

～2024 年度インターナショナル・サマーサイエンススクール・
ハイデルベルク研究報告書～



崇城大学 生物生命学部 生物生命学科 2 年
高橋光

1) 初めに

私は、ドイツのハイデルベルク市で行われたインターナショナルサマーサイエンススクール 2024 に参加した。7 月 14 日～8 月 10 日の間、ハイデルベルク市内の研究機関のワークショップやハイデルベルク大学病院でのインターンシップに加え、様々なアクティビティに参加した。3 週間のインターンシップでは、フゾバクテリウムの大腸がんへの影響について実験を行った。8 月 8 日には、DKFZ で研究の成果発表が行われた。

2) フゾバクテリウムと大腸がん

フソバクテリウムは、歯周病、結腸直腸癌、局所皮膚潰瘍など、いくつかのヒトの病気や感染症を引き起こす可能性がある。フゾバクテリウムヌクレアタムは、ヒトに最も影響を与えるフソバクテリウム株である。結腸直腸癌は、大腸、特に結腸と直腸に発生する癌である。腺腫と呼ばれる良性ポリープが癌性になったときに発生する場合もあれば、正常な粘膜に直接発生する場合もある。

ほとんどの結腸直腸癌は、年齢と生活習慣の要因によるものであり、根本的な遺伝性疾患による原因はごくわずかである。危険因子には、西洋型食生活、肥満、喫煙、身体活動の欠如などが挙げられる。リスクを高める食事要因には、赤身の肉、加工肉、アルコールなどがある。

細菌は、腫瘍細胞に対する免疫系の反応を損なっているため、腫瘍は通常よりも簡単かつ迅速に成長することができる。

3) 実験方法

今回の研究では、FTIR、Maldi、MTT assay の 3 つの方法を行った。

最初に研究に用いるバクテリアの培養と DNA の分離を行った。DNA 分離は、サンプル(通常は血液、唾液、組織などの生物学的サンプル)から分離された生物の細胞から DNA を分離するプロセスである。これには、細胞を壊して開き、タンパク質やその他の汚染物質を取り除き、DNA を精製して他の細胞成分がないようにすることが含まれる。

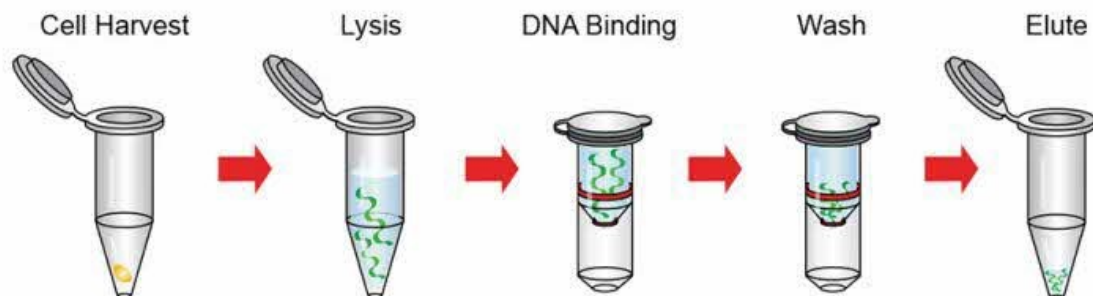


図 1. DNA 分離の流れ

3-1. FTIR

FTIR は、固体の吸収または放出の赤外線スペクトルを取得するために使用される手法である。FTIR 分光器は、広いスペクトル範囲にわたって高分解能のスペクトルデータを同時に収集する。これは、一度に狭い範囲の波長で強度を測定する分散型分光計に比べて大きな利点をもたらす。

3-2. Maldi

Maldi は、試料をマトリックスと混合し、レーザー光を照射してイオン化を行う。マトリックスとは、試料分子を保護しながらイオン化を助ける役割を持つ、イオン化支援剤のことである。約 20 種類の細菌を用い、その細菌がどのような種類のバクテリアであるのか調べた。

