

腸内細菌叢—腸—脳軸に着目した  
ストレス惹起性消化管機能異常の解析

たか じょう たけし

高 城 健

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

# 目 次

第 1 章 緒言	1
第 1 節 ストレスとは	1
第 2 節 視床下部—下垂体—副腎皮質軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis)	2
第 3 節 脳腸相関(brain-gut interaction)	2
第 4 節 脳腸相関と腸内細菌の関係	3
第 5 節 うつ病と腸内細菌との関係	4
第 6 節 現代社会におけるストレス	4
第 7 節 ストレスと過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS)	5
第 8 節 本検討における仮説と目的	5
第 2 章 急性ストレス負荷動物モデルを用いた腸内細菌叢 および消化管内臓知覚の変化の検討	7
第 1 節 目的	7
第 2 節 方法	7
第 1 項 動物	7
第 2 項 シヤトル箱法によるストレス負荷と行動試験	8
第 3 項 行動パターンの定義	8
第 4 項 Colorectal distension (CRD)	9
第 5 項 腸内細菌叢の解析	10
第 6 項 統計処理	10
第 3 節 結果	10
第 1 項 行動パターンの変化	10
第 2 項 CRD の閾値	11
第 3 項 腸内細菌の相対豊富度	11
第 4 項 腸内細菌叢の多様性	12

第 4 節 小括	13
第 3 章 水回避ストレスモデルを用いた内臓知覚過敏に対する 糞便微生物移植の有効性の検討	14
第 1 節 目的	14
第 2 節 方法	14
第 1 項 動物	14
第 2 項 糞便微生物移植 (fecal microbiota transplantation: FMT)	15
第 3 項 水回避ストレス(water avoidance stress: WAS)	15
第 4 項 CRD	15
第 5 項 腸内細菌叢の解析	15
第 6 項 統計処理	16
第 3 節 結果	16
第 1 項 CRD の閾値の変化量	16
第 2 項 腸内細菌の相対豊富度	17
第 3 項 腸内細菌叢の多様性	17
第 4 項 WAS 負荷前後における腸内細菌の変化	17
第 5 項 CRD の閾値の変化と腸内細菌の変化の相関	18
第 4 節 小括	18
第 4 章 水回避ストレスモデルを用いた内臓知覚過敏に対する 自家培養菌の有効性の検討	19
第 1 節 目的	19
第 2 節 方法	19
第 1 項 動物	19
第 2 項 自家培養菌の投与	19
第 3 項 WAS	20
第 4 項 CRD	20
第 5 項 大腸 mRNA の抽出と発現の評価	20

第 6 項	統計処理	21
第 3 節	結果	22
第 1 項	CRD の閾値の変化量	22
第 2 項	大腸タイトジャンクション mRNA 発現の変化	22
第 4 節	小括	22
第 5 章	総括	23
第 6 章	考察	24
第 1 節	急性ストレス負荷動物モデルにおける検討	24
第 2 節	WAS 負荷 IBS 動物モデルにおける検討	26
第 7 章	結論	30
	謝辞	31
	略語説明	32
	引用文献	33
	図表	41

# 第 1 章 緒言

## 第 1 節 ストレスとは

現代社会は「ストレス社会」であると形容されるほど，ストレスの存在は我々の健康状態と密接に関係している．日本においてストレスという概念が認知され始めたのは 1980 年代と比較的最近のことである．

元来，ストレスという単語は物理工学の分野で用いられていたものであり，「物体に外から圧力が加えられた際に生じる歪み」を意味していた．医学領域にストレスの概念を初めて持ち込んだのは Cannon<sup>1)</sup>であり，1915 年のことである．彼はイヌに吠えられたネコが興奮し，副腎髄質からアドレナリンが分泌されて自律神経系が興奮した結果，瞳孔散大，血圧上昇，脈拍数増加，消化管運動低下，唾液分泌低下などの生体反応が出現することを発見し，これを“fight-or-flight response”として提唱した．

一方，ストレスという言葉が医学領域で初めて用いたのは Selye<sup>2)</sup>である．彼は 1936 年に発表した論文の中で，外界からの刺激に対する一連の生体反応を“general adaptation syndrome” (汎適応症候群，以下 GAS と略す)と命名し，報告している．この発表が契機となってストレスの概念が広く知られるようになった．この時点ではまだストレスという単語は用いられていなかったが，後に Selye は生体に加えられる外界からの刺激や環境因子を“stressor”，刺激に適応しようとして生じる生体の内部に非特異的な反応を“stress”と定義した．現在では両者が混同され，両者とも「ストレス」と呼称されることが多い．

なおストレスは刺激の種類により，物理的なもの(温度，光，音など)，化学的なもの(薬物，食事など)，生物学的なもの(細菌，花粉など)，精神的なものに大別される．本研究は，精神的ストレスと消化管機能との関係について研究したものである．

## 第2節 視床下部—下垂体—副腎皮質軸

(hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis)

Selye は GAS の過程において副腎皮質に変化がみられることを発見し、その背景には非特異的な神経内分泌反応が存在すると考えたが、これこそが HPA axis として現在広く知られている概念の原点である。HPA axis は Cannon の提唱した“fight-or-flight response”でみられる自律神経系の変化と併せて、ストレスの病態生理の根幹を形成していると考えられている。

生体が stressor に曝露されると、視床下部室傍核より副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(corticotropin releasing hormone: CRH)が放出され、CRH は下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone: ACTH)の分泌を促し、ACTH は副腎皮質からのグルココルチコイド分泌を引き起こす。

グルココルチコイドには糖新生の促進や免疫反応の抑制などの作用があり、生体にとって重要なホルモンである。正常であればネガティブフィードバックにより、ACTH は CRH の分泌を抑制し、グルココルチコイドは ACTH と CRH の分泌を抑制するが、stressor 曝露が過剰になるとネガティブフィードバックが破綻し、HPA axis が亢進した状態となる。HPA axis の亢進が長期化すると生体が疲弊するのみならず、海馬神経細胞の萎縮やアポトーシス促進がみられるようになり、記憶や学習能力の低下といった高次脳機能障害を惹起する原因となる<sup>3)</sup>。

## 第3節 脳腸相関(brain-gut interaction)

ストレスの概念が提唱され始めたのは比較的最近ではあるものの、「腹が据わる」、「腸が煮えくり返る」、「断腸の思い」などの慣用句にみられるように、消化器と中枢神経との関連性は古来より日本においても注目されていた。

消化管と脳は、炎症性サイトカイン、神経伝達物質、消化管ホルモンなどを介して双方向的に関連しているが、その概念は脳腸相関

として知られている<sup>4)</sup>。消化管の情報は中枢神経系を介して大脳に伝達され、腹痛や腹部不快感などの腹部症状、時には抑うつや不安などの情動（比較的急速に引き起こされた一時的で急激な感情の動き）を惹起する。また、それらの情動が HPA axis や自律神経系を介して消化管へ伝達されることにより、腹部症状が増悪するという悪循環を形成することもある。

#### 第4節 脳腸相関と腸内細菌の関係

近年では先述の脳腸相関に加えて中枢神経系 (central nervous system: CNS) と腸内細菌との相互作用が注目されており、これらを含む腸内細菌叢—腸—脳軸 (microbiota-gut-brain axis: MGB axis) という概念も提唱されている<sup>5)</sup>。MGB axis の経路としては自律神経系の一環である腸管神経系 (enteric nervous system: ENS) が注目されており、腸内細菌と ENS との関係についての報告もみられている。

Sudo ら<sup>6)</sup>は無菌 (germ free: GF) マウスに *Bifidobacterium infantis* を経口投与すると、視床下部において神経活動のマーカーである c-Fos の発現が速やかに増強されることを報告し、さらにその反応は乳幼児期にカプサイシン処理で求心性神経線維を破壊した GF マウスでは認められないこと、またセロトニン (5-hydroxytryptamine: 5-HT) 受容体の一つである 5-HT<sub>3</sub> 受容体のアンタゴニスト、グラニセトロンで前処置を行うと抑制されることを報告した<sup>7)</sup>。この結果は、腸内細菌の作用によって腸クロム親和性細胞 (enterochromaffin cell: EC cell) から産生されたセロトニンが求心性神経末端の 5-HT<sub>3</sub> 受容体に作用し、孤束核を経由して脳へ情報を伝達する経路が重要であることを示唆している。

また、Bravo ら<sup>8)</sup>はマウスに *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 株を経口投与するとストレスによる不安・抑うつ行動が減弱するが、迷走神経を切離したマウスではその作用が認められないことを報告し、JB-1 株による不安抑制効果は迷走神経を介していることを示した。

## 第5節 うつ病と腸内細菌との関係

うつ病はストレス関連精神疾患の一つとして知られており，ストレスと関連の深い消化器疾患である過敏性腸症候群(irritable bowel syndrome: IBS)と強い関連性を持つ疾患であるため，近年うつ病患者の腸内細菌叢も注目されるようになってきた．実際にそれを検討した報告もあり，Naseribafroueiら<sup>9)</sup>はうつ病患者において *Bacteroides* 目の増加と *Lachnospira* 科の減少の他，*Oscillibacter* と *Alistipes* に強い関連性がみられたと報告し，Jiangら<sup>10)</sup>は *Enterobacter* や *Alistipes* の増加と *Faecalibacterium* の減少がみられたと報告している．また Maesら<sup>11),12)</sup>はうつ病患者の血清に含まれる腸内細菌由来の抗 LPS 抗体濃度は健常人のものと比較して有意に高く，またその血中濃度と消化器症状に相関がみられたことを報告している．

## 第6節 現代社会におけるストレス

IT 技術の発展やグローバル化の進展は現代社会に大きな恩恵をもたらしたが，一方で労働力流動化によって職場における人間関係は希薄化し，コンピューターやスマートフォンの普及はテクノストレスを惹起するようになった<sup>13)</sup>．それらは現代社会におけるストレスの一因となっているが，日本においては特有の労働環境にまつわる問題もみられる．

第二次世界大戦後，日本は高度経済成長やバブル景気を経て復興を成し遂げたが，その裏では長時間労働とサービス残業を強いる事業所，そして労働者の過労死(karoshi)が社会的問題として浮き彫りとなった<sup>14)</sup>．過労死の原因は心血管系イベントと抑うつ状態・うつ病に関連した自殺が大半を占めるとされており，近年は労働環境の改善以外に労働者のメンタルヘルスケアの重要性も注目されている．2015年12月に「労働安全衛生法」が改正され，一定規模以上の事業所ではストレスチェックが義務付けられた<sup>15)</sup>．



## 第7節 ストレスと過敏性腸症候群(irritable bowel syndrome: IBS)

精神的ストレスはうつ病や心的外傷後ストレス障害(post-traumatic stress disorder: PTSD)など多岐にわたるストレス関連精神疾患の誘因となるが、それらの疾患は機能性胃腸障害(functional gastrointestinal disorder: FGID)との関連性が指摘されている。FGIDの発症機序は未だ不明な点が多いが、FGIDの一形態であるIBSにおいては精神的ストレスが脳腸相関に影響を与え、内臓知覚過敏や消化管の運動障害などの機能異常が惹起されることにより、腹痛、便通異常、腹部膨満感などの症状が出現すると考えられている。

IBSは通常、検体検査や画像検査で器質的疾患を除外することによって診断を行うが、内臓知覚過敏の有無を評価するバロスタット法の有用性が報告されている<sup>16)</sup>。なおIBS動物モデルを用いた実験においても、colorectal distension (CRD)に対する反応によって内臓知覚過敏の有無を評価する手法が広く行われている。

またIBS発症の機序に関係するものの一つとして腸内細菌の変化が注目されている。実際IBSの患者では腸内細菌叢の構成が健常人と異なることが知られており<sup>17)</sup>、実臨床においてもプロバイオティクスによるIBSの治療が広く試みられている。

一方、ストレス性精神疾患であるうつ病や不安症の既往はIBS発症リスクとなることが知られており、IBS患者はうつ病や不安症との合併率が高いことも指摘されている<sup>16),18),19)</sup>。なおPTSDとIBSとの関連性を指摘する報告もいくつかみられる<sup>20)-23)</sup>。またIBS患者において腸内細菌叢の変化が報告されているが、前述の通りうつ病患者においても同様の報告があり、両者に関連性がみられる可能性がある。

## 第8節 本検討における仮説と目的

前述の通り、精神的ストレスとIBSとの関連性については広く知られており、脳腸相関に着目したストレスと消化管の関係は以前より検討され、報告されてきた。しかしながら、ストレスによって惹

起された情動がどのような行動変化を引き起こし，どのような消化器症状と腸内細菌叢の変化を引き起こすのか，といった MGB axis の一連の流れを同時に直接検討した報告はない．また，腸内細菌叢の変化はどのように一連の病態に関連しているのかは未だ不明瞭である．

そこで今回我々は，精神的ストレスが行動変化や内臓知覚過敏を惹起する原因は腸内細菌の変化にあるという仮説を立て，ストレスを負荷した動物モデルを用いて検討を行うこととした．

## 第2章 急性ストレス負荷動物モデルを用いた腸内細菌叢および消化管内臓知覚の変化の検討

### 第1節 目的

前章で述べた通り，ストレス関連精神疾患と IBS との関連性については一般的に知られているものの，ある個体における腸内細菌叢の変化が，行動変化と消化器症状の両方の原因になっているという確証はない．それを確認するには，実際にストレスによって惹起された情動がどのような行動変化を引き起こし，どのような消化器症状と腸内細菌叢の変化を引き起こすのか，といった MGB axis の一連の流れを同一の個体で同時に検討する必要があるが，これまでにそのような報告はみられない．

そこで我々は前述の仮説を基に，ストレスによる行動変化を検証する実験モデルとして確立されている，シャトル箱を用いた急性ストレス負荷動物モデル<sup>24)-29)</sup>を用い，精神的ストレスにより惹起された行動変化と腸内細菌叢の変化，そして消化器症状との関係を探るべく実験を行うこととした．なお当モデルは，本学の行動科学研究部門と精神科学講座で考案されたものである．

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

6週齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア，東京)を使用した．ラットはプラスチックケージ 1 ケージにつき 3 匹ずつの飼育とし，飼育環境は室温を 24°C，湿度 55%とし，12 時間明暗サイクルに保たれた環境下で，飼料(日本エスエルシー，東京)および水は自由に摂取させた．入荷後 1 週間の馴化期間を経た後，実験を行った．

実験は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て行った(No. 15089)．動物の扱いは防衛医科大学校の実験動物使用に関するガイドラインに準拠し，これを遵守した．以降の動物実験も同様である．

## 第2項 シャトル箱法によるストレス負荷と行動試験(図 1A, B)

一定のストレッサーを動物に負荷した場合，個体によっては異常な行動パターンを呈することがある．シャトル箱法はストレッサーとして電撃を使用し，その後の行動変化をモニターすることにより，うつ様変化や PTSD 様変化の出現した個体を区別することができる実験法である．

当実験には既報と同様の動物モデルを使用している．薄暗い環境の中で 2 方向シャトル箱型行動解析システム (Med Associates, Inc., St. Albans, VT, USA) を使用し，ラットに逃避不能の電撃を 0.8mA，刺激時間 15 秒，待機時間  $15 \pm 7.5$  秒の設定で 60 回 (30 分) 負荷し，その 2 週間後に行動観察を実施する．

行動観察では薄暗い環境の中で同じシャトル箱システムを用い，5 分間の周囲環境への順応期を設けてラットの自発運動量を測定した後，回避・逃避試験を行う．回避・逃避試験では，5 秒間の光刺激が呈示されている間にシャトル箱の中央ゲートを通過しない場合，0.8mA の電撃が最大で 15 秒負荷される，という trial を待機時間  $15 \pm 7.5$  秒で合計 80 回繰り返す．

各 trial の成績は，電撃負荷前に光刺激のみに反応して反対側に移動する「回避 avoidance」，電撃に曝露されてから移動する「逃避 escape」，移動せずに電撃を受け続ける「失敗 error」のいずれかに分類する．最終的には，順応期の自発運動量と回避・逃避試験の成績を総合し，行動パターンを判定する．

## 第3項 行動パターンの定義

同一の条件で電撃負荷を実施しても行動観察の成績は個体によって異なるが，ある一定の傾向がみられるため，パターン傾向によって分類を行った．回避・逃避試験中に「失敗」を 10 回以上示した場合は，うつ病の動物モデルとされる learned helplessness (LH) 状態<sup>30),31)</sup>と同様の特徴を呈していると考えられるため，LH 群と

して分類した。その他のラットに関しては non-LH 群(以下 NLH 群)として分類し、比較検討を行った。

また NLH 群において、刺激の少ない順応期に活動が少なく(中央ゲートの通過が 10 回以下)、刺激の多い回避・逃避試験中に活動が多い(trial 間のゲート通過と「回避」が合計 30 回以上)ラットがみられた。これは PTSD に特徴的な活動性と反応性の二方向性の行動変化を伴い、精神障害動物モデルとしての表面妥当性と構成概念妥当性を満たすと捉えることができるため<sup>32)</sup>、これを PTSD 群として分類してその他のラット(non-PTSD 群、以下 NPT 群)と比較検討を行った。

#### 第 4 項 Colorectal distension (CRD)

内臓知覚過敏の有無を評価するため、CRD を実施した。前章で述べた通り、内臓知覚過敏は IBS の主要な病態として知られており、CRD は IBS 動物モデルを用いた実験で内臓知覚をモニタリングする手段として極めて有用であると報告されている<sup>33)</sup>。

装置は既報<sup>34)</sup>を参考に自作したものをを用いた(図 2)。行動試験終了後、一晚絶食としたラットにイソフルラン(和光純薬工業、大阪)吸入麻酔を行い、ERCP カテーテル(PR-V234Q; オリンパス、東京)先端にラテックス手袋から作成した 5cm 長のバルーンを糸とテープで固定したものを経肛門的 6cm に挿入し、尾根部にテープ固定した。その後ラットをホルダー(KN-325-A; 夏目製作所、東京)内に静置し、覚醒後 30 分経過した後に CRD を開始した。

バルーンカテーテルには三方活栓で血圧計とゴム球が接続されている。バルーンを秒速 1mmHg で緩徐に加圧し、ラットの腹筋が視覚的に収縮を開始した時点での圧を閾値とした。これをビデオ録画と共に最低 3 回繰り返す、評価を行った。評価に際しては、急性ストレス負荷と行動試験を実施していないラット(control 群、以下 CON 群)と比較を行った。

## 第 5 項 腸内細菌叢の解析

既報を参考に処理を行った<sup>35)-37)</sup>。CRD 終了後、ラットより新鮮な盲腸内容物を採取し、採取後は速やかに $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。盲腸内容物から QIAamp stool mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いて腸内細菌 DNA の抽出を行った。16S rRNA 遺伝子の可変領域 V4 を標的とし、プライマー(Forward: 515F, Reverse: 806rcbc33~52)と TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ, 大阪)を用いて 16S rRNA 遺伝子領域を PCR 法により増幅した。QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)により PCR 産物を精製した。次世代シーケンサー MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)を用いた解析は明治(株)に委託した。

## 第 6 項 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。CRD による閾値については一元配置分散分析(one way analysis of variance: one way ANOVA)と Tukey-Kramer 法を用いて評価を行った。腸内細菌の相対豊富度については Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて評価を行った。統計処理には JMP Pro version 12.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。有意水準は 0.05 とした。腸内細菌叢の多様性については Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)を用いて解析したデータを基に評価を行った。

## 第 3 節 結果

### 第 1 項 行動パターンの変化

14 匹のラットに対し急性ストレス負荷を実施し、行動試験を行った結果、LH を呈したラットは 2 匹(14.3%)であった。また、PTSD 様変化を呈したラットは 7 匹(50.0%)であった。

1 回のプロトコールでは LH を呈するラットが 2 匹と少数であったため、以降 LH を呈するラットが合計 5 匹となるまで同一のプロトコールを繰り返した。LH を呈した 5 匹を LH 群とし、その他の

個体から無作為に抽出した NLH 群 10 匹(PTSD 群 5 匹と NPT 群 5 匹)と共に、以降の検討を行った。

## 第 2 項 CRD の閾値

各群における CRD の閾値は、LH 群で  $21.42 \pm 1.57 \text{ mmHg}$ 、NLH 群で  $28.43 \pm 1.49 \text{ mmHg}$ 、CON 群で  $29.07 \pm 1.07 \text{ mmHg}$  であり、LH 群の閾値は CON 群のそれと比較して有意に低値であった ( $p=0.0480$ , Tukey-Kramer 法) (図 3 A)。

また、NLH 群を PTSD 群と NPT 群に分け、CON 群との比較検討も実施したが、CRD の閾値は PTSD 群で  $29.30 \pm 1.50 \text{ mmHg}$ 、NPT 群で  $26.88 \pm 3.34 \text{ mmHg}$  であり、明らかな差を認めなかった ( $p=0.6786$ , one way ANOVA) (図 3 B)。

## 第 3 項 腸内細菌の相対豊富度

LH 群、NLH 群、CON 群の三群間における腸内細菌の相対豊富度の比較を行ったところ、門レベルの解析では LH 群において Actinobacteria の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった ( $1.94 \pm 0.72\%$  vs  $0.46 \pm 0.11\%$ ,  $p=0.0326$ , Steel-Dwass) (図 4 A, B)。

存在比率 0.1%以上の上位 27 科の解析では、LH 群において Clostridiales incertae sedis の相対豊富度が CON 群と比較して有意に低値であった ( $15.80 \pm 1.24\%$  vs  $29.67 \pm 2.79\%$ ,  $p=0.0326$ , Steel-Dwass)。また LH 群において Lactobacillaceae ( $22.52 \pm 2.21\%$  vs  $10.90 \pm 1.07\%$ ,  $p=0.0326$ )、Turicibacteraceae ( $9.55 \pm 1.59\%$  vs  $3.28 \pm 0.54\%$ ,  $p=0.0326$ )、Peptostreptococcaceae ( $4.53 \pm 0.96\%$  vs  $2.33 \pm 0.20\%$ ,  $p=0.0326$ )、Bifidobacteriaceae ( $1.55 \pm 0.71\%$  vs  $0.24 \pm 0.05\%$ ,  $p=0.0326$ ) の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった。一方、NLH 群において S24-7 の相対豊富度が CON と比較して有意に高く ( $3.17 \pm 0.69\%$  vs  $1.39 \pm 0.20\%$ ,  $p=0.0446$ )、\*[Mogibacteriaceae] の相対豊富度が CON と比較して有意に低値であった ( $0.41 \pm 0.04\%$  vs  $0.77 \pm 0.10\%$ ,  $p=0.0230$ ) (図 5 A, B)。

存在比率 0.1%以上の上位 28 属の解析では，LH 群において *Clostridiales incertae sedis* の相対豊富度が CON 群と比較して有意に低値であった ( $15.80 \pm 1.24\%$  vs  $29.67 \pm 2.79\%$ ,  $p=0.0326$ , Steel-Dwass). また LH 群において *Lactobacillus* ( $22.50 \pm 2.20\%$  vs  $10.89 \pm 1.07\%$ ,  $p=0.0326$ ), *Turicibacter* ( $9.55 \pm 1.59\%$  vs  $3.28 \pm 0.54\%$ ,  $p=0.0326$ ), *Peptostreptococcaceae incertae sedis* ( $4.52 \pm 0.83\%$  vs  $2.33 \pm 0.20\%$ ,  $p=0.0326$ ), *Bifidobacterium* ( $1.55 \pm 0.71\%$  vs  $0.24 \pm 0.05\%$ ,  $p=0.0326$ ) の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった．一方，NLH 群において *S24-7 incertae sedis* の相対豊富度が CON と比較して有意に高く ( $3.17 \pm 0.69\%$  vs  $1.39 \pm 0.20\%$ ,  $p=0.0446$ )，\*\**[Mogibacteriaceae] incertae sedis* の相対豊富度が CON と比較して有意に低値であった ( $0.41 \pm 0.04\%$  vs  $0.77 \pm 0.10\%$ ,  $p=0.0230$ ) (表 1).

次に，NLH 群を PTSD 群と NPT 群に分け，CON 群と三群間における腸内細菌の相対豊富度の比較を行った．門レベルの解析では明らかな差は認めなかった(図 6 A, B).

存在比率 0.1%以上の上位 27 科の解析では，PTSD 群において *S24-7* ( $2.64 \pm 0.18\%$  vs  $1.39 \pm 0.20\%$ ,  $p=0.0326$ , Steel-Dwass) の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった．一方，NPT 群において\**[Mogibacteriaceae]* ( $0.31 \pm 0.04\%$  vs  $0.77 \pm 0.10\%$ ,  $p=0.0326$ ) の相対豊富度が CON 群と比較して有意に低値であった(図 7 A, B).

存在比率 0.1%以上の上位 28 属の解析では，PTSD 群において *S24-7 incertae sedis* ( $2.64 \pm 0.18\%$  vs  $1.39 \pm 0.20\%$ ,  $p=0.0326$ , Steel-Dwass) の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった．一方，NPT 群において\*\**[Mogibacteriaceae] incertae sedis* ( $0.31 \pm 0.04\%$  vs  $0.77 \pm 0.10\%$ ,  $p=0.0326$ ) の相対豊富度が CON 群と比較して有意に低値であった．

#### 第 4 項 腸内細菌叢の多様性

LH 群，NLH 群，CON 群の三群間における腸内細菌叢の多様性の比較を行った． $\alpha$  多様性の評価で Shannon index を比較したとこ



ろ, LH 群は他二群と比較して低い傾向を示した (LH 群:  $6.16 \pm 0.25$ , NLH 群:  $6.74 \pm 0.14$ , CON 群:  $6.79 \pm 0.19$ ,  $p=0.0715$ , ANOVA) (図 8 A).  $\beta$  多様性の評価で主座標分析(Principal Coordinate Analysis: PCoA)を行ったところ, LH 群は他二群と比較して異なる分布を示した(図 8 B). また平均 UniFrac 距離(weighted)解析を行ったところ, CON 群—LH 群間の平均 UniFrac 距離が CON 群内の平均距離よりも有意に高く ( $0.18 \pm 0.01$  vs  $0.12 \pm 0.01$ ,  $p=0.0062$ , Steel-Dwass), また LH 群内の平均距離よりも高い傾向を示した ( $0.18 \pm 0.01$  vs  $0.14 \pm 0.01$ ,  $p=0.1778$ ) (図 8 C). これは両群間の細菌叢構造が異なる傾向を示すことを意味する.

次に, NLH 群を PTSD 群と NPT 群に分け, CON 群と三群間における腸内細菌叢の多様性の比較を行った. Shannon index の比較では三群間で有意な変化は認めなかった(PTSD 群:  $6.63 \pm 0.25$ , NPT 群:  $6.87 \pm 0.14$ , CON 群:  $6.79 \pm 0.19$ ,  $p=0.6989$ , ANOVA) (図 9 A)が, PCoA では PTSD 群は CON 群と比較して異なる分布を示した(図 9 B).

#### 第 4 節 小括

同一の急性ストレス負荷を実施したのにもかかわらず, その反応として出現する行動パターンは個体によって異なっていた. LH 群においては内臓知覚過敏が認められた. また, 特に LH 群においては腸内細菌叢の多様性が低下し, 特徴的な腸内細菌叢の構成がみられた.

- \* QIIME 解析時, Greengenes database により Clostridiales 目 Mogibacteriaceae 科として分類.
- \*\* QIIME 解析時, Greengenes database により Clostridiales 目 Mogibacteriaceae 科として分類, 所属位置不明.

## 第3章 水回避ストレスモデルを用いた内臓知覚過敏に対する糞便微生物移植の有効性の検討

### 第1節 目的

第1章で述べた通り，IBS発症の機序の一つとして腸内細菌叢の変化が注目されており，臨床においてもプロバイオティクスによるIBSの治療が試みられている．しかしながら，実際にIBSに対するプロバイオティクスを用いた腸内細菌への治療介入試験は数多くみられるものの，有効性が示されたものは *Bifidobacterium*<sup>38)</sup> や *Lactobacillus*<sup>39)</sup> に属する特定の単一菌種であったり，複数の菌種の合剤<sup>40)-42)</sup>であったり，有効な菌種は一様ではない．

一方，2013年に再発性偽膜性腸炎に対する糞便微生物移植(fecal microbiota transplantation: FMT)<sup>43)</sup>の有効性が報告されて以降，各種消化器疾患の腸内細菌叢に介入する治療法として健常人をドナーとしたFMTが注目され始めた．IBSに対するFMTの有効性を検討した報告もみられるがその数はわずかであり，有効性も一様ではない<sup>44)-46)</sup>．

そこで我々は，動物実験モデルを用いてIBSに対するFMTの有効性を検討した．前章で用いた手法では内臓知覚過敏を呈するラットの発生率が低率であったため，本検討ではIBSの動物実験モデルとして水回避ストレス(water avoidance stress: WAS)モデルを用いることとした．なお，WASモデルは慢性的な精神的ストレス負荷により内臓知覚過敏が惹起されることを示したモデルであり<sup>47)</sup>，精神的ストレスで腹痛が増悪するIBSの病態を反映するものとされている．

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

使用動物と飼育環境については前章第2節第1項と同様である．実験は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て行った(No. 14101)．

## 第2項 糞便微生物移植(fecal microbiota transplantation: FMT)

既報を参考に実施した<sup>48)</sup>。同齡のストレス負荷をしていないラットをドナーとして新鮮便を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。FMT実施の際は10倍量の1% PBSを加えてホモジナイズした後、 $4^{\circ}\text{C}$ 、800g、2分間の遠心分離で得られた上清を使用した。WAS負荷開始後よりイソフルラン吸入麻酔の上で経胃的に1日2回、1回あたり1mLを投与した。FMTを行うWAS+FMT群、WAS負荷を実施して1% PBSを1mL経胃投与するWAS+PBS群、WAS負荷を行わず同様に1% PBSを経胃投与するSham+PBS群の全3群で実験を行った。本検討のタイムラインを図10に示す。

## 第3項 水回避ストレス(water avoidance stress: WAS)

入荷後1週間の馴化期間を経た後、既報を参考にしてWAS負荷を開始した<sup>47)</sup>。幅46.5cm×奥行37cm×高さ24cmの透明な容器の中央に直径10cm×高さ10cmのプラットホームを設置し、プラットホームの頂部より1cm下が水位となるように容器に水を入れ、ラットをプラットホーム上に1日1時間、10日間連続で放置した。同様の容器に水がない状態でラットを1日1時間、10日間連続で放置したものをSham WASとした。

## 第4項 CRD

使用する器具と詳細な閾値の測定方法については前章第2節第4項と同様である。今回は時系列による閾値の変化を評価した。

まず10日間のWAS負荷開始の前日(day0)にCRDを実施し、WAS負荷終了の翌日(day11)、6日後(day16)、11日後(day21)に再度CRDを実施した。day0の結果を基準とし、各々の結果から差分で変化量を求めて三群間で比較した。

## 第5項 腸内細菌叢の解析

各群より無作為に5匹ずつ選択し、WAS負荷開始前(day0)とWAS

負荷終了後(day10)にそれぞれの個体より新鮮便を回収し，腸内細菌叢の解析を行った．使用試薬と詳細な解析手法については 前章 第 2 節 第 5 項 と同様である．

#### 第 6 項 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した．CRD による閾値の変化量の評価については one way ANOVA と Tukey-Kramer 法を用いて評価を行った．また腸内細菌の解析を行った個体に関しては，WAS 負荷前後の各腸内細菌の変化を paired t-test，WAS 負荷前後の各腸内細菌の変化と CRD による閾値の変化の関係を Pearson の積率相関係数( $r$ )を求めて評価した．腸内細菌の相対豊富さ，腸内細菌叢の多様性については 前章 第 2 節 第 6 項 と同様である．

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 CRD の閾値の変化量

WAS 負荷前後における CRD の閾値の変化量を比較したところ，day11 では Sham+PBS 群で  $0.81\pm 1.11$  mmHg，WAS+PBS 群で  $-4.21\pm 0.83$  mmHg，WAS+FMT 群で  $1.41\pm 1.49$  mmHg であった．WAS+PBS 群における閾値の変化量は Sham+PBS 群と比較して有意に低下していた( $p=0.0203$ ，Tukey-Kramer 法)が，この閾値低下の変化は WAS+FMT 群において有意に改善していた( $p=0.0092$ ) (図 11)．

以降の閾値の変化量は Sham+PBS 群の day16 で  $2.37\pm 1.48$  mmHg，day21 で  $2.37\pm 1.57$  mmHg，WAS+PBS 群の day16 で  $-4.21\pm 2.55$  mmHg，day21 で  $-4.67\pm 3.32$  mmHg，WAS+FMT 群の day16 で  $3.22\pm 1.54$  mmHg，day21 で  $1.81\pm 1.65$  mmHg であった．いずれも有意差は認めなかったものの，WAS+PBS 群における閾値の低下は WAS の終了後も遷延する傾向にあり，WAS+FMT 群においては WAS の終了後も閾値低下の改善効果が持続する傾向にあった( $p=0.1031$ ， $0.0723$ ，one way ANOVA)．

## 第2項 腸内細菌の相対豊富さ

まず WAS 負荷前の三群間における腸内細菌の相対豊富さの比較を行った。門レベル、WAS 負荷前における存在比率 0.1%以上の上位 20 科、存在比率 0.1%以上の上位 26 属のいずれの解析においても明らかな有意差は認められなかった。

次に WAS 負荷後の三群間における腸内細菌の相対豊富さの比較を行った。門レベルの解析では、WAS+FMT 群において Actinobacteria の相対豊富さが Sham+PBS 群と比較して有意に高値を示した ( $11.90 \pm 2.12\%$  vs  $4.13 \pm 1.14\%$ ,  $p=0.0326$ , Steel-Dwass) (図 12 A, B)。WAS 負荷後における存在比率 0.1%以上の上位 21 科の解析では、WAS+FMT 群において Bifidobacteriaceae の相対豊富さが Sham+PBS 群と比較して有意に高く ( $11.33 \pm 2.14\%$  vs  $3.47 \pm 1.17\%$ ,  $p=0.0326$ )、また WAS+PBS 群において Staphylococcaceae の相対豊富さが Sham+PBS 群と比較して有意に低値を示した ( $0.13 \pm 0.06\%$  vs  $0.01 \pm 0.00\%$ ,  $p=0.0326$ ) (図 13 A, B)。また存在比率 0.1%以上の上位 31 属の解析では、WAS+FMT 群において *Bifidobacterium* の相対豊富さが Sham+PBS 群と比較して有意に高値を示した ( $11.33 \pm 2.14\%$  vs  $3.47 \pm 1.17\%$ ,  $p=0.0326$ )。

## 第3項 腸内細菌叢の多様性

WAS 負荷前の三群において腸内細菌の  $\alpha$  多様性を Shannon index で比較したが、明らかな差は認めなかった (WAS+PBS 群:  $5.16 \pm 0.12$ , WAS+FMT 群:  $5.42 \pm 0.12$ , Sham+PBS 群:  $5.16 \pm 0.13$ ,  $p=0.2832$ , ANOVA)。また WAS 負荷後の三群間についても同様に比較したが、明らかな差は認めなかった (WAS+PBS 群:  $5.70 \pm 0.36$ , WAS+FMT 群:  $5.59 \pm 0.22$ , Sham+PBS 群:  $5.74 \pm 0.31$ ,  $p=0.9335$ )。

## 第4項 WAS 負荷前後における腸内細菌の変化

それぞれの群において WAS 負荷前後の各腸内細菌の変化を比較した。WAS 負荷後における存在比率 0.1%以上の上位 31 属におい

て、WAS+PBS 群でのみ有意な変化を認めた菌は、*Lactobacillus* (WAS 前 WAS+PBS 群:  $45.04 \pm 4.57\%$ , WAS 後 WAS+PBS 群:  $12.98 \pm 2.38\%$ ,  $p=0.0051$ ), *SMB53* (WAS 前:  $3.85 \pm 0.72\%$ , WAS 後:  $6.18 \pm 0.65\%$ ,  $p=0.0416$ ), \**[Prevotella]* (WAS 前:  $0.69 \pm 0.13\%$ , WAS 後:  $0.23 \pm 0.05\%$ ,  $p=0.0496$ ), \*\**Prevotella* (WAS 前:  $0.26 \pm 0.05\%$ , WAS 後:  $0.08 \pm 0.02\%$ ,  $p=0.0321$ )であった(図 14).

