

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29年度 総括研究報告書
研究代表者 宮地 元彦
平成 30 年(2017)年 5 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. 疫学研究の進捗状況と腸内細菌叢と生活習慣との関係 …………… 6

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 …………… 12

國澤 純

3. 脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析 …………… 18

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 …………… 27

水口賢司

・ 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 34

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)

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（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

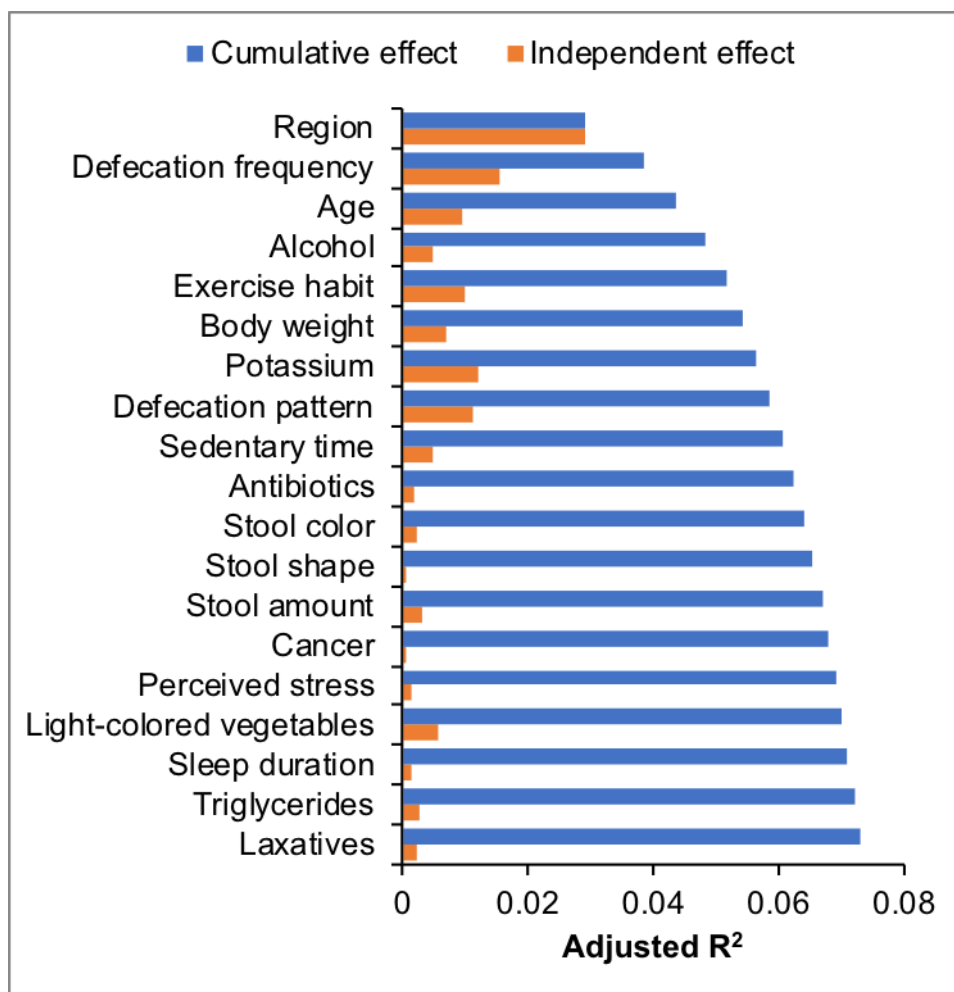


図1. 変数増加法によるステップワイズ回帰 (vegan: ordiR2step関数) により、メタデータの内19項目が独立してBray-Curtis指数と関連していた。

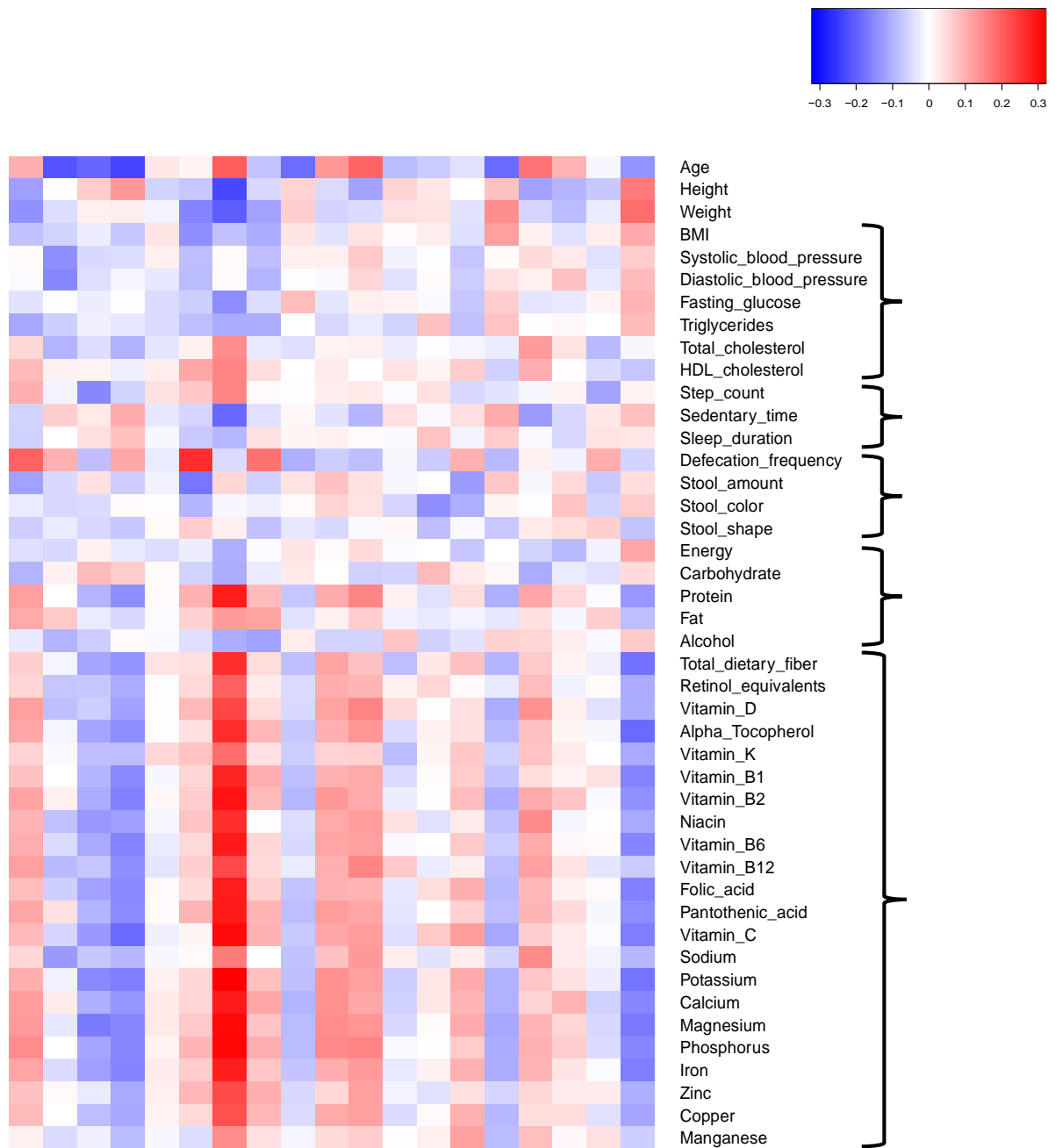


図2．存在比1%以上で検出された属レベルの細菌と主要なメタデータとの相関のヒートマップ。様々な微量栄養素の摂取量が、Firmicutes門に属する*Faecalibacterium*属、*Subdoligranulum*属、*Eubacterium rectale group*属および*Roseburia*属と正に相関し、特に*Faecalibacterium*属の存在比と強い正の相関を示した。一方、これらの微量栄養素は*Bacteroides*属、*Parabacteroides*属、*Sutterella*属の存在比とはいずれも負に相関していた。

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。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に関する検討結果を研究論文としてまとめ、プロトコルを公開する。また、研究期間の最終年度となる 29 年度は、腸管免疫と腸内細菌の分析を進め、目標である 600 名分の分析を完了する。また得られたデータの一部を用い、腸内細菌と関連のある生活習慣を検索する。

< 方法 >

前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。

< 結果と考察 >

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いう結果を研究論文として公表し、さらに、関連機器メーカーのホームページで公開した。

またこれまでに収集したヒト試料（糞便、血液）について腸内細菌と免疫因子の分析を進め、目標である 600 名分以上（腸内細菌叢 722 名分、免疫因子 646 名分）のデータ取得を行い、データベースに収載した。本データベースを用いた解析から、Bacteroidetes の割合と正の相関もしくは負の相関を示す食事成分や血中の炎症性サイトカイン濃度と負に相関する腸内細菌を同定した。今後、これらの知見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。

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動物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（サイトカインや抗菌分子）などを免疫学的手法（ELISA など）を用いて分析する。

また、腸内細菌の研究分野において簡便か

つ安定に試料を採取・保管し、腸内細菌叢を分析できる方法の確立が求められている。そこで、本事業で確立した保存液を用いた解析プロトコルを論文などで公表し、さらに多くの研究者が活用できるようにする。

また得られたデータをデータベースに収載し、腸内細菌と関連のある生活習慣や生体機能を検索する。

B．研究方法

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、ビーズ破砕（ガラスビーズ、4,260 rpm、50秒）および核酸自動抽出器GENE PREP STAR（クラボウ）によってDNAを精製し、16SのV3-V4領域を増幅し、シーケンスを行った。シーケンスはMiseq Reagent Kit v3 (Illumina)を用いてMiseq (Illumina)で行い、得られたFastqファイルから、Qiimeなどの解析パイプラインを用いて菌種を推定した。

保存液を用いた採便においては、以下の点に注意が必要である（詳細は平成28年度に報告済み）。

- 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

これらの検討結果を研究論文として公表し、さらに本プロトコルと関連しているメーカーであるクラボウ、ニッポンジーン、イルミナの各社のホームページでプロトコルを公開した。

また、採取した血液から血清を分離し、サイトカインや抗菌ペプチドなどをELISAやBioplexを用いて測定した。さらに質問票やBDHQなどを用いて対象者の食事などの生活習慣に関する情報を取得した。得られたデータをデータベース化し、ピアソンの相関係数などを用いて相関解析を行った。

（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 健常な日本人の腸内細菌および腸管免疫

データの収集

平成27年度から平成29年度の研究期間において、糞便と血液をそれぞれ746検体収集した。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。

C-2 腸内細菌と食事や免疫因子との関連

健常者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（図1。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 α やIL-4と負の相関を示す腸内細菌が同定された（図2。未発表データのため食事成分名は明示せず）。

D．考察

C-1の通り、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。

E．結論

本研究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最適化し、論文発表した。さらに関連メーカー各社のホームページでプロトコルを公開し、広く活用してもらえる体制が構築できた。データベースの構築においては、目標である600名を超える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、データベースを用いた解析から腸内細菌と食事成分や免疫因子の関連を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 T. Nagatake, Y. Shiogama, A. Inoue, J. Kikuta, T. Honda, P. Tiwari, T. Kishi, A. Yanagisawa, Y. Isobe, N. Matsumoto, M. Shimojou, S. Morimoto, H. Suzuki, S. Hirata, P. Steneberg, H. Edlund, J. Aoki, M. Arita, H. Kiyono, Y. Yasutomi, M. Ishii, K. Kabashima, and J. Kunisawa, 17,18-EpETE- GPR40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques. *J Allergy Clin Immunol* (2018, in press)
- 2 N. Shibata, J. Kunisawa, K. Hosomi, Y. Fujimoto, K. Mizote, N. Kitayama, A. Shimoyama, H. Mimuro, S. Sato, N. Kishishita, K. J. Ishii, K. Fukase, and H. Kiyono. Lymphoid tissue-resident *Alcaligenes* LPS induces IgA production without excessive inflammatory responses via weak TLR4 agonist activity. *Mucosal Immunol* (in press)
- 3 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
- 4 Shibata N, Kunisawa J*, and Kiyono H. Dietary and microbial metabolites in the regulation of host immunity. *Front Microbiol* 8: 2171, 2017
- 5 S. Hirata and J. Kunisawa, Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases. *Allergol Int* S1323-8930(17) 30086-2, 2017
- 6 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
- 7 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

- 8 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
 - 9 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
 - 10 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
- ### 2. 学会発表
- 1 國澤純、微生物の排除と共生を司る腸管免疫システムの理解と応用 日本薬学会第138年会 金沢(ホテル金沢)(2018年3月28日)
 - 2 國澤純、食と腸内細菌から考える栄養科学の新展開 第90回日本栄養評議会 東京(ホテルグランドヒル市ヶ谷)(2018年3月14日)
 - 3 國澤純、食と腸内細菌が織りなす腸内環境の構築と健康科学への新展開 第15回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム 東京(東京大学)(2018年3月9日)
 - 4 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)
 - 5 國澤純、食と腸内フローラが織りなす腸内環境とあなたの健康 国立健康・栄養研究所セミナー 東京(よみうりホール)(2018年2月25日)
 - 6 國澤純、ビッグデータから紐解く未病状態の理解と食による制御の可能性 JSPS「食による生体恒常性維持の指標となる未病マーカーの探索戦略」委員会 2017

- 年度 第 3 回研究会 東京 (東京大学)
(2018年2月9日)
- 7 國澤純、食と腸内細菌が織りなす腸内環境の構築と健康長寿社会の実現に向けた挑戦 一般財団法人キヤノン財団共催調査・研究部会シンポジウム「和食と健康」～「食」と今話題の腸内細菌研究の新展開～ 東京 (富士ソフトアキバプラザ) (2018年2月6日)
- 8 國澤純、健康科学における食と腸内フローラの可能性と双生児研究との連携 双生児研究学会 大阪 (大阪大学) (2018年1月27日)
- 9 國澤純、食事成分と腸内細菌が形成する免疫環境と健康・長寿研究「健康長寿食品研究開発プラットフォーム」H29年度第4回公開ワークショップ 東京 (COREDO 日本橋) (2018年1月26日)
- 10 國澤純、食と腸内フローラから考える健康科学の最前線 第26回 アジア栄養科学ワークショップ 福岡 (中村学園大学) (2018年1月20日)
- 11 國澤純、食と腸内細菌が織りなす腸内環境と健康科学への新展開 ロートクロスイノベーションフォーラム 京都 (ロートリサーチビレッジ京都) (2017年12月21日)
- 12 國澤純、腸内環境と免疫システムから考える健康科学の最前線 第1回 最先端粘膜免疫学シンポジウム 仙台 (佐勘) (2017年12月11日)
- 13 國澤純、栄養・腸内細菌を介した免疫制御と創薬・健康科学へのチャレンジ CVMW2017 大阪 (大阪国際交流センター) (2017年12月9日)
- 14 國澤純、食と腸内フローラが織りなす腸内環境の構築と健康科学への挑戦 早稲田大学セミナー 東京 (早稲田大学) (2017年11月28日)
- 15 國澤純、食と腸内フローラが織りなす腸内環境の形成と健康科学への新展開 平成29年度 日本臨床栄養研究会 徳島 (アスティ徳島) (2017年11月26日)
- 16 國澤純、食と腸内細菌が織りなす腸内環境の構築と生体応答・疾患 第26回 東海新生児研究会 名古屋 (名古屋市立大学病院) (2017年11月25日)
- 17 國澤純、あなたのお腹は大丈夫? 健康増進における腸内環境の重要性と健康科学への新展開 立教大学ブランディング事業セミナー 東京 (立教大学) (2017年11月21日)
- 18 國澤純、食事成分と腸内細菌が形成する免疫環境の理解と健康・長寿研究への展開 第16回ホスファチジルセリン研究会 東京 (日比谷コンベンションホール) (2017年11月2日)
- 19 國澤純、腸内環境を起点とする創薬・食品研究の現状と将来展望 第7回食品薬学シンポジウム 京都 (京都薬科大学) (2017年10月28日)
- 20 國澤純、健康科学におけるマイクロバイオームの可能性と将来展望 第4回関西バイオ医療研究会 大阪 (産総研) (2017年10月23日)
- 21 國澤純、次世代シークエンサーを用いた腸内細菌叢解析のためのサンプル調整法と腸内細菌叢データを活用した健康科学への展開 イルミナウェビナー 東京 (イルミナ) (2017年10月18日)
- 22 國澤純、腸内環境を介した生体構築とヘルスサイエンスへの展開 第44回 佐島シンポジウム 東京 (慶応義塾大学) (2017年10月13日)
- 23 國澤純、食と腸内フローラを介した健康維持と疾患 BioJapan2017 横浜 (みなとみらい) (2017年10月13日)
- 24 國澤純、腸内環境に関するビッグデータの集積と機能性食品開発 食品開発展2017記念セミナー 東京 (東京ビッグサイト) (2017年10月4日)
- 25 國澤純、食と微生物を介した腸内環境の構築と生体応答・疾患 第59回歯科基礎医学会学術大会 長野 (松本歯科大学) (2017年9月18日)
- 26 國澤純、質量分析技術を活用した腸内環境の理解とヘルスサイエンスへの展開 第42回 日本医用マスペクトル学会年会 東京 (一橋講堂) (2017年9月14日)
- 27 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)
- 28 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)
- 29 國澤純、ビタミンを介した免疫制御と健康科学への展開 第3回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会 東京 (海運クラブ) (2017年8月25日)
- 30 國澤純、食品と腸内細菌を起点に形成される生体構築と疾患 第7回 オルソオルガノジェネシス検討会 熊本 (熊本大学) (2017年8月24日)
- 31 國澤純、ヒトマイクロバイオームビッグデータ集積と健康医療応用の現状と展望 日本マイクロバイオームコンソーシアム設立記念シンポジウム 東京 (The Grand Hall 品川) (2017年7月28日)
- 32 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)
- 33 國澤純、ビタミンB1による生体防御メカニズムとコホートデータを活用した健康科学への展開 食肉と健康を考えるフォーラム 東京 (東郷記念館水交クラブ) (2017年7月18日)
- 34 國澤純、病原性細菌と共生細菌に対する免疫応答と制御 第64回トキシンシンポジウム 神戸 (兵衛向陽閣) (2017年7月10日)
- 35 國澤純、腸から考える健康増進と疾患 第18回日本毒性学会生涯教育講演会 横浜 (パシフィコ横浜) (2017年7月9日)
- 36 國澤純、アレルギー疾患における腸内環境の影響と健康科学への展開 第48回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術集会 福井 (AOSSA) (2017年6月30日)
- 37 國澤純、腸内細菌と食事を介した免疫環境の構築とヘルスサイエンスへの展開 第17回日本NO学会学術集会 徳島 (阿波観光ホテル) (2017年5月20日)
- 38 國澤純、腸内環境に関連するビッグデータの集積と健康科学、創薬、機能性食品開発への展望 第383回CBI学会研究講演会 大阪 (グランフロント) (2017年5月12日)
- 39 國澤純、お腹から始まる生体反応の摩訶不思議 生物資源工学研究所 特別セミナー 石川 (石川県立大学) (2017年4月24日)
- 40 國澤純、食や腸内フローラが形成する腸内環境と免疫制御、健康科学への展開 第76回 関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会 大阪 (難波御堂筋ホール) (2017年4月22日)
- 41 國澤純、健康維持・増進に関わる腸内環境の摩訶不思議と創薬・機能性食品への展開 ~腸(お腹)から健康を考える~ 第151回 彩都バイオサイエンスセミナー 大阪 (彩都バイオヒルズセンター) (2017年4月14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

