

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6231925号
(P6231925)

(45) 発行日 平成29年11月15日 (2017.11.15)

(24) 登録日 平成29年10月27日 (2017.10.27)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/06 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/06

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 Z

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2014-68360 (P2014-68360)	(73) 特許権者	000006127
(22) 出願日	平成26年3月28日 (2014.3.28)		森永乳業株式会社
(65) 公開番号	特開2015-188380 (P2015-188380A)		東京都港区芝5丁目33番1号
(43) 公開日	平成27年11月2日 (2015.11.2)	(74) 代理人	100112874
審査請求日	平成28年5月19日 (2016.5.19)		弁理士 渡邊 薫
		(74) 代理人	100147865
			弁理士 井上 美和子
		(72) 発明者	小田 巻 俊孝
			神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森
			永乳業株式会社 食品基盤研究所内
		審査官	西 賢二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腸内菌叢の老若判定方法及び菌群のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトの腸内菌叢について加齢に伴い特定の菌群が増減している高齢集団に特徴的な腸内菌叢のタイプである老齢タイプと若齢集団に特徴的な腸内菌叢のタイプである若齢タイプのいずれであるかを判定する方法であって、

ヒトの糞便検体に含まれる全て菌の数に対する (a) Lachnospiraceae科に属する菌群の割合、および下記 (b) ~ (j) の科に属する菌群のうち少なくともいずれか一つの菌群の前記ヒトの糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する割合に基づき前記腸内菌叢を判定する判定工程、を有し、

前記判定工程では、前記菌群ごとの前記割合を独立変数とし、前記糞便検体を得た個体の年齢又は月齢に関する回帰分析によって回帰式を算出して解を求め、前記回帰式の解と予め定められた基準値とを比較して、前記解が前記基準値を超える場合には前記腸内菌叢を老齢タイプと判定し、前記解が前記基準値以下である場合には前記腸内菌叢を若齢タイプと判定する、腸内菌叢の老若判定方法。

(b) Bifidobacteriaceae科

(c) Peptococcaceae科

(d) Enterococcaceae科

(e) Verrucomicrobiaceae科

(f) Catabacteriaceae科

(g) Clostridiaceae科

(h) Caulobacteraceae科

(i) Propionibacteriaceae科

(j) Enterobacteriaceae科

【請求項 2】

前記判定工程では、前記回帰式として下記式 (1) を算出し、
下記式 (1) の解 y が 0 を超える場合には、前記腸内菌叢を老齢タイプと判定する、
請求項 1 に記載の腸内菌叢の老若判定方法。

$$y = \alpha + \sum_{k=1}^n \beta_k x_k \quad \cdots (1)$$

10

(式中、 n は前記独立変数の数であり、 k は前記菌群が属する科のうち第 k 番目の科を意味し、 α は前記回帰式の切片であり、 β は前記回帰式の回帰係数であり、 x は前記割合である。)

【請求項 3】

前記判定工程の前に前記割合を測定する測定工程を有する、請求項 1 または 2 に記載の腸内菌叢の老若判定方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の腸内菌叢の老若判定方法の結果に基づいて糞便検体を複数の群に分ける選別工程と、

20

選別された前記複数の群のうち少なくともいずれか一つの群の糞便検体に含まれる菌群を同定する菌群同定工程と、を有する、腸内菌叢の老若判定マーカーとなる菌群のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、腸内菌叢の老若判定方法及び老若判定マーカーとなる菌群のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

30

ヒトなど動物の腸内には、多種類の細菌が常在している。これらの常在細菌によって形成される腸内菌叢においては、乳児期にビフィズス菌が増加したり、老人でウェルシュ菌が増加し、ビフィズス菌が減少するなど、成長や加齢に伴い特定の菌群が増減することが知られている。また、宿主の健康状態や宿主が摂取する薬剤、食物等によって腸内菌叢を構成する菌群の種類やその数が変動することも知られている。

【0003】

このような腸内菌叢については、近年、そのバランスが崩れると腸内環境を悪化させ、便秘症状や下痢症状を発症したり、宿主の免疫機能が低下することなどが明らかとなってきた。これに対し、良好な腸内菌叢の維持や悪化した腸内菌叢を改善する薬剤や飲食物も開発されてきている。例えば、特許文献 1 には、「ラクトパーオキシダーゼを有効成分とする腸内フローラ改善剤」が開示されている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2003 - 246753 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記特許文献 1 に記載された腸内フローラ改善剤のような腸内菌叢に作用する成分の効果を評価するためには、腸内菌叢の状態が改善しているか否かを判定する必要がある。一

50

方、腸内菌叢を構成する菌群は多様であり、個体差も大きいため、腸内菌叢に含まれる菌群については、未だに同定されていない種もある。このため、腸内菌叢の状態に関してより詳細に判定するために、腸内菌叢の状態と関連する菌群の同定や当該菌群の数の変動を調べることが求められている。特に、老化現象は、多様な症状を含む現象であり、個体差も大きいため、腸内菌叢の状態について「老齢の状態」にあるか又は前記老齢の状態より若い「若齢の状態」にあるかを判定するためには、適切な指標を用いることが求められている。そこで、本開示は、腸内菌叢について老齢タイプと若齢タイプのいずれであるかを判定する方法等を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は鋭意検討した結果、糞便検体から同定された複数種類の菌群のうち、Lachnospiraceae科に属する菌群の、菌叢全体の菌数に対する割合に基づいて、糞便検体を高齢タイプと若齢タイプに、精度高く分類できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

すなわち本開示は、ヒトの腸内菌叢について加齢に伴い特定の菌群が増減している高齢集団に特徴的な腸内菌叢のタイプである老齢タイプと若齢集団に特徴的な腸内菌叢のタイプである若齢タイプのいずれであるかを判定する方法であって、ヒトの糞便検体に含まれる全て菌の数に対する（a）Lachnospiraceae科に属する菌群の割合、および下記（b）～（j）の科に属する菌群のうち少なくともいずれか一つの菌群の、前記ヒトの糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する割合に基づき前記腸内菌叢を判定する判定工程、を有し

前記判定工程では、前記菌群ごとの前記割合を独立変数とし、前記糞便検体を得た個体の年齢又は月齢に関する回帰分析によって回帰式を算出して解を求め、前記回帰式の解と予め定められた基準値とを比較して、前記解が前記基準値を超える場合には前記腸内菌叢を老齢タイプと判定し、前記解が前記基準値以下である場合には前記腸内菌叢を若齢タイプと判定する腸内菌叢の老若判定方法を提供する。

（b）Bifidobacteriaceae科

（c）Peptococcaceae科

（d）Enterococcaceae科

（e）Verrucomicrobiaceae科

（f）Catabacteriaceae科

（g）Clostridiaceae科

（h）Caulobacteraceae科

（i）Propionibacteriaceae科

（j）Enterobacteriaceae科

本開示は、また、前記判定工程では、前記回帰式として下記式（1）を算出し、下記式（1）の解 y が 0 を超える場合には、前記腸内菌叢を老齢タイプと判定する判定方法とすることもできる。

【0008】

【数1】

$$y = \alpha + \sum_{k=1}^n \beta_k x_k \quad \cdots (1)$$

【0009】

（式中、 n は前記独立変数の数であり、 k は前記菌群が属する科のうち第 k 番目の科を意味し、 α は前記回帰式の切片であり、 β は前記回帰式の回帰係数であり、 x は前記割合で

10

20

30

40

50

ある。)

前記腸内菌叢の老若判定方法は、前記判定工程の前に前記割合を測定する測定工程を有していてもよい。

【0010】

本開示はまた、上記腸内菌叢の老若判定方法の結果に基づいて糞便検体を複数の群に分ける選別工程と、選別された前記複数の群のうち少なくともいずれか一つの群の糞便検体に含まれる菌群を同定する菌群同定工程と、を有する、腸内菌叢の老若判定マーカーとなる菌群のスクリーニング方法を提供する。

