

プロバイオティクスの認知機能とストレスへの影響に関する研究

ライプニツ脳科学研究所：高垣 堅太郎

要 旨

本研究はプレーンヨーグルトによって腸内細菌叢を調整することによる、記憶・学習・ストレスなどの高次脳機能への影響を調べることを長期目標とする。とりわけ、小児医療で頻繁に遭遇する抗生物質使用条件下（腸内細菌叢攪乱条件化）に注目し、腸内細菌叢の抗生物質使用による攪乱が長期記憶とストレスにどのような影響を及ぼすか、さらにはその影響がヨーグルトの投与によって緩和できるかどうかも前臨床的に試験した。よって作業仮説としては、抗生物質投与状態では腸内細菌叢攪乱により高次学習行動に支障が見られ、これがヨーグルトの同時投与により解消されるのではないかと考えた。この前臨床試験を行うに当たっては、複雑な大脳皮質依存性学習のモデルである、スナネズミによる聴覚識別モデルを用いた。

本研究では生物学的に有意な抗生物質使用条件下での行動の攪乱は見られ、ヨーグルトの同時投与によってこれは解消された。ただし、さまざまな理由により、中心的な学習指標であるデルタ値において統計的有意にはいたらなかった。考察部ではこの原因を精査し、今回の研究から得られる改善点、今回の研究を予備研究とする追加研究の展開などを考えてゆく。

緒 言

近年、腸内細菌叢による全身の健康状態・病態への影響が徐々に解明されてきた¹⁾。炎症反応や内分泌・代謝疾患への影響はもちろんのこと²⁾、不安障害・鬱³⁾などといった心身疾患、さらにはパーキンソン病をはじめ本来中枢神経系のみがかかわっていると考えられていた脳神経疾患⁴⁾、そして認知機能への影響^{5),6)}も徐々に知られるようになってきた。

例えば認知機能に限っていうと、腸内感染や無菌飼育によって空間記憶機能が低下し、これがプロバイオティクスの投与によって緩和されることが示されている⁷⁾。ただし、この先行研究では、空間記憶という主に海馬などに依存する進化学的に、低次の脳機能を中心に評価している点で、ヒトの学習のモデルとしてそもそも難点があるほか、モデルの結果をヒトの行動に敷衍する上では学習に沿ったさまざまな段階の分析（刺激習得、オペラント条件付け習得、分類化習得など）の評価や学習中のストレスの評価が難しいという点も問題である。

こういった点を含め、一般的に齧歯類を用いたモデルはヒトの認知機能やストレスに関する研究のモデルとして適さない部分も多い。例えば、多くの齧歯類の記憶タスクは、単純すぎて大脳皮質をすべて取り除いた除脳動物でも十分行うことが可能であり、逆に除脳動物の方が学習の結果が良いことすらある⁸⁾。よって、齧歯類を用いてヒトの認知機能などを探索する場合、種の違いを十分に留意した上で行動モデルを注意深く選定し、実験結果は細心の注意を払いつつ敷衍する必要がある。

その点、本研究で用いるモデルは脳皮質依存性がはっきりと確立されており⁹⁾⁻¹²⁾、未知の聴覚刺激をもその特徴から分類して認識できるという高度な分類化学習機能も可能であること¹³⁾、学習記憶期間も5~10日間と比較的長いこと、学習の過程（刺激習得、オペラント条件付け習得、分類化習得など）を経時的に追えること、また、この5~10日間の行動中のストレス状態を飛び跳ねや行動量のビデオ解析を通して定量できるという利点がある。

実験方法

1 実験動物（対象者）

本実験は生後3~4ヶ月のスナネズミ (*Meriones unguiculatus*) を対象として行った。この種は学習行動が豊かで高次脳機能の研究には向くが、難点として、癲癇体質が挙げられる。よって、以前発表された方法¹⁴⁾などを参考にしながら三半規管刺激による癲癇誘起によりスクリーニングを行い、癲癇罹患動物を取り除いた。残る合計21匹を対象として、行動実験を行った。

2 実験飼料（試験食）

本実験では通常飼料の任意摂取とした。ただし、実験介入として対象動物を4群に分け、飲料水をそれぞれ以下の通りとした：

① Ctl: 通常飲料水

② Abx: 通常飲料水+抗生物質 (ampicillin 1 g/L, neomycin 1 g/L, metronidazole 1 g/L, vancomycin 0.5 g/L)

③ Abx+Yog: 通常飲料水+抗生物質+市販のプレーンヨーグルト (重量あたり10%)

④ Yog: 通常飲料水+市販のプレーンヨーグルト

飲料水は、行動実験開始の1週間前より、このように手を施した。

なお、上述の標準抗生物質溶液は腸内細菌叢を完全に攪乱させる事がマウスで示されているが、一方で下痢などの病態を引き起こす事も知られている。スナネズミについては飲料水の摂取量および体重変化を経日的に測定し、また、異常病体を示さないかどうか毎日監視した。

実験中糞便が少々やわらかくなった以外は、特段の病態は認めなかった。スナネズミは砂漠動物で節水量も体重あたりマウスの半分以下に抑えることができるため、飲料水摂取量の監視は、経口投与の有効性を確認する意味も果たした。試験群による飲料水摂取量は、大きな差異を認めなかった。

3 実験方法

本研究ではスナネズミを用いた聴覚刺激の 2 分類タスクを用いた。2 つの聴覚刺激としては FM スイープ音として、2-4 kHz の上昇音または 4-2 kHz の下降音（両者とも 250 ms）を用いた。対象動物は 2 チェンバーからなる行動実験箱（シャトルボックス）に入れた後、3 分間の順化期間を経てから約 30 秒ごとに行動のトライアルを行い、これを 90 回繰り返した。

トライアルでは上昇音か下降音の 2 種類の聴覚刺激音を聞き、上昇音であれば行動実験箱の反対側のチェンバーに移動（Go）、下降音であれば移動しない（NoGo）。ただし、上昇音に対して誤って反対チェンバーに移動しなかった場合（NoGo）、または下降音に対して誤って移動した場合（Go）は、後脚より若干の電気ショックによる学習強化（reinforcement）を行った。この実験を 1 日 1 回、5 日間行うことにより、全ての群において優位の学習が見られた。

さらに、学習行動と記憶の柔軟性を評価するため、5 日間の学習の後、2 日間の休みを置き、再度 5 日間の「逆転学習（reversal learning）」実験を行った。

実験装置は、行動をパソコン端末から制御し反応時間などを記録したほか、同時に本研究の一環としてカメラを用いて行動を記録し、パソコンと同期するシステムをプログラムした。行動実験終了後、最終日にはクエン酸溶液下で胸郭から経心室的に血液を採取し、血清標本を準備した。

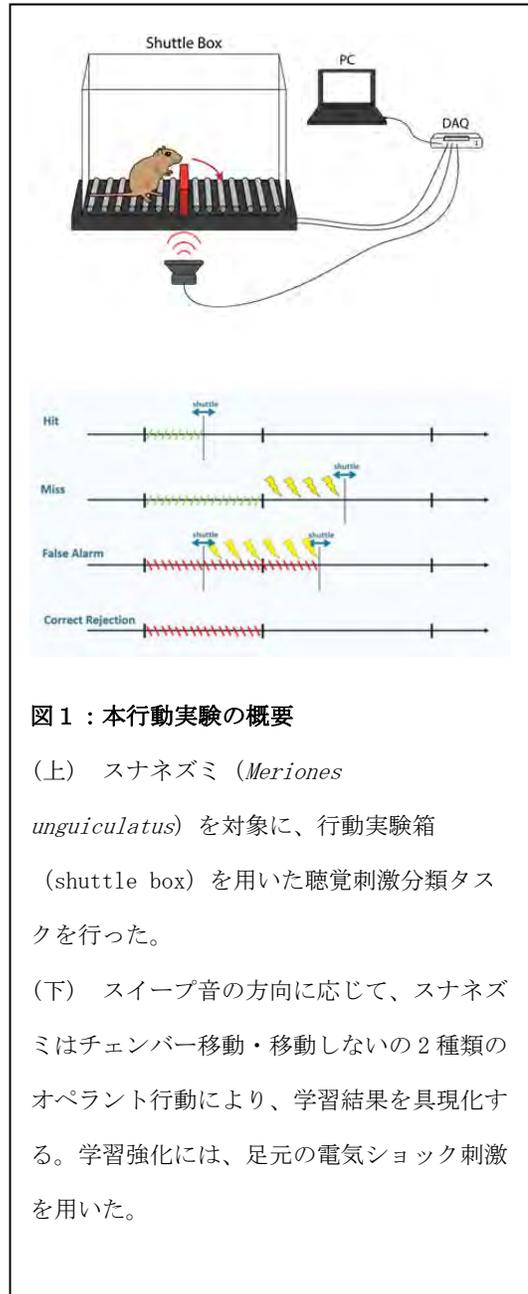


図 1：本行動実験の概要

(上) スナネズミ (*Meriones*

unguiculatus) を対象に、行動実験箱

(shuttle box) を用いた聴覚刺激分類タスクを行った。

(下) スイープ音の方向に応じて、スナネズミはチェンバー移動・移動しないの 2 種類のオペラント行動により、学習結果を具現化する。学習強化には、足元の電気ショック刺激を用いた。

