

大腸癌周術期における腸内細菌叢の変化と 術後創感染への影響に関する研究

聖路加国際病院 消化器センター
副センター長 大東 誠司

はじめに

近年、大腸癌は増加の一途を辿っており大腸癌の罹患率、死亡率は依然として増加傾向にある。大腸癌治療の根幹は外科的手術であり、5年相対的生存率75%以上と比較的良好な成績といえる。しかし大腸癌術後の感染症、なかでも surgical site infection (SSI) は大きな問題であり、およそ10%前後と高い発生率である¹⁾。一旦SSIが生じた場合、入院期間は有意に延長し、患者のみならず医療者への負担は避けられない。我々は、大腸癌患者では健康人と比較して腸内細菌叢は大腸癌発生の早い段階から変化しており、加えて、有機酸なかでも短鎖脂肪酸の減少、便pHの上昇といった腸内環境は有意に変化していることを報告してきた (Table 1)²⁾。そこで今回、大腸癌術前・術後の腸内細菌叢の変化を検討し、SSIとの関連を考察した。

	大腸癌群 (n = 93)	健常者群 (n = 49)	p value
Total bacterial counts	10.3 ± 0.7 (93/93)	10.8 ± 0.3 (49/49)	< 0.001
Obligate anaerobe			
<i>Clostridium coccooides</i> group	9.5 ± 0.7 (93/93)	9.9 ± 0.4 (49/49)	0.004
<i>C. leptum</i> subgroup	9.4 ± 0.8 (93/93)	10.1 ± 0.4 (49/49)	< 0.001
<i>Bacteroides fragilis</i> group	9.6 ± 0.8 (91/93)	10.2 ± 0.4 (49/49)	< 0.001
<i>Bifidobacterium</i>	9.3 ± 0.9 (91/93)	9.7 ± 0.6 (49/49)	0.006
<i>Atopobium</i> cluster	9.0 ± 0.7 (91/93)	9.5 ± 0.5 (49/49)	< 0.001
<i>Prevotella</i>	8.2 ± 1.4 (58/93)	8.1 ± 1.8 (25/49)	0.897
<i>C. difficile</i>	5.0 ± 1.1 (10/93)	5.0 ± 0.9 (2/49)	0.919
<i>C. perfringens</i>	5.5 ± 1.7 (53/93)	5.1 ± 1.3 (27/49)	0.448
Facultative anaerobe			
Total <i>Lactobacillus</i>	6.9 ± 1.6 (93/93)	7.0 ± 1.3 (49/49)	0.695
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.2 ± 1.0 (78/93)	7.6 ± 1.1 (49/49)	0.026
<i>Enterococcus</i>	6.6 ± 1.4 (80/93)	6.8 ± 1.4 (49/49)	0.666
<i>Staphylococcus</i>	4.3 ± 0.7 (76/93)	4.8 ± 0.7 (49/49)	< 0.001
Aerobe			
<i>Pseudomonas</i>	4.9 ± 1.1 (19/93)	4.3 ± 1.0 (6/49)	0.127
Total organic acids	75.9 ± 39.5 (93/93)	99.1 ± 30.0 (49/49)	< 0.001
Succinic acid	3.1 ± 4.7 (64/93)	2.8 ± 9.7 (30/49)	0.020
Formic acid	1.8 ± 2.2 (70/93)	1.7 ± 1.0 (40/49)	0.170
Lactic acid	3.0 ± 3.4 (29/93)	3.2 ± 4.5 (10/49)	0.676
Acetic acid	49.3 ± 27.2 (93/93)	59.6 ± 19.2 (49/49)	0.002
Propionic acid	12.7 ± 8.1 (91/93)	19.8 ± 6.6 (49/49)	< 0.001
Butyric acid	7.7 ± 4.7 (88/93)	11.8 ± 4.9 (49/49)	< 0.001
Valeric acid	2.8 ± 1.2 (37/93)	3.9 ± 1.7 (23/49)	0.029
Isovaleric acid	2.8 ± 1.9 (44/93)	3.6 ± 1.9 (31/49)	0.063
pH	7.4 ± 0.8 (93/93)	6.9 ± 0.6 (49/49)	< 0.001

