

令和元年6月23日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15820

研究課題名(和文)高齢者の自然免疫系(好中球機能)を高める腸内細菌叢の探索

研究課題名(英文) Exploring Intestinal bacteria flora that enhance innate immune system (Neutrophil function) for the elderly.

研究代表者

沢田 かほり (Sawada, Kaori)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：50624889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本対象に検出された腸内細菌320属のうち、90%以上の対象者が保有していたのは18属であり、その内容に60歳未満と60歳以上で違いはみられなかった。60歳未満では18属うち2属の占有率(一人の対象者から検出された細菌属のリード数の総和に対する個々の細菌属のリード数の比)と好中球機能に関連がみられたが、60歳以上では関連がみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで免疫機能と腸内細菌の関連について細菌叢に着目した研究はほとんど行われていなかったが、本結果より、「9割以上の方が共通に保有している細菌属の構成に年代による違いはないが、その占有率と好中球機能との関連が60歳未満に比べ60歳以上では薄くなることから、「加齢に伴う免疫老化に腸内細菌叢が影響している可能性」が示唆された。一方で、対象の1割しか保有していない細菌属の方が圧倒的に多いことから、今後は構成菌の比率だけでなく、その機能性にも着目した解析を行っていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Of the 320 genera detected in this subject, more than 90% of the subjects were owned by 18 genera, there was no difference between under 60 and over 60 years old. Under 60 years of age, the occupancy rate (ratio of the number of leads of individual bacteria to the total number of bacteria detected from one subject) of 2 of the 18 genera was related to neutrophil function. However, no association was found over the age of 60.

研究分野：公衆衛生

キーワード：腸内細菌叢 好中球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う“免疫老化”により、高齢者では易感染性となることが指摘されている。

ヒトの腸管には約 1,000 種類、100~1,000 兆個の常在細菌（病原性を示さない細菌）が生息していると考えられており、これら腸内細菌叢の恒常性の破綻が、感染症や肥満、炎症性腸疾患、2 型糖尿病など、さまざまな疾患と関連することが報告されている。

近年、次世代シーケンサーの導入により、培養を介さずに細菌叢全体から直接抽出した細菌の集合体ゲノム（メタゲノム）を解析することが従来よりも簡便かつ精密になった。これにより、腸内細菌叢と疾患や健康の関連についての研究が活発に行われているが、免疫との関係については前述のようにマウスを用いた報告がほとんどであり、細菌叢バランスとの関連をみた研究は少ない。

申請者らは、2005 年より弘前市岩木地区（旧岩木町）の住民約 1,000 名に対して「岩木健康増進プロジェクト・プロジェクト健診」をこれまで 12 年間実施し、生化学的データから社会学的データまで網羅的な 600 項目に及ぶ健康人ビッグデータを集積している。また、申請者らはスポーツ医学の分野において、アスリートの易感染性予防のための一指標として好中球機能を測定し、身体コンディションと好中球機能の関係についての知見を蓄積してきた。好中球は人体に侵入した細菌に対していち早く働く、自然免疫系の主要な免疫細胞であり、細菌を貪食し、活性酸素種を産生するなどして異物排除に働く。高齢者では獲得免疫系の数が相対的に少なくなることから、自然免疫系を担う好中球機能の維持は易感染性予防に重要である。

2. 研究の目的

好中球機能と腸内細菌叢バランスの関係性を明らかにし、さらに、600 項目の健康ビッグデータと合わせて詳細に解析することで、好中球機能を活性化させる腸内細菌叢にはどのような背景（生活習慣、社会関連データなど）が影響しているのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

岩木健康増進プロジェクトにおいて過去 12 年間に蓄積された 600 項目に及ぶ膨大な健康ビッグデータを基盤にして、2017・2018 年の 2 年間で好中球機能を測定し、腸内細菌叢と好中球機能及び健康関連項目との関連を網羅的に検討し、腸内細菌の機能的役割と好中球機能を高める腸内細菌バランスを明らかにする（テーマ ）。これに基づき、好中球機能を高める生活習慣および社会性のモデルの確立をめざす（テーマ ）。

好中球機能は、全血を用い、オプソニン化ザイモザンにより刺激した際の活性酸素種（Reactive Oxygen Species; 略称 ROS）産生能および貪食能を測定した。好中球機能の評価は、フローサイトメーターにより好中球 10,000 個を計数した際の蛍光検出細胞数 (Events)、平均蛍光強度 (Mean)、さらに蛍光検出細胞数と平均蛍光強度を乗じた累積蛍光強度 (Cumulative Fluorescence Intensity; 略称 CFI)、累積蛍光強度と循環好中球数 (/ μ l) を乗じた値の 4 指標を用いた。

