

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

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

(H27 - 循環器等 - 一般 - 004)

平成27年度 総括研究報告書

研究代表者 宮地 元彦

平成28年(2016)年3月

目次

・ 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 ……………1
宮地元彦、國澤 純、水口賢司、窪田哲也

・ 分担研究報告書

1. 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 ……………5
宮地元彦、大野治美、村上晴香
 2. 糞便状態および排便状況の調査票の開発および健常者における糞便状態・排便状況の調査 ……………7
大野治美、村上晴香、宮地元彦
 3. 健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌叢の解析に関する研究 …………… 10
國澤 純、細見晃司
 4. 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 …………… 22
水口賢司
 5. 脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析 …………… 25
窪田哲也
- ・ 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 29
- ・ 研究成果の刊行物・別刷 …………… 30

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、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。

<方法> 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の参加者を対象とし、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糞便・排便状況調査票を確立するための文献研究を実施した（宮地）。医薬基盤研究所ならびに理化学研究所の腸内細菌や免疫に関する解析技術を用いて糞便や血液サンプルを分析する（國澤、窪田）。それらのデータをバイオインフォマティクス手法を用いてデータベース化し解析する（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。2016年2月11日現在において、90名の研究参加同意が得られ、生活習慣調査、血液、糞便サンプルリングを完了した。3月末までに140名の被験者に対し測定を実施する予定である。また、糞便の一部について腸内細菌叢の解析が終了した。血液による短鎖脂肪酸の解析については、予備検討が終了した（窪田）。さらに、本研究で得られたデータをどのようにバイオインフォマティクスの手法を用いて解析するかを検討を行った（水口）。

<まとめ> 本年度の計画であった250名のうち年度末までに140名の参加予定であり、進捗は60%程度であるが、採便・運搬、分析、解析の方法が確立した。

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（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。

本年度の具体的な研究目的は以下のとおりであった。

参加同意者の確保

糞便・排便状況調査票の確立

採便・運搬法と腸管免疫と腸内細菌叢の分析法の確立

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析の確立

データベースの構築法の検討

B. 研究方法

参加同意者の確保

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(本年度の目標250名)から糞便サンプルの提供を依頼する。サンプリングにあたっては腸内細菌叢の分析の妥当性や再現性を確保することに加えて、参加者に負担がなく、より多くの参加者の参加同意を得るための最良の方法を検討する必要がある。これらを勘案し、従来の凍結保存・運搬法でなく、常温での保存・運搬が可能な方法を用いることとした。

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(BDHQによる)等について測定・調査を行った。

(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)。

糞便・排便状況調査票の確立

PubMedおよびCiNii等により、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。その後、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)の参加者を対象において、「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構築を目指した疫学研究」への参加を依頼し、同意が得られた被験者に対し、新たに作成した調査票を用いて、糞便状態・排便状況の調査を行った。

採便・運搬法と腸管免疫と腸内細菌叢の分析法の確立

採便および便の輸送方法を確立するために、採取したヒト便からすぐにDNA抽出した場合と保存液に浸した状態で2日間室温に放置した便から抽出したDNAを用いた場合で腸内細菌叢の解析を行い、結果を比較した。また、本事業では扱う検体数が多いことから、自動抽出器によるDNA抽出の最適化を行った。腸管免疫因子としてIgA抗体を定量的に検出するためのサンドイッチELISA法を確立し、冷凍や冷蔵などの保存方法の違いによる影響を検討した。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析の確

立

脂肪酸の測定:Folch法で全脂質を抽出し、カラムを用いて脂質クラスを分離する。分離した脂質に内部標準を加えて、誘導化試薬を用いてメチル化を行う。中和、洗浄を行った後、窒素気流下で乾燥して、ヘキサンに再溶解してGC-MSで脂肪酸組成を測定する。

胆汁酸の測定:サンプルを凍結乾燥し、緩衝液に再溶解する。溶解液に酵素を加えて脱抱合後し、イオン交換カラムを用いて遊離の胆汁酸分画を調整する。さらに水酸基・カルボン酸基を非極性化するために、ジアゾメタンを用いてカルボン酸基をメチル化、続いてジメチルエチルシリルイミダゾールを用いてジメチルエチルシリルエーテル化を行う。シリカゲルカラムにかけて誘導体化された胆汁酸を調整、乾固後ヘキサン50 μ Lで再溶解しGC-MSで測定する。

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。

C. 研究結果

参加同意者の確保

本研究は、採択時期が遅れたため、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も平成27年9月7日となった(受付番号:健栄3)。承認後、2015年10月より既存のNEXISコホートの参加者(登録者数1,077名)に研究参加の依頼を順次行った。2016年2月11日現在において、90名の同意が得られ、生化学的・生理学的指標の測定が行われた。

糞便・排便状況調査票の確立

文献検索の結果を基に、糞便の形状・固さ、糞便の色、糞便の量などを聞き取る調査票を作成した。また、本研究へ同意が得られた者において、それら調査票を用いて調査を行った。80名の健常者を対象に糞便状態・排便状況の調査を行った。その結果、1週間当たりの排便回数は、週当たり7回以上と答えた人が最も多かった(63.7%)。また、1回あたりの排便量は便モデル(2cm \times 10cm)換算で、2本分と答えた人が最も多かった(57.5%)。さらに便の形状はバナナ状と答えた者が最も多く(80.0%)、色は黄土色(40.0%)と茶色(40.0%)と答えた者が最も多かった。

採便・運搬法と腸管免疫と腸内細菌叢の分析法の確立

採便後すぐにDNA抽出した場合に比べて保存液を用いることでFirmicutes/Bacteroides

比 (F/B比) が減少する傾向にあった。また、市販のキットを用いてDNA抽出した場合に比べて自動抽出したDNAではF/B比が増加する傾向にあった。同様に属レベルでの菌叢解析においてもFirmicutes門やBacteroides門に属する菌の割合の変化が認められた。採便方法やDNA抽出方法が腸内細菌叢の解析結果にある程度影響することが明らかとなった。今後、このようなサンプリングなどの解析方法による違いがサンプル間の比較解析に与える影響について検体数を増やして検討していく予定である。しかし、保存液を用いることで便を室温で保存・輸送しても腸内細菌叢を解析できたことから、初年度は保存液を用いた腸内細菌叢解析のデータ収集をすでに開始している。また、ヒト便を一晩冷凍、冷蔵保存したサンプルにおいて、採便後すぐに処理したサンプルと同程度にIgA抗体を検出できた。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析の確立

血漿中の代謝産物を精度と再現性良く測定するために、血漿からの各種代謝マーカーの抽出方法や測定方法を確立した。また健康者のサンプルであるため、適切な標準化物質を探索し、腸内細菌との関連性が深いと考えられるパルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸、さらにコール酸、デオキシコール酸といった1次胆汁酸や2次胆汁酸などを定量的に測定できた。

データベースの構築法の検討

遺伝子、パスウェイ情報等を鍵とした独自のデータウェアハウス技術を拡張し、化合物や疾患などの、より多様なデータを統一的に解析できる枠組みを構築した。また、腸内細菌叢のデータを米国国立生物工学情報センター (NCBI) の提供する生物種IDとともにデータベース化する予定である。さらに、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を入手し、予備的な多変量解析と相関解析を行った。その結果、赤血球数と最大酸素摂取量や腹囲と動物性脂肪摂取量などに既知の相関がみられることを確認した。

D. まとめ

本年度の計画として、資料収集を250名予定していたが、現時点で140名の予定であることから、達成度としては60%である。今後、目標のサンプル数に到達すべく被験者のリクルートを行い、順次解析を行っていく。

糞便状態および排便状況を聞き取るための調査票を開発し、80名の健康者を対象に糞便状態・排便状況の調査を行った。

常温による採便・運搬法が確立したが、腸管免疫指標の分析のための冷凍保存・運搬法についても検討を加えることとした。脂肪酸と胆汁酸を定量的に測定することができたが、サンプル数も多いことから、前処理の簡略化を検討する。

少数のデータを予備的に解析し、それぞれのデータの性質を理解した上で、データをどのように格納するか設計を行った。この設計に基づいてデータベースを構築し、来年度以降データの格納を行い、異なる種類のデータ間の横断的な解析ができる環境を整える予定である。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kikuchi N, Miyamoto-Mikami E, Murakami H, Nakamura T, Min SK, Mizuno M, Naito H, Miyachi M, Nakazato K, Fukunaga N: ACTN3 R577X genotype and athletic performance in a large cohort of Japanese athletes. *Eur J Sport Sci* 2015; Epub ahead of print

Gando Y, Murakami H, Kawakami R, Yamamoto K, Kawano H, Tanaka N, Sawada S, Miyatake N, Miyachi M: Cardiorespiratory fitness suppresses age-related arterial stiffening in healthy adults: A 2-year longitudinal observational study. *J Clin Hypertens* 2016; Epub ahead of print

Kunisawa J, Sugiura Y, Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H: Mode of bioenergetic metabolism during B cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B1. *Cell Rep* 2015; 13:122-131

Suzuki H, Kunisawa J: Vitamin-mediated immune regulation in the development of inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2015; 15:212-215

Yi-An Chen, Lokesh P. Tripathi, Kenji Mizuguchi: An integrative data analysis platform for gene set knowledge discovery in a data warehouse framework. *Database* (in press).

2. 学会発表

國澤純, 栄養を介した免疫制御と創薬・機能性食品開発への展開, 日本薬学会第136年会, 横浜(パシフィコ横浜), 2016年3月28日

國澤純, 腸内環境を介した免疫制御の基礎的解明と創薬・機能性食品開発への

展開, 第97回日本栄養・食糧学会関東支部会大会シンポジウム, 東京(東京大学), 2016年3月12日

Jun Kunisawa, Diet-Commensal Crosstalk for the control of gut immunity, Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems, Yokohama, RIKEN, 2 March, 2016

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, BMFHシンポジウム2016, 東京(東京大学), 2015年2月13日

國澤純, 腸から眺めるヘルスサイエンス, 第3回先進イメージング医学研究会・学術集会, 神戸(有馬温泉ホテル), 2015年2月12日

國澤純, 免疫制御における腸内環境の影響と免疫創薬、機能性食品、ワクチンへの展開, 第6回学際的脂質創生研究部会講演会, 徳島(徳島大学), 2015年1月22日

國澤純, 医薬・健康・栄養の複合的観点から見たヘルスサイエンス, 彩都産学官連携フォーラム2016, 大阪(千里ライフサイエンスセンター), 2016年1月20日

國澤純, 腸内環境を介した免疫制御とアジュバント開発への展開, 第9回次世代アジュバント研究会, 大阪(千里ライフサイエンスセンター), 2016年1月19日

國澤純, 食と腸管免疫を起点とした機能性食品、創薬に向けた新たな展開, HIHA第5回ワークショップ, 広島(広島大学), 2015年11月27日

水口賢司, データウェアハウスによる創薬関連データ統合と解析の実際, 第361回CBI学会研究講演会, 大阪, 2015.4.24

(招待講演)

水口賢司, 健康な日本人の生活習慣と腸管免疫・腸内細菌データベースの構築: バイオインフォマティクスの視点から, シリーズ「薬づくりの新しいR&Dモデルを探る」第11回「薬づくりと健康食品開発を結ぶ」, 東京, 2016.1.15 (招待講演)

陳怡安, ロケシュ テリパチ, 水口賢司, 創薬の初期研究における統合データウェアハウスTargetMine, トーゴの日シンポジウム2015, 東京, 2015.10.5 (ポスター)

長尾知生子, 五十嵐芳暢, 森田瑞樹, 陳怡安, 深川明子, 坂手龍一, 水口賢司, 創薬・疾患研究のためのデータベース検索システム Sagace & Toxygates, トーゴの日シンポジウム2015, 東京, 2015.10.6 (ポスター)

Chen Y.A., Tripathi L.P., Mizuguchi K., The integration of biological data and its application to drug discovery, CBI学会2015年大会, 東京, 2015.10.27 (ポスター)

水口賢司, 坂手龍一, 深川明子, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 医薬基盤・健康・栄養研究所の創薬支援データベースとツール, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本分子生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015.12.1 (ポスター)

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

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

研究代表者 宮地元彦
研究協力者 大野治美、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 健康増進研究部

研究要旨

<目的> 健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベース構築をめざし、現在進行しているコホート研究（NEXIS）において、健康人を対象に糞便や血液などをサンプリングし、分析に供することを目的とした。

<方法> 現在進行している NEXIS コホートの参加者（登録者数 1,077 名）において、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）。同意が得られた被験者に対し、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 DXA による体組成や、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、体力の測定を行った。さらに、3 次元加速度計を用いた日常身体活動量の測定や BDHQ を用いた栄養摂取状況も併せて調査した。

<結果> 2016 年 2 月 11 日現在において、90 名の同意が得られ、生化学的・生理学的指標の測定が行われた。3 月末までに 140 名の被験者に対し測定を実施する予定である。また、糞便の一部について腸内細菌叢の解析が終了した。

<まとめ> 疫学班の本年度の計画として、250 名の試料収集完了を予定していたが、年度末までに 140 名の予定であることから、本年度の達成度の自己評価を 60%とする。

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。

本年度は250名の健康人を対象に糞便や血

液などをサンプリングし、分析に供することを当初の計画としている。

B．研究方法

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（本年度の目標250名）から糞便サンプルの提供を依頼する。サンプリングにあたっては腸内細菌叢の分析の妥当性や再現性を確保することに加えて、参加者に負担がなく、より多くの参加者の参加同意を得るための最良の方法を検討する必要がある。これらを勘案し、従来の凍結保存・運搬法でなく、常温での保存・運搬が可能な方法を用いることとした。

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（BDHQによる）等について測定・調査を行った。

（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

本研究は、採択時期が遅れたため、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も平成27年9月7日となった（受付番号：健栄3）。承認後、2015年10月より既存のNEXISコホートの参加者（登録者数1,077名）に研究参加の依頼を順次行った。2016年2月11日現在において、90名の同意が得られ、生化学的・生理学的指標の測定が行われた。測定が終了した対象者の特性を表1に示した。

表1 被験者特性

	男性(n=12)	女性(n=78)
年代、n数(%)		
30代	0(0)	2(3)
40代	0(0)	10(13)
50代	3(25)	18(23)
60代	7(58)	31(40)
70代～	2(17)	17(22)
身長(cm)	170.5 ± 5.0	155.7 ± 5.3
体重(kg)	70.1 ± 10.3	54.6 ± 7.1
BMI	24.0 ± 2.8	22.6 ± 2.7

D．まとめ

疫学班の本年度の計画として、資料収集を250名予定していたが、現時点で140名の予定であることから、達成度としては60%である。今後、目標のサンプル数に到達すべく被験者のリクルートを行い、順次解析を行っていく。

E．研究発表

1. 論文発表

Kikuchi N, Miyamoto-Mikami E, Murakami H, Nakamura T, Min SK, Mizuno M, Naito H, Miyachi M, Nakazato K, Fukunishi N: ACTN3 R577X genotype and athletic performance in a large cohort of Japanese athletes. *Eur J Sport Sci* 2015; Epub ahead of print
 Gando Y, Murakami H, Kawakami R, Yamamoto K, Kawano H, Tanaka N, Sawada S, Miyatake N, Miyachi M: Cardiorespiratory fitness suppresses age-related arterial stiffening in healthy adults: A 2-year longitudinal observational study. *J Clin Hypertens* 2016; Epub ahead of print

2. 学会発表

なし

F．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

糞便状態および排便状況の調査票の開発および
健常者における糞便状態・排便状況の調査

研究協力者 大野治美、村上晴香
研究代表者 宮地元彦
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
国立健康・栄養研究所健康増進研究部

研究要旨

<目的> 腸内細菌叢や腸管免疫を測定する上で重要な基礎情報となる糞便の状態を把握するための質問票を開発し、健常者の糞便の状態や排便の状況を明らかにすることを目的とした。また、これら糞便状態・排便状況の見える化に発展させることを目的とする。

<方法> PubMed および CiNii 等により、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。その後、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）の参加者を対象において、「健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベース構築を目指した疫学研究」への参加を依頼し、同意が得られた被験者に対し、新たに作成した調査票を用いて、糞便状態・排便状況の調査を行った。

<結果> 文献検索の結果を基に、糞便の形状・固さ（O'Donnell et al., BMJ. 1990 ; 300:439-40）糞便の色（瀧口ら, 腸内細菌学雑誌 11:117-122, 1998）糞便の量（山野ら, 腸内細菌学雑誌 18:15-23, 2004）などを聞き取る調査票を作成した。また、本研究へ同意が得られた者において、それら調査票を用いて調査を行った。80名の健常者を対象に糞便状態・排便状況の調査を行った。その結果、1週間当たりの排便回数は、週当たり7回以上と答えた人が最も多かった（63.7%）。また、1回あたりの排便量は便モデル（2cm×10cm）換算で、2本分と答えた人が最も多かった（57.5%）。さらに便の形状はバナナ状と答えた者が最も多く（80.0%）、色は黄土色（40.0%）と茶色（40.0%）と答えた者が最も多かった（図）。

<まとめ> 糞便状態および排便状況を聞き取るための調査票を開発し、80名の健常者を対象に糞便状態・排便状況の調査を行った。今後、全ての参加者を対象に調査を実施し、腸内細菌叢の分析結果や様々な生活習慣との関わりを多面的に解析することで、“糞便”による健康状態の見える化を図る。

A. 研究目的

近年、腸内細菌叢と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）。しかしながら、腸内細菌叢の多様性や種類等の全容を解明していくことは多大なコストを要するというデメリットもある。

一方、腸内細菌が生息する場所は、小腸の終わりから大腸全体であり、我々が食物として摂取した物が通過する場所でもある。我々が摂取した食物は、生体に消化・吸収された後に、“糞便”として排泄される。実はこの糞便の約3分の1は、腸内細菌の死骸であるとも言われている。つまり、我々の糞便は、腸内における腸内細菌叢の状態を一部表していることが考えられる。しかしながら、これまで、排便状況や糞便の状態と腸内細菌叢との関係や、排便状況や糞便の状態と生活習慣との関わりについて検討した研究はほとんどな

い。

そこで本研究では、腸内細菌や腸管免疫を測定する上で重要な基礎情報となる糞便の状態を把握するための質問票を開発し、健常者の糞便の状態や排便の状況を明らかにすることを目的とした。また、様々な生活習慣や健康状態・疾患との関わりを多面的に解析することで、良好な糞便状況を示し、さらに“糞便”の見える化に発展させることを目的とする。

B. 研究方法

B-1. 糞便状態および排便状況の調査票の検討と開発

PubMedおよびCiNii等により、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。また、

腸内細菌叢に影響を与えると思われる項目についても文献研究を行い、それらについても併せて質問票を作成した。

B-2. 調査票を用いた糞便状態・排便状況の調査

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)の参加者を対象において、「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構築を目指した疫学研究」への参加を依頼し、同意が得られた被験者に対し調査を行った。

C. 研究結果

C-1. 糞便状態および排便状況の調査票の検討と開発

文献検索の結果、糞便の状態としてよく評価されている項目は、下記の通りであった。

- 糞便の量 (山野ら, 腸内細菌学雑誌18:15-23, 2004) ...便モデル(2cm×10cm)の何本分に相当するか
- 糞便の形状・固さ (O'Donnell et al., BMJ. 1990; 300:439-40) ...Bristolスケール
- 糞便の色 (瀧口ら, 腸内細菌学雑誌 11:117-122, 1998)
- その他: 糞便の臭い、おならの臭い、排便後の爽快感、便秘がち・下痢がちなど (中川ら, 日本栄養・食糧学会誌43(2):95~101, 1990、勝野ら, 腸内細菌学雑誌17:15-25, 2003、日本栄養士会雑誌51(1):25-30, 2008)

また、その他、腸内細菌に影響を与える要因として、これまでの調査(BDHQによる栄養摂取状況)に加え、下記の項目が追加された。

- 発酵食品の摂取量や頻度 (Nutrition Research Reviews 28: 42-66, 2015、J Investig Allergol Clin Immunol. 2007;17(2):92-100、腸内細菌学雑誌14:97-102, 2001、Mol Nutr Food Res 59(5):1004-8, 2015)
- 人工甘味料の摂取量や頻度 (Suez J et al. Nature 514, 181-186, 2014、Frankenfeld CL et al. Ann Epidemiol 25(10):736-42, 2015)
- 抗生物質の摂取 (Young VB et al. J Clin Microbiol 42(3):1203-6, 2004、Jernberg C. ISME J. 1:56-66, 2007)

これら糞便状態・排便状況および食物やその他の項目を含む調査票が開発された。

C-2. 調査票を用いた糞便状態・排便状況の調査

2016年2月5日現在において、80名の同意が得られ、B-1で開発された質問票を用いて糞便状態・排便状況が調査された。

1週間当たりの排便回数は、週当たり7回以上と答えた人が最も多かった(63.7%)。また、1回あたりの排便量は便モデル(2cm×10cm)換算で、2本分と答えた人が最も多かった(57.5%)。さらに便の形状はバナナ状と答えた者が最も多く(80.0%)、色は黄土色(40.0%)と茶色(40.0%)と答えた者が最も多かった(図)。これら排便状況や糞便状況に年齢による差や性差は認められなかった。一方、糞便の臭いやおならの臭いについては、年齢との関連が認められ、若齢者ほど臭いと答える者が多かった(spearman's ρ ; -0.349, -0.281, $p < 0.05$ respectively)。また、男性は女性と比較して下痢がちである者の割合が多かった(2検定, 男性25%, 女性2.9%, $p < 0.05$)。

D. まとめ

糞便状態および排便状況を聞き取るための調査票を開発し、80名の健常者を対象に聞き取りを行った。その結果1週間当たりの排便回数は、週当たり7回以上、1回あたりの排便量は便モデル(2cm×10cm)換算で、2本分、便の形状はバナナ状、色は黄土色と茶色と答えた者が最も多かった。本研究結果は、腸内細菌叢研究の基礎的資料として、日本人の幅広い年齢における糞便状態・排便状況を明らかにし、様々な生活習慣や健康状態との関わりを多面的に解析することで、良好な糞便状況を示し、さらに“糞便”の見える化に寄与するものとする。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 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

図 ふん便の形状と色のマトリクス

	便の形状 (ブリストルスケール)	便の状態	便の色					
			黄色	うすい黄土色	黄土色	茶色	こげ茶色	黒色
コロコロ状	1 	硬くてコロコロな便 排便困難			1		2	
カチカチ状	2 	硬い便 ソーセージ状である						
	3 	やや硬い便 表面にひび割れのあるソーセージ状			3	3	2	
バナナ状	4 	普通便 表面がなめらかで やわらかいソーセージ状	1	8	25	27	3	
半練り状	5 	やわらかくてしわのある 半固形状			3	1		
泥状	6 	泥状の便 不定形で境界線がない				1		
下痢・液状	7 	水様で、固形物を 含まない液体状の便						

健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌叢の解析に関する研究

研究分担者 國澤 純
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
ワクチンマテリアルプロジェクト・プロジェクトリーダー
研究協力者 細見 晃司
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
ワクチンマテリアルプロジェクト・特任研究員

< 目的 >

本研究では、食事や運動などの生活習慣、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に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を目指している。初年度は、ヒト試料を対象に腸管免疫や腸内細菌叢の解析方法を確立し、データ収集を開始するための検討を行った。また、食事と腸管免疫という観点から、腸管での免疫応答を新しい食事成分としてビタミン B1 に着目し、腸管 IgA 産生における役割について解析を行った。

< 方法 >

採便および便の輸送方法を確立するために、採取したヒト便からすぐに DNA 抽出した場合と保存液に浸した状態で2日間室温に放置した便から抽出した DNA を用いた場合で腸内細菌叢の解析を行い、結果を比較した。また、本事業では扱う検体数が多いことから、自動抽出器による DNA 抽出の最適化を行った。腸管免疫因子として IgA 抗体を定量的に検出するためのサンドイッチ ELISA 法を確立し、冷凍や冷蔵などの保存方法の違いによる影響を検討した。ビタミン B1 がエネルギー代謝に必須であることから、IgA 抗体産生細胞の分化過程におけるエネルギー代謝産物のメタボローム解析を行い、代謝経路の変化とビタミン B1 への依存性について検討した。また、ビタミン B1 欠乏食で飼育したマウスを用いて、経口ワクチン（コレラ毒素）に対する免疫応答を検討した。

< 結果と考察 >

採便後すぐに DNA 抽出した場合に比べて保存液を用いることで Firmicutes/Bacteroides 比（F/B 比）が減少する傾向にあった。また、市販のキットを用いて DNA 抽出した場合に比べて自動抽出した DNA では F/B 比が増加する傾向にあった。同様に属レベルでの菌叢解析においても Firmicutes 門や Bacteroides 門に属する菌の割合の変化が認められた。採便方法や DNA 抽出方法が腸内細菌叢の解析結果にある程度影響することが明らかとなった。今後、このようなサンプリングなどの解析方法による違いがサンプル間の比較解析に与える影響について検体数を増やして検討していく予定である。しかし、保存液を用いることで便を室温で保存・輸送しても腸内細菌叢を解析できたことから、初年度は保存液を用いた腸内細菌叢解析のデータ収集をすでに開始している。また、ヒト便を一晩冷凍、冷蔵保存したサンプルにおいて、採便後すぐに処理したサンプルと同程度に IgA 抗体を検出できた。

エネルギー代謝産物のメタボローム解析から、腸管に存在する IgA 抗体産生細胞はその前駆体であるナイーブ B 細胞に比べて、解糖系への依存度が高いことが明らかとなった。ビタミン B1 がクエン酸回路に関連することから、ビタミン B1 欠乏食で飼育したマウスにおいては腸管（パイエル板）のナイーブ B 細胞の著しい減少が認められた。また、ビタミン B1 欠乏食飼育マウスでは経口投与したワクチン抗原（コレラ毒素）特異的な糞便中 IgA 抗体の減少などの免疫応答の減弱が認められた。ビタミン B1 の摂取は日常の食事だけでなく腸内細菌や糖尿病などとも関連していることから、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症の相互関係を理解する上でビタミンとエネルギー代謝が一つのキーワードになると考えている。

A. 研究目的

腸内細菌叢の変化や乱れがぜんそくなどのアレルギー疾患や肥満、代謝性疾患などに関連することがヒトや疾患モデルを用いた研究から明らかとなってきた。また、食事や運動といった生活習慣や腸管免疫の違いが腸内細菌叢を変化させることも報告されている。しかし、これらの研究成果の多くは欧米人を対象としたものであり、食文化や生活習慣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おらず、腸管免疫に関する個人差も明らかとなっていない。本研究では、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を目的に、食事や運動などの生活習慣と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の便サンプルを用いて、次世代シーケンサーを用いた16Sメタゲノム解析および免疫因子(IgA抗体や抗菌分子)などを測定する免疫学的手法(ELISAなど)を確立し、解析を開始する。腸内細菌や腸管免疫と関連する食事・栄養成分に関する新規知見を得ることを目的に、ビタミンB1の腸管における役割について解析する。

B. 研究方法

B-1 腸内細菌叢の解析プロトコルの確立

家庭での採便を考慮して、便サンプルを室温で保存・輸送し腸内細菌叢を解析するプロトコルについて検討した。ヒト便をテクノスルガから市販されている採便キット(保存液入り)を用いて採取し、保存液に浸した状態で室温で2日間保存した場合と採便後にすぐにDNA抽出した場合で菌叢解析を行い、結果を比較した。DNA抽出はガラスビーズ破砕した便サンプルからISOFEALキット(ニッポンジーン)を用いて行った。

腸内細菌叢の解析方法を以下に示す。便から抽出したDNAを12.5 ngをテンプレートにプライマー(forward; 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGCGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'、reverse; 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3')とPCR酵素 KOD plus (Toyobo)を用いて95 30sec-55 30sec-68 1min:25サイクルの条件で16SのV3-V4領域の約550 bpを増幅した。Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter)を用いてPCR産物の精製を行い、Nextera XT Index Kit v2 set A (Illumina)を用いてライブラリーを調整した。シーケンスはMiseq Reagent Kit v3 (Illumina)を用いてMiseq (Illumina)で行った。得られたFastqファイルから、イルミナ社のクラウドサービス(Basespace)上の16S metagenomicsを利用してGreengenesデータベースをもとに菌種を同定し、菌叢解析を行った。

B-2 核酸自動抽出器を用いた便からのDNA抽出

出条件の最適化

本事業では取り扱う検体数が多いこと、DNA抽出におけるヒューマンエラーを防止するという観点から、核酸自動抽出器GENE PREP STAR (クラボウ)を用いた便からのDNA抽出の最適化を行った。マウス便を採便キット(テクノスルガ)を用いて採取、ガラスビーズ破砕し、ISOFEALキットもしくはGENE PREP STARで抽出したDNAを用いて菌叢解析を行い、結果を比較した。また、保存液の持ち込みによる影響が懸念されることから、保存液を除く目的でサンプルを遠心分離もしくはPBS洗浄し、自動抽出するという群を加えて検討を行った。

B-3 ヒト便中の腸管免疫因子(IgA抗体)の検出法の確立と便の保存方法による影響の検討

サンドイッチELISA法により以下の5つの条件で保存した便サンプルからIgA抗体を検出した。

ヒト便を採取し、採取後すぐに調整した。

-30 で2日間冷凍保存。

4 で1日間冷蔵保存後、-30 で1日間冷凍保存。

室温で1日間放置後、-30 で1日間冷凍保存。

採便キットを用いて保存液に浸した状態で室温保存。

以下に試料の調整方法とサンドイッチELISAの条件を示す。ヒト便に100 mg/mlとなるようにPBSを添加し、ボルテックスにより4 で10分間懸濁した後、3,000 x g、4 で10分間遠心分離を行った上清を-30 で保存し、試料として用いた。

サンドイッチELISAは、プレート: NUNC-IMMUNO PLATE (Thermo Scientific)、固着化抗体: Goat anti-human Ig(H+L)-UNLB (Southern Biotech)(1,000倍希釈)、ブロッキング: 1% BSA添加PBS、検出用抗体: Goat anti-human IgA-HRP (Southern Biotech)(4,000倍希釈)、基質: TMB (フナコシ)で行った。

B-4 ビタミンB1の腸管における機能解析

マウス腸管のパイエル板から回収したナイーブB細胞と絨毛組織から回収したIgA産生細胞のエネルギー代謝物(クエン酸やグルコース1リン酸など)を測定した。ビタミンB1欠乏餌と通常餌で3週間飼育したマウスの腸管のパイエル板と絨毛組織におけるナイーブB細胞数およびIgA産生細胞数を測定した。ビタミンB1欠乏餌もしくは通常餌飼育マウスに飼育開始後14、21日目にコレラ毒素を経口免疫し、最終免疫から10日後に便中のコレラ毒素特異的IgA抗体および腸管組織のコレラ毒素特異的IgA抗体産生細胞数を測定した。その間、最終免疫後の10日間の飼育は通常餌にて飼育した。