4 分析方法

10 日間の学習行動実験を通して行動システムと連動したビデオ記録装置を用い、学習の速度やストレス・不安行動（飛び跳ねや行動量など）をビデオ測定・定量し、4 群の行動の違いを比較した。

行動実験終了後は外部検査機関による血清標本の分析でコルチソールをストレスマーカーとして測定に供した。また、行動中の糞便は PCR 検査に供し、腸内細菌叢の攪乱を確認した。

5 統計解析

行動のトライアル成功率、反応時間（reaction time）についての解析には、Mathematica（バージョン 10-11、Wolfram Research 社）を用いてプログラムしたルーチンで、4 群の統計的検定などにはこのソフトに装備されている標準的な関数を使用した。

また、本研究の一環として、行動実験中の動物の行動やストレス状態を測定するためのソフト開発も行った（図 2）。



図 2：本行動実験のビデオ解析

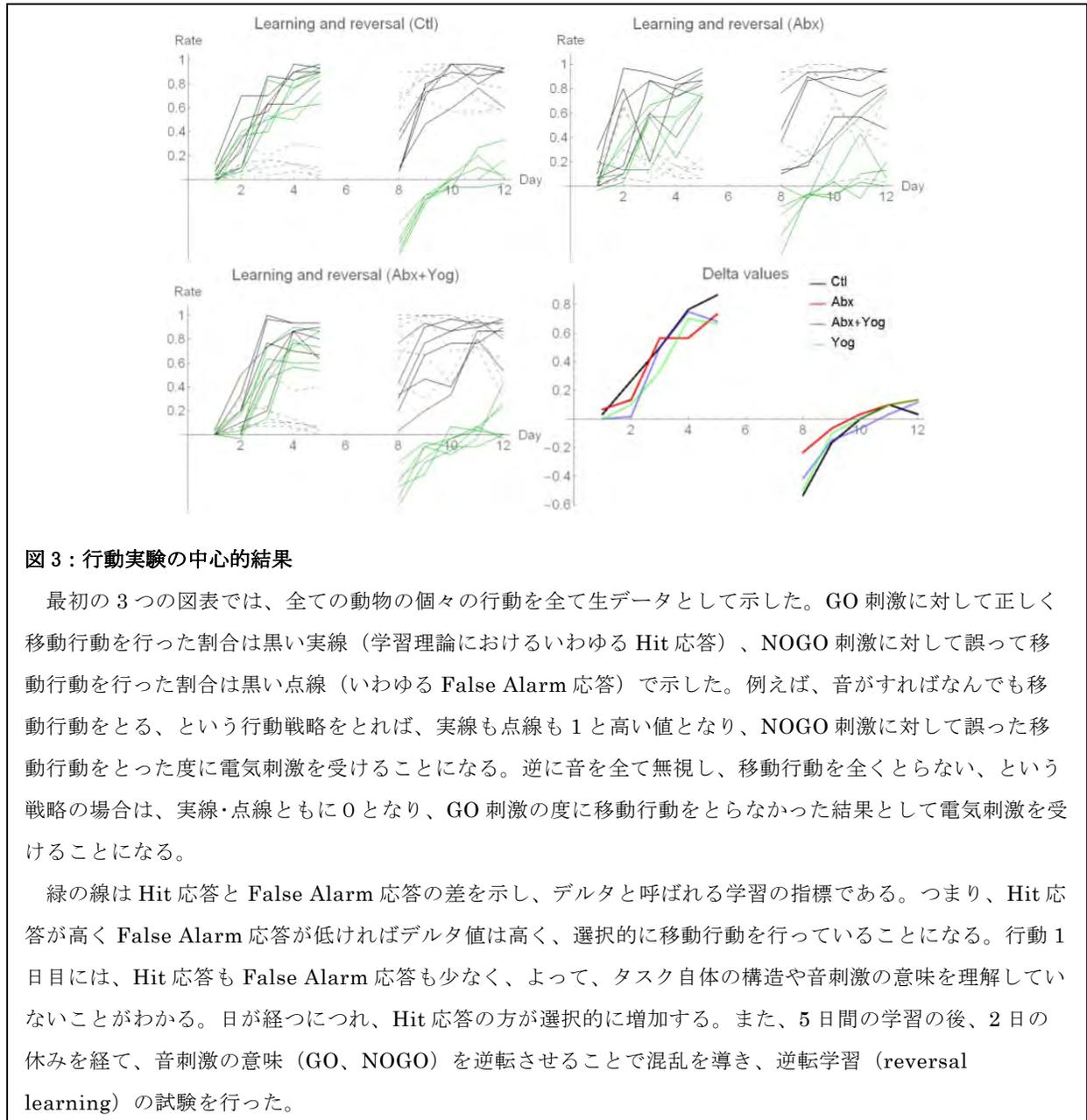
本研究においては、ビデオによる行動解析を行った。その一例として、本研究の一環として開発・改良した解析ソフトの解析画面を上に表示。ソフトが耳部分を正確に捉え、その経時的な軌跡を表示できていることがわかる。

また中段のグラフには、行動実験の経過を正確に捉えるための LED 信号の軌跡が、矩形派として伺える。その下には、複雑な形状の動き探知の軌跡がうかがえる。動きが止まった状態の部分は、フリージングというストレス行動を示す。（Takagaki, et al., in preparation）

結果

1 行動実験の生データ

行動実験は予定通りとり行われた。中心的な記憶指標について、以下に 3 群の生データと前実験群の中央値（右下）とを示す。グラフの示す内容については、図の説明に記した。



この行動実験の生データからは、抗生物質条件（Abx、図 3 右上）において、コントロール条件（Ctl、図 3 左上）と比べ、学習について個体差が大きく、行動が攪乱されている事が伺える。これは、ストレスなどによる行動の阻害と解釈できる。また、抗生物質＋ヨーグルト条件下（Abx+Yog、図 3 左下）においては行動が再び正常化していることが伺え、抗生物質条件化での行動に対する悪影響が緩和されていると解釈できる。

行動の攪乱が単に学習速度の低下（デルタ値の上昇の低下）ではないという点は、特記に値する。つまり、抗生物質による攪乱とヨーグルトによる回復は、記憶というプロセス自体を直接阻害しているわけではないと考えられ、むしろ、ストレスや行動をとりおこなう上での集中力のよなものに対する影響と考えられるのである。この点については以下考察で述べるとおり、今後の研究の方向性として考えてゆきたい。

こうした行動学的・個体的なデータは明らかであるが、単にデルタ指標を取って統計を行うと、以上の傾向が中央値に若干みられるものの、統計学的な有意には至っていない。この点は今後、行動実験の方法および実験計画・個体数の面から改善できる点である（考察参照）。

2 病態・生化学データ

諸般の事情による研究開始の遅れもあり、血清及び糞便の生化学検査は、外注実験の結果を待つ状態である。この部分については、水分摂取量と体重の推移を含め、8月の報告会にての報告をお待ちいただきたい。

考察と展望

1 本研究の結論

本研究では行動学的に有意な抗生物質使用条件下での行動の攪乱はみられ、ヨーグルトの同時投与によってこれは解消された。ただし、中心的な学習指標であるデルタ値において統計的有意にはいたらなかった。

よって、この実験系は抗生物質投与による高次行動の攪乱およびヨーグルトによる緩和を検証する上で希望的な結果を示してはいるが、実用に供するためには以下に述べる改良を行い、行動学的にみられる現象を統計的にも優位な形に具現化する必要がある。

2 今後の研究において改善すべき点

本研究は、この後の研究に対していくつかの改善点を指し示すものとなった。もちろん、生物学的に有意と思われても統計的には有意ではなく、個体差が大きい場合は、予備実験の個体差のバラつきをもとに効果について統計的有意を検証するのに必要な個体数を計算し、実験個体数を増やした計画の後続実験を行う、という方針もある。ただ、本研究の行動実験はとても労力のかかるものであるため、本研究で示したよりも大幅に高い個体数をもって同じ後続実験を行うことはあまり現実的でない。よって、実験内容の精査が必要となる。

