慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	涙液のマルチオミクスによる眼の健康状態の評価に関する研究
Sub Title	Evaluation of an eye condition based on multiple omics of tear fluid.
Author	馬場, 藤貴(Baba, Fujitaka)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2013
Jtitle	生命と情報 No.20 (2013.) ,p.8- 38
JaLC DOI	
Abstract	眼は視覚を通じて光を受容し, 外環境を認識するための非常に重要な感覚器である。したがって眼を失えば著しくQuality of Life(QOL)が低下することが容易に予測される。眼の表面は常に涙液により覆われている。涙液は瞼を円滑に動かす役割や, 外来物質を洗い流すなどの役割を担うが, 免疫グロブリンA(IgA)やリゾチームなどの抗菌性のたんぱく質も含むことも知られている。このように涙液は眼を保護する重要な役割を有するが, 涙液に含まれる低分子化合物•細菌叢についての知見は乏しいのが現状である。そこで本研究では, 健康な人の涙液にはどのような低分子化合物が存在し, また細菌叢が構築されているのかを調べる目的で研究を行った。健康な人の涙液の状態を定義する比較対象として, 近年増加しているアトピー性角結膜炎(AKC)患者の涙液試料を供試した。これら健常者とAKC患者の涙液サンプルを供試し, キャピラリー電気泳動•飛行時間型質量分析装置(CE-TOF/MS)および次世代シークエンサーを用いて涙液中の代謝物および細菌叢について網羅的に解析した。得られたデータを比較解析することで, 健康な人の涙液プロファイルの評価を行うとともに, AKC患者の涙液プロファイルから疾患との関連を考察した。結果, 涙液中細菌叢の網羅的解析から, 健康状態に関わらずアクネ菌や乳酸菌が涙液細菌叢の大部分を占めることが明らかとなった。同時にLeuconostoc属菌やLactococcus属菌などの乳酸菌は健常者に多く, Burkholderia属菌やSthaphylococcus属菌, アクネ菌などの病原菌はAKC患者に多いことが明らかとなった。メタボローム解析結果からは全アミノ酸に対する個々のアミノ酸の割合がAKC患者の炎症度と関係している可能性が示唆された。複数のオミクス解析の結果から, 涙液研究の新領域を開拓することに成功した。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2013年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000020-0008

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.

修士論文ダイジェスト

2013年度　修士卒業論文（平成25年度）

涙液のマルチオミクスによる眼の健康状態の評価に関する研究

慶應義塾大学大学院　政策・メディア研究科

馬場　藤貴

修士論文2013年度（平成25年度）

【題目】

涙液のマルチオミクスによる眼の健康状態の評価に関する研究

【論文要旨】

眼は視覚を通じて光を受容し，外環境を認識するための非常に重要な感覚器である．したがって眼を失えば著しくQuality of Life （QOL）が低下することが容易に予測される．眼の表面は常に涙液により覆われている．涙液は瞼を円滑に動かす役割や，外来物質を洗い流すなどの役割を担うが，免疫グロブリンA （IgA）やリゾチームなどの抗菌性のたんぱく質も含むことも知られている．このように涙液は眼を保護する重要な役割を有するが，涙液に含まれる低分子化合物・細菌叢についての知見は乏しいのが現状である．そこで本研究では，健康な人の涙液にはどのような低分子化合物が存在し，また細菌叢が構築されているのかを調べる目的で研究を行った．健康な人の涙液の状態を定義する比較対象として，近年増加しているアトピー性角結膜炎（AKC）患者の涙液試料を供試した．これら健常者とAKC患者の涙液サンプルを供試し，キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置（CE-TOF/MS）および次世代シークエンサーを用いて涙液中の代謝物および細菌叢について網羅的に解析した．得られたデータを比較解析することで，健康な人の涙液プロファイルの評価を行うとともに，AKC患者の涙液プロファイルから疾患との関連を考察した．結果，涙液中細菌叢の網羅的解析から，健康状態に関わらずアクネ菌や乳酸菌が涙液細菌叢の大部分を占めることが明らかとなった．同時に*Leuconostoc*属菌や*Lactococcus*属菌などの乳酸菌は健常者に多く，*Burkholderia*属菌や*Sthaphylococcus*属菌，アクネ菌などの病原菌はAKC患者に多いことが明らかとなった．メタボローム解析結果からは全アミノ酸に対する個々のアミノ酸の割合がAKC患者の炎症度と関係している可能性が示唆された．複数のオミクス解析の結果から，涙液研究の新領域を開拓することに成功した．

【キーワード】

涙液，マルチオミクス，乳酸菌，常在細菌叢，代謝産物

慶應義塾大学大学院　政策・メディア研究科

馬場　藤貴

Abstract of Master's Thesis Academic Year 2013

【Title】

Evaluation of an eye condition based on multiple omics of tear fluid.

【Summary】

The human eye is well known as a vital organ of vision, and play a very important role to receive visual input from outside. Quality of life (QOL) will be reduced remarkably if we lose eyes. Therefore, we need to care our eye condition. Tear fluid is also known as a secretion product from tear gland and work as a cleaner and lubricant of eye surface. One of main components in tear fluid is an antimicrobial protein such as immunoglobulin A (IgA) and lysozyme which suppress pathogenic microbial infection. Although the antibiotic function of tear fluid is well known, other functions and components of tear fluid remain unclear. To this end, we comprehensively analyzed tear metabolites and microflora of healthy subjects using capillary electrophoresis–time of flight-mass spectrometer (CE-TOF/MS) and a next-generation sequencer, respectively. The tear metabolic profile and microflora of healthy subjects was evaluated by comparison with those in atopic keratoconjunctivitis (AKC) patients, suggesting that both tear fluid of healthy and AKC patients contained high proportion of lactic acid bacteria and *Propionibacterium* species. Furthermore, we found that lactic acid bacteria such as *Leuconostoc*and*Lactococcus* increased in healthy subjects, and decreased disease-causing microbes such as *Burkholderia*, *Sthaphylococcus* and *Propionibacterium acnes*. Tear metabolic profiling showed that the amino acid composition was different between healthy subjects and AKC patients, suggesting that amino acid composition might be related to the inflammation of AKC patients. Taken together, our multiple omics approach could provide us a new frontier of tear fluid research.

【Keywords】

Tear, Multiple omics, Lactic acid bacteria, Metabolite, Microflora

Keio University Graduate School of Media and Governance
Fujitaka Baba

第1章　序論

眼・涙液

眼は視覚を通じて光を受容し，外環境を認識するための非常に重要な感覚器である．我々ヒトの場合脳に伝わる情報の多くが視覚からの情報であるとされており，視覚の低下と老化は密接に関係する．したがって眼を失えば著しくQuality of Life （QOL）が低下することが容易に予測される．涙液は眼から分泌される体液のことである．下記に示す眼球の保護作用によって涙液の存在もまたQOLの維持に重要である．涙液は3つの異なった層によって構成されており，その3つは成分・分泌される場所が異なることが知られている（Zhou *et al.*, 2012）．油層はまぶたの縁にある皮脂腺であるマイボーム腺から分泌され，その組成の多くは脂分である．油層は目の涙液膜の蒸発を防ぎ，涙が頬にこぼれ落ちるのを防止し，閉じたまぶた内を気密にする働きを持つ．2つ目はムチンから構成されるムチン層である．結膜杯状細胞から分泌され，角結膜の表面を覆い，涙液層を親水性にする．それにより涙液が表面張力の影響を受けずに隙間無く広がることができる作用を持っている（Mircheff *et al.*, 2005）．3つ目は水層であり，涙液の大部分を占め，涙腺から分泌される．その機能は幅広く，水層は眼球の粘膜を潤すほか，角膜と結膜に栄養を届け，細菌の侵入を防ぐ働きを持つ．水のほか多くのタンパク質，栄養源である代謝物を含んでいるとされるが（リポカリン，ラクリチン，グルコース，尿素，ナトリウム，カリウム），低分子のイオン性化合物についてはアミノ酸を除きほとんど理解されていない．また，異物・細菌などが眼表面に侵入した場合の防御機構として涙液中のムチンや水分によってこれらを物理的に洗い流す作用が一般的であるが，涙液中に含まれるリゾチーム，ラクトフェリン，IgA，IgGなどの抗体・補体が抗微生物作用を示すことも知られている（Albietz *et al.*, 2006）．リゾチームはグラム陽性菌細胞壁を溶解させ，IgAの細菌誘拐作用を助ける．ラクトフェリンは細菌の増殖に必要な鉄分をキレートすることによって，細菌の増殖を抑制する．さらに，補体C3生成に関与することでマクロファージの細菌の貪食を促進する．IgGは免疫複合体を生成し，細菌融解作用を示す．涙液中の補体成分はリゾチームや免疫グロブリンの効果を促進する．このような抗菌性物質の働きにより眼表面は無菌であると言われてきたが，近年の報告では結膜嚢擦過物の細菌培養を行ったとき，最も多く検出されるのが表皮ブドウ球菌であり，次いでアクネ菌，コリネバクテリウム属，時に黄色ブドウ球菌が検出されている（Inoue *et al.*,2008）．これらはバランスを保ちながら存在し，病原性微生物の侵入を防止していると考えられている．しかし，ここに挙げられた報告の多くは血液寒天培地などを用いた培養による結果であり，これらの結果は眼表面の常在菌の割合を正確に反映しているとは言えず，健康なヒトの眼表面に存在する細菌叢は未だに明らかにされていない．このように涙液は眼を保護する重要な役割を有するが，涙液に含まれる低分子化合物・細菌叢についての知見は乏しいのが現状である．そこで本研究では，健康なヒトの涙液にはどのような低分子化合物が存在し，また細菌叢が構築されているのかを調べる目的で研究を行った．

アトピー性角結膜炎（AKC）

健康な人の涙液の状態を定義する比較対象として，近年増加しているアトピー性角結膜炎（AKC）患者の涙液試料を供試した．眼は環境中のアレルゲンに真っ先に反応する器官である．実際，眼性のアレルギー性炎症はアレルギーを患っている患者に頻繁的に起こりうる．一方で皮膚試験調査によるとアメリカだけでも4000~5000万人がアレルギーを発症するという結果が明らかになっている．アレルギー性眼病は季節性アレルギー性結膜炎（SAC），永続的なアレルギー性結膜炎（PAC），アトピー性角結膜炎（AKC），春の角結膜炎（VKC），巨大な乳頭結膜炎（GPC）の5つのタイプに分けられる．SAC，PAC，AKCとVKCの臨床特徴は眼の充血である．その中でも，アトピー性角結膜炎（AKC）は重症化機転が生ずると角膜に合併症を起こし，失明の危険まである疾患である（Stahl *et al.*, 2004）．AKCには肥満細胞の増殖や，好酸球の増殖が見られるが，涙液中の代謝物による分析によるとさらに

ヒスタミンやロイコトリエンの増加が認められる（Fukagawa *et al.*, 1994）（Abelson *et al.*, 1980）．この事実はアミノ酸や脂肪酸代謝のバランスの偏りがアレルギー疾患と密接に関係することを示唆している．角膜に炎症の起きたAKC患者，角膜に炎症の起きていないAKC患者を比較対象に用いることで炎症を起こしていない健康な人の涙液の代謝物プロファイルを考察できると考えた．

またAKCの炎症を理解する上で常在菌の理解は非常に重要である．AKCにおいて，スーパー抗原発現率と潰瘍に相関が見られることは知られている（Fujishima *et al.*, 2012）．スーパー抗原とはタンパク性のT細胞活性化因子であり，免疫学的な特異性と関係なくT細胞レセプター（TCR）に結合してT細胞を活性化する物質である（Tantilipikorn *et al.*, 2012）．現在スーパー抗原は黄色ブドウ球菌と化膿性レンサ球菌から見つかっているが，先行研究によるとアトピー性角結膜炎の疾患患部からは黄色ブドウ球菌及び，そのスーパー抗原が確認されている（Fujishima *et al.*, 2012）．眼表面の感染症と細菌の関係性のみならずAKCと細菌の関係性は密であり近年その理解が求められている．代謝物同様AKCの患者と健常者から得た細菌プロファイルを比較することで，炎症を起こしていない健康な人の眼表面における細菌叢プロファイルを定義できると考えた．

