

令和 6 年 7 月 6 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K20203

研究課題名(和文)人工肛門萎縮腸管へのシンバイオティクス投与による腸管免疫賦活に関する臨床応用

研究課題名(英文)Clinical application of intestinal immunity stimulation by administering synbiotics to the atrophied intestine of the anal side of ileostomy.

研究代表者

岡本 耕一 (Okamoto, Koichi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・外科学講座・講師)

研究者番号：20783517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：回腸双孔式人工肛門閉鎖術前において、廃用性萎縮した肛門側腸管へのシンバイオティクス投与効果を無作為化比較試験で検討したところ、投与群において有意な形態学的萎縮改善効果および成熟免疫担当細胞数の増加を認めた。腸内細菌叢の網羅的解析において、投与群の口側菌叢-肛門側菌叢の定性的群間距離(OA distance)は、非投与群のOA distanceと比し有意に小さく、投与群と非投与群の肛門側菌叢間距離(AA distance)は非投与群内のAA distanceと比し有意に小さかった。術後の血中細菌DNAの検討では、非投与群において大腸菌が2例、腸球菌が1例に認められたが、投与群では認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおいて、シンバイオティクス投与前後の腸管を採取し、萎縮腸管に対するシンバイオティクスによる形態学的かつ免疫学的に有意な萎縮改善効果を確認できたこと、便や腸液の通過しない腸管内の細菌叢の解明と、シンバイオティクス投与により有意な変化を明らかにしたこと、人工肛門閉鎖後にBacterial translocationが発生し、シンバイオティクス投与によるその予防効果が窺えたこと、以上が本研究の学術的意義となる。また、日常診療において、人工肛門閉鎖は一般的に行われる手術であり、本成果を参考にした安全な人工肛門閉鎖が他施設でも普及すれば、多くの患者への還元と共に医療費削減にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：A randomized controlled trial examined the effect of administering synbiotics to the atrophic anal side of ileostomy with double orifices before stoma closure. The treatment group showed a significant improvement in morphological atrophy and an increase in the number of mature immune cells. In a comprehensive analysis of the intestinal flora, the UniFrac distance between the oral side flora and the anal side flora (OA distance) in the treatment group was significantly smaller than the OA distance in the non-treatment group, and the UniFrac distance between the anal side flora (AA distance) between the treatment group and the non-treatment group was significantly smaller than the AA distance in the non-treatment group. In an examination of bacterial DNA in the blood after surgery, Escherichia coli was found in two cases and Enterococcus faecalis in one case in the non-treatment group, but none in the treatment group.

研究分野：消化器外科

キーワード：シンバイオティクス プロバイオティクス 人工肛門閉鎖 萎縮腸管 バクテリアルトランスロケーション

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

下部直腸で器械吻合を行う低位前方切除術では、縫合不全の合併率が高く 10%程度と報告されている。縫合不全が発生しても重篤化させないため、一時的な人工肛門造設は非常に有用であるが、吻合部の安静が保たれた後に 2 期的な人工肛門閉鎖術を行う必要があり、低位前方切除術に人工肛門造設を加えるか否かについては施設により意見が分かれる。

そのため、国内において大腸癌研究会主宰のプロジェクト研究「低位前方切除術における一時的な人工肛門造設に関する多施設共同前向き観察研究」が実施された。その結果、一時的な人工肛門造設は、縫合不全発症による全身的な悪影響を緩和し、緊急での再手術の必要性を有意に減らすことが示された。

一方、人工肛門閉鎖術は手術侵襲が軽度で、全身状態が良好な患者を対象にした手術であるが、術後合併症発生率は軽微な創感染も含め 10~40%との報告もあり、軽度な手術侵襲であるにも関わらず術後感染性合併症の発生率は比較的高い。また、人工肛門閉鎖術後に感染性合併症の数%は全身性炎症反応症候群 (SIRS) や重篤な腸炎を併発し重篤化することがあり、当科においても過去 15 年間で原因不明の敗血症をきたした 2 例の死亡を経験した。

