

## 別添 3

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）  
総括研究報告書

### 生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する 健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースの構築に関する疫学研究

研究代表者 宮地元彦  
研究分担者 國澤純、水口賢司  
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所  
研究分担者 窪田哲也  
国立研究開発法人 理化学研究所

#### 研究要旨

<目的> 食事・栄養状況や身体活動・運動などの生活習慣と免疫疾患・生活習慣病との関係に関するコホート研究から得られたヒト試料を対象に、生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースを構築し、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにすることを目的とする。

<方法> 大規模介入研究に参加する20～80歳までの男女を研究対象者とした(宮地)。また、腸内細菌叢に関連する生活習慣調査・身体測定を実施した(宮地)。先端解析技術を用いて糞便の腸内細菌叢や免疫指標、血液サンプルの脂肪酸や胆汁酸を網羅的に分析する(國澤、窪田)。それらをデータベース化しバイオインフォマティクス手法を用いて解析する(水口)。

<結果> 糞便・排便状況調査票、採便法および便輸送方法を確立した。2017年3月末日現在において、408名の研究参加同意が得られ調査・測定を終えた。また、糞便採取・運搬ならびに腸内細菌分析法が確立し、それに基づき385名のシーケンスが終了した。血液の307名の脂肪酸と110名の胆汁酸の分析が終了した(窪田)。これらを格納するデータベースの基本構造と分析ソフトウェアが完成した(水口)。腸内細菌の多様性と便の硬さや排便頻度が関係することが明らかとなった。

<まとめ> 4つの研究班の成果は、研究申請時に掲げたマイルストーンに概ね到達した。最終年度となる平成29年度は、目標とした参加者600名の確保、全参加者の糞便の腸内細菌叢・腸管免疫指標、血液の脂肪酸・胆汁酸の分析の完了、データベースへの全データの格納と分析、論文の執筆を目標として研究を遂行する。

#### A. 研究目的

近年、腸内細菌叢と健康や疾患との関わりに関する多くの報告がなされている(Chatelier et al. Nature 2013, Clemente et al. Cell 2012)。また、我々が摂取する食事によっても腸内細菌叢は大きく影響を受けている(Davide et al. Nature 2014)。しかしながら、これらの研究成果は欧米人を対象としたものであり、食事・栄養摂取状況や身体活動が異なるわが国では異なった知見が得られる可能性がある。また、先行研究では、参加者の生活習慣の違いは全く考慮されていない。さらに、腸内細菌叢は食事内容に加えて腸管免疫の違いにより変化するが、その個人差についても検討されていない。

本研究では、食事・栄養状況や身体活動・運動などの生活習慣と免疫疾患・生活習慣病との関係に関するコホート研究から得られたヒト試料を対象に、生活習慣病やアレルギー

疾患の新しい予防法確立に資する健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースを構築し、そのデータを横断的に分析することにより、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにすることを目的とする。

平成28年度の具体的な研究目的は以下のとおりであった。

疫学研究の進捗状況と排便状況と腸内細菌叢との関係(宮地)

採便・運搬法の標準化と腸管免疫と腸内細菌叢の分析(國澤)

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析(窪田)

データベースの構築(水口)

#### B. 研究方法

疫学研究の進捗状況と排便状況と腸内細菌叢との関係

国立健康・栄養研究所がすでに確立し運営している大規模介入研究(NEXISコホート)の参加者を対象とし、20~80歳までの男女、合計600名(本年度までの到達目標450名)から糞便サンプルを提供して頂く。

また、現在進行しているNEXISコホートで行われている項目についても測定を行った。身体組成(身長、体重、腹囲、体脂肪率等)、生活習慣病リスクファクター(血糖、血中脂質、血圧等)、動脈硬化度、体力(筋力、持久力、柔軟性等)、現病歴・既往歴、日常身体活動量(3次元加速度計による)、栄養摂取状況(BDHQIによる)、排便状況等について測定・調査を行った。

平成27年度は、健康な人の糞便状態や排便状況について報告している論文、および、それらと健康との関わりについて検討している論文を検索し、糞便の状態や排便の状況に関する質問項目を決定した。現在進行しているNEXISコホートの参加者(登録者数1,077名)に対して、研究参加の依頼を行った。平成29年2月末までに同意が得られた401名の被験者に対し、糞便採取の依頼を行い、自宅にて糞便の採取を行っていただいた。得られた糞便のうち361検体において16S-rRNAによる腸内細菌叢の解析を行った。糞便・排便状況、性・年齢と腸内細菌叢の構成・多様性との関連を検討した。

採便・運搬法の標準化と腸管免疫と腸内細菌叢の分析

採便キットによるサンプル収集とサンプルからのDNA抽出方法を確立するために、採便部位、採便量、保存液の希釈、便の水分量、保管期間、DNA抽出の前処理が菌叢解析の結果に及ぼす影響について検討し、プロトコルの最適化を行った。同一のヒト糞便サンプルから医薬健栄研と他機関でDNA抽出を行い、菌叢解析の結果を比較した。さらに、相関式を用いて他機関のデータを変換し、医薬健栄研のデータと統合(ブリッジング)できるか検討した。またデータベースの構築のために約400名のヒト試料を対象に、次世代シーケンサーを用いた糞便中の菌叢解析を行った。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析

脂肪酸の測定: サンプルに誘導化試薬と内部標準液を添加して攪拌後に加温する。その後NaOHとn-ヘキサンを添加し振盪後、遠心分離にて分離した上清をサンプル管に分注し、GC-ESIを用いて脂肪酸24種類について測定した。

胆汁酸の測定: LC条件としては、カラムはI nertSustainSwift C18を用い、移動相は0.2%のギ酸を含むメタノールと水を用いてグラジエント条件で18種類の胆汁酸を分離した。MS条件としては、イオン化はESIによるネガティブモードで行い、MRM法で測定し、18種類の胆汁酸についてMRM設定を行った。

データベースの構築法の検討

食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣のデータおよび腸内細菌叢のデータをデータベース化し、別途構築した遺伝子、タンパク質、疾患、化合物、パスウェイ情報等を統合したデータベースとともに、多変量解析や機械学習等を用いることによって、分子メカニズムや各種測定量の関係を解析する。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所研究倫理審査委員会の承認を得て行われた(受付番号: 健栄3)。

C. 研究結果

疫学研究の進捗状況と排便状況と腸内細菌叢との関係

エンテロタイプ: Bacteroides、Prevotella、Ruminococcaceaeは糞便の形状と関連し、採便時の糞便の形状が柔らかい泥状になるほどPrevotellaが多いという結果が得られた。多様性と性別、BMI、糞便の形状および排便頻度は有意な関連を示した。多様性は、糞便の形状が柔らかい泥状になるほど、また、排便量および頻度が多いほど低かった。

採便・運搬法の確立と腸管免疫と腸内細菌叢の分析

採便キットの検討から、採便部位によって菌叢が異なることがある、採便量が過剰である場合や保存液が希釈された場合、水分量が少なく硬い便の場合では、保存液による菌の不活化が不十分となる、保存期間が長いと一部の菌の割合が変化する、DNA抽出の前に遠心分離などの前処理を行うと菌叢解析の結果が変化する、ことが明らかとなった。

平成29年年3月31日時点で糞便408検体、血液399検体を国立健康・栄養研究所から受領した。すべての糞便からDNA抽出を完了しており、そのうちの385検体についてはシーケンスを完了し、16S配列データを取得した。また、余剰のDNAおよび便サンプルは-30℃で凍結保管している。

これまでに収集した血液サンプルのうち、390検体のIgG/IgA抗体、サイトカイン・ケモカイン、抗菌ペプチド、常在菌であるアルカリゲネス特異的抗体価の測定を完了した。余剰の血液サンプル(血清および血漿)は-80℃もしくは液体窒素で凍結保管している。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析

腸内細菌や疾患の発症に深く関与する脂肪酸24種類についてGC-ESIを用いて測定を行い、307名の血漿サンプルの分析が完了した。男性では善玉の脂肪酸である3系が低く、

6/ 3系の比率は男性の方が有意に高かった。年齢を3群に分類すると若い人ほど 6系が高く、6/ 3系の比率は年齢の増加とともに有意に低下していることが明らかとなった。また血漿中の胆汁酸18種類について110名の測定を完了した。胆汁酸の種類により感度以下になり測定できない検体が存在した。測定できた検体に関して男女別に検討したところ一次胆汁酸が男性で有意に増加していた。一方年齢別に検討してみたが特に有意な差はなかった。さらに短鎖脂肪酸の分析法についてLC-MSを用いて短時間で簡便な分析方法の確立を試みた。

