

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09361

研究課題名（和文）乳幼児の反復性尿路感染症における腸内細菌層是正による新規予防法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new preventive method to correct gut microbiota in infants with recurrent urinary tract infections

研究代表者

木全 貴久（KIMATA, TAKAHISA）

関西医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90593517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：有熱性尿路感染症（fUTI）を発症した乳幼児の腸内細菌叢中には、大腸菌を含む *Escherichia-Shigella* 属が多く、炎症性サイトカインを抑制する *Bacteroides fragilis* の割合が有意に低いことを明らかにした。また、食物繊維が豊富な機能性大麦を摂取することで、腸内細菌叢の酪酸酸性菌などの有益菌を増加させたことから、食物繊維の摂取は腸内細菌叢を是正する可能性がある。しかし、シンバイオティクスを、VURを有する乳児にfUTIの予防で用いた結果、6例中5例が再発した。したがって、腸内細菌叢を治療標的とするためには、腸内細菌叢とfUTIの因果関係をさらに解明する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性腎尿路異常がない有熱性尿路感染症（fUTI）を発症した乳幼児の腸内細菌叢の解析で、大腸菌を含む *Escherichia-Shigella* 属が多く、炎症性サイトカインを抑制する *Bacteroides fragilis* の割合が有意に低いことを示した。したがって腸内細菌叢の異常が、fUTIの発症リスク因子になることを明らかにした。また、食物繊維が豊富な機能性大麦を摂取することで、腸内細菌叢の酪酸酸性菌などの有益菌を増加させたことから、食物繊維の摂取は腸内細菌叢を是正する可能性があることを示した。さらなる検討が必要であるが、fUTIの再発予防に腸内細菌叢の是正を治療の標的にできる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We found that the intestinal microbiota of infants with febrile urinary tract infection (fUTI) was rich in *Escherichia-Shigella* species, including *E. coli*, and significantly low in *Bacteroides fragilis*, which suppresses inflammatory cytokines. In addition, the intake of dietary fiber-rich functional barley increased beneficial bacteria such as butyric acid bacteria in the intestinal microbiota, suggesting that dietary fiber intake may correct the intestinal microbiota. However, when synbiotics were used to prevent fUTI in infants with VUR, five out of six cases recurred. Therefore, in order to target the intestinal microbiota as a therapeutic target, the causal relationship between the intestinal microbiota and fUTI needs to be further elucidated.

研究分野：腎泌尿器

キーワード：小児 乳幼児 尿路感染症 膀胱尿管逆流 腸内細菌叢 プロバイオティクス プレバイオティクス シンバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

日常感染症である有熱性尿路感染症 (febrile urinary tract infection: fUTI) を発症した乳幼児の 30～50% に膀胱尿管逆流 (vesicoureteral reflux: VUR) が存在する。国際分類 grade 以上の VUR 合併例は fUTI を反復し、将来腎不全に至る可能性がある。そのため、fUTI を起こした乳幼児の治療・管理の最終目標は、fUTI の反復と慢性腎不全への進行の予防である。

一般に UTI の起炎菌は大腸菌を始めとした腸内細菌である。近年、腸内細菌叢における大腸菌の割合が 1% を超えると fUTI 発症リスクが上昇することが報告された【Magruder M, et al. Nat Commun. 2019】。ST 合剤の CAP と同時にプロバイオティクスを投与したところ、CAP のみで治療した症例と比較して大腸菌やクレブシエラが属する *Enterobacteriales* 目が有意に抑制されていた ($p=0.02$) (平成 30 年度～令和 2 年度若手研究: 18K16750)。しかし、CAP の耐性菌出現の問題は未解決である。

2. 研究の目的

乳幼児期の VUR 症例に、プロバイオティクスとプレバイオティクスを多く含む食品を多く摂取してもらい腸内細菌叢を是正することで fUTI の再発率を低下させることを明らかにし、副作用のない fUTI 予防法を立案すること。

