

Title	涙液常在菌のメタゲノム解析と眼科医療応用について
Sub Title	Metagenomic analysis of the tear microflora and about ophthalmology medical care application
Author	馬場, 藤貴(Baba, Toki) 富田, 勝(Tomita, Masaru)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2010-09
Jtitle	研究会優秀論文
JaLC DOI	
Abstract	近年皮膚常在菌のメタゲノム解析を用いたアトピーと常在菌の関係性についての報告が多数あるが、両者に明らかな相関関係は見いだせていない。その理由は二つあり、一つ目は、多くの研究が培養を介しているため正確な菌叢を得られないこと、二つ目はサンガー法を用いているためシークエンスの本数が僅かであることである。本研究では、サンプル(アトピー性角結膜炎(AKC)患者から採取された涙液(n=6)、炎症を起こしていない健常人から採取された涙液(n=4))から培養を介せずにDNAを抽出し、PCRを用いて16S rRNA遺伝子のV3～V4領域を増幅した。 さらにパイロシーケンサーを用いてそれらの塩基配列を網羅的に決定し、AKCの病理と細菌叢の関連性について考察した。 細菌叢プロファイルはAKC患者群・健常群を有意に分けることを示し、涙液中細菌叢の解析が眼疾患の診断や病理解明に有効である可能性を示唆した。 また、健常者の涙液からは乳酸菌(<i>Lactococcus lactis</i>)の割合が有意に大きいことが示された。すでに腸内では乳酸菌が免疫機能の恒常性に重要な働きを示していることが知られている。アトピー・アレルギー患者の糞便中では乳酸菌(<i>Bifidobacterium</i>属や<i>Lactobacillus</i>属など)の割合が有意に少ないことが知られているが、本研究では涙液由来の常在菌から同様の結果を示すことができた。 さらにそれらは免疫疾患や眼疾患で増加することが知られている細菌(<i>Staphylococcus</i>属など)と有意に負の相関を示している。これらの結果は、免疫と常在菌の関係が腸内細菌などの消化管のみならず炎症患部でも同様であることを示唆している。 プロバイオティクスとは口腔から肛門に至る広義の消化管に存在する細菌群に働きかけて、あるいは単独で生体に有益な効果をもたらす生きた細菌のことを示すが、本研究では消化管のみならず有用菌が皮膚常在菌へ直接有益な効果を働きかける事を期待する新しいプロバイオティクスの可能性について示す。
Notes	先端生命科学プロジェクト2010年度春学期：冊子体は4頁のみカラー印刷だが、全頁カラー図版とした。
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0646

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究会優秀論文

涙

液常在菌のメタゲノム解析と 眼科医療応用について

2010年度 春学期

SPRING

Keio SFC Academic Society

馬場 藤貴 環境情報学部 4年

先端生命科学プロジェクト

慶應義塾大学湘南藤沢学会

研究会優秀論文推薦のことば

本研究は、涙液に免疫恒常、疾患予防、治療に有用な細菌（善玉菌）が多く含まれることを発見し、さらに涙液中の常在菌を分析して病理診断を行う新しい手法の提案している。ヒト常在菌による生体の恒常性保持には近年注目が集まってきているが、常在菌と宿主の免疫の関係を把握する方法が無く、特に免疫疾患と常在菌の関連性については明らかになっていなかった。馬場君の成果はそういったジレンマをブレイクする画期的なものである。

慶應義塾大学
環境情報学部教授
富田 勝

Metagenomic analysis of the tear microflora and about ophthalmology medical care application

涙液常在菌のメタゲノム解析と眼科医療応用について

環境情報学部4年 馬場藤貴

要旨

近年皮膚常在菌のメタゲノム解析を用いたアトピーと常在菌の関係性についての報告が多数あるが、両者に明らかな相関関係は見いだせていない。その理由は二つあり、一つ目は、多くの研究が培養を介しているため正確な菌叢を得られないこと、二つ目はサンガー法を用いているためシークエンスの本数が僅かであることである。本研究では、サンプル（アトピー性角結膜炎（AKC）患者から採取された涙液（n=6）、炎症を起こしていない健常人から採取された涙液（n=4））から培養を介さずにDNAを抽出し、PCRを用いて16S rRNA遺伝子のV3～V4領域を増幅した。さらにパイロシークエンサーを用いてそれらの塩基配列を網羅的に決定し、AKCの病理と細菌叢の関連性について考察した。細菌叢プロファイルはAKC患者群・健常群を有意に分けることを示し、涙液中細菌叢の解析が眼疾患の診断や病理説明に有効である可能性を示唆した。

また、健常者の涙液からは乳酸菌（*Lactococcus lactis*）の割合が有意に大きいことが示された。すでに腸内では乳酸菌が免疫機能の恒常性に重要な働きを示していることが知られている。アトピー・アレルギー患者の糞便中では乳酸菌（*Bifidobacterium*属や*Lactobacillus*属など）の割合が有意に少ないことが知られているが、本研究では涙液由来の常在菌から同様の結果を示すことができた。さらにそれらは免疫疾患や眼疾患で増加することが知られている細菌（*Staphylococcus*属など）と有意に負の相関を示している。これらの結果は、免疫と常在菌の関係が腸内細菌などの消化管のみならず炎症患部でも同様であることを示唆している。プロバイオティクスとは口腔から肛門に至る広義の消化管に存在する細菌群に働きかけて、あるいは単独で生体に有益な効果をもたらす生きた細菌のことを示すが、本研究では消化管のみならず有用菌が皮膚常在菌へ直接有益な効果を働きかける事を期待する新しいプロバイオティクスの可能性について示す。

キーワード

メタゲノム解析、プロバイオティクス、涙液、乳酸菌、アトピー性角結膜炎

注）本論文は e-KAMO System (<http://mcarchive.sfc.keio.ac.jp/ekamo/>) に

詳細までわかりやすく全文カラー版にて掲載されておりますので、ご参照ください。

1. 序論

1.1 免疫疾患とヒト常在菌の研究とその問題点

近年メタゲノム解析を用いたヒト常在菌の理解が広まりつつある[1]。とりわけ、免疫疾患と皮膚常在菌の関係性についての論文が多数報告されているものの[2]、免疫と皮膚常在菌の明らかな相関関係は見いだせていない[3]。その理由は二つある。一つ目は、多くの研究が培養法を用いているため正確な菌叢を得られないこと、二つ目は技術的な理由からシーケンシングの本数が僅かであることである。これらのことからアトピーと常在菌の関係を正しく理解するためには未培養性の細菌も含めて網羅的に常在菌の変化を観察するべきだと考えられる。

一方で免疫疾患と腸内細菌の関連性については研究が進んでいる(表1)。腸内細菌叢とアトピー性皮膚炎の発症の関連性を前向き調査で解析したところ、腸内細菌叢の異常が免疫(アレルギー)疾患発症と強く関連することがすでに示唆されており、さらにこの腸内細菌叢の違いがアレルギー発症に先だって認められることから、腸内細菌叢の異常が、アレルギー疾患の原因であるとの考察がなされている[4]。

アトピー性皮膚炎においては、湿潤型アトピー性皮膚炎は主に首周りや肘膝関節裏、乾燥型アトピー性皮膚炎は頭皮、額、肩、内腿、内腕に発症し易いのが特徴である。筆者はアトピー性皮膚炎が部分的に発症するという背景から免疫疾患と常在菌の関係性において腸内細菌のみでは説明ができなかったと考える。その為、常在菌を対象とする免疫疾患の予防・治療においては患部の常在菌について研究を行う必要があるだろう。

例えばヒトの免疫機能については消化管などの細胞からの粘膜免疫が非常に密接に関わる事も知られているが[5]、ヒト常在菌の研究では湿潤部と乾燥部において常在菌のバランスが異なり[6]、特に生殖器などでは乳酸菌が粘膜面に侵入してくる病原性微生物を防ぐ働きがあるという報告がある[7]。これらの結果は腸管以外にも特定の微生物が免疫バランスの恒常性に大きく働いていることを示しており、非常に興味深い。これらのことからアトピーと腸管以外の常在菌についての関係性を明らかにするためには、アトピーが引き起こされやすい粘膜性の器官の常在菌プロファイルを得ることが不可欠である。そのため、本研究では「眼」に着目し、アトピー性角結膜炎涙液中の常在菌を研究対象に選んだ。

表1 腸内細菌叢とアレルギーの関連

	著者	発表年	対象の疾患, マーカーと年齢など	対象との腸内細菌叢の違い	文献
症例・対象研究	Bjorksten	1999	2歳アレルギー児	○	[33]
	Kirjavainen	2001	1歳までのアトピー性皮膚炎	×	[50]
	Watanabe	2003	アトピー性皮膚炎	○	[29]
	Murray	2005	4歳児 アレルゲン感作, 喘鳴	×	[51]
	Sepp	2005	5歳児 喘鳴, 鼻炎, 湿疹	○	[52]
	Gore	2008	生後6ヶ月までのアトピー性皮膚炎	○	[53]
コホート調査	Bjorksten	2001	2歳までのアトピー性皮膚炎発症	○	[4]
	Kalliomaki	2001	1歳までのアレルゲン感作	○	[54]
	Suzuki	2008	1歳までのアレルゲン感作, 湿疹	○	[55]

1.2 メタゲノム解析

前述の通り、免疫と皮膚常在菌の明らかな相関関係を見出すためには、より正確かつ詳細な細菌プロファイルを得ることが重要になってくる。これまでヒト常在菌の多くは培養することにより菌数をカウントし、各菌の存在比を調べる手法が主流であったが、多くの常在菌は培養が困難もしくは、培養の成功例がなく、このような難培養性の微生物も含めた全体像を把握するには他のアプローチが求められている。

その例として、DGGE・T-RFLP などの手法が知られているが[8][9]、それらは常在菌の大まかな傾向を得るにとどまり、難培養性の微生物も含め網羅的な細菌叢を得るための手法としては不十分である。一方で注目されるのは 16S rDNA クローンライブラリー法である。約 1500 塩基からなる 16S rDNA の配列には豊富な分類学情報が含まれ、また今日の塩基配列解析の精度を考えると、きわめて信頼性の高い菌種同定を可能とする。さらに 16S rRNA 遺伝子(16S rDNA)は配列保存性が高く、広範な生物種に共通する PCR プライマーの作成が可能である。そのため、様々な生物の簡便な種同定や群衆構造解析、分子系統解析などにもっとも頻繁に使われている。とりわけ、環境サンプル中の難培養性のものも含めた微生物叢の解明には 16S rDNA 解析は必須であり、PCR にて 16S rDNA を増幅し、シーケンスを行う。これらにより難培養性細菌も含めた環境サンプル中の細菌叢の解明、多様性の推定・比較、細菌群集構造の推定・比較などが可能である。

本研究では済生会中央病院との共同研究により、健常者(n=4)、アトピー性結膜炎患者(n=6)それぞれから採取された涙液(n=10)のサンプル群からゲノム DNA を抽出し、培養を介さず、バクテリアの 16S rDNA に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、そのシーケンス結果から細菌科・属・種を推定することで、細菌種多様性・最近群衆構造の比較を目的とする、これまでも同サンプルを用いてサンガー法による結果を報告しており(図 1)、健常者の涙液細菌叢は患者群のものよりも乳酸菌が多く見られることが分かっている。特に乳酸菌 (*Lactococcus* 属) の割合の大きさは健常者において顕著であった。また、患者群は健常者群と比較して様々な菌属が推定され、患者群の細菌のバラエティーは健常者のものに比べ豊富であることがわかる。このことから健常者の眼表面環境はある種の細菌叢を保っているが、患者群はこの割合が大いに崩れていることが予想される。

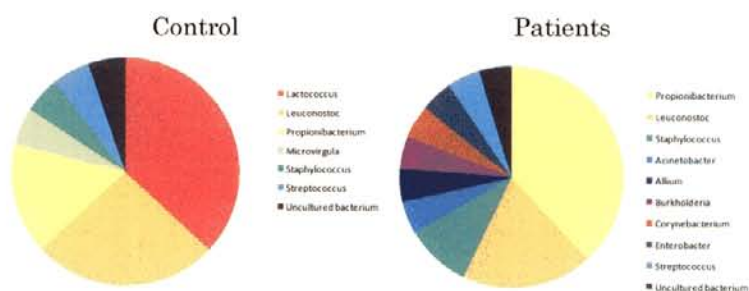


図 1: サンガー法により推定された菌属の種類と割合

1.3 次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析

パイロシーケンサーは、近年ゲノム研究・遺伝子発現研究などに多大な影響を与えている。特にメタゲノム解析の分野にとって次世代シーケンサーの出現はスピードとコストの両面において画期的である[10]。次世代シーケンサーは一度に数万から数十万リードの配列データを得ることができる。16S rDNA の配列解析に基づく菌叢解析では、存在比の小さな菌種まで得るためには膨大なリード数を確保する必要があるが、次世代シーケンサーを利用することでこの点を克服することができる。また次世代シーケンサーの中でも Roche 社製 GS FLX (454) は他社の機種に比べ長いリードを得ることができることが特徴である。そのため本研究では 454 をもちいてシーケンスを行った。

1.4 プロバイオティクス

プロバイオティクスとは口腔から肛門に至る広義の消化管に存在する細菌群に働きかけて、あるいは単独で生体に有益な効果をもたらす生きた細菌のことを示す。(ヨーグルトなどの代表例を示すとよい) 例えば、プロバイオティクス投与によるアレルギー疾患の治療の試みがなされているが、デンマークの Rosenfeldt らは、二十盲検・クロスオーバー法によって *Lactobacillus* 属の経口摂取におけるアトピー性皮膚炎に対する効果を検討している[11]。従来のアトピー性角結膜炎の治療法としては抗アレルギー点眼薬やステロイド点眼薬が用いられる。前者の抗アレルギー点眼薬は特に副作用などはないが、ステロイド点眼薬には感染症にかかりやすくなるという副作用が存在する。これはステロイドが眼表面細菌叢に影響を与え、健康維持に必要な細菌に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。さらに細菌叢の偏りがアトピーの原因だとすると抗アレルギー点眼薬は根本的な解決になっていないと考える。その点、医科プロバイオティクスではもともと宿主に存在する細菌を用いることで疾患の治療・予防を行う。さらに本来免疫疾患を抑えている常在細菌叢の改善を目指す治療を行うため、免疫疾患の長期的な解決になりうる可能性や、安全面でも大いに信頼できると考える。

本研究では健常者の涙液からはアトピー性角結膜炎患者の涙液に比べ、乳酸菌の割合が有意に大きいことを示した。アトピー・アレルギー患者の糞便中では乳酸菌の割合が有意に少ないことが知られているが、本研究では涙液由来の常在菌から同様の結果を示すことができた。さらにそれらは免疫疾患や眼疾患で増加することが知られている細菌と有意に負の相関を示していた。また、筆者はこれまでアトピー性角結膜炎のメタボロームプロファイルについての解析を行ってきたが、細菌由来の抗菌性代謝物である Quinate が健常者に多く、患者ではこの物質が有意に少ないことを示した。これらの結果は、免疫と常在菌の関係が腸内細菌などの消化管のみならず炎症患部でも同様であることを示唆している。その他メタボロームで有意差が見られた物質も細菌と絡めた考察ができることを示した。このように本研究では消化管のみならず有用菌が皮膚常在菌へ直接有益な効果を働きかける事を期待する新しいプロバイオティクスの可能性について記述する。

2. 対象と手法

2.1 メタゲノム解析

2.1.1 対象とDNA抽出

本研究には涙液サンプルを用いた。健常者から採取したもの(n=4)、アトピー性結膜炎を引き起こした患者から採取したもの(n=6)の合計10 サンプルを用いた。涙液のサンプルはすべてガラスキャピラリーまたはピペットマンによって涙腺から直接採取されたものであり、サンプリング後は速やかに-20℃で保存された。用いたサンプルの詳細を表2に示す。

採取された涙液サンプルはQIAGEN 社製QIAamp DNA Stool Kit を用いてDNA を抽出した。DNA抽出Kitの条件検討は付録に示す。その後、表3のプライマーと条件を用いてPCRを行い、16S rDNAのV3-V4領域を増幅した。その後、次世代シーケンサーによるシーケンスを行うため、サンプルをFilgen株式会社に発注した。その際、発注先によってサンプル識別タグを付与するためのPCRが5サイクル行われた。

用いたプライマーは約550塩基ほどの配列を増幅する配列である。現行の次世代シーケンサーは350-450bpが1リードの平均長と言われているため、増幅配列の全長をシーケンスできないと考えられるが、本研究では各リードをシーケンス限界まで配列を決定した。

表2 DNAを採取したサンプル詳細

サンプル名	涙液量(μL)	性別	採取された目
C1	90	男	左
C2	105	男	右
C3	40	女	左
C4	40	男	左
P1	30	-	左
P2	40	-	左
P3	40	-	左
P4	40	-	右
P5	40	-	左
P6	20	-	左

サンプル名のCとはControlをPとはPatientsをあらわす

表3 rRNA 遺伝子増幅のためのPCR プライマーとPCR 条件

対象生物	Forward配列(341F)	Reverse配列(907R)
細菌	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'

	←	30 cycle	→	
95℃	95℃	48℃	72℃	72℃
5:00	0:30	0:30	2:00	5:00
				4℃
				∞

↓
5 cycle(by Filgen)

30cycleのPCRの後、Filgen株式会社に次世代シーケンサーのよるシーケンシングを発注した。

その際、サンプル識別タグを付与するためのPCRを5 cycle行った。

2.1.2 メタゲノムシーケンス配列の系統解析

シーケンスされたメタゲノムデータはRibosomal Database Project (RDP) を用いて解析した[12]。RDPは既知の16S rRNA配列をGenBankより収集したデータベースである。同時に提供されている相同性検索は配列と2次構造の両方を考慮する独自のアルゴリズムで構築されている。本研究ではRDPの機能の中で、ClassifierとSeqmatchを用いた。前者は大量のシーケンスデータをRDP中のデータベースから16S rRNA進化系統樹に従って分類し、菌属より上流の分類を推定する機能である。一方で後者はRDP中のデータベースと相同性検索を行い、得られた配列と最も配列的に近似する配列（菌種）を推定する機能を持つ。

本研究で用いたシーケンスデータは約30bp-600bpのリード長を持つが、プログラムの都合上Classifierを行うには250bpの配列長が必要となるため、解析の対象として250bpより短いものは除いた。もともとシーケンスデータ中の短い配列はPCRの際に人工的に生じた配列の可能性があるため、閾値を定めてそれよりリード長の長いものを解析対象に選ぶ必要があった。ClassifierとSeqmatch両者とも既知の配列との相同性が95%以上マッチするもののみ解析対象とした。Seqmatchは菌種を推定することが目的であるため、データベースから難培養性のもの（Uncultured bacterium）は除いた。推定された結果の中で最も相同性が高い配列を記録した。

先述の方法で推定された菌（門・綱・目・科・属・種）はメタゲノムプロファイルとして編集し、マイクロアレイの網羅的解析の用いられるTM4やJMPなどの統計ソフトで解析した。具体的にはヒートマップやマンホイットニーのU検定、PCA解析、相関解析などを行った。一連の手順はフローとして図2に示す。後述するメタボローム解析における統計解析も同様にTM4とJMPを用いている。

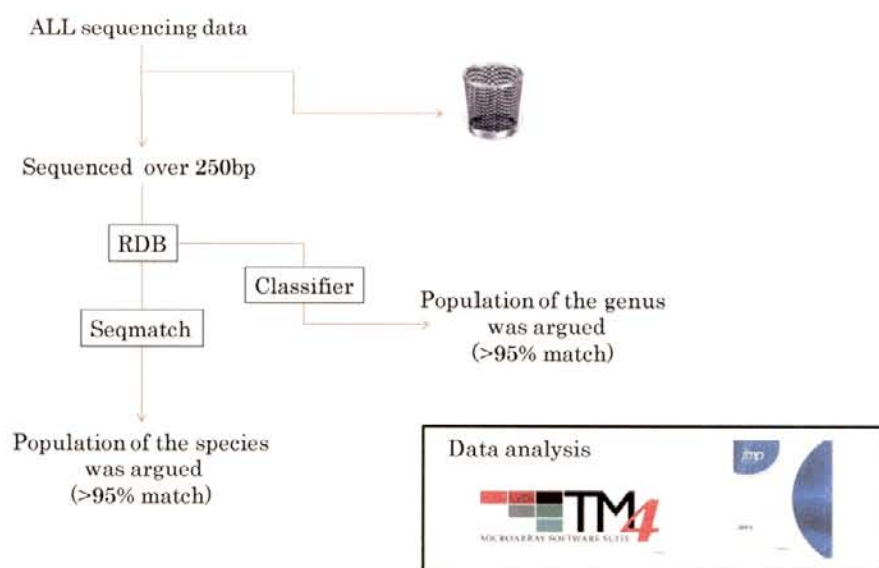


図2 メタゲノムデータ解析のフローチャート

2.1.3 16S rRNA 系統樹によるメタゲノムシーケンス配列の分類解析

これまでに1369 属から各1 配列を用いて作成された系統樹は、従来シーケンスされている16SrDNA 配列の全データから本研究と同じプライマーを用いた時に増幅される配列を基に作成された(図3)。この系統樹は次世代シーケンサーを用いた解析を視野に入れて作成したものである。1属につき1種の配列はランダムに選定した。本研究ではこの系統樹から実際にシーケンスされた細菌属のみを抜粋して系統樹を別途作成し、健常者およびアトピー性角結膜炎で見られる菌属の傾向解析を行った。

配列系統解析にはClustalW(1.83)[13]をもちいた。その際パラメータはrRNAやtRNAなどのRNA配列のアライメントに最適とされるGap Open Penalty = 22.5, Gap Extension Penalty = 0.83[14]を用い、Bootstrap100回試行で系統樹を作成した。系統樹の描画にはiTOL(<http://itol.embl.de/>)[15]を用いた。16S rRNAによるバクテリアの系統解析の際、習慣的に古細菌をアウトグループに設定する。今回はuncultured archaeon Methanobacteria および、*Thermoproteus neutrophilus*の2種をアウトグループに設定した。

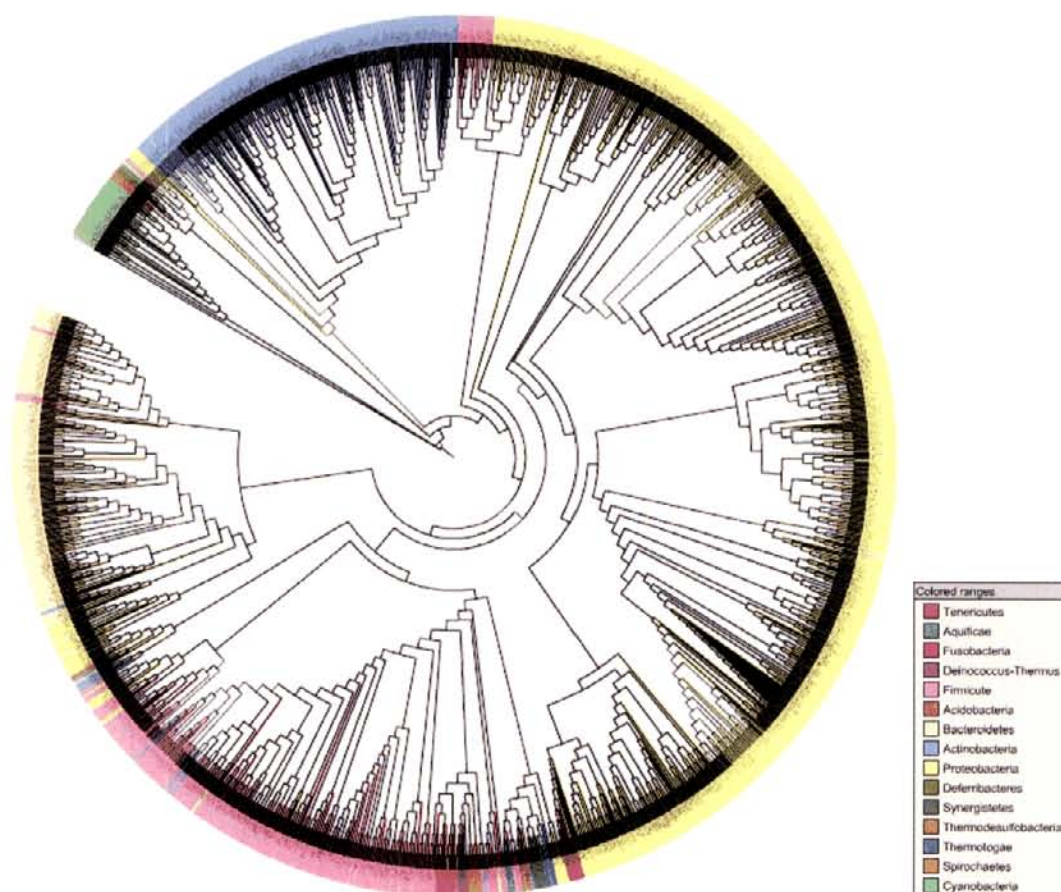


図2：バクテリア1369属を推定するための系統樹
ラベルは門ごとに色分けした

2.2 メタボローム解析

2.2.1 対象と測定条件

健常者、重症アトピー性角結膜炎患者、中度アトピー性角結膜炎患者それぞれ5人、合わせて15 サンプルの涙を測定した。中度患者においては結膜炎のみ、重度患者においては、SPK（点状表層角膜炎）や角膜潰瘍など、結膜炎の合併症として角膜の炎症が見られる臨床像の患者である。これらの解析は2008年に行われた測定であり、CE-TOF/MS による測定は、鶴岡キャンパスにて慶應義塾大学先端生命科学研究所の研究員である平山明由氏によって、以下の文献と同じ条件で行われた[16]。

2.2.2 陽イオン性代謝物質前処理

20uM Methionine sulfone, 25uM MES MeOH 溶液0.9mL に涙液サンプル(50ul)添加後、10 分間静置。抽出液を全量採取し、Milli-Q 水400uL を加えた後、3本のチューブに250uL ずつ分取した。それを遠心分離した後、ろ液600uL を遠心乾固させ、200uM3-Aminopyrrolidine の入ったMilli-Q 水で5 倍に溶解し、CE-TOF/MS で測定した。

2.2.3 陰イオン性代謝物質前処理

20uM MES, 25uM MES MeOH 溶液 0.9mL に涙液サンプル(50ul)を添加し、10 分間静置。抽出液を全量採取し、Milli-Q 水 400uL を加えた後、3本のチューブに 250uL ずつ分取した。それを遠心分離した後、ろ液 600uL を遠心乾固させ、200uM Trimesate の入った Milli-Q 水で5 倍に溶解し、CE-TOF/MS で測定した。

2.2.4 MS/MSによる物質同定

MS/MSの解析によって、ALDRICH社から購入した標本と涙液サンプル中のマススペクトルの比較により一部未知代謝物の物質同定を行った。CE-TOF/MS による測定は、鶴岡キャンパスにて慶應義塾大学先端生命科学研究所の研究員である平山明由氏によって、以下の文献と同じ条件で行われた[17]。

2.2.5 データ解析

データの解析には、MasterHands-2.6.1.2 を用いた。このソフトウェアは、CE-TOF/MS によって測定されたデータからピークを検出し、得られた代謝物質濃度を異なる対象間で比較することが可能である。まず、比較を行う際にはアライメント（複数回測定したデータを統合すること）を行い、その時の許容範囲は、質量電荷比 (m/z) が20ppm、泳動時間 (Migration Time : MT) を0.5分とした。アライメントの手法として2つの内部標準でデータを正規化する方法を用いた。アライメント終了後、全代謝物質について出てきたピークはそのままの状態ではどの物質によるものなのかを特定できない為、ピークの質量電荷比と泳動時間から物質の特定を行った。なお、物質名を推定するにあたり設けた許容範囲は、 m/z が20ppm、MTを1.0 分とした。

最後に、物質名が推定された物質について、サンプル間で各代謝物質のピーク面積(Area)を比較し、2 者間において統計的に有意に差のある物質を選出した ($P\text{-value}<0.05$)。なお、統計処理にはマンホイットニーのU検定を用いた。

3. 結果

3.1 サンプル調整結果

3.1.1 涙液からの DNA 抽出

DNA 抽出後のサンプルからは目的のバンドは見られない。涙液には DNA が薄いので、DNA 抽出直後からは経験的にバンドが検出されない。後の PCR において増幅が確認されることからゲノム DNA の存在は確かめられる。

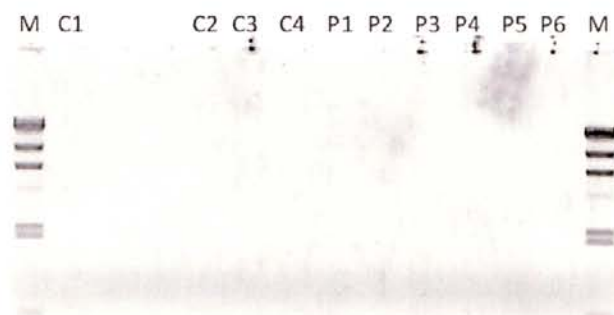


図 3：サンプルから抽出されたゲノム DNA

泳動条件は 0.8%アガロースゲルで 100V, 30 分。バンドの検出は EtBr 染色にて行った
マーカー(M)は λ HindIII を用いた。

3.1.2 PCR の条件検討

前述した PCR 条件をもとに PCR 回数の条件検討を行った。30 回において目的の場所にバンドが見られている。40 回ではバンドがラダーになっているだけでなく、予定外の配列長のバンドが増幅されてしまっている。以後 PCR は最適な回数として 30 回とした。

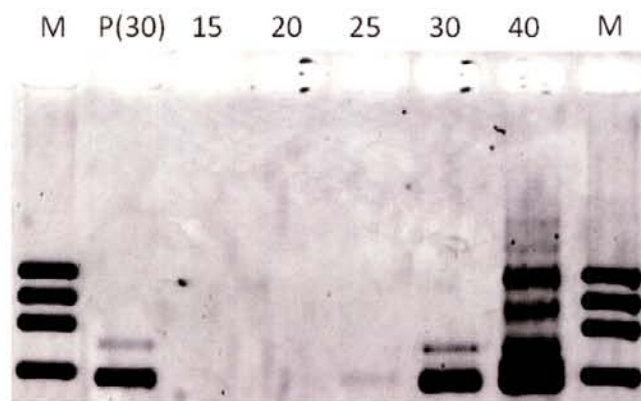


図 4：PCR の条件検討

泳動条件 1.5%アガロースゲルで 100V, 30 分。バンドの検出は EtBr 染色にて行った。

P(30)と表記されているものは過去に同プライマーで増幅が確認された DNA に対し
PCR 30Cycle 行ったもの。

マーカー(M)は *Hae*III を用いた。

3.1.3 次世代シーケンサー発注に向け収集された DNA

本実験において DNA 抽出後, PCR によって増幅した目的の DNA の濃度または最終的な収量を表 4 に、またその時得られた PCR の電気泳動結果を図 5 に示す。次世代シーケンサー発注において、必要な DNA 量は 5 μ g である。今回の実験によって次世代シーケンサー発注に十分といえる DNA 量を確保することができた。

表 4：本実験において得られたサンプル詳細

サンプル名	濃度(μ g/ μ L)	容量(μ L)	Total_DNA(μ g)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀
C1	0.06	340	19.35	1.91	0.0569	0.0299
C2	0.06	340	19.88	1.81	0.0585	0.0323
C3	0.05	340	17.76	1.81	0.0522	0.0288
C4	0.05	340	17.43	1.82	0.0513	0.0282
P1	0.05	340	18.18	1.85	0.0535	0.0289
P2	0.06	340	19.18	1.79	0.0564	0.0316
P3	0.06	340	19.33	1.82	0.0569	0.0313
P4	0.06	340	18.91	1.77	0.0556	0.0314
P5	0.06	280	15.69	1.73	0.0560	0.0325
P6	0.06	280	16.65	1.70	0.0595	0.0350

本実験において得られた DNA の濃度や量を示す。

右に示すのはその計算に用いた OD 値である。

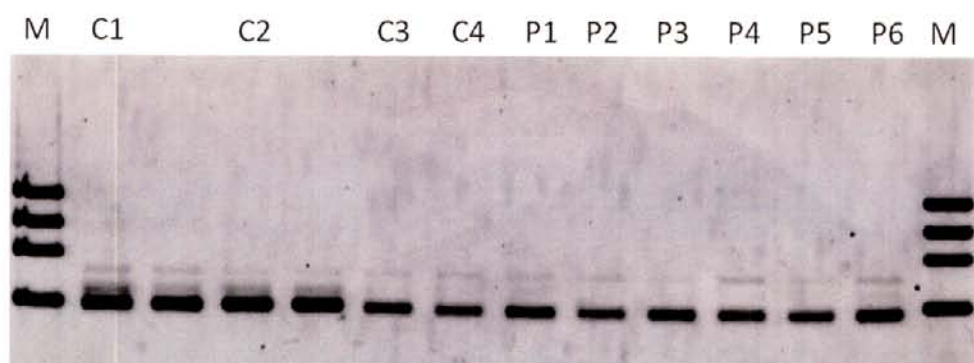


図 5：次世代シーケンサー用に調整されたサンプル DNA

泳動条件 1.5%アガロースゲルで 100V, 30 分, バンドの検出は EtBr 染色にて行った。

マーカー(M)は *Hae*III を用いた。サンプル名が空白のところは、健常者を n=6 で実験していたが今回は予算やサンプル数の都合でパイロシーケンスを行わないものである。

3.2 メタゲノム解析結果

3.2.1 454 シークエンスデータ

表 5, 図 6 に示すのは, Filgen によってシークエンスされた, データの詳細である. どのサンプルにおいても, それぞれ 1 万リード以上の配列が獲得された. このことは全てのサンプルについて全細菌の 0.01% 以上のポピュレーションを持つ細菌を解析できるデータを取得したことを示しており, 網羅的な細菌叢の解析として意味のあるデータであると言える. それぞれ平均リード長は 450bp 前後であり, このリード長をもってすれば細菌の分類上多くの配列が属レベルまでの推定を可能にされる. ヒストグラムからは全てのサンプルのシークエンスが同様に成功していることを示いる. 今回解析に使わなかった 250bp 以下の配列は全データのわずか 6.95% であることも読み取れる.