#### 第 5 項 CRD の閾値の変化と腸内細菌の変化の相関

WAS 負荷後の存在比率 0.1%以上の上位 31 属の腸内細菌を解析の対象とし、WAS 負荷前後の各菌の変化と CRD による閾値の変化の相関分析を行った。\**[Prevotella]* (WAS+PBS 群:  $-0.46 \pm 0.16\%$ , WAS+FMT 群:  $-0.27 \pm 0.20\%$ , Sham+PBS 群:  $-0.01 \pm 0.05\%$ ,  $r=0.5055$ ,  $p=0.0546$ ), *Parabacteroides* (WAS+PBS 群:  $0.10 \pm 0.02\%$ , WAS+FMT 群:  $0.13 \pm 0.06\%$ , Sham+PBS 群:  $0.06 \pm 0.01\%$ ,  $r=0.4684$ ,  $p=0.0782$ ), *Lactobacillus* (WAS+PBS 群:  $-32.05 \pm 5.74\%$ , WAS+FMT 群:  $-12.24 \pm 4.50\%$ , Sham+PBS 群:  $-17.45 \pm 6.39\%$ ,  $r=0.4627$ ,  $p=0.0825$ )の変化において正の相関を示す傾向を認め、*Clostridium* (WAS+PBS 群:  $-6.74 \pm 2.04\%$ , WAS+FMT 群:  $-14.39 \pm 4.13\%$ , Sham+PBS 群:  $-8.93 \pm 2.23\%$ ,  $r=-0.5078$ ,  $p=0.0533$ )において負の相関を示す傾向を認めた。

#### 第 4 節 小括

WAS 負荷の継続により、内臓知覚過敏がみられた。FMT を実施することにより、内臓知覚過敏の出現が抑制された。一部の腸内細菌は WAS 負荷前後で存在割合が大きく変化し、また内臓知覚過敏の程度と相関を示す傾向がみられた。

\* QIIME 解析時、Greengenes database により Paraprevotellaceae 科 *Prevotella* 属として分類。

\*\* QIIME 解析時、Greengenes database により Prevotellaceae 科 *Prevotella* 属として分類。

## 第4章 水回避ストレスモデルを用いた内臓知覚過敏に対する自家培養菌の有効性の検討

### 第1節 目的

前章では IBS の動物実験モデルの一つである WAS モデルを用いて FMT の有効性を検討したところ、FMT によって内臓知覚過敏が抑制された。FMT は IBS に有効な治療手段の一つとなる可能性が示唆されたが、実際に臨床応用する際にはレシピエント側の精神的な問題の他、感染や手技に伴う偶発症のリスクなど安全性の問題などが少なからず存在する。

そこで我々は、内臓知覚過敏の抑制に関連している優勢菌種をドナーの糞便から培養して FMT の代用とすることにより、それらの問題を解決できるのではないかと考え、再度 WAS モデルを用いた実験を行って IBS に対する自家培養菌の有効性を検討した。

### 第2節 方法

#### 第1項 動物

使用動物と飼育環境については 前章 第2節 第1項 と同様である。実験は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て行った (No. 14101)。

#### 第2項 自家培養菌の投与

前章 第2節 第2項 と同様、同齡のストレス負荷をしていないラットをドナーとして新鮮便を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。前章 第3節 第4項、第5項 の結果を基に、FMT によって相対豊富度の低下が抑制され、かつ CRD による閾値の変化と正の相関を示す傾向を認めた菌の中で優勢菌種であった *Lactobacillus* を自家培養菌として選定した。

糞便 1g を Lactobacilli MRS Broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) で作成した液体培地 10mL で希釈した後、

100 $\mu$ L ずつ *Lactobacilli* MRS Agar (Becton, Dickinson and Company) で作成した寒天培地に塗布し，37°C で 72 時間嫌気培養した．生育したコロニーを液体培地内に接種後，さらに 37°C で 48 時間嫌気培養した．培養後の液体培地を 4°C，3,100rpm，10 分間で遠心し，上清を捨てて PBS による洗浄を 2 回繰り返す，*Lactobacillus* を得た．

PBS を用いて *Lactobacillus* 150 mg/mL を含有する懸濁液を作成し，WAS 負荷開始後よりイソフルラン吸入麻酔の上で経胃的に 1 日 2 回投与した．

### 第 3 項 WAS

使用する器具と詳細な実施方法については 前章 第 2 節 第 3 項 と同様である．

### 第 4 項 CRD

使用する器具と詳細な実施方法については 前章 第 3 節 第 5 項 と同様である．10 日間の WAS 負荷開始の前日(day0)に CRD を実施し，WAS 負荷終了の翌日(day11)に再度 CRD を実施した．day0 の結果を基準とし，差分で変化量を求めた．

### 第 5 項 大腸 mRNA の抽出とその発現の評価

大腸におけるタイトジャンクションの発現の程度によって腸管透過性を評価するため，大腸 messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現を reverse transcription (RT) -polymerase chain reaction (PCR) 法にて評価した．10 日間の WAS 負荷終了後，ラットにペントバルビタールナトリウム(共立製薬，東京)50mg/kg を腹腔内投与して麻酔を行い，回腸末端より 3cm の箇所より近位結腸組織を採取し，RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)へ浸漬した後，-20°C で保管した．

組織のホモジナイズには MagNA Lyser (Roche, Basel,



Switzerland)を 6,500rpm, 50 秒の条件で使用した。ホモジナイズ後は RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出し, 分光光度計 (Gene Quant; Pfizer, New York, NY, USA)で濃度を測定した後, そのうち 1.5 $\mu$ L を DNase / RNase free 蒸留水 (Thermo Fisher Scientific) で希釈して 14 $\mu$ L の水溶液を作成し, 逆転写反応に使用した。

逆転写反応は RNA 水溶液 14 $\mu$ L, Random Primer 1.25 $\mu$ L (タカラバイオ), SuperScript II Reverse Transcriptase 1 $\mu$ L (Thermo Fisher Scientific), dNTP Mixture 0.625 $\mu$ L (タカラバイオ), RNasin 0.625 $\mu$ L (Promega, Fitchburg, WI, USA), DTT 2.5 $\mu$ L (Thermo Fisher Scientific), First Strand Buffer 5 $\mu$ L (Thermo Fisher Scientific)を混合した後, Gene Amp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific)を使用して行った。反応条件は 25 $^{\circ}$ C 15 分, 42 $^{\circ}$ C 15 分, 48 $^{\circ}$ C 30 分, 20 $^{\circ}$ C 15 分とし, 終了後に complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)を得た。

cDNA を得た後, リアルタイム PCR 法を行った。1 検体あたり cDNA 3 $\mu$ L, プローブ 2 $\mu$ L, qPCR Mastermix (Eurogentec, Seraing, Belgium) 5 $\mu$ L を混合して 384 well プレートに配置し, triplicate とした。反応には 7900HT Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を使用し, 条件は 50 $^{\circ}$ C 2 分, 95 $^{\circ}$ C 10 分の後, 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 1 分を 40 サイクル繰り返す設定とした。プローブは  $\beta$  actin (Actb; Rn00667869\_m1, Thermo Fisher Scientific)を内在性コントロールに設定し, Claudin-1 (Cldn1; Rn00581740\_m1, Thermo Fisher Scientific)を使用した。結果の解析には SDS 2.4 (Thermo Fisher Scientific)および RQ Manager 1.2.1 (Thermo Fisher Scientific)を使用し,  $\Delta\Delta$ Ct 法によって評価した。

## 第 6 項 統計処理

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。本実験系を WAS+Lac 群とし, 前章の WAS+PBS 群, WAS+FMT 群, Sham+PBS 群の三群と比較を行った。CRD による閾値の変化量の評価については one way ANOVA と Tukey-Kramer 法を用いて評価を行った。PCR の結果に

については Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて評価を行った。

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 CRD の閾値の変化量

WAS 負荷前後における CRD の閾値の変化量を比較したところ、 $1.95 \pm 1.66 \text{ mmHg}$  であった。前章の三群と共に比較すると、WAS+PBS 群における閾値の変化量は Sham+PBS 群と比較して有意に低下しており ( $p=0.0452$ , Tukey-Kramer 法), WAS+FMT 群と WAS+Lac 群における閾値の変化量は WAS+PBS 群と比較して有意に上昇していた (それぞれ  $p=0.0212$ ,  $0.0170$ ) (図 15)。

#### 第 2 項 大腸タイトジャンクション mRNA 発現の変化

大腸 Claudin-1 の mRNA 発現量を測定し、前章の WAS+PBS 群、WAS+FMT 群、Sham+PBS 群の三群と共に比較した。Sham+PBS 群を基準とした近位結腸における Claudin-1 の発現量は WAS+PBS 群で  $0.48 \pm 0.04$  倍、WAS+FMT 群で  $1.38 \pm 0.34$  倍、WAS+Lac 群で  $1.07 \pm 0.28$  倍であった。WAS+PBS 群では Sham+PBS 群と比較して減少する傾向を認めたが ( $p=0.0931$ , Steel-Dwass 法), WAS+FMT 群と Sham+PBS 群、WAS+Lac 群と Sham+PBS 群の間には差を認めなかった ( $p=0.8698$ ,  $1.0000$ ) (図 16)。

### 第 4 節 小括

自家培養菌の投与を実施することにより、WAS 負荷による内臓知覚過敏の出現が抑制された。

## 第5章 総括

急性ストレス負荷動物モデルにおける腸内細菌叢の構成と内臓知覚の変化の検討，WAS 負荷 IBS 動物モデルにおける腸内細菌に介入する治療の有効性の検討を行った．

シャトル箱を用いた急性ストレス負荷動物モデルの実験においては，急性ストレスの反応として出現する行動パターンは個体によって異なっていることが判明した．また特にうつ病様の行動パターンを呈する個体においては内臓知覚過敏がみられた他，腸内細菌叢の多様性が低下し，特徴的な腸内細菌叢の構成がみられた．

WAS 負荷 IBS モデルの実験において，WAS 負荷により誘発される内臓知覚過敏は FMT の実施により抑制されること，一部の腸内細菌は WAS 負荷前後で存在割合が大きく変化しており，内臓知覚過敏の程度と相関を示す傾向がみられることが判明した．また，その相関を示す優勢菌種を自家培養し，投与することによっても内臓知覚過敏の出現が抑制されることが判明した．

## 第6章 考察

### 第1節 急性ストレス負荷動物モデルにおける検討

今回我々は、ストレスがどのような行動変化を引き起こし、どのような消化器症状と腸内細菌叢の変化を引き起こすのか、といった MGB axis の一連の流れを同時に直接検討すべく、シャトル箱を用いた急性ストレス負荷動物モデルの実験を行った。その結果、ストレスの反応として出現する行動パターンは個体によって異なっていた。また特にうつ病様の行動パターンを呈する個体においては内臓知覚過敏がみられた他、腸内細菌叢の多様性が低下し、特徴的な腸内細菌叢の構成がみられた。

実際にラットに急性ストレスを負荷し、その後 CRD を実施して内臓知覚の評価を行ったところ、うつ病と類似した行動パターンを呈する LH 群ラットのみ内臓知覚過敏がみられた。うつ病や不安症の既往は IBS 発症リスクとなること、また IBS 患者はうつ病や不安症との合併率が高いことが知られており<sup>16),18),19)</sup>、内臓知覚過敏は IBS でみられる所見の一つとしてよく知られている<sup>49),50)</sup>が、本検討でみられたこの所見はうつ病と IBS との関連性を支持する所見と考える。

IBS の詳細な機序の全容は未だ不明な点が多いが、その一つとして腸内細菌の関連が指摘されている<sup>17)</sup>。一方、うつ病においても腸内細菌叢の構成に変化がみられる旨の報告がみられる<sup>9)-12)</sup>。本検討では、ラットに急性ストレスを負荷しその後に盲腸便を採取して腸内細菌叢の比較を行ったが、特にうつ病様の LH 群ラットでは無処置群である CON 群と比較して腸内細菌叢の構成が大きく異なっていた。腸内細菌叢の多様性を評価したところ、LH 群は  $\alpha$  多様性で低下傾向を示し、 $\beta$  多様性で異なる傾向を示していた。これは腸内細菌叢を構成する細菌種や細菌数に変化し、細菌叢の構成に異常をきたす *dysbiosis* がみられたことを意味している<sup>51)</sup>。

また各群の菌種ごとの比較においては、属レベルで最優勢菌種である *Clostridiales incertae sedis* の割合が有意に低下していた。Yu ら

<sup>52)</sup>は chronic variable stress (CVS)を負荷するラットモデルにおいて腸内細菌叢の解析を行っているが、CVS 負荷により *Clostridiales incertae sedis* の割合が有意に低下していたと報告しており、我々の結果はこれと合致している。

一方、本検討の LH 群ラットでは *Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Peptostreptococcaceae incertae sedis*, *Bifidobacterium* の割合が有意に上昇していた。この結果は、*Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium* は精神的ストレスの負荷により割合が低下するという報告<sup>53)-55)</sup>や、*Lactobacillus* や *Bifidobacterium* はプロバイオティクスとして IBS の治療に有効である<sup>38)-42)</sup>という報告とは異なるように見える。しかしながら、プロバイオティクスとして IBS に有効性が示されている菌種は未だに一定していないのが現状であり、また精神症状の改善に寄与する微生物は「サイコバイオティクス」(psychobiotics)<sup>56)</sup>として注目され、研究が進められているが、こちらも菌種に関しては未だ確立されたものはない。なお、Zheng ら<sup>57)</sup>はうつ病患者では *Bifidobacterium* が属する *Actinobacteria* 門の割合が増加していたと報告しており、Dalziel ら<sup>58)</sup>はしばしばうつ病モデルとして用いられる Wistar-Kyoto rat において *Turicibacter* と *Lactobacillus* の割合が増加していたと報告している。これらは我々の結果と合致している。先述の *Clostridiales incertae sedis* の変化と併せて考察すると、特定の菌種のみが病態を左右しているというよりも、むしろ腸内細菌叢全体の構成が変化して多様性が低下する dysbiosis が病態に多大な影響を与えているのではないかと考える。

また本検討では、PTSD と IBS との関連を示すいくつかの報告が見られることを受け、PTSD 群に対しても内臓知覚や腸内細菌叢の検討を行っている。PTSD に関する内臓知覚や腸内細菌叢の検討を行ったという報告は今までみられていない。PTSD 群では LH 群のような著明な内臓知覚過敏や腸内細菌叢の変化はみられなかった。両群間で内臓知覚や腸内細菌叢の傾向は明らかに異なっており、これは特定

の精神疾患で特徴的な内臓知覚や腸内細菌叢の変化がみられることを示唆しているものと思われる。

本検討の問題点としては、単一種の雄性ラットでのみ検討を行っていること、腸内細菌や内臓知覚の変化との関連性が指摘されている炎症性サイトカイン、短鎖脂肪酸(short-chain fatty acids: SCFA)、5-HTなどの神経伝達物質、HPA axisに関連するホルモン<sup>5)-8),16),17)</sup>の変化を評価していないことなどが挙げられる。そのため、腸内細菌の変化がどのような機序を介して行動パターンや内臓知覚の変化に関連するのかという詳細については解明されていない。また、急性ストレス負荷前の腸内細菌叢の評価が未実施であり、各個体における腸内細菌の時間的変化は不明である。うつ病様の行動パターンを呈し内臓知覚過敏がみられた個体はストレス負荷前より他の行動パターンを呈した個体と腸内細菌叢の構成が当初より著しく異なっていた可能性があるが、それについても未検証である。しかしながら、精神的ストレスとMGB axisの関連が今後より明確になれば、腸内細菌に介入する治療法をストレス性精神疾患に応用できる可能性もある。今後さらなる検討が必要と考える。

## 第2節 WAS 負荷 IBS 動物モデルにおける検討

シャトル箱を用いた急性ストレス負荷動物モデルの実験において、うつ病様の行動変化に伴ってdysbiosisと内臓知覚過敏がみられた。内臓知覚過敏はIBSでみられる病態の一つであるため、この結果は精神的ストレスによるdysbiosisがIBS発症の原因とされることに合致するものと考えられる。しかしこのdysbiosisが内臓知覚過敏の原因であるのか、偶然認められた現象に過ぎないのかは結論づけることはできなかった。そこでdysbiosisが内臓知覚過敏の病態に関与しているか、さらに検討することとした。

IBSの治療には様々な試みがなされており、腸内細菌に介入してdysbiosisの改善を狙う治療として、プロバイオティクスの投与は実臨床において以前より広く行われてきた。近年、IBSを含め各種消化

器疾患において健常者をドナーとした FMT の応用が検討され始めているが、IBS におけるその有用性は明確でない。そこで我々は WAS 負荷 IBS モデルを用い、IBS に対する FMT の有効性を検討した。

WAS 負荷を 10 日間連続で実施したところ、WAS 負荷終了後には内臓知覚過敏がみられ、近位結腸の claudin-1 の発現が減少する傾向もみられた。これらの所見は IBS の病態を反映しているものと思われるが、WAS 負荷期間中に連日 FMT を実施することにより、内臓知覚過敏の発生が抑制され、近位結腸の claudin-1 の発現減少が抑制される傾向もみられた。この結果は、FMT が IBS の治療法として有効である可能性を示唆しているものと考えられる。

今回、WAS 負荷前後において存在割合が大きく変化し、CRD の閾値の変化と相関を示す傾向を持つ腸内細菌として、*Lactobacillus* と *Prevotella* が挙げられた。*Lactobacillus* と IBS との関係は以前より注目されており、IBS 患者において *Lactobacillus* の減少を認めたという報告が度々なされてきた<sup>59)-61)</sup>。それらの報告は本検討と合致しているものの、一方で逆に増加を認めたという報告も散見される<sup>17),62)</sup>。実際、*Lactobacillus* の増減の変化については WAS 負荷 IBS 動物モデルと先のシャトル箱法の動物モデルでは逆の結果が導かれた。また *Prevotella* もしばしば IBS との関係が言及されており<sup>63),64)</sup>、重症の IBS 患者ほど *Prevotella* の存在割合が低かったという報告もある<sup>65)</sup>。本検討では WAS 負荷によって *Prevotella* の相対豊富度が低下していたため、その報告と整合性はみられるものの *Prevotella* の腸内細菌叢全体に占める割合は低く、それ単体が内臓知覚過敏に関与しているとは考え難い。前節でも触れた通り、特定の菌単体ではなく腸内細菌叢全体の変化、すなわち dysbiosis が病態に影響している可能性が考えられる。

本検討で FMT が IBS の治療法の選択肢となる可能性が示唆された。しかしながら実際に臨床応用する際には、他人の糞便を受け入れなければならないことに対するレシピエント側の精神的な受け入れ準備、非特定な細菌や真菌も同時に移植されるために伴う感染のリス

ク、手技に伴う穿孔や誤嚥などのリスク，等の問題が少なからず存在する<sup>66),67)</sup>。現在は IBS 患者の腸内細菌叢に介入する治療としてプロバイオティクスの投与が広く行われており，実際本邦のガイドラインにおいても推奨度 A となっている<sup>16)</sup>。しかし，プロバイオティクスの経口投与は比較的安価で安全性が高いものの，実際にそれのみで IBS が寛解するケースを経験することは少ない。また海外においては，“Recommendations for Probiotic Use: Update 2015”によると IBS に対して有効性 A とされるプロバイオティクスはなく，*Bifidobacterium infantis* B5624 と VSL#3 が有効性 B とされるにとどまっている<sup>68)</sup>。

本検討の問題点としては先の急性ストレス負荷動物モデルと同じく，単一種の雄性ラットでのみ検討を行っている点，炎症性サイトカイン，SCFA，神経伝達物質，HPA axis 関連ホルモンの変化を評価していない点の他に，WAS 負荷を行わず FMT を行う Sham WAS と FMT の組み合わせの検討が未実施であった点などが挙げられる。また，先のシャトル箱法の動物モデルではうつ病様の行動変化を呈する個体が少なかったため，腸内細菌叢への介入の有効性を検討するモデルには止むを得ず WAS 負荷 IBS モデルを用いたことも問題点として挙げられる。その結果，*Lactobacillus* の増減の変化は期せずして二つのモデル間で反対の結果となった。この結果は，同じ内臓知覚過敏という病態であっても，いくつかの行動変化のパターンとそれに対応した *dysbiosis* のパターンを介して出現している可能性があることを示唆している。今回検討することはできなかったが，シャトル箱法の動物モデルには *Lactobacillus* 投与は効果が期待できないと想定され，同様に様々なストレスが病態に関与するヒトの IBS に対して単一菌種由来のプロバイオティクスを臨床応用することには限界があると予想される。

そこで我々は，FMT の有効性とプロバイオティクスの安全性を兼ね備えた方法として，内臓知覚過敏の抑制に関連している優勢菌種を同じ動物のドナーの糞便から単離し，培養して FMT に代用する方



