

ヒトマイクロバイオーム

Vol. 2

解析技術の進展とデータ駆動型・ターゲット機能型研究最前線

監修

服部正平

監修者・執筆者一覧

【監修者】

服部 正平 早稲田大学理工学術院先進理工学研究科 教授

【執筆者】(執筆順)

服部 正平 早稲田大学理工学術院先進理工学研究科 教授

緒方 勇亮 国立研究開発法人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 特別研究員

須田 互 国立研究開発法人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 副チームリーダー

飯田 哲也 大阪大学微生物病研究所 教授

金子 慶也 東京大学大学院新領域創成科学研究科

関 真秀 東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任助教

Lucky R Runtuwene 東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任助教

鈴木 穰 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

鈴木 慶彦 東京大学大学院新領域創成科学研究科

西嶋 傑 欧州分子生物学研究所構造・計算生物学ユニット

森下 真一 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

木口 悠也 国立研究開発法人産業技術総合研究所産総研・早大生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ リサーチアシスタント/早稲田大学大学院先進理工学研究科

福田 真嗣 慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任教授/神奈川県立産業技術総合研究所腸内細菌叢プロジェクト グループリーダー/筑波大学医学医療系 客員教授/株式会社メタジェン 代表取締役社長 CEO

岡橋 伸幸 大阪大学大学院情報科学研究科 准教授/国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター 客員研究員

上田 政宏 JSR 株式会社 JSR・慶應義塾大学医学化学イノベーションセンター/国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター 客員研究員

有田 誠 慶應義塾大学薬学部 教授/国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター チームリーダー/横浜市立大学大学院生命医科学研究科 客員教授

大津 厳生 筑波大学生命環境系 准教授

川島 祐介 公益財団法人かずさ DNA 研究所ゲノム事業推進部 研究員

小原 収 公益財団法人かずさ DNA 研究所ゲノム事業推進部 部長

平山 和宏	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
坂本 光央	国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室 専任研究員／国立研究開発法人日本医療研究開発機構 PRIME
森 宙史	大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所情報研究系 助教
黒川 顕	大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所情報研究系 教授/副所長
永田 尚義	東京医科大学消化器内視鏡学 准教授
松木 隆広	株式会社ヤクルト本社中央研究所基盤研究所共生システム研究室 室長
金 倫基	慶應義塾大学薬学部 教授
高安 伶奈	東京大学大学院医学系研究科 助教
加藤久美子	森永乳業株式会社研究本部基礎研究所腸内フローラ研究グループ 研究員
小田巻俊孝	森永乳業株式会社研究本部基礎研究所腸内フローラ研究グループ グループ長
細見 晃司	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センター 研究員
國澤 純	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センター センター長
長谷 耕二	慶應義塾大学薬学部 教授
新藏 礼子	東京大学定量生命科学研究科 教授
小川 順	京都大学大学院農学研究科 教授
岸野 重信	京都大学大学院農学研究科 准教授
中本 伸宏	慶應義塾大学医学部 准教授
菊水 健史	麻布大学獣医学部 教授
上村いつか	麻布大学大学院獣医学研究科
栃谷 史郎	鈴鹿医療科学大学保健衛生学部 准教授
市川 将隆	慶應義塾大学医学部 助教
筋野 智久	慶應義塾大学医学部 専任講師
金井 隆典	慶應義塾大学医学部 教授
竹内 直志	国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター 研修生／慶應義塾大学 大学院医学研究科
中西 裕美子	地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所腸内細菌叢プロジェクト 常勤研 究員／国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター粘膜システム研究 チーム 客員研究員
前田 悠一	大阪大学大学院医学系研究科 助教
佐藤和貴郎	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長

山村 隆	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所 特任研究部長
平山 正昭	名古屋大学大学院医学系研究科 准教授
大野 欽司	名古屋大学大学院医学系研究科 教授
福土 審	東北大学大学院医学系研究科 教授／東北大学病院心療内科 科長
吉田 尚史	神戸大学大学院医学研究科 医学研究員
山下 智也	神戸大学医学部附属病院循環器内科 准教授
平田 健一	神戸大学大学院医学研究科 教授
梅井 正彦	東京大学大学院医学系研究科
赤澤 宏	東京大学大学院医学系研究科 講師
クヌギ 功刀 浩	帝京大学医学部 教授／国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 客員研究員
内藤 裕二	京都府立医科大学大学院医学研究科 准教授
高木 智久	京都府立医科大学大学院医学研究科 准教授
成田 雅美	東京都立小児総合医療センターアレルギー科 医長
下条 直樹	千葉大学大学院医学研究院小児病態学 教授
塩崎 有宏	富山大学附属病院産科婦人科 講師/臨床准教授
齋藤 滋	富山大学 学長
三島 英換	東北大学病院腎高血圧内分泌科 院内講師
菊地 晃一	東北大学東北メディカル・メガバンク機構 助教
阿部 高明	東北大学大学院医工学研究科 教授
岩田 恭宣	金沢大学附属病院感染制御部腎臓内科 特任准教授
中出 祐介	金沢大学附属病院臨床検査部 副技士長
和田 隆志	金沢大学大学院腎臓内科学 教授
垣花 和彦	東京都立駒込病院血液内科 医長
井上 亮	摂南大学農学部 教授
向山 広美	東京農工大学大学院農学研究院
宮本 潤基	東京農工大学大学院農学研究院 特任助教
木村 郁夫	東京農工大学大学院農学研究院 教授
青木 亮	江崎グリコ株式会社健康科学研究所
山下 喜久	九州大学大学院歯学研究院 教授
竹下 徹	九州大学大学院歯学研究院 准教授
山崎 和久	新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

池田 恵莉	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 非常勤講師
竹内 康雄	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 講師
東 みゆき	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授
石原 和幸	東京歯科大学微生物学講座 教授
富田 秀太	岡山大学病院ゲノム医療総合推進センター 准教授
川崎 洋	国立研究開発法人理化学研究所科技ハブ産連本部 上級研究員
天谷 雅行	慶應義塾大学医学部 教授
漆山 大知	福岡大学医学部 助教
秦 健一郎	国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所周産期病態研究部 部長
宮本 新吾	福岡大学医学部 主任教授
米井 嘉一	同志社大学大学院生命医科学研究科 教授
HAASBROEK Kyle	同志社大学大学院生命医科学研究科
辻 典子	国立研究開発法人産業技術総合研究所細胞分子工学研究部門 上級主任研究員
松本 光晴	協同乳業株式会社研究所技術開発グループ 主幹研究員
庄司 俊彦	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門食品健康機能研究領域 ユニット長
遠山 忠	山梨大学大学院総合研究部/国際流域環境研究センター 准教授
石澤 秀紘	静岡大学グリーン科学技術研究所 日本学術振興会特別研究員
宮本 浩邦	千葉大学大学院園芸学研究科 連携客員教授/国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター 客員主管研究員/株式会社サーマス CTO
大野 博司	国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター粘膜システム研究チーム チームリーダー
児玉 浩明	千葉大学大学院生物化学研究室 教授
島 綾香	アニコム先進医療研究所株式会社研究開発部 課長/主席研究員
石原 玄基	アニコム先進医療研究所株式会社 取締役

目次

序 論 ヒトマイクロバイオーム研究の現状と今後の展望

(服部 正平)

1. はじめに	3
2. ヒトマイクロバイオーム研究の国際動向	3
3. ヒトマイクロバイオームの科学的・社会的インパクト	6
4. おわりに	7

第 1 編 マイクロバイオームにおける解析技術とデータ分析

第 1 章 メタゲノム解析

第 1 節 メタゲノム解析・16S 解析とその解析技術

(緒方 勇亮, 須田 互)

1. はじめに	11
2. 腸内細菌叢解析の方法論	11
3. プロトコールの違いによる解析結果への影響の評価	14
4. おわりに	16

第 2 節 メタゲノム解析による病原微生物検出

(飯田 哲也)

1. はじめに	19
2. NGS とメタゲノム解析	19
3. メタゲノム解析の病原微生物検出への応用	19
4. メタゲノム解析による新規病原微生物の検索	22
5. 日常検査におけるメタゲノム解析	24
6. 日常検査への導入における課題	25
7. マイクロバイオーム解析	25
8. おわりに	27

第 3 節 ナノポアシークエンサーを用いた On Site 解析：メタゲノム解析への展望

(金子 慶也, 関 真秀, Lucky R Runtuwene, 鈴木 穰)

1. はじめに	29
2. On Site シークエンスにおけるナノポアシークエンサー	30
3. ナノポアシークエンサーを用いたメタゲノム解析	31

目次

4. ショットガンメタゲノム解析：ゲノムアセンブルへ	32
5. 情報解析	32
6. 実施例	33
7. おわりに	35

第4節 ロングリードメタゲノミクス (鈴木 慶彦, 西嶋 傑, 森下 真一)

1. はじめに	37
2. ロングリードが求められる場面	37
3. ロングリードによる細菌叢の全長 eMGE 解析	38
4. ロングリードのこれから	43

第5節 ヒト腸内ファージ叢 (バイローム) 解析 (木口 悠也)

1. はじめに	47
2. 腸内バイローム解析の方法論	47
3. 腸内ファージ叢の生理機能	49
4. 長鎖型シーケンサーを用いた腸内ファージ叢解析	50
5. おわりに	55

第2章 代謝物・遺伝子産物解析

第1節 マイクロバイオームの機能理解に向けたメタボロゲノミクスアプローチ (福田 真嗣)

1. はじめに	57
2. メタボロミクスに用いる分析装置	57
3. メタボロゲノミクスアプローチ	59
4. 腸内エコシステムのバランス破綻がもたらす腸管関連疾患	61
5. メタボロゲノミクスアプローチにより明らかになった早期大腸がんマーカー	63
6. 腸内エコシステムのバランス破綻がもたらす全身性疾患	64
7. 腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす生体恒常性	66
8. おわりに	68

第2節 マイクロバイオームのリピドミクス (岡橋 伸幸, 上田 政宏, 有田 誠)

1. はじめに	71
2. 腸内細菌によって産生される脂質	71
3. 腸内細菌脂質の計測法	74
4. 未知脂質の効率的同定法の開発	76
5. おわりに	78

第3節 硫黄でマイクロバイオームを知る：腸内・口腔内フローラ診断に役立つツール (大津 巖生)

1. はじめに 79
 2. 硫黄の網羅的解析手法 81
 3. おわりに 84

第4節 マイクロバイオームのプロテオーム解析 (川島 祐介, 小原 収, 須田 互)

1. ゲノム情報とプロテオーム解析 87
 2. なぜマイクロバイオームのプロテオーム解析が必要なのか? 87
 3. マイクロバイオームのプロテオーム解析の前処理法 88
 4. LC-MS/MS 分析とデータ解析 89
 5. リファレンスデータベースについて 90

第3章 無菌動物とノトバイオート技術 (平山 和宏)

1. はじめに 93
 2. マイクロバイオーム研究に用いられる技術 93
 3. 無菌動物技術とノトバイオート技術 97
 4. おわりに 100

第4章 常在菌の分離培養・分類 (坂本 光央)

1. はじめに 103
 2. 常在菌の分離培養 103
 3. 常在菌の分類 105
 4. おわりに 108

第5章 ヒトマイクロバイオーム統合データベースの構築 (森 宙史, 黒川 顕)

1. はじめに 111
 2. 公共の塩基配列データレポジトリ 111
 3. マイクロバイオームデータベース 112
 4. ヒトマイクロバイオーム統合データベース 115
 5. 統合 DB を利用したアプリケーション開発 117
 6. おわりに 118

第2編 腸内マイクロバイオームの生態と機能

第1章 メタゲノムデータを用いた腸内細菌叢と影響因子

(永田 尚義, 西嶋 傑)

1. 外的・内的要因と腸内細菌叢 123
2. 世界の大規模腸内細菌研究 123
3. 日本人を対象とした腸内細菌研究が必要 125
4. 日本人の大規模腸内細菌研究 126
5. 大規模腸内細菌研究における問診情報の注意点 128
6. 腸内細菌研究のサンプル収集・保存の注意点：腸管洗浄後の便は避けるべき 129

第2章 年齢・加齢と腸内細菌

第1節 乳児腸内フローラの形成メカニズム—乳児腸内菌叢の形成に影響を与える

ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖利用遺伝子の同定— (松木 隆広)

1. はじめに 131
2. 新生児の生後1カ月間の腸内菌叢構成の変化 131
3. 菌叢構成と腸内環境の関連性 132
4. ビフィズス菌の母乳オリゴ糖の利用性は菌株ごとに異なる 134
5. フコシルラクトース利用に必須な遺伝子の同定 135
6. FL利用遺伝子は乳児の腸内菌叢構成および有機酸プロファイルに影響を与える 136
7. 乳児腸内菌叢に影響を与えるその他の因子 137
8. おわりに 138

第2節 乳幼児の腸内細菌叢の特性

(金 倫基)

