

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：33704

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01921

研究課題名(和文) 幼児期における腸内細菌叢と体格・体力・運動習慣の相互関係 4年間の縦断的調査

研究課題名(英文) Association between the gut microbiota and body composition, physical fitness, and habitual physical activity in young childhood

研究代表者

小栗 和雄 (OGURI, KAZUO)

岐阜聖徳学園大学・教育学部・教授

研究者番号：10387516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、幼児42名(男児21名、女児21名)を対象に、便を採取し、次世代シーケンサーを用いた16SrRNAにて腸内細菌の組成を解析した。また、行動体力レベルと食事・休養・運動の習慣を測定・アンケートにて調査した。肥満児と非肥満児では腸内細菌の組成が大きくことになっており、肥満児は非肥満児に比べてバクテロイデス門の細菌が少なく、ファーミキューテス門の細菌が多いことが示された。他方、腸内細菌の総数、多様性、ビフィズス菌の割合、乳酸菌の割合については肥満児と非肥満児の間に有意差は認められなかった。今後は、行動体力や運動習慣の関係を検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の小児では、肥満、痩せ、アレルギー、喘息、体力低下、運動器障害などの健康障害が長らく問題視されている。これらの発生要因として、経済や科学技術の飛躍的な発展によって小児の身体活動量や体力、免疫力が低下したことが挙げられている。ただし、小児期の生活習慣の不良がどのような機序で健康障害を引き起こすのかは不明であった。そんな中、近年、その機序の一端を担う因子として腸内細菌叢が注目され、成人だけでなく小児においても腸内細菌叢が健康障害に影響することが明らかになっている。本研究で、小児の健康状態を左右する腸内細菌叢を良好にコントロールする手法を見出すことができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, a faecal sample was collected from 42 young children (21 boys and 21 girls), and the composition of the gut microbiome was analyzed by 16S ribosomal RNA gene sequencing. In addition, the physical fitness level and diet, rest, and exercise habits were measured and surveyed by questionnaire. The composition of the gut microbiome was significantly different between obese and non-obese children, indicating that obese children have fewer bacteria in the phylum Bacteroidetes and more bacteria in the phylum Firmicutes than non-obese children. On the other hand, there were no significant differences between obese and non-obese children in terms of total number of intestinal bacteria, diversity, bifidobacteria ratio, and lactic acid bacteria ratio. In the future, we will examine the relationship between behavioral physical fitness and exercise habits.

研究分野：運動生理学、発育発達学

キーワード：腸内細菌叢 小児 運動習慣 体力

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトは母体の胎内にあるときは完全無菌の環境で過ごす、出生後に皮膚や気道、消化管などの粘膜で細菌が増殖し、成人後には1000種類、100兆個、1.5kgの細菌が集まって「腸内細菌叢」(フローラ、またはマイクロビオータ)を形成し、宿主とともに共生している。腸内細菌の分類は、門(phylum)、綱(class)、目(order)、科(family)、属(genus)に従って行われるが、自然界で検出される70門以上の細菌のうち、腸内細菌叢は、ファーミキューテス門、バクテロイデス門、アクチノバクテリア門、プロテオバクテリア門の4門に含まれる細菌が99%以上を占める。この構成を換言すると、ビフィドバクテリウム属(例:ビフィズス菌)やラクトバシラス属(例:乳酸桿菌)などの善玉菌が20%、ユウバクテリウム属やクロストリジウム属(例:ウェルシュ菌)などの悪玉菌が10%、バクテロイデス属(例:レンサ球菌)やファーミキューテス属などの日和見菌が70%を占めている。

