

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390192
 研究課題名（和文） 腸内細菌とストレス反応：動物実験と臨床研究の融合による統合的解明
 研究課題名（英文） Gut microbiota and Host Stress Response
 研究代表者
 久保 千春（KUBO CHIHARU）
 九州大学・大学病院・教授
 研究者番号：80117100

研究成果の概要（和文）：

本研究では、腸内細菌が成長後のストレス反応や行動面にどのような影響を及ぼすかについて、動物実験およびヒトでの臨床研究により検討した。

1. 人工菌叢マウスを用いた行動解析：無菌マウスに通常の SPF マウスの糞便を移入した Ex-GF マウスでは、無菌マウスと比較し、不安関連行動の増強が認められた。
2. ヒト新生児の唾液中コルチゾール濃度と母親の出産前における vagina 内の *Bifidobacterium/Lactobacillus* 比（B/L 比）との間に負の相関を認めた。

研究成果の概要（英文）：

Our previous works on germ-free and gnotobiotic mice demonstrate that gut microbiota can affect the development of hypothalamic-pituitary-adrenal reaction to stress. In this study, behavioral analysis was further investigated using these mice. In addition, we also examined the effects of maternal fecal and vaginal flora on infant salivary cortisol levels. As a result, germ-free mice were more anxious than Ex-GF mice which were reconstituted with SPF feces. Regarding salivary cortisol levels in human babies, they were negatively correlated with the ratio of *Bifidobacterium* to *Lactobacillus* in maternal cervical swabs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
20 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
21 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：生理学, ストレス, 神経科学, 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

（1）生体は、胎内感染などの特殊な要因がないかぎり、通常、無菌の状態で出生する。その後、速やかに母体および外界環境から常

在細菌が定着し、いわゆる腸内細菌叢を形成していく。こうして形成された腸内細菌叢は、少なくとも500種以上の総数100兆を超える細菌によって構成されるきわめて複雑な細

菌集団であり、その重量は実に 1kg にも相当するとされている。これらの細菌およびその菌体成分は、抗原刺激をたえず宿主に及ぼしその免疫機能を修飾することにより、免疫系のみならず様々な生体防御機構の発達・制御にも深く関与しているものと考えられる。

このような生体防御機構のひとつである視床下部-下垂体-副腎軸

(hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis) は、外界からの有害刺激が生体に加わった際に、下垂体からの ACTH 分泌を介し副腎からコルチゾールを分泌させるという一連の反応を惹起することにより生命維持に不可欠な生体システムを担っている。この HPA axis 反応性の発達・成熟には、遺伝的要因のみならず、出生早期の外界環境因子も深く関与していることが知られている。我々のグループは、以前より、無菌 (germ free: GF) マウス、単一細菌のみを有する人工菌叢マウスを用いて、腸内細菌叢が HPA axis のストレス反応性へ及ぼす影響について研究を進めてきた。その結果、無菌マウスでは、ストレス刺激 (拘束ストレス) に対する HPA axis の反応性が通常の specific pathogen free (SPF) 環境下で生育されたマウスと比較し、著明に亢進していることを発見した。さらに人工菌叢マウスを用いた一連の実験により、腸内細菌は HPA axis の反応性制御に深く関与していることを明らかにした (*J Physiol.* 2004;558:263-75)

一方、ヒト腸内細菌叢の解析はもっぱら寒天培地を駆使した培養法でおこなわれてきたが、この方法では腸内フローラの多様性を調べるには限界があることが明らかになってきた。すなわち、腸内細菌叢構成菌種の約 20 % は培養可能な既知菌種であるが、残り 80 % は培養困難か、あるいはその菌数が低いため、未同定未分類の菌種である。これに対して、最近、16S リボゾーム RNA 遺伝子を指標とする分子生物学的手法の導入により、未同定菌種の解析が可能になり、腸内フローラの全貌が明らかになりつつある。この原理を用いた腸内フローラの解析方法の一つで、迅速、簡便および大量のサンプルが処理可能な方法がリアルタイム PCR 法である。

ストレス状態で腸内細菌叢の構成が変化することは、1970 年代から世界各国より報告されてきたが、逆に腸内細菌叢の変動が中枢神経の発達や機能に影響するかどうかに関しては全く解明されていない。ある種の腸内細菌が生理活性物質であるアミンを生成することから、腸内細菌叢が脳機能の発達に影響を与えうる可能性が文献上挿話的に語

られているが、科学的に十分検討されておらず、未踏の分野といってもよい状態である。

2. 研究の目的

本研究では、GF マウス、人工菌叢マウスを駆使して、生後に定着してくる腸内細菌が成長後の行動面 (運動能、不安関連行動、探索行動、など) にどのように関与しているかについて検討した。加えてヒト新生児におけるリアルタイム PCR による母-児の腸内細菌叢解析と児のコルチゾール分泌能との関連についても調査した。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌叢がマウスの行動面に及ぼす影響

実験には GF マウスおよび Ex-GF マウスを用いた。Ex-GF マウスは無菌の母マウスに SPF マウスの糞便を投与して作製した。実際の実験にはその母マウスから出生した仔マウスを用いた。実際の行動は行動解析装置 (カラービデオ・トラッキング・システム) を用いて評価した。オープン・フィールドでは総移動距離 (運動能の指標) 中心滞在時間 (不安関連行動の指標) の 2 項目を解析した。さらに不安関連行動の 1 つである Marble burying behavior も測定した。これら 3 つの指標について経時的 (生後 7, 10, 13 週) に評価した。すべてのマウスは同一条件のアイソレーター内で飼育・管理した。

(2) ヒト新生児おける腸内細菌叢形成とコルチゾール分泌能との関連

対象: 福岡市内の I 病院に通院中の妊婦のうち、出産予定日が 3 ヶ月以内、おおむね正常の妊娠状態にある、かつ同意能力を有する被検者を対象とした。ただし、出産予定日 1 ヶ月以内あるいは検体採取前 1 ヶ月以内に抗菌剤を 3 日以上服用した、出産後、糞便検体採取前に抗菌剤の投与を受けた、極端な早産、未熟児、のいずれかに該当する患者は対象外とした。同意を得られた妊婦に対し、生活状況等に関する聞き取り調査を行うとともにうつ状態を評価するための自記式質問紙 CES-D (Center for Epidemiologic Studies) を行った。今回の解析には以上によってエントリーされた 110 組の母子を用いた。

細菌学的解析

同意の得られた母親から糞便サンプルを提出してもらったと同時に妊婦検診の際に頸管粘液を採取した。児に関しては 1 ヶ月の検

診でI病院に来院する際、検診日前日あるいは当日に採取した児の糞便を母親に持参してもらうことを原則としたが、一部のサンプルは検診時に採取した。この際、児の栄養法、成育状況についても合わせて聞き取り調査を行った。糞便は、寒天平板法による菌叢分析に加え、リアルタイム PCR 法によるビフィズス菌の菌種別定量を行った。

児の唾液サンプルは1ヶ月検診当日に採取した。サンプルは小児唾液採取用に開発された Salmetrics 社製の脱脂綿を用い、脱脂綿より遠心分離にて回収した。唾液中のコルチゾール濃度は同社製の唾液コルチゾール測定用高感度 ELISA キットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 人工菌叢マウスでの行動解析

まずアイソレーター内で測定が可能で、かつ再現性が高い行動を同定するために一連の予備実験を行った。その結果、Marble-burying behavior およびオープン・フィールドを用いた方法が測定に適していることがわかった。

オープン・フィールド

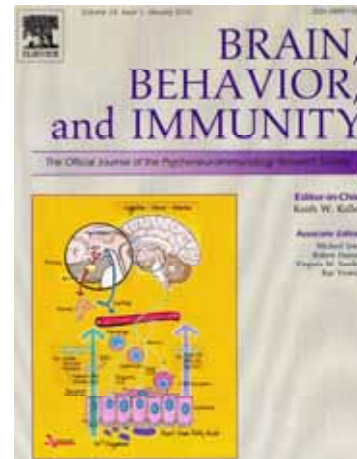
GF マウスでは、Ex-GF マウスと比較し、一定時間内における総移動距離が長く、また中心部滞在時間は短かった。

marble burying behavior

GF マウスでは、Ex-GF マウスよりも一定時間内(30分間)に多くのビー玉を埋める行動が観察された。

以上の結果は、厳密にコントロールされた実験下において常在細菌叢が宿主の行動面(特に不安関連行動)に影響しうることを証明したものである。現在、この結果を学術雑誌に投稿すべく準備を進めている。

近年、本研究領域への関心が世界的に高まっていることから、英文、邦文にて総説を発表した。特に *Brain Behavior Immunity* 誌上に発表した総説は論文中の概念図が以下のように表紙に採用された。



(2) ヒト新生児における腸内細菌叢形成とコルチゾール分泌能との関連

ヒト新生児腸内細菌叢形成における母子間垂直伝播に関する検討

110組の母-児の糞便中ビフィズス菌種に関する垂直伝播の実態に関してリアルタイム PCR を用いて検討した。その結果、母親の糞便中には100%また児の糞便中には90%の割合で何らかのビフィズス菌種が認められた(下表)。

Prevalence of the colonization of Bifidobacterium species in both the feces of mothers and babies and in vaginal swabs of mothers

Genus or species examined	Prevalence of positive samples (%)		
	Feces of mothers (n = 110)	Vaginal swabs (n = 100)	Feces of babies (n = 110)
<i>Bifidobacterium</i>	100	83.0	90.0
<i>B. adolescentis</i>	63.6	26.0	2.7
<i>B. bifidum</i>	27.3	2.0	10.9
<i>B. breve</i>	26.4	56.0	43.6
<i>B. catenulatum</i> group	68.2	53.0	11.8
<i>B. dentium</i>	2.7	18.0	5.5
<i>B. infantis</i>	4.6	3.0	19.1
<i>B. longum</i>	91.8	24.0	32.7

また、母親の糞便中に *Bifidobacterium breve* または *Bifidobacterium infantis* が定着している場合、児のビフィズス菌総数の増加およびビフィズス菌種の多様性に富んでいることが明らかとなった(下表)。

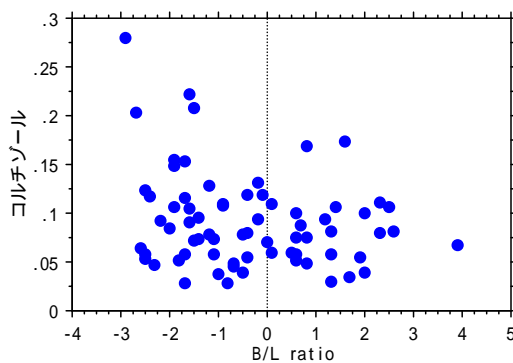
Maternal determinants	Bifidobacterial counts in the feces of the baby (log ₁₀ cells/g feces)	
	OR (95% CI)	p
Detection of <i>Bifidobacterium</i> species in the feces		
<i>B. adolescentis</i>	1.06 (0.48-2.36)	0.888
<i>B. bifidum</i>	0.64 (0.28-1.45)	0.287
<i>B. breve</i>	2.36 (1.05-5.33)	0.038
<i>B. catenulatum</i> group	1.41 (0.65-3.06)	0.387
<i>B. dentium</i>	1.89 (0.15-23.02)	0.619
<i>B. infantis</i>	24.78 (3.87-158.83)	0.001
<i>B. longum</i>	0.85 (0.22-3.32)	0.811
No. of <i>Bifidobacterium</i> species detected in the vaginal swabs	0.92 (0.74-1.13)	0.431
Delivery by cesarean section	0.18 (0.04-0.87)	0.033

Maternal determinants	No. of <i>Bifidobacterium</i> species detected in the feces of the baby	
	OR (95% CI)	p
Detection of <i>Bifidobacterium</i> species in the feces		
<i>B. adolescentis</i>	1.04 (0.45-2.44)	0.923
<i>B. bifidum</i>	1.65 (0.69-3.93)	0.262
<i>B. breve</i>	4.82 (1.96-11.85)	<0.001
<i>B. catenulatum</i> group	1.26 (0.55-2.9)	0.583
<i>B. dentium</i>	3.99 (0.28-56.19)	0.306
<i>B. infantis</i>	3.45 (0.55-21.54)	0.185
<i>B. longum</i>	1.05 (0.24-4.53)	0.948
No. of <i>Bifidobacterium</i> species detected in the vaginal swabs	1.05 (0.84-1.32)	0.661
Delivery by cesarean section	0.08 (0.01-0.62)	0.016

