

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）
平成29年度 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> 首都圏、山口県周南市、新潟県南魚沼市、大阪府に在住する 20~80 歳までの男女を 743 名を研究対象者とした。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> 2018 年 2 月末日現在 743 名の研究参加同意が得られた。そのうち 722 名の腸内細菌叢のシーケンスが終了し、646 名分の免疫指標の測定が完了した。434 名の血漿サンプルの脂肪酸、胆汁酸の分析が完了した（窪田）。データベースにこれらのデータを格納し、データ解析した（水口）。腸内細菌叢解析の結果、*Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門が全体の約 9 割を占めていた。Enterotype 解析の結果、クラスター分けには *Bacteroides* 属、*Prevotella* 属、*Faecalibacterium* 属が主に影響していることが明らかとなり、それぞれのクラスターの割合は約 4:1:5 であった。細菌群集構造（Bray-Curtis 指数）とメタデータとの関連をステップワイズ回帰で分析した結果、19 項目が関連し、最も強い要因はコホートの違い（現居住地）で、運動習慣、座位時間、睡眠時間などの生活習慣や、カリウム摂取量や色の薄い野菜の摂取量などの食事要因に加え、習慣的な排便頻度や採便当日の糞便の形状・色・量など、複数の排便・糞便状況が関連していた。19 項目により細菌群集構造の個人差の 7.3%が説明された。糞便中の短鎖脂肪酸の測定系を確立し 237 名について解析した。その結果アセテート、プロピオン酸、吉草酸は有意に男性で高く、乳酸は女性で上昇していた。

<まとめ> 4つの研究班により、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ための健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースが構築することができた。データベースから得られる知見を今後論文等で公表していく。

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30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腸内細菌叢と生活習慣との関係(宮地)

腸管免疫と腸内細菌叢の解析に関する研究(國澤)

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析(窪田)

健康な日本人の腸内細菌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腸内細菌叢と生活習慣との関係(宮地)

首都圏コホート(NEXIS)の参加者、山口県周南市の市職員、新潟県魚沼市の住民ならびに市職員、大阪市の特定非営利活動法人職員に研究参加の依頼を行った(平成27年9月7日倫理審査委員会承認済み、受付番号:健栄3)。平成30年2月末までに同意が得られた743名の研究参加者に対し、自宅にて糞便の採取を行っていただいた。

うち722糞便検体において16S rRNAによる腸内細菌叢の解析を行った(分析班<國澤>)。また、身体特性や生活習慣病危険因子、身体活動量、栄養摂取状況、排便状況などのメタデータを調査した(疫学班<宮地>)。得られたメタデータ140項目に欠損値がない1578名を対象として、腸内細菌叢とメタデータとの関連を検討した。

腸管免疫と腸内細菌叢の解析に関する研究(國澤)

平成28年度までに確立した保存液を用いたサンプル収集とサンプルからのDNA抽出方法を学術論文に投稿した。また同方法を用い、ヒト糞便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。またBioplexやELISA法を用いて血液サンプル中のサイトカイン、IgGおよびIgA抗体、抗菌ペプチドなどの免疫因子を測定した。さらに本研究班で構築したデータベースを用いて腸内細菌叢と食事成分や免疫因子の関連を解析した。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析(窪田)

1. 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、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。

2. 糞便中の短鎖脂肪酸の測定: 糞便サンプル5-10mgを用いて、ミリQと内部標準液を混合した後、塩酸とジエチルエーテルを入れ、誘導化試薬を混合し、GC-MSを用いて解析した。

3. 胆汁酸の測定: 血漿と糞便サンプルからカラムなどを用いて抽出し、MRM法を用いてLC-MS/MSで測定した。

健康な日本人の腸内細菌データベースの構築(水口)

首都圏コホート(NEXIS)の参加者、山口県周南市の市職員、新潟県南魚沼市の住民ならびに市職員、大阪市の認定特定非営利活動法人の活動参加者の計722人の便からDNAを抽出し、16SリボソームRNA遺伝子配列を取得した。これらの配列データから腸内細菌叢を解析し、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とともにデータベース化した。

(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腸内細菌叢と生活習慣との関係(宮地)

細菌群集構造(Bray-Curtis指数)とメタデータとの関連を単変量解析により検討した結果、58項目がBray-Curtis指数と有意に関連していた($P < 0.05$)。変数増加法によるステップワイズ回帰を行った結果、19項目が独立してBray-Curtis指数と関連しており、最も強く関連していた要因はコホートの違い(現居住地)であった。また、運動習慣、座位時間、睡眠時間などの生活習慣や、カリウム摂取量や色の薄い野菜の摂取量などの食事要因に加え、習慣的な排便頻度や排便当日の糞便の形状・色・量など、複数の排便・糞便状況が関連していた。これら19項目により細菌群集構造の個人差が7.3%説明された。各細菌の存在比と強く関連するメタデータを探索した結果、ピアソンの積率相関係数0.3以上の強さで関連するメタデータと細菌のペアが23組抽出された。抽出されたメタデータはいずれも微量栄養素の摂取量で、抽出された細菌の大半をRuminococcaceae科が占めていた。さらに、様々な微量栄養素の摂取量が、Firmicutes門に属するFaecalibacterium属、Subdoligranulum属、Eubacterium rectale group属およびRoseburia属などの酪酸産生菌として知られる細菌と正に相関していた。

腸管免疫と腸内細菌叢の解析に関する研究(國澤)

すべての糞便からDNA抽出を完了しており、そのうちの722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、646検体のサイトカイン・ケモカイン、抗菌ペプチドの測定を完了した。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。

健康者20名のデータを用いて食事成分と

腸内細菌の相関を解析した結果、食事成分AがそれぞれBacteroidetesと負に相関することが明らかとなった（未発表データのため食事成分名は明示せず）。さらに、腸内細菌と免疫因子の相関を解析した結果、炎症性サイトカインであるMIP-1 やIL-4と負の相関を示す腸内細菌が同定された（未発表データのため食事成分名は明示せず）。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析（窪田）

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、434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n-3系が低く、n-6/n-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n-6系の方が高く、n-6/n-3系の比率は年齢の増加とともに有意に低下することが明らかとなった。さらに血中n-3系脂肪酸はn-3系脂肪酸摂取量と魚介類と正の相関を示した。一方血中n-6系脂肪酸は、n-6系脂肪酸摂取量とは相関を示さなかった。次に血漿中の胆汁酸438名分と糞便中71名分について18種類の胆汁酸の測定を完了した。血中と糞便中の相関解析を行ったところ、リトコール酸やデオキシコール酸といった2次胆汁酸で有意な相関関係を認めた。最後にGC-MSを用いて糞便中の短鎖脂肪酸の測定系を確立し237名について解析した。その結果アセテート、プロピオン酸、吉草酸は有意に男性で高く、乳酸は女性で上昇していた。

健康な日本人の腸内細菌データベースの構築（水口）

成人日本人722名の腸内細菌叢を解析した結果、Firmicutes門、Bacteroidetes門が全体の約9割を占めていた。Enterotype解析の結果、クラスター分けにはBacteroides属、Prevotella属、Faecalibacterium属が主に影響していることが明らかとなり、それぞれのクラスターの割合は約4:1:5であった。細菌群集構造、多様性には性別、年齢、地域による偏りがあり、Lachnospiraceae科、Ruminococcaceae科の細菌がα多様性と正の相関を示した。腸内細菌叢のデータに加え身体データや食事・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のデータをデータベース化した。さらに、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腸内細菌叢と生活習慣および排便状況との関係（宮地）

平成29年度の研究により、1)一般的な日本人の成人男女において、コホートの違い（地域差）が最も強く細菌群集構造に関連すること、2) 19項目のメタデータにより細菌群集構造の個人差が7.3%説明されること、3) 微量栄養素の摂取量が、Ruminococcaceae科ならびにFirmicutes門に属するFaecalibacterium属、Subdoligranulum属、Eubacterium rectale group属およびRoseburia属などFirmicutes門に属する細菌と正に相関し、Bacteroides属、Parabacteroides属、Sutterella属とは負に相関することが明らかになった。

以上、600名近くの一一般的な日本人の成人男女を対象として、腸内細菌叢と関連する生活習慣や排便・糞便状況などの要因を横断的に明らかにした。当初の計画である600名を大きく超える700名以上の、重篤な疾患を有さない自立した日本人を対象とした研究成果であるが、欧米で実施された1,000名余りの研究と比較してサンプル数が足りないこと、サンプル数や参加者の特性に地域差がある事など、データの価値ならびに分析結果の精度を高める余地が残されている。また、研究開始時のこれらの腸内細菌叢や生活習慣と腸管免疫および疾患発症との相互関係、さらには因果関係を解明するまでには至らなかったことから、これらの研究データを活用して今後より詳細な分析を実施すると共に、サンプル数の増加や介入研究の実施が必要である。

腸管免疫と腸内細菌叢の解析に関する研究（國澤）

722名分の腸内細菌叢、646名分の腸管免疫因子の分析を完了し、600名という目標を達成できた。さらに、予備的な検討ではあるが、腸内細菌と食事成分や免疫因子の関連が明らかになってきたことから、今後、これらのデータをもとに介入試験や動物モデルを用いた試験が行われ、因果関係や機能が解明されることで食事や腸内細菌を介した新規の疾患の予防法や治療法の開発に繋がると期待できる。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析（窪田）

脂肪酸では男性において善玉の脂肪酸と考えられるn-3系が低く、n-6/n-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いことがよく知られており、その大きな原因として女性ホルモンであるエストロゲンの影響と考えられている。さらに年齢を3群に分類すると若い人ほどn-6/n-3系の比率が高いことが明らかとなり、これは大塚らが無作為に抽出した一般住民における年齢群別血清脂肪酸構成比率における横断研究で報告した結果と一致した。このことからおそらく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

したのではないかと考えられた。

血漿中の胆汁酸については抽出方法を変更したことにより前年と比較して感度以下のサンプルがかなり減少したが、それでも感度以下になり測定できない検体が存在した。

2次胆汁酸は血中と糞便中で正の相関を示し、血中の2次胆汁酸を測定することにより糞便中の産生量を予測できる可能性が示唆される。また糞便中の短鎖脂肪酸、特にアセテート、プロピオン酸、吉草酸、乳酸に男女の違いを認めることから、食事の質や量の違い、腸内細菌叢の違いが関与しているのではないかと考えられた。

健康な日本人の腸内細菌データベースの構築（水口）

本研究では、詳細な生活習慣情報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技術を用いて横断的に分析することによって、分子機序の推定や各種測定量の間の相関予測モデルを構築することを目指している。今年度は、722名の腸内細菌叢の解析を完了し、生活習慣のデータとともにデータベース化した。昨年度までに作成した腸内細菌叢と生活習慣等の関連を図示化して解析するソフトウェアにヒートマップや主座標分析の結果を表示する機能を追加し、このソフトウェアを用いて各データ間の関連を解析した。

これまでに腸内細菌叢に関する多くの研究がなされ、食事や疾患との関連が明らかにされてきている。しかしながら、腸内細菌叢を身体活動や運動との関わりといった観点から解析された例は少ない。さらに、多数のサンプルを同じ手法を用いて解析した腸内細菌叢のデータはほとんどなかった。今回構築したデータベースは実験・データ解析手法による影響を排除した腸内細菌叢のデータおよび食事・栄養状況や身体活動・運動などの生活習慣と免疫疾患・生活習慣病といった多様な情報も含まれている。従って、腸内細菌と様々なPhenotypeとの関連を確認することはもちろん、動物実験の結果をヒトデータと照合、あるいは動物実験の設計・条件検討など様々な形で貢献できる可能性がある。さらに、開発したソフトウェアを用いることによって、データベース上のデータを表示、相関解析が可能のため、バイオインフォマティクスの専門家でなくても、簡便に結果を求めることが可能である。

平成29年度は目標とした参加者600名を超える722名の参加者を確保し、全参加者の糞便の腸内細菌叢の分析を完了した。646名の腸管免疫指標、400名余りの血液の脂肪酸・胆汁酸の分析の完了し、分析を完了したデータのデータベースへの格納を行った。このデータベースの分析結果から、腸内細菌叢と生活習慣、腸管免疫指標、代謝産物との関係に関する知見を今後公表していく。