これら腸内細菌叢の構成は、食事・運動・睡眠などの生活習慣、ストレス、加齢などによって大きく変化し、かなりの個体差が生じる。腸内細菌が宿主に影響を及ぼすのは、その存在によるものではなく、実際にはそれらが産出し、菌体外、つまり宿主の体内へ排出する物質によるものである。リポ多糖、エンドトキシン、トリメチルアミンは宿主に悪影響を及ぼし、トリメチルアミンの産生は動脈硬化に繋がる。一方、酢酸や酪酸は粘液の分泌を増加させ腸管を保護するといった良い影響を与える。こうした作用によって、腸内細菌叢が成人の癌、アレルギー、肥満、糖尿病、皮膚疾患、貧血、婦人科疾患、老化、痴呆症、自閉症、うつ病など数多くの疾患や感情と強く関与していることが明らかとなっている。例えば、腸内細菌叢と肥満の関係について、Ley(2006)は、肥満症患者や肥満モデルマウスの腸内細菌叢では、ファーミキューテス門が増加し、バクテロイデス門が減少していること、そして無菌マウスに肥満マウスの腸内細菌叢を注射すると体脂肪が47%増える一方、非肥満マウスの腸内細菌叢を注射すると27%の増加で済むこと、腸内細菌の全遺伝子数が少なく多様性が低いことを報告している。Kasai(2015)やKoliada(2017)は、BMIとファーミキューテス門、バクテロイデス門、ファーミキューテス門とバクテロイデス門の比率(以下、F/B比)が有意な相関関係にあり、肥満者は非肥満者や痩身者に比べてファーミキューテス門が増加し、バクテロイデス門が減少し、F/B比が高いことを報告している。Hartstra(2015)は、2型糖尿病・Metsを有する対象において腸内細菌叢に乳酸菌が多く、短鎖脂肪酸を算出する腸内細菌が減少し、腸内細菌叢の多様性が減っていることを報告している。またBercik(2012)は、活発なマウスの腸内細菌を臆病なマウスに移入すると、臆病なマウスがより活発になる(高い台からすぐに降りられる)ことを報告し、性格や感情は腸内細菌によって支配されていることを報告している。このように、腸内細菌叢が心身の機能に多大な影響を及ぼすことが科学的に証明され、腸内細菌叢のコントロールは、原因が不明であった疾病や不定愁訴を予防・改善する標的として期待されている。

他方、日本の小児では、肥満、痩せ、アレルギー、喘息、体力低下、運動器障害などの生活習慣病が問題視されている。これらの発生要因として、科学技術や経済が発展し、生活の利便性が高まったことによって身体活動量や免疫力が低下したことが長年にわたって指摘されてきた。しかし、小児期において生活様式の変化がどのような機序で上記の生活習慣病を引き起こすかは不明であった。そんな中、近年、その機序の一端を担う因子として腸内細菌叢の関わりを示唆する報告がなされている。Finlay(2015)は、300人以上の乳幼児を対象として生後3か月と1年の時点で便サンプルを検査し、特定の腸内細菌4種が少ない生後3かが月の乳幼児は喘息の発症リスクが高いことを報告している。またKalliomaki(2008)は、幼少時の腸内に黄色ブドウ球菌が多く、ビフィズス菌の少なかった児童は、その後、過体重なることが多かった。こうした報告から、腸内細菌叢は運動・栄養・睡眠などの生活習慣の調整因子であり、腸内細菌叢が小児における肥満、痩せ、アレルギー、喘息、体力低下などの生活習慣病に大きな役割を果たす可能性あると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景から、成人では腸内細菌叢が運動・栄養・睡眠などの生活習慣の調整因子であり、肥満などの生活習慣病に強く関与していることは明らかになっている。しかし、この関連について小児を対象に検討した先行研究はほとんど見当たらない。特に運動は、小児期における生活習慣の中核であり、文部科学省が2012年に「幼児期運動指針」を策定したことから重要性がうかがえる。こうした背景から、小児期における腸内細菌叢が運動習慣や体力とどのように関係するのか極めて興味深い。

他方、小児に関する先行研究が少ない背景には、細菌検査手法と対象者獲得の困難性が考えられる。腸内細菌叢の検査手法は、これまで培養法で行われてきたが、腸内細菌叢を形成する常在菌の約80%は培養困難菌であることから方法論的限界があった。また、数多くの小児とその保護者から研究参加や便採取への同意や協力を得ることは容易ではない。こうした背景の中、本研究では、培養困難菌を含む多種多様な腸内細菌の種類や量を解析することができる次世代シーケンサーを活用したメタゲノム解析を行った。また、幼児という低年齢の小児とその保護者から研究参加への同意を得ることに成功した。

そこで、本研究では、下記を研究の目的とした。

- ・小児の腸内細菌叢を測定し、幼児期において腸内細菌叢がどのような構成（主要 4 門）なのか、個体差があるのかを検討する。
- ・小児の腸内細菌叢が肥満・痩せ、体力の高低、身体活動量の多少とどのように関係するのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 対象者

岐阜県内の 2 つの幼稚園の年中児と年長児 99 名に対して本研究への参加を募集した結果、42 名の幼児から参加の申込がなされた。参加児とその保護者に研究の主旨と方法を説明し、直筆の署名が入った文書により研究参加への同意を得た上で以下の測定を行った。そして、全ての測定データが揃った 42 名（年齢 4.5 歳～6.5 歳、平均年齢 5.7±0.7 歳、男児 21 名、女児 21 名）を対象者とした。

