alum** よりも早期に現れ、さらに、**Alum** が細胞性免疫のみを活性化する機構であるのと異なり、細胞性免疫および体液性免疫の両方を活性化することがわかった。ミルセンの抗体産生誘導効果の理由として、炭素数 **C₁₀** のミルセンが、炭素数が類似している **Lipid A** と同様に **TLR4** を介して行ったこと、あるいは、ポリマー体を形成したミルセンを抗原と混合することにより、抗原提示能が上昇したことが考へる。さらに、結核菌抗原 **Ag85B** 抗原に対しても特異的な抗体の産生を誘導することがわかり、臨床抗原にも応用できることが考えられた。これらの結果より、ミルセンは既存のアジュバントよりも効果的なアジュバントとして臨床応用できることが期待できる。

第二章 自然免疫活性化物質の探索 ～初期感染防御と獲得免疫の増強～

自然免疫の活性化は、病原体に即時的に働く初期防御だけでなく、獲得免疫の活性化を増強する働きを持っている。そこで、本章の実験では、ミルセンの抗体産生誘導効果を増強するために、自然免疫を活性化することに注目した。そして、継続して摂取可能な乳酸菌を使用して自然免疫を活性化することを目標とした。さらに、自然免疫活性化作用が強い乳酸菌を選択するために、自然免疫のみを持つ昆虫が保有する乳酸菌、中でも病原性の高い微生物に対して強い抵抗性を持つ、蚊が保有する乳酸菌に注目した。本

研究では、福岡市の大濠公園にて蚊を採集し、その蚊の腸管から乳酸菌を単離することを試みた。今回、単離した乳酸菌候補の 1 つを **Ohori** 株と命名して解析を行った。**Ohori** 株の形態学的、生理・生化学的、および遺伝学的特徴は、*Enterococcus* 属乳酸菌の特徴を示したが、*Enterococcus* 属乳酸菌の既知種と異なっていた。本研究より、**Ohori** 株は *Enterococcus* 属乳酸菌の新種であると考え、**Ohori** 株を、新規細菌として、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）に寄託した。

Ohori 株について、ヒト腸管由来細胞 **Caco-2** 細胞における抗菌ペプチド誘導作用について検討した。**Ohori** 株の生菌体および死菌体を **Caco-2** 細胞に曝露して、**Caco-2** 細胞における抗菌ペプチド **HBD-2** の発現誘導効果調べた。その結果、**Ohori** 株の死菌体のみで感染時に初期防御作用を担う **HBD-2** の発現量が上昇した。このことより、**Ohori** 株は、ヒトにおいて抗菌ペプチドを誘導する作用があることが確認された。また、この効果は、熱処理によって漏出した菌体内の成分が関与していることが考えられる。乳酸菌の菌体内成分のひとつであるゲノム DNA は、*in vitro* および *in vivo* において、免疫を活性化させる作用があることが報告されており、今回、熱処理によって漏出した **Ohori** 株のゲノム DNA が **Caco-2** 細胞において、抗菌ペプチドの遺伝子を誘導することによって免疫を活性化している可能性が示唆された。しかし本研究では、抗菌ペプチドのタンパク質の分泌が誘導されるか否かを確認するまでには至っていない。今後の研究では、**HBD-2** を含む抗菌ペプチドのタンパク質の産生誘導効果を検討する必要がある。さらに、本研究では、**Ohori** 株のどの菌体成分が抗菌ペプチドを誘導しているかを特定するまでには至らなかった。今後の研究では、ゲノム DNA を含む菌体内成分を **Caco-2** 細胞に曝露して、抗菌ペプチド誘導効果について検討する必要がある。今後、抗菌ペプチド誘導作用の作用機序についてさらに解析を進めることで、獲得免疫の活性化を助ける作用機序も明らかになることが期待できる。

実験の部

1) マウス

4 週齢の雄の BALB/c マウス（九動）を用いた。マウスは、プラスチックケージの中に、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\%\pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクル（7 : 00AM 点灯）の動物室で飼育した。なお、エサは CE-2（クレア、東京）を用い、水は自由に摂取できるようにした。実験動物の取扱いは、福岡大学動物実験委員会（Experimental Animal Care and Use Committee）規程に従った。

2) 免疫活性化作用の検討

2-1) 試料作製に使用した溶液

10xPBS

組成	(g)
NaCl	80
KCl	2
リン酸水素二ナトリウム（12 水和物）	29
リン酸二水素カリウム	2
Total（超純水）	1L

10N NaOH で pH7.4 に調整する

121 °C、20 分で滅菌する

1xPBS は、100mL 上記の 10xPBS を 900mL の超純水に無菌的に加え 1L とし、十分に混合した後、121°C、20 分で滅菌したものを使用する。

PBS-T

500mL の 1xPBS に 0.05 (w/v) % となるように Tween-20 を添加して十分に混合する。

2-1) 投与試料の作製

OVA と Ag85B の調製

OVA（Sigma-Aldrich）と Ag85B（abcam）を PBS でそれぞれ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調製した。

ミルセンの調製

800 μ g/ μ L のミルセン (Wako Pure Chemical Industries) 7 μ L を 14 μ L の dimethyl sulfoxide (DMSO) に懸濁した。その後、0.7mL の PBS で、ミルセンの最終濃度が 8.0mg/mL となるように調製した。OVA または Ag85B 調製液と、ミルセン溶液を等量混合して、投与用試料とした。また、OVA または Ag85B のみを投与する場合は、21 μ L の DMSO を PBS で 0.7mL に調製した溶液とそれぞれの抗原を等量混合して作製した。

Alum の調製

Alum solution (Imject Alum、Thermo Scientific) は、1 μ L の alum solution (40 μ g/ μ L) を 100 μ L の OVA または Ag85B 溶液に懸濁し、最終的に 200 μ g/mL となるように PBS で調製した。

2-2) マウスへの投与

すべてのマウスの投与は、200 μ L の腹腔内投与で行った。

2-3) 投与スケジュールと投与群

ミルセンの OVA 特異的 IgG 産生誘導効果の検討

1 群 6 匹のマウスに、3 週おきに 3 回 (0、3、6 週) 投与を行った。投与群は、OVA のみを投与した群 (Control)、ミルセンのみを投与した群 ([ミルセン (OVA-)]、OVA と Alum を投与した群 ([Alum (OVA+)]、OVA とミルセンを投与した群 ([ミルセン (OVA+)] 作成した。初回投与から 3、5、7 週目にマウスから採血して、血清を回収した。

ミルセンの抗体産生誘導作用の特徴の検討

1 群 6 匹のマウスに、0、3、6 週に投与を行った。その際、ミルセンについて図に示すように、3 種類の投与法を設定した。まず、OVA とミルセンを混合して投与した群 (混合投与)、OVA とミルセンを混合せずに同時に別々の箇所投与した群 (個別投与 (0 時間))、ミルセンを投与した 24 時間後に OVA を投与した群 (個別投与 (24 時間)) を作成した。それぞれの群初回投与から 8 週目にマウスから採血し、血清を回収した。

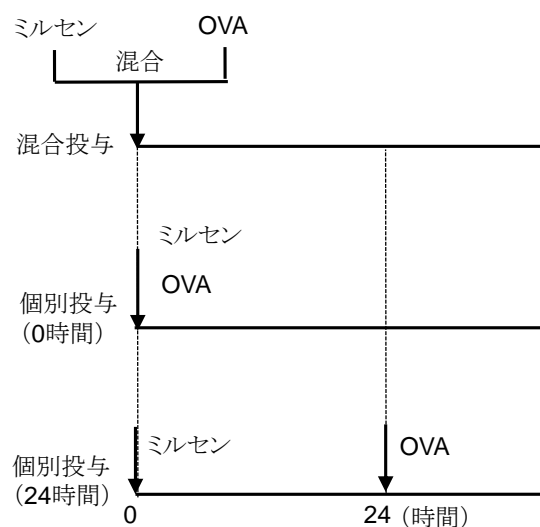


図 ミルセンの3種類の投与法

脾細胞サイトカイン測定によるミルセンの免疫活性型の確認

1 群 6 匹のマウスに、0、3、6 週に投与を行った。投与群は、Control 群、[ミルセン (OVA-)]群、[Alum (OVA+)]群、[ミルセン (OVA+)]群を作製した。初回投与から 3、8 週目にマウスの脾臓を摘出して、脾細胞を回収した。

IgG サブタイプの測定によるミルセンの免疫活性型の確認

1 群 6 匹のマウスに、0、3、6 週に投与を行った。投与群は、Control 群、[Alum (OVA+)]群、[ミルセン (OVA-)]群、[ミルセン (OVA+)]群を作成した。初回投与から 5、8 週目にマウスから採血して、血清を回収した。

ミルセンの結核菌抗原 Ag85B に対する抗体産生誘導効果の検討

1 群 6 匹のマウスに、3 週おきに 3 回投与を行った。投与群は、Control 群、[ミルセン (Ag85B-)]群、[Alum (Ag85B+)]群、[ミルセン (Ag85B+)]群を作製した。初回投与から 3、5、7 週目にマウスから採血して、血清を回収した。

