

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670292

研究課題名(和文)腸内細菌測定による「腸年齢」の推定

研究課題名(英文) Estimation of the 'ntestinal' age by microbiota analysis

研究代表者

中路 重之(Nakaji, Shigeyuki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10192220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：成人を対象として、腸内常在菌における各菌群の比率の加齢変化につき疫学的に調査した。加齢に伴いLactobacillales及びPrevotellaの増加、Bifidobacterium及びClostridiumの減少が顕著であった。男女とも50～60歳代で、Lactobacillalesの比率は増加し、Clostridiumの比率は低下した。一方、女性のみでBifidobacteriumの比率は60歳以降で有意に低下した。Prevotellaの比率は50～70歳代に増加する傾向がみられた。すなわち、加齢に伴う腸内常在菌の変化は男女ともに60歳前後で生じやすいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The alterations of gut microbiota by the advance in aging on the residents of Hirosaki, Aomori were investigated by the large-scale survey (about 1,000 adults in Iwaki town in Aomori prefecture). The aging introduced a significant increasing numbers of Lactobacillales and Prevotella and decreasing numbers of bifidobacteria and clostridia. Then, the increasing number of lactobacilli and reduction of clostridia from 50 years old to 60 years old are revealed. A proportion of bifidobacteria to all gut microbiota was significantly indicated in more than 60 years old on the only female. The isolation of Prevotella was increased from 50 to 70 years old. These results in the present study suggested that the gut microbiota on male and female was varied thereabout 60 years olds.

研究分野：社会医学

キーワード：腸内細菌 腸年齢 推定式 Clostridium Bifidobacterium Lactobacillales Prevotella 一般住民

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌叢が健康や各種疾患の予防や治療において重要である可能性が指摘されている。すなわち、Lactobacillales 属はコレステロールの吸収を抑制する作用や、高血圧の抑制作用が報告されており、Bifidobacterium 属に関しては、その摂取によりアレルギーの予防効果やアトピー性皮膚炎の改善に関与することが明らかになってきている。また、Clostridium 属や Bacteroides 属は大腸がんの発生に関与する可能性が指摘されている。

しかし、腸内細菌叢の構成菌は加齢により変化する。すなわち、先行研究のすべてで加齢に伴い、Lactobacillales 属は増加することが報告されている。Bifidobacterium 属については変化が認められなかったとする報告が2例あるものの、近年の報告では減少することがほぼ一致した見解として報告されている。しかし、Clostridium 属については増加を示す報告が5例、減少を示す報告が4例と一定の見解を得るに至っていない。また、Bacteroides 属についても増加を示す報告が4例、減少を示す報告が5例、変化はみられないとする報告が1例あり、こちらも一定の見解が得られていない。加えて、腸内細菌叢の加齢変化は、構成菌の増減だけでなく、便中の総菌量についても減少する可能性が推測されている。

つまり、加齢に伴い腸内細菌叢は菌の構成比率だけでなく、その量も変化する可能性が考えられる。したがって、腸内細菌叢の加齢変化を正確にとらえるためには、同定できる構成菌だけの量の評価では不十分である。すなわち、糞便中の細菌叢全体の量における個々の構成菌の量の相対評価が必要と考えられるが、実際にそのような方法で評価した研究はない。

これまでの腸内細菌叢の評価の困難さは、その測定法にある。従来、腸内細菌叢を評価するには培養法を用いていた。しかし、腸内細菌の数は糞便 1g あたり 10¹⁴ 個と非常に多く、少なくとも 500 種類以上が存在することが知られており、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されている。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評価していた。また、腸内細菌叢は非常に個体差が大きいため、その研究については多検体による疫学研究が望ましいが、培養法は多検体調査には適さない。

しかし、2001 年になって、腸内細菌叢の評価に分子生物学的手法の一つである T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法が用いられるようになった。Nagashima らは T-RFLP 解析と 16SrDNA クローンライブラリー法を組み合わせた T-RFLP 解析 (Nagashima 法) を用いて細菌の種類を推定する方法を開発した。これによ

ってより多くの検体を短時間で処理できるようになり、未知の微生物を含めた菌群の科～属レベルで腸内細菌叢全体の構成比が評価可能になった。しかし、この方法を用いて腸内細菌叢の加齢変化を調査した研究はない。また、これまでの研究の対象者数は 100 人以下がほとんどであり、さらに肥満やライフスタイルまで考慮した研究はみられない。

2. 研究の目的

30 歳以上の一般住民 933 名を対象に年齢と腸内細菌叢の関係を疫学的に調査・検討した。腸内細菌叢の評価は、糞便をサンプルとして T-RFLP 解析 (Nagashima 法) を用いて、腸内細菌叢全体の各菌の OTU 割合を測定した。上記解析の際、肥満、喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣で補正を行った。

3. 研究の方法

対象

対象は 2006 年度の岩木健康増進プロジェクト、プロジェクト健診に参加した 30 歳以上の者 933 名である。このプロジェクトは青森県弘前市郊外にある岩木地区住人の希望者を対象とし生活習慣病予防と健康の維持・増進、寿命の延長を目指して企画されたものである。

調査項目に欠損項目があるもの及び下剤の使用、既往歴に消化器悪性疾患のあるものを除いた 798 名 (男性 292 名、女性 506 名) を解析対象とした。

被験者には検査の目的と方法を説明し、あらかじめ文書で同意を得た。本調査は弘前大学医学部倫理委員会の承認を得た。

生活習慣と身体計測

対象者には事前に自己記入式の質問用紙を配布し、プロジェクト健診当日に個人面接を行い、回答の確認後に回収した。調査項目は、性別、年齢、現病歴と既往歴、薬剤服用の有無であった。生活習慣は、喫煙習慣、飲酒習慣および運動習慣について、それぞれの有無を調査した。

腸内細菌解析

自己式アンケートの配布に併せて、便検体の回収容器として採便キットを配布し、プロジェクト健診当日にキットを回収し、冷凍保存した。健診終了後に静岡県静岡市のテクノスルガ (株) に凍結移送し、T-RFLP 解析 (Nagashima 法) にて分析した。

T-RFLP 解析 (Nagashima 法) は北海道立食品加工研究センターおよび株式会社テクノスルガ (旧: 株式会社 NCIMB Japan) との共同研究により独自開発された T-RFLP 解析の解釈法である。この方法では腸内細菌の各菌種を OTU (Operational Taxonomic Units) で表現する。OTU は解析において切断された細菌の DNA

断片の断片長が近似した集団であり腸内細菌の各系統分類群の相対比を表すことができる。なお、本研究ではこれによって得られた各 OUT に対して推定される菌によって解析を行った。

T-RFLP 法

・ DNA 抽出

専用の容器を用いて糞便サンプルを採取し、新鮮なうちにグアニジウム溶液 (4M guanidium thiocyanate, 100mM Tris-HCl [pH9.0], 40mM EDTA [pH8.0]) に保存した。糞便を攪拌して懸濁したのち、ビーズチューブ (beads tube) に移し、細胞破碎装置 (FastPrep) にて振とうした。自動核酸抽出装置にて DNA を抽出した。

・ PCR

蛍光標識した 516f と、1510r のユニバーサルプライマーセットを用いた。DNA ポリメラーゼは、HotStarTaq (QIAGEN, Tokyo) を用いた。滅菌水 17.4ul、10xPCR buffer 2.5ul、dNTPs 2.5ul、25mM MgCl₂ 1.5ul、25mM labeled 516f・1510r プライマー 0.2ul、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2ul を混合し反応液を作成した。反応液 24ul と DNA 抽出液 1ul を加え、thermal cycler にて以下のサイクルで PCR を行った。温度とサイクル数は 95 15 分 (preheating) 95 30 秒 (denaturation)・50 30 秒 (annealing)・72 2 分 (extension) 30 サイクル、72 10 分 (terminal extension) とした。得られた PCR 反応物 2ul を 2.0% アガロースゲルで電気泳動し、バンドを確認した。GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit にて PCR 産物の精製を行った。GFX カラムを Collection Tube の上に置き、DNA 溶液に Capture Buffer 500ul を加え 13000rpm で 30 秒遠心した。Collection Tube の溶出液を捨て、500ul の Wash Buffer を加え、13000rpm で 30 秒間遠心した。カラムを 1.5ml のチューブに移し 55ul の T10E0.1 suspension buffer を加え、1 分間室温に放置した。13000rpm で 1 分間遠心し、溶出液を回収した。BsiI (5'-CCN(NNN)NNGG-3') 1ul、NEB3 Buffer (NEW ENGLAND BioLabs) 1ul、PCR 産物 5ul を混合し、サーマルサイクラーを用いて 55 で 3 時間反応させ、氷冷した。

