

高齢者の機能的消化管異常の腸内細菌との関連と  
その特性に対応した治療法の選択に関する研究（29-13）

主任研究者 松浦 俊博 国立長寿医療研究センター 消化器内科部（部長）

## 研究要旨

### 3年間全体について

高齢者に特徴的な消化器症状の一つに下部消化管に器質的疾患にない便秘あるいは下痢などを便通異常があげられる。高齢者の便通異常は、従来加齢による腸蠕動機能低下、併存疾患によるステロイド剤、NSAID、神経精神疾患薬などの多数の薬剤服用などが原因とされてきたが、近年腸内細菌叢の変化が関連している可能性が指摘されている。そこで、大腸内視鏡で大腸に器質的疾患の除外された高齢の便通異常患者を対象に腸内細菌叢（16S rRNAを指標とする次世代シーケンサーを使用したメタゲノム解析）との関連を検索するとともに、併存疾患や薬剤との関連を調査して、その適切な治療法を考案することを目的とした。また、国立長寿医療研究センターにて、センター内研究者に向けて供給を行っている加齢育成動物を用いて糞を用いた腸内細菌叢、あるいは大腸菌の代謝産物である短鎖脂肪酸等の加齢変化を解析し、マウスのマイクロバイーム研究を通して腸内細菌叢の加齢変化に関する情報基盤の確立も併せて行った。

まず、高齢者に多い疾患である便秘症の改善を図ることで腸内細菌叢の改善傾向が見られた。また、プロバイオティクスを同時投与することによって便秘改善がやや早くなることが今年度の検討から明らかとなり、便秘に対してのより有用な治療法である可能性が示唆されるとともに、一層の腸内細菌の改善をもたらす傾向がみられ腸内環境をより良好に保つ可能性があることが明らかとなった。また、動物実験からは、水溶性イソフラボンの大腸の組織恒常性を維持して腸管バリア機能に作用する可能性が示唆された。

### 2019年度について

便秘患者にたいする介入試験は3年間で施行して、検討事項も変わらないため、今年度含めた3年間の研究として介入結果を検討した。また、動物実験では種レベルで解析を行うと、加齢によって *Akkermansia muciniphila* 菌の割合が減少し、水溶性イソフラボン投与によって改善していたことから、水溶性イソフラボンの大腸の組織恒常性を維持して腸管バリア機能に作用する可能性が示唆された。

主任研究者	松浦 俊博	国立長寿医療研究センター	消化器内科部	(部長)
分担研究者	京兼 和宏	国立長寿医療研究センター	消化器内科部	(医長)
	山田 理	国立長寿医療研究センター	消化器内科部	(医師)
	久野 裕司	国立長寿医療研究センター	消化器内科部	(医長)
	丸山 光生	国立長寿医療研究センター	研究所	(副所長)

研究期間 2017年4月1日～2020年3月31日

#### A. 研究目的

加齢に伴い、便秘症の罹患患者は増加していきしばしば難治性となるが、このことに腸内細菌叢の変化が関与している可能性が指摘されている。

腸内細菌叢は人間個々によって異なり、3歳くらいまでに完成されるが、高齢になるとそれまでの食生活などの環境因子によって徐々に変化して、乳酸菌類などのプロバイオティクスが減少してクロストリジウム属やウエルシュ菌などの有害菌が増加してくることが明らかとなっている。腸管は消化吸収機能有して人間の栄養状態を司るのみならず、人間の最も大きな免疫器官でありこの腸内細菌叢の変化が高齢者の免疫機能に影響することによる易感染性、腸内細菌の有害菌より産生される物質と高血圧や糖尿病などの生活習慣病、認知症との関連性も報告されていて、腸内細菌を整えることは加齢、疾患予防につながることを期待されている。また、腸内細菌の加齢による変化には個人差があるが、腸の蠕動運動に影響を与えて便通異常を引き起こしている可能性が、最近示唆された。

本研究の目的は、高齢者での便通異常と腸内細菌叢（16S rRNA を指標とする次世代シーケンサーを使用したメタゲノム解析）との関連を検索するとともに、その適切な治療法を考慮することである。便通異常改善薬には、多種類存在するがその使用に関しては多くの場合で医師の経験などに基づいた治療方針基準により判断されて行われているのが現状であり、施設ごとの治療方針が異なっているのが現状である。また、乳酸菌製剤の腸内細菌に与える影響についての検討はされているが、高齢者の便秘症患者を対象とした検証はすくない。このため、プロテオバイオティクスを使用した薬剤介入をすることによる便通改善度および腸内細菌叢の変化の有無を調査して、腸内細菌叢の視点からその標準化についての可能性を検討することを目的とした。さらに、国立長寿医療研究センターの特色であるマウスエイジングファームから供給されているマウス (C57BL/6J) の加齢変化による菌叢解析に注目し、65歳以上の高齢者由来の糞便より、メタゲノム解析を行った結果をマウスのマイクロバイオーム解析の結果と合わせて議論して高齢者の腸内環境（腸管免疫）の維持による老年疾患の改善や予防との関連を検証する。

## B. 研究方法

### 3年間全体について

国立長寿医療研究センター病院消化器内科に通院する 65 歳以上で、原因検索のために必要な大腸内視鏡で大腸における器質的疾患が除外されたあとに、同意の得られた患者より以下の項目に関して調査を行った。また、便秘異常患者に対する治療は必要であるため、通常内服薬群（A群）：麻子仁丸あるいはアミティーザ使用（刺激性下剤のセンノサイド、ラキソベロンは頓用使用可）と通常内服薬（麻子仁丸あるいはアミティーザ）に加えてプロバイオティクス（乳酸菌製剤：ビオスリー、ラックB）使用群（B群）（刺激性下剤のセンノサイド、ラキソベロンは頓用使用可）に無作為に割り付けて治療を行い、便秘改善、腸内細菌の変化に関して検討した。

（平成 29 年 8 月に倫理・利益相反審査委員会承認）

### 1. 患者基本情報

年齢、性別、罹病期間、体重、BMI、飲酒、喫煙、病歴（神経疾患、糖尿病の有無）、内服薬（服薬種類、数、回数、特に腸内細菌への影響を及ぼす可能性のある抗生剤、PPI 内服の有無）、生活習慣（食生活、乳酸菌を含んだ食事やサプリメントの摂取の有無）

### 2. 栄養状態：MNA (mini nutritional assessment)

### 3. 患者の QOL 調査：HADS

### 4. 生活機能調査：基本的 ADL (Barthel index)

### 5. 排便状況-回数 (回/週)、形状 (Bristol)、量 (バナナ 0.5 本、1 本)

### 6. 尿、便、血液検査

すべての検体はバイオバンクに預託、腸内細菌検査に関してもバイオバンクに預託した後に外部委託で検討した。

マウスを使用した腸内細菌の加齢にともなう基礎的検討では、NCGG 加齢育成動物を含む C57BL/6J 雄マウスを合計 28 匹から採便した糞便サンプルより細菌叢 DNA を調製し、腸内細菌の菌叢解析については菌種の特異・菌種組成、系統寿の比較解析を目的に 16SrRNA 産物を指標に次世代シーケンサー (NGS) を用いた腸内フローラ解析することに加えて、7 週齢と 12 ヶ月齢の C57BL6 マウスを普通食で一週間馴化させた後、自由摂取で 10% イヌリンを含む食物繊維負荷試験を 4 週間行った結果の糞便中の短鎖脂肪酸も測定した。

### 2019 年度について

2019 年度は、3 年間の全ての便秘感に関する症例に対して介入結果の検討を行った。また、炎症性腸疾患モデルマウスに対する炎症抑制効果や腸内細菌叢への作用を解析してきた水溶性イソフラボンの生理的な加齢性組織変化に対する効果を検証するため、日本 SLC

より購入した雄の若齢 C57BL6N マウス (2 ヶ月齢)、国立長寿医療研究センター実験動物施設エイジングファームより提供を受けた老齢 C57BL6N マウス (23 ヶ月齢) に水溶性イソフラボンの経口ゾンデによる投与を週三回、4 週間行い、糞便を回収した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては世界医師会「ヘルシンキ宣言」および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成 26 年度文部科学省、厚生労働省告示第 3 号)を遵守して行った。当院の倫理・利益相反審査委員会承認後に、調査票は調査目的以外には使用しない、本調査により知り得た情報は一切、第三者に漏洩しないなど、患者のプライバシーの保護については十分配慮して行った。

ここに記載したすべての研究に関わる動物実験に関しては実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、的確に管理されたもとで実施した。具体的には実験動物の使用、及び処分に関しても苦痛の軽減等、倫理上の問題は実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、当該研究施設の動物実験倫理委員会承認を受けた後に動物実験ガイドラインに則って実施した。

## C. 研究結果

### 3 年間全体について

1 年目は、倫理委員会の承認に手間取り、A 群 6 例、B 群 2 例の調査のみで終了した。2 年目は A 群 5 例、B 群 13 例をエントリーして、A 群 11 例、B 群 14 例での調査および腸内細菌の検討を行った。最終年度の 3 年目では、2019 年 9 月末でエントリーを終了、最終的に、A 群 13 例、B 群 16 例の検討となった。幸いなことに脱落症例は B 群の 1 例のみであった。

まず、患者背景因子に関しては、B 群で女性と便秘の罹患歴で長い患者が多かったが、栄養状態、ADL、年齢分布を含め両群間に明らかな相違は認められなかった。栄養状態に関しては MNA (mini nutritional assessment) 使用してスクリーニングしたが、今回検討の症例では明らかな低栄養状態の患者は見られなかった。また、アルブミン値で両群間および薬剤介入前後の栄養状態を検討したが、いずれも明らかな差は見られなかった。

患者の QOL に関しては、HADS スコアで検討したところ、心配度スコアもうつ度スコアも、殆どの症例で 0~2 点と低値であった。また、介入前後でも、元々のスコア低値のため変化がみられなかった。HADS スコアは便秘解消により改善すると期待していたが、大腸精査後ですでに腸管に器質的疾患がないことがわかった後の調査である影響があると考えられた。同様に、生活機能調査は基本的 ADL (Barthel index) で評価したが、ほぼ正常で両群間に差はみられなかった。

つぎに、主要評価項目である自発的排便の改善度に関して検討した。1 週間の排便回数は、介入前に A 群では週に 1.6 回 B 群では 1.7 回と両群とも同程度の回数であった。介入後 1

週目で A 群は 3.9 回、B 群が 5.7 回と有意に (Cox 検定、 $p < 0.05$ ) B 群の自発的排便回数が多くなった。2 週目以降ではほぼ同等の回数であるものの若干 B 群の方が多い傾向にあった。最終の 12 週目では A 群では週に 5.2 回 B 群では 5.9 回となり、3 週から 12 週において両群とも介入前に比べて有意 ( $p < 0.01$ ) に改善していた。

また、便の性状変化として Bristol スコアを使用した経時的変化を見たところ、介入前で A 群では、1.3、B 群では 1.4 であった。両群間に差は見られなかったが、1 週目には A 群では、2.9、B 群では 3.6 と B 群の方がやや良好な Bristol スコアを示した。また、経時的経過では 3 週目以降では両群とも同等にて、12 週後に A 群で 4.1、B 群で 3.8 と介入前と比べて有意に ( $p < 0.01$ ) 改善していた。この変化にともない、排便量は増加していた。また、今回の調査では、当初から食欲不振患者は少なかったため症状改善は腹部膨満感に関して調査したが、A 群では 13 例中 10 例、B 群では 16 例中 14 例で症状が改善したと回答、症状改善に対する満足度は両群とも極めて高かった。

さらに、介入前後の腸内細菌の変化について検討した。まず、A 群では、Actinobacteria と Proteobacteria 門には菌株数と構成割合に大きな変化がなかったが、Bacteroides 門がやや減少して、その減少分 Firmicutes 門の増加する傾向にあった。一方、B 群では Proteobacteria 門の菌株数と構成割合減少して、Actinobacteria 属の菌株数と構成割合増加傾向となり、Firmicutes 門の変化は殆どみられなかった。

しかしながら、両群とも介入前後および群間比較において、その多様性、類似性に関して統計的有意差はみられなかった。

動物実験では、C57BL/6 における高繊維食負荷の有無による糞便中の短鎖脂肪酸の加齢変化を解析検討した。7 週齢の若齢 C57/B16 マウスと 1 年齢 (54 週齢) の加齢 C57/B16 マウスそれぞれの群での体重変化、食餌の一日平均摂取量についてはイヌリン食の効果として非摂取群に比べて、経時的に減少する傾向が見られたが、加齢による変化は顕著ではなかった。

## 2019年度について

2019 年度のエントリー症例は A 群 2 例、B 群 2 例と期間が短く少ないことと、検討事項は 3 年間通じて同様のため 3 年間症例をまとめた報告とした。また、動物実験による水溶性イソフラボンの投与に関する検討では、門レベルの解析で加齢による腸内細菌叢変化は認められなかったが、より詳細に解析すると加齢によって減少した Akkermansia muciniphila 種が投与によって増加することが明らかとなった。水溶性イソフラボンは炎症に関連した Akkermansia muciniphila 種を増加させることで大腸の組織恒常性を維持して腸管バリア機能に作用することを示唆すると考えられた。

## D. 考察と結論

便秘改善薬内服による介入は、自発的排便、Bristol スコアからの検証および症状改善に関して検討したところ極めて有用であることが判明した。A 群と B 群との比較では 12 週後

の最終的な検証結果では明らかな相違はなかったが、プロバイオティクス併用群で、早期に便秘の改善する結果を認めた。

一方、腸内細菌の結果よりは、有意差は見られなかったが、便秘薬を投与して便秘が改善することによって日和見感染の原因とされる Bacteride 門の減少が見られた。また、プロバイオティクス併用すると、Bacteride 門の減少に加えて、一般的に悪玉菌とされる Proteobacteria 門の減少と、善玉菌とされる Actinobacteria 門が増加する傾向にあった。

これらの結果から、便秘を改善することは日和見感染の原因とされる Bacteride 門の減少効果につながる可能性が考えられ、さらに便秘薬にプロバイオティクスを加えることによって、Bacteride 門の減少および Actinobacteria 門の増加効果が認められた。すなわち、便秘改善およびプロバイオティクス投与は、腸内環境をより良い状態にたもって、腸管免疫の環境保持に役立つ可能性が示唆された。

また、便秘薬にプロバイオティクスを加えることが早期の自発排便改善を促すのに有用であるとの結果となったことを加味すると、高齢者の便秘の治療に関しては、便秘薬+プロバイオティクス併用療法が、その効果および腸内細菌叢の両方の観点からもより有用な治療法であると考えられた。

今回は外来患者を対象に検討したため、難治性便秘症の患者はいなかった。ADL の悪い患者や神経難病などを合併した薬剤性便秘の患者を対象として、便秘薬とプロバイオティクスの併用がより効果的な便秘治療法であるかの検証が必要と考えられた。

ところで、腸管は消化吸収を調整して全身の栄養状態を司るのみならず、人間の最も大きな免疫器官であることがわかっている。腸内細菌と腸管免疫は密接に関与し、全身の免疫にも多大な影響を及ぼしていることも明らかとなっている。つまり、これまでの文献的に示されたような高齢者での腸内での有害菌の増加は、全身の免疫力の低下およびその易感染性に関与していると思われる。今回の我々の研究の結果において、便秘解消に加えてプロバイオティクス投与することは、有害菌の少ないより良い腸内環境を作る可能性が示唆されたことから、加齢による全身免疫力低下を予防することにも有用である可能性が考えられた。さらに、最近の研究では腸内細菌の有害菌より産生される物質と高血圧や糖尿病などの生活習慣病、認知症との関連性が次第に明らかにされてきている。つまり、今回検討した治療法は免疫低下による肺炎などの疾患以外に高齢者特有の様々な疾患発症を予防に役立つ可能性を期待させるものと思われる。

一方、動物実験よりは、加齢マウスにおける高繊維食負荷の有無による糞便中の短鎖脂肪酸の加齢を解析したが、有意な変化はみられなかった。しかし、腸内細菌叢の検討からは、門レベルの解析では加齢的变化は認めなかったものの、種レベルで解析を行うと、加齢によって Akkermansia muciniphila 菌の割合が減少し、水溶性イソフラボン投与によって改善していることが分かった。Akkermansia muciniphila 菌はヒトの腸内にも存在するムチン分解菌であり、近年では肥満や糖尿病、炎症への関連性が多く報告されているため、Soyaflavone HG は炎症誘導モデルだけでなく自然加齢変化に対する有益な効果がある可能

性が示唆された。

今後、この高齢者の便秘改善およびマウスの介入実験の研究結果を基に便秘解消やプロバイオティクス内服治療による腸内細菌の改善が、高齢者の免疫能の維持や肺炎などの全身免疫能低下による疾病の発症の予防に本当に寄与しているかに関する発展的長期的縦断研究を令和2年度から開始する予定としている。

便秘患者に関する検証に関しては、まだ症例数が少ないため、便秘解消による腸内細菌叢変化の仮説を立証するにはさらに症例蓄積して、検証を重ねる必要があると考えられた。また、今後はよりADLの悪い患者や薬剤性便秘の患者を対象にして、これらの検証を行い、便秘薬とプロバイオティクスの併用がより効果的な便秘治療法である可能性を探索することと、腸内細菌環境保持が患者の健康予後の改善に寄与するかの長期的な縦断的検討をする必要があると考えられた。

E. 健康危険情報：なし

F. 研究発表

論文発表（主任研究者）

2019年度

1. 松浦俊博；サルコペニアの診断と治療～わが国におけるサルコペニアの現状と対策をふまえて～ 消化器・肝臓内科 5、78-83 2019
2. 松浦俊博；新介護福祉士テキスト シリーズ 建帛社『生活支援の基礎知識 [こころとからだのしくみ]』 消化器系 2019

2017年度

1. 松浦俊博：高齢者胃潰瘍について 2017

論文発表（分担研究者）

2019年度

1. Kim SE, Kawaguchi K, Hayashi H, Furusho K, Maruyama M; Remission Effects of Dietary Soybean Isoflavones on DSS-Induced Murine Colitis and an LPS-Activated Macrophage Cell Line. *Nutrients* 11, 1746, 2019
2. Morita Y, Maruyama M et al; Long-term intake of *Lactobacillus paracasei* KW3110 prevents age-related chronic inflammation and retinal cell loss in physiologically aged mice. *Aging.*, 10(10)2723-2740, 2018.

2018年度

1. Morita Y, Maruyama M et al. Long-term intake of *Lactobacillus paracasei* KW3110 prevents age-related chronic inflammation and retinal cell loss in physiologically aged mice. *Aging.*, 10(10)2723-2740, 2018.
- 2.

2017年度

1. Sakamoto A, Matsuda T, Kawaguchi K, Takaoka A, Maruyama M. ;  
Involvement of Zizimin2/3 in the age-related defect of peritoneal B-1a  
cells as a source of anti-bacterial IgM. *Int Immunol.* 2017 Nov  
1;29(9):431-438.
2. 丸山光生 特集:「老年医学を支える基礎老化研究、*Geriatric Medicine 老年医  
学*(2017) Vol. 55 (5):469-470
3. 坂本明彦、丸山光生 「細胞老化と個体老化」*病理と臨床*(2018) 36(2): 98-101

学会発表 (主任研究者)

2019年度

1. 松浦俊博; 高齢者の食欲不振と消化機能との関連に関する検討 第61回老年医  
学会学術集会 2019. 6. 仙台
2. 松浦俊博; ターミナル期の患者への食事に対する満足度をあげる関わり 第24回  
日本緩和医療学会 2019. 6. 横浜

2018年度

1. 松浦俊博; 高齢者の終末期にあるがん患者の退院先の決定に及ぼす影響因子  
第72回国立病院総合医学会 2018 神戸

学会発表 (分担研究者)

2019年度

1. Maruyama M; Infrastructure and Platform Building for Geroscience in Japan.  
*Asian Geroscience Conferences* May, 2019, Shenzhen China
2. 丸山光生; 水溶性大豆イソフラボン SoyaFlavone HG の抗炎症効果と腸内細菌叢  
に与える影響と加齢変化の関連. 第22回不二たん白研究報告会 2018. 5. 東  
京
3. 丸山光生; 水溶性大豆イソフラボンが腸内細菌叢に与える影響と加齢変化. 第  
42回日本基礎老化学会大会、2019. 6. 仙台
4. 金湘殷、亀井優香、木村郁生、國澤 純、丸山 光生. 水溶性大豆イソフラボン  
が腸内細菌叢に与える影響と加齢変化. 第42回日本基礎老化学会大会、2019. 6.  
仙台

2018年度

1. Maruyama M ; Summary Report in Aging Biology. ICAH-NCGG symposium, May 11,  
2018, Taipei.

2017年度

1. 城内健太、森田悠治、松田剛典、桐浴隆嘉、坂本明彦、藤原大介、丸山光生  
*Effects of food constituents on immunosenescence in physiological aged*

mice. 第40回日本基礎老化学会大会 2017年6月16日 名古屋

2. Maruyama M, Sakamoto A, Matsuda T, Matsui N, Takaoka A. Concomitant deletion of Zizimin2/3 to mimic impaired protective immunity in aged mice. Gordon Research Conferences (Aging Biology of), July 11, 2017. Les Diablerets, Switzerland
3. Maruyama M, Jounai K, Sakamoto A, Morita Y, Kirisako T, Matsuda T, Fujiwara D. A novel food constituent potentially mitigates inflammation in physiologically aged mice. IAGG 2017 World Congress. July 24, 2017. San Francisco, CA, USA
4. Akatsu H, Arai S, Tanaka T, Kamiya A, Arakawa K, Masaki Y, Tanaka H, Kanematsu T, Ohara H, Inoue K, Xia J-Z, Maruyama M, Investigation on the effect of aminolevulinic acid on intestinal environment of aging mice 39th ESPEN CONGRESS. Sep 10, 2017. Hague, Nederland
5. Maruyama M, Sakamoto A, Takaoka A Zizimin2-deficient mice showing defective production of natural antibacterial immunoglobulin M and interruption in B-cell development 19th GCC. Sep 14, 2017. Venice, Italy
6. Sakamoto A, Takaoka A, Maruyama M; Putative function of Zizimin2/3 in Immunosenescence of peritoneal B-1a cells as a source of natural antibacterial IgM KEYSTONE SYMPOSIA, Feb 27, 2018, Texas, USA

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし