187　フレイル患者の栄養状態と腸内細菌叢との関連性の解明	土橋　昭

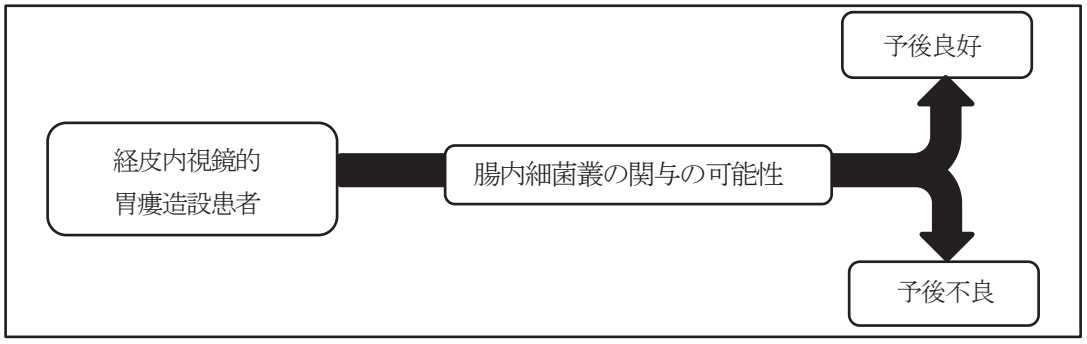
【目的】今後、更なる高齢化社会の到来により、経皮内視鏡的胃瘻造設（Percutaneous Endoscopic Gastrostomy：PEG）を行う患者のニーズが増えることが示唆される。PEG 患者の予後については、血液検査（CRP、Alb）や術前肺炎の有無などとの関連が知られているが、PEG 患者の予後を腸内細菌叢の観点から調べた報告はない。今回、メタ 16srRNA 法を用いて、PEG 前後での細菌叢の変化および造設前の細菌叢と短期予後について明らかにすることを目的に本研究を行った。

【方法】PEG 目的の症例を対象として、それぞれ口腔内・胃液・便のサンプリングを行い、－80℃ディープフリーザーで凍結保存した。解凍後、Lysozyme 酵素で DNA 抽出を行い 16S rRNA V1-V2 領域の PCR を経て、次世代シークエンサーMiSeq を使用してリードを得た。OUT（operational taxonomic unit）作成後、RDP CORE／NCBI Genome DB へアサインし、菌種同定を行った。評価項目は、口腔・胃・腸内の 3 時点（胃瘻造設前・造設 1 日後・造設 7 日後）における、各 taxon の相対的豊富度（Relative abundance）、α多様性（OTU 数、Chao1 index、Shannon's index、ACE index）とし、炎症の程度と栄養に関するバイオマーカーとの相関を解析した。

【結果】対象 6 例（男 1 例、女 5 例、平均年齢 80±8 歳）の背景疾患は、ALS （amyotrophic lateral sclerosis）2 例、脳血管障害 2 例、精神疾患 1 例、乳癌 1 例であった。胃細菌叢の PEG 前後の比較では、造設前から造設翌日にかけて門レベルで Proteobacteria が（P＝0.03）、属レベルで Acinetobacter 属が（P＝0.02）それぞれ増加していた。造設前から 1 週間後にかけての臨床バイオマーカーとの相関解析では、口腔内細菌叢では、Prabacteroides 属、Bacteroides 属、Eikenella 属の PEG 前の Abundance が、PNI 値の改善幅と有意な正の相関を示し、Haemophilus 属、Neisseria 属、Rothia 属、Shannon index と有意な負の相関を示した。胃内細菌叢では、Eikenella 属が白血球数の増加と負の相関を示した。また、Capnocytophaga 属は、アルブミン値の増加と有意な負の相関を示した。Bifidobacterium 属と Leptotrichia 属は、血小板数の上昇と正の相関を示した。Parabacteroides 属、Blautia 属、Erysipelatoclostridium 属は、CRP 値の上昇と正の相関を示した。腸内細菌叢では、Parabacteroides 属が術後のリンパ球数増加と有意な正の相関を示した。

