

人間ドック受診者における口腔内・腸内微生物叢を用いた 生活習慣病の新規バイオマーカーの探索

三 好 佐和子

杏林大学医学部総合医療学教室

背景

ヒトの共生微生物叢 (microbiota) は、宿主であるヒトと緊密な相互関与を行いながら、ヒトの健康維持に貢献している。近年では、microbiotaの乱れ (dysbiosis) が、免疫疾患、代謝性疾患などに関与することが報告され、特に糞便検体を用いた腸内microbiotaについて精力的な研究が進められてきた。一方、消化管の入り口である口腔内には健常人で7-8億/mL (唾液中) の細菌が存在し、1日1.0-1.5 Lの唾液が嚥下される。口腔内細菌叢は、腸内細菌叢と関連し、さらに胆汁や胃酸の影響が弱くなる加齢変化に伴い、その相関は強くなることが報告されている (Iwachi M, et al. Immun Inflamm Dis 2019)。また、口腔内細菌が異所的に腸管に生着し炎症性腸疾患のような消化管疾患の原因となるとの報告 (Atarashi K, et al. Science 2017) や動脈硬化性疾患、関節リウマチなどの全身疾患の経過や病態生理に影響する可能性が示唆されている (Ordovas JM, et al. Curr Opin Lipidol 2006, Zhang X, et al. Nat Med 2015)。

脳・心血管疾患などのリスクとなる代謝関連疾患 (いわゆる生活習慣病) は、加齢とともに罹患数が増加し、健康寿命短縮、QOL低下にもつながる。また、医療費の観点からも一次予防、早期介入が重要である。健康から疾患に至るまでのシーケンシャルな体内細菌叢の変化は、この早期介入の一つの指標となる可能性がある。健診や人間ドック受診者には、完全な健常人のほか、生活習慣病予備軍、治療介入前の生活習慣病患者が多く含まれているため、早期介入の重要な場である。そのため、健康から生活習慣に至る体内細菌叢の検討において人間ドックでのサンプリング、解析は非常に有用と考えられる。対象者の積極的な協力を要する便採取は、検便検査同時採取により比較的容易であり、さらに、簡便で臨床応用しやすい唾液採取についても、検査前絶食状態のため食事などの外的環境の影響

を最小限にできる。また、宿主面に関しては、人間ドックにおいて蓄積している一般人口に準ずる受診者の詳細な臨床データ、代謝、サイトカインプロファイル等の血清学的な変化も合わせた、幅広い臨床データセットと組み合わせた包括的解析が可能である。これらの検体・データ群の解析は、さまざまな疾患マーカーの開発につながる可能性がある。

目的

我々は人間ドック受診者を対象に、健常群、メタボリックシンドローム群、肥満/非疾患群、非肥満/疾患群について、それぞれ経時的な検討を行い、腸内 (糞便)・口腔内 (唾液) 細菌叢の変化を評価、比較することとした。

方法

2021年7月から2022年8月までの杏林大学医学部付属病院人間ドック受診者を対象とした。同意を得られた受診者に対し、人間ドック用の検便採取と同時に研究用便検体採取を依頼し、受診時 (前日夜から絶食) に唾液を採取、検査終了後の残血清を保存した。また、唾液、便検体のDNA抽出処理を行い、全細菌特異的16S rRNA標的primer set (Eub338F・Eub518R) を使用したPCRにより細菌DNAが回収できているかを確認した。

人間ドック受診時の臨床データ (各種測定データ、問診による既往、内服歴) から、本邦メタボリックシンドローム診断に準じ、①健常群 (Healthy control: HC群): 非メタボリックシンドロームかつBody Mass Index (BMI) 正常 (BMI 18.5以上25未満)、糖尿病、高血圧、脂質異常加療歴なし、②メタボリックシンドローム群 (Metabolic syndrome: MS群): メタボリックシンドローム診断基準を満たす、③肥満/非疾患群 (Healthy obesity: HO群): メタボリックシンドローム診断基準をみたさないBMI $\geq$ 25、かつ上記疾患加療歴なし、④非肥満/疾患群 (Unhealthy

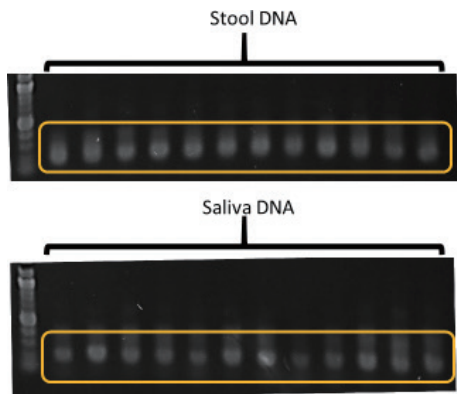


図 1

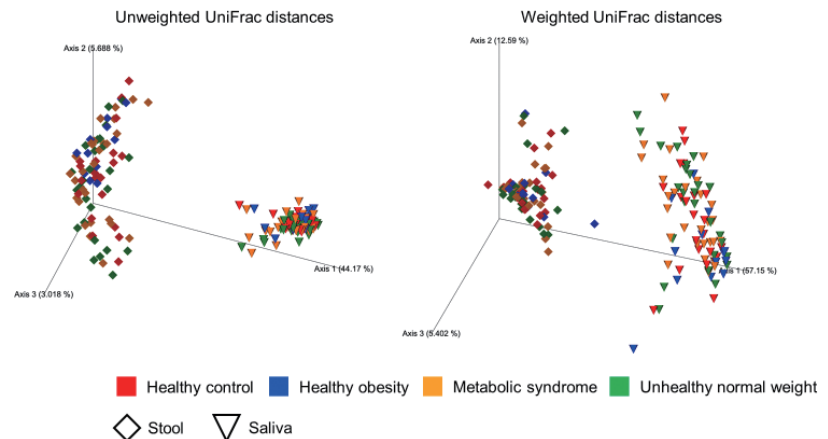


図 2

normal weight : UH群) : 腹囲径正常 (男性<85 cm, 女性<90 cm) かつBMI正常, 血糖・脂質・血圧異常を有する (非加療) の4群を抽出した。これら4群において, 糞便, 唾液検体の16S rRNA gene amplicon sequencing解析を行った。

なお, 本研究はヘルシンキ宣言, 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に基づき, 杏林大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた (承認番号:1743-01)。

結果

2021年7月～2022年8月までの受診者1346例の受診者のうち, 497例 (男性338例, 女性159例, 年齢25～87歳, 中央値59歳) の参加を得られた。糞便, 唾液検体のDNA抽出に際し条件検討を行い, 全細菌PCRでは有効な結果が得られ, 安定して細菌DNAが得られる手法を確立した (図1)。

また, まずは特定健診対象となる中年～前期高齢者45～74歳に対象を絞り, HC群21例 (男性8例, 女性13例, 年齢45～71歳, 中央値57歳), HO群13例 (男性12例, 女性1例, 年齢45～66歳, 中央値49歳), UH群26例 (男性17例, 女性9例, 年齢45～74歳, 中央値59歳), MS群28例 (男性26例, 女性2例, 年齢47～72歳, 中央値61歳) の解析を行った。88名の糞便・唾液の計176検体全てにおいて, 良好な16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンシング (V4領域) 実施が可能であった。

QIIME 2を用いたUniFrac distancesに基づくdiversityのPCoAプロットを図2に示す。Unweighted/Weighted UniFrac distancesがそれぞれ検体内に存在する細菌の種類に着目したもの, 細菌の種類に加えて占有割合も考慮したものである。いずれの場合も糞便検体と唾液検体は大きく離れたクラスターを形成していることから, 細菌構成が明らかに異なることが確認された。またUnweighted UniFrac distancesでは糞便検体間でのばらつきが唾液検体間よりも大きく, Weighted UniFrac distancesでは糞便検体間よりも唾液検体間が大きかった。本結果より, 唾液検体では, 存在する細菌の種類は糞便よりも検体間で差異が小さいものの, 各細菌の占有割合は大きく異なっているという特徴が示唆された。

結論

人間ドック受診者の糞便, 唾液検体を用い, 細菌DNAの16S rRNA gene amplicon sequencing解析を行った。既報の通り, 糞便, 唾液での細菌構成は異なることが示された。今後, HC, HO, MSおよびUHの各群において特徴的な細菌構成についての検討を唾液細菌叢および糞便細菌叢のそれぞれについて継続する必要がある。また, 今回参加の497例中477例は毎年受診している方々であり, 翌年の受診, 研究参加も見込めるため, 今後経時的な解析も行う予定である。