・ T-RFLP 解析

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer および GeneScan ソフトウェアを用いてフラグメントの解析を行った。HiDi ホルムアミド 12ul、MapMarker X-Rhodamine Labeled 50-1000bp サイズスタンダード 0.2ul を混合し、制限酵素反応液を 1ul ずつ添加した。95 で 2 分間加熱し氷冷する。injection time は 30 秒、collection time は 40 分とした。泳動終了後、GeneScan にて蛍光強度を測定した。

・ OTU 化

塩基長の近いフラグメント同士をグループ化し、Operational taxonomic units (OTU) とした。OTU 毎に蛍光強度がピークとして観

察されるので、総ピーク面積における各ピーク面積から相対的な細菌量を測定した。

統計解析

解析は、対象を男女別に分け、各菌の比率と年齢の相関関係を重回帰分析により評価した。各菌は測定した OTU により同定された。さらに、年齢により対象を 30 歳以上 40 歳未満、40 歳以上 50 歳未満、50 歳以上 60 歳未満、60 歳以上 70 歳未満、70 歳以上の 5 群に分けて、年齢群ごとの菌の比率を共分散分析法により比較した。共分散分析後の多重比較には、bonferroni 法を用いた。上記の統計解析では BMI、喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣を補正項目とした。

以上のデータの入力と解析には SPSS 21.0J for windows を用い、有意水準を 0.05 未満と判断した。

4 . 研究成果

対象者の概要

対象者の平均年齢は男性 59.2±12.7 歳、女性 59.23±11.6 歳であり有意差はみられなかった。BMI は男性 23.8±3.0、女性 23.2±2.9 であり有意に男性で高かった (p<0.01)、喫煙習慣、飲酒習慣のある割合は女性に比べて有意に男性で高かった (p<0.01)、運動習慣のある割合は男女間で有意差はみられなかった。

各菌群の加齢による変化

各菌群に対する年齢による変化について回帰分析を行った結果、男女とも、Clostridium 属 (男女とも p<0.01)、Bifidobacterium 属 (男性 p<0.05、女性 p<0.01) については減少傾向が、Prevotella 属 (男女とも p<0.01)、Lactobacillales 属 (男女とも p<0.01) については増加傾向が有意に認められた。

各菌群における年齢群ごとの比較

男性では、Clostridium 属において、30 歳代 - 70 歳代、40 歳代 - 70 歳代、50 歳代 - 70 歳代で 70 歳代に減少の有意傾向が認められ (p<0.10) Lactobacillales 属において、40 歳代 - 60 歳代では 60 歳代に、40 歳代 - 70 歳代では 70 歳代に増加の有意傾向が (p<0.10)、50 歳代 - 60 歳代では 60 歳代に (p<0.01)、50 歳代 - 70 歳代では 70 歳代に (p<0.01) 有意な増加が認められた。また、女性では、Clostridium 属においては、30 歳代 - 70 歳代、40 歳代 - 70 歳代、50 歳代 - 60 歳代、50 歳代 - 70 歳代で 60 歳代および 70 歳代に有意な減少が認められ (p<0.01) Bifidobacterium 属においては、30 歳代 - 60 歳代、30 歳代 - 70 歳代で 60 歳代および 70 歳代に減少の有意傾向が認められ (p<0.10) Lactobacillales 属においては、30 歳代 - 70 歳代 (p<0.01) 40 歳代 - 60 歳代 (p<0.05) 40 歳代 - 70 歳代 (p<0.01) 50 歳代 - 60 歳代 (p<0.01) 50 歳代 - 70 歳代 (p<0.01) で 60 歳代および 70

歳代に有意な増加が認められた。さらに Prevotella 属においては、30 歳代 - 70 歳代、40 歳代 - 70 歳代では 70 歳代に増加の有意傾向が ($p < 0.10$)、50 歳代 - 70 歳代 ($p < 0.05$) で 70 歳代に有意な増加が認められた。

本論文は、一般成人を対象として、腸内細菌叢における各菌群の比率の加齢変化について疫学的に調査した初めての研究である。先行研究は、加齢に伴う増減変化を高年齢と若年者で比較したものがほとんどであり、本研究のように加齢による増減傾向の評価や年齢群間の比較を大規模に行ったものはない。近年、加齢による Clostridium 属の増加が大腸がんのリスクを上昇させ、Bifidobacterium 属の増加が慢性炎症を亢進させている可能性が指摘されており、この分野の早期の解明が求められている。

Lactobacillales 属については、先行研究のすべてで加齢に伴って増加する傾向が指摘されており、本調査結果においても男女ともに増加する傾向がみられた。また年代間の変化をみると、男女とも、Lactobacillales 属は 60 歳未満では差がないが、その後増加する傾向がみられた。

Bifidobacterium 属については、加齢による変化はないと報告している論文が 2 本あるが、抗生剤や消化器疾患の影響が除外されていない。上記以外の論文では、抗生剤や消化器疾患の影響を除外しても、Bifidobacterium 属が加齢に伴って減少することが示されている。本結果でも Bifidobacterium 属は男女ともに加齢に伴って減少する傾向がみられた。また、年代間の変化をみると、Bifidobacterium 属は 60 歳未満では差がないが、女性でのみその後低下する傾向がみられた。

Clostridium 属については、先行研究において加齢に伴って増加を示す報告と減少を示す報告があり、一定の見解が得られていない。本調査においては、加齢に伴って減少する傾向がみられた。このように結果が一致しない要因としては、対象年齢の幅の違いが考えられた。すなわち、本研究では 30 歳から最高齢で 83 歳までを対象にしているが、先行研究のほとんどが 60 歳以上で Clostridium 属と加齢の関係を調査しており、N 数も少ない。加えて、本研究においても男女ともに、年齢と負の相関関係を示したが、年代間の変化をみると、50 歳代と 60 歳代の間で低下を示したが、60 歳代と 70 歳以上では有意差はみられなかった。

Bacteroides 属については、先行研究において加齢とともに増加を示す報告、減少を示す報告、変化を示さないとする報告があり、一定の見解が得られていない。本調査においては、男女ともに加齢に伴う変化はみられなかった。

本調査において Prevotella 属については、男女ともに加齢に伴って増加する傾向がみられた。現在、加齢と腸内の Prevotella 属

の関係については明らかにされていない。しかし、口腔における Prevotella 属については、若い時期に比べて、加齢により出現率が増えることが報告されている。したがって、ヒトの腸内の Prevotella 属も加齢に伴って増加する可能性が推測された。また、年代間の変化をみると、Prevotella 属は 60 歳未満では差がないが、女性でのみその後増加する傾向がみられた。

本研究では年齢と各菌群の相関関係を示すのみならず、各菌群の比率の年代間の変化を検討した。その結果、各菌群の加齢による変化は、全て 30 歳代から 50 歳代までは有意差がみられず、その後増減を示した。すなわち、加齢に伴う腸内細菌叢の変化は男女ともに 60 歳後に生じやすいと考えられた。腸内細菌叢は長期間の食生活によって形成されるため、腸内細菌叢の加齢変化に伴う疾病予防のためには、この時期に向けた若い時期からの食生活の管理が重要である可能性が推測された。

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 12 件)

甲斐知彦, 高橋一平, 沢田かほり, 大久保礼由, 久田貴義, 辨野義己, 中路重之. 弘前市の一般住民における加齢が腸内常在菌に及ぼす影響. アンチ・エイジング医学 2014; 10:95-103.

Hayashida N, Imaizumi M, Shimura H, Furuya F, Okubo N, Asari Y, Nigawara T, Midorikawa S, Kotani K, Nakaji S, Ohtsuru A, Akamizu T, Kitaoka M, Suzuki S, Taniguchi N, Yamashita S, Takamura N. Thyroid ultrasound findings in a follow-up survey of children from three Japanese prefectures: Aomori, Yamanashi, and Nagasaki. Sci Rep. 2015;5:9046.

Murakami M, Yoshikawa T, Nakamura T, Ohba T, Matsuzaki Y, Sawamura D, Kuwasako K, Yanagisawa T, Ono K, Nakaji S, Yanai K. Involvement of the histamine H1 receptor in the regulation of sympathetic nerve activity. Biochem Biophys Res Commun. 2015;458(3):584-9.

Shimoyama T, Chinda D, Matsuzaka M, Takahashi I, Nakaji S, Fukuda S. Decrease of serum level of gastrin in healthy Japanese adults by the

change of Helicobacter pylori infection. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29 Suppl 4:25-8.

