

研究紹介

分泌型免疫グロブリンAが認識する腸内細菌種の同定

鶴田 剛 司

(応用動物科学コース)

Identification of commensal bacteria coated with secretory immunoglobulin A

Takeshi Tsuruta

(Course of Applied Animal Science)

A part of commensal intestinal bacteria in mammal including human, mouse, bovine and pig are coated with secretory immunoglobulin A (S-IgA). It has been suggested from our previous research that S-IgA coating of commensal bacteria occur in bacterial group specific manner in human and mouse intestine. Thus, identification of S-IgA-coated bacterial genera/species would certainly help to elucidate the interaction between S-IgA and commensal intestinal bacteria. However, the method to identify the genera/species of S-IgA-coated bacteria has not been established. To identify S-IgA-coated bacterial composition, we developed the method combining immunohistochemical detection of S-IgA and subsequent 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis. Furthermore, human and mice fecal S-IgA coated bacterial composition was evaluated by this newly developed method with ten frequently-used FISH probes. Fecal S-IgA-coated bacterial composition was successfully analyzed with this method and this analysis suggested that *Enterobacteriaceae* was preferably coated with S-IgA whereas *Bacteroides/Prevotella* and *Lactobacillus/Enterococcus* groups seemed to be poorly coated with S-IgA. This method will be applied to confirm whether interaction between S-IgA and commensal intestinal bacteria relate to symptom of inflammatory bowel diseases.

Key words : Secretory immunoglobulin A, commensal intestinal bacteria, fluorescence in situ hybridization

緒 言

分泌型免疫グロブリンA (S-IgA) は哺乳動物の腸管腔内に分泌される主要な免疫グロブリンである。S-IgAの主な機能として病原微生物に対する感染防御機能が広く知られているが^{1,2)}、哺乳動物の腸管内に500種100兆個存在する腸内細菌に対してS-IgAがどのような影響を及ぼしているかは未解明な部分が多い^{3,4)}。腸管

内には病原細菌の排除機能を持つS-IgAが多量に(腸内細菌数の約 10^7 倍)腸管腔内に分泌されているにもかかわらず、腸内細菌は排除されることなく安定した腸内細菌叢を形成している。このことから、近年、S-IgAが腸内細菌に対して排除的機能以外の働きをしている可能性が提起されている。

S-IgAと腸内細菌の相互作用に関する新たな知見がWaijらによって報告された。哺乳動物の腸管腔において一部の腸内細菌はS-IgAが結合した状態で存在しており⁵⁾、この現象は全ての消化管部位で起こっていることが明らかとなった。しかし、S-IgAが結合している腸内細菌種は不明であるため、S-IgAの腸内細菌への結合が細菌種特異的な免疫応答であるか、あるいは非特異的な免疫応答であるかは明らかではない。その理由としてS-IgAが結合している腸内細菌種の検索方法が未だ確立されていないことが挙げられる。我々は、S-IgAが結合している腸内細菌(S-IgA被覆菌)を免疫染色で色素検出し、その後、その細菌種構成をfluorescence in situ hybridization (FISH法)で蛍光染色する新規手法を確立した。本研究では、確立した新規手法を用いてヒトおよびマウスの糞便中S-IgA被覆菌の細菌種構成を検討した。

材料と方法

ヒトボランティアおよび実験動物

ヒトボランティア5名(年齢:25~30歳)を本実験に採用し、インフォームドコンセントを全ての被験者から得た。9週齢のC57BL/6マウス(メス, n=5)をマウスブリーダーAおよびBより購入した。全てのマウスには固形飼料(CE-2, 日本クレア)および飲料水を自由給与させた。マウスは購入後1週間SPF施設にて馴化した。ヒトおよびマウスより糞便を採取し、30分以内に -80°C で保存した。

サンプル作製

採取した糞便サンプルをPBSで10倍希釈した後、マイクロホモジナイザーで5分間ホモジナイズした。粗雑物を除去するために糞便懸濁液を遠心分離($100 \times g$, 20分)した。上清を回収し、遠心分離($9,000 \times g$, 10分)により細菌ペレットを得た。細菌ペレットをPBS 1 mlで再懸濁し、ボルテックスで30秒間洗浄した。遠心分離後($9,000 \times g$, 10分)、上清を除去し、再度洗浄を行った。

その後、細菌ペレットを4%のパラホルムアルデヒドで再懸濁し、 4°C で一晩固定した。固定後、遠心分離($9,000 \times g$, 10分)を行い、1 mlのPBSで2回洗浄を行った。洗浄後、ペレットをエタノール-PBS (1:1, v/v)で懸濁し、解析まで -20°C で保存した。

S-IgA 被覆菌の免疫染色

上記サンプル溶液を適宜希釈し、シランコート10-well スライドガラス（松浪硝子工業）の各ウェルに20 μ l の希釈液を加えた。ドラフトチャンバーで乾燥させた後に、PBS で洗浄した。洗浄後、1% BSA-PBS で希釈したウサギ抗 IgA 抗体（1:100; Rockland 社）およびアインタイプコントロール（1:100; Dako 社）を30 μ l ずつ各ウェルに加えた。室温で1時間インキュベーションした後、PBS で5分間、3回洗浄を行った。洗浄後、1% BSA-PBS で希釈した HRP ラベル抗ウサギ IgG 抗体（1:100; Dako 社）を各ウェルに加えた。室温で1時間インキュベーションした後、PBS で5分間、3回洗浄を行った。その後、DAB タブレット（和光純薬）および0.0001% H₂O₂ (wt/vol) を添加した0.01 M Tris buffer (pH 7.2) 中で5分間インキュベートした。インキュベート後、蒸留水に浸し、DAB 発色反応を止めた。

FISH

FISH 法は Harmsen ら（2002）の報告に基づいて行った。免疫染色処理後のスライドガラスを99.5%エタノール中で脱水し、空気乾燥させた。16S rRNA をターゲットにしたオリゴヌクレオチドユニバーサルプローブ（EUB 338, Cy3 ラベル）および10種類の細菌群特異的な Cy3 ラベルオリゴヌクレオチドプローブを FISH 解析に使用した⁶⁾。オリゴヌクレオチドプローブ NON 338 は陰性コントロール用プローブとして使用した。プローブの配列、標的細菌群およびハイブリダイゼーションコンディションは Table 1 に示した。Cy3 ラベルオリゴヌクレオチドプローブ（5 ng/ μ l）を添加したハイブリダイゼーションバッファー [750 mM NaCl（和光純薬）、100 mM Tris-HCl（Sigma 社）、5 mM EDTA（ナカライテスク）、0.01% BSA (wt/vol, ナカライテスク)、10%硫酸デキストラン (wt/vol, Sigma 社)] を10 μ l ずつ各ウェルに加えた。その後、ハイブリダイゼーションバッファーをウェル全体に行き渡らせるためにカバーガラスをかぶせた。スライドガラスを湿潤箱に静置し、インキュベーター内で50°Cでインキュベーションした後、スライドガラスを洗浄バッファー [180 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.01% Sodium dodecyl sulfate (wt/vol; 和光純薬)] に浸し、45°Cで20分間インキュベートした。洗浄後、Milli-Q 水に浸し、空気乾燥させた。DAPI 染色後、蛍光の退色を防ぐため Vectashield (Vector Laboratories 社) を5 μ l ずつ各ウェルに加えた。封入後、スライドガラスを蛍光顕微鏡 (IX 81; オリパス社) で観察した。全画像の取得は IX 81 に付属のデジタルカメラ DP 71 (オリパス社) で行った。

統計解析

統計解析は統計解析ソフト Statcel 2 を用いて行った。それぞれの細菌群の総細菌数、S-IgA 被覆菌数および S-IgA 被覆率（総細菌数に占める S-IgA 被覆菌数の割

合）は平均 \pm 標準誤差 (SE) で示した。ヒトおよびマウスの各データの細菌群間の違いは一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合について、Bonferroni's multiple comparison test を用いて平均値の差の検定を行った。有意水準は5%とした ($P < 0.05$)。

結 果

S-IgA 被覆菌の細菌種構成検索

顕微鏡観察および画像取得には実験1と同じデジタルカメラ付属の蛍光顕微鏡を使用した。取得した画像は画像解析ソフトウェア Metamorph (Molecular Devices 社) を用いて画像解析を行った。S-IgA 被覆菌 (DAB 陽性) の解析のために明視野画像を、細菌種構成の検索および総細菌数の解析のために、同一視野の Cy3 および DAPI シグナルをそれぞれ撮影した。DAB 陽性および Cy3 陽性の閾値設定はアインタイプコントロール抗体で免疫染色したスライドガラスおよび NON 338 でハイブリダイゼーションを行ったスライドガラスを基準に行った。10種類の細菌群特異的なプローブで検出した総細菌数 (Cy3 陽性) および S-IgA 被覆菌数 (Cy3 および DAB 陽性) をそれぞれカウントした。総細菌数の計測は EUB 338 および DAPI シグナルを合成した画像を用いて行った。EUB 338 は全ての細菌にハイブリダイズしない可能性が報告されている^{7,8)}。また実験1の観察結果から DAPI が認識していない細菌を EUB 338 が認識しているというケースが多く見られた。これらのことから EUB 338 および DAPI シグナルを合成した画像を総細菌数の計測に用いた。

マウス

マウス (ブリーダー A) では、総細菌数に有意な差がないにも関わらず、S-IgA 被覆菌数は *Enterobacteriaceae* において clostridial clusters XIVa・XIVb, *Atopobium* cluster, *R. Flavifaciens*, *R. bromii* (検出限界以下), *Bacteroides/Prevotella* および *Lactobacillus/Enterococcus* groups より有意に多く存在した ($P < 0.05$) (Fig. 1 a, Table 2)。マウス (ブリーダー A) の S-IgA 被覆率は *Enterobacteriaceae* (29.45 \pm 6.81%) でその他の細菌群よりも有意に高かった ($P < 0.05$) (Fig. 1 a, Table 2)。マウス (ブリーダー B) では全ての細菌群でマウス (ブリーダー A) よりも高い S-IgA 被覆率を示した。しかし、マウス (ブリーダー B) もマウス (ブリーダー A) と同様に総細菌数に有意な差がないにも関わらず、S-IgA 被覆菌数は *Enterobacteriaceae* において *F. prausnitzii* を除いたその他の細菌群より有意に多く存在した ($P < 0.05$, Table 2)。また、S-IgA 被覆率も *Enterobacteriaceae* (71.43 \pm 6.06%) でその他の細菌群よりも有意に高かった ($P < 0.05$, Table 2)。その一方で S-IgA にコートされにくい細菌群も存在していた。マウス (ブリーダー B)

