

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590488

研究課題名（和文） 小腸細菌叢における細菌種の定量的解析

研究課題名（英文） A quantitative analysis of bacterial flora in the small intestine

研究代表者

平井 義一 (HIRAI YOSHIKAZU)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00127581

研究成果の概要（和文）：小腸細菌叢の状況は、検体採取が困難なため、判明していない。この研究では近年開発されたダブルバルーン内視鏡を用いて、健康成人（胃液 pH3.0 以下）の小腸から粘液を採取し、培養法により小腸細菌叢の定量的解析を行なった。胃・十二指腸では細菌数は少なく、下部空腸から爆発的に増加した。この下部空腸において、腸管の嫌気性が確立された。*Clostridium difficile* は全体の約 60% から検出され、分離菌株の半数は毒素遺伝子を保有していた。この菌は回腸部以降で検出された。また、*Helicobacter pylori* 感染者では生菌が胃から空腸部まで検出された。

研究成果の概要（英文）：The state of bacterial flora in the small intestine is unclear because of the difficulty for taking samples. We investigated bacteria quantitatively by cultures from small intestinal juices which were taken with a double-balloon endoscope as a new technique. A few of bacteria were found in the stomach and duodenum, while we detected many bacteria on and after the lower jejunum. In the lower jejunum, anaerobic condition is established. *Clostridium difficile* was detected from approximately 60% of healthy adults. A half of isolated strains had enterotoxin genes (*toxA* and *toxB*). This bacterium was isolated on and after the ileum. In adults infected with *Helicobacter pylori*, the bacterium was culturable with juices from the stomach to the jejunum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：構造・生理

1. 研究開始当初の背景

ヒト消化管の中で口腔、胃・十二指腸、大腸（大便）において、細菌叢の解析は培養法や遺伝子検索など様々な方向から詳細に検

討されてきた。しかし、十二指腸と大腸の間をつなぐ小腸での検討はほとんど行われていない。この理由は検体採取が困難なためである。成人小腸は約 6m と長く、上部および

下部消化管内視鏡を用いての材料採取は不可能であり、手術時もしくは単なるチューブを用いてのおおまかな検討があるのみであった。胃に棲息するピロリ菌がどの部位まで培養可能であるのか（便では抗原が存在するが、培養は不能）、大腸で過剰増殖すると偽膜性大腸炎を起こすディフィシル菌が小腸のどの部位から棲息しているのかなどは全く不明であった。

一方、近年になって、小腸病変を観察するために、カプセル内視鏡やダブルバルーン内視鏡が開発された。カプセル内視鏡では検体の採取は不能であるが、ダブルバルーン内視鏡では検体の採取が可能であり、採取部位の特定も容易である。しかし、この研究以前には、この内視鏡により検体を採取し、小腸細菌叢の解析を行なった研究はなされていない。

2. 研究の目的

極力正常と思われる成人を対象として、小腸（空腸・回腸）の特定部位からダブルバルーン内視鏡を用いて粘液を採取し、細菌叢の解析を行う。基本的に培養検出で嫌気性菌、通性菌の全体菌数を把握する。別途に、ピロリ菌およびディフィシル菌の選択培養を行いこれらの棲息状況を把握する。

この研究の目的は正常な小腸細菌叢を把握することである。将来に、腸管炎症性疾患（クローン病・潰瘍性大腸炎）や小腸潰瘍などでの細菌叢検討を行い、今回の研究と対比して、これら疾患の原因把握・病態把握に役立てる。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者：

自治医科大学附属病院においてダブルバルーン内視鏡による小腸検査を行なった19才以上の患者を対象とした。あらかじめ、病歴聴取により、抗菌剤など腸管細菌叢に影響を与える薬剤を使用していない患者を選択し、書面にて許諾を得て、対象者とした。小腸において閉塞など病変がほとんどない患者および病変が局所的潰瘍・出血の患者のみで検討を行なった。ピロリ菌胃棲息が胃・上部小腸菌叢に影響することが判明したため、別途にピロリ菌感染・非感染患者で、書面にて許諾を得て、対象者とした。この場合は、上部消化管内視鏡で胃・十二指腸の検体採取のみを行なった。この二つの検討は、別途に自治医科大学臨床研究倫理審査委員会の許可を得て行なった。

