

自己免疫性膵炎モデルにおける腸内細菌叢と  
自然免疫応答の役割についての研究

いとう すぐる  
伊東 傑

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度

# 目 次

第1章 緒言	
第1節 自己免疫性膵炎	1
第2節 AIP と自然免疫反応	2
第3節 AIP と腸内細菌叢	3
第4節 本検討における仮説と目的	4
第2章 AIP モデルマウスの作製	
第1節 目的	5
第2節 方法	5
第1項 動物	5
第2項 細菌株	5
第3項 AIP モデルマウスの作製と検体採取	6
第4項 組織学的検討	6
第5項 mRNA の抽出および RT-PCR 法	7
第6項 統計学的処理	8
第3節 結果	8
第1項 組織学的所見	8
第2項 炎症性サイトカイン	9
第4節 小括	9
第3章 AIP モデルマウスの腸内細菌叢の検討	
第1節 目的	10
第2節 方法	10

第1項	動物	10
第2項	AIPモデルマウスの作製と盲腸便の採取	10
第3項	遺伝子学的な腸内細菌叢の解析	11
第4項	統計学的処理	11
第3節	結果	12
第1項	腸内細菌の多様性	12
第2項	腸内細菌の相対豊富度	13
第3項	LEfSe解析	13
第4節	小括	14
第4章 抗菌薬による腸内細菌叢の変化が膵臓の炎症に与える影響の検討		
第1節	目的	15
第2節	方法	15
第1項	動物	15
第2項	抗菌薬	15
第3項	抗菌薬投与と検体採取	16
第4項	膵炎の評価	16
第5項	統計学的処理	16
第3節	結果	17
第1項	組織学的所見	17
第2項	炎症性サイトカイン	17
第4節	小括	18

## 第5章 *Lactobacillus gasseri* (LG) の経口投与が膵臓の炎症に与える影響の検討

第1節 目的	19
第2節 方法	19
第1項 動物	19
第2項 <i>Lactobacillus gasseri</i>	19
第3項 LG投与と検体採取	20
第4項 膵炎の評価	20
第5項 統計学的処理	20
第3節 結果	21
第1項 組織学的所見	21
第2項 炎症性サイトカイン	21
第4節 小括	21

## 第6章 LGの腹腔内投与が膵臓の炎症に与える影響の検討

第1節 目的	22
第2節 方法	22
第1項 動物	22
第2項 <i>Lactobacillus gasseri</i>	22
第3項 LG投与と検体採取	23
第4項 膵炎の評価	23
第5項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析	23
第6項 統計学的処理	24
第3節 結果	24
第1項 組織学的所見	24
第2項 炎症性サイトカイン	24

第3項 腸内細菌の多様性	25
第4項 LEfSe解析	25
第4節 小括	26
第7章 細菌の菌体成分が <i>in vitro</i> で腹腔マクロファージに与える影響の検討	
第1節 目的	27
第2節 方法	27
第1項 動物	27
第2項 腹腔マクロファージの回収および培養方法	27
第3項 腹腔マクロファージにおける大腸菌刺激試験	28
第4項 腹腔マクロファージにおける LG 刺激試験	28
第5項 腹腔マクロファージにおける細菌の構成成分別の刺激試験	28
第6項 統計学的処理	29
第3節 結果	29
第1項 大腸菌刺激によるサイトカイン発現と LG 添加による変化	29
第2項 TLR ligand による炎症抑制効果の検討	30
第4節 小括	30
第8章 総括	31
第9章 考察	32
第10章 結論	37
謝辞	38

略語一覽	39
附記	41
参考文献	42
図表	50

# 第1章 緒言

## 第1節 自己免疫性膵炎

自己免疫性膵炎 (Autoimmune pancreatitis : AIP) は本邦から提唱された慢性膵炎であり(1, 2), 1型 AIP と 2型 AIP の 2 亜型に分類される. 本邦では 1型 AIP が主であり, 高齢の男性に多い. 病理学的には, 膵管周囲を中心とする著明なリンパ球や形質細胞の浸潤, 特徴的な花筵状の線維化 (storiform fibrosis), 閉塞性静脈炎、多数の IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (LPSP) を呈し, 硬化性胆管炎, 硬化性涙腺炎・唾液腺炎, 後腹膜線維症などをしばしば合併するため IgG4 関連疾患の膵病変と考えられている. 一方, 2型 AIP は血清 IgG4 の上昇などの血液免疫学的所見に乏しく, idiopathic duct-centric pancreatitis (IDCP) と好中球上皮病変 (granulocytic epithelial lesion : GEL) を特徴とし, 欧米に多い. また 1型 AIP と比べ若年層に発症し, 膵外病変として潰瘍性大腸炎を合併する(3, 4).

AIP は国際コンセンサス診断基準が提唱された 2011 年以降(4), 罹患患者数は増加しており, ステロイド治療が著効することから何らかの免疫反応の関与が想定されているが, その病態はいまだに不明な点が多い. 近年, AIP の病態解明に関して様々な報告がなされている. 岡崎らは AIP の機序として, 遺伝的因子を背景に環境因子による免疫学的因子 (自然免疫・獲得免疫) の異常により発症, 再燃, 増悪するのではないかと推測している. また誘導と進行の二相性メカニズムがあり, 自己抗原や微生物を含む特異抗原に対する初期反応により炎症性サイトカインを放出する Th1 型の免疫反応が起こり, その後に IgG や IgG4, 自己抗体を産生する Th2 型の免疫反応が病態に関与するのではないかと報告している(5).

## 第2節 AIP と自然免疫反応

抗原提示細胞（マクロファージ・樹状細胞）や上皮細胞が担う自然免疫反応は獲得免疫の誘導にも関連しており，近年 AIP の発症と自然免疫反応の関係が報告されている．AIP 患者の膵臓組織では Toll-like receptor 7（TLR7）陽性の M2 マクロファージの浸潤が多く(6)，AIP 患者の膵臓や血液中の好塩基球が増加している(7)．また AIP モデルマウスの膵臓では形質細胞様樹状細胞（Plasmacytoid dendritic cells：pDC）が多く集積しており，Interferon  $\alpha$ （IFN $\alpha$ ）の産生が著明に増加している(8)など，自然免疫に関わる細胞の AIP への関与が考えられる．

また，AIP と自然免疫反応の関連を支持するように，様々な微生物由来成分を誘導因子として用いた AIP モデルマウスが報告されている．具体的には，MRL/Mp マウスに TLR3 リガンドである Poly (I:C)（Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt）を腹腔内に反復投与するようなモデル(9)，C57BL/6 マウスに加熱処理をした大腸菌（*Escherichia coli*：E.coli）の死菌体を腹腔内に反復投与するモデル(10)，Interleukin-10（IL-10）ノックアウトマウスにリポポリサッカライド（Lipopolysaccharide：LPS）を腹腔内に反復投与するモデル(11)などがある．

腹腔マクロファージは腹腔内の自然免疫および獲得免疫に関与する腹膜細胞由来の細胞種である．腹腔マクロファージは炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインを大量に放出する能力があるため，自然免疫細胞や炎症性 T 細胞の分化を制御する上で重要な役割を担っている(12)．また膵炎マウスでは，全身性炎症反応症候群と代償性抗炎症反応症候群が並行して発症しており(13)，その中心的な役割を担っているのが腹腔マクロファージである．しかし，AIP モデルにおける役割はまだ不明な部分が多い．



### 第3節 AIP と腸内細菌叢

自然免疫反応の誘導には、TLR や NOD-like receptor (NLR) などのパターン認識受容体が重要である。腸内細菌はパターン認識受容体の最大の刺激因子であることから、腸内細菌叢に対する免疫反応が AIP の病態に関与している可能性がある。

また近年、膵臓疾患と腸内細菌叢の関係についての報告もみられる(14, 15)。膵臓の分泌物であるエラスターゼの濃度は腸内の微生物属の存在量や血漿の代謝物の変化に相関しており、腸内細菌叢の形成に膵臓の機能が影響している(16)。また慢性膵炎では腸内細菌の多様性の低下により抗菌ペプチドの産生が抑制され腸管バリア機能が低下し、炎症性の細菌や毒素が腸管から膵臓に移動し、膵臓での炎症や線維化を引き起こすのではないかという報告もあり(17)、腸内細菌叢の変化が疾患の発症の原因になっている可能性がある。

また IgG4 関連疾患や AIP と腸内細菌との関連についてもいくつか報告がある。IgG4 関連疾患患者の腸内細菌では、*Clostridium* や *Streptococcus* が増加しており、*Alistipes* や *Bacteroides* が減少している(18)。AIP 患者と他の慢性膵炎患者の腸内細菌叢を比較すると、AIP 患者と比べて慢性膵炎患者では *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Clostridium* の割合が高い(19)。またステロイド治療を行った AIP 患者の寛解前後の腸内細菌叢を比較すると *Klebsiella* が減少している(20)。モデルマウスにおいても、*Bifidobacteriales* の増加がみられ、抗菌薬投与により膵炎が改善し、AIP マウスの便を移植することで、膵臓の炎症が増悪したとの報告がある(21)、また、AIP モデルマウスに Dextran Sulfate Sodium (DSS) を投与して腸管バリア機能を破綻させることで、特定の菌種 (*Staphylococcus sciuri*) の膵臓への移行を通じて AIP が悪化するという報告もあり(22)、腸内細菌叢が AIP の病態に関与することが示されている。ヒト AIP に関して、現時点で乳酸菌などの腸内細菌投与が病態改善に寄与したという報告はないが、前述のように腸

内細菌叢との関連は報告されており(23), 腸内細菌叢の変化が病態改善に繋がる可能性がある。

#### 第4節 本検討における仮説と目的

前述のように, AIP において腸内細菌叢との病態への関連についての報告はされているが, 乳酸菌など腸内細菌を用いた病態への影響についてはあまり検討されていない。また多くの AIP モデルが腹腔内に菌体成分を投与することで発症していることから, 自然免疫に関与する腹腔マクロファージの作用が影響している可能性を考慮し, 本研究では大腸菌を腹腔内に反復投与することで作製される AIP モデルマウスを用いて, AIP 発症機序を検討することを目的とした。特にモデルマウスにおける腸内細菌叢の変化と抗菌薬投与による腸内細菌の減少が病態に与える影響について検討した。また, 乳酸菌投与による病態への影響について検討を行った。

## 第2章 AIPモデルマウスの作製

### 第1節 目的

AIPの病態について検討を行うため、AIPモデルマウスの作製を行った。現在までに様々な微生物由来抗原を用いたAIPモデルマウスが報告されている(9-11, 21)。その中で加熱処理をした大腸菌を腹腔内に反復投与することで作製できるモデルマウスに着目した(10)。このモデルマウスでは、膵臓及び唾液腺に炎症を認め、ヒトのAIP同様、IgGや抗炭酸脱水素酵素抗体、抗核抗体などの自己抗体の上昇を認め、AIPモデルマウスとして確立されている。

このモデルマウスを用いて、膵臓の炎症を組織病理学的に検討し、膵臓組織の炎症性サイトカイン mRNA (Messenger ribonucleic acid) の発現を調べた。

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

動物は6週齢の雌性C57BL/6Jマウス（日本クレア，東京，日本）を使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号19069, 21058）。マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った。

#### 第2項 細菌株

AIPの誘導には、非病原性大腸菌ATCC (American Type Culture Collection) 25922株 (JCM, 理研BRC, つくば, 日本) を使用した。0.5%NaClを含む栄養ブロス中で好氣的に激しく振盪しながら37°C, 18時間培養した。菌体を遠心 (2000 g, 5 min, 15-25°C) し、上清を廃棄しリン酸緩衝生理食塩水

(phosphate-buffered saline : PBS ; pH 7.4) で2回洗浄した。80°Cで30分間加熱処理した後、PBSに再懸濁した。栄養寒天培地上で37°C、72時間培養し、完全滅菌を確認した。

### 第3項 AIPモデルマウスの作製と検体採取

6週齢の雌性 C57BL/6 に熱処理した大腸菌 (ATCC 25922,  $10^7$  CFU/PBS 200  $\mu$ L) を週に1回、8週間腹腔内投与した群を *E.coli* 群 (n = 10) とした。対照群として同様に PBS 200  $\mu$ L を腹腔内投与した群を PBS 群 (n = 10) とした。最終投与後1週間後に3種類の混合麻酔薬 (メドトミジン 0.3 mg/kg, ミダゾラム 4.0 mg/kg, ブトルファノール 5.0 mg/kg) を用いて深麻酔下で安楽死させ検体を採取し、膵臓の組織学的検討および膵中央部の各種サイトカイン mRNA 発現を RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) 法を用いて測定した。

また、菌株の異なる大腸菌 (ATCC 11775, JCM) を用いて同様の方法で作製したモデルマウスを ATCC 11775 群 (n = 5) とし、上記で使用した大腸菌 (ATCC 25922 群) と比較した。

### 第4項 組織学的検討

大腸菌および PBS の最終投与後1週間後に3種類の混合麻酔薬 (メドトミジン 0.3 mg/kg, ミダゾラム 4.0 mg/kg, ブトルファノール 5.0 mg/kg) を用いて深麻酔下で安楽死させ膵臓の検体を採取した。採取した組織検体は 10%ホルマリン中性緩衝液 (富士フィルム和光純薬) で固定した後パラフィンに包埋し、切片を作製した後ヘマトキシリン・エオジン染色した。膵臓病変の病理組織学的評価は、光学顕微鏡下で行われた。各マウスの膵臓病変の重症度は、既報(24)を参考に grade 0 : 単核球の浸潤がなくほぼ正常な膵臓, grade

1：単核球の凝集および／または実質破壊を伴わない間質内への浸潤， grade 2：単核球浸潤を伴う局所的な実質破壊， grade 3：びまん性の実質破壊だが一部無傷の実質が残留， grade 4：臍島以外のほぼ全ての臍組織が破壊または脂肪組織で置換されている， の5段階で評価した．前項と同様に *E.coli* 群（n = 10） と PBS 群（n = 10） の2群で比較検討を行った．

#### 第5項 mRNAの抽出およびRT-PCR法

臍臓における mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて評価した．臍臓中央部の組織を採取し，RNAlater（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）へ浸漬した後， $-20^{\circ}\text{C}$  で保管した．組織のホモジナイズには MagNA Lyser（Roche, Basel, Switzerland）を 6,500 rpm・50 秒の条件で使用した．ホモジナイズ後は RNeasy Mini Kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いて RNA を抽出し，分光光度計（Gene Quant; GE Healthcare, Chicago, IL, USA）で濃度を測定した後，そのうち 1.5  $\mu\text{g}$  を DNase・RNase free water（Thermo Fisher Scientific）で希釈して 14  $\mu\text{L}$  の水溶液に調製し逆転写反応に使用した．逆転写反応は RNA 水溶液 14  $\mu\text{L}$ ，Random Primer 1.25  $\mu\text{L}$ （タカラバイオ，大津，日本），SuperScript II Reverse Transcriptase 1  $\mu\text{L}$ （Thermo Fisher Scientific），dNTP Mixture 0.625  $\mu\text{L}$ （タカラバイオ），RNasin 0.625  $\mu\text{L}$ （Promega, Madison, WI, USA），dithiothreitol（DTT）2.5  $\mu\text{L}$ （Thermo Fisher Scientific），First Strand Buffer 5  $\mu\text{L}$ （Thermo Fisher Scientific）を混合した後，Gene Amp PCR System 9700（Thermo Fisher Scientific）を使用して行った．反応条件は  $25^{\circ}\text{C}$  15 分， $42^{\circ}\text{C}$  15 分， $48^{\circ}\text{C}$  30 分， $20^{\circ}\text{C}$  15 分とし，終了後に complementary deoxyribonucleic acid（cDNA）を得た．

cDNA を得た後，RT-PCR 法を行った．1 検体あたり cDNA 3  $\mu\text{L}$ （9 ng），プローブ 2  $\mu\text{L}$ ，qPCR Mastermix（Eurogentec, Seraing, Belgium）5  $\mu\text{L}$  を混合して

384 well プレートに配置し, triplicate とした. プローブは内在性コントロールとして mouse Gapdh (Mm4331182 : Thermo Fisher Scientific) を設定し, mouse Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Mm00443258 : Thermo Fisher Scientific) , mouse IFN $\gamma$  (Mm00801778 : Thermo Fisher Scientific) , mouse IL-1 $\beta$  (Mm01336189 : Thermo Fisher Scientific) , mouse IL-10 (Mm00439616 : Thermo Fisher Scientific), mouse IL-12b (Mm01288989 : Thermo Fisher Scientific) を使用した. 装置は Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System, SDS software version 2.4 (Thermo Fisher Scientific) を使用し, 条件は 50°C 2 分, 95°C 10 分の後, 95°C 15 秒, 60°C 1 分を 40 サイクル繰り返す設定とした. 結果の解析には RQ Manager 1.2.2 (Thermo Fisher Scientific) を使用し,  $\Delta\Delta C_t$  法によって評価した. 前項と同様に *E.coli* 群 (n = 10) と PBS 群 (n = 10) の 2 群で比較検討を行った.