涙液中のイオン性代謝物の解析

曽我らが開発したキャピラリー電気泳動（CE）と飛行時間型質量分析計（TOF/MS）を組み合わせた分析装置であるCE-TOF/MSは，高分離能と高分解能，高感度を併せ持ち，体液物質の多くを占める水溶性のイオン性化合物の分析に適している（Soga *et al.*, 2000）．涙液の9割は水層であることから涙液中の代謝物の多くは水溶性の物質であることが予想される．そのため，炎症を起こしていない健康な人の涙液のイオン性代謝物プロファイルを取得するためにCE-TOF/MSは最適であると考えられる．本邦ではAKC重症患者，中度患者，健常者それぞれ5人合わせて15サンプルの涙をCE-TOF/MSによって測定し，炎症の起きていない眼の涙液に特徴的なイオン性代謝物の組成について考察する．

眼表面の細菌叢解析

炎症を起こしていない健康な人の眼表面における細菌叢プロファイルを取得するためには，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，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（Schabereiter *et al.*, 2001）（Rasiah *et al.*, 2005）（Nagashima *et al.*, 2003）．一方で注目されるのは16S rRNA遺伝子のクローンライブラリー法である．約1500塩基からなる16S rRNA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 rRNA解析は必須であり，PCRにて16S rRNA遺伝子を増幅し，シークエンスを行う．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（Costello *et al.*, 2009）．

また，パイロシークエンサーは，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（Sundquist *et al.*, 2007）（Schuster *et al.*, 2008）．特にメタゲノム解析の分野にとって次世代シークエ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．次世代シークエ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 rRNA遺伝子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，次世代シークエ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．また次世代シークエンサーの中でも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をもちいてシークエンスを行った．

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），AKC患者（n=5）それぞれから供試された涙液（n=9）のサンプル群からゲノム DNA を直接抽出し，培養を介さず，バクテリアの 16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行い，シークエンス結果から細菌種を推定することで，涙液の細菌種多様性について言及する．また，情報学的な解析を介して炎症の起きていない眼に特徴的な細菌叢について報告する．

第2章　対象と手法

2.1　メタボローム解析に用いた涙液サンプル

はじめに本研究は，慶応義塾大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った．すべての被験者から書類での告知に基づく同意を得られたうえでサンプリングを行った．AKCおよび健常者の診断は日本角膜学会のアレルギー性結膜疾患診断ガイドラインに従って行った．重症AKC患者，中度AKC患者，健常者それぞれ 5 人，合わせて 15 サンプルの涙を供試した．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（図1）．AKC患者または健常者いずれも，他の疾患は見られなかった（表1）．AKC患者の治療には0.1%デキサメタゾン，0.1%フルオロメトロン，0.05%シクロスポリンA，クロモリンナトリウムが処方されており，腎皮質ステロイド治療は受けていない．涙液の採取はマイクロピペットを用いる手法を採用し，点眼液を使わず両眼から供試した．涙液は細胞を除去するために遠心分離されたのち，速やかに4℃で保存した．

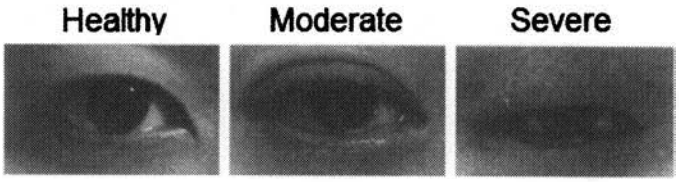


図1健常者とAKC患者の臨床写真
左：健常者，中：中度結膜炎患者，右：重度結膜炎患者

表1：メタボローム解析に用いられたサンプルの詳細

Case	Sample	SPK	Ulcer
AKC patients (severe)	L91	-	+
	R140	+	-
	R173	-	+
	L43	-	+
	R113	+	-
AKC patients (moderate)	R8	-	-
	R145	-	-
	R66	-	-
	R68	-	-
	L48	-	-
Control	C1	-	-
	C2	-	-
	C3	-	-
	C4	-	-
	C5	-	-

表中に示す臨床上の病名について，SPKは瀰漫性表層角膜炎，
MLcerは角膜潰瘍を示している．

2.2 CE-TOF/MS測定条件

測定は以下の装置を用いて行った（Agilent 1100 isocratic HPLC pump, Agilent G1603ACE-MS adapter kit, Agilent G1607A CE–electrospray ionization （ESI）-MS sprayer kit）．システムの制御とデータの収集には以下のソフトウェアを用いた（CE: Agilent G2201AA ChemStation software, TOFMS: Analyst QS）．CE-TOF/MSの測定上のコンディションについては割愛するが，Soga *et al.*,（2006）と同様の手法で行った．内部標準は10uMか100uMになるようにMilii-Q水によって希釈したものを用いた．サンプルは内部標準の入ったMilli-Q水によって希釈し，測定した．

2.3 メタボロームデータ解析

メタボロミックデータはMaster Hands2を用いて解析した（Sugimoto *et al.*, 2000）．データ処理方法は，以下のステップから成っている．ノイズのフィルタリング，ベースラインの補正，泳動時間の補正，ピークの検出，電気泳動図に基づく，ピークのアライメントである．その後，それぞれのピークの正確なm/zはガウス曲線によって計算した．さらに，動的計画法に基づいて，泳動時間を正規化した．最後にm/z（25ppm）と泳動時間（0.2min）の閾値で標準物質のメタボロームプロファイルと合わせることによって，すべての代謝物を同定した．ヒートマップはZ-scoreによって正規化されたメタボロミックプロファイルを用いて描画した．ヒートマップの描画は MultiExperiment Viewer （MeV）softwareを用いた（Saeed *et al.*, 2003）． Principal components analysis （PCA）はJMP software version 8.0.2 （SAS Institute, Cary, NC）によって作成した．なおメタボロームプロファイルにおける2群比較解析は判別分析の一種であり，オミクス解析に利用されるOrthogonal partial least squares discriminant analysis（OPLS-DA）によって行った（Bylesjo *et al.*, 2007）．代謝物の有意差について，コルモゴロフ - スミノルフ検定によって正規性を確認したものはstudent`sのT-testによって，正規性が確認できなかったものはウェルチのT-testによって計算した．

2.4 16S rRNA遺伝子クローンライブラリー解析に用いた対象

本研究には涙液サンプルを用いた．健常者から供試したもの（n=4），AKCを引き起こした患者から供試したもの（n=5）の合計9サンプルを用いた．AKC患者の治療には抗生物質は処方されておらず，また腎皮質ステロイド治療も受けていない．涙液のサンプルは点眼液を使わず両眼から供試した．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供試したものであり，サンプリング後

は速やかに-20℃で保存した．用いたサンプルの詳細を表2に示す．

表2:16Sクローンライブラリー解析に用いられたサンプルの詳細

Case	Sample	SPK	Ulcer
AKC patients	P1	-	-
	P2	-	+
	P3	+	-
	P4	-	-
	P5	-	-
Healthy subjects	C1	-	-
	C2	-	-
	C3	-	-
	C4	-	-

表中に示す臨床上の病名について，SPKは瀰漫性表層角膜炎，MLcerは角膜潰瘍を示している．

2.5 16S rRNA遺伝子クローンライグラリー法のためのDNA抽出

供試した涙液サンプルからQIAGEN 社製QIAamp DNA Stool Mini Kit（土壌用）を用いてDNA を抽出した．また，グラム陽性菌の抽出効率を上げるため涙液サンプルに1.4mlのBuffer ASL添加した後，0.1mm細胞破砕用ガラスビーズ0.1gをサンプルにアプライし，5minの水平ボルテックスを行った．ヒトフローラを構成する菌群にはグラム陽性菌であるFirmicutes門やActinobacteria 門の菌種が多いことが予想されるため，グラム陰性菌との核酸の抽出効率に差が出ないような破砕方法を採用する必要がある．

2.6 16S rRNA遺伝子クローンライグラリー法のためのPCR条件

プライマーは細菌のユニバーサルプライマーとして知られるものを用いた（Del, Panno *et al.*, 2005）．Forwardとして5`-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' （341F），Reverseとして5`-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' （907R） を用いて16S rRNA遺伝子のV3-V5領域を増幅した．変性温度95度にて30秒，アニーリング温度48度にて30秒，伸長反応は72度にて2分を合わせて30サイクル行った．その後，Roche社製GS FLX （454）によるシークエンスを行うため，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が，本研究のシークエンスに用いた次世代シークエンサーは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クエ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クエンス限界まで配列を決定した．

2.7 シークエンスデータの配列同定

シークエ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．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（Cole *el al.*, 2009）．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．前者は大量のシークエンスデータを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クエンスデータは約30bp-600bpのリード長を持つが，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．もともとシークエ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り，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．Classfier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．図2には解析のワークフローを示す．

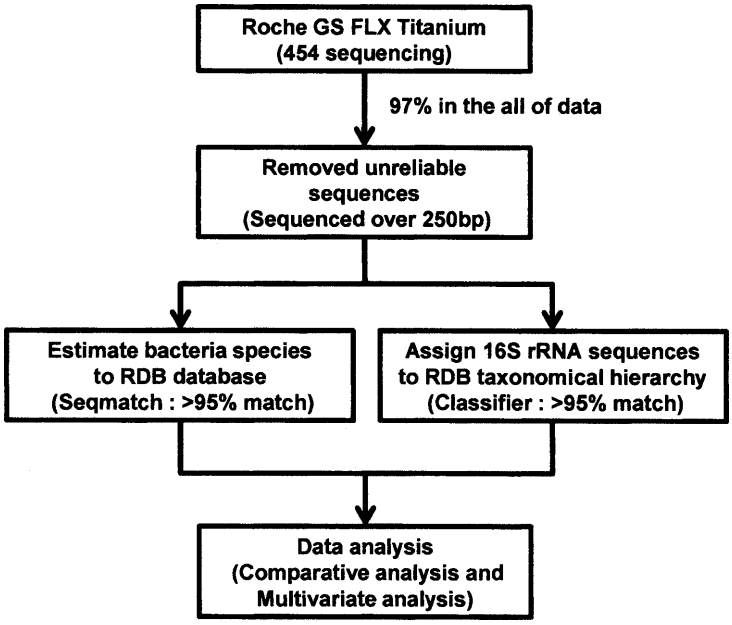


図2. 細菌叢解析のワークフロー
シークエンスされたデータのなかでは250bp以上の配列のみ解析した．RDBのseqmatchとclassfierによって細菌を推定した．これらのデータを細菌叢のプロファイルとして編集し，統計解析を行った．

2.8 細菌叢データの統計解析

先述の方法で推定された細菌種に基づく細菌叢プロファイルに対してマイクロアレイの網羅的解析に用いられるTM4（Saeed *et al.*, 2003）やJMP，SIMCAなどの統計ソフトを用いてマンホイットニーのU検定，相関解析，判別分析（OPLS-DA），UniFrac解析（Lozupone *et al.*, 2005）を行った．また，メタゲノムデータの自己相関解析結果に元づいてCytoscape_v2.8.1によってネットワークを作成した．ネットワーク解析に用いたレイアウトはForce-directed layoutである．各ノードのレイアウトをGMLファイルに出力した後，彩色とノードの直径の編集はperlを用いて行った．

2.9 涙液からの乳酸菌の培養

16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法では，炎症が起きていない健康な人の涙液において乳酸菌が多数存在している可能性を示唆したが，16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法は，涙液から抽出されたDNAから細菌叢を推定する方法であり，乳酸菌が眼表面に常在していることを証明することはできない．そのため乳酸菌を単離することを目的に一般的に乳酸菌の単離培養に用いられるMRS培地およびGAM培地による嫌気培養を試みた（De MAN *et al.* 1960）．本研究には筆者（健常者）から供試した涙液を用いた．涙液のサンプルはピペットマンによって涙腺から直接供試したものである．採取

された涙液はサンプリング後速やかに4℃で保存し，2時間以内に培養に用いた．また涙液の供試にもとなっては慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス実験・調査委員会の承諾のもとで行った．MRS寒天培地，GAM寒天培地に涙液50-150μLを塗布し，7日間の嫌気培養を行った．得たコロニーをMRS培地が補填された96wellプレートで4日間嫌気的に単離培養した．培養した液体培地をテンプレートとして，乳酸菌特異的なプライマーセット（5`- AGCAGTAGGGAACTTCCA-3' （LabF362），5`-CACCGCTACACATGGAG -3' （LabR677））を用いてPCRを行った（Rinttila *et al.* 2004）．PCRは変性温度94度にて30秒，アニーリング温度56度にて90秒，伸長反応は72度にて1分を合わせて30サイクル行った．96ウェルプレートにて単離培養した細菌株のうち乳酸菌特異的なプライマーによるPCRでバンドが得られた細菌株をMRS液体培地によって継代培養した．継代培養した細菌株について以下の手順でグラム染色を行った．培地をスライドガラスに定着させ，クリスタルバイオレット120μLを作用させ，水洗した．ヨウ素液200μLを作用させ，水洗した．エタノール120μLによって脱色・水洗した．パイフェル液120μLを作用させたのち水洗した後，乾燥後顕微鏡によって観察した．さらにPCR断片の増幅が確認できた単離株についてはサンガーシークエンスを用いて細菌同定を行った．シークエンスには27F （5' -AGRGTTTGATYMTGGCTCAG- 3'），1492R（5' -GGYTACCTTGTTACGACGACTT- 3'）のプライマーを用いた（Sakamoto *et al.*, 2003）．PCRは変性温度96度にて10秒，アニーリング温度50度にて5秒，伸長反応は60度にて4分を合わせて25サイクル行った．

