人間生活文化研究　Int J Hum Cult Stud.　No. 29　2019

Original Paper
原著論文

主観的健康感と腸内細菌叢の関連性に関する研究

Study on relationship between self-rated health and intestinal microbiota

福島（平川）あずさ[1,2]
[1]大妻女子大学院人間文化研究科人間生活科学専攻，[2]公益社団法人生命科学振興会研究調査部

Azusa Fukushima-Hirakawa [1,2]
[1]Doctoral Program for Studies in Human Life Sciences, Otsuma Women's University
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357
[2] Life Science Promoting Association, Japan
25-3 Daikyo-cho, Shinjyuku –ku, Tokyo, Japan 160-0015

キーワード：主観的健康感，腸内細菌叢，玄米食，酪酸産生菌，*Roseburia*
Key words：Self-rated health, Intestinal microbiota, Brown rice diet, Butyrate-producing bacteria, *Roseburia*

抄録

目的　玄米食者は便通や便の性状がよく，望ましい腸内環境である可能性があり，主観的健康感が高いことが報告されている．本研究では，主観的健康感と腸内細菌叢の関連性を明らかにすることを目的とした．

方法　1,222 名が参加した GENKI Study の対象者に呼びかけて，Nested Study として 97 名の便を集め 16S rDNA アンプリコン解析を行い，門レベル，属レベルで主観的健康感との関連を検討した．

結果　主観的健康感が高い者はとくに酪酸産生菌の占有率が高い傾向があり(p=0.052)，また *Rosebria* 属の占有率が高いほど主観的健康感が有意に高かった(p=0.020)．主観的健康感が高かった玄米食者は酪酸産生菌が有意に高く(p=0.023)，とくに *Faecalibacterium prausnitzii* (p=0.026)，*Rosebria* (p=0.013)，*Bilophila* (p=0.048）属の占有率が有意に高かった．

考察　主観的健康感が高い者は酪酸産生菌や短鎖脂肪酸産生菌と関連があることが明確になった．腸内細菌によって産生される酪酸とその代謝産物は，直接ないし間接的に中枢神経系の回路網を介し情動に影響を及ぼすことが先行研究で推察されている．今後の研究課題は，対象の選択バイアスを少なくすると共に，追跡研究や介入研究によって，普遍性の高い，主観的健康感と「腸内細菌叢—腸管—脳」の因果関係を明確にすることである．

結論　主観的健康感が高いほど酪酸産生菌の *Rosebria*，*Faecalibacterium prausnitzi* の占有率は高く，短鎖脂肪酸産生菌 *Blautia*，*Bilophila* 属の占有率が高いことが明らかになった．

Ⅰ 序論

WHO の健康の定義には,｢健康とは, 病気でないとか, 弱っていないということではなく, 肉体的にも, 精神的にも, そして社会的にも, すべてが満たされた状態｣とされている[1]． しかし, このようなすべてが満たされた健康状態でいられることは現代社会においてはとても難しいといえる.

一方,「主観的健康感」は, 主観的で自主的な判断に基づく簡便な自己評価指標として, わが国でも国民生活基礎調査をはじめとする各種社会調査に用いられてきた[2-3]．「主観的健康感」の先行研究では,「主観的健康感」は医師の診断などの客観的な健康度よりも適確に死亡率を予測することが明らかになっている[4-8]．そして高齢者の研究において,「主観的健康感が低い」者は,「生命予後も悪い」ことが報告されている.

筆者は「主観的健康感」は必ずしも血液生化学検査値と一致しているとは考えていない． たとえば, パラリンピックの選手の様に器質的障害があっても元気で活躍する者や, がんに罹患しても闘病しながら社会復帰を果たし自己実現している者もいるからである.

したがって本研究では, 病気の「有り・無し」ではな

く，本人が主観的に感じとっている相対的な健康感を「主観的健康感」と定義した．

我々が関わった研究GENKI Study I [9-11]において，玄米食者は，主観的健康感が高かった．また，玄米食者は腸内環境がよい可能性が示唆された．

しかしながら，主観的健康感と腸内細菌叢との関連を明確にした先行研究はない．もし，主観的健康感と腸内細菌叢，そして食生活や生活習慣との相互関連が明確になれば，今後の健康支援方策において新しい対応が出来ることが期待できる．

最近の腸内細菌叢研究報告を踏まえれば，インドールやアンモニアを産生する腸内細菌叢の比率が高い場合は健康に好ましくない何らかの影響を受けていることが推定される．バランスのよい食事を摂取することは，栄養素を取り入れるだけではなく，大腸の腸内細菌に働きかけて，有用菌を活性化し，腸内環境を整える働きもしているからである．

しかしながら，腸内環境がよい可能性がある玄米食者が，どのような腸内環境と腸内細菌叢を有しているかについては，先行研究が未だ無く，玄米摂取と腸内細菌叢との関連性を示す有力なエビデンスは出されていない [12]．本研究では主観的健康感の高い集団の腸内環境を知るために，ヒト糞便を用いて腸内細菌叢を分析し検討することとした．

1.　調査方法

①調査票： GENKI Study 調査票に基づき対象者の特性，主食とする米（白米，玄米，その他混合米）の種類と基本属性，生身体的要因として慢性疾患の有無，通院や投薬の有無，生活習慣に関する項目（喫煙・睡眠・食生活・サプリメント健康食品の摂取・運動習慣の有無）を，社会的要因として，趣味や健康法，ストレスについて質問した．便通や便の形状も詳しく質問した．

また，主観的健康感の質問項目は，「健康である」，「まあまあ健康である」，「どちらとも言えない」，「健康でない」の４段階について質問した．

②腸内細菌： 2 回目アンケートの回答時に腸内細菌調査に協力すると申し出た Nested Study[13] の 97 名に採便キットを送り，便を回収した．新鮮な糞便をサンプルボトル（サンプルボトルには，100 ｍM Tris-HCl, pH9.0, 40mM　トリス EDTA, pH8.0, および４M グアニジンチオシアネートおよび 0.001％ブロモチモールブルー液が入っている．）に耳かきほど採り，よく振ってもらい，採取した糞便サンプルをテクノスルガ・ラボ（静岡県）に送り，腸内細菌分析と同定を行った．

便懸濁液 0.8ml を FastPrep24 Instarument(MP Biomedicals，Santa Ana,CA)による 2.0ml スクリューキャップチューブ中（500 万回振動/second）で 2 分間ジルコニアビーズを用いてホモジナイズし，氷上に 5 分間置いた．その後 5000× g で 1 分間遠心分離した後，自動核酸抽出装置（Precision System Science，Chiba，Japan）を用いて懸濁液 200μl から DNA を抽出した．自動核酸抽出のための試薬として， MagDEADNA200（Precision System Science，CA）を用いた [14-17]．16S rDNA の V3-V4 領域を，順方向プライマー Pro341F5’-CTACACACXXXXXXXXACACTCTTTCCCTACACGAGGCTCTTCCGATCTCCTACGGGNBGCASCAG-3′を用いて増幅した．

DNA の増幅には，MiSeq (Illumina, San Diego,CA) を使用して，糞便中の微生物群集構造の NGS 分析を行った．ここで Xs は試料特異的 8bp のバーコード配列を表し，これによりほとんどの腸内細菌を検出できるシステムを使って解析した．1 例につき，2 万から 3 万の配列を分析した．

サンプルバーコード配列は CTCTCTAT，TATCCTCT，GTAAGGAG，ACTGCATA，AAGGAGTA，CTAAGCCT，CGTCTAAT，TCTCTCCG，TCGACTAG，TTCTAGCT，CCTAGAGT，GCGTAAGA，CTATTAAG，AAGGCTAT，GAGCCTTA，TTATGCGA およびリバースプライマー5’-Pro806R CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATZZZZZZZZGTGACTGGAGTTCAGACTGTGCTCTTCCGACTACNVGGGTATCTAATCC-3’, Zs が表すサンプル固有の 8-bp バーコードシーケンス（TCGCCTTA，CTAGTACG，TTCTGCCT，GCTCAGGA，AGGAGTCC，CATGCCTA，GTAGAGAG，CAGCCTCG，TGCCTCTT，TCCTCTAC，TCATGAGC，CCTGAGAT，TAGCGAGT and GTATCTCC）である．熱サイクルのためのタッチダウン PCR 反応およびアンプリコールの調製は，高橋の方法によって行った [18]．

バイオインフォマティックス分析により決定された 16S rDNA 配列を，テクノスルガ・ラボ微生物同定データベース DB-BA10.0 に対して Metagenom@KIN ソフトウェア（World Fusion Co., Ltd.，Tokyo，Japan）を用いて相同性の探索を行った．データベースは 1 万以上の菌の同定が可能で

あり,ほとんど全ての既知の菌を網羅的に同定する．分類学上の命名法にたっている細菌を種レベルで同定し, 本研究では属, 門レベルに集計した．

2. 統計解析

アンケートから得られた情報および腸内細菌プロファイルを Excel データセットを用い SPSS データセットを作成した．

表 1. 主観的健康感の各要因との関連性

		主観的健康感							
		健康である		まあまあ健康である		あまり健康でない健康でないの合計			
		n	%	n	%	n	%	計	p 値
性・年齢	３０歳代	1	25.0	3	75.0	0	0.0	4	
男性	４０歳代	2	40.0	3	60.0	0	0.0	5	n.s.
	５０歳代	1	25.0	3	75.0	0	0.0	4	
	６０歳代以上	3	50.0	3	50.0	0	0.0	6	
	３０歳代	2	25.0	6	75.0	0	0.0	8	
女性	４０歳代	6	30.0	12	60.0	2	10.0	20	n.s.
	５０歳代	9	52.9	6	35.3	2	11.8	17	
	６０歳代以上	16	50.0	16	50.0	0	0.0	32	
BM I区分（kg /㎡）	18.5未満	12	40.0	16	53.3	2	6.7	30	
	18.５以上25未満	25	42.4	33	55.9	1	1.7	59	n.s.
	２５以上３０未満	2	50.0	1	25.0	1	25.0	4	
	３０以上	0	0.0	1	100.0	0	0.0	1	
現病歴	なし	30	61.2	19	38.8	0	0.0	49	<0.01
投薬状況	あり	5	31.3	10	62.5	1	6.3	16	n.s.
	なし	34	42.5	43	53.8	3	3.8	80	
身体活動レベル	毎日7～8千歩は歩く	5	45.5	5	45.5	1	9.1	11	n.s.
便通（毎日ない）	週2回	1	100.0	0	0.0	0	0.0	1	
	週3回	2	66.7	1	33.3	0	0.0	3	
	週4回以上	3	30.0	7	70.0	0	0.0	10	n.s.
便通（毎日ある）	毎日1回	22	40.0	30	54.5	3	5.5	55	
	毎日2回	8	36.4	13	59.1	1	4.5	22	
	毎日3回	1	33.3	2	66.7	0	0.0	3	
便の状態	下痢気味	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	
	軟らかめ	6	30.0	12	60.0	2	10.0	20	
	バナナ状	28	43.1	36	55.4	1	1.5	65	n.s.
	硬め	1	20.0	4	80.0	0	0.0	5	
	下痢と便秘を繰り返す	2	66.7	0	0.0	1	33.3	3	
ストレス	ない	10	55.6	8	44.4	0	0.0	18	0.026

各項目の割合は欠損値を除いて算出した。

分析は性別・各年齢階層別に行い，門レベルで偏りの有無を検討した．次いで主観的健康感の高い群と必ずしも健康とはいえない群の 2 群に分け，腸内細菌を属レベルで検討した．また，等分散性が仮定できなかったため，2 群ではウェルチ検定を，3 群では Tamhane の多重比較を行った．次に，玄米食ならびに健康感と腸内細菌の関係について主成分分析を行った（回転法は Kaiser の正規化を伴うバリマックス法を用いた）．食物繊維の多い玄米の摂取の有無，睡眠時間，健康法，慢性疾患の有無など特定の食品や生活習慣との関連性について，各カテゴリー別変数間の関連の有意性は，χ^2 検定を用いて関連性を統計学的に検討した．

