

琉球大学学術リポジトリ

[原著] 生菌製剤の効果と作用機序に関する研究

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): C. difficile, probiotics 作成者: 友利, 健彦, Tomori, Takehiko メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016015

生菌製剤の効果と作用機序に関する研究

友 利 健 彦

琉球大学医学部外科学第一講座
(1994年4月4日受付、1994年6月21日受理)

Studies on Probiotics: Evidence and Mechanism of Its Efficacy

Takehiko Tomori

First Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

ABSTRACT

The efficacy of probiotics (prophylactic use of microorganisms to prevent diseases) which has been empirically used for many decades, was determined by examining the antimicrobial associated proliferation of *Clostridium difficile* in the intestine and the mechanism of inhibition was studied. Probiotics (*C. butyricum* spore) was administered to the 56 cases out of 109 patients who were on antibiotics therapy. The detection rates of *C. difficile* in the stool samples (2 specimens from one patient) after antimicrobial therapy were 27.4% (29 specimens out of 106) in the 53 non-probiotics-administered group, and 15.2% (17/112) in the 56 probiotics-administered group ($p < 0.03$). The detection rate of D-1 antigen were 28.3% (30/106), and 17.0% (19/112) ($P < 0.05$), respectively. Log values of the geometric means of the detected *C. difficile* count per gram of stool were 5.94 ± 1.32 in the probiotics-administered group and 6.97 ± 1.11 non-probiotics-administered group ($p < 0.02$). When *C. difficile* and *C. butyricum* were mixed and cultured in GAM broth, the growth of *C. difficile* was inhibited after 9 hours of incubation. As the pH tended towards lower values, the growth also increased. This phenomenon was not seen in a pure culture of *C. difficile* in GAM broth when pH was lowered by the addition of HCl in contrast to the effect with butyric acid. The increase of antibody-titer was enhanced when mice were immunized with *C. difficile* together with *C. butyricum*. These results suggested that *C. butyricum* inhibit the proliferation of *C. difficile* by means of some cellular product and by stimulating the host defence mechanism. *Ryukyu Med. J.*, 14(3)187~195, 1994

Key words : *C. difficile*, *C. butyricum*, probiotics

緒 言

*Clostridium difficile*は抗菌薬関連性下痢症や偽膜性大腸炎の原因菌として1970年代の後半頃から注目され

てきた¹⁻³⁾。この疾患に対しては、第一に抗菌薬使用の中止を原則とするが、原疾患の性質によっては抗菌薬投与の中止が困難な例も少なくない。その様な場合、通常バンコマイシンを併用するが、併用を止めると再

発することが多い⁴⁹⁾。そのため、抗菌薬の投与を受ける患者に対する偽膜性大腸炎の発症予防や*C. difficile*の増殖を阻止する新たな方法が必要とされている。

近年、抗菌薬使用に関わる諸問題が多発していることもあり、生菌剤に対する関心が医学領域のみならず畜産、養魚関係者においても高まっている。我が国において生菌剤は既に50年以上の間経験的に使われており、また市販品としても20種類を上回る製品が出回っている。しかし、生菌剤の効果や作用機序に関する科学的な証拠は実に乏しいものである。

今回、著者は*Clostridium butyricum*の芽胞を主成分とする生菌剤を用い、*C. difficile*に対する抑制効果とその作用機序を検討した。

材料と方法

I. 臨床材料の検討

A. 対象症例

琉球大学附属病院及びその関連病院に入院し、特に消化器疾患がなく抗菌薬を1週間以上投与された患者を対象とした。このうち抗菌薬投与開始前に便から*C. difficile*を検出した症例は除外した。

B. 生菌剤の投与

生菌剤としては*C. butyricum* M588の芽胞を成分とする散剤(1g中に芽胞約109個を含む、製剤名ミヤBM)を使用した。1症例おきの投与を原則とし、抗菌薬療法開始と同時に1日3gを14日間連続で投与した。

C. 検体採取

便検体は抗菌薬開始前、投与後1週間目、2週間目の計3回採取した。

D. 分離・培養と菌数測定

便検体は10倍に段階希釈し、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 希釈液をそれぞれ0.05mlづつを以下の寒天平板3分画に接種し、37°C、2~3日間嫌気状態のもとで培養後*C. difficile*及び*C. butyricum*の菌数を測定した。芽胞数は検体をエタノール処理した後のコロニー形成数によって求めた⁷⁾。

*C. difficile*検出用として変法cycloserine-cefoxitin-fructose(以下CCFA)培地を用いた⁸⁾。*C. butyricum*検出用としては5%馬血液添加BL寒天培地(日水製薬)を基礎培地とし、培地1000ml当りノボオシナトリウム(Sigma)5mg、プロピオン酸ナトリウム(和光純薬)20g、フ化ナトリウム(和光純薬)200mgを添加した⁹⁾。

検体の取扱いは嫌気性グローブボックス(株式会社ヒラサワANX-1)と混合ガス($N_2:H_2:CO_2=80:10:10$)を使用し、嫌気環境下で行った。

E. 菌の確認同定

*C. difficile*の同定はコロニーの形態、その独特の臭

気により鑑別、釣菌し、グラム染色を行った。更にbrain heart infusion(以下BHI) brothで培養を行い、その上清でCDチェックD1(三菱化成)のラテックス凝集反応が陽性のものをRAP ID ANA II anaerobic identification system(Innovative Diagnostic Systems, Inc., Atlanta, Ga)にて同定を行った。

C. butyricum M588の同定はコロニー形態、グラム染色とこの菌株に特異的なKM1 phageに対する感受性により同定した¹⁰⁾。

II. 実験的検討

A. 液体培地における混合培養

液体培地で*C. difficile*と*C. butyricum*の混合培養を行った時の菌数、及びtoxin A・Bの産生量を*C. difficile*単独培養時と比較検討した。

1. 菌数による効果判定

GAM, BHI brothにおいて*C. difficile*, *C. butyricum*の混合培養を行い、単独培養時の増殖曲線との比較を3時間毎の菌数計算にて効果判定を行った。

接種菌は栄養型のものを用い、接種菌量は培養開始時点で 10^4 - 10^5 CFU/mlとなるように調整した。

2. 毒素産生量による効果判定

BHI brothにおける*Clostridium difficile* toxin A(以下CDTA), toxin B(以下CDTB)産生量の単独・混合培養による差をenzyme-linked immunosorbant assay(以下ELISA), 培養細胞変性効果(以下CPE)により比較した。

ELISA法はPayneらの変法を用いた¹¹⁾。培養上清を濾過滅菌し、その100 μ lをELISA plate(Dynatech)の各wellに入れ、4°C、一晩で固相化を行った。0.02% Tween 20含有PBS(以下PBS-T)にて5分、3回洗浄後、抗CDTA抗体(ウサギ、細菌学教室より分与されたもの)を1次抗体、ペロキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(ヤギ、Sigma)を2次抗体とし、基質として2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)を用い発色後、microplate reader(MPR A4i, Tosoh)を用いて波長415nmにおける吸光度にてCDTAの産生量を比較した。

CPEはEdelsteinらの変法を用いた¹²⁾。培養細胞はVero細胞を用い、培養液はRPMI 1630(10% fetal calf serum, SM10万U/l, PC100mg/l添加)を使用した。Vero細胞を 1.5×10^5 個/mlに調整した細胞浮遊液180 μ lを細胞培養用96穴平底マイクロプレート(Becton Dickinson)の各wellに加え、CO₂ incubator(株式会社ヒラサワCPD-170)にて37°C、1-2日間培養し細胞がwellに単層となるようにした。その後ELISAで使用した検体をPBSで倍数希釈を行い、その希釈系列各20 μ lをそれぞれのwellに加え、24時間後のCPEを判定し、

細胞変性を示す最大希釈濃度を求めた。なお、CPE陽性の判定は細胞変性効果がwellの100%に起こっているものとした。

B. 固定培地上における菌の発育

寒天培地を用いた実験ではmGAM agar、0.1% sodium taurocholate添加mGAM (以下t-mGAM) agar、0.1% sodium taurocholate添加GAM (以下t-GAM) agar、BL agar、0.1% sodium taurocholate添加BL agar (以下t-BL)、0.1% sodium taurocholate添加 cycloserine-cefoxitin-fructose agar (以下tCCFA)、BHI agarの7種類を用いた。寒天上に*C. difficile* 8.0×10^7 CFU/mlの菌液0.1 mlを接種し、コンラージ棒にて塗り広げ、その中心部に*C. butyricum* 1.0×10^8 CFU/mlを0.05mlを滴下し、嫌気状態にて37°C、24時間の培養後、*C. butyricum*の菌苔周囲において*C. difficile*の発育が抑制されているか否かを観察した。

C. 感染実験

1. 感染モデルの作成

実験動物としては体重120g前後のゴールデンハムスターを使用した。エーテル麻酔下で胃ゾンデを用いてCefatrizine 9mgと*C. difficile* 芽胞 10^8 個を1 mlの浮遊液として投与した。今回は20匹のハムスターを使用し、10匹には 10^8 個の*C. butyricum*芽胞を、他の10匹には生理食塩水をそれぞれ1 ml投与した。

2. 検査内容と方法

腸内容物中の*C. difficile*菌数及び抗菌・抗毒素抗体を測定した。ハムスターが発症し、死亡する直前に屠殺して、全腸管内容物を3 mlの生理食塩水で洗い出したものを検体とした。生き残ったものは接種後120時間目に屠殺して検体を作成した。菌数は検体の10倍希釈系列を作り上述の方法によって算定した。抗体はELISA法によって測定した。ELISAの固相は*C. difficile*死菌液(McFarland No. 3)および精製CDTA(細菌学教室より分与) $1 \mu\text{g/ml}$ を用いて作成した。感作したELISA plate (Dynatech) 各wellに検体の遠心上清($0.45 \mu\text{ミリア}$ 濾過) $100 \mu\text{l}$ を加えて反応させた後、1次抗体として抗ハムスター全血清抗体(ウサギ、Sigma)、2次抗体はペロキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(ヤギ、Sigma)を用いて反応を行い、波長415nmでの吸光度の平均値にて比較を行った。

