

新時代を迎えた腸内常在菌研究

辨野 義己

国立研究開発法人理化学研究所イノベーション推進センター辨野特別研究室*

受付日：2017年10月3日 受理日：2017年10月12日

培養・単離を介さない手法によるヒト腸内常在菌の多様性解析はその生活特性との関連を明らかにする手段として用いられ、生活特性（年齢、性別、BMI、食生活、運動習慣など）との関係も解明されるようになった。また、腸内常在菌の腸内・脳内代謝物へ及ぼす影響について網羅的な解析が行われ、腸内常在菌の宿主への役割が見えてきた。さらに、腸内常在菌の大腸疾患のみならず、加齢や肥満に対する影響についての新しい知見も得られている。

Key words: analysis of normal gut microbiota, lifestyle characteristics, gut and cerebral metabolites, aging, obesity

はじめに

21世紀は腸内常在菌の構造と機能が全面的に解明され、それを人類は自らの健康管理に応用しえる時代である。さらに、腸内常在菌の構成解析に留まらず、生活習慣、食生活などとの関連についても究明されようとしている。本項では腸内常在菌の機能として、個人および生活習慣と腸内常在菌の相関性、オミックス解析による腸内・脳内代謝物の網羅的解析による新しい知見および宿主における加齢・肥満への影響について論じる。

1. 現代医療解明のトップランナーとしての腸内常在菌

ヒトの腸内常在菌の構成がきわめて個人差が大きいため、腸内常在菌が棲む場である大腸はヒトの臓器のなかで最も種類の多い疾患が発症する場とされている。腸内常在菌を構成している細菌が直接腸管壁に働き、消化管の構造・機能に影響し、宿主の栄養、薬効、生理機能、老化、発がん、免疫、感染などにきわめて大きな影響を及ぼすことになる。腸内常在菌が産生した腐敗産物（アンモニア、硫化水素、アミン、フェノール、インドールなど）、細菌

毒素、発がん物質（ニトロソ化合物など）、二次胆汁酸などの有害物質は腸管自体に直接障害を与え、発がんやさまざまな大腸疾患を発症するとともに、一部は吸収され長い間には宿主の各種内臓に障害を与え、発がん、肥満、糖尿病、肝臓障害、自己免疫病、免疫能の低下などの原因になるであろうと考えられている（Fig. 1）。

しかしながら、先人の数多くの努力によって確立された嫌気培養法の応用により、ようやく腸内常在菌が見えたように思えたが、たとえ高度な嫌気培養装置を用いて検出しても腸内常在菌の多様性解析に限界があることが明らかとなった。つまり、それを構成している腸内常在菌の約30~40%は培養可能な既知菌種であるが、残りは集落非形成菌であると推定されている。

2. 腸内常在菌をどのようにとらえるのか？

～培養を介さない手法による腸内常在菌の解析～

遺伝子を介した手法の発展により、腸内常在菌の多様性解析は飛躍的に進展している。とりわけ、リボゾームRNA（rRNA）は生物に普遍的に存在する保存性の高い核酸分子であり、細菌の進化系統研究に最も有効な分子マーカーとして、頻繁に使われ

*埼玉県和光市広沢 2-1

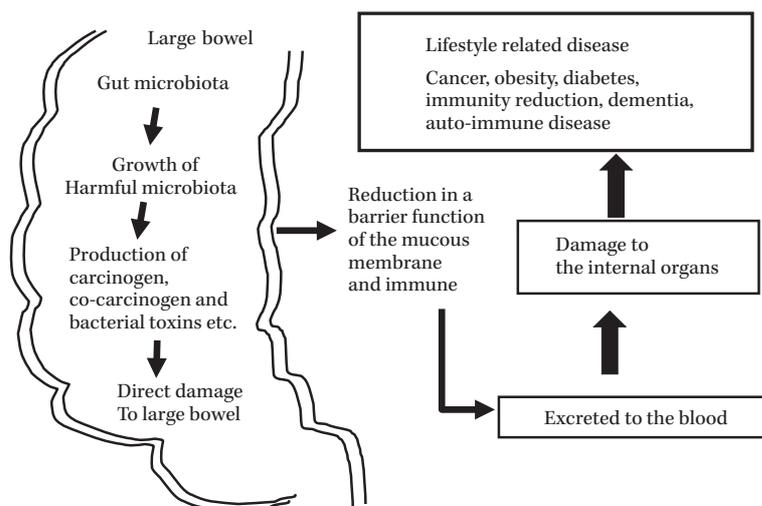


Fig. 1. Relationship between gut microbiota and disease

Table 1. Gut microbiota on healthy adults, vegetarian and aged persons using 16S rDNA clone libraries (%)

