

炎症性腸疾患における平滑筋の機能解析

～多価不飽和脂肪酸の影響～

文京学院大学保健医療技術学部

理学療法学科 野部 裕美（主任研究者）

理学療法学科 石田 行知（共同研究者）

作業療法学科 坂井 泰（共同研究者）

【要約】

消化管における平滑筋の役割は、食物を胃や腸において消化液と混合し、同時に押し砕くことにより、栄養分や水分を吸収しやすくし、残渣は排便へと導くことである。しかしながら、ストレスや食生活の乱れなどを原因とする腹痛や下痢などの症状は、平滑筋機能が正常に働かないことに起因し、日常生活における QOL の低下が引き起こされる。さらに、近年食物嗜好の欧米化や免疫力の低下により、クローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性大腸疾患を引き起こす患者数が増加してきている。このような炎症性腸疾患の原因は不明であり、治療法は対症療法に限られている。そのため、我々は実験的炎症性腸疾患モデル動物を作製し、炎症時の平滑筋の機能障害に着目してきた。本研究においては、機能障害の原因が神経性機能の低下によるものか、平滑筋自体に障害が起きているか、電気刺激により検討をおこなった。併せて、炎症の予防効果を期待し、多価不飽和脂肪酸が結腸平滑筋の収縮能に影響をおよぼすか検討をおこなった。

実験動物は、ウイスター系雄性ラットを用いた。多価不飽和脂肪酸としてエイコサペンタエン酸：EPA（300 mg/kg/day）を用いた。炎症処置 2～3 週間前に EPA を毎日経口投与した。結腸炎症モデル動物の作製は、結腸の内腔に起炎物質であるトリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）試薬（100 mg/kg）を注腸して作製した。実験に用いた群は、水をあらかじめ経口投与し結腸内腔に生理食塩水（0.9% NaCl）を注腸した非炎症群、TNBS 処置した炎症群、EPA をあらかじめ経口投与し TNBS 処置した EPA 群の 3 群で測定した。張力測定は、マグヌス装置を用いて、等尺性張力を測定した。平滑筋組織標本は、ラットより結腸を摘出し、粘膜層を取り除き、約 5 mm のリング標本とした。輪走筋方向の収縮を測定した。電気刺激の条件は、神経刺激として 0.5 ms、20 Hz、40 V、筋刺激として 5 ms、20 Hz、40 V、いずれも 10 秒間刺激をおこなった。

結腸平滑筋組織に神経刺激を与えると、刺激直後に起こる収縮反応（On-contraction）と刺激を停止した直後に起こる収縮反応（Off-contraction）が 3 群で認められた。Off-contraction は炎症群で非炎症群より大きな収縮反応であった。この反応は、EPA をあらかじめ経口投与していた群でも同様であった。神経刺激をおこなった反応は、ムスカリン受容体を介した収縮反応であった。炎症によりムスカリン受容体を介した収縮反応への依存性が高くなることが示唆された。また、筋刺激をおこなった反応は Off-contraction は非炎症群と比較して炎症群では有意に発生張力は小さかった。EPA 群では、この反応が回復した。

キーワード：神経刺激、筋刺激、多価不飽和脂肪酸、ムスカリン受容体、結腸平滑筋

【緒言】

消化管は、食物を消化・分解し栄養分を体内に吸収する重要働きを有する器官である。これらの働きは、複雑かつ精巧であり、消化管を構成する代表的な組織の1つである平滑筋の機能は、未だ不明な点が多い。新たに解明される事実は、健康維持に直結することが多く、関心が高まってきている。消化管には、多くの神経細胞や神経叢、筋組織や線維芽細胞、特別な細胞として腸管平滑筋組織に存在するカハール介在細胞などが存在し、腸管運動をコントロールしている(1, 2)。このような細胞や組織は、消化管の管状構造を形成し、空間的な配置をとっており効率的かつ、異なる機能をもつ細胞群がお互い協力し合い、食物を正確に安全に輸送・消化・吸収するために働いている。

また、腸管には神経系がとてもよく発達している。この腸神経系は、脳から独立したかたちで腸管機能を制御している。これにより、蠕動運動が起こり、中枢とは完全に独立した動きを担っていることから、腸は「第二の脳」と言われている。このように、腸管は独自の機能を有し、細胞内に腸管特有の作用をもたらすタンパク質を有すると考えられる。

腸管のもう一つの特徴として、免疫系が発達していることが挙げられる。つまり、体内に入ってくる異物(ウイルスや細菌など)を排除する防御システムが発達している。身体の内側に存在する腸管であるが、絶えず外部からの危険にさらされ外界と接していると考えられている。このことから、腸内細菌や好中球、マクロファージ(3, 4)などの免疫細胞が多く存在する。これらの腸内細菌のバランスが腸管の機能に影響を与えると考えられる。

このような腸内細菌のバランスの乱れは、腸が過敏となり疾患に結びついてくる。また、ストレスや軽い腸炎により病気を引き起こし、過敏性腸症候群はその代表的な疾患である。下痢、便秘、腹痛をはじめ、全身にさまざまな症状が起こる。同様にクローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性大腸疾患でも、大腸、小腸の粘膜に慢性の炎症・潰瘍を引き起こし(5, 6)、これにより十分な栄養が取れず食事制限が強いられ長期間の薬物療法が必要となる。この中でも、現代社会におけるストレスは腸管機能に密接に関係し、日常生活におけるQOLに多大なる影響を及ぼす。ストレスを受けることで、腸管運動が亢進したり抑制したりするため、下痢や便秘が起こる。これらの現象は、神経と深く関係し、自律神経失調症の症状や吐き気、消化器の不調が起こる。このように過敏性腸症候群は、QOLを低下させる深刻な疾患である。明確な原因は不明であり、難治性疾患となっている。現時点での治療法は、対症療法である。

日本におけるクローン病の疫学的な研究では、多価不飽和脂肪酸の摂取が炎症抑制と関係しているとの報告がある(7)。本研究では、多価不飽和脂肪酸であるn-3系脂肪酸のエICOSAペンタエン酸エチル(EPA)とn-6系脂肪酸のリノール酸(LA)(今回の研究報告ではLAの結果は除く)を毎日経口摂取することにより、腸管の機能に影響を与えるのではないかと考えた。EPAは、生体内物質であるプロスタグランジンやトロンボキサン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドの前駆体であるn-3系多価不飽和脂肪酸の一つである。

生体内では合成できない脂肪酸であり、魚油に多く含まれ、肉の油に含まれている飽和脂肪酸とは異なり、中性脂肪を減少させ動脈硬化を改善する効果が報告されている (8)。マウスを用いた研究では、高酸素投与の異常な血管新生を抑制したり、インスリン抵抗の抑制や耐糖能を改善したりするとの報告がある (9, 10)。

これまでの我々の報告において、結腸平滑筋における CCh 刺激による収縮反応は、細胞外からの Ca^{2+} の流入と細胞内カルシウムストアーからの Ca^{2+} の放出が重要な役割を果たしていることを明らかとしている (11)。また、ラット結腸平滑筋組織の自動運動と脱分極性刺激薬である KCl の収縮反応について詳細な検討をおこなってきている (12)。炎症が惹起されると KCl による反応の立ち上がり速度が速くなり、炎症による過敏性が示唆された。そこで本年度は、炎症による機能障害が神経性機能の低下によるものか、平滑筋自体に障害が起きているか、電気刺激により検討をおこなった。併せて、炎症の予防効果を期待し、多価不飽和脂肪酸が結腸平滑筋の収縮能に影響をおよぼすか検討をおこなった。これらの研究が、炎症性腸疾患の治療薬開発するための基盤となることを目的とする。

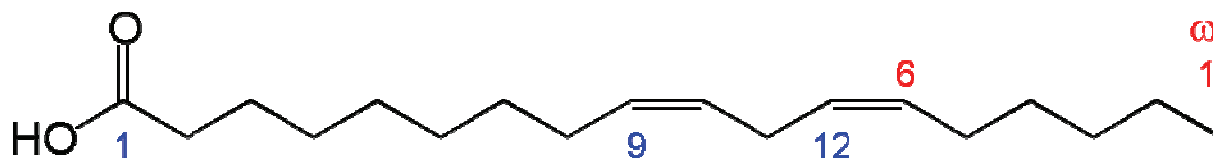
【実験方法】

<動物>

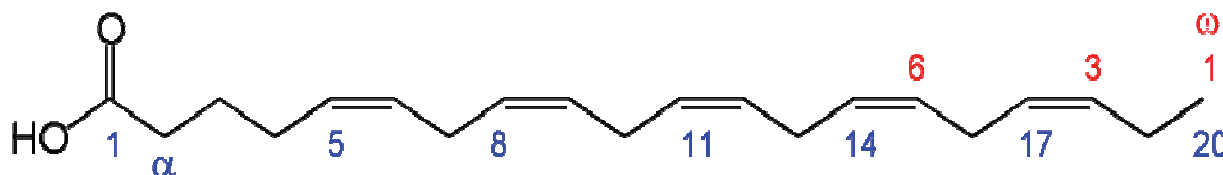
実験動物は、7 週齢ウイスター系雄性ラット (体重 200 ~ 250 g) を東京実験動物 (株) より購入し、2 ~ 3 日間本学の動物飼育環境に慣らした後、実験に用いた。飼育環境は、室温を 24°C に保ち、12 時間の明暗サイクルで自由に飲食・飲水させて飼育した。実験動物の取り扱いおよび処置に関しては、文京学院大学動物実験倫理委員会の管理下においておこなった。

<多価不飽和脂肪酸投与方法>

多価不飽和脂肪酸の投与方法は、n-3 系 (20:5 : $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$) エイコサペンタエン酸エチル (EPA)、n-6 系 (18:2 : $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$) リノール酸 (LA) を 300 mg/kg body weight/day 1 mL をそれぞれ 2~3 週間にわたり経口投与した。非炎症群は水を同量経口投与した。この多価不飽和脂肪酸の投与は、共同研究先である城西大学の協力にておこなった。



エイコサペンタ塩酸 (EPA) : n=3 系多価不飽和脂肪酸 (20:5) C₂₀H₃₀O₂



リノール酸 (LA) : n=6 系多価不飽和脂肪酸 (18:2) C₁₈H₃₂O₂

<炎症動物の作製>

結腸炎症モデル動物の作製は、2～3週間脂肪酸または水を経口投与したラットをイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、結腸の内腔に起炎物質であるトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 試薬 (100 mg/kg) を注腸した (13)。これを炎症群とした。また、同様に麻酔下で生理食塩水 (0.9% NaCl) をラットの結腸内腔に投与したものを非炎症群とした。それぞれの薬液を投与した後に、腹腔および皮膚を縫合した。麻酔から醒めたラットをケージ内に戻し、室温 24°C、12 時間の明暗サイクルで自由に飲食・飲水させて 3 日間飼育した。これらのラットは、非炎症群 (水+0.9% NaCl)、炎症群 (水+TNBS)、EPA 群 (EPA+TNBS) の 3 群に分け、測定に使用した。

<張力測定と電気刺激条件>

平滑筋組織標本は、0.9% NaCl、TNBS 処置後 3 日目にラットを致死させ、開腹し結腸を摘出した。近位結腸組織を約 5 mm の長さに切り取り、管腔を開き輪走筋方向の等尺性張力を測定した。張力の測定方法は、オーガンバスに組織を懸垂し、36°C に加温した生理的塩類栄養液 (Krebs 溶液 ; 120 mM NaCl、4.7 mM KCl、2.5 mM CaCl₂、1.2 mM MgSO₄、1.1 mM KH₂PO₄、23.8 mM NaHCO₃、11.1 mM glucose、95% O₂、5% CO₂ の混合ガスを通気し、pH 7.4 とした) 10 mL 中に結腸組織を懸垂し、張力測定をおこなった (図 1)。標本に約 1 g (10 mN) の静止張力をかけ、張力の大きさは、反応前と反応後の最大張力の変化量 (g) を組織質重量当たりの収縮力 (mN/mg wet wt) で示した。

電気刺激の条件は、神経刺激として 0.5 ms、20 Hz、40 V、筋刺激として 5 ms、20 Hz、40 V、いずれも 10 秒間刺激をおこなった (図 2)。

