

生活習慣病と腸内細菌との関連：一般住民での検討

(研究助成金 70万円)

弘前大学大学院 医学研究科 地域がん疫学講座

松坂方士

I 諸言

わが国を含むほとんどの先進国では、病的な肥満や2型糖尿病、高血圧および脂質異常症の有病率が上昇しており、社会的にも大きな課題となっている¹⁾。これまで生活習慣の悪化や遺伝的な異常、内分泌疾患およびその他の身体的状況が病的な肥満の原因であることは広く認識されてきたが、腸内細菌叢の中に存在するlactobacillalesと肥満との関連について考察されたことはあまりなかった。

腸内細菌叢と肥満との関連についての基礎的な研究はこれまでにいくつか報告されており、その中では一卵性双生児であっても肥満の有無によって腸内細菌叢の構成が異なることについて論じているものもある²⁾。また、肥満者が大幅に体重減少した場合には腸内細菌叢の構成が非肥満者の構成に近づくことも報告されている³⁾ことから、腸内細菌叢の変化が宿主に身体的な変化をもたらして体重を変化させると考えられている。

腸内細菌叢とその宿主の体格、特に肥満の有無との因果関係は動物実験においても様々に検討されている。その中の一つに、餌中に肥満のマウスが有する腸内細菌が混入されたマウスでは、同様に餌中に非肥満のマウスが有する腸内細菌を混入されたマウスと比較して体脂肪が上昇するという報告がある⁴⁾。また、細菌の個々の種類に関する検討では、lactobacillalesの摂取によって肥満の予防や改善がもたらされるだけでなく、肥満によってもたらされる疾患である高血圧や高血糖、脂質異常症の予防や改善についても効果があることが明らかになっている⁵⁻⁸⁾。

一方、ヒトにおいては腸内細菌叢中のlactobacillalesと肥満についての関連はいまだに明らかにされていない。Santacruzらは食事制限と身体活動の増加による体重減少が腸内細菌叢中のlactobacillales

を増加させることを報告している¹⁰⁾が、その一方で、ArmourgonらとMillionらは腸内細菌叢に含まれるlactobacillalesの割合は非肥満者よりも肥満者の方が高いこと、そしてKarlssonらは修学前児童を対象にした研究で便中lactobacillalesの割合は肥満児と非肥満児では差がないことを示している¹¹⁻¹³⁾。このように報告によって結果が異なることは、研究対象者数が少なかったことや腸内細菌を検出する検査方法の感度が低かったことが原因である可能性が考えられている¹⁴⁾。

近年、NagashimaらがT-RFLP法に16SrDNAクローンライブラリー法を組み合わせることで、腸内細菌叢中の全ての菌種の割合を短時間で検出することを可能にした^{15,16)}ことを契機として、腸内細菌叢の研究においてTerminal restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)法が用いられる機会が増加している。本研究では、このT-RFLP法を利用して日本人の一般住民における肥満と腸内細菌叢との関連を検討した。上記のようにこれまで当該分野では大きな課題となっていた腸内細菌の検出感度と対象者数について本研究では十分に考慮されており、今後の健康推進に十分に应用できる成果が得られると考えられる。

II 方法

1. 対象者

対象者は岩木健康増進プロジェクトに参加した青森県弘前市岩木地区に在住する一般住民814名である。岩木健康増進プロジェクトは岩木地区住民の健康増進と平均寿命の改善を目的に、弘前大学大学院医学研究科を中心に実施されている研究事業である。

消化管の手術既往がある者や直近に抗生剤を内服した者、あるいは抗脂質異常症薬や下剤を内服している者は本研究の対象者から除外した。また、データに欠損値がある者も対象者から除外し、最終的には613名（男性249名、女性364名）を本研究の解析対象者とした。

研究参加に先立って対象者には本研究の目的および方法について説明し、書面によってインフォームド・コンセントを得た。なお、岩木健康増進プロジェクトは弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て実施されている。

2. 生活習慣の聞き取りと身体状況の把握

研究参加者には調査日以前に自記式アンケートを配布し、あらかじめ記入をお願いした。アンケート用紙は調査当日に回収し、その後、不明の点について調査スタッフによって個別の聞き取りを行った。自記式アンケートの項目は、性別、年齢、既往歴、喫煙歴の有無と喫煙頻度、常習飲酒の有無とその頻度である。なお、喫煙歴の有無と喫煙頻度、常習飲酒の有無とその頻度から、それぞれ喫煙量と飲酒量を算出した。また、体脂肪率はマルチ周波体組成計（TANITA, MC-190）によって測定した。

3. high-density lipoprotein (HDL) コレステロール, low-density lipoprotein (LDL) コレステロール
空腹時採血により得られた血液サンプルは直ちに血清分離され, HDLコレステロール値およびLDLコレステロール値を測定した。

4. 腸内細菌叢の分析

(a) 便中からの腸内細菌deoxyribonucleic acid (DNA) 抽出

採便にはテクノスルガラボ株式会社 (静岡県) のT-RFLP法専用容器を用いた。専用容器内にはGTC緩衝溶液 (100mM Tris-HCl [pH 9.0], 40mM Tris-EDTA [pH 8.0], 4 M Guanidine Thiocyanate) が満たされており, 調査当日に回収後はDNA抽出まで -83°C で冷凍保存した。

便とGTC緩衝溶液の混合液約800 μ Lをジルコニウムビーズ (株式会社ニッポンジーン, 東京) とともに試験管に分注し, 室温で3分間 FastPrep FP100A Instrument (MP Biomedicals, Irvine, CA) により攪拌した。冷却後, 5000rpmで1分間遠心分離し, Magtration System 12 GC and GC series MagtrationMagaZorb DNA Common Kit 200N (プレシジョン・システム・サイエンス株式会社, 千葉県) によりDNAを抽出した。最終的なサンプルのDNA濃度は10 ng/ μ Lに調整した。

(b) Polymerase Chain Reaction (PCR) 法

本研究では27F [5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'], あるいは 516f [5'-TGCCAGCA GCCGCGGTA-3'], あるいは 1492R [5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'] を16S rRNA遺伝子増幅に用いた。アプライドバイオシステムズ (東京) が作成した6'-carboxyfluorescein (6-FAM) により27Fより上流の5'末端にラベルした。同様に, 516Fより上流の5'末端にはアプライドバイオシステムズ (東京) が作成したHEXによりラベルした。

DNAサンプル (10ng) のPCR 増幅は以下の手順で行った。

- (1) 95°Cで15minの予熱
- (2) 95°C35秒間で30サイクルの変性
- (3) 50°C30秒間の徐冷
- (4) 72°C10minの伸長

増幅した16S rRNA遺伝子はMultiScreen FB plates (メルクミリポア, 東京) によって精製し, 40 μ Lの蒸留水で希釈した。

FAMでラベルしたPCR精製物 (2 μ L) はそれぞれ10UのHhaI, MspI, AluIに37°Cで3時間温浸した。HEXでラベルしたPCR精製物 (2 μ L) も10UのBslI (New England BioLabs, Inc. Ipswich, USA) に 55°Cで3時間温浸した。

(c) T-RFLP法

T-RFLPの長さはABI PRISM 3100 genetic analyzer (アプライドバイオシステムズ, 東京) のGeneScan modeにより, GS-2500 ROX (アプライドバイオシステムズ, 東京) を標準マーカーとして測定した。フラグメントの大きさはGENESCAN 3.1 software (アプライドバイオシステムズ, 東京) を用いてlocal Southern法により推定した。phylogenetic assignment database for T-RFLP analysis of human colonic microbiota (PAD-HCM) やMicrobiota Profiler (Infocom T-RFLP Database & Analysis Software, インフォコム株式会社, 東京) などのT-RFLP法で用いられるコンピューター分析プログラムにより, 主なT-RFを同定した。また, サンプル間の類似性から距離を決定し, Pearsonの相関係数とunweighted pair-group methods with arithmetic means (UPGMA) により視覚的に樹系図を作成した。各T-RFは全T-RFのピークエリアに対する個々のピークエリアが占める割合 (%) を定量し, area under the curve (%AUC) により数値化した。

(d) Operational taxonomic unit (OTU)

各T-RFはフラグメントの大きさによって28の operational taxonomic unit (OTU) に分類した。そのうち, 上記のコンピューター分析プログラムによりOTU332はlactobacillalesに対応するため, T-RFの%AUCから算出したOTU332の割合を腸内細菌叢中のlactobacillalesの割合とした。

(e) 統計学的解析

解析に先立ち, 対象者を性別 (男性, 女性), 年齢 (65歳以上, 65歳未満), 体脂肪率 (男性: 15%以下, 15-20%, 20-25%, 25%以上, 女性: 25%未満, 25-30%, 30-35%, 35%以上) により層別化した。

あらかじめ推定される交絡因子である喫煙量や飲酒量を共分散分析 (ANCOVA) で調整後, 体脂肪率で層別化した4グループ間をBonferroni法を用いてOTU332の割合を比較した。

65歳以上の女性については体脂肪率に関して追加解析を要した。すなわち, これらを総コレステロール値 (180mg/dL以下, 180-200mg/dL, 200-220mg/dL, 220mg/dL以上), HDLコレステロール値 (50mg/dL以下, 50-60mg/dL, 60-70mg/dL, 70mg/mL以上), LDLコレステロール値 (<100mg/dl, 100-120mg/dl, 120-140mg/dl and >140mg/dl) で4群に分類し, OTU332の割合を群間で比較した。なお, 比較に際しては, あらかじめ推定される交絡因子である喫煙量や飲酒量を共分散分析 (ANCOVA) で調整した。

全てのp値は両側で, 0.05未満をもって有意差ありと判断した。データ解析にはPASW Statistics 18 (IBM, Armonk, NY, USA) を用いた。

Ⅲ 結 果

対象者の特徴を表Table 1に示した。男性、女性とも対象者には中高年が多く、性別による年齢差はみられなかった。女性対象者における体脂肪率と血清脂質濃度（総コレステロール、LDLコレステロール、HDLコレステロール）は男性対象者よりも有意に高値であった。本研究における男性対象者の喫煙量と飲酒量は、女性対象者を上まわっていた。

体脂肪率で分類したグループにおけるOTU332割合の調整平均をFigure 1に示した。男性対象者における体脂肪グループ間では、OTU332割合の有意差は認められなかった。65歳未満女性では男性と同様に体脂肪グループ間でのOTU332割合の有意差はみられなかったが、65歳以上女性では他の体脂肪グループと比較して体脂肪率25%以下グループのOTU332割合は有意に高かった。

Table 1. Characteristics of the subjects

	Males(N=249)	Females(N=364)	
Age (years old)	57.3 ± 0.8	57.7 ± 0.7	
Percentage of body fat (%)	20.0 ± 0.3	30.2 ± 0.3	**
Total cholesterol (mg/dL)	198.0 ± 1.9	204.4 ± 1.6	*
HDL cholesterol (mg/dL)	58.4 ± 1.0	64.2 ± 0.7	**
LDL cholesterol (mg/dL)	115.9 ± 1.8	123.7 ± 1.5	**
Consumed pure alcohol quantity per day (g)	45.9 ± 3.2	5.5 ± 1.0	**
Consumed cigarette (pack year)	16.2 ± 1.3	1.5 ± 0.3	**

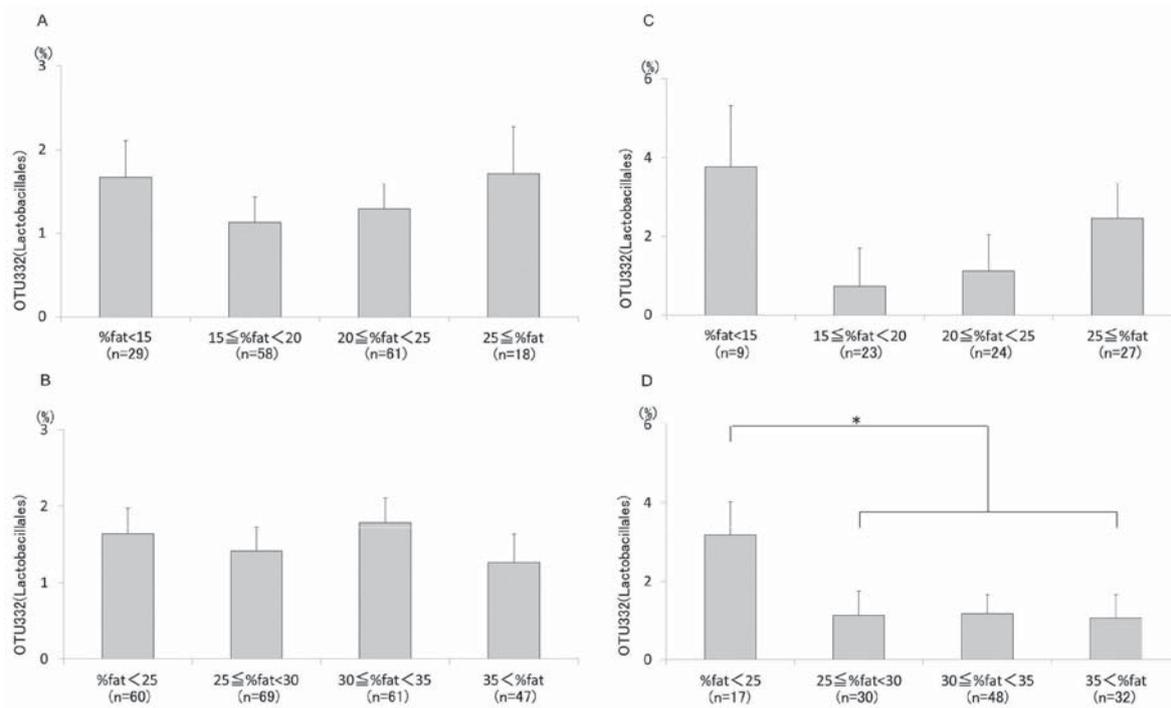
Mean ± SD

HDL: high-density lipoprotein

LDL: low-density lipoprotein

* : p<0.05、** : p<0.01, P-values were calculated by un-paired t-test.

Figure 1. Percentage of OTU332 and body fat in males and females



Error bars represent standard errors of the means

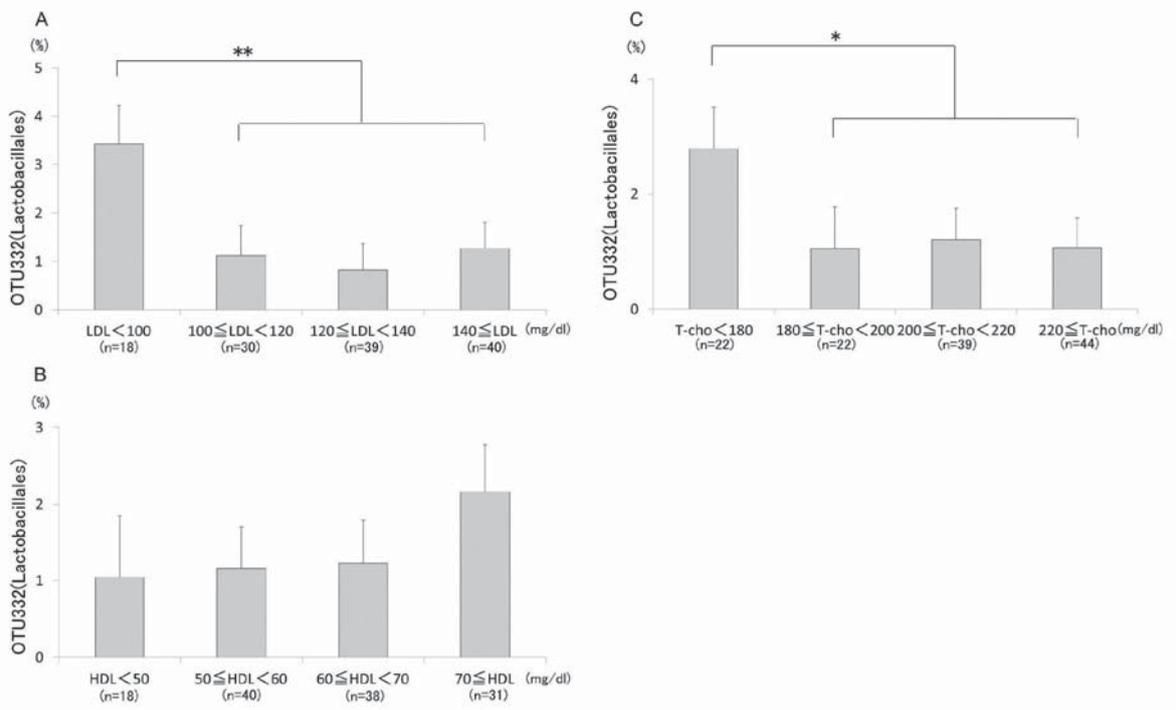
Significant differences between stratum of %fat < 25 and other strata were represented as *.

*: p < 0.05

(A) Male, age < 65y. (B) Male, age ≥ 65y. (C) Female, age < 65y. (D) Female, age ≥ 65y

65歳以上女性におけるOTU332割合と血清脂質（総コレステロール，LDLコレステロール，HDLコレステロール）濃度をFigure 2に示した。血清総コレステロール濃度および血清LDLコレステロール濃度が最も低い群においてOTU332割合は他群と比較して高く，これより濃度が高い他の3群間ではOTU332濃度の差はなかった。血清HDLコレステロールとOTU332濃度との関連は認められなかった。

Figure 2. Percentage of OTU332 and serum cholesterol in women who were ≥65 years old



Error bars represent standard errors of the mean.

LDL: low density lipoprotein cholesterol

HDL: high density lipoprotein cholesterol

T-cho: total cholesterol;

Significant differences between the lowest stratum and other strata were represented as *.

*: p < 0.05

**: p < 0.01

IV 考察

我々の知る限り、T-RFLP法を用いて一般住民を対象にして肥満と便中lactobacillalesとの関連を報告した研究は本報が最初である。これまで一般住民対象の研究で腸内細菌叢を検討した研究はあったが、それらは腸内細菌叢の一部から全体の構成を推測しているにすぎなかった。

Santacruzらは体重が減少するにしたがって便中のlactobacillalesが増加することを示した¹⁰⁾が、いくつかの報告では逆の結果が示された¹¹⁻¹³⁾。本研究では、65歳以上の女性において体脂肪率25%以下グループのlactobacillalesの割合は最も高かった。高齢者女性では、体脂肪率が25%以下は日本肥満学会だけでなく米国スポーツ医学会の基準においても平均あるいは平均以下のカテゴリーに入る^{17,18)}。したがって、本研究の結果は便中lactobacillalesの割合と非肥満との関連を示していると考えられる。

便中lactobacillalesが肥満の予防や改善に影響する原因の一つとして、lactobacillalesが消化管での脂質の再吸収を減少させ、また排泄を促進することで血中脂質濃度を低下させることがあげられる^{9,19-21)}。これにより、便中のlactobacillales量はコレステロールの吸収阻害を通じて体脂肪率に関連

していると考えられる。本研究では、高齢女性において便中lactobacillales割合が高いことと総コレステロールが低いこと、およびLDLコレステロールが低いことが関連していた。腸内細菌叢中のlactobacillalesがコレステロール吸収に大きく影響するのであれば、lactobacillalesの減少は高齢女性において肥満の危険因子になると考えられる。

高齢女性とは対照的に、男性と若年女性では腸内細菌中のlactobacillales割合と体脂肪率との関連は認められなかった。女性ホルモンは消化管からのコレステロール排泄を促進するが²³⁾、閉経後女性の血中女性ホルモン濃度は若年女性や男性よりも低いことが報告されている²²⁾。さらに、血中女性ホルモン濃度が低い閉経後女性は血中コレステロール濃度の増加から肥満になりやすいことも明らかになっている^{24,25)}。したがって、本研究で観察された高齢女性における体脂肪率と便中lactobacillalesとの関連は女性ホルモンが機序になっており、加齢による脂質代謝や糖代謝の低下がその関連を促進している可能性が考えられた²⁶⁻³¹⁾。

本研究にはいくつかの限界点が指摘できる。第一に、腸内細菌が存在するのは大腸および直腸であるが、消化吸収は主に小腸内で行われる。したがって、腸内細菌叢が体脂肪率と関連するという本研究の仮説は、小腸と腸内細菌叢の関係が明確になった時点で許容されるものと考えられる。第二に、便中の細菌遺伝子には、腸内細菌叢の細菌遺伝子と食物と同時に摂取した細菌の遺伝子が含まれている。したがって、本研究の結果は体脂肪率と摂取食物に付着していた細菌とが関連していたことを示唆する可能性もある。そのため、lactobacillesを多く含む発酵食品の摂取頻度を自記式アンケートに含めるべきであった。第三に、なぜ高齢女性においてのみ体脂肪率とlactobacillesの関連がみられたかについて十分に検討することができなかった。本研究では血中女性ホルモン濃度を測定しておらず、また高齢女性において血中コレステロール濃度の低下が体脂肪率の低下をもたらすかどうかも十分に検討する必要がある。

References

- 1) Pan HJ, Cole BM, Geliebter A. The benefits of body weight loss on health-related quality of life. *J Chin Med Assoc* 2011;74:169-75.
- 2) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457:480-4.
- 3) Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444 : 1022-23.
- 4) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444:1027-31.
- 5) Kawase M, He F. Anti-obesity effects of probiotics in fermented milk. *J Intest Microbiol* 2010;24: 265-71.

- 6) Sonoyama K. Metabolic Syndrome and Gut Microbiota. *J Intest Microbiol* 2010; 24:193-201.
- 7) Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillales helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 1994; 77: 917-22.
- 8) Lee K, Paek K, Lee HY, Park JH, Lee Y. Antiobesity effect of trans-10,cis-12- conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillales plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *J Appl Microbiol* 2007; 103:1140-6.
- 9) Kajimoto O, Hirata H, Aoe S, Takahashi T, Suzuki U, Tanaka H. Fermented milk containing *Lactobacillales gasseri* (SP strain) decreases serum cholesterol concentration in men with boundary and mild hypercholesterolemia. *J Jpn Soc Lactic Acid Bacteria* 2002; 13: 114-24.
- 10) Santacruz A, Marcos A, Warnberg J. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* 2009; 17: 1906-15.
- 11) Armougom F, Henry M, Vialettes B. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillales* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 2009;4:e7125.
- 12) Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, Valero R. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillales reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes* 2012;36:817-25.
- 13) Karlsson CL, Onnerfalt J, Xu J, Molin G, Ahrn S, Thorngren-Jerneck K. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity* 2012 ;20:2257-61.
- 14) Marshall JC. Gastrointestinal flora and its alterations in critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1999; 2: 405-11.
- 15) Nagashima K, Mochizuki J, Hisada T, Suzuki S, Shimomura K. Phylogenetic analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences from human fecal microbiota and improved utility of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Biosci Microflora* 2006; 25: 99-107.
- 16) Nagashima K, Hisada T, Sato M, Mochizuki J. Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1251-62.
- 17) American College of Sports Medicine, editor. ACSM'S Health-Related Physical Fitness Assessment Manual, 2ndEd. America; Lippincott / William&Wilkins 2008.p59.
- 18) Japan society for the study of obesity,editer. Himan himansyo no sidou manual (Tutorial Manual for Obesity) (version 2) . Japan. Ishiyaku Publishers Incorporated 2001.p5.

- 19) Usman, Hosono A. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillales gasseri* strains. *J Dairy Sci* 1999; 82: 243-8.
- 20) Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillales acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1985; 49: 377-81.
- 21) Tahri K, Grill JP, Schneider F. Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Curr Microbiol* 1996; 33: 187-93.
- 22) Khosla S, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3555-61.
- 23) Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K et al. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J Biol Chem* 2000; 275: 11404-11.
- 24) Lobo RA. Clinical review 27: Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 925-30.
- 25) Espeland MA, Stefanick ML, Kritz-Silverstein D, Fineberg SE, Waclawiw MA, James MK, Greendale GA. Effect of postmenopausal hormone therapy on body weight and waist and hip girths. Postmenopausal Estrogen-Progestin Interventions Study Investigators. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1549-56.
- 26) Kotani K, Tokunaga K, Fujioka S, Kobatake T, Keno Y, Yoshida S, Shimomura I et al. Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994; 18: 207-12.
- 27) Gambacciani M, Ciapponi M, Cappagli B, Piaggese L, De Simone L, Orlandi R, Genazzani AR. Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 414-7.
- 28) Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 904: 502-6.
- 29) Jensen J, Nilas L, Christiansen C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas* 1990; 12: 321-31.
- 30) Stevenson JC, Crook D, Godsland IF. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. *Atherosclerosis* 1993; 98:8 3-90.
- 31) Godsland IF, Gangar K, Walton C, Cust MP, Whitehead MI, Wynn V, Stevenson JC. Insulin resistance, secretion, and elimination in postmenopausal women receiving oral or transdermal hormone replacement therapy. *Metabolism* 1993;42:846-53.