

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17049

研究課題名（和文）重症救急患者の腸内細菌叢の変化が全身免疫・腸管免疫に与える影響の解析

研究課題名（英文）The analysis of the influence of the gut microbiota change in severe emergency patients on systemic and intestinal immune system.

研究代表者

小島 将裕 (Ojima, Masahiro)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70721091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトにおいて腸内細菌叢は腸管内のリンパ組織との相互作用により、免疫に関与することが注目を集めている。重症患者において急性期に腸内細菌叢が大きく変化し、その変化が合併症や生命予後とも関連することがこれまで明らかになっているが、そのメカニズムが明らかではなかった。本研究により、重症救急患者の急性期において、便中エンドトキシン量がリンパ球の分布および血中免疫グロブリン量と相関関係にあり、便中IgA量とも相関関係にあることが明らかとなった。また、代表的な合併症である下痢の発症時にもこれらのデータで有意な変化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症救急患者においても、腸内細菌叢と全身免疫（体性免疫および液性免疫）および腸管免疫の間には関連がある可能性があることが本研究により示唆された。重症救急患者において、急性期の腸内細菌叢を制御することは患者の免疫能を制御することにつながる可能性があり、合併症や生命予後の改善につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The association between human gut microbiome and immune system has been reported and attracted attention in various diseases. We previously reported the change of gut microbiota in the ICU patients may associate with infectious complications and prognosis. However, the background of these findings were unclear. The aim of this study was to explore the association between gut microbiome and immune system (cell-mediated immunity, humoral-mediated immunity and gut immunity) in the ICU patients. We revealed the correlations between the amount of endotoxin in feces and distribution of lymphocytes or the amount of immune globulin (IgA) in the blood. We also revealed the association between the amount of endotoxin in the feces and the amount of IgA in the feces. There were statistical differences in the amount of endotoxin and IgA in the feces and the distribution of lymphocytes between patients with diarrhea and without diarrhea.

研究分野：救急医学

キーワード：腸内細菌叢 腸管免疫 体性免疫 液性免疫 救急 集中治療 エンドトキシン IgA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には 1000 種類 100 兆個を超える腸内細菌が存在している。腸内細菌叢が腸管関連リンパ組織 (GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue) にある樹状細胞およびリンパ球を活性化し、全身免疫にも影響を与えていることが近年注目されている。一方で宿主免疫も腸内細菌叢の恒常性維持に影響を与えていることが次第に明らかになってきており、腸管内に分泌される IgA 抗体は腸内細菌叢の制御に重要な役割を果たしていることが予想される。

救急領域においては、ICU 入室患者において腸内細菌叢や腸内環境が大きく変化しており、この変化が患者の予後や合併症の発生率などと関連があることが明らかになりつつある。我々は SIRS (全身性炎症反応症候群)、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生命予後、合併症の発生率、腸管蠕動運動不全の発生と関連があることを報告した。また、高処理シークエンサーを用いた解析では、従来行われていた培養法では明らかになっていなかったレベルでも重症患者の腸内細菌叢が大きく変化し、この変化は生命予後にも関連している可能性を報告した。一方でビフィズス菌、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、腸管免疫や全身免疫を改善し、重症救急患者の予後を改善させる可能性がある。我々は実際にシンバイオティクス療法により腸内細菌叢を整えることで、便中短鎖脂肪酸の増加や便 pH の正常化が得られ、腸内環境が改善し、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もあることも報告した。

これらの研究から重症救急患者においても腸内細菌叢が宿主の免疫系ともなんらかの関連を持ち、宿主の生体反応に関連することが推測されるが、この臨床上の疑問に対しては世界的にも報告例が乏しく、明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は重症救急患者の急性期の腸内細菌叢と全身免疫 (細胞性免疫および液性免疫)・腸管免疫との関連を探索することである。また、患者の生命予後や下痢などの合併症との関連を探索することである。

## 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なることが予想される 16 歳以上の敗血症症例を対象とした。第 1-3 病日・第 8-10 病日・第 15-17 病日に採血と直腸ぬぐい検体の採取および採便を行った。腸内細菌叢の評価として、ELISA 法による便中エンドトキシンの定量評価を行った。腸管免疫の評価は、ELISA 法による便中 IgA の定量評価を行った。全身免疫の指標として、フローサイトメトリー法により、血中リンパ球の CD3・CD4・CD8・CD56 の割合、CD4/CD8 比、CD4+CD25+Foxp3+ の割合を測定し、細胞性免疫能を評価した。また、血中の免疫グロブリン量を免疫比濁法を用いて測定し、液性免疫能を評価した。全身炎症の指標として好中球/リンパ球比を用いた。患者の年齢や性別、診断名、合併症、生死の転帰、来院時の APACHE スコア、SOFA スコア、使用した抗生物質などの患者情報も日々記録した。

腸内細菌叢の変化と全身免疫・腸管免疫の変化との関連を検索するために得られたデータの相関関係を Spearman の順位相関係数で評価した。また、腸内細菌叢の変化と代表的な合併症である下痢 (Bristol stool scale Type 6 or 7) との関連を検索するために、採便時の下痢の有無で 2 群に分け Mann-Whitney の U 検定を用いて 2 群間を比較した。すべての統計結果は  $p < 0.05$  を有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) 対象患者の背景

本研究では 8 例 (男性 7 例、女性 1 例) の敗血症患者を対象とした。平均年齢 64.9 歳であった。全例 Sepsis-2 の診断基準を満たしていた。来院時 APACHE スコアは中央値 22.0 (IQR: 18.8-29.3)、来院時 SOFA スコアは中央値 9.5 (IQR: 5.5-11.8) の重症度で 1 例 (12.5%) が死亡転帰となった。また、観察期間中に下痢を発症したのは 6 例 (75.0%) であった。全例で抗生物質が使用されていた。

### (2) 腸内細菌叢と全身免疫・腸管免疫との関連

#### 腸内細菌叢と細胞性免疫

便中エンドトキシン量は血中の CD3+CD4+陽性細胞 (ヘルパー T 細胞) の CD3+陽性細胞 (T 細胞) に占める割合、CD3+CD8+ (細胞障害性 T 細胞) の CD3+陽性細胞 (T 細胞) に占める割合、CD4/CD8 比と有意に相関関係を示した。血中の CD3+CD4+陽性細胞の CD3+陽性細胞に占める割合とは負の弱い相関関係、CD3+CD8+ の CD3+陽性細胞に占める割合とは正の相関関係、CD4/CD8 比とは負の相関関係であった (図 1)。

