

研究報告 2019 (KISTEC Annual Research Report, 2019)

【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「腸内細菌叢」プロジェクト

解析ツール開発グループ

◆総括	105
プロジェクトリーダー兼グループリーダー 大野 博司	
◆肥満者、または、耐糖能異常者に特有の腸内細菌と代謝物の探索	108
中西 裕美子	
◆業績	111
腸内環境制御グループ	
◆総括	113
腸内環境制御グループグループリーダー 福田真嗣	
◆腸内環境制御基盤技術の開発に向けた難培養性腸内細菌の培養法確立および生体に与える影響 の評価	116
中藤 学	
◆業績	119

腸内細菌叢プロジェクト

解析ツール開発グループ

プロジェクトリーダー兼グループリーダー 大野 博司

【基本構想】

我が国において糖尿病患者は増加の一途をたどり、罹患患者数は約 950 万人を数えるに到っている。糖尿病は高齢者における主要な疾患であり、糖尿病に肥満・高脂血症・高血圧が合併するメタボリックシンドロームは動脈硬化を促進し、心筋梗塞・脳卒中のリスク増大を介して日本人の健康寿命を短縮する最大の原因となっており、大きな社会的・経済的問題となっている。最近腸内細菌と肥満、2 型糖尿病といった生活習慣病との関連が動物やヒトで報告され、このことが肥満や 2 型糖尿病の誘因の 1 つとなっているのではないかと考えられる。従って摂取する栄養素やエネルギー状態によって変化する腸内細菌叢を捉えることができれば、肥満や 2 型糖尿病発症といった生活習慣病の予測や治療に役立つと考えられる。本研究では、摂取する栄養素やエネルギー状態の把握とメタゲノム解析による腸内細菌の菌種や機能といった包括的な解析に加え、遺伝的背景を加味し、そのデータを横断的に解析することにより、食習慣、腸内細菌叢、生活習慣病発症の相互関係を明らかにすることを目的とする。方法は、これまでの欧米人の論文をもとに東京大学付属病院の検診受診者で 20 歳から 75 歳までの男女含む肥満者 100 名、耐糖能異常者 100 名、肥満も耐糖能異常もない者 計 100 名の合計 300 名を対象とした。解析項目は、(1) 簡易型自記式食事歴法質問票 (BDHQ) を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定、(2) 腹部エコーを含む臨床データ (3) 血中アディポカインの測定、(4) 腸内細菌叢の 16S・メタゲノム解析、(5) 血中・糞便中のメタボローム解析、(6) 単核球を用いたトランスクリプトーム解析、(7) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析、(8) 統合データベースの作成と解析ツールの開発を行う。このことにより、どのような腸内細菌叢が生活習慣病発症に重要な役割をしているかが明らかとなり、さらに新規バイオマーカーなどの開発や予防薬、個別化医療といった新しい予防法やリスク診断の実現を目指す。

1. 平成 30 年度の研究目的

本研究では、摂取する栄養素やエネルギー状態の把握とメタゲノム解析による腸内細菌の菌種や機能といった包括的な解析に加え、遺伝的背景を加味し、そのデータを横断的に解析することにより、食習慣、腸内細菌叢、生活習慣病発症の相互関係を明らかにすることを目的とする。方法はこれまでの欧米人の論文をもとに東京大学付属病院の検診受診者で 20 歳から 75 歳までの男女含む肥満者 100 名、耐糖能異常者 100 名、肥満も耐糖能異常もない者 計 100 名の合計 300 名を対象とする。また 2 週間以内に何らかの抗生物質を投与あるいは内服した者、何らかの消化器系の薬を内服している者、糖尿病治療薬を内服している者、3 ヶ月以内に体重が 3 kg 以上増減した者は、腸内細菌叢に影響を与える可能性が大きいためリクルートから除外し解析する。解析する項目は、(1) 簡易型自記式食事歴法質問票 (BDHQ) を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定、(2) 腹部エコーを含む臨床データ、(3) 血中アディポカインの測定、(4) 腸内細菌叢の 16S・メタゲノム解析、(5) 血中・糞便中のメタボローム解析、(6) 単核球を用いたトランスクリプトーム解析、(7) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析、(8) 統合データベースの作成と解析ツールの開発を行う。昨年度に引き続き上記項目について解析し、食習慣・身体活動量、腸内細菌叢、生活習慣病

発症の相互関係について解析する。

2. 研究の成果

(1) 簡易型自記式食事歴法質問票 (BDHQ) を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定

昨年度 7 月よりリクルートを開始し、現地点で 313 名をリクルートし、219 名の同意を得ることができ、同意取得率 69.9% であり、順調に経緯した (図 1)。特に再受診された方の同意取得率は 83.7% と非常に高かったが、再受診されず、郵送のみの方の同意取得率は 47% と約 1.7 倍の差があ

図 1 BDHQ と活動量のリクルート状況

Month	Consent (-)	Consent (+)	A group	B group	C group	Consent rate (%)	Total/M
Jul/17	1	17	3	4	10	94.4	18
Aug/17	3	15	3	7	5	83.3	18
Sep/17	3	11	3	4	4	78.6	14
Oct/17	5	16	7	5	4	76.2	21
Nov/17	2	18	8	7	3	90.0	20
Dec/17	3	12	0	8	4	76.9	15
Jan/18	1	9	5	2	2	90.9	10
Feb/18	1	7	4	1	2	87.5	8
Mar/18	3	6	3	1	2	66.7	9
Apr/18	3	8	6	0	2	72.7	11
May/18	1	13	6	4	3	92.9	14
Jun/18	5	18	6	4	8	78.3	23
Jul/18	1	6	1	1	4	85.7	7
Aug/18	0	0	0	0	0	-	0
Sep/18	0	2	0	2	0	100	2
Oct/18	0	4	3	0	1	100	4
Nov/18	0	1	0	1	0	100	1
Dec/18	0	1	0	1	0	0	1
Total	32	164	58	52	54	83.7	196

Month	Consent (-)	Consent (+)	A group	B group	C group	Consent rate (%)	Total/M
Sep/18	27	13	12	1	0	32.5	40
Oct/18	32	8	0	5	3	20.0	40
Nov/18	27	10	2	3	4	27.0	37
Dec/18	0	14	3	5	6		
Feb/19	0	10	3	2	3	27.0	
Total	86	55	17	14	13	47.0	117

った。この違いは元々再受診者の方が健康に対する意識が高い可能性があったのではないかと考えられた。またBDHQと活動量計については、今後の食習慣や身体活動量の参考にしていただくために、その一部のデータを被験者全員に返却した。

(2) 腹部エコーを含む臨床データ

同意撤回者/糞便未提出者/解析困難者が9名存在し、肥満も耐糖能異常もない者106名、肥満者97名、耐糖能異常者(肥満+非肥満者)100名のサンプル採取が終了するとともに、腹部エコーを含む臨床データを取得することが出来たため統合データベースに格納した。

(3) 血中アディポカインの測定

303名分に対しAdiponectin, MCP-1, CRPといった血中のアディポカインの測定を終了したため、統合データベースに格納した。

(4) 腸内細菌叢の16S・メタゲノム解析

健康者、肥満者、耐糖能異常者の糞便検体を用いて、DNA抽出し、16S rRNA遺伝子のV1-2領域をPCRで増幅しシーケンシングを行い、菌種の同定を試みた。追加したデータを含めて解析したところ、昨年度のデータと傾向は一致し、門レベルにおいて耐糖能異常者でFirmicutes門が減少、肥満者でBacteroidetesの減少を認めた。更に肥満者、耐糖能異常者ではActinobacteriaの増加を認めた。

(5) 血中・糞便中のメタボローム解析

安定的かつ正確性を期するために、糞便中の水溶性代謝産物について195検体を解析し204物質を同定した。さらに脂質代謝産物について150検体を解析し348物質を同定し、Spearmanの相関係数を用いてクラスティングを行い、水溶性代謝産物については45、脂溶性代謝産物については38のクラスターに分類した。血漿中の水溶性代謝物を解析した結果、91物質が同定された。主成分分析の結果から耐糖能異常者の血漿中水溶性代謝物は健康者や肥満者と異なることが分かった。

(6) 単核球を用いたトランスクリプトーム解析

昨年度に引き続き正常者、肥満患者、糖尿病予備群(IGT)の末梢血単核細胞から、RNAを抽出しCAGE遺伝子発現解析を行い、疾患バイオマーカーの同定を合計300名分を行った。正常者に比べ肥満患者・糖尿病予備群で発現量が上昇した遺伝子には、免疫細胞のシグナル伝達に重要なPTPN6(SHP1)、2型糖尿病のリスク遺伝子であるTCF7L2など疾患との関連性が報告されているものが複数含まれていた。

(7) 全ゲノムシーケンセスによる遺伝子多型解析

昨年度に引き続き肥満も耐糖能異常もない者135名に対してイルミナ社TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kitを用いてライブラリーを作製後、イルミナ社のHiSeqXを使用して全ゲノムシーケンセスを行った。ライブラリーの両側から配列を151bp、1サンプル当たり45Gbp以上を解読した。

(8) 統合データベースの作成と解析ツールの開発

サンプル、データ、グループといった個々が連動して動くことができるというコンセプトの元、臨床データ、アディ

ポカインデータらを格納した。さらに個々の被験者データを瞬時に描出できるようにするとともに(図2)、研究者が解析したい項目だけをエクセル表として抽出できるようにした(図3)。