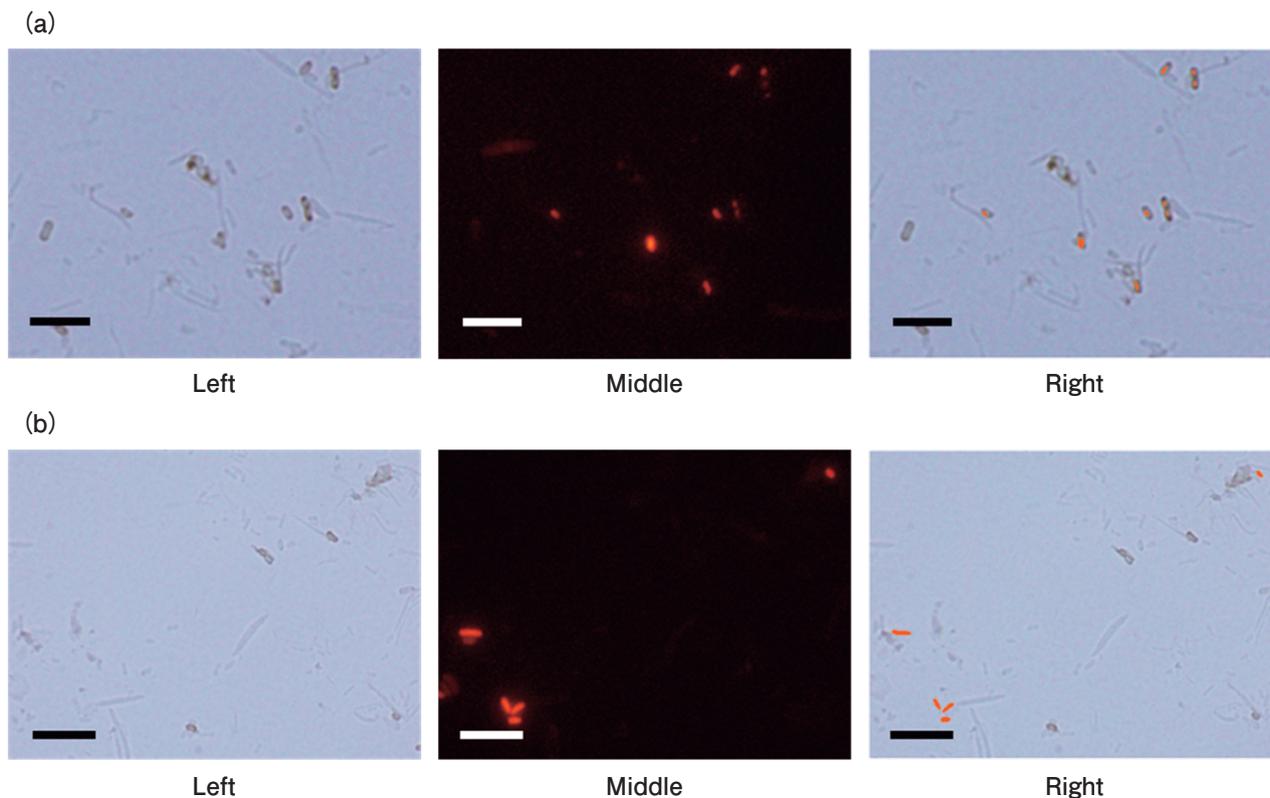


Fig. 1 Typical image of the *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillus/Enterococcus* groups coated with S-IgA. S-IgA-coated bacteria in mice faeces were hybridized with ENTER1432 (a) and LAB158 (b). Left : bright-field image, Middle : fluorescence image for Cy3 signals. Right : Merged image. Only red signal was extracted from fluorescence image and merged with bright-filed images using Azpainter 2 (free software). Bars represent 5 μm .

Table 1 Oligonucleotide probes used in this study

Probe	Target bacterial groups/species	Sequence (5'-3')	Hybridization conditions			References
			F*	TH**	L***	
EUB 338	Univsal eubacterial probe	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0	50	0	Amann <i>et al.</i> (1990)
NON 338	Negative control	ACTCCTACGGGAGGCAGC	0	50	0	Wallner <i>et al.</i> (1993)
BAC 303	<i>Bacteroides/Prevotella</i>	CCAATGTGGGGGACCTT	0	45	0	Manz <i>et al.</i> (1996)
EREC 482	Clostridial cluster XIVa and XIVb	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	0	50	0	Fraks <i>et al.</i> (1998)
BIF 164	<i>Bifidobacterium</i> genus	CATCCGGCATTACCACC	0	50	0	Langendijk <i>et al.</i> (1995)
LAB 158	<i>Lactobacillus-Enterococcus</i>	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	20	45	10	Franks <i>et al.</i> (1998)
FPRAU 645	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (part of cluster IV)	CCTCTGCACTACTCAAGAAAAAC	0	50	0	Suau <i>et al.</i> (2001)
RFLA 729	<i>Ruminococcus flavifaciens</i>	AAAGCCCAGTAAGCCGCC	20	50	15	Harmsen <i>et al.</i> (2002)
RBRO 730	<i>Ruminococcus bromii</i>	TAAAGCCCAGYAGGCCGC	20	50	15	Harmsen <i>et al.</i> (2002)
ENTER 1432	<i>Enterobacteriaceae</i>	CTTTTGCAACCCACT	0	50	0	Sghir <i>et al.</i> (2000)
ATO 291	<i>Atopobium</i> cluster	GGTCGGTCTCTCAACCC	0	45	0	Harmsen <i>et al.</i> (2000)
PROP 853	Clostridial cluster IX	ATTGCGTTAACTCCGGCAC	0	50	0	Walker <i>et al.</i> (2005)

*Formamide concentration in the hybridization buffer (%).

**Hybridization temperature (°C).

***Lysozyme treatment (min).

Table 2 The whole population, S-IgA coated population and the S-IgA coating ratio in the predominant faecal bacterial groups of mouse

Probe	Mouse (Supplier A)			Mouse (Supplier B)		
	Whole* population	S-IgA coated* population	S-IgA coating** ratio (%)	Whole population	S-IgA coated population	S-IgA coating ratio (%)
EU B338 or DAPI	124.14 ± 5.06	10.66 ± 0.56	8.64 ± 0.56	164.4 ± 36.51	10.09 ± 1.3	6.63 ± 0.66
	†					
ENTER 1432	5.52 ± 0.63 cde	1.74 ± 0.54 a	29.45 ± 6.81 a	6.1 ± 0.46 b	4.31 ± 0.36 a	71.43 ± 6.06 a
FPRAU 645	6.58 ± 0.78 cd	0.77 ± 0.28 ab	11.33 ± 4.25 b	9.24 ± 1.87 b	3.1 ± 0.87 ab	33.28 ± 5.93 b
PROP 853	6.72 ± 0.76 cd	0.63 ± 0.15 ab	9.44 ± 2.03 b	7.6 ± 1.51 b	0.77 ± 0.34 c	8.86 ± 3.84 bc
EREC 482	19.64 ± 1.68 a	0.19 ± 0.14 b	1.21 ± 0.97 b	29.22 ± 11.06 a	1.94 ± 0.76 bc	12.59 ± 5.28 bc
ATO 291	8.95 ± 1.07 bc	0.29 ± 0.18 b	3.21 ± 2.06 b	5.95 ± 0.84 b	1.31 ± 0.51 bc	23.46 ± 9.22 bc
BIF 164	6.29 ± 0.58 cde	0.87 ± 0.2 ab	13.87 ± 2.95 b	6.29 ± 1.1 b	1.5 ± 0.16 bc	25.8 ± 3.14 bc
RFLA 729	3.87 ± 0.4 de	0.05 ± 0.05 b	0.95 ± 0.95 b	4.93 ± 1.02 b	0.53 ± 0.25 c	12.96 ± 6.22 bc
		† †				
RBRO 730	1.79 ± 0.48 e	ND b	0 ± 0 b	5.08 ± 2.17 b	0.48 ± 0.19 c	21.35 ± 8.57 bc
BAC 303	9.92 ± 1.07 bc	0.26 ± 0.08 b	2.56 ± 0.77 b	7.89 ± 1.29 b	0.28 ± 0.08 c	3.95 ± 1.65 c
LAB 158	12.46 ± 1.31 b	0.36 ± 0.19 b	3.58 ± 2.11 b	7.79 ± 1.53 b	ND c	0 ± 0 c

Values are given as mean ± SE

*Counts 10⁸ cells per gram faeces

**The ratio of S-IgA coated population to whole population

† Values sharing the same letter are not significantly different at $P < 0.05$.