3) 抗原特異的抗体産生量の測定

OVA 特異的 IgG および IgG サブタイプは、ELISA 法を用いて行った[11]。回収した血液を 12,000rpm、15 分遠心し、血清を回収した。回収した血清を 50°C、30 分加温し補体の非働化を行った。これらの処理をした血清は、使用するまで、-20°C で保存した。

ELISA 法は、96well プレートに 0.05M の重炭酸塩緩衝液 (pH9.6) で 10 μ g/mL に作製した OVA を添加し、4°C で一晩インキュベートした。そして、PBS-T および PBS で洗浄した後、1%の BSA (Biochemical Reagents) でブロッキングした。血清試料は、はじめに、PBS で Total IgG について 200 倍、IgG1 について 3000 倍、IgG2a について 100 倍に希釈した。また、また、Ag85B 特異的 total IgG の測定は、血清を 20 倍に希釈して使用した。その後プレート上で 2 倍ずつ希釈していき、1,638,400 倍まで希釈した。そして、37°C で 2 時間インキュベートした。再び PBS-T および PBS で洗浄した後、alkaline phosphatase で標識した抗マウス二次抗体を 4,000 倍希釈して添加した。そして、再び 37°C で 2 時間インキュベートした。PBS-T および PBS で洗浄した後、最後に、*p*-nitrophenyl phosphate solution (Sigma–Aldrich) を添加し、OD₄₀₅ 値をプレートリーダーで測定した。Total IgG のエンドポイントは、バックグラウンドのカットオフ値を超えていたら陽性と判断した。また、カットオフ値は、OVA または Ag85B をコーティングした well の光学濃度がコーティングしていない well の光学濃度の 2 倍となった場合に陽性とした。

4) サイトカイン産生量の測定

サイトカインの産生量はサンドウィッチ ELISA 法により測定した[11]。初回投与 3 週目および 8 週目に無菌下で脾臓を摘出し、摘出した細胞を 3mL の RPMI 1640 培地 (Sigma–Aldrich) を用いてホモジナイズした。そして、4°C、1,200rpm、5 分遠心して沈殿した細胞を回収した。回収した細胞液に、さらに 3mL の RPMI 1640 培地を添加し、脂肪組織を取り除いた後、4°C、1,200rpm、8 分で遠心して単一の細胞を回収した。さらに回収した細胞から赤血球を取り除くために、1mL の ATC-0.83%NH₄Cl:Tris アミノメタン溶液 (pH7.2) 9:1 の割合で混合した溶液を加え、4°C、1,500rpm、5 分で遠心した。最後に、細胞を再び 10%の熱不活性化させた FBS を加えた RPMI 1640 培地に懸濁した。実験に使用する細胞数は、トリパンブルー染色法を用いて計測した。そして、脾細胞は 12well プレートに 2×10^7 となるように播種し、プレートは、37°C、5%CO₂ で培養した。0.5mg/mL の OVA で再刺激した後、細胞の上清を IL-13 については 24 時間、および IFN- γ 、IL-4 においては 72 時間後に回収した。サンドウィッチ ELISA 法 (Duoset、R&D Systems) を使用して測定した。

5) 抗体産生誘導効果の検討における統計解析

ミルセンの抗体産生誘導作用の検討に関する研究において、データは、**one-way ANOVA** と **Turkey post-hoc test** を使用した。すべての解析において、**P < 0.05** を有意差ありと判断した。

6) 蚊の採集

6-1) 蚊の採集

人囿法は、ヒトに集まった蚊を、以下の図に示す吸虫管を用いて吸い上げ、捕獲する方法である（図 2-1 (C)）。採集時の情報を以下の表に示す。採集した蚊は、**15mL** の遠心用チューブに入れ、チューブを氷中で保存し、大濠公園から福岡大学の当研究室まで移動した。

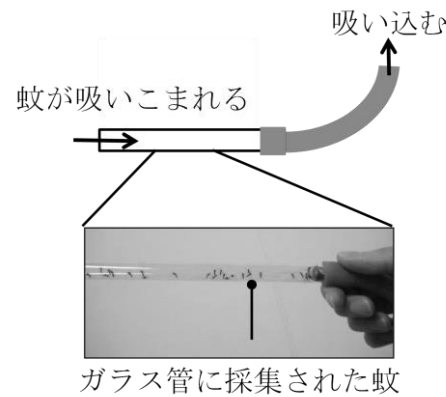


図 吸虫管

採集日	2012 年 9 月 13 日
採集場所	福岡市中央区大濠公園（福岡）
天候	晴れ
気温	30℃ -31℃
緯度・経度	北緯 33 度・東経 130 度
移動時間	1 時間

表 蚊の採集における条件

6-2) 蚊の同定

氷麻酔を施した蚊について、実体顕微鏡（SZX7、OLYMPUS）で、触覚の形、足の模様などを観察して、その種類を同定した。本研究で同定したヒトスジシマカの特徴を以下に示す。

ヒトスジシマカの特徴

- ・ 黒い体色
- ・ 背の真ん中に白い縦縞が 1 本入っている
- ・ 4 番目のフ節は、白黒色が等分されている
- ・ 翅の付け根の鱗片が白色円形である
- ・ メスの触覚は 1 本だが、オスの触覚は刷毛状になっている

6-3) 蚊の解剖

70%エタノールに浸漬したスライドグラス、白金耳、およびピンセットをクリーンベンチ中に入れ、紫外線照射することにより滅菌した。その後、スライドグラスを実体顕微鏡に置き、滅菌した PBS を滴下した。滴下した PBS 上に氷麻酔を施した蚊を移し、白金耳を用いて中腸を取り出した。

6-4) 乳酸菌の単離

摘出した中腸を 1 匹ごとに PBS で希釈した 40%グリセリン 100 μ L を入れたバイオマッシャー（ニッピ）を使用してホモジナイズした。中腸のホモジナイズ液を GYP 寒天培地に塗布し、30 $^{\circ}$ C、48-96 時間培養した。単離した乳酸菌候は、80% (w/v) グリセロールを使用して -80 $^{\circ}$ C で保存した。

7) 使用した乳酸菌

7-1) 乳酸菌

本研究に使用した乳酸菌、*Enterococcus termitis* LMG8895、*Enterococcus sileciacus* LMG 23085 は、Belgian Coordinated Collections of Microorganisms（BCCM/LMG）から、*Enterococcus faecalis* NBRC 100480 は、National Institute of Technology and Evaluation（NITE）Biological Resource Center（NBRC）から購入した。

7-2) 培地

以下の表に示す組成で培地を作製した。なお、寒天培地を使用する場合は、400mL に対して 6g の寒天を添加した。

GYP 白亜寒天培地

組成	(g)
グルコース	10
酵母エキス	10
ポリペプトン	5
カツオ肉エキス	2
酢酸ナトリウム・3H ₂ O	2
Salt solution	5mL
Tween 80 solution	10mL
Total (イオン交換水)	1.0 (L)
pH 6.8	
180℃、30 分乾熱滅菌した CaCO ₃	5 (g)
121℃ で 15 分間高圧蒸気滅菌する	

Salt solution

組成	(g)
MgSO ₄ ・7H ₂ O	4.0
MnSO ₄ ・4H ₂ O	0.2
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.2
NaCl	0.2
Total (イオン交換水)	100 (mL)

MRS 培地

組成	(g)
ポリペプトン	10
カツオ肉エキス	10
酵母エキス	5
Tween 80	1
クエン酸アンモニウム	2
酢酸ナトリウム	5
リン酸二カリウム	2
グルコース	20
MRS mix	1mL
Total (イオン交換水)	1.0 (L)

pH7.8±0.2

115℃で10分間高圧蒸気滅菌する

MRS mix

組成	(g)
硫酸マグネシウム	1.0
硫酸マンガン	0.5
Total (イオン交換水)	10 (mL)

Todd-Hewitt 培地

組成	(g)
かつお肉エキス	10.0
トリプトン	20.0
グルコース	2.0
重炭酸ナトリウム	2.0
塩化ナトリウム	2.0
リン酸水素二ナトリウム	0.4
Total (イオン交換水)	1.0 (L)

pH7.8±0.2

115℃で10分間高圧蒸気滅菌する

Bile/aesculin 培地

組成	(g)
ペプトン	8.0
胆汁酸	20.0
クエン酸第二鉄	0.5
エスクリン	1.0
Total (イオン交換水)	1.0 (L)

pH7.1±0.2

121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌する

Kanamycin/aesculin/azide 培地

組成	(g)
トリプトン	20.0
酵母エキス	5.0
塩化ナトリウム	5.0
クエン酸ナトリウム	1.0
アジ化ナトリウム	0.15
硫酸カナマイシン	10.0mg
Total (イオン交換水)	1.0 (L)

pH7.0±0.2

121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌する

Slanetz-Bartley 培地

組成	(g)
トリプトース	20.0
酵母エキス	5.0
グルコース	2.0
リン酸水素二ナトリウム	4.0
アジ化ナトリウム	0.4
塩化テトラゾニウム	0.1
Total (イオン交換水)	1.0 (L)

pH7.2±0.2

メンブランフィルター法で滅菌

また、以下の培地は購入した。

- ・ M17 培地 (Becton, Dickinson and Company) (ただし、使用前に滅菌した 10%乳糖溶液を容量の 1/20 量添加した。) 調製した培地を 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- ・ Brain heart infusion (BHI) 培地 (Becton, Dickinson and Company) 調製した培地を 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

