

課題番号 : 28指2401

研究課題名 : 腸内細菌ゲノムデータベース構築から疾患と腸内細菌との関連を解明する研究: Human Microbiome Cohort Study

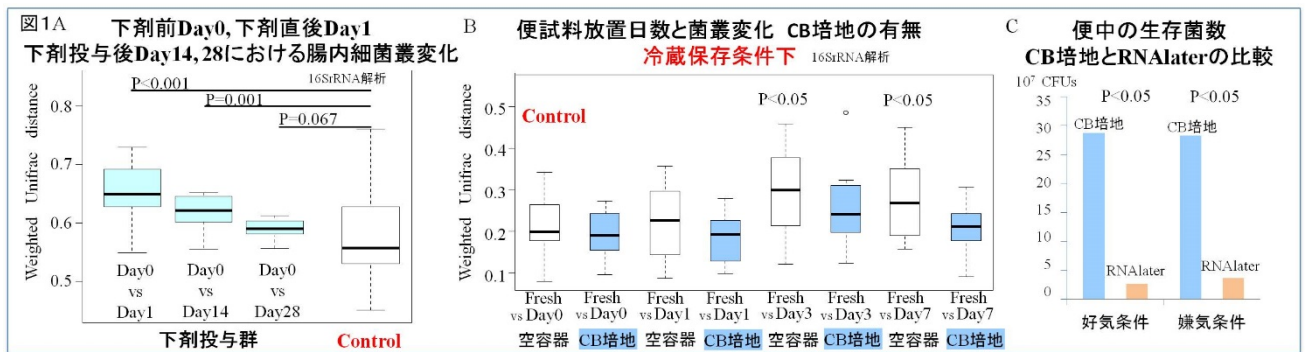
主任研究者名 : 永田尚義

分担研究者名 : 秋山徹、永田尚義

キーワード : 腸内細菌、メタゲノム解析、便サンプリング法、便保存法

研究成果 :

便採取・保存法に関するプロトコル確立と生菌培養向上を目指した予備研究を行った(論文投稿中)



多数の被験者から便試料を簡易的に収集でき、かつ腸内細菌叢の安定性が保証できるような便採取法、保存方法を確立するため予備研究を行った。

大腸内視鏡検査前の下剤直後の便は、病院で回収が可能であり、すぐに冷凍保存できる利点がある。しかし、下剤による腸内細菌や代謝物質への影響は不明であった。下剤処置のないコントロールの細菌叢の経時変化と下剤投与前後の経時的変化を比較すると、コントロールよりも下剤直後の便は unifrac distance 値は高く菌叢が有意に異なっていた(図 1A)。下剤後、時間の経過と共に菌叢変化はコントロール近づく傾向があったが、28 日後でも下剤の影響が残っている事が分かった。Metabolome 解析でも同様であり、20 種類の代謝物質が下剤直後の便で変化した。以上から、腸管洗浄後直後の便は Microbiome・Metabolome 研究には適さず、便採取は腸管洗浄液内服前に行うことが望ましいと分かった。次に、自宅で排便した場合、便試料は室温保存または冷蔵保存いずれにすべきか?、排便後どのくらいの期間放置できるのか?を検証した。また、生菌の分離にも対応できる可能性のある Cary-Blair (CB) 培地における保存法の有効性も検証した。CB 培地は、古くから細菌培養の保存・輸送で使用されてきたが、メタゲノム解析での有効性は証明されていなかった。冷蔵保存の検討(図 1B): 保存液のない空容器では、コントロール(新鮮便と-80℃保存便の一致度)と比較し 3 日目から有意差を認めた。一方、CB 培地入り容器(青)では 7 日目まで有意差を認めなかった。室温保存の検討では、空容器ではコントロールと比較し、1 日目から有意差を認めたが、CB 培地入り容器では、3 日目から有意差を認めた。以上の結果から、保存液がない容器で便を採取する場合、冷蔵では 1 日、室温では排便当日に解析場所まで持参する必要性が判明した。一方、CB 培地容器は、保存過程による特定の細菌変化を抑制するため空容器と比較し長い保存が可能であり、低コスト(50 円/本)な点も踏まえると多くの施設で利用でき、大規模腸内細菌研究に使用できると考えられた。最後に、CB 培地と RNA later 保存液において冷凍保存された糞便中の生菌数を調べたところ、好気・嫌気条件ともに CB 培地の方が生菌分離数が高かった(図 1C)。CB 培地は責任細菌種の分離培養ができる可能性があることを示唆しており、無菌マウスへの投与実験にも発展できると考えられた。申請者は、分離培養を想定し、後述する 4,000 例の糞便は、CB 培地の保存に加え、保存液なしでも凍結保存している。

