

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293054

研究課題名(和文)腸内細菌による宿主行動変化の全容とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文)How do gut microbes affect host behaviors?

研究代表者

須藤 信行(Sudo, Nobuyuki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60304812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オープンフィールド法とビー玉埋没テストを用いて、人工菌叢マウスの行動特性を、アイソレーター内測定法を用いて厳密に測定した。無菌マウス(GF)は、SPFマウスの糞便を移植した無菌マウス(EX-GF)と比較し、多動で不安レベルが高かった。GFマウスに*Bifidobacterium infantis*を移植すると運動能が、*Bla utia coccoides*の移植によって不安関連行動が減弱した。このように腸内微生物は宿主の行動特性やストレス応答の発現に関わっていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, open-field and marble-burying tests were used to analyze anxiety-like behaviors and locomotor activity in gnotobiotic BALB/c mice with a common genetic background in a sterile isolator. As a result, EX-GF mice, the gnotobiotic mice with normal specific pathogen-free microbiota, were less anxious and active than GF mice using open-field and marble-burying tests. Monoassociation with *Brautia coccoides* reduced the anxiety level, but it did not affect the locomotor activity. In contrast, colonization with *Bifidobacterium infantis* decreased the locomotor activity, while having little effect on the anxiety level. These results strongly support the view that gut microorganisms modulate behavioral phenotype and stress response of the hosts.

研究分野：内科学一般(含心身医学)

キーワード：環境生理学 腸内細菌 行動 不安 ストレス メタボローム

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢は、体細胞の総数を超える約 100 兆の細菌によって構成されるきわめて複雑な集団であり、その重量は成人では 1kg にも相当するとされている。この腸内細菌は、ヒトには存在しない多くの細菌固有遺伝子を含んでおり、体細胞では代謝できない物質を栄養素に分解する、などの重要な役割を演じている。

2010 年の Science 誌上 (330:1612-3, 2010)で、過去 10 年間における 10 大成果のひとつに“腸内フローラ研究の進歩”が挙げられているように、腸内細菌叢は、これまで知られていなかった宿主の生理機能や炎症性腸疾患、肥満症などの病態形成にも深く関与していることが明らかにされている。

我々のグループは、以前より、無菌 (germ-free: GF) マウス、人工菌叢マウスを用いて、腸内細菌叢の宿主中枢神経機能へ及ぼす影響について研究を進めてきた。その結果、GF マウスでは、主要なストレス応答系である視床下部 - 下垂体 - 副腎軸

(hypothalamic pituitary adrenal axis: 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明らかにした。さらに単一の細菌より構成された人工菌叢マウスを用いた実験により、腸内細菌は成長後の HPA axis の反応性に深く関与していることが明らかとなった (J Physiol. 2004;558:263-75)。

以上の事実は、腸内細菌に由来するシグナルが宿主の中枢神経機能へ影響することを示しており、極めて興味深い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、人工菌叢マウスを用い、腸内細菌が成長後の行動特性 (運動能、不安関連行動、攻撃性) の発現にどのように関与しているかに関して、信頼性と再現性に優れた“アイソレーター内行動解析法”を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

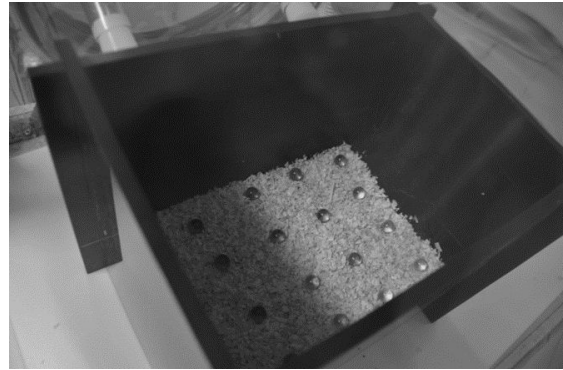
実験には、GF、SPF マウスの腸内細菌を移植した GF マウス (EX-GF)、*Bifidobacterium infantis* 単一細菌マウス、

Blautia coccoides 単一細菌マウス (すべて雄 BALB/c マウス) を用いた。これら単一細菌マウスは、それぞれの細菌 (10⁹ CFU) を母マウスへ経口的に投与し、その母マウスから出生した仔マウスを用いた。この 2 種類の単一細菌マウスを用いた理由は、ヒトにおける最優勢菌叢のひとつである、細菌学的、免疫学的基礎データが蓄積されている、すでに当施設で保有されている、ことによる。

(2) 行動特性の評価

マウスの行動特性は、ガラス玉覆い隠し行

動 (図: marble-burying behavior: MBB)