#### 第 6 項 統計学的処理

各データは平均値  $\pm$  標準誤差で表した. 各群間の比較分析では Levene の等分散性検定を用いて, データの同時性を調べた. 等分散の群間では Student's t-test を用いた. 統計解析には, 両側検定 p 値 0.05 未満を有意差ありとした.

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 組織学的所見

各群の代表的な組織標本を図 1A に示す. PBS 群では膵実質は保たれており, 膵管周囲の炎症細胞の浸潤はあまり認めなかった. 一方 *E.coli* 群 (ATCC 25922) では膵管周囲に炎症細胞浸潤を認めた. また, 膵の線維化を伴う小葉の萎縮, 一部脂肪織置換があり膵炎の所見を認めた. 膵炎重症度の組織学的グレードによる評価では (図 1B), PBS 群が  $0.20 \pm 0.13$ , *E.coli* 群が  $2.70 \pm 0.15$

と *E.coli* 群で有意にグレードが高かった (PBS 群 vs *E.coli* 群,  $p < 0.001$ ). 組織学的所見では、リンパ球や形質細胞の浸潤だけでなく、好中球浸潤や好中球上皮病変に似た所見など 2 型 AIP の特徴も観察された。一方、1 型 AIP に特徴的な唾液腺炎などの腭外病変も観察された。

また菌株の異なる大腸菌 (ATCC11775) を用いた ATCC11775 群では、腭管周囲や小葉間に炎症細胞浸潤を伴う線維化を認めるが、腭実質の脱落はあまり認めなかった (図 1C). 炎症重症度の組織学的グレードによる評価では (図 1D), ATCC 11775 群が  $1.5 \pm 0.22$ , ATCC 25922 群が  $2.8 \pm 0.37$  と ATCC 25922 群で有意にグレードが高かった ( $p = 0.043$ ).

## 第 2 項 炎症性サイトカイン

両群における炎症性サイトカインの mRNA の発現量を図 1E に示す.

IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  いずれの発現量も *E.coli* 群で有意に多かった (PBS 群 vs *E.coli* 群 : IFN $\gamma$ ,  $p = 0.001$  ; TNF $\alpha$ ,  $p = 0.017$  ; IL-1 $\beta$ ,  $p = 0.023$ ).

## 第 4 節 小括

大腸菌 (ATCC 25922) の死菌体をマウスの腹腔内に反復投与することで、腭臓に炎症の所見を認め、腭臓の炎症性サイトカイン mRNA 発現も亢進した。既報(10)と同様に AIP モデルマウスが作製できていると考えられた。しかしながら、菌株の異なる大腸菌 (ATCC 11775) では炎症の程度が軽度であったため、以下の検討では大腸菌 (ATCC 25922) を使用することとした。

## 第3章 AIP モデルマウスの腸内細菌叢の検討

### 第1節 目的

近年、膵疾患と腸内細菌叢の関係についての報告がなされている(17, 23). 実際に AIP 患者では他の慢性膵炎患者と腸内細菌叢が異なっており, ステロイド治療による AIP の寛解後に *Klebsiella* が減少するなど, AIP の病態に腸内細菌叢の攪乱が関与していると報告されている. そのため, 前章で作製した AIP モデルマウスを用いて, 通常のマウスとの腸内細菌叢の変化について比較検討した.

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

動物は6週齢の雌性 C57BL/6J マウス (日本クレア) を使用した. 実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 19069, 21058). マウスの飼育は, 防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い, 通常のマウス飼料および自由飲水で行った.

#### 第2項 AIP モデルマウスの作製と盲腸便の採取

6週齢の雌性 C57BL/6 に熱処理した大腸菌 (ATCC 25922,  $10^7$  CFU/PBS 200  $\mu$ L) を週に1回, 8週間腹腔内投与した群を *E.coli* 群 (n=5) とした. 同様に PBS 200  $\mu$ L を腹腔内投与した群を control 群 (n=5) とした. 最終腹腔内投与の1週間後にマウスを安楽死させ, 腸内細菌の遺伝子解析用に新鮮な盲腸便を採取し解析までの間 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した.



### 第3項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析

細菌叢の分析には、20mg の糞便サンプルを使用した。DNA 抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて、既報(25)のプロトコル Q を参考に実施した。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域の増幅とインデックス PCR は、Nextera XT index kit v2 (Illumina, San Diego, CA, アメリカ合衆国) を用いて、製造者の推奨に従って行った。ライブラリーは、MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) (Illumina) を用いて MiSeq (Illumina) で配列決定した。シーケンシングにより得られた FASTQ を QIIME 2 を用いて解析した。また、LEfSe 解析は Galaxy/Hutlab アルゴリズムを用いて行った。

### 第4項 統計学的処理

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。腸内細菌の多様性について Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2) を用いて解析したデータを基に評価を行った。β 多様性については Permutational analysis of variance (PERMANOVA) を使用し、PERMANOVA では第1種の過誤を補正した q 値を用い、q 値 0.05 未満を有意差ありとした。腸内細菌の相対豊富度については Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて評価を行った。また、control 群と E.coli 群の間で有意差のある微生物分類群を特定するために、群間比較解析として LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) 解析を行い、LDA (Linear Discriminant Analysis) スコアが 3.0 以上の菌種を抽出した。

### 第3節 結果

#### 第1項 腸内細菌の多様性

control 群, *E.coli* 群の二群間における腸内細菌の多様性の比較を行った.  $\alpha$  多様性の結果を図 2A に示す. Chao1 index を用いた比較では, *E.coli* 群は control 群と比較して有意に値が低かった (control 群:  $417.1 \pm 19.8$ , *E.coli* 群:  $351.7 \pm 11.74$ ,  $p = 0.016$ ). また, Shannon index を用いた比較でも, *E.coli* 群は control 群と比較して有意に値が低かった (control 群:  $6.93 \pm 0.05$ , *E.coli* 群:  $6.63 \pm 0.05$ ,  $p = 0.016$ ). さらに, Simpson index を用いた比較においても, *E.coli* 群は control 群と比較して有意に値が低かった (control 群:  $0.985 \pm 0.00088$ , *E.coli* 群:  $0.980 \pm 0.00122$ ,  $p = 0.032$ ).

$\beta$  多様性の Unweighted Unifrac 距離解析による評価では (図 2B), control 群内 ( $0.335 \pm 0.022$ ) と *E.coli* 群内 ( $0.404 \pm 0.028$ ) の距離よりも control 群 - *E.coli* 群間 ( $0.490 \pm 0.018$ ) の平均 Unifrac 距離が有意に高かった ( $q = 0.017$ : control 群内 vs control 群 - *E.coli* 群間,  $p < 0.001$ ; *E.coli* 群内 vs control 群 - *E.coli* 群間,  $p = 0.039$ ) 主座標分析 (Principal Coordinate Analysis: PCoA) を行ったところ, *E.coli* 群は control 群と異なる分布を示した (図 2C).

さらに, Weighted UniFrac 距離解析を行ったところ (図 2D), control 群内 ( $0.071 \pm 0.006$ ) と *E.coli* 群内 ( $0.069 \pm 0.005$ ) よりも control 群 - *E.coli* 群間の平均 Unifrac 距離 ( $0.104 \pm 0.003$ ) が有意に高かった ( $q = 0.010$ : control 群内 vs control 群 - *E.coli* 群間,  $p < 0.001$ ; *E.coli* 群内 vs control 群 - *E.coli* 群間,  $p < 0.001$ ). また, 主座標分析 (PCoA) を行ったところ, *E.coli* 群は control 群と異なる分布を示した (図 2E). これらの結果より, 両群の細菌叢構造が異なると考えられた.

## 第2項 腸内細菌の相対豊富さ

腸内細菌の相対豊富さの比較を行ったところ、門レベルの解析では（図2F）、*Firmicutes* が control 群では  $57.6 \pm 1.7\%$ であったのに対し、*E.coli* 群では  $54.1 \pm 2.6\%$ と低かった（ $p = 0.04$ ）。また、*Actinobacteriota* は control 群が  $1.8 \pm 0.4\%$ であったのに対し、*E.coli* 群では  $3.6 \pm 0.4\%$ と高かった（ $p < 0.01$ ）

科レベルにおいて存在比率 1%以上の 14 科においての検討では、7 種類の菌で有意な占有率の変化を認めた。*E.coli* 群で増加した菌としては *Erysipelotrichaceae*（control 群： $9.34 \pm 0.73\%$ 、*E.coli* 群： $13.28 \pm 0.79\%$ 、 $p = 0.009$ ）、*Eggerthellaceae*（control 群： $1.28 \pm 0.12\%$ 、*E.coli* 群： $1.99 \pm 0.18\%$ 、 $p = 0.016$ ）、*Bifidobacteriaceae*（control 群： $0.48 \pm 0.08\%$ 、*E.coli* 群： $1.60 \pm 0.18\%$ 、 $p = 0.009$ ）であり、減少した菌としては *Prevotellaceae*（control 群： $1.55 \pm 0.19\%$ 、*E.coli* 群： $0.95 \pm 0.14\%$ 、 $p = 0.047$ ）、*Lactobacillaceae*（control 群： $9.76 \pm 1.50\%$ 、*E.coli* 群： $6.56 \pm 0.34\%$ 、 $p = 0.047$ ）、*Clostridiaceae*（control 群： $1.54 \pm 0.13\%$ 、*E.coli* 群： $0.00 \pm 0.00\%$ 、 $p = 0.005$ ）、*Ruminococcaceae*（control 群： $1.73 \pm 0.26\%$ 、*E.coli* 群： $0.60 \pm 0.13\%$ 、 $p = 0.009$ ）の有意な減少を認めた（図2G）。

## 第3項 LEfSe 解析

LEfSe 解析はメタゲノムマーカーを発見するための手法であり、複数条件下の微生物群集データを対象に、集団の違いを説明できる微生物種や系統などを統計学的に抽出する解析法である。具体的には、Kruskal-Wallis sum-rank 検定により対象の群に関して有意な存在量の差を持つ菌種を検出し、Wilcoxon rank-sum 検定を用いて生物学的一貫性を調査し、最後に LDA を用いて各特徴の効果量を推定している(26)。比較する群間の違いに相関する微生物

物群を抽出し、有意差のあった系統をクラドグラムで図示した（図 2H）。また、LEfSe 解析の結果で特に差があった菌種（LDA スコアが 3.0 以上）を図 2I に示す。科レベルにおいて LDA スコアが高値を示したのは、*E.coli* 群では *Erysipelotrichaceae*, *Bifidobacteriaceae*, Control 群では *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* であった。

#### 第 4 節 小括

盲腸便中の腸内細菌を次世代シーケンサーによる遺伝学的な解析をした結果、AIP モデルマウスにおいて腸内細菌の多様性が低下すること、また、その腸内細菌叢が通常のマウスと異なることが確認された。また群間比較解析である LEfSe 解析結果から、モデルマウスでは *Erysipelotrichaceae*, *Bifidobacteriaceae* が増加し、*Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* が減少しており、これらの微生物群が病態に関与している可能性が考えられた。

## 第4章 抗菌薬による腸内細菌叢の変化が膵臓の炎症に与える影響の検討

### 第1節 目的

AIP 患者では他の慢性膵炎患者と腸内細菌叢が異なっており、また病態に応じて腸内細菌叢が変化することが報告されている(17, 20). またモデルマウスにおいて、AIP モデルマウスの糞便移植や共生生活により、膵臓の炎症が増悪するとの報告もある(21). AIP モデルマウスでは腸内細菌の多様性が低下し、通常のマウスと異なる腸内細菌叢になることが確認できた. 腸内細菌叢が AIP の病態に関与した可能性があるが、膵炎に伴う外分泌機能の低下が腸内細菌叢を二次的に変化させた可能性もある. そこで、腸内細菌叢の変化が原因か結果かを明らかにするために、抗菌薬 (Antibiotics : ABx) 投与がモデルマウスの膵炎に与える影響について検討した.

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

動物は6週齢の雌性 C57BL/6J マウス (日本クレア) を使用した. 実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 19069, 21058). マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った.

#### 第2項 抗菌薬

腸内細菌を除去するため既報を参考にして、アンピシリン (富士フィルム和光純薬) を 1 g/L, バンコマイシン (富士フィルム和光純薬) を 0.5 g/L, ネ

オマイシン (LKT Labs. , St. Paul, MN, USA) を 1 g/L, メトロニダゾール (富士フィルム和光純薬) を 1 g/L となるように 4 種の抗菌薬を混合した水溶液を作製した.

### 第 3 項 抗菌薬投与と検体採取

6 週齢の雌性 C57BL/6 に熱処理した大腸菌 (ATCC 25922,  $10^7$  CFU/PBS 200  $\mu$ L) を週に 1 回, 8 週間腹腔内投与し, その間抗菌薬を混合した水溶液を自由飲水で投与した群を ABx-*E.coli* 群 (n = 10), 通常水を投与した群を water-*E.coli* 群 (n = 10) とした. また対照群として, 大腸菌の代わりに PBS を腹腔内投与し, 抗菌薬を混合した水溶液を自由飲水で投与した群を ABx-PBS 群 (n = 10), PBS を腹腔内投与し, 通常水を自由飲水した群を water-PBS 群 (n = 10) とした.

検体採取は前項と同様に大腸菌の最終投与後 1 週間後に 3 種類の混合麻酔薬を用いて深麻酔下で安楽死させ検体を採取し, 膵臓の組織学的検討および膵中央部の各種サイトカイン mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて測定した.

### 第 4 項 膵炎の評価

第 2 章同様, 膵臓の炎症の重症度について組織学的グレードで評価し, 炎症性サイトカイン mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて, ABx-*E.coli* 群, water-*E.coli* 群, ABx-PBS 群, water-PBS 群の 4 群で比較した.

### 第 5 項 統計学的処理

各データは平均値  $\pm$  標準誤差で表した. 群間の比較には, Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて評価を行った. また, 一元化分散分析 (one way analysis of variance : One-way ANOVA) を行い, 必要に応じて Turkey Kramer の

事後検定を行った。p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

### 第3節 結果

#### 第1項 組織学的所見

各群の代表的な組織標本を図 3A に示す。water-*E.coli* 群では、膵管周囲の炎症細胞浸潤や線維化、膵実質の脱落が著明であった。ABx-*E.coli* 群では膵管周囲の炎症細胞浸潤や線維化、一部に膵実質の脱落を認めるが water-*E.coli* 群と比較すると膵実質の脱落は抑制されていた。また water-PBS 群、ABx-PBS 群ではわずかに炎症細胞の浸潤を認めるが線維化や膵実質の脱落などの炎症所見は認めなかった。組織学的グレードによる評価では (図 3B)、water-PBS 群が  $0.00 \pm 0.00$ 、ABx-PBS 群が  $0.15 \pm 0.11$ 、water-*E.coli* 群が  $2.50 \pm 0.21$ 、ABx-*E.coli* 群が  $1.45 \pm 0.20$  であり、water-*E.coli* 群と比べて他の 3 群は有意に低値であった (water-PBS 群 :  $p < 0.01$ 、ABx-PBS 群 :  $p < 0.01$ 、ABx-*E.coli* 群 :  $p < 0.05$ )。

#### 第2項 炎症性サイトカイン

各群における炎症性サイトカインの mRNA の発現量を図 3C に示す。

IFN $\gamma$  の発現量は water-*E.coli* 群で有意に多かった (water-*E.coli* 群 vs water-PBS 群,  $p = 0.001$ )。また、ABx-*E.coli* 群は、water-*E.coli* 群と比べて有意に少なかった (ABx-*E.coli* 群 vs water-*E.coli* 群,  $p = 0.015$ )。TNF $\alpha$  の発現量も water-*E.coli* 群で有意に多く (water-*E.coli* 群 vs water-PBS 群,  $p < 0.001$ )、ABx-*E.coli* 群は、water-*E.coli* 群と比べて有意に少なかった (ABx-*E.coli* 群 vs water-*E.coli* 群,  $p < 0.001$ )。IL-1 $\beta$  の発現量についても water-*E.coli* 群で有意に多く (water-*E.coli* 群 vs water-PBS 群,  $p < 0.001$ )、ABx-*E.coli* 群は、water-*E.coli* 群と比べて有意に少なかった (ABx-*E.coli* 群 vs water-*E.coli* 群,  $p < 0.001$ )。

#### 第4節 小括

AIP モデルマウスに抗菌薬を混合した水溶液を自由飲水させると、通常水を飲水した群と比べて、膵臓の炎症は抑制され、膵炎の組織学的重症度も有意に低下した。また膵臓組織の炎症性サイトカイン mRNA 発現も有意に少なかった。以上から、このモデルの病態に腸内細菌叢が関与していると考えられた。



## 第5章 *Lactobacillus gasseri* (LG) の経口投与が膵臓の炎症に与える影響の検討

### 第1節 目的

AIP モデルマウスでは通常マウスと比べて腸内細菌叢が異なっており多様性も低下していた。また抗菌薬の投与により膵臓の炎症が抑制され、腸内細菌叢が AIP モデルマウスの膵臓の病態に関与している可能性が示された。

自己免疫疾患モデルでは probiotics による病態の改善が報告されているが(27-29), AIP についての報告はされていない。そのため、今回モデルマウスの腸内細菌叢で減少していた *Lactobacillales* 科の *Lactobacillus gasseri* (LG) を投与することで腸内細菌叢の変化を促し、膵臓の炎症抑制の効果を期待して、LG の経口投与によるモデルマウスの膵臓の炎症に与える影響について検討した。

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

動物は6週齢の雌性 C57BL/6J マウス（日本クレア）を使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 19069, 21058）。マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った。

#### 第2項 *Lactobacillus gasseri*

乳酸菌である *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 株を使用した。LG は MRS (de Man-Rorosa-Sharpe) 寒天培地で 37°C, 48 時間嫌気培養した。菌体を遠心 (2000 g, 5 min, 15-25°C) し、上清を廃棄しリン酸緩衝生理食塩水 (PBS;

pH 7.4) で2回洗浄した。80°Cで30分間加熱処理した後、PBSに再懸濁した。

### 第3項 LG投与と検体採取

6週齢の雌性 C57BL/6 に熱処理した大腸菌 (ATCC 25922,  $10^7$  CFU/PBS 200 $\mu$ L) を週に1回, 8週間腹腔内投与し, その間, 週3回, 加熱処理をした LG (ATCC 33323,  $10^9$  CFU/PBS 200  $\mu$ L) を経口投与した群を *E.coli*-LG 群 (n = 5), LGの代わりに同量の PBS 200  $\mu$ L を経口投与した群を *E.coli*-PBS 群 (n = 5) とした。

検体採取は前章と同様に大腸菌の最終投与後1週間後に3種類の混合麻酔薬を用いて深麻酔下で安楽死させ検体を採取し, 膵臓の組織学的検討および膵中央部の各種サイトカイン mRNA 発現を測定した。

### 第4項 膵炎の評価

第2章, 第2節, 第4項と同様, 膵臓の炎症について組織学的グレードで評価し, また膵臓組織の炎症性サイトカイン mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて, *E.coli*-LG 群, *E.coli*-PBS 群で比較した。

### 第5項 統計学的処理

各データは平均値  $\pm$  標準誤差で表した。各群間の比較分析では Levene の等分散性検定を用いて, データの同時性を調べた。等分散の群間では Student's t-test を用いた。p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

### 第3節 結果

#### 第1項 組織学的所見

両群の代表的な組織標本を図4Aに示す。いずれの群においても膵臓の線維化を伴う小葉の萎縮と膵管周囲を中心に炎症細胞浸潤があり、また一部膵実質の脱落を認めた。組織学的グレードによる重症度評価では(図4B)、*E.coli*-PBS群が  $2.5 \pm 0.35$ 、*E.coli*-LG群が  $2.5 \pm 0.27$  と有意差は認めなかった ( $p = 0.915$ )。

#### 第2項 炎症性サイトカイン

両群におけるサイトカインの mRNA の発現量を図4Cに示す。

IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインの発現量は両群で有意差はなかった (IFN $\gamma$  :  $p = 0.109$ , TNF $\alpha$  :  $p = 0.626$ , IL-1 $\beta$  :  $p = 0.775$ )。また IL-10 の発現量も両群で有意差はなかった ( $p = 0.064$ )。

#### 第4節 小括

AIPモデルマウスの作製時に、LGの死菌体を経口投与したが膵臓の炎症所見に変化はなく、膵臓の炎症性サイトカイン mRNA 発現も変化がなかった。

## 第6章 *Lactobacillus gasseri* (LG) の腹腔内投与が膵臓の炎症に与える影響の検討

### 第1節 目的

AIP モデルマウスに対して *Lactobacillus gasseri* (LG) の経口投与を行ったが、膵臓の炎症には有意な変化は見られなかった。誘導因子として大腸菌を腹腔内に投与しており、病態の発生源は腹腔内における免疫反応が想定されるが LG 経口投与では十分な量の菌体が腹腔内へ到達していない可能性を考えた。そこで LG を腹腔内投与することで、炎症への直接的な関与の有無が明らかになると考えた。本章では LG の腹腔内投与がモデルマウスの膵臓の炎症に与える影響について検討した。

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

動物は6週齢の雌性 C57BL/6J マウス（日本クレア）を使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 19069, 21058）。マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った。

#### 第2項 *Lactobacillus gasseri*

第5章、第2節、第2項目と同様に、乳酸菌として *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 株を使用した。

### 第3項 LG投与と検体採取

6週齢の雌性C57BL/6に熱処理した大腸菌（ATCC 25922,  $10^7$  CFU/PBS 200  $\mu$ L）を週に1回、8週間腹腔内投与し、大腸菌投与の前後2日に加熱処理をしたLG（ATCC 33323,  $10^7$  CFU / PBS 200  $\mu$ L）を腹腔内投与した群を *E.coli*-LG 群（n = 12）、LGの代わりに同量のPBS 200  $\mu$ Lを腹腔内投与した群を *E.coli*-PBS 群（n = 10）とした。また、大腸菌の投与はせず、LG（ATCC 33323,  $10^7$  CFU/PBS 200  $\mu$ L）およびPBS 200  $\mu$ lを週1回、8週間腹腔内投与した群をそれぞれLG群（n = 5）、PBS群（n = 10）とした。

検体採取は前項と同様に大腸菌の最終投与後1週間後に3種類の混合麻酔薬を用いて深麻酔下で安楽死させ検体を採取し、膵臓の組織学的検討および膵中央部の各種サイトカイン mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて測定した。また、腸内細菌の遺伝子解析用に新鮮な盲腸便を採取し解析までの間 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 第4項 膵炎の評価

第2章、第2節、第4項と同様に膵臓の炎症について組織学的グレードで評価し、*E.coli*-LG 群、*E.coli*-PBS、LG 群、PBS 群の4群で比較した。また膵臓組織の炎症性サイトカイン mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて、*E.coli*-LG 群、*E.coli*-PBS 群で比較した。

### 第5項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析

第3章で用いた盲腸便と *E.coli*-LG 群の盲腸便を、第3章、第2節、第3項と同様の方法で腸内細菌叢の分析を行い、比較検討した。

## 第6項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した。群間の比較には、Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて評価を行った。また、一元化分散分析 (one way analysis of variance : One-way ANOVA) を行い、必要に応じて Turkey Kramer の事後検定を行った。p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

腸内細菌叢に関しては、第3章、第2節、第4項と同様の方法で解析した。

## 第3節 結果

### 第1項 組織学的所見

両群の代表的な組織標本を図 5A に示す。*E.coli*-PBS 群では膵臓の線維化を伴う小葉の萎縮と膵管周囲に炎症細胞浸潤を認めた。しかし、*E.coli*-LG 群では、膵管周囲および小葉間に線維化、炎症細胞の浸潤を認めるが、小葉の萎縮および膵実質の脱落は抑制されていた。組織学的グレードによる重症度評価では (図 5B)、*E.coli*-PBS 群が  $2.60 \pm 0.27$ 、*E.coli*-LG 群が  $1.75 \pm 0.23$  と *E.coli*-LG 群で有意にグレードが低かった ( $p = 0.024$ )。また、PBS 群および LG 群では、膵臓の炎症の所見は認めなかった。

### 第2項 炎症性サイトカイン

両群における炎症性サイトカインの mRNA の発現量を図 5C に示す。

IFN $\gamma$  の発現量は両群で有意差はなかったが、*E.coli*-LG 群で少ない傾向であった (*E.coli*-PBS 群 vs *E.coli*-LG 群,  $p = 0.10$ )。TNF $\alpha$  の発現量も両群で有意差はなかったが、*E.coli*-LG 群で少ない傾向であった (*E.coli*-PBS 群 vs *E.coli*-LG 群,  $p = 0.09$ )。また、IL-1 $\beta$  の発現量は、*E.coli*-LG 群で有意に少なかった (*E.coli*-PBS 群 vs *E.coli*-LG 群,  $p = 0.01$ )

### 第3項 腸内細菌の多様性

PBS 群, *E.coli* 群, *E.coli*-LG 群における腸内細菌の多様性を比較した.  $\alpha$  多様性の結果を図 5D に示す. Chao1 index を用いた比較では, *E.coli* 群と *E.coli*-LG 群を比較すると, *E.coli*-LG 群で有意に高かった (*E.coli* 群 :  $351.1 \pm 10.8$ , *E.coli*-LG 群 :  $553.9 \pm 19.4$ ,  $p = 0.006$ ). さらに, PBS 群と *E.coli*-LG 群での比較でも有意な差を認めた (PBS 群 :  $417.91 \pm 19.0$ , *E.coli*-LG 群 :  $553.9 \pm 19.4$ ,  $p = 0.011$ ).

また Shannon index を用いた比較でも, *E.coli* 群と *E.coli*-LG 群を比較すると, *E.coli*-LG 群で有意に高かった (*E.coli* 群 :  $6.631 \pm 0.050$ , *E.coli*-LG 群 :  $7.276 \pm 0.073$ ,  $p = 0.006$ ). さらに, PBS 群と *E.coli*-LG 群での比較でも有意な差を認めた (PBS 群 :  $6.926 \pm 0.047$ , *E.coli*-LG 群 :  $7.276 \pm 0.073$ ,  $p = 0.028$ ).

また  $\beta$  多様性の評価で, Jaccard 距離を測定したところ, 3 群はすべて異なる集団であった (表 1,  $q = 0.010$  : PBS 群 vs. *E.coli* 群,  $q = 0.005$  : PBS 群 vs. *E.coli*-LG 群,  $q = 0.005$  : *E.coli* 群 vs. *E.coli*-LG 群) . 平均 UniFrac 距離に関して占有率を加味しない Unweighted 解析を用いて行ったところ, 3 群はすべて有意に異なる集団であった (表 1,  $q = 0.017$  : PBS 群 vs. *E.coli* 群,  $q = 0.017$  : PBS 群 vs. *E.coli*-LG 群,  $q = 0.006$  : *E.coli* 群 vs. *E.coli*-LG 群) . また, 占有率を加味する Weighted 解析を用いて行ったところ, 群はすべて有意に異なる集団であった (表 1,  $q = 0.009$  : PBS 群 vs. *E.coli* 群,  $q = 0.009$  : PBS 群 vs. *E.coli*-LG 群,  $q = 0.009$  : *E.coli* 群 vs. *E.coli*-LG 群).

#### 第4項 LEfSe解析

LEfSe解析の結果で特に差があった菌種（LDAスコア 4.0以上）を図5E, Fに示す。科レベルにおいてLDAスコアが高値を示したのは、*E.coli*群で *Erysipelotrichaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Muribaculaceae*, *E.coli*-LG群では *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Akkermansiaceae*であった。また、*Lactobacillaceae*は両群で差はなかった。

#### 第4節 小括

AIPモデルマウスの作製時に、LGを腹腔内投与することで脾臓の炎症所見は抑制され、脾臓の炎症性サイトカイン mRNA 発現も抑制された。また、腸内細菌叢の変化を認め、モデルマウスで認めた $\alpha$ 多様性の低下はみられなかった。



## 第7章 細菌の菌体成分が *in vitro* で腹腔マクロファージに与える影響の検討

### 第1節 目的

AIPモデルを作製する際に、LGを腹腔内投与することで脾臓の炎症は抑制された。また多くのモデルが腹腔内に菌体成分を投与することでAIPモデルを作製できていることから、その発生機序に自然免疫反応に関する腹腔マクロファージが関与している可能性を考えた。マウスの腹腔内よりマクロファージを回収し、*in vitro* で大腸菌およびLG投与による影響を検討した。

また、LGは乳酸菌の一種であり、乳酸菌が生体に効果をもたらす上で重要になるのが乳酸菌の構成成分である。乳酸菌の属するグラム陽性菌は、テイコ酸や核酸、ペプチドグリカン、細胞多糖などから構成されており、各構成成分により刺激されるTLRも異なる(30-33)。そこで、乳酸菌が有するそれぞれのTLR ligandを用いて炎症抑制効果を検討した。

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

動物は6週齢の雌性C57BL/6Jマウス（日本クレア）を使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号19069, 21058）。マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った。

#### 第2項 腹腔マクロファージの回収および培養方法

6週齢の雌性C57BL/6に4%チオグリコレート培地（ニッスイ、東京、日

本) 2.0 mL を腹腔内に投与し, 3-4 日後, 腹腔内に RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培地 5 ml を投与, 腹部をマッサージし腹腔内溶液を回収した. 回収した溶液は赤血球溶解を行い, 細胞濃度を測定し,  $1.0 \times 10^6$  個の細胞を well に播種した. 培養は, 10%ウシ胎児血清, 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI1640 培地を用いて, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で行った. 2 時間培養後に RPMI1640 培地で洗浄し, well に接着した細胞を腹腔マクロファージとして使用した.

### 第3項 腹腔マクロファージにおける大腸菌刺激試験

第2項で回収・培養した腹腔マクロファージに加熱処理をした大腸菌 (ATCC25922, 20 µg/mL) を加えて 4 時間培養し, 遊離細胞を除去したのち, well に接着した腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン mRNA 発現を測定した (*E.coli* 群, n = 6). 対照群として同量の PBS を投与した (PBS 群, n = 6).

### 第4項 腹腔マクロファージにおける LG 刺激試験

第2項で回収・培養した腹腔マクロファージに加熱処理をした大腸菌 (20 µg/mL) と同時に LG (20 µg/mL) を添加して 16 時間培養し, 遊離細胞を除去したのち, well に接着した腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン mRNA 発現を測定した (*E.coli*-LG 群, n = 8). 対照群として同量の PBS を投与した (*E.coli* 群, n = 8). また大腸菌刺激はせず, LG (20 µg/ml) および PBS を加えた群をそれぞれ LG 群 (n = 8), PBS 群 (n = 8) とした.

### 第5項 腹腔マクロファージにおける細菌の構成成分別の刺激試験

第2項で回収・培養した腹腔マクロファージに加熱処理をした大腸菌

(ATCC 25922, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と同時に LG (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), TLR2 ligand のリポテイコ酸 (LTA : Lipoteichoic acid, InvivoGen, CA, USA) (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), TLR7 ligand の Imiquimod (IMQ, InvivoGen) (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), TLR9 ligand の CpG (ODN 1826, ENZO Life Sciences, Lausen, Switzerland) (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を加えて 16 時間培養し, 遊離細胞を除去したのち, well に接着した腹腔マクロファージのサイトカイン mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて測定した (PBS 群, PBS-*E.coli* 群, LG-*E.coli* 群, TLR2-*E.coli* 群, TLR7-*E.coli* 群, TLR9-*E.coli* 群, 各群  $n = 8$ ).

## 第 6 項 統計学的処理

各データは平均値  $\pm$  標準誤差で表した. 群間の比較は, 一元化分散分析 (one way analysis of variance: one way ANOVA) を行い, 必要に応じて Turkey-Kramer の事後検定を行った.  $p$  値 0.05 未満を有意差ありとした.

## 第 3 節 結果

第 1 項 大腸菌刺激によるサイトカインの発現と LG 添加による変化 (図 6)

$\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  いずれの発現量も *E.coli* 群で有意に増加したが (PBS 群 vs *E.coli* 群,  $\text{IFN}\gamma$  :  $p = 0.002$ ,  $\text{TNF}\alpha$  :  $p = 0.003$ ,  $\text{IL-1}\beta$  :  $p = 0.002$ ), それぞれの群に LG を添加したところ, 大腸菌の刺激で増加した  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  の mRNA 発現量は有意に減少した (*E.coli* 群 vs *E.coli*-LG 群,  $\text{IFN}\gamma$  :  $p = 0.009$ ,  $\text{TNF}\alpha$  :  $p = 0.002$ ,  $\text{IL-1}\beta$  :  $p = 0.088$ ). また  $\text{IL-10}$  の mRNA 発現量は大腸菌の刺激では変化しなかったが, LG の添加により有意に増加した (*E.coli* 群 vs *E.coli*-LG 群,  $p = 0.002$ ). さらに,  $\text{IL-12 (p40)}$  の mRNA 発現量は, LG での刺激時のみ有意に増加した (PBS 群 vs PBS-LG 群,  $p < 0.001$ ).

## 第2項 TLR ligandによる炎症抑制効果の検討 (図7)

大腸菌刺激で増加した  $\text{IFN}\gamma$  の発現量は LG-*E.coli* 群, TLR7-*E.coli* 群で有意に減少した (PBS-*E.coli* 群 vs LG-*E.coli* 群 :  $p = 0.016$ , PBS-*E.coli* 群 vs TLR7-*E.coli* 群 :  $p = 0.020$ ).  $\text{TNF}\alpha$  の発現量についても PBS-*E.coli* 群と比較して LG-*E.coli* 群, TLR7-*E.coli* 群で有意に減少した (PBS-*E.coli* 群 vs LG-*E.coli* 群 :  $p = 0.020$ , PBS-*E.coli* 群 vs TLR7-*E.coli* 群 :  $p = 0.029$ ). また  $\text{IL-1}\beta$  の発現量は PBS-*E.coli* 群と比較して TLR2-*E.coli* 群で有意に増加した (PBS-*E.coli* 群 vs TLR2-*E.coli* 群 :  $p = 0.045$ ).

一方,  $\text{IL-10}$  の発現量は PBS-*E.coli* 群と比較して LG-*E.coli* 群, TLR7-*E.coli* 群で有意に増加した (PBS-*E.coli* 群 vs LG-*E.coli* 群 :  $p < 0.001$ , PBS-*E.coli* 群 vs TLR7-*E.coli* 群 :  $p = 0.042$ ).

## 第4節 小括

加熱処理した大腸菌で腹腔マクロファージを *in vitro* で刺激すると, モデルマウスの脾臓組織と同様に, 炎症性サイトカイン mRNA 発現が亢進した. また, 腹腔マクロファージを大腸菌で刺激する際に, LG を添加することで, 大腸菌刺激により増加した炎症性サイトカインの mRNA 発現が抑制され, 抗炎症性サイトカインである  $\text{IL-10}$  の mRNA 発現が亢進した. 大腸菌で刺激を受けたマクロファージが分泌する炎症性サイトカインは LG の刺激で抑制され, 抑制性サイトカインである  $\text{IL-10}$  は LG の刺激で増加しており, 腹腔内マクロファージは LG の刺激により抗炎症作用を誘導する可能性があることが示唆された.

また, 加熱処理した大腸菌で腹腔マクロファージを *in vitro* で刺激する際に, 細菌の各菌体構成成分で刺激される TLR ligand を添加すると, TLR7 ligand を添加した際に,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  の発現は減少し,  $\text{IL-10}$  の発現が増加した.

## 第8章 総括

加熱処理することで死菌体とした大腸菌株を反復投与することで、膵臓に炎症を認め、膵臓組織の炎症性サイトカイン mRNA 発現は増加しており、既報の通り AIP モデルマウスを作製できた。このモデルマウスでは、通常マウスと異なる腸内細菌叢を呈しており、 $\alpha$  多様性が低下していた。また LEfSe 解析では科レベルにおいて *Lactobacillaceae* や *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* が有意に減少していた。また、モデルマウスの作製時に、抗菌薬入りの水溶液を与えることで、膵臓の炎症は抑制された。

モデルマウスに乳酸菌である LG を経口投与したが、膵臓の炎症に変化は認めなかった。しかし、LG を腹腔内に投与することで、膵臓の炎症は抑制された。また腸内細菌叢の変化を認め、モデルマウスで認めた  $\alpha$  多様性の低下がみられなかった。

マウスから回収した腹腔マクロファージを大腸菌で刺激すると、モデルマウスの膵臓と同様に炎症性サイトカインの発現は増加しており、LG を添加することで炎症性サイトカインの発現増加は抑制された。さらに、細菌の菌体構成成分で刺激される各種 TLR の ligand を添加すると、一本鎖 RNA を認識する TLR7 の ligand 添加時に、炎症性サイトカインの発現が有意に抑制された。

## 第9章 考察

本研究では大腸菌を腹腔内に反復投与することで作製される AIP モデルマウスを用いて、LG 投与による膵臓の炎症抑制効果および腹腔マクロファージを介した自然免疫反応について検討を行った。この AIP モデルマウスでは、他のモデルマウス同様に加熱処理をした大腸菌を腹腔内に反復投与することで膵臓に炎症を及ぼした。モデルマウスでは腸内細菌叢が変化し、多様性が低下し *dysbiosis* を呈していた。また乳酸菌である LG を腹腔内に投与することで、腹腔マクロファージからの炎症性サイトカインの放出を抑制し、膵臓の炎症も抑制された。その機序として TLR7 の関与が示唆された。

本研究では、さまざまな AIP モデルマウスの中から加熱処理をした大腸菌の死菌体を反復投与することで作製できるモデルマウスを使用した(10)。多くの AIP モデルマウスが、腹腔内に微生物または微生物由来成分を投与していることから(9, 11, 21)、その病態に自然免疫反応の関与が疑われる。また、モデル作製時に、既報とは菌株が異なる大腸菌を使用した際、モデルマウスと比較して膵臓の炎症が軽度であったことから、その菌株により抗原性や免疫反応が異なると推測される。

自然免疫反応の誘導に重要であるパターン認識受容体を刺激する腸内細菌と膵疾患との関連について多くの報告がある(14, 15, 17)。また、AIP の病態に関しても腸内細菌との関連について報告されている。実際に AIP 患者では、他の慢性膵炎の患者と比べて腸内細菌叢が変化しており(19)、AIP 患者のステロイド治療による寛解後に *Klebsiella* が減少しており、モデルマウスに *Klebsiella pneumoniae* を経口投与することで膵臓の炎症が増悪したとの報告もある(20)。本研究においても、対称群と比べてモデルマウスで腸内細菌叢が変化しており、

$\alpha$ 多様性も低下し、dysbiosisを来たしていた。また、群間比較解析であるLEfSe解析では、モデルマウスにおいて *Erysipelotrichaceae*, *Bifidobacteriaceae*が増加し、*Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*が減少しており、これらの微生物群が病態に関与している可能性が考えられた。

しかしながら、膵炎により膵外分泌能が低下した結果、腸内細菌叢に影響を及ぼした可能性も否定できないため、これらを鑑別する目的で抗菌薬を投与し腸内細菌を減少させてAIPモデルを作製したところ、モデルマウスの膵臓の炎症は抑制された。したがって、このモデルの病態に腸内細菌叢が関与していると考えられた。急性膵炎モデルにおいても、抗菌薬投与による腸内細菌の減少により膵炎が抑制されている(34)。また、鎌田らは、モデルマウスの糞便移植や共生飼育により膵臓の炎症が増悪したと報告しており(21)、腸内細菌叢の変化がAIPの免疫反応に影響を与えている可能性がある。他にも膵臓疾患と腸内細菌叢との関係についていくつか報告はあるが(16, 23)、腸内細菌叢がどのようにして膵臓の炎症に関与しているか不明な部分が多く、その作用機序に関しては今後さらなる検討が必要である。

AIPと同様にステロイドが著効する自己免疫疾患においては、probioticsの病態への関与が報告されている(27-29)。また慢性膵炎モデルにおいて多糖類の投与が病態を改善するとの報告もあるが(35)、AIPでの報告はない。そのため、モデルマウスを用いてLGによる腸内細菌叢の変化が膵臓の炎症に与える影響を検討した。LEfSe解析の結果、モデルマウスでは対照群と比べて *Lactobacillaceae*や *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*が減少していることから、これらが病態に関与している可能性を考え、乳酸菌である *Lactobacillus gasseri*を用いて占有率を補正することによる病態改善を期待し、LGの投与を検討した。LGは乳酸菌の中でも、高いIL-12産生誘導能を有している(36)。IL-12はnaïve Tリンパ球に作用して活性化リンパ球、特にTh1反応を誘導し、免疫反応をTh2

反応から Th1 反応に切り替える免疫調整機能を有している(37). また, アレルギー疾患であるスギ花粉症の患者に対して, 加熱処理をした LG を経口投与することで鼻症状スコアおよび血清 IgE 値が改善している(38, 39). AIP においても, Th2 型の免疫反応や(40), 好酸球, アレルギー疾患との関与が報告されていることから(41, 42), Th1 型の免疫反応を誘導する LG は AIP の病態改善に寄与するかもしれないと考えた.

そこで最初に, LG の経口投与による膵臓の炎症への作用を検討した. LG は加熱処理を行ってもマクロファージにおける IL-12 産生誘導能が低下せず(36), また加熱処理をすることで製品の保存が容易で, 保存期間も長くできるという点から(37), 臨床応用も考慮して熱処理をした LG を用いた. モデルマウスを作製する際に, 週 3 回 LG の経口投与を行い, 膵臓の炎症を評価したが, 膵臓の炎症に有意な改善は見られなかった. 加熱処理をした LG を 8 週間連続で経口投与することで腸内細菌叢の変化を誘導できたという報告もあるものの(43), 腸内細菌叢を変化させる能力は生菌には及ばないと考えられ, 生菌での検討が必要と考えられる.

次に, 腹腔マクロファージの関与を考え LG の腹腔内投与による影響を検討した. モデルマウス作製時に加熱処理をした LG を腹腔内に投与することで, 膵臓の炎症は抑制され, またモデルマウスでは低下していた腸内細菌の多様性が改善しており, 異なる腸内細菌叢を示した. また, 腹腔マクロファージを用いた *in vitro* 実験においても, 大腸菌刺激で増加した炎症性サイトカインの発現が, LG を添加することで抑制された. すなわち, 腹腔内に投与された大腸菌が腹腔マクロファージを刺激することで自然免疫反応によるサイトカイン産生が起こり, それが膵臓の炎症に影響を与えられとされる. さらに, そこに LG を添加することで, 大腸菌刺激によるマクロファージからの炎症性サイトカインの放出が抑制され, 膵炎の発症抑制もしくは増悪の抑制に影響した可能性が



ある。

今回の検討は死菌を用いたので、菌からの代謝産物の影響は無視でき、LGの病態への影響を与えた主たる因子は菌体の構成成分であったと考えられる。乳酸菌の属するグラム陽性菌は、テイコ酸やペプチドグリカン、細胞多糖、タンパク質、核酸などから構成されており、いずれかの構成成分が大腸菌刺激により炎症を抑制した可能性がある。 *In vitro* において腹腔マクロファージに大腸菌刺激を行う際に、いくつかの TLR ligand を添加すると、TLR7 ligand である IMQ を添加した際に有意に炎症性サイトカインの発現は抑制され、抗炎症作用を有する IL-10 の発現が上昇した。 AIP 患者の脾臓には TLR7 陽性細胞の浸潤が増えていることや(6)、IgG4 関連疾患において TLR7 を発現する M2 マクロファージが Th2 免疫応答の関係する IL-33 分泌を促すなど(44)、TLR7 が病態形成に関与しているとの報告もあるが、アレルギー疾患である喘息の治療では TLR7 のリガンドが症状を改善させたという報告と増悪させたという報告があり(45-47)、TLR7 の病態への関与にはまだ不明な点が多々ある。特に AIP に関して、TLR7 が pDC を刺激し 1 型 IFN の放出を促すことで病態悪化につながる報告があるが、TLR7 は Th2 型から Th1 型への免疫誘導に関与するという報告(46)もあることから、AIP に関しても両方の側面を呈しており、その病期による免疫反応の違いやそのバランスが AIP の病態に影響していることが予想される。また、一方でリガンド間の TLR との結合力の差などで、下流のシグナルが異なっている可能性もある。同じ菌でも株の種類により免疫誘導に違いがあり(48, 49)、本研究でも菌株による TLR ligand の結合力の差や cross tolerance の影響、もしくは他の炎症誘導経路の存在などにより効果が異なる可能性もあり、今後は本研究で用いた LG から抽出した菌体成分での抗炎症作用の検討が必要と考えられる。

本研究では、モデルマウスの腸内細菌叢の多様性が低下し、乳酸菌である *Lactobacillaceae* が減少しており、LGを投与することで膵臓の炎症が抑制された。LGは通性嫌気性菌のため膵臓に近い上部消化管にも生息することが可能であり(50)、また腸管の免疫機能に関わる IgA の分泌を誘導することから(51)、*Lactobacillaceae* が腸管からの細菌や毒素の侵入を防いでいた可能性がある。また、LGは自然免疫細胞において IL-12 産生を促すことから(37, 52)、AIPにおける Th2 免疫反応による過度な免疫を抑制したかもしれない。今回の研究では、LGの腹腔内投与により膵炎は抑制されたが、経口投与では有意な変化は認めなかったことから、今後は生菌の使用や投与量の調整などより効果的な LG の投与方法の検討が必要と考える。また、LGによる膵炎抑制の機序として腹腔マクロファージによる自然免疫反応の関与が示されたが、ヒトにおいて LG が腹腔マクロファージを刺激する機序や刺激されたマクロファージが膵臓に炎症を及ぼす機序については本研究では検討できておらず今後の課題と考える。しかしながら、モデルマウスの膵炎に腸内細菌叢が関与しており、乳酸菌である LG の投与により膵炎が抑制されたことは、LGが AIP 治療あるいは予防に有用なプロバイオティクスである可能性を示しており、その作用機序を解明することは今後の AIP の病態改善に寄与すると考える。

## 第10章 結論

AIPモデルマウスでは、腸内細菌叢が変化し多様性が低下しており、抗菌薬の投与により膵炎が抑制されたことから、モデルマウスの病態に腸内細菌叢の関与が考えられた。また乳酸菌であるLGの腹腔内投与により膵炎が抑制されたことから、細菌に対する宿主の免疫反応が病態に関与しており、その主座として腹腔マクロファージの関与が考えられた。さらに、細菌と腹腔マクロファージの接点としてTLR7の関与が示唆された。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，御指導，校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座講師 東山正明博士および防衛医科大学校内科学講座教授 穂苅量太博士に衷心より感謝申し上げます．本研究の遂行に際し，貴重な御助言と御協力を賜りました防衛医科大学校内科学講座の教室員諸先生に感謝申し上げます．また本研究の一部は，一般財団法人 防衛医科大学校振興会からの助成金により実施しました．この場を借りて深謝いたします．

## 略語一覽

ABx : Antibiotics

AIP : Autoimmune pancreatitis

ATCC : American Type Culture Collection

CFU : Colony forming unit

cDNA : Complementary deoxyribonucleic acid

DSS : Dextran Sulfate Sodium

GEL : Granulocytic epithelial lesion

IDCP : Idiopathic duct-centric pancreatitis

IFN : Interferon

IL : Interleukin

IMQ : Imiquimod

LDA : Linear discriminant analysis

LEfSe : Linear discriminant analysis effect size

LG : *Lactobacillus gasseri*

LPS : Lipopolysaccharide

LPSP : Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis

LTA : Lipoteichoic acid

mRNA : Messenger ribonucleic acid

NLR : Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor

PBS : Phosphate-buffered saline

PCoA : Principal Coordinate Analysis

PERMANOVA : Permutational analysis of variance

pDC : Plasmacytoid dendritic cells

Poly (I:C) : Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor necrosis factor

## 附記

本研究の主旨は下記の学会で発表した.

- (1) 第 29 回日本消化器関連学会週間 (2021 年 11 月, Web 開催)
- (2) 第 6 回 Gastro-PLUS (2021 年 12 月, Web 開催)
- (3) 米国消化器病週間 2022 (2022 年 5 月, Web 開催)
- (4) 第 47 回日本リンパ学会総会 (2023 年 6 月, 浜松)

## 参考文献

1. Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. 1995;40(7):1561-8.
2. Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, Unno H, Furuya N, Akamatsu T, Fukushima M, Nikaido T, Nakayama K, Usuda N, Kiyosawa K. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med*. 2001;344(10):732-8.
3. Sah RP, Chari ST, Pannala R, Sugumar A, Clain JE, Levy MJ, Pearson RK, Smyrk TC, Petersen BT, Topazian MD, Takahashi N, Farnell MB, Vege SS. Differences in clinical profile and relapse rate of type 1 versus type 2 autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology*. 2010;139(1):140-8; quiz e12-3.
4. Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M, Kim MH, Klöppel G, Lerch MM, Lühr M, Notohara K, Okazaki K, Schneider A, Zhang L. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas*. 2011;40(3):352-8.
5. Okazaki K, Uchida K. Autoimmune Pancreatitis: The Past, Present, and Future. *Pancreas*. 2015;44(7):1006-16.
6. Fukui Y, Uchida K, Sakaguchi Y, Fukui T, Nishio A, Shikata N, Sakaida N, Uemura Y, Satoi S, Okazaki K. Possible involvement of Toll-like receptor 7 in the development of type 1 autoimmune pancreatitis. *Journal of gastroenterology*. 2015;50(4):435-44.
7. Yanagawa M, Uchida K, Ando Y, Tomiyama T, Yamaguchi T, Ikeura T, Fukui T, Nishio A, Uemura Y, Miyara T, Okamoto H, Satoi S, Okazaki K. Basophils activated via



TLR signaling may contribute to pathophysiology of type 1 autoimmune pancreatitis. *Journal of gastroenterology*. 2018;53(3):449-60.

8. Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, Uchida K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, Okazaki K, Strober W, Chiba T, Watanabe T. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- $\alpha$  Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2015;195(7):3033-44.

9. Kamata K, Watanabe T, Minaga K, Strober W, Kudo M. Autoimmune Pancreatitis Mouse Model. *Current protocols in immunology*. 2018;120:15.31.1-15.31.8.

10. Haruta I, Yanagisawa N, Kawamura S, Furukawa T, Shimizu K, Kato H, Kobayashi M, Shiratori K, Yagi J. A mouse model of autoimmune pancreatitis with salivary gland involvement triggered by innate immunity via persistent exposure to avirulent bacteria. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2010;90(12):1757-69.

11. Nishio A, Asada M, Uchida K, Fukui T, Chiba T, Okazaki K. The role of innate immunity in the pathogenesis of experimental autoimmune pancreatitis in mice. *Pancreas*. 2011;40(1):95-102.

12. Liu T, Liu F, Peng LW, Chang L, Jiang YM. The Peritoneal Macrophages in Inflammatory Diseases and Abdominal Cancers. *Oncol Res*. 2018;26(5):817-26.

13. Sandler M, van den Brandt C, Glaubitz J, Wilden A, Golchert J, Weiss FU, Homuth G, De Freitas Chama LL, Mishra N, Mahajan UM, Bossaller L, Volker U, Broker BM, Mayerle J, Lerch MM. NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Response and Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndromes in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2020;158(1):253-69 e14.

14. Zhang Z, Tanaka I, Pan Z, Ernst PB, Kiyono H, Kurashima Y. Intestinal homeostasis and inflammation: Gut microbiota at the crossroads of pancreas-intestinal barrier axis. *Eur J Immunol.* 2022;52(7):1035-46.
15. Thomas RM, Jobin C. Microbiota in pancreatic health and disease: the next frontier in microbiome research. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(1):53-64.
16. Pietzner M, Budde K, Ruhlemann M, Volzke H, Homuth G, Weiss FU, Lerch MM, Frost F. Exocrine Pancreatic Function Modulates Plasma Metabolites Through Changes in Gut Microbiota Composition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(5):e2290-e8.
17. Pan LL, Li BB, Pan XH, Sun J. Gut microbiota in pancreatic diseases: possible new therapeutic strategies. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(7):1027-39.
18. Plichta DR, Somani J, Pichaud M, Wallace ZS, Fernandes AD, Perugino CA, Lahdesmaki H, Stone JH, Vlamakis H, Chung DC, Khanna D, Pillai S, Xavier RJ. Congruent microbiome signatures in fibrosis-prone autoimmune diseases: IgG4-related disease and systemic sclerosis. *Genome Med.* 2021;13(1):35.
19. Hamada S, Masamune A, Nabeshima T, Shimosegawa T. Differences in Gut Microbiota Profiles between Autoimmune Pancreatitis and Chronic Pancreatitis. *The Tohoku journal of experimental medicine.* 2018;244(2):113-7.
20. Kamata K, Watanabe T, Minaga K, Hara A, Sekai I, Otsuka Y, Yoshikawa T, Park AM, Kudo M. Gut microbiome alterations in type 1 autoimmune pancreatitis after induction of remission by prednisolone. *Clinical and experimental immunology.* 2020;202(3):308-20.
21. Kamata K, Watanabe T, Minaga K, Hara A, Yoshikawa T, Okamoto A, Yamao K, Takenaka M, Park AM, Kudo M. Intestinal dysbiosis mediates experimental autoimmune pancreatitis via activation of plasmacytoid dendritic cells. *International immunology.*

2019;31(12):795-809.

22. Yoshikawa T, Minaga K, Hara A, Sekai I, Kurimoto M, Masuta Y, Otsuka Y, Takada R, Kamata K, Park AM, Takamura S, Kudo M, Watanabe T. Disruption of the intestinal barrier exacerbates experimental autoimmune pancreatitis by promoting the translocation of *Staphylococcus sciuri* into the pancreas. *International immunology*. 2022.

23. Schepis T, De Lucia SS, Nista EC, Manilla V, Pignataro G, Ojetto V, Piccioni A, Gasbarrini A, Franceschi F, Candelli M. Microbiota in Pancreatic Diseases: A Review of the Literature. *Journal of clinical medicine*. 2021;10(24).

24. Kanno H, Nose M, Itoh J, Taniguchi Y, Kyogoku M. Spontaneous development of pancreatitis in the MRL/Mp strain of mice in autoimmune mechanism. *Clinical and experimental immunology*. 1992;89(1):68-73.

25. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, Tramontano M, Driessen M, Hercog R, Jung FE, Kultima JR, Hayward MR, Coelho LP, Allen-Vercoe E, Bertrand L, Blaut M, Brown JRM, Carton T, Cools-Portier S, Daigneault M, Derrien M, Druesne A, de Vos WM, Finlay BB, Flint HJ, Guarner F, Hattori M, Heilig H, Luna RA, van Hylckama Vlieg J, Junick J, Klymiuk I, Langella P, Le Chatelier E, Mai V, Manichanh C, Martin JC, Mery C, Morita H, O'Toole PW, Orvain C, Patil KR, Penders J, Persson S, Pons N, Popova M, Salonen A, Saulnier D, Scott KP, Singh B, Slezak K, Veiga P, Versalovic J, Zhao L, Zoetendal EG, Ehrlich SD, Dore J, Bork P. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol*. 2017;35(11):1069-76.

26. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*. 2011;12(6):R60.

27. Yamashita M, Ukibe K, Matsubara Y, Hosoya T, Sakai F, Kon S, Arima Y,

Murakami M, Nakagawa H, Miyazaki T. *Lactobacillus helveticus* SBT2171 Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2596.

28. Mardani F, Mahmoudi M, Esmacili SA, Khorasani S, Tabasi N, Rastin M. In vivo study: Th1-Th17 reduction in pristane-induced systemic lupus erythematosus mice after treatment with tolerogenic *Lactobacillus* probiotics. *Journal of cellular physiology*. 2018;234(1):642-9.

29. Jia H, Ren S, Wang X. Heat-killed probiotic regulates the body's regulatory immunity to attenuate subsequent experimental autoimmune arthritis. *Immunology letters*. 2019;216:89-96.

30. Nishibayashi R, Inoue R, Harada Y, Watanabe T, Makioka Y, Ushida K. RNA of *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 Is a Major Component Inducing Interleukin-12 Production from Human Monocytic Cells. *PloS one*. 2015;10(6):e0129806.

31. Hiramatsu Y, Satho T, Hyakutake M, Irie K, Mishima K, Miake F, Kashige N. The anti-inflammatory effects of a high-frequency oligodeoxynucleotide from the genomic DNA of *Lactobacillus casei*. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):139-47.

32. Kaji R, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Nanno M, Shida K. Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain *Lactobacillus* strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(7):3505-13.

33. Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Kaji R, Nagaoka M, Nanno M. Peptidoglycan from *Lactobacilli* inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):e858-69.

34. Tsuji Y, Watanabe T, Kudo M, Arai H, Strober W, Chiba T. Sensing of commensal

organisms by the intracellular sensor NOD1 mediates experimental pancreatitis. *Immunity*. 2012;37(2):326-38.

35. Hu Y, Sheng Y, Yu M, Li K, Ren G, Xu X, Qu J. Antioxidant activity of *Inonotus obliquus* polysaccharide and its amelioration for chronic pancreatitis in mice. *Int J Biol Macromol*. 2016;87:348-56.

36. Miyazawa K, He F, Kawase M, Kubota A, Yoda K, Hiramatsu M. Enhancement of immunoregulatory effects of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 by heat treatment and culture medium. *Letters in applied microbiology*. 2011;53(2):210-6.

37. Ou CC, Lin SL, Tsai JJ, Lin MY. Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. *Journal of food science*. 2011;76(5):M260-7.

38. Kawase M, He F, Kubota A, Hiramatsu M, Saito H, Ishii T, Yasueda H, Akiyama K. Effect of fermented milk prepared with two probiotic strains on Japanese cedar pollinosis in a double-blind placebo-controlled clinical study. *International journal of food microbiology*. 2009;128(3):429-34.

39. Gotoh M, Sashihara T, Ikegami S, Yamaji T, Kino K, Orii N, Taketomo N, Okubo K. Efficacy of oral administration of a heat-killed *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on patients of Japanese cedar pollinosis with high Japanese-cedar pollen-specific IgE. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2009;73(9):1971-7.

40. Okazaki K, Sumimoto K, Mitsuyama T, Uchida K. [Abnormal immunity in IgG4-related autoimmune pancreatitis]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2014;37(1):11-8.

41. Sah RP, Pannala R, Zhang L, Graham RP, Sugumar A, Chari ST. Eosinophilia and allergic disorders in autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(11):2485-91.

42. Takeda S, Satoh T, Kawaguchi S, Endo S, Terada S, Muramatsu A. Eosinophilic pancreatitis with serum IgG4-positivity, potentially associated with autoimmune pancreatitis. *Clin J Gastroenterol*. 2023;16(1):96-104.
43. Yoda K, He F, Miyazawa K, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M. Orally administered heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 alters respiratory immune responses and intestinal microbiota of diet-induced obese mice. *Journal of applied microbiology*. 2012;113(1):155-62.
44. Ishiguro N, Moriyama M, Furusho K, Furukawa S, Shibata T, Murakami Y, Chinju A, Haque A, Gion Y, Ohta M, Maehara T, Tanaka A, Yamauchi M, Sakamoto M, Mochizuki K, Ono Y, Hayashida JN, Sato Y, Kiyoshima T, Yamamoto H, Miyake K, Nakamura S. Activated M2 Macrophages Contribute to the Pathogenesis of IgG4-Related Disease via Toll-like Receptor 7/Interleukin-33 Signaling. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(1):166-78.
45. Drake MG, Kaufman EH, Fryer AD, Jacoby DB. The therapeutic potential of Toll-like receptor 7 stimulation in asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(6):484-91.
46. Lebold KM, Jacoby DB, Drake MG. Toll-Like Receptor 7-Targeted Therapy in Respiratory Disease. *Transfus Med Hemother*. 2016;43(2):114-9.
47. Matesic D, Lenert A, Lenert P. Modulating toll-like receptor 7 and 9 responses as therapy for allergy and autoimmunity. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12(1):8-17.
48. Kim HG, Lee SY, Kim NR, Ko MY, Lee JM, Yi TH, Chung SK, Chung DK. Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2008;18(6):1191-6.
49. Sashihara T, Sueki N, Ikegami S. An analysis of the effectiveness of heat-killed

lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *Journal of dairy science*. 2006;89(8):2846-55.

50. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90(3):859-904.

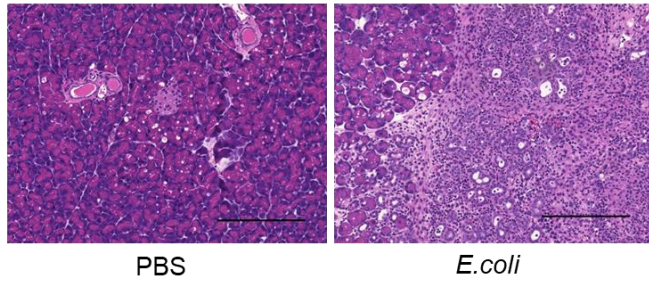
51. Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, Kadooka Y, Shiozaki T, Nakagawa H, Nakayama Y, Miyazaki T. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF-beta expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PloS one*. 2014;9(8):e105370.

52. Sashihara T, Ikegami S, Sueki N, Yamaji T, Kino K, Taketomo N, Gotoh M, Okubo K. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus gasseri* OLL2809 reduces cedar pollen antigen-induced peritoneal eosinophilia in Mice. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2008;57(4):397-403.

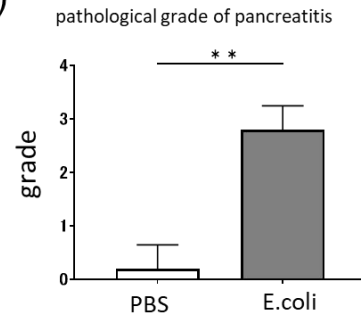
# 図 表



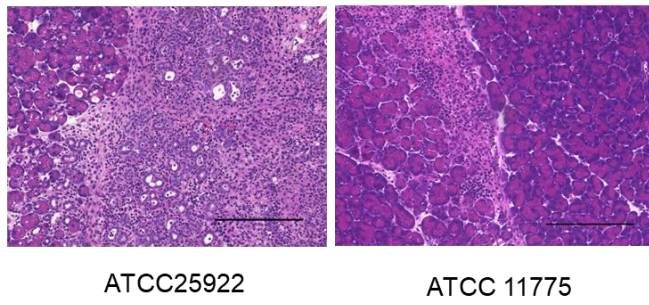
(A)



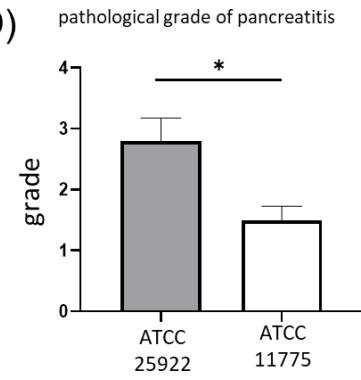
(B)



(C)



(D)



(E)

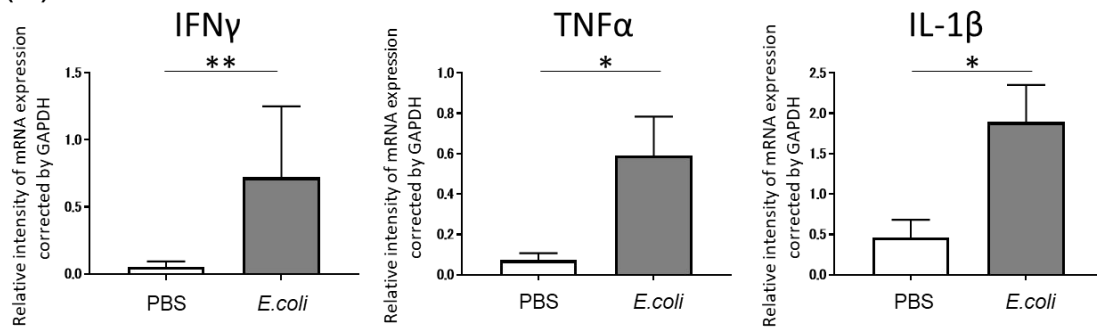


図1 大腸菌投与による膵臓の炎症評価

対照群を PBS 群, 大腸菌投与群を *E.coli* 群とした (各群 n = 10). \*p < 0.05,

\*\*p < 0.01

A 膵臓の組織標本 (ヘマトキシリン・エオジン染色像) bar=200μm

B 膵炎重症度の組織学的グレード

PBS 群と比較して, *E.coli* 群で有意にグレードの平均値が高い.

C 膵臓の組織標本 (ヘマトキシリン・エオジン染色像) bar=200μm

D 膵炎重症度の組織学的グレード

ATCC 11775 群と比較して, ATCC 25922 群で有意にグレードの平均値が高い.

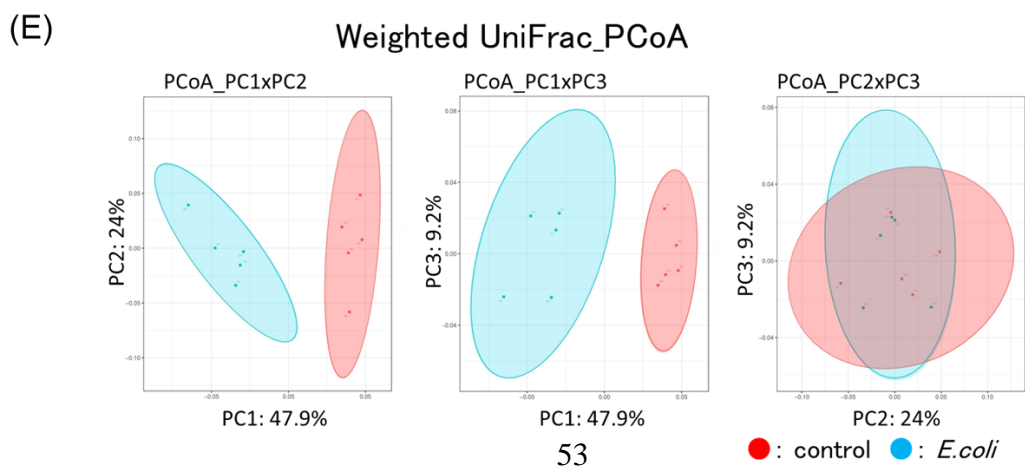
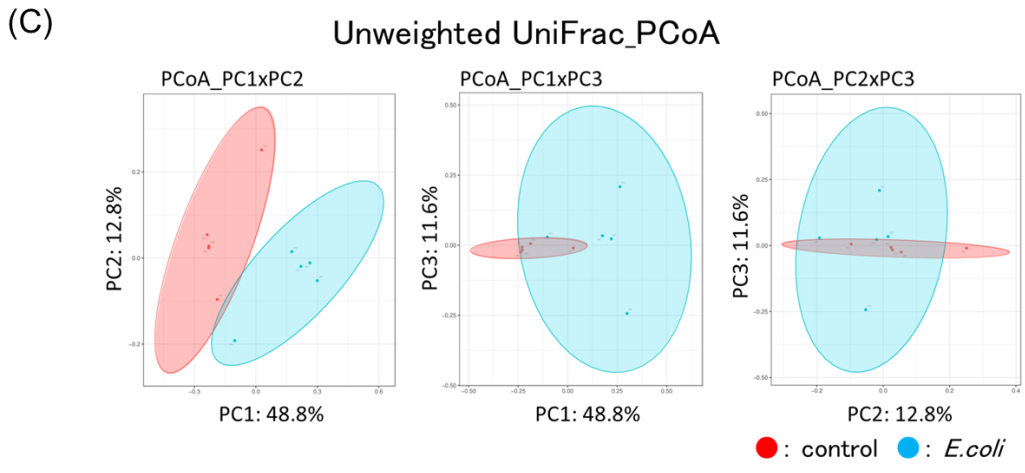
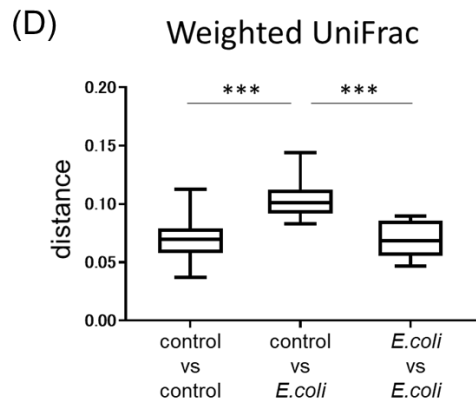
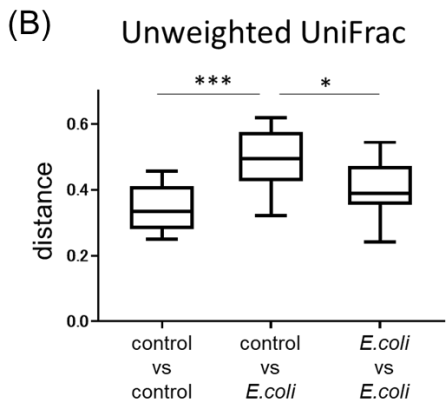
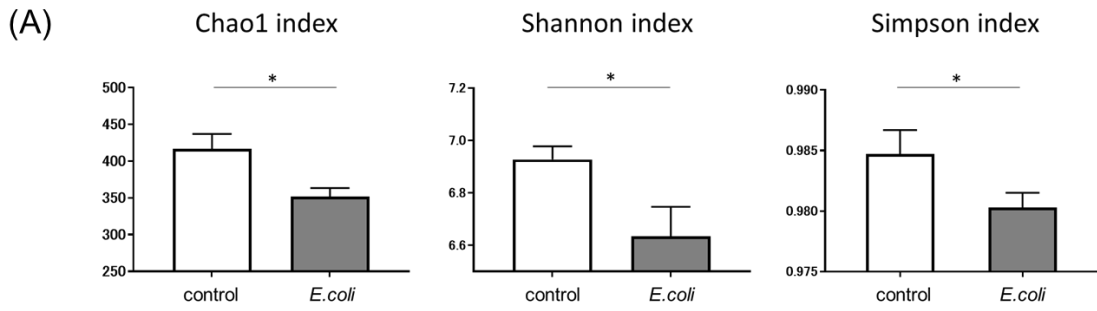
E 膵臓の炎症性サイトカイン mRNA 発現

PBS 群と比較して, *E.coli* 群で有意に mRNA 発現量が高い.

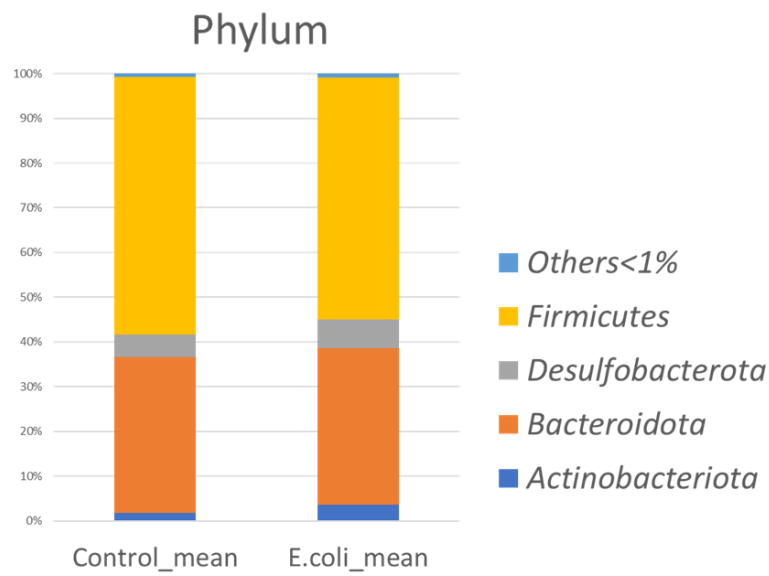
ATCC : American Type Culture Collection, IFN : Interferon, IL : Interleukin,

mRNA : Messenger ribonucleic acid, PBS : Phosphate-buffered saline,

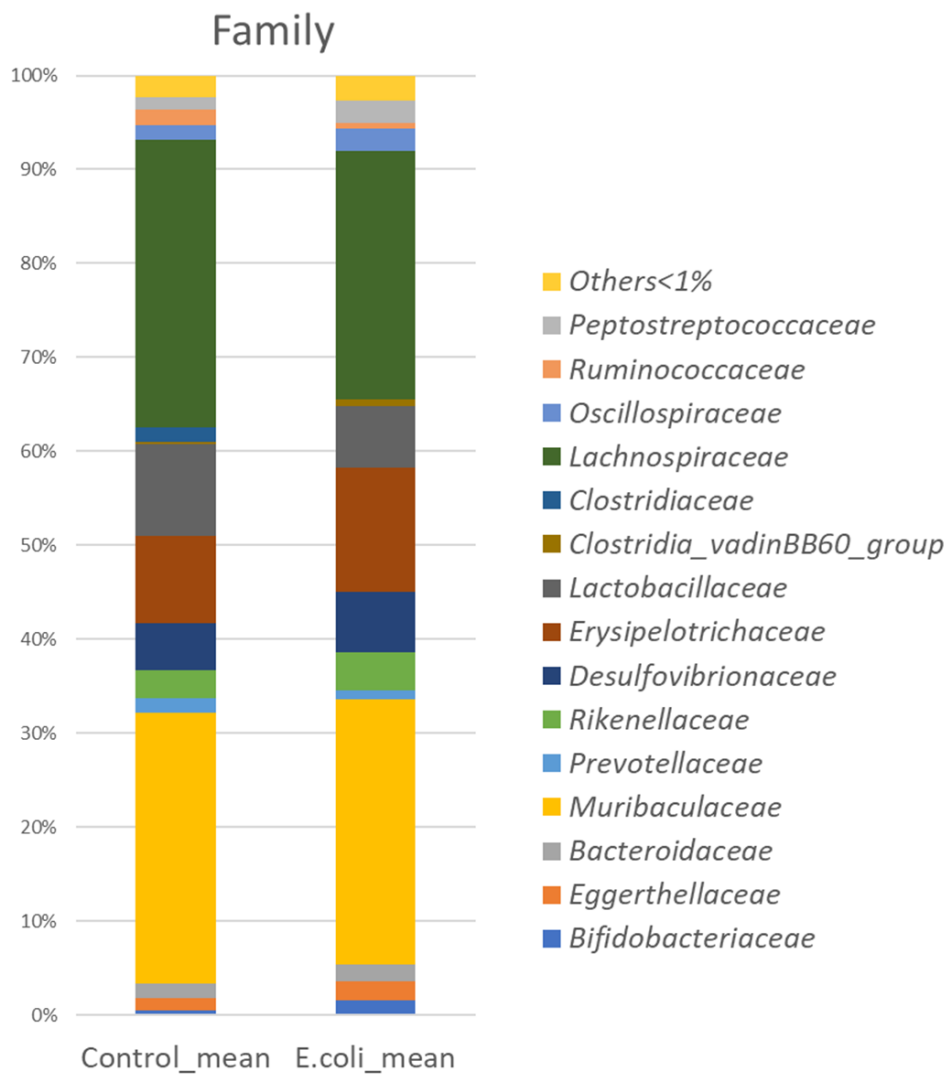
TNF : Tumor necrosis factor



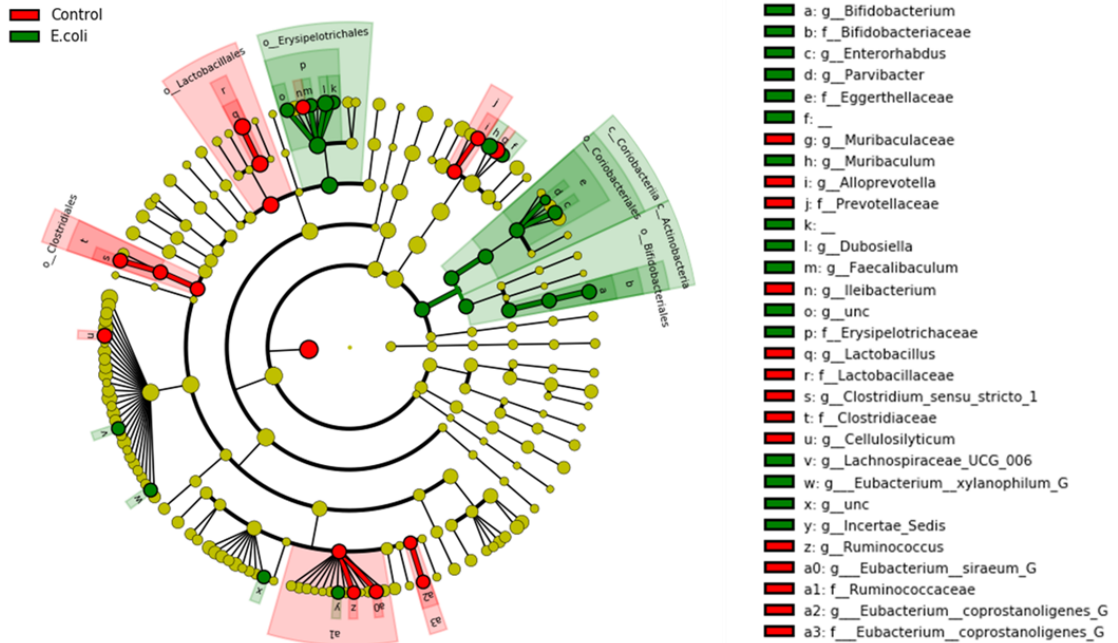
(F)



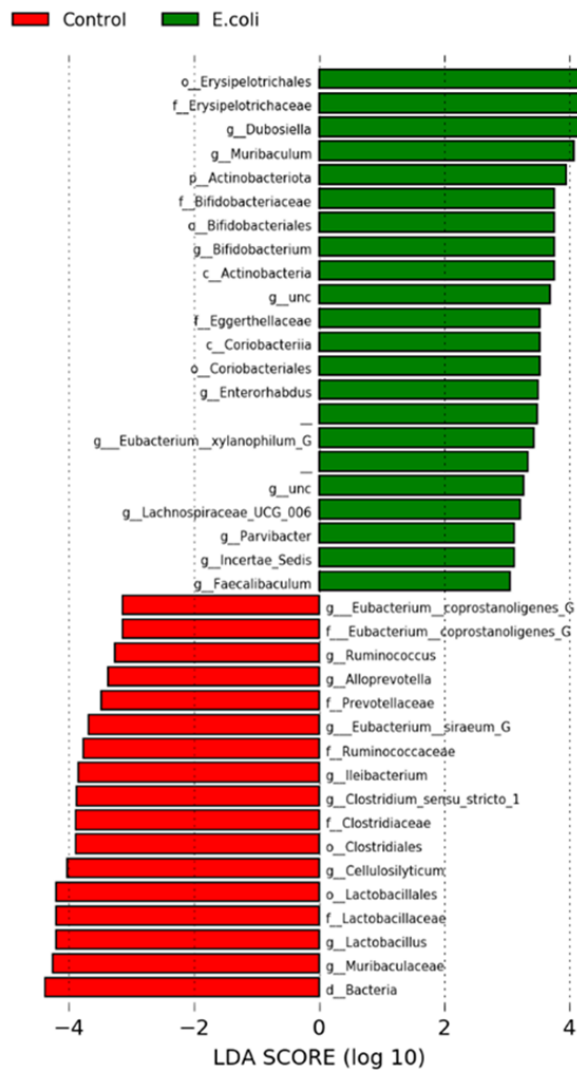
(G)



(H)



(I)



## 図2 AIPモデルマウスの腸内細菌の検討

大腸菌投与群 (*E.coli* 群) と PBS 投与群 (control 群) の新鮮な盲腸便を採取し比較検討を行った (各 n = 5).

### A $\alpha$ 多様性の検討

Chao1, Shannon, Simpson いずれにおいても, control 群と比較して *E.coli* 群で有意に低下を認めた. \* $p < 0.05$

### B $\beta$ 多様性の検討, 平均 UniFrac 距離 (Unweighted) 解析

占有率を加味しない Unweighted UniFrac 距離で control 群 - *E.coli* 群間の距離は, control 群内および *E.coli* 群内の距離と比べて有意に高かった.

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

### C Unweighted UniFrac PCoA plot

各群において Unweighted UniFrac 距離解析を行った際の主座標分析の結果を示す. control 群は●, *E.coli* 群は●でプロットしている.

### D $\beta$ 多様性の検討, 平均 UniFrac 距離 (Weighted) 解析

占有率を加味する Weighted UniFrac 距離で control 群 - *E.coli* 群間の距離は, control 群内および *E.coli* 群内の距離と比べて有意に高かった.

\*\*\* $p < 0.001$

### E Weighted UniFrac PCoA plot

各群において Weighted UniFrac 距離解析を行った際の主座標分析の結果を示す. control 群は●, *E.coli* 群は●でプロットしている.

### F 腸内細菌叢の解析 門レベル (群別)

門レベルの解析では, *E.coli* 群で *Firmicutes* が減少し, *Actinobacteriota* が増加した.

### G 腸内細菌叢の解析 科レベル (群別)

存在比率 1%以上の 14 科においての検討では, 7 種類の菌で有意な占有率

の変化を認めた。 *E.coli* 群で増加した菌としては *Erysipelotrichaceae*, *Eggerthellaceae*, *Bifidobacteriaceae* であり, 減少した菌としては *Prevotellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* の有意な低下を認めた。

#### H LefSe 解析 (クラドグラム)

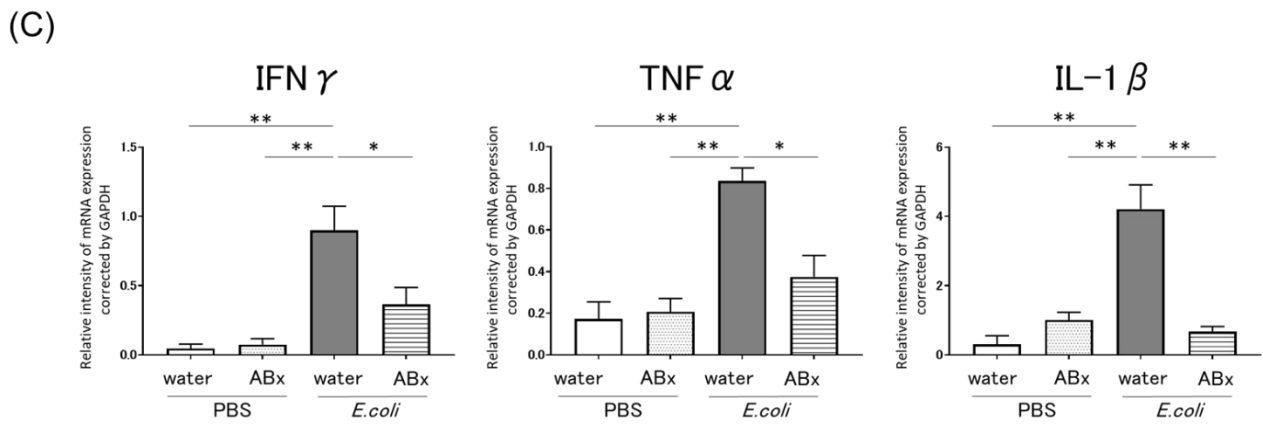
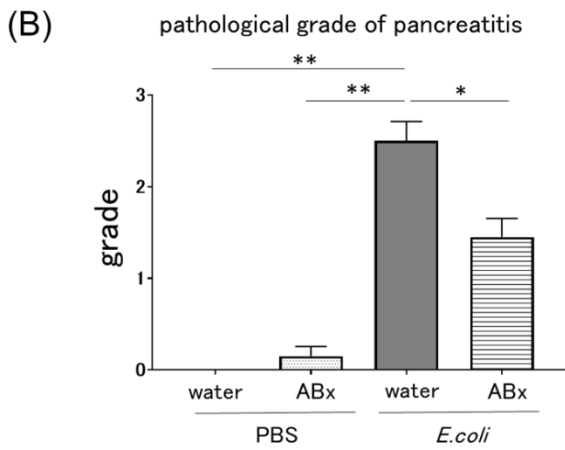
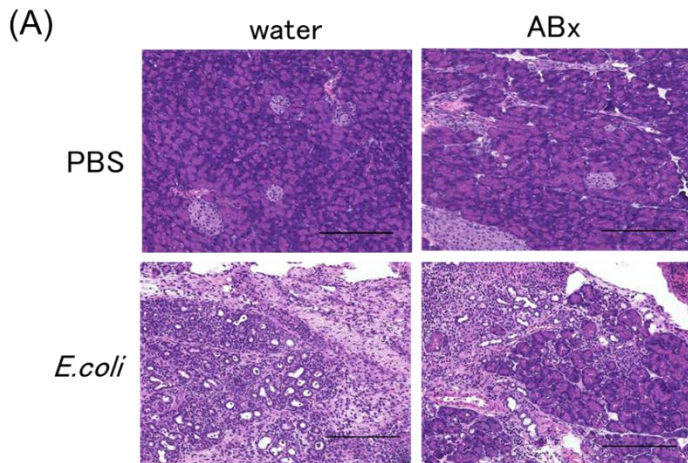
比較する群間の違いに相関する微生物群を抽出し, 有意差のあった系統をクラドグラムで図示した。

#### I LefSe 解析 (LDA スコア 3.0 以上)

LDA スコアが高値を示したのは, *E.coli* 群では *Erysipelotrichaceae*, *Bifidobacteriaceae*, control 群では *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* であった。

LDA : Linear Discriminant Analysis, LefSe : Linear discriminant analysis effect size,

PBS : Phosphate-buffered saline, PCoA : Principal Coordinate Analysis,





### 図3 抗菌薬投与による膵臓の炎症評価

抗菌薬を摂取しながら大腸菌投与した群を ABx-*E.coli* 群, 通常水を摂取しながら大腸菌投与した群を water-*E.coli* 群, 抗菌薬を摂取しながら PBS 投与した群を ABx-PBS 群, 通常水を摂取しながら PBS 投与した群を water-PBS 群として比較検討した. (各 n = 10) \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

A 膵臓の特徴的な組織標本 (ヘマトキシリン・エオジン染色像),

bar = 200µm

B 膵炎重症度の組織学的グレード

water-*E.coli* 群と比べて, water-PBS 群, ABx-PBS 群, ABx-*E.coli* 群で有意にグレードが低かった.

C 膵臓の炎症性サイトカイン mRNA 発現

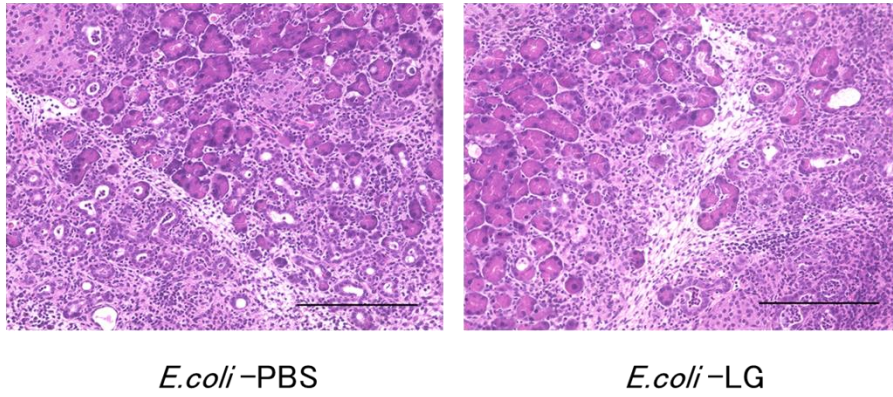
IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  いずれの発現量も water-*E.coli* 群と比べて, water-PBS 群, ABx-PBS 群, ABx-*E.coli* 群で有意に少なかった.

ABx : Antibiotics, IFN : Interferon, IL : Interleukin,

mRNA : Messenger ribonucleic acid, PBS : Phosphate-buffered saline,

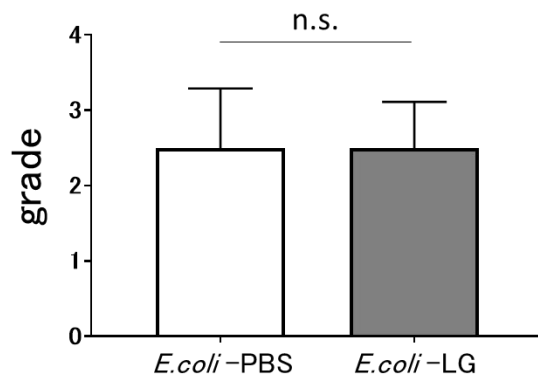
TNF : Tumor necrosis factor

(A)



(B)

pathological grade of pancreatitis



(C)

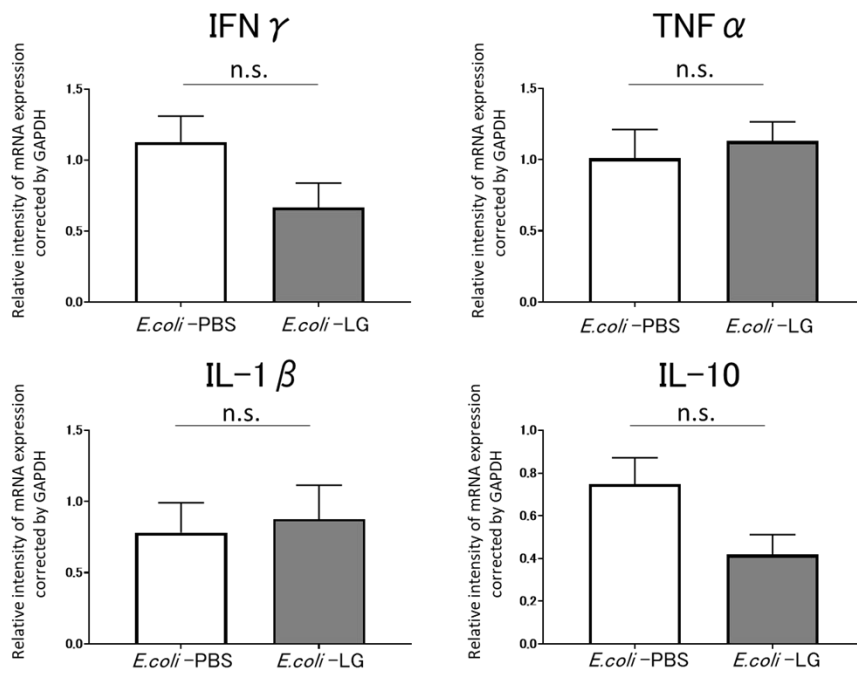


図4 LG 経口投与による膵臓の炎症評価

対照群を *E.coli*-PBS 群, LG 経口投与群を *E.coli*-LG 群とした (各群 n = 5).

A 膵臓の特徴的な組織標本 (ヘマトキシリン・エオジン染色像),

bar=200 $\mu$ m

B 膵炎重症度の組織学的グレード

両群で有意な差は認めなかった.

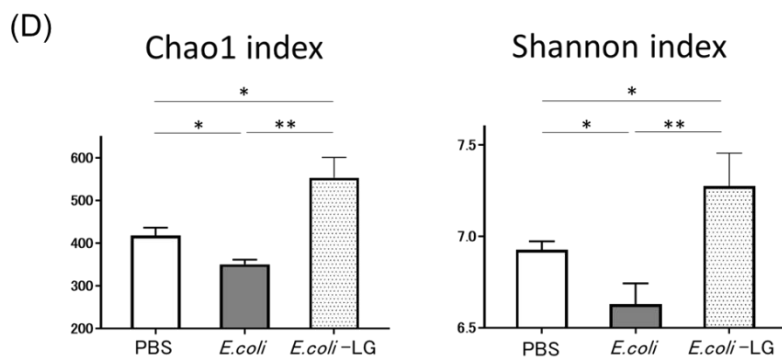
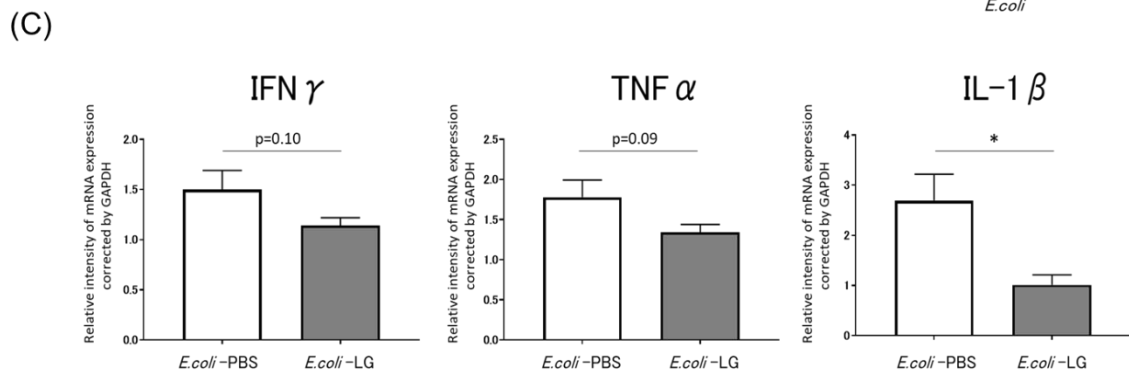
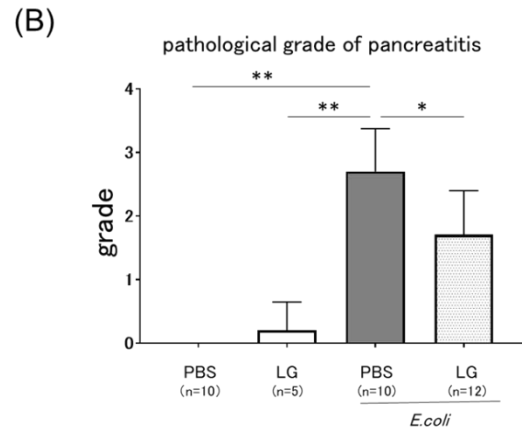
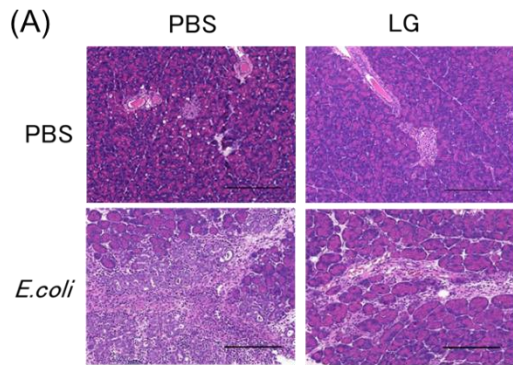
C 膵臓の炎症性サイトカイン mRNA 発現

炎症性サイトカイン IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の発現量は両群で有意差はなかった. また IL-10 の発現量も両群で有意差はなかった.

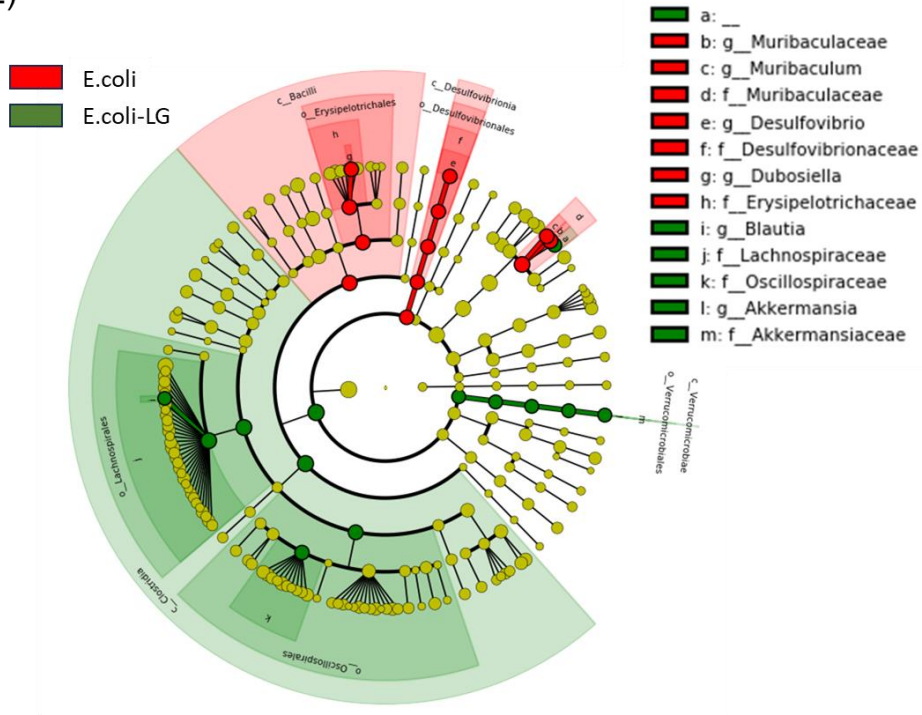
IFN : Interferon, IL : Interleukin, LG : *Lactobacillus gasseri*,

mRNA : Messenger ribonucleic acid, n.s. : Not significant,

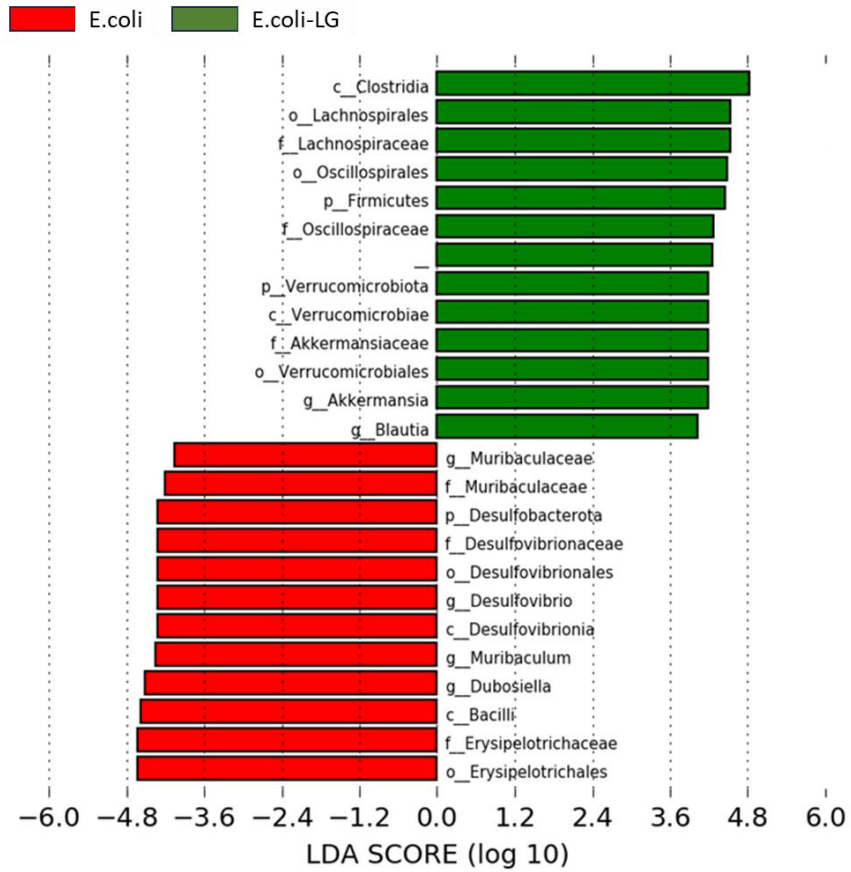
PBS : Phosphate-buffered saline, TNF : Tumor necrosis factor,



(E)



(F)



## 図5 LG腹腔内投与による膵臓の炎症評価

対照群を *E.coli*-PBS 群, LG 腹腔内投与群を *E.coli*-LG 群とした

(各 n = 10). また大腸菌を投与せず, LG または PBS を投与した群を LG 群, PBS 群とした (各 n=5).

A 膵臓の特徴的な組織標本 (ヘマトキシリン・エオジン染色像).

bar=200 $\mu$ m

B 膵炎重症度の組織学的グレード

*E.coli*-PBS と比べて *E.coli*-LG 群でグレードが低かった. また, PBS 群および LG 群では, 膵臓の炎症の所見は認めなかった.

C 膵臓の炎症性サイトカイン mRNA 発現

対照群を *E.coli*-PBS 群, LG 腹腔内投与群を *E.coli*-LG 群とした (各 n = 10). *E.coli*-PBS 群と比べて *E.coli*-LG 群で IL-1 $\beta$  の発現量は有意に少なく, IFN $\gamma$  および TNF $\alpha$  の発現量はより少ない傾向であった.

D  $\alpha$  多様性の検討

Chao1 index, Shannon index いずれにおいても, *E.coli* 群と比べて *E.coli*-LG 群で  $\alpha$  多様性は有意に高かった. \*p < 0.05

E *E.coli* 群と *E.coli*-LG 群間の REfSe 解析 (クラドグラム)

F *E.coli* 群と *E.coli*-LG 群間の REfSe 解析 (LDA 4 以上)

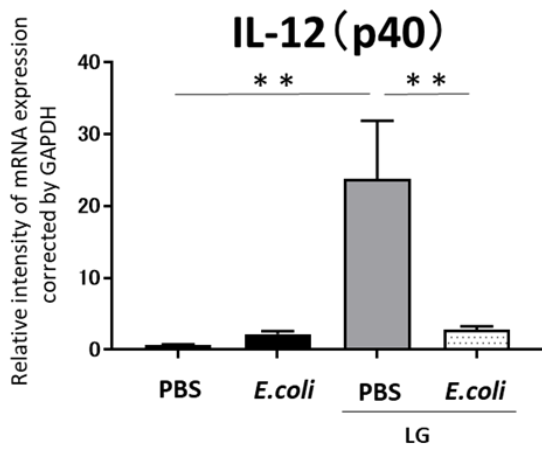
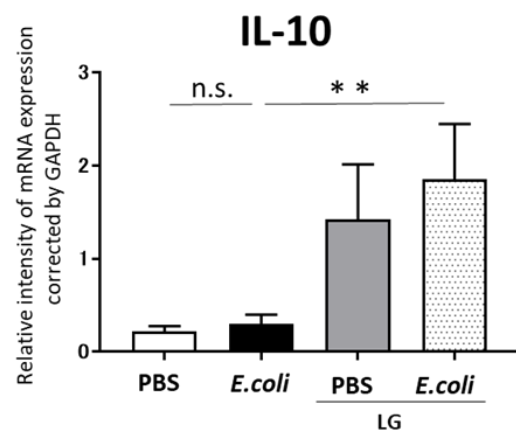
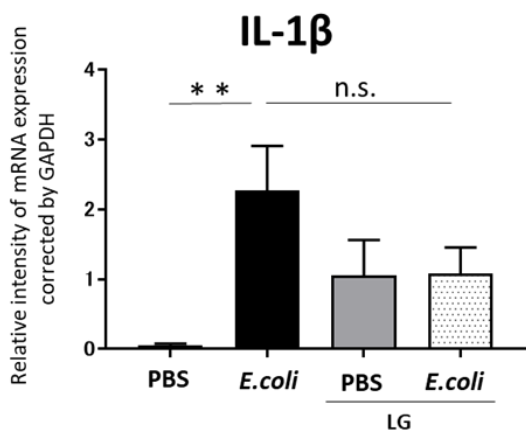
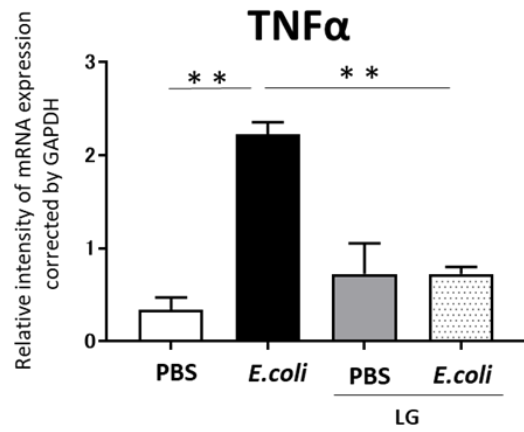
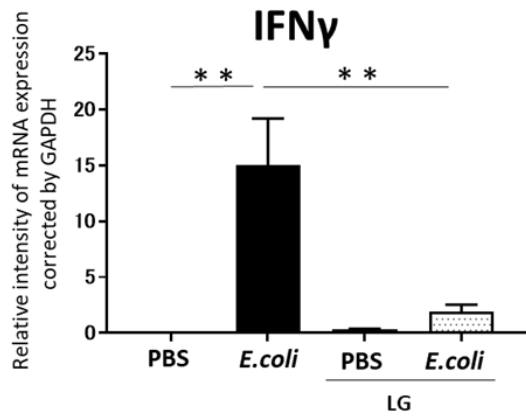
科レベルにおいて LDA スコアが高値を示したのは, *E.coli* 群で *Erysipelotrichaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Muribaculaceae*, *E.coli*-LG 群では *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Akkermansiaceae* であった.

IFN : Interferon, IL : Interleukin, LDA : Linear discriminant analysis,

LEfSe : Linear discriminant analysis effect size, LG : *Lactobacillus gasseri*,

mRNA : Messenger ribonucleic acid, PBS : Phosphate-buffered saline,

PCoA : Principal Coordinate Analysis, TNF : Tumor necrosis factor



## 図6 大腸菌およびLG刺激によるサイトカイン mRNA 発現

### 大腸菌刺激によるサイトカイン mRNA 発現

腹腔マクロファージに PBS 刺激をした群を PBS 群，大腸菌刺激をした群を *E.coli* 群として，両群を比較した（各 n = 6）．IFN $\gamma$ ，TNF $\alpha$ ，IL-1 $\beta$  いずれの発現量も *E.coli* 群で有意に多かった．IL-10 の発現量は両群で差はなかった．

### LG 刺激による炎症性サイトカイン mRNA 発現

大腸菌刺激の際に PBS を添加した群を *E.coli*-PBS 群，LG を添加した群を *E.coli*-LG 群，大腸菌刺激をせずに PBS，LG を添加した群をそれぞれ PBS 群，LG 群とした．*E.coli*-PBS 群を比べて，*E.coli*-LG 群では IFN $\gamma$ ，TNF $\alpha$  の発現は有意に少なく，IL-10 の発現は有意に多かった．

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01,

IFN : Interferon, IL : Interleukin, LG : *Lactobacillus gasseri*,

mRNA : Messenger ribonucleic acid, n.s. : Not significant,

PBS : Phosphate-buffered saline, TNF : Tumor necrosis factor



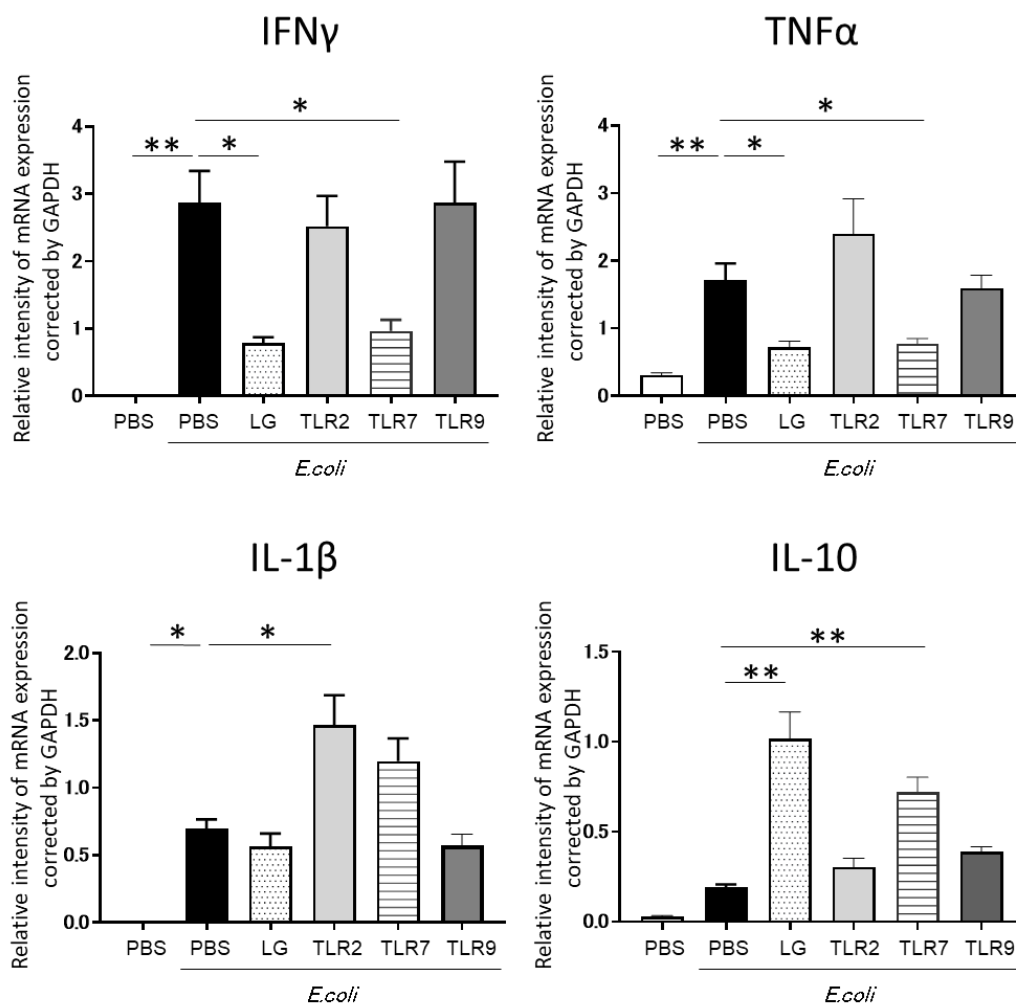


図7 乳酸菌の構成成分別の TLR ligand による炎症抑制作用の検討

大腸菌刺激時に PBS, LG, TLR2 ligand, TLR7 ligand, TLR9 ligand をそれぞれ添加し炎症性サイトカイン発現を比較検討した (PBS 群, LG 群, TLR2 群, TLR7 群, TLR9 群, 各群 n = 8)。

IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  の発現量は PBS 群と比較して LG 群, TLR7 群で有意に少なく, IL-10 の発現は LG 群, TLR7 群で有意に高かった。

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01,

IFN : Interferon, IL : Interleukin, LG : *Lactobacillus gasseri*,

mRNA : Messenger ribonucleic acid, PBS : Phosphate-buffered saline,

TLR : Toll like receptor, TNF : Tumor necrosis factor

表 1  $\beta$  多様性の検討

Group	Jaccard			Unweighted UniFrac			Weighted UniFrac		
	pseudo-F	p-value	q-value	pseudo-F	p-value	q-value	pseudo-F	p-value	q-value
PBS vs. <i>E.coli</i> (n=5)	7.1	0.010	0.010 *	4.6	0.016	0.017 *	6.4	0.006	0.009**
PBS vs. <i>E.coli</i> -LG (n=5)	6.5	0.003	0.005**	4.9	0.017	0.017 *	11.0	0.003	0.009**
<i>E.coli</i> vs. <i>E.coli</i> -LG (n=6)	11.9	0.003	0.005**	4.9	0.002	0.006**	18.6	0.009	0.009**