腸内細菌叢は、糞便サンプルから DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析の結果より、16SrDNA 領域の配列から属レベルの細菌種の構成比率を求めた。対象者中で当該細菌属を有している住民の割合を「保有率」、一人の対象から検出された細菌属のリード数の総和に対する個々の細菌属のリード数の比を「占有率」と定義した。同対象地区における先行研究より、住民が保有する細菌種 (351 属) のうち、すべての参加者が保有する細菌属はわずか 3 属であり、参加者の 1 割以下しか保有していない細菌属が 255 属と圧倒的に多いことが報告されており、本研究では参加者の 9 割以上が保有する細菌属に絞って分析を行った。

4. 研究成果

腸内細菌叢の解析(糞便から DNA 抽出~シーケンス~データ解析)には約 1 年を要するため、本報告は 2017 年度プロジェクト健診にて得られたデータをもとに解析した結果である (2018 年データと合わせた解析は今後速やかに実施し、学会、論文等で発表する予定である)。

2017 年度プロジェクト健診参加者 1073 名のうち、悪性新生物・心疾患・脳血管疾患の既往がある者、下剤・抗生剤・ステロイドの服薬のある者、欠損値のある者を除く 886 名 (男性 375 名、511 名) について解析を行った (図 1)。男女・年代の内訳は表 1 のとおりである。

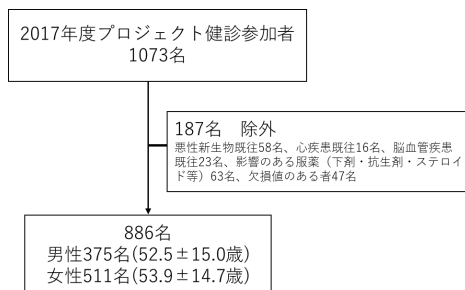


図 1.解析対象者

表 1.対象者の年代内訳

		年齢カテゴリ 2		合計	
		<60	60≤		
性別	男性	度数	240	135	375
		性別の %	64.0%	36.0%	
	女性	度数	296	215	511
		性別の %	57.9%	42.1%	
合計		度数	536	350	886
		性別の %	60.5%	39.5%	

【解析結果1：保有率90%以上の細菌種（属）】

本対象において、属レベルで計320種の細菌種が検出された。そのうち、すべての対象が保有していたのは2属（Bacteroides属、Streptococcus属）のみで、90%以上の対象が保有していたのは18属であった。60歳以上と60歳未満とで、90%以上の対象が保持する細菌属に違いは認められなかった。本結果より、今後の解析は保有率90%以上の18属に絞って好中球機能との関連解析を実施した。

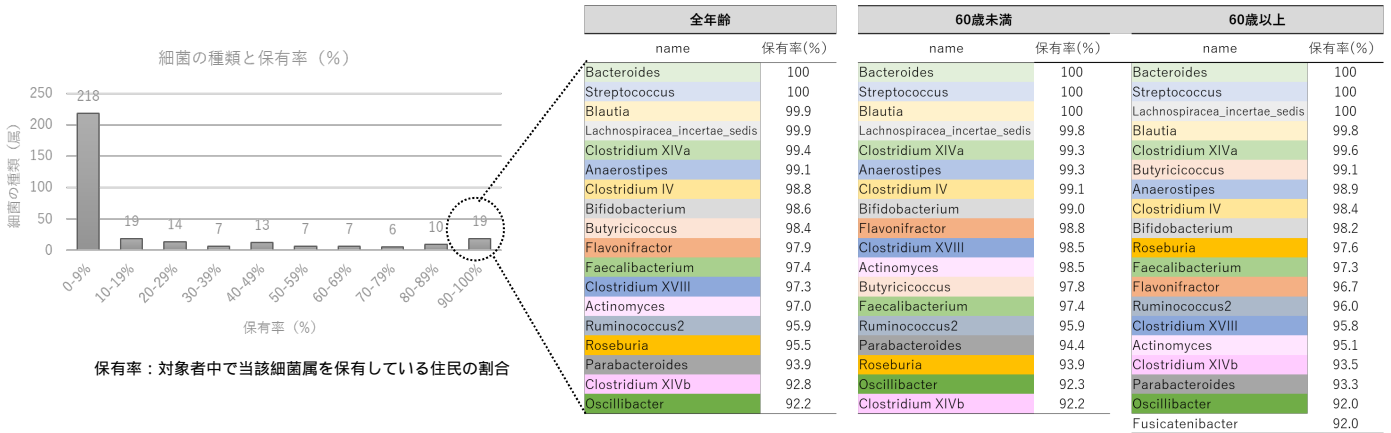


図2. 腸内細菌の種類と保有率

【解析結果2：腸内細菌占有率と年齢の相関解析】

男女共通で年齢と負の相関を示した細菌種は3属（Blautia属、Anaerostipes属、Bifidobacterium属）正の相関を示した細菌種は2属（Streptococcus属、Lachnospiraceae_incertae_sedis属）であった。

表2. 腸内細菌占有率 と年齢の相関

性別	年齢	相関係数																		
		1_Bacteroides	2_Streptococcus	3_Blautia	4_Lachnospiraceae_incertae_sedis	5_Clostridium XIVa	6_Anaerostipes	7_Clostridium IV	8_Bifidobacterium	9_Butyricoccus	10_Flavonifractor	11_Faecalibacterium	12_Clostridium XVIII	13_Actinomyces	14_Ruminococcus2	15_Roseburia	16_Parabacteroides	17_Clostridium XIVb	18_Oscillibacter	
男性	年齢	Pearsonの相関係数	-.058	.198**	-.164**	.129*	.044	-.239**	.065	-.241**	.097	-.046	.088	-.079	.066	-.053	.086	-.061	-.021	.185**
		有意確率(両側)	.263	.000	.001	.012	.396	.000	.207	.000	.060	.376	.087	.127	.200	.302	.098	.242	.690	.000
		N	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375
女性	年齢	Pearsonの相関係数	-.162**	.214**	-.174**	.121**	-.031	-.088*	-.039	-.153**	-.010	-.200**	.057	-.031	.058	-.069	.021	-.194**	-.029	.003
		有意確率(両側)	.000	.000	.000	.006	.489	.046	.378	.001	.827	.000	.196	.489	.190	.118	.636	.000	.506	.955
		N	511	511	511	511	511	511	511	511	511	511	511	511	511	511	511	511	511	

** 相関係数は1%水準で有意(両側)

* 相関係数は5%水準で有意(両側)

占有率：一人の対象者から検出された細菌属のリード数の総和に対する個々の細菌属のリード数の比

【解析結果3：好中球機能と年齢の相関解析】

男性においては、年齢と好中球機能に有意な関連がみられなかった。女性において、白血球数、好中球機能、ROS産生能(CFI×好中球数)、食食能(CFI×好中球数)が年齢と負の相関を示した(表3)。

表3. 好中球機能と年齢の相関

性別	年齢	相関係数										
		白血球数μl	好中球数μl	ROS_Events	ROS_Mean	ROS_CFI	ROS_CFI*好中球数	食食能_Events	食食能_Mean	食食能_CFI	食食能_CFI*好中球数	
男性	年齢	Pearsonの相関係数	-.099	-.027	.050	-.015	-.004	-.020	.034	-.029	.032	.001
		有意確率(両側)	.055	.606	.331	.773	.945	.704	.514	.573	.538	.983
		N	375	375	375	375	375	375	375	375	375	
女性	年齢	Pearsonの相関係数	-.154**	-.124**	.008	-.044	-.035	-.109*	-.005	-.024	-.025	-.121**
		有意確率(両側)	.000	.005	.850	.323	.428	.013	.903	.589	.567	.006
		N	511	511	511	511	511	511	511	511	511	

** 相関係数は1%水準で有意(両側)

* 相関係数は5%水準で有意(両側)

【解析結果4：好中球機能と腸内細菌占有率の相関解析（重回帰分析）】

保有率 90%以上の 18 属の占有率と好中球機能の関連を重回帰分析により解析した。すべての解析は男女別に、年齢と体脂肪率を調整して実施した。

全年齢では、男性において貪食能と Clostridium XIVa 属との間に負の相関がみられ、女性において ROS 産生能と Anaerostipes 属に正の相関がみられた（表 4-1）。同様の関連が 60 歳未満でもみられた（表 4-2）。好中球機能と保有率 90%以上の腸内細菌叢との関連は 60 歳未満の方がより多くみられ、60 歳以上では関連が薄くなること示唆された（表 4-3）。

表 4-1. 好中球機能と腸内細菌占有率の相関（全年齢）

全年齢 (n=886)		p<0.01 p<0.05																	
男性 (n=375)	1_Bacteroides	2_Streptococcus	3_Blaustia	4_Lachnospiraceae_incertae_sedis	5_Clostridium	6_Anaerostipes	7_Clostridium	8_Bifidobacterium	9_Butyricibacterium	10_Flavobacterium	11_Faecalibacterium	12_Clostridium	13_Actinomyces	14_Ruminococcus	15_Roseburia	16_Parabacterium	17_Clostridium	18_Oscillospira	
																			19_Oscillospira
ROS産生能_Event	-0.06	-0.055	0.045	-0.073	-0.092	-0.056	0.016	-0.017	-0.006	0.069	-0.069	0.042	0.021	0.026	-0.001	-0.048	-0.063	-0.054	
ROS産生能_Mean	0.067	0.034	0.010	0.015	-0.043	0.041	-0.035	-0.080	0.028	0.055	-0.003	-0.132	-0.010	0.001	-0.035	-0.024	-0.029	-0.053	
ROS産生能_CFI	0.055	0.020	0.022	0.029	-0.056	0.021	-0.034	-0.076	0.024	0.064	-0.017	-0.109	-0.007	0.003	-0.032	-0.033	-0.034	-0.060	
ROS産生能_CFI*好中球数	0.033	-0.042	0.041	-0.022	-0.083	-0.010	-0.069	-0.025	-0.017	0.026	-0.059	0.018	0.015	-0.016	-0.024	-0.009	-0.068	-0.048	
貪食能_Event	0.028	-0.032	0.022	0.035	-0.135	-0.045	-0.004	-0.040	0.047	0.137	-0.032	-0.025	-0.006	0.027	0.016	-0.050	-0.038	-0.051	
貪食能_Mean	0.075	0.018	-0.033	-0.028	-0.115	0.034	-0.039	-0.068	0.102	0.097	0.066	-0.143	0.012	0.028	-0.047	0.051	0.042	0.016	
貪食能_CFI	0.072	0.008	-0.013	-0.014	-0.136	0.012	-0.038	-0.066	0.092	0.120	0.043	-0.127	0.006	0.032	-0.032	0.023	0.031	0.004	
貪食能_CFI*好中球数	0.051	-0.047	0.046	-0.062	-0.157	-0.041	-0.083	-0.006	0.016	0.034	-0.040	0.037	0.038	0.013	-0.018	0.032	-0.044	0.006	

重回帰分析。調整項目：年齢、体脂肪率。値は標準回帰係数。

表 4-2. 好中球機能と腸内細菌占有率の相関（60歳未満）

60歳未満 (n=536)		p<0.01 p<0.05																	
男性・60歳未満 (n=240)	1_Bacteroides	2_Streptococcus	3_Blaustia	4_Lachnospiraceae_incertae_sedis	5_Clostridium	6_Anaerostipes	7_Clostridium	8_Bifidobacterium	9_Butyricibacterium	10_Flavobacterium	11_Faecalibacterium	12_Clostridium	13_Actinomyces	14_Ruminococcus	15_Roseburia	16_Parabacterium	17_Clostridium	18_Oscillospira	
																			19_Oscillospira
ROS産生能_Event	0.12	0.105	0.091	0.015	-0.124	0.058	0.020	-0.075	-0.040	0.166	-0.014	0.057	-0.004	0.004	-0.008	-0.077	-0.045	0.014	
ROS産生能_Mean	0.156	0.112	-0.012	-0.047	-0.047	0.105	-0.053	-0.115	-0.036	0.103	-0.022	-0.146	-0.092	-0.030	-0.003	-0.078	0.002	0.018	
ROS産生能_CFI	0.139	0.119	0.008	-0.033	-0.063	0.102	-0.043	-0.118	-0.037	0.126	-0.027	-0.118	-0.082	-0.028	-0.007	-0.087	-0.005	0.010	
ROS産生能_CFI*好中球数	0.048	-0.015	0.092	-0.011	-0.015	0.065	-0.051	-0.046	-0.101	0.090	-0.015	0.023	0.053	-0.039	0.029	-0.045	-0.040	0.019	
貪食能_Event	0.083	0.119	0.040	-0.007	-0.209	0.057	-0.026	-0.101	-0.012	0.210	-0.004	-0.044	-0.048	0.013	-0.016	-0.095	-0.018	0.087	
貪食能_Mean	0.157	0.039	-0.083	-0.001	-0.194	0.029	-0.107	-0.104	0.023	0.127	0.030	-0.183	-0.033	-0.003	-0.086	0.002	0.054	0.097	
貪食能_CFI	0.156	0.064	-0.050	-0.004	-0.219	0.042	-0.102	-0.109	0.012	0.165	0.022	-0.162	-0.045	0.001	-0.075	-0.028	0.048	0.115	
貪食能_CFI*好中球数	0.036	-0.057	0.098	0.003	-0.124	-0.004	-0.106	-0.024	-0.095	0.096	0.022	0.021	0.099	-0.009	0.010	0.008	-0.027	0.088	

重回帰分析。調整項目：年齢、体脂肪率。値は標準回帰係数。

表 4-3. 好中球機能と腸内細菌占有率の相関（60歳以上）

60歳以上 (n=350)		p<0.01 p<0.05																	
男性・60歳以上 (n=135)	1_Bacteroides	2_Streptococcus	3_Blaustia	4_Lachnospiraceae_incertae_sedis	5_Clostridium	6_Anaerostipes	7_Clostridium	8_Bifidobacterium	9_Butyricibacterium	10_Flavobacterium	11_Faecalibacterium	12_Clostridium	13_Actinomyces	14_Ruminococcus	15_Roseburia	16_Parabacterium	17_Clostridium	18_Oscillospira	
																			19_Oscillospira
ROS産生能_Event	0.006	-0.239	-0.045	0.153	-0.022	-0.187	-0.050	0.073	0.063	-0.124	-0.179	0.007	0.133	0.001	-0.031	0.001	-0.121	-0.104	
ROS産生能_Mean	-0.101	-0.111	-0.015	0.144	0.016	-0.005	-0.103	0.015	0.076	0.083	0.063	-0.074	0.172	-0.052	-0.116	0.009	-0.182	-0.142	
ROS産生能_CFI	-0.094	-0.149	-0.008	0.155	0.008	-0.053	-0.115	0.033	0.080	0.034	0.026	-0.067	0.176	-0.050	-0.107	0.009	-0.176	-0.143	
ROS産生能_CFI*好中球数	0.004	-0.149	-0.115	0.048	-0.171	-0.061	-0.180	0.022	0.043	-0.052	-0.170	-0.011	0.046	-0.052	-0.154	0.012	-0.128	-0.089	
貪食能_Event	-0.038	-0.233	-0.021	0.088	0.052	-0.164	-0.085	0.086	0.130	-0.019	-0.075	0.003	0.165	-0.026	0.030	0.030	-0.151	-0.179	
貪食能_Mean	-0.070	0.002	0.037	-0.109	0.136	0.126	0.001	0.073	0.148	0.037	0.206	-0.078	0.158	0.043	0.069	0.175	-0.059	-0.042	
貪食能_CFI	-0.066	-0.068	0.030	-0.060	0.135	0.044	-0.033	0.088	0.158	0.014	0.143	-0.067	0.195	0.024	0.069	0.144	-0.095	-0.092	
貪食能_CFI*好中球数	0.103	-0.070	-0.113	-0.088	-0.155	-0.041	-0.118	0.033	0.105	-0.113	-0.167	0.034	0.063	0.014	-0.080	0.077	-0.055	-0.021	

重回帰分析。調整項目：年齢、体脂肪率。値は標準回帰係数。

【考察】

本結果より、保有率 90%以上の腸内細菌の中でいくつかの細菌属は好中球機能との関連がみられ、その関係は 60 歳未満に比べ 60 歳以上では薄れることが示唆された。本報告では占有率 90%以上の 18 属との関連のみに着目したが、先行研究および図 2 より、対象の 1 割しか保有していない細菌属（本対象では 218 属）の方が圧倒的に多いことから、今後はより多くの細菌属を考慮した解析を実施していく必要がある。たとえば、細菌叢の構成だけでなく、その代謝物と好中球機能の関連についてみていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

中路 重之、相馬 優樹、倉内 静香、沢田 かほり、村下 公一、工藤 憲一 . ビッグデータ解析における腸内細菌 岩木健康増進プロジェクトでの検討(解説) . *BIO Clinica* 2017;32(14):1423-8. (査読有)

秋元 直樹、高橋 一平、沢田 かほり、中路 重之 他(10 人中 3 番目) . 過敏性腸症候群 (IBS)における腸内細菌叢の検討 . *体力・栄養・免疫学雑誌* 2016;26(1):22-32. (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。