

氏名・(本籍) 岡本敏彦(奈良県)  
学位の種類 博士(医学)  
学位記番号 博士第332号  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位授与年月日 平成12年3月27日  
学位論文題目 Preventive efficacy of butyrate enemas and oral-administration of *Clostridium butyricum* M588 on dextran sodium sulfate-induced colitis in rats  
(DSS 腸炎ラットに対する酪酸注腸及び酪酸産生菌 *Clostridium butyricum* M588 経口投与による予防的効果)

審査委員 主査 教授 山路 昭  
副査 教授 岡村 富夫  
副査 教授 馬場 忠雄

## 論文内容の要旨

### 【目的】

哺乳類の腸内発酵産物である短鎖脂肪酸は、生体に対して様々な作用を及ぼすことが近年明らかにされている。短鎖脂肪酸の一つである酪酸 (butyrate) は結腸上皮細胞のエネルギー源となるほか、上皮細胞の増殖促進効果があることが知られている。今までに、潰瘍性大腸炎への butyrate 注腸の有用性は多数報告されているが、注腸の繁雑さや butyrate の扱いにくさのため、臨床での使用はほとんどなされていない。そこで我々は、潰瘍性大腸炎モデルとされるラット DSS 大腸炎に対して butyrate の注腸投与を行い、特にその前投与における有用性を確認したうえで、さらに大腸内で n-butyrate を産生する腸内細菌、*Clostridium butyricum* M588 (CBM588) の芽胞製剤の経口投与による炎症性腸疾患の予防的効果を確認するため、実験的な検討をおこなった。

### 【方法】

10週齢のSD系雄性ラットを水溶性線維除去食にて飼育した。大腸炎は3%のdextran sulfate sodium (DSS) 溶液を、10日間自由飲水させて作成し、11日目以降は1%のDSS溶液を自由飲水させ腸炎を持続させた。butyrate注腸の実験では、前投与群にはbutyrateの注腸を17日間毎日おこない、DSS溶液を8日目から10日間飲水させた。後投与群にはDSS溶液を飲水させてから11日目よりbutyrateの注腸を開始し14日間おこなった。対照群には生理食塩水を注腸した。CBM588経口投与の実験では、CBM588投与群には1日1回3gのCBM588芽胞製剤を滅菌水に混和したものを、DSS投与1週間前より投与終了時まで17日間経口投与した。CBM588非投与群には滅菌水のみを同様に17日間投与した。投与終了と同時に大腸を摘出し、ulcer index、肛門より口側5cmの大腸粘膜中のmyeloperoxidase (MPO) 活性、潰瘍周囲のproliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞率の測定をおこなった。大腸内の便は嫌氣的培養をおこない、腸内細菌叢と菌数を測定し、さらにガスクロマトグラフィーにて、酢酸・プロピオン酸・酪酸・イソ酪酸・イソ吉草酸・吉草酸・イソカプロン酸・乳酸の各便中脂肪酸濃度を測定した。

### 【結果】

butyrate注腸の実験では、ulcer index、MPO活性ともにbutyrate前投与群で有意な炎症の軽減を認めた。CBM588経口投与の実験では、便中の腸内細菌叢では、cecumでもcolonでも、CBM588投与群に全例*C. butyricum* M588の出現を認めた。他の腸内細菌叢としては、cecumでは*Lactobacillus*及び*Eubacterium*が、colonでは*Eubacterium*のみがCBM588投与群で有意に増殖していた。また便中短鎖脂肪酸では、酪酸菌投与群に、酢酸・プロピオン酸・酪酸が有意に増加しており、中でも酪酸の増加率が約1.6倍で最も高かった。乳酸はCBM588投与群で減少傾向を認めたが、有意差はなかった。ulcer index、MPO活性は、CBM588投与群で有意に低値であった。PCNA陽性細胞率は、CBM588投与群で有意に高値であった。

### 【考 察】

今回の実験で、CBM588 の栄養体は CBM588 投与群全例の便で検出され、さらに n-butyrate 濃度の増加が認められた。このことは、経口投与された CBM588 の芽胞は、DSS 溶液や腸管内分泌物の影響を受けずに発芽・増殖し、butyric acid を産生したことを示している。DSS 腸炎では腸内細菌叢が著しく変化し、*Lactobacillus* は減少し *Bacteroidaceae* は有意に増加するとの報告がある。今回の実験では両群で腸内最多菌である *Bifidobacterium* がほとんど検出されなかったのは、主に DSS 溶液の影響によるものと考えられるが、CBM588 投与群で *Lactobacillus* は逆に増加していた。このことは、DSS 溶液の影響以上に、CBM588 の *Lactobacillus* に対する増殖促進作用が強かったものと考えられる。また DSS 腸炎の発症機序として、*Bacteroidaceae* の増加が関与していると考えられているが、*Bacteroidaceae* は両群間で有意な変化は認められなかった。このことから、CBM588 及び *Lactobacillus* の増殖により *Bacteroidaceae* の増加が抑えられ、このことが DSS 腸炎の発症を抑制した一因と考えられる。短鎖脂肪酸は大腸癌に対するアポトーシス誘導作用や、発癌を抑制するとの報告も認められる。特に潰瘍性大腸炎の長期予後においては、大腸癌の合併は大きな問題の 1 つである。CBM588 芽胞製剤は、長期に内服しても安全で、また臭いなどの問題もない為コンプライアンスの点からも優れており、緩解期に内服することで、緩解維持効果が期待できる。大腸癌の予防の点からも、CBM588 芽胞製剤のさらなる応用が期待できる。

### 【結 論】

CBM588 の DSS 大腸炎に対する予防的投与は有効である。

## 論文審査の結果の要旨

酪酸は腸上皮細胞のエネルギー源となるほか、腸上皮細胞の増殖効果を有する。3% dextran sodium sulfate (DSS) を経口投与し作成したラット大腸炎モデルに、酪酸産生菌 *Clostridium butyricum* M588 (CBM588) の芽胞製剤を経口投与し、腸粘膜の潰瘍や炎症に及ぼす影響を検討した。(1)酪酸を DSS 大腸炎モデル作成前に注腸投与し、潰瘍形成及び炎症の抑制効果を確認した。(2) CBM588 を DSS 大腸炎モデル作成前に経口投与した結果、潰瘍形成及び炎症の抑制効果と潰瘍周辺の上皮細胞の増殖効果を認め、便培養では CBM588 が出現し、便中の酪酸は 1.6 倍に増加していた。すなわち経口投与された CBM588 は腸管内で酪酸を産生したことを示唆した。

本研究は、酪酸及び CBM588 製剤の前投与により DSS 大腸炎の腸粘膜障害が軽減することを明らかにした。このことは、酪酸産生菌による潰瘍性大腸炎の緩解維持効果を期待する上で意義あるものであり、博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年2月17日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。