

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11011

研究課題名(和文) 腸内細菌叢は耐糖能に影響を及ぼすのか～HbA1c高値地域と正常地域の比較研究

研究課題名(英文) Does the intestinal flora affect glucose tolerance? -Comparative study of high HbA1c and normal areas

研究代表者

鈴木 良雄 (Suzuki, Yoshio)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：30612395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：千葉県銚子市と三重県は、耐糖能異常者(HbA1c>5.5%)の割合に大きな違いがある。この違いに腸内細菌叢が関与していると考えた。そこで、銚子市と三重県の糖尿病治療を受けていない女性の特定検診受信者を対象に、腸内細菌叢と関連する菌を特定することを目的とした。千葉県銚子市では46名、三重県では29名が研究に参加した。

腸内細菌叢をHbA1c正常群と高値群とで比較すると、多様性は高値群の方が小さいことと、多様性では群間に違いがあることを共通して確認することができた。一方、高値群と正常群とで構成比に有意な違いが観察された菌は、GenusレベルでもSpeciesレベルでも共通したものはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究では、HbA1cの「高値者 vs 正常者」や「糖尿病患者 vs 健常者」のように耐糖能により対象者を分類・比較し両者間に有意な違いが報告されているが、違いを示す菌自体は研究間では一致していない。本研究では同一手法でHbA1c高値者の多い千葉県銚子市と三重県の参加者の腸内細菌叢を比較することで、両地域に共通してHbA1cと関連する菌を特定することを期待したが、現状ではその期待は達成できていない。しかし、HbA1cと関連する菌を特定することができれば、腸内細菌叢を介した耐糖能を維持・改善の手法を開発できると期待される。今後、更に、両地域の共通点、相違点などを解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：Choshi City, Chiba Prefecture, and Mie Prefecture have a large difference in the percentage of people with impaired glucose tolerance (HbA1c > 5.5%). We hypothesized that the intestinal microflora is involved in this difference. Therefore, we aimed to identify bacteria associated with intestinal microflora in female recipients of special health check-ups who were not receiving diabetes treatment in Choshi City and Mie Prefecture. Forty-six participants in Choshi City, Chiba Prefecture, and 29 participants in Mie Prefecture participated in the study. Comparing the intestinal microbiota between the normal HbA1c group (N) and the high HbA1c group (H), it was commonly confirmed that alpha diversity was lower in the H group, and there were differences between the groups in beta diversity. On the other hand, no significant differences in compositional ratios were observed between the H and N groups, neither at the genus level nor at the species level in common.

研究分野：腸内細菌叢

キーワード：耐糖能 腸内細菌叢 HbA1c 食事 栄養素 食品 マイクロビーム 特定検診

1. 研究開始当初の背景

世界の糖尿病患者は 2017 年には 4 億人以上で、2045 年には 6 億 93 百万人に増加すると推定されており世界的な課題である[Cho et al. Diabetes Res Clin Pract 2018]。糖尿病には自己免疫性疾患である 1 型糖尿病と代謝性疾患である 2 型糖尿病があるが、2 型糖尿病の方が多い。そして 2 型糖尿病の発症には生活習慣を含む環境要因が大きく寄与すると考えられる。そのため、効果的な予防法を開発するために、発症に寄与する要因を明らかにすることが重要な課題となっている。

エネルギーの摂取過剰による肥満が 2 型糖尿病を引き起こすことは明らかであり、欧米ではこれが 2 型糖尿病の主な原因となっているが、日本の 2 型糖尿病患者は必ずしも肥満ではない。この違いの理由として日本人と欧米人ではインスリン分泌能に違いがあることが指摘され、その背景に遺伝的多様性が示唆されているが、日本人の耐糖能に影響を及ぼす遺伝的素因は明確にはなっていない。

