



シリーズ 腸内細菌叢 12

腸内細菌叢の解析法の進歩

Advances in gut microbiome analysis

たか やす れ な ます おか ひろ あき す だ わたる
 高 安 侖 奈^{1,3)} : 増 岡 弘 晃²⁾ : 須 田 互³⁾
 Lena TAKAYASU Hiroaki MASUOKA Wataru SUDA

はじめに

我々ヒトを含む動物の皮膚や粘膜面には膨大な数の細菌群が常在しており、この細菌群のことを常在細菌叢と呼んでいる。ヒト常在細菌叢（マイクロバイオーム）の中でも特に大腸の細菌叢（腸内細菌叢）を構成する細菌の種類は約 1,000 種、その総菌数はヒト一人あたり約 40 兆個にも及び、これは約 30 兆個と見積もられる宿主の細胞数を上回っている¹⁾。

これまでの研究から腸内細菌叢はさまざまな生活習慣病^{2,3)}（肥満、糖尿病など）、年齢^{4,5)}、食事⁶⁾、概日リズム⁷⁾等によって変容・変動し、腸内細菌叢と宿主の広範囲な生理状態の間に密接な関係があることが明らかとなってきた。本稿では、これまでの腸内細菌叢研究の変遷の歴史を振り返りつつ、最新の技術・研究についても紹介する。

I. 腸内細菌叢研究の始まり

腸内細菌の研究は、17 世紀後半に「微生物学の父」と呼ばれる Leewenhoek が、手製の顕微鏡を用いて糞便中から微生物を発見したことに端を発する。しかしながら、研究が本格的に開始されたのはそれから約 150 年後のことであった。19 世紀になり、Koch や Pasteur により純粋培養法や滅菌法といった技術が開発され、細菌学の基礎が確立した。その後、ヒト糞便より大腸菌、乳児糞便よりビフィズス菌⁸⁾、

および *Lactobacillus acidophilus* の分離がなされた⁹⁾。また、Mechnikov はブルガリア地方には長寿者が多く、ヨーグルトがよく摂取されていることに着目した。彼は老化の原因の一つが腸内にある腐敗細菌の産生する毒素であり、ヨーグルトの摂取によって腐敗細菌の働きを抑制することで長寿を保つことができるという仮説を立て、1907 年に“The Prolongation of Life”を執筆した¹⁰⁾。このとき、「腸内細菌叢のバランスを改良し生体に良い影響を与える細菌」、すなわち“probiotics（プロバイオティクス）”の考え方が生まれたと考えられる。

1950 年代になり、腸内の細菌を集団として捉えた研究、つまりは腸内細菌叢の研究が本格的に始まった。腸内細菌叢の研究を始めるに当たって、まずは腸内細菌の培養法が各国の研究チームによって検討された。そのうちの一人であった Mitsuoka らは、1960 年代に 4 種類の非選択培地と 10 種類の選択培地を併用する、腸内細菌の包括的分離培養法を確立した¹¹⁾。この方法の開発により、最優勢菌から腸内にわずかししか存在していない細菌まで、糞便中の細菌を幅広く検出できるようになった。

また、Reyniers を始めとする研究チームによって無菌動物飼育装置が開発された¹²⁾。これによって、無菌動物の飼育および、無菌動物に既知の細菌（群）のみを定着させたノトバイオート動物の確立が可能となった。ノトバイオート動物では、目的の細菌（群）が宿主の生理作用に与える影響を明らかにすることができ、病原細菌の発病や病態の研究においても有

1) 東京大学大学院 医学系研究科 国際保健学専攻 人類生態学教室

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

2) 東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医学専攻

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

3) 理化学研究所 生命医科学研究センター
 マイクロバイオーム研究チーム

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22

1) Department of Human ecology, School of International Health, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo (7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo)

2) Department of Veterinary Medical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo (1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo)

3) Laboratory for Microbiome Sciences, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (1-7-22 Suehirocho, Tsurumi-ku, Yokohama)

用である。また、無菌動物に糞便懸濁液を経口投与することにより、腸内細菌叢を無菌動物の腸内に移植することができる。完全な再現はできない場合もあるが、腸内細菌叢研究において重要な *in vivo* モデルの一つである。

このように、多くの研究者の貢献により腸内細菌学が樹立し、さらにはさまざまな技術培養を介した解析技術および無菌動物の開発によって、腸内細菌叢の研究が大きく進展していくこととなった。

II. 解析技術の向上 (NGS の登場)

しかしながら、1980年代に入ると、顕微鏡下で環境試料から観察される細菌のバリエーションに対し、培養できる菌の量が遥かに少ないこと¹³⁾が明らかになり、培養を介する解析手法は細菌叢の全体構造の網羅的な解析には十分でないことが明らかになった。また、培養を介する解析手法には莫大な労力や時間、および熟練した技術が要求されるといった問題があることがかねてより明らかになっていった。このため、培養を介さずにマイクロバイーム全体から直接抽出したDNAに対し、網羅的な配列決定を行う解析手法が必須となった。しかし、ヒト常在細菌叢を構成する菌種は多様であり、個人間差も大きいことから、非常に多くの配列を解析する必

要がある。そのため、当時の技術ではヒト常在細菌叢の解析には膨大な時間・コストがかかり、重大な課題となっていた。

2005年以降、サンガー法に基づく従来のシーケンシング技術とは原理の異なる次世代シーケンサー (Next generation sequencer: NGS) が開発された。NGSの登場により、DNA塩基配列の読み取り効率が飛躍的に向上し、解析コストが低下したことから、現在ではヒト常在細菌叢に関する研究が非常に活発化している。

III. バイオインフォマティクスを用いた解析技術

ここでは、NGSを用いて常在細菌叢を解析する際、一般的に使われる手法について紹介していく。

1. メタ 16S 解析

16S解析 (16SrRNA系統解析) は、現在最も多くの細菌叢研究で用いられている方法で、細菌叢を構成する細菌の種類と組成比を、比較的安価で簡便に調べることができる (図1)。16S解析では、全ての細菌に共通して存在する必須遺伝子の一つである16S rRNA遺伝子を標的にしてPCR増幅を行い、NGSで網羅的にシーケンスする (アンプリコン

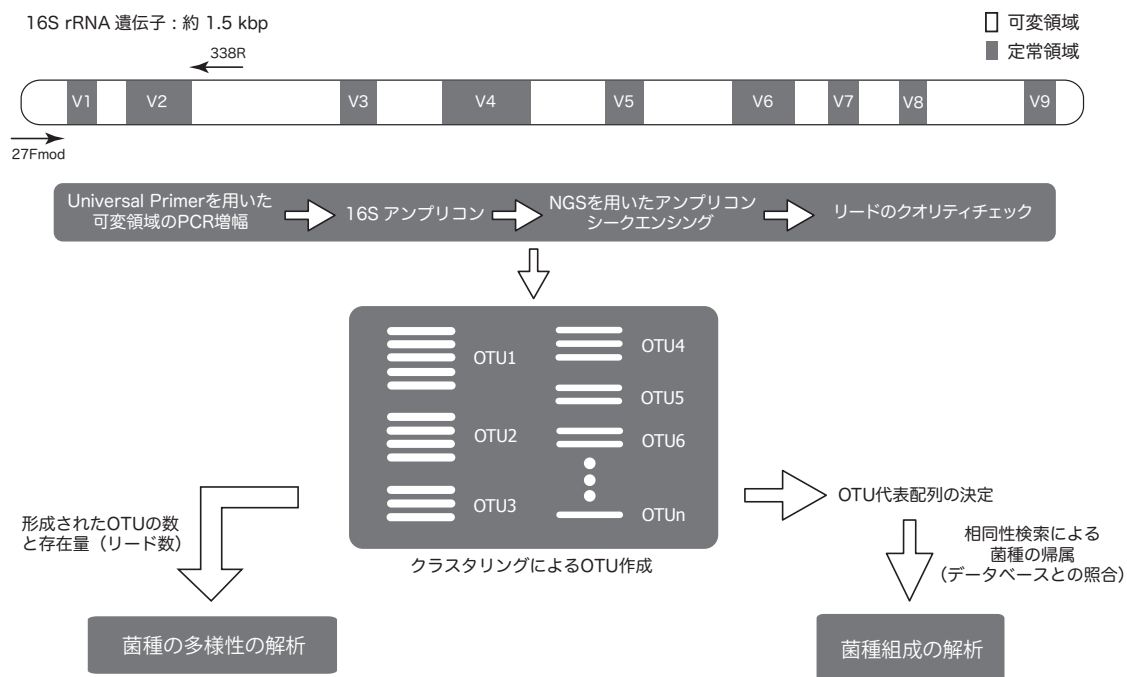


図1 NGSを用いた16S rRNA遺伝子解析 (メタ16S解析) の概念図

シーケンシング)。この遺伝子は長さ 1,500 塩基程度で、リボソーム RNA 分子の 2 次構造の維持に関わる菌種間の保存性の高い定常領域と、二次構造への影響が少なく菌種毎に配列が異なる可変領域が交互に存在する。この特徴を利用して、全ての細菌種を対象にしたプライマー (Universal primer) を用いて PCR 増幅し、その増幅領域中に含まれる可変領域の DNA 配列の差異に基づいて、菌叢を構成する細菌の種類と相対存在量を知ることができる。また、NGS では 1 稼働で大量のリードが得られるため、検体特有のバーコード配列を付加した PCR 産物を用いることで、複数検体を同時にシーケンスすることができる。

得られたリードはクオリティチェックの後、リード同士の相同性を基にクラスタリングされ、OTU (Operational Taxonomic Units : 分類学的操作単位) と呼ばれるクラスターに分類される。特に相同性 97% の OTU は分類学上の種に相当する分類として扱われることが多く、その代表配列をデータベース

に照会することで、菌種帰属を行う。すなわち、一検体から形成される OTU の数はその検体を構成する細菌種の数に相当し、各 OTU に含有されるリードの量はその菌種の存在量に相当すると考えられる。

メタ 16S 解析については QIIME と呼ばれる解析ツールも公開されており、得られた次世代シーケンサーのデータから、比較的簡単に、16S データのクオリティチェックや、OTU 解析を行うことができる。

2. メタゲノム解析

前節で紹介したメタ 16S 解析はコストが安く多用される一方、菌叢全体が持つ遺伝子機能に関する直接的な情報を得ることはできなかった。一方で、菌叢ゲノム DNA をランダムに断片化し、網羅的な配列決定 (Whole Genome Shotgun Sequencing) を行うメタゲノム解析では、機能遺伝子を含むゲノム全体を包括的に取得し解析するため、菌叢全体のもつ機能についての知見を得ることが可能となる (図 2)。