双孔式人工肛門の肛門側腸管は数か月間もの長期間腸管を使用しないため、便や腸液の通過が無くなり腸内細菌を介する抗原提示や物理的刺激の欠如が生じ、廃用性に形態学的かつ免疫学的な萎縮を来す。(Figure 1,2)

Figure 1

回腸双孔式人工肛門の肛門側腸管の形態学的萎縮評価 HE染色

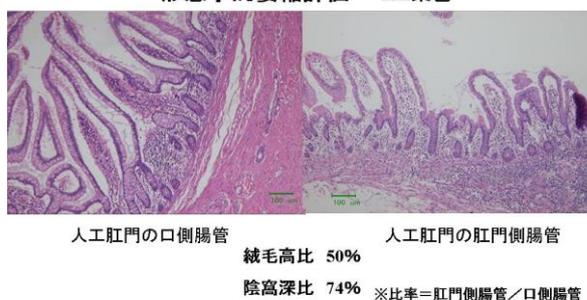
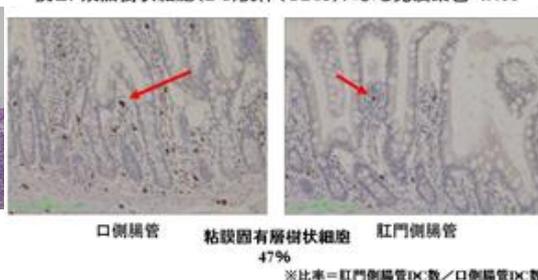


Figure 2

免疫学的萎縮評価

抗ヒト成熟樹状細胞(DC)抗体(CD83)による免疫染色 x400



特に、人工肛門閉鎖術後に感染性腸炎や bacterial translocation が疑われる術野外感染を来した症例と非感染症例との比較では、術野外感染合併症例は形態学および免疫学的 (免疫担当細胞数) に有意な肛門側腸管の萎縮が認められた (Figure 3,4)。

Figure 3

形態学的萎縮の検討

非感染症 vs. 術野外感染 (37例) (6例)

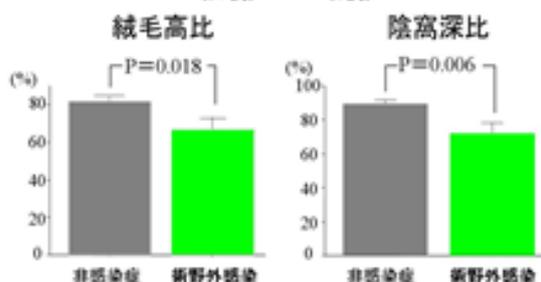
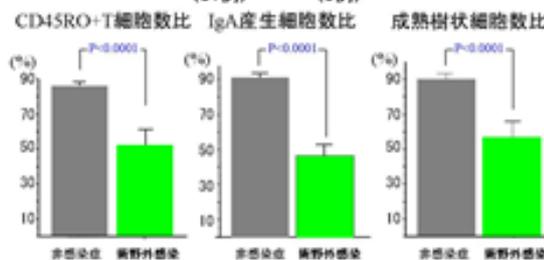


Figure 4

免疫学的萎縮の検討

非感染症 vs. 術野外感染 (31例) (6例)



※比=肛門側腸管/口側腸管

以上の結果から、術後の感染性腸炎や bacterial translocation のリスクを軽減するため、シンバイオティクスを用いて双孔式人工肛門の肛門側腸管の形態学的・免疫学的萎縮の改善や腸内細菌叢を整え、その後に人工肛門閉鎖術を実施する治療法を考案し、無作為化比較試験により検証した。