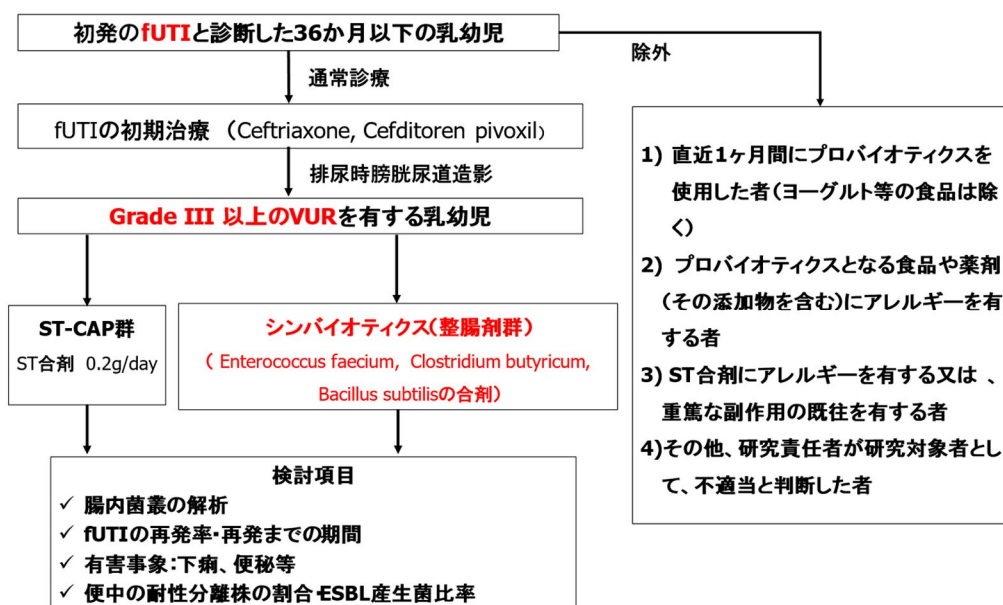
3. 研究の方法

当初はプレバイオティクスやプロバイオティクスとなる食品を摂取することを想定し研究計画を立案したが、fUTI を初めて発症する症例のほとんどが、離乳食が始まる前の生後 2～4 か月の症例であるため、今回は、安全性を考えプロバイオティクスおよびプレバイオティクスを含む整腸剤 (*Enterococcus faecium*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus subtilis*) をシンバイオティクスとして用いることとした。

(1) 生後 36 か月以下の初発の fUTI 症例に対し、fUTI の初期治療終了後、排尿時膀胱尿道造影検査を施行し、fUTI の再発率が高いとさせる高度 VUR (国際分類 度以上) 症例を対象とする。(図 1)

(2) ST 合剤の CAP を施行する群 (ST-CAP 群) とシンバイオティクス (プロバイオティクス + プレバイオティクス) を摂取してもらう群 (整腸剤群) に分け、fUTI の再発率 (6 か月後、1 年後、2 年後) 腸内細菌叢の変化、有害事象、便中の耐性菌分離株の比率を検討する。さらに、CAP 群と整腸剤群の腸内細菌叢を解析し、*Escherichia-Shigella* 属の比率を比較する。(図 1)

図 1 対象と方法



4. 研究の成果

(1) 食物繊維の摂取が腸内細菌叢に与える影響

乳幼児の対象に本研究を行う前に、成人ボランティアに食物繊維を多く含む食材を摂取することで、腸内細菌叢変化があるかを明らかにすることを目的に検討を行った。健康成人 18 名を対象として、プレバイオティクスとして機能性大麦を含むグラノーラ 40g(機能性大麦含有量は 20.4g、食物繊維 5.6g、レジスタントスターチ 0.68g を含有)を 1 日 1 回、週 4 回以上、4 週間摂取させた。摂取開始前、摂取終了時、摂取終了 1 か月後に便を採取し、16S rRNA 遺伝子解析を行い、多様性、腸内細菌叢構成菌目割合、酪酸産生菌割合を比較した。

結果は、対象 18 名(男性 12 人、66%)、年齢中央値は 35.9 歳[四分位範囲: 33.8-41.6]であった。摂取前後で多様性、腸内細菌叢構成菌目割合に有意な差は認めなかった。酪酸産生菌に関しては、摂取前には中央値 5.9%[2.4-6.8]であったのに対し、摂取終了時は 8.2%[3.7-10.8]と、有意に上昇した($p=0.043$)。しかし摂取終了 1 か月後には 5.4%[2.3-9.0]と摂取前の水準に低下した。

Clostridium 属に含まれる一部の酪酸産生菌は食物繊維を分解して酪酸を産生する。今回使用したグラノーラは β -グルカン、フルクタン、難消化性デンプンなどの食物繊維が豊富に含まれているため、これらの成分が腸内でプレバイオティクスとして働き、酪酸産生菌が増加したものと考えられた。以上からプレバイオティクスの投与は、酪酸産生菌のような有益菌の減少に特徴づけられる dysbiosis の是正に有用であることが示唆された。

(2) 乳児の fUTI 発症における腸内細菌叢の異常

乳児の fUTI は日常よく遭遇する感染症であるが、その発症の危険因子は不明である。ほとんどの fUTI は腸内細菌の上行性感染によって引き起こされるため、腸内細菌叢の dysbiosis が fUTI のリスクを高める可能性がある。そこで、乳児期の腸内細菌叢の dysbiosis が、fUTI の発症リスクを高めるとする仮説の検証を行った。

初めて fUTI を発症した生後 3~11 か月の乳児 28 人(fUTI 群)と同年齢の健康な乳児 51 人(HC 群)から便サンプルを採取した。fUTI の診断基準は、高熱($>38.5^{\circ}\text{C}$)およびカテーテル法で採取した尿サンプル中の 10^4 cfu/mL 以上の細菌を検出したものとした。全患者に対して超音波検査および排尿時膀胱尿道造影(VCUG)を実施し、VUR や重度水腎症などの先天性腎尿路異常(CAKUT)を検索した。VUR の患者 10 人と尿管瘤の患者 1 人は研究から除外した。CAKUT がなかった 28 人の患者を fUTI 群とした。比較群として、基礎疾患がなく、予防接種のために当院を受診し、両親が研究への参加に同意した年齢と性別が一致する小児 51 名を対象とした(HC)。

各群の腸内細菌叢の評価は次世代シーケンサーを利用してメタゲノム解析(16S rRNA 遺伝子解析)を行い、腸内細菌叢の多様性、構成菌目を 2 群間で比較した。

2 群間で性別、月齢、在胎週数、分娩様式、栄養方法、1 か月以内の抗菌薬の使用、プロバイオティクス・乳製品摂取、いずれも有意差を認めなかった。また、今回、fUTI 群で検出された起因菌は 28 例中 27 例が大腸菌であった。

図 2 アルファ多様性の比較を示す。Shannon 指数、Chao 指数ともに fUTI 群が、HC 群よりも有意に多様性は低かった(いずれも $p<0.001$)。

図 2 α 多様性の比較

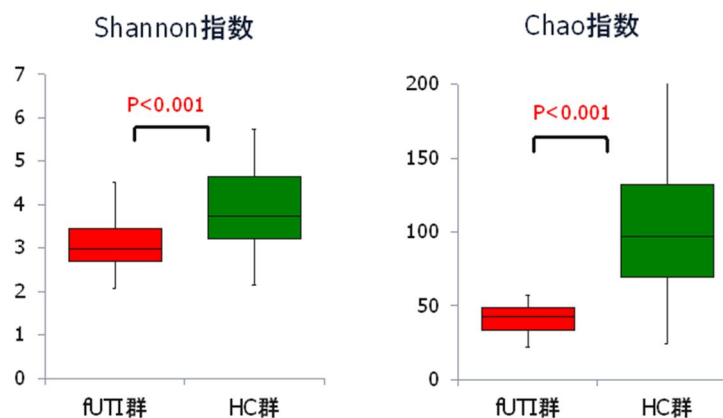
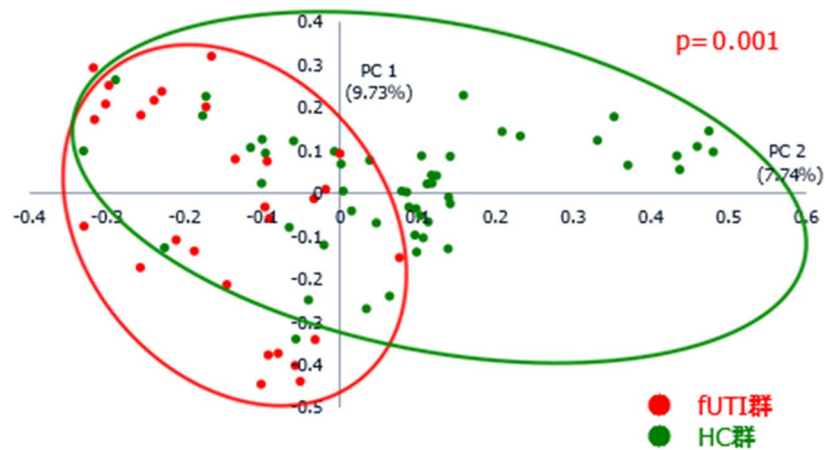


図3にβ多様性の比較を示す。赤のプロットが fUTI 群、緑のプロットが HC 群であるが、各個体群でプロットが近い方が似通った腸内細菌叢を示すことから、2 群間では、有意に異なる群集を形成していた。

図3 β多様性の比較



複数条件下の微生物群集データを対象に集団の違いを統計学的に抽出し、ある現象を引き起こす原因菌を探索することに用いられる Lefse 分析の結果を図4に示す。fUTI 群では HC 群よりも大腸菌を含む *Escherichia-Shigella* 属の菌数が多いことが示された。対照的に、HC 群では、*Bacteroides fragilis* の量が fUTI 群よりも多かった。

図5に腸内細菌叢における *Escherichia-Shigella* 属の相対的存在量の比較を示す。fUTI の主な原因細菌である大腸菌を含む *Escherichia-Shigella* 属の腸内細菌叢における割合は、fUTI グループ（中央値 9.5%、IQR 4.6~22.2%）の方が HC グループ（中央値 3.1%、IQR 1.2~6.5%）よりも有意に高かった。p < 0.001。

以上の結果から、fUTI 群と HC 群の腸内細菌叢を比較したところ、α多様性とβ多様性の両方に有意差が認められた。さらに、腸内細菌叢における *Escherichia-Shigella* 属の割合は、fUTI 群の方が HC 群よりも有意に高かった。一般に、*Escherichia-Shigella* 属の大部分は大腸菌であるため、この結果は fUTI 群の方が HC 群よりも腸内細菌叢における大腸菌の割合が高かったことを示唆している。したがって、先天性腎尿路異常がない乳幼児においても、腸内細菌叢における *Escherichia-Shigella* 属の割合が高いことが、fUTI 発症のリスク要因となることが示された。

図4 2 群間の腸内細菌叢の比較

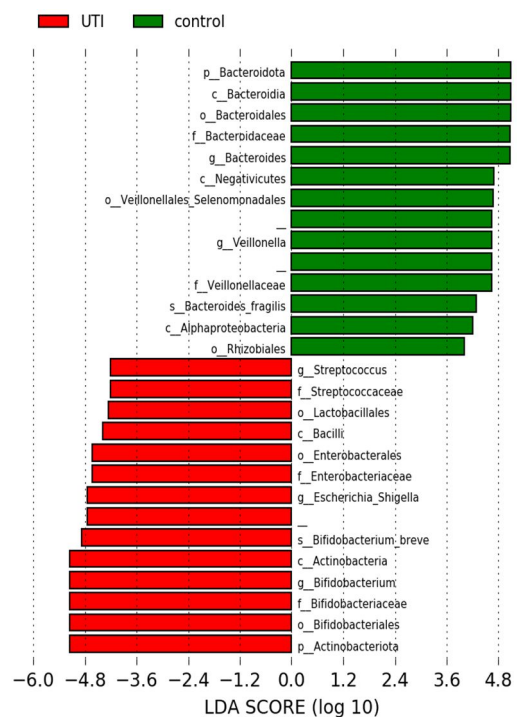
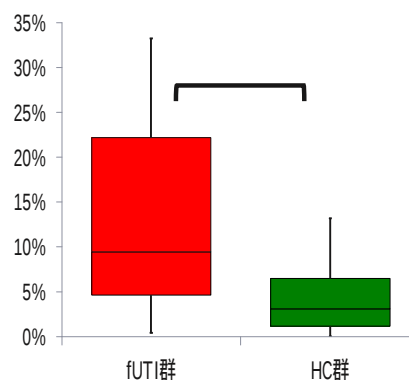


図5 *Escherichia-Shigella* 属の比較



(3) VUR 患者に対する腸内細菌叢の是正による fUTI 予防の検討

機能性大麦がプレバイオティクスとして働き、腸内細菌叢における有益菌の増加が認められたこと、fUTI 発症症例は、大腸菌を含む *Escherichia-Shigella* 属の菌数が多いことから、fUTI を再発するリスクの高い国際分類 度以上の VUR を有する患者に対して、プロバイオティクスやプレバイオティクスを摂取させ腸内細菌叢を是正することで fUTI を、予防できるかを検討を行った。

ST-CAP 群 (9 例、男 4 例、月齢中央値 6.2 か月)、整腸剤群 (6 例、男 3 例、月例中央値 4.8 か月) を対象として開始した。在胎週数、分娩様式、乳児期の栄養法に差はなかった。

経過観察中に、ST-CAP 群に再発は認めなかったが、整腸剤群は、早期に 6 例中 5 例が再発した。ST-CAP 群と比較し、整腸剤群は再発を抑制期間が有意に短い結果となった ($p<0.001$)。

整腸剤群の再発例 5 例の初発時、再発時とも起炎菌はすべて *E.coli* であった。再発していない 1 例は、初発時の起炎菌は、*Klebsiella* 属であった。

再発した 5 例は、通常のリ再発治療を行ったのち、ST-CAP による予防に変更し、再発していない。5 例が脱落したため整腸剤群の腸内細菌の経過観察は中断となった。

fUTI 初期治療の抗菌薬投与により、治療直後にはほぼ *Lactobacillales* 目のみとなり、多様性が大幅に低下していた。

Lactobacillales 目の *Enterococcus faecium* が大部分を占めた。*Enterococcus faecium* は投与した β ラクタム系抗菌薬 (CTRX、CDTR-PI) に耐性であるため残存し相対的に増加した可能性が示唆される。VUR を有する乳児にとってこのような強力な抗菌薬投与のよって dysbiosis をきたした腸内細菌叢に、今回投与した整腸剤に含まれるプロバイオティクス、プレバイオティクスの量では、早期に腸内細菌叢を是正できなかった可能性がある。

5. 考察と結論

今回の検討でプレバイオティクスとして機能すると考えられる食物繊維が豊富な機能性大麦を摂取することで、腸内の酪酸酸性菌の増殖を促進し有益菌の増加させることから、プレバイオティクスの摂取は、腸内細菌叢の有益菌の増加に影響すると考えられる。

また、fUTI を発症した乳児の腸内細菌叢の検討で行った LEfSe 分析の結果、fUTI 群では HC 群よりも腸内細菌叢中の *Bacteroides fragilis* の割合が有意に低いことが示された。*Bacteroides fragilis* の多糖体 A は、NF- κ B の阻害、制御性 T 細胞の誘導、炎症性ヘルパー T 細胞の抑制を引き起こす。その結果、炎症性サイトカインが抑制される。このように、本研究では、乳児期の腸内細菌叢の dysbiosis と fUTI との関連は、尿路上行性に感染する大腸菌の相対的存在量の増加と、全身の免疫防御機能を低下させる *Bacteroides fragilis* の相対的存在量の減少の両方に起因することを示す。一方、LEfSe 分析では、fUTI 群では予想を反してビフィズス菌属が多いことが示された。ビフィズス菌は、免疫応答の成熟を促進し、免疫系のバランスをとって炎症を抑え、腸管バリア機能を改善し、酢酸産生を増加させるなど、宿主に利益をもたらすことが実証されている。しかし、今回の結果からビフィズス菌が多いだけでは、fUTI の原因菌である *Escherichia-Shigella* 属の増殖を抑制するのに不十分である可能性が示唆された。したがって、fUTI を発症した乳児は、乳児期に腸内細菌叢の異常な発達を示し、多様性の低さ、*Escherichia-Shigella* 属の割合の高さ、*Bacteroides fragilis* の割合の低さを特徴としていることが fUTI 発症の危険因子である可能性がある。

一方で、シンバイオティクスとして働くと考えられる整腸剤 (*Enterococcus faecium*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus subtilis* の 3 種を含有) を、VUR を有する乳児に fUTI の予防で用いた結果、6 例中 5 例が再発した。この結果から、腸内細菌叢を fUTI の再発予防のための治療標的とするためには、起炎菌と腸内細菌のバランスを確認するためのさらなる研究が必要である。腸内細菌叢と fUTI の因果関係が詳細に解明できれば、乳児期の腸内細菌叢の dysbiosis を是正するための、適切なプロバイオティクス、プレバイオティクス、シンバイオティクスの種類、量などを選定することで、乳児の再発性 fUTI の発症を抑制できる可能性は十分あると考え、今後も検討を進めていく予定である。

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 1件）

1 . 著者名 Urakami Chika, Yamanouchi Sohsaku, Kimata Takahisa, Tsuji Shoji, Akagawa Shohei, Kino Jiro, Akagawa Yuko, Kato Shogo, Araki Atsushi, Kaneko Kazunari	4 . 巻 11
2 . 論文標題 Abnormal Development of Microbiota May Be a Risk Factor for Febrile Urinary Tract Infection in Infancy	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Microorganisms	6 . 最初と最後の頁 2574 ~ 2574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms11102574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------