

# Elemental diet 長期摂取ラットにおける消化管内 細菌叢の変動とその影響

和歌山県立医科大学消化器外科 (主任: 勝見正治教授)

柿原美千秋

## EFFECTS OF A LONG-TERM ELEMENTAL DIET ON GASTROINTESTINAL MICROFLORA IN RATS

Michiaki KAKIHARA

Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical College

(Director: Prof. Masaharu Katsumi)

elemental diet (以下 ED) の長期摂取が消化管内細菌叢や vitamin K, B<sub>12</sub>, 葉酸に及ぼす影響をラットを用い検索した。総菌数は胃, 小腸で減少し盲腸で増加した。各菌群の菌数, 検出率をみると Bacteroidaceae, Veillonella, Clostridium が増加し, Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterobacteriaceae, Streptococcus, Staphylococcus, Pseudomonas は減少した。ED 摂取 1 週目よりプロトロンビン時間が  $16.8 \pm 1.4$  秒 ( $p < 0.05$ ) と延長し, vitamin K 欠乏症をきたした。ED 摂取 4 週目には vitamin B<sub>12</sub> は血中で  $1,288 \pm 164$  pg/ml ( $p < 0.005$ ) と増加し, 肝で  $35.6 \pm 1.3$  ng/g ( $p < 0.005$ ) と減少し, 葉酸は血中で  $8.8 \pm 0.80$  ng/ml ( $p < 0.005$ ), 肝で  $0.75 \pm 0.04$  μg/g ( $p < 0.05$ ) と共に減少した。これらのビタミンの変動要因のひとつとして消化管内細菌叢の著明な乱れの関与が推測された。

索引用語: 消化管内細菌叢, elemental diet, vitamin K 欠乏症, vitamin B<sub>12</sub> 欠乏症, 葉酸欠乏症

### 緒言

従来, 消化管内細菌叢は大腸菌, 腸球菌などの通性嫌気性菌 (以下好気性菌) がそのほとんどを占めると考えられていたが, ここ10数年前に光岡らや Haenel によって実際にはヒトではその1,000倍以上も多くの偏性嫌気性菌 (以下嫌気性菌) が存在することが明らかにされた<sup>1)</sup>。以来今日まで, 消化管内細菌叢が生体に対していかなる役割を果たしているかという問題は重要な研究課題として関心が寄せられ, 最近, 消化管内細菌叢は宿主の栄養, 発癌, 免疫, 感染などに深い関係があることを示唆する事実が明らかにされてきた<sup>2)</sup>。一方 elemental diet (以下 ED) は腸管の安静と栄養補給のために経腸栄養剤のひとつとして広く臨床で応用されているが, その易吸収性および無残渣性という特性から消化管内容物が減少し, 消化管内細菌叢に何らかの影響を及ぼすことも次第に明らかにされて

きた<sup>3)~5)</sup>。腸内菌により vitamin K (以下 V.K) をはじめ数種のビタミンが合成され宿主に利用されているが<sup>6)7)</sup>, ED 摂取時のビタミンの変動をみた報告はない。そこで著者は ED の長期単独投与が消化管内細菌叢および腸内菌により合成される V.K, vitamin B<sub>12</sub> (以下 V.B<sub>12</sub>), 葉酸に及ぼす影響について実験的に検討した。

### 実験材料および方法

#### I. 実験動物と飼育条件

生後約10週齢の Wistar 系雄性ラット (静岡県実験動物農業協同組合) を約2週間の予備飼育を行い, 体重300~350g の発育順調なもの計224頭を使用した。ラットは金網製ケージに2頭ずつ収容し, 室温  $24 \pm 2$  °C, 湿度  $60 \pm 20\%$  の環境で飼育した。

#### II. 実験群と実験食

対照群(80頭), ED 群(100頭, ただし17頭は vitamin K<sub>1</sub> (以下 V.K<sub>1</sub>) 強制投与), V.K<sub>1</sub> 2倍添加 ED 群(24頭), V.K<sub>1</sub> 10倍添加 ED 群(20頭) の4群を作製した。対照群にはオリエンタル酵母社製固型飼料 MF を,

ED群には味の素社製 ED-AC粉末を、V.K<sub>1</sub> 2倍添加 ED群および10倍添加 ED群にはそれぞれV.K<sub>1</sub>含有量がED群の2倍、10倍で他の組成がED群と同じものを用いた。これらの実験食および水は自由に経口摂取させた。

III. 検索項目と方法

1. EDの成長およびプロトンピン時間におよぼす影響とV.K投与効果

対照群、ED群について体重を実験開始1週以内は毎日、以後は週1回測定し、プロトンピン時間(以下PT, Quick一段法)をED摂取前、後(以下前および後)1, 4, 12週目に測定し、V.K累積摂取量を固型飼料MFおよびEDのビタミン含有量と摂取量から算出した。ED群に腹腔内または経口的にV.K<sub>1</sub>(phylloquinone)を毎週、体重1kg当り30mgを強制投与し、PTに及ぼす影響を4週目に測定した。

2. 腸管からのV.K吸収障害の有無

脂溶性ビタミンの吸収に必要な胆汁酸の変動をみるため、各群について末梢血および腸管内 glycocholic acidを radioimmunoassay polyethylenglycol法にて測定した。後者の測定には十二指腸から直腸までの腸管を内容物を含んだまま細片化し、この全量に生理食塩水5.0mlを加え氷冷下に homogenizeし、その homogenateを生理食塩水で10倍希釈したものを KM-shaker (Iwaki製)にて振動数340s.p.m.で35分間攪拌したのち2,100×gで10分間遠心しその上清を用

いた。

腸壁の変化によるV.Kの吸収障害の有無をみるため胃、小腸上部(口側1/4の部位)、小腸下部(肛側1/4の部位)、盲腸、結腸の組織学的変化を hematoxylin-eosin染色にて前、後1, 4, 12週に観察し、さらに小腸上部(ほぼ2等分した小腸の口側)、小腸下部(同、肛側)、結腸を生理食塩水で洗浄後、Toyo濾紙 No. 6にて水分を吸収し、湿重量と長さを測定し、1cm当りの湿重量を算出した。各群のPTを4週目に測定した。

3. 消化管内細菌叢

前、後1, 4, 12週の4時期にラットの後大静脈から採血、屠殺し、胃、小腸上部、小腸下部、盲腸、結腸の各組織と内容物を常時O<sub>2</sub> free CO<sub>2</sub> gasを吹きつけているジャーに移し嫌氣的処置を行ったのち、上記消化管各部位の細菌叢を光岡の方法<sup>2)</sup>に従い検索した。表1に使用した培地、培養方法および日数を示す。培養終了後、各培地に発育したコロニーをできる限り多く釣菌し、培地による選択性、コロニーの数と形態、グラム染色性、菌形態、好氣的発育試験などにより菌群レベルで同定、定量した。菌数は胃、小腸上部、小腸下部、盲腸では内容物1g当りの対数値で表し、結腸ではED摂取により内容物がほとんどなくなることや個々のラットによりその量にばらつきがあるため結腸組織1g当りの対数値で示し、消化管各部位の内容物総量当りの総菌数も対数値で表し、平均値と標準誤差を求めた。検出限界菌数は200/gである。

