

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15986

研究課題名(和文) 犬における糞便細菌叢移植療法の基礎的研究

研究課題名(英文) Establishment of the methodology of fecal microbiota transplantation in dogs

研究代表者

五十嵐 寛高 (Igarashi, Hirotaka)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：20758172

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)：糞便細菌叢移植(Fecal Microbiota Transplantation: FMT)は腸内細菌叢を改善させる新規の治療法として注目されている手技である。獣医学領域でもFMTは少数の症例で実施され始めてはいるものの、その実施プロトコールについての検討は全く行われていない。そこで本研究では、犬におけるFMTの実施プロトコール確立のための第一歩として、移植経路(経口投与または大腸内注入)によるドナー便との腸内細菌叢の類似度への影響について比較検討を行った。その結果、経口投与では移植1週間後に類似度が上昇し、大腸内注入では移植1週間後に類似度が低下する傾向にあることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、犬におけるFMT療法の安全性および経口投与方法の有用性が明らかとなった。今後、ドナー糞便の処理方法や投与回数などについても検討を進めることでFMTの実施プロトコールが確立されれば、臨床症例に対する治療が飛躍的に進められると予想される。さらに、本研究やその後の臨床試験によって得られた知見は、まだ研究段階である医学領域でのFMTの実施プロトコールの確立や適応疾患の選別に対しても貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Fecal microbiota transplantation is a novel procedure for the treatment of gastrointestinal diseases. To date, no reports have evaluated the validity of FMT in veterinary medicine, although several reports of dogs received FMT had been documented. Therefore, this study aimed to establish an evidence of FMT protocol in dogs.

Comparison of the weighted unifracs distance between donor and each recipient revealed that the microbiome of dogs with oral-FMT showed the decrease of the distance after 1 week of FMT, and then returned to the baseline level at 2 weeks after the FMT. In contrast, the distance of dogs with rectal-FMT showed a tendency to increase after 1 week of FMT, and then recovered to the baseline level at 2 weeks after the FMT.

These results suggest that the oral administration of donor feces could have an equivalent or superior effect on the recipient's microbiome compared with rectal-administration method.

研究分野：獣医内科学

キーワード：糞便細菌叢移植 腸内細菌叢 慢性腸炎 犬 プロトコール

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

腸内細菌叢は宿主の消化管内で生息するためにさまざまな代謝活動を行っている。そのため、この腸内細菌叢の変動は炎症性腸疾患などの消化器疾患の他、糖尿病やアトピー性皮膚炎など、さまざまな慢性疾患の病態に関わることが明らかとなっている。現在、この変動した腸内細菌叢を是正するために抗菌薬やプロバイオティクス、プレバイオティクスが広く用いられている。しかし、抗菌薬の常用は菌交代現象や薬剤耐性菌出現などの問題があり、プロバイオティクスやプレバイオティクスはその治療効果が限定的であるという問題がある。これに対し、新しい腸内細菌叢の改善法として健常者の腸内細菌叢を投与する糞便細菌叢移植（Fecal Microbiota Transplantation：FMT）が近年医学領域で実施され始めている。FMTはドナーの選別基準や安全性、最適な投与方法などといった基礎的条件についてのデータが乏しく、今後のデータ蓄積に基づいたガイドライン構築が望まれている領域であるが、*Clostridium difficile* 感染症やクローン病に対して高い奏効率を示すことが報告されている。一方で、獣医学領域におけるFMTについての報告は乏しく、安全性や投与方法といったFMT実施における基礎的条件は全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、基礎的検討が行われていない犬でのFMTに対し、まずは実験犬を用いてFMTの基礎的条件を検討し、その安全性および最適な糞便の投与方法を確立することを目的とした。具体的には、第1に糞便の投与経路についての検討を行い、第2にドナー糞便の保存方法に関する検討を行うこととした。

FMTは医学領域でもまだ統一されたプロトコルやガイドラインが策定されていない治療法である。そのため、特に国内ではレシピエント患者の安心のためにドナーが近親者に限定されることが多く、感染症や代謝性疾患などの基礎疾患のないドナーの確保が時に困難となるという課題が指摘されている。これに対し、獣医学領域では感染性の消化器疾患をスクリーニングする検査（直接鏡検やELISA・リアルタイムPCRによる複数種の感染症診断パネルなど）が日常的に実施されている。また、輸血のために動物病院または飼主間で供血犬を提供しあう相互協力システムが既に広く行われているため、医学領域よりもドナーとなる健常犬の確保が比較的容易であることが予想される。

3. 研究の方法

1) 糞便の投与経路に関する検討

ドナーには健常な雑種犬2頭を使用し、レシピエントにはドナー犬とは異なる施設で飼育されている健常なビーグル犬6頭を使用した。レシピエント犬は自由飲水をさせ、特定のドライフードをFMT実施2週間前から実験が終了するまでの期間にわたって1日2回ずつ一定量を与えた。なお、これらはいずれも過去4週間以内に一切の投薬治療がされていない個体であった。

2頭より合計約100gの糞便を採取し、直ちに生理食塩水で希釈して、380mlの糞便懸濁液を生成した。この懸濁液作成のプロトコルは以前行われた研究に基づいて行ったが、1頭のドナーでは十分な量の糞便が採取できなかったため、本研究では2頭のドナーの糞便を混ぜ合わせることにした。糞便懸濁液をガーゼでろ過することで残渣を除去し、レシピエント犬1頭あたり50mlの糞便懸濁液を8Frのフィーディングチューブを用いて経口投与あるいは大腸内注入を行った。大腸内注入群では、糞便懸濁液が肛門から漏れることを防ぐため、腰部を肩部よりも高く浮かせた状態で30分間保定した。

FMTの前日、1週間後、および2週間後に糞便を採取した。DNA抽出後にIllumina MiSeqを使用した16S解析を実施し、各検体中の腸内細菌叢構成の類似性についてUnifrac距離を比較検討した。さらに、FMTの実施前日および2週間後に消化管内視鏡を実施し、十二指腸および結腸の病理組織学的な変化を観察した。

2) ドナー糞便の処理方法についての検討

ドナーには健常な雑種犬4頭を使用し、レシピエントにはドナー犬とは異なる施設で飼育されている健常なビーグル犬6頭を使用した。レシピエント犬は自由飲水をさせ、特定のドライフードをFMT実施2週間前から実験が終了するまでの期間にわたって1日2回ずつ一定量を与えた。なお、これらはいずれも過去4週間以内に一切の投薬治療がされていない個体であった。

実験1)と同様にドナー犬から糞便を採取し、半量は直ちに糞便懸濁液を作成してFMTに供することとした。残りの半量は-80℃で1週間凍結保存し、その後に糞便懸濁液を作成してFMTに供することとした。

レシピエント犬6頭は3頭ずつ2群に分け、新鮮便または凍結便から作成された糞便懸濁液を1回経口投与し、その投与前および投与後7日・14日目に糞便を採取してDNA抽出・16S解析に供することとした。なお、この実験はクロスオーバー形式で実施することとし、初回のFMT・糞便採取から半年経過後にもう一方の糞便液の投与を行うこととした。

4. 研究成果

1) 糞便の投与経路に関する検討

FMT の実施前後に行った血液検査では、臨床的に問題となるような変動は認められなかった。十二指腸および結腸の病理組織検査では FMT の実施前後のいずれにおいても軽度の腸炎が認められたが、病変の程度はいずれも軽度であった。また全ての検体についてリンパ球クローナリティ検査での異常所見は認められなかった。さらに、実験期間中に感染症の発現、嘔吐や下痢などの消化器症状、健康状態に異常は認められなかったため、FMT による有害事象は認められないものと判断した。

腸内細菌叢の多様性を比較するために Chao1 および Shannon index を算出した。Chao1 は FMT 実施前後および各群間に有意差を認めなかったが、Shannon index の変動幅については大腸内注入群と比べて経口投与群の方が有意に大きいことが明らかになった(図 1)。さらに各検体中の細菌叢構成と移植糞便中の細菌叢構成との類似度について Weighted Unifrac distance の変動を比較したところ、経口投与群では移植 1 週間後にかけて Unifrac 距離の減少傾向が認められ、2 週間後には移植前の水準へと戻るのに対し、大腸内注入群では移植 1 週間後に Unifrac 距離が増加傾向を示し、2 週間後に移植前の水準へと回復した(図 2)。

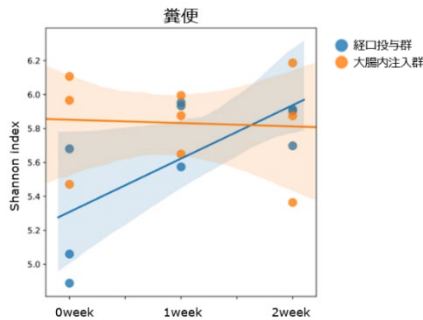


図 1 糞便中細菌叢における Shannon index の変化

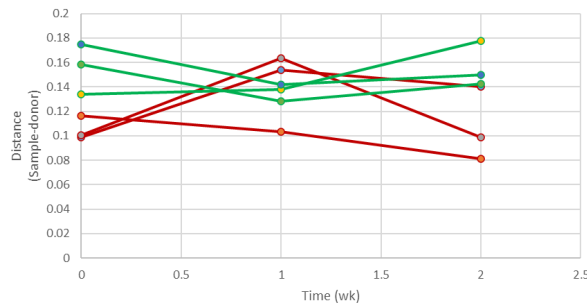


図 2 各検体と移植糞便中における細菌叢構成の Weighted Unifrac distance の変化
緑線が経口投与群、赤線が大腸内注入群のデータを示す

2) ドナー糞便の処理方法についての検討

FMT の実施前後に行った血液検査では、臨床的に問題となるような変動は認められなかった。実験期間中に感染症の発現、嘔吐や下痢などの消化器症状、健康状態に異常は認められなかったため、FMT による有害事象は認められないものと判断した。本実験については、採取された各糞便検体を用いた 16S 解析を実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤 哲之, 五十嵐寛高, 内山 淳平, 新田 卓, 久末 正晴 |
| 2. 発表標題 犬の糞便細菌叢移植における移植経路についての基礎的検討 |
| 3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 海野 朝香, 今西 市朗, 水上 圭二郎, 大隅 尊史, 五十嵐 寛高, 村上 裕信, 島 綾香, 石原 玄基, 宇根 有美, 阪口 雅弘, 内山 淳平 |
| 2. 発表標題 イヌの純血種コロニーを利用したアトピー性皮膚炎に関連した口腔・腸内細菌叢の変動の解析 |
| 3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 五十嵐寛高 |
| 2. 発表標題 イヌの腸内細菌叢とプレジジョンメディスン |
| 3. 学会等名 遺伝研研究会 コンパニオンアニマルのゲノム医療（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 五十嵐寛高 |
| 2. 発表標題 消化器疾患と抗菌薬の使い方 |
| 3. 学会等名 第17回日本獣医内科学アカデミー学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 五十嵐寛高 |
| 2. 発表標題 今熱いマイクロバイオーム 消化器疾患への治療戦略 |
| 3. 学会等名 第17回日本獣医内科学アカデミー学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 竹内翔子, 五十嵐寛高, 吉峰敏記, 福山登, 島田和典, 新田卓, 田村悠, 久末正晴 |
| 2. 発表標題 犬用デンタルガムが犬の口腔内細菌叢に与える影響の評価試験 |
| 3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Igarashi H, Takeuchi S, Yoshimine T, Fukuyama N, Shimada K, Nitta S, Tamura Y, Hisasue M |
| 2. 発表標題 Effect of dental gum administration on the canine oral microbiome. |
| 3. 学会等名 The 6th Asian Meeting of Animal Medicine Specialties (AMAMS 2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 五十嵐寛高 |
| 2. 発表標題 腸内細菌に関わる病気・免疫 ~いま、知っておくべきこと~ |
| 3. 学会等名 第40回動物臨床医学会記念年次大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 五十嵐寛高 |
| 2. 発表標題 今時の食物繊維の効能 最近のトピックスと正しい使い方 |
| 3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|