1. はじめに 141
2. 乳児腸内細菌の役割 141
3. 乳児期の腸内細菌叢を変化させる環境因子とその影響 144
4. おわりに 147

第3節 マウス：加齢と腸内細菌叢

(高安 伶奈)

1. はじめに 149
2. 一生にわたるマウス腸内細菌叢の変遷 150
3. まとめと今後の展望 153

第4節 腸内細菌叢への加齢の影響

(加藤 久美子, 小田巻 俊孝)

1. はじめに 155

2. 加齢の腸内細菌叢への影響	155
3. おわりに	162

第3章 腸内細菌叢と免疫

第1節 共生細菌を介した粘膜組織での免疫システムの発達と制御

(細見 晃司, 國澤 純)

1. はじめに	165
2. 粘膜組織の構造と生体防御	165
3. 腸内細菌を介した粘膜免疫の活性化	168
4. 腸管リンパ組織内共生細菌と粘膜免疫	170
5. 共生細菌が持つユニークな菌体成分構造と免疫制御	172
6. 腸管以外の粘膜面における常在細菌と粘膜免疫	173
7. おわりに	174

第2節 腸内細菌定着による宿主エピゲノム修飾変化

(長谷 耕二)

1. はじめに	177
2. 腸内代謝物による Treg 細胞誘導メカニズム	177
3. 酪酸による濾胞制御性 T 細胞の誘導	179
4. 腸内細菌と DOHaD	180
5. おわりに	181

第3節 腸管 IgA による腸内細菌叢制御メカニズム

(新藏 礼子)

1. はじめに	183
2. 腸管 IgA 抗体の機能	183
3. 腸管 IgA 抗体の種類	185
4. 腸管 IgA 抗体が結合する細菌の解析	186
5. 腸管由来モノクローナル IgA 抗体の認識分子の解析	187
6. Proteobacteria は腸管 IgA 抗体の主要な標的である	190
7. おわりに	190

第4章 腸内細菌の脂肪酸代謝と生活習慣病

(小川 順, 岸野 重信)

1. はじめに	193
2. 腸内細菌による食事由来脂肪酸の代謝と代謝物	193
3. 腸内細菌脂肪酸代謝物の生理機能	195
4. 腸内細菌脂肪酸代謝物の機能性食品素材としての開発	198
5. おわりに	198

第5章 腸内細菌と肝疾患

(中本 伸宏)

1. はじめに	201
2. 腸内細菌が肝疾患に寄与する機序	201
3. 非アルコール性脂肪性肝疾患と腸内細菌	202
4. アルコール性肝疾患と腸内細菌	204
5. 肝硬変と腸内細菌	205
6. 肝臓がんと腸内細菌	205
7. 原発性胆汁性胆管炎と腸内細菌	205
8. 原発性硬化性胆管炎と腸内細菌	206

第6章 腸内細菌と脳機能

第1節 幼少期環境による中枢発達に関わる腸内細菌叢の役割

(菊水 健史, 上村 いつか)

1. はじめに	211
2. 細菌叢の垂直伝播	211
3. 幼少期ストレス	212
4. 離乳期と腸内細菌叢	214
5. おわりに	219

第2節 母親の腸内細菌と子どもの脳の発達

(栃谷 史郎)

1. はじめに	221
2. 子どもの腸内細菌叢の定着	221
3. 脳発達と腸内細菌叢の時系列的関連	223
4. 母親から子どもへの腸内細菌叢の伝搬に影響を与える因子	223
5. 子どもの脳発達における母親の腸内細菌叢が果たす役割	228
6. おわりに	228

第3編 疾病のマイクロバイーム

第1章 腸内細菌叢と炎症性腸管疾患

(市川 将隆, 筋野 智久, 金井 隆典)

1. はじめに	233
2. ヒトの腸内細菌叢の役割	233
3. IBD 患者の菌相の違いと免疫機序	235
4. 治療への応用	237
5. その他の IBD 最新のトピック (原発性硬化性胆管炎関連腸炎について)	239
6. おわりに	240

第2章 腸内細菌叢と肥満・2型糖尿病 (竹内 直志, 中西 裕美子)

1. はじめに 243

2. 肥満と2型糖尿病に関する腸内細菌研究 243

3. 腸内細菌が肥満・2型糖尿病に与える影響の機序 245

4. 腸内細菌叢改善による肥満・2型糖尿病の予防, 治療に向けた介入研究 249

5. おわりに 250

第3章 腸内細菌叢とリウマチ性疾患 (前田 悠一)

1. はじめに 253

2. 関節リウマチの環境要因 253

3. 関節リウマチ患者の腸内細菌叢の異常 254

4. メタゲノムショットガンシーケンスによる腸内細菌叢の解析 255

5. RA患者由来の腸内細菌叢がSKGマウスの関節炎増悪に関与する 255

6. プレボテラ属細菌と関節リウマチ 256

7. 脊椎関節炎と腸内細菌叢 257

8. おわりに 257

第4章 腸内細菌叢と多発性硬化症 (佐藤 和貴郎, 山村 隆)

1. はじめに 259

2. MSの疫学 260

3. MS発症に関わる環境因子 260

4. 臨床現場での気づき 261

5. 脳腸相関の理解の進歩—両者を行き来するリンパ球 261

6. 動物モデルから得られた成果 262

7. MS患者の腸内細菌叢解析 263

8. 視神経脊髄炎患者の腸内細菌叢 264

9. 食生活の欧米化が日本人MS患者の増加を招いた可能性 265

10. 今後の展望 265

第5章 腸内細菌叢とパーキンソン病 (平山 正昭, 大野 欽司)

1. はじめに 269

2. 治療に対する影響 269

3. 病態, 発症修飾因子としての腸内細菌 271

第6章 腸内細菌叢と過敏性腸症候群 (福土 審)

1. はじめに 275

2. IBSにおける脳腸相関 275

目次

3. 感染性腸炎後 IBS	276
4. IBS の腸内細菌叢の特徴	276
5. 腸内細菌叢と消化管粘膜・消化管神経系	278
6. 腸内細菌叢を変化させることによる IBS の治療	279
7. おわりに	281

第7章 腸内細菌叢と循環器疾患 (吉田 尚史, 山下 智也, 平田 健一)

1. はじめに	283
2. 腸内細菌代謝物と循環器疾患	283
3. 冠動脈疾患に特徴的な腸内細菌叢	284
4. 腸内細菌種と冠動脈疾患との関連	285
5. 無菌マウスと動脈硬化	287
6. おわりに	288

第8章 腸内細菌叢と心不全 (梅井 正彦, 赤澤 宏)