† † ND, not detected

Table 3 The whole population, S-IgA coated population and the S-IgA coating ratio in the predominant faecal bacterial groups of human

Probe	Human		
	Whole* population	S-IgA coated* population	S-IgA coating** ratio (%)
EU B338 or DAPI	151.68 ± 55.02	10.84 ± 1.23	9.32 ± 1.87
		†	
ENTER 1432	13.82 ± 4.63	2.79 ± 0.68 ab	22.56 ± 3.25
FPRAU 645	12.19 ± 4.44	0.81 ± 0.31 ab	7.47 ± 1.42
PROP 853	11.01 ± 1.26	2.67 ± 0.42 ab	25.04 ± 4.39
EREC 482	35.92 ± 9.66	4.68 ± 1.43 a	18.28 ± 8.35
ATO 291	41.57 ± 9.76	4.1 ± 1.91 ab	11.44 ± 5.89
BIF 164	84.88 ± 56.8	1.94 ± 0.27 ab	5.8 ± 1.78
RFLA 729	2.53 ± 1.32	0.39 ± 0.34 b	13.33 ± 8.16
RBRO 730	17.78 ± 16.97	0.39 ± 0.2 b	11.61 ± 8.54
BAC 303	3.69 ± 1	0.31 ± 0.15 b	7.43 ± 3.59
LAB 158	2.75 ± 0.89	0.08 ± 0.08 b	1.43 ± 1.43

Values are given as mean ± SE

*Counts 10⁸ cells per gram faeces

**The ratio of S-IgA coated population to whole population

† Values sharing the same letter are not significantly different at $P < 0.05$.

では総細菌数に有意な差がないにも関わらず、*Bacteroides/Prevotella* グループ (3.95 ± 1.65%) および *Lactobacillus/Enterococcus* グループ (検出限界以下) の S-IgA 被覆率は *Enterobacteriaceae* (71.43 ± 6.06%) および *F. Prausnitzii* (33.28 ± 5.93%) より有意に低い値を示した ($P < 0.05$) (Fig. 1 b, Table 2). マウス (ブリーダー A) でも同様の傾向が見られ、*Bacteroides/Prevotella* グループ (2.56 ± 0.77%) および *Lactobacillus/Enterococcus* グループ (3.58 ± 2.11%) で低い S-IgA 被覆率を示した。

ヒト

S-IgA 被覆率は各細菌群間で有意な差がなかったが ($P = 0.07$), マウス糞便中の結果と同様の傾向がヒトの糞便中でも見られた。*Enterobacteriaceae* は高い割合で S-IgA によりコートされており (22.56 ± 3.25%), *Bacteroides/Prevotella* グループ (7.43 ± 3.59%) および *Lactobacillus/Enterococcus* グループ (1.43 ± 1.43%) の S-IgA 被覆率は低かった (Table 3). マウスとは違い、ヒトでは clostridial cluster IX (25.04 ± 4.39%) で高い S-IgA 被覆率を、*Bifidobacterium* (5.8 ± 1.78%) で低い S-IgA 被覆率をそれぞれ示した。

考 察

本実験で確立した S-IgA 被覆菌の細菌叢構成の検索方法は多量の S-IgA によりコートされた S-IgA 被覆菌

をターゲットにした検索方法ではあるが、各細菌群のS-IgA被覆率はブリーダーの異なるマウス間およびマウス・ヒト間で異なることが本法により明らかとなった。これはブリーダーの異なるマウス間およびマウス・ヒト間の細菌種構成の違い^{9,10)}が原因であると考えられる。

加えて、ヒトおよびマウスの糞便中S-IgA被覆菌の細菌叢構成検索の結果から2つの興味深いことが示唆された。ひとつは*Enterobacteriaceae*がその他の細菌群と比較して顕著に高いS-IgA被覆率を示したことで、もうひとつは*Bacteroides/Prevotella*グループおよび*Lactobacillus/Enterococcus*グループなどのS-IgAにコートされにくい細菌群の存在である。

これらの結果は我々の過去の研究¹¹⁾において示唆されてきた常在性腸内細菌がS-IgAにより選択的にコートされている可能性を強く支持するものであると考えられる。なぜ*Enterobacteriaceae*が選択的にS-IgAによりコートされるのか、また、*Bacteroides/Prevotella*グループおよび*Lactobacillus/Enterococcus*グループがS-IgAコートを免れているのかは興味深い点ではあるが、本研究からはその原因は不明であり、今後の研究で明らかにする必要がある。

本実験から確立したS-IgA被覆菌の細菌叢構成の新規検索方法はヒトおよびマウスの糞便を用いた解析に適用でき得る手法であることが明らかになった。

ヒトの生理状態が変化することによってヒトの糞便中S-IgA被覆率も変化することが報告されている。Van der Waaijら(2004)は炎症性腸疾患(IBD)患者においてS-IgA被覆率が上昇することを報告しており¹²⁾、Nadalら(2008)はライフスタイル介入試験により体重が6kg以上減少したヒトボランティアにおいて糞便中のS-IgA被覆率が減少することを報告している¹³⁾。しかし、これらのS-IgA被覆率の変化の原因は依然として不明である。本研究で確立したS-IgA被覆菌の細菌叢構成の検索方法はこれらの生理状態の変化に伴うS-IgA被覆率の変化がどの細菌種へのS-IgA被覆率の変化によるものなのかを明らかにできると考えられる。

謝 辞

本研究は北海道大学農学研究院教授・原博博士、京都府立大学講師・井上亮博士の指導の下で行われたものである。ここに感謝を申し上げます。

引用文献

- 1) Mazanec, M. B., Kaetzel, C. S., Lamm, M. E., Fletcher, D., Nedrud, J. G : Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **89**, 6901-6905 (1992)
- 2) Ren, J. M., Zou, Q. M., Wang, F. K., He, Q., Chen, W., Zen, W. K : PELA microspheres loaded *H. pylori* lysates and their mucosal immune response. World J. Gastroenterol., **8**, 1098-1102 (2002)
- 3) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V : Human faecal flora : The normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. Appl. Microbiol., **27**, 961-979 (1974)
- 4) Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A : Diversity of the human intestinal microbial flora. Science, **308**, 1635-1638 (2005)
- 5) Van der Waaij, L. A., Limburg, P. C., Mesander, G., Van der Waaij, D : In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. Gut, **38**, 348-354 (1996)
- 6) Chassard, C., Scott, K. P., Marquet, P., Martin, J. C., Del'homme, C., Dapigny, M., Flint, H. J., Bernalier-Donadille, A : Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. FEMS Microbiol. Ecol., **66**, 575-583 (2008)
- 7) Bouvier, T., del Giorgio, P. A : Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH) : a quantitative review of published reports. FEMS Microbiol. Ecol., **44**, 3-15 (2003)
- 8) Rogers, S. W., Moorman, T. B., Ong, S. K. : Fluorescent in situ hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil. Soil Sci. Soc. Am. J., **71**, 620-631 (2007)
- 9) Ohashi, Y., Hiraguchi, M., Ushida, K : The composition of intestinal bacteria affects the level of luminal IgA. Biosci. Biotechnol. Biochem., **70**, 3031-3035 (2006)
- 10) Salzman, N. H., De Jong, H., Paterson, Y., Harmsen, H. J., Welling, G. W., Bos, N. A : Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. Microbiology, **148**, 3651-3660 (2002)
- 11) Tsuruta, T., Inoue, R., Nojima, I., Hara, H., Tsukahara, T., Yajima, T : The amount of secreted IgA may not determine the secretory IgA coating ratio of gastrointestinal bacteria. FEMS Immunol. Medical. Microbiol., **56**, 185-189 (2009)
- 12) Van der Waaij, L. A., Kroese, F. G. M., Visser, A., Nelis, G. F., Westerveld, B. D., Jansen, P. L. M., Hunter, J. O : Immunoglobulin coating of faecal bacteria in inflammatory bowel disease. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., **16**, 669-674 (2004)
- 13) Nadal, I., Santacruz, A., Marcos, A., Warnberg, J., Garagorri, M., Moreno, L. A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., Martí, A., Molerés, A., Delgado, M., Veiga, O. L., Garcia-Fuentes, M., Redondo, C. G., Sanz, Y : Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. Int. J. Obes., **33**, 758-767 (2008)