

令和元年6月11日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19593

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた難治性*C. difficile*腸炎の治療戦略の検討研究課題名(英文) Examination of treatment strategy for intractable *C. difficile* infection using the mouse *C. difficile* infection microbiota model

研究代表者

山口 哲央 (YAMAGUCHI, Tetsuo)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：10408239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CDIマウスモデルの腸内細菌叢に対するバンコマイシン、フィダキソマイシン、*Clostridium butyricum*、およびラクトフェリンの影響を検討した。CDIマウスでは非感染マウスと比較して*Clostridia*網の割合が低下しており、バンコマイシンおよびフィダキソマイシン治療によりさらに低下した。*C. butyricum*投与群、およびラクトフェリン投与群では*Clostridia*網の割合が維持されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬関連腸炎の中でもCDIは代表的な疾患であるが、近年、強毒型*C. difficile*が欧米を中心に問題となっており、その病態解析と適切な治療指針が求められている。特に腸内細菌叢の攪乱がCDI再発のリスクになるため、CDI発症時および抗CD薬投与時の腸内細菌叢の変化を明らかにすることは学術的・社会的に意義深い。使用する抗CD薬により細菌叢は異なり、プロバイオティクス投与による腸内細菌叢攪乱の予防効果が示唆された。現在、論文投稿準備中であり、情報を発信していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of vancomycin, fidaxomicin, the probiotic *Clostridium butyricum* and the prebiotic lactoferrin on the intestinal microbiota in a mouse model with clindamycin induced intestinal dysbiosis followed by *Clostridioides difficile* inoculation. Composition of the intestinal microbiome was investigated by sequence and quantitative PCR analyses of bacterial 16S rRNA gene in faecal DNA. The class *Clostridia* formed a numerically smaller proportion of the microbiota in the model than in uninoculated mice. Both vancomycin and fidaxomicin treatment further decreased *Clostridia* in *C. difficile*-inoculated mice. Probiotic treatment increased the proportion of *Clostridia* in the microbiome, but *C. difficile* inoculation led to decreased gut microbiome diversity compared with uninoculated mice.

研究分野：感染症学、細菌学

キーワード：CDI プロバイオティクス 腸内細菌叢 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗菌薬関連腸炎

抗菌薬関連腸炎は抗菌薬治療中に注意すべき有害事象のひとつであり、抗菌薬投与下では5~30%の頻度で起こるといわれている。中でも *C. difficile* 腸炎(CDI)は代表的な疾患であり、抗菌薬投与により大腸の正常細菌叢が乱され、抗菌薬に耐性の *C. difficile* が増殖し、毒素を大量に産生することで偽膜性腸炎を引き起こすと考えられている。全ての *C. difficile* が腸炎を引き起こすわけではなく、病原性を有する *C. difficile* はトキシンAやトキシンBを産生する。効果の期待できる抗菌薬はメトロニダゾール(MNZ)やバンコマイシン(VCM)などで限られており、本来腸内細菌叢が乱れて発症する病気であるため、再発を繰り返すことも少なくない。近年、欧米の医療関連施設で強毒型 *C. difficile* によるアウトブレイクが報告されており、問題となっている(A. C. Clements et al. Lancet Infect Dis 2010, 10:395)。下痢、偽膜性腸炎のほか、トキシック巨大結腸症や敗血症などの重篤な病態を引き起こすことがある。我々は、帝王切開後の健康な女性に発症した重症CDIを経験し、我が国で初めての強毒型 *C. difficile* によるCDIとして報告している(Nakamura I et al. J Infect Chemother 2014, 20:380)。

(2) CDI マウスモデル

この強毒型 *C. difficile* は、その病原性に toxinA や toxinB に加えて binary toxin が関与することが分かってきているが、CDIの病態に関しては明らかになっていない部分も多く、実際に臨床では難治例や再発例に苦しむことも少なくない。病態を明らかにするためには臨床像の収集が大切であるが、マウスモデルによる検討も有用である。過去の報告では抗菌薬を用いてマウスの腸管内を除菌した後に強毒型 *C. difficile* 株を接種させると、腸炎を起こすことが分かっている(Chen, X et al. Gastroenterology 2008, 135:1984)。当研究室においても、この手法を用いて、IL17K0 マウスにおける致死率の改善やCDIと好中球の影響を明らかにしてきた(未発表データ)。このモデルは強い腸炎を引き起こす利点がある反面、除菌抗菌薬に抗CD薬であるVCMやMNZを含んでおり、治療薬としての抗CD薬の評価や、CDI再発マウスモデルの作成は難しかった。

