

令和元年6月20日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21204

研究課題名(和文) 新生児壊死性腸炎に対する糞便移植の有効性に関する研究

研究課題名(英文) The protective effects of fecal microbiota transplantation in a rat model of necrotizing enterocolitis.

研究代表者

藤井 喬之 (Fujii, Takayuki)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：00746696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：新生児壊死性腸炎に高率に合併する短腸症候群モデルにおける解析を行った。特に小腸粘膜と腸内細菌叢との関連に着目した。短腸症候群モデルに食物繊維の一種であるグアーガムを投与すると小腸粘膜の炎症が抑制され、粘膜の変性が有意に軽減した。また短腸モデルにグアーガムを投与すると腸内細菌叢がコントロールに近い腸内細菌叢となる傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児壊死性腸炎の重篤な合併症に短腸症候群がある。短腸症候群では腸管粘膜の萎縮や透過性の亢進から、腸内菌共生バランス失調を招き更なる合併症を引き起こすため、腸内環境の是正が重要である。食物繊維のグアーガムを用いることで小腸の粘膜が抑制され、腸内細菌叢の異常が是正される可能性を示した。このことは短腸症候群における新たな治療戦略の確立に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether partially hydrolyzed guar gum ameliorates small intestinal mucosal damage and alters the intestinal microbiota using a rat small bowel resection (SBR) model. The mucosal degeneration rate was significantly higher in the SBR group. Partially hydrolyzed guar gum administration alleviated small intestinal mucosal damage, which could be associated with modulation of the intestinal microbiota.

研究分野：小児外科学

キーワード：壊死性腸炎 短腸症候群 Dysbiosis 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

壊死性腸炎 (necrotizing enterocolitis : NEC) は新生児集中治療室に入院した患児の 1~5% に発症する比較的多い疾患である。多くは未熟児に発症し、いったん発症すると救命困難である。また救命できたとしても短腸症候群となることが多い。短腸症候群となると長期間の静脈栄養が必要となるが、その場合カテーテル関連血流感染症や腸管不全合併肝機能障害を併発することも多い。しかしこれらは小腸肝臓移植が必要となることがある。日本においては小児の移植は普及しておらず、小児外科領域の難治性疾患の一つと言える。壊死性腸炎発症の重要な因子として児の未熟性に加えて腸管の炎症や腸内細菌叢の異常があり、これらの抑制が発症の予防のために重要な鍵となると考えられている。腸内細菌叢の異常を是正する試みの一つとして生菌製剤であるプロバイオティクスの投与が挙げられ、一定の成果が報告されている。しかしながら、完全に異常を是正して NEC の発症を予防するにはいたっておらず、新たな治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

壊死性腸炎に高率に合併する短腸症候群モデルを作成することで、腸管の炎症を抑制し、腸内細菌叢の是正を促進する治療法について病理組織学的手法、微生物学的手法を用いて検討を行う。我々は水溶性食物繊維の一種でグアー豆から生成される加水分解グアーガムに着目した。これはグアー豆を酵素処理して低粘度化することで食品への混入が容易となっており、大量に摂取可能な食品の一種である。腸内細菌によって分解され短鎖脂肪酸が産生されるが、その短鎖脂肪酸の産生量が他の食物繊維に比べて多い特徴がある。また、様々な生理活性を有しており、コレステロール低下作用や血糖値抑制効果、腸管順応の促進効果、腸管血流増進効果、腸内細菌叢の是正効果がすでに知られている。しかしながら、グアーガムが短腸症候群の腸管粘膜や腸内細菌に与える作用は不明な点が多い。そこで、グアーガムを投与することで腸管免疫として重要な小腸粘膜の炎症を抑制する効果があるかを検証する。また、便中の短鎖脂肪酸量の測定を行い、炎症抑制効果のメカニズムの解明を目指す。さらに、腸内細菌叢の変化を解析することで腸内環境の異常を是正する手段を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