7-3) 菌の保存

80%グリセリンの調製

80mL のグリセリンと 20mL のイオン交換水を混合し、121°C、20 分で高圧蒸気滅菌した。

グリセリンストックの作製

2mL のスクリュウ付きチューブに、一晚培養した菌液と 80%グリセリンを等量十分に混合し、-80°C で保存した。

グリセリンストックからの菌の取り出し方

-80°C に保存してあるグリセリンストックが解凍しないうちに、火炎滅菌した白金耳を用いて掻き取り、平板培地の一部に塗りつけ、グリセリンストックはすぐに-80°C に戻した。その後、平板培地に塗布した一部を全体に塗り広げた。

グリセリンストックの更新

5-6mL の培地に-80°C のグリセリンストックから、0.5-1mL 接種して一晚培養し、2mL のスクリュウ付きチューブに、80%グリセリンと等量混合した。

8) 菌の培養

すべての菌株の培養は M17 培地で行った。培養温度は、Ohori 株と *E. termitis* に関しては、至適培養温度を検討して決定した温度で培養した。至適培養温度の決定は、以下に示す 13) 培養温度の違いが発育に与える影響の検討に従って行い、21°C から 41 °C までで検討した。そして、両菌ともに培養温度は 34°C に決定した。その他の菌株に関しては、プロトコールで推奨された温度を使用した。至適培養時間は、それぞれの菌株の増殖曲線を作成し、OD₆₀₀=0.05 から培養を開始し、OD₆₀₀=0.5-1.0 付近に達した時間

を使用した。その結果、Ohori 株、*E. termitis*、*E. sileciacus* は、10 時間、*E. faecalis* は 4 時間培養することに決定した。それ以降、本培養を行う場合は、前培養した菌液を $OD_{600}=0.05$ となるように希釈し、そこから至適培養時間を用いて培養した。

9) 形態観察

9-1) コロニー観察

Ohori 株を M17 寒天培地に接種し、34°C、48 時間培養した後、コロニーの形、色、表面の形態を肉眼で観察した。また、コロニーの大きさは、定規を用いてシャーレの裏からコロニーの直径を測定した。

9-2) グラム染色

清拭したスライドガラスの上に、精製水を白金耳で 1-2 滴置き、少量の菌を白金耳で加え、軽く混合しながら 1cm に広げた。その後、塗付した菌液を空気中で自然乾燥し、塗付した面を上にして、ゆるやかな火炎中を連続して 5 秒間に 3 回程度通過させ、固定させた。次に、クリスタルバイオレット (neo-B&M ワコー) で菌の塗付面を覆うようにして 30-60 秒染色し、スライドガラスの染色液を傾けて捨て、そのまま水道水で水洗した。そして、ヨウ素液 (neo-B&M ワコー) で菌の塗付面が十分に覆われるようにして 60 秒間反応させ、再び洗浄をした。乾燥しないままに 5-6 滴の脱色液 (neo-B&M ワコー) を塗付面一面に滴下し、スライドガラスをゆすって捨てる操作を 30 秒以内に 3-4 回繰り返した。再び洗浄した後、パ이프エル液 (neo-B&M ワコー) で菌の塗付面を覆うようにして 30-60 秒染色した後、洗い流した。完成したスライドガラスにツェーデル液を 1 滴落として、システム顕微鏡 BH-2 (OLYMPUS) を用いて油浸法により観察した。

9-3) 電子顕微鏡

Ohori 株を M17 培地で一晚培養し、培養後の菌液を、M17 培地で $OD_{600}=0.05$ となるように希釈して、10 時間培養した。培養した菌体を、10,000rpm、2 分で遠心後、上清を取り除くことで回収した。そして、約 2.9×10^9 CFU/mL の菌液を 10 倍希釈となるように 2% (w/v) のグルタルアルデヒド・0.1M リン酸緩衝液溶液、4°C で前固定した。本研究では、菌体を回収・前固定した後、花市電子顕微鏡技術研究所 (愛知県) に委託した。委託後の作業工程は以下の通りである。0.1M のリン酸緩衝液で洗浄し、2%四酸

化オスミウム-0.1M リン酸緩衝液で 4°C、2 時間静置して後固定した。固定した菌体を 0.1M のリン酸緩衝液で洗浄後、50%, 70%, 90%, および 100%のエタノールで計 2 時間処理することで脱水した。その後、酢酸イソアミルで室温、20 分の置換を 2 回繰り返し、電子顕微鏡撮影用の試料とした。次に、作製した試料を試料台に移し、臨界点乾燥法で乾燥した。そして、オスミウムプラズマコートでコーティングした。撮影は、JSM-6320F (JEOL) を用いて 5kV で行った。

10) 培地の違いによる増殖の有無

各乳酸菌を Todd-Hewitt 寒天培地、BHI 寒天培地 (Becton、Dickinson and Company)、MRS 寒天培地に接種し 37°C、48 時間培養し、コロニー形成の有無を確認した。

11) エスクリン加水分解作用および塩化テトラゾリウム還元作用の有無の確認

各乳酸菌を Bile/aesculin 寒天培地、Kanamycin/aesculin/azide 寒天培地に接種し、それぞれ 37°C、35°C で 48 時間培養した。エスクリン加水分解作用の有無は、培地にコロニーを形成し、周りに黒色のハローを形成するか確認することで判断した。また、各乳酸菌を Slanetz-Bartley 寒天培地に接種し、35°C、48 時間培養した。Ohori 株の塩化テトラゾリウム還元作用の有無は、培地に赤色または栗色のコロニーを形成するか確認することで判断した。

12) カタラーゼ試験

5%となるように馬脱繊維血液 (Nippon Bio-test Laboratories) を添加した BHI 寒天培地と添加していない BHI 寒天培地のそれぞれに各乳酸菌を塗布し、37°C、48 時間培養した。培養後のコロニーをスライドガラスに塗付し、過酸化水素を滴下した。カタラーゼ反応の判定は、過酸化水素滴下時に、気泡が発生した場合をカタラーゼ陽性、気泡が発生しない場合をカタラーゼ陰性とした。

13) 培養温度の違いが発育に与える影響の検討

Ohori 株を M17 培地で一晚培養し、培養後の菌液を M17 培地で OD₆₀₀=0.05 となるように希釈し、0.5mL チューブに 200 μ L ずつ分注した。分注したチューブを、サーマルサイクラー PC818 (ASTEC) で 5-61°C (3 回の反応に分け、それぞれ 5-25°C、21-41°C、41-61°C で設定した) まで温度を変化させて 10 時間培養した。培養後、それぞ

れ培養液の OD₆₀₀ 値を測定した。

14) 培地の pH の違いが発育に与える影響の検討

0.5N HCl および 0.5N NaOH を使用して、以下の表に示すような pH 調整液を調製した[71]。

酸性側 pH (pH3-6) の調整

濃度 (N)	0.5N HCl (mL)	滅菌水 (mL)	推定 pH	本研究での実際の pH
0.03	0.6	9.4	6	6.56
0.04	0.8	9.2	6	6.41
0.05	1.0	9.0	6	6.09
0.12	2.4	7.6	5	5.19
0.15	3.0	7.0	4	4.36
0.16	3.2	6.8	4	4.08

塩基側 pH (pH7-10) の調整

濃度 (N)	0.5N NaOH (mL)	滅菌水 (mL)	推定 pH	本研究での実際の pH
0.01	0.2	9.8	7	7.12
0.04	0.8	9.2	8	7.86
0.05	1.0	9.0	8.9	8.33
0.06	1.2	8.8	9	8.79
0.08	1.6	8.4	9.6	9.45
0.09	1.8	8.4	10	9.72

表 M17 培地の pH 調整に使用した調整液の組成

2 倍濃度の滅菌した M17 培地を調製し、上記の pH 調整液と無菌的に 5mL ずつ等量混合した。その後、それぞれの混合液から 5mL ずつ摂取し、pH を測定した。本研究での実際の pH を表の一番右に示す。そして、Ohori 株を M17 培地で一晩培養し、培養後の菌液を M17 培地で OD₆₀₀=0.05 となるように残りの各混合液 5mL で希釈し、34°C、24 時間培養した。培養後、それぞれの培養液の OD₆₀₀ 値を測定した。

15) 培地の NaCl 濃度の違いが発育に与える影響の検討

M17 培地の塩濃度を 0、1、3、5、6、6.5、7、8、9、10%となるように NaCl を用いて調整し、高圧蒸気滅菌した。その後、M17 培地で一晚培養した Ohori 株をそれぞれの培地で、OD₆₀₀=0.05 となるように希釈して、34 °C、24 時間培養した。培養後、それぞれの培養液の OD₆₀₀ 値を測定した。