「日本人の腸内・口腔内微生物叢データ構築」を開始しており。現在までに約 3700 例の臨床情報の付随した便試料があり、2,400 例のショットガンシーケンスが終了している。データベースから健常人の腸内細菌を解析したところ、優先属は、Bacteroides、Blautia、Bifidobacteriumであった。年齢、性別、様々な食習慣、アルコール摂取が菌種組成に影響を及ぼすことも示した。

Subject No. : 28-2401

Title : The gut microbiome and colorectal disease: A human microbiome cohort study

Researchers : Nagata Naoyoshi, Tohru Miyoshi-Akiyama

Key word : Cary-Blair transport medium; RNAlater; fecal sampling; fecal storage; bacterial survival rate; microbial diversity; room temperature; liquid nitrogen snap freezing; freeze–thaw cycle

Abstract :

Background: The proper transport and storage of feces is important in microbiome studies. However, how long fecal samples can withstand a period of refrigeration or room temperature, and the appropriate preservative, are largely unknown. Cary–Blair transport medium has been used for many years because it is inexpensive (less than US\$0.50) and prevents bacterial overgrowth. However, its effectiveness for metagenomic analyses has never been tested. To facilitate hospital-based or epidemiological microbiome studies, we determined the effects of the storage time, storage temperature, and Cary–Blair medium on the stability of the human gut microbiota.

Methods: Gut microbial compositions were compared using a 16S rRNA sequence analysis after storage with different methods. The effects of Cary–Blair medium on the microbiota were also analyzed.

Results: The microbial compositions of samples left at 4 °C for 3 or 7 days or at 25 °C for 1, 3, or 7 days differed significantly from the reference sample (–80 °C storage), whereas samples stored in Cary–Blair remained unchanged for longer periods (7 days at 4 °C and 24 h at 25 °C). The relative abundances of phylum *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*, and genera *Bacteroides* and *Bifidobacterium* changed significantly at 25 °C, whereas Cary–Blair medium inhibited the reduction in phylum *Bacteroidetes* and genera *Bacteroides* and the increase in phylum *Actinobacteria* and genera *Bifidobacterium*. The bacterial survival counts were significantly lower in the RNAlater samples than in the Cary–Blair samples under aerobic and anaerobic culture conditions.

Conclusions: Storage time and storage temperature significantly affect the gut microbial composition in fecal samples. Given the low cost, inhibitory effect on bacterial changes, and potential utility in bacterial isolation, Cary–Blair medium containers are suitable for large-scale or hospital-based microbiome studies, especially if direct freezing at –80 °C is unavailable.

課題番号 : 28-2401

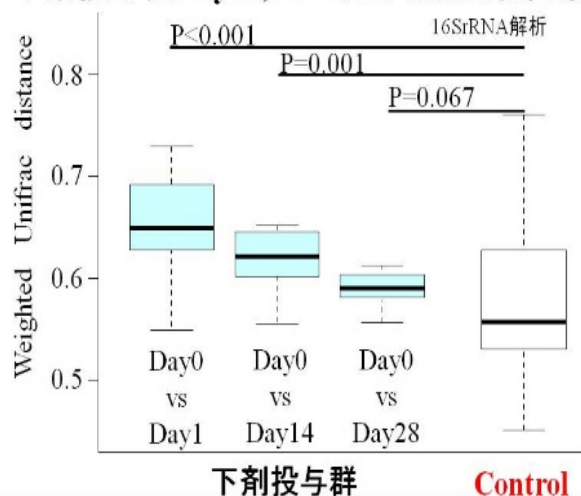
研究課題名 : 腸内細菌ゲノムデータベース構築から疾患と腸内細菌との関連を解明
する研究 : Human Microbiome Cohort Study