D. 生菌剤の免疫刺激実験

*C. butyricum*による*C. difficile*に対する免疫応答の増強効果を調べるためmouse (Balb/c, 8w, ♂) 各群10匹づつの腹腔内に*C. difficile*、*C. butyricum*の死菌を 10^8 CFU単独または混合で総量1 mlとなるよう生理食塩水にて浮遊させ投与し、0, 10, 20, 30日目の血清抗体価をELISA法で測定した。なお対照群として生理食塩水1 mlをマウス腹腔内に投与した。

ELISA法は*C. difficile*、*C. butyricum*の死菌液の濁度をMcFarland No. 3に調整した液にて固相化を行った。各血清と反応後、一次抗体として抗マウスIgM抗体(ウサギ、Sigma)を用い、前述の方法にて波長415nmでの吸光度の平均値を求め、投与前の吸光度を1とした時の比率にて抗体価の上昇を比較・検討した。

結 果

I. 症例内容

便検体採取後、臨床データを病歴より収集した。患者数は213例で、その内最初の便検体で*C. difficile*が陽性であった例(14/213, 6.6%)、便検体の採取が不完全例、薬剤投与の不完全例の計104例を除いた109例を対象とした。その内53例が対照群(Group 1)、56例が生菌剤投与群(Group 2)となった。年齢分布は全体で11歳から95歳(mean \pm SD = 59.5 ± 17.8)、Group 1は11歳から89歳(57.1 ± 18.1)、Group 2は17歳から95歳(61.8 ± 17.4)であった。男女比は全体で40/69、Group 1で16/37、Group 2で24/32であった。

基礎疾患は手術施行例では耳鼻咽喉科疾患が26例で最も多く、手術非施行例では感染症が20例で最も多かった(Table 1)。抗菌薬療法については主治医に特に指定していなかったため種々様々で、治療方法は32種類であった(Table 2)。

II. 症例における効果判定

抗菌薬投与開始後の対照群・投与群各々の延べ検体数106・112件における*C. difficile*の検出率はそれぞれ27.4% (29/106)、15.2% (17/112)と投与群で低く、2群の差の有意水準は $p < 0.03$ であった(Fig. 1)。

またD-1抗原陽性率は抗菌薬投与開始前に対照群・投与群でそれぞれ8.9%、9.4%であった。投与開始後ではそれぞれ28.3% (30/106)、17.0% (19/112)で投与群において低かった。2群の差の有意水準は $p < 0.05$ であった(Fig. 1)。

*C. difficile*陽性検体における便1g中の菌数は幾何平均の対数値で投与群・非投与群それぞれ 5.94 ± 1.32 、 6.97 ± 1.11 で投与群の方が低く、両平均値の差の有意水準はT検定にて $p < 0.02$ であった(Fig. 2)。

III. In vitroにおける病原菌の抑制

A. *C. difficile*の増殖抑制

GAM brothで*C. difficile*と*C. butyricum*を混合培養した場合、*C. butyricum*は単独培養と同様な増殖曲線を示したが、*C. difficile*は9時間目以降菌数の減少が認められた(Fig. 3)。BHI brothにおける混合培養では*C. difficile*の増殖曲線は単独培養時と同様であった。

Table 1 Patient characteristics

	probiotics		total
	+	-	
Operation			
cholecystolithiasis	2	2	4
appendicitis		1	1
breast tumor	7	3	10
thyroid disease	2	5	7
ovarian tumor		1	1
orthopedical disease	11	5	16
tympanoplastics	6	20	26
others	4	1	5
Non-operation			
respiratory disease	20	11	31
liver cirrhosis		1	1
heart failure		1	1
cerebral apoplexy		1	1
Unknown	4	1	5

混合培養を行った時の9時間目以降の培地pHはBHIbrothでは6.0前後であったのに対し、GAM brothでは5.5-5.1であった(Fig. 4)。この抑制効果が単にpHの低下に基くものであるのか、*C. butyricum*が産生する特定の物質によるものであるのかを調べるため次の実験を行った。*C. butyricum*の主要代謝産物である酪酸によりGAM brothのpHを6.0、5.0に調整し、*C. difficile*の増殖曲線の変化を観察した(Fig. 5a)。pH 6.0では変化が認められなかったが、5.0では菌の増殖が認められず、特に9時間以降菌数が減少する傾向が認められた。しかし培地を塩酸にてpH 5.0に調整すると菌数はpH6.0の場合とほぼ同様に増殖した(Fig. 5b)。

寒天培地に*C. difficile*を塗り広げ、その中央に*C. butyricum*液をスポットすると培地の種類により阻止円形成に差が認められ、t-mGAM agarで最もよく観察された(Fig. 6)。mGAM agar、t-GAM agar、BL agar、t-BL agarにおいても阻止円の形成が認められたが、tCCFA agar、BHI agarでは認められなかった。また*C. butyricum*の培養上清を滴下した場合にはこの様な発育阻止作用は認められなかった。中心に*C. difficile*を接種した場合、何れの培地にても阻止円は認められなかった。

Table 2 Antibiotics used in the experiment

antibiotics	probiotics	
	+	-
ABPC	1	0
AZT	3	1
AZT+CCL	0	3
AZT+OFLX	0	3
CDZM	1	1
CDZM+AMPC	1	3
CDZM+CPDX-PR	3	2
CPZ	3	1
CPZ+FMOX	1	0
CTM+CDZM+CPDX-PR	0	2
CTM+CTM(P. O)	1	0
CTM+CPDX-PR	2	2
CTM+LFLX	0	1
CZON	4	0
CZON+AMK	3	0
FMOX	5	7
FMOX+AZT	1	0
FMOX+CCL	1	0
FMOX+CLDM+CZON	1	0
FMOX+LFLX+PIPC	1	0
FMOX+PIPC+CTM	1	0
FMOX+PIPC+TOB	1	1
FMOX+OFLX	8	4
LMOX+AMK	8	16
LMOX+CCL	0	1
LMOX+CDZM	0	1
LMOX+CMZ	2	0
OFLX	1	0
OFLX+LFLX	0	1
PIPC	1	1
PIPC+FMOX	1	0
SCE 2787	1	2

ABPC: ampicillin, AMK: amikacin sulfate, AMPC: amoxicillin, AZT: aztreonam, CCL: cefaclor, CDZM: cefodizime sodium, CLDM: clindamycin, CMZ: cefmetazole sodium, CPDX-PR: cefpodoxime prozetil, CPZ: cefoperazon sodium, CTM: cefotiam dihydrochloride, CZON: cefuzonam sodium, FMOX: flomoxef sodium, LFLX: lomefloxacin, LMOX: latamoxef sodium, OFLX: ofloxacin, PIPC: piperacillin sodium, SCE 2787: new drug(cefem), TOB: tobramycin

B. *C. difficile*の毒素産生に対する影響

BHI brothにおける単独・混合培養ではtoxin Aの産生量に差は認められなかったが、toxin Bにおいては単独培養の方が培養開始後24時間で産生量が多く、そ

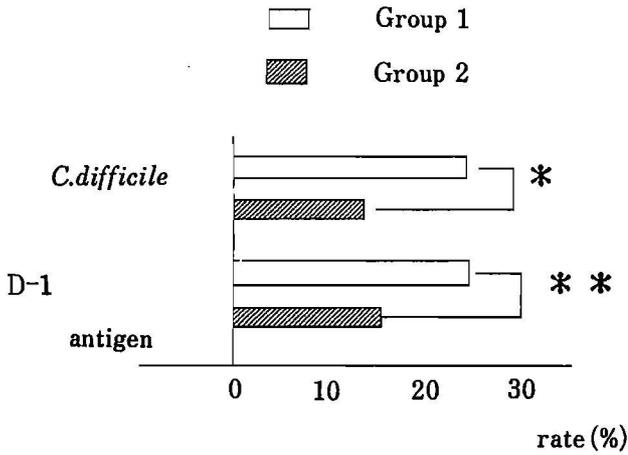


Fig. 1 Detection rate of *C. difficile* and D-1 antigen in the stools. Group 1: patients without probiotics. Group 2: patients with probiotics. *: $p < 0.03$ **: $p < 0.05$

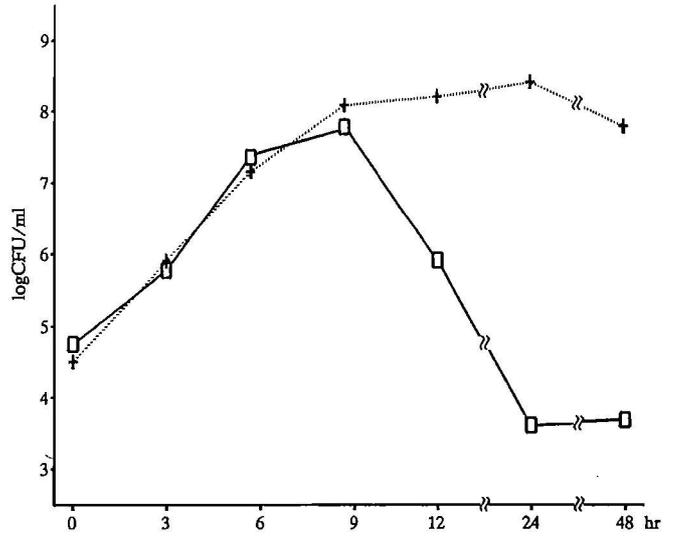


Fig. 3 Growth curves of *C. difficile* in mixed culture with *C. butyricum*. □: BHI broth +; +: GAM broth

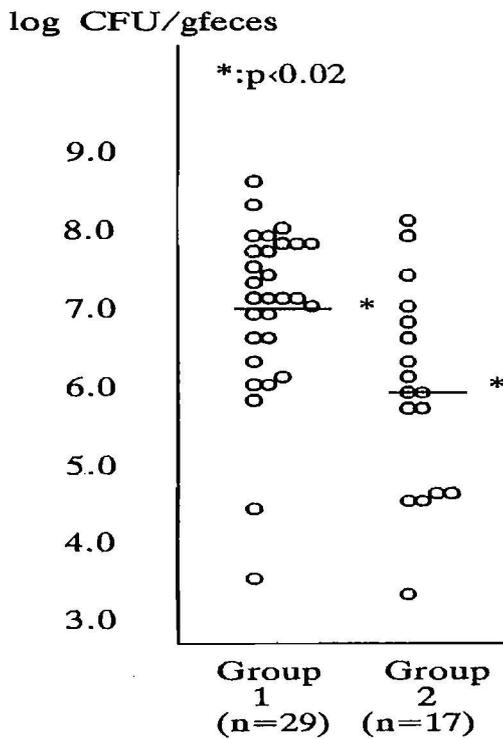


Fig. 2 Number of *C. difficile* organism per gram of stool. The log of geometric mean (bar) SD is 6.97 ± 1.11 in Group 1 and 5.94 ± 1.32 in Group 2. *: $p < 0.02$ by T-test

の後は産生量に差が認められなくなった (Table 3)。

IV. 感染モデルにおける効果判定

ハムスターを用いた感染実験における死亡率は生菌

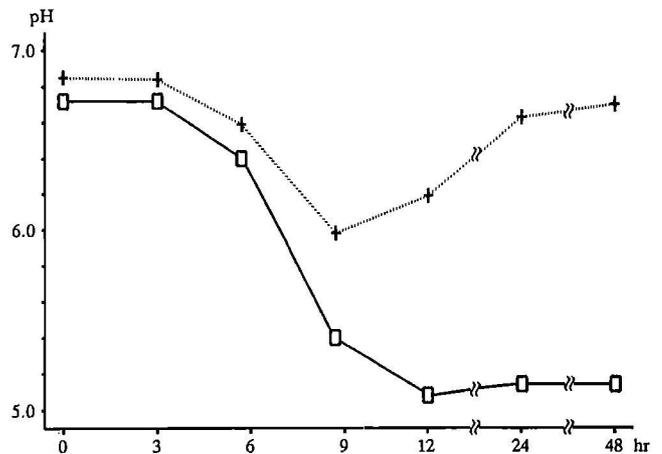


Fig. 4 Changes of pH during mixed culture shown in Fig. 3. □: BHI broth +; +: GAM broth

剤投与・非投与群でそれぞれ8/10 (80%), 9/10 (90%)であった。死亡したハムスターの平均生存時間は投与・非投与群でそれぞれ61.8、55.2時間であった。腸内容物の *C. difficile* の菌数は投与・対照群でそれぞれ6.89、7.75 log CFU/mlであった ($p < 0.4$)。また腸内容物の抗体は抗 *C. difficile* 抗体、抗CDTA抗体ともに投与・対照群に差が認められなかった (Table 4)。

V. 免疫刺激効果

C. butyricum, *C. difficile* 単独投与により抗 *C. difficile* 抗体価の上昇は認められなかったが、*C. butyricum* を同時に投与した場合、抗 *C. difficile* 抗体価の上昇が

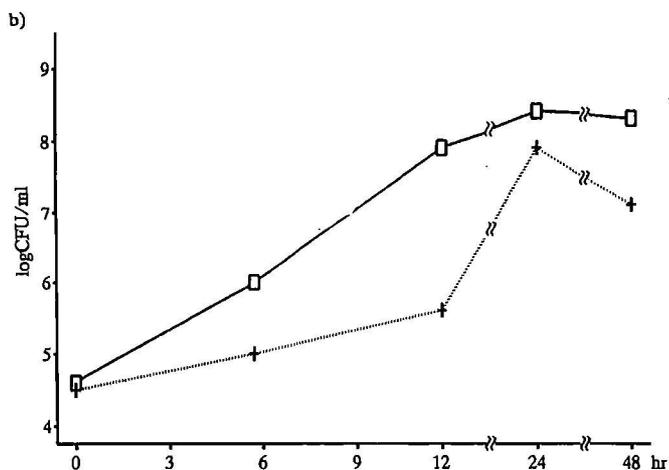
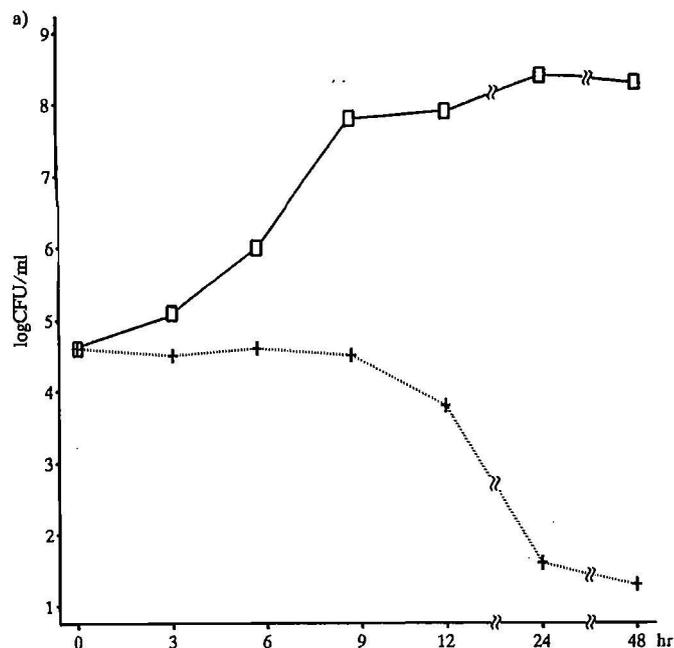


Fig. 5 Growth curves of *C. difficile* in GAM broth with a) butyric acid and b) hydrochloric acid at pH 5.0 and 6.0. □ : pH 6.0 + : pH 5.0

認められた (Fig. 7)。

考 察

今回、抗菌薬投与前の *C. difficile* 検出率は 6.6% であった。日本人の保菌率は欧米に比べて高いと言われており、本邦における健康成人糞便中の検出率の報告によると 0-16% であり、また欧米においては 0-3% であるとの報告が多く、今回もほぼ従来の報告と同様の結果が認められた¹³⁻¹⁷⁾。

抗菌薬は統一することができず、グループマッチングにおいて問題を残している。しかし、黒岩らの報告

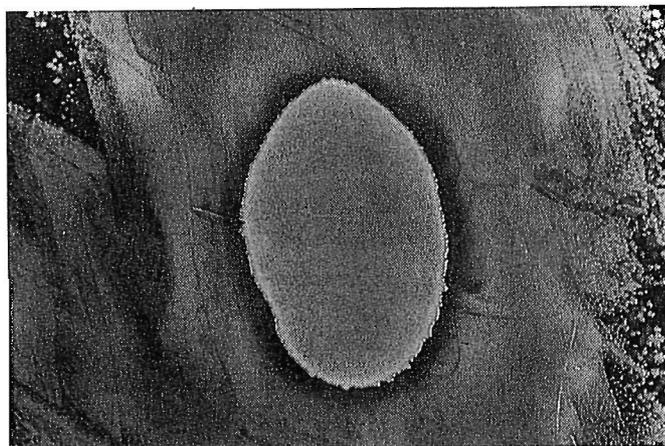


Fig. 6 Inhibition of *C. difficile* by *C. butyricum* (spot) on agar plate using modified GAM medium supplemented 0.1% sodium taurocholate.

と同様、抗菌薬を投与された患者の *C. difficile* の検出率が生菌剤投与群において対照群より低くなることが確認された⁹⁾。更に D-1 抗原陽性率や *C. difficile* の菌数が生菌剤投与群で有意に低いことから、*C. butyricum* M588 は生菌剤として抗菌薬投与時の腸管内における *C. difficile* の増殖を抑制する効果があると考えられる。

以上のような抑制効果の作用機序として ① *C. difficile* の発芽・増殖の抑制 ② *C. difficile* の毒素産生の抑制 ③ *C. difficile* またはその毒素の腸上皮に対する結合の抑制等が考えられ、それが *C. butyricum* の直接作用によるものであるのか、または宿主を介しての BRM (biological response modifier) 的な作用によるのかを検討する必要がある。

C. difficile の発芽・増殖の抑制に関して、液体培地を用いた実験では GAM broth で *C. butyricum*, *C. difficile* を混合培養すると培地の pH が低下するとともに *C. difficile* の抑制が認められることが判明した。更にこの培地 pH の減少による増殖抑制現象は、培地の pH を無機酸である塩酸で調整すると認められず、揮発性脂肪酸で *C. butyricum* の主要代謝産物である酪酸で調整することにより認められることが示された。このことは Rolfe が *in vitro* において揮発性脂肪酸 (酪酸を含む) は *C. difficile* の増殖を抑制するという報告と一致する¹⁸⁾。また今回の検討においては増殖型細胞について調べたが芽胞型については川崎が培地の pH により *C. difficile* の芽胞の発芽が遅延し、pH 5.72 以下では発芽が認められなかったと報告している¹⁹⁾。更にこの現象は酪酸により培地の pH を調節した時も認められたと述べている。これらのことより *C. butyricum* の代謝産物である酪酸が *C. difficile* の増殖型のみでなく芽胞の発芽を阻止し、*C. difficile* の増殖抑制に重要な役割を果た

Table 3 Production of toxins

Culture (hr)	ELISA (OD ₄₁₅) ⁺					CPE ⁺⁺				
	0	12	24	48	90	0	12	24	48	90
Single*	.003	.002	.054	.045	.038	0	0	128	128	128
Mix**	.006	.008	.039	.032	.021	0	4	16	128	128

⁺: optical density at 415 nm. ⁺⁺: reciprocals of maximum dilution with CPE. *: single culture of *C. difficile* in BHI broth. **: mixed culture of *C. difficile* and *C. butyricum* in BHI broth.

