

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 分担研究報告書

健康な日本人の腸内細菌データベースの構築
疫学研究の進捗状況と腸内細菌叢と生活習慣との関係

研究代表者 宮地元彦
研究協力者 大野治美、谷澤薫平、小西可奈、村上晴香
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所
国立健康・栄養研究所 身体活動研究部

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、そのデータを横断的に分析することを目的とする。

<方法> 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、大阪市の特設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578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。

<結果> 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。

<まとめ> 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) 生活習慣、食事・栄養、排便状況を含む19個の変数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* 属と正に相関することが明らかになった。

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（David 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、参加者の食事・栄養摂取以外の生活習慣の違いは考慮されていない。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ならびにメタデータを対象に、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29年度末までに600名の健常人を対象に糞便や血液などをサンプリングする。さらに得られた糞便サンプルから腸内細菌叢を解析し、参加者の身体状況、生活習慣などのメタデータとの関連を明らかにする。

B．研究方法

国立健康・栄養研究所が首都圏ですでに確立し運営している大規模介入研究（NEXIS）の参加者を対象とし、20～80歳までの男女に糞便サンプルの提供を依頼した。また、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、大阪市の認定特定非営利活動法人職員にも糞便の提供を依頼した。糞便のサンプリングは、平成28年度までに確立した保存液を用いて行った（Hosomi et al. *Sci Rep.* 2017）。

また、各地域で共通して、身体特性（身長、体重等）、生活習慣病リスクファクター（血糖値、血中脂質、血圧等）、現病歴・既往歴、生活習慣（運動習慣、睡眠時間など）、食事・栄養摂取状況（BDHQによる）、採便時ならびに習慣的糞便状況等についても測定を行った。採便時および習慣的な糞便の形状・色と排便量・頻度は、昨年度に開発した調査票を用いて調査した（Ohno et al. *Sci Rep.* 投稿中）。

NEXIS コホートの参加者から提供された糞便より、核酸自動抽出器 GENE PREP STAR（クラボウ社）を用いて DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を Miseq（Illumina 社）によりシーケンスした（分析班〈國澤〉）。

菌種の同定ならびに菌叢解析は、微生物群集解析ソフト QIIME を用いて行った（分析班〈水口〉）。低クオリティの配列（リード）ならびにキメラ配列を除去した後、Silva データベースを参照として、97%の類似度を持つ 16S rRNA 遺伝子配列群（operational taxonomic unit：OTU）を同定した。得られた OTU より、門～属の分類群レベルで各菌の存在比を求めた。全てのサンプルにおけるリード数は、10000 リードに希釈して全ての解析を行った。

細菌群集構造と 140 項目の変数を含むメタデータ（対象者の基本情報・身体特性：5 項目、生活習慣病リスクファクター：9 項目、現病歴・既往歴：33 項目、生活習慣：11 項

目、食事・栄養摂取状況：58 項目、採便時ならびに習慣的糞便状況：23 項目）との関連を解析するため、R パッケージ phyloseq を用いて OTU レベルの菌叢の構成より Bray-Curtis 指数を求めた。また、R パッケージ vegan の envfit 関数を用いて、Bray-Curtis 指数とメタデータとの関連を網羅的に解析した。さらに、各変数が細菌群集構造に及ぼす複合的な影響を明らかにするために、vegan の ordiR2step および ordistep 関数を用いて、ステップワイズ回帰（変数増加法または変数減少法）を行った。門～属レベルに分類した細菌の存在比とメタデータの関連はピアソンの積率相関係数により示した。

（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

平成30年2月末までに743名から糞便サンプルの提供を受け、その内722名のシーケンスが完了した（NEXIS：436名、周南市：86名、南魚沼市：100名、健康ラボステーション：100名）。

722名の対象者の内、140項目のメタデータのいずれにも欠損値がない578名（NEXIS：408名、周南市：82名、南魚沼市88名を対象として、腸内細菌叢とメタデータとの関連を解析した。表1に、対象者578名の特性をコホート別に示した。NEXISにおいて、年齢および女性の割合は、他の2つのコホートと比較して高かった。また、運動習慣者の割合、歩数、様々な微量栄養素の摂取量もNEXISにおいて高かった。

OTUレベルのBray-Curtis指数とメタデータとの関連を単変量解析（vegan：envfit関数）により検討した結果、140項目のメタデータのうち58個がBray-Curtis指数と有意に関連していた（ $P < 0.05$ ）。さらに、変数増加法によるステップワイズ回帰（vegan：ordiR2step関数）を行った結果、メタデータの内19項目が独立してBray-Curtis指数と関連していた（図1）。最も強くBray-Curtis指数と関連していた要因はコホートの違い（現居住地域差）で、細菌群集構造の個人差を2.9%説明していた。変数減少法によるステップワイズ回帰を行った場合も、コホートの違い（地域差）が最も強くBray-Curtis指数と関連していた。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・栄養摂取要因に加え、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・糞便状況が独立してBray-Curtis指数と関連していた。抽出された19項目の変数により細菌群集構造の個人差が7.3%説明された。

次に、各細菌の存在比と強く関連するメタ

データを探索し、ピアソンの積率相関係数 $r > 0.3$ もしくは $r < -0.3$ の変数を抽出した。その結果、 $r > 0.3$ 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(図2)。

さらに、本研究の対象集団において、存在比1%以上で検出された属レベルの細菌と主要なメタデータとの相関をヒートマップで示した(図2)。図2に示した通り、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属と正に相関し、特にFaecalibacterium属の存在比と強い正の相関を示した。一方、これらの微量栄養素はBacteroides属、Parabacteroides属、Sutterella属の存在比とはいずれも負に相関していた。

D. 考察とまとめ

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。

表1に示した通り、コホート間で年齢、男女比、運動習慣者の割合、栄養摂取量は有意に異なっていたが、多変量解析によりこれらの要因を考慮したとしても、コホートの違いは独立して細菌群集構造と関連していた。したがって、コホート間における年齢、男女比、運動習慣者の割合および栄養摂取量などの要因のみでは、コホートの違いが細菌群集構造に及ぼす影響全てを説明することはできず、本研究で調査した調査項目以外の未知の要因により、コホートによる細菌群集構造の違いが生じることが予想される。本研究において、コホートの違いは細菌群集構造の最も強い予測因子であったことから、ポピュレーションレベルで細菌群集構造の解析を行う際に、コホートあるいは居住地域の違いは必ず考慮すべき重要な要因の一つであると考えられる。

また、19項目の変数により細菌群集構造の個人差が7.3%説明された。Falony et al. (Science, 2016) は、1106名のベルギー人を対象として、503項目のメタデータと細菌群集構造との関連をステップワイズ回帰(変数増加法)により分析し、18項目の変数により細菌群集構造の個人差を7.7%説明できることを報告しており、本研究の結果と同程度であった。したがって、人種に関わらず、細菌群集構造に比較的強い影響を及ぼす十数個の変数によ

り説明されるその個人差は10%にも満たなく、その他の影響力の弱い多数の環境要因や、遺伝的要因や母体要因などの先天的な要因、あるいはそれらの相互作用により細菌群集構造の個人差の大部分が説明されると考えられる。

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・糞便状況が独立して細菌群集構造と関連することが明らかになった。Falony et al. (Science, 2016) は、糞便の形状(糞便の固さ、水分量、大腸通過時間等を反映する指標)の主観的評価に用いられているBristol Stool Form Scaleが、細菌群集構造の強い予測因子であることを報告していたが、形状以外の排便・糞便状況に関する要因と細菌群集構造との関連は不明であった。本研究により、糞便の形状とは独立して、排便頻度や糞便の色・量などの要因が細菌群集構造と関連することが初めて明らかになった。腸内細菌叢と疾患や生活習慣との関連を解析する上で、細菌群集構造に強く影響する糞便の形状を交絡因子として評価することの重要性が示唆されていたが(Vandeputte et al. Gut, 2016)、糞便の形状のみならず、排便頻度や糞便の色・量などの要因も合わせて評価することが、より精度高く腸内細菌叢と疾患や生活習慣との関連を明らかにするために重要であると考えられる。

