

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07920

研究課題名(和文)胆汁酸代謝からみたクロストリジウム・ディフィシル関連下痢症の制御に関する研究

研究課題名(英文) Serum bile acid analysis of patients with Clostridium difficile -associated diarrhea

研究代表者

岩本 淳一 (Iwamoto, Junichi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10384950

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)：clostridium difficile関連下痢症(CDAD)の病態生理や制御を明らかにするために、LC-MS/MSを用いたclostridium difficile関連下痢症およびハイリスク患者血清の胆汁酸分画解析を行った。CDAD発症および再発群では血中のデオキシコール酸(DCA)/[DCA+コール酸(CA)]比の低下が認められた。またその低下は、抗生剤投与前、投与後に関わらずCDAD発症群の初回血清で認められ、初回血清中の(DCA)/[DCA+コール酸(CA)]比の低下が、その後のCDAD発症予測因子として重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、病院・老人施設等におけるクロストリジウム・ディフィシル腸炎が増加して欧米型の様に難治性の傾向となっている。今回の研究で抗生剤投与を行った症例でクロストリジウム・ディフィシル腸炎発症例と非発症例で胆汁酸代謝が異なることを証明した。血液検査で胆汁酸測定を行い解析することで、クロストリジウム・ディフィシル腸炎発症予測、発症リスク、また難治性になる可能性を予測することができる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the pathophysiology and predicting factors of Clostridium difficile -associated diarrhea (CDAD), new LC-MS/MS methods were developed for bile acid analysis of patients' serum. By use of the methods, we analyzed serum from patients with CDAD and high risk group of CDAD. (DCA)/(DCA+CA)ratio was decreased in the CDAD patients compared with non-CD patients after using antibiotics. The decrease of (DCA)/ (DCA+CA)ratio were shown in patients with CDAD before using antibiotics or before the development of CDAD. Thses results indicate that evaluation of bile acid profiles such as (DCA)/ (DCA+CA)ratio is useful for predicting the development CDAD in high risk group.

研究分野：消化器内科学

キーワード：クロストリジウム・ディフィシル 胆汁酸代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、病院・老人施設等における Clostridium difficile 関連下痢症 (CD-associated diarrhea, CDAD) が増加している。欧米型の強毒株による感染はまだ散発的であるが、高齢化社会を迎え、今後わが国でも増加する可能性があり、対策が急務である。CDAD の発症は、C. difficile に対して抗菌活性を有する二次胆汁酸の減少が一因とされている。その二次胆汁酸は、肝臓由来の一次胆汁酸を基質にして、大腸内で Clostridium subcluster XIVa (XIVa) によって生成される。研究代表者らは平成 28 年度までに、極微量の糞便 (肛門部拭い綿棒) または血清を用いて、大腸内 XIVa の多寡を 1 時間以内に判定する新しい方法を確立した。本研究はこの方法を応用し、1) CDAD の新規発症・再発の危険度を評価する方法の開発、2) 難治例となるメカニズムの解明、さらに 3) 胆汁酸代謝からみた CDAD 予防法の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究により、CDAD の高リスク群の絞り込み、難治例の予測が可能となり、個人の腸内環境に応じた適切なマネージメントが可能にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胆汁酸分析

血清、糞便および組織中の胆汁酸は、血清中と胆汁中ではアルカリ加水分解せずに、また肝臓、小腸および糞便中胆汁酸は、1N KOH 水溶液中 80℃ で 20 分間アルカリ加水分解した後に、0.5 M Potassium phosphate buffer (pH 7.5) を添加して、Bond Elute C18 カートリッジ (200 mg, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で抽出・精製した。蒸発乾固後に 20 mM 酢酸アンモニウムバッファー (pH 7.5) / メタノール (1:1, v/v) に再溶解し、その一部を HPLC-MS/MS に導入して分析した。HPLC カラムは Hypersil GOLD column (150 x 2.1 mm, 3 μm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用し、移動相は既報に従った (J Lipid Res 61:54-69, 2020)。

(2) CDAD の発症者では、真に腸内 XIVa の減少による二次胆汁酸の減少が存在し、それを応募者が開発した極微量の糞便由来サンプル または血清の胆汁酸分画分析 (図 1) によって診断可能であることを検証した。胆汁酸マーカー、デオキシコール酸 (DCA) / [DCA + コール酸 (CA)] 比、2 次 BA / (2 次 + 1 次 BA)、free usual BAs、free DCA / total DCA、7 BA / (7 BA + 7oxoBA) の測定を行った。