表 5 次世代シーケンサーによってシークエンスされたデータ

Samples	Number of Reads	Number of Bases	Avg.length
C1	28,446	13,125,300	461.4
C2	31,495	14,739,837	468.0
C3	23,611	10,779,089	456.5
C4	23,336	10,913,181	467.7
P1	26,213	12,125,273	462.6
P2	17,093	7,558,293	442.2
P3	20,260	9,279,070	458.0
P4	21,670	9,979,582	460.5
P5	19,976	9,293,768	465.2
P6	23,338	10,608,562	454.6

左からサンプル名・リード数・リード長・平均リード長を示す

サンプルの C は Control を P は Patients を示す

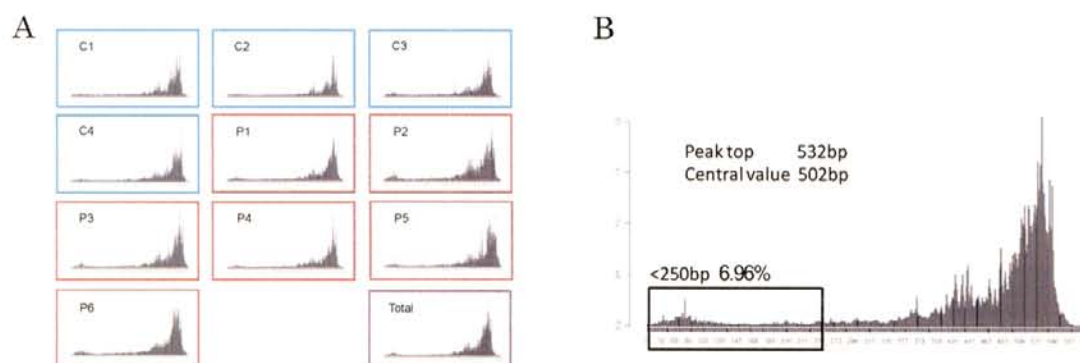


図 6 獲得されたシークエンスデータのヒストグラム

A 各サンプルのヒストグラム, B 10 サンプル合計のヒストグラム

ヒストグラムの縦軸はデータ全体に対する割合をあらわしている.

3.2.2 涙液細菌叢

図7はシーケンスデータから解析された細菌種（属）のポピュレーションを示している。それぞれ総シーケンスデータから優勢種（属）を上位10種（属）選定した。それを10色に割り振り、割合からの積立グラフを作成したものである。その際、健常者群と患者群の細菌ポピュレーションの違いを明確にするために、図7-Aでは健常者群(n=4)から解析されたデータの合計の上位10種（属）を、図7-Bでは患者群(n=6)から解析されたデータの合計上位10種（属）を積み立てたものを図示している。

細菌属の推定は全データの80~90%、細菌種の推定は60~80%行う事が出来た。細菌“属”については健常者に最も多かった細菌属は *Leuconostoc*（乳酸菌の1属）であることに対して、患者群に最も多かった細菌属は *Propionibacterium*（一般的な皮膚常在菌）であった。細菌“種”では同様に健常者に最も多かった細菌種は *Leuconostoc citreum* であり、患者群は *Propionibacterium acnes* が多い。さらに患者群では健常者に比べて、*Staphylococcus* 属や *Burkholderia* 属またはそれに属する細菌種が上位にリストされている。患者群では上位10種に入らない細菌属（種）が健常者より多くを占めている。

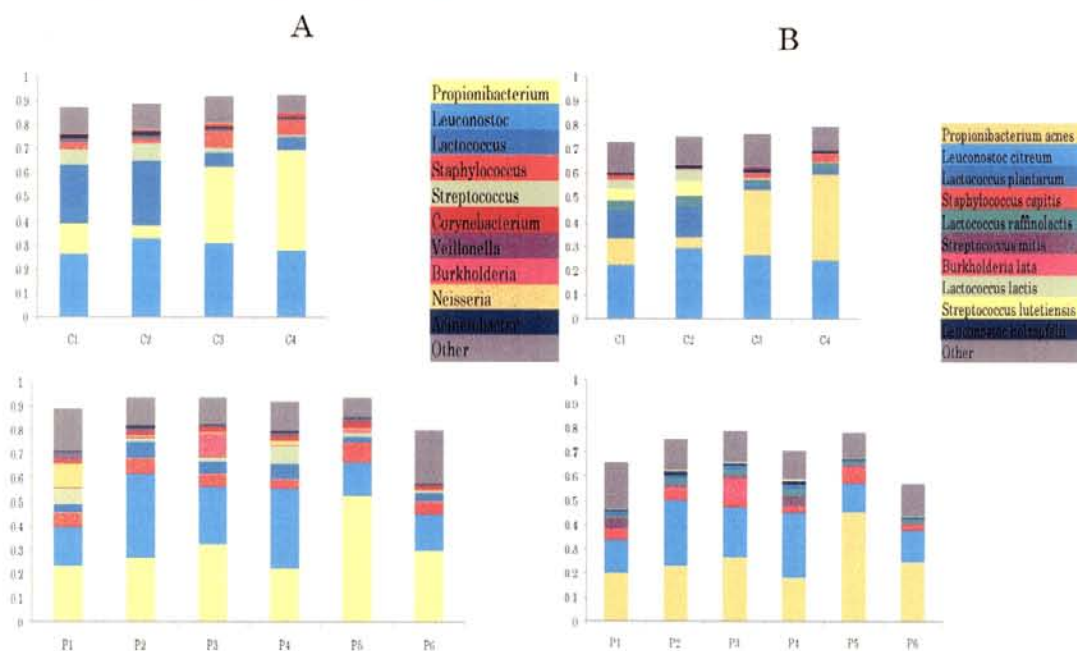


図7 獲得されたシーケンスデータからの菌推定結果

A 菌属の推定結果, B 菌種の推定結果

両者のデータにおいて全サンプルからの優勢菌順で多いものから10種（属）が選定された（図の右上）

同様に健常者群、患者群の合計においてランキングし優勢順序に従ってグラフは積み立てられた

Other と表記したものはトップ10以外の菌種（属）である

全てのグラフにおいて割合が100%に達していないが、残り（無色）は菌種（属）が推定できなかったものである

3.3 メタボローム解析結果

表 6 および、図 8 にはメタボローム解析結果からマンホイットニーの U 検定によって統計的優位差が確認された物質を示した。陰イオンから 1 物質、陽イオンから 3 物質が統計的な優位差のある物質として同定された。アトピー性角結膜炎発症によって増減する物質を選定するため、健常群を Control, アトピー性角結膜炎患者を Patients とした時の統計的な有意差を計算したものと (表 6-A), 合併症特有に増減する代謝物を選定するために健常者を Control または合併症を引き起こしていないアトピー性角結膜炎患者, 合併症を引き起こしているアトピー性角結膜炎患者を Patients とした時の統計的な有意差 (表 6-B) を別途計算した。Quinate はどちらにおいても統計的な優位差を示した。また gamma-Carboxyglutamic acid (GLA) は合併症を引き起こした時に有意に低下した。

表 6 メタボロームによって有意差を示した代謝物

A	Name	Ave_C	Ave_P	P-value
	gamma-Butyrobetaine	1.91E-03	2.41E-03	**
	o-Acetylcarnitine	2.64E-02	7.55E-03	*
	Quinate	2.55E-03	1.38E-03	*
B	Name	Ave_C	Ave_P	P-value
	gamma-Carboxyglutamic acid	1.44E-02	2.40E-03	**
	Quinate	2.16E-03	1.00E-03	*

A 健常群を Control, アトピー性角結膜炎患者を Patients とした時の統計的な有意差

B 健常者を Control または合併症を引き起こしていないアトピー性角結膜炎患者, 合併症を引き起こしているアトピー性角結膜炎患者を Patients とした時の統計的な有意差

Ave_C とは健常群の平均, Ave_P とは患者群の平均値である

P-value (P<0.05=*, P<0.01=**)

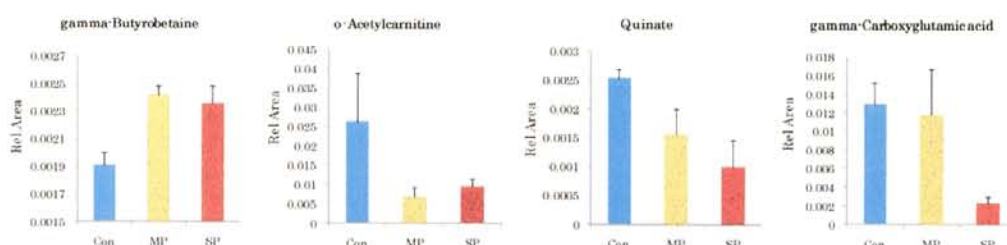


図 8 有意差の見られた代謝物質

Con は健常者群(青), MP は合併症の見られないアトピー性角結膜炎患者 (黄), SP は合併症の見られるアトピー性角結膜炎患者をしめす (赤)

縦軸は CE-TOF/MS によって測定された際のピーク面積をあらわす

4. 議論

4.1 病理診断としての涙液メタゲノム解析

4.1.1 ヒートマップによるクラスター解析

次世代シーケンサーによって測定された細菌属の割合を元に、それらのデータのヒートマップを描画することで、網羅的なデータにおける菌属割合の傾向を客観的に評価することを試みた(図9)。サンプル名と推定された細菌属名の両方を対象に Pearson Correction によるクラスタリングを行った。サンプル間におけるクラスタリングでは健常者群と患者群を大まかにクラスタリングすることができ、この結果は細菌属のプロファイルでアレルギー性結膜炎を診断できることを示している。他にも同様に様々な免疫疾患を皮膚常在菌から診断できる可能性も示唆している。これらの考察は後述の PCA を用いた議論でも取り上げる。ヒートマップから読み取れるように、涙液細菌叢は個人差が多くみられる。しかし、これらの個人差をもってしても健常者群と患者群をクラスタリングできたことは非常に興味深いことである。

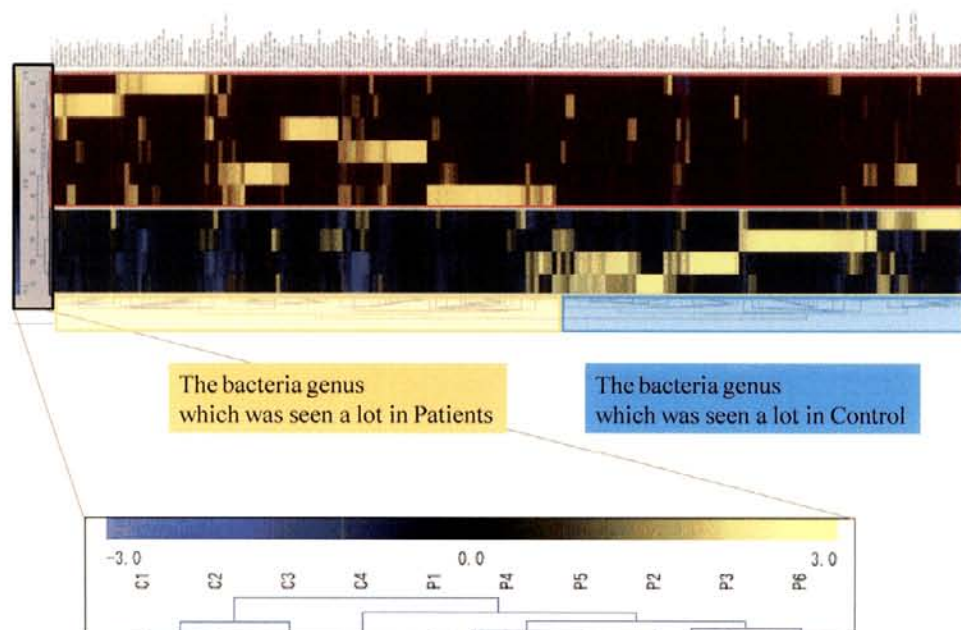


図9 健常群・患者群に優位差のみられた菌属についてのヒートマップ

サンプルと細菌属それぞれについて階層的クラスタリングを行っている

下に図示したものはサンプルをクラスタリングしたものを拡大したものである

緑で囲ったサンプル(下4サンプル)は健常者群、赤で囲ったサンプル(上6サンプル)は患者群である

水色で色づけされた細菌属は健常者群に多くみられる菌属としてクラスタリングされたものである

オレンジで色づけされた細菌属は患者群に多くみられる菌属としてクラスタリングされたものである

また観察された細菌属は細菌属間におけるクラスタリングと合わせて、健常者のいずれかのサンプルに多くみられる細菌属(94 属)および、患者群のいずれかのサンプルに多くみられる細菌属 (113 属) に大きく 2 つにクラスタリングされた。健常者に多く見られる細菌属と患者に多く見られる細菌属それぞれに分子進化学的な共通点があるのではないかと仮定し、観察された菌属 207 属による 16S rRNA 分子系統解析を行った(図 10)。

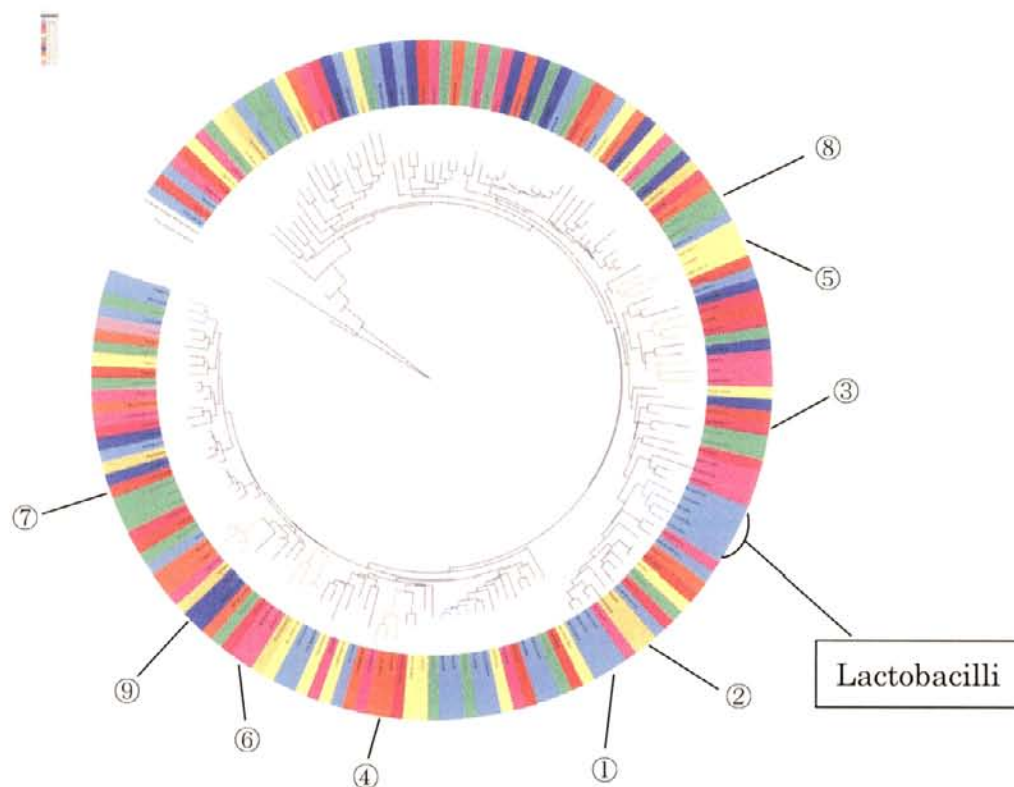


図 10 観察された菌属 207 属による分子系統解析

健常群に多くみられた菌属はサンプルごとに寒色(水①、黄緑②、青③)、患者群に多くみられた菌属はサンプルごとに暖色(赤④、ピンク⑤、黄⑥、オレンジ⑦、マゼンタ⑧、黄土⑨)で色つけた

