

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650474

研究課題名（和文）腸内フローラを指標とする健康評価法の開発と食生活管理システムの構築
 研究課題名（英文）Development of the new method and construction of an eating-habits managerial system which evaluate health condition based on the flora pattern in intestines

研究代表者

近藤 壽彦（KONDO TOSHIHIKO）

群馬大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：10162108

研究成果の概要（和文）：

本研究は腸内フローラを指標とする健康評価・管理システムを開発し、肥満、メタボリックシンドローム、腸管感染症、大腸癌などの効果的な予防を行うための保健医療の実現をめざすものである。本研究では、腸内フローラを構成する細菌群の中から腸の年齢、健康、病態などに大きく影響を及ぼす細菌群に焦点を絞り、門、科、属などグループ特異的に解析可能な新たな分析法を開発し、その検証の結果、健康評価・管理システムとしての有用性が確認された。

研究成果の概要（英文）：

In this research, we develop the new technology which analyzes the flora pattern in human intestines, and aim at effective prevention of obesity, metabolic syndrome, enteric infection, and colorectal cancer. We evaluated intestinal health condition by measurement of the ratio of a good bacteria and bad bacteria. Moreover, the obesity was also evaluated from the ratio of the bacteria in *Bacteroidetes* and *Firmicutes*. As a result of performing various examination, it was verified that this method is effective in healthy evaluation and health care administration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、腸内フローラ

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内には数百種類、数百兆個もの細菌が生息し、マイクロエコシステムとも言うべき腸内フローラを形成し、一定のバランスの下に維持されている。

腸内フローラは通常、宿主の年齢、生理状態、食物の種類や量、ストレス、薬物の投与などによって大きく変動するが、何等かの原因でバランスが崩れると、有害性の強い細菌

群が優勢となり、異常発酵や便秘を惹起し、感染症、大腸癌などの疾病発症の原因となる。

興味あることには、腸内フローラの改善で痩せや肥満を制御する可能性が明らかとなり（Nature 444, 1022-1023, 2006、Nature 444, 1027-1031, 2006）、より有効なプロバイオティクスやプレバイオティクスの手法の開発が求められている。

ところで、従来、腸内フローラの解析には

専ら培養法などの細菌学的手法が用いられたため、多大な労力と分析時間を要するものであった(光岡ら、1989)。近年、分子生物学的手法の導入とともに腸内フローラ解析法は一変し、腸内フローラを構成する細菌群の全ゲノムをシーケンサーとコンピュータとを駆使して網羅的に分析するメタバイオロジーの手法が用いられるようになった。しかしながら、この方法では莫大な費用と時間が必要なため、とても個人レベルの腸内フローラを解析する手段として導入できるものではない。

我々は塩基配列特異的熱溶出クロマトグラフ法(SSTEC法)を原理とする遺伝子解析システムを既に開発した(特許H09-046414)。本システムは、DNAの塩基配列の違いを融解温度の差として検出するもので、遺伝子解析、遺伝子変異解析、ホモロジー解析などを高精度、高感度かつ迅速に実施できるという優れた特長をもつ。このシステムを基盤とし、新たに腸内フローラを構成する細菌群の中から、腸年齢、健康、腸管病態などに大きく影響を及ぼす細菌(門、科、属、種)に限定して解析できる簡便な分析システムを開発し、個々人のエビデンスに基づいた新たな評価法を考案することで、本研究の学術的・応用的基盤が構築できると考えている。

2. 研究の目的

高齢化社会を迎え、医療費の高騰が懸念される中で、健康を維持し、生活習慣病や癌の発症を未然に防ぐ予防医学の果たすべき役割は大きい。中でも、腸内細菌叢(腸内フローラ)を改善し、健康増進をはかるプロバイオティクスやプレバイオティクスへの期待は益々大きいものがある。