#### データベースの構築

腸内細菌叢と身体データや食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣、さらに腸管免疫に関わる因子との関連を解析するためのデータベースを構築した。このデータベースにNEXISコホート20名のデータを格納して統合した。作成したデータベースを用いて、腸内細菌叢と様々な身体データや生活習慣、腸管免疫に関わる因子との関連を対話的に解析できるソフトウェアを開発した。このソフトウェアを用いることによって、それぞれの菌種と相関の高い生活習慣等を容易に抽出することができるようになった。

#### D. 考察とまとめ

##### 疫学研究の進捗状況と排便状況と腸内細菌叢との関係

本研究では腸内細菌叢の多様性と糞便の状況について検討した。糞便の形状と頻度は多様性と関連していた。便が柔らかく液状であり、排便頻度が多いほど多様性が低いことも示された。これまでの先行研究では報告されてこなかった、便の頻度、量、色、においなど、形状以外の排便状況について今後検討を進めることで、排便状況の観察結果から腸内細菌叢の見える化を進める予定である。

##### 採便・運搬法の確立と腸管免疫と腸内細菌叢

以上の検討から、保存液を用いた採便では、以下の点に注意が必要である。

1. 便の複数か所からサンプリングを行う。
2. 採便量は0.1 g/ml以下にする
3. 保存液の希釈を避ける
4. 保存液と便をよく混和する
5. 保管期間は短い方が望ましい
6. 前処理を行わずにDNAを抽出する

また、腸内細菌叢および腸管免疫因子の測定は順調に進んでいると考えている。最終目標である600名を目標に最終年度半ばまでに残りの測定を完了したいと考えている。

##### 脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析

脂肪酸では男性において善玉の脂肪酸と考えられる 3系が低く、6/ 3系の比率が有意に増加していた。男性では女性に比べて心血管イベントが低く、その原因として、血

中の 3系が低いことがその一端を担っている可能性が考えられた。若い人ほど 6/ 3系の比率が高いことが明らかとなり、年齢に伴い食事摂取の内容が変化したことにより、血漿中の脂肪酸構成比率が変化した可能性が考えられた。今後食事摂取量、脂質代謝異常の有無、エネルギー消費量など様々な因子の影響を考慮に入れた解析が必要である。

血漿中の胆汁酸18種類について110名の測定を完了したが、胆汁酸の種類により感度以下になり測定できない検体が存在した。今後これらの課題を考量しながら解析していく必要があると考える。

#### データベースの構築

本研究では、300項目以上にわたる詳細な身体データや生活習慣のデータと腸内細菌叢や腸管免疫データについてバイオインフォマティクスを用いて統合的に解析することを目指している。今回構築したデータベースとソフトウェアを用いることによって、生活習慣と腸内細菌との新たな関係が見いだされつつある。そこからどのような腸管免疫や腸内細菌叢を形成することが健康を維持するうえで重要かが明らかとなり、将来的には生活習慣の改善による従来の予防法に留まらず、プロ・プレバイオティクス、新しい治療薬、予防薬や疾患発症予測のバイオマーカーの開発につながる可能性があると考えている。来年度はこのデータベースにさらに多数のNEXISコホートのデータを追加するとともに、このデータを用いて様々な角度から解析を行っていく予定である。

宮地らによる疫学班が1年目の試料収集の遅れを挽回し、累計400名以上の試料を収集したことにより、國澤、窪田両分担研究者による試料分析を可能が可能となり、腸内細菌叢と生活習慣に関する新たな知見が得られた点は貴重な成果と自己評価する。また、水口らによるデータベースならびにそれに付随するソフトウェアが構築されたことにより、400名あまりのデータのデータベースへの格納とその分析が可能となった点も着実な成果である。

平成28年度までの、4つの研究班の成果から、最終年度である平成29年度内に、研究申請時に掲げたマイルストーンを高い水準で達成することが期待できる状況に到達したと総括する。

平成29年度は目標とした参加者600名の確保、全参加者の糞便の腸内細菌叢・腸管免疫指標、血液の脂肪酸・胆汁酸の分析の完了、データベースへの全データの格納と分析、新たな知見に関する論文の執筆を目標として研究を遂行する。

E. 健康危険情報  
なし

F. 研究発表

## 1. 論文発表

Kikuchi N, Zempo H, Fuku N, Murakami H, Sakamaki-Sunaga M, Okamoto T, Nakazato K, Miyachi M. Association between ACTN3 R577X Polymorphism and Trunk Flexibility in 2 Different Cohorts. *Int J Sports Med*. 2017 [Epub ahead of print]

Furushima T, Miyachi M, Iemitsu M, Murakami H, Kawano H, Gando Y, Kawakami R, Sanada K. Comparison between clinical significance of height-adjusted and weight-adjusted appendicular skeletal muscle mass. *J Physiol Anthropol*. 2017, 13;36(1):15.

Yvert T, Miyamoto-Mikami E, Murakami H, Miyachi M, Kawahara T, Fuku N. Lack of replication of associations between multiple genetic polymorphisms and endurance athlete status in Japanese population. *Physiol Rep*. 2016 ;4(20). pii: e13003.

Miyamoto-Mikami E, Murakami H, Tsuchie H, Takahashi H, Ohiwa N, Miyachi M, Kawahara T, Fuku N. Lack of association between genotype score and sprint/power performance in the Japanese population. *J Sci Med Sport*. 2017;20(1):98-103.

Hosomi K and Kunisawa J. The specific roles of vitamins in the regulation of immunosurveillance, allergy, and inflammation in the gut. *Immune Net*. (2017, in press)

Kunisawa J. Metabolic changes during B cell differentiation for the production of intestinal IgA antibody. *Cell Mol Life Sci*. (2017, in press)

Kunisawa J and Kiyono H. Sphingolipids and epoxidized lipid metabolites in the control of gut immunosurveillance and allergy. *Front Nutrition*. 2016, 3:3.

Kunisawa J. Immunity and Nutrition. *Encyclopedia of Immunology*. 2016, vol. 5, pp. 120-126, (Edited by Michael J.H. Ratcliffe), Academic Press, Oxford, UK.

Nyström-Persson J., Natsume-Kitatani Y., Igarashi Y., Satoh D., Mizuguchi K., Interactive Toxicogenomics: Gene set discovery, clustering and analysis in Toxygates, *Sci Rep* (in press).

その他複数（各分担研究報告書を参照）

## 2. 学会発表

國澤純、腸が奏でる生体応答と健康科学への展開 JCHMシンポジウム 東京(東

京工業大学) (2017年3月23日)

國澤純、腸内細菌と食を介した腸内環境の形成と健康・疾患 第90回日本細菌学会総会 仙台(仙台国際センター)(2017年3月20日)

國澤純、腸内環境から考えるヘルスサイエンスの最前線 日本農芸化学会2017年度大会 京都(京都女子大学)(2017年3月19日)

國澤純、栄養と腸内フローラが織りなす腸管免疫環境の構築と健康科学への展開 大阪大学臨床栄養研究会 大阪(大阪大学)(2017年3月13日)

國澤純、生活習慣と連動した腸内細菌叢の形成と健康科学への新展開 JSB関西地域部会 第22回バイオメディカル研究会 大阪(グランフロント大阪)(2017年3月11日)

國澤純、食と腸内フローラが奏でる腸内環境の構築と創薬・健康科学への新展開 創薬薬理フォーラム 第61回談話会 東京(日本薬学会 長井記念館)(2017年1月20日)

國澤純、腸内環境を介した免疫制御と健康科学への新展開 第20回日本病態栄養学会 年次学術集会 京都(国立京都国際会館)(2017年1月15日)

Jun Kunisawa, Nutrition and Microbiome in Human Health and Diseases The 2nd Osaka University Twin Research International Symposium Osaka (Saji Keizo Memorial Hall)(2016, November 26)

國澤純、食事や生活習慣と連動した腸内フローラの形成と生体応答 神戸大学農工連携次世代バイオプロダクション(iBioK)主催フォーラム 神戸(神戸大学)(2016年11月25日)

國澤純、健康指標としての腸内細菌 JA SIS2016 ライフサイエンス イノベーションフォーラム 千葉(幕張メッセ)(2016年9月8日)

國澤純、栄養 腸内フローラネットワークを介した免疫制御と疾患 腸内マイクロビオータ研究会 神戸(神戸大学)(2016年4月15日)

その他多数（各分担研究報告書を参照）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし