

令和 2 年 6 月 1 7 日現在

機関番号： 8 2 6 1 2

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2017 ~ 2019

課題番号： 1 7 K 1 8 4 0 5

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 Children with 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： 8 0 7 5 1 1 9 8

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小児潰瘍性大腸炎患者8例に対し、抗菌薬による前処置後に、嫌気的条件下で調製したドナー便の反復投与を行う糞便移植を実施した。その結果、2例では長期的な臨床的寛解が得られ、内視鏡的寛解も達成された。残る6例は1例治療反応性の改善を認めたものの、長期的寛解は達成できなかった。不応例は、いずれもステロイド抵抗性もしくは依存性の難治例で、うち5例は生物学的製剤や免疫調節薬を複数使用しても寛解しない難治例であった。糞便中の腸内細菌叢の解析では移植前はドナーとは大きく異なる構成であったが、6例で移植によりドナーの構成に近似する傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児潰瘍性大腸炎患者8例に対して糞便移植を行い、2例で臨床的寛解に加えて、内視鏡的寛解を1年間にわたり達成できたことは有意義であった。一方で、6例は長期的寛解を達成しえなかったが、うち5例は現在使用できるあらゆる治療薬を駆使しても寛解を維持できない最重症例であった。腸内細菌叢の解析では、8例中7例がドナーと大きく異なる細菌組成だったが、8例中6例では移植によりドナーに近似する傾向が見られた。以上より、あらゆる治療に抵抗性の最重症例よりは軽症～中等症の症例に効果が期待できる可能性があること、および、小児患者に最適なドナー組成について、さらなる検討が望まれることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, repetitive fecal microbiota transplantations (FMTs) using anaerobically-prepared stool after antibiotic pretreatment altered the intestinal bacterial compositions. Clinical and endoscopic remission was achieved in 2 patients who had never received infliximab or tacrolimus. Further studies are needed to optimize FMT methods and donor and patient selection.

研究分野： 小児炎症性腸疾患

キーワード： 糞便移植 腸内細菌叢 炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 小児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

（1）小児 UC 患者における FMT の有効性と腸内細菌叢の変化に関する検討

近年、本邦における潰瘍性大腸炎(UC)の患者数は増加傾向が続いており、2016 年には 16 万人を超えた。現在のところ、UC の原因は完全には明らかにされていないが、免疫異常や環境因子に加え、腸内細菌叢の異常の関与が報告されている。

この腸内細菌叢を是正する治療として注目されたのが糞便移植(FMT)である。FMT は、治療抵抗性の偽膜性腸炎に対し 90%以上の有効性があることがすでに大規模比較試験で証明されている。UC においても、FMT により寛解導入・維持に成功した報告があるが、本邦小児における実施報告は限られている。

（2）嫌気的な糞便の処理が偏性嫌気性菌に与える影響に関する検討

UC 患者に対する FMT の実施方法については、統一された方法はなく、報告者により様々な方法で実施されていた。近年の次世代シーケンサーを用いた手法により、これまでは培養が難しかった偏性嫌気性菌についても解析が可能になるとともに、ヒトの腸内には 1000 種類を超える多様な腸内細菌が棲息していることが明らかになった。そのうち、いわゆる有用菌とされる菌は、ほとんどが空気に触れると死滅してしまう偏性嫌気性菌であると言われている。そこで、我々は、FMT を実施するにあたり、これらの偏性嫌気性菌をより多く保持するために、採便からミキシングに至る処理を嫌気的环境下で行ったが、この嫌気的なミキシング処理が、従来の好気的环境下での処理と比較して、偏性嫌気性菌の保持につながるかどうかについては、明らかにされていない。

2．研究の目的

（1）小児 UC 患者における FMT の有効性と腸内細菌叢の変化に関する検討

UC は、大腸全摘術以外に根治治療がない。したがって、過剰な免疫応答を抑制するために、ステロイドや免疫抑制剤が使用されることが多い。小児期の患者においては、これらの使用による易感染性や成長障害などの副作用のリスクも少なくない。FMT によって、UC の原因の一つと考えられている腸内細菌叢の異常を是正することができれば、より根本的な原因治療となる可能性がある。

そこで、本研究では本邦小児 UC 患者における FMT の有効性・安全性を明らかにし、小児 UC 患者における腸内細菌叢の特徴と FMT による変化を明らかにすることを目的とした。

（2）嫌気的な糞便の処理が偏性嫌気性菌に与える影響に関する検討

嫌気的环境下で FMT の前処理を行うことで、投与する糞便溶液中の嫌気性菌数に差が出るかを明らかにすることを目的とした。

3．研究の方法

（1）小児 UC 患者における FMT の有効性と腸内細菌叢の変化に関する検討

本研究では、FMT の効果を高めるために、まず、FMT 実施前に、抗菌薬による腸管前処置を行った。さらに、腸内細菌の多くを占めるとされる偏性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た。そして、FMT は単回ではなく、複数回反復して行うプロトコールとした。

FMT が患者の腸内細菌叢に与える影響を評価するため、FMT 前後で、患者およびドナーの糞便を採取し、糞便中の細菌叢を次世代シーケンサーで解析した。

（2）嫌気的な糞便の処理が偏性嫌気性菌に与える影響に関する検討

健康な成人被験者から専用容器を用いて便を採取し、上記の FMT の際に行っている方法と同じ方法で、嫌気環境を保って便を運搬し、嫌気的环境下で生食とミキシング処理をした便と、好気的环境下で生食とミキシング処理をした便の両者に含まれる生菌数を、RT-qPCR 法を用いることで定量的に評価した。

4．研究成果

（1）小児 UC 患者における FMT の有効性と腸内細菌叢の変化に関する検討

本研究期間中に計 8 例の小児 UC 患者に対して FMT を実施した。うち 2 例では、反復 FMT により、臨床的寛解が得られただけでなく、内視鏡的寛解も達成された。さらに、この 2 例では、FMT 中止後も約 1 年間にわたり寛解状態が維持された。

残る 6 例では寛解が得られなかったが、この非寛解例 6 例中 5 例は、生物学的製剤を含む複数の内科的治療を組み合わせても治療が奏功せず、ステロイド依存性もしくは抵抗性を示し、外科的大腸全摘術をも考慮されていた難治例であった。このような治療抵抗性の難治例における FMT の効果は限定的であると考えられた。

腸内細菌叢の解析を行ったところ、FMT 実施前の患者の細菌叢は、健康ドナーの細菌組成とは大きく異なっていた。一方、FMT 実施後の細菌叢は、8 例中 6 例でドナーに近づく傾向がみられており、我々の FMT は患者の糞便中の細菌組成を変えるポテンシャルを有していると考えられ

た。反対に、これらの6例中4例では細菌叢が変化しても臨床効果には結びつかなかったということになる。FMTによって菌叢がドナー組成に近似しても臨床的には改善が得られなかった理由として、患者の腸管粘膜上皮バリアの破壊、粘膜免疫担当細胞の異常活性化などの腸内細菌以外の因子の影響が強かった可能性、そして、注入便中の細菌組成が患児にとって適切ではなかった可能性などが考えられた。

なお、小児潰瘍性大腸炎に対するFMTの成績については、1例の先行症例に関して、反復してFMTを行ったことの有効性を、腸内細菌叢の劇的な変化とともに *Pediatrics International* 誌に報告した。

また、2016年にカナダで開催された *World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHAN)*、2019年にアメリカで開催された *2019 Crohn's & Colitis Congress (CCC)*、日本国内では第15回日本消化管学会総会学術集会および第122回日本小児科学会学術集会で小児UC患者に対するFMTの治療成績と腸内細菌叢の変化について報告した。

(2) 嫌気的な糞便の処理が偏性嫌気性菌に与える影響に関する検討

我々は本研究において、偏性嫌気性菌をより多く保持するために嫌気的環境下で採便からミキシングに至る処理を行ってきたが、この嫌気的なミキシング処理が、従来の好気環境下でのミキシング処理と比較して、偏性嫌気性菌の保持につながるかについて検討を行った。

この研究では、生菌数を定量的に評価するために、RT-qPCR法を用いて、好気処理・嫌気処理の両方でミキシング処理後の生菌数を比較した。

その結果、嫌気的処理を行った方が、有意に *Clostridium coccoides* group, *Bacteroides fragilis* group などの偏性嫌気性菌を保持できることが示された。有意差はなかったが、*C. leptum* subgroup においても嫌気的処理群の方がより多い生菌数が見られる傾向があった。

嫌気的処理により、これらの偏性嫌気性菌群をより多く保持できたことは、FMTの有効性や効率を高めることに関与する可能性があると考えられた。

なお、FMTの好気的・嫌気的な便処理法が嫌気性菌に与える影響についての研究成果は、2017年10月に米国で開催された *AIBD (Advances in Inflammatory Bowel Disease)*、2019年にハンガリーで開催された *5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PAEDIATRIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (PIBD)* で報告した。

なお、現在、これらの研究成果を2本の論文にまとめ、医学雑誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 清水 泰岳
2. 発表標題 小児潰瘍性大腸炎8例に対する抗菌薬前処置併用複数回反復糞便移植の報告
3. 学会等名 第15回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotaka Shimizu
2. 発表標題 OUTCOME OF THE REPETITIVE FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION USING FECAL SOLUTION PREPARED UNDER THE ANAEROBIC CONDITION FOLLOWING THE ANTIBIOTIC PRETREATMENT IN EIGHT CHILDREN WITH ULCERATIVE COLITIS
3. 学会等名 2019 Crohn's & Colitis Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 泰岳
2. 発表標題 小児潰瘍性大腸炎患者 8 例に対する抗菌薬前処置併用糞便移植の実施経験
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu H, Arai K, Takeuchi I, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, Matsumoto S, Yamashiro Y
2. 発表標題 Anaerobic Preparation Method of Solutions for Fecal Microbiota Transplantation is not Superior to Conventional Aerobic Method.
3. 学会等名 ADVANCES in INFLAMMATORY BOWEL DISEASES (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----