2.10 定量PCRによる乳酸菌の定量

16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法による細菌叢解析について，本研究に供試した検体数は健常者4名，AKC患者5名と健康なヒトの涙液常在菌を定義する上で十分な検体数とは言えない．よって乳酸菌の16Sr RNA遺伝子特異的なプライマーを用いた定量PCR法を用いて，より多くの涙液検体から乳酸菌数の定量を行い，乳酸菌の含有量が眼の健康の指標になりえるか否かを検討する必要がある．そのために本研究では先行研究によって示される乳酸菌特異的なプライマーを用いて定量PCRを十分に行う事が出来るかの条件検討を行った．

本研究には筆者（健常者）から供試した涙液と16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法による細菌叢解析において涙液中から多く確認された乳酸菌である*Leuconoctoc citreum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus plutarum*の単離株（理研より購入）をGAM培地により継代培養したものを用いた．涙液のサンプルはピペットマンによって涙腺から直接供試したものであり，サンプリング後は速やかに-20℃で保存した．

DNA抽出は，ヌクレアーゼの反応を阻害するためEDTAが通常のTEバッファーの10倍入ったTE10とよばれるバッファー（10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0）中で，以下のような連続した酵素反応によって行った．涙液20μLまたは単離株を継代培養した培養液20 μLにTE10を500 μl加えた．そこへ終濃度が15 mg/mlになるようにLysozymeを加え，37°Cで一晩インキュベートした．その後，終濃度が600 unit/mlになるようにAchromopeptidaseを加えて37°Cで8時間インキュベートした後，最終濃度が1%になるようにSDS（pH 7.2）を加え，さらに終濃度が1 mg/mlになるようにProteinase Kを加えて55°Cで一晩インキュベートした．酵素反応後のサンプルはPhenol/Chloroform /soamylalcohol溶液で2回処理してタンパク質を除去した後，エタノール沈殿にてゲノムDNAを精製した．抽出したDNAをテンプレートとし，*Leuconoctoc citreum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus plutarum*の特異的なプライマー（*Leuconoctoc citreum*（LcitF: 5'-AAAACTTAGTATCGCATGATATC-3`, LcitR: 5`-CTTAGACGACTCCCTCCCG-3`），*Lactococcus lactis*（16S L lactis_forward: 5`-CGTAGGTCCCGAGCGTTGTC-3`, 16S L lactis_reverse: 5`-GGTTGAGCCACTGCCTTTTACAC-3`），*Lactococcus plutarum*（LcPl-F: 5`-TGGTACTTGTACTAGTTGGATGAGTAG-3`, Lc-R: 5`-GTTGAGCCACTGCCTTTTAC-3`））によって

乳酸菌の定量を試みた（Bounaix *et al.*, 2010）（Braat *et al.*, 2006）（Odamaki *et al.*, 2011）．PCRは変性温度95度にて10秒，アニーリング温度60度にて30秒，伸長反応は72度にて90秒の条件で行った．

第3章　結果

メタボローム解析結果

イオン性代謝物と炎症の関連性について考察し，炎症が起きていない状態の涙液中代謝物を定義するために5人の健常者と5人の中度のAKC患者から成る合計10サンプルのグループと，5人の重度AKC患者の代謝物測定量を解析した．なお，比較群である2つのグループの間で年齢（P = 0.20，t = 1.38）または性別（P = 0.49，$\chi 2 = 0.46$）に有意差は見られなかった．涙液の全15検体の代謝物質をCE-TOF/MSによって分析し，51の代謝物質を涙液の中から同定した．タンパク質の合成に必須である20個のアミノ酸のうち，システインのみ検出されなかった．システインは体外の環境において早急に酸化されることが知られているため，今回の涙液からもシステインが検出されなかったものと思われる．また，涙液代謝物プロファイルは個人差が大きかった（図3）．

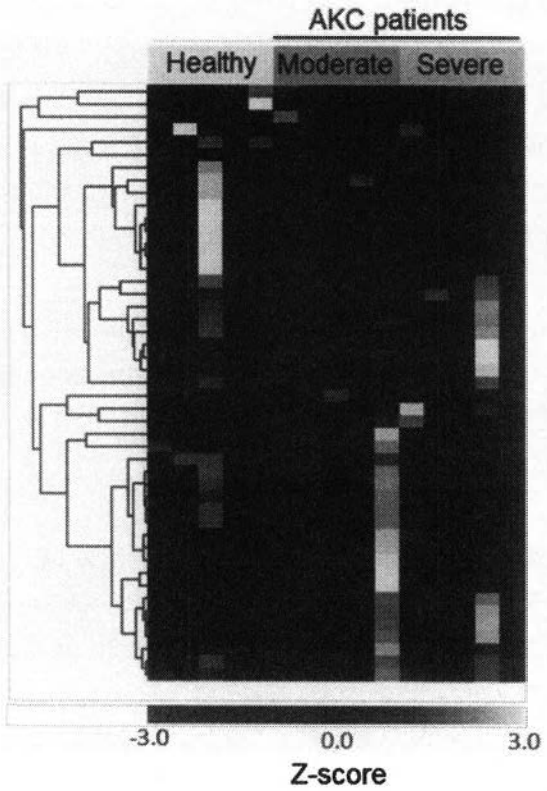


図3メタボロームプロファイルから得られたヒートマップ
サンプルの少なくとも3分の2で見られた涙代謝物質量を示した．縦は代謝物，横は検体を示してる．階層的クラスタリングによって代謝物をクラスタリングした．健常者（n=5），中度AKC患者（n=5），重度AKC患者（n=5）．51代謝物の相対濃度を示している．

3.1　サンプル調整結果

涙液からのDNA抽出

涙液に存在するDNAの量は非常に少ないため，DNA抽出後のサンプルからはDNAのバンドは見られ

ない（図4）．しかし，微量ながらもバクテリア由来のDNAが存在していることは次項に示すPCR実験によって確かめた．

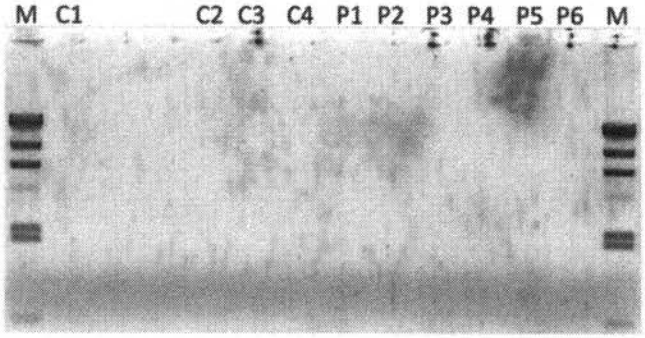


図4：サンプルから抽出されたゲノムDNA
泳動条件は0.8%アガロースゲルで100V，30分．バンドの検出はEtBr染色にて行った．
マーカー（M）はλ*Hind*Ⅲを用いた．

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（図5）．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，非特異的な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．

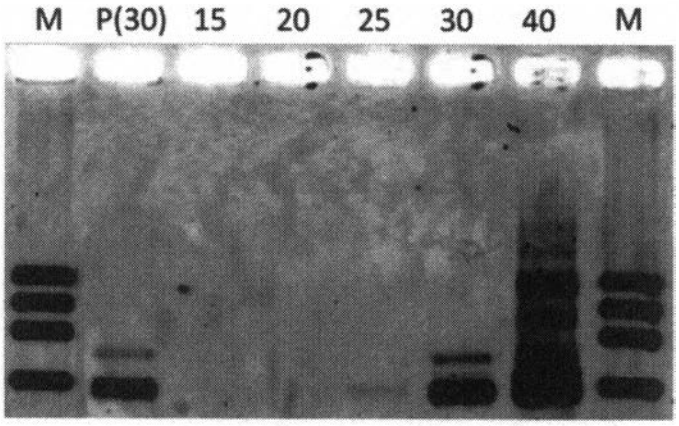


図5：PCRの条件検討
泳動条件1.5%アガロースゲルで100V，30分，バンドの検出はEtBr染色にて行った．P（30）と表記されているものは過去に同プライマーで増幅が確認されたDNAに対しPCR 30Cycle行ったもの．マーカー（M）は*Hae*Ⅲを用いた．

次世代シークエンシング用サンプルの調整

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3に，またその時得られたPCRの電気泳動結果を図6に示す．次世代シークエンサー発注において，必要なDNA量は5μgである．涙液のPCR実験によって次世代シークエンサー発注に十分といえるDNA量を得た．

表5：本実験において得られたサンプル詳細

サンプル名	濃度(μg/μL)	容量(μL)	Total_DNA(μg)	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．

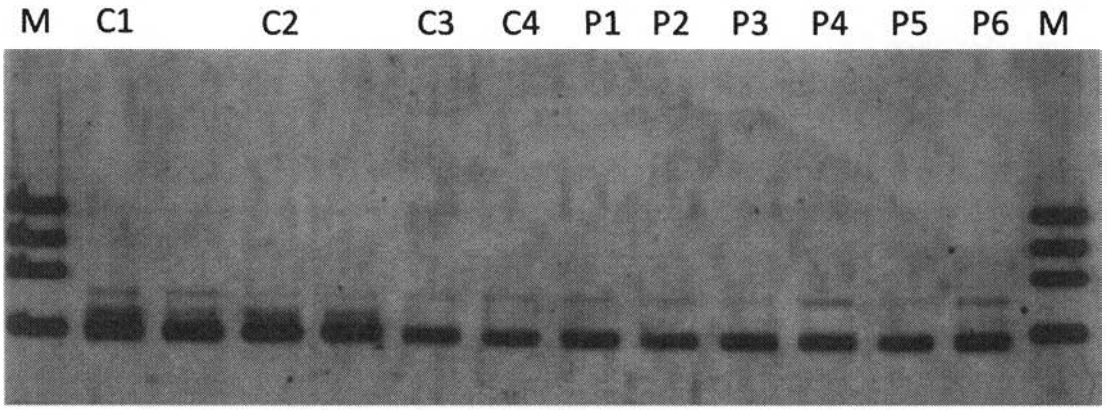


図6：次世代シークエンサー用に調整されたサンプルDNA

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クエンスを行わないものとした．

シークエンスデータのバックグラウンド

表4，図7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を獲得した．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する．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している．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%であることも示された．

表4　次世代シークエンサーによって得られた配列の詳細

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

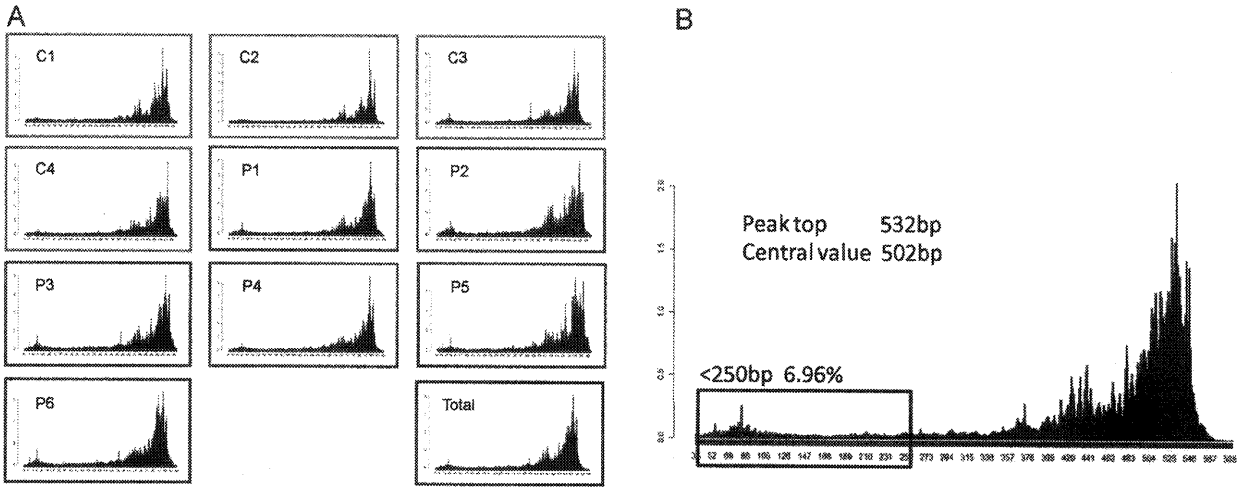


図7　獲得されたシークエンスデータのヒストグラム

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．

涙液常在菌叢解析結果

図8に示すのは健常者4名，AKC患者5名の涙液常在菌叢プロファイルである．涙液からは462株の細菌が同定された．約75%が配列同定され，約25%の配列は既知のいかなる細菌の16S rRNA遺伝子配列の断片とも相同性を示さなかった．健康状態に関わらず*Propionibacterium acnes*や*Leuconostoc citreum*のDNA断片が涙液中から多く配列同定された．乳酸菌の含有率および一部病原性の細菌に個人差は見られたが，3.1項に示した代謝物のプロファイル（図3）に対して，細菌叢は明確な個人差は示さなかった．

