

腸内細菌パターンに影響を及ぼす因子の探索

Exploring research of factors affecting the gut microbial patterns

滋賀県立大学大学院 人間文化学研究科 生活文化学専攻

瀬浦 崇博

SEURA, Takahiro

指導教員 福渡 努 教授

目次

序論	1
第1章 腸内細菌パターンと食物摂取状況および精神的ストレスとの関連性	
1. 目的	4
2. 方法	4
3. 結果	8
4. 考察	20
第2章 日本食スコアが腸内細菌叢に及ぼす影響	
1. 目的	22
2. 方法	22
3. 結果	23
4. 考察	31
第3章 腸内細菌パターンを誘導する食事因子の解析 —若年成人女性を対象とした秤量記録法による分析—	
1. 目的	33
2. 方法	33
3. 結果	35
4. 考察	44
まとめ	46
引用文献	47
発表論文	54
謝辞	55

序論

ヒトの腸管内には約 100 兆個もの多種多様な腸内常在菌が生育しており、複雑な腸内細菌叢（腸内フローラ）を形成している。細菌は生物分類の階級に従うと上位から順に門（phylum）、綱（class）、目（order）、科（family）、属（genus）、種（species）に分類され、腸内細菌叢は近年の分子遺伝学的手法の進歩によって *Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門、*Actinobacteria* 門、*Proteobacteria* 門の 4 つ門で 95%以上を占めることが確認されている[1, 2]。さらに日本人では属レベルで見ると、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Faecalibacterium*、*Ruminococcus* などの細菌種で形成されていることが明らかとなっている[2]（Fig. 1）。

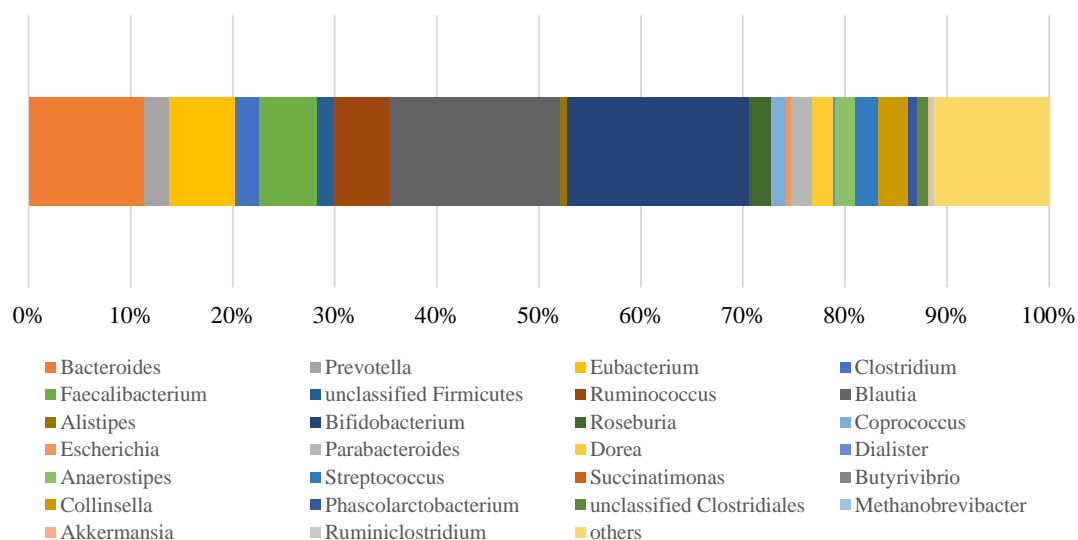


Fig. 1. 日本人の属レベルでの腸内細菌叢の割合

Nishijima らの報告[2]を基に、著者が作成した図

このような腸内細菌叢の割合は食事内容によって変化し、宿主の恒常性維持に密接に関与していることが様々な論文で示されている。例えば、高脂肪・高糖質食摂取のマウスでは、*Firmicutes* 門の占有率が高く *Bacteroidetes* 門は減少している一方で、低脂肪食摂取のマウスでは、*Bacteroidetes* 門が増加することが明らかとなっている[3]。また Hildebrandt らは、食餌誘導性肥満に抵抗性を示す RELM β ノックアウトマウス群と野生型マウス群では高脂肪食を与えた場合、両群ともに *Firmicutes* 門が増加し、*Bacteroidetes* 門は減少したことを見出し[4]、この結果から腸内細菌叢の構成は、宿主の食事内容やエネルギーバランスが関係している可能性が示唆された。

動物試験と同様に、ヒトを対象とした調査研究によっても食事が腸内細菌叢に影響を及ぼすことが証明されている。De Filippo らは、ヨーロッパおよびアフリカに住む子供たちの腸内細菌叢を比較し、ヨーロッパの子供たちは *Firmicutes* 門が全体の約 50%を占めていたのに対し、アフリカの子供たちでは *Bacteroidetes* 門が優勢で、*Firmicutes* 門は 10%程度であ

ったことを報告している[5]。その理由として習慣的な食事形式の違いが影響しており、特にヨーロッパの子供たちでは砂糖類、動物性脂肪、エネルギー摂取量が高い欧米型の食事習慣が原因だと示唆されている。対照的に、野菜、果物、豆類やオリーブオイルなどを多く取り入れた地中海式の食事では、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などの腸内有用菌や *Bacteroides* を増加させることが報告されている[6]。また、赤ワインは地中海式の食事の一部として頻繁に飲まれているが、20日間の赤ワインの摂取により *Bacteroides* および *Bifidobacterium* が増加し、さらに血中の中性脂肪やコレステロールを減少させることが確認されている[7]。このように、地中海式の食事では、腸内細菌に有益な影響を与える一方で、欧米型の食事では腸内環境を害し、生活習慣病の発症に繋がることを見出されつつある。

さらに最近では、メンタルヘルスの変化や神経系の発達に、腸内細菌叢が深く関与することが明らかとなっている。脳と腸は自律神経系を介して双方向的に情報伝達を行っており、これは「脳腸相関 (brain-gut interaction または gut-brain axis)」と呼ばれている[8]。ヒトにおいては、腸内細菌叢が変動することによって心理的ストレスが高まり、うつ病、自閉症などを引き起こすことが明らかとなっており、腸内細菌叢の構成は宿主のストレス状態を制御する重要な因子の一つであることが提唱されている。これまでに腸内細菌とストレスの関係については、精神的ストレスが *Lactobacillus* などの腸内有用菌を減少させるほか[9]、ストレスが発症の原因とされている過敏性腸症候群の患者では *Bifidobacterium* が減少することが報告されている[10]。またうつ病患者では微生物多様度を示す指標となる α 多様性が低下し、健常者と比較して β 多様性が大きく変化することが確認されている[11]。さらに Kato らは、8週間のプロバイオティクス (*Lactobacillus casei*) を含む発酵乳の摂取により α 多様性が増加し、客観的ストレス指標の一種である唾液中のコルチゾールが有意に減少することを示している[12]。

上述の学術的背景は、食事内容や形式の違いにより腸内細菌叢が変化すること、宿主のストレス状態が腸内細菌組成に影響を及ぼすことを示している。しかしながら、ヒトの腸内細菌叢は国や集団レベルで異なることが明らかとなっており、他国の健常者データは使用できない。特に日本人の腸内細菌叢は、諸外国と比較して *Bifidobacterium* の占有率が最も高く *Prevotella* が低いことが明らかとなっている[2]。また、Arumugam らの研究により、ヒトの腸内細菌叢は3つのパターン（それぞれ、*Bacteroides* エンテロタイプ、*Prevotella* エンテロタイプ、*Ruminococcus* エンテロタイプと呼ばれる）に分類されることが知られているが[13]、食文化や食習慣、民族が違う日本人では結果が異なることが予想される。さらに、ヒトの腸内細菌構造は加齢によって変化し、特に高齢者と若年成人では組成が大きく異なることが報告されており[14]、Arumugam らの研究においても高齢者を除いた成人のエンテロタイプは明確に示されていない。したがって、腸内細菌研究を我々の生活に繋げるためには、日本人の若年成人を対象として日本特有の食習慣やストレス状況を把握し、腸内細菌パターンとの関係を明らかにする必要がある。特に若年期の腸内細菌パターンと食習慣およびストレス状態の関連性に着目することにより、若年成人に多発する精神的疾患由来の過敏

性腸症候群などの予防に繋がるほか、若い年代のうちから腸内細菌に由来する疾患の予防や対策に講じることが可能となる。さらには若年期から腸内細菌パターンに応じた食生活の改善によって、腸内有用菌の増加または有害菌の減少を目指すという新しい栄養指導法も提案できる。以上のことから本研究では、日本人の若年者を対象とした横断的調査により腸内細菌パターンを明らかにし、さらに腸内細菌パターンの違いに影響を及ぼす栄養素の探索とストレス状況の関連について明らかにすることを目的とした。その目的を達成する為に、第1章では、主成分分析法により腸内細菌パターンを分類し、栄養素摂取量および唾液ストレス指標との関連性を検討した。第2章では、日本人特有の食事形式である日本食に着目し、日本食スコアが腸内細菌叢に及ぼす影響を調査した。また、第3章では、秤量記録法を用いて詳細な栄養状態を評価し、クラスター分析法による腸内細菌パターンとの関連性を検討した。

第1章 腸内細菌パターンと食物摂取状況および精神的ストレスとの関連性

1. 目的

網羅的遺伝子発現解析によりヒトの腸内細菌叢は、大きく分けて3つのパターン（エンテロタイプ）に分類されることが明らかとなっている。最も多いのが *Ruminococcus* エンテロタイプ、次に *Bacteroides* エンテロタイプ、最も少ないパターンとして *Prevotella* エンテロタイプに分けられる[13]。これらのエンテロタイプは食事習慣に関連することが知られており、特に動物性食品が豊富な食事では *Bacteroides* エンテロタイプを形成し、植物性食品が豊富な食事では *Prevotella* エンテロタイプが形成される [15]。また Carrothers らは、授乳婦を対象として食習慣と腸内細菌叢の関連性を調査し、その結果パントテン酸、ビタミン B2、ビタミン B6、ビタミン B12 の摂取量と *Bacteroides* の占有率との間にそれぞれ有意な負の相関があったことを報告している [16]。これら以外にも多くの研究により栄養素摂取量の違いによって腸内細菌組成が変化することが示されている[17, 18, 19]。

また近年では、ストレスに関連した要因が、腸内細菌叢に作用することが多数の先行研究で報告されている。たとえば、社会的混乱ストレス（social disruption stressor）に暴露されたマウスでは、*Clostridium* が増加し、*Bacteroides* を減少させることが明らかとなっている[20]。さらに阪神淡路大震災前後における被災者の腸内細菌叢を調査した研究では、震災後には *Candida* や *Pseudomonas* などの腸内有害菌が増加していたことが示されており、震災時の精神的ストレスが腸内環境にも影響を及ぼすことを意味している[21]。

このように腸内細菌叢は、食事要因以外にも精神的なストレスが関与することは明確である。しかしながら、著者の知る限りでは、日本人かつ若年健常者を対象とした研究によって腸内細菌パターン別に食事内容やストレス状態を調査した研究は未だ見られない。そこで第1章では、横断的調査により腸内細菌パターンと食物摂取状況および精神的ストレスとの関連性について調査を実施した。

2. 方法

2-1. 対象者

2017年8月から2018年7月の間に、A大学に在籍する学生（18～22歳）のうち、同意を得られた男性22名、女性39名の合計61名を対象とした。研究実施に際しては、本研究の目的と意義、調査方法を書面および口頭にて説明し、本人の同意を得た。なお、本研究はヘルシンキ条約を遵守し、愛知淑徳大学健康医療科学部倫理審査委員会の承認を得て実施した（No.2017-2）。

2-2. 調査項目

1) 身体組成の計測

体成分分析装置（InBody270, 株式会社インボディ・ジャパン）を使用して対象者の体重、

Body Mass Index (BMI)、骨格筋量、体脂肪率を測定した。

2) 食物摂取頻度調査

簡易型自記式食事歴質問票 (BDHQ : Brief-type self-administered diet history questionnaire) を使用して、習慣的なエネルギー摂取量、栄養素摂取量および食品群別摂取量を調査した。BDHQ は、自記式食事歴質問票 (DHQ : self-administered diet history questionnaire) の簡易版として栄養疫学研究用として開発され、日本人の過去 1 か月程度の食事内容が評価できる食事調査である。BDHQ の精度および妥当性については、Kobayashi らにより検討されており、16 日間の秤量記録法と比較した場合、食品群別摂取量の相関係数は男性で中央値 0.44 (0.14-0.82)、女性で中央値 0.48 (0.22-0.83) であり、さらに男性では 29 品目中 16 品目、女性では 14 品目で秤量記録法との間に差がないことが報告されている[22]。なお本研究では、エネルギー摂取量の違いが栄養素および食品群別摂取量に及ぼす影響を考慮し、栄養素密度法によるエネルギー1000kcal あたりの値を算出して解析に用いた。BDHQ を使用した栄養素密度法での食事評価に関する妥当性についても先行研究により検証は行われている[22, 23]。

3) 糞便細菌叢の分析

3-1) 糞便の採取

糞便の採取については、対象者に事前に採便キット(株式会社テクノスルガ・ラボ、静岡県)を配布し、自宅で糞便を採取してもらった。採便キットには保存液(4 M guanidium thiocyanate, 100mM Tris-HCl (pH 9.0), 40mM EDTA, 0.001% bromothmol blue)が入っており糞便採取後、室温での長期保存が可能である。対象者には特に糞便採取の時間は指定せず、便意を催した際に採取してもらうよう依頼した。

3-2) DNA 抽出

糞便からの DNA 抽出は、株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。すなわち、保存液に懸濁された糞便をジルコニアビーズにより破砕し、その懸濁液から核酸抽出試薬 Magtration System GC series Mag DEA DNA 200 および核酸抽出装置 Magtration System 12 GC(プレシジョン・システム・サイエンス株式会社、千葉県)を使用して DNA を抽出した[24]。

3-3) T-RFLP 法

抽出 DNA は、PCR 法を用いて 16SrDNA 遺伝子の増幅を行い、その増幅断片を末端標識制限酵素断片多型分析 (T-RFLP : Terminal restriction fragment length polymorphism) 法を用いて糞便細菌叢を解析した。T-RFLP 法による糞便細菌叢の解析は、株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。PCR 法では、標識プライマーとして 516f (5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3') と 1510r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を使用して、Nagashima らの方法に準じて

行い[25, 26]、得られた増幅産物は、制限酵素 Bs/L で切断した。末端制限断片の長さは、遺伝子解析装置（ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer System; Applied Biosystems, USA）を用いて決定し、DNA 解析ソフトウェア（GeneMapper; Applied Biosystems, USA）を用いて解析した。T-RFLP 法により算出される細菌種は Table 1-1 の通りである。

Table 1-1. T-RFLP 法で解析される腸内細菌種

菌種	門レベル	特徴
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroidetes</i>	ヒトやマウスの腸内細菌叢を構成する優勢菌のひとつ。腸管免疫系の IgA 産生の誘導に関与。近年では、動物性たんぱく質を多く摂取する食習慣との関連性が明らかとなっている。
<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroidetes</i>	日本人では、 <i>Prevotella</i> の占有率が低いことが報告されている。食物繊維を分解する能力が高いことで知られている。
<i>Lactobacillales</i>	<i>Firmicutes</i>	糖を嫌氣的に代謝して乳酸を産生する。ヨーグルトやチーズ、漬物などの発酵食品に用いられる菌種である。
<i>Clostridium</i> cluster (IV, IX, XI, XIVa, XVIII)	<i>Firmicutes</i>	宿主免疫系において制御性 T 細胞の分化を誘導し、炎症反応を調節。炎症性腸疾患の患者では、IV および XIVa が低下するとの報告がある。クラスターの分類は分子系統的にクラスター分けをしたもの。
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Actinobacteria</i>	プロバイオティクスとして利用される菌のひとつ。便秘や下痢などを改善する整腸作用をもつ。
others		T-RFLP 法では解析できない解像度の低い細菌種。 <i>Proteobacteria</i> 門などが含まれる。

3-4) T-RFLP 法により得られた微生物群集構造のパターン化

対象者 61 名の微生物群集構造を類似したパターンに分類するために、T-RFLP 法により解析された 10 種の細菌グループ (*Bifidobacterium*、*Lactobacillales*、*Bacteroides*、*Prevotella*、*Clostridium* cluster IV、*Clostridium* subcluster XIVa、*Clostridium* cluster IX、*Clostridium* cluster XI、*Clostridium* cluster XVIII、others) を変数として主成分分析を行い、第一主成分 (Principal Component 1; PC1) の因子付加量が正のグループと負のグループに分類し、腸内細菌パターンを決定した。主成分分析は、Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 22.0 を使用した。さらに微生物群集の多様性を解析するために Simpson および Shannon-Wiener の多様度指数を算出した[27, 28]。

4) 唾液ストレスマーカー

4-1) 唾液の採取

唾液の採取方法は、Michisige および Nagler の方法に従って実施した[29, 30]。すなわち安静時条件下で吐唾法により 5 分間、口腔内の唾液を直接サンプリングチューブに吐き出し採取した。唾液は日内変動に考慮し、9 時～11 時の間に採取した。また唾液採取の 60 分前より飲食の摂取をしないように依頼した。採取した唾液は 4°C、3000rpm で 15 分間の遠心分離を行い、上清を唾液サンプルとし、解析に用いるまで-80°C で保管した。

4-2) 唾液コルチゾール濃度の測定

唾液コルチゾール濃度の測定は、CORTISOL SALIVARY IMMUNOASSAY KIT (Salimetrics LLC, USA) を用いて、ELISA 法により説明書に従って測定した。抗コルチゾールモノクロナール抗体がコーティングされた 96 ウェルマイクロプレートに Cortisol Standard (3.000、1.000、0.333、0.111、0.037、0.012 μ g/dL) および唾液サンプルを 25 μ l ずつ各ウェルに加えた。さらに Assay Diluent を 25 μ l ずつ各ウェルに分注した後、1600 倍に希釈した Cortisol Enzyme Conjugate を 200 μ l ずつ各ウェルに分注した。その後、プレートミキサーで 500rpm、5 分間室温で攪拌した後、室温で 1 時間インキュベートした。インキュベート終了後、10 倍に希釈した Wash Buffer により洗浄を 4 回行った。洗浄後、各ウェルに TMB Substrate Solution を 200 μ l ずつ加え、500rpm、5 分間室温で攪拌した後、室温暗所で 25 分間インキュベートした。インキュベート終了後、Stop Solution を各ウェルに 50 μ l ずつ分注し、500rpm、3 分間室温で攪拌し、反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (Sunrise Rainbow RC-R ; TECAN, USA) にて 450nm (補正波長 490nm) の波長で測定した。唾液コルチゾール濃度は、検量線を作成し、得られた検量線より算出した。

4-3) 唾液 α -アミラーゼ濃度の測定

唾液 α -アミラーゼ濃度の測定は、SALIVARY α -AMYLASE KINETIC ENZYME ASSAY KIT (Salimetrics LLC, USA) を用いて説明書に従って測定した。96 ウェルマイクロプレートに Alpha-Amylase Diluent で 200 倍に希釈した唾液サンプルを 8 μ l ずつ各ウェルに加えた後、37°C に保温した Alpha-Amylase substrate Solution を 320 μ l ずつ各ウェルに分注した。37°C で 1 分間インキュベートとした後、すぐにマイクロプレートリーダー (Sunrise Rainbow RC-R ; TECAN, USA) にて 405nm の波長で 1 回目の測定を行った。測定終了後、37°C で 2 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーで 2 回目の測定を行った。唾液 α -アミラーゼ濃度は、2 回の計測値を用いて以下の式により算出した。

$$\alpha\text{-アミラーゼ濃度 (U/mL)} = \frac{\Delta\text{Abs./min} \times \text{TV} \times \text{DF}}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}}$$

$\Delta\text{Abs./min}$ = Absorbance difference per minute

TV = Total assay volume (0.328ml)

DF = Diluent factor (200)

MMA = Millimolar absorptivity of 2-chloro-p-nitrophenol (12.9)

SV = Sample volume (0.008ml)

LP = Light path (0.97)

4-4) 唾液 s-IgA 濃度の測定

唾液 s-IgA 濃度の測定は、SALIVARY SECRETORY IGA INDIRECT ENZYME IMMUNOASSAY KIT (Salimetrics LLC, USA) を用いて、ELISA 法により説明書に従って測定した。まず初めに 5ml チューブに SIgA Diluent を 3ml 加えた後、SIgA Diluent で 5 倍希釈した唾液サンプルおよび SIgA Standard (600、200、66.7、22.2、7.4、2.5 $\mu\text{g/mL}$) をそれぞれ 10 μl ずつ分注し、よく混和した。次に 120 倍希釈した SIgA Antibody Enzyme Conjugate を 50 μl ずつ加え、室温で 90 分間インキュベートしたものを調整済み唾液サンプルと SIgA 標準溶液とした。高純度ヒト SIgA がコーティングされた 96 ウェルマイクロプレートに調整済み唾液サンプルと SIgA 標準溶液をそれぞれ各ウェルに 50 μl ずつ分注した後、プレートミキサーで 400rpm、90 分間室温で攪拌した。攪拌終了後、10 倍に希釈した Wash Buffer により洗浄を 6 回行った。洗浄後、各ウェルに TMB Substrate Solution を 200 μl ずつ加え、500rpm、5 分間室温で攪拌した後、室温暗所で 40 分間インキュベートした。インキュベート終了後、Stop Solution を各ウェルに 50 μl ずつ分注し、500rpm、3 分間室温で攪拌し、反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (Sunrise Rainbow RC-R ; TECAN, USA) にて 450nm (補正波長 490nm) の波長で測定した。唾液 s-IgA 濃度は、検量線を作成し、得られた検量線より算出した。

5) 統計処理

測定値は全て平均値 \pm 標準誤差で示した。2 群間の比較は対応のない t 検定を使用した。また対象者の唾液ストレスマーカーの値を三分位 (Low、Medium、High) に分け、各分位の微生物多様度の傾向性について Jonckheere-Terpstra 検定を用いて検討した。統計解析には、SPSS version 22.0 を使用し、5%未満を有意水準とした。

3. 結果

1) 主成分分析による腸内細菌パターンの分類

主成分分析の結果による第一主成分 (PC1) の因子負荷量は Fig. 1-1 の通りである。因子負荷量は各腸内細菌グループと主成分との相関関係を表しており、-1 から 1 の範囲の値と

なる。*Bifidobacterium*、*Lactobacillales*、*Clostridium* cluster IX、*Clostridium* cluster XI、others は、正の主成分負荷量を示し *Clostridium* subcluster XIVa、*Bacteroides*、*Clostridium* cluster XVIII、*Clostridium* cluster IV、*Prevotella* は負の主成分負荷量を示していたことから、主成分得点が正のグループを *Bifidobacterium*&*Lactobacillales* パターン (BL pattern; n=28) とし、負のグループを *Bacteroides* パターン (B pattern; n=33) とした。また腸内細菌パターンの類似度関係を可視化するために、第一主成分を横軸に、第二主成分を縦軸に示した結果、BL type と B type では微生物群集構造は類似していないことが確認された (Fig. 1-2)。

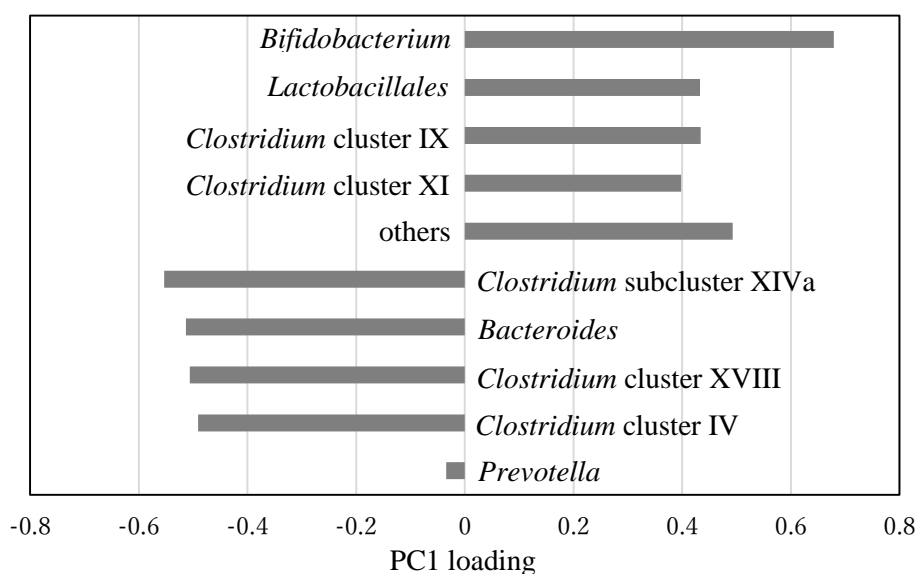


Fig. 1-1. 第1主成分の因子負荷量

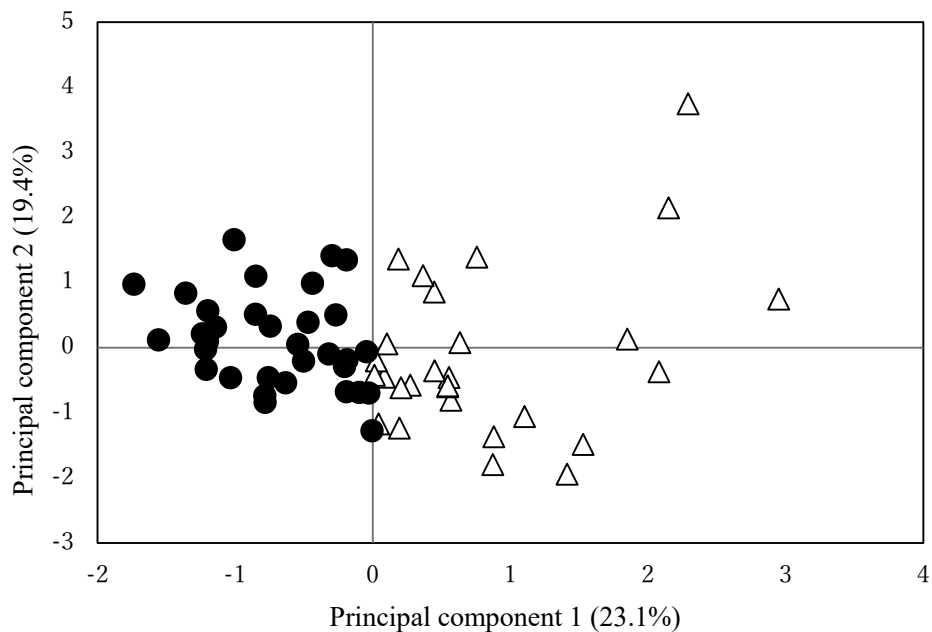


Fig. 1-2. 腸内細菌パターンの類似度関係の比較

● ; B pattern、△ ; BL pattern

2) 身体組成の比較

Table 1-2 に BL pattern と B pattern の身体組成を示した。体重、BMI、骨格筋量、体脂肪率に有意な差異は認められなかった。

Table 1-2. パターン別での身体組成の比較

	BL pattern (n=28)	B pattern (n=33)
Proportion of men (%)	11 (39%)	11 (33%)
Body weight (kg)	58.1 ± 1.1	56.6 ± 1.4
BMI (kg/m ²)	21.2 ± 0.5	20.9 ± 0.3
Skeletal muscle mass (kg)	25.4 ± 1.1	24.7 ± 1.0
Percent body fat (%)	20.4 ± 1.4	19.6 ± 1.4

値は平均値±標準誤差で示した。

2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

3) 腸内細菌叢の比較

Table 1-3 に BL pattern と B pattern の腸内細菌叢を示した。*Bifidobacterium* ($p<0.01$)、*Lactobacillales* ($p<0.01$)、*Clostridium* cluster IX ($p<0.01$) は B pattern と比較して BL pattern が有意に高く、*Bacteroides* ($p<0.05$)、*Clostridium* cluster IV ($p<0.01$)、*Clostridium* subcluster XIVa

($p<0.01$)、*Clostridium* cluster XVIII ($p<0.05$) は BL pattern と比較して B pattern が有意に高かった。

Table 1-3. パターン別での腸内細菌叢の比較

Bacteria (%)	All subjects (n=61)	BL pattern (n=28)	B pattern (n=33)
<i>Bifidobacterium</i>	10.4 ± 1.1	16.4 ± 1.6	5.4 ± 0.8**
<i>Lactobacillales</i>	4.1 ± 0.6	5.5 ± 1.6	2.7 ± 0.5**
<i>Bacteroides</i>	46.8 ± 1.8	43.4 ± 2.2	50.6 ± 2.0*
<i>Prevotella</i>	3.8 ± 1.4	2.1 ± 1.3	4.4 ± 2.1
<i>Clostridium</i> cluster IV	6.8 ± 0.6	4.9 ± 0.8	8.3 ± 0.6**
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	13.9 ± 0.7	11.6 ± 0.7	17.2 ± 0.8**
<i>Clostridium</i> cluster IX	5.4 ± 0.7	7.3 ± 1.2	3.2 ± 0.6**
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2	2.0 ± 0.3*
others	6.8 ± 0.6	7.1 ± 0.9	6.1 ± 0.4

値は平均値±標準誤差で示した。

* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

4) 微生物多様度の比較

Simpson index および Shannon-Wiener index により BL pattern と B pattern の微生物多様度を比較した (Fig. 1-3)。BL pattern (0.78 ± 0.01) では B pattern (0.74 ± 0.01) と比較して Simpson index が有意に高値であったが ($p<0.05$)、Shannon-Wiener index には有意な違いは示されなかった。

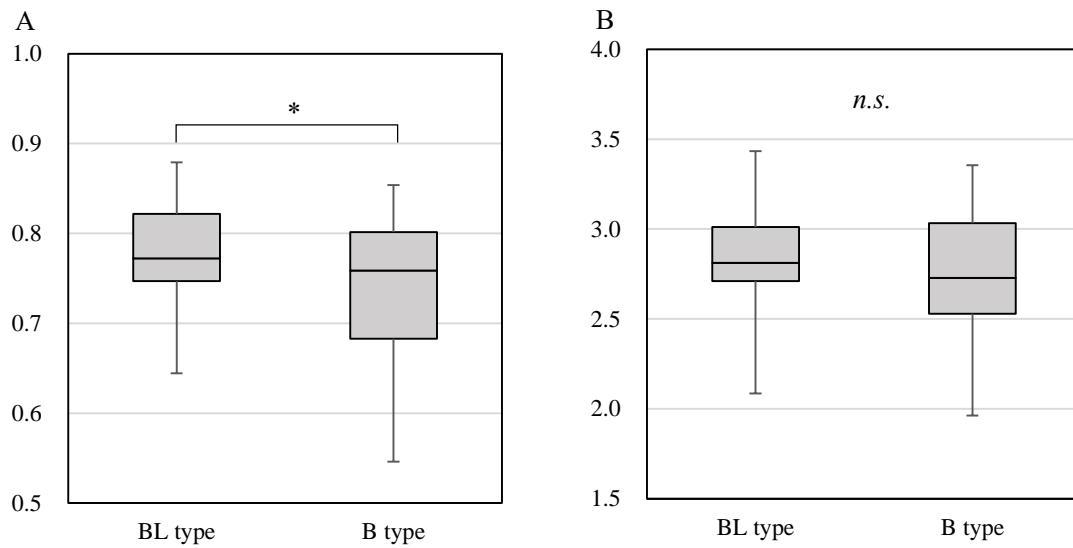


Fig. 1-3. パターン別での微生物多様度の比較

(A) Simpson index、(B) Shannon-Wiener index

* $p < 0.05$ 、*n.s.* ; not significant、2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

5) エネルギーおよび栄養素摂取量の比較

Table 1-4 に BL pattern と B pattern のエネルギーおよび栄養素摂取量を示した。B pattern では BL pattern と比較して水溶性、不溶性および総食物繊維の摂取量が有意に高値であった ($p < 0.05$)。

Table 1-4. パターン別でのエネルギーおよび栄養素摂取量の比較

	BL pattern	B pattern
Energy (kcal)	2204 ± 179	1847 ± 90
Protein (g/1000 kcal)	35 ± 2	37 ± 1
Fat (g/1000 kcal)	32 ± 2	34 ± 1
Carbohydrate (g/1000 kcal)	137 ± 5	132 ± 3
Cholesterol (mg/1000 kcal)	205 ± 18	232 ± 14
Water soluble fiber (g/1000 kcal)	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1*
Water insoluble fiber (g/1000 kcal)	3.7 ± 0.2	4.5 ± 0.2*
Total dietary fiber (g/1000 kcal)	5.2 ± 0.3	6.4 ± 0.4*
Salt (g/1000 kcal)	5.0 ± 0.2	5.3 ± 0.2
Potassium (mg/1000 kcal)	1233 ± 94	1332 ± 61
Calcium (mg/1000 kcal)	302 ± 37	290 ± 14
Magnesium (mg/1000 kcal)	115 ± 7	127 ± 5
Phosphorus (mg/1000 kcal)	536 ± 38	552 ± 17
Iron (mg/1000 kcal)	3.6 ± 0.2	4.3 ± 0.2
Zinc (mg/1000 kcal)	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.1
Copper (mg/1000 kcal)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.0
Manganese (mg/1000 kcal)	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1
Retinol equivalents (μg/1000 kcal)	345 ± 42	417 ± 33
Vitamin D (μg/1000 kcal)	5.2 ± 0.9	5.9 ± 0.6
α-tocopherol (mg/1000 kcal)	3.9 ± 0.2	4.4 ± 0.2
Vitamin K (μg/1000 kcal)	136 ± 18	181 ± 16
Vitamin B ₁ (mg/1000 kcal)	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Vitamin B ₂ (mg/1000 kcal)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0
Niacin (mg/1000 kcal)	7.6 ± 0.7	8.1 ± 0.4
Vitamin B ₆ (mg/1000 kcal)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
Vitamin B ₁₂ (μg/1000 kcal)	3.7 ± 0.4	4.6 ± 0.4
Folic acid (μg/1000 kcal)	157 ± 12	191 ± 11
Pantothenic acid (mg/1000 kcal)	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.1
Vitamin C (mg/1000 kcal)	56 ± 4	66 ± 5

値は平均値±標準誤差で示した。

*p<0.05、2群間の比較には対応のないt検定を使用した。

6) 食品群別摂取量の比較

Table 1-5 に BL pattern と B pattern の食品群別摂取量を示した。B pattern では BL pattern と比較してその他の野菜 (p<0.05)、きのこ類 (p<0.05)、豆類 (p<0.01) および卵類 (p<0.05) の摂取量が有意に高値であった。

Table 1-5. パターン別での食品群別摂取量の比較

	BL pattern	B pattern
Cereals (g/1000 kcal)	222 ± 19	206 ± 11
Potatoes (g/1000 kcal)	23 ± 3	26 ± 4
Green-yellow vegetables (g/1000 kcal)	60 ± 9	67 ± 6
Other vegetables (g/1000 kcal)	62 ± 7	90 ± 8*
Mushrooms (g/1000 kcal)	3.0 ± 0.7	5.1 ± 0.8*
Beans (g/1000 kcal)	19 ± 3	33 ± 3**
Fish (g/1000 kcal)	29 ± 4	36 ± 4
Meat (g/1000 kcal)	47 ± 7	42 ± 2
Eggs (g/1000 kcal)	20 ± 2	27 ± 3*
Milk/Dairy products (g/1000 kcal)	117 ± 23	83 ± 10
Fruits (g/1000 kcal)	63 ± 10	63 ± 11
Beverages (g/1000 kcal)	291 ± 37	280 ± 28
Oil (g/1000 kcal)	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.4

値は平均値±標準誤差で示した。

*p<0.05、2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

7) 唾液ストレスマーカーの比較

Fig. 1-4 に BL pattern と B pattern の唾液中のコルチゾール、 α -アマラーゼおよび s-IgA の値をそれぞれ示した。B pattern (196.3±12.0ng/dL) では BL pattern (157.9±11.8ng/dL) と比較してコルチゾール値が有意に高い値が示されたが (p<0.05)、 α -アマラーゼおよび s-IgA の値には有意な差異は認められなかった。