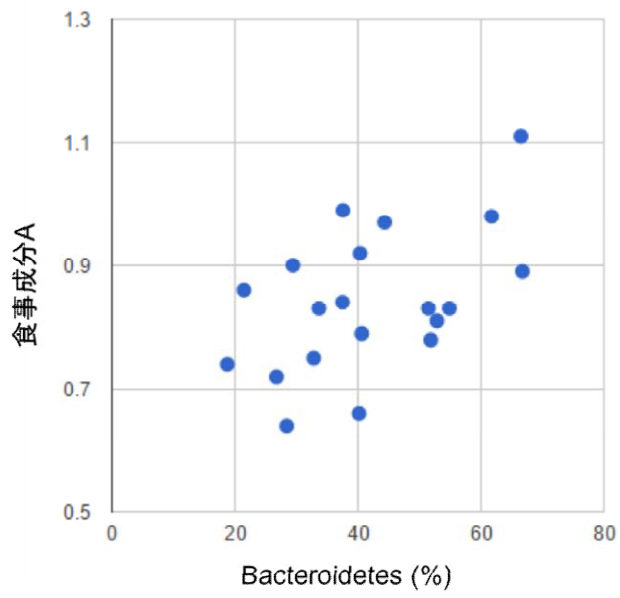


図1. 食事成分と腸内細菌の関連

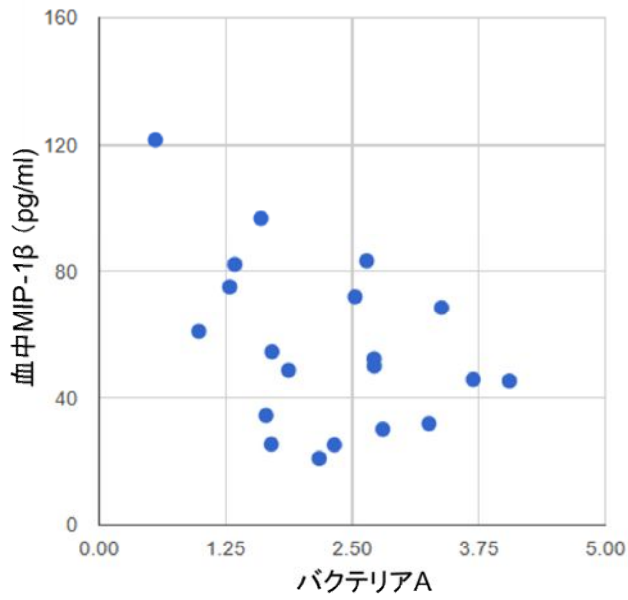


図2. 免疫因子と腸内細菌の関連

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
研究協力者 夏目 やよい
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・研究員
研究協力者 朴 鐘旭、陳 怡安、Attayeb Mohsen、川島 和
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・特任研究員

<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技術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> 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。

<結果> 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。

<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。

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り、生活・食事・疾病などの変化による腸内細菌叢の変化、腸内細菌叢の変化による代謝・免疫などの身体への影響に関する多様な研究が行われている。しかしながら、ヒトの腸内細菌叢は

個人差が大きいいため、このような関連を確度高く解明するのは困難である。

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。腸内細菌叢のデータを得る際に、サンプリングから解析まで統一された手法を用いることにより、異なる手法による影響を排除した。得られたデータを解析することで、一般的な日本人の腸内細菌叢の特徴を明らかとする。また、腸内細菌叢のデータと多様なメタデータについてパ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ためのデータベースの構築を目的とする。

B. 研究方法

便サンプル由来のDNAから次世代シーケンサーを用いて16SリボソームRNA遺伝子のv3-v4領域の配列を取得した。配列データは解析ソフトウェアQiimeとリボソームRNAデータベースSILVAを用いて解析し、97%の類似度を持つ配列をOTU (Operational Taxonomic Unit)単位で分類した上で各OTUの由来する細菌を同定した。また、サンプルごとのリード数を10,000リードで統一した上で、サンプル内の多様性を示す α 多様性、サンプル間の多様性を示す β 多様性の解析を行った。

腸内細菌叢のデータに加え、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をPostgreSQLデータベースに格納した。

データ解析は、統計解析ソフトウェアRを用いて行った。

(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

(1)腸内細菌叢のデータ解析

20~80歳までの日本人男女の腸内細菌は、門レベルでは、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Fusobacteria*、*Verrucomicrobia*が多くを占めていることが認められ(図1)、その内、*Firmicutes*門(45.3%)、*Bacteroidetes*門(43.7%)が全体の約9割を占めた。*Firmicutes*門は*Faecalibacterium*属と*Blautia*属がそれぞれ26%と8%で他の属の菌に比べて多く存在していたのに加え、*Lachnospiraceae*科と*Ruminococcaceae*科に属している菌が多様に存在していた。*Bacteroidetes*門は*Bacteroides*属(71%)および*Prevotella*属(11%)、*Actinobacteria*門は*Bifidobacterium*属(61%)および*Collinsella*属(22%)が大半を占めた。 α 多様性解析の結果、各参加者において確認されたOTU数は10,000リード中、244 OTUから2048 OTUまでとなり、個人差が大きかった。また、 α 多様性指数として広く

使われているShannon指数、Simpson指数を用いて多様性指を評価した結果、約3~4倍の変動が認められた。

腸内細菌叢は個人ごとに大きく異なることが知られている。Arumugamらはヒトの腸内細菌叢パターンを*Bacteroides*、*Prevotella*、*Ruminococcus*の割合によって大きく3つに分類し、Enterotypeと命名した(Arumugam et al., Nature 2011)。本研究においても日本人に多く認められるEnterotypeを探索するため、属レベルとOTUレベルで各細菌の存在比から個人間における腸内細菌叢の類似度(以後、サンプル間の距離として定義)を計算し、その距離をもとにクラスタリングを行った。また、各細菌の存在比を定量的に考慮して計算されるBray-Curtis距離、および系統学的情報と多様性情報をもとに計算する非加重UniFrac距離を用いてサンプル間の距離を計算し、主座標分析法を用いてサンプル間の類似度を可視化した(図2)。クラスタリングにはArumugamらと同様にPAM Clustering法を用いた。その結果、どの定義による距離においても、最適とされるクラスターは3つとなった。また、統計ソフトウェアRパッケージveganのenvfit関数を用いて、腸内細菌群集構造とTaxonomyの関係性を矢印で示した結果、どの定義による距離においても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った。*Faecalibacterium*属の優占に特徴付けられるEnterotypeはOTUレベルBray-Curtisで46%、非加重UniFracで49%を占めており、最も多いEnterotypeとなった。*Bacteroides*属の優占に特徴付けられるEnterotypeはOTUレベルBray-Curtisで37%、非加重UniFracで43%を占めた。*Prevotella*属の優占に特徴付けられるEnterotypeはOTUレベルBray-Curtisで14%、非加重UniFracで11%を占め、比較的割合が小さかった。

性別、年齢層、地域の違いによる腸内細菌叢への影響を評価するため、各項目で分類して得られたサブグループにおいてOTUレベルBray-Curtis距離に基づく主座標分析や細菌群集構成と多様性の比較をおこなった(図3)。その結果、性別、年齢、地域によって腸内細菌叢に偏りがあることが明らかとなった。男性は女性と比べ、*Faecalibacterium*の割合が少なく、*Prevotella*の割合が多い傾向が認められた。また、年齢を重ねるごとに*Bacteroides*の割合が減っていくことが確認された。さらに、首都圏コホート(NEXIS)は他地域と比べ、*Bacteroides*が少なく、*Faecalibacterium*が多く存在した。特に、*Faecalibacterium*は地域差が大きいことが示され

た（2倍以上）。 α 多様性も性別、年齢層、地域の影響を受けており、特に地域による影響が大きかった。

一サンプル内でどれだけ多様な細菌が検出されたかを評価する指標である α 多様性は、その細菌叢が構成するシステムの頑健性を反映していると考えられており、多様な細菌が存在するほど健康であると言われている（Mosca et al., Frot Microbiol 2016）。そこで、OTU レベル Bray-Curtis 主座標分析の座標に Shannon α 多様性指数をマッピングし、その結果をグラデーションで示した（図4）。その結果、*Firmicutes* 門の *Lachnospiraceae* 科、*Ruminococcaceae* 科、*Faecalibacterium* 属などが多く存在するほど多様性が増加する結果となった。また、確認された OTU 数、Shannon 指数、Simpson 指数を用いて門レベルから属レベルまでの Taxonomy の割合との相関係数を求めた結果、*Lachnospiraceae* 科、*Ruminococcaceae* 科の細菌が α 多様性と正の相関を示した。一方、*Bacteroidetes* 門、*Prevotella* 属の細菌は多様性と負に相関していた。

(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ことから、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（トリプル）でデータを格納するようデータベースを設計した。このデータベースに、首都圏コホート(NEXIS)の参加者436名、山口県周南市の市職員86名、新潟県南魚沼市の住民および市職員100名、大阪市の認定特定非営利活動法人の活動参加者100名、計722人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

昨年度までに作成したオンラインソフトウェアに、いくつかの機能を追加した。腸内細菌のデータは門レベルから属レベルまで、棒グラフおよびヒートマップによって可視化が可能となっただけでなく、その関連を4種類の距離（OTUレベル Bray-Curtis、属レベル Bray-Curtis、非加重 UniFrac、加重 UniFrac）に基づいて階層的クラスタリングをおこない、Dendrogramを出力すること

ができる。さらに、オンラインシステム上で主座標分析を用い、その結果を描画することもできる。また、結果の表示だけでなく、腸内細菌と様々なPhenotypeとの関係、Phenotype間での関係を相関係数で示すことが可能となった（Pearson, Spearman）（図5）。

C. 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網羅的に解析できるようになったことが大きい。このような技術発展に伴い、腸内細菌と健康および疾患の関係や食事などによる腸内細菌への影響といった様々な報告がされている（Chatelier et al., Nature 2013; Clemente et al., Cell 2012; Davide et al., Nature 2014）。しかしながら、腸内細菌叢は個人差が大きく、特定のPhenotypeとの関連を示すことはそれほど容易なことではない。このような問題を克服するため、大規模なコホート研究による腸内細菌データの収集に寄せられる期待は大きい。健康人を対象とした従来の腸内細菌研究の大半は、できるだけ多くの個体から得られたデータを利用するためにサンプル調製手法、DNA抽出方法、16SリボソームRNA遺伝子の領域、シーケンシング方法などに違いがあるデータを統合し、解析を行っている。従って、このようにして得られた腸内細菌叢の知見は、実験やデータ解析の手法の違いに起因する可能性がある。

本研究では、すべてのサンプルに対してサンプリングから解析までプロトコルを統一することで手法の違いによる影響をできるだけ排除した。そのため、より信憑性のある解析ができたと考えられる。

本研究により、性別、年齢、地域のいずれも腸内細菌叢に影響を及ぼすことが明らかとなった（図3）。性別に関しては、女性が男性より、多様性が高く、*Faecalibacterium*の割合が多かった。*Faecalibacterium*属*Faecalibacterium prausnitzii*は健康な成人の腸内環境に多く存在し、約5%以上を示していると報告されている（Miquel et al., Curr Opin Microbiol 2013）。本研究では、男性で8.7%を示しており、先行研究と比較して多い割合を示し、女性では14%を示し、男性の約2倍であった。また、*Faecalibacterium*は他の地域と比べNEXISコホートでより比率が大きい事が見いだされた。NEXISコホートの参加者は他地域の参加者と比較してより健康意識が高く、定期的な運動や適切な栄養分を摂取している背景から

このような結果に関係した可能性がある。年齢に関しては20歳から39歳の青年層と40歳から64歳の中年層、65歳からの老年層間で*Faecalibacterium*の割合の差が確認されたが、これはNEXISコホートの年齢層の影響を受けているためと考えられる。

多様性とTaxonomyとの関連性を評価した結果、Firmicutes 門のLachnospiraceae科、Ruminococcaceae科に属する菌が α 多様性との正の相関を示し、Bacteroidetes門、Prevotella属菌は多様性と負に相関していた。RuminococcaceaeやLachnospiraceaeに属する細菌は食物繊維の分解や酪酸の生産に寄与し、乳酸の蓄積を防いで腸内環境のpH安定化に寄与すると報告されており (Lagier et al., Front Cell Infect Microbiol 2012; Biddle et al., Diversity 2013; Duncan et al., Appl Environ Microbiol 2002)、これらの相互作用によって腸内細菌環境が安定化され多様性が増加したことが考えられる。

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、簡単に結果を求めることが可能である。

E. 結論

本研究では、20～80歳までの日本人男女722名の腸内細菌叢データを統一された手法で解析し、その特徴を明らかにした。また、これらの腸内細菌の情報とともに詳細な生活習慣と腸管免疫および疾患発症の情報をデータベース化することにより、それぞれの相互関係の分析を可能にした。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] 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

[2] Hosomi K., Ohno H., Murakami H., Natsume-Kitatani Y., Tanisawa K., Hirata S., Suzuki H., Nagatake T., Nishino T., Mizuguchi K., Miyachi M., and Kunisawa J., 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

2. 学会発表

[1] Hosomi K., Murakami H., Natsume-Kitatani Y., Yi-An C., Ohno H., Tanisawa K., Kawashima H., Nishino T., Matsunaga A., Hirata S., Suzuki H., Nagatake T., Mizuguchi K., Miyachi M., Kunisawa J., Optimization of DNA preparation method from feces in guanidine thiocyanate solution for 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. In Cold Spring Harbor Asia Conference on Microbiota, Metagenomics & Health, Suzhou, China. 2017.9.4-8

[2] 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)