E . 健康危険情報
なし

F . 研究発表

1. 論文発表

- Sloan RA, Sawada SS, I-Min L, Gando Y, Kawakami R, Okamoto T, Tsukamoto K, Miyachi M. The Association of Fit-Fat Index with Incident Diabetes in Japanese Men: A Prospective Cohort Study. *Sci Rep*. 2018; 12;8(1):569
- Kamada M, Kitayuguchi J, Abe T, Taguri M, Inoue S, Ishikawa Y, Bauman A, Lee IM, Miyachi M, Kawachi I. Community-wide intervention and population-level physical activity: a 5-year cluster randomized trial. *Int J Epidemiol*. 2018; 47(2):642-653.
- Kamada M, Shiroma EJ, Buring JE, Miyachi M, Lee IM. Strength Training and All-Cause, Cardiovascular Disease, and Cancer Mortality in Older Women: A Cohort Study. *J Am Heart Assoc*. 2017; 6(11):e007677.
- Gando Y, Murakami H, Yamamoto K, Kawakami R, Ohno H, Sawada SS, Miyatake N, Miyachi M. Greater Progression of Age-Related Aortic Stiffening in Adults with Poor Trunk Flexibility: A 5-Year Longitudinal Study. *Front Physiol*. 2017; 8:454.
- K. Hosomi, H. Ohno, H. Murakami, Y. Natsume-Kitatani, K. Tanisawa, S. Hirata, H. Suzuki, T. Nagatake, T. Nishino, K. Mizuguchi, M. Miyachi, and J. Kunisawa, Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Sci Rep* 7(1):4339, 2017
- Shibata N, Kunisawa J, and Kiyono H. Dietary and microbial metabolites in the regulation of host immunity. *Front Microbiol* 8: 2171, 2017
- S. Hirata and J. Kunisawa, Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases. *Allergol Int* S1323-8930(17) 30086-2, 2017
- K. Hosomi and J. Kunisawa, The specific roles of vitamins in the regulation of immunosurveillance, allergy, and inflammation in the gut. *Immune Netw* 17: 13-19, 2017
- 長竹貴広、國澤純 免疫・ワクチン応答を左右する腸内環境因子としての栄養と腸内細菌 医学のあゆみ 264(5): 403-410, 2018
- 松永安由、國澤純 腸内フローラや食品成分を介した免疫グロブリンA産生制御 *Clinical Neuroscience* 35(11): 1285-1287, 2017
- 平田宗一郎、國澤純 腸内環境を介した

リポクオリティの形成とアレルギー疾患の制御 アレルギーの臨床 37(129) 49-52, 2017

粕淵真由、木村郁夫、國澤純 腸内環境と腸管免疫・生体防御に関する新しいトピックス 消化と吸収39(2): 66-70, 2017

水口賢司, 創薬の初期研究におけるデータベース構築とモデリング, 学術の動向, 22(7):62-65, 2017

その他複数

2. 学会発表

Miyachi M: +10 min of physical activity per day. 1st Southeast Asia Public Health Nutrition Conference: 2017.5.17: Kuala Lumpur

Gando Y, Murakami H, Kawakami R, Ohno H, Tanisawa K, Konishi K, Sawada SS, Miyatake N, Miyachi M: Cardiorespiratory fitness is associated with age-related carotid enlargement: A 5-year longitudinal study. American Heart Association Scientific Sessions 2017: 2017.11.12: Anaheim-USA

Jun Kunisawa, Involvement of Diets and Commensal Bacteria in the Regulation of Lipid-mediated Immune Regulation for the Control of Health and Diseases 4th Microbiome R&D & Business Collaboration Congress Singapore, Singapore (March 6, 2018)

Jun Kunisawa, Establishment of gut environment by dietary materials and commensal bacteria in the regulation of host immune responses AMED-Leibniz Workshop in the Life Sciences Ettal, Germany(September 10, 2017)

Jun Kunisawa, Crosstalk between diets and commensal bacteria for the

creation of immunologic environment in the gut Cold Spring Harbor Asia Suzhou, China (September 6, 2017)

Jun Kunisawa, Establishment of gut environment by dietary materials and commensal bacteria in the regulation of host immune responses Frontiers in agricultural immunology Sendai (Tohoku University) (July 24, 2017) 粟木喜久江、窪田哲也、大野治美、村上晴香、宮地元彦、窪田直人 健康人302名における血漿中脂肪酸及び胆汁酸濃度の性別や年齢別解析 第26回日本脂質栄養学会 東京2017.09.22

夏目やよい, 健康人における生活習慣・腸内細菌叢とデータベース構築, CBI学会2017年大会フォーカストセッション, 東京, 2017.10.4 (招待講演)

Mohsen A., Park J., Chen Y., Kawashima H., Mizuguchi K., Impact of read trimming on Illumina paired-end-sequencing samples in the microbiome analysis using Qiime, CBI学会2017年大会, 東京, 2017.10.3

水口賢司, 坂手龍一, 深川明子, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 樋口千洋, 長尾知生子, 創薬・健康・栄養研究を支援するNIBIOHNのデータベース, 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸, 2017.12.6

その他多数

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

商標登録「腸みえるシート」登録第6020435号 (2018年2月16日登録)