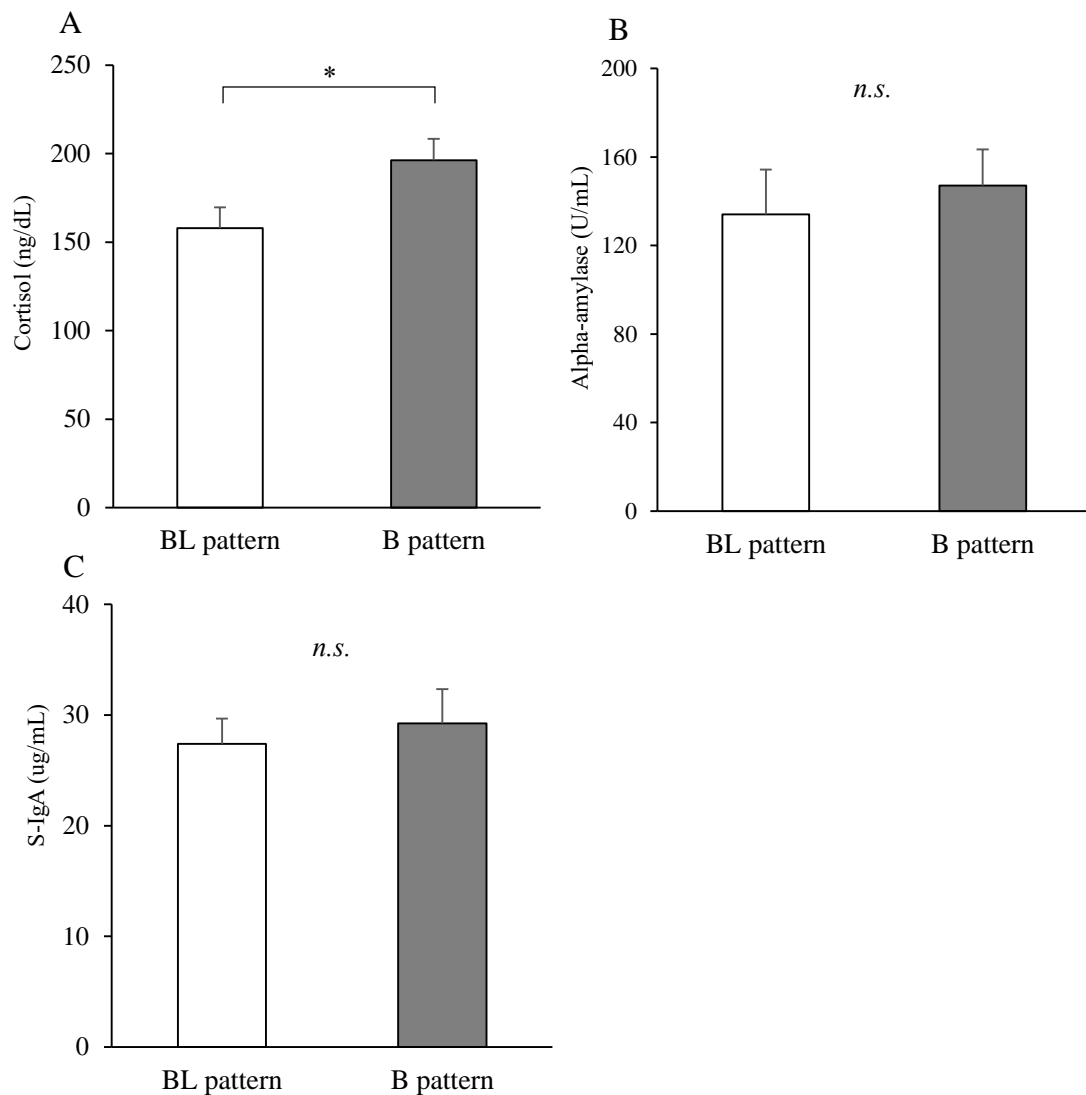


Fig. 1-4. パターン別での唾液ストレスマーカーの比較

(A) コルチゾール、(B) α -アミラーゼ、(C) s-IgA

* $p < 0.05$ 、*n.s.*; not significant、2 群間の比較には対応のない *t* 検定を使用した。

8) 腸内細菌叢と栄養素摂取量の関連性

Fig. 1-5 は腸内細菌の占有率と栄養素摂取量の相関を示したヒートマップである。各腸内細菌といくつかの栄養素に有意な相関関係が確認されたが、その中でも *Clostridium cluster IV* の占有率は鉄 ($r=0.45$, $p < 0.01$)、レチノール当量 ($r=0.42$, $p < 0.01$)、ビタミン K ($r=0.40$, $p < 0.01$) および葉酸 ($r=0.43$, $p < 0.01$) の摂取量との間において 0.4 以上の相関係数が示された。

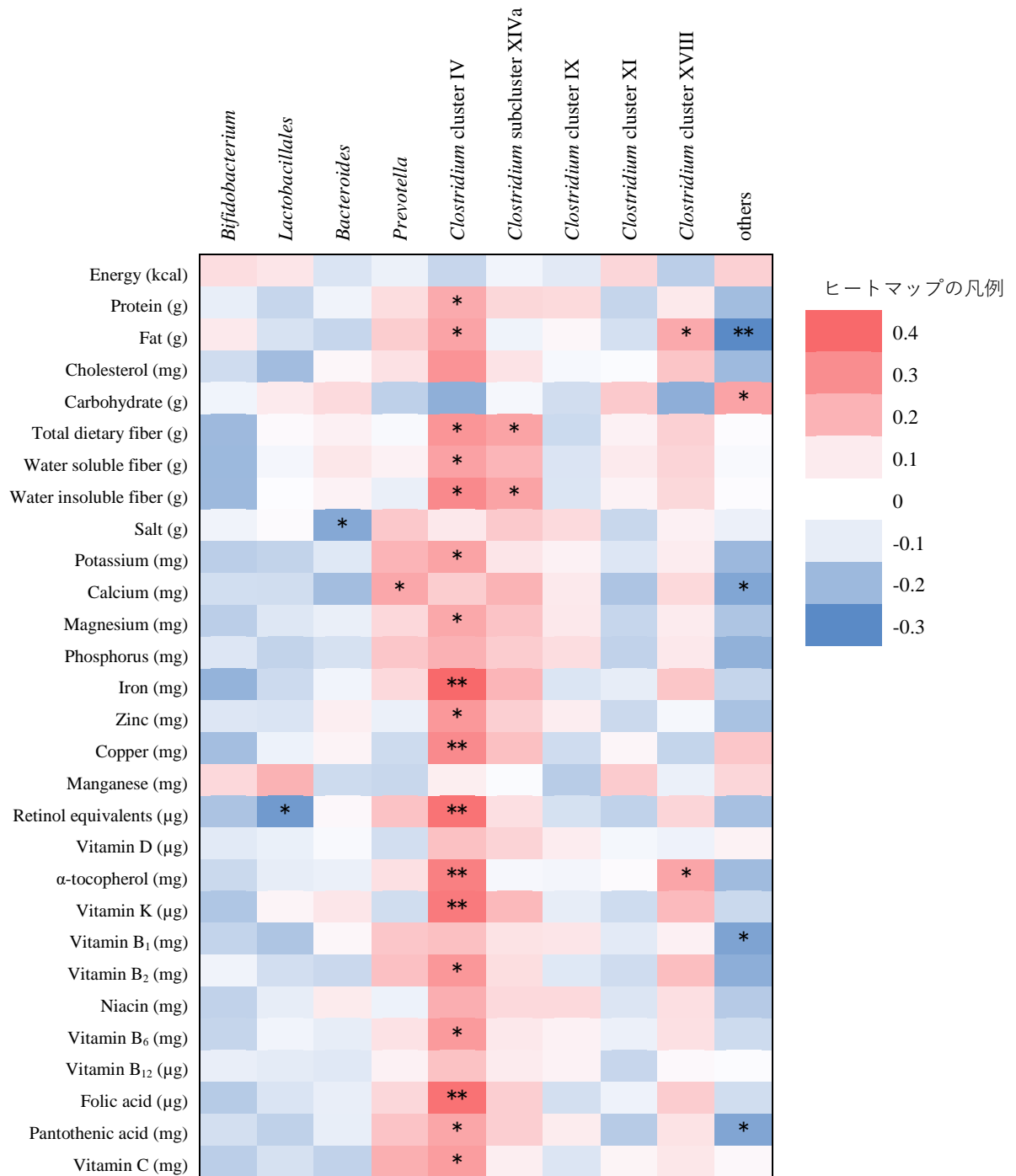


Fig. 1-5. 腸内細菌叢と栄養素摂取量の相関

栄養素摂取量は全て 1000kcal 当たり

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、Spearman の順位相関係数を用いた。

9) 腸内細菌叢と食品群別摂取量との関連性

Fig. 1-6 は腸内細菌の占有率と食品群別摂取量の相関を示したヒートマップである。各腸内細菌叢といくつかの食品群に有意な相関関係が確認されたが、その中でも *Clostridium* cluster IV の占有率はその他の野菜 ($r=0.42, p<0.01$) の摂取量との間において 0.4 以上の相関係数が示された。

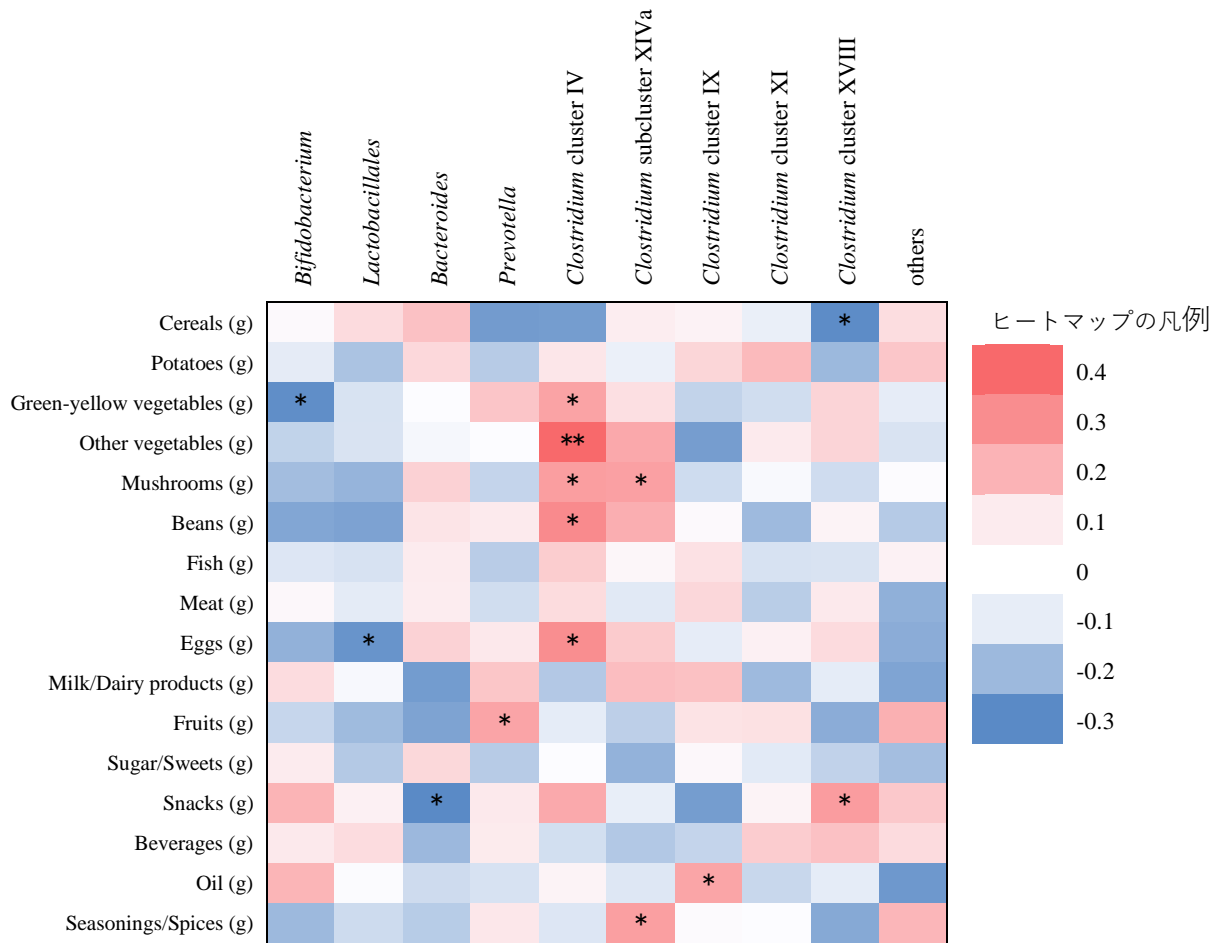


Fig. 1-6. 腸内細菌叢と食品群別摂取量の相関

栄養素摂取量は全て 1000kcal 当たり

* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、Spearman の順位相関係数を用いた。

10) 唾液ストレスマーカーと微生物多様度の関係性

唾液ストレスマーカー値の違いが微生物多様度に関連しているか検討する為に、各唾液ストレスマーカーの値を Low、Medium、High の三分位に分類し、多様度指数を比較した (Fig. 1-7, 1-8)。 α -アミラーゼおよび s-IgA の値が高い者ほど、Simpson index が有意に減少する傾向性が確認された (p for trend < 0.05)。しかしながら、Shannon-Wiener index については、有意な傾向性は示されなかった。

