

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 8 月 30 日現在

機関番号：	32701
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011～2013
課題番号：	23651186
研究課題名（和文）	腸内フローラを用いた動物個体識別法の開発
研究課題名（英文）	Development of the animal individual identification method using intestinal microbiota
研究代表者	
	森田 英利 (MORITA HIDETOSHI)
	麻布大学・獣医学部・教授
	研究者番号：70257294

研究成果の概要（和文）：野生動物保護や害獣管理には、個体識別が重要である。標識による識別、視覚的特徴による個体識別法があり、生態学や野生動物学分野において一定の成果を上げてきた。しかし、それぞれに問題点や不確定な要素が否めないとの指摘もあり、より確実に簡便な個体識別法が望まれている。本研究は、対象動物を捕獲することなくサンプル採取が可能な糞便に着目し、その糞便に含まれる腸内細菌叢（フローラ）を用いた新たな個体識別法の開発をめざした。まず、日本の動物園で飼育されている 32 頭のオランウータンの糞便を、最短でも 3 か月以上の間隔をあけて各個体 3 回ずつ採取した。各サンプルから高純度の細菌由来ゲノムを精製し、網羅的 16S リボソーム遺伝子解析（16S 解析）を行った。得られた DNA 配列情報を用いて UniFrac 解析（群集解析）した結果、同じ個体の腸内細菌叢は、32 頭中 28 頭のオランウータンでクラスタリングし、他の個体とは区別できた。すなわち、腸内細菌叢の群集解析によりオランウータン（動物）を個体識別できる有用な結果を得ることができた。また、オランウータンの腸内細菌叢は、ヒト、ジャイアントパンダ、マウスとは異なるクラスターを形成していることも確認された。

研究成果の概要（英文）：Individual identification is important to wild animal protection and harmful animal management. There were the identification with the mark, the individual identification method by the visual characteristic and gave constant result in the field of ecology and wild zoology. However, there is the indication that each cannot deny problems and an uncertain element, and the individual identification method that it is more certain and easy is expected. Sample collection paid its attention to possible feces without capturing a target animal, and this study aimed at the development of the new individual identification method using the microbiota (intestinal flora) in the feces. As a result of collecting feces of 32 orangutans in Japanese zoological parks, and having done UniFrac analysis, intestinal microbiota of the same individual clustered 28 of 32 orangutans and was able to distinguish it from other individuals. Therefore, the useful result that an individual could distinguish an orangutan (animal) using intestinal microbiota was obtained. It was confirmed that the intestinal microbiota of the orangutan formed different clusters of human, giant panda, and mouse.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：個体識別、腸内細菌叢（腸内フローラ）、UniFrac 解析、オランウータン

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト腸内細菌叢の 16S リボソーム遺伝子 (16S) とメタゲノム解析により、個人の腸内細菌叢を構成する菌種組成は、他人とは有意差をもって異なっており、さらに一卵性双生児でも腸内細菌叢の構成菌種は異なることが示された (Turnbaugh, et al, Nature, 2009)。すなわち、腸内細菌叢の解析によって個人が特定できるのである。警察犬は一卵性双生児同士を区別できないと考えられていたが、さらに訓練をすることで、最近の研究によりその両者の匂いをかぎわけられるという知見が報告され (2011 年 6 月 25 日 読売新聞)、これは個々のもつ細菌叢の違いに起因する可能性がある。また、ヒト皮膚細菌叢からも個人が特定できる知見が得られている (Fierer, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2010)。したがって、個体の細菌叢は、個体を識別する手段としてきわめて有効であると推察される。

申請者らは、本邦初のヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析の実績 (Kurokawa, et al, DNA Res, 2007) があり、現在も様々なヒトや動物の腸内細菌叢の 16S 解析やメタゲノム解析を行っており、16S とメタゲノム情報から定量性をもって構成菌種の割合を示すこと、すなわち個体識別を数値化によって裏付ける技術をもつ。