本研究は、腸内フローラパターンを指標とする健康評価・管理システムを開発し、個々人の消化機能の改善はもとより、肥満やメタボリックシンドロームをはじめとする、腸内感染症、大腸癌などの効果的な予防を行うためのエビデンスに基づいた21世紀型の保健医療の実現をめざす。

具体的課題としては、第一に、分析対象とする特定の腸内細菌群をそれらの存在量比を正しく反映する定量的分析法を確立すること、第二に、腸内フローラを可視的なパターンとして解析可能なシステムを構築すること、第三に、善玉菌である*Bifidobacterium*属の菌群と悪玉菌である*Clostridium*属の菌群の存在量比から腸年齢や腸の健康状態を評価する指標を樹立すること、第四に、*Bacteroidetes*門と*Firmicutes*門の菌群の存在量比から肥満や痩せの指標を樹立すること、第五に、主として*Lactobacillus*属の菌群の腸管内での消長からプロバイオティクス及びプレバイオ

ティクスを総合的に評価するシステムを確立すること、である。

3. 研究の方法

(1) 第一の課題

腸内に存在する特定の細菌群(門、科、属、種)を特異的かつ定量的に増幅するための多種類のプライマーを新規に設計し、競合的マルチプレックスPCR法を採用して定量性を確保した。すなわち、腸内細菌の16S rRNA遺伝子を増幅対象とし、BLASTによるホモロジー検索、ClustalWによる塩基配列の整列、そして、Primer3とmfoldを用いてプライマーの最適化を図った。この方法では、一方のプライマー(ユニバーサルプライマー)を腸内細菌に共通の配列を選定することによって、競合性に基づいた定量法を実現させ、他方のプライマー(特異的プライマー)を種や属に固有な配列を選定することによって、増幅対象とする菌種や属の特異性を担保した。また、科や門など配列が多様で広範囲に及ぶものは、ヒトの腸内にユビキタスかつ多量に存在する数種から数十種の菌種や属を選択し、各々のプライマー間の融解温度(T_m)の差が $\pm 0.2^\circ\text{C}$ 以下になるよう設計し、マルチプルプライマーを用いるプロトコールで対応した。

ヒト糞便(20 mg)試料から迅速かつ高精度にDNAを調製する独自の抽出・精製法を新たに開発し、これを用いて調製したDNAをtemplateとする競合的マルチプレックスPCR法で増幅したPCR産物が正しく腸内細菌の存在量を反映したものであるかどうかについて、①新規に合成した人工遺伝子を加える添加実験と、②real time PCR法を用いた定量実験とで検証した。

(2) 第二の課題

DNAの熱力学的安定性はDNA相補鎖の塩基配列とそれを取り巻くイオン環境によって厳密に決まるものである。我々の開発した塩基配列特異的熱溶出クロマトグラフ法(以下、SSTEC法)は、特定の塩基配列を持った固相化プローブDNAに対して相補的にハイブリダイズする被検DNAの熱力学的安定性を、一定の昇温勾配下に熱溶出される被検DNAのクロマトグラフ的挙動から評価する方法である。本法で測定される溶出ピークの温度は、DNA固有の融解温度(melting temperature; T_m)を与え、ピーク面積はDNA量を反映する。

本研究に際して用いる固相化プローブの塩基配列は、分析目的に応じて異なるものを用いることになるが、それぞれmfoldを用いる熱力学的解析から厳密に設計した。すなわち、後述の第三の課題のためには、善玉菌、悪玉菌と比較菌とが T_m の違いから3つのピークとしてパターン化できるものとした。ま

た、第四の課題のためには、*Bacteroidetes* と *Firmicutes* とが2つのピークとして分離し、第五の課題のためには、*Lactobacillus* 属の細菌がそれぞれの種の違いに応じて異なる Tm のピークを示すように設計した。

前項で述べた競合的マルチプレックス PCR 法によって増幅された一次増幅産物は、5' - 末端を蛍光標識されたユニバーサルプライマーを用いる非対称 PCR 法によって蛍光標識された後、蛍光検出器を備えた自動 DNA 分析システムを用いて SSTE C 分析を行った。

(3) 第三の課題

本研究では善玉菌として *Bifidobacterium longum* と *Bifidobacterium adolescentis*、悪玉菌として *Clostridium perfringens* と *Clostridium paraputrificum* を分析対象として選定した。これら4種の菌はヒトの腸内にはユビキタスに存在する菌群であり、その量的変動が腸の健康状態に直結することが知られている。ところが、腸管内に存在する善玉菌の数は概ね 10^8 倍も悪玉菌のそれより多いため、これらの存在量を単純に比較することは困難である。そこで本研究では、善玉菌と悪玉菌のそれぞれに、腸管内に同程度の菌数で生息し、善玉でも悪玉でもない中間的な菌を比較菌としておいて解析する方法が採られた。比較菌の要件としては、何人にもユビキタスに存在し、しかも、その存在量が人の生涯を通じて不変であることが重要である。このような観点から善玉菌の比較菌を *Collinsella aerofaciens* と *Blautia productus*、悪玉菌の比較菌を *Enterococcus faecalis* と *Enterococcus faecium* として選定した。

(4) 第四の課題

遺伝的に肥満と痩せのヒトを比較すると、腸内フローラを形成する *Bacteroidetes* 門と *Firmicutes* 門に属する菌の相対量が異なるという研究報告がある。腸内フローラが肥満の環境要因のひとつであるならば、腸内フローラの人為的制御が肥満の予防・治療に有効な戦略となる。そこで、本研究では肥満と腸内フローラとの関係、特に *Bacteroidetes* 門と *Firmicutes* 門との関係に注目した。

Bacteroidetes 門と *Firmicutes* 門の細菌群はヒトの腸内フローラの大部分を占めており、*Bacteroidetes* 門には約 20 の属が存在し、ヒトの腸内フローラでは *Bacteroides* 属が単一の属としては最も優勢である。注意すべきことは、この属の菌群は偏性嫌気性で通常良性であるが、術後や穿孔潰瘍などによって腹腔内まで到達すると日和見感染を起こすことも知られている。

一方、*Firmicutes* 門は、腸内フローラ中で最も大きな門であり、*Lactobacillus*、*Bacillus*、*Mycoplasma*、*Clostridium* など 250

以上の属がこの門に属している。したがって、*Bacteroidetes* 門の細菌群を特異的に増幅する特異的プライマーの設計にあたっては、ヒト糞便中にユビキタスかつ多量に存在する *B. acidofaciens*、*B. flagilis*、*B. intestinalis* など数種類の菌を選択して、これらを単一の特異的プライマーで増幅可能なものとした。

他方、*Firmicutes* 門は多様性が余りにも大きいことから、7種類のプライマーをマルチで使い、*Clostridium* 属、*Geobacillus* 属、*Anaerofilum* 属などは Firmi-A プライマーを、*Bacillus* 属、*Enterococcus* 属、*Lactobacillus* 属、*Staphylococcus* 属、*Listeria* 属などは Firmi-B、*Lactobacillus* 属、*Bacillus* 属、*Facklamia* 属、*Blautia* 属などは Firmi-C、*Blautia* 属、*Eubacterium* 属、*Clostridium* 属、*Butyrivibrio* 属などは Firmi-D、*Roseburia* 属 *Eubacterium* 属、*Lachnospiraceae* 属、*Butyrivibrio* 属などは Firmi-E、*Parvimonas* 属、*Peptostreptococcus* 属、*Anaerococcus* 属、*Fingoldia* 属、*Desulfosporosinus* 属などは Firmi-F、*Megasphaera* 属、*Clostridium* 属、*Anoxybacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Bacillus* 属などは Firmi-G をそれぞれ用いることとし、これにより、*Firmicutes* 門に属する 30 属以上の菌群を同時に増幅可能な特異的プライマーの設計が可能となった。

(5) 第五の課題

機能性食品はその作用機構から、プロバイオティクス (Probiotics)、プレバイオティクス (Prebiotics)、バイオジェニクス (Biogenics) に分類される。プロバイオティクスは、「腸内微生物のバランスを改善することによって宿主動物に有益に働く生菌添加物」で、乳酸菌、納豆菌、酪酸菌などの生菌剤および発酵乳・乳酸菌飲料等の食品がプロバイオティクスの範疇に入る。プレバイオティクスは、「結腸内の有用菌の増殖を促進したり、あるいは、有害菌の増殖を抑制し、その結果、腸内浄化作用によって宿主の健康に有利に作用したりする難消化性食品成分」で、オリゴ糖がこれに含まれる。また、バイオジェニクスは、「直接あるいは腸内フローラを介して免疫賦活、コレステロール低下、血圧降下、整腸、抗腫瘍、抗血栓、造血などの生体調節・生体防御・疾病予防・回復・老化制御等、直接働く食品成分」で、免疫強化物質 (biological response modifier : BRM) を含む生理活性ペプチド、植物フラボノイド、DHA、EPA など生活習慣病の予防に有効な食品成分がこれに該当する。

本研究では、プロバイオティクスとして重要な意義をもつ乳酸菌から、*L. casei*、*L. bulgaricus*、*L. salivarius*、*L. brevis* の4種類の *Lactobacillus* に焦点を絞り、分析系の確立とともに腸管内の消長を調査する

技術的基盤を構築した。本研究で対象とした4種の菌はいずれも市販の発酵乳や乳酸菌飲料、サプリメントに含まれている菌で、同一の固相化プローブを用いてそれぞれ異なる T_m 値のピークとして明確に区別できるように設計した。

4. 研究成果

(1) ヒトの糞便中に存在する腸内細菌量の評価と定量性についての検証

腸内細菌の DNA の質と量の解析から正確かつ定量的な評価を行うためには、①分析対象とする腸内細菌と同時に PCR 増幅が可能であり、②その量が正確に求められていて、③通常、腸内には存在しない細菌を内部標準とする添加実験によって評価することが必要である。しかし、腸内フローラは多種多様な細菌から構成されるため、この目的に適した標準物質を探すことは困難である。そこで、その配列の一部が腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子と同一であり、かつ、自然界に存在することのない人工遺伝子配列 (363 bp) を新規に考案し、化学合成した DNA を用いて添加実験を行った。

図1は人工遺伝子の $10^0 \sim 10^{-10}$ までの希釈系列を作製し、それぞれを鋳型として一次 PCR を行ったときの増幅産物の電気泳動像である。増幅産物の鎖長は約 176bp であり、配列から予測される一次増幅産物鎖長 (175bp) とほぼ等しいため、目的とする配列が正しく増幅されたことは明らかである。

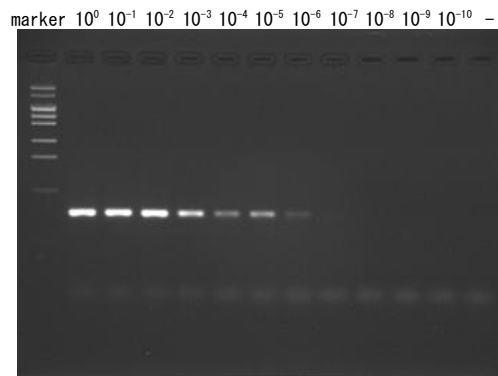


図1 人工遺伝子の一次増幅産物の電気泳動像

次に、人工遺伝子の添加実験からヒトの糞便 1g あたりの菌数を求めると、善玉菌の代表格である *B. adolescentis* が $10^9 \sim 10^{11}$ 乗の範囲の数値が得られた。また、悪玉菌である *C. paraputrificum* が $10^5 \sim 10^6$ 乗、比較菌の *E. faecalis* が $10^5 \sim 10^6$ 乗、乳酸菌の *L. casei* が 10^5 乗レベルであった。これらの数値は、培養法で別途求めた菌数とも良い一致を示していた。したがって、本法による菌数の定量が、腸内細菌の存在量を正しく反映していることが明確に検証されたも

のと考える。

(2) 競合的マルチプレックス PCR 法が増幅効率において菌種間で差がないことの検証

我々は、プライマー設計には細心の注意を払っているが、多種多様な塩基配列をもつ細菌間の競合的マルチプレックス PCR 法で増幅効率に差がないかどうかを事前に検証しておく必要がある。そこで、既に遺伝子の定量法として定評のあるリアルタイム PCR 法によって、本法で採用したプライマーが正しく機能するかどうかを詳細に検討した。*C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *E. faecium* のリアルタイム PCR の結果の一例を図2に示す。

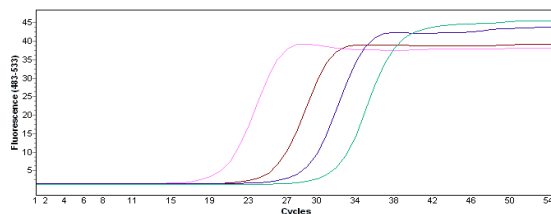


図2 リアルタイム PCR による各種細菌 DNA の増幅曲線

図の増幅曲線は左から *C. paraputrificum* (ピンク)、*C. perfringens* (茶)、*E. faecalis* (紫)、*E. faecium* (緑) のそれを示しているが、増幅効率の指標となる変曲点の傾きが全ての菌種で同一であったことから、本法で採用しているプライマーが競合的マルチプレックス PCR 法を増幅効率においても菌種間で差がないことが明確に示された。

(3) 善玉菌と悪玉菌の存在比から腸年齢や腸の健康状態の評価

2本のチューブを用意し、一方のチューブでは善玉菌の *B. longum* と *B. adolescentis* とを ZD プライマーで、比較菌の *B. producta* と *C. aerofaciens* とを HZ プライマーで共増幅することとし、他方のチューブでは悪玉菌の *C. perfringens* と *C. paraputrificum* とを AD プライマーで、比較菌の *E. faecalis* と *E. faecium* とを HA プライマーで共増幅することとした。ここで特記すべきことは、PCR 法は、増幅回数を十分に経過した後では飽和状態となり、増幅産物量が概ね一定量となることである。競合的マルチプレックス PCR 条件下でも最終増幅産物は一定量となるが、善玉菌でも悪玉菌の場合でも、比較菌との間の相対量は増幅回数とは無関係に常に一定となることを指摘しておきたい。したがって、一次増幅後の増幅産物の試料を 1:1 に混ぜ、それをテンプレートとして蛍光標識ユニバーサルプライマーを用いて二次増幅すれば、善玉菌と悪玉菌とを同じ量的レベルで比較できることになる。図3に、善玉菌、悪玉菌、

比較菌用に設計した単一の固相化プローブを用いて SSTEAC 解析を行った結果を示す

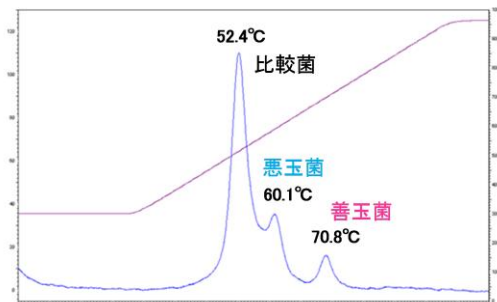


図3 善玉菌、悪玉菌、比較菌の SSTEAC パターン

図から明らかなように、善玉菌、悪玉菌、比較菌それぞれが異なる T_m 値のピークとして検出されることが分かった。SSTEAC 法の測定精度が $\pm 0.1^\circ\text{C}$ から判断して、本法が善玉菌と悪玉菌の解析に十分に応用可能なことが示されたものと考えられる。