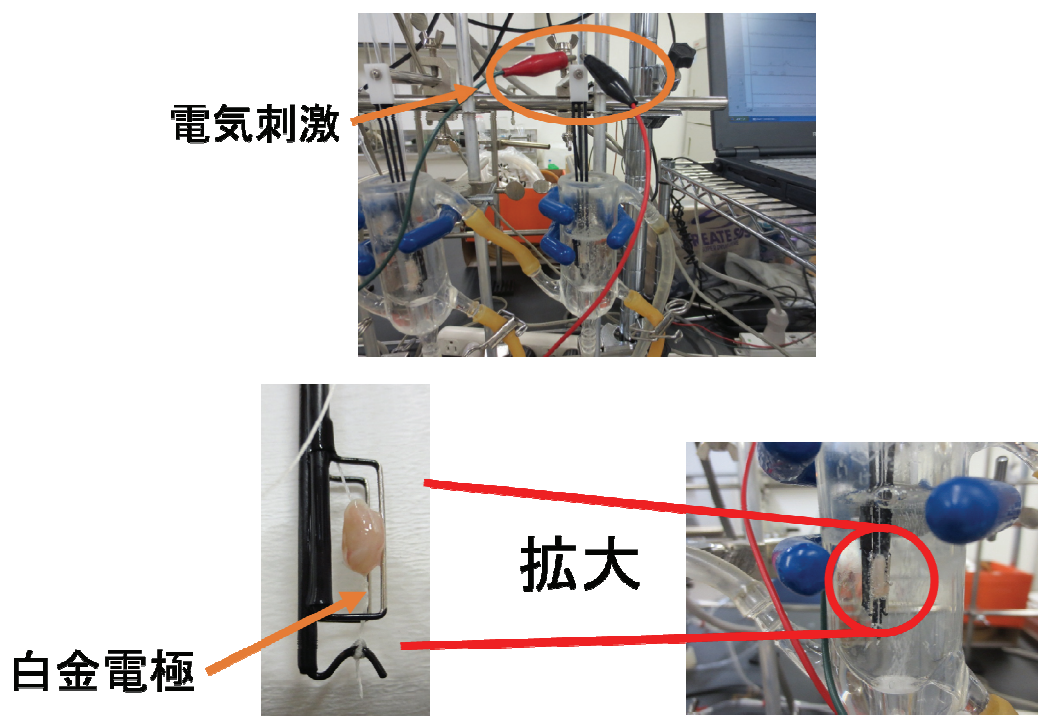


図1. 収縮測定装置と電気刺激電極（上）と結腸組織標本と白金電極

電気刺激について

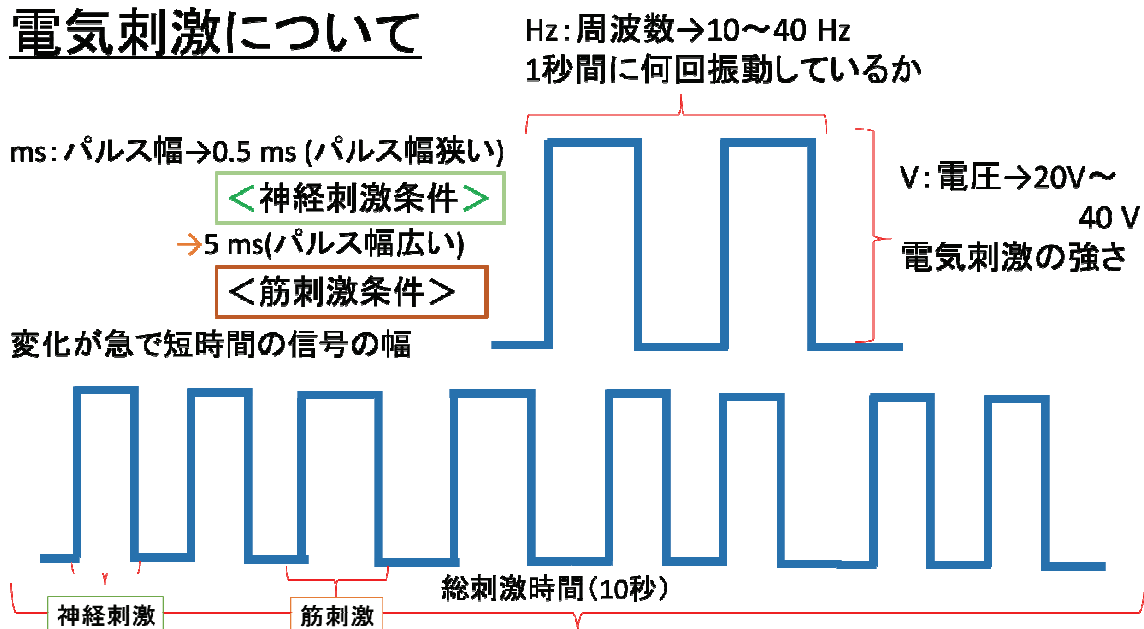


図2. 神経刺激と筋刺激の条件

<データ解析>

解析はそれぞれの実験データより張力を読み取り、反応前と反応後の最大張力の変化量 (g) を組織質量あたりの収縮力 (mN/mg wet wt) に換算して求めた (平均値±標準誤差)。統計的判断は多群間比較検定に基づき、有意水準を 5% 未満とした。

【結果と考察】

<神経刺激による収縮反応>

神経刺激 (0.5 ms) を 10 秒間おこなった時の収縮反応について検討した。周波数や電圧はそれぞれ、10~40 Hz、20~40 V で数回測定をおこなったが、その時の筋の状態により、最適刺激周波数・電圧には多少の違いが生じた。しかし、20 Hz と 40 V での刺激が多く組織で反応が安定していた。図 3 に収縮反応の典型的な収縮波形を示した。

収縮の波形には、電気刺激をおこなった時に生じる収縮反応 **On-contraction** と電気刺激停止直後、収縮反応が起こる反応を **Off-contraction**、この両方の反応が起きる反応の 3 つのパターンが認められた (14)。これらの反応が、どのくらいの頻度で認められるか、割合を測定した (結果未掲載)。その結果、**On-contraction** は非炎症群で約 44%、炎症群で約 92%、EPA 群で約 33%の割合で反応が生じた。このことから、炎症が生じると反応する割合が増加し、神経過敏になる可能性が示唆された。同様に **Off-contraction** についても検討したところ、非炎症群で 100%、炎症群でも 100%、EPA 群で約 90%の割合で反応が生じた。神経刺激停止直後の収縮反応は、炎症・非炎症と関係なく、収縮反応が生じやすいことが明らかとなった。これは、神経刺激により結腸組織に存在する様々な神経が興奮し、反応性が高まったと考えられる。また、この反応する割合は EPA の前処置で改善されることが明らかとなった。

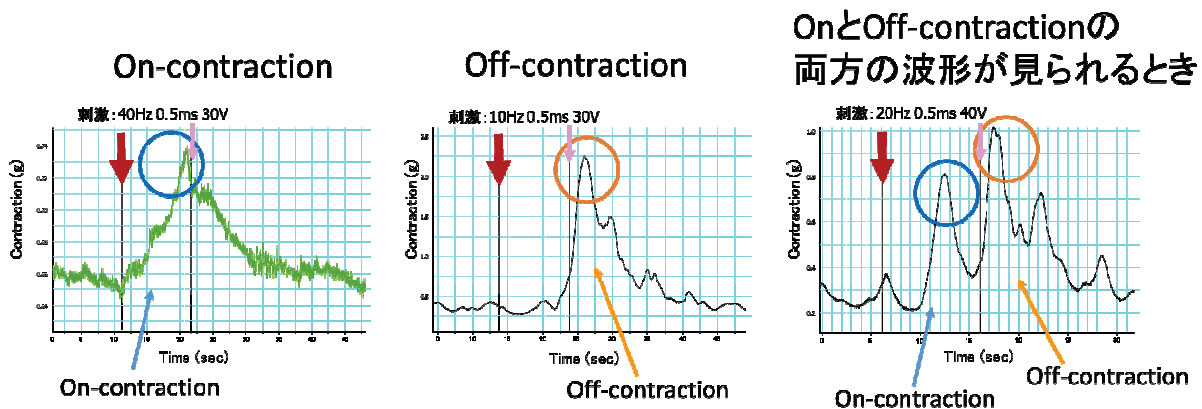


図 3. 神経刺激による収縮波形の典型例

結腸平滑筋組織をオーガンバスに懸垂後、神経刺激 (0.5 ms) を与えた。矢印のところを刺激をおこない、このとき発生した収縮反応を**On-contraction** (左)、刺激停止直後に発生した収縮反応を**Off-contraction** (中)とした。刺激時と刺激停止後の両方で発生した収縮反応 (右) が認められた。

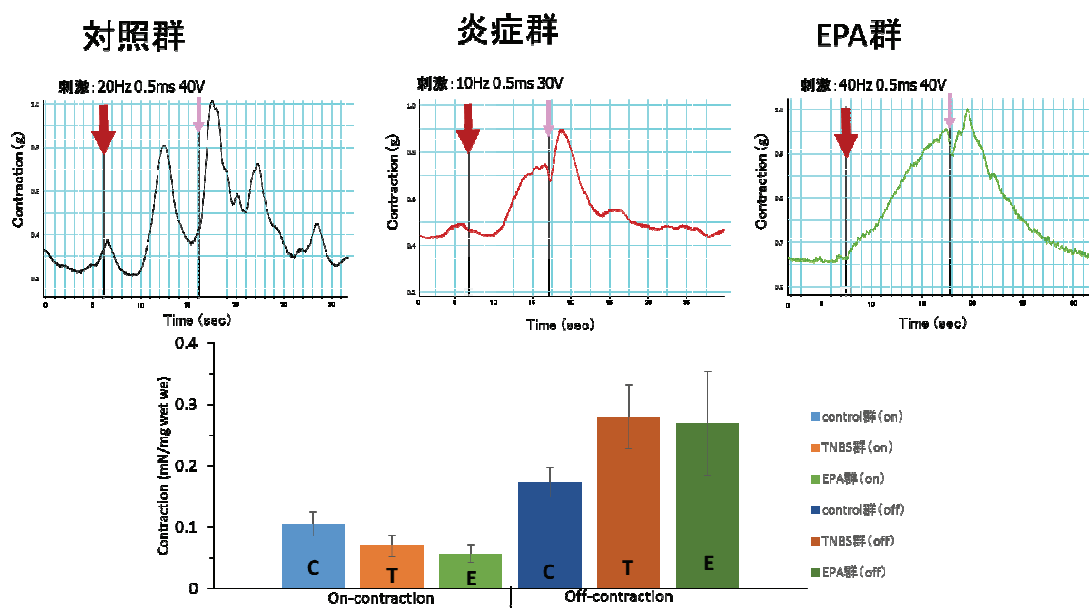


図4. 神経刺激による収縮反応の比較

上段に典型的な収縮波形を左から対照群（非炎症群）、炎症群、EPA群で示した。いずれも太い矢印のところでは神経刺激をおこない、細い矢印で刺激を停止した。刺激条件は、図中に示している。下段は、収縮反応の大きさを示した。左側がOn-contractionの非炎症群（C）、炎症群（T）、EPA群（E）、右側がOff-contractionで、同様の並びで示した。

また、このときの収縮反応の大きさを検討したところ、Off-contractionはOn-contractionと比較して、3群とも大きな収縮反応が生じることが明らかとなった（図4）。3群間での収縮力の大きさは、On-contractionでは非炎症群が炎症群、EPA群と比較して増加傾向であった。Off-contractionは、その反対に非炎症群は炎症群、EPA群と比較して減少傾向であった。3群間での収縮波形を確認したところ、非炎症群はOn-contractionは一過性の反応であり、その後Off-contractionが再度一過性に反応するような2相性の反応であった。炎症群やEPA群では、On-contractionが十分弛緩しないうちにOff-contractionが現れる傾向であった。すなわち、非炎症群は神経刺激により速やかに収縮・弛緩反応するが、炎症群やEPA群は収縮反応の応答が遅いと考えられる。

次に、神経刺激による収縮反応が、確実に神経を刺激して起こしている反応であるか確認した（図5）。神経の作用を遮断するテトロドトキシン（TTX）を用いて検討した。0.1 μM TTXを10分間前処置した後、神経刺激をおこなった。TTX非存在下での収縮反応を100%として、TTX存在下での神経刺激時の反応を測定した。その結果、On-contractionは3群ともTTXにより有意に抑制された。また、Off-contractionにおいても3群とも有意に抑制された。このことから、On-contractionは神経を介した反応であることが確認でき、またOff-contractionにおいても神経系を介した反応であることが明らかとなった。いずれの反応において、神経刺激をおこなうことにより結腸平滑筋組織から収縮性の神経伝達物質が作用し、収縮反応を引き起こしていることが示唆された。

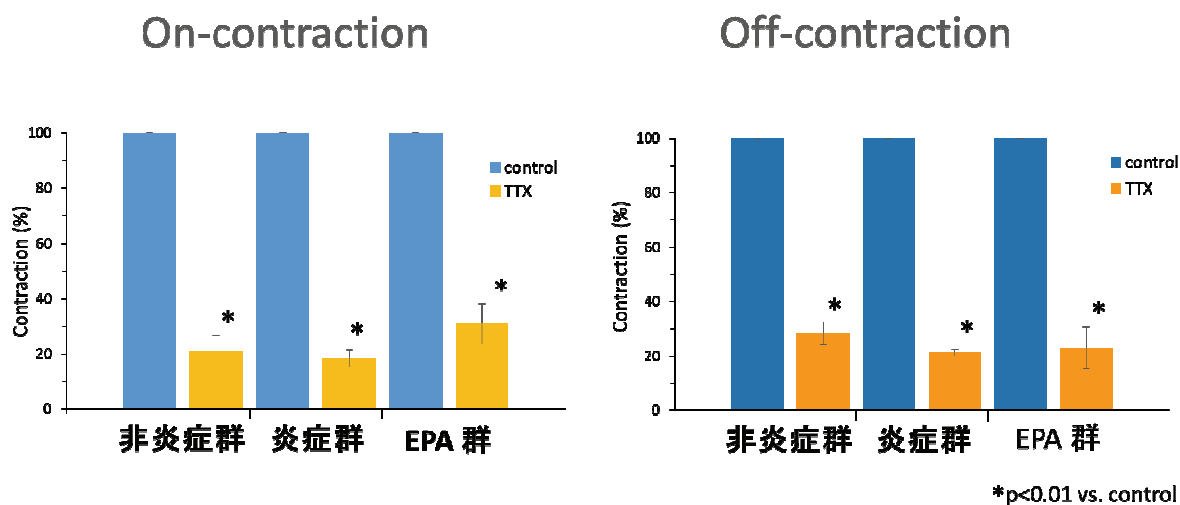


図 5. 神経刺激による TTX の影響

結腸組織に 0.1 μM TTX をあらかじめ 10 分間前処置し、神経刺激 (0.5 ms、20 Hz、40 V) を 10 秒間おこなった。TTX 未処置時の収縮反応を 100%として、処置後に神経刺激を与えた時の収縮反応を%で示した。On-contraction の結果は左、Off-contraction の結果は右に示す。それぞれの最大収縮力を平均値 \pm 標準誤差 (n=3~4) で示した。* $P<0.01$ は TTX 非存在下での収縮を 100%としてそれぞれの発生張力を比較した時の有意差を示した。

神経刺激による反応が、副交感神経伝達物質を介した収縮反応であるか検討した。副交感神経阻害薬であるアトロピンを用いて測定した (図 6)。0.1 μM アトロピンを 3 分間前処置した後、神経刺激をおこなった。アトロピン非存在下での収縮反応を 100% として、アトロピン存在下での神経刺激時の反応を測定した。その結果、いずれの反応もアトロピンにより有意に抑制された。アトロピン非存在下と比較して、On-contraction の非炎症群では $31.5 \pm 7.4\%$ (n=4)、炎症群では $7.6 \pm 0.3\%$ (n=3)、EPA 群では $23.4 \pm 8.6\%$ (n=4) の反応率であった。アトロピンの前処置により、炎症群での減少率は非炎症群より大きく、EPA 群ではこの減少の割合が非炎症群と同様であり、EPA は炎症による障害を回復させる傾向を示したと考えられる。Off-contraction においても、非炎症群では $24.5 \pm 7.5\%$ (n=4)、炎症群では $14.5 \pm 7.9\%$ (n=3)、EPA 群では $9.0 \pm 1.8\%$ (n=4) の反応率であった。このことから、炎症により神経刺激による反応はムスカリン受容体を介した収縮反応性への依存度が高くなることを示唆する。

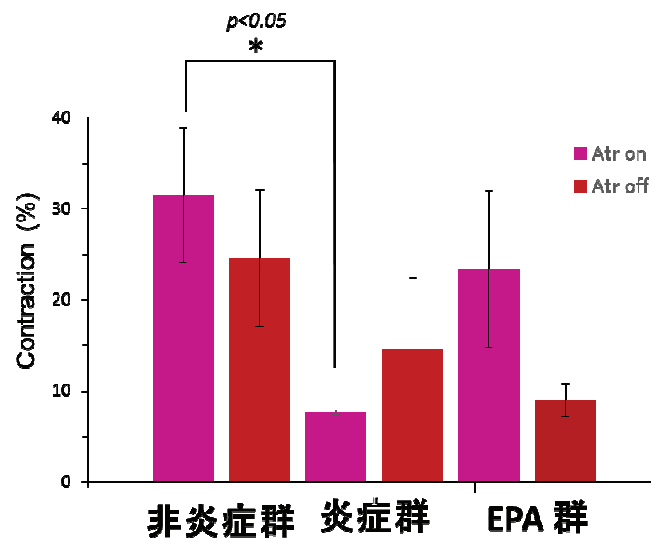


図 6. 神経刺激によるアトロピンの影響

結腸組織に 0.1 μM アトロピンをあらかじめ 3 分間前処置し、神経刺激 (0.5 ms、20 Hz、40 V) を 10 秒間おこなった。アトロピン未処置時の収縮反応を 100%として、処置後に神経刺激を与えた時の収縮反応を%で示した。左のカラムは On-contraction の結果、右のカラムは Off-contraction の結果を示す。それぞれの最大収縮力を平均値 \pm 標準誤差 (n=3~4) で示した。* $P<0.05$ は非炎症群と比較した時の有意差を示した。

<筋経刺激による収縮反応>

次に、神経刺激と同様に筋刺激による反応を検討した。筋刺激を与えるには、神経刺激より強い刺激をおこなうことにより、筋に直接刺激が伝わる。その条件として、今回の実験では周波数は 20 Hz、電圧は 20~40 V、パルス幅が 5 ms で 10 秒間電気刺激をおこなった。神経刺激時にもみられたが、その時の筋の状態により、最適刺激周波数・電圧には多少の違いが生じた。しかし、神経刺激より 20 Hz と 40 V で多くの組織が安定した反応を示した。図 7 に収縮反応の典型的な収縮波形を示した。神経刺激時と比較すると、On-contraction は 3 群とも約 2 倍以上の大きな収縮力が生じた。群間での差異は認められなかった (神経刺激：非炎症群 0.10、炎症群 0.06、EPA 群 0.05、筋刺激：非炎症群 0.22、炎症群 0.28、EPA 群 0.28 mN/mg wet wt)。収縮波形は 3 群とも類似しており、十分弛緩しないうちに Off-contraction が発生した。Off-contraction の収縮力の大きさは $0.56 \pm 0.1\text{mN/mg wet wt}$ であり、On-contraction ($0.22 \pm 0.0\text{mN/mg wet wt}$) と比較して有意に大きかった。筋刺激では、炎症群と EPA 群は On-contraction と Off-contraction で収縮力に大きな違いは認められなかった。このことから、炎症により Off-contraction は収縮力が減少することが明らかとなり、炎症が誘発されると収縮能が障害されることが示唆された。これまでの報告においても、ハムスターの大腸を用いた研究で炎症処置 1 週間後の静止張力測定で減少することが明らかとなっている (15)。この収縮力の減少に影響を与える機能障害には、EPA の前処置では有意な回復は認められなかったが、わずかに収

縮力は回復傾向を示した。

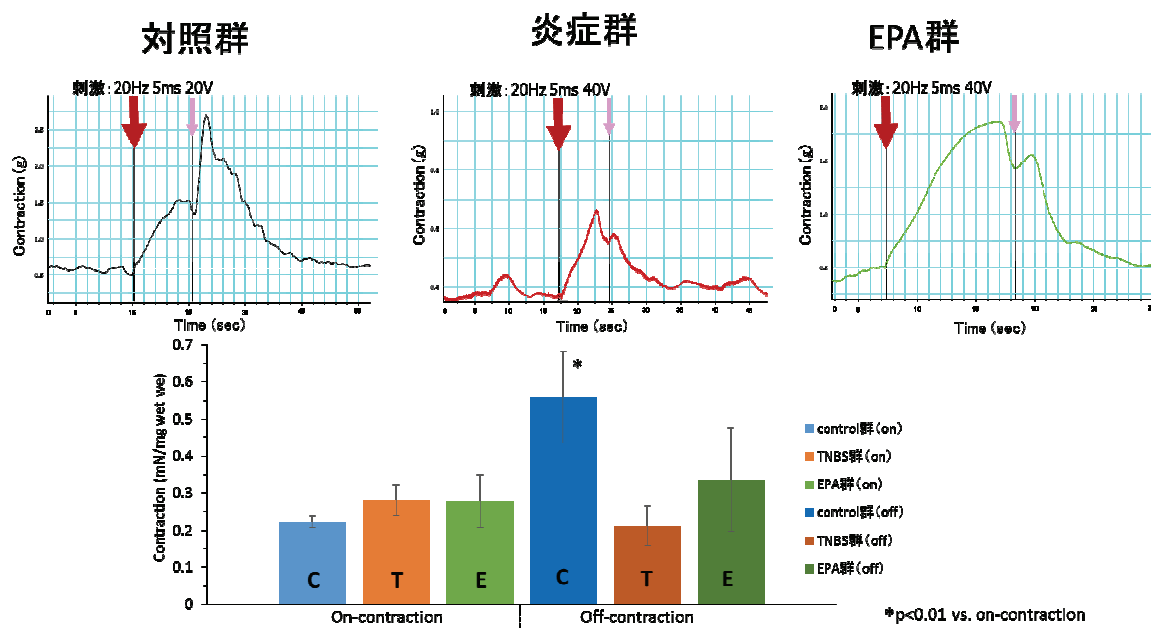


図7. 筋経刺激による収縮反応の比較

上段に典型的な収縮波形を左から対照群（非炎症群）、炎症群、EPA群で示した。いずれも太い矢印のところで神経刺激をおこない、細い矢印で刺激を停止した。刺激条件は、図中に示している。下段は、収縮反応の大きさを示している。左側がOn-contractionの非炎症群（C）、炎症群（T）、EPA群（E）、右側がOff-contractionで、同様の並びで示した。

次に、この筋経刺激による収縮反応は、神経を介して起こっている反応であるか確認した（図8）。神経の作用を遮断するテトロドトキシン（TTX）を用いて検討した。0.1 μ M TTX を 10 分間前処置した後、筋経刺激をおこなった。TTX 非存在下での収縮反応を 100% として、TTX 存在下での筋刺激時の反応を測定した。その結果、On-contraction は 3 群とも TTX により有意に抑制された（非炎症群 $32.2 \pm 6.4\%$ (n=5)、炎症群 $17.6 \pm 7.7\%$ (n=4)、EPA 群 $39.4 \pm 5.2\%$ (n=5))。このことから、筋刺激による On-contraction は神経性の因子を介した反応を刺激していることが示唆された。TTX による抑制率は、3 群の中で炎症群が一番大きかったことから、炎症により筋層内に存在するアウエルバッハの神経叢が過敏になり収縮性の神経伝達物質が放出され作用することが示唆された。Off-contraction においても 3 群とも有意に抑制された（非炎症群 $60.5 \pm 8.6\%$ (n=5)、炎症群 $21.2 \pm 5.3\%$ (n=4)、EPA 群 $33.9 \pm 5.8\%$ (n=5))。Off-contraction においても神経系を介した反応であることが明らかとなった。しかし、非炎症群での反応は、他の群と比較して抑制が弱かったことから、筋刺激停止後の収縮反応は神経を介した反応が弱いことが示唆され、筋の自動運動を抑制している ICC 細胞が Off-contraction を制御している可能性が考えられる。炎症により、ICC が傷害される可能性が考えられた。電気刺激による収縮反応は、TTX やアトロピンで抑制されることが ICC を欠損したラットの大腸を用いた研

究やネコの食道平滑筋を用いた研究と本研究は同様の結果であった (16, 17)。食道平滑筋では、G タンパク質や Ca^{2+} チャンネルの関与が収縮に重要と報告している。EPA の前処置では、この回復はあまり認められなかった。筋刺激による Off-contraction の成因は不明であるが、今回の結果から一部神経性の要因や ICC が関与していることが示唆された。

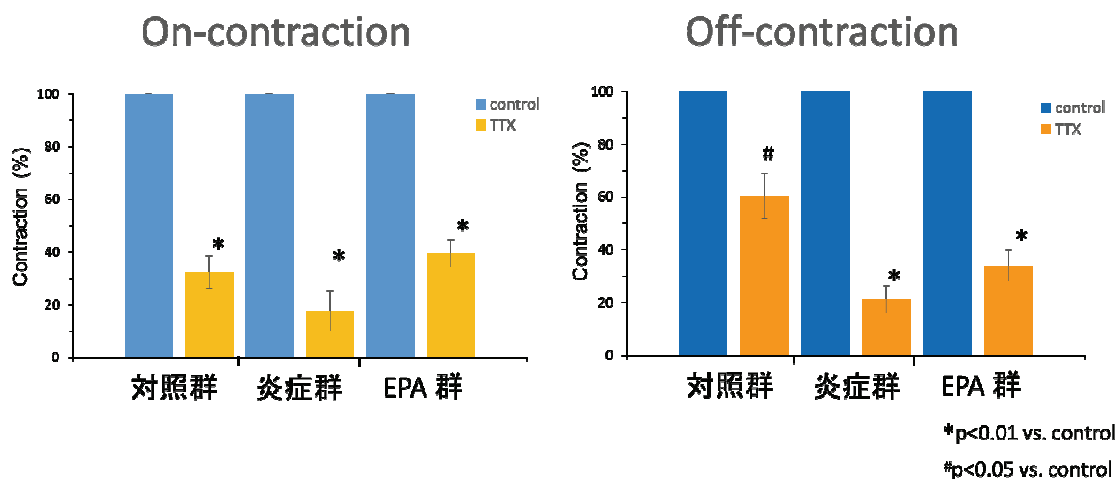


図8. 筋経刺激によるTTXの影響

結腸組織に 0.1 μ M TTX をあらかじめ 10 分間前処置し、筋経刺激 (5 ms、20 Hz、40 V) を 10 秒間おこなった。TTX 未処置時の収縮反応を 100% として、処置後に筋経刺激を与えた時の収縮反応を%で示した。On-contraction の結果は左、Off-contraction の結果は右に示す。それぞれの最大収縮力を平均値 \pm 標準誤差 (n=3~4) で示した。* $P<0.01$ 、# $P<0.05$ は TTX 非存在下での収縮を 100% とし、それぞれの発生張力を比較した時の有意差を示した。

筋経刺激による反応が、副交感神経伝達物質を介した収縮反応であるか検討した。副交感神経阻害薬であるアトロピンを用いて測定した (図 9)。0.1 μ M アトロピンを 3 分間前処置した後、筋経刺激をおこなった。アトロピン非存在下での収縮反応を 100% として、アトロピン存在下での筋刺激時の反応を測定した。その結果、いずれの反応もアトロピンにより有意に抑制された。アトロピン非存在下と比較して、On-contraction の非炎症群では $28.9 \pm 6.4\%$ (n=3)、炎症群では $7.2 \pm 3.5\%$ (n=4)、EPA 群では $31.8 \pm 10.9\%$ (n=5) の反応率であった。Off-contraction においても、非炎症群では $35.7 \pm 12.2\%$ (n=3)、炎症群では $12.0 \pm 5.2\%$ (n=4)、EPA 群では $22.7 \pm 9.0\%$ (n=4) の反応率であった。On-contraction、Off-contraction 共に、アトロピンの前処置により、炎症群での減少率は非炎症群、EPA 群より大きく、EPA は炎症を回復させる傾向を示したと考えられる。このことから、炎症により筋経刺激による反応はムスカリン受容体を介した収縮反応性への依存度が高くなることを示唆する。この反応は、ムスカリン受容体のサブタイプの中でも M2 や M3 受容体が関係しているとの報告がある。この中では、ノックアウトマウスの回腸を用いた研究で、アトロピン前処置で電気刺激条件が 50 Hz、0.5 ms、50 V、5 秒間刺激が抑制され、受容体の M2、M3 サブタイプと M2・M3 ダブルサブタイプノッ

クアウトマウスを用いての研究で示唆している (18)。

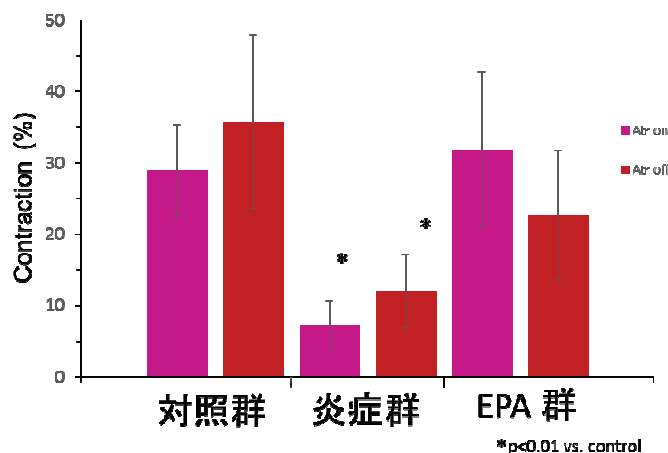


図9. 筋経刺激によるアトロピンの影響

結腸組織に 0.1 μ M アトロピンをあらかじめ 3 分間前処置し、筋経刺激 (5 ms、20 Hz、40 V) を 10 秒間おこなった。アトロピン未処置時の収縮反応を 100%として、処置後に筋経刺激を与えた時の収縮反応を%で示した。左のカラムは On-contraction の結果、右のカラムは Off-contraction の結果を示す。それぞれの最大収縮力を平均値 \pm 標準誤差 (n=3~4) で示した。* $P<0.01$ は非炎症群と比較した時の有意差を示した。

最後に、神経刺激、筋刺激における阻害薬の影響を収縮力で比較した (図 10)。神経刺激では非炎症群が他の群と比較して On-contraction で収縮力が大きい、Off-contraction では炎症群や EPA 群が大きかった。Off-contraction の結果は、TTX やアトロピンの前処置で炎症群が一番抑制率が高かったことから、炎症により神経性の要因が強く関与した結果か、神経による反応に過敏となり、刺激後の反応性が大きくなったかと考えられる。On-contraction においても、炎症群では、TTX やアトロピンにより抑制が強かったことから、神経を介し特に副交感神経伝達物質に敏感になり収縮反応が生じていると考えられる。EPA の前処置は、Off-contraction の反応を回復させることが示唆された。

筋刺激の On-contraction では、神経刺激の Off-contraction と同様な反応であった。しかし、Off-contraction は非炎症群では TTX で有意な抑制でなかったことから神経を介した反応でないことが示唆された。しかし、炎症が起こると TTX で有意な抑制が認められ、アトロピンでも有意な抑制であったことから、炎症群における Off-contraction の反応は、神経を介したムスカリン受容体作動性の収縮反応であることが示唆された。炎症により Off-contraction の収縮反応は非炎症群と比較して有意に減少したことから、炎症はムスカリン受容体を傷害する可能性を示唆する。EPA の前処置は、この反応を回復することを明らかとした。

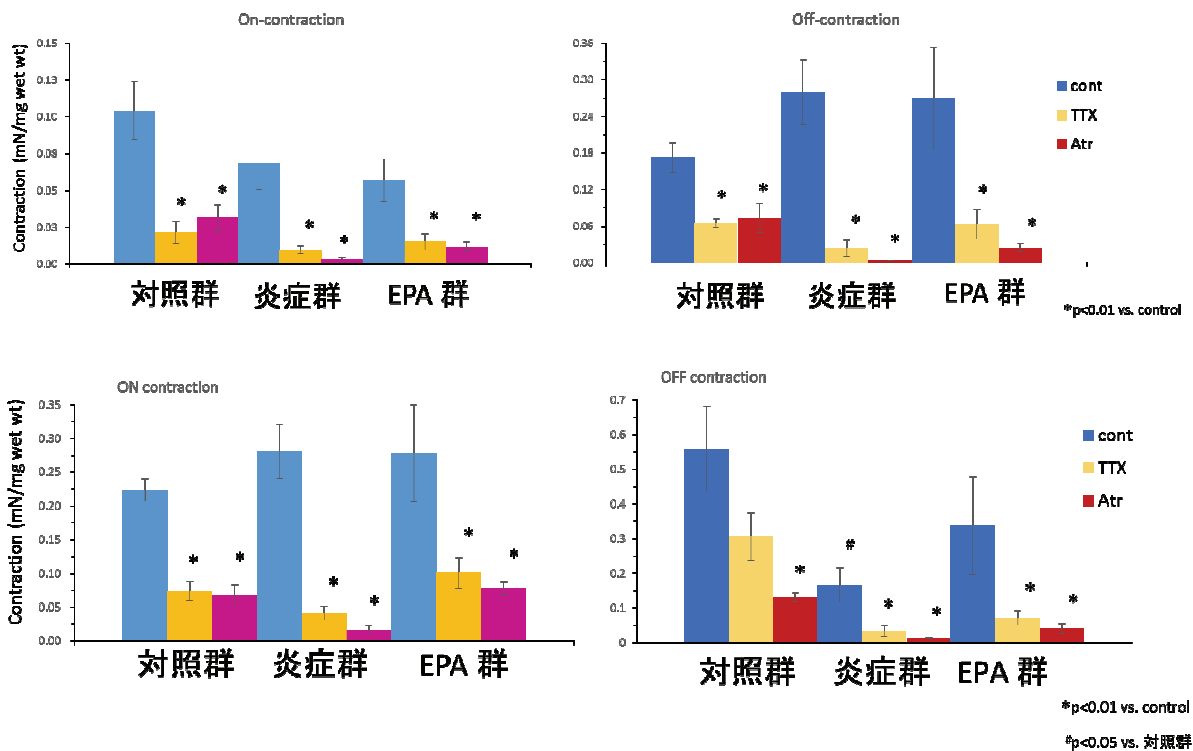


図10. 神経刺激、筋刺激における阻害薬の影響

結腸組織に神経刺激（上段）として 0.5 ms、20 Hz、40 V、筋刺激（下段）として 5 ms、20 Hz、40 V を 10 秒間おこなった時の収縮反応を mN/mg wet wt として示した。0.1 μ M TTX（10 分間前処置）、0.1 μ M アトロピン（3 分間前処置）をした後、それぞれの刺激を与えた時の反応を同様に示した。左のカラムは On-contraction の結果、右のカラムは Off-contraction の結果を示す。それぞれの最大収縮力を平均値±標準誤差（n=3～5）で示した。* $P < 0.01$ は阻害薬非存在下での反応と比較した時の有意差、# $P < 0.05$ は非炎症群と比較した時の有意差を示した。

以上の結果をまとめると、神経刺激による Off-contraction は、炎症群で神経を介したアセチルコリンによるムスカリン受容体刺激による収縮反応への依存性が高くなることが示唆された。筋刺激による Off-contraction は、炎症により収縮反応が抑制され、この反応は神経刺激と同様に、神経を介したアセチルコリンによるムスカリン受容体刺激による収縮反応への依存性が高くなることが示唆された。Off-contraction の成因は未だ不明であるが、本研究によりこの反応の成因を明らかとする一助となる可能性が見いだされた。

EPA の予防効果は、筋刺激による Off-contraction の反応を回復させることが明らかとなった。また、筋刺激の On-contraction は炎症による神経への過敏反応を回復させる可能性が示唆された。これにより、炎症性腸疾患治療薬の新たなターゲットが提案できると期待される。

【引用文献】

- (1) Kaji N, Horiguchi K, Iino S, Nakayama S, Ohwada T, Otani Y, Firman, Murata T, Sanders KM, Ozaki H, Hori M., Nitric oxide-induced oxidative stress impairs pacemaker function of murine interstitial cells of Cajal during inflammation. *Pharmacol Res.* 2016; 111: 838-848.
- (2) Lyford GL, He CL, Soffer E, Hull TL, Strong A, Senagore AJ, Burgart LJ, Young-Fadok T, Szurszewski JH, Farrugia G., Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Gut* 2002; 51: 496-501.
- (3) Hori M, Nobe H, Horiguchi K, Ozaki H., MCP-1 targeting inhibits muscularis macrophage recruitment and intestinal smooth muscle dysfunction in colonic inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol*: 2008; 294: C391-C401.
- (4) 野部裕美、石田行知、坂井泰、炎症および虚血時における内臓平滑筋機能解析. 文京学院大学総合研究所紀要: 2012; 13; 249-259.
- (5) Wehner S, Behrendt F, Lyutenski B, Lysson M, Bauer A, Hirner A, Kalff J., Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut* 2007; 56: 176-185.
- (6) Krinsky M, Yedgar S, Aptekar L, Schwob O, Goshen G, Gruzman A, Sasson S, Ligumsky M., Amelioration of TNBS-induced colon inflammation in rats by phospholipase A₂ inhibitor. *Am J Physiol Gast* 2003; 285: G586-G592.
- (7) Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N., Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63: 741-745.
- (8) Dyerberg J, Bang H O, Hjerne N., Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr.* 1975; 28: 958-966.
- (9) Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, et al. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med.* 2007; 13: 868-873.
- (10) White PJ, Arita M, Taguchi R, Kang JX, Marette A. Transgenic Restoration of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Insulin Target Tissues Improves Resolution Capacity and Alleviates Obesity-Linked Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat-Fed Mice. *Diabetes.* 2010; 59: 3066-3073.
- (11) 野部裕美、石田行知、坂井泰、結腸炎症モデル動物における平滑筋機能解析. 文京学院大学総合研究所紀要: 2014; 14; 183-195.
- (12) 野部裕美、石田行知、坂井泰、難病大腸炎の治療法の一端を知る. 文京学院大学総合研究所紀要: 2016; 16; 95-106.
- (13) Morris GP, Beck PL, et al., Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 1989; 96: 795-803.
- (14) Sakai Y, Daniel EE., Multiple responses to electrical field stimulation in

circular muscle of canine gastric corpus. *Can J Physiol. Pharmacol.* 1984; 62: 912-918.

- (15) Gurung YB, Shimizu Y, Shiina T, Mahmoud ME, Saito S, Takewaki T., Impairment and restoration of spontaneous contractile activity of longitudinal smooth muscles in the TNBS-inflamed hamster distal colon. *Biomedical Res.* 2007; 28: 301-308.
- (16) Albertí E, Mikkelsen HB, Wang XY, Díaz M, Larsen JO, Huizinga JD, Jiménez M., Pacemaker activity and inhibitory neurotransmission in the colon of Ws/Ws mutant rats. *Am J Gastrointest liver physiol.* 2007; 22: G1499-1510.
- (17) Park JH, Kim HS, Park SY, Im C, Jeong JH, Kim IK, Sohn UD. The influences of G proteins, Ca²⁺, and K⁺ channels on electrical field stimulation in cat esophageal smooth muscle. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009; 13: 393-400.
- (18) Unno T, Matsuyama H, Izumi Y, Yamada M, Wess J, Komori S., Roles of M2 and M3 muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice. *Br J Pharmacol.* 2006; 149: 1022-1030.

学長裁量経費を受けた「本学理学療法学科卒業生のスイスでの学術研修」の報告

福井勉¹⁾，正保哲²⁾，三村節子³⁾，長谷川淳⁴⁾

1) 保健医療技術学部学部長・理学療法学科教授

2) 保健医療技術学部・理学療法学科助教

3) 文京学院大学 GSI オフィス

4) Kliniken Valens・Kliniken Valens 生涯学習センター

平成 28 年 3 月 18 日から 3 月 24 日にかけて、Kliniken Valens (スイス) での研修を行い、卒業生 11 名および教員 2 名が参加した学術研修について報告する。学長裁量経費のテーマのうち、「永久サポート大学」は非常に魅力的でタイムリーであった。それは、本学部の設立からの事情がある。保健医療技術学部は開設から 10 年が経過した。この間、理学療法学科、作業療法学科、臨床検査学科のカリキュラムで重要な位置を占める、臨床実習あるいは臨地実習施設の確保には本当に難渋してきた。その大きな理由は大学付属医療機関が無いことと新設大学の最弱点とも言える卒業生のバックアップが無いことであった。臨床実習制度を維持するための教員の負担度は大きく、卒業生が医療機関などでリーダー的存在となるまでにはあと数年必要と考えられ、本学への帰属意識を維持させるためには継続的な教育が重要と考えられる。理学療法学科では、そのため現職者を対象とした「理学療法ブラッシュアップコース」を 10 年前に加え、卒業生を対象とした「卒業生フォローアップコース」を実質的に 5 年前から実施している。卒業生と教員の連携は非常に重要であり、学会活動などの研究活動だけではなく、卒業生の仕事を紹介する授業内での教育関係の時間も徐々に増大してきている。中でも卒業生が臨床実習指導者となることが年々増加し、さらに学内での客観的臨床能力試験 OSCE (Objective Structured Clinical Examination) においても卒業生の協力が欠かせなくなっている。

医療系大学では医療機関を中心とした実習制度に支えられているが、逆に卒業生が自らの母校に帰属意識を持っていない大学においては実習施設を断られるケースを多く聞く。このような大学においては学生全員が一度に実習を行うことができなくなっている。本学科においては教員と卒業生の関係性は現状で極めて良好と考えられ、また帰属意識も高いと考えられるが、「教員が変わっても大学への帰属意識を持続的に維持するためにはシステムの改革が必要である」と考える。このためには卒業生に対する教育を継続的に行うとともに、教員自身の能力向上が不可欠であると考えられる。

今後この研修制度が確立されれば、卒業生の臨床能力向上を卒業した大学がバックアップするという稀有なケースを作ることができさらに教員と卒業生の関係性を維持向上するという、本研修の主目的を果たすことができると考えられる。現在、例えば毎日卒業生が来学しない日はないくらい各教員の元へ卒業生が来ていることから良好な関係性は伺うことができこれを維持するには努力が必要であると考えられる。

本学の学長裁量経費のテーマのうちのひとつであるこの「永久サポート大学」において、卒業生が帰属意識を保有し続けてくれることで、現役の学生に対しても多くのメリットがある。それは各方面からの評判、卒業生が臨床実習施設で重要な位置を占めるキャリアッ

プ、そのために行われる臨床実習の施設確保など枚挙に暇がない。

また臨床実習施設自体への最新情報提供も同様に重要である事を感じている。それは実習施設訪問時に行う小規模セミナーの開催数の需要の多さ（年間 100 回以上）にも表されている。やはり我々が提供できる情報つまりは最新医療知識や技術に関する事項が常に刷新されている必要性である。臨床実習施設の確保には前述のように教員負担が大きい、逆に人望のある教員のもとでは、卒業後も学びたいと大学院に入学するケースや共同で研究を行っている例も本学ではよく見られる。この良好な卒業生との関係性は伝統となるまで維持させ、システム化が必要であると考えられる。また前述したように我々の知る限り、保健医療技術関係で卒業生に対する海外研修制度を有している大学はない。以下(表 1)のようなメリットは学長裁量経費応募段階であげたが、このためには本学 GSI グループの存在は特に重要であった。

表 1 卒後研修の意義

1. 入学前から謳うことが可能となり学部学生募集にも寄与する可能性があること
2. 卒業生の帰属意識が高まり、職場で「文京学院大学」教育に関心が高まる
3. GSI グループにより組織的に、提携関係がフォーマルになる
4. GSI グループにより医療研修で重要な「修了書」発行を提携先に正式に打診できる

特に、現役医療職が 1 週間休暇を確保するためには、修了書発行は重要であった。各職場への卒業生からの説明と同時に本人の動機付けとしても有効であったと考えられる。またミーティングを毎日行ったがこのことにより自分と異なる職場環境の紹介、自分の社会人としての経過を改めて見つめなおしてもらった意義も大きいと考えられた。相手方との交渉も、GSI グループ無しには考えることができなかった。

保健医療技術学部卒業生の資格は教員保有資格と同等であるため、卒業後に学会、研修会などで顔を合わせる機会が多い。医療職は元来が生涯学習であり本学の永久サポートの概念はこの新しい教育システムに合致しているものと考えられる。海外研修についての相手先については、医療技術やシステムに定評があり、安全面が確保されていることが重要であると考えられる。理学療法分野においては特定の内容に関する研修が海外でも実施されている事が多いため、特定の国と言うよりは特定の病院が指定されることが考えられる。今後、2 から 3 カ国の医療先進国との連携を強め、数年毎に研修を重ねて行きたいと考えている。今回行った第 1 回研修旅行では、上記条件を満たす事を考慮し、スイスにある **Kliniken Valens · Rehabilitazitonszentrum Valens** を選別し大変良かったと考えている。このクリニックはヨーロッパ各国から患者が集まり、リハビリテーションにおける研修制度も有している。引率した 1 名が、過去に一度訪れていることと、理学療法士の 1 名に日本人がおり、窓口になってくださったことがより安心できた要件であった。今回 2 日を研修に当てたが、その内容は多岐にわたり、一部言語の問題はあったがほぼ不自由なく過ごすことができた。別紙資料にある充実した内容からも理解して頂けることと考えている。

実際の研修は 2 日間であり、院内見学、**Kliniken Valens** におけるクリニカルリーズニング、慢性腰痛における疼痛メカニズム、エルゴノミックリハビリテーション、課題指向型訓練とバランス、多発性硬化症に対するリハビリテーション、PNF テクニックの実技指導、患者デモンストレーションを数回など本当に充実した内容であった。

今回の研修の終了後のアンケートをみると、海外と日本の違いについては、それほど大きくないと感じる者が多かった。しかし、言語力をはじめとする自分の力の無さについても感じたものも多く、卒業生の今後のあり方についても一石を投じることができたと考えている。欠点としては、費用の問題である。今回、学長裁量で補填して頂いた金額は全体の 1 割強であり、困難とは思いう反面、アンケートでもその指摘が多く少し補助を増額して頂きたく考えた次第である。また中には今後海外でも働きたい旨を述べてくれたものもいて、企画者としての動機付けにもなったことを付け加えたい。海外と日本のボーダーは今後徐々に無くなっていくものと思われ、本研修の意義は高いこともアンケートから伺える。企画力と海外での協力体制も徐々に整えていく必要があると思われる。今後も図のように永久サポート循環を回せるように努力していきたいと考えている。

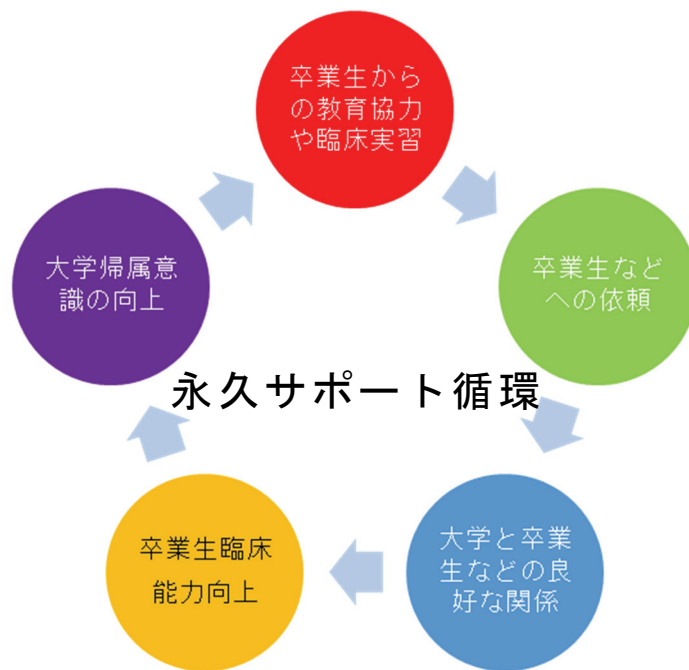


図1 卒業生の学部教育への好循環「永久サポート循環」

2016年3月18日（金） 成田空港出発



3月19日（土）ルツェルン半日観光



ホテルでのミーティングの様子



3月20日（日）BAD RAGAZ 周辺施設の見学（旧結核施設）



研修第1日目 3月21日（月）施設見学と慢性疼痛の研修（長谷川淳先生：Kliniken Valens）



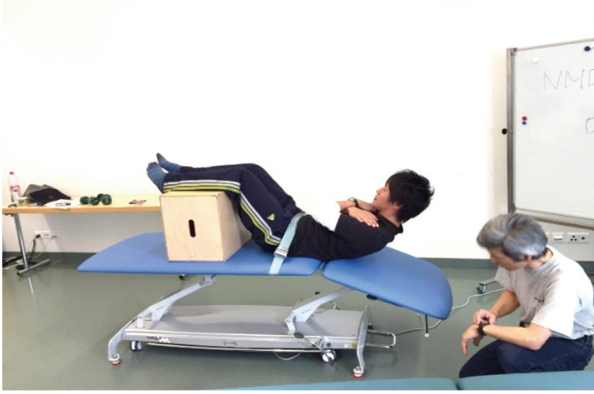


施設見学



長谷川先生による講義と実技研修



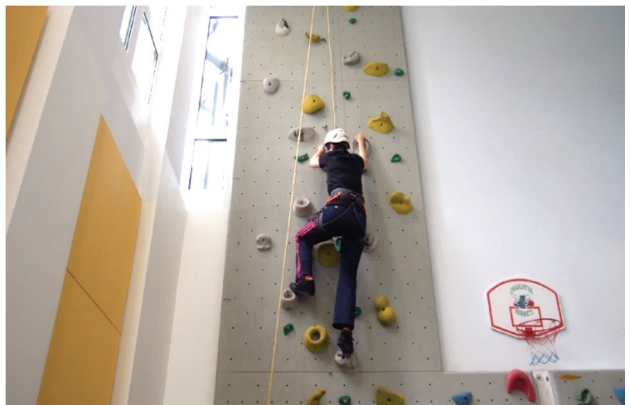


エルゴノミックリハビリテーション





ボルダリング体験



研修第2日目 3月22日(火) a m ボバースコンセプト p m PNFの研修
PNFの研修



ボバースコンセプトの研修



修了式



図 2 スイス研修風景

＜2016年 チューリッヒ研修 日程表＞

食事あり→○ 食事なし→× 機内食あり→▲

日付	都市	時刻	交通手段	日程・内容	食事
3月18日 (金)	成田 チューリッヒ	08:30 11:10 15:50	LX161 専用車	成田空港集合(予定) 国際線にてチューリッヒへ チューリッヒ空港到着 日本語ガイドがお出迎え。 ガイドとともにホテルへ移動 (NOVOTELCITY WEST 泊)	昼 : 機 昼 : 機 夕 : ×
3月19日 (土)	チューリッヒ	09:00 13:00	専用車	ホテルにて朝食 ルツェルンへの半日観光(日本語ガイド付) チューリッヒ中央駅付近解散 その後、自由行動 (NOVOTELCITYWEST 泊)	朝 : ○ 昼 : X 夕 : X
3月20日 (日)	チューリッヒ BAD RAGAZ	16:00	専用車	ホテルにて朝食 夕方のご出発まで自由行動 チューリッヒからバドラガッツへ向けて出発 (日本語ガイドがホテルまで帯同します) (SORREL TAMINA 泊)	朝 : ○ 昼 : X 夕 : X
3月21日 (月)	BAD RAGAZ Kliniken Valens	07:30 08:00 17:00 17:15	専用車 専用車	ホテルにて朝食 ホテル出発 Kliniken Valens にて研修 研修終了 研修先出発、ホテルへ * 往復送迎にはガイドはありません。 (SORREL TAMINA 泊)	朝 : ○ 昼 : X 夕 : X
3月22日 (火)	BAD RAGAZ Kliniken Valens	07:30 08:00 17:00 17:15	専用車 専用車	ホテルにて朝食 ホテル出発 Kliniken Valens にて研修 研修終了 研修先出発、ホテルへ * * 往復送迎にはガイドはありません。 (SORREL TAMINA 泊)	朝 : ○ 昼 : X 夕 : X
3月23日 (水)	BAD RAGAZ チューリッヒ	09:00 13:00	専用車 LX160 便	ホテルにて朝食 バドラガッツからチューリッヒ空港へ出発 (日本語ガイドがホテルから空港まで帯同します) チューリッヒ空港から国際線にて成田空港へ (機内泊)	朝 : ○ 昼 : 機 夕 : —
3月24日 (木)	成田	08:55		成田空港到着。お疲れ様でした。	朝 : 機

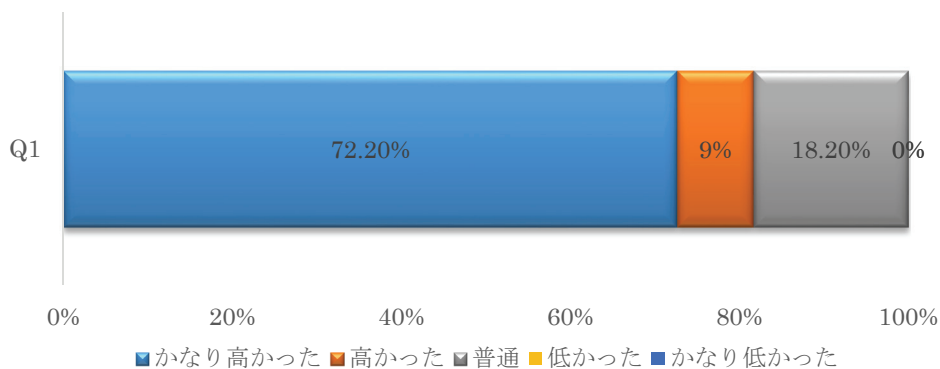
利用航空会社: スイスインターナショナルエアウェイズ

表 2 スイス研修計画

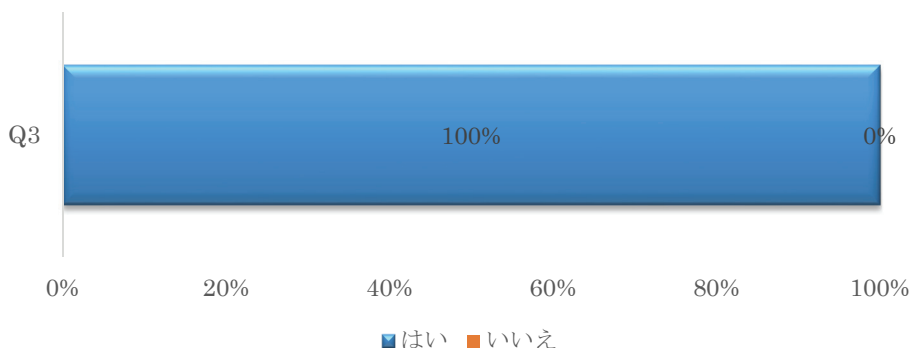
Plan Seminer für japanische Gruppe (Hotel Tamiana: 081 303 7171)

Datum	Zeit	Thema	内容	
Mo. 21.03.2016	08.00	Begrüßung und Geschichte der Kliniken Valens	研修会開催のご挨拶とクリニックスバレンスの歴史	
	08.20	Klinikführung	院内見学	
	09.00	Rehabilitationskonzept der Kliniken Valens und Clinical Reasoning	当院における治療概念と臨床カルリーズニング	
	09.30	Painmechanismus bei chronischen Rückenschmerzen (CLBP)	慢性腰痛における疼痛メカニズム	
	10.30	Pause	休憩	
	11.00	Biopsychosocialmodel und Behandlungskonzept bei CLBP	生物心理社会的因子の関連性と慢性腰痛の治療概念	
	11.50	Mittagspause	昼食	
	13.00	Praxis der Untersuchung und Behandlungsprinzipien bei CLBP	実技:慢性腰痛に対する評価と治療介入	
	15.00	Pause	休憩	
	15.30	Theorie: Ergonomietraining bei CLBP	理論:慢性腰痛に対するエルゴミックリハビリテーション	
	16.00	Praxis: Ergonomietrainingsprogramm bei CLBP	実技:慢性腰痛に対するエルゴミックリハビリテーション	
	17.00	Ende	1日目終了	
	Di. 22.03.2016	08.00	Theorie: Task oriented learning bei neurologische Patienten	理論:タスク重視型運動学習概念
		08.30	Patientendemo	実技:患者デモンストレーション
09.30		Gruppenarbeit / praktisches Üben	グループワーク/実技練習	
10.00		Pause	休憩	
10.30		Patientendemo	実技:患者デモンストレーション	
11.30		Diskussion	質疑討論	
11.50		Mittagessen	昼食	
13.00		neurologische Rehabilitation am Beispiel Multiple Sklerose (MS)	多発性硬化症に対するリハビリテーション	
13.30		Patientendemo (Befundaufnahme und Behandlung mit einzelnen PNF Griffen Pattern und Techniken)	実技:患者デモンストレーション (PNFにおける評価と治療)	
14.30		Pause	休憩	
15.00		Praktisches Üben PNF	実技練習:PNF	
15.30		Patientendemo	実技:患者デモンストレーション	
16.30		Diskussion	質疑討論	
17.00		Ende	研修会終了	

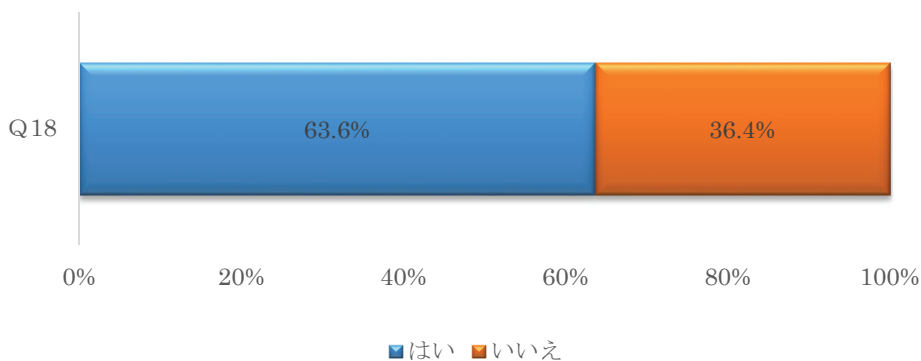
プログラムに関する期待は？



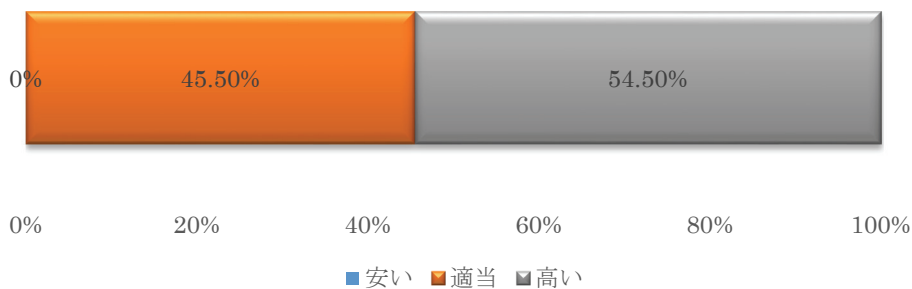
海外研修は初めてですか？



日本と海外の理学療法の違いを感じましたか？



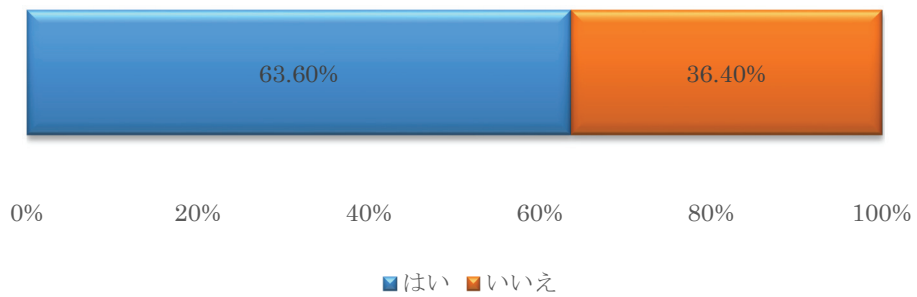
研修にかかった費用について



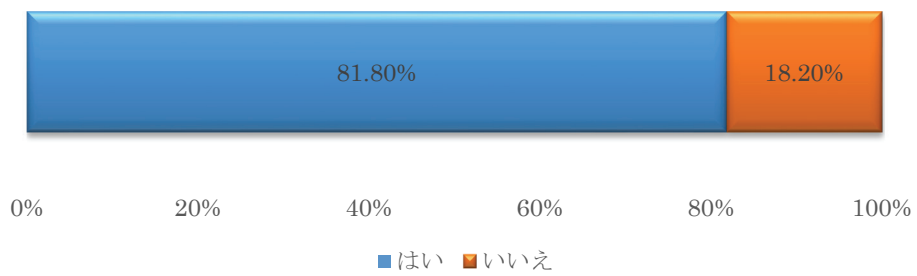
語学に対する意識は？



職場で伝達講習の機会がありますか？



今回の研修で臨床能力が改善したと感じますか？



今回のようなプログラムは、継続する必要があると思いますか？



図 3 アンケート結果（一部抜粋）

【背景及び目的】

サルモネラ感染症の原因菌は、主に *Salmonella Enterica* で、2,500種ほどの血清型に細分されており、本研究では食中毒の原因となる *Salmonella Enteritidis* を研究対象とする。欧米では、鶏卵の *Salmonella Enteritidis* (以下SEと略) を原因とする食中毒が知られており、鶏卵を生で食する習慣が殆どないが、わが国では鶏卵の生食は一般的な食事形態の1つとなっている。サルモネラ菌属による食中毒の報告は減少しつつあるも、毎年何例かの報告があり、その危険性もしばしば指摘される¹⁾。サルモネラによる食中毒(サルモネラ症)は、汚染された食品を摂取してから12~48時間の潜伏期間を経て発症し、主症状は急性胃腸炎であり、下痢、腹痛、嘔吐および発熱等がみられる。下痢は軟便、水様便が多いが、重症では粘血便が見られることもある。さらに重篤な場合には、死に至る可能性もあり、危険な食中毒でることは疑いがなく(表1)。原因菌としては、*S. Enteritidis* による食中毒が多く(図1)、主として鶏卵を介して生じ、サルモネラ属菌は乾燥に強い等の特徴があるため、環境中での生存率が高いとされる²⁾。鶏の体内にはサルモネラ属菌が常在し、in egg汚染とon egg汚染のルートが考えられ、特にon eggの菌の侵入から繁殖に至る機序について、海外での研究結果では明らかにされているが³⁾、本邦では明確にされていない。鶏卵は一般に洗浄後、市場で流通されるので、本研究において、鶏卵の洗浄が菌の透過(on egg汚染)にどのような影響を及ぼすかについての検証を行った。

	発生件数	患者数	死者数
平成8年	350	16,576	3
平成9年	521	10,926	2
平成10年	757	11,471	1
平成11年	825	11,888	3
平成12年	518	6,940	1
平成13年	361	4,949	0
平成14年	465	5,833	2
平成15年	350	6,517	0
平成16年	225	3,788	2
平成17年	144	3,700	1

表1 食中毒事件の発生件数と患者数及び死者数

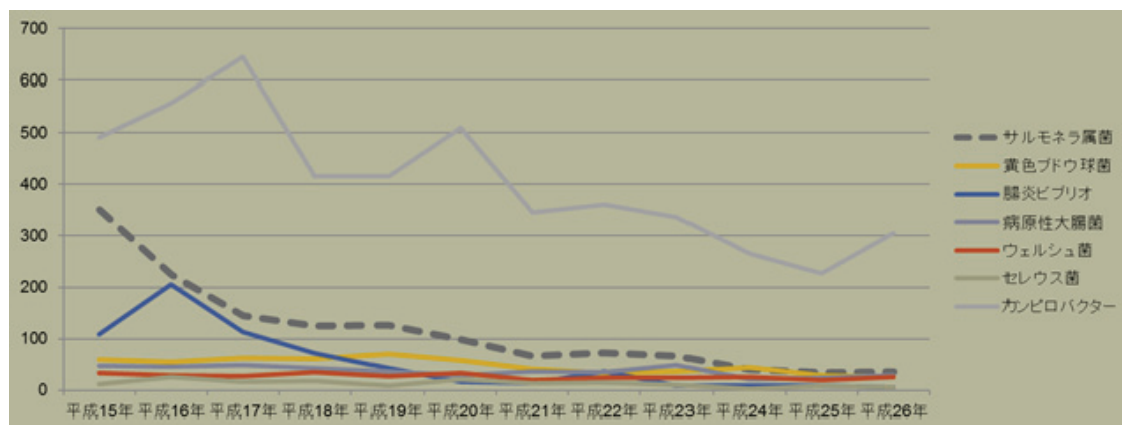


図1 菌種ごとの食中毒事件数の推移（年間） 厚労省統計データより著者作成

【方法】

鶏卵の菌汚染機序（on egg 汚染）については以下の3点について菌汚染の状況を調べた。

1. 鶏糞中又は鶏体内での *salmonella* 属菌存在の確認。

鶏糞中には *salmonella* 属菌が存在することが確認されている^{4) 5) 6) 7) 8)}。一般の鶏にどのくらいの菌が存在するかを検証するために、臓器の検体（消化管＝盲腸）を採取し培養した。解剖を行った鶏は日齢51日の鶏（ブロイラー）で、50羽を解剖し、そのうちの10羽の盲腸から盲腸便を取り出して、*salmonella* 属菌を分離培養した。さらに分離した菌株を用いて、市販の鶏卵で卵殻が菌が透過するかの試験を行った。培養には、先行研究を参考に DHL 寒天培地を用い、さらにハーナテトラチオネート（HTT）で増菌培養を行った⁸⁾。

2. 卵殻を洗浄した洗浄卵と洗浄しない無洗浄卵での菌透過比較試験。

卵の洗浄基準については、食品衛生に関する厚生省（当時）から出された通知に詳細が示されているので概要を以下に示した⁹⁾（表2）。通常の洗浄方法は次亜塩素酸等の薬品で洗浄されている場合が一般的で、効果も安全性も確認されている¹⁰⁾。今回も洗浄用液には、先行研究と同様に次亜塩素酸 FAC 濃度 200ppm、32℃で46秒間液に浸し、10分乾燥したものを使用した³⁾。また卵殻の構造は、表面が厚さ 10μm 程度のクチクラ層で覆われており、これは主にタンパク質から成る脆弱な層である。そのため簡単な洗浄や摩擦で失われることがある。内部の卵殻層は、スポンジ基質で、有機物からなるスポンジ状の構造に無機質が沈着したものである。これは炭酸カルシウムを主成分とするが、最外層の部分ではマグネシウムやリン酸塩がやや増加し、卵殻強度を高めている。そのため全体として鶏卵は固い殻で保護されている状態であり、外部からの様々な菌種が侵入するのを防いでいる。