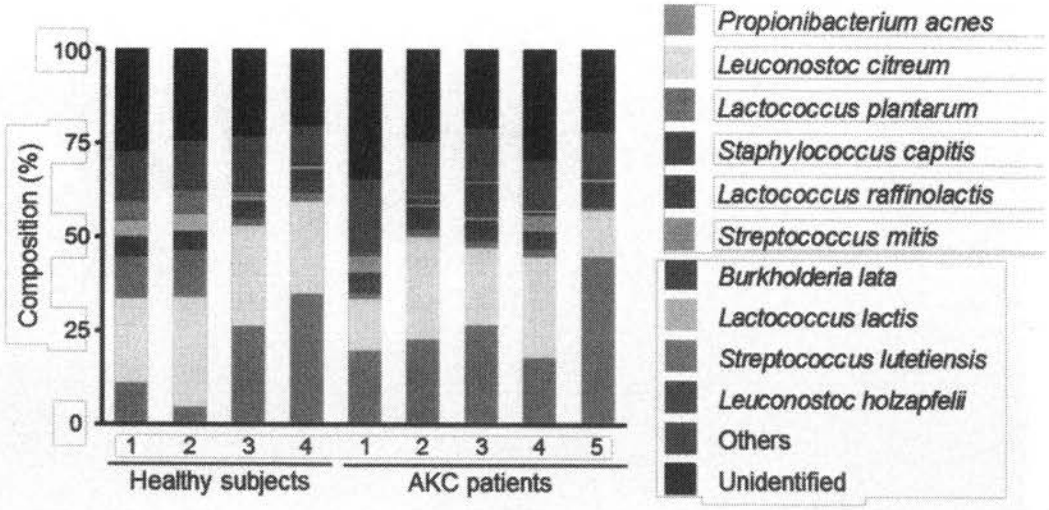


図8　涙液常在菌叢.

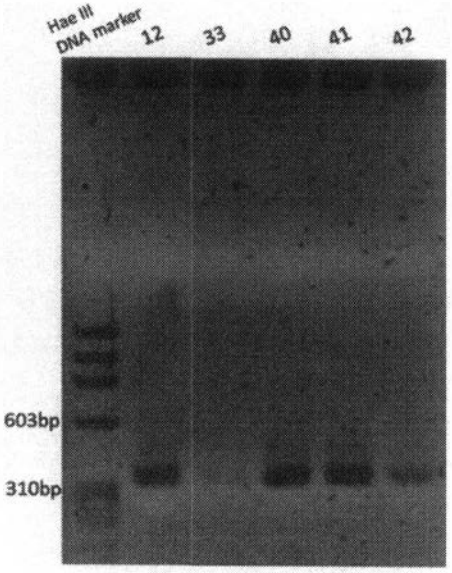
細菌叢はRibosomal Database Project （RDP）のSeqmatchによって解析した．涙液から得られた細菌について最も多い物から10種について着色した．"Other"と書いてあるものはSeqmatchによって細菌の推定はされたものの，前述の10種に含まれないものである.

涙液からの乳酸菌の培養

MRS培地による涙液からの単離培養において，涙液50-150μLをMRS寒天培地に塗布したものについて，30個ほどのコロニーが確認された．複数のMRS寒天培地から得られたコロニーは大きいものから恣意的に96ウェルプレートにて単離培養した．96の培養株の内，乳酸菌特異的なプライマーで増幅の確認できた単離株について継代培養した.

96の単離した細菌株のうち5つの細菌株から乳酸菌特異的なプライマーを用いたPCRにてバンドが得られた（図9）．目的通り310bp前後の増幅配列を得た.

図9：乳酸菌特異的なプライマーで増幅の確認できた単離株



泳動条件1.5%アガロースゲルで100V，30分，バンドの検出はGel Red染色にて行った．マーカー（M）は*Hae*Ⅲを用いた．12,33,40,41,42番（これらの番号は実験上便宜的に各菌株にナンバリングしたものである）.

乳酸菌特異的なプライマーで増幅を確認した細菌株に対してグラム染色を行った．その結果を図10に示す．いずれの染色結果からもグラム陽性球菌と特徴の一致する染色結果が得られた．

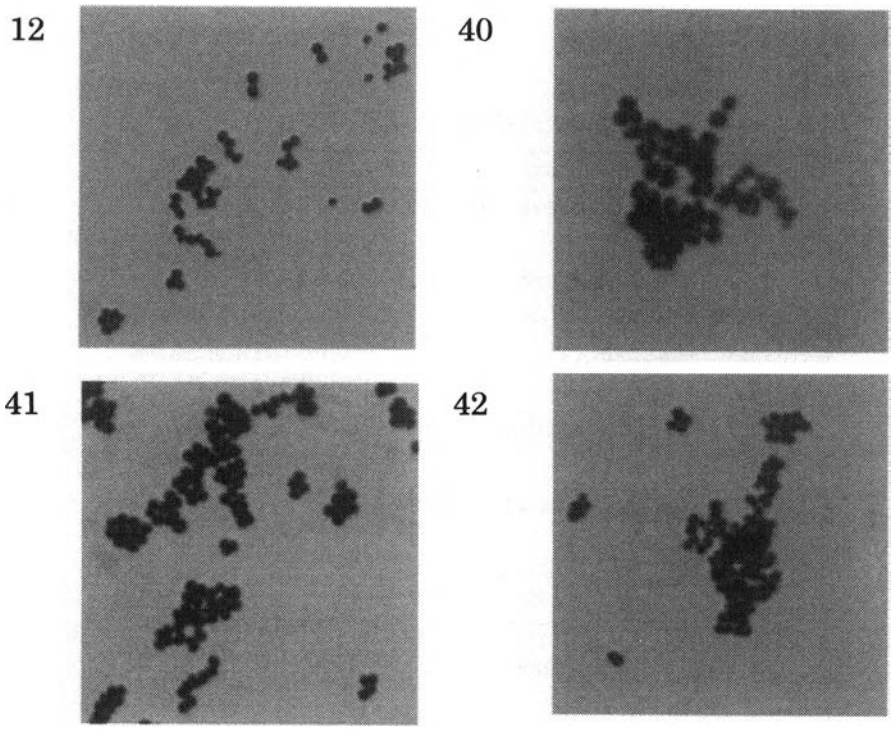


図10:グラム染色結果

乳酸菌特異的なプライマーによってバンドが確認できた単離株に対して，16S rRNS遺伝子のほぼ全長である約1500bpのDNA断片をPCRによって得た後，シークエンスによって細菌種を同定した．得られた配列に対してNCBIのBLASTにて相同性検索を行った（表5）．4株中の3株が*Staphylococcus epidermidis*であった．600-1000bpのシークエンスデータの中で相同性は97-98%だった．4株中の1株は*Staphylococcus saccharolyticus*であった．950bpほどのシークエンスを得たが，相同性は99%であった．

表5：シークエンス結果

Sample No	Result of seqencing	Identities
12	Staphylococcus epidermidis	97%
33	Staphylococcus saccharolyticus	99%
40	Unknown	-
41	Staphylococcus epidermidis	98%
42	Staphylococcus epidermidis	97%

乳酸菌特異的なプライマーを用いた定量PCR

表6に示すのが*Leuconoctoc citreum*，*Lactococcus lactis*，*Lactococcus pluntarum*の特異的なプライマーによって定量PCRを行った結果である．*Lactococcus lactis*特異的なプライマーを用いた定量PCRについては涙液から抽出したDNAを用いたサンプルからも微量の*Lactococcus lactis*のDNA配列を確認

することに成功したが，*Leuconoctoc citreum*，*Lactococcus pluntarum*特異的なプライマーを用いた定量PCRについては涙液から抽出したDNAを用いたサンプルからはプライマーダイマー以外の増幅を確認することはできなかった．涙液から酵素法でDNA抽出を行ったものとは別に涙液原液をテンプレートとし，同様の条件で定量PCRを行ったが，涙液原液からはいかなる細菌の配列の増幅も確認することはできなかった．

表6　乳酸菌の定量的PCR

Sample Name	CT
Leuconostoc citreum	
Tear	N.D.
Positive control	19.4
Lactococcus lactis	
Tear	32.3
Positive control	17.5
Lactococcus pluntarum	
Tear	N.D.
Positive control	9.9

Tear：涙液から酵素法によって得られたDNAを用いて定量PCRを行ったもの．

議論

炎症特徴的な涙液中の代謝物

判別分析の1種であるOPLS-DAによって炎症特異的な代謝物を判別した（図11 A-B）．炎症が少ない検体はUreaが少なく，o-Acetylcarnitineが優位に多い（P=0.037）ことが示された（図11C）．Ureaは尿素回路上の代謝物であるが，尿素回路は細胞の外傷による炎症応答に非常に重要な代謝経路の一つである（Sorensen *et al.*, 1975）．o-Acetylcarnitineはアミノ酸の一種である．アミノ酸に着目した尿素回路と眼の炎症についての考察は後に述べる．

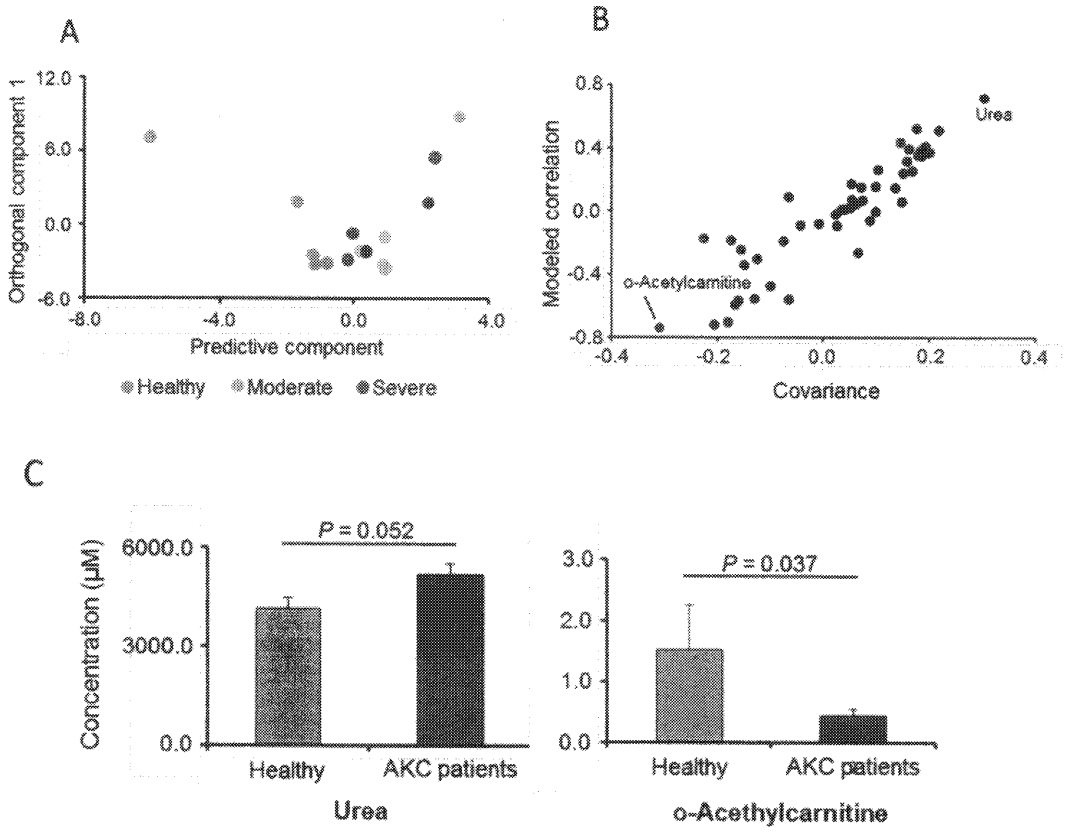


図11炎症と特徴的な涙液中の代謝物
A:OPLS-DAローディングプロット，B: OPLS-DAスコアプロット，C:OPLS-DAによって炎症特異的であると判別された代謝物の代謝物濃度（エラーバーは標準偏差，優位差はT-testによって計算した）．

