

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19647

研究課題名(和文) 小児潰瘍性大腸炎に対する糞便移植と腸内細菌叢の検討

研究課題名(英文) Fecal Microbiota Transplantation for pediatric ulcerative colitis

研究代表者

清水 泰岳 (SHIMIZU, HIROTAKA)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・器官病態系内科部・医師

研究者番号：80751198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎に対する糞便移植については、2017年度末までに合計9例に対して実施した。比較的軽症の患者で早期に移植した場合は良好な結果が得られた。しかし、糞便移植を希望する患者の多くは、複数の内科的治療を尽くしても治療が奏功せず、外科的大腸全摘術を回避する目的であり、その場合の治療成績は不十分だった。

糞便移植の治療成績は、小児潰瘍性大腸炎の1例に対し、反復して糞便移植を行ったことの有効性を Pediatrics International誌に報告した。また、2016年にはカナダで開催されたWCPGHANで5例に対する成績を報告した。便処理法の研究成果は2017年に米国のAIBDで報告した。

研究成果の概要(英文)：We performed FMT to 9 children with ulcerative colitis until the end of March 2018. Favorable results were achieved in relatively mild patients. However, most part of the candidates for this study were already resistant to several drugs including biologics and / or steroid and intended to avoid colectomy. In these patients, the result of FMT was not promising. We reported a case successfully treated with repeated FMTs on Pediatric International. We presented 5 cases treated with repeated FMTs at WCPGHAN held in Canada. At AIBD 2017 in USA, we reported the impact on microbiota by blending the FMT solutions under aerobic condition.

研究分野：Gastroenterology

キーワード：FMT ulcerative colitis children

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における潰瘍性大腸炎の患者数は増加の一途をたどっており、2012年には14万人を超えた。潰瘍性大腸炎の原因は完全には明らかにはなっていないが、免疫異常、環境因子に加え、腸内細菌叢の異常の関与が報告されている(Gut 53:1-4,2004)。さらに、腸内細菌数の減少だけでなく、多様性の低下も認められること、その傾向はステロイド治療抵抗例ではより顕著であることも報告されている(Inflamm Bowel Dis 18:1799-1808,2012)。この腸内細菌叢の異常の是正をターゲットにした治療が糞便移植である。

糞便移植は、健常なヒトの便を処理し、患者の腸内に注入する治療である。欧米では *C. difficile* の薬剤耐性株による難治性偽膜性腸炎が問題となっているが、従来の薬物治療では治癒率が31%なのに対し、糞便移植では94%と非常に高い有効性がRCTで示されている(NEJM 368:407-15,2013)。

成人の潰瘍性大腸炎に対する糞便移植の成績は、AndersonらのSystematic reviewによると、症状改善が76%、6週以内のIBD治療薬中止が76%、寛解が63%で認められた(Aliment Pharmacol Ther 36:503-516,2012)。

小児潰瘍性大腸炎に対しては、Kundeらが7歳から21歳の小児潰瘍性大腸炎患者10例に対して5日間の糞便移植を行い、1週間以内に67%で臨床的改善を認め、33%は臨床的寛解を認め、さらに1か月後まで維持したことを報告している(JPGN 56:597-601,2013)。

しかし、本邦小児潰瘍性大腸炎に対する糞便移植の報告はなく、また、本邦小児潰瘍性大腸炎患児における腸内細菌叢に関するデータをまとめた報告もない。そこで本研究では、本邦小児潰瘍性大腸炎患者における糞便移植の有効性と安全性を明らかにし、その腸内細菌叢の特徴と糞便移植による変化について検討することを課題とした。

潰瘍性大腸炎の治療は大きく進歩し、多くの患者では、5-ASA製剤、ステロイド、免疫調節薬、免疫抑制剤、血球成分除去療法、生物学的製剤などの内科的治療により、寛解導入・維持が可能となった。しかし、いずれも腸管に生じた炎症(=結果)の鎮静化を目的とした治療であるため、多くの場合、治療を生涯にわたり継続しなければならない。また、ステロイドの成長障害や易感染性、免疫調節薬・生物学的製剤の発癌リスク等、それぞれの治療に特有の副作用が報告されており、特に成長期にあり、罹病期間も長くなる小児では治療上の問題になることも少なくない。

このような状況の中で、近年、潰瘍性大腸炎の原因の一つと考えられている腸内細菌の異常をターゲットとした治療として、糞便移植が注目されている。

もし、潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢の異常が糞便移植により是正され、それに伴い治療薬の中止と長期寛解維持が可能となれば、

小児を含めたすべての患者にとって、福音となる可能性がある。さらに症例を重ねて、糞便移植前後での腸内細菌叢の変化を検討することで、潰瘍性大腸炎の病態解明の一助となるデータが得られたり、将来的に、「理想的な腸内細菌叢」が明らかになれば、それらを配合した、より安全かつ簡便な人工便の開発につながられる可能性がある。

## 2. 研究の目的

申請者は2013年に11歳のステロイド依存性、全結腸炎型の潰瘍性大腸炎患者を担当した。5-ASA製剤、ステロイド、タクロリムス、インフリキシマブといった本邦のガイドラインに示されているあらゆる内科的治療を行ったが、ステロイドを離脱できず、頻回の再燃を繰り返していた。大腸全摘術の相対的適応と考えたが、本人・家族とも手術治療に同意せず、家族から糞便移植実施への強い希望があったため、倫理委員会の承認を経て糞便移植を実施した。結果、糞便移植を反復して実施することにより、インフリキシマブでの寛解維持が可能となり、それまで5mg以下に減量すると確実に再燃を繰り返していたステロイドも1.5mgまで減量可能となった。症状増悪による緊急入院がなくなり、復学も可能となるなど、明らかな改善を認めた。

移植前には、*Klebsiella*(43%)、*E.coli*(36%)、*Morganella*(11%)、*Salmonella*(3%)などが大半を占める異常な組成だったが、移植3週間後からは最優勢菌が *Bacteroides*(73%)となり、ドナー便の腸内細菌叢に近似していった。なお、移植によると思われる有害事象は認めなかった。

以上のように、我々は、小児潰瘍性大腸炎患者1例に対して本邦初となる糞便移植を行い、臨床的な効果と安全性、腸内細菌組成の劇的な改善を確認した。

これらの経験を踏まえ、本研究では、プロトコールに則って、より多くの症例に対して糞便移植を実施し、糞便移植の効果と安全性の検討を行うとともに、腸内細菌叢の解析により、本邦小児患者の糞便中腸内細菌叢の特徴、糞便移植による腸内細菌叢の変化、内視鏡的寛解の達成率、効果を得るのに必要な糞便移植の回数などを検討することとした。さらに著効群と無効群の比較をすることにより、患者の腸内細菌叢の特徴やドナー側の腸内細菌叢の特徴など、効果予測因子の検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

【1】糞便移植の効果と安全性を検討するため、基準を満たした複数の症例に対して、プロトコールに従って糞便移植を実施し、臨床症状スコア(PUCAI)、血液検査、便中カルプロテクチン、内視鏡所見、組織学的所見等に基づき、評価する。

【2】本邦の小児潰瘍性大腸炎患者における腸内細菌叢の特徴と糞便移植による変化を

明らかにするために、患者とドナーの糞便を定期的に採取し、順天堂大学大学院プロバイオティクス研究講座の指導・協力を得て、腸内細菌叢の解析を行う。

【3】糞便移植奏功群と無効群で患者・ドナーの細菌叢を分析し効果予測因子の検討を行う。

#### 【糞便移植の実施方法】

糞便移植の対象患者の組入基準

- ・ 6 歳以上 18 歳未満の小児で、Porto Criteria にて潰瘍性大腸炎と診断された患者、もしくは、同様に潰瘍性大腸炎と診断され、大腸全摘術後に難治性回腸囊炎となった患者。
- ・ ただし、潰瘍性大腸炎の治療は、原則として、本邦の小児潰瘍性大腸炎治療指針案（2008 年）ならびに、ヨーロッパ小児栄養消化器肝臓学会によるコンセンサスガイドライン（2012 年）に基づいた治療を優先する。
- ・ しかし、患者・家族から糞便移植実施についての明確な要望があった場合、アレルギー等により 5-ASA 製剤を使用できないが、それ以上の治療強化は躊躇われる場合、従来の治療に抵抗性でステロイド依存性の場合等では、治療選択肢の一つとして糞便移植を提示する。
- ・ また、抗菌薬投与や注腸治療などの従来の治療に抵抗性の難治性回腸囊炎についても、同様に治療選択肢の一つとして糞便移植を提示する。
- ・ いずれも本治療が現時点では確立された治療ではないこと、未知の感染リスクを伴うこと等について十分な説明を行い、書面での同意が確認された場合に糞便移植を行うものとする。

糞便移植の対象患者の絶対的除外基準

- ・ 潰瘍性大腸炎患者では、大量出血、中毒性巨大結腸症等、明らかな手術適応のある患者
- ・ 感染性腸炎に罹患している患者

糞便移植の対象患者の相対的除外基準

- ・ 明らかな食物アレルギー、薬物アレルギーの既往のある患者
- ・ HBV, HCV, HIV 陽性患者

糞便移植のドナーの選択基準

- ・ ドナーは、原則として、患者の家族・三親等以内の親族で、以下の除外基準に該当しない健康な方とする。

糞便移植の実施スケジュール

- ・ 糞便移植は原則として、初回は 5 日間連続で行い、その後 2~3 週間に 1 回の頻度で反復して実施する。
- ・ 1 か月毎に糞便移植継続の必要性を評価し、1 か月以上の寛解状態が確認された場合

には、移植を終了できる。

- ・ 患者・家族から中止の申し出があった時、状態が悪化し、手術や他の治療導入が妥当と判断された時は中止する。
- ・ 最長で 24 か月のフォローを行う。
- ・ 定期的に患者を診察し、臨床症状を小児潰瘍性大腸炎の活動性指標である PUCAI (Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index) で評価し、血液検査で炎症反応等を確認する。患者・ドナーの糞便も定期的に採取し、腸管炎症の指標として有用性が報告されている便中カルプロテクチンを国立成育医療研究センター免疫科で測定する。また、腸内細菌叢の解析と腸内環境因子の有機酸・pH の測定を順天堂大学大学院プロバイオティクス研究講座で実施する。

## 4. 研究成果

潰瘍性大腸炎に対する糞便移植については、先行症例 1 例を含め、合計 9 例（うち 3 例は VE0-IBD）に対して実施した。

治療成績としては、3 例で改善が得られたが、6 例では効果不十分もしくは無効だった。

本研究の特徴としては、糞便移植実施前に抗菌薬による腸管前処置を行っていること、さらに、腸内細菌の多くを占めるとされる嫌気性菌を保持するため、通常は大気下にて行われている便の採取からブレンダーでのミキシングに至る処理を、嫌気環境を保って行っていること、そして、便移植を単回ではなく、複数回反復して行っていることがあげられるが、現状において、糞便移植を希望する患者の多くが、内科的治療を尽くしても治療が奏功せず、外科的大腸全摘術を回避する目的であり、特にそういった症例の治療成績は不良と言わざるを得なかった。一方で、比較的早期に介入した患者では、比較的良好な結果が得られ、治療強化の回避や患者の QOL の改善にも寄与することができた。

糞便移植がどのような症例に適しているのかを含め研究を継続し、検討を重ねる。

また、副次的な研究として、移植便の前処理を嫌気的環境で行うことについての有用性を検討するため、前処理を好気・嫌気それぞれの環境で行った場合の腸内細菌叢の変化を検討した。この研究では菌叢の解析を菌の死滅後すみやかに分解される RNA を対象として行うことで、検体中の生菌数を評価した。

その結果、好気的処理と嫌気的処理を行った直後に RNA later を用いて RNA を固定し、菌組成を比較した場合では、好気的環境で便を処理した場合も、有意な生菌数の減少は見られなかった。

ただし、好気的攪拌処理により菌が死滅した場合でも、直後に RNA later で固定すると、RNA としては保存される可能性も考えられたため、好気的攪拌処理後 2 時間大気中に静置した検体の菌組成も検討したところ、攪拌直後と比較して有意な菌数の減少が認められ

た。

今後は、実際の糞便移植を実施する状況に合わせて、好氣的攪拌処理を行ったのちに、好氣環境で1時間放置した検体と、嫌氣的攪拌処理を行ったのちに、嫌氣環境を保って1時間静置した検体について、嫌氣性菌の保持に差がみられるかについても検討を進める。

## **5. 主な発表論文等**

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Shimizu H, Arai K, Abe J, Nakabayashi K, Yoshioka T, Hosoi K, Kuroda M.

Repeated fecal microbiota transplantation in a child with ulcerative colitis. *Pediatr Int.* 2016; 58: 781-5.

2. 清水泰岳, 新井勝大:【糞便微生物移植(FMT)】小児腸疾患に対する糞便微生物移植. *G.I. Research* 2016;24(1):26-30

〔学会発表〕(計3件)

1. Shimizu H, Arai K, Takeuchi I, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, Matsumoto S, Yamashiro Y. Anaerobic Preparation Method of Solutions for Fecal Microbiota Transplantation is not Superior to Conventional Aerobic Method. *ADVANCES in INFLAMMATORY BOWEL DISEASES*, 2017, USA.

2. Shimizu H, Sato M, Takeuchi I, Hirano Y, Arai K: Effect of Repetitive Fecal Microbiota Transplantation to the 5 Japanese Children with Ulcerative Colitis. *World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHAN)*, Montreal, Canada. 2016/10/5-8

3. 清水泰岳, 竹内一朗, 丘逸宏, 新井勝大ら. 糞便移植を実施した小児潰瘍性大腸炎の5例. 日本小児 IBD 研究会, 大阪. 2017/2/5

## **6. 研究組織**

(1)研究代表者

清水 泰岳

研究者番号: 80751198

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし