

令和元年6月20日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09088

研究課題名(和文) 一般住民における腸内フローラと動脈硬化性疾患の関連についての疫学的検討

研究課題名(英文) An epidemiological study about a role for the intestinal microbiota in the pathogenesis of atherosclerosis in a population of community-dwelling Japanese.

研究代表者

深水 亜子 (Fukami, Ako)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90449926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、一般住民における腸内フローラと動脈硬化性疾患の関連についての疫学的検討を目的として研究を実施した。腸内のフローラの網羅的な解析は実現に及ばず、腸内細菌代謝産物や腸管内炎症マーカーと動脈硬化関連因子との疫学的研究となった。腸内細菌代謝産物との有意な関連を明らかにすることはできなかったが、メタボリック症候群の構成因子との正の傾向にあることは示された。また、腸内環境に関わる腸管内の炎症性バイオマーカーと尿中微量アルブミンとの関連は、腸管内の炎症と血管内の炎症および血管内皮機能との関連を示唆する結果と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸内細菌代謝産物と血清動脈硬化関連因子との統計学的な有意な関連を明らかにすることはできなかったが、メタボリック症候群の構成因子との正の傾向にあることは示された。また、腸内環境に関わる腸管内の炎症性バイオマーカーと尿中微量アルブミンとの関連は、腸管内の炎症と血管内の炎症および血管内皮機能との関連を示唆する結果と考えられる。動脈硬化性疾患において、腸内細菌により作られた腸内環境が影響する可能性を示唆する結果であると考え、今後の更なる研究に寄与する意義ある結果であったと考える。

研究成果の概要(英文)：This study was demonstrated to investigate a role for the intestinal microbiota in the pathogenesis of atherosclerosis. We couldn't perform comprehensive analysis about

intestines bacterial flora, but we investigated that associations between metabolites of enteric bacteria or inflammatory biomarkers and atherosclerotic parameters in a general population. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide levels, one of intestines bacterial flora, were tendency associated with metabolic factors. Moreover faecal Chitinase 3-like 1 and calprotectin levels, inflammatory biomarkers in the intestine, were significantly associated with urinary albumin-to-creatinine ratio, it suggested that intestinal inflammation may be involved in endothelial dysfunction.

研究分野：疫学 循環器内科

キーワード：住民検診 腸内細菌 動脈硬化 疫学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞など動脈硬化性疾患による死亡は常に日本人の死因の上位を占める。動脈硬化症は、慢性炎症性疾患であるとされているがその発症には脂質代謝異常など多くの要因が関わり、食品に由来する栄養成分も影響することは明らかである。近年、世界的に腸内フローラ（細菌叢）と様々な疾患発症との関連調査が進められているなか、腸内細菌が産生するホスファチジルコリン代謝産物が心血管病を悪化させることが報告された。(Nature, 2011.7:472:57-63)

卵・牛乳・肉類等により供給される食物由来のホスファチジルコリン(PC)は、腸内細菌の作用により分解されてトリメチルアミン(TMA)を生じ、肝臓に取り込まれた後、フラビンモノオキシゲナーゼ(FMO)で酸化されトリメチルアミン N-オキシド(TMAO)となる。このTMAOはマクロファージの泡沫細胞化を促進し動脈硬化を促進的に作用することが明らかとなっている。また、動物実験では、PC含有の多い食物を摂取させたマウスでは、血中TMAOが上昇し、動脈硬化巣が増加したことや、マウスに抗生物質を投与し腸内細菌を減少させるとPCによる血中TMAOの増加が抑制され動脈硬化の増悪も抑制されたとの報告もある。(Nature, 2011.7:472:57-63)さらにヒトにおいても血中TMAO高値群では主要心血管病発症が有意に高いという報告もある。(N.Eng.J Med.2013;368:1575-84)しかし、我が国ではヒトを対象とした研究は未だ報告されていない。

### 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では、地域一般住民を対象として動脈硬化性疾患および動脈硬化の危険因子との関連を有する腸内フローラ（細菌叢）の属種の解明を行うことや腸内フローラを介した代謝産物である血中・尿中TMAOと動脈硬化関連因子との疫学的検討を行うことにより、動脈硬化性疾患の進展予防につながる重要なエビデンスを得る。研究期間内には、以下のことを明らかにする。

- (1) 一般住民を対象とした住民検診により対象者の糞便に含まれる腸内細菌叢の属種を調査し、栄養調査により得られた食物由来の栄養素と腸内細菌叢の属種との関連を検討する。
- (2) 一般住民を対象とした住民検診により対象者の糞便に含まれる腸内細菌叢の属種を調査し、動脈硬化性疾患関連因子と関連する腸内細菌叢の属種の同定を行う。
- (3) 食事由来PCの腸内フローラを介した代謝産物である血中および尿中TMAOを測定し、栄養調査により得られた食事由来の各栄養素との関連を検討する。
- (4) 血中および尿中TMAOと動脈硬化性疾患関連因子との検討および動脈硬化の進展との関連や動脈硬化性疾患発症との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