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、微量栄養素とRuminococcaceae科の存在比との間に比較的強い正の相関が認められた。また、Firmicutes門に属するFaecalibacterium属、Subdoligranulum属、Eubacterium rectale group属およびRoseburia属と、様々な微量栄養素との間に正の相関が認められた。これらの細菌はいずれも酪酸産生菌として知られており、酪酸産生の増加は腸内pHの低下に寄与する。In vitroの実験により、Firmicutes門に属する細菌は低いpHに耐性がある一方で、Bacteroidetes門に属する細菌は低いpHに対する耐性が弱いことが報告されている(Duncan et al. Environ Microbiol, 2009)。本研究において、Firmicutes門に属する細菌の多くが腸内細菌叢の多様性と正に相関する一方で、Bacteroidetes門に属する主要な細菌であるBacteroides属とPrevotella属は腸内細菌叢の多様性と負に相関していた(分析班<水口>)。したがって、ビタミンやミネラルなどの微量栄養素が豊富な食事を摂取することにより、様々な酪酸産生菌が増加し、Firmicutes門に属する細菌の増加とBacteroidetes門に属する細菌の減少を招き、結果として腸内細菌叢の多様性が増加する可能性が考えられる。しかし、これらの因果関係は不明であり、縦断研究や介入研究による検討が必要である。

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。日本人を対象とした初めての研究成果であるが、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、データベース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。

3.その他
商標登録「腸みえるシート」登録第602043
5号（2018年2月16日登録）

E. 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.

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

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

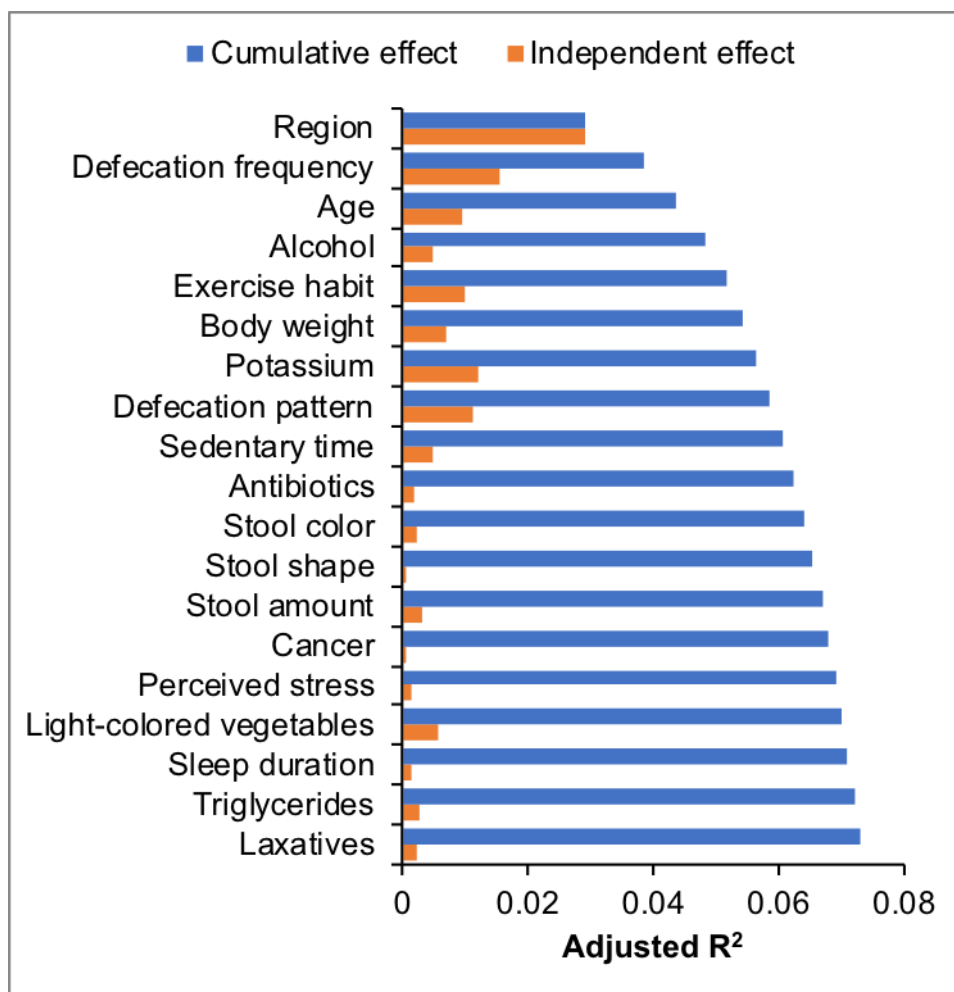


図1. 変数増加法によるステップワイズ回帰 (vegan: ordiR2step関数) により、メタデータの内19項目が独立してBray-Curtis指数と関連していた。

