

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791939

研究課題名(和文)重症敗血症におけるシンバイオティクス療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of synbiotic therapy in severe sepsis

研究代表者

山田 知輝 (Yamada, Tomoki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40623434

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)：腸管は、SIRS(全身性炎症反応症候群)病態において標的となりやすく、腸管が炎症反応の進行や感染症の合併に影響するとも考えられている。SIRS患者では便中短鎖脂肪酸や腸内優勢菌が入院後1週目から健康人に比べ低値であり、長期に低値が持続した。敗血症患者において、死亡例では生存例に比べて、便中ClostridiumやBifidobacteriumがより減少していた。重症敗血症患者に対しシンバイオティクスを投与したところ、感染合併症などに有意差はなかったが、腸内細菌叢や短鎖脂肪酸は保たれた。重症患者に対するシンバイオティクス療法は腸内細菌叢を保持することができ、これが病態に影響する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The gut is an important target organ for injury after severe insults. We reported that gut microbiota and gut environment deteriorated in patients with severe systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and that count of fecal microbiota and concentrations of fecal short-chain fatty acids (SCFAs) in these patients were significantly lower than those in healthy volunteers over a 6-week period. Furthermore, the gut flora was significantly altered in patients with sepsis, especially in non-survivors.

We evaluate if synbiotics therapy can maintain the gut microbiota and environment in patients with severe sepsis. There were significant differences between the synbiotics and no-synbiotics groups by the analysis of changes over time in number of total bacteria, Bifidobacterium, and Lactobacillus, and concentration of acetate and butyrate. But there was no significant difference between the two groups about infectious complications and outcome.

研究分野：救急・集中治療医学、栄養管理

キーワード：シンバイオティクス プロバイオティクス 敗血症 RCT 腸内細菌叢 短鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内細菌叢は、出生直後から細菌の定着により速やかに形成が始まり、民族、年齢、食事習慣など様々な遺伝、環境因子の影響を受けて徐々に安定化する。健全な腸内細菌叢が形成できない新生児疾患(短腸症候群、気道食道瘻など)では、肺炎、腸炎、菌血症等の重症合併症が繰り返し引き起こされることから、ヒトが成長する上で健全な腸内細菌叢の存在は不可欠と考えられる。成人の便には実に 10^{11} CFU (colony forming unit)/g 以上もの細菌が存在しており、腸内細菌からは多彩なシグナルが生体へ送られ続けられることも明らかとなってきた。

重症救急患者の臨床経過に多大な影響を与える重要臓器のひとつとして腸管が注目され、1990年代には、抗生剤による腸管内殺菌が重症患者の予後を改善するか否かに関して研究が進められた。しかしながら、腸管内殺菌の効果は定まっておらず、むしろ腸内細菌叢の破壊に起因すると考えられる二次感染の増加が明らかになった。

近年、生体に有用な効果をもたらす微生物(生菌製剤=プロバイオティクス)とその微生物を選択的に増殖させる効果を持つ非消化性の食物(菌の増殖因子=プレバイオティクス)の同時投与(シンバイオティクス)が、腸内細菌叢のバランスを保つ新たな腸管内治療として小児科領域、肝胆外科、肝移植領域などで注目されている。重症救急患者においてもシンバイオティクス投与の有効性が期待されるが、未だ十分に検討されておらず、これまでに RCT の報告もない。

さらに、主に酪酸、プロピオン酸、酢酸を指す短鎖脂肪酸は、腸内細菌叢による発酵を受けて産生されるが、これらは腸管上皮細胞の栄養としての働きがあり、腸管蠕動や腸管血流の増加に影響する他、血管内栄養素輸送やその他様々な作用を指摘され、特に酪酸は抗炎症作用、腸管壁防御作用、腸管ホルモン産生作用などを持つ。急性期重症病態での短鎖脂肪酸の役割はこれまで解明されていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、SIRS に伴う腸内細菌叢の崩壊や、それに対するシンバイオティクス投与効果の報告に加え、SIRS に腸管機能不全を伴った患者で、腸内細菌叢とその代謝産物である短鎖脂肪酸がより大きく減少しており、かつ、感染合併症罹患率や致死率が高いことを報告してきた。

