

201324147A

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業))

難治性炎症性腸疾患の腸内フローラ・  
メタゲノム解析と抗菌薬療法の  
有効性の評価解析

(H25-難治等(難)一般-031)

平成25年度  
総括・分担研究報告書

平成26年3月

研究代表者

黒田 誠

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業  
（難治性疾患克服研究事業））  
総括・分担研究報告書

研究課題：難治性炎症性腸疾患の腸内フローラ・メタゲノム解析と抗菌薬療法の有効性の評価解析

課題番号：H25-難治等（難）—一般—031

研究代表者：所属機関 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

氏名 黒田 誠

研究分担者：所属機関 東京慈恵会医科大学附属柏病院 消化器・肝臓内科

氏名 大草 敏史

所属機関 日本大学医学部附属板橋病院

氏名 加藤 公敏

所属機関 富山大学医学部第3内科・消化器造血器腫瘍制御内科学

氏名 杉山 敏郎

所属機関 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学

氏名 廣田 良夫

所属機関 杏林大学医学部感染症学

氏名 神谷 茂

所属機関 慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科・腸内細菌学

氏名 福田 真嗣

## 研究要旨：

潰瘍性大腸炎（UC）は、個有の遺伝的背景に“特有の腸内細菌フローラ”が増悪に関与しているとの報告がある。もし感染症であれば抗菌薬による治療が有効だと想定され、実際に、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1年以上緩解する治験成績が報告されている。この成果報告から、抗菌薬治療の前後で変動する細菌フローラ組成を深く理解し、寛解・健常維持に不可欠な細菌フローラのバランスを解明できるものと考えられている。

本研究では、難病の発症・増悪を環境因子（後天的因子）としてヒト微生物フローラに着目し、先天的な遺伝型と複合的に生じうる発症メカニズムの解明を目的とする。将来的には、本研究により特定した病原体ゲノム情報を基盤とした迅速診断法の開発や、最適な抗菌薬選択にも資する基盤構築を目的とした。

本研究課題前に執り行った厚労研究（H22-新興-若手-019、代表：黒田誠）の成果において、ATM治療前の急性期便から大量に大腸菌が検出され、ATM治療後において健常な腸内細菌フローラに近づきつつ有ることを示した。今年度の計画において引き続き追加解析した結果（計25名）からも、治療前および治療後数週間は腸内細菌科、特に大腸菌群の検出頻度が高いことが示された。大腸菌による腸管症状は腸管出血性大腸菌（EHEC）食中毒による粘血便が代表とされる。UC急性期便はEHEC粘血便と類似しており、EHEC下痢便の腸内フローラ解析においてもEHECの存在量よりも*Bacteroides*属の検出比率が高いことが明らかとなった。また、メタゲノム解析で得られた大腸菌ゲノムワイドSNPs解析では、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多様性を失っていることが示唆された。寛解時の健常便では*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、UC患者はその多様性をなくした腸内細菌フローラであると示唆された。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、今後の追加検体のメタゲノム解析によってUC患者の症状をより明確に説明する検査法を開発し、ATM治療に代わる適切な抗菌薬処方提案ができるものと考えている。

## A. 研究目的

特定疾患の病因追求のため、数多くのヒト・リスク因子や疾患特異的バイオマーカーの探索研究が国内外で精力的に行われている。人種ごとに発症率が異なる病態であっても、同じ国・地域に居住することで発症率が同等になるとの疫学調査もあり、環境因子による発症・増悪の可能性は否定できない。多発性硬化症（multiple sclerosis, MS）、サルコイドーシス、難治性炎症

性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease, IBD）などでは環境因子の関与、特に感染症を契機とした免疫異常が病態の主因である可能性が示唆されている。

昨今の技術革新により、ヒトゲノム解析からヒト微生物フローラ解析の網羅的な研究成果が随所に見受けられる。中でも健常な微生物フローラの破綻（dysbiosis）が難病の発症・増悪に起因している可能性がトピックスとしてとりあげられている。潰

瘍性大腸炎 (UC) は、個有の遺伝的背景に“特有の腸内細菌フローラ”が増悪に関与しているとの報告がある。もし感染症であれば抗菌薬による治療が有効だと想定され、実際に、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1年以上緩解する治験成績が報告されている。この成果報告から、抗菌薬治療の前後で変動する細菌フローラ組成を深く理解し、寛解・健常維持に不可欠な細菌フローラのバランスを解明できるものと考えられている。

本研究では、難病の発症・増悪を環境因子 (後天的因子) としてヒト微生物フローラに着目し、先天的な遺伝型と複合的に生じうる発症メカニズムの解明を目的とする。将来的には、本研究により特定した病原体ゲノム情報を基盤とした迅速診断法の開発や、最適な抗菌薬選択にも資する基盤となる。

