

主論文の要約

**Influence of proton pump inhibitors on microbiota in
chronic liver disease patients**

〔慢性肝疾患患者における Proton pump inhibitor 使用による
腸内細菌叢の影響〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：藤城 光弘 教授)

山本 健太

【緒言】

近年逆流性食道炎の罹患率増加や抗血小板薬を内服する患者の増加によりプロトンポンプインヒビター（PPIs）の使用は増加している。肝硬変患者においてPPIs内服による合併症として肝性脳症・特発性細菌性腹膜炎の増加が報告されているがその機序は十分解明されていない。臨床的に肝性脳症が下剤や抗生剤で治療されることや、特発性細菌性腹膜炎は腸管内細菌が腸管外組織に移行する病態である **Bacterial Translocation** と関連するためこれらの疾病が腸内細菌叢と関連があるとされている。一方でPPIsの使用により胃酸バリアが破壊され、腸内細菌叢の変化が生じるとされている。これらのことから我々は慢性肝疾患患者がPPIsを使用したときに生じる腸内細菌叢の変化が肝性脳症や特発性細菌性腹膜炎と関連していると考えた。特に合併症のリスクの低いChild-Turcotte-Pugh分類AもしくはBの患者において細菌叢にどのような変化が生じているかは不明であるため、これらの患者におけるPPIs内服・非内服患者の腸内細菌叢を比較し、その関連を検討した。

【対象及び方法】

2016年6月から2017年12月までに当院を受診した慢性肝疾患患者のうちChild-Turcotte-Pugh分類AもしくはBの患者198例を対象とした。本研究は本学生命倫理委員会の承認後、同意を得られた患者を対象とした(2015-0420)。腸内細菌叢は腸管切除や免疫抑制剤などにより影響を受けるためこれらの疾患を持つ患者を除外し、対象患者をpropensity score matching法を用いて年齢・性・Child-Turcotte-Pugh分類について患者背景を均等化してPPIs内服群(PPI群:31例)、非内服例(non-PPI群:31例)の腸内細菌叢を比較した(Figure1)。

細菌叢に関しては糞便からDNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Germany)も用いてDNAを抽出した。抽出したDNAに対して16SrRNAのV3, V4領域をターゲットにMiSeq Reagent Kit v3 with 2×300 reads (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いてIllumina社製Miseq(pair-ended reads,600 cycles)にてシーケンスを行った。メタゲノム解析はQIIME 1.9.1ソフトウェアを用いてGreengenes version 13_8をリファレンスとして行った。多重検定としてLinear discriminant analysis Effect Size (LEfSe)と機能予測遺伝子の検出にはPhylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt)とKyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) orthologyを用いた。

【結果】

2群における患者背景に関してプロペンシティーマッチング前はPPIsを内服する患者群で肝予備能が低かったが、マッチング後では差を認めなかった(Table1)。各群の門レベルにおける細菌叢の相対存在量はFirmicutes門においてPPI群が31.9%、non-PPI群が36.7%、Bacteroidetes門ではPPI群が58.4%、non-PPI群で50.7%であった(Figure 2a)。しかし属レベルではいくつかの細菌に差を認めた(Figure2b)。統計学的有意差を検定するためLEfSeを用いて属レベルまで2群間の菌叢の違いを検討したところPPI

群において2種類の目、5種類の科、*Streptococcus*など7種類の属の相対存在量が高く、non-PPI群において3種類の目、4種類の科、*Ruminococcus*など7種類の属が低いことが示された(Figure3a)。これらはプロペンシティー前のPPI使用を使用していない群(n=62)を比較した際にも同様の傾向を示した。(Figure3b)。

これらの細菌叢の違いにより生じる細菌叢の持つ機能を比較するため PICRUSt を用いて、それぞれの機能予測遺伝子の差を検定した(Figure4)。Figure4 では KEGG PATHWAY level 1 から3におけるカテゴリーに沿って有意差を認めた機能遺伝子群の違いを示している。これにより2群における細菌が行う代謝が異なることが示された。特に *Lipid metabolism* は脂肪代謝だけでなく、ステロイド骨格を基礎とする胆汁酸代謝が含まれており、*Bacterial motility proteins* や *Bacterial chemotaxis* は免疫応答と関連し *Bacterial Translocation* に関連する遺伝子が含まれていた。

【考察】

本検討により Child-Turcotte-Pugh 分類 A もしくは B の段階における慢性肝疾患患者が PPIs を使用した際に腸内細菌叢が異なり、これらが行う代謝機能が異なることが示された。既報にて健常人が PPIs を内服した際に胃酸バリアの低下により口腔内常在菌が増加することが報告されている。一方で進行した肝硬変患者の腸内細菌叢は慢性肝疾患患者と比較すると口腔内常在菌が増加し、本来存在する腸内細菌が減少することも報告されている。これらには肝性脳症や特発性細菌性腹膜炎の危険性を増加させる共通した変化が関連すると仮定し、進行した肝硬変患者を除外した Child-Turcotte-Pugh 分類 A もしくは B の慢性肝疾患患者が PPIs を内服した際に生じる変化と肝硬変や肝性脳症・特発性細菌性腹膜炎のリスクとなる腸内細菌叢の変化に関する既報を比較し共通点を検索した (Table2)。Table 2 では第 2.3 列には LEfSe により検出された細菌名が属・科レベルで記載されている。共通した菌叢を同定するため第 5 列目には健常人が PPIs を内服した変化、第 6 列には進行した肝硬変により生じた変化、第 7.8 列には肝性脳症・特発性細菌性腹膜炎と関連すると報告されている細菌叢の変化を併記した。これにより灰色で示された菌が共通して変化していることがわかる。つまり我々はこれらの菌叢が肝性脳症や特発性細菌性腹膜炎の危険性が増加する原因と関連する菌である可能性を示した。さらなる機序解明のため PICRUSt を用いて細菌叢の持つ機能遺伝子を検討し腸管内免疫や胆汁酸などが関連する可能性を示したが明らかな機序解明にはさらなる症例の追加と検討が必要であると考えられた。

【結語】

我々は PPIs を内服した群では口腔内常在菌が多く存在し、もともと腸管内にいる腸管内自生菌が相対的に少ないことを示した。これらの変化が長期的に継続することで PPIs 内服により肝性脳症・特発性細菌性腹膜炎の危険性が増加する可能性があると考えられた。今後腸内細菌叢をバイオマーカーとして PPIs による合併症リスクを評価することや、新規薬剤の開発などが将来的に可能となるかもしれない。