16) 細菌からの DNA の抽出

一晚培養した細菌を Gentra Puregene Yeast/bact. Kit (QIAGEN) を用いて培養した。一晚培養した培養液を 12,000 rpm、2 分で集菌し、上清を廃棄した後、300μL の Cell Suspension Solution を加えて懸濁し、1.5μL の Lytic Enzyme Solution を加え混和して、37°C、30 分インキュベートした。その後、15,000 rpm、1 分遠心して上清を廃棄し、300μL の Cell Lysis Solution を加えて懸濁した。懸濁後、80 °C、5 分加熱し、室温に冷ましてから、1.5 μL の RNase A Solution を加えて混和し、37°C、60 分インキュベートした。試料を室温まで冷まし、100μL の Protein Precipitation Solution を加え、20 秒ボルテックスした。その後、5 分氷冷し、15,000 rpm、3 分遠心した。その後、上清を 300μL のイソプロパノールに加え、十分に混和した。15,000rpm、1 分遠心し、上清を廃棄し、300μL の 70%エタノールを加え、再び 15,000rpm、1 分遠心し、上清を廃棄した。その後、真空乾燥機を用いて、5 分間で乾燥させた。最後に 10μL の Nuclease free water (NFW) で懸濁し、DNA 溶液とした。

17) G+C 含有量の算出

0.5μg/mL に調整した精製 DNA、40μL を 100°C、10 分で熱変性し、氷冷した。そして、DNA-GC Kit (Yamasa Corporation) に付属しているヌクレアーゼ P1 溶液を 40μL 加え、50°C で 60 分ヌクレアーゼ処理した。その後、Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75、Takara) を 40μL 加えて 37°C、1 時間で脱リン酸化し、これを HPLC 用のデオキシリボ核酸混合試料とした。デオキシリボ核酸混合試料から、HPLC 法により、guanine (G)、cytosine (C)、adenine (A)、thymine (T) の 4 塩基を分離した。カラムは、COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Packed Column (NACALAI TESQUE) を使用し、カラム温度は 27°C に設定した。分離溶媒は、0.01M NH₄H₂PO₄ (pH6.6) -アセトニトリル (40:1, v/v) を使用した。また、標準品として、DNA-GC Kit に付属している 4 塩基の等量混合物である GC Analysis Std を使用した。そして、DPL910-W (日本分光) を用いて、それぞれ

60 μ L の試料を使用して測定した。G+C 含有量は、試料に含まれるそれぞれの核酸のピーク面積 (N_S) と、標準品のピーク面積 (N_R) を用いて、 $(\text{mol\% G+C}) = 100 \times (G_S/G_R + C_S/C_R) / (A_S/A_R + G_S/G_R + C_S/C_R + T_S/T_R)$ 式で算出した。

18) 生化学的性質

糖の資化性および、酵素反応を調べるために、API 50CH および API 20 Strep (bioMérieux、France) を使用した。M17 で 24 時間培養した菌体を、10,000rpm、2 分で遠心し、上清を取り除くことで回収した。そして、滅菌水に希釈して各キットに使用した。

API 50 CH

菌体を添付されている 10mL の API 50CHL 培地に、 $OD_{600}=0.45$ となるように菌液を添加した。添加した後、49 種類の基質が入ったプレートに 120 μ L ずつを加え、その上から、ミネラルオイルを約 250 μ L ずつ重層した。そして、34 °C で培養し、培養 24 時間後および 48 時間後にプレートの各 well の培地の色の変化を確認した。基質の色の変化と評価については、キットのプロトコールに従った[48]。

API 20 Strep

菌体を 3mL の滅菌水に $OD_{600}=0.45$ となるように希釈して、添付された基質が入ったプレートの VP から ADH までに 100 μ L ずつ接種した。そして、残りの菌液 0.5mL を添付されている GP 培地に添加し、プレートの RIB から GLYG までに 120 μ L ずつ添加した。その後、ADH から GLYG までに、ミネラルオイルを約 250 μ L ずつ重層した。そして、34 °C で培養し、培養 4 時間後に基質 VP に添付の VP1 および VP2 を 1 滴ずつ、HIP に NIN を 2 滴、PYRA から LAP までに、ZYMA および ZYMB を 1 滴ずつ添加し、10 分後に培地の色の変化を確認して判定を行った (一次判定)。また、培養 24 時間後にすべての基質の培地の色の変化を確認して判定を行った (二次判定)。基質の色の変化と評価については、キットのプロトコールに従った[48]。

19) 塩基配列の解読

16S rRNA 遺伝子の解読

初めに、第 3 領域を標的とした約 500bp の塩基配列を解読した。その際、プライマ

ーは表にある 8-Fw および 519-Rv を使用した。また、PCR の反応は KOD Plus (TOYOBO) を使用して、以下の表に示した条件で行った。その後、さらに解析するために、約 1500bp の完全長配列を解読した。PCR の反応は、表に示す 8-Fw および 1522-Rv を使用した。

遺伝子	プライマー	配列 (5'→3')
16S rRNA	8-Fw	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1522-Rv	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA
	519-Fw	CAGCMGCCGCGGTAAT
	907-Rv	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT
	519-Rv	ATTACCGCGGCKGCTG
	907-Fw	AAACTYAAKGAATTGACGG
<i>pheS</i>	<i>pheS</i> -21-Fw	CAYCCNGCHCGYGAYATGC
	<i>pheS</i> -22-Rv	CCWARVCCRAARGCAAARCC

表 16S rRNA 遺伝子、*pheS* 遺伝子の配列解析に使用したプライマー

組成	容量 (μL)	最終濃度
10x PCR Buffer for KOD -Plus-	5	1x
2mM dNTPs	5	0.2mM each
25mM MgSO ₄	2	1.0mM
Fw プライマー (10μM each)	1.5	
Rv プライマー	1.5	
テンプレート DNA	≥1	Genomic DNA 10-200ng/50μL
KOD -Plus- (1U/μL)	1	1U/50μL
NFW	to 50	

表 PCR 反応液の組成

初期熱変性	94°C	2 分	
熱変性	94°C	15 秒	※ 35 サイクル
アニーリング	55°C	30 秒 (部分配列の場合)	
	55°C	2 分 (全長配列の場合)	
伸長	68°C	2 分	

表 PCR 反応条件

得られた PCR 産物を、1%のアガロース S（ニッポンジーン）ゲルで 135V、20-30 分で電気泳動し、エチレンブロマイド液に 20 分浸漬した後、紫外線下 PCR 産物を確認した。確認したゲル中の PCR 産物を MonoFas DNA Purification Kit I（GL Sciences）を用いて抽出・精製した。精製した PCR 産物を、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いて標識し、シークエンスの試料とした。その際、16S rRNA の部分配列を解析する場合は、8-Fw および 519-Rv、完全長を解析する場合には、全領域を 3 つの領域に分け、それぞれのプライマーは、表に示す 8-Fw、519-Fw、519-Rv、907-Fw、907-Rv、1522-Rv を使用した。そして、3730xl DNA Analyzer（ABI）を使用してシークエンス解析を行った。本研究では、ゲル抽出後の PCR 産物を作製した後、北海道システムサイエンスにシークエンス解析を委託した。解析された配列について、各領域のセンス鎖とアンチセンス鎖の 2 配列を Sequence Scanner（Applied Biosystems）を使用して解読した。そして、各領域の 2 配列の情報が一致した部分をその領域の配列として決定した。全配列の解析では、決定した 3 領域の塩基配列を統合して、16S rRNA 遺伝子の全配列を決定した。

pheS 遺伝子の解読

pheS 遺伝子配列解析も、16S rRNA 遺伝子の解析と同様の試薬・方法で行った。*pheS* 遺伝子は、500bp 程度なので、PCR の反応時間は 30 秒で行った。上記の表に示したプライマー *pheS*-21-Fw、および *pheS*-22-Rv を使用して、PCR 反応の温度条件は、Naser SM の方法に従い[49]、以下の表に示す条件で行った。

初期熱変性	95°C	5 分	
熱変性	95°C	1 分	※ 3 サイクル
アニーリング	46°C	2 分 30 秒	
伸長	72°C	1 分 15 秒	
熱変性	95°C	35 秒	※ 30 サイクル
アニーリング	46°C	1 分 15 秒	
伸長	72°C	1 分 15 秒	
反応終了	72°C	7 分	

表 *pheS* 遺伝子における PCR 反応条件

20) 相同性解析

20-1) BLAST を使用した相同性解析

16S rRNA 遺伝子、および *pheS* 遺伝子の配列を決定した後、BLAST [72]を利用して、相同性の検索を行った。相同性検索の条件は、以下の表に示すとおりに行った。

設定項目	条件
Basic BLAST	nucleotide blast
Enter Query Sequence	決定した配列を挿入
Choose Search Set	Others (nr etc.)
Program Selection	Somewhat similar sequences (blastn)

