

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82714

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K16610

研究課題名(和文)腸内環境簡易評価システムの確立および走行運動が大腸環境へ与える影響の解明

研究課題名(英文) Establishment of simple evaluation system for intestinal environment and elucidation of effect of running exercise on intestinal environment

研究代表者

萩尾 真人 (HAGIO, Masahito)

神奈川県衛生研究所・理化学部・主任研究員

研究者番号：00623927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糞中化学物質の簡易分離法と細菌叢簡易評価法をそれぞれ確立し、両者を組み合わせた腸内環境簡易評価法の確立を行った。この方法を用いることで、マウスの糞一粒から分子極性に応じた化学物質の簡易分離を行うとともに、細菌叢の個体間類似性の比較を簡便に行うことが出来るようになった。強制走行運動負荷と高脂質食摂取条件下での腸内細菌叢は、どちらも比較的早期に有意な変化が見られたもののそのタイミングが異なることが明らかとなった。腸内細菌以外にも腸内環境を構成する要素は多く存在するため、今後はそれらを含めた腸内環境として要素間の関連とともに宿主への影響を評価できる方法への発展を目指していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：本研究によって確立した評価法は、高価もしくは特殊な分析機器を必要としない汎用性を備えている。そのため、多くの研究機関で活用が容易であるとともに、腸内環境を扱う様々な研究課題において、環境因子同士の関連性比較や環境変化タイミングの比較などの分析に有効である。

社会的意義：腸内環境簡易評価法は、一日単位での分析・解析を可能とする簡便性、迅速性を備えているため、健康人と様々な疾病の罹患者との腸内環境比較や、同一人物の長期的な腸内環境モニターを詳細に実施することが出来る。そのため腸内環境の観点から、様々な疾病の予防や健康管理に活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a simple method for separating chemical substances in feces and a simple method for evaluating microflora, and established a simple method for evaluating the intestinal environment by combining both methods. By using this method, it became possible to easily separate chemical substances according to the molecular polarity from a single grain of mouse feces and to easily compare the similarities of microflora among individuals. It was clarified that the intestinal microflora under the conditions of forced running exercise load and the high-fat diet intake had significant changes at a relatively early stage, but their timings were different. Since there are many elements that make up the intestinal environment other than intestinal bacteria, we would like to aim for the development of a method that can evaluate the intestinal environment including other elements with the mutual relationships, and the effects on the host.

研究分野：生体分析化学、運動生理学

キーワード：腸内環境 腸内細菌叢 運動 群集解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリックシンドロームをはじめとした様々な病態(糖尿病、肥満、認知症など)において、腸内細菌と宿主の間に深い関連性が認められてきている。腸内細菌は腸内環境の構成要素の一つであり、腸内細菌由来物質(代謝物など)や宿主由来物質(腸管腔内への分泌物など)とともに腸内環境を形成している。各要素は独立しているわけではなく互いに影響を及ぼしながら混在しているため、最終的な宿主への影響要因を1つに絞り込むことは難しい。そこで、様々な要素を集約した腸内環境という形で宿主との関係性を評価するアプローチが必要であると考えた。

腸内環境へと集約する前段階として、あらかじめ各要素を正確に把握しておく必要があるが、既存の分析手法では各要素間の関連性が厳密には保持されていない可能性がある。通常、腸内環境に関連した分析項目が複数の場合、単一の糞や腸内容物を使用するのではなく、項目の数だけ用意し各項目に適した抽出、測定を実施するためである。また、要素の1つである腸内細菌叢の分析には、次世代シーケンサーを用いた膨大なデータ収集・解析を行う手法が現在の主流であるが、要するコストや時間の面で簡便とは言い難い。以上のことから、同一の試料を成分ごとに分離する方法や、細菌叢を簡易的にかつ迅速に評価できる方法が必要であると考えた。

運動は腸管に関わる様々な疾病のリスクを減少させる効果が認められてきているが、その詳細なメカニズムや、腸内環境に与える影響は未だ不明な点が多い。また、運動は大腸がんの発生リスク減少効果があること、一方で高脂質食摂取が大腸がんのリスクファクターであることから、対照的な各条件下での腸内環境に関し、既存とは異なるアプローチで比較することで新しい知見が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

試料の分離方法の確立において、分析項目の相互関連性維持を達成するために、単一サンプルからの複数成分分離を目指す。また、各分析項目の完全分離法の確立を目指すものではなく、本抽出を行う前の粗分離を目的とする。試料中化学物質の分子構造に着目し、比較的容易に試料から溶出する高極性分子、低極性分子をあらかじめ分離し、残った試料から目的の分析項目の抽出を行う抽出前簡易分離法の確立を目指す。

腸内細菌叢の評価において、全体像としての解析結果はDNAシーケンス解析と大きく異なることなくコストや時間を抑えた簡易細菌叢評価法の確立を目指す。本研究ではT-RFLP法に着目し、具体的な菌種情報を得ることなく個体間の菌叢類似性を評価するアプローチを取ることとした。

これらの手法を組み合わせたものを腸内環境簡易評価法とし、大腸がん発生リスクに対して逆の作用が考えられている運動負荷と高脂質食摂取条件下での腸内環境を比較評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 糞中化学物質簡易分離法の確立

ラット、またはマウスの糞一粒から、複数の水系溶媒と有機系溶媒の組み合わせにより、高極性物質画分、低極性物質画分および糞層を区別可能な分離法を検討した。

(2) 腸内細菌叢の簡易評価法の確立

糞中トータルDNAの抽出後、細菌16S rRNAの特定領域に対しPCR増幅、次いでT-RFLPを実施し、DNA断片長と検出強度の組み合わせのデータを取得後、統計解析ソフト「R」を使用したデータ解析手法の検討を行った。

(3) 運動負荷および高脂質食摂取がマウス腸内環境に与える影響

8週齢のC57BL/6J雄性マウスにトレッドミルによる一定時間の強制走行運動負荷を1週間毎日実施した。採糞を毎日行い、上記分離法、評価法を適用し腸内環境の変化を比較した。また同条件のマウスを使用し、高脂質食摂取を1週間継続した場合の腸内環境の変化も比較した。

4. 研究成果

(1) 腸内環境簡易評価法の確立

糞中化学物質の簡易分離法では、ラットまたはマウスの一塊の糞から高極性物質画分、低極性物質画分および糞層への分離が可能となった(特願2017-011365)。腸内細菌叢の簡易評価法では、T-RFLPデータの「視覚的要約」と「統計解析(検定)」を組み合わせで簡易評価法とした。T-RFLPの測定データが各断片塩基長の検出強度であることから、各分析において類似度指数を用いることとし、比較解析時には、時間固定での個体比較、および個体固定での時間比較、という2種類のアプローチで評価を行うこととした。上記の糞中化学物質の簡易分離法、腸内細菌叢の簡易評価法を併せて腸内環境簡易評価法とした。

(2) 運動負荷および高脂質食摂取がマウス腸内環境に与える影響

マウスに対し走行運動負荷を7日間継続したところ、視覚的比較では試験開始2日後に各個体の腸内細菌叢が運動群と非運動群の各グループに分かれ、その後次第に両グループの差が消

失する傾向が見受けられた。マウスに対し高脂質食の摂取を7日間継続したところ、試験開始1～2日後にコントロール群と高脂質食摂取群の各グループに分かれているように見受けられたが、運動負荷時ほどグループ形成は明瞭でなく、グループ差の消失も運動負荷時よりも速やかな傾向が見受けられた。検定では運動負荷条件が試験開始後2日目に、高脂質食摂取条件では試験開始後1日目に有意に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

(3) 総括

本研究で確立した細菌叢簡易評価法を用いることで、様々な要因が腸内細菌叢に及ぼす影響の有無を特に菌叢類似性の観点から迅速に比較・評価することが可能となった。この方法を用いることで菌叢の短期的変化を見逃さずに変化タイミングのスクリーニングが可能である。糞中化学物質の簡易分離法と併せることで腸内環境簡易評価法としたが、腸内細菌以外にも腸内環境を構成する要素は多く存在するため、今後はそれらを含めた腸内環境として要素間の関連とともに宿主への影響を評価できる方法への発展を目指す。

運動負荷試験、高脂質食摂取試験における腸内細菌叢評価の結果を比較すると、その挙動の違いが確認された。高脂質食摂取による細菌叢変化は比較的早期に起こりその変化は速やかに喪失する傾向が見られた一方で、運動負荷による変化タイミングはそれより若干遅れ、その変化の消失は緩やかであった。このような細菌叢の挙動の違いが大腸がん発生リスクの観点からどのように関与するのかは現時点で不明であるが、今後腸内環境簡易評価法をさらに発展させるとともに明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丸山剛志、鶴子啓、児島伸彦、萩尾真人
2. 発表標題 マウス糞中胆汁酸及び細菌DNAの簡易抽出法の検討
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsuyoshi Maruyama, Nobuhiko Kojima, Masahito Hagio
2. 発表標題 Establishment of simple method for evaluating gut microbiota using T-RFLP
3. 学会等名 IUNS 21st International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 糞便中の化学物質の抽出方法、及びキット	発明者 萩尾真人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-011365	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	松本 恵 (MATSUMOTO Megumi)	日本大学・文理学部・教授 (32665)	
研究協力者	清水 英寿 (SHIMIZU Hidehisa) (10547532)	島根大学・生物資源科学部・准教授 (15201)	