2. 研究の目的

当初は最も適切な抗菌薬の組合わせを検討し、CDI再発モデルの確立を目指したが、CDI再発モデルの検討が困難であった。このため、各種CDI治療薬(バンコマイシン、フィダキソマイシン)および、プロバイオティクス(*Clostridium butyricum*)、プレバイオティクス(ラクtoferrin)の腸内細菌叢への影響を評価することで、CDI再発へのリスクを検討することとした。除菌抗菌薬投与時やCDI発症時に抗CD薬やプロバイオティクスを投与し、次世代シーケンサー(NGS)を用いた16S rRNA解析を行い、経過中の腸管内細菌叢の変化を追うことで、最も腸内細菌叢の攪乱を防ぐ治療方針の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 治療群

非感染マウス群、CDIマウス群、非感染・各種抗菌薬投与群(バンコマイシン、フィダキソマイシン)、CDIマウス・各種抗菌薬投与群・2日間および7日間、非感染・プロバイオティクス投与群(*C. butyricum*、ラクtoferrin)、CDIマウス・プロバイオティクス投与群(*C. butyricum*、ラクtoferrin)をそれぞれ作成し、定めた日程で安楽死させ、解剖し盲腸から10-20µgの便を採取tris-TDTAバッファーに懸濁。マイナス80度に保存し、下記解析用サンプルとして用いた。

(2) NGSを用いた16S rRNA遺伝子解析による腸内細菌叢の把握

Power Fecal DNA Isolation Kit (QIAGEN KK, Osaka, Japan)を用いて各サンプルのDNAを抽出し、Illumina MiSeq™ system (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いてV3-V4領域を対象としたシーケンスを行なった。PCRおよびサンプル調整、シーケンスはIllumina MiSeq Systemのプロトコルに従い、解析はCLC Genomics Workbench 10.1.1 (Microbial Genomics Module)を用いて行なった。OTU (Operational Taxonomic Unit) 解析はGreengenesデータベースを用いて97%の類似度を基準としてクラスター分類した。

(3) リアルタイムPCRを用いた腸内細菌叢の定量化

SYBR Greenを用いたリアルタイムPCRにより16S rRNA遺伝子をターゲットとして細菌の遺伝子量を定量した。*C. difficile*、および*B. fragilis*の総菌数あたりの割合を算出した。

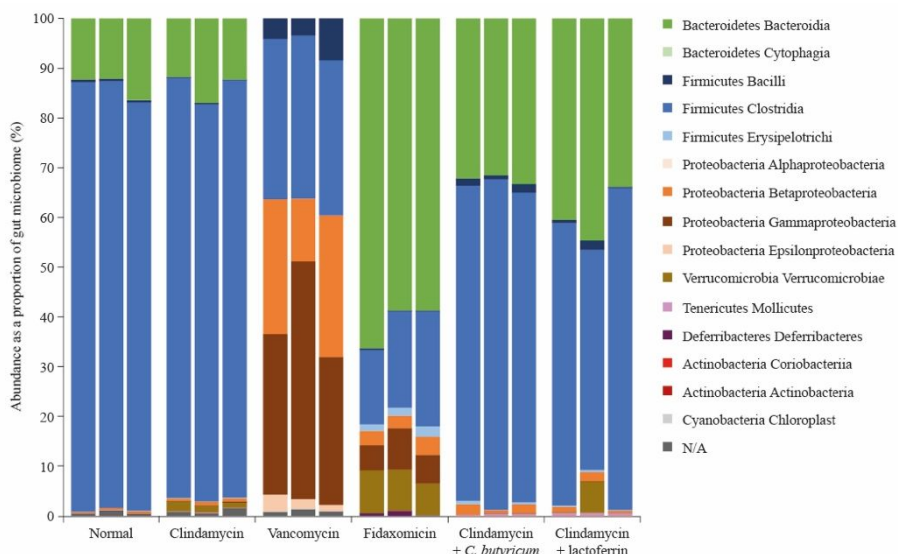
4. 研究成果

(1) 非感染マウスにおける抗菌薬の影響

Normal miceでは、Clostridia網がもっとも割合が高く、次いでBacteroidia網であった。クリンダマイシン投与マウスではVerrucomicrobiae網が軽度増加していた(図1)。バンコマイシンの投与ではBetaproteobacteria網とGammaproteobacteria網の増加し、Clostridia網が減少した。フィダキソマイシン投与ではClostridia網の減少が確認されたがBacteroidia網の割合は増加した。*C. butyricum*とlactoferrin投与群ではどちらもBacteroidia網の割合を