(倫理面への配慮)

ヒトサンプルを用いた解析、マウスを用いた動物実験について、いずれも所属する研究所において申請を行い、承認後に研究を開始している。

C. 研究結果

C-1 腸内細菌叢の解析プロトコルの確立

採便キットを用いて採取し、保存液に浸した状態で室温で2日間保存した場合（保存液群）では採便後にすぐにDNA抽出した場合（対照群）を比較した結果、腸内細菌叢の多様性の指標となるSannon species diversityは保存液群で2.635、対照群で2.554であり、保存液群で252菌種、対照群で237菌種が同定された（表1）。Firmicutes/Bacteroides比（F/B比）は保存液群で0.67、対照群で1.01であった（図1）。同様に属レベルでの菌叢解析においても、保存液群で*Bacteroides*の割合が増加し、Firmicutes門に属する*Faecalibacterium*の割合が減少していた（図2）。

C-2 核酸自動抽出器を用いた便からのDNA抽出条件の最適化

以下の4群を設定し、菌叢解析の結果を比較した。

- 1) ISOFECALキットを用いた手動による抽出
- 2) 自動抽出（前処理なし）
- 3) 遠心分離したサンプルから自動抽出
- 4) PBS洗浄したサンプルから自動抽出

Sannon species diversityは1)のISOFECALキットを用いた手動による抽出では1.973、2)の自動抽出器を用いた抽出では2.130、3)の遠心分離した群では2.214、4)のPBS洗浄した群では2.372であり、手動による抽出に比べて自動抽出の方が高い傾向にあった（表2）。1)では214菌種、2)では266菌種、3)では180菌種、4)では200菌種が同定された（表2）。F/B比は1)で0.34、2)で0.59、3)で0.74、4)で1.71であり、自動抽出において遠心分離やPBS洗浄といった前処理を行うことで高くなった（図3）。同様に3)や4)では2)に比べて、*Bacteroides*門に属する*Parabacteroides*や*Bacteroides*の割合が減少し、Firmicutes門に属する*Lactobacillus*の割合が増加していた（図4）。

C-3 健常な日本人の腸内細菌叢データの収集と20検体の測定例

2015年12月31日時点で39検体を収集し、39検体すべてのDNA抽出を完了し、そのうちの20検体についてはシーケンスを行い、16S配列データを取得した。また、1月以降も集まった検体から順にDNA抽出を行っており、抽出したDNAを保管している。

すでにデータを取得した20検体の測定例について、各検体につき200菌種以上が同定された（表3）。サンプルID 6230、6228、6222は*Parabacteroides*タイプのエンテロタイプを示し、その他の17検体は*Bacteroides*タイプに大別す

ることができた（図5）。

C-4 ヒト便中の腸管免疫因子（IgA抗体）の検出法の確立と便の保存方法による影響の検討

サンドイッチELISAによりヒト便中のIgA抗体を検出することができた。方法B-3に示すやの冷凍や冷蔵で保存した場合は、の採便後すぐに試料を調整した場合と同程度にIgA抗体が検出されたが、の室温で保存した場合は発色強度（OD450nm）の減弱が認められた（図6）。の採便キットを用いた場合は、発色強度が顕著に減弱していた（図6）。

C-5 ビタミンB1の腸管における機能解析

マウスのパイエル板から回収したナイーブB細胞と腸管絨毛組織から回収したIgA産生細胞のエネルギー代謝物を測定した結果、解糖系代謝物であるグルコース1リン酸がナイーブB細胞に比べてIgA産生細胞で多く検出された。一方で、クエン酸回路の代謝物であるクエン酸やコハク酸は両細胞で変化は認められなかった。

ビタミンB1欠乏餌で飼育したマウスでは通常餌で飼育したマウスに比べてパイエル板が小さく、B220陽性のナイーブB細胞が減少していた。一方で腸管絨毛組織に存在するIgA産生細胞の組織内分布および細胞数の変化は認められなかった。ビタミンB1欠乏餌飼育マウスでは便中のコレラ毒素特異的IgA抗体が減少し（図7）、腸管組織のコレラ毒素特異的IgA抗体産生細胞数も減少していた。

D. 考察

C-1の検討において、保存液を用いることでF/B比の減少や一部の菌の割合の変化が認められた。この原因は保存液に含まれるグアニジン塩などのタンパク変性剤によって一部の菌が溶菌したためではないかと考えられる。しかし、採便キットを用いることでヒト便を室温で保存・輸送しても腸内細菌叢を解析できることが確認されたので、本年度の本事業においてはサンプリングや輸送の観点から、採便キットを用いた採便が妥当であると考えた。また、採便キットを用いることで家庭での採便が可能となり、協力者の精神的な負担の軽減とそれに伴う参加者の増加が期待できる。

C-2の検討において1)ISOFECALキットを用いた手動による抽出に比べて、2)自動抽出の方がSannon species diversityが高く、多くの菌種を同定できるという結果であった。DNA抽出時に使用しているdetergentの違い等が影響したと考えられる。また、前処理の影響については、遠心分離やPBS洗浄などの前処理を行うことで検出できる菌の数が減るといった結果であった。この結果はグラム陰性菌などの保存液で溶菌してしまう菌のDNAを遠心分離やPBS洗浄の過程でロスした結果を反映していると考えられる。以上の検討から、採

便方法やDNA抽出方法が腸内細菌叢の解析結果に影響を及ぼすことが明らかとなった。今後、このようなサンプリングなどの解析方法による違いがサンプル間の比較解析に与える影響について検体数を増やして検討していく予定である。しかし、保存液中の便から前処理を行わずに自動抽出したDNAを用いて菌叢解析が可能であると考えられることから、本事業では採便キットを用いて採便し、検体は室温で保存・輸送し、核酸自動抽出器を用いて抽出したDNAにより解析を進めている。昨年未までに39検体のDNA抽出とそのうち20検体のシーケンスを完了している。また、16S配列データの取得だけではなく、抽出したDNAや便そのものを冷凍保管しており、バンクとしての活用も可能ではないかと考えている。

C-4の検討からサンドイッチELISA法によるヒト便中のIgA抗体の検出方法を確立した。冷凍や冷蔵で保存した便サンプルからIgA抗体を検出でき、多少室温で放置しても大きな影響がないことが明らかとなった。しかし、腸内細菌叢解析用の保存液に浸した便からはIgA抗体の検出が困難であると考えられることから、腸管免疫因子の解析には便を採便後すぐに冷凍するなどの方法を確立する必要があると考えられる。また、IgA抗体以外にdefensinなどの抗菌分子の検出も検討していく予定である。

ビタミンB1は水溶性ビタミンの一種で欠乏すると脚気になることが知られている。しかし、腸管における役割や欠乏の影響は十分に理解されていなかった。一方で、IgA抗体は腸管をはじめとする粘膜面での生体防御の中核を担う因子であり、腸内細菌叢の構成などにも影響することが報告されている。ビタミンB1がクエン酸回路に必須な因子であることから、腸管免疫担当細胞のエネルギー代謝と機能に着目し解析を行った結果、ナイーブB細胞はIgA産生細胞へ分化する過程においてエネルギー代謝が変化することが明らかとなった。その結果として、ナイーブB細胞はIgA産生細胞に比べてビタミンB1への依存性が高いと考えられる。さらに、ビタミンB1の欠乏により、ワクチン抗原に対する免疫応答(抗原特異的IgA抗体産生)が減弱することが明らかとなった。食事や栄養状態が腸管免疫に大きく影響することが明らかとなり、ビタミンB1の摂取が日常の食事だけでなく腸内細菌や糖尿病などとも関連していることから、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症の相互関係を理解する上でビタミンとエネルギー代謝が一つのキーワードになると考えている。ビタミンB1は本事業における検討項目の一つになり得ると考えられる。

E. 結論

本年度の検討から腸内細菌叢の解析プロトコルを確立し、すでにデータの取得を進めている。IgA抗体などの腸管免疫因子を解析するためには採便や便の輸送方法の改良が必要で

ある。

腸管免疫と生体防御という観点からビタミンB1の新たな機能と重要性が明らかとなり、本事業における評価項目の一つとなり得ることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kunisawa J, Sugiura Y, Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H: Mode of bioenergetic metabolism during B cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B1. *Cell Rep* 2015; 13:122-131

Suzuki H, Kunisawa J: Vitamin-mediated immune regulation in the development of inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2015; 15:212-215

2. 学会発表

國澤純、栄養を介した免疫制御と創薬・機能性食品開発への展開 日本薬学会第136年会 横浜(パシフィコ横浜)(2016年3月28日)

國澤純、腸内環境を介した免疫制御の基礎的解明と創薬、機能性食品開発への展開 第97回日本栄養・食糧学会関東支部会大会シンポジウム 東京(東京大学)(2016年3月12日)

Jun Kunisawa, Diet-Commensal Crostalk for the control of gut immunity Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems (Yokohama, RIKEN, 2 March, 2016)

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 BMFHシンポジウム2016 東京(東京大学)(2015年2月13日)

國澤純、腸から眺めるヘルスサイエンス 第3回先進イメージング医学研究会・学術集会 神戸(有馬温泉ホテル)(2015年2月12日)

國澤純、免疫制御における腸内環境の影響と免疫創薬、機能性食品、ワクチンへの展開 第6回学際的脂質創生研究部会講演会 徳島(徳島大学)(2015年1月22日)

國澤純、医薬・健康・栄養の複合的観点

から見たヘルスサイエンス 彩都産学
官連携フォーラム2016 大阪(千里ライ
フサイエンスセンター) (2016年1月20
日)

國澤純、腸内環境を介した免疫制御とア
ジュバント開発への展開 第9回 次世
代アジュバント研究会 大阪(千里ライ
フサイエンスセンター) ((2016年1月1
9日)

國澤純、食と腸管免疫を起点とした機能
性食品、創薬に向けた新たな展開 HiH
A第5回ワークショップ 広島(広島大
学) (2015年11月27日)

H. 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

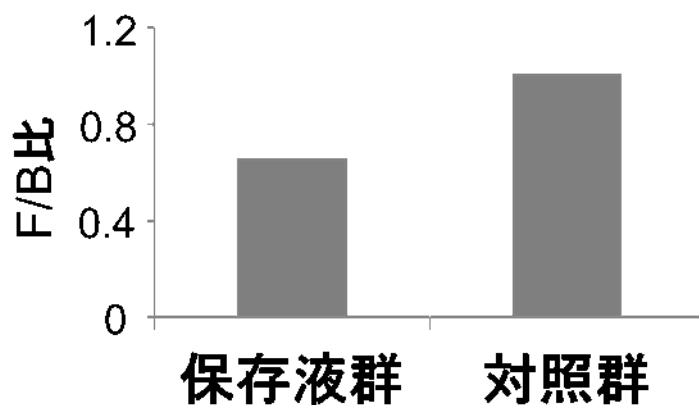


図1. 採便キットを用いた菌叢解析の検討 (Firmicutes/Bacteroides比)(C-1)

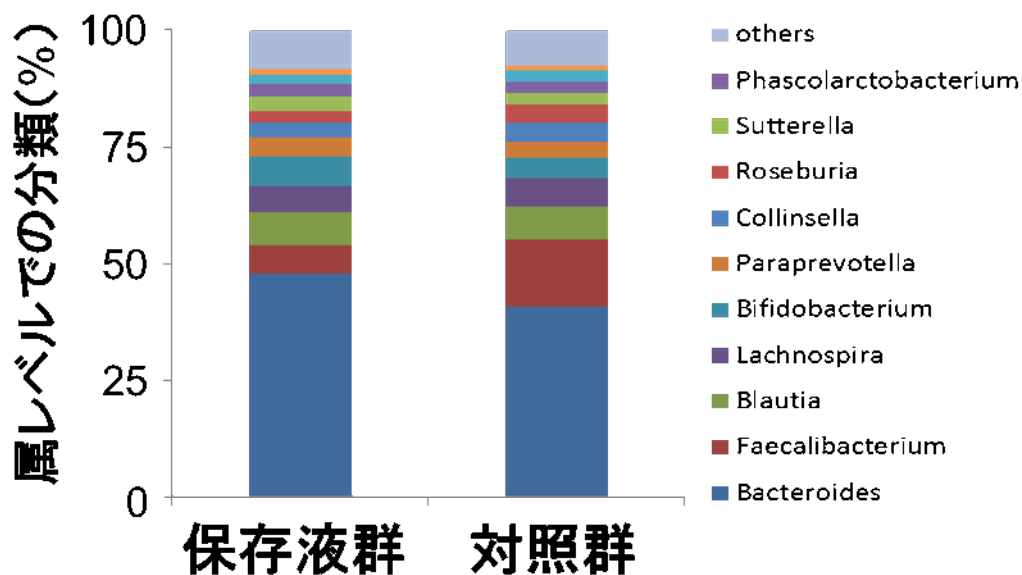


図2. 採便キットを用いて採取したヒト便の菌叢解析(C-1)

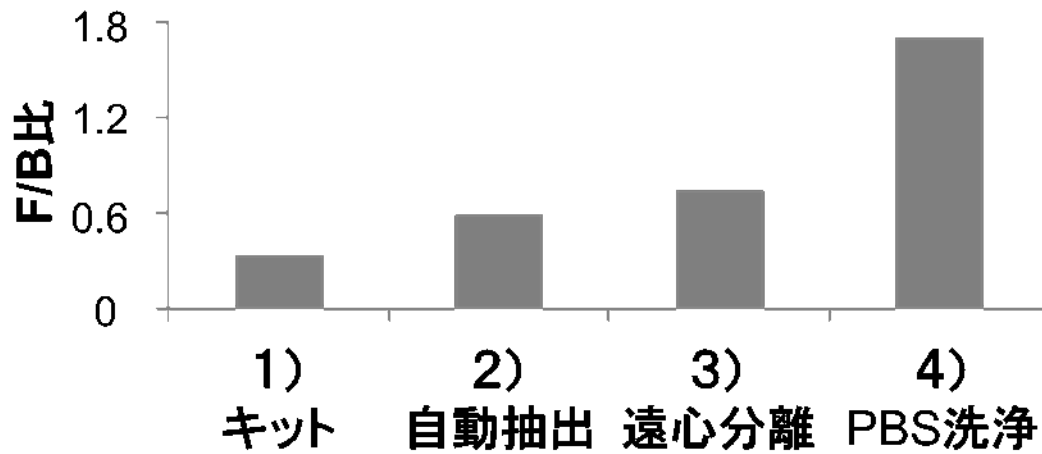


図3. 核酸自動抽出器を用いた菌叢解析の検討 (Firmicutes/Bacteroides比)(C-2)

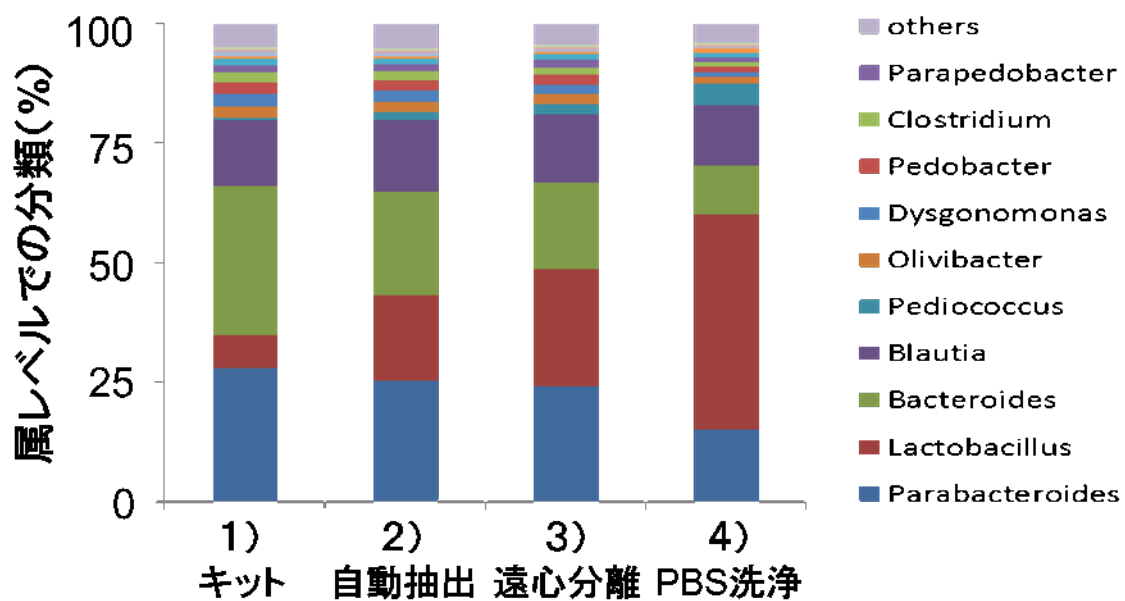


図4. 核酸自動抽出器を用いて採取したヒト便の菌叢解析(C-2)

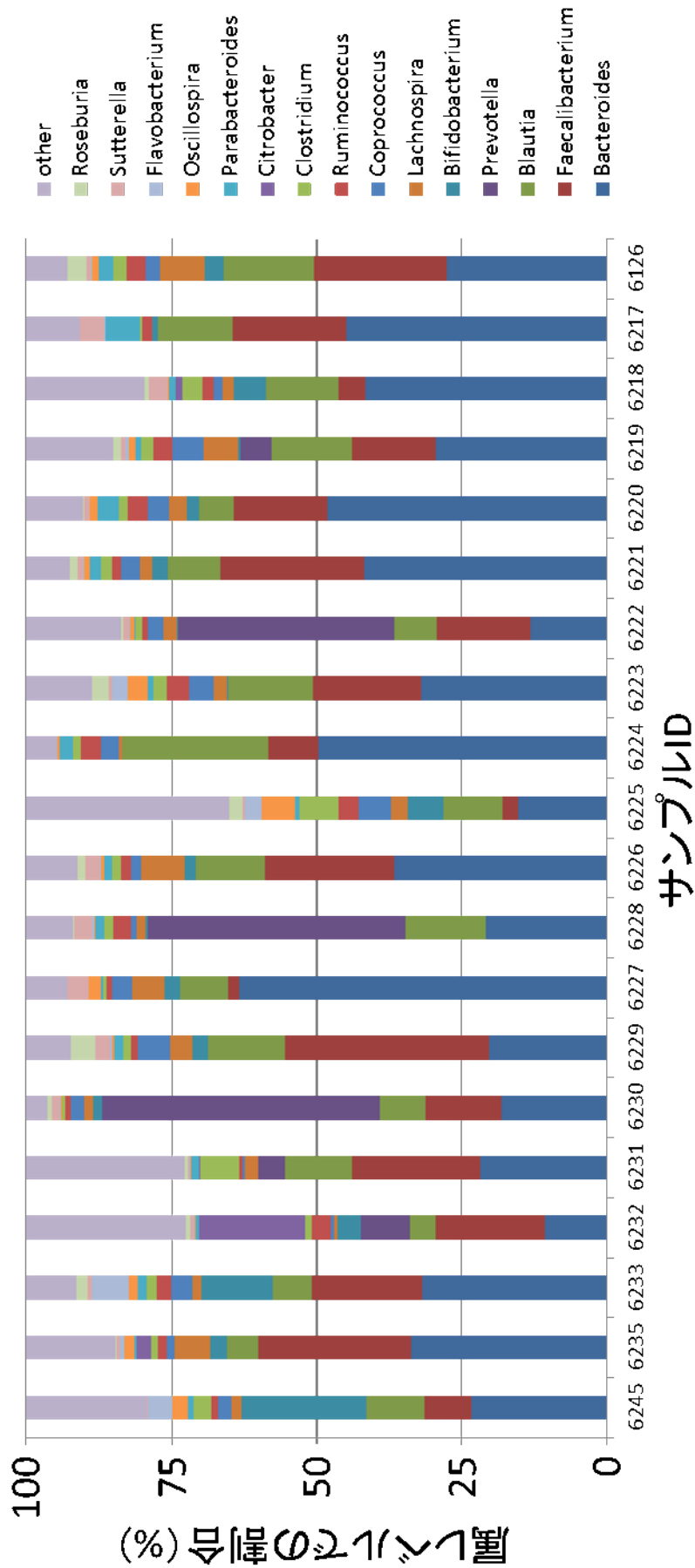


図5. 最初に解析を終えた20サンプルの測定例(C-3)

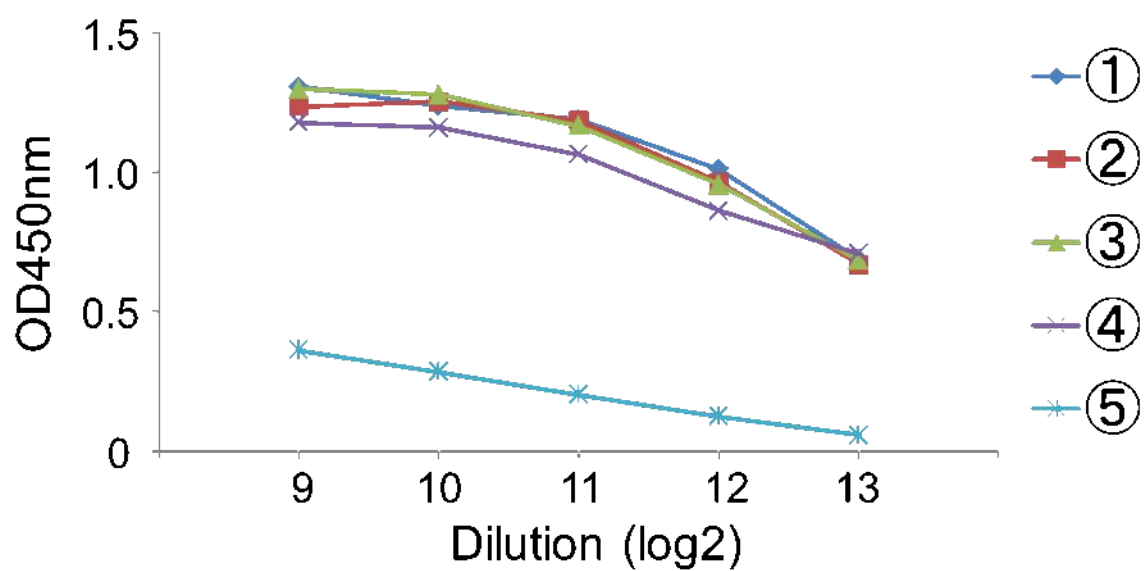


図6. ヒト便中のIgA抗体の検出

- ①採便後すぐ ②冷凍2日間 ③冷蔵1日間、冷凍1日間
 ④室温1日間、冷凍1日間 ⑤保存液で室温2日間

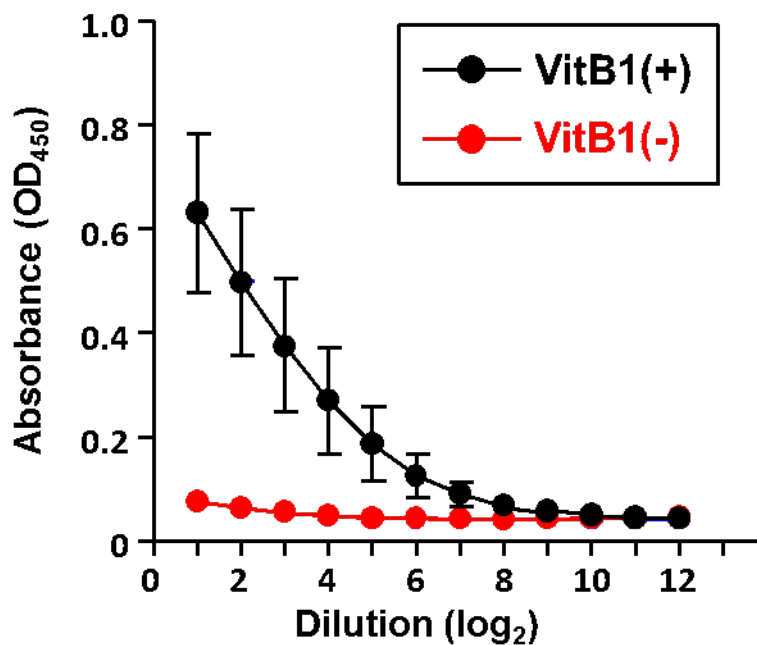


図7. 経口ワクチンに対する腸管IgA応答における
ビタミンB1の効果

ビタミンB1欠乏餌、もしくはコントロール餌で3週間飼育した。その間、Day 14と21にコレラトキシンを経口免疫した。Day 31に糞便を回収し、コレラトキシン特異的IgAをELISA法にて測定した。両群ともDay 21から31までは通常餌で飼育した。

表1. 多様性の指標の比較(C-1)

	Sannon species diversity	同定菌種数
保存液群	2.635	252
対照群	2.554	237

表2. 多様性の指標の比較(C-2)

	Sannon species diversity	同定菌種数
1)ISOFECALキット	1.973	214
2)自動抽出	2.130	266
3)遠心分離	2.214	180
4)PBS洗浄	2.372	200

表3. 同定できた菌種の数(C-3)

サンプルID	菌種数
6245	429
6235	344
6233	406
6232	408
6231	320
6230	266
6229	298
6227	243
6228	267
6226	283
6225	432
6224	253
6223	318
6222	370
6221	296
6220	334
6219	406
6218	344
6217	225
6126	301

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

研究分担者 水口 賢司
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
バイオインフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー

<目的> 食事・栄養摂取状況や身体活動・運動など詳細な生活習慣情報の得られた被験者を対象に腸内細菌叢を解析し、腸内細菌叢、腸管免疫、生活習慣データおよび公共のデータベースからの情報を統合した基盤データベースを設計する。それらのデータについてバイオインフォマティクスを用いて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。

<方法> 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。

<結果> 遺伝子、パスウェイ情報等を鍵とした独自のデータウェアハウス技術を拡張し、化合物や疾患などの、より多様なデータを統一的に解析できる枠組みを構築した。また、腸内細菌叢のデータを米国国立生物工学情報センター(NCBI)の提供する生物種IDとともにデータベース化する予定である。さらに、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を入手し、予備的な多変量解析と相関解析を行った。その結果、赤血球数と最大酸素摂取量や腹囲と動物性脂肪摂取量などに既知の相関がみられることを確認した。

<まとめ> 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、少数のデータを予備的に解析し、それぞれのデータの性質を理解した上で、データをどのように格納するかを設計を行った。この設計に基づいてデータベースを構築し、来年度以降データの格納を行い、異なる種類のデータ間の横断的な解析ができる環境を整える予定である。

A. 研究目的

最近の研究によって、腸内細菌叢が食事や肥満、代謝性疾患などと関連することが明らかとなってきている。本研究では、食事・栄養摂取状況や身体活動・運動など詳細な生活習慣情報の得られた被験者を対象に腸内細菌叢を解析し、腸内細菌叢、腸管免疫、生活習慣データおよび公共のデータベースからの情報を統合した基盤データベースを設計する。それらのデータについてバイオインフォマティクスを用いて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。

B. 研究方法

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法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)

すべてのデータは匿名化されており、個人を特定する情報は含まれていない。

C. 研究結果

(1) データ統合技術の開発

遺伝子、パスウェイ情報等を鍵とした独自のデータウェアハウス技術を拡張し、化合物や疾患などの、より多様なデータを統一的に解析できる枠組みを構築した(Chen *et al.*, 下記発表論文)。この技術を活用して、生活習慣や腸内細菌叢のデータ統合を実行していくことを計画している(図1)。

(2)腸内細菌叢のデータ解析

腸内細菌叢のデータは16SリボソームRNA遺伝子の配列を次世代シーケンサーで解析し、細菌分類における門、綱、目、科、属、種のレベルで分類したリード数のデータである。これらのデータをサンプル間で比較、分類する方法について検討した。今後得られるデータについては、米国国立生物工学情報センター (NCBI) の提供する生物種IDとともにデータベース化する予定である。

(3)生活習慣・生理指標データの多変量解析

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の中から数値化可能なデータを抽出したところ321項目あった。これらのデータについて、予備的な多変量解析と相関解析を行った(図2)。その結果、赤血球数と最大酸素摂取量や腹囲と動物性脂肪摂取量などに既知の相関がみられることを確認した。

D. 考察

腸内細菌叢に関する研究は、ここ数年の間に非常に多く行われるようになった。これは次世代シーケンサーの普及により、細菌を培養することなく大規模に解析できるようになったことが大きい。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で解析された例は少ない。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。この解析から、これまでに知られていなかった生活習慣と腸内細菌との関わりが見いだせる可能性があると考えている。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。

E. 結論

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、少数のデータを予備的に解析し、それぞれのデ

ータの性質を理解した上で、データをどのように格納するか設計を行った。この設計に基づいてデータベースを構築し、来年度以降データの格納を行い、異なる種類のデータの間の横断的な解析ができる環境を整える予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yi-An Chen, Lokesh P. Tripathi, Kenji Mizuguchi: An integrative data analysis platform for gene set knowledge discovery in a data warehouse framework. *Database* (in press).

2. 学会発表

【国内学会: 招待講演】

水口賢司, データウェアハウスによる創薬関連データ統合と解析の実際, 第361回 CBI学会研究講演会, 大阪, 2015.4.24 (招待講演)

水口賢司, 健康な日本人の生活習慣と腸管免疫・腸内細菌データベースの構築: バイオインフォマティクスの視点から, シリーズ「薬づくりの新しいR&Dモデルを探る」第11回「薬づくりと健康食品開発を結ぶ」, 東京, 2016.1.15 (招待講演)

【国内学会: 一般講演】

陳怡安, ロケシュ テリパチ, 水口賢司, 創薬の初期研究における統合データウェアハウスTargetMine, トーゴーの日シンポジウム2015, 東京, 2015.10.5 (ポスター)

長尾知生子, 五十嵐芳暢, 森田瑞樹, 陳怡安, 深川明子, 坂手龍一, 水口賢司, 創薬・疾患研究のためのデータベース検索システム Sagace & Toxygates, トーゴーの日シンポジウム2015, 東京, 2015.10.6 (ポスター)

Chen Y.A., Tripathi L.P., Mizuguchi K., The integration of biological data and its application to drug discovery, CBI学会2015年大会, 東京, 2015.10.27 (ポスター)

水口賢司, 坂手龍一, 深川明子, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 医薬基盤・健康・栄養研究所の創薬支援データベースとツール, 第38回日本分子生物学会年会第88回日本分子生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015.12.1 (ポスター)

