

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11183

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた尿路性器感染症の病態解析に関する研究

研究課題名(英文) Study on the analysis of genitourinary tract infections using a next generation sequencer

研究代表者

和田 耕一郎 (Wada, Koichiro)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：20423337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：性感染症については、検体を採取することに患者様の負担が大きく、臨床研究法の施行によって実施することができませんでした。尿路感染症については、乳酸菌タブレットを口から摂取する前後で直腸と膣内の細菌叢に違いが生ずるか、乳酸菌膣坐剤の投与前・中・後の膣内細菌叢と反復性膀胱炎の関係、を調査しました。では、細菌叢に一定の変化は認めませんでした。子宮を摘出した方々においては、直腸と膣内の細菌叢が類似し、タブレットの影響をより受けにくい傾向が認められました。においては、乳酸菌膣坐剤が反復性膀胱炎の予防に寄与しており、膣内細菌叢でも乳酸菌の増加がみられ、投与終了後1年間の予防効果も認められました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、膣内に定着した細菌が尿路感染症の原因になることが示されました。また、乳酸菌のタブレットを口から摂取しても膣内細菌叢の変化はほとんど起こりませんでした。乳酸菌を含む膣坐剤を直接膣に挿入することで細菌叢が変化し、投与中だけでなく投与後も尿路感染症を予防することが示されました。これらの研究は、尿路感染症、特に反復性(繰り返す)膀胱炎の発生するメカニズムの解明と予防法・予防効果について検証した数少ない研究であり、予防医学として社会に還元できるものです。また、予防によって抗菌薬の使用量が減少し、薬剤耐性菌の蔓延を防止する効果もあると考えられます。

研究成果の概要(英文)：Research on sexually transmitted diseases could not be conducted due to the large invasiveness of sample collection and to the enforcement of the Clinical Trials Act. Regarding urinary tract infections, two clinical trials using next generation sequencer was carried out; (1) investigation of differences in the bacterial flora between the rectum and vagina before and after taking the lactobacillus tablet orally; (2) evaluation of vaginal suppository containing lactobacillus for prevention of recurrent cystitis. In (1), no significant change was observed in the bacterial flora, but in those who had undergone hysterectomy, the bacterial flora in the rectum and vagina was similar, and it was found that they were less susceptible to the effects of tablets. In (2), the suppository contributed to the prevention of recurrent cystitis, and an increase in lactobacillus was also observed in the vaginal flora, and a preventive effect was also observed for 1 year after the end of administration.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路感染症 性感染症 乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬耐性菌の増加が国内外で問題となっており、新規抗菌薬の開発も停滞している。また、難治性、反復性の尿路生殖器感染症に対して治療に難渋し、既存の抗菌薬を長期間、反復的に使用することでさらに耐性菌の増加に拍車がかかっている。この悪循環に歯止めをかけるためには、感染症の病態に応じて適切な予防を行っていくことが重要と考えられる。これまで、女性の尿路感染症については主に逆行性感染、特に膣が定着した細菌のリザーバーとなっていることに起因し、性感染症についてはオーラルセックスや尿路や生殖器の粘膜接触が原因といわれてきた。

本研究を申請した岡山大学の尿路感染症研究班では、30年以上前から各種尿路感染症由来株の薬剤耐性化や尿路バイオフィーム感染症、*Chlamydia* を中心とした性感染症に関する研究を推進してきた。そのなかで、難治性・反復性尿路感染症に対する治療・予防と、性感染症における病原微生物の特定と感染経路について未だ完全には解明されていない病態について研究を継続している。

以上の背景ならびに経緯から、今回、次世代シーケンサーを用いて閉経前・後の女性における尿路感染症の病態解明、男性尿道炎における病原微生物の探索と感染経路の解明を明らかにする研究計画を立案した。すなわち、高いシーケンス効率によって膣、直腸、咽頭の細菌叢を明らかにし、尿路感染症と性感染症の原因微生物との相同性を検証することで尿路生殖器感染症の病態を分子生物学的に、網羅的に解明することを目的とする。

2. 研究の目的

尿路感染症はごく一般的な感染性疾患であり、特に女性では生涯のうちに人口の約60%が一度は罹患し、さらに罹患後一年以内にその3分の1が再発を経験すると報告されている。反復性膀胱炎の病態として、乳酸菌を中心とした膣の常在菌(デーデルライン桿菌)によるバリアが関与しているといわれており、特に閉経後の女性はバリアの喪失による腸内細菌の膣への定着によって、膣が腸内細菌のリザーバーとなって細菌を供給することが原因とされている。しかし、性活動期の女性でも尿路感染症になることも多い。また、前述した膣の常在菌によるバリアを分子生物学的に詳細な検討を加えた基礎研究はない。新規の抗菌薬開発が停滞し、薬剤耐性菌が増加している現在、反復性尿路感染症の治療や予防を検討する上で、病態を明らかにすることが重要であり、本研究によりプロバイオティクスなどを用いた予防を行うことができれば使用抗菌薬量を減らすことが可能となる。

一方、*Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) や *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) による性感染症のうち、特に男性尿道炎と子宮頸管炎は日本だけでなく世界的な蔓延が社会問題となっている。原因微生物として前述した *C. trachomatis* や *N. gonorrhoeae* のほか、*Mycoplasma* や *Ureaplasma*、さらに我々が報告した *Chlamydophila caviae* (*C. caviae*) も挙げられる。尿道炎のうち非淋菌非クラミジア性尿道炎が約3割を占め、未報告の病原微生物も性感染症の原因になっている可能性が考えられる。感染経路としては性器粘膜の接触感染が最も一般的とされているが、オーラルセックスによる咽頭粘膜を介した感染の重要性が指摘されている。実際、我々が2012年に報告したヘテロセクシャルの男性尿道炎患者の咽頭から *C. trachomatis* や *N. gonorrhoeae* が分離された事実により、必ずしも咽頭と性器粘膜の接触によらない可能性も考えられる。従って性感染症の蔓延を食い止めるためには病原微生物や感染経路に関してさらに検証することが不可欠である。

3. 研究の方法

近年、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析が広まりつつある。次世代シーケンサーは膨大なゲノム情報を読み取ることが可能であり、ヒト以外の多くの生物やヒトにおける新生物の分野で活用されている。感染症の分野では未知の感染症について病原体の候補を絞り込んだり、細菌のタイピングや比較を行ったりすることが可能であり、細菌叢を解析することもできる。すなわち、膣分泌液や便、唾液の検体中の16S rRNA 遺伝子を次世代シーケンサーでシーケンスすることで膣、直腸、口腔内の細菌叢に含まれる細菌のライブラリを作成できる。岡山大学病院内にある岡大バイオバンクには、主に癌診療におけるテーラーメイドな解析と治療を目的として次世代シーケンサー(Illumina MiSeq™)が導入され、安価にシーケンスを行うことが可能となっている。岡大バイオバンク内では感染症の遺伝子を取り扱うことも可能であり、当研究室では既に他の感染症に関するシーケンス解析に取りかかっている。そのため、本研究課題についても解析までスムーズに行うことが可能である。

本研究において、以下の臨床研究と次世代シーケンサーによる解析を行った。

乳酸菌タブレットの直腸および膣内細菌叢に及ぼす影響に関する検討

対象は2016年10月～2018年3月に当科外来通院中で、尿路感染症のない閉経後の女性50例とした。*Lactobacillus brevis* 製剤であるラブレ（カゴメ）を1か月間服用し、服用前後の直腸及び膣内スワブ検体を次世代シーケンサーで解析した。機器はMiSeq® system (Illumina Inc., San Diego, CA)で、シーケンス法は16S Metagenomic Sequencingを採用した。各検体の関係を相関係数で算出し、年齢、子宮摘出歴の有無、糖尿病の併存、過去1年の膀胱炎治療歴、タブレット以外の乳酸菌の摂取状況との関連について、Wilcoxon検定で検討をおこなった。

乳酸菌膣坐剤を用いた反復性膀胱炎の予防効果に関する検討（第二相試験・特定臨床研究）

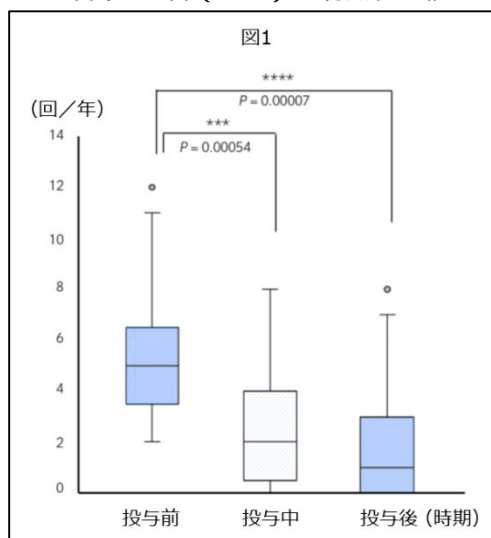
対象は2013年から2020年に岡山大学病院に通院中で、1年間で2度以上の膀胱炎罹患歴を有する成人女性とし、他に重篤な疾患を有する女性は除外した。1年間、*Lactobacillus crispatus* GAI 98322株からなる膣坐剤を週3回、隔日で眠前に膣内投与を実施した。投与中の1年間、投与後の1年間における膀胱炎の罹患回数を投与前と比較し、さらにそれぞれの時期に採取した膣内細菌叢を次世代シーケンサーで解析して比較した。膀胱炎に罹患した際には尿中分離菌と膣内細菌叢を比較検討し、細菌叢の状態と膀胱炎発症の関連についても解析した。