3. 卵殻内での汚染範囲（卵白と卵黄）の確認。

菌の卵殻透過試験方法については、以下の表にまとめた（表3）。卵殻内での菌の汚染範囲に関して、割卵後、卵白と卵黄との分離し、それぞれの卵液の中に菌が存在するかを分離培養した。尚、使用菌株に関しては、SE 及び SI の菌株については文京学院大学管理株を使用し、ST については本研究に際し、日本獣医生命科学大学で解剖したブロイラーより採取した菌を株として保存培養したものを使用した。

鶏卵管理基準

- ◆ 原料卵は、正常卵、破卵、汚卵及び軟卵に選別。
- ◆ 破卵、汚卵及び軟卵は、搬入後24時間以内に又は8℃以下で保存し72時間以内に割卵し、加熱殺菌。
- ◆ 正常卵を3日以上保存する場合は、8℃以下で保存し、できるだけ速やかに割卵する。
- ◆ 汚卵は、必ず洗浄するとともに、150ppm以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液又はこれと同等以上の効果を有する殺菌剤で消毒。

表2 鶏卵管理基準（「厚生省通知第1674号」を抜粋したものを著者改変）

試験	方法	菌株	培地
①市販鶏卵の経時的菌卵殻侵入試験	市販鶏卵に3種の <i>Salmonella</i> 属菌の菌液に90秒間浸して、経時的に観察。 * 全卵を培養（鶏卵20個）	S.Enteritidis (SE) S.Typhimurium (ST) S.Infantis (Si)	SS 寒天培地
②洗浄卵と無洗浄卵の比較試験	養鶏場で入手した無洗浄鶏卵（15個）と洗浄鶏卵（15個）につき3種の <i>Salmonella</i> 属菌の菌液に90秒間浸して、観察。 * 卵黄と卵白を分離し、別培養	S.Enteritidis (SE) S.Typhimurium (ST) S.Infantis (Si)	DHL 培地 * <i>salmonella</i> 増菌培地として Hajna Tetrathionate Broth を使用

表3 菌の卵殻透過試験方法

【結果】

市販鶏卵で行った菌の経時的卵殻透過試験の結果からは以下の表に見られるように、*Salmonella* 属菌の透過は、SEのみが9日目から確認された¹⁾（表4）。又その後日を置いて菌量が増加することも確認できている。しかし、他の *Salmonella* 菌属では確認できなかった。Broiler10羽中、1羽の盲腸便からは、*Salmonella* 属菌と疑われるコロニーを4検体分離培養し（図2）、4検体を Api（SYSMEX bioMérieux Co.,Ltd 社製）を用いて調べたところ、その1検体より *Salmonella spp.* を検出した。該菌種は血清型の判別により *Salmonella typhimurium* であることが分かった。尚本実験では環境設定は全て常温下（20℃前後）での保存を行った。

<i>Salmonella Spp.</i>	5日目	7日目	9日目	11日目
<i>S.enteritidis</i>	0	0	2.0×10 ² CFU/egg	5.0×10 ² CFU/egg
<i>S.typhimuri</i>	0	0	0	0
<i>S.infantis</i>	0	0	0	0

表4 *salmonella* 菌属卵殻透過（on egg 汚染）試験

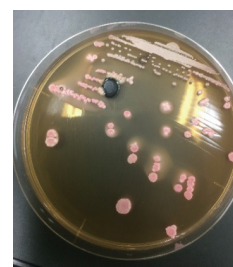


図2 盲腸便の培養

洗浄卵と無洗浄卵での菌透過比較試験では、3種の *salmonella* 属菌のうち、洗浄卵での *Salmonella typhimurium* のみに卵殻の透過が確認され、他の菌種については確認が出来なかった（表5）。また菌の侵入も卵白にのみ確認されたが、卵黄に侵入したという形跡は不明であった。

<i>Salmonella</i> Spp.	Conditioning	①	②	③	④	⑤
<i>S. enteritidis</i>	UW-EY (洗浄卵黄)	—	—	—	—	—
	UW-AL (洗浄卵白)	—	—	—	—	—
	W-EY (無洗浄卵黄)	—	—	—	—	—
	W-AL (無洗浄卵白)	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	UW-EY	—	—	—	—	—
	UW-AL	—	—	—	—	—
	W-EY	—	—	—	—	—
	W-AL	—	—	—	+	—
<i>S. infantis</i>	UW-EY	—	—	—	—	—
	UW-AL	—	—	—	—	—
	W-EY	—	—	—	—	—
	W-AL	—	—	—	—	—

表5 卵殻の洗浄比較試験

【考察】

我が国の鶏卵の生産流通に関しては、徹底した管理体制が敷かれ、食卓には安全な食材が提供されていることが知られている^{12) 13) 14) 15) 16) 17)}。しかし我々の行った実験では、鶏卵に付着した鶏糞から、卵殻を透過して、SEが侵入すること証明された。又 Broiler の盲腸便からは *S. typhimurium* が検出されたところを鑑みるに、鶏卵が on egg で *salmonella* 属菌の汚染に曝露されることが *in vitro* で確認できた。また一般に行われている鶏卵の洗浄に関しては、卵殻を洗浄した場合と洗浄しなかった場合では、洗浄した鶏卵に菌の侵入が認められ、むしろ洗浄したことで卵殻の強度や厚さに構造的な変化が生じ、より一層卵殻への菌侵入の可能性が高まったと言えるのかも知れない。鶏卵を洗浄した後は、保存管理に十分に注意を払う必要があることが、本実験よりわかった。ただ実際に構造的な変化が生じたことで、菌が侵入し易くなったのかどうかは、課題が残ったので、更なる追加的な検証が待たれる。また菌種によって侵入の違いが見られたのは、菌の性質によるものかの確認は本実験では分からなかったもので、やはり追加的な実験が求められるであろう。今回の研究では、卵白と卵黄での違いもみられたが、それがいかなる理由によるのかも判明していない。さらなる詳細な分析が必要である。結論として、鶏卵の生食は、状況によっては危険性を残している。鶏卵の生食を行うに当たっては、徹底した衛生管理について追加的な指針の策定が望ましい。

* 本研究は、文京学院大学共同研究費助成を受けて行われた研究である。また研究に際しては、日

本獣医生命科学大学 牛島研究室及び對馬研究室の協力を得て、貴重な検体の提供及びアドバイスを頂いた。ここにお二方に対しあらためて本誌面にて心から謝意を申し上げる次第である。

* 利益相反：本研究において、開示すべき COI は存在しない。

【参考文献】

- 1) サルモネラ食中毒の発生動向とニワトリ(資料) : 伊藤武, 楠淳, 東京都立衛生研究所 微生物部 細菌第一研究科
- 2) 鶏卵輸送用再生紙トレイに付着した Salmonella の生存性の検討と消毒の試み : 市川雅子, 石本明宏, 福原理映子他, 鶏病研究会報, 1999, 35 巻 3 号, 144-150
- 3) Effects of egg shell quality and washing on Salmonella Infantis penetration : Samiullah, K.K. Chousalkar, J.R. Roberts et al. International Journal of Food Microbiology 2013 165, 77-83
- 4) 養鶏場におけるサルモネラ汚染実態調査 : 青木栄樹, 脇田嘉宏, 古田淳, 宮崎次朗 他 鶏病研究会報, 1993, 28 巻 4 号, 216-219
- 5) SPF 鶏におけるブロイラー盲腸由来およびヒト食中毒事例由来 Campylobacter jejuni の実験的感染 : 佐々木淳, 御領政信, 岡田幸助, 岩獣会報(Iwate Vet.), 2009, Vol. 35 (4), 133-138
- 6) 鶏糞便からのサルモネラ培養法の検討 : 中村政幸, 矢島佳世, 永田知史 et al. 鶏病研究会報, 2001, 36 巻 4 号, 201-206
- 7) Relationship between Salmonella Population and Levels of Volatile Fatty Acids in Ceca of *Eimeria tenella*-infected Chickens : Eiichiroh BABA, Masako NAKANO, Tsuneo FUKATA, and Akira ARAKAWA, Jpn, J, Vet. Sa, 1987, 49(5), 847-851
- 8) Salmonella と Campylobacter jejuni の検査法 : 鶏病研究会, 鶏病研究会報, 1992, 28 巻 2 号, 55-66
- 9) 厚生省通知 : 平成 10 年 11 月 25 日第 1674 号
- 10) 次亜塩素酸ナトリウムを用いた洗浄・殺菌操作の理論と実際 : 福崎智司, 調理食品と技術, 2010, vol6 No. 1, 1-13
- 11) 鶏卵の環境状況に関する概括的考察—サルモネラ属菌汚染を中心に— : 鈴木光一, 眞野容子, 古谷信彦, 對馬宣道, 藤谷克己 生物試料分析, 2016 vol.39, 277-281
- 12) 卵選別包装施設の衛生管理要領 : 厚生省通知 (平成 10 年 11 月 25 日 第 1674 号)
- 13) 鶏卵の生産衛生管理ハンドブック—指導者編 : 平成 27 第 2 版 農林水産省消費・安全局
- 14) 鶏卵の生産衛生管理ハンドブック—採卵鶏農場・生産者編 : 平成 24 年 農林水産省消費・安全局
- 15) 平成 17 年鶏卵のサルモネラ総合対策指針 (厚生労働省)
- 16) クーリング・パッドを備えたトンネル換気型無窓鶏舎の夏季における舎内環境の特徴 : 對馬宣道, 向後克哉, 太田能之 畜産の研究 2008, Vol.62-10, 1069-1079
- 17) トンネル換気型無窓鶏舎の冬季における舎内環境の特徴 : 對馬宣道, 向後克哉, 太田能之 畜産の研究 2008, Vol.62-11, 1189-1197

【和文要旨】

サルモネラ菌属による食中毒の報告は減少しつつあるも、その危険性がしばしば指摘される。一方我国では鶏卵の生食は一般化しており、その危険性が予想される場所である。本研究においては、*Salmonella* 属菌について鶏卵への on egg での菌汚染について検証した。鶏卵は採卵されると一般に洗浄して市場に流通される。そこで洗浄前と洗浄後で卵殻の透過にどのような影響があるか検証を試みた。使用した *Salmonella* 属菌は 3 種類で、*Salmonella Infantis*, *Salmonella Entiritidis*, *Salmonella Typhimurium* である。卵殻内への侵入機序については市販の鶏卵を用いて、9 日前後で透過することが先行の研究で認められている (2106 鈴木 藤谷 et al)。洗浄卵と無洗浄卵での菌透過比較試験では、3 種の *salmonella* 属菌のうち、洗浄卵での *Salmonella typhimurium* のみに卵殻の透過が確認され、他の菌種については確認が出来なかった。さらに菌の侵入も卵白にのみ確認されたが、卵黄に侵入したという形跡は不明であった。今後は鶏卵の生食に関して、その安全性を担保するべき何らかの追加的措置が求められる。

【英文要旨】

Reporting of food poisoning case caused by *Salmonella* spp. is decreasing in these days, but its health risk is often pointed out. On the other hand eating raw eggs in our country is getting popular even at the street restaurants, where its risk is expected highly. In this study, we examined the bacterial contamination (on egg) of eggs for *Salmonella* spp. When the eggs collected at each chicken farm, they are circulated in the market after being washed generally. Therefore we verified whether there are any impacts on the bacterial penetration of the eggshell by eggshell washing. *Salmonella* spp., used in this study was three types, *Salmonella Infantis*, *Salmonella Entiritidis*, *Salmonella Typhimurium*. For the bacterial penetration mechanisms through the eggshell into the egg inside, the period of transmission was in about 9 days, which was observed in the preceding study by using commercial eggs. (2106 Suzuki Fujitani et al). In the comparison test of bacterial transmission between the wash eggs and un-washed eggs, the transmission of eggshell has been confirmed only in *Salmonella Typhimurium* in the wash eggs, but no other species were detected. Though the bacterial penetration of the eggshell was confirmed only in the egg albumen, but not detected in the egg yolk. With respect to eating raw eggs, any additional security measures should be required for the safety of food intoxication in the future.

人工呼吸器関連肺炎の発症機序における多剤耐性緑膿菌(MDRP)と non-MDRP の病原性 についての比較検討

文京学院大学保健医療技術学部 古谷信彦、眞野容子

要旨

人工呼吸器肺炎における多剤耐性緑膿菌(MDRP)と non-MDRP の病原性の差を明らかにするためにバイオフィーム形成量、菌体外物質 (pyocyanin、elastase、total protease) 産生量を比較するとともにバイオフィーム形成状態での薬剤感受性試験を可能にする in vitro モデルの作製を試み、MDRP と non-MDRP におけるバイオフィーム形成量とバイオフィーム内生菌数を比較検討した。pyocyanin はクロロホルムで抽出し、elastase、total protease はそれぞれ Remazol Brilliant Blue R-Hide 法、elastin congo red 法で測定した。バイオフィームは 1%クリスタルバイオレットで染色し、エタノールで抽出後、吸光度(OD750)で測定した。また、ミュラー・ヒントン培地を用いてバイオフィーム内の生菌数を求めた。その結果、菌体外物質 (pyocyanin、elastase、total protease) 産生量はすべて MDRP よりも non-MDRP の方が高く、バイオフィーム産生量は MDRP の方が non-MDRP よりも多いことが明らかとなった。以上より MDRP と non-MDRP の病原因子には相違があることが示唆された。

背景・目的

近年、抗癌剤、免疫抑制剤などの薬剤や medical device などの医療技術の進歩によりそれまで難治とされていた疾病の予後が著しく改善している。しかし、その一方でこのような薬剤や medical device の使用は compromised host の増加をもたらし、医療機関内で発症する日和見感染症の温床となっている。人工呼吸器関連肺炎 (VAP) はそのような日和見感染症の中で最も予後の悪い感染症であり、緑膿菌による感染症はメチシリン感性黄色ブドウ球菌 (MSSA)、インフルエンザ菌について多くみられ、その死亡率は 40%以上に達する。緑膿菌は多くの抗菌薬に対して自然耐性を示し、さらに多剤耐性緑膿菌 (MDRP) が出現・増加している¹⁻³⁾。MDRP は発症した場合、有効な抗菌薬がないのでほとんどの症例が死に至るが、non-MDRP は発症した場合、薬剤感受性試験の結果によって適切な抗菌薬が投与されるのでほとんどが救命されると考えられるが、実際には MDRP と non-MDRP で VAP の発症率と VAP による死亡率に差がないことが示唆されている⁴⁾。

緑膿菌の病原性には付着や motility に関与する鞭毛や 4 型線毛、細胞壁の構成成分であり、内毒素でもあるリポポリサッカライド (LPS)、菌体外に分泌される様々な種類の外毒素や酵素、宿主細胞に直接毒素を接種する 2 型および 3 型分泌システム、バイオフィームの形成や病原性の制御に関与するクオラムセンシングシステムや GacA/GacS 二成分システム、cyclic-di-GMP など様々な因子が関与する⁵⁾。

そこで、本研究ではその原因を解明するために MDRP と non-MDRP の病原因子について比較検討した。また、挿管チューブに付着した緑膿菌はバイオフィームを形成する。薬剤感受性検査に基づいた抗菌薬投与にも関わらず、non-MDRP による死亡率が高い背景には通常の薬剤感受性検査で測定される最小抗菌薬発育阻止濃度 (MIC : minimum inhibitory concentration) とバイオフィーム存在下における MIC の乖離が想定される。そこで、今回、バイオフィーム産生量とバイオフィーム存在下における MIC の測定が可能な簡易法の確立を試みた。

材料・方法

使用菌株: 喀痰から分離された臨床由来 MDRP と non-MDRP をそれぞれ 7 株ずつ使用し、コントロール株として PAO1 を使用した。MDRP は感染症法に準じ、カルバペネム系、アミノグリコシド系、ニューキノロン系の 3 剤すべてに耐性であるものとし、non-MDRP は上記 3 剤すべてに感性であるものとした。

菌体外物質産生量の測定: pyocyanin: LB broth 5mL に 10^5 /mL の菌液を $10 \mu\text{L}$ 接種し、 35°C 、24 時間振盪培養した。3000rpm、10 分の遠心で得た上清にクロロホルムを加え、よく混和し遮光状態で 3 時間静置した。上清を除去し、0.2N HCl を加えて遮光状態で 1 夜静置、クロロホルム層を除去した後、520nm の波長で吸光度を測定した⁶⁾。

elastase、total protease: 上記菌液を加えた LB broth を 35°C 、15~16 時間振盪培養した。total protease は 3000rpm、10 分の遠心で得た上清に Remazol Brilliant Blue R-Hide を 5mg 加え 1 時間反応させた後に 595nm の波長で吸光度を測定した⁷⁾。elastase は 3000rpm、10 分の遠心で得た上清に Elastin Congo Red を 10mg 加え 6 時間反応させた後に 495nm の波長で吸光度を測定した⁸⁾。

バイオフィーム形成量の測定: 緑膿菌を 1.5×10^5 /mL (マクファーランド 0.5) 含むミュラー・ヒントン液体培地を 10 倍希釈し、96well マイクロプレートに $180 \mu\text{L}$ ずつ接種し、 35°C 、24 時間静置培養した。培養後、各 well に 1%クリスタルバイオレットを $20 \mu\text{L}$ ずつ分注し 10 分間染色、PBS で洗浄後、各 well の培養液を除去し乾燥させた。各 well に 95%エタノールを $200 \mu\text{L}$ ずつ分注し 15 分間抽出後、570nm の波長で吸光度を測定した⁹⁾。

バイオフィーム内生菌数の測定: ミュラー・ヒントン液体培地で 10^4 /mL の濃度の菌液を作製し、96well マイクロプレートに $150 \mu\text{L}$ /well ずつ接種し、peg の付いた蓋をかぶせ 35°C 、24 時間静置培養した。培養後、蓋をリンスプレートにかぶせ 2 分間放置洗浄し、蓋をさらに PBS が $150 \mu\text{L}$ /well 入ったリカバリープレートに移し、sonicator で 10 分間超音波処理した。リカバリープレートから蓋を外し、プレートから $10 \mu\text{L}$ ずつ採取し、段階希釈後、ミュラー・ヒントン寒天培地に接種し菌数を測定した⁹⁾。

結果

pyocyanin の産生量の平均値は MDRP 群よりも non-MDRP 群の方が高値を示した。また、MDRP 群では pyocyanin の産生はほとんど認められなかった(図 1)。elastase、total protease の産生量の平均値は pyocyanin と同様、MDRP 群よりも non-MDRP 群の方が高値を示した。しかも MDRP では elastase、total protease とともにその産生はごく少量であった(図 2)。バイオフィーム形成量は、PAO1 株の吸光度 1 とした場合で示した(図 3)。バイオフィーム形成量の平均値は non-MDRP 群では PAO1 株と同等であったが、MDRP 群は PAO1 株の 2 倍以上の産生がみられた。また、non-MDRP 群では株によってバイオフィーム形成量に差がみられた。一方、peg 当たりのバイオフィーム内生菌数の平均値は non-MDRP 群と MDRP 群で差はみられず、1 菌当たりのバイオフィーム形成量も non-MDRP 群よりも MDRP 群の方が多量であることが明らかとなった(図 4)。

図 1. MDRP と non-MDRP における pyocyanin 産生量の比較

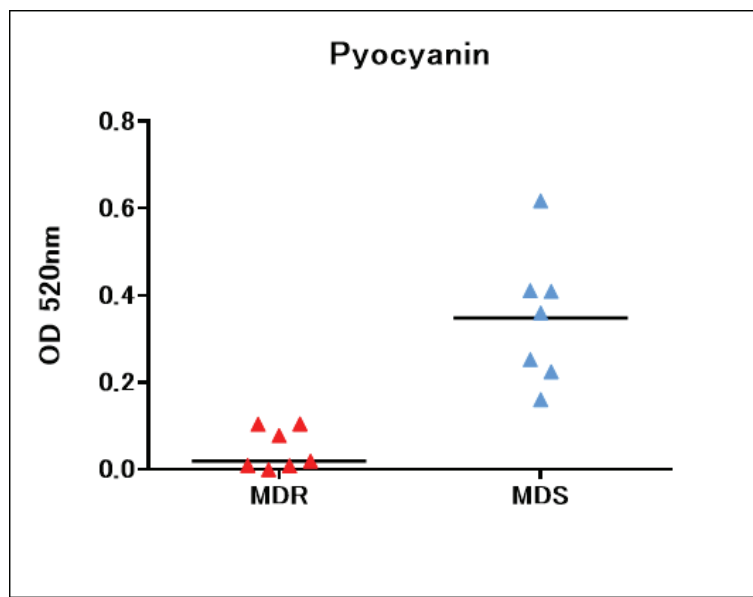


図 2. MDRP と non-MDRP における菌体外酵素 (Elastase、Total protease) の産生量の比較

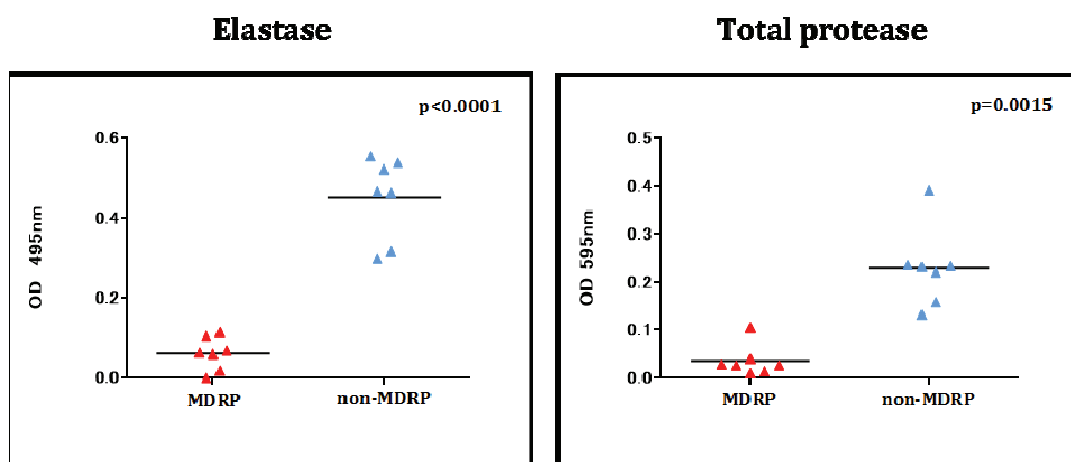
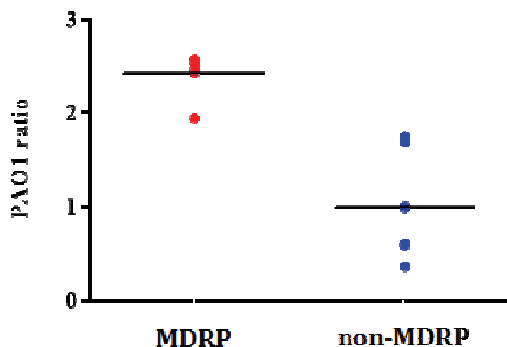
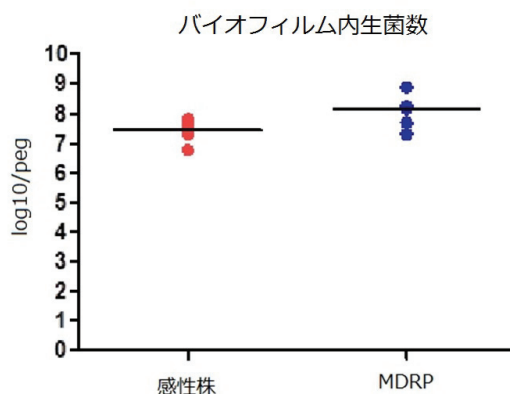


図 4. MDRP と non-MDRP のバイオフィーム産生量の比較



P. aeruginosa PAO1 株の吸光度を 1 とし、比で算出

図 5. MDRP と non-MDRP のバイオフィーム生菌数の比較



考察

MDRP 群は non-MDRP 群よりも菌体外産生物質の産生量は明らかに低値であり、一方、バイオフィーム産生量は MDRP 群の方が明らかに高値を示す。このことから non-MDRP 群と MDRP 群では肺炎の発症機序が異なることが推定される。すなわち、non-MDRP 群では菌体外産生物質による肺胞破壊が、MDRP 群ではバイオフィームによる肺拡散能の障害(DLco の低下)が想定される。したがって、今後、バイオフィームの酸素透過性についても検討する必要がある。また、今回の検討でバイオフィーム存在下における MIC 測定法を確立することができた。non-MDRP 群による高い死亡率はバイオフィームの影響によって菌体表面に到達する抗菌薬の濃度が低下することによるものと考えられる。したがって、バイオフィーム存在下における MIC と通常の薬剤感受性検査で得られる MIC の比較検討も今後実施する必要がある。

文献

- 1) Melson WG, Rovers MM, Groenwold RH, et al: Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis* 13:665-671, 2013.

- 2) Kalanuria AA , Zai W, Mirski M, et al: Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Critical Care* 18:208-215, 2014.
- 3) Hedrick TL, Smith RL, McEamey STM: Differences in early- and late-onset ventilator-associated pneumonia between surgical and trauma patients in a combined surgical or trauma intensive care unit. *J Trauma-Injury Infect Critical Care* 64:714-720, 2008.
- 4) Yang K, Zhou H, Guglielmo BJ, Wiener-kronish J: Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: the role of endotracheal aspirate surveillance cultures. *Ann Pharmacother* 43:28-35, 2008.
- 5) Gallatly SL, Hancock REW: *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease* 67:159-173, 2013.
- 6) Essar DW, Eberly L, Hadero A, et al: Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthases in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 172:884-900, 1990.
- 7) Kumar L, Chhibber S: Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fitoterapia* 102:84-95, 2015.
- 8) Ohman DE, Cryz SJ: Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol* 142:836-842, 1980.
- 9) Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al: The Calgary biofilm device; New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37:1771-1776, 1999.