(2) 検体採取

小腸の嫌気性に影響を与えないために、機器改造にて窒素注入で（通常は大気注入）、小腸の粘液を採取した（通常検査と同様に下剤処置は受けている）。採取部位は小腸の中

で、空腸および回腸の各3ヶ所とした。別に対照として胃・十二指腸・直腸の3ヶ所から粘液を採取した。なお、ダブルバルーン内視鏡を用いても一度ですべての小腸観察は行えない。上半分は口腔側から、下半分は肛門側から観察を行なった。

胃・十二指腸検体のみの採取者（ピロリ菌感染患者）では粘液以外に胃生検検体も採取した。小腸などの粘液は使い捨てチューブで採取した後に流動パラフィン入りガラスビンに注入した。注入時に流動パラフィンが粘液検体上に重層状態となり、大気と接触しない。

(3) 検体処理（培養）

検体は採取後ただちに細菌学教室に運び、嫌気性チャンバーに入れた。嫌気培養の過程は全てこのチャンバー内で行なった。通性菌培養は検体を大気中に出して培養過程を行なった。ピロリ菌培養は微好気性チャンバーで行なった。総菌数測定用にはTryptic soy寒天培地（大気中培養）とGAM寒天培地（嫌気培養）を使用した。嫌気性菌培養用各菌種選択培地として、Bacteroides selective培地、変法 FM (Fusobacterium medium) 培地、変法 VS (Veillonella selective) 培地、ES (Eubacterium selective) 培地、変法 LBS (Lactobacillus selective) 培地、BS (Bifidobacterium selective) 培地、SPS (Perfringens selective) 培地、CCMA培地 (Clostridium difficile) を選定した。ただし、CCMA培地は選択性が不十分であったため、*Clostridium difficile* の同定に polymerase chain reaction (PCR) を併用した。通性菌培養用（大気中培養）各菌種選択培地として、DHL培地（腸内細菌用）、Mitis Salivarius培地（レンサ球菌、腸球菌用）、PEES (Staphylococcus selective) 培地、Potato Dextrose 培地 (Yeasts 用)、Helicobacter 培地（ピロリ菌用）を選定した。

(4) 検体処理（培養以外）

粘液検体では、宿主因子としてpH、胆汁酸、リゾチームおよび分泌型IgAを測定した。pH以外は粘液を15,000rpmで15分間遠心したものを用いた。

4. 研究成果

細菌数の算定において何を基準とするかは決まっていない。今回の検討では胆汁酸、リゾチームおよび分泌型IgAの量を検討したが、粘液1ml当たりの分泌型IgAの量には大きな差がなかったため、粘液1ml当たりで細菌数を計算した。小腸各部位からは3-5mlの粘液が採取された。

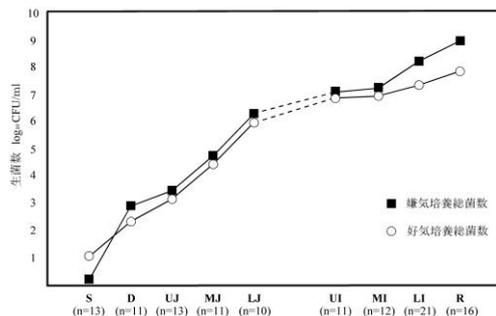
また、ピロリ菌感染患者で胃液が中性化した患者では、強酸性対象者に比べて、胃・十二指腸および空腸上部で細菌数が明らかに多いことが判明した。ピロリ菌感染患者でも

胃液 pH が酸性では非感染胃液強酸性対象者と比べて、ピロリ菌以外の細菌では差が認められなかった。このため、健康成人の小腸細菌叢検討では胃液 pH が 3 以下のヒトを対象に結果をまとめた。

(1) 胃液 pH が 3 以下の対象者での状況：

対象患者は経口側（小腸上半分）で 16 例、肛門側（小腸下半分）で 22 例の合計 38 例であった。

胃からはほとんど菌は検出されず、十二指腸でも検出細菌は少数であった。十二指腸からは、胆汁酸抵抗性の細菌が検出された。上部空腸から検出される菌数はまだ少ないが、下部空腸では検出菌数の爆発的な増加が認められた。通性菌は十二指腸から上部空腸にかけて出現し、中部空腸から回腸にかけて増加した。嫌気性菌は十二指腸から下部空腸にかけて酸素抵抗性の高い順に出現した。その後、下部空腸から回腸にかけて増加した。回腸では菌数が安定したペースで増加し、下部回腸では糞便細菌叢とほぼ同じ細菌叢が完成している。中部回腸以降は嫌気性培養菌数が大気中培養菌数を明確に上回った（嫌気性培養では大腸菌などの通性菌も増殖するため、この状況は偏性嫌気性菌が通性菌より明確に多いことを示す）。小腸の細菌数変化を下図に示した。



図：好気培養および嫌気培養による総菌数の変化

■；嫌気培養による総菌数，○；好気培養による総菌数，グラフ中の値は消化管各部位で菌出された菌数の平均値である。S；胃(stomach)，D；十二指腸(duodenum)，UJ；上部空腸(upper jejunum)，MJ；中部空腸(middle jejunum)，LJ；下部空腸(lower jejunum)，UI；上部回腸(upper ileum)，MI；中部回腸(middle ileum)，LI；下部回腸(lower ileum)，R；直腸(rectum)。

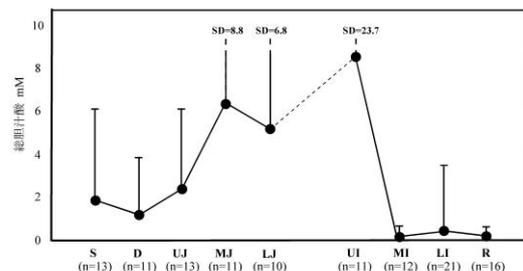
これらの状況から、腸内が嫌気状態になるのは下部空腸付近からと思われた。

C. difficile は下部空腸以降で検出された。このことから腸内が嫌気状態になるのは下部空腸付近であることを示している。回腸以降で検出菌数は増加し、10 の 5 乗以上 (粘

液 1ml 当たり) となった。CCMA 培地ではは選択性が不十分であり、*C. difficile* コロニーと他菌コロニーとの区別が困難であった。このため、分離コロニー (分離被験者で各 5 コロニー) で PCR を用いて遺伝子検索を行なった。検出遺伝子は *C. difficile* に特異的な遺伝子である *tpi* (triosephosphate isomerase の遺伝子) と毒素遺伝子の *tcdA* (ToxinA の遺伝子) および *tcdB* (ToxinB の遺伝子) である。この検索の結果、最終的に 63% (14 名/22 名) から *C. difficile* が検出された。従来の検出頻度より大幅に高率である。この菌の芽胞産生は菌株により大きく異なることも報告されている。我々は検体をほとんど大気に曝すことなく嫌気培養を行なっている。この処理が高率検出になった理由と考えている。この菌の健康成人保有は高率である可能性がある。さらに、毒素遺伝子の検出では分離株の 50% (7 名/14 名) が陽性であった。毒素自体の産生を検討していないが、我々の結果では 30% の健康成人が毒素産生 *C. difficile* を腸管保有していると想定された。なお、毒素産生株はすべて *tcdA* および *tcdB* の双方を保有していた。

ピロリ菌は胃液にて 31% (4 名/13 名) に検出された。この検討では胃酸 pH が 3.0 以下の対象者で結果を検討している。これらの患者の年齢は高く、長期感染でも胃酸が中性化していない例があることが示されている。空腸では検出菌数は低下するものの、下部空腸においても 20% の検体で検出された。上部回腸では 1 名 (8%) の検出であり、これ以降は検出されなかった。ピロリ菌は十二指腸部以降では速やかに球状化して培養不能となると考えられていたが、空腸部ではかなりの培養可能菌体が存在することが明らかとなった。実験的にピロリ菌は嫌気性で速やかに球状化して培養不能となることは確認されている。上記したように、我々のデータからは下部空腸付近で嫌気状態となると考えられ、ヒト腸管内でも嫌気性確立によって培養不能となると考えている。

宿主因子として pH、胆汁酸、リゾチームおよび分泌型 IgA を測定した。胃液 pH では 3.0 以下の被験者を選んでいる。十二指腸では pH5 程度となり、空腸部ではほぼ中性となり、下部空腸以降は 7.2-7.4 程度に安定していた。胆汁酸濃度の測定結果を下図に示す。



図：消化管各部位における粘液中の総胆汁酸濃度

●；総胆汁酸濃度の平均値および標準偏差。S；胃(stomach)，D；十二指腸(duodenum)，UJ；上部空腸(upper jejunum)，MJ；中部空腸(middle jejunum)，LJ；下部空腸(lower jejunum)，UI；上部回腸(upper ileum)，MI；中部回腸(middle ileum)，LI；下部回腸(lower ileum)，R；直腸(rectum)。

ばらつきが大きいのが、胆汁酸濃度は小腸後半になるとともに増加し、上部回腸で最高濃度となり、中部回腸以降はほとんど検出されなくなった。従来から考えられてきたように、胆汁は十二指腸に排出された後に小腸での水分吸収に従って濃度が上昇し、回腸に入ると再吸収により検出されなくなることが明らかである。

リゾチームおよび分泌型 IgA の測定結果もばらつきが大きいのが、粘液 1ml 当たりでは全測定点で概ね一定と考えられた。この結果から細菌数の表記を粘液 1ml 当たりとする事とした。

上述の小腸細菌叢の状況が詳細に検討されたのは世界で初めてである。今後はこの結果を基にして、腸管炎症性疾患(クローン病・潰瘍性大腸炎)や小腸潰瘍などでの細菌叢解析を行い、これら疾患の原因把握・病態把握に役立てたい。

(2) 胃液 pH 中性化したピロリ菌感染者での検討：

胃液 pH が 5 以上で経口側からダブルバルーン内視鏡による小腸検査を行なった患者(4名)では、胃液 pH が 3 以下の患者に比べて、胃・十二指腸で細菌数が明確に多かった。さらに空腸上部でも細菌数が多く検出された。このため、上述した、胃液 pH が 3 以下の患者とは別に検討することとした。この検討では上部消化管内視鏡を用いて胃・十二指腸の生検材料を採取し、分離培養にて細菌の棲息状況を検討した(上述の検討とは別途に臨床研究倫理審査委員会の許可を得た)。生検材料を用いたのは、一時的混入細菌を除外して棲息細菌を検討するためである。なお、この検討では、ピロリ菌感染患者のみでなく、非感染患者を含めて検討した。

患者の中で、胃液 pH はピロリ菌感染者で平均 6.1 であったのに対し、非感染者では 2.2 均であり、ピロリ菌感染者では明確に中性化の傾向を示した。ただし、ピロリ菌感染者の 20% 程度は pH 3.0 以下であった。胃生検材料はホモジナイズし、培養を行なった。結果は 1 生検材料当たりの菌数で表記した。ピロリ菌感染者では 10 の 3 乗個程度の菌数(ピロリ菌は含まれていない)が分離されたが、非

感染者からはほとんど菌は検出されなかった。十二指腸でも同様の傾向であり、ピロリ菌感染者では 10 の 2 乗個程度の菌数が分離された。従来から、ピロリ菌感染者の胃には雑菌が多く、分離培養時に抗菌剤を添加しない培地を用いると真菌を含む様々な菌のコロニーが形成されると言われてきた。しかし、ピロリ菌感染者(胃酸中性化者)の胃粘膜にこのように多量の細菌が棲息していることが明確になったのは初めてである。分離細菌種を検討すると、レンサ球菌、ナイセリア、ヘモフィルスが主要であり、嫌気性菌ではベーネラおよびフソバクテリウムが分離された。これら分離主要細菌は口腔細菌叢を構成する主要細菌と同じであった。この分離細菌の中で、ナイセリア属菌種はニトロソ化能があることが報告されている。このため、分離ナイセリア属菌種を検討したところ、亜硝酸ナトリウムとモルフォリンを用いた方法で、高いニトロソ化能が検出された。また、ピロリ菌感染者(胃酸中性化者)の胃液を検討したところ、非感染患者に比較して、亜硝酸塩が増加し、アスコルビン酸が低下していた(アスコルビン酸低下は従来から知られている)。このような状況から、ピロリ菌感染者(胃酸中性化者)の胃では胃酸中性化とアスコルビン酸低下により亜硝酸塩が増加し、食物由来の二級アミンとともに胃定着ナイセリア属菌種によりニトロソ化合物に変化すると推察された。このニトロソ化合物が胃癌発生に関わることは十分想定される。なお、分離ナイセリア属菌株の菌種を検討したところ、ほとんどは *Neisseria subflava* であった。この検討はまだ少数の被験者で行われたのみであり、今後検討例を増加させ、詳細に検討する予定である。

(3) 腸管スピロヘータ症の検討

ヒト腸管には大腸を中心にスピロヘータが感染している報告がある。症状は無症状もしくは軽度の炎症(腹痛・下痢)とされている。医学領域での認知度は低い。感染菌種としては *Brachyspira pilosicoli* と *Brachyspira aalborgi* が知られている。

我々は小腸細菌叢検討時に、肛門側から挿入例において、大腸部分に軽度炎症を認める例があり、病因を検討した。これらの例は上記の(1)(2)検討例からは除外し、診断・診療目的で検討した。数例の広範囲大腸粘膜からスピロヘータが形態的に確認され、培養検出も可能であった。また、大腸の軽度炎症が長期に継続している免疫不全患者からも検出された。この腸管スピロヘータ症の治療方針は決まっていないが、我々の検討ではメトロニダゾールが効果を示した。腸管スピロヘータ症の検討は例数も少ないため、今後は注意深く症例を集積しながら検討を続けたい。

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 11 件)

- ① Takezawa T, Hayashi S (2 番目), Hirai Y (10 番目) (全 11 名)、Human intestinal spirochetosis in an immunocompromised host: Evaluation of eradication therapy by endoscopy, histopathology and bacteriology、Clin J Gastroenterol、5:69-73、2012、(査読有)
- ② Shimomura H, Hosoda K, Hayashi S, Yokota K, Hirai Y、Phosphatidyl-ethanolamine of *Helicobacter pylori* functions as steroid-binding lipid in the assimilation of free cholesterol and 3 β -hydroxyl steroids into the bacterial cell membrane、J Bacteriol、194:2658-2667、2012、(査読有)
- ③ Hosoda K, Shimomura H, Hayashi S, Yokota K, Hirai Y、Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori*、FEMS Microbiol Lett、318:68-75、2011、(査読有)
- ④ Yano T (1 番目、全 12 名)、New technique for direct percutaneous endoscopic jejunostomy using double-balloon endoscopy and magnetic anchors in a porcine model、Dig Endosc、23:206、2011、(査読有)
- ⑤ 下村裕史、林俊治、平井義一、*Helicobacter pylori* と胃癌、臨床と微生物、38:195-202、2011、(査読無)
- ⑥ 林俊治、平井義一、*Helicobacter pylori* のほかにもヒト発癌との関連が示唆されている寄生生物はありますか。Helicobacter Research、14:331-333、2010、(査読無)
- ⑦ 林俊治、下村裕史、平井義一、*Helicobacter pylori* 感染と免疫応答、臨床検査、54:151-157、2010、(査読無)
- ⑧ 林俊治、林芳和、平井義一、*Helicobacter pylori* 感染と胃内細菌叢、Helicobacter Research、14:39-43、2010、(査読無)
- ⑨ Shimomura H、Hosoda K、Hayashi S (3 番目)、Hirai Y (6 番目) (全 6 名)。Steroid mediate resistance to the bactericidal effect of phosphatidylcholines against *Helicobacter pylori*。FEMS Microbiol Lett (査読有) 301:84-94、2009。
- ⑩ Hosoda K、Shimomura H (2 番目)、

Hayashi S (3 番目)、Hirai Y (6 番目) (全 6 名)、Anabolic utilization of steroid hormones in *Helicobacter pylori*。FEMS Microbiol Lett、297:173-179、2009、(査読有)

- ⑪ Yano T、Yamamoto H、Current state of double balloon endoscopy: the latest approach to small intestinal diseases、J Gastroenterol Hepatol、24:185-92、2009、(査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Takezawa T, Hayashi S, Hirai Y, Sugano K、Clinical and microbiological studies on human intestinal spirochaetosis、International workshop、第 98 回日本消化器病学会総会、2012 年 4 月 20 日、東京
- ② 林俊治、林芳和、太田英孝、平井義一、ヒトの胃と小腸の細菌叢、シンポジウム「消化管細菌叢」、第 93 回日本細菌学会関東支部総会

[図書] (計 2 件)

- ① 平井義一、病原性(下痢原性)大腸菌感染症、pp460-463、今日の消化器疾患治療指針(第 3 版)(幕内雅敏、菅野健太郎、工藤正俊 編)、医学書院、東京、2010
- ② 林俊治、*Clostridium difficile* 関連疾患、pp184-186、消化器疾患最新の治療 2011-2012 (菅野健太郎、上西紀夫、井廻道夫 編)、南江堂、東京、2011

[産業財産権]

○出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計◇件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 義一 (HIRAI YOSHIKAZU)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：00127581

(2) 研究分担者

下村 裕史 (SHIMOMURA HIROFUMI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：80348002
矢野 智則 (YANO TOMONORI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：30438634
林 俊治 (HAYASHI SHUNJI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40260765

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

林 芳和 (HAYASHI YOSHIKAZU)
自治医科大学・附属病院・病院助教
竹澤 敬人 (TAKEZAWA TAKAHITO)
自治医科大学・附属病院・臨床助教
(レジデント)
細田 浩一 (HOSODA KOUICHI)
自治医科大学・医学部・大学院
(博士課程)