

令和元年6月18日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00845

研究課題名(和文) ヒト糞便由来腸内細菌群のエネルギー要求度による宿主健康度の推定

研究課題名(英文) Estimation of host health state by an electrogastroenterogram, a fecal analysis and an energy demanding of fecal microbiota

研究代表者

長友 克広 (Katsuhiro, Nagatomo)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：30542568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：「便の状態を見れば、今の健康状態が分かる」という言葉は、「体内の外環境状態を糞便から知ることができる」ということを示している。本研究では、食物の消化・栄養素の吸収が行われる場の状態をより科学的に評価することを目的とし、健康状態を「腸内細菌群の栄養素要求度の揺らぎ」、「便の性状」、「消化管運動」の3つの視点から検討した。消化管機能が著しく破綻した胃がんモデルマウスでは、腸内細菌の栄養素要求性が野生型マウスよりも増加した。一方、糞便性状や腸電図は解析方法の確立まで辿り着いたが、各測定項目の紐付けは検討段階となっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管に異常を来したマウスでは、糖を取り込む腸内細菌が増加していた。健康な個体であれば、栄養素は小腸で十分に吸収され、排便間近の糞便中では非常に少ないかゼロに近い状態と考えられるため、肛門付近まで輸送されてきた腸内細菌は糖輸送体をほとんど発現していないと考えられる。一方、病気のマウスでは栄養素が十分に吸収できない状態となっており、排便間近の糞便中でも糖輸送体を発現している腸内細菌がいるものと考えられる。このことから、栄養素の吸収という健康の源と言える生体機能を、腸内細菌を用いて評価可能であると示唆される。ただし、健康状態を取り戻せる段階で腸内細菌が異常を来すのか、更に検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Stool in a macroscopic observation shows us our health condition. Thorough analysis of gut activities and energy demanding of fecal bacteria would show us more informations about internal body condition. We analyzed electroenterograms, stool characteristics and energy demanding of fecal microbiota. Fourier analysis of electroenterograms from abdominal surface revealed fingerprint-like gut activities. By their similarity between stool and soil, stool characteristics were analyzed by pH, solidity, conductivity and color. In nutrients-demanding experiments of human fecal bacteria, only my feces were used. Therefore, we needed to check nutrients demanding of enteric bacteria in an extremely bad condition. Glucose-incorporating fecal bacteria increased in gastric tumor model mice compared with wild type one. These results indicated that the enteric environment could evaluate from energy demanding of fecal microbiota. At present, we try to find a method of correlation analysis of these data.

研究分野：生理学

キーワード：腸内細菌 腸電図

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

正常な便は80%が水分であり、残り20%の固形分は剥がれ落ちた腸管上皮細胞、未消化の食物(タンパク質・脂肪)、腸内細菌(生菌・死菌)からなる(図1)(Stephen & Cummings, *J Med Microbiol*, 1980; Rose ら, *Critic Rev Environ Sci Technol*, 2015; Guyton & Hall, *Textbook of Medical Physiology* 13th ed., 2015)。便の性状は、消化管環境や消化管運動、食物中の成分、腸内細菌のはたらきによって変わることを意味する。

食物は様々な物質を含有しており、その成分によって腸内細菌叢は構成を変え(David ら, *Nature*, 2014)、土壌細菌においては、植物ホルモンであるサリチル酸“たった1種類の物質”だけで菌叢構成が変わる(Lebeis ら, *Science*, 2015)。また、腸内細菌は食物成分を様々な代謝産物に変換し(Matsumoto ら, *Sci Rep*, 2012)、代謝産物が他の細菌に利用される(ヤクルト本社中央研究所編, *ラクトバチルス ケイシタ株*, 2011)。さらに、生体分泌物の胆汁酸も腸内細菌叢構成に影響を与える(Islam ら, *Gastroenterology*, 2011)。様々な食物成分と多様多種の腸内細菌、消化管という場で生成される代謝産物、また宿主消化管から分泌される物質の間で、複雑な食物連鎖が構築されていることは想像に難くない(Post, *Trends Ecol Evol*, 2002)。