Table 1 : 大腸癌群と健常者群との腸内環境の比較

対象と方法

2011-2012年に経験した初発大腸癌125例のうち、閉塞などに伴う緊急手術例、永久あるいは一時的人工肛門造設例、術前放射線化学療法例、周術期の長期抗菌剤使用例などを除外し、最終的には81例を対象とした。81例に対する周術期管理はパスを用いて同一の方法を用いた。すなわち術前日にニフレック 2Lを用いた機械的腸管洗浄、抗菌剤(CMZ 1g)は皮切直前、術後8時間ごとに3回のみで終了し、食事は術後3日より開始した。細菌叢の検索は入院直後から術前の下剤を開始する前の便、ならびに術後7-10日までの便を採取し特別な容器に確保後は直ちに冷凍保存した。SSIに関しては米国疾病管理予防センター(CDC)の定める診断基準に沿って特定し、SSI分離菌と腸内細菌叢の変化との関連を検討した。細菌叢は16s-rRNAを標的とした計13種類のプライマーを用いて定量的RT-PCR法で同定した。

結 果

81例の適格例の詳細をTable 2に示す。

Patients (n = 81)	
Age	68.9 ± 12.3 (28 - 89)
Gender (M / F)	47 : 34
BMI	22.1 ± 3.4 (16.3 – 29.2)
Stage (0-I / II / III / IV)	31 / 17 / 21 / 12
Operation procedure	
Rt. colectomy	27
Lt. colectomy	23
Rectal resection	31
Open / Laparoscopic procedure	21 / 60
SSI (%)	6 / 81 (7.4 %)

Table 2 : 対象の詳細

1. 術前後での腸内細菌叢の変化

術前と術後の2群間における腸内細菌叢を比較した (Table 3)。まず総菌数に関しては術前に比較して術後では有意に減少していた (10.3 ± 0.6 vs. $9.4 \pm 1.2 \log_{10}$ cells/g of feces; $p < 0.001$)。具体的には最優勢菌である偏性嫌気性菌の6菌群 (*Clostridium coccoides* group, *C. leptum* subgroup, *B. fragilis* group, *Bifidobacterium*, *Atopobium*

cluster, および *Prevotella*) が減少していた。一方、通性嫌気性菌である *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, 好気性菌である *Pseudomonas* は術後で有意に増加しており、これらはいずれも病原性を有する菌種を含む菌群であった。

	術前 group (n = 81)	術後 group (n = 81)	p
Total bacterial counts	10.3 ± 0.6 (81/ 81)	9.4 ± 1.2 (81/ 81)	< 0.001
Obligate anaerobe			
<i>Clostridium coccooides</i> group	9.5 ± 0.7 (81/ 81)	7.7 ± 1.3 (47/ 81)	< 0.001
<i>C. leptum</i> subgroup	9.5 ± 0.7 (81/ 81)	7.0 ± 1.5 (34/ 81)	< 0.001
<i>Bacteroides fragilis</i> group	9.6 ± 0.7 (80/ 81)	8.9 ± 1.4 (30/ 81)	0.036
<i>Bifidobacterium</i>	9.3 ± 1.0 (80/ 81)	7.9 ± 1.5 (57/ 81)	< 0.001
<i>Atopobium</i> cluster	9.0 ± 0.7 (81/ 81)	6.5 ± 0.8 (62/ 81)	< 0.001
<i>Prevotella</i>	8.2 ± 1.4 (51/ 81)	6.8 ± 0.9 (15/ 81)	0.005
<i>C. difficile</i>	5.2 ± 0.9 (8/ 81)	6.4 ± 3.3 (3/ 81)	0.669
<i>C. perfringens</i>	5.7 ± 1.8 (45/ 81)	4.7 ± 1.8 (22/ 81)	0.067
Facultative anaerobe			
Total <i>Lactobacillus</i>	7.0 ± 1.5 (81/ 81)	7.7 ± 1.8 (79/ 81)	0.484
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.2 ± 1.0 (69/ 81)	7.7 ± 1.1 (59/ 81)	0.015
<i>Enterococcus</i>	6.7 ± 1.4 (70/ 81)	8.3 ± 1.8 (68/ 81)	< 0.001
<i>Staphylococcus</i>	4.3 ± 0.7 (70/ 81)	5.3 ± 1.4 (67/ 81)	< 0.001
Aerobe			
<i>Pseudomonas</i>	5.0 ± 1.4 (15/ 81)	6.4 ± 1.9 (29/ 81)	0.013

Table 3 : 術前後での腸内細菌叢の変化

2. 手術部位別での腸内細菌叢の比較

右側切除群、左側切除群、および直腸切除群の3群間で腸内細菌叢の比較を行った。結果、総細菌叢数、*Bifidobacterium*ならびに*Enterobacteriaceae*で有意差がみられた。3群間内の検討では総細菌叢数では右側切除群に比較して直腸切除群が低下しており (10.0 ± 0.7 vs. 8.9 ± 1.4 log10 cells/g of feces; p<0.05)、*Bifidobacterium*では右側切除群 (9.0 ± 1.6)、左側切除群 (8.4 ± 1.3) に比較していずれも直腸切除群 (6.9 ± 1.0) が有意に減少していた。

3. 術後SSIと腸内細菌叢の変化との関連

SSIは81例中6例(7.4%)に発生し、内訳は浅層4例、深層1例、体腔1例であった。SSIの診断時期は術後3日以内1例、4-7日4例、8日以降1例であった。SSI発生例と非発生例の2群間における術後細菌叢の変化を比較したが、両群間に有意差はみられなかった。SSI分離菌は総計10検体の菌種が確認された。具体的には *Pseudomonas aeruginosa* 2例、*Enterococcus faecalis* 2例、*Enterococcus coli*, *Enterobactore cloacae*, *Enterococcius gallinarum*, *Bacteroides sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) が各々1例。SSI分離菌10検体中 *Bacteroides sp.* を除く9検体(90%)は、術後腸内細菌叢のなかで増加を示した菌群に属する菌種であった。

考 察

今回、RT-qPCR法を用いて大腸癌術前後の腸内細菌叢の変化を検討した結果、術後早期では腸内細菌叢は著しく変化していることが確認できた。具体的には *C. coccoides* group, *C. leptum* subgroup, *B. fragilis* group, *Bifidobacterium*, *Atopobium* cluster, および *Prevotella* が減少しており、これらは全てヒト腸管内の最優勢菌である偏性嫌気性菌に属している。一般に偏性嫌気性菌は腸管内環境の安定性を保つ上で極めて重要であることに加え、免疫系の成熟、複合炭水化物の消化、など様々な役割を果たしており³⁾、通常、人体にとっては有益とされる菌種が多く含まれている。一方、増加を認めた通性嫌気性菌である *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* および好気性菌である *Pseudomonas* は一般的には病原性を有するとされる菌種を包含する菌群である。すなわち、今回の結果は大腸癌術後では通常、有益とされる菌群が有意に減少し、逆に病原性を有する菌群は増加していたことになる。今回、術前処置として行った腸管洗浄に加え、周術期の抗菌薬が腸内細菌叢に大きな変化を及ぼしたことは容易に想像されるが、病原性を有する菌群は術後には増加していた事実は非常に興味深い。術前後の細菌叢の解析からはSSI発生の有無の2群間には有意な差はみられなかった。しかしSSI発生は6例(7.4%)と少数であり、一定の結論を出すには十分な症例数とは言い難い。むしろ、今回検出されたSSI分離菌のおよそ90%にもおよぶ大多数の菌種は、術後に増加した菌群に含まれていた結果に注目したい。

本研究により大腸癌術後では腸内環境に著しい変化が起きていることは確認できたが、SSIを防止するうえでも腸内環境の変化をいかに安定させるかが今後の課題である。今回の結果から *Staphylococcus*, *Pseudomonas* などの菌群が増加しており、この菌群に属する一部の菌種がSSI分離菌の大部分を占めていたことから、こうした菌種にどう対処するかが重要である。予防的抗菌薬の使用を安易に強化することは、菌交代現象や耐性菌出現のリスクからも得策ではないであろう。そこで最近、注目されているのがprobioticsあるいはprebioticsである。Probioticsとは生体内、特に腸管内の細菌叢に作用し、そのバランス

を改善することにより生体に利益をもたらす生きた微生物と定義される。また prebiotics は上部消化管で分解されず、腸管内で生体に利益をもたらす微生物の増殖を促進させる物質を指す。Probioticsとprebioticsを合わせてsynbioticsと称され、実際、胆道癌の術後ではsynbioticsを使用することで腸内環境が改善し術後感染症も有意に低下することが報告されている⁴⁾。また大腸癌の術後にprobioticsを用いることで感染性合併症の低下⁵⁾、QOLの改善⁶⁾も報告されている。Probioticsやsynbioticsの使用により、細菌叢の改善のみならず腸管内での免疫能の向上やQOLの向上につながっていることが重要なポイントといえる。Probioticsによる有害事象も報告⁷⁾はあるが、一般的には安全な薬剤とされており、改めて大規模臨床試験を含めた今後の動向に期待したい。

要 約

大腸癌81例を対象として、手術前後での腸内細菌叢の比較を行った。結果、ヒト腸管内の最優勢菌である偏性嫌気性菌で、通常、人体にとっては有益とされる*C. coccoides* group、*C. leptum* subgroup、*B. fragilis* group、*Bifidobacterium*、*Atopobium* cluster、*Prevotella*などが有意に減少していた。一方、通性嫌気性菌である*Enterobacteriaceae*、*Enterococcus*、*Staphylococcus*、および好気性菌である*Pseudomonas*は増加しており、これらは一般的に病原性を有する菌種を包含する菌群である。すなわち、大腸癌術後では通常、有益とされる菌群が有意に減少し、逆に病原性を有する菌群は増加していることが明らかとなった。一方、SSIは7.4%に発生し、分離菌の90%にもおよぶ大多数の菌種は、術後に増加した菌群に含まれていた。SSIを防止することは喫緊の課題であるが、周術期の腸内細菌叢を含めた腸内環境の安定化が重要である。

文 献

1. 草地信也, 幕内晴朗, 真下啓二ほか. 手術部位感染 (SSI: Surgical Site Infection) が与える在院日数と直接医療費への影響の調査研究. 日外感染症会誌 33:101-105, 2010
2. Ohigashi S, Sudo K, Kobayashi D, et al. Changes of the intestinal microbiota, short chain fatty acids, and fecal pH in patients with colorectal cancer. Dig Dis Sci 58:1717-1726, 2013
3. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. Gastroenterology 2009;136:65-80
4. Sugawara G, Nagino M, Nishio H, et al. Perioperative synbiotic treatment to prevent postoperative infectious complications in biliary cancer surgery: a randomized controlled trial. Ann Surg 244:706-714, 2006
5. Liu Z, Qin H, Yang Z, et al. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery - a double-blind study. Aliment Pharmacol Ther 33:50-63, 2011

6. Ohigashi, S, Hoshino Y, Ohde A, et al. Functional outcome, quality of life, and efficacy of probiotics in postoperative patients with colorectal cancer. *Surg Today* 41:1200-1206,2011
7. Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 371:651-659,2008