

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249019

研究課題名(和文)腸内細菌叢と全般的健康度の関連性の研究

研究課題名(英文) Investigation between intestinal flora and general health status

研究代表者

中路 重之(Nakaji, Shigeyuki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10192220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 23,900,000円、(間接経費) 7,170,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢と健康度の関連を検討した。腸内細菌叢はT-RFLP法で測定した。以下の結果が得られた。1. 加齢で増加：OTU657・990。2. 加齢で減少：OTU940。3. 血清アルブミン高値で減少：OUT338。4. 米類摂取多い群で増加：OTU124(米類分解に關与)。5. ミルク摂取多い群で増加：OTU919・124(糖分解に關与)。6. 生野菜摂取多い群で減少：OTU124(意義不明)。7. 睡眠障害ある群で増加：OTU124。8. 65歳以上の女性の体脂肪率25%未満群でOTU332割合が有意に高い。OTU332(乳酸菌)の肥満予防効果が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The association between intestinal flora and general health status were investigated among general populations. Following results were obtained; 1. Proportion of OTU657 and 990 increased with age, 2. Proportion of OTU940 decreased with age, 3. Proportion of OTU338 decreased in the subject group with high serum albumin level, 4. Proportion of OTU124 increased in the subject group with high rice intake, 5. Proportion of OTU919 and 124 increased in the subject group with high milk intake, 6. Proportion of OTU124 decreased in the subject group with high raw vegetable intake, 7. Proportion of OTU124 increased in the subject group with sleep disorder, 8. The relationship between proportion of OTU332 (lactobacillus) and body fat percentage - in 65+ -year-old females, significantly high percentage of OTU332 was observed in those with body fat percentage of less than 25% compared to those with greater than 25%. Thus, lactobacillus was suggested to have a preventive effect against obesity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：腸内細菌 全般的健康度 T-REL P 法 OUT 肥満 加齢 食事 一般住民

1. 研究開始当初の背景

近年腸内細菌叢と健康度、各種疾患(病態)との関係が注目を浴びている。しかしその詳細については不明な部分が多くブラックボックスと称される所以である。このようなブラックボックスの原因はひとえに腸内細菌叢の状況把握の困難さにあった。腸内細菌の数は 10^{14} と多く、500種類以上が存在し、その60%から80%は培養できない不明な菌であることが明らかとなってきた。つまり、我々は腸内細菌のわずか30%の菌を培養することで全体を云々していたのである。そこで理化学研究所の辨野は分子生物学的手法(T-RFLP法、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)を用いて糞便中の細菌のDNAを検出することでトータルの細菌叢の実態を把握する方法を開発した。

一方、近年、日本を含めた先進国では肥満者が増加し、肥満を起因とした糖尿病、高血圧症、脂質代謝異常症などの健康障害の増加が社会問題となっている。したがって、健康の全般度を議論するためには肥満を中心にする必要がある。

一方、肥満を増悪させる要因には、生活習慣、遺伝、内分泌などが挙げられるが、近年腸内細菌もまたこれに関与する可能性が指摘されている。すなわち、一卵性双生児であっても肥満型とやせ型を比較すると、腸内細菌叢が違ふことが報告されている。また、Peter J.らは、肥満者が減量すると、その腸内細菌叢が非肥満者の腸内細菌叢に似てくることを報告している。さらに、肥ったマウスの腸内細菌を投与したマウスは、やせたマウスの腸内細菌を投与したマウスと比べて体脂肪量が多くなることが報告されている。したがって、肥満は腸内細菌叢と関連し、肥る細菌叢と肥らない細菌叢があると考えられる。しかし、腸内細菌叢における菌種量と肥満の関係について調査した研究はあるが、菌種のバランスと肥満の関係について調査した研究はみられない。

腸内細菌叢には多種多様な菌種が存在するが、その中で乳酸菌はその摂取により肥満及び肥満関連疾患に対して予防・改善効果がある可能性が指摘されてい

る。すなわち、乳酸菌にはプロバイオティクス効果として血圧低下作用、脂質代謝改善作用、糖代謝改善作用などあることが報告されている。山本らは乳酸菌入りのミルク摂取により、高血圧ラットの血圧が下がったことを報告している。また、乳酸菌を含む発酵乳の摂取により総コレステロール値が低下することが報告されている。Leeらは乳酸菌を食餌誘導性肥満マウスに投与し、体重、脂肪量、及び血糖値が低下することを報告している。

