

## 《原著》

# 弘前市の一般住民における腸内細菌の種多様性と加齢との関係

棟方理<sup>1,2</sup>、高橋一平<sup>1</sup>、相馬優樹<sup>1</sup>、  
倉内静香<sup>1</sup>、大圃研<sup>1,3</sup>、上谷英史<sup>4</sup>、  
高橋和幸<sup>5</sup>、甲斐知彦<sup>6</sup>、久田貴義<sup>7</sup>、  
辨野義己<sup>8</sup>、村下公一<sup>9</sup>、中路重之<sup>1</sup>

- 1 弘前大学大学院医学研究科社会医学講座
- 2 国立研究開発法人 国立がん研究センター 中央病院 血液腫瘍科
- 3 NTT 東日本関東病院
- 4 弘前大学大学院保健学研究科
- 5 弘前学院大学
- 6 関西学院大学
- 7 テクノスルガラボ株式会社
- 8 国立研究開発法人 理化学研究所イノベーション推進センター 辨野特別研究室
- 9 弘前大学 COI 研究推進機構

### キーワード

1. 腸内細菌叢
2. 共通細菌
3. 種多様性
4. 加齢
5. 性差

【緒言】近年、腸内細菌叢の異常が、疾患発症に関与する可能性が報告されているが、健常成人における腸内細菌叢の正常構成の詳細は明らかにされていない。【方法】今回我々は、一般住民 950 名 (男性 386 名、女性 564 名) を対象とし、次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢の網羅的解析により、健常人における共通する腸内細菌の同定および腸内細菌叢に対する加齢の及ぼす影響および性差について検討を行った。【結果】90%以上の対象者が保有する腸内細菌 (共通細菌) が、男女それぞれ 13 属のみ同定された。男女ともに約 7 割の腸内細菌属は、対象者の 5%未満のみで検出された。同定された共通細菌 13 属中 8 属の占有率において年齢変化に応じて有意な相関関係を認められた。【考察】腸内細菌叢の構成菌は個人により異なり、共通する腸内細菌は極めて少なく、多様性があると考えられた。共通細菌自体に男女差はなく、加齢に伴う変化も男女差は限定的と考えられた。

体力・栄養・免疫学雑誌 第 27 巻 第 3 号 128-136 頁 2017 年

### 【緒言】

近年、分子遺伝学的解析法の進歩により腸内細菌叢の網羅的解析が可能となり、様々な疾患において腸内細菌叢の異常が、その発症に関与している可能性が報告されている。炎症性腸疾患<sup>1)</sup>や過敏性腸症候群<sup>2,3)</sup>といった消化管疾患、リウマチ性疾患を含む自己免疫性疾患<sup>4)</sup>、大腸癌<sup>5)</sup>を代表とする悪性腫瘍、自閉症スペクトラム障害<sup>6)</sup>を含む精神疾患など、その関連は多岐にわたっている。さらに加齢に伴い発症頻度が上昇する糖尿病および肥満を含むメタボリックシンドローム<sup>7,8)</sup>、動脈硬化<sup>9)</sup>も腸内細菌叢の変化が、その発症に関連している可能性が報告されている。疾患との関連に関する研究が進む一方で、腸内細菌叢が健康維持、疾患の発症予防および治療<sup>10-12)</sup>において重要な役割を果たす可能性も合わせて指摘されている。

16S リボソーム RNA (16S rRNA) を標的とした解析法により、成人ヒト消化管には約 1000 種、 $10^{14}$  個に及ぶ腸内細菌が存在することが示されている<sup>13)</sup>。その菌種構成は個人ごとに異なり、安定しているが、一方で変化しうることも明らかにされている<sup>14,15)</sup>。すなわち、ヒトにより腸内保有菌の構成は様々であり、さら

に保有菌の共通性も高くない可能性が考えられている。しかし、現時点で健常成人における腸内細菌叢の正常構成および腸内細菌の保有状況の詳細は明らかにされていない。

これまでに、腸内細菌叢の主要構成菌について検討した研究では、門レベルでは Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria が、属レベルでは *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, *Alistipes*, および *Ruminococcus* などが、主要構成菌に相当すると報告されている<sup>14,16,17)</sup>。これらの成果により、ヒト腸内細菌叢は、*Bacteroides*, *Prevotella* および *Ruminococcus* の占有率の違いにより 3 つの構成パターン (Enterotype) に分類できることも報告されている<sup>16)</sup>。さらに、Qin らはヨーロッパ人 124 名の主要構成菌を種レベルで解析し、*Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides vulgatus*, *Roseburia intestinalis*, *Coprococcus comes* などの 18 菌種がすべての対象者から検出され、57 菌種が 90%以上、75 菌種が 50%以上の対象者から共通に検出されたと報告している<sup>18)</sup>。すなわち、腸内細菌叢の多様性の理解にはその種多様性と共通性、さらに占有率を調査することが重要と考えられる。しか

し、いずれの報告も数十名から数百名を対象とした検討であり、その多様性を多角的に調査して研究はほとんどなく、腸内細菌叢の異常を正確に評価・判断するために、正常ヒト腸内細菌叢に関する更なるデータの蓄積が必要である。健常日本人における腸内細菌叢のデータは、106名を対象としたメタゲノム解析の成果が報告されており、門レベルで *Actinobacteria*、属レベルで *Bifidobacterium* が海外のデータと比較して多く、日本人以外の人種の腸内細菌叢の細菌構成と異なっている可能性が示唆された<sup>19)</sup>。しかし、日本人における正常腸内細菌叢のデータは、現時点で極めて限定されており<sup>19,20)</sup>、大規模な研究成果は知られていない。約1000種の腸内細菌の中から健常者における主要構成菌を明らかにすることは、将来的に個人の生活・健康状態に合わせた簡便かつ効果的な腸内細菌叢の管理法の開発が必要となった場合の基礎的データになり得ることが期待される。すなわち、健常日本人の腸内細菌叢の構成を大規模に検討することが必要である。

腸内細菌叢の構成は加齢により変化することが知られている。これまでの加齢と腸内細菌に関する研究では、高齢者において *Bifidobacterium* の減少、大腸菌群、腸球菌および一部の *Clostridium* の増加が報告されている<sup>21)</sup>。また Biagi らは、超高齢者において、高齢者や成人と比較して腸内細菌叢の多様性が有意に減少することを報告した<sup>22)</sup>。さらに Lahti らは、加齢と腸内細菌叢の関連を検討し、培養できない *Clostridiales* の分布が複峰性を示し、加齢に伴いその占有率が増すことを報告した<sup>23)</sup>。しかし、これまでの研究は、腸内細菌叢の全体の構成および保有状況を考慮しておらず、培養可能菌を対象とした培養法を用いた小規模な解析が主であり、腸内細菌叢と加齢の関係に関して一定の見解は得られていない。

腸内細菌叢における性差に関する検討では、動物モデルにおいて腸内細菌叢の構成に影響を与える食生活を含む生活様式および女性ホルモンの影響により、腸内細菌叢に性差が存在する可能性が報告されている<sup>24)</sup>。一方、健常人を対象とした検討では、性差の影響は限定的であり明らかではないとする報告<sup>25,26)</sup>や性差は存在するとする報告<sup>18,27)</sup>があり、加齢に伴う変化と同様に一定の結論には達していない。以上より、年齢や性別に応じた一般人の腸内細菌叢の実態を明らかにする必要がある。

今回我々は、青森県弘前市の一般住民を対象として、次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢の網羅的解析により、健常人における共通した腸内細菌群を属レベルで同定し、加齢と腸内細菌叢の関係を男女別に調査し、腸年齢モデル作成を目的とする検討を行った。

## 【方法】

### 1. 対象

対象は、2015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一般住民1113名の内、調査項目に欠損項目がある者、下剤・抗生剤を内服している者および既往に悪性新生物・脳血管障害・心疾患のある被験者を除いた950名(男性386名、女性564名)を対象とした。

本健診プロジェクトは、青森県弘前市の岩木地区住人のうち希望者を対象とし、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。被験者には、検査の目的および方法を説明し、あらかじめ文書で同意を得た。本調査は、弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て実施された。

### 2. 調査・測定項目

被験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、既往歴、薬剤服用の有無、喫煙・飲酒・運動習慣の有無に関してであった。また、測定項目として、身長・体重を測定し、body mass index (BMI) [体重(kg) / 身長(m)<sup>2</sup>] を算出した。

### 3. 腸内細菌叢の解析

自己記入式質問用紙の配布に併せて、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採便キットを回収した。健診終了後に静岡県静岡市の株式会社テクノスルガ・ラボに移送し、解析を行った。腸内細菌叢の解析は次世代シーケンサーを用いた16S rRNA 遺伝子による系統解析を用いた。菌種の推定には、テクノスルガ・ラボ微生物同定データベース DB-BA 10.0 を使用した。本データベースはテクノスルガ・ラボと国立遺伝学研究所との共同開発によって構築された細菌・古細菌の16S rDNA 領域のデータベースである。基準株の16S rDNA 領域のデータのみ限定することで、多くの検体をより短時間で解析することを可能にしたデータベースであり、腸内細菌叢と肥満や大腸癌等との関連をみた研究での利用例が報告されている<sup>28-30)</sup>。

プロジェクト健診時に回収した便検体について、ジルコニアビーズを用いて FastPrep24Instrument (MP Biomedicals, USA) による破碎を行った懸濁液 200 $\mu$ L について、Magtration System 12GC (Precision System Science, Japan) および MagDEA DNA 200 (Precision System Science) を用いて細菌 DNA の抽出を行った。最終的に ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA) を用いて DNA サンプル濃度を 10 ng/ $\mu$ L に調整した。

次世代シーケンス解析は Takahashi らの方法に従って行った<sup>29)</sup>。細菌の16S rDNA における V3-V4 領域の約 430 bp を増幅するためのプライマーである Pro341F および Pro805R を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) を用いて PCR 増幅を行った。増幅された DNA 断片について、Illumina Miseq Reagent Kit version 3 および Illumina Miseq

表 1. 参加者の特徴および共通細菌の占有率と保有率

	男性 (n=386)		女性 (n=564)		P値*
年齢	52.3 ± 15.4		54.9 ± 14.6		< 0.01
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.7 ± 3.3		22.4 ± 3.5		< 0.01
喫煙習慣あり (%)	30.3		8.9		< 0.01
飲酒習慣あり (%)	68.4		27.8		< 0.01
運動習慣あり (%)	19.2		16.7		0.320

	男性 (n=386)		女性 (n=564)		P値*
	保有率 (%)	占有率 (%)	保有率 (%)	占有率 (%)	
<i>Anaerostipes</i>	97.4	1.8 ± 2.0	98.9	1.8 ± 1.8	0.851
<i>Bacteroides</i>	100.0	18.4 ± 12.1	100.0	19.6 ± 10.9	0.117
<i>Bifidobacterium</i>	98.2	5.4 ± 7.1	98.2	6.2 ± 6.5	0.076
<i>Blautia</i>	100.0	9.7 ± 5.6	100.0	9.8 ± 5.1	0.911
<i>Eubacterium</i>	98.2	4.6 ± 3.5	99.3	4.8 ± 3.4	0.280
<i>Faecalibacterium</i>	94.3	6.5 ± 4.9	97.0	7.8 ± 5.1	< 0.01
<i>Flavonifractor</i>	92.5	0.1 ± 0.2	93.3	0.2 ± 0.3	< 0.01
<i>Fusicatenibacter</i>	92.2	2.6 ± 2.4	92.2	3.0 ± 2.8	< 0.05
<i>Lachnoclostridium</i>	99.5	1.5 ± 1.7	100.0	1.3 ± 1.5	0.144
<i>Parabacteroides</i>	94.0	1.7 ± 2.1	91.8	1.7 ± 2.1	0.692
<i>Roseburia</i>	91.7	1.3 ± 1.6	96.8	1.6 ± 1.8	0.064
<i>Ruminococcus</i>	96.9	3.6 ± 3.8	98.2	4.4 ± 3.9	< 0.01
<i>Streptococcus</i>	99.2	1.6 ± 3.0	99.3	1.5 ± 3.0	0.626

\*P 値は t 検定または  $\chi^2$  検定の有意確率

sequencing system (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてプライマーを除く約 430 bp の塩基配列を決定した。

得られた塩基配列について、Metagenome@KIN analysis software (World Fusion, Japan) を用いて、データベースとして、TechnoSuruga Lab Microbial Identification database DB-BA10.0 (TechnoSuruga Laboratory, Japan) を用いて帰属分類群の推定を行った。塩基配列の識別は 97% 以上の相同率が得られたものの中で最上位の菌種を近縁種として推定した。今回の解析では 2127 属の推定が可能であり、本研究では計 420 属が検出された。

次世代シーケンス解析から得られた個々の細菌属 (genus) のリード数は、その細菌属が検出された回数を示すものであり、個人の腸内での細菌属の存在比率を反映する数値として用いることができる。個々の細菌属が一人の対象者の腸内環境で占める割合を占有率と定義した。占有率は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して求めた。統計解析には占有率の値を用いた。また、対象者 950 名の中で当該細菌属を保有している住民の割合を保有率と定義した。保有率は、全対象者についてリード数が 1 以上 (最低でも 1 回以上検出された) の細菌属数をカウントし、全対象者数

に対する割合として算出した。

#### 4. 統計解析

90%以上の対象者が保有していた腸内細菌を“共通細菌”と定義した。

対象者の特徴の性差を、対応のない t 検定および  $\chi^2$  検定を用いて検討した。また、各共通細菌の比率と年齢との相関関係を重回帰分析により評価した。重回帰分析は男女別におこない、BMI、喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣を調整項目とした。重回帰分析において年齢と有意な関連を認めた共通細菌の比率を用いて、共通細菌群の組み合わせより年齢を推定する重回帰モデルを検討した。多重共線性は VIF 値により評価した。統計解析には SPSS Statistics ver.22.0 を用い、有意水準は危険率 5%未満とした。