主任研究者名 : 永田尚義 分担研究者名 : 永田尚義、秋山徹

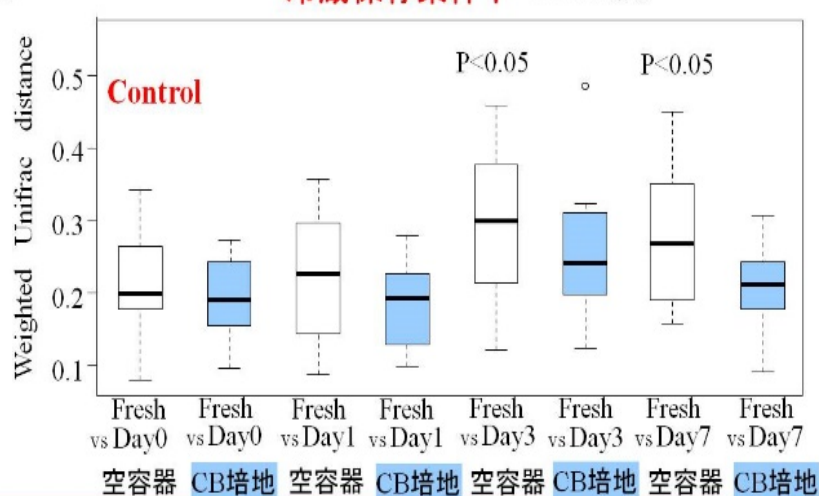
これまでにおこなったこと

1. DNA抽出法の違いによる腸内細菌叢の検討 DNA抽出法の確立 (2016)
2. 保存容器、保存方法による腸内細菌叢の影響 サンプル法の確立 (2017)
3. 下剤内服による腸内細菌叢の影響 サンプル法の確立 (2017)
4. ショットガンメタゲノム解析による日本人健常人における腸内細菌叢(2017)

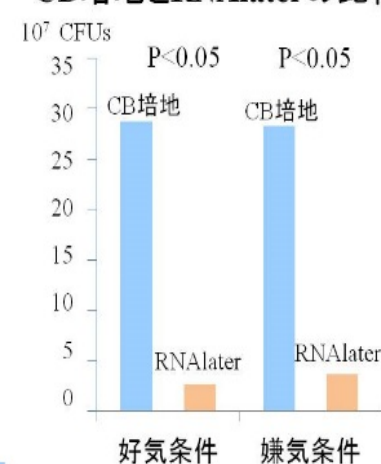
図1A 下剤前Day0,下剤直後Day1
下剤投与後Day14,28における腸内細菌叢変化