アミノ酸プロファイルはAKCの炎症と相関する

近年，角膜上皮細胞のアミノ酸輸送体の存在が，報告されている（Puck *et al.*, 1984）（Katragadda *et al.*, 2005）．涙液中の様々なアミノ酸が眼の上皮細胞の健康の維持と眼病患者の上皮細胞の状態に関与していることを示している．近年ではアミノ酸プロファイルと炎症を主要とする眼疾患の関係性についての報告もなされている（Nakatsukasa *et al.*, 2011）．o-Acethylcarnitineなどのアミノ酸が炎症を起こしていない検体で多いことも踏まえて，アミノ酸のみに着目して解析を行った．

タンパク質の合成に必要な20種類のアミノ酸濃度を基にPCAを行った（図12）．測定されたアミノ酸濃度について，正規化を行わずにPCAを行った結果においては炎症と涙液中のアミノ酸の相関を示すことはできなかった（図12 A-B）．これは3.1項の図3により示されたアミノ酸濃度の個体差によるものであると推測できたため，総アミノ酸量でアミノ酸のプロファイルを正規化した．正規化の手法については炎症時の涙液中のアミノ酸濃度を報告した先行研究と同様の手法で行われた（Nakatsukasa *et al.*, 2011）．正規化の結果，炎症の起こしていない健常者の主成分プロットとAKC患者の主成分プロットを分離することができた．さらに角膜に炎症をきたした重度AKC患者の主成分プロットはAKC患者全体の主成分プロットに対して右側に位置することが示され，炎症とアミノ酸の割合の相関が示された（図12 C-D）．正規化されていないアミノ酸プロファイル（表7）では，健常者とAKC患者における有意差は確認できなかった．しかし，正規化されたデータにおいては，健常者とAKC患者の間でバリン，ロイシン，アスパラギン酸，リジン，フェニルアラニン，チロシン，トリプトファンの有意差（$P < 0.05$）を認めた．トリプトファンは肥満細胞によって生成されるという報告がある（Ludolph-

Hauser *et al.*, 1999）．前述のとおり，AKCの発症と肥満細胞の増殖は密接に関係する背景から涙液中のトリプトファンの割合は炎症によって変化する可能性があり，非常に興味深い．アルギニンは眼の細胞の炎症の際に創傷治癒を促すことが知られている．先行研究ではアルギニンが眼の炎症によって減少する傾向にあることが示されているが（Nakatsukasa *et al.*, 2011），本研究のPCAのスコアプロットでも同様の傾向を示している．アルギニンはオルニチンやシトルリンによって合成されるが，先行研究では炎症がおこると涙液中のオルニチンやシトルリンが増減するという傾向が知られている（Nakatsukasa *et al.*, 2011）．本解析においてはオルニチンやシトルリンが増減するという傾向を得ることはできなかったが，オルニチンやシトルリンは尿素経路を介して尿素にも代謝される．尿素が炎症に伴って増加する傾向にある事をOPLS-DAによって示したが，炎症の起きている際にオルニチンやシトルリンがアルギニンに代謝されるよりも尿素に代謝されてしまう背景があるとすると非常に興味深い．PCAによって涙液中のアミノ酸バランスは炎症の起きていない涙液成分を示す一つの指標になりえることが明らかになった．

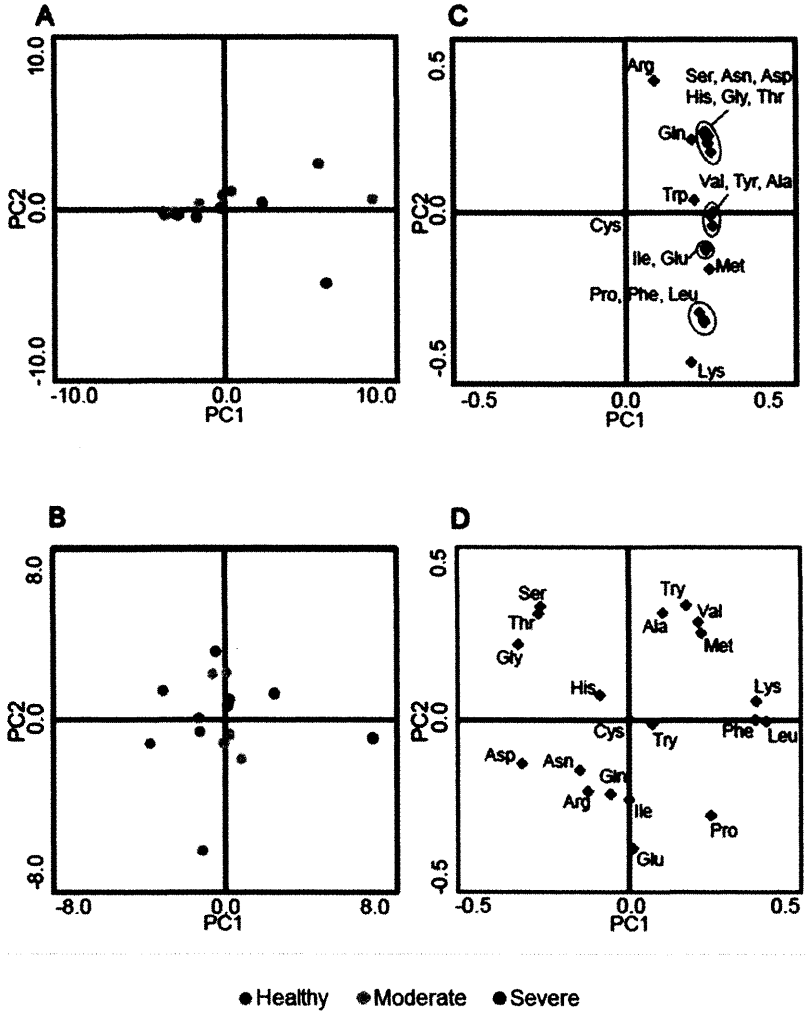


図12 20種類のアミノ酸によるPCA解析

A：20種類のアミノ酸によるPCA解析のローディングプロット（正規化前）．健常者（青），中度AKC患者（黄），重度AKC患者（赤） B： 20種類のアミノ酸によるPCA解析のスコアプロット（正規化前）．C：総アミノ酸量で正規化を行った20種類のアミノ酸によるPCA解析のローディングプロット．健常者（青），中度AKC患者（黄），重度AKC患者（赤）D：総アミノ酸量で正規化を行った20種類のアミノ酸によるPCA解析のスコアプロット．

表7　涙液中の必須アミノ酸濃度

Amino acids (μmol/l)	Control	AKC (Not Complicated)	AKC (Complicated)	*P*-value
Glycine	37.6 ± 16.7	44.5 ± 21.1	44.0 ± 11.8	0.87
Alanine	37.5 ± 19.6	44.4 ± 20.1	51.9 ± 17.2	0.63
Serine	75.8 ± 35.5	106 ± 58.0	82.4 ± 23.2	0.84
Proline	21.2 ± 10.6	26.7 ± 7.58	41.0 ± 17.7	0.41
Valine	11.2 ± 5.61	15.7 ± 7.61	20.6 ± 6.02	0.37
Threonine	22.0 ± 11.0	25.5 ± 12.3	24.6 ± 6.16	0.93
Isoleucine	2.96 ± 0.83	5.58 ± 3.09	5.95 ± 1.86	0.51
Leucine	10.3 ± 5.46	18.5 ± 10.1	27.2 ± 14.0	0.44
Asparagine	4.86 ± 2.57	4.86 ± 2.57	5.18 ± 1.22	0.88
Aspartic acid	21.4 ± 9.93	20.2 ± 11.2	16.7 ± 4.88	0.64
Glutamine	43.1 ± 28.2	24.9 ± 8.60	36.2 ± 9.98	0.90
Lysine	10.7 ± 6.37	15.0 ± 7.53	41.4 ± 22.7	0.29
Glutamic acid	40.7 ± 18.9	37.0 ± 14.2	47.5 ± 20.0	0.72
Methionine	1.03 ± 0.68	1.45 ± 0.88	2.21 ± 0.82	0.35
Histidine	15.4 ± 8.29	20.1 ± 9.68	16.1 ± 4.04	0.83
Phenylalanine	5.78 ± 2.95	13.2 ± 7.51	17.1 ± 8.59	0.46
Arginine	16.0 ± 8.93	17.3 ± 5.57	9.16 ± 1.28	0.17
Tyrosine	2.19 ± 1.18	4.31 ± 2.14	4.55 ± 1.30	0.48
Tryptophan	3.91 ± 1.78	12.0 ± 7.85	6.88 ± 1.14	0.80
Cysteine	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	N.A.

Mean values ± SEM.

涙液常在菌叢

結膜嚢擦過物の細菌培養を行ったとき，最も多く検出されるのが表皮ブドウ球菌であり，次いでアクネ菌，コリネバクテリウム属，時に黄色ブドウ球菌が検出されている（Inoue *et al.*,2008）．これらの結果から現在，眼表面の常在菌は皮膚常在菌と同様であるという理解が一般的である．涙液中における細菌叢プロファイルの特徴を検証するために，涙液常在菌叢は皮膚常在菌のどの部位と似た傾向が見られるのか，先行研究と比較した．彼らは皮膚環境を皮脂・湿潤・乾燥の3タイプに分け，本研究と同じ16S rRNA遺伝子のクローンライブラリー法で細菌叢プロファイルを報告している（Grice *et al.*, 2009）．

涙液から得た眼表面常在菌の半数以上がLactobacillalesである．涙液常在菌叢と3つの部位の皮膚常在菌叢を比較した際の相関係数は最大でもR^2=0.05と非常に低い値を示しており，涙液常在菌叢は皮膚常在菌に比べ非常にユニークであることが示された（図13 A）．涙液には皮膚と比べて非常にLactobacillalesが多い．この事から涙液常在菌の中でもとりわけ乳酸菌が重要な働きをしている可能性が示唆される．興味深いことに，涙液常在菌のプロファイルからLactobacillalesを除いた細菌叢プロファイルを作成すると皮脂部の皮膚常在菌に酷似する（R^2=0.79）というデータを得た（図13 B）．Griceらの報告では顔面の常在菌は皮脂部の常在菌に分類されることからも，眼の常在菌は顔面の常在菌に乳酸菌を含むものである可能性がある．乳酸菌は腸内に豊富にいる菌であるが，膣や子宮，尿道などにも存在し，病原菌の繁殖を防ぎ，活動を抑制することはすでに知られている（Senok *et al.*, 2009）（Ravel *et al.*, 2011）．この事からは涙液常在菌の中のLactobacillalesは，皮膚から眼表面への病原菌の侵入を防御している可能性が考えられる．今回涙液から最も多く見つかったのは*Leuconostoc*属の細菌である．*Leuconostoc*属の細菌はすでに結膜嚢から単離されているが（Schabereiter-Gurtneret *et al.*, 2001），従来のように培養法を用いた検証では*Leuconostoc*属をはじめとするLactobacillalesが眼から全体の細菌のおよそ半分もの割合で検出されることは無かった．

