

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16750

研究課題名(和文)腸内細菌叢に注目した膀胱尿管逆流症例に対する再発性尿路感染症の新規予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new preventive method for recurrent urinary tract infections focusing on gut microbiota

研究代表者

木全 貴久(KIMATA, Takahisa)

関西医科大学・医学部・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)：乳児期に発症した有熱性尿路感染症(fUTI)の患児の約30-50%に膀胱尿管逆流(VUR)を合併している。特に高度のVURを合併する場合、fUTIを再発し将来腎機能障害に至る可能性がある。そのため、少量の抗菌薬(ST合剤)を予防内服しfUTIの予防を行う。しかし、ST合剤の予防内服を行ってもfUTIを再発する症例が存在する。腸内細菌叢における、fUTIの起炎菌となる大腸菌の比率が増加するとfUTIの発症リスクとなることが報告されている。今回の研究で、ST合剤の予防内服に加え整腸剤(プロバイオティクス)を内服し腸内細菌叢の大腸菌の比率がより減少する事を明らかとし、新規予防法となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の尿路感染症の予防として、尿中に侵入した細菌の増殖を抑制する目的で抗菌薬の予防内服が行われてきた。しかし、抗菌薬の長期使用は耐性菌を増加させるため、長期間抗菌薬で尿路感染症を予防投与することは困難であった。今回の研究で、整腸剤を内服することで、腸内細菌叢における、尿路感染症の原因となる菌の比率を抑制する事で尿路感染症を予防する治療法は、副作用もなく安全かつ効率的な方法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Approximately 30-50% of children with febrile urinary tract infections (fUTI) that develop in infancy have vesicoureteral reflux (VUR). Especially with severe VUR, fUTI may recur and lead to renal dysfunction in the future. Therefore, a small amount of antibacterial drug is taken prophylactically to prevent fUTI. However, there are cases in which fUTI recurs even after prophylactic administration of antibacterial drug. It has been reported that an increase in the proportion of Escherichia coli, which is the causative agent of fUTI, in the gut microbiota poses a risk of developing fUTI. In this study, it was clarified that the ratio of Escherichia coli in the gut microbiota was reduced by taking probiotics in addition to the preventive oral administration of antibacterial drug, and it was shown that it could be a new preventive method.

研究分野：小児腎泌尿器

キーワード：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 逆流性腎症 ST合剤

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

幼児において有熱性尿路感染症 (febrile urinary tract infection: fUTI) は、日常感染症の1つであり、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 以上の高度 VUR 合併例は fUTI を反復し、腎瘢痕を形成するため腎機能障害をきたす可能性がある。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 の反復と腎瘢痕形成、およびそれによる慢性腎不全への進行の予防である。一方で VUR は自然軽快する可能性が高い疾患であるため、まずは内科的治療である抗菌薬の予防投与 (continuous antibiotic prophylaxis: CAP) が選択される。2014 年に報告された大規模な randomized control trial (RCT) である The RIVUR (Randomized Intervention for Children with Vesicoureteral Reflux) trial の結果、ST (Sulfamethoxazole- Trimethoprim) 合剤を用いた CAP の結果、UTI の再発リスクを大幅に軽減させることが判明した (50%低下)。この結果から、CAP が VUR 患者の fUTI 予防に有効であることが高いエビデンスレベルで証明された {Hoberman A, et al. N Engl J Med. 370(25): 2367-76, 2014.}。しかし、臨床の場では、CAP を行っても fUTI を再発する症例をしばしば経験する。

近年、分娩様式や乳児期の栄養法によって大きく変化する腸内細菌叢が、小児期の様々な疾患の発症に影響することが注目されている {Sevelsted A, et al. Pediatrics. 135(1):e92-8, 2015}。そこで私たちは、ST 合剤による CAP 施行中の高度 VUR 症例における再発性 fUTI (breakthrough infection : BTI) が、腸内細菌叢の形成に最も影響を与えられと考えられる分娩様式と新生児期の栄養法に関連するか否かを明らかにすることを目的に検討を行った。grade 以上の VUR を認め、ST 合剤による CAP を行った 66 例 (月齢中央値 4 か月、男児 49 例) を対象とした。BTI の既往のない群 (A 群、n=34) と既往のある群 (B 群、n=32) に分け、分娩様式 {帝王切開分娩、経膈分娩} と新生児期の栄養法 (母乳、混合、人工乳) の比率を 2 群間で比較した。その結果、2 群間で初回 fUTI 時の月齢、性別、初回 fUTI 時の起炎菌における *E.coli* の割合、在胎週数、出生体重、VUR の grade に有意差は認めなかった。帝王切開分娩で出生した患者の比率は A 群 9%、B 群 29% であり B 群が有意に多かった ( $p=0.031$ )。一方で、新生児期の栄養法は 2 群間で差を認めなかった。

一般に UTI の起炎菌は *E.coli* を始めとして腸内細菌が多いが、ヒトの腸管内には数百菌種の腸内細菌が 100 兆個以上存在し、近年、腸内細菌叢と免疫系との相互作用が注目されている (Geuking MB, et al. Gut Microbes. 3:411-8, 2014)。腸内細菌叢の形成は出生直後から始まり、特に乳児期の腸内細菌叢の形成には、分娩様式や乳児期の栄養法が大きく影響する。帝王切開で出産された乳児では、自然経膈分娩児と比較し、乳酸を産生する乳酸菌やビフィズス菌の定着が遅延する。尿路においては、乳酸菌やビフィズス菌などの有益菌主体の腸内細菌叢が産生を誘導する IgA、活性酸素、および酸性物質などが抗菌作用を発揮し、無菌的に保持されている。

私たちは、grade 度の高度 VUR 症例において、BTI 症例と BTI のない症例の糞便を用いて次世代シーケンサーでメタゲノム解析した。その結果、BTI のない症例は、有益菌 (乳酸菌、ビフィズス菌) が 45% を占めていたが、BTI 症例は有益菌の比率は 10% と少なかった。

以上の先行研究の結果から BTI 症例に正常な腸内細菌叢が形成されにくい帝王切開出生児が多いこと、BTI 症例は、乳酸菌主体の有益菌の割合が少ないことから、BTI の発症には腸内細菌叢の影響が示唆される。また、腸内細菌叢の形成時期のあたる乳児期早期に fUTI に罹患して強力な抗菌薬治療を受け腸内細菌叢に異常をきたしていると考えられる。したがって、VUR 合併症例に対して、プロバイオティクスを投与し腸内細菌叢を是正することで尿路の自然免疫系を賦活化できれば、より効果的に fUTI の再発を予防できるのではないかという着想に至り、それを検証するために今回の研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

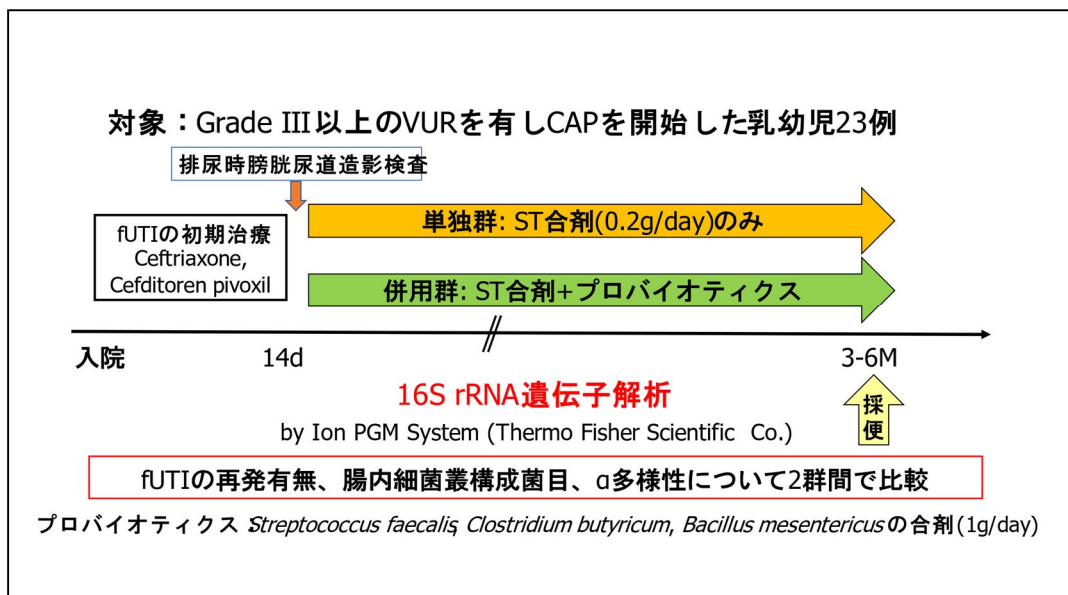
乳幼児期の VUR 合併症例に、ST 合剤の予防内服だけでなく、プロバイオティクスを併用し腸内細菌叢を是正することで、より効果的な fUTI の予防法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