表 BLAST 検索の際の設定値

相同性検索の結果を上位から確認して、近縁種であると思われる細菌を選択した。

20-2) Genetyx を使用した相同性解析

GenBank/EMBL/DDBJ に保存されている *Enterococcus* 属の配列を GENETYX Ver. 11.1.0 (GENETYX CORPORATION) を使用してアライメントし、相同性 (%) を算出した。Ohori 株と比較したい種に関する配列情報を NCBI から参照した。そして、Genetyx を利用して、Genetyx ファイルで配列情報を保存した。その後、Genetyx を開き、「Homology」の欄より、「Nucleotide vs Nucleotide Homology」を選択して、「Query Sequence」に Ohori 株と比較したい近縁種の配列情報を保存したファイルを挿入し、「Target Sequence」には、Ohori 株の配列を挿入した。「OK」を選択することで、Ohori 株と近縁種の配列を比較した。結果では、選択した配列の相同性 (%) と、配列の一致・不一致の箇所を確認することができる。

21) 系統樹の作成方法

系統樹の作成、およびその際に必要なアライメントには MEGA 6 [73]を使用した。また、系統樹の作成において、16S rRNA 遺伝子においては、2014 年までに報告されているすべての *Enterococcus* 属乳酸菌を選択した。また、*pheS* 遺伝子に関しては、近縁であると考えられた種を選択して作成した。これまでに報告されている菌種の検索および選択には、bacterio.net [74]を使用した。

21-1) 配列のアライメント

MEGA 6 の「Align」内の「Edit/Build Alignment」を選択した。その後、表示されるダイアログの「Create new alignment」を選択し DNA でのアライメントを選択した。表示されたダイアログ内の cell に系統樹の作成に加えたい配列を挿入した。その後、「Alignment」タブを選択し、「Align by Clustal W」を選択してアライメントを実行した。その際、パラメータは以下の表に示す規定値で行った。結果が表示された後、目視で配列のずれなどを確認した。また、「Translate Protein Sequence」を選択して、タンパク質に変換された場合でも配列にずれがないかを確認した。アライメント結果は、MEGA 形式のファイルで保存した。

設定項目	条件
Pairwise Alignment	
Gap Opening Penalty	15
Gap Extension Penalty	6.66
Multiple Alignment	
Gap Opening Penalty	15
Gap Extension Penalty	6.66
DNA Weight Matrix	IUB
Transition Weight	0.5
Use Negative Matrix	OFF
Delay Divergent Cutoff (%)	30
その他	チェックなし

表 MEGA 6 を使用したアライメントの際の設定値

21-2) 系統樹の作成

ダイアログ内の「Phylogeny」を選択し、さらに「Construct/Test Neighbor-Joining Tree」を選択した。そして、アライメントを終了した MEGA ファイルを選択した。そして、各種系統樹作成のための条件は、以下の表に示す。そして、「Compute」を選択して系統樹の作成を行った。

設定項目	条件
Phylogeny Test	
Test of Phylogeny	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replication	1000
Substitution Model	
Substitution Type	Nucleotide
Model/Method	Jukes-Cantor model
Rates and Patterns	
Rates among Sites	Uniform rates
Pattern among Lineages	Same (Homogeneous)
Data Subset to Use	
Gaps/Missing Data Treatment	Complete deletion
Select Codon Positions	すべて選択

表 MEGA 6 を使用した系統樹の作成の際の設定値

22) DNA-DNA ハイブリダイゼーション

22-1) 使用した試薬の組成

20 × PBS (-)

組成	(g)
NaCl	160
KCl	4
Na ₂ HPO ₄	23
KH ₂ PO ₄	4
Total (超純水)	1000mL

PBS-Mg

PBS (-) に MgCl₂ を終濃度 0.1M となるように加える。

組成	(g)
MgCl ₂ · 6H ₂ O	4.06
Total (超純水)	200mL

20 × SSC

組成	(g)
NaCl	175.32 (3M)
クエン酸ナトリウム二水和物	88.23 (0.3M)
Total (MQ)	1000mL (pH=7.0 NaOH)

0.1M Tris-HCl (pH9.0)

組成	(mL)
トリス塩基	1.21
Total (MQ)	200mL (pH=9.0 HCl)

プレハイブリダイゼーション溶液

組成 (10mL, 50well 相当)	組成(mL)
20 × SSC	1.0
50 × デンハルト溶液※	1.0
10mg/mL Denatured salmon DNA	0.1
ホルムアミド	5.0
Total (MQ)	10 mL

ハイブリダイゼーション溶液

組成 (10mL, 50well 相当)	(mL)
20 × SSC	1.0
50 × デンハルト溶液※	1.0
10mg/mL Denatured salmon DNA	0.1
ホルムアミド	5.0
硫酸デキストラン	0.25 g
Total (MQ)	10 mL

※デンハルト溶液 (Wako Pure Chemical Industries)

ストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ溶液

組成 (10ml、50well 相当)	(mL)
ストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ原液	10 μ L
0.5%BSA-PBS (-)	10mL

4-メチルウンベリフェニルガラクトピラノシド溶液 (4MUF 溶液)

組成 (10ml、50well 相当)	(mL)
10mg/mL 4MUF- β -D-ガラクト ピラノシドメチルホルムアミド溶液	100 μ L
PBS-Mg	10mL

22-2) 実験方法

一連の実験行程は、マイクロプレート法に従って行った [50]。1/10 \times SSC で溶解した Ohori 株、*E. termitis*、*E. silesiacus*、および *E. faecalis* の精製 DNA を、100°C、10 分で熱変性し、氷冷した。熱変性した精製 DNA を 0.1M の PBS-Mg で 10 μ g/mL となるように希釈し、100 μ L ずつ Nunc Fluoro Module Plate (Thermo Fisher Scientific) の各 well に添加し、30°C、2 時間保持し、プレートに固定した。その後、プレート内の上清を廃棄し、45°C、3 時間保持することで固定した精製 DNA を乾燥させた。この時、陰性コントロールとして、Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes (Sigma-aldrich) も固定・乾燥した。次に、Ohori 株、*E. termitis*、*E. silesiacus*、および *E. faecalis* の精製 DNA を PHOTO PROBE Biotin (VECTOR) を使用して、プロトコールに従いビオチン標識した。10-40 μ L の精製 DNA に PHOTO PROBE Biotin Reagent を等量添加し、95°C で 30 分インキュベートした。その後、144 μ L のイオン交換水と、16 μ L の Tris Buffer を添加した。そして、160 μ L の sec-butanol を添加してボルテックスした。その後、4,000rpm、1 分で遠心する操作を 2 回繰り返し、ブタノール相を取り除いた。そして、2.5 μ L の Precipitant と、150 μ L の 95% エタノールを添加し、十分混和した。その後、13,000rpm で 15 分遠心した後、上清を取り除き、70%のエタノールでペレットを洗浄した。13,000rpm、5 分で遠心し、上清を廃棄した後、ペレットを真空乾燥機で乾燥させた。乾燥させたペレットは、それぞれの菌種の任意の濃度になるように、NFW で溶解し、標識 DNA とした。今回の実験では、予備実験として DNA-DNA ハイブリダイゼーションに使用する菌株について、標識 DNA の濃度を決した。Ohori 株、*E. termitis*、*E. silesiacus*、および *E. faecalis* について、蛍光レベルが約 4000 になる濃度を本実験に使用した。今回の予備実験により標識 DNA の濃度は、Ohori 株、*E. termitis*、

E. silesiacus、および *E. faecalis* の濃度は、すべて 0.06 µg/mL に決定した。乾燥後のプレートにプレハイブリダイゼーション溶液を各 well に 200µL 添加し、37°C、30 分間で固定した。その後、プレハイブリダイゼーション溶液を破棄し、ハイブリダイゼーション溶液に溶解した標識 DNA を各 well に 100µL ずつ加え、3 時間ハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション温度は、近縁種の *E. termitis* および *E. silesiacus* に使用した温度を参考に 32°C で行った[54]。その後、1/10×SSC 溶液を各 well に 300µL ずつ添加して、破棄する洗浄作業を 3 回繰り返した。その後、PBS で 1000 倍希釈したストレプトアビジン-β-ガラクトシダーゼ (Life Technologies Corporation) を 100µL ずつ各 well に添加し、37°C、30 分で、標識 DNA とストレプトアビジンを結合させた。その後、上清を破棄してプレートを 1 × SSC で洗浄し、最後に、PBS-Mg で 100 倍に希釈した 4-メチルウンベリフェニルガラクトピラノシド溶液 (4MUF 溶液) (Wako Pure Chemical Industries) を 100µL ずつ各 well に添加し、基質-酵素反応を行った。基質-酵素反応による蛍光は、Synergy HT (Bio Tek) を用いて、励起波長 360nm、測定波長 450nm で検出した。相同性の算出は、まず、各反応系について、反応で得られたすべての蛍光値から陰性コントロールの蛍光値を引き、その値を、 $\text{DNA-DNA 相同性 (\%)} = (\text{Ohori 株以外の各菌株を固定した well に標識した Ohori 株を添加した値}) / (\text{Ohori 株を固定した well に標識した Ohori 株を添加した値}) \times 100$ 式で算出した。