#### 【結果】

##### 1. 対象者の特徴 (表 1)

本研究の対象者の平均年齢は、男性 52.3±15.4 歳、女性 54.9±14.6 歳であり、女性で有意に高かった (P<0.01)。BMI は、男性 23.7±3.3、女性 22.4±3.5 であり、男性で有意に高かった (P<0.01)。喫煙習慣および飲酒習慣のある者の割合は、女性に比べて、男性で有意に

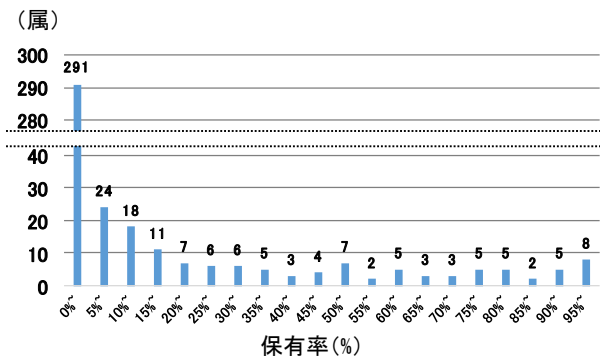


図1: 男性における腸内細菌の保有率ごとの属数

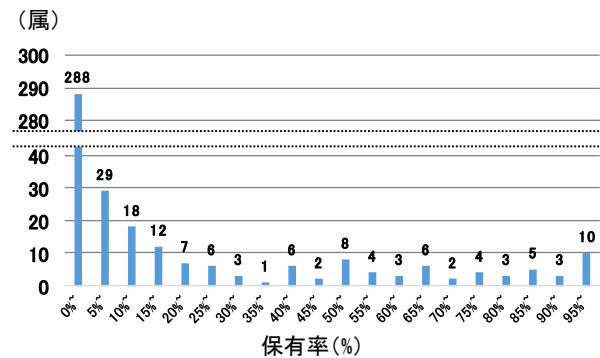


図2: 女性における腸内細菌の保有率ごとの属数

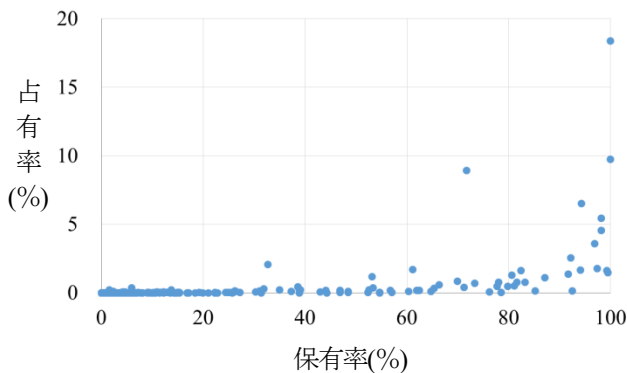


図3: 男性における腸内細菌の保有率と占有率の関連

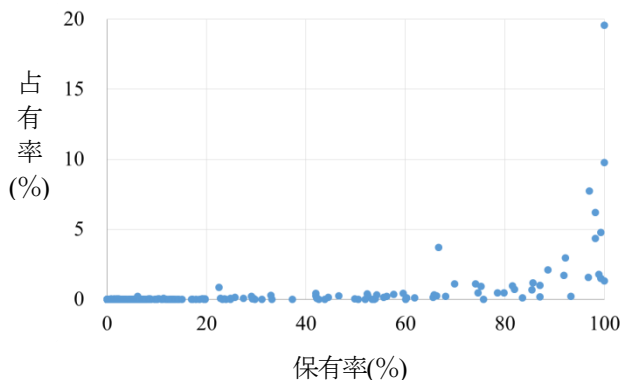


図4: 女性における腸内細菌の保有率と占有率の関連

高かった ( $P < 0.01$ )。一方、運動習慣のある者の割合は、男女間で有意差を認めなかった。

## 2. 腸内細菌の保有率および共通細菌

図1、図2に各腸内細菌の保有率別の属数を男女別に示した。共通細菌は、男女ともに同じ13属が同定された(表1)。共通細菌の中で、保有率が100%であった腸内細菌は、男性2属(*Bacteroides*、*Blautia*)、女性3属(*Bacteroides*、*Blautia*、*Lachnoclostridium*)であり、*Faecalibacterium*、*Flavonifractor*、*Fusicatenibacter*、*Ruminococcus*の4属は女性で有意に占有率が高かった( $p < 0.05$ )。同定可能な420属の中で、男性291属、女性288属は対象者の5%未満でのみ検出された。