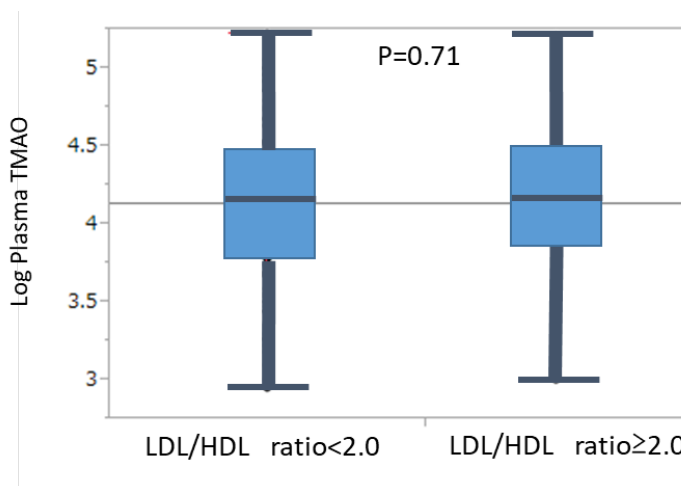
- (1) 住民検診の実施：平成14年より毎年実施している長崎県佐世保市宇久島（漁村地区）での住民検診を平成28年度も実施する。40歳以上の地域住民に対し住民検診であり、対象者は約250名である。主な検診の内容は、問診（既往歴、家族歴、内服歴、飲酒、喫煙、睡眠や生活活動量、栄養調査等の質問表を含む）や、血液検査（血計、一般生化学検査、空腹時血糖値、インスリン値等の糖代謝、脂質代謝の検査項目、高感度CRP、血漿TMAO等）、検尿（尿中TMAO等）、血圧、心電図、頸動脈および心臓超音波検査、内科診察である。平成28年度には、全対象者糞便検査を実施し腸内フローラの解析を実施する予定であったが、全対象者の糞便検体から腸内フローラの網羅的解析を実施するには多額の費用が必要であり、実施困難であったことより、内容を改訂し、腸内環境に関わる便中バイオマーカーの測定（Chitinase 3-like 1, Calprotectin）を実施した。
- (2) 栄養調査の解析、検討：これまでの住民検診において food frequency 法という手法で栄養士の聞き取りによる食事摂取による栄養調査法を実施してきた。平成28年度の宇久島検診においても同様に栄養調査を実施し摂取エネルギーや栄養素など詳細なデータを取得した。
- (3) 検体の測定：平成28年度に実施する住民検診で採取した対象者約250名の血液・尿より、血漿および尿中TMAOの測定を行う。測定にはガスクロマトグラフィーを用いる。また、糞便検査より腸内環境に関わる便中バイオマーカーの測定を実施した。

### 4. 研究成果

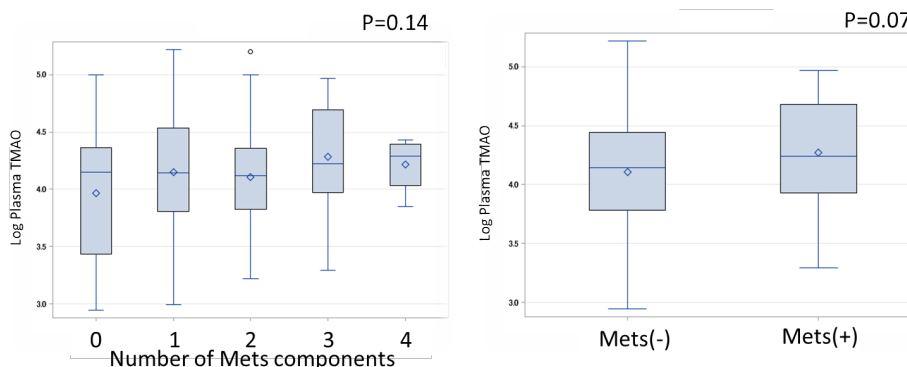
- (1) 住民検診受診者（n=221名、平均年齢66.3歳±9.4歳）から得られた血清および尿

中 TMA/TMAO 値と動脈硬化に関連する各変量との関係についての検討

血漿および尿中 TMA/TMAO 値に性別による有意差は認めなかった。  
 血漿 TMA と血漿 TMAO 及び尿中 TMA と尿中 TMAO、血漿 TMAO と尿中 TMAO(尿中 Cr 換算値)との間には、有意な正の相関関係を認めた。  
 血漿 TMAO は年齢が高いほど高値を示したが、この関係は女性においてのみ認められた。  
 血漿 TMAO を目的変数とした単変量解析では、年齢、収縮期血圧、HbA1C、総コレステロール、LDL コレステロール、non-HDL コレステロール、血漿 TMA、尿中 TMAO(尿中 Cr 換算値)と正の関連を認めた。  
 ステップワイズ法による解析では、尿中 TMAO(尿中 Cr 換算値)、non-HDL コレステロール、血漿 TMA および年齢は、他と独立して血漿 TMAO と有意な関連を認めた。  
 血清 LDL/HDL コレステロール比低値群と高値群において、血漿 TMAO 値に有意な差は認められなかった。



メタボリック症候群構成因子が増加し、メタボリック症候群を有する群において血漿 TMAO 値は高値である傾向が認められた。



以上のことより、腸内細菌の代謝産物である血中および尿中 TMA/TMAO は、血清の動脈硬化関連因子と有意な関連は示されなかったが、メタボリック症候群の構成因子との正の関連がある傾向にあることが明らかになった。

(2) 住民検診から得られた糞便検体 155 検体(男性 80 名、女性 75 名)平均年齢男性 70.2 歳、女性 69.3 歳において、腸内の炎症に関わるバイオマーカーである Chitinase 3-like 1 および Calprotectin 値と各種動脈硬化関連の変量および栄養調査による栄養素との関連についての検討

便中 Chitinase 3-like 1 についての検討

便中 Chitinase 3-like 1 値の平均値は、性別により差があり、男性の値が女性の値に比べて高値を示した。

年齢との関連については、男女ともに関連は認めなかった。

男性における検討では、便中 Chitinase 3-like 1 値は、血清 Na 値、尿中アルブミン値、推定塩分摂取量と正に、身長および認知機能 MMSE 値と負に、統計学的に有意

な関連が認められた。  
女性における検討では、脂質異常症ありと血清中性脂肪値と負の関連が認められた。

#### 便中 Calprotectin 値についての検討

便中 Calprotectin 値の平均値には、性別による違いは認められなかった。  
年齢との関連については、男性では、年齢とともに上昇しが、女では関連は認めなかった。  
男性における検討では、年齢、睡眠時間、尿中アルブミン尿と正の関連を、体重、BMI、ウエスト径、ヒップ径、血清 AST 値と負の関連を認めた。  
女性における検討では、尿中カリウム値と負の関連が認められた。

以上のことより、腸管内の炎症性マーカーである、便中 Chitinase 3-like 1 および便中 Calprotectin は、疫学的に性別による違いが大きいことが明らかとなった。さらに、これらは共に、男性において尿中アルブミン値との強い関連が示された。このことは、腸管内の炎症が血管内皮機能傷害とも関連する可能性を示唆する興味深い結果であった。

本研究において、腸内細菌代謝産物と血清動脈硬化関連因子との統計学的な有意な関連を明らかにすることはできなかったが、腸内環境に関わる腸管内の炎症性バイオマーカーと尿中微量アルブミンとの関連は、腸管内の炎症と血管内の炎症および血管内皮機能との関連を示唆する結果と考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 9 件 )

Nohara-Shitama Y, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Kono S, Morikawa N, Nakao E, Sakaue A, Tsuru T, Fukumoto Y. The 24-hour urinary potassium excretion, but not sodium excretion, is associated with all-cause mortality in a general population. *J Am Heart Assoc.* 2018 (in press). doi: 10.1161/JAHA.117.007369

Sakaue A, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Kono S, Nakao E, Morikawa N, Tsuru T, Hamamura H, Yoshida N, Fukumoto Y. Association between physical activity, occupational sitting time and mortality in a general population: An 18-year prospective survey in Tanushimaru, Japan. *Eur J Prev Med.* 2018 (in press). doi: 10.1177/2047487318810020.

Morikawa N, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Nakao E, Kono S, Tsuru T, Sakaue A, Hamamura H, Fukumoto Y. Thrombospondin-2 as a potential risk factor in a general population. *Int Heart J.* 2018 (in press). doi: 10.1536/ihj.18-246.

Nakao E, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Kono S, Sakaue A, Morikawa N, Tsuru T, Fukumoto Y: Elevated plasma transforming growth factor 1 levels predict the development of hypertension in normotensives: The 14-year follow-up study. *Am J Hypertens.* 2017 Aug 1;30(8):808-814. doi: 10.1093/ajh/hpx053.

Kono S, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Morikawa N, Nakao E, Sakaue A, Tsuru T, Fukumoto Y: Impact of cystatin C and microalbuminuria on cognitive impairment in the population of community-dwelling Japanese. *Atherosclerosis.* 2017 Oct; 265:71-77. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.022.

Enomoto M, Adachi H, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Kono S, Nakao E, Morikawa N, Tsuru T, Sakaue A, Fukumoto Y: A useful tool as a medical checkup in a general population -Bioelectrical impedance analysis. *Front Cardiovasc Med.* 2017 Feb 2;4:3. doi: 10.3389/fcvm.2017.00003. eCollection 2017.

Nakamura S, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nohara Y, Kono S, Nakao E, Sakaue A, Tsuru T, Morikawa N, Fukumoto Y: Trends in coronary risk factors and electrocardiogram findings from 1977 to 2009 with 10-year mortality in Japanese elderly males - The Tanushimaru Study *J Cardiol.* 2017 Oct; 70(4):353-358. doi: 10.1016/j.jjcc.2016.12.0

Umeki Y, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Nakamura S, Nohara Y, Nakao E, Sakaue A, Tsuru T, Morikawa N, Fukumoto Y: Serum albumin and cerebro-cardiovascular mortality during a 15-year study in a community-based cohort in Tanushimaru, a

cohort of the Seven Countries Study. Intern Med 55(20): 2917-2925, 2016.10  
Tsuru T, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Kono S, Nakao E, Sakaue A, Morikawa N, Fukumoto Y: Augmentation index (AI) in a dose-response relationship with smoking habits in males - The Tanushimaru Study - Medicine (Baltimore) 95(51): e5368, 2016.12

[学会発表](計 11 件)

Fukami A, Adachi H, Enomoto M, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Nakao E, Tsuru T, Morikawa N, Yamasaki H, Fukami K, Fukumoto Y: An association between plasma and urinary levels of trimethylamine-N-oxide(TMAO) and metabolic factors in a population of community-dwelling Japanese. 第 80 回日本循環器学会学術集会.2016.

Kono S, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Morikawa N, Nakao E, Sakaue A, Tsuru T, Fukumoto Y: Impact of cystatin C and microalbuminuria on cognitive impairment in the population of community-dwelling Japanese. The American Heart Association, The 89th Scientific Sessions (AHA2016)  
Nohara Y, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Otsuka M, Kumagai E, Nakamura S, Obuchi A, Kono S, Morikawa N, Nakao E, Sakaue A, Tsuru T, Fukumoto Y: Twenty four-hour urinary potassium excretion, but not sodium excretion, was associated with all-cause mortality in a general population - the 27.5-year prospective data from the Tanushimaru Study - The American Heart Association, The 89th Scientific Sessions (AHA2016)

Nakao E, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Obuchi A, Nohara Y, Morikawa N, Kono S, Sakaue A, Tsuru T, Fukumoto Y: Elevated plasma TGF- $\beta$ 1 levels predicted the development of hypertension in normotensives in a general population: The 14-year follow-up study in Uku town The American Heart Association, The 89th Scientific Sessions (AHA2016)

Fukami A, Adachi H, Enomoto M, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Nakao E, Fukumoto Y: Serum zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein levels were associated with carotid intima media thickness in females in a population of community-dwelling Japanese The 85th European Atherosclerosis Society (EAS2017)

Sakaue A, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Otsuka M, Kumagai E, Nohara Y, Kono S, Morikawa N, Nakao E, Tsuru T, Fukumoto Y: Association between physical activity and mortality -The Tanushimaru Study - The 85th European Atherosclerosis Society (EAS2017)

Tsuru T, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Nakao E, Sakaue A, Morikawa N, Fukumoto Y: Augmentation index (AI) and smoking habits from viewpoint of epidemiology -The Tanushimaru study- The 85th European Atherosclerosis Society (EAS2017)

Kono S, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Otsuka M, Kumagai E, Nohara Y, Morikawa N, Nakao E, Sakaue A, Tsuru T, Fukumoto Y: Impact of cystatin C and microalbuminuria on cognitive dysfunction in the population of community-dwelling Japanese. The 21st International Epidemiological Association, World Congress of Epidemiology.2017.

Hamamura H, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Tsuru T, Sakaue A, Kono S, Fukumoto Y. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is independently associated with insulin resistance and triglycerides levels in a general population. 第 82 回日本循環器学会総会学術集会.2018.

Nakamura S, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nohara Y, Tsuru T, Sakaue A, Kono S, Hamamura H, Fukumoto Y. Impact of ejection fraction in echocardiogram on cognitive impairment in the population of community-dwelling Japanese. 第 82 回日本循環器学会総会学術集会.2018.

Enomoto M, Adachi H, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, Nohara Y, Kono S, Sakaue A, Hamamura H, Fukumoto Y. Association of cognitive function with dehydroepiandrosterone sulfate as a longevity marker in a population of community dwelling Japanese; Tanushimaru Study. 第 82 回日本循環器学会総会学術集会.2018.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。