図2

患者データ詳細画面(腸内細菌)

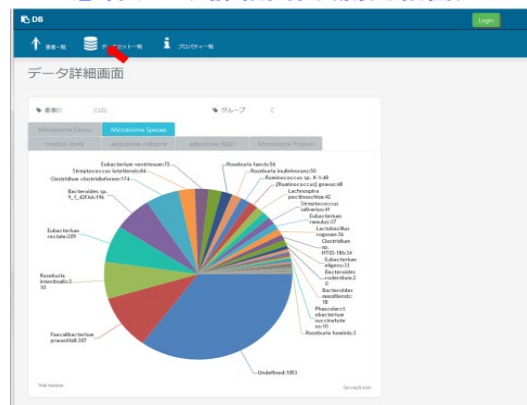


図3

患者データ出力選択画面

(9) マルチオミックス解析を用いた肥満・耐糖能異常者における腸内細菌叢との関連についての検討

これまでに2型糖尿病と腸内細菌に関しては、2012年に中国から2型糖尿病に関わる約60,000種類のマーカーが発見され、特に2型糖尿病患者でClostridium属やBacteroides属の細菌が優位であること、また2型糖尿病患者では、腸上皮バリア機能の保持に重要な役割を果たす酪酸の生合成に関わる細菌叢が減少しており、逆に酸化ストレスに対し保護的に働くカタラーゼなどの還元酵素と逆相関することが明らかとなっている¹。2013年には平均年齢70歳のヨーロッパ人女性の2型糖尿病の解析からClostridium属、Ruminococcus属、Faecalibacterium属が正常耐糖能者で優位に、Lactobacillus gasseriが2型糖尿病患者で優位であることが見出され、さらに酪酸を産生する腸内細菌の数が健康な女性に比べ減少していることが報告されている²。そこでSpearmanの相関係数によってクラスター分類した項目で、メタボリックシンドローム、NAFLD、肥満、耐糖能異常と有意な相関のあるパラメータを抽出し腸内細菌との関連性を検討し、腸内細菌の絞り込みを行った。絞り込んだ腸内細菌と臨床パラメータの関連を検討したところ、Collinsella, Allisonella, Acidaminococcusは肥満者

や耐糖能異常者において有意に増加していることが明らかとなった。

(10) 脂肪肝を中心とした検討

食生活の欧米化や車社会による運動不足に伴い、平成 28 年度の国民健康・栄養調査では肥満者(Body mass index $\geq$ 25)の割合は男性で 31.3%、女性で 20.6%存在していることが報告されている。そして BMI の増加とともに非アルコール性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)の有病率がこの 10 年間で約 2 倍まで増加している³。この NAFLD の原因の一つとして、最近腸内細菌の関与が指摘されており、実際 NAFLD 罹患者では Bacteroidetes 門が減少し、Firmicutes 門が増加していることが明らかになっている⁴。しかし NAFLD が腸内細菌を介してどのように発症するのかは十分に分かっていない。そこで臨床データについて詳細に解析したところ、肥満者、耐糖能異常者では BMI、中性脂肪、肝臓の数値が有意に高値を示し、善玉のコレステロールである HDL が有意に低値を示した。一方血圧や悪玉のコレステロールである LDL は 3 群間で差を認めなかった。つまり NAFLD を解析するのに非常に適したサンプルであると考えられた。実際腹部エコーでは肥満者、耐糖能異常者で脂肪肝と指摘されている方が多く存在していた。そこで NAFLD を中心に多重ロジスティック回帰分析を行うと非肥満者では BMI と中性脂肪が、肥満者では ALT と HDL が NAFLD と関連性が強いことが明らかとなり、非肥満者と肥満者での NAFLD の成因が異なる可能性が示唆された。さらにこれらのパラメータと腸内細菌について検討したところ、Allisonella がすべてのパラメータと有意な相関を示した。

3. 今後の研究計画

- (1) 簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定
東京大学検診部や病態栄養治療部の現場スタッフと密に連携し、クレームらの対応を検討するとともにリクルート率の向上を図っていく。また受診予定の被験者に対しては、郵送で対応していく。
- (2) 腸内細菌叢の 16S・メタゲノム解析
各種臨床パラメータやメタボローム解析結果との相関解析やクラスター解析で候補に挙げた細菌についてはマウスで確認する。また 16S 解析だけでは十分な情報を得ることができないため、今後はメタゲノム解析も追加で行う。
- (3) 血中・糞便中のメタボローム解析
引き続き血清中のアミノ酸や短鎖脂肪酸濃度についても測定していく。解析したデータについて、個々人の糞便中のアミノ酸や短鎖脂肪酸濃度との相関解析を行うとともに、腸内細菌叢との関連解析を行い、これらの代謝物の変

化と関連する細菌を探索する。さらに脂溶性代謝産物に関しては、解析サンプル数を増加させるとともにノンターゲット法で候補になった物質に関して、ターゲット法を用いて精度を上げて測定していく。

(4) 統合データベースの作成と解析ツールの開発

昨年度に引き続き統合データベースおよび解釈プラットフォームをそれぞれのサブパートに分けてモジュール化し、臨床データおよび解析データを安全に保存し便利な使用環境と融通性ある活用が可能となる統合データベースおよび解析プラットフォームの構築を行う。また複数の遺伝子発現量の組み合わせ、さらにマイクロバイオーム、メタボロームデータを組み込むことで、より高い確率で正常者と肥満・糖尿病予備群を識別できるアルゴリズムの開発に取り組む。これらの遺伝子は、疾患メカニズムに関わっている可能性もあることから、今後ノックアウトマウスなどを用い疾患との因果関係を検証していく。

【参考文献】

1. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*.49:55-60,2012.
2. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*.498:99-103,2013.
3. Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol* 47: 586-595. 2012.
4. Nistal E, Sáenz de Miera LE, Ballesteros Pomar M, Sánchez-Campos S, García-Mediavilla MV, Álvarez-Cuenllas B, Linares P, Olcoz JL, Arias-Loste MT, García-Lobo JM, Crespo J, González-Gallego J, Jorquera Plaza F. An altered fecal microbiota profile in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with obesity. *Rev Esp Enferm Dig*.111:275-282, 2019.

肥満者、または、耐糖能異常者に特有の

腸内細菌と代謝物の探索

中西 裕美子

1. はじめに

近年、肥満や2型糖尿病（T2D）といった生活習慣病と腸内細菌との関連が動物やヒトで報告されている。肥満のヒトではFirmicutes門の細菌とBacteroidetes門の細菌の比（Firmicutes/Bacteroidetes [F/B]比）が高く、細菌種の多様性は低いことなどが報告されている。さらに肥満やT2Dの患者の腸内細菌を無菌マウスに移植すると同様の病態を生じることから、異常な菌の組成そのものが病態の原因の1つであることが証明されている。従って、肥満やT2Dに伴う異常な腸内細菌叢を改善することで病態の治療や予防に役立つことが期待されている。本研究では、肥満やT2Dの発症に関連する腸内細菌やその代謝物を探索し、また、それらの機能解析を行うことで、肥満やT2Dの発症や悪化に関与する腸内細菌のメカニズムを解明する。

1. 1 肥満やT2Dと腸内細菌との関わり

近年、世界中で増加の一途をたどっている肥満や糖尿病が腸内細菌と密接な関わりがあると多数報告されている。まず、2006年にGordonらのグループが肥満の患者や肥満モデルマウスにおいて、Firmicutes門が増加し、Bacteroidetes門が減少することを報告した[1, 2]。その後、肥満のヒトや肥満モデルマウスにおいて、Verrucomicrobia門の*Akkermansia muciniphila*の割合が減少していることが明らかとなり、同菌をマウスに経口投与したところ、インスリン抵抗性や脂肪の蓄積といったメタボリックシンドロームの病態を改善できたことが報告された[3]。一方、T2Dの発症には遺伝的要因と環境要因が関与すると考えられているが、これまでの研究から遺伝学的要因の寄与は小さく、環境要因の影響の方が大きいことが示唆されている[4]。そのため、環境要因の1つとして近年、腸内細菌の重要性が注目されており、実際に、中国やヨーロッパにおいてT2D患者の大規模コホート研究が行われた[5, 6]。中国人のT2D患者の腸内細菌叢のメタゲノム解析（細菌のゲノム情報すべてを読み、どのような遺伝子を持つかを解析する手法）結果から、T2D群に特徴的な腸内細菌の遺伝子群を用いてT2D発症リスクを判別することが可能であることが報告されている[5]。また、ヨーロッパでも同様のコホートが行われたが、2つコホート研究を比較するとヨーロッパ系コホートと中国人コホートではT2Dを識別するメタゲノムマーカーが異なっていたことから、メタゲノムによるT2D予測法は、研究の対象集団の年齢や居住場

所に応じて作成する必要があると提唱されている。

1. 2 日本における肥満やT2Dを対象とした腸内細菌研究

前述のように、海外ではヒトを対象とした肥満やT2Dの対規模なコホート研究が行われているが、日本人における肥満やT2Dの腸内細菌叢の研究例は少ない。肥満に関しては2015年に発表された健常者23名と肥満者33名の糞便中の腸内細菌叢をT-RFLP（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism）法で比較した結果では、Bacteroidetes門の細菌が肥満者で有意に低かったことを報告している[7]。また、T2Dに関しては健常者50名と2型糖尿病患者50名の糞便中の腸内細菌をRT(Real time)-PCR法で比較した結果、T2D患者で*C. coccoides* group、*Atopobium* cluster、*Prevotella*属が有意に減少し、*Lactobacillus*属が有意に増加していた。また、*C. coccoides* group、*Atopobium* clusterはT2D患者の血中でも検出された。T2D患者では糞便中の酢酸、プロピオン酸が有意に減少していたことも報告している[8]。これらの研究では、症例数が少ないこと、また、腸内細菌叢を解析する手法として、T-RFLP法やRT-PCR法を用いているが、これらの方法では腸内細菌叢の一部分を解析することしかできないことが問題であり、症例数を増やし網羅的な解析法による腸内細菌叢解析を行い、日本人における肥満や糖尿病の発症に関わる腸内細菌を探索することが重要である。

2. 実験と結果

2. 1 実験方法

2. 1. 1 ヒト試験の概要

本研究では、東京大学附属病院予防医学センターと共同で、健康診断の受診者うち、空腹時血糖が110 mg/dLもしくはヘモグロビンA1cが6.0%以上の受診者を耐糖能異常（Impaired glucose tolerance :IGT）群、また、BMIが25以上で正常血糖の受診者を肥満群とし、これらの受診者に加え、同数の非肥満で非IGTの受診者を健常者群として本研究にリクルートし、通常の検診項目に加えて便や血液を採取した。リクルートした人数はそれぞれ約100名である。

2. 1. 2 腸内細菌叢解析

採取した糞便からDNA抽出し、16S rRNA遺伝子のV1-2領域をPCRで増幅した後、Miseq (Illumina)によりシーケン

スを行った。得られた塩基配列データは、微生物解析ソフトウェア QIIME v1.9.1 (<http://qiime.org/>) を用いて解析を行った。USEARCH v6.1544 のアルゴリズムを使用し、得られた遺伝子配列から 97%以上の類似性をもつ配列を Operational taxonomic unit (OTU) と設定した。OTU の系統分類は、Greengenes データベース v13.8 (<http://greengenes.secondgenome.com/>) をリファレンスとして属レベルまで分類した。

2. 1. 2 メタボローム解析

腸内細菌叢解析に用いた糞便検体から水溶性代謝物と短鎖脂肪酸を抽出し、それぞれの抽出サンプルを GCMS-TQ8030（島津製作所）を用いて、測定を行った。水溶性代謝物の抽出と誘導体化は、糞便に水：MeOH：クロロホルムを 5：5：2 の比率で加え、上層の水溶性画分を凍結乾燥した後に、Methoxyamine を加えオキシム化を行った後に、N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide を加えてトリメチルシリル化を行った。また、短鎖脂肪酸の抽出と誘導体化は、水：HCl：ジエチルエーテルを 2：1：4 の比率で加え、上層の脂溶性画分を採取し、N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide を加えて誘導化を行った。それぞれの誘導体化したサンプルは BPX-5 カラムを用いて、GCMS-TQ8030 の MRM モードで測定を行った。

2. 2 結果

2. 2. 1 腸内細菌叢解析の結果

腸内細菌叢の全体的な変化を比較するため、データのグループ間の距離の指標である Weighted unifracs distance を計算し Principal coordinate analysis (PCoA) プロットを行ったところ、3 群は分かれることはなかったため、全体的な細菌叢において変化は見られなかった。また、腸内細菌叢の多様性の低下が疾患に関連するなどの報告があるが、多様性についても 3 群では変化がなかった。次に、細菌の系統的な種類ごとに比較を行ったところ、肥満群では Bacteroidetes 門の細菌が有意に減少していた。これは過去の研究の結果とも一致していた。また、肥満群では Actinobacteria 門の細菌も有意に増加していた（図 1）。細菌の分類を属レベルで比較を行ったところ、*Collinsella* 属が肥満群と IGT 群で有意に増加していることが分かった。

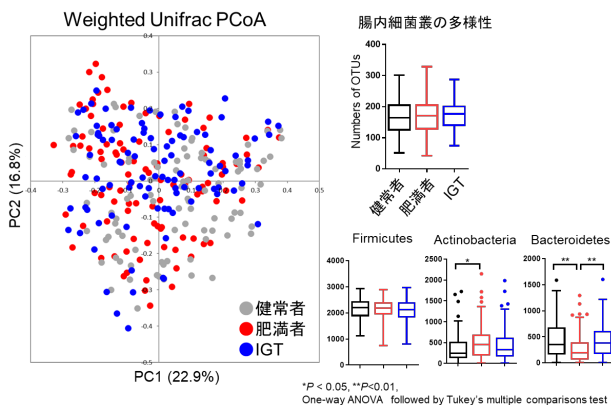


図 1. 腸内細菌叢解析の結果

2. 2. 2 メタボローム解析の結果

血漿と糞便のメタボローム解析を行ったところ、血漿中から 101 化合物、糞便中から 109 化合物を同定した。まず、代謝物に関しても全体的な傾向を調べるため、主成分分析 (Principal component analysis: PCA) を行った結果、血漿中代謝物は IGT 群が他の 3 群と比較し全体的に代謝物に変化がみられていた。一方で糞便中代謝物についてはあまり 3 群が分離しておらず、全体的な傾向に違いは見られなかった（図 2）。

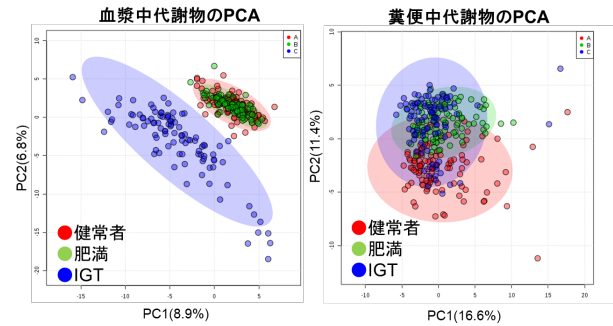


図 2. 血漿中代謝物と糞便中代謝物の PCA の結果

次に、血漿中代謝物について、多群検定を行い 3 群間で有意に異なる代謝物を調べた。その結果、64 化合物に有意差 (P 値が 0.05 以下) が見られた。有意差が見られた血漿中代謝物の濃度変化を相対的に示し、変化の傾向を Heatmap で示した（図 3）。代謝物の種類について着目するとアミノ酸や単糖が IGT 群で多く、短鎖脂肪酸が健常者で多いことが分かった。

糞便中代謝物についても、多群検定を行い 3 群間で有意に異なる代謝物を調べた。その結果、34 化合物に有意差 (P 値が 0.05 以下) が見られた。有意差が見られた血漿中代謝物の濃度変化を相対的に示し、変化の傾向を Heatmap で示した（図 4）。血漿中代謝物ではアミノ酸や単糖が IGT 群で多かったが、糞便中代謝物では肥満群で特にそれらの物質が多い傾向にあり、血漿中と糞便中では異なる傾向にある事が分かった。

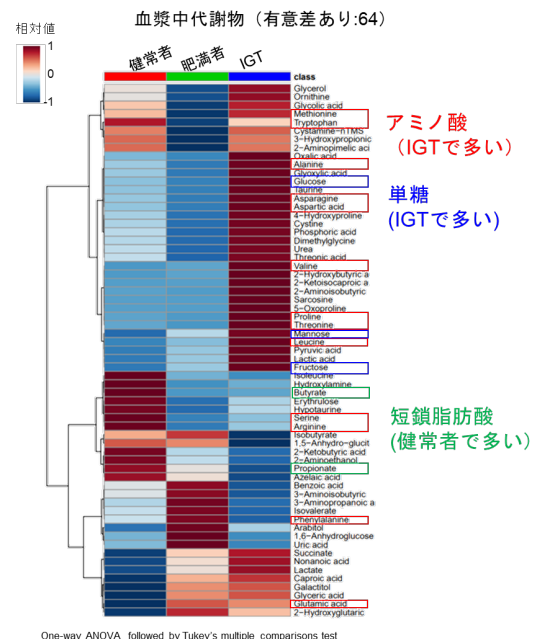


図 3. 3 群間で有意差が見られた血漿中代謝物の変化

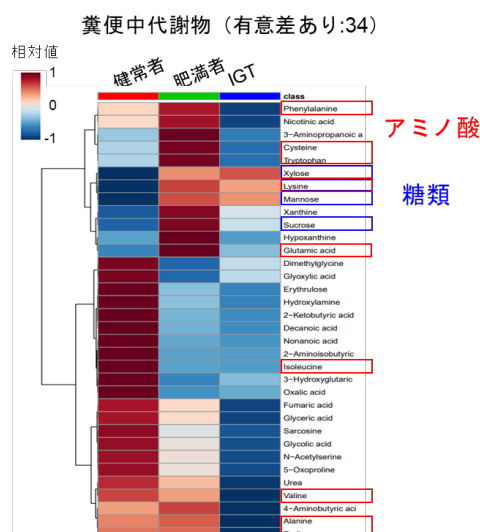


図 4. 3 群間で有意差の見られた糞便中代謝物の変化

3. 考察及び今後の展望

糞便中の腸内細菌叢解析の結果から、門レベルでは肥満者で Bacteroidetes が減少し、Actinobacteria が増加していた。属レベルでは *Collinsella* 属が肥満者と IGT で有意に増加していた。肥満者で Bacteroidetes 門の細菌が減少することは過去の報告と一致していた。Actinobacteria や *Collinsella* 属の変化についてはあまり報告がないため、日本人特有の腸内細菌叢の変化を示していると考えられる。

血漿メタボロームの結果からは、IGT 群ではアミノ酸の増加や糖類の増加が見られ、血中アミノ酸の増加は 2 型糖尿病のヒトで増加しているという過去の報告[9]と一致していた。また、肥満者と IGT の血漿で短鎖脂肪酸が減少していた。短鎖脂肪酸はインスリン感受性や代謝機能を上げる報告があるため、そのような有用な代謝産物が減少していることが、肥満や糖尿病の発症や悪化に関与している可能性がある。糞便メタボローム解析の結果からは、血漿の結果と比較し、グループ間に違いはあまりみられず、血漿中とは異なる代謝物の変動をしていた。腸内の低分子代謝物の多くは吸収され血中に入り、肝臓等で代謝を受けるため、糞便中で変化していた代謝物が血中においても同じ変動がみられなかったことが考えられた。

今後の予定として、肥満群と IGT 群では変化している代謝物が異なるため、それぞれ健康者群と比較し、有意に異なる腸内細菌や代謝物を探索する。また、腸内細菌叢データと代謝物データの統合解析法の検討を行う。さらに、現在、GC/MS により水溶性代謝物を計測しているが、GC/MS 分析では分析できない代謝物、または、不安定な代謝物について LC-MS により分析を行う。

【参考文献】

1. R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, J. I. Gordon, Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022-1023 (2006).

2. P. J. Turnbaugh et al., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027-1031 (2006).

3. H. Plovier et al., A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature medicine* **23**, 107-113 (2017).

4. C. Fuchsberger et al., The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature* **536**, 41 (2016).

5. J. Qin et al., A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55-60 (2012).

6. H. K. Pedersen et al., Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* **535**, 376-381 (2016).

7. C. Kasai et al., Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol* **15**, 100 (2015).

8. J. Sato et al., Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* **37**, 2343-2350 (2014).

9. R. Liu et al., Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med* **23**, 859-868 (2017).

業 績

【原著論文】

1. Kubota T, Inoue M, Kubota N, Takamoto I, Mineyama T, Iwayama K, Tokuyama K, Moroi M, Ueki K, Yamauchi T, Kadowaki T. Downregulation of macrophage Irs2 by hyperinsulinemia impairs IL-4-induced M2a-subtype macrophage activation in obesity. *Nat Commun.* 9:4863, 2018.

【総説】

1. 窪田哲也、窪田直人、門脇 孝 インスリン抵抗性-インスリン作用「失調」仮説- 医と食 Vol. 10 No.3: 146-149, 2018.
2. 大野博司 腸内細菌と宿主の生理・病理 生物試料分析 41: 125-134, 2018
3. 大野博司 腸内フローラの健康と病気への関わり 亜鉛栄養治療誌 Vol.8 No. 2: 50-57, 2018
4. 大野博司、宮本博邦 腸内細菌叢と宿主の生理・病理 日本動物用医薬品協会会報 Vol.62 No. 6: 1-20, 2018
5. 宮本浩邦、児玉浩明、大野博司 畜産・家禽類の生産性を制御する環境微生物 -好熱菌・耐熱菌を中心として- 畜産技術 762:18-22, 2018
6. 佐藤尚子、大野博司 共生細菌が制御する自然リンパ球と疾患誘導 実験医学増刊 Vol.37、No. 2、2019
7. 中西裕美子、大野博司 老化と腸内細菌 実験医学増刊 Vol.37 No. 2 2019

【書籍】

なし

【口頭発表】

招待講演

1. 大野博司 腸内細菌が健康と病気に及ぼす影響 「長野ブランド郷土色」平成29年度第2回公開シンポジウム、2018.1、長野
2. 窪田哲也: 肥満における M2a-subtype マクロファージ活性化障害の分子機構第12回 Diabetes Leading-edge Conference、2018.8、千葉
3. Ohno H. Impact of smoking on the gut microbiota in IBD patients FALK Symposium “IBD and Liver: East Meets West、2018.9、Kyoto

4. 大野博司 宿主-腸内細菌相互作用 第25回日本門脈圧亢進症学会 特別講演、2018.9、大阪

5. Ohno, H. Obesity, Impaired Glucose Tolerance and gut microbiota. 5th International Probiotics and Prebiotics Symposium、2018.12、Surabaya, Indonesia

6. 大野博司 Host-microbiota interaction in the host health and diseases. 第47回日本免疫学会学術集会 Overview Talk、2018.12、福岡

7. 大野博司 ヒトマイクロバイオーームと疾患発症の関連 第5回日本食看護研究会、2019.3、東京

口頭発表

1. 窪田哲也、窪田直人、井上真理子、林高則、相原允一、高本偉碩、山内敏正、植木浩二郎、門脇孝：肥満の M2a-subtype マクロファージにおける Irs2 の役割の解明、第91回日本内分泌学会学術総会、2018.4、宮崎
2. 窪田哲也、窪田直人、井上真理子、林高則、相原允一、高本偉碩、山内敏正、植木浩二郎、門脇孝：マクロファージにおける Irs2 は IL-4 による M2a-subtype 活性化を減弱し、インスリン抵抗性を惹起する、第61回日本糖尿病学会年次学術集会、2018.5、東京

ポスター発表

1. Nakanishi Y. and Hiroshi O. Aging-related alterations in the intestinal environment lead to gut dysbiosis, Poster presentation, International Conference on Ageing, 7 – 8 March 2019, Penang, Malaysia

受賞

1. 大野博司 文部科学大臣表彰科学技術賞（研究部門）2018.4、東京
2. 大野博司 第61回野口英世記念医学賞 2019.11、福島
3. 窪田哲也 第33回日本肥満・糖尿病動物学会 研究賞 2019.3、福岡

【特許】

- (1) 国内特許出願 0件
- (2) 国外特許出願 0件

腸内細菌叢プロジェクト

腸内環境制御グループ プロジェクトリーダー 福田真嗣

【基本構想】

本プロジェクトは、近年増加傾向にある様々な疾患と関連が示唆されている腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御することにより、腸内環境のバランスの悪化が起因となる疾患の予防や治療につながる腸内環境制御システムの基盤構築を目的とする。

ヒトの腸管内にはおよそ 1,000 種類、40 兆個にも及ぶとされる腸内細菌が生息している。正常なバランスを保っている腸内細菌叢は外部から侵入する外来細菌の定着を防いだり、宿主免疫系を活性化したりする。しかし、腸内細菌叢のバランスの乱れは大腸炎や大腸がんといった腸管関連疾患のみならず、代謝疾患や自己免疫疾患などの全身疾患にも関連することが報告されている。遺伝子解析技術の進歩により、腸管内に生息する細菌叢の構成、種類などが明らかになってきたが、生息する個々の腸内細菌が果たす役割や、その役割を理解するための腸内細菌の培養方法などについては十分とは言えず、さらなる進展が望まれている。加えて、腸内細菌叢由来の代謝物質が宿主の健康維持や疾患に深く関与していることが示されてきたが、それらがどのような腸内細菌により産生されているのかについても不明な点が多い。

腸内細菌叢を含む、腸内環境を適切に制御するためには個々の腸内細菌の特性を理解し、腸内細菌叢由来の代謝物質や菌体自身が宿主へ与える影響を知ることが重要となる。腸内細菌が主に生息する大腸は嫌気性環境であり、腸内細菌叢を構成する細菌のほとんどは偏性嫌気性細菌に区別される。これまで、専用の培養容器と脱酸素・炭酸ガス発生剤を組み合わせた簡易的な嫌気環境下やグローブボックスなどの嫌気培養装置を使用した腸内細菌の単離培養方法が確立されている。また、腸内細菌の単離培養に使用することができる選択培地もいくつか市販されている。しかしながら、標的腸内細菌の培養が困難なケースが報告されるなど、腸内細菌の培養技術については改善が必要とされる部分が多い。ゆえに難培養性腸内細菌の培養技術の開発が最優先課題となる。そこで本プロジェクトでは、鍵となる腸内環境制御システムの構築を行うために（１）難培養性腸内細菌の新規培養方法の確立（２）難培養性腸内細菌単独定着マウスを作製し、それらが宿主に与える影響の解析、の２つを実施する。これらの研究を遂行することで、将来的には腸内環境制御に向けた創薬やサプリメント、機能性食品の開発につながり、健康維持、疾患予防および新規治療方法開発に貢献できると考えている。

1. 平成 30 年度の研究目的

プロジェクト二年目となる平成 30 年度は以下を重点項目として定めた。

(1) 腸内細菌基準株の安定的培養技術の確立

腸内細菌叢を構成する個々の腸内細菌を得るためには二つの方法がある。一つ目は、腸内細菌叢が含まれているヒトやマウスの便試料懸濁液を直接培地プレート上に播種し、コロニーを形成させ、単離する方法である。二つ目は微生物バンクに登録されている腸内細菌基準株を入手し、培養する方法がある。腸内細菌基準株はいくつかのバイオリソースセンターから入手することができるが、日本国内において腸内細菌を含む微生物基準株は理化学研究所バイオリソースセンター（以下理研 BRC とする）内の微生物材料開発室に保管、登録されている（URL: <http://jcm.brc.riken.jp/ja/>）。

昨年度に引き続き、現在までに蓄積してきたヒトおよびマウスの腸内細菌叢の解析データから重要性が高いと思われる腸内細菌の選定を続け、入手可能な腸内細菌基準株を理研 BRC より購入した。入手した腸内細菌基準株に関し

