

別添 1

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28年度 総括研究報告書
研究代表者 宮地 元彦
平成 29 年(2017)年 4 月

別添 2

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と排便状況と腸内細菌叢との関係 …………… 5

宮地元彦、谷澤薫平、大野治美、村上晴香

2. 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 …………… 7

國澤 純

3. 脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析 …………… 17

窪田哲也

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 …………… 21

水口賢司

・ 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 25

・ 研究成果の刊行物・別刷 …………… 27

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

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）
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排便状況と腸内細菌叢との関係

研究代表者 宮地元彦
研究協力者 大野治美、谷澤薫平、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> 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）、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（分析班<國澤>）。また体組成や、生活習慣病危険因子、体力等の測定を行った。さらに、身体活動量、栄養摂取状況、排便状況なども併せて調査した。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。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。

<結果> 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 が多いと言う結果が得られた。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。

<まとめ> 腸内細菌叢の構成や多様性は糞便の状態と関連することが示唆された。最終年度の平成 29 年度には、目標とする 600 名のデータベースを完成し、腸内細菌叢と排便、生活習慣との関係をより深く検討する。

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。

当初の計画では、平成28年度末までに450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、参加者の特性や栄養摂取状況との関連をパイロット分析する。

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(NEXIS)の参加者を

対象とし、20～80歳までの男女、平成28年度末までの目標450名（最終目標数：600名）を目指し、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、参加者の負担が少なく、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した。その結果、従来の先行研究で用いられている凍結保存・運搬法でなく、自宅で採便後、保存液に糞便を浸す保存液と十分混和することで、常温での保存・運搬が可能となる方法を用いた。

また、本研究参加者をリクルートしているNEXISで実施されている以下の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）、採便時ならびに習慣的糞便状況等。

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。

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。低クオリティーの配列（リード）ならびにキメラ配列を除去した後、Greengenes 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、それぞれの OTU を進化的に同一の菌種とみなした。また、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。サンプル毎に得られたリード数が異なったため、全てのサンプルにおけるリード数は、最小リード数（5455リード）に希釈して全ての解析を行った。

個人内における細菌叢の多様性の指標である 多様性の指標として、Shannon Index を QIIME により求めた。また、個人間における細菌叢の多様性の指標である 多様性は、R パッケージ “vegan” を用いて求めた。属レベルの菌叢の構成より、多様性の指標として Bray-Curtis 指数を求め、主座標分析によりサンプル間の相対位置関係を示した。また、パッケージ “vegan” の “envfit” 関数を用いて、第一、第二主座標と糞便状態および排便状況との関連を検討し、その方向性と強さを座標上に示した。

採便時および習慣的糞便の形状・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。
（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29年2月までに401名の同意を得、サンプルの提供を受けた。目標とする450名に対し、50名弱足りなかったことから、平成29年度には、目標とする600サンプルに対し、残りの200名のリクルートならびにサンプルの提供を達成するよう努力する。

得られた401名のサンプルのうち、16S-rRNA 遺伝子のシーケンスが完了した369名を対象として、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。その結果、腸内細菌叢の代表的な3つの構成パターン（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（図1）。この関連は、採便時および習慣的な糞便の両方において確認された。

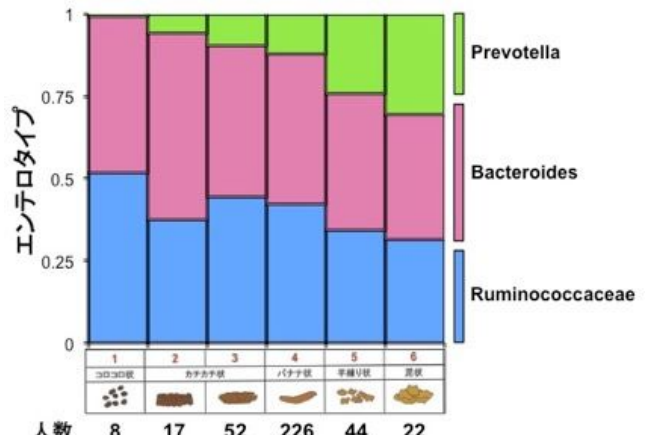


図1．採便時の糞便の形状と腸内細菌叢のエンテロタイプ

また、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（図2）。

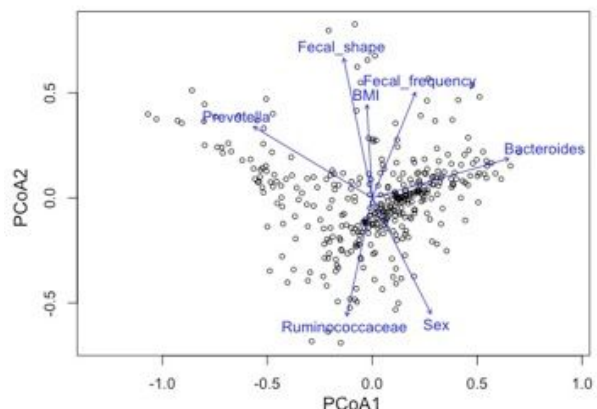


図2．多様性（Bray-Curtis dissimilarity）と糞便の形状および排便頻度との関係

さらに、多様性は、糞便の形状が柔らかい泥状になるほど (Spearman's $\rho = -0.157$, $P = 0.003$)、また、排便量 (Spearman's $\rho = -0.140$, $P = 0.007$) および頻度が多いほど低かった (Spearman's $\rho = -0.167$, $P = 0.001$, 図3)。

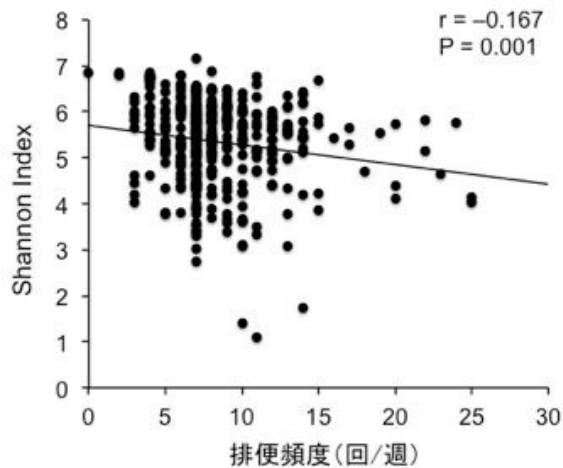


図3 . 排便頻度と 多様性 (Shannon Index) との関係

D . 考察とまとめ

本年度の研究により、糞便の形状および排便量・頻度は腸内細菌叢の構成・多様性と関連することが明らかになり、糞便の観察や排便記録により腸内細菌叢の状態を把握できる可能性が示唆された。

Vandeputteら (2016) の53名の欧米女性を対象とした研究でも、本研究と同様に Bristolスケールで評価した糞便の形状と腸内細菌叢の構成との間の関係が報告されている。本研究では対象者数が多かったため、彼らの結果よりもより明確な関連が図1の通り得られた。

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。

E . 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.

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

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）
分担研究報告書

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
腸内環境システムプロジェクト
プロジェクトリーダー

<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。研究期間の2年目となる28年度は、採便キット（保存液）を用いた採便と便の保管に関する検討と最適化を行い、初年度に継続して腸管免疫と腸内細菌の分析を進める。また、他施設との連携という観点から、解析施設の違いが菌叢解析の結果に及ぼす影響について検討する。さらに、異なる施設で得られた菌叢解析の結果を統合（ブリッジング）することの可能性について検討する。

<方法>

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い、BioplexやELISA法を用いて血中サイトカイン、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。

<結果と考察>

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。これらの原因は、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対する感受性や酸素の存在下での増殖能といった細菌の構造的・生理学的な性状の違いによるものと考えられる。以上の結果から、保存液を用いて採取した便からの菌叢解析においては、採便量に注意し、便の複数か所から採取した便を保存液とよく混和し、できれば採便から1週間以内に前処理を行わずに抽出したDNAを用いて菌叢解析することが望ましいと考えられる。

これらの手法を用いたヒト試料の解析状況については、これまでに約400名のヒト試料について腸内細菌と免疫因子の分析を行った。データ収集は順調に進んでいると考えている。

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、代謝性疾患などと関連することがヒトや動物モデルを用いた研究から明らかとなってきている。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健康に関するコホート研究から得られたヒトの便サンプルについて次世代シーケンサーを用いた16Sメタゲノム解析を行うと共に、血液サンプルについて免疫因子(IgA抗体や抗菌分子)などを免疫学的手法(ELISAなど)を用いて分析する。腸内細菌叢の解析プロトコルの標準化という観点から、保存液を用いて採取した便からのDNA調整方法について検討を行う。

B. 研究方法

B-1 採便キット(保存液)を用いた腸内細菌叢の解析プロトコルの最適化

ヒト便をテクノスルガ・ラボ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、採便、保管、DNA抽出方法について以下に示す項目について検討した。

前処理の影響: 保存液に浸したサンプル(そのまま)と、保存液の成分を取り除く目的でサンプルを遠心分離(13,000 x g、5分、室温)したペレット、さらにPBSで洗浄したペレットからそれぞれDNAを抽出し、シーケンスした。

採便量の検討: 0.01-0.3 g/mlで採便し、3日以内もしくは1か月保管後にDNAを調整し、シーケンスした。

保存液の希釈: 保存液に浸したサンプルにPBSを添加し(保存液1.0 mlに浸した便0.1 gにPBSを0.1 mlもしくは1.0 ml添加)、3日以内もしくは1か月保管後にDNAを調整し、シーケンスした。

保管期間: 保存液に浸した便から1週間おきにDNAを調整し、シーケンスした。

採便部位: 1つの便について、異なる部位(表面層か深部、先か後など5か所)からサンプルを採取し、菌叢を比較した。

DNA抽出、シーケンス、菌叢解析は初年度に確立した方法に準じて行った。サンプルをビーズ破砕(ガラスビーズ、4,260 rpm、50秒)し、核酸自動抽出器 GENE PREP STAR (クラボウ)を用いてDNAを精製し、精製したDNA(12.5 ng)をテンプレートにプライマー(forward; 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGCGACAGCCTACGGGN GGCWGCAG-3'、reverse; 5'-GTCTCGTGGGCTCGG

AGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-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。

(倫理面への配慮)

ヒトサンプルを用いた解析について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 採便キットを用いた腸内細菌叢の解析プロトコルの最適化

18名の便サンプルを解析したところ、Bacteroidetes門が多いグループ1、Firmicutes門が多いグループ2、Actinobacteria門が多いグループ3の3つのグループに分類された(図1)。そこで被験者を3つのグループに分けて検討を行った。

前処理の影響

DNA抽出の前に遠心分離などの前処理を行った場合、Bacteroidetes門が多いグループ1では前処理によってBacteroidetes門の割合が有意に減少し、Firmicutes門の割合が増加した(図2)。Firmicutes門が多いグループ2では顕著な変化は認められなかった(図2)。Actinobacteria門が多いグループ3では6名の平均値では変化は認められなかったが(図2)、個々のデータをみると6名中4名でActinobacteria門の割合が減少していた(データ示さず)。このように遠心分離やPBS洗浄といった前処理によって菌叢解析の結果が変化し、その影響は保有する腸内細菌の種類により異なる結果であった。

採便量の検討

採便後3日以内にDNAを調整した場合、すべてのグループにおいて採便量によって菌叢の違いは認められなかった(図3a)。一方で、室温で1か月間保管した場合は、採便量が少ないサンプル(0.01-0.1 g/ml)では3日以内にDNA調整した場合と比べて菌叢の違いは認められなかったが、0.3 g/mlという高濃度で1か月間保管したサンプルでは、すべてのグループにおいて他の条件で保管したサンプルに比べてProteobacteria門の割合が増加していた(図3a)。さらに、綱レベルで解析したところ、Gammaproteobacteria綱の割合が増加していた(図3b)。

次に、個々の被験者のデータについてみると、0.3 g/mlで1か月間保管したすべてのサンプルでProteobacteria門やGammaproteobacteria綱の割合が増加しているのではなく、便の水分量が少ないサンプルで増加している傾向

が認められた(図4)。

保存液の希釈

採便後3日以内にDNAを調整した場合、PBS添加群と非添加群で菌叢の違いは認められなかった。しかし、PBS 1 mlを添加して室温で1か月間保管した場合、の採便量の検討結果と同様に、すべてのグループにおいてProteobacteria門、Gammaproteobacteria綱の割合が増加していた。また、PBSを添加していない群と0.1 ml添加した群について、3日以内と1か月後で比較してみると、グループ1と2では変化は認められないが、グループ3ではActinobacteria門の割合が減少しており、FirmicutesやBacteroidetesの割合が増加していた。

保管期間の検討

採取した便を保存液に浸し、よく混和した後、すぐ(0日)、3日、1週間、2週間、3週間、4週間保管後にDNAを調整し、菌叢を比較した結果、ほとんどのサンプルで菌叢は変化せずに4週間保存されていたが、Actinobacteria門が多いサンプルでは2週間以上保管したサンプルにおいて*Bifidobacterium*の割合が減少していた(図6)。

採便部位の検討

図7aに示すように便の表面3か所、深部1か所、表面3か所を混ぜて、サンプルを採取した。属レベルのデータをもとに系統解析を行った結果、10名中8名のサンプルは部位が異なっても同じクラスターに分類されたが、2名では表面の先(outer: a)から採取したサンプルが異なるクラスターに分類され、採便部位によって菌叢の違いが認められた(図7b,c)。

C-2 健常な日本人の腸内細菌および腸管免疫データの収集

2017年3月31日時点で糞便408検体、血液399検体を収集した。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。

D. 考察

C-1の の検討において、保存液に浸した便について遠心分離などの前処理を行うと、菌叢が変化することが明らかとなった。特にBacteroidetes門の細菌の割合が多い検体で顕著な変化が認められた。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対して感受性の高い*Bacteroides*などの菌が溶菌し、そのDNAを前処理の過程でロスしてしまった結果を反映していると考えられた。実際に保存液中(遠心分離した上清)から菌特異的なPCR法によって*Bacteroides*が検出された(データ示

さず)。以上のことから、保存液に浸した便からは前処理を行わずに精製したDNAを用いて菌叢解析することが望ましいと考えられた。

C-1の の検討において、採便量が多いサンプル(0.3 g/ml)を室温で1か月間保管すると、Gammaproteobacteriaの割合が増加していた。この原因は採便量が多すぎると保存液が十分に効かず、菌が不活化されなかったために、酸素の存在下でも増殖できる通性嫌気性のGamma proteobacteriaが増殖したためであると考えている。また、便の水分量とGammaproteobacteriaの割合に負の相関が認められたことから、水分量の少ない硬い便は保存液が浸透しにくく、不活化されにくい可能性があると考えられた。さらに、C-1の の検討から、保存液をPBSで希釈した場合も採便量が多い場合と同様に菌が十分に不活化されないためにGammaproteobacteriaが増殖したと考えられた。これらの結果から、保存液を用いて便を採取する際は、採便量と保存液の希釈に注意が必要であり、実際にサンプルを採取する被験者に十分に説明する必要があると考えられる。

C-1の の検討でActinobacteriaが多いグループ3においてActinobacteria門の割合が1か月保管後に減少していたことから、保管期間の影響についてより詳細に検討を行った。C-1の の結果、1か月後においてもBacteroidetes門やFirmicutes門に属する細菌の割合はほとんど変化しなかったが、Actinobacteria門に属する*Bifidobacterium*の割合が減少していた。この原因ははっきりとは分からないが、保存液によって菌ゲノムの性状や構造変化が起こり、PCR効率やDNA抽出に影響したのではないかと考察している。この検討から、保存液で採取した便からは出来るだけ早く(理想的には1週間以内)にDNAを調整することが望ましいと考えられた。

C-1の の検討から、1つの便から採取したサンプルであっても、採取する部位によって菌叢が異なることがあることが明らかになった。このことから、糞便を用いた菌叢解析では、サンプルを便の複数か所から採取することが望ましいと考えられた。

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

C-2の通り、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。

E. 結論

本年度の検討から採便キットを用いた腸内細菌叢の解析プロトコルを確立し、最適化した。

腸内細菌叢の解析における施設間の違いを比較し、多機関の連携の可能性について検討を進めている。最終目標600名のうちすでに約400名のサンプルの分析を完了しており、データ取得の進捗状況としては順調であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kanaya T, Hase K, Sakakibara S, Kato T, Tachibana N, Sasaki T, Hashimoto Y, Sato T, Watarai H, Kunisawa J, Shibata N, Williams I, Kiyono H and Ohno H. IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *J Exp Med.* (2017, in press)
- 2 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)
- 3 Kunisawa J. Metabolic changes during B cell differentiation for the production of intestinal IgA antibody. *Cell Mol Life Sci.* (2017, in press)
- 4 Kunisawa J and Kiyono H. Sphingolipids and epoxidized lipid metabolites in the control of gut immunosurveillance and allergy. *Front Nutrition.* 2016, 3:3.
- 5 Kunisawa J. Immunity and Nutrition. *Encyclopedia of Immunology.* 2016, vol. 5, pp. 120-126, (Edited by Michael J.H. Ratcliffe), Academic Press, Oxford, UK.
- 6 澤根健人、國澤純. 食用油を起点に形成される生体内脂質環境の構築とアレルギー疾患の制御. *実験医学増刊.* 2017 (印刷中).
- 7 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.* 2017 (印刷中).
- 8 長竹貴宏、國澤純. 食物アレルギーの発症における食用油クオリティの影響 ~油の質がアレルギー体質を決める！？~. *化学と生物.* 2017, 55(1): 11-12.
- 9 鈴木英彦、國澤純. ビタミンによる免疫応答の制御と疾患. *炎症と免疫.* 2017, 25(1): 29-33.
- 10 國澤純. 腸内環境を介した免疫制御とアレルギー・炎症との関連. *Labcab.* 2016, 17:5-7.
- 11 平田宗一郎、國澤純. 脂質を介した腸管免疫の制御と疾患・生体防御. *生体の科学.*

2016, 67(3): 242-246.

- 12 細見晃司、國澤純. 腸内細菌と粘膜免疫. *ヒトマイクロバイオーム研究最前線* (監修、服部正平). 2016, 119-128.
- 13 細見晃司、國澤純. マイクロバイオームとワクチン開発. *ヒトマイクロバイオーム研究最前線* (監修、服部正平). 2016, 299-306.
2. 学会発表
 - 1 國澤純、腸内環境を起点に進める創薬研究 日本薬学会 第137年会 仙台(東北大学) (2017年3月26日)
 - 2 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)
 - 3 國澤純、腸内環境データを活用した健康科学の推進 仁生プロジェクトセミナー 徳島(徳島大学) (2017年3月22日)
 - 4 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)
 - 5 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)
 - 6 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)
 - 7 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 JSBi 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)
 - 8 國澤純、腸内環境が導く生体応答の基礎的解明と健康科学への新展開 第11回 関西ライフサイエンスリーディングサイエンスリストセミナー 大阪(グランフロント大阪) (2017年3月9日)
 - 9 國澤純、セルフメディケーションにおけるサプリメント・健康食品の今後 ~科学的根拠の確立~ セルフメディケーション 学術フォーラム 神戸(神戸学院大学) (2017年3月5日)
 - 10 國澤純、腸内環境を介した免疫システムの構築とワクチン、創薬、機能性食品開発への展開 第19回 藤田保健衛生大学小児科後期研修セミナー 名古屋(サイプレスガーデンホテル) (2017年2月4日)

- 11 國澤純、健康増進における腸内環境の重要性と Precision medicine & nutrition としての可能性 彩都産学官連携フォーラム 2017 大阪(千里ライフサイエンスセンター) (2017年1月25日)
- 12 Jun Kunisawa, Gut Environmental Factors Act as Natural Adjuvants in the Regulation of Intestinal Immune Responses against Oral Vaccines 10th Meeting of the Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium Osaka (Senri Life Science Center) (2017, January 24)
- 13 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)
- 14 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)
- 15 國澤純、腸内環境データを活用した健康科学と健康長寿社会の実現に向けた展開 第1回マイクロバイオームワークショップ 大阪(グランフロント) (2016年12月22日)
- 16 國澤純、アレルギーの予防と改善を目指した腸内環境の理解と応用 第3回総合アレルギー講習会 横浜(パシフィコ横浜) (2016年12月17日)
- 17 Jun Kunisawa, Gut Environment in the Regulation of Host Immunity and Its Application to the Human Health Science 6th Investigative Commission of Ortho-Organogenesis Okinawa (OIST) (2016, December 8)
- 18 Jun Kunisawa, Critical Roles of Gut Environmental Factors in the Regulation of Immunosurveillance and Allergic Diseases The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology Okinawa (Lagna Garden Hotel) (2016, December 6)
- 19 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)
- 20 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)
- 21 國澤純、消化管免疫と腸内環境から考える Precision Medicine & Nutrition の可能性 第54回小腸研究会 埼玉(ソニックシティ) (2016年11月12日)
- 22 國澤純、腸から考えるヘルスサイエンス 第3回 六甲医学研究会 兵庫(淡路夢舞台国際会議場) (2016年10月28日)
- 23 國澤純、腸内環境を介した免疫制御の基礎的解明と応用・実用化研究に向けた展開 第12回日本食品免疫学会 東京(東京大学) (2016年11月10日)
- 24 國澤純、腸内細菌を活用したワクチン開発、免疫創薬、ヘルスサイエンスへの展開 マイクロバイオームワークショップ~健康と疾患に関わるヒト細菌叢解析の最適手段~ 東京(東京コンファレンスセンター品川) (2016年9月20日)
- 25 國澤純、健康指標としての腸内細菌 JASIS2016 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)
- 26 國澤純、Precision medicine & nutrition の実現に向けた腸内環境の理解と応用 腸内菌叢の創薬応用セミナー 東京(コクヨホール品川) (2016年9月7日)
- 27 國澤純、腸から考えるヘルスサイエンスと創薬・ワクチン・機能性食品開発への展開 第21回 那須ティーチイン 東京(ホテルマリナーズコート東京) (2016年7月30日)
- 28 國澤純、腸内環境から考えるヘルスサイエンスと将来展望 第33回 大阪大学ツインリサーチセミナー 大阪(大阪大学) (2016年6月15日)
- 29 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)
- 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

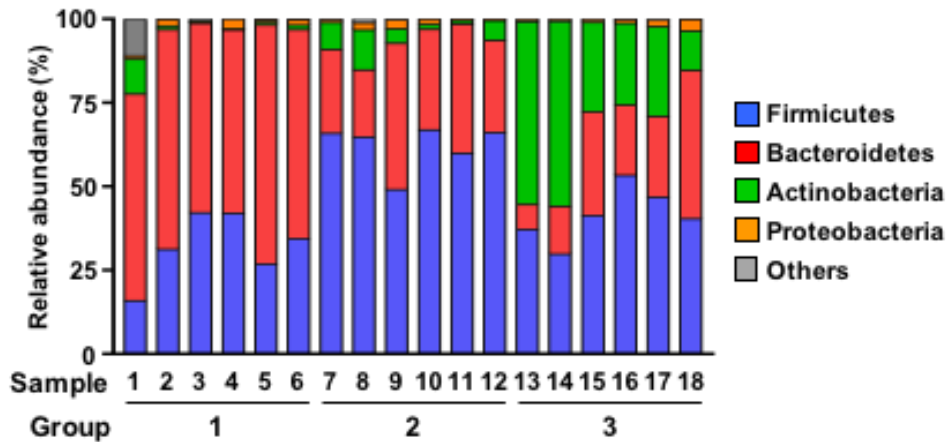


図1. 被験者18名の便の菌叢解析

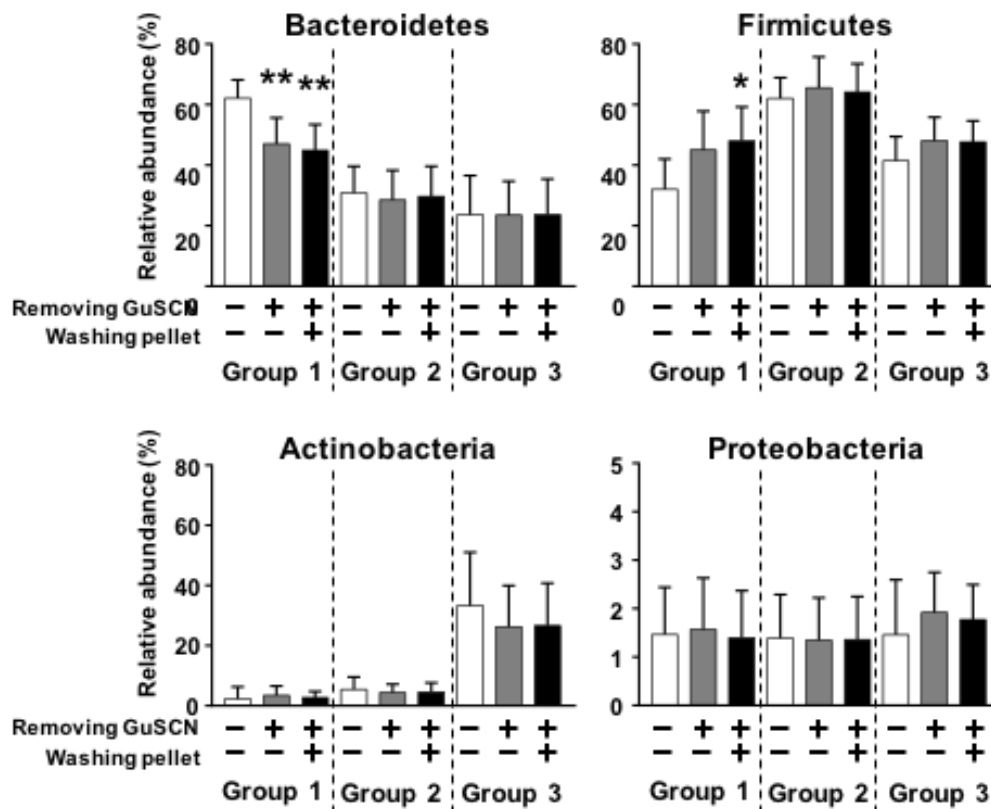


図2. DNA抽出における前処理の影響

保存液に浸した便から次の3つの条件でDNAを調整し、シーケンスを行った。①直接DNAを調整した。②遠心分離したペレットからDNAを調整した。③②のペレットをさらにPBSで洗浄したペレットからDNAを調整した。

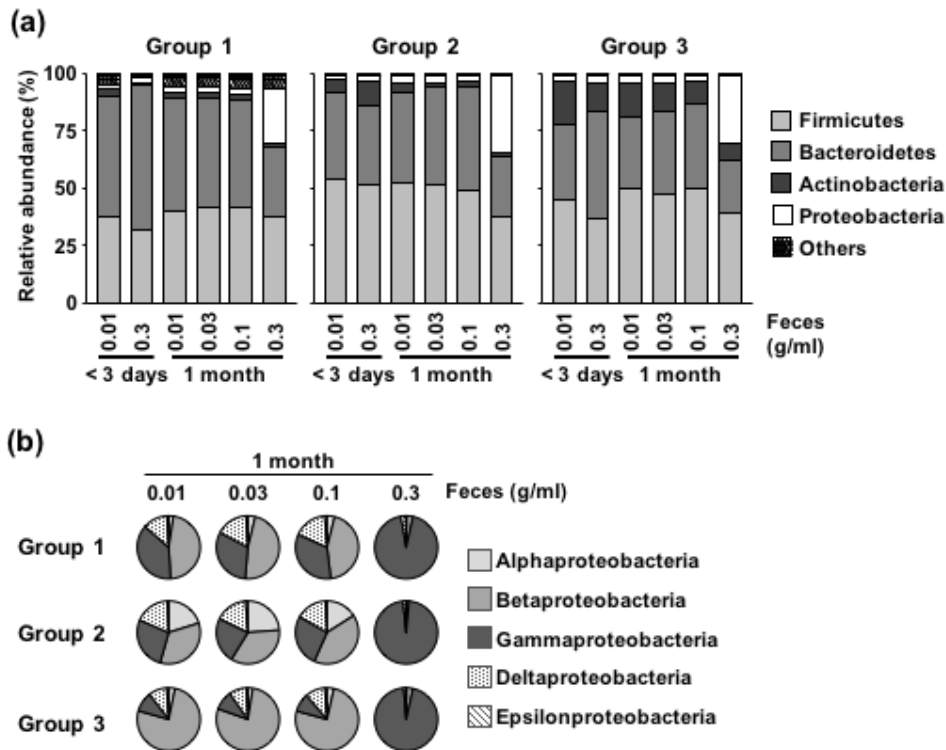


図3. 採便キットを用いた保管における採便量の検討
 ヒト便を0.01, 0.03, 0.1, 0.3 g/mlになるように保存液に懸濁し、3日以内もしくは室温で1か月間保管後にDNAを調整し、シーケンスを行った。(a)門レベルでの各グループの菌叢解析の結果。(b)Proteobacteria門に分類される5つの綱の割合。

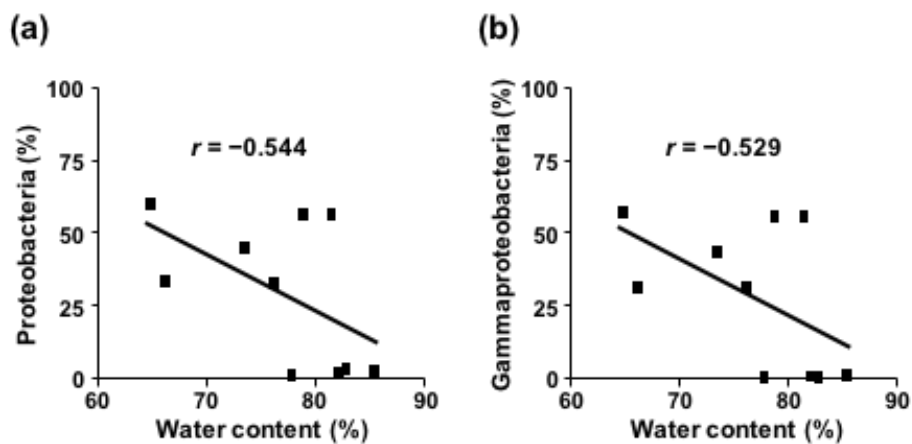


図4.採便キットを用いた保管における便の水分量の検討
 0.3 g/mlで1か月間保管したサンプルのProteobacteria門(a)もしくはGammaproteobacteria綱(b)の割合と便の水分量の相関を示した。

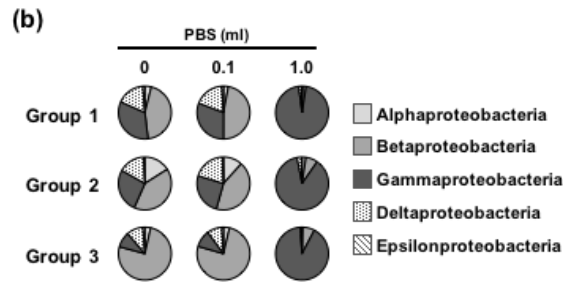
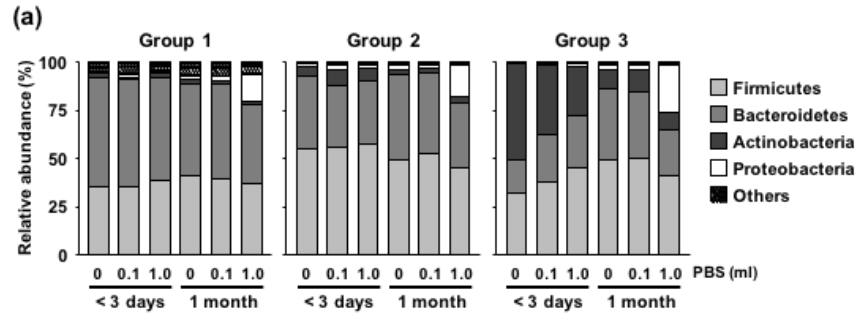


図5. 採便キットを用いた保管における保存液の希釈の検討
 保存液1.0 mlに浸したヒト便0.1 gにPBSを0.1 mlもしくは1.0 ml添加し、3日以内もしくは室温で1か月間保管後にDNAを調整し、シーケンスを行った。(a)門レベルでの各グループの菌叢解析の結果。(b)Proteobacteria門に分類される5つの綱の割合。

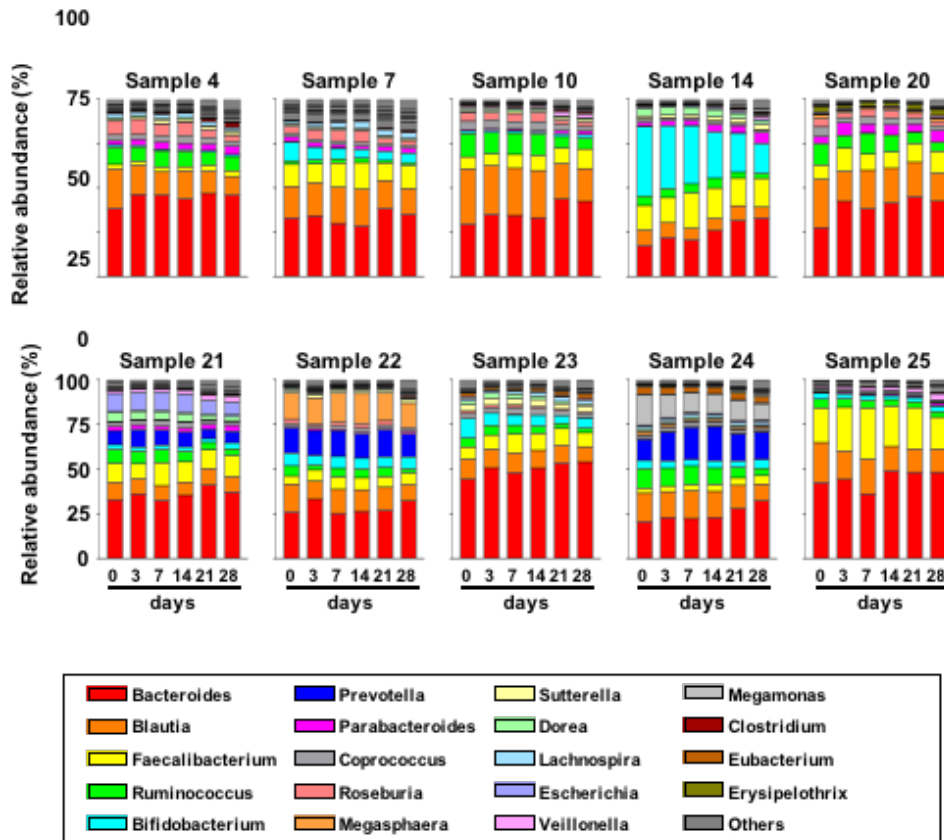


図6. 保存期間の検討

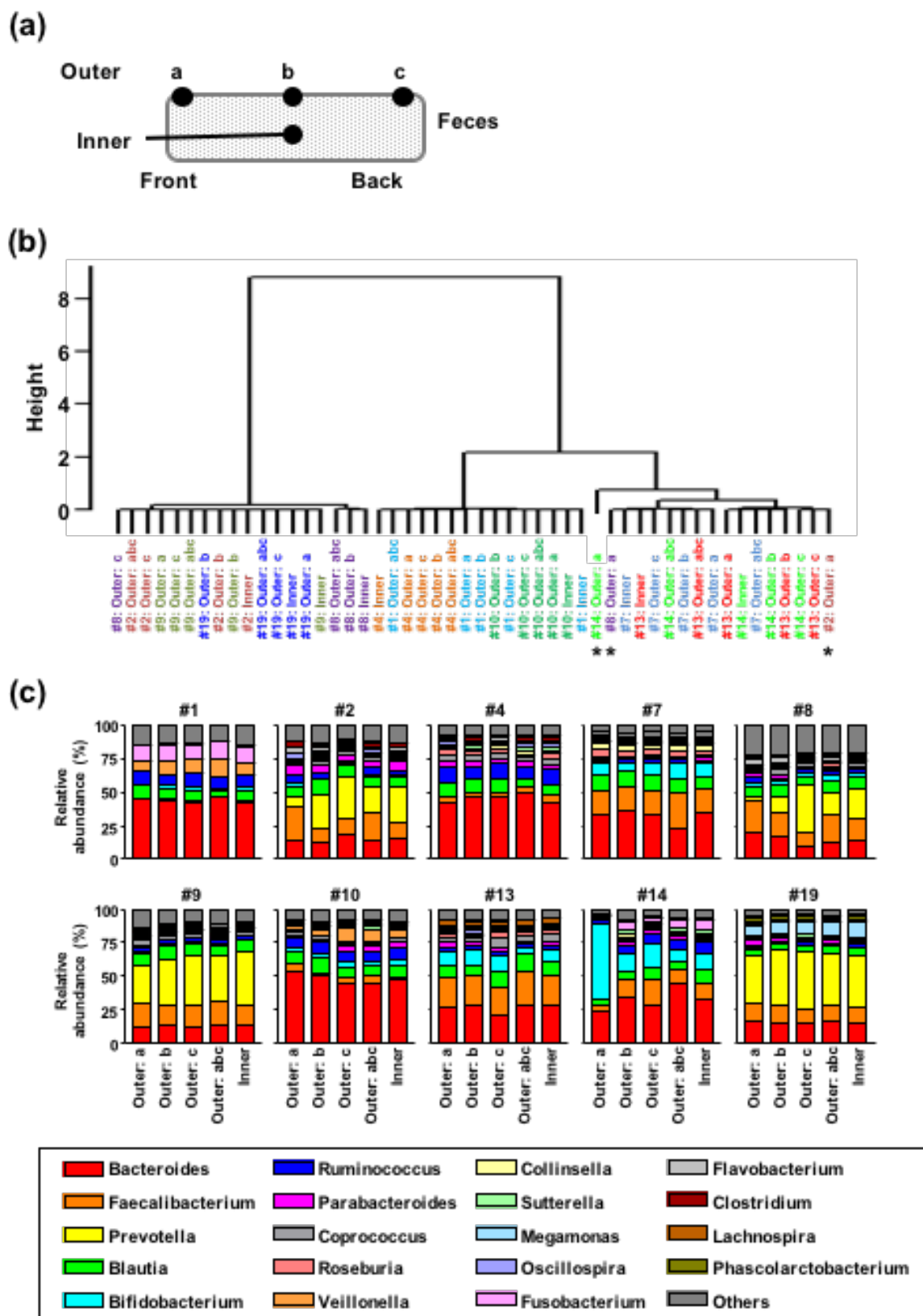


図7. 異なる採便部位の菌叢の比較

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）
分担研究報告書

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。そこで血漿中の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: 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。

2. 胆汁酸の測定: LC条件としては、カラムはInertSustainSwift 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。

<結果> 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。

<まとめ> 血漿中の脂肪酸については性別や年齢別により差があることが明らかとなった。胆汁酸に関しては感度以下になってしまうものが存在し、さらなる感度の上昇を検討する必要がある。

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必要がある。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。そこで本研究では血漿中の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

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。

2. 胆汁酸の測定

LC条件としては、カラムはInertSustainSwift 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(図1)。

(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

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系の方が高く、6/3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。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、コール酸、タウロコール酸、ヒオデオキシコール酸は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。

さらに腸内細菌による重要な代謝産物である短鎖脂肪酸の分析法を検討中である。GCによる短鎖脂肪酸の分析の報告はあるが、誘導体化やGC分析に長時間を要する。そこでLC-MSを用いた短時間で簡便な短鎖脂肪酸の分析方法の確立を試みている。現時点では、短鎖脂肪酸を感度よく分析するためのLC-MS条件がほぼ確立され、残る課題としてより適切なLCカラムの検討を行っている。また血漿からの簡便で効率の良い短鎖脂肪酸の抽出方法についてもほぼ確立できており、LC-MSの条件が完全に決定した時点で抽出方法についても最終決定を行う予定である。

D．考察

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。しかし本研究から血中の3系が低いことがその原因の一旦を担っている可能性が考えられた。さらに年齢を3群に分類すると若い人ほど

6/ 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。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。胆汁酸は肝臓においてコレステロールから合成され一次胆汁酸が胆嚢に蓄えられる。その後食事により腸管に分泌され、腸内細菌によって2次胆汁酸に代謝され、95%が肝臓に再吸収、4%が糞便とともに排出、1%が血中に吸収される。従って血漿中に存在する胆汁酸はかなり低いことが予想され、そのため感度以下となり測定できなかった可能性が高い。今後は塩酸などを添加するなどして、抽出効率を上げることにより再度測定を試みる必要がある。測定できた被験者において胆汁酸は年齢別では全く差を認めなかったが男性では女性に比べ1次胆汁酸濃度が有意に上昇していた。この原因ははっきりしないが、食事摂取量にともなう胆汁酸合成の増加、女性ホルモンや腸内細菌の影響などが考えられ、今後これらの因子を考量しながら解析していく必要があると考える。

E．結論

血漿中の脂肪酸については性別や年齢別により差があることが明らかとなった。胆汁酸に関しては感度以下になってしまうものが存在し、さらなる感度の上昇を検討する必要がある。

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

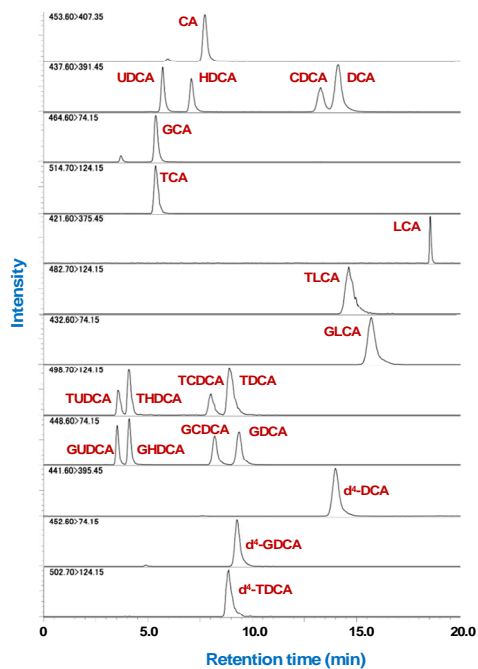
1. 特許取得
特になし

図1 胆汁酸内部標準液を用いたLC-MS/MSを用いた分離方法

LC-MS/MSの機械設定

Sample			
	Diluent : Methanol		
	Diluent volume : 50ul		
	Injection Volume : 3ul		
Column			
	COSMOCORE 2.6PBr		
	Size : 2.1mmI.D.-100mm		
	Particle size : 2.6μm		
	Temperature : 40		
Mobile Phase			
	A : H ₂ O		
	B : Methanol containing 0.2% formic acid		
	Flow rate : 0.4 ml/min		
	Gradient	Time(min)	% of A % of B
		0	25 75
		15	25 75
		18	0 100
		19.5	0 100
		19.6	25 75
		20	25 75
Detector			
	Model : Shimadzu LCMS-8040		
	Ion mode : ESI-		
	Ion spray voltage : -3000kV		
	Desolvation temp : 250		
	Mode : MRM		
	Dwell time : 100msec		

胆汁酸内部標準液のクロマトグラム



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)
分担研究報告書

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> 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、それぞれの菌種と関連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。

<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、多項目を格納するための腸内細菌叢データベースの構築を行い初期データの格納を行うとともに、作成したデータベースを用いて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を開発した。来年度さらに多数のデータを追加し様々な角度から解析を行っていく予定である。

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、腸管免疫因子、メタボローム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の手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) 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。これらのデータの解析方法について検討を行った後、NEXISコホート20名の被験者の腸内細菌叢データを解析した。

(2) 腸内細菌叢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に、これらのデータを格納するためのデータベースを構築した。生活習慣等のデータ項目が多項目にわたると、項目の追加、変更を柔軟に行えるようにするために、サンプルごとに各項目の値を格納する代わりに、サンプル・項目・値の組み合わせでデータを格納するようデータベースを設計した(図1)。このデータベースに、NEXISコホート20名の腸内細菌叢データと身体データや生活習慣等のデータを格納した。

(3) 腸内細菌叢と生活習慣等の関連を図示化するソフトウェアの開発

ウェブブラウザを通して作成したデータベースにアクセスし、腸内細菌叢のデータを細菌分類の各階層で図示したり(図2)、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オンラインソフトウェアを開発した(図3)。このソフトウェアを用いることによって、それぞれの菌種の数と(逆)相関の高い生活習慣を抽出したり、逆にある生活習慣と(逆)相関の高い菌種を抽出することが容易にできるようになった。

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。

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、多項目を格納するための腸内細菌叢データベースの構築を行い初期データの格納を行った。また、作成したデータベースを用いて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を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

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).

2. 学会発表

【国内学会: 招待講演】

水口賢司, データ統合と計算ネットワーク生物学による創薬研究, 第15回国際バイオテクノロジー展(アカデミックフォーラム), 東京, 2016.5.12(招待講演)

水口賢司, 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, マイクロバイオーム公開セミナー(1), 大阪, 2016.10.21(招待講演)

水口賢司, 計算システム生物学による創薬: 分子, 構造からネットワークへ, 2016年度第1回バイオ単分子研究会, 兵庫, 2016.10.23(招待講演)

【国内学会: 一般講演】

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, トーゴ の日シンポジウム 2016, 東京, 2016.10.5(ポスター)

陳怡安, ロケシュ テリパチ, 川島和, 水口賢司, 統合データウェアハウスTargetMineの高度化とデータ解析ツール, トーゴ の日シンポジウム2016, 東京, 2016.10.6(ポスター)

Tripathi L.P., Itoh N.M., Kondo Y., Takeda Y., Mizuguchi K., An integrative systems analysis of gene expression profiles of the fibrotic lung from CD151 knockout mice reveals insights into the mechanisms of lung fibrosis, CBI学会 2016大会, 東京, 2016.10.25(ポスター)

G . 知的財産権の出願・登録状況
無し

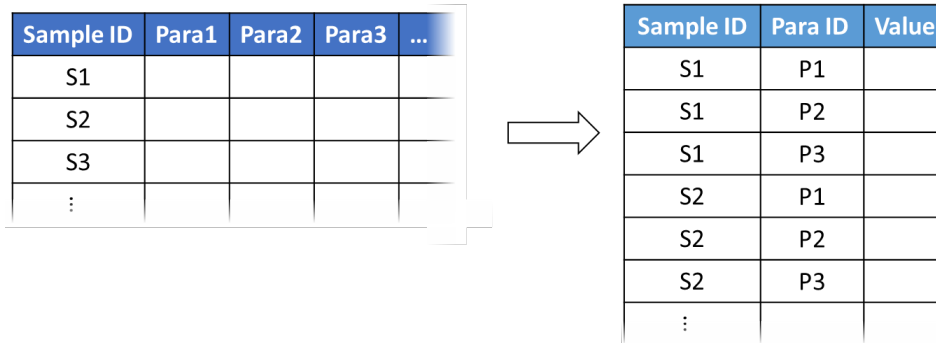


図1. 多項目データを柔軟に格納できるデータベース設計

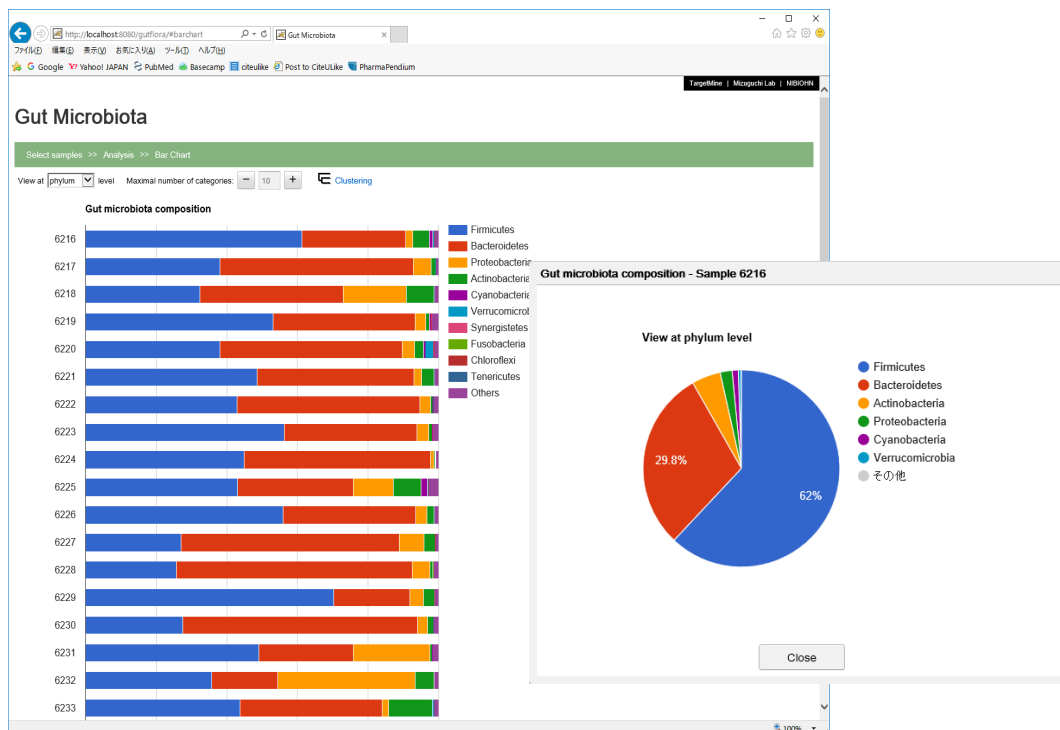


図2. 腸内細菌叢データを細菌分類の各階層で表示

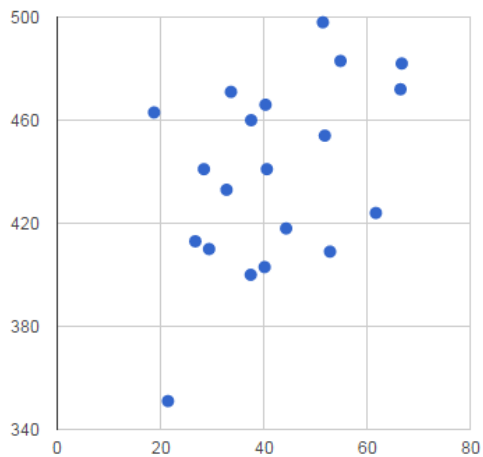


図3. 特定の身体データや生活習慣データと相関のある細菌を解析

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kunisawa J	Immunity and Nutrition.	Encyclopedia of Immunology. (Edited by Michael J.H. Ratcliffe), Academic Press, Oxford, UK	5	120-126	2016

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, 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.		Epub ahead of print	2017
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.	13;36(1)	15	2017
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.	4(20).	pii: e13003	2016
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.	20(1)	98-103	2017
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.	3	3	2016

Nyström-Persson J., Natsume-Kitatani Y., Igarashi Y., Satoh D., Mizuguchi K.,	Interactive Toxicogenomics: Gene set discovery, clustering and analysis in Toxygates	<i>Sci Rep</i>			2017. in press
--	--	----------------	--	--	-------------------