しかし、腸内の乳酸菌量と肥満の関係に関する研究は少なく、結果は一致していない。すなわち、Santacruzらは、運動と食事管理による減量が腸内の乳酸菌量を増加させることを報告し、乳酸菌に肥満改善効果がある可能性を指摘している。反対に、ArmourgonらやM.millionらは、肥満者の腸内細菌叢に乳酸菌が多いことを報告している。Karlssonらは未就学児童について肥満群と正常群を比較しているが乳酸菌量に有意な差は出していない。このように、結果が一致しない理由として、対象数が少ないことと、T-RFLP法のように腸内細菌を包括的に評価する方法が存在しなかったことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、青森県の弘前市岩木地区住民を対象に腸内細菌叢の全体像と健康度の全体像を調査し、両者の関連をみることで、腸内細菌叢と全体的健康度との関連を検討する。また、健康度の中でもその中心にある肥満度と腸内細菌叢との関係を明らかにする。具体的には、青森県岩木地区の20歳以上の全住民を対象として、健康度全般に関する調査と腸内細菌叢(T-RFLP法によるプロファイリング)の測定を行い、両者の関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) 対象

対象は2010年度岩木健康増進プロジェクト、プロジェクト健診参加者814名である。このプロジェクトは青森県弘前市郊外にある岩木地区の住人のうちの希

望者を対象とし生活習慣病予防と健康の維持・増進、寿命の延長を目指して企画されたものである。

調査項目に欠損項目があるもの及び抗菌剤・抗高脂血症薬・下剤の使用、既往歴に消化器悪性疾患のあるものを除いた613名(男性249名、女性364名)を解析対象とした。

被験者には検査の目的と方法を説明し、あらかじめ文書で同意を得た。本調査は弘前大学医学部倫理委員会の承認を得た。

(2) 生活習慣と身体計測

対象者には事前に自己記入式の質問用紙を配布し、プロジェクト健診当日に個人面接を行い回答の確認後に回収した。調査項目は、性別、年齢、現病歴と既往歴、薬剤服用の有無であった。生活習慣は、喫煙と飲酒について、それぞれ量と頻度を調査した。喫煙量は、喫煙開始年齢から現在もしくは禁煙年齢までの喫煙年数に1日の喫煙本数を掛けプリンクマン指数を算出した。飲酒量は、現在の飲酒状況から1日当たりの純アルコール量を算出した。体脂肪率は体組成計(TANITA MC-190)を使用し、インピーダンス法により測定した。

(3) 血液検査

採血は早朝空腹時に座位にて上肢の皮静脈より採取された。血中総コレステロール、HDLコレステロール及びLDLコレステロールの測定は採取された全血を速やかに遠心し血清分離を行った後、三菱化学メディエンスへ外部委託し、酵素法によって測定した。

(4) 腸内細菌解析

自己式アンケートの配布に併せて、便検体の回収容器として採便キットを配布し、プロジェクト健診当日にキットを回収し、冷凍保存した。健診終了後に静岡県静岡市のテクノスルガ(株)に凍結移送し、T-RFLP解析(Nagashima法)にて分析した。

(5) 統計解析

解析は、対象を男女別かつ65歳以上と65歳未満の4群に分けて各々おこなった。

男性においては体脂肪率で15%未満群、15-20%群、20-25%群、25%以上群に分けて、それぞれのOTU332割合を共分散分析法により比較検討した。女性においては体脂肪率で25%未満群、25-30%群、30-35%群、35%以上群に分けて、男性同様にOTU332割合を共分散分析法により比較検討した。なお、この際には交絡因子である年齢、喫煙習慣、飲酒習慣で調整して検討した。多重比較にはbonferroni法を用いた。

さらに、65歳以上の女性では血中総コレステロールを180mg/dl未満群、180-200mg/dl群、200-220mg/dl群、220mg/dl以上群に分けて、HDLコレステロールを50mg/dl未満群、50-60mg/dl群、60-70mg/dl群、70mg/dl以上群に分けて、LDLコレステロールを100mg/dl未満群、100-120mg/dl群、120-140mg/dl群、140mg/dl以上群に分けて、それぞれのOTU332割合を年齢、喫煙習慣、飲酒習慣で調整して共分散分析法により比較検討した。多重比較にはbonferroni法を用いた。