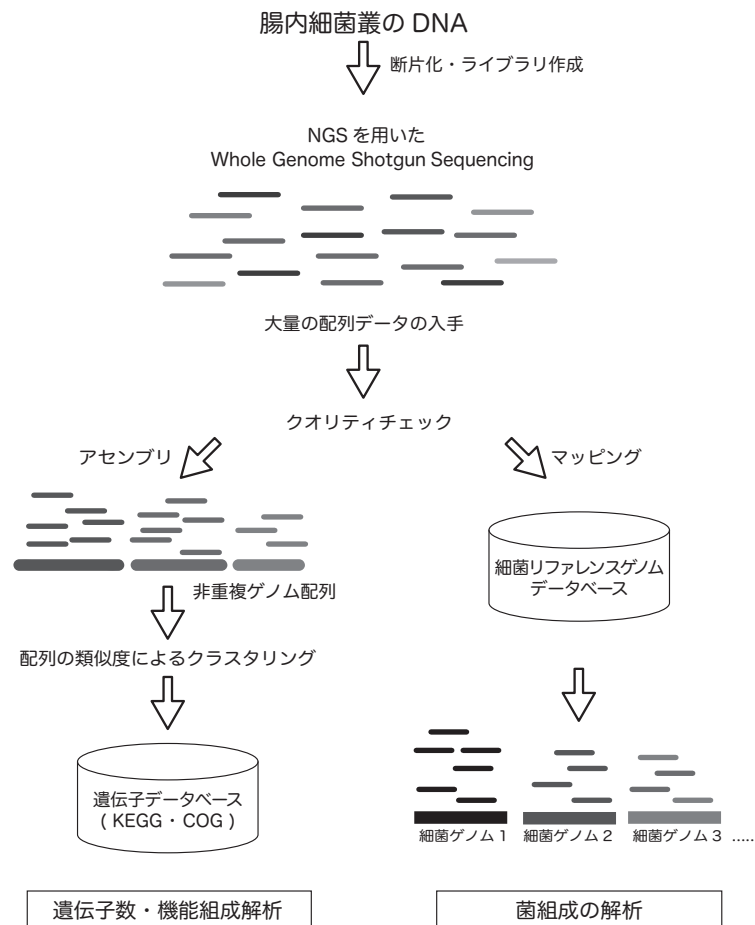


図 2 NGS を用いたショットガンメタゲノム解析の概念図

ショットガンシーケンシングで得られたリードは、クオリティチェックの後、リードを直接バクテリアのゲノム配列データベースに照合(マッピング)したり、系統的指標となる遺伝子の解析を行うことで細菌の種類と量について、16S解析と同様の情報を得ることができる。一方で、クオリティチェック後にアセンブリと呼ばれる操作を経て、数十~数百bpの短いリードから数千~数万bpの長い塩基配列(コンティグ)に再構築し、そこに含まれる遺伝子配列を機能遺伝子データベースに照合することで、菌叢に含まれる遺伝子の種類と量についても知ることができる。

メタゲノム解析では、バクテリアの全ゲノムの情報を利用するため、同じ種由来と推定されるコンティグを集め疑似的なゲノムを構築するビニングと呼ばれる手法や、ゲノムの複製開始点からの距離によりマッピングされるリード数が異なることを利用した iRep¹⁴⁾ 等の増殖速度の推定手法など、新しい解析手法も開発されつつある。また、検体に含まれている全てのDNAを解析対象にするため、バクテリア以外に、ウイルスや古細菌、宿主のゲノムが観測される場合がある。このような潜在的な情報の多さから、メタゲノム解析は技術の進歩とともに、より多くの研究で使われるようになってきている。

3. 種の多様性

16S解析やメタゲノム解析で得られた菌叢構造の特徴を定量的に調べる際、代表的な指標としてまず種の多様性を調べることが多い。ある一つの環境における種の多様性をアルファ多様性と呼び、異なる検体間での構成種の多様性をベータ多様性と呼ぶ。

アルファ多様性を説明する指標は、種の豊富さ (richness) と均等さ (evenness) に基づいて定義される。基本的に種が多ければ多いほど多様であると言えるため、richnessが高いほど多様性指数は高くなる。前述した種数や OTU 数がこの指標に該当する。また同じ種数であっても、どれか一種がほとんどの割合を占める群集よりも、それぞれの種が同等の個体数の群集の方が、より多様性指数が高いと考えられる。このような evenness を加味した多様性指数としては、Shannon の多様度指数や Simpson の多様度指数などが代表的である。環境に比べると腸内に存在する細菌叢は密度が非常に高い一方で、

アルファ多様性が低いことが特徴とされる。現在知られているバクテリア 55 門のうち、腸内で観測されるのが 10 門弱、そのうちよく見られるものは 3 ~ 4 門に限られる¹⁵⁾。

ベータ多様性を考える時には、検体毎の菌叢構造の類似度・距離に基づいた解析が行われる。16S解析では、この構造類似度を OTU の代表配列の相同性に基づいて決定する UniFrac 解析¹⁶⁾ が汎用される。UniFrac 解析では、形成された各 OTU の代表配列を用いて系統樹を作成し、各検体間で共有している枝の長さ、検体毎に固有の枝の長さの比率から検体間の違いの大きさを 0-1 までの間の距離として求める (UniFrac 距離)。すなわち、2 つの菌叢間の UniFrac 距離が 0 の場合は菌叢構造が 100% 一致しており、逆に 1 に近ければ二者の菌層構造は完全に異なっていることを意味する。また、菌種組成比に基づく数学的な距離としては、Bray-Curtis 距離や Jaccard 距離が用いられることが多い。OTU を構成しないで解析するメタゲノム解析においては、しばしばこのような数学的定義の距離が用いられる。各検体間で得られた菌叢距離を用いて主座標分析 (Principle Coordinate Analysis : PCoA) を行うことで、各検体の類似性を視覚化することも可能である。また、PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) 等を用いて群間・群内距離に基づいた統計検定を行うことができる。

4. 群比較

宿主の生理状態と常在細菌の関係を調べる多くの研究では、健常者群と疾患群などの群ごとに特徴的な腸内細菌種を特定することを目標の一つとしている。今までに多くの疾患で健常者と腸内細菌が異なる様子が観察されているが^{17~20)}、そのような腸内細菌叢異常 (dysbiosis) は、疾患の診断に役に立つのみならず、予防や治療に役立つ場合もある。

群毎の菌叢構造の全体的な差異については、上述のベータ多様性の記述を参照されたい。しかし、疾患に関連する細菌種は、優占種であるとは限らないため、菌叢全体の距離を使った解析では結果が出にくい場合もある。たとえば組成比の重みをつけた菌叢距離 (重み付き距離) ではベータ多様性に差が見られないが、共通する種数に基づく菌叢距離 (重みなし距離) を使う場合には差がつく場合や、全体的

な差異は見られないものの、個別の菌種では差がある場合などがある。個別の分類群の比較では、16S解析やメタゲノム解析で得られる細菌叢データが組成比であること、リード数の少ない分類群はシーケンサーエラーを含む可能性があること、個々の分類群に含まれるリード数の分布は正規分布とは限らないことなどを考慮する必要がある。相対存在比の少ない分類群を解析から除外することや、ノンパラメトリックな統計手法を用いることで対応することができるが、群間比較解析では、LEfSeなどのツールも公開されており (URL : <https://bitbucket.org/biobakery/biobakery/wiki/lefse#rst-header-lefse-bitbucket>)、得られた細菌叢データからのバイオマーカーの探索などが簡単に行えるため、それらを利用して良い。また、ランダムフォレストやROC曲線など機械学習を利用してバイオマーカーとなりうる細菌群を特定することも可能である²¹⁾。

また、群間で差がある細菌群が疾患の原因である可能性が疑われる場合は、候補となった細菌群を単離培養して無菌マウスに移植したり、通常のマウスに抗生剤等を用いて候補菌を残すような選択圧をかけるようなマウス実験を繰り返すことで、因果関係を確認していく²²⁾。

5. 時系列解析

ヒト常在細菌叢は、数時間～数年のタイムスパンでさまざまに変動することがわかっている。たとえば、腸内や口腔細菌叢では日常的に概日リズムに従った菌叢変動が起きており^{7, 23)}、加齢とともに菌叢構造が変化する可能性も指摘されている^{24, 25)}。一方で刺激等に応答した常在細菌叢の短期的な変化も報告されており、たとえば、食事を低脂肪/高脂肪食に制限すると、1日で腸内細菌叢構造が有意に変化する⁶⁾。

このように、常在細菌叢は特に明確な刺激がなくても時間とともに徐々に変化しており、日常的な行動等に刺激される短期的な変動も伴う。常在細菌叢の時間的な変動を追う研究は、群間比較を主眼にした研究に比べて少ないが、常在細菌叢の日常的な揺らぎや食事の影響などについて理解することは、群間比較研究においても重要となる。たとえば、概日リズムの影響を避け、なるべく同時刻の検体を収集することで、より鮮明に群間比較を行うことができ

るようになる。

また、抗生物質の投与や、健常者の便を移植する便移植治療などによる菌叢変動について予測・モデル化する試みも進んでいる²⁶⁾が、細菌叢の時間的な変化を予測することは未だ困難である。数理的な細菌叢のモデル化が発展することで、個人間差の高い個々の腸内細菌叢に対して最適な制御を行うことができるようになるだろう。

IV. 次世代の解析技術

NGSを用いたメタゲノム解析手法によるメタゲノム解析が導入されたことにより、現在では世界各国で大規模な解析が行われている。これまでに行われてきた主要なメタゲノム解析によって、腸内細菌叢の疾患との関連、国レベルでの多様性、腸内細菌叢の持つ遺伝子の多様性、など重要な知見が得られてきた。これらの報告は1リードの読み取り塩基長が300base程度のショートリードNGSで行われた解析である。これらのショートリードシーケンサーは低コストで大量の配列データを生産できる利点があるが、そこから得られるコンティグは非常に断片的なものであり、個々の細菌ゲノムの全体構造を再構築し構造を知ることは困難である。更に断片化されたLinearの状態のコンティグを、細菌の染色体、プラスミドあるいはPhageと見分けるのは非常に困難であり、従来のメタゲノム解析は染色体とこれらの染色体以外のextrachromosomal genetic elementsを層別化できていない。

一方で、近年、1リードの読み取り塩基長が10kbaseを超えるlong read NGSが開発され、その性能が日進月歩で向上している。これらのシーケンサーは、現状では塩基配列の読み取り精度が高くないことや、得られるリード数がショートリードシーケンサーに比較して少ない課題はあるが、1リードが数kbase以上という長鎖を読み取り可能なので、アセンブルを行うことで、腸内細菌叢を構成する細菌ゲノムやプラスミドなどをより完全に近い状態で決定できることが証明されつつある²⁷⁾。

おわりに

上述してきたとおり、近年、腸内細菌の研究は飛

躍的に進展しており、われわれ人にとって重要な新知見が次々と明らかにされている。特に NGS を応用したメタゲノム解析は研究の大きな推進力になっている。

しかしながら、これらの配列データに基づく解析は、得られた結果の解釈をデータベースに依存していることから、データベースの充実度が解析精度に直結する性質をもつ。ヒト常在細菌叢に関しては 2008 年ごろから International Human microbiome consortium (IHMC: <http://www.human-microbiome.org/>) が立ち上がり、世界規模で常在細菌の分離培養およびゲノム解読によるデータベースの拡充を進めた。これらによって今日では得られた大半のデータがデータベースサーチにより解釈可能になっている。しかしながら、各細菌株レベルでのゲノムの差異や、プラスミドなどの extrachromosomal genetic elements の共同に関しては、未解明な部分が多い。特に、腸内細菌叢に含まれる Phage/virus (virome) に関してはほとんどその実態が明らかにされていないまま、研究が進んでいる現状がある。

今後、シーケンス技術と Bioinformatics の向上により、これらの未解明部分を含め真のヒト常在細菌叢の全体構造が解明されることを期待したい。

文 献

- 1) Sender R, et al. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 2016; **164** (3): 337-340.
- 2) Turnbaugh PJ, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009; **457** (7228): 480-484.
- 3) Clemente JC, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 2012; **148** (6): 1258-1270.
- 4) Koenig JE, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011; **108**. (Supplement 1) : 4578-4585.
- 5) YATSUNENKO, Tanya, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature*, 2012, **486**. 7402: 222-227.
- 6) Wu GD, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 2011; **334** (6052): 105-108.
- 7) Thaiss CA, et al. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, 2014; **159** (3): 514-529.
- 8) Tissier H. Etude sur la flore intestinale des normale nourissons (Etat normal et pathologique). Garré et Naud. 1900, Paris
- 9) Moro E. Uber den Bacillus acidophilus n. sp. *Jahrb. Kinderheilk*, 1900, **52**: 38-55.
- 10) Metchnikoff E. *The prolongation of life*. 1907. New York: GP Putman's Sons.
- 11) Mitsuoka T, 1970, International Congress on Nutrition.
- 12) Trexler PC and Reynolds LI, Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Applied microbiology*, 1957; **5** (6): 406.
- 13) Amann R, et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial media with water-insoluble substrates. *FEMS Microbiol. Rev*, 1995; **59** (1): 143-169.
- 14) Brown CT, et al. Measurement of bacterial replication rates in microbial communities. *Nature biotechnology*, 2016; **34** (12): 1256.
- 15) Bäckhed F, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005; **307** (5717): 1915-1920.
- 16) Lozupone C and Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; **71** (12): 8228-8235.
- 17) Arthur JC, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *science*, 2012; **338** (6103): 120-123.
- 18) Frank DN, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007; **104** (34): 13780-13785.
- 19) Ley RE, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. 2006; *Nature*, **444** (7122): 1022-1023.
- 20) Gonzalez A, et al. The mind-body-microbial continuum. *Dialogues in clinical neuroscience*, 2011; **13** (1): 55.
- 21) Iwasawa K, et al. Dysbiosis of the salivary microbiota in pediatric-onset primary sclerosing cholangitis and its potential as a biomarker. *Scientific reports*, 2018; **8** (1): 1-10.
- 22) Atarashi K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013 Aug 8; **500** (7461): 232-6.
- 23) Takayasu L, et al. Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome. *DNA Research*, 2017; **24**.3: 261-270.
- 24) Lozupone CA, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 2012; **489** (7415): 220-230.
- 25) Faith JJ, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 2013; **341** (6141): 1237439.
- 26) Stein RR et al. Ecological modeling from time-series inference: insight into dynamics and stability of intestinal microbiota. *PLoS computational biology*, 2013; **9** (12): e1003388
- 27) Suzuki Y, et al. Long-read metagenomic exploration of extrachromosomal mobile genetic elements in the human gut. *Microbiome*, 2019; **7** (1): 119.