法を考案した。これは我々の今回の研究で特徴的な点である。プロバイオティクスの効果を左右する因子の一つとして、個体への生着の成否が挙げられる。菌の生着の成否にはドナーとレシピエントとの相性があるため、その動物から単離したプロバイオティクスは高い効果が期待できると想定した上での検討であった。実際に WAS 負荷 IBS モデルで検討したところ、期待通りの内臓知覚過敏の改善がみられ、その効果は FMT とほぼ同レベルであった。この手法であれば FMT に伴うレシピエント側の精神的な問題や感染のリスク等を排除できる。また患者の人種、年齢、性別、食物、居住環境などの背景に合わせて菌種を選定して対応することによって、より適切な治療が可能になるものと考ええる。今後さらなる検討が必要と考える。

## 第 7 章 結論

ストレス対策は現代の社会人にとって身近で重大な課題である。精神的ストレスは様々な疾患の原因となることが知られているが、その中でも IBS は有病率が高く、患者の QOL を著しく低下させる疾患である。

今回我々は動物モデルを用いて、ストレスはどのような行動変化を引き起こし、どのような消化器症状と腸内細菌叢の変化を引き起こすのか、という MGB axis の一連の流れを同時に直接検討すると共に、IBS モデルにおける FMT や自家培養菌の投与の有効性を検討した。

急性ストレス負荷動物モデルの実験において、精神的ストレスへの曝露により dysbiosis がみられ、行動変化や内臓知覚過敏を惹起する一因となっていることが示された。また WAS 負荷 IBS モデルの実験において、FMT や自家培養菌の投与が内臓知覚過敏の出現抑制に効果的であることが示された。

近年、個別化医療という概念が盛んに提唱されている。それは、患者の個人レベルで病気の原因を特定し、最適な治療方法を施す医療のことを指す。最も早くその臨床応用を期待されているのが癌領域であり、癌細胞の遺伝子検索解析が対象となっている。今回我々が行った自家培養菌の投与は、まさに dysbiosis に由来する疾患に対する個別化医療モデルである。すなわち、FMT は正常の腸内細菌に入れ替える汎用性の高い「はまった治療」であるが、個別に腸内細菌の異常を解析し同種の動物から単離した菌を用いて介入する手法も病態を改善させ得ることが示された。現時点において IBS の治療に個別化医療を応用するのは、費用対効果の面で困難と考える。しかし、遺伝子検索解析のコストは年々飛躍的に低下しており、個別化医療に移行する時代が遠くない未来に訪れるかもしれない。今後の研究のさらなる進展と臨床応用が期待される。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，御指導と御高閲を賜りました 防衛医科大学 校内科学講座 教授 穂苅量太博士 に衷心より感謝申し上げます．

また本研究の遂行に際し，貴重な御助言と御協力を賜りました 防衛医科大学 防衛医学研究センター 行動科学研究部門 教授 清水邦夫博士，株式会社明治 研究本部 乳酸菌研究所 基盤微生物研究部 マイクロバイオーム G 土橋英恵様，防衛医科大学 校内科学講座 助教 岡田義清博士，同 准教授 富田謙吾博士 をはじめ，同 校内科学講座，同 精神科学講座の教室員諸先生に深く感謝の意を表します．

本研究の一部は，一般財団法人 防衛医学振興会 からの助成金により実施しました．この場を借りて深謝致します．

## 略語説明

5-HT	5-hydroxytryptamine / serotonin	5-ヒドロキシトリプタミン / セロトニン
ACTH	adrenocorticotropic hormone	副腎皮質刺激ホルモン
ANOVA	analysis of variance	分散分析
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
CNS	central nervous system	中枢神経系
CRD	colorectal distension	結腸直腸膨張刺激
CRH	corticotropin releasing hormone	副腎皮質刺激ホルモン放出 ホルモン
CVS	chronic variable stress	慢性変動ストレス
EC cell	enterochromaffin cell	腸クロム親和性細胞
ENS	enteric nervous system	腸管神経系
FGID	functional gastrointestinal disorder	機能性胃腸障害
FMT	fecal microbiota transplantation	糞便微生物移植
GAS	general adaptation syndrome	汎適応症候群
GF	germ free	無菌
HPA axis	hypothalamic-pituitary-adrenal axis	視床下部—下垂体—副腎 皮質軸
IBS	irritable bowel syndrome	過敏性腸症候群
LH	learned helplessness	学習性無力感
MGB axis	microbiota-gut-brain axis	腸内細菌叢—腸—脳軸
mRNA	messenger ribonucleic acid	伝令リボ核酸
PCoA	principal coordinate analysis	主座標分析
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PTSD	post-traumatic stress disorder	心的外傷後ストレス障害
RT	reverse transcription	逆転写反応
SCFA	short-chain fatty acid	短鎖脂肪酸
WAS	water avoidance stress	水回避ストレス

## 引用文献

- 1) Cannon WB. Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Researches into the Function of Emotional Excitement. New York: D Appleton and Company; 1915.
- 2) Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936; 138: 3479.
- 3) Landfield PW, Waymire JC, Lynch G. Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. *Science*. 1978; 202: 1098-102.
- 4) Track NS. The gastrointestinal endocrine system. *Can Med Assoc J*. 1980; 122: 287-92.
- 5) Bercik P. The microbiota-gut-brain axis: learning from intestinal bacteria? *Gut*. 2011; 60: 288-9.
- 6) Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. 2004; 558: 263-75.
- 7) Sudo N. Role of microbiome in regulating the HPA axis and its relevance to allergy. *Chem Immunol Allergy*. 2012; 98: 163-75.
- 8) Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 16050-5.
- 9) Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linlökken A, Wilson R, et al. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil*. 2014; 26: 1155-62.
- 10) Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*, 2015; 48: 186-94.
- 11) Maes M, Kubera M, Leunis JC. The gut-brain barrier in major

- depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008; 29: 117-24.
- 12) Maes M, Kubera M, Leunis JC, Berk M. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *J Affect Disord.* 2012; 141: 55-62.
- 13) 春日伸予. IT 化とストレス. *日本労働研究雑誌.* 2011; 53: 34-37.
- 14) 福山和恵, 岩田幸代, 吉岡隆之, 平山園子, 小澤徹, 武居明日美, 他. 生活習慣病症例における, 職業性ストレスと精神的ストレスとの関連 過労死予防の観点から. *日本職業・災害医学会会誌.* 2016; 64: 255-259.
- 15) 厚生労働省労働基準局安全衛生部労働衛生課産業保健支援室. ストレスチェック制度について. *総合健診.* 2016; 43: 299-303.
- 16) 福土審, 他. 日本消化器病学会(編). 機能性消化管疾患ガイドライン 2014—過敏性腸症候群(IBS). 東京: 南江堂; 2014.
- 17) 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, e114-5.
- 18) Kanazawa M, Endo Y, Whitehead WE, Kano M, Hongo M, Fukudo S. Patients and nonconsulters with irritable bowel syndrome reporting a parental history of bowel problems have more impaired psychological distress. *Dig Dis Sci.* 2004; 49: 1046-53.
- 19) Koloski NA, Jones M, Kalantar J, Weltman M, Zaguirre J, Talley NJ. The brain-gut pathway in functional gastrointestinal disorders is bidirectional: a 12-year prospective population-based study. *Gut.* 2012; 61: 1284-90.
- 20) Irwin C, Falsetti SA, Lydiard RB, Ballenger JC, Brock CD, Brener W.

- Comorbidity of posttraumatic stress disorder and irritable bowel syndrome. *J Clin Psychiatry*. 1996; 57: 576-8.
- 21) Savas LS, White DL, Wieman M, Daci K, Fitzgerald S, Laday Smith S, et al. Irritable bowel syndrome and dyspepsia among women veterans: prevalence and association with psychological distress. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009; 29: 115-25.
- 22) White DL, Savas LS, Daci K, Elserag R, Graham DP, Fitzgerald SJ, et al. Trauma history and risk of the irritable bowel syndrome in women veterans. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010; 32: 551-61.
- 23) Iorio N, Makipour K, Palit A, Friedenberg FK. Post-traumatic stress disorder is associated with irritable bowel syndrome in African Americans. *J Neurogastroenterol Motil*. 2014; 20: 523-30.
- 24) Koba T, Kodama Y, Shimizu K, Nomura S, Sugawara M, Kobayashi Y, et al. Persistent behavioural changes in rats following inescapable shock stress: a potential model of posttraumatic stress disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2001; 2: 34-7.
- 25) 清水邦夫, 澤村岳人, 丹生谷正史, 中井完治, 高橋祥友, 野村総一郎. 心的外傷後ストレス障害の動物モデル作成に関する研究 防衛医科大学校における取り組みを中心に. *脳と精神の医学*. 2004; 15: 323-33.
- 26) Sawamura T, Shimizu K, Nibuya M, Wakizono T, Suzuki G, Tsunoda T, et al. Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats. *Neurosci Lett*. 2004; 357: 37-40.
- 27) Wakizono T, Sawamura T, Shimizu K, Nibuya M, Suzuki G, Toda H, et al. Stress vulnerabilities in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Physiol Behav*. 2007; 90: 687-95.
- 28) Kikuchi A, Shimizu K, Nibuya M, Hiramoto T, Kanda Y, Tanaka T, et al. Relationship between post-traumatic stress disorder-like behavior and reduction of hippocampal 5-bromo-2'-deoxyuridine-positive cells after inescapable shock in rats. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2008; 62: 713-20.

- 29) Takahashi T, Shimizu K, Shimazaki K, Toda H, Nibuya M. Environmental enrichment enhances autophagy signaling in the rat hippocampus. *Brain Res.* 2014; 1592: 113-23.
- 30) Overmier JB, Seligman ME. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol.* 1967; 63: 28-33.
- 31) Musty RE, Jordan MP, Lenox RH. Criterion for learned helplessness in the rat: a redefinition. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990; 36: 739-44.
- 32) Yehuda R, Antelman SM. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry.* 1993; 33: 479-86.
- 33) Casén C, Vebø HC, Sekelja M, Hegge FT, Karlsson MK, Cierniejewska E, et al. Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015; 42: 71-83.
- 34) Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology.* 2000; 119: 1276-85.
- 35) Jinno S, Toshimitsu T, Nakamura Y, Kubota T, Igoshi Y, Ozawa N, et al. Maternal Prebiotic Ingestion Increased the Number of Fecal Bifidobacteria in Pregnant Women but Not in Their Neonates Aged One Month. *Nutrients.* 2017; 9.
- 36) Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012; 6: 1621-4.
- 37) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 7: 335-6.
- 38) O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, et al. *Lactobacillus* and *bifidobacterium* in irritable bowel syndrome:



- symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*. 2005; 128: 541-51.
- 39) Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahrné S, Jeppsson B. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95: 1231-8.
- 40) Kim HJ, Vazquez Roque MI, Camilleri M, Stephens D, Burton DD, Baxter K, et al. A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL#3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil*. 2005; 17: 687-96.
- 41) Williams EA, Stimpson J, Wang D, Plummer S, Garaiova I, Barker ME, et al. Clinical trial: a multistrain probiotic preparation significantly reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009; 29: 97-103.
- 42) Enck P, Zimmermann K, Menke G, Müller-Lissner S, Martens U, Klosterhalfen S. A mixture of *Escherichia coli* (DSM 17252) and *Enterococcus faecalis* (DSM 16440) for treatment of the irritable bowel syndrome -- a randomized controlled trial with primary care physicians. *Neurogastroenterol Motil*. 2008; 20: 1103-9.
- 43) van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013; 368: 407-15.
- 44) Borody TJ, George L, Andrews P, Brandl S, Noonan S, Cole P, et al. Bowel-flora alteration: a potential cure for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome? *Med J Aust*. 1989; 150: 604.
- 45) Pinn DM, Aroniadis OC, Brandt LJ. Is fecal microbiota transplantation (FMT) an effective treatment for patients with functional gastrointestinal disorders (FGID)? *Neurogastroenterol Motil*. 2015; 27: 19-29.
- 46) Mizuno S, Masaoka T, Naganuma M, Kishimoto T, Kitazawa M,

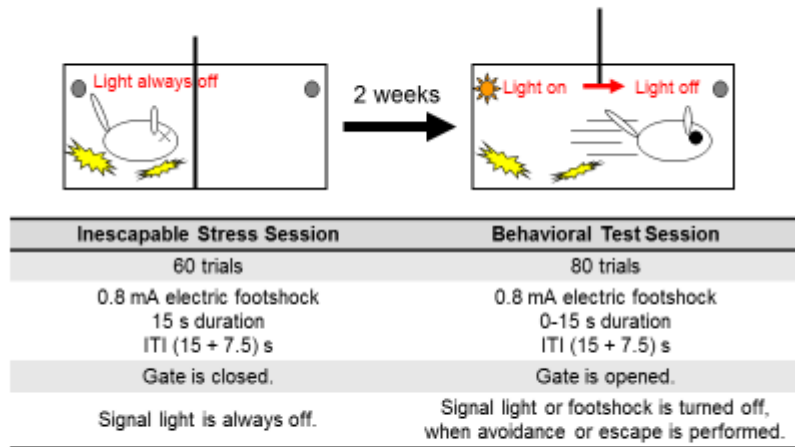
- Kurokawa S, et al. Bifidobacterium-Rich Fecal Donor May Be a Positive Predictor for Successful Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Digestion* 2017; 96: 29-38.
- 47) Bradesi S, Schwetz I, Ennes HS, Lamy CM, Ohning G, Fanselow M, et al. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 289: G42-53.
- 48) Di Luccia B, Crescenzo R, Mazzoli A, Cigliano L, Venditti P, Walser JC, et al. Rescue of Fructose-Induced Metabolic Syndrome by Antibiotics or Faecal Transplantation in a Rat Model of Obesity. *PLoS One.* 2015; 10: e0134893.
- 49) Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AA. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. Methods to assess visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 303: G141-54.
- 50) Ludidi S, Mujagic Z, Jonkers D, Keszthelyi D, Hesselink M, Kruimel J, et al. Markers for visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2014; 26: 1104-11.
- 51) Casén C, Vebø HC, Sekelja M, Hegge FT, Karlsson MK, Cierniejewska E, et al. Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015; 42: 71-83.
- 52) Yu M, Jia H, Zhou C, Yang Y, Zhao Y, Yang M, et al. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. *J Pharm Biomed Anal.* 2017; 138: 231-239.
- 53) Aizawa E, Tsuji H, Asahara T, Takahashi T, Teraishi T, Yoshida S, et al. Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *J Affect Disord.* 2016; 202: 254-7.

- 54) Clark A, Mach N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. *J Int Soc Sports Nutr.* 2016; 13: 43.
- 55) Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci.* 2017; 20: 145-155.
- 56) Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry.* 2013; 74: 720-6.
- 57) Zheng P, Zeng B, Zhou C, Liu M, Fang Z, Xu X, et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol Psychiatry.* 2016; 21: 786-96.
- 58) Dalziel JE, Fraser K, Young W, McKenzie CM, Bassett SA, Roy NC. Gastroparesis and lipid metabolism-associated dysbiosis in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017; 313: G62-G72.
- 59) Balsari A, Ceccarelli A, Dubini F, Fesce E, Poli G. The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. *Microbiologica.* 1982; 5: 185-194.
- 60) Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, Mättö J, Kassinen A, Krogius L, et al. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100: 373-382.
- 61) Chassard C, Dapoigny M, Scott KP, Crouzet L, Del'homme C, Marquet P, et al. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 35: 828-838.
- 62) Carroll IM, Chang YH, Park J, Sartor RB, Ringel Y. Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gut Pathog.* 2010; 2: 19.
- 63) Maccaferri S, Candela M, Turrone S, Centanni M, Severgnini M,

- Consolandi C, et al. IBS-associated phylogenetic unbalances of the intestinal microbiota are not reverted by probiotic supplementation. *Gut Microbes*. 2012; 3: 406-13.
- 64) Rajilić-Stojanović M, Jonkers DM, Salonen A, Hanevik K, Raes J, Jalanka J, et al. Intestinal microbiota and diet in IBS: causes, consequences, or epiphenomena? *Am J Gastroenterol*. 2015; 110: 278–287.
- 65) Tap J, Derrien M, Törnblom H, Brazeilles R, Cools-Portier S, Doré J, et al. Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2017; 152: 111-123. e8.
- 66) Kelly CR, Ihunnah C, Fischer M, Khoruts A, Surawicz C, Afzali A, et al. Fecal microbiota transplant for treatment of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients. *Am J Gastroenterol*. 2014; 109: 1065-71.
- 67) Patel NC, Griesbach CL, DiBaise JK, Orenstein R. Fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection: Mayo Clinic in Arizona experience. *Mayo Clin Proc*. 2013; 88: 799-805.
- 68) Floch MH, Walker WA, Sanders ME, Nieuwdorp M, Kim AS, Brenner DA, et al. Recommendations for Probiotic Use -- 2015 Update: Proceedings and Consensus Opinion. *J Clin Gastroenterol*. 2015; 49: S69-73.

# 図 表

A



B

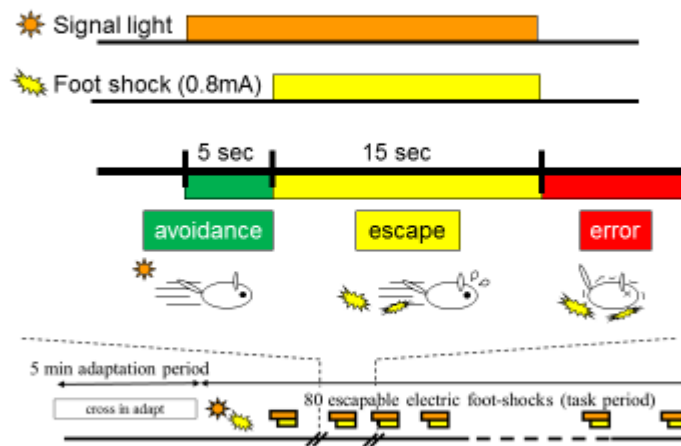


図 1 急性ストレス負荷試験の概要(22),24)より引用, 改変)

A 試験全体の流れと各セッションの条件

B 行動試験の概要と回避・逃避試験の成績判断基準

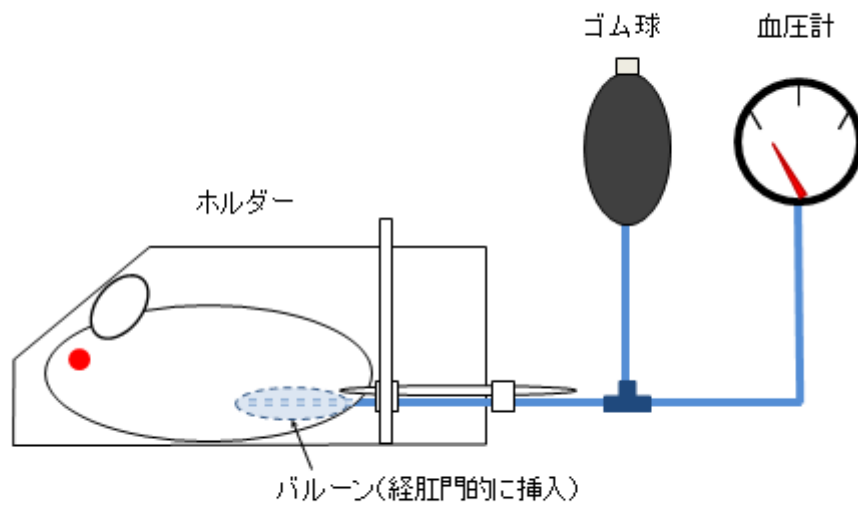


図 2 Colorectal distension (CRD) 負荷装置の概略図

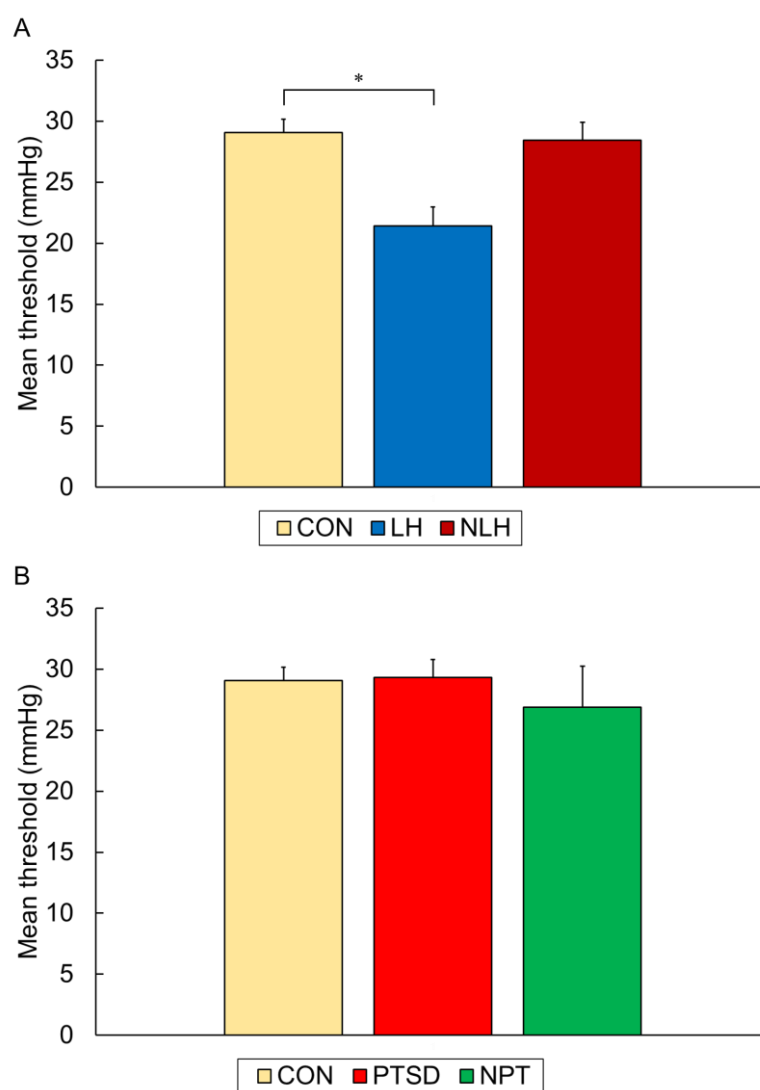


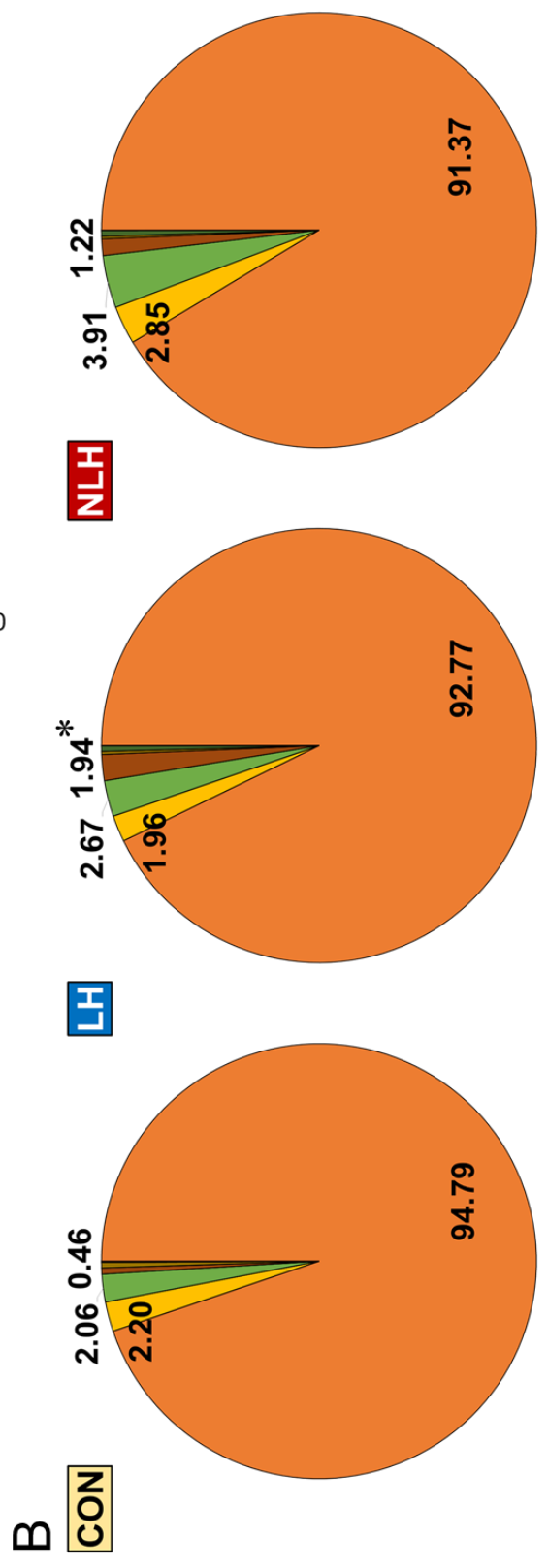
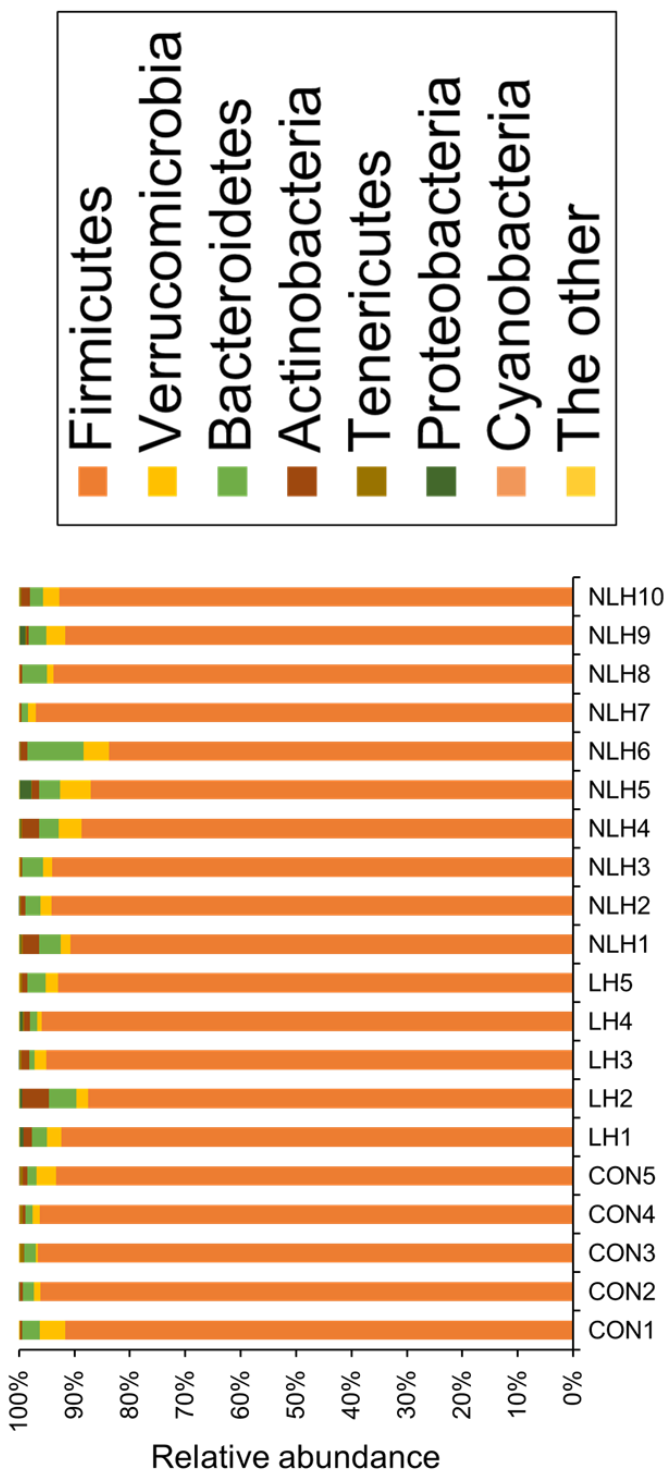
図 3 急性ストレス負荷後における CRD の閾値の比較

A CON 群(n=5), LH 群(n=5), NLH 群(n=10)における比較. LH 群は CON 群と比較して有意に閾値の低下を認めた(\* $p < 0.05$ ).

B NLH 群を PTSD 群(n=5)と NPT 群(n=5)に分け, CON 群(n=5)と比較. 各群間に明らかな差は認めなかった.

データは平均値±標準誤差で示した. 統計には one way ANOVA, post hoc には Tukey-Kramer 法を使用した.





☒ 4

図 4 急性ストレス負荷後における腸内細菌叢の比較  
(LH 群, 門レベル)

- A 各個体における門レベルの相対豊富度.
- B 各グループにおける門レベルの相対豊富度の比較. CON 群 (n=5), LH 群 (n=5), NLH 群 (n=10). LH 群において Actinobacteria の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった (\*p<0.05).

B のデータは平均値で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した.

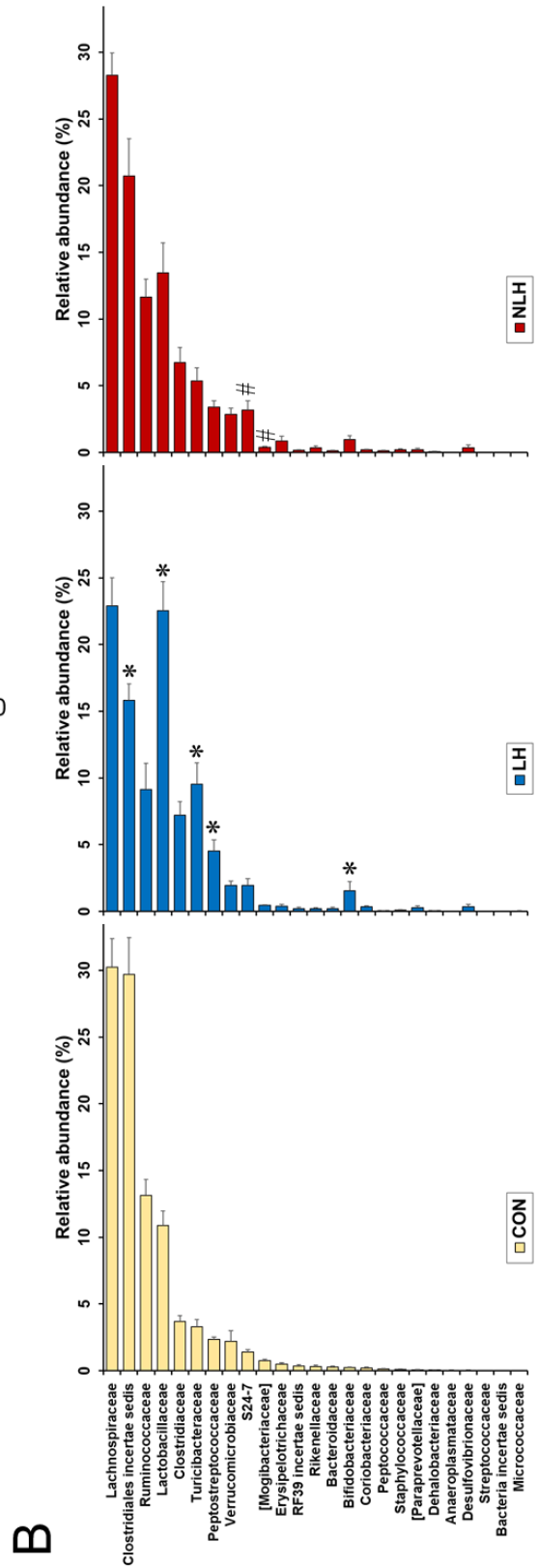
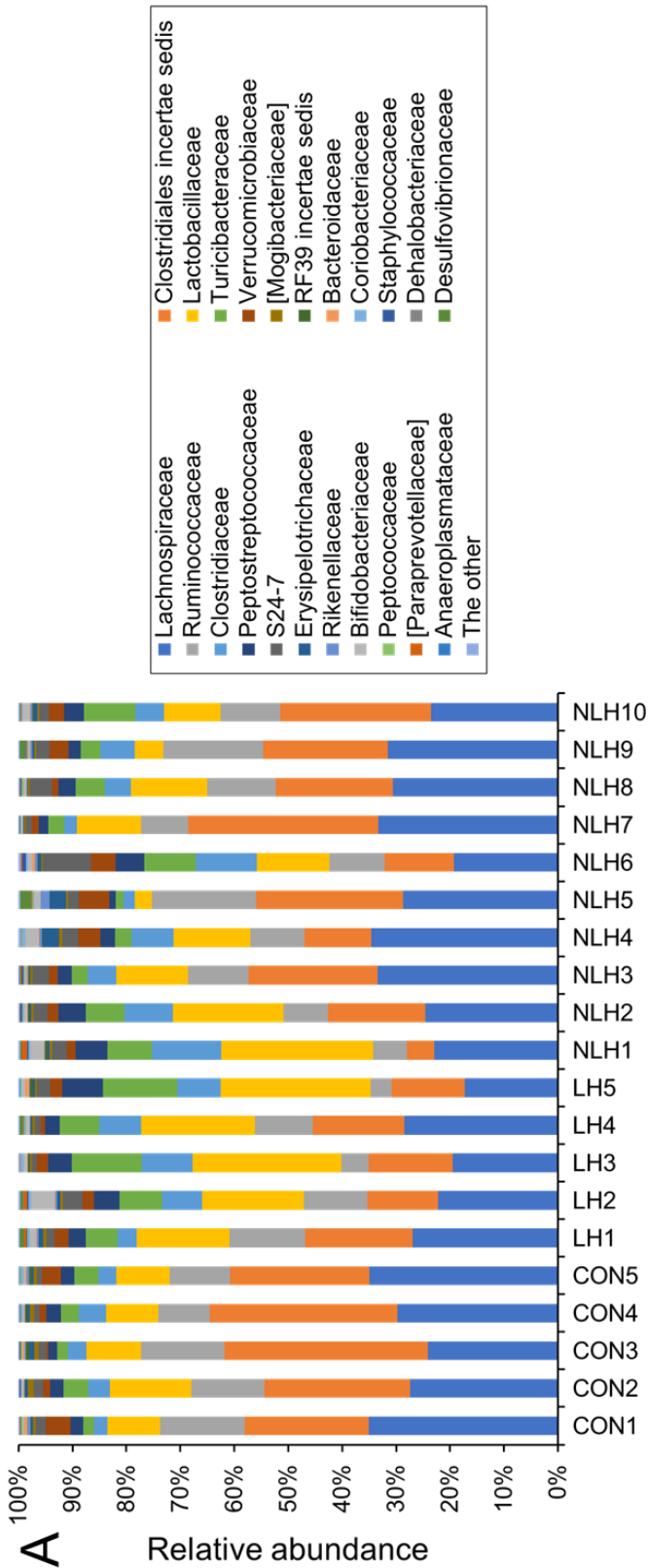


図 5 急性ストレス負荷後における腸内細菌叢の比較  
(LH 群, 科レベル)

- A 各個体における科レベルの相対豊富度. 存在比率 0.1%以上の上位 27 科.
- B 各グループにおける科レベルの相対豊富度の比較. 存在比率 0.1%以上の上位 27 科. CON 群(n=5), LH 群(n=5), NLH 群(n=10). LH 群において *Clostridiales incertae sedis* の相対豊富度が CON 群と比較して有意に低く, *Lactobacillaceae*, *Turicibacteraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Bifidobacteriaceae* の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった(\* $p < 0.05$ ). また, NLH 群において S24-7 の相対豊富度が CON と比較して有意に高く, \*[*Mogibacteriaceae*]の相対豊富度が CON と比較して有意に低値であった(# $p < 0.05$ ).

B のデータは平均値±標準誤差で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した.

- \* QIIME 解析時, Greengenes database により *Clostridiales* 目 *Mogibacteriaceae* 科として分類.

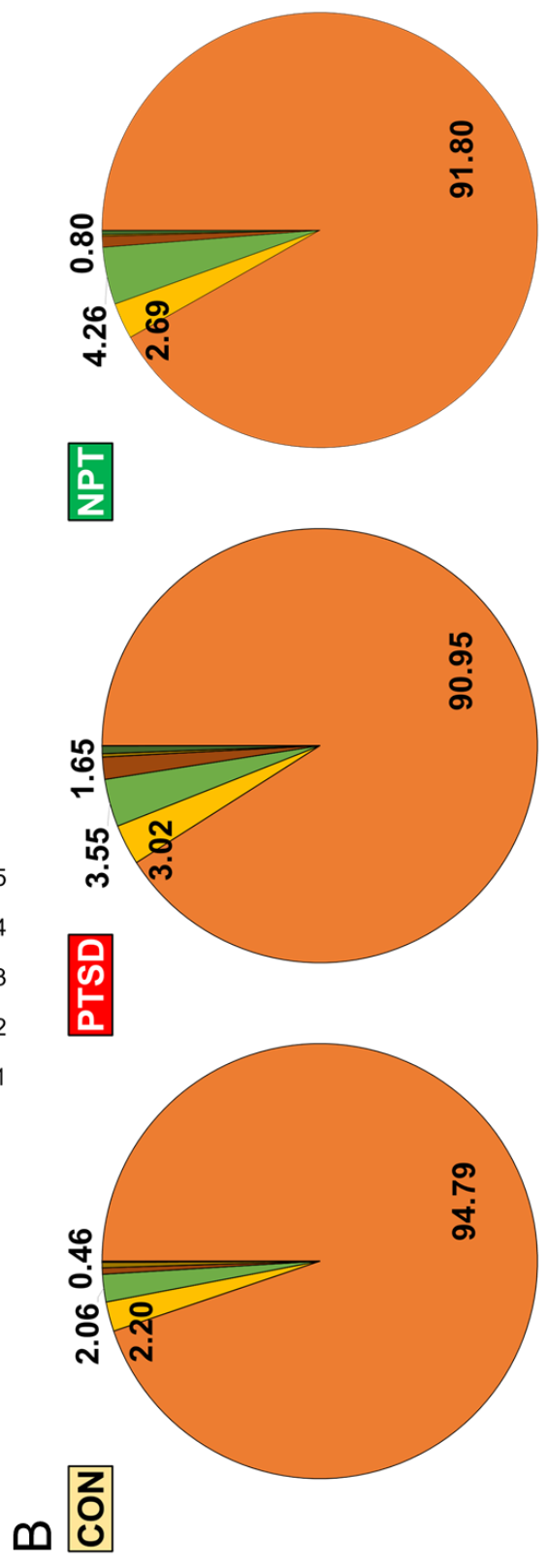
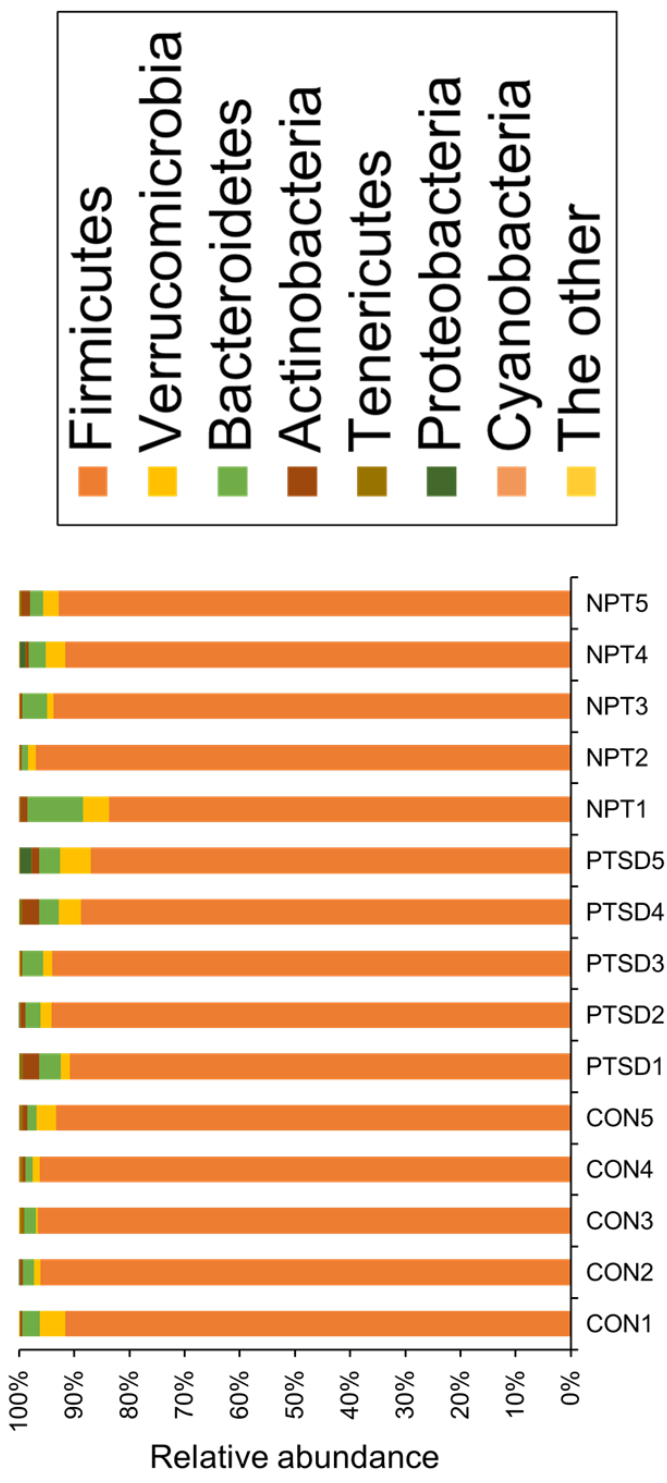
Genus	CON		LH		NLH		Kruskal-Wallis P Value	Steel-Dwass	
	Mean ± SE (%)	SE (%)	Mean ± SE (%)	SE (%)	Mean ± SE (%)	SE (%)		P Value	P value
Clostridiales incertae sedis	29.6665 ± 2.79	2.79	15.8018 ± 1.24	1.24	20.7234 ± 2.80	2.80	0.0407	CON vs LH	0.0326
Lachnospiraceae incertae sedis	17.0738 ± 2.68	2.68	10.0771 ± 1.15	1.15	13.7927 ± 1.32	1.32	0.1014		
Lactobacillus	10.8927 ± 1.07	1.07	22.5036 ± 2.20	2.20	13.4452 ± 2.25	2.25	0.0167	CON vs LH	0.0326
Oscillospira	7.7237 ± 1.20	1.20	3.2864 ± 1.14	1.14	6.3002 ± 1.02	1.02	0.0500		
[Ruminococcus]	5.5351 ± 0.77	0.77	5.0135 ± 0.58	0.58	5.9964 ± 0.48	0.48	0.7007		
Coprococcus	5.1522 ± 1.76	1.76	5.9013 ± 1.53	1.53	6.0364 ± 0.65	0.65	0.5761		
Turicibacter	3.2801 ± 0.54	0.54	9.5465 ± 1.59	1.59	5.3737 ± 0.96	0.96	0.0292	CON vs LH	0.0326
Ruminococcus	3.1728 ± 0.21	0.21	4.2252 ± 1.26	1.26	3.3148 ± 0.32	0.32	0.8258		
Peptostreptococcaceae incertae sedis	2.3304 ± 0.20	0.20	4.5191 ± 0.83	0.83	3.3783 ± 0.50	0.50	0.0485	CON vs LH	0.0326
Akkermansia	2.1974 ± 0.80	0.80	1.9639 ± 0.30	0.30	2.8521 ± 0.49	0.49	0.6031		
Clostridium	2.1533 ± 0.31	0.31	3.8920 ± 0.74	0.74	4.1808 ± 0.96	0.96	0.4089		
Ruminococcaceae incertae sedis	1.7582 ± 0.23	0.23	1.3899 ± 0.31	0.31	1.6280 ± 0.18	0.18	0.4909		
Roseburia	1.6500 ± 0.23	0.23	0.9156 ± 0.33	0.33	1.4071 ± 0.31	0.31	0.3253		
SMB53	1.4993 ± 0.25	0.25	3.2816 ± 0.81	0.81	2.5161 ± 0.37	0.37	0.1365		
S24-7 incertae sedis	1.3917 ± 0.20	0.20	1.9529 ± 0.49	0.49	3.1707 ± 0.69	0.69	0.0309	CON vs NLH	0.0446
[Mogibacteriaceae] incertae sedis	0.7687 ± 0.10	0.10	0.4628 ± 0.03	0.03	0.4052 ± 0.04	0.04	0.0151	CON vs NLH	0.0230
Blautia	0.5414 ± 0.26	0.26	0.6664 ± 0.42	0.42	0.7713 ± 0.36	0.36	0.8907		
RF39 incertae sedis	0.3690 ± 0.10	0.10	0.2143 ± 0.09	0.09	0.1640 ± 0.04	0.04	0.2683		
Rikenellaceae incertae sedis	0.3055 ± 0.10	0.10	0.1836 ± 0.07	0.07	0.3499 ± 0.14	0.14	0.6917		
Butyrivococcus	0.2925 ± 0.16	0.16	0.1359 ± 0.07	0.07	0.2645 ± 0.06	0.06	0.6878		
Bacteroides	0.2730 ± 0.07	0.07	0.2047 ± 0.12	0.12	0.1410 ± 0.04	0.04	0.1566		
Bifidobacterium	0.2420 ± 0.05	0.05	1.5455 ± 0.71	0.71	0.9765 ± 0.28	0.28	0.0500	CON vs LH	0.0326
Erysipelotrichaceae incertae sedis	0.2204 ± 0.09	0.09	0.2157 ± 0.14	0.14	0.1205 ± 0.03	0.03	0.7579		
Adlercreutzia	0.1956 ± 0.09	0.09	0.3427 ± 0.08	0.08	0.2090 ± 0.05	0.05	0.2505		
Clostridium	0.1533 ± 0.07	0.07	0.0379 ± 0.02	0.02	0.0516 ± 0.02	0.02	0.4385		
Clostridium	0.1147 ± 0.03	0.03	0.0524 ± 0.02	0.02	0.0835 ± 0.02	0.02	0.2505		
Clostridium	0.1021 ± 0.03	0.03	0.0739 ± 0.04	0.04	0.0691 ± 0.01	0.01	0.6542		
[Eubacterium]	0.1010 ± 0.07	0.07	0.0435 ± 0.04	0.04	0.0178 ± 0.01	0.01	0.2421		

表 1 急性ストレス負荷後における腸内細菌の相対豊富度  
(LH 群, 属レベル)

各グループにおける属レベルの相対豊富度の比較。存在比率 0.1%以上の上位 28 属。CON 群(n=5), LH 群(n=5), NLH 群(n=10)。LH 群において *Clostridiales incertae sedis* の相対豊富度が CON 群と比較して有意に低値であった(p<0.05)。また LH 群において *Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Peptostreptococcaceae incertae sedis*, *Bifidobacterium* の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった(p<0.05)。一方, NLH 群において *S24-7 incertae sedis* の相対豊富度が CON と比較して有意に高く, \*\*[*Mogibacteriaceae*] *incertae sedis* の相対豊富度が CON と比較して有意に低値であった(p<0.05)。

データは平均値±標準誤差で示した。統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した。

\*\* QIIME 解析時, Greengenes database により Clostridiales 目 *Mogibacteriaceae* 科として分類, 所属位置不明。

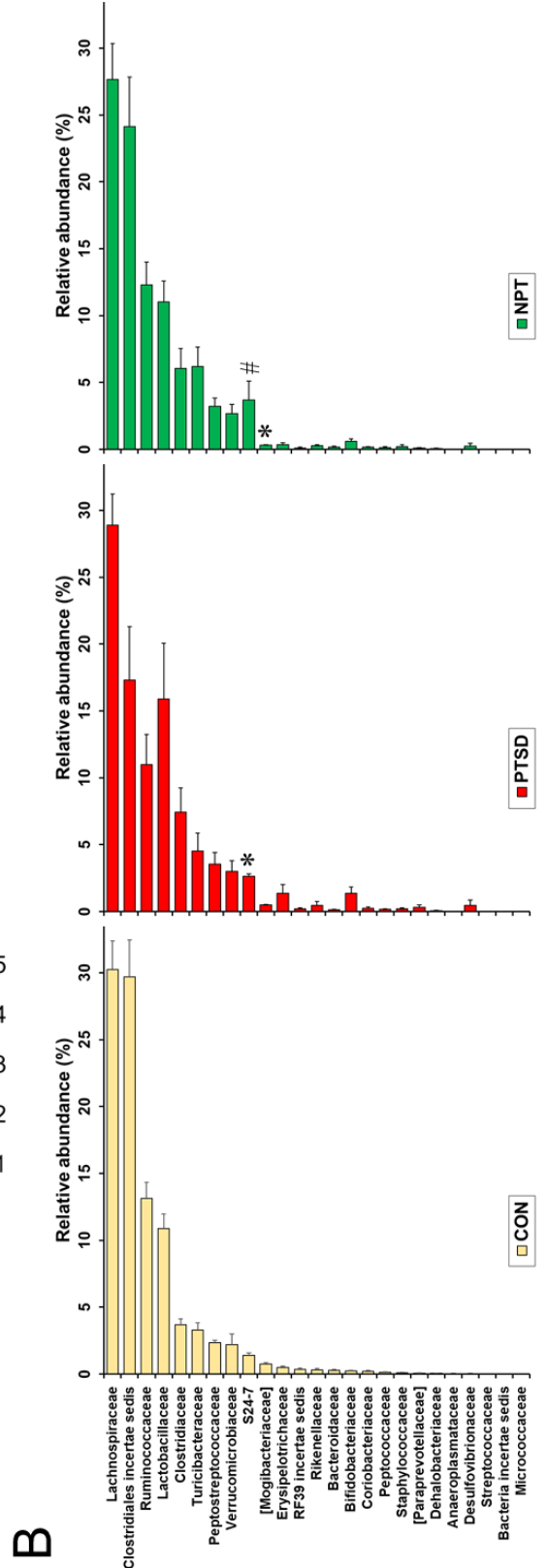
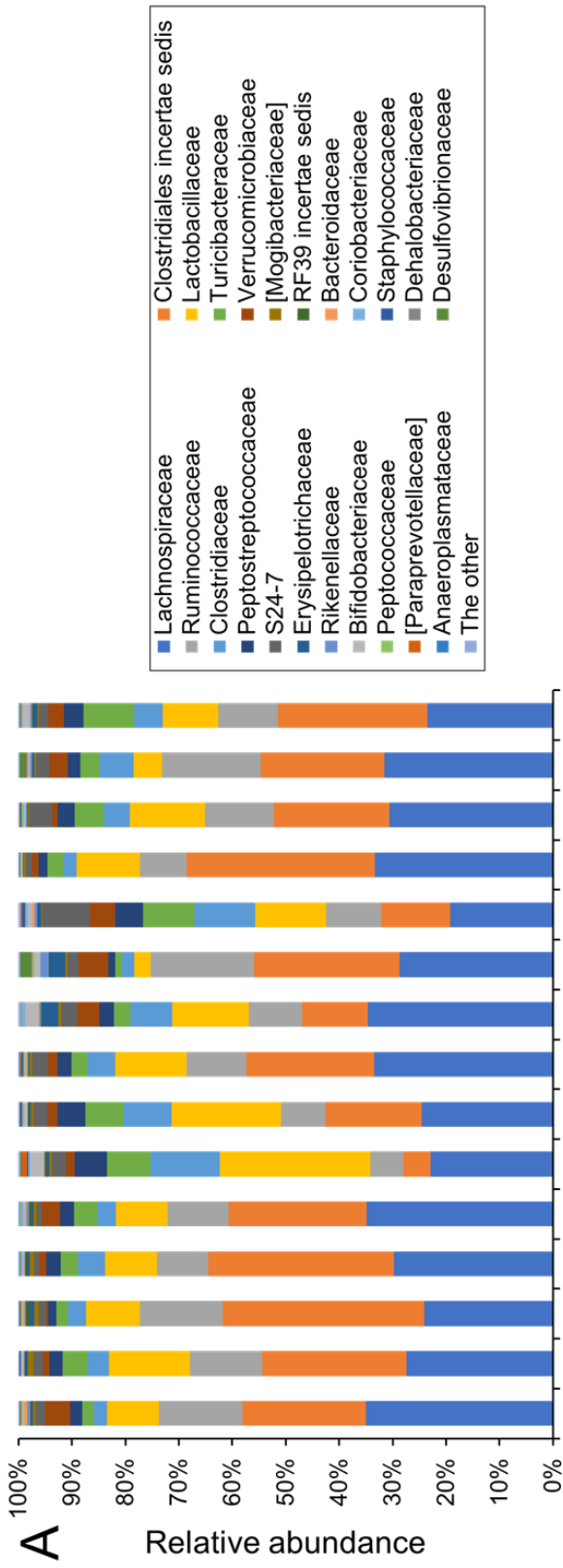


☒ 6

図 6 急性ストレス負荷後における腸内細菌叢の比較  
(PTSD 群, 門レベル)

- A 各個体における門レベルの相対豊富度.
- B 各グループにおける門レベルの相対豊富度の比較. CON 群 (n=5), PTSD 群 (n=5), NPT 群 (n=5).

B のデータは平均値で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した.



7



図 7 急性ストレス負荷後における腸内細菌叢の比較  
(PTSD 群, 科レベル)

- A 各個体における科レベルの相対豊富度. 存在比率 0.1%以上の上位 27 科.
- B 各グループにおける科レベルの相対豊富度の比較. 存在比率 0.1%以上の上位 27 科. CON 群 (n=5), PTSD 群 (n=5), NPT 群 (n=5). PTSD 群において S24-7 の相対豊富度が CON 群と比較して有意に高値であった (\* $p < 0.05$ ). 一方, NPT 群において \*[Mogibacteriaceae] の相対豊富度が CON 群と比較して有意に低値であった (# $p < 0.05$ ).

B のデータは平均値±標準誤差で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した.

- \* QIIME 解析時, Greengenes database により Clostridiales 目 Mogibacteriaceae 科として分類.

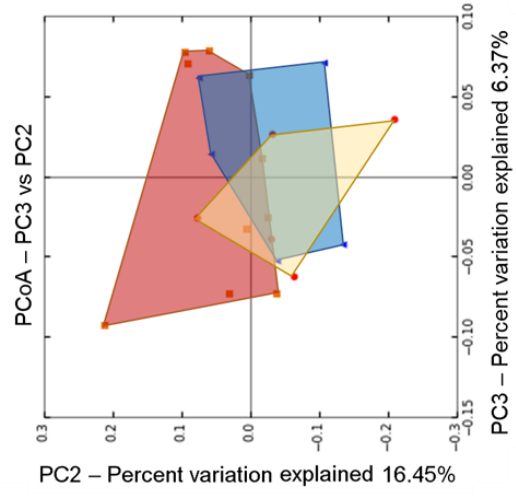
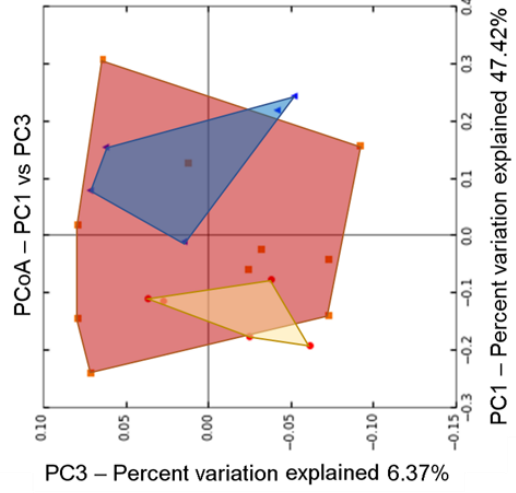
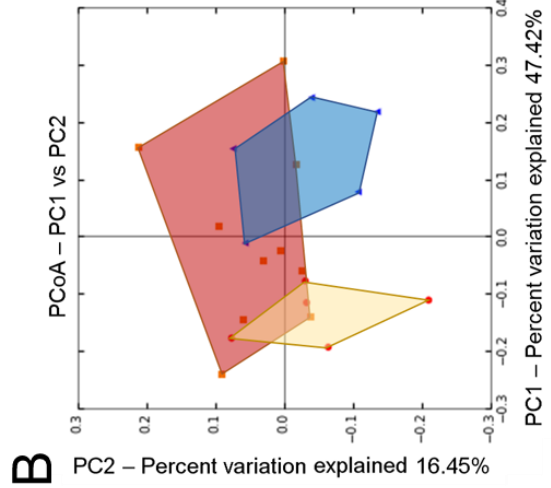
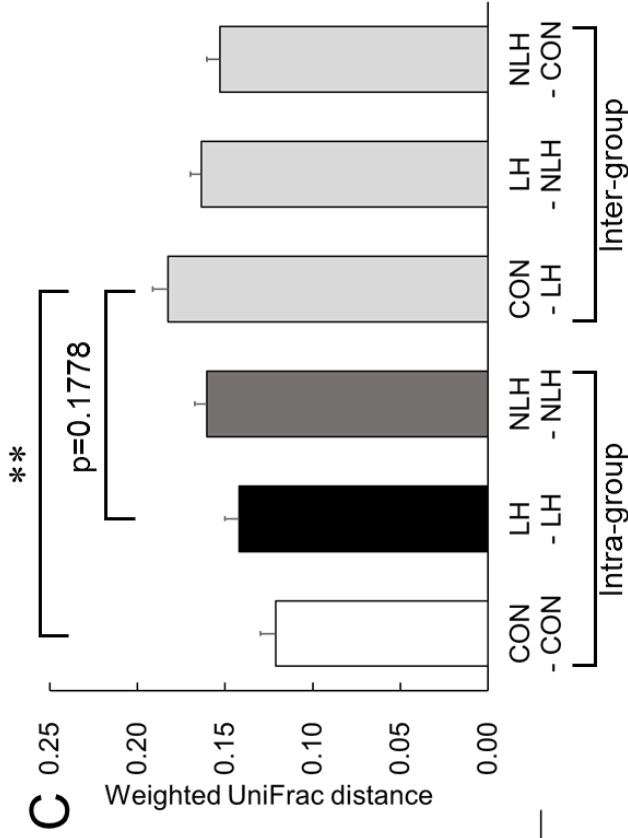
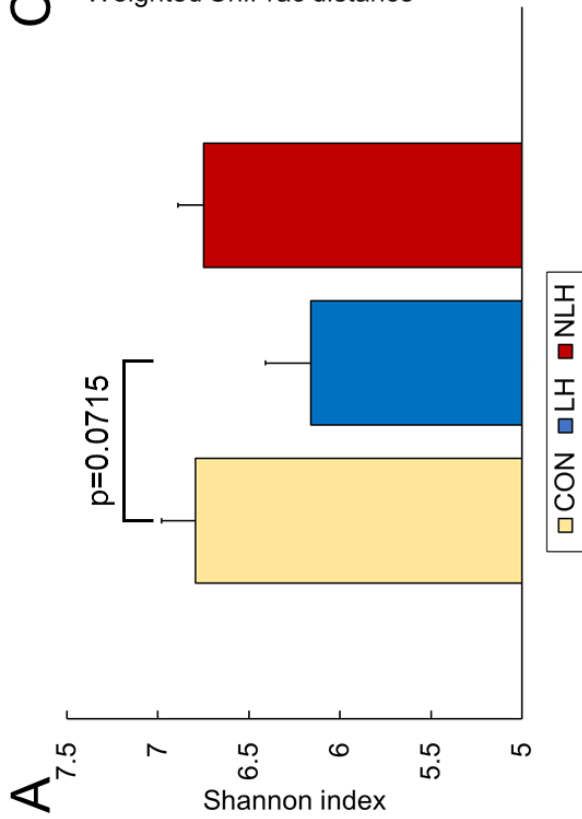


図 8 急性ストレス負荷後における腸内細菌の多様性の検討  
(LH 群)

- A  $\alpha$  多様性の評価, Shannon index の比較. CON 群 (n=5), LH 群 (n=5), NLH 群 (n=10). LH 群は他二群と比較して低い傾向を示した.
- B  $\beta$  多様性の評価, PCoA. CON 群 (n=5), LH 群 (n=5), NLH 群 (n=10). LH 群は他二群と比較して異なる分布を示した.
- C 平均 UniFrac 距離 (weighted) 解析. CON 群内 (n=10), LH 群内 (n=10), NLH 群内 (n=45), CON 群—LH 群間 (n=25), LH 群—NLH 群間 (n=50), NLH 群—CON 群間 (n=50). CON 群—LH 群間の平均 UniFrac 距離が CON 群内の平均距離よりも有意に高く (\*\*p<0.01), また LH 群内の平均距離よりも高い傾向を示した.

A, C のデータは平均値±標準誤差で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した.

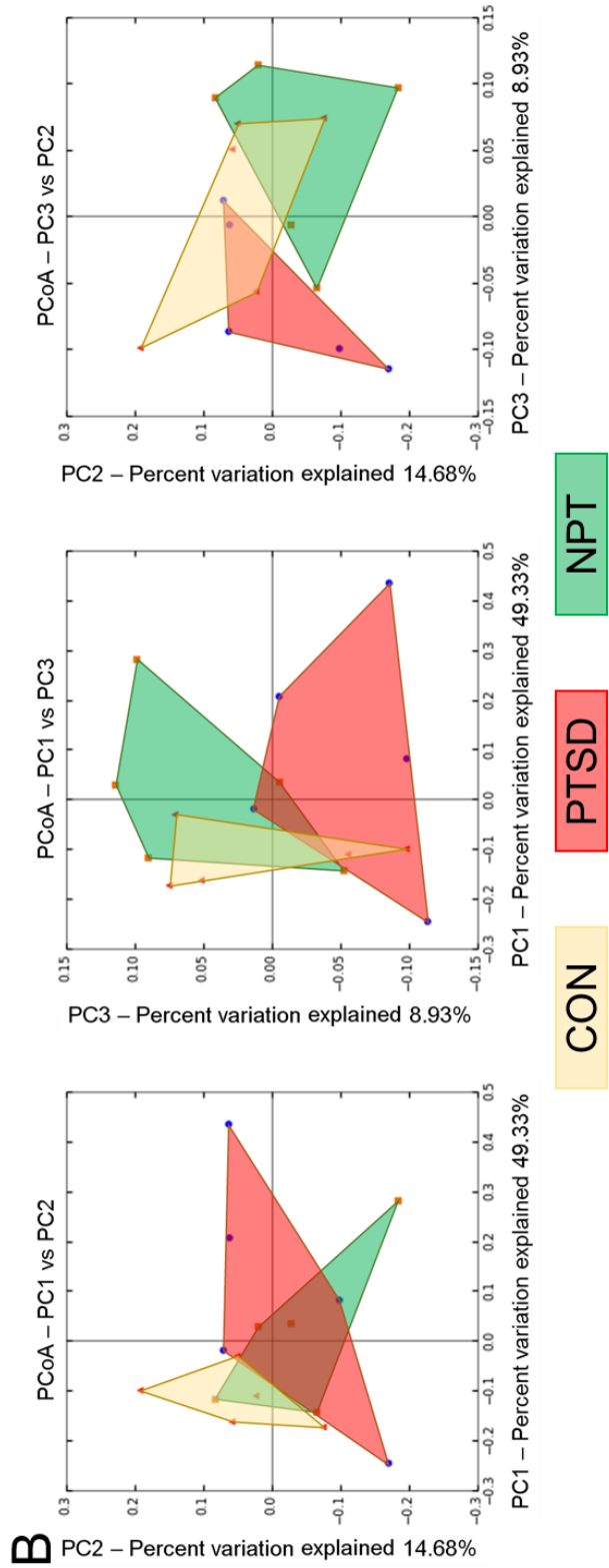
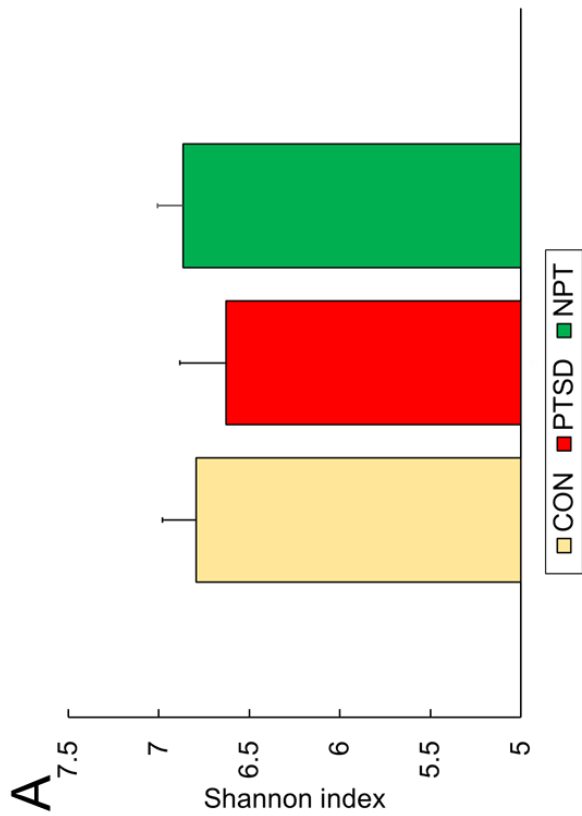


図 9 急性ストレス負荷後における腸内細菌の多様性の検討  
(PTSD 群)

A  $\alpha$  多様性の評価, Shannon index の比較. CON 群 (n=5), PTSD 群 (n=5), NPT 群 (n=5).

B  $\beta$  多様性の評価, PCoA. CON 群 (n=5), PTSD 群 (n=5), NPT 群 (n=5). PTSD 群は CON 群と比較して異なる分布を示した.

A のデータは平均値±標準誤差で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した.

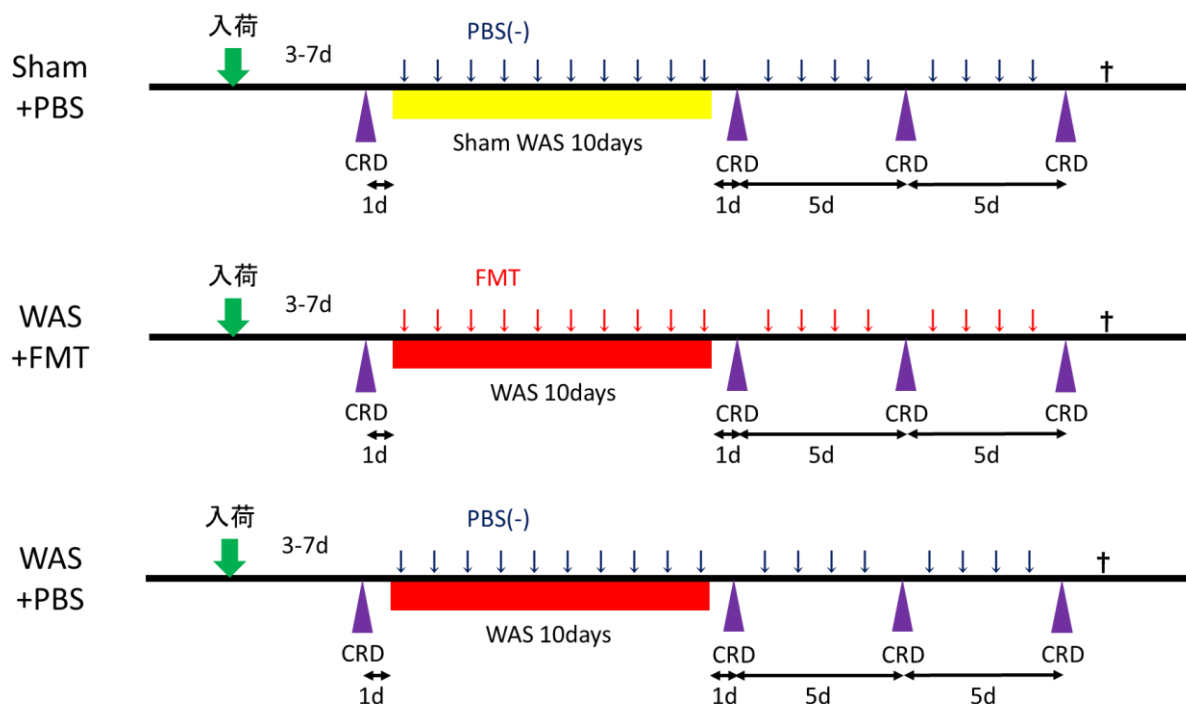


図 10 「水回避ストレスモデルを用いた内臓知覚過敏に対する糞便微生物移植の有効性の検討」のタイムライン

WAS または Sham WAS の負荷は 1 日 1 時間，10 日間連続で実施し，FMT は WAS 負荷開始日より 1 日 2 回，CRD 実施日を除いて連日実施した．また WAS 負荷開始の前日 (day0)，WAS 負荷終了の翌日 (day11)，6 日後 (day16)，11 日後 (day21) に CRD を実施した．

WAS	water avoidance stress	水回避ストレス
CRD	colorectal distension	結腸直腸膨張刺激
FMT	fecal microbiota transplantation	糞便微生物移植

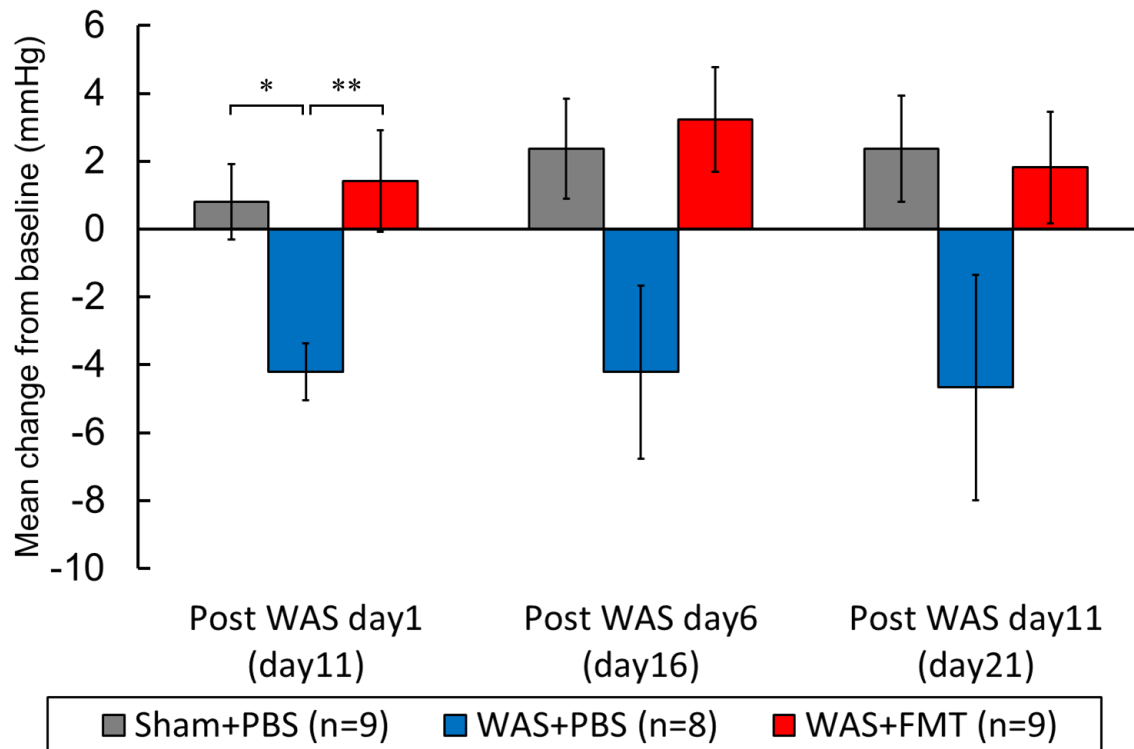


図 11 WAS 負荷前後の CRD の変化

Sham+PBS 群(n=9), WAS+PBS 群(n=8), WAS+FMT 群(n=9)における比較. WAS 負荷前後における CRD の閾値の変化量を比較した. WAS 負荷終了翌日 (day11)では WAS+PBS 群における閾値の変化量は Sham+PBS 群と比較して有意に低下しており (\* $p < 0.05$ ), WAS+FMT 群における閾値の変化量は WAS+PBS 群と比較して有意に上昇していた (\*\* $p < 0.01$ ).

以降 day16 と day21 ではいずれも有意差は認めなかったものの, WAS+PBS 群における閾値の変化量は低下している傾向であった.

データは平均値±標準誤差で示した. 統計には one way ANOVA, post hoc には Tukey-Kramer 法を使用した.

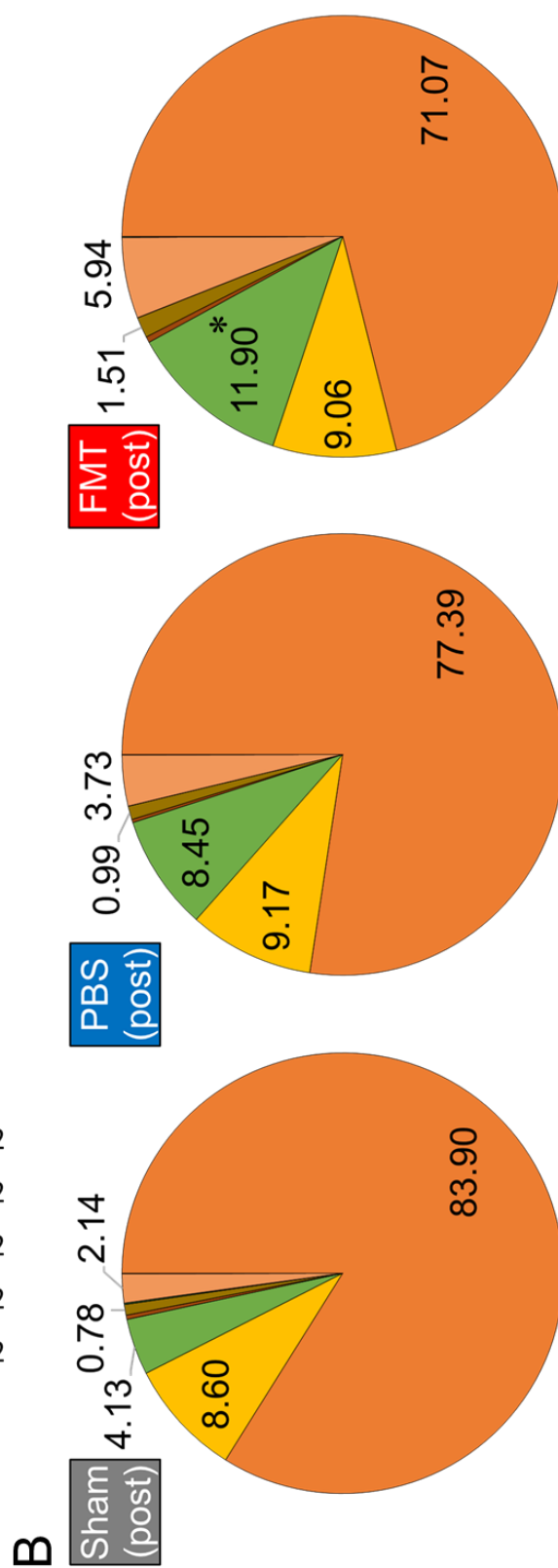
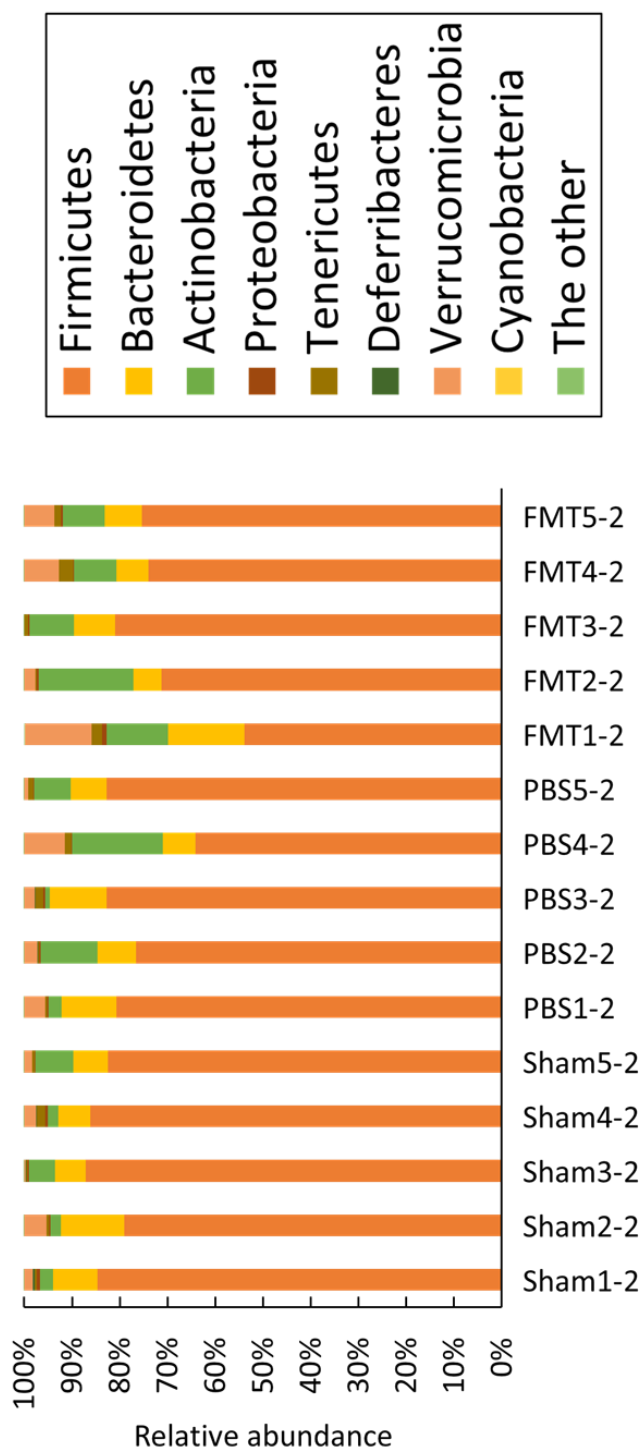




図 12 WAS 負荷終了後(day10)の腸内細菌叢の比較(門レベル)

- A 各個体における門レベルの相対豊富度.
- B 各グループにおける門レベルの相対豊富度の比較. Sham+PBS 群 (n=5), WAS+PBS 群 (n=5), WAS+FMT 群 (n=5). WAS+FMT 群において Actinobacteria の相対豊富度が Sham+PBS 群と比較して有意に高値であった(\*p<0.05).

B のデータは平均値で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した. なお, この図における“Sham”は Sham+WAS, “PBS”は WAS+PBS, “FMT”は WAS+FMT をそれぞれ表している.

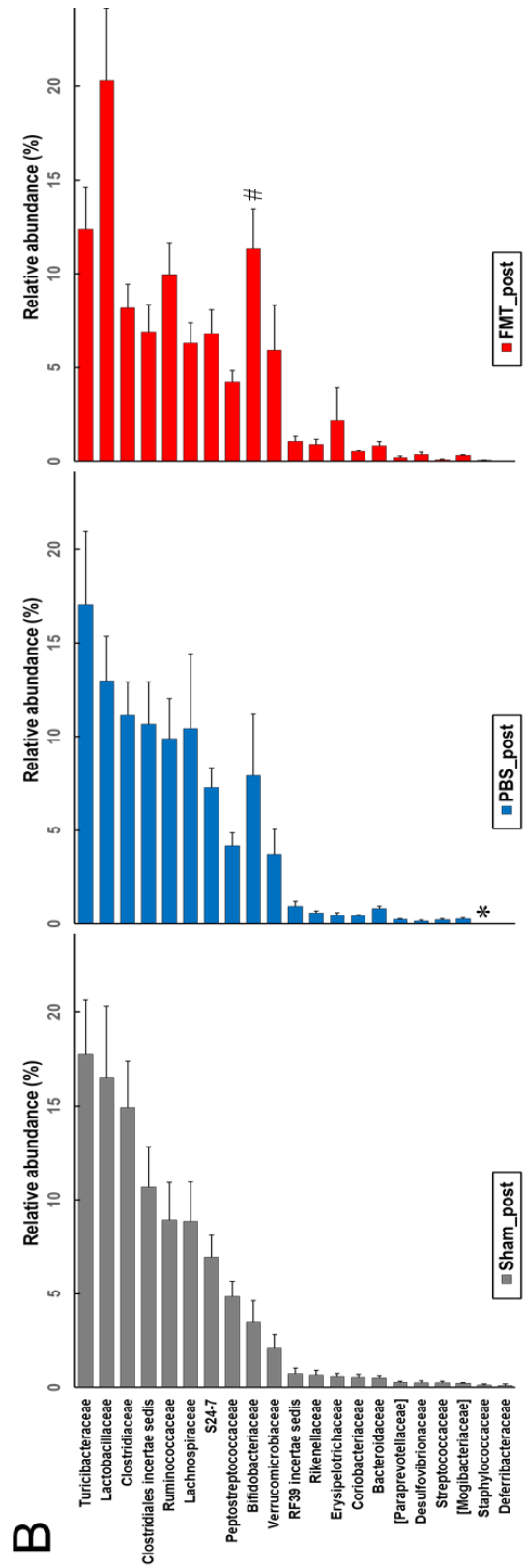
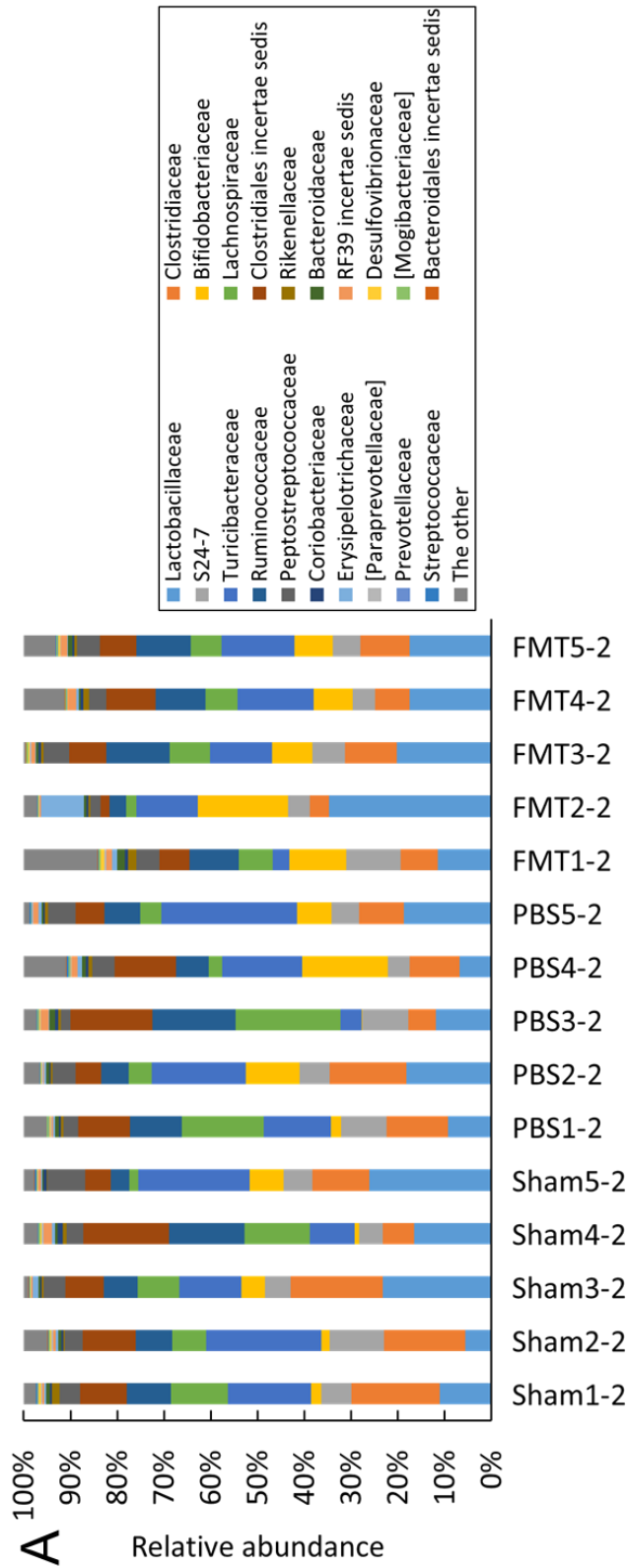


図 13 WAS 負荷終了後(day10)の腸内細菌叢の比較(科レベル)

- A 各個体における科レベルの相対豊富度. 存在比率 0.1%以上の上位 21 科.
- B 各グループにおける科レベルの相対豊富度の比較. 存在比率 0.1%以上の上位 21 科. Sham+PBS 群(n=5), WAS+PBS 群(n=5), WAS+FMT 群(n=5). WAS+FMT 群において Bifidobacteriaceae の相対豊富度が Sham+PBS 群と比較して有意に高く( $\#p<0.05$ ), また WAS+PBS 群において Staphylococcaceae の相対豊富度が Sham+PBS 群と比較して有意に低値を示した( $*p<0.05$ ).

B のデータは平均値±標準誤差で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した. なお, この図における“Sham”は Sham+WAS, “PBS”は WAS+PBS, “FMT”は WAS+FMT をそれぞれ表している.

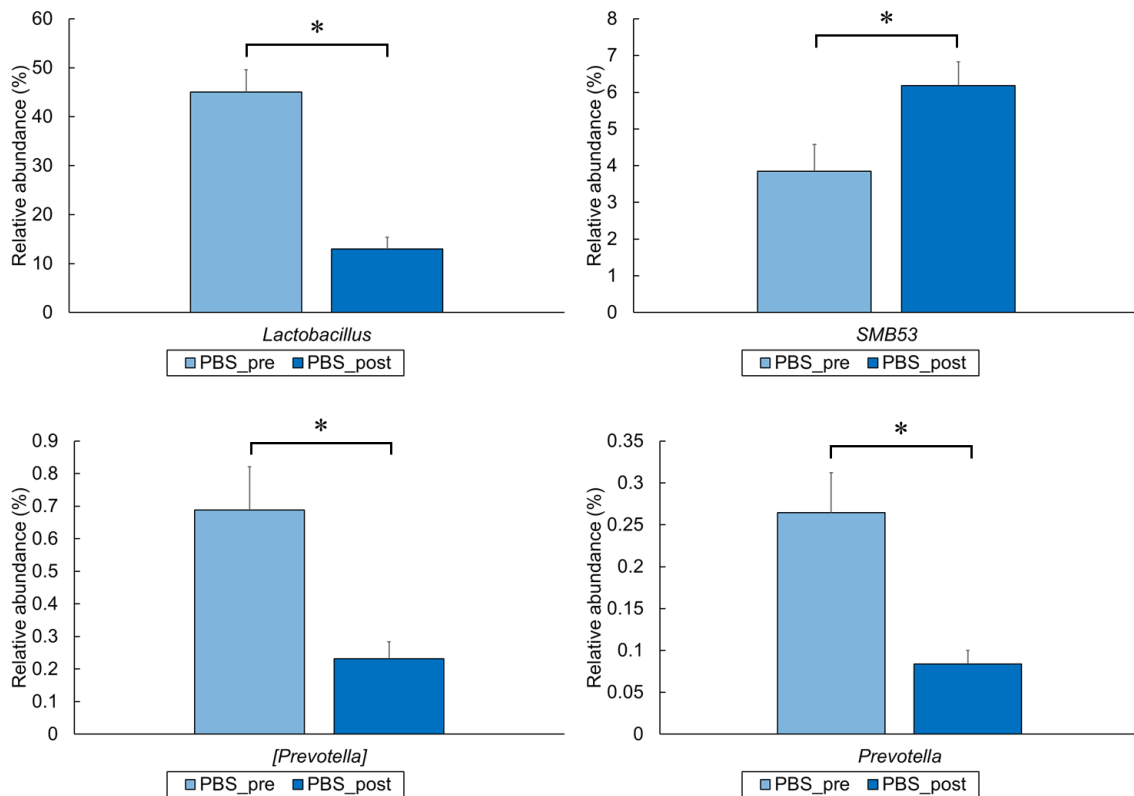


図 14 WAS 負荷前後における腸内細菌叢の変化

それぞれの群において WAS 負荷前後の各腸内細菌の変化を比較した。WAS 負荷後における存在比率 0.1% 以上の上位 31 属において、WAS+PBS 群で有意な変化を認め、WAS+FMT 群と Sham+PBS 群で有意な変化を認めなかった菌は、*Lactobacillus*, *SMB53*, \*[*Prevotella*], \*\**Prevotella* であった(すべて \* $p < 0.05$ )。

データは平均値 ± 標準誤差で示した。統計には paired t-test を使用した。なお、この図における“PBS”は WAS+PBS を表している。

- \* QIIME 解析時、Greengenes database により Paraprevotellaceae 科 *Prevotella* 属として分類。
- \*\* QIIME 解析時、Greengenes database により Prevotellaceae 科 *Prevotella* 属として分類。

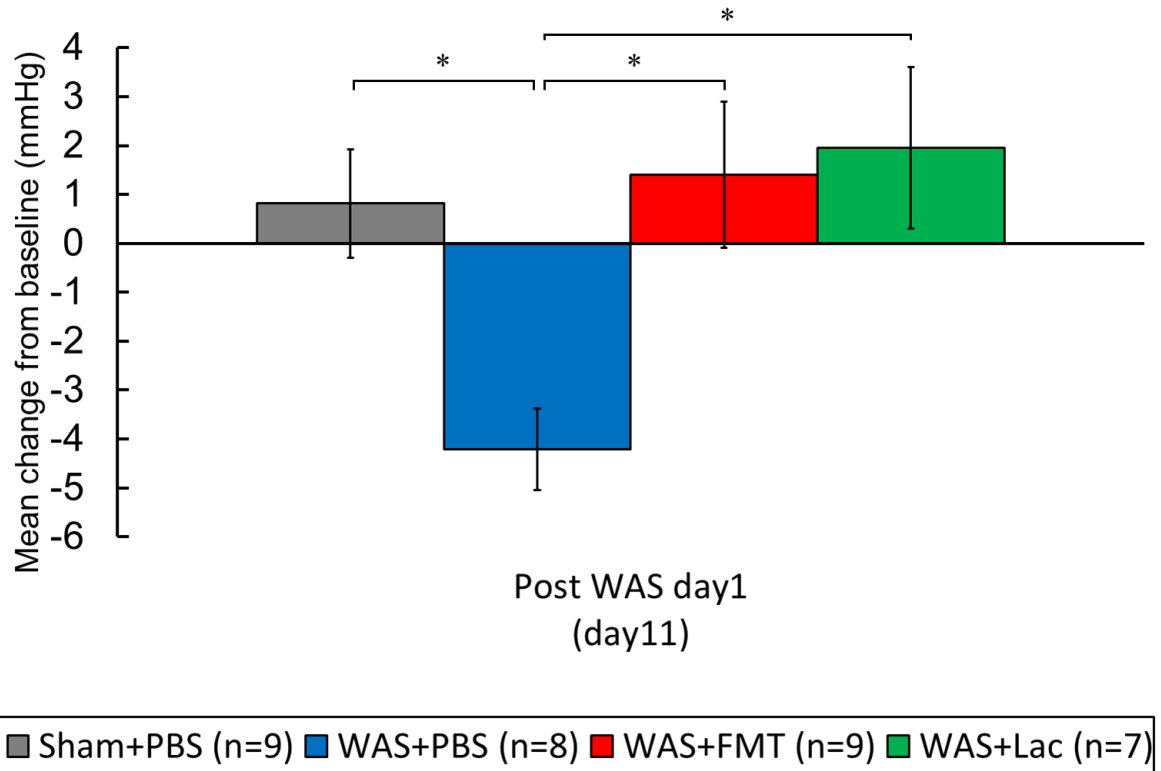


図 15 WAS 負荷中 Lactobacillus 投与における CRD の変化

WAS+Lac 群(n=7), Sham+PBS 群(n=9), WAS+PBS 群(n=8), WAS+FMT 群(n=9)における比較. WAS 負荷前後における CRD の閾値の変化量を比較した. WAS+PBS 群における閾値の変化量は Sham+PBS 群と比較して有意に低下しており (\* $p < 0.05$ ), WAS+FMT 群と WAS+Lac 群における閾値の変化量は WAS+PBS 群と比較して有意に上昇していた(双方とも \* $p < 0.05$ ).

データは平均値±標準誤差で示した. 統計には one way ANOVA, post hoc には Tukey-Kramer 法を使用した.

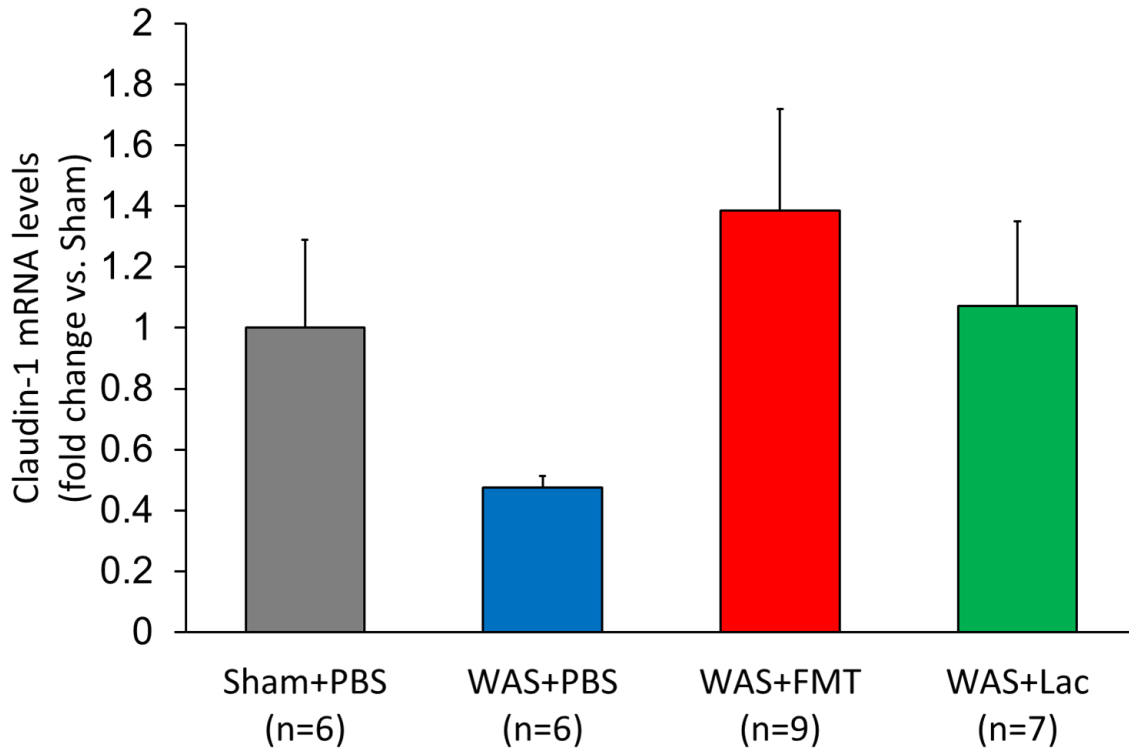


図 16 WAS 負荷中 Lactobacillus 投与における大腸タイトジャンクション mRNA 発現の変化

WAS+Lac 群(n=7), Sham+PBS 群(n=6), WAS+PBS 群(n=6), WAS+FMT 群(n=9)における比較. 近位結腸における Claudin-1 の mRNA 発現量を比較した. WAS+PBS 群では Sham+PBS 群と比較して減少する傾向を認めた.

データは平均値±標準誤差で示した. 統計には Kruskal-Wallis 検定, post hoc には Steel-Dwass 法を使用した.