

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03761

研究課題名（和文）重症病態での腸内細菌叢を介した免疫システム解明と腸内細菌叢再構築のための治療戦略

研究課題名（英文）Analysis of immune system via gut microbiota in critically ill condition and treatment strategy for gut microbiota reconstruction.

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：重症病態の侵襲による腸管不全および全身の生体応答をテーマに研究を行っている。重症患者を対象にメタゲノム解析を用いて最初の1週間で主なBacteroidetes門、Firmicutes門の割合は著変し、5-7日でいったん平衡に達した。動物モデルで腸内細菌叢異（Dysbiosis）と便中代謝産物との関連を検討したところ、腸内細菌叢関連の代謝産物やIgAが上昇した。

腸内細菌叢回復のため腸管内治療不応性の難治性下痢症例への糞便微生物移植を計画し、糞便微生物移植の特定臨床研究（jRCTs051220110）が承認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲後の急性期に腸内細菌叢が劇的に変化することを示すことで予防的な腸内細菌叢を保持するためのプロバイオティクスやシンバイオティクス治療の妥当性が示された。腸内細菌叢の代謝産物やIgAなどのグロブリンが、腸内細菌叢を介して、生体の防御のために応答していると考えられ、抽出された物質群から将来の創薬につながる可能性がある。

また、難治性の下痢などの腸内細菌叢の崩壊がなおりにくい症例に対して、腸内細菌そのものを移植する糞便微生物移植の臨床研究の準備を行うことで、疾病によらず腸内細菌叢の崩壊（Dysbiosis）が病態の悪化に関与する患者に対して新たな治療になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We performed research on intestinal failure and host response following injury in critically ill conditions. In metagenomic analysis, gut microbiota dramatically changed the proportion of Bacteroidetes and Firmicutes, and were stabilized within 5-7days after admission. In animal research, gut microbiota dysbiosis was associated with fecal metabolites and IgA. We also made a research project of fecal microbiota transplantation for refractory diarrheal patients to reconstruct the original gut microbiota. In order to make a platform for various disease with gut dysbiosis, we had approval of “Specified clinical trial for fecal microbiota transplantation and gut microbiota reconstruction in patients with refractory diarrhea (jRCTs051220110)”

研究分野：救急医学

キーワード：腸内細菌 侵襲 ICU 糞便微生物移植 FMT IgA プロバイオティクス シンバイオティクス

## 1. 研究開始当初の背景

生体の免疫システムは、病原体だけでなく外傷などの私達自身の組織が抗原となって、生体全体に炎症が引き起こされる。一連の炎症性変化は、全身性炎症反応 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) と呼ばれ、進行すると敗血症や多臓器障害などの合併症をひきおこし死亡原因となる。日本の第3位の死因は肺炎であるが、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患などの疾病も肺炎などの感染症を引き起こすことがしばしばである。米国では97万人が敗血症により入院となり、その数は増加している。病院死亡の50%以上が敗血症によるものであり医療費負担となっている。2017年に、WHOはSepsis (敗血症) の診断・治療・管理の改善を決議した。外傷は、本邦において5歳から39歳までの第1位の死亡原因である。様々な要因による外傷や感染などの生体への侵襲が、炎症反応を引き起こし、マクロファージや好中球が主になり、大量のサイトカインや活性酸素を放出して、生体の免疫力を変化させてSIRSを引き起こすと考えられている。SIRSが悪化すると、腸炎や肺炎などさらなる感染合併症や多臓器障害などを引き起こすため、この炎症反応を制御することはいずれの疾患群においても重要な課題であり、その治療法の開発が求められている。

全身性炎症反応は急性期に共通した概念であるが、そのメカニズムは不明な点が多い。菌などの外来異物や外傷による自己組織によって免疫系が起動され、炎症反応が引き起こされると同時に抗炎症作用も惹起される。これは代償性抗炎症反応症候群 (compensatory anti-inflammatory response syndrome: CARS) と呼ばれ、免疫抑制の状態となり易感染性になると考えられる。我々は、侵襲時にインフラマソームの活性化とともに血液中のCD8+T細胞が減少しCD4+T細胞、B細胞が増加するとともに、過剰な免疫応答を抑制する制御性T細胞が増加することを報告した(基盤研究(C)2015-2017)。病原菌に対する抗菌薬による治療だけでなく、侵襲に対して好中球・リンパ球などの防御システムが起動しない免疫不応の状態を改善する治療が重要である。

## 2. 研究の目的

重症病態での腸内細菌叢や腸管機能を介した免疫担当細胞などの影響を評価し、腸内細菌叢を維持・回復するための治療戦略を構築することが目的である。

## 3. 研究の方法

### 腸内細菌叢解析

腸内細菌叢の解析に関しては、すべての細菌が持っている16SリボソームRNA遺伝子(16S rRNA)を用いた網羅的なメタゲノム解析により、生物の分類の階層である門・綱・目・科・属・種にいたる解析を行った。

### 腸管免疫評価

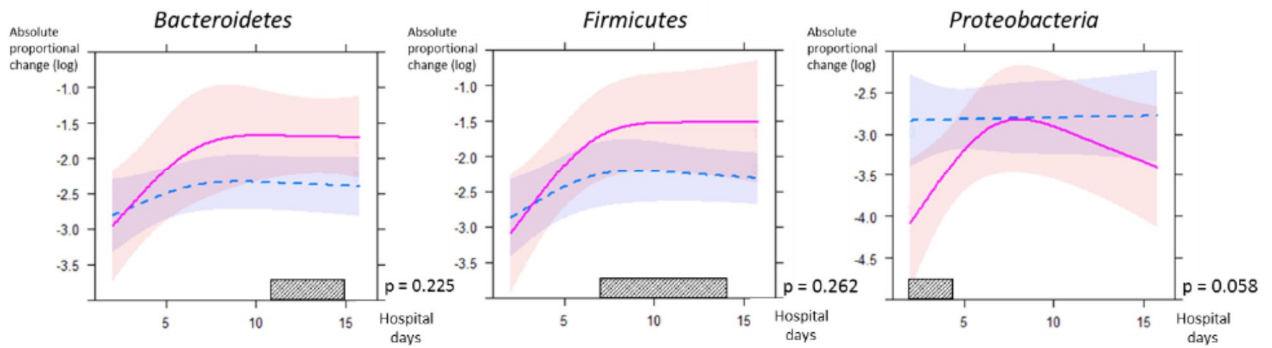
腹膜炎モデル (CLP: cecal ligation puncture) を用いて腸管組織中の白血球を抽出し、CD4、CD8などの表面マーカーを解析した。また、腸管から白血球およびIgA陽性細胞を単離してin vitroで静置し上清のIgA濃度を測定した

## 4. 研究成果

重症病態での腸管不全の全身の免疫能におよぼすメカニズムの解明

### 研究1 侵襲早期の腸内細菌叢崩壊の病態解明

重症患者を対象にメタゲノム解析を用いて入院後一週間を中心に便検体を回収した。門レベルでの解析を行い、腸内細菌の絶対的变化を変数として統計解析を行った。最初の一週間で主な細菌(門)であるBacteroidetes門、Firmicutes門の割合は著変し、その変化は5-7日ですでに平衡に達したことから、早期侵襲の影響は最初の一週間でほとんど変化がみられることが明らかになった。その後、Proteobacteriaは変化することから菌交代が起こっていると考えられた。属レベルで解析を行うと、*Blautia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*などは減少し、*Enterococcus*は増加した。以上より、抗菌薬を含めた重症患者に対する治療は最初の一週間で腸内細菌叢に劇的な影響をおよぼす。抗炎症に関連する腸内細菌は減少することから炎症反応が惹起されやすい状態になることが予想されることから、一週間以上の治療におけるICU疲労症候群などの易感染性の一因として腸内細菌叢の影響が今後の課題と考えられた(Ojima M, et al: Dig Dis Sci. 2022;67(6):2420.)



図：

### 研究2 腸内細菌叢と免疫グロブリンとの関連

重症患者を対象に便と血液データ間との相関係数を検討した。便中 Bacteroidetes は血液中 CD4 数と負の相関、Firmicutes は血液中 CD4 数と正の相関があった。便中 IgA は、血中グロブリン (IgG、IgA) と負の相関があった。以上より、腸内細菌叢が全身の免疫と関連する可能性が示唆された (第 48 回日本救急医学会・学術集会)。

血液 \ 便	Bacteroidetes	Firmicutes	便中IgA
CD4数	-0.46	0.52	0.50
CD8数	-0.21	0.36	-0.60
Treg数	-0.16	0.36	0.13
IgA	0.12	0.04	-0.55
IgG	-0.19	0.31	-0.53
IgM	-0.12	0.08	0.53

### 研究3 腸内細菌叢異常 (Dysbiosis) と便中代謝産物との関連

侵襲時の腸内細菌叢の推移を評価するために腹膜炎マウスモデルを用いて腸内細菌叢を経日的に評価した。第 1 病日には *Enterobacteriaceae* が上昇した。第 7 病日には、回復に伴い *Lachnospiraceae* と *Ruminococcaceae* の割合が上昇していた。便中代謝産物を CE-TOFMS 法によるメタボローム解析で評価したところ、バリン、ロイシン、グリシン、セリンなどのアミノ酸や動脈硬化や心血管合併症と関連するコリン由来のベタイン、trimethylamine N oxide (TMAO) などの腸内細菌叢関連の代謝産物が上昇した。逆に、抗炎症や腸管透過性にかかわる短鎖脂肪酸は減少していた。

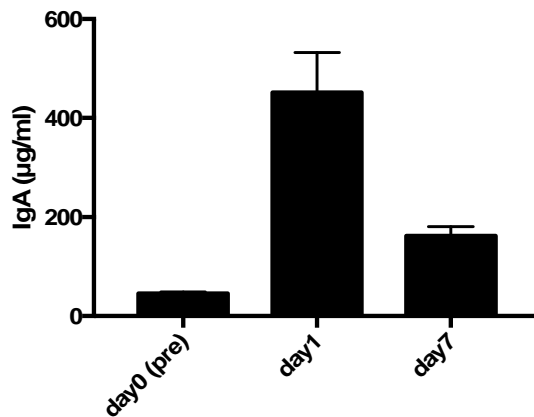
腸内細菌と代謝産物の変化に応答する宿主の反応をみるために、腸管組織の免疫担当細胞を評価したところ、制御性 T 細胞に相当する Foxp3+CD4+ 細胞の上昇がみられた。全身炎症反応に対して抗炎症反応が亢進して生体の均衡をとっていると推察された (Muratsu A, et al. Acute Med Surg. 2022;9(1):e770. )

### 研究4 腸管免疫の評価～腸管内 IgA 分泌と腸内細菌叢異常との関連

腹膜炎モデル (CLP : cecal ligation puncture) を用いて腸管組織中の白血球を抽出したところ、CLP 群で白血球は有意に上昇していた。CD4, CD8+CD3 細胞数は著変なかったが、CLP

群の Gr- 1 陽性細胞は有意に増加していた。IgA+B220-細胞は有意に増加していた。

IgA 産生細胞の分泌能力。腸管から白血球および IgA 陽性細胞を単離して in vitro で静置し上清の IgA 濃度を測定したところ、上清の IgA 濃度は CLP 群で有意に高かった。以上より、侵襲時の腸管組織に IgA 陽性細胞が増加して IgA が腸管内腔に分泌されていることが示唆された。



(図) 侵襲時における便中の IgA 量の変化。大腸菌の増加に対して、IgA が 24 時間以内に早期に分泌されていた。

## 2) 腸管バリアの評価 ~ RT-PCR を用いたバクテリアルトランスロケーションの評価

腸内細菌叢が腸管外にでていくバクテリアルトランスロケーションが原因で、敗血症の一因になっていることが考えられている。胆管癌の手術で患部切除後の血液やリンパ節を、細菌のリボソーム RNA に特異的な reverse transcriptase polymerase chain reaction 法を用いると 20-30% が陽性になることが報告されている (Ann Surg. 2010; 252:1013.) が、重症病態では十分証明されていない。重症患者の血液を採取し、RT-PCR 法を用いて同定される腸内細菌の有無を確認する。これらのデータをもとに腸管バリアを介したバクテリアルトランスロケーションを継続して評価する。

(評価方法) 敗血症を対象に、血液標本の RT-PCR を行った。

(結果) 12 例の敗血症の RT-qPCR を行ったがいずれも細菌は検出されなかった。

(考察) 炎症反応において細菌は早期に排除され、細菌によりひきおこされる炎症反応が重症病態と関連しているのではないかと考えられた。早期の抗菌療法は重要であるが、引き続き引き起こされる炎症反応の制御も重要な治療目標と予想された。

以上より、侵襲によって腸内細菌叢の Dysbiosis が進行するとともに代謝産物の変化が劇的におこっていた。腸管の Dysbiosis の進行とともに腸管内の IgA が分泌されることで腸内細菌叢異常への制御機構や全身免疫への関与が予想された。

## 腸内細菌叢回復のための新規治療法開発 ~ 難治性下痢に対する腸内細菌叢再構築 (糞便微生物移植)

腸管内治療不応性の難治性下痢症例への糞便微生物移植を計画した。疾患単位での糞便微生物移植ではなく、下痢という病態を対象とした糞便微生物移植として、Dysbiosis を伴うあらゆる疾患のプラットホームになることを目指して計画を行い、特定臨床研究 (jRCTs051220110) として承認された。

以下の選択基準・評価項目とした。

(対象者の選択基準)

18 歳以上

水様、泥状下痢（ブリストル 6、7）に標準治療を行っても、のべ 10 日以上下痢が継続する患者。

もしくは、止痢薬を使わないと下痢が継続する患者。（下痢： 3 回/日以上、もしくは便量 200ml/日以上）

腸内細菌叢の崩壊（Dysbiosis）

本研究への参加について文書による同意が本人又は代諾者から得られる者

（主要評価項目）

有害事象（自覚症状及び他覚所見の確認、臨床症状・検査値の変動）

収集期間：28 日

（副次的評価項目）

（1）形状（ブリストル分類）の推移

（2）排便回数の推移

（3）便量の推移

（4）腸内細菌叢の変化（便塗抹・培養、ゲノム）

（5）血液学的検査・血中炎症バイオマーカー（CRP、IL-6、LRG）の変化

今後、疾患横断的な腸内細菌叢異常（Dysbiosis）を起点とした、新たな腸管内治療およびその端緒になる研究を目標にしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 清水健太郎、小倉裕司	4. 巻 44
2. 論文標題 【腸管・腸内細菌叢と集中治療】重症病態における腸内細菌叢と腸管内治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ICUとCCU	6. 最初と最後の頁 435-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Shimizu, K. Takahashi, A. Motooka, D. Nakamura, S. Tomono, K. Ogura, H. Shimazu, T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Fecal Gram staining of phagocytosed bacteria to differentiate methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 1078-1081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2020.05.021	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 -

1. 著者名 清水 健太郎、小倉 裕司	4. 巻 44
2. 論文標題 【敗血症～残された課題～】基礎医学 敗血症や敗血症の治療は、どのように宿主の細菌叢や細菌叢によってもたらされる効果を変化させるか？	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 救急医学	6. 最初と最後の頁 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Arisa Muratsu, Mitsunori Ikeda, Kentaro Shimizu, Shoichiro Kameoka, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, Hisatake Matsumoto, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Dynamic change of fecal microbiota and metabolomics in a polymicrobial murine sepsis model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acute medicine&surgery	6. 最初と最後の頁 e770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ams2.770	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 -

1. 著者名 Masahiro Ojima, Kentaro Shimizu, Daisuke Motooka, Takuma Ishihara, Shota Nakamura, Ayumi Shintani, Hiroshi Ogura, Tetsuya Iida, Kazuhisa Yoshiya, Takeshi Shimazu	4. 巻 6
2. 論文標題 Gut Dysbiosis Associated with Antibiotics and Disease Severity and Its Relation to Mortality in Critically Ill Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci	6. 最初と最後の頁 2420-2432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-021-07000-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 清水 健太郎
2. 発表標題 臓器障害と臓器連関-その機序と治療- 重症患者における腸内細菌叢の変化と感染合併症の臓器連関 粘膜免疫を介したつながり
3. 学会等名 日本救急医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 健太郎
2. 発表標題 不断前進、敗血症診療 重症患者の腸内細菌叢とシンバイオティクスの有用性
3. 学会等名 日本救急医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 健太郎
2. 発表標題 腸内細菌とプロバイオティクス・プレバイオティクスの有用性 重症患者の腸内細菌叢とシンバイオティクスの有用性
3. 学会等名 日本静脈経腸栄養学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 健太郎
2. 発表標題 FECAL IMMUNOGLOBULIN A(IGA) IN DIARRHEAL PATIENTS IN THE ICU : A PRELIMINARY STUDY
3. 学会等名 Shock (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	松浦 裕司 (Matsuura Hiroshi)  (10791709)	大阪大学・医学部附属病院・医員  (14401)	
研究分担者	蛭原 健 (Ebihara Takeshi)  (10813975)	大阪大学・医学部附属病院・医員  (14401)	
研究分担者	小倉 裕司 (Hiroshi Ogura)  (70301265)	大阪大学・医学系研究科・准教授  (14401)	
研究分担者	嶋津 岳士 (Shimazu Takeshi)  (50196474)	大阪大学・医学系研究科・教授  (14401)	
研究分担者	新谷 歩 (Ayumi Shintani)  (00724395)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授  (24402)	



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