

1 研究の背景と目的

プロトンポンプ阻害薬(PPI)は強力な胃酸分泌抑制作用を持ち、逆流性食道炎、胃潰瘍等での高い治療効果を発揮してきた。更に、器質的疾患を認めない機能性胃腸症等にも多く処方され、日常診療での処方頻度は非常に高い。一方、PPI使用によるクロストリジウムデフィシル腸炎のリスク増大(Sandra Dial et al., *JAMA* 2005)、サルモネラ腸炎の発症率の増加(Wu HH et al., *Clin Infectious Disease* 2014)など、細菌性腸炎発症の報告が国内外で後を絶たず、適正な投薬/服薬を行う上でその機序を解明することは急務と考える。胃酸は pH1.0-2.0 程の強酸で、食物の消化と、経口的に侵入した雑菌の体内侵入を阻止するバリア機能を持つが、我々は先行実験にて、PPI 投与に伴いマウス小腸での腸内細菌叢の変化と、代謝産物の変化が生じることを見出しており (未発表)、この結果は、胃を通過する細菌類等の量的、質的变化と腸内細菌バランスの崩壊、代謝産物変化による免疫状態修飾など感染性腸炎発症リスクにおいて多様な影響がある可能性を示唆している。そこで本研究では、PPI 投与による腸内環境の変化が感染性腸炎への感受性を修飾するか検討し、その機序について解析を行った。

2 研究方法・研究内容

- ① PPI 投与による定常状態での腸管 (大腸・小腸) の免疫細胞分布変化の検討
C57BL/6 野生株マウスを、PPI (ランソプラゾール:Laz)投与群、非投与群 (コントロール、生理食塩水投与) の二群に分け、8 日間 Laz (8mg/kg/day)、または生食を腹腔内投与した。Day8 で腸間膜リンパ節、大腸をそれぞれ摘出し、リンパ節については、滅菌スライドガラスですり潰して単細胞懸濁液を作成し、大腸については内容物を十分に洗浄、EDTA 添加のバッファー等で上皮を除去後、Collagenase 処理にて組織内の血球系細胞を取り出した。これら細胞は CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、CD11c、CD11b、F4/80 などで染色し、フローサイトメトリーにて細胞群の分布変化を検討した。
- ② *C. rodentium* 経口感染への感受性の検討と炎症程度の評価
本実験では、マウスの病原細菌として、*Citrobacter rodentium* (以下 *C. rodentium*) を用いた。*C. rodentium* は、ヒトに対する腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管出血性大腸菌(EHEC)等と同様に、マウスに対し、宿主上皮に affaching and effecting(A/E) lesion を形成することにより大腸炎を惹起するとされるマウスの腸管病原細菌である。今回、我々は、Laz 投与による pH 上昇で、胃を通過する *C. rodentium* 数が増加し、PPI 投与群で易感染性を示すと仮説をたてた。そこで、C57BL/6 野生株マウスで Laz 投与群、非投与群を準備し、Laz 投与群は、8 日間 Laz (8mg/kg/day)を腹腔内投与した。更に各群を非感染群 (滅菌 PBS 経口投与) と、感染群に分け、感染群に対し各濃度の *C. rodentium*【 1×10^4 CFU(colony forming unit)、 1×10^5 CFU、 1×10^6 CFU、 1×10^8 CFU】を経口ゾンデにて投与した。感染導入後は、マウスの体重変化、便の性状を経時的に観

察し、感染後 2 週で感染成立の有無につき検討を行った。脾臓は感染による腫大を検討する目的で重量の測定をおこない、また、大腸組織は Hematoxylin-Eosin(HE)染色にて病理学的評価をおこなった。更に大腸組織より mRNA を採取し、TNF α 、IL-6、IL-1 β などの炎症性サイトカインをリアルタイム PCR にて測定した。

③ PPI 投与に伴う胃通過病原菌量変化の評価

C57BL/6 野生株マウスを、Laz 投与群、非投与群（コントロールとして生理食塩水を投与）の二群に分け、8 日間に Laz (8mg/kg/day)又は生食の腹腔内投与を行った後、Day8 に各マウスに経口ゾンデにて *C. rodentium* を感染させた。感染導入 1 時間後に全マウスの盲腸内容物を採取し、これを寒天培地に播き、24時間培養後に重量当たりのコロニー形成数をカウントし、病原菌の通過を評価した。

3 研究成果

① PPI 投与による定常状態での腸管（大腸・小腸）の免疫細胞分布変化の検討

我々は本課題の先行実験において、Laz 投与により、小腸内容物の酪酸やプロピオン酸といった短鎖脂肪酸濃度が有意に変化したことを代謝産物メタボローム解析によって確認している（未発表）。これら代謝物は、腸管の制御性 T 細胞誘導を修飾し腸の免疫バランスに影響を及ぼすことが知られている(Arpaia et al., *Nature* 2013, Furusawa et al., *Nature* 2013)。そこで、本課題において、腸間膜リンパ節細胞をフローサイトメトリーで解析し FoxP3 陽性 T 細胞の頻度に変化があるか評価したが、両群に明らかな差は認めなかった(Figure1)。また、大腸に於いて、CD3 陽性細胞 (T 細胞)、CD19 陽性細胞 (B 細胞)、CD11b、CD11c 陽性細胞（樹状細胞、マクロファージ）の評価も行ったが、やはり、両群に明らかな差は認めなかった。これらの結果から、Laz 投与により小腸内容物の代謝産物変化を認めたものの、制御性 T 細胞や、免疫細胞分布変化に影響を及ぼすに至らないと考えられた。また、感染性腸炎の罹患部位となる大腸粘膜に於いても、Laz 投与のみでは免疫的修飾は来さないことが分かった。

② *C. rodentium* 経口感染への感受性の検討と炎症程度の評価

C. rodentium 1×10^5 CFU の経口投与を行ったところ、Laz 投与/感染群においては、体重増加不良が認められた一方で、Laz 非投与群/感染群においては、非感染コントロール群と同様の体重増加を認めた。便性状をスコア化して評価したところ、Laz 投与群において有意に軟便傾向を認めた。摘出した大腸組織の病理学的評価に於いても、Laz 投与群では、有意な腸管壁の肥厚、炎症細胞浸潤等の所見が確認され、脾臓重量も Laz 投与群にて有意に増加していた(Figure2, 3)。更に、大腸組織にて mRNA レベルでの TNF α 、IL-6、IL-1 β 等の炎症性サイトカインの遺伝子発現の上昇も認められた。以上より、 1×10^5 CFU の経口投与では、Laz 投与群において大腸炎が成立し、非投与群では成立しないという結果が得られた。また、 1×10^4 CFU の経口投与では、両群ともに感染成立せず、 1×10^6 CFU、 1×10^8 CFU の経口投与では Laz 投与群、非投与群ともに大腸炎成立が確認された。この結果から、Laz は感染性腸炎のリスクを増大させると考えられた。

③ PPI 投与に伴う胃通過病原菌量変化の評価

感染導入 1 時間後に採取した盲腸内容物の培養を行うと、Laz 非投与群と非感染コント

ロール群に比して、Laz 投与群に於いて有意に培養される colony 数の増加を認めた。この結果から、Laz 投与で胃酸分泌抑制行くと、経口的に侵入した外来性病原菌がより多く遠位腸管に到達することが証明された。

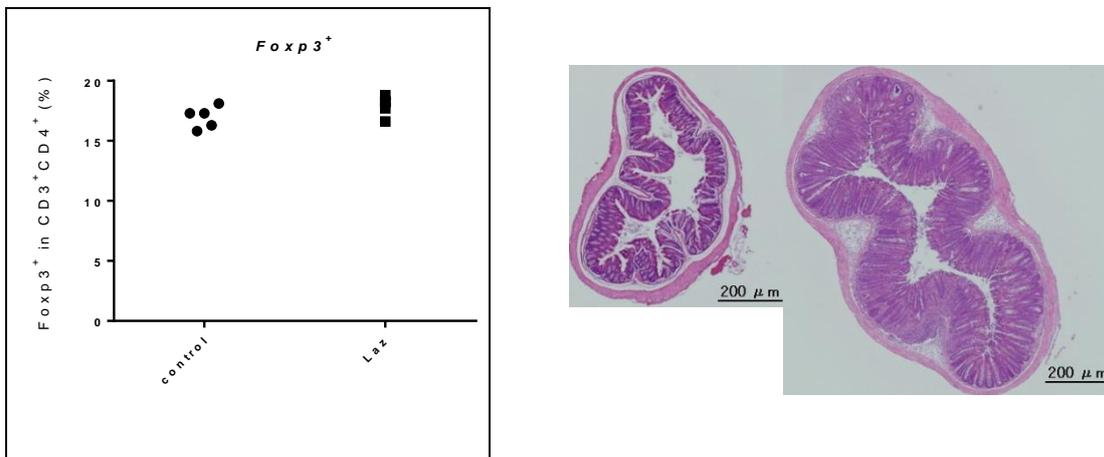


Fig1(左)、Foxp3 陽性 CD4 陽性制御性細胞の全 CD3 陽性 CD4 陽性 T 細胞中の割合をフローサイトメトリーで解析 Fig2(右)、*C. rodentium* 感染導入を行い、大腸組織切片に対し HE 染色を施行。左は Laz 非投与/感染群、Laz 投与/感染群。

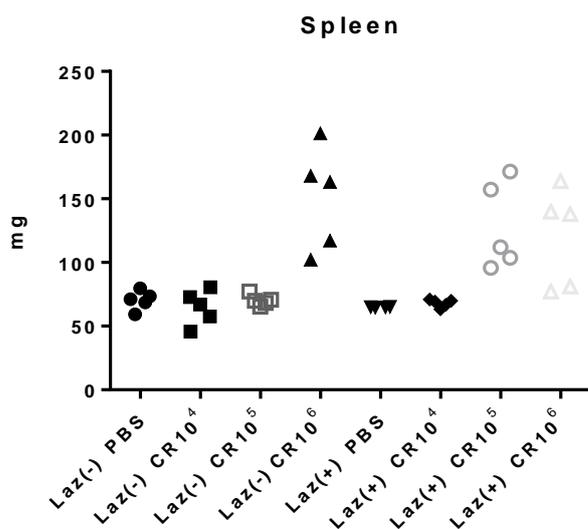


Fig3、Laz 投与マウスに数種類の dose にて *C. rodentium* 感染導入を行い、導入 2 週後の脾臓の重量を測定

4 生活や産業への貢献および波及効果

PPI は、高い治療効果のある薬剤である一方、実臨床では、胃酸分泌と直接の関連が比較的高くないと考えられるような疾患、症状等に対しても、安易に処方されている現状がある。それに伴い、多くの副作用が徐々に明らかとなっており、その一つとして細菌性腸炎が挙げられているが、これらはコホート研究、臨床論文による報告が殆どである。本研究にて得られた知見は、調査が困難であった胃以外の他臓器、特に腸管への PPI の影響を基礎検討し、これまで推論に留まっていた正確な機序について、免疫学的側面を中心に評価を行えたことに新規性、大きな意義があると考えられる。我々の研究から、PPI が細菌性腸炎リスクを高めた理由として、PPI が直接的に腸管免疫の細胞分布には変化を与えず、胃酸分泌抑制によって経口的に侵入した病原菌の腸管到達数が増加することが機序であることが示唆された。つまり、食品の洗浄等にて、外来性の病原体を除

去した状況であれば、特に有害事象として感染性腸炎を起こす可能性は極めて少ない薬剤であることが考えられた。しかしながら一方で、認知症(Gomm, W et al. *JAMA Neurol* 2016)、慢性腎臓病(Lazarus, B et al., *JAMA Intern. Med* 2016)、骨粗鬆症(Chen, C, H et al., *Osteoporos. Int* 2016)等、PPIの腸管外における副作用についての報告も多く、PPIの腸管外臓器や全身性に与える影響の解明に際しては、今後さらなる知見の集積が重要であると考えられる。

最後になりましたが、ひょうご科学技術協会の研究助成を頂きましたことで、本研究を推進することが出来、結果、既存の結果と併せて、大きな結果を生み出すことが出来たと考えております。心より感謝申し上げますとともに、今後の益々の発展を祈念いたしまして結びの言葉に代えさせていただきます。ありがとうございました。