我々ヒトでは神経伝達物質として機能するドーパミンやノルアドレナリンなどの物質が、腸内細菌においても生成・分泌されており(Lyte & Freestone 編集, *Microbial Endocrinology*, 2010)、確かに無菌マウスの消化管管腔からドーパミンはほとんど検出されない(Asano ら, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012)。ドーパミンは消化管運動の抑制(Haskel & Hanani, *Dig Dis Sci*, 1994; Li ら, *J Neurosci*, 2006)や、他にも種々の生理機能に関与している(Eisenhofer ら, *Pharmacol Rev*, 2004; Beaulieu & Gainetdinov, *Pharmacol Rev*, 2011)。また数多くの食物中の成分や腸内細菌の代謝産物は、腸管に発現している種々のイオンチャネルや受容体を介して、腸管に直接作用していると考えられる(Boesmans ら, *Br J Pharmacol*, 2010)。

さらに極めて興味深いのは腸内細菌が脳にはたらきかけるという腸-脳相関(Gut-Brain Axis)の存在である(Lyte & Cryan 編集, *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*, 2014; Saulnier ら, *Gut Microbs*, 2013; Matsumoto ら, *Front Syst Neurosci*, 2013; Neunlist & Schemann, *J Physiol*, 2014)。腸内細菌が代謝産物を介して宿主にはたらきかけ、食の嗜好や行動を決めている可能性すらある(Norris ら, *J Bacteriol*, 2013; Lyte, *PharmaNutrition*, 2013; Meisel ら, *Cell*, 2014)。

近年のメタゲノム解析から、個人毎に腸内細菌叢の構成は異なるが、遺伝子組成を機能でソートすると、個人毎にバラツキはなく、ある一定の範囲で保存されているようである(The Human Microbiome Project Consortium, *Nature*, 2012)。このことから、善玉菌や悪玉菌の増減(腸内細菌叢の構成比率の変動)を、腸内細菌叢総体としての“機能の揺らぎ”として捉えることが可能ではないかと考えた。

以上のように、腸管内に存在する物質は直接的・間接的に宿主に影響を与えており、その核となる食塊は腸内細菌の力を借りて最終的に便になることから、腸内細菌の状態や便の性状、さらに場としての消化管状態を知ることは重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

排泄した便を観察することで、今現在の身体の調子を簡単に知ることができる。多くの場合、食事内容や生活を見直すきっかけとなる。食事は我々人間の栄養になるだけでなく、腸内細菌の栄養にもなる。腸管内では170種以上の腸内細菌の間で、種々の代謝産物による複雑な食物連鎖が起きており、腸内細菌叢の構成比率は常に変動していると考えられる。栄養素の偏りや他の要因により腸内細菌叢の均衡が崩れると、宿主の消化管環境に悪影響を及ぼす細菌群や代謝産物が増加し、その状態が長引けば多くの疾病の引き金となり、やがて病気になる。そこで、大便中の腸内細菌群の栄養素要求度を評価し、定常状態から逸脱したら食事内容や生活を改めて、健康時の状態を目指し回復するのはどうだろうか。本研究は「腸内細菌群の栄養素要求度の揺らぎ」が宿主健康度を表す指標になるのか、「便の性状」や「消化管運動」と共に解析し、検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、腸内細菌の機能を生きたまま評価することにより宿主健康状態の推定を行うものである。検討項目は、①腸内細菌のエネルギー要求量、②糞便性状、③宿主消化管運動の電気生理的解析である。

#### (1) 「腸内細菌のエネルギー要求度」実験プロトコルの検証

腸内細菌の大部分は酸素存在下で死滅する偏性嫌気性菌である(Eggerth & Gagnon, *J Bacteriol*, 1932; Suau ら, *Appl Environ Microbiol*, 1999)。弘前大学医学研究科・臨床検査医学講座・萱場広之教授、弘前大学附属病院臨床検査部門・木村正彦先生に糞便試料の取り扱