[3] 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

[4] 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

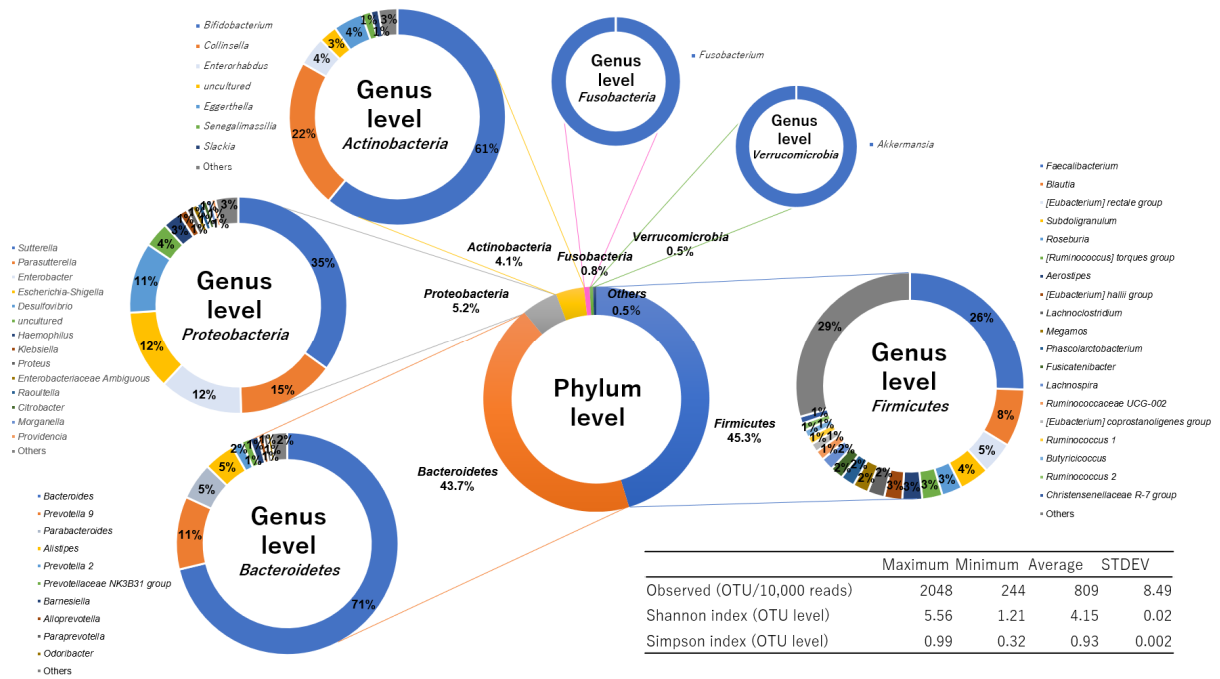


図1. 日本人の腸内細菌叢：門レベル、属レベル

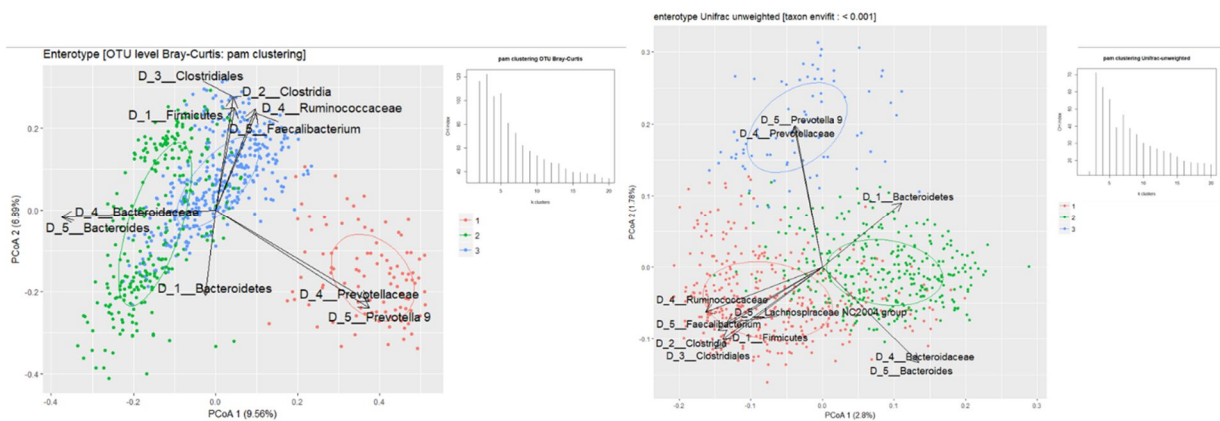


図2. 日本人の腸内細菌叢エンテロタイプ

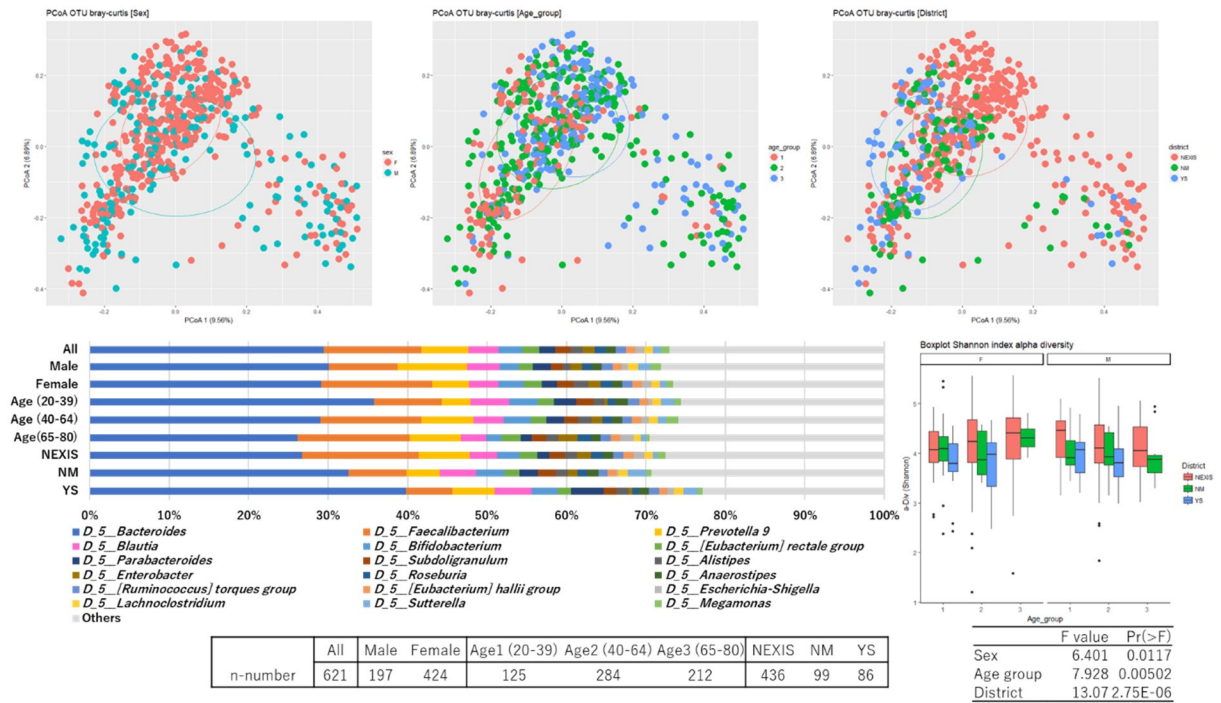


図3. 性別、年齢層、地域に対する腸内細菌叢およびα多様性

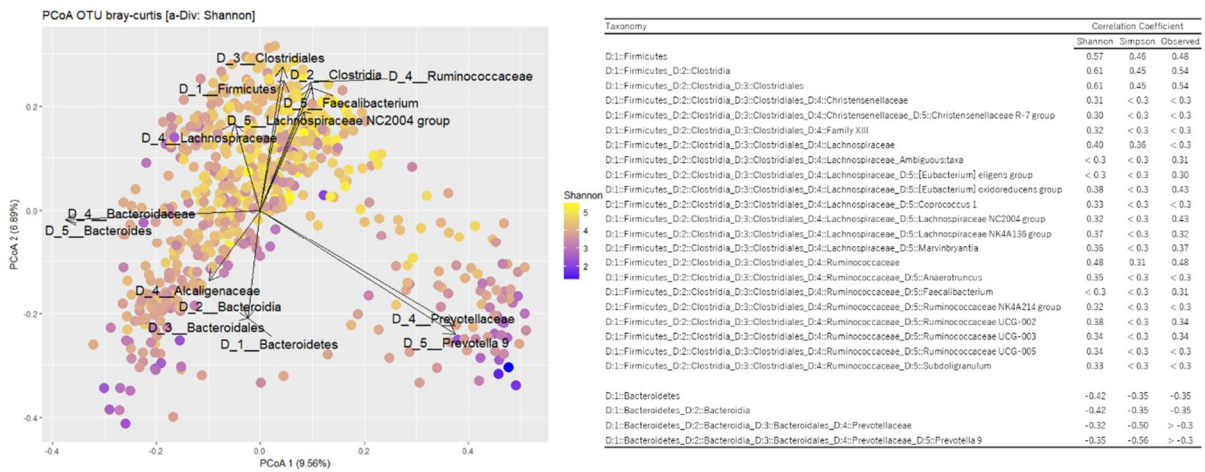


図4. 腸内細菌多様性とTaxonomyの関係

Gut Microbiota v2

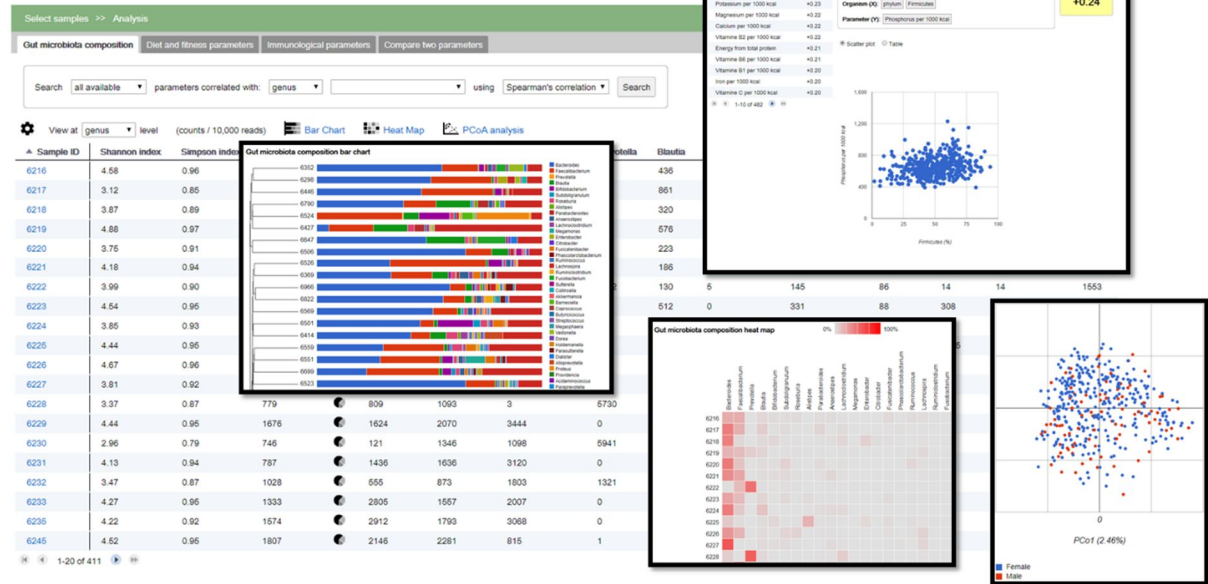


図5. 腸内細菌叢と生活習慣等の関連を図示化するソフトウェア (Gut Microbiota)