健常者群に 3 属以上まとまったクラスターを赤色、患者群に 3 属以上まとまったクラスターを青色に色つけた

系統樹の色合いが暖色・寒色と非常にまばらであり、健常群、患者群に見られる細菌属について、それぞれに傾向が全くないことが図からも明らかである。しかし、系統樹右下側に着目すると *Lactococcus* 属, *Weissella* 属, *Lactobacillus* 属, *Leuconostoc* 属が健常者において多く見られた属名として固まっている。これらの菌属は乳酸菌と言われ、細菌叢の恒常性を保つ働きがある菌としてプロバイオティクスに応用される菌属である。健常サンプルに豊富に含まれる乳酸菌などの考察は後述するプロバイオティクスにおける考察によって行う。

4.1.2 メタゲノムデータの2群比較

次ページの図 11・表 7 に示すものは、観察された細菌種（属）のなかで健常群と患者群において統計的有意差が確認された細菌種（属）をヒートマップに描画したものである。細菌属では推定された 207 属中の 16 属が統計的有意差を示した（図 11-A）。細菌種のレベルにおいては推定された 461 種中の 26 種が統計的有意差を示した（図 11-B）。統計的有意差を示した細菌属の下流の細菌で同じく統計的有意差を示した細菌種は

Corynebacterium 属, *Burkholderia* 属, *Actinomyces* 属, *Neisseria* 属のみであった。先述したとおり、属レベルで統計的有意差を示した細菌は 16 属、種レベルで統計的有意差を示した細菌は 26 種にも及ぶことに対し、それらの系統学的な共通項が 4 属、4 種のみであることは逆に興味深いものである。またこれらはすべて患者群において増加を示している細菌属である。患者を診断するためには細菌種よりもより上流の細菌プロファイルを得れば十分であるが、健常者に多い細菌は細菌種レベルで観察しなければならないかもしれない。さらにこのことから属レベルでの議論と種レベルでの議論は性質が全く異なる可能性を示している。医学では単離された菌がどのような役割を示すのか、病原性を示すのかを中心に議論を行い、属より上流の差異については大きくふれることはあまりない。一方で医科プロバイオティクスでは特定の菌種はもちろん乳酸菌など、菌属もしくは科レベルで議論することも多い。本項はメタゲノム解析を医学、特に病理学的な側面で考察するので患者群に統計的有意に増加を示した細菌種についていくつか挙げて議論を行いたいと思う。

Burkholderia lata はセパシア菌群と言われる細菌の 1 つである。環境常在性で β -プロテオバクテリアに属するセパシア菌(*Burkholderia cepacia*)群は、は病原菌として知られており [18]、易感染患者に重篤な肺炎を発症させる起因菌であるが、動植物への病原性、高度の抗生物質耐性をもつ。アトピー性角結膜炎患者群に有意差が見られたものの、健常者にもわずかにこの菌が見られることは興味深い（図 12-A）。ある患者サンプルにおいては全細菌の 8% を占める多数菌であるため疾患とのアトピー性角結膜炎疾患との関連性が強く疑われる。すでに眼に感染症をきたす菌としても知られている。

Corynebacterium accolens は眼疾患の原因菌をはじめヒトの病原菌としての報告はめったにない、しかし肉芽腫乳腺炎と診断される患者の胸膿瘍から有意に検出されたとの報告もあり [19]、病原菌としての可能性も捨てきれない。実際にアトピー性角結膜炎患者はほぼ全てからこの菌は高い割合で観察されており、他のサンプルに比べばらつきが少ないため、病理マーカーとして、またアトピー性角結膜炎疾患との関連菌として非常に重要である菌と考える。

Staphylococcus hominis はメチシリン耐性コアグラゼ陰性ブドウ球菌であり、免疫の低下によって感染の可能性がある病原菌である。また化学療法によって免疫低下を引き起こした時にも感染の危険性がある。アトピー性角結膜炎の治療としてステロイド点眼薬を用いる場合があるが、ステロイドが免疫の低下を引き起こし、様々な感染症を引き起こすことはすでに眼科領域では知られているところである。

Rothia dentocariosa は眼表面における常在菌である [20]と同時に眼内炎を起こす病原菌としても知られている[21]. 常在菌であるこの菌がアトピー性角結膜炎に多く見られたことは、この細菌は免疫疾患の原因菌であると言うよりも、それに付随する炎症に影響を及ぼす細菌としての理解が適切であると考え、眼疾患とゆかりの深いこの菌の有意差はデータの信憑性を示す。

Neisseria subflava は日和見的な病原菌である。しかしまれに心内膜炎、菌血、髄膜炎、敗血症性関節炎、眼内炎と敗血症の原因となっていることが知られている[22]。さらに *Neisseria* 属の他の細菌は結膜炎で増えることがすでに知られている[23]。

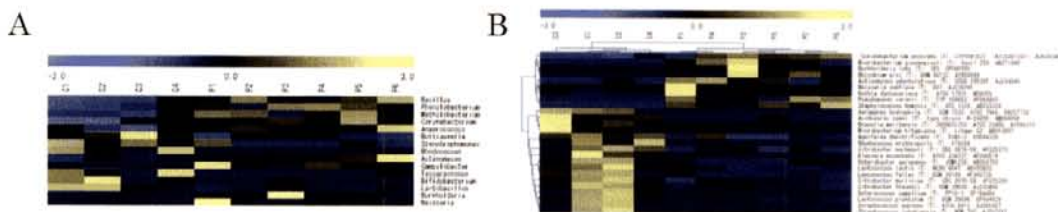


図 11 マンホイットニーの U 検定によって有差を示した菌種(属)

A: 菌属 B: 菌種

表 7 統計的優位を示した細菌種(属)のサンプル差と統計量

A	Genus	Ave_C	Ave_P	P-value	B	Species	Ave_C	Ave_P	P-value
	<i>Corynebacterium</i>	9.62E-03	2.04E-02	*		<i>Burkholderia lata</i>	1.09E-03	2.14E-02	*
	<i>Burkholderia</i>	1.18E-03	2.25E-02	*		<i>Neisseria subflava</i>	6.20E-04	8.93E-03	*
	<i>Neisseria</i>	1.76E-03	2.13E-02	*		<i>Corynebacterium accolens</i>	8.60E-04	2.90E-03	*
	<i>Actinomyces</i>	1.68E-03	4.36E-03	*		<i>Rothia dentocariosa</i>	3.08E-04	1.09E-03	*
	<i>Bacillus</i>	7.65E-04	3.19E-03	*		<i>Rhizobium pisi</i>	0.00E+00	4.75E-04	*
	<i>Anaerococcus</i>	7.28E-04	1.71E-03	*		<i>Staphylococcus hominis</i>	0.00E+00	4.45E-04	**
	<i>Campylobacter</i>	2.91E-05	8.84E-04	*		<i>Pseudomonas veronii</i>	0.00E+00	2.62E-04	*
	<i>Phenylobacterium</i>	1.80E-04	7.28E-04	*		<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1.71E-05	2.08E-04	*
	<i>Methylobacterium</i>	1.79E-04	7.05E-04	*		<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	0.00E+00	1.65E-04	*
	<i>Buttiauxella</i>	4.09E-03	2.26E-03	*		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	2.89E-02	2.87E-04	*
	<i>Lactobacillus</i>	4.63E-03	5.32E-04	*		<i>Citrobacter werkmanii</i>	5.84E-03	2.16E-03	*
	<i>Stenotrophomonas</i>	2.10E-04	5.12E-05	*		<i>Citrobacter murlinae</i>	5.53E-03	1.88E-03	*
	<i>Bifidobacterium</i>	2.59E-04	9.12E-06	*		<i>Citrobacter freundii</i>	4.00E-03	1.20E-03	*
	<i>Tessaracoccus</i>	1.14E-04	8.21E-06	*		<i>Lactococcus lactis</i>	7.03E-04	1.28E-04	*
	<i>Rhodococcus</i>	5.11E-05	0.00E+00	*		<i>Leuconostoc fallax</i>	7.52E-04	7.32E-05	*
						<i>Enterococcus camelliae</i>	4.63E-04	0.00E+00	*
						<i>Streptococcus equinus</i>	3.70E-04	0.00E+00	*
						<i>Aquitalea denitrificans</i>	2.12E-04	5.91E-05	*
						<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.35E-04	3.65E-05	*
						<i>Brucella melitensis</i>	1.25E-04	0.00E+00	*
						<i>Acidovorax caeni</i>	1.07E-04	8.92E-06	*
						<i>Kluyvera ascorbata</i>	9.38E-05	0.00E+00	*
						<i>Microbacterium kitamiense</i>	5.29E-05	0.00E+00	*
						<i>Rhodococcus erythropolis</i>	5.03E-05	0.00E+00	*
						<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.96E-05	0.00E+00	*
						<i>Lactococcus plantarum</i>	6.86E-02	1.38E-02	*

青に塗りつぶされたものは健常者に赤に塗りつぶされたものは患者群に多く見られた菌種(属)である

A: 菌属 B: 菌種

P-value($P<0.05=*$, $P<0.01=**$)

今回統計的有意差が見られた細菌種は 26 種ある。これらの中のいくつかは眼疾患を引き起こすことが知られている細菌種だったが、その他多くは今まで眼疾患とのかかわりが議論されていないものである。本研究ではこれらのように、今まで眼疾患に関わる可能性を示されていなかったがアレルギー性角結膜炎に関わる可能性がある菌を複数種発見し、報告したことは間違いないものであると考える。しかしこれは既知の配列と高い相同性を示したと言う事にすぎず、実際に涙液の中から培養かつ単離しなければ今回統計有意差を示した細菌を眼疾患における病原菌とは断定できない。アトピー性角結膜炎患者からこれらの菌を単離することは眼科領域の研究者に一任するところである。

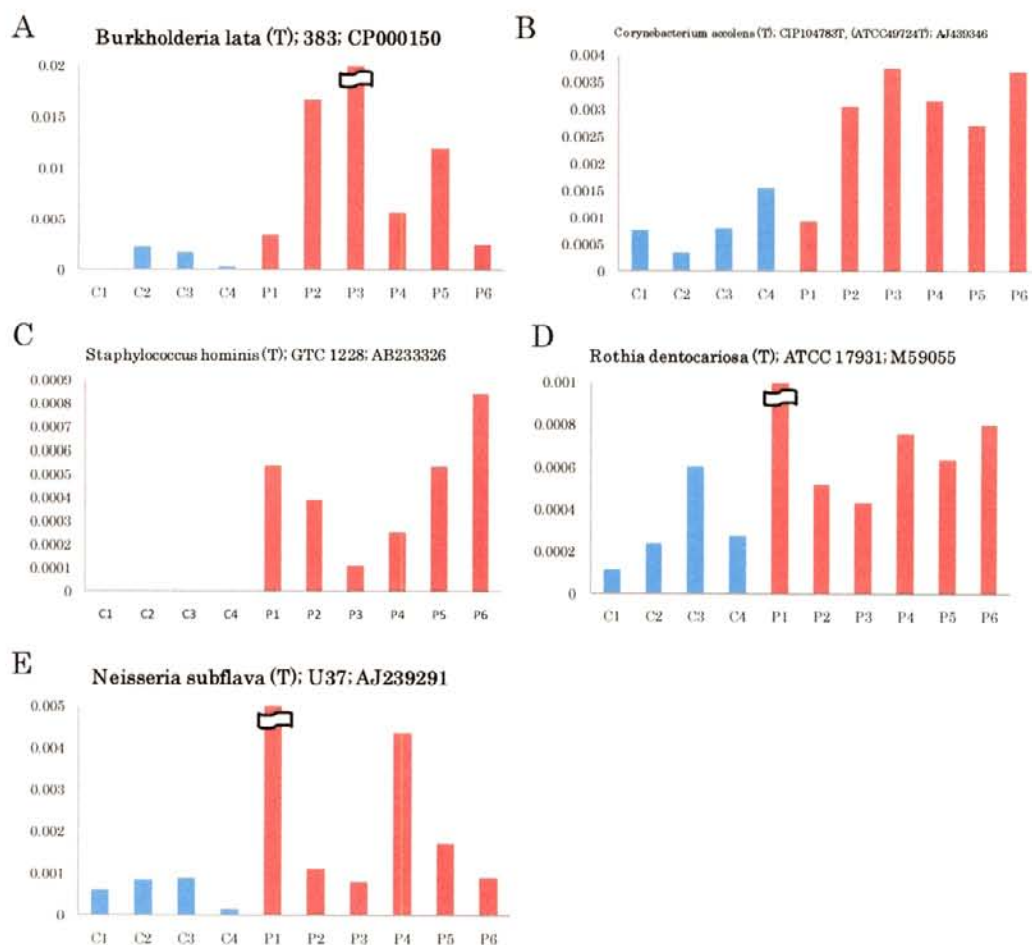


図 12 マンホイトニーの U 検定によって有差を示した菌種(属)

A: *Burkholderia lata* B: *Corynebacterium accolens* C: *Staphylococcus hominis*

D: *Rothia dentocariosa* E: *Neisseria subflava*

青: 健常者 赤: 患者群

グラフの縦軸はシーケンスされた属の全体に対する割合を示す
一部グラフの最大値を変更した。そのため一部データを省略した。

4.1.3 ブドウ球菌とアトピー性角結膜炎

Staphylococcus 属（ブドウ球菌）は皮膚の常在菌であるが、まれに病原菌となる可能性があり、細菌病理では非常に重要な細菌である。病原性をもつブドウ球菌は MRSA と言われる細菌と MR-CNS と呼ばれる細菌群に分けられる。MRSA とは *Staphylococcus aureus* のことであり、病原性の常在菌として最も多く研究されているブドウ球菌である[24]。コアグラーゼ陽性の代表菌種は MRSA であり、種々な病態を呈す。コアグラーゼ陰性ブドウ球菌が CNS であり、ブドウ球菌のほとんどが CNS である。コアグラーゼとは菌体外酵素の 1 つであり、血漿凝固作用を有する。近年、免疫疾患患者腸内の *Staphylococcus aureus* が有意に増加しているとの報告された[4]。ブドウ球菌がアトピーを起こした患者の涙液から有意に検出されたと言う報告もあるが[25]、データが少なく今後さらなる議論の必要がある。

図 13 に示すのは、それぞれ MRSA と MR-CNS に推定された菌種のメタゲノムプロファイルである。MRSA では患者において菌の増加は確認できないが、MR-CNS 群ではすでに統計的に有意を示した *Staphylococcus hominis*、他 *Staphylococcus epidermidis* はステューデントの検定では有意差が確認されている。サンプル数の充実によって MR-CNS とアトピー性角結膜炎の関連性がさらに浮き彫りになるかもしれない。眼感染症における MRSA および MR-CNS の薬剤感受性についての論文ではレボフロキサシンの点眼によって MRSA は殺菌されたものの、MR-CNS では殺菌が確認されていない [26]。さらに、MR-CNS は MRSA に比べて上皮細胞への付着性が高いため付着面の面では MRSA より病原性が高いと言う報告もある[27]。本研究の結果から免疫疾患、特にアトピー性角結膜炎と MR-CNS の関連性が疑われる中で、MR-CNS の生体への執着性は強く、従来の科学的療法ではこれらを抑えきれないことが懸念される。

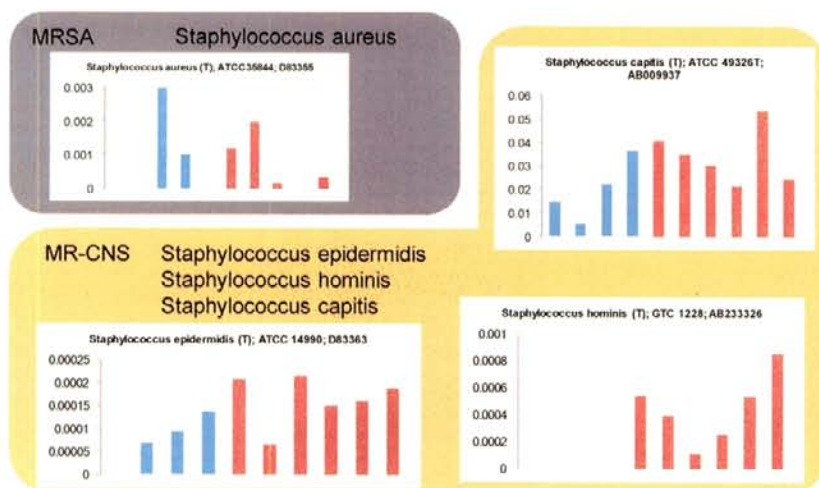


図 13 観察された MRSA と MR-CNS 菌群

灰色:MRSA 黄色:MR-CNS 菌群

青:健常者 赤:患者群

グラフの縦軸はシーケンスされた属の全体に対する割合を示す

4.1.4 PCA による傾向分析

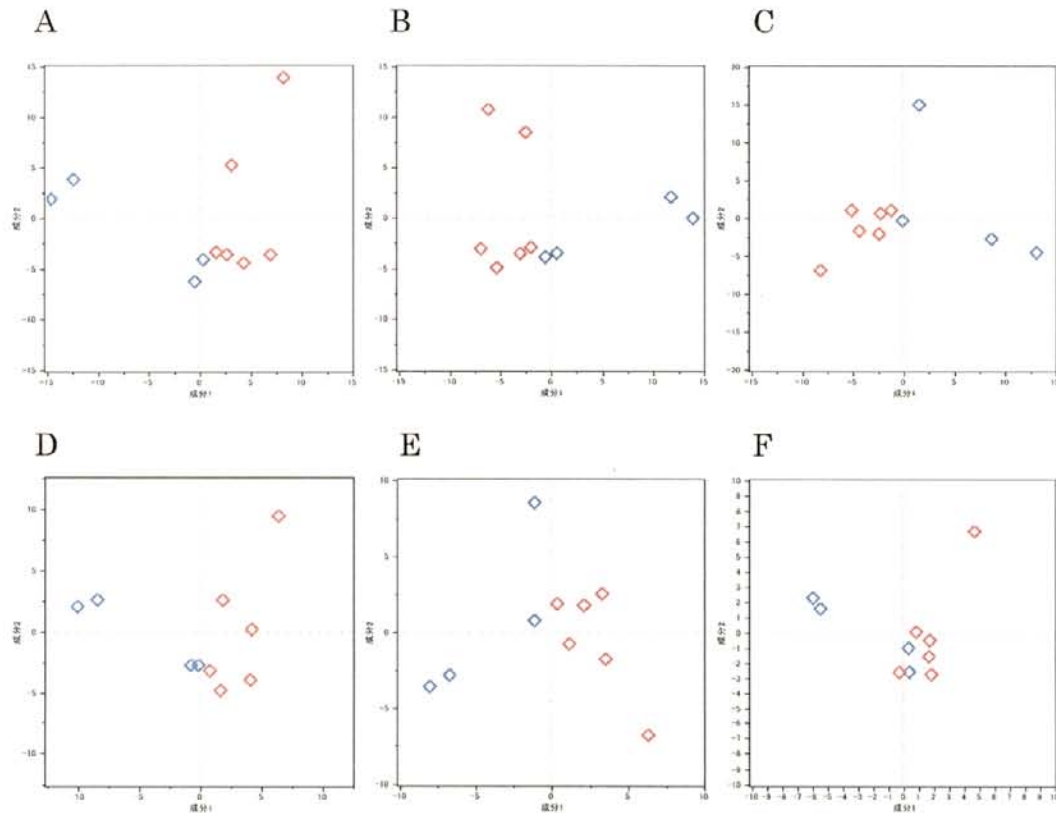


図 14 様々な条件下での PCA 解析

- A. 推定された菌種全てにおいて描画された PCA B. 推定された菌種において描画された PCA (N>3)
C. 推定された菌属全てにおいて描画された PCA D. 推定された菌属において描画された PCA (N>3)
E. 推定された菌科全てにおいて描画された PCA F. 推定された菌目全てにおいて描画された PCA

青:健康者 赤:患者群

図 14 に示すのは、細菌種（属、科、目）プロファイルを元に作成された PCA 解析結果である。細菌科・属・種の PCA 解析においては健康群および、患者群を明確に判断することができる。しかしながら目より分類的に上流に当たる分類で PCA 解析を行うと、両群を明確に分類することはできない。多くのメタゲノム解析においては門・綱などの細菌プロファイルについて議論すること多いが[28], 上流の階層での議論は有意義ではなく、環境サンプル（特に常在菌）においてその場の環境を考察するためには少なくとも科より下流の分類クラスで考察しなければならないことを今回の結果は強く示唆している。

図 14-C では推定された菌属全てにおいて PCA 解析を行ったが、図 14-D は観察された細菌属の中でも 3 サンプル以上に観察された細菌プロファイルについて作成されたものである。D にくらべ C の PCA 解析は患者群のまとまりがよい。このことは細菌の中の少数菌

もしくは個人差を形成する細菌もアトピー性角結膜炎の病理に関わっていることや、疾患を起こすと非常にユニークな細菌が繁殖してしまう可能性を示している。

前述したが細菌種として推定されたものは全体の 60~80%程度である。80~90%の推定能を誇っている細菌属や細菌科と同様に PCA 解析の結果が好ましいのはメタゲノム解析で宿主の状態を示すためには本研究のようにシーケンサー測定限界までシーケンスを行うなど、より長いシーケンスデータを取得することが望ましいことや、常在菌叢が大きく病理に貢献することを示唆しており、これらのことからメタゲノムプロファイルはアトピー性角結膜炎の診断に非常に有用である事を示す。さらにその他、眼疾患の診断や、皮膚常在菌叢の解析における免疫疾患の診断をメタゲノム解析によって行える可能性を示している。実際にアトピー性皮膚炎の症状スコアと腸内細菌叢の関連について示す論文がある[29]。同様に免疫疾患の診断を皮膚常在菌で手軽に行う事ができる可能性がある。

4.1.5 メタボロームデータとメタゲノムデータの比較

図 15-A に示すのは 2008 年に測定したアトピー性角結膜炎患者群(n=10)と健常群(n=5)を用いて作成された PCA 解析結果である。メタボローム解析を用いた時よりもメタゲノム解析を用いたほうが健常群と患者群の判断に優れていることは明白である。

その原因としてはヒトの恒常性が大きく関与していると考察される。代謝物を始めヒトは外界からのストレスを受けた時に内分泌を一定に保つ恒常性が働く。一方で環境中に存在する微生物、特に常在菌は宿主の影響を直接受け、変化した環境により細菌が活性を失ったり、逆に活性を得たりする。さらに微生物は微生物同士のクロストレーキングが頻繁に行われることから少しの環境的ストレスが細菌叢に多大な影響を与えるものであると考えられる。このことは常在菌叢が個人差を生んでしまう反面で、宿主の状態や病理に強く反映できるものであることを示唆しており、ヒトの様々な病理疾患のマーカー探索の対象として、ヒト由来のものよりも細菌性のものの方が優れている可能性を示唆する。

メタボローム解析は代謝物の濃度を正規化することや測定の際に生じたノイズデータの削除などの解析の手間が非常に多いほか、解析のためのコスト、時間の両面において研究者の負担が大きいものである。その点、メタゲノム解析はメタボローム解析に比べ非常に簡易である。環境サンプルから DNA を抽出し、PCR を行う事が全自動で行うことが現在可能であることも重ねて、非常に低時間、低負担で行う事ができる。さらに近年では次世代シーケンサーの出現と同時にシーケンスにかかる値段や、シーケンサーそのものの低コスト化が進んでおり、将来的には病院にシーケンサーがおかれる時代が訪れると予想されている。診断のみならずオーダーメイド医療などの重要性がささやかれる中で、個人差の大きい常在菌叢の乱れを解析し、各患者にて増加が見られた病原細菌に対する処方を行うことも可能である。メタゲノム解析を用いた新しい病気の診断・処方方法は次世代シーケンサーの出現同様、次の世代を担うものとして将来ブレイクスルーを起こすものであると考えられる。

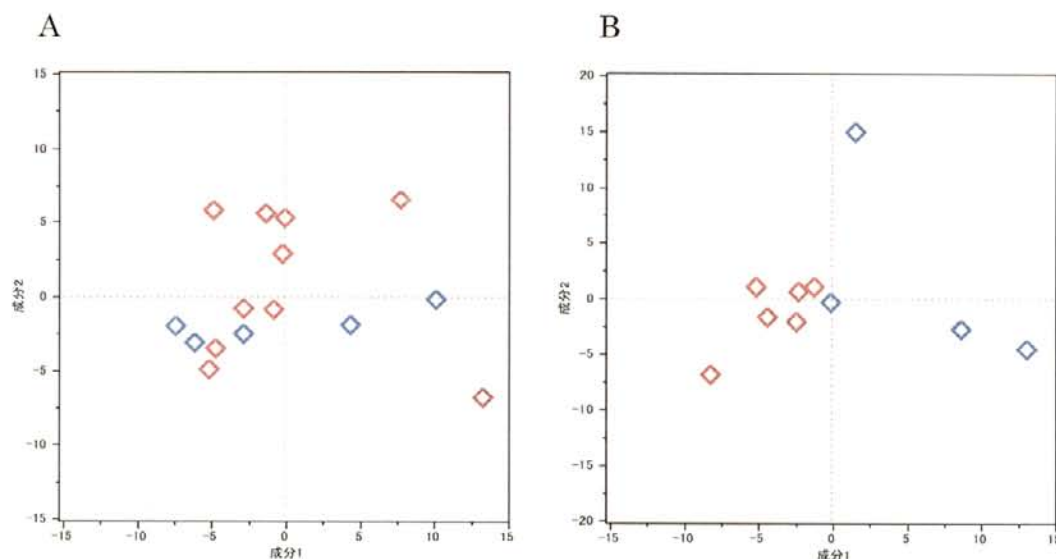


図 15 様々な条件下での PCA 解析

A. メタボロームデータ(涙液中 113 代謝物)を用いた PCA

B. ゲノムデータを用いた PCA(図 13-C と同じ図)

●:健康者 ▲:患者群

4.2 プロバイオティクスとしての涙液メタゲノム解析

これまでの章では病原微生物や、それらの影響でのアトピー性角結膜炎の病理への影響について議論を行ったが、本章からはプロバイオティクス、つまりは有用菌の視点からの病理議論や、本来涙液に常在する菌、もしくは健康状態に多く見られる細菌について眼表面の健康をいかに守っているのか、またその工業的応用の可能性について議論する。

4.2.1 比較解析から考察する涙液中の有用菌とその働き

図 16 に示したのは患者群に比べ健康者において有意に増加を示した細菌である。2 群間の平均値の比較は前章表 7 を参考にさせていただきたい。健康者の涙液中には患者群に比べ、乳酸菌が多いことがわかる。一般的に健康者の涙液には *Leuconostoc citreum* と呼ばれる菌が最優勢に存在しているが(図 7-B)、特に *Bifidrobacterium* 属、*Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属が有意に多い。実際にアレルギー疾患においてこれらの属に該当する腸内細菌が減少するという報告や、口腔摂取することにより免疫疾患が改善するという報告があるのでそれぞれいくつか紹介する。プロバイオティクスでは *Bifidrobacterium* 属、*Lactobacillus* 属を口腔摂取することで症状が改善された報告がいくつか知られている。Wang らは、平均 14~15 歳の通年性アレルギー患者に対して、二重盲検法で *Lactobacillus paracasei* を投与したところ、生活の質を含めた臨床症状の有意な改善を見たと報告している[30]。また、成人のスギ花粉症に対して *Bifidrobacterium longum* が有効であるとの報告もある[31]。その他プロバイオティクスの経口摂取においてアトピー性の眼疾患が改善されたとの 1 例も報告されている[32]。さらに免疫疾患において腸内から減る菌としても

Bifidobacterium 属, *Lactobacillus* 属はすでに挙げられている[4]. このように免疫疾患で腸内細菌において増減することが知られている菌がアトピー性角結膜炎を起こした涙液常在菌でも同様に確認することができ, 免疫疾患と常在菌の関係は以前から着目されてきた腸内細菌のみならず, 炎症患部でも同様であることを示している.

次に常在菌の乱れは免疫疾患の原因であるのか, 結果であるのかは重要な問題である. この点に関しては腸内細菌叢の違いがアレルギー発症に先だって認められるとの報告があり[4], 常在菌叢の乱れが免疫疾患の原因になる可能性を示している. 本研究において先行研究との一致として患者群から観察された乳酸菌の減少や, ブドウ球菌の増加, *Enterobacteria* (本サンプルの患者においても *Enterobacteriaceae* 科の増加が有意であった) の増加[33]がアトピー性角結膜炎発症の原因になっている可能性が示唆される.

また, *Lactococcus lactis* の割合は健常群において有意に多い. *Lactococcus lactis* はプロバイオティクスとしてすでに様々な分野で応用されているが, *Lactococcus lactis* が生成するリン酸化菌体外多糖[34]は哺乳動物の免疫活性の発現に非常に重要であることが知られている[35]. *Lactococcus lactis* が眼表面の免疫向上に働いていることは先行研究からも支持されるところである.

同じく健常群に多い菌として有意差を示すものに *Streptococcus lutetiensis* が挙げられる. *Streptococcus* 属の細菌の生理的作用は非常に多種多様である. 齧蝕原性細菌である種[36], やプロバイオティクスとしてヒトに利用される菌種もいる[37]. 本解析では既知の細菌と比べ 95%以上の相同性を得たものを細菌種の推定としている. しかし実際は RDB のスコアリングの手法の影響や, 対象となる配列が既知の細菌と異なる場合もある. そのため 16S rRNA の進化系統樹で細菌種の推定をより詳細にしないこととした (図 17). 対象として用いたのは本研究のシーケンスデータの中で *Streptococcus lutetiensis* として推定された 10 リードをランダムに選び, 既知の *Streptococcus* 属の細菌種の中で *E. coli* のアウトグループの基進化系統樹を作成した. 条件は対象と手法で述べたものと同じである. 結果, *Streptococcus lutetiensis* として推定された全ての菌に対して近縁に *Streptococcus lutetiensis* が推定されたが同じく近縁に *Streptococcus infantarius* や *Streptococcus bovis* が位置された. そのため, 性質上これらの菌と似た機能を持つと仮定した.

スーダンの伝統的なラクダの発酵乳”Gariss”の中には *Streptococcus infantarius* や *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus* などの菌が含まれることが知られている[38]. *Streptococcus infantarius* は心内膜炎の原因となる病原菌として知られている[39]. しかし, ”Gariss”から単離された菌の内多くが *Streptococcus infantarius* であるにもかかわらず, 消費者の病気の発病は報告されていない[40]. それどころか, ”Gariss”はリーシュマニア症またはカラアザールさらには他の種類の感染症を治療するのに用いられる. カラアザールの原因となる原虫は免疫システムを攻撃し宿主に発熱をもたらす. このことは”Gariss”が免疫機能の改善の能力を持っていることを示唆しており, 本研究分野におけるアトピー性角結膜炎と関連しても興味深い. これに関連して健康の維持として伝統的にヒトは

Bifidobacterium 属, *Lactobacillus* 属, *Streptococcus* 属を含む乳製品を摂取してきたという報告がある [41]. 病原性を持つ細菌も種類によっては乳酸菌との共存によってヒトの健康に莫大な利益を働きかける可能性を示唆しており, 涙液中でも同様にそれらが行われている可能性をしめしている.