23) 使用した細胞

23-1) Caco-2 細胞の培養

72 歳男性由来のヒト大腸癌由来細胞株である。培養に使用した培地は、以下の組成のものを利用した。

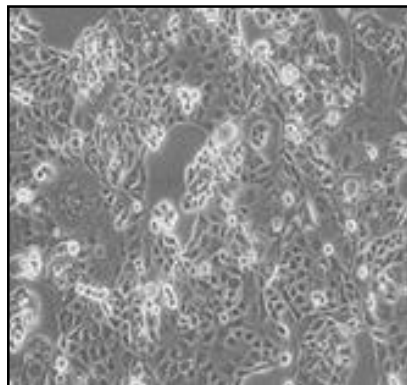


図 Caco-2 細胞

組成	(g)
Minimum Essential Medium (GIBCO)	1 袋
ストレプトマイシン	0.1
ペニシリン	0.1
炭酸水素ナトリウム	2.2
ヒルビン酸ナトリウム (Nacalai Tesque)	10 (mL)
Total (超純水)	1 (L)

表 Caco-2 細胞の培養に使用した培地の組成

以上の組成に、10%となるように、fetal bovine serum (FBS、Biowest) を添加して、37°C、5%CO₂ で培養した。実験に使用する際は、1%の FBS を添加して使用した。ただし、乳酸菌を使用した実験を行う場合には、培地中の抗生物質（ペニシリン・ストレプトマイシン）を添加していない培地を使用した。また、細胞培養および実験には、以下の組成の PBS を使用した。

組成	(g)
KCl	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.896
NaCl	8.0
Total (超純水)	1 (L)

表 Caco-2 細胞の実験に使用した PBS の組成

細胞用培地および PBS は、0.22μm の滅菌フィルター (IWAKI) を用いて滅菌した。

23-2) Caco-2 細胞の保存と解凍

75cm² 細胞培養用フラスコで培養した Caco-2 細胞の培養上清を、廃棄し、10mL の PBS で洗浄した。9mL の PBS と 1mL のトリプシン (Invitrogen) を加え十分混和し、37°C、5%CO₂ で 5-10 分インキュベートした。その後、フラスコの底面から細胞が剥がれていることを確認した後、10%FBS を添加した MEM を 5mL 加え、50mL チューブ

に移し、1000rpm、10 分で遠心した。上清を廃棄し、細胞保存液セルバンカー（日本全薬工業）を 1mL 加えた。そして、2mL のスクリーキャップ付きチューブに移し、-80°C で保存した。

24) 乳酸菌の死菌化

Ohori 株を M17 培地、34°C で一晩培養し、培養後の菌液を M17 培地で OD₆₀₀=0.05 となるように希釈し、34°C、10 時間本培養した。培養終了後、1.5mL チューブに 1mL ずつ菌液を分注し、それぞれの菌液をそれぞれ BLOCK INCUBATOR BI-525 (ASTEC) を使用して、50°C、60°C、70°C で 10 分間処理した。その後、任意の濃度に希釈して M17 寒天培地に塗布した。34°C、48 時間培養し、生成したコロニーの数を計測した。熱処理をしていない菌液をコントロールとして、各熱処理温度における生菌率を算出することで、死菌化温度を判断した。予備実験の結果、Ohori 株は、60°C、10 分で死菌体となった（下図）。実験では、Caco-2 細胞に曝露するために、Ohori 株を M17 培地で培養した後、15,000 rpm、1 分遠心し、上清を除去した後、PBS で数回洗浄した。その後、抗生物質を含まない MEM 培地を使用して、決定した曝露濃度に調整した菌液を決定した温度で熱処理し、室温まで十分冷ましてから、Caco-2 細胞に曝露した。

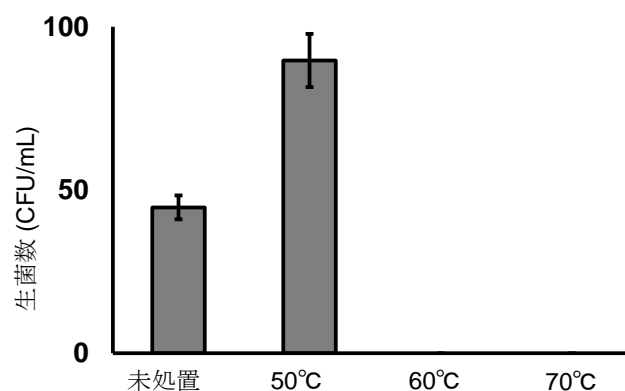


図 本研究で決定した Ohori 株の死菌化温度

25) WST-1 試薬を用いた Caco-2 細胞生存率の算出

24 well プレート (Nunc) に、1% FBS を含んだ培地で 2.0×10^5 cells/well の Caco-2 細胞懸濁液を各 well に 500μL ずつ無菌的に摂取し、24 時間培養しプレートに定着させた。その後、培養上清を除去し、それぞれ 500μL の MEM を各 well に添加し、その後 Ohori 株の菌体を 500μL ずつ優しく曝露し、最終濃度が 1.0×10^7 CFU/mL から $1.0 \times$

10⁹CFU/mL となるように調整した。そして、24 時間培養後、上清を廃棄し、Caco-2 細胞を 1mL の PBS で 3 回洗浄した。そして、室温に戻した 50μL の Premix WST-1 試薬 (TaKaRa Bio) を加えた抗生物質を含まない MEM を各 well に 500μL ずつ添加し、遮光して 1 時間インキュベートした。1 時間後、24well プレートから、各 well の上清を 96well プレート (Nunc) に 100μL ずつ移し替え、プレートリーダー (Nalge Nunc International) を用いて OD₄₅₀ と OD₆₃₀ における OD 値を測定した。Caco-2 細胞の生存率は、 $\text{OD}_{450}\text{-OD}_{630}(\text{sample}) / \text{OD}_{450}\text{-OD}_{630}(\text{non-treated control}) \times 100 (\%)$ で算出した。本研究では、死菌体において 1.0 × 10¹⁰CFU/mL は、WST-1 試薬で測定する前に細胞がプレートからはがれて死滅したため、生菌、死菌ともに 1.0 × 10⁷CFU/mL から 1.0 × 10⁹CFU/mL までの濃度を使用して Caco-2 細胞の生存率を検討した (図)。その結果、生菌は、1.0 × 10⁷CFU/mL で若干の生存率の低下が見られたが、1.0 × 10⁹CFU/mL で生存率に影響を与えなかったため、継続して実験した。死菌体はすべての濃度において生存率に影響を与えなかった。

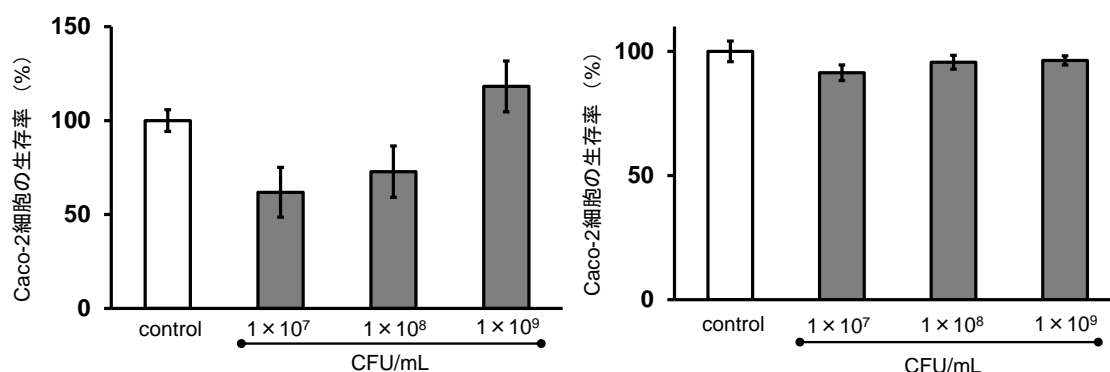


図 Ohori 株の曝露に対する Caco-2 細胞の生存率
(左図が生菌体、右図が死菌体に対する生存率)

26) real-time PCR に使用する cDNA サンプルの調製

26-1) Caco-2 細胞からの Total RNA の抽出

6 well プレート (Nunc) に 1 % FBS を含んだ培地で Caco-2 細胞を 7.0 × 10⁵ cells/well となるように接種し、24 時間培養して、プレートに定着させた。その後、1.0 × 10⁷CFU/mL から 1.0 × 10⁹CFU/mL の濃度の Ohori 株の生菌および死菌を曝露し、6 時間培養した。細胞上清を破棄し、500μL の PBS で優しく 2 回程度洗浄し、その後、各 well に 1 mL の ISOGEN (日本ジーン) を添加し、定着している細胞を十分に懸濁し、