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。そこで血漿中や糞便中の脂肪酸、胆汁酸、短鎖脂肪酸の測定系を確立する。

＜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、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。

＜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、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。

＜まとめ＞GC-MSやLC-MS/MSを用いて、血漿中の脂肪酸24種類、血漿中と糞便中の胆汁酸18種類、糞便中の短鎖脂肪酸10種類の測定系を確立することが出来た。今後測定できた代謝産物と食事摂取、女性ホルモンや腸内細菌の影響などの因子を考量しながら解析していく。

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) 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や糞便中の代謝産物である短鎖脂肪酸を含む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歳までの男女の血漿と糞便を用いて、脂肪酸や胆汁酸を測定する。

1. n-3やn-6を含む脂肪酸の測定

血漿サンプル400 μ l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(図1)。

2. 血漿と糞便中の胆汁酸の測定

血漿サンプル100 μ lを用いて3mlのアセトニトリルと10 μ lの内部標準液を混合し抽出した。糞便サンプル(71名分)に関しては20-30mgを用いて230 μ lの水、1N NaOH、メタノールと内部標準液を混合し、さらにODSカラムを用いて抽出した。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1,2)。

3. 糞便中の短鎖脂肪酸の測定

糞便サンプル5-10mgを用いて、90 μ lのミリ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る。その後誘導化試薬であるMTBSTFAを混合し、80°Cで20分間インキュベートする。48時間後GC-MSを用いて解析した(図3)。

(倫理面への配慮)

提供された血漿サンプルは、鍵付きの-20°C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、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(図4)。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(図5)。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(図6-9)。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抽出方法と測定系を確立し、237名について解析した。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(図10)。年齢別では3群間で差を認めなかった(図11)。

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。本研究においても血中のn-3系が低い理由の一旦にエストロゲンなどのホルモンが関与し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。また血中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が、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。これは同じ代謝酵素を用いてn-3系とn-6系が代謝されているためではないかと考えられた。すなわちn-3系の脂肪酸をより多く摂取するとn-3系を代謝するために代謝酵素が使用されてしまい、n-6系の代謝が起こらない。実際血中n-3系が増えると血中のn-6系が減少していた。また血中においてn-6系ではリノール酸が多く、n-3系では最終代謝産物であるドコサヘキサエン酸(DHA)が最も高かった。

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。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と考えられた。面白いことに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。

E. 結論

GC-MSやLC-MS/MSを用いて、血漿中の脂肪酸24

種類、血漿中と糞便中の胆汁酸18種類、糞便中の短鎖脂肪酸10種類の測定系を確立することが出来た。今後食事摂取内容、女性ホルモンや腸内細菌の影響など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。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表

榎木喜久江、窪田哲也、大野治美、村上晴香、宮地元彦、窪田直人 健常人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

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1

血漿中の脂肪酸の測定

測定項目(24項目)		測定項目(18項目)		
脂肪酸	ラウリン酸	C12:0	胆汁酸	コール酸(CA)
	ミリスチン酸	C14:0		タウロコール酸(TCA)
	ミリスチレン酸	C14:1 ω5		グリココール酸(GCA)
	パルミチン酸	C16:0		ケノデオキシコール酸(CDCA)
	パルミトレン酸	C16:1 ω7		タウロケノデオキシコール酸(TGDCA)
	ステアリン酸	C18:0		グリコケノデオキシコール酸(GCDCA)
	オレイン酸	C18:1 ω9		ウルソデオキシコール酸(UDCA)
	リノール酸	C18:2 ω6		タウロウルソデオキシコール酸(TUDCA)
	γ-リノレン酸	C18:3 ω6		グリコウルソデオキシコール酸(GUDCA)
	リノレン酸	C18:3 ω3		デオキシコール酸(DCA)
	アラキジン酸	C20:0		タウロデオキシコール酸(TDCA)
	エイコセン酸	C20:1 ω9		グリコデオキシコール酸(GDCA)
	エイコサジエン酸	C20:2 ω6		リトコール酸(LCA)
	5-8-11エイコサトリエン酸	C20:3 ω9		タウロリトコール酸(TLCA)
	ジホモ-γ-リノレン酸	C20:3 ω6		グリコリトコール酸(GLCA)
	アラキドン酸	C20:4 ω6		ヒオデオキシコール酸(HDCA)
	エイコサペンタエン酸	C20:5 ω3		タウロヒオデオキシコール酸(THDCA)
	ベヘニン酸	C22:0		グリコヒオデオキシコール酸(GHDCA)
	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) (ng/mL)

図2

血漿中胆汁酸抽出方法

0.3ml 血漿
 90μl 1N HCl
 3ml アセトニトリル

↓ vortex for 30sec
 ↓ centrifuge for 10 min at 2000g

Supernatant
 ↓ Filter (0.45μm)
 ↓ Dry by Speedvac

Residue
 ↓ 50μl MeOHで再懸濁
 ↓ LC-MS/MS解析

糞便中胆汁酸抽出方法

20-40mgの糞便
 230μl H₂O
 20μl 1N NaOH
 250μl MeOH
 内部標準液(d⁴-DCA, d⁴-TDCA, d⁴-GDCA, 500μg each)

↓ vortex for 1 hr
 ↓ centrifuge for 5 min at 2000g

100μl Supernatant
 200μl H₂O
 ↓ ODS spincolumn
 ↓ Wash with 300μl H₂O

BA fraction
 ↓ 100μl MeOHで再懸濁
 ↓ Filter (0.45μm)
 ↓ LC-MS/MS解析

図3

短鎖脂肪酸抽出方法

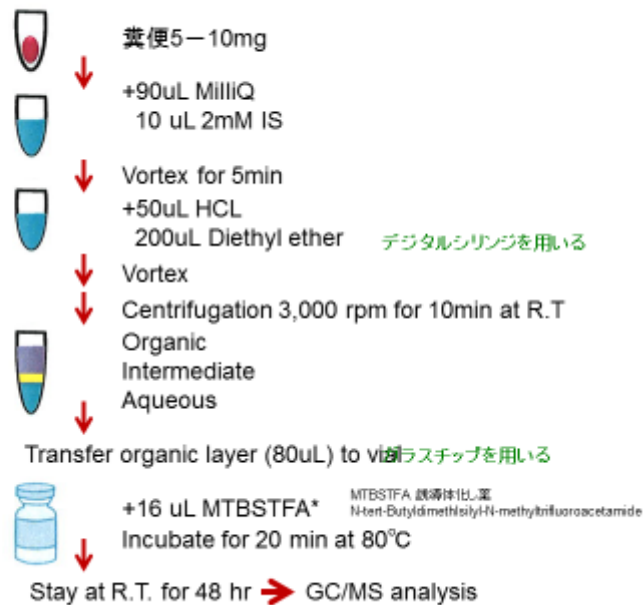


図4

女性と男性における血漿中の脂肪酸濃度

	Female		Male		Mann-Whitney U test P-Value
	FA concentration (µg/ml plasma)	Sample number (n/265)	FA concentration (µg/ml plasma)	Sample Number (n/70)	
Age	62 ± 10	265	59 ± 13	70	0.133
BMI	23 ± 3	265	24 ± 3	70	0.0000
ラウリン酸	2.3 ± 2.0	264	2.7 ± 5.1	69	0.2432
ミリスチン酸	26.0 ± 12.0	265	30.0 ± 48.1	70	0.1526
パルミチン酸	710.7 ± 145.0	265	745.0 ± 461.1	70	0.1702
ステアリン酸	241.2 ± 40.4	265	233.8 ± 115.7	70	< 0.0001
アロキジン酸	9.2 ± 1.6	265	8.3 ± 2.9	70	< 0.0001
ペヘニン酸	22.5 ± 4.3	265	19.3 ± 3.6	70	< 0.0001
リグロリン酸	21.7 ± 4.1	265	19.5 ± 3.6	70	< 0.0001
ミスチリン酸	1.6 ± 1.0	263	1.8 ± 3.9	69	0.0230
パルミトリン酸	56.8 ± 24.1	265	59.6 ± 67.0	70	0.1384
オレイン酸	605.8 ± 150.1	265	691.9 ± 627.5	70	0.9762
エイコセン酸	4.6 ± 1.4	265	5.8 ± 5.4	70	0.0105
エルシン酸	1.3 ± 0.3	70	1.5 ± 0.7	17	0.5011
ネルボン酸	41.0 ± 6.8	265	36.1 ± 5.9	70	< 0.0001
5-8-11エイコサトリン酸	2.7 ± 1.6	256	2.6 ± 2.5	69	0.1042
リノリン酸	26.1 ± 11.6	265	28.6 ± 25.8	70	0.2802
エイコサペンタエン酸	90.3 ± 59.4	265	71.7 ± 44.4	70	0.0016
ドコサペンタエン酸	22.1 ± 8.9	265	20.5 ± 9.7	70	0.0419
ドコサヘキサエン酸	168.2 ± 51.5	265	148.3 ± 52.3	70	0.0016
リノール酸	963.7 ± 174.0	265	961.2 ± 250.7	70	0.0324
γリノール酸	11.5 ± 7.0	265	10.3 ± 7.4	70	0.1867
エイコサジエン酸	7.3 ± 1.5	265	7.9 ± 3.6	70	0.184
ジホモγリノール酸	39.7 ± 12.3	265	38.7 ± 13.8	70	0.4874
アラキドン酸	224.7 ± 48.4	265	209.0 ± 59.3	70	0.0136
エイコサトリン酸	4.9 ± 1.5	265	5.3 ± 3.2	70	0.1862
Total FA	3324.6 ± 560.7	265	3357.9 ± 1686.3	70	0.0107
SFA	1033.4 ± 195.8	265	1058.4 ± 633.2	70	0.0048
MUFA	710.1 ± 170.5	265	795.4 ± 702.8	70	0.0253
PUFA	1581.2 ± 244.0	265	1504.0 ± 382.7	70	0.0002
n9	654.3 ± 152.5	265	736.6 ± 635.7	70	0.8001
n6	1271.8 ± 203.3	265	1252.4 ± 318.9	70	0.005
n3	306.8 ± 109.7	265	269.1 ± 112.2	70	0.0016
n6/n3	4.61 ± 1.65	265	5.15 ± 1.72	70	0.0077

Results are expressed as mean ± SD.

図5

年齢別における血漿脂質中の脂肪酸濃度

	< Age 50		Age 51-59		Age 70 ≤		Kruskal-Wallis P-Value	Steel-Dwass test		
	FA concentration (μg/ml plasma)	Sample number (n/46)	FA concentration (μg/ml plasma)	Sample number (n/184)	FA concentration (μg/ml plasma)	Sample number (n/67)		<Age50 v.s. Ag. 51-59	<Age50 v.s. Age70 ≤	Age51-59 v.s.Age70 ≤
Age	43 ± 8	62	62 ± 6	195	74 ± 3	78	0.3154			
FBI	46.17	62	198.36	195	61.17	78	0.0207	0.0056	0.0361	0.8967
BMI	22 ± 1	62	23 ± 0	199	23 ± 0	67				
ラウリン酸	2.6 ± 5.5	61	2.3 ± 1.9	194	2.3 ± 2.0	78	0.3199			
ミリスチン酸	26.8 ± 51.2	62	26.8 ± 12.3	195	26.9 ± 10.9	78	<0.001	<0.001	0.0004	0.9672
パルミチン酸	679.6 ± 485.2	62	725.1 ± 148.4	195	729.9 ± 141.4	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.9584
ステアリン酸	222.4 ± 121.5	62	243.5 ± 41.2	195	243.7 ± 36.8	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.9678
アラキジン酸	8.2 ± 3.1	62	8.2 ± 1.6	195	8.2 ± 1.6	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.9465
ペルリン酸	19.4 ± 4.1	62	22.6 ± 4.3	195	21.7 ± 3.8	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.1977
リノレン酸	18.6 ± 3.7	62	22.0 ± 4.0	195	21.4 ± 3.8	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.3565
ヨリスチレン酸	1.7 ± 4.2	61	1.6 ± 1.0	194	1.6 ± 0.9	77	0.0024	0.0019	0.0173	0.9658
パルトリレン酸	54.4 ± 71.9	62	57.1 ± 23.1	195	60.4 ± 24.0	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.4981
オレイン酸	603.4 ± 661.1	62	627.1 ± 161.9	195	631.9 ± 150.6	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.9443
エイコシエン酸	4.9 ± 5.7	62	4.8 ± 1.6	195	5.0 ± 1.4	78	0.0011	0.0276	0.0006	0.1726
エルシエン酸	1.5 ± 0.9	19	1.3 ± 0.3	55	1.2 ± 0.1	21	0.5631			
ネルセン酸	35.7 ± 8.1	62	40.6 ± 8.8	195	41.7 ± 7.2	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.4498
5-8-11E-αガリエン酸	2.6 ± 3.1	60	2.7 ± 1.4	190	2.7 ± 1.4	75	0.0595			
リノレン酸	22.3 ± 21.0	62	27.4 ± 12.5	195	28.0 ± 17.3	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.967
E-γ-リノレン酸	57.4 ± 38.0	62	89.6 ± 59.9	195	101.6 ± 54.8	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.0159
β-オクサドセカエン酸	17.8 ± 9.3	62	22.1 ± 8.8	195	24.1 ± 8.6	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.042
β-オクサヘキサエン酸	132.3 ± 47.8	62	166.5 ± 48.1	195	183.4 ± 52.3	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.019
リノール酸	920.2 ± 289.8	62	1005.9 ± 175.4	195	958.3 ± 154.7	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.0032
γ-リノレン酸	8.9 ± 7.1	62	11.8 ± 7.1	195	11.5 ± 7.1	78	0.0012	0.0008	0.0157	0.9012
E-ε-リノレン酸	7.0 ± 3.6	62	7.6 ± 1.6	195	7.6 ± 1.5	78	0.0001	0.0001	0.0012	0.9651
ジホモγ-リノレン酸	35.5 ± 13.0	62	40.3 ± 12.3	195	40.6 ± 12.5	78	0.0109	0.0116	0.0298	0.993
アラキジン酸	208.9 ± 61.0	62	224.0 ± 47.3	195	225.0 ± 51.3	78	0.0081	0.0079	0.0298	0.9385
β-オクサドデカエン酸	5.2 ± 3.3	62	5.0 ± 1.5	195	4.9 ± 1.6	78	0.8718			
Total FA	3096.0 ± 1772.8	62	3385.7 ± 562.9	195	3383.5 ± 532.7	78	<0.001	<0.001	<0.001	1
SFA	977.6 ± 667.1	62	1051.4 ± 198.4	195	1055.1 ± 189.0	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.9689
MUFA	700.4 ± 741.7	62	731.5 ± 180.1	195	740.8 ± 170.9	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.8964
PUFA	1418.0 ± 398.9	62	1602.8 ± 238.9	195	1587.6 ± 222.5	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.9602
n9	646.9 ± 669.9	62	675.4 ± 163.7	195	681.4 ± 151.8	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.9218
n6	1185.6 ± 338.0	62	1294.6 ± 203.9	195	1247.9 ± 179.8	78	<0.001	<0.001	0.0236	0.2083
n3	229.8 ± 100.1	62	305.6 ± 107.5	195	337.1 ± 105.3	78	<0.001	<0.001	<0.001	0.017
n6n3	5.7 ± 1.8	62	4.7 ± 1.5	195	4.1 ± 0.2	78	<0.001	0.0017	<0.001	0.0006

Results are expressed as mean ± SD.

図6

血漿中胆汁酸と性差の関係

血漿中胆汁酸	女性		男性		p値
	平均 (ng/ml)	数	平均 (ng/ml)	数	
DCA	146.6 ± 177.3	315	153.0 ± 118.1	90	0.2037
CDCA	113.6 ± 185.8	292	165.0 ± 242.8	88	0.0617
HDCA	7.0 ± 11.3	21	4.6 ± 2.5	5	1
UDCA	151.7 ± 241.0	283	152.9 ± 186.6	82	0.1851
CA	59.3 ± 141.9	310	61.7 ± 120.0	91	0.2896
GCA	56.4 ± 133.7	246	156.5 ± 974.5	80	0.0269
TCA	55.5 ± 450.8	238	61.5 ± 397.3	71	0.5001
LCA	5.2 ± 4.2	226	6.0 ± 6.1	66	0.6558
TLCA	12.4 ± 9.7	20	23.5 ± 35.7	11	0.7568
GLCA	8.7 ± 11.3	94	8.7 ± 7.4	19	0.7529
TDCA	43.5 ± 367.4	280	31.1 ± 165.6	80	0.6517
TCDC	125.5 ± 1158.3	316	106.5 ± 540.5	95	0.6051
THDCA	4.9 ±	1	±	0	
TUDCA	16.8 ± 19.4	74	27.1 ± 45.4	18	0.9216
GDCA	144.0 ± 230.6	306	173.7 ± 567.1	90	0.7717
GCDCA	277.8 ± 338.7	332	431.3 ± 1127.1	97	0.0428
GHDCA	0.8 ±	1	±	0	
GUDCA	130.1 ± 233.9	287	127.7 ± 190.6	84	0.8409

Results are expressed as mean ± SD.