### 2. 研究の目的

人工肛門閉鎖術後、「強度な廃用性萎縮による腸管免疫の低下した肛門側腸管に便や腸液が流れ込むことにより、bacterial translocation や感染性腸炎を来したのではないか。」という仮説を立て、腸管の粘膜萎縮を改善することが報告されているシンバイオティクス (乳酸菌, グルタミン, 食物繊維およびオリゴ糖) を、人工肛門から萎縮した肛門側腸管に直接投与することにより、術前に萎縮の改善と腸管免疫能の向上を図る。その後、人工肛門閉鎖術を行うことによって、より安全な手術を目指す。

### 3. 研究の方法

回腸人工肛門閉鎖術前に Synbiotics 投与群と非投与群へ無作為に割り付け、投与群 23 症例と非投与群 25 症例を対象に解析した。投与群には、術直前 4 日間 Synbiotics としてビオフェルミン® 3g/day と GFO® 2 袋/day を肛門側腸管へ人工肛門から直接注入した。主要評価項目は、感染性合併症発生率、SIRS 発生率、SIRS 期間および術後平均在院日数とし、副次的評価項目は、病理組織学的な形態学的・免疫学的萎縮改善度、血中細菌 DNA 検出率（術前、術後 4 病日、術後 7 病日）、人工肛門の口側と肛門側腸管各々の腸内細菌叢の変化を解析した。

### 4. 研究成果

無作為に割り付け、対象となった投与群 23 症例と非投与群 25 症例の 2 群間において、患者背景に差を認めなかった。また、Synbiotics 投与による有害事象は無く、安全に投与できた。

主要評価項目（感染性合併症発生率、SIRS 発生率、SIRS 期間および術後平均在院日数）に関しては、両群間に有意差を認めなかった。

一方、副次的評価項目は以下の有意な効果が認められた。

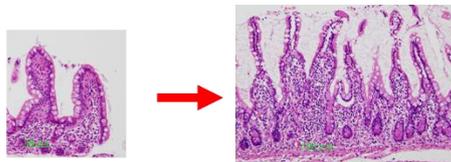
#### (1) Synbiotics 投与による形態学的・免疫学的萎縮改善効果の検証

絨毛高萎縮改善比 [(SC 切除肛門側標本 / SC 切除口側標本) × 100 - (投与前生検肛門側標本 / 投与前生検口側標本) × 100] を比較すると、投与群と非投与群の順に 13.9 ± 3.0% vs. 3.3 ± 2.9%, P=0.016 で有意な形態学的萎縮改善効果、CD45RO+ T 細胞数改善比は 14.8 ± 2.4% vs. 0.1 ± 2.3%, P<0.0001 で有意な免疫学的萎縮改善効果を認めた。

### 一形態学的萎縮改善効果の検討一

	投与群 (n=23)	非投与群(n=25)	P-value
生検 (投与前) 絨毛高萎縮比(%) <sup>※</sup>	59.8 ± 3.3	64.6 ± 3.2	n.s. <sup>1)</sup>
※(投与前生検肛門側標本 / 投与前生検口側標本)			
↓			
萎縮改善比 [(SC 切除肛門側標本 / SC 切除口側標本) × 100 - (投与前生検肛門側標本 / 投与前生検口側標本) × 100] を算出			
絨毛高萎縮改善比(%)	13.9 ± 3.0	3.3 ± 2.9	0.016 <sup>2)</sup>

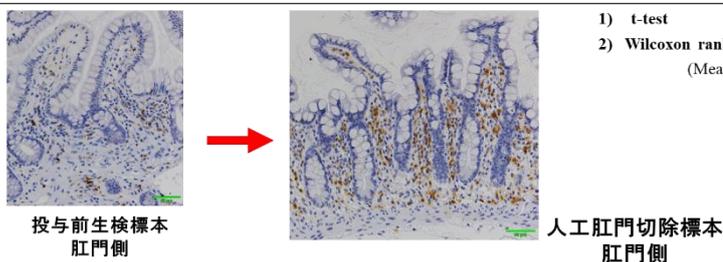
1) t-test  
2) Wilcoxon rank sum test  
(Means ± SEM)



### 一免疫学的萎縮改善効果の検討一

	投与群(n=23)	非投与群(n=25)	P-value
生検 (投与前) CD45RO+ T細胞数改善比(%) <sup>※</sup>	78.0 ± 2.4	81.7 ± 2.3	n.s. <sup>1)</sup>
※ (投与前生検肛門側標本 / 投与前生検口側標本) (対物40倍3視野の合計でそれぞれ検討)			
↓			
萎縮改善比 [(SC 切除肛門側標本 / SC 切除口側標本) × 100 - (投与前生検肛門側標本 / 投与前生検口側標本) × 100] を算出			
CD45RO+ T細胞数改善比(%)	14.8 ± 3.0%	0.1 ± 1.6%	<0.001 <sup>2)</sup>

1) t-test  
2) Wilcoxon rank sum test  
(Means ± SEM)

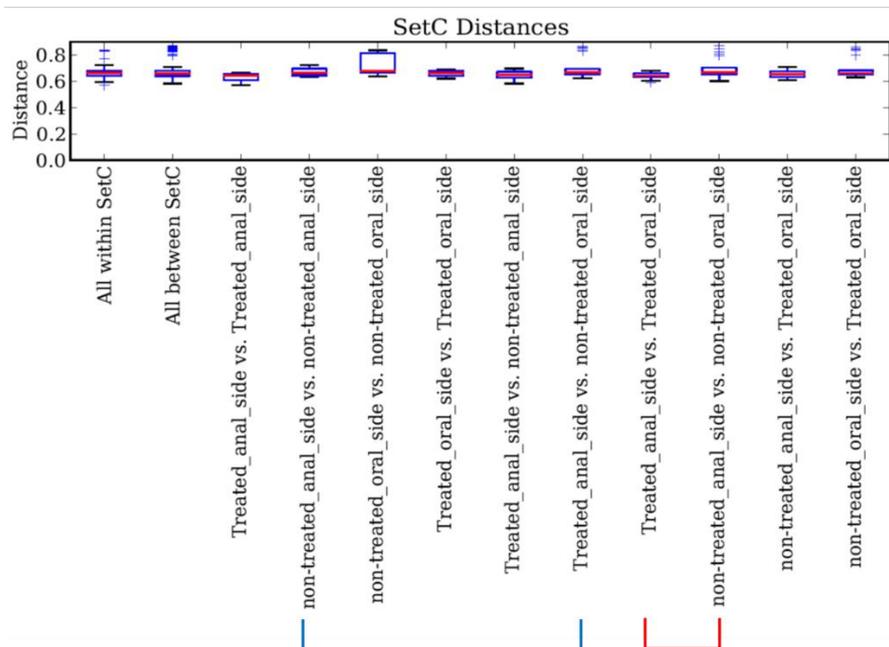


## (2) 人工肛門の肛門側空置腸管への Synbiotics 投与による腸内細菌叢への影響

本研究登録 1~10 番目の症例を対象に、口側と肛門側腸管それぞれの粘膜から細菌 DNA を抽出し、細菌の種を超えて保存・安定している 16S rRNA 領域を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。

細菌叢の定性的群間距離（菌叢構造の違いを距離として計算）に関して、投与群の口側菌叢-肛門側菌叢の群間距離 (OA distance) は、非投与群の OA distance と比較し有意に小さく (P=0.001)、投与群と非投与群の肛門側菌叢間距離 (AA distance) は非投与群内の AA distance と比較し有意に小さかった (P=0.041)。α 多様性に関しては、非投与群と投与群各々の肛門側腸管の菌叢に有意差は認めなかった。

### — 腸内細菌叢の網羅的解析 —



## (3) 人工肛門の肛門側空置腸管への Synbiotics 投与による腸内細菌叢への影響

In situ hybridization 法による術後 4 病日の末梢血における好中球中の DNA 測定において、全 48 例中、非投与群では大腸菌が 2 例と腸球菌が 1 例に認められ BT が疑われたが、投与群に細菌 DNA は認めなかった。

### — In situ hybridization 法による血液中の好中球が貪食した細菌 DNA の測定 —

(術前、術後第4および第7病日)

In situ hybridization 法による測定の特徴

- ・血液培養法の約4倍の検出率
- ・抗菌薬投与の有無で成績が左右されない
- ・Contaminationの可能性が低い

	投与群 (n=23)	非投与群 (n=25)	P-value
<b>In situ hybridization 陽性</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>n.s.</b>
陽性菌種			
<b>大腸菌</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	
			(4POD 陽性1例、7POD 陽性1例)
<b>腸球菌</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	(7POD 陽性)

Fisher's exact probability test

以上の結果より、人工肛門閉鎖術前の肛門側空置腸管への Synbiotics 投与は、形態学および免疫学的に有意な萎縮改善効果を有すると共に、肛門側腸管内の細菌叢を整え、人工肛門閉鎖術後の Bacterial translocation を予防する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 神津 慶多, 岡本 耕一, 梶原 由規, 神藤 英二, 畑中 宏之, 上野 秀樹	4. 巻 82
2. 論文標題 廃用萎縮腸管に便とプレバイオティクス注入後に回腸人工肛門を閉鎖した1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨床外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1363-1368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3919/jjsa.82.1363	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本耕一, 梶原由規, 望月早月, 山寺勝人, 曾田悠葵, 田代恵太, 神藤英二, 辻本広紀, 岸庸二, 上野秀樹
2. 発表標題 回腸双孔式人工肛門の肛門側萎縮腸管へのSynbiotics投与が腸内細菌叢へ及ぼす影響 - 16S rRNA解析結果 -
3. 学会等名 第79回日本消化器外科学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岡本耕一
2. 発表標題 Probioticsの腸管免疫賦活効果を用いた手術成績向上の試み - 大腸癌手術および人工肛門閉鎖術への臨床応用 -
3. 学会等名 第8回那須栄養リハビリ研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本耕一 相原一紀 田中耕太郎 神藤英二 梶原由規 望月早月 白石壮宏 永田健 安部紘生 辻本広紀 岸庸二 上野秀樹
2. 発表標題 Probiotics投与による新たな大腸術前の腸管前処置法が術後の臨床的転帰に与える影響 -Conの立場から-
3. 学会等名 第34回日本外科感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本耕一, 神藤英二, 梶原由規, 望月早月, 山寺勝人, 阿尾理一, 米村圭介, 白石壮宏, 永田健, 矢口義久, 小林美奈子, 長谷和生, 辻本広紀, 岸庸二, 上野秀樹
2. 発表標題 回腸双孔式人工肛門閉鎖術前の肛側腸管へのSynbiotics投与による粘膜萎縮改善効果の検討 - 無作為化比較試験 -
3. 学会等名 第35回 日本臨床栄養代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本耕一, 神藤英二, 梶原由規, 望月早月, 小林美奈子, 阿尾理一, 米村圭介, 白石壮宏, 永田健, 安部紘生, 岩崎 寿光, 宮田 陽一, 永生 高広, 菅澤 英一, 長谷和生, 辻本広紀, 岸庸二, 上野秀樹
2. 発表標題 回腸双孔式人工肛門閉鎖術における術後腸炎およびBacterial translocation予防に関する検討
3. 学会等名 第75回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本耕一, 神藤英二, 梶原由規, 望月早月, 渡邊智記, 山寺勝人, 阿尾理一, 米村圭介, 白石壮宏, 小林美奈子, 青笹季文, 辻本広紀, 長谷和生, 橋口陽二郎, 深柄和彦, 上野秀樹
2. 発表標題 双孔式人工肛門の肛側腸管萎縮と閉鎖術後の感染性合併症との関連 - Synbioticsによる萎縮改善のランダム化比較試験 -
3. 学会等名 第119回日本外科学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------