以上のデータの入力と解析にはSPSS 17.0J for windowsを用い、有意水準を0.05未満と判断した。

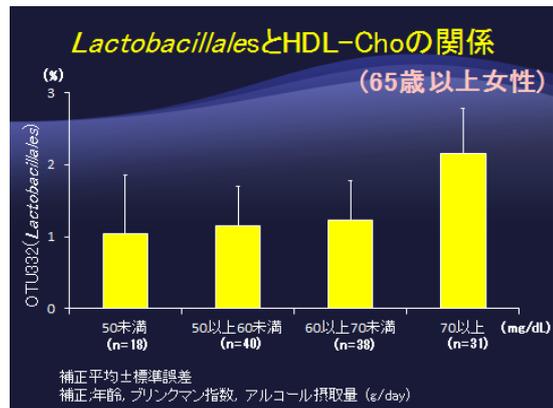
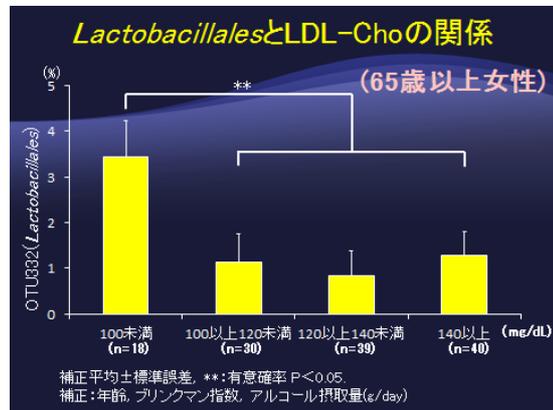
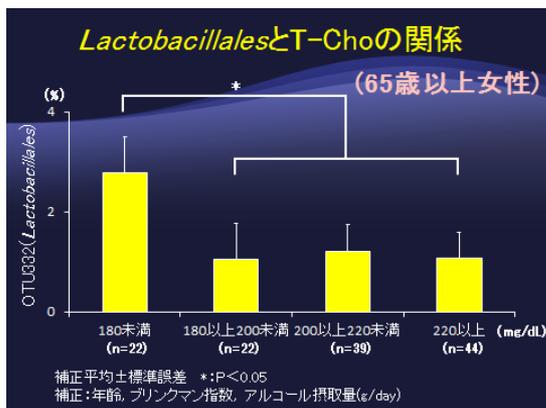
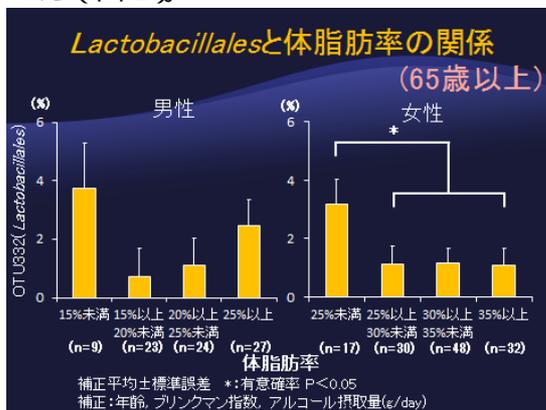
4. 研究成果

その結果、加齢や生活習慣・健康指標と各OTUとの間に以下のような一定の関連が示唆された。

- (1) 加齢とともに増加：OTU657,990→腸年齢の推定に役立つ
- (2) 加齢とともに減少：OTU940→腸年齢の推定に役立つ
- (3) 血清アルブミン高値の群で減少：OUT338
- (4) 呼気水素高値の群で増加し、呼気メタン高値の群で減少：OTU940→大腸における炭水物の分解に関与し、かつ古細菌と拮抗する立場の菌か
- (5) 呼気アセトン高値の群で増加：OTU338
- (6) 呼気イソブレン高値の群で増加：OTU955
- (7) 一秒率高値の群で増加：OTU110
- (8) 米類摂取が多い群で増加：OTU124→米類分解に関与する菌か