【発明の効果】

【0011】

本開示により、腸内菌叢について老齢タイプと若齢タイプのいずれであるかを判定する方法等が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法の工程の一例を示すフローチャートである。

【図2】本開示に係る菌群のスクリーニング方法の工程の一例を示すフローチャートである。

【図3】選別工程の一例を示すフローチャートである。

【図4】本開示に係る物質のスクリーニング方法の工程を示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本開示を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本開示の代表的な実施形態を示したものであり、これにより本開示の範囲が狭く解釈されることはない。

【0014】

(1) 腸内菌叢の老若判定方法

本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法では、腸内菌叢について老齢タイプと若齢タイプのいずれであるかを判定する。図1は、本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法の一例を示すフローチャートである。腸内菌叢の老若判定方法には、少なくとも判定工程S12が含まれる。また、本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法では、判定工程S12の前に、後述する、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する特定の菌群の割合を測定する測定工程S11を有していてもよい。

以下、測定工程S11と判定工程S12について順に説明する。なお、本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法において、腸内細菌叢を構成する菌群の「菌」とは、細菌(bacteria)及び古細菌(archaea)を含み、かつ、真菌(fungi)を含まないものである。また、これは、後述する菌群のスクリーニング方法においても同様である。

【0015】

本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法では、糞便検体として動物から得られたものを用いることができる。動物としては、例えば、サル、チンパンジー、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ等が挙げられる。ヒトから得られる糞便検体が好ましく、ヒトについては、20歳以上の成人から得られる糞便検体がより好ましい。乳幼児など、腸内菌叢に関して成人とは異なる特徴を有することが知られている年齢層を除外することによって、所定の年齢未満の若齢集団における腸内菌叢を構成する菌群の種類や菌数についてのばらつきが、より抑制される。

【0016】

測定工程S11は、糞便検体に含まれる菌群のうち少なくとも(a) Lachnospiraceae科に属する菌群について、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する割合を測定する工程である。また、測定対象とする菌群は、(a) Lachnospiraceae科に加えて、(b) Bifid

10

20

30

40

50

obacteriaceae科、(c) Peptococcaceae科、(d) Enterococcaceae科、(e) Verrucomicrobiaceae科、(f) Catabacteriaceae科、(g) Clostridiaceae科、(h) Caulobacteraceae科、(i) Propionibacteriaceae科、(j) Enterobacteriaceae科のうちいずれかの科に属する菌群も測定対象とすることができる。

【0017】

本工程S11では、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する、上記(a)～(j)科に属する菌群のうち少なくとも(a) Lachnospiraceae科に属する菌群の割合を求める。全菌数及び上記割合は、例えば、下記の手法により求めることができる。

【0018】

<(a)～(j)の科に属する菌群の測定>

10

糞便検体に含まれる菌のうち、上記(a)～(j)の科に属する菌群に分類される菌の数は、公知手法を用いて求めることができ、その手法は特に限定されない。例えば、菌の分類については、リボソームを構成する小型のサブユニット(16S)に存在するRNAをコードする遺伝子(16SrRNA遺伝子)の塩基配列に基づき、各々の菌を、上記(a)～(j)の科に属する各々の菌群又は、その他の菌群に分けることができる。また、糞便検体に含まれる各々の菌群の菌数の算出についても、例えば、糞便検体中に含まれる、各々の菌に由来する16SrRNA遺伝子のDNA量やコピー数を定量することにより行うこともできる。菌数の算出について、以下に例を挙げる。

【0019】

塩基配列に基づき菌数を算出するためには、まず、糞便検体に含まれる菌群のDNAを糞便検体から抽出する。糞便検体からのDNAの抽出は、公知の手法を用いて行うことができ、その手法は特に制限されない。例えば、フェノール・クロロホルムを用いる抽出法により、糞便検体からDNAを抽出することができる。本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法においては、フェノール・クロロホルムを用いる抽出方法によりDNAを抽出することが好ましい。

20

【0020】

また、フィルターを備えるスピンカラムなどを用いて、糞便検体からDNAを抽出してもよい。なお、本工程S11では、DNAの抽出は必須の工程ではなく、予め糞便検体から抽出されたDNA溶液を試料とすることもできる。

【0021】

30

糞便検体から得られるDNAについては、菌数の測定に必要なDNA量又はコピー数を得るために、核酸増幅反応を行うことが好ましい。DNAの増幅については、PCR(Polymerase Chain Reaction)等、公知の手法を用いて行うことができ、核酸増幅反応において用いるプライマーについても、公知の設計手法を用いて設計することができる。さらに、核酸増幅反応の際に、DNAの解析に必要な配列を増幅核酸鎖に組み込ませるように、プライマーを設計してもよい。

【0022】

上記(a)～(j)の科に属する菌群に分類される菌の数は、例えば、上記DNA溶液に含まれるDNAを鋳型とする定量的PCR法やT-RFLP(Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)法によって測定することができる。定量的PCR法では、各々の菌群の16SrRNA遺伝子のうち特異的な配列部分に結合するプライマーを用い、核酸増幅反応を行うことにより、所望の菌群の16SrRNA遺伝子のDNA量又はコピー数を測定することができる。またT-RFLP法では、末端に標識が付されたプライマーを用いて、16SrRNA遺伝子の各菌群に特異的な配列部分を含む増幅核酸鎖を生成し、得られた増幅核酸鎖を制限酵素で処理し断片化してサイズの異なるDNA断片とする。このDNA断片を電気泳動により分離し、泳動パターンにおける各々のピークの同定とピーク強度から、所望の菌群の16SrRNA遺伝子のDNA量又はコピー数を測定することができる。

40

【0023】

また、上記DNA溶液に含まれるDNAについては、FISH(Fluorescen

50

ce in situ hybridization) 法により、所望の菌群の 16S rRNA 遺伝子の DNA 量又はコピー数を算出してもよい。この他、DNA マイクロアレイを用いて 16S rRNA 遺伝子の DNA 量又はコピー数を算出することもできる。

【0024】

16S rRNA 遺伝子の DNA 量又はコピー数は、上述した方法の他に、シーケンサーを用いて糞便検体から抽出された DNA の塩基配列を決定し、特定の配列を解読した回数から求めることもできる。また、シーケンサーを用いる方法の場合、同じ操作によって、糞便検体に含まれる上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群以外の菌の 16S rRNA 遺伝子についても解読することができる。このため、糞便検体に含まれる上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群以外の菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数も併せて求めることができる。

10

【0025】

シーケンサーを用いる方法としては、例えば、クローンライブラリー法、DGGE / TGGE (Denaturing / Temperature Gradient Gel Electrophoresis) 法、メタゲノム解析等がある。クローンライブラリー法では、糞便検体から抽出された DNA の 16S rRNA 遺伝子の、各々の菌群に特異的な配列部分を増幅して、得られた増幅核酸鎖をプラスミドに挿入して、増幅核酸鎖を含むプラスミドの塩基配列を解読する。DGGE / TGGE 法では、クローンライブラリー法と同様に DNA を増幅し、得られた核酸鎖を電気泳動によって核酸鎖の配列に応じて分離し、バンドを切り出して、ゲル内の DNA を回収して当該 DNA の塩基配列を決定する。メタゲノム解析では、糞便検体から得られた DNA を断片化して、必要に応じて核酸増幅反応等を行った後、各々の DNA 断片又は増幅核酸鎖の塩基配列を決定する。

20

【0026】

上述した塩基配列の決定は、サンガー法の原理を利用したシーケンサーで行うこともでき、また、次世代シーケンサーで行うこともできる。特にメタゲノム解析は、解読性能がより高い次世代シーケンサーで行うことが好ましい。

【0027】

シーケンサーを用いて解読された塩基配列から菌群を同定する場合には、解析ソフトウェアやデータベース等を利用する公知の解析方法を利用することができる。データベースとしては、例えば、Genbank、ENA、DDBJ 等が挙げられる。また、16S rRNA 遺伝子に特化したデータベースである Greengenes database 等も利用することができる。