【結論】本研究では、口腔内および胃内細菌叢が PEG 後早期の炎症の発生に関与している可能性が示唆された。今後は、被験者数を増やして今回確認された候補微生物の関与について確度を高めて調査するとともに、被験者をさらに長期間追跡し、長期的な栄養改善とマイクロバイオームとの関連性の解明を試みる。

経皮内視鏡的胃瘻造設後の患者における腸内細菌叢と予後の関連



187. フレイル患者の栄養状態と腸内細菌叢との関連性の解明

土橋　昭

東京慈恵会医科大学 内視鏡医学講座

Key words：フレイル，胃瘻，細菌叢，メタ 16srRNA 解析，転帰

緒　言

経皮内視鏡的胃瘻造設術（Percutaneous Endoscopic Gastrostomy：PEG）は、経口摂取困難な患者に対する栄養投与経路の作成を目的に開発された医療技術である。経口摂取不能状態に陥った高齢者でも経腸的な栄養吸収を行うことを可能とし、時に患者をフレイル状態から回復させることができる。しかしながら実際には、PEG 後に出血・創部感染・肺炎などの偶発症発生や胃瘻栄養開始後も栄養改善不良など、治療効果が得られない高齢者も存在する。この場合、高齢者本人の健康寿命の延長に繋がらないだけでなく、胃瘻を造設したことでより多くの医療資源を要するため、医療経済学的にも損失を被る結果となる。

ヒトは摂取食物の種類・熱量が同一であっても、個体によって栄養吸収の程度が異なり、結果として生じる身体反応（太りやすい・痩せやすい等）に差異が生じることが知られているが、この原因に腸内細菌叢が関与している可能性が指摘されている［1］。今回、我々は低栄養状態を呈しているフレイル患者の偶発症や栄養改善を前もって予測する因子として、腸内細菌叢に注目し、フレイル合併胃瘻造設予定患者に対し、口腔内・胃内・腸内細菌叢の経時的変化（造設前・造設翌日・造設 7 日後の 3 回）の解析を行い、その後の臨床バイオマーカーとの関連性について探索した。

方　法

1. デザイン

多施設共同観察研究（慈恵医科大学附属病院本院・柏病院）。

2. 対象患者

適格基準：経皮内視鏡的胃瘻造設術を受ける患者。

除外基準：消化器癌のために、胃瘻を造設する患者、術前に抗生剤投与が 1 ヶ月間投与されている患者。

3. 研究期間

2020 年 6 月～2021 年 1 月。

4. 検体回収と保存

造設前（胃瘻造設日の手術直前）・造設翌日・造設 7 日目の 3 時点で、口腔擦過・胃液・便の 3 種類のサンプルを採取した。口腔サンプルは、生理食塩水に浸した口腔ケア用滅菌スワブを用いて、口腔内全体を擦過して採取した。胃液は、造設時には内視鏡下で吸引し、造設後にはカテーテルチップを用いて経胃瘻的に吸引し採取した。便は、自己排便または直腸診にて採取した。各サンプルは 50 ml FALCON チューブ採取後ただちに－80℃の Deep freezer にて凍結保存した。なお、術後感染予防目的にサンプル採取後、胃瘻造設直前にセファゾリン 1 g の経静脈投与を行った。

5. 16S rRNA アンプリコンシークエンス

各サンプルが入った FALCON チューブを氷上にて自然解凍した。4℃ 9,000 G 10 min で遠心し、上清を破棄した。口腔内用採取スワブについては、スワブ先端のスポンジ部分を切離し、サリベットに封入、4℃ 9,000xG 10 min で遠心し体液サンプルのみを分離採取した。遠心後ペレットは 2 ml マイクロチューブに封入し、TE10 溶液を用いて 2 ml までメスアップし、4℃ 9,000xG 10min で遠心、上清を破棄した。その後、再度 800 μl まで TE10 溶液でメスアップ

