

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04773

研究課題名(和文) 一般住民において腸内細菌叢が潜在性動脈硬化の進展におよぼす影響

研究課題名(英文) Gut microbiota and subclinical atherosclerosis in general population

研究代表者

有馬 久富 (Arima, Hisatomi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：20437784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、滋賀県草津市の一般住民男性を対象とした前向きコホート研究において、669名の対象者の便検体から腸内細菌を同定した。胸部CT画像をもちいて標準的な方法でAgaston Scoreを算出し、10点以上を冠動脈石灰化と定義した。腸内細菌と冠動脈石灰化との関連を検討したところ、Lactobacillusは、冠動脈石灰化の有病リスク低下と関連していた(腸内細菌割合1標準偏差(9%)上昇あたりの多変量調整オッズ比0.84、95%信頼区間0.70-1.00)。Lactobacillusは、動脈硬化に予防的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present analysis is to investigate the association between gut microbiota and coronary artery calcification (CAC) in general Japanese men. Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis (SESSA) is a prospective cohort study of randomly selected men from a general Japanese population. This analysis included 669 participants who completed a follow-up examination including analysis of gut microbiota. After adjustment for age, BMI, total cholesterol, HDL cholesterol, HbA1c, smoking, alcohol intake, regular exercise, and use of medication to treat hypertension, dyslipidemia or diabetes, frequency of Lactobacillus was associated with lower risks of coronary artery calcification (odd ratio 0.84 per 1SD [9%] increase, 95%CI 0.70-1.00) while there were no clear relationships for Bifidobacterium, Bacteroides, Prevotella or Clostridium. Lactobacillus appears to be associated with lower prevalence of CAC in a general population of Japanese men.

研究分野：予防医学

キーワード：腸内細菌 潜在性動脈硬化 コホート研究

## 1. 研究開始当初の背景

Global Burden of Disease Study 2010 によると、世界で年間約 5300 万人が死亡しており、その約 30% が冠動脈疾患・脳卒中などの動脈硬化性疾患によるものである [1]。わが国においても動脈硬化性疾患は主な死因の一つであり、その頻度は約 25% である。わが国の動脈硬化性疾患の年齢調整死亡率は、戦後大幅に減少したが、人口の高齢化とともにその絶対数は今後増加していくものと推測される。さらなる動脈硬化性疾患の予防戦略を構築していくために、血圧・糖尿病などの古典的危険因子の管理を徹底していくのみならず、予防に結びつけることのできる新たな危険因子の探索も必要である。

われわれヒトの腸内には、500 種類以上、総数 100 兆個以上にもおよぶ共生細菌群が常在している。この腸内細菌叢は、細菌同士の相互作用により独自の代謝系を構築し、さらに宿主との相互作用により宿主の生理的状态に影響を及ぼしていると考えられてきた。この腸内常在菌が肥満 [2] などの代謝性疾患や動脈硬化性疾患 [3] にも関与している可能性が指摘されたことは、これらの疾患を感染症の観点からもとらえなくてはならないという点において大変ショッキングであり、腸内細菌への注目度を一気に高めることとなった。

最近、食物に含まれるホスファチジルコリンが腸内細菌により分解されたコリン代謝産物が、動脈硬化性疾患のリスクを増大させると報告された [3]。また、腸内細菌が、腸管の免疫修飾作用を介して全身の免疫機能に影響を与えることにより動脈硬化を促進する可能性も示唆されている [4]。前述のように、腸内細菌組成の偏倚は、肥満およびそれに伴う代謝性疾患をきたすことにより、動脈硬化を促進する可能性がある。このように、腸内細菌はさまざまな機序を介して動脈硬化と関連している可能性があるが、画像検査により正確に評価した潜在性動脈硬化との関連を検討した報告はほとんどない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、滋賀県草津市の一般住民男性を対象とした既存のコホート研究調査に腸内細菌検査を加えることにより、腸内細菌叢組成と胸部 CT で評価した冠動脈石灰化およびその危険因子との関連を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis (SESSA) は、滋賀県草津市の一般住民男性を対象とした前向きコホート研究である。滋賀県草津市在住の一般住民から無作為に抽出された男

女約 1200 人 (40 歳から 79 歳) を対象として、2006 年から 2008 年の間にベースライン調査を実施した。ベースライン調査では、生活習慣に関する詳細な問診、身体測定、インピーダンス法による体脂肪率測定、診察室・家庭血圧測定、血液・尿検査、12 誘導心電図、抑うつ度検査などに加えて、脈波伝播速度 (pulse wave velocity) 検査、超音波検査による頸動脈内中膜肥厚およびプラーク、CT 検査による冠動脈および大動脈石灰化など潜在性動脈硬化の検査が行われた。

