

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350871

研究課題名(和文) プロバイオティクスによるインスリン抵抗性改善の検討

研究課題名(英文) Investigation of improvement of insulin resistance by probiotics

研究代表者

金澤 昭雄 (Kanazawa, Akio)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30407259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病患者70名をプロバイオティクス(乳酸菌シロタ株飲料)投与群と非投与群とにランダム化して16週間の観察を行った。便中の乳酸菌数は増加し、血液中の総細菌数は有意に低下した[2.0(1.0-3.0)/6.0(3.0-12.0)細胞数/ml血液、群間比較：P<0.05]。結論として、日本人2型糖尿病においてプロバイオティクスの投与はバクテリアルトランスロケーションを抑制した。

研究成果の概要(英文)：Seventy Japanese patients with type 2 diabetes were randomised to two groups: the probiotic group drank Lactobacillus casei strain Shirota-fermented milk for 16 weeks, while the control group ingested no probiotics. At the end of the study, the fecal counts of the Lactobacillus in the probiotic group were significantly higher than in the control group. Intriguingly, the total count of blood bacteria was significantly lower in the probiotic group [2.0(1.0-3.0)/6.0(3.0-12.0) cells/ml, P<0.05]. Our results showed that probiotic administration reduced bacterial translocation in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：腸内フローラ プロバイオティクス インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの腸管内では多種・多様な細菌が絶えず増殖を続け、これらは腸内細菌と呼ばれ、個々の菌が集まって複雑な微生物生態系を構築している。この微生物群は「腸内フローラ」と称され、食事内容の変化でその組成は影響を受けるとされている。特に高脂肪食の摂取では腸内フローラのバランス異常を生じ、腸管でのバリア機能の低下、つまり透過性の亢進をきたす。透過性の亢進は腸内細菌及び、その成分の血中への移行(バクテリアルトランスロケーション)をもたらし、炎症性サイトカインの増加を介して、微小な慢性炎症を宿主であるヒトに惹起し、肥満、糖尿病のインスリン抵抗性の一因となっている。しかしながら、これまで日本人2型糖尿病において腸内フローラの解析とバクテリアルトランスロケーションに関する研究は皆無であった。

(2) そこで、以前に我々は2型糖尿病患者50名と非糖尿病50名を対象にして、腸内フローラ解析とバクテリアルトランスロケーションの検討を行い、2型糖尿病患者の糞便中では非糖尿病例と比較して、最優勢偏性嫌気性菌群のクロストリジウムコッコイデス、アトボミウムクラスター、プレボテラの菌数レベルが有意に低値、一方、通性嫌気性菌群の乳酸菌の菌数レベルが有意に高値であったこと、2型糖尿病患者の糞便中の有機酸濃度も有意に低値であったことを報告し、日本人2型糖尿病患者において、初めて腸内フローラのバランス異常が存在することを示した。また、2型糖尿病患者において、血液中ではインターロイキン-6とリポポリサッカライド結合タンパク(LBP)が有意に上昇し、本来なら腸内で生息するはずの細菌が非糖尿病例に比べ、高頻度に血液で検出され(検出率28%対4%)、バクテリアルトランスロケーションの増加が認められた。しかし、我々の先行研究は横断研究のため、腸内フローラのバランス異常とインスリン抵抗性との直接的な因果関係が明らかでなかった(文献1)。

2. 研究の目的

(1) 2型糖尿病患者を対象にして、プロバイオティクスとしてよく知られている乳酸菌シロタ株を含有する飲料を投与し、腸内フローラが変化するかどうかを検討した。

(2) プロバイオティクス投与によって血液中への腸内細菌の移行と腸内細菌が産生する毒素(リポポリサッカライド)が結合するタンパクを測定し、これらが減少するかどうかを検討した。また、インスリン抵抗性の誘因となる炎症性サイトカインの測定を行った。最終的な目標はプロバイオティクスによって、腸内フローラが改善し、バクテリアルトランスロケーションが抑制され、その結果としてインスリン抵抗性を引き起す炎症性サイトカインの減少が認められるかどうか

であった。

3. 研究の方法

(1) 順天堂大学医学部附属順天堂医院の糖尿病・内分泌内科の外来に通院中で、食事・運動療法もしくは、 α -グルコシダーゼ阻害薬以外の薬物療法で加療中の2型糖尿病患者70名を対象とし(年齢30~79歳、HbA1c6%以上8%未満)、乳酸菌シロタ株を含有する飲料を飲むするプロバイオティクス群と非飲用の対照群とにランダム化して、16週間の経過観察を行った。また、乳酸菌数としては飲料1本あたり、400億個の乳酸菌シロタ株が含有されているものを使用した。2型糖尿病患者70人を対象とし、プロバイオティクス群(35人)と対照群(35人)が割り付けられ、試験開始前と開始8週後と16週後で血液中と糞便中の腸内フローラの解析及び、有機酸濃度の測定を行った。さらに、血中リポポリサッカライド結合タンパク及び、高感度C反応性タンパク、腫瘍壊死因子- α 、インターロイキン-6、アディポネクチン、空腹時血糖、ヘモグロビンA1c、脂質(総コレステロール、中性脂肪、HDL-コレステロール)のフォローを行った。対照群において割り付け後に同意撤回が1名、プロバイオティクス群において経過中、腸炎を発症したため、解析から除外され、各群34名が最終的に解析された。

(2) 腸内フローラは食事、年齢、遺伝学的な要因で変動することが知られ、技術的な問題もあり、これまでは詳細な解析が困難であった。そこで、我々は効率よく糞便中と血液中の腸内細菌を解析するため、ヤクルト本社中央研究所が開発した腸内フローラ解析システム Yakult Intestinal Flora Scan (YIF-SCAN[®])を用いて解析を行った。このシステムは定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法で、DNAの1,000倍以上存在するリボソームRNAを解析対象とするので、DNAを解析対象とする定量的PCR法より1,000倍も検出感度が向上し、腸内フローラ中の菌数レベルが低い菌種も定量可能であり、従来のシャーレを用いた培養法に比べ、格段に迅速、簡便、高精度な腸内フローラ解析が可能である。特に血液中の生菌の検出率は1個/1ml血液の精度で検出可能である

4. 研究成果

(1) 研究対象となった患者背景

2型糖尿病患者70名中をエントリーし、各群34名が試験を終了した。試験開始前の主な背景は以下の通りである。(投与群/非投与群) <平均年齢>64 \pm 9.2歳/65 \pm 8.3歳、<糖尿病歴>13.9 \pm 9.6年/12.2 \pm 7.2年、<HbA1c>6.9 \pm 0.5%/6.8 \pm 0.5%、<体格指数>24.2 \pm 2.4 kg/m²/23.9 \pm 2.6kg/m²であり、両群の間で差は認めなかった。また、その他の臨床因子も図1に示すように総コレステロール、中性脂肪、HDL-コレステロール、炎症

性サイトカインの値も両群間で差異を認めなかった。

表 1

	対照	プロバイオティクス
人数	34名	34名
性別(男/女)	20/14	29/5
年齢(歳)	65.0±8.3	64.0±9.2
体格指数(kg/m ²)	24.6±2.6	24.2±2.6
糖尿病罹病期間(年)	12.2±7.2	13.9±9.6
HbA1c(%)	6.8±0.5	6.9±0.5
空腹時血糖(mg/dL)	129.5±26.6	128.5±19.1
T-CHO(mg/dL)	182.9±28.2	188.2±31.7
HDL-C(mg/dL)	55.7±14.7	54.0±15.2
中性脂肪(mg/dL)	109.4±45.0	104.7±35.6
TNF-(pg/mL)	0.9±0.3	1.1±0.5
IL-6(pg/mL)	1.8±0.9	1.7±1.2
LBP(μg/mL)	11.2±3.9	10.0±2.2

T-CHO:総コレステロール、HDL-C:HDL-コレステロール、TNF- α :腫瘍壊死因子- α 、IL-6:インターロイキン-6、LBP:リポポリサッカライド結合タンパク