したのち、Lysozyme（37℃、60 min）、Achromopeptidase（37℃、30 min）、Proteinase K（55℃、60 min）の各酵素を反応させ、フェノール・クロロホルム溶液を用いて細菌 DNA を抽出した。次に、バーコード配列を付与したユニバーサルプライマー（27Fmod ＆ 338R および unique 8-bp barcode）を用いて 16S rRNA の V1-V2 領域を 20 サイクルで増幅した。PCR 産物は、次世代シークエンサーMiSeq（Illumina 社）にて多検体同時シークエンス（Reagent Kit v3（600-cycles））を行い、標的領域の塩基配列データを得た。UCLUST プログラムを用いて 96%以上の相同性の基準で各検体 3,000 reads の深度で OTU グルーピングを行った。GLSEARCH プログラムを用いて、RDP CORE／NCBI の両データベースへアサインし菌種を同定した。

6. 評価項目

1）「ベースラインの腸内細菌叢プロファイル（Relative abundance（%）／α-diversity indices [Shannon index／Chao1／number of OTUs／ACE]）」と「ベースラインから造設 7 日目にかけての胃瘻造設・フレイル関連臨床メタデータ（下記）の変化量」との相関（Spearman's correlation coefficient test）（腸内・口腔内・胃液の各 3 部位細菌叢）。

2）胃瘻造設に伴う、口腔内・胃内・腸内の各部位細菌叢の経時的変化（ベースライン vs.術後 1 日目、ベースライン vs.術後 7 日目、術後 1 日目 vs 術後 7 日目）。

フレイル重症度関連臨床メタデータ：PNI スコア・CONUT スコア・GNRI スコア・アルブミン値・プレアルブミン値・レチノール結合蛋白値・亜鉛値・総コレステロール値・CRP 値・フェリチン値・白血球数・総リンパ球数・血小板数。

結　果

1. 患者背景

研究期間内に 6 例が本試験に登録され、合計 38 検体を回収し、メタ 16S rRNA 細菌叢解析を実施した。6 例の背景は、平均年齢 80（±8）歳、性別は男性 1 名（17%）、胃瘻造設翌日の CRP 平均値は 0.49 mg/L（IQR 0.12～1.16）であった。背景疾患は ALS 2 例、脳血管障害 2 例、精神疾患 1 例、乳癌 1 例であった。

2. 胃瘻造設に伴う、口腔内・胃内・腸内の各部位細菌叢の経時的変化（図 1）

胃瘻造設前後（造設時、造設翌日、造設 7 日目）における細菌叢の変化を調べるため、門・属レベルそれぞれにおいて検出されたリード数の差に対し Wilcoxon signed rank test を実施した。まず胃細菌叢の門レベルでの解析では、造設前から造設翌日に Firmicutes 門が減少し（P＝0.02）（図 1a）、Proteobacteria 門が相対的に増加した（P＝0.03）（図 1b）。また、同じ胃細菌叢を属レベルでの解析では造設前から造設翌日にかけて Acinetobacter 属が増加した（P＝0.02）（図 1c）。腸内細菌叢解析では、Hungatella 属が造設前から造設 7 日目にかけて増加し（図 1d）、口腔内細菌叢の属レベル解析では、造設翌日から造設 7 日目にかけて Bifidobacterium 属が増加した（図 1e）。

3.「造設時の腸内細菌叢プロファイル」と「造設時から 7 日目にかけての各臨床バイオマーカーの変化量」との相関（図 2）

造設時の細菌叢プロファイルが、造設前から造設 7 日目にかけての炎症や栄養に関する臨床バイオマーカーに影響しうるかどうかを評価するため、「各腸内細菌叢プロファイル（Relative abundance（%）／α-diversity indices [Shannon index／Chao1／number of OTUs／ACE]）」と「炎症・栄養関連血液検査の変化量」との相関を Spearman's correlation coefficient test を用いて検定した。その結果、まず口腔内細菌叢では、Prabacteroides 属、Bacteroides 属、Eikenella 属の造設時の Abundance が、PNI 値の改善幅と有意な正の相関を示した（図 2a）。Haemophilus 属、Neisseria 属、Rothia 属、Shannon index と有意な負の相関を示した。次に胃内細菌叢では、Eikenella 属が白血球数の増加と負の相関を示した。Capnocytophaga 属は、アルブミン値の増加と有意な負の相関を示した（図 2b）。Parabacteroides 属、Blautia 属、Erysipelatoclostridium 属は、CRP 値の上昇と正の相関を示した。最後に腸内細菌叢では、Parabacteroides 属が術後のリンパ球数増加と有意な正の相関を示した（図 2c）。