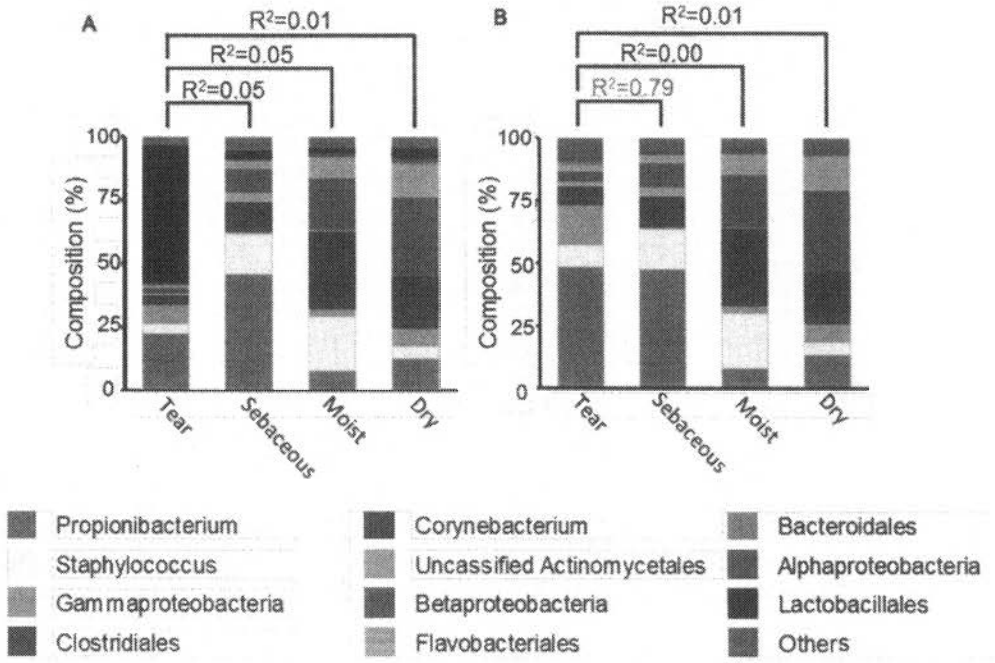


図13: 涙液中の細菌叢と皮膚常在菌叢の比較

A：*Lactobacillales*を含む涙液中の細菌叢と皮膚常在菌叢の比較．B：*Lactobacillales*を除いた涙液中の細菌叢と皮膚常在菌叢の比較．Grace et al.（2010）によって報告された皮膚常在菌と涙液の常在菌を比較した．Tearは454 GS FLX Titaniumを用いて本研究で得られたデータを示す．SEBA，MOIST，DRYそれぞれGriceの報告によって脂っぽい部分，湿った部分，乾いた部分として報告されている皮膚常在菌である．R2の値についてはピアソンの相関係数で本研究によって得られた涙液中の細菌叢とGriceが報告した皮膚常在菌叢を比較したものである．

3.1 炎症を特徴付ける涙液細菌叢

涙液細菌叢は炎症特異的に変化するのかQIIMEを用いてUniFrac解析を行った（図14）．これは主座標分析であり，細菌叢のプロファイルを2次元空間にプロットしたものである（Lozupone *et al.*, 2005）．細菌の種類とリード数（量）を考慮した解析（Weighted）ではAKC患者から得た細菌叢と健常者から得た細菌叢がおおまかに分離している様子がうかがえる．従ってAKC患者と健常者の間つまり炎症の起きたサンプル間の細菌叢は特に明確な違いがあることが示された．一方で，細菌の種類のみに注目し，リード数を考慮しない解析（Unweighted）ではWeightedに比べて明確な違いを示している．Weighted UniFrac解析はリード数を加味するため各細菌の量（構成比）を考慮しているのに対して，Unweighted UniFrac解析では細菌の種類数のみを考慮する手法である．この結果は炎症を起こした場合の涙液細菌叢に差をもたらしているものが構成比よりも細菌の種類であることを示している．そのため判別分析（OPLS-DA）を用いて炎症特徴的に増減する細菌種を考察した．

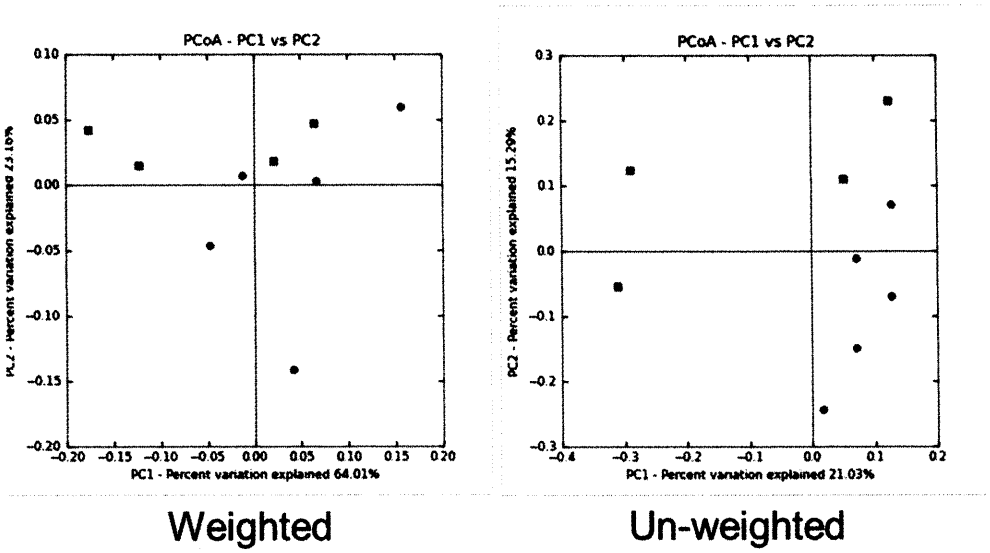


図14　UniFrac解析によるAKC患者と健常者の涙液常在菌層の比較
左：Weighted UniFrac解析結果，右：Unweighted UniFrac解析結果

図15に示したものがOPLS-DAによって明らかになった炎症特異的な細菌種および炎症の起きていない健康な眼常在菌に代表的な細菌種である．同様に表8にはOPLS-DAによって判別された細菌種のリストを示した（OPLS-DAによる特異性の絶対値が0.2以上のもの）．

結果，炎症の起きていない涙液に特徴的にみられるのは乳酸菌であり，炎症の起きている涙液から特徴的に確認されるのは眼病の原因になりえる病原性細菌であった．

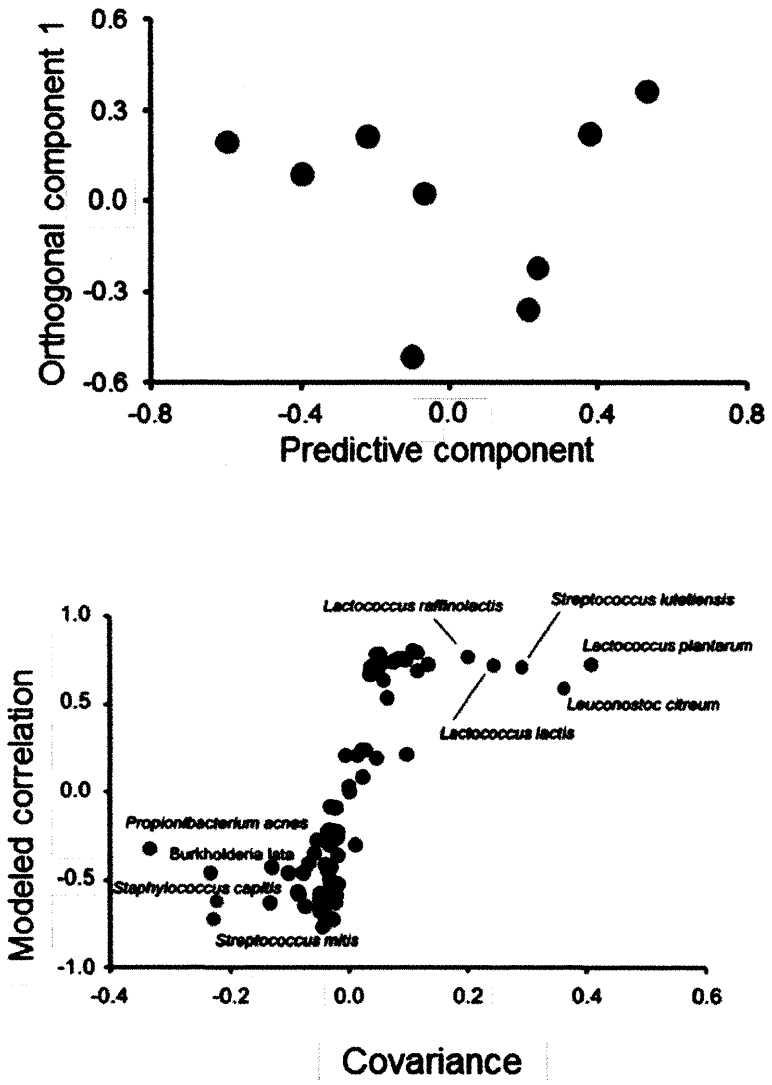


図15炎症と特徴的な涙液中の代謝物
A:OPLS-DAローディングプロット，B: OPLS-DAスコアプロット．
特異性の期待値が0.2を上回るものについて着色した．赤がAKCに特徴的な細菌種，青がAKCに特徴的な細菌種を示す

炎症の起きていない涙液から得られた常在菌に特徴的に見られたのは*Lactococcus pluntarum, Streptococcus lutetiensis, Lactococcus raffinolactis, Lactococcus lactis, Leuconostoc citreum*でありそのすべてが乳酸菌の細菌種であった．*Lactococcus pluntarum, Streptococcus lutetiensis*の割合はマンホイットニーのU検定でもAKC患者と健常者の間で優位差（$P<0.05$）を示している．*Lactococcus lactis*はバクテリオシンという抗菌ペプチドを生成することが知られている（Nakajimaet *et al.*, 1992）．通常バクテリオシンは抗菌スペクトルが非常に狭い．しかし，*Lactococcus lactis*の生成するナイシンは非常に広い抗菌スペクトルをもつことが知られており，ブドウ球菌などの細菌にも効能を示す（Millette *et al.*, 2007）．AKCをはじめとするアトピー性疾患では黄色ブドウ球菌が増加する傾向にあることからも眼常在菌の中の乳酸菌は病原菌排除機能に貢献しているかもしれない．

AKC患者の涙液から得られた常在菌に特徴的に見られたのは*Propionibacterium acnes, Burkholderia lata, Staphylococcus capitis, Streptococcus mitis*であった．*Burkholderia lata*の割合はマンホイットニーのU検定でもAKC患者と健常者の間で優位差（$P<0.05$）を示している．*Propionibacterium acnes*は皮

膚や毛髪部位の常在菌でまれに皮膚化膿や心内膜炎などを起こすことが報告されており，眼科領域では，眼内手術後に*Propionibacterium acnes*眼内炎が起こることがあることが知られているなど眼科臨床上でも非常に重要な細菌である（Meisler *et al.*, 1986） （Roussel *et al.*, 1987） （Coden *et al.*, 1993）．*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，病原菌として知られており，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（Vanlaere *et al.*, 2009）．AKC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．ある患者サンプルにおいては全細菌の8%を占めており眼の炎症との関連性も疑われる．臨床情報との比較では浮腫の悪化が強く認められる患者に多く見られた．結膜浮腫は結膜細胞組織に水分が溜まって腫れる現象の事で，炎症反応によるものの場合には，サイトカインやケモカイン，神経伝達物質により結膜細胞に水分が移動すると言われているが，根本的な原因は不明である（Tanaka *et al.*, 2006）．*Burkholderia lata*の増加が浮腫の悪化の原因か否かについては今後の研究が期待される．

表8　OPLS-DAによってAKC患者・健常者それぞれに特徴的であると判別された細菌種

Species of bacteria	Composition (%)		*P*-value
	Healthy	AKC	
Lactococcus plantarum (T); DSM 20686; EF694029	6.9E-02 ± 2.8E-02	1.5E-02 ± 1.9E-03	0.027
Leuconostoc citreum (T); ATCC49370; KCTC3526; AF111948	2.6E-01 ± 1.4E-02	2.0E-01 ± 3.2E-02	0.327
Streptococcus lutetiensis (T); NEM 782; AJ297215	2.9E-02 ± 1.6E-02	3.1E-04 ± 6.2E-05	0.014
Lactococcus lactis (T); NCDO 607T; AB100802	2.5E-02 ± 1.1E-02	5.3E-03 ± 8.9E-04	0.221
Staphylococcus capitis (T); ATCC 49326T; AB009937	2.0E-02 ± 6.6E-03	3.6E-02 ± 5.4E-03	0.142
Streptococcus mitis (T); ATCC 49456; AF003929	5.6E-03 ± 2.5E-03	2.4E-02 ± 8.9E-03	0.086
Burkholderia lata (T); 383; CP000150	1.1E-03 ± 5.1E-04	2.5E-02 ± 1.6E-02	0.014
Propionibacterium acnes (T); ATCC6919; AB042288	1.9E-01 ± 7.0E-02	2.6E-01 ± 4.9E-02	0.462

Compositionは細菌の割合の平均値とその標準誤差を示す．*P*-valueはマンホイットニーのU検定による．

3.2　自己相関解析

図16は涙液常在菌の中の21種類の主要な細菌種についての自己相関マップである．赤で示したものはOPLS-DAにおいてAKC患者特徴的であると判別された細菌種であり，青で示したものがOPLS-DAにおいて炎症の起きていない検体特徴的であると判別された細菌種である（OPLS-DAのスコアプロットにおける特異性の期待値が0.2を上回るもの）．著しい正の相関が見られるほど赤，負の相関が見られるほど緑に描画される自己相関ヒートマップ解析を行った．赤字で示された細菌種と青字で示された細菌種は逆相関する傾向にあることが明らかになった．同時に青字で示された乳酸菌種同士は強い正の相関を示している．本結果は涙液常在菌の中の乳酸菌と病原菌が互いに逆相関している可能性を示唆している．

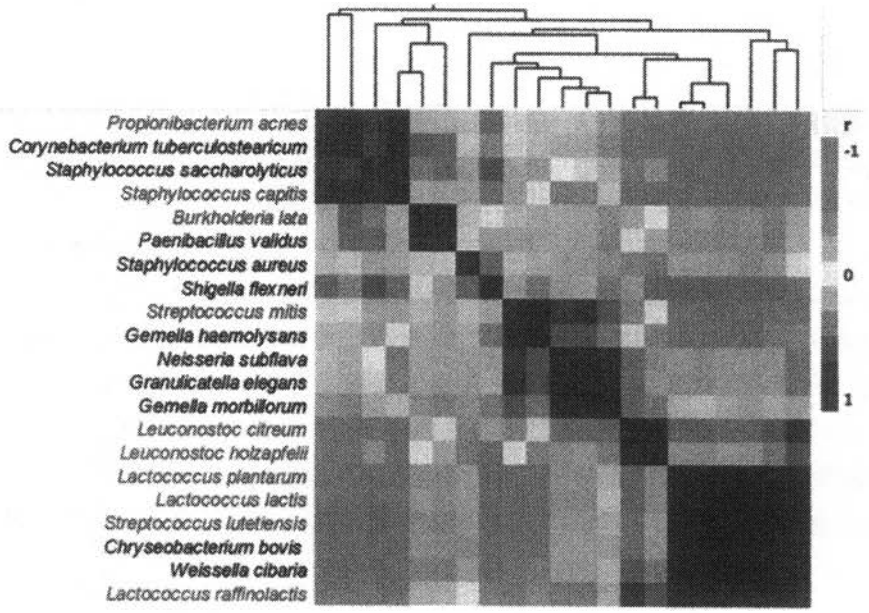


図16涙液常在菌の自己相関解析

涙液常在菌の中の21種類の主要な細菌について解析した．自己相関解析にはスピアマンの自己相関係数を用いた．赤字で示すものはOPLS-DAによってAKCに特徴的に多かった細菌である．青字で示すものはOPLS-DAによって健常者に特徴的に多かった細菌である（OPLS-DAのスコアプロットにおける特異性の期待値が0.2を上回るもの）．

3.3 ネットワーク解析

前項で示された乳酸菌同士の正の相関関係および，乳酸菌群と病原菌群の負の相関関係は涙液常在菌叢の代表的な種のみによって得られた傾向である．これらの傾向が涙液常在菌叢全体で一般的に観察できるのかを明らかにするために，涙液常在菌叢の細菌種のうちで比較的多くみられた細菌種（全9サンプルの細菌の割合の合計が0.1%を超えた細菌種）について細菌種のネットワーク解析を行った（図17）．ノードの1つが細菌種を表し，青のノードは乳酸菌属を示している （*Leuconostoc, Streptococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Lactococcus, Weissella, Abiotrophia, Granulicatella*）．黄色のノードは眼病に関わる病原性細菌の属を示した （*Neisseria, Staphylococcus, Propionibacterium, Pseudomonas, Corynebacterium*）．各細菌種をつなぐエッジは著しい正の相関関係や負の相関関係を示している．ピンクのエッジは有意な正の相関を示し，グレイのエッジは有意な負の相関を示している．正の相関の次数の大きいノード（細菌種）の大きさは大きく，次数の少ないノードの大きさは小さい．ネットワークに黄色い文字で示したのはOPLS-DAによってAKC患者または健常者特徴的に判別された細菌種（OPLS-DAのスコアプロットにおける特異性の期待値が0.2を上回るもの）とスーパー抗原を生成する細菌種（*Sthaphylococcus aures*および*Streptococcus mitis*）である．ネットワーク左上には乳酸菌を示す青いノードが集中するクラスターが存在する．さらにこれらは互いに著しい正の相関を示した．ネットワーク右には3つのクラスターが確認される．上から日和見菌を主体とする黄色いノードと青いノードが共存するクラスター，黄色いノードを主体とする病原菌を中心に構成されるクラスター，*Burkholderia lata*などの病原菌が存在する小さなクラスターである．これら3つのクラスターはクラスターごとに著しい正の相関を示している．特筆すべきは乳酸菌のクラスターと病原菌のクラスターが互いに著しい負の相関を示している事である．これらの結果は涙液常在菌の中には乳酸菌と病原菌が存在し，それらが互いに拮抗しあっている可能性を示している．炎症の起こしていない健康な涙液

から得られた細菌叢からは乳酸菌が，AKCによる炎症を起こしている検体からは病原性細菌が特徴的に得られ，それらが互いに負の相関を示している結果は眼の病原性細菌の排除機構を考察する際に重要である．現在の眼科学では涙液を通じて物理的に異物や病原菌を洗い流すこと，もしくは涙液中のリゾチーム・ラクトフェリン・IgG・IgAなどの抗菌性物質を介しての細菌の殺菌が病原菌に対する眼の防御機構の全てであるとされているが，眼常在菌の乳酸菌が病原菌から眼の健康を守っている可能性を考慮すると本研究の報告は非常に興味深いものになる．

AKCの病理を理解する上で細菌が生成するスーパー抗原の存在は非常に重要である．スーパー抗原はT細胞を非特異的に多数活性化させ，多量のサイトカインを放出させる抗原である（Tantilipikorn *et al.*, 2012）．AKCをはじめとするアトピー疾患患部で*Sthaphylococcus aures*の増加が多々報告されているだけでなく（Nakata *et al.*, 2000） （Hauser *et al.*, 1985），*Sthaphylococcus aures*が生成するスーパー抗原がAKCの炎症の原因であるとする報告は後を絶たない（Nakata *et al.*, 2000）．ネットワーク上では*Sthaphylococcus aures*は中央上部のクラスターに位置している．興味深いことに*Sthaphylococcus aures*と正の相関を示す細菌種は少ない（4種のみである）だけでなく，*Sthaphylococcus aures*が属するクラスターは他のクラスターと負の相関を示すこともない．この結果から眼表面の細菌叢を正常に保とうとしても*Sthaphylococcus aures*は単独で増加する事が予想される．AKCが再発しやすい疾患であることからも非常に興味深い．

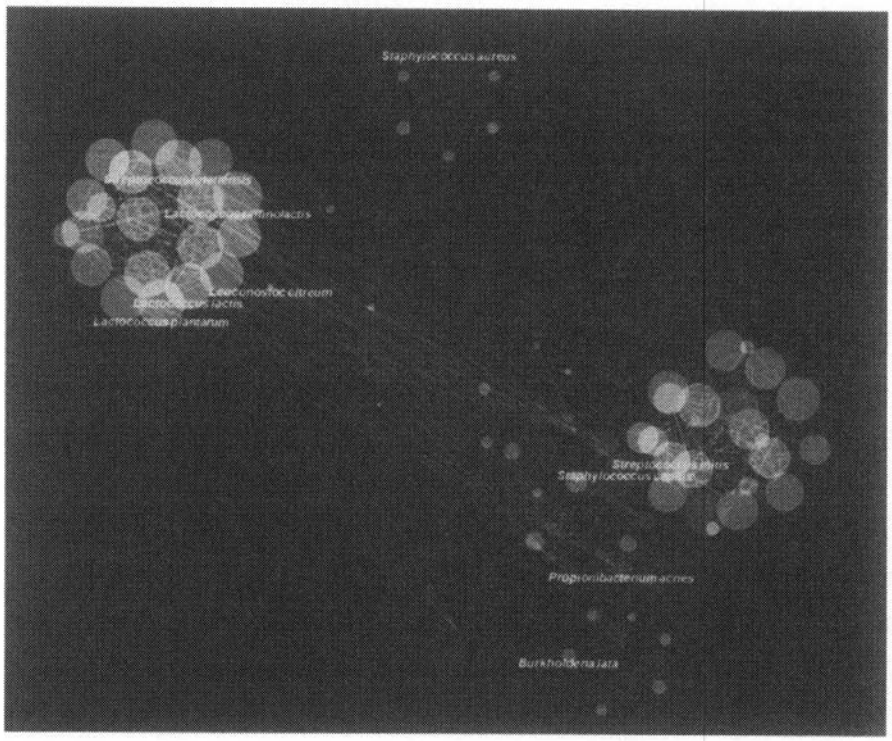


図17: 涙液常在菌叢の自己相関解析を基に作成されたネットワーク解析
ネットワークモデルはサイトスケープによって作成した．一つのノードは一つの細菌種を示す．青のノードは乳酸菌属を示す （*Leuconostoc, Streptococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Lactococcus, Weissella, Abiotrophia, Granulicatella*）．黄色のノードは眼病に関わる病原性細菌の属を示す（*Neisseria, Staphylococcus, Propionibacterium, Pseudomonas, Corynebacterium*）．ピンクのエッジは有意な正の相関を示す．グレイのエッジは有意な負の相関を示す．ノードのサイズはノードの正の相関の繋がりの多さに比例している．

涙液からの乳酸菌の培養

本研究で用いた乳酸菌特異的なプライマーはすでに先行研究によって報告されている物であるが（Rinttila *et al.*, 2004），単離した細菌株をテンプレートにPCRを行ったもののうち，5株が乳酸菌特異的なプライマーで増幅が確認できたにもかかわらず，単離された5株すべてがブドウ球菌であった．表9に示すのが乳酸菌特異的プライマーの配列とそれに対応する今回シークエンスされたブドウ球菌種のDNA配列である．*Staphylococcus epidermidis*についてはリバースプライマーの3'側の1塩基，*Staphylococcus saccharolyticus*についてはフォワードプライマーとリバースプライマー両方の3'側の1塩基にミスマッチが確認できた．プライマーの3'側の配列がアニーリングされていないとPCRの増幅は理論的には起こりにくい．その点を考慮して本研究で用いたプライマーは乳酸菌特異的として設計されていると考えられるが，今回単離したブドウ球菌株の16Sの配列にたまたま変異が入っていた可能性や，DNA3'側の配列不一致を超えてDNAの伸長反応が起こってしまった可能性を考えると，今回用いた乳酸菌のプライマーは涙液中の乳酸菌の単離培養に向けての単離株のスクリーニングに適さなかったことが問題点として考えられる．

表9：乳酸菌特異的プライマーとシークエンスされたブドウ球菌の相同配列とミスマッチ

Forward primer	
Specific primer (Lab F362)	5' -AGCAGTAGGGAATCTTCCA- 3'
Staphylococcus epidermidis	5' -AGCAGTAGGGAATCTTCCA- 3'
Staphylococcus saccharolyticus	5' -AGCAGTAGGGAATCTTCCG- 3'
Riverse primer	
Specific primer (Lab R677)	5' -CACCGCTACACATGGAG- 3'
Staphylococcus epidermidis	5' -CACCGCTACACATGGAA- 3'
Staphylococcus saccharolyticus	5' -CACCGCTACACATGGAA- 3'

赤字で示した部分がミスマッチ部分

定量PCRによる乳酸菌の定量

定量PCRによって*Lactococcus lactis*のDNA以外に涙液から乳酸菌のDNA配列の増幅を得ることはできなかった．16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法による涙液中の細菌叢の解析によると細菌叢の乳酸菌の中で最も多いポピュレーションを示したのは*Leuconostoc citreum*である．しかし，今回涙液から*Leuconostoc citreum*のDNAの存在が確認できなかったことについては以下の理由が挙げられる．*Leuconostoc citreum*特異的なプライマーを先行研究より取得したが，その増幅長はおよそ1500bpである（Bounaix *et al.*, 2010）．定量PCRでは70-200bpほどのPCR断片の定量に優れており，長いPCR断片を定量することに適していない．今回定量PCRの伸長反応時間を90秒と長く設定したが，DNAの定量を行うに至らなかった．*Leuconostoc citreum*の特異的なプライマーが定量PCRに適したものでなかったために，涙液中に*Leuconostoc citreum*のDNAが存在しても，涙液中の細菌は微量であるため定量の検出限界を大きく下回ってしまうことが予想される．*Leuconostoc citreum*のDNA配列の定量PCRを用いた実験およびその為の特異的プライマーの作成は今日まで行われていない．その為，涙液から*Leuconostoc citreum*のDNA配列の定量PCRを行う場合，新たに定量PCRに適した短い配列を増幅目的とした特異的なプライマーを設計する必要がある．

