

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07611

研究課題名（和文）腸内細菌叢による発達障害（神経発達症）の行動特性への影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of influence of gut microbiota on behavior characteristics of neurodevelopmental disorders

研究代表者

三上 克央（Mikami, Katsunaka）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90548504

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、腸内細菌叢の精神活動への影響について、衝動的行動や攻撃的行動に焦点を当て検証した。BALB/cマウスを、GF、および無菌マウスに病原体を保有していないマウスの常在腸内細菌叢を経口投与した（EX-GF）マウス群の2群に分類した。攻撃性評価のため、8週齢の去勢マウスと非去勢マウスの間で、無菌環境下で10分間対峙させた。GFマウスは、Ex-GFマウスに比べ、より攻撃的な行動を示した。以上の結果から、腸内細菌叢が、衝動性や攻撃性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸内細菌叢による精神活動や行動への影響を、飼育や繁殖が容易ではない無菌マウスを使用して明らかにしたところに、学術的意義がある。また、本研究は、発達早期の健全な腸内細菌叢の維持は、生涯を通じて問題となる行動の緩和に寄与する可能性があることを示唆した。この点は、発達早期の腸内細菌叢の重要性を示唆し、重要な社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：This study examined the effect of gut microbiota on host mental activity, especially impulsive and aggressive behaviors. To make gnotobiotic mice associated with gut microbiota from SPF mice, the parent mice orally received stool from SPF mice and their offspring were used as Ex-GF mice. To assess aggression, 8-week-old castrated and non-castrated mice were confronted for 10 minutes in strictly sterile environments. GF mice exhibited more aggressive behavior than Ex-GF mice, which suggested that the gut microbiota was likely to have an effect on impulsive and aggressive behaviors.

研究分野：精神医学

キーワード：精神医学 児童青年精神医学 無菌マウス 行動解析 腸内細菌叢 腸内細菌叢-腸管-脳軸 発達早期

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

腸と脳機能の相互関係に関心が高まっている。近年、この脳腸相関において、腸内細菌叢の重要性が認識され、「腸内細菌叢-腸管-脳軸」の概念が提唱されている。我々は、腸内細菌叢の脳機能への影響を早くから仮説として立て、腸内細菌叢が宿主のストレス反応に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、発達早期の腸内細菌叢がストレス反応だけでなく、宿主の精神活動や行動に影響を及ぼすと考え、無菌 (germ-free、以下 GF) マウスを用いて行動解析を行い、GF マウスでは、常在菌叢マウスとの比較において、活動性と不安症状が高まることを解明した。多動性や不安症状は、神経発達症に関連した所見であることから、我々は、神経発達症の症状に注目し、発達早期の腸内細菌叢が衝動性や攻撃性、社会性に影響を及ぼすという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、宿主の衝動性や攻撃性、社会性に焦点を当て、当該行動への腸内細菌叢の影響について、アイソレーター内で飼育した GF マウスを用いた行動解析によって解明することを目的とした。

3. 研究の方法

BALB/c の GF マウスの雄と雌を選択し、その仔マウス (2 代目) をアイソレーター内で繁殖した。次に、当該 2 代目のマウスを、GF マウス群、および GF マウスに病原体を保有していないマウスの常在腸内細菌叢を経口投与した (Ex-GF) マウス群の 2 群に分類し、各マウス群をアイソレーター内で飼育した。そして、各群で繁殖を行い、雄の仔マウス (3 代目) を作出した。生後 4 週齢以降に母子の分離を行い、その後当該 3 代目のマウスを単独で飼育した。生後 8 週齢時に、各群 30 匹を、同週齢の同群の去勢マウスを対戦相手とし、オープンフィールド形式で、1 対 1 で 10 分間対戦させた。攻撃行動は、尾による威嚇行為や立ち上がり、かみつき、攻撃的な接触、攻撃を目的とした追跡行動 (Schneider, R et al., *Behav. Neural Biol.* 1992; 57:198-204) を観察した。そして、対戦状況をビデオ観察し、行動解析を行った。観察後は、各マウスの微小脳部位を摘出し、カテコラミン濃度を高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography、以下 HPLC) で測定した。

また、8 週齢の Ex-GF マウスの糞便希釈液を、0 週齢、6 週齢、10 週齢の GF マウスに経口投与し、この無菌マウスを通常化 (conventionalization、以下 CVL) した群を、それぞれ、CVL0 群、CVL6 群、CVL10 群とした。各群それぞれ 12 週齢時に、上記の方法で攻撃性を測定した。

社会性については、社会性を客観的に定量化するゴールドスタンダードとして three-chamber 社会性試験がある。Three-chamber 社会性試験は、中央に出入り口がある 2 枚の仕切りで 3 つの部屋から構成されている装置を用いる。被験マウスは、出入口を通り 3 つの部屋を行き来することができる。まず、出入口を閉じた状態で中心部の部屋に被験マウスを一定時間置き、開始地点の部屋に慣らす。その後、ストレンジャーマウスを両端の部屋に置かれたカップの片方に入れ、出入口を開き、被験マウスの各部屋での滞在時間などを計測する。社交性の高いマウスほど、ストレンジャーマウスの臭いを嗅ぐために近づいている時間が増加する。しかし、この three-chamber 社会性試験を使用した研究では、ほとんどが無菌のアイソレーター外で測定されており、無菌状態を維持した環境下で測定された報告はほとんどない。したがって我々は、社会性の評価については、無菌環境下のアイソレーター内で行う実験系の確立に、まず取り組むこととした。

4. 研究成果

8 週齢のマウスで比較したところ、GF マウスの方が、Ex-GF よりも攻撃性が高かった。次に、CVL0 群と CVL6 群、CVL10 群の攻撃性について、CVL10 群とその他 2 群を比較したところ、CVL0 群と CVL6 群の両群は、CVL10 群と比較して有意に攻撃性が低かった。CVL0 群と CVL6 群の両群の攻撃性には有意な差は認めなかった。また、CVL0 群と CVL6 群、CVL10 群の攻撃性と、8 週齢の GF マウスとの攻撃性を比較したところ、CVL0 群のみが、有意に攻撃性が低かった。さらに、GF マウスと Ex-GF マウスの前頭前野と線条体、脳幹の各部位で、dopamine (DA) と DA の代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) を測定したところ、DA は各部位で GF マウス群が有意に上昇し、DOPAC は GF マウス群で有意に低下した。その結果、各部位の DOPAC/DA は、GF マウスの方が有意に低下した。

以上の結果からは、宿主の攻撃性の程度に腸内細菌叢が影響していることが示唆された。また、発達早期の健全な腸内細菌叢の維持が、宿主の攻撃性の減弱に寄与する可能性が示唆された。

一方、社会性については、実験系の確立に取り組んだ。Three-chambers 社会性試験を行うためには、中央に出入り口がある 2 枚の仕切りで 3 つの部屋から構成されている装置を用いる。問題は、既存の装置では、今回の無菌環境下の実験に使用できない点であった。すなわち、この装置を無菌環境下のアイソレーター内に設置するためには、当該アイソレーター

に入る大きさの装置にすること、そして、無菌化する操作に耐えうる装置にすること、の2つの問題を克服する必要があった。今回我々は、試行を重ね、当該条件を満たした装置を製作することができた。今後の課題は、当該装置を使用して、GF マウスと Ex-GF マウスの行動解析の比較により、腸内細菌叢の社会性への影響を解明することである。

引用文献

- 1 . Watanabe N, Mikami K, Hata T, Kimoto K, Nishino R, Akama F, Yamamoto K, Sudo N, Koga Y, Matsumoto H. Effect of gut microbiota early in life on aggressive behavior in mice. *Neuroscience Research*. 2021;168: 95-99.
- 2 . 木本啓太郎、三上克央、渡邊己弦 . 腸内細菌叢による発達早期の精神活動と行動への影響 . *児童青年精神医学とその近接領域* . 2020;61: 412-416.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 2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 Watanabe N, Mikami K, Hata T, Kimoto K, Nishino R, Akama F, Yamamoto K, Sudo N, Koga Y, Matsumoto H	4. 巻 168
2. 論文標題 Effect of gut microbiota early in life on aggressive behavior in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 95-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.01.005	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 -
1. 著者名 木本啓太郎、三上克央、渡邊己弦	4. 巻 61
2. 論文標題 腸内細菌叢による発達早期の精神活動と行動への影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 児童青年精神医学とその近接領域	6. 最初と最後の頁 412-416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 須藤信行	4. 巻 72
2. 論文標題 【脳とからだ】腸,免疫系,脳の相互作用 腸内細菌によるストレス応答・行動特性の制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 386-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 須藤信行	4. 巻 73
2. 論文標題 【脳腸関連-脳-身体】の双方向性制御】ストレスと脳腸関連	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩	6. 最初と最後の頁 889-897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 須藤信行	4. 巻 40
2. 論文標題 【生活習慣病と腸内細菌】ストレス応答と腸内細菌	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Progress in Medicine	6. 最初と最後の頁 201-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 三上克央、渡邊己弦、木本啓太郎	4. 巻 34
2. 論文標題 腸内細菌-腸-脳軸の観点から考察した神経発達症	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ストレス科学	6. 最初と最後の頁 144-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 須藤信行	4. 巻 37
2. 論文標題 【腸内細菌が関与する諸疾患-腸内細菌が全身を制御する?】精神健康・精神疾患と腸内細菌	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 カレントセラピー	6. 最初と最後の頁 395-400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Sudo Nobuyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Role of gut microbiota in brain function and stress-related pathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 75-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.19-006	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 -

1. 著者名 須藤信行	4. 巻 95
2. 論文標題 【プロバイオティクス・プレバイオティクス臨床応用の現状】うつ病・うつ状態、自閉症など	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床と研究	6. 最初と最後の頁 1004-1008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 須藤信行	4. 巻 81
2. 論文標題 【生活習慣病と子ども-DOHaDと健康のカギ】 DOHaDの基礎 周産期ストレスと脳腸相関	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 1285-1290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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14件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 三上克央
2. 発表標題 腸内細菌叢 - 腸管 - 脳軸による発達早期の精神活動への影響
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会 (シンポジウム)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三上克央
2. 発表標題 腸内細菌叢による発達早期の精神活動と行動への影響
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会学術総会 (シンポジウム)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤信行
2. 発表標題 腸内細菌と脳腸相関
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会学術総会（シンポジウム）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊己弦、三上克央、西野良、木本啓太郎、相場勇志、山本賢司、松本英夫
2. 発表標題 腸内細菌叢の相違による宿主行動特性への影響：神経発達症を見据えて
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤信行
2. 発表標題 “腸内細菌 - 腸 - 脳相関”に関する最近のトピックス
3. 学会等名 第41回日本生物学的精神医学会（教育講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤信行
2. 発表標題 腸内細菌と脳腸相関
3. 学会等名 日本乳酸菌学会（特別講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe Natsuru, Mikami Katsunaka, Kimoto Keitaro, Akama Fumiaki, Aiba Yuji, Yamamoto Kenji, Matsumoto Hideo
2. 発表標題 INFLUENCE OF COMMENSAL MICROBIOTA ON AGGRESSIVE BEHAVIORS
3. 学会等名 19th WPA (World Psychiatric Association) World Congress of Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sudo Nobuyuki
2. 発表標題 Gut microbiota alters stress response and behavior in living mammals
3. 学会等名 The 25th World Congress of the International College of Psychosomatic Medicine (Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤信行
2. 発表標題 腸内細菌とストレス関連疾患
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会 (シンポジウム)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikami Katsunaka
2. 発表標題 Effect of microbe-gut-brain axis on mental state and behaviors early in life
3. 学会等名 The 10th Congress of the Asian Society for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions (Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤信行
2. 発表標題 腸内細菌とストレス
3. 学会等名 第35回日本ストレス学会学術総会（会長講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤信行
2. 発表標題 腸内細菌 腸 脳相関
3. 学会等名 第2回日本心身医学会関連学会合同集会（教育講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木本啓太郎、三上克央、渡邊己弦
2. 発表標題 腸内細菌叢と発達早期の精神活動
3. 学会等名 第60回児童青年精神医学会総会（シンポジウム）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikami Katsunaka
2. 発表標題 Influence of gut microbiota on behaviors and mental status early in life
3. 学会等名 18th Congress of the Asian College of Psychosomatic Medicine (Symposium)（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三上克央 (内藤裕二 編集)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 170 (分担 p.38-p.44)
3. 書名 脳腸相関と疾患：発達障害『脳腸相関：各種メディエーター、腸内フローラから食品の機能性まで』（分担執筆）	

〔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
研究 分担者	須藤 信行 (Sudo Nobuyuki) (60304812)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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
---------	---------