図3、図4に各腸内細菌の保有率と腸内細菌叢内の平均占有率との関係を男女別に示した。男女ともに保有率が高い腸内細菌で占有率も高い傾向を認めた。しかし、男女ともに*Flavonifractor*は、共通細菌に該当したが占有率は低かった(男性:0.1%、女性:0.2%)。一方、共通細菌には該当しないが占有率の高い腸内細菌として、男性では*Prevotella* (8.9%)、*Megamonas* (2.1%)、*Lactobacillus* (1.7%)、*Subdoligranulum* (1.6%)、女性では*Prevotella* (3.7%)および*Subdoligranulum* (2.1%)が同定された。

## 3. 各共通細菌と年齢の関係(表2)

男女ともに共通細菌13属中8属の占有率において、年齢と有意な相関関係が認められた。男性においては、年齢が高いほど*Roseburia*および*Streptococcus*の占有率が高く( $p < 0.01$ )、*Anaerostipes*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Blautia*、*Fusicatenibacter*、*Parabacteroides*の占有率が低かった( $p < 0.01$ )。一方、女性においては、年齢が高いほど*Roseburia*、*Ruminococcus*、*Streptococcus*の占有率が高く( $p < 0.05$ )、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Blautia*、*Fusicatenibacter*、*Parabacteroides*の占有率が低かった( $p < 0.05$ )。

## 4. 男女別の腸年齢の重回帰モデル

男女それぞれにおいて、重回帰分析により年齢変化と有意な相関関係が認められた共通細菌を説明変数、年齢を目的変数とした重回帰モデルにより、腸年齢の推定式を作成した(図5)。男女ともに8属を同時に投入した。 $R^2$ 値は、男性で0.199、女性で0.139であった(表3・表4)。

### 【考察】

本研究は、大規模な健康成人を対象とした腸内細菌の網羅的解析により、健康成人の多くが共通して保有する腸内細菌を属レベルで同定し、その占有率の高さを評価した。さらに、それらの細菌を対象として加齢と腸内細菌の関係を明らかにした。これまでにも、健康成人における腸内細菌叢に関する研究の成果が、国際共同プロジェクトも含めて複数報告されているが、いずれも小規模な研究である<sup>14-19)</sup>(表5)。腸内細菌の解析手法は、従来の分離培養法から、近年は分子遺伝学的解析手法にシフトし、培養不能菌も含めて腸内細

表 2. 共通細菌と年齢の関係

	男性			女性		
	$\beta$	P値	R <sup>2</sup> 値	$\beta$	P値	R <sup>2</sup> 値
<i>Bacteroides</i>	-0.222	< 0.01	0.124	-0.211	< 0.01	0.131
<i>Blautia</i>	-0.236	< 0.01	0.130	-0.154	< 0.01	0.110
<i>Lachnoclostridium</i>	0.048	0.334	0.078	0.066	0.103	0.091
<i>Streptococcus</i>	0.198	< 0.01	0.114	0.191	< 0.01	0.123
<i>Eubacterium</i>	0.094	0.057	0.084	0.020	0.618	0.087
<i>Anaerostipes</i>	-0.215	< 0.01	0.121	-0.071	0.081	0.092
<i>Bifidobacterium</i>	-0.136	< 0.01	0.094	-0.143	< 0.01	0.107
<i>Ruminococcus</i>	0.029	0.556	0.076	0.093	< 0.05	0.095
<i>Faecalibacterium</i>	0.028	0.580	0.076	0.012	0.758	0.087
<i>Roseburia</i>	0.225	< 0.01	0.126	0.120	< 0.01	0.101
<i>Flavonifractor</i>	-0.070	0.156	0.081	-0.055	0.172	0.090
<i>Parabacteroides</i>	-0.138	< 0.01	0.094	-0.124	< 0.01	0.102
<i>Fusicatenibacter</i>	-0.129	< 0.01	0.092	-0.081	< 0.05	0.093

\*BMI, 喫煙習慣, 飲酒習慣, 運動習慣を調整変数として投入

**男性**

$$\text{腸年齢} = -0.663 \times \text{Anaerostipes} - 0.160 \times \text{Bacteroides} - 0.191 \times \text{Bifidobacterium} \\ - 0.350 \times \text{Blautia} - 0.724 \times \text{Fusicatenibacter} - 0.208 \times \text{Parabacteroides} \\ + 1.938 \times \text{Roseburia} + 0.875 \times \text{Streptococcus} + 59.052$$