一方、人間の腸内細菌叢は出生から 3 年程度までに生育環境の影響を受け個人に特有のパターンが形成され、以後は大きくは変わらない。そして日本人にはバクテロイデスの多い B タイプが多いのに対して欧米人はプレボテラの多い P タイプが多いということが知られている。また、腸内細菌叢は基本的には 3 歳以降は終生にわたって個人に固有のパターンが維持されるが、摂取する食品の影響も受けることも知られている。

我々は、これまで千葉県銚子市や三重県等で疫学研究を行ってきた。その経験から、銚子市と三重県(紀北町、菰野町)は同じような生活環境でありながら、女性の耐糖能異常者(HbA1c 高値 5.6%以上)の割合が銚子市は 64.0%であるのに対して三重県(紀北町、菰野町)は 20%未満と大きな違いがあることを認識していた。

2. 研究の目的

本研究は千葉県銚子市と三重県の糖尿病治療を受けていない女性の特定検診受診者を対象に、腸内細菌叢(およびそれに影響を及ぼす食生活)と耐糖能の関連を明らかにすることを目的とした(図 1)。

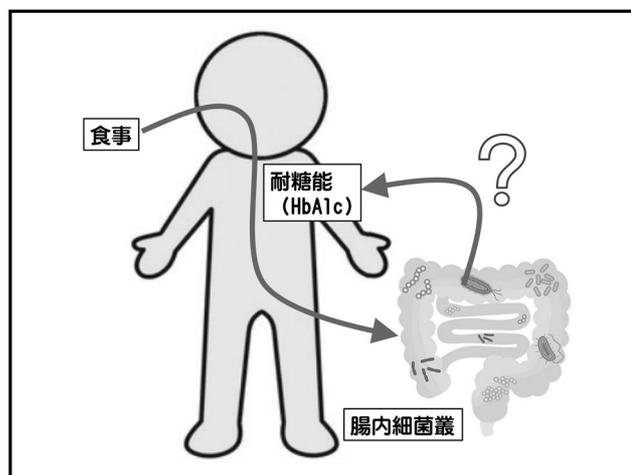


図 1 本研究の目的

3. 研究の方法

本研究計画では、腸内細菌叢(およびそれに影響を及ぼす食生活)と耐糖能の関連を明らかにするために研究期間中に以下のように研究を行うこととした。

(1) 被験者

特定健診で得た HbA1c の結果から、各地域で治療を受けていない HbA1c 高値者(5.6%以上)と正常者(HbA1c が 5.5%以下) 各 25 名ずつを募集することとした。

被験者の選択基準と除外基準は以下のとおり。

[選択基準]

- 千葉県銚子市あるいは三重県のどちらかに居住している方
- 年齢は 40 歳以上かつ 59 歳以下
- 性別は女性
- BMI が 30 kg/m² 未満
- 直近の特定健診を受診した方
- 自発的に書面での同意をもって試験に参加する方

[除外基準]

- 医師により糖尿病(あるいは血糖値)に対する薬物治療を受けている方
- 1 年以内に妊娠・出産をした方または、現在妊娠中の方
- 新型コロナウイルスに感染している、あるいは感染経験のある方

- B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスに感染している方
最近3か月以内に他の臨床試験に参加した方
6) 最近6か月間にアルコール中毒あるいは薬物中毒にかかったことのある方

(2) 質問紙調査

特定健診時の質問紙調査に加えて、簡易型自記式食事歴法質問票 (BDHQ) を用い食習慣の調査も行う。

(3) 腸内細菌叢の分析

被験者の腸内細菌叢を 16S rRNA の配列を指標に分析する。

(4) 腸内細菌叢 (およびそれに影響を及ぼす食生活) と耐糖能の関連の解析

HbA1c と腸内細菌叢及び食生活 (BDHQ) との関連を解析する。

(5) 倫理的配慮

本研究はヘルシンキ宣言の原則に基づき、順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科倫理委員会の承認 (承認番号 2021-111, 2021-122, 2021-125, 2022-79) を得て実施した、被験者は実験の目的、方法、安全配慮、危険性などについて事前に説明を受け、自署した同意書を提出して研究に参加した。