表1 消化管内細菌叢の検索に用いた培地

培地の種類	略名	分離・計数の対象となる主な菌群	培養方法	培養日数	
非選択培地	Medium 10	M10	普通の方法では培養できない高い嫌気度を必要とする菌	Plate-in-bottle法 (嫌気培養)	4
	EG 寒天	EG	多くの偏性嫌気性菌と通性嫌気性菌	GasPak法にて嫌気培養	
	BL 寒天 (BBL)	BL	乳酸菌の発育に適し、また、各菌群の集落に特徴があって菌群レベルの分類が容易である		3
	Trypticase soy blood agar (BBL)	TS	好気性菌	好気培養	
選択培地	BS 寒天	BS	<i>Bifidobacterium</i>	GasPak法にて嫌気培養	3
	ES 寒天	ES	<i>Eubacterium</i>		
	NBGT 寒天	NBGT	<i>Bacteroidaceae</i>		
	変法 VS 寒天	VS	<i>Veillonella</i>		
	Neomycin Nagler 寒天	NN	<i>Clostridium perfringens</i> を含むレシチナーゼ陽性 <i>Clostridium</i>	CO <sub>2</sub> ガスジャー培養	3
	変法 LBS 寒天	LBS	<i>Lactobacillus</i>		
	DHL 寒天	DHL	<i>Enterobacteriaceae</i>	好気培養	1
	TATAC 寒天	TATAC	<i>Streptococcus</i>		
	PEES 寒天	PEES	<i>Staphylococcus</i>		
Potato dextrose 寒天	P	酵母, 糸状菌	好気培養	2	
NAC 寒天	NAC	<i>Pseudomonas</i>			

4. EDの末梢血および肝組織内 V.B<sub>12</sub>, 葉酸におよぼす影響

対照群, ED 群の V.B<sub>12</sub>, 葉酸の累積摂取量を V.K と同様の方法で算出し, 前, 後 1, 4, 12 週の 4 時期に末梢血 V.B<sub>12</sub> を competitive protein binding analysis sephadex 法にて, 末梢血葉酸を competitive protein binding analysis dextran coated charcoal 法にて測定した. さらにビタミンの貯蔵臓器のひとつである肝への影響をみるため肝組織 200mg を採り, 生理食塩水 4.0ml を加え氷冷下に homogenize し, その homogenate を KM-shaker にて振動数 340s.p.m. で 10 分間攪拌したのち 2,100 × g で 10 分間遠心し, その上清中の V.B<sub>12</sub>, 葉酸を上記方法にて測定した.

5. 測定値の統計処理

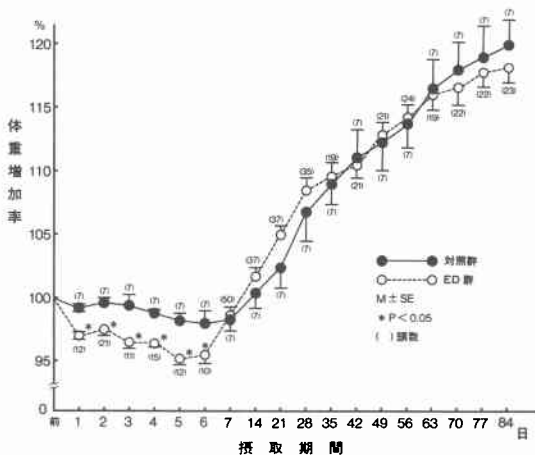
平均値と標準誤差で表し, 有意性は t 検定あるいは  $\chi^2$  検定にて判定した. 危険率が 5% 以下の場合を有意差ありとした.

結果

1. EDの成長およびPTにおよぼす影響とV.K投与効果

対照群, ED 群ともに摂取 1 週未満では体重は低下し ED 群でより減少したが, 1 週以後は両群の間に差がなく前値に比べ増加し続けた (図 1). 図 2 に V.K<sub>1</sub> 累積摂取量と PT との関係を示す. 累積摂取量は 1 週目には対照群 4.7 ± 0.45 μg に対して ED 群が 10.2 ± 0.39 と多く, 4, 12 週でも ED 群が多かった. PT は ED 群で 1 週目より 16.8 ± 1.4 秒と延長し, 4 週目に 19.9 ± 0.90, 12 週目に 24.6 ± 2.0 と経過的に著明に延長した. ED 群で V.K<sub>1</sub> の強制投与を受けていない 83 頭の

図 1 ED 自由経口摂取時の体重の変化



うち 16 頭 (19%) が出血傾向のため死亡した. 死亡率は ED 摂取期間が長い程高くなった. 出血部位としては脾臓が 100% にみられ, ほかに膀胱, 消化管, 後腹膜腔, 生殖器系がそれぞれ 88, 81, 56, 44% を占めた. 図 3 に V.K<sub>1</sub> を腹腔内あるいは経口的に強制投与した ED 群の PT の変動を示す. ED 群で延長したのに対して V.K<sub>1</sub> 腹腔内投与 ED 群では 13.1 ± 0.31 秒, 経口投与 ED 群では 13.2 ± 0.30 と, ともに対照群 13.2 ± 0.20 に比べ差がなかった.

2. 腸管からの V.K 吸収障害の有無

末梢血 glycocholic acid は ED 群で 1, 4, 12 週にわたり著明な減少をきたした. そこで対照群および摂取 4 週目の各 ED 群における腸管内 glycocholic acid を末梢血 glycocholic acid と対比して図 4 に示す. 末梢血では対照群に比べ各 ED 群で著明に減少し, 腸管

図 2 V.K<sub>1</sub> 累積摂取量と PT の関係

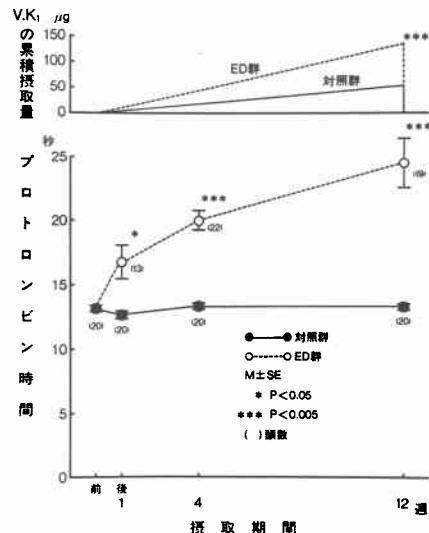


図 3 PTにおよぼすV.K<sub>1</sub>腹腔内投与(左)および経口投与(右)の影響 (V.K<sub>1</sub> 30mg/kg/週 × 4 週)

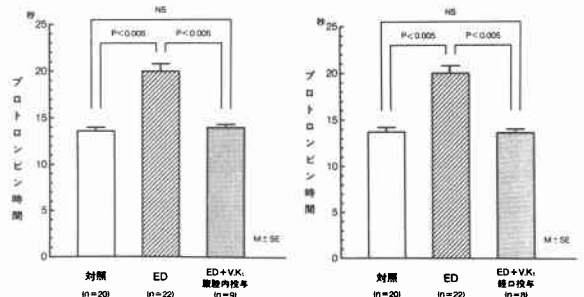


図4 血中および腸管内グリコロール酸(開始4週後)

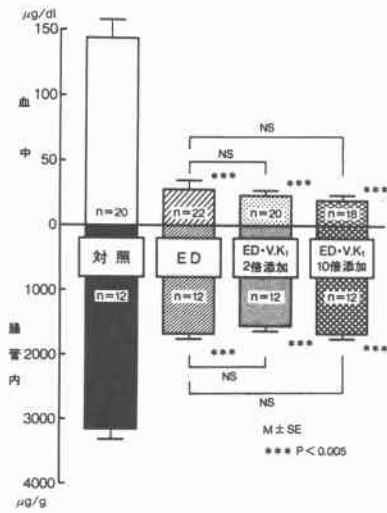
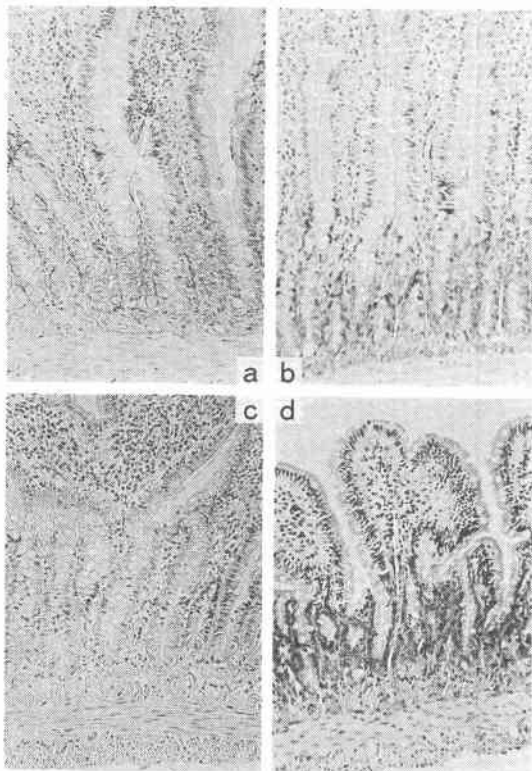


図5 ED摂取前後の小腸の組織像(HE, ×100)  
 a: ED摂取前の小腸上部, b: ED摂取12週目の小腸上部, c: ED摂取前の小腸下部, d: ED摂取12週目の小腸下部



内 glycocholic acid も対照群 $3,160 \pm 156 \mu\text{g/g}$  に対して各ED群でそれぞれ $1,680 \pm 71$ ,  $1,550 \pm 54$ ,  $1,660 \pm$

図6 消化管の湿重量の変化

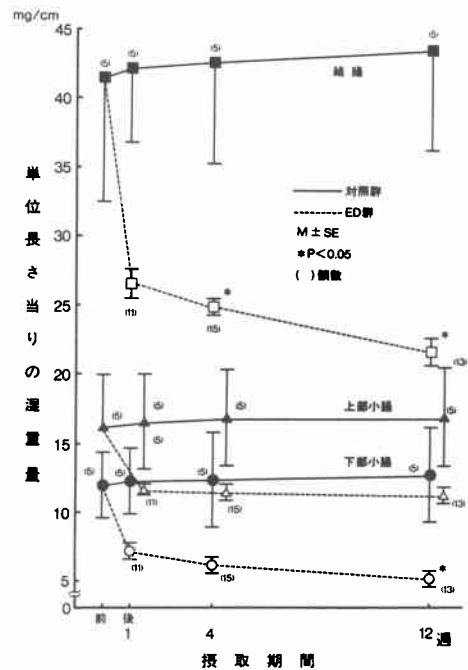
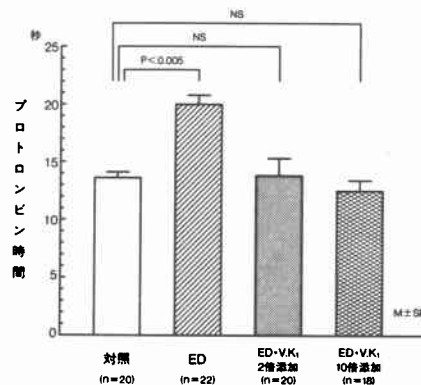


図7 PTにおよぼすV.K<sub>1</sub>添加ED摂取の影響(開始4週後)



112と著明な減少をきたした。ED群とV.K<sub>1</sub>添加ED群との間には末梢血, 腸管内ともに差がなかった。一方消化管の組織学的変化をみると, EDを長期に単独摂取すると小腸下部, 結腸で腸壁の厚さの減少, クリプトの深さの減少など萎縮傾向がみられた(図5)。図6に対照群とED群の小腸上部, 小腸下部, 結腸の1cm当りの湿重量を示す。小腸上部では両群間に差がなかったが, ED群では結腸で4週目より, 小腸下部で12週目に減少した。PTは対照群 $13.2 \pm 0.20$ 秒に比べED群で $19.9 \pm 0.90$ と延長したが, V.K<sub>1</sub> 2倍添加ED群,

10倍添加 ED 群ではそれぞれ  $13.8 \pm 0.40$ ,  $12.6 \pm 0.30$  と延長しなかった (図7)。

3. 消化管内細菌叢

1) 総菌数の変動

i) 消化管内容物または組織1g 当りの変動: 胃では前  $9.5 \pm 0.15$  に対して後 1, 4, 12週にはそれぞれ  $7.1 \pm 0.68$ ,  $7.8 \pm 0.38$ ,  $8.1 \pm 0.38$  とすべて減少した。小腸上部では前  $8.0 \pm 0.26$  に比べて後 4週には  $6.8 \pm 0.30$  と減少した。小腸下部では前  $9.6 \pm 0.11$  に対して後 1, 4週にはそれぞれ  $8.3 \pm 0.19$ ,  $8.8 \pm 0.19$  と減少した。盲腸では前  $10.3 \pm 0.11$  に対して後 1, 4, 12週にはそれぞれ  $10.9 \pm 0.11$ ,  $10.8 \pm 0.08$ ,  $11.0 \pm 0.15$  とすべて増加した。結腸では後 1, 4, 12週にわたり減少傾向がみられた (図8)。

ii) 消化管各部位の内容物総量当りの変動: 胃, 小腸の上部消化管では, 内容物1g 当りの総菌数の変動とほぼ同じであった。盲腸では ED 摂取前後に変化がなかったが, 結腸では減少した。結局, 消化管全体に生

息する総細菌数は ED 摂取による影響を受けず対照群と差がなかった (図9)。

2) 嫌気性菌の変動

i) Bacteroidaceae: 胃では ED 摂取前には検出されなかったが, 後 1, 4, 12週には検出率がすべて43%となり, 菌数も  $2.4 \pm 0.06$ ,  $3.0 \pm 0.35$ ,  $5.7 \pm 1.1$  と増加傾向をきたした。小腸上部では前14%にすぎなかった検出率が後1週に86%, 4, 12週には100%と上昇した。小腸下部では前後で検出率に差がなかったが, 菌数は前  $3.3 \pm 0.30$  に比べ, 後 1, 4, 12週にはそれぞれ  $6.0 \pm 0.42$ ,  $5.9 \pm 0.57$ ,  $7.4 \pm 0.45$  とすべて増加した。盲腸では前後ともに検出率は100%で, 菌数は前  $10.0 \pm 0.11$  に対して後 1, 4, 12週にはそれぞれ  $10.9 \pm 0.11$ ,  $10.7 \pm 0.08$ ,  $11.0 \pm 0.15$  とすべて増加した。結腸では前後ともに検出率は100%であったが, 菌数は摂取後減少傾向をきたした (図10)。

ii) Clostridium: ED 摂取前には小腸では検出されず, 胃で29%, 盲腸で14%, 結腸で29%検出された。ED 摂取後には検出率は胃では変化がなかったが, 小腸上部では12週目に71%, 小腸下部では4週目に71%, 12週目に86%, 盲腸, 結腸では1週目よりそれぞれ86%, 100%, 4, 12週にはともに100%と高くなった。菌数も増加傾向を示した (図10)。

iii) Bifidobacterium: 検出率は ED 摂取1週目の盲腸と12週目の結腸で29%と前の100%に比べて低下した。菌数は胃では前  $4.7 \pm 0.04$  に対して後 1, 4週にはそれぞれ  $3.3 \pm 0.36$ ,  $3.6 \pm 0.30$  と減少した。小腸では検出率, 菌数ともに変化しなかった (表2)。

iv) Veillonella: 小腸では上部, 下部ともに後 4, 12週に検出率がそれぞれ71%, 86%と前の0%に比べ

図8 ED 摂取による総菌数の変動 (n=7)

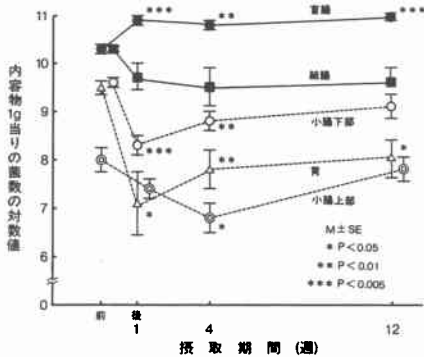


図9 ED 摂取による内容物総量当りの総菌数の変動 (n=7)

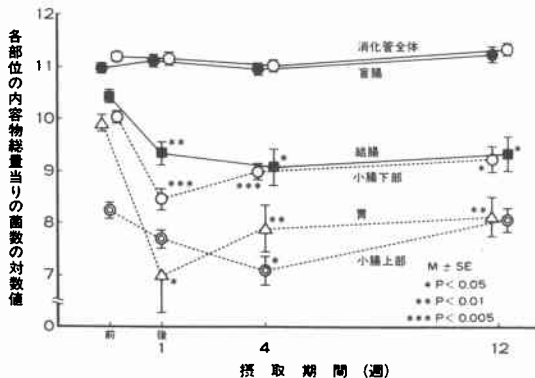


図10 ED 摂取による Bacteroidaceae (左) および Clostridium (右) の変動 (n=7)

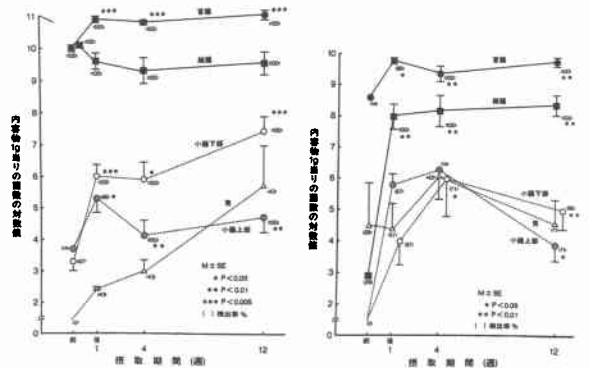


表2 消化管内細菌叢の変動 (内容物1g 当り):

ED 摂取 1, 4, 12週のうち 1, 2, 3 時期に検出率または菌数が有意に変化すれば, これをそれぞれ 1, 2, 3 本の矢印で表した, 上向きは増加を, 下向きは減少を示す. NS: 有意差なし.

菌群	部位	胃	小腸上部	小腸下部	盲腸	結腸
総菌数		↓↓↓	↓	↓↓	(↑↑)	NS
嫌気性菌	Bacteroidaceae	NS	(↑↑↑)	(↑↑↑)	(↑↑↑)	NS
	Bifidobacterium	↓↓	NS	NS	↓	↓
	Veillonella	NS	(↑↑)	(↑↑)	NS	NS
	Clostridium	NS	(↑)	(↑↑)	(↑↑↑)	(↑↑↑)
	Lactobacillus	↓↓↓	↓	↓↓	↓	↓↓↓
好気性菌	Enterobacteriaceae	↓↓↓	NS	NS	↓	↓
	Streptococcus	↓↓↓	NS	NS	NS	↓
	Staphylococcus	↓↓	NS	NS	NS	↓↓
	Pseudomonas	NS	NS	NS	↓	↓↓↓
好気性菌数	(↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	

上昇した. 他の部位では検出率, 菌数に差がなかった (表2).

v) その他: Eubacterium, Peptococcaceae は消化管各部位においてさしたる変動をきたさなかった. Megasphaera, B. melaninogenicus は ED 摂取前後で検出されなかった.

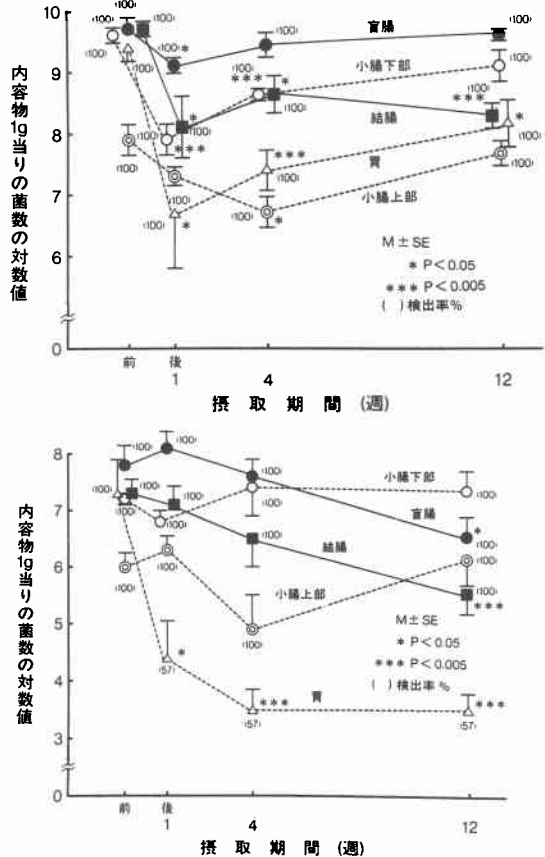
3) 好気性菌の変動

i) Lactobacillus: ED 摂取前後を通してすべてのラットの全消化管で100%検出された. 菌数の変動をみると, 胃では前 $9.4 \pm 0.19$ に比べて後1, 4, 12週にはそれぞれ $6.7 \pm 0.91$ ,  $7.4 \pm 0.42$ ,  $8.1 \pm 0.38$ とすべて減少し, 小腸上部でも前 $7.9 \pm 0.23$ に対して後4週目に $6.7 \pm 0.26$ と減少し, 小腸下部では前 $9.6 \pm 0.11$ に対して後1, 4週にはそれぞれ $7.9 \pm 0.23$ ,  $8.6 \pm 0.11$ と減少した. 盲腸では前 $9.7 \pm 0.19$ に比べて後1週目に $9.1 \pm 0.11$ と減少し, 結腸でも前 $9.7 \pm 0.11$ に対して後1, 4, 12週にはそれぞれ $8.1 \pm 0.53$ ,  $8.6 \pm 0.30$ ,  $8.2 \pm 0.23$ とすべて減少した (図11).

ii) Enterobacteriaceae: ED 摂取前後に胃以外の消化管で100%検出され, 胃でも検出率に差がなかった. 菌数の変動をみると, 胃では前 $7.3 \pm 0.60$ に対して後1, 4, 12週にはそれぞれ $4.4 \pm 0.65$ ,  $3.5 \pm 0.35$ ,  $3.5 \pm 0.20$ とすべて減少したが, 小腸では変化がなかった. 盲腸では前 $7.8 \pm 0.38$ に比べて後12週に $6.5 \pm 0.34$ と減少をきたし, 結腸でも前 $7.3 \pm 0.23$ に対して後12週に $5.5 \pm 0.38$ と減少した (図11).

iii) Streptococcus: 胃以外の消化管では ED 摂取前後ともに検出率100%であり, 胃でも検出率に差がな

図11 ED 摂取による Lactobacillus (上) および Enterobacteriaceae (下) の変動 (n=7)



かった. 菌数に関してみると, 胃では前 $7.2 \pm 0.57$ に対して後1, 4, 12週にはそれぞれ $4.1 \pm 0.52$ ,  $3.8 \pm 0.35$ ,  $3.9 \pm 0.45$ とすべて減少し, 小腸, 盲腸では摂取前後に差がなく, 結腸では前 $6.9 \pm 0.19$ に対して後12週には $5.5 \pm 0.38$ と減少した (表2).

iv) Staphylococcus: 検出率は胃では ED 摂取後4, 12週には14%と前の86%に比べ低下したが, 小腸, 盲腸, 結腸では前後に差がなかった. 菌数に関してみると, 胃, 小腸, 盲腸では ED 摂取前後で差がなかったが, 結腸では前 $5.7 \pm 0.15$ に対して後4, 12週にはそれぞれ $4.6 \pm 0.34$ ,  $4.0 \pm 0.45$ と減少した (表2).

v) Pseudomonas: ED 摂取前後において検出率は全消化管で差がなかった. 菌数の変動をみると, 胃, 小腸では ED 摂取前後で差がなかったが, 盲腸では前 $5.8 \pm 0.31$ に比べて後12週に $4.4 \pm 0.30$ と減少し, 結腸でも前 $6.0 \pm 0.27$ に対して後1, 4, 12週にはそれぞれ

図12 ED 摂取時の消化管内細菌叢における嫌気性菌の相対的増加 (n=7) : log (嫌気性菌数/好気性菌数)

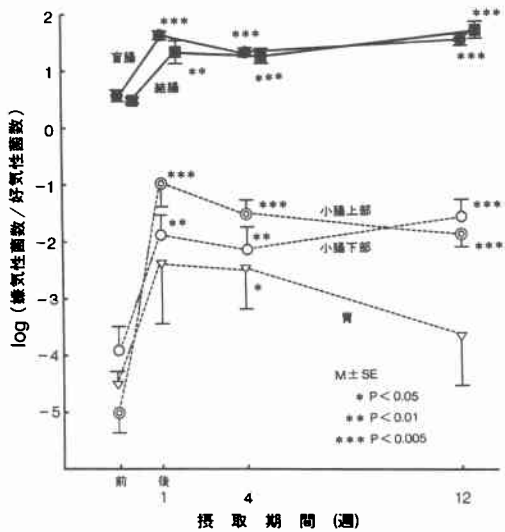
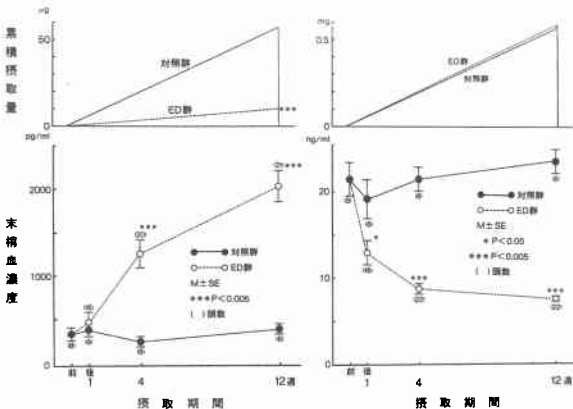


図13 V.B<sub>12</sub> (左) と葉酸 (右) の累積摂取量と末梢血濃度の関係



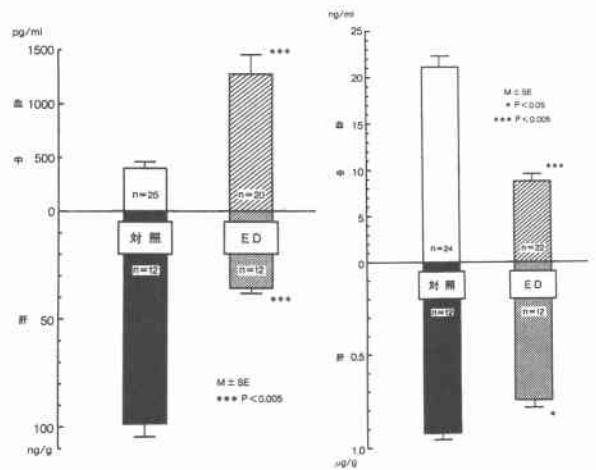
4.4±0.37, 4.0±0.58, 3.6±0.18とすべて減少した(表2).

vi) その他 : Bacillus, Corynebacterium, 酵母, 糸状菌は ED 摂取前後でほとんど検出されなかった。

4) 好気性菌数に対する嫌気性菌数の比の変動

ED 摂取により胃, 小腸上部, 小腸下部, 盲腸, 結腸の全消化管で著明に上昇した。すなわち ED 摂取前に比べて摂取後には嫌気性菌が胃, 小腸の上部消化管では約1,000倍の, 盲腸, 結腸の下部消化管では約10倍の相対的増加をきたした (図12)。

図14 血中および肝組織における V.B<sub>12</sub> (左) と葉酸 (右) の変動 (開始 4 週後)



4. ED の末梢血および肝組織内 V.B<sub>12</sub>, 葉酸におよぼす影響

V.B<sub>12</sub>および葉酸の累積摂取量と末梢血濃度の関係を図13に示す。ED 群では V.B<sub>12</sub>の摂取量は少量であったが, 末梢血 V.B<sub>12</sub>は前398±45.3pg/ml に対して後 4, 12週にはそれぞれ1,288±164, 2,077±198と増加した。対照群と ED 群の葉酸の摂取量に差がなかったが, 末梢血葉酸は前21.4±1.1ng/ml に比べて後 1, 4, 12週にはそれぞれ13.0±1.5, 8.8±0.75, 7.6±0.37と減少した。ED 摂取 4 週目の末梢血および肝組織内 V.B<sub>12</sub>, 葉酸の変動を図14に示す。肝組織内 V.B<sub>12</sub>は対照群98.1±6.5ng/g に対して ED 群では35.6±1.3と減少した。肝組織内葉酸も対照群0.92±0.046 μg/g に対して ED 群では0.75±0.039と減少した。

考 察

ED を単独で摂取させると PT は摂取 1 週目より延長し, この傾向は経過的により著明となり, なかには出血傾向のため死亡するラットも出現した。この PT の延長, 出血傾向をきたした原因のひとつとして V.K 欠乏の可能性が考えられた。そこで V.K<sub>1</sub>を腹腔内あるいは経口的に強制投与したところ PT の延長はみられなかった。つまり ED 群で PT の延長ひいては出血傾向をきたしたのは, V.K 摂取量が多い<sup>8)</sup>にもかかわらず, 実際には V.K の欠乏状態に陥っていくためと考えられた。この原因として腸管からの吸収障害と消化管内細菌叢の乱れの 2 点を想定した。前者には ED 摂取による腸管壁の器質的あるいは機能的変化と脂溶性

ビタミンの吸収に必要な胆汁酸の減少が考えられ、後者には V.K 産生菌の減少、消費菌の増加が推測された<sup>9)10)</sup>。

まず ED 摂取による腸管からの V.K の吸収障害の可能性について考察したい。ED 摂取により小腸下部、結腸は組織学的に腸壁の厚さとクリプトの深さが減少するなど萎縮傾向をきたし、これらの単位長さ当りの湿重量も減少したため、腸壁自体の障害による吸収障害の可能性が考えられた。ED 摂取により Nelson ら<sup>11)</sup>は小腸粘膜のクリプトの深さの減少、Young ら<sup>12)</sup>は小腸粘膜の重量、DNA 量、蛋白質量の減少、Janne ら<sup>13)</sup>は結腸粘膜の萎縮をきたしたと報告している。この原因としては ED が小腸上部でほとんど吸収されるため粘膜の廃用性萎縮が大きな比重を占めていると思われる。glycocholic acid をはじめ胆汁酸は腸管からの脂質、脂溶性ビタミンの吸収に関与している<sup>14)</sup>。末梢血 glycocholic acid は ED 摂取 1 週目より著減した。そこで ED 摂取 4 週目に ED 群、V.K<sub>1</sub> 2 倍および 10 倍添加 ED 群で腸管内 glycocholic acid を測定したところ、これらはすべて著減した。この原因としては糞便中への glycocholic acid の喪失が増加し、しかも肝における胆汁酸自体による negative feedback 機構により合成が代償されえない場合や、合成自体が障害される場合がある<sup>15)</sup>。ED は脂質含有量がきわめて少なく、cholesterol をまったく含まないため、本実験では肝での胆汁酸合成能が低下した可能性が想像された。また Sacquet らは食物繊維が胆汁酸代謝に影響を与えると報告している<sup>16)</sup>が、ED には繊維がまったく含まれないことも glycocholic acid の減少に関係があるのかもしれない。一方、V.K<sub>1</sub> 2 倍あるいは 10 倍添加 ED の自由経口摂取では PT はまったく延長しなかつたので、PT に影響を与える程の腸管からの V.K の吸収障害はないと考えられた。したがって ED 群では V.K 摂取量が多く、腸管壁の萎縮や glycocholic acid の減少による吸収障害も存在しない。それにもかかわらず V.K 欠乏をきたした原因として、消化管内細菌叢が関与している可能性が推察された。そこで以下 ED 摂取にともなう V.K 欠乏と消化管内細菌叢の変化との関係について考察する。

胃では ED 摂取前には *Lactobacillus* は  $10^9$ /g 程度になり最優勢菌叢を構成し、*Enterobacteriaceae*、*Streptococcus* も  $10^7$ /g 位まで増殖したが、*Bacteroidaceae* や *Clostridium* はほとんど検出されなかつた。しかし ED 摂取により上記好気性菌は減少し、

*Bacteroidaceae*、*Clostridium* は検出率と菌数が増加傾向をきたした。小腸上部の細菌叢の構成は ED 摂取前には胃とほぼ同様であったが、菌数は内容物 1g 当りでは約 1/30、内容物総量当りでは約 1/100 に減少した。ED 摂取後には本来下部消化管に存在する *Bacteroidaceae*、*Clostridium*、*Veillonella* などの嫌気性菌の検出率が高くなったが、好気性菌は大きな影響を受けなかつた。小腸下部では ED 摂取前には *Lactobacillus* が最優勢菌叢であったが、嫌気性菌の検出率は小腸上部より高かつた。ED 摂取により *Lactobacillus* が減少したのに対して *Bacteroidaceae* は菌数が増加し、*Veillonella*、*Clostridium* は検出率が高くなった。したがって小腸では細菌叢の面からみると“小腸の大腸化”とも言うべき嫌気性菌の絶対的増加など著明な乱れをきたしたことが明らかになった。盲腸内環境は細菌の発育にもっとも適し、各種の細菌が増殖し総菌数は  $10^{10.3}$ /g に達した。ED 摂取前には最優勢菌叢は *Bacteroidaceae* であり、ついで *Lactobacillus*、*Eubacterium*、*Peptococcaceae*、*Bifidobacterium*、*Enterobacteriaceae*、*Streptococcus*、*Staphylococcus*、*Pseudomonas* などが検出されたが、*Clostridium* はほとんど検出されなかつた。ところが ED 摂取により *Bacteroidaceae* や *Clostridium* が増加し、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Enterobacteriaceae* は減少した。結腸組織についてみると ED 摂取前には盲腸内細菌叢とほとんど同じであった。ED 摂取により嫌気性菌では *Bacteroidaceae* や *Veillonella* には変化がなく、有益菌の *Bifidobacterium* が減少し、有害菌<sup>2)</sup>の *Clostridium* が著しい増加をきたした。好気性菌では *Lactobacillus* が著減したのをはじめ *Enterobacteriaceae*、*Streptococcus*、*Staphylococcus* も減少した。便中細菌叢と結腸内細菌叢はほぼ同じと言われている<sup>17)</sup>ため諸家の便中細菌叢の報告をみると、*Lactobacillus* が増加したとするものはなく、これ以外の好気性菌や *Clostridium*、*Bifidobacterium* の増減は一定していない<sup>4)5)18)~20)</sup>。*Bacteroidaceae* は Winitz ら<sup>3)</sup>が減少したとしているが、著者の成績では他の報告<sup>4)5)19)20)</sup>と同じように変化は認められなかつた。総菌数についてみると Winitz ら<sup>3)</sup>は著減したとし、鈴木ら<sup>21)</sup>は増加したとしているが他の報告<sup>4)5)18)~20)23)24)</sup>では変化がなく、Winitz らの成績に関して Finegold ら<sup>22)</sup>は培養手技の不備を指摘している。

ラットでは菌数のもっとも多い盲腸で内容物総量当りの菌数が変化しなかつたため、消化管全体に生息す



る総細菌数は減少しなかったが、胃、小腸、結腸では内容物総量当りの菌数が減少したのでヒトのような盲腸の小さい動物では消化管全体の総細菌数は減少すると思われた。

好気性菌数に対する嫌気性菌数の比はED摂取1週目より消化管全体にわたり著明に増加した。鈴木ら<sup>21)</sup>も便中細菌叢でこの比は増加したと述べているが、Atteberyら<sup>4)</sup>、Bornsideら<sup>19)</sup>、Axelssonら<sup>23)</sup>、Glotzerら<sup>24)</sup>は変化しなかったと報告している。著者の成績でこの比が著しく高くなったのは、主にClostridiumやBacteroidaceaeの検出率、菌数が胃以外で増加したためである。

要するに、ED摂取時のV.K欠乏と消化管内細菌叢の関係を検討するため消化管各部位の細菌叢を検索したところ、総菌数の変動、Bifidobacterium以外の主要嫌気性菌の増加、主要好気性菌の減少、好気性菌に対する嫌気性菌の相対的増加などをきたし、消化管内細菌叢は著しい乱れをきたしたことが明らかとなった。この変動の要因としては、EDには繊維が含まれず小腸上部でほとんど吸収され消化管内容物が著減したこと、このため腸蠕動が低下したこと、さらにED摂取自体がストレス<sup>25)</sup>になりうることなどが想像されるが、もっとも基本的な要因はEDの組成そのものが市販固型飼料と異なることにあると考えられた。また報告者により消化管内細菌叢について一定した見解が得られないのは、使用されるEDの組成が異なることも要因のひとつとして考えられた。

V.Kは天然には植物由来のV.K<sub>1</sub>と細菌由来のV.K<sub>2</sub>(menaquinone)がある。後者は消化管内細菌叢を構成するE. coli, K. pneumoniae, Proteus, Streptococcus, Staphylococcus, Bacillusなどの好気性菌や、Bacteroidaceae, Bifidobacterium, Clostridium, Eubacterium, Veillonellaなどの嫌気性菌のある種の菌株により産生される<sup>9)10)</sup>。著者の成績ではED摂取によりEnterobacteriaceae, Streptococcus, Staphylococcusなどは胃、盲腸、結腸で減少し、Bacteroidaceaeは小腸と盲腸で増加し、Clostridiumは小腸、盲腸、結腸で増加し、Veillonellaは小腸で増加し、Bifidobacteriumは盲腸と結腸で減少した。したがってEnterobacteriaceae, Streptococcus, Staphylococcus, Bifidobacteriumなどが減少したことから腸内で合成されるV.K<sub>2</sub>が減少する可能性があり、一方Clostridium, Bacteroidaceae, Veillonellaの増加によりV.K<sub>2</sub>が増加する可能性もあるが、著者は消化管内細菌

叢を菌群レベルで同定、定量したため、増加したClostridiumやBacteroidaceaeにはV.K<sub>2</sub>産生能がなかったか、または乏しかったとしか言及しえない。またBacteroidaceae, Lactobacillus, E. coliのなかにはV.Kを消費するものもあり<sup>9)</sup>、消化管内細菌叢とV.Kとの関係はきわめて複雑であり詳細は今後の解明が待たれる。

つぎに消化管内細菌叢と胆汁酸の関係について考察する。glycocholic acidが腸管で著減した原因のひとつとして、ED摂取により脱抱合能のあるBacteroidaceae<sup>14)</sup>が小腸で著増したため、glycocholic acidが脱抱合をうけ減少した可能性も推測された。また非抱合型胆汁酸は抱合型に比べて腸内菌に対する抑制作用が強い<sup>26)</sup>ため、胆汁酸の脱抱合が消化管内細菌叢の乱れの要因のひとつとして考えられた。

ED摂取により消化管内細菌叢の乱れの他のビタミンに対する影響を、V.K<sub>2</sub>同様腸内菌により合成されるV.B<sub>12</sub>、葉酸について補足的に検討した。ED群ではV.B<sub>12</sub>は摂取量が少ないにもかかわらず末梢血で増加し、肝組織で減少した。V.B<sub>12</sub>には同族体がいくつかありEDに含まれているのはcyanocobalamineである。本実験で用いたV.B<sub>12</sub>の測定法はCPBA sephadex法であり同族体を区別なく全体として測定する。したがってV.B<sub>12</sub>が複雑な変動をきたした一因として、腸管より吸収されたcyanocobalamineが活性型V.B<sub>12</sub>であるmethylcobalamineへの転換が肝で障害されたためcyanocobalamineが末梢血で増加<sup>27)</sup>し、一方肝組織ではV.B<sub>12</sub>はcyanocobalamineとしては存在しえない<sup>28)</sup>ので、肝組織でV.B<sub>12</sub>が減少した可能性が想像された。またV.B<sub>12</sub>は腸内菌により産生、消費される<sup>29)30)</sup>ため消化管内細菌叢の乱れもこの複雑な変動の一因と考えられた。葉酸については摂取量に差がなかったが末梢血、肝組織ともに減少した。この原因として葉酸の産生、消費が腸内菌により行われている<sup>31)32)</sup>ことを考えると消化管内細菌叢の乱れにも一因があると推測された。

ED摂取時にV.K欠乏をきたした原因としてV.Kの吸収障害と消化管内細菌叢の乱れの2点を想定し検討してきた。ED摂取により腸壁の萎縮傾向、glycocholic acidの減少などをきたしたがV.Kの吸収障害をきたすほどのものではなかった。そこで消化管各部位の細菌叢を検索したところ、以上述べたような著しい乱れをきたしたことが明らかになった。したがってこの消化管各部位の細菌叢の著しい乱れがV.K欠乏

やV.B<sub>12</sub>, 葉酸の変動した原因のなかの重要なものと推察された。

### 結 論

ラットにEDを自由に経口摂取させ胃, 小腸上部, 小腸下部, 盲腸, 結腸の細菌叢をED摂取前, 後1, 4, 12週目に検索し, 消化管内細菌叢のビタミン, とくにV.Kに与える影響を検討し以下の結論を得た。

1. ED摂取によりほぼ100%にV.K欠乏症をきたした。

2. ED摂取により腸管内 glycocholic acid は約1/2に減少し腸管壁も萎縮傾向をきたしたが, これらの変化はV.Kの吸収障害を招来するほどのものではなかった。

3. ED摂取により消化管各部位で, 内容物または組織1g当りの好気性菌は約1/10~1/10,000に減少し, Bifidobacterium 以外の嫌気性菌は約10~100,000倍に増加し, 総菌数は盲腸では約10倍に増加したが, 他の部位では約1/10~1/100に減少した。

4. ED摂取により末梢血でV.B<sub>12</sub>は約3~5倍に増加し, 葉酸は約1/3~2/3に減少した。また肝組織では前者は約1/3に, 後者は約4/5に減少した。

5. 以上から, ED摂取時のV.K欠乏症あるいはV.B<sub>12</sub>, 葉酸の変動の重要な原因として消化管内細菌叢の著明な乱れが推察された。

稿を終わるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました勝見正治教授に深甚の謝意を表するとともに, 終始直接御指導を戴きました青木洋三講師ならびに御協力を戴いた共同研究班, 教室の諸兄に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第21回日本消化器外科学会総会, 第83回日本外科学会総会, 第22回日本外科代謝栄養学会において発表した。

### 文 献

- 1) 光岡知足: 腸内菌叢の研究における最近の進歩—とくに嫌気性菌を中心として—。日細菌誌 29: 773—788, 1974
- 2) 光岡知足: 腸内菌の世界—嫌気性菌の分離と同定—。改訂版, 東京, 叢文社, 1984
- 3) Winitz M, Adams RF, Seedman DA et al: Studies in metabolic nutrition employing chemically defined diets. II. Effects on gut microflora populations. Am J Clin Nutr 23: 546—559, 1970
- 4) Attebery HR, Sutter VL, Finegold SM: Effect of a partially chemically defined diet on normal human fecal flora. Am J Clin Nutr 25: 1391—1398, 1972
- 5) Crowther JS, Drasar BS, Goddard P et al: The effect of a chemically defined diet on the faecal flora and faecal steroid concentration. Gut 14: 790—793, 1973
- 6) Hollander D, Muralidhara KS, Rim E: Colonic absorption of bacterially synthesized vitamin K<sub>2</sub> in the rat. Am J Physiol 230: 251—255, 1976
- 7) Savage D, Lindenbaum J: Clinical and experimental human vitamin K deficiency. Edited by Lindenbaum J: Nutrition in hematology. N Y, Churchill Livingstone, 1983, p271—320
- 8) National research council: Nutrient requirements of laboratory animals. Third edition. Washington, National academy of sciences, 1978, p7—37
- 9) Bentley R, Meganathan R: Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. Microbiol Rev 46: 241—280, 1982
- 10) Ramotar K, Conly JM, Chubb H et al: Production of menaquinones by intestinal anaerobes. J Infect Dis 150: 213—218, 1984
- 11) Nelson LM, Carmichael HA, Russell RI et al: Small-intestinal changes induced by an elemental diet (Vivonex) in normal rats. Clin Sci Mol Med 55: 509—511, 1978
- 12) Young EA, Cioletti LA, Winborn WB et al: Comparative study of nutritional adaptation to defined formula diets in rats. Am J Clin Nutr 33: 2106—2118, 1980
- 13) Janne P, Carpentier Y, Willems G: Colonic mucosal atrophy induced by a liquid elemental diet in rats. Am J Dig Dis 22: 808—812, 1977
- 14) Tabaqchali S: Abnormal intestinal flora: Metabolic and clinical consequences. Gastroenterol Jpn 19: 351—362, 1984
- 15) Vlahcevic ZR, Prugh MF, Gregory DH et al: Disturbances of bile acid metabolism in parenchymal liver cell disease. Clin Gastroenterol 6: 25—43, 1977
- 16) Sacquet E, Leprince C, Riottot M: Dietary fiber and cholesterol and bile acid metabolisms in axenic (germfree) and holoxenic (conventional) rats. I. Effect of wheat bran. Reprod Nutr Dev 22: 291—305, 1982
- 17) Drasar BS, Hill MJ: Human intestinal flora. London, Academic Press, 1974, p36—43
- 18) Bounous G, Devroede GJ: Effects of an elemental diet on human fecal flora. Gastroenterology 66: 210—214, 1974
- 19) Bornside GH, Cohn I: Stability of normal human fecal flora during a chemically defined, low residue liquid diet. Ann Surg 181: 58—60,

- 1975
- 20) Dickman MD, Chappelka AR, Schaedler RW : Evaluation of gut microflora during administration of an elemental diet in a patient with an ileoproctostomy. *Am J Dig Dis* 20 : 377-380, 1975
- 21) 鈴木邦彦, 長崎明男, 樋渡信夫ほか : クロウン病患者の糞便菌叢—未治療およびED治療による変動について—. *日消病会誌* 80 : 1144-1150, 1983
- 22) Finegold SM, Attebery HR, Sutter VL : Factors affecting studies with chemically defined diets. *Am J Clin Nutr* 26 : 785-792, 1973
- 23) Axelsson CK, Justesen T : Studies of the duodenal and fecal flora in gastrointestinal disorders during treatment with an elemental diet. *Gastroenterology* 72 : 397-401, 1977
- 24) Glotzer DJ, Boyle PL, Silen W : Preoperative preparation of the colon with an elemental diet. *Surgery* 74 : 703-707, 1973
- 25) 辨野義己, 光岡知足 : 腸内菌叢の変動要因. *治療学* 14 : 581-587, 1985
- 26) Floch MH, Binder HJ, Filburn B et al : The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 25 : 1418-1426, 1972
- 27) 湯川 進, 丹生広通, 前田孝夫ほか : 慢性肝疾患大球性貧血に対するメチルコバラミン ( $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ ) の効果. *薬理と治療* 5 : 229-238, 1977
- 28) Linnell JC, Hoffbrand AV, Hussein HA-A et al : Tissue distribution of coenzyme and other forms of vitamin  $\text{B}_{12}$  in control subjects and patients with pernicious anaemia. *Clin Sci Mol Med* 46 : 163-172, 1974
- 29) Giannella RA, Broitman SA, Zamcheck N : Vitamin  $\text{B}_{12}$  uptake by intestinal microorganisms : Mechanism and relevance to syndromes of intestinal bacterial overgrowth. *J Clin Invest* 50 : 1100-1107, 1971
- 30) Uphill PF, Jacob F, Lall P : Vitamin  $\text{B}_{12}$  production by the gastro-intestinal microflora of baboons fed either a vitamin  $\text{B}_{12}$  deficient diet or a diet supplemented with vitamin  $\text{B}_{12}$ . *J Appl Bacteriol* 43 : 333-344, 1977
- 31) Klipstein FA, Samloff IM : Folate synthesis by intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr* 19 : 237-246, 1966
- 32) Hoffbrand AV, Tabaqchali S, Booth CC et al : Small intestinal bacterial flora and folate status in gastrointestinal disease. *Gut* 12 : 27-33, 1971