B 便試料放置日数と菌叢変化 CB培地の有無
冷蔵保存条件下 16S rRNA解析



C 便中の生存菌数
CB培地とRNAlaterの比較

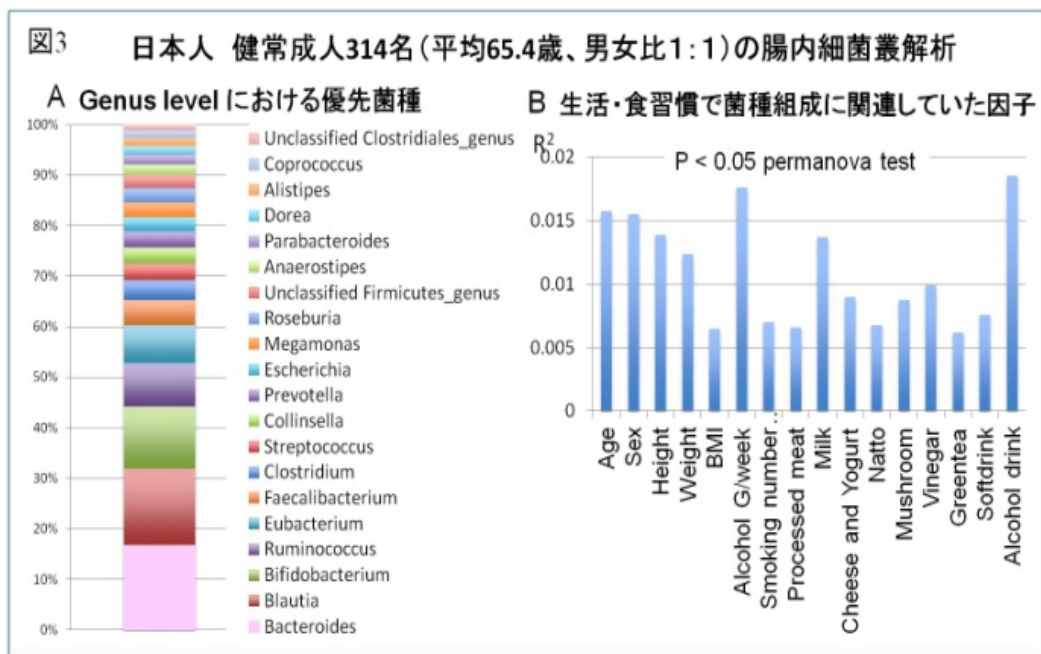


多数の被験者から便試料を簡易的に収集でき、かつ腸内細菌叢の安定性が保証できるような便採取法、保存方法を確立するため予備研究を行った。

大腸内視鏡検査前の下剤直後の便は、病院で回収が可能であり、すぐに冷凍保存できる利点がある。しかし、下剤による腸内細菌や代謝物質への影響は不明であった。下剤処置のないコントロールの細菌叢の経時変化と下剤投与前後の経時的変化を比較すると、コントロールよりも下剤直後の便はunifrac distance値は高く菌叢が有意に異なっていた(図1A)。下剤後、時間の経過と共に菌叢変化はコントロール近づく傾向があったが、28日後でも下剤の影響が残っている事が分かった。Metabolome解析でも同様であり、20種類の代謝物質が下剤直後の便で変化した。以上から、腸管洗浄後直後の便はMicrobiome・Metabolome研究には適さず、便採取は腸管洗浄液内服前に行うことが望ましいと分かった。

次に、自宅で排便した場合、便試料は室温保存または冷蔵保存いずれにすべきか？、排便後どのくらいの期間放置できるのか？を検証した。また、生菌の分離にも対応できる可能性のあるCary-Blair(CB)培地における保存法の有効性も検証した。CB培地は、古くから細菌培養の保存・輸送で使用されてきたが、メタゲノム解析での有効性は証明されていなかった。冷蔵保存の検討(図1B)：保存液のない空容器では、コントロール(新鮮便と-80℃保存便の一致度)と比較し3日目から有意差を認めた。一方、CB培地入り容器(青)では7日目まで有意差を認めなかった。室温保存の検討では、空容器ではコントロールと比較し、1日目から有意差を認めたが、CB培地入り容器では、3日目から有意差を認めた。以上の結果から、保存液がない容器で便を採取する場合、冷蔵では1日、室温では排便当日に解析場所まで持参する必要性が判明した。一方、CB培地容器は、保存過程による特定の細菌変化を抑制するため空容器と比較し長い保存が可能であり、低コスト(50円/本)な点も踏まえると多くの施設で利用でき、大規模腸内細菌研究に使用できると考えられた。

最後に、CB培地とRNAlater保存液において冷凍保存された糞便中の生菌数を調べたところ、好気・嫌気条件ともにCB培地の方が生菌分離数が高かった(図1C)。CB培地は責任細菌種の分離培養ができる可能性があることを示唆しており、無菌マウスへの投与実験にも発展できると考えられた。



日本人の腸内・口腔内微生物叢データ構築を開始しており、現在までに約3,700例の臨床情報の付随した便試料、2,400例のショットガンシーケンスが終了している。

データベースから健常人の腸内細菌を解析したところ、優先属は、*Bacteroides*、*Blautia*、*Bifidobacterium*であった。服部研から報告された106名の健常人データでは、平均年齢32歳であったが(DNA Res. 2016;23:125)、年齢層が異なる別集団で解析しても、優先属は一致していることを示した。また、年齢、性別、様々な食習慣、アルコール摂取が菌種組成に影響を及ぼすことも示した。

課題番号 : 28指2401

研究課題名 : 腸内細菌ゲノムデータベース構築から疾患と腸内細菌との関連を解明する研究: Human Microbiome Cohort Study (臨床班)