30

糞便検体から得られる DNA の解析結果を、これらのデータベースに蓄積された菌群の塩基配列に対して相溶性検索することにより、糞便検体に含まれる菌群を同定することができる。いずれかの菌群に同定された配列のうち、上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群の 16S rRNA 遺伝子として同定された配列のコピー数を、上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群の数とすることができる。

【0028】

< 糞便検体に含まれる全ての菌の数の測定 >

糞便検体に含まれる全ての菌の数の測定は、公知の手法を用いて求めることができ、その手法は特に限定されない。例えば、上述したシーケンサーを用いる方法においては、16S rRNA 遺伝子の配列中、糞便検体に含まれる菌で共通の塩基配列部分に結合するプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子の配列を解読することにより、上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群以外の菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数も算出することができる。このため、糞便検体に含まれる全菌数は、例えば、糞便検体で測定される全ての菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数の和としてもよい。また、顕微鏡等を用いて、糞便検体に含まれる菌を数えることによって、糞便検体に含まれる全ての菌の数を求めることもできる。本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法においては、測定工程 S11 に、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読する工程を有する方法が好ましい。なお、本工程 S11 に用いられる糞便検体は、採取後に培養操作が行われていない検体が望ましい。培養操作において、各々の菌の増殖率が異なることによって、採取時の糞便検体における各菌の割合が

40

50

変化してしまうおそれがあるためである。

【 0 0 2 9 】

< 割合の算出 >

糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群の各々の割合とは、糞便検体に含まれる全菌数を「 1 」としたときの相対値である。従って、上記割合は、上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群の各々に分類された菌の数と糞便検体に含まれる全菌数から求めることができる。また、上述したように、上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群の 1 6 S r R N A 遺伝子のコピー数と、糞便検体に含まれる全ての菌の 1 6 S r R N A 遺伝子のコピー数から上記割合を求めることもできる。なお、上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群が検出されなかった場合には、その菌群の割合は 0 とする。

10

【 0 0 3 0 】

判定工程 S 1 2 は、少なくとも、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する (a) Lachnospiraceae 科に属する菌群の割合に基づき、腸内菌叢を老齢タイプと若齢タイプのいずれかに判定する工程である。また、本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法において、上述した菌群の割合は、測定工程 S 1 1 によって求めることもできる。

【 0 0 3 1 】

「老齢タイプ」とは、任意の年齢以上のヒトを高齢集団とし、この高齢集団に特徴的な腸内菌叢のタイプを意味する。一方、「若齢タイプ」とは、任意の年齢未満のヒトを若齢集団とし、この若齢集団に特徴的な腸内菌叢のタイプを意味する。任意の年齢とは、例えば、65歳とすることができる。

20

【 0 0 3 2 】

また、例えば、マウスの糞便検体について、本開示に係る腸内細菌叢の老若判定方法を用いる場合、任意の月齢以上のマウスを高齢集団とし、任意の月齢未満のマウスを若齢集団とすることができる。

【 0 0 3 3 】

また、本工程 S 1 2 では、(a) Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合に加えて、下記 (b) ~ (j) の科に属する菌群のうち少なくともいずれか一つの菌群の、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する割合に基づき、腸内菌叢を判定することが好ましい。

(b) Bifidobacteriaceae 科

(c) Peptococcaceae 科

30

(d) Enterococcaceae 科

(e) Verrucomicrobiaceae 科

(f) Catabacteriaceae 科

(g) Clostridiaceae 科

(h) Caulobacteraceae 科

(i) Propionibacteriaceae 科

(j) Enterobacteriaceae 科

【 0 0 3 4 】

本工程 S 1 2 では、実施例に示すように、(a) Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合と、(b) Bifidobacteriaceae 科に属する菌群の上記割合と、に基づき判定することが好ましく、(a) Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合と、(b) Bifidobacteriaceae 科に属する菌群の上記割合と、(c) Peptococcaceae 科に属する菌群の上記割合と、に基づき判定することがより好ましい。

40

【 0 0 3 5 】

さらに、(a) Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合と、(b) Bifidobacteriaceae 科に属する菌群の上記割合と、(c) Peptococcaceae 科に属する菌群の上記割合と、(d) Enterococcaceae 科に属する菌群の上記割合と、(e) Verrucomicrobiaceae 科に属する菌群の上記割合と、に基づき判定することがより好ましい。そして、本工程 S 1 2 では、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する上記 (a) ~ (j) の科に属する菌群の各々の上記割合のうち、これらの割合全てに基づき判定することがより好ましい。

50

【 0 0 3 6 】

上述した菌群の割合に基づく腸内菌叢の判定には、公知の統計的手法を利用して腸内菌叢を「老齢タイプ」と「若齢タイプ」のいずれかに判定することができる。統計的手法としては、例えば、多変量解析が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

また、多変量解析は、上述した菌群の割合を独立変数として、糞便検体を得た個体の年齢又は月齢を従属変数とする回帰分析とすることが好ましい。例えば、回帰分析によって、回帰式を算出して、当該回帰式の解を予め定められた基準値と比較することにより、簡便に判定を行うことができる。従って、本工程 S 1 2 では、菌群ごとの上記割合を独立変数とし、糞便検体を得た個体の年齢又は月齢に関する回帰分析によって回帰式を算出して、当該回帰式に基づき腸内菌叢を判定することもできる。

10

【 0 0 3 8 】

回帰分析については、公知の分析法の中から適宜選択することができる。回帰分析としては、例えば、単回帰分析、重回帰分析、ロジスティック回帰分析、判別分析等が挙げられる。また、上述した回帰式を判定に用いる場合には、回帰式の解と、予め定められた基準値と、を比較して判定を行ってもよい。さらに、解が基準値を超える場合には腸内菌叢を「老齢タイプ」と判定し、解が基準値以下である場合には腸内菌叢を「若齢タイプ」と判定してもよい。

【 0 0 3 9 】

単回帰分析又は重回帰分析によって回帰式の算出した場合には、回帰式を用いて、上述した菌群の割合から各検体の年齢又は月齢の予測値を回帰式の解として得ることができる。そして、本工程 S 1 2 では、この予測値と予め定められた基準とを比較して、腸内菌叢を「老齢タイプ」と「若齢タイプ」のいずれかに判定してもよい。また、単回帰式又は重回帰式については、例えば、最小二乗法等を用いて算出することができる。

20

【 0 0 4 0 】

判別分析を行う場合には、量的変数である「糞便検体を得た個体の年齢又は月齢」について、これを質的変数に置き換える。質的変数への置き換えとしては、例えば、所定の年齢又は月齢以上については、「1」とし、所定の年齢又は月齢未満については「-1」とすることができる。所定の年齢又は月齢とは、例えばヒトの場合には、65歳とすることができる。また、質的変数として用いる2値は、「1」と「-1」の他、「0」と「1」や、「1」と「100」などとすることもできる。

30

【 0 0 4 1 】

判別分析において、腸内菌叢を「老齢タイプ」と「若齢タイプ」のいずれかに判定するための回帰式には、回帰式又は重回帰式のように、直線モデル又は平面モデルの線形関数を用いることもできる。そして、これらの回帰式によって、上述した菌群の割合に基づき各検体の年齢又は月齢の予測値を回帰式の解として得ることができる。さらに、本工程 S 1 2 では、この予測値と予め定められた基準とを比較して、腸内菌叢を「老齢タイプ」と「若齢タイプ」のいずれかに判定してもよい。また、判別分析においては、マハラノビスの距離を用いて2次曲線を求めて、これを腸内菌叢の判定に用いることもできる。

【 0 0 4 2 】

40

ロジスティック回帰分析を行う場合にも、量的変数である、糞便検体を得た個体の年齢について、これを質的変数に置き換えることができる。また、ロジスティック回帰式は、最小二乗法や最尤法によって求めることができる。上述した単回帰式又は重回帰式と同様に、ロジスティック回帰式によっても、上述した菌群の割合に基づき各検体の年齢又は月齢の予測値を得ることができる。そして、この予測値と予め定められた基準とを比較して、腸内菌叢を「老齢タイプ」と「若齢タイプ」のいずれかに判定することができる。

【 0 0 4 3 】

なお、上述した各種回帰式の算出については、計算機等により、上述した菌群の割合と、糞便検体を得た個体の年齢又は月齢から、自動的に回帰式を算出させることもできる。

【 0 0 4 4 】

50

下記に、本工程 S 1 2 で用いることができる回帰式の一例を示す。下記式 (1) 中、 n は独立変数の数であり、 k は菌群が属する科のうち第 k 番目の科を意味し、 α は回帰式の切片であり、 β は回帰式の回帰係数であり、 x は割合である。

【 0 0 4 5 】

【 数 2 】

$$y = \alpha + \sum_{k=1}^n \beta_k x_k \quad \cdots (1)$$

【 0 0 4 6 】

本工程 S 1 2 において、(a) Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合のみに基づいて腸内菌叢を判定する場合には、上記式 (1) は、単回帰式となり、 n は「 1 」である。また、(a) Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合に加えて、上記 (b) ~ (j) の科に属する菌群のいずれかの上記割合をも用いる場合には、これらの科に属する菌群ごとの上記割合を、各々、独立変数とする。また、「 k 」の最大値は、独立変数の数と同じである。

【 0 0 4 7 】

本工程 S 1 2 では、「糞便検体を得た個体の年齢」について、これを質的変数に置き換えた後、上記式 (1) を算出してもよい。例えば、ヒトから得られた糞便検体について判定する場合、糞便検体を得た個体の年齢について、65 歳以上を「 1 」に、65 歳未満を「 - 1 」に、各々置き換えて、回帰式を求め、上記式 (1) の解 y が基準値「 0 」を超える場合には、その腸内菌叢を、65 歳以上に特徴的な「老齢タイプ」と判定することもできる。

【 0 0 4 8 】

本開示に係る腸内菌叢の老若判定方法においては、上述したように、少なくとも、糞便検定に含まれる全ての菌群に対する Lachnospiraceae 科に属する菌群の割合に基づいて、腸内菌叢が老齢タイプと若齢タイプのいずれであるか、を判定することができる。腸内菌叢のタイプを判別することによって、例えば、腸内菌叢の状態の把握が容易となる。また、腸内菌叢のタイプを判別することは、後述する菌群のスクリーニング方法や物質のスクリーニング方法において、好適に用いられ得る。

【 0 0 4 9 】

(2) 菌群のスクリーニング方法

本開示に係る菌群のスクリーニング方法では、腸内菌叢に含まれる菌群のうち、腸内菌叢を老齢タイプ又は若齢タイプに判定するための老若判定マーカーとなる菌群を探索する。

図 2 は、本開示に係る菌群のスクリーニング方法の工程を示すフローチャートである。

【 0 0 5 0 】

菌群のスクリーニング方法には、少なくとも選別工程 S 2 1 及び菌群同定工程 S 2 2 が含まれる。なお、老若判定マーカーとは、腸内菌叢が老齢タイプであるか否かを判定するためのマーカー、腸内菌叢が若齢タイプであるか否かを判定するためのマーカー、及び腸内菌叢が老齢タイプと若齢タイプのいずれであるかを判定するためのマーカーのうち、少なくともいずれかに該当するものである。

【 0 0 5 1 】

選別工程 S 2 1 は、糞便検体について、上述した腸内菌叢の老若判定方法の結果に基づき糞便検体を複数の群に分ける工程である。腸内菌叢の判定については、上述した通りである。選別工程 S 2 1 の一例を図 3 に示す。

【 0 0 5 2 】

図 3 に示す選別工程 S 2 1 では、上述した腸内菌叢の判定により、糞便検体を老齢タイプと若齢タイプのいずれかに分ける。また、本工程 S 2 1 では、上述した (a) Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合のみに基づいて、糞便検体を選別してもよいが、Lachn

10

20

30

40

50

ospiraceae科に属する菌群の上記割合に加えて、上記(b)~(j)のうち、いずれかの科に属する菌群の上記割合にも基づいて、糞便検体を選別してもよい。

【0053】

菌群同定工程S22は、上述した選別工程S21によって選別された複数の群のうち、少なくともいずれか一つの群の糞便検体に含まれる菌群を同定する工程である。即ち、老齢タイプに分類された一つの群と、若齢タイプに分類された一つの群のうち、少なくともいずれか一つの群の糞便検体に含まれる菌群を同定する工程である。対象とする群は、菌群のスクリーニングの目的に応じて決めることができる。例えば、老齢タイプと判定するためのマーカー探索が目的であれば、老齢タイプに該当する糞便検体に含まれる菌群を同定することが好ましい。また、若齢タイプと判定するためのマーカー探索が目的であれば、若齢タイプに該当する糞便検体に含まれる菌群を同定することが好ましい。

10

【0054】

また、複数の群の各々について、それらの群に含まれる糞便検体を菌群の同定対象としてもよい。例えば老齢タイプに該当する糞便検体と、若齢タイプに該当する糞便検体の各々から菌群を同定することもできる。なお、本開示において「菌群を同定する」とは、少なくとも門レベルまで同定されていることを指し、さらに綱レベル、目レベル、科レベル、属レベル及び種レベルのうち、いずれかのレベルまで同定することも含まれる。

【0055】

本工程S22において、糞便検体に含まれる菌群の同定は、公知の手法を用いて行うことができ、その手法は限定されない。例えば、糞便検体に含まれる菌群のゲノムを解読して、塩基配列に基づいて行うこともできる。この場合、菌群の16SrRNA遺伝子の塩基配列を解析して、各々の菌群を同定することができる。以下に、本工程S22の一例を示す。

20

【0056】

まず、糞便検体に含まれる菌群のDNAを抽出する。DNAの抽出については、上述した腸内菌叢の老若判定方法における測定工程S11と同様の方法で行うことができる。

【0057】

次に、得られたDNAの塩基配列を解読する。塩基配列の解読は、公知の手法によって行うことができ、その手法は限定されない。塩基配列の決定については、上述した腸内菌叢の老若判定方法における測定工程S11と同様に、例えばシーケンサーを用いる方法等によって行うことができる。また、上述した腸内菌叢の老若判定方法における測定工程S11と同様の方法により、例えば、解読されたDNAの塩基配列をデータベースに照会することで、菌群を同定することができる。

30

【0058】

本開示に係る菌群のスクリーニング方法では、上述した腸内菌叢の老若判定方法を利用して、糞便検体を複数の群に分けて選別することができる。例えば、予め老齢タイプに該当すると判定された糞便検体は、該当しなかった他の糞便検体に比べて、加齢によって腸内菌叢がより大きく変化している可能性の高い検体である。従って、本開示に係る菌群のスクリーニング方法では、より効率的に老若判定マーカーを探索することができる。

【0059】

また、例えば、若齢タイプに該当した糞便検体から同定された菌群やその菌数を、老齢タイプを判定するためのマーカー検索において、リファレンスとして用いることもできる。このリファレンスにより、若齢タイプであると判定された糞便検体においても同程度の割合で存在した菌群や菌種を、老齢タイプを判定するためのマーカー候補から除外することができる。

40

このため、より効率的に老齢タイプと判定するためのマーカーを探索することができる。この点については、老齢タイプに該当した糞便検体から同定された菌群やその菌数を、若齢タイプを判定するためのマーカー検索において、リファレンスとして用いる場合も同様である。

【0060】

50

(3) 物質のスクリーニング方法

本開示に係る物質のスクリーニング方法では、食餌や物質に含まれる腸内菌叢へ作用するものを探索する。図4は、本開示に係る物質のスクリーニング方法のフローチャートである。物質のスクリーニング方法には、少なくとも測定工程S31、相関算出工程S32及び物質同定工程S33が含まれる。なお、本開示に係る物質のスクリーニング方法において、腸内菌叢へ作用するものとは、例えば、腸内菌叢の老化を促進したり、あるいは抑制したりするなど、腸内菌叢のバランスを変化させるものである。

【0061】

測定工程S31は、上述した菌群のスクリーニング方法により、老若判定マーカーとして同定された菌群について、動物から得た糞便検体に含まれる全菌数に対する割合を測定する。菌群の割合の測定については、上述した通りである。

10

【0062】

本開示に係る物質のスクリーニング方法において、食餌又は物質の動物への摂取は、経口摂取であっても、非経口摂取であってもよい。また、摂取回数は、1回でも複数回でもよい。複数回の場合、同じ食餌又は物質を複数回に渡って摂取してもよい。動物から得られる糞便検体は、食餌又は物質を摂取する前と摂取した後の各々の時点で採取されたものであってもよい。

【0063】

相関算出工程S32は、測定工程S31で測定された菌群の割合について、その増減と、動物が摂取した食餌又は物質との相関を求める工程である。動物が食餌又は物質を摂取した後、上述した菌群のスクリーニングによって老若判定マーカーとされた菌群の数が糞便検体において変動すれば、その食餌又は物質は腸内菌叢へ作用するものである可能性が高い。また、動物が摂取した食餌又は物質の量に応じて、菌群の割合の変動の程度も変化すれば、その食餌又は物質は腸内菌叢へ作用するものである可能性が高い。本工程S32では、このような、動物が摂取した食餌又は物質と、糞便検体の全菌数に対する特定の菌群の割合における相関関係を解析する。

20

【0064】

本工程S32では、例えば相関係数 r を算出してもよい。また、例えば、カイ二乗検定やマンホイットニー U 検定等の検定方法を用いて、食餌又は物質を摂取した群と摂取していない群との間の、老若判定マーカーとした菌群の上記割合の差異について、 χ^2 値や U 等を求めてもよい。相関について数値で表わすことができれば、その算出方法は特に限定されず、母集団の大きさや測定工程S31で測定する菌群の種類の数等に合わせて、公知の統計手法の中から適宜選択できる。

30

【0065】

また、相関算出工程S32では、任意の統計手法に基づき、老若判定マーカーとして用いた菌群の上記割合の増減と、動物が摂取した食餌又は物質との相関について、計算機等により自動的に相関関係を解析してもよい。

【0066】

物質同定工程S33は、相関算出工程S32において算出された値が閾値を満たす場合に、その食餌又は物質を腸内菌叢へ作用するものとして同定する工程である。閾値は、相関算出工程S32において相関の算出に用いた方法に合わせて適宜設定できる。

40

例えば、相関算出工程S32において相関係数 r 、 χ^2 値又は U を算出するのであれば、本工程S33では、これらの数値に対応する p 値に対して閾値を設定できる。例えば、閾値を $p < 0.05$ とする場合、前記 p 値がこれに該当すれば、閾値を満たすものとする。また、前記 p 値がこれに該当しなければ、閾値を満たさないものとする。

【0067】

上記閾値を満たした場合、その動物が摂取した食餌又は物質は、腸内菌叢へ作用するものとして同定される。例えば、食餌又は物質の摂取後に、老齢タイプと判定するためのマーカーとされる菌群の上記割合が老齢タイプの範囲外へ変動し、相関算出工程S32によって算出された値が閾値を満たす場合には、その食餌又は物質は、腸内菌叢の若齢タイプ

50

への変化を促進するものとして同定される。

また、食餌又は物質の摂取後に、若齢タイプと判定するためのマーカーとされる菌群の上記割合が若齢タイプの範囲外へ変動し、その相関が閾値を満たす場合には、その食餌又は物質は、腸内菌叢の老齢タイプへの変化を促進するものとして同定される。

【 0 0 6 8 】

本開示に係る物質のスクリーニング方法では、上述した菌群のスクリーニング方法によって老若判定マーカーとされる菌群の上記割合を指標とすることにより、簡便に腸内菌叢へ作用するものをスクリーニングすることができる。

【 0 0 6 9 】

本開示は、以下の構成を採用することもできる。

10

〔 1 〕腸内菌叢について老齢タイプと若齢タイプのいずれであるかを判定する方法であって、糞便検体に含まれる全て菌の数に対する (a) Lachnospiraceae科に属する菌群の割合に基づき前記腸内菌叢を判定する判定工程、を有する、腸内菌叢の老若判定方法。

〔 2 〕前記判定工程では、前記 (a) Lachnospiraceae科に属する菌群の前記割合に加えて、下記 (b) ~ (j) の科に属する菌群のうち少なくともいずれか一つの菌群の、前記糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する割合に基づき、前記腸内菌叢を判定する、上記〔 1 〕に記載の腸内菌叢の老若判定方法。

(b) Bifidobacteriaceae科

(c) Peptococcaceae科

(d) Enterococcaceae科

20

(e) Verrucomicrobiaceae科

(f) Catabacteriaceae科

(g) Clostridiaceae科

(h) Caulobacteraceae科

(i) Propionibacteriaceae科

(j) Enterobacteriaceae科

〔 3 〕前記判定工程では、前記菌群ごとの前記割合を独立変数とし、前記糞便検体を得た個体の年齢又は月齢に関する回帰分析によって回帰式を算出して、当該回帰式に基づき前記腸内菌叢を判定する、上記〔 1 〕又は〔 2 〕に記載の腸内菌叢の老若判定方法。

〔 4 〕前記判定工程では、前記回帰式の解と、予め定められた基準値と、を比較して、前記解が前記基準値を超える場合には前記腸内菌叢を老齢タイプと判定し、前記解が前記基準値以下である場合には前記腸内菌叢を若齢タイプと判定する、上記〔 3 〕に記載の腸内菌叢の老若判定方法。

30

〔 5 〕前記判定工程では、前記回帰式として下記式 (1) を算出し、下記式 (1) の解 y が 0 を超える場合には、前記腸内菌叢を老齢タイプと判定する、上記〔 4 〕に記載の腸内菌叢の老若判定方法。

【 0 0 7 0 】

【 数 3 】

$$y = \alpha + \sum_{k=1}^n \beta_k x_k \quad \cdots (1)$$

40

【 0 0 7 1 】

(式中、 n は前記独立変数の数であり、 k は前記菌群が属する科のうち第 k 番目の科を意味し、 α は前記回帰式の切片であり、 β は前記回帰式の回帰係数であり、 x は前記割合である。)

〔 6 〕前記判定工程の前に前記割合を測定する測定工程を有する、上記〔 1 〕 ~ 〔 5 〕のいずれかに記載の判定方法。

【 0 0 7 2 】

〔 7 〕上記〔 1 〕 ~ 〔 6 〕のいずれかに記載の腸内菌叢の老若判定方法の結果に基づい

50

て糞便検体を複数の群に分ける選別工程と、選別された前記複数の群のうち、少なくともいずれか一つの群の糞便検体に含まれる菌群を同定する菌群同定工程と、を有する、腸内菌叢の老若判定マーカーとなる菌群のスクリーニング方法。

【 0 0 7 3 】

〔 8 〕 上記〔 7 〕に記載の菌群のスクリーニング方法により同定された菌群について、動物から得た糞便検体に含まれる全て菌の数に対する割合を測定する測定工程と、前記菌群の前記割合の増減と、前記動物が摂取した食餌又は物質と、の相関を求める相関算出工程と、前記相関算出工程において算出された値が閾値を満たす場合に、前記食餌又は物質を腸内菌叢へ作用するものとして同定する物質同定工程と、を含む、物質のスクリーニング方法。