善玉菌と悪玉菌の量比から腸年齢や腸の健康状態を判断する場合、理論的にはそれぞれのピーク面積比から評価する必要がある。しかしながら、図では悪玉菌に対して比較菌の裾野の影響が顕著なため、正確な面積の算定には特に注意が必要となる。また、一般的には、ピーク面積の測定は必ずしも容易でないことから、ピーク高さの測定で代用できれば解析がより簡単になると考えられる。このような観点から、多数の糞便試料の測定結果を下に、面積比と高さの比とで比較検討したところ、腸年齢や腸の健康状態を評価する点においては、両者の間で大きな差がないことが確認された。よって、健康指標としては、比較菌の裾野の影響を単純に引き去った、ピーク高さの比でよいと結論できた。

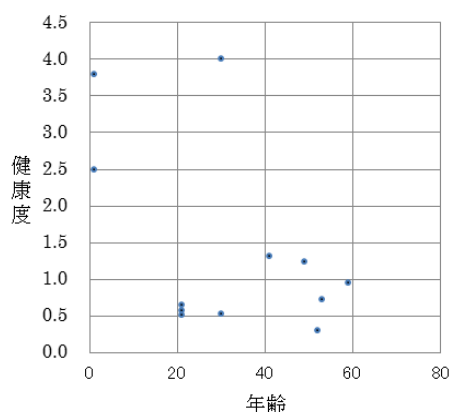


図4 腸管健康度と年齢との関係

そこで、健康の指標を腸管健康度と定義し、善玉菌と悪玉菌のピーク高さの比率から腸管健康度を求めることにした。図4は、様々な年齢からなる 12 名の健康人を対象に

SSTEAC 解析を行った結果を示したものである。幼若者の方が成人より腸管健康度が高く、年齢が増加するほど低下する傾向が見られたが、大学生(21)はいずれも低値であった。

今回の研究では、測定数が少なく、被験者の食生活や生活習慣などの個々人の臨床所見が十分に把握されていないため、一般的な結論を得るためには、今後更なる解析結果の蓄積が必要なるう。

(4) *Bacteroidetes* と *Firmicutes* の存在比から肥満の評価

糞便から抽出精製した DNA をテンプレートとし、*Bacteroidetes* 用のプライマー 1 種、*Firmicutes* 用プライマー 7 種、ユニバーサルプライマー 1 種とで構成されるミックスプライマーを用いて競合的マルチプレックス PCR を行った。そして引き続き、非対称 PCR で蛍光標識した試料を、肥満の評価のために開発した固相化プローブを充填したカラムを用いて SSTEAC 解析したところ、図5に示されるようなパターンが得られた。

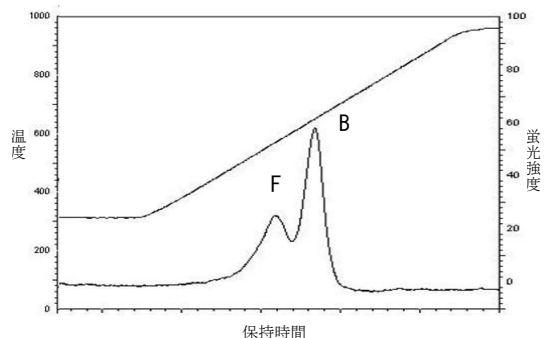


図5 肥満評価のための SSTEAC パターン

この図の B は *Bacteroidetes* 由来のピーク、F は *Firmicutes* 由来のピークを示す。ピークの T_m はそれぞれの、 65.1°C と 56.9°C であった。本法で検出される *Bacteroidetes* 門の菌種はヒトの腸管内に棲息する数種の菌種が対象に検出されるが、*Firmicutes* 門では実に 30 属、100 種以上の及ぶが、図から明らかのように、それぞれ門特異的な 2 つのピークに集約していることが分かった。また、前項の実験と同様、それぞれの量比をピーク面積比ではなくピーク高さ比で代用することも確認した。よって、ここに肥満指標を腸管肥満度、 $H(B/F)$ で表す新規の評価法が確立された。

そこで、健康成人(学生ボランティア、21歳) 11 名から提供された糞便から抽出精製した DNA を試料として SSTEAC 解析を行った。図6と図7は $H(B/F)$ に対して身長と体重とから算出される BMI、或いは生体インピーダンスから計測される体脂肪率(%)とをそれぞれプロットしたものである。図の比較から分かるように、本法で解析される腸管肥満度は、

BMI より体脂肪率により高い相関がみられた。

今後、実施例を更に増やして、腸内フローラと肥満、特に脂肪代謝との関係を追及していきたいと考えている。

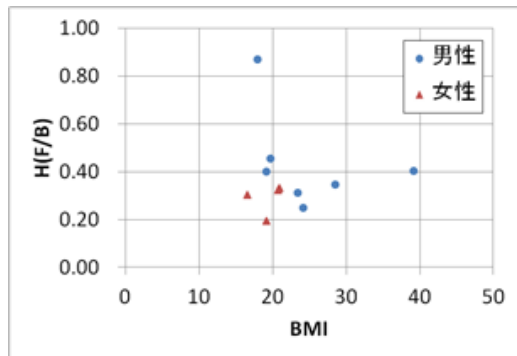


図6 腸管肥満度とBMI との関係

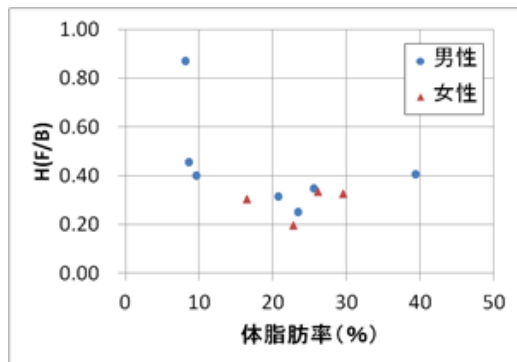


図7 腸管肥満度と体脂肪率との関係

(4) 乳酸菌の消長に基づくプロバイオティックスの評価

乳酸菌群、*Lactobacillus* に属する細菌においても常在菌として腸内フローラを形成しているものも多いが、プロバイオティックスの対象として発酵食品やサプリメントとして利用されているものは本来ヒトの腸管内に棲息しているものではない。したがって、プロバイオティックスとしてより有効な菌を探索するためには、腸管内での保持や安定性の状況が評価されなくてはならない。

そこで本研究では、プロバイオティックスとして広く用いられている *Lactobacillus casei*、*L. bulgaricus*、*L. salivarius*、*L. brevis* の4種の乳酸菌を対象として、ヒトの腸管内での消長を解析できる特異的プライマーとプロバイオティックス分析用の固相化プローブを開発した。

SSTEC 解析の結果、何れの乳酸菌においても単一のピークが示され、 T_m 値はそれぞれ、*L. casei* が 70.8°C 、*L. bulgaricus* が 51.3°C 、*L. salivarius* が 49.7°C 、*L. brevis* が 57.9°C であった（紙面の都合で図の掲載は省略）。また、4種の乳酸菌の混合試料においても、

それぞれのピークは明確に区別できるものであった。

現在、我々は各種ヨーグルトを経口投与したときの、腸管内での乳酸菌の消長を経時的に追跡しているところである。今後、プロバイオティックスのみならず、プレバイオティックスやバイオジェニックスのより有効な利用法を駆使した健康管理技術を開発し、保健医療の向上を目指したいと考えている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 壽彦 (KONDO TOSHIHIKO)

群馬大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：10162108

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし ()

(4) 研究協力者

本学の学生と大学院生、一般ボランティア