(2) 肥満度の算出

身長と体重を測定し、 $(\text{体重} - \text{標準体重}) / \text{標準体重} \times 100(\%)$ から各対象者の肥満度を算出した。各対象者の標準体重は、性別・年齢別・身長別の標準体重計算式⁸⁾を用いて算出した。肥満度が -15%以下を「痩身」、-15%以上で 15%未満を「標準体型」、15%以上を「肥満」と判定した。

(3) 糞便の採取と腸内細菌叢の検査

糞便は、細菌の生命保持のため収集当日の起床後に排出された糞便を採便容器に封入させ、午前 9 時までで収集した。収集した糞便は DNA 抽出に使用するまで -4℃ で保存した。腸内細菌の DNA を抽出するために、糞便 0.2g を用いて細胞の粉碎、複数回の遠心分離と沈殿の採取を繰り返して DNA 溶液を作成した。次に、DNA 溶液に対して RNAase 処理を行い、PCR 用溶液を作成した。以上により増幅した DNA を用いて細菌 16S rRNA を標的とした定量的 RT-PCR 法による次世代シーケンサー (Inumina 社製) を用いたメタゲノム解析を行った。検出する項目は、門分類の割合、ビフィズス菌の割合、乳酸菌の割合、F/B 比であった。

(4) 体力の測定

測定項目は、握力 (筋力)、25m 走 (スピード)、立ち幅跳び (瞬発力)、ソフトボール投げ (巧緻性)、長座体前屈 (柔軟性)、反復横跳び (敏捷性)、体支持持続時間 (筋持久力) である。握力は幼児用アナログ握力計を用いて、左右の記録の平均を測定値 (kg) とする。25m 走は、光電管計測器を用いて 1/100 秒単位で測定する。立ち幅跳びは、マット上の踏切線から両脚同時踏切で前方に跳び、踏切線と着地した地点との最短距離を cm 単位で測定する。ソフトボール投げは、1 号球を遠投した時のボール落下地点までの距離を 0.5m 単位で測定する。長座体前屈は、レール付きの長座体前屈計を用い、台上に両手を置いて前屈したときの移動距離を cm 単位で測定する。反復横跳びは、1 本のラインを左右交互に 5 秒間で跳んだ回数を測定する。体支持持続時間は、30cm 間隔の机に左右の手を置いて足を床から離して身体を両腕だけで支え、体重を支えられず床に足が着くまでの時間を秒単位で測定する。

4. 研究成果

対象者の肥満度を算出した結果、肥満児 6 名 (男 3 名、女 3 名)、非肥満児 36 名 (男 18 名、女 18 名) であった。表 1 に、肥満児と非肥満児の基本属性を示した。年齢と身長には 2 群間に有意差は認められなかったが、体重と肥満度は肥満児において有意に高い値であった。

表 1. 肥満児と非肥満児における基本属性と腸内細菌の比較

項目	肥満児 (n=6)	非肥満児 (n=36)
年齢 (歳)	6.1 ± 0.4	5.8 ± 0.6
身長 (cm)	115.3 ± 4.9	111.2 ± 4.5
体重 (kg)	28.4 ± 7.2 *	18.8 ± 1.9
肥満度 (%)	35.0 ± 23.1 *	-0.7 ± 7.3
腸内細菌		
総数	127027 ± 65792	111428 ± 37412
多様性	11.2 ± 1.8	12.9 ± 2.3
ビフィズス菌 (%)	8.5 ± 7.3	6.5 ± 4.8
乳酸菌 (%)	2.9 ± 3.8	1.7 ± 1.7

*: p<0.05 (vs 非肥満児)

図 1 に、肥満児と非肥満児における腸内細菌叢の門分類の比較を示した。肥満群は非肥満群に比べてバクテロイデス門が有意に低く、ファーミキューテス門が有意に高いことが示された。