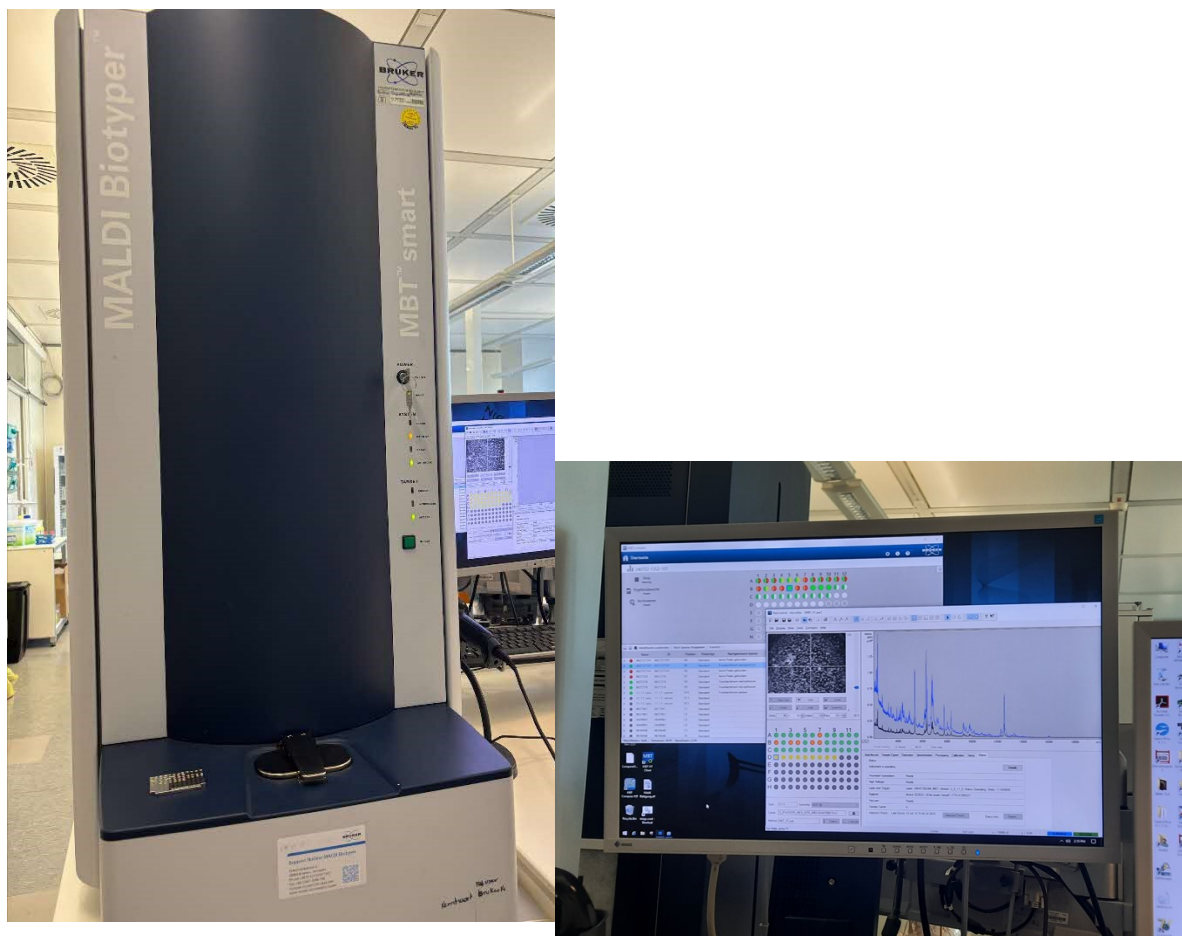


図 2. Maldi 装置

結果は色として現れ、測定したい物質が含まれている場合は緑、測定したい物質が特定できない場合は黄色になるが、バクテリアが存在しない場合は測定不可となる。

3-3. MTT assay

MTT アッセイ (MTT 法) の原理は、細胞増殖／細胞死を測定する方法の一つである。大腸がんの細胞が含まれる溶液にバクテリアを加えて培養し、その後 MTT 溶液(試薬)を加えることで生きた細胞が MTT を代謝し、細胞の増殖・減少を測定することが出来る。その際、代謝物の量によって黄色から紫に変化する。今回の実験では、がん細胞とバクテリアの培養時間を 3 時間と 20 時間にして対照実験を行った。

