

A β 凝集体の抗原性に影響を与えるビフィズス菌の代謝産物に関する研究

日大生産工(院) ○高島 聖史 日大生産工 吉宗 一晃

1. 緒言

世界的に平均寿命が伸び高齢化が進んでいるため、認知症患者が増加傾向にある。認知症とは脳機能が低下することにより、日常生活や社会生活を営めない状態をさす。厚生労働省の統計によると、2012年度で認知症患者は約462万人であった。今後も認知症患者は増加し、2025年には約675万~730万人に達すると推測されているため、対策が急務である。

アルツハイマー病(Alzheimer Disease:AD)は認知症患者の過半数を占めており、我が国では、認知症の約70%がADによる認知症であるといわれている。ADの病理的特徴として、脳内に現れる老人斑がある。この老人斑はAmyloid-beta (A β)と呼ばれるタンパク質が主要構成成分であり、A β が脳内に凝集・蓄積し、神経細胞に対し高い毒性を示すことで神経細胞死を誘導しADが発症すると考えられている。

現在、ADの根本的な治療法は存在していない。AD患者の脳では認知機能低下が始まる20~30年前からA β の蓄積が始まっているため、早期に脳内のA β を排除するような予防法の確立が重要である。脳の周りを流れる髄液と血液間の物質移動は血液脳関門と呼ばれる機構で制限されているものの、A β の除去機構は、いくつか存在している。その1つに血管周囲リンパ排水路を介したA β 排出機構がある。脳内で生産された一部のA β は、このリンパ排水路を介して髄液からリンパ節、血液に排出されている。A β が増加した場合では、血管周囲リンパ排水路を介したA β 排出機構がADの進行抑制に重要と考えられている¹⁾。加齢などにより、A β がリンパ排水路内に沈着することで、排出機能が低下することがADの主要因とも考えられている。そのため、リンパ内のA β 排出を促進することができれば、ADの予防になりうる。

近年、腸内細菌と健康が密に関連していることが明らかになっている。ヒトの腸では、1000種類以上、約100兆個の細菌が複雑な生態

系を形成し、生体内・生体外成分の代謝、ビタミンの生成、免疫力の活性化、病原菌の腸管内での増殖阻止など多くの重要な役割を担っている。この細菌の複雑な生態系の組成の変化は、炎症性腸疾患、肥満、糖尿病など、様々な疾患の発症に関与している。AD患者と健常者の腸内微生物叢の多様性を調べた研究で、AD患者ではビフィズス菌*Bifidobacterium*の減少を含む腸内細菌の変化が明らかになっている²⁾。ビフィズス菌*Bifidobacterium*は腸内フローラの主要構成菌群の一つであり、乳酸や酢酸等を生成し、宿主の健康状態に大きく関わっていることが明らかになっている。近年、*Bifidobacterium*の摂取によりADマウスの認知機能低下を改善させたという報告がなされている³⁾。また、腸内常在菌の中には、代謝産物を介し大脳の代謝系に影響を与えているという報告がある。これらから、腸内細菌の脳機能への働きが注目されている。

腸内細菌の代謝産物の一部はリンパに取り込まれることもあるため、ADの原因であるA β と結合するような代謝産物を生産する細菌を腸内に常駐させることで、リンパ内からのA β の排出・蓄積の抑制ができる可能性がある。ビフィズス菌は、一定量摂取することで宿主に有益な効果をもたらす生きた微生物をさすプロバイオティクスとして注目されている。将来的には、腸内細菌の新しいプロバイオティクスとして、食生活の改善等によるADの予防効果について証明したいと考えている。

当研究室ではA β 凝集体と特異的に反応するモノクローナル抗体を作成し*in vitro*でA β 凝集体の検出を行っている。本実験ではビフィズス菌の代謝産物がA β 凝集体に与える条件について、作成したモノクローナル抗体との反応性を指標として検討した。

Study on metabolite produced by *Bifidobacterium* sp. as an inhibitor of the Amyloid b aggregation

Masafumi TAKASHIMA and Kazuaki YOSHIMUNE

2. 実験方法および測定方法

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

本実験ではA β 凝集体の検出をELISAによって行った。ELISAは目的の抗原を、特異抗体で捕捉するとともに、抗体に結合した酵素の反応を利用して検出・定量する方法である。本実験の抗原はA β 凝集体及びビフィズス菌培養上清とA β 凝集体との懸濁液を使用した。また、抗体はモノクローナル抗体77-3を使用した。これらの抗体はサイズの異なるA β 凝集体と反応する特徴がある。モノクローナル抗体77-3は直径0.05 μ mから0.22 μ mのA β 凝集体と特異的に反応する。A β をビフィズス菌培養上清で懸濁し、形成したA β 凝集体に対する抗A β 凝集体抗体との反応性をELISAで調べた。培養上清の代わりにビフィズス菌を培養したMRS培地を添加したものを対照とした。

ビフィズス菌株培養上清の調製

実験に使用した*B. breve* MCC1274株は 0.05 % (wt/v)システインを添加したMRS寒天培地で嫌気培養した。菌体1 gあたり5 mlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え懸濁し、遠心分離(12,00 rpm、5 min)で集菌した上清を培養上清としELISAに使用した。

3. 実験結果および考察

ELISAの結果、ビフィズス菌の代謝産物をA β に添加した場合、ELISAの吸光度の値が上昇した。(Fig.1)。このことから、ビフィズス菌の代謝産物によってA β 凝集体の形状が変化していることが示唆された。抗体77-3はこの代謝産物によって形状が変化したA β 凝集体が持つエпитープと良く反応することが考えられた。

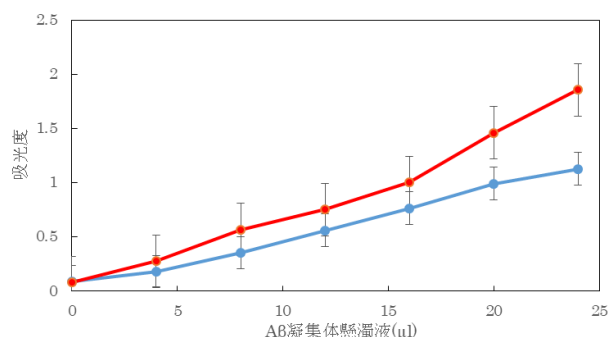


Fig.1 *B. breve* 菌代謝産物のA β 凝集体に対する影響

A β 凝集体を培養上清で懸濁(赤)及び、PBSで懸濁(青)して抗体77-3を用いてELISAを行った。

次に、培養上清の熱耐性について検討するために、100℃で1分間熱処理しELISAで抗体77-3との反応性を調べた(Fig.2)。

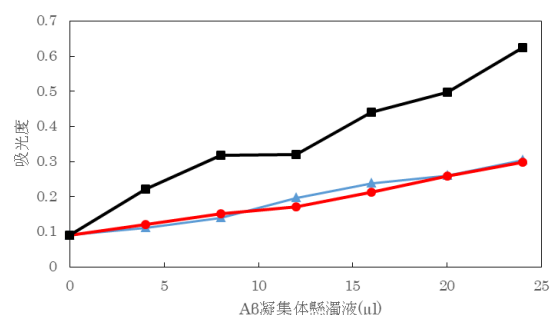


Fig.2 ビフィズス菌代謝産物の熱耐性の検討

A β 凝集体を培養上清で懸濁(黒)、100℃、1分で熱処理した培養上清(青)、及び、PBSで懸濁(赤)して抗体77-3を用いてELISAを行った。

その結果、培養上清を100℃、1分で熱処理すると抗体との反応性が低下することが分かった。80℃、1分及び3分で熱処理した培養上清を使い同様の実験を行うと、抗体との反応性は維持された。このことから、ビフィズス菌の代謝産物は熱処理によって効果が失活することが考えられた。

今回のELISAの結果から、A β 凝集体の抗原性はビフィズス菌の代謝産物によって影響を受けることが分かった。この効果は、100℃の熱処理によって低下することから、タンパク質等の菌体代謝産物が影響していることが示唆された。ビフィズス菌の代謝産物がA β 凝集体に作用することでA β 凝集体の表面積を大きくし、抗体との反応性を向上させたと考えられる。また、A β 凝集体の溶解度等の性質が変化しているとも考えられる。

これらの結果から、ビフィズス菌の培養上清は、A β 凝集体に影響を与えている可能性がある。今後は、A β 凝集体の抗原性に最も影響を与える条件の検討、ビフィズス菌の代謝産物の同定を行っていく。

参考文献

- 1) R, Deane, et al., *Neuron*, 43, 333–344, (2004)
- 2) N, Vogt, et al., *Scientific Reports*, 7, 13537, (2017)
- 3) Y, Kobayashi, et al., *Scientific Reports*, 7, 13510, (2017)