## B. 研究方法

UCは、遺伝的背景と腸内細菌フローラが密接に関連して発症する事が示唆されている (Asano *et al.*, 2009, *Nature Genetics*; Frank *et al.*, *PNAS*, 2007)。7万人以上のゲノムワイド多型解析 (GWAS) の結果から、腸内フローラへの免疫応答に異常を伴う疾患であることが明白になってきた (Jostins, *et al.*, 2012, *Nature*)。この成果に付随して、発症増悪に関与する細菌種を同定できれば病因論の1側面を説明できると考えた。三剤の抗菌薬投与で1年以上緩解する症例の存在が確認されており (Ohukusa *et al.*, *Gastroenterology*, 2005)、膨大な腸内細菌フローラから特定の細菌を同定できれば、UCの病因に近づけるものと考えている。

H22-24年度において厚労省研究課題「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 (H22-新興-若手-019、代表: 黒田誠)」で8名のUC患者便・腸内フローラ解析を行った。H24年度終了時点では、治療前において特有の系統群である大腸菌が優勢に検出されることを見出した。

本研究課題では更に患者人数を追加して、抗菌剤治療前と2週間、3ヶ月および1年後で腸内細菌フローラの比較解析を行い、抗菌薬治療により減少 (消失) する菌種および生理・代謝産物を特定し、UC発症に深く関与する因子を探索する。

### 1) 次世代シーケンサーによるUC患者腸内細菌層の網羅的定量解析

\* UC患者の腸内細菌叢の解析は、全て下記の条件で行う事とする。

研究分担者 (大草敏史、杉山敏郎、加藤公敏、神谷茂) の協力を得て、インフォームドコンセントを受けたUC患者の抗菌剤治療前後の糞便検体より腸内細菌叢のDNAを

抽出する。患者臨床情報から研究に適した分類とスタディーであるかどうか個別に検証を行う (分担: 廣田良夫)。

次世代シーケンサーで1サンプルあたり約1,000万リード以上解読し、細菌の属・種の検出分類と存在比率を定量的に解析する。検出細菌の存在数をRのheatmap群平均法にて分類し、系統樹を作成した。

UC患者の抗菌剤治療前および寛解三ヶ月後の糞便中細菌フローラの網羅解析 (代表: 黒田誠)。緩解一年後の同患者および二年後の同患者の細菌叢の網羅解析 (一、二年後検体については、別途計画を申請して採扱後に執り行う)。100名の患者便 (治療前後の2検体) と、100名の対照群 (抗菌薬無しのアミノサリチル酸製剤による治療群) の便の配列解読を行う予定。

### 2) UCに密接に関与すると予測される新規細菌の分離および全ゲノムシーケンズ決定

UC患者の抗菌剤治療前後の細菌叢動態解析の結果から、治療前後でその割合が優位に低下もしくは消失した細菌の分離を抗菌剤治療前の患者検体から試みる。更に、分離菌株の同定と全ゲノムシーケンズを行い、同種のゲノム情報が公開されている場合は、比較ゲノム解析を行う。候補となりうる細菌を最低8菌種までに絞り、ゲノムシーケンズを行う (代表: 黒田誠、分担: 大草敏史、神谷茂)。

#### (倫理面への配慮)

- ・ 基幹病院や大学病院などにおけるUC患者を対象に検体を採取する場合は、大学の倫理委員会にて本研究の承認を受けたのちに、インフォームドコンセントが得られた患者のみの検体解析を行う。連結可能匿名化ができる連続した番号を本研究の提供者個々のIDとし、研究者間の臨床データなどのやりとりはすべてこのIDを運用して行う。
- ・ 本研究ではヒト臨床検体を取り扱うため、あらかじめ国立感染症研究所および関連病院へヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会に申請し、承認を得ている (感染研 No. 479)。国立感染症研究所において使用する検体は連結不可能匿名化とする。
- ・ 細菌を取り扱う実験は、感染症研究所で定められたバイオセーフティーの規則に則って行う。
- ・ 常時データの蓄積、動向調査の解析、その結果に基づく対策への科学的助言体制を推進する。