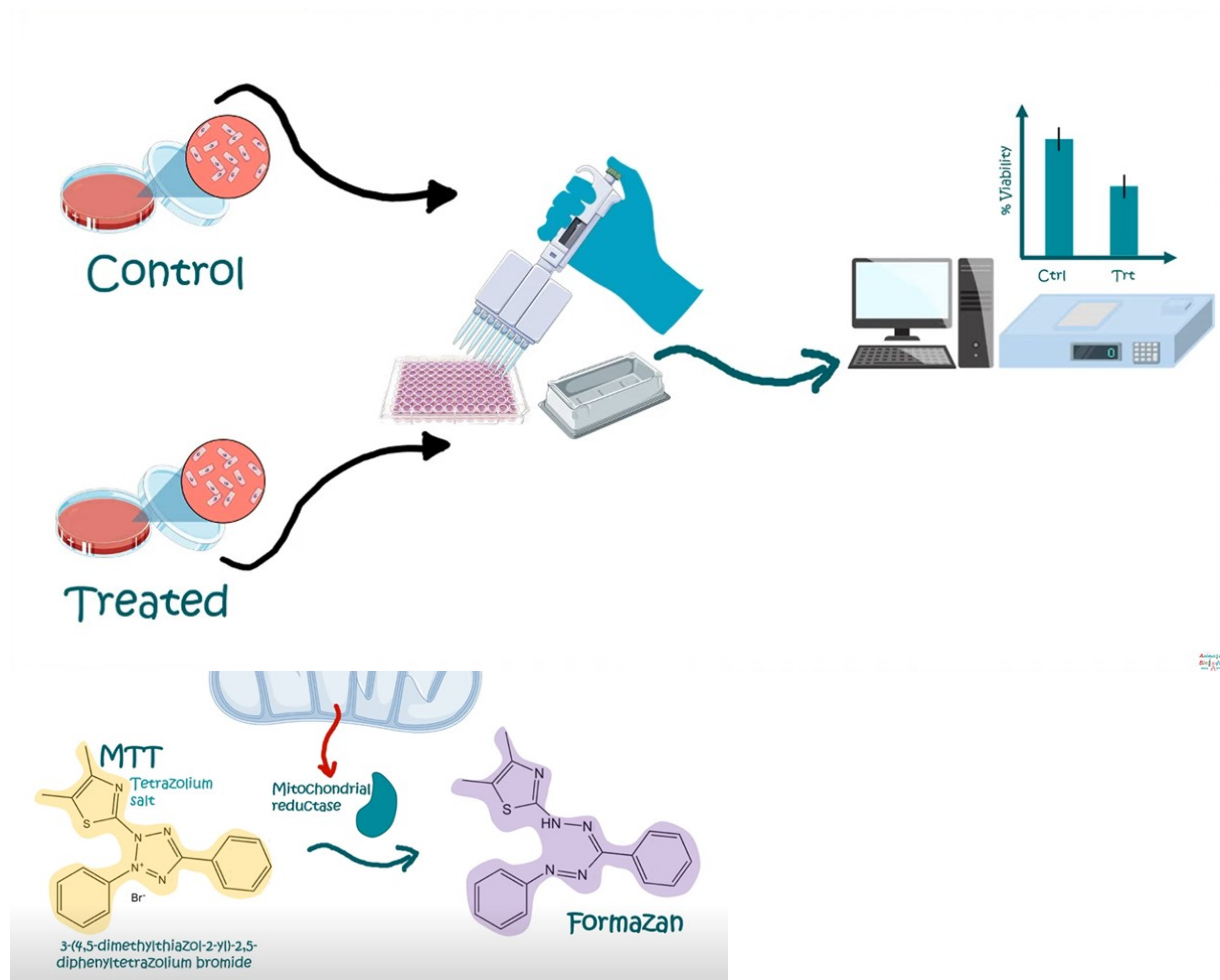


図 3. MTT assay の流れ

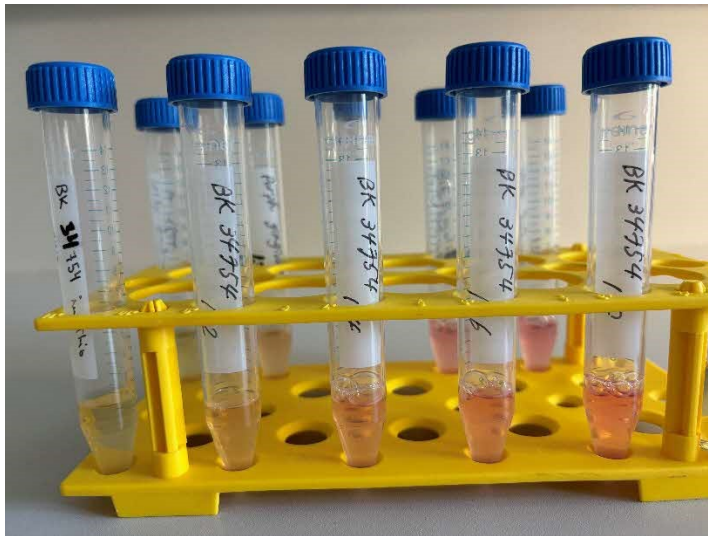


図 4. 大腸がん細胞とバクテリアの混合物(サンプル液)

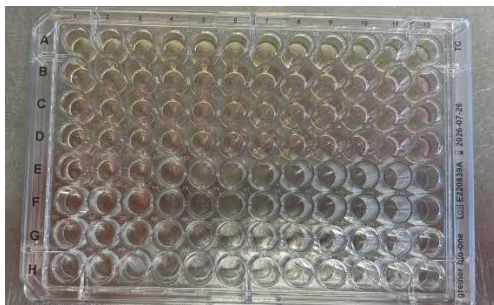


図 5. 試薬を加えた直後



図 6. 試薬を加えた 30 分後

4) 結果と考察

4-1. FTIR の結果

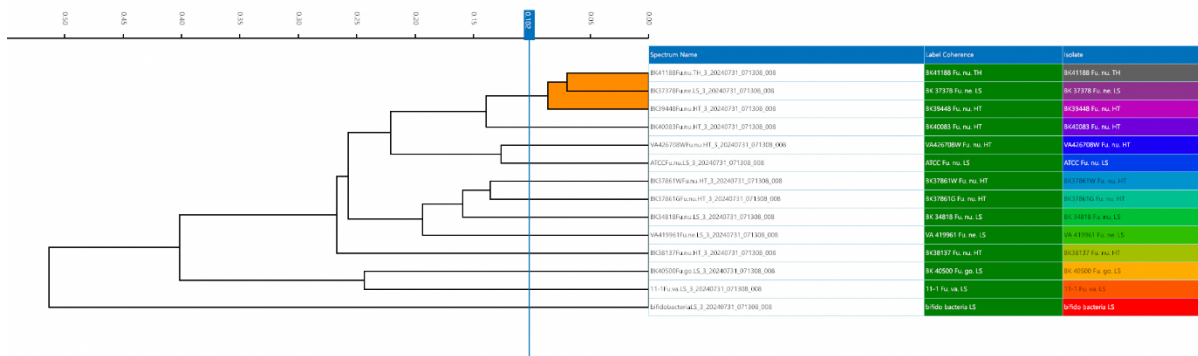


図 7. FTIR の計測結果

今回の実験では、*fusobacterium necrophorum*、*fusobacterium nucleatum*、*fusobacterium barium*、*bifidobacteria* を使用した。その結果、バクテリアの種類ごとに近い値が得られた。また、*fusobacterium necrophorum* と *fusobacterium nucleatum* は比較的近い値が得られた。一方で、*fusobacterium barium*、*bifidobacteria* は他の種に比べて高い値が得られた。

4-2. Maldi の結果

Ergebnisübersicht					
Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungszahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungszahl
(+++)(A)	BK 40500 (Standard)	Fusobacterium gonidiaformans	<u>2.10</u>	Fusobacterium gonidiaformans	<u>2.09</u>
(+++)(A)	BK 37861 gr. (Standard)	Fusobacterium nucleatum	<u>2.02</u>	Fusobacterium nucleatum	<u>1.95</u>
(+++)(A)	BK 37861 kl. (Standard)	Fusobacterium nucleatum	<u>2.20</u>	Fusobacterium nucleatum	<u>2.13</u>
(+)(B)	BK 41334 (Standard)	Staphylococcus epidermidis	<u>1.89</u>	Staphylococcus epidermidis	<u>1.82</u>
(+++)(A)	BK 41035 (Standard)	Streptococcus constellatus	<u>2.12</u>	Streptococcus constellatus	<u>1.97</u>

図 8. Maldi の測定結果

結果として、フゾバクテリウム属もいくつかの種があるが、種によって固有の値を持つことはない、一方で比較的近い値が得られた。

4-3. MTT assay の結果

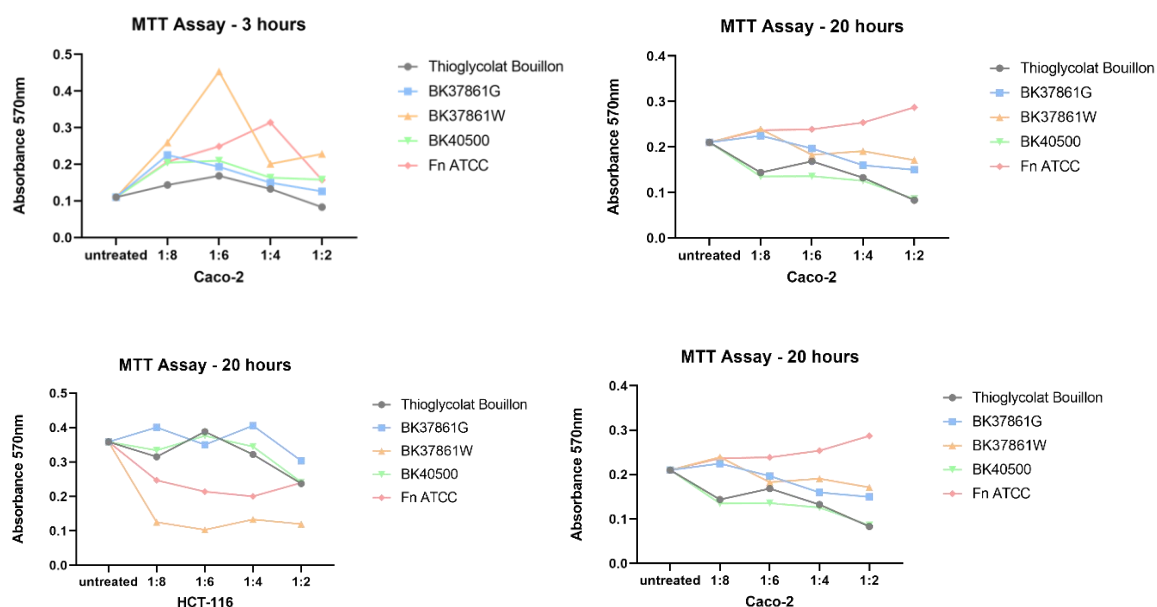


図 9. MTT assay の測定結果

グラフは 570nm の光照射したときの MTT の吸光度を示している。

上 2 つは Medium(培地)として Caco-2 を使用した時の結果である。Thioglycolat

Bouillon(以降 Thio と記す)は培養液であり、これと同じ動きをしているものとそうではないものがある。

3 時間の方を見ると、1:6 の時に最も吸光度が高い物が多いことから、代謝が多く行われたことが分かる。20 時間の方を見ると、Fn.ATCC 以外はすべて、バクテリアの割合が低くなるほど吸光度が下がっていることから、フゾバクテリウムが多く含まれている時がより MTT の代謝が活発に行われているということが分かる。また、下の 2 つは Medium が Caca-2 と HCT-116 で 20 時間培養したときの結果である。BK37861W と Fn.ATCC 以外は HCT-116 の Medium の時の方が吸光度が全体的に高いことが分かる。このことから、また、Caca-2 の時は Thio を基準にして、ポジティブなコントロールになっているが、HCT-116 の方は、ネガティブなコントロールのものがある。つまり、ネガティブなものは、バクテリアを入れることで代謝が下がっているということになるため、細胞数が減少したことになる。

4-4. まとめ

3 つの実験からフゾバクテリウムの種によって違う特徴を持っており、そのすべてが大腸がんの細胞増殖に影響を及ぼしているわけではないということが分かった。また、培地や培養時間、バクテリアの量によっても値が変化するため、人によって影響の大きさは異なってくるということが分かった。

4) 最後に

ハイデルベルクで過ごした 4 週間は、サイエンスの知識を身につけるだけでなく、自分自身を大きく成長させてくれたと考える。5 カ国 8 都市の学生が集まり、それぞれ違った文化があり、とても刺激を受けた。3 週間ハイデルベルク大学病院で研究をして、Dr.Zimmermann、Dr.My-lan は私と同じラボの Laura に熱心に指導して下さって、楽しく研究に取り組むことが出来た。

I am grateful to Dr.Zimmerman, Dr.My-lan, and Other participants.

I would also like to thank the city of Kumamoto and Heidelberg for giving me this opportunity. I will study Science and English harder.

