

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670788

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた重症救急患者の腸内細菌叢の解析と新たな治療への応用

研究課題名(英文) The analysis of the gut microbiota change in severe emergency patients via high-throughput DNA sequencing

研究代表者

小島 将裕 (Masahiro, Ojima)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70721091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢は全身の免疫システムにおいて重要な役割を担い、救急患者においても生命予後や感染合併症などに影響を与える可能性が示されている。近年、高処理シーケンサーによる網羅的な細菌叢の解析が可能となった。本研究により、重症救急患者の急性期にダイナミックな腸内細菌叢の変化が生じており、抗生物質や疾患の重症度などが影響を与えていることが明らかとなった。また、来院時は患者ごとに固有の細菌叢が定着しているが、入院から1週間までに特に細菌叢が変移し、その後は新たな安定した腸内細菌叢に移行することも明らかとなった。また、過剰な腸内細菌叢の偏移は宿主である患者の生命予後にも悪影響を与えている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that the gut microbiota plays an important role in the whole body immune system and it may affect patient's prognosis and infectious complications in emergency patients. In recent years, it has become possible to analyze comprehensive bacterial microbiota by high-throughput sequencer. This study revealed the dynamic gut microbiota changes in the acute phase of severe emergency patients and that the antibiotics and the severity of the disease had some effect on gut microbiota change. Also, it was revealed that each patient had a unique gut microbiota at the time of arrival and that the gut microbiota shifted especially up to one week after hospitalization, and thereafter it shifted to a new and static state. It was also shown that the deviation of excessive intestinal flora may adversely affect the life prognosis of the host patient.

研究分野：救急、集中治療

キーワード：腸内細菌叢 重症患者 高処理シーケンサー 抗生物質 重症度

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌叢は腸管免疫だけでなく全身の免疫システムにおいて重要な役割を担うことが明らかになりつつある。救急領域においても、全身性炎症反応症候群(SIRS)や敗血症患者において、腸内細菌叢の恒常性の破綻が全身炎症に大きな影響を及ぼし、生命予後や感染性合併症の発生率にも影響しうることが注目されている。腸管内治療により腸内細菌叢をコントロールすることは救急重症患者の予後を改善するためには極めて重要である。

我々はSIRS、敗血症、外傷など重症救急患者において、腸管内細菌叢の変化が予後、合併症の発生率、腸管蠕動運動不全の発生に極めて重要であることを報告した (Neurogastroenterol Motil 2011;23:330-335、Dig Dis Sci 2011;56:1782-1788、2011;56:1171-1177、J Trauma 2006;60:126-133)。また、ピフィズス菌、乳酸菌などの偏性嫌気性菌を善玉菌、ブドウ球菌や緑膿菌などを悪玉菌として考え、腸管内細菌叢を制御することで、腸管免疫、全身免疫を改善し、重症救急患者の予後を改善させる可能性がある。我々は実際にプロバイオティクス療法により腸内細菌叢を整えることで、敗血症における合併症の発生率低下や予後の改善の可能性があることも報告した (Dig Dis Sci 2013;58:23-32、2009;54:1071-1078)。

しかし、従来の培養法やPCR法では同定できる菌種に限られており、腸管内細菌叢の氷山の一角しか解析できていなかった。近年開発された次世代シーケンサーを用いることによりこれまで同定できなかった菌種も含めて網羅的に解析することが可能になった。

2. 研究の目的

本研究では、重症救急患者の急性期における腸内細菌叢の変化を次世代シーケンサーを用いてメタゲノム解析することで、これまでとらえることが出来ていなかった細菌叢全体の変化を解析することである。また、腸内細菌叢の変化のパターンの解析と変化を引き起こしている要因を統計的に明らかにすることである。さらに腸内細菌叢の変化が宿主の予後に影響を与えようかどうかを明らかにすることである。最終的には新たな腸管内治療を開発することを目指す。

3. 研究の方法

来院時より3日以上的人工呼吸管理が必要と予想される症例を対象とした。

対象症例から採取した便検体または肛門ぬぐい検体の細菌固有の16S rRNAを次世代シーケンサーによりメタゲノム解析し、腸管内細菌叢の組成を解析した。検体は経日的に入院から1-2日目、2-4日目、5-8日目、7-14日目のタイミングで採取した。メタゲノ

ム解析は大阪大学微生物研究所で行った。患者の年齢や性別などの基礎データのほかに入院時の重症度(ISS、APACHE、SOFA score)、予後などの臨床経過や使用した抗生物質と腸内細菌叢の関連性について統計学的解析を行った。

また、コントロール群として健康人の便も同様に次世代シーケンサーによりメタゲノム解析し、重症救急患者の腸内細菌叢の変化と比較検討した。

統計手法は混合モデルを使用した。また、解析は門レベルでの解析とした。

4. 研究成果

(1) 重症救急患者の腸内細菌叢の変化

重症救急患者12症例の便検体を経時的に採取し、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢の変化をメタゲノム解析した。その結果、多くの症例において最初の検体ではBacteroidetes門とFirmicutes門の細菌が主要な構成要素であった。すべての患者で急性期にはダイナミックな細菌叢の変化が生じていることが明らかとなった(図1)。

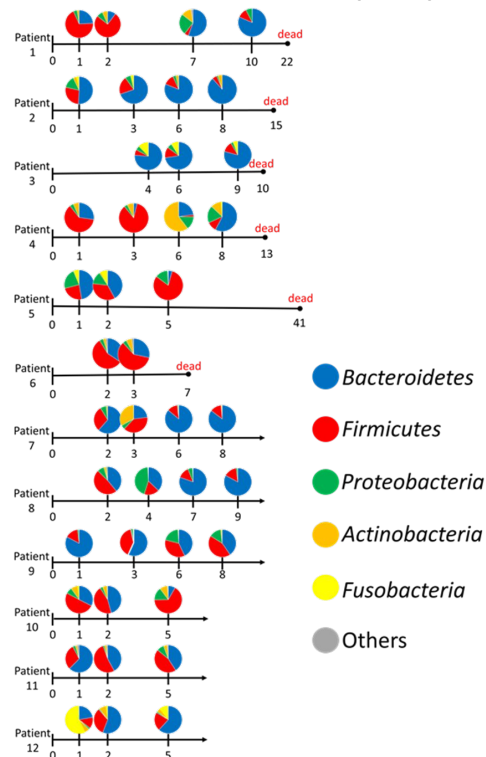


図1 重症救急患者12症例の便検体中の経時的な腸内細菌叢の変化

(2) 重症救急患者と健康人の腸内細菌叢の変化の比較検討

上記の重症救急患者12症例と健康人7人の便検体をそれぞれメタゲノム解析し、Bacteroidetes門・Firmicutes門・Proteobacteria門・Actinobacteria門・Fusobacteria門の主要5門について経時的な変化の割合を線形混合モデルを用いて比較検討した。その結果、重症救急患者は健康人に比較して急性期において、Bacteroidetes

門と Firmicutes 門は有意に変化が大きいたことが明らかとなった(それぞれ $p=0.014$, 0.018)。その他の門では両群間で有意差は認めなかった(図2)。

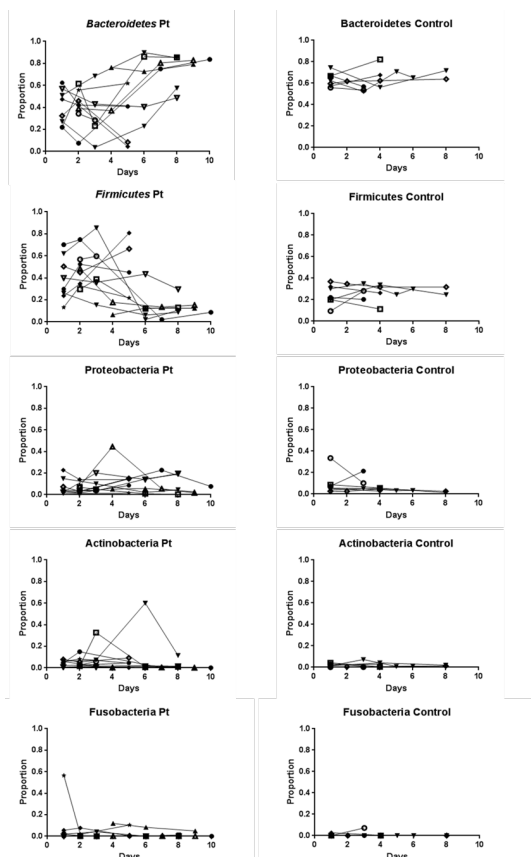


図2 重症救急患者 12 症例の便検体中の主要 5 門の経時的な組成割合の変化

(3) 重症救急患者での腸内細菌叢の変化パターンの検討

上記 12 症例を含めた全 71 症例の重症救急患者の便検体を経時的に採取し、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を行った。まず、全症例の最初に採取した検体の主要 5 門の構成比を一覧にしたところ、各患者は来院時から固有の細菌叢を有しており、患者ごとの変異が大きいたことがわかった(図3)。

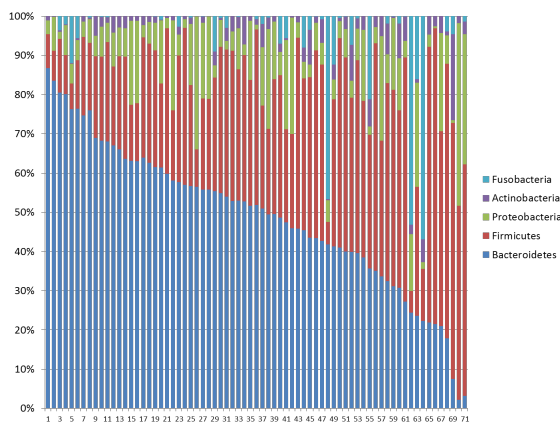


図3 重症救急患者 71 症例の入院後最初の便検体中の主要 5 門の構成割合

次に患者群全体として急性期に経時的に腸内細菌叢の変化が生じているのかを検討した。1-3 病日・4-7 病日・8-14 病日に採取した便検体中の主要 5 門の構成割合の変化をみた。その結果、患者群全体としてみると、各門の構成割合に経時的な変化は認めなかった(図4)。

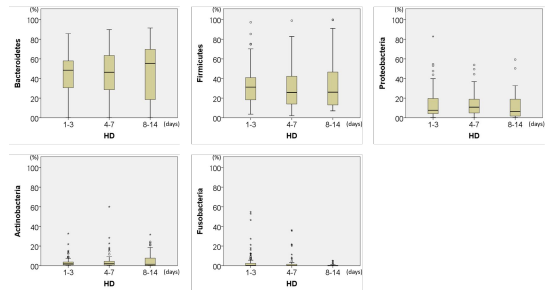


図4 重症救急患者 71 症例全体としての経時的な主要 5 門の構成割合の変化 (HD=hospital day;入院病日)

次に症例ごとに最初の便検体から経時的に各門の構成割合の変化がどれほど生じているのかを検討した。各症例の最初の検体の各門の構成割合を基準点として、第 2 検体以降の検体の各門の構成割合との差の絶対値を「構成割合の変化量」として検討した。その結果、Bacteroidetes 門と Firmicutes 門は経時的に変化量が大きくなること明らかとなった(図5)。

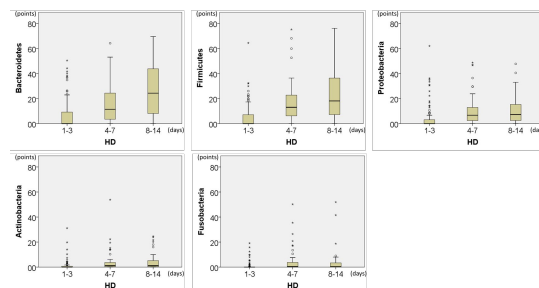


図5 重症救急患者 71 症例における経時的な主要 5 門の各症例の最初の検体からの構成割合の変化量

これらの結果から、以下のことが明らかとなった。

重症救急患者は入院当初から各患者固有の腸内細菌叢を有しており、入院後の急性期にダイナミックな細菌叢の変化が生じる。

細菌叢の変化は患者群全体として検討すると症例ごとの変化の方向が異なるため変化が見えないが、患者ごとに注視すると腸内細菌叢は経時的に変化がみられる。

(4) 重症救急患者の腸内細菌叢の変化を引き起こす要因についての検討

次に経時的な腸内細菌叢の変化を引き起こしている要因について検討した。本研究では抗生物質(カルバペネム系)の使用の有無および疾患の重症度が患者の腸内細菌叢に影響を与えるかを検討した。

まず、カルバペネム系抗生物質の使用の有

無で患者群を2群に分け、主要5門における各病日での前日からの構成割合の変化量を各群で解析した。その結果、全体として Proteobacteria 門と Fusobacteria 門で2群間に有意差を認めた。また、病日ごとに検討すると、Proteobacteria 門の第1-5病日、Actinobacteria 門の第11-16病日、Fusobacteria 門の第16病日と第17病日に2群間で有意差を認めた。さらに、Bacteroidetes 門・Firmicutes 門ではカルバペネム系抗生物質の使用の有無に関わらず、第7病日以降は変化量が0に近くなり、経時的な変化が見られないことが示された(図6)。

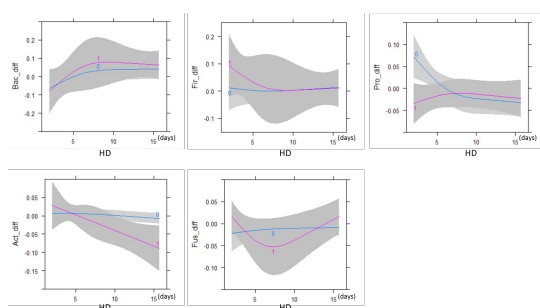


図6 重症救急患者71症例における、カルバペネム系抗生物質の使用の有無による主要5門の各病日の前日からの構成割合の変化量の推移(0=カルバペネム系抗生物質使用せず、1=カルバペネム系抗生物質の使用あり)

最初の便検体と各病日の便検体との構成割合の変化量をカルバペネム系抗生物質の使用の有無にわけ、主要5門について検討した。その結果、全体として Proteobacteria 門と Actinobacteria 門において2群間で有意差を認めた。また、病日ごとに検討すると、Bacteroidetes 門の第11-15病日、Firmicutes 門の第7-14病日、Proteobacteria 門の第1-4病日、Actinobacteria 門の第13-17病日、Fusobacteria 門の第14-17病日に2群間で有意差を認めた。Firmicutes 門と Bacteroidetes 門では第7病日以降は変化量が一定となっており、経時的な変化が見られないことが示された(図7)。

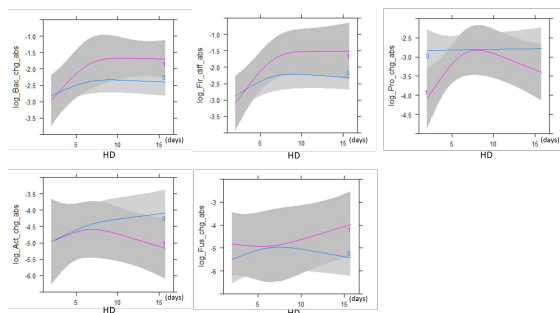


図7 重症救急患者71症例における、カルバペネム系抗生物質の使用の有無による経時的な主要5門の最初の便検体からの構成割合の変化量の推移(0=カルバペネム系抗生物質使用せず、1=カルバペネム系抗生物質の使用あり)

疾患の重症度として、各病日の SOFA score を使用した。カルバペネム系抗生物質に使用の有無で患者群を2群に分け、主要5門における最初の検体から各 SOFA score における検体への構成割合の変化量を主要5門について検討した。その結果、全体として Bacteroidetes 門と Fusobacteria 門で2群間に有意差を認めた。また、SOFA score ごとに検討すると、Bacteroidetes 門では SOFA score が1点または14点以上の時、Proteobacteria 門では4-11点の時、Actinobacteria 門では7点または8点の時、Fusobacteria 門では11点以上の時に2群間で有意差が認められた(図8)。

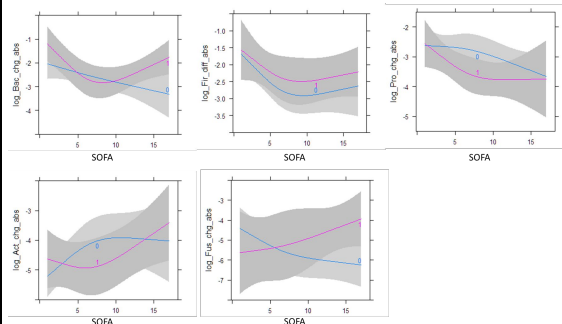


図8 重症救急患者71症例における、カルバペネム系抗生物質の使用の有無による主要5門における最初の検体から各 SOFA score における検体への構成割合の変化量の推移(0=カルバペネム系抗生物質使用せず、1=カルバペネム系抗生物質の使用あり)

以上の結果から、以下のことが統計的に明らかになった。

抗生物質の使用は重症救急患者の急性期において、腸内細菌叢の変化に関係する

疾患の重症度は重症救急患者の急性期において、腸内細菌叢の変化に關与する。

抗生物質や疾患の重症度の影響は各細菌門により効果が異なる。

重症救急患者の急性期において、腸内細菌叢は最初の1週間は大きく変化するが、その後は新たな安定した腸内細菌叢を獲得する。

(5) 重症救急患者の腸内細菌叢の変化と生命予後との関連についての検討

腸内細菌叢の主要な細菌門は多くの症例で Bacteroidetes 門と Firmicutes 門であったため、Bacteroidetes 門と Firmicutes 門の構成割合の比(B/F比と定義した)を腸内細菌叢の変化の指標として用いることとした。B/F比が0.1未満または10より大となる場合を「過度な腸内細菌叢の偏移」と定義し、入院中に1度でも過度な腸内細菌叢の偏移を認められた症例と認めなかった症例で最終的な生命予後に相違があるのかを検討した。表1はその結果であり、過度な腸内細菌叢の偏移が認められた症例では生命予後が悪化する傾向が認められた(p=0.053)。

	Extreme Imbalance (B/F ratio > 10 or B/F ratio < 0.1)	Not extreme Imbalance (0.1 ≤ B/F ratio ≤ 10)	Sum
Survivors	11	36	47
Deceased	11	13	24
Sum	22	49	71

表 1 入院中の過度な腸内細菌叢の偏移の有無と生命予後

(6) まとめ

以上をまとめると、重症救急患者の急性期にはダイナミックな腸内細菌叢の変化が生じており、抗生物質や疾患の重症度などが影響を与えていることが明らかとなった。来院時は患者ごとに固有の細菌叢が定着しているが、入院から1週間までが特に細菌叢が変移し、その後は新たな安定した腸内細菌叢に移行することも明らかとなった。また、過度な腸内細菌叢の偏移は宿主である患者の生命予後にも悪影響を与えている可能性が明らかとなった。急性期の腸内細菌叢を各患者に合わせてコントロールすることは重症救急患者の新たな治療法となりうると思われる。

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)

Ojima M, Motooka D, Shimizu K, Gotoh K, Shintani A, Yoshiya K, Nakamura S, Ogura H, Iida T, Shimazu T: Metagenomic Analysis Reveals Dynamic Changes of Whole Gut Microbiota in the Acute Phase of Intensive Care Unit Patients, *Dig Dis Sci*. 2016 Jun;61(6):1628-34. 査読有
DOI 10.1007/s10620-015-4011-3

清水健太郎、小島将裕、小倉裕司、嶋津岳士：プロバイオティクス・プレバイオティクス、日本静脈経腸栄養学会 31 巻 3 号：797-802、2016. 査読無
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jспен/31/3/31_797/_pdf

[学会発表](計3件)

Masahiro Ojima, Daisuke Motooka, Kentaro Shimizu, Kazuhisa Yoshiya, Hiroshi Ogura, Shota Nakamura, Tetsuya Iida, Takeshi Shimazu: High-throughput DNA sequencing reveals dynamic change of gut microbiota in ICU patients. Society of Critical Care Medicine 's 44th Critical Care Congress, Phoenix, Arizona, 2015 年 1月

小島将裕、清水健太郎、吉矢和久、小倉裕司、嶋津岳士：重症病態における腸内細菌叢の変化と腸管内治療による予後改善の可能性。第43回日本救急医学会総会、東京、2015

年 10 月

小島将裕、清水健太郎、元岡大祐、石原拓磨、吉矢和久、小倉裕司、中村昇太、新谷歩、嶋津岳士：高処理シーケンサーを用いた重症救急患者における腸内細菌叢の網羅的評価。第44回日本救急医学会総会、東京、2016年11月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 将裕 (MASAHIRO OJIMA)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70721091

(2) 研究分担者

吉矢 和久 (KAZUHISA YOSHIYA)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40379201

山田 知輝 (TOMOKI YAMADA)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号：40623434

嶋津 岳士 (TAKESHI SHIMAZU)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50196474

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

新谷 歩 (AYUMI SHINTANI)
大阪大学・医学系研究科・寄付講座教授
研究者番号：00724395