2010 年から 2014 年の間に、男性の対象者 853 名に対して同一のプロトコルを用いた追跡調査が行われた。追跡調査では、頭部 MRI が新たに導入され、ラクナ梗塞、微小出血、白質病変などの無症候性脳血管障害や脳萎縮について詳細に調査された。この繰り返し調査の対象者に、追加検査として 2015 年から 2017 年の間に腸内細菌検査を実施した男性 669 名を本研究の対象とした。

### (2) 腸内細菌検査

まず、対象者から便検体を収集し、DNA を抽出した。次に、細胞の 16S リボゾーム (r)DNA を特異的なプライマーを用いて増幅し、さらに特定の制限酵素で処理してできた DNA 断片の大きさと量の情報を分析する Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法を用いて、存在する腸内細菌の種類とその頻度を判定した。残存した DNA 検体は、滋賀医科大学アジア疫学研究センター内の超低温フリーザーで将来の次世代シーケンサー等を用いた詳細な解析のために長期保存している。

### (3) 冠動脈石灰化

冠動脈石灰化は、追跡調査時の胸部 CT 画像をもちいて評価した。CT 値 130 以上、面積 1 平方ミリメートル以上を石灰化病変と定義し、各石灰化病変について CT 値及び面積で重みづけをして合計し、Agaston Score を算出した [5]。画像解析は、トレーニングされた研究者が標準化された方法で行った。本研究では、Agaston Score 10 以上を冠動脈石灰化と定義した。

### (4) 動脈硬化危険因子

空腹時に採血を行い、血液検査を実施した。糖尿病は、空腹時血糖値  $\geq 126$  mg/dL、HbA1c  $\geq 6.5\%$  または治療中と定義した。LDL コレステロールは、Friedwald 式を用いて算出した。

### (5) 統計解析

年齢別に腸内細菌割合を算出した。腸内細菌と冠動脈石灰化あるいは糖尿病との関連は、ロジスティック回帰モデルをもちいて検討した。腸内細菌と LDL コレステロールとの関連は、重回帰モデルをもちいて検討した。

統計ソフトには、SAS Version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)をもちいた。

#### 4. 研究成果

##### (1)対象者背景

対象者の平均年齢は69歳であった。BMIの平均値は23.4kg/m<sup>2</sup>、平均血圧は132/77mmHgであった。腸内細菌割合の平均値は、Bifidobacterium 7%、Lactobacillales 7%、Bacteroides 43%、Prevotella 7%、Clostridium 26%であった。年齢と腸内細菌の関連を検討したところ、加齢とともにBifidobacteriumが減少し、Lactobacillusが増加する傾向にあった(表1)。

表1. 年齢別にみた腸内細菌割合

腸内細菌	-54歳	55-64歳	65-74歳	75-84歳	85歳
Bifidobacterium	7.8%	8.8%	7.4%	6.7%	4.7%
Lactobacillus	3.0%	5.4%	5.6%	7.7%	11.1%
Bacteroides	49.8%	43.4%	42.1%	42.8%	46.1%
Prevotella	6.4%	7.9%	7.5%	6.7%	5.1%
Clostridium	26.6%	26.6%	27.5%	25.2%	23.7%
他	6.4%	7.9%	9.8%	11.1%	9.3%

##### (2)腸内細菌と冠動脈石灰化

392名(58.6%)の対象者に冠動脈石灰化を認めた。表2に腸内細菌と冠動脈石灰化との関連を示す。Lactobacillusは、冠動脈石灰化の有病リスク低下と関連していた(腸内細菌割合1標準偏差(SD)上昇あたりの多変量調整オッズ比0.84、95%信頼区間0.70-1.00)。一方、Bifidobacterium、Bacteroides、Prevotella、Clostridiumと冠動脈石灰化との間には明らかな関連を認めなかった。

一般住民男性において、Lactobacillusは、冠動脈石灰化の有病リスク低下と関連する可能性が示唆された。

表2. 腸内細菌と冠動脈石灰化

腸内細菌	多変量調整オッズ比* (95%信頼区間)	P値
Bifidobacterium	1.07 (0.90-1.27)	0.442
Lactobacillus	0.84 (0.70-1.00)	0.047
Bacteroides	1.01 (0.95-1.07)	0.839
Prevotella	0.99 (0.95-1.03)	0.513
Clostridium	1.15 (0.97-1.37)	0.109

\*1 標準偏差 (Bifidobacterium 8.3, Lactobacillales 9.0, Bacteroides 15.8, Prevotella 13.0, Clostridium 8.7) 上昇あたり、調整項目: 年齢、BMI、総コレステロール、HDLコレステロール、HbA1c、喫煙、飲酒、運動、降圧薬、糖尿病治療薬、脂質降下薬