ては、今後の研究に向け嫌気性チャンバー内にて安定的かつ容易に培養する方法を検討した。

(2) ヒト由来腸内細菌の単離、培養技術の確立

ヒトやマウスの腸内細菌叢において主要な割合を占める腸内細菌は基準株として単離されているものが多い。一方で、腸内細菌叢の中における割合が低く、数が少ない腸内細菌の単離、培養は難しく培地作製の工夫や新規培養法の開発が必要となっている。腸内細菌の多くは偏性嫌気性細菌に分類され、単離、培養中において少しでも酸素が混入すると死滅することもある。このような腸内細菌を失うことなく単離、培養する際に、培養環境中の酸素を可能な限り除去することが必要となる。

我々の体内には食物に由来する多くの栄養素や未消化物が存在しており腸内細菌はそれらを栄養源として増殖している。そのため細菌の増殖に必要な栄養等を添加した新たな培地を作製することも重要となる。本年度は慶應義塾大学先端生命科学研究所や森下仁丹株式会社と協力し、新たな培地作製や新規培養装置の導入によりヒト由来腸内細菌の新規培養方法の構築を試みた。はじめに理研 BRC

より入手した腸内細菌基準株の中でも厳密な嫌気環境下でしか生育できない腸内細菌を用いて、新規培養方法の有効性の検証を行った。また新規培地を用いて、健康人の便試料からの腸内細菌の単離、培養を試みた。

(3) 腸内細菌が生体に及ぼす影響の評価

単離、培養方法を確立した腸内細菌について、生体に与える影響を評価するためには以下に挙げる方法がある。1. 腸内細菌単独定着マウスを構築し、代謝物質の網羅的解析や腸管上皮細胞、免疫細胞の組成や数を検討する。2. 安定培養した腸内細菌の投与による免疫系の変化や、薬剤マウス誘導腸炎モデルにおける炎症応答への感受性を評価する。本プロジェクトの拠点である川崎生命科学・環境センター（LiSE）には実験動物の維持、繁殖、実験を実施するための施設が備わっていない。そこで隣接する公益財団法人 実験動物中央研究所（以下 CIEA とする）と連携し腸内細菌単独定着マウスの解析や腸内細菌投与実験を実施した。これまでに安定培養方法を確立した腸内細菌の数が増加するにつれて、腸内細菌単独定着マウスを構築するためのビニールアイソレーターの数を確保するのが困難になりつつある。そこで、多くの腸内細菌の機能を明らかにするため、大型実験動物施設を有する筑波大学との連携を開始し、来年度からの共同研究に向けた準備を進めてきた。

2. 平成 30 年度の研究成果

平成 30 年度は以下に挙げる具体的な研究成果を得ることができた。実験方法、結果の詳細は研究員報告書に記載するため要点を示す。

(1) 腸内細菌基準株の安定的培養方法の確立

独自に作成した腸内細菌株のリストを元に、本年度は理研 BRC から入手可能な腸内細菌基準株 11 種類（グラム陽性菌 6 種類、グラム陰性菌 5 種類）を入手した。これらに加えて、昨年度培養の検討ができなかった 6 種類の腸内細菌基準株に関しても嫌気チャンパー内にて安定培養方法の確立を試みた。はじめに嫌気性菌の一般的な培養に広く用いられている GAM ブイヨンを用いて寒天培地、液体培地を作成し、腸内細菌基準株の培養を実施した。大半の腸内細菌基準株は GAM 培地を用いて安定培養することができた。その一方で、GAM 培地により培養できなかった腸内細菌基準株は、より栄養素が豊富に含まれている YCFA 培地をベースにさらにいくつかの栄養素を加えた改良型 YCFA 培地を用いて培養を試みた。その結果、本年度検討したすべての腸内細菌基準株の培養に成功した。昨年度と合わせるとこれまでに 43 種類の腸内細菌基準株の安定的培養方法を確立できた（表 1）。

一方で、6 種類の腸内細菌基準株に関しては GAM 培地、改良型 YCFA 培地のどちらでも培養することができなかった。これらの腸内細菌基準株に関しては、引き続き組成の異なる培地を用いて安定的な培養方法の確立を目指していく。

	基準株入手数	培養成功数	培養検討中
グラム陽性菌	31	29	2
グラム陰性菌	17	14	4

表 1 H30 年度終了時の腸内細菌基準株の培養状況

(2) ヒト由来腸内細菌の単離、培養技術の確立

昨年度に確立した嫌気培養方法を用いて、ヒト便試料からの腸内細菌を単離、培養を試みた。始めに便試料に含まれている食物由来の未消化物をフィルターを用いて除去し、残った腸内細菌懸濁液を様々な選択培地に播種、嫌気チャンパー内にてコロニーを形成させた。プレート上に形成されたコロニー群から単コロニーを分取し、液体培地内にて培養を継続した（図 1）。増幅が確認されたものは DNA を抽出し、その配列をシーケンス解析することで、菌種の同定を行った。本年度は本手法により 1 種類のグラム陽性菌および 3 種類のグラム陰性腸内細菌をヒト便試料より単離することができた（図 1）。

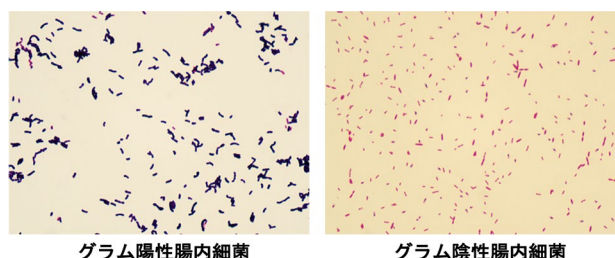


図 1 ヒト便試料由来の腸内細菌のグラム染色

腸内細菌叢を構成する個々の腸内細菌同士は生存競争を繰り返す一方で、互いに助け合い共生する細菌も存在していると考えられている。すなわち、ある腸内細菌が産生する代謝産物が他の腸内細菌の増殖に重要である可能性がある。このような状況を擬似的に再現するために、二槽式透析培養器を用いた腸内細菌の培養を試みた（図 2）。本培養装置は細菌を通さずに特定の成分のみを通す特殊な膜を中央部に配置しており、腸内細菌叢を含む培地で産生された代謝物質などの成分が膜を通してもう一方に供給される仕組みとなっている。始めに本培養装置の有用性を検証するために、片側に培地と難培養性腸内細菌基準株を添加し、反対側に腸内細菌叢を含む培地を加え、嫌気チャンパー内にて培養を試みた。その結果、本透析培養器を用いることで難培養性腸内細菌基準株を培養することができた。今後は項目 1 で培養できなかった腸内細菌基準株の培養やヒト由来新規腸内細菌の単離などに応用していく。

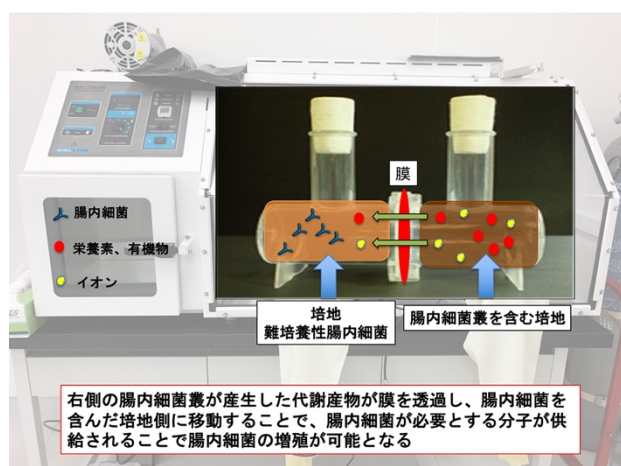
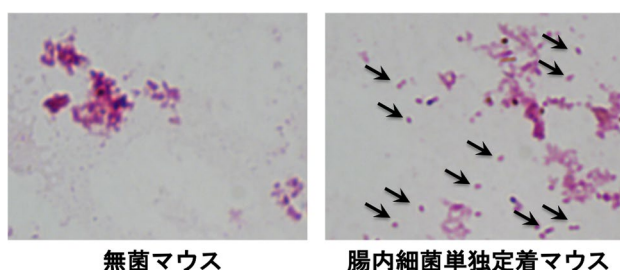


図2 二槽式透析培養器を用いた腸内細菌培養方法の概要

(3) 腸内細菌が生体に及ぼす影響の評価

安定培養に成功した、腸内細菌基準株の中から選抜した腸内細菌をマウスに腹腔内投与し、免疫系に与える影響を評価した。その結果、グラム陰性常在腸内細菌の一つを投与するとマウスの生存には影響しないものの、脾臓が肥大し、炎症に関する免疫応答が強く惹起されることを見出した。常在腸内細菌の免疫感作によりこのような強い炎症反応が誘導される報告はほとんどなく、本所見は新しい知見であると考えられる。

腸内細菌単独定着マウスの構築に関しては、本年度は1種類の腸内細菌定着マウスの構築を行った。無菌マウスに腸内細菌を経口投与した後、糞便を定期的に回収して標的腸内細菌の定着を検討した。グラム染色による検鏡の結果、目的の腸内細菌がマウス腸内に定着できていることを確認できた（図3）。今後は構築した腸内細菌単独定着マウスを用いて代謝物質の網羅的解析や腸管上皮細胞、免疫細胞の組成や数を検討する。



無菌マウス

腸内細菌単独定着マウス

図3 無菌マウスおよび腸内細菌単独定着マウス糞便のグラム染色像。無菌マウスにおいても未消化物の塊が観察されるが、腸内細菌単独定着マウスでは未消化物以外に矢印で示すように定着した腸内細菌が観察される。

3. 研究協力体制に関して

本プロジェクトでは研究を円滑に進めていくために様々な研究機関との共同研究を実施している。そのため、共同研究先との綿密な連携はプロジェクトを推進していく上で重要な項目となる。CIEAは隣接しているため、研究ディスカッションも容易に行うことが可能である。一方で、

慶應義塾大学の両研究施設、筑波大学は距離が離れているため、常時オンライン接続をすることで、互いの研究室を繋ぐことにより円滑なコミュニケーション環境を整備し、活用している。また、図4で示す共同研究先とは定期的に進捗状況を報告する機会を設け、プロジェクトの課題や進め方を議論している。

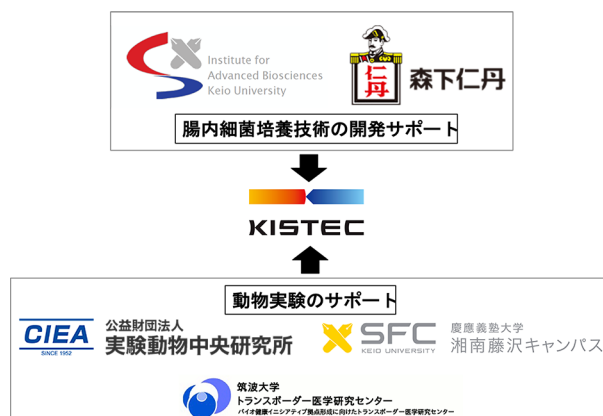


図4 本プロジェクトの研究協力体制

4. 総括

プロジェクト2年目となる本年度は、腸内細菌基準株の安定培養法の検討に取り組み、43種類の腸内細菌株について安定培養法を確立した。その後、本年度の研究計画に沿った研究項目を実施し、計画通りに研究開発を進めることができた。来年度以降も引き続き計画に沿って研究開発を実施し、当初の研究目標以上の成果が得られるよう取り組む。

腸内環境制御基盤技術の開発に向けた難培養性腸内細菌の 培養法確立および生体に与える影響の評価

中藤 学

1. はじめに

我々は生後すぐに外部の環境に曝されることにより微生物との共生関係が始まる。体内にありながら外界とも繋がる消化管内も例外ではない。ヒトの腸管にはおよそ1000種類、40兆個もの腸内細菌が生息しており、地球上のあらゆる環境の中で最も生息密度が高い場所の一つとなっている。腸内細菌同士は互いに生存競争を繰り広げたり、互いに支えあったりしながら一定のバランスを保つことで腸内細菌叢を形成している。食生活の変化が大きい乳幼児期では腸内細菌叢の変動も大きくなるが、成人になると日々の食事や生活様式により多少の変動はあるものの腸内細菌叢は安定した状態となる（参考文献1）。

1. 1 腸内細菌叢が宿主に与える影響

共存関係を構築している腸内細菌叢は宿主に有益な効果をもたらしている。我々は呼吸や飲食などにより、常に外来抗原が体内へと侵入するリスクを抱えている。腸内細菌叢は消化管内に侵入してくるこれらの外来性抗原の定着を防ぐ役割を果たしている。また、腸内細菌は食物由来の未消化物を栄養源として発酵分解し、その際に代謝物質として低分子を菌体外に放出する。腸内細菌叢由来代謝物質は腸管上皮細胞のエネルギー源となるだけではなく物理的バリアの構築に寄与し腸管上皮細胞の恒常性維持にも重要な役割を果たしている（参考文献2）。更に、一部の腸内細菌由来代謝物質は宿主の免疫機能を活性化する。例えば、腸内細菌叢を構成する主要な細菌群の一種であるクロストリジウム目細菌群が食物繊維を代謝発酵し産生する酪酸は、炎症やアレルギーの起因となる過剰な免疫応答を抑制するT細胞である制御性T細胞の分化誘導を促進するといった重要な役割を果たしている（参考文献3,4）。

その一方で、ストレスや生活習慣の乱れにより腸内細菌叢のバランスが崩れることが疾患につながることも知られている。実際に腸内細菌叢の乱れが大腸がんや大腸炎などの腸管関連疾患のみならず、糖尿病、動脈硬化、自閉症、アレルギー疾患など多岐にわたる疾患の発症にも関連することが報告されている（参考文献5）。また、バランスの乱れた腸内細菌叢由来の代謝物質も、これらの疾患を引き起こす要因となっている（参考文献6）。ゆえに、腸内細菌叢を含む腸内環境を正常に保つことは健康維持にとって重要となる。

1. 2 個々の腸内細菌を対象とした研究の重要性和課題

これまでの研究から個人個人の腸内細菌叢の構成、種類および経時変化は明らかとなってきた。また、項目1.1で述べてきたように腸内細菌叢由来の代謝物質は宿主の健康維持に重要な要素となってくるのみならず、疾患とも深く関わる事が明らかとなってきた。しかしながら、それらの代謝物質が腸内細菌叢を構成するどの腸内細菌由来するものであるかについては、不明な点が多い。そのため個々の腸内細菌の特性や代謝物質を理解することが重要である。しかしながらこれらに関する研究報告数が少ない一番の理由は、腸内細菌の培養方法が十分に確立されていないことが挙げられる。腸内細菌はその多くが偏性嫌気性細菌に分類されており、少量の酸素の混入により生育が阻害されてしまう。脱酸素剤などを利用した簡易的嫌気環境の構築やグローブボックスなどの嫌気培養装置を利用した腸内細菌の培養も進んでいる。しかしながら、依然として単離、培養ができない腸内細菌も数多く残されているのが現状である。

1. 3 腸内環境制御基盤技術の構築に向けて

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御する基盤技術の構築は、我々の健康維持や疾患予防に有効な手段となる。このような基盤技術を構築するためには、以下に示す3つの課題に取り組む必要がある

1. 腸内細菌の安定的な大量培養方法の確立
2. 難培養性腸内細菌の新規培養技術の開発
3. 腸内細菌単独定着マウスを作製や腸内細菌の投与が生体に与える影響の評価する

個々の腸内細菌に関する基礎データの蓄積は、腸内環境制御基盤技術に必要となる創薬、栄養補助食品、機能性食品の開発にも直結することが期待される。

2. 実験と結果

2. 1 腸内細菌基準株の安定的培養方法の確立

個々の腸内細菌の特性を理解するために微生物バンクの一つである理化学研究所バイオリソースセンターより腸内細菌基準株11種類（グラム陽性菌6種類、グラム陰性菌5種類）を入手した。これらの腸内細菌基準株に加え、昨年度に培養の検討ができなかった6種類の腸内細菌基準株を加えた合計17種類の基準株の安定培養方法の確立を試みた。

はじめに嫌気性菌の培養に一般的に用いられている GAM ブイヨン（日水製薬株式会社）を用いて、寒天培地および液体培地を作製し、嫌気チャンバー内にて腸内細菌基準株の培養を試みた。それぞれの培地に腸内細菌のストック溶液を添加し、嫌気性チャンバー内において 24-72 時間 37℃ に保ちながらプレート上でのコロニー形成の検討および液体培地中における腸内細菌の増幅を行った。その結果、8 種類のグラム陽性菌、7 種類のグラム陰性菌のコロニー形成および液体培地での増殖を確認することができた。しかしながら、2 種類の腸内細菌基準株に関しては GAM 培地による増殖が観察されなかったため、GAM 培地よりもビタミンやミネラル成分が多く含まれる YCFA 培地に更に数種類の栄養素添加した改良型 YCFA 培地による培養を試みた。改良型 YCFA 培地の使用により安定培養に成功した（表 1）。

安定的な培養方法を確立したすべての腸内細菌基準株は、細菌類を染色する方法の一つであるグラム染色を実施することで単一の細菌のみしか存在しないことを確認した。単一菌であることが確認できた腸内細菌基準株については、今後の実験の際に他の菌が混入した際にも対処できるように予備の凍結ストックを作製した。

	検討数	培養成功数
グラム陽性菌	10 種	10 種 (GAM8 種, 改良型 YCFA2 種)
グラム陰性菌	7 種	7 種 (GAM7 種)

表 1 本年度に実施した腸内細菌基準株の培養状況

2. 2 ヒト由来腸内細菌の単離、培養

昨年度確立した嫌気培養方法を用いて、ヒト便試料からの腸内細菌の単離、培養を試みた。腸内細菌を単離する際に、様々な種類の選択培地や、市販の培地をベースとして独自に栄養素などを追加した培地を用いてヒト便試料より腸内細菌の単離、培養を試みた。培養プレート上から単コロニーを分取、培養した後に DNA を抽出した。その後、シーケンス解析により菌株の同定を実施した。その結果、1 種類のグラム陽性菌、3 種類のグラム陰性菌を単離、培養することに成功した（図 1）。

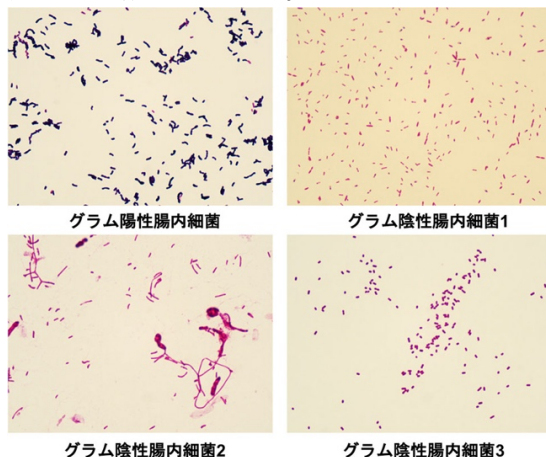


図 1 健康人便試料より単離した腸内細菌のグラム染色

2. 3 ヒト由来腸内細菌単離に向けた新規培養技術の確立

腸内細菌同士は生存競争をすることにより宿主の消化管内の限られた生存領域を確保しているが、一方で、互いに共生関係を持つ腸内細菌も存在している可能性が示唆されている。このような腸内細菌は互いの利益になるような代謝物質を産生、利用することで増殖していることが推察される。そこで微生物共生系を検討するために使用されている、二槽式透析培養器を用いた腸内細菌の培養を試みた。左右のガラス器具の間には、細菌は通過することができないが、代謝物質などの低分子化合物は透過できる径の膜を装填した。本透析培養器の有用性を検証するために難培養性腸内細菌基準株の培養を試みた。嫌気チャンバー内にて 72 時間 37℃ に保ちながら培養した結果、本透析培養器を用いることで難培養性腸内細菌基準株を培養することができた（図 2）。今後は本培養器を用いて、ヒト由来細菌の単離を実施していくのみならず、未だ培養方法が確立できていない腸内細菌基準株の培養を試みていく。

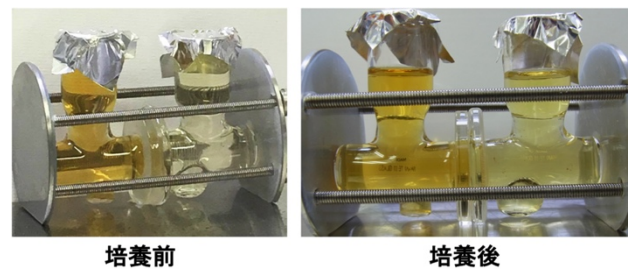


図 2 二槽式透析培養器を用いた難培養性腸内細菌基準株の培養検討

2. 4 腸内細菌が生体に与える影響の評価

本プロジェクトはこれまでに 40 種類を超える腸内細菌基準株の安定培養方法を確立してきた。次にこれらの腸内細菌が生体に与える影響を評価するために以下に示す動物実験を実施した。始めに、腸内細菌基準株の中から選抜した 8 種類の腸内細菌をマウスに腹腔内投与し、免疫系に与える影響を評価した。本年度検討した 7 種類の腸内細菌は軽い炎症を起こすだけであったが、1 種類のグラム陰性常在腸内細菌（図 3 に記載されているグラム陰性腸内細菌 1）を投与すると脾臓において強い炎症応答を引き起こすことが明らかになった（図 3）。さらに炎症応答に伴う免疫細胞の変化を検証したところ、特徴的に変化する免疫細胞集団を見出すことができた（図 3）。

更に単独の腸内細菌が生体におよぼす影響を評価するために、本年度は 1 種類の腸内細菌定着マウスの構築を行った。無菌マウスに腸内細菌を経口投与した後、糞便を回収し、腸内細菌の定着を検討した。回収した便をバッファー内ですり潰し、懸濁液を用いてグラム染色を実施した。比較対照の無菌マウス由来の懸濁液中にも食物の未消化物の塊が見られるが、腸内細菌単独定着マウスでは食物の

未消化物以外に菌体が存在していることを確認することができた。菌体の形状は投与前のものと一致しており、標的とする腸内細菌の定着していることを確認することができた（図4）。

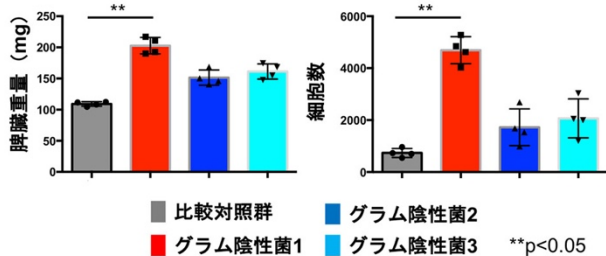


図3 腸内細菌腹腔内投与後の脾臓重量および、変化があった免疫細胞の細胞数

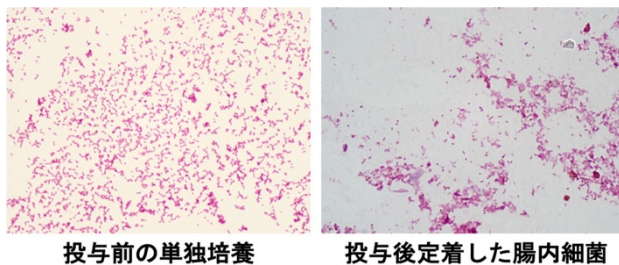


図4 投与前の培養した腸内細菌および腸内細菌単独定着マウス由来の便に含まれる腸内細菌のグラム染色像

3. 考察及び今後の展望

本年度は17種類の腸内細菌基準株の安定的培養法の確立に成功した。一方で、6種類の腸内細菌基準株に関してはGAM培地、改良型YCFA培地のどちらでも培養することができなかった。これらの腸内細菌基準株に関しては、本年度に構築した二槽式透析培養器を用いた培養を次年度に試みる。本年度に見出した常在グラム陰性腸内細菌の免疫感作により引き起こされる強い炎症応答に関する報告はほとんどなく、本所見は新しい知見であると考えられる。次年度以降は詳細なメカニズムの解明を進めていく。また構築した腸内細菌単独定着マウスの代謝物の網羅的解析、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を検討していく。

4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、腸内細菌の分離、新規培養技術の構築では慶應義塾先端生命科学研究所の谷川直紀博士、楊佳約博士、楊永寿博士、筑波大学トランスボーダー医学センターの尾花望博士、森下仁丹株式会社の河野麻美子博士を始め多くの方々のご協力を賜りました。また動物実験に関しては公益財団法人 実験動物中央研究所の高橋利一氏、小倉智幸氏、野津量子氏から腸内細菌単独定着マウス構築のためのご指導、ご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1 Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.Z., Abe, F., Osawa, R., Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 25:16:90, 2016.
- 2 Okada, T., Fukuda, S., Hase, K., Nishiumi, S., Izumi, Y., Yoshida, M., Hagiwara, T., Kawashima, R., Yamazaki, M., Oshio, T., Otsubo, T., Inagaki, O. K., Kakimoto, K., Higuchi, K., Kawamura, Y. I., Ohno, H., Dohi, T. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 4: 1654, 2013.
- 3 [†]Furusawa, Y., [†]Obata, Y., [†]*Fukuda, S. ([†]co-first and ^{*}corresponding author), Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., [†]* Hase, K., ^{*} Ohno, H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450, 2013.
- 4 Atarashi, K., Tanoue, T., Suda, W., Oshima, K., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S.W., Fritz, J.V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., Honda, K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500: 232-236, 2013.
- 5 Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., Finlay, B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):859-904.
- 6 Schulz, M.D., Atay, C., Heringer, J., Romrig, F.K., Schwitalla, S., Aydin, B., Ziegler, P.K., Varga, J., Reindl, W., Pommerenke, C., Salinas-Riester, G., Böck, A., Alpert, C., Blaut, M., Polson, S.C., Brandl, L., Kirchner, T., Greten, F.R., Polson, S.W., Arkan, M.C. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature.* 514(7523):508-12, 2014.

