

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2009

課題番号：18200044

研究課題名（和文） アレルギー疾患と腸内細菌叢の関連：地域住民での検討

研究課題名（英文） Relation between allergic characteristics and intestinal flora

研究代表者 中路 重之（NAKAJI SHIGEYUKI）

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10192220

研究成果の概要（和文）：近年、アレルギー性疾患の増加が著しい。アレルギー性疾患との関係で注目されているのが腸内細菌叢であるが、その測定方法の困難さゆえ、いまだ十分な病因解明には至っていない。すなわち、腸内細菌の数は 10^{14} と多く、少なくとも 400 種類以上が存在し、その 60% から 80% は培養できない不明な菌であることが明らかとなってきた。つまり、我々は腸内細菌のわずか 30% の菌を培養することで全体を云々していたのである。したがって、アレルギー性疾患と腸内細菌との関連性を解明するためには腸内細菌の全体像の把握が不可欠である。

本研究では、青森県の弘前市岩木地区住民（人口 1.1 万人）を対象に腸内細菌叢の全体像とアレルギー疾患・体質の保有状況を調査し、両者の関連性（多重ロジスティック解析方法を使用）をみることで、腸内細菌叢がアレルギー性疾患に及ぼす影響を検討した。具体的には、岩木地区の 20 歳以上の全住民（男性 281 名、女性 466 名、合計 747 名）を対象として、アレルギー性疾患及びアレルギー性体質の保有状況（アトピー性皮膚炎、花粉症、食物アレルギー、気管支喘息などの呼吸器アレルギー、鼻眼アレルギー、皮膚アレルギー）と腸内細菌叢（DNA によるプロファイリング：Nagashima 法の各 ITU）の測定を行い、両者の関係を検討した。その結果、皮膚アレルギー以外は何らかの OTU と関連性を示し、なかでも鼻眼アレルギーとは 9 つの ITU（全 22ITU の 41%）との間に有意な関連性がみられた。

研究成果の概要（英文）：A remarkable increase in the number of allergic disease has been observed in recent years. At the same time, the role of intestinal flora and its association with the disease has been gaining attention, although its etiology has not been clarified due to the difficulties to measure and culture intestinal flora. Approximately 10^{14} with more than 400 types of intestinal flora are present in a human body, and 60%-80% of them have been found to be unculturable. Consequently, previously reported researches have been carried out based on the 30% of culturable intestinal flora only. Therefore, it is extremely important to understand the overall image of intestinal flora in order to clarify the associations between allergy diseases and intestinal flora.

The present study was targeted to residents at Iwaki area in Hirosaki city, Aomori prefecture in Japan to investigate the situations of allergy and intestinal flora. The association between them was analysed by using the multiple logistic regression analysis. Subjects were 747 Iwaki residents (281 males and 466 females) over 20 years old, and information on their allergic situations (presence of eczema, hay fever, alimentary allergy, respiratory allergy such as bronchial asthma, nose and eye allergy, and cutaneous allergy) as well as their intestinal flora were collected and measured (DNA profiling and ITU according to the Nagashima method). As a result, cutaneous allergy was found to be associated with some ITUs, and the significant associations were observed between nose and eye allergy and 9 ITUs which accounted for 41% of total ITUs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2007年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	24,300,000	7,290,000	31,590,000

研究分野：社会医学

科研費の分科・細目：公衆衛生学・健康科学

キーワード：腸内細菌、アレルギー、疫学調査、地域住民、弘前市岩木地区

1. 研究開始当初の背景

近年、アレルギー性疾患（花粉症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、食物アレルギーなど）の増加が著しい。

アレルギー性疾患との関係で注目されているのが腸内細菌叢（intestinal microbiota）であるが、その測定方法の困難さ故、いまだ十分な病因説明には至っていない。すなわち、腸内細菌の数は 10^{14} と多く、少なくとも 400 種類以上が存在し、その 60% から 80% は培養できない不明な菌であることが明らかとなってきた。つまり、我々は腸内細菌のわずか 30% の菌を培養することで全体を云々していたのである。

一方、我々は日本で最も平均寿命の短い青森県弘前市岩木地区を対象に平成 17 年より 10 年間のコホート事業として「岩木健康増進プロジェクト」を開始した。本事業では、約 7000 人の 20 歳以上の住民を対象に生活習慣病とそれに関連する因子の調査解析を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、青森県の弘前市岩木地区住民（人口約 1.1 万）を対象に腸内細菌叢の全体像とアレルギー疾患・体質の保有状況の全体像を調査し、両者の関連をみることで、腸内細菌叢とアレルギー疾患の関連を検討した。

具体的には、岩木地区の 20 歳以上の全住民を対象として、アレルギー疾患の保有状況及びアレルギー体質に関する調査（アンケート調査と好酸球数等の血液検査）と腸内細菌叢（DNA によるプロファイリング）の測定を行い、両者の関係を検討した。

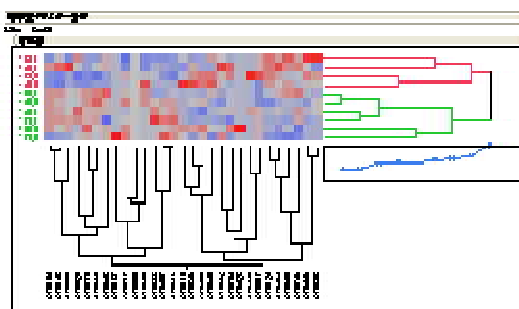
3. 研究の方法

(1) 測定方法

採集した便サンプルを用い、ターミナル

RFLP 解析を応用した Nagashima 法（文献 1,2 参照）で腸内菌叢を分析した。本解析法は、末端蛍光標識したプライマーセットで鋳型 DNA を PCR 増幅し、制限酵素による消化後、フラグメント解析を行い、塩基配列の違いから制限酵素切断部位が異なることを利用し、検出ピークの強度、位置、数により評価・比較する断片多型性解析である。

従来のターミナル RFLP 解析では得られるパターンが複雑であるが、Nagashima 法ではほぼ同じサイズのフラグメント長のもを "OTU" 化し、これがヒト腸内常在菌のすべてではないものの各系統分類群におおまかな相対比として表現が可能としているのが特徴である。



(2) 対象者

解析対象者は 747 名（男性 281 名、女性 466 名）であった。内訳は女性が男性より多く、20, 30 代の若年層が少なかった。

(3) 解析方法

各クラスターとアレルギー疾患の保有状況の関係を多重ロジスティック解析を用いて検討した。なお $P < 0.05$ を以って有意とした。

4. 研究成果

(1) OTU: 表 1 のような OTU に分類された。ただし、各 OTU に含まれる細菌に関する情報の詳細は十分に明らかではない。

表 1 OTU 分類

OTU106	Clostridium subcluster XIVa
OTU110	Others
OTU124	Bifidobacterium
OTU137	Prevotella
OTU168	Clostridium cluster IV
OTU317	Prevotella
OTU332	Lactobacillales
OTU338	Clostridium cluster XI
OTU366	Bacteroides
OTU369	Clostridium cluster IV
OTU423	Clostridium cluster XVIII
OTU443	Others
OTU469	Bacteroides
OTU494	Clostridium subcluster XIVa
OTU505	Clostridium subcluster XIVa
OTU517	Clostridium subcluster XIVa
OTU520	Lactobacillales
OTU550	Others
OTU650	Clostridium cluster XVII, XVIII
OTU657	Lactobacillales
OTU749	Clostridium cluster IV
OTU754	Clostridium subcluster XIVa
OTU770	Others
OTU853	Bacteroides
OTU919	Clostridium cluster XI
OTU940	Others
OTU955	Clostridium subcluster XIVa
OTU968	Others
OTU990	Clostridium subcluster XIVa

(2) 年代別分布

年代と性別で階層型クラスタリングを行ったのが図 1 である。男女とも 40 歳代と 50 歳を境に 2 つのグループに分かれた。また各 OTU 間も一定の関連性を有した。すなわち、年齢によって腸内細菌叢が一定の変動を示すことが明らかになった。このことはいわゆる「腸年齢」の考えかたにもつながるものである。

図 1 クラスタ分析による腸内細菌 (各 ITU) と年齢との関係

(3) 各病態との関係

皮膚アレルギー以外は何らかの OTU と関連性を示し、なかでも鼻眼アレルギーとは 9 つの ITU との間に有意な関連性がみられた (表 2)。

表 2 各種アレルギーと腸内細菌 (ITU) の関連 (多重ロジスティック解析)

	アトピー	花粉症	食物アレルギー	呼吸器アレルギー	鼻眼アレルギー	皮膚アレルギー
全体						
110						
124						
137						
168						
332						
338						
366						
369						
423						
469						
494						
505						
520						
650						
657						
749						
754						
770						
919						
940						
955						
968						

岩木健康増進プロジェクトでは多くの健康関連項目の調査をしており、各 OTU との関連が明らかとなり、さらには OTU の分析が進むことで、腸内菌叢の役割が明らかにされていくもの (ブラックボックスからの脱却) と期待される。

文献

1. Nagashima K et al.: Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial Populations in Human Feces, Appl. Environ. Microbiol., 69: 1251-1262 (2003).
2. Nagashima K et al.: Phylogenetic analysis of 16s ribosomal RNA gene sequences from human fecal microbiota and improved utility of terminal restriction fragment length polymorphism profiling, Biosci. Microflora, 25: 99-107 (2006).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Shimaya S, Shimoyama T, Fukuda S, Matsuzaka M, Takahashi I, Umeda T, Chinda D, Saito D, Sakamoto J, Nagura T,

Danjo K, Nakaji S. The recovery rate at the human terminal ileum of an orally administered non-digestive oligosaccharide (raffinose). *Int J Food Sci Nutr*.2009;60:344-351. 査有