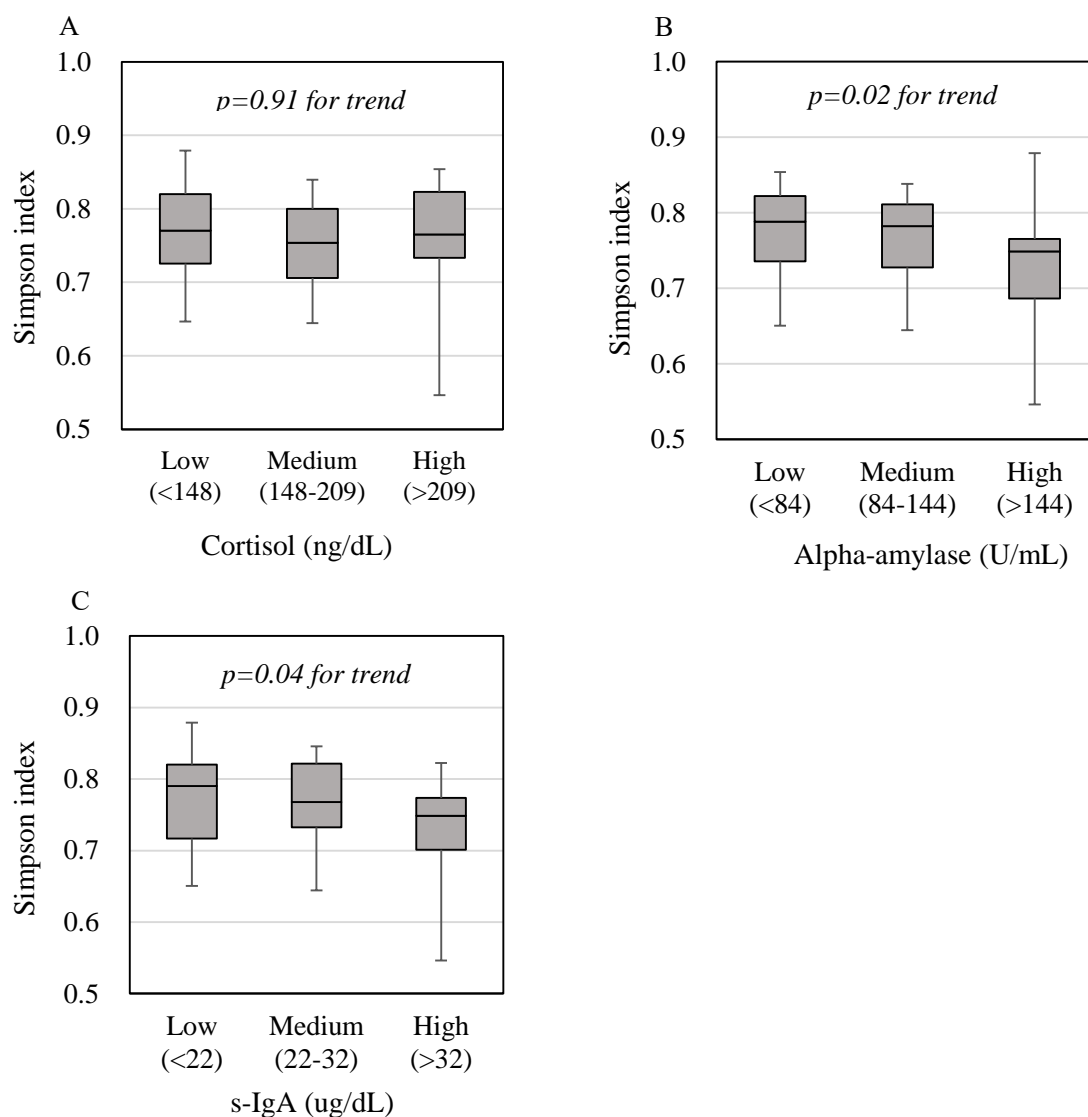


Fig. 1-7. 唾液ストレスマーカー三分位による Simpson index の比較

(A) コルチゾール、(B) α -アミラーゼ、(C) s-IgA

Low、Medium、High の唾液ストレスマーカーの平均値の傾向性は、Jonckheere-Terpstra 検定を使用した。

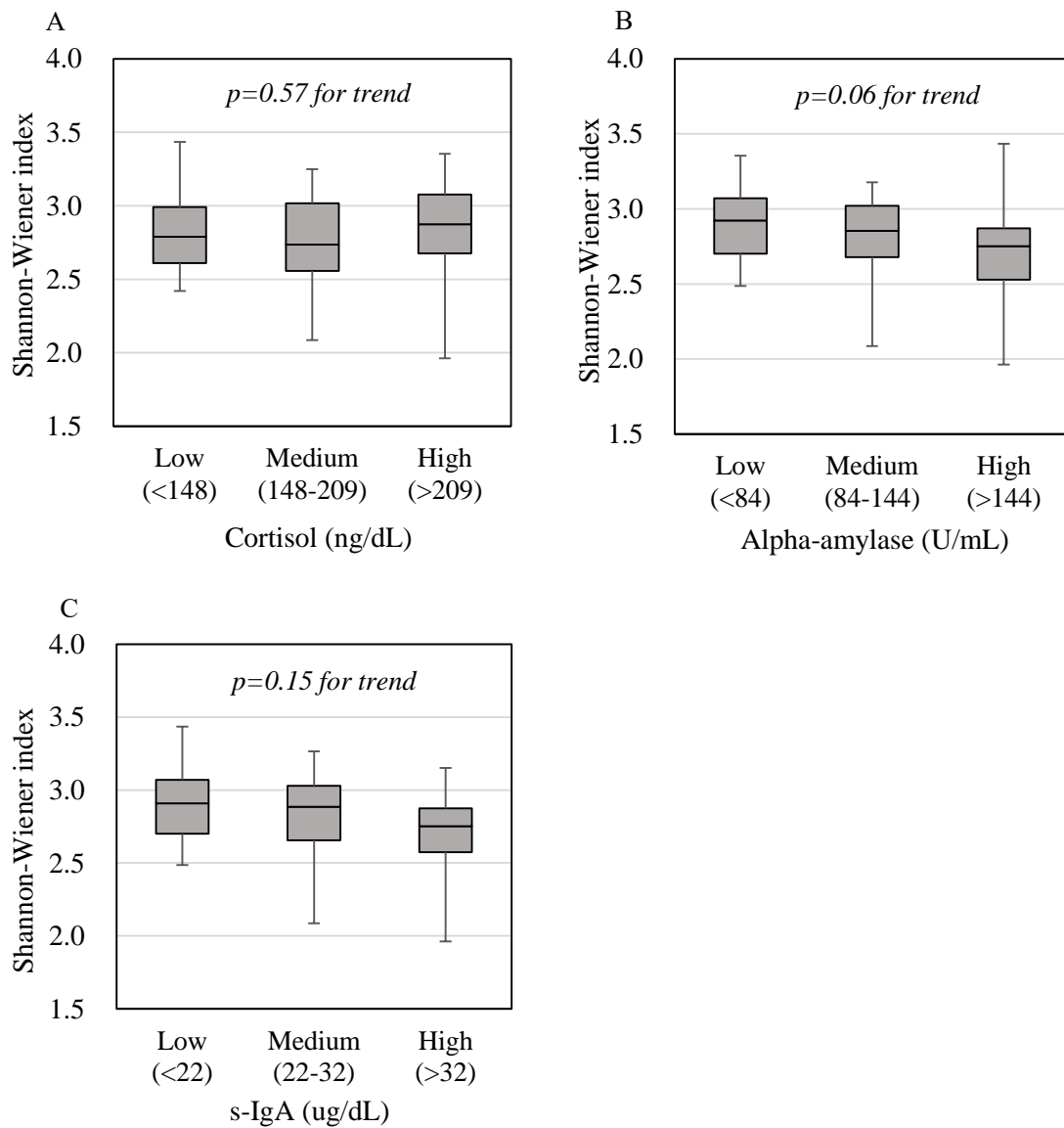


Fig. 1-8. 唾液ストレスマーカー三分位による Shannon-Wiener index の比較

(A) コルチゾール、(B) α -アミラーゼ、(C) s-IgA

Low、Medium、High の唾液ストレスマーカーの平均値の傾向性は、Jonckheere-Terpstra 検定を使用した。

4. 考察

第 1 章では、日本人の若年成人を対象に腸内細菌パターンと食物摂取状況およびストレス状態との関係性を調査した。糞便細菌叢の分析には T-RFLP 法を用い、食事の評価については食物摂取頻度調査の一つである BDHQ を使用した。またストレス状態の把握には唾液中のコルチゾール、 α -アミラーゼおよび s-IgA を指標とした。研究の結果、腸内細菌パターンは *Bifidobacterium* および *Lactobacillales* の占有率が高いパターン (BL pattern) と *Bacteroides* の高いパターン (B pattern) に分類され、両パターンでは、食物繊維をはじめその他の野菜、キノコ類、豆類および卵類の摂取量に有意な差異が認められた。さらに BL pattern では唾液コルチゾールの値が有意に低いことが示され、腸内細菌パターンは食事のみならずストレス状態にも関連する可能性が示唆された。また、被験者全体の腸内細菌占有率を見ると、*Bifidobacterium* が約 10%、*Lactobacillales* が約 4%、*Bacteroides* は約 47%、*Prevotella* が約 4%、*Clostridium* group (IV、XI、XIVa、XVIII) は約 28%であった。Kasai らは、T-RFLP 分析により男性 11 名、女性 12 名の日本人 (平均年齢 45.6 歳) における非肥満者の腸内細菌叢を調査している。その結果によると *Bifidobacterium*、*Lactobacillales*、*Bacteroides*、*Prevotella* および *Clostridium* group (IV、XI、XIVa、XVIII) の平均占有率はそれぞれ、8%、5%、41%、3%および 32%と示されており[31]、本研究における対象者の平均値とおおむね一致した結果であったと言える。

目的で述べたように、エンテロタイプ形成には三大栄養素の摂取量が関与していることが明らかとなっているが、本研究においては両パターンで、炭水化物、タンパク質、脂質の摂取量に有意な違いは確認されず、先行研究とは一致した結果は得られなかった。しかしながら、興味深いことに B pattern では野菜類、キノコ類、豆類、さらに水溶性、不溶性および総食物繊維の摂取量が有意に高い値が示された。様々な横断研究により食物繊維の摂取量が多いベジタリアンやヴィーガン (絶対採食主義者) の者では、腸内の *Bifidobacterium* は一般の食事の者と比べ低いことが確認されている[32, 33]。一方で介入研究では、食物繊維の摂取が腸内の *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などを増加させることが明らかとなっており[34]、本研究結果とは一致しない。このことは、食物繊維の摂取が必ずしも *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などの腸内有用菌を増加させるわけではないことを示している。つまり、日常の食事ではいろいろな食品を摂取しており、単一の栄養素が腸内細菌叢に影響を及ぼしているのではなく、様々な食品や栄養素、あるいはそれら以外の要因が相互に作用し腸内細菌組成を構成していると考えられる。したがって、今後の研究では日本人の腸内細菌パターンの変化に最も関わる主要因子を探ることが課題となる。

BL pattern では、唾液中のコルチゾール値が減少し、さらに微生物多様度も減少していた。様々な腸内細菌種の中で *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* はプロバイオティクスとして知られており、腸内環境を良好に保ち、精神的疾患の予防や改善にも繋がることを見出されつつある。その中でも、*Lactobacillus casei* Shirota 株を含む乳製品は、8 週間摂取すると α 多様性が増加し、ストレス誘発性の不安や鬱症状が改善されることが明らかとなっている[12]。

また *Bifidobacterium longum* R0175 および *Lactobacillus helveticus* T0052 の経口摂取によっても尿中コルチゾール値が減少し、気分尺度を示すスコアが改善されたことが認められている[35]。これらのプロバイオティクスがストレス反応を緩和するメカニズムについては未だ明確にはなっていないが、Takada らはラットに *Lactobacillus casei* 株を2週間摂取させた時、視床下部の室傍核における Corticotropine-releasing factor (CRF) 分泌の抑制を明らかとした[36]。さらに、Desbonnet らはラットに *Bifidocacteria* を2週間摂取させ観察した結果、Interleukin-6 (IL-6) が減弱し、鬱症状が改善されることを示した[37]。つまり、*Bifidobacterium* や *Lactobacillales* はストレス放出ホルモンや炎症性サイトカインの産生に関わり、宿主のストレス応答を調節していることが示唆される。このことから *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* の占有率が多い腸内細菌パターンにおいては、ストレス反応が抑制され、宿主の精神的健康度を良好に保つ可能性があることが考えられる。

また近年では、腸内細菌組成のみならず腸内の微生物多様度が宿主の健康を保持する上で重要な因子となることが明らかになりつつある。たとえば、食物繊維の少ない食事では、 α 多様性が減少することが分かっている [38]。また双子の腸内細菌叢を比較したメタゲノム解析によると、肥満児では腸内微生物の多様性が減少し、多様性の低下が肥満形成の重要な因子であるとされている[39]。このように、腸管内の微生物多様性の高さが健康上の利点と強く関連していることが見出されており、精神的なストレスもまた腸内微生物の豊富さや多様性を減少させることが明らかとなっている[11]。本研究においても、唾液ストレスマーカーの高い B pattern では、Simpson index が有意に低く、Shannon-Wiener index も低下傾向であることが示された。さらに Simpson index については、 α -アミラーゼや s-IgA の値が高くなるほど有意に減少する傾向性が確認された。本研究は、健常者の腸内細菌パターンの変動に習慣的なストレスが反映していること、さらにストレス状態が腸管の微生物多様度にも影響を及ぼす可能性を示し、今後の研究を示唆する重要な報告である。

第2章 日本食スコアが腸内細菌叢に及ぼす影響

1. 目的

第1章にて腸内細菌パターンの違いは、食物繊維、キノコ類、豆類等の摂取量の違いが関与する可能性が示され、さらに唾液コルチゾール値にも影響することが明らかとなった。本章では、日本人の腸内細菌叢に及ぼす別の食事要因として、我が国の食事形式のひとつである日本食に着目した。これまでに動物性たんぱく質や脂質の摂取が豊富な欧米型の食事や、野菜類、果物、魚介類を頻繁に摂取する地中海式の食事が腸内細菌叢に影響を及ぼすことが確認されている[40]。したがって、日本型の食事形式も腸内細菌叢に影響するという仮説が考えられる。近年では、日本食が高血圧や循環器疾患および高齢者の機能障害の発症を予防し [41, 42, 43]、健康的な食事形式であることが注目されている。これらの栄養疫学研究では、特に食事摂取頻度調査票 (FFQ : Food Frequency Questionnaire) や簡易型自記式食事履歴問票 (BGHQ : Brief-type self-administered diet history questionnaire) を用いて日本食の摂取頻度を評価した日本食スコア (Japanese diet score) が採用されている。そこで第2章では、前章で得られた BDHQ の結果より日本食スコアを算出し、日本食スコアが腸内細菌叢に及ぼす影響に関して検討することを目的とした。

2. 方法

1) 対象者および調査項目

対象者は、61名のうちエネルギー摂取量が著しく高かった1名を除外し60名とした。また、身体計測値、食事データおよび T-RFLP の結果は第1章で得られたデータを使用した。

2) 日本食スコア

日本食型食事スタイルの傾向を算出するために、第1章で得られた BDHQ の結果を基に、めし、みそ汁、海藻、漬物、緑黄色野菜、魚介類、緑茶、肉類、コーヒーの9種類の食品群から日本食スコアを算出した[44]。得点の算出方法は、9種類の食品群摂取量を男女別に集計を行い、それぞれの中央値をカットオフ値として、めし、みそ汁、海藻、漬物、緑黄色野菜、魚介類、緑茶は中央値以上で一点、肉類およびコーヒーは中央値未満で1点とし、これらの合計得点 (0~9点) を Japanese diet score (JD score) とした。得られた JD score から 0~3点の者は低得点群 (Low JD group)、4~8点の者は高得点群 (High JD group) とし、栄養素摂取量および糞便細菌叢を比較した。

3) 統計処理

測定値は全て平均値±標準誤差で示した。2群間の比較は対応のない t 検定を使用した。また日本食スコア算出に使用した9種類の食品群については、摂取量を三分位 (Low、Medium、High) に分類し、各分位の腸内細菌占有率の傾向性について Jonckheere-Terpstra 検定を用い

て検討した。統計解析には、SPSS version 22.0 を使用し、5%未満を有意水準とした。

3. 結果

1) 身体組成の比較

Table 2-1 に Low JD group と High JD group の身体組成を示した。体重、BMI、体脂肪率、骨格筋量に有意な差異は認められなかった。

Table 2-1. Low JD group および High JD group における身体組成の比較

	Low JD group (n=22)	High JD group (n=38)
Proportion of men (%)	10 (45%)	12 (32%)
Body weight (kg)	60.5 ± 1.7	56.1 ± 1.5
BMI (kg/m ²)	21.7 ± 0.4	20.8 ± 0.4
Skeletal muscle mass (kg)	26.7 ± 1.3	24.5 ± 0.9
Percent body fat (%)	18.4 ± 1.7	20.5 ± 1.2

値は平均値±標準誤差で示した。

2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

2) 腸内細菌叢の比較

Table 2-2 に Low JD group と High JD group の腸内細菌叢を示した。*Bacteroides* は Low JD group と比較して High JD group が有意に高く ($p<0.05$)、*Prevotella* は Low JD group と比較して High JD group が有意に低かった ($p<0.05$)。

Table 2-2. Low JD group および High JD group における腸内細菌叢の比較

Bacteria (%)	Low JD group (n=22)	High JD group (n=38)
<i>Bifidobacterium</i>	10.4 ± 2.0	9.9 ± 1.3
<i>Lactobacillales</i>	4.8 ± 1.3	3.7 ± 0.6
<i>Bacteroides</i>	42.6 ± 3.0	50.3 ± 1.5*
<i>Prevotella</i>	7.7 ± 3.2	0.1 ± 0.1*
<i>Clostridium</i> cluster IV	6.5 ± 0.8	6.9 ± 0.7
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	13.9 ± 0.9	15.5 ± 1.0
<i>Clostridium</i> cluster IX	5.3 ± 1.2	4.9 ± 0.9
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.3
others	6.5 ± 0.8	6.8 ± 0.6

値は平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ 、2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

3) 微生物多様度の比較

Simpson index および Shannon-Wiener index により Low JD group と High JD group の微生物多様度について比較した結果 (Fig. 2-1)、両グループに有意な差異は認められなかった。

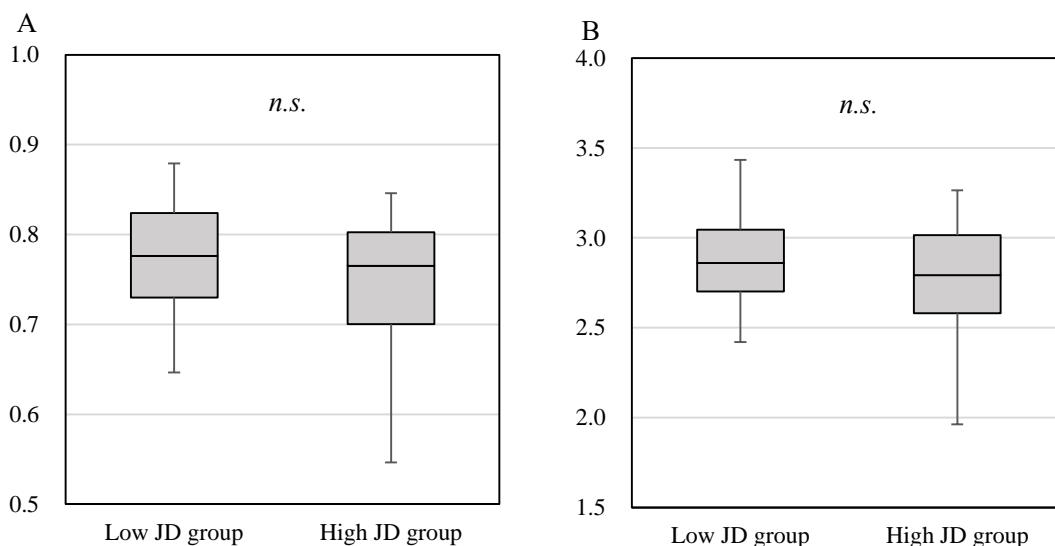


Fig. 2-1. Low JD group および High JD group における微生物多様度の比較

(A) Simpson index、(B) Shannon-Wiener index

n.s.; not significant、2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

4) エネルギーおよび栄養素摂取量の比較

Table 2-3 に Low JD group と High JD group のエネルギーおよび栄養素摂取量を示した。Low JD group では High JD group と比較して銅 ($p<0.01$) およびビタミン D ($p<0.05$) の摂取量が有意に低値であった。

Table 2-3. Low JD group および High JD group におけるエネルギーおよび栄養素摂取量の比較

	Low JD group	High JD group.
Energy (kcal)	1864 ± 176	2113 ± 116
Protein (g/1000 kcal)	35 ± 3	36 ± 1
Fat (g/1000 kcal)	35 ± 2	31 ± 1
Carbohydrate (g/1000 kcal)	132 ± 6	137 ± 3
Cholesterol (mg/1000 kcal)	229 ± 24	212 ± 11
Water soluble fiber (g/1000 kcal)	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1
Water insoluble fiber (g/1000 kcal)	3.7 ± 0.3	4.4 ± 0.2
Total dietary fiber (g/1000 kcal)	5.2 ± 0.4	6.2 ± 0.3
Salt (g/1000 kcal)	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.2
Potassium (mg/1000 kcal)	1250 ± 119	1314 ± 56
Calcium (mg/1000 kcal)	307 ± 43	290 ± 17
Magnesium (mg/1000 kcal)	115 ± 9	125 ± 4
Phosphorus (mg/1000 kcal)	538 ± 44	548 ± 18
Iron (mg/1000 kcal)	3.7 ± 0.3	4.2 ± 0.2
Zinc (mg/1000 kcal)	4.2 ± 0.2	4.4 ± 0.1
Copper (mg/1000 kcal)	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0**
Manganese (mg/1000 kcal)	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Retinol equivalents (μg/1000 kcal)	390 ± 64	387 ± 23
Vitamin D (μg/1000 kcal)	4.2 ± 1.0	6.1 ± 0.4*
α-tocopherol (mg/1000 kcal)	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Vitamin K (μg/1000 kcal)	142 ± 24	170 ± 14
Vitamin B ₁ (mg/1000 kcal)	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Vitamin B ₂ (mg/1000 kcal)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0
Niacin (mg/1000 kcal)	7.6 ± 0.8	7.9 ± 0.3
Vitamin B ₆ (mg/1000 kcal)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Vitamin B ₁₂ (μg/1000 kcal)	3.3 ± 0.4	4.4 ± 0.3
Folic acid (μg/1000 kcal)	162 ± 16	183 ± 10
Pantothenic acid (mg/1000 kcal)	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.1
Vitamin C (mg/1000 kcal)	56 ± 6	64 ± 4

値は平均値±標準誤差で示した。

*p<0.05、**p<0.01、2群間の比較には対応のないt検定を使用した。

5) 食品群摂取量の比較

Table 2-4 に日本食スコア算出のために使用した 9 食品群の摂取量を示した。Low JD group では High JD group と比較して飯、味噌汁、漬物、海藻類および魚介類の摂取量が有意に低かった ($p < 0.05$)。一方でコーヒーの摂取量については、High JD group と比較して Low JD group で有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

Table 2-4. Low JD group および High JD group における 9 食品群の摂取量の比較

	Low JD group	High JD group
Rice (g/1,000 kcal)	127 ± 18	175 ± 12*
Miso soup (g/1,000 kcal)	50 ± 14	69 ± 8*
Pickles (g/1,000 kcal)	2.5 ± 0.9	4.8 ± 0.8*
Green and yellow vegetables (g/1,000 kcal)	61 ± 12	67 ± 5
Seaweeds (g/1,000 kcal)	3.1 ± 0.9	7.6 ± 1.3*
Fish (g/1,000 kcal)	24 ± 5	36 ± 3*
Green tea (g/1,000 kcal)	117 ± 35	127 ± 21
Meat (g/1,000 kcal)	50 ± 8	41 ± 3
Coffee (g/1,000 kcal)	70 ± 19	20 ± 5*

値は平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ 、2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