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) を合併した乳幼児 23 例 (年齢中央値 4.8 か月、男女比 14:9) を対象とした。18 例は ST 合剤 (0.2g/day) のみ内服し (CAP 単独群)、5 例はプロバイオティクスを併用した (併用群)。

プロバイオティクスは、*Streptococcus faecalis*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus*

*mesentericus* の合剤を 1g/day (分3) 内服させた。



fUTI 発症後 3-6 か月の時点で採取した便を用いて腸内細菌叢の分析を行った。各群の腸内細菌叢の評価は次世代シーケンサー( Ion PGM System ,Thermo Fisher Scientific Co. )を利用してメタゲノム解析、すなわち 16S rRNA 遺伝子解析を行い、微生物生態系の多様性を示す Shannon Index および Simpson Index、構成菌目を 2 群間で比較した。両群とも検討期間中に fUTI を再発した患者はいなかった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 対象の背景

CAP 単独群とプロバイオティクスを併用群の 2 群間で、精査、月齢、分娩様式、乳児期の栄養法 (母乳栄養、人工乳栄養、混合栄養) 初発の fUTI 時の起炎菌における大腸菌の比率すべて有意な差は認めなかった。

### 対象の背景

	全体 (n=23)	単独群 (n=18)	併用群 (n=5)	p値
性別, 男性 (%)	14 (60%)	9 (50%)	5 (100%)	0.12
月齢 (月)	4.8 (3.2-10.8)	5.8 (2.8-11.0)	3.5 (3.3-9.7)	0.71
分娩様式, 経膣分娩 (%)	19 (83%)	14 (78%)	5 (100%)	0.54
栄養*	母乳 (%)	9 (50%)	3 (60%)	0.43
	混合 (%)	8 (44%)	1 (20%)	
	人工乳 (%)	1 (6%)	1 (20%)	
起炎菌, 大腸菌 (%)	14 (61%)	11 (61%)	4 (80%)	0.61

\*母乳：80%以上母乳、人工乳：80%以上人工乳、混合：その他  
中央値 (四分位範囲)

##### (2) 再発の有無と 多様性の比較

両群とも検討期間中に fUTI を再発した患者はいなかった。

多様性は、Shannon Index および Simpson Index とともに 2 群間で有意な差は認めなかった。

## α多様性の比較

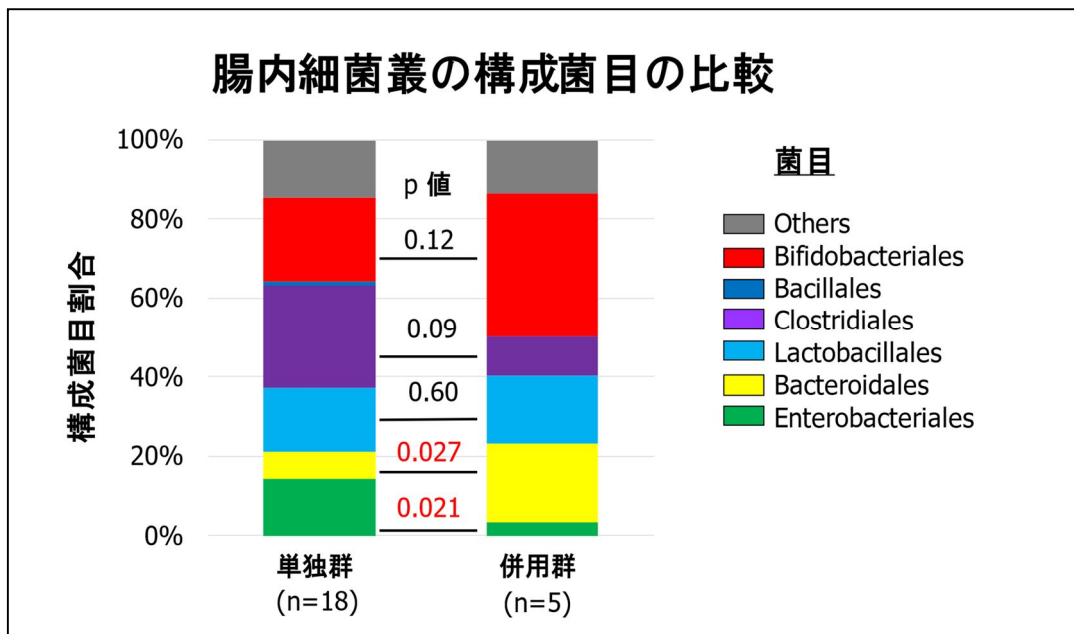
	単独群 (n=18)	併用群 (n=5)	p 値
観察された菌種数 (種)	32 (25-44)	36 (30-40)	0.77
Shannon Index	3.37 (2.76-3.90)	3.84 (3.54-4.37)	0.50
Simpson Index	0.81 (0.69-0.86)	0.78 (0.70-0.83)	0.50

中央値 (四分位範囲)

α多様性は2群間で有意な差を認めず

### (3) 腸内細菌叢における構成菌目の比較

腸内細菌叢における構成菌目 (Bifidobacteriales、Bacillales、Clostridiales、Lactobacillales、Bacteroidales、Enterobacteriales) を2群間で比較した結果、プロバイオティクス併用群では Enterobacteriales 目の割合が低く (3.4% vs 14.4%, p=0.021)、Bacteroidales 目の割合が有意に高かった (19.9% vs 6.6%, p=0.027)。



### (4) 考察と結論

本研究結果から CAP にプロバイオティクス併用することで、大腸菌、クレブシエラなど fUTI の起因菌が多く含まれる Enterobacteriales 目の増殖を抑制していることが明らかとなった。

また、Bacteroidales 目は腸管粘膜における IgA 産生促進などの免疫修飾作用を有することが知られているが、今回併用したプロバイオティクスに含まれる糖化菌 (*Bacillus mesentericus*) が産生するオリゴ糖によって増殖した可能性がある { Donaldson G et al. Science 18;360(6390):795-800,2018 }。また fUTI の主要起因菌である大腸菌やクレブシエラが属する Enterobacteriales 目が相対的に抑制されていた。

以上の結果から CAP とプロバイオティクスの併用は、粘膜免疫の増強と病原菌の増殖抑制を介して CAP の効果を高める可能性があり、より効果的な予防法となると考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Akagawa Yuko, Kimata Takahisa, Akagawa Shohei, Yamaguchi Tadashi, Kato Shogo, Yamanouchi Sohsaku, Hashiyada Masaki, Akane Atsushi, Kino Minoru, Tsuji Shoji, Kaneko Kazunari	4. 巻 204
2. 論文標題 Impact of Long-Term Low Dose Antibiotic Prophylaxis on Gut Microbiota in Children	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1320 ~ 1325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/JU.0000000000001227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木全貴久
2. 発表標題 Effects of continuous antimicrobial prophylaxis on gut microbiota in infants with vesicoureteral reflux
3. 学会等名 18th Congress of IPNA（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木全貴久
2. 発表標題 尿路の感染制御と腸内細菌叢
3. 学会等名 第29回日本小児泌尿器科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------