

科学研究費補助事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700686

研究課題名（和文） 腸内細菌叢が動脈硬化に及ぼす影響についての大規模疫学研究

研究課題名（英文） Large-scale epidemiological study of the effects of gut microbiota on atherosclerosis

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：本研究は腸内細菌叢と健康・各種疾病・病態との関係を解明することを目的として、腸内細菌叢、上腕足首脈波伝播速度 (baPWV)、体脂肪率を測定し、解析を行った。対象は青森県弘前市岩木地区に在住する一般住民約 1000 人とした。腸内細菌と baPWV の関係については一定の傾向は認められなかった。腸内細菌と肥満 (BMI、体脂肪率) との関係については 65 歳以上の女性において BMI が 20 未満の群がそれ以外の群に比して OCU332 (Lactobacillales) が有意に高値であった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the relationship among gut microbiota, health conditions and certain diseases. The subjects were about 1000 residents of Iwaki area, Hirosaki city. We determined types of gut microbiota, brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV) and percentage of body fat, and analysed them. The association between gut microbiota and baPWV was not observed. In female subjects over 65 years old, the ratio of OCU 332 (Lactobacillales) in gut microbiota among the group with BMI less than 20.0 was significantly highest compared with other groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生活習慣、地域保健

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病が医学、医療の分野で最大の問題となっている。特に生活習慣の結果・原因とも考えられる肥満が注目されている。肥満は個体のエネルギー収支の不均衡によって体脂肪が過剰に蓄積した状態であり、生活習慣の結果と考えられる。さらに、肥満は高血圧症、脂質代謝異常症、糖尿病などの生活習慣病の原因となる病態とも考えられる。それらはどれも動脈硬化の危険因子となっており、動脈硬化と肥満は密接に関連していることが考えられる。

最近になり、動脈硬化を簡便にかつ客観的に評価する方法として、baPWV (brachial-ankle Pulse Wave Velocity) が報告されてきている。baPWV は動脈硬化の優れた指標の一つで、近年、簡易な血圧脈波装置が開発され、それから算出される baPWV が、種々の疫学調査で利用され始めている。

また、最近、腸内細菌叢と健康・各種疾病・病態との関係が注目されている。

しかしながら、腸内細菌叢の詳細については不明な部分が多い。このような状況の原因はひとえに腸内細菌叢の状況把握の困難さにある。従来、腸内細菌叢を評価するには培養法を用いていた。しかし、腸内細菌の数は 10^{14} と多く、少なくとも 500 種類以上が存在することが知られており、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。最近になり、分子生物学的手法 (T-RFLP 法) 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が開発された。本研究は、この分子生物学的手法を用いた簡便な測定方法を用いて、地域住民の腸内細菌叢を評価する。

2. 研究の目的

本研究では動脈硬化の危険因子として考えられている肥満を BMI と体脂肪率を用いて評価した。動脈硬化の指標として baPWV を用いた。

現段階において我が国では腸内細菌と動脈硬化、肥満の関係を検討したものは少なく、大規模で包括的なデータは存在しない。

そこで、本研究では一般住民を対象に腸内細菌と動脈硬化、肥満との関連について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 研究対象と調査項目

本研究では青森県弘前市岩木地区に在住する一般住民で岩木健康増進プロジェクト、プロジェクト健診に参加した約 1000 人を対象とした。調査項目に欠落項目があるもの、抗菌剤、下剤使用者、既往歴に消化器悪性疾患のあるものを除いたため、最終対象者は 694 名となった。

本研究ではアンケートで性別、年齢、生活習慣(飲酒習慣、喫煙習慣)を聞き取った。また身長、体重を測定し BMI を算出した。体組成計 (TANITA MC-190) にて体脂肪率を測定した。あらかじめ配布していた容器にて便をサンプルとして採取回収し、T-RFLP 法にて分析した。

(2) 測定方法

① 体脂肪率

体脂肪率の測定は、マルチ周波数によるインピーダンス測定方法にて測定する体組成計 (マルチ周波数体組成計 MC-190) (タニタ、東京) を使用した。

② 上腕足首脈波伝播速度 (baPWV)

baPWV の測定は、form PWV/ABI (オムロン

コーリン、東京) を使用した。baPWV は、血圧測定カフを両側の上腕と足首に巻いて加圧し、容積脈波波形を記録したのから上腕と足首の脈波の立ち上がりの時間差を求め、心臓から測定部位までの距離差で除して算出される。本研究では、左右の baPWV の平均値を測定値とした。

③腸内細菌 (T-RFLP 法)

T-RFLP 法とは細菌の集団構成パターンの比較や変化の追跡を簡易的に調べる手法である。1 種の微生物が 1 つのピークとして検出されるため、ピークの数、試料中に存在する優占微生物の多様性を示す指標となる。

また、ピーク高の比から、そのピークに相当する微生物のおよその構成比を推定することもできる。

T-RFLP 解析のみでは、個々にピークに相当する細菌の種類を特定する事はできないが、クローン解析結果と比較することにより、どのピークがどの微生物種に相当するかを推定することは可能となる。

- 1) 腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子を、蛍光標識プライマーを用いて PCR 増幅
→ PCR 産物の末端が蛍光標識される
- 2) PCR 増幅産物を制限酵素処理
→ DNA 塩基配列の違いにより、異なる部位で切断される
- 3) DNA シーケンサーを用いて電気泳動
→ 蛍光標識された DNA 断片がピークとして検出される
→ 微生物種の違い (DNA 配列の違い) によって、ピークの出現位置が異なる
- 4) OUT (Operational taxonomic units) 塩基長の近いフラグメント同士をグループ化した。
→ OTU 毎に蛍光強度がピークとして観察さ

れるので、総ピークの面積における各ピークの面積から相対的な細菌量を測定した。

(3) 解析方法

性別、年齢 (65 歳以上、65 歳未満) にて 4 群に分類した。各群の OTU の比率を共分散分析法により、年齢・喫煙歴・飲酒歴により補正し、bonferroni 法により多重比較を行った。統計学的に $p < 0.05$ をもって有意差ありと判断した。

4. 研究成果

表 1 に対象者の特徴を示した。男性 266 名、女性 428 名と女性が多かった。対象者の平均年齢は男性、女性ともに 50 代後半であった。平均 BMI については男性 23.9、女性は 23.1 と男性が有意に高かった。平均体脂肪率については男性が 20.1 %、女性は 30.7 % であり、女性が有意に高値であった。アルコール摂取量では男性は 46.6 g/日、女性では 5.0 g/日であり、男性が有意に高値であった。喫煙習慣 (Brinkman index) については男性が 321.0、女性は 25.2 であり、男性が有意に高値であった。

腸内細菌と baPWV の関係について検討を行ったが、一定の傾向は認められなかった。

同様に、腸内細菌と肥満 (BMI、体脂肪率) との関係についても 65 歳未満においては男女ともに有意な関連は認めなかった。同様に 65 歳以上の男性においても有意な差は認めなかった。

しかし、65 歳以上の女性において BMI が 20 未満の群がそれ以外の群に比して OCU332 (Lactobacillales) が有意に高値であった。また、体脂肪率が低い群が OCU332 の割合が多い傾向がみられた (図 1)。

Kadooka らの研究では多施設無作為偽薬

対照介入試験により 87 名の被験者に *Lactobacillus gasseri* SBT2055 を含む脱脂乳あるいはこれを含まない脱脂乳を 12 週間投与した結果、前者において体重、BMI、腹囲、ならびに内蔵及び皮下脂肪が有意に減少したと報告した。また Armougom らは肥満と正常体重の被験者各 20 名から採取した便に qPCR による分析を行った結果、正常にくらべ、肥満者において *Lactobacillus* が多いと報告した。

Lactobacillales が体格に影響を与えるメカニズムについても様々な報告がある。Sato らは *L. gasseri* SBT2055 が脂質の腸管からの吸収抑制を介してラットの白色脂肪細胞サイズを減少させると報告した。

このように、本研究を含め腸内細菌と肥満との関連は様々な研究で指摘されている。しかし、腸内細菌が肥満に影響しているのか、あるいは肥満が腸内細菌に影響しているのか、腸内細菌と肥満の因果関係はまだ明らかではない。今後、研究が進展し、腸内細菌が体格に与える影響が明らかになれば腸内細菌と健康との関係が明らかになり、将来的にはプロバイオティクスなど腸内細菌の修飾による肥満治療への臨床的応用の可能性も考えられる。

本研究は横断研究である為、腸内細菌と体格との因果関係について検討できない。そのため、今後は対象数を増やし、食事などの生活環境との関わりを検討し、さらに追跡調査を行うことにより、岩木健康増進プロジェクトを通じた縦断研究への発展などが考えられる。

表1. 対象者の特徴

	男性(n=266)		女性(n=428)	
年齢(歳)	57.5	± 0.8	58.9	± 0.6
BMI(kg/m ²)	23.9	± 0.2	23.1	± 0.1 *
体脂肪率(%)	20.1	± 0.3	30.7	± 0.3 *
アルコール(g/日)	46.6	± 3.3	5.0	± 0.9 *
Brinkman index	321.0	± 24.1	25.2	± 4.8 *

数値: 平均値±標準誤差

T-test により比較検定 * : P<0.01

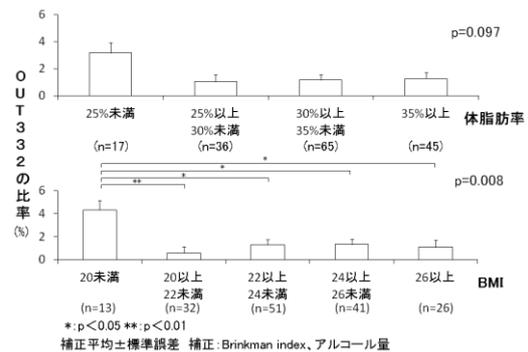


図1. 65歳以上女性におけるOTU332(*Lactobacillales*)とBMI、体脂肪率の関係

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3件)

- ① 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 Medical Journal 2011, 62: 7-17.
- ② Kumeta K, Danjo K, Matsuzaka M, Takahashi I, Watanabe K, Iwane K, Tsuya R, Umeda T, Sato K, Fukuda S, Nakaji S. Prevalence of irritable bowel syndrome and its relation to lifestyle and depression quotient in a Japanese general population. Hirosaki Medical Journal 2011, 62:144-65.
- ③ 佐藤研, 福田眞作, 檀上和真【機能性消化器疾患の基礎と臨床】一般住民におけるIBSの有病率とライフスタイル、心理社会的背景との関連. 消化器内科 2011, 53: 476-81.

[学会発表] (計4件)

- ① 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, 2012年3月, 京都
- ② 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・免疫学会大会, 2011年8月, 東京

- ③ 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回日本衛生学会学術総会, 2011年3月, 誌上開催

- ④ 長谷部達也, 梅田孝, 佐藤弘道, 鈴木隆, 谷本歩実, 徳田糸代, 徳安秀正, 山本博, 矢野智彦, 中路重之. 呼気中水素およびメタン濃度と腸内細菌叢の関連に関する研究. 第80回日本衛生学会, 2010年5月, 仙台

[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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし