10 研究領域2

高次機能食品の開発を視野に入れた炎症性腸疾患を緩和するプロバイオティクスに関する研究

Studies of probiotics for moderately severe inflammatory bowel disease: development of refined functional food

大橋　典男　Norio OHASHI　生活健康科学研究科食品栄養科学専攻微生物学教室　教授

Professor, Laboratory of Microbiology, Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka

Profile

2008年　静岡県立大学食品栄養科学部教授
2006年　静岡県立大学環境科学研究所教授
2002年　静岡県立大学環境科学研究所助教授
1997年　オハイオ州立大学獣医学部獣医科学研究部
1992年　博士（薬学）を取得、東京大学
1984年　新潟薬科大学薬学部助手
1984年　金沢大学薬学研究科修士課程修了
1981年　新潟薬科大学薬学部卒業

2008　Professor, School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka
2006　Professor, Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka
2002　Associate Professor, Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka
1997　Research Scientist and Adjunct Assistant Professor, The Ohio State University, USA
1992　Ph.D., University of Tokyo
1984　Research Associate, Niigata College of Pharmacy
1984　M.S., Kanazawa University of Tokyo
1981　B.S., Niigata College of Pharmacy

Contact

TEL　054-264-5553
　　+81-54-264-5553
e-mail　ohashi@u-shizuoka-ken.ac.jp
URL　http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/microbiol/

序論

本グローバルCOE事業において、我々は感染症と生活習慣病をキーワードに研究を展開している。炎症性腸疾患は、主として消化管に原因不明の炎症をおこす慢性疾患の総称で、潰瘍性大腸炎やクローン病が知られている。その発症要因には生活習慣も係っていると考えられており、さらに発症後は病原細菌に対して易感染性になることも示唆されている。また、炎症性腸疾患の患者では腸内細菌叢が炎症反応を惹起するような免疫反応を誘導しており、近年、腸内細菌叢を是正するプロバイオティクスが炎症性腸疾患の緩和に有効であると考えられることから注目を集めている。そこで、本研究では、炎症性腸疾患の進行状況について、リアルタイムで観察できる*in vivo*イメージング法を確立し、大腸炎の緩和効果が期待できるプロバイオティクス乳酸菌の探索のため、このイメージング法の利用ついて検討した。

成果

炎症性腸疾患のひとつである潰瘍性大腸炎において、我々は病原細菌に対して易感染性となることに着目した。生物発光性腸管病原性大腸菌であるXen-14株は通常、マウス腸管内には定着しない。しかしながら、潰瘍性大腸炎のマウスモデルであるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）処理マウスにXen-14株を感染させ、*in vivo*イメージングにより観察を行ったところ、Xen-14株は排除されずに腸管内に留まることが判った（図1）。つまり、DSS誘発性潰瘍性大腸炎の疾病進行とXen-14株の感染進行に関連性があることが判明し、Xen-14株の感染状況をモニターすることで潰瘍性大腸炎の病態を非侵襲的かつ経時的に追跡できる実験系の確立に成功した。さらに、この系を用いて、炎症性大腸炎の予防あるいは緩和効果が期待できるプロバイオティクス乳酸菌の探索を試みた。我々がこれまでに分離した*Lactobacillus plantarum* No-B6株および*L. paracasei* Tm21-1株をDSS投与期間前と投与期間中に毎日接種し、その後、Xen-14株を感染させ、*in vivo*イメージングにより観察を行った。その結果、*L. paracasei* Tm21-1株がDSSによる潰瘍性大腸炎発症を遅延させる傾向があることが示唆された（図2）。

展望

乳酸菌は菌種株によって宿主に与える効果が異なるため、乳酸菌をプロバイオティクスとして利用する場合、その目的用途に合わせて適切な菌種・菌株を選択する必要がある。今回確立した*in vivo*イメージングを用いた潰瘍性大腸炎の可視化法はプロバイオティクス乳酸菌探索のために極めて有効な方法であると考えられ、今後のプロバイオティクス研究に大きく貢献するものと考える。

Introduction

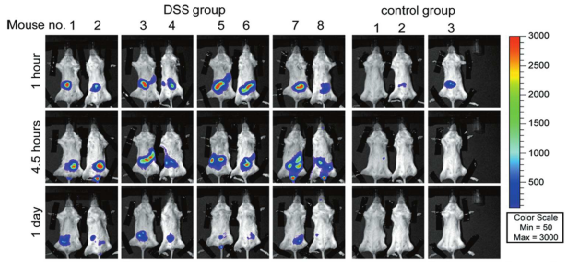
Inflammatory bowel diseases (IBDs), such as ulcerative colitis and Crohn's disease, are characterized by chronic intestinal inflammation of unknown cause. Lifestyle is reportedly a risk factor for IBD. Because bowel flora may induce intestinal inflammation, probiotics have recently been studied to determine whether they improve the intestinal milieu in patients with IBD. The aim of this study was to establish an *in vivo* imaging method for visualizing IBD progression in real time. We used this method to explore the effects of lactic acid bacteria (LAB) in moderately severe IBD.

Results

Patients with ulcerative colitis are known to be compromised in their intestines. Bioluminescent enteropathogenic *Escherichia coli* Xen-14 do not usually colonize the mouse intestinal tract. Treating mice with dextran sulfate sodium (DSS) is a way of creating an animal model of ulcerative colitis. When we administered Xen-14 orally to DSS-treated mice, we were able to visualize colonization of Xen-14 in their intestines by an *in vivo* imaging method that detects bacterial emission, suggesting that progression of DSS-induced ulcerative colitis involves intestinal infection with Xen-14 (Figure 1). We next used this imaging system to explore the role of probiotic LAB in preventing or moderating IBD. We administered *Lactobacillus plantarum* No-B6 or *L. paracasei* Tm21-1 orally to mice that we kept in isolation in our laboratory for 2 weeks before and during DSS treatment, and then challenged them with Xen-14. *In vivo* imaging analysis revealed that administration of *L. paracasei* tends to delay the onset of ulcerative colitis (Figure 2).

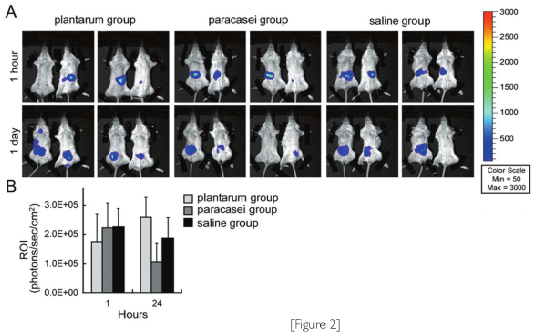
Perspectives

LAB are commonly used as probiotics. However, it is necessary to select a bacterial strain that is appropriate for the intended application, because the effects on the host of different strains are different. We successfully established an *in vivo* imaging method for visualization of probiotic LAB in ulcerative colitis. This method will contribute to future probiotic research.



[図1]
生物発光性腸管病原性大腸菌Xen-14株を用いた潰瘍性大腸炎マウスの*in vivo*イメージング潰瘍性大腸炎マウスモデルであるDSS投与群（DSS group）では生食投与群（control group）と比較して生物発光性腸管病原性大腸菌Xen-14株の腸管内定着が観察された。

[Figure 1]
In vivo imaging of mice with DSS-induced ulcerative colitis using bioluminescent pathogenic *E. coli* Xen-14.
We analyzed mice treated with DSS (DSS group) or given saline (control group) using the infection with bioluminescent pathogenic *E. coli* Xen-14 and quantified the emissions by time-lapse images.



[図2]
*in vivo*イメージングを用いた潰瘍性大腸炎に対する乳酸菌の緩和効果の評価
A）DSS投与前およびDSS投与中の計2週間に*L. plantarum* No-B6株(plantarum group)あるいは*L. paracasei* Tm21-1株(paracasei group)の投与を行い、Xen-14株を接種した後の*in vivo*イメージング。B）*in vivo*イメージングにより検出された生物発光を定量化したグラフ。

[Figure 2]
Evaluation of probiotic effect of lactic acid bacteria on ulcerative colitis by *in vivo* imaging.
A) *In vivo* bioluminescent images at indicated times after challenge with *E. coli* Xen-14. We administered *L. plantarum* No-B6 (plantarum group) or *L. paracasei* Tm21-1 (paracasei group) to mice for 2 weeks before and during DSS treatment, and then challenged them with Xen-14. B) Quantitative bioluminescence analysis of the research described in A.

代表的な発表論文と研究業績 ／ Major Publications and Achievements

1. M. Shinohara, K. Uchida, S. Shimada, K. Tomioka, N. Suzuki, T. Minegishi, S. Kawahashi, Y. Yoshikawa, N. Ohashi: Novel concentration method for detection of norovirus and sapovirus from water using minute particles of amorphous calcium phosphate. *J. Med. Microbiol.*, 60, 780-786 (2011)
2. Y. Katanasaka, T. Ishii, T. Asai, H. Naitou, N. Maeda, F. Koizumi, S. Miyagawa, N. Ohashi, N. Oku: Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. *Int. J. Cancer*, 127, 2685-2698 (2010)
3. T. Hayashi, M. Nakamichi, H. Naitou, N. Ohashi, Y. Imai, M. Miyake: Proteomic analysis of growth phase-dependent expression of *Legionella pneumophila* proteins for identifying novel virulence-associated factors. *PLoS One*, 22, e11718 (2010)
4. Wuritu, Y. Ozawa, Gaowa, F. Kawamori, T. Masuda, T. Masuzawa, H. Fujita, N. Ohashi: Structural analysis of a *p44/msp2* expression site of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected ticks inhabiting Japan. *J. Med. Microbiol.*, 58, 1638-1644 (2009)
5. T. Oya-Ito, N. Naitou, S. Masuda, N. Kinae, N. Ohashi: Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 360-369 (2008)
6. K. Inoue, S. Maruyama, H. Kabeya, N. Yamada, N. Ohashi, Y. Sato, M. Yukawa, T. Masuzawa, F. Kawamori, T. Kadosaka, N. Takada, H. Fujita, H. Kawabata. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5086-5092 (2008)