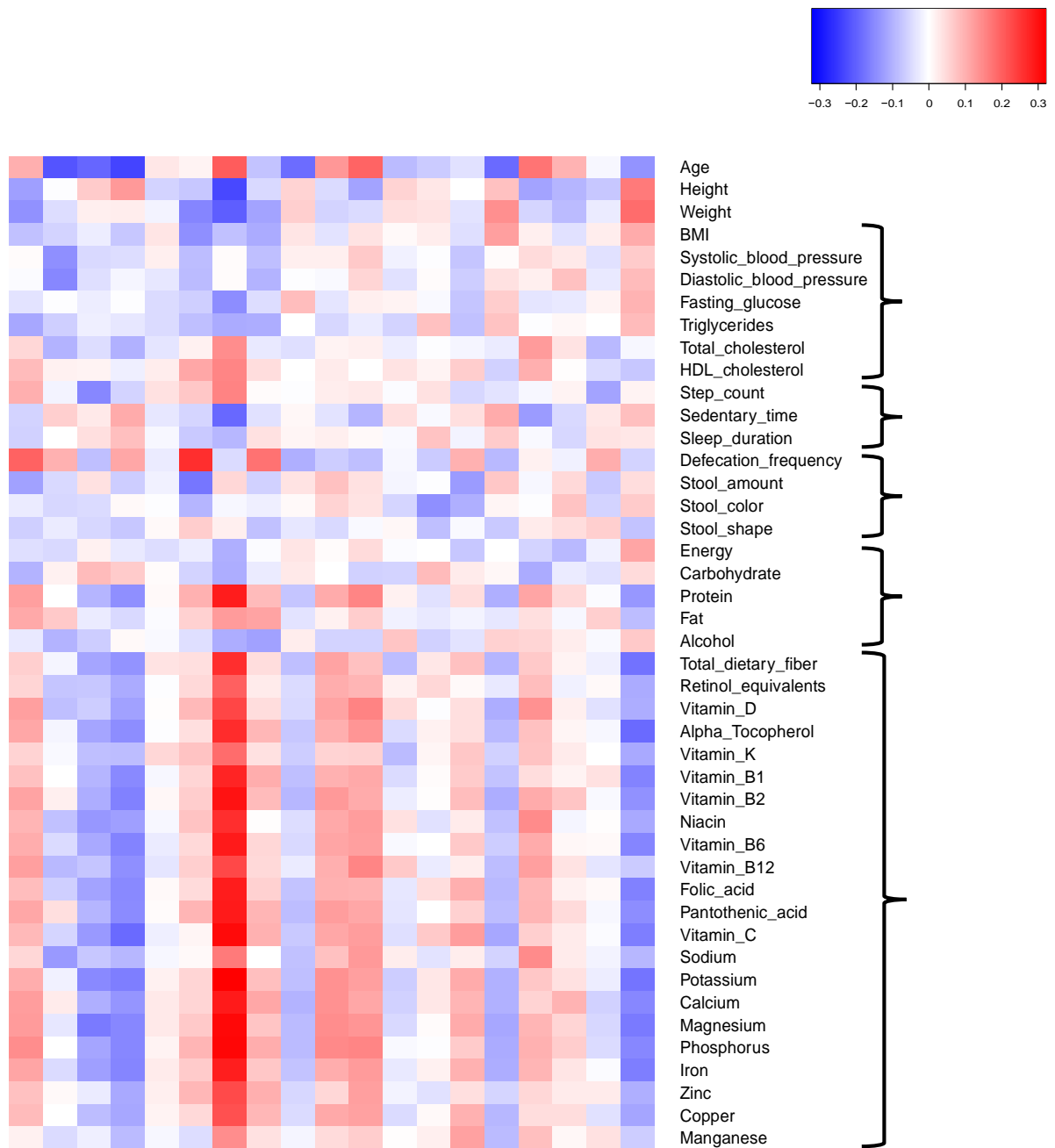


図2．存在比1%以上で検出された属レベルの細菌と主要なメタデータとの相関のヒートマップ。様々な微量栄養素の摂取量が、Firmicutes門に属する*Faecalibacterium*属、*Subdoligranulum*属、*Eubacterium rectale group*属および*Roseburia*属と正に相関し、特に*Faecalibacterium*属の存在比と強い正の相関を示した。一方、これらの微量栄養素は*Bacteroides*属、*Parabacteroides*属、*Sutterella*属の存在比とはいずれも負に相関していた。