

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19590734

研究課題名（和文） 胃酸分泌変動に伴う腸内細菌叢の動態に関する検討

研究課題名（英文） Change of intestinal microflora due to reduce of gastric acid secretion

研究代表者 岡 政志（OKA MASASHI）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40334396

研究成果の概要：1) ラット胃酸分泌抑制モデルにおいて、腸内細菌叢を 12 種の菌種および菌群について糞便の細菌特異的 primer による PCR を行うことで腸内細菌数の半定量化を行い、胃酸分泌抑制ラットで有意に菌数の増加を認めた。2) インフォームド・コンセントを得た被験者の糞便において、1) と同様の菌種・菌群の PCR 解析を行った。胃酸減少を伴った被験者において、有意な菌数増加を認めた。多くの菌種・菌群について、胃酸分泌低下により腸内細菌の増加をもたらすことを証明したと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化器薬（食道、胃、小腸、大腸）

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には多種多様な細菌が常在し、複雑な微生物生態系（腸内フローラ）を形成している。ヒトが排泄する糞便のおよそ 3 分の 1 から 2 分の 1 は生きた細菌で占められ、その大部分が偏性嫌気性菌である。またヒトの大腸内には 500 種類以上、菌数にして糞便 1 グラムあたり約 10^{11} 個の細菌が棲息し、それら細菌の全重量は 1.5 キログラムにも達すると推定されている。

これまで腸内フローラの解析は伝統的に主に培養法により行われていたが、非常に多大なコストがかかる割に培養できる菌の種類は少なく、フローラを構成している菌種の約

20～30%程度しか培養同定できないと推定されていた。ところが、Woese CR らにより、この腸内フローラの 70～80%を占める培養困難な構成菌の解析が 16S rRNA 遺伝子をターゲットとする分子生物学的手法が種々導入されたことで飛躍的な進歩をとげた。

松木らは腸内細菌の主要な 12 菌種について、その 18S rRNA に特異的な primer を用いた定量的 PCR 法により、菌量の定量に成功している。この方法は、従来の培養法とは全く別の新しい測定法であり、定量性、菌の特異性、そして調べることのできる菌の種類が多いことについては、従来の方法をはるかに凌駕している。従来の方法で腸内細菌を調べても

一定の結果が出なかったのは、この実験方法による問題があったと考えられる。

この腸内フローラのパターンを規定する要因として腸管免疫、腸蠕動、食習慣、胆汁酸分泌などが想定されているが、明らかなメカニズムが判明しているわけではない。

また胃酸分泌と腸内フローラの間にも微妙なバランスが成立しており、例えば、1)慢性萎縮性胃炎の進展、2)消化性潰瘍治療を目的とした胃酸分泌抑制薬の使用、3)胃疾患治療のための胃切除術、4)暴飲暴食やストレスによる胃内 pH の上昇などは、細菌の存在によって厳しい酸性環境の緩和をもたらす、腸内フローラの変化を生じ、腸管感染症や bacterial overgrowth syndrome の成立に至る結果になることはよく知られた事実である。しかしながら、胃酸分泌低下が胃や小腸と異なり、大腸内フローラに与える影響の詳細についてはこれまで明らかにされていない。

本研究はこの点に着目し、胃酸分泌低下が大腸内フローラに与える変化を明らかにすることを目的に、定量的 PCR (polymerase chain reaction) 法を用いて健常成人、胃腸疾患患者およびラットにおける糞便ならびに大腸内容物中の 12 菌属・菌群の動態を検討した。

2. 研究の目的

胃酸分泌抑制モデルラットの腸管内容物およびインフォームド・コンセントをえた萎縮性胃炎患者および対照者の糞便の腸内細菌叢を最新の技術である、菌種・菌群特異的 primer による PCR 法により半定量することで、菌種・菌群の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 酸分泌抑制 rat モデルによる検討：

Wistar rat (雄性、7 週齢、体重約 190g)20 匹に normal diet(CRF-1)を給餌し、1 週間飼育室の環境に慣れさせた後、各群 5 匹ずつ、以下の 4 群に振り分けた。すなわち、強力な胃酸分泌抑制薬であるプロトンポンプ阻害薬 (Proton pump inhibitor:以下 PPI)のオメプラゾール® (和光純薬株式会社、東京)を 5mg/kg/day(0.01%)

、100mg/kg/day(0.2%)を含有する CRF-1 を与える B,C 群、そしてヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬(H₂ receptor antagonist:以下 H₂RA)のラニチジン® (和光純薬株式会社、東京)を 8mg/kg/day(0.02%)を含有する CRF-1 を与える D 群、および CRF-1 のみを投与する対照群 (A 群)である (図 1)。

薬剤の濃度については、オメプラゾールは Hagiwara T *et al*、ラニチジンは Watanabe H *et al* の報告を踏まえ、調整した。



図 1

各群のラットを specific pathogen free (SPF) レベルの環境下で 4 週間飼育後、屠殺、70%エタノールで表皮を滅菌後開腹、Cecum、Descending colon、Rectum の 3 領域から腸管内容物を採取し、滅菌専用チューブに迅速に採取し、-80°Cで分析までの期間保存した。

2) 萎縮性胃炎の合併の有無によるヒト腸内フローラの動態についての検討：

文書による informed consent を得た重篤な疾患のない中年成人 44 名 (男 36 名、女 8 名; 48-77 歳、平均年齢 57.2±14.4 歳)を対象とした。いずれも大便の回収する日から遡り 4 週間以内にプロトンポンプ阻害薬 (PPI) やヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬(H₂RA)といった胃酸分泌抑制薬あるいは抗生物質の投与歴はない。各被験者は採血の後、別の日に早朝の大便 (5 g) を嫌気条件下に採取し、分析までの期間、冷凍保存(-80°C)した。

対象者から採血された血液は血清分離後、-20°Cで測定までの期間、冷凍保存した上で、萎縮性胃炎の指標である血清ペプシノゲン (PG) 値の測定に供した。測定には我々が報告した、既報の RIA 系を使用した。測定結果を基に萎縮群と非萎縮群に分類した。萎縮性胃炎の判定には、PG I 値 ≤ 70 μg/l かつ PG I/II 比 ≤ 3 を用い、本 criteria を満たす場合、胃粘膜萎縮陽性、それ以外を萎縮陰性とした。今回の対象者を血清 PG 値の結果から、萎縮陽性、陰性の 2 群に分け、2 群間において年齢・性別が match するように 22 名ずつ配分した上で、両群間で腸内フローラの差について検討した。

3) 腸内フローラの同定：

糞便サンプルからの DNA 抽出:-80°Cにて保存されていた rat およびヒト糞便サンプルより以下のようにガラスビーズ法を用いて DNA の抽出を行った。

定量的 Real-time PCR：

PCR の増幅と同定は ABI PRISM 7900HT

sequence detection system(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)を用いて、特異的プライマーと SYBR Green®法を用いて検討した。検討に用いたヒト最優勢 12 菌属・菌群(*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Atopobium* group、*Bacteroides fragilis* group、*Eubacterium cylindroids* group、*Enterobacteriaceae*、*Prevotella*、*Clostridium coccoides* group、*Clostridium leptum* subgroup、*Fusobacterium*、*Clostridium ramosum* group、*Veillonella*)を表 2 の各菌属・菌群特異的プライマーを用いて解析を行った。

[統計解析]

各検討において、属・群間の有意差については統計ソフト SPSS (SPSS Japan Inc.,Tokyo) を使用して検討した。検定には Mann-Whitney's *U* test を用い、 $P<0.05$ を統計学的に有意とした。

4. 研究成果

1) ラットモデル:

まず、control の rat 大腸の部位別に菌数を検討した。各菌属・菌群について、Cecum は Descending colon、Rectum にくらべ、若干菌数が少ない傾向があったが、有意差はなく、部位間よりも個体間の差のほうが大きい傾向があった。(図 2)。

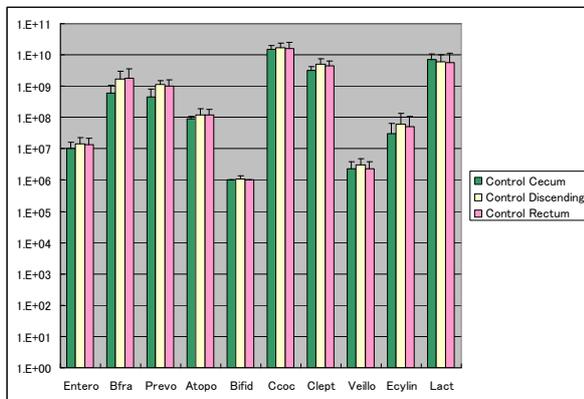


図 2 Rat 大腸 3 領域における各菌属・菌群の菌数分布

次に PPI 投与群と H₂RA 投与群と control を比較した。多くの菌群において、PPI 投与群において用量依存的に菌数が増加していた。*Lactobacillus*、*Prevotella*、*Atopobium* group、*Clostridium coccoides* group、*Veillonella*、*Bacteroides fragilis* group、*Enterobacteriaceae* の 7 菌属・菌群においてオメプラゾール 100mg/kg/day 投与群は他の 3 群に対し、有意に菌数が増加していた(前者 5 属・群で $P<0.01$ 、後者 2 属・群で $P<0.05$)。また *Clostridium coccoides* group においてオメプラゾール 5mg

/kgw 投与群が control にくらべ有意に菌数が増加していた。一方 *Bifidobacterium*、*Eubacterium cylindroids* group、*Clostridium leptum* subgroup は 4 群間に有意差を認めなかった(図 3)。

なお *Fusobacterium*、*Clostridium ramosum* group は今回の動物実験では検出されなかった。

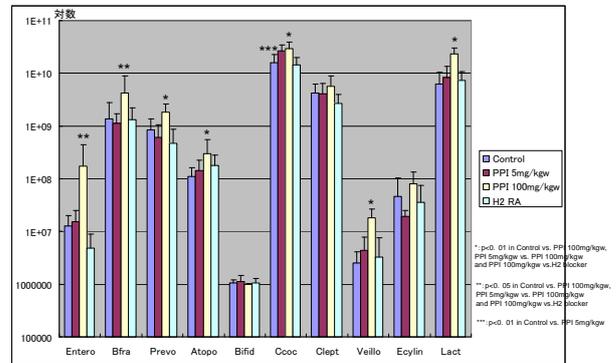


図 3 Rat 大腸内における菌属・菌群別の菌数分布

2) ヒトモデル:

萎縮性胃炎の無い群(非萎縮群)に比べ、萎縮性胃炎を有する群(萎縮群)において *Enterobacteriaceae*、*Clostridium ramosum* group の 2 菌属・菌群を除く 10 の菌属・菌群の菌数増加が認められた。なかでも *Veillonella*($P=0.003$)、*Lactobacillus*($P=0.002$)の 2 菌群は統計学的に有意に菌数が増加した(図 4)。

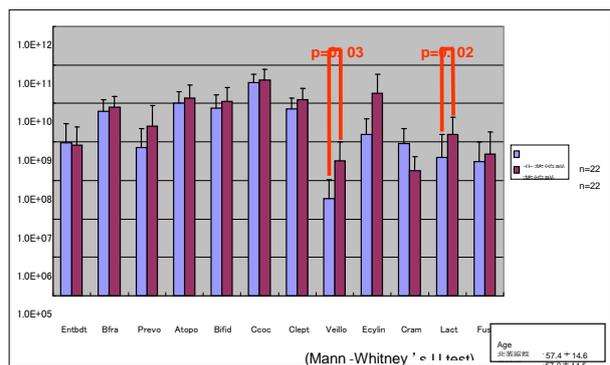


図 4 非萎縮性胃炎群・萎縮性胃炎群間における 12 菌属・菌群の比較

考察

腸内フローラは、食物の分解、生体内・外成分の代謝、ビタミンなどの必須栄養素の合成、免疫力の活性化、病原性菌の増殖抑制などの

様々な生理活性を有しており(9)、それゆえ宿主であるヒトの健康と密接な関係がある。この腸内フローラの機能を解析するには、腸内フローラを構成する菌を正確に把握することが必要である。

これまで腸内フローラの解析は主に培養法により行われていたが、フローラを構成している菌種の約20~30%程度しか培養同定できないと推定されていた。ところが、Woese CRらにより、この腸内フローラの70~80%を占める培養困難な構成菌の解析が16SrRNA遺伝子をターゲットとする分子生物学的手法が種々導入されたことで飛躍的な進歩をとげた(12)。

腸内フローラの構成菌については、高齢になるほどビフィズス菌が減少し、クロストリジウム、大腸菌、腸球菌などが増加することが報告されている。一方、ヒトの大腸内フローラの構成は同年齢でも極めて個人差が大きいことも報告されている(14)。

大腸はヒトの臓器の中で最も種類の多い菌種が存在しており、それらによる多彩な疾患が発症する場である。腸内細菌が直接腸管壁に働きかけ、消化管の構造・機能に極めて大きな影響を及ぼすことになる。大腸癌を自然発症するモデルマウスの研究から、大腸内フローラの構成菌が大腸癌の発症に関与していることが明らかとなっているが、これまでのところヒトの大腸癌の成因に関与する大腸内細菌は特定されていない。従ってこれまで検出不可能であった難分離・難培養の腸内細菌にその高い活性をもつ菌種・菌株が存在していることが推定される。今回培養法によらないフローラ解析方法として特異的プライマーを用いた定量的PCR法を使用することができ、12菌属・菌群の検出を行った結果、萎縮性胃炎の有無、胃酸分泌低下モデル動物の実験で明確な差を見出すことができた。

『Ratの腸内フローラに対するPPI、H₂RAの関与(検討1)』

胃酸分泌低下のモデルラットにおいて、controlに比べ、いくつもの菌群において大腸内フローラが変動することが認められた。そしてPPI投与では菌数の変動について用量依存性も示すことができた。これは、胃酸が経口的な細菌の侵入に対しバリアとなっており、PPIによって、それが崩壊するためと考えられた。なおH₂RAによって腸内フローラはあまり変動しなかった。PPIの方が、持続的な胃酸分泌に与える影響が強いためと考えられる。また個体内のCecum、Descending colon、Rectumの3領域では、各菌属・菌群の菌数はcontrolでもPPI、H₂RA投与群においてもあまり変化せず、個体間での差の方が強い傾向が認められた。このため、今後のRat腸内フローラの検討では直腸の検

討を優先して行うことの合理性が示されたと考えられる。

『萎縮性胃炎の進展における腸内フローラの相違(検討2)』

萎縮性胃炎を有する場合、大腸内フローラは10の菌属・菌群において菌数増加が認められた。特に萎縮性胃炎群で有意差を持って菌数が増加した*Veillonella*、*Lactobacillus*については、ratでも同様の結果が示されており、ヒトとratで同じ結果が示されたことは、非常に強固な事実を示していると考えられる。

以前より慢性萎縮性胃炎、悪性貧血、薬剤の使用などにより、胃酸分泌が低下することによって胃酸バリアが崩壊し、胃、十二指腸、上部小腸の細菌数が増加する現象を

“bacterial overgrowth”と報告されている(16,17)。Bacterial overgrowthでは、胃、十二指腸、近位空腸に*streptococci*、*lactobacilli*、小腸全般には*enterobacteriaceae*といった特定の菌属が増加することが報告されており(18,19)、今回の結果とは対照的である。大腸での細菌増殖のメカニズムが胃酸バリアの崩壊に加え、何らかのメカニズムの関与があることが推測された。

『胃酸バリアの崩壊と大腸腫瘍の関連』

HP感染と大腸腫瘍の関連について、いくつかの論文において検討されているが、結論はcontroversialで、関連が有るという報告、無いという報告の両者がある。またHP持続感染により惹起される慢性萎縮性胃炎と大腸腫瘍との関連を検討した報告もみられるが、その数は極めて少なく一定のコンセンサスは得られていない。ところでこの報告では慢性萎縮性胃炎を有する場合、直腸がんのリスクが増加することが示されている。われわれの今回の結果から、萎縮性胃炎を有することにより、大腸内フローラが変動することが示された。対象を増やし、比較検討することにより、Kadoらの指摘する大腸癌発生に関与する腸内細菌の特定および腫瘍発生メカニズムの一端を解明することができる可能性があると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kanno T, Oka M, Ichinose M *et al.* : Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora. Biochemical and Biophysical Research Communication 381, 666-670, 2009、査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有井 研司 (ARII KENJI) (平成 19 年～平成 20 年)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：6 0 2 8 5 4 0 0

岡 政志 (OKA MASASHI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：4 0 3 3 4 3 9 6

(2) 研究分担者

岡 政志 (OKA MASASHI) (平成 19 年～平成 20 年)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：4 0 3 3 4 3 9 6

一瀬 雅夫 (ICHINOSE MASAO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：5 0 1 4 3 4 2 5

(3) 連携研究者

なし