

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告

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 消化器内科診療部（部長）

研究要旨

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。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オ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う。

主任研究者

松浦 俊博 国立長寿医療研究センター 消化器内科診療部（部長）

分担研究者

京兼 和宏 国立長寿医療研究センター 消化器内科診療部・内視鏡診療科（医長）

山田 理 国立長寿医療研究センター 消化器内科診療部（医師）

久野 裕司 国立長寿医療研究センター 消化器内科診療部・消化器内科診療科(医長)

丸山 光生 国立長寿医療研究センター 研究所（副所長）

A. 研究目的

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
ことが期待されている。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秘異常を引き起こしている可能性が、細菌示唆された。

本研究の目的は、高齢者での便秘異常と腸内細菌叢（16S rRNA を指標とする次世代シ
ークエ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。便秘異常改善薬には、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。このため、腸内細菌叢の
状況と薬剤介入をすることによる変化および便秘異常改善の有無を調査して、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。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

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う。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する。

（H29. 8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する。

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 (菌叢解析) を行った。腸内細菌を 8 グループに分類して各グループ間で 3 ヶ月齢から 22 ヶ月齢間の加齢変化がみられるものを考察し、菌叢解析全体の中での占有率も検討した。

(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で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

平成 30 年 1 月末までに、A 群 6 例、B 群 2 例が調査終了した。患者背景因子に関しては、症例は少数ではあるが、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。患者の QOL に関しては、HADS スコアで検討した。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のためか、心配度スコアは全症例で 0~2 点と低値でうつ度スコアも B 群の 1 例のみ 9 点であったが、その他の 7 例は 0~3 点で QOL は問題なかった。このうつ度スコアやや高い症例も介入後に 3 点と低下していた。同様に、生活機能調査は基本的 ADL (Barthel index) で評価したが、ほぼ正常であった。

まず、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。グラフに示すように、両群とも週に回の排便回数が、介入前に A 群では週に 2.1 回 B 群では 2.3 回であったが、12 週目では A 群では週に 5.8 回 B 群では 6.0 回と著明に改善していた。

次に、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、1.7、B 群では 2.5 であったが、12 週間後には A 群で 4.2、B 群で 3.5 と改善していた。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、症状改善に極めて有効であった。

さらに、介入前後の腸内細菌の変化について検討した。ヒト試験における「年齢と腸内菌叢」の加齢変化をみても属のレベルで *Proteo-bacteria* が増加し、*Firmicutes* が減少するというある程度の傾向がみる事が報告されている。当研究での現在までの検証では、A 群の介入前で *Proteo-bacteria* が少なく、*Actinobacteria* が想定以上に多い感はあるものの、B 群の介入前ではほぼ同様な傾向であった。A 群では便秘の改善にとヨーグルトの摂取症例がやや多かったことが一因と考えられ、さらなる蓄積が必要と思われた。

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* 門の増加していた。

一方、B 群では *Proteobacteria* 門の菌株数と構成割合の著明な減少が際立ち、*Actinobacteria* 属の菌株数と構成割合の著明な増加をみた、*Firmicutes* は菌株数の大きな差は見られなかったが、*Proteobacteria* と *Bacteroides* 門の減少が大きいため構成割合が相対的に増加していた。

マウスの腸内細菌では、各月齢マウスの腸内細菌占有率を解析するとマイナーな集団であるが、*Turicibacter*、*Clostridiaceae*; g₁、CW040f_F16; g₂等が含まれるグループ菌属が加齢に伴い、高齢群で増加がみられた。

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、症状改善に大きな差は極めて有効であった。しかし、A 群と B 群に明らかな相違はなく、便秘の改善という点に限ると通常の便秘薬のみでよいとの結果でプロバイオティクス併用の効果は見られなかった。一方、腸内細菌の結果よりは、便秘薬の介入群では、日和見感染の原因とされる *Bacteroides* 門の減少が見られた。また、プロバイオティクス併用では、*Bacteroides* 門の減少に加えて、一般的に悪玉菌とされる *Proteobacteria* 門の著明な減少と、当然ながら善玉菌とされる *Actinobacteria* 門が増加していた。

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 *Bacteroides* 門の減少効果につながる可能性が考えられた。しかし、今回の検証からは、便秘の改善と *Proteobacteria* 門の変化の関連性は低いとの結果であった。すなわち、便秘薬にプロバイオティクスを加えることにより、*Proteobacteria* 門から *Actinobacteria* 門への置き換え効果が *Bacteroides* 門の減少効果に上乗せされ、腸内細菌叢をより良い状態にたもてる可能性が示唆

された。また、マウスの腸内細菌の検討では、加齢による菌叢変動の明確な結果は現状までの検討で得られなかった。

便秘患者に関する検証に関しては、まだ症例数が極めてすくないため、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。マウスの腸内細菌の加齢変化もまだ検討段階であり、今後はマウス個体の n 数を増やすことや短鎖脂肪酸など、その腸内代謝産物の変化についても検証していくことで、腸内細菌叢そのものを制御する宿主の生体防御能（腸管免疫系）の加齢変化とリンクさせていく予定としている。

E. 健康危険情報 : 該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表 :

- 1) 松浦俊博：高齢者胃潰瘍について 2017
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) 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

2. 学会発表

- 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