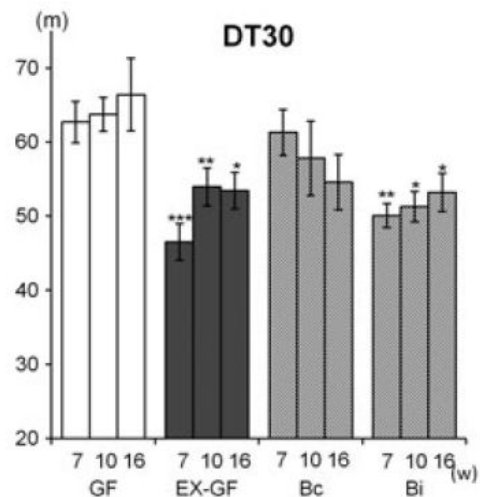


とオープンフィールド法 (open field method: OFT) をアイソレーター内で行う“アイソレーター内行動解析法”にて評価した。

MBB は、敷き詰めた床敷 (オガクズ) 上に配したガラス玉をマウスが床敷内に埋めこむ行動である。この行動はセロトニン再取り込み阻害薬にて抑制されることより、強迫性障害の動物モデルとして位置づけられており、不安関連行動を反映するとされている。OFT は、実験動物の自発運動量や活動性、一般行動を測定する場合に汎用されるが、動物の不安や恐怖などの情動反応を評価する試験としても利用される簡便な方法である。実際の測定は、アクリル板で作成した四角形のフィールドを用い、マウスが 30 分間に移動した距離 (DT30) および辺縁部滞在時間 (TS30) を自動行動解析装置 (カラービデオ・トラッキング・システム) にて解析した。一般に不安レベルの高いマウスはフィールドの辺縁部を好む傾向があり、辺縁部滞在時間が長いほど不安レベルが高いと判定する。

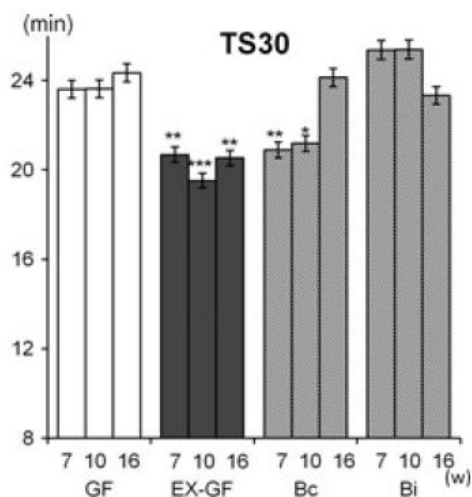
なお、実験に用いたすべてのマウスは、行動解析前後に糞便を採取し、無菌または移入された単一細菌のみであることを確認した。

4. 研究成果

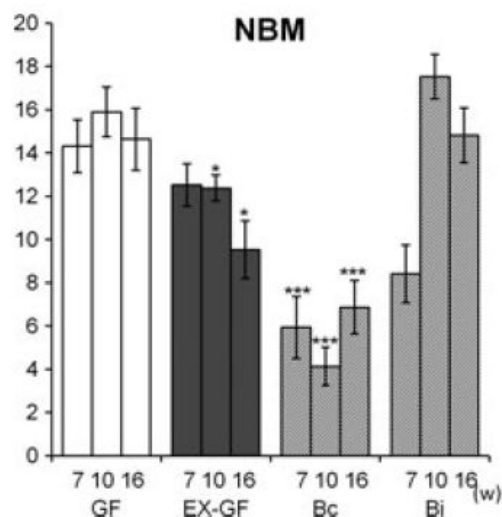


上図のように GF 群は EX-GF 群と比較し、いずれの週齢においても有意に長い距離を移動していた。Bifidobacterium infantis (Bi) 群では、EX-GF 群と同程度に DT30 が減弱

していたが、*Blautia coccoides* (Bc) 群では減弱効果は認めず、GF 群と同程度に多動であった。



次に不安関連行動を OFT とガラス玉埋没行動 (marble burying behavior: MBB) を用いて評価した。OFT における不安関連行動の指標として辺縁部滞在時間 (TS30) を用いた。上図のように GF 群は EX-GF 群と比較し、いずれの週齢においても有意に辺縁部滞在時間が長かった。Bc 群は、GF 群と比較し、7, 10 週齢において有意に TS30 が短縮していた。一方、Bi 群は、GF 群と同程度の不安レベルであった。



次に MBB を用いた不安関連行動を検討したところ、7 週齢では GF, EX-GF 群の間に埋められたビー玉数に差はなかったが、週齢を重ねるにつれて EX-GF のガラス玉覆い隠し行動は減弱した。一方、Bc 群は、GF 群と比較し、全週齢にわたって NBM は低かった。一方、Bi 群は、GF 群と比較し、7 週齢では低下していたが、10, 16 週齢時点では差はなく、時間経過を考慮した ANOVA では群間差を認めなかった。以上の結果は、GF マウスは、EX-GF マウスと比較し、多動で不安レ

ベルが高いことを示している。

以上の結果は、腸内細菌叢は宿主の行動特性を変化させることを示している。現在、この行動変容に至る経路や関与する物質の同定を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

(1) Nishino R, Sudo N, et al., Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods., *Neurogastroenterology & Motility*., 査読有, 25, 2013, 521-528.

(2) 須藤 信行., 生活習慣の見直しとストレス解消のすすめ 腸内フローラとストレス., *皮膚の科学*., 査読有, 12, 2013, 37-41.

(3) Sudo N., Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut., *Adv Exp Med Biol*., 査読有, 817, 2014, 177-94.

(4) Yoshihara K., Psychosomatic treatment for allergic diseases., *Biopsychosoc Med*., 査読有, 18;9, 2015, 8.

(5) Chijiwa T, Oka T, Lkhagvasuren B, Yoshihara K, Sudo N., Prior chronic stress induces persistent polyI:C-induced allodynia and depressive-like behavior in rats: Possible involvement of glucocorticoids and microglia., *Physiol Behav*., 査読有, 1;147, 2015, 264-73.

(6) Morita C, Tsuji H, Hata T, Gondo M, Takakura S, Kawai K, Yoshihara K, Ogata K, Nomoto K, Miyazaki K, Sudo N. Gut Dysbiosis in Patients with Anorexia Nervosa., *Plos One*., 査読有, 18;10(12), 2015, e0145274.

(7) Tsuda A, Suda W, Morita H, Takanashi K, Takagi A, Koga Y, Hattori M., Influence of Proton-Pump Inhibitors on the Luminal Microbiota in the Gastrointestinal Tract., *Clin Transl Gastroenterol*., 査読有, 11;6, 2015, e89.

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) 須藤信行. ストレス関連疾患の病態と治療, 第 62 回東北支部主催生涯教育講演会, 2014 年 2 月 15 日, 宮城.

(2) 須藤信行. 腸内細菌とこころの発達, 第 13 回抗加齢医学の実際 2013, 2013 年 9 月 16 日, 東京.

(3) 須藤信行. 腸内細菌研究の動向と心身医

学の接点, 第 54 回日本心身医学会総会なら
びに学術講演会, 2013 年 6 月 27 日, 神奈川.

(4) Sudo N. Gut microbiota influence stress
response and behavior of the host, The
16th Congress of Asian College of
Psychosomatic Medicine, August 22nd,
2014, Indonesia.

(5) 須藤信行. 腸内細菌と脳腸相関—心身医学
研究の新しい展開—, 第 55 回日本心身医学会
総会ならびに学術講演会, 2014 年 6 月 7 日,
千葉.

(6) 須藤信行. 腸内細菌によるストレス反
応・行動特性の制御, 第 10 回日本食品免疫学
会学術大会, 2014 年 10 月 17 日, 東京

(7) 須藤信行. 内科領域におけるストレス関
連疾患の病態と治療, 第 53 回九州支部生涯
教育講演会 (日本内科学会九州支部), 2015
年 1 月 10 日, 福岡.

(8) 須藤信行. 腸内細菌によるストレス反
応・行動特性の制御, 第 88 回日本内分泌学会
学術総会, 2015 年 4 月 24 日, 東京.

(9) 須藤信行. 腸内細菌によるストレス反
応・行動特性の制御, 第 24 回日本臨床環境医
学会学術集会, 2015 年 6 月 7 日, 東京.

(10) 須藤信行. 腸内細菌から見た栄養学 プ
ロバイオティクス・プレバイオティクスの臨床
応用の可能性, 第 56 回日本心身医学会総会
ならびに学術講演会, 2015 年 6 月 27 日, 東
京.

(11) 須藤信行. 腸内細菌と脳腸相関, 第 45 回
日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学
的精神医学会合同年会, 2015 年 9 月 26 日, 東
京.

(12) 須藤信行. 症状としての過食: 腸内細菌
からみた摂食障害, 第 31 回日本ストレス学
会学術総会, 2015 年 11 月 7 日, 東京.

(13) 須藤信行. 脳腸相関に基づく消化器・心
療内科診療の新展開 腸内細菌からみた脳腸
相関, 第 20 回日本心療内科学会総会・学術大
会, 2015 年 11 月 21 日, 岩手.

〔図書〕(計 1 件)

(1) 須藤信行. 「腸内細菌と脳機能」, ヒトマ
イクロバイオーム研究最前線 (服部正平, 監
修), pp442, 2016, 株式会社エヌ・ティ・エ
ス

〔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

須藤 信行 (SUDO NOBUYUKI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 60304812

(2) 研究分担者

吉原 一文 (YOSHIHARA KAZUFUMI)

九州大学病院・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

(3) 連携研究者

なし