

氏名（本籍） 神山篤史

学位の種類 博士（医学）

学位記番号 医博第2545号

学位授与年月日 平成20年3月25日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学系研究科  
(博士課程)医科学専攻

学位論文題目 Terminal restriction fragment length polymorphism analysis demonstrates time-dependent shift to “colon-like” bacterial community in pouch flora after total proctocolectomy  
(新しい分子生物学的手法による大腸全摘術後便中細菌叢の経時的解析)

(主査)

論文審査委員 教授 佐々木巖 教授 林富

教授 賀来満夫

# 論文内容要旨

## 【背景】

現在、潰瘍性大腸炎（UC）に対する標準術式として、大腸全摘術兼回腸囊肛門吻合術が広く行われている。本術式は、人工肛門の回避と自然肛門の温存、疾患の根治を達成しうる術式であるが、術後の問題点と「大腸化」に基づく intestinal adaptation と回腸囊炎の発生があげられる。これまで当教室ではラットモデルを中心に大腸全摘術後の腸管上皮の形質変化について検討し、術後に遺伝子発現に基づく大腸形質の獲得と本来備わっていた小腸形質の喪失が生じることを示した。さらに並行して腸内細菌の存在が腸管上皮細胞の機能に直接関与することを無菌マウスを用いて明らかにしてきた。以上から、大腸全摘術後の回腸においても、新たな腸内細菌叢の構成と大腸化をはじめとする形質の変化は密接に関連することが予想される。一方、術後に発生する非特異的炎症、回腸囊炎に対し、腸内細菌を標的とする抗生物質の有効性が示されている。しかし、従来の腸内細菌の検討は培養法を用いるほかに方法が無く、その多くを占める培養困難な細菌については検討不能であった。

## 【目的】

本研究の目的は、培養不能の細菌を含め大腸全摘術後の回腸内細菌叢の経時的变化を、細菌DNAを指標として検討することである。

## 【方法】

大腸全摘術後の UC 患者 49 人から経時的に、また健常成人 31 人からそれぞれ 125 および 31 検体を採取した。前者の検体は、回腸瘻群、術後 2 年以下の回腸囊群、術後 2 年以上経過した回腸囊群に、後者の検体を対照群として 4 群に分類した。糞便から DNA を抽出し、terminal restriction fragment length polymorphism 法にて解析した。本法の概略は、蛍光標識した universal primer を用いて細菌由来の DNA を增幅し、産物を制限酵素で処理後、DNA 電気泳動パターンにより構成細菌群を予測するという手法である。さらに、DNA 断片（fragment）を大腸や回腸瘻における出現頻度により、それぞれ「大腸型」、「小腸型」、「共通型」 fragment として分類して検討を行った。

## 【結果】

相同性をもとにデンドログラムを作成したところ、大きく 4 クラスター（Cluster I, II, III, IV）に分類された。回腸瘻の多くは Cluster I, II に分類され、ほとんど全ての対照群は Cluster IV

に分類された。回腸囊は術後経過期間に従ってクラスターが分かれ、初期の回腸囊では Cluster I, II に、後期のものでは Cluster III, IV に分類された。以上より、回腸囊内細菌叢は経時に大腸で構成される細菌叢に近づくことが示された。また、回腸囊では「小腸型」fragment が経時に出現率が減少し、「大腸型」fragment は逆に増加していた。しかし、「大腸型」fragment の増加は一部の fragment に限られていた。また、いずれの fragment も培養不能の腸内細菌主体に構成され、6割は未培養の細菌 (uncultured bacteria) であった。

### 【結語】

回腸瘻、回腸囊、大腸の糞便中細菌叢は大きく異なり、上皮細胞の形質変化と同様に回腸囊における腸内細菌叢も経時に「大腸化」し、それらの変化には培養不能な未知の腸内細菌が深く関与すると考えられた。

## 審査結果の要旨

潰瘍性大腸炎に対する標準術式として大腸全摘術兼回腸囊肛門吻合術が広く行われているが、術後の問題点として「大腸化」に基づく intestinal adaptation と回腸囊炎の発生が挙げられる。これまで当教室ではラットモデルを中心に大腸全摘術後の腸管上皮の形質変化について検討し、術後に遺伝子発現に基づく大腸形質の獲得と本来備わっていた小腸形質の喪失が生じることを示してきた。さらに並行して腸内細菌の存在が腸管上皮細胞の機能に直接関与することを、無菌マウスを用いて明らかにしてきた。以上から、大腸全摘術後の回腸においても新たな腸内細菌叢の構成と大腸化をはじめとする形質の変化は密接に関連することが予想されるが、従来の腸内細菌の検討は培養法を用いるほかに方法が無く、その多くを占める培養困難な細菌については検討不能であった。

本論文では大腸全摘術後の回腸内細菌叢の経時的变化を、新しい分子生物学的手法である terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法を用いることで細菌 DNA を指標として培養困難な細菌を含めて検討した。回腸囊の糞便から DNA を抽出し、回腸囊内の腸内細菌叢の経時的变化を DNA レベルで検討した研究はこれまでになく、本論文は極めて独創的である。また、培養不能の細菌を含め相同性をもとにクラスター解析を行い、回腸囊内細菌叢は経時的变化を伴って大腸で構成される細菌叢に近づくことを証明した。つまり、回腸囊では「小腸型」細菌群が経時に出現率が減少し、「大腸型」細菌群は一部で逆に増加していた。また、いわゆる「大腸化」は一部の細菌群に限られており、その構成は培養不能の腸内細菌を主体になされていることを明示した。以上の結果より、intestinal adaptation および回腸囊炎の病態解明につながる回腸囊内の腸内細菌叢の経時的变化を分子生物学的手法で証明することに成功している。

以上のように、本論文は新規知見に富み、その論旨も論理的・科学的であり、東北大学医学博士の学位論文として値するものである。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。