していることが示唆された。

*C. difficile*の毒素産生の抑制についてはtoxin Aでは認められなかったがtoxin Bでは混合培養に於て24時間までは産生量の減少が認められた。このことは*C. butyricum*が存在することにより*C. difficile* toxin Bの産生が短期間であるが抑制されることを示しており、*C. difficile*関連性疾患の発症抑制に関与している可能性が示唆された。

生体を介しての作用はgolden hamsterによる今回の実験では認められなかった。しかし、*C. butyricum*を投与してもハムスターの死亡率や生存時間に影響を及ぼさなかった事は生菌剤の投与を1回にしたこと(人では2週間毎日投与した)及び人における作用機序がハムスターにおいて発現していない可能性もある。マウスを用いた実験では*C. butyricum*による抗*C. difficile*抗体産生の促進が認められた。このことは生体内において*C. butyricum*と*C. difficile*が同時に存在する時*C. difficile*に対する抗体産生が刺激される事を示唆している。

生菌剤としての*C. butyricum*に関する臨床的検討は以前も行われており、また基礎的検討も僅かではあるが認められる^{9,20-22)}。今回の研究でもそれらと同様な結果が認められた。大腸ファイバー検査例に*C. butyricum*を検査前1週間投与し、検査施行時に盲腸内容の吸引検体より*C. butyricum*の検出を行ったところ、検体5例中1例のみでしか発芽は認められず、しかもその菌数は10⁵ CFU/mlレベルであった(未発表データ)。このように投与した*C. butyricum*の腸管内における増殖が顕著でないことから*C. butyricum*の抑制機序は菌同士の相互作用のみでは考え難く、マウスの実験でみられたアジュバント効果のように腸管では局所免疫の刺激など生体を介した作用の方が考えやすい。

以上より*C. butyricum*の*C. difficile*に対する抑制機序は単一のものではなく、宿主の免疫系を介した作用と、

Table 4 Experimental infection in Hamsters¹

	probiotics	
	+	-
No. of animals examined	10	10
No. of animals died	8	9
Hours from inoculation to death	61.8±19.2 (n=8)	55.2±9.5 (n=9)
Antibody titer in the intestinal contents		
Anti- <i>C. difficile</i>	0.071±0.047 (n=8)	0.068±0.029 (n=9)
Anti-CDTA Ab	1.053±0.564 (n=8)	1.193±0.213 (n=9)

¹The results are means±SD.

*C. butyricum*自体が産生する酪酸による作用の2つが関与していると考えられた。

生菌剤を含む薬剤の有効性は詳細な臨床観察を伴った多数の症例検討によって判定されるが、単一物質の化学薬品とは異なる生菌性整腸剤に関する有効性のメカニズムを解明することは極めて難しい問題である。一般的には乱れた腸内細菌叢を正常化することが効果のメカニズムであるかのようにいわれてきたが、正常な腸内細菌叢とは何であるかさえ曖昧であり、またどの様なメカニズムで正常にするのかと言うことは全く論じられてこなかった。今回著者は目標を腸管病原菌*C. difficile*一つに絞ってその動向を追求した。その結果、*C. difficile*は同属の*C. butyricum*によって抑制されるという事実を示すことができた。これはある種の症状を予防または改善する作用機序の一つといえる。

臨床医学ではこれで一つの結論となるが、医学細菌

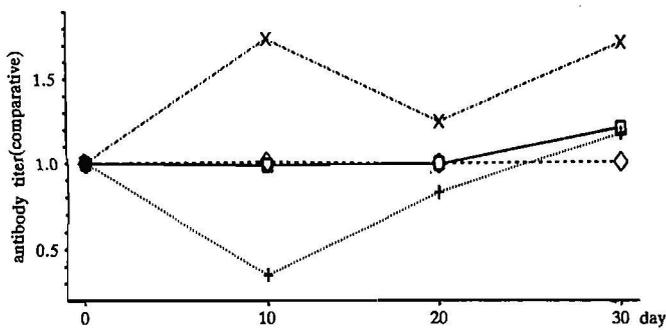


Fig. 7 Anti-*C. difficile* antibody titer in mice after one dose immunization. □ : physiological saline ◇ : *C. difficile* + : *C. butyricum* × : *C. butyricum* + *C. difficile*

学的にはどのようにして抑制するかという機序の解明が必要である。この点についても種々の示唆に富むデータを示したが、抗菌薬の最小発育阻止濃度(MIC)などのようにclear cutな結果にはならないのは当然かもしれない。

MRSAの出現により院内感染は現在更に大きな問題となっている。MRSA、緑膿菌と共に*C. difficile*は院内感染の起因菌として大きな注目を集めており、また抗菌薬投与によるMRSA腸炎に*C. difficile*が同時に検出される場合に重症となるという興味深い事実も報告されている^{23,24}。院内感染の起因菌はいずれも多剤耐性であり、抗菌薬による治療法には限界がある。そのため、今後生菌剤による治療がますます期待されると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導および御校閲を賜りました琉球大学医学部細菌学教室岩永正明教授に深甚なる謝意を表します。また実験等に快く協力して頂いた黒岩豊秋先生、比嘉直美先生、和気 稔先生をはじめとする教室の諸先生方に感謝致します。

本論文の要旨は第67回日本感染症学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Larson, H. E., Price, A. B., Honour, P., and Borriello, S. P.: *Clostridium difficile* and the etiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*. 1: 1063-1066, 1978.
- 2) Bartlett, J. G., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L., and Onderdonk, A. B.: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.* 298: 531-534, 1978.
- 3) George, R. H., Symonds, J. M., Dimock, F., Brown, J. D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M. R. B., Alexander-Williams, J., and Burdon, D. W.: Identification of *Clostridium* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.*, 1: 695, 1978.
- 4) Finch, R. G., Thomas, H. J. M., Lewis, M. J., Slack, R. C. B., and Gorge, R. H.: Relapse of pseudomembranous colitis after vancomycin therapy. *Lancet*. 2: 1076-1077, 1979.
- 5) Bartlett, J. G., Tedesco, F. J., Shull, S., Lowe, B., and Chang, T.: Symptomatic relapse after oral vancomycin therapy of antibiotics-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterol.* 78: 431-434, 1980.
- 6) Walters, B. A., Roberts, R., Stafford, R., and Seneviratne, E.: Relapse of antibiotic associated colitis: endogenous persistence of *Clostridium difficile* during vancomycin therapy. *Gut*. 24: 206-212, 1983.
- 7) Koransky, J. R., Allen, S. D., and Dowell, V. R. Jr.: Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 762-765, 1978.
- 8) 上野一恵, 渡辺邦友, 小林とよ子: 偽膜性腸炎と *Clostridium difficile*, *モダンメディア*, 25: 798-810, 1979.
- 9) 黒岩豊秋, 岩永正明, 小張一峰, 東恩納厚, 金城福則, 齊藤 厚: 抗菌剤投与後の *Clostridium difficile* 検出に対する生菌性整腸剤の併用について, *日感染症誌* 64: 1425-1432, 1990.
- 10) Maeda, A., Isii, K., Tanaka, M., Mikami, Y., and Arai, T.: KMI, a bacteriophage of *Clostridium butyricum*. *J. Gen. microbiol.* 132: 2271-2275, 1986.
- 11) Payne, D., Moore, N., and Lambert, P.: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure the expression of the K88 fimbrial antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *J. Immunol. Meth.* 159: 283-289, 1993.
- 12) Edelstein, M. A. C.: Isolation and identification of *Clostridium difficile*; Tissue culture cytotoxicity assay, in *Clostridium difficile*: Its role in intestinal disease. (Rolfe, R. D. and Finegold, S. M., ed) pp367-379, Academic press, California, 1988.

- 13) 上野一恵, 小林とよ子, 渡辺邦友: 薬剤性腸炎—細菌学的立場から, 臨床成人病 14: 1039-1049, 1984.
- 14) 国井乙彦, 斧 康雄: 抗生物質起因性大腸炎の疫学, 臨床消化器内科 1: 935-944, 1986.
- 15) 小林とよ子: 抗菌剤投与と *Clostridium difficile* による下痢症に関する研究, Jpn J. Antibiotics, 36: 464-476, 1983.
- 16) 中村信一: クロストリディウム・ディフィシルの病原因子: 医学細菌学 5 巻, 中野昌康, 吉川昌之介, 竹田美文(編), pp55-97, 菜根出版, 東京, 1990.
- 17) George, W. L., Rolfe, R. D., and Finegold, S. M.: *Clostridium difficile* and its cytotoxin feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. J. Clin. Microbiol., 15: 1049-1053, 1982.
- 18) Rolfe, R. D.: Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *Clostridium difficile*. Infect. Immun. 45: 185-191, 1984.
- 19) 川崎賢二: *Clostridium difficile* の発育に関する基礎的検討—*C. difficile* の発芽増殖に対する pH の影響, 日感染症誌 62: 598-607, 1990.
- 20) 田口信洋, 阿部章彦, 三上 囊, 新井 正: *Clostridium butyricum* による実験的抗生物質起因性下痢症の予防, 日本細菌学雑誌 43: 829-835, 1988.
- 21) 倉田 晋, 滝 芳樹, 井上賢次, 宮川恭一: 抗生物質投与時の下痢に対する活性型酪酸菌製剤(ミヤBM) の予防効果, 小児科臨床 41: 2409-2414, 1988.
- 22) 黒岩豊秋, 小張一峰, 岩永正明: 酪酸菌 (*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588株) による腸管病原菌抑制作用, 日感染症誌 64: 257-263, 1990.
- 23) 稲松孝思, 安達桂子, 増田義重, 巨島文子, 竹島寿男, 橋本 肇: MRSA 腸炎の臨床(1) 内科の立場から, 臨床消化器内科 6: 653-661, 1991.
- 24) Johnson, S., Clabots, C. R., Linn, F. V., Olson, M. M., Peterson, L. R., Gerding, D. N.: Nosocomial *Clostridium difficile* colonization and disease. Lancet. 336: 97-100, 1990.