Microorganisms	Healthy adults			Vegetarian	Aged persons		
	A	B	C		D	E	F
<i>Clostridium</i> Cluster I	0	1.1	0	0	0	0	0
<i>Clostridium</i> Cluster IV (<i>Clostridium leptum</i> group)	22.7	12.4	11	13.1	34.7	16.1	9.5
<i>Clostridium</i> Cluster IX	0	9.8	34	0	0	35.8	14.3
<i>Clostridium</i> Cluster XI	0	0.4	0.8	0	0	1.2	0
<i>Clostridium</i> Subcluster XIVa (<i>Clostridium coccooides</i> group)	58.8	23.7	29	59.6	25.3	2.5	3.6
<i>Clostridium</i> subcluster XIVb	0.5	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium</i> Cluster XVI	0	4.1	0	1.7	4	0	0
<i>Clostridium</i> Cluster XVII	0	8.3	0	0	0	2.5	0
<i>Clostridium</i> Cluster XVIII	0	0	0.4	12	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	0	0.4	5.3	0.5	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	0	1.2	0
<i>Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides</i>	5	9.4	16.3	6	20	8.6	15.4
<i>Streptococcus</i>	3.7	28.8	0.4	0	2.7	1.2	0
<i>Proteobacteria</i>	0.5	0.8	1.6	0	5.3	17.3	54.8
Others	8.8	0.8	1.2	7.1	8	13.6	2.4

ている。1990年代以降、16S rRNA 遺伝子の塩基配列をもとにした菌種レベルでの系統分類法が確立し、さまざまな細菌種の遺伝子配列データが蓄積され、だれもが容易に微生物研究に用いることが可能となっている。これらのデータをもとに、16S rRNA 遺伝子の特定配列を標的とした菌種特異的プライマー¹⁾を用いたPCR (polymerase chain reaction) 法が確立され、多種類の細菌種が混在する試料から特定の菌種を検出・同定することが可能となったのである。従来の培養法と比較してより簡便、迅速、正確な標的菌種の検出および同定法として用いられる

ようになった。

この腸内常在菌の大部分を占める培養・分離が困難な常在菌解析に16S rRNA 遺伝子を指標とする分子生物学的手法が導入され、ようやく難培養・難分離の腸内常在菌の全貌が見えてきたのである²⁻⁷⁾。以下、16S rRNA 遺伝子解析を用いた培養を介さない手法により解析された腸内常在菌解析成績を中心に紹介する。

2-1. 菌種特異的プライマーによる腸内常在菌の解析

ヒトの腸内常在菌の菌群レベルでの解析には、

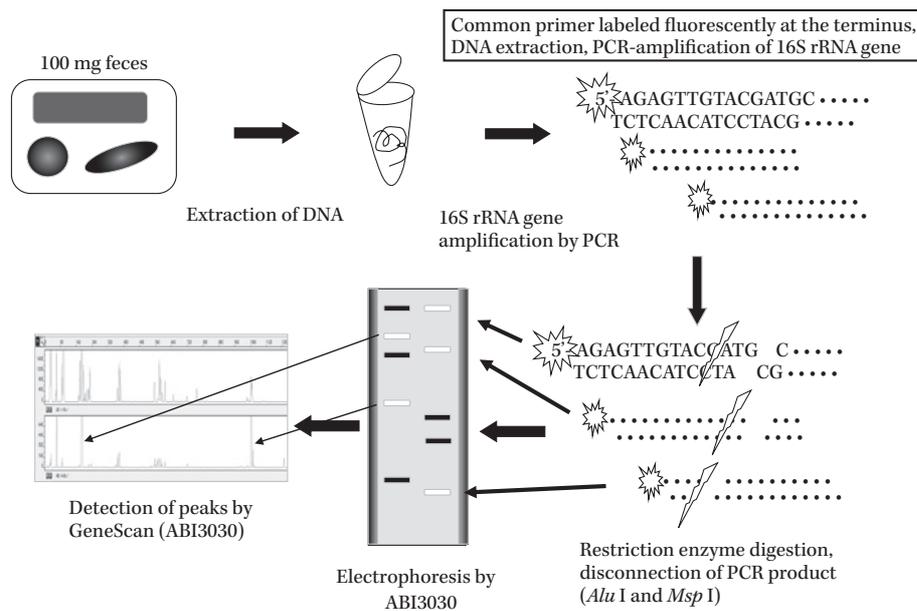


Fig. 2. Principles of Terminal-RFLP Method

Frank ら⁵⁾による *Clostridium (C.) coccooides-Eubacterium rectale* グループ (*Clostridium* クラスタ XIVa, XIVb), *Bacteroides fragilis* グループに特異的なプローブや Harmsen ら⁶⁻⁸⁾による *Lactobacillus/Enterococcus*, *Ruminococcus* グループ, *Atopobium* cluster に特異的なプローブおよび Langendijk ら¹⁾の *Bifidobacterium* 属に特異的なプローブが有効とされている。これらの報告は、腸内常在菌の構造解析に分子生物学的な手法による新しい分類体系を導入した点で非常に意義が大きい。