- (9) ミルク摂取が多い群で増加 : OTU919、124→乳糖分解に關与する菌か
- (10) 生野菜摂取が多い群で減少 : OTU124
- (11) 睡眠障害がある群で増加 : OTU124→睡眠障害に何らかの關連ありか
- (12) 男女で反対の關連が示されたもの : 白血球数 OTU106、一秒率 OTU369、呼気水素 OTU770、睡眠障害 OTU968
- (13) 糖尿病、喫煙、飲酒、運動、MANO 指数 (全体的健康度) とは強い關連は見られなかった。

(14) OTU332 割合と体脂肪率の關係
 65 歳以上の女性において体脂肪率 25% 未滿群は体脂肪率 25% 以上の群より有意に OTU332 割合が高かった。しかし、65 歳未滿の女性及び男性では体脂肪率と OTU332 割合に有意な關係はみられなかった (図 1)



一方、65 歳以上の女性においては、総コレステロールにおいて、180mg/dL 未滿の群はそれ以上の群に比べて OTU332 割合が高かった (図 2)

LDL コレステロールにおいても 100mg/dL 未滿の群はそれ以上の群に比べて OTU332 割合が高かった (表 3)

しかし、HDL コレステロールにおいて有意な關係はみられなかった (表 4)

【考察】

今回の結果で、腸内細菌と種々の因子との關連性が示唆された。具体的には、加齡、血清アルブミン、呼気水素・メタン・アセトン・イソプレン、呼気一秒率、米類摂取、ミルク摂取、生野菜摂取、睡眠、肥滿などである。今後、異なる対象者において詳細な検討を行う必要がある。

以下に、健康度の中心的キーワードである肥滿と腸内細菌の關係につきとくに考察を行う。

これまでの腸内の乳酸菌と肥滿の關係に關する調査では、減量により糞便中の乳酸菌量が増えたことから、腸内の乳酸菌量の増加は肥滿改善に有効である可能性が指摘されてきた。しかし、關連を認めない報告や反対の關係を示す報告もあった。本調査より、65 歳以上の女性にお

いて、体脂肪率が25%未満の者はそれ以上の者に比べて腸内細菌叢における乳酸菌の占める割合が大きい可能性が示唆された。ACSMの基準においても日本肥満学会においても60歳以上の女性において体脂肪率25%未満は「標準もしくは標準以下」に入る。したがって、65歳以上の女性では、肥満者に比べて非肥満者の方が腸内細菌叢における乳酸菌割合が高いと考えられた。

現在、乳酸菌が肥満の予防・改善効果を持つ理由として、脂質代謝への関与が指摘されている。すなわち、乳酸菌の摂取により総コレステロール値は低下し、そのメカニズムとして消化吸収への関与が考えられている。つまり、乳酸菌がコレステロールと結合することや、その胆汁酸脱抱合作用によって、コレステロールの再吸収阻害・排泄促進作用が報告されている。したがって、腸内の乳酸菌の増減もまたコレステロール代謝に影響を与えることで、肥満を改善する可能性が示唆される。本調査においても、65歳以上の女性において総コレステロール180mg/dL未満の群はそれ以上の群に比べて乳酸菌割合が高かった。また、LDLコレステロールにおいても100mg/dL未満の群はそれ以上の群に比べて乳酸菌割合が高かった。したがって、腸内細菌叢における乳酸菌割合の低下は脂質代謝において高LDL血症を起こし、肥満のリスクを高める可能性が推測された。

一方、本結果より男性や65歳未満の女性では腸内の乳酸菌割合と肥満に関連はみられなかった。すなわち、65歳以上の女性でのみ関連がみられた要因として、女性ホルモンの関与が推測された。閉経後の女性の女性ホルモン濃度は、閉経前の女性よりも、男性よりも低値であることが知られている。一方、女性ホルモンはコレステロールの代謝排泄促進作用を有する。また女性ホルモンが低い閉経後の女性は、高コレステロールおよび高血糖となり、さらに肥満になりやすいことが報告されている。したがって、65歳以上の女性では、女性ホルモン濃度が低いために脂質代謝に対する腸内細菌叢の影響が相対的に大きくなり、有意な関連が表出したと推測された。

女性は、高齢化により脂質代謝や糖質代謝の悪化が引き起こされ、肥満しやすい

いことが知られている。本調査より、65歳以上の女性で、腸内細菌叢の乳酸菌バランスと脂質代謝および肥満が関連する可能性がみられた。高齢女性の肥満および肥満関連疾患の予防のために腸内の乳酸菌バランスを高めるような生活習慣が重要であるかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

甲斐知彦, 高橋一平, 沢田かほり, 大久保礼由, 久田貴義, 辨野義己, 中路重之. 弘前市の一般住民における加齢が腸内常在菌に及ぼす影響. アンチ・エイジング医学 2014;

10(1):95-103.査読有

Watanabe K, Takahashi I, Sawada, K, Okubo N, Matsuzaka M, Akimoto N, Umeda T, Nakaji S, Hisada Y, Benno Y. Possible relationship between percentage of body fat and *lactobacillales* in gut microbiota: results from a community-based study. *Hirosaki Med J*

2014;65:12-20.査読有

Shimoyama T, Higuchi H, Matsuzaka M, Chinda D, Nakaji S, Fukuda S. *Helicobacter pylori* infection is associated with a decreased risk of tooth loss in healthy Japanese men. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(6):489-92.査読有
<http://dx.doi.org/10.7883/yoken.66.489>

Shimoyama T, Aoki M, Sasaki Y, Matsuzaka M, Nakaji S, Fukuda S. ABC screening for gastric cancer is not applicable in a Japanese population with high prevalence of atrophic gastritis. *Gastric Cancer.* 2012;15(3):331-4.査読有 doi:

10.1007/s10120-012-0141-x

中路重之, 岩根かほり, 辨野義己. 腸内細菌とがん. 腫瘍プラクティス 2012; 8(2): 170-3.査読有

Hasebe T, Umeda T, Danjo K, Takahashi I, Matsuzaka M, Kudo J, Semato M, Saito Y, Hisada T, Benno Y, Nakaji S, Hakamada K. Effect of Human Gut Microbiota on

the Methane Production. Hirosaki Med J 2011;62(1):7-17.査読有
Kumeda K, Danjo K, Matsuzaka M, Takahashi I, Watanabe K, Iwane K, Tsuya R, Umeda T, Sato K, Fukuda S, Nakaji S. Prevelence of irritable bowel syndrome and its relation to lifestyle and depression quotient in a Japanese general population. Hirosaki Med J

2011;62(2-4):144-165.査読有

中路重之, 長谷部達也, 津谷亮佑, 高橋一平, 檀上和真, 松坂方士, 梅田孝, 辨野義己. 腸内細菌とライフスタイル・健康指標との関係 岩木健康増進プロジェクトでの検討. 日本臨床腸内微生物学会誌 2011;13(1):4-7.査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

渡邊清誉, 高橋一平, 本田勝義, 米田勝朗, 三輪孝士, 和田尚子, 伊東良, 上谷英史, 梅田孝, 中路重之. 腸内の乳酸菌と肥満の関連について. (第 82 回日本衛生学会、京都 2012.03.23-26)

渡邊清誉, 本田勝義, 矢野智彦, 米田勝朗, 三輪孝士, 和田尚子, 伊東良, 小川武志, 梅田孝, 中路重之. 腸内細菌と体脂肪の関連について. (第 21 回体力・栄養・免疫学、東京 2011.08.27-28)

渡邊清誉, 梅田孝, 黒岩純, 竹石洋介, 田中充洋, 松田基子, 中路重之. 腸内細菌叢と肥満との関係. (第 81 回日本衛生学会、Web 開催 2011.03.23-10.03)

〔図書〕(計 1 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://social.med.hirosaki-u.ac.jp/greeting.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中路 重之 (NAKAJI, Shigeyuki)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10192220

(2)研究分担者

高橋 一平 (TAKAHASHI, Ippei)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70400132

松坂 方士 (MATSUZAKA, Masashi)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70431434

梅田 孝 (UMEDA, Takashi)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50311535

檀上 和真 (DANJO, Kazuma)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90463760

(3)連携研究者

辨野義己 (BENNO, Yoshimi)

独立行政法人理化学研究所 知的財産戦略センター・特別招聘研究員

研究者番号：40087599