

論文内容の要旨

論文提出者氏名 向井 理英子

論文題目

High-Fat diet causes constipation in mice via decreasing colonic mucus.

論文内容の要旨

便秘は最も一般的な胃腸症状の一つであり、生活の質に影響を与える慢性機能性障害である。そして食習慣は、便秘の発症の重要な要因である。食物繊維や十分な量の水分摂取が

便秘を改善するという報告はよく見受けられるが、脂肪摂取との関係に関する報告は少ない。ヒトを対象とした研究では高脂肪食が糖尿病や高齢者の便秘と強く関連するという報告があるが、この背景にあるメカニズムは未だ不明である。

さらに、結腸粘液が糞便のスムーズな動きを促進することも報告されているが、便秘と大腸粘液量の関係に着目した報告は少ない。

そこでこの研究では、高脂肪食 (HFD) が、マウスモデルで便秘を引き起こすかどうかについて、特に大腸粘液量に着目してそのメカニズムを明確にすることを目的とした。我々の知る限り、この研究がマウスモデルを用いた HFD と便秘関係を明らかにする最初の研究であるとする。

6 週齢の雄性 C57BL / 6 マウスを使用し、無作為に 6 匹ずつ 2 つのグループに分けた。HFD group は HFD (56.7 Fat kcal%, HFD32, CLEA) を、普通食 (Normal chow diet) group は NCD (12.0 Fat kcal%, CE2, CLEA) を 8 週間自由摂取させ、体重、摂餌量、便重量、便の水分含有量を測定した。その結果、体重は HFD グループで有意に増加したが摂餌量は 2 群で有意差は認めなかった。便重量は HFD グループで有意に減少し (0.86 ± 0.32 vs. 2.07 ± 0.41 g/day; $p = 0.002$)、便水分含有量は有意差を認めなかった。 (25.86 vs. 11.65% ; $p = 0.084$)

全消化管通過時間は、墨汁 0.1 ml を胃内へ投与し着色した便が排出するまでの時間を測定、大腸通過時間は、インフルランで吸入麻酔をかけたマウスの盲腸に 0.05% のフェノールレッド溶液を 0.1 ml 注入し、その後着色した便が排出するまでの時間を測定した。結果は、全消化管通過時間 (272.0 ± 32.25 vs. 189.16 ± 41.30 min; $p = 0.006$)、大腸通過時間 (194.60 ± 53.29 vs. 91.80 ± 40.70 min; $p = 0.027$) とともに HFD group で延長を認めた。

大腸の粘液量は PAS 染色陽性物質の量を測定した。すなわち、大腸を摘出し、1ml の PBS で懸濁・ホモジネートした後、 4°C ・20,630 G で 15 分間遠心分離した。さらに過ヨウ素酸 (0.1%、 $100 \mu\text{l}$) を加え、 37°C で 2 時間インキュベート後、 $100 \mu\text{l}$ のシッフ試薬を添加し、室温でインキュベートした。30 分後、得られた溶液の 555 nm の波長の吸光度を

PAS 陽性物質の量として測定した。さらに、組織学的検討も行った。方法は、NCD group および HFD group それぞれの大腸組織を摘出しアルシアンブルー染色することにより行った。ランダムに選択した部位で総面積に対する青く染色された面積の比率を、Image J を使用し分析した。その結果、PAS 染色陽性物質 (1.76 ± 0.11 vs. 1.32 ± 0.19 $\mu\text{g}/\mu\text{g protein}$; $p = 0.025$) および、組織の青染色面積比率 (39.34 ± 4.55 vs. $52.17 \pm 14.18\%$; $p = 0.047$) とともに HFD group で減少していた。さらに、大腸粘液と便秘の関係を明らかにするために、粘液洗浄作用を持つ界面活性剤 (Pluronic F-68) を使用して補助実験を行った。Pluronic F-68 は、界面活性剤の中でも腸管障害を起こすことなく大腸粘液を減少させる作用を持つと報告がある。これを NCD 給餌マウスの盲腸に注射し、24 時間後に前述の方法で大腸粘液量と大腸通過時間を測定した。Pluronic F-68 は蒸留水と比較して NCD 給餌マウスにおいて、結腸粘液量を有意に減少させた (1.62 ± 0.39 vs. 2.87 ± 0.93 $\mu\text{g}/\mu\text{g protein}$; $p = 0.040$)。さらに、Pluronic F-68 を注射したマウスは大腸通過時間の延長 (35.83 ± 8.65 vs. 24.17 ± 5.55 分; $p = 0.035$) と便重量の低下 (1.80 ± 0.29 対 3.16 ± 0.33 g/日; $p = 0.032$) を認めた。粘液量と大腸通過時間には負の相関を認めた。 ($r = -0.56$)

最後に、酸化ストレスマーカーとして Malondialdehyde (MDA) を測定した。MDA は脂質過酸化分解生成物の一つであり、脂質過酸化の主要なマーカーとして広く用いられている。摘出した大腸粘膜の MDA 濃度を市販の MDA 測定キット (JAICA、静岡、日本) を使用してマニュアルに従い測定した。HFD group の大腸粘膜内の平均 MDA 濃度は NCD group に比して有意に高値であった。 (0.328 ± 0.060 vs. 0.111 ± 0.045 nM/g protein; $p = 0.042$)

以上の結果から、HFD は大腸粘液量を減少させることでマウスの便秘を引き起こすと考えられた。HFD group では便重量が減り、大腸通過時間が延長した一方で摂餌量や便水分含有量に差を認めなかったことから、HFD は便の組成には影響を与えず、単に便の通過を妨げることで便秘を引き起こしていると考えられた。便のスムーズな動きを促進するためには、便と粘膜表面との間の粘液層が重要であることが報告されており、我々は粘液の重要性に着目し研究を行った。そして実際、Pluronic F-68 によって大腸粘液を減少させることで、便重量の低下、大腸通過時間の延長を認めた。大腸粘液はおそらく糞便の通過に重要な役割を果たす。大腸通過時間を測定する事は、大腸の運動障害の有無から便秘の種類を判断し、個別の治療方針を決定できるという点で有用である。便秘モデルマウスを扱った既報では、全消化管通過時間のみを検討している報告が多く、in vivo で大腸通過時間を検討している既報はなく、意義深いと考える。さらに抗酸化物質が便秘を改善することが知られており、本研究でも大腸粘膜での酸化ストレスについて検討した。本研究では、脂質過酸化の指標として MDA を測定し、HFD group で上昇を認めたがこれが便秘とどのように関連しているのかは更なる研究が必要である。HFD による大腸粘液の減少は便秘の原因の 1 つであり、食事の改善や粘液増加剤が HFD による便秘の治療に有用となりうる。