1. はじめに	289
2. 心不全における腸管バリア機構と炎症サイトカイン	290
3. 心不全における腸内細菌叢	291
4. 心不全と腸内細菌代謝物	293
5. 心不全に対する腸内細菌叢をターゲットとした治療	297
6. 今後の展望	299
7. おわりに	299

第9章 腸内細菌叢と気分障害 (うつ病, 双極性障害) (功刀 浩)

1. はじめに	301
2. 動物モデルによる検討	301
3. 大うつ病性障害患者の腸内細菌叢に関する解析	302
4. 双極性障害患者の腸内細菌叢の解析	305
5. ヒトを対象としたプロバイオティクス摂取の有用性の検討	306
6. 想定されるメカニズム	307

第10章 腸内細菌叢と慢性便秘症 (内藤 裕二, 高木 智久)

1. はじめに	309
2. 慢性便秘症患者の腸内細菌叢	309
3. 粘膜関連細菌叢が宿主相互作用に関与	311
4. ノトバイオート研究からみた便秘メカニズム	312
5. 慢性便秘症患者に対する糞便移植は有効か?	314

6. プレ・プロバイオティクスを用いた慢性便秘症治療	314
7. おわりに	314

第 11 章 腸内細菌叢とアレルギー (成田 雅美)

1. はじめに	317
2. 腸内細菌叢による免疫制御とアレルギー	317
3. 気管支喘息	320
4. 食物アレルギー	321
5. 腸内細菌叢をターゲットとした介入	323
6. おわりに	326

第 12 章 腸内細菌叢と小児アトピー性皮膚炎 (下条 直樹)

1. はじめに	329
2. ヒトの腸内細菌叢の形成	329
3. アトピー性皮膚炎における腸内細菌叢の関与についての疫学研究	331
4. アトピー性皮膚炎発症に関連する腸内細菌の機能因子	332
5. 腸内細菌叢を標的とするアトピー性皮膚炎の治療・予防	334
6. おわりに	335

第 13 章 妊娠・出産と腸内細菌叢 (塩崎 有宏, 齋藤 滋)

1. はじめに	337
2. 妊娠経過中の腸内細菌叢の変化	337
3. 妊娠前の過体重および肥満と腸内細菌叢との関連性	338
4. 妊娠中の食事により腸内細菌叢はどのような影響を受けるか?	339
5. 妊娠中の抗菌薬が腸内細菌叢に与える影響	341
6. 産褥期における腸内細菌叢の変移	341
7. 妊娠糖尿病と腸内細菌叢との関連性	341
8. 切迫早産・早産と腸内細菌叢の関連性	343
9. 早産を減らすために何をすればいいのか?	347
10. おわりに	348

第 4 編 治療法/治療薬開発

第 1 章 腎臓病の治療開発

第 1 節 腸内環境改善による腎臓病の治療開発 (三島 英換, 菊地 晃一, 阿部 高明)

1. 慢性腎臓病 (CKD)	353
----------------	-----

目次

2. CKD と腸内細菌叢の関連	353
3. 腸管由来尿毒素と CKD 治療	354
4. プロバイオティクス, プレバイオティクスによる尿毒素減少効果	356
5. 便秘症治療薬による CKD 治療効果の可能性	357
6. 糖尿病性腎臓病とフェニル硫酸	357
7. まとめと展望	358

第2節 腸内細菌代謝産物による腎臓病の治療薬開発

(岩田 恭宜, 中出 祐介, 和田 隆志)

1. はじめに	361
2. 腸内細菌叢由来代謝産物	361
3. おわりに	364

第2章 マイクロバイームとワクチン開発

(細見 晃司, 國澤 純)

1. はじめに	367
2. 共生細菌を介した免疫刺激と注射型ワクチンに対する効果	367
3. 経口ワクチンに対する免疫応答と共生細菌	368
4. 食事由来ビタミンや脂質と腸内細菌の関連, ワクチンへの影響	370
5. 腸管における常在細菌依存的な IgA 抗体産生増強システム	371
6. 腸管 IgA 抗体応答を増強する共生細菌	372
7. おわりに	373

第3章 移植片対宿主病 (GVHD) の FMT

(垣花 和彦)

1. はじめに	375
2. 腸内細菌と急性 GVHD	375
3. 腸管急性 GVHD に対する FMT	376
4. FMT の利点と問題点	379
5. 今後の展望	380

第4章 腸内細菌叢と自閉症スペクトラム障害

(井上 亮)

1. 自閉症スペクトラム障害	383
2. 腸内細菌叢と自閉症スペクトラム障害	384
3. 腸内環境の改善と自閉症スペクトラム障害	386
4. おわりに	389

第5章 腸内細菌叢と肥満 (脂質)

(向山 広美, 宮本 潤基, 木村 郁夫)

1. はじめに	393
---------	-----

2. 腸内細菌叢と肥満	393
3. 腸内細菌由来代謝産物とエネルギー代謝制御	394
4. 短鎖脂肪酸	396
5. 多価不飽和脂肪酸	398
6. おわりに	399

第6章 メタボリックシンドロームを抑制する腸内増殖性プロバイオティクス (青木 亮)

1. はじめに	401
2. メタボリックシンドロームと腸内細菌叢	401
3. <i>B. lactis</i> GCL2505 の腸管での増殖性と動態	402
4. <i>B. lactis</i> GCL2505 の抗メタボリックシンドローム効果とそのメカニズム	403
5. <i>B. lactis</i> GCL2505 のヒトに対する抗メタボリックシンドローム効果	405
6. おわりに	406

第5編 腸管以外のマイクロバイオームの生態と機能

第1章 口腔マイクロバイオームの生態と機能

第1節 口腔マイクロバイオームによる健康評価 (山下 喜久, 竹下 徹)

1. 口腔マイクロバイオームを構成する細菌種	411
2. 口腔マイクロバイオームの微量構成細菌種を反映する口腔の健康	414
3. 口腔マイクロバイオームの主要構成細菌種を反映するヒトの健康	416
4. おわりに	419

第2節 口腸連関を基盤とした歯周病と全身疾患の関連—マウスモデルによる解析— (山崎 和久)

1. はじめに	421
2. 歯周病とは	421
3. 歯周病と全身疾患の関連	423
4. 歯周病が全身疾患に及ぼす病因メカニズムとその問題点	425
5. 歯周病と全身疾患を結ぶ新たなメカニズム	426
6. <i>P. gingivalis</i> による腸内細菌叢のディスバイオーシスと疾患の関連	428
7. おわりに	430

目次

第3節 歯周病の口腔細菌叢 (池田 恵莉, 竹内 康雄, 東 みゆき)

1. 歯肉病に関わる細菌叢解析の歴史 433

2. 次世代シーケンス技術を用いた網羅的な歯周病関連細菌叢解析 434

3. 歯周病関連細菌と宿主との関係 440

4. おわりに 441

第4節 歯周治療と歯肉縁下マイクロバイオーーム (石原 和幸)

1. はじめに 443

2. 歯周炎と歯周治療 444

3. 従来の歯周治療についての解析 445

4. スケーリング, ルートプレーニングによるマイクロバイオーームの変化 446

5. 抗菌薬を用いた治療 448

6. 処置による菌叢の変化と宿主応答 449

7. 歯周治療後のメンテナンス 449

8. おわりに 450

第2章 皮膚マイクロバイオーームの生態と機能

第1節 皮膚マイクロバイオーームの多様性 (富田 秀太)

1. はじめに 453

2. 身体部位別皮膚マイクロバイオーームの多様性 453

3. 皮膚マイクロバイオーームを構成する細菌の多様性 456

4. 皮膚マイクロバイオーームの多様性と恒常性 458

5. おわりに 458

第2節 皮膚マイクロバイオーームと皮膚疾患 (川崎 洋, 天谷 雅行)

1. はじめに 459

2. 皮膚疾患と dysbiosis 459

3. 尋常性ざ瘡 (にきび) 461

4. アトピー性皮膚炎 461

5. 白斑 463

6. 乾癬 464

7. 皮膚マイクロバイオーーム研究の課題 464

8. おわりに 465

第3章 生殖器系マイクロバイームと疾患：女性生殖器系のマイクロバイームと早産予防・治療を中心に

(漆山 大知, 秦 健一郎, 宮本 新吾)

1. はじめに	469
2. マイクロバイーム研究に関わる女性生殖器の解剖と生理	469
3. 早産と関連する主な感染症	471
4. 女性生殖器系マイクロバイームと疾患	472
5. これまでの早産予防・治療戦略と試み	476
6. 新たな早産予防・治療戦略確立に向けて	477
7. おわりに	477

第6編 応用研究：食品とマイクロバイーム

第1章 食品由来アスタキサンチンの腸内細菌叢への影響

(米井 嘉一, HAASBROEK Kyle)

1. はじめに	483
2. 方法	483
3. 実験結果	484
4. 高脂肪食による腸内細菌叢の変化	489
5. AXの腸内細菌叢への作用	490
6. おわりに	490

第2章 醗酵食品による腸内環境の最適化とアレルギー予防 (辻 典子)

1. はじめに	493
2. 腸内環境と免疫機能	493
3. アレルギーと炎症・抗炎症	494
4. 小腸自然免疫の活性化	495
5. 乳酸菌によるアレルギーの抑制	497
6. 衛生仮説と食事仮説	497
7. 醗酵食品によるアレルギーの制御	498
8. 醗酵代謝産物の免疫修飾効果	499
9. 大腸腸内細菌叢の調節効果	500
10. おわりに	500

第3章 健康寿命延伸を目指した腸内マイクロバイームの代謝制御によるポリアミン産生食品の開発

(松本 光晴)

1. はじめに	503
---------	-----

目次

2. 細胞の健全化に不可欠な物質ポリアミン	504
3. 腸内マイクロバイオーームによる大腸管腔内ポリアミン濃度の増加方法	504
4. 腸内ハイブリッド・ポリアミン生合成機構	505
5. 腸内ポリアミン濃度上昇によるマウスの健康寿命伸長効果	507
6. 血管内皮機能をターゲットとしたヒト臨床試験	508
7. おわりに	510

第4章 ポリフェノールによる腸内細菌叢改善効果 (庄司 俊彦)

1. 食品中のポリフェノールの分類	513
2. ポリフェノールの生体調節機能	514
3. ポリフェノールの腸内細菌叢に与える影響	515
4. おわりに	517

第7編 ヒトマイクロバイオーーム以外の応用事例

第1章 マイクロバイオーームを活用した植物・微細藻類バイオマス生産 (遠山 忠, 石澤 秀紘)

1. はじめに	521
2. 水生植物ウキクサのマイクロバイオーーム	522
3. 微細藻類のマイクロバイオーーム	525
4. おわりに	528

第2章 家畜動物に対するプロバイオティクスとその展望 (宮本 浩邦, 大野 博司, 児玉 浩明)

1. はじめに	531
2. 家畜における抗生物質の使用量削減の必要性	531
3. 従来の家畜動物用のプロバイオティクス	532
4. 芽胞形成菌プロバイオティクスの新たな利用価値	534
5. 複数種のプロバイオティクスの活用	536
6. 抗生物質代替剤の開発のための家畜フローラマウスの活用	537
7. 動物用プロバイオティクスと循環型農業との関係	538
8. おわりに	539

第3章 伴侶動物の腸内細菌叢 (島 綾香, 石原 玄基)

1. はじめに	543
2. 伴侶動物を取り巻く状況と腸内細菌叢	543
3. 動物種・品種による細菌叢の違い	544

4. ヒトのモデルとしての伴侶動物	546
5. 腸内細菌叢と関連する因子	547
6. 糞便移植	548
7. 腸内細菌叢以外の常在細菌叢	548
8. おわりに	549

※本書に記載されている会社名，製品名，サービス名は各社の登録商標または商標です。なお，本書に記載されている製品名，サービス名等には，必ずしも商標表示（®，TM）を付記しません。

序 論

ヒトマイクロバイオーーム研究の 現状と今後の展望

早稲田大学 服部 正平

1. はじめに

本書は、2016年刊行の『ヒトマイクロバイオーム研究最前線』の後も著しい進展を見せているヒトと常在微生物との共生関係を解き明かすヒトマイクロバイオーム研究について、その最新動向を概観することを目的に企画されました。

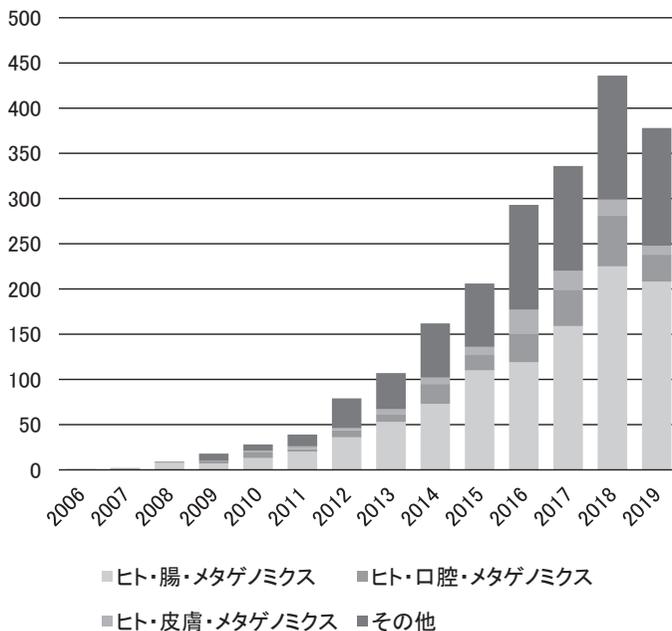
ヒト常在微生物叢の主たるメンバーである真正細菌（細菌）の定着と形成は個体の出生と同時に始まり、1人の個体に生息する細菌の種類は約1,000種、その個数はヒト細胞数よりわずかに多い約40兆個と見積もられています¹⁾。また、形成される微生物叢の構成菌種の組成や数は高い個人間多様性を示し、また皮膚、口腔、消化器系、泌尿器系などの部位ごとに高い部位特異性を持っています²⁾。

わが国におけるヒト常在細菌の研究は1960年代の光岡知足博士らの腸内細菌の分離培養に始まり、1980年代には16SリボソームRNA遺伝子（16S）を指標とした培養を介さない分子生物学的手法による解析が行われるようになりました。この16S解析によって培養困難な菌種も同定でき、これらも含めた俯瞰的な細菌解析（微生物生態学）が可能になりました。しかし一方で、16S解析では微生物叢が有する遺伝子（機能）情報の収集は困難でした。この問題を解決したのが米国（2006年）と日本（2007年）のチームからのヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析の研究です³⁾⁴⁾。メタゲノム解析はショットガンシーケンスにより微生物叢の総体ゲノム（マイクロバイオーム）情報を網羅的に収集する方法です。ついで2008年以降には高出力なDNAシーケンス能を有する次世代シーケンサー（NGS）が世界的に普及し、NGSを用いたメタゲノム解析によって遺伝子・ゲノム情報を短時間・低コストで大量に収集することが実現し、微生物叢全体の生態と機能を俯瞰することが可能となりました⁵⁾。このような技術革新を背景に、2008年に米国HMP（Human Microbiome Project）と欧州連合のMetaHIT（Metagenomics of the Human Intestinal Tract）の大型プロジェクトが始動し、同時に日欧米中などの研究者からなる国際コンソーシアムIHMC（The International Human Microbiome Consortium）が立ち上がりました⁶⁾。今日、IHMCは有用技術やデータなどの共有や国際学会の開催など、ヒトおよび関連マイクロバイオーム研究を国際的に推進する横断的なハブとしての役割を果たしています（<http://www.human-microbiome.org>）。

2. ヒトマイクロバイオーム研究の国際動向

今日に至るヒトマイクロバイオーム研究の国際動向は、そのpubmed論文数から推察できます。その数は2019年だけでも約12,000報（key word=human microbiome）に達し、創成期の2006年の約40倍に増えています。また、腸、口腔、皮膚細菌叢などの部位ごとのメタゲノム解析論文（key word=human, metagenomics, gut, oral, skin）の2006～2019年間の総数は2,000報を超えています（**図1**）。これらマイクロバイオーム研究の推移の特徴は、疾患（例えば、米国NIHのHMPの後継プロジェクトであるiHMPでは早産・未熟児出生、炎症性腸疾患（IBD）、2型糖尿病が主たる研究対象になっています⁷⁾）を含めた数千名のコホート規模の研究が近年著し

ヒトマイクロバイオーム研究の現状と今後の展望



※口絵参照

図1 ヒト常在菌叢メタゲノミクス論文数 (Pubmed) の推移

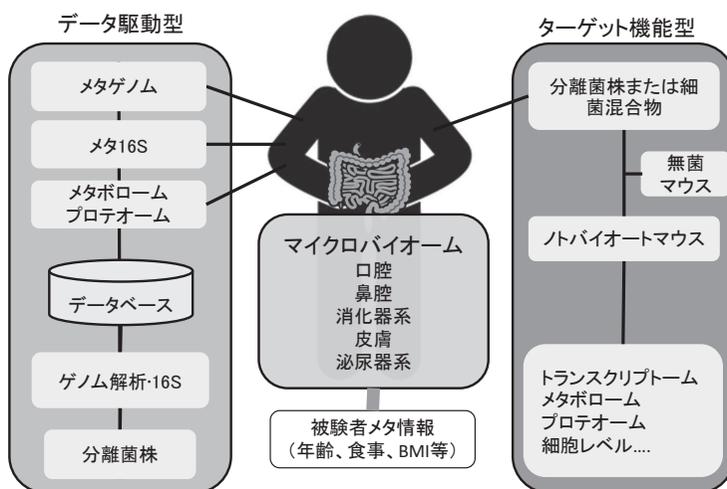


図2 ヒトマイクロバイオーム研究におけるデータ駆動型とターゲット機能型アプローチ

く増加してきていることです (表 1)。これらの研究動向からヒトマイクロバイオーム研究が基礎研究から実用化や産業創生を目指した大規模なデータサイエンスへと変貌しつつあることがわかります。

ヒトマイクロバイオームの解明は、データ駆動型研究とターゲット機能型研究の大きく2つのアプローチで進んでいます (図 2)。前者には被験者からの糞便や口腔などの微生物叢のNGSを用いた16Sとメタゲノムデータの収集、加えて質量分析機や核磁気共鳴 (NMR) を用いたメタ

表 1 主なヒト腸内細菌叢メタゲノム解析論文の推移と国際動向

発表年	発表国	対象*	被験者数**	文献
2006	米国	健康成人, 腸	2	3)
2007	日本	健康成人・乳幼児, 腸	13	4)
2009	米国	肥満症, 腸	18	14)
2010	デンマーク/スペイン	炎症性腸疾患, 腸	124	5)
2012	中国	2型糖尿病, 腸	345	J. Qin et al.: <i>Nature</i> , 490 , 55-60 (2012).
	米国	健康 腸・口腔・皮膚	139	2)
2013	ロシア	健康成人, 腸	96	A.V. Tyakht et al.: <i>Nat. Commun.</i> , 4 , 2469 (2013).
	スウェーデン	2型糖尿病, 腸	145	F.H. Karlsson et al.: <i>Nature</i> , 498 , 99-103 (2013).
2014	中国	肝硬変, 腸	237	N. Qin et al.: <i>Nature</i> , 513 , 59-64 (2014).
	フランス/ドイツ	大腸がん, 腸	196	G. Zeller et al.: <i>Mol. Syst. Biol.</i> , 10 , 766 (2014).
	米国	健康皮膚, 腸	263	J. Oh et al.: <i>Nature</i> , 514 , 59-64 (2014).
2015	オーストリア	大腸がん, 腸	156	Q. Feng et al.: <i>Nat. Commun.</i> , 6 , 6528 (2015).
	中国	関節リウマチ, 腸	212	X. Zhang et al.: <i>Nat. Med.</i> , 21 , 895-905 (2015).
	中国	大腸がん, 腸	160	G. Nakatsu et al.: <i>Nature Commun.</i> , 6 , 8727 (2015).
	中国	大腸がん, 腸	128	J. Yu et al.: <i>Gut</i> , pii. gutjnl-2015-309800 (2015).
	デンマーク	1, 2型糖尿病, 腸	106	K. Forslund et al.: <i>Nature</i> , 528 , 262-266 (2015).
	イスラエル	大規模コホート, 腸	800	D. Zeevi et al.: <i>Cell</i> , 163 , 1079-1094.
	スウェーデン	母と幼児, 腸	200	F. Bäckhed et al.: <i>Cell Host Microbe</i> , 17 , 852 (2015).
	米国	小児クローン病, 腸	111	J. D. Lewis et al.: <i>Cell Host Microbe</i> , 18 , 489-500 (2015).
2016	日本	健康成人, 腸	106	18)
	オランダ	大規模コホート (宿主因子相関), 腸	1,135	23)
	米国	未熟児, 腸	84	M. K. Gibson et al.: <i>Nat. Microbiol.</i> , 1 , 16024 (2016).
	オランダ, ベルギー	大規模コホート (16S), 腸	3,948	24)
2018	ドイツ, スウェーデン, フィンランド, 米国	大規模コホート (小児1型糖尿病), 腸	783 (10,913)	T. Vatanen et al.: <i>Nature</i> , 562 , 589.
	ドイツ, スウェーデン, フィンランド, 米国	大規模コホート (乳児・小児), 腸	903 (10,867)	C. J. Stewart et al.: <i>Nature</i> , 562 , 583.
	中国	大規模コホート (16S, 地域差), 腸	7,009	Y. He et al.: <i>Nat. Med.</i> , 24 , 1532.
	中国	大規模コホート (16S, メタボリック症候群), 腸	6,896	Y. He et al.: <i>Microbiome.</i> , 6 , 172.
	イギリス	大規模コホート (16S, 双子), 腸	2,737	25)
オランダ	大規模コホート (16S, 地域差, 人種差), 腸	2,084	21)	
2019	オランダ	大規模コホート (腸と血中代謝物), 腸	2,309	D. Vojinovic et al.: <i>Nat. Commun.</i> , 10 , 5813.
2020	オランダ	メタアナリシス (薬剤代謝 血中代謝物), 腸	18,873	26)

*16S は 16S 解析

**カッコ内は解析サンプル数

ヒトマイクロバイオーム研究の現状と今後の展望

ボロームやプロテオームデータの収集、それらの情報・統計解析による微生物叢の全体構造や機能特性の解明、健康者-疾患患者間の比較解析による疾患微生物叢の特徴の解明、さらには被験者の食事、性差、年齢、生活習慣・環境、投薬、身体などのさまざまな情報との関連性の解明などが含まれます。また IHMC 参加チームの共同研究による腸内微生物叢の解析技術（DNA 抽出法）の標準・最適化も検討されています⁸⁾。一方後者のアプローチでは、特定の微生物種あるいは微生物叢の宿主への生理機能の解明、例えば対象とする微生物（叢）を無菌マウスに定着させ（作製されたマウスをノトバイオートマウスという）、微生物（叢）や宿主の遺伝子や代謝物、細胞レベルのデータ解析による細菌-宿主間の相互作用機構や微生物（叢）の機能特性（*in vivo* と *in vitro*）の解明が行われています。

3. ヒトマイクロバイオームの科学的・社会的インパクト

これまでのデータ駆動型研究によるヒト常在微生物叢の生態と生理機能の解明から、特に腸内微生物叢と疾患との関係では、その変容が神経系、免疫系、代謝系などのさまざまな臓器・組織における病態と相関することが明らかになってきました（表1の論文）。また、特定の常在菌（叢）と宿主細胞間の相互作用の研究からは、菌が有する食事成分の代謝能（代謝物）が細菌-宿主細胞間の相互作用の分子実体として生理機能の発序に関与することもわかってきました⁹⁾⁻¹²⁾。また、この作用が単一の微生物種だけではなく複数種がチームとしてその生理作用を発揮する傾向があり¹²⁾、この性質は病原性微生物を対象とする近代細菌学の概念から大きく外れています。より最近では、特定の腸内常在菌の病巣臓器や組織への転移（translocation）が観察され¹³⁾¹⁴⁾、腸内細菌の変容と遠隔臓器や組織の病態発症に腸内細菌の転移が示唆されました。また口腔常在菌が腸内細菌叢の脆弱化を介して腸管に異所定着し、炎症を誘導する口腸連関が疾患発症の一因になることも報告されています¹⁵⁾。

健康者の腸内微生物叢は、個人および集団（国）レベルで大きく異なっていることが報告され¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、日本人の腸内微生物叢には *Bifidobacterium* が米国や中国よりも優勢していることなどが明らかになっています¹⁸⁾。一方で、腸内細菌叢は国や個人に関係なく一律な機能特性を持ち¹⁸⁾¹⁹⁾、常在菌の形成と定着には菌の系統よりもそれらが有する機能による強い選択圧の存在が示唆されます。また同一菌種であっても遺伝子の水平伝播などにより株ごとにその機能（ゲノム）は異なることがあります（例えば、異なった *Klebsiella* 株の Th1 と Th17 細胞の誘導¹⁴⁾¹⁵⁾）、菌種（名）だけに依存した研究は間違った解釈を導く懸念があります。

ヒト腸内微生物叢の形成や多様性には宿主の遺伝的背景や年齢、各国の地理的關係、食習慣、生活環境などの違いが程度の差を持って関与しています²⁰⁾⁻²⁵⁾（**図3**）。最近では、プロトンポンプインヒターなどの種々の治療薬の腸内細菌叢への影響も報告されています²⁶⁾⁻²⁸⁾。

