

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05938

研究課題名（和文）腸内細菌代謝物を用いたテララーメイドな善玉菌の分離・培養技術の創出

研究課題名（英文）Development of technology for isolation and cultivation of probiotic bacteria using metabolites from in vitro colonic microbiota culture

研究代表者

佐々木 大介（Sasaki, Daisuke）

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教

研究者番号：00650615

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：有用な腸内細菌分離法の構築を進めた。具体的には、有用菌候補を多く保有している健康者糞便を *in vitro* 培養し、嫌気無機合成培地に培養後の培養上清を添加した新規培地を考案した。その結果、300種以上の分離菌株を取得することができた。16S rRNA 遺伝子を解読することで菌種の同定を行ったところ、Bacteroidetes門およびFirmicutes門に属する細菌が多く、次いでActinobacteria門やProteobacteria門細菌が少数得られた。中でもヒトの腸管環境の健全化や免疫賦活・調整に影響を与えていると考えられる未培養菌を含む酪酸産菌を数種、分離培養することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの腸内細菌の変化がさまざまな疾患の原因や結果になっていることが明らかにされてきている中、健康維持、恒常性維持、免疫調整に深く換喩することが判明している酪酸を産生する腸内細菌を実際の腸内から分離し、それを利用した生菌製剤の研究開発が求められてきている。本研究はそのような将来的に注目される研究開発のために、その材料を提供する培養方法として、今後非常に重要になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Construction of a useful colonic bacteria isolation method was completed. First, healthy human feces containing many useful bacteria candidates were cultured *in vitro*. Subsequently, a new medium was developed by adding the culture supernatant after cultivation to the anaerobic synthetic medium. As a result, more than 300 isolated strains were isolated and cultured. Bacterial species were identified by sequencing the 16S rRNA gene, and many of the bacteria belonged to the phyla Bacteroidetes and Firmicutes, and a small number of bacteria belonged to the phyla Actinobacteria and Proteobacteria. Among them, several species of butyrate-producing bacteria, including uncultured strains, which are thought to be beneficial to human health, have been isolated and cultured.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 マイクロバイオーム 酪酸産生菌 短鎖脂肪酸 酪酸 *in vitro*腸内細菌培養 分離培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸内の腸内細菌の種類や代謝物が、ヒトの健康維持や疾患に大きく関わっていることが広く一般的にも知られるようになった。一方、プロバイオティクスには摂取によって有用な機能が期待される微生物、いわゆる善玉菌も含まれるが、個人個人で異なる腸内細菌叢に対して一様に効果を発揮するものは存在しない。もしも、万人に効果のあるプロバイオティクスがあるならば、すでに健康社会が築かれているはずである。

そこで本研究では、未知の善玉菌が含まれている可能性の高い、腸内細菌の中でもヒトの健康に資する有用な機能を持った未培養菌に注目し、それを分離・培養できる新規技術の構築を目的にしている。また、考案した方法で分離してきた菌株が、新規な善玉菌候補であるかどうかの確認、およびその摂取が腸内細菌叢構造やその代謝産物へどのような影響を与えるか、定着性(既存腸内細菌叢への残存性)を明らかにする。

2. 研究の目的

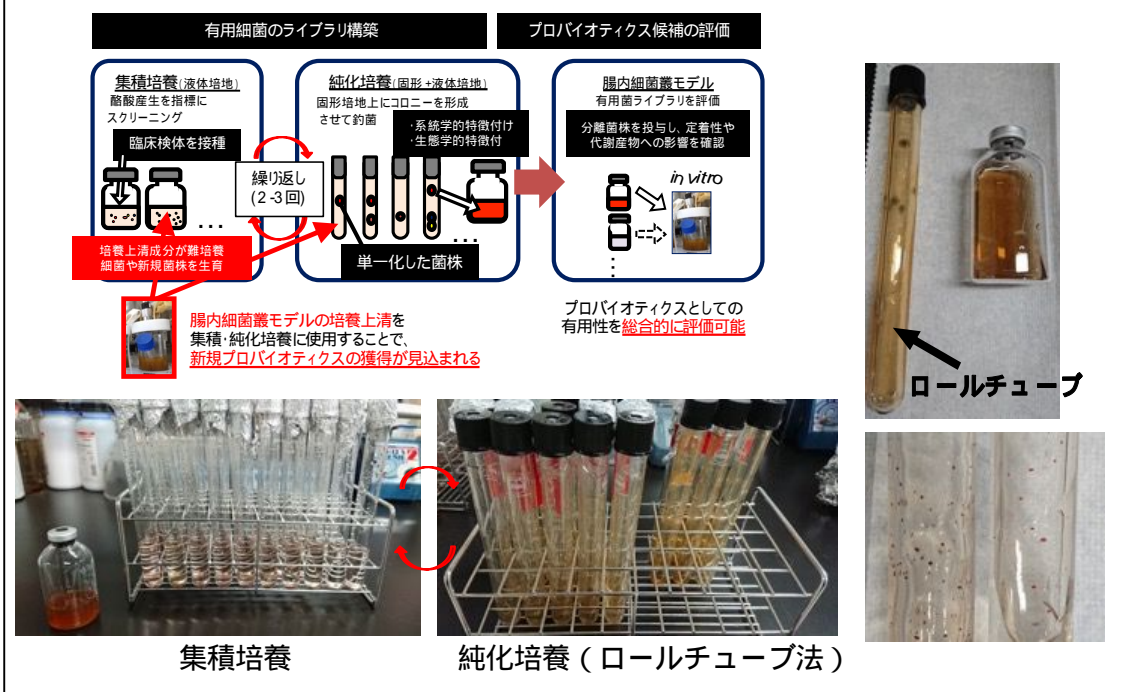
ヒトにはヒトの善玉菌ではなく個人には個人ごとの、つまりテラーメイドな善玉菌が必要な時代が来ると予想される。それに先んじて、我々の研究グループが所有する *in vitro* 腸内細菌叢モデルの培養液を分離培養源として使用すれば、テラーメイド善玉菌を取得する新規技術を開発できるという着想が、本研究のポイントであり目的である。本研究の成果は、近未来的に、健康人の健康維持を目的とした善玉菌を提供するために必要な技術要素となることが予想される。さらに各種疾患の改善・治療法の一つのツール開発として、有用腸内細菌の分離法を確立することは非常に価値がある。

3. 研究の方法

・1-2 年目に分離法を確立する。まずは健康人の糞便を *in vitro* 培養し、培養上清を取得する。フィルター滅菌にて除菌後、上清濃度および別途添加する酢酸濃度の希釈系列、接種する糞便液の希釈系列を作成し、ブチルゴム栓をしたバイアル瓶を用いてそれぞれの組み合わせで培養する。数週間後、生育した菌液を数千倍まで希釈し、再度、液体上清培地に植菌する。その後、ロールチューブ法で作成した固形培地に移してコロニーを単一化し、16S rRNA 遺伝子を解読することで菌種の同定を行う(下図)。嫌気性菌は好気性菌に比べて生育が極端に遅いため、実際には試行錯誤を繰り返して技術開発する必要がある。

・3 年目前までには、構築した分離方法で酪酸産生菌を分離する。その菌株を同じ分離元の糞便を接種にした *in vitro* 腸内細菌叢モデルの培養時にいくつかの菌体量で添加し、酪酸産生量の変化と *in vitro* 培養後の菌叢への定着性・残存性について、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子の構造解析から明らかにする。さらに、同菌種の市販プロバイオティクスや標準菌株の添加試験の結果を比較し、テラーメイド(個人ごと)の分離菌株を摂取する有効性を証明する。また、本研究計画で構築した分離培養法による酪酸産生菌が新種であった場合は、適宜、速やかに寄託および特許・論文化を遂行する。

酪酸産生菌(嫌気性菌)の分離



4. 研究成果

初年度は、有用腸内細菌の分離法を確立を実施した。具体的には、腸内細菌叢の詳細な解析から、有用菌候補を多く保有していると思われる1人の健康人糞便を *in vitro* 培養し、培養上清を取得した。フィルター滅菌等にて除菌後、上清濃度および別途添加する酢酸などの短鎖脂肪酸濃度の希釈系列、接種する糞便液の希釈系列を作成し、プチルゴム栓をしたバイアル瓶を用いてそれぞれの組み合わせで培養した。数週間後、生育した菌液を数千倍まで希釈し、再度、液体上清培地に植菌し、その後にロールチューブ法で作成した固形培地に移してコロニーを単一化し、16S rRNA 遺伝子を解読することで菌種の同定した。その結果、Bacteroidetes 門および Firmicutes 門に属する細菌が複数種分離できた。

次年度には、腸内細菌培養に要求される嫌気培養による集積培養を3回・コロニー形成を1回、連続的に実施し、年度内に分離菌株のシーケンスまで実施することができた。具体的な方法としては、有用菌候補を多く保有している健康者糞便を *in vitro* 培養し、嫌気無機合成培地に培養後の培養上清を添加した新規培地を考案し、さらに短鎖脂肪酸などの化合物を別途添加した数種の培地を用意した。それらを用い、同一人物の糞便検体を植菌源とした集積培養・ロールチューブによるコロニーの分離を実施し、300種以上の分離菌株を取得することができた。それぞれの分離菌株の 16S rRNA 遺伝子を解読することで菌種の同定を行ったところ、Bacteroidetes 門および Firmicutes 門に属する細菌が多く、次いで Actinobacteria 門や Proteobacteria 門細菌が少数得られた。中でもヒトの腸管環境の健全化や免疫賦活・調整に影響を与えていると考えられる酪酸を産生する細菌を数種、分離培養することに成功した。

最終年度は、分離培養に成功した有用菌候補株(酪酸産生菌・1分離菌株: Unclassified Lachnospiraceae)を用い、これを幾人かの健康者(疾患患者も今後に予定)の糞便培養モデルにいくつかの菌体量で添加し、酪酸産生量の変化と *in vitro* 培養後の菌叢への定着性・残存性について、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子の構造解析を行なった。さらに、同菌

種の市販プロバイオティクスや購入可能な酪酸産生菌株の添加試験の結果を比較した。しかしながら、新規に分離培養した酪酸産生菌は *in vitro* 培養で定着・残存することがなく、培養後の 16S シーケンス解析で検出されることはなかった。つまり、分離した菌株は他の健康者の腸内細菌叢では定着性が弱いことが示唆された。今後、分離元の健康者への添加培養も検討し、テラメイド(個人ごと)の分離菌株の有効性を解析すること、酪酸産生菌の増加が報告されるプレバイオティクスとの組み合わせによる定着性を解析することを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Daisuke, Sasaki Kengo, Abe Aya, Ozeki Makoto, Kondo Akihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of partially hydrolyzed guar gums of different molecular weights on a human intestinal in?vitro fermentation model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2023.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木大介、安部綾、小関誠、佐々木建吾、近藤昭彦
2. 発表標題 ヒト腸内細菌叢培養モデルによるガーガム加水分解物の機能性評価
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会（創立100周年記念大会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------