Shimoyama T, Oyama T, Matsuzaka M, Danjo K, Nakaji S, Fukuda S. Comparison of a stool antigen test and serology for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in mass survey. *Helicobacter*. 2009;14(2):87-90. 査有

Matsuzaka M, Fukuda S, Yamai K, Tsuya R, Fukuoka Y, Takahashi I, Yaegaki M, Shimoyama T, Sakamoto J, Umeda T, Nakaji S. Are individuals with lower neutrophil oxidative burst activity more prone to Helicobacter pylori infection?. *Luminescence*. 2008;23(3):132-8. 査有

Kato M, Ishige A, Anjiki N, Yamamoto M, Irie Y, Taniyama M, Kibe R, Oka J, Benno Y, Watanabe K. Effect of herbal medicine Juzentaihoto on hepatic and intestinal heat shock gene expression requires intestinal microflora in mouse. *World J Gastroenterol*. 2007;28;13(16):2289-97. 査有

〔学会発表〕(計9件)

高橋一平, 梅田孝, 檀上和真, 松坂方士, 井上亮, 山居聖典, 中路重之. 比較的低頻度の健康実践教室の参加が生活習慣、各種健康指標に及ぼす効果について『岩木健康増進プロジェクト』での試み. 第64回日本体力医学会大会, 2009年9月18日, 新潟市.

Matsuzaka M, Danjo K, Yamai K, Tsuya R, Inoue R, Iwane S, Kurauchi S, Takahashi I, Shimoyama T, Sakamoto J, Fukuda S, Umeda T, Nakaji S. No association between green tea consumption and chronic atrophic gastritis: The Iwaki health promotion study. 16th United European Gastroenterology Week, Oct 22, 2008 Austria Center Vienna Vienna, Austria

Danjo K, Matsuzaka M, Yamai K, Iwane K, Tsuya R, Inoue R, Yano T, Kumagai T, Takahashi I, Umeda T, Nakaji S. The relationship between irritable bowel syndrome and depression among the general population in Japan. 16th United European Gastroenterology Week, Oct 22, 2008 Austria Center Vienna Vienna, Austria

Yamai K, T Umeda T, Shimoyama T, Sakamoto, Fukuda S, Inoue R, Tsuya R, Iwane K, Ito H, Matsuzaka M, Takahashi I, Danjo K, Nakaji S. The relationship

between breath hydrogen and functional gastrointestinal disorders in the Japanese population (P1382). 16th United European Gastroenterology Week, Oct 22, 2008 Austria Center Vienna Vienna, Austria

Yamai K, Umeda T, Inoue R, Tsuya R, Iwane K, Chisyaki T, Matsuzaka M, Takahashi I, Danjo K, Nakaji S. The prevalence of irritable bowel syndrome among the Japanese general population. 16th United European Gastroenterology Week, Oct 22, 2008 Austria Center Vienna Vienna, Austria

Yamai K, Umeda T, Inoue R, Tsuya R, Iwane K, Sumikawa K, Shimoyama T, Sakamoto J, Fukuda S, Matsuzaka M, Takahashi I, Danjo K, Nakaji S. The relationship between Helicobacter pylori infection and arterial stiffness in the Japanese general population. *Helicobacter pylori*: 16th United European Gastroenterology Week, Oct 20, 2008, Austria Center Vienna, Vienna, Austria

Matsuzaka M, Danjo K, Yamai K, Tsuya R, Inoue R, Iwane K, Koga T, Takahashi I, Shimoyama T, Sakamoto J, Fukuda S, Umeda T, Nakaji S. Are individuals with lower neutrophil oxidative burst activity more prone to Helicobacter pylori infection?. 16th United European Gastroenterology Week, Oct 20, 2008 Austria Center Vienna Vienna, Austria

Matsuzaka M, Danjo K, Yamai K, Tsuya R, Inoue R, Iwane K, Tsubakihara T, Takahashi I, Shimoyama T, Sakamoto J, Fukuda S, Umeda T, Nakaji S. The positive association between chronic atrophic gastritis and serum opsonic activity of peripheral blood neutrophils. 16th United European Gastroenterology, Oct 20, 2008 Austria Center Vienna Vienna, Austria

中路重之. 青森県の特定地域住民を対象とした健康診断. 第2回日本フローラテック研究会特別講演, 2008年2月27日, 和光市.

〔図書〕(計1件)

中路重之他: 食物繊維: 基礎と応用. 日本食物繊維学会監修/日本食物繊維学会編集委員会編集, 第一出版, 2008, 282頁

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：特許第 号

出願年月日： 年 月 日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者

中路 重之

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10192220

(2)研究分担者

梅田 孝

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50311535

高橋 一平

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70400132

福田 真作

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60261450

下山 克

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50312492

(3)連携研究者

辨野 義己

理化学研究所・知的財産戦略センター特別招

聘研究員

研究者番号：40087599

松崎 靖司

東京医科大学・霞ヶ浦病院・教授

研究者番号：50209532