

網羅的代謝プロファイリング手法を用いエネルギー代謝に

注目した高齢者腸内環境への介入研究

【助成対象者】

医療法人さわらび会 福祉村病院

(現職 名古屋市立大学大学院医学研究科 地域医療教育学/地域療養医学)

赤津裕康

【共同研究者】

国立長寿医療研究センター研究所 丸山 光生

静岡県立大学薬学部 (現職 立命館大学薬学部) 井之上 浩一

【研究の目的】

腸内環境が宿主に及ぼす影響はいまだ未知の領域であるが、細菌学、分子生物学と解析機器の進歩でその全貌の一部が解明されつつある。昨今、栄養学と医学の連携と共にプレ/プロバイオティックスを用いた研究が注目されている。昨今、我々の研究を含め、プレ/プロバイオティックス介入がホストの免疫機能改善に有効であるとの報告が多数なされている。今回、フィールドとなった福祉村病院は愛知県豊橋市にある高齢者・障害者施設群の中心的施設であり、長期間にわたり人工栄養で管理されている方も多い。

高齢者は慢性炎症性疾患に罹患しやすい状況になっている。また明らかにそのような疾患の罹患が認められなくとも、加齢により耐糖能障害や鉄代謝障害が発生することが知られており、その一部は慢性炎症状態の関与も示唆されている。

本研究ではエネルギー代謝に注目し、末期人工栄養高齢者に加え健常な若年者および高齢者も長期的には対象とし介入研究、観察研究をデザインし展開していく。

腸内細菌叢の状況把握は次世代シーケンサーの登場で状況は大幅に変わった。今回はその解析に加え、質量分析、メタボロミクスのアプローチから脂肪酸や胆汁酸という脂質代謝に関わる化合物から、炎症や糖代謝などを一括で解析できる分析技術の開発、実用応用も視野に入れヒト便のメタボローム解析の標準的手法の確立も目指しながら、ヒトの腸内細菌叢遺伝子解析結果との照合も行っていく。

【研究の成果】

1) 末期人工栄養高齢者への介入（臨床的効果に関して）

今回の介入試験ではまずプレバイオティクス効果も期待できる胃内で胃酸作用によりゲル化するペクチン含有経管栄養剤の効果を観た。クロスオーバー試験としてゲル化する製剤を前半に投与する群（A群）と後半に投与する群（B群）の2群に割り付けを行い、24週間の介入予定で開始した。ただし、残念ではあるが、承諾を得られなかった症例に加え、開始前後で病状が変化し試験を完遂できなかった症例が多く終了できた症例は5名となった。A群 4例とB群 1例といった偏りも出てしまったため、クロスオーバー試験としては不十分な結果となり、試験の追加を行う準備を進めている。

今回は現時点で、結果の得られた5例の成果について報告する。

書面での承諾を得た後、登録時、介入観察開始4週、12週、16週、24週で採血と採便を行い、介入期間中の全身状態の観察や排便回数、下剤の使用状況、便性（ブリストールスケール）はカルテ記事から抽出を行った。

結果

- a. 全身状態等：喀痰量や発熱に関してA群、B群の前半/後半の間で明らかな差を認めなかった。
- b. 便：排便回数や下剤使用状況、便性状においてA群、B群の前半/後半の間で統計的有意差を得るには至らなかったが、ペクチン含有経管栄養剤使用時に改善している傾向が認められた。
- c. 一般血液検査：A群、B群の前半/後半の間での変化は認められなかった。
- d. Diamine Oxidase (DAO) 活性：腸管粘膜の状態を反映すると考えられているDAO活性を外注にて測定したが、サンプル処理に問題があった可能性があり、活性測定値は全サンプルにおいて検出限界以下であった。

2) ヒト便の菌叢解析（委託）

登録時、介入観察開始4週、12週、16週、24週で採取した便を用いてガラスビーズ法での粉碎、QIAamp DNA Stool Mini Kitによる糞便DNA抽出、Polymerase chain reaction (PCR)を用いた16S rRNA 遺伝子増幅、次世代シーケンサー(Miseq)によるDNA配列決定と解析を行った。

結果

症例数が少なく、有意差検定を十分に行う事はできなかったが、一部ペクチン含有経管栄養剤の添加によると思われる変化として（図1）

- a. ビフィズス菌が増加傾向
- b. Bacteroidetesが減少
- c. Firmicutesが増加傾向
- d. 他の菌種においては大きな変化は認めなかった。
- e. ペクチン含有経管栄養剤の添加によりFirmicutesに対するBacteroidetesの割合が

減少している傾向が認められた。

3) 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) によるヒト便のメタボミクス

DNA抽出用に粉碎した便溶解液を以下の方法で抽出し測定した (測定条件も以下に示す)

処理方法

1. ヒト便の菌叢解析に利用した便試料溶液 0.5 mL に対して、0.1%ギ酸水溶液/アセトニトリル 0.5 mL を加えた。その後、SUPELCO 社製固相分散 (Z-Sep/C18) を加え、ホモジナイズを 5 分行った。
2. 本溶液を遠心分離 (10krpm, 10min, 4°C) 行い、上清 0.5 mL をとりわけ、その後、0.2 μm のフィルターろ過した。
3. 本溶液を直接 LC/MS にて分析を実施した。

測定条件

—液体クロマトグラフィー条件—

LC 装置 : ACQUITY UPLC I-Class (Waters 社製)

カラム : ACQUITY UPLC® BEHC18 (1.7 μm , 2.1×150 mm, Waters 社製)

移動相 : A 溶液 0.1%ギ酸水溶液 / B 溶液 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

流速 : 0.4 mL/min

移動相条件 B% (min) : 5 (0) -5 (0.5) -95 (20.5) -95 (23.5) -5 (23.6) -5 (30)

カラム温度 : 40°C

注入量 : 5 μL

—質量分析計条件—

MS 機器 : Xevo G2-XS Q Tof (Waters 社製)

イオン化/測定モード : ESI ポジティブモード/センシティブモード

スキャンモード : MS モード (m/z 50~1000)

Lockspray 標準液 : Leucine/ Enkephalin 0.1%ギ酸含有水/アセトニトリル=1/1 溶液

—多変量解析条件—

使用ソフト : progenesis QI (Waters)

解析範囲 : 保持時間 0-24 min, m/z 50-1000

強度の絞り : 設定値 3

標準化法 : リファレンスに従う補正方法

結果・考察

DNA 抽出用試料を利用して、固相分散抽出による代謝物の一斉分析を試みた。その結果、検出されたイオンは数万以上となり、確実に様々な便中の代謝物 (質量数 1000 以下のイオン) を検出していることが判明した。また、QC サンプル不検出もしくはばらつき (RSD: 20% 以上) のピーク (約 15000 程度) は除外したイオンを用いて、多変量解析を実施した。全

検体の主成分分析（PCA）を行った結果、個人差のばらつきが観察され、DNA などの菌叢解析に伴う関連した傾向は観察されなかった（図 2）。一方で、各個人における PCA を行った結果、登録時、介入観察開始 4 と 12 週、及び 16 と 24 週というグループ差が観察され、ペクチン含有経管栄養剤による明らかな代謝物変化が観察された（図 3）。本結果より、患者個人に絞り込み、経時変化による便の代謝物を解析することで、ペクチン含有経管栄養剤の投与による菌叢変化などを明らかにすることが分かった。

【今後の課題】

- 1) 今回は 1 添加物の有無による解析ではあったが、腸内細菌叢での遺伝子解析による変化を認める事が出来た。しかしながら、症例数が不十分であり、また固体差も大きく認められた。このため、さらに症例数を増やし、症例毎に継時的に改めて解析していく必要がある。
- 2) ヒト便を用いたメタボローム解析は確立された方法論がなく、試行錯誤であったが、ある程度の手応えをえることが出来た。今後、網羅的代謝プロファイリング手法としてさらに症例を増やして解析条件の再検討も加え、より良い方法を確立していく必要がある。また、患者個人の主成分分析（PCA）による変化を取られることができたため、今後は判別分析などの方法を用いて、どの代謝物が増えたのか、同定・解析を行っていく必要がある。
- 3) ある程度栄養学的バックグラウンドを統一した経管栄養患者に対しての介入であったが、健常高齢者と言うわけではなため、健常高齢者の解析も今後比較検討していきたい。ただ、食事形態など、栄養学的背景を統一することは困難であるが、a) 加齢動物での解析、b) 健常であるが、施設などに入所されており、食事背景が統一された一群の方々に協力を仰いで解析を進めていく研究を計画する必要がある。
- 4) プレバイオティクス、プロバイオティクスによる介入の他、エネルギー代謝に影響を及ぼす可能性のある機能性食品を用いた栄養介入やエネルギー消費が多いマラソン競技などに参加している中高年ランナーの競技前後での解析（現在、計画中）等も行えれば、ホストのエネルギー代謝と言う観点から新たな腸内細菌環境の変化見られる可能性がある。

【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

本研究で得られた成果は今後、学術集会および欧文論文として発表していく。