4. 研究成果

(1) 千葉県銚子市

a. 被験者

HbA1c 高値者 (H 群) 25 名、正常者 (N 群) 21 名の合計 46 名が研究に参加した。HbA1c は H 群 $5.9 \pm 0.4\%$ 、N 群 $5.4 \pm 0.1\%$ であった。年齢 (H 群 52.8 ± 4.9 歳、N 群 50.0 ± 5.1 歳)、身長 (H 群 158.5 ± 4.5 cm、N 群 158.4 ± 4.0 cm)、体重 (H 群 54.6 ± 9.2 kg、N 群 54.2 ± 5.6 kg) には、H 群と N 群間に有意な差はなかった。血液生化学項目では、 γ -GT は H 群 (29.5 ± 19.0 U/L) の方が N 群 (19.4 ± 11.8 U/L) より有意に高値であった ($p < 0.05$)。一方、HDL-C、LDL-C、TG、GOT (AST)、GPT (ALT)、Creatinine、e-GFR には H 群と N 群間に有意な差はなかった。また、HbA1c と上記項目の間に有意な相関はなかった。

b. 食習慣

BDHQ で測定された 47 の栄養素の摂取量を比較すると、H 群は N 群よりも、Na の摂取量が有意に多かった。一方、HbA1c と各栄養素の摂取量との間に有意な相関はなかった。また、BDHQ で測定された 70 の食品群の摂取量を比較すると、H 群は N 群よりも、漬物 (その他)、うどん、柑橘類 (季節)、調理砂糖の摂取量が有意に多かったが、ハム、洋菓子、100%ジュース、ワインの摂取量は有意に少なかった。また、HbA1c と漬物 (その他)、うどん、ウイスキー、めんスープ、しょうゆ量の摂取量との間に正の相関が観察され、とうふ・油揚げ、100%ジュース、ワインの摂取量との間に負の相関が観察された。

c. 腸内細菌叢

収集した糞便検体について腸内細菌叢の分析を行った。各検体から 10,000 read の 16S rRNA のアンプリコンをアノテーションし全体で 10 門、192 属、488 種の細菌を同定し構成比を得た。

検体内の菌の多様性を示す α -多様性 (Species レベル) は、Observed, Chao1, ACE, Fisher のいずれの指標も HbA1c 高値群 (5.6%以上; H 群) の方が正常群 (5.5%以下; N 群) より有意に小さかった。

また、検体間の菌叢距離を示す β -多様性 (Species レベル) は Bray-Cutis index, Jensen-Shannon Divergence, Jaccard index のいずれの指標でも H 群と N 群の間には有意な違いがあった。

Genus レベルで比較すると、N 群の方が H 群よりも有意に多い菌は *Gordonibacter*, *Catenibacillus* などの 15 属、有意に少ない菌は *Fusobacterium*, *Bacteroides* などの 4 属であった (表 1)。

Species レベルで比較すると、N 群の方が H 群よりも有意に多い菌は *Alistipes putredinis*, *Anaerostipes hadrus* などの 31 種、有意に少ない菌は *Lachnospiraceae bacterium_9_1_43BFAA9*, *Catenibacillus scindens* などの 9 種であった。

表 1 HbA1c 高値群と正常群で有意な違いのあった種

Normal > High		High > Normal	
Genus	P	Genus	P
<i>Gordonibacter</i>	< 0.001	<i>Fusobacterium</i>	0.013
<i>Catenibacillus</i>	0.005	<i>Bacteroides</i>	0.014
<i>Anaerostipes</i>	0.006	<i>Megamonas</i>	0.020
<i>G_undefined_Ruminococcaceae</i>	0.011	<i>Robinsoniella</i>	0.021
<i>Alistipes</i>	0.018		
<i>Catenisphaera</i>	0.026		
<i>Desulfotomaculum</i>	0.026		
<i>Desulfovibrio</i>	0.026		
<i>Adlercreutzia</i>	0.027		
<i>Ruthenibacterium</i>	0.035		
<i>Anaerofustis</i>	0.037		
<i>Anaerotruncus</i>	0.040		
<i>G_undefined_Lachnospiraceae</i>	0.042		
<i>Intestinimonas</i>	0.044		
<i>Eisenbergiella</i>	0.048		

