

一般演題 B-9

微量分析系を用いた血管部位別の短鎖脂肪酸濃度と、
腸管内容物中濃度との比較

Distribution of short-chain fatty acids in the respective parts of blood vessel by micro-analyses, and a comparison with their intestinal concentration in pigs

○塚原隆充^{1, 2}, 松川典子², 友永省三³, 牛田一成¹, 落合邦康⁴

¹ 京都府立大学大学院生命環境科学研究科, ² 栄養・病理学研究所,

³ 京都大学大学院農学研究科動物栄養科学, ⁴ 日本大学歯学部細菌学

【目的】 腸内細菌によって腸管内で生産される短鎖脂肪酸 (SCFA) は、拡散などによって腸管組織から吸収される。SCFA の中で、酢酸は主に血流に乗って末梢のエネルギー源に、プロピオン酸は主に肝臓で糖新生されることが知られている。一方で *n*-酪酸は、大部分が大腸上皮細胞のエネルギー源となり、血流中では殆ど確認できないと報告されてきた。近年、微量の SCFA を鋭敏かつ定量的に測定できる分析法が発達した。今回、ガスクロマトグラフィー・質量分析計 (GC-MS) を用いることで、血管部位ごとに微量な SCFA を測定し、腸管内容物中の SCFA 濃度との比較検討を行った。

【方法】 健康な5ヵ月齢メスブタ4頭 (体重約 100 kg) を供試した。市販肥育期仔豚飼料 (肉豚 VV, 日本配合飼料) を14日間給与後、ペントバルビタール麻酔下で開腹した。回腸静脈, 盲腸静脈, 門脈および腹部大静脈から採血し, 血清を分取した。また, 回腸および盲腸内容物を採取した。それらの内容物中 SCFA 濃度はイオン排除高速液体クロマトグラフィーで, 血清は島津製作所製の GCMS-QP2010 Ultra/SE を用いて測定した。

【結果】 盲腸内容物中の平均酢酸濃度は 105.8 mM, プロピオン酸濃度は 47.4 mM, *n*-酪酸濃度は 18.2 mM であった。一方で, 盲腸組織直上にある盲腸静脈血からは, 盲腸内容物中濃度のそれぞれ 1.45%, 2.01%, および 2.51% の割合で検出された。また, 門脈血からは, それぞれ 0.08%, 0.07%, および 0.07% の割合であった。一方, 回腸内容物中にも盲腸と同水準の *n*-酪酸が検出された個体があったが, その個体でも回腸静脈からは 0.04% の *n*-酪酸しか検出されなかった。

【考察】 *n*-酪酸は血流には殆ど検出されないとされているが, 盲腸組織直上の静脈血からは, 門脈血の100倍以上と比較的高濃度が検出された。これらの差は血流量および血流速度に因るものと考えられるが, 詳細は不明である。今後はこれらの分析系を用いて, SCFA 吸収を発酵基質給餌条件下や経時的変化などについて検討する予定である。

一般演題 B-10**酪酸産生菌による潜伏感染ウイルス再活性化****Reactivation of latently infecting viruses by butyric acid-producing bacteria**

○今井健一, 落合邦康

日本大学歯学部細菌学, 日本大学総合歯学研究所生体防御部門

【目的】 われわれは「細菌とウイルスとの微生物間相互作用」の観点から, 細菌感染症が HIV や EBV およびインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響を検討している. その一環として, 酪酸産生菌がエピジェネティック制御により潜伏感染ウイルスを再活性化することを明らかにした. 潜伏感染ウイルスは, 自らのプロモーター領域にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリクルートし, 抑制型のクロマチン構造を形成することで長期間にわたる潜伏感染状態を維持する. 一方, 生体内で潜伏ウイルスがどのように再活性化されるのかについては不明な点が多かった. われわれは, グラム陰性嫌気性菌の代謝産物である酪酸が HDAC 阻害効果を有することから, 細菌感染が潜伏感染ウイルスの再活性化を誘導することを推察した.

【材料および方法】 供試菌株として代表的腸内細菌 9 株を用いた. HIV および EBV 潜伏感染細胞に供試菌株の培養上清を添加し, HIV 活性化能と EBV の複製に必須である転写因子 ZEBRA の発現を検討した. 培養上清中の短鎖脂肪酸量はガスクロマトグラフィーにて測定した.

【結果】 腸内細菌の *Clostridium* 属, *Eubacterium* 属, *Fusobacterium* 属菌株で顕著な HIV および EBV の複製と転写の活性化が認められた. 種々の短鎖脂肪酸の影響を検討した結果, 酪酸添加時のみに潜伏感染ウイルスの再活性化が認められた. ChIP アッセイの結果, 酪酸産生菌はヒストンのアセチル化を促進し, ウイルスのクロマチン構造を「非活性化型」から「活性化型」に誘導することで潜伏ウイルスを活性化することが明らかとなった.

【考察】 同様の現象は口腔細菌や女性生殖器に常在する酪酸産生菌においても認められたことから, 異種微生物の感染による相互作用がウイルス感染症の病態形成に深く関与していると考えられる. HIV 感染の初期段階において, 腸管粘膜下でのウイルスの爆発的な増殖に腸内細菌が関与していること, また EBV が大腸性潰瘍炎等に関与していることが報告されている. ウイルス性疾患の発症と進展阻止に細菌感染症の予防と治療が重要であることが示唆される.

一般演題 B-11

Lactobacillus gasseri CP2305 株のストレス性下痢改善効果および
その作用メカニズムの検討Effect of *Lactobacillus gasseri* strain CP2305 on symptoms of
CRF-induced diarrhea and study on its working mechanism澤田大輔¹, ○藤原 茂², 桑野由紀³, 六反一仁³¹カルピス(株) 商開セ, ²カルピス(株) 発酵研, ³徳島大学ストレス制御医学

【目的】我々は、*L. gasseri* CP2305 株（以下 CP2305 株）の摂取が過敏性腸症候群患者の症状（重症度指標）、排便習慣ならびに腸内細菌叢を改善すること、健常者では、ストレス低減、腹部症状改善、および腸内細菌叢改善効果を生菌および死菌双方において示すことを明らかにしている。ここでは、健常者ストレス負荷時における下痢改善効果を説明するため、CRF 誘導性下痢ラットにおける下痢改善効果の検証とその作用機作の検討を行った。

【方法】CRF 誘導性下痢改善効果の評価：4 週齢の雄性 SD ラット（CRJ 厚木）を 1 週間予備飼育後、群分けし、菌体を粉末餌（CRF-1）に混餌し、3 週間飼育した。下痢誘発当日は概日リズムを考慮し、朝 9 時より体重測定を行い、イソフルラン麻酔後、体重 1 kg 当たり 125 μ g の CRF を腹腔内に投与し、その後誘導される下痢を評価した。

HPA 軸関連部位並びに結腸／直腸部位の遺伝子発現解析：CRF 投与 4 時間後、断頭放血にて屠殺し、摘出各部位より RNA 抽出を行った。下痢評価指標の中間値に近い 3 例のラット RNA を用い、DNA アレイ解析によって遺伝子発現を比較した。データをクラスタリングし、パスウェイ解析を行った。

【結果】CP2305 株は、生菌および加熱殺菌状態の何れでも有意なストレス性下痢改善効果を示した。公知対照菌である *L. gasseri* 市販株 A ならびに緩下生菌製剤 B との比較においても、CP2305 株の効果の優位性を認めた。

遺伝子発現解析においては、CRF 投与後、海馬、脳幹、副腎ならびに結腸の遺伝子発現は CP2305 株の摂取によって大きく変化した。副腎では、炎症関連遺伝子（TNF, TLR2, STAT1, CSF1, MMP）の亢進抑制が、結腸では補体系遺伝子群発現の抑制が認められ、炎症抑制作用が強く示唆された。また、クロライド・チャンネル関連遺伝子の発現抑制を認め、CRF によって誘導される管腔への水分排出の抑制が支持された。

【考察】CRF を投与することで HPA 軸を活性化し、ストレス性の下痢を誘発評価する実験系を構築した。CP2305 株は生菌および死菌の何れにおいてもストレス性下痢改善効果を示した。CP2305 株は炎症反応の抑制によってストレス応答系に働きかけ、ストレス緩和に資すること、また、クロライド・チャンネルを抑制して下痢症状を緩和することが考えられた。

一般演題 B-12

実験的過敏性腸症候群モデル（内臓痛覚過敏モデル）に対する
Streptococcus faecalis 129 BIO 3B の効果Effect of *Streptococcus faecalis* 129 BIO 3B on visceral hypersensitivity
in an experimental model of irritable bowel syndrome○嶋川真木¹, 常峰 智¹, 卷崎 寛², 駒田 徹², 大野裕史¹, 山村秀樹¹¹ ビオフェルミン製薬(株) 神戸研究所, ² 日本チャールス・リバー(株) 大阪 SAS センター

【目的】過敏性腸症候群 (Irritable Bowel Syndrome; IBS) は大腸に潰瘍などの器質的病変を認めないにもかかわらず、腹痛や腹部不快感を伴う便通異常（下痢、便秘など）が慢性的に繰り返される機能的消化管障害である。乳酸菌製剤は IBS 患者に対して便通異常改善を目的として実際の医療現場で使用されているものの、もう一つの IBS の主症状である腹痛に対する効果については不明である。そこで今回、IBS に伴う腹痛モデルとして使用されている TNBS 誘発ラット内臓痛覚過敏モデルに対する *Streptococcus faecalis* 129 BIO 3B (SF3B, 現在の分類学上の菌種は *Enterococcus faecium*) の効果について検討した。また、IBS の発症に肥満細胞の関与が報告されていることから、SF3B の肥満細胞に及ぼす影響についても検討した。

【方法】内臓痛覚過敏モデルは 8 週齢雄性 SD ラットを一晩絶食後、麻酔下で腹部を切開し、近位結腸に TNBS/30% エタノール溶液を 50 mg/kg 注入後、腹部を縫合することにより作製した。SF3B 投与群は TNBS 処置の 2 週間前から 1 日 1 回 3 週間経口投与した。なお、Sham (TNBS 非投与) 群および Vehicle 群には PBS を投与した。内臓痛覚過敏の評価は、一晩絶食したラットに肛門からバルーンを直腸へ挿入し、バロスタット装置により伸展刺激を加え、痛み行動を示す内圧を内臓痛閾値として求めた。閾値の測定後、遠位結腸粘膜を採取し、ラット肥満細胞特異的プロテアーゼ (Rat mast cell protease 2; RMCP2) の粘膜における遺伝子発現量を測定した。また、ラット腹腔肥満細胞の脱顆粒反応 (ヒスタミン遊離) に対する SF3B の効果について検討した。

【結果】Sham 群と比較して Vehicle 群では内臓痛閾値の有意な低下が認められ、SF3B 投与群では Vehicle 群と比較して内臓痛閾値の有意な増加が認められた。一方、遠位結腸粘膜における RMCP2 遺伝子発現量については、Sham 群と比較して Vehicle 群では有意な増加が認められたものの、SF3B 投与群は Vehicle 群と差は認められなかった。また、ラット腹腔肥満細胞に遊離刺激剤 (compound 48/80) を作用させることによって誘発される脱顆粒反応に対して、SF3B は有意な抑制効果を示した。

【考察】SF3B の経口投与によって IBS に伴う腹痛 (内臓痛覚過敏) が抑制され、その作用機序の一つとして、遠位結腸における肥満細胞数には影響せず、肥満細胞の脱顆粒反応を抑制する可能性が示唆された。

一般演題 B-13**プロバイオティクスの二重盲検試験による寛解期の
潰瘍性大腸炎患者への再燃抑止効果の検証**

A single centre randomized-double-blind control study of
probiotics shows efficacy in preventing relapse in patients
with inactive ulcerative colitis

○吉松安嗣, 津田裕紀子, 山田哲弘, 鈴木康夫
東邦大学医療センター佐倉病院消化器内科

【目的】我々は過去, 標準的な治療法に対し非応答性もしくは不耐性の軽～中等症のUC患者20名に対する4週間のプロバイオティクス投与による寛解導入効果を検証した。その結果, 臨床症状および内視鏡検査上の改善をもたらすとともに, 一定の腸内菌叢の改善に伴う寛解導入効果, さらには寛解維持効果としても期待できる可能性を報告した。今回我々は寛解期にあるUC患者へのプロバイオティクスによる再燃抑制効果を検証するため, 無作為二重盲検試験を実施した。

【方法】プロバイオティクスとして乳酸菌, 酪酸菌, 糖化菌からなる医療用生菌製剤を用いた。インフォームドコンセントを得たUC外来患者60名を対象に大腸内視鏡検査で内視鏡スコアの基準を見定めた後, 被験者を二重盲検によって無作為にプロバイオティクス群とプラセボ群に分けた。両群とも被験者に対し1日あたり9錠を12ヵ月継続投与した。臨床症状は定期的に毎月, あるいは症状の悪化や追加療法を伴う場合に評価した。服用開始時から3ヵ月毎に糞便サンプルを採取し, 糞便菌叢の構成比をT-RFLPによって検索しクラスタ分析にて解析した。

【結果】各群23名, 計46名が試験を完了した一方, 14名は除外対象となった。再燃率は服用開始より3ヵ月経過時点でプロバイオティクス群(0%)がプラセボ群(17%)より有意に低く, 以降それぞれ6ヵ月時点では9%および27%, 9ヵ月時点では22%および35%であった。12ヵ月後の寛解維持率はプロバイオティクス群が70%, プラセボ群が57%となった。糞便菌叢のT-RFLPクラスタ分析では, 過去の寛解導入検証時と同様に3つのクラスタに分岐した一方, 各クラスタに属する被験者数の比率は異なった。

【考察】 Kaplan-Meier法によって解析したところ, 有意差は認めないものの全期間にわたりプロバイオティクス群がプラセボ群より高い寛解維持率を示した。また, 糞便菌叢に基づく3つのクラスタ分岐のうち, 特にクラスタIに属する被験者に対してプロバイオティクス群がプラセボ群より寛解維持効果の高いことが示された。以上より, 本プロバイオティクスはUC患者の寛解維持において有効であると考えられた。