(2) 便中の腸内フローラ解析

試験終了時、プロバイオティクス投与群では便中の総乳酸菌、特に乳酸菌カゼイが有意に上昇した(投与群/非投与群:7.4±0.8/5.0±1.3/ \log_{10} 細胞数/グラム便、群間比較:P<0.01)。また便中のクロストリジウムコッコイデスの数は16週後において投与群で有意に上昇していた(投与群/非投与群:9.8±0.4/9.5±0.6 \log_{10} 細胞数/グラム便、群間比較:P<0.05)。また、クロストリジウムレプテムサブグループもまた有意に上昇していた(投与群/非投与群:9.8±0.5/9.4±0.8 \log_{10} 細胞数/グラム便、群間比較:P<0.05)。また、プロバイオティクス投与群では投与開始16週後において便中の乳酸菌ガゼリ(投与前/投与16週後:5.1±1.2/5.6±1.1 \log_{10} 細胞数/グラム便、P<0.05)と乳酸菌ロイテリ(投与前/投与16週後:4.8±1.0/5.3±1.0 \log_{10} 細胞数/グラム便、P<0.05)の菌数が投与前に比べて有意に増加した。

(3) 便中の有機酸濃度の測定

試験開始前の便中の総有機酸濃度は両群間で差異を認めなかったが、酪酸の濃度は対照群に比べ、プロバイオティクス投与群において有意に高値であった(投与群/非投与群:16.7±9.2/12.6±7.6 マイクロモル/グラム便、P<0.05)。また、試験開始後、プ

ロバイオティクス群の便中の酪酸濃度は減少し、試験終了時には対照と比べて有意な差を認めなかった。また、便中のpHも両群間で差を認めなかった。

(4) 血液中の腸内フローラ解析

試験開始時において両群[対照/プロバイオティクス群:4.5(2.3-5.3)/2.4(2.1-4.1)個/ml血液、中央値(四分位)]において血中総菌数は有意な差を認めなかった。また、プロバイオティクス投与後8週目においても両群で有意差を認めなかった[対照群/プロバイオティクス:2.3(1.6-20.2)/4.4(2.1-9.0)個/ml血液]。しかしながら、試験終了時において表2に示すようにプロバイオティクス投与群においては試験終了時に対照にくらべ、有意に血中での総細菌数の減少を認めた。検出率については各群間で有意な差を認めなかった。

さらに今回の検討で2型糖尿病患者において試験開始前、開始8週後、終了時(16週後)の三回にわたって血中腸内フローラの解析を行った結果、血中へのバクテリアルトランスロケーションは継続的に認められ、菌血症が恒常的な現象であることも明らかになった。

表 2

試験終了時(16週後)			
対照(34名)		プロバイオティクス(34名)	
血中総菌数	検出率	血中総菌数	検出率
6.0 (3.3-12.4)	29.4	1.8 (1.0-3.2)*	20.6

血中総菌数は個/ml血液、中央値(四分位)で表記、*P<0.05 対照、検出率(%)

(5) 炎症性サイトカインと血糖コントロールの変化

HDL-コレステロール、総コレステロールとHbA1cを除けば、その他の炎症性サイトカインは試験開始時と終了時の間で有意な変動を認めなかった。血糖コントロールの指標であるHbA1cは両群において試験開始時から有意に上昇した。また、プロバイオティクス群では総コレステロールが、対照群においてはHDL-コレステロールが試験開始時から有意に上昇した。さらに、高感度C反応性タンパクはプロバイオティクス群で有意に上昇したが、その変化量は両群間で有意な差を認めなかった。

(6) 考察と今後の展開

これまでは乳酸菌シロタ株がメタボリック症候群において腸内フローラや炎症性マーカーに及ぼす報告や糖尿病患者においては他のプロバイオティクスを用いてインスリン感受性に及ぼす影響を検討した報告はあった。しかし、我々の研究のように血中への

バクテリアルトランスロケーションを主要評価項目とした研究はこれまでなかった。以前の研究では一般集団において、血中の腸内細菌のリボゾーム DNA の濃度が高い集団ほど、将来に糖尿病発症のリスクが高いとも明らかになっており、バクテリアルトランスロケーションは肥満や糖尿病などの疾患で重要な役割を担っている可能性がある。今回、我々が腸内フローラの解析で用いた YIF-SCAN® は高感度で血液 ml あたり、1 個の細菌も検出可能であり、今回の解析が可能になったと考えられる。

ある先行研究はメタボリック症候群において乳酸菌シロタ株を投与したところ、腸内フローラの組成に影響を与えなかった。しかし、プロバイオティクスの細胞数は我々が使用した数(400 億)の半数が使われており、投与期間も 12 週間と短かった。実際、我々の検討でも 8 週間後ではバクテリアルトランスロケーションは抑制されていなかった。それゆえ、確実にバクテリアルトランスロケーションを抑制するにはより多くのプロバイオティクス細胞とより長い投与期間が必要であるかもしれない。腸内フローラの解析において、プロバイオティクス投与後にクロストリジウムコッコイデスとクロストリジウムレプトムサブグループの便中の菌数は有意に上昇した。また、総乳酸菌数の増加とともに乳酸菌ロイテリや乳酸菌ガセリなどの菌も増加しており、腸内フローラに変化を認めた。特に、クロストリジウムコッコイデスはヒトの腸内フローラにおいては最優勢菌の一つである。我々の以前の研究では 2 型糖尿病患者の便中ではクロストリジウムコッコイデスは非糖尿病例より低下していたが、今回のプロバイオティクスの介入により非糖尿病レベルまで改善していた。それゆえ、クロストリジウムコッコイデスの中の特定の菌がヒトの腸内環境の健康維持に關与する可能性がある。しかし、詳細はまだ不明であり、今後はさらなる研究が必要である。

重要なことに、乳酸菌カゼイ、乳酸菌ロイテリ、乳酸菌ガセリはプロバイオティクス投与後にいずれも上昇していたが、これらは腸管バリア機能を保持する作用があることが報告されており、血中への菌の移行の抑制に寄与した可能性は示唆される。しかしながら、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子-1、インターロイキン-6、高感度 C 反応性タンパクはプロバイオティクス投与後に減少を認めなかった。以前、我々のグループでは健常集団に乳酸菌シロタ株 400 億個を投与したところ、便中の有機酸濃度の増加とビフィズス菌の増加を認めており、プロバイオティクス投与により腸内環境が改善すれば、これらの変化が認められることが期待されるが、今回の我々の検討では便中の有機酸濃度とビフィズス菌は変動せず、健常な集団と糖尿病のような病気をもつ集団では、プロバイオティクス投与の効果異なる可能性も考

えられる。従って、今後は、プロバイオティクスの投与期間の延長、複数の菌を組み合わせる投与、また、生きた細菌とオリゴ糖のような腸内環境を整える有効な食品を組み合わせたシンバイオティクスと呼ばれるより効果的な介入手法が糖尿病患者の腸内フローラの改善、さらには炎症性サイトカインを減少させ、インスリン抵抗性の改善につながるか否かの検討が必要である。

今回の研究における限界として、二重盲検法ではなかったため、プロバイオティクス群の患者は乳酸菌飲料の効果を知っていたため、バイアスがかかった可能性があげられる。

結論として、本研究では乳酸菌シロタ株を含有する飲料は 2 型糖尿病患者の腸内フローラを変化させ、血中に移行する腸内細菌の総数を減少させることができた。しかし、その効果は部分的なものであり、さらに腸内フローラを改善、慢性炎症を減少させるための手段が必要あり、今後の検討が必要である。

< 引用文献 >

Sato J, Kanazawa A, et al. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014, 37(8):2343-50.

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

< 国内 >

発表者 佐藤淳子
2 型糖尿病患者の腸内細菌叢に対するプロバイオティクスの効果
第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会
平成 29 年 5 月 18 日(木) ~ 20 日(土)
名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

< 国外 >

発表者 佐藤淳子
Probiotics reduce bacterial translocation in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus
第 77 回米国糖尿病学会
平成 29 年 6 月 9 日(金) ~ 13 日(火)
サンディエゴコンベンションセンター(サンディエゴ、カリフォルニア)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

金澤 昭雄 (KANAZAWA, Akio)

順天堂大学大学院代謝内分泌学講座・准教授

研究者番号：30407259