図 1 . 肥満児と非肥満児における腸内細菌叢の門分類の比較

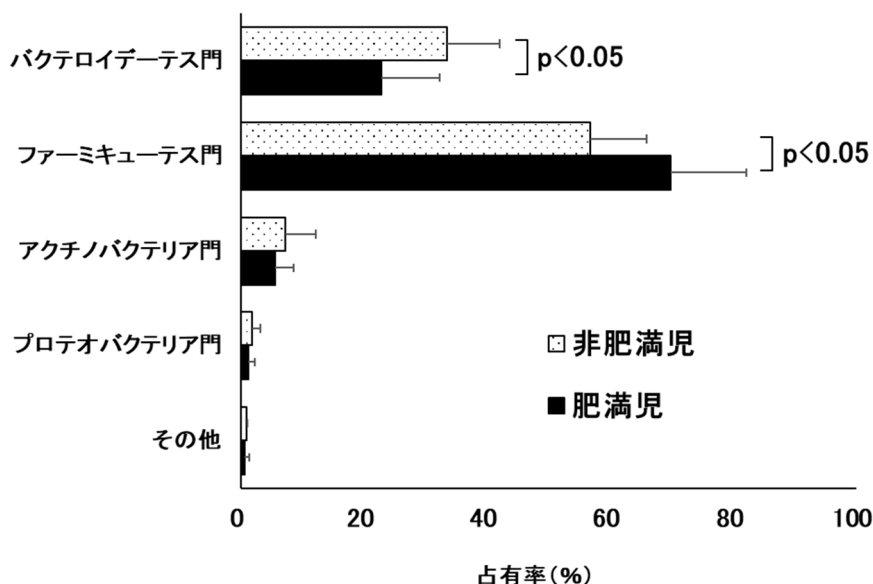
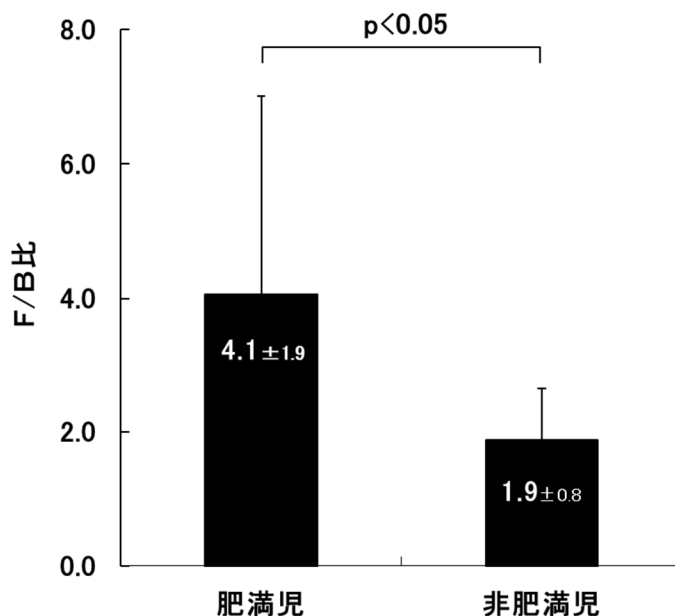


図 2 に、肥満児と非肥満児における腸内細菌叢の F/B 比の比較を示した。肥満群は非肥満群に比べて F/B 比が有意に高いことが示された。他方、腸内細菌の総数、多様性、ビフィズス菌の割合、乳酸菌の割合については肥満群と非肥満群の間に有意差は認められなかった。

図 2 . 肥満児と非肥満児における F/B 比の比較



また、対象児の中で、体力の偏差値合計が上位 25%に位置した 10 名を高体力群、同合計が下位 25%に位置した 10 名を低体力群として腸内細菌叢の特性を比較した。その結果、腸内細菌叢の門分類、F/B 比、腸内細菌の総数、多様性、ビフィズス菌の割合、乳酸菌の割合に群間差は認められなかった。

本研究では、4 歳から 6 歳の幼児を対象に腸内細菌叢を測り、肥満との関係を検討した結果、幼児期に肥満である場合、腸内細菌叢におけるファーミキューテス門が増加し、バクテロイデス門が減少し、F/B 比が高い状態にあることが示された。

本研究と同様に腸内細菌叢と肥満の関係を検討した先行研究として、原 (2018) は、6 歳から 16 歳の日本の小児を対象に肥満児 15 名 (男 11 名、女 4 名) と非肥満児 4 名 (男 2 名、女 2 名) の腸内細菌叢を比較し、肥満度とバクテロイデス門の菌数との間に $r=-0.63$ の有意な負の相関があること、肥満児のバクテロイデス門の割合が有意に低いことを報告している。Kasai (2015)

は、日本の成人を対象に BMI が 25 以上の肥満者 33 名と BMI が 20 未満の非肥満者 23 名の腸内細菌叢を比較し、非肥満者に比べて肥満者のバクテロイデス門の割合が有意に低く、F/B 比が有意に高いことを報告している。Koliada (2017) は、61 名の成人を対象に BMI と腸内細菌叢の関係を検討し、BMI とファーミキューテス門($r=0.41$)、バクテロイデス門($r=-0.43$)、F/B 比($r=0.47$)が有意な相関関係を示すことを報告した。これらの先行研究と本研究の結果は一致しており、小児や成人においてファーミキューテス門の増加とバクテロイデス門の低下が肥満と密接に関わっていることは明らかであろう。特に本研究において、生後 4~6 年しか経ていない幼児において腸内細菌叢が肥満に影響を及ぼすことが明らかとなったことは極めて興味深い。ヒトは母体の胎内にあるときは完全無菌の環境で過ごし、出生後に腸内細菌が増殖する。本研究の結果から、生後 4 年から 6 年という短い期間であっても、食事や運動、睡眠などの生活習慣によって肥満につながる腸内細菌叢が形成されることがうかがえる。

腸内細菌叢のファーミキューテス門やバクテロイデス門が肥満に関与する機序について、バクテロイデス門はファーミキューテス門と比較して、短鎖脂肪酸の産生能力が高い性質があり、産生された短鎖脂肪酸はシグナル分子としてエネルギー分配に関与している。具体的には、ファーミキューテス門は通常はエネルギーにならない食物繊維まで分解してエネルギーにする能力が高く、エネルギー摂取量を増やして肥満しやすくすることが指摘されている。

次に、肥満児の腸内細菌叢の門分類の特徴について検討した。本研究の肥満児と非肥満児のバクテロイデス門の割合は 22.8%と 33.4%、ファーミキューテス門の割合は 69.9%と 56.8%、F/B 比は 4.1 と 1.9 であった。これに対して、Kasai (2015) は、肥満者と非肥満者のバクテロイデス門の割合を 37.0%と 44.0%、ファーミキューテス門の割合を 40.8%と 37.0%、F/B 比を 1.7 と 0.9 と報告している。Koliada (2017) は、BMI が普通の成人、BMI が 25 から 29.9 の成人、BMI が 30 以上の成人について、バクテロイデス門の割合を 42.0%、37.4%、31.3%、ファーミキューテス門の割合を 36.5%、45.9%、48.1%と報告している。これらの成人のデータと比較すると、本研究で測定した幼児のバクテロイデス門の割合は低く、ファーミキューテス門の割合は高いことがうかがえる。上記の機序から、成人に比べて小児、特に肥満児はエネルギーを摂取する能力が高いものと考えられるが、推察の域を越えず、今後の重要な課題である。

今後、次世代シーケンサーを活用したメタゲノム解析はさらに進歩し続け、より早く安価に腸内細菌叢を把握することができるようになる。これによって腸内細菌叢の状態を定期的に把握することができれば、脂肪増加の危険性を知った上で食事や運動などの生活習慣を調整することができる。小児は「国の宝」であり、その健康を左右する肥満や MetS を早期に抽出したり、生活習慣を適正化することはそれらを予防・改善する上で非常に重要な方策である。今後もこれらの方策に寄与することのできる確かな知見の構築に努めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小栗和雄	4. 巻 65
2. 論文標題 小児における肥満やメタボリックシンドロームの要因を「はかる」～肥満関連遺伝子と腸内細菌からのアプローチ～	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 教育医学	6. 最初と最後の頁 122-128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazuo Oguri
2. 発表標題 Utilization of health science evidence of metabolic syndrome and gut microbiota in children
3. 学会等名 International Conference of the 66th Japanese Society of Education and Health Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K.Oguri, K.Kasuga, T.Nakano and T.Sakai
2. 発表標題 Nine-year Longitudinal Study Of Obesity In Japanese Young Children
3. 学会等名 The 64th Annual Meeting of the American College of Sports Medicine（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 編著：佐藤善人、著者：小栗和雄、他17名	4. 発行年 2018年
2. 出版社 （株）学文社	5. 総ページ数 198
3. 書名 子どもがやる気になるスポーツ指導	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	春日 晃章 (KASUGA Koshō) (30343726)	岐阜大学・教育学部・教授 (13701)	
研究分担者	中野 貴博 (NAKANO Takahiro) (50422209)	中京大学・スポーツ科学部・教授 (33908)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------