細胞溶解液を 1.5mL サンプリングチューブに移した。1 分ボルテックス後、室温で約 20-30 分静置した。その後、12,000 × g、15 分、4°C で遠心し、上層の水相のみを新しい 1.5 mL サンプリングチューブに移した。そこへ、500μL のイソプロパノールを添加し、4-5 回インバートミックス後、室温で 5 分静置した。12,000 × g、10 分、4°C で遠心し上清を廃棄し、1mL の 70%エタノールを添加し、4-5 回インバートミックスした。12,000 × g、5 分、4°C で遠心し上清を廃棄し、約 5 分、真空乾燥した。その後、50μL の NFW を添加し沈殿を十分に溶解した。抽出した total RNA サンプルは、使用まで-80°C にて保存した。

26-2) DNase 処理

DNase 処理には RNase-free DNase set (QIAGEN) を使用した。以下の表に示すゲノム DNA 除去反応液を調製し、その後、23°C、10 分インキュベートした。

組成	容量
Buffer RDD	10μL
DNase I stock solution	2.5μL
RNA solution	≤100μg
RNase-Free water	to 10μL
Total	10μL

表 DNase 処理における反応液の組成

26-3) Total RNA の精製

精製には、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を使用した。DNase 処理を行った total RNA サンプルに 350μL の Buffer RLT Plus を添加し、よく混和した後、溶液を gDNA Eliminator スピンカラムに添加した。10,000 rpm、30 秒、20°C で遠心し、カラムを廃棄、ろ液を保存した。次に、250μL の 99%エタノールを添加し、よく混和した後、2mL コレクションチューブにセットしたスピンカラムにサンプルを全量 (700μL) 移し、10,000rpm、1 分、20°C で遠心後、ろ液を廃棄した。さらに、スピンカラムに 500μL の Buffer RPE を添加し、10,000rpm、1 分、20°C で遠心後、ろ液を廃棄した。再度、スピンカラムに 500μL の Buffer RPE を添加し、10,000rpm、2 分、20°C で遠心した。スピンカラムを新しい 1.5mL コレクションチューブにセットし、RNase free water を 50μL

添加し、10,000rpm、1分、20℃で遠心して total RNA を溶出した。さらに、ろ液を再度スピンカラムに添加し、10,000rpm、1分、20℃で遠心して total RNA を再溶出した。

26-4) 逆転写による cDNA の作製

逆転写には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を使用した。まず、精製した total RNA 溶液を 65℃、5分インキュベートし、その後、氷上で急冷した。そして、表に示す逆転写反応液を調製し、37℃で15分、98℃で5分インキュベートすることで、cDNA を作製した。

組成	容量
5 × RT Master Mix	2μL
total RNA	1μg
RNase-Free water	任意
Total	10μL

表 逆転写の際に使用した反応液の組成

26-5) real-time PCR 反応および測定条件

real-time PCR は StepOne (Applied Biosystems) を使用した。試薬の組成は以下の表に示すとおりにした。その後、表の手順で反応させた。本研究では、HBD-2 を検出対象とし、ハウスキーピング遺伝子として RPL13A を使用した。使用したプライマーの配列は以下の表に示す。

遺伝子	プライマー	配列 (5'→3')
HBD-2	Sense	GCCATGAGGGTCTTGATCTCC
	Anti-sense	AGGTAACAGGATCGCCTATACCAC
RPL13A	Sense	GGTATGCTGCCCCACAAAAC
	Anti-sense	TTCAGACGCACGACCTTGAG

表 real-time PCR に使用したプライマー

組成	容量
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	4.81 μ L
50 × ROX reference dye	0.19 μ L
sense Primer (10pmol/ μ L)	300nM
antisense Primer (10pmol/ μ L)	300nM
DNA 溶液	1 μ L
NFW	任意の量
Total	10 μ L

表 real-time PCR に使用した反応液の組成

初期変性	95°C	10 分	
変性	95°C	15 秒	40 サイクル
伸長	60°C	45 秒	
融解度曲線分析	95°C	15 秒	
	60°C	15 秒	
	95°C	15 秒	

表 StepOne における real-time PCR 反応条件

26-6) 遺伝子発現量の解析

測定した値を用いて、内標準遺伝子である **RPL13A** で標準化した後、各遺伝子の発現量を $\Delta\Delta C_t$ 法により算出した。結果は、乳酸菌を曝露していないものをコントロールとして使用した。

27) Ohori 株の抗菌ペプチド遺伝子発現効果の検討における統計解析

Caco-2 細胞における抗菌ペプチド誘導作用に関する研究において、データは、平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で表した。統計解析は、**student-t** 検定を用いて行った。すべての解析において、 $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。

引用文献

- [1] World Health Organization. The top 10 causes of death The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- [2] 厚生労働省. 死因順位（1～5 位）別死亡数・死亡率（人口 10 万対）,性・年齢（5 歳階級）別. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai14/>
- [3] Wiesner J., Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*.**1**, 440-464 (2010).
- [4] Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **366**, 2748-55 (2011).
- [5] Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. **278**, 38105-38108 (2003).
- [6] Food and Agriculture Organisation of the United Nations; World Health. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.
- [7] 青枝 大貴, 石井 健. 次世代ワクチンの方向性. 感染・炎症・免疫 Autumn 2014 Vol.44-3.
- [8] World Health Organization. WHO prequalified vaccines.
http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/PQ_vaccine_list/en/en/
- [9] Wang W., Singh M. Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. *World Journal of Vaccines*.. **1**, 33-78 (2011).
- [10] Pal S. Complementary and alternative medicine: An overview. *Curr. Sci*. **82**, 518–524 (2002).
- [11] Tanjina S., Satho T., Irie K., Watanabe M., Hosokawa M., Hiramatsu Y., Talukder P.,

- Okuno T., Tsuruda S., Uyeda S., Fukmits Y., Tamura Y., Nakashima Y., Imoto M., Toda A., Kashige N., Miake F. Pyriproxyfen enhances the Immunoglobulin G immune response in mice. *Microbiol and Immunol.* **57**, 316-322 (2013).
- [12] Cekic C., Casella C. R., Sag D., Antignano F., Kolb J., Suttles J., Hughes M. R., Krystal G., Mitchell T. C. MyD88-dependent SHIP1 regulates proinflammatory signaling pathways in dendritic cells after monophosphoryl lipid A stimulation of TLR4. *J Immunol.* 2011;186(7):3858-65. **186**, 3858-3865 (2011).
- [13] Sieniawska E., Swatko-Ossor M., Sawicki R., Ginalska G. Morphological Changes in the Overall *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra Cell Shape and Cytoplasm Homogeneity due to *Mutellina purpurea* L. Essential Oil and Its Main Constituents. *Med Princ Pract.* **24**, 527-532 (2015).
- [14] Oleszycka E., Lavelle E. C. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Curr Opin Immunol.* **28**, 1-5 (2014).
- [15] Liu B., Li L., Sun G., Liu D., Li S., Cui D. Isolelective 3,4-(co)polymerization of bio-renewable myrcene using NSN-ligated rare-earth metal precursor: an approach to a new elastomer. *Chem Commun (Camb).* **51**, 1039-1041 (2015).
- [16] Kimoto T., Mizuno D., Takei T., Kunimi T., Ono S., Sakai S., Kido H. Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10: induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses. *Influenza Other Respir Viruses.* **7**, 1218-1226 (2013).
- [17] Aoshi T., Koyama S., Kobiyama K., Akira S., Ishii K. J. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr Opin Virol.* **1**, 226-232 (2011).
- [18] Leser T. D., Molbak L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ Microbiol* **11**, 2194–

2206 (2009).

- [19] Pessione E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol.* **22**, 86 (2012).
- [20] Mach T. Clinical usefulness of probiotics in inflammatory bowel diseases. *J Physiol Pharmacol* **57**, 23-33 (2006).
- [21] Yan F., Polk DB. Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **9**, 717-721 (2006).
- [22] Vanderhoof J. A. Probiotics in allergy management. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **47**, S38–S40 (2008).
- [23] Williams N. T. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm.* **67**, 449-458 (2010).
- [24] Bermudez-Brito M., Plaza-Díaz J., Muñoz-Quezada S., Gómez-Llorente C., Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* **61**, 160-174 (2012).
- [25] Shida K., Kiyoshima-Shibata J., Kaji R., Nagaoka M., Nanno M. Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology.* **128**, e858-869 (2009).
- [26] Castillo N. A., Perdigón G., de Moreno de Leblanc A. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol.* **11**, 117 (2011).
- [27] Engel P., Martinson V. G., Moran N. A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109**, 11002-11007 (2012).
- [28] König H. *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *J Appl Microbiol.* **101**, 620-627 (2006).

- [29] Killer J., Kopečný J., Mrázek J., Rada V., Benada O., Koppová I., Havlík J. Straka J. *Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**, 2020–2024 (2009).
- [30] Higashiguchi D. T., Husseneder C., Grace J. K., Berestecky J. M. *Pilibacter termitis* gen. nov., sp. nov., a lactic acid bacterium from the hindgut of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 15–20 (2006).
- [31] Stokes B. A., Yadav S., Shokal U., Smith L. C., Eleftherianos I. Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front Microbiol.* 2015;6:19. **6**, 19 (2015).
- [32] Asama T., Arima T. H., Gomi T., Keishi T., Tani H., Kimura Y., Tatefuji T., Hashimoto K. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *J Appl Microbiol.* **119**, 818-26 (2015).
- [33] Clements A. N. THE BIOLOGY OF MOSQUITO VOLUME 1 DEVELOPMENT, NUTRITION AND REPRODUCTION, Chapman & Hall, (1992).
- [34] Cumberland S. Mosquito wars. *Bull World Health Organ.* **87**, 167-168 (2009).
- [35] 害虫駆除なんでも辞典「蚊を知る」. アース製薬. <http://www.earth-chem.co.jp/gaichu/ka/knowledge/>
- [36] Minard G., Mavingui P., Moro C. V. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors.* **6**, 146 (2013).
- [37] Carissimo G., Pondeville E., McFarlane M., Dietrich I., Mitri C., Bischoff E., Antoniewski C., Bourgouin C., Failloux A. B., Kohl A., Vernick K. D. Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, E176-185

(2015).

- [38] Smits H. H., de Jong E. C., Wierenga E. A., Kapsenberg M. L. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* **26**, 123-129 (2005).
- [39] Mullié C., Yazourh A., Thibault H., Odou M. F., Singer E., Kalach N., Kremp O., Romond M. B. Increased poliovirus-specific intestinal antibody response coincides with promotion of *Bifidobacterium longum-infantis* and *Bifidobacterium breve* in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatr Res.* **56**, 791-795 (2004).
- [40] Schlee M., Harder J., Köten B., Stange E. F., Wehkamp J., Fellermann K. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol.* **151**, 528-535 (2008).
- [41] Menendez A., Willing B. P., Montero M., Wlodarska M., So C. C., Bhinder G., Vallance BA, Finlay BB. Bacterial stimulation of the TLR-MyD88 pathway modulates the homeostatic expression of ileal Paneth cell α -defensins. *J Innate Immun.* **5**, 39-49 (2013).
- [42] Deng J., Li Y., Zhang J., Yang Q. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. *Res Vet Sci.* **94**, 62-68 (2013).
- [43] 浜田 盛之、鈴木健一郎. 何から始めよう 微生物の同定 細菌・アーキア編. *生物工学* **89**, 744-74 (2011).
- [44] 日本細菌学会. 細菌の系統分類と同定方法. *日本細菌学雑誌* **55**, 545-584 (2000).
- [45] 江崎 孝行. 腸内フローラの同定 : DNA プローブとプライマー. *腸内細菌学雑誌* *Journal of intestinal microbiology* **20**, 245-258 (2006).
- [46] 吉田 眞一、柳 雄介、吉開 泰信. 戸田新細菌学, 南江堂, 改訂 33 版, (2007).

- [47] 鈴木 健一郎、平石 明、横田 明. 微生物の分類・同定実験法. シュプ リンガー・
フェアーク東京 (2001).
- [48] シ ス メ ッ ク ス ・ ビ オ メ リ ュ ー . <http://www.sysmex-biomerieux.jp/servlet/srt/bio/japan/home>
- [49] Naser S. M., Thompson F. L., Hoste B., Gevers D., Dawyndt P., Vancanneyt M., Swings J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*. **151**, 2141-2150 (2005).
- [50] Ezaki T., Hashimoto Y., Yabuuchi E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Evol Microbiol*. **39**, 224-229 (1989).
- [51] Carina Audisio M., Torres M. J., Sabaté D. C., Ibarguren C., Apella M. C. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut *Microbiol Res*. **166**, 1-13 (2011).
- [52] Endo A., Salminen S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol*. **36**, 444-448 (2013).
- [53] Neveling D. P., Endo A., Dicks L. M. Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee-hives. *Curr Microbiol*. **65**, 507-515 (2012).
- [54] Svec P., Vancanneyt M., Sedláček I., Naser S. M., Snauwaert C., Lefebvre K., Hoste B., Swings J. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **56**, 577-581 (2006).
- [55] Kadri Z., Spitaels F., Cnockaert M., Praet J., El Farricha O., Swings J., Vandamme

- P. Enterococcus bulliens* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **108**, 1257-1265 (2015).
- [56] Guerrero-Olmos K., Báez J., Valenzuela N., Gahona J., Del Campo R., Silva J. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Enterococcus* species from gut microbiota of Chilean *Altiplano camelids*. *Infect Ecol Epidemiol*. **23**, 4 (2014).
- [57] Stackebrandt E., Goebel B. M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bact* 1994;44(4):846-849. **44**, 846-849 (1994).
- [58] Karl H. S, Renate K. B. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **34**, 31-34 (1984).
- [59] Svec P., Devriese L. A., Sedláček I., Baele M., Vancanneyt M., Haesebrouck F., Swings J., Doskar J. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol*. **51**, 1567-1574 (2001).
- [60] Vancanneyt M., Zamfir M., Devriese L. A., Lefebvre K., Engelbeen K., Vandemeulebroecke K., Amar M., De Vuyst L., Haesebrouck F., Swings J. *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *Int J Syst Evol Microbiol*. **54**, 2175-2179 (2004).
- [61] 大濠公園・西公園. 大濠公園について. <http://www.ohorikouen.jp/about/index.html>
- [62] Krishnan M., Bharathiraja C., Pandiarajan J., Prasanna V. A., Rajendhran J., Gunasekaran P. Insect gut microbiome - An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pac J Trop Biomed*. **4**, S16-21 (2014).
- [63] Bauer S., Tholen A., Overmann J., Brune A. Characterization of abundance and

- diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by molecular and culture-dependent techniques. *Arch Microbiol.* **173**, 126-137 (2000).
- [64] Engel P., Moran N. A. Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut Microbes.* **4**, 60-65 (2013).
- [65] Cunliffe R. N., Mahida Y. R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol.* **75**, 49-58 (2004).
- [66] Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol.* **21**, 147-151 (2005).
- [67] Hosaka Y., Koslowski M., Nuding S., Wang G., Schlee M., Schäfer C., Saigenji K., Stange E. F., Wehkamp J. Antimicrobial host defense in the upper gastrointestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **20**, 1151-1158 (2008).
- [68] Granier A., Goulet O., Hoarau C. Fermentation products: immunological effects on human and animal models. *Pediatr Res.* **74**, 238-244 (2013).
- [69] Hiramatsu Y., Satho T., Irie K., Shiimura S., Okuno T., Sharmin T., Uyeda S., Fukumitsu Y., Nakashima Y., Miake F., Kashige N. Differences in TLR9-dependent inhibitory effects of H₂O₂-induced IL-8 secretion and NF- κ B/I κ B- α system activation by genomic DNA from five *Lactobacillus* species. *Microbes Infect.* **15**, 96-104 (2013).
- [70] Hiramatsu Y., Satho T., Hyakutake M., Irie K., Mishima K., Miake F., Kashige N. The anti-inflammatory effects of a high-frequency oligodeoxynucleotide from the genomic DNA of *Lactobacillus casei*. *Int Immunopharmacol.* **23**, 139-47 (2014).
- [71] 小崎 道雄, 内村 泰, 岡田 早苗. 乳酸菌実験マニュアル-分離から同定まで-. 朝倉書店, (1992).

- [72] National Center for Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [73] Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* **30**, 2725-29 (2013).
- [74] List of prokaryotic names with standing in nomenclature. bacterio.net. <http://www.bacterio.net/>

謝辞

本稿を終わるにあたり、本研究に終始懇切なご指導ならびにご鞭撻を賜りました福岡大学薬学部微生物薬品化学教室の見明史雄 教授、鹿志毛信広 教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、多くの御助言と御協力を頂いた当研究室の佐藤朝光 助教、中島幸彦 助教、福岡大学薬学部生化学教室の本田伸一郎 准教授、福岡大学薬学部生体機能制御学教室の三島健一 教授、入江圭一 助教に深謝いたします。さらに、共同研究として懇切丁寧なご助言を頂きました福岡大学工学部の三島健司 准教授、タンジナ・シャーミン 研究員、北里大学大学院感染制御科学府の渡邊峰雄 准教授、第一薬科大学の戸田晶久 教授、古賀貴之 助教、公益財団法人東京都医学総合研究所の細川雅人 主席研究員、国立感染症研究所の平松征洋 博士、に厚く御礼申し上げます。

また、研究に関して実験機器の使用などでご協力を頂いた福岡大学衛生化学教室の喜多秀樹 助教、藍原大甫 助教に深く感謝致します。また、様々な形で本研究にご協力を頂きました福岡大学薬学部微生物薬品化学教室の奥野隆啓 氏、鶴田翔大 氏、福光由起 女史、百武美香 女史、奥山由希子 女史、福田愛海 女史、茶川奈々 女史、高田真衣 女史、槌谷果歩 女史に心より感謝の意を表します。最後に、学生生活を通じ、精神的、経済的支援を賜りました両親および家族をはじめ、多くの友人に心から感謝いたします。