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

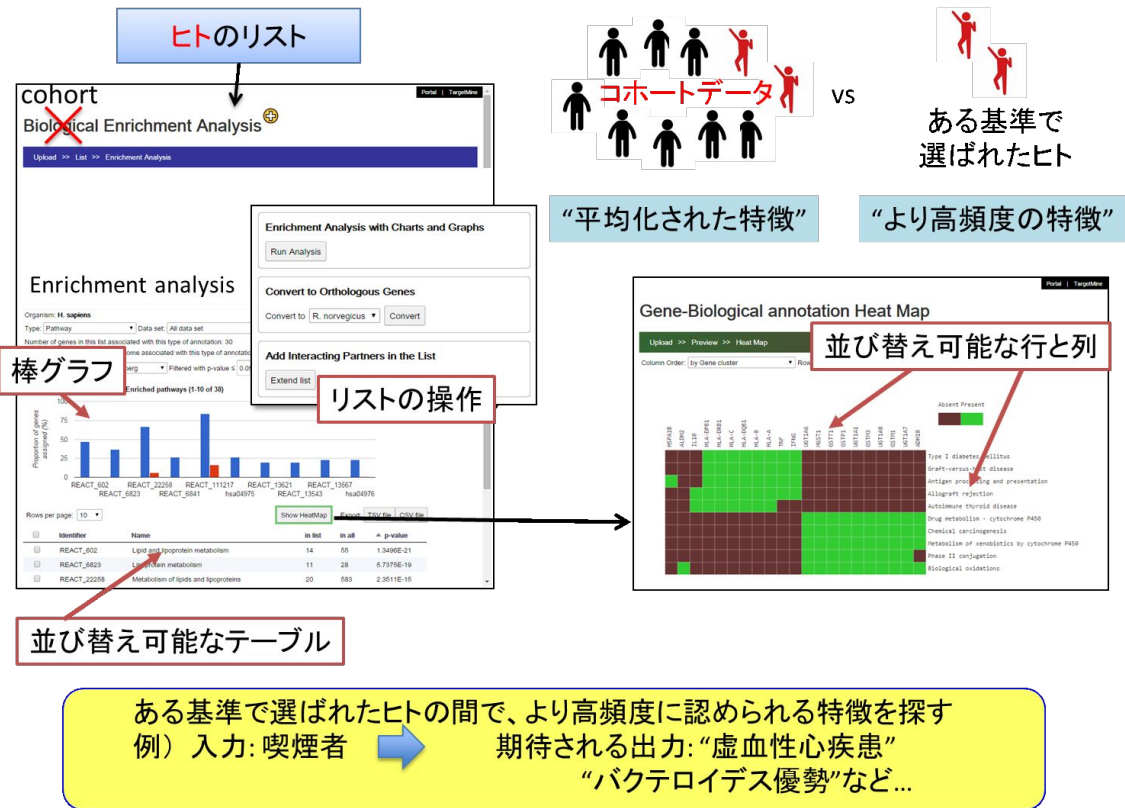


図1. 独自データウェアハウス技術を用いたデータ統合とエンリッチメント解析

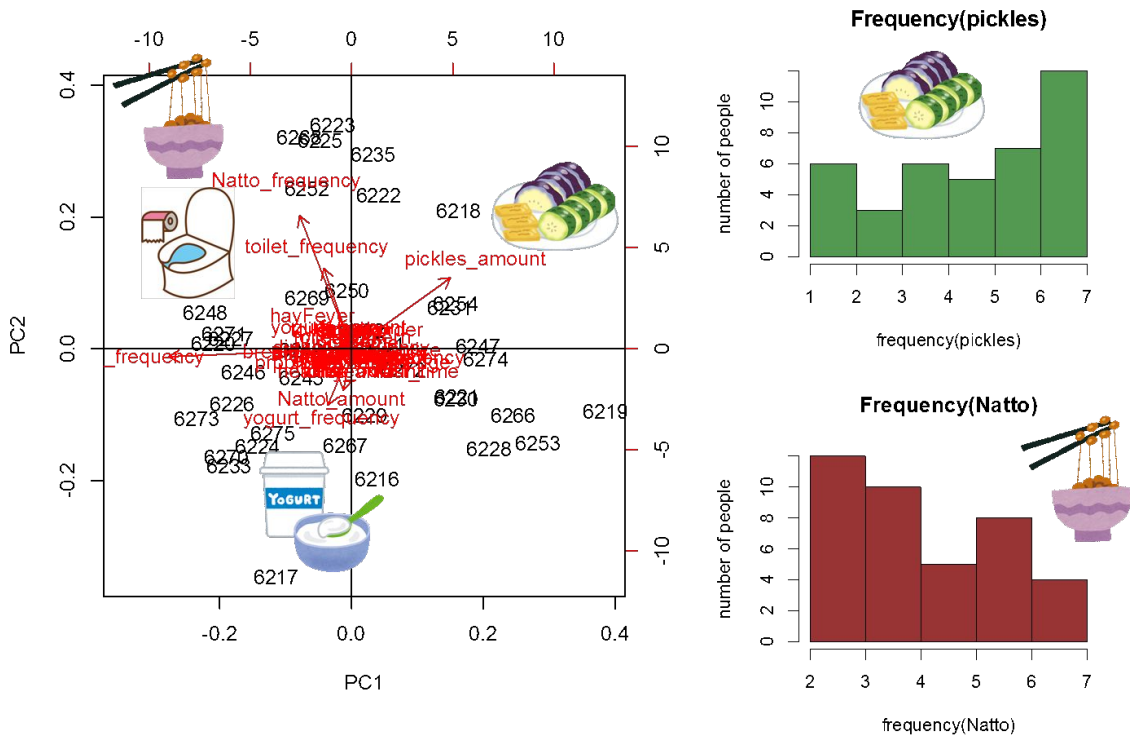


図2. 多項目のデータ間での多変量解析の例(主成分分析)

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析

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> 環境因子の一つとして注目されている腸内細菌は、食事によりダイナミックにその組成が変化し、肥満・2型糖尿病をはじめとする生活習慣病やアレルギー性疾患との関連性が指摘されている。特に食事に含まれる脂質や食後分泌される胆汁酸は腸内細菌によって分解され吸収されるが、食事や腸内細菌の変化によって分解や吸収が異なることが知られている。そこで本研究ではメタボローム解析を用いて、代謝産物である脂肪酸や胆汁酸を測定する方法を確立する。

<方法> 1. 脂肪酸の測定: Folch法で全脂質を抽出し、カラムを用いて脂質クラスを分離する。分離した脂質に内部標準を加えて、誘導化試薬を用いてメチル化を行う。中和、洗浄を行った後、窒素気流下で乾燥して、ヘキサンに再溶解してGC-MSで脂肪酸組成を測定する。2. 胆汁酸の測定: サンプルを凍結乾燥し、緩衝液に再溶解する。溶解液に酵素を加えて脱抱合後し、イオン交換カラムを用いて遊離の胆汁酸分画を調整する。さらに水酸基・カルボン酸基を非極性化するために、ジアゾメタンを用いてカルボン酸基をメチル化、続いてジメチルエチルシリルイミダゾールを用いてジメチルエチルシリルエーテル化を行う。シリカゲルカラムにかけて誘導体化された胆汁酸を調整、乾固後ヘキサン50 μ Lで再溶解しGC-MSで測定する。

<結果> 健常者のサンプルであるため、適切な標準化物質を探索し、腸内細菌との関連性が深いと考えられるパルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸、さらにコール酸、デオキシコール酸といった1次胆汁酸や2次胆汁酸などを定量的に測定することができた。

<まとめ> 脂肪酸と胆汁酸を定量的に測定することができたが、サンプル数も多いことから、イオン化などの前処理の部分などもう少し簡略化できるかどうか検討する余地があった。

A. 研究目的

肥満・2型糖尿病といった生活習慣病やアトピー性皮膚炎といったアレルギー性疾患は、近年増加の一途を辿っている。これらの疾患の増加は、遺伝素因と高脂肪食といったエネルギー過剰や車社会といった身体活動・運動不足といった環境因子の相互作用に起因すると考えられている。特に環境因子の一つとして最近腸内細菌は注目されており、食事によりダイナミックにその組成が変化し、肥満・2型糖尿病をはじめとする生活習慣病やアレルギー性疾患との関連性が指摘されている。従って腸内細菌を含む環境因子と遺伝素因の相

互作用を明らかにしていくことが極めて重要である。しかしこれまでの腸内細菌に関連した多くの研究は、欧米によるデータであり、欧米とは遺伝的背景や食事・運動といった身体活動も異なっていることから、日本人のデータが必須である。そこで食事・栄養摂取状況や身体活動・運動と生活習慣病との関連について、コホート研究から得られたヒト試料を用いて、バイオインフォマティクス手法などを駆使し、腸内細菌を含めた食・栄養による免疫と代謝の相互メカニズムを踏まえつつ、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する。また、そのデータベース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も目的とする。具体的には、国立健康・栄養研究所が確立し運営している既存のコホート研究（NEXIS）600名に対し、1）腸内細菌叢のメタゲノム解析、2）腸管免疫指標、3）メタボローム解析、4）詳細かつ標準的な生活習慣、5）動脈硬化度、体格、身体組成、体力などの生理指標、6）GWASとインピュテーション法の併用による網羅的遺伝子多型解析する。遺伝子やパスウェイ情報を鍵とし、すでに構築しているデータベースに独自のデータウェアハウス技術等を用い新たな情報を追加した基盤データベースを設計する。特に食事に含まれる脂質や食後分泌される胆汁酸は腸内細菌によって分解され吸収されるが、食事や腸内細菌の変化によって分解や吸収が異なることが知られている。そこで本研究ではメタボローム解析を用いて、代謝産物である脂肪酸や胆汁酸を測定する方法を確立する。

B．研究方法

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の参加者を対象とし、20～80歳までの男女、合計600名の血漿を用いて、脂肪酸や胆汁酸を測定する。

1. 脂肪酸の測定

Folch法で全脂質を抽出し、カラムを用いて脂質クラスを分離する。分離した脂質に内部標準を加えて、誘導化試薬を用いてメチル化を行う。中和、洗浄を行った後、窒素気流下で乾燥して、ヘキサンに再溶解してGC-MSで脂肪酸組成を測定する(図1a)。

2. 胆汁酸の測定

サンプルを凍結乾燥し、緩衝液に再溶解する。溶解液に酵素を加えて脱抱合後し、イオン交換カラムを用いて遊離の胆汁酸分画を調整する。さらに水酸基・カルボン酸基を非極性化するために、ジアゾメタンを用いてカルボン酸基をメチル化、続いてジメチルエチルシリルイミダゾールを用いてジメチルエチルシリルエーテル化を行う。シリカゲルカラムにかけて誘導体化された胆汁酸を調整、乾固後ヘキサン50 μ Lで再溶解しGC-MSで測定する(図1b)。

(倫理面への配慮)

提供された血漿サンプルは、鍵付きの-20で保存する。当研究室ではヒトゲノムを扱わ

ないが、本研究ではヒトゲノムを扱うことから、当研究所ではヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則って申請し、倫理委員会で承認されている。

C．研究結果

血漿中の代謝産物を精度と再現性良く測定するために、血漿からの各種代謝マーカーの抽出方法や測定方法を確立した。また健常者のサンプルであるため、適切な標準化物質を探索し、腸内細菌との関連性が深いと考えられるパルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸、さらにコール酸、デオキシコール酸といった1次胆汁酸や2次胆汁酸などを定量的に測定できた(図2)。

D．考察

脂肪酸と胆汁酸を定量的に測定することができたが、サンプル数も多いことから、イオン化などの前処理の部分などもう少し簡略化できるかどうか検討する余地があった。

E．結論

当研究所の倫理審査が3ヵ月に1回しか行われないため、倫理審査の承認を得るために時間を要し、実際のサンプルを測定することができなかった。今後は実際のサンプルを測定しデータを解析していく。

F．研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表
特になし

G．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

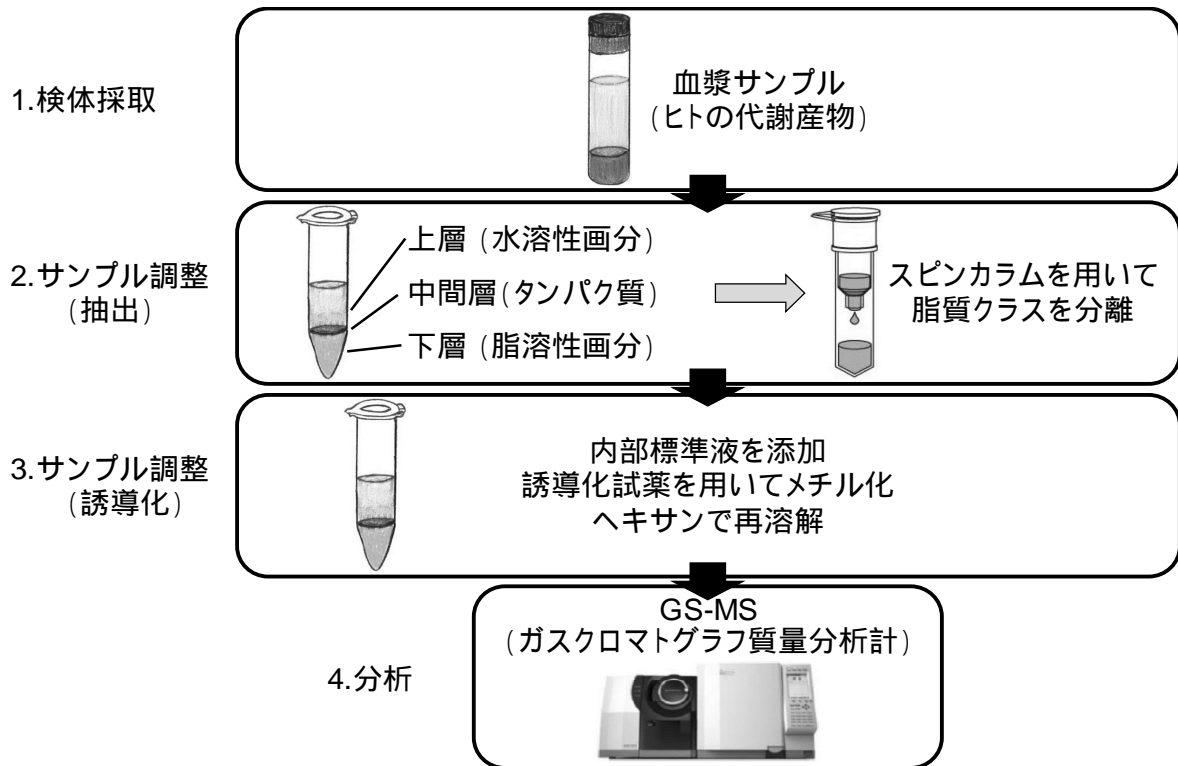


図1a 脂肪酸の測定方法

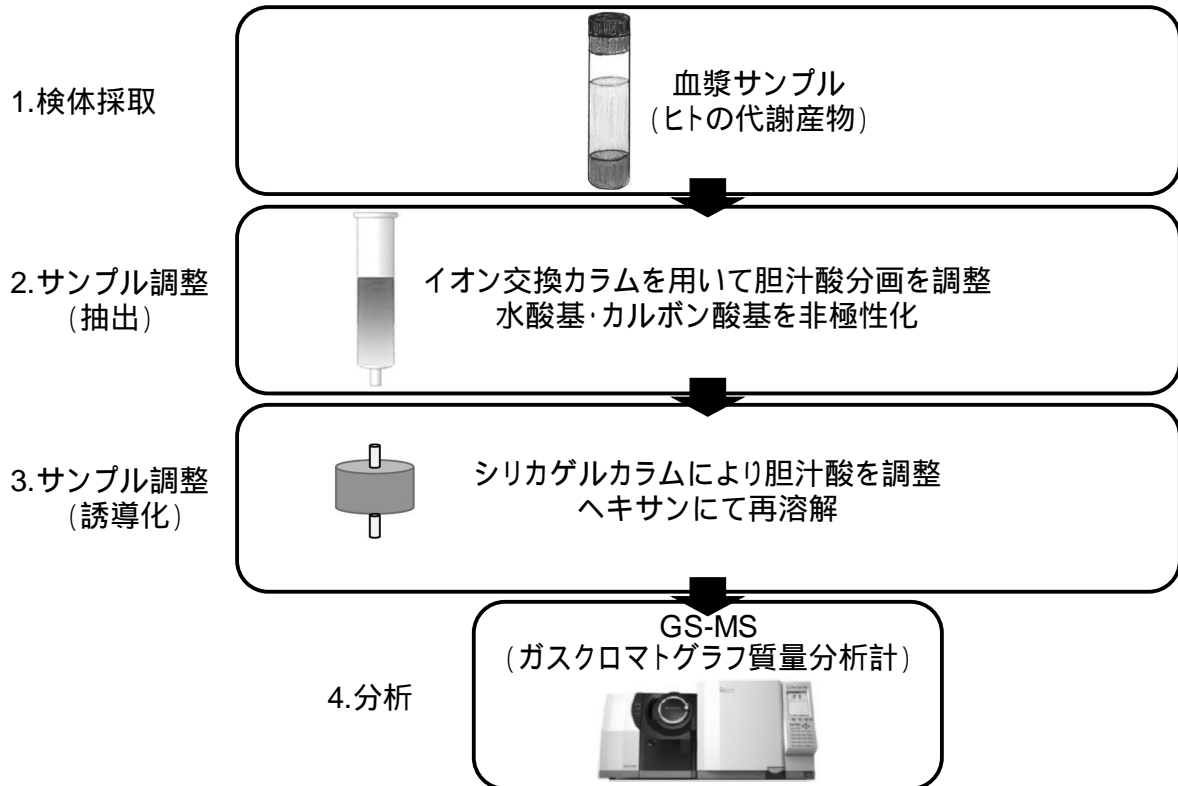


図1b 胆汁酸の測定方法

測定項目

脂肪酸	C12:0
ラウリン酸	C12:0
ミリスチン酸	C14:0
ミリストレイン酸	C14:1 ω5
パルミチン酸	C16:0
パルミトレイン酸	C16:1 ω7
ステアリン酸	C18:0
オレイン酸	C18:1 ω9
リノール酸	C18:2 ω6
γ-リノレン酸	C18:3 ω6
リノレン酸	C18:3 ω3
アラキジン酸	C20:0
エイコセン酸	C20:1 ω9
エイコサジエン酸	C20:2 ω6
5-8-11エイコサトリエン酸	C20-3 ω9
ジホモ-γ-リノレン酸	C20:3 ω6
アラキドン酸	C20:4 ω6
エイコサペンタエン酸	C20:5 ω3
ベヘニン酸	C22:0
エルシン酸	C22:1 ω9
ドコサテトラエン酸	C22:4 ω6
ドコサペンタエン酸	C22:5 ω3
リグノセリン酸	C24:0
ドコサヘキサエン酸	C22:6 ω3
ネルボン酸	C24:1 ω9

(μg/mL)

測定項目

胆汁酸	コール酸
タウロコール酸	タウロコール酸
グリココール酸	グリココール酸
ケノデオキシコール酸	ケノデオキシコール酸
タウロケノデオキシコール酸	タウロケノデオキシコール酸
グリコケノデオキシコール酸	グリコケノデオキシコール酸
ウルソデオキシコール酸	ウルソデオキシコール酸
タウロウルソデオキシコール酸	タウロウルソデオキシコール酸
グリコウルソデオキシコール酸	グリコウルソデオキシコール酸
デオキシコール酸	デオキシコール酸
タウロデオキシコール酸	タウロデオキシコール酸
グリコデオキシコール酸	グリコデオキシコール酸
リトコール酸	リトコール酸
タウロリトコール酸	タウロリトコール酸
グリコリトコール酸	グリコリトコール酸

(μmol/L)

図2 脂肪酸と胆汁酸を絶対値で測定

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kikuchi N, Miyamoto-Mikami E, Murakami H, Nakamura T, Min SK, Mizuno M, Naito H, Miyachi M, Nakazato K, Fuku N	ACTN3 R577X genotype and athletic performance in a large cohort of Japanese athletes.	Eur J Sport Sci	Epub ahead of print		2015
Gando Y, Murakami H, Kawakami R, Yamamoto K, Kawano H, Tanaka N, Sawada S, Miyatake N, Miyachi M	Cardiorespiratory fitness suppresses age-related arterial stiffening in healthy adults: A 2-year longitudinal observational study.	J Clin Hypertens	Epub ahead of print		2016
J. Kunisawa, Y. Sugiura, T. Wake, T. Nagatake, H. Suzuki, R. Nagasawa, S. Shikata, K. Honda, E. Hashimoto, Y. Suzuki, M. Setou, M. Suematsu, H. Kiyono	Mode of bioenergetic metabolism during B cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B ₁ .	Cell Rep	13	122-131	2015
H. Suzuki, J. Kunisawa	Vitamin-mediated immune regulation in the development of inflammatory diseases.	Endocr Metab Immune Disord Drug Targets	15	212-5.	2015
Yi-An Chen, Lokesh P. Tripathi, Kenji Mizuguchi	An integrative data analysis platform for gene set knowledge discovery in a data warehouse framework	Database			in press