

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08731

研究課題名(和文) 消化器外科手術後感染性合併症を予防するプロバイオティクス製剤の開発

研究課題名(英文) Development of probiotics medicine for probiotics medicine for preventing postoperative infectious complications following

研究代表者

横山 幸浩 (Yokoyama, Yukihiro)

名古屋大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：80378091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間を通じて高度侵襲消化器外科手術を受ける患者の術前の便を約2,200例分、血液を250例分ほど集積した。これらの検体を解析し、術前腸内環境と術後感染性合併症の関係について調べている。中間解析では、術前便中有機酸濃度の中で乳酸濃度が上昇した患者ではより術後感染性合併症を発生しやすいことが判明した。また術前に採集した血液は、細菌特異的リボソームRNAをターゲットにしたRT-PCR法で解析し、術前の潜在的菌血症の有無を調べ、その結果と術後感染性合併症の関連を調べている。少なくとも食道癌手術症例においては、術前潜在的菌血症の存在と術後手術部位感染症(SSI)に有意な相関があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度侵襲消化器外科手術における術前腸内環境と術後合併症(特に感染性合併症)との関連についての報告は少ない。この意味で、本研究の結果はオリジナリティが高いたく、今後さらに外科手術と腸内環境の関連を研究してゆくきっかけとなり得る。本研究で証明している潜在的菌血症(O-BT, Occult-bacterial translocation)は、日常臨床で行われている培養法では決して検出できない。しかし我々はこのO-BTが臨床的にも重要であると考えている。実際に本研究ではそのことが証明されている。

研究成果の概要(英文)：Over the course of the study, approximately 2,200 preoperative stool samples and 250 blood samples were collected from patients undergoing highly invasive gastrointestinal surgery. We are analyzing these samples and investigating the relationship between the preoperative intestinal environment and postoperative infectious complications. An interim analysis revealed that patients with elevated lactate concentrations in their preoperative fecal organic acid concentrations were more likely to develop postoperative infectious complications. In addition, blood collected before surgery was analyzed using RT-PCR, which targets bacteria-specific ribosomal RNA, to determine the presence or absence of occult bacteremia before surgery. At least in cases of esophageal cancer surgery, we found a significant correlation between the presence of preoperative occult bacteremia and postoperative surgical site infection (SSI).

研究分野：消化器外科

キーワード：腸内環境 便中有機酸濃度 術後感染性合併症 高度侵襲消化器外科手術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれは先行研究で、周術期にプロバイオティクスを使用することにより、術後感染性合併症発生が抑制されることを確認してきた。われわれがプロバイオティクスとして使用したものは *Lactobacillus casei* Shirota および *Bifidobacterium breve* Yakult であったが、これらがプロバイオティクス製剤として最善のものであるかについては不明である。ヒトの腸内には術後感染性合併症をより強く抑制する菌が存在する可能性がある。本研究では、高度侵襲外科手術後の合併症を最も強力に抑制する腸内細菌種を、無菌マウスにヒトの腸内細菌叢を移植したモデルを用いて探索することを目的とする。

2. 研究の目的

消化器外科領域の高度侵襲外科手術では、術後感染性合併症の発生を減らすことが重要な課題である。われわれは先行研究で、高度侵襲外科手術を受ける患者において、手術侵襲に伴う腸内環境の乱れがバクテリアルトランスロケーションを誘発し、これが術後の感染性合併症につながることを証明してきた。また周術期にプロバイオティクスを使用することにより、これらの負の要因が改善されることも複数の臨床研究で確認してきた。本研究では、まず周術期において人体に最も有用な影響を与える菌種を複数の候補から同定することを目的とする。さらにこの菌種が同定されたら、有用な影響をもたらすために必要な至適投与量や投与回数を無菌マウスから作成したノトバイオート化マウス(単独・複数を問わず細菌叢が明らかなマウス)のモデルを用いて探索する。

3. 研究の方法

高度侵襲外科手術患者からの糞便の採取; 高度侵襲外科手術を予定されている患者から術前に採取した試料のうち糞便中の短鎖脂肪酸濃度が 高く腸内環境が良好であると判断され、かつ術後に合併症を併発しなかった患者の便(優良便)と術前より便中短鎖脂肪酸濃度が低く、術後も合併症を併発した患者の便(非優良便)に分ける。選択する症例数は優良便 20 例、非優良便 20 例とする。

ヒト便移植マウスの作成; 無菌マウスにヒトの優良便と非優良便を経口投与し、ヒト便移植マウスを作成する。優良便、非優良便ともに 1 例分を各々 2 匹の無菌マウスに投与する。

ヒト便移植マウスを用いた肝障害モデルの実験; 上記ヒト便移植マウスに対して肝虚血再灌流を 15 分行った後に 70% 肝切除術を行い、術後 3 時間後、6 時間後、24 時間後の肝障害の程度を評価する。また腸間膜リンパ節や血液中の細菌量を細菌特異的リボソーム RNA をターゲットにした RT-PCR 法 (YIF-Scan 法) で測定し、バクテリアルトランスロケーションの有無および程度を評価する。さらに腸管の整合性の評価として、採取した腸管サンプルに対して HE 染色による組織学的評価を行うとともに、claudin、occludin、および ZO-1 の mRNA や蛋白発現を real-time PCR、Western blotting、免疫組織染色などで確認する。

最も肝障害が低かった糞便検体の菌叢解析; 上記モデルで最も肝障害程度が低かった糞便検体と最も肝障害程度が高かった糞便検体を次世代シーケンサーおよび YIF-Scan 法を用いて菌叢解析を行い比較し、手術侵襲に伴う肝障害あるいはバクテリアルトランスロケーションを抑制するために最も有効な菌種を選別する。

最も肝障害程度の低かった菌種を移植したマウスによる至適投与量、投与期間の探索; 上記の研究を通じて同定された最も肝障害を起こしにくい菌種(単数あるいは複数)を用いて、ノトバイオートマウスを作成し、菌の至適投与量および投与期間を確定する耐術能を最も高める菌種を凍結乾燥化; 肝障害やバクテリアルトランスロケーション誘発を最も強く抑制する菌種を凍結乾燥化し、通常のマウス(非無菌マウス)に経口投与し、これまでの実験と同様に肝ストレスモデルによる肝障害の程度、バクテリアルトランスロケーションの有無、腸管粘膜組織整合性の変化を確認する。またマウスから糞便を採取し、経口投与した菌種が定着しているかどうか、またこの菌種により腸内環境に変化がみられるかどうかを評価する。腸内環境の評価としては、代表的な腸内細菌種だけでなく、腸内環境全体の代謝機能を反映した便中有機酸濃度(特に酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸濃度)や便中 pH も測定する。このような過程を経て最終的にヒトに投与可能なプロバイオティクス製剤を開発する。

4. 研究成果

研究期間を通じて高度侵襲消化器外科手術を受ける患者の術前の便を約 2,200 例分、血液を 250 例分ほど集積した。これらの検体を解析し、術前腸内環境と術後感染性合併症の関係について調べている。中間解析では、術前便中有機酸濃度の中で乳酸濃度が上昇した患者ではより術後感染

性合併症を発生しやすいことが判明した。また術前に採集した血液は、細菌特異的リボゾーマル RNA をターゲットにした RT-PCR 法で解析し、術前の潜在的菌血症の有無を調べ、その結果と術後感染性合併症の関連を調べている。少なくとも食道癌手術症例においては、術前潜在的菌血症の存在と術後手術部位感染症（SSI）に有意な相関があることが判明した。これらの研究を通じて、プロバイオティクス製剤となり得る菌種の候補がいくつかみつまっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 横山幸浩 | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 高度侵襲消化器外科手術における潜在的菌血症の臨床的意義 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 外科と代謝・栄養 | 6. 最初と最後の頁 181-185 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 横山幸浩 | 4. 巻 78 |
| 2. 論文標題 外科手術における腸内細菌叢の重要性 シンバイオティクスの術後感染性合併症抑制効果 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 臨床外科FOCUS | 6. 最初と最後の頁 364-369 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| 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 Masahide Fukaya , Yukihiro Yokoyama , Hiroaki Usui , Hironori Fujieda , Yayoi Sakatoku , Takamasa Takahashi , Kazushi Miyata , Mai Niikura , Takuya Sugimoto , Takashi Asahara , Masato Nagino , Tomoki Ebata | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Impact of synbiotics treatment on bacteremia induced during neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer: A randomised controlled trial | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Nutrition | 6. 最初と最後の頁 5781-5791 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clnu.2021.10.004. Epub 2021 Oct 13. | 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 Yukihiro Yokoyama, Masahide Fukaya | 4. 巻 233 |
| 2. 論文標題 Clinical Importance of Occult-Bacterial Translocation Is Still Under Investigation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of American College of Surgeons | 6. 最初と最後の頁 162-164 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jamcollsurg.2021.03.032. | 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8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 横山幸浩 |
| 2. 発表標題 手術前後の食事にシンバイオティクスを加えると術後合併症は減らせるか？-エビデンスのご紹介- |
| 3. 学会等名 腹部救急学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 横山幸浩 |
| 2. 発表標題 高度侵襲外科手術におけるシンバイオティクスの有効性について |
| 3. 学会等名 日本臨床栄養代謝学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------------|
| 1. 発表者名 横山幸浩 |
| 2. 発表標題 高度侵襲外科手術におけるシンバイオティクスの感染性合併症抑制効果 |
| 3. 学会等名 日本臨床腸内微生物学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 横山幸浩 |
| 2. 発表標題 高度侵襲消化器外科手術の周術期におけるシンバイオティクスの感染性合併症抑制効果 |
| 3. 学会等名 日本外科感染症学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 出井秀幸、横山幸浩 |
| 2. 発表標題 肝胆膵外科手術における術前腸内細菌叢が術後合併症に及ぼす影響についての前向き臨床研究 |
| 3. 学会等名 日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 出井秀幸、横山幸浩 |
| 2. 発表標題 肝胆膵外科手術における術前腸内細菌叢が術後感染性合併症に及ぼす影響についての前向き臨床研究 |
| 3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名 長尾拓哉、横山幸浩 |
| 2. 発表標題 食道切除・胃管再建における術後合併症と術前便中有機酸濃度の検討 |
| 3. 学会等名 日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 出井秀幸 横山幸浩 夏目誠治 奥野正隆 川勝章司 清水泰博 柳野正人 江畑智希 |
| 2. 発表標題 膵頭十二指腸切除症例における術前腸内細菌叢が術後合併症に及ぼす影響についての前向き臨床研究 |
| 3. 学会等名 日本外科代謝栄養学会 |
| 4. 発表年 2021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 | 山口 淳平 (Yamaguchi Junpei) (00566987) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901) | |
| 研究分担者 | 渡辺 伸元 (Watanabe Nobuyuki) (20746903) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901) | |
| 研究分担者 | 江畑 智希 (Ebata Tomoki) (60362258) | 名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901) | |
| 研究分担者 | 國料 俊男 (Kokuryo Toshio) (60378023) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|