統計処理においては，SPSS＠Statistics Version 25.0 for Mac OS を使用し，統計学的有意水準は，5%とした[19]．

3.　倫理的配慮

本研究は，公益社団法人生命科学振興会倫理委員会の承諾を得た（承認番号 2017 年第 1 号）．個人情報保護のために調査票は個人を特定できないよう匿名化され，分析者は ID 化されたデータを使用した．

II 結果

1.　主観的健康感と各要因との関連性

分析の対象とした 97 名の平均年齢は，男性 52.2±13.2 歳，女性は 55.3±12.1 歳，年齢範囲は 30～79 歳であった．男女共 40 歳代が 1/4 で女性では 60 歳代が一番多かった．

主観的健康感の分布と各要因の関係を示す（表 1）．性別に，年齢階級と主観的健康感との関連を見ると，性・年齢別にみた主観的健康感には有意な関連がみられなかった．主観的健康感と統計学的に見て関連が見られた項目は，現病歴とストレス状況のみであった（表 1）．

2.　米の種類（玄米とその他の分類）でみた基本的属性

主食を玄米とその他に分けて年齢と BMI の分布をみると，玄米食者は平均年齢がその他よりも高いものの肥満度 BMI には有意な関連が見られなかった（表 2）．主食の米による便通と便の性状を比較したが，有意な関連は見られなかった（表 3）．

3.　腸内細菌叢のプロファイル比較

腸内細菌叢のプロファイル（門レベル）を図 1 に示す．

表 2.　主食の米（玄米とそれ以外）による年齢，BMI の比較（n=97）

	年齢（平均値±標準偏差）	p値	BMI（平均値±標準偏差）	p値
玄米	56.66±12.10	n.s.	20.06±2.62	n.s.
その他の米	48.98±11.12		19.99±2.81	

各項目の割合は欠損値を除いて算出した。

表 3.　主食の米（玄米とそれ以外）による便通，便の性状の比較

		玄米 n (%)	その他 n (%)	p値
便通（毎日ない）	週2回	1 (1.7%)	0	n.s.
	週3回	3 (5.1%)	0	
	週4回以上	3 (5.1%)	7 (20.6%)	
便通（毎日ある）	毎日1回	**36 (61%)**	18 (52.9%)	
	毎日2回	**13 (22%)**	9 (26.5%)	
	毎日3回	**3 (5.1%)**	0	
		59 (100%)	34 (100%)	
便の状態	下痢気味	0	0	n.s.
	軟らかめ	9 (15%)	10 (31.3%)	
	バナナ状	**47 (78.3%)**	18 (56.3%)	
	硬め	3 (5%)	2 (6.3%)	
	下痢と便秘を繰り返す	1 (1.6%)	2 (6.3%)	
		60 (100%)	32 (100.2%)	

データの検定は、Kendall τ 検定を用いた。
各項目の割合は欠損値を除いて算出した。

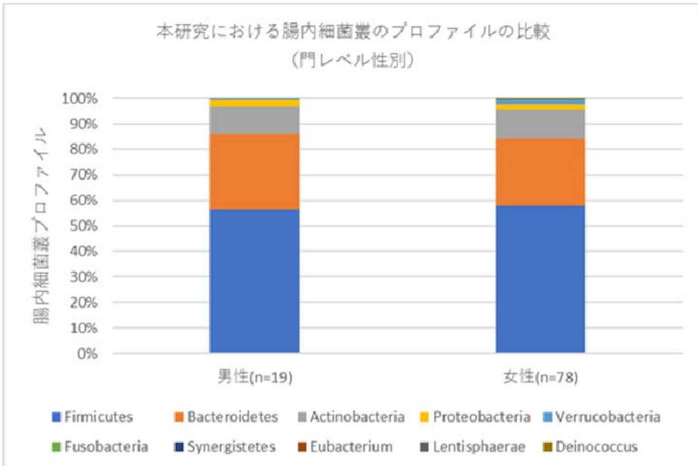

図 1.　腸内細菌叢のプロファイル（門レベル性別）

男女に差はなく，*Firmicutes* 門が 40%以上，ついで *Bacteroidetes* 門が 20%台，*Actinobacteria* 門が 10％弱，*Proteobacteria* 門が数％であった．*Fusobacteria*，*Synergistetes*，*Eubacterium*，*Lentisphaerae*，*Deinococcus* 門などは 1%以下であり，個人間のばらつきが大きかった．

米の種類別に腸内細菌プロファイル（門レベル）を比較し，平均値の差の検定を行ったところ *Proteobacteria* 門に有意差があった（表 4）．

表 4. 米の種類別腸内細菌叢プロファイル（門レベル）

	白米食	混合米食	玄米食
Firmicutes (%)	44.3±3.0	44.0±3.5	43.8±2.5
Bacteroidetes (%)	22.0±4.2	23.5±3.0	19.9±1.8
Actinobacteria (%)	7.5±2.2	8.1±1.7	8.8±1.8
Proteobacteria (%)	0.7±0.3	2.3±0.9	1.5±0.9*
Verrucobacteria (%)	1.6±1.0	0.4±0.3	1.3±0.6
Fusobacteria (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.3
Synergistetes (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0*
Eubacterium (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.1
Lentisphaerae (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

平均値±標準誤差
**白米群と比べて有意差あり ($p<0.05$).*

次に腸内細菌叢のプロファイル（属レベル）を図 2 に示す.

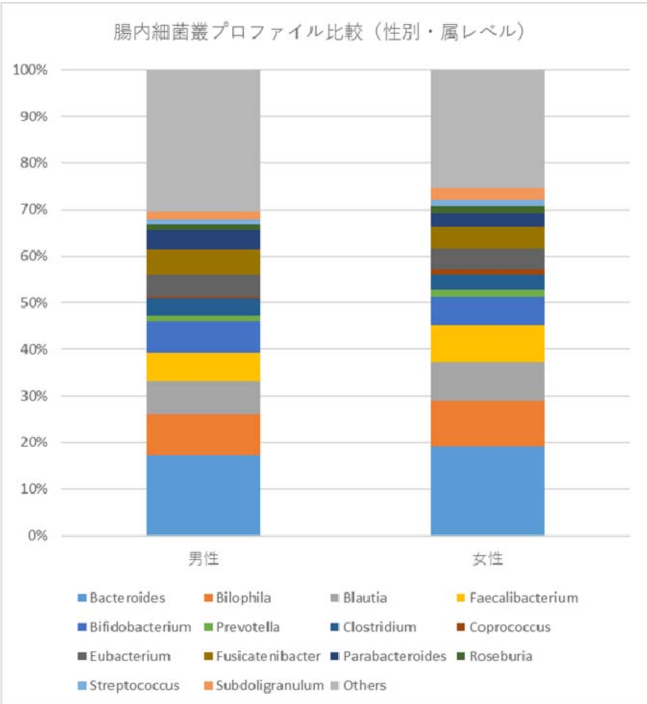

図 2. 腸内細菌叢のプロファイル比較(性別・属レベル 男性 n=19,女性 n=78)

対象者の平均値による腸内細菌叢のプロファイルは，男女別ともに，*Bacteroides*，*Bilophila*，*Blautia*，*Faecalibacterium*，*Bifidobacterium* 属の順に占有率が高かった（図 2）.

対象者の平均値による腸内細菌叢のプロファイル（属レベル）を，米の種類別に比較し表 5 に示す.

表 4 と同様に平均値の差の検定を行ったところ，*Bilophila*，*Faecalibacterium*，*Roseburia* 属に有意差があった（表 5）.

以上の結果により，参加者の腸内細菌叢のプロファイルの特徴を明らかにすることができた．そこでさらに，本研究の要となる主観的健康感との関係をより詳細に分析を行うこととした.

表 5. 白米，混合，玄米食による腸内細菌叢プロファイル比較(属レベル)

	白米食	混合米食	玄米食
Bacteroides (%)	18.4±2.2	15.8±2.6	19.2±2.3
Bifidobacterium (%)	8.0±4.0	6.8±1.5	5.7±1.2
Blautia (%)	5.7±2.0	8.5±1.7	8.5±1.2
Bilophila (%)	6.3±1.4	9.7±1.7	9.9±1.4*
Clostridium (%)	2.5±0.6	4.9±1.7	3.4±0.6
Eubacterium (%)	5.1±1.5	3.6±1.2	4.5±1.5
Faecalibacterium (%)	4.5±1.4	6.5±2.1	8.6±1.9*
Prevotella (%)	0.4±0.7	1.8±1.4	1.5±1.5
Parabacteroides (%)	4.9±1.5	2.2±1.5	3.0±0.6
Roseburia (%)	0.6±0.5	1.7±0.6	1.7±0.4*

平均値±標準誤差
**白米群と比べて有意差あり ($p<0.05$).*

4. 腸内細菌叢の主成分分析

主観的健康感は，本研究においては，「健康である」と回答した者は男性 7 名（7.2%），女性 34 名（33.1%）であった．そこで，主観的健康感を「健康である」41 名と「必ずしも健康とはいえない」55 名の 2 群に分け，腸内細菌の属レベルでの主成分分析を行った.

回転法は Kaiser の正規化を伴うバリマックス法を用いた.

主成分分析の結果，*Blautia*，*Bilophila* 属の比率（第一主成分）と *Roseburia*，*Prevotella*，*Eubacterium*，*Clostridium* 属の比率（第二主成分），*Coprococcus*，*Bifidobacterium* 属の比率（第三主成分），*Bacteroides*，*Faecalibacterium* 属の比率（第四主成分），*Streptococcus*，*Parabacteroides* 属の比率（第五主成分）が収束した．主観的健康感が高い者の腸内細菌叢は 77%が 5 つの菌のグループ化で説明できる収束であった（表 6,7,図 3）.

主観的健康感の高い者は *Blautia*，*Bilophila*，*Roseburia* 属が主成分としてとくに高い傾向があった．*Blautia*，*Bilophila* 属は空間成分プロットで，重なるように近接している菌であることが示された（図 3）.

表 6.　主観的健康感の高い者における腸内細菌叢の主成分分析（属レベル）

	第一主成分	第二主成分	第三主成分	第四主成分	第五主成分
Blautia	0.960	-0.002	0.023	-0.161	0.043
Bilophila	0.942	-0.044	0.014	-0.179	-0.044
Roseburia	0.072	0.946	-0.086	-0.01	0.044
Prevotella	-0.169	0.894	0.104	-0.219	-0.082
Eubacterium	-0.066	0.017	0.837	0.038	0.01
Clostridium	-0.192	-0.054	-0.805	0.005	0.124
Coprococcus	-0.117	-0.113	0.582	0.188	0.416
Bifidobacterium	0.314	0.011	-0.018	-0.774	0.041
Bacteroides	-0.131	-0.391	0.11	0.702	-0.188
Faecalibacterium	0.14	0.535	0.123	0.557	0.451
Streptococcus	-0.242	-0.093	-0.272	-0.166	0.709
Parabacteroides	0	0	0	0	-1

因子抽出法: 主成分分析
回転法:Kaiserの正規化を伴うﾊﾞﾘﾏｯｸｽ法
a 8 回の反復で回転が収束した。
b 分析ﾌｪｰｽﾞに使用されるのは subjecthealth = 健康である に対するｹｰｽのみ。

表 7.　腸内細菌叢の主成分分析（属レベル）分散の合計

成分	初期の固有値 合計	分散の %	累積 %	回転後の負荷量平方和 合計	分散の %	累積 %
1	3.097	23.820	23.820	2.810	21.612	21.612
2	2.212	17.012	40.832	2.182	16.781	38.394
3	2.181	16.777	57.609	1.870	14.388	52.782
4	1.348	10.396	67.975	1.735	13.349	66.131
5	1.179	9.071	77.046	1.419	10.915	77.046
6	0.879	6.761	83.807			
7	0.718	5.532	89.339			
8	0.510	3.927	93.285			
9	0.370	2.948	96.112			
10	0.363	2.794	98.805			
11	0.970	0.748	99.653			
12	0.250	0.190	100.000			

因子抽出法: 主成分分析

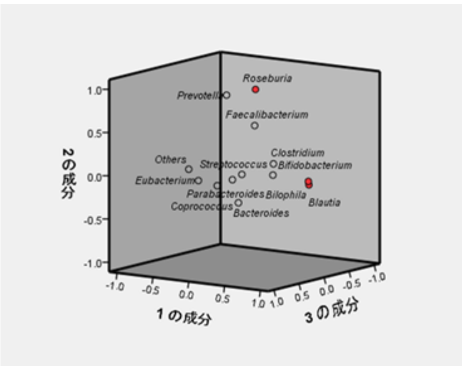

図 3.　主観的健康感の高い人の菌属の空間プロット

次に，97 名のうち酪酸産生菌が検出されなかった 1 名を除いて,酪酸産生菌（*Clostridium butyricum*, *Eubacterium*，*Roseburia*，*Butyrivibro*, *Faecalibacterium prausnitzii*）と主観的健康感の関係を「健康である」と「必ずしも健康でない」の平均値の差の検定を行ったところ，酪酸産生菌が多いほど，主観的健康感が高い傾向を示した（表 8 p=0.052）.

表 8.　酪酸産生菌占有率(%)と主観的健康感の検討

	平均値	標準誤差	平均値の差 (a)−(b)	p 値
健康である(a)	27.829	1.816	3.039	0.052
必ずしも健康でない(b)	24.790	1.410		

等分散を仮定しないWelchの検定　a 漸近的 F 分布
（健康であるｎ=40, 必ずしも健康でないｎ=57）

次に，主観的健康感が高い集団は玄米食を摂取していたため，玄米食と関連の強い腸内細菌を明らかにするため，玄米食と白米食の２群比較で参加者の占有率の高い菌属について検討を行った (表 9). 個別の菌では玄米食に対し等分散性の検定がほとんどの菌属で有意であったため，等分散性を仮定しない検定（Welch の検定）を行った．その結果，*Faecalibacterium prausnitzii* （ｐ=0.026），*Rosebria*（ｐ=0.013），*Bilophila*（ｐ=0.048）属の占有率が有意に高かった（表 9）.

表 9.　玄米食と白米食における腸内細菌叢との関係（属レベル）

		平均値	平均値の標準誤差	平均値の差 玄米食ー白米食	p 値
Bacteroides(%)	白米食	20.052	1.756	−0.805	n.s.
	玄米食	19.247	1.360		
Bifidobacterium(%)	白米食	7.999	3.905	−2.268	n.s.
	玄米食	5.731	0.802		
Blautia(%)	白米食	5.720	1.003	2.816	0.08
	玄米食	8.536	0.615		
Bilophila(%)	白米食	6.314	1.123	3.614	**0.048**
	玄米食	9.928	0.760		
Clostridium(%)	白米食	2.481	0.449	0.905	n.s.
	玄米食	3.386	0.464		
Eubacterium(%)	白米食	5.142	1.424	−0.640	n.s.
	玄米食	4.502	0.408		
Faecalibacterium(%)	白米食	4.488	1.109	4.070	**0.026**
	玄米食	8.558	0.780		
Fusicatenibacter(%)	白米食	5.194	1.435	−0.336	n.s.
	玄米食	4.858	0.454		
Prevotella(%)	白米食	0.352	0.288	1.113	n.s.
	玄米食	1.465	0.583		
Parabacteroides(%)	白米食	4.900	1.456	−1.896	n.s.
	玄米食	3.004	0.369		
Roseburia(%)	白米食	0.556	0.227	1.117	**0.013**
	玄米食	1.673	0.296		
Subdoligranulum(%)	白米食	1.279	0.689	1.327	n.s.
	玄米食	2.606	0.326		

等分散を仮定しないWelchの検定　a 漸近的 F 分布（白米食ｎ=10, 玄米食ｎ=74）

Ⅲ 考察

２年前に行った GENKI Study□調査の結果，白米食群と玄米食群では，玄米食群のほうが主観的健康感は高く，「健康である」と答えた割合は男性で 52.4％，女性で 44.2％であった．玄米食者群では，20 歳時の体重を現在維持している者が多く，肥満の者が少ない[11]．玄米食群の特徴として，白米食群よりも①BMI を適正に保っている．②既往歴が少なく，現在の服薬も少ない．③食生活は肉類の摂取がなく，和風の食事で野菜摂取量が多い．④便通は毎日１，２回あり，便の性状もバナナ状が多い（OR=1.72，p＜0.01）．⑤断食や瞑想，ヨガ体験者が多い（OR=3.72，p＜0.001）．⑥１日 8000 歩以上歩き，さまざまな趣味や運動習慣がある．⑦健康診断を受けない．⑧日常生活でパソコンを使用し，自転車に乗り，車を運転しない，などがあった．便通や便の形のよいことはよい腸内環境を示唆するものであった[21]．本研究の結果により，特徴的な所見として玄米食群は便通や便の性状がよく，酪酸産生菌の占有率が高く，望ましい腸内環境であることが示唆された．

一般的に *Firmicutes* 門は肥満に多い菌とされている．本研究における対象者の菌の占有率を属レベルでみてみると，平均 1%以上の占有率を示したのは *Firmicutes* の中で 10 属あった．肥満には遺伝，食事，運動など多要因が関係していることから，腸内細菌の門レベルのみで判定するには注意が必要と考える．

本研究の対象者に *Firmicutes* 門の占有率が高かったのは，肥満者が多いからではなく，酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸産生菌の菌属占有率が高かったためと思われる．

主観的健康感と生活要因について検討した結果，「ストレスがない」に有意な関連があった．そこでまずストレスに関して腸内細菌を検討した結果，酪酸産生菌との有意な関連は得られず，個別の菌との有意差も得られなかった．ストレスは，腸内細菌への影響との間に中間的な決定要因が存在する可能性が考えられ，因果関係の全体モデルについて，今後の課題として明らかにしていきたい．