業 績

【原著論文】

1. Orimo T, Sasaki I, Hemmi H, Ozasa T, Fukuda-Ohta Y, Ohta T, Morinaka M, Kitauchi M, Yamaguchi T, Sato Y, Tanaka T, Hoshino K, Katayama KI, Fukuda S, Miyake K, Yamamoto M, Satoh T, Furukawa K, Kuroda E, Ishii KJ, Takeda K, Kaisho T. Cholera toxin B induces interleukine-1 β production from resident peritoneal macrophages through pyrin as well as NLRP3 inflammasome. *Int. Immunol.* 2019 in press.
2. Nagata N, Tohya M, Fukuda S, Suda W, Nishijima S, Takeuchi F, Ohsugi M, Tsujimoto T, Nakamura T, Shimomura A, Yanagisawa N, Hisada Y, Watanabe K, Imbe K, Akiyama J, Mizokami M, Miyoshi-Akiyama T, Uemura N, Hattori M. Effects of bowel preparation on the human gut microbiome and metabolome. *Sci. Rep.* 9: 4042, 2019.
3. Kushida, M., Sugawara, S., Asano, M., Yamamoto, K., Fukuda, S., Tsuduki, T. Effects of the 1975 Japanese diet on the gut microbiota in younger adults. *J. Nutr. Biochem.* 64: 121-127, 2019.
4. Ishii, C., Nakanishi, Y., Murakami, S., Nozu, R., Ueno, M., Hioki, K., Aw, W., Hirayama, A., Soga, T., Ito, M., Tomita, M., *Fukuda, S. (*correspondence) A metabologenomic approach reveals changes in the intestinal environment of mice fed on American diet. *Int. J. Mol. Sci.* 19: E4079, 2018.
5. Nishihara, T., Kuno, S., Nonaka, H., Tabata, S., Saito, N., Fukuda, S., Tomita, M., Sando, S., Soga, T. Beta-galactosidase-responsive synthetic biomarker for targeted tumor detection. *Chem. Commun.* 54: 11745-11748, 2018.
6. Hayakawa, T., Nathan, SKSS., Stark, DJ., Saldivar, DAR., Sipangkui, R., Goossens, B., Tuuga, A., Clauss, M., Sawada, A., Fukuda, S., Imai, H., Matsuda, I. First report of foregut microbial community in proboscis monkeys: Are diverse forests a reservoir for diverse microbiomes? *Environ. Microbiol. Rep.* 10: 655-662, 2018.
7. Yamamoto, Y., Nakanishi, Y., Murakami, S., Aw, W., Tsukimi, T., Nozu, R., Ueno, M., Hioki, K., Nakahigashi, K., Hirayama, A., Sugimoto, M., Soga, T., Ito, M., Tomita, M., *Fukuda, S. (*correspondence) A metabolomic-based evaluation of the role of commensal microbiota throughout the gastrointestinal tract in mice. *Microorganisms*, 6: E101, 2018.
8. Kisuse J, La-Ongkham O, Nakphaichit M, Therdtatha P, Momoda R, Tanaka M, Fukuda S, Popluechai S, Kespechara K, Sonomoto K, Lee YK, Nitisinprasert S, Nakayama J. Urban Diets Linked to Gut Microbiome and Metabolome Alterations in Children: A Comparative Cross-Sectional Study in Thailand. *Front. Microbiol.* 9: 1345, 2018.
9. Hayakawa T, Sawada A, Tanabe AS, Fukuda S, Kishida T, Kurihara Y, Matsushima K, Liu J, Akomo-Okoue EF, Gravena W, Kashima M, Suzuki M, Kadowaki K, Suzumura T, Inoue E, Sugiura H, Hanya G, Agata K. Improving the standards for gut microbiome analysis of fecal samples: insights from the field biology of Japanese macaques on Yakushima Island. *Primates.* 59: 423-436, 2018. (IF 1.202)
10. Yasutomi, E., Hoshi, N., Adachi, S., Otsuka, T., Kong, L., Ku, Y., Yamairi, H., Inoue, J., Ishida, T., Watanabe, D., Ooi, M., Yoshida, M., Tsukimi, T., Fukuda, S., Azuma, T. Proton Pump Inhibitors Increase the Susceptibility of Mice to Oral Infection with Enteropathogenic Bacteria. *Dig. Dis. Sci.* 63: 881-889, 2018.

【総説】

1. 野間口達洋、村上慎之介、*福田真嗣
腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす生体恒常性と疾患性
生化学, 19: 65-72, 2019.
2. 朴成和、福田真嗣、工藤千恵、砂川優
マイクロバイオーーム研究の可能性
がん分子標的治療, 16: 56-63, 2019.

3. 村上慎之介、*福田真嗣
「腸内デザイン」が切り拓く病気ゼロ社会、
化学と生物、56: 692-696, 2018.
4. 村上慎之介、*福田真嗣
腸内環境に基づく層別化ヘルスケアがもたらす未来
生物工学会誌、96: 524-528, 2018.
5. 福田真嗣
腸内細菌叢がもたらす生体恒常性と疾患
腎臓内科・泌尿器科、7: 519-526, 2018.
6. Toju, H., Peay, KG, Yamamichi, M., Narisawa, K.,
Hiruma, K., Naito, K., Fukuda, S., Ushio, M.
Nakaoka, S., Onoda, Y., Yoshida, K., Schlaeppli, K.,
Bai, Y., Sugiura, R., Ichihashi, Y., Minamisawa, K.,
Kiers, ET.
Core microbiomes for sustainable agroecosystems.
Nat. Plants 4: 247-257, 2018.

【口頭発表】

（招待講演）

1. Shinji Fukuda
A metabolomic approach reveals the function of
gut microbiota in health and disease
The 9th Federation of the Asian and Oceanian
Physiological Society Congress (FAOPS 2019), Kobe
Convention Center, Hyogo, Japan, Mar. 29th, 2019.
2. 福田真嗣
第 3 の液性因子：腸内細菌叢由来代謝物質がもた
らす機能
日本農芸化学会 2019 年度大会 東京農業大学世
田谷キャンパス（東京）、2019 年 3 月 24 日
3. Shinji Fukuda
A metabolomic approach reveals the function of
gut microbiota in health and disease
Keio International Symposium 2019 Keio University
Faculty of Pharmacy, Tokyo, Japan, Mar. 8th, 2019.
4. Shinji Fukuda
The impact of gut microbiota-derived metabolites in
tumorigenesis
U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program,
21th International Conference on Emerging
Infectious Disease in the Pacific Rim, La Thanh hotel,
Hanoi, Vietnam, Feb. 27th, 2019.
5. Shinji Fukuda
A metabolomic approach reveals the function of
gut microbiota in health and disease

The 3rd Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry
Society (KBMS) Symposium 2019, Kyoto
University Masukawa Hall, Kyoto, Japan, Feb. 23rd,
2019.

6. 福田真嗣
メタボゲノミクスが解き明かす腸内細菌叢機能とそ
の制御
神戸大学農工連携次世代バイオプロダクション主催
フォーラム 神戸大学百年記念館（兵庫）、2019 年 1
月 31 日
7. 福田真嗣
茶色い宝石物語、腸内細菌叢の革新的制御技術の
開発
サイエンスパーク拠点間連携シンポジウム 湘南へ
ルスイノベーションパーク（神奈川）、2019 年 1 月 24
日
8. Shinji Fukuda
A metabolomic approach reveals the function of
gut microbiota in health and disease
Asia-Pacific Nutrigenomics and Nutrigenetics
Organization (APNNO) 2018, Ito International
Research Center (Tokyo), Dec. 3rd, 2018.
9. 福田真嗣
食を介した腸内環境の制御による新たな健康維持
基盤技術の創出
第 16 回大麦食品シンポジウム サッポロビール本社
（東京）、2018 年 11 月 23 日
10. Shinji Fukuda
The impact of gut microbiota-derived metabolites in
health and disease
NTU 90th Anniversary Symposium, National Taiwan
University, Taipei, Taiwan, Nov. 15th, 2018.
11. 福田真嗣
疾患制御における腸内細菌叢由来代謝物質の役割
第 12 回メタボロームシンポジウム 鶴岡市先端研究
産業支援センター（山形）、2018 年 10 月 18 日
12. 福田真嗣
腸内細菌叢機能の包括的理解と腸内デザインによ
る新規ヘルスケア産業の創出
BioJapan 2018 パシフィコ横浜（神奈川）、2018 年
10 月 12 日
13. Shinji Fukuda
The impact of gut microbiota-derived metabolites in
tumorigenesis

- The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka International Convention Center, Sep. 28th, 2018.
14. 福田真嗣
腸内環境に基づく個別化ヘルスケアの必要性
第 39 回日本食品微生物学会学術総会 大阪市立大学杉本キャンパス(大阪)、2018 年 9 月 27 日
 15. 福田真嗣
もう一つの臓器、腸内細菌叢の機能に迫る
第 2 回慶應ライフサイエンスシンポジウム 慶應義塾大学日吉キャンパス(東京)、2018 年 9 月 13 日
 16. Shinji Fukuda
The importance of gut luminal metabolism in health and disease
FALK symposium 212 IBD and Liver: East meets West, Kyoto Hotel Okura, Sep. 8th, 2018.
 17. 福田真嗣
もう一つの臓器、腸内細菌叢の機能に迫る
第 58 回生命科学夏の学校(山梨)、2018 年 8 月 31 日
 18. 中藤学
腸内環境を整えて生活習慣病を予防し、健康寿命をのばそう
かながわ発・中高生のためのサイエンスフェア 新都市ホール 2018 年 7 月 14 日
 19. 福田真嗣
腸内環境に基づく個別化医療・ヘルスケアの必要性
第 67 回日本アレルギー学会学術大会 幕張メッセ(千葉)、2018 年 6 月 23 日
 20. 福田真嗣
もう一つの臓器、腸内細菌叢の機能に迫る 第 29 回 HiHA セミナー 広島大学東広島キャンパス(広島)、2018 年 5 月 25 日
 21. 福田真嗣
腸内環境を標的とした新たな疾患予防・治療基盤技術の創出
第 20 回 KEMS 研究会 慶應義塾大学信濃町キャンパス(東京)、2018 年 5 月 19 日
 22. 福田真嗣
腸内細菌叢がもたらす生体恒常性と疾患
第 72 回日本口腔科学会学術集会 ウィンクあいち(愛知)、2018 年 5 月 13 日
 23. 福田真嗣
腸内環境の制御による疾患予防・治療基盤技術の構築
第 4 回 Gut Microbiota 研究会 東京プリンスホテル(東京)、2018 年 5 月 12 日
- (口頭発表)
1. 田中一己, Aw Wanping, 鈴木健大, 尾花望, 富田勝, 福田真嗣.
米ぬか摂取による大腸炎抑制機構の解明
日本農芸化学会 2019 年度大会, 東京都世田谷区, 2019 年 3 月 26 日
優秀発表、トピックス賞 受賞
 2. 田中一己, Wanping Aw, 鈴木健大, 尾花望, 富田勝, 福田真嗣
米ぬか摂取による大腸炎抑制メカニズムの解明
第 2 回慶應ライフサイエンスシンポジウム 神奈川県横浜市 2018 年 9 月 13 日
研究奨励賞受賞
- 【特許】
- (1) 国内特許出願 0 件
 - (2) 国外特許出願 0 件