6) 食品群摂取量と腸内細菌叢との関係

9 種類の食品群摂取量を Low、Medium、High の三分位に分類し、腸内細菌叢を比較した結果 (Table 2-5)、飯の摂取が高いほど *Prevotella* の占有率が有意に低くなる傾向性を示し (p for trend < 0.05)、海藻類の摂取量が高いほど *Clostridium cluster IX* の占有率が有意に低くなる傾向性を示した (p for trend < 0.05)。また緑茶の摂取量が高いほど *Bifidobacterium* の占有率が有意に高くなる傾向性が示された (p for trend < 0.05)。

Table 2-5. 食品群摂取量三分位による腸内細菌叢との関連

	Low	Medium	High	
Rice (g/1000 kcal)	95	138	203	p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	9.4 ± 1.6	8.5 ± 1.7	12.5 ± 2.2	0.43
<i>Lactobacillales</i>	4.5 ± 1.1	2.6 ± 0.6	5.3 ± 1.2	0.29
<i>Bacteroides</i>	42.5 ± 2.8	52.5 ± 2.0	46.4 ± 2.8	0.36
<i>Prevotella</i>	9.4 ± 3.8	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	<0.05
<i>Clostridium</i> cluster IV	8.0 ± 0.9	6.6 ± 0.8	5.9 ± 1.1	0.10
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	14.3 ± 1.4	15.6 ± 1.1	14.7 ± 1.2	0.57
<i>Clostridium</i> cluster IX	3.5 ± 1.1	6.4 ± 1.1	5.0 ± 1.3	0.45
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.91
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	2.0 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.1 ± 0.3	<0.05
others	6.0 ± 0.5	5.8 ± 0.6	8.3 ± 1.2	0.24
Miso soup (g/1000 kcal)	0	40	96	p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	10.2 ± 1.7	12.3 ± 2.1	8.0 ± 1.9	0.28
<i>Lactobacillales</i>	4.9 ± 1.0	4.0 ± 0.8	3.5 ± 1.1	0.06
<i>Bacteroides</i>	45.8 ± 2.9	47.5 ± 2.7	49.0 ± 2.5	0.40
<i>Prevotella</i>	4.5 ± 2.4	2.2 ± 2.2	2.1 ± 1.9	0.89
<i>Clostridium</i> cluster IV	6.6 ± 0.8	6.4 ± 0.9	7.4 ± 1.0	0.67
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	14.1 ± 1.5	14.5 ± 1.1	16.1 ± 1.1	0.09
<i>Clostridium</i> cluster IX	6.5 ± 1.4	3.2 ± 0.6	5.6 ± 1.3	0.55
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.95
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.4	0.05
others	5.4 ± 0.4	7.9 ± 1.0	6.6 ± 0.9	0.30
Pickles (g/1000 kcal)	0.0	0.2	1.0	p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	9.6 ± 2.1	9.8 ± 2.0	10.9 ± 1.7	0.40
<i>Lactobacillales</i>	3.9 ± 1.0	4.0 ± 1.1	4.3 ± 1.0	0.81
<i>Bacteroides</i>	47.8 ± 3.1	47.8 ± 2.8	46.9 ± 2.2	0.52
<i>Prevotella</i>	3.8 ± 2.7	3.6 ± 2.3	1.4 ± 1.4	0.48
<i>Clostridium</i> cluster IV	6.5 ± 0.8	6.4 ± 1.0	7.4 ± 1.0	0.58
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	14.9 ± 1.2	14.1 ± 1.2	15.7 ± 1.3	0.66
<i>Clostridium</i> cluster IX	4.9 ± 1.2	4.8 ± 1.2	5.5 ± 1.3	0.96
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.55
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.3	2.0 ± 0.3	0.56
others	6.7 ± 0.6	7.5 ± 1.2	5.8 ± 0.4	0.39
Green and yellow vegetables (g/1000 kcal)	28	63	97	p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	11.2 ± 1.8	11.0 ± 2.0	8.2 ± 2.0	0.15
<i>Lactobacillales</i>	3.7 ± 1.2	4.9 ± 1.0	3.6 ± 0.8	0.60
<i>Bacteroides</i>	47.4 ± 2.8	48.1 ± 2.3	46.8 ± 3.0	0.97
<i>Prevotella</i>	2.9 ± 2.0	0.0 ± 0.0	5.8 ± 3.1	0.14
<i>Clostridium</i> cluster IV	6.9 ± 1.0	6.7 ± 1.0	6.8 ± 0.8	0.77
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	14.2 ± 1.1	14.8 ± 1.3	15.8 ± 1.2	0.43
<i>Clostridium</i> cluster IX	5.0 ± 1.3	5.7 ± 1.2	4.5 ± 1.2	0.64
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.35
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.4 ± 0.3	1.9 ± 0.4	1.5 ± 0.3	0.95
others	6.9 ± 0.8	6.5 ± 0.9	6.6 ± 0.8	0.73

(次ページに続く)

	Low	Medium	High	
Seaweeds (g/1000 kcal)	1.0	3.6	8.6	p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	9.3 ± 2.3	10.5 ± 2.0	10.3 ± 1.5	0.41
<i>Lactobacillales</i>	3.5 ± 0.7	5.2 ± 1.4	3.5 ± 0.7	0.97
<i>Bacteroides</i>	44.7 ± 3.3	49.2 ± 2.5	47.9 ± 2.2	0.86
<i>Prevotella</i>	6.0 ± 3.1	1.3 ± 1.3	2.1 ± 2.0	0.22
<i>Clostridium</i> cluster IV	5.7 ± 1.0	6.8 ± 1.0	7.6 ± 0.8	0.14
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	14.7 ± 1.0	13.0 ± 1.1	16.9 ± 1.3	0.29
<i>Clostridium</i> cluster IX	8.2 ± 1.8	4.5 ± 1.0	3.3 ± 0.7	<0.05
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.95
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.7 ± 0.4	0.89
others	5.9 ± 0.8	7.6 ± 1.1	6.4 ± 0.4	0.31
Fish(g/1000 kcal)	15	27	47	p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	9.2 ± 1.7	10.1 ± 2.1	11.0 ± 1.9	0.48
<i>Lactobacillales</i>	4.7 ± 1.1	4.5 ± 1.2	3.1 ± 0.7	0.55
<i>Bacteroides</i>	46.7 ± 2.9	44.6 ± 2.7	51.2 ± 2.2	0.23
<i>Prevotella</i>	4.9 ± 2.7	3.8 ± 2.6	0.0 ± 0.0	0.29
<i>Clostridium</i> cluster IV	6.2 ± 0.9	7.2 ± 1.0	6.9 ± 0.9	0.55
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	15.2 ± 1.2	15.1 ± 1.3	14.5 ± 1.3	0.70
<i>Clostridium</i> cluster IX	5.4 ± 1.3	4.3 ± 1.1	5.5 ± 1.2	0.82
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.40
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.9 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.3	0.29
others	5.5 ± 0.4	8.6 ± 1.0	5.9 ± 0.8	0.75
Green tea (g/1000 kcal)	0	42	246	p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	5.8 ± 1.2	11.2 ± 2.0	12.2 ± 1.9	<0.05
<i>Lactobacillales</i>	3.7 ± 1.1	3.1 ± 0.9	5.0 ± 1.0	0.29
<i>Bacteroides</i>	51.2 ± 2.3	45.4 ± 3.5	46.4 ± 2.2	0.22
<i>Prevotella</i>	3.7 ± 2.3	5.0 ± 3.4	1.0 ± 1.0	0.32
<i>Clostridium</i> cluster IV	7.6 ± 1.0	5.9 ± 0.8	6.9 ± 1.0	0.64
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	15.1 ± 0.9	14.8 ± 1.1	14.9 ± 1.3	0.65
<i>Clostridium</i> cluster IX	5.0 ± 1.5	7.6 ± 1.5	3.5 ± 0.7	0.33
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.30
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.8 ± 0.4	1.3 ± 2.6	1.6 ± 0.3	0.58
others	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.5	7.9 ± 1.0	0.15
Meat (g/1000 kcal)	29	37	53	p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	10.2 ± 1.7	8.9 ± 1.8	11.2 ± 2.2	0.83
<i>Lactobacillales</i>	3.8 ± 1.0	4.6 ± 0.8	3.8 ± 1.2	0.50
<i>Bacteroides</i>	45.7 ± 2.7	48.9 ± 2.6	47.8 ± 2.7	0.53
<i>Prevotella</i>	7.1 ± 3.3	0.0 ± 0.0	1.6 ± 1.4	0.54
<i>Clostridium</i> cluster IV	6.2 ± 0.8	7.0 ± 1.0	7.2 ± 1.0	0.47
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	14.1 ± 1.1	16.7 ± 1.5	14.1 ± 1.0	0.91
<i>Clostridium</i> cluster IX	5.2 ± 1.0	4.2 ± 1.2	5.9 ± 1.4	0.96
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.88
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.5 ± 0.3	0.33
others	5.6 ± 0.4	7.7 ± 1.0	6.6 ± 0.9	0.62

(次ページに続く)

	Low		Medium		High		
Coffee (g/1000 kcal)	0		14		85		p for trend
<i>Bifidobacterium</i>	10.4	± 2.0	12.0	± 2.2	7.5	± 1.6	0.27
<i>Lactobacillales</i>	3.8	± 0.9	3.9	± 0.9	1.6	± 4.2	0.63
<i>Bacteroides</i>	46.2	± 2.9	49.4	± 2.2	48.2	± 2.8	0.48
<i>Prevotella</i>	3.0	± 1.9	0.0	± 0.0	6.1	± 3.4	0.88
<i>Clostridium</i> cluster IV	7.3	± 1.0	6.0	± 0.9	7.4	± 1.0	0.92
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	16.0	± 1.5	13.9	± 1.2	14.9	± 1.1	0.92
<i>Clostridium</i> cluster IX	5.0	± 1.4	5.3	± 1.0	3.6	± 0.8	0.73
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.4	± 0.1	0.4	± 0.2	0.4	± 0.2	0.31
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	1.5	± 0.2	1.3	± 0.3	2.0	± 0.4	0.34
others	6.4	± 0.6	7.7	± 1.0	5.7	± 0.9	0.12

細菌の占有率は平均値±標準誤差、食品群の摂取量は中央値で示した。

Low、Medium、High の傾向性は、Jonckheere-Terpstra 検定を使用した。

4. 考察

日本食は主に、魚介類、野菜類、海藻類、豆類などが豊富で肉類や動物性の脂質が少ないことが特徴であり、地中海式の食事形式と類似していることが知られている[45]。これまでの先行研究により地中海式の食事は特に *Bacteroides* を増加させる食事スタイルであることが明らかとなっている[6]。我々の研究でも似たような結果となり、特に緑黄色野菜や海藻類、魚介類の摂取が高く、肉類の摂取量が低い High JD group では、*Bacteroides* の占有率が高くなることが確認された。Carrothers らは、授乳婦の食事摂取状況と腸内細菌叢の関連性を調査し、*Bacteroides* はタンパク質の摂取量と負の相関があったことを報告している[16]。またベジタリアンの者でも、腸内の *Bacteroides* が優勢であることが分かっている[46, 47]。このことから、腸内の *Bacteroides* の変動は習慣的な食事が関与すると考えられ、特に肉類や野菜類を含む様々な食品の摂取量が作用し、*Bacteroides* を変化させる一因となる可能性がある。しかし、一部の報告では、動物性たんぱく質や脂質を豊富に含む欧米型の食習慣においても *Bacteroides* が豊富であることを示しており[15]、*Bacteroides* と日本食との関係性については未だ不明な部分が多い。

また本研究では、Low JD group と比較して High JD group で *Prevotella* が有意に低くなり、さらに飯の摂取量が高いほど *Prevotella* の占有率が低くなることが確認された。しかしながら、先行研究では *Prevotella* は炭水化物の摂取量と正の相関性を示すことが報告されており[15]、本研究の結果とは一致しない。また低脂肪、高炭水化物の食習慣であるアフリカやエジプト人の子供たちにおいても、腸内の *Prevotella* の占有率が豊富であることが確認されている[48, 5]。食物繊維やレジスタントスターチなどの難消化性炭水化物の摂取は、*Prevotella* の占有率を促進する栄養素であることが示唆されており[49]、近年では *Prevotella* が食事やライフスタイルのバイオマーカーとなりうる腸内細菌種として注目されている[50]。このような報告がある一方で、日本人の腸内細菌構造の特徴として *Prevotella* は占有率がとても低く、マイナーポピュレーションであることが示されており[51]、特に T-RFLP 法などの解像度の低い解析では検出されにくい細菌種のひとつである[52]。本研究の結果より、日本人で *Prevotella* の占有率が低い理由としては、日本食の主食となる飯の摂取が関与していると考えられるが、これらの複雑な関係を解明するためにはさらなる調査が必要である。

興味深いことに緑茶の摂取量は、*Bifidobacterium* の占有率と有意な正の関係性が示された。多くの研究者により緑茶と腸内細菌叢との関連が報告されている。例えば、Unno らは緑茶の摂取により *Clostridium* を含むグラム陽性菌が減少し、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などの腸内有用菌が増加することを明らかとしている[53]。また別の研究においても、緑茶飲料を用いた 10 日間の介入試験により、*Bifidobacterium* の増加を報告している[54]。さらに Tzounis らはヒト大腸モデル（バッチ培養）に(+)-catechin を添加すると *Bifidobacterium* が有意に増加することを確認し、緑茶中に含まれるカテキン類が腸内細菌の増殖に関与していることを示している[55]。したがって我々の研究は、緑茶摂取の短期試験に基づく研究結果を裏付けており、さらに緑茶の習慣的な摂取においても *Bifidobacterium* の増加に関与する

可能性があることを示唆している。

本章では、BDHQ の結果より日本食の指標となる日本食スコアを算出し腸内細菌叢との関連性を検討した結果、日本食スコアの違いにより腸内細菌構造が異なることを明らかとした。また日本食の主食となる飯類は *Prevotella* を低下させ、緑茶は *Bifidobacterium* を上昇させることが示唆された。Tsuduki らの研究グループは、日本食の健康有益性に関して様々な検証を行い、これまでにメタボリックシンドロームの予防や肥満リスクの減少を見出している[56, 57, 58]。また、同研究チームは若年健常者に 4 週間 1975 年型日本食を摂取させた結果、*Firmicutes* 門が増加することを明らかにしているほか[59]、マウスを用いた動物実験では、1975 年型日本食と運動を組み合わせることにより、*Bacteroides* および *Clostridium* の増加を見出すことを報告している[60]。本研究では、Low JD group と High JD group との間で属レベルでは、*Prevotella* や *Bacteroids* に違いが示されたが、門レベルでは有意な差異は認められなかった。腸内細菌叢と食習慣、特に日本食との関連性については未だエビデンスが蓄積されておらず、明確な結論は得られていないのが現状である。しかしながら、本研究結果は習慣的な日本食の摂取が腸内細菌叢に影響を及ぼす可能性を示した初めての報告であり、同様の報告が蓄積することによって日本食と腸内細菌叢との関係の解明に寄与するだろう。

第3章 腸内細菌パターンを誘導する食事因子の解析

—若年成人女性を対象とした秤量記録法による調査—

1. 目的

先行研究では腸内細菌パターンは3つのエンテロタイプ（それぞれ *Bacteroides* エンテロタイプ、*Prevotella* エンテロタイプ、*Ruminococcus* エンテロタイプ）に分類され[13]、さらに *Bacteroides* エンテロタイプは動物性たんぱく質や脂質が豊富な食事と関連し、*Prevotella* エンテロタイプは炭水化物が豊富な食事と関連することが確認されている[15]。しかしながら、第1章では、日本人若年者の腸内細菌構造は主に *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* が多い腸内細菌パターン（BL pattern）と *Bacteroides* が多い腸内細菌パターン（B pattern）の大きく2つのタイプに分けられる結果となった。また両パターンの食物摂取状況を比較した結果、タンパク質、脂質、炭水化物に有意な差異は認められなかった他、これらの栄養素と腸内細菌種に相関性も示されず、先行研究とは一致しない結果であった。日本人のエンテロタイプについては、未だ不明な部分が多く、若年日本人特有の腸内細菌パターンを詳しく理解するには、さらなる調査研究の蓄積が必要となる。そこで第3章では、食事調査法の中でも個人の栄養素摂取量がより正確に評価できる秤量記録法を用いて食物摂取状況を評価し、腸内細菌パターンに関連する栄養素因子を検討した。しかしながら、秤量記録法では摂取したすべての食品をスケールで計量し記録するという煩雑な調査の為、食事調査技法について比較的知識を持った被験者が必要であると考えられる。以上の理由より、本研究の対象者は管理栄養士を目指す若年成人女性と限定し、調査を実施した。

2. 方法

2-1. 対象者

2014年8月から2015年7月の間に、管理栄養士の養成課程に在籍する女子学生（20～22歳）のうち、同意を得られた28名を対象とした。研究実施に際しては、本研究の目的と意義、調査方法を書面および口頭にて説明し、本人の同意を得た。なお、本研究はヘルシンキ条約を遵守し、相模女子大学倫理審査委員会の承認を得て実施した（No.1423）。

2-2. 調査項目

1) 食事調査

食事調査は、連続した3日間（平日2日、休日1日）の秤量記録法により行った。対象者は食事調査期間に食べたり飲んだりした食品全て（栄養補助食品を除く）についてスケールを用いて測定し、食事記録紙に記録した。スケールによる秤量が不可能な場合は、目安量またはできるだけ正確な重量を記録するよう指導した。インスタント食品や惣菜など調理または半調理されている食品を摂取した場合は、摂取した商品名と商品に記載されている重量および栄養価を記録するよう依頼した。3日間の食事記録の後、記録内容に誤りがないか

管理栄養士との面談のもと確認し、標準化を行った。栄養価の計算は、エクセル栄養君 Ver. 7.0 (建帛社、東京) を用いて 1 日当たりのエネルギー摂取量と栄養素摂取量および食品群別摂取量を算出した。なお秤量記録法による食事調査の結果は、栄養素密度法によるエネルギー1000kcal あたりの値を算出して解析に用いた。

2) 糞便細菌叢の分析

2-1) 糞便の採取

糞便の採取については、被験者に事前に採便キット(株式会社テクノスルガ・ラボ、静岡県)を配布し、自宅で糞便を採取してもらった。採便キットには保存液(4 M guanidium thiocyanate, 100mM Tris-HCl (pH 9.0), 40mM EDTA, 0.001% bromothmol blue) が入っており糞便採取後、室温での長期保存が可能である。被験者には特に糞便採取の時間は指定せず、便意を催した際に採取してもらうよう依頼した。

2-2) DNA 抽出

糞便からの DNA 抽出は、株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。すなわち、保存液に懸濁された糞便をジルコニアビーズにより破砕し、その懸濁液から核酸抽出試薬 Magtration System GC series Mag DEA DNA 200 および核酸抽出装置 Magtration System 12 GC(プレシジョン・システム・サイエンス株式会社、千葉県)を使用して DNA を抽出した[23]。

2-3) T-RFLP 法

抽出 DNA は、PCR 法を用いて 16SrDNA 遺伝子の増幅を行い、その増幅断片を末端標識制限酵素断片多型分析 (T-RFLP : Terminal restriction fragment length polymorphism) 法を用いて糞便細菌叢を解析した。T-RFLP 法による糞便細菌叢の解析は、株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。すなわち PCR 法では、標識プライマーとして 516f (5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3') と 1510r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を使用して、Nagashima らの方法に準じて行い[24, 25]、得られた増幅産物は、制限酵素 Bs/I で切断した。末端制限断片の長さは、遺伝子解析装置 (ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer System; Applied Biosystems, USA) を用いて決定し、DNA 解析ソフトウェア (GeneMapper; Applied Biosystems, USA) を用いて解析した。T-RFLP 法により算出される細菌グループは第 1 章の Table 1-1 と同様である。

3) T-RFLP 法により得られた微生物群集構造の解析

被験者 28 名の微生物群集構造を類似したパターンに分類するために、T-RFLP 法により解析された 10 種の細菌グループ (*Bifidobacterium*、*Lactobacillales*、*Bacteroides*、*Prevotella*、*Clostridium* cluster IV、*Clostridium* subcluster XIVa、*Clostridium* cluster IX、*Clostridium* cluster XI、*Clostridium* cluster XVIII、others) を変数としてクラスター分析を行い、デンドログラム

を作成した。クラスター間の類似度の測定はユークリッド距離を用い、分類法はウォード法とした。また 10 種の細菌グループを変数として主成分分析を行い、類似度関係を第一、第二主成分を示す散布図として可視化した。クラスター分析および主成分分析は、Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 22.0 を使用した。さらに微生物群集の多様性を解析するために Simpson および Shannon-Wiener の多様度指数を算出した[26, 27]。

4) 統計処理

測定値は全て平均値±標準偏差で示した。2 群間の比較は対応のない t 検定を使用した。糞便細菌叢と栄養素摂取量および食品群別摂取量の相関については、Spearman の順位相関係数を用いた。統計解析には、SPSS version 22.0 を使用し、5%未満を有意水準とした。

3. 結果

1) クラスター分析による微生物群集構造の分類

被験者 28 名の微生物群集構造をクラスター分析した結果、2 つのグループ (Cluster A group : 12 名、Cluster B group : 16 名) に分類された (Fig. 3-1)。

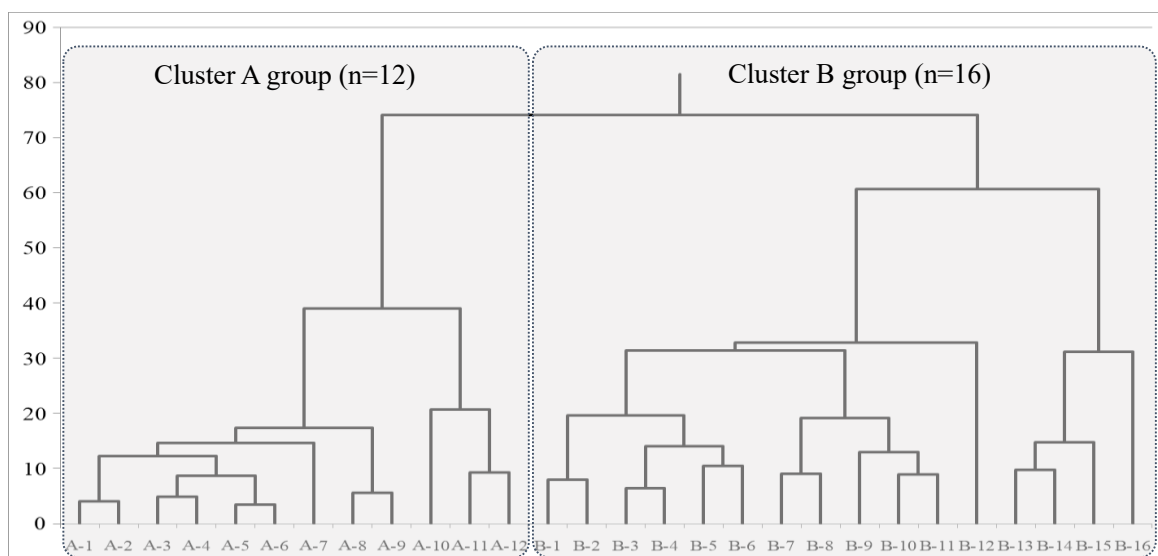


Fig. 3-1. クラスター分析による腸内細菌パターンの分類 (デンドログラム)

クラスター分析の結果を基にデンドログラムを作成し、2 つのクラスターに分類した。

2) 微生物多様度および類似性の比較

Cluster A group と Cluster B group の微生物多様度を比較した結果 (Fig. 3-2)、Cluster B group は Cluster A group と比較して Simpson および Shannon-Wiener index が有意に高かった ($p < 0.05$)。また主成分分析を行った結果、第一主成分の寄与率は 18.6%、第二主成分の寄与率は 13.2% であった。第一主成分を横軸に、第二主成分を縦軸に散布図を作成し可視化した結果、両群

間の腸内細菌パターンは類似していないことが確認された (Fig. 3-3)。

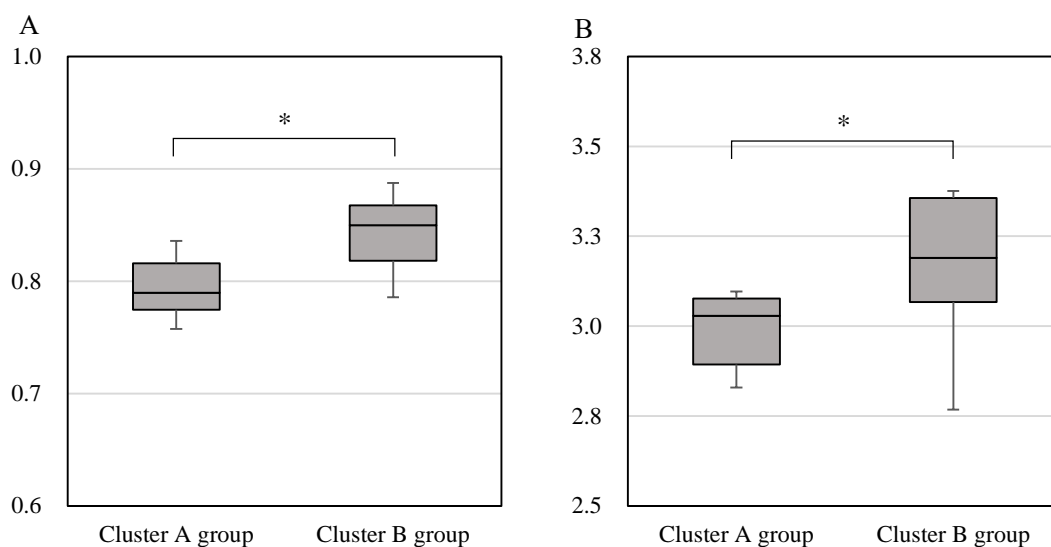


Fig. 3-2. 微生物多様度指数の比較

(A) Simpson index、(B) Shannon-Wiener index

* $p < 0.05$ 、2群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

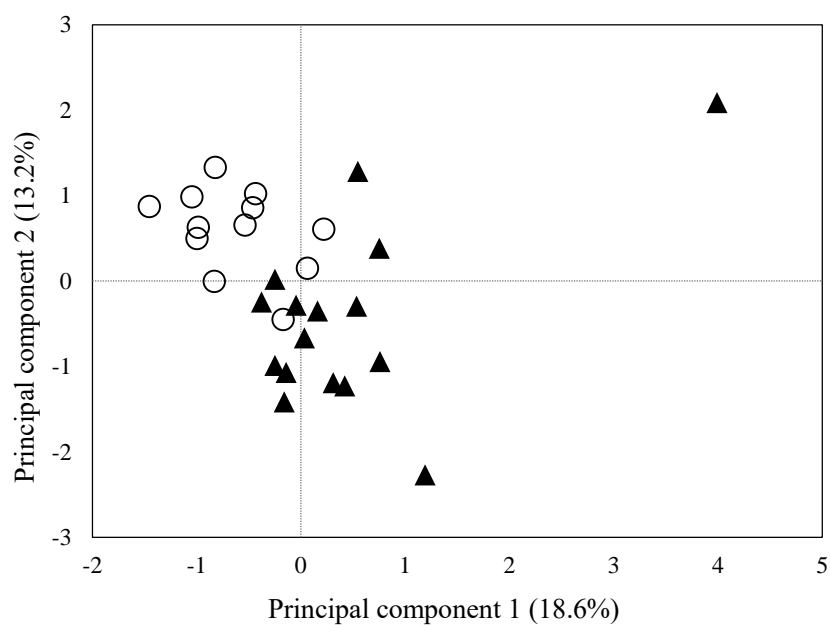


Fig. 3-3. 腸内細菌パターンの類似度関係の比較

○ ; Cluster A group、▲ ; Cluster B group

3) 腸内細菌叢の比較

Table 3-1 に Cluster A group と Cluster B group の腸内細菌叢を示した。Cluster B group では Cluster A group と比較して、*Bifidobacterium* ($p<0.01$)、*Lactobacillales* ($p<0.05$) の占有率が有意に高かった。さらに *Bacteroides* ($p<0.01$)、*Clostridium* cluster IV ($p<0.05$)、*Clostridium* cluster XVIII ($p<0.05$) については、Cluster B group と比較して Cluster A group で有意に占有率が高かった。すなわち、Cluster A group では *Bacteroides* などが豊富な腸内細菌パターンであり、Cluster B group では *Bifidobacterium* および *Lactobacillales* が豊富な腸内細菌パターンであることが確認された。

Table 3-1. クラスタ別での腸内細菌叢の比較

Bacteria (%)	Cluster A group	Cluster B group
	(n=12)	(n=16)
<i>Bifidobacterium</i>	4.8 ± 3.5	17.5 ± 5.9**
<i>Lactobacillales</i>	2.9 ± 1.8	5.2 ± 3.0*
<i>Bacteroides</i>	45.3 ± 4.8	31.1 ± 10.1**
<i>Prevotella</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>Clostridium</i> cluster IV	12.4 ± 4.7	7.9 ± 6.2*
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	23.8 ± 7.9	25.2 ± 7.7
<i>Clostridium</i> cluster IX	3.1 ± 2.0	3.1 ± 2.7
<i>Clostridium</i> cluster XI	0.4 ± 0.6	1.6 ± 2.6
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	2.5 ± 1.8	1.2 ± 1.2*
others	4.9 ± 1.9	7.2 ± 1.1

値は平均値±標準偏差で示した。

* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、2 群間の比較には対応のない t 検定を使用した。

4) エネルギーおよび栄養素摂取量の比較

Table 3-2 に Cluster A group と Cluster B group のエネルギーおよび栄養素摂取量を示した。Cluster A group では Cluster B group と比較して鉄 ($p<0.05$) およびビタミン K ($p<0.01$) の摂取量が有意に低かった。

Table 3-2. クラスタ別でのエネルギーおよび栄養素摂取量の比較

	Cluster A group	Cluster B group
Energy (kcal)	1746 ± 322	1599 ± 341
Protein (g/1000 kcal)	38 ± 5	37 ± 3
Fat (g/1000 kcal)	32 ± 6	32 ± 7
Cholesterol (mg/1000 kcal)	197 ± 58	185 ± 66
Carbohydrate (g/1000 kcal)	137 ± 12	138 ± 15
Water soluble fiber (g/1000 kcal)	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.4
Water insoluble fiber (g/1000 kcal)	5.0 ± 1.5	5.1 ± 1.4
Total dietary fiber (g/1000 kcal)	6.9 ± 2.0	7.4 ± 2.0
Salt (g/1000 kcal)	4.3 ± 1.0	5.1 ± 1.5
Potassium (mg/1000 kcal)	1323 ± 282	1356 ± 243
Calcium (mg/1000 kcal)	279 ± 82	294 ± 72
Magnesium (mg/1000 kcal)	123 ± 18	146 ± 42
Phosphorus (mg/1000 kcal)	575 ± 99	561 ± 60
Iron (mg/1000 kcal)	3.5 ± 0.5	4.7 ± 1.9*
Zinc (mg/1000 kcal)	4.3 ± 0.6	4.4 ± 0.8
Copper (mg/1000 kcal)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2
Manganese (mg/1000 kcal)	1.5 ± 0.5	2.1 ± 1.5
Retinol equivalents (μg/1000 kcal)	363 ± 309	254 ± 82
Vitamin D (μg/1000 kcal)	3.4 ± 2.4	3.7 ± 2.7
α-tocopherol (mg/1000 kcal)	3.2 ± 1.1	3.8 ± 2.2
Vitamin K (μg/1000 kcal)	76 ± 29	128 ± 32**
Vitamin B ₁ (mg/1000 kcal)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Vitamin B ₂ (mg/1000 kcal)	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Niacin (mg/1000 kcal)	17 ± 4	16 ± 2
Vitamin B ₆ (mg/1000 kcal)	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Vitamin B ₁₂ (μg/1000 kcal)	3.3 ± 1.9	3.2 ± 3.1
Folic acid (μg/1000 kcal)	159 ± 50	192 ± 54
Pantothenic acid (mg/1000 kcal)	3.4 ± 0.6	3.3 ± 0.5
Vitamin C (mg/1000 kcal)	53 ± 18	58 ± 27

値は平均値±標準偏差で示した。

*p<0.05、**p<0.01、2群間の比較には対応のないt検定を使用した。

5) 食品群別摂取量の比較

Table 3-3 に Cluster A group と Cluster B group の食品群別摂取量を示した。Cluster A group では Cluster B group と比較してキノコ類および菓子類の摂取量が有意に高かった ($p<0.05$)。

Table 3-3. クラスタ別での食品群別摂取量の比較

	Cluster A group	Cluster B group
Cereals (rice, noodles, etc) (g/1000 kcal)	215 ± 50	226 ± 59
Potatoes (g/1000 kcal)	21 ± 19	16 ± 12
Green-yellow vegetables (g/1000 kcal)	61 ± 43	46 ± 36
Other vegetables (g/1000 kcal)	74 ± 31	88 ± 40
Mushrooms (g/1000 kcal)	13 ± 14	5 ± 6*
Seaweed (g/1000 kcal)	6 ± 15	3 ± 6
Beans (g/1000 kcal)	14 ± 12	27 ± 38
Fish (g/1000 kcal)	32 ± 19	26 ± 16
Meat (g/1000 kcal)	49 ± 21	44 ± 25
Eggs (g/1000 kcal)	21 ± 17	23 ± 18
Milk/Dairy products (g/1000 kcal)	94 ± 61	69 ± 45
Fruits (g/1000 kcal)	45 ± 33	31 ± 37
Sugar/Sweets (g/1000 kcal)	3 ± 3	5 ± 4
Snacks (g/1000 kcal)	29 ± 24	12 ± 14*
Beverages (g/1000 kcal)	270 ± 216	255 ± 207
Nuts (g/1000 kcal)	1 ± 4	2 ± 3
Oil (g/1000 kcal)	5 ± 2	6 ± 4
Seasonings/Spices (g/1000 kcal)	25 ± 13	27 ± 11

値は平均値±標準偏差で示した。

* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、2群間の比較には対応のないt検定を使用した。

6) 腸内細菌叢と栄養素摂取量の関連性

Fig. 3-4. は腸内細菌の占有率と栄養素摂取量の相関を示したヒートマップである。*Bifidobacterium* の占有率はマグネシウム ($r=0.45, p<0.05$)、鉄 ($r=0.53, p<0.01$) およびビタミン K ($r=0.69, p<0.01$) 摂取量との間に有意な正の相関が認められた。*Bacteroides* の占有率はビタミン K ($r=-0.46, p<0.01$) および葉酸 ($r=-0.42, p<0.05$) の摂取量との間に有意な正の相関が認められた。*Clostridium cluster XI* はコレステロール ($r=-0.60, p<0.01$) およびビタミン B2 ($r=-0.38, p<0.05$) の摂取量との間に有意な相関関係が認められた。