##### (3)腸内細菌と糖尿病

糖尿病有病者は138名(20.6%)、糖尿病治療状況は、経口薬治療80名(50.8%)、インスリン治療14名(10.1%)、薬物治療なし44名(31.9%)であった。表3に腸内細菌と糖尿病との関連を示す。Bifidobacterium、LactobacillusおよびClostridiumの1SD増加あたりの糖尿病有病オッズ比は1.29(95%信頼区間1.08-1.55)、1.39(95%信頼区間1.17-1.66)、0.74(95%信頼区間0.60-0.91)と有意な関連を認めた。糖尿病群における検討では、薬物治療なしおよびインスリン治療者に比べ、経口薬治療者でBifidobacterium(5.9% vs 7.4% vs 10.7%)、Lactobacillales(6.6% vs 5.1% vs 11.4%)が多く、Clostridium(28.2% vs 25.3% vs 22.1%)が少なかった。

一般住民男性において、Bifidobacterium、LactobacillalesおよびClostridiumは糖尿病有病と関連した。この結果は、糖尿病治療、特に経口薬による腸内細菌叢の変化を反映している可能性があると考えられた。

表3. 腸内細菌と糖尿病

腸内細菌	多変量調整オッズ比* (95%信頼区間)
Bifidobacterium	1.29 (1.08-1.55)
Lactobacillus	1.39 (1.17-1.66)
Bacteroides	0.87 (0.72-1.06)
Prevotella	0.89 (0.73-1.10)
Clostridium	0.74 (0.60-0.91)

\*1 標準偏差 (Bifidobacterium 8.3, Lactobacillales 9.0, Bacteroides 15.8, Prevotella 13.0, Clostridium 8.7) 上昇あたり、調整項目: 年齢、BMI、喫煙、飲酒、運動

##### (4)腸内細菌とLDLコレステロール

LDLコレステロールの平均値は118mg/dlであった。重回帰モデルにおいて、LDLコレステロールは、Bifidobacteriumと負の関連(-2.58、95%信頼区間-4.99 to -0.17、P=0.036)、Prevotellaと正の関連を示した(2.64、95%信頼区間0.17 to 5.10、P=0.036)(表4)。層別解析では、LDL-CとBifidobacteriumとの間の負の関連が脂質降下薬非服用者で強かったが(P interaction=0.010)、Prevotellaとの正の関連は服用の有無にかかわらず同程度であった。

一般住民男性において、LDLコレステロールは、Bifidobacteriumと負の関連、Prevotellaと正の関連を示した。

表4. 腸内細菌とLDLコレステロール(mg/dl)

腸内細菌	* (95%信頼区間)	P値
Bifidobacterium	-2.58 (-4.99, -0.17)	0.036
Lactobacillus	1.76 (-0.61, 4.13)	0.145
Bacteroides	-0.75 (-3.14, 1.65)	0.542
Prevotella	2.64 (0.17, 5.10)	0.036
Clostridium	-0.94 (-3.41, 1.54)	0.458

\*1 標準偏差 ( Bifidobacterium 8.3, Lactobacillales 9.0, Bacteroides 15.8, Prevotella 13.0, Clostridium 8.7) 上昇あたり、調整項目: 年齢、BMI、喫煙、飲酒、運動、降圧薬、糖尿病治療薬、脂質降下薬

#### (5)考察

一般住民男性における検討で、腸内細菌の Lactobacillus は、冠動脈石化の有病リスク低下と関連しており、動脈硬化に予防的に働く可能性が示唆された。Lactobacillus は、動脈硬化の主要な危険因子である糖尿病、LDL コレステロールとは関連しておらず、他の危険因子あるいは代謝産物を介して動脈硬化に予防的に働いている可能性がある。Lactobacillus の動脈硬化予防作用については機序を含めて詳細な検討が必要と考えられる。

また、本研究の結果から Lactobacillus を増やすような食生活、微生物(プロバイオティクス) その働きを助ける物質(プレバイオティクス) 抗生物質(アンチバイオティクス) などを用いて腸内環境を整備することにより、動脈硬化性疾患のさらなる予防につながる可能性があると考えられ、この点についてもさらなる検討が必要と考えられる。

#### <引用文献>

1. Lozano R, et al. Lancet 2012;380:2095-128.
2. Turnbaugh PJ, et al. Nature 2006;444:1027-31.
3. Tang WH, et al. New Engl J Med 2013;368:1575-84.
4. Takeda M, et al. Arterioscl Thromb Vasc Biol 2010;30:2495-503.
5. Agatston AS, et al. J Am Coll Cardiol 1990;15:827-32.