**女性**

$$\text{腸年齢} = -0.193 \times \text{Bacteroides} - 0.225 \times \text{Bifidobacterium} - 0.306 \times \text{Blautia} \\ - 0.363 \times \text{Fusicatenibacter} - 0.654 \times \text{Parabacteroides} + 0.874 \times \text{Roseburia} \\ + 0.172 \times \text{Ruminococcus} + 0.777 \times \text{Streptococcus} + 61.950$$

図 5: 男女別の腸年齢式

表 3. 男性の腸年齢の重回帰モデル

	偏回帰係数	標準誤差	標準化偏回帰係数	P値	VIF	R <sup>2</sup> 値
<i>Bacteroides</i>	-15.98	6.61	-0.126	< 0.05	1.279	0.199
<i>Blautia</i>	-35.02	16.06	-0.128	< 0.05	1.611	
<i>Streptococcus</i>	87.53	23.73	0.173	< 0.01	1.039	
<i>Anaerostipes</i>	-66.26	39.59	-0.088	0.095	1.289	
<i>Bifidobacterium</i>	-19.07	10.49	-0.088	0.07	1.107	
<i>Roseburia</i>	193.85	45.88	0.201	< 0.01	1.067	
<i>Parabacteroides</i>	-20.85	37.39	-0.028	0.578	1.215	
<i>Fusicatenibacter</i>	-72.44	30.09	-0.115	< 0.05	1.078	

菌叢を構成する細菌の網羅的解析が可能となった。本研究で採用した 16S rRNA を標的とした解析手法が、最近の報告で多くなっているが、腸内細菌叢由来の全ゲノム解析に基づく報告も増えてきている。本研究で

は、16S rDNA における V3-V4 領域をターゲットとしたユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅した DNA ライブラリーを次世代シーケンサーでシーケンシングし、得られたリードを参照配列にマッピングし

表4. 女性の腸年齢の重回帰モデル

	偏回帰係数	標準誤差	標準化偏回帰係数	P値	VIF	R <sup>2</sup> 値
<i>Bacteroides</i>	-19.35	5.85	-0.15	0.001	1.238	0.139
<i>Blautia</i>	-30.63	12.74	-0.11	0.017	1.271	
<i>Streptococcus</i>	77.72	19.25	0.16	0.000	1.042	
<i>Bifidobacterium</i>	-22.46	9.25	-0.10	0.015	1.096	
<i>Ruminococcus</i>	17.20	15.78	0.05	0.276	1.137	
<i>Roseburia</i>	87.36	32.19	0.11	0.007	1.055	
<i>Parabacteroides</i>	-65.42	27.60	-0.10	0.018	1.042	
<i>Fusicatenibacter</i>	-36.33	20.71	-0.07	0.080	1.034	

表5. 腸内細菌叢に関する研究の比較

公表年	著者	測定対象	測定方法	解析レベル	対象者数	対象者の特徴
2005	Eckburg PB, et al	16SrRNA	Sequence	門	3	健康人
2007	Kurokawa K, et al	Metagenome	Sequence	属	13	健康日本人(乳幼児含む)
2010	Qin J, et al	Metagenome	NGS	種	124	健康人・肥満者・IBD患者
2012	HMP Consortium	16SrRNA	NGS	属	242	健康人
2011	Arumugam M, et al	16SrRNA	Sequence	門・属	39	健康人・肥満者・IBD患者(日本人13名含む)
2011	Wu GD, et al	16SrDNA	Sequence	属	98	健康人
2014	Ding T, et al	16SrRNA	NGS	属	300	健康人
2016	Nishijima S, et al	Metagenome	NGS	門・属	106	健康日本人
2016	本研究	16SrRNA	NGS	属	950	健康日本人

IBD: inflammatory bowel disease, NGS: next generation sequence

菌の種類を推定する解析法を用いた。本解析法と類似の解析法を用いた報告は多く、他の研究成果との比較可能性は担保し、かつ、多様性を考慮した腸内細菌叢の細菌構成を明らかにした初めての大規模研究である。

腸内細菌叢の変化と疾患の関連が明らかにされつつある近年、腸内細菌叢に対する介入が、健康維持や疾病予防、さらに疾病治療法の一つになり得ることが示唆されている<sup>10-12</sup>。一方で、正常対照となり得る信頼性の高い日本人における腸内細菌叢の正常構成を大規模に検討した基礎的データは十分とは言えない。さらに、腸内細菌叢に対する介入を考慮した場合、約1000種にのぼる腸内細菌のいずれを対象とするか、全年齢層および男女問わずに均一な手法でよいのかという未解決の問題がある。今回我々は、属レベルで90%以上の対象者が保有する腸内細菌を“共通細菌”と定義し解析を行った。これらの細菌と加齢との関係を男女別に明らかにすることで、将来的に各年齢層に応じたより簡便な腸内細菌叢の管理法・介入法の提供を考慮した場合に基礎となるデータになることが期待される。