(2) 三重県

a. 被験者

HbA1c 高値者 (H 群) 9 名、正常者 (N 群) 20 名の合計 29 名が研究に参加した。

HbA1c は N 群は $5.3 \pm 0.2\%$ 、H 群は $5.9 \pm 0.2\%$ であった。年齢 (N 群 48.6 ± 4.2 歳、H 群 49.1 ± 6.7 歳)、身長 (N 群 156.9 ± 4.8 cm、H 群 159.9 ± 4.7 cm) には、H 群と N 群間に有意な差はなかった。H 群の方が N 群より、体重 (N 群 53.1 ± 8.0 kg、H 群 62.8 ± 10.4 kg)、腹囲 (N 群 76.9 ± 9.9 cm、H 群 87.0 ± 7.7 cm)、BMI (N 群 21.5 ± 2.9 kg/m²、H 群 24.6 ± 4.3 kg/m²)、DPB (N 群 68.7 ± 9.8 mmHg、H 群 77.9 ± 10.7 mmHg) が有意に大きかった (表 3)。また、HbA1c と、体重 ($r = 0.431$, $P = 0.020$)、腹囲 ($r = 0.439$, $P = 0.006$)、BMI ($r = 0.299$, $P = 0.032$) との間に正の相関関係 (Spearman) が認められた。

b. 食習慣

BDHQ で測定された 47 の栄養素の摂取量を比較すると、H 群は N 群よりも、レチノール (N 群 307 ± 154 μ g/1000 kcal、H 群 164 ± 62 μ g/1000 kcal、 $P = 0.013$) とレチノール当量 (N 群 480 ± 136 μ gRE/1000 kcal、H 群 350 ± 98 μ gRE/1000 kcal、 $P = 0.013$) の摂取量が有意に小さかった。一方、HbA1c とアルコールの摂取量との間に負の相関が認められた (Pearson's $r = -0.392$, $P = 0.039$)。

また、BDHQ で測定された 70 の食品群の摂取量を比較すると、H 群は N 群よりも、レバーの摂取量が有意に小さかった (N 群 1.21 ± 1.12 g/1000 kcal、H 群 0.15 ± 0.46 g/1000 kcal、 $P = 0.039$)。一方、HbA1c と漬物 (緑葉野菜) に正 (Pearson's $r = 0.431$, $P = 0.022$)、ワインに負 (Pearson's $r = -0.414$, $P = 0.029$) の相関関係が認められた。

c. 腸内細菌叢

収集した糞便検体について腸内細菌叢の分析を行った。このとき、HbA1c 正常群の 1 名の検体からは正常に DNA を抽出できなかつた。したがって、正常群 19 名、高値群 9 名の検体を分析した。各検体から 10,000 read の 16S rRNA のアンプリコンをアノテーションし全体で 13 門、188 属、334 種の細菌を同定し構成比を得た。

検体内の菌の多様性を示す -多様性は、Genus と Species の両レベルで Observed, Chao1, ACE, Shannon, Simpson, Fisher を比較した。その結果、Genus レベルの、Simpson のみ HbA1c 高値群 (5.6%以上; H 群) の方が正常群 (5.5%以下; N 群) より有意に小さかつたが、他では有意な違いは見られなかつた。

また、検体間の菌叢距離を示す -多様性は、Genus と Species の両レベルで Bray-Cutis, Jensen-Shannon, Jaccard を比較したが、Species レベルの Jaccard のみで H 群と N 群の間に有意な違いを観察した。

Genus レベルで比較すると、*Faecalimonas* と *Bifidobacterium* は N 群の方が H 群よりも有意に少なく、*Romboutsia* は有意に多かつた。