増加させた(図1)。

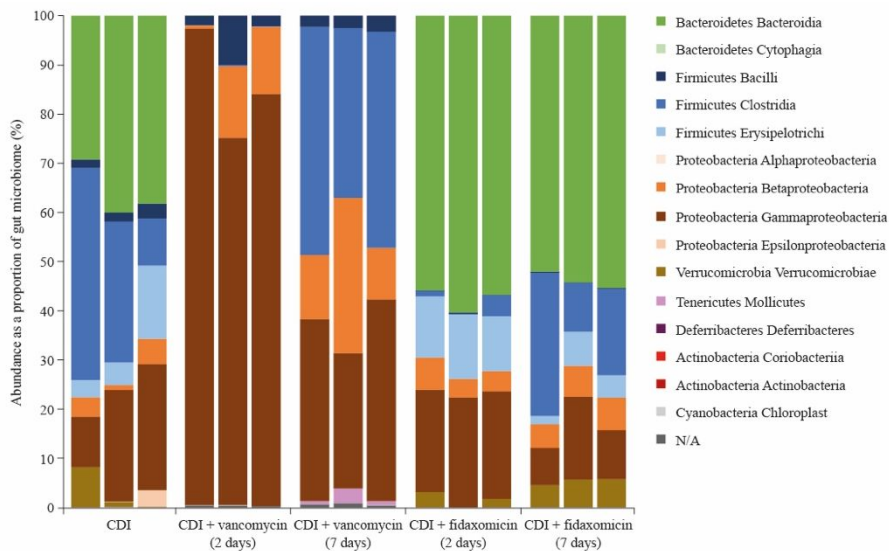
図1



(2) CDI マウスにおける抗菌薬の影響

Normal mice と比べると、CDI マウスでは Clostridia 網の割合が少なく、Betaproteobacteria 網, Gammaproteobacteria 網, Bacteroidia 網, および Erysipelotrichi の割合が多かった(図1)。CDI マウスでは、非治療群(CDI 群)と比べ、バンコマイシン治療群において、Bacteroidia 網と Clostridia 網の減少が認められ、Betaproteobacteria 網と Gammaproteobacteria 網の割合が増加していた。Gammaproteobacteria 網や Clostridia 網の割合は、バンコマイシン 2 日間投与と 7 日間投与では異なっていた(図2)。フィダキシマイシン投与群では非治療群(CDI 群)と比べて Clostridia 網の割合が減っていたが、Bacteroidia 網の割合は増加していた。

図2



(3) CDI マウスにおけるプロバイオティクスの影響

C. butyricum およびラクトフェリンの投与は Clostridia 網の割合を増加させた(図3)。

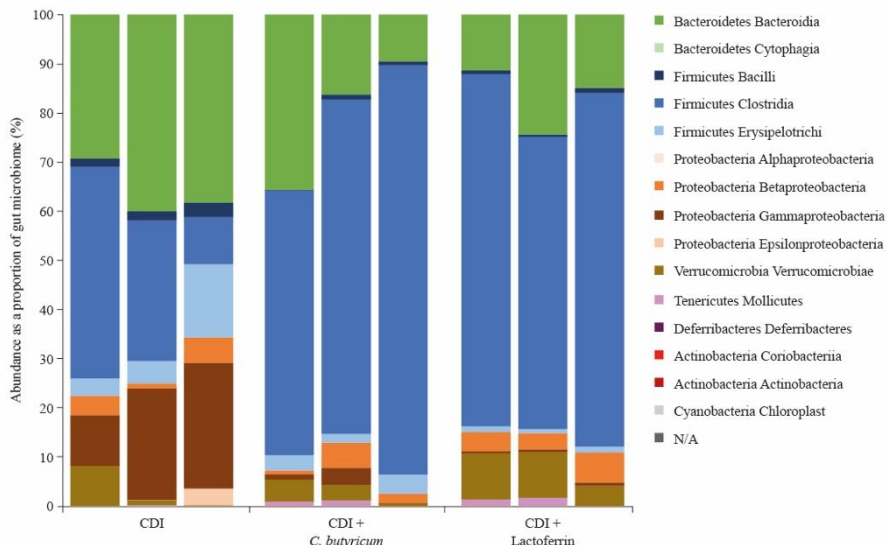
(4) 多様性

Shannon diversity index では normal マウスと比べて CDI マウスでは有意に多様性が下がっていた。未治療 CDI マウスと比較して、バンコマイシン治療 CDI マウスでは有意に多様性が下がっていた。Chao1 estimations では、未治療 CDI マウスと比較して、バンコマイシン治療 CDI およびフィダキシマイシン治療 CDI において有意に多様性が下がっていた。

(5) リアルタイム PCR による *C. difficile* および *B. fragilis* の定量

未治療 CDI マウスと比較して、バンコマイシン治療群およびフィダキシマイシン治療群において *C. difficile* の割合は少なかった。特に、フィダキシマイシン 7 日間投与群では検出限界以下であり、有意に低かった。バンコマイシン投与群では *B. fragilis* が有意に下がっていたが、フィダキシマイシン投与では *B. fragilis* の低下は確認されなかった。*C. butyricum* とラクトフェリン投与群においても同様に *B. fragilis* の低下は確認されなかった。

図 3



5. 主な発表論文等
なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山口哲央, CDI 予防へのアプローチ(プロバイオティクス), 第 67 回日本化学療法学会総会(シンポジウム 16), 2019 年 4 月

〔図書〕(計 1 件)

山口哲央, CDI における腸内細菌叢の変化と新しい治療法, クロストリジウムディフィシル感染症(医薬ジャーナル社), 2016 年 11 月, p34-42

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。