またストレスは情動に影響を及ぼすのと，酪酸は抑うつ作用があるという報告[20]があることから，主観的健康感について検討するのであればさらに症例数を追加する必要があることが明確になった．

主観的健康感の高い被験者の腸内細菌叢を調べた結果，腸内発酵を行う菌属の占有率が高かった．腸内発酵の中でも，ヒトの健康維持に酪酸産生菌が重要であることが示され，注目されている．酪酸産生菌は一般的に *Anaerostipes*，*Clostridium*，*Coprococcus*，*Eubacterium*，*Butyrivibrio*，*Faecalibacterium prausnitzii*，*Roseburia*，*Fusobacterium* 属などが知られている．本研究において対象者から検出された酪酸産生菌は *Clostridium*，*Coprococcus*，*Eubacterium*，*Butyrivibrio*，*Faecalibacterium prausnitzii*，*Roseburia* 属であった．腸管組織は酪酸がなければアポトーシス，炎症，粘膜萎縮が起こるので，これら酪酸産生菌は恒常性の維持を保つためにとても重要な菌属である．

さらに主観的健康感に強く影響を及ぼしている菌を調べるために主成分分析を行ったところ，5 つの主成分で 77%が説明できるように収束した．とくに第一主成分として，*Blautia*，*Bilophila* 属があり，第二主成分として *Roseburia* 属が主成分であった．これらの菌が主観的健康感に関連が高い菌属であることが考えられた．そこで，主観的健康感と個別の菌の相関を検討すると，主観的健康感が高い群では酪酸産生菌である *Roseburia* 属の占有率が有意に高いという結果が得られた（p=0.020）．主観的健康感と酪酸産生菌との検討では，酪酸産生菌（p=0.052）で有意差はなかったものの，酪酸産生菌が多いほど主観的健康感が高いという傾向がみられた．

以上の結果より，*Roseburia* 属は，腸脳相関を介し主観的健康感と関連が強い菌と考えられた．腸管には多数の求心性神経（迷走神経，脊髄求心性神経）が分布しており，これらは腸管内腔の情報を中枢神経へ伝達していると考えられている．

マウスに *Bifidobacterium* を経口投与し，神経細胞活動性の指標として用いられている C-FOS を経時的に測定したところ，視床下部で，*Bifidobacterium* が投与後に増加しているという報告[21]があった．この結果から，腸内細菌によって腸管クロム親和性細胞から遊離されたセロトニンが迷走神経あるいは脊髄求心神経末端のセロトニン type3 レセプターに作用し狐束核を経由して脳へ情報を伝えていく経路の存在を示唆すると報告されている[21]．

本研究においても，*Roseburia* や *Faecaribacterium* の占有率が高い者の CFOS は増加していると考えられ，腸管クロム親和性細胞から遊離されたセロ

トニンが迷走神経あるいは脊髄求心神経末端のセロトニンレセプターに作用し，狐束核を経由して脳へ情報を伝えていく経路があることが考えられた．その際に酪酸は直接脳関門を通れるかどうかという問題があるが，ストレスがかかる状況においては脳関門の透過性が増すことがマウスの実験で明らかであり，酪酸が直接脳にいかなくてもCFOSの増加やβ-hydroxybutyrateなど，別の形で腸から脳へ伝達を行っていることも考えられるため今後更なる解明が待たれる．

以上の結果から，主観的健康感は *Rosebria* 属や *Faecalibacterium prausnitzii* などの酪酸産生が腸脳相関を介して影響を及ぼしている可能性が示唆された．*Faecalibacterium prausnitzii* は，1 菌属 1 菌種の特殊な菌で，ヒトの全腸内細菌の約 5%を占める．また，酢酸を消費して，健康に有益な酪酸を産生するため，世代のプロバイオティクスと考えられている．Lukovac ら[22] のマウスの実験では *Faecalibacterium prausnitzii* が酪酸を産生し，腸管上皮にエネルギーを与え，多くの菌を活性化し腸粘膜の恒常性を保っていることが明らかになっているため，玄米食者は腸粘膜の恒常性が保たれ免疫機能が整い健康に寄与している可能性も考えられる．2 型糖尿病患者に対する腸内細菌の検討より，糖尿病患者の腸内細菌には酪酸を産生する腸内細菌，とくに酪酸産生菌である *Roseburia* 属の腸内細菌が減っていると報告されている[23]．

Roseburia 属の占有率は健康度のマーカーとなりうる可能性があるとされている．

また，酪酸は，抗うつ作用を持つことが動物実験で明らかにされている． 酪酸を投与されたマウスでは,脳内の海馬や前頭葉での BDNF（脳由来神経栄養因子）が増加していることが示された[23]．つまり，脳の成長に関係している可能性が考えられる．そのメカニズムとして 酪酸のヒストンデアセチラーゼ阻害作用による BDNF 発現増強が想定されている．さらに，無菌マウスの脳内における BDNF 濃度は同じ年齢の通常マウスより低いという事実から，腸内細菌が脳の機能に影響する可能性があるとされている．以上の結果は，腸内細菌がストレス応答の制御や脳内神経成長因子に影響していることを示している．本研究で得られた酪酸産生菌の増加と主観的健康感の有無，ストレスへの影響に寄与している可能性が高い．

次に，主観的健康感が高い集団は玄米食を摂取していたため，玄米食と関連の強い腸内細菌を明らかにするため，参加者の代表的な菌属を用いて平均値の差の検定を行った結果，玄米食摂取群は酪酸産生菌との関連がみられた．個別の菌では主観的健康感との主成分分析で第一主成分だった *Blautia*，*Bilophila* 属，第二主成分の *Roseburia* 属が有意な関連を示し，*Faecalibacterium prausnitzii* は主観的健康感と相関し，玄米食の有無とも相関することが明らかになった．