## C. 研究結果

### 1) 抗菌薬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25名の自然排便便 (図1) のメタゲノム解析を行った

(一部、未解読で進行中の検体も含む)。得られた検体の治療法、性別、弁済守備、治療前後の経過、便の肉眼的所見について表にまとめた。サンプルあたり、メタゲノム解読として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ATM/AFM抗菌薬治療前 (before)、後 (after) において検出された細菌科 (family) ごとに検出数を算出し、さらに検出割合を指標にした群平均法にて分類・系統樹作成した。腸内細菌科Enterobacteriaceaeが多く検出された検体群、治療前の検体が多く集合した群、治療後の検体が多く集合した群に分けられた (図2)。治療前が主に集合するクラスター群を見ると一様ではなかったが、Bacteroidaceae, Leuconostocaceae, Ruminococcaceae 科の3つのそれぞれが優勢なクラスターに分けられることが示唆された。これら検出細菌科は、治療後に減少している傾向が見られた。さらに“腸内細菌科Enterobacteriaceaeが多く検出された検体群”の検体情報を見ると、治療の有無に関係ないように見られるが、治療後2週間以内の検体も含まれており、これまでの成果で候補として挙げられた腸内細菌科・大腸菌群が治療により完全に減少していない治療途上の可能性が挙げられた。

そこで、同じデータを元に、科Familyレベルから更に詳細な属Genusレベルにまで分解能を上げて分類を試みた (図3)。治療前ではやはり *Bacteroides*属が多く検出され、次に大腸菌 *Escherichia*属が優勢になっていく様子が見られた。次に治療後で多く検出されるクラスターでは、*Streptococcus*属、*Lactobacillus*属が顕著に優勢であり、寛解時におけるヨーグルト等のプロバイオティクスの影響が多分に見られる結果となった。治療前であっても患者がプロバイオティクスを処方され (もしくは好んでヨーグルト製品の摂取)、その影響による可能性が示唆された。(代表：黒田誠、分担：大草敏史)

## 2) 以下、各分担者の個別成果と研究方針

潰瘍性大腸炎患者に対してATM治療を行い、治療効果のあった9例の治療前後の腸上皮細胞付着腸内フローラの変動をT-RFLP法により予備的に検討した。その結果、

1) 潰瘍性大腸炎の増悪時は腸内フローラの多様性が著しく減少している。2) ATM治療後には、その多様性が回復、ほぼ健康人のパターンに類似する。治療後、最も顕著に回復、増加していた腸内細菌をT-RFLP法で解析すると、培養可能細菌では *Ruminococcus obeum*であり、その他、培養不能の2種の細菌が同定され、その1種は *Ruminococcus*属であった。以上の結果はATM治療有効例では治療後に腸内フローラが多様性を回復、正常化している可能性を示唆する。今後、次世代シーケンサによる腸内フローラの網羅的解析により、さらに詳細な検討

が必要である。(研究分担者：杉山敏郎)

難治性潰瘍性大腸炎の発症に影響する因子を解析するため、腸内フローラ解析の方法について検証した。腸内フローラの解析法として選択培地を組み合わせた培養法や菌属菌群特異的プライマーを用いた定量的リアルタイムPCR法による解析を行った。これらの解析では定量性や少数菌の検出感度が優れていたものの、すべて既知の細菌をターゲットとして行われた。従って、次世代シーケンサによる腸内フローラの網羅的解析と比べて、未知の細菌や培養不能細菌についての情報が不足する可能性が指摘された。(研究分担者：神谷茂)

インフォームドコンセントを得た中等症、重症の活動期潰瘍性大腸炎に対する2週間の抗菌剤多剤療法を行い、その臨床的有効性があることを、症状の (、内視鏡所見) の改善より確認し、抗菌剤治療前後の糞便検体と血清検体を解析のため、(二名分) 提供した。(研究分担者：加藤公俊)

現在、当研究班で収集している便検体について、臨床情報、メタゲノム、メタボローム、に関するデータを、多変量解析手法により統合的に解析し、潰瘍性大腸炎 (UC) の発症に対する独立した要因を明らかにする。(研究分担者：廣田良夫)

難治性潰瘍性大腸炎患者の早期診断や新規治療法の確立を目的とし、患者の血清中に含まれる低分子化合物について網羅的に解析するメタボローム解析手法の構築を行った。患者血清中の水溶性代謝産物をクロロホルム・メタノール・水の混合液により抽出し、スピнкаラムを用いた除タンパク後に遠心濃縮し、得られた試料について、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOF/MS) を用いてメタボローム解析を実施した。今後は、これまでに得られている健康者の血清中代謝産物プロファイルと詳細な比較解析を実施し、難治性潰瘍性大腸炎患者の早期診断や新規治療法に有効な血清バイオマーカー探索を実施する。(研究分担者：福田真嗣)

## D. 考察

本研究課題前に執り行った厚労研究 (H22-新興-若手-019、代表：黒田誠) の成果において、ATM治療前の急性期便から大量に大腸菌が検出され、ATM治療後において健康な腸内細菌フローラに近づきつつ有ることを示した。今年度の計画において引き続き追加解析した結果 (計25名) から、治療前および治療後数週間は腸内細菌科、特に大腸菌群の検出頻度が高いことが示された。

大腸菌による腸管症状は腸管出血性大腸菌 (EHEC) 食中毒による粘血便が代表とされる。UC急性期便はEHEC粘血便と類似しており、EHEC下痢便の腸内フローラ解析においてもEHECの存在量よりも *Bacteroides*属の検出比率が高い。これは粘血便による共

通する特徴なのであろうか、腸管上皮の炎症に伴う出血で*Bacteroides*属の増殖を優勢に促進した結果のようにも見受けられる。つまり、優勢に検出された*Bacteroides*属はUC発症の候補ではなく、UC発症で生じた副次的な産物かもしれない。

また、急性期は激しい下痢症状であるため、直腸はじめ下部消化管で生じている具体的な“悪者”は流れ去り、上部消化管の腸内フローラが必然的に自然排泄便となって排出され、それらを解析しているに過ぎない可能性も有りうる。しかしながら、メタゲノム解析で得られた大腸菌ゲノムワイドSNPs解析では、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多様性を失っていることが示唆された。寛解時の健常便では*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、UC患者はその多様性をなくした腸内細菌フローラであると考えられる。

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。難治性疾患であるUCは、遺伝的背景と腸内細菌フローラが密接に関連して発症する事が示唆されている(Asano *et al.*, 2009, *Nature Genetics*; Frank *et al.*, *PNAS*, 2007)。7万人以上のゲノムワイド多型解析(GWAS)の結果から、腸内フローラへの免疫応答に異常を伴う疾患であることが明白になってきた(Jostins, *et al.*, 2012, *Nature*)。UCは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。本計画で25名のUC患者の抗菌薬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

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。) 7 研究発表

なし

### 1) 達成度について

研究課題採択後に急ぎ追加病院施設の倫理申請を行い、臨床、腸内フローラ解析、メタボローム解析における研究体制が整った。病院施設あたりUC患者は年間数十名程度であるため、臨床検体の確保が不十分にならざるを得ないが、本計画目的を貫徹できるよう努力を続けていく。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

UCと腸内フローラの関連を解析する国際プロジェクトが進んでいる(UCHMP)。難治性腸疾患には特有のEnterotypeの関与が示唆されているが、根本的な細菌種の同定にまで至っていない(Arumugam *et al.*, 2011, *Nature*)。本申請計画は抗菌薬による治療前後のフローラ変動比較であり、より明解な細菌種の同定につながり、UCの診断・予防・治療に資するターゲットを提案できるものと考えている

### 3) 今後の展望について

交付決定(H25年9月)から現在まで約半年の短期間であったため、抗菌治療前の検体を計25症例しか遂行できていない。治療1、2年後の腸内フローラの変動を詳細に理解すべく、長期フォローアップを継続的に遂行していく予定である。以下、具体的な展望を記載する。

#### 平成26年度以降の将来的な計画展望

##### ・メタボローム解析によるUC患者特有の生理・代謝産物の特定

UC患者の抗菌剤治療前および寛解三ヶ月後の患者血清・便のメタボローム解析(分担:福田真嗣)を行い、患者特有の生理・代謝産物を特定する。

##### ・緩解一年後の同患者および二年後の同患者の細菌叢の網羅解析

平成25年度で収集した腸内フローラのメタゲノム情報を更に重厚にするため、同一患者の1,2年後の排泄便のメタゲノム解析を行う。この時点で緩解維持もしくはUC再燃等の群分類も行い、最低2年間の診療情報と照合しながら腸内フロー

ラの変動とUC発症の相関解析を行う（代表：黒田誠、分担：大草敏史）。

・迅速診断法に資する特異的遺伝子の同定

計画1，2にて得られた配列情報からUC発症に特徴的な病原体および塩基配列を抽出し、その特異配列を基準にした遺伝子迅速診断法を開発する。TaqMan法等の定量的PCR検査法を用いて患者便もしくは血清から有意に検出されるかどうか健康者便との比較解析で検証する（代表：黒田誠、分担：大草敏史、杉山敏郎）。

・病原体特異抗原による抗体診断キットの開発

計画1，2にて得られた配列情報から有意に検出された細菌種の特異表層抗原を選別し、無細胞タンパク質合成法にて抗原を調整する。特異抗原を用いたELISA検査系を作成し、UC患者血清の治療前後

における抗体価変動を解析する。また、調整した抗原を用い、マウス体外免疫法（RAntIS法）にて短期間でモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する。得られたモノクローナル抗体によるイムノクロマト検出キットを作成する。メタボローム解析で有意に検出された代謝産物がバイオマーカー診断薬に応用できるかどうか検討する。

4) 研究内容の効率性について

本研究課題の前課題（H22-新興-若手-019、代表：黒田誠）が既に遂行済みであり、採択後半年の経過でも十分な研究体制作りができた。今後、これまでよりも検体解析数を増やし、本目的を貫徹できると考える