8 週の SD ラットを用いた。70%小腸大量切除による短腸症候群モデルを作成した。水溶性食物繊維であるグアーガムを 10%飼料に混入して経口投与した。合計 21 匹のラットを腸管単純切除・再吻合する Sham 群、Sham にグアーガムを与えた群、70%小腸切除を行った短腸モデル群、70%短腸モデルにグアーガムを経口投与した群の計 4 群を作成した。手術の 7 日前から液体飼料を与えて順応を図った。術前日は絶食とした。セボフルランの吸入麻酔を用いて手術を行い、術直後から速やかに飲水を再開した。また、術翌日から術後 5 日までは液体飼料を与えた。グアーガム投与群には 10%混入して与えた。術後 6 日目からは粉末飼料に変えて、グアーガムを与えた。術後 21 日目に犠死せしめた。体重の変化を 3 日毎に測定した。犠死させた際に小腸に加えて、糞便を採取して解析を行った。小腸は吻合部から 3cm 近傍を標本として採取し、中性ホルマリン液で 48 時間固定した。小腸粘膜はヘマトキシリン・エオジン染色や抗 CD45 抗原を用いた免疫染色による組織学的検討を行った。小腸粘膜の変性率を計測して腸管粘膜の炎症の評価を行った。抗 CD45 陽性細胞数を測定して炎症細胞浸潤の程度の評価を行った。また、便中の短鎖脂肪酸量を高速クロマトグラフィーを用いて解析を行った。腸内細菌は次世代シーケンサーを用いて解析を行った。主座標分析を行って腸内細菌叢の多様性を評価した。また、短腸モデルと短腸にグアーガムを投与したモデルを比較して腸内細菌の relative abundance を求めた。

4. 研究成果

短腸症候群モデルにグアーガムの投与の有無で体重に有意な変化は見られなかった。組織学的検討ではヘマトキシリン・エオジン染色で観察すると、短腸モデルはコントロールに比べて小腸粘膜の炎症を示唆する変性や凝固壊死の所見が観察され、小腸上皮の変性率は SBS30.2±10、SBS+グアーガム 12.1±2.9、Sham11.4±4.5、Sham+グアーガム 6.3±2.0%であった。この変化はグアーガムを投与すると改善しており統計学的有意に抑制されることが判明した。

抗 CD45 抗原を用いた免疫染色でも同様に、短腸モデルはコントロールに比べて統計学的有意に抗 CD45 陽性細胞の浸潤が多くみられた。しかし、グアーガムを投与すると抗 CD45 陽性細胞の浸潤が有意に抑制されることが判明した (SBS76.4±16.3、SBS+グアーガム 26.4±15.4、Sham27.9±20.3、Sham+グアーガム 20.9±13.8 : 抗 CD45 抗原陽性細胞数/10 絨毛)。

分子微生物学的検討として行った、主座標分析を用いた腸内細菌叢の解析では、短腸モデルとコントロールでは腸内細菌の分布が異なっていた。しかし興味深いことに、これはグアーガムの投与によってコントロールに近づくことが分かった。このことは短腸症候群では腸内細菌

叢の異常が見られるが、これはグアーガムの投与によって是正される傾向を確認出来た。

次に、短腸モデルと短腸にグアーガムを投与したモデルを比較して腸内細菌の relative abundance を求めると、短腸モデルにグアーガムを投与すると、非投与群に比べて統計学的有意に *Lachnospiraceae* が増加することが分かった。*Lachnospiraceae* は短鎖脂肪酸を産生することが知られており、本研究で認めた短鎖脂肪酸の増加傾向と関連している可能性が考えられた。

便中短鎖脂肪酸の分析では酢酸がグアーガムの投与によって増加する傾向が見られた。

以上の結果から、短腸症候群モデルにグアーガムを投与することによって、小腸粘膜の炎症が抑制されることが判明した。これらの効果は腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸の血流増進効果や抗炎症効果による可能性があるが、詳しいメカニズムに関しては今後さらに研究が必要である。また、短腸症候群で高率に認める腸内細菌叢の異常がグアーガムにより是正されることが示唆された。これらの研究成果は実際の臨床現場においても、短腸症候群患児の腸管の炎症を抑制し、腸内細菌の異常を是正することでカテーテル関連血流感染症や腸管不全合併肝機能障害の予防に役立つことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

52nd Annual Scientific Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会) で Partially hydrolyzed guar gum improves small intestinal damage in association with modulating intestinal microbiota following massive small bowel resection を発表した。

第 119 回日本外科学会学術集会で短腸症候群モデルにおけるグアーガムの腸管上皮保護作用と腸内細菌叢との関連を発表した。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田中彩，形見祐人，千葉陽一，上野正樹，今大路治之，桑原知巳，大西峻，加治健，家入里志，三木崇範，下野隆一

ローマ字氏名：

Aya Tanaka, Hiroto Katami, Yoichi Chiba, Masaki Ueno, Haruyuki Imaohji, Tomomi Kuwahara, Shun Onishi, Tatsuru Kaji, Satoshi Ieiri, Takanori Miki, Ryuichi Shimono

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。