腸内細菌同様, 免疫疾患において眼表面の常在菌叢バランスが偏っていることを示した. 眼表面細菌叢の偏りにより, アトピー性角結膜炎が誘発される可能性が示唆された. そのことが事実であるならば, 乳酸菌などのプロバイオティクスの投与によってアトピー性角結膜炎の予防が可能であるのかもしれない. 従来のプロバイオティクスでは口腔摂取が一般的であった. 本研究では涙液常在菌叢が免疫疾患に影響を与える考察であるため, ヒト由来の乳酸菌を直接点眼することで直接的に患部の健康改善に影響を与えることが可能である. その際には *Streptococcus infantarius* と乳酸菌を同時に摂取することでより有用な効果を期待できそうだ.

涙液の pH は 7.5~8.0 のアルカリ性だと言われている. 一方で乳酸菌の増殖至適 pH は 5.5~5.8 の弱酸性であり, 涙液環境は乳酸菌生息に優れているとはとても言えない. その乳酸菌にとって劣悪な環境の中でこれらの菌が生息し, 宿主の健康を維持していることは非常に興味深いことである.

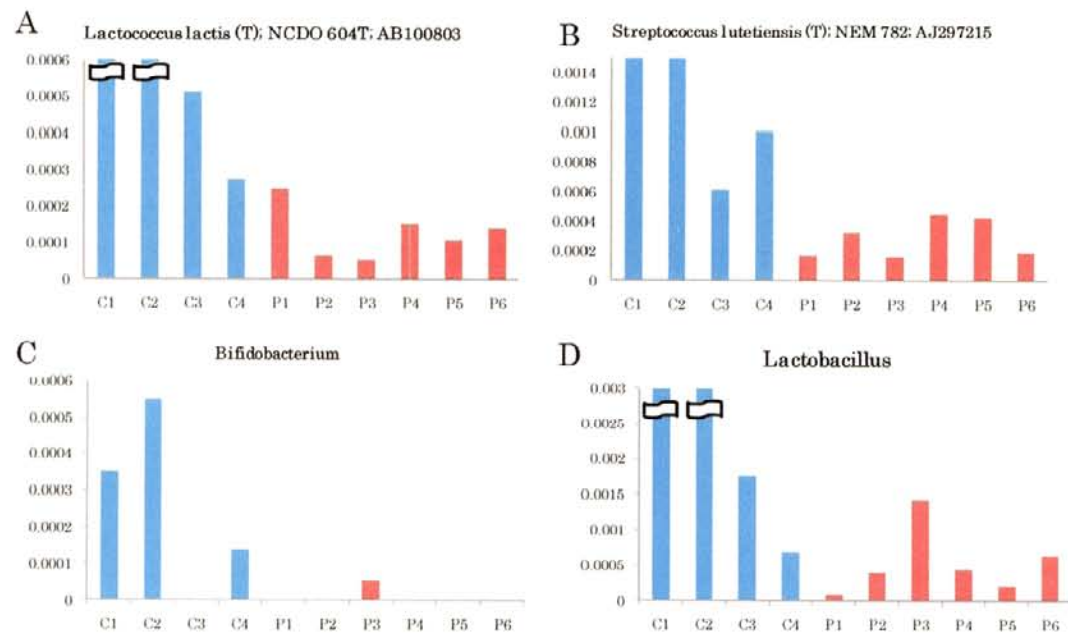


図 16 マンホイットニーの U 検定によって有差を示した涙液有用菌

A: *Burkholderia lata* B: *Corynebacterium accolens*

C: *Staphylococcus hominis* D: *Rothia dentocariosa*

青: 健常者 赤: 患者群

グラフの縦軸はシークエンスされた属の全体に対する割合を示す
一部グラフの最大値を変更した. そのため一部データを省略した.

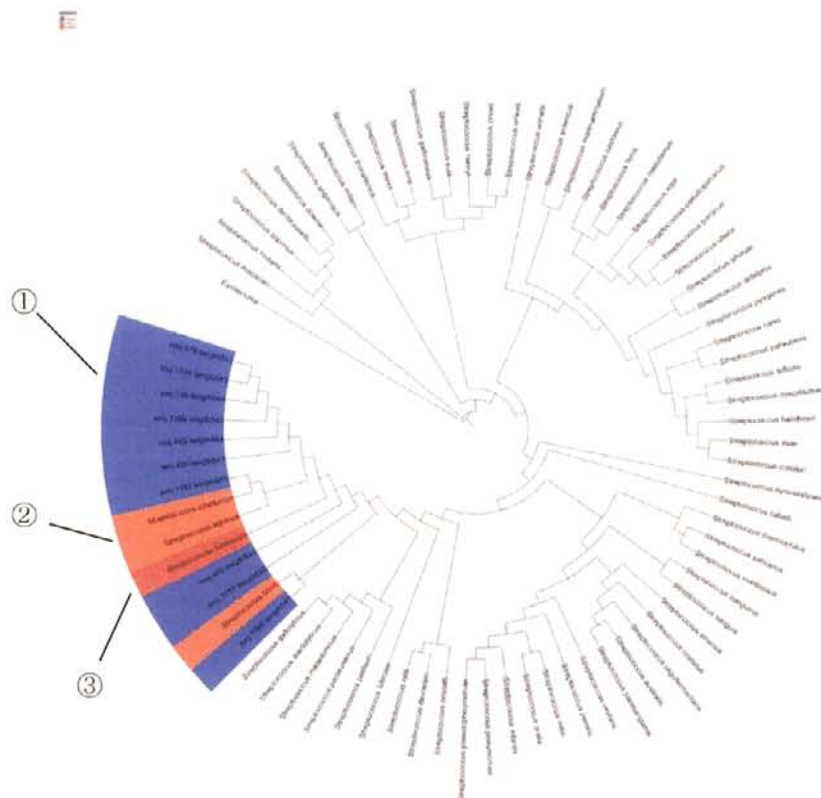


図 17 *Streptococcus* 属の系統解析

青①:シーケンスによって得られた配列 赤②:RBD(SeqMatch)によって得られた配列(青)と相関性が高いと推定された菌種 オレンジ③:Seq Match では推定されなかったが、得られた配列(青)と近縁と思われる菌種

4.2.2 自己相関解析から考察する涙液中の有用菌とその働き

プロバイオティクスとは口腔から肛門に至る広義の消化管に存在する細菌群に働きかけて、あるいは単独で生体に有益な効果をもたらす生きた細菌のことを示す。この場合、アトピー性角結膜炎に多く見られた細菌を抑えるような菌や、アレルギーによって増えると言われているような菌を抑えるような菌が涙液プロバイオティクスとして有用であると判断ができる。

図 18 では観察された細菌属のうち 3 サンプル以上に観察された細菌属の自己相関マップである。この図からは先述したとおり、アトピー性角結膜炎によって増えることが確認された細菌や、すでに免疫疾患で増えることが確認された菌属と負の相関を示す細菌を客観的に捕えることができる。図の右上が -0.8 から -1.0 の高い負の相関を示す濃いブルーの色にマッピングされている。成分 1 となるのはアトピー性角結膜炎によって有意に増加した *Corynebacterium* 属および、免疫疾患において腸内や皮膚ですでに増加が示されており、本研究でも議論に挙げた *Staphylococcus* 属やこれらを含めた 4 属の細菌である。それに対

し、成分2として挙げられるのは、乳酸菌（*Bifidrobacterium* 属、*Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、*Weiserria* 属）の他、*Enterococcus* 属などの細菌である。乳酸菌が免疫疾患の予防や治療にプロバイオティクス的な効果を示すことは今まで議論したが、免疫疾患において *Enterococcus* 属が減ることから[4]、これらの細菌も同様に免疫恒常性に関わる細菌である可能性が高い。従来からプロバイオティクスとして用いられているのは *Bifidrobacterium* 属、*Lactobacillus* 属の細菌であった。しかし今回の結果ではその他の乳酸菌も免疫疾患に悪影響を及ぼしそうな細菌と負の相関を示している。*Lactococcus* 属、*Weiserria* 属の細菌もプロバイオティクスとして応用されることが期待される。

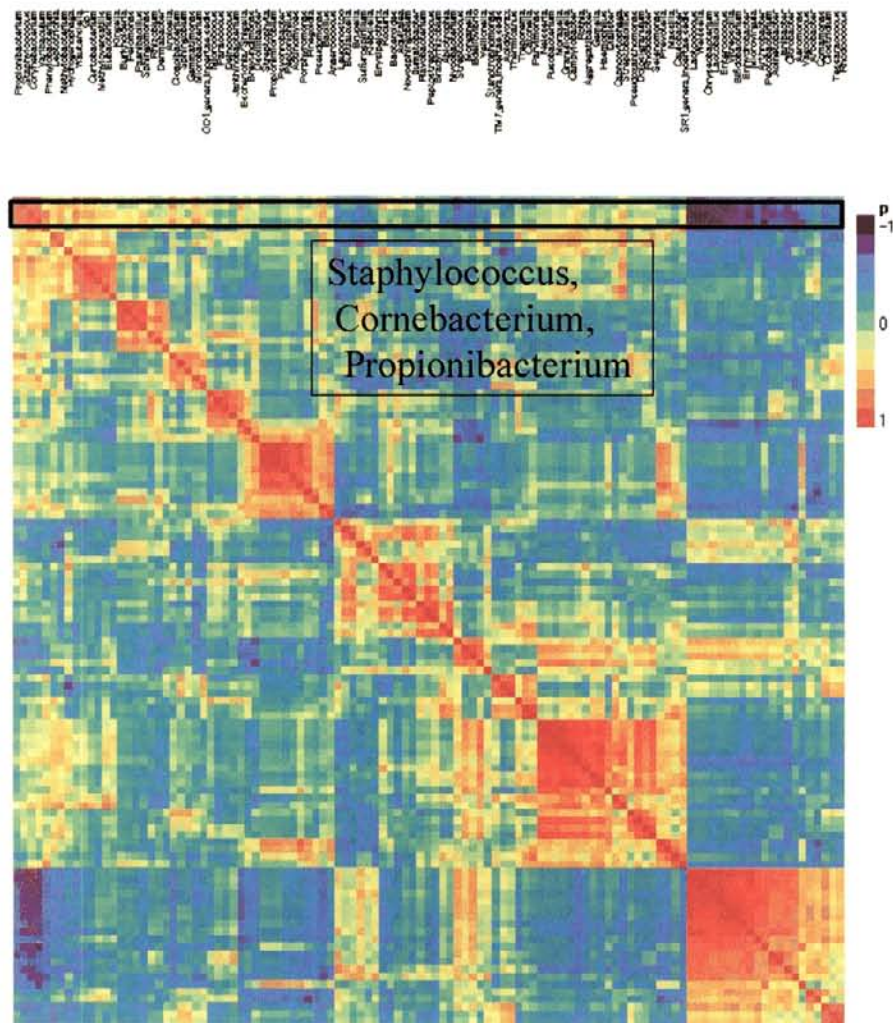


図 18 推定された細菌属についての自己相関マップ

正の相関を示すと赤、相関を示さないと碧、負の相関を示すと青とマッピングした

図右上は特に負の相関を示すプロファイルである

図の上の囲みは変数 1 である *Staphylococcus* 属、*Cornebacterium* 属、*Propionibacterium* 属の集団である

付録では図 18 の自己相関により、負の相関に統計差が見られたデータの中で属に推定されたものは($P<0.005$)、種に推定されたものは($P<0.01$)の有意差が見られたデータを表にしたものを載せ、免疫疾患に関わりのあるものを赤、免疫疾患の改善が見られそうな細菌を青で表記している。このことからプロバイオティクスとなりえる菌同士で拮抗することは無く、免疫疾患に関わりのあるものをまんべんなく抑制していることが見て取れる。

負の相関を示した割合のいくつかを図 19 で示す。属と種両方で議論をするが、種での相関も同様の解析によって得られた結果である。様々な乳酸菌と負の相関を示し、さらに免疫との関連がささやかれる *Staphylococcus* 属の抗菌性についての議論を中心に行っていきたい。すでに *Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属は免疫改善のプロバイオティクスとして用いられ、これらの菌は本サンプルにおいても有意に *Staphylococcus* 属と負の相関を示すが、それ以上に *Lactococcus* 属、*Weiserria* 属が *Staphylococcus* 属と有意な負の相関を示した(添付と図 19-A/C)。 *Staphylococcus* 属のみならずこれらの細菌はその他、アトピー性角結膜炎患者において増加した細菌属（特に *Conrnebacterium* 属）へも有意な負の相関を示していた(図 19B/D)。そのことから乳酸菌は様々な病原菌に対して細菌ワイドにこれらの菌を抑制する作用があることを示唆している。さらに *Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属以外の乳酸菌 (*Lactococcus* 属、*Weiserria* 属) が眼疾患、特にアトピー性角結膜炎に利益をもたらすとすると医科バイオティクスとして新しくこれらの乳酸菌を取り入れることが非常に重要となってくる。さらにこれらの細菌をヒト由来にて単離することができれば、口腔摂取の他、点眼として患部に直接作用を促すことは安全面と効果の両面において非常に有意義であると考ええる。

ところで、細菌種レベルにての議論においても *Lactococcus* 属は眼表面の健康において非常に有益な働きを示している可能性がある。*Lactococcus* 属のなかでは *Lactococcus raffinolactis* と *Lactococcus lactis* と推定された菌種が、健常群に有意に多く見られた細菌である(図 19E/F)、*Staphylococcus hominis* と著しい負の相関を示している。これらの菌はほかの *Staphylococcus* 属の細菌や、アトピー性角結膜炎患者により増加した細菌とも同様に負の相関を示している。*Lactococcus lactis* はすでに先述でも議論されたが、あらかじめ *Staphylococcus* 属を培養した脱脂乳に *Lactococcus lactis* を添加することで *Staphylococcus* 属の細菌が急速に死滅するとの研究報告がすでに報告されている

(http://www.nyusankin.or.jp/scientific/moriji_5.html, 図 2)。*Lactococcus raffinolactis* と *Lactococcus lactis* は新しいプロバイオティクスとして有用であるかもしれない。さらにこれら推定された菌には同じ菌種でも様々な菌株が存在する。推定された株が違う事で、負の相関係数と、有意差が異なることから、眼の健康を著しく維持している乳酸菌は常在菌として独自の抗菌機能を持っていたとしても不思議が無い。そのため眼疾患に直接作用するプロバイオティクスの提案の場合、それらはヒトの涙液から単離される必要があるだろう。

このように本研究では新しいプロバイオティクスの新細菌としての提案、また手法として点眼という新しいプロバイオティクスの摂取方法の提案を示した。

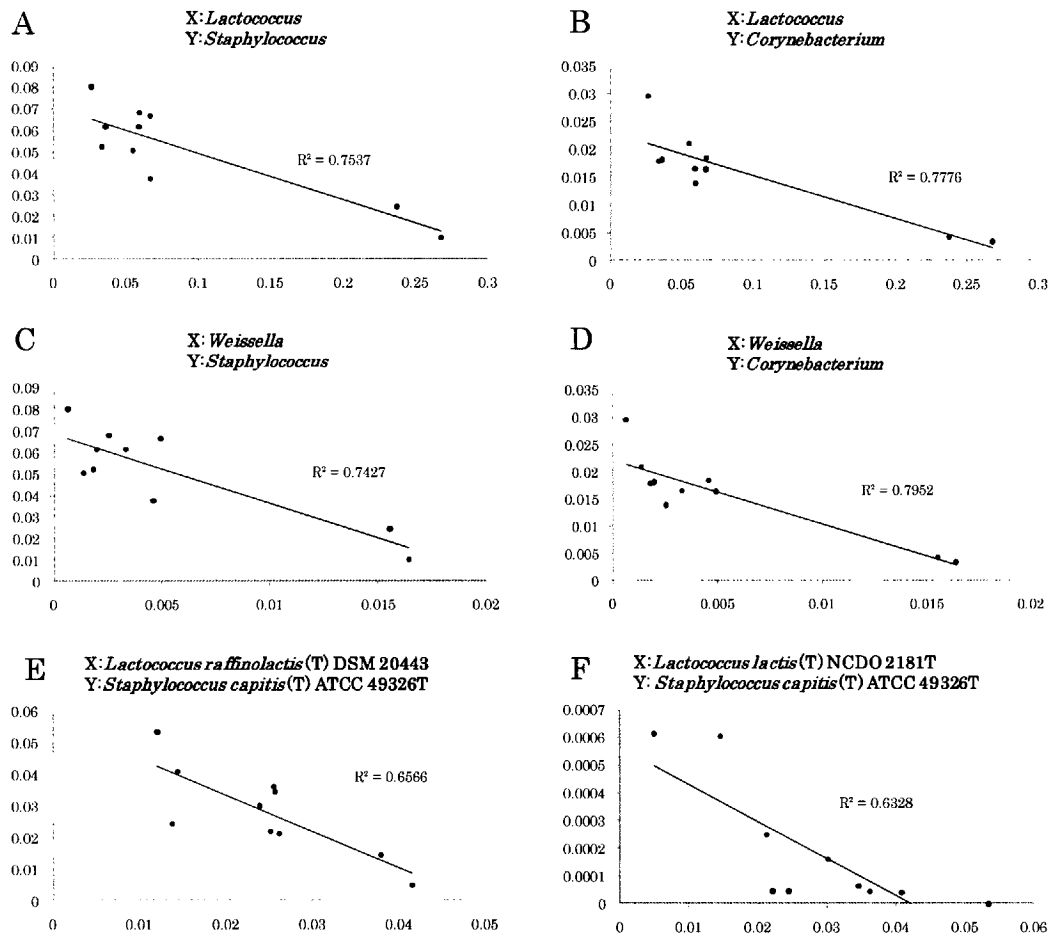


図 19 乳酸菌とアトピー性角結膜炎に関わる可能性のある細菌との相関プロット

図の軸の単位は X 軸, Y 軸ともにサンプルにおける対象となる菌の割合である

X:の後に書かれているのは成分 1 の細菌名, Y:の後に書かれているのは成分 2 の細菌名である

4.2.3 涙液メタボローム解析と常在菌との関連性

細菌と疾患性についての関連性をメタボローム解析データから議論を行う。既知の物質において、健康者とアトピー性角結膜炎患者においては 3 物質統計差が確認されている。アトピー性角結膜炎で合併症を引き起こしているものとそれ以外のサンプルで 2 物質統計差が確認された (表 6・図 8)。それぞれ共通に有意差が見られたものとしては Quinate という代謝物質が挙げられる。図 8 のグラフでは (グラフ右から 2 番目) 健康者より合併症の引き起こされていないアトピー性角結膜炎患者が、それよりも合併症を引き起こしている患者が徐々に低値を示していることがわかる。このことは病気の進行に応じて本物質が有意に減少することを示しているが、Quinate はヒトをはじめとした真菌を除く真核生物で代謝することはできない (図 20)。Quinate は主に細菌や植物によりシキミ酸経路を

介して合成される。Quinate は尿でも測定される代謝物であり、Quinate は尿を弱酸性にして細菌の繁殖を抑える働きがあるので、膀胱炎や腎盂炎などの尿路感染症の予防効果が期待されている[42]。アトピー性角結膜炎患者の涙液には様々な病原菌がいるという研究結果と Quinate 量が症状に従って低下している事実との関連性は非常に興味深いものである。

Quinate を合成する酵素は quinate/shikimate dehydrogenase である。酵素を包括的かつ詳細な情報がまとめられているデータベースである BRENDA[43]によりこの酵素を持つ事が知られている生物を調べたところ、*Staphylococcus* 属など本疾患で、または既知の免疫疾患において増加傾向が見られる細菌のプロファイルと有意に負の相関を示した細菌属 (*Lactobacillus* 属や *Enterococcus* 属の細菌) がこの酵素を作る遺伝子を持っていることがわかった。quinate/shikimate dehydrogenase をコードする遺伝子は quinate を脱水素することが確認されていない shikimate dehydrogenase をコードする遺伝子とオーソログな関係にある。そのため shikimate dehydrogenase とデータベースに登録されていても実際は quinate を脱水素する能力があるのではないかと考えた。健康群に多くみられ、様々な病原細菌と負の相関を示した *Lactococcus lactis* の shikimate dehydrogenase のアミノ酸配列を NCBI の Protein BLAST によって相同性検索を行った。結果、*Enterococcus* 属の quinate/shikimate dehydrogenase と高い相同性 (E-value=2e-75) を示した。*Lactococcus lactis* の shikimate dehydrogenase は Quinate の脱水素能を持っているかもしれない。また対象として *Staphylococcus* 属の shikimate dehydrogenase のアミノ酸配列をクエリーに同様の手法で検索したところ、一番相同性の高い quinate/shikimate dehydrogenase との相同性は (E-value=2e-21) であった。一般的に E-value が e-50 を下回るたんぱく質は機能が近似していると言えるが、e-20 程度では機能が一致しているかどうか疑わしい。つまり少なくとも *Lactococcus lactis* などの有用菌では quinate が合成できるが、*Staphylococcus* 属の細菌では合成できない可能性が示された。この件に関してはどの微生物が quinate を合成できる能を持っているのか、さらなる配列解析を進めていきたい。

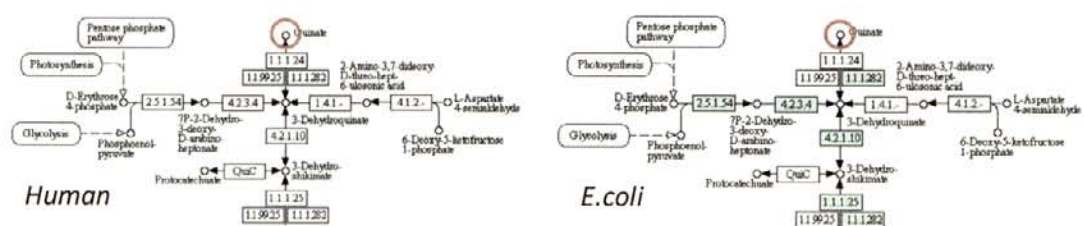


図 20 Quinate の合成経路

赤でくくった代謝物質が Quinate である

代謝物質の間には番号のふられた四角いタグが付いているがこれは酵素を示す緑にぬられていれば対象とする生物ですすでに発現が確認されたたんぱく質である

図左がヒト、右が大腸菌のシキミ酸経路である大腸菌は Quinate を合成できる

gamma-Carboxyglutamic acid (GLA)は合併症を引き起こしたAKC患者のみの有意な低下が見られた物質である。GLA はタンパク質の翻訳後修飾でグルタミン酸残基のγ基がカルボキシル化することで、生合成することが知られている[44]。しかし、一次代謝および二次代謝で生合成されるとの報告は今まで報告されていない。このことから、合併症を引き起こしたAKC 患者において、GLA 濃度の著しい低下を見たのはタンパク質由来であるという事が考えられる。GLA残基を持つたんぱく質の機能として最もよく知られているのは組織の石灰化の抑制である。このことはアトピー性角結膜炎の臨床像である角膜プラークと言われる合併症と条件が一致する。角膜プラークはアトピー性角結膜炎によって傷つけられた角膜に発生するカルシウム沈着であり、原因はほとんどわかってきていなかった。

GLA残基を持つたんぱく質の活性にはグルタミン残基がカルボキシル化しGLA残基になる必要があるが、これらの修飾はビタミンK依存性である[45]。ビタミンKの供給源は大きくビタミンK1とビタミンK2である。ビタミンK1はヒトが代謝するが、ビタミンK2はヒトでは代謝できない。筆者はビタミンK2に着目し議論を進める。ビタミンK2 (MK-7) が血管壁へのカルシウム沈着を有意に防ぐことは報告されている[46]。動脈硬化の病理は動脈の石灰化である。それだけでなくビタミンK2と石灰化についての議論はあとを絶たず[47]、現在の医学では細胞の石灰化とビタミンK2の関連性については重要性を増している。

ビタミン K と細菌の常在菌の関連は非常に密接なものである。すでに腸内細菌ではビタミン K は食物からの摂取と並んで、幾つかの種類に属する複数腸内細菌によっても供給されるとの報告がある[48]。眼表面の細菌叢特に有用菌のバランスが崩れることでビタミン K2 の生産が阻害され、たんぱく質が GLA 化されず、機能の活性を得られていないため、健常者ではタンパク質から分解された GLA 残基が CE によって測定され、タンパク質が GLA 化されなかった重症患者では GLA が多く測定されなかった事が考えられる。細菌叢が崩れビタミン K の供給が滞ったために合併症が引き起こされるという議論である。

これらの議論を総括するとアトピー性角結膜炎の発症、合併症の発症は図 21 に示した概念図によって起こると仮説を立てた。眼表面には病原菌含め様々な有用菌（プロバイオティクス）が存在する。プロバイオティクスは Quinate やビタミン K2 などを生成し、眼表面の健康を維持しているが、何らかの影響でそのバランスが崩れ、病原菌の割合が増えると免疫反応に異常をきたす。その結果、アトピー性角結膜炎が発症してしまい、増加している病原菌によって組織に炎症を起こす。さらにプロバイオティクスの割合を減らした環境ではビタミン K2 の総生産が滞り、いままで石灰化を防いでいた環境が揺らいでいるため、角膜の炎症も合わせて組織の石灰化を起こしてしまう。

眼の免疫疾患の予防や治療、時には合併症の予防のためには、眼表面へのプロバイオティクスの投与、または有用代謝物の点眼が必要であるかもしれない。この仮説が正しければ、従来の化学治療は病理の一端に対する処方であり、根本的な解決にならないのは明らかであろう。我々が提案するのは炎症の治癒や疾患の予防に直接作用するプロバイオティクスである。

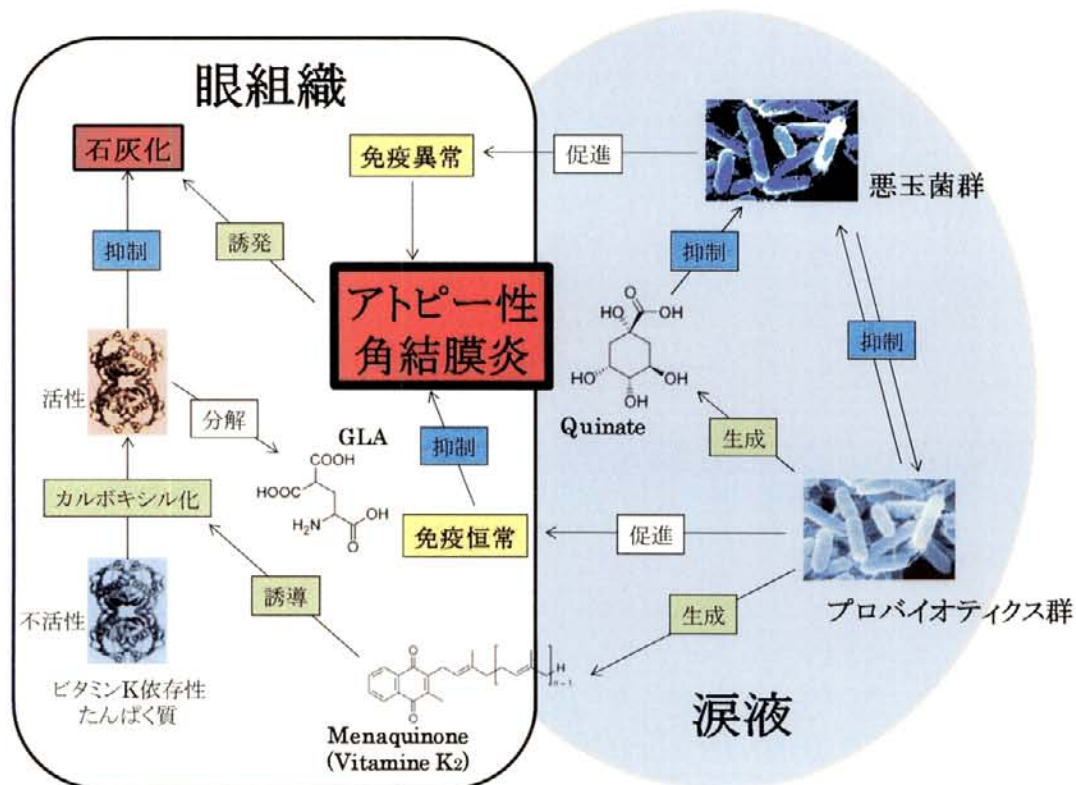


図 21 アトピー性角結膜炎発症メカニズムの仮説

5. 結語

本研究は次世代シーケンサーの低コスト化と普及によって可能となる、皮膚（涙液）常在菌を用いて病理の診断を行う新しい手法の提案のみならず、涙液に免疫恒常、疾患予防、治療に有用な細菌が多く含まれることを明らかにした。従来の培養法を行った実験では涙液から乳酸菌などの細菌が見つかったという報告すら少ない。本研究では消化管のみならず有用菌が皮膚常在菌へ直接有益な効果を働きかける事を期待する新しいプロバイオティクスの可能性について示した。従来のプロバイオティクスでは口腔摂取が一般的であったが、炎症患部による著しい細菌叢の変化や、その細菌の病態に対する関わりがより明らかになれば医科プロバイオティクスは口腔摂取のみならず眼科領域では点眼、皮膚科領域では塗薬などに応用の幅を広げるだろう。

ところで涙液にはなぜ乳酸菌が多く存在するのだろう。筆者は今まで病原菌への抵抗や、免疫改善の観点から様々な議論を行ったが、実はそれだけではないのではないかと考える。これはあくまでも筆者の推測であるが、眼と体内（口や消化管）がつながっていることがそのヒントになると考える。涙液は涙腺から分泌され、涙小管から排出後、鼻や喉に排出される。鼻・喉は免疫応答の疾患が多発する器官であることも興味深い。一方で湿潤環境である一面においては眼表面が湿潤条件を好む乳酸菌にとっての絶好の培養槽である事

が出来る。生物（特にヒト）は長い進化の上で涙液という天然のプロバイオティクスを製造し、無意識にそれを口腔摂取することで、免疫系の恒常を計っているのではないだろうか。腸内細菌としての乳酸菌の定着が不安定である乳児は様々な免疫疾患を起こすことが知られている。乳児は良く涙を流すことは明らかであるが、一説によるとヒトは泣くことで免疫を高めるとも言われている（現時点で科学的根拠は無い）。また、泣くことで副交感神経が活性し免疫を高めるという説もあるが、筆者は泣くことで涙液中のプロバイオティクスが多量に口腔摂取されるからなのではないかと考える。

ヒトがなぜ泣くのかという議論の決着は未だについていないが、文明の上で、また健康機能性食品として、プロバイオティクスを利用するより前からヒトは免疫向上のためのプロバイオティクスを自然的に獲得していたのかもしれない。近年ではヒトの神経伝達物質に関わる酵素は細菌から伝播されたとの報告もある[49]。感情が高ぶった際にヒトは涙を流すが、細菌とヒトの高度な進化の関連性についても非常に興味深いものである。

6. 謝辞

今回の実験や解析にあたり、献身的に指導をしてくださったアドバイザーの村上慎之介氏、今回のサンプリングに協力してくださった済生会中央病院藤島弘氏・東京歯科大学市川総合病院眼科五十嵐安弥子氏。研究にあたりアドバイスいただいたグループの皆様。そしてなによりこのような研究の機会を与えてくださった富田勝氏に熱く御礼申し上げます。

参考文献

1. Costello,E.K., Lauber,C.L., et al. (2009) Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 1694-1697.
2. Nakata,K., Inoue,Y., et al. (2000) A high incidence of *Staphylococcus aureus* colonization in the external eyes of patients with atopic dermatitis. *Ophthalmology*, 107, 2167-2171.
3. Albietz,J.M. and Lenton,L.M. (2006) Effect of antibacterial honey on the ocular flora in tear deficiency and meibomian gland disease. *Cornea*, 25, 1012-1019.
4. Bjorksten,B., Sepp,E., et al. (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 108, 516-520.
5. Mircheff,A.K., Wang,Y., et al. (2005) Mucosal immunity and self-tolerance in the ocular surface system. *Ocul.Surf.*, 3, 182-192.
6. Grice,E.A., Kong,H.H., et al. (2009) Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324, 1190-1192.
7. Senok,A.C., Verstraelen,H., et al. (2009) Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst.Rev.*, (4), CD006289.
8. Rasiyah,I.A., Wong,L., et al. (2005) Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Arch.Oral Biol.*, 50, 779-787.
9. Nagashima,K., Hisada,T., et al. (2003) Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces.*Appl.Environ.Microbiol.*, 69, 1251-1262.
10. Schuster,S.C. (2008) Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat.Methods*, 5, 16-18.
11. Rosenfeldt,V., Benfeldt,E., et al. (2003) Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 111, 389-395.
12. Cole,J.R., Wang,Q., et al. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.*, 37, D141-5.
13. Ompson,J.D., Higgins,D.G., et al. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.
14. Wilm,A., Mainz,I., et al. (2006) An enhanced RNA alignment benchmark for sequence alignment programs. *Algorithms Mol.Biol.*, 1, 19.
15. Letunic,I. and Bork,P. (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23, 127-128.