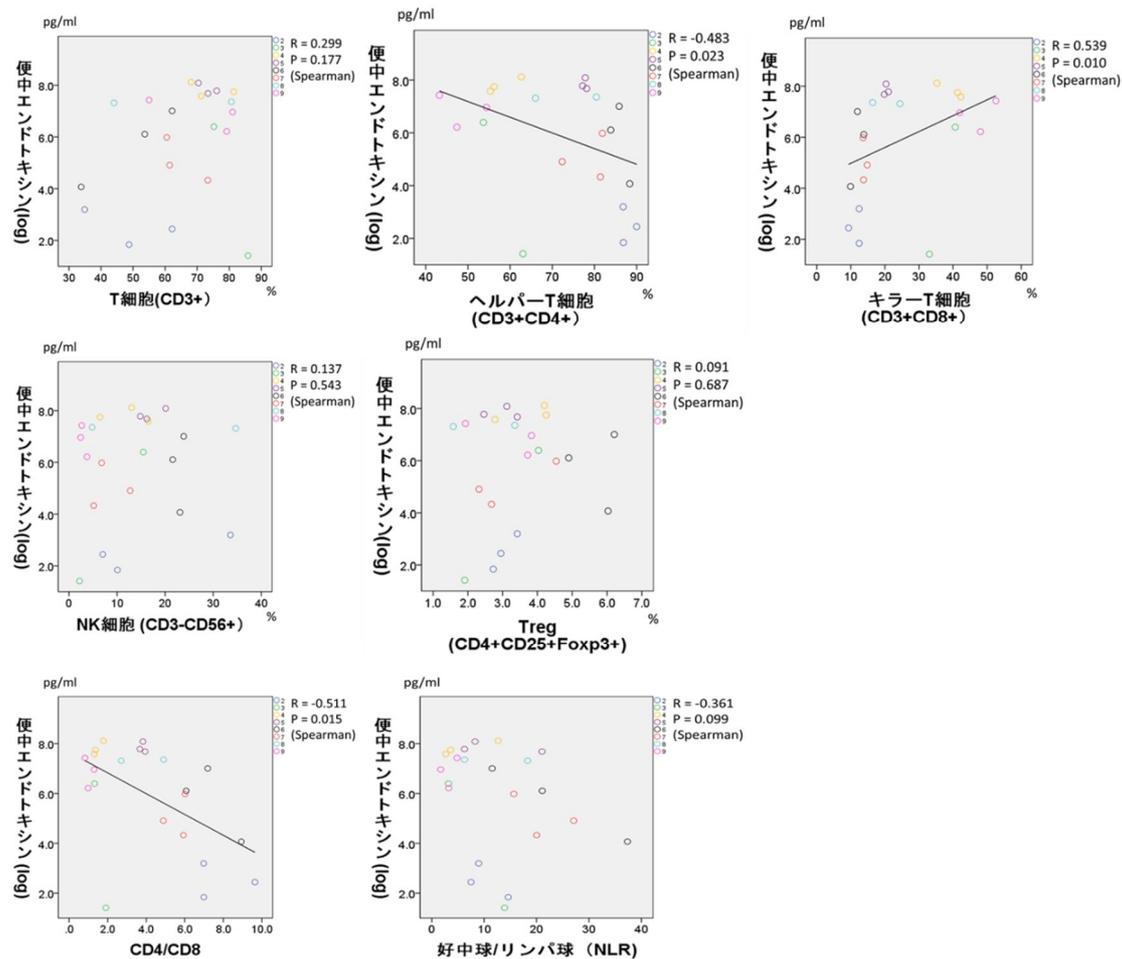


図1 便中エンドトキシン量とリンパ球サブセットおよび好中球/リンパ球比との相関

### 腸内細菌叢と液性免疫

便中エンドトキシン量は血中 IgA 量と有意に相関関係を示し、正の相関関係であった ( 図 2 )。

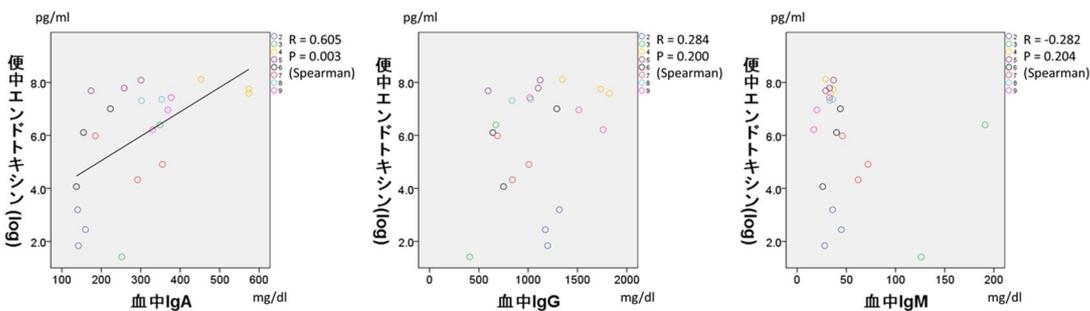


図2 便中エンドトキシン量と血中免疫グロブリン量との相関

### 腸内細菌叢と腸管免疫

便中エンドトキシン量は便中 IgA 量と有意に相関関係を示し、強い負の相関関係を示した ( 図 3 )。

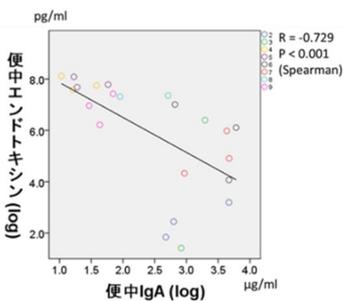


図3 便中エンドトキシン量と便中 IgA 量との相関

### (3) 下痢との関連

#### 腸内細菌叢と下痢

便中エンドトキシン量は採便時に下痢便を認めなかった群が下痢便を認めた群よりも有意に多かった(図4)。

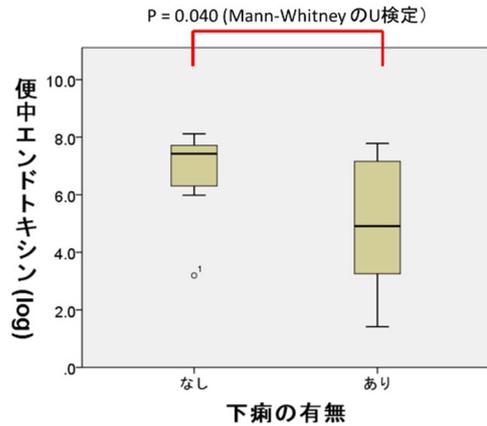


図4 便中エンドトキシン量の下痢あり群と下痢なし群との比較

#### 細胞性免疫と下痢

血中の CD3+CD4+陽性細胞(ヘルパーT細胞)の CD3+陽性細胞(T細胞)に占める割合および CD4/CD8比、好中球/リンパ球比は採便時に下痢便を認めなかった群が下痢便を認めた群よりも有意に低かった。血中の CD3+CD8+ (細胞障害性T細胞)の CD3+陽性細胞に占める割合は採便時に下痢便を認めなかった群が下痢便を認めた群よりも有意に高かった(図5)。

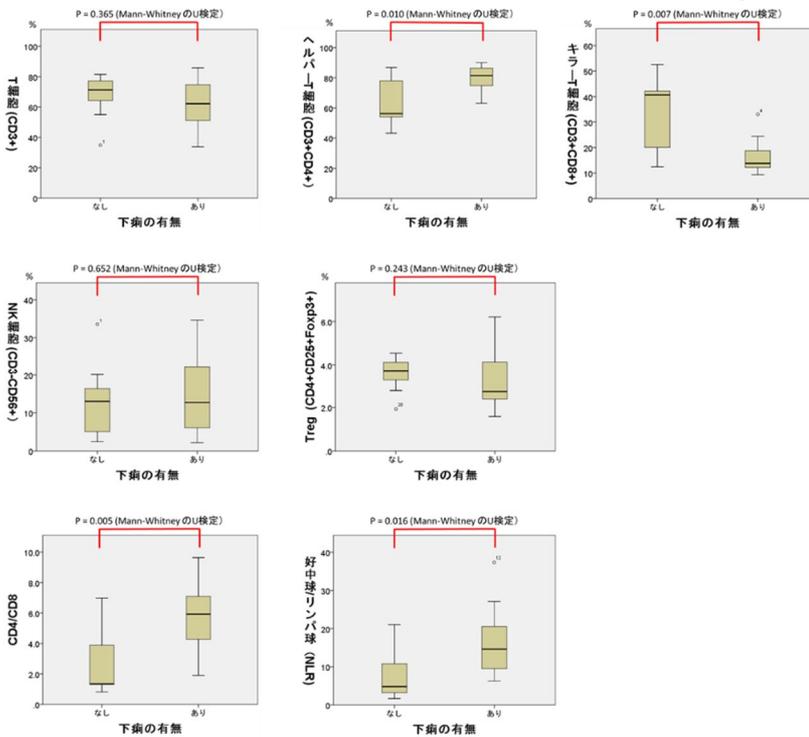


図5 体性免疫の各種データでの下痢あり群と下痢なし群との比較

#### 液性免疫と下痢

血中の免疫グロブリン量は両群間で統計的な有意差を認めなかった(図6)。

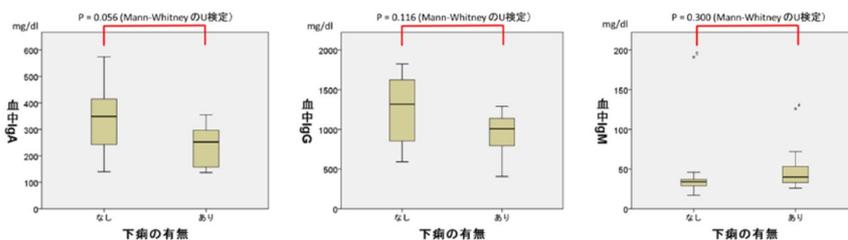


図6 血中の免疫グロブリン量の下痢あり群と下痢なし群との比較

## 腸管免疫と下痢

便中 IgA 量は採便時に下痢を認めなかった群が下痢を認めた群よりも有意に少なかった( 図 7 )。

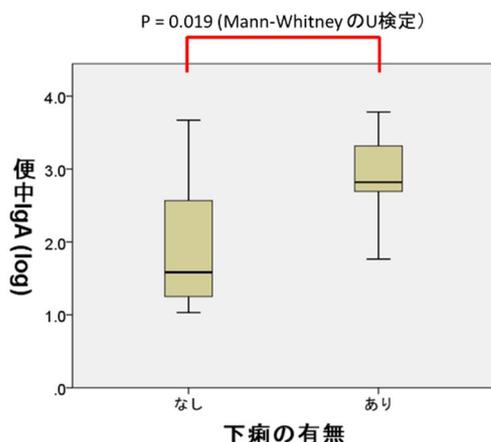


図 7 便中 IgA 量の下痢あり群と下痢なし群との比較

### ( 4 ) 結果のまとめ

以上の結果より以下のことが本研究により明らかとなった。

- 便中エンドトキシン量と細胞性免疫(血中のヘルパーT細胞・細胞障害性T細胞の割合、CD4/CD8比)、血中および便中のIgA量には関連がある可能性がある。
- 下痢の症状がある場合は、便中エンドトキシン量、細胞性免疫(血中のヘルパーT細胞・細胞障害性T細胞の割合、CD4/CD8比)、好中球/リンパ球比、便中のIgA量は有意に変化している可能性がある。

### ( 5 ) 考察

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁を構成するリポ多糖類であり、グラム陰性菌の死滅や破壊に伴い増加する。本研究では便中エンドトキシン量と便中IgA量には高い負の相関が認められ、血中のIgA量とは逆に正の相関が認められた。本研究は探索的観察研究のため因果関係を述べることは困難であるが、以下のように類推した。便中IgAは便中の病原菌と結合し、腸内細菌叢の制御に関与すると考えられている。便中のIgAが豊富に存在するような状態では腸内細菌叢が保たれており、その結果病原菌となるようなグラム陰性菌が少なく、便中のエンドトキシンが低くなる可能性が考えられた。

また、便中エンドトキシン量とヘルパーT細胞数の割合とは負の相関を認め、細胞障害性T細胞の割合とは正の相関、さらにCD4/CD8比とは負の相関を認めた。便中のエンドトキシン量が多い症例では、CD4/8比の低下が認められることから、便中のエンドトキシンが増加するような腸内細菌叢が崩れた症例ではヘルパーT細胞の低下が生じて病原体に対する免疫力が低下することを示唆している。本研究では近年腸内細菌叢との関連での注目を集めている制御性T細胞との相関関係は認めなかった。

下痢の有無との関連では下痢のある症例では便中エンドトキシン量が有意に少なく、ヘルパーT細胞の割合が増加し、細胞障害性T細胞の割合が低下し、CD4/CD8比の増加、好中球/リンパ球比の増加、便中IgA量の増加が認められた。重症病態時の下痢には様々な要因(腸内細菌叢の変化、経腸栄養剤の浸透圧、腸管機能低下など)があり、本研究により因果関係を類推するのは困難ではあるが、重症患者の入院中の下痢は腸内細菌叢・細胞性免疫・腸管免疫・全身炎症と関連する可能性が示唆された。

これらの結果から重症救急患者の急性期の腸内細菌叢と全身免疫・腸管免疫には関連がある可能性が高いと考える。本研究は、急性期の腸内細菌叢をsynbiotics療法や糞便移植などにより制御することで患者の免疫能を制御するという仮説に一定の論拠を与えるものになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島将裕、清水健太郎、元岡大祐、中村昇太、小倉裕司、飯田哲也、嶋津岳士
2. 発表標題 重症救急患者の腸内細菌叢・腸内環境の変化と臨床との関連
3. 学会等名 第87回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第60回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第65回日本化学療法学会西日本支部総会（招待講演）
4. 発表年 2017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
研究協力者	清水 健太郎  (Shimizu Kentaro)		
研究協力者	兒嶋 嵩  (Kojima Takashi)		
研究協力者	元岡 大祐  (Motooka Daisuke)		
研究協力者	石原 拓磨  (Ishihara Takuma)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小倉 裕司  (Ogura Horoshi)		
研究協力者	中村 昇太  (Nakamura Shota)		
研究協力者	新谷 歩  (Shintani Ayumi)		
研究協力者	嶋津 岳士  (Shimazu Takeshi)		