図7

年齢別における血漿中の胆汁酸濃度

	< Age 50		Age 51-69		Age 70 ≧		Kruskal-Wallis	Steel-Dwas test		
	平均 (ng/ml)	数	平均 (ng/ml)	数	平均 (ng/ml)	数		<Age50 v.s. Age 51-69	<Age50 v.s. Age70 ≧	Age51-69 v.s. Age70 ≧
DCA	118.7 ± 90.6	99	154.0 ± 142.2	219	166.4 ± 259.4	87	0.098	0.0849	0.2864	0.968
CDCA	89.2 ± 124.0	91	127.3 ± 175.0	203	159.6 ± 298.1	86	0.0368	0.024	0.2292	0.9565
HDCA	9.4 ± 17.1	9	5.4 ± 3.6	11	4.3 ± 1.6	6	0.8519	0.8918	0.9105	1
UDCA	138.9 ± 198.0	86	151.2 ± 241.8	200	168.0 ± 231.9	79	0.9872	0.9893	0.9904	0.9982
CA	38.8 ± 110.6	98	55.0 ± 95.3	213	94.3 ± 218.5	90	0.0021	0.0023	0.0151	0.9844
GCA	37.0 ± 102.0	80	111.7 ± 665.5	178	52.1 ± 78.9	68	0.0057	0.0062	0.0326	0.9966
TCA	103.2 ± 777.8	77	50.6 ± 278.5	167	18.2 ± 35.2	65	0.1288	0.1487	0.2023	0.9989
LCA	4.6 ± 2.8	67	6.0 ± 5.6	153	4.9 ± 3.6	72	0.4779	0.6068	0.9941	0.5713
TLCA	8.4 ± 9.3	6	19.7 ± 25.9	22	7.0 ± 2.8	3	0.2526	0.3862	0.7949	0.4961
GLCA	8.3 ± 8.9	21	8.7 ± 12.7	65	8.9 ± 6.0	27	0.3987	0.963	0.5652	0.4078
TDCA	89.8 ± 660.8	85	29.9 ± 121.4	192	15.4 ± 25.5	83	0.7828	0.7691	0.9502	0.9455
TCDCa	251.8 ± 2059.6	99	88.4 ± 376.4	222	58.1 ± 92.5	90	0.3549	0.5566	0.3168	0.821
THDCA	±		4.9 ±	1	±					
TUDCA	12.9 ± 12.5	15	21.3 ± 29.7	55	16.7 ± 24.9	22	0.257	0.5216	0.9626	0.3158
GDCA	116.6 ± 186.9	97	172.3 ± 431.1	210	137.0 ± 167.9	89	0.1738	0.1673	0.3247	0.9999
GCDCA	241.3 ± 307.0	103	337.8 ± 767.3	232	328.0 ± 406.9	94	0.1702	0.2175	0.2168	0.9441
GHDCA	0.8 ±	1	±		±					
GUDCA	88.2 ± 93.5	92	135.5 ± 185.8	198	162.0 ± 367.7	81	0.4594	0.5072	0.4973	0.9994

Results are expressed as mean ± SI

図8

糞便中胆汁酸濃度(性差)

	女性		男性		Mann-Whitney P-value
	ng/mg	N	ng/mg	N	
CA	282.7 ± 593.7	48	300.6 ± 510.3	15	0.7715
CDCA	233.4 ± 438.7	33	200.9 ± 247.0	11	0.946
DCA	1036.5 ± 1307.9	49	1354.9 ± 3055.8	14	0.1805
LCA	328.6 ± 327.7	50	357.6 ± 542.4	14	0.485
GCA	13.7 ± 25.7	19	5.0 ± 4.9	8	0.1674
GLCA	0.2 ± 0.1	3	0.4	1	0.1797
GDCA	2.8 ± 4.2	37	1.5 ± 2.2	12	0.0227
GCDCA	7.1 ± 21.1	36	3.4 ± 3.7	12	0.4605
GHDCA		0		0	
GUDCA	7.9 ± 10.4	10	0.9 ± 0.4	2	0.0317
TCA	5.2 ± 9.6	9	9.0 ± 10.2	2	0.4795
TLCA	4.1	1		0	
TDCA	9.8 ± 13.8	6	1.4	1	0.1336
TCDCa	6.8 ± 5.1	7	9.9 ± 2.5	2	0.1432
THDCA		0		0	
TUDCA	5.0	1		0	
HDCA	5.0 ± 3.9	15	5.1 ± 4.3	5	0.9652
UDCA	150.8 ± 246.9	37	294.7 ± 540.2	12	0.8707

Results are expressed as mean ± SD.

図9

糞便中胆汁酸と年齢の関係

	Spearman	P- value	N
CA	-0.0888	0.4887	63
CDCA	-0.3287	0.0294	44
DCA	-0.2306	0.069	63
LCA	-0.2058	0.1029	64
GCA	-0.2035	0.3086	27
GLCA	-0.7379	0.2621	4
GDCA	-0.3679	0.0093	49
GCDCA	-0.0898	0.5438	48
GHDCA	0	<.0001	0
GUDCA	-0.1716	0.5938	12
TCA	-0.3326	0.3176	11
TLCA			1
TDCA	-0.4505	0.3104	7
TCDCA	0.0167	0.9659	9
THDCA	0	<.0001	0
TUDCA			1
HDCA	-0.6292	0.003	20
UDCA	-0.2313	0.1098	49

図10

糞便中短鎖脂肪酸と性差の関係

	女性		男性		Mann-Whitney U test
	平均 (mol/g)	数	平均 (mol/g)	数	p値 (Prob>ChiSq)
Formate	3.05 ± 3.01	76	3.44 ± 3.38	24	0.226
Acetate	56.02 ± 17.29	207	63.27 ± 14.99	72	0.0002
Propionate	17.25 ± 9.12	207	23.86 ± 11.66	72	<.0001
Isobutyrate	1.70 ± 1.01	207	1.95 ± 1.62	72	0.9594
Butyrate	11.95 ± 7.57	207	13.27 ± 6.82	72	0.0896
Isovalerate	1.14 ± 0.78	206	1.33 ± 1.31	72	0.8461
Valerate(Pentanoate)	1.42 ± 1.09	207	2.01 ± 1.59	71	0.0058
Hexanoate	0.27 ± 0.70	207	0.33 ± 0.58	72	0.3802
Lactate	1.17 ± 1.82	25	0.18 ± 0.26	12	0.0322
Succinate	1.76 ± 6.40	175	2.82 ± 8.69	65	0.9833

Results are expressed as mean ± SD.

図11

糞便中短鎖脂肪酸と年齢の関係

	< Age 50		Age 51-69		Age 70 ≤		Kruskal-Wallis
	平均 (mol/g)	数	平均 (mol/g)	数	平均 (mol/g)	数	p値 (Prob> ChiSq)
Formate	2.75585 ± 2.28314	31	2.99204 ± 3.37898	52	4.30174 ± 3.30977	17	0.1257
Acetate	59.18936 ± 17.1397	74	57.57219 ± 16.97827	149	57.02171 ± 16.94878	57	0.7974
Propionate	18.58277 ± 9.64237	74	19.39579 ± 10.8485	149	18.17131 ± 9.33547	57	0.8977
Isobutyrate	1.8906 ± 1.50588	74	1.6693 ± 1.02776	149	1.82214 ± 1.17751	57	0.7833
Butyrate	12.509 ± 7.81199	74	11.81624 ± 6.82712	149	13.14582 ± 8.23924	57	0.5451
Isovalerate	1.28888 ± 1.20944	74	1.10873 ± 0.79123	149	1.26494 ± 0.9293	56	0.6624
Valerate (Pentanoate)	1.85253 ± 1.50016	73	1.3915 ± 1.11139	149	1.65337 ± 1.23358	57	0.0585
Hexanoate	0.40277 ± 1.07809	74	0.22636 ± 0.40394	149	0.26548 ± 0.48062	57	0.6757
Lactate	0.68929 ± 0.94187	12	1.14778 ± 2.02234	19	0.22055 ± 0.24914	6	0.5431
Succinate	0.63045 ± 2.09465	69	2.9339 ± 9.27063	123	1.75363 ± 4.52684	49	0.8065

Results are expressed as mean ± SD.

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
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.	12;8(1)	569	2018
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.	47(2)	642-653	2018
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.	6(11)	e007677	2017
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.	8	454	2017
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