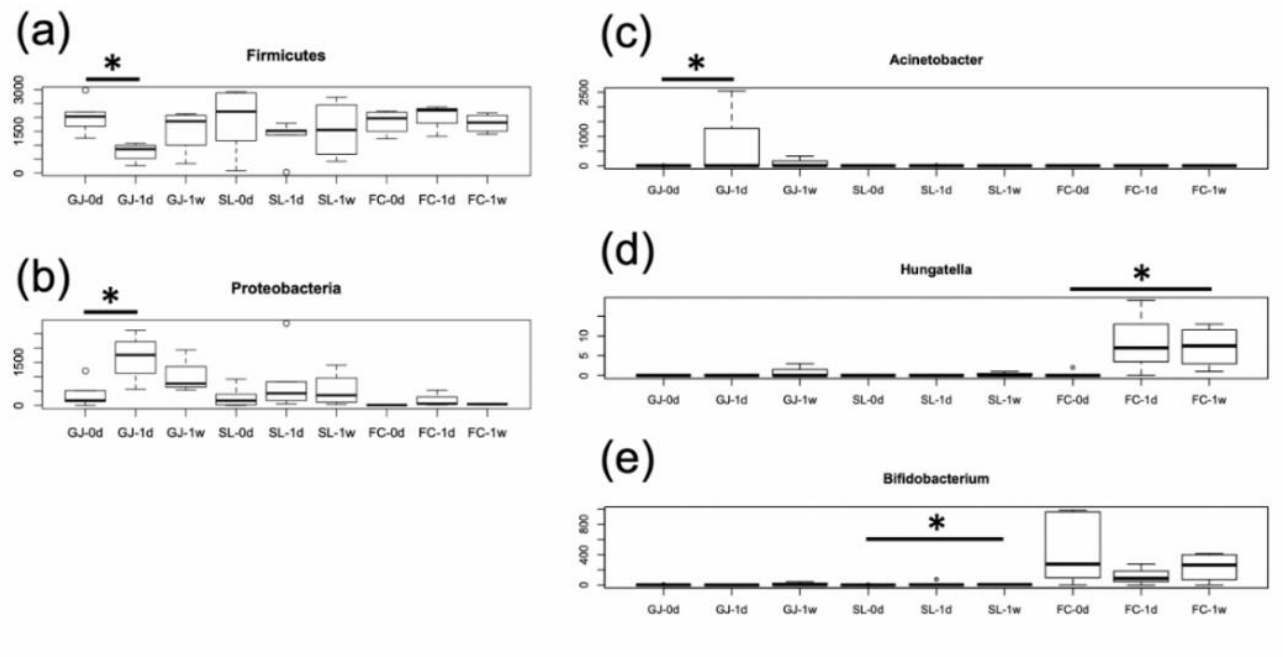


図 1. 胃瘻造設前後における口腔内・胃内・腸内の各部位細菌叢の経時的変化

X軸は採取した時点（0d、1d、1w）と部位（口腔、胃、便）、Y軸はリード数を表す。

GJ：胃細菌叢、SL：口腔内細菌叢、FC：腸内細菌叢、0d：造設時（ベースライン）、1d：造設後翌日、1w：造設後7日目。Firmicutes門（a）、Proteobacteria門（b）、Acinetobacter属（c）、Hungatella属（d）、Bifidobacterium属（e）のRelative abundanceの経時的変化（Wilcoxon signed rank test、* P＜0.05）。

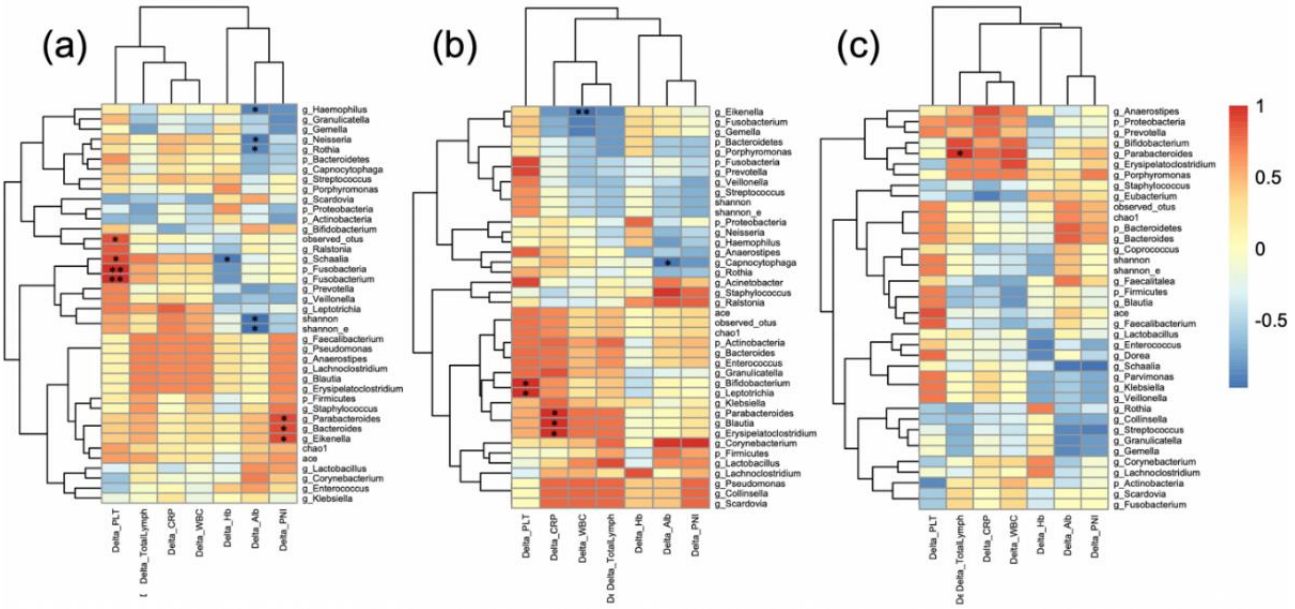


図 2.「造設前の腸内細菌叢プロファイル」と「造設時から造設 7 日目にかけての各臨床バイオマーカー（下記）の変化量」との相関を示した Heat map（Spearman’s correlation coefficient test）（口腔内（a）・胃液（b）・腸内（c）の各 3 部位細菌叢）

X 軸は各バイオマーカーの「造設時」から「造設 7 日目」にかけての変化量を、Y 軸はリード数を表す。X 軸・Y 軸ともにクラスタリングあり。Delta：変化量「7 日目の数値－造設時の数値」、PLT：血小板数、Total_Lymph：総リンパ球数、CRP：C 反応性蛋白、WBC：白血球数、Hb：ヘモグロビン濃度、Alb：アルブミン値、PNI：小野寺 Prognostic Nutritional Index。* P＜0.05、* P＜0.01。

考　察

本研究は、フレイル状態を伴う胃瘻造設患者に対し、メタ 16S rRNA シークエンスを用いて口腔内・胃内・腸内の各細菌叢を造設前・造設翌日・一週間後の各時点において経時的に測定を行った初めての報告である。その結果、造設時点におけるマイクロバイオームと造設 1 週間後にかけての臨床的バイオマーカーの変化量との間に相関関係が認められた。特に、口腔と胃に存在する嫌気性菌の一部が、造設後 1 週間後にかけての炎症反応の上昇と強い相関関係がみられた。このことは、口腔内および胃内細菌叢が、内視鏡的造設手技に際して創部や気道などに移行し、その後の創部感染や誤嚥などの偶発症に関連していることを示している可能性がある。

先行研究では、Sandra らがフレイルの重症度が高い患者の腸内細菌叢では、Lactobacillus 属が著明に減少していることを報告している［2］。本研究では低栄養状態を示す CONUT スコアが高い患者で逆に Lactobacillus 属が多い（$P<0.01$）という結果であった。一方、Matthew Jackson らは、一卵性双生児の腸内細菌叢研究において、フレイル患者ではα多様性指標が低下していることを報告している[3]。本研究では、低栄養患者で Shannon index が低く WBC や CRP が高い傾向があるものの有意性はなく、Chao1 や ACE など他のα多様性との間に相関は観察されなかった。これらの相反する結果は、栄養とフレイル間の評価指標の差異、人種の差異などに起因する可能性が考えられるが、今後症例数を増やし再現性を検証する必要がある。

また、今回の検討にはいくつかの制限事項がある。本研究では、1 ヶ月以内の抗菌薬使用症例を除外している。胃瘻患者は造設前に抗菌薬治療を受けていることが多く、多数の症例が除外された。結果として、今回の解析対象症例が、母集団である一般的な胃瘻造設患者全体を代表していない可能性がある。また、本研究では、胃瘻造設時の皮膚切開前にセファゾリン 1 g の単回投与を全例で実施した。抗菌薬の使用はたとえ単回投与であっても、長期間にわたり腸内細菌に影響を与える可能性が指摘されており［4］、細菌叢変化は抗菌薬によって生じている可能性が否定できず、結果の解釈には注意を要する。最後に、本研究は当初、半年後の栄養学的な指標の改善と、造設時のマイクロバイオームとの間に関連があるかどうかを調査することを主目的とした。しかし、研究期間中に COVID-19 の感染拡大の影響があり胃瘻造設数や臨床試験参加希望者数が減少したため、少数例かつ 1 週間という短期間での評価のみにとどまる結果となった。評価した項目には、アルブミンや PNI などの栄養指標が含まれており、マイクロバイオームとの間にも複数の相関が見られたが、これらの栄養指標は CRP などの炎症の数値と逆相関する傾向にあるため、栄養を評価しているというより寧ろ短期の炎症の程度が影響している可能性がある。

本研究では、口腔内および胃内細菌叢が胃瘻造設後早期の炎症の発生に関与している可能性が示唆された。今後は、被験者数を増やして今回確認された候補微生物の関与について確度を高めて調査するとともに、被験者をさらに長期間追跡し、長期的な栄養改善とマイクロバイオームとの関連性の解明を試みる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者として、多大なるご助言とご支援をいただきました理化学研究所 IMS マイクロバイオーム研究室の須田亙先生、高安玲奈先生に深く感謝申し上げます。同時に本研究は、東京慈恵会医科大学内視鏡医学講座において実施されたものであり、ご協力いただいた教室の皆様に感謝いたします。さらに、本研究に対しご援助いただきました公益財団法人上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文　献

1）　Bouter KE, van Raalte DH, Groen AK, Nieuwdorp M. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. Gastroenterology [Internet]. 2017;152(7):1671–8. PMID:28192102. DOI:10.1053/j.gastro.2016.12.048.

2) Van Tongeren SP, Slaets JPJ, Harmsen HJM, Welling GW. Fecal microbiota composition and frailty. Appl Environ Microbiol. 2005;71(10):6438–42. PMID:16204576. DOI:10.1128/AEM.71.10.6438-6442.2005.
3) Jackson M, Jeffery IB, Beaumont M, Bell JT, Clark AG, Ley RE, et al. Signatures of early frailty in the gut microbiota. Genome Med [Internet]. 2016;8(1):1–11. PMID:26822992. DOI:10.1186/s13073-016-0262-7.
4) Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. ISME J. 2007;1(1):56–66. PMID:18043614. DOI:10.1038/ismej.2007.3.