本研究では、以下の3段階に分けて、救急患者、特に敗血症患者での腸内細菌叢と短鎖脂肪酸の変化と、シンバイオティクス療法の効果につき検証した。

(1) 重症 SIRS 患者における腸内細菌叢・便中短鎖脂肪酸濃度の長期にわたる変化を評

価するとともに、便中短鎖脂肪酸濃度と腸管合併症(腸炎、腸管蠕動不全)発症との関係を検討する。

(2) 敗血症患者における腸内細菌叢の変化を定量的に評価し、生存例と死亡例の腸内細菌叢を比較検討する。

(3) 人工呼吸器管理を要する Severe Sepsis 患者を対象として、Sepsis Surviving Campaign Guideline (以下 SSCG) に基づく従来療法にシンバイオティクス療法を併用した治療と、従来療法のみでの治療について、多施設共同前向き randomized control 研究を行い、重症敗血症患者に対するシンバイオティクス療法の効果に関して、腸内細菌叢、腸内環境を経日的に評価してメカニズムを解明し、腸管合併症、ならびに予後との関連性を検討する。なお、投与するプロバイオティクス、プレバイオティクスは市販されている食品であり、その安全性は確立されているものとしている。

3. 研究の方法

(1) 重症 SIRS 患者における腸内細菌叢・便中短鎖脂肪酸濃度の長期にわたる変化

2003年11月から2008年1月にかけて、当センターに入院し、SIRS の診断基準を満たし、血清 CRP 値が 10mg/dL 以上であった患者を対象とした。入院から6週目までにかけて、患者より便を採取し、便中短鎖脂肪酸濃度ならびに腸内細菌叢を測定した。

経腸栄養は標準濃厚流動食(ライフロン-Q10)を用いて、できる限り早期から開始した。経鼻胃管(8Fr ED チューブ)で 20ml/H で開始し、 $25\text{-}30\text{ kcal/kg/日}$ を投与目標とした。原則として H2 ブロッカーを投与した。感染症が生じた場合には empirical に抗生剤投与を行った。

便中短鎖脂肪酸濃度は高速液体クロマトグラフィーで、腸内細菌叢は培養法で測定した。臨床経過中の消化管合併症(腸炎、腸管蠕動不全)も評価した。健康ボランティア(14人)の便中短鎖脂肪酸濃度・腸内細菌叢を測定し、これを正常域とした。

短鎖脂肪酸濃度、腸内細菌数の経時的変化については一般化推定方程式(GEE)を用いて、平均推定値(mean estimate)と95%信頼区間(CI)を求め、最初の週と2-6週目のそれぞれの値とを比較した。健康ボランティアにおける便中短鎖脂肪酸濃度および腸内細菌叢を測定し、参照値とした。腸管合併症を発症した患者と発症しなかった患者の便中短鎖脂肪酸濃度について比較した。

(2) 敗血症患者における腸内細菌叢の変化

2006年7月から2009年9月にかけて当救命救急センターで治療した敗血症患者を対象とし、患者から便を採取し、RT-qPCR 法を

用いて、便検体から 12 種の腸内細菌を定量的に評価した。

敗血症生存例、死亡例、および健康成人の間で腸内細菌叢を比較検討した。統計は Steel-Dwass 法を用いた。

(3)重症敗血症患者に対するシンバイオティクス療法の効果に関する RCT

2012 年 9 月から 2014 年 3 月の間に、大阪大学医学部附属病院高度救命救急センター並びに大阪府立急性期・総合医療センター高度救命救急センターに入院した 16 歳以上の人工呼吸器管理を要する Severe Sepsis 患者を対象とし、72 時間以内にシンバイオティクスを投与できなかった症例や主治医が本試験を実施するのに不適当と認めた症例は除外した。

シンバイオティクスとしては、プロバイオティクスとしてピフィズス菌ヤクルト株・乳酸菌シロタ株、プレバイオティクスとしてガラクトオリゴ糖を用いた。投与群では来院後 72 時間以内から経口摂取が開始できるまでの間、経腸栄養チューブより前述シンバイオティクスを投与する。経腸栄養は来院後 72 時間以内に開始し、目標栄養投与量は 25kcal/kg とし、開始後 7 日以内に速やかに目標まで達するようにした。投与栄養剤は原則統一することとし、他の生菌製剤や腸管蠕動亢進薬は予防投与しないこととした。

患者の肛門からスワブを用いて定期的に（入院時より 3、7、14、21、28 病日）検体を採取、RT-PCR 法により偏性嫌気性菌、通性嫌気性菌を測定した。腸内環境の評価として、high speed liquid chromatography 法により有機酸、特に短鎖脂肪酸を含めた 9 種類と pH を測定した。入院時の重症度は APACHE、SOFA score で評価した。

臨床効果はシンバイオティクス開始後 4 週目の腸炎、人工呼吸器関連肺炎（VAP）、菌血症の感染合併症と生存率で評価するとともに、ICU での滞在日数、人工呼吸器使用日数、SOFA score 変化、腸管蠕動不全の発生率、などを評価した。

4. 研究成果

(1)重症 SIRS 患者における腸内細菌叢・便中短鎖脂肪酸濃度の長期にわたる変化

対象患者は 140 名で、年齢は平均 58.9 歳、APACHE score は 16.8 ± 7.6 点、外傷症例の ISS は 23.1 ± 11.5 点、死亡率は 30%、SIRS の原因は 78 人が感染、30 人が外傷、12 人が熱傷、その他が 20 人であった（表 1）。

対象患者の酪酸、プロピオン酸、酢酸の便中濃度は健康成人より有意に低く、入院 1 週目より 6 週目まで低値が持続した。腸内細菌叢は総偏性嫌気性菌とともにバクテロイデス、ピフィドバクテリウム、エンテロバクテリア等の腸内優勢菌が顕著に減少していた（図 1）。一方、ブドウ球菌、緑膿菌、カンジ

ダなどの健康時にはほとんどいない病原性菌が増加していた。これらの変化は入院後 6 週にわたって改善が見られなかった。また、患者の便中短鎖脂肪酸濃度については、腸炎や蠕動不全を含む消化管合併症を発症した患者でより低値であった。

表 1 研究 1 の患者背景 (n=140)

年齢(歳)	58.9 ± 19.3 ^a	SIRSの原因疾患	
性別(男性/女性)	91/49	Sepsis	78
APACHE II	16.8 ± 7.6 ^a	肺炎	21
ISS(外傷30例)	23.1 ± 11.5 ^a	腹膜炎	21
死亡率	30.0%(42/140)	壊死性筋膜炎	20
		腸炎	5
腸炎合併率	25.7%(36/140)	髄膜炎	3
蠕動不全合併率	10.0%(14/140)	縦隔炎	2
		その他の感染症	6
		外傷	30
		頭頸部	12
		胸部	5
		腹部	8
		骨盤部	5
		熱傷	12
		その他	20

^a 平均 ± 標準偏差 (SD)

ISS; Injury Severity Score
APACHE; Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

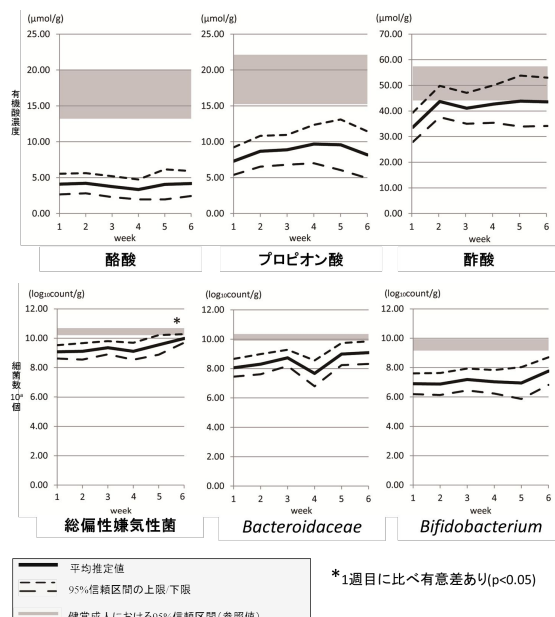


図 1 短鎖脂肪酸、腸内細菌叢の経時変化

(2)敗血症患者における腸内細菌叢の変化

敗血症患者 53 名のうち、生存患者は 37 名、死亡患者は 16 名であったが、両群間の、年齢、性別、敗血症の原因疾患および入院時の APACHE score (生存患者 16.9 ± 7.4 vs 死亡患者 19.9 ± 8.3; p=0.19) に有意差を認めなかった（表 2）。

表 2 研究 2 の患者背景 (n=53)

	生存	死亡	
人数(人)	37	16	
年齢(歳)	64.4 ± 15.9 ^a	64.6 ± 22.1 ^a	p=0.97
性別(男性/女性)	23/14	9/7	p=0.76
APACHE II score	16.9 ± 7.4 ^a	19.9 ± 8.3 ^a	p=0.19
敗血症の原因			
肺炎	8	7	
壊死性筋膜炎	10	1	
腸炎	2	2	
腹膜炎	5	2	
菌血症	4	1	
髄膜炎	4	1	
その他の感染症	4	2	a: 平均 ± SD

腸内細菌叢の評価の結果、総腸内細菌数に加え、偏性嫌気性菌の中でも *Clostridium coccoides*、*Clostridium leptum*、*Bacteroides fragilis*、*Bifidobacterium*、*Atopobium cluster* (図 2) が敗血症生存患者に比して、敗血症死亡患者で有意に低下していた。さらにこの中でも、総腸内細菌数、*Clostridium coccoides*、*Clostridium leptum*、*Bifidobacterium* では敗血症の生存患者のみにおいても、健康成人より有意に減少していた。一方、病原性菌であるブドウ球菌や緑膿菌では敗血症生存患者と死亡患者の間に有意差はなかった。

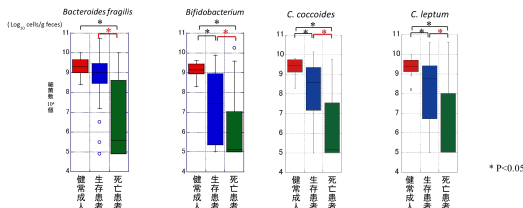


図 2 敗血症患者における腸内細菌叢の変化

これらの結果より病態および予後に大きく関わっているのは病原性菌の増加ではなく、偏性嫌気性菌の減少である可能性が示唆された。また、腸内優勢菌にあるにもかかわらず従来法では検出されなかった *Clostridium* 属が重症患者において減少していることが明らかとなった。このことは、*Clostridium* 属が腸内の regulatory T cell (調節性 T 細胞; Treg) を誘導することが近年示されていることなどからも、注目すべき結果である。

(3)重症敗血症患者に対するシンバイオティクス療法の効果に関する RCT

対象患者はシンバイオティクス投与群・非投与群共に 11 名であり、患者背景 (年齢、性別、入院時 APACHE スコア・SOFA スコア、経腸栄養開始日・実施日数、TPN 使用率) に有意差はなかった (表 3)。

表 3 患者背景

	シンバイオティクス投与群	シンバイオティクス非投与群	P value
患者数	11	11	
年齢	74 (60-83)	72 (57-84)	1.00
性別(男/女)	7/4	4/7	0.40
入院時 APACHE II score	18 (14-24)	14 (13-22)	0.56
入院時 SOFA score	7(6-9)	6(2-7)	0.24
経腸栄養開始病日	2(1-4)	2(1-4)	0.80
経腸栄養実施期間(日)	22(9-41)	21(14-30)	0.95
TPN 使用	5	3	0.66