いについて伺ったところ、偏性嫌気性菌を対象とする場合、30分以内の作業を推奨された。また室温条件で空気中にそのまま放置した糞便試料を用いた 16S rRNA 解析では、15分以内に実験を行うことを推奨しているグループもいる(Gorzalak ら, PLoS One, 2015)。腸内細菌回収に有効な作業時間を検討するために、予備実験として、便採取後 6 時間まで検体を採取し、それぞれ 16S rDNA の PCR 増幅産物(アンプリコン)を検討した。大部分が偏性嫌気性菌かつ難培養性であることから、時間経過と共に減少すると予想されたが、意外にもアンプリコンは増加した(図 1)。つまり、時間経過に応じて偏性嫌気性菌以外の腸内細菌が増加している、すなわち腸内細菌叢の変化が生じることから、菌叢解析を実施し検討することにした。諸事情により、便採取後、ろ過前後と 30 分後の検体を用いて菌叢解析を行った。セルストレイナーを用いたろ過作業ではほとんど影響が出ないが、ろ過後 30 分放置することで僅かに菌叢変化を生じることが判明した(図 2)。蛍光糖試薬の投与までの間、可能な限り時間短縮することとした。

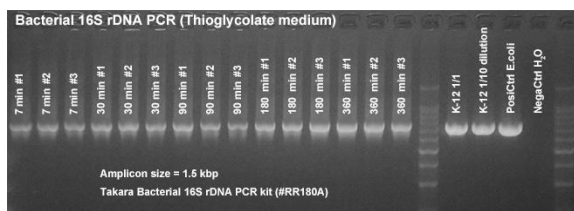


図 1 16S rDNA PCR 結果

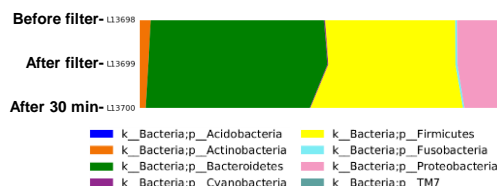


図 2 実験工程に伴う腸内細菌叢の変動

### (2) 細胞それ自体や細胞膜の障害を検出する赤色蛍光糖試薬の性能評価

細胞は生と死の 2 つの状態をデジタル的ではなくアナログ的に遷移している。所属している研究室では、生きた細胞を用いて蛍光糖試薬の取り込みを評価しており、細胞障害や細胞膜破綻を検出する為に赤色蛍光糖試薬を用いてきた(Sasaki, Nagatomo ら, Hum Cell, 2016)。実際のところ、どの程度の障害を検出しているのか確認したことがなかったので、大腸菌をエタノール処理し、蛍光糖試薬を投与し、緑色蛍光糖試薬と赤色蛍光糖試薬を比較した。さらに、細胞の生死判定キットなどで用いられている Propidium iodide (PI) と赤色蛍光糖試薬の性能を比較した。

25% エタノール処理で緑色蛍光糖試薬を取り込む大腸菌が皆無となる。細胞自体や細胞膜に異常事態が生じていて、D 体ブドウ糖に類する緑色蛍光糖試薬を取り込む状況ではないことが分かる。この時、通常用いられている PI が検出できる細胞障害の程度は、赤色蛍光糖試薬よりも非常に少ない(図 3)。また、別途コロニー形成試験