16. Soga,T., Baran,R., et al. (2006) Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J.Biol.Chem.*, 281, 16768-16776.
17. Hirayama,A., Kami,K., et al. (2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.*, 69, 4918-4925.
18. Mahenthiralingam,E., Urban,T.A., et al. (2005) The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat.Rev.Microbiol.*, 3, 144-156.
19. Ang,L.M. and Brown,H. (2007) *Corynebacterium accolens* isolated from breast abscess: possible association with granulomatous mastitis. *J.Clin.Microbiol.*, 45, 1666-1668.
20. Morley,A.M. and Tuft,S.J. (2006) *Rothia dentocariosa* isolated from a corneal ulcer. *Cornea*, 25, 1128-1129.
21. MacKinnon,M.M., Amezcua,M.R., et al. (2001) A case of *Rothia dentocariosa* endophthalmitis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 20, 756-757.
22. Furuya,R., Onoye,Y., et al. (2007) Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population. *J.Infect.Chemother.*, 13, 302-304.
23. de Souza,A.L. and Seguro,A.C. (2009) Conjunctivitis secondary to *Neisseria meningitidis*: a potential vertical transmission pathway. *Clin.Pediatr.(Phila)*, 48, 119.
24. Bartlett,J.G. (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Top.HIV.Med.*, 16, 151-155.
25. Toshitani,A., Imayama,S., et al. (1999) Reduced amount of secretory component of IgA secretion in tears of patients with atopic dermatitis. *J.Dermatol.Sci.*, 19, 134-138.
26. Akiko,N., Chie,Sotozono., et al. (2006) Incidence and Drug Sensitivity of MRSA and MRCNS among Ocular Infections. *Journal of the eye*, 23(11), 1461-1463.
27. Mitsuru,K., (1994) メチシリン耐性コアグラエゼ陰性ブドウ球菌の上皮細胞への付着性および酵素産生性. *歯科医学*. 57(3). 81.
28. Frank,D.N., St Amand,A.L., et al. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104, 13780-13785.
29. Watanabe,S., Narisawa,Y., et al. (2003) Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 111, 587-591.
30. Wang,M.F., Lin,H.C., et al. (2004) Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr.Allergy Immunol.*, 15, 152-158.

31. Xiao,J.Z., Kondo,S., et al. (2006) Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Clin.Exp.Allergy*, 36, 1425-1435.
32. Xiao,J.Z., Kondo,S., et al. (2007) Clinical efficacy of probiotic *Bifidobacterium longum* for the treatment of symptoms of Japanese cedar pollen allergy in subjects evaluated in an environmental exposure unit. *Allergol.Int.*, 56, 67-75.
33. Bjorksten,B., Naaber,P., et al. (1999) The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin.Exp.Allergy*, 29, 342-346.
34. Nakajima,H., Hirota,T., et al. (1992) Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr.Res.*, 224, 245-253.
35. Sato,T., Nishimura-Uemura,J., et al. (2004) Dextran from *Leuconostoc mesenteroides* augments immunostimulatory effects by the introduction of phosphate groups. *J.Food Prot.*, 67, 1719-1724.
36. Ajdic,D., McShan,W.M., et al. (2002) Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 14434-14439.
37. McFarland,L.V. (2007) Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med.Infect.Dis.*, 5, 97-105.
38. Abdelgadir,W., Nielsen,D.S., et al. (2008) A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *Int.J.Food Microbiol.*, 127, 215-219.
39. Schlegel,L., Grimont,F., et al. (2000) *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 50 Pt 4, 1425-1434.
40. Abdelgadir,W.S., Ahmed,T.K., et al. (1998) The traditional fermented milk products of the Sudan. *Int.J.Food Microbiol.*, 44, 1-13.
41. Dunne,C., Murphy,L., et al. (1999) Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 279-292.
42. Pereira,A.C., Oliveira,D.F., et al. (2008) Identification of the antimicrobial substances produced by *Solanum palinacanthum* (Solanaceae). *An.Acad.Bras.Cienc.*, 80, 427-432.
43. Barthelmes,J., Ebeling,C., et al. (2007) BRENDA, AMENDA and FRENDA: the enzyme information system in 2007. *Nucleic Acids Res.*, 35, D511-4.
44. Furie, B. and Furie, BC. (1991) *Annals of the New York Academy of Sciences*, 614,1-10

45. Bandyopadhyay,P.K. (2008) Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitam.Horm.*, 78, 157-184.
46. Erkkila,A.T. and Booth,S.L. (2008) Vitamin K intake and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.*, 19, 39-42.
47. Amizuka,N., Li,M., et al. (2009) Biological effects of vitamin K2 on bone quality. *Clin.Calcium*, 19, 1788-1796.
48. Knight,D.J. and Girling,K.J. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 1831.
49. Iyer,L.M., Aravind,L., et al. (2004) Evolution of cell-cell signaling in animals: did late horizontal gene transfer from bacteria have a role? *Trends Genet.*, 20, 292-299.
50. Kirjavainen,P.V., Apostolou,E., et al. (2001) Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 32, 1-7.
51. Murray,C.S., Tannock,G.W., et al. (2005) Fecal microbiota in sensitized wheezy and non-sensitized non-wheezy children: a nested case-control study. *Clin.Exp.Allergy*, 35, 741-745.
52. Sepp,E., Julge,K., et al. (2005) Intestinal microbiota and immunoglobulin E responses in 5-year-old Estonian children. *Clin.Exp.Allergy*, 35, 1141-1146.
53. Gore,C., Munro,K., et al. (2008) Bifidobacterium pseudocatenulatum is associated with atopic eczema: a nested case-control study investigating the fecal microbiota of infants. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 121, 135-140.
54. Kalliomaki,M., Kirjavainen,P., et al. (2001) Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 107, 129-134.
55. Suzuki,S., Shimojo,N., et al. (2008) A quantitative and relative increase in intestinal bacteroides in allergic infants in rural Japan. *Asian Pac.J.Allergy Immunol.*, 26, 113-119.

付録1 DNA 抽出 Kit の条件検討

土壌用 DNA 抽出 Kit を用いたものは糞便用 DNA 抽出 Kit を用いたものよりも DNA の抽出能がよい



付録 2

シーケンスされた細菌種プロファイルの自己相関により 2 群間に有意な負の相関がみられた細菌種の

組み合わせ P value($P<0.01=*$, $P<0.005=**$, $P<0.001=***$)

赤: 免疫疾患にて増加することが知られている細菌

ピンク: 免疫改善に役に立つことは知られていないが患者群に増加を示している細菌

青: 免疫疾患にて低下することや、プロバイオティクスとしての機能が知られている細菌

水色: プロバイオティクスとしての機能は報告されていないが健常群に多く見られる細菌

変数1	変数2	相関係数	P-value
Enterobacter nimipressuralis (T): LMG 10245-T: Z66077	Staphylococcus saccharolyticus (T): L37602	-0.90133	***
Aeromonas hydrophila (T): type strain: CIP 107985; AM262151	Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	-0.89237	***
Klebsiella oxytoca (T): ATCC 13182T: AF129440	Staphylococcus saccharolyticus (T): L37602	-0.87625	***
Raoultella terrigena (T): ATCC 33257T: Y17658	Staphylococcus capitis (T): ATCC 49325T: AB009937	-0.8465	**
Enterobacter aerogenes (T): JCM1235: AB004750	Staphylococcus epidermidis (T): ATCC 14990: D83363	-0.84371	**
Pseudomonas asplenii (T): ATCC 23835T: AB021397	Leuconostoc citreum (T): ATCC49370: KCTC3526: AF111948	-0.83842	**
Kluyvera cryocrescens (T): ATCC33435: AF310218	Staphylococcus capitis (T): ATCC 49325T: AB009937	-0.83051	**
Morganella morganii (T): DSM 14850: DQ358146	Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	-0.8227	**
Raoultella terrigena (T): ATCC 33257T: Y17658	Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	-0.81817	**
Acinetobacter calcoaceticus (T): type strain: NCCB 22016: AJ8889	Propionibacterium acnes (T): ATCC6919: AB042288	-0.81785	**
Leuconostoc fallax (T): DSM 20189: AF360738	Enhydrobacter aerosaccus (T): type strain: LMG 21877 = ATCC 2709	-0.81535	**
Lactococcus raffinolactis (T): DSM 20443: EF694030	Corynebacterium accolens (T): CIP104783T: (ATCC49724T): AJ439346	-0.81033	**
Leuconostoc fallax (T): DSM 20189: AF360738	Staphylococcus capitis (T): ATCC 49325T: AB009937	-0.80956	**
Aquifalea denitrificans (T): 5YN1-3: EU594330	Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	-0.80831	**
Corynebacterium flavesceus (T): NCDO 1320: X84441	Wautersella falsenii (T): type strain: NF 993: AM084341	-0.80591	**
Kluyvera cryocrescens (T): ATCC 33435: AF310218	Shigella flexneri (T): X96963	-0.80373	*
Staphylococcus cohnii (T): ATCC 29974 (=MAFF 911487): D83361	Propionibacterium acnes (T): ATCC6919: AB042288	-0.80354	*
Lactococcus lactis (T): NCDO 2181T: AB100804	Aquifalea denitrificans (T): 5YN1-3: EU594330	-0.80249	*
Lactococcus lactis (T): NCDO 1320: X84441	Propionibacterium acnes (T): ATCC6919: AB042288	-0.80049	*
Pseudomonas asplenii (T): ATCC 23835T: AB021397	Corynebacterium accolens (T): CIP104783T: (ATCC49724T): AJ439346	-0.80027	*
Citrobacter gillenii (T): ATCC 46938: AF025367	Citrobacter gillenii (T): CDC 46938: AF025367	-0.7971	*
Lactococcus lactis (T): NGDO 2181T: AB100804	Staphylococcus capitis (T): ATCC 49325T: AB009937	-0.79547	*
Enterobacter aerogenes (T): JCM1235: AB004750	Acinetobacter calcoaceticus (T): type strain: NCCB 22016: AJ8889	-0.79171	*
Staphylococcus hominis (T): GTC 1228: D83363	Lactococcus raffinolactis (T): DSM 20443: EF694030	-0.78974	*
Enterobacter kobei (T): type strain: CIP 105566: AJ508301	Staphylococcus epidermidis (T): ATCC 14990: D83363	-0.78876	*
Lactococcus lactis (T): NCDO 2181T: AB100804	Staphylococcus saccharolyticus (T): L37602	-0.78857	*
Corynebacterium flavesceus (T): NCDO 1320: X84441	Acinetobacter calcoaceticus (T): type strain: NCCB 22016: AJ8889	-0.78775	*
Enterobacter aerogenes (T): JCM1235: AB004750	Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	-0.78561	*
Weissella cibaria (T): LMG 17699T: AJ295989	Propionibacterium acnes (T): ATCC6919: AB042288	-0.78321	*
Enterococcus camelliae (T): FP15-1: EF154454	Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	-0.78149	*
Acinetobacter calcoaceticus (T): type strain: NCCB 22016: AJ8889	Chryseobacterium bovis (T): H9: EF204446	-0.78047	*
Enterobacter kobei (T): type strain: CIP 105566: AJ508301	Staphylococcus saprophyticus (T): ATCC 15305: AP068934	-0.77985	*
Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	Chryseobacterium bovis (T): H9: EF204446	-0.7794	*
Bacillus flexus (T): F015715: AB021185	Leuconostoc citreum (T): ATCC49370: KCTC3526: AF111948	-0.77859	*
Pseudomonas flavesceus (T): B62: U01916	Staphylococcus saccharolyticus (T): L37602	-0.77655	*
Streptococcus equinus (T): ATCC 9812: A/301607	Acinetobacter calcoaceticus (T): type strain: NCCB 22016: AJ8889	-0.77448	*
Acinetobacter calcoaceticus (T): type strain: NCCB 22016: AJ8889	Streptococcus lutetiensis (T): NEM 782: AJ297215	-0.77351	*
Corynebacterium appendicis (T): DSM 44531T: IMMIB R-3491: AJ3149	Leuconostoc holzapfelii (T): type strain: LMG 23990 = BFE 7000:	-0.77347	*
Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	Streptococcus lutetiensis (T): NEM 782: AJ297215	-0.77229	*
Streptococcus equinus (T): ATCC 9812: A/301607	Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	-0.77047	*
Clostridium putrescentiae (T): DSM 2619: X71857	Bacteroides acidifaciens (T): A40: AB021164	-0.77046	*
Pseudomonas asplenii (T): ATCC 23835T: AB021397	Leuconostoc holzapfelii (T): type strain: LMG 23990 = BFE 7000:	-0.76831	*
Shigella flexneri (T): X96963	Streptococcus lutetiensis (T): NEM 782: AJ297215	-0.7681	*
Enterococcus camelliae (T): FP15-1: EF154454	Acinetobacter calcoaceticus (T): type strain: NCCB 22016: AJ8889	-0.76642	*
Staphylococcus epidermidis (T): ATCC 14990: D83363	Weissella cibaria (T): LMG 17699T: AJ295989	-0.76551	*
Enterococcus camelliae (T): FP15-1: EF154454	Shigella flexneri (T): X96963	-0.76531	*

付録 3

シーケンスされた細菌属プロファイルの自己相関で 2 群間に有意な負の相関がみられた細菌属の組み合わせ

赤:免疫疾患にて増加することが知られている細菌属

ピンク:免疫改善に役に立つことは知られていないが患者群に増加を示している細菌属

青:免疫疾患にて低下することや、プロバイオティクスとしての機能が知られている細菌

属水色:プロバイオティクスとしての機能は報告されていないが健常群に多く見られる細菌属

Pvalue($P < 0.005 = **$, $P < 0.001 = ***$)

変数1	変数2	相関係数	P-value
<i>Aeromonas</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.805	**
<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Acidovorax</i>	-0.807	**
<i>Acinetobacter</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.811	**
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.811	**
<i>Oscillibacter</i>	<i>Veillonella</i>	-0.815	**
<i>Vitreoscilla</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.816	**
<i>Microvirgula</i>	<i>Staphylococcus</i>	-0.823	**
<i>Pectobacterium</i>	<i>Staphylococcus</i>	-0.829	**
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Staphylococcus</i>	-0.830	**
<i>Enterococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.831	**
<i>Lactobacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	-0.832	**
<i>Comamonas</i>	<i>Finegoldia</i>	-0.840	**
<i>Enterococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	-0.840	**
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Staphylococcus</i>	-0.848	**
<i>Varibaculum</i>	<i>Chryseobacterium</i>	-0.858	**
<i>Varibaculum</i>	<i>Lactococcus</i>	-0.858	**
<i>Vitreoscilla</i>	<i>Staphylococcus</i>	-0.860	**
<i>Lactobacillus</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.861	**
<i>Weissella</i>	<i>Staphylococcus</i>	-0.862	**
<i>Varibaculum</i>	<i>Weissella</i>	-0.863	**
<i>Varibaculum</i>	<i>Enterococcus</i>	-0.866	**
<i>Staphylococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	-0.868	**
<i>Varibaculum</i>	<i>Lactobacillus</i>	-0.875	***
<i>Microvirgula</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.875	***
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.875	***
<i>Corynebacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	-0.882	***
<i>Weissella</i>	<i>Corynebacterium</i>	-0.892	***
<i>Pectobacterium</i>	<i>Varibaculum</i>	-0.918	***

涙液常在菌のメタゲノム解析と眼科医療応用について

2010年9月10日 初版発行

著者 馬場藤貴

監修 富田勝

発行 慶應義塾大学 湘南藤沢学会

〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322

TEL:0466-49-3437

Printed in Japan 印刷・製本 ワキプリントピア

SFC-SWP 2010-S-001

■ 本論文は研究会において優秀と認められ、出版されたものです。