Suau ら²⁾の菌種レベルでの解析により、*Faecalibacterium prausnitzii* が高頻度かつ高菌数で存在することがわかった。また、FISH とフローサイトメトリーの組み合わせにより、Zoetendal ら⁹⁾は、未培養 *Ruminococcus obeum* 様菌種がヒトの腸内常在菌の最優勢構成菌群である *C. coccooides-E. rectale* グループの約 16% を占める最優勢菌種であることを、Mueller ら¹⁰⁾は、230 例のヨーロッパ人の腸内常在菌の構成を、年齢層、性別、および国別での違いについて解析し、イタリア人における *Bifidobacterium* の構成比は、年齢層に関係なくフランス、ドイツ、スウェーデン人のそれに比べ 2~3 倍も高いこと、60 歳以上の高齢者群における大腸菌群は地域に関係なく若年齢群 (20~50 歳) に比べ高いこと、*Bacteroides-Prevotella* グループは男性群が

女性群に比べて高いことをそれぞれ示した。Hayashi ら^{3,4,11)}は、成人、老人およびベジタリアンの腸内常在菌を詳細に解析し、抽出クローンの 25% を 98% のホモロジー率を示す 31 既知菌種に同定し、残り 75% のクローンが 99 の新規なファイロタイプ (系統型, Phylotype) に属することを明らかにした (Table 1)。このような 16S rDNA によるクローンライブラリーの構築によって、ヒト腸内常在菌は *Clostridium* rRNA クラスタ IV, IX, XIVa および XVIII や *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* の各グループなどに属するクローンであることを明らかにした。そして分離されたクローンのうち、*Clostridium* rRNA クラスタ IV (全クローンに占める割合: 11~22%) および XIVa (23~59%) に属する菌株が多く常在していることも明らかにした。また、極端な菜食主義者の腸内常在菌を検索したところ、*Clostridium* rRNA クラスタ XIVa, IV および XVIII が優勢に検出された。さらに、高齢者 (75~88 歳) の腸内常在菌解析の結果、240 クローンを分離し、その 46% を 27 種の既存菌種に同定し、残り 54% はファイロタイプであるとしている⁵⁾。老人の腸内より分離されたクローンは 83 種類の菌種あるいはファイロタイプであり、その 13% は新規のファイロタイプであった。健康成人の成績⁴⁾と異なり、*Clostridium* rRNA クラスタ XIVa の出現

Table 2. Relationship between gut microbiota and personal and lifestyle characteristics on 3,220 healthy adults

Group	Major gut microbiota	Personal and lifestyle characteristics
Group 1 (n = 797)	Firmicutes, <i>Ruminococcus</i> , <i>Clostridium</i> XIVa, <i>Bacteroides</i>	Female: >60 years old, 25%BMI<, constipation
Group 2 (n = 193)	<i>Clostridium</i> III + XVIII, <i>Ruminococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Coriobacteriaceae</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Actinomyces</i>	Female: <59 years old, 25%BMI<, consumption of probiotics
Group 3 (n = 397)	<i>Clostridium</i> I, <i>Eubacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Bacteroides</i>	Female: >60 years old, 25%BMI<, consumption of vegetable, seaweed, fish, Natto, non-smoking, no alcohol
Group 4 (n = 476)	<i>Clostridium</i> XIVa, <i>Fusobacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Bacteroidetes</i>	Female: 25%BMI<
Group 5 (n = 322)	<i>Clostridium</i> XIVa, <i>Eubacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Actinomyces</i>	Male: consumption of vegetable, seaweed, fish, Natto
Group 6 (n = 441)	<i>Clostridium</i> XIVa, <i>Eubacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Slackia</i> , <i>Collinsella</i> , <i>Gordonibacter</i>	Male: <59 years old, non-constipation
Group 7 (n = 482)	<i>Clostridium</i> , <i>Lachnospira</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i>	Male: 60 years old, 25%BMI>, consumption of vegetable, seaweed, fish, Natto, and alcohol, smoking
Group 8 (n = 112)	<i>Clostridium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i>	Male: <59 years old, 25%BMI>, smoking