玄米食者と白米食者の腸内細菌叢の比較を行った結果，玄米食者で酪酸産生菌の占有率が高く，個別の酪酸産生菌で検討しても有意差が検出された．以上の結果から，玄米食者が摂取している食物繊維が何らかの発酵を受けて酪酸が産生され，腸脳相関を介して主観的健康感を高めている可能性が示唆された．玄米の食物繊維は不溶性のヘミセルロースが主体であるが，これはフェルラ酸架橋によるものである．しかし，小麦フスマをヒト糞便と一緒にファーメンターにて培養するとフェルラ酸架橋がはずれ，アラビノキシランが溶出し，酪酸産生菌が増加することが示されている[24]．玄米においても，大腸内で腸内細菌によりフェルラ酸架橋がはずれて，アラビノキシランが発酵を受けて酪酸産生菌の増加をもたらした可能性が高い．

さらに玄米食者で有意に多かった *Blautia* 属は酢酸，乳酸，コハク酸を産生することが明らかになっている[25]．*Blautia* 属は，*Clostridium coccoides* が,新しい菌属として *Blautia* 属に再分類され，*Blautia coccoides* と命名された．ヒト腸内における最優勢菌の一つであり，高齢者や糖尿病，肝硬変，大腸がん，乳がんなどをはじめ種々の疾患の患者腸内で減少していることからも有用菌の一つと考えられている．これら短鎖脂肪酸の産生菌の増加も，玄米中の食物繊維であるアラビノキシランが発酵した結果であると考えられる．

さらに，玄米食者が副菜として日常よく食べる根菜類（フラクタン）や海藻（アルギン酸）などの水溶性食物繊維を *Blautia* 属などが分解して，乳酸や酢酸を産生し，それらを使って大腸内に存在する酪酸産生菌が酪酸を産生している機序も考えられる．これらの仮説は玄米食の介入研究により明らかにされるであろう．

さらに，玄米にはγ-オリザノール，GABA（γ-アミノ酪酸），ポリフェノール，ビタミン E，葉酸，鉄，亜鉛などさまざまな重要成分が含まれている．

とくに，フェルラ酸やγ-オリザノールなど機能性物質が脳の精神領域に影響を及ぼすことが報告されており，これらの成分が複合的に関与している可能性も否定できない．玄米の複合作用は，単一の成分で構成されるサプリメントでは発現できないため，重要な食材と言えよう．

光岡ら[26]のビフィズス菌の研究で，加齢に伴い，有用菌であるビフィズス菌が減少するという報告がある．また,アジア人腸内細菌叢を調べた結果にはビフィズス菌の低下とともに，*Enterobacteria* の増加が見られたと報告されていた[27]．しかし，詳細にみてみると，あくまでも全体的な傾向であり，個人のばらつきが大きいためその傾向を逸脱するサンプルも多く，今後の課題となっていた．本研究のデータは年代に大きな差異が見られなかったことから，この逸脱するサンプルに値すると思われた．

また，そもそも主観的健康感が高い人は玄米食者だったので，最初から玄米食者の腸内細菌をみていただけで，玄米食者の特徴を示しただけなのではないかとの見方もあるようだが，必ずしも結果は同じではなかった．このことより，主観的健康感の影響と，玄米の影響は何らか違うものがあるのではないかと考えている．しかし，血液検査などで玄米特有のγ-オリザノールなどの影響についてバイオマーカーにより検討できていないため，この部分は今後の研究課題である．今回の集団は非玄米食者が少なかったのでデータの偏りも否定できない．

研究の限界として，本研究の対象者は白米摂取者が少なく，しかも健康に気をつけている集団の横断研究であり，選択バイアスがあったこと，また1年後調査の参加者が少なかったことであり，生体のバイオマーカーが利用できなかったこと，菌体―生体の代謝的関係を全体として把握できなかったことがある．本研究の対象者が玄米を食べているひと者の割合が多く，対照とする白米食者の人数が少なかったため交絡因子として排除することができなかった．玄米を交絡因子として排除した分析を行えるようにすることは今後の課題としたい．

今後，主観的健康感を高めていた生活習慣因子，たとえば白米を摂取している者が玄米食に変えることにより同様の結果を得られるかどうか，また身体活動の低い者が1日8000歩以上を歩くことで主観的健康感が高くなるかどうかということに関し，再現性と共に，明確な因果関係を立証するためには，追跡研究と共に，介入研究あるいは臨床研究を実施することが研究課題である．

Ⅳ 結論

本研究において，主観的健康感と腸内細菌叢との関連を検討したところ，生活要因として，玄米食，身体活動に好ましい特性があり，酪酸産生菌との関連が示された．

主観的健康感が高い者は *Blautia* 属などの短鎖脂肪酸産生菌が第一主成分として収束され，酪酸産生菌が高い傾向がみられた．とくに主観的健康感が高い群では酪酸産生菌である *Roseburia* 属の占有率が有意に高いという結果が得られた．また，主観的健康感が高かった玄米食群において，酪酸産生菌が有意に多いことが示唆された．とくに，*Faecalibacterium prausnitzii* と *Roseburia* 属の占有率が有意に高かった．酪酸は，直接又はその代謝産物が腸管・中枢神経系の回路網を介して，情動に影響を及ぼすとラットの実験から推察されている．

したがって，主観的健康感－酪酸産生菌の増加には何らかの因果関係がある可能性が示唆された．

本研究により，ヒトにおいても microbiome-gut-brain axis が主観的健康感に大きく影響している可能性があると考えられた．これらの因果構造の究明は，今後の研究課題である．

謝辞

本研究を実施するにあたり協力していただいた97名の参加者，テクノスルガ・ラボ並びに，(公社)生命科学振興会事務局・生塚壽恵子，佐合井紫織諸氏に感謝いたします．また，がんセンター東病院・水野正一先生，首都大学東京・星旦二先生，相模女子大学・児玉小百合先生，東アジア太平洋臨床栄養学会長・渡邊昌先生に深く感謝申し上げます．