4. 研究成果

性感染症に関しては、特に男性患者からの検体採取に侵襲を伴う点と、臨床研究法の施行によって実施が困難であった。

の研究では、解析が可能であった47例のうち、ビフィズス菌属 (*Bifidobacteriaceae* spp.) が増加した症例は膣で5例、直腸で2例であり、乳酸菌属 (*Lactobacillaceae* spp.) が増加したのは膣で2例、直腸で1例であった。2例で腸内細菌科細菌群 (*Enterobacteriaceae*) が直腸で増加し、その2例では膣内の腸内細菌科細菌の量は不変であった。全体として一定の傾向は認めなかったが、子宮摘除歴のある症例では膣内、直腸内の細菌叢に変化は認めず、膣と直腸の細菌叢に相動性が高い結果となった。年齢、糖尿病歴、膀胱炎の既往歴、他の乳酸菌摂取に有意な相関は認めなかった。本成果は令和元年の日本化学療法学会西日本支部総会で報告した。

28名の登録患者のうち、21名が完遂した。投与中は21名中18名（86%）で有効性が認められた（投与前5回、投与中2回、 $P=0.00054$ ）。また、投与後1年間も膀胱炎罹患数が有意に減少していた（1回、 $P=0.00007$ ）（図1、参考文献より引用、改編）。膣内細菌叢の解析では、投与後に乳酸菌の割合が増加している症例が認められたが、全例に認められた傾向ではなかった。膀胱炎の原因菌は大腸菌が最も多く、膣内細菌叢にも同様の細菌が認められる傾向がみられた。本研究によって、乳酸菌膣坐剤の反復性膀胱炎予防効果が認められ、膣内細菌叢の改善効果も確認された。これにより、反復性膀胱炎の原因として、膣が最近のリザーバーとなっている可能性が裏付けられた。本成果は *International Journal of Urology* で報告した。



参考文献

Sadahira T, Wada K, Araki M, Mitsuhata R, Yamamoto M, Maruyama Y, Iwata T, Watanabe M, Watanabe T, Kariyama R, Nasu Y, Ishii A. Efficacy of *Lactobacillus* vaginal suppositories for the prevention of recurrent cystitis: A phase II clinical trial. *Int J Urol.* 2021 Oct;28(10):1026-1031.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 和田耕一郎 | 4. 巻 74 |
| 2. 論文標題 泌尿器科臨床における感染制御の実際 - カテーテル関連尿路感染症対策 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 臨床泌尿器科 | 6. 最初と最後の頁 1044-1047 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 和田耕一郎 | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 ESBL産生菌感染症 - 新薬タゾバクタム/セフトロザンの有用性と今後の治療展望 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 感染と抗菌薬 | 6. 最初と最後の頁 0-1 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 和田耕一郎、定平卓也、荒木元朗、渡邊豊彦、那須保友 | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 非淋菌性尿道炎に対する1日200 mg sitafloxacin 投与方法 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 日本化学療法学会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 181-185 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 定平卓也、和田耕一郎、三井将雄、石井垂矢乃、荒木元朗、渡部昌実、渡邊豊彦、那須保友 | 4. 巻 80 |
| 2. 論文標題 再発性尿路感染症に対するプロバイオティクスの有効性 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 西日本泌尿器科 | 6. 最初と最後の頁 505-509 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Satoko Matsuo, Koichiro Wada, Takuya Sadahira, Ritsuko Mitsuata, Masumi Yamamoto, Ayano Ishii, Reiko Kariyama, Toyohiko Watanabe, Yasutomo Nasu | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Impact of Lactobacillus probiotics on biofilm formed by Pseudomonas aeruginosa | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 European Urology | 6. 最初と最後の頁 e548 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S1569-9056(19)30403-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 岩破一博、和田耕一郎 | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 性感染症のパートナーへの対応：私はこうしている | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 日本性感染症学会誌 | 6. 最初と最後の頁 217 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Sadahira T, Wada K, Araki M, Mitsuata R, Yamamoto M, Maruyama Y, Iwata T, Watanabe M, Watanabe T, Kariyama R, Nasu Y, Ishii A. | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Efficacy of Lactobacillus vaginal suppositories for the prevention of recurrent cystitis: A phase II clinical trial. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Urology | 6. 最初と最後の頁 1026-1031 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14636. Epub 2021 Jul 13. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 5件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koichiro Wada, Takuya Sadahira, Motoo Araki, Takehiro Iwata, Ayano Ishii, Toyohiko Watanabe, Yasutomo Nasu |
| 2. 発表標題 Best Management for Antimicrobial Prophylaxis in Prostate Biopsy |
| 3. 学会等名 40th Congress of the Societe Internationale dUrologie (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koichiro Wada, Takuya Sadahira, Motoo Araki, Takehiro Iwata, Ayano Ishii, Toyohiko Watanabe, Yasutomo Nasu |
| 2. 発表標題 Best Management for UTI Caused by Quinolone-Resistant Pathogens |
| 3. 学会等名 40th Congress of the Societe Internationale dUrologie (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和田耕一郎 |
| 2. 発表標題 日本エイズ学会 / 日本性感染症学会合同シンポジウム 尿道炎の診断と治療 |
| 3. 学会等名 第34回日本エイズ学会学術