(3) CDAD 高リスク群の胆汁酸分画を測定し、CDAD 未発症時にも二次胆汁酸の減少があるか否かを明らかにする。さらに、CDAD 発症高リスク群への抗生剤投与前後の胆汁酸分画を測定し、二次胆汁酸減少の程度と CDAD 発症の関係を明らかにした。

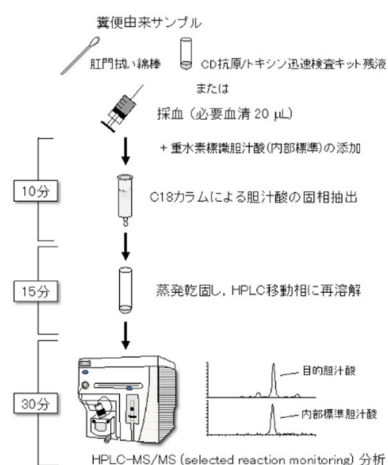


図1 胆汁酸の分析ステップと必要時間

4. 研究成果

(1) 基礎実験として健常人での抗生剤 (LVFX, ST合剤) 投与前後の血清および糞便由来サンプルの胆汁酸分画を測定した。その結果、健常人に 1 週間程度 LVFX, ST合剤を投与しても胆汁酸分画に有意な変化が認められないことが明らかになった。また、腸内細菌叢の変動因子を明らかにするため、ヒト型の胆汁酸組成を持った遺伝子改変マウスの飼育・繁殖を行った。

(2) CDAD 高リスク群の血清サンプルの収集と胆汁酸分析を開始した。その結果、CDAD 発症および再発群では血中のデオキシコール酸 (DCA) / [DCA + コール酸 (CA)] 比の低下が認められた (図 2)。CDAD 発症および再発群での血中のデオキシコール酸 (DCA) / [DCA + コール酸 (CA)] 比の測定に加えて、以下の胆汁酸マーカー、2 次 BA / (2 次 + 1 次 BA)、free usual BAs、free DCA / total DCA、7 BA / (7 BA + 7oxoBA) の測定を追加した。その結果、血中のデオキシコール酸 (DCA) / [DCA + コール酸 (CA)] 比の低下と同様に CDAD 発症では 2 次 BA / (2 次 + 1 次 BA) の比の低下が認められたが、free usual BAs、free DCA / total DCA、7 BA / (7 BA + 7oxoBA) は CDAD 発症群と非発症群間で

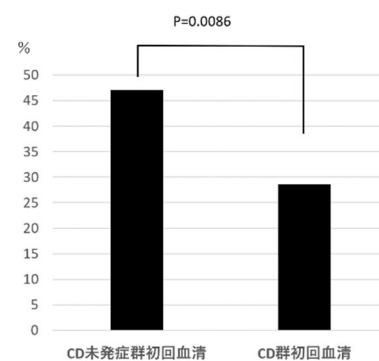


図2 CD未発症群と発症群での DCA/(DCA+CA)の比較

有意な差を認めなかった。入院後初回血清で胆汁酸マーカーを、CDAD発症群と非発症群で比較したところ、(DCA)/[DCA + コール酸(CA)]比がCDAD発症群で有意に低下していた。またその低下は、抗生剤投与前、投与後に関わらずCDAD発症群の初回血清で認められ、初回血清中の(DCA)/[DCA + コール酸(CA)]比の低下が、その後のCDAD発症予測因子として重要であることが示唆された(図3)。

(3) 一方、ヒト型の胆汁酸組成を持った遺伝子改変マウスを用いて、抗生剤投与以外に糞便中のDCA/(DCA+CA)比の低下を引き起こす因子を検討した。その結果、高脂肪・高シヨ糖食投与が、血清および糞便中のDCA/(DCA+CA)比を低下させることが明らかになった。CDADの発症・再発に食生活習慣も影響を与える可能性が示唆された。

(4) 今後の展望

今回の結果を基に、CDADが難治化となるメカニズムの更なる詳細な解明、更なる確固としたCDAD予防法の確立を目指して引き続き現在検討を行っている。

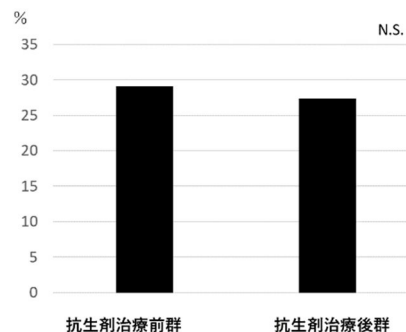


図3 CD発症群での初回血清が抗生剤投与前群と投与後群でのDCA/(DCA+CA)の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Morishita Y, Monma T, Ueda H, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Ikegami T.	4. 巻 61
2. 論文標題 Regulations of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 54-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1194/jlr.RA119000395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwamoto J, Adachi Y, Honda A, Monma T, Matsuzaki Y	4. 巻 64
2. 論文標題 The comparison of the intensity of human intestinal spirochetes between <i>Brachyspira pilosicoli</i> and <i>Brachyspira aalborgi</i> infections	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 86-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.18-68	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanazawa T, Takezawa T, Iwamoto J, Adachi Y	4. 巻 80
2. 論文標題 Simultaneous isolation of two species, <i>Brachyspira pilosicoli</i> and <i>Brachyspira aalborgi</i> , from a patient with ulcerative colitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 1416-1419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami M, Iwamoto J, Honda A, Tsuji T, Tamamushi M, Ueda H, Yara S, Miyazaki T, Hirayama T, Saitou Y, Ikegami T, Matsuzaki Y	4. 巻 24
2. 論文標題 Detection of gut dysbiosis due to reduced clostridium subcluster IXVa using the fecal or serum bile acid profile	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflamm Bowel Dis	6. 最初と最後の頁 1035-1044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ibd/izy022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bamba S, Inatomi O, Nishida A, Ohno M, Imai T, Takahashi K, Naito Y, Iwamoto J, Honda A, Inohara N, Andoh A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Relationship between the gut microbiota and bile acid composition in the ileal mucosa of Crohn's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5217/ir.2021.00054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchiyama K, Takami S, Suzuki H, Umeki K, Mochizuki S, Kakinoki N, Iwamoto J, Hoshino Y, Omori J, Fujimori S, Yanaka A, Mizokami Y, Ohkusa T	4. 巻 15
2. 論文標題 Efficacy and safety of short-term therapy with indigo naturalis for ulcerative colitis: An investigator-initiated multicenter double-blind clinical trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0241337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura M, Overby A, Michimae H, Matsui H, Takahashi S, Mabe K, Shimoyama T, Sasaki M, Terao S, Kamada T, Yanaka A, Iwamoto J, Tanabe S, Tari A, Nasu S, Suzuki H, Yamagata Murayama S	4. 巻 25
2. 論文標題 PCR analysis and specific immunohistochemistry revealing a high prevalence of non-Helicobacter pylori Helicobacters in Helicobacter pylori-negative gastric disease patients in Japan: High susceptibility to an Hp eradication regimen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Helicobacter	6. 最初と最後の頁 e12700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hel.12700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwamoto J, Murakami M, Monma T, Ueda H, Tamamushi M, Konishi N, Yara SI, Hirayama T, Ikegami T, Honda A, Mizokami Y.	4. 巻 66
2. 論文標題 Current states of prevention of drug-induced gastroduodenal ulcer in real clinical practice: a cross-sectional study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 158-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.19-66	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上 昌, 門馬 匡邦, 岩本 淳一
2. 発表標題 胆汁酸研究の新たな臨床展開: 自己免疫性肝疾患からウイルス肝炎、生活習慣病まで 血清胆汁酸分析を用いたdysbiosisの診断と消化器疾患診療への応用
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多 彰、宮崎照雄、岩本淳一、平山 剛、池上 正
2. 発表標題 ヒト型胆汁酸マウスにおける胆汁酸代謝
3. 学会等名 第41回胆汁酸研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 昌, 岩本淳一, 本多 彰
2. 発表標題 血中胆汁酸分析による腸管内Clostridium subcluster XIVa比率の簡易評価
3. 学会等名 第49回日本消化吸収総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本淳一
2. 発表標題 腸内環境と腎臓病治療薬, 腸内細菌叢と胆汁酸代謝の関連性
3. 学会等名 第51回日本消化吸収学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
研究 分担者	本多 彰 (Honda Akira) (10468639)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究 分担者	宮崎 照雄 (Miyazaki Teruo) (60532687)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------