

201225022.9-5
厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗菌剤治療により寛解する難治性炎症性腸疾患患者の
網羅的細菌叢解析と病因・増悪因子細菌群の解明

平成24年度 研究報告書
及び
平成22～24年度総合研究報告書

平成25年3月

研究代表者

黒田 誠

(国立感染症研究所)

平成22～24年度厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
総合研究報告書

抗菌剤治療により寛解する難治性炎症性腸疾患患者の
網羅的細菌叢解析と病因・増悪因子細菌群の解明

研究代表者 黒田 誠 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター センター長
研究協力者 関塚剛史 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室
研究協力者 大草敏史 東京慈恵会医科大
研究協力者 寺尾修一 加古川東市民病院

研究要旨

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。三種の抗菌剤 (ATM: アモキシシリン/テトラサイクリン/メトロニダゾール) を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解する治療例が報告されている。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と相関するのかわかりません。本研究は、UC 発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後で網羅的かつ定量的に解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行い、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解することを目的とする。

これまでに、UC 患者の腸内細菌叢は、T-RFLP、定量 PCR、16S rDNA のシーケンス等の手法で解析されてきた。しかしながら、上記手法は網羅性もしくは定量性のどちらかに特化しており、密接に関連する菌種の特定に至らず、より網羅的かつ定量的解析が必要となる。細菌叢の新解析手法として、パイロシーケンス法による次世代シーケンサーが用いられているが、コストが高いのが難点である。本研究課題により、Illumina社の次世代シーケンサーを用いて糞便中の minor group ($1 \times 10^3 \sim 4$ cfu/1g) の細菌の検出も可能な、簡便で安価、網羅的かつ定量的解析手法を開発した。

UC 患者2名 (UC266875, UC-267223) の発症時および ATM 治療後の寛解時の排泄便を得て (研究協力者: 寺尾修一先生・加古川東市民病院)、便検体に内在する細菌フローラを16S-rDNA 解読法とメタゲノミクス法にて同定・分類し比較検討した。得られた細菌の解読リードを細菌属レベルで分類したところ、寛解維持に伴い腸内環境を改善する *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* の増加が顕著であり、腸内フローラが健常に近づきつつあると示唆された。一方、患者2名の発症時の様子は異なっており、*Escherichia*, *Ruminococcus*, *Leuconostoc*, *Bacteroides* の検出が顕著であった。

平成23年度はUC患者2名の発症時およびATM治療後の寛解時の排泄便を得て便検体に内在する細菌フローラを16S-rDNA解読法とメタゲノミクス法にて同定・分類し比較検討した。平成24年度はATM治療に代わりAFM (アモキシシリン/フォスホマイシン/メトロニダゾール)治療を受けたUC患者6名の治療前後の腸内フローラ解析を行った。メタゲノム解析とLEfSe法による統計解析にてAFM治療前後で大腸菌が有意に検出され、昨年度のATM治療患者と類似した結果が得られた。大腸菌の中でも具体的な病原性を示す大腸菌系統であるかどうか、ゲノムワイド塩基多型にて系統分類した結果、食中毒で頻繁に検出される大腸菌とは異なり、ある特有の偏った大腸菌系統株が増殖しやすい環

境であることが示唆された。AFM 治療によって健常時のような多様な系統の大腸菌群が検出されていることから、菌叢の多様性が UC 寛解に貢献しているものと推察された。

A. 研究目的

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個々の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。*Fusobacterium varium* が UC の増悪因子である可能性が報告されており、三種の抗菌剤 ATM (アモキシシリン/テトラサイクリン/メトロニダゾール) を二週間投薬するだけで、その疾患が 1 年以上緩解することが明らかとなってきた。また、テトラサイクリンに代えてフォスフォマイシンのほうが副作用が少ないという観点から AFM 治療 (アモキシシリン/フォスフォマイシン/メトロニダゾール) においても治験が行われ、ステロイド離脱が見られることから有効な治療法の一つと考えられている。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が抗菌薬により減少して疾患増悪をおさえているのかは未だ不明である。本研究は、UC 発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後で網羅的且つ定量的に解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行い、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解することを目的とする (図 1)。

B. 研究方法

平成 22 年度に腸内細菌叢の網羅解析法を開発し報告した (図 2・左)。それに加え今年度、供試 DNA を網羅的に配列解読し生物種毎に分類するメタゲノミクス解析法も開発した (図 2・右)。2 つの方法を併用する理由として、細菌のみを解析対象とする 16S-rDNA 解読法に加え、メタゲノミクス解析法を追加することで供試検体の現況を包括的に理解できると考えたからである。

UC 患者 2 名 (UC266875, UC-267223) の発症時および ATM 治療後に寛解維持している時の排泄便を得た (研究協力者: 寺尾修一先生・加古川東市民病院)。糞便懸濁液を溶菌酵素 (lysozyme と achromopeptidase の混合) にて溶菌処理を施し、

QIAGEN DNA stool kit を用いて DNA 精製した。精製 DNA を用いて 16S-rDNA 可変領域 V3 を対象にイリミナライブラリー用の PCR アンプリコンを得た。平行して、NEXTERA sample prep kit を用いてメタゲノム DNA ライブラリーを作製した。それぞれ Illumina GAIIX を用いて平均 1000 万本の配列を解読し、細菌種鑑別に有効な配列対象を検討した。解読リードを相同性検索により細菌種を鑑別した。配列検索に使用したデータベースは、RDP10 (Ribosomal Database project release 10) と NCBI non-redundant nt データベースを用いた。

平成 23 年度に引き続き、AFM 治療を施した UC 患者 6 名の治療前後における自然排泄便を得た (研究協力者: 大草敏史: 東京慈恵会医科大・柏病院)。NEXTERA sample prep kit を用いてメタゲノム DNA ライブラリーを作製した。それぞれ Illumina GAIIX を用いて平均 1000 万本の配列を解読し、細菌種鑑別に有効な配列対象を検討した。解読リードを megablast 相同性検索により細菌種を鑑別した。配列検索に使用したデータベースは NCBI non-redundant nt データベースを用いた。MEGAN ver4.7 を用いて細菌種の分類を行い、該当する細菌の解読リード本数から検出率を算出した。統計的に UC 発症に関連する細菌群を抽出するために、LEfSe 統計処理 (Segata. et al, Genome Biol. 12, R60, 2011) を用いた (図 7)。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出を行った。患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。国立感染症研究所・医学研究倫理委員会にて承認済み。

C. 研究結果

1) ATM 治療 UC 患者 UC-266875

発症、ATM 治療 1 ヶ月後、ATM 治療 7 ヶ月後の便検体に内在する細菌フローラを同定・分類し比較検討した。16S-rDNA の解読リードから、発症時は大腸菌が最も優勢菌種であり 67.6%を占めていた (図 3・上)。解読リード数と主成分分析の結果から、発症時に多く ATM 治療後に減少した細菌属として *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Campylobacter* が候補として挙げられた (図 3・上)。その逆の ATM 治療後に *Blautia*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* が増加しており、健常成人の腸内フローラに類似した細菌プロファイルを示していた。

同じ便検体 DNA をメタゲノミクス解析により検討したところ、粘血便が示すように、発症時の解読リードの 99%がヒト配列であった (図 4・左上)。UC 発症による大腸粘膜の炎症が顕著であることを示していると思われる。ATM 治療後、ヒト配列の検出率が減少するとともに細菌の検出率が増加し、健常者に近い細菌比率に近づいていることが分かった。

得られた細菌の解読リードを細菌属レベルで分類したところ、寛解維持に伴い腸内環境を改善する *Bifidobacterium* の増加が顕著であり、腸内フローラが健常に近づきつつあるように示唆された。一方、ATM 治療により消失する細菌が UC 発症の増悪因子と想定される。患者 2 名の発症時の様子は異なっており、UC-266875 の便の細菌の 95%が大腸菌であり、16S-rDNA 解読と同様の結果を得た (図 4・中央上ラインプロット)。血清型の異なる病原性大腸菌の全ゲノム配列が数多く報告・公開されているため、菌株の固有 SNPs を利用して株系統に分類した (図 4・右)。発症時は腸管外大腸菌 ExPEC の系統に属する UMN026 株と同等の菌株が有意に存在し、ある特定の大腸菌株が腸内で大量に増殖していることが推察された。ATM 治療による寛解に伴い、健常フローラと同様の多様な系統の大腸菌の割合に変動していることが分かった。

図 4 で得られた結果を主成分分析にてプロットした (図 5)。発症時 (ATM 治療前) で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出し、図 4

で上述した同様の結果が得られた。

2) ATM 治療 UC 患者 UC-267223

発症、ATM 治療 1 ヶ月後、ATM 治療 3 ヶ月後の便検体に内在する細菌フローラを同定・分類し比較検討した。16S-rDNA の解読リードから、発症時は *Coprococcus*, *Bacteroides* が最も優勢菌種であった (図 3・下)。解読リード数と主成分分析の結果から、発症時に多く、ATM 治療後に減少した細菌属として *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Campylobacter* が候補として挙げられた (図 3・下)。その逆の ATM 治療後に *Blautia*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* が増加しており、健常成人の腸内フローラに類似した細菌プロファイルを示していた。

同じ便検体 DNA をメタゲノミクス解析により検討したところ、UC-266875 と同様に、粘血便が示す 99%がヒト配列であった (図 4・左下)。UC 発症による大腸粘膜の炎症が顕著であることを示していると思われる。

得られた細菌の解読リードを細菌属レベルで分類したところ、寛解維持に伴い腸内環境を改善する *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* の増加が顕著であり、前述の UC-266875 と同様、腸内フローラが健常に近づきつつあるように示唆された。一方、患者 2 名の発症時の様子は異なっており、UC-267223 の便の細菌の 35%が *Ruminococcus*、20%が *Leuconostoc*, *Bacteroides* であった (図 4・中央下ラインプロット)。

図 4 で得られた結果を主成分分析にてプロットした (図 5)。発症時 (ATM 治療前) で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出し、図 4 で上述した同様の結果が得られた。UC-266875 便は *Bacteroides*, *Leuconostoc* が顕著であり UC-266875 とは異なるが、*Leuconostoc* の菌数の減少が UC-266875 でも認められることから、共通する候補の可能性が示唆された。

3) AFM 治療前後で有意に検出される腸内細菌の同定

AFM 治療を受けた UC 患者 6 名の自然排泄便（-, 発症時; 2w, AFM 治療 2 週後; 1m, AFM 治療 1 ヶ月後）のメタゲノム解析を行った。サンプルあたり、300 万本~3000 万本の解読リードを得た。塩基レベルで相同性解析した結果を細菌属レベルで分類した（図 6）。一見して AFM 治療前の発症時には大腸菌 *Escherichia coli* の検出率が高く、UC 患者 6 名のうち患者 B 以外の 5 名から検出された。AFM 治療により患者 D 以外の 4 名で検出率が大幅に減少し、AFM 治療効果と UC 寛解との関係性が示唆された。

統計的に有意に UC 発症に関連する細菌群を抽出するために、LEfSe 統計処理 (Segata. et al, Genome Biol. 12, R60, 2011) を用いた（図 7）。Non-parametric 検定と Linear discriminant analysis による統計解析法であり、群間で共通して変動する因子を特定する統計手法である。今回、AFM 治療前後の 2 群比較において、症状に起因する腸内細菌群を同定するために使用した。LEfSe 法により、6 名の抗菌薬 AFM 治療の前後で、大腸菌 *Escherichia coli* が有意に検出された（図 8）。

LEfSe 解析結果から大腸菌 *E. coli* のみを抽出して表示した。6 名中 4 名で大腸菌 *E. coli* は治療前において有意な存在量を示し、潰瘍性大腸炎に何らかの要因となっている可能性が示唆された（図 9）。

4) UC 患者から検出された大腸菌のゲノムワイド系統分類

大腸菌にも 0157 を代表とする腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC) や、病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*: EPEC) などに分類され、病原性が異なる大腸菌の系統が複数知られている。そこで、同じ大腸菌の中でも具体的な病原性を示す大腸菌系統であるかどうか、ゲノムワイド塩基多型にて検討し分類を試みた。

