日消外会誌　14（11）：1614～1625，1981年

胆石，とくにコレステロール結石生成における腸管内細菌の意義について
―とくに無菌動物を使用して―

日本医科大学第1外科（主任：代田明郎教授）
大学院生　岡　村　俊　一　郎

EFFECT OF INTESTINAL MICROFLORA ON GALLSTONE FORMATION BY CHOLESTEROL RICH DIET IN GERMFREE MICE

Shunichiro OKAMURA
The First Department of Surgery, Nippon Medical School
(Director: Prof. Akiro Shirota)

従来より腸内細菌は，コレステロールおよび胆汁酸を代謝し，コレステロール結石生成に強い影響を与えていることが報告されている．

今回，無菌マウスにE.coliとS.faecalisを単独に，あるいは両菌を混合投与して人工フローラを作製し，10%cholesterol＋0.5%cholic acid含有食を摂取させた．この結果，胆嚢内結石形成率をみると，無菌群では4週目すでに100%であるのに対して，E.coli単独汚染群では4週目80%，8週目100%であり，S. faecalis単独汚染群では67%，89%そして両菌混合汚染群では73%，92%と無菌群に対して低率であった．この様にE.coliとS.faecalisが単独または同時に存在することによりコレステロール結石形成が抑制された事実を明らかにした．

索引用語　無菌マウス，胆石食，腸内細菌，肝コレステロール，胆石形成率

I　諸　言

胆石の生成に関しては，従来より種々の観点から甚だ多くの研究が行われ，その業績は枚挙にいとまないが，とくにコレステロール結石の生成に関しては，未だ充分解明されているとは言い難い．

ところで教室古川ら[1)2)]はTepperman[3)]らの方法に準じて高cholesterol高cholic acid食を無菌および普通マウスに投与し，腸内常在菌の全く欠如している無菌マウスでは普通マウスに比べて早期に極めて高率にコレステロール結石が胆嚢内に生成され，腸内常在菌はコレステロール結石生成に対して抑制的な作用を演じているとともに普通マウスにおいてもコレステロール結石生成過程においては腸内常在菌がDysbakterie[2)]なる状態を呈し，生体内におけるcholesterolならびに胆汁酸代謝に強く影響をおよぼし，本結石が生成されることを実験的に立証，コレステロール結石生成における腸管内細菌の意義について報告している．

そこで今回，著者は，コレステロール結石生成における腸管内細菌の意義をさらに動的に明らかにするために，無菌マウスに腸管内細菌叢の中心をなすEscherichia coli（E.coli）とStreptococcus faecalis（S. faecalis）をそれぞれ単独に，あるいは両菌を混合投与して人工フローラを作製し，これらマウスに古川[1)]の方法に準じて高cholesterol・高cholic acid食を投与し，経日的に結石形成率，肝cholesterol量，胆嚢胆汁中cholesterol量と胆汁酸量ならびにその組成，肝機能，腸内細菌の変動，肝および胆嚢の組織形態学的変化を総合的に研究し，つぎの成績を得た．

II　実験材料と方法

1．実験材料

1）実験動物

実験動物中央研究所より入手したJCL・ICR系無菌マウスおよび普通マウスをそれぞれ日本医科大学無菌生物研究室で継代繁殖させ，生後6週齢に達したオスのみを実験に供した．

2） 実験胆石食

日本クレア製CL-2飼料にcholesterolとcholic acidをそれぞれ1%と0.5%の割り合いに混じた固型飼料を125℃，25分間高圧蒸気滅菌し，水は水道水を飼料と同様に滅菌して，それぞれ自由に経口摂取させた．

3） 使用菌種および菌浮遊液の作製

JCL・ICR系普通マウス糞便由来のE.coliとS.faecalisをそれぞれ単独或は同時に生理食塩水10mlに溶解し，各々E.coli10^5～10^7/ml，S.faecalis10^5～10^7/mlの浮遊液を作製した．

2. 実験方法

生後6週齢に達した無菌マウスに前述の各菌単独および混合浮遊液のそれぞれ0.1mlを金属胃管を用いて胃内に注入し，以下の4群に分けた．

無菌群：無処置無菌マウス群

E 群：E.coli単独汚染群

S 群：S.faecalis単独汚染群

混合群：E.coli, S.faecalis同時混合汚染群

それぞれの菌投与後1週間および2週目に各マウスの糞便を用いて各菌の定着を確認の後，この2週目より実験食を投与，摂取させた．

実験食投与前各群5匹，実験食投与後4週目無菌群14匹，E群20匹，S群15匹，混合群11匹，8週目無菌群16匹，E群20匹，S群16匹，混合群12匹を各群のアイソレータ内より搬出，体重測定後，エーテル麻酔下にて心臓穿刺により採血，屠殺，以下の検索を行った．なお，無菌群は8週齢より実験食を摂取させた．

1） 体重の測定

金属製レター・スケールで各週ごとに体重を測定した．

2） 胆嚢内結石の確認

摘出した胆嚢を光学顕微鏡にて観察し，結晶の析出あるいは集合を認めたもの，完全に結石の形成が認められたものを胆石陽性とした．

3） 胆石組成の分析

胆石はGreating infra-red spectrophotometer（日本分光）を用いて赤外分光分析法にて分析した．

4） 胆嚢胆汁中胆汁酸の測定

摘出した胆嚢をシャーレ内で切開し，5～6匹分の胆汁をプールして検体に供した．胆汁は121℃，4時間オートクレイブし抱合型胆汁酸を脱抱合させ，5 β-cholanic acidを内部標準物質とし，各胆汁酸をTFA（triflulo acetate）誘導体として，ガスクロマトグラフィー法にて測定した．

5） 胆嚢胆汁中cholesterol量の測定

胆汁酸抽出過程のアルカリ・エーテル処理にて得られた中性脂質を処理してO-phthaladehyde法にて発色させ，波長550nmで分光々度計（Beckman B型）により比色，定量した．

6） 肝cholesterol量の測定

肝約1 grを切除し，Folch水洗法にて処理し，石油エーテルでcholesterolを抽出し，前述の方法で比色，定量した．

7） 肝機能検査

各個体の血清GOT，GPT，AL-P（alkalinephosphatase），T-cholesterol，triglyceride値を日立自動分析装置716型を用いて測定した．

8） 腸管内容中細菌の検索

総胆管開口部および回盲部より各々2㎝肛門側をそれぞれ1.5㎝～3㎝採取し，腸管壁を含めたまま生理食塩水を加えてホモジナイズし，100倍希釈を続けながら，その0.1mlを各培地に塗抹，培養し，腸管1 gr当りの菌数を算出した．なお，培地は，DHL寒天培地（栄研），Heart infusion寒天培地（栄研），EF寒天培地（ニッスイ）を使用した．

9） 肝・胆嚢壁の形態学的観察

肝は細切し，胆嚢壁は長軸にそつて割を入れ，10%ホルマリンに固定したのち，型の如く系列アルコールで脱水し，パラフィンに包埋した．包埋後2～5 μの切片を作製し，HE染色，PAS染色を施行し，光学顕微鏡にて観察した．また一部については凍結切片を用いSuddan III染色も付加した．

III 実験成績

1. 体重の変動

全群ともに実験食投与4週間目までは順調な体重増加の傾向を示したが，5週目以後体重は漸減し，無菌群のみは8週目の体重減少がとくに著しく，10～12週目に至ると全例死亡した．（図1）

2. 胆石形成率

実験食投与後4週目，無菌群ではすでに，14匹中全例，100%に胆石の形成をみたが，E群では20匹中16例，80%，S群では15匹中10例，67%，混合群では11匹中8例，73%で胆石の形成は無菌群に較べて明らかに低率であった．実験食投与後8週目の結石形成率は，無菌

図1　胆石形成食投与によるマウス体重の変動

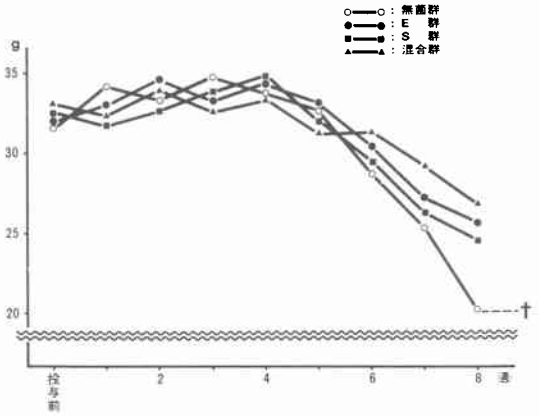
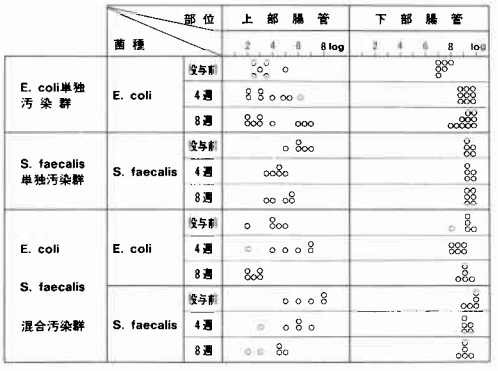


表1　胆石形成食投与による胆嚢内結石形成率

実験群	投与期間（週）	総数（匹）	有結石例（匹）	結石率（%）
無菌群	4	14	14	100
	8	16	16	100
E. coli 単独汚染群	4	20	16	80
	8	20	20	100
S. faecalis 単独汚染群	4	15	10	67*
	8	16	14	89
E. coli S. faecalis 混合汚染群	4	11	8	73*
	8	12	11	92

＊は無菌群に比しstudent t-test $p<0.05$にて有意差あり

表2　胆石形成食投与による腸管内細菌の変動



群ではもちろん16匹中16例，100%であったが，E群では20匹中20例，100%，S群では16匹中14例，89%，混合群では12匹中11例，92%と各群ともに結石形成率は明らかに増加し，無菌群により近い値をを示した（表2）．

3．胆石組成

形成された各群の胆石は全て赤外線分析を施行したが，標準 cholesterol と極似のパターンを示し，高純度の cholesterol 結石であることを確認した（図2）．

4．胆嚢胆汁中胆汁酸の変動

cholic acid 量は，無菌群では実験食投与後漸次増量したが，E群，S群および混合群では各群ともに4週目，8週目と投与前の値に比して減少した．chenodeoxycholic acid 量は全群ともに極めて少量で，その変動は殆んど認められなかった．一方二次胆汁酸である deoxycholic acid は，無菌群では当然ながら検出されなかったが，E群，S群および混合群いずれも検出されなかった（図3）．

5．胆嚢胆汁中 cholesterol 量の変動

無菌群，E群，S群および混合群いずれも増量し，8週目に到ると混合群では，他の3群に較べて高値を示した（図4）．

6．肝 cholesterol 量の変動

無菌群，E群およびS群は4週後すでに実験食投与前に比して約10倍の高値を示し漸次増量する傾向を示した．これに対して，混合群では前述3群に較べてその増量は軽度であった（図5）．

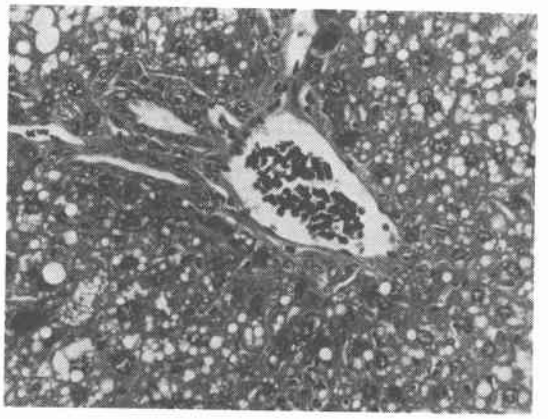
7．肝機能の変動

血清 GOT，GPT 値については，無菌群，E群およびS群は4週後に実験食投与前の約4倍の高値を示した．8週後に到るとE群およびS群はさらに上昇したが，無菌群では逆にその値は減少した．一方，混合群ではその値の上昇は他の3群に比して極めて緩徐であつた．Al-P，T-cholesterol 値については，無菌群，E群およびS群は，実験食投与後4週目すでに著明な高値を示したが，混合群ではその上昇は軽度であった．triglyceride 値は，無菌群，E群およびS群ともに実験食投与4週目ですでに全く検出されなかったが，混合群ではその減少は他の3群に比して緩徐で8週目でもなおわずかながら検出された（図6）．

8．腸管内容中の細菌数の変動

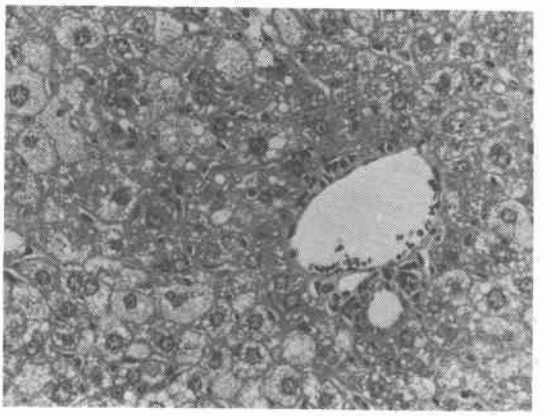
E群の上部腸管では，E.coli は実験食投与前に比して4週目以後，分布の拡大および個体差が認められたが，下部腸管では4週目以後若干の増加を示した．S群の上部腸管では，S.faecalis は実験食投与前に比して4週目以後漸減傾向を示したが，下部腸管では何ら変動を示さなかつた．混合群の上部腸管の E.coli においては，4週目の分布のバラツキは8週目に到ると認められなくなり，S.faecalis においては，S.faecalis 単独汚染群と同様週を追つて減少傾向を示した．下部腸管

写1　実験食投与4週目のS群(NoS5)の肝光顕像．HE染色．×200



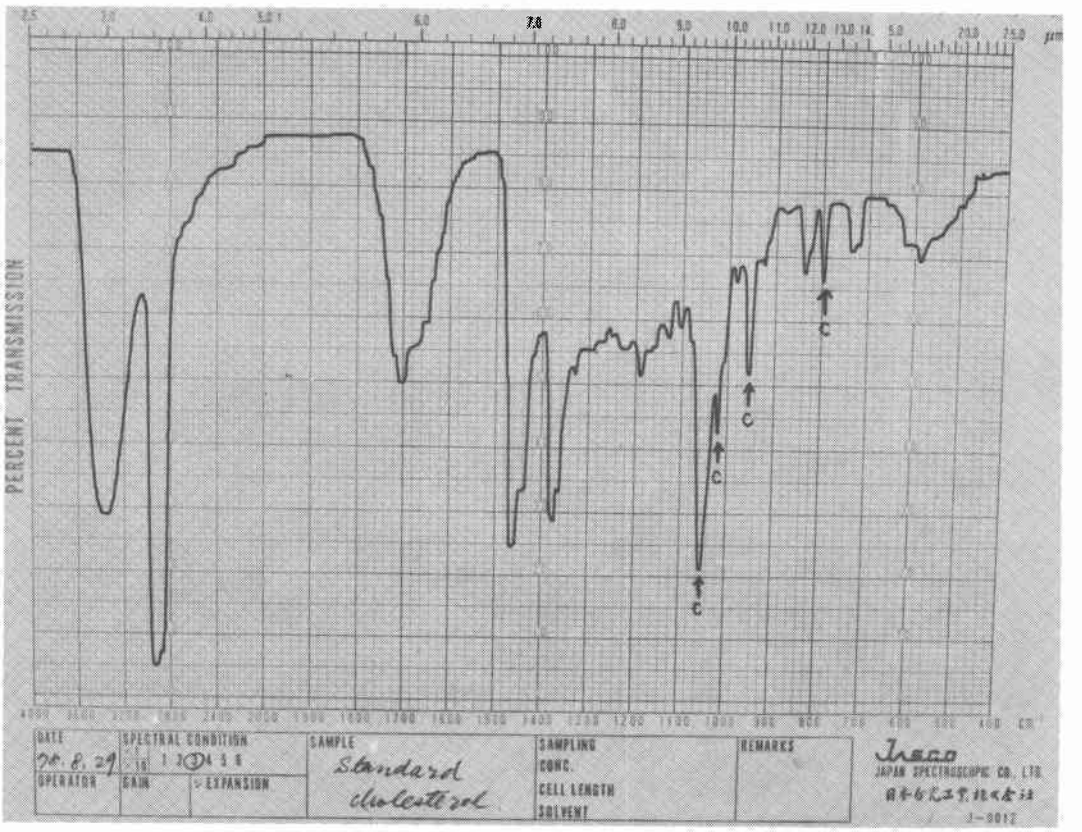
核の大小不同性，染色性の低下，細胞質に大中の空胞変化が著明である．又，胆汁栓の出現も認められる．

写2　実験食投与8週目の混合群（NoE・S6）の肝光顕像．HE染色．×200



細胞質のビマン性空胞変化が著明で核の消失を認める部分もある．

図2(a)　標準cholesterolの赤外線分析



では，E.coli，S.faecalis ともにいずれの群においても実験食投与前と同様にほぼ full growth の状態を示した（**表2**）．

9．肝ならびに胆嚢壁の形態学的観察

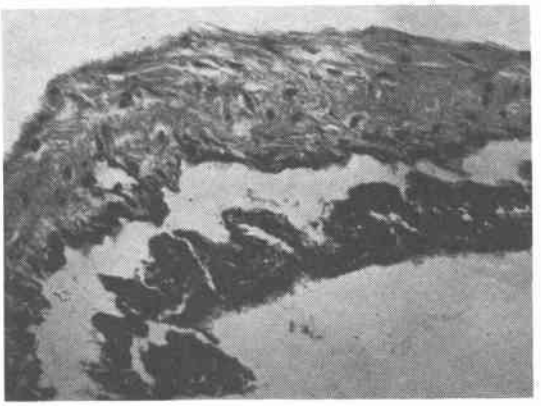
1）肝組織所見

E および S 両群ともに，実験食投与4週後，肝細胞索の基本的改築にはいたらないが，核の大小不同性および染色性の低下を認めた．肝細胞はビマン性の空胞変化を示した（**写1**）．　8週目に到ると肝細胞索の明瞭な構造は消失し，同時に肝細胞は膨化し著明な大小の空胞変化を示した．なお，この HE 染色による空胞変化は Suddan III染色により，脂質の沈着であることが確認された．混合群においては，各週でその変化は上述単独汚染両群に比して軽微にとどまっており，8週目に到っても肝細胞索の乱れも中等度であり，細胞質のビマン性の空胞変化や核の大小不同性も若干軽微であった（**写2**）．　無菌群における変化は，単独汚染群とほぼ同様であるが，各週ともにその変化の程度は若干強い傾向にあった．

2）胆嚢壁の組織

全実験群ともにその経時的変化，程度は同じであった．実験食投与後，粘膜上皮は肥厚し，PAS 染色陽性のムコ物質が出現した．また，これらの変化は経日的に増強する傾向を示した（**写3**）．

写3　実験食投与8週目の混合群（NoE・S18）の胆嚢壁光顕像．PAS 染色．×200



粘膜上皮表面にムコ物質が出現する．

図2（b）　胆石形成食投与8週目に於ける無菌マウスの胆石の赤外線分析

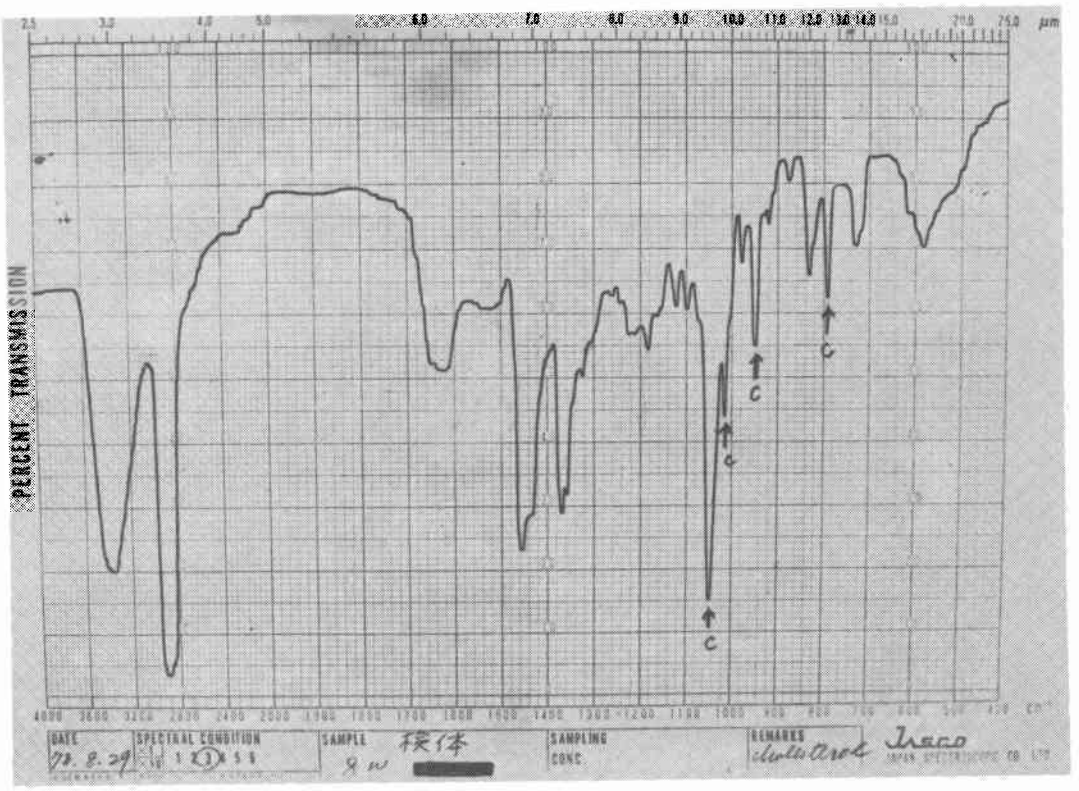


図3　胆石形成食投与による胆嚢胆汁酸組成の変動

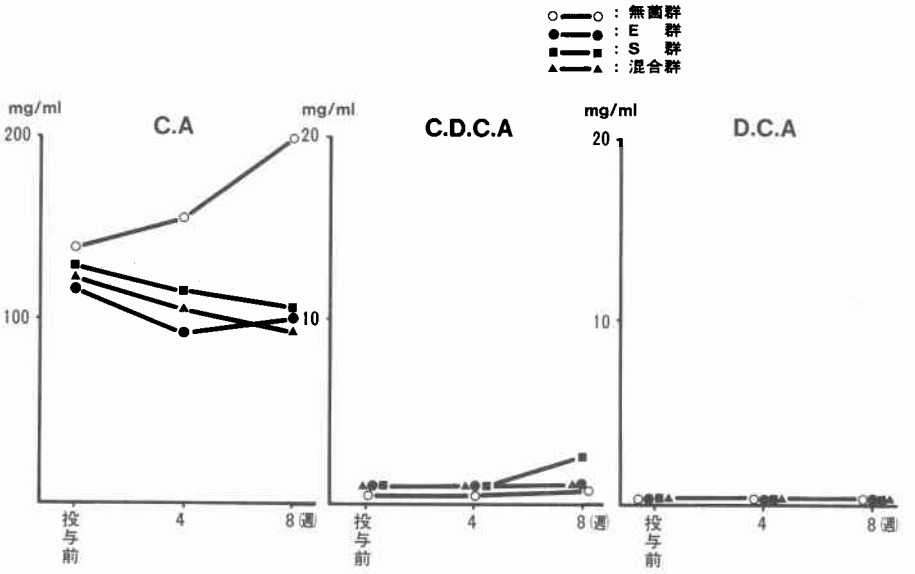


図4　胆石形成食投与による胆嚢胆汁中 cholesterol 量の変動

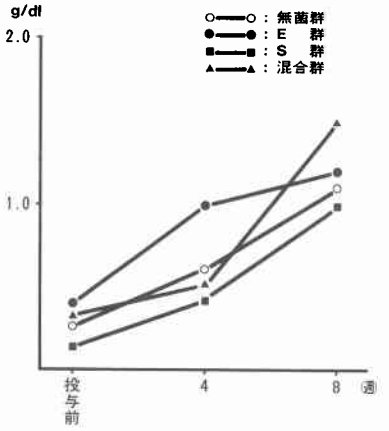
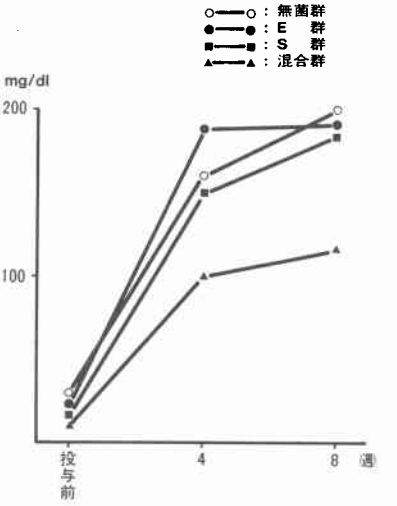