引用文献

1）公益社団法人日本 WHO 協会. https://www.japan-who.or.jp/commodity/kenko.html
2）内閣府．平成 28 年度国民生活基礎調査．こころの健康に関する調査. https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa16/index.html
3）岡戸順一，星旦二．主観的健康感の医学的意義と健康支援活動．総合都市研究. 2000; 73;125.
4）Idler E, Benyamini Y. Self-rated health and

mortality: A review of twenty-seven community studies. J Health Soc Behav. ; 1997;38(1):21-37.
5）岡戸順一，艾斌，巴山玉蓮，　星 旦二．主観的健康感が高齢者の生命予後に及ぼす影響．日本健康教育学会誌 2003; 11(1): 31-38.
6）艾　斌，　星　旦二．高齢者における主観的健康感の有用性に関する研究　日本と中国における研究を中心に．日本公衆衛生雑誌 2005; 52(10): 841-52.
7) 岡戸純一, 艾　斌, 巴山玉蓮,桜井尚子,藤原佳典,他．主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析．総合都市研究 2003; 81:19-30.
8）Nakata A. A systematic review of self-rated health and the immune system. Jpn J Behav Med. 2013. Vol. 19(2): 75-82.
9）福島（平川）あずさ，渡邊昌，水野正一．玄米食者と健康感横断研究 GENKI Study I から．医と食　2018; 10(4); 197-203.
https://ci. nii. ac. jp/naid/40021539848
10）Watanabe S, Mizuno S, Hirakawa A. Effects of brown rice on obesity: GENKI Study I (Cross sectional epidemiological study).　J Obes Chronic Dis 2018;2(1): 12-19.　doi: 10. 17756/jocd. 2018-013
11）渡邊昌，水野正一，高橋正仁，et al. 肥満と糖尿病 ：肥満者と玄米食者の食生活 ：GENKI Study から (特集 糖尿病の実態と肥満).医と食. 2018; 10(2)，79-86.　https://ci. nii. ac. jp/naid/40021539848/
12）青江誠一郎．穀類に含まれる食物繊維の特徴について．日本調理科学会誌. 2016; 49(5):297-302.
13）Nested Study
https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/nested+study
14) Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010; 464 (7285):59-65.
15）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; 197:919-934.
doi 10.1007/s00203-015-1125-020.
16) Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 2012;464:59-65. doi:10.1038/nature08821
17）Quail MA, Smith M, Coupland P, Ottoand TD, Harris SR. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent,　Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genom 2012;13:341. doi:10.1186/1471-2164-13-341.
18）Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima N. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing.　PLoS ONE 2014;9(8): e105592.
doi:10.1371/journal.pone.0105592.
19）IBM SPSS＠Statistics
https://www.ibm.com/software/jp/marketplace/spss/
20）Tsankova NM, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. Nat Rev Neurosci. 2007; 8: 355–367.
21）須藤信行．脳機能と腸内細菌叢．腸内細菌学雑誌. 2017;31:23-32.
22）Lukovac S, Belzer C, Pellis L, Keijser BJ, de Vos WM, Montijn RC, et al. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids.MBio. 2014 Aug 12;5(4).
23）Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, Fong S3, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Roseburia spp.: a marker of health? Future Microbiol. 2017 Feb;12:157-170. doi: 10.2217/fmb-2016-0130.
24）Duncan SH, Russell WR, Quartieri A, Rossi M, Parkhill J, Walker AW, Flint HJ. Wheat bran promotes enrichment within the human colonic microbiota of butyrate-producing bacteria that release ferulic acid. Environ Microbiol. 2016;18(7):2214-25.
25）Martinez I, Lattimer MJ, Hubach KL, et al. Gut microbiome composition is intaked to whole grain-induced immunological improvements. The ISME J. 2013; 7:269-280.
26）光岡知足．腸内フローラと食餌．理化学研究所腸内フローラシンポジウム 12．学会出版センター．東京,1994.
27）中山二郎．腸内フローラからみた日本人とアジア人の健康．日本食生活学会誌. 2018; 29(3):137-140.

Abstract

Purpose　In previous studies, brown rice eaters had regular bowel movements and the monitoring of their stool microbiota showed a normal microbial diversity profile. A subpopulation among participants to the GENKI I cohort study was studied to explore the relationship between the subjective feeling of being healthy (positive emotions) and the profile of the intestinal bacterial flora.

Method　Ninety-seven participants who had been enrolled in the GENKI I Study had their fecal bacteria analyzed at phylum and genus levels by 16S rDNA amplicon sequencing, and correlations with epidemiological data were examined. The subjective feeling of being healthy was measured by a self-rated assessment tool.

Results　Participants scoring high on the subjective sense of health showed a higher abundance of *Roseburia* in their stools (p = 0.013). Eaters of brown rice diet also tended to carry more butyric acid-producing bacteria, especially of the *Faecalibacterium prausnitzii* (p =0.026). The proportion of bacteria producing short-chain fatty acids such as *Bilophila* (p =0.048) was also higher in brown rice eaters.

Discussion　It has been reported that butyric acid and derived metabolites produced by intestinal bacteria could affect emotions mediated through the gut-brain nervous system. The subjective feeling of being healthy has complex determinants. Butyrate-producing bacteria could be one of them. However, a limitation of this study is that being healthy was a criterion for being enrolled in the GENKI cohort. A selection bias might therefore have influenced the observed results. Our hypothesis should thus be further explored through an intervention study.

Conclusion　We have identified a possible correlation between a high subjective sense of health and the presence of butyric acid-producing bacteria in the gut. In addition, *Faecalibacterium prausnitzii* was more abundance detected among brown rice eaters. Participants scoring high on the subjective sense of health showed a higher abundance of *Roseburia* in their stools. It was revealed that the occupancy rate of the short - chain fatty acid - producing bacteria, such as *Blautia,* and *Bilophila* is high.

（受付日：2018 年 12 月 13 日，受理日：3 月 12 日）

福島（平川）あずさ　（ふくしま・ひらかわ　あずさ）
現職：内閣府食品安全委員会事務局技術参与，公益社団法人生命科学振興会研究調査部員

大妻女子大学大学院人間文化研究科博士後期課程在学中．
専門は栄養教育，食品安全．博士後期課程では，生命科学振興会研究調査部が行った GENKI Study I における玄米食者の食生活調査や，断食前後と断食中のケトン体，血糖値，腸内細菌叢の変化に関する研究に従事した．