

《原著》

過敏性腸症候群 (IBS) における腸内細菌叢の検討

秋元直樹¹, 高橋一平¹, 沢田かほり¹,
佐藤諭¹, 甲斐知彦², 谷川涼子³,
森隆志¹, 福田眞作⁴, 中根明夫⁵,
中路重之¹

- 1 弘前大学大学院医学研究科社会医学講座
- 2 関西学院大学
- 3 青森県立あすなろ療育福祉センター
- 4 弘前大学大学院医学研究科消化器血液内科学講座
- 5 弘前大学大学院医学研究科感染生体防御学講座

キーワード

1. 過敏性腸症候群 (IBS)
2. 腸内細菌
3. 脳腸相関
4. 性差
5. 加齢

【諸言】過敏性腸症候群 (IBS) は QOL を大きく損なう疾患であり、その有病率は就業年齢層で高いため、予防法や治療法の開発は急務とされる。しかし、腸内細菌バランスと IBS の関連の機序は明らかになっていない。

【方法】我々は一般住民 1012 名 (男性 394 名、女性 618 名) を対象として、男女および 50 歳前後の 4 群に分け、IBS の罹患状況と腸内細菌バランスの関係について検討した。

【結果】50 歳未満の男女において IBS の罹患リスクは *Bifidobacterium* (属) の割合が高い程小さく、さらに 50 歳未満の女性において *Clostridiales* (目) の割合が高い程大きかった。50 歳以上の男性において IBS の罹患リスクは *Prevotella* (属) の割合が高い程大きかった。50 歳以上の女性において IBS の罹患リスクは *Clostridiales* (目) の割合が高い程小さく、*Anaerotruncus* (属) の割合が高い程大きかった。

【考察】若年者においては主に脳腸相関を介した反応が IBS のリスクに関与し、高齢者においては慢性炎症が IBS のリスクを上昇させることが示唆された。

体力・栄養・免疫学雑誌 第 26 巻 第 1 号 22-32 頁 2016 年

【諸言】

過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome : IBS) は、通常の臨床検査では器質的な異常が認められないものの、腹痛あるいは腹部不快感とそれに関連する便通異常が慢性もしくは再発性に持続する状態と定義される¹⁾。IBS の生命予後は悪くないが、罹患者の心身的、社会的な健康度を損なうために生活の質が低下する²⁾。その有病率は 10 - 20% であり特に就業年齢層で高いため^{1,3,4)}、その予防法や治療法の開発は急務とされる。しかし、IBS の有病率が女性で高いことや高齢者では発症率が低いといった、IBS の性差や加齢の機序については明らかになっていない。

これまで IBS の病因として免疫異常、食物アレルギー、腸管運動の異常、腸管粘膜の慢性炎症、精神的ストレス、食習慣等の生活習慣といった様々な要因が挙げられてきたが^{4,5)}、近年、下痢や抗生物質の投与後に IBS を発症するリスクが上昇することが報告されたことから^{6,7)}、腸内細菌叢がその発症や増悪に関与している可能性が注目され、多くの研究が行われてきた。すなわち、腸内細菌叢を混乱させると考えられる感染性胃腸炎や抗生物質投与後の患者を追跡した結果、IBS

の発症率がコントロール群と比較して有意に高い結果が認められ、腸内細菌叢の乱れによって IBS の発症リスクが高まると考えられた。また、腸内でいくつかの菌が異常増殖することにより腸内細菌叢のバランスが崩れ、IBS が発症する例も報告されている⁸⁾。これに対して、IBS の原因腸内細菌に対する抗生物質投与⁹⁾、腸内細菌のバランスを整えると考えられている乳酸菌の摂取 (プロバイオティクス)¹⁰⁾、オリゴ糖などのプレバイオティクス¹¹⁾により IBS 症状が改善される可能性が指摘されている。このように、現在、IBS の関連として *Bifidobacterium* (属) の減少や *Veillonella* (属)、*Lactobacillus* (属) の増加等、多くの報告が挙げられているが¹²⁻¹⁴⁾、一方で、関連はみられないとする報告や *Lactobacillus* (属) の減少がみられるといった反対の結果を示す文献もみられ^{15,16)}、一定の見解は得られていない。

これまで腸内細菌叢と IBS の関係について検討した研究は、数十人規模の患者と年齢や性別をマッチさせた対照群を対象としたものが多かった。その理由は、初期の研究は腸内細菌叢を時間のかかる培養法によって検討していたことにより、多くの対象について検討

することが出来なかったためと考えられる。また、培養法では、腸内に多数存在する偏性嫌気性菌等の培養は困難であり、培養可能な菌のみについての検討しか出来なかった。そのため、腸内細菌叢について全体を網羅した検討は行われていなかった。近年、細菌の DNA や RNA を用いて検討を行う T-RFLP 法や次世代シーケンス解析を用いることで、培養困難な菌を含む腸内細菌叢を網羅的に検討することが可能になり、それらを用いた研究も行われるようになってきた^{17,18)}。しかし、IBS の有病率は男女および年齢によって異なることから、その病態も異なる可能性がある。そのため、本来は年齢や性別についての検討が必要であると考えられるにもかかわらず、これまでの研究ではそれらを考慮した検討は行われていなかった。その理由として、患者を対象としているために、対象者の年齢は平均 50 歳未満の研究が多く、高齢者における検討が不十分となっていたことが一因と考えられる。さらに、これまで IBS と腸内細菌叢の関連について検討を行った研究では門レベルから種のレベルまで、様々な細菌分類の段階について検討が行われている¹²⁻¹⁸⁾。しかし、門レベル等の全体的なバランスと、属レベル等の、下位の分類について同時に検討したものはみられず、これまでの研究では IBS の病因が全体的なバランスの変化によるものか、一部の細菌の異常増殖によるものなのかを検討できず、詳細なメカニズムの解明は行われていなかった。本研究によって、腸内細菌叢と IBS の関係について、これまで不透明であった性別や加齢との関係について明らかにすることができると考えられた。

我々は青森県弘前市の一般住民を対象として、IBS と腸内細菌叢の関係について、次世代シーケンサーによる解析を用いて、年齢や性別を考慮した詳細な検討を行った。生活習慣や BMI、抑うつ傾向の有無が IBS の発症や病態に影響を及ぼすことも知られているため⁹⁾、本研究ではこれらの要因について調整を行った。また、腸内細菌叢の全体的なバランスと下位の項目を検討するため、最初に order (目) レベルについての検討を行い、有意な傾向がみられた細菌群において、さらに family (科)、genus (属) と、下位の分類について解析を行った。先行研究によって、IBS の有病率は加齢によって低下し、特に 50 歳前後で比較した場合に若年者の有病率が有意に高いことが報告されているため¹⁹⁾、本研究では年齢を 50 歳前後で群分けして解析を行った。

【方法】

1. 対象

対象は、2014 年度の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一般住民 1167 名の内、欠損項目のある者、消化管悪性新生物・炎症性腸疾患の既往のある者、下剤・抗生物質を内服している者を除いた 1012 名 (男性 394 名、女性 618 名) を対象とした。このプロジェクトは日本の青森県弘前市の岩木地区住民のうち希望者を対象とし、生活習慣病予防と健康の維持・増進、寿命の延長を目指して企画されたものである。被験者には検査の目的と方法を説明し、あらかじめ文書で同意を得た。本調査は弘前大学医学部倫理委員会の承認を得た。

2. 調査・測定項目

対象者には事前に自己記入式の質問用紙を配布し、プロジェクト健診当日に個人面接を行い、回答の確認後に回収した。調査項目は、性別、年齢、現病歴、既往歴、内服歴、喫煙・飲酒・運動習慣の有無について、抑うつ度の自己評価尺度として CES-D (center for epidemiologic studies depression scale)²⁰⁾、Rome III 診断基準²¹⁾を基に作成した排便状況についての質問票を用いて IBS の罹患について調査した。CES-D については 16 点以上を抑うつ傾向ありとした。

また、測定項目として、身長・体重を測定し、body mass index (BMI) (体重 (kg) / 身長 (m)²) を算出した。

3. 腸内細菌叢の解析

自己記入式質問用紙の配布に併せて、便検体の回収容器として採便キットを配布し、プロジェクト健診当日にキットを回収した。健診終了後に静岡県静岡市の株式会社テクノスルガ・ラボに移送し、解析を行った。腸内細菌叢の解析は 16SrDNA 部分を用いた次世代シーケンス解析とテクノスルガ・ラボ微生物同定データベース DB-BA 9.0 による菌種の推定を行った。本データベースはテクノスルガ・ラボと国立遺伝学研究所との共同開発によって構築された細菌の 16SrDNA 領域のデータベースである。基準株の 16SrDNA 領域のデータのみに限定することで、多くの検体をより短時間で解析出来ることを可能にしたデータベースであり、腸内細菌叢と肥満や大腸癌等との関連をみた研究に利用されている²²⁻²⁴⁾。

プロジェクト健診時に回収した便検体について、ジルコニアビーズを用いて FastPrep FP100A Instrument (MP Biomedicals, USA) による破碎を行った懸濁液 200 μ L について、Magratration System 12GC (Precision System Science, Japan) および MagDEA DNA 200 (Precision System Science) を用いて細菌 DNA の抽出を行った。最終的に ND-1000 (NanDrop Technologies, USA) を用いて DNA サンプルを 10 ng/ μ L に調整した。

表 1-a 対象者の特徴

	男性			女性		
	50 歳未満	50 歳以上		50 歳未満	50 歳以上	
人数	174	220		208	410	
年齢	37.7 ±7.3	63.6 ±8.2	**	37.1 ±7.9	63.9 ±7.9	**、††
BMI	23.7 ±3.5	23.5 ±2.7		21.4 ±3.6	22.8 ±3.1	**、#、††
喫煙習慣あり	70 (40.2%)	55 (25.0%)	**	25 (12.0%)	20 (4.9%)	**、#、††
飲酒習慣あり	114 (65.5%)	158 (71.8%)		76 (36.5%)	91 (22.2%)	**、#、††
運動習慣あり	55 (31.6%)	74 (33.6%)		48 (23.1%)	163 (39.8%)	††
抑うつ傾向あり	20 (11.5%)	20 (9.1%)		45 (21.6%)	70 (17.1%)	#
IBS 罹患あり	12 (6.9%)	6 (2.7%)		14 (6.7%)	15 (3.7%)	

平均値±標準偏差 または 人数 (%) 一元配置分散分析 または カイ 2 乗検定

** : p<0.01 50 歳未満男性との比較

: p<0.05, ## : p<0.01 50 歳以上男性との比較

†† : p<0.01 50 歳未満女性との比較

表 1-b order (目) レベルにおける腸内細菌バランスの比較

	男性			女性		
	50 歳未満	50 歳以上		50 歳未満	50 歳以上	
<i>Bacteroidales</i> (目)	28.7 ± 9.9	25.8 ± 10.2	**	26.0 ± 8.9	23.7 ± 9.0	**、#、†
<i>Bifidobacteriales</i> (目)	6.0 ± 6.2	4.5 ± 6.9		8.2 ± 6.8	5.2 ± 6.6	††
<i>Clostridiales</i> (目)	32.7 ± 9.7	33.0 ± 10.4		33.4 ± 9.3	36.5 ± 9.9	**、##、††
<i>Lactobacillales</i> (目)	1.8 ± 3.3	4.8 ± 7.6	**	2.3 ± 4.4	3.5 ± 5.5	**、†