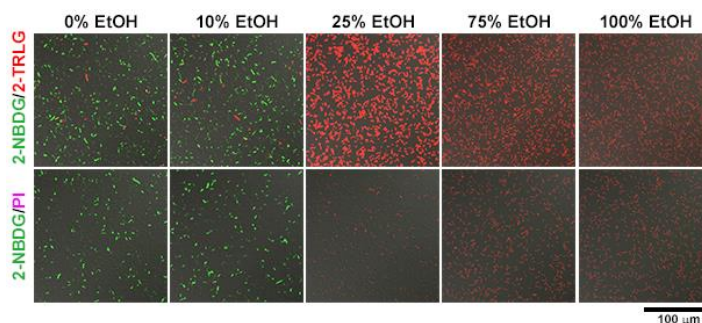


図 3 赤色蛍光糖試薬が細胞障害を感度良く検出している様子

も実施しており、25%エタノール処理を行うと不可逆的にコロニー形成能力が損なわれる、すなわち増殖できない=死の状態に移行していると考えられる。

日常的に使用している消毒用アルコールは、World Health Organization (WHO)では 70% エタノール(Laboratory biosafety manual 3<sup>rd</sup> edition, 2004), Centers for Disease Control and Prevention (CDC)では 60~90% エタノール(Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008)を使うように勧められている。多くの古い文献を紐解くとアルコールの影響を調べた研究で用いられている菌体は乾燥菌体が主であり、生きた状態の菌を用いてアルコールの影響を調べた文献では 25%程度の低濃度エタノールで回復不能な状態に陥ることが報告されている(Morton, Ann N Y Acad Sci, 1950)。

転じて、醸造の世界に目を向けると、日本酒でもワインでも発酵で得られるアルコール濃度は 20%を超えることはほぼないことから、低濃度のエタノールでも機能障害を受けることは間違いないと考えられる。

### (3) 便性状解析

便性状解析は、便を「土」と見なし、土壌環境測定項目から実際に計測可能と考えられる pH, 硬度, 電気伝導度, 色を測定項目とした。糞便色解析は、画像処理ソフト Fiji の Plugin である Color Inspector 3D を使用した。三次元 RGB 軸 (8 bit) に対して、色とその頻度を球の大きさとしてグラフ化した(図 4)。

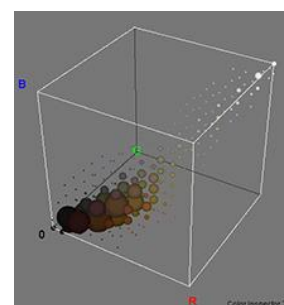


図 4 糞便色解析の例

#### (4) 非侵襲的方法による腸管運動の電気生理学的記録

ヒト消化管では部位により1分間に数回から10回程度、ペースメーカー細胞による徐波と活動電位の2つの電気活動が発生し、小腸では分節運動・蠕動運動・振子運動によって食塊が混和・輸送される(Sandersら, Physiology of the gastrointestinal tract 5th ed., 2012)。この複合的な電気活動を記録するために、PowerLab26T(ADInstruments)にEOGポッド(ML317)を接続し、臍を中心に左右10cmのところに記録電極を貼付し、臍直下に参照電極を貼付した(図5)。心電ノイズや体動ノイズはLowPassフィルター(0.5 Hz)を通して処理し、ゆっくりとした変動成分をフーリエ変換し、周波数成分を解析した。

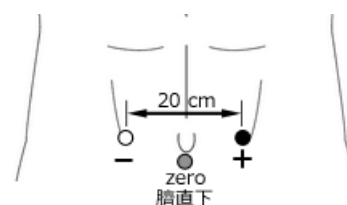


図5 腹部電極配置

#### 4. 研究成果

それぞれの解析項目の紐付けをどのように実施すべきか検討している段階であるため、分かりやすい結果を中心に掲載し、最後に研究の方向性と将来への展望を記載する。

##### (1) 胃がんモデルマウスによる腸内細菌のエネルギー要求度

申請時当初計画していなかったが、消化管機能の破綻と腸内細菌のエネルギー要求量を比較するために胃がんモデルマウスを利用した。本マウスは遺伝子改変マウスであり、3種類の遺伝子を欠損すると生後50週で高確率に胃がんを発症する(Oshimaら, Gastroenterology, 2006)。食餌や飼育環境が野生型マウスと常に同じであるため、両マウスの腸内細菌を用いることで、健常時と健康状態が破綻した時の腸内細菌のエネルギー要求量の比較を簡便に行えるものと考えた。

糞便採取に際して、野生型マウスでは瑞々しい光沢を伴う色調も均一な糞塊を得ることができた。一方、胃がんモデルマウスの糞塊は野生型で採取されたサンプルよりも小形で色調が均一ではなかった。また、菌体の形状解析は実施していないが、野生型マウスでは多く見られる大形の桿菌が胃がんモデルマウスでは減少しているようであり、多様性の低下が起きていると推定される。

糞便採取後、速やかに腸内細菌を含む画分をろ過分離し、2色の蛍光糖試薬を投与した(Yamada K, Biol Pharm Bull, 2018)。細胞膜破綻などの異常な取り込みを解析から除外し、D体ブドウ糖蛍光試薬の取り込みの程度を解析した。同時期に実施した取り込み実験を並べると一目瞭然となることだが、胃がんモデルマウスの腸内細菌は野生型マウスの腸内細菌よりも、緑色蛍光糖試薬の取り込む菌が多く検出された。

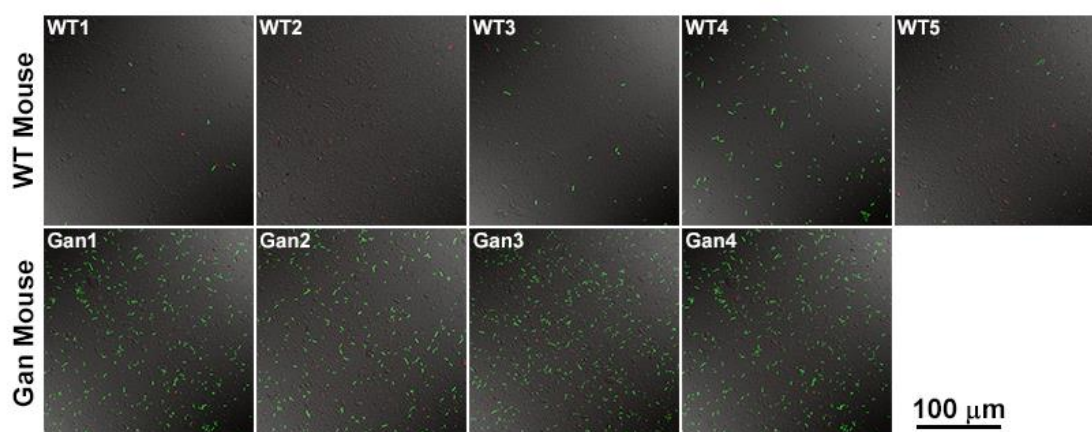


図6 胃がんモデルマウスではブドウ糖を取り込む腸内細菌が増加する

健常であれば、食物に含まれる重要な栄養素のブドウ糖は、全て生体で利用することが望ましく、消化吸收も正常に機能していれば小腸で十分に吸収されるため、大腸を経由してきた糞塊には残存するブドウ糖が極端に減少しており、ブドウ糖を利用する腸内細菌も減少していると考えられる。また、DNA上にはブドウ糖輸送体の設計図があっても、周辺環境にブドウ糖がなければ輸送体を発現する意味がないと考えられる。このことから胃がんモデルマウスでは消化吸收のバランスが崩れており、肛門近くまで輸送された糞塊にもブドウ糖が含有されていると考えられる。

さらに、エンドポイントでマウスを解剖し、臓器の状況を確認した(H&E染色は行わず、マクロ解剖のみ)。末期状態の胃がんモデルマウスでは解剖する以前に、腹部が膨張およびゴツゴツしており明らかに異常を来していることが予想できた。確かに、胃腸が膨大化しており、盲腸

に多量の糜粥が残存していた。外見から末期状態に移行していないと考えられる胃がんモデルマウスは解剖しても明らかな所見は観察されなかったが、緑色蛍光糖試薬の取り込み量が増加しているため、組織細胞レベルで異常が生じていると予想される。もしかしたら、異常所見が生じていても、速やかに処置すれば元に戻るような状態であり、腸内細菌の機能から、健常とは異なる状態に移行しつつある状況が表れている可能性も否定できない。

(2) 非侵襲的方法による腸管運動の電気生理学的記録

腹部から消化管運動の電気活動を長時間測定し、フーリエ変換により周波数解析を行った結果、体外から記録できる成分としては、主に 0.2 Hz 以下に集中していることが分かった。また、食間に行った記録と食事中の記録を比較すると、0.05~0.15 Hz 帯域に変化する成分が存在する。さらに、非常に短い期間ではあるが 0.3 Hz 前後に生じる活動も記録された。本研究では、気管内に、所謂「お腹の調子が悪い」という時の記録は取れなかったが、「ゴロゴロする」「ぎ

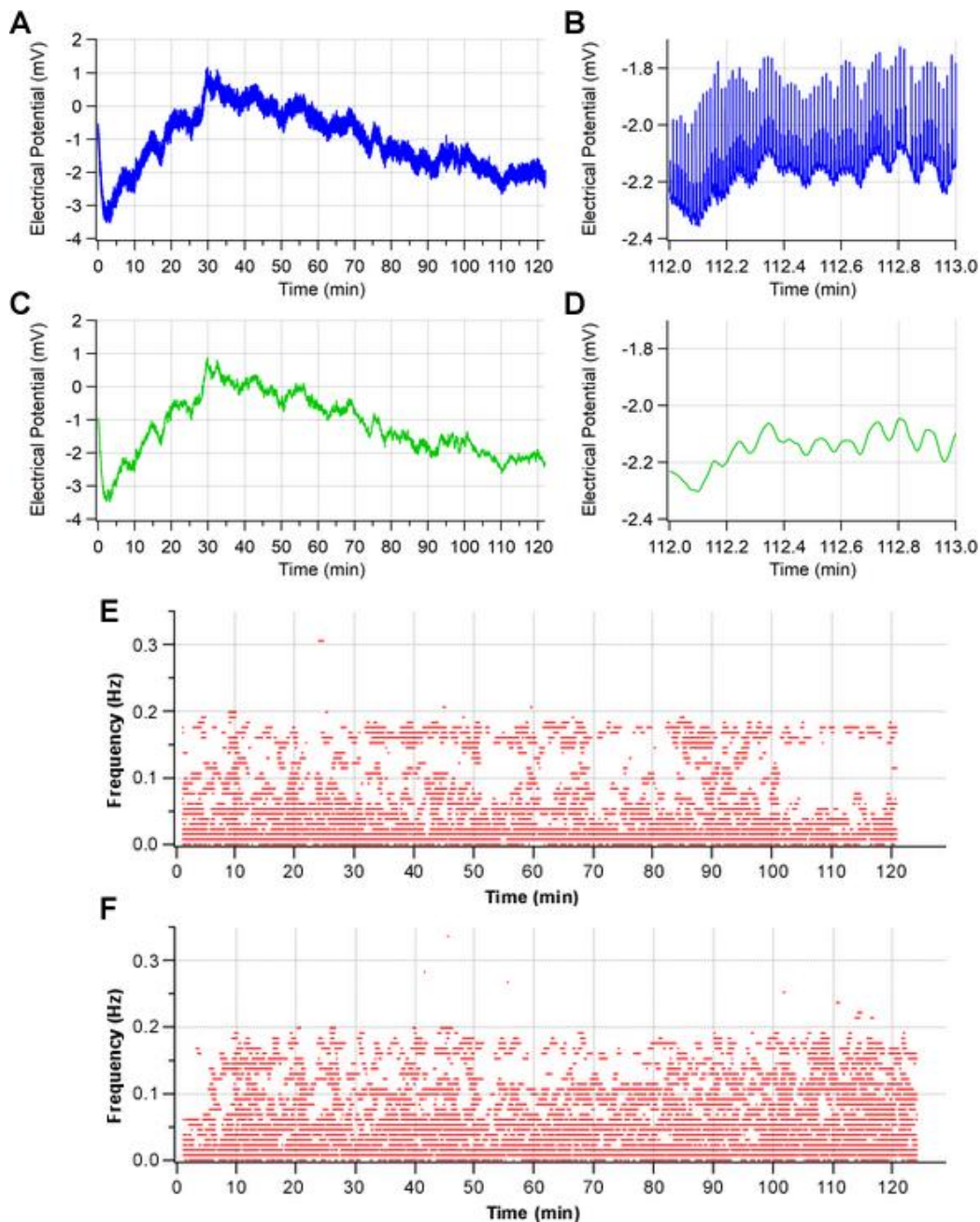


図7 腸電図解析 A) 実際に記録される腸電図記録、食後3時間以上を経過している、B) 記録Aの一部を拡大したもので、心電波形がノイズとして混入している、C) Low Pass Filter を通した波形、D) 記録Bに相当する箇所での電位変化、E) 記録Cをフーリエ変換し、0.5 Hz 以下で強度が 10  $\mu$ V 以上の成分を抽出したグラフ、F) 解析Eとは別の日の食事中の記録、検出される周波数成分が異なる

ユルユルする」という表現から推測するに、消化管の異常活動により、被検者毎に周波数帯域は異なるのかもしれないが 0.17 Hz 前後の特徴的な周波数成分が高頻度方向へシフトするのではないかと考えられる。

### (3) ヒト糞便由来腸内細菌のエネルギー要求度

ヒトの場合、おそらく雑食であることが一番の理由であると考えられるが、まず糞便残渣の有する自家蛍光が強く、また蛍光糖試薬の非特異的相互作用により投与後洗浄してもある程度の強度で蛍光が残ってしまう。いずれにしても赤くなった箇所は解析から除外するが、実験プロトコルで残渣を取り除く工程を考える必要がある。研究成果(1)のマウスを用いた蛍光糖試薬取り込みの程度と比較すると野生型マウスに近いと考えられる。調子が悪いという主訴もないため、妥当な結果と考えられる。

### (4) 今後の方向性

現在、腸内細菌叢解析が主流となっているが、腸内で起こりうる食物連鎖、遺伝子の水平伝播など、遺伝子解析では想像し得ない部分を、細菌叢全体としての機能解析という形で補完することができると考えている。今回、基礎的な研究手法に関してはほぼ確立できたと考えており、今後、各項目の紐付けを含めて、宿主の健康状態を評価できるように進めていく。また、臨床グループとの共同研究も検討していく。さらに、緑色蛍光糖試薬を取り込んだ腸内細菌をセルソーターなどで単離し、遺伝子解析を行えば菌種同定も可能と考えている。

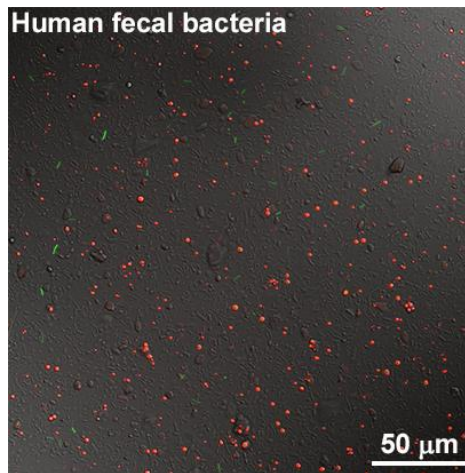


図8 ヒト腸内細菌の例

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

①長友克広, 小野幸輝, 萱場広之, 山田勝也, 細胞状態の悪化を鋭敏に検出する蛍光L-グルコース誘導体 2-TRLG ~ヨウ化プロピジウム(PI)との比較~, 第48回 東北生理談話会, 岩手医科大学循環器医療センター (2016/10/15)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当者ナシ

(2) 研究協力者

該当者ナシ