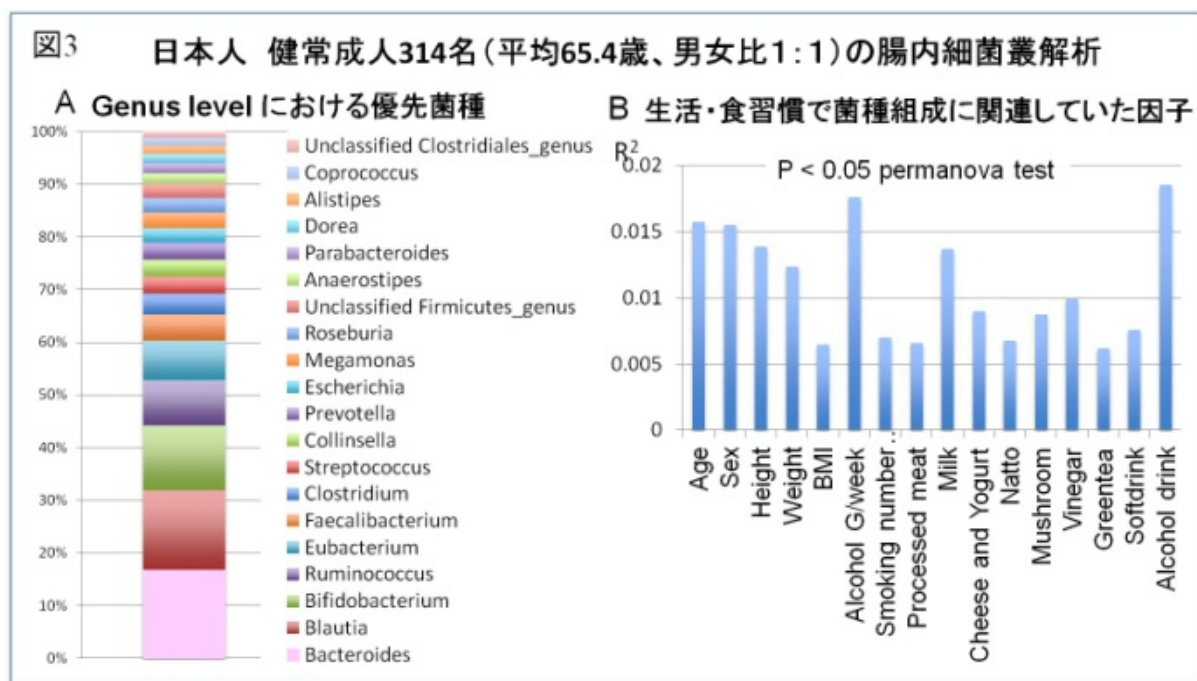
主任研究者名 : 永田尚義

分担研究者名 : 永田尚義

キーワード : 腸内細菌、メタゲノム解析、健常日本人腸内細菌叢

研究成果 :

健常日本人の腸内細菌ショットガンメタゲノム解析による予備研究を行った。



「日本人の腸内微生物叢データ構築」を開始してから現在までに約 3,700 例の臨床情報の付随した便試料が存在し、2,400 例のショットガンシークエンスが終了している。データベースから健常人の腸内細菌を解析したところ、優先属は、*Bacteroides*、*Blautia*、*Bifidobacterium*であった(図 3A)。服部研から報告された 106 名の健常人データでは、平均年齢 32 歳であったが(DNA Res. 2016;23:125)、年齢層が異なる別集団で解析しても、優先属は一致していることを示した。また、年齢、性別、様々な食習慣、アルコール摂取が菌種組成に影響を及ぼすことも示した(図 3B)。

今後

2018 年度は 3000 例のショットガンメタゲノムデータから臨床因子とくに疾患や薬剤使用と腸内微生物叢との関連を明らかにしていく。

ヒト腸内の菌種組成や機能組成は個人間の多様性が高いため、十分な被験者数が必要である。2016 年、ヨーロッパ在住被験者の糞便試料(N=1,135)を用いて、臨床因子と腸内細菌遺伝子との関連が報告されているが(Science 2016;352:565)、1,000 例以上のメタゲノム解析はこの他にはない。本研究では、過去の研究と比較し、症例数も倍以上であり、消化管の内視鏡診断が付随している点、微生物叢に影響を及ぼす抗生剤、抗真菌薬、抗ウイルス薬など詳細な薬剤情報を収集している点、過敏性腸症候群などの消化器症状や便性状の評価をしている点が特色である。一方、大規模メタゲノム解析から薬剤使用と腸内細菌叢変化を検証した報告は国内外をみても皆無である。

研究目的

1. 日本人の腸内細菌ゲノムデータベースを構築する
2. 大腸疾患リスク、糖尿病リスクを腸内細菌から明らかにする
3. 病気の悪化(重症化、再発)と関連する腸内細菌を明らかにする

これまで行ったこと

- DNA抽出プロトコル変更後の東大データとの比較検討
- サンプル採取からDNA抽出工程までの諸条件における細菌叢への影響の評価
- メタゲノム情報と基本情報および食事の相関解析

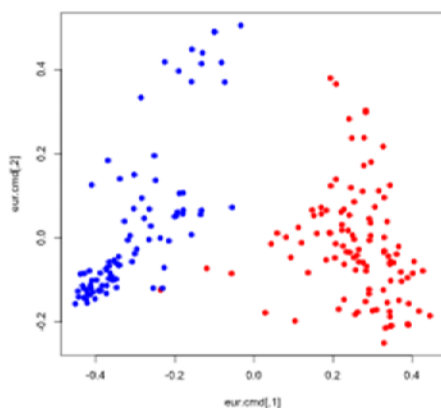
解析手順変更後の比較検討

- DNA抽出法: 服部研の酵素法に変更
- 取得データ量: 0.2Gから1Gへ変更

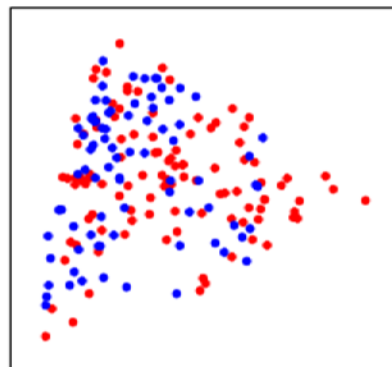
➡ 服部研106人とNCGM80人のメタゲノムデータを比較 (PCoA解析)

- NCGM 80名
- 東京大学 106名

前回の抽出法での成績



今回の成績



東大の方法と同じ方法でDNA抽出を行ったところ両データの相関性が改善された

現在の解析状況

- DNA抽出済みの検体数：3401検体
 - DNAデータの取得済みの検体数：2347検体
(他国の例と比較しても遜色のない検体数)
- ➡
1. 400検体でサンプリング法の検証
 2. 2347検体で日本人集団の大規模解析

メタゲノム情報との相関解析

	解析項目								
	年齢	性別	BMI	体重	身長	飲酒の有無	飲酒の頻度	喫煙の有無	抗菌剤の有無
Genus	0.00799	0.1249	0.4775	0.2218	0.06993	0.04595	0.01798	0.4076	0.004995
Species	0.001998	0.1149	0.6703	0.1908	0.01099	0.004995	0.002997	0.5604	0.01499

	解析項目							
	米	パン	麺	野菜	果物	魚介	肉	加工肉
Genus	0.05195	0.6553	0.3417	0.02797	0.03297	0.1888	0.1778	0.4745
Species	0.002997	0.2398	0.7712	0.06993	0.007992	0.5514	0.2977	0.3467

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 28-2401

研究課題名： 腸内細菌ゲノムデータベース構築から疾患と腸内細菌との関連を解明する研究：Human Microbiome Cohort Study

主任研究者名：永田尚義

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
メタゲノムデータを用いた日本人腸内細菌叢と食・生活習慣の関連解析	遠矢 真理, 西嶋 傑, 永田 尚義, 須田 互, 秋山 徹, 秋山 純一, 大杉 満, 上村 直実, 服部 正平	日本細菌学会	福岡	2018年3月
ショットガンメタゲノム解析による腸内細菌と消化器疾患との関連	永田尚義, 遠矢真理, 秋山徹, 西嶋傑, 須田互, 秋山純一, 上村直実, 服部正平	第62回日本人類遺伝学会	神戸	2017年11月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
腸内細菌大規模データベース化	永田尚義	毎日新聞	新聞誌	2016年9月23日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと