

中高年の運動習慣者における腸内細菌叢の特徴と 体脂肪率の関連性

—— 末端標識制限酵素断片多型分析法による解析 ——

河村孝幸, 松生香里*

要旨: 運動施設を定期的にご利用している20名(平均年齢: 72.7歳, 男性: 13名, 女性: 7名)の糞便を採取し, 生活習慣病等の既往歴や体組成のデータを基に, 関連性を分析した。腸内細菌叢の解析には末端標識制限酵素断片多型分析法を用い, 構成細菌を28のOperational Taxonomic Units (OTUs)に分類した。体組成はインピーダンス法を用いて評価した。全体的には腸内細菌の中でも, *Bacteroides* 属の占有率が最も高く(平均: $45 \pm 16\%$), 20名中16名で最も優勢であった。一方, *Prevotella* 属あるいは *Lactobacillales* 目の占有率が最も高い被験者が各1名, 未分類の菌が最も多い者は2名であった。腸内細菌叢と体組成の関連では, *Clostridium cluster IV* と体脂肪率 ($r=0.47, p<0.05$), および BMI ($r=0.51, p<0.05$) との間に正の相関関係が認められた。なお, 性別, 年齢, 高血圧の既往の有無と各腸内細菌の占有率には有意差が見られなかった。腸内細菌は腸内内容物の代謝を担っていることから, ある種の腸内細菌叢の構成が肥満に関係している可能性が考えられる。

キーワード: 腸内細菌, 体組成, 運動習慣

1. はじめに

ヒトの腸管には1,000種類, 100兆個以上の腸内細菌が生息しており, その細菌叢は年齢によって異なり¹⁾, その組成が個人で安定していることが知られている²⁾。

近年, 肥満やメタボリックシンドローム, 動脈硬化の形成に対して, 腸内環境を規定する腸内細菌叢が重要な存在である可能性が指摘されている³⁻⁵⁾。特に, 肥満と腸内細菌叢との関連については, メタ解析の結果から肥満者と非肥満者において組成が異なることが示されている⁶⁾。

運動習慣は前述の生活習慣に起因する疾患に対する予防改善効果を有することは明らかであるが, その効果の一部は腸内細菌叢の変化を介している可能性が動物実験で報告されている⁷⁾。一方, ヒトを対象とした運動習慣と腸内細菌の関連については, ラグビー選手を対象⁸⁾とした研究のみである。

そこで, 本研究では, 運動習慣を有する中高年者における腸内細菌叢の特徴を明らかにするとともに, 既往歴や体組成との関連性について検討した。

*川崎医療福祉大学 医療技術学部 健康体育学科

2. 方 法

2.1 被験者

運動施設を定期的に利用のうち、「腹圧トレーニングによる腸管コンディショニング維持とサルコペニア予防効果」の研究に同意が得られた20名（平均年齢：72.7歳，男性：13名，女性：7名）を対象に実施した。なお，本研究の実施にあたっては，東北大学倫理審査委員会（承認番号：2016-1-118，承認年月日：2016年5月30日），ならびに東北福祉大学研究倫理委員会にて承認を得た（受付番号：RS160607，承認年月日：2016年6月30日）。

2.2 腸内細菌叢の分析

被験者に対して，糞便を（株）テクノスルガ・ラボが提供する専用のキットを用いて自己採取し，提出するよう依頼した。腸内細菌叢の分析には，末端標識制限酵素断片多型分析（Terminal restriction fragment length polymorphism：T-RELP）法を用い，検体から抽出したDNAの16S rDNA部分をPCRで増幅し，制限酵素で切断したDNAの長さが近いものをグループ化し，さらに近縁種をまとめることで，Clostridium（属），Bifidobacterium（属），Prevotella（属），Lactobacillales（目），Bacteroides（属）の5群に分類した⁹⁾。分類された菌種ごとに占有率を求め，細菌群集の構成を解析した。各細菌群集の特徴¹⁰⁾について表1に示す。

2.3 体組成の計測

体組成成分は，身体組成計（（株）バイオスペース InBody230）を用いてbioelectrical impedance analysis（生体電気インピーダンス）法によって測定した。測定項目は，骨量（kg），体脂肪量（kg），除脂肪量（kg），骨格筋量（kg），体脂肪率（%），骨格筋率（%），基礎代謝（kcal/d）であった。