平均値±標準偏差 一元配置分散分析

* : p<0.05, ** : p<0.01 50 歳未満男性との比較

: p<0.05, ## : p<0.01 50 歳以上男性との比較

† : p<0.05, †† : p<0.01 50 歳未満女性との比較

次に、細菌の 16S rDNA における V3-V4 領域の約 430bp を増幅するためのプライマーである Pro341F および Pro805R を使用し、Rotor-Gene Q quantitative thermal cycler (Qiagen Germany) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 増幅された DNA について、Illumina Miseq Reagent Kit version 2 および Illumina Miseq sequencing system (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてプライマーを除く約 430bp を決定した。

得られた DNA 配列について、Metagenome@KIN analysis software (World Fusion, Japan) を用いて、データベースとして、TechnoSuruga Lab Microbial Identification database DB-BA 9.0 (TechnoSuruga Laboratory, Japan) を用いて細菌の検索を行った。DNA の識別は 97% 以上の相率率が得られたものの中で最上位の菌種を近縁種として推定した。次世代シーケンシング解析は Takahashi らの方法に従った²⁵⁾。

得られた菌種について、order (目)、family (科)、genus (属) の各段階について、全体に対する割合を百分率で算出し、解析に用いた。

4. 統計解析

対象を男女に分け、さらに 50 歳未満と 50 歳以上の群に分けた。各群について、IBS 罹患の有無と腸内細菌叢との関連について、ロジスティック回帰分析による検討を行った。解析時には、年齢、BMI、抑うつ傾向の有無、飲酒・喫煙・運動習慣の有無を調整項目とした。本研究において、目レベルでは約 50 項目が検出されたものの、大部分の項目は平均割合が 1% 未満と低い割合であった。そのため、目レベルでの解析はこれらの項目を除いた 4 項目 (*Bacteroidales*、*Bifidobacteriales*、*Clostridiales*、*Lactobacillales*) に対して行い、その後の解析は有意な傾向がみられた項目に対して、family (科)、genus (属) とより下位の分類について検討を行った。本研究においては、上記 4 項目の合計で腸内細菌叢の約 7 割を占めていた。解析には SPSS ver.12.0J (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) を用いた。本研究においては、有意水準を p<0.05 とし、p<0.1 を傾向ありとした。

【結果】

表 2 過敏性腸症候群 (IBS) と腸内細菌叢の関係 (目レベル)

	order (目)	男性		女性	
		Exp (B)	p	Exp (B)	p
50 歳未満	<i>Bacteroidales</i>	1.000	0.995	1.020	0.566
	<i>Bifidobacteriales</i>	0.851	0.075	0.872	0.044
	<i>Clostridiales</i>	1.022	0.575	1.063	0.057
	<i>Lactobacillales</i>	0.996	0.972	0.937	0.679
50 歳以上	<i>Bacteroidales</i>	1.104	0.069	1.044	0.132
	<i>Bifidobacteriales</i>	0.817	0.233	1.035	0.311
	<i>Clostridiales</i>	0.944	0.181	0.920	0.002
	<i>Lactobacillales</i>	0.989	0.878	0.935	0.466

ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

表 3-a 50 歳未満の男女における IBS と *Bifidobacteriales* (目) の細菌の関係

<i>Bifidobacteriales</i> (目)	男性			女性		
	割合 (%)	Exp (B)	p	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Bifidobacteriaceae</i> (科)	5.96	0.851	0.075	8.18	0.872	0.044

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

表 3-b 50 歳未満の男女における IBS と *Bifidobacteriaceae* (科) の細菌の関係

<i>Bifidobacteriaceae</i> (科)	男性			女性		
	割合 (%)	Exp (B)	p	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Alloscardovia</i> (属)	3.60×10^{-4}	0.000	0.998	1.88×10^{-4}	0.000	0.999
<i>Bifidobacterium</i> (属)	5.96	0.851	0.075	8.18	0.872	0.044
<i>Gardnerella</i> (属)	5.17×10^{-5}	0.000	1.000	8.52×10^{-4}	6.13×10^{-55}	0.600
<i>Parascardovia</i> (属)	1.01×10^{-4}	0.000	0.999	1.91×10^{-4}	3.31×10^{89}	0.365
<i>Scardovia</i> (属)	6.21×10^{-5}	0.000	0.999	2.49×10^{-4}	0.000	0.999

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

対象者の特徴を表 1 に示す。BMI、喫煙習慣のある者の割合、飲酒習慣のある者の割合については、男性と比較して女性で有意に低い結果がみられた。運動習慣のある者の割合は 50 歳未満の女性において低い結果がみられた。抑うつ傾向のある者の割合は男性と比較して女性において高い結果がみられた。IBS の罹患の有無については、有意な差はみられなかったものの、50 歳未満の群において割合が高い傾向がみられた。また、*Bacteroidales* (目) の割合は、女性と比較して男性において高く、男女共に 50 歳未満の群において高い結果がみられた。*Bifidobacteriales* (目) の割合は 50 歳未満の女性において他の群と比較して高値であった。*Clostridiales* (目) の割合は 50 歳以上の女性において他の群と比較して高値であった。*Lactobacillales* (目) の割合は男女ともに 50 歳以上の群において高値であった。

IBS と腸内細菌叢の関係について、目レベルにおける解析結果を表 2 に示す。50 歳未満の男性において、*Bifidobacteriales* (目) の割合が高い程 IBS のリスクが小さい傾向がみられ、その割合は 1%上がる毎に 0.851 倍であった ($p=0.075$)。50 歳未満の女性においては *Bifidobacteriales* (目) の割合が高い程リスクが有意に低下し、その割合は 1%上がる毎に 0.872 倍であった ($p=0.044$)。50 歳未満の女性において、*Clostridiales* (目) の割合が高い程 IBS のリスクが大きい傾向がみられ、その割合は 1%上がる毎に 1.063 倍であった ($p=0.057$)。50 歳以上の男性において、*Bacteroidales* (目) の割合が高い程 IBS のリスクが大きい傾向がみられ、その割合は 1%上がる毎に 1.104 倍であった ($p=0.069$)。50 歳以上の女性において、*Clostridiales* (目) の割合が高い程 IBS のリスクが有意に小さく、その割合は 1%上がる毎に 0.920 倍であった ($p=0.002$)。これらの有意

表 4-a 50 歳未満の女性における IBS と *Clostridiales* (目) の細菌の関係

<i>Clostridiales</i> (目)	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Christensenellaceae</i> (科)	1.17×10^{-3}	0.000	0.753
<i>Clostridiaceae</i> (科)	1.71	0.804	0.312
<i>Clostridiales Family XI</i> (科)	8.84×10^{-3}	9254.926	0.572
<i>Clostridiales Family XIII</i> (科)	9.18×10^{-4}	2.81×10^{40}	0.186
<i>Eubacteriaceae</i> (科)	3.71	1.163	0.068
<i>Lachnospiraceae</i> (科)	16.73	1.090	0.076
<i>Oscillospiraceae</i> (科)	4.81×10^{-3}	0.000	1.000
<i>Peptococcaceae</i> (科)	8.90×10^{-4}	0.000	0.997
<i>Peptostreptococcaceae</i> (科)	1.11	0.971	0.853
<i>Ruminococcaceae</i> (科)	9.93	1.044	0.409

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

表 4-b 50 歳未満の女性における IBS と *Eubacteriaceae* (科) の細菌の関係

<i>Eubacteriaceae</i> (科)	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Eubacterium</i> (属)	3.71	1.163	0.068
<i>Pseudoramibacter</i> (属)	1.55×10^{-4}	0.000	0.999

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

表 4-c 50 歳未満の女性における IBS と *Lachnospiraceae* (科) の細菌の関係

<i>Lachnospiraceae</i> (科)	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Anaerostipes</i> (属)	1.77	1.292	0.193
<i>Blautia</i> (属)	12.01	1.053	0.318
<i>Butyrivibrio</i> (属)	9.67×10^{-5}	0.000	0.999
<i>Cellulosilyticum</i> (属)	5.52×10^{-5}	1.58×10^{279}	0.106
<i>Coproccoccus</i> (属)	0.68	1.661	0.054
<i>Dorea</i> (属)	1.04	1.714	0.055
<i>Hespellia</i> (属)	2.99×10^{-2}	59.833	0.396
<i>Lachnoanaerobaculum</i> (属)	1.66×10^{-5}	0.000	1.000
<i>Lachnospira</i> (属)	0.18	0.648	0.690
<i>Marvinbryantia</i> (属)	1.76×10^{-3}	2.12×10^{-23}	0.465
<i>Oribacterium</i> (属)	4.63×10^{-4}	0.000	0.998
<i>Parasporobacterium</i> (属)	1.16×10^{-4}	5.01×10^{81}	0.480
<i>Pseudobutyrvibrio</i> (属)	2.18×10^{-3}	0.000	0.994
<i>Robinsoniella</i> (属)	1.46×10^{-4}	0.000	0.999
<i>Roseburia</i> (属)	1.03	0.928	0.791
<i>Shuttleworthia</i> (属)	3.73×10^{-5}	0.000	0.999
<i>Syntrophococcus</i> (属)	1.78×10^{-5}	0.000	1.000

ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

な結果又は傾向がみられた項目について、さらに下位レベルにおける解析を行った。

50 歳未満の男女における IBS と *Bifidobacteriales* (目) の細菌の関係を表 3 に示す。50 歳未満の男性において

は *Bifidobacteriaceae* (科)、さらに下位の *Bifidobacterium* (属) の割合が高い程リスクが小さい傾向がみられ、その割合は 1%上がる毎に 0.851 倍であった (共に $p = 0.075$)。50 歳未満の女性においては

表 5-a 50 歳以上の男性における IBS と *Bacteroidales* (目) の細菌の関係

<i>Bacteroidales</i> (目)	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Bacteroidaceae</i> (科)	14.42	0.959	0.402
<i>Porphyromonadaceae</i> (科)	1.55	0.630	0.314
<i>Prevotellaceae</i> (科)	9.27	1.070	0.036
<i>Rikenellaceae</i> (科)	0.54	0.514	0.466

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

表 5-b 50 歳以上の男性における IBS と *Prevotellaceae* (科) の細菌の関係

<i>Prevotellaceae</i> (科)	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Paraprevotella</i> (属)	0.20	1.776	0.408
<i>Prevotella</i> (属)	9.07	1.069	0.038

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

Bifidobacteriaceae (科)、さらに下位の *Bifidobacterium* (属) の割合が高い程リスクが小さく、その割合は 1% 上がる毎に 0.872 倍であった (共に $p=0.044$)。

50 歳未満の女性における IBS と *Clostridiales* (目) の細菌の関係を表 4 に示す。*Clostridiales* (目) の中で *Eubacteriaceae* (科) および *Lachnospiraceae* (科) の割合が高い程 IBS のリスクが大きい傾向がみられ、その割合は 1% 上がる毎にそれぞれ 1.163 倍、1.090 倍であった (各々 $p=0.068$, $p=0.076$)。 *Eubacteriaceae* (科) の中で *Eubacterium* (属) の割合が高い程 IBS のリスクが大きい傾向がみられ、その割合は 1% 上がる毎に 1.163 倍であった ($p=0.068$)。 *Lachnospiraceae* (科) の中で *Coprococcus* (属)、*Dorea* (属) の割合が高い程 IBS のリスクが大きい傾向がみられ、その割合は 1% 上がる毎にそれぞれ 1.661 倍、1.714 倍であった (各々 $p=0.054$, $p=0.055$)。

50 歳以上の男性における IBS と *Bacteroidales* (目) の細菌の関係を表 5 に示す。*Bacteroidales* (目) の中で *Prevotellaceae* (科) の割合が高いほどリスクが大きく、その割合は 1% 上がる毎に 1.070 倍であった ($p=0.036$)。 *Prevotellaceae* (科) の中で *Prevotella* (属) の割合が高いほどリスクが大きく、その割合は 1% 上がる毎に 1.069 倍であった ($p=0.038$)。

50 歳以上の女性における IBS と *Clostridiales* (目) の細菌の関係を表 6 に示す。*Clostridiales* (目) の中で *Lachnospiraceae* (科) および *Ruminococcaceae* (科) の割合が高い程 IBS のリスクが小さく、それぞれ 1% 上がる毎に 0.864 倍、0.879 倍であった (各々 $p=0.09$, $p=0.013$)。 *Lachnospiraceae* (科) の中で *Anaerostipes* (属)、*Coprococcus* (属) および *Hespellia* (属) の割合が高い程 IBS のリスクが小さい、または小さい傾向がみられ、それぞれ 1% 上がる毎に 0.510 倍、0.482 倍、0.079 倍で

あった (各々 $p=0.035$, $p=0.061$, $p=0.079$)。 *Ruminococcaceae* (科) の中で *Faecalibacterium* (属) および *Ruminococcus* (属) の割合が高い程 IBS のリスクが小さい、または小さい傾向がみられ、それぞれ 0.870 倍、0.795 倍であった (各々 $p=0.090$, $p=0.032$)。一方で、*Anaerotruncus* (属) の割合が高い程 IBS のリスクが大きく、その割合は 1% 大きくなる毎に 37667.3 倍であった ($p=0.040$)。

【考察】

本研究は、腸内細菌と IBS の関係について性別および加齢を考慮し、order (目)、family (科)、genus (属) の各段階において検討した初めての研究である。

現在、腸内細菌叢が IBS と関連する機序として、中枢神経系を介した経路 (脳腸相関) と腸管粘膜の慢性炎症を介する経路の 2 種類が主に想定されている^{26,27)}。中枢神経系を介した経路は、セロトニンの不足や CRH の過剰発現等によって、不安・抑うつ傾向や内臓知覚過敏の増悪が引き起こされ、IBS のリスクが上昇すると考えられている。これらの異常はセロトニンの前駆物質であるトリプトファンを産生する腸内細菌の減少や一部の腸内細菌の異常増殖によって引き起こされると考えられている。一方で、腸内細菌叢のバランスを整えることで不安や抑うつといった反応を抑制し、IBS のリスクを低下させると考えられている⁸⁾。しかし、中枢神経系を介した経路は加齢に伴い減弱するため²⁸⁾、高齢者では腸管粘膜の慢性炎症が IBS と腸内細菌叢をつなぐ主な機序と考えられる。すなわち、一部の腸内細菌の異常増殖によって腸管粘膜の慢性炎症が引き起こされることがその要因として考えられている。腸管粘膜の慢性炎症によって粘膜透過性が亢進し、病因となる物質が侵入した結果、ヒスタミンや炎症性サ

表 6-a 50 歳以上の女性における IBS と *Clostridiales* (目) の細菌の関係

<i>Clostridiales</i> (目)	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Christensenellaceae</i> (科)	1.41×10^{-3}	0.000	0.645
<i>Clostridiaceae</i> (科)	1.95	1.089	0.387
<i>Clostridiales</i> Family <i>XI</i> (科)	6.15×10^{-3}	100.326	0.628
<i>Clostridiales</i> Family <i>XIII</i> (科)	9.74×10^{-4}	4.74×10^{-50}	0.490
<i>Eubacteriaceae</i> (科)	4.24	0.912	0.400
<i>Lachnospiraceae</i> (科)	16.03	0.864	0.009
<i>Oscillospiraceae</i> (科)	6.10×10^{-2}	0.919	0.998
<i>Peptococcaceae</i> (科)	3.41×10^{-4}	193416978	0.836
<i>Peptostreptococcaceae</i> (科)	1.51	1.027	0.851
<i>Ruminococcaceae</i> (科)	12.47	0.879	0.013

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

表 6-b 50 歳以上の女性における IBS と *Lachnospiraceae* (科) の細菌の関係

<i>Lachnospiraceae</i> (科)	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Anaerostipes</i> (属)	1.59	0.510	0.035
<i>Blautia</i> (属)	10.30	0.923	0.220
<i>Butyrivibrio</i> (属)	1.32×10^{-2}	0.000	0.977
<i>Cellulosilyticum</i> (属)	4.84×10^{-3}	7.71×10^{-8}	0.771
<i>Coprococcus</i> (属)	1.15	0.482	0.061
<i>Dorea</i> (属)	1.07	0.668	0.250
<i>Hespellia</i> (属)	3.07×10^{-2}	4.32×10^{-10}	0.079
<i>Lachnoanaerobaculum</i> (属)	4.47×10^{-4}	2.20×10^{24}	0.497
<i>Lachnospira</i> (属)	0.24	0.379	0.356
<i>Marvinbryantia</i> (属)	5.27×10^{-3}	0.164	0.940
<i>Oribacterium</i> (属)	5.45×10^{-4}	6.94×10^{-8}	0.886
<i>Parasporobacterium</i> (属)	3.86×10^{-4}	0.000	0.997
<i>Pseudobutyrvibrio</i> (属)	7.87×10^{-3}	1.312	0.965
<i>Robinsoniella</i> (属)	7.49×10^{-3}	1.279	0.893
<i>Roseburia</i> (属)	1.60	0.795	0.314
<i>Shuttleworthia</i> (属)	6.32×10^{-5}	0.000	0.999

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

表 6-c 50 歳以上の女性における IBS と *Ruminococcaceae* (科) の細菌の関係

<i>Ruminococcaceae</i> (科)	割合 (%)	Exp (B)	p
<i>Acetivibrio</i> (属)	1.43×10^{-2}	0.000	0.977
<i>Anaerofilum</i> (属)	2.92×10^{-4}	0.000	0.998
<i>Anaerotruncus</i> (属)	8.65×10^{-3}	37667.3	0.040
<i>Faecalibacterium</i> (属)	6.09	0.870	0.090
<i>Ruminococcus</i> (属)	4.70	0.795	0.032
<i>Subdoligranulum</i> (属)	1.66	0.974	0.895

割合は平均値 ロジスティック回帰分析

調整項目：年齢, BMI, 喫煙・飲酒・運動習慣の有無, 抑うつ傾向の有無

イトカインが放出され、平滑筋の異常収縮等が引き起こされることで IBS のリスクが上昇すると考えられている。この原因となるものは、グラム陰性桿菌の菌体やメタン・アンモニアといった有害なガスと考えられている²⁷⁾。

本研究の結果、若年者においては男女共に *Bifidobacterium* (属) の割合が高くなることで IBS のリスクが低下する傾向が認められた。*Bifidobacterium* (属) はトリプトファン産生能を有することが知られており、ラットによる研究では *Bifidobacterium* (属) の *B. infantis* の摂取によって血中のトリプトファン濃度が上昇することが報告されている²⁹⁾。さらに、*Bifidobacterium* (属) は酢酸や乳酸を産生する乳酸菌であり、これらの酸が pH を低下させることで、病因となりうる細菌の増殖を抑える可能性が指摘されている^{13,30)}。したがって、50 歳未満の男女においては *Bifidobacterium* (属) の増加によって腸内細菌叢が整えられ、脳腸相関を介した精神的な安定が得られることで IBS のリスクが低下すると考えられた。

また、50 歳未満の女性において、*Clostridiales* (目) に属する *Eubacterium* (属) や *Coprococcus* (属)、*Dorea* (属) の割合が高い程 IBS のリスクが上昇する傾向が認められた。*Dorea* (属) については IBS 患者において増加しているとする報告がみられる¹⁴⁾が、*Eubacterium* (属) や *Coprococcus* (属) と IBS の関係については明らかにされていない。しかし、IBS 患者の便では *Clostridiales* (目) の細菌が産生する酢酸やプロピオン酸といった短鎖脂肪酸の量が増加していることが知られている。これらの酸は適度な量であれば腸管運動の促進等、人体に有益な作用が認められるが、過剰となった場合は脳腸相関を介して IBS のリスクを上昇させると考えられている¹³⁾。しかし、50 歳未満の男性においては *Clostridiales* (目) の増加によるリスクの上昇は認められなかった。先行研究によって、脳腸相関を介した情動反応は女性の方が強く、男性では女性と比較して弱いことが報告されており、男女で結果が異なる理由と考えられた³¹⁾。また、本研究において、抑うつ傾向のある者の割合が女性において有意に高いことも上記の傾向を支持するものと考えられた。

一方で、50 歳以上の男女においては *Bifidobacterium* (属) および *Clostridiales* (目) によるリスクの増減は認められなかった。脳腸相関を介した情動反応は加齢によって低下することが知られているため、50 歳以上の男女においてはこれらの菌による影響が認められなかった可能性が考えられた。

本結果より、50 歳以上の男性においては *Prevotella* (属) の増加が IBS のリスクを上昇させる可能性が考えられた。IBS 患者の小腸粘膜において、*Prevotellaceae*

(科) や *Prevotella* (属) が異常増殖していることが報告されている^{16,18)}が、そのメカニズムは明らかになっていない。一方で、これらの細菌は慢性炎症を引き起こして、大腸がんのリスクを上昇させることが知られている³²⁾。したがって、50 歳以上の男性において、*Prevotella* (属) は腸管粘膜の慢性炎症を介して IBS のリスクを増加させる可能性が示唆された。一方で、50 歳以上の女性においては上記の関係は認められなかった。女性における大腸がんの罹患率は男性と比較して有意に低いことが報告されており、その理由として、抗炎症作用のあるエストロゲンが関与していると考えられている³³⁾。さらに、腸内細菌叢における *Prevotella* (属) は男性と比較して女性において有意に低い可能性があることが指摘されている³⁴⁾。上記の機序は明らかになっていないが、本研究においても、年代に関わらず女性の *Prevotella* (属) の割合は男性の半分以下と有意に低かった。これらのことから、女性の場合は男性と比較して *Prevotella* (属) による影響が小さく、IBS のリスクとして認められなかった可能性が示唆された。

50 歳以上の女性においては、50 歳未満の女性においてリスクの上昇が示唆された *Clostridiales* (目) に属する細菌である *Anaerostipes* (属)、*Coprococcus* (属)、*Hespellia* (属)、*Faecalibacterium* (属)、*Ruminococcus* (属) の増加によってリスクが低下する可能性が示唆された。上記のように、高齢者においてこれらの菌の脳腸相関による IBS のリスクは小さいと考えられる。一方で、女性においては便秘型 IBS が多いことが知られており、高齢になるとさらにその傾向が強くなる。*Hespellia* (属) も含め、*Clostridiales* (目) に属する細菌は短鎖脂肪酸を産生することが知られている^{13,35)}。そのため、短鎖脂肪酸の増加による腸管運動の亢進が便秘に対して有利に働いた結果、IBS のリスクとしては低下として認められた可能性が推測された。

一方で、*Ruminococcaceae* (科) の *Anaerotruncus* (属) によるリスクの上昇が示唆された。*Anaerotruncus* (属) については、IBS との関連については検討されていないものの、腹部膨満感や腹痛を有する者において有意な増加が認められている³⁶⁾。ただし、その機序は明らかにされていない。本研究における解析の結果、*Hespellia* (属) や *Anaerotruncus* (属) が IBS の発症に関与している可能性が示唆されたものの、これらの細菌は今回の対象者の約半数において検出されず、さらに検出された者においてもその割合は 0.1%未満と非常に低い割合であったため、評価を行うことが難しいと考えられた。

本研究の限界点として、IBS の場合、下痢型、便秘型といった病型によって病因が異なる可能性があるが、IBS 患者の n 数が少なかったため、病型を分けた検討

を行うことができなかったことが挙げられる。また、本研究は横断研究であるため、腸内細菌バランスの変化が IBS の病因であるという因果関係については断定できない。さらに、本研究では腸内細菌として検出された項目について、それぞれの菌種単独での全体に対する割合を算出して検討を行った。そのため、腸内細菌の複合的な作用については検討していないことや全体に対する割合が非常に少ない場合には判定が難しく、これらについてはより詳細な検討が必要だと考えられた。

【結論】

本研究の結果、50 歳未満の者においては、男女ともに *Bifidobacterium* (属) の割合が高い程 IBS のリスクが小さく、女性においては *Clostridiales* (目) に属する細菌の割合が高い程リスクが大きくなる可能性が示唆された。50 歳以上の者においては、男性は *Prevotella* (属) の割合が高い程 IBS のリスクが大きく、女性は *Clostridiales* (目) に属する最近の割合が高い程リスクが小さくなる可能性が示唆された。

(受稿 2015/11/26 受理 2015/12/15)

【謝辞】

本論文の作成にあたり、本研究の趣旨を理解し快く協力していただいた岩木健康増進プロジェクト・

プロジェクト健診の参加者の皆様に心から感謝いたします。

なお本研究は文部科学省革新的イノベーション創出プログラム(COI STREAM、2013 -)「脳科学研究とビッグデータ解析の融合による画期的な疾患予兆発見の仕組み構築と予防法の開発」の助成を受けたものである。

【文献】

- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC: Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480-91.
- Si JM, Yu YC, Fan YJ, Chen SJ: Intestinal microecology and quality of life in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol* 2004;10:1802-5.
- Gwee KA: Irritable bowel syndrome in developing countries – a disorder of civilization or colonization. *Neurogastroenterol Motil* 2005;17:317-24.
- Kubo M, Fujiwara Y, Shiba M, Kohata Y, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe K, et al: Differences between risk factors among irritable bowel syndrome subtypes in Japanese adults. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:249-54.
- Kumeta K, Danjo K, Matsuzaka M, Takahashi I, Watanabe K, Iwane K, Ryosuke T, et al: PREVALENCE OF IRRITABLE BOWEL SYNDROME AND ITS RELATION TO LIFESTYLE AND DEPRESSION QUOTIENT IN A JAPANESE GENERAL POPULATION. *Hiroshima Med J* 2011;62:144-65.
- Gwee KA, Graham JC, McKendrick MW, Collins SM, Marshall JS, Walter SJ, Read NW : Psychometric scores and persistence of irritable bowel after infectious diarrhoea. *Lancet* 1996;347:150-3.
- Mendall MA, Kumar D: Antibiotic use, childhood affluence and irritable bowel syndrome(IBS). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:59-62.
- Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G: Irritable bowel syndrome: A microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol* 2014;20:14105-25.
- Pimentel M, Lembo A, Chey WD, Zakko S, Ringel Y, Yu J, Mareya SM, et al : Rifaximin Therapy for Patients with Irritable Bowel Syndrome without Constipation. *N Engl J Med* 2011;364:22-32.
- Yoon H, Park YS, Lee DH, Seo JG, Shin CM, Kim N : Effect of administering a multi-species probiotic mixture on the changes in fecal microbiota and symptoms of irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Biochem Nutr* 2015;57:129-34.
- Silk DB, Davis A, Vulevic J, Tzortzis G, Gibson R: Clinical trial: the effects of a trans - galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:508-18.
- Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkituokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, Malinen E, et al: The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects. *Gastroenterology* 2007;133:24-33.
- Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S: Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:512-9.
- Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, de Vos WM: Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:1792-801.

- 15) Matto J, Maunulselä L, Kajander K, Palva A, Korpela R, Kassinen A, Saarela M: Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome—a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43:213-22.
- 16) Dlugosz A, Winckler B, Lundin E, Zakikhany K, Sandstrom G, Ye W, Engstrand L, et al: No difference in small bowel microbiota between patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *Sci Rep* 2015; 17;5:8508. doi: 10.1038/srep08508.
- 17) Pozuelo M, Panda S, Santiago A, Mendez S, Accarino A, Santos J, Guamer F, et al : Reduction of butyrate-and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci Rep* 2015;4:5:12693. doi:10.1038/srep12693.
- 18) Chung CS, Chang PF, Liao CH, Lee TH, Chen Y, Lee YC, Wu MS, et al: Differences of microbiota in small bowel and faeces between irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Scand J Gastroenterol* 2015;23:1-10.
- 19) Lovell RM, Ford AC: Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;10:712-21.
- 20) LS Radloff: The CES-D Scale: A Self – Report Depression Scale for Research in the General Population. *Applied psychological measurement* 1977;1:385-401.
- 21) Drossman DA: The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006;130: 1377-90.
- 22) Takayoshi H, Kaori E, Kiyonori K: Inter- and intra-individual variations in seasonal and daily stabilities of the human gut microbiota in Japanese. *Arch Microbiol* 2015;197:919-34.
- 23) Chika K, Kazushi S, Isao M, Junichiro T, Yumi O, Hidekazu I, Masahiko T, et al: Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterology* *BMC Gastroenterol* 2015;15:100.doi: 10.1186/s12876-015-0330-2.
- 24) Chika K, Kazushi S, Isao M, Junichiro T, Yumi O, Hidekazu I, Masahiko T, et al: Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. *Oncol Rep* 2015;4:doi: 10.3892/or.2015.4398.
- 25) Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M : Development of a Prokaryotic UniversalPrimer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 2014;9: e105592. doi:10.1371/journal.pone.0105592.
- 26) Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ: Brain – gut microbiome interactions and functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2014;146:1500-12.
- 27) Talley NJ, Fodor AA: Bugs, stool, and the irritable bowel syndrome: too much is as bad as too little? *Gastroenterology* 2011;141:1555-9.
- 28) Saffrey MJ: Aging of the mammalian gastrointestinal tract: a complex organ system. *AGE* 2014;36:1019-32.
- 29) Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG: The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res* 2008;43:164-74.
- 30) Elamin EE1, Masclee AA, Dekker J, Pieters HJ, Jonkers DM: Short – Chain Fatty Acids Activate AMP-Activated Protein Kinase and Ameliorate Ethanol – Induces Intestinal Barrier Dysfunction in Caco - 2 Cell Monolayers. *J Nutr* 2013;143:1872-81.
- 31) Chang L, Toner BB, Fukudo S, Guthrie E, Locke GR, Norton NJ, Sperber AD: Gender, Age, Society, Culture, and the Patient's Perspective in the Functional Gastrointestinal Disorders. *GASTROENTEROLOGY* 2006;130:1435-46.
- 32) Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H: Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol* 2015 ; 6 : doi: 3389/fmicb. 2015.00020.
- 33) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, Lacroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, et al: Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321-33.
- 34) Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, et al: Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1027-33.
- 35) Whitehead TR, Cotta MA, Collins MD, Lawson PA: *Hespellia stercorisuis* gen. nov., sp.nov. and *Hespellia porcina* sp. Nov., isolated from swine manure storage pits. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:241-5.
- 36) Jalanka-Tuovinen J, Salonen A, Nikkila J, Immonen O,

Kekkonen R, Lahti L, Palva A, et al: Intestinal microbiota in healthy adults : temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal

symptoms. PLoS One 2011;6:e23035. Doi: 10.1371/journal.pone.0023035.

Study of Gut Microbiota on Irritable Bowel Syndrome (IBS)

Naoki AKIMOTO¹, Ippei TAKAHASHI¹, Kaori SAWADA¹, Satoshi SATO¹, Tomohiko KAI², Ryoko TANIKAWA³, Takashi MORI¹, Shinsaku HUKUDA⁴, Akio NAKANE⁵, Shigeyuki NAKAJI¹

1 Department of Social Medicine, Hirosaki University Graduate School of Medicine

2 Kwansei Gakuin University

3 Aomori Prefectural Asunaro Treatment and Care Center

4 Department of Gastroenterology and Hematology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

5 Department of Microbiology and Immunology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

Irritable bowel syndrome (IBS) has a great impact on the quality of life. As the peak prevalence of IBS is at working age, developments of appropriate prevention and treatment are essential. However, the mechanism including its relationship with gut microbiota remains unclear. In this study, association between IBS and microbiota was investigated using the data collected from 1012 adults (394 males and 618 females). Prior to the analyses, subjects were divided into two genders, and each gender group was further divided into two by separating them at the age of 50 years. As a result, genus *Bifidobacterium* was found to decrease the risk of IBS in both males and females under 50 years old. In females under the age of 50 years, order *Clostridiales* was found to increase the risk of IBS. However, in the females over 50 years old, it was found to decrease the risk, and *Anaerotruncus* was found to increase the risk of IBS instead. For males over 50 years old, genus *Prevotella* was found to increase the risk of IBS. Therefore, the brain-gut axis suggested to be associated with the risk of IBS in younger generation, while in older generation, chronic inflammation was suggested to increase the risk of IBS.

Key words: Irritable bowel syndrome (IBS) , gut microbiota, brain-gut axis, gender difference, aging

別刷請求先：高橋一平

〒036-8562 青森県弘前市在府町5 弘前大学大学院医学研究科社会医学講座

TEL: 0172-39-5041

FAX: 0172-39-5038

e-mail: ippei@hirosaki-u.ac.jp