おわりに

涙液中細菌叢の網羅的解析から，健康状態に関わらずアクネ菌や乳酸菌が涙液細菌叢の大部分を占め

ることが明らかとなった．従来までの報告では眼にいる細菌は皮膚常在菌と同様であるとされてきた．本邦によって眼に乳酸菌が常在する可能性を示したが，培養を介さない16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法による網羅的な細菌叢解析の手法によって得られた結果であると考えている．一方で結膜嚢から16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法で解析された健常者の眼細菌叢の報告からは乳酸菌は確認されていない（Dong *et al.*, 2011）．乳酸菌が眼に常在する場合，いかなる場所に定着しているかを議論することは今後重要である．本邦は涙液から乳酸菌を培養することに失敗した．今後涙液からの乳酸菌の培養を介して乳酸菌が生菌として眼に存在することの証明が期待される．

本研究では，乳酸菌が炎症の起きていない健康な眼を代表する涙液常在菌であることを示した．さらに乳酸菌種は角結膜の炎症によって増加するような病原菌と逆相関することを示した．今後乳酸菌の涙液常在菌「叢」の中での機能が明らかにされる事が注目される．乳酸菌の存在が眼の炎症を悪化させる因子になる病原性細菌に対してのバリアになっている事が明らかになれば，涙液のもつ外来の微生物に対する防御機能の新たな要因として乳酸菌の存在を提示することができ，非常に興味深い．

メタボローム解析結果からはアミノ酸の割合がAKC患者の炎症度と関係している可能性が示唆された．炎症とアミノ酸の関係については従来から議論されていたが，アミノ酸のみならずUreaやo-Acethylcarnitineの涙液中濃度もAKC患者の炎症度と関係する可能性を示し，アミノ酸だけでなく様々な低分子化合物が炎症度を表現し得ることを示した．代謝産物の網羅的解析による涙液中の低分子化合物動向を知ることは眼科領域における炎症メカニズムを説明する手法として有効であるかもしれない．

涙液に含まれる低分子化合物・細菌叢についての知見は乏しいが，メタボロームおよび16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法など網羅的な手法による涙液中代謝物，細菌叢の理解によってその一端を明らかにすることができた．今後もマルチオミクスの手法を駆使し，涙液の神秘が解明されていくことに期待する．

謝辞

先端生命科学研究会で研究を行うに当たり，お世話になりました多くの方々に感謝の意を述べさせて頂きます．皆様のお名前は慶應義塾の慣習に習い，また親しみと感謝の意を込めて「さん」付けで表記させて頂きます．男友達については不自然なため「君」付けになることはお許しください．

まずお礼を申し上げたいのは福田真嗣さんであります．研究の御指導から生活の御指導まで大変お世話になりまして感謝してもしきれないというのが正直な気持ちであります．初めの出会いは分子生物学会において奥様である福田紀子さんと共に私のポスターを見に来てくださったことだったと思います．にも関わらずIAB赴任前に冨田さんとご一緒させていただいた食事の席ではすっかりお会いしたことを忘れておりまして，「記憶にないです」と発言しましたところ「失礼でしょ」と隣にいた冨田さんに頭を殴られました．その節は大変失礼をいたしました．最もそれは福田さんが実年齢よりも大変若く見えるためにIABに准教授として赴任される福田さんと人物が一致しなかった為であります．もしかしたらこの弁解こそが重ねて失礼なのかもしれませんが，福田さんが研究に対しても私生活に対しても少年のような夢を持っておられるからだと思います．福田さんに出会わなければ研究の楽しさを見失ったまま修士卒業を迎えていたかもしれません．本当にありがとうございました．日々無感動な時間が流れるこの世界が福田さんの行う研究を通じて少しでも夢に満ちたものに変わっていくことを強く希望いたします．

学士生活に引き続き修士生活においても村上慎之介君，亀崎圭太君にお世話になりました．村上君については腐れ縁といった感じです（悪い意味ではなく）．村上君は日々の暮らしをより豊かで楽しい生活にする能力があると思います．それも村上君特有の人生経験から来るものであり，安心感のある創造を行う事が出来るのは村上君の才能だと思います．そういった意味で村上君は研究者に向いている

と思いますので，今後もこつこつ知識を積み重ねながら研究に勤しんでください．そして何か面白い発見があったら研究から身を引いた私にいつものようにわかりやすく語り聞かせてくれればうれしく思います．亀崎圭太君とは「ウェルネス飯」「ラーメン」仲間です．最近では大場春佳さんという非常に変わった方も仲間に入るようになりましたが，「ウェルネス飯」という文化を正しく継承することができるのは亀崎圭太君他にありません．これからもお肉をよく食べ，福田さんの下でよく学び，亀崎君特有の人間性を磨いていってください．あと彼女作ってください，亀崎君にそれを望んでいる人は結構います．

医学部，共同研究関連では藤島浩さん・坪田一男さんにも大変お世話になりました．これらの方々を通じて分子生物学の考え方と医学の考え方の両面の素晴らしさを比較しながら実感できたことは私の学士・修士生活でかけがえのない経験でした．これからもお世話になることもあるかもしれませんが，よろしくお願いいたします．

最後に冨田勝さんにお礼を申し上げたいと思います．高校生時代から私の研究を見守ってくださいました．私は高校生がバイオ研究に触れるSBPというイベントの一期生として参加しましたが，初めにお話ししたのはその面接の時でした．非常に疲れておられたのか，第一印象は非常に怖い方なのかと感じておりましたが，プログラムの中で研究や人生論などを話す姿を見てそのイメージは消し飛びました．冨田さんの人生に対する考えは非常に論理的かつユニークであり，冨田さんから学んだ事は今までの人生だけでなく，これからの人生にも大いに生かされると考えます．私自身大変不出来な生徒であり，失礼なことも致しましたことをお詫びいたします．最近ではSBPのOBと冨田さんが集まる機会がありました．そこでおっしゃられた「普通の大人にはなるな」という言葉を胸に，残りの人生を精進していこうと思います．冨田さんにしていただいたことは感謝してもしきれません．今までありがとうございました．

参考文献

Stahl, J. L. and Barney, N. P. (2004) Ocular allergic disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. **4**, 455-459

Zhoul. and Beuerman,R.W. (2012) Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog.Retin.Eye Res.*, 31, 527-550.

Fukagawa, K., Saito, H., et al. (1994) Histamine and tryptase levels in allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. Cornea. **13**, 345-348

Abelson, M. B., Baird, R. S., et al. (1980) Tear histamine levels in vernal conjunctivitis and other ocular inflammations. Ophthalmology. **87**, 812-814

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

Tanaka, M., Dogru, M., et al. (2006) Quantitative evaluation of the early changes in ocular surface inflammation following MMC-aided papillary resection in severe allergic patients with corneal complications. Cornea. **25**, 281-285

Soga, T. and Heiger, D. N. (2000) Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. Anal Chem. **72**, 1236-1241

Sugimoto, M., Hirayama, A., et al. (2010) Differential metabolomics software for capillary electrophoresis-mass spectrometry data analysis. Metabolomics. **6**, 27-41

Saeed, A. I., Sharov, V., et al. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques. **34**, 374-378

Katragadda, S., Talluri, R. S., et al. (2005) Identification and characterization of a Na+-dependent neutral amino acid transporter, ASCT1, in rabbit corneal epithelial cell culture and rabbit cornea. Curr Eye Res. **30**, 989-1002

Puck, A., Liappis, N. and Hildenbrand, G. (1984) Ion exchange column chromatographic investigation of free amino acids in tears of healthy adults. Ophthalmic Res. **16**, 284-288

Ludolph-Hauser, D., Rueff, F., et al. (1999) [Tryptase, a marker for the activation and localization of mast cells]. Hautarzt. **50**, 556-561

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.

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.

Mircheff,A.K., Wang,Y., et al. (2005) Mucosal immunity and self-tolerance in the ocular surface system. *Ocul.Surf.*, 3, 182-192.

Grice,E.A., Kong,H.H., et al. (2009) Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324, 1190-1192.

Senok,A.C., Verstraelen,H., et al. (2009) Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst.Rev.*, (4), CD006289.

Rasiah,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.

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.

Schuster,S.C. (2008) Next-generation sequencing transforms today's biology. Nat.Methods, 5, 16-18.

Sundquist,A., Bigdeli,S., et al. (2007) Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing. *BMC Microbiol.*, 7, 108.

Inoue,Y., Usui,M., et al. (2008) Preoperative disinfection of the conjunctival sac with antibiotics and iodine compounds= a prospective randomized multicenter study. *Jpn.J.Ophthalmol.*, 52, 151-161.

Ravel,J., Gajer,P., et al. (2011) Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 108 Suppl 1, 4680-4687.

Schabereiter-Gurtner,C., Maca,S., et al. (2001) 16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, 42, 1164-1171.

Meisler,D.M., Palestine,A.G., et al. (1986) Chronic Propionibacterium endophthalmitis after extracapsular cataract extraction and intraocular lens implantation. *Am.J.Ophthalmol.*, 102, 733-739.

Roussel,T.J., Culbertson,W.W., et al. (1987) Chronic postoperative endophthalmitis associated with Propionibacterium acnes. *Arch.Ophthalmol.*, 105, 1199-1201.

Coden,D.J., Hornblass,A., et al. (1993) Clinical bacteriology of dacryocystitis in adults. *Ophthal.Plast.Reconstr.Surg.*, 9, 125-131.

Hauser C, Wuethrich B, Matter L, Wilhelm JA, Sonnabend W, Schopfer K. Staphylococcus aureus skin colonization in atopic dermatitis patients. Dermatologica 1985;170=35-9.
Hauser C, Wuethrich B, Matter L, Wilhelm JA, Schopfer K. The immune response to S. aureus in atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 1985;114=101-4.
Nakata K, Inoue Y, Harada J, et al. A high incidence of Staphylococcus aureus colonization in the external eyes of patients with atopic dermatitis. Ophthalmology 2000;107=2167-71.
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.
Millette,M., Dupont,C., et al. (2007) Partial characterization of bacteriocins produced by human Lactococcus lactis and Pediococccus acidilactici isolates. J.Appl.Microbiol., 102, 274-282.
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.
Del, Panno, MT. Morelli, IS. Engelen, B. Berthe-Corti, L. (2005) Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. FEMS Microbiol. Ecol. 53, 305-316
Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., et al. (2003) BioTechniques 34 , 374–378. pmid=12613259
De MAN. J. C., ROGOSA. M., et al. (1960) A MEDIUM FOR THE CMLTIVATION OF LACTOBACILLI. Journal of Applied Microbiology., 23, 130-135
Sakamoto,M., Takeuchi,Y., et al. (2003) Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J.Med.Microbiol.*, 52, 79-89.
Rinttila,T., Kassinen,A., et al. (2004) Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J.Appl.Microbiol.*, 97, 1166-1177.
Fujishima,H., Okada,N., et al. (2012) The role of Staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration.*Allergy*, 67, 799-803.
Tantilipikorn,P., Bunnag,C., et al. (2012) Staphylococcus aureus superantigens and their role in eosinophilic nasal polyp disease. *Asian Pac.J.Allergy Immunol.*, 30, 171-176.
Costello,E.K., Lauber,C.L., et al. (2009) Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science, 326, 1694-1697.
Bylesjo,M., Eriksson,D., et al. (2007) Data integration in plant biology: the OPLS-DA method for combined modeling of transcript and metabolite data. *Plant J.*, 52, 1181-1191.
Lozupone, C., and Knight, R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 71:8228-8235.
Bounaix,M.S., Gabriel,V., et al. (2010) Characterization of glucan-producing Leuconostoc strains isolated from sourdough.*Int.J.Food Microbiol.*, 144, 1-9.
Braat,H., Rottiers,P., et al. (2006) A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease.*Clin.Gastroenterol.Hepatol.*, 4, 754-759.
Odamaki,T., Yonezawa,S., et al. (2011) Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of Lactococcus species. *Lett.Appl.Microbiol.*, 52, 491-496.
Sorensen,F.H., Bone,J., et al. (1975) Urea production related to intraperitoneal inflammation. *Ann.Surg.*, 181, 409-411.
Nakatsukasa,M., Sotozono,C., et al. (2011) Amino Acid profiles in human tear fluids analyzed by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Am.J.Ophthalmol.*, 151, 799-808.e1.
Schabereiter-Gurtner,C., Maca,S., et al. (2001) 16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, 42, 1164-1171.
Vanlaere,E., Baldwin,A., et al. (2009) Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, Burkholderia contaminans sp. nov. and Burkholderia lata sp. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 59, 102-111.
Dong,Q., Brulc,J.M., et al. (2011) Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, 52, 5408-5413.