Sugawara N, Yasui-Furukori N, Takahashi I, Matsuzaka M, Nakaji S. Age and gender differences in the factor structure of the Center for Epidemiological Studies Depression Scale among Japanese working individuals.

Compr Psychiatry. 2015;56:272-8.

狭戸尾 真梨子, 高橋 一平, 大久保 礼由, 関根 陽平, 飯塚 浩史, 徳田 糸代, 有賀 玲子, 長谷部 達也, 渡邊 清誉, 松本 秀彦, 中路 重之. 一般住民におけるメタボリックシンドロームと残存歯数の関係. 体力・栄養・免疫学雑誌 2014;24:55-61.

有賀 玲子, 高橋 一平, 鈴川 一宏, 関根 陽平, 和田 尚子, 高橋 和幸, 山田 睦雄, 田中 里奈, 松坂 方土, 梅田 孝, 中路 重之. HbA1c と動脈の硬さの関連に関する研究 岩木健康増進プロジェクトでの横断研究と追跡研究. 体力・栄養・免疫学雑誌 2014;24: 35-43.

谷川 涼子, 高橋 一平, 大久保 礼由, 小野 真実, 奥村 俊樹, 石橋 剛士, 竹石 洋介, 中山 真樹, 矢野 智彦, 熊坂 義裕, 中路 重之. 一般住民における呼気水素と好中球機能の関係 (RELATIONSHIP BETWEEN EXHALED HYDROGEN AND HUMAN NEUTROPHIL FUNCTION IN THE JAPANESE GENERAL POPULATION)(英語). 弘前医学 2014;65:138-46.

中路 重之, 佐藤 諭, 秋元 直樹. 感染症とがん. 臨床腫瘍ブラクティス 2014;10:460-4.

和田 簡一郎, 小野 睦, 田中 利弘, 板橋 泰斗, 熊谷 玄太郎, 岩崎 宏貴, 佐々木 英嗣, 横山 徹, 沼沢 拓也, 陳 俊輔, 石橋 恭之, 高橋 一平, 梅田 孝, 中路 重之. 検診からわかる整形外科疾患 脊椎疾患 頸髄症健診への取り組みと縦断的な腰部脊柱管狭窄症健診から得られた知見を中心に. 臨床整形外科 2014;49:867-71.

珍田 大輔, 下山 克, 松坂 方土, 速水 史郎, 秋元 直樹, 佐藤 諭, 中路 重之, 福田 眞作. Helicobacter pylori 感染が中高年男性の骨密度へ及ぼす影響. 消化と吸収 2014;36:356-60.

渡邊 清誉, 高橋 一平, 沢田 かほり, 大久保 礼由, 松坂 方土, 秋元 直樹,

梅田 孝, 中路 重之, 久田 貴由, 辨野 義己. 一般住民の腸内細菌叢における乳酸菌と肥満の関連について (POSSIBLE RELATIONSHIP BETWEEN PERCENTAGE OF BODY FAT AND LACTOBACILLALES IN GUT NIICROBIOTA: RESULTS FROM A COMMUNITY-BASED STUDY)(英語). 弘前医学 2014;65:12-20.

〔学会発表〕(計2件)

甲斐知彦, 沢田かほり, 大久保礼由, 徳田糸代, 徳安秀正, 山本博, 小川武志, 高橋一平, 中路重之. 弘前市の一般住民を対象とした腸内細菌の加齢変化に関する評価. 第24回体力・栄養・免疫学会大会. 20140830. 同志社大学.

秋元直樹, 赤池あらた, 金子美由紀, 伊東良, 溝口絵里加, 矢野智彦, 金野潤, 椿原徹也, 竹石洋介, 徳田糸代, 田中里奈, 高橋一平, 中路重之. 機能性腸障害罹患患者における腸内細菌叢の検討. 第24回体力・栄養・免疫学会大会. 20140830. 同志社大学.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 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

(2)研究分担者

沢田かほり (SAWADA, Kaori)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50624889

高橋一平 (TAKAHASHI, Ippei)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70400132

松坂方士 (MATSUZAKA, Masashi)
弘前大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70431434

佐藤諭 (SATO, Satoshi)
弘前大学・大学院医学研究科・助手
研究者番号：00725319