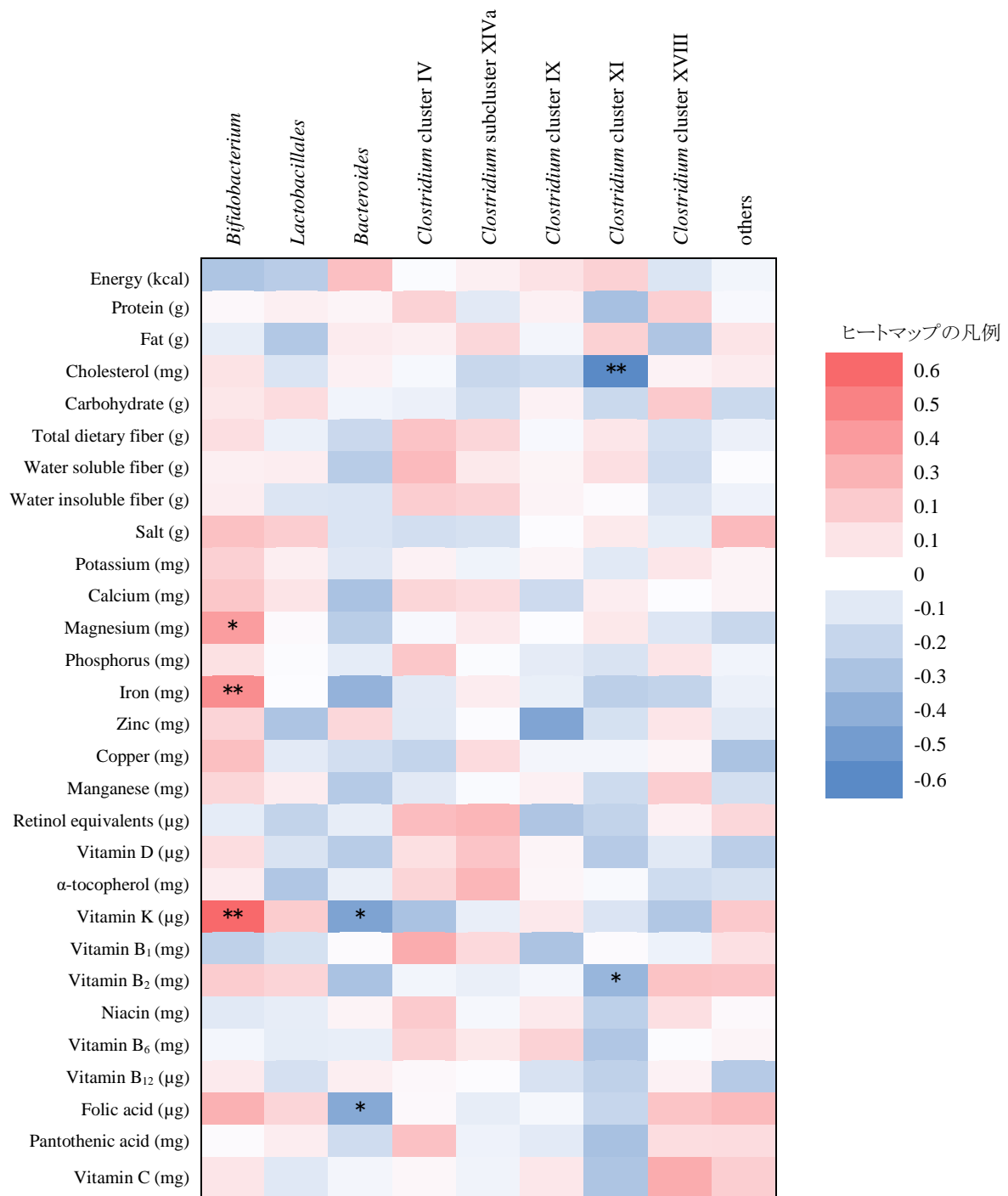


Fig. 3-4. 腸内細菌叢と栄養素摂取量の相関

栄養素摂取量は全て 1000kcal 当たり

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Spearman の順位相関係数を用いた。

また Fig. 3-5. は腸内細菌の占有率と食品群別摂取量の相関を示したヒートマップである。各腸内細菌叢といくつかの栄養素に有意な相関関係が確認されたが、その中でも *Clostridium* cluster XI の占有率は卵類の摂取量との間に有意な負の相関が認められた ($r=-0.67, p<0.01$)。

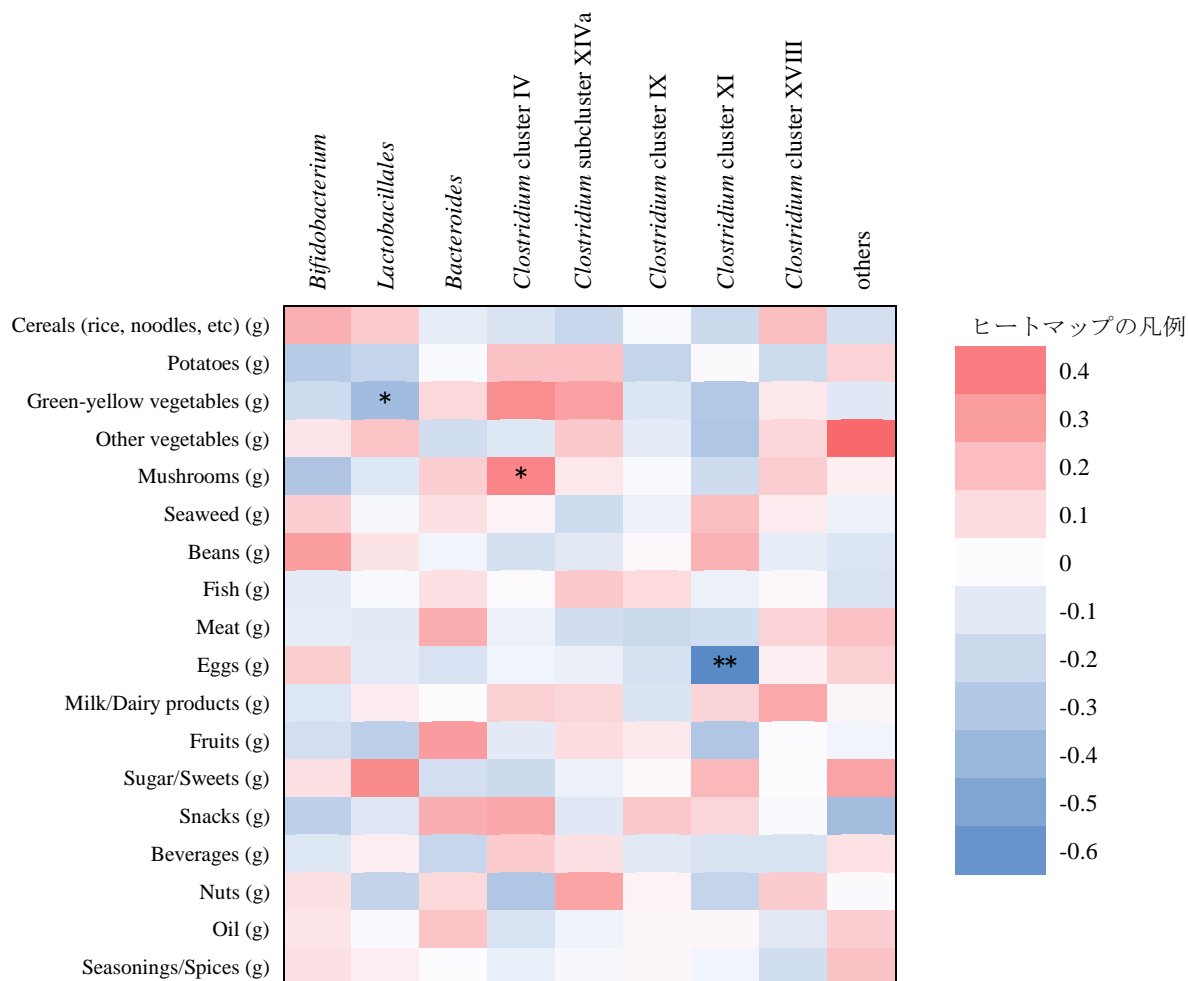


Fig. 3-5. 腸内細菌叢と食品群別摂取量の相関

食品群別摂取量は全て 1000kcal 当たり

* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、Spearman の順位相関係数を用いた。

7) 食物繊維摂取量と腸内細菌叢の関連性

Fig. 3-6. は食品別での食物繊維摂取量と腸内細菌の占有率の相関を示したヒートマップである。*Bifidobacterium* の占有率は豆類の水溶性食物繊維の摂取量と有意な正の相関が認められ ($r=0.44$; $p<0.05$)、*Lactobacillales* の占有率は穀類の水溶性 ($r=0.45$; $p<0.05$)、不溶性 ($r=0.49$; $p<0.01$)、総食物繊維 ($r=0.50$; $p<0.01$) の摂取量との間に有意な正の相関が示された。また、*Clostridium* cluster IV の占有率はキノコ類の水溶性 ($r=0.45$; $p<0.05$)、不溶性 ($r=0.38$; $p<0.05$)、総食物繊維 ($r=0.40$; $p<0.01$) 摂取量との間に有意な正の相関が示された。さらに *Clostridium* cluster XI については、穀類に含まれる水溶性 ($r=0.40$; $p<0.05$) および総食物繊維 ($r=0.39$; $p<0.05$) の摂取量との間に有意な正の相関を示し、野菜の水溶性 ($r=-0.42$; $p<0.05$)、不溶性 ($r=-0.39$; $p<0.05$) および総食物繊維 ($r=-0.39$; $p<0.05$) 摂取量との間には有意な負の相関が示された。

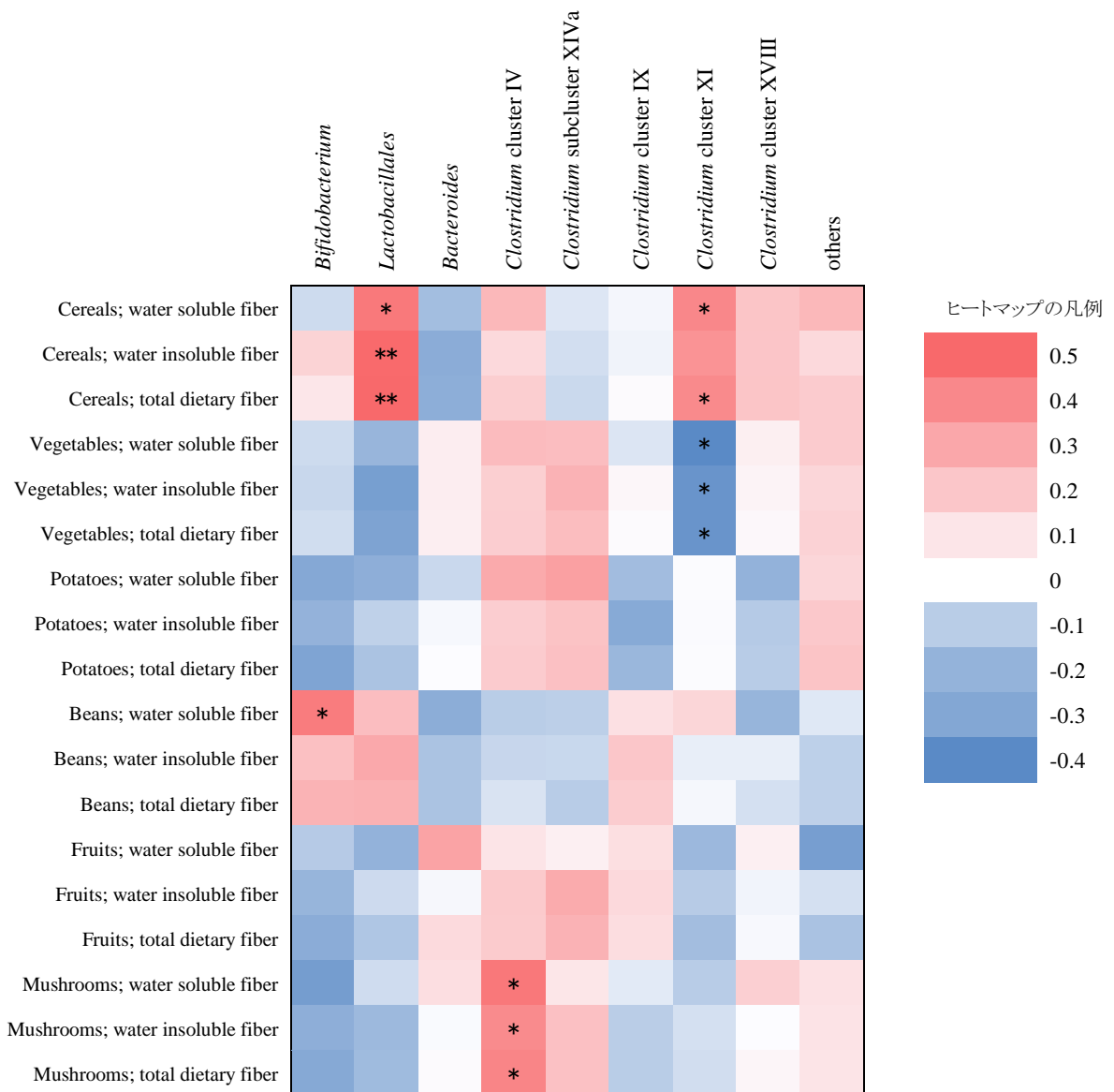


Fig. 3-6. 食品群別にみた食物繊維摂取量と腸内細菌叢の相関

食物繊維摂取量は全て 1000kcal 当たり

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 、Spearman の順位相関係数を用いた。

4. 考察

第3章では日本人の20~22歳の若年成人女性を対象に、クラスター分析を使用して腸内細菌パターンを分類した。その結果、*Bacteroides* などの占有率が高いパターン（Cluster A group）と *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* の占有率が高いパターン（Cluster B group）が算出された。この結果は、第1章での主成分分析による結果と同様であった。本研究では、対象者の糞便細菌叢を分析するために T-RFLP 法を使用した。T-RFLP 法は、微生物の群集構造を迅速に分析でき、多くのサンプルの検査に適しているが、各 T-RF ピークは複数の種類の微生物に由来する為、全ての細菌種を検出できない欠点を有している[61]。したがって近年では、次世代シーケンサーを使用し 16s rRNA 遺伝子をターゲットとしたメタ 16s 解析やメタゲノム解析により腸内細菌を網羅的に分析する手法が主流となっている。メタ 16s 解析の結果では、日本人、ヨーロッパ人、アメリカ人の腸内微生物は *Bacteroides*、*Prevotella*、*Ruminococcus* の3つのエンテロタイプに分類されることが示されている[13]。また、Nakayama らのメタゲノム解析では、アジア5か国（日本、中国、インドネシア、タイ、台湾）の子供の腸内細菌叢は、主に *Prevotella* または *Bifidobacterium/Bacteroides* のエンテロタイプに分類されることを報告している[62]。こうしたことを踏まえると、今後の研究では、次世代シーケンサーを用いて網羅的に調査し、各年代の腸内細菌構造を分析することによって、日本人に特徴づけられるエンテロタイプを明確化し、生活習慣との関連性を明らかにすることが重要であると考えられる。また、日本人を含めた12か国の人々の腸内細菌叢を解析した研究結果において、日本人は *Bifidobacterium* の占有率が最も高い腸内細菌パターンであり、諸外国に比べ特有の腸内細菌構造を保有していることが明らかとなっている[2]。第1章および第3章の結果やこれまでの先行研究の結果を踏まえると、日本人の若年者では、特に *Bifidobacterium* あるいは *Bacteroides* を豊富に保有するエンテロタイプが多く占めているのではないかと予想される。いずれにせよ、今回の結果は n 数が少ないものの若年日本人の腸内細菌パターンが特有であるという結論を示唆する重要な研究であったと言える。

Clostridium cluster XI はコレステロールおよび卵類の摂取量との間に有意な負の相関性が認められた。Cavallini らは、*Clostridium* が血清コレステロール値との間に負の相関を示すことを明らかにしているほか[63]、腸管内で免疫反応を調整する制御性 T 細胞の発現を増加させる作用があることも見出されている[64]。さらに *Clostridium* group に属する細菌群が食物繊維を代謝し、酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸を産生することが報告されている[65]。短鎖脂肪酸は、結腸上皮細胞の主要なエネルギー源であるとともに、腸管を刺激して蠕動運動を活性化し、便秘の解消や有害細菌の発育抑制にも寄与していることが確認されている。したがって、習慣的な低コレステロール食は *Clostridium* group を代表とする短鎖脂肪酸の産生細菌の増加につながり、大腸内の炎症を抑え、便秘や下痢の解消に寄与する可能性がある。

また、鉄の摂取量は *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* の占有率が高い cluster B group で有意に高く、*Bifidobacterium* との間に有意な正の相関性が示された。鉄は *Lactobacillus* の発育に必要な微量元素であり[66]、鉄欠乏性貧血の若年女性では、糞便中の *Lactobacillus* が低下

することが明らかとなっている[67]。しかしながら、Kortman らはマウスに高鉄分食を2週間摂取させた場合、コントロール群と比較して *Bifidobacteriaceae* や *Lactobacillaceae* が低下したことを報告している[68]。また、過剰な鉄の摂取は病原性細菌の *Salmonella* や *Escherichia coli* の増加が認められている[69]。メカニズムは不明のままであるが、これらの研究は、鉄の摂取が腸内細菌組成に関連しているものと考えられ、引き続き、鉄の摂取量が腸内細菌叢に及ぼす影響を調査する必要がある。

Clostridium cluster IV の占有率はキノコ類との間に弱い相関であるが有意な正の相関性が示され、第1章と同様の結果が確認された。さらに、*Clostridium* cluster IV はキノコ類の水溶性、不溶性、総食物繊維摂取量との間に有意な正の相関が示された。Chang らは、高脂肪食摂取のラットにキノコ類の一種である霊芝の抽出液を与えた結果、腸内の *Clostridium* cluster IV、XIVa および XVIII などの増加を報告しており、霊芝に含まれる食物繊維が寄与する可能性を示唆している[70]。特にキノコ類にはイヌリンや β -グルカンなどの食物繊維が豊富であり[71, 72]、これらの食物繊維はプレバイオティクスとして機能することが知られている。プレバイオティクスは、腸管内で腸内細菌により分解され、代謝産物として酪酸や酢酸などの短鎖脂肪酸を産生し、これらは大腸粘膜上皮細胞のエネルギー源として利用される。さらに本研究では、穀類に含まれる水溶性、不溶性、総食物繊維は *Lactobacillales* と、豆類に含まれる水溶性食物繊維は *Bifidobacterium* との間に有意な正の相関性が確認された。動物を対象とした介入研究では、精製飼料に10%の小麦ふすま由来の食物繊維を添加した飼料を30日間摂取させた結果、回腸内の *Lactobacillus* が増加したことを報告している[73]。また、ヒトを対象とした横断研究では、*Bifidobacteriales* 目が多い者では、豆類の食物繊維摂取量が高かったことが示されているほか[74]、豆類由来の難消化性デキストリン摂取によって *Bifidobacteria* の有意な増加が確認されている[75]。これらの研究は、本研究結果を支持する結論であり、食物繊維の種類により作用する腸内細菌種が異なることが示唆される。本研究は、腸内細菌叢と秤量記録法によって算出した食事摂取量との関係性を初めて報告した研究であるが、研究の対象者が少なかつたため、今後はn数を増やし、習慣的な食物繊維の摂取量や供給源の違いが腸内細菌叢に及ぼす実態を把握する必要がある。

まとめ

本学位請求論文は、若年日本人の腸内細菌パターンを明らかにし、さらに腸内細菌パターンの違いに影響を及ぼす栄養素の探索とストレス状況の関連について明らかにすることを目的として研究を行った。

第1章では、主成分分析法により腸内細菌パターンを分類し、エネルギー、多量栄養素、微量栄養素などの摂取量と唾液ストレスマーカーとの関連性を検討した。その結果、腸内細菌パターンは BL pattern と B pattern に分類され、食物繊維の摂取量が関連していた。また、BL pattern では唾液コルチゾールの値が有意に低いことが示された。

第2章では、BDHQの結果から日本食スコアを算出し、日本食スコアの違いが腸内細菌叢に及ぼす影響を検討した。その結果、High JD group では、*Prevotella* の占有率が有意に低くなり、さらに飯の摂取量が高くなるほど *Prevotella* の占有率が低くなることが明らかとなった。

第3章では、クラスター分析法により腸内細菌パターンを分類し、さらに秤量記録法により食物摂取状況を評価して関連性を検討した。その結果、*Bacteroides* が豊富な Cluster A group と *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* が豊富な Cluster B group に分類された。また穀類に含まれる水溶性、不溶性、総食物繊維は *Lactobacillales* と、豆類に含まれる水溶性食物繊維は *Bifidobacterium* との間に有意な正の相関性が確認された。

以上の結果から、限られた n 数ではあるが若年日本人の腸内細菌構造は *Bifidobacterium* や *Lactobacillales* が多い腸内細菌パターンと *Bacteroides* が多い腸内細菌パターンに分類され、諸外国とは異なる特有のパターンを持つことが示唆された。またこれらの腸内細菌パターンは、食事習慣のみならずストレス状況が要因となる可能性が明らかとなった。さらに日本食スコアの違いが腸内細菌叢の変化に影響を及ぼし、特に日本食の主食となる飯の摂取量が腸内の *Prevotella* 占有率に影響する可能性を初めて明らかにした研究であり、日本人の食事形式の特徴である日本食が腸内の健康維持に役立つことが期待される。一方で、本研究の対象者は若年者に限られており日本人の腸内細菌パターンを明確化したとは言えないほか、遺伝的要因や排便習慣の要因が影響していたことも捨てきれない。また、本研究は横断的な調査研究の為、ストレスと腸内細菌叢との因果関係については、腸内細菌叢の変化によりストレスが誘発されたのか、またはストレスが腸内細菌叢を変化させたのかの前後関係が明確ではない。さらに腸内細菌叢の分析は T-RFLP 法により解析した為、限られた細菌種しか評価ができなかった。近年の腸内細菌研究は、次世代シーケンサーを利用したメタゲノム解析により、腸内の微生物構造を網羅的に調査する方法が主流である。しかしながら、日本人若年成人を対象として、腸内細菌パターンと食事およびストレスに関する報告はこれまでになく、本研究の結果は日本人の腸内細菌パターンを掲示するために必要なエビデンスとして貢献できると考える。また本研究を基盤として、様々な年代の腸内細菌パターンを明確化することで、腸内細菌パターンを良好に保つ食事指導の提案や精神疾患の予防や治療に応用できる可能性も秘めており、人の健康を支える為の新たなアプローチに繋がるだろう。

引用文献

- 1) Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59-65.
- 2) Nishijima S, Suda W, Oshima K, Kim SW, Hirose Y, Morita H, Hattori M. 2016. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res* **23**: 125-133.
- 3) Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* **3**: 213-223.
- 4) Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD. 2009. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* **137**: 1716-1724. e1-2.
- 5) De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 14691-14696.
- 6) Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, Abrouk M, Farahnik B, Nakamura M, Zhu TH, Bhutani T, Liao W. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med* **15**: 73.
- 7) Queipo-Ortuño MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, Cardona Diaz F, Andrés-Lacueva C, Tinahones FJ. 2012. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *AM J Clin Nutr* **95**: 1323-1334.
- 8) Mayer EA, Tillisch K. 2011. The brain-gut axis in abdominal pain syndromes. *Annu Rev Med* **62**: 381-396.
- 9) Knowles SR, Nelson EA, Palombo EA. 2008. Investigating the role of perceived stress on bacterial flora activity and salivary cortisol secretion: a possible mechanism underlying susceptibility to illness. *Biol Psychol* **77**: 132-137.
- 10) Kerckhoffs AP, Samsom M, van der Rest ME, de Vogel J, Knol J, Ben-Amor K, Akkermans LM. 2009. Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol* **15**: 2887-2892.
- 11) Kelly JR, Borre Y, O' Brien C, Patterson E, El Aidy S, Deane J, Kennedy PJ, Beers S, Scott K, Moloney G, Hoban AE, Scott L, Fitzgerald P, Ross P, Stanton C, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG.

2016. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J Psychiatr Res* **82**: 109-118.
- 12) Kato-Kataoka A, Nishida K, Takada M, Kawai M, Kikuchi-Hayakawa H, Suda K, Ishikawa H, Gondo Y, Shimizu K, Matsuki T, Kushiro A, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Miyazaki K, Kuwano Y, Rokutan K. 2016. Fermented Milk Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota Preserves the Diversity of the Gut Microbiota and Relieves Abdominal Dysfunction in Healthy Medical Students Exposed to Academic Stress. *Appl Environ Microbiol* **82**: 3649-3658.
 - 13) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, Mrini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**: 174-180.
 - 14) Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, Abe F, Osawa R. 2016. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol* **16**: 90.
 - 15) Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**: 105-108.
 - 16) Carrothers JM, York MA, Brooker SL, Lackey KA, Williams JE, Shafii B, Price WJ, Settles ML, McGuire MA, McGuire MK. 2015. Fecal microbial community structure is stable over time and related to variation in macronutrient and micronutrient intakes in lactating women. *J Nutr* **145**: 2379-2388.
 - 17) Yamaguchi Y, Adachi K, Sugiyama T, Shimosato A, Ebi M, Ogasawara N, Funaki Y, Goto C, Sasaki M, Kasugai K. 2016. Association of Intestinal Microbiota with Metabolic Markers and Dietary Habits in Patients with Type 2 Diabetes. *Digestion* **94**: 66-72.
 - 18) Røytiö H, Morkkala K, Vahlberg T, Laitinen K. 2017. Dietary intake of fat and fibre according to reference values relates to higher gut microbiota richness in overweight pregnant women. *Br J Nutr* **118**: 343-352.

- 19) HB Jang, MK Choi, JH Kang, SI Park, HJ Lee. 2017. Association of dietary patterns with the fecal microbiota in Korean adolescents. *BMC Nutr* **3**:20.
- 20) Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. 2011. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* **25**: 397-407.
- 21) Tatsuka H, Takemoto Y, Okamoto T, Fujimori Y, Tamura S, Wada H, Okada M, Kanamaru A, Kakishita E. 2000. Changes in microbial flora in neutropenic patients with hematological disorders after the Hanshin-Awaji earthquake. *Int J Hematol* **71**: 273-277.
- 22) Kobayashi S, Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Hirota N, Notsu A, Fukui M, Date C. 2011. Comparison of relative validity of food group intakes estimated by comprehensive and brief-type self-administered diet history questionnaires against 16 d dietary records in Japanese adults. *Public Health Nutr* **14**: 1200-1211.
- 23) Kobayashi S, Honda S, Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Hirota N, Notsu A, Fukui M, Date C. Both comprehensive and brief self-administered diet history questionnaires satisfactorily rank nutrient intakes in Japanese adults. *J Epidemiol* **22**: 151-159.
- 24) Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Ushiroda C, Ohnogi H, Kudo Y, Yasui M, Inui S, Hisada T, Honda A, Matsuzaki Y, Yoshikawa T. 2016. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **310**: G367-G375.
- 25) Nagashima K, Hisada T, Sato M, Mochizuki J. 2003. 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.
- 26) Nagahima K, Mochizuki J, Hisada T, Suzuki S, Shimomura K. 2006. Phylogenetic analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences from human fecal microbiota and improved utility of terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Bioscience microflora* **25**: 99-107.
- 27) Hill TC, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 1-11.
- 28) Gafan GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt DA. 2005. Statistical analyses of complex denaturing gradient gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol* **43**: 3971-3978.
- 29) Michisige F, Kanno K, Yoshinaga S, Yasuoka S. 2006. Effect of saliva collection method on the concentration of protein components in saliva. *J Med Invest* **53**: 140-146.
- 30) Nagler Rm, Hershkovich O. 2005. Relationships between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile. *Arch Oral Biol* **50**: 7-16.
- 31) Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, Tameda M, Shiraki K, Ito M, Takei Y, Takase K. 2015. 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* **15**: 100.
- 32) Zimmer J, Lange B, Frick JS, Sauer H, Zimmermann K, Schwiertz A, Rusch K, Klosterhalfen S, Enck P. 2012. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr* **66**: 53-60.
 - 33) Ferrocino I, Di Cagno R, De Angelis M, Turrone S, Vannini L, Bancalari E, Rantsiou K, Cardinali G, Neviani E, Cocolin L. 2015. Fecal Microbiota in Healthy Subjects Following Omnivore, Vegetarian and Vegan Diets: Culturable Populations and rRNA DGGE Profiling. *PLoS One* **10**: e0128669.
 - 34) So D, Whelan K, Rossi M, Morrison M, Holtmann G, Kelly JT, Shanahan ER, Staudacher HM, Campbell KL. 2018. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **107**: 965-983.
 - 35) Messaoudi M, Violle N, Bisson JF, Desor D, Javelot H, Rougeot C. 2011. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes* **2**: 256-261.
 - 36) Takada M, Nishida K, Kataoka-Kato A, Gondo Y, Ishikawa H, Suda K, Kawai M, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Kuwano Y, Miyazaki K, Rokutan K. 2016. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterol Motil* **28**: 1027-1036.
 - 37) Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. 2008. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res* **43**: 164-174.
 - 38) Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. 2016. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* **529**: 212-215.
 - 39) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**: 480-484.
 - 40) De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Stora A, Laghi L, Serrazanetti DI, Di Cagno R, Ferrocino I, Lazzi C, Turrone S, Cocolin L, Brigidi P, Neviani E, Gobbetti M, O'Toole PW, Ercolini D. 2016. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* **65**: 1812-1821.
 - 41) Kanauchi M, Kanauchi K. 2017. Development and nutritional validity of a novel Japanese diet score and its relation with health status. *Int J Exp Med* **10**: 1651-1660.
 - 42) Okada E, Nakamura K, Ukawa S, Wakai K, Date C, Iso H, Tamakoshi A. 2018. The Japanese food score and risk of all-cause, CVD and cancer mortality: the Japan Collaborative Cohort Study. *Br J Nutr* **120**: 464-471.
 - 43) Tomata Y, Watanabe T, Sugawara Y, Chou WT, Kakizaki M, Tsuji I. 2014. Dietary patterns and

- incident functional disability in elderly Japanese: the Ohsaki Cohort 2006 study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **69**: 843-851.
- 44) Tomata Y, Zhang S, Kaiho Y, Tanji F, Sugawara Y, Tsuji I. 2019. Nutritional characteristics of the Japanese diet: A cross-sectional study of the correlation between Japanese Diet Index and nutrient intake among community-based elderly Japanese. *Nutrition* **57**: 115-121.
 - 45) Gabriel AS, Ninomiya K, Uneyama H. 2018. The role of the Japanese traditional diet in healthy and sustainable dietary patterns around the World. *Nutrients* **10**: E173.
 - 46) Matijašić BB, Obermajer T, Lipoglavšek L, Grabnar I, Avguštin G, Rogelj I. 2014. Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *Eur J Nutr* **53**: 1051-1064.
 - 47) Liszt K, Zwielehner J, Handschur M, Hippe B, Thaler R, Haslberger AG. 2009. Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. *Ann Nutr Metab* **52**: 253-257.
 - 48) Shankar V, Gouda M, Moncivaiz J, Gordon A, Reo NV, Hussein L, Paliy O. 2017. Differences in gut metabolites and microbial composition and functions between Egyptian and U.S. children are consistent with their diets. *mSystems* **2**: e00169-16.
 - 49) Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, Hallen A, Martens E, Björck I, Bäckhed F. 2015. Dietary fiber-Induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metab* **22**: 971-982.
 - 50) Gorvitovskaia A, Holmes SP, Huse SM. 2016. Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome* **4**: 15.
 - 51) Nam YD, Jung MJ, Roh SW, Kim MS, Bae JW. 2011. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *Plos One* **6**: e22109.
 - 52) Adachi K, Sugiyama T, Yamaguchi Y, Tamura Y, Izawa S, Hijikata Y, Ebi M, Funaki Y, Ogasawara N, Goto C, Sasaki M, Kasugai K. 2019. Gut microbiota disorders cause type 2 diabetes mellitus and homeostatic disturbances in gut-related metabolism in Japanese subjects. *J Clin Biochem Nutr* **64**: 231-238.
 - 53) Unno T, Osakabe N. 2018. Green tea extract and black tea extract differentially influence cecal levels of short-chain fatty acids in rats. *Food Sci Nutr* **6**: 728-735.
 - 54) Jin JS, Touyama M, Hisada T, Benno Y. 2012. Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to Bifidobacterium species. *Microbiol Immunol* **56**: 729-739.
 - 55) Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GG, George T, Leonczak J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP. 2008. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br J Nutr* **99**: 782-792.
 - 56) Sakamoto Y, Yamamoto K, Hatakeyama Y, Tsuduki T. 2016. Effects of fatty acid quality and quantity in the Japanese diet on the suppression of lipid accumulation. *J Oleo Sci* **65**: 61-73.

- 57) Ishikawa H, Guo X, Sugawara S, Iwagaki Y, Yamamoto K, Tsuduki T. 2018. Effect of the Japanese diet during pregnancy and lactation or post-weaning on the risk of metabolic syndrome in offspring. *Biosci Biotechnol Biochem* **82**: 515-524.
- 58) Mizowaki Y, Sugawara S, Yamamoto K, Sakamoto Y, Iwagaki Y, Kawakami Y, Igarashi M, Tsuduki T. 2017. Comparison of the Effects of the 1975 Japanese Diet and the Modern Mediterranean Diet on Lipid Metabolism in Mice. *J Oles Sci* **66**: 507-519.
- 59) Kushida M, Sugawara S, Asano M, Yamamoto K, Fukuda S, Tsuduki T. 2019. Effects of the 1975 Japanese diet on the gut microbiota in younger adults. *J Nutr Biochem* **64**: 121-127.
- 60) Asano M, Iwagaki Y, Sugawara S, Kushida M, Okouchi R, Yamamoto K, Tsuduki T. 2019. Effects of Japanese diet in combination with exercise on visceral fat accumulation. *Nutrition* **57**: 173-182.
- 61) Kitts CL. 2001. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr Issues Intest Microbiol* **2**: 17-25.
- 62) Nakayama J, Watanabe K, Jiang J, Matsuda K, Chao SH, Haryono P, La-Ongkham O, Sarwoko MA, Sujaya IN, Zhao L, Chen KT, Chen YP, Chiu HH, Hidaka T, Huang NX, Kiyohara C, Kurakawa T, Sakamoto N, Sonomoto K, Tashiro K, Tsuji H, Chen MJ, Leelavatcharamas V, Liao CC, Nitisinprasert S, Rahayu ES, Ren FZ, Tsai YC, Lee YK. 2015. Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep* **5**: 8397. 2109.
- 63) Cavallini DC, Suzuki JY, Abdalla DS, Vendramini RC, Pauly-Silveira ND, Roselino MN, Pinto RA, Rossi EA. 2011. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. *Lipids Health Dis* **10**: 126.
- 64) Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Ito K, Honda K. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331**: 337-341.
- 65) Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, Zoetendal EG, Erbil R, Greve JW, Buurman WA, de Vos WM, Rensen SS. 2013. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity* **21**: E607-615.
- 66) Elli M, Zink R, Rytz A, Reniero R, Morelli L. 2000. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J Appl Microbiol* **88**: 695-703.
- 67) Balamurugan R, Mary RR, Chittaranjan S, Jancy H, Shobana Devi R, Ramakrishna BS. 2010. Low levels of faecal lactobacilli in women with iron-deficiency anaemia in south India. *Br J Nutr* **104**: 931-934.
- 68) Kortman GA, Mulder ML, Richters TJ, Shanmugam NK, Trebicka E, Boekhorst J, Timmerman HM, Roelofs R, Wiegerinck ET, Laarakkers CM, Swinkels DW, Bolhuis A, Cherayil BJ, Tjalsma H. 2015. Low dietary iron intake restrains the intestinal inflammatory response and pathology of enteric infection by food-borne bacterial pathogens. *Eur J Immunol* **45**: 2553-2567.

- 69) Jaeggi T, Kortman GA, Moretti D, Chassard C, Holding P, Dostal A, Boekhorst J, Timmerman HM, Swinkels DW, Tjalsma H, Njenga J, Mwangi A, Kvalsvig J, Lacroix C, Zimmermann MB. 2015. Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut* **64**: 731-742.
- 70) Chang CJ, Lin CS, Lu CC, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Tseng SF, Wu TR, Chen YY, Young JD, Lai HC. 2015. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat Commun* **6**: 6:7489.
- 71) Aida F.M.N.A, Shuhaimi M, Yazid M, Maaruf AG. 2009. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trend Food Sci Tech* **20**: 567-575.
- 72) Hughes SA, Shewry PR, Gibson GR, McCleary BV, Rastall RA. 2008. In vitro fermentation of oat and barley derived β -glucans by human faecal microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* **64**: 482-493.
- 73) Chen H, Chen D, Michiels J, De Smet S. 2013. Dietary fiber affects intestinal mucosal barrier function by regulating intestinal bacteria in weaning piglets. *Commun Agric Appl Biol* **78**: 71-78.
- 74) Dominianni C, Sinha R, Goedert JJ, Pei Z, Yang L, Hayes RB, Ahn J. 2015. Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PLoS One* **10**: e0124599.
- 75) Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Vicaut E, Neut C, Flourié B, Brouns F, Bornet FR. 2004. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am J Clin Nutr* **80**: 1658-1664.

発表論文

1. Seura T, Yoshino Y, Fukuwatari T. 2017. The relationship between habitual dietary intake and gut microbiota in young Japanese women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 63: 396-404.
2. Seura T, Fukuwatari T. 2019. Japanese diet score is associated with gut microbiota composition in young Japanese adults. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 65: 414-420.
3. Seura T, Fukuwatari T. 2019. Differences in gut microbial patterns associated with salivary biomarkers in young Japanese adults. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. (投稿中)

謝辞

本博士論文は、滋賀県立大学大学院人間文化学研究科生活文化学専攻健康栄養部門で行った研究をまとめたものである。まず初めに、本研究を進めるにあたり、社会人である私を快く研究室へ受け入れて下さりました、福渡努教授に心より感謝致します。また、研究の内容や方向性に関して親切丁寧なご助言、ご指導をいただき、博士課程における研究活動を支えてくださいましたこと、厚くお礼申し上げます。そして、本研究を始めるにあたりご指導いただきました相模女子大学栄養科学部管理栄養学科 吉野陽子教授に心より感謝し、厚くお礼申し上げます。また、私の学位取得を応援して下さった、愛知淑徳大学スポーツ・健康医科学科主任安藤富士子教授ならび教員の皆様に感謝の意を表します。本研究を進めるにあたり、貴重なデータを提供していただきました対象者の皆様に心より感謝申し上げます。最後に、今日まで支えてくれました両親、いつも笑顔で励ましてくれた妻の有希に感謝の気持ちを申し上げたく、謝辞に代えさせていただきます。