株毎にゲノム上に異なる塩基 (SNVs, single nucleotide variations) を有し、個人特定のようによく細かく系統分類することが可能である。そこで、メタゲノム解読により得られた解読リードを各種大腸菌株 (計 21 株, 図 10) のゲノム配列にリードマッピングし、どの系統群に類する大腸菌株が便

中に含まれていたのか検討した。

大腸菌 EHEC および EPEC 食中毒では食中毒に直接関連した大腸菌系統のみ顕著な量として検出された（図 6: EHEC は赤バー、EPEC はピンク・バー）。AFM 治療後や他ケースコントロールと比較して、治療前ではある特有の偏った大腸菌系統株が増殖しやすい環境であることが示唆された。治療によって多様な系統の大腸菌群が検出されていることから健常フローラに近づきつつある、つまり、菌叢の多様性が UC 寛解に貢献しているものと推察された。

D. 考 察

本研究課題で開発した網羅的細菌種鑑別法は、包括的に細菌および生物種の鑑別を定量的に解析する事ができる。従来法では、「氷山の一角」に過ぎない変動を議論せざるを得なかったが、次世代シーケンサーによる deep-sequencing は、より深くまで掘り下げて詳細な解析を可能にしてくれる。

患者 UC-266875 の発症時においては尿路病原性大腸菌と思われる固有の大腸菌株が過剰に増殖しており、ある単一の細菌種に固定されてしまって多様性を失っていることが分かった。健常便では *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* 等、様々な細菌種が混在して健常性を維持しているため、その多様性からは程遠い腸内細菌フローラである。UC 発症時の解析結果は、腸内フローラの多様性が健常性を維持する重要なファクターであることを示唆していた。

H23 年度の成果で、ATM 治療前の急性期便から大量に大腸菌が検出される患者がおり、ATM 治療において健常な腸内細菌フローラに近づきつつあることを示した。H24 年度は 6 名の UC 患者の自然排泄便を検体にして AFM 治療前後の腸内細菌フローラを解析し、昨年度と同様に大腸菌が有意に検出率され、UC 発症になんらかの因果関係を示唆するデータを得た。

大腸粘膜のびらん炎症像が示すように、UC 発症時は通常の大腸菌フローラでは無いだろうと感じていたが、ある固有の大腸菌株が過剰に増殖しており、ある単一の細菌種に固定されてしまって多様性を

失っていることが分かった。想定通り特有の細菌が過剰に増殖した結果、UC の増悪に関連していることが示唆された。

ステロイド治療も無効な抵抗性 UC 患者には ATM および AFM 治療等、代替医療を必要とする。ATM 治療の臨床試験の成績から、全ての UC 患者を ATM 治療で根治させることは難しいと思われる。しかしながら、プラセボ群と比べて明らかに優位にステロイド離脱できている治療法であるため、細菌による増悪は明らかである。具体的に増悪に係る細菌種を特定することが本研究課題の最終目標であり、UC 患者の症状をより明確に説明する検査法開発に貢献し、かつ ATM 治療に代わる適切な抗菌薬処方を提案できるものと考えている。

E. 結 論

コッホの 4 原則に適合する感染症は、その病原体が培養可能であり、且つ感染実験系が確立している為、その理解がし易い。しかしながら、その原則に当てはまらない培養不可能な病原体、および、病原性は低いが数種の要因で疾患を呈するものに関する理解は進んでいない。この様な、新たに提唱可能な新興感染症となりうる病原体の理解は、今後更に重要となる。また、難治性疾患である UC は、上記のような新興感染症の可能性が強く示唆されるため、感染症と難治性疾患との関係をより詳細に理解する為の研究が必要不可欠となる。

本研究課題は近年発症患者数が増加の一途を辿る UC の発症機序を腸内細菌叢側から理解することを目的としている。本年度は 6 名の UC 患者の AFM 治療前後の排泄便から UC 発症に関連する細菌の同定を試みた。UC 発症時は大腸菌などが優勢に検出され、dysbiosis といわれる健常バランスが乱れた腸内細菌フローラになっていることを明らかにした。得られた研究結果は、日本国内のみならず、全世界の本疾の予防、患者の治療、更にはその診断に

重要な知見を提供できると考えている。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1) 論文発表 なし

2) 学会発表

- ① 関塚剛史, 黒田 誠。次世代シーケンサーを用いた 16S rDNA 配列解読による網羅的且つ定量的な腸内細菌叢解析。第 15 回腸内細菌学会 (2011 年 6 月 東京医科歯科大・湯島キャンパス)
- ② Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda. A comprehensive and quantitative 16S ribosomal DNA deep-sequencing analysis for microbiota using next-generation sequencer. IUMS 2011 Bacteriology 2011/9/6 ~ 10. Sapporo, Japan.
- ③ Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda. A Comprehensive And Quantitative 16S rDNA Deep-sequencing Analysis For Microbial Flora Using Next-generation Sequencer. 111th General Meeting American Society for Microbiology. May 21-24, 2011. New Orleans, Louisiana, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 該当なし