(2) オランウータンとヒトは同じ霊長類であり、「科」のレベルで分類されている。ヒトでは腸内細菌叢が個々で異なっていることから、オランウータンでも同様の結果が得られるものと考えた。高い木の上にいる野生のオランウータンであっても、糞便採取は可能であることを確認しており、動物園で飼育されているオランウータンで得られた本研究目的の知見は、野生のオランウータンに応用することが可能だと考えている。すなわち、申請者らの予想どおりに、腸内細菌叢で個体識別ができる場合、野生のオランウータンの生態的寿命、生活様式、食性等を明らかにできると期待される。

また、保護される野生オランウータンを自然に帰した後の標識法による追跡調査は実際には困難であるためにその生存率は不明な場合が多い。糞便中の細菌叢解析による個体識別が可能となれば、保護したオランウータンを自然に返した後の生死や行動範囲を調べる上で、有用な手法となる。本研究目的の個体識別法の確立は、生態学、野生動物学、行動学にも大きく貢献する。

2. 研究の目的

野生動物保護や害獣管理には、個体識別が重要である。標識による識別、視覚的特徴に

よる個体識別法があり、生態学や野生動物学分野において一定の成果を上げてきた。しかし、その個体識別法にはそれぞれに問題点や不確定な要素が否めないとの指摘もあり、より確実に簡便な個体識別法が望まれている。本研究は、対象動物を捕獲することなくサンプル採取が可能な糞便に着目し、その糞便中に含まれる腸内細菌叢 (腸内フローラ) を用いた新たな個体識別法の開発をめざす。

本研究では、野生動物保護の観点および個体識別が困難なオランウータンを対象とする。具体的には、先行研究として日本国内の動物園で飼育されている血縁関係の明らかな複数個体のオランウータンの糞便を経時的に採取し、その腸内細菌叢の 16S リボソーム遺伝子およびメタゲノム解析を行った。得られる各個体の塩基配列データについて主成分分析等の情報学的・統計学的解析を行い、個体識別法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 国内オランウータンの糞便サンプル採取と保存：日本の動物園等で飼育されている 30 頭のオランウータンの糞便を、経時的かつ体系的にサンプルリングし凍結保存する。グリセロールストックした糞便中の腸内細菌からゲノム DNA を調製する。

(2) 腸内細菌叢の 16S またはメタゲノム解析：高速シーケンサーを用いて 16S 配列と一部メタゲノム配列を決定する。

(3) 個体識別の検証：得られた全個体の配列情報について配列類似度を指標にしてクラスタリングを行い、それらを主成分分析することにより、個体間の系統関係を解明する (個体識別能の検証)。これらデータとオランウータンの血統登録表により血縁関係との照会も行う。このほか、野生と飼育オランウータンの腸内細菌叢およびヒト腸内細菌叢との比較解析からそれらの相違を調べる。

4. 研究成果

(1) 日本の動物園で飼育されている 32 頭のオランウータンの糞便を、最短でも 3 か月以上の間隔をあげ、3 回ずつ採取した。その腸内細菌叢由来のゲノム DNA のクオリティには問題がないことを確認したので、各サンプルの 16S 解析を行った。構成菌種の比較のために、ヒト、ジャイアントパンダ、マウスの糞便の細菌叢についても UniFrac 解析 (群集解析) した。その結果、図 1 に示したとおり、生物種間で違いがみられ、オランウータンは 1 つのクラスターを形成した。すなわち、オランウータン独自の腸内細菌叢を有することがわかったので、

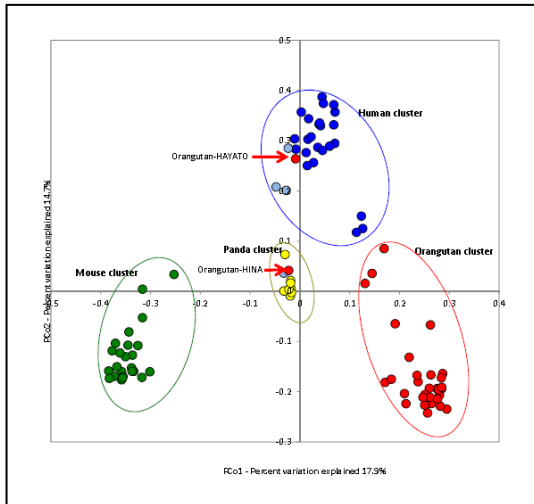


図1 オランウータン (赤)、ヒト (青)、ジャイアントパンダ (黄)、マウス (ふか緑) のUniFrac 解析結果

(2) 同じ個体の3回ずつの腸内細菌叢について16S解析とUniFrac解析を行った結果、32頭中28頭のオランウータンでクラスターリングし、他の個体とは区別できた(図2)。したがって、腸内細菌叢は、ヒトでの研究と同様、オランウータン(動物)でも個体識別できる有用な手法である可能性を示唆できた。

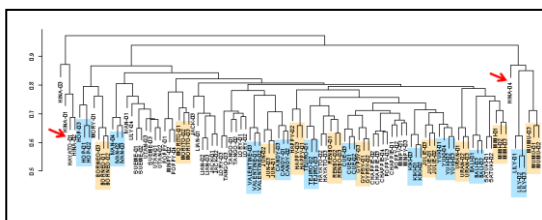


図2 経時的なオランウータンの腸内細菌叢のクラスター解析

(3) 本研究の過程で、母オランウータンが哺乳・育児しない生後すぐのオランウータンが2頭いて、それらは人工飼育された。その2頭のオランウータンの腸内細菌叢は、他のオランウータンの細菌叢とはクラスターリングせず、in house dataの健全なヒト腸内細菌叢のクラスターに含まれた(図1の赤い矢印)ことから、ヒトの生活する環境中の細菌によって、生後すぐのオランウータンの腸内細菌叢が形成された可能性を示唆された。

そのうちの1頭を人工飼育した飼育員の腸内細菌叢を解析し、そのオランウータンの細菌叢との比較している。また、その2頭のオランウータンは、親オランウータンの元で飼育しているので、その後の細菌叢の変化も興味深い。その結果によっては、各生物種の腸内細菌叢を形成する経緯が明らかになる可

能性がある。すなわち、食糞などの習慣のない生物種では、腸内細菌叢は、親から子に直接、伝播するというより、その生物種の生活環境菌が腸内に入り込んで、その後、定着できるものが、その生物種の細菌叢を形成していく、という考え方である。

本研究成果としては、そこまで考慮してまとめたい。

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3件)

①長森隆・小池麻里子・海老久美子・中野章代・今岡明美・梅崎良則・服部正平・森田英利・日本動物腸内細菌研究コンソーシアム、日本国で飼育されているオランウータンの腸内フローラ解析、SAGA(アフリカ・アジアに生きる大型類人猿を支援する集い)、2010年11月13日、麻布大学

②須田互・日本動物腸内細菌叢研究コンソーシアム・鈴木晃・鈴木南水子・飯岡恵里香・大森恵美・富山由紀子・中野章代・金錫元・大島健志朗・服部正平・森田英利、腸内細菌叢を指標としたオランウータンの個体識別法の開発、第6回日本ゲノム微生物学会大会、2012年6月12日~14日、立教大学池袋キャンパス

③森田英利・須田互・日本動物腸内細菌叢研究コンソーシアム・鈴木晃・鈴木南水子・飯岡恵里香・大森恵美・富山由紀子・中野章代・金錫元・大島健志朗・服部正平、オランウータンの腸内細菌叢解析による個体識別の可能性、第117回日本畜産学会大会、2013年9月9日~10日、新潟大学

〔図書〕(計2件)

①森田英利・他2名著、(株)講談社サイエンティフィック、新バイオテクノロジーテキストシリーズ:微生物学第2版(印刷中)

②須田互・大島健志朗・森田英利、学研メディカル秀潤社、次世代シーケンサーを用いた常在菌叢解析、細胞工学2013年11月号特集「体内にあるもう一つの世界:マイクロバイオームの驚異」服部正平 監修(印刷中)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 英利 (MORITA HIDETOSHI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：70257294

(2) 研究分担者

服部 正平 (HATTORI MASAHIRA)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：70175537

研究分担者

藤 英博 (TOH HIDEHIRO)

九州大学・生体防御医学研究所・特任講師

研究者番号：10353468

(3) 連携研究者

なし