

乳化剤の 1 種であるポリソルベート 8 0
による腸内細菌叢の変化が小腸の
粘膜障害に与える影響についての検討

古 橋 廣 崇

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度

目 次

第1章 緒言

第1節 本邦における加工食品と食品添加物	1
第2節 乳化剤とは	1
第3節 ポリソルベート類 (polysorbates)	2
第4節 乳化剤消費と疾患	2
第5節 乳化剤と腸内細菌	3
第6節 本検討における仮説と目的	3

第2章 乳化剤の経口投与がマウスの小腸に与える影響についての検討

第1節 目的	6
第2節 方法	6
第1項 動物と試薬	6
第2項 組織学的検討	6
第3項 RNA の抽出および QRT - PCR 法	7
第4項 ELISA 法による IL-1 β の蛋白定量	8
第5項 透過性の検討	8
第6項 統計学的処理	9
第3節 結果	
第1項 組織学的所見	9
第2項 炎症性サイトカイン及びインフラマソーム	9
第3項 小腸の透過性	9
第4節 小括	10

第3章 乳化剤の経口投与がマウスの腸内細菌叢に与える影響についての検討

第1節 目的	11
第2節 方法	11
第1項 動物と試薬	11
第2項 小腸の腸内細菌の採取	11
第3項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析	11
第4項 培養法による腸内細菌叢の解析	12
第5項 統計学的処理	12
第3節 結果	13
第1項 遺伝子学的解析	13
第2項 培養法	13
第4節 小括	14

第4章 乳化剤が *Proteus mirabilis* に与える影響についての検討

第1節 目的	15
第2節 方法	15
第1項 <i>P. mirabilis</i> の増殖能の検討	15
第2項 <i>P. mirabilis</i> の運動性の検討	15
第3項 統計学的処理	16
第3節 結果	16
第1項 乳化剤が <i>P. mirabilis</i> の増殖能に与える影響	16
第2項 乳化剤が <i>P. mirabilis</i> の運動性に与える影響	16
第4節 小括	17

第5章 乳化剤による腸内細菌叢の変化が NSAIDs 腸炎に与える影響

第1節 目的	18
第2節 方法	18
第1項 動物と試薬	18
第2項 潰瘍面積の計測	18
第3項 組織学的検討	18
第4項 RNA の抽出および QRT - PCR 法	19
第5項 ELISA 法による IL-1 β の蛋白定量	19
第6項 透過性の検討	19
第7項 統計学的処理	19
第3節 結果	20
第1項 肉眼的所見及び組織学的所見	20
第2項 炎症性サイトカイン及びインフラマソーム	20
第3項 小腸の透過性	20
第4節 小括	20

第6章 乳化剤による NSAIDs 腸炎の増悪と腸内細菌叢の変化の関連性についての検討

第1節 目的	22
第2節 方法	22
第1項 乳化剤と抗菌薬を投与したマウスの作成	22
第2項 糞便微生物移植 (fecal microbiota transplantation: FMT)	22
第3項 インドメタシン腸炎の評価	23
第4項 統計学的処理	23
第3節 結果	23

第1項 抗菌薬投与後の変化	23
第2項 乳化剤を投与したマウスの便の FMT	24
第4節 小括	24
第7章 <i>Proteus mirabilis</i> が NSAIDs 腸炎に与える影響についての検討	
第1節 目的	25
第2節 方法	25
第1項 動物	25
第2項 <i>P. mirabilis</i> の経口投与	25
第3項 インドメタシン腸炎の評価	26
第4項 統計学的処理	26
第3節 結果	26
第1項 組織学的所見	26
第2項 炎症性サイトカイン及びインフラマソーム	26
第4節 小括	27
第8章 考察	28
第9章 結論	32
謝辞	33
参考文献	34
図表	39

第1章 諸言

第1節 本邦における加工食品と食品添加物

戦後、我が国の食生活は大きく変化し、「食の欧米化」が急速に進んできた。また、家族構成やライフスタイルの変化により、加工食品の需要が高まってきた。加工食品とは食品に何らかの加工を施したもので、水産練り製品、肉加工品、乳加工品、嗜好食品、調味料、菓子類、冷凍食品、レトルト食品、缶詰食品、インスタント食品など、多岐にわたる [1]。

食品の加工技術の進歩に伴い、加工食品が更に普及し、その消費量は年々増加してきており、農林水産省によると、2010年の時点で全世帯の食料支出における加工食品の占める割合はすでに50%を超えている [2]。

加工食品の消費量増加の一方で、食品添加物の危険性は広く認識されるようになり、厚生労働省は食品添加物の安全性を十分に検討したうえで、食品衛生法に基づいてその使用を認めている。食品添加物は古くから我々の生活に取り込まれていたものから、近年になって化学的に合成されたものまで、様々な種類が使用されているが、厚生労働省ではマーケットバスケット方式による食品添加物の摂取量を調査しており、各食品添加物の摂取量が安全上問題ないことを確認している [3]。

第2節 乳化剤とは

食品添加物は食品衛生法施行原則に従い表示されており、保存料・甘味料・着色料のように用途別に記載する場合や、乳化剤・香料・調味料のように物質名の代わりに種類を示す一括名で記載する場合などがある。

乳化剤はその名のとおりに、「乳化」作用を目的に使用される物質の一括名であり、複数の物質が含まれる場合がある。「乳化」とは水と油のような性質が

異なる物質同士を混ぜ合わせる作用のことであり、乳化剤は食品中に含まれる界面活性剤とほぼ同義である。

乳化剤は「乳化」以外にも、起泡・消泡・分散・浸透などの作用を有しており、様々な加工食品に使用されている。水中油滴型（O/W 型）・油中水滴型（W/O 型）のように水と油のどちらに浸透しやすいかで分類されたり、大豆レシチンのような天然のものと、人工的に合成されたものかによって分類されたりすることもあるが、それぞれの親油基と親水基に用いられる物質で分類されるのが一般的である。

第3節 ポリソルベート類（polysorbates）

乳化剤には様々な種類があり、本邦における消費量ではグリセリン脂肪酸エステルが最も多い。その他にも、ショ糖脂肪酸エステル・ソルビタン脂肪酸エステルなどがあり、ポリソルベート類はソルビタン脂肪酸エステルにエチレンオキシドを反応させて作られた乳化剤である。

米国では 1960 年代に使用が認可され、パンやサラダドレッシングなどの日常に欠かせない食品にも使用されている。本邦でも 2008 年に食品添加物として認可され、コンビニエンスストア等で販売されているような気軽に手に入る加工食品にも使用されている [4]。

第4節 乳化剤消費と疾患

「食の欧米化」と共に、我々の食生活は高カロリー・高脂肪食へと変化し、糖尿病や脂肪肝などの生活習慣病が増加してきている。その他にも、食生活の変化に伴い増加してきた疾患として炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease : IBD）が挙げられる。IBD の原因は不明であるが、高脂肪食・低線維食との関連が指摘されている [5-7] 。

また、IBD の増加には乳化剤などの食品添加物の増加も関連していることが疫学的なデータから疑われている。実際、本邦におけるクローン病の患者数と乳化剤の消費の経時的変化をグラフにすると（図 1）のように正の相関を示すが [8]、これらの直接的な因果関係を示すデータは報告されていない。

第 5 節 乳化剤と腸内細菌

近年、IL10 遺伝子欠損マウスにポリソルベート 80（polysorbate 80 : P80）を投与したところ腸内細菌叢を変化させ、大腸の粘液の菲薄化や大腸炎の誘発に加え、メタボリックシンドロームや大腸がんのリスクになることが報告された。しかも、アメリカ食品医薬品局（Food and Drug Administration : FDA）で認可されている低濃度で P80 を投与し、病原性が認められた [9, 10]。しかし、遺伝的に腸炎に対する脆弱性がある個体ではなくても腸内細菌叢の変化や腸炎を惹起させるのか、大腸以外の消化管への影響はどうか、P80 がどのように腸内細菌叢を変化させているのか、変化した腸内細菌叢と腸炎の関係などの検討はされておらず、不明な点は多い。

第 6 節 本検討における仮説と目的

先述した様に乳化剤の消費量増加がクローン病の罹患率の増加と強く関連しているとする疫学的な報告がされた [8]。クローン病は原因不明の疾患であるが、患者の腸内細菌は健常人とは異なる報告が数多くあり [11, 12]、抗生剤や糞便移植が有効だった症例の存在 [13, 14]、リスク感受性遺伝子に腸内細菌を認識する NOD2 遺伝子変異があることなど [15, 16]、様々な報告から腸内細菌の攪乱（dysbiosis）が起こり、それに対する免疫細胞の異常な反応が病態に深く関与すると想定されている。すなわち、乳化剤の消費量増加がクローン病を増加させた機序には腸内細菌叢の変化が関連している可能性が考え

られる。さらに、メタボリックシンドロームの原因は以前より高脂肪食などの栄養素の関与が指摘されてきたが [5]、近年、消化管の異常、特に粘膜の透過性が亢進する (leaky gut) ことによって管腔内の腸内細菌の産生する病原毒素が吸収され、血流を介して脂肪肝や動脈硬化などの全身疾患の原因となる説がある [17]。この際、病原毒素の吸収部位としては、栄養素の吸収システムを備える小腸の関与が大腸よりも強いと想定されている。すなわち、既報で乳化剤により惹起されたメタボリックシンドロームは小腸の腸内細菌叢の変化と関連している可能性が考えられる。

そこで私は、乳化剤は既報のあった大腸だけでなく小腸にも影響を与え、健康被害の原因となっているのではないかと仮説を立てた。特に、クローン病にもメタボリックシンドロームにも共通の原因である腸内細菌が小腸でも変化を受けているのではないかと考えた。

一方で、消炎鎮痛剤として広く用いられている非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) による薬剤性の小腸炎 (NSAIDs 腸炎) が近年増加していると報告されている。増加の原因としてはカプセル内視鏡やバルーン内視鏡の発明により、小腸の観察ができるようになったことに起因しているに過ぎないとの考え方もある一方で、小腸アフタや潰瘍は低用量アスピリン内服患者で 30-63.6% [18-20]、NSAIDs 長期内服患者においては 29-68% に及ぶことが明らかにされており [21, 22]、高齢化社会に伴い、これらの薬剤の使用量が増加していることが NSAIDs 腸炎の増加の一因とも考えられる。NSAIDs 腸炎の病態には腸内細菌の攪乱がその発生に重要な役割を果たしていることが知られており、乳化剤による腸内細菌叢の変化が、炎症を起こしやすい環境を作るのだとすれば、乳化剤摂取は NSAIDs 腸炎を悪化させる可能性があり、近年の NSAIDs 腸炎の増加の一因になりうると思った。

しかし、乳化剤が小腸に与える影響や、代表的な小腸炎である NSAIDs 腸炎の関係についての報告は全くされていない。そこで、乳化剤が NSAIDs 腸炎に与える影響についてインドメタシン（indomethacin : IND）腸炎モデルマウスを用いて検討した。また、乳化剤による小腸の腸内細菌の変化を解析することで、NSAIDs 腸炎のみならず、クローン病やメタボリックシンドロームの病態に関わる腸内細菌の攪乱を解明する一助となると考えた。

第2章 乳化剤の経口投与がマウスの小腸に与える影響 についての検討

第1節 目的

近年、乳化剤が大腸炎を誘発すると報告されたが [9]、乳化剤が小腸に対し、どのような影響を与えるかについては知られていない。乳化剤が小腸に与える直接的な影響について既報にならい、FDA で使用が認められている低濃度のポリソルベート 80 (Polysorbate80 : P80) とカルボキシメチルセルロース (Carboxymethyl cellulose : CMC) を用いてマウスで検討した [9]。

第2節 方法

第1項 動物と試薬

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本 SLC、静岡) に対し、乳化剤として 1% w/v の P80 (富士フイルム和光純薬、大阪) または 1% w/v の CMC (ファンタジー、埼玉) を 8 週間自由飲水させた (図 2 A)。水、P80 もしくは CMC を 8 週間自由飲水させたマウスを安楽死させた後に小腸を採取して、組織学的所見、炎症性サイトカインの変化や透過性の変化について検討した。実験は防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 15094)。マウスの飼育は防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水にて行った。

第2項 組織学的検討

小腸の組織学的所見は採取した小腸の一部を 10%ホルマリンで固定後パラフィン包埋、切片作成後ヘマトキシリン・エオジン染色し、絨毛 (villous)、陰窩 (crypt) の高さを測定し、小腸絨毛の萎縮を villous / crypt 比 (V/C ratio)

として計測することで評価した[23, 24]。対照群 (n = 3)、CMC 群 (n = 3)、P80 群 (n = 3) での比較検討を行った。

第3項 RNA の抽出および QRT - PCR 法

小腸における messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現を reverse transcription (RT) -polymerase chain reaction (PCR) 法にて評価した。回腸末端より 10cm 口側で全層の小腸を採取し、RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) へ浸漬した後、-20°C で保管した。組織のホモジナイズには MagNA Lyser (Roche, Basel, Switzerland) を 6,500 rpm・50 秒の条件で使用した。ホモジナイズ後は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出し、分光光度計 (Gene Quant; Pfizer, New York, NY, USA) で濃度を測定した後、そのうち 1.5 µL を DNase・RNase free 蒸留水 (Thermo Fisher Scientific) で希釈して 14 µL の水溶液を作成し、逆転写反応に使用した。逆転写反応は RNA 水溶液 14 µL、Random Primer 1.25µL (タカラバイオ、滋賀)、SuperScript II Reverse Transcriptase 1µL (Thermo Fisher Scientific)、dNTP Mixture 0.625 µL (タカラバイオ)、RNasin 0.625 µL (Promega, Fitchburg, WI, USA)、DTT 2.5 µL (Thermo Fisher Scientific)、First Strand Buffer 5µL (Thermo Fisher Scientific) を混合した後、Gene Amp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った。反応条件は 25°C 15 分、42°C 15 分、48°C 30 分、20°C 15 分とし、終了後に complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を得た。cDNA を得た後、QRT-PCR 法を行った。QRT-PCR 法のプライマープローブとして、mouse TNF-α (Mm00443258 : Applied Biosystems, Carlsbad, CA)、mouse IL-1β (Mm01336189 : Applied Biosystems)、mouse NLRP3 (Mm00840904 : Applied Biosystems) および mouse GAPDH (Mm4331182 : Applied Biosystems) を用いた。384-well プレートに 5

μl の PCR MasterMix (qPCR master mix plus; Eurogen, Seregno, Italy)、2 μl の Taqman プローブ (Applied Biosystems) 及び 3 μl (9ng) の作成した cDNA を混和して PCR 反応を行った(反応条件:50°C2 分、95°C10 分の preincubation の後、95°C15 秒、60°C1 分を 40 サイクル)。結果は、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) で解析した。

第 4 項 ELISA 法による IL-1 β の蛋白定量

mRNA により翻訳された Pro IL-1 β はインフラマソーム構成蛋白の 1 つである NLRP3 により活性化された caspase-1 により切断され、成熟型 IL-1 β として炎症の促進活性を発揮するため [25, 26]、IL-1 β は ELISA 法による蛋白定量も行った。対照群 (n = 4) と P80 群 (n = 6) から摘出した 2~3cm 長の回腸末端組織を 1 ml の Cell Lysis Buffer 2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) に浸し、ポリトロンでホモジナイズして蛋白溶解液を作成した。蛋白溶解液の全蛋白量を Protein Standard II (BIO RAD, Hercules, CA, USA) を基準とし、DCTM Protein Assay (BIO RAD) を用いて計測した。また、IL-1 β の蛋白量を Quantikine ELISA kit mouse IL-1 β /IL-1F2 (R&D systems) を用いて計測し、単位蛋白あたりの IL-1 β の蛋白量を定量的に計測した。計測にはマイクロプレートリーダー (Benchmark Plus; BIO RAD) を用いた。

第 5 項 透過性の検討

第 1 項と同様に 8 週間 P80 を自由飲水させたマウスを作成し、対照群 (n = 8) と P80 群 (n = 8) の 2 群に分けた。6 時間絶飲食させた後に、fluorescein isothiocyanate-dextran:FITC-dextran (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) をゾンデを用いて経口投与した (1 匹あたり 600 mg/kg)。FITC-dextran 投与 1 時間後に全血を採取し、得られた全血を 3,000 rpm・5 分の条件で遠心にか

け、血清を採取した。消化管粘膜より吸収された血清中の FITC-dextran を蛍光プレートリーダー SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて計測した。計測は 480～535nm の波長で行った。

第 6 項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した。2 群間の比較には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 3 節 結果

第 1 項 組織学的所見

V/C ratio は対照群 3.61 ± 0.35 、CMC 群 2.80 ± 0.11 、P80 群 2.82 ± 0.32 であり、CMC 群及び P80 群で低下傾向を示したが有意差を認めなかった (図 3 A)。

第 2 項 炎症性サイトカイン及びインフラマソーム

組織学的所見は CMC と P80 で、ほぼ同等に変化しており、小腸に与える影響は乳化剤の種類による差はないと考え、以後の検討は乳化剤として P80 のみを使用した。対照群と P80 群とで、各 mRNA (TNF α 、NLRP3、IL-1 β) の発現に有意差を認めなかった (n = 6) (図 3 B)。

単位蛋白あたりの IL-1 β の蛋白量は対照群 15.7 ± 2.34 pg / mg protein standard、P80 群 12.5 ± 1.5 pg / mg protein standard で有意差を認めなかった (図 3 C)。

第 3 項 小腸粘膜の透過性

血清中の FITC-dextran の濃度は対照群 29.6 ± 4.1 μ g/ ml、P80 群 23.0 ± 3.8

μg/ ml で有意差を認めなかった（図 3 D）。

第 4 節 小括

健康な個体への乳化剤の経口投与単独では小腸の粘膜障害は起きず、透過性も亢進しなかった。

第3章 乳化剤の経口投与がマウスの腸内細菌叢に与える影響についての検討

第1節 目的

腸内細菌はその多くが大腸に存在しており、大腸の腸内細菌が様々な疾患と関連があることが報告されている [27]。近年、乳化剤による腸内細菌叢の変化が、大腸炎を増悪させることが報告された [9]。小腸の腸内細菌は大腸と比べると数は少ないが、クローン病や NSAIDs 腸炎において小腸の腸内細菌が炎症と関連し、病態に関与するとの報告もある[28-30]。そこで、乳化剤が小腸の腸内細菌叢にも変化を起こしている可能性を考え、腸内細菌叢の変化を検討した。

第2節 方法

第1項 動物と試薬

P80 を第2章と同様に8週間自由飲水させたマウスを作成した。

第2項 小腸の腸内細菌の採取

作成したマウスの回腸末端から10 cmの部位で1 cm長の小腸を採取した。採取した小腸を1 mlのバッファーに浸し、小腸粘膜に付着した腸内細菌を4℃で保存した。また、腸内細菌の遺伝子解析用に新鮮な小腸内容物を採取し-80℃で保存した。

第3項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析

既報を参考に処理を行った [31-33]。-80℃保存した小腸内容物から QIAamp stool mini kit (Qiagen) を用いて腸内細菌の DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の可変領域 V4 を標的とし、プライマー (Forward: 515F, Reverse:

806rcbc33~52) と TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ、大阪) を用いて 16S rRNA 遺伝子領域を PCR 法により増幅した。増幅した腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子を Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms : T-RFLP 法を用い、門レベルで解析した。T-RFLP 法による解析はミヤリサン製薬 (株) に委託した。また、次世代シーケンサー MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を用い、腸内細菌叢の網羅的遺伝子解析を行い、その多様性を評価した。解析は明治 (株) に委託した。解析項目は一個体における多様性を意味する α 多様性の評価として Shanon index を用い、異なる個体間の同一群における多様性を意味する β 多様性の評価として UniFrac 解析を用いた。UniFrac 解析で得られた UniFrac 距離 (unweighted) 及び UniFrac 距離 (weighted) に基づいた主座標分析 (Principle coordinate analysis ; PCoA) により、異なる腸内細菌叢間の全体構造の相違を視覚的に評価した。また、培養法で単離した黒色のコロニーの菌種の同定はアクロモペプチターゼ (富士フイルム和光純薬) で DNA を抽出し、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ) で 16S rDNA を PCR 増幅した。ABI PRISM 3130 x1 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) を用いて、得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、既報の配列と比較した。解析はテクノスルガ・ラボ (株) に委託した。

第 4 項 培養法による腸内細菌叢の解析

DHL 培地 (日水製薬、東京) ・ GAM 培地 (日水製薬) を作成した。DHL 培地 ・ GAM 培地はともに腸内細菌の選択培地である。DHL 培地では大腸菌などの乳糖 ・ 白糖を分解する菌が赤 ~ 桃色のコロニーを形成する。また、DHL 培地に含まれるクエン酸鉄アンモニウムと硫化水素が反応して硫化鉄をつくることで、硫化水素産生菌が黒色のコロニーを形成する。バッファー内で保存した小腸をマイクロピペットの先端で組織を崩すように懸濁し、菌体浮

遊液を作成した。菌体浮遊液をリン酸緩衝食塩水（phosphate buffered Saline : PBS）で 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 倍に希釈し、各濃度 $100\mu\text{l}$ の菌体浮遊液を DHL 培地及び GAM 培地に接種した。DHL 培地は好気下で 24 時間後、GAM 培地は嫌気下で 48 時間後にコロニー数をカウントした。

第 5 項 統計学的処理

2 群間の比較には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、3 群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を使用し、 p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 3 節 結果

第 1 項 遺伝子学的解析

次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析では特定の菌種の増加傾向は見られなかったが、 α 多様性を示す shanon index が極めて減少しており（図 4 A）、個体内での多様性が低下していると考えられた。 β 多様性については pCoA で、対照群では狭い範囲に分布していたが、P80 群では幅広い領域に分布し、有意に拡大していた。すなわち、多様性が低下し、個体間でばらつきの大きな菌叢構造となり、不安定な腸内細菌叢となった（図 4 B）。

T-RFLP 法による門レベルの比較をすると、対照群では γ -Proteobacteria 門が $12 \pm 1\%$ であったのに対し、P80 群では $17 \pm 2\%$ に増加していた。逆に Bacteroides 門は対照群が $22 \pm 2\%$ であったのに対し、P80 群では $16 \pm 2\%$ と減少していた（図 4 C）。

第 2 項 培養法

γ -Proteobacteria 門の増加の結果を受けて、小腸粘膜内細菌叢の培養を腸内細菌科の選択培地で実施した。GAM 培地では複数のコロニーが混在し、

肉眼での識別が困難であった。DHL 培地では赤色のコロニー（乳糖・白糖分解菌）と黒色のコロニー（硫化水素産生菌）が明瞭に肉眼的に識別されたため（図 5 A）、DHL 培地のみコロニーのカウントを行った。対照群では赤色のコロニーのみを認め、黒色のコロニーを認めなかった。乳化剤投与群では赤色のコロニーの数は減少し、黒色のコロニーが赤色のコロニー以上に優勢に分離され、極めて対照的なパターンを示した（図 5 A）。

培養法で増加した黒色のコロニーを遺伝子解析したところ 16S rDNA 部分塩基配列は *Proteus mirabilis* の基準株 JCM 1669^T に対し相同率 99.6% の相同性を示し、 γ -Proteobacteria 門に属する *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) と同定された。

第 4 節 小括

小腸粘膜の腸内細菌を次世代シーケンサーによる遺伝子学的な解析をした結果、乳化剤により腸内細菌の多様性が低下し、腸内細菌叢の攪乱を起こしていることが明らかとなった。T-RFLP 法による解析では γ -Proteobacteria 門が有意ではないが増加傾向にあった。小腸粘膜の腸内細菌を腸内細菌科の選択培地で培養すると、対照群ではほとんど認めなかった硫化水素産生菌のコロニーを多数認め、その菌は *P. mirabilis* と同定された。

第4章 乳化剤が *Proteus mirabilis* に与える影響についての検討

第1節 目的

P. mirabilis は腸内細菌の1種であり、常在菌であるが、一定の環境下で腸炎を惹起することが報告されており [34]、ヒトでは主に日和見感染として尿路感染症を引き起こす菌としても知られている [35]。第3章では乳化剤の投与により *P. mirabilis* が増加していた。*Proteus* 属は全周性の鞭毛をもち、運動性が高いため、コロニーを形成しにくいことが特徴的な菌であり、その名の由来ともなっている（ギリシャ神話における変身が得意な神「**Proteus**」が語源とされる）。乳化剤が *P. mirabilis* の増殖や、その代表的な特徴である運動性の高さに与える影響について検討した。

第2節 方法

第1項 *P. mirabilis* の増殖能の検討

各濃度の P80（10%、1%、0.1% w/v）を加えたハートインヒュージョン液体培地（日水製薬）に小腸粘膜の培養で得られたコロニーから採取した *P. mirabilis* を加えて、37℃で振盪培養した。菌の増殖に伴い、徐々に液体培地の透過性は低下するため、経時的にマイクロプレートリーダー（**Benchmark Plus**; BIO RAD）で吸光度（600nm）を計測することで、菌の増殖能の変化を検討した。

第2項 *P. mirabilis* の運動性の検討

既報にならい、*P. mirabilis* の運動性をみるためにハートインヒュージョン液体培地（日水製薬）に寒天を 1.0% w/v になるように添加して、半固形培

地を作成した（通常の固形培地は 1.5% w/v）。半固形培地は P80 が 0.02% w/v となるように加えたものも作成した [36]。

半固形培地の中心に小腸粘膜の培養で得られたコロニーから採取した *P. mirabilis* を滅菌した竹串で点接種し、37°C で培養した。6 時間後、半固形培地の表面に膜状に増殖した *P. mirabilis* の増殖範囲の長軸を計測し、P80 を含まない培地を P80 (-) 群 (n = 10)、P80 を含む培地を P80 (+) 群 (n = 10) として *P. mirabilis* の運動性の変化を評価した。比較として、*E. coli* も同様に P80 (-) 群 (n = 5)、P80 (+) 群 (n = 5) で運動性の変化を評価した。

第 3 項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した。2 群間の比較には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 3 節 結果

第 1 項 乳化剤が *P. mirabilis* の増殖能に与える影響

液体培地に *P. mirabilis* を加えたものと、P80 を加えた液体培地に *P. mirabilis* を加えたもので吸光度に差はなく、P80 は *P. mirabilis* の増殖能を亢進させなかった (図 6 A)。

第 2 項 乳化剤が *P. mirabilis* の運動性に与える影響

P. mirabilis の増殖範囲の長軸は、P80 (-) 群では 20.4 ± 2.5 mm で、P80 (+) 群では 42.1 ± 2.8 mm であり、P80 を含んだ半固形培地で *P. mirabilis* の運動性は有意に亢進していた (P80 (-) 群 vs. P80 (+) 群、 $p < 0.01$)。それに対し、*E. coli* の P80 (-) 群では増殖範囲の長軸が 10.0 ± 1.8 mm で、

P80 (+) 群では 15.0 ± 1.3 mm と、P80 の添加による運動性の亢進は認めなかった (P80 (-) 群 vs. P80 (+) 群、 $p = 0.054$) (図 6 B)。

第 4 節 小括

乳化剤はその直接的な作用により *P. mirabilis* を増加させているわけではないことが明らかとなった。マウスでの乳化剤による *P. mirabilis* の増加には生体内での様々な要因が関係していると考えられるが、その一つとして乳化剤が *P. mirabilis* の運動性を亢進させることで、*P. mirabilis* が、より増殖しやすい環境に移動できる可能性が考えられた。

第5章 乳化剤による領内細菌叢の変化が NSAIDs 腸炎に与える影響

第1節 目的

第2章では健常な個体への乳化剤の投与は小腸炎を惹起しなかったが、第3章で乳化剤により、腸内細菌叢の攪乱が起きていることが明らかとなった。腸内細菌叢の攪乱により小腸炎が増悪しやすい環境に変化していると仮説を立て、インドメタシン腸炎モデルマウスを用いて検討した。

第2節 方法

第1項 動物と試薬

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスに水もしくは P80 を8週間飲ませた後に、インドメタシン (Indomethacin ; IND、富士フイルム和光純薬) を 5 mg/kg/日で連続2日間 (計 10 mg/kg) 腹腔内投与し、24時間後に安楽死させて小腸を採取した (図 2 B) [23]。

第2項 潰瘍面積の計測

安楽死を行う30分前に1%エバンスブルー (富士フイルム和光純薬) を 200 µl 静注し、摘出した全小腸に漏出したエバンスブルーによる青斑 (blue spot) を IND により生じた潰瘍の面積として計測することで評価した [23, 24]。water + IND 群 (n = 4)、P80 + IND 群 (n = 4) の2群に分け、比較検討を行った。

第3項 組織学的検討

小腸の組織学的所見は採取した小腸の一部を 10%ホルマリンで固定後パ

ラフィン包埋、切片作成後ヘマトキシリン・エオジン染色し、組織学的スコアで評価した。組織学的スコアは既報を参考に、grade 0：正常の粘膜及び絨毛構造、grade 1：絨毛先端の上皮下の組織が脱落し空間の出現を認める、grade 2：上皮下の空間が拡大し、粘膜固有層が肥厚する、grade 3：絨毛が短縮し、先端の構造が破壊された絨毛も出現する、grade 4：多くの絨毛が短縮し、陰窩の過形成を認める、grade 5：全ての絨毛が鈍化し、陰窩が細長くなる、の6段階で粘膜筋板1mmあたりの平均gradeを算出して評価した [24, 37]。第2項同様に water + IND 群 (n = 6)、P80 + IND 群 (n = 6) の2群に分け、比較検討を行った。

第4項 RNAの抽出およびQRT-PCR法

第2章第3項同様に炎症性サイトカイン及びインフラマソームのmRNAを乳化剤の有無で water + IND 群 (n = 6)、P80 + IND 群 (n = 6) の2群に分け、比較した。

第5項 ELISA法によるIL-1 β の蛋白定量

第2章第4項と同様にIL-1 β の蛋白定量を行い、乳化剤の有無で water + IND 群 (n = 6)、P80 + IND 群 (n = 6) の2群に分け、比較した。

第6項 透過性の検討

第2章第5項と同様にFITC-dextranを用いて、小腸の透過性を water + IND 群 (n = 4)、P80 + IND 群 (n = 4) の2群で比較した。

第7項 統計学的処理

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。2群間の比較には

Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第3節 結果

第1項 肉眼的所見及び組織学的所見

潰瘍面積は water + IND 群では $8.8 \pm 3.0 \text{ mm}^2$ に対し、P80 + IND 群では $18.8 \pm 5.5 \text{ mm}^2$ であり、P80 による増悪傾向を認めたが、有意差は認めなかった (water + IND 群 vs. P80 + IND 群、 $p = 0.13$) (図 7 A)。

組織学的スコアは water + IND 群の grade 2.2 ± 0.5 に対し、P80 + IND 群では grade 4.0 ± 0.4 であり、IND 投与下では P80 は有意に組織学的スコアを増悪させた (water + IND 群 vs. P80 + IND 群、 $p < 0.05$) (図 7 B)。

第2項 炎症性サイトカイン及びインフラマソーム

IND 投与下における P80 の有無で比較すると、water + IND 群に比し、P80 + IND 群の各 mRNA の発現は増加傾向を示したが、有意差は認めなかった (図 7 C)。

単位蛋白あたりの IL-1 β の蛋白定量は water + IND 群 $119.5 \pm 17.6 \text{ pg / mg protein standard}$ 、P80 + IND 群 $296.2 \pm 40.6 \text{ pg / mg protein standard}$ で P80 による増加を有意に認めた (water + IND 群 vs. P80 + IND 群、 $p < 0.05$) (図 7 D)。

第3項 小腸の透過性

血清中の FITC-dextran 濃度を IND 投与下における P80 の有無で比較すると、water + IND 群 $41.0 \pm 6.1 \text{ } \mu\text{g / ml}$ 、P80 + IND 群 $48.8 \pm 5.4 \text{ } \mu\text{g / ml}$ であり、IND 投与下においても P80 は小腸の透過性を亢進させなかった (図 7 E)。

第4節 小括

乳化剤により IND 腸炎は増悪した。第2章において、健常個体に対して、乳化剤は消化管の炎症を惹起しなかったが、乳化剤は小腸炎に対する脆弱性を増悪させていると考えられた。

第6章 乳化剤による NSAIDs 腸炎の増悪と腸内細菌叢の変化の関連性についての検討

第1節 目的

P80 は腸内細菌叢の攪乱を起こしたが、それが小腸炎に対する脆弱性の原因か単なる並存事象であるかを検討することを目的とした。その為、①抗菌薬で腸内細菌を減少させた際にも P80 の小腸炎に対する脆弱性が残存するか、②P80 で変化した腸内細菌叢を移植して腸炎に対する脆弱性も移植できるかを検討した。

第2節 方法

第1項 乳化剤と抗菌薬を投与したマウスの作成

前章までと同様に 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに水もしくは P80 を自由飲水させ、6 週間飲ませた時点で抗菌薬を追加し、水もしくは P80 を計 8 週間、抗菌薬を 2 週間自由飲水させたマウスを作成した (図 2 C)。グラム陰性菌を減少させるために抗菌薬として 1 g/l のネオマイシン (neomycin ; FRM, LKT Labs., St.Paul, MN, USA) を使用した [38]。IND の投与及び検体の採取についても前章までと同様に行い、water + FRM + IND 群 (n = 4)、P80 + FRM + IND 群 (n = 4) で比較した。

第2項 糞便微生物移植 (fecal microbiota transplantation : FMT)

乳化剤を投与したマウスの便の FMT を行うことで、腸内細菌が変化し、乳化剤を経口投与した際と同様に IND 腸炎が増悪するか検討した。FMT に用いる菌としては小腸粘膜の腸内細菌は量が極めて少なかったため、代わりに盲腸便を用いた。前章までと同様に 8 週齢の雄性 C57BL/6J マ

ウスに P80 を 8 週間飲ませ、安楽死させた後に盲腸便を採取した。採取した盲腸便 200 mg を 1500 μ l の PBS で希釈した[39]。別のマウスにゾンデを用いて、盲腸便を強制的に経口投与（1 日 1 回 200 μ l）して FMT を行った群を作成した。対照として健常のマウスの盲腸便の FMT を行った群も作成した。7 日間連続して FMT を行い、それぞれの群の一部には FMT の開始から 6 日目と 7 日目に 5 mg/kg の IND（計 10 mg/kg）を腹腔内投与した（図 2 D）。IND 投与 24 時間後にマウスを安楽死させて検体を採取した。健常のマウスの便を FMT した群を cont 便群（n = 4）、さらに IND を腹腔内投与した群を cont 便 + IND 群（n = 6）、P80 を飲ませたマウスの便を FMT した群を P80 便群（n = 4）、さらに IND を腹腔内投与した群を P80 便 + IND 群（n = 6）とした。

第 3 項 インドメタシン腸炎の評価

前章までと同様に組織学的所見を組織学的スコアで評価し、炎症性サイトカイン及びインフラマソームを mRNA で比較した。第 1 項の抗菌薬を用いた実験では ELISA 法による IL-1 β の蛋白定量も行った。

第 4 項 統計学的処理

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。2 群間の比較には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 3 節 結果

第 1 項 抗菌薬投与後の変化

抗菌薬投与下で IND 腸炎を誘導し、組織学的スコアを計測したが、water + FRM + IND 群 grade 3.00 ± 0.41 、P80 + FRM + IND 群 grade 3.25 ± 0.25 と

FRM 投与下では P80 の有無による差は認めなかった (図 8 A)。

また、IL-1 β の蛋白量は、water + FRM + IND 群 189.2 ± 67.7 pg / mg protein standard、P80 + FRM + IND 群 162.2 ± 40.5 pg / mg protein standard とほぼ同程度であり、FRM 投与下では P80 の有無による差は認めなかった。P80 による組織学的所見の悪化や IL-1 β の上昇はいずれも消失しており、腸内細菌の変化の関与が考えられた (図 8 B)。

第 2 項 乳化剤を投与したマウスの便の FMT

組織学的スコアは cont 便群 grade 1.25 ± 0.25 、P80 便群 grade 1.50 ± 0.30 、cont 便 + IND 群 grade 3.00 ± 0.26 、P80 便 + IND 群 grade 3.12 ± 0.31 であり、P80 を投与したマウスの盲腸便を FMT した群と健常マウスの盲腸便を FMT した群で有意差を認めなかった (図 9 A)。

また、炎症性サイトカイン及びインフラマソームの mRNA の発現も、IND 投与の有無に関わらず、P80 を投与したマウスの盲腸便を FMT した群と健常マウスの盲腸便を FMT した群で有意差を認めなかった (図 9 B)。

第 4 節 小括

抗菌薬で腸内細菌を減少させると、P80 による IND 腸炎の増悪は再現されず、腸内細菌が IND 腸炎の増悪に関与していると考えられた。しかし、P80 を投与したマウスの盲腸便を移植したマウスと健常群の盲腸便を移植したマウスとで IND 腸炎に対する脆弱性に変化はなく、P80 の経口投与による IND 腸炎の増悪は再現されなかった。

第7章 *Proteus mirabilis* が NSAIDs 腸炎に与える影響 についての検討

第1節 目的

抗菌薬の投与下で P80 の小腸炎に対する脆弱性が消失したため、腸内細菌叢の変化が関与していると考えられたが、FMT では腸炎に対する脆弱性が再現できなかった。腸内細菌叢の変化が P80 の腸炎の脆弱性の病態に関与しているかさらに検討するため、P80 により小腸粘膜内で増加していた *P. mirabilis* に焦点をあてた。P80 による IND 腸炎の増悪が *P. mirabilis* をマウスに直接投与することで再現されるか実験することで、*P. mirabilis* の増加が IND 腸炎の増悪に寄与しているかを検討した。

第2節 方法

第1項 動物

前章までと同様に 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。

第2項 *P. mirabilis* の経口投与

P80 を 8 週間自由飲水させたマウスの小腸粘膜の培養で得たコロニーから *P. mirabilis* を採取し、ハートインヒュージョン液体培地（日水製薬）を用いて、37℃で振盪培養した。増殖させた *P. mirabilis* を 5,000 rpm・10 分の条件で遠心をかけて *P. mirabilis* のペレットを作成した。PBS で希釈し、約 10^{14} 個/ml になるように調整した。ゾンデを用いて、調整した菌体浮遊液もしくは PBS を強制的に 200μl 経口投与した。第6章の FMT 同様に 1 日 1 回 7 日間連続して行い、一部のマウスには *P. mirabilis* もしくは PBS の経口投与開始から 6 日目と 7 日目に 5 mg/kg の IND を腹腔内投与した（図 2 E）。IND 投

与 24 時間後にマウスを安楽死させて検体を採取し、PBS を経口投与した群を PBS 群 (n = 6)、さらに IND を腹腔内投与した群を PBS + IND 群 (n = 6)、*P. mirabilis* を経口投与した群を P. m 群 (n = 6)、さらに IND を腹腔内投与した群を P. m + IND 群 (n = 6) として 4 群で比較した。

第 3 項 インドメタシン腸炎の評価

前章までと同様に組織学的所見を組織学的スコアで評価し、炎症性サイトカイン及びインフラマソームを mRNA で比較した。

第 4 項 統計学的処理

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。2 群間の比較には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 3 節 結果

第 1 項 組織学的所見

組織学的スコアは PBS 群 grade 1.27 ± 0.17 、P. m 群 grade 1.40 ± 0.25 、PBS + IND 群 grade 2.83 ± 0.31 、P. m + IND 群 grade 3.00 ± 0.32 と *P. mirabilis* 投与群と非投与群において、IND 投与の有無に関わらず、両群に有意差を認めなかった (図 10 A)。

第 2 項 炎症性サイトカイン及びインフラマソーム

IND 投与による小腸粘膜の炎症性サイトカイン及びインフラマソームの mRNA の発現は P. m 群と PBS 群、P. m + IND 群と PBS + IND 群とで有意差を認めなかったが、*P. mirabilis* の経口投与群で IND 投与下では NLRP3 や IL-1 β に若干の増加傾向を認めた (図 10 B)。

第4節 小括

P. mirabilis の経口投与のみでは IND 腸炎の増悪に影響を与えなかった。乳
化剤による IND 腸炎の増悪には複数の菌種の相互作用が関与している可能性
が考えられる。

第8章 考察

既報による検討では、腸炎に対する脆弱性があるように遺伝子操作されたマウスにおいて、乳化剤が腸内細菌叢の攪乱を起こし、大腸炎に対する脆弱性を亢進させることが示されていた。今回の検討で、人に通常許容されている濃度の P80 が健常な動物の小腸における腸内細菌叢の攪乱を惹起する事、小腸炎に対する脆弱性を亢進する事を明らかにし、また、抗菌薬の投与下では小腸炎に対する脆弱性が消失していることから、腸内細菌叢の攪乱が小腸炎に対する脆弱性の病態に関与していることを示した。一方で、小腸粘液内で通常では少数しか存在しない *P. mirabilis* が著増したものの、この菌が小腸炎に対する脆弱性の原因かどうかは結論づけられなかった。

P80 が引き起こす腸内細菌叢の変化として *P. mirabilis* の増加に注目したが、*P. mirabilis* の経口投与では IND 腸炎の増悪を再現できなかった。*P. mirabilis* が病態に関与している可能性を想定したのは *P. mirabilis* が大腸炎の悪化を惹起している既報に基づく。Seo らは炎症を惹起する血中からリクルートしてきた単球系細胞が腸内細菌に反応して NLRP3 インフラマソーム依存性 IL-1 β 産生を介して消化管炎症を惹起すること、その際特に *P. mirabilis* が強力な作用を持つことを報告している [34]。その作用は大腸菌やシトロバクターをはるかにしのぎ、サルモネラと比肩した。注目すべきは粘膜固有層に在住する単球系細胞にはそのような作用をきたさなかった事である。今回の検討では、IND 単独群に比較して乳化剤 + IND 群で IL-1 β 蛋白質の増加を認めたものの、IND を投与していない乳化剤投与のみの群では *P. mirabilis* が小腸粘液内で増加したにも関わらず、IL-1 β や NLRP3 の増加を認めず、既報と一致しない結果を得た。

この理由として 1 つ目には、健常の腸管のような IL10 高産生のマクロファージが優位な炎症のない環境では *P. mirabilis* の炎症惹起作用がほとんど発揮されず、炎症下でリクルートしてくる CCR2 陽性のマクロファージが優位に浸潤す

る環境でのみ発揮されるのであれば説明がつく。すなわち、今回行った IND 腸炎モデルは極めて急性のモデルであり、CCR2 陽性の炎症惹起性マクロファージが浸潤するのに十分な時間がない環境だったので影響が軽微にとどまった可能性がある。IL-1 β や NLRP3 は FMT や *P. mirabilis* の負荷実験でも有意差こそ得られなかったが上昇する傾向にはあり、慢性の小腸炎モデル等で CCR2 陽性のマクロファージが優位に浸潤する環境での検討を要すると思われた。臨床現場において NSAIDs 腸炎は慢性炎症であり、今回我々が用いたモデルマウスよりも *P. mirabilis* の影響が大きくなる可能性があり、早急に検討すべき課題と考える。第 2 の理由としては *P. mirabilis* の抗炎症活性が菌株ごとに異なる可能性が考えられる。*P. mirabilis* の NLRP3 インフラマソーム依存性 IL-1 β 産生増加には菌中の HpmA hemolysin 活性が必須と報告されている [34]。*P. mirabilis* は尿路感染の病原菌であるが毒性は菌株によって様々で、その毒性の差は HpmA hemolysin 活性に関連すると報告されている [35]。今回、購入したマウスに在住する *P. mirabilis* の HpmA hemolysin 活性が既報の報告のマウスのものより低かった可能性が考えられる。第 3 の理由に大腸と小腸の差、特に粘液層の違いが考えられる。Okumura らは大腸の分厚い粘液層に Ly6/ PLAUR domain containing 8 (Lypd8) という分子が存在し、*P. mirabilis* を初めとする鞭毛を有する菌の粘膜への侵入を防いでいること、Lypd8 の低下している状況では *P. mirabilis* を初めとする鞭毛を有する菌が病原性を有することを報告している [40]。したがって、大腸においては単球系細胞への影響のみならず、粘液層への影響を考える必要がある。小腸では分厚い粘液層のかわりに α -defensin の様な抗菌物質を生体が分泌することが知られており、*P. mirabilis* との関与は今後検討の必要がある。

緒言で述べたとおり、乳化剤はさまざまな物質の一括名であり、本研究で用いた P80 は乳化剤の 1 種に過ぎず、P80 が腸炎活動性に変化を与えたことは、P80 の物質固有の作用の可能性もあるが、乳化剤に普遍的に存在する作用が腸内細

菌叢に変化を与えた可能性もある。乳化剤には「乳化」以外にもさまざまな性質を有しており、本検討では乳化剤のどの作用が腸内細菌叢を変化させるのかは解明できていない。たとえば、乳化剤の作用の一つに「静菌」作用がある。これも乳化剤が腸内細菌に与える影響の一つとして考えられるが、この「静菌」作用はイオン化した乳化剤と菌体が電氣的に引き合うことで生じると考えられている。すなわち、イオン化する乳化剤とイオン化しない乳化剤とでは腸内細菌に与える影響が異なる可能性がある。胆汁酸は強い乳化作用を有しており、脂肪の乳化作用により消化吸収を助けている。いわば生体内の乳化剤といえる。近年、胆汁酸には消化吸収以外の様々な作用があることが報告され、特に静菌・増殖作用は注目されている。注目すべきは側鎖の代謝を体内で受けるが、それにより腸内細菌への効果が変わることである。一次胆汁酸のタウロコール酸は *C. difficile* の発芽を促進し、胆汁酸の 7 位脱水酸化反応を受けた二次胆汁酸は逆に増殖を抑制すると報告されている [41]。一方で、この 7 位脱水酸化反応にもある種の腸内細菌が関与しているとする報告や [42]、腸内細菌の産生する抗菌物質を胆汁酸が産生阻害するという報告もされている [43]。今回、P80 を液体培地に混入した実験では、直接の腸内細菌の増殖能への影響は示せなかった。しかし、半固形培地において *P. mirabilis* の運動性を亢進させたことから、腸内細菌叢の攪乱に至った可能性の 1 つとして、乳化剤が *P. mirabilis* の運動性を亢進させることで、*P. mirabilis* が、より増殖しやすい環境に移動したためではないかと考えた。Araki らは DSS 大腸炎モデルを用い、DSS の大量な環境で *P. mirabilis* が増殖しやすいと報告している [44]。また、Garett らは腸炎モデルで *P. mirabilis* が増殖したと報告しているが [45]、いずれも機序については明らかにされていない。乳化剤のみならず、胆汁酸、粘液層、免疫細胞、 α -defensin を含めた *P. mirabilis* の増殖機序の解明は、食生活の変化に伴う消化管炎症疾患やメタボリックシンドロームの増加の病態解明に重要な知見を与えると考える。

P80 はソルビタン脂肪酸エステルにエチレンオキシドを反応させて作られるが、生体内では膵のリパーゼにより、その 100%が加水分解されるとされている[4]。従って、消化管内では乳化剤はすでに「乳化」作用を失っている可能性があり、加水分解された親水基もしくは親油基そのものの効果の可能性も否定はできない。

乳化剤がどのようにして炎症を惹起しやすい腸内細菌環境を形成しているのか明らかにすることができれば、本当の意味で安全な乳化剤が明らかになる可能性があり、「乳化剤」としてひとくくりにして、その全てを危険な食品添加物として認識するのは過剰かもしれない。

第9章 結論

乳化剤による腸内細菌の変化がインドメタシン腸炎を増悪させることが明らかとなった。

乳化剤により、*P. mirabilis* が増加するなど腸内細菌の多様性が低下し、腸内細菌叢の攪乱が起きることで腸炎を起し易い環境に変化していると考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座講師 東山正明博士および防衛医科大学校内科学講座教授 穂苅量太博士に衷心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました防衛医科大学校内科学講座教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

また本研究の一部は防衛医科大学校振興会からの助成金により実施しました。この場を借りて深謝いたします。

本研究の主旨は日本消化器病学会大会（第 58 回，2016 年 11 月，神戸）（第 59 回，2017 年 10 月，福岡）（第 60 回，2018 年 11 月，神戸）、日本消化器病学会総会（第 103 回，2017 年 4 月，東京）、日本小腸学会（第 55 回，2017 年 10 月，京都）、GI research academy（2016 年 6 月，東京）、米国消化器病学会大会（2016 年 5 月，サンディエゴ）（2017 年 5 月，シカゴ）（2018 年 5 月，ワシントン D.C.）において発表した。

参考文献

1. 厚生労働省 . 加工食品 .
<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/food/e-03-017.html>. Accessed April 30, 2019.
2. 農林水産省 . 食料消費の動向 . http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h26/h26_h/trend/part1/chap1/c1_3_01.html. Accessed April 30, 2019.
3. 厚生労働省 . マーケットバスケット方式による年齢層別食品添加物の一日摂取量の調査 .
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/sesshu/index.html. Accessed April 30, 2019
4. Food Safety Commission. Evaluation Report of Food Additives Polysorbates (Polysorbates 20, 60, 65 and 80). https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/foodadditive/polysorbate_report.pdf. Accessed May 15, 2019
5. Owczarek D, Rodacki T, Domagala-Rodacka R, et al. Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2016;22:895-905.
6. Statovci D, Aguilera M, MacSharry J, et al. The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front Immunol*. 2017;8:838.
7. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *The American journal of gastroenterology*. 2011;106:563-73.
8. Roberts CL, Rushworth SL, Richman E, et al. Hypothesis: Increased consumption of emulsifiers as an explanation for the rising incidence of Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7:338-41.
9. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 2015;519:92-6.

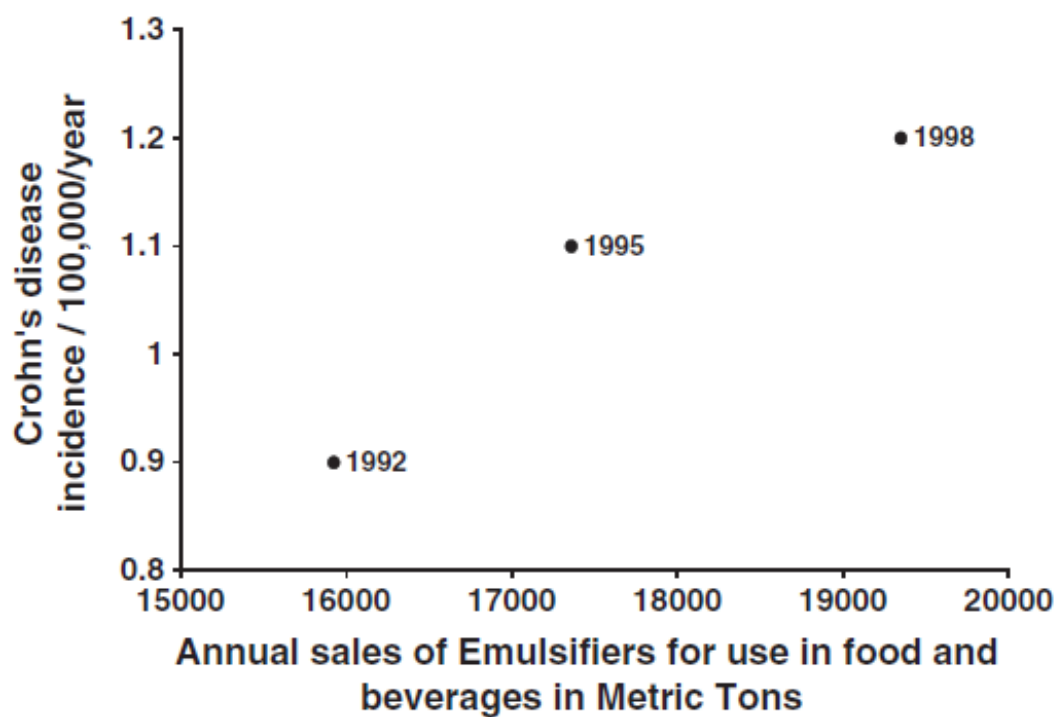
10. Viennois E, Merlin D, Gewirtz AT, et al. Dietary Emulsifier-Induced Low-Grade Inflammation Promotes Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* 2017;77:27-40.
11. Liguori G, Lamas B, Richard ML, et al. Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients. *J Crohns Colitis.* 2016;10:296-305.
12. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & nutrition.* 2011;6:209-40.
13. Scott KP, Antoine JM, Midtvedt T, et al. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microbial ecology in health and disease.* 2015;26:25877.
14. Kerman DH, Deshpande AR. Gut microbiota and inflammatory bowel disease: the role of antibiotics in disease management. *Postgraduate medicine.* 2014;126:7-19.
15. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411:603-6.
16. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411:599-603.
17. Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, et al. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014;20:16079-94.
18. Endo H, Hosono K, Inamori M, et al. Incidence of small bowel injury induced by low-dose aspirin: a crossover study using capsule endoscopy in healthy volunteers. *Digestion.* 2009;79:44-51.
19. Smecuol E, Pinto Sanchez MI, Suarez A, et al. Low-dose aspirin affects the small bowel mucosa: results of a pilot study with a multidimensional assessment. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2009;7:524-9.

20. Endo H, Hosono K, Inamori M, et al. Characteristics of small bowel injury in symptomatic chronic low-dose aspirin users: the experience of two medical centers in capsule endoscopy. *J Gastroenterol*. 2009;44:544-9.
21. Goldstein JL, Eisen GM, Lewis B, et al. Video capsule endoscopy to prospectively assess small bowel injury with celecoxib, naproxen plus omeprazole, and placebo. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2005;3:133-41.
22. Maiden L. Capsule endoscopic diagnosis of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced enteropathy. *J Gastroenterol*. 2009;44 Suppl 19:64-71.
23. Narimatsu K, Higashiyama M, Kurihara C, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 agonists ameliorate indomethacin-induced murine ileitis by suppressing the TLR4 signaling. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30:1610-7.
24. Higashiyama M, Hokari R, Kurihara C, et al. Indomethacin-induced small intestinal injury is ameliorated by cilostazol, a specific PDE-3 inhibitor. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2012;47:993-1002.
25. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*. 2009;27:229-65.
26. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*. 2009;27:519-50.
27. de Vos WM, de Vos EA. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition reviews*. 2012;70 Suppl 1:S45-56.
28. Shen Z, Zhu C, Quan Y, et al. Update on intestinal microbiota in Crohn's disease 2017: Mechanisms, clinical application, adverse reactions, and outlook. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2017;32:1804-12.

29. Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut*. 2008;57:181-7.
30. Kent TH, Cardelli RM, Stamler FW. Small intestinal ulcers and intestinal flora in rats given indomethacin. *Am J Pathol*. 1969;54:237-49.
31. Jinno S, Toshimitsu T, Nakamura Y, et al. Maternal Prebiotic Ingestion Increased the Number of Fecal Bifidobacteria in Pregnant Women but Not in Their Neonates Aged One Month. *Nutrients*. 2017;9.
32. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*. 2012;6:1621-4.
33. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010;7:335-6.
34. Seo SU, Kamada N, Munoz-Planillo R, et al. Distinct Commensals Induce Interleukin-1beta via NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Monocytes to Promote Intestinal Inflammation in Response to Injury. *Immunity*. 2015;42:744-55.
35. Allison C, Coleman N, Jones PL, et al. Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect Immun*. 1992;60:4740-6.
36. Niu C, Graves JD, Mokuolu FO, et al. Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *J Microbiol Methods*. 2005;62:129-32.
37. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 1970;101:478-83.

38. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118:229-41.
39. Gregory JC, Buffa JA, Org E, et al. Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. *J Biol Chem*. 2015;290:5647-60.
40. Okumura R, Kurakawa T, Nakano T, et al. Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature*. 2016;532:117-21.
41. Khoruts A, Sadowsky MJ. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016;13:508-16.
42. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*. 2006;47:241-59.
43. Kang JD, Myers CJ, Harris SC, et al. Bile Acid 7 α -Dehydroxylating Gut Bacteria Secrete Antibiotics that Inhibit *Clostridium difficile*: Role of Secondary Bile Acids. *Cell chemical biology*. 2019;26:27-34.e4.
44. Araki Y, Mukaisho K, Sugihara H, et al. *Proteus mirabilis* sp. intestinal microflora grow in a dextran sulfate sodium-rich environment. *International journal of molecular medicine*. 2010;25:203-8.
45. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenko T, et al. Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*. 2010;8:292-300.

図 表



Journal of Crohn's and Colitis (2013) 7, 338–341 より引用

図 1 日本における乳化剤の消費量とクローン病の罹患率の関係

乳化剤の消費量は経時的に増加しており、クローン病の罹患率と正の相関関係にある。

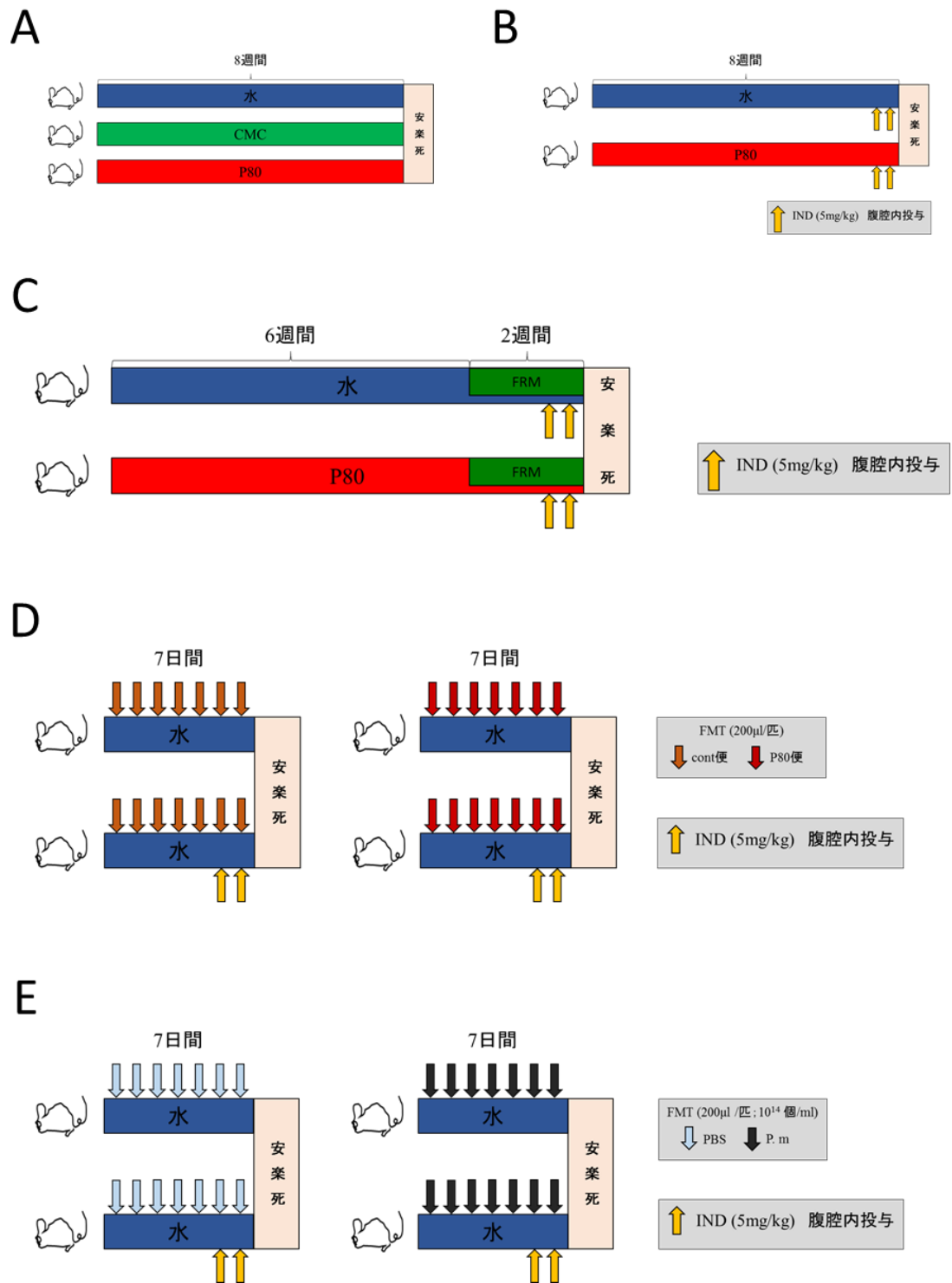


図 2 各章における動物モデル作成の模式図

(A) 第 2 章

乳化剤の単独投与による影響の検討。

(B) 第 5 章

Indomethacin (IND) 投与下における乳化剤の影響の検討。

(C) 第 6 章 第 2 節 第 1 項

抗菌薬を投与した際の water + IND 群と P80 + IND 群の比較。

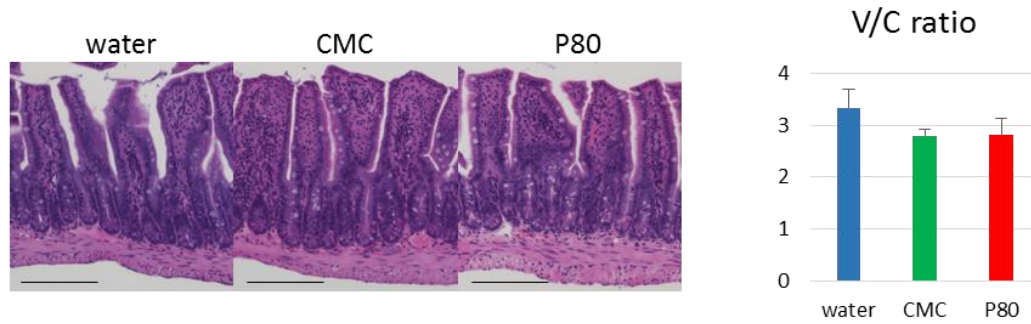
(D) 第 6 章 第 2 節 第 2 項

健常マウスの便の fecal microbiota transplantation (FMT) と P80 を投与したマウスの便の FMT の比較。

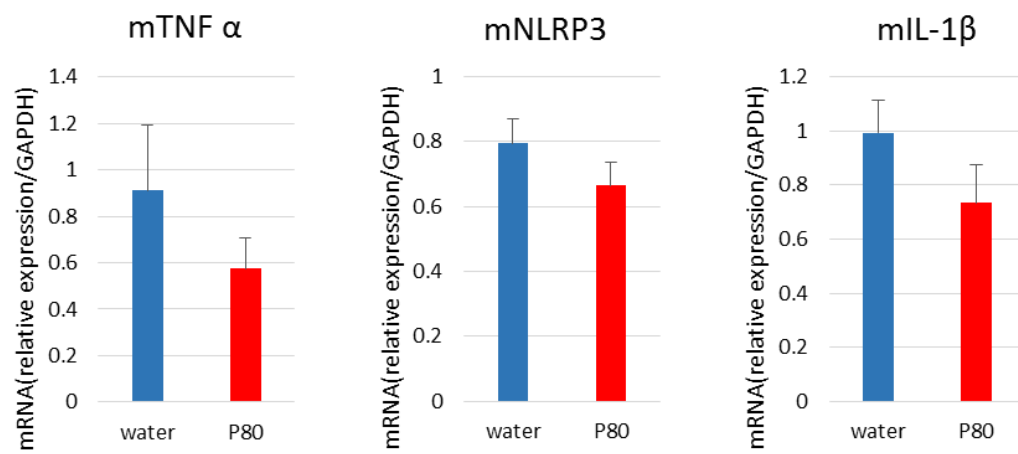
(E) 第 7 章

Proteus mirabilis (*P. mirabilis*) の経口投与による影響の検討。

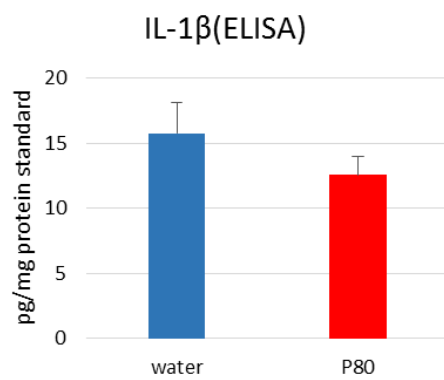
A



B



C



D

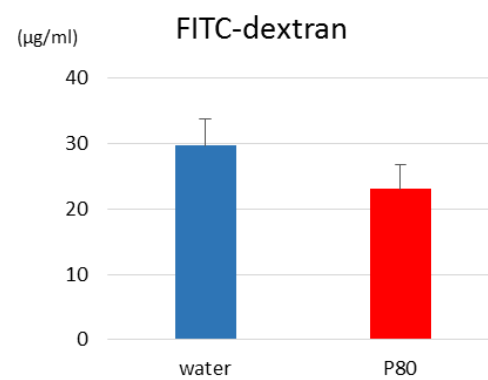


図 3 乳化剤が小腸に与える直接的な影響

(A) 組織学的所見の比較

V/C ratio は対照群 3.61 ± 0.35 、CMC 群 2.80 ± 0.11 (vs. 対照群、 $p = 0.21$)、P80 群 2.82 ± 0.32 (vs. 対照群、 $p = 0.33$) であり、CMC 群及び P80 群で若干の低下を認めるものの、有意差を認めなかった ($n = 3$)。bar は $200 \mu\text{m}$ 。

(B) 炎症性サイトカイン及びインフラマソームの mRNA の比較

TNF α 、NLRP3、IL-1 β の全てにおいて、対照群と P80 群の mRNA の発現に有意差を認めなかった ($n = 6$)。

(C) IL-1 β 蛋白定量の比較

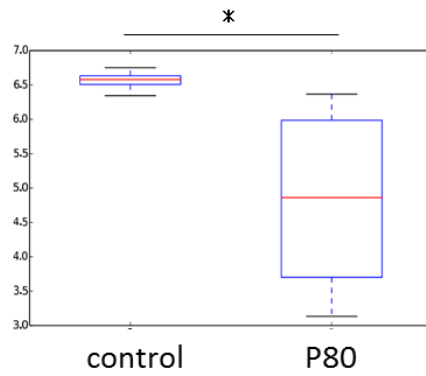
単位蛋白あたりの IL-1 β の蛋白量は対照群 $15.7 \pm 2.3 \text{ pg / mg protein standard}$ 、P80 群 $12.5 \pm 1.5 \text{ pg / mg protein standard}$ であり、有意差を認めなかった ($p = 0.25$ 、 $n = 6$)。

(D) 透過性の比較

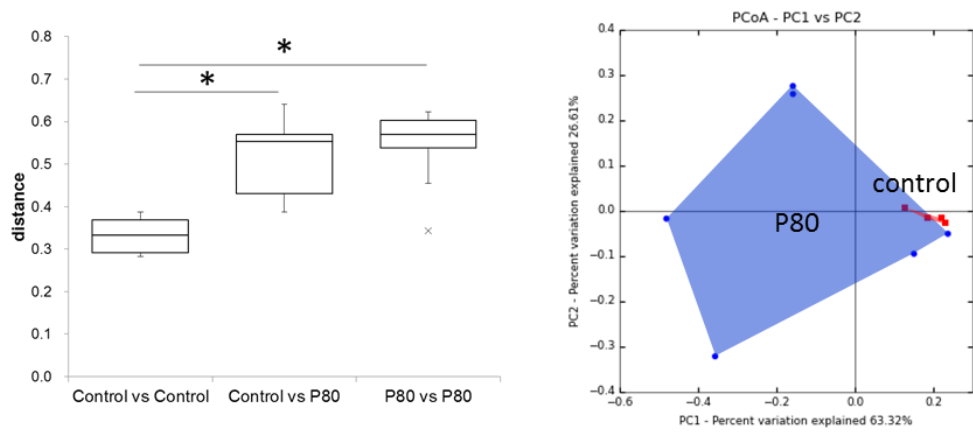
600 mg/kg の FITC-dextran を経口投与させてから 1 時間後の血清中の FITC-dextran の濃度は対照群 $29.6 \pm 4.1 \mu\text{g/ml}$ 、P80 群 $23.0 \pm 3.8 \mu\text{g/ml}$ であり、有意差を認めなかった ($p = 0.26$ 、 $n = 8$)。

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、 p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

A



B



C

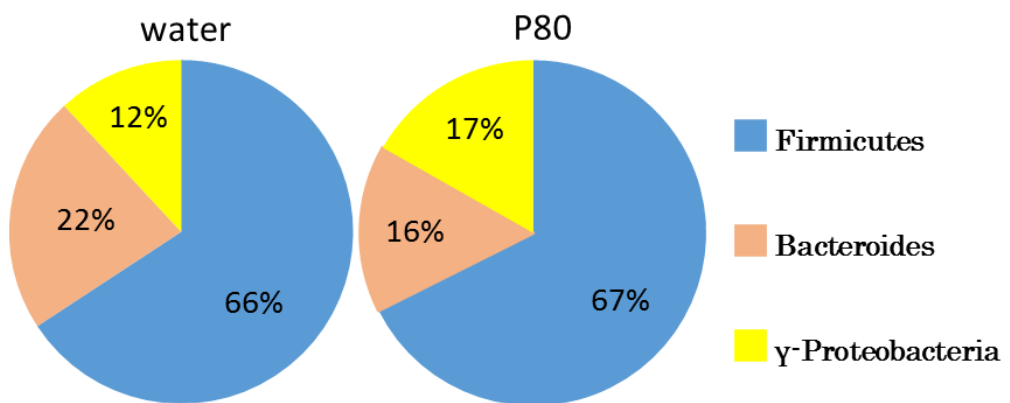


図 4 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析

(A) Shannon index を用いた α 多様性の比較

α 多様性を示す shanon index が極めて減少しており、個体内での多様性が低下していると考えられた (* $p < 0.001$ 、対照群 ($n = 4$) vs. P80 群 ($n = 6$))。

(B) β 多様性の評価

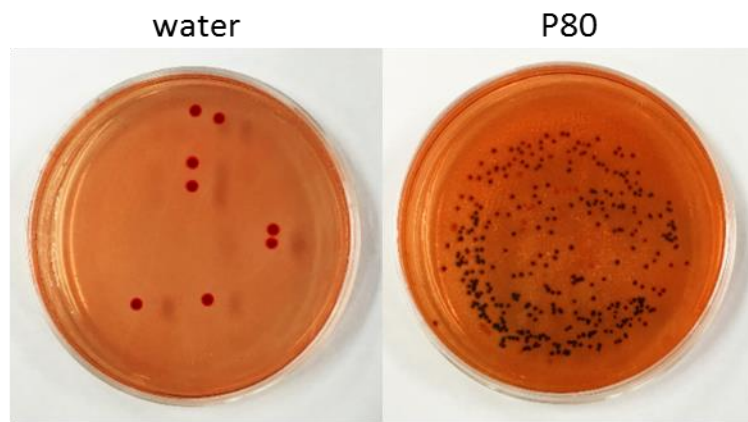
Principle coordinate analysis (PCoA) で対照群では狭い範囲に分布していたが、P80 群では幅広い領域に分布し、有意に拡大していた (* $p < 0.01$)。すなわち、多様性が低下し、個体間でばらつきの大きな菌叢構造となり、不安定な腸内細菌叢となった。対照群 ($n = 4$)、P80 群 ($n = 6$)。

(C) Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms (T-RFLP) 法による門レベルの解析

対照群では γ -Proteobacteria 門が $12 \pm 1\%$ であったのに対し、P80 群では $17 \pm 2\%$ に増加していた。逆に Bacteroides 門は対照群が $22 \pm 2\%$ であったのに対し、P80 群では $16 \pm 2\%$ と減少していた。

A の統計には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、B の統計には Kruskal-Wallis 検定を使用し、 p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

A



B

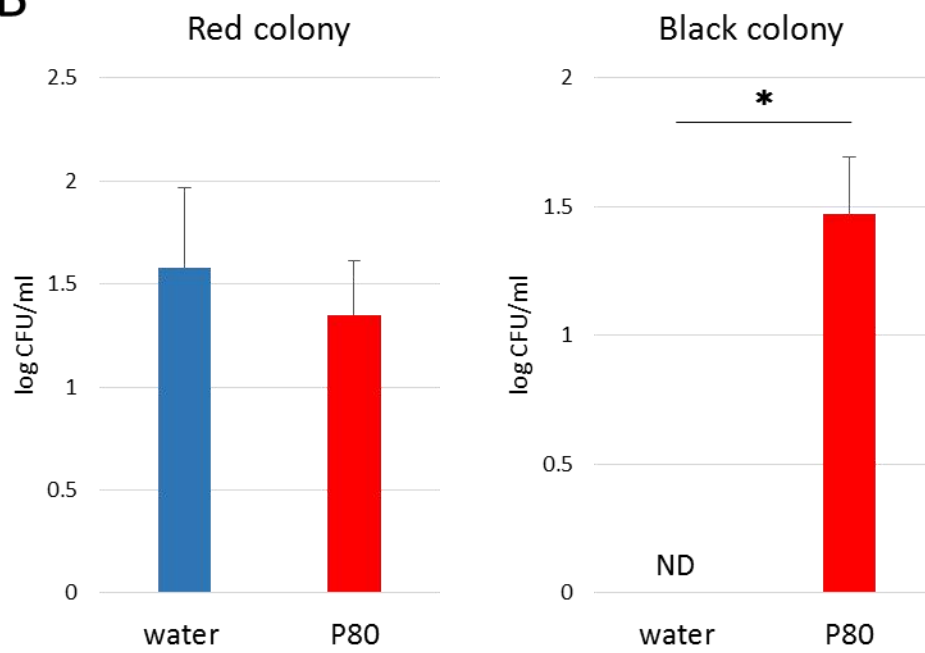


図 5 培養法による腸内細菌叢の解析

(A) DHL 培地の肉眼的所見

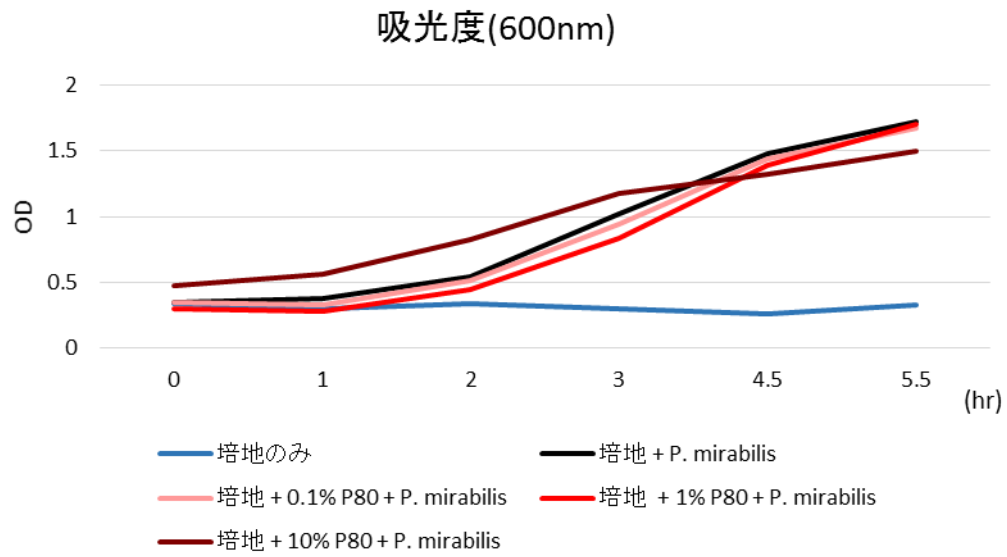
DHL 培地では乳糖・白糖分解菌を示す赤色のコロニー（写真左）と硫化水素産生菌を示す黒色のコロニー（写真右）が明瞭に肉眼的に識別された。

(B) コロニー数の比較

コロニーをカウントすると、対照群では赤色のコロニーのみ認め、黒色のコロニーを認めなかった。P80 群では赤色のコロニーの数は減少し、黒色のコロニーが赤色のコロニー以上に優勢に分離された。

B のデータは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

A



B

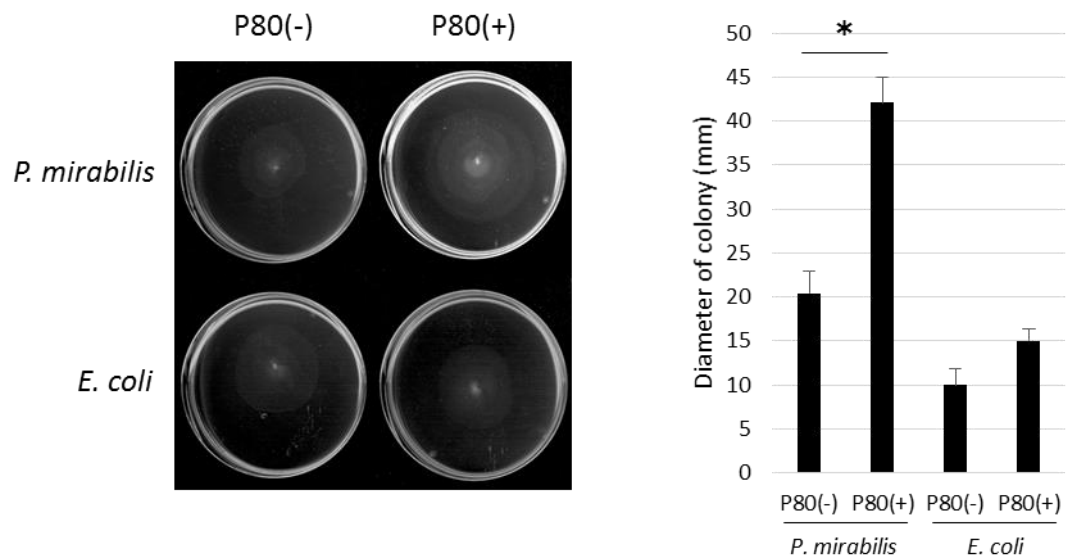


図 6 乳化剤が *P. mirabilis* に与える直接的な影響

(A) 乳化剤が *P. mirabilis* の増殖能に与える影響

P80 を含んだ液体培地においても *P. mirabilis* の増殖能は変化しなかった。

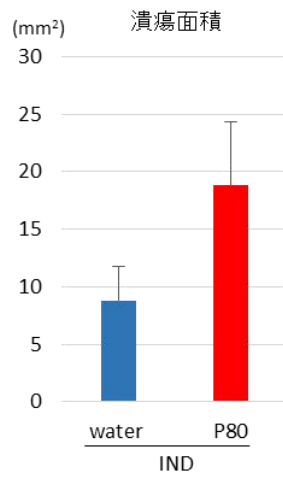
(B) 乳化剤が *P. mirabilis* の運動性に与える影響

P80 を含まない半固形培地 (P80 (-) 群) では 6 時間後の *P. mirabilis* の増殖範囲の長軸が $20.4 \pm 2.5\text{mm}$ であったのに対し、P80 (0.02% w/v)を加えた半固形培地 (P80 (+) 群) では $42.1 \pm 2.8\text{ mm}$ であり、P80 (+) 群で *P. mirabilis* の運動性が有意に増加した ($n = 10$ 、 $*p < 0.01$)。

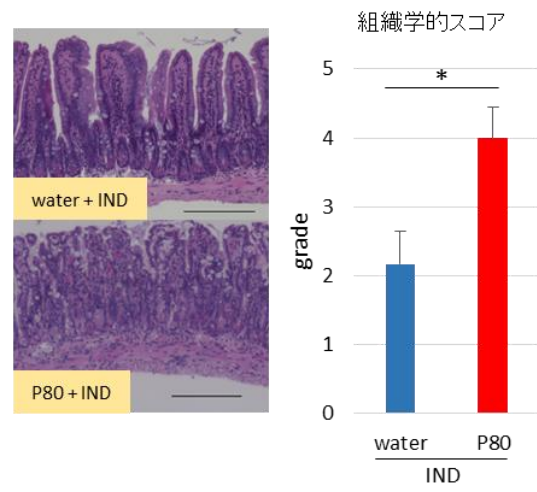
一方、*Escherichia coli* (*E. coli*) の P80 (-) 群では増殖範囲の長軸が $10.0 \pm 1.8\text{ mm}$ であったのに対し、P80 (+) 群では $15.0 \pm 1.3\text{ mm}$ であり、P80 の添加により *E. coli* も運動性は亢進するものの、有意差は認めなかった ($n = 5$ 、 $p = 0.054$)。

B のデータは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、 p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

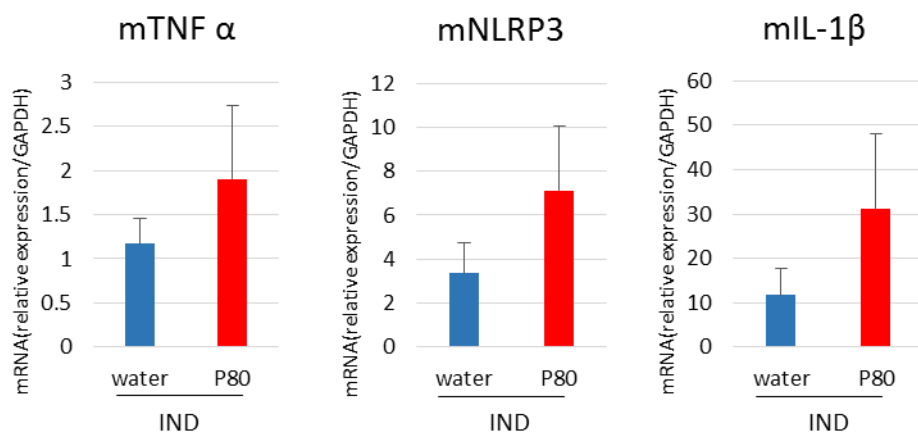
A



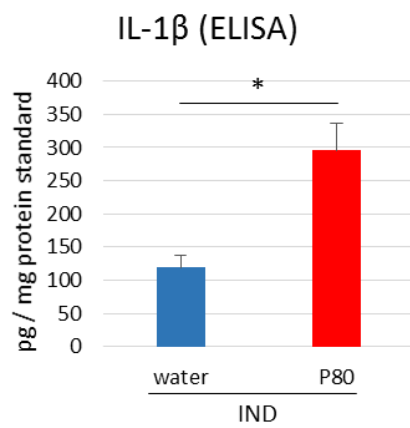
B



C



D



E

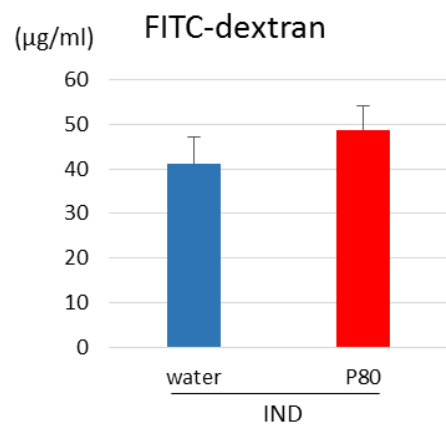


図 7 乳化剤が IND 腸炎に与える影響

(A) 潰瘍面積の比較

全小腸のエバンスブルーが漏出した青斑の面積を潰瘍面積として計測すると、water + IND 群 $8.8 \pm 3.0 \text{ mm}^2$ に対し、P80 + IND 群では $18.8 \pm 5.5 \text{ mm}^2$ であり、P80 による増悪傾向を認めたが、有意差は認めなかった ($p = 0.13$, $n = 4$)。

(B) 組織学的所見の比較

組織学的スコアは water + IND 群で $\text{grade } 2.2 \pm 0.5$ であったのに対し、P80 + IND 群で $\text{grade } 4.0 \pm 0.4$ であり、P80 + IND 群で有意に増悪していた ($*p < 0.05$, $n = 6$)。bar は $200 \mu\text{m}$ 。

(C) 炎症性サイトカイン及びインフラマソームの mRNA の比較

water + IND 群に比し P80 + IND 群で、TNF α 、NLRP3、IL-1 β の全てにおいて mRNA の発現は増加傾向を認めたが、有意差は認めなかった ($n = 6$)。

(D) IL-1 β の蛋白定量

単位蛋白あたりの IL-1 β の蛋白定量は water + IND 群 $119.5 \pm 17.6 \text{ pg / mg protein standard}$ 、P80 + IND 群 $296.2 \pm 40.6 \text{ pg / mg protein standard}$ であり、P80 による増加を有意に認めた ($*p < 0.05$, $n = 6$)。

(E) 透過性の比較

600mg/kg の FITC-dextran を経口投与させてから 1 時間後の血清中の FITC-dextran の濃度は water + IND 群 $41.0 \pm 6.1 \mu\text{g/ml}$ 、P80 + IND 群 $48.8 \pm 5.4 \mu\text{g/ml}$ であり、IND 投与下においても有意差を認めなかった ($p = 0.38$, $n = 4$)。

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、 p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

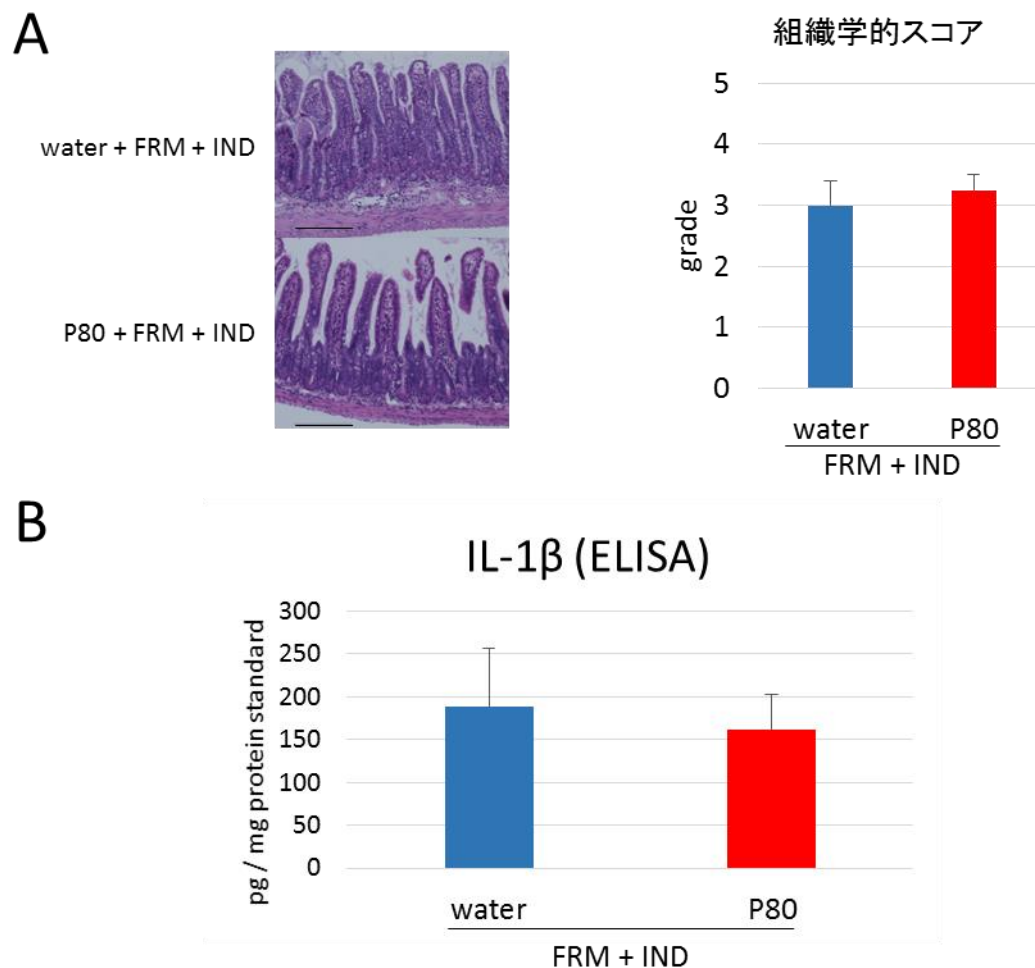


図 8 抗菌薬投与下における乳化剤が IND 腸炎に与える影響。

(A) 組織学的所見の比較

ネオマイシン(neomycin ; FMR)を投与した water + FRM + IND 群と P80 + FRM + IND 群で組織学的スコアに差はなく、P80 の経口投与でみられた IND 腸炎に対する脆弱性は消失していた。bar は 200 μ m。

(B) IL-1 β の蛋白定量

ネオマイシンの投与下では P80 による IL-1 β の増加を認めなくなった。

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

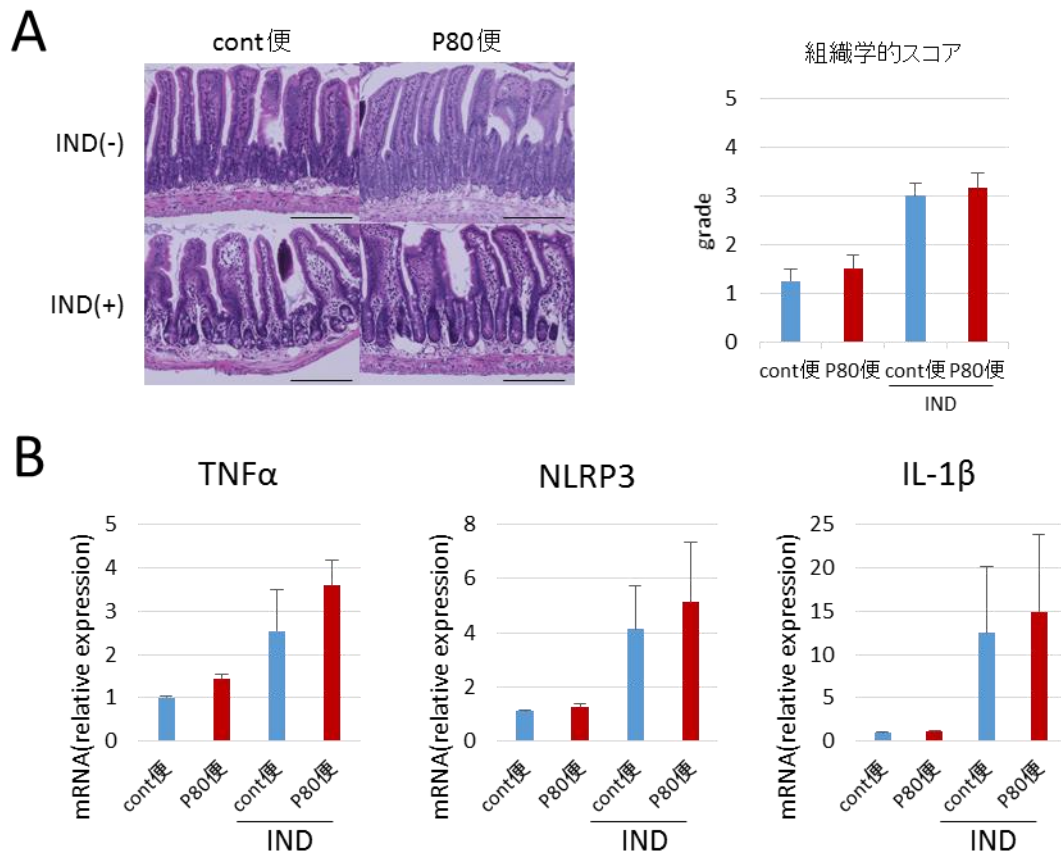


図9 乳化剤を投与したマウスの便の FMT が IND 腸炎に与える影響

(A) 組織学的所見の比較

組織学的スコアは健常マウスの便を FMT した群 (cont 便群) と P80 を 8 週間飲ませたマウスの便を FMT した群 (P80 便群) で有意差を認めなかった。IND 投与下においても cont 便 + IND 群と P80 便 + IND 群で有意差を認めなかった ($n = 4$)。bar は 200 μ m。

(B) 炎症性サイトカイン及びインフラマソームの mRNA の比較

IND 投与の有無に関わらず、cont 便群に比し、P80 便群の各 mRNA の発現は増加傾向にあったが、有意差を認めなかった ($n = 6$)。

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

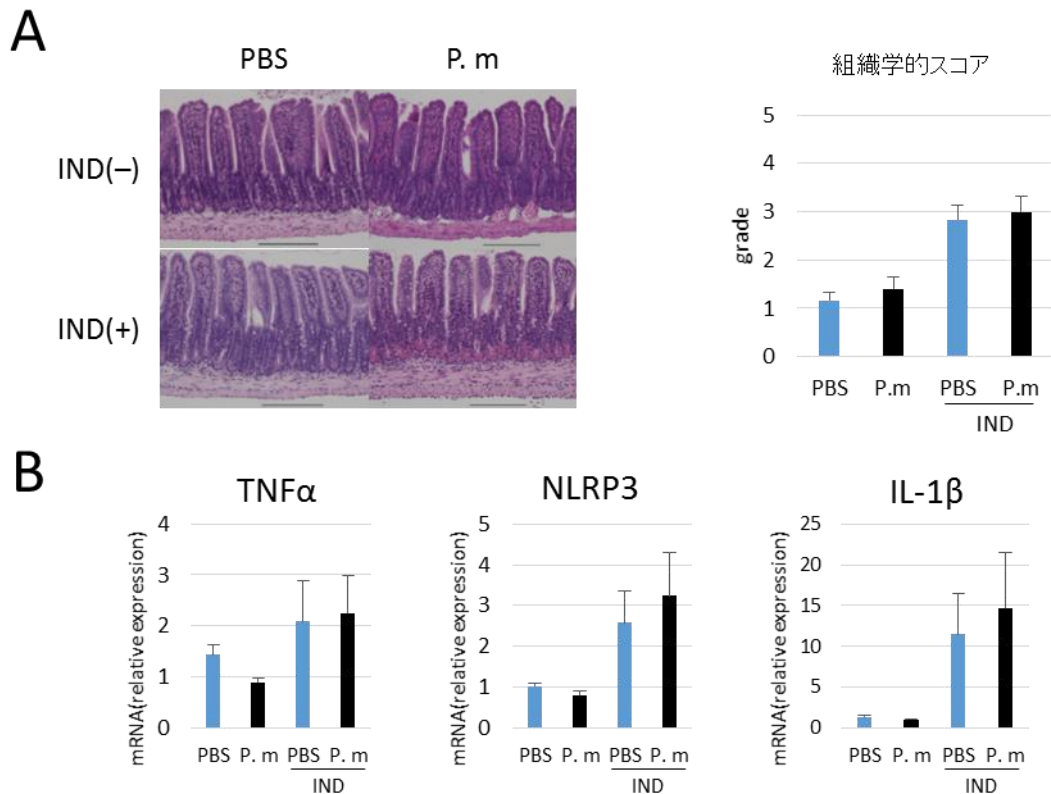


図 10 *P. mirabilis* の経口投与が IND 腸炎に与える影響

(A) 組織学的所見の比較

組織学的スコアは PBS 群 grade 1.27 ± 0.17 、P. m 群 grade 1.40 ± 0.25 、PBS + IND 群 grade 2.83 ± 0.31 、P. m + IND 群 grade 3.00 ± 0.32 であり、PBS 群 vs. P. m 群および PBS + IND 群 vs. P. m + IND 群でそれぞれ組織学的所見に有意差を認めなかった。各群 (n = 6)。bar は 200 μ m。

(B) 炎症性サイトカイン及びインフラマソームの mRNA の比較

P. m 群と PBS 群で各 mRNA の発現に有意差を認めなかった (n = 6)。IND 投与下においても PBS + IND 群と P. m + IND 群で各 mRNA の発現に有意差を認めなかったが (n = 6)、NLRP3 と IL-1 β は増加傾向を認めた。

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計には Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。