本研究で用いた解析方法では属レベルで420属の腸

内細菌が同定された。しかし、90%以上の対象者が保有する細菌(共通細菌)は男女ともにこのうち13属のみ、さらに100%の対象者が保有する腸内細菌は、*Bacteroides*, *Blautia* の2属のみであった。さらに、男女ともに約7割の腸内細菌属は、対象者の5%未満のみで検出された。すなわち、腸内細菌叢の構成菌は個人により異なり、共通する腸内細菌は極めて少なく、多様性があると考えられた。

一方、今回同定された共通細菌は、腸内細菌叢における占有率が高い傾向であることも合わせて示された。さらに、共通細菌13属全体で、男女ともに腸内細菌叢において約6割を占めていた。すなわち、本研究で同定された腸内細菌属は、共通細菌であると同時に腸内細菌叢の主要構成菌群であることが推測される。

本研究では、年齢と共通細菌の相関関係の検討を行った。同定された共通細菌13属の中で男女ともに8属において、年齢変化に応じて有意に占有率の変化が認められ、7属は男女共通であった。*Roseburia* および *Streptococcus* の2属は増加傾向であり、*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Fusicatenibacter*, *Parabacteroides* の5属は、減少傾向であった。一方、*Anaerostipes* は男性のみで有意に減少傾向、*Ruminococcus* は、女性のみ

で有意に増加傾向を示した。本研究の結果からは、年齢に応じて共通細菌の占有率は変化しうることが明らかになったが、共通細菌自体に男女差はなく、加齢に伴う変化に関しても男女差は認めるものの限定的であると考えられた。

さらに、本研究では共通細菌から年齢を推定する腸年齢モデルを作成した。上記重回帰分析により年齢と相関関係が認められた 8 属を説明変数として男女別に解析を行い、 $R^2$  値は男性 0.199 および女性 0.139 であった。本結果は、共通細菌 8 属を用いた腸年齢の推定式の精度も依然として十分とは言えないことを示しており、より精度の高い推定式を今後も検討していく必要があると考える。

近年、宿主に保健効果を示す生きた微生物、またはそれを含む食品と定義されるプロバイオティクスにおいて<sup>31)</sup>、種レベル、さらには菌株レベルでの議論が進められている。一方、本研究においては複数の菌種を包括した属レベルの解析であり、種レベルでのデータの蓄積が必要となると考える。腸年齢モデルの作成についても、種レベルでの解析を行うことでより精度の高い腸年齢モデルになる可能性が期待される。さらに、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析の進歩により、本研究のように腸内細菌叢の菌種構成を明らかにするのみならず、腸内細菌叢全体のゲノム解析、RNA シーケンスおよびトランスクリプトーム解析により、腸内細菌叢の有する様々な機能についても明らかにされつつある<sup>32)</sup>。腸内細菌叢の構成菌種をその機能により分類し、機能に基づいた腸内細菌群の加齢による変化を明らかにすることは、より精度の高い腸年齢モデルの確立につながる可能性がある。

## まとめ

本研究により健常日本人における腸内細菌叢の約 6 割を占める共通細菌が、男女それぞれ 13 属存在することを明らかにした。年齢に応じて共通細菌の占有率は変化しうることが明らかになったが、男女差は認めるものの限定的であると考えられた。この大規模研究から得られた成果は、健常日本人における腸内細菌叢の多様性を示す信頼性の高い基礎的なデータとなり得る。一方、16S rRNA 解析に基づき同定された共通細菌を用いた腸年齢モデルの予測精度は依然として十分とは言えず、腸内細菌叢の全ゲノム解析を含めたメタゲノム解析などの最新の解析手法を取り入れた腸年齢モデルの検討が必要である。

(受稿 2016/12/4 受理 2017/1/4)

## 【参考文献】

- 1) Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D: The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 2014;146:1489-99.
- 2) Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G: Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol* 2014;20:14105-25.
- 3) Simren M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BM, Spiller RC, Vanner S, Verdu EF, et al: Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013;62:159-76.
- 4) Scher JU, Szczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, Rostron T, et al: Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife* 2013;2:e01202.
- 5) Abreu MT, Peek RM, Jr: Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology* 2014;146:1534-46 e3.
- 6) Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, et al: Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 2013;155:1451-63.
- 7) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027-31.
- 8) Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, et al: Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 2010;328:228-31.
- 9) Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, et al: Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011;472:57-63.
- 10) Silk DB, Davis A, Vulevic J, Tzortzis G, Gibson GR: Clinical trial: the effects of a transgalactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:508-18.
- 11) Yoon H, Park YS, Lee DH, Seo JG, Shin CM, Kim N: Effect of administering a multi-species probiotic mixture on the changes in fecal microbiota and symptoms of irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Biochem Nutr* 2015;57:129-34.
- 12) Pimentel M, Lembo A, Chey WD, Zakko S, Ringel Y, Yu J, Mareya SM, et al: Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med* 2011;364:22-32.
- 13) Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB: Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:859-904.
- 14) Ding T, Schloss PD: Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* 2014;509:357-60.
- 15) Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, et al: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-8.
- 16) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, et al: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-80.
- 17) Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, et al: Linking long-term

- dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334:105-8.
- 18) Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, et al: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
  - 19) Nishijima S, Suda W, Oshima K, Kim SW, Hirose Y, Morita H, Hattori M: The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res* 2016;23:125-33.
  - 20) Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, Takami H, et al: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007;14:169-81.
  - 21) Mitsuoka T: Intestinal flora and aging. *Nutr Rev* 1992;50:438-46.
  - 22) Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, et al: Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 2010;5:e10667.
  - 23) Lahti L, Salojarvi J, Salonen A, Scheffer M, de Vos WM: Tipping elements in the human intestinal ecosystem. *Nat Commun* 2014;5:4344.
  - 24) Org E, Mehrabian M, Parks BW, Shipkova P, Liu X, Drake TA, Luskis AJ: Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes* 2016;7:313-22.
  - 25) Human Microbiome Project C: Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-14.
  - 26) Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrom K, Rajilic M, Vaughan EE, de Vos WM, Collins MD, et al: Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4153-5.
  - 27) Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, et al: Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1027-33.
  - 28) Hisada T, Endoh K, Kuriki K: Inter- and intra-individual variations in seasonal and daily stabilities of the human gut microbiota in Japanese. *Arch Microbiol* 2015;197:919-34.
  - 29) Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, Tameda M, et al: Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol* 2015;15:100.
  - 30) Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, Tameda M, et al: Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. *Oncol Rep* 2016;35:325-33.
  - 31) Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, et al: Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80 Suppl 1:S147-71.
  - 32) Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C: Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;12:R60.



# Effects of Advancing Age on the Species-Diversity of Gut Microbiota in the Residents of Hirosaki City

Wataru MUNAKATA<sup>1,2</sup>, Ippei TAKAHASHI<sup>1</sup>, Yuki SOMA<sup>1</sup>, Shizuka KURAUCHI<sup>1</sup>, Ken OHATA<sup>1,3</sup>,  
Hidefumi KAMITANI<sup>4</sup>, Kazuyuki TAKAHASHI<sup>5</sup>, Tomohiko KAI<sup>6</sup>, Takayoshi HISADA<sup>7</sup>, Yoshimi BENNO<sup>8</sup>,  
Koichi MURASHITA<sup>9</sup>, Shigeyuki NAKAJI<sup>1</sup>

1 Department of Social Medicine, Hirosaki University Graduate School of Medicine

2 Department of Hematology, National Cancer Center Hospital

3 NTT EAST NTT Medical Center Tokyo

4 Hirosaki University Graduate School of Health Science

5 Hirosaki Gakuin University

6 Kansei Gakuin University

7 TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

8 Benno Laboratory, RIKEN Innovation Center

9 Hirosaki University COI Research Initiatives Organization

Recent researches revealed that altered gut microbiota was associated with the onset of diseases. However, the normal composition of gut microbiota has not been fully elucidated. To identify the common bacterial genera in healthy adults, large scale analysis of fecal samples obtained from 950 healthy adults (385 males and 564 females) was performed. In addition, an alteration of gut microbiota by aging and sex difference in gut microbiota were investigated. The analysis of gut microbiota was performed by next-generation sequencing. In this study, the bacterial genus carried by more than 90% of all the subjects was defined as common bacteria genus. Only 13 common bacterial genera were identified in both males and females. On the other hand, the approximately 70% of bacterial genera were identified in less than 5% of all the subjects. The occupancies of each 8 genera within 13 common bacterial genera were shown to have the significant correlations with advancing age. These results suggest a great diversity in human gut microbiota in each individuals and gender has limited effects on the composition of gut microbiota.

**Key word:** gut microbiota, common bacteria genus, species-diversity, aging, sex difference

別刷請求先：高橋一平

〒036-8562 青森県弘前市在府町5 弘前大学大学院医学研究科社会医学講座

TEL: 0172-39-5041

FAX: 0172-39-5038

e-mail: ippei@hirosaki-u.ac.jp