実験の行動学的な面を考える上で最も大きな問題点は、抗生物質投与条件化での行動の攪乱が、記憶の主要指標であるデルタ値には統計的に有意に反映されていないことである。行動実験ではよくあることだが、タスクが本研究の問いかける攪乱条件に対して簡単すぎることに起因していると考えられる。逆に、より学習が難しいタスクの方が何日にもわたって学習が必要であるため、本研究で指し示されたストレス条件などによっての攪乱効果をより如実に現わすと考えられる。よって、後続実験では本研究で用いたタスクの構成（delay conditioning と呼ばれる音刺激が何度も行われる条件）ではなく、より高度なタスク構成（trace conditioning と呼ばれる 1 回の音刺激に対して、時間差を持って応答しなければならない条件）に変更することを予定している。より高度なタスク構成を用いると、当部局内での 30 年近い経験からして、学習にかかる日数は 3 日程度から、5~10 日程度に延長されることは間違いない。ただし、行動の日数が延長されるため、実験の難易度が若干上がることの覚悟が必要である。

また、本研究ではパソコンによるイメージ解析システムを構築したが、これを用いた行動パラメータのより詳細な分析により、直接本研究の実験データより行動の有意性が数値化できる可能性もある。この点については研究を続け、8 月の発表会までにはより詳しい方向性を示してゆけるよう、鋭意プログラミングを行っている。例えば、フリーズ行動によって、各群のストレス状態を数値化、また、反応時間の解析などによって、各群の集中状態を数値化することができるはずである。

3 今後の展望

後続研究により本研究の結果が確認されより確固とした形で定量化できれば、脳腸管軸の高次行動に対する影響を探索するモデルとして、とても有用なものとなる可能性がある。その場合は、迷走神経による生理学的な連携を評価するため、別実験において行動中の迷走神経発火および脳波を測定したり、2 デオキシグルコースによる脳代謝測定において、脳の中のどの部分が抗生物質・ヨーグルトによって影響されているかを測定することも視野に入れたい。

文 献

- 1) Sommer, F. & Bäckhed, F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 227–238 (2013).
- 2) Caesar, R., Fåk, F. & Bäckhed, F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism: Review: Gut microbiota and metabolism. *J. Intern. Med.* **268**, 320–328 (2010).
- 3) Foster, J. A. & McVey Neufeld, K.-A. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* **36**, 305–312 (2013).
- 4) Klingelhoefer, L. & Reichmann, H. Pathogenesis of Parkinson disease—the gut-brain axis and environmental factors. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 625–636 (2015).
- 5) Borre, Y. E., Moloney, R. D., Clarke, G., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. in *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease* (eds. Lyte, M. & Cryan, J. F.) **817**, 373–403 (Springer New York, 2014).
- 6) Cryan, J. F. & Dinan, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 701–712 (2012).
- 7) Gareau, M. G. *et al.* Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* **60**, 307–317 (2011).
- 8) Oakley, D. A. Neocortex and learning. *Trends Neurosci.* **2**, 149–152 (1979).
- 9) Ohl, F. W., Scheich, H. & Freeman, W. J. Change in pattern of ongoing cortical activity with auditory category learning. *Nature* **412**, 733–736 (2001).
- 10) Wetzels, W., Ohl, F. W. & Scheich, H. Global versus local processing of frequency-modulated tones in gerbils: An animal model of lateralized auditory cortex functions. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 6753–6758 (2008).
- 11) Wetzels, W., Ohl, F. W., Wagner, T. & Scheich, H. Right auditory cortex lesion in Mongolian gerbils impairs discrimination of rising and falling frequency-modulated tones. *Neurosci. Lett.* **252**, 115–118 (1998).
- 12) Ohl, F. W., Wetzels, W., Wagner, T., Rech, A. & Scheich, H. Bilateral ablation of auditory cortex in Mongolian gerbil affects discrimination of frequency modulated tones but not of pure tones. *Learn Mem* **6**, 347–362 (1999).
- 13) Wetzels, W., Wagner, T., Ohl, F. W. & Scheich, H. Categorical discrimination of direction in frequency-modulated tones by Mongolian gerbils. *Behav. Brain Res.* **91**, 29–39 (1998).
- 14) Seto-Ohshima, A., Ito, M., Kudo, T. & Mizutani, A. Intrinsic and drug-induced seizures of adult and developing gerbils. *Acta Neurol. Scand.* **85**, 311–317 (1992).