

一般演題 A-1

メタゲノムによるヒト腸管培養モデル中の細菌叢解析

Microbiota composition in the human intestinal simulation model revealed by metagenomics

○佐々木建吾¹, 高木理沙², 福田伊津子², 大澤 朗²¹ 神戸大学自然科学系先端融合研究環, ² 神戸大学大学院農学研究科

【目的】近年, ヒトの病気予防や老化防止に有益とされる成分を含んだ機能性食品が市場に多く流通しており, 経口摂取されヒト腸内フローラ中の有益細菌の成長を促し宿主の健康を促進する事が知られている。一般的に, 食品成分の機能性評価は動物給餌試験やヒト介入試験にて行われるが, 前者は腸内細菌叢や消化物の腸内滞留時間がヒトと異なる事, 後者は倫理的ハードルが高いので容易に実施できない等で誤った評価につながる可能性がある。そこで我々はヒト腸内細菌叢を培養器中で再現し, 種々の機能性成分を投入して簡便に腸内細菌叢の変動や代謝物を最新の分析技術をもってモニターできる「ヒト腸管培養モデル」を確立した。さらに, 本モデルに *Bifidobacterium* 属を選択的にヒト腸内で増やすとされる種々のオリゴ糖を添加し, 当該菌属の消長を調べる事で, より現実的なプレバイオティクス評価を行った。

【方法】培養器に GAM 培地を基礎培地として充填し, 窒素・炭酸混合ガスを曝気して嫌気状態を保ち 37°C で培養して, 健康な成人の糞便を投入した。短鎖脂肪酸 (SCFA) 濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。培養液より抽出した細菌叢 DNA は 16S rRNA 遺伝子を増幅して次世代シーケンサーを用いてメタゲノム解析を行った。他方, 糞便のみを投入したコントロール及び7種のオリゴ糖を投入した対象群において, 定量 PCR 法により *Bifidobacterium* 属の菌数測定を行った。

【結果】ヒト腸管培養モデルにおける SCFA は, 培養初期に乳酸・コハク酸の生成・消費が観察され, 培養後期に酢酸・プロピオン酸・酪酸が優先するとともに, それらの組成が投入した各人糞便中に近似していた。さらに, メタゲノム解析より種レベルでの多様性が糞便のものと近似しており, 細菌叢構成は主な門, 属のレベルで各人糞便細菌叢組成と近似していた。また, 本モデルによってラフィノース以外の6種のオリゴ糖について, *Bifidobacterium* 属の生育促進効果が見られると同時に酢酸生成を増加させており, プレバイオティクス効果があることが認められた。

【考察】本モデルは代謝活性および細菌叢構成においてヒト腸管内の環境を模す事から, ヒト介入試験に先立った種々の食品成分の機能性の評価に有用である事が示唆された。

一般演題 A-2

核内受容体 FXR を活性化する腸内細菌の探索

Screening of FXR-stimulating bacteria from gut commensals

○大坂利文^{1,2}, 張 先琴², 常田 聡²¹ 東京女子医科大学医学部微生物学免疫学教室² 早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻

【目的】 リガンド依存的な転写調節因子である核内受容体は、様々な生体機能に関わる遺伝子発現を制御している。核内受容体は様々な疾患の創薬ターゲットであり、これまでに多くの医薬品が開発されてきた。脂質代謝・糖代謝・炎症応答の制御に関わる Farnesoid X 受容体 (FXR) は、肥満や代謝性疾患の治療・予防の重要な標的分子であり、FXR リガンドであるオベチコール酸は原発性胆汁性肝硬変や非アルコール性肝炎などの治療薬として期待されている。また、脂肪やコレステロールの吸収を抑える働きを有することで注目されている茶カテキンの成分であるエピガロカテキンガレートも FXR のアゴニストである。つまり、食餌成分や腸内細菌などの腸内環境因子と FXR との相互作用は、ヒトの健康増進および代謝性疾患の予防に資することが期待される。そこで本研究では、FXR の刺激能を定量的に評価するバイオアッセイ系を確立するとともに、FXR アゴニスト活性を有する腸内細菌の探索を目的として研究を行った。

【方法】 ヒトおよびマウス糞便などから分離した細菌株 (*Bacteroides* 属, *Bifidobacterium* 属, *Clostridium* 属, *Enterococcus* 属, *Eubacterium* 属, *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属, *Streptococcus* 属, *Parabacteroides* 属, *Ruminococcus* 属; 38 菌株) を用いて、FXR を直接刺激することが可能な細菌をスクリーニングした。スクリーニング方法としては、SW480 細胞 (ヒト結腸癌由来細胞株) に FXR 発現ベクターおよび FXR レポーターベクターをトランスフェクションして構築した FXR レポーター細胞株を用いて、生菌、菌体成分、培養上清の FXR 刺激能を評価した。また、高脂肪食を用いた食餌誘導性肥満マウスモデルを用いて、FXR 刺激性細菌の抗肥満効果を検証した。

【結果】 FXR レポーター細胞株によるスクリーニングの結果、*Bacteroides dorei* と *Eubacterium limosum* の培養上清中に FXR アゴニスト活性を見出した。また、qRT-PCR によって、FXR 関連遺伝子の mRNA 発現が誘導されていることを確認し、腸内細菌由来の代謝産物が直接的に FXR と相互作用することが示された。つぎに、高脂肪食を用いた食餌誘導性肥満マウスモデルを用いて、2 つの細菌培養上清が抗肥満効果を有するかを検証したところ、*B. dorei* 由来の細菌培養上清の投与 (経胃投与) は、体重増加の抑制や肝機能マーカーが改善することが確認された。

【考察】 腸内に共生する一部の常在細菌は宿主細胞の核内受容体のリガンド活性をもつ化合物を産生し、宿主の代謝恒常性維持に貢献している可能性が示唆された。

一般演題 A-3

高脂肪食摂取ラットの盲腸内菌叢の変化における胆汁酸の寄与：
「胆汁酸仮説」の証明にむけてContribution of bile acid to the alteration of cecal microbiota composition
on a high-fat diet in rats: Towards the proof of “bile-acid hypothesis”

○渡辺真通¹, 萩尾真人², 李 慈英¹, 小椋義俊³, 林 哲也³,
清水英寿⁴, 石塚 敏¹, 吹谷 智¹, 横田 篤¹

¹北海道大学大学院農学研究院, ²東洋大学生命科学部応用生物科学科,

³九州大学大学院医学研究院, ⁴島根大学生物資源科学部生物資源科学研究科

【目的】 西欧食の特徴である高脂肪が腸内細菌叢に与える影響の解明は、メタボリックシンドローム発症との関連から注目を集めているが、高脂肪食による菌叢変化の要因には不明な点が多い。当研究室ではこれまで胆汁酸が腸内の菌叢変化に寄与する事を見出し、高脂肪食摂取において脂質吸収に必須な胆汁酸量が増大することから、高脂肪食摂取により増大する胆汁酸の抗菌活性が選択圧となり菌叢バランスが崩れる「胆汁酸仮説」を提唱している (Islam *et al.*, *Gastroenterology*, 2011; Yokota *et al.*, *Gut Microbes*, 2012)。本研究はこの仮説の検証を目的とした。

【方法】 2週間予備飼育した5週齢の雄 WKAH ラットを2群に分け、デキストリン食 (Control), デキストリン-高ラード食 (HL) の長期投与試験 (4週間および8週間) を行った。各群4~6匹 (計19匹) について盲腸内容物を採取後、LC/MSによる胆汁酸分析、次世代シーケンサーによるメタ16S菌叢解析を行った。さらに、*in vitro* で胆汁酸耐性を検証するため、デオキシコール酸 (DCA) 添加、非添加のEG寒天培地およびBrucella寒天培地により腸内細菌株を分離後、GAM-MOPS液体培地を用いてDCA耐性試験を行った。

【結果および考察】 摂取4週間および8週間後いずれにおいても、HL群ではControl群と比べて高いDCA濃度および総胆汁酸濃度を示した。この時の菌叢では、HL群においてBacteroidetes門細菌に対するFirmicutes門細菌の比が顕著に増大したことから、後者が前者よりも高い胆汁酸耐性を持つことが示唆された。そこで、これを検証するためラットの盲腸内容物より腸内細菌株の分離を行い、DCA耐性試験を行ったところ、高脂肪食摂取により増加する8種のFirmicutes門細菌のIC₅₀ (0.6~1.5 mM) は4種のBacteroidetes門細菌のIC₅₀ (0.1~0.2 mM) に比べて有意に高い値を示し、Firmicutes門細菌はBacteroidetes門細菌よりも高い胆汁酸耐性を有することが示された。これらの結果は、胆汁酸仮説と矛盾せず、高脂肪食摂取における菌叢バランスの崩壊に胆汁酸が寄与することが示唆された。現在、胆汁酸添加食投与においても類似のOTUの変動が観察されるかについて検討中である。

一般演題 A-4**アルツハイマー型認知症患者腸内細菌叢がそのノトバイオート
マウス認知機能におよぼす影響****Influence of microbiota of Alzheimer disease patients
on cognitive function in mice**

○上村いつか¹, 杉浦悠毅², 山崎睦美¹, 宇根有美¹, 村山 洋¹, 荒井 健⁴,
小松一代⁴, 若杉茂俊⁴, 服部正平³, 菊水健史¹, 森田英利⁵
¹麻布大院獣医, ²慶應義塾大医学部, ³早稲田大院先進理工学,
⁴介護老人保健施設 葵の園・常総, ⁵岡山大院環境生命科学

【目的】 短期記憶や方向感覚の喪失, 気分変動がみられるアルツハイマー型認知症 (AD) の原因は明らかにされていない. AD 発症の要因のひとつに腸内細菌叢の変化があるのではないかと仮説立て, AD 患者と健常者の腸内細菌叢のメタゲノム解析を行い, AD 患者の腸内細菌が健常者と比較して異なるのかを比較検討した. さらに, 無菌マウスに AD 患者の腸内細菌叢を投与し, その認知行動を観察することで AD の発症における腸内細菌叢の関与を明らかにし, AD の予防, 治療に貢献することを目的とした.

【方法】 グリセロールストックによって -80°C で保存した AD 患者の糞便から細菌のゲノムを抽出後, 網羅的 16S リボソーム RNA 遺伝子解析を行い, 高齢な健常者腸内細菌叢との比較を行った. さらに 4 週齢 C57BL/6 の無菌マウスに AD 患者腸内細菌叢を経口投与したノトバイオートマウス (GF-AD マウス) と, 高齢な健常者腸内細菌叢を経口投与したノトバイオートマウス (GF-Cont マウス) を作成し, 10 週齢~30 週齢までの認知行動を物体認識試験 (object recognition test, ORT) 及び場所認識試験 (object location test, OLT) を用いて測定した. また, これらのマウスを解剖し, 脳を中性緩衝ホルマリンで固定後, ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) および抗 $A\beta$ 42 抗体を用いた免疫染色 (IHC) を実施し, 海馬と皮質を観察した.

【結果】 AD 患者腸内細菌の網羅的 16S リボソーム RNA 遺伝子解析において, 相同性 97%以下にアサインされる菌種が存在した. また, 30 週齢の GF-Cont マウスでは新奇の物体, あるいは新奇の場所に対する探索行動が増加し, 正常な認知機能が確認された. しかし, GF-AD マウスは特に場所認知行動実験で変化した物体と変化していない物体の探索時間に差異が認められず, 認知能力の低下がうかがえた. 脳を組織学的に検索したが, 2つの群の全ての個体で神経細胞の脱落や変性などの著変が認められなかった. 抗 $A\beta$ 42 抗体を用いた免疫染色においても, 陽性所見は得られなかった.

【考察】 物体の場所や物体の特徴を記憶していた場合, 新奇の物体に対する探索時間が増加し, 変化していない物体に対する探索時間が減少する. GF-Cont マウスは物体の場所と特徴を認知記憶していたが, GF-AD マウスは物体の位置に対する認知記憶が障害されているといえる. また, $A\beta$ 42 の蓄積が見られなかったことから, この認知記憶障害は他の要因によるものであると考えられる.

一般演題 A-5

加齢に伴う腸内 *Bifidobacterium* 属菌種構成の変化

Age-related changes in composition of gut bifidobacterial species

○密山恵梨¹, 小田巻俊孝¹, 加藤久美子¹, 清水金忠¹, 大澤 朗²¹ 森永乳業株式会社, ² 神戸大学大学院農学研究科

【目的】近年, 我々は次世代シーケンサーを用いて加齢に伴った腸内細菌叢の変動を詳細に解析しているが, 以前より培養法から示唆されていた結果と一致し, *Bifidobacterium* 属菌の割合は離乳後急激に低下し, その後も高齢になると徐々に減少していくことが示されている. 本研究では加齢に伴い減少する本属に着目し, より詳細な菌種レベルでの変化を明らかにすることを目的とした.

【方法】0~104歳の健常人446名から糞便を回収し, フェノール・ガラスビーズ法を用いてDNA抽出した. MiSeqにてV3-V4領域を標的とした16Sメタゲノム解析を実施後, *Bifidobacterium* 属7菌種・亜種 (*B. longum* ssp. *longum*, *B. breve*, *B. adolescentis* group, *B. pseudocatenulatum* group, *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. animalis* ssp. *lactis*) それぞれに特異的なプライマーを用いて定量PCRを実施した.

【結果】*B. longum* ssp. *longum* の検出率は86.8%と最も高く, 乳児から高齢者まで幅広く検出された. 次いで検出率の高かった菌種は *B. pseudocatenulatum* group および *B. adolescentis* group で半数以上の被験者から検出されたが, 離乳前の被験者からはほとんど検出されなかった. 一方離乳前に最も検出された菌種は *B. breve* で, 3歳以下の約70%から検出された. *B. dentium* は検出率・菌数ともに低い値を示したが, 60歳以降検出率が増加し, 3割程度の高齢者から検出された. 本来ヒトに棲息する菌種ではない *B. animalis* ssp. *lactis* も11.4%の被験者から検出されたが, その年代は離乳中から70歳代に限定的であった. 各被験者が保有している菌種数は 2.9 ± 1.4 種であったが, *B. longum* ssp. *longum*, *B. bifidum*, *B. pseudocatenulatum* が検出された被験者は, 検出されなかった被験者と比較し該当菌種以外の保有菌種数や総ビフィズス菌数が有意に高かった. 特に *B. longum* ssp. *longum* 検出の有無は *B. longum* ssp. *longum* 以外の保有菌種数への影響が大きかった.

【考察】加齢に伴う *Bifidobacterium* 属の変化は菌種ごとに大きく異なっていたが, その高い検出率から *B. longum* ssp. *longum* は日本人のどの世代でも定着しやすい菌種であると考えられた. さらに, *B. longum* ssp. *longum* 等の有無により共存する他の *Bifidobacterium* 属菌種数に違いが認められたことから, 該当菌種が他の菌種と相利・片利共生を築いている, もしくは *B. longum* ssp. *longum* 等が存在できない腸内環境では, 他の *Bifidobacterium* 属菌種も棲息しづらいのではないかと考えられた.

一般演題 A-6

新生児の生後 1 年間の腸内細菌叢変化と
食物アレルギー発症の関連性の解析Signature and occurrence observed in developmental gut microbiota
in allergic infant

○田中 優¹, 東佳那子¹, 山本麻寿紗¹, 本田倫子¹, 百田理恵¹,
清原千香子², 園元謙二^{1,3}, 鷲尾昌一⁴, 中山二郎¹

¹九州大学大学院農学研究院, ²九州大学大学院医学研究院,
³九州大学バイオアーキテクチャーセンター, ⁴聖マリア学院大学看護学部

【目的】近年, 増加傾向にある乳幼児期の食物アレルギー発症と腸内細菌叢の関連性を解析する前向きあるいは後ろ向き研究が世界的に行われている. 我々のグループでも過去の調査で生後 1 ヶ月後の糞便細菌叢が後のアレルギー発症に関連していることを見出している. 本研究では, 生後 1 歳時までの糞便細菌叢と生後 3 年間のアレルギー発症の関連性について, 近年技術進歩の目覚ましいメタ 16S rRNA 解析の手法を取り入れて綿密に解析した. そして, 新たな知見を得るに至ったので発表する.