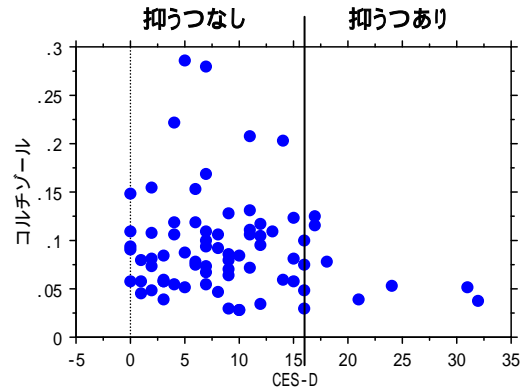
以上の結果を *Pediatric Research* 誌上に発表した。

児のコルチゾール分泌能に影響する母体側要因

まず母親の細菌要因について検討した。母親の出産前における頸管粘液内の *Bifidobacterium/Lactobacillus* 比 (B/L 比) と児のコルチゾール分泌能との間に有意な負の相関を認めた ($r = -0.247$, $P = 0.0388$)。つまり B/L 比が低い (*Bifidobacterium* の割合が *Lactobacillus* より低い) ほど児のコルチゾール分泌能が高いことになる。



次に母親の抑うつと児のコルチゾール分泌能の関係について検討した。CES-D 値に基づき (カットオフ 16 点) 母親を“抑うつ傾向あり”と“抑うつ傾向なし”の 2 群に分け比較したところ、“抑うつ傾向あり”の母親から出生した児の唾液中コルチゾール値は“抑うつ傾向なし”の場合よりも低下していた ($P = 0.067$ by Mann-Whitney's U test)。CES-D 値を横軸に児の唾液中コルチゾール値を縦軸にしてプロットした散布図を下に示す。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, Bienenstock J, Mood and gut feelings, *Brain Behav Immun*, 査読有, 24 巻, 2010, 9-16

Mikami K, Takahashi H, Kimura M, Isozaki M, Izuchi K, Shibuta R, Sudo N, Matsumoto H, Koga Y, Influence of maternal bifidobacterial microbiota on the establishment of intestinal bifidobacterial microbiota in infants, *Pediatric Research*, 査読有, 65 巻, 2009, 669-674

Boonyaritchaikij S, Kuwabara K, J Nagano J, Kobayashi K, Koga Y, Long-term administration of probiotics to asymptomatic pre-school children for either the eradication or the prevention of helicobacter pylori Infection. *Helicobacter*, 査読有, 14 巻, 2009, 202-207

Shibata R, Kimura M, Takahashi H, Mikami K, Aiba Y, Takeda H, Koga Y, Clinical effects of kestose, a prebiotic oligosaccharide, on the treatment of atopic dermatitis in infants, *Clin Exp Allergy*, 査読有, 39 巻, 2009, 1397-1403

須藤信行, 腸内フローラによるストレス反応の制御: 腸内フローラと脳機能, 医学のあゆみ, 査読無, 228 巻, 2009, 223-226

Hiramoto T, Chida Y, Sonoda J, Yoshihara K, Sudo N, Kubo C, The hepatic vagus nerve attenuates Fas-induced apoptosis in the mouse liver via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor, *Gastroenterology*, 査読有, 134 巻, 2008, 2122-2131

Yoshihara K, Yamada H, Hori A, Yajima T, Kubo C, Yoshikai Y, IL-15 exacerbates collagen-induced an enhanced CD4(+) T cell response arthritis with to produce IL-17, *European Journal of Immunology*, 査読有, 37 巻, 2007, 2744-2752

〔学会発表〕(計4件)

須藤信行, 脳腸相関からみたプロバイオ
ティクスの展望, プロバイオティクスシ
ンポジウム 2010, 2010年4月, 東京

須藤信行, 久保千春, 精神神経免疫学と
アレルギーの最前線, 第59回日本アレルギー
学会総会, 2009年10月, 秋田

須藤信行, ストレスと腸内フローラ, 第
13回腸内細菌学会, 2009年6月, 東京

Sudo N, The microbiome Brain-Gut axis:
The ability of gut flora to influence the host
hypothalamic-pituitary-adrenal axis,
Digestive Disease Week 2008, May 17-22,
2008, San Diego, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 千春 (KUBO CHIHARU)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号: 80117100

(2) 研究分担者

須藤 信行 (SUDO NOBUYUKI)

九州大学大学院・医学研究院・教授

研究者番号: 60304812

吉原 一文 (YOSHIHARA KAZUFUMI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 20444854

古賀 泰裕 (KOGA YASUHIRO)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 60170221