Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-29

Proton pump inhibitors increase the susceptibility of mice to oral infection with enteropathogenic bacteria

Yasutomi, Eiichiro

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2018-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7143号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007143

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Proton pump inhibitors increase the susceptibility of mice to oral infection with enteropathogenic bacteria

プロトンポンプ阻害薬は腸管病原菌に対するマウスの感受性を増強させる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科学講座　消化器内科学
（指導教員：西　愼一教授）

安冨　栄一郎

プロトンポンプ阻害薬（PPI）は、胃壁細胞に存在する H^+,K^+-ATPase（プロトンポンプ）を阻害することで，強力な胃酸分泌抑制作用を持つ。そのため日常診療に於いては、逆流性食道炎や胃潰瘍等の酸分泌関連疾患をはじめ、処方頻度は非常に高い。しかしその一方で、近年、認知症や慢性腎臓病、顕微鏡的大腸炎等、複数の副作用の関する疫学研究の報告を認める。感染性腸炎のリスク増大もその一つであるが、同様にその詳細な機序は解明されていない。今回我々は，マウスモデルを用い、PPI 投与が感染性腸炎に与える影響、その機序につき、腸内環境変化の観点から検討を行った。

8-10 週齢の雄性の C57BL/6J マウスを用い、代表的な PPI である Lansoprazole（Laz）を 8mg/kg/day の投与量にて、1 日目から 8 日目まで連日腹腔内投与を行った後、8 日目に 10^4、10^5、10^6 Colony Forming Units（CFUs）のそれぞれの菌量の *Citrobacter rodentium*（*C.rodentium*）をゾンデを用いて経口投与し、感染導入を行った。体重変化を経時的に評価した後、22 日目にマウスの腸管組織を採取し、H&E 染色及び、mRNA レベルでの炎症性サイトカインの発現量にて腸炎の評価を行った。結果、10^4CFUs の *C.rodentium* を投与した際は、Laz 投与群、非投与群ともに体重に変化を認めなかったものの、10^6CFUs の *C.rodentium* を投与した際は、両群ともに体重増加不良を認めた。10^5CFUs の *C.rodentium* を投与した際は、Laz 投与群のみに於いて体重増加不良の傾向が認められ、病理組織上、陰窩の延長、粘膜の肥厚、炎症細胞浸潤等の炎症性変化を認めた。また、定量 PCR においては、TNF-α、IFN-γ、IL-6 といった炎症性サイトカイン発現量の有意な増加を認めた。Laz 投与により、より少ない菌量の *C.rodentium* で腸炎が成立することが確認された。

次に、同様にマウスに対し、Laz を 1 日目から 8 日目まで連日腹腔内投与行った後、8 日目に 10^5CFUs の *C.rodentium* を経口ゾンデを用いて投与し、その 1 時間後に解剖を行い、盲腸内容物を回収のうえ菌量の測定を行った。菌量は、内容物を滅菌 PBS 中に 100mg/ml の濃度で懸濁させ、MacConkey 寒天培地上に撒布し、37℃の条件下で 24 時間培養後、生じたコロニー数にて測定した。結果、Laz 投与群では非投与群と比較して有意な菌量増加を認めた。即ち Laz 投与により、盲腸に到達する *C.rodentium* の菌量増加がもたらされることが確認された。

盲腸に到達する *C.rodentium* の菌量増加の要因として、Laz 投与による殺菌効果の低下、腸内環境変化を介したコロナイゼーションレジスタンスの変化を考えた。まず、前者の評価を目的とし、マウスに対し、Laz を 1 日目から 8 日目まで連日腹腔内投与行った後、8 日目に胃、近位小腸（十二指腸から空腸）、遠位小腸（回腸）、盲腸の pH 値を測定した。結果、胃 pH については、Laz 投与群に於いて非投与群に比べ有意な上昇を認め、殺菌効果低下を裏付ける結果であった。その他の部位の pH については、両群間で明らかな差を認めず、pH の観点からは Laz が腸内環境に与える影響は乏しいと考えられた。次いで、後者につき、腸内細菌叢の観点から評価する目的で、マウスに対し、Laz を 1 日目から 15 日目まで連日腹腔内投与行った後、15 日目に回腸内容物と糞便を回収し、腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子解析を行ったところ、Laz 非投与群では、回腸で Firmicutes 門に属する菌種が優勢であったのに対し、糞便では Bacteroidale が回腸に比して明らかに多いことが示された。一方、Laz 投与群では、回腸内容物で Bacteroides 門の増加、Firmicutes

門の減少を傾向とした、糞便細菌叢の組成と近い腸内細菌叢の構成が認められた。マウスは食糞の習性があるため、経口摂取された細菌が先に示した通り、胃酸分泌抑制により殺菌されず腸管に到達したためと考えた。続いて、採取した内容物の代謝産物のメタボローム解析を行ったところ、回腸内容物では、Laz 投与群に於いて、非投与群と比較してプロピオン酸、酪酸濃度の有意な低下を認めた。糞便に於いては両代謝物ともに、両群間で明らかな濃度差を認めなかった。そのため、腸内細菌叢、代謝産物の観点からは Laz 投与に伴う腸内環境変化は主として小腸に起こると考えられた。

プロピオン酸、酪酸は、腸内細菌の発酵に伴って生成される短鎖脂肪酸であり、腸管内に於いて制御性 T 細胞の分化誘導に関わっていることが知られている。そこで、Laz 投与連日腹腔内投与の後、腸管の所属リンパ節である、腸間膜リンパ節を採取し、CD3CD4 陽性 T 細胞における Foxp3 陽性の制御性 T 細胞、また、Th1 細胞、Th17 細胞の頻度につき、フローサイトメトリーで評価したが、両群で明らかな差を認めなかった。腸内細菌叢、代謝産物の観点で腸内環境変化を認めたものの、それに伴った免疫担当細胞の分化分布の変化は認めなかった。さらに、腸内環境変化を認めた回腸組織の遺伝子発現変化を包括的に解析するためマイクロアレイを施行したが、抗微生物ペプチドを始めとするその他の腸管免疫にかかわる因子や、オフターゲット遺伝子等の発現に大きな変化は認めなかった。また、Laz が感染成立部位である大腸に対する直接的な免疫修飾作用を持つ可能性も考慮し、大腸の粘膜固有層細胞をフローサイトメトリーにて解析したが、明らかな免疫担当細胞の分布変化は認めなかった。

結論として、マウスモデルを用いた本研究では、Laz 投与は胃酸分泌抑制を介し、腸管病原菌に対する感受性を増強させることがわかった。一方で、Laz 投与は小腸を主に腸内細菌叢変化、代謝産物変化をもたらすことが確認されたものの、これらの変化がもたらす免疫学的修飾、コロナイゼーションレジスタンスの明らかな変化は確認されず、このような要因の関与は乏しいと考えられた。現代においては、胃酸分泌抑制剤の需要は高く、日常的にも安易な処方が目立つ一方で、腸管感染症は、特に老人、乳幼児などに於いては、時に致死的となりうる。本研究は PPI 投与により腸管感染症のリスクが増大する可能性を示しており、リスクとベネフィットを評価した上での、適正な PPI 使用が必要である科学的根拠を与える成果があったと考える。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2766 号	氏 名	安冨 栄一郎
論文題目 Title of Dissertation	Proton pump inhibitors increase the susceptibility of mice to oral infection with enteropathogenic bacteria プロトンポンプ阻害薬は腸管病原菌に対するマウスの感受性を増強させる		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 森信 暁雄 副 査 Vice-examiner 古屋敷智之 副 査 Vice-examiner 勝二 郁夫		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【緒言】

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、逆流性食道炎や胃潰瘍をはじめ、処方頻度は非常に高い。一方で、認知症や慢性腎臓病、顕微鏡的大腸炎等の副作用も報告されている。感染性腸炎のリスク増大もその一つであるが、その詳細な機序は解明されていない。今回我々は，マウスモデルを用い、PPI 投与が感染性腸炎に与える影響とその機序につき、腸内環境変化の観点から検討した。

【方法と結果】

8-10 週齢の雄性の C57BL/6J マウスを用い、代表的な PPI である Lansoprazole（Laz）8mg/kg/day を連日腹腔内に投与し、8 日目に *Citrobacter rodentium*（*C. rodentium*）を経口投与した。10^4CFUs の *C. rodentium* を投与した際は、Laz 投与群、非投与群ともに体重変化はなかったが、10^6CFUs の *C. rodentium* を投与した際は、両群ともに体重増加不良を認めた。10^5CFUs の *C. rodentium* を投与した際は、Laz 投与群のみに於いて体重増加不良が認められ、病理組織で、陰窩の延長、粘膜の肥厚、炎症細胞浸潤等の炎症性変化を認めた。定量 PCR では、TNF-α、IFN-γ、IL-6 といった炎症性サイトカインの発現が有意な増加していた。Laz 投与により、より少ない菌量の *C. rodentium* で腸炎が成立することが確認された。

次に、Laz を連日腹腔内投与行った後、8 日目に 10^5CFUs の *C. rodentium* を経口投与し、1 時間後に盲腸内容物を回収し、菌量の測定を行った。Laz 投与群では非投与群と比較して有意な菌量増加を認めた。Laz 投与により、盲腸に到達する *C. rodentium* の菌量増加がもたらされることが確認された。

盲腸に到達する *C. rodentium* の菌量増加の要因として、Laz 投与による殺菌効果の低下、腸内環境変化を介したコロナイゼーションレジスタンスの変化を考えた。前者を検討するために、マウスに、Laz を連日腹腔内投与し、8 日目に胃、近位小腸（十二指腸から空腸）、遠位小腸（回腸）、盲腸の pH 値を測定した。胃 pH は、Laz 投与群では非投与群に比べ有意な上昇を認めた。その他の部位の pH については、両群間で明らかな差を認めず、Laz が腸内の pH に与える影響は乏しいと考えられた。後者を評価する目的で、マウスに Laz の連日腹腔内投与を行い、15 日目に回腸内容物と糞便を回収し、腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子解析を行った。Laz 非投与群では、回腸では Firmicutes 門に属する菌種が優勢であり、糞便では Bacteroidale が優勢であった。一方、Laz 投与群では、回腸内容物で Bacteroides 門の増加、Firmicutes 門の減少を認め、糞便細菌叢の組成と近い腸内細菌叢の構成が認められた。マウスは食糞の習性があるため、経口摂取された細菌が胃酸分泌抑制により殺菌されず腸管に到達したためと考えられた。メタボローム解析を行ったところ、回腸内容物では、Laz 投与群では非投与群と比較してプロピオン酸、酪酸濃度の有意な低下を認めた。糞便では両群間で明らかな濃度差を認めなかったため、腸内細菌叢、代謝産物の観点から

はLaz投与に伴う腸内環境変化は主として小腸に起こると考えられた。

プロピオン酸、酪酸は、腸内細菌の発酵に伴って生成される短鎖脂肪酸であり、制御性T細胞の分化誘導に関与することが知られている。Laz連日腹腔内投与の後、腸間膜リンパ節を採取し、CD3CD4陽性T細胞における制御性T細胞、Th1細胞、Th17細胞の頻度をフローサイトメトリーで評価したが、両群で差を認めなかった。また、回腸組織の遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析したが、抗微生物ペプチド、その他の腸管免疫にかかわる因子、オフターゲット遺伝子等の発現に大きな変化は認めなかった。大腸の粘膜固有層細胞にも、明らかな免疫担当細胞の分布変化は認めなかった。

【結論】

マウスモデルを用いた本研究で、Laz 投与は胃酸分泌抑制を介し、腸管病原菌に対する感受性を増強させることが明らかとし、またLaz投与は小腸の腸内細菌叢変化、代謝産物変化をもたらすことを確認した。しかしながら免疫学的修飾やコロナイゼーションレジスタンスの変化に対する影響は確認されず、さらなる検討が必要であると考えられる。

現代において胃酸分泌抑制剤は高頻度に処方される。一方で、腸管感染症は、特に老人、乳幼児などに於いては、時に致死的となりうる病態であり、胃酸分泌抑制剤の適正な使用が必要である。

本研究は、腸管感染症における胃酸分泌抑制剤の役割を研究したものであるが、従来明らかでなかった、胃酸分泌抑制剤の腸管病原菌に対する感受性増強、小腸の腸内細菌叢および代謝物変化に対する影響について重要な知見を得たものとして価値ある集積である。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。