臨床アウトカムとして、新たな感染症合併率、ICU 入院期間、人工呼吸期間、ICU/28 日死亡率、腸管蠕動不全合併率に有意差を認めなかった (表 4)。

表 4 臨床アウトカム

	シンバイオティクス投与群	シンバイオティクス非投与群	P value
ICU 入院期間(日)	24(22-45)	29(22-43)	0.90
人工呼吸期間(日)	17(10-43)	21(12-26)	0.95
4週目までの感染合併症	4	7	0.40
VAP	1	5	0.15
腸炎	4	3	1.00
菌血症	3	1	0.59
8週目までの感染合併症	3	0	0.21
28日死亡	3	1	0.59
ICU死亡	4	2	1.00
腸管蠕動不全	3	2	1.00

しかし、入院から 1 週ごとに便中の腸内細菌数および有機酸量を測定したところ、線形混合モデルを用いた解析で総細菌数、*Clostridium coccoides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、酢酸、酪酸において交互作用を認めた。また、投与菌も有意に増加しており、抗生剤暴露に関わらず、便中に認められた。(図 3-9)

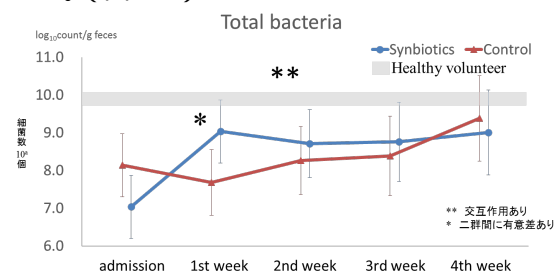


図 3 総細菌数の推移

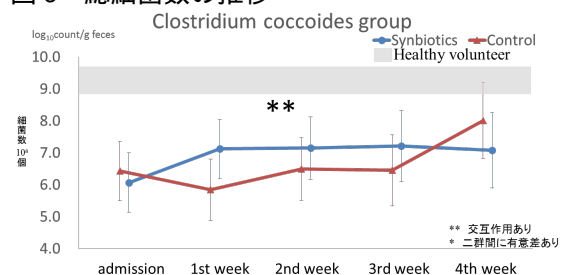


図 4 Clostridium coccoides 数の推移

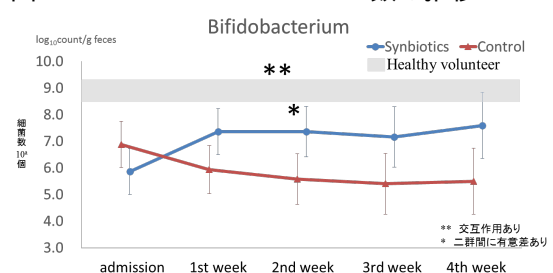


図 5 Bifidobacterium 数の推移

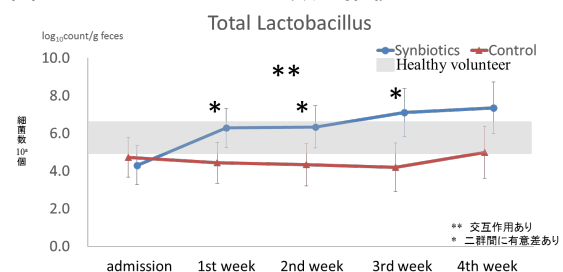


図 6 Lactobacillus 数の推移

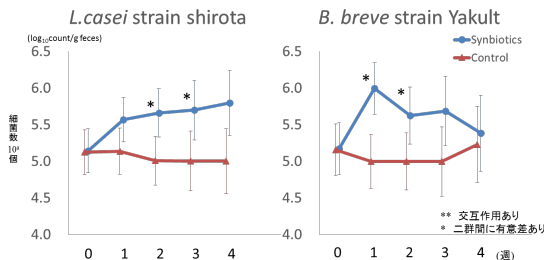


図7 投与菌の推移

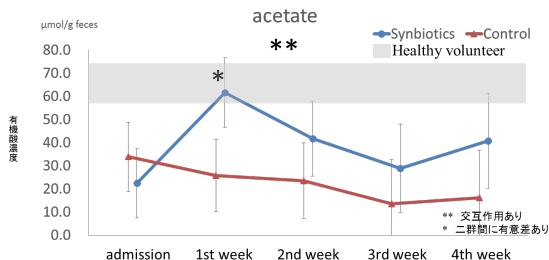


図8 酢酸の推移

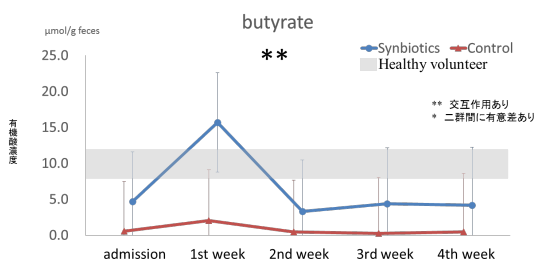


図9 酪酸の推移

この結果は、臨床アウトカムには有意差を認めなかったが、腸内細菌叢や腸内環境は有意に改善しており、病勢の改善に寄与する可能性があることを示唆している。

シンバイオティクス療法の効果ははっきりしていない部分も多いが、meta-analysisにより待機手術症例に投与することで術後感染症を減少させることや、ICU患者での人工呼吸器関連肺炎（VAP）を減らせることが示されている。この研究は、SIRS、特に敗血症は腸内細菌叢が崩れ、短鎖脂肪酸が減少し、そしてその変化は長く続くが、シンバイオティクス療法にてこの変化を抑え、腸内細菌叢を維持できることが示された。登録症例数の多いRCTができれば、シンバイオティクス療法による臨床アウトカムの改善を証明できる可能性も考えられる。

この研究から下記のこと示された。

重症患者では早期より腸内細菌叢のバランスが崩れ、腸内環境は崩壊し、その変化が数週間以上にわたって持続していた。

Sepsisでは死亡患者において生存患者よりも腸内優勢菌の減少はより顕著であった。

シンバイオティクス療法は腸内細菌叢を安定させ、重症敗血症患者に対しても有用である可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

山田知輝, 清水健太郎, 小倉裕司, 嶋津岳士, 【ICUにおける早期経腸栄養をめぐって】Critical Careにおけるシンバイオティクス療法、ICUとCCU、査読無、38、2014、545-554

Tomoki Yamada, Kentaro Shimizu, Hiroshi Ogura, et al. Rapid and Sustained Long-Term Decrease of Fecal Short-Chain Fatty Acids in Critically Ill Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome, JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition. 査読有、2014 in press (2014 Apr 7. Epub ahead of print), DOI: 10.1177/0148607114529596

[学会発表](計7件)

Tomoki Yamada, et al. Synbiotics therapy improves gut dysbiosis in severe sepsis patients; a randomized controlled trial. Society of Critical Care Medicine's 44th Critical Care Congress. 2015年1月18日 米国フェニックス

山田知輝ら、SIRS患者における腸内細菌叢の変化とシンバイオティクス療法、第27回日本外科感染症学会総会学術集会、2014年12月4日、東京

山田知輝ら、SIRS患者における腸内細菌叢・腸内環境の変化とシンバイオティクス療法、第51回日本外科代謝栄養学会学術集会、2014年7月5日、大阪

山田知輝ら、SIRS患者における腸内細菌叢の変化とシンバイオティクス療法、第41回日本救急医学会総会・学術集会、2013年10月22日、東京

山田知輝ら、SIRS患者における腸内細菌叢の変化とシンバイオティクス療法、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月12日、福岡

山田知輝ら、敗血症患者での腸内細菌叢の変化 生存群 vs. 死亡群、第40回日本集中治療医学会学術集会、2013年3月1日、松本

山田知輝ら、SIRS患者における腸内環境の評価 便中短鎖脂肪酸低下の遷延、第40回日本救急医学会総会・学術集会、2012年11月13日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 知輝 (YAMADA, Tomoki)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40623434

(2) 研究協力者

小倉 裕司 (OGURA, Hiroshi)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70301265

清水 健太郎 (SHIMIZU, Kentaro)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60379203