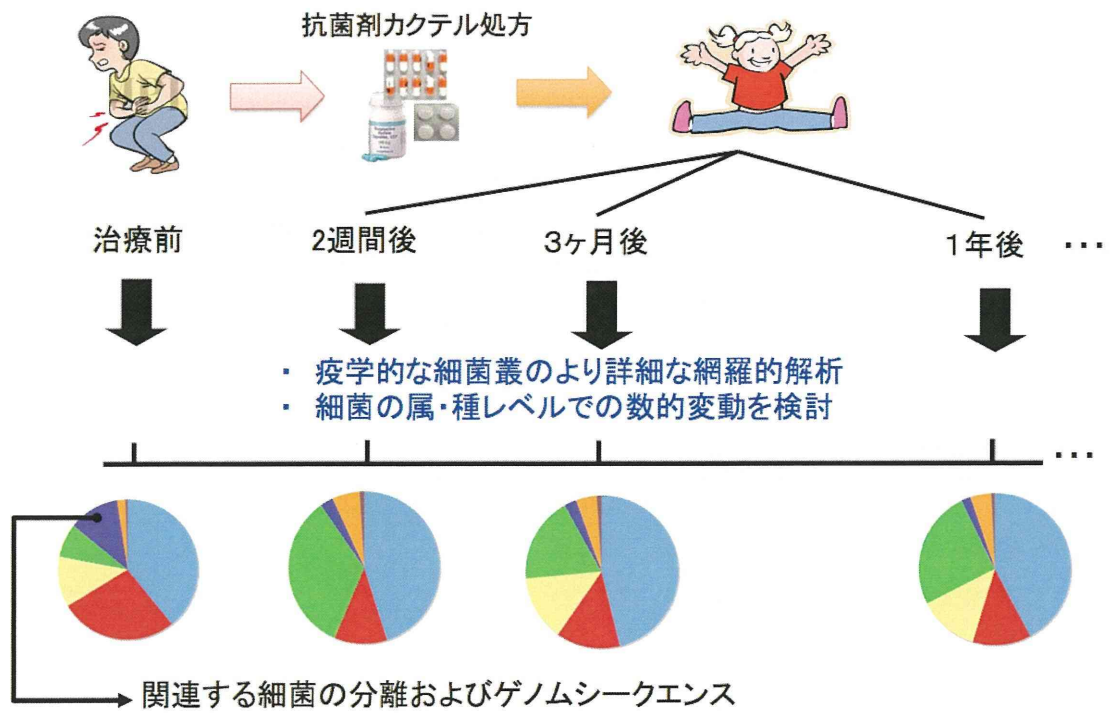
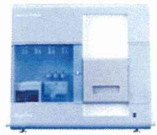
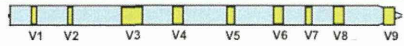


図1 研究計画の流れ図

網羅的配列解読による細菌フローラ解析



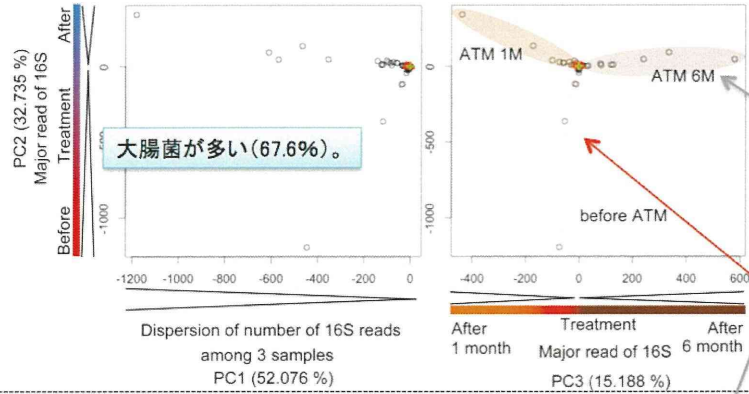
細菌 16S-rDNA 配列による同定分類	メタゲノミクス
 <ul style="list-style-type: none">細菌のみをターゲットにしている。	<ul style="list-style-type: none">供試検体の状況がよくわかる。 (血便の場合、ヒト配列が多数検出)
<ul style="list-style-type: none">登録細菌種が多い。 (7,877菌種。RDP10 database)	<ul style="list-style-type: none">解読済みの細菌種が少ない (2,728菌種。GOLD database)
<ul style="list-style-type: none">Variable領域の特徴で菌鑑別できる。	<ul style="list-style-type: none">種レベルの明確な分類が難しい。
<ul style="list-style-type: none">ウイルス、真菌等、他の病原体を検査できない。	<ul style="list-style-type: none">ウイルス、真菌等、他の病原体の同定も可能。

- 本計画は、抗菌薬3剤カクテル(ATM)により寛解したUC患者を想定しているため、細菌のみをターゲットにしている。
- しかしながら、患者便の全体像を把握するため、メタゲノミクスも行い、包括的な考察を行う。

図2 本研究で用いた細菌フローラ解析の特徴(利点と欠点)

細菌 16S-rDNA 配列による同定分類および主成分分析

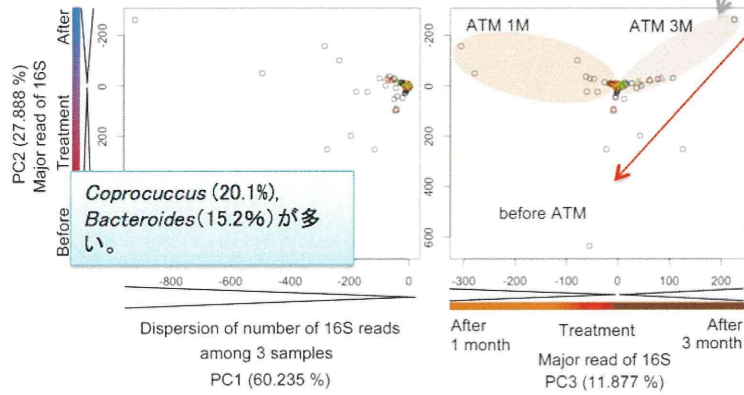
UC-266875



◆ATM治療後、*Blautia*,
*Lactobacillus*が顕著に増加。
◆健全ヒト細菌フローラで多く
存在する*Ruminococcus*,
*Bifidobacterium*が増加

◆*Leuconostoc*, *Lactococcus*,
*Campylobacter*が有意。
◆“*Leuconostocaceae*”の配列
が多く見受けられる

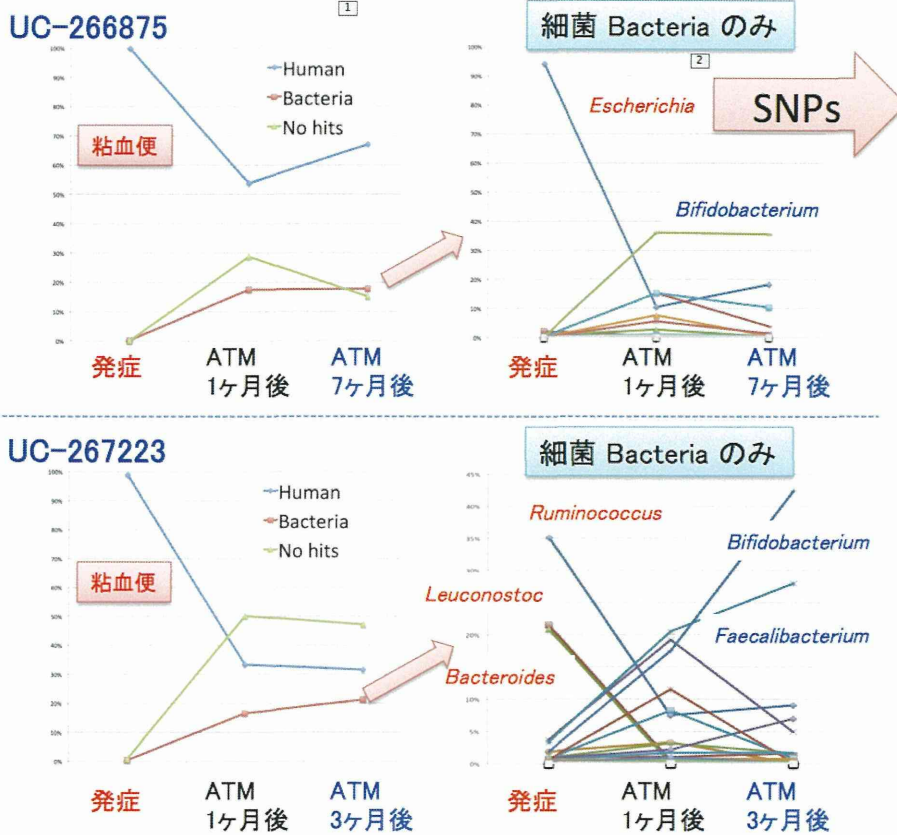
UC-267223



○ Common read among 3 samples △ Common read between 2 samples + Unique read

図3 UC患者(2名: UC-266875 と UC-267223)の患者便(発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療3-7ヶ月後)の細菌フローラを16S-rDNA配列の網羅配列解読で解析した。属レベルで同定分類し、その存在比率を主成分分析にてプロットした。ATM治療前(before ATM)で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出した。

メタゲノクスによる細菌フローラ解析



大腸菌 *Escherichia coli* 発症時に UMN026 と同じ系統の *E. coli* が大多数

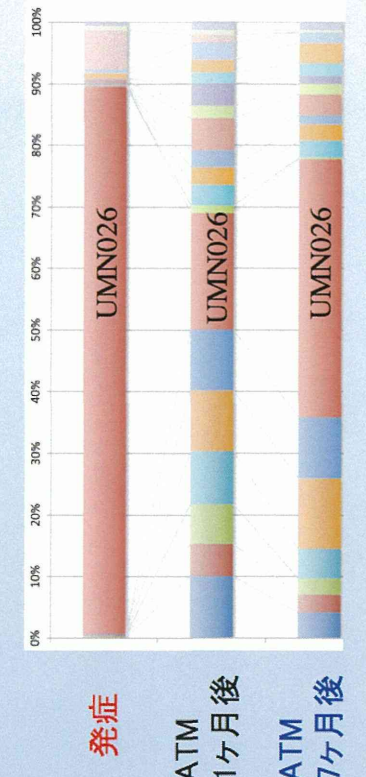


図4 UC患者(2名: UC-266875 と UC-267223)の患者便(発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療3-7ヶ月後)の細菌フローラをメタゲノム解析として網羅配列解読を行った。塩基レベルで相同性解析 (blastn) した結果を属レベルで同定分類した。ATM治療前(before ATM)で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出した。

発症時は粘血便であり、網羅解読の結果が示すように99%近くの解読リードがヒト配列であった。ATM治療により寛解が維持されていることを示唆するように、便中の細菌DNA量(解読リード数)が20%程度まで増加していた(左図ラインプロット)。寛解維持に伴い、腸内環境を改善する *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* の増加が顕著であり、腸内フローラが健常に近づきつつあるように考えられる。ATM治療により消失する細菌がUC発症の増悪因子と想定される。患者2名の発症時の様子は異なっており、UC-266875の便の細菌の95%が大腸菌であり、UC-267223では *Bacteroides*, *Leuconostoc* が顕著であった(中央図ラインプロット)。UC-266875便の大腸菌は、菌株の固有SNPsを利用して具体的な株系統に分類した(右図縦グラフ)。発症時は腸管外大腸菌 ExPEC の系統に属する UMN026 株と同等の菌株が有意に存在し、ある特定の大腸菌株が腸内で大量に増殖していることが推察された。ATM治療による寛解に伴い、健常フローラと同様の多様な系統の大腸菌の割合に変動していることが分かった。一方、UC-266875便は *Bacteroides*, *Leuconostoc* が顕著であり UC-266875 とは異なるが、*Leuconostoc* の菌数の減少が UC-266875 でも認められることから、共通する候補の可能性はある。

メタゲノムによる細菌フローラ解析・主成分分析

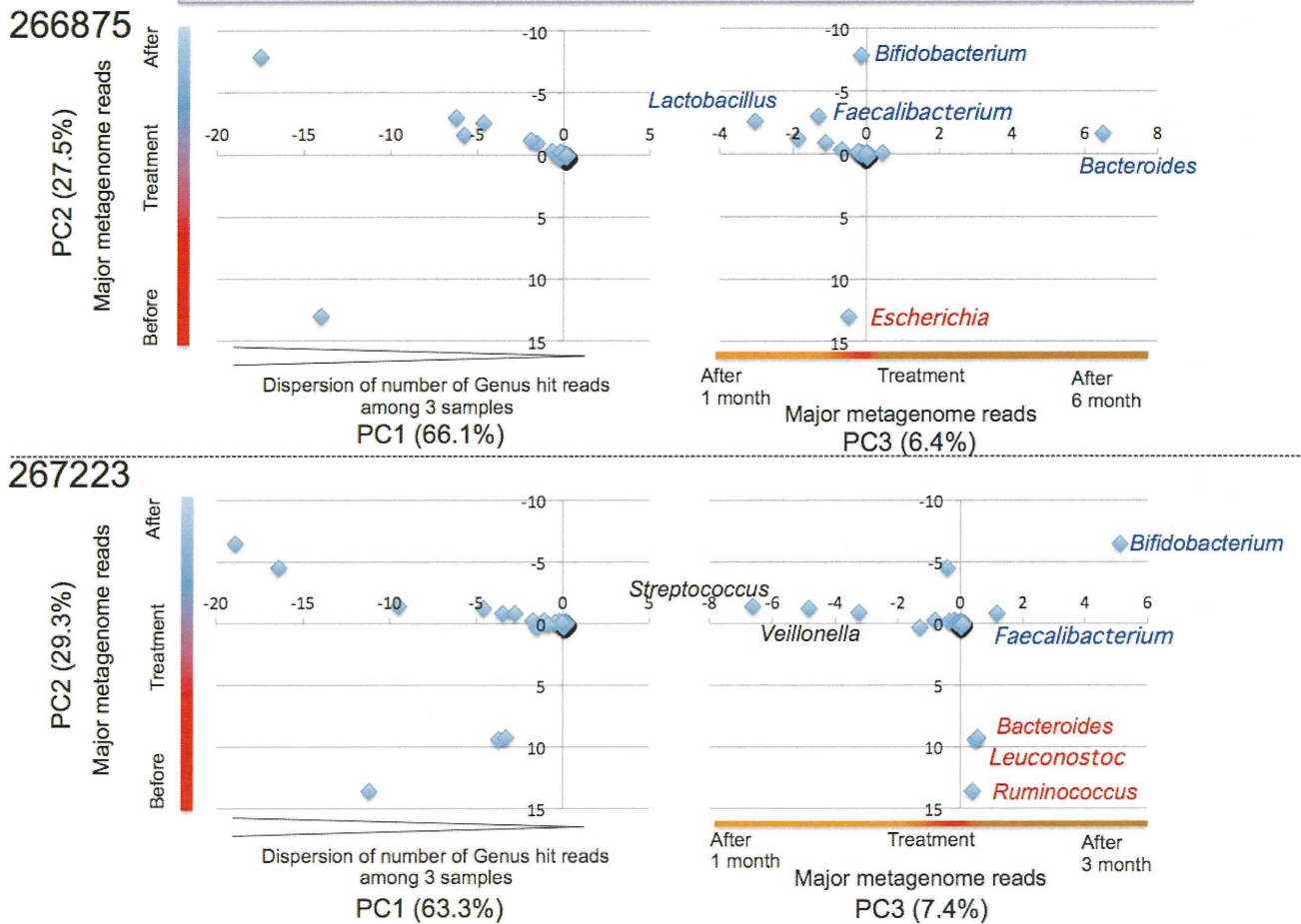


図5 UC患者(2名: UC-266875 と UC-267223)の患者便(発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療3-7ヶ月後)の細菌フローラをメタゲノム解析として網羅配列解読を行った。図4で得られた結果を主成分分析にてプロットした。ATM治療前(before ATM)で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出した。

AFM治療における便フローラの組成分析 (TetracyclineからFosfomycinに治療薬変更)

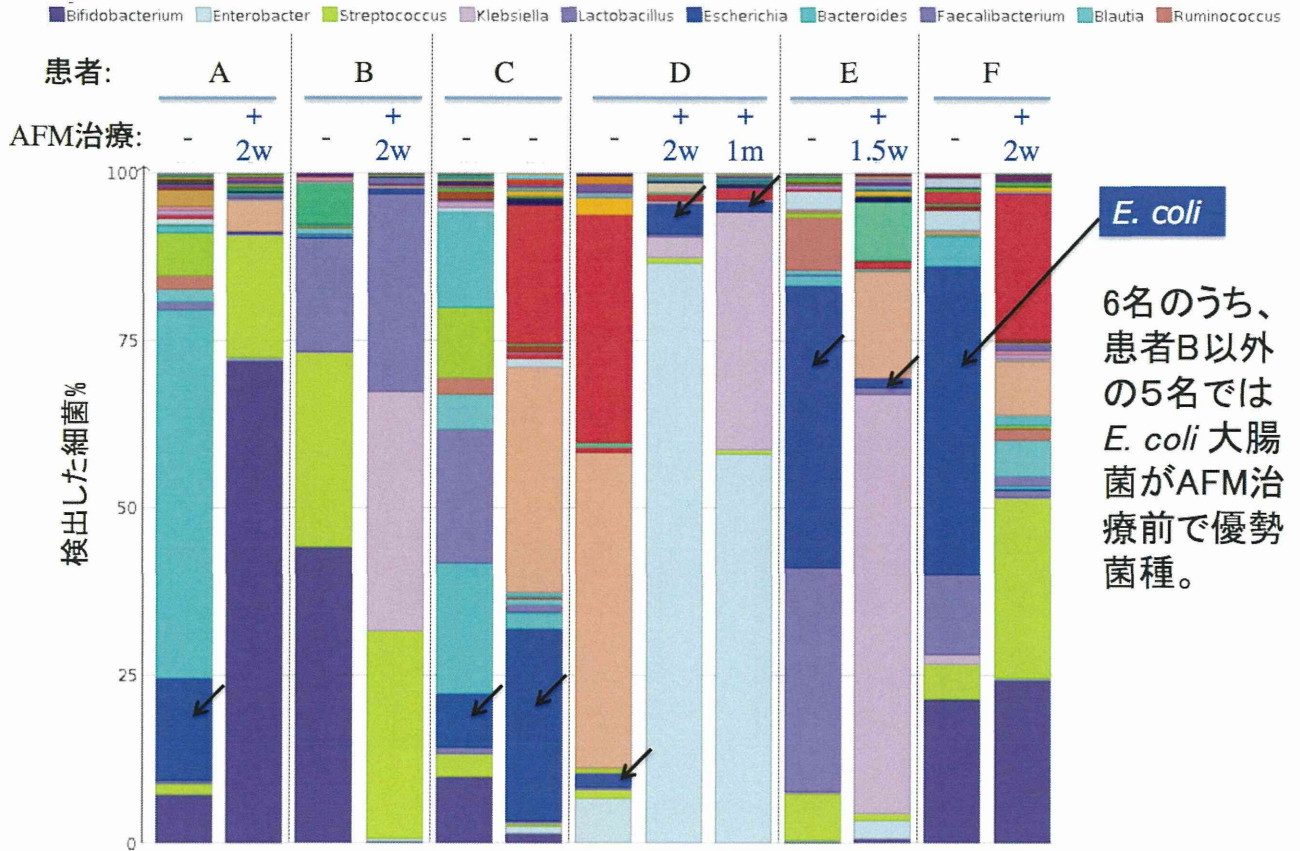


図6 AFM治療を受けたUC患者6名の自然排泄便(-, 発症時; 2w, AFM治療2週後; 1m, AFM治療1ヶ月後)のメタゲノム解析を行った。塩基レベルで相同性解析した結果を細菌属レベルで分類した。一見してAFM治療前の発症時には大腸菌 *Escherichia coli* の検出率が高く(青バー、矢印)、UC患者6名のうち患者B以外の5名から検出された。AFM治療により患者D以外の4名で検出率が大幅に減少し、AFM治療効果とUC寛解との関係性が示唆された。

LEfSe (Segata. et al, Genome Biol. 12, R60, 2011)
Non-parametric検定とLinear discriminant analysisによる統計解析法。

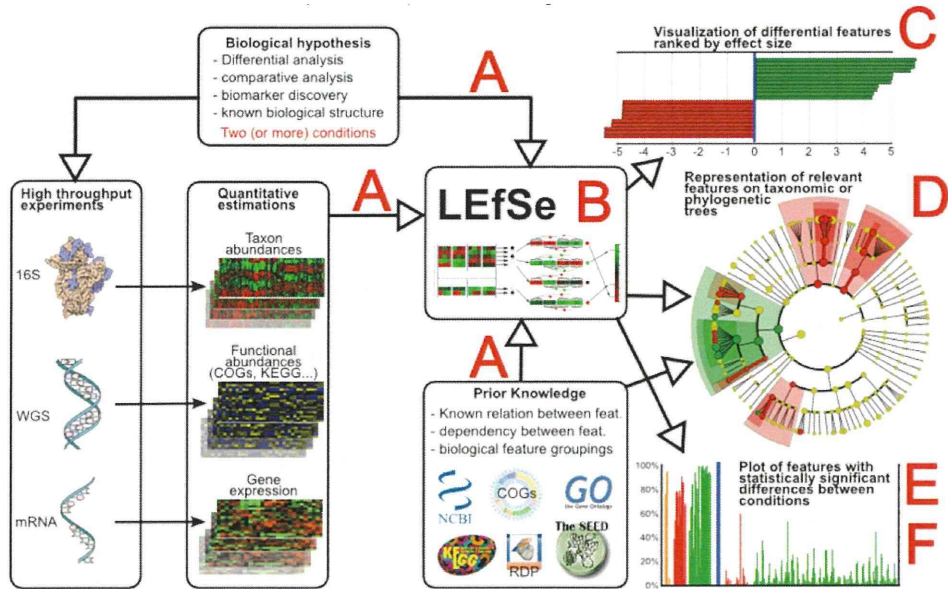


図7 LEfSe法の概要(Segata. et al, Genome Biol. 12, R60, 2011)。Non-parametric 検定と Linear discriminant analysis による統計解析法。AFM 治療前後の2群比較において、症状に起因する腸内細菌群を同定するために使用した。

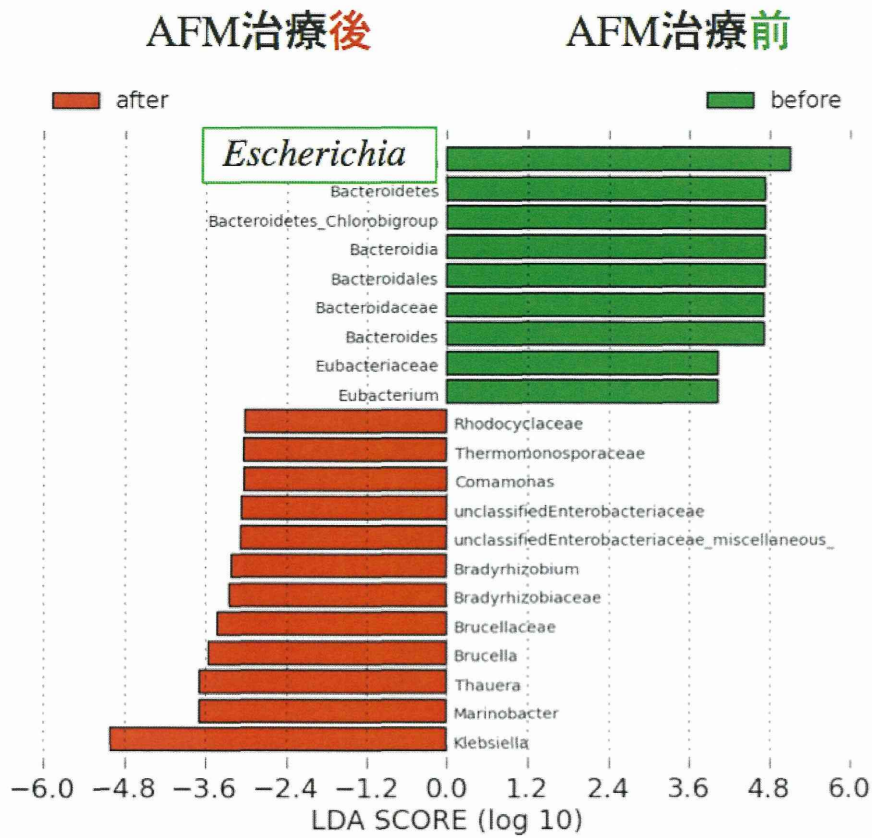


図8 LefSe 法により、6名の抗菌薬 AFM 治療の前後で有意に変動する細菌属を抽出した。治療前において大腸菌 *Escherichia coli* が有意に検出された。

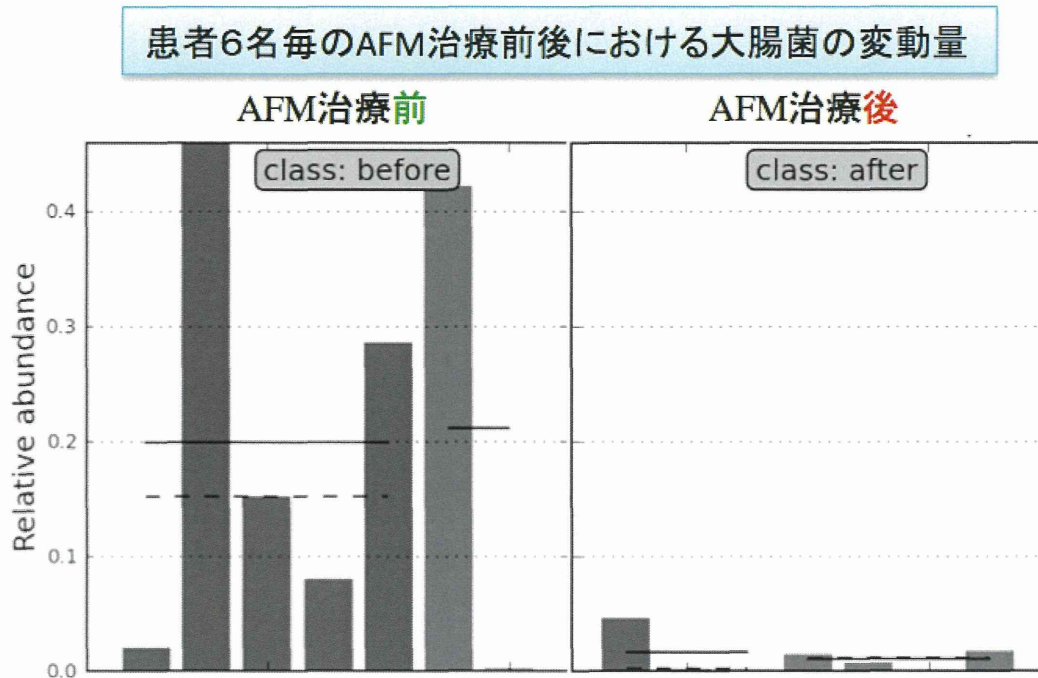


図9 LefSe 解析結果から大腸菌 *E. coli* のみを抽出して表示した。6名中4名で大腸菌 *E. coli* は治療前において有意な存在量を示し、潰瘍性大腸炎に何らかの要因となっている可能性が示唆された。

AFM治療前後で検出された大腸菌のゲノムワイドSNPs系統分類
(コントロールに食中毒等の腸管疾患を含む)

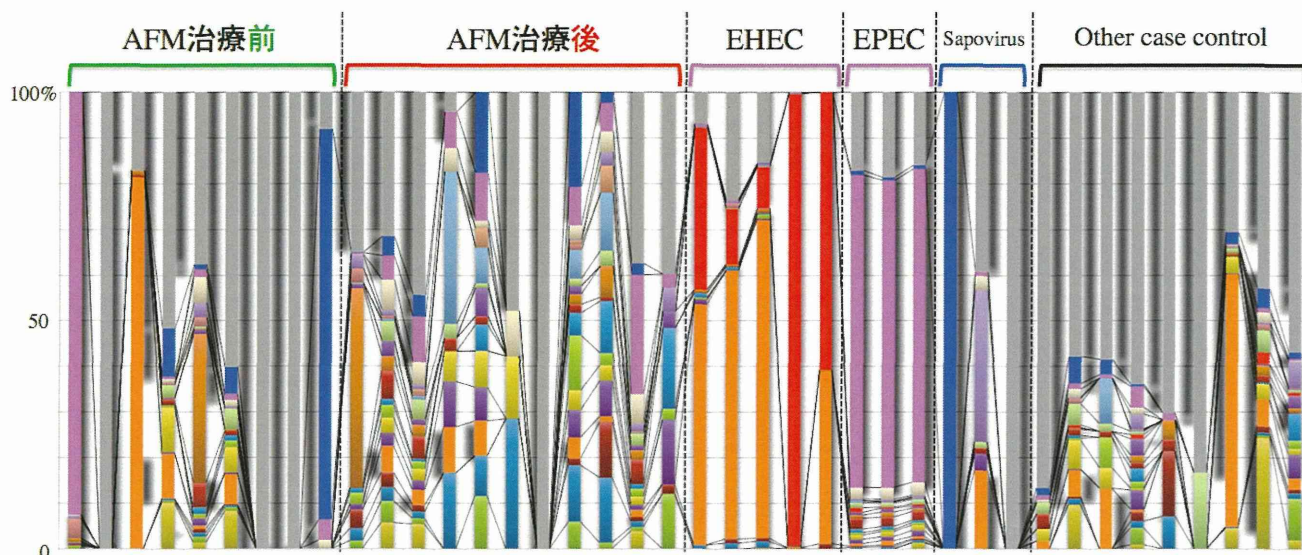


図10 同じ大腸菌の中でも株毎にゲノム上に異なる塩基 (SNVs, single nucleotide variations) を有し、個人特定のように細かく系統分類することが可能である。そこで、メタゲノム解読により得られた解読リードを各種大腸菌株 (計21株, 下表参照) のゲノム配列にリードマッピングし、どの系統群に類する大腸菌株が便中に含まれていたのか検討した。大腸菌 EHEC および EPEC 食中毒では食中毒に直接関連した大腸菌系統のみ顕著な量として検出された (EHEC は赤バー、EPEC はピンク・バー)。AFM 治療後や他ケースコントロールと比較して、治療前ではある特有の偏った大腸菌系統株が増殖しやすい環境であることが示唆された。治療によって多様な系統の大腸菌群が検出されていることから健康フローラに近づきつつある、つまり、菌叢の多様性が UC 寛解に貢献しているものと推察された。

大腸菌・系統群
536
55989
ATCC_8739
BL21_Gold_DE3-b_rel606
CFT073
e24377a
ED1a
HS_8739
IA11
IA139
K12
O103_H2_12009
O111
O127_H6_E2348_69
O157
O26
O55
SE11
sms_3_5
UMN026
UTI89-APEC-S88

本研究計画のまとめ

難病・潰瘍性大腸炎の原因は不明である。
～抗炎症治療による対処療法しかない～

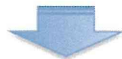


抗菌薬治療で奏功する症例報告がある。(3割程度)
～病因論を感染症として探る～



抗菌薬処方前後の細菌フローラの変動解析(次世代シーケンサー)

- UC発症時において、非常に偏った細菌フローラである。
(単一の系統に集約している。多様性が失われている)
- 抗菌薬治療により、減衰した細菌種を特定できた。
(*Bacteroides*, *Leuconostoc*, *Escherichia coli* 等)



潰瘍性大腸炎患者の根治療法を目指した病因論解明