2.4 統計解析

腸内細菌叢の占有率に関して，性別，年齢群，高血圧の既往の有無の2群間の比較には，対応のないt検定，またはMann-Whitney's U検定を行った。腸内細菌叢の占有率と体組成成分など各指標との2変量間の関連に関しては，Spearmanの相関係数により有意性の検定を行った。なお，体組成測定は，2名が健康上の理由で測定できなかったため，腸内細菌叢の占有率と体組成成分の相関関係の分析には18名のデータを採用した。

表 1. 腸内細菌の群集ごとの特徴 (T-RFLP 法に基づく分類)

細菌群集の分類	特徴
Bifidobacterium	“ビフィズス菌”として知られるヒト腸内の最優占菌の一つ。ヒトに対する生理作用は、腸管感染防御作用、免疫機能の増強作用、腸内腐敗の抑制作用等、“善玉菌”としての作用が知られている。
Lactobacillales	Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus 等を含むいわゆる乳酸菌群。一部の菌種はヒトに対する生理作用として、腸管感染防御作用、免疫機能の増強作用、腸内腐敗の抑制作用等、“善玉菌”としての作用を持つものがある。
Bacteroides	一部の菌種は臨床分野で日和見感染菌として知られるが、一般にヒト腸内の正常フローラの細菌として存在する。細菌種も多種多様で、宿主に様々な影響を与える。
Prevotella	一部の菌種は臨床分野で日和見感染菌として知られるが、口腔常在細菌でもある。
Clostridium cluster IV	ヒト糞便では検出される例が多い。ほとんどの菌種は宿主に与える影響やヒト腸内での機能については未知の部分が多いが、酪酸を産生する菌株が多数存在する。Faecalibacterium prausnitzii は、抗炎症作用を持つという報告がある。
Clostridium subcluster XIVa	ヒト糞便では検出される例が多い。宿主に与える影響やヒト腸内での機能については未知の部分が多いが、ヒト腸管で酪酸を産生する菌株の多数が Clostridium subcluster XIVa に多く含まれているという研究報告もある。
Clostridium cluster IX :	ヒト糞便では検出される例が多い。ほとんどの菌種は宿主に与える影響やヒト腸内での機能については未知の部分が多いが、プロピオン酸を産生する菌株が多く存在する
Clostridium cluster XI	ヒト糞便では検出される例が多い。胆汁酸を 2 次胆汁酸に変換する菌種が含まれる。
Clostridium cluster XVIII	ほとんどの菌種は宿主に与える影響やヒト腸内での機能については未知の部分が多い。

文献 10) より一部改変, 引用。

3. 結 果

3.1 被験者の特徴

被験者の年齢および体組成成分について表 2 に示した。BMI が 25 以上の肥満者は 7 名含まれていた。また、高血圧の既往がある者は 8 名であった。

3.2 腸内細菌叢の占有率について：性別ごとの分析 (図 1)

全体的には腸内細菌の中でも、Bacteroides の占有率が平均 45.2% と最も高く、次いで Clostridium subcluster XIVa が 15.8% 存在していた。性別ならびに高血圧の既往の有無と腸内細菌叢の構成に関しては、いずれの細菌群集においても有意差が認められなかった。

表 2. 被験者の身体的特徴

項目	男性 (n=13)		女性 (n=7)		合計 (N=20)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
平均年齢	75.0	6.9	69.1	5.3	72.9	6.8
身長 (cm)	166.0	6.3	157.1	4.2	163.0	7.0
体重 (kg)	68.4	9.8	61.4	12.9	66.1	11.1
BMI (kg/m ²)	24.4	3.6	24.7	4.4	24.5	3.7
骨量 (kg)	2.8	0.3	2.4	0.3	2.6	0.3
体脂肪量 (kg)	17.5	5.8	20.7	7.6	18.6	6.4
除脂肪量 (kg)	51.0	6.3	40.8	5.9	47.6	7.8
骨格筋量 (kg)	27.6	4.3	20.8	3.7	25.3	5.2
体脂肪率 (%)	25.2	5.5	32.7	5.8	27.7	6.5
骨格筋率 (%)	40.4	4.2	34.1	3.0	38.3	4.8
基礎代謝 (kcal/d)	1,358.4	122.0	1,130.4	104.5	1,282.4	158.3