#### 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 5 件)

Suzuki S, Arima H, Miyazaki S, Fujiyoshi A, Kadota A, Takashima N, Hisamatsu T, Kadowaki S, Zaid M, Torii S, Horie M, Murata K, Miura K, Ueshima H for the SESSA Research Group.

Self-reported Sleep Duration and Subclinical Atherosclerosis in a General Population of Japanese Men. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2018;25: 186-198

Zaid M, Miura K, Fujiyoshi A, Abbott RD, Hisamatsu T, Kadota A, Arima H, Kadowaki S, Torii S, Miyagawa N, Suzuki S, Takashima N, Ohkubo T, Sekikawa A, Maegawa H, Horie M, Nakamura Y, Okamura T, Ueshima H for the SESSA Research Group. Associations of serum LDL particle concentration with carotid intima-media thickness and coronary artery calcification. J Clin Lipidol. 2016; 10: 1195-1202

Fujiyoshi A, Miura K, Kadowaki S, Azuma K, Tanaka S, Hisamatsu T, Arima H, Kadota A, Miyagawa N, Takashima N, Ohkubo T, Saitoh Y, Torii S, Miyazawa I, Maegawa H, Murata K, Ueshima H for the SESSA Research Group. Lifetime cigarette smoking is associated with abdominal obesity in a community-based sample of Japanese men: The Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis (SESSA). Prev Med Rep. 2016; 4: 225-232

Hisamatsu T, Miura K, Arima H, Kadota A, Kadowaki S, Torii S, Suzuki S, Miyagawa N, Sato A, Yamazoe M, Fujiyoshi A, Ohkubo T, Yamamoto T, Murata K, Abbott RD, Sekikawa A, Horie M, Ueshima H for the Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis (SESSA) Research Group. Smoking, Smoking Cessation, and Measures of Subclinical Atherosclerosis in Multiple Vascular Beds in Japanese Men. J Am Heart Assoc. 2016; 5: e003738

Torii S, Arima H, Ohkubo T, Fujiyoshi A, Kadota A, Takashima N, Kadowaki S, Hisamatsu T, Saito Y, Miyagawa N, Zaid M, Murakami Y, Abbott RD, Horie M, Miura K, Ueshima H for the SESSA Research Group. Association between Pulse Wave Velocity and Coronary Artery Calcification in Japanese men: the Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis (SESSA). J Atheroscler Thromb. 2015;22:1266-1277

#### [学会発表](計 1 件)

有馬久富、近藤慶子、岡見雪子、藤吉朗、

門田文、高嶋直敬、久松隆史、門脇紗也佳、宮澤伊都子、三浦克之、上島弘嗣 for the SESSA Research Group. Gut microbiota and coronary artery calcification in a general population of Japanese men: Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis (SESSA). 第 82 回日本循環器学会学術集会、2018 年 3 月 23-25 日、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
滋賀動脈硬化疫学研究 SESSA セッサ  
<https://hs-web.shiga-med.ac.jp/sessa/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

有馬 久富 (ARIMA, Hisatomi)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号：20437784

### (2)研究分担者

上島 弘嗣 (UESHIMA, Hirotugu)  
滋賀医科大学・アジア疫学研究センター・  
特任教授  
研究者番号：70144483

三浦 克之 (MIURA, Katsuyuki)  
滋賀医科大学・医学部・特任教授  
研究者番号：90257452

安藤 朗 (ANDO, Akira)  
滋賀医科大学・医学部・特任教授  
研究者番号：90252395

ABBOTT ROBERT (ABBOTT, Robert)  
滋賀医科大学・アジア疫学研究センター・  
特任教授  
研究者番号：20722416

藤吉 朗 (FUJIYOSI, Akira)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10567077

門田 文 (KADOTA, Aya)  
滋賀医科大学・アジア疫学研究センター・  
特任准教授  
研究者番号：60546068

高嶋 直敬 (TAKASHIMA, Naoyuki)  
滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：80435883

久松 隆史 (HISAMATSU, Takashi)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号：60710449  
(平成 29 年度より連携研究者)

近藤 慶子 (KONDO, Keiko)  
滋賀医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号：20566567

門脇 紗也佳 (KADOWAKI, Sayaka)  
滋賀医科大学・医学部・客員助教  
研究者番号：60510344

### (3)連携研究者

大野 聖子 (OHNO, Seiko)  
滋賀医科大学・アジア疫学研究センター・  
特任講師  
研究者番号：20610025

宮川 尚子 (MIYAGAWA, Naoko)  
滋賀医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号：20388169

門脇 崇 (KADOWAKI, Takashi)  
滋賀医科大学・医学部・客員助教  
研究者番号：30324578

### (4)研究協力者

岡見 雪子 (OKAMI, Yukiko)