以上のように、2008年ころから本格的に開始されたヒトマイクロバイオーム研究によって得られたさまざまな新知見は、健康と病気のみならず生命そのものの成り立ちへの考え方にもパラダイムシフトを起しつつあり、その科学的・社会的なインパクトは計り知れません。すなわち、ヒトマイクロバイオーム研究はヒトゲノムをヒトマイクロバイオームからなる「超生命体」と捉え

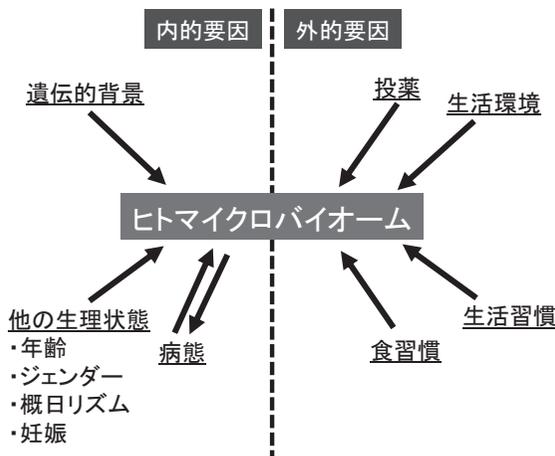


図3 ヒトマイクロバイオーームに影響する諸因子

る概念²⁹⁾の実証であり、3つの生物種ドメインである真核生物、原核生物、古細菌からなる「ヒト」の研究ともいえます。これに関連して、ヒトマイクロバイオーームは厳密には細菌、細菌中の染色体外プラスミド、バクテリオファージおよび真菌の4つのそれぞれ独立した遺伝的要因から構成されています。菌種組成の変動に関与するバクテリオファージの菌への感染や外部の環境変動へのプラスミドの迅速な適応や遺伝子の水平伝播の解析は、これまでの菌（染色体）中心の研究に加えてより緻密で広範囲に捉えた研究へと展開されると考えられます³⁰⁾。

4. おわりに

ヒトマイクロバイオーーム研究は、上述したようにすべての生物種ドメインと独立した遺伝的要因とその産物が関与するため、その包括的な解明にはメタゲノム、メタボローム、プロテオーム、ノトバイオートなどの異種技術と知識の活用と連携が必須であり、ヒトのみならず家畜や植物などの他生物の常在菌叢への展開も含め、医学（免疫系、代謝系、神経系）、微生物学、ゲノム科学、情報・統計学、食品科学、栄養学などの幅広い学際的な知識のさらなる集積が今後も要求されると考えられます。また、非侵襲性診断法、低副作用医薬品、健康維持・増進に寄与する食品やサプリメント開発など、マイクロバイオーームを利用した応用研究や産業創成も世界的に活発化しています（例えば、わが国における1,000人規模での戦略的イノベーションプログラムSIP）。このような現状を鑑み、本書は広範囲かつ正確な情報発信と把握を目指して企画されました。

最後に、お忙しい中ご協力いただきました各執筆者の皆様には、この紙面をお借りして衷心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) R. Sender et al.: *Cell*, **64**, 337–340 (2016).
- 2) Human Microbiome Project Consortium: *Nature*, **486**, 207–14 (2012).
- 3) S. Gill et al.: *Science*, **312**, 1355–1359 (2006).
- 4) K. Kurokawa et al.: *DNA Res.*, **14**, 169–181 (2007).
- 5) J. Qin et al.: *Nature*, **464**, 59–65 (2010).
- 6) A. Mullard: *Nature*, **453**, 578–580 (2008).
- 7) The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium: *Nature*, **569**, 641–648 (2019).
- 8) P. I. Costea et al.: *Nat Biotechnol.*, **35**, 1069–1076 (2017).
- 9) S. Fukuda et al.: *Nature*, **469**, 543–547 (2011).
- 10) S. Yoshimoto et al.: *Nature*, **499**, 97–101 (2103).
- 11) Y. Furusawa et al.: *Nature*, **504**, 446–450 (2013).
- 12) K. Atarashi et al.: *Nature*, **500**, 232–236 (2013).
- 13) S. Manfredo Vieira et al.: *Science*, **359**, 1156–1161 (2018).
- 14) N. Nakamoto et al.: *Nat Microbiol.*, **4**, 492–503 (2019).
- 15) K. Atarashi et al.: *Science*, **358**, 359–365 (2017).
- 16) C. De Filippo et al.: *Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 14691–14696 (2010).
- 17) T. Yatsuneneko et al.: *Nature*, **486**, 222–227 (2012).
- 18) S. Nishijima et al.: *DNA Res.*, **23**, 125–133 (2016).
- 19) P.J. Turnbaugh et al.: *Nature*, **457**, 480–484 (2009).
- 20) G. D. Wu et al.: *Science*, **334**, 105–108 (2011).
- 21) J. K. Goodrich et al.: *Cell*, **159**, 789–799 (2014).
- 22) M. Deschasaux et al.: *Nat Med.*, **24**, 1526–1531 (2018).
- 23) E. Pasolli et al.: *Cell*, **176**, 649–662 (2019).
- 24) A. Zhernakova et al.: *Science*, **352**, 565–569 (2016).
- 25) G. Falony et al.: *Science*, **352**, 560–564 (2016).
- 26) M. A. Jackson et al.: *Nat Commun.*, **9**, 2655 (2018).
- 27) J. Liu et al.: *Nat Med.*, **26**, 110–117 (2020).
- 28) A. Vich Vila et al.: *Nat Commun.*, **11**, 362 (2020).
- 29) J. Lederberg: *Science*, **288**, 287–293 (2000).
- 30) Y. Suzuki et al.: *Microbiome*, **7**, 119 (2019).

この先をご覧いただくには、パスワードが必要です。

制限つきPDFで全ページをご覧いただけます。
(制限内容：閲覧期間の設定、コピーやプリントの禁止など)

- ・ PDFの閲覧

「パスワード」と「専用のビューア」（無料）が必要です。
費用は一切かかりません。

※WindowsのPCでのみご覧いただけます。予めご了承ください。

- ・ パスワード ※電子試読ページよりお申込みください
<https://www.nts-book.com/ntsの電子試読>
ページ下部にお申込みフォームがあります。

右のQRコードからも
電子試読ページにアクセス
いただけます。



- ・ ビューアのダウンロード

PDFは、株式会社スカイコムの SkyPDF Viewer（無償のPDFビューア）をダウンロードしてご覧いただけます。

※Adobe Acrobat Readerなど他のPDF閲覧アプリケーションではご覧になれません。

SkyPDF Viewer 無償ダウンロード：
<https://www.skycom.jp/free/>