10

【 実施例 】

【 0 0 7 4 】

1. 実験例 1

本実験例では、糞便検体に含まれる菌群について、老齢及び若齢の各々に特徴的な菌群の同定を試みた。

【 0 0 7 5 】

< 検体 >

本実験例では、健常な 174 名（21～104 歳）の日本人から提供された糞便検体を用いた。この 174 名の内訳は、20 歳代：9 人、30 歳代：45 人、40 歳代：21 人、50 歳代：13 人、60 歳代：5 人、70 歳代：10 人、80 歳代：46 人、90 歳代：19 人、100 歳以上：6 人であり、平均年齢は 61.7 歳である。

20

【 0 0 7 6 】

< DNA の抽出 >

本実験例では、まず、糞便検体からの DNA の抽出を行った。約 20 mg の糞便検体に対して、450 μ l の抽出用溶液（100 mM Tris / HCl、4 mM EDTA、pH 9.0）を加えて懸濁し、さらに、10% SDS 溶液 50 μ l、0.1 mm 径のガラスビーズ 300 mg、500 μ l の TE 飽和フェノール（和光純薬）を加えて混合した。得られた懸濁液に対しては、Fast Prep FP 100A（フナコシ社製）を用いてパワーレベル 5 で 30 秒の破碎処理を実施した後、14,000 $\times$ g で 5 分間遠心して 400 μ l の上清を得た。得られた上清に 250 μ l のフェノール・クロロホルム溶液（和光純薬）を加えて混合し、14,000 $\times$ g で 5 分間遠心した後、250 μ l の上清を回収した。回収した上清に、2-プロパノールを 250 μ l 加え、DNA を沈殿させ、200 μ l の Tris - EDTA バッファー（pH 8.0）に再度溶解させて、これを DNA 溶液とした。

30

【 0 0 7 7 】

< DNA の増幅 >

次に、上記 DNA 溶液に含まれる菌群のゲノムに対して核酸増幅反応を行った。下記表 1～表 3 に、本実験例で用いたプライマーの配列を示す。表 1 に示すプライマーセットは、16S rRNA 遺伝子の第 3～4 可変領域を増幅させるためのプライマーである。これらのプライマーについては、便宜的に第 1 プライマーセットとする。

40

【 0 0 7 8 】

【 表 1 】

プライマー	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
Tru357F	CGCTCTTCCGATCTCTG TACGGRAGGCAGCAG	1
Tru806R	CGCTCTTCCGATCTGAC GGACTACHVGGGTWTCTAAT	2

【 0 0 7 9 】

表 1 中、「R」は、グアニン又はアデニンを意味する。「W」は、アデニン又はチミン若しくはウラシルを意味する。「H」は、アデニン又はシトシン又はチミン若しくはウラシルを意味する。「V」は、アデニン又はグアニン又はシトシンを意味する。

【 0 0 8 0 】

50

また、下記表 2 及び表 3 に示すプライマーセットは、次世代シーケンサー（M i s e q（イルミナ社製））を用いて塩基配列を解析するために必要な配列（アダプター領域及びインデックス領域）を増幅核酸鎖に組み込むためのプライマーセットである。表 2 に示すプライマーはフォワードプライマーであり、表 3 に示すプライマーは、リバースプライマーである。これらのプライマーは、便宜的に第 2 プライマーセットとする。なお、表 1 ～表 3 に示すプライマーは、L i f e T e c h n o l o g i e s 社のオリゴプライマー作成サービスにより得た。

【 0 0 8 1 】

【表 2】

プライマー	塩基配列 (5' → 3')		配列番号
F2nd_D501	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	TATAGCCT ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	3
F2nd_D502	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	ATAGAGGC ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	4
F2nd_D503	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	CCTATCCT ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	5
F2nd_D504	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	GGCTCTGA ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	6
F2nd_D505	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	AGGCGAAG ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	7
F2nd_D506	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	TAATCTTA ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	8
F2nd_D507	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	CAGGACGT ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	9
F2nd_D508	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	GTACTGAC ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	10
F2nd_D509	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	AGGCTATA ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	11
F2nd_D510	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	GCCTCTAT ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	12
F2nd_D511	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	AGGATAGG ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	13
F2nd_D512	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	TCAGAGCC ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	14
F2nd_D513	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	CTTCGCCT ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	15
F2nd_D514	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	TAAGATTA ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	16
F2nd_D515	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	ACGTCCTG ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	17
F2nd_D516	AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC	GTCAGTAC ACACCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTG	18

【表 3】

プライマー	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
R2nd_D701	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT ATTACTCG GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	19
R2nd_D702	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT TCCGGAGA GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	20
R2nd_D703	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT CGCTCAIT GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	21
R2nd_D704	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT GAGATTCC GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	22
R2nd_D705	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT ATTCAGAA GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	23
R2nd_D706	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT GAATTGCT GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	24
R2nd_D707	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT CTGAAGCT GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	25
R2nd_D708	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT TAATGCGC GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	26
R2nd_D709	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT CCGCTATG GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	27
R2nd_D710	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT TCCGCGAA GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	28
R2nd_D711	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT TCTCGCGC GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	29
R2nd_D712	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAT AGCGATAG GTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTGAC	30

10

20

30

40

【 0 0 8 3 】

上述したDNA溶液及び第1プライマーセットを含む総液量25μlの反応液を、Takara ExTaq HS kit (タカラバイオ社製) を用いて調製した。核酸増幅反応は、サーマルサイクラー (Veriti 200 (Life Technologies社製)) を用いて行い、94 - 3分の後、94 - 30秒、50 - 30秒、72 - 30秒を1サイクルとし、これを20回繰り返し、その後72 - 10分として、PCR反応を行った。得られたPCR産物を1%アガロースゲルにて電気泳動し、バンドパターンにより、増幅核酸鎖を確認した。

【 0 0 8 4 】

50

続いて、得られたPCR産物1 µlを鋳型とし、第2プライマーセットを用いて上述した条件と同様にPCR反応を行った。但し、サイクル数は15回とした。得られたPCR産物を1%アガロースゲルにて電気泳動し、バンドパターンを確認した後、QIAquick 96 PCR Purification Kit (キアゲン社製)を用いてPCR産物を精製した。精製後のPCR産物については、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay kit (Life Technologies社製)によりDNA濃度を測定した。

【0085】

< DNAのシーケンス >

複数の糞便検体に由来するPCR産物を同じ濃度で混合したものをMiSeq v2 Reagent kit (イルミナ社製)に供し、MiSeqにてシーケンス解析を実施した。

【0086】

< 菌群の同定及び菌数の算出 >

上記シーケンス解析により得られたペアエンド配列をfastq-join (version.1.1.2-301) (<http://code.google.com/p/ea-utils/wiki/FastqJoin>)にて、QIIMEソフトウェア (version 1.6.0) (<http://qiime.org/>)にて97%の相同性を有する配列ごとをOUT (Operational Taxonomy Unit)とした。各OUTの代表配列を下記データベースに対してBLAST検索することにより、腸内菌叢の構成を解析した。

データベース: Greengenes database 12_10

(http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database/12_10)

【0087】

< 結果 >

上述した腸内菌叢の構成の解析の結果、個々の糞便検体について8295 ± 2366の配列が得られた。本実験例では、この配列数を各糞便検体に含まれる全菌数とした。また、これらの配列のうち、個々の門又は科ごとの数を各々の門又は科に属する菌群の数とした。上記相同性検索の結果、表4及び表5に示す腸内菌叢構成が得られた。表4は、門レベルでの分類を示し、表5は、科レベルでの分類を示す。

【0088】

【表4】

門
<i>Actinobacteria</i>
<i>Bacteroidetes</i>
<i>Cyanobacteria</i>
<i>Elusimicrobia</i>
<i>Euryarchaeota</i>
<i>Firmicutes</i>
<i>Fusobacteria</i>
<i>Proteobacteria</i>
<i>Synergistetes</i>
<i>Tenericutes</i>
<i>TM7</i>
<i>Verrucomicrobia</i>

【0089】

10

20

30

40

【表 5】

科		
<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Odoribacteraceae</i>
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Desulfitobacteraceae</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Paenibacillaceae</i>
<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Dethiosulfovibrionaceae</i>	<i>Paraprevotellaceae</i>
<i>Bacillaceae</i>	<i>Elusimicrobiaceae</i>	<i>Pasteurellaceae</i>
<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Peptococcaceae</i>
<i>Barnesiellaceae</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>EtOH8</i>	<i>Prevotellaceae</i>
<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Exiguobacteraceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Rikenellaceae</i>
<i>Cardiobacteriaceae</i>	<i>Flexibacteraceae</i>	<i>Rs-045</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Ruminococcaceae</i>
<i>Catabacteriaceae</i>	<i>Gemellaceae</i>	<i>S24-7</i>
<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>
<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Succinivibrionaceae</i>
<i>Christensenellaceae</i>	<i>Leptotrichiaceae</i>	<i>Synergistaceae</i>
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Syntrophomonadaceae</i>
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Turicibacteraceae</i>
<i>Coprobacillaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Veillonellaceae</i>
<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>mitochondria</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>
<i>Dehalobacteriaceae</i>	<i>Neisseriaceae</i>	

10

20

【0090】

2. 実験例 2

本実験例では、上記実験例 1 で同定された各門又は各科に属する菌群について、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対する各々の菌群の割合が、腸内菌叢を「老齢タイプ」と「若齢タイプ」のいずれかに判定する場合に有用であるか検討した。また、本実験例では、年齢が 65 歳以上の個体から得られた糞便検体を「老齢タイプ」とし、64 歳以下の個体から得られた糞便検体を「若齢タイプ」とした。

30

【0091】

< 回帰式の算出 >

本実験例では、糞便検体の上記 2 種類のタイプへの分類に際して、回帰式を用いた。本実験例では、表 4 及び表 5 に示す門又は科に属する菌群の上記割合を、各々、独立変数とし、糞便検体を得た 174 の個体の年齢を従属変数とし、最小二乗法により、単回帰式を算出した。即ち、本実験例における回帰分析の独立変数及び従属変数は、各々、「1」である。

【0092】

さらに、従属変数については、回帰式を算出する前に、量的変数から質的変数に置き換えた。具体的には、174 の糞便検体を得た各々の個体の年齢について、65 歳以上を「1」、65 歳未満を「-1」に置き換えた。

40

【0093】

【表 6】

	切片(α)	回帰係数(β)
Lachnospiraceae科	1.61	-3.63
Bifidobacteriaceae科	0.18	-3.98
Clostridiaceae科	-0.19	11.07
Bacteroidaceae科	-0.34	0.04
Enterococcaceae科	-0.05	0.63

【0094】

50

上記表 6 に、算出された各回帰式のうち、Lachnospiraceae科、Bifidobacteriaceae科、Clostridiaceae科、Bacteroidaceae科及びEnterococcaceae科の各々に属する菌群の上記割合に基づき算出された回帰式の切片(α)と回帰係数(β)を示す。

【0095】

また、下記式(2)は、本実験例の回帰式を示す。なお、下記式(2)において、αは切片であり、βは回帰係数であり、xは各科に属する菌群の上記割合である。

【0096】

【数4】

$$y = \alpha + \beta x \quad \cdots (2)$$

10

【0097】

本実験例では、算出された切片αと回帰係数βに基づき、上記式(2)の解yを求め、基準と比較した。本実験例では、基準値として「0」を設定し、基準値0を超えた場合に、その糞便検体を得た個体の腸内菌叢について、65歳以上の「老齢タイプ」に分類した。一方、回帰式の解yが0以下の場合には、その糞便検体を得た個体の腸内菌叢について、65歳未満の「若齢タイプ」に分類した。

【0098】

< 結果 >

表 7 に本実験例の結果を示す。表 7 は、Lachnospiraceae科、Bifidobacteriaceae科、Clostridiaceae科、Bacteroidaceae科及びEnterococcaceae科の、各々に属する菌群について、回帰式の解yと基準値に基づく「老齢タイプ」又は「若齢タイプ」への分類と、糞便検体を得た個体の実際の年齢(実年齢)と、を比較した結果を示す。また、正答率(%)とは、検体の分類結果と検体を得た個体の実年齢とが一致した検体数の、検体数全体に占める割合(%)を示す。さらに、検出率は、174の糞便検体のうち、各々の科に属する菌群が検出された検体の割合を示す。なお、各々の科に属する菌群が検出されなかった糞便検体については、「判定結果と実年齢が一致しない検体数」にカウントした。

20

【0099】

【表7】

	判定結果と実年齢が 一致した検体数	判定結果と実年齢が 一致しない検体数	正答率 (%)	検出率 (%)
Lachnospiraceae科	145	29	83.3	100
Bifidobacteriaceae科	117	57	67.2	100
Clostridiaceae科	113	61	64.9	100
Bacteroidaceae科	108	66	62.1	100
Enterococcaceae科	93	81	53.4	97.7

30

【0100】

Bifidobacteriaceae科に属する菌群は、多くのヒトの腸内菌叢に存在し、また、加齢に伴い腸内で菌数が減少することが知られている菌群である。Bifidobacteriaceae科に属する菌群の上記割合に基づく糞便検体の分類において、正答率は67.2%であった。

【0101】

また、Clostridiaceae科、Bacteroidaceae科及びEnterococcaceae科の、各々に属する菌群の上記割合に基づく糞便検体の分類では、正答率は、各々、64.9%、62.1%、53.4%であった。一方、Lachnospiraceae科に属する菌群の上記割合に基づく糞便検体の分類では、正答率は、83.3%であった。

40

【0102】

本実験例の結果から、Lachnospiraceae科に属する菌群の上記割合に基づき、糞便検体を分類した場合、従来、加齢に伴い菌数が変動することが知られているBifidobacteriaceae科の上記割合に基づき分類した場合よりも高い正答率で、検体を分類できることが示された。また、174の全ての検体で、Lachnospiraceae科に属する菌群が検出された。

【0103】

50

上述した結果から、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対するLachnospiraceae科に属する菌群の割合は、糞便検体を「老齢タイプ」と「若齢タイプ」のいずれかに判定する判定方法において、有用な値であることが示された。従って、Lachnospiraceae科に属する菌群の上記割合に基づき糞便検体を判定することにより、精度高く糞便検体を判定できることが示された。

【 0 1 0 4 】

さらに、Lachnospiraceae科に属する菌群の検出率は、174検体において100%であった。このことから、Lachnospiraceae科に属する菌群の上記割合を用いる腸内菌叢の老若判定方法は、複数の糞便検体において、検出される検体が限られる菌群の上記割合を用いる方法に比べて、汎用性の高い方法であることが示された。

10

【 0 1 0 5 】

3. 実験例 3

上述した実験例 2 において、糞便検体に含まれる全ての菌の数に対するLachnospiraceae科に属する菌群の割合に基づいて判定することにより、糞便検体を得た個体の腸内菌叢を「老齢タイプ」と「若齢タイプ」のいずれかに精度高く判定できることが明らかとなった。そこで、本実験例では、Lachnospiraceae科に属する菌群の上記割合と、他の科に属する菌群の上記割合と、を組み合わせることにより、腸内菌叢の判定の精度がより高められるか検証した。

【 0 1 0 6 】

本実験例では、上記実験例 2 で用いた (a) Lachnospiraceae科に属する菌群の上記割合に加えて、(b) Bifidobacteriaceae科、(c) Peptococcaceae科、(d) Enterococcaceae科、(e) Verrucomicrobiaceae科、(f) Catabacteriaceae科、(g) Clostridiaceae科、(h) Caulobacteraceae科、(i) Propionibacteriaceae科、(j) Enterobacteriaceae科、の各々に属する菌群の割合について、糞便検体に含まれる全ての細菌の数に対する各々の菌群の割合を用いた。具体的には、下記の 4 つの組み合わせについて、検討した。

20

パターン A : (a) Lachnospiraceae科、(b) Bifidobacteriaceae科

パターン B : (a) Lachnospiraceae科、(b) Bifidobacteriaceae科、(c) Peptococcaceae科

パターン C : (a) Lachnospiraceae科、(b) Bifidobacteriaceae科、(c) Peptococcaceae科、(d) Enterococcaceae科、(e) Verrucomicrobiaceae科

30

パターン D : (a) Lachnospiraceae科、(b) Bifidobacteriaceae科、(c) Peptococcaceae科、(d) Enterococcaceae科、(e) Verrucomicrobiaceae科、(f) Catabacteriaceae科、(g) Clostridiaceae科、(h) Caulobacteraceae科、(i) Propionibacteriaceae科、(j) Enterobacteriaceae科

【 0 1 0 7 】

< 回帰式の算出 >

本実験例では、糞便検体の分類に際して、実験例 2 と同様に、回帰式を用いた。回帰式については、各科に属する菌群の上記割合を独立変数とし、糞便検体を得た 174 の個体の年齢を従属変数として、最小二乗法により算出した。即ち、パターン A の独立変数は「2」であり、パターン B の独立変数は「3」であり、パターン C の独立変数は「5」であり、パターン D の独立変数は「10」である。

40

【 0 1 0 8 】

さらに、従属変数については、実験例 2 と同様に、回帰式を算出する前に、174 の糞便検体を得た各々の個体の年齢について、65 歳以上を「1」、65 歳未満を「-1」に置き換えた。各科に属する菌群の上記割合と、糞便検体を得た 174 の個体の年齢について、重回帰分析を行い、下記式 (1) に示す回帰式を得た。

【 0 1 0 9 】

【数 5】

$$y = \alpha + \sum_{k=1}^n \beta_k x_k \quad \cdots (1)$$

【0 1 1 0】

上記式(1)において、nは独立変数の数であり、kは菌群が属する科のうち第k番目の科を意味し、 α は回帰式の切片であり、 β は回帰式の回帰係数であり、xは各科に属する菌群の上記割合である。

【0 1 1 1】

10

また、下記表8に、各パターンの回帰式の切片と回帰係数(偏回帰係数)を示す。なお、菌群の括弧内のアルファベットは、上述した(a)~(j)の各科に対応する。

【0 1 1 2】

【表 8】

パターン	切片 (α)	回帰係数(β)									
		菌群 (a)	菌群 (b)	菌群 (c)	菌群 (d)	菌群 (e)	菌群 (f)	菌群 (g)	菌群 (h)	菌群 (i)	菌群 (j)
A	1.90	-3.72	-4.32	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1.78	-3.61	-4.08	69.54	-	-	-	-	-	-	-
C	1.84	-3.74	-4.24	67.85	-2.44	104.56	-	-	-	-	-
D	1.47	-3.23	-3.60	81.55	-2.35	112.91	9.04	-1.69	655.86	-1537.63	1.73

【0113】

本実験例では、算出された切片 α と回帰係数（偏回帰係数） β に基づき、回帰式の解 y を求め、基準と比較した。基準値は、実験例2と同様に、「0」を設定し、基準値0を超えた場合に、その糞便検体を得た個体の腸内菌叢について、65歳以上の「老齢タイプ」と判定した。

【0114】

< 結果 >

表9に本実験例の結果を示す。表9は、回帰式の解 y と基準値に基づく「老齢タイプ」又は「若齢タイプ」への分類と、糞便検体を得た個体の実際の年齢（実年齢）と、を比較した結果を示す。また、正答率（％）とは、検体の分類結果と検体を得た個体の実年齢と

10

20

30

40

50

が一致した検体数の、検体数全体に占める割合（％）を示す。

【 0 1 1 5 】

【表 9】

パターン	判定結果と実年齢が 一致した検体数	判定結果と実年齢が 一致しない検体数	正答率 (%)
A	159	15	91.4
B	161	13	92.5
C	163	11	93.7
D	165	9	94.8

【 0 1 1 6 】

10

表 9 のパターン A に示すように、Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合に加えて、Bifidobacteriaceae 科に属する菌群の上記割合に基づき糞便検体を分類すると、その正答率は、90％を超えた。また、パターン B に示すように、Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合及び Bifidobacteriaceae 科に属する菌群の上記割合に加えて、Peptococcaceae 科に属する菌群の上記割合に基づき糞便検体を分類すると、その正答率は、92.5％であった。さらに、パターン C では、正答率が 93.7％であり、パターン D では、正答率が 94.8％であった。

【 0 1 1 7 】

本実験例の結果から、Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合に加えて、Bifidobacteriaceae 科、Peptococcaceae 科、Enterococcaceae 科、Verrucomicrobiaceae 科、Catabacteriaceae 科、Clostridiaceae 科、Caulobacteraceae 科、Propionibacteriaceae 科又は Enterobacteriaceae 科のうち、少なくともいずれかの一つの科に属する菌群の上記割合に基づき糞便検体を分類した場合には、正答率をさらに高められることが示された。

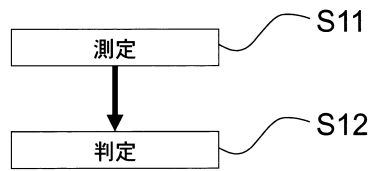
20

【 0 1 1 8 】

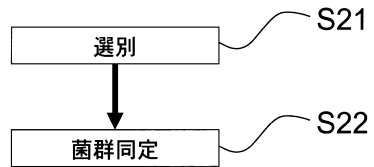
また、実験例 2 において示されたように、Bifidobacteriaceae 科に属する菌群の上記割合、Clostridiaceae 科に属する菌群の上記割合及び Enterococcaceae 科に属する菌群の上記割合は、単独で腸内細菌叢の判定に用いた場合には、正答率が 50～60％程度であった。しかし、これらの菌群の上記割合については、Lachnospiraceae 科に属する菌群の上記割合と組み合わせて判定に用いた場合には、腸内菌叢の老若の判定に有用であることが示された。

30

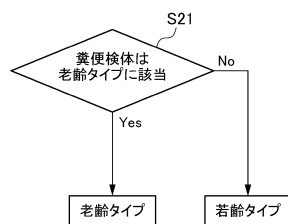
【図 1】



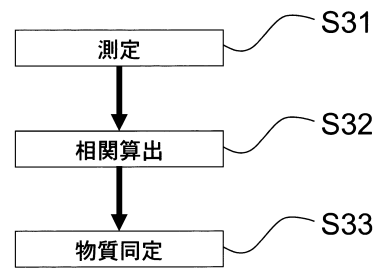
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0006231925000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 1 2 0 3 2 (J P , A)

ISHIBASHI, N. et al. , Bifidobacteria: their significance in human intestinal health , M al. J. Nutr. , 1 9 9 7 年 , Vol.3 , pp.149-159

BIAGI, Elena et al. , Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians , PLoS ONE , 2 0 1 0 年 5 月 , Vol.5, Issue 5 , e10667

MARATHE, Nachiket et al. , Changes in human gut flora with age: an Indian familial study , BMC Microbiology , 2 0 1 2 年 , Vol.12 , 222

光岡知足, 加齢および疾病の腸内細菌叢に及ぼす影響, 医学のあゆみ, 1 9 8 8 年 1 0 月 2 9 日 , Vol.147, No.5, Pages 363-366

辨野 義己, 大腸は病気の発生源 - 腸内常在菌の全容解明および疾病予防 - , 消化と吸収, 2 0 1 1 年 3 月 3 1 日 , Vol.33, No.2, Pages 216-225

MARIAT, D. et al. , The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age , BMC Microbiol. , 2 0 0 9 年 , Vol.9: 123 , pp.1-6

YATSUNENKO, T. et al. , Human gut microbiome viewed across age and geography , Nature , 2 0 1 2 年 , Vol.486 , pp.222-227

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)