



シリーズ 腸内細菌叢 2

# 腸内細菌叢の消化管疾患への関与

## Association between Gut Microbiota and Gastrointestinal disease

おお くさ とし ふみ  
大 草 敏 史  
Toshifumi OHKUSA

### はじめに

腸内細菌の研究は長年、培養法により培養可能な菌種を対象におこなわれていたが、1990年代頃から細菌に特異的な遺伝子である16SリボソームRNA (16S rRNA) とそれをコードする遺伝子16S rDNAをターゲットとするダイレクトシークエンスが行われるようになり、これまでに知られていない菌種の検出が可能となってきた。それに加えて、次世代シークエンサーの登場により、遺伝子解析の迅速化がはかられ、メタゲノム解析が可能となって莫大な量の腸内細菌叢 (Gut microbiota) の解明が進んできた。そして、健常者と比べて、各種疾患でそのmicrobiota構成が異なっていることが分かってきた (dysbiosis)。そのdysbiosisが炎症性腸疾患をはじめ、過敏性腸症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、大腸癌、2型糖尿病や肥満に関与していることが報告され、さらには自閉症などとも関係があるのではないとも言われてきている (表1)。本稿では腸内細菌叢と消化管疾患とのかかわりを概説する。

表1 腸内細菌叢のdysbiosisの関与が報告されている疾患

大腸癌
炎症性腸疾患
過敏性腸炎と小腸細菌異常増殖症
<i>Clostridium difficile</i> 腸炎
抗菌薬起因性下痢
肝臓疾患 (ASH, NASH)
肥満
2型糖尿病
アレルギー疾患
自閉症などの精神疾患
多発性硬化症

### I. 腸内細菌と大腸癌

今まで大腸癌に関与している腸内細菌としては、細菌培養法の解析により、ある種の病原性 *E. coli*、腸管毒素原性 *Bacteroides fragilis* や *Streptococcus bovis* などが挙げられてきた<sup>1)</sup>。その内 *Streptococcus bovis* については、最近メタ解析が行われており、大腸癌患者の糞便培養で *Streptococcus bovis* の検出率が高く、オッズ比2.52 (95% CI 1.14-5.58) と高い関連性が示唆されている<sup>2)</sup>。これに対して最近の細菌ゲノム解析法の Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) と Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) を組み合わせた方法では、大腸癌患者の糞便で *Clostridium coccoides* と *Clostridium leptum* group の遺伝子多型が健常者より多く認められ、大腸癌組織では周囲の非癌部と比べて *Coriobacteria* が増加し、*Enterobacteria* が減少していたと報告されている<sup>1)</sup>。また、pylosequence法では大腸癌の糞便で *Bacteroidetes* と *Prevotella* が増加していたと報告している。さらに、最近Ahnらはpylosequence法で、*Bacteroidetes* も増加していたが、*Fusobacterium* が一番多く、次に *Porphyromonas* が増加していたと報告している<sup>3)</sup>。この *Fusobacterium* については、同菌属が癌組織で有意に多く検出され、FISH法でも非癌部粘膜とくらべ多かったという報告<sup>4)</sup> や癌組織から培養されたという報告もなされており<sup>5)</sup>、現時点で一番注目されている。

### II. 腸内細菌と炎症性腸疾患 (IBD)

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease : IBD)

は潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis : UC) とクローン病 (Crohn's Disease : CD) に大別され、免疫異常で自己の腸管粘膜に対してリンパ球を中心とした炎症性細胞が攻撃し炎症・潰瘍が起こるといった自己免疫性疾患であるといわれてきていた。しかし、IL-10 ノックアウトマウスなどの自然発症腸炎モデルが無菌にすると腸炎が発症しないことや、細菌構成成分の細胞内レセプターの NOD2 (CARD15) の機能異常が CD 発症に関与していることが明らかにされたことから、腸内細菌の役割がクローズアップされ、最近では、IBD は腸内細菌感染症ではないかと言われてきている<sup>6)</sup> その根拠となる事項を表 2 に提示した。