【方法】平成 20 年から 23 年の間に, 福岡県久留米市聖マリア病院で出生した計 69 名の新生児の糞便サンプル (生後 1, 2, 6, 12 ヶ月時), 出生前後の診療記録, 生後 3 年間のアレルギー発症に関するアンケート調査データを用いて行った. 糞便メタ 16S rRNA 解析は, 糞便サンプルから抽出した全細菌ゲノム DNA を基に Illumina 社 Miseq によりペアエンド配列解析を行った. 得られた配列データから Uparse により OTU を作成し, QIIME を用いて系統解析を行い, 各サンプルの細菌叢プロファイルを作成した. 生後 2 年後までに食物アレルギーの罹患歴を有する被験者をアレルギー発症群 (n=10), アレルギー罹患歴のない被験者を健常群 (n=22) として細菌叢の比較解析を行った.

【結果および考察】生後 2 ヶ月において, 細菌叢の系統学的多様性の指標である PD whole tree, 生後 12 ヶ月において PD whole tree 及び Observed species がアレルギー群で有意に低かった (p<0.05 in Mann Whitney U test). また, アレルギー群では生後 2 ヶ月で *Veillonella* 属の占有率が有意に少なく (p<0.05), 生後 12 ヶ月では Unclassified *Clostridium*, Uncl. Enterobacteriaceae の占有率が有意に多かった (p<0.01). Uncl. *Clostridium* については, さらに OTU レベルで解析を行った結果, 2 つの OTU がアレルギー群で有意に多かった (p<0.05). 現在この 2 つの OTU に関して, さらに長い領域を解析し系統解析を行っている. また, これらの *Clostridium* 属細菌と宿主免疫系との相互作用について興味を持たれる.

一般演題 A-7

ある種の腸内細菌の占有率は、月経付随不定愁訴や
血漿女性ホルモン濃度と相関するIntestinal microbiota correlate to menstrual cycle-dependent complaints
and plasma levels of female hormones○松本 舞¹, 飯野久和², 菅沼大行¹¹カゴメ株式会社自然健康研究部, ²昭和女子大学大学院生活機構研究科

【目的】月経前症候群や月経困難症等の月経付随不定愁訴は、女性の QOL を低下させる大きな要因の一つである。これら、月経付随不定愁訴の発現過程は複雑で原因も一つではないが、発症や症状の程度に女性ホルモンが何らかの影響を与えていると考えられる。女性ホルモンの濃度は、更年期障害にも関連することが知られており、その症状の緩和に、腸内菌叢により大豆イソフラボンから派生するエクオールが有効であるとの報告がある。このことから、更年期障害とよく似た症状を示し、同様に女性ホルモンの影響が推定される月経付随不定愁訴に対しても、エクオール産生菌のような腸内細菌が影響を与えていることが推測されるが、そのことを示した報告はこれまでにない。そこで本試験では、腸内細菌と、月経付随不定愁訴や女性ホルモンとの間の関連の有無を明らかにすることを目的とした。

【方法】正常な月経周期を示す女子大生 10 名から糞便および血漿サンプルを、約 3 か月間毎週採取し、腸内細菌の占有率と、 17β -エストラジオールおよびプロゲステロンの血漿濃度を測定した。また、期間中の月経付随不定愁訴の重症度をアンケートで調査し、不定愁訴スコアを求めた。月経周期に伴う菌叢の変動は主成分分析により評価した。細菌の占有率と不定愁訴スコアや女性ホルモン濃度との関連は、スピアマンの順位相関係数により解析した。

【結果】主成分分析により、月経周期による腸内菌叢の変動は、菌叢の個人差と比較して小さいことが示唆された。一方、特定の菌種の占有率と不定愁訴や女性ホルモン濃度との関連性の評価で、エクオール産生菌の一つである *Bacteroides ovatus* の占有率と不定愁訴スコアとの間に有意な負の相関 ($r = -0.766$, $p < 0.05$) を認めた。また、不定愁訴スコアや女性ホルモン濃度と占有率に相関のある菌種が他にも複数見出された。

【考察】エクオール産生菌の占有率が不定愁訴スコアと負の相関を示したことから、この菌を持つ者では、更年期障害同様に、イソフラボンから派生する植物エストロゲンが月経付随不定愁訴の症状緩和に寄与していることが考えられる。また、複数の菌種の占有率が、月経付随不定愁訴や血漿女性ホルモン濃度と相関を示したことから、作用機序の詳細は不明であるが、腸内細菌が何らかの形で月経前症候群や月経困難症に影響を及ぼしている可能性が高いと考えられた。