Species レベルで比較すると、*Faecalimonas umbilicata*, *Clostridium scindens*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Clostridium clostridioforme* は N 群の方が H 群よりも有意に少なく、*Bacteroides plebeius* は有意に多かつた。

(3) 総括

本研究では 2021 年度に千葉県銚子市、2022 年度に三重県で、それぞれ HbA1c 高値群 (20 名) と正常群 (20 名) の研究協力者を確保する予定であつた。2020 年から新型コロナウイルス感染症が日本に上陸し、腸内細菌叢などに及ぼす影響は未知であつたので、「新型コロナウイルスに感染している、あるいは感染経験のある方」を除外基準に加え研究を開始した。

2021 年度は高値群 25 名、正常群 20 名を確保でき順当に始動したが、その後、新型コロナウイルス感染症が急拡大し、不要不急の活動や、県境をまたぐ移動などが大きく制限される状況となつてしまつた。2022 年度から三重県で研究協力者の募集を開始したが、順調に研究協力者を得ることができなかつた。新型コロナウイルス感染症の第 8 波は 2022 年 12 月をピークとして 2023 年 3 月には収束の様子であつたので、2023 年 4 月を超え 2023 年度も募集を継続した。ところが、2023 年 5 月 8 日に新型コロナウイルス感染症の 5 類感染症への移行があり、発熱症状を呈した患者についても新型コロナウイルス感染であるかどうかを確認しない場合が生じることになつてしまつた。一方、厚生労働省の速報値により、2023 年 5 月以降、全国的に (研究対象である三重県においても) 第 9 波が生じていることが報告された。一方、ほとんどの成人がワクチン接種者となり、抗体価によって感染歴を評価することもできなくなつていた。そのため「新型コロナウイルスに感染している、あるいは感染経験のある方」を除外基準としている状態で、さらなる被験者を確保できる可能性が非常に小さくなつてしまつた。そこで、2023 年 6 月で募集を打ち切つた。最終的に獲得した研究協力者は 29 名であり、全研究協力者から検体、メタ情報の収集を終えたのが 2023 年 10 月となつた。2023 年中には検体の分析までは終了したが、千葉県銚子市と三重県のデータを統合して解析するまでには至らなかつた。

三重県では、高値群が 9 名しか得られなかつたため、腸内細菌叢の N 群と H 群との比較で有意な違いを観察できたものは千葉県銚子市に比べて少なかつた。しかし、多様性は H 群の方が小さいことと、多様性では H 群と N 群に違いがあることを共通して確認することができた。一方、H 群と N 群とで構成比に有意な違いが観察された菌は、Genus レベルでも Species レベルでも共通したものはなかつた。

これまで耐糖能 (糖尿病) と腸内細菌叢との関連を調べた研究では、HbA1c の「高値者 vs 正常者」や「糖尿病患者 vs 健常者」のように耐糖能 (病状) により対象者を分類・比較し両者間に有意な違いが報告されているが、違いを示す菌自体は研究間では一致していない。本研究では同一手法で HbA1c 高値者の多い千葉県銚子市と三重県の参加者の腸内細菌叢を比較することで、両地域に共通して HbA1c と関連する菌を特定することを期待したが、現状ではその期待は達成できていない。しかし、HbA1c と関連する菌を特定することができれば、腸内細菌叢を介した耐糖能を維持・改善の手法を開発できると期待される。今後、更に、両地域の共通点、相違点などを解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋玲子、鈴木良雄、櫻井しのぶ、中西唯公
2. 発表標題 ヘモグロビンA1cと腸内細菌叢との関係
3. 学会等名 第81回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

腸内細菌叢と耐糖能との関係に関する研究 http://sakura.wv2.ne.jp/CM-test/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	南 唯公 (中西唯公) (Minami Yuko) (50582110)	順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授 (32620)	
研究分担者	櫻井 しのぶ (Sakurai Shinobu) (60225844)	順天堂大学・医療看護学部・教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------