

学 術

子牛の下痢症治療を目的とした 腸内細菌叢移植の有効性

野地 智法

東北大学大学院農学研究科

緒 言

腸内細菌叢に関する近年の研究の進展は著しく、これまで同定が困難であった腸内に存在する嫌気性菌の存在も、次世代シーケンサーを用いたDNA分析技術の進展により同定できる時代となった。その結果、腸内に発達する微生物叢の全貌が明らかにされ、健康や疾病への腸内の微生物叢が与える影響について、多くの知見が得られてきた。我々は、難治化した下痢症を発症する子牛（レシピエント）に対し、健常な子牛（ドナー）より採取した糞便を移植することで、下痢症状を劇的に緩和できることを示してきた。加えて、ドナーおよびレシピエントの糞便を用いた微生物叢解析（メタゲノム解析）および代謝物解析（メタボローム解析）を実施することで、腸内細菌叢移植が子牛の下痢症に対し有効である理由を科学的に示すことに成功してきた。本総説では、子牛の腸内細菌叢移植の有効性とそれを裏付ける科学的エビデンスを紹介することで、子牛の下痢症治療を目的とした腸内細菌叢移植を日本全土で広く普及させるためのきっかけとしたい。

先行するヒトを対象とした腸内細菌叢移植

病原性のクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) が引き起こすヒトの腸炎は、ヒトの大腸で引き起こされる感染症であり、その症状として、軽度な場合では下痢症が、重篤化した場合には大腸に致死的な炎症が引き起こされる。発症

の要因は、長期間の抗生物質投与等による正常な腸内細菌叢の攪乱とされており、それにより、*C. difficile*が大腸で異常増殖することが問題となる。クロストリジウム・ディフィシル腸炎の治療法として、症状が重篤でない場合には、経口補水や発症の要因とされた抗生物質投与を中止することが一般的である。加えて、*C. difficile*除去を目的とした特定の抗生物質（バンコマイシンやメタロニダゾール）投与も重篤度に応じて行われる。しかしながら、治療に成功した場合でも、患者の15-20%がクロストリジウム・ディフィシル腸炎を再燃するとされており、それにより多くの患者が死亡している。このような背景の中、健康者（ドナー）由来の糞便を疾患患者に移植する腸内細菌叢移植は、腸内微生物環境の攪乱を伴う様々な疾患に対する有望な治療法として注目されており^{1,2)}、特に、この再燃性のクロストリジウム・ディフィシル腸炎に対し腸内細菌叢移植を実施することで、優れた臨床成績が期待できることが報告されている^{3,4)}。

下痢症を発症する子牛を対象とした 腸内細菌叢移植

子牛の下痢症は、高い罹患率と死亡率により、日本のみならず世界の畜産業に甚大な経済損失をもたらしている⁵⁾。感染性の下痢症の発生要因は様々であり、ウイルス（例：ロタウイルス、コロナウイルス）、細菌（例：腸管毒素原性大腸菌、サルモネラ、クロストリジウム）、原虫（例：クリプトスポリジ

ウム、コクシジウム),あるいは,それらの複合感染などが知られている^{6,7)}.一部の微生物(例:クロストリジウム)は,臨床的に健常な子牛の糞便からも時に検出されることから,それらの存在が必ずしも下痢症の発生に関与していないことには注意が必要である.子牛の下痢症治療を目的とした薬剤選択の際には,臨床獣医師による慎重かつ適切な判断が必要であり,不適切な抗菌剤使用がもたらす薬剤耐性菌の出現リスクを十分理解する必要がある^{8,9)}.我々は,既存の獣医療に従い,様々な下痢症治療(例:整腸効果を期待した生菌剤や抗菌薬投与)を施した結果として,完治に至らず難治化した子牛の下痢症に対し,腸内細菌叢移植を試験的に実施することで良好な成果を得てきたので,その成果を次に紹介する(図1).

千葉県農業共済組合(以下,NOSAI千葉)と東北大学は5年以上に渡り腸内細菌叢移植の有用性評価に関わる共同研究を実施しており,本稿では2019年に実施した試験成果を紹介する.具体的には,千葉県内で飼育されている難治性下痢症発症牛(レシピエント)に対し,健全育成子牛(ドナー)の糞便を用いた腸内細菌叢移植を計20回実施した.腸内細菌叢移植の手法については,次項で詳細に述べる.

NOSAI千葉では腸内細菌叢移植とその臨床評価,東北大学は16S rRNA遺伝子を標的としたメタゲノム解析(糞便微生物叢解析)と,CE-TOFMSを用いたメタボローム解析(糞便代謝物解析)を担当することで,臨床と基礎の双方の観点から腸内細菌叢移植の有効性を分析した.子牛に対する腸内細菌叢移植は,潤滑剤を塗ったブタの子宮洗浄用のカテーテルを用い,それを第二腰椎部位まで挿入した後,約100gのドナー由来の糞便を溶解した糞汁200mlを注入することで実施した.その結果,20回の試験のうちの14回(70%)で下痢症状が大幅に改善され,難治性下痢症に対する腸内細菌叢移植の優れた有効性が臨床的に実証された(図2)¹⁰⁾.腸内細菌叢移植が成功した有効群(70%)と,失敗した無効群(30%)を比較したメタゲノム解析から,腸内細菌叢移植が成功する際には,いくつかの要件が必要であることが示された.具体的には,1)ドナーと糞便移植前のレシピエントの腸内細菌叢は大きく異なっている必要があること,2)レシピエントの腸内細菌叢は,移植後,ドナーの腸内細菌叢に類似していくことが重要であること,3)腸内細菌叢移植の成否はレシピエントの状態のみならず,ドナーにも依存する(臨床判断のみで健全育成子牛をドナー



図1 子牛の下痢症治療を目的とした腸内細菌叢移植

	糞便移植 直前	糞便移植 翌日	糞便移植 1週間後
症例 1	水様	正常	正常
症例 2	水様	水様	泥状
症例 3	泥状	泥状	泥状
症例 4	泥状	泥状	出荷
症例 5	泥状	泥状	泥状
症例 6	水様	正常	泥状
症例 7	水様	泥状	正常
症例 8	水様	正常	正常
症例 9	水様	泥状	泥状
症例 10	水様	泥状	正常
症例 11	水様	泥状	正常
症例 12	水様	正常	正常
症例 13	水様	正常	正常
症例 14	水様	正常	正常
症例 15	水様	泥状	正常
症例 16	泥状	正常	正常
症例 17	泥状	泥状	正常
症例 18	泥状	泥状	泥状
症例 19	水様	正常	正常
症例 20	水様	水様	死亡

図2 腸内細菌叢移植後の下痢症状の変化

として選抜できない) 場合があることが示された (図3)。さらには、腸内細菌叢移植後にドナーからレシピエントへ移行する適合性を示す微生物属として、*Selenomonas*属が同定された。また、メタゲノム (糞便微生物叢) 及びメタボローム (糞便代謝物) 解析といった、二つの異なる解析から得られる結果の関係性を検証するためのプロクラステス解析により、腸内細菌叢移植の有効群では、2つの解析結果に強い正の相関が認められた。このことは、腸内細菌叢移植が成功する際のレシピエントの腸内の微生物環境変化は、関連性を持って、代謝環境にも影響を与えていることが示された。具体的には、代謝環境も微生物環境と同様に、有効群ではドナーとレシピエントで大きく異なっており、また、移植後のレシピエントの代謝環境はドナーの代謝環境に類似するように変化していた。さらには、ドナーおよび腸内細菌叢移植前のレシピエントの糞便に含まれる特定の代謝物 (例: glycerol 3-phosphate, dihydroxyacetone phosphate and isoamylamine) の濃度が低値であることが、腸内細菌叢移植の有効性を期待する上で重要であることが明らかにされた。加えて、それらの代謝物は、腸内細菌叢移植の成否に深く関わる分子と

しての特徴に加え、腸内細菌叢移植の成否を予測するバイオマーカーになり得る可能性も示された。それ以上に、千葉県内で飼育されている計158頭の健康牛および下痢症発症牛より糞便をさらに採材し、機械学習による腸内細菌叢移植の最適ドナーを選択するための基準の確立を試みたところ、*Sporobacter*属がドナー糞便に存在することが、腸内細菌叢移植を成功に導くために重要であることが示された。以上の通り、子牛の難治性下痢症を治療することを目的とした本研究を通して、腸内細菌叢移植の有効性に関する科学的根拠が数多く得られ、また、腸内細菌叢移植を獣医療として技術開発する上で必要とされる要素も多数見出された。

子牛に対する腸内細菌叢移植の技術的要素

腸内細菌叢移植用の有用微生物を含む糞汁は、病原性を有する微生物およびウイルス感染のないことが証明されたドナー牛より採取した100グラム程度の糞便を、速やかに200mlの生理的食塩水を用いて懸濁し、それをガーゼでろ過し残渣を除去することで調整している (図1)。糞便移植に必要とされる

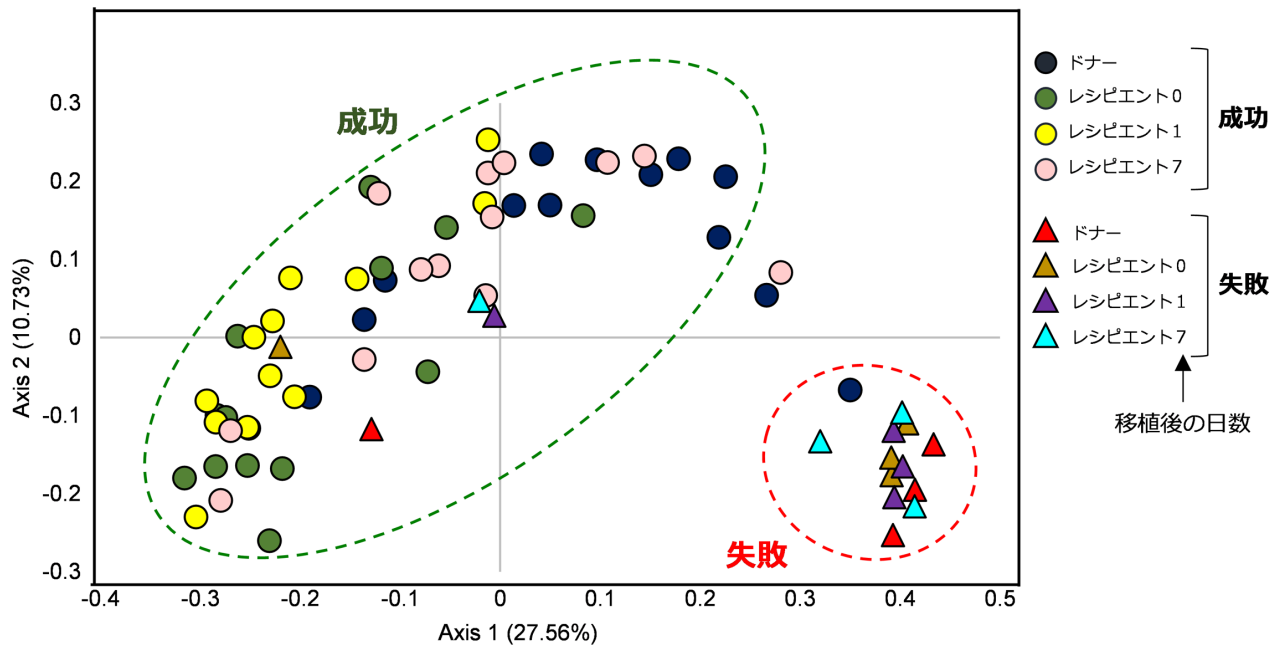


図3 腸内細菌叢移植後のレシピエントの糞便中の微生物叢変化

ドナー由来の糞便の必要十分量に関しては現在検討中であるが、100グラム以下でも十分な有効性が確認できることは検証済みである。注意すべき点として、腸内細菌叢移植の有効性検証を目的とした試験は、ドナー糞便の安全性が検証された上で初めて成立するものであり、その検証をすること無く、腸内細菌叢移植を実施することは、水平感染の危険性を有していることを明記する。NOSAI千葉には動物実験に関する倫理を評価する実験動物委員会が設けられており、委員会に属する有識者が試験内容を精査した上で、委員会が承認した課題として実験的に腸内細菌叢移植を実施している。ドナー候補牛が病原性の微生物・ウイルスに感染していないことは、糞便検査（イムノクロマト法（Rainbow Calf Scours®（Bio-X社））によるロタウイルス、コロナウイルス、大腸菌、クリプトスポリジウム、クロストリジウムの感染評価および、ショ糖浮遊遠心法による原虫、線虫の感染評価、さらには、PCRによる血液検査（牛白血病ウイルスおよび牛ウイルス性下痢症ウイルスの感染評価）により事前に確認し、その上で腸内細菌叢移植を実施している。検査に必要とされるコストについては今後の課題であるが、この糞便・血液検査がドナーの安全性を実証する上で極めて重要である。糞便を移植するには、直径1.5cm程の