1983 年 Warren と Marshall により *H. pylori* が発見され、胃・十二指腸潰瘍や胃がんの原因であることが解明され、潰瘍学は革命的進歩を遂げた。すなわち、潰瘍と癌が実は感染症であったということである。われわれはこの発見を期に、潰瘍性大腸炎も大腸に潰瘍の多発する疾患であることから *H. pylori* と同様に潰瘍を引き起こす原因菌がいるのではないかと考え、まず、潰瘍性大腸炎の病変粘膜に細菌がいるのかどうかアクロジン・オレンジ染色を用いて検討した。その結果、病変粘膜に多数の細菌が付着し、一部は侵入していることを見出し、1993 年に JGH 誌に報告した<sup>7)</sup>。その後、1999 年 Schultsz らは in situ hybridization を用いて、細菌特異的な 16S rRNA を染色することで UC も CD についても健常コントロールと比べ有意に多く細菌が直腸粘膜の粘液層に棲みついていると報告している<sup>8)</sup>。彼らは、粘膜には侵入していないと報告したが、2002 年 Swidsinski らは、同じ方法で光学顕微鏡だけでなく透過電顕を用いて検討し、健常コントロールと腸炎症状があったものと、2 カ月以内に無症状と

なった自然治癒腸炎とを比べ、UC, CD で粘膜細菌が有意に多く検出され、さらに電顕所見から細菌が粘膜細胞内に侵入していたと報告している<sup>9)</sup>。また、細菌培養も施行し、それらが腸内細菌であることを明らかにした。すなわち、健常者の腸管粘膜では腸内細菌の付着や侵入を防ぐ粘膜防御機構が機能しているが、IBD ではその機能が低下し、粘膜に多数の腸内細菌の付着や侵入をゆるしているということである。

IBD では腸内細菌叢のバランスが崩れ dysbiosis になっているということも報告されている。Swidsinski らは前述したように UC, CD で in situ hybridization により粘膜細菌が有意に多いことを報告しているが、同時に粘膜培養を行い、嫌気性菌、とくに *Bacteroides* が、また、好気性菌では *Enterobacteriaceae* がコントロールと比べ有意に多かったと報告している<sup>9)</sup>。培養法ではなく、細菌の 16S リボゾーム RNA (16S rRNA) をターゲットとする細菌解析法による解析では、CD では *Bacteroides* の減少はみられず、*Clostridia*、特に *Clostridium* IXa や IV group が減少しているといった報告も多い<sup>10~12)</sup>。さらに、*Clostridium* IV group に属している *Fecalibacterium parausnitzii* (酪酸産生菌) が IBD で減少しているといった報告もある<sup>13)</sup>。また、最近、この *Fecalibacterium parausnitzii* に加えて、同じ酪酸産生菌の *Roseburia hominis* も UC で減少していたという多数例での解析も報告もされた<sup>14)</sup>。この著者らは酪酸産生が減少して発症したのではないかと推測したものの、実際の便中の短鎖脂肪酸分析では特に酪酸は減少していなかった。本邦でも、Andoh らが、T-RFLP 法による糞便細菌叢の解析で、CD では活動期、寛解期ともに *Fecalibacterium parausnitzii* が減少しており、活動期で *Bacteroides* が増加、*Bifidobacterium* が減少していたと報告している<sup>15)</sup>。また CD では糞便や粘膜で *E. coli* が増加しているといった報告も多い<sup>9, 16~19)</sup>。この *Bacteroides* や *Proteobacteria* 門の *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* など) といった細菌群は compromised host においては敗血症をはじめとした日和見感染を引き起こす病原性菌であり、腸内細菌の中では悪玉菌 = aggressive microbial species とされている。これに対して善玉菌 = beneficial microbial species = probiotics である *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* が UC や CD で減少しているといった報

表 2 炎症性腸疾患の腸内細菌説の根拠

根 拠
<ul style="list-style-type: none"> <li>免疫異常自然発症腸炎は無菌状態では発症せず、腸内細菌が原因である。</li> <li>IBD の腸管粘膜には細菌が異常に多い。</li> <li>正常人と比べて悪玉菌 &gt; 善玉菌とバランス異常がある。</li> <li>遺伝子多型分析により、IBD では細菌排除機構や粘膜防御機構の低下に結びつく遺伝子多型が多い。</li> <li>IBD では腸内細菌に対する Tolerance が低下して過剰免疫反応 = 炎症が起こる。</li> <li>自然免疫の主体である Toll-like receptor (TLR) は腸管上皮に発現し、その多くが細菌をリガンドとしている。</li> </ul>

表3 潰瘍性大腸炎の原因ではないかと推測されている細菌

報告者	報告年	原因菌	検出材料
Roediger	1993	sulphate-reducing bacteria	粘膜
Matsuda	2000	<i>Bacteroides vulgatus</i>	粘膜
Ohkusa	2002	<i>Fusobacterium varium</i>	粘膜
Swidsinski	2002	<i>Bacteroides, Enterobacteriaceae</i>	粘膜

告もある<sup>19, 20)</sup>。このように、IBDのdysbiosisの内容には諸説があるが、大きくは、病原性菌を多く含むProteobacteria門が増加し、probioticsを含むFirmicutes門が減少していると言われている<sup>6)</sup>。

### 1. UCの原因細菌

歴史的には多数の細菌種がUCの主要な病因と推測されてきたが、その中で、最近の研究で原因菌として疑われている主な菌種や菌群を表3に提示した。

Roedigerらは、硫化水素を産生する硫酸還元細菌群(sulphate-reducing bacteria, SRB)がUCで多く、同菌群によって産生される硫化水素が酪酸の吸収を阻害し、細胞の増殖を過剰にさせ、細菌を貪食、殺菌することを阻害するとともに、粘膜細胞に対して毒性を有していることから、硫化水素を産生するSRBがUCの原因ではないかとしている<sup>21, 22)</sup>。これは、特定の菌種でなく硫化水素を産生する菌群を原因としてとらえている点で興味深い。

Matsudaら<sup>23)</sup>は直腸粘膜の培養と血清抗体検査より*Bacteroides vulgatus*が原因菌ではないかと報告している。

筆者らは、UCの手術切除標本の病変粘膜を詳細に調べ、桿菌が病変粘膜に付着し、また潰瘍部分では粘膜内に侵入していることを報告した<sup>7)</sup>。そしてUC患者の粘膜の炎症部位から分離同定した*Fusobacterium varium* (*F. varium*)の検出率が、CD、虚血性腸炎または大腸腺腫のある患者や健常人より有意に高く、血清抗体価もUC患者で有意に高いことを報告した。また免疫組織化学染色法を用いて、*F. varium*が粘膜の炎症部位に、他の疾患患者や健常人と比べて高率に存在することを証明した<sup>24)</sup>。さらに、*F. varium*はベロ毒素の遺伝子がないにもかかわらずベロ細胞毒性を示したため、その毒性のもとを検索した。その結果、同菌の産生する酪酸がベロ細胞毒性を持つことを明らかにした。そして、同菌の産生する酪酸の注腸で、アポトーシスが生じ、マウスにUC類似病変が惹起されていることを

示した<sup>25)</sup>。酪酸は大腸においては腸上皮のエネルギー源といわれているが、アポトーシスの誘導作用もある<sup>26)</sup>。菌垢の最終代謝物である酪酸が菌周病の原因であるという以前の報告でも酪酸に毒性があると言われている<sup>27)</sup>。さらに、新生児壊死性腸炎は酪酸産生菌によって起こるとも報告されている<sup>28)</sup>。これらの報告は、われわれの*F. varium*が大腸粘膜に付着・侵入し、酪酸を産生することによって大腸潰瘍が惹起されるといった説を支持するものである。さらに、*F. varium*が大腸粘膜細胞に付着・侵入し、粘膜からIL-8, TNF $\alpha$ などの炎症性サイトカイン産生を著明に促進する作用があることも確認した<sup>29)</sup>。以上から、同菌が潰瘍に加えて炎症も惹起し、潰瘍性大腸炎を引き起こしているのではないかと考えている(図1)。

この*F. varium*と潰瘍性大腸炎に関しては、名古屋大学のMinamiらも、UC患者の*F. varium*感染率をWestern-blotting法を用いて検討しているが、その結果、血清抗体が認められたのはUC 112例中45例(40.2%)であり、健常対照者128名中20名(15.6%)と比べ有意に感染率が高かったと報告している(p<0.01)<sup>30)</sup>。さらに、彼らは、抗体陽性のUCの方が陰性の患者と比べ、より活動性が高く、全大腸炎型といった病変範囲が広いものが多かったと報告している。滋賀医大のAndohらは、UCの糞便細菌叢を16S rRNA geneを用いたT-RFLP法(Terminal

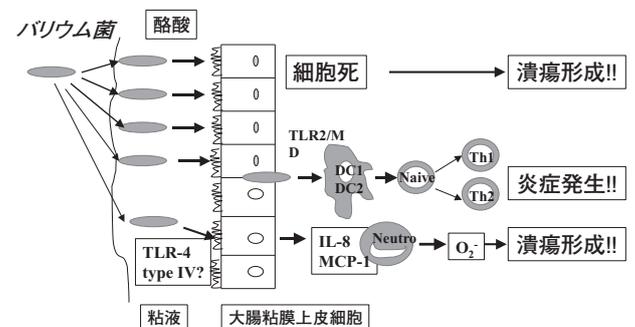


図1 *F. varium*(バリウム菌)による大腸潰瘍と炎症の発生(仮説)

Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis) で検索しているが、それによると、活動期と非活動期の細菌叢の比較で、活動期では *Fusobacterium* をはじめ *Eubacterium* や Unclassified bacteria が多かったと報告している<sup>31)</sup>。

筆者らは、その後 *F. varium* を除菌するために、*F. varium* 抗体陽性の UC 患者に、同菌に感受性がある抗菌剤 3 剤 (アモキシシリン、テトラサイクリン、メトロニダゾール; ATM 療法) を併用して投与したところ、UC の症状と内視鏡および病理組織所見の改善が見られた<sup>32)</sup>。さらに多施設共同の 200 名余の二重盲検プラセボ対照試験でも ATM 投与群はプラセボ群と比べて有意に高率に改善と緩解が得られている<sup>33)</sup>。以上より同菌が UC の原因の 1 つである可能性は高いと考えられている。

## 2. CD の原因細菌

CD の原因細菌としていくつかの細菌が報告されているが (表 4)、その中でもっとも注目されているものは Chiodini ら<sup>34)</sup> が報告した *Mycobacterium paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*; 現在 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* とよばれている) である。*M. paratuberculosis* は家畜の伝染病であるヨーネ病の起炎菌として知られている。ヨーネ病は下痢や粘血便などを呈する慢性腸炎であり、肉眼的に小腸や大腸潰瘍を、そして病理学的には非乾酪性肉芽腫を伴い、ヒト CD の動物モデルといっても過言でないほど CD に酷似している。この菌は大変発育が遅く、通常の方法での培養同定が難しい非定型抗酸菌であるが、最初に CD から分離培養したのが、Chiodini らである。その後 Sanderson ら<sup>35)</sup> は、PCR 法を用いてこの菌に特異的な DNA 断片 (IS900) が、CD 患者組織の 65% に検出されたと報告した。一方 UC 患者では 4%、そして対照群では 13% の検出率であった。Wall ら<sup>36)</sup> も同様な方法で CD 患者の 20% に同菌の存在が認められると報告した。しかし、PCR 法で解析を行ったが病変組織

から *M. paratuberculosis* は検出されなかったという報告や、血清学的にも免疫組織染色によっても *M. paratuberculosis* は検出されなかったという報告もある<sup>37, 38)</sup>。これに対し、Ryan らは、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法で肉芽腫組織のみをくり抜いて DNA を抽出し PCR をおこなったところ、CD 患者の肉芽腫からは IS900 が 40% に検出され、腸結核やサルコイドーシスなどの肉芽腫からは検出されなかったと報告している<sup>39)</sup>。さらに、驚くべきことに Naser らは CD 患者の末梢血に、高い割合で生きた *M. paratuberculosis* が存在することを培養と PCR 法によって証明した<sup>40)</sup>。CD の *M. paratuberculosis* 病因説の真偽をめぐって、今なお多くの議論が繰り返されているが、最近になり抗 mycobacterium 作用のある rifaximin を投与しプラセボと比べ、より CD が緩解となったという報告がなされている<sup>41)</sup>。

また、Darfeuille-Michaud らの粘膜接着性侵入性 *E. coli* も候補にあげられている。彼らは手術で切除された回腸を培養し、そこから高率に  $\alpha$ ヘモリジン活性があり粘膜接着性侵入性の *E. coli* を検出している (活動性病変 84.6%、非活動性病変 78.9%、対照 33%)<sup>42)</sup>。さらに、最近の報告で *Fusobacterium nucleatum* も CD の内視鏡生検粘膜から検出されている。Strauss らの報告によると、CD17 例中 10 例 (58.8%) から検出されており、すべて細胞侵入性があったということである<sup>43)</sup>。

## Ⅲ. 腸内細菌と過敏性腸症候群 (IBS)

IBS の疾患概念が提唱された 1960 年代から、感染性腸炎罹患後に IBS が発症することが知られていた<sup>44)</sup>。また、1982 年に Balsari らは便培養法による解析で過敏性腸症候群 (IBS) が健常者と比べ、*Bifidobacteria*, *Lactobacilli* や嫌気性菌が減少していると報告したが<sup>45)</sup>、IBS の消化管機能異常説が全盛のためかほとんど省みられていなかった。しかし、

表 4 クロウン病の原因ではないかと推測されている細菌

報告者	報告年	原因菌	検出材料
Chiodini	1984	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	粘膜、リンパ節
Darfeuille-Michaud	1998	adherent <i>E. coli</i>	粘膜
Strauss	2011	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	粘膜

2003年にPimentelらが下痢型IBSで小腸腸内細菌異常増殖(SIBO)が多く認められることを発見し<sup>46)</sup>、それに対してrifaximinといった抗菌薬やVSL#3といったprobioticsの投与をすることで症状が改善することが明らかにされてから、腸内細菌とIBSの関係が注目されてきた<sup>47)</sup>。そして、FISH法による検索でbacteroidesやclostridiaがIBS粘膜中に増加しており、糞便のメタゲノム解析ではProteobacteriaやある種のFirmicutesが増加し、それ以外のFirmicutesやBacteroidetesとBifidobacteriaが減少していたと報告されている<sup>47)</sup>。但し、IBSは症状も下痢型、便秘型、混合型と多彩で、原因としても食餌アレルギー、薬剤性、さらに加齢に伴うものもあることから、上記のように腸内細菌だけが原因となるIBSは一部かも知れない。

#### IV. 腸内細菌と非ステロイド性抗炎症薬 起因性腸炎 (NSAID 腸炎)

非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)が胃・十二指腸潰瘍を惹起することはよく知られていたが、小腸潰瘍を引き起こすことはあまり知られていなかった。しかし、カプセル内視鏡と小腸内視鏡の普及により、NSAID投与後に50%以上と高率に小腸潰瘍ができることが明らかになり、臨床的にも消化管出血の原因として問題となってきている。1969年にKentらはラットにインドメタシンを投与し、小腸潰瘍がほぼ100%にできること、それが、neomycin, polymyxin B, bacitracinの抗菌薬3剤投与により抑制されることを証明した<sup>48)</sup>。また、培養法の解析で、潰瘍出現時は*E. coli*, *Bacteroides*, *Clostridia*が著明に増加しており、抗菌薬投与によりこれらの3菌種は抑制され、ほぼ正常に復したことから、小腸潰瘍の発生にこれらの3菌種の関与があると推測した。また、Robertらは、このインドメタシン小腸潰瘍が無菌ラットではできなかつたと報告している<sup>49)</sup>。本邦でも1996年にUejimaらは5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(4-methylsulfonylphenyl) thiopheneというCOX-2阻害薬をラットに投与したところ無菌ラットでは小腸潰瘍はできず、SPFラットで小腸潰瘍が57~71%に出現したと報告している<sup>50)</sup>。また、このマウスにneomycin, streptomycin, bacitracinの抗菌薬3剤を投与すると潰瘍形成は見られず、培養法による

検討で*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*と*Bacteroides*といったグラム陰性桿菌が便でも病変粘膜でも増加しており、抗菌薬投与で著減していたことから、これらのグラム陰性桿菌が病変形成に関与しているとしている。このように、NSAID小腸潰瘍の原因は腸内細菌にあると考えられている。

### おわりに

最近の分子生物学の応用によって、腸内細菌の解析は新時代を迎えており、腸内細菌がさまざまな疾患に関与しているということが分かってきた。また、無菌マウスにTargetとする腸内細菌を移植することで疾病を作成するといったことが行われ、さまざまな疾病に腸内細菌が一因となっていることが明らかになってきている。今や、Nature, Scienceといった基礎系から、Gastroenterology, Gutといった臨床系の雑誌にまで、毎号Microbiotaの記事が出ない号はないといった状態である。

また、種々の疾患がmicrobiotaの多様性が失われ、dysbiosisによって起こると言われてきているが、どちらにしても、増加する菌と減少する菌があり、増加する菌種や菌群に原因菌がある可能性が高いわけである。単にdysbiosisですませることなく、原因菌や菌群の追及を行うべきである。現状はmicrobiotaの解析も門のレベルであり、種のレベルまでには迫っていない。従って、まだ原因治療は未だしと思われる。今後さらに研究が進み種のレベルになり、その結果、上記疾患の革命的治療法が出現することを期待する。

### 文 献

- 1) Mai V, Morris JG Jr. Need for prospective cohort studies to establish human gut microbiome contributions to disease risk. *J Natl Cancer Inst.* 2013; **105**: 1850-1851.
- 2) Krishnan S, Eslick GD. *Streptococcus bovis* infection and colorectal neoplasia: a meta-analysis. *Colorectal Dis.* 2014; **16**: 672-680.
- 3) Ahn J, Sinha R, Pei Z, et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013; **105**: 1907-1911.
- 4) Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; **22**: 292-298.
- 5) Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacte-*

- rium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012 ; **22** : 299-306.
- 6) Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease : current status and the future ahead. *Gastroenterology.* 2014 ; **146** : 1489-1499.
  - 7) Ohkusa T, Okayasu I, Tokoi S, et al. Bacterial invasion into the colonic mucosa in ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1993 ; **8** : 116-118.
  - 8) Schultz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, et al. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology.* 1999 ; **117** : 1089-1097.
  - 9) Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002 ; **122** : 44-54.
  - 10) Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 ; **104** : 13780-13785.
  - 11) Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, et al. Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol.* 2006 ; **44** : 4136-4141.
  - 12) Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut.* 2006 ; **55** : 205-211.
  - 13) Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 ; **15** : 1183-1189.
  - 14) Machiels K, Joossens M, Sabino J, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014 ; **63** : 1275-1283.
  - 15) Andoh A, Kuzuoka H, Tsujikawa T, et al. Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2012 ; **47** : 1298-1307.
  - 16) Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of *Clostridiales* in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.* 2007 ; **1** : 403-418.
  - 17) Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, et al. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2007 ; **56** : 669-675.
  - 18) Ryan P, Kelly RG, Lee G, et al. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease—detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol.* 2004 ; **99** : 1539-1543.
  - 19) Scanlan PD, Shanahan F, O'Mahony C, et al. Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* 2006 ; **44** : 3980-3988.
  - 20) Macfarlane S, Furrer E, Cummings JH, et al. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clin Infect Dis.* 2004 ; **38** : 1690-1699.
  - 21) Roediger WE, Duncan A, Kapaniris O, et al. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition : implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1993 ; **104** : 802-809.
  - 22) Gardiner KR, Halliday MI, Barclay GR, et al. Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995 ; **36** : 897-901.
  - 23) Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, et al. Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J.Gastroenterol. Hepatol.*, 2000 ; **15** : 61-68.
  - 24) Ohkusa T, Sato N, Ogihara T, et al. *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J.Gastroenterol. Hepatol.*, 2002 ; **17** : 849-853.
  - 25) Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, et al. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *GUT*, 2003 ; **52** : 79-83.
  - 26) Hague A, Elder DJ, Hicks DJ, et al. Apoptosis in colorectal tumour cells : incuction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int.J.Cancer*, 1995 ; **27** : 400-406.
  - 27) Singer RE, Buckner BA. Butyrate and propionate : important components of toxic dental plaque extracts. *Infect Immun* 1981 ; **32** : 458-463.
  - 28) Popoff MR, Szyllit O, Ravisse P, et al. Experimental cecitis in gnotoxenic chickens monoassociated with *Clostridium butyricum* strains isolated from patients with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infect Immun* 1985 ; **47** : 697-703.
  - 29) Ohkusa T, Yoshida T, Sato N, et al.: Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion : a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J Med Microbiol.* 2009 ; **58** : 535-545.
  - 30) Minami M, Ando T, Okamoto A, et al. Seroprevalence of *Fusobacterium varium* in ulcerative colitis patients in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 ; **56** : 67-72.
  - 31) Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007 ; **13** : 955-962.
  - 32) Ohkusa T, Nomura T, Terai T, et al. Effectiveness of Antibiotic Combination Therapy in Patients with Active Ulcerative Colitis: A Randomized, Controlled Pilot Trial with Long-Term Follow Up. *Scand J Gastroenterol* 2005 ; **40** : 1334-1342.
  - 33) Ohkusa T, Kato K, Terao S, et al. Newly Developed Antibiotic Combination Therapy for Ulcerative Colitis : A Double-Blind Placebo-Controlled Multicenter Trial. *Am J*

- Gastroenterol. 2010 ; **105** : 1820-1829.
- 34) Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, et al. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. Dig. Dis. Sci., 1984 ; **29** : 1073-1079.
  - 35) Sanderson JD, Moss MT, Tizard ML, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. Gut, 1992 ; **33** : 890-896.
  - 36) Wall S, Kunze ZM, Saboor S, et al. Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 1993 ; **31** : 1241-1245.
  - 37) Kobayashi K, Brown WR, Brennan PJ, et al. Serum antibodies to mycobacterial antigens in active Crohn's disease. Gastroenterology, 1988 ; **94** : 1404-1011.
  - 38) Kobayashi K, Blaser MJ, Brown WR. Immunohistochemical examination for mycobacteria in intestinal tissues from patients with Crohn's disease. Gastroenterology, 1989 ; **96** : 1009-1015.
  - 39) Ryan P, Bennett MW, Aarons S, et al. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. Gut, 2002 ; **51** : 665-670.
  - 40) Naser SA, Ghobrial G, Romero C, et al. Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. Lancet, 2004 ; **364** : 1039-1044.
  - 41) Prantera C, Lochs H, Grimaldi M, et al. ReticStudy Group (Rifaximin-Eir Treatment in Crohn's Disease). Rifaximin-extended intestinal release induces remission in patients with moderately active Crohn's disease. Gastroenterology. 2012 ; **142** : 473-481.
  - 42) Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 1998 ; **115** : 1405-1413.
  - 43) Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. Inflamm Bowel Dis. 2011 ; **17** : 1971-1978.
  - 44) Chaudary NA, Truelove SC. The irritable colon syndrome. A study of the clinical features, predisposing causes, and prognosis in 130 cases. Q J Med. 1962 ; **31** : 307-322.
  - 45) Balsari A, Ceccarelli A, Dubini F, et al. The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. Microbiologica. 1982 ; **5** : 185-194.
  - 46) Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome. a double-blind, randomized, placebo-controlled study. Am J Gastroenterol. 2003 ; **98** : 412-419.
  - 47) Simrén M, Barbara G, Flint HJ, et al. Rome Foundation Committee. Intestinal microbiota in functional bowel disorders : a Rome foundation report. Gut. 2013 ; **62** : 159-176.
  - 48) Kent TH, Cardelli RM, Stamler FW. Small intestinal ulcers and intestinal flora in rats given indomethacin. Am J Pathol. 1969 ; **54** : 237-249.
  - 49) Robert A, Asano T. Resistance of germfree rats to indomethacin-induced intestinal lesions. Prostaglandins. 1977 ; **14** : 333-341.
  - 50) Uejima M, Kinouchi T, Kataoka K, et al. Role of intestinal bacteria in ileal ulcer formation in rats treated with a non-steroidal antiinflammatory drug. Microbiol Immunol. 1996 ; **40** : 553-560.