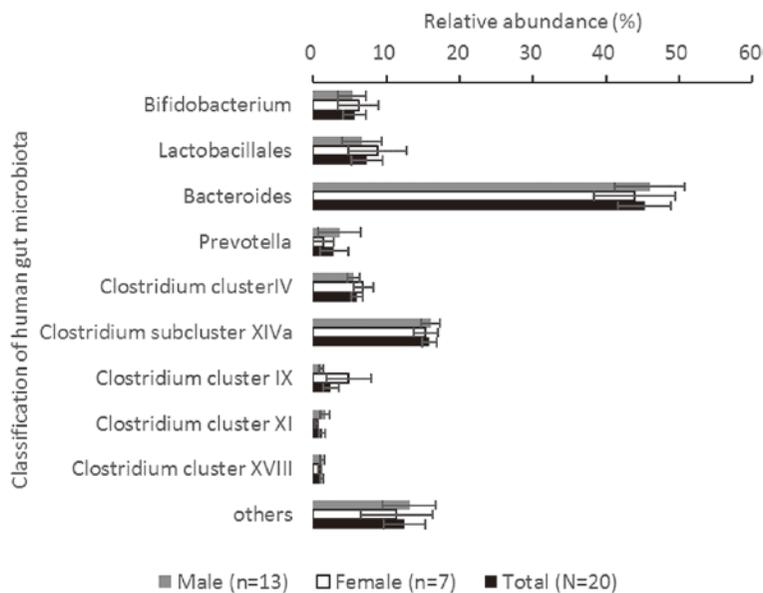


図 1. 腸内細菌叢の占有率：性別間の比較

3.3 腸内細菌叢の占有率について：被験者毎の分析 (図 2)

被験者ごとに、Bacteroides の占有率が 20 名中 16 名で最も優勢であった。一方、Prevotella あるいは Lactobacillales の占有率が最も高い被験者が各 1 名、未分類の菌が最も多い者は 2 名であった。

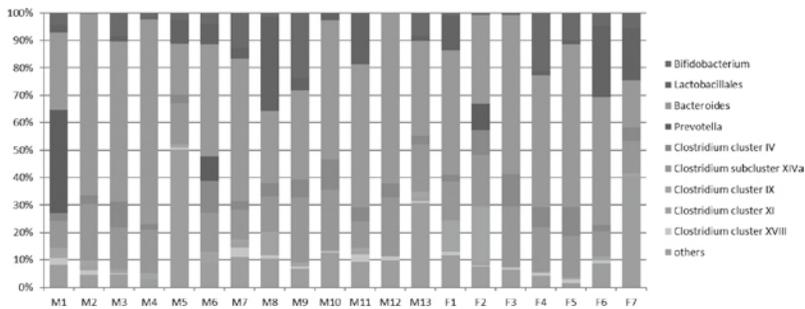


図2. 被験者毎の腸内細菌叢の占有率
Mは男性、Fは女性の被験者を表す。

3.4 腸内細菌叢の占有率と体組成の関連性

腸内細菌叢と体組成の関連では、Clostridium cluster IVと体脂肪率 ($r=0.47, p<0.05$: 図3A)、およびBMI ($r=0.51, p<0.05$)との間に正の相関関係が認められた。一方で、Clostridium cluster IXとBMI ($r=-0.55, p<0.05$)の間に負の相関関係が認められた(図3B)。なお、体脂肪率とBMI以外の体組成に関する諸指標と各腸内細菌の占有率には有意な相関関係が見られなかった。

4. 考 察

4.1 体脂肪と腸内細菌叢の関連性

腸内細菌は腸管内で産生する代謝産物を介して、宿主のエネルギー代謝に影響を与え、肥満症の形成に寄与していることが明らかになってきている。今回の結果においても、短鎖脂肪酸の産生に関わる腸内細菌叢の構成比とBMIおよび体脂肪率に関連性が見られた。酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸は主に腸内細菌によって難消化性の炭水化物や食物繊維などから産生され、肥満患者や肥満モデル動物の腸管腔内で高濃度に存在している。これらの短鎖脂肪酸は腸管上皮細胞など宿主のエネルギー源となり、得られるエネルギー量は欧米人では140~180 kcalともいわれており¹¹⁾、より体脂肪蓄積をきたしやすい個体の形成に寄与している可能性がある。

4.2 血圧と腸内細菌叢の関連性

今回は、4割の被験者では高血圧症として薬物治療を受けている申告があったが、腸内細菌叢には主だった特徴は見られなかった。腸内細菌の血圧調節に関する報告も散見され、腸内細菌の一種である乳酸菌は乳酸発酵の過程で、種々のペプチドを産生する。それらのペプチドには、アンジオテンシン変換酵素に対する阻害活性を持ち、自然発症高血圧ラットへの経口投与で軽度な血圧降下作用を示すことが報告されている¹²⁾。また、腸内細菌主要代謝産物である短鎖脂肪酸が血圧調整機構に関与していることも明らかになっている⁴⁾。

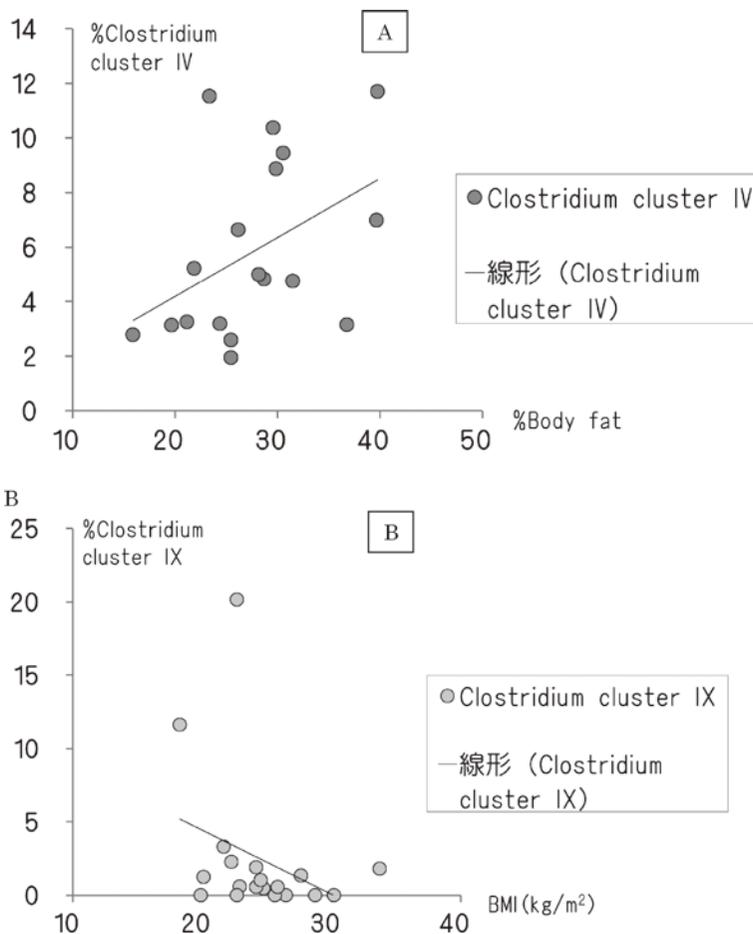


図 3. 腸内細菌叢の占有率と体組成指標との関連性。A: Clostridium cluster IV と体脂肪率の関連性; B: Clostridium cluster IX と BMI の関連性

4.3 加齢と腸内細菌叢の関連性

本研究の被験者には 70 歳以上が 12 名, うち 80 歳以上は 3 名含まれていた。70 歳以上と 70 歳未満で腸内細菌叢の占有率には統計的な有意差は認められなかった。腸内細菌叢に対する加齢の影響については横断的な研究のみであるが, 1973 年に光岡は, 培養法を用いて加齢に伴う腸内細菌叢の変動を初めて明らかにし, 老年期には *Bifidobacterium* (ビフィズス菌を含む) が減少し, *Escherichia coli*, *Strepococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* が増加することを報告していた¹³⁾。最近になって, 次世代シーケンサーによる DNA 解析の手法を用いて, 0 歳から 104 歳までの 367 名の腸内細菌叢を調べた結果, ビフィズス菌を含む Actinobacteria は 60 歳以降に急速に減少する一方, Proteobacteria の占有率は乳幼児と 80 歳以上の高齢者で高くなることが報告されている¹⁾。今回は 20 名という少数から得た結果ではあるが, 図 2 に示したように被験者毎

の腸内細菌叢が実に多彩であったことを鑑みると、加齢の他にも腸内細菌叢を変化させる要因があることが推察される。

4.4 本研究の限界

本研究の限界としては、第一に、本研究で採用した T-RFLP 法の解像度の低さ¹⁴⁾が挙げられる。T-RFLP 法は腸内細菌叢の比較的簡便で再現性の良い分子生物学的手法として、食事や疾病、生活習慣の影響などの研究で幅広く活用されている¹⁴⁾。T-RFLP 法では、Clostridium (属), Bifidobacterium (属), Prevotella (属), Lactobacillales (目), Bacteroides (属) の 5 群に分類され、それらが腸内細菌叢全体の 7-8 割程度を占める。しかしながら、T-RFLP 法では分類できない菌種もあり、本研究では未分類の菌の占有率が最も多かった者が 2 名存在した。

二点目に、腸内細菌叢の構成に影響を与える食事内容などの生活習慣¹⁾や抗菌剤などの服薬や歯科治療、自己免疫疾患、消化器疾患などの既往について、それらの疾患自体や治療の影響を排除することはできなかった。

三点目として、運動施設利用者のみを対象とし、運動習慣を有さない対照群を設定しなかったことから、今回得られた結果が運動習慣に影響するかどうかについては不明である。

5. 結 語

腸内細菌は腸内内容物の代謝を担っていることから、ある種の腸内細菌叢の構成が肥満に関係している可能性が考えられる。運動習慣との関連性については本研究では明確にできなかったが、腸内細菌叢の個人差を踏まえた肥満症に対する新たな介入法の開発が期待される。

6. 謝 辞

本研究は、公益財団法人・健康科学財団による（研究助成）助成事業『健康科学の推進に寄与する研究』の助成を受けたものである（研究代表者：松生香里）。

引 用 文 献

- 1) Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao J, Abe F, Osawa R: Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC microbiol*, 16, 90, 2016
- 2) Honda K, Littman DR: The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation. *Annu Rev Immunol*, 30, 759-795, 2012
- 3) 入江潤一郎: 肥満と腸内細菌. *診断と治療*, 105, 380-384, 2016
- 4) 脇野修, 田島敬也, 吉藤歩, 伊藤裕: 腸内細菌と生活習慣病. *5, 16-22, 2016*

- 5) Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, Hirota Y, Hayashi T, So A, Kasahara K, Yodoi K, Matsumoto T, Mizoguchi T, Ogawa W, Hirata K : Analysis of Gut Microbiota in Coronary Artery Disease Patients : a Possible Link between Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. *J Atheroscler Thromb*, 23, 908-921, 2016
- 6) Walters WA, Xu Z, Rob Knight R : Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett*, 588, 4223-4233, 2014
- 7) Queipo-Ortuño MI, Seoane LM, Murri M, Pardo M, Gomez-Zumaquero JM, Cardona F, Casanueva F, Tinahones FJ : Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS One*, 8, e65465, 2013
- 8) Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, Hayes P, O'Reilly M, Jeffery IB, Wood-Martin R, Kerins DM, Quigley E, Ross RP, O'Toole PW, Molloy MG, Falvey E, Shanahan F, Cotter PD : Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*, 63, 1913-1920, 2014
- 9) Nakashima K, Mochizuki J, Hisada T, Suzuki S, Shimomura K : Phylogenetic analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences from human fecal microbiota and improved utility of terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Biosci Microflora*, 25, 99-107, 2006
- 10) 株式会社 テクノスルガ・ラボ. ヒト腸内細菌分類群 : https://www.tecsr.org.jp/t-rflp/t_rflp_hito_OTU.html 閲覧日 : 平成 29 年 10 月 21 日
- 11) Bergman EN : Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev*, 70, 567-590, 1990
- 12) Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T : Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci*, 78, 777-783, 1995
- 13) Mitsuoka T, Hayakawa K : The fecal flora in man. I. Composition of the fecal flora of various age groups. *Zentralbl Bakteriolog Orig A*, 223, 333-342, 1973
- 14) 長島浩二, 久田貴義, 望月淳 : T-RELP 法による腸内細菌叢の解析. *腸内細菌学雑誌*, 28, 155-164, 2014