シリコンチューブ（ブタの子宮洗浄用のカテーテル）を用いており、それを、潤滑剤を塗布した状態で直腸より挿入することで、移植を実施している。挿入時は、直腸の怒責に逆らわず慎重に進めていき、30～40cm程度の抵抗を感じた部位にて移植を行うことが重要である。怒責の強い個体に対しては臭化プリフィニウム等の鎮痙薬を用いることで、糞汁の逆流を防ぐことが求められる。最後に生理食塩水等でチューブ内をフラッシュし、直後に糞汁が肛門より半量以上逆流しなければ、移植は成功したと理解している。レシピエントの腸管中に共生する多量の微生物に対し、ドナーの糞便由来の微生物はごく僅かであるが、それでも十分の有効性を期待できることが、腸内微生物叢移植の特徴である。一方、コクシジウム症等といった腸管組織を破壊し偽膜性腸炎を引き起こす可能性がある腸炎に対しては、治療効果の減弱や遅延が認められる場合があることを追記する。また、腸内細菌叢移植と抗生物質の併用に関しては検討しておらず、抗生物質投与による微生物叢の攪乱が十分予測されるため、推奨をしていない。ドナー由来の糞便から移植用の糞汁調整に至るまでの工程は、現状では、臨床獣医師の手によって生産現場で実施されているが、将来的には、安全性が保証されたドナー糞便由来の調整済みの有用微生物を

臨床獣医師が入手できる仕組みを確立することが、腸内微生物叢移植を日本全土に普及させる上で必要である。

最後に

優良ドナー由来の糞便を用いた腸内微生物叢移植は非常に有効である一方で、その安全性を事前に適切に検証することは、予期せぬ感染事故を防ぐ上で必要不可欠である。また、現段階では、腸内微生物叢移植は子牛の下痢症に対する獣医療として認可されておらず、実験レベルでその有効性が実証されているに過ぎない。今後は、腸内微生物叢移植の有効性に関わる優良ドナー由来の有用微生物（もしくは代謝物）が製剤として開発され、その安全性が保証されることが、腸内微生物叢移植が日本全土に普及する近道であると確信する。

謝辞

本研究はJRA畜産振興事業「子牛への糞便移植の技術基盤形成と疾病制御事業」の支援を受けて2019年から2021年までの3年間、NOSAI千葉と東北大学で実施したものである。

引用文献

- 1) Khoruts A, Sadowsky MJ. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 ; 13 : 508-16.
- 2) Zhang F, Cui B, He X, Nie Y, Wu K, Fan D, FMT-standardization Study Group. Microbiota transplantation: concept, methodology and strategy for its modernization. *Protein Cell*. 2018 ; 9 : 462-73.
- 3) Gomez DE, Arroyo LG, Costa MC, Viel L, Weese JS. Characterization of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic dairy calves. *J Vet Intern Med*. 2017 ; 31 : 928-39.
- 4) Li SS, Zhu A, Benes V, Costea PI, Hercog R, Hildebrand F, et al. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science*. 2016 ; 352 : 586-9.
- 5) Huang MZ, Cui DA, Wu XH, Hui W, Yan ZT, Ding XZ, Wang SY. Serum metabolomics revealed the differential metabolic pathway in calves with severe clinical diarrhea symptoms. *Animals (Basel)*. 2020 ; doi: 10.3390/ani10050769.
- 6) Cho YI, Yoon KJ. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci*. 2014 ; 15 : 1-17.
- 7) Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2009 ; 25 : 13-36.
- 8) Constable PD. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2009 ; 25 : 101-20.
- 9) Hu J, Ma L, Nie Y, Chen J, Zheng W, Wang X, et al. A microbiota-derived bacteriocin targets the host to confer diarrhea resistance in early-weaned piglets. *Cell Host Microbe*. 2018 ; 24 : 817-832.
- 10) Islam J, Tanimizu M, Shimizu Y, Goto Y, Ohtani N, Sugiyama K, Tatezaki E, Sato M, Makino E, Shimada T, Ueda C, Matsuo A, Suyama Y, Sakai Y, Furukawa M, Usami K, Yoneyama H, Aso H, Tanaka H, Nochi T. Development of a rational framework for the therapeutic efficacy of fecal microbiota transplantation for calf diarrhea treatment. *Microbiome*. 2022 ; 10 : 31.

プロフィール

静岡県出身、2000年に東北大学農学部卒業、2002年に東北大学大学院農学研究科博士課程前期修了、2005年に東北大学大学院農学研究科博士課程後期修了、博士（農学）取得。その後、2005年から2009年まで東京大学医科学研究所博士研究員、2009年から2013年までノースカロライナ大学チャペルヒル校博士研究員、その間、2008年から2010年にかけて日本学術振興会特別研究員SPD。2013年4月から2021年3月まで東北大学大学院農学研究科准教授、2021年4月から東北大学大学院農学研究科教授。その他、東北大学大学院農学農学研究科食と農免疫国際教育研究センター副センター長、東北大学高度教養教育・学生支援機構教授、東京大学医科学研究所国際ワクチンデザインセンター客員教授、カナダゲルフ大学農学部客員教授、台湾台北医学大学保健栄養学系客員教授を兼任。