図6　胆石形成食投与による肝機能の変動



IV　総括ならびに考察

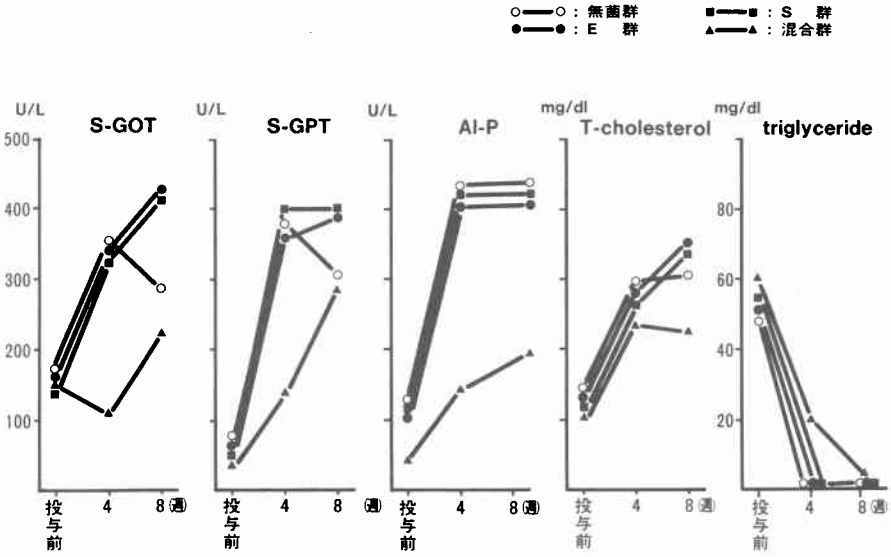
胆石の生成に関しては，従来よりいろいろの学説があるが，とくにコレステロール結石の成因に関しては Admirand, Small[4]らの胆汁酸，lecithin, cholesterol の形成するミセルにおけるモル濃度の相関が注目されている．

ところでヒトにおける胆石の生成とその病態などに関する研究では，臨床上おのずとかなりの制約があるので．近年はもっぱら動物を用いた実験的研究が行われている．

すなわち，Dam ら[5]（1952）をはじめとして，Tepperman[3]（1964），大管ら[6]（1971）のハムスターやマウスなどの種々の動物を用いた胆石形成実験が多数あるが[7)~19)]，いずれもコレステロール結石と食餌性因子との関係を詳細に検討したもので，胆石の形成には肝を中心とした cholesterol, 胆汁酸代謝異常が密接な関係を有することを報告している．

ところで，これらの実験的研究はいずれも腸内常在菌を有する普通動物を用いたものであって，従来より cholesterol および胆汁酸の腸管からの吸収あるいは

図5　胆石形成食投与による肝 cholesterol 量の変動



代謝には腸内常在菌がきわめて重要な役割を演じていることが知られていたが[20)~33)]この腸内常在菌の胆汁酸および cholesterol 代謝に果たす役割は Gustafsson (1957) ら[34)~36)]の無菌動物を用いた研究以来一層明らかにされている[37)~39)]

わが教室においても代田，八田ら[40)41)]は，腸内常在菌の胆汁酸代謝におよぼす影響を動的にとらえるために無菌マウスに E.coli (KIC-107) と S.faecalis (KIC-51) をそれぞれ単独に，あるいはまた混合投与して腸管内に定着せしめ，胆嚢胆汁と腸管内容中の胆汁酸およびその組成を追求して無菌マウスと普通マウスのそれと比較検討し，両菌を混合投与すると各菌単独投与に比べて胆嚢胆汁および腸管内容中の胆汁酸量およびその組成が普通マウスのそれに接近するとともに，胆汁酸の脱抱合および一次胆汁酸から二次胆汁酸への変換はこの両菌の存在によって起こり，抱合型胆汁酸は主として S.faecalis により脱抱合を受けて遊離胆汁酸に，脱水酸化反応および酸化反応による胆汁酸の変化は主として E.coli によって行われることを立証，報告している．

したがって，腸内常在菌が胆石，とくにコレステロール結石の生成において1つのきわめて大きな役割を果しているであろうことは容易に想像されるところである．

このような観点から，近年その飼育方法に急速な進歩発達を遂げた無菌動物を研究に使用することは，この問題を解明するのに今日最もユニークな手段の1つであると思われる．

しかしながら，この無菌動物を使用した胆石形成実験は，Frey ら[42)] (1968) と古川ら[1)2)] (1978) によるもの以外現在のところみあたらない．

Frey ら[42)]は Tepperman ら[3)]の1.0%cholesterol と0.5%cholic acid を混じた食餌を普通マウスと無菌マウスに投与して経日的に胆石形成率，血清 cholesterol 値，および胆嚢壁の組織学的変化を検索している．

その成績によると，コレステロール結晶を含めた胆石形成率は実験食投与4週目に普通群ではすでに80%を示したのに対し，無菌群では50%と低く，その肉眼的結石化率は普通群では60%であったのに対し，無菌群では1例もみられなかった．さらに6週目になると，その形成率は普通群では82%と4週目とほぼ同じであつたが，全例が肉眼的結石であった．これに対し無菌群では82%と普通群のそれと全く同じであったが，肉眼的結石は27%と低率にとどまった．

両群の血清 cholesterol 値は実験食投与前の両群の間には差異はみられなかったが，実験食投与後ではいずれの時期においても無菌群の方が高い値を示した．

このような胆石形成率，とくに結石率の差異について Frey ら[42)]は普通群の結石化率の増加は胆道系に腸内常在菌の感染がおこり，その細菌，あるいは細菌の一部が核となつてコレステロール結晶が集合し，ついには結石まで発育するのであろうと Dineen[43)],

Edlund[44], Rains[45], らの文献を参考にして推察している．さらにまた両群の胆嚢壁の組織学的所見は白血球浸潤を伴った筋層の肥大を示していることから，細菌の有無とは無関係に胆嚢炎が発生すると述べている．

古川ら[1)2)]はFreyら[42)]と同様にTepperman ら[3)]の方法に準じて1.0%cholesterolと0.5%cholic acidを含有した飼料を無菌マウスと普通マウスに投与し，胆嚢内結石形成率，胆嚢胆汁中胆汁酸組成，肝および血清cholesterol量，肝機能，肝・胆嚢の組織学的変化，さらには腸内常在菌の変動などについて追求し，この両群を比較検討している．

その成績によると，実験食投与4週後頃より無菌群でもまた普通群でも胆嚢内にコレステロール結晶，コレステロール結石，あるいはまた両者混在するものがよく認められ，明瞭なコレステロール結石は両群ともに時間の経過にしたがって増加し，とくに普通群では実験食投与24週後には全例がコレステロール結石で占められていた．しかしながらこの両群における結晶をも含めた結石形成率を時間的経過にしたがって詳細に比較検討すると上述Freyらの成績とは異なり，無菌群では4週後早くも100%の結石形成率を示したのに対し，普通群では4週および8週後ではともに60%，24週後に到つてはじめて100%の結石形成率を示し，両群の間に明らかな差異を認め，実験食投与後4～8週という比較的早期におけるこの結石形成率の明瞭な差異を生じた最も大きな要因の1つとして両群における肝cholesterol量に対する胆汁中胆汁酸量，とくにcholic acid量の比の相異をあげ，腸内常在菌は生体内におけるcholesterolと胆汁酸代謝にきわめて重要な役割を果していて，コレステロール結石の生成に関しては抑制的な作用を演じていると述べている．さらにまた普通群の実験食投与24週後には全例に明らかなコレステロール結石が形成されていたことは，コレステロール結石が時間の経過にしたがって成長していったものと考えられるが，実験食投与8週後より著しく増量したdeoxycholic acidも少なからず関与しているものと考えられ，このように無菌群と普通群が大きな差異を生じた最大の因子は腸内常在菌の有無によるもので，実験食投与後腸内常在菌を有する普通マウスの胆石形成過程においては，空腸，結腸のいずれにおいても腸内常在菌，とくに嫌気性菌がある時期には著しく増加し，またある時期には著しく減少して高度の分布異常を来たし，腸内細菌叢のいわゆるDysbakterie[2)]なる状態を呈していたことを強調している．

そこで著者は，コレステロール結石形成における腸内細菌の果たす役割についてさらに動的に詳細に追求するために，無菌マウスに腸内細菌叢の中心をなすE. coliとS.faecalisをそれぞれ単独に，あるいは両菌を混合投与して人工フローラを作製し，高cholesterol・高cholic acid食を投与し，経日的に結石形成率，肝cholesterol量，胆嚢胆汁中cholesterol量と胆汁酸量およびその組成，肝機能，肝・胆嚢の組織形態学的変化などを総合的に研究した．

まず体重の変動についてみると，無菌群をはじめとしてE群，S群および混合群いずれも実験食投与後4週目までは体重は増加し，順調な発育傾向を示したが，5週目からは各群ともに体重は減少し，とくに無菌群ではその減少が最も高度となり，10～12週目には全例死亡した．この事実は各群の開腹所見で肉眼的に脂肪肝が無菌群，各菌単独汚染群，混合汚染群の順に軽度となる傾向を示した事実と照合して，実験食投与後の体重減少が人工フローラの存在により明らかに阻止抑制されたことを示すものと思われる．

また胆嚢内の結石形成率も無菌群では古川の報告と同様に実験食投与後4週目にしてすでに100%であったが，各菌単独汚染群および両菌混合汚染群いずれにおいても67%～80%と無菌に比べて明らかに低率で，8週目に到って89%～100%と次第に無菌群のそれに接近する傾向を示し，人工フローラが結石形成率を明らかに阻止抑制する事実が確認された．なおこれら結石はいずれも純高度コレステロール結石であることが赤外線分析で確認された．

血清および肝cholesterolは無菌群では実験食投与後4週目より著しく増量したが，このcholesterolの増量に関してはすでに多くの報告[2)46)47)]がなされている．

これに対し各菌単独汚染群ではその増量は無菌群とほぼ同様であったが，両菌混合投与群では，その増量が著しく阻止抑制された．

胆汁中胆汁酸についてみると，cholic acidは無菌群では，実験食投与後4週目より増量したのに対し，各菌単独汚染群および両菌混合汚染群では，無菌群と異なり漸次減少した．chenodeoxycholic acidは各群ともに微量に検出されたにすぎなかった．また二次胆汁酸であるdeoxycholic acidは無菌群で検出されなかったのは当然であるが，各菌単独汚染群，両菌混合汚染群でもともに検出されなかったのは今回実験に使用したJCL-ICR系普通マウス糞便由来のE.coliとS.

faecalisには7 α-dehydroxylationの作用を有していないものと思われる．

なお，胆嚢胆汁中cholesterolは実験食投与後いずれの群でも増量を示した．

以上の成績から，無菌群と細菌汚染各群における肝cholesterol量に対する胆汁中胆汁酸とくにcholic acid量の比の相異が実験食投与後の早期における無菌群と細菌汚染各群の結石形成率の明瞭な差異を生じた最も大きな要因の1つではないかと考えられる．

このように無菌群と細菌汚染各群が大きな差異を生じた最大の因子は腸内細菌の有無にあることは容易に相像されるところで，このさいの各群の腸管内容中の細菌の変動をみると，無菌群では実験食投与後いずれの時期においても投与前と全く同様に腸管内容はすべて無菌であつたことはもちろんであるが，細菌汚染各群の上部腸管においては，E.coliは本菌の単独汚染群では実験食投与後のいずれの時期においても分布の拡大をみたが，混合汚染群では実験食投与後の分布拡大は8週目には縮少し，投与前とほぼ同様の状態を示すに至った．S. faecalisは本菌の単独汚染群，混合汚染群ともに実験食投与後時間の経過にしたがつて漸次減少した．下部腸管におけるE.coliとS.faecalisはいずれの群においても実験食投与前と同様にほぼfull growthの状態を示した．

すなわち，細菌汚染群では単独汚染群，混合汚染群のいずれにおいてもE.coliあるいはS.faecalisが，実験食投与後の経過では変動はみられたが，実験食投与後8週目まで明らかに定着していることが確認された．

従来より腸内細菌がcholesterolをcoprostanolへ，また抱合型胆汁酸を遊離胆汁酸へ，一次胆汁酸を二次胆汁酸へ変換する作用を有することはすでに述べたように広く知られているところであるが，このような変換物質はそれらの前駆物質に比べていずれも腸管から再吸収が防げられるといわれている．

したがって，腸内細菌を全く有しない無菌群においては細菌汚染群，とくに混合汚染群に比べて投与された過剰のcholesterolとcholic acidがともに腸管からよく吸収されて肝および血清cholesterol量と胆汁中胆汁酸，とくにcholic acid量の著しい増加を来たしたものと思われる．

肝機能について，まずS-GOT, S-GPTの変動をみると，各菌単独汚染群，混合汚染群ともに実験食投与後増強したが，その程度が混合汚染群では中等度であったのに対し，各菌単独汚染群ではきわめて高度で，実験食投与後4～8週目には投与前の4～5倍の高い値を示した．ところが無菌群では実験食投与後4週目までは上述各群と同様に増強したが，8日目には却って減弱し，混合汚染群とほぼ同様な値を示すに到った．これは無菌群が10～12週目には全例死亡したことにより，恐らく高度の肝障害が起こり，肝の游出酵素が減弱したためと思われる．またAl-Pは無菌群，各菌単独汚染群，混合群ともに増強し，triglycerideは減少したが，混合汚染群のAl-Pの増強とtriglycerideの減少は他の3群に比べると幾分軽度であった．

これらの肝を中心とした生化学的所見は肝の組織形態学的変化ともよく一致し，混合汚染群では無菌群および各菌単独汚染群に比べて軽度であったが，この組織学的所見でとくに注目されたのは無菌群および各菌単独汚染群ではcholesterolの沈着が著しく高度であったのに対し，混合汚染群ではその沈着が比較的軽度であったことである．

このような差異がいかなる機序によって招来されたかについては，さらに今後の検討にまたねばならないが，すくなくとも腸内細菌，とくにE.coliとS.faecalisの混合汚染が肝における各種の代謝過程の調節に，あるいはまたその機能に強く関与していることを充分に示唆しているものと考える．

さらにまた，今回の実験で各群ともに結石の生成と同時に胆嚢粘膜上皮に出現した陽性のムコ物質は，すでに多くの報告[48)~52)]がみられるように胆嚢内に析出したコレステロール結晶が凝集して結石化していく過程に関与するとともに胆嚢粘膜上皮を防禦する働きをなしているものと思われる．

以上の一連の諸研究成績は，腸内細菌が生体内におけるcholesterolと胆汁酸代謝にきわめて重要な影響を及ぼし，コレステロール結石生成には抑制的な作用を演じていることを示唆するもので，コレステロール結石生成における腸内細菌の意義の一端を，無菌動物にE.coliとS.faecalisをそれぞれ単独にあるいは混合投与して単純な人工フローラを作製して動的にさらに明らかになしえたものと考える．

V　結　論

胆石，とくにコレステロール結石生成における腸内細菌の意義を明らかにするために，無菌マウスに腸内細菌叢の中心をなすE.coliとS.faecalisをそれぞれ単独に，あるいは両菌を混合投与して，人工フローラ

を作製し，これらマウスに1％cholesterol＋0.5％cholic acid食を投与して，経日的に胆嚢内の結石形成率，肝cholesterol量，胆嚢胆汁中cholesterol量と胆汁酸量ならびにその組織形態学的変化などを総合的に研究し，大要次の成績を得た．

1．実験食投与後の体重は，5週目から無菌群，各菌単独汚染群および両菌混合汚染群いずれも減少し，とくに無菌群ではその減少が最も著しく，10～12週目には全例死亡した．

2．胆嚢内の結石形成率は，各菌単独汚染群および両菌混合汚染群では無菌群に較べて，明らかに低率であった．なお，これら胆嚢内結石はいずれも高純度のコレステロール結石であった．

3．実験食投与後の胆嚢胆汁中胆汁酸組成の変動をみると，無菌群ではcholic acidの著しい増量を認めたのに対し，各菌単独汚染群，両菌混合汚染群では減少傾向を示した．いずれの群においてもchenodeoxycholic acidは極めて微量であり，deoxycholic acidは全く検出されなかった．

4．胆嚢胆汁中cholesterolは実験食投与後いずれの群も増量を示した．

5．肝cholesterolは実験食投与後いずれも増量を示したが，とくに，無菌群および各菌単独汚染群では，両菌混合汚染群に較べて著しい増量を示した．

6．肝機能は実験食投与後，いずれの群も障害されたが，無菌群および各菌単独汚染群では，両菌混合汚染群に較べてより高度に障害された．

7．実験食投与後のS.faecalisは上部腸管では単独汚染群および両菌混合汚染群ともに減少したが，E. coliは一定の傾向を示さなかった．下部腸管では両菌ともにほとんど変動を認めなかった．

8．実験食投与後の肝の組織形態学的変化はいずれの群も脂肪肝の像を示したが，両菌混合汚染群では無菌群および各菌単独汚染群に較べて若干軽微であつた．胆嚢壁ではいずれの群もPAS陽性のムコ物質が経日的に同じ程度に増加する傾向を示した．

本論文要旨は昭和53年および54年1月の第11，12回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会と昭和54年5月の第79回日本外科学会総会において発表した．

擱筆するに臨み，ご指導と御校閲を賜つた本学第1外科学教室代田明郎教授に深く感謝するとともに，本学無菌生物研究室長足立憲治博士，ならびに古川清憲博士，第一病理学教室相原薫助教授につつしんで謝意を表する．

文　献

1）古川清憲：胆石生成に関する研究，とくに無菌動物を使用して．日外誌，79(7)：597—609，1978．

2）代田明郎，足立憲治，古川清憲：胆石，特にコレステリン結石の生成と腸管内細菌，一無菌動物を使用した研究成績を中心として一．日本医事新報，2885：24—32，1979．

3）Tepperman, J., Caldwell, F. T. and Tepperman, H. M.: Induction of gallstones in mice by feeding a cholesterolcholic acid containing diet. Am. J. Physiol., 206: 628—634, 1964.

4）Admirand, W. H. and Small, D. M.: The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. J. Clin. Invest., 47: 1043—1052, 1968.

5）Dam, H. and Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamsters. Acta Path. Microbiol. Scand., 30: 236—241, 1952.

6）Osuga, T., Portman, O. W.: Experimental formation of gallstones in the squirrel mankeys. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136: 722—726, 1971.

7）Prange, I., Christensen, F. and Dam, H.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 11. Relation between diet and composition of the bladder bile. I. z. Ernaehrungswiss., 3: 59—78, 1962.

8）Prange, I., Christensen, F. and Dam, H.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 14. Relation bdtween diet and composition of the bladder bile. II. Z. Ernaehrungswiss., 4: 193—207, 1964.

9）Christensen, F., Prange, I. and Dam, H.: Composition of the bladder bile of young white mice reared on a diet causing formation of cholesterol gallstones in young hamsters. Z. Ernaehrungswiss., 3: 117—121, 1962.

10）Cook, R. P., Kliman, A. and Fieser, L. F.: The absorption and metabolism of cholesterol and its main companions in the rabbit with observations on the atherogenic nature of the sterols. Arch. Biochem. Biophys., 52: 439—450, 1954.

11）Bevans, M. and Mosbach, E. H.: Biological studies of dihydrocholesterol. Production of biliary concrements and inflammatory lesions of the biliary tract in rabbits. Arch. Path., 62: 112—117, 1956.

12）Hofmann, A. F. and Mosbach, E. H.: Identification of allodeoxycholic acid as the major component of gallstones induced in the rabbit

by 5α-cholestan-3β-ol. J. Biol. Chem., 239 : 2813—2821, 1964.

13) Palmer, R. H.: Gallstones produced experimentally by Lithocholic acid in rats. Science, 143 : 1339—1340, 1965,

14) Palmer, R. H. and Haruban, Z.: Production of bile duct hyperplasia and gallstones by lithocholic acid. J. Clin. Invest., 45 : 1225—1267, 1966.

15) Schoenfield, L. J. and Sjövall,: Bile acid and cholesterol in guinea pigs with induced gallstones. Am. J. Physiol., 211 : 1069—1074, 1966.

16) Englert, E. Jr., Harman, C.G. and Wales, E.E. Jr.: Gallstones induced by normal foodstuffs in dogs. Nature, 224 : 280—281, 1969.

17) Caldwell, F.T., Levitsky, K. and Rosenberg, B.: Dietary production and dissolution of cholesterol gallstones in the mouse. Am. J. Physiol., 209 : 473—478, 1965.

18) Pedreira, F. and Tepperman, J.: Bile flow rate and cholesterol content in mice fed a gallstone-inducing diet. Am. J. Physiol., 206 : 635—640, 1964.

19) Bernneman, D.E., Connor, W.E., Forker, E.L. et al.: The formation of abnormal bile and cholesterol in the prairie dog. J. Clin. Invest. 51 : 1495—1503, 1971.

20) Noman, A. & Grubb, R.: Hydrolysis of conjugated bile acids by clontridia and enterococc, Acta Pathol. Microbiol. Scand., 36 : 537—547, 1955.

21) Beher, W.T., Filus, A.M., Rao, B. et al.: A Comparative study of Bile Acid Metabolism in the Rat, Mouse, Hamster and Gerbil. Proc. soc. Exptl Biol. Med., 130 : 1067—1074, 1969.

22) Frankel, M.: The biological splitting of conjugated bile acid. Biochem. J., 30 : 2111—2116, 1936.

23) Midtvedt, T. & Norman, A.: Bile acid transformations by microbial strain belongs to genera found in intestinal contents. Acta path. Microbiol. Scand., 71 : 629—638, 1967.

24) Hill, H.J. & Draser, B.S.: Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. Gut, 9 : 22—27, 1968.

25) Simada, K., Bricknell, K.S. & Finegold, S.M.: Deconjugation of bile acids by intestinal becteria. J. infect. Die., 119 : 273—281, 1969.

26) Norman, A.: Influence of chemotherapeutics on the metabolisms of bile acid in the intestine of rats. Acta physiol. scand., 33 : 99—107, 1955.

27) Norman, A. & Bergman, S.: The action of intestinal microorganisms on bile acids. Acta chem. Scand., 14 : 1781—1789, 1960.

28) Portman, O.W., Shah, S., Antonis, A., et al.: Alteration of bile salts by bacteria. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 109 : 959—965, 1962.

29) Hayakawa, S., Samuelsson, B.: Transformation of cholic acid in vitro by corynebacterium simplex. J. Biol. Chem., 239 : 94—97, 1964.

30) Gustafsson, B.E., Midtvedt, T. & Norman, A.: Isolated fecal microorganisms capable of 7-dehydroxylating bile acid. J. Exp., 123 : 413—432, 1966.

31) Midtvent, T. & Norman, A.: Paramenters in 7α-dehydroxylation of bile acids by anaerobic lactobacilli. Acta path. microbiol. Scand., 72 : 313—329, 1968.

32) Bergström, S. & Danielsson, H.: Formation and metabolism of bile acids. In Handbook of Physiology, Section 6 : Alimentary Canal, vol. 5 ; Bill ; Digestion; Ruminal physiology, ed. Code C.F., 2391—2407, 1968.

33) Norman, A. & Sjövall, T.: On the transformation and Enterohepatic circulation of cholic acid in the Rat. J. Biol. Chem., 233 : 872—885, 1958.

34) Gustafsson, B.E., Bergström, S., Lindstedt, S., et al.: Turnover and nature of fecal bile acids in germfree and infected rats fed cholic acid-24-^{14}C. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 94 : 467—471, 1957.

35) Gustafsson, B.E., Midtvent, T. & Norman, A.: Metabolism of cholic acid in germfree animals after the establishment in the intestinal trach of deconjugating and 7α-dehydroxylating. bacteria. Acta path. Microbiol. Scand., 72 : 433—442, 1968.

36) Gustafsson, B.E. & Norman, A.: Influence of diet on the turnover of bile acids in germfree and conventional rats. Br. J. Nutr., 23 : 429—442, 1969.

37) Eyssen, H., Parmentier, G., Mertents, J. et al.: The bile acids of the mous : Effect of microflora, age and sex. Germfree Research, Biological Effect of Gnotobiotic Envionments. Edited by Jamen B. Heneghan, Academic Press., 271—276, 1973.

38) Eyssen, H.J., Parmentier, G.C. & Mertents, J. A.: Sulfated Bile Acids in Germ-free and Conventional Mice. Eur. J. Biochem., 66 : 507—514, 1976.

39) Suzuki, R.: Influence of intestinal microorganisms on the metabolism of bile acid in mice.

Keio J. Med., 19 : 73—86, 1970.
40) 八田重男：胆汁酸代謝と腸管内細菌に関する実験的研究．日外誌，80(5)：446—480，1979.
41) 代田明郎，八田重男：胆汁酸代謝と腸管内細菌—とくに無菌動物を使用した研究成績を中心として—．日本医事新報，2872：10—19，1979.
42) Frey, C., Thorpe, C. and Abrams, G. : Gallstone formation in the germfree mouse. Am. J. Surg., 115 : 75—81,1968.
43) Dineen, P. : The importance of the route of infection in experimental biliary tract obstruction. Surg., Gynec. Obst., 119 : 1001—1008, 1964.
44) Edlund, Y.A., Mollstedt, B.O. and Ouchterlony, O. : Bacteriological investigation of the biliary system and liver in biliary tract disease correlated to clinical date and microstructure of the gall bladder and liver. Acta Chir. Scandinav., 116 : 461—476, 1959.
45) Rains, A.J. H., Barson, G.J. and Crawford, N. et al. : A chemical and bacteriological study of gallstones. The presence of an actionmycete. Lancet, 2 : 624—618, 1960.
46) Kellogg, T. and Wostmann, B, : The renponse of germfree rats to dietary cholesterol. Germfree Biol., 3 : 293—295, 1969.
47) Wostmann, B.S. : Intestinal bile acid and cholesterol absorption in the germfree rat. J. Nutr., 103 : 982—990, 1973.
48) 菊地彬夫：胆石症胆嚢の組織学的及び組織代学的研究．結石種類による胆嚢壁の変化を中心として．日消会誌，69：617—627，1972.
49) 馬場盛行：人胆嚢壁の病理組織学的研究．久留米医誌，25：72—105，1962.
50) 中村善啓：Dihydrocholesterol による胆石形成に関する研究—とくに家兎胆嚢粘膜微細構造の変化について—．医学研究，34：123—141，1964.
51) Nakamura, N. : Mucopolysacharides and their significance in gallstone formation. Tohoku J. Med., 93: 235—247, 1967.
52) Maki, T. and Nakamura, N. : Histochemical study on mucopolysaccharides in calcium bilirubinate gallstone. Tohoku J. Exp. Med., 98 : 81—86, 1969.