が一例を除いて低く (2.5~3.6%), *Clostridium* rRNA クラスタ IV や IX およびガンマプロテオバクテリア (*Gamma Proteobacteria*) の高頻度出現が認められている。

2-2. ターミナル RFLP 法によるヒト腸内常在菌の解析

16S rDNA クローンライブラリー法は腸内常在菌を構成している菌種 (群) の解析が可能であるが、それを行うには時間と多額の費用が求められる。したがって、腸内常在菌の解析において、迅速、簡便および大量のサンプル処理が要求される。そこで多様な微生物叢を数値として把握する分子生物学的手法として RFLP 法による多様性解析と遺伝子解析システムによる全自動解析を組み合わせた Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 解析と呼ばれる手法が提案された¹²⁾。これは 16S rRNA 遺伝子などを増幅するプライマーの 5'末端を蛍光標識し、制限酵素処理で得られた末端断片の多型を遺伝子解析システムによって解析する方法で、これにより自動化、迅速化が可能となった。腸内常在菌の多様性解析において本法と 16S rDNA 塩基配列を使った各分子生物学的手法とを比較すると、その多様性解析やデータベース構築という点で優れた方法である。実際には Fig. 2 に示すように大便から直接得られたクローンを PCR 増幅後、2 種類の制限酵素でそれらを切断し、遺伝子解析システムにより検出された多様な T-RF パターンのピーク面積を自動測定し、それにより複雑な腸

内常在菌を解析するものである。糞便材料から得られた T-RF パターンのクラスタ解析により、ヒト腸内常在菌の多様性解析が可能となり、その検出法の簡便性および再現性が得られることも確認されている¹³⁾。

2-3. 次世代型シーケンサーによる腸内常在菌解析

近年、次世代型シーケンサーによるヒト腸内常在菌解析が用いられている。解析に用いられるデータベースに搭載されている腸内常在菌は既存菌属・菌種であり、集落非形成菌である“難培養常在菌”の把握は困難である。しかしながら、この装置を応用することにより腸内常在菌の構成と機能の把握が容易になり、多くの研究者が腸内常在菌への関心を高めていることは事実である。

3. 腸内常在菌と生活特性 (食生活・生活習慣など) との関連性

急速な高齢化と飽食による生活習慣病患者群の増大に起因し、国民医療費はすでに 30 兆円を超え国家財政上で喫緊の課題になっている。そこで国民生活の QOL (生活の“質”) を大きく損なわない予防医学的手法の開発が切望されているが、未だ具体的な突破口は見出されていない。

そこで、腸内常在菌解析の成績と生活特性との関連性を解明し、完成した腸内常在菌-生活特性データベースを駆使して、生活習慣の予測および罹患予測と現状の比較を実施が可能となるであろうと確信している。つまり、腸内常在菌の成績が健康維持・

Table 3. Classification of metabolites detected from germ free mice and conventional mice

Metabolites	GF>CV	GF≐CV	GF<CV
Amino acid derivative	23.9	14.3	23.4
Amino acid metabolism relatives	4.3	3.6	9.1
Basic amino acid	8.7	26.8	0
Carbohydrate metabolism intermediates	13	0	2.6
Central carbon metabolism intermediates	2.2	3.6	6.5
Co-enzyme derivates	2.2	3.6	7.8
Lipid metabolism relatives	10.9	8.9	9.1
Nucleic acid relatives	19.6	5.3	15.5
Peptide	8.7	16.1	2.6
Others	6.5	17.8	23.4

GF: Germ free mice, CV: Conventional mice

増進および疾患リスクの軽減に結びつき、やがては健康 QOL の向上に結びついていくことである。これらの試みは健康予防効果を促進し、これから増え続ける国民医療費の大幅削減に拍車をかけることになろう。

そこで、現代日本人 3,220 名の腸内常在菌の構成と 143 項目に及ぶ属性（年齢、性別など）や食生活、生活習慣、運動習慣などのアンケート調査を実施し、腸内常在菌と食生活・生活習慣との関係を検索したところ、ヒトの腸内常在菌のパターンが、食生活や生活習慣などによって、グループ分類された (Table 2)。

この解析結果をもとにして、腸内常在菌データベースを構築し、生活習慣の予測や将来の健康状態の把握により、個人ごとの健康維持・増進や病気予防などに利用することも可能となるであろう。

4. 腸内常在菌の腸内および大脳皮質内代謝物への影響

腸内環境が宿主の健康に多大な影響を与えていることは周知の事実である。腸内環境-宿主間のクロストークは、現在、腸管上皮細胞表面の Toll 様受容体などを經由した、菌体成分の直接刺激の研究が盛んに行われ、詳細なメカニズムが明らかになりつつある。しかしながら、腸内常在菌の代謝物の研究はほとんど実施されていない。腸内常在菌の代謝物は少なくとも数百種類以上存在すると考えられ、そのほとんどは低分子のため腸管粘液層にも浸透し、上皮細胞にも直接影響を与える。また、腸管からも吸収され血中に移行し全身へ運搬されることが容易に想像でき、健康との関連性はきわめて高いと考えられる。

最近、腸内常在菌が宿主の各臓器、血液¹⁴⁾や尿¹⁵⁾内の代謝物に影響していることが知られている。これまで、困難とされてきた生体内代謝物の測定にメタボロミクスが有効であることが示唆されてきた^{16,17)}。実際に、腸内常在菌によって誘導された血液中¹⁸⁾や尿中¹⁹⁾の代謝物の測定にメタボロミクスが用いられるようになった。

Matsumoto ら²⁰⁾は遺伝的な偏りをなくすために、兄妹で交配させて誕生した無菌マウス (GF) のオス 6 匹を、無菌状態で育てた 6 匹と、生後 4 週間目に“糞便カクテル”を食べさせた腸内常在菌を含む体内微生物を有する、特定の病原体を保菌しない、通常実験で用いられるマウス (SPF: 6 匹) の 2 群に分け、滅菌水や滅菌飼料などを使って同じ条件で育て、7 週間目に、両群のマウスから、腸内容物を回収して、キャピラリー電気泳動 (CE)-TOFMS を用いたメタボローム法により腸内代謝物の網羅的解析を実施した。その結果、腸内容物メタボローム検出成分のカテゴリー別比率を無菌 (Germ free, 以下 GF) マウスおよび通常菌叢 (Conventional, 以下 CV) マウスの大腸内容物より 10 個のカテゴリーに分類し、GF < CV, GF ≐ CV, GF > CV のそれぞれの成分で Table 3 のような成績を見出している。すなわち、CV マウスは GF マウスに比べて、アミノ酸代謝関連成分、中心炭素代謝中間体、ビタミン類・ビタミン類代謝中間体が多く、反対に、GF マウスは CV マウスに比べてアミノ酸やペプチドは少なく、それらは両群に共通して該当するものが多かったとしている。特に、腸内常在菌により、βアラニンの前駆物質アスパラギン酸、カダベリンの前駆物質リジン、プトレシンの前駆物質オルニチン、

Table 4. Metabolites whose concentrations were higher in the cerebral metabolites of conventional mice than in that of germ free mice

Compound name	GF		CV
Trimethylamine N-oxide	1.87	<<	8.2
Ethylglutamine	6.1	>>	1.4
Dopamine	5.3	>>	2.9
2-Methylserine	4.9	<<	8.7
3-Methylhistidine	6.1	>>	1
Tryptophan	9.7	>>	1.4
Pipecolic acid	1.6	<	2.3
Tyrosine	4.8	>	3.5
Phenylalanine	3.7	<	5
N-Acetylaspatic acid	2.1	>	1.7
N-Acetylneuramic acid	1	>>	8.8
Biotin	2.2	>	1.8
Sericin	1.1	<	2.1

GF: Germ free mice, CV: Conventional mice

チラミンの前駆物質チロシン、 γ -アミノ酪酸の前駆物質グルタミン酸などが活性を受けることが解明されている。これらの研究成果は、これまでの腸内常在菌研究がその構成のみの視点を重視するあまり、本来、宿主と腸内常在菌の関係を示す代謝物を軽視してきた流れを変えうる力を有していると高く評価され、機能性食品開発の一助ともなっている。今後、ノートバイオート動物（既知菌種・菌株投与動物）などを駆使して、さまざまな腸内代謝物に及ぼす菌種・菌株レベルでの解明が進展するものと思われる。

さらに、腸と脳の間には双方向のシグナルは生体の恒常性維持に重要であり、神経、ホルモン、免疫レベルにおいても制御されている²¹⁾。これらのシステムの攪乱はストレス反応や行動における変化にも直結している^{22,23)}。さらに、脳の発達や行動にも腸内常在菌が関与していることも報告されている^{24,25)}。

これまで、未解明であった腸内常在菌と脳の“腸脳関係”が世界で初めて明らかにされた。Matsumotoら²⁶⁾は腸内代謝物解析と同様の手法により、GFおよびSPFの両群のマウスから、脳内容を回収して、脳内代謝物を網羅的に測定した。大脳皮質に含まれる代謝物196成分を、両群で比較したところ（Table 4）、代謝物のうち23成分（行動と関連深い神経伝達物質であるドーパミン、統合失調症との関連性ありとするセリン、多発硬化症やアルツハイマー発症に関連性ありとされるN-アセチルアスパラギン酸など）は、GFマウスのほうがCVマウ

スより高濃度であり、逆に、15成分（神経伝達物質の前駆物質である芳香族アミノ酸、てんかん発症と関連あるらしいピペコリン酸、統合失調症との関連性ありとするセリン、乳児の脳機能発達に関与しているらしいN-アセチルノイラミン酸など）は、GFマウスのほうがCVマウスより低濃度であることが解明された。腸内常在菌が脳内代謝物の産生促進・減弱に関与していることが明らかにされた。GFマウスに多かった成分には、大脳皮質のエネルギー代謝に関係する物質が含まれており、明らかに、GFマウスのほうがCVマウスよりも大脳のエネルギー消費が大きいとされている。

本成績のみでは、脳の活性化や脳の病気にかかわっている神経伝達物質と、腸内常在菌の詳細な関係についてはまだ分析されていないが、脳の健康や疾病、発達と衰弱、学習や記憶、行動などを研究推進するうえで大きな意義があるといえよう。前述のように今後は、ノートバイオート動物を駆使して、さまざまな腸内代謝物に及ぼす菌種・菌株レベルでの解明が望まれている。

5. エイジングを左右する腸内常在菌

エイジングは「エイジングに付随する生理学的機能の後戻り」と規定されている²⁷⁾。いわば生体防御機能の低下と理解されてもいいであろう。エイジングによる腸管運動の低下は排便・便秘にも影響を与え、食事成分の腸内滞留時間の長期化に繋がってくる。Biagiら²⁸⁾は健康成人、70歳老人および百寿者の腸内常在菌の多様性解析について、培養を介さない手法で解析したところ、健康成人および70歳老人の腸内常在菌の構成およびその多様性は百寿者のそれとは有意に異なることを認めている。特に百寿者の腸内Firmicutes類が再構築される特徴を有しており、超粘膜の炎症状態が増悪と関連しているらしいとしている。特に*Fb. prauznitzii*およびその関連菌種の著しい減少を伴う腸内常在菌の変動が指摘されている。さらに*E. limosum*とその関連菌種が健康成人および70歳老人に比べて、百寿者の腸内で10倍ほど増加していると述べている。健康人であれば、腸内常在菌の構成における恒常性を維持し、生体防御機能が成立することになる。

3,220名の腸内常在菌解析と個人属性（性別、年齢、BMIなど）・生活特性との相関性を検索したわれわれの成績から、特に年齢と性別との間には腸

腸内常在菌構成に密接な関係があることが判明した。すなわち、前述のグループ1, 3, 7は60歳以上の被験者に多く認められ、グループ2, 6, 8は59歳以下の被験者が多いことが判明した。性別においても、同様の傾向があることも明らかにされている。

6. 肥満を左右する腸内常在菌

腸内常在菌の多様性解析の進展は、宿主の有する腸内常在菌の役割、特に生体防御機能解明に大きな貢献をしている。腸内常在菌がいかに生体防御機能をコントロールし、現代的課題である肥満を腸内常在菌という視点からとらえてみる。

生活習慣病の症状として、メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）が知られている。おなかの周りに脂肪が蓄積した内臓脂肪型肥満が起き、これに高血圧、脂質異常、高血糖のどれか1つでも併発していれば、「メタボ」と診断されることは周知のことであろう。メタボを引き起こす主要因として、食生活の乱れ、運動不足、喫煙、飲酒、ストレスなどが挙げられているが、この分野で腸内常在菌との関係が注目されてきた。

メタボと腸内常在菌との関係は、動物レベルでは20世紀半ばには明らかになっている。ニワトリやネズミにある種類の抗生物質を与えると、肥満が促進されるという事実である。家畜での短期間での肥育促進のため、飼料添加物としての抗生物質が利用されてきた。実はその肥育のメカニズムは解明されていないが、栄養素の奪取を促進する腸内常在菌の減少により、その体内吸収が促進されるため、肥育が促進され、また、抗生物質で乳酸菌の活動が抑えられることで、腸内常在菌がサポートするはずだった免疫システムも動きが鈍り、そこで消費されるはずだったカロリーが肥満化のほうに向かうという可能性も考えられている。

2006年、腸内常在菌が肥満に影響しているとする研究論文が「ネイチャー」に掲載された²⁹⁾。肥満のマウスと通常マウスを対象に、腸内常在菌をBacteroides類とFirmicutes類に分けて分析した結果、肥満のマウスにはFirmicutes類が多く、Bacteroides類が少ないことが判明したのである。これはヒトの場合も同様で、肥満の人ほどFirmicutes類が多く、Bacteroides類が少なかったというのである。研究グループは、Firmicutes類のなかに、消化されにくい多糖類までも分解してカロリーにする細菌

があることを指摘した。つまり、同じエサを食べたとしても高カロリー状態になり、肥満するという。一方のBacteroides類は、脂肪細胞への脂肪の取り込みを防ぐ短鎖脂肪酸（酢酸など）をつくりだし、筋肉で脂肪を燃焼させることで肥満を防いでいると推察されている。

そして、肥満の親をもつ双子のうち、1人が肥満、もう1人がやせ型という対象を集め、肥満体質が親から子に受け継がれた時、そこに腸内常在菌は関係しているのかを調べたところ、双子のうち肥満の子は腸内常在菌の構成が母親と似ていること、やせた子のそれは母とは違う腸内常在菌構成であるという^{30,31)}。これまで、食生活に偏りや太りやすい遺伝体質とされていた肥満の常識に一石を投じる研究となった。しかしながら、それらと傾向が一致しない報告³²⁻³⁵⁾もあり、今後の重要な課題であろう。

木村ら^{36,37)}は、腸内常在菌がつくりだす短鎖脂肪酸（酢酸など）が脂肪の蓄積を防ぐしくみを解明した。つまり、脂肪組織に多く存在し、脂肪の蓄積を防ぐ働きのある「GPR43」（G-protein-coupled receptor 43）というタンパク質に着目し、マウスを、①普通マウス、②GPR43欠損マウス、③GPR43過剰マウス、に振り分け、それぞれに脂肪を多く含んだえさを与えた結果、GPR43欠損マウスは体重と脂肪量が増加して肥満の傾向を示したのに対し、過剰マウスはやせる傾向を示し、脂肪を多く含んだえさを与えても肥満型糖尿病になりにくいため、GPR43が肥満を抑えたと判断された。

この研究で、肥満とGPR43というタンパク質の関係が明らかにされたが、そこに腸内常在菌がかかわっているのではないかと試験を進め、無菌マウスでGPR43欠損マウスとGPR43過剰マウスをつくらせて、同様の試験をしたところ、両者の脂肪量に差が認められなかったのである。このことから、GPR43は腸内常在菌により機能することが解明されたのである。さらなる分析で、GPR43は腸内常在菌がつくる短鎖脂肪酸で活性化され、脂肪細胞に脂肪酸が蓄積することを防ぐというわけである。

「過度な食事によって過剰なエネルギーが得られた時、腸内常在菌がつくりだす短鎖脂肪酸が増えることによって、GPR43が活性化し、脂肪組織に過剰なエネルギーが蓄積されることを防ぎ、筋肉によるエネルギー消費を増やす方向に誘導することで、

肥満や代謝機能の異常を防ぐ」と結論付けている。

短鎖脂肪酸は多くの腸内常在菌が産生するが、特にビフィズス菌が多くつくる酢酸や乳酸、さらに酪酸産生菌による酪酸などに肥満予防効果が期待されている。

おわりに

21世紀、あらゆる疾病発症の要因の一つとして、腸内常在菌の役割がクローズアップされている。腸内常在菌の単分離・培養を介さないアプローチにより、ようやくヒトの腸内常在菌の全貌が見渡せるようになってきた。その結果、ヒトの腸管内には数多くの未分類の常在菌が複雑な群集構造をつくり上げて共生していることが明らかとなった。これらの共生腸内常在菌の局在や分布、生物活性・機能と結びつけて総合的にこのエコシステム系を理解していくことが今後の課題である。

従来の“腸内常在菌学”は、細菌分類学を背景にして、いわば「知るための研究」であった。一方、腸内常在菌解析による健康診断法の確立は、予防医学と手を携えて進むことで、人々の健康に結びつく研究という意味では、「知る」という科学の営みを超えた研究分野といえる。

そして、加齢、肥満という現代的課題は腸内常在菌の構成と機能の解明により、新たな研究領域に拍車をかけ、人々の健康の有り様さえも変えうる力になるか否かの分岐点となっている。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文献

- 1) Langendijk P S, Schut F, Jansen G J, Raangs G C, Kamphuis G R, Wilkinson M H, et al: Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3069-75
- 2) Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J J, Gibson G R, Collins M D, et al: Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4799-807
- 3) Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y: Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic

- culture-based method. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 535-48
- 4) Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y: Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 557-70
- 5) Franks A H, Harmsen H J, Raags G C, Jansen G J, Schut F, Welling G W: Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rDNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3336-45
- 6) Harmsen H J, Elfferich P, Schut F, Welling G W: A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent *in situ* hybridization. *Microb Ecol Health Dis* 1999; 11: 3-12
- 7) Harmsen H J, Wildeboer-Veloo A C, Grijpstra J V, Knol J, Degener J E, Welling G W: Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4523-7
- 8) Harmsen H J, Raangs G C, He T, Degener J E, Welling G W: Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2982-90
- 9) Zoetendal E G, Ben-Amor K, Harmsen H J, Schut F, Akkermans A D, de Vos W M: Quantification of uncultured Ruminococcus obeum-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4225-32
- 10) Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, et al: Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1027-33
- 11) Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y: Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 819-31
- 12) Liu W-T, Marsh T L, Cheng H, Forney L J: Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4516-22
- 13) Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y: Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 133-42
- 14) Claus S P, Ellero S L, Berger B, Krause L, Bruttin A, Molina J, et al: Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction. *MBio* 2011; 2: e00271-10
- 15) Claus S P, Tsang T M, Wang Y, Cloarec O, Skordi E, Martin F P, et al: Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on

- mouse metabolic phenotypes. *Mol Syst Biol* 2008; 4: 219
- 16) Raamsdonk L M, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh M C, et al: A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 45-50
- 17) Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, Nakamura S, Shimizu K, Ueno Y, et al: Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol Biosyst* 2008; 4: 135-47
- 18) Wikoff W R, Anfora A T, Liu J, Schultz P G, Lesley S A, Peters E C, et al: Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3698-703
- 19) Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, et al: Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2117-22
- 20) Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Kurihara S, Sawaki E, et al: Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci Rep* 2012; 2: 233
- 21) Rhee S H, Pothoulakis C, Mayer E A: Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 306-14
- 22) Cryan J F, O'Mahony S M: The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: 187-92
- 23) Cryan J F, Dinan T G: Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 701-12
- 24) Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, et al: Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 3047-52
- 25) Neufeld K M, Kang N, Bienenstock J, Foster J A: Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: 255-64
- 26) Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Sawaki E, Koga Y, et al: Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: a pilot study. *Front Syst Neurosci* 2013; 7: 9
- 27) Imahori K: How I understand aging. *Nutr Rev* 1992; 50: 351-2
- 28) Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al: Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 2010; 5: e10667
- 29) Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, Magrini V, Mardis E R, Gordon J I: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027-31
- 30) Turnbaugh P J, Quince C, Faith J J, McHardy A C, Yatsunencko T, Niazi F, et al: Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 7503-8
- 31) Ridaura V K, Faith J J, Rey F E, Cheng J, Duncan A E, Kau A L, et al: Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 2013; 341: 1241214
- 32) Collado M C, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S: Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 894-9
- 33) Duncan S H, Lobley G E, Holtrop G, Ince J, Johnstone A M, Louis P, et al: Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 1720-4
- 34) Mai V, McCrary Q M, Sinha R, Gleib M: Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr J* 2009; 8: 49
- 35) Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos N A, Donus C, et al: Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18: 190-5
- 36) Kimura I, Inoue D, Hirano K, Tsujimoto G: The SCFA Receptor GPR43 and Energy Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 85
- 37) Nakajima A, Nakatani A, Hasegawa S, Irie J, Ozawa K, Tsujimoto G, et al: The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages. *PLoS One* 2017; 12: e0179696

Current Topics of the Gut Microbiota and its Host

Yoshimi Benno

Benno Laboratory, RIKEN Innovation Center, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama, Japan

As a first step towards the practical application of gut microbiota composition (GMC) analysis, we used terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the GMC in 3,220 Japanese adults (16–92 years old) to examine the associations between the GMC and 26 personal and lifestyle characteristics, including age, gender, BMI, dietary habits, and other habits. The 3,220 gut microbial communities were divided into 8 clusters (1–8) based on their operational taxonomic units (OTUs). For all of the clusters, significant correlations were observed between the clusters and personal and lifestyle characteristics, as revealed by the chi-square test and odds ratio analysis. Interestingly, each cluster also had correlations with other personal and lifestyle characteristics besides gender, age, and BMI, such as defecation, frequency of eating vegetables, and smoking habits. In conclusion, we demonstrated multiple associations between the GMC and personal and lifestyle characteristics. Moreover, the role of the influence of the GMC on age and obesity was also reviewed.

Recent studies have suggested that the GMC influences gut-brain communication. We analyzed the cerebral metabolites of germ-free (GF) mice and conventionalized (CV) mice, which were inoculated with a suspension of feces obtained from specific pathogen-free mice, using capillary electrophoresis with time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS). CE-TOFMS identified 196 metabolites from the cerebral metabolites in both GF and CV mice. The concentrations of 38 metabolites differed significantly ($p < 0.05$) between GF and CV mice.