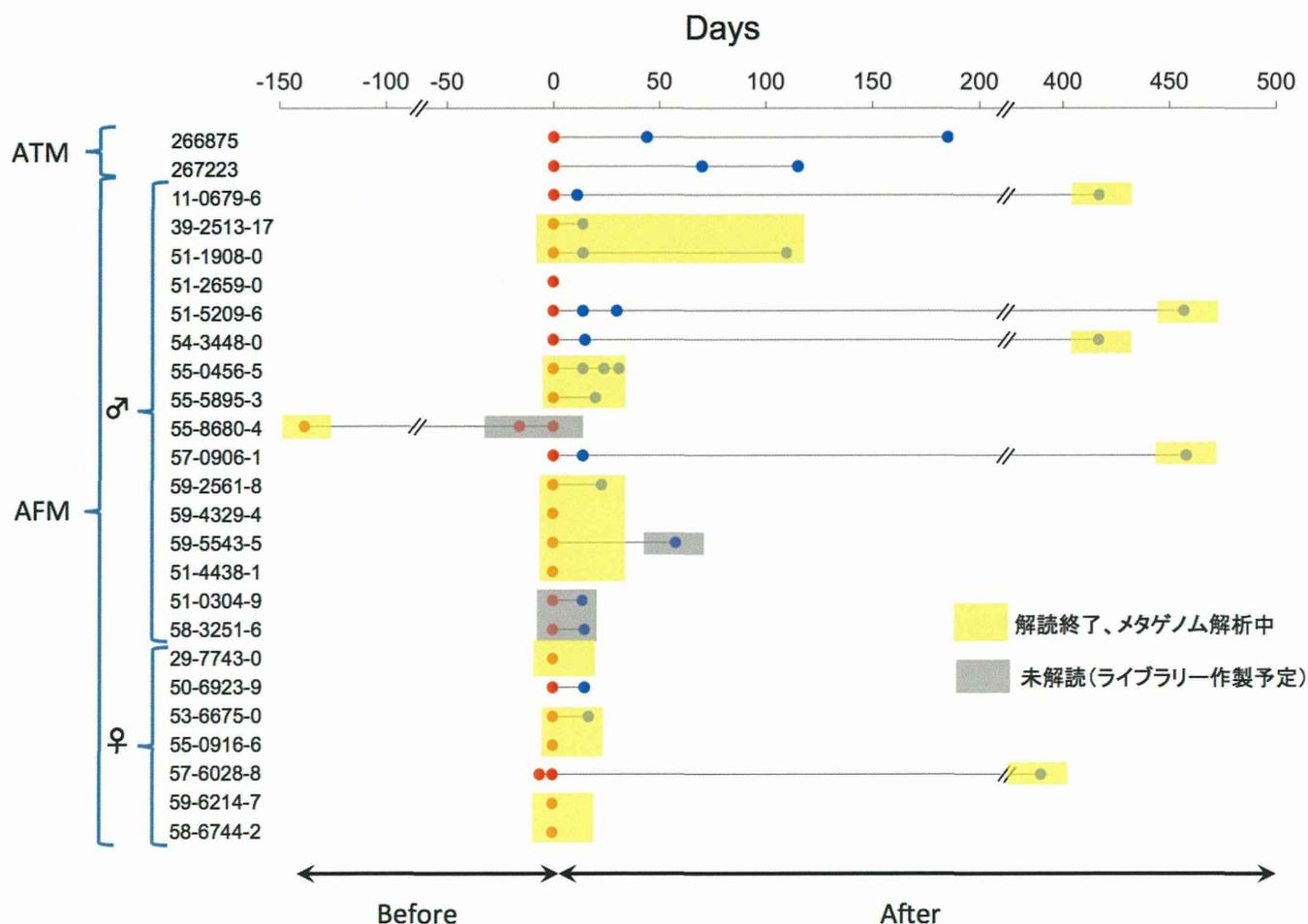


図1 腸内フローラ解析を行ったUC患者の検体採取と配列解読・情報解析状況。ATM, Amoxicillin, Tetracycline, Metronidazole 3剤併用; AFM, Amoxicillin, Fosfomycin, Metronidazole 3剤併用. Day 0 はATM/AFM抗菌治療を開始する前の糞便検体採取日(●)であり、治療後の経過をフォローした便検体採取日(●)を示した。H22-24年度の計画(H22-新興-若手-019、代表:黒田誠)では8名分の前後しか解析出来ていなかったが、本計画にて新たに17名(計25名)の検体採取を行い、将来的なフォローアップと腸内フローラ解析の試料とした。

| 患者 ID      | 治療抗生薬 | 性別 | 便採取日     | 抗生薬治療前後           | 便状態 (肉眼所見)   |
|------------|-------|----|----------|-------------------|--|
| 266875     | ATM   | ?  | 08/12/9  | before ATM        | 粘血便  |
|            |       |    | 09/1/22  | after ATM         | 通常便  |
|            |       |    | 09/6/12  | after 6M ATM      | 通常便、少し粘性有り   |
| 267223     | ATM   | ?  | 08/10/28 | before ATM        | 色は綺麗なピンク色。血便とも言いがたい... 緩めではあるが、前回の様な血まみれのサラサラな状態ではない。軽い出血のある下痢に近い? 溶菌しても、食物残渣の様な不要物が沈んでくる。 |
|            |       |    | 09/1/6   | after ATM 1M      | 通常便、少しドス黒い。固めで、色が強めの普通なウンチって感じ。際立って、食物残渣の様な不要物は認められず。                                      |
|            |       |    | 09/2/20  | after ATM 3M      | 通常便。黄土色で、固さも普通(ちょっと柔らかめの軟便?)。溶菌しても、食物残渣の様な不要物が沈んでくる。                                       |
| 11-0679-6  | AFM   | ♂  | 12/5/21  | before AFM?       | 黒～緑色の便   |
|            |       |    | 12/6/1   | after AFM 1.5week | 普通(黄色)   |
|            |       |    | 13/7/12  | after AFM 1.2M    | 黄土色～茶色   |
| 29-7743-0  | AFM   | ♀  | 12/6/29  | before AFM        | 水下痢? 黄色～黄土色  |
| 39-2513-17 | AFM   | ♂  | 12/7/13  | before AFM        | 水下痢? 黄色～黄土色  |
|            |       |    | 12/7/27  | after AFM         | 普通 黄色～黄土色  |
| 50-6923-9  | AFM   | ♀  | 12/4/4   | before AFM        | 黒めの血便(組織少)   |
|            |       |    | 12/4/19  | after AFM 2week   | 普通(焦げ茶色)   |
| 51-1908-0  | AFM   | ♂  | 13/5/22  | before AFM        | 黄色～黄土色、やや黒い  |
|            |       |    | 13/6/5   | after AFM         | 普通 黄色～黄土色  |
|            |       |    | 13/9/9   | after AFM 3M      | 焦げ茶 普通   |
| 51-2659-0  | AFM   | ♂  | 12/5/19  | ?                 | 普通(黄土色)  |
| 51-5209-6  | AFM   | ♂  | 12/4/18  | before AFM        | 粘血便(組織入り)  |
|            |       |    | 12/5/2   | after AFM 2week   | 普通(黄土色)  |
|            |       |    | 12/5/18  | after AFM 1M      | 普通(黄土色)  |
|            |       |    | 13/7/19  | after AFM 1.2M    | 普通 茶色～焦げ茶色   |
| 53-6675-0  | AFM   | ♀  | 13/7/22  | before AFM        | 黄色～黄土色 下痢? ドロドロして、粘性高い   |
|            |       |    | 13/8/8   | after AFM         | 焦げ茶 普通   |
| 54-3448-0  | AFM   | ♂  | 12/5/18  | before AFM        | 血便(ほぼ血、組織混入少)  |
|            |       |    | 12/6/2   | after AFM 2week   | 普通(黄土色)  |
|            |       |    | 13/7/9   | after AFM 1.3M    | 普通 焦げ茶色  |
| 55-0456-5  | AFM   | ♂  | 13/6/10  | before AFM        | 粘血便? ドス黒い ネバネバ   |
|            |       |    | 13/6/24  | after AFM         | 普通 黄色～黄土色  |
|            |       |    | 13/7/4   | after AFM         | 焦げ茶で、少し緑がかった 凄くゆるい   |
|            |       |    | 13/7/11  | after AFM         | 焦げ茶で、少し緑がかった 凄くゆるい   |
| 55-0916-6  | AFM   | ♀  | 13/6/26  | before AFM        | 下痢? 茶色～焦げ茶色  |
| 55-5895-3  | AFM   | ♂  | 13/8/20  | before AFM        | 血便 ほぼ血液 サラサラ   |
|            |       |    | 13/9/9   | after AFM         | 血便 ほぼ血 ネバネバで組織若干入り   |
| 55-8680-4  | AFM   | ♂  | 13/6/21  | before AFM        | 血便 ほぼ血 組織若干入り  |
| 57-0906-1  | AFM   | ♂  | 12/4/3   | before AFM        | 粘血便(組織入り)  |
|            |       |    | 12/4/17  | after AFM 2week   | 普通(茶色)   |
|            |       |    | 13/7/5   | after AFM 1.5M    | 普通 茶色～焦げ茶色   |
| 57-6028-8  | AFM   | ♀  | 12/5/28  | before AFM???     | 血便と普通便(黄土色)の混在   |
|            |       |    | 12/6/3   | before AFM        | 粘血便(組織入り)  |
|            |       |    | 13/6/28  | after AFM 1.2M    | 茶色～焦げ茶色 すこし緩い  |
| 59-2561-8  | AFM   | ♂  | 13/7/4   | before AFM        | 下痢? 茶色～焦げ茶色  |
|            |       |    | 13/7/27  | after AFM         | 普通 黄色～黄土色 少し黄色も混じる   |
| 59-4329-4  | AFM   | ♂  | 13/7/30  | before AFM        | 黄色と茶色の混ざり バサバサしたかんじ  |
| 59-5543-5  | AFM   | ♂  | 13/7/31  | before AFM        | 緑、黄色、少し赤が混じる ドロドロして組織混じっている?   |
| 59-6214-7  | AFM   | ♀  | 13/8/13  | before AFM        | 焦げ茶、茶色、黒が混じる 普通っぽい感じはする  |
| 51-4438-1  | AFM   | ♂  | 12/11/17 | before AFM        | 焦げ茶 普通 固さは緩め   |
| 58-6744-2  | AFM   | ♀  | 13/6/5   | before AFM        | 焦げ茶 普通 固さは緩め   |

A: Amoxicillin, T: Tetracycline, M: Metronidazole, F: Fosfomicin

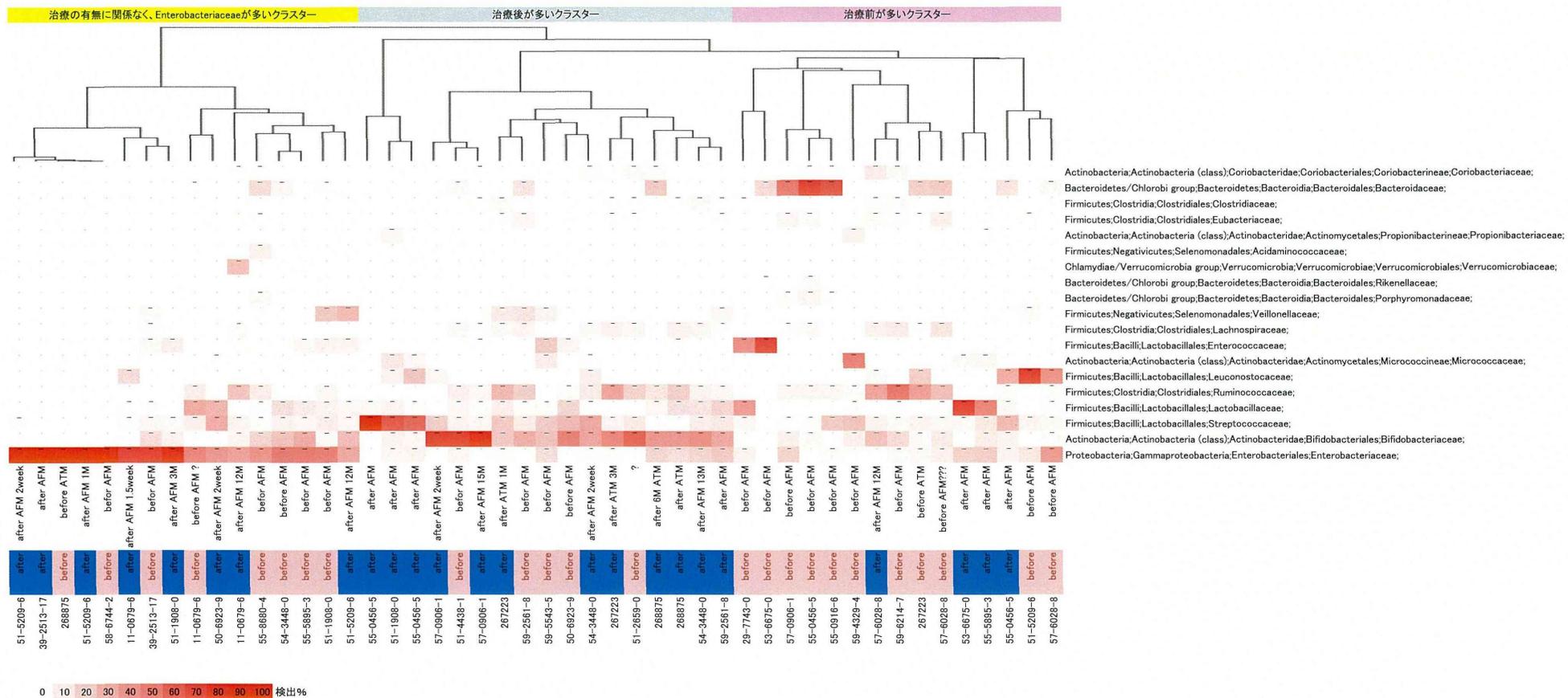


図2 現在までに解読・解析できているUC患者のATM/AFM治療前後における腸内フローラ解析(生物系統科Familyにて分類)のヒートマップ図。  
 抗生薬治療前(before)、後(after)において検出された細菌科ごとに検出数を算出した。さらに検出割合を指標にした系統関係に分類し、腸内細菌科Enterobacteriaceaeが多く検出された検体群、治療前の検体が多く集合した群、治療後の検体が多く集合した群に分けられた。

Escherichiaが多いクラスター 治療後でまとまる Bifidoが非常に治療後でまとまる 比較的、治療前で多いクラスター? Bifidobacteriumが多いクラスター。治療前後関係無し?  
 発症前のものおおいかも?

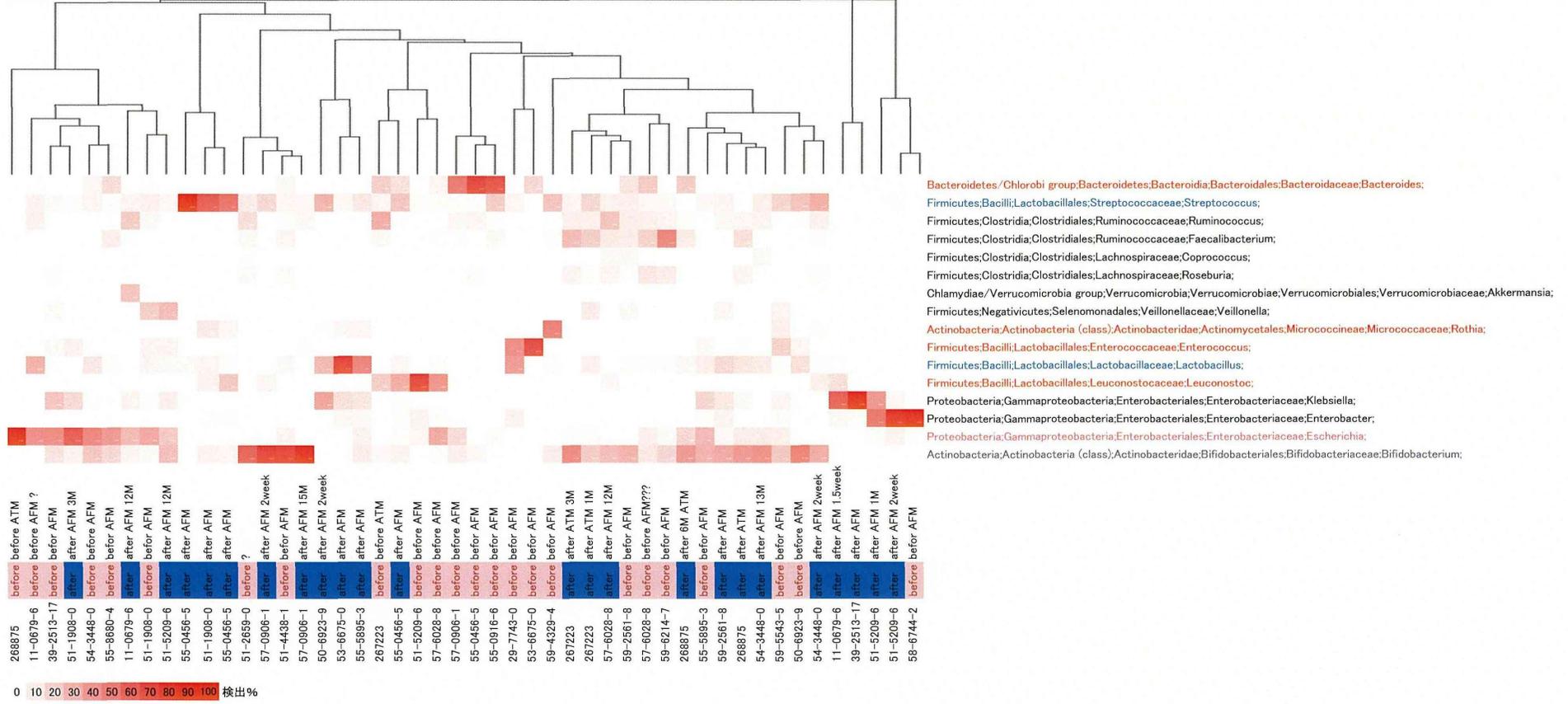


図3 現在までに解読・解析できているUC患者のATM/AFM治療前後における腸内フローラ解析(生物系統 属Genusにて分類)のヒートマップ図。抗生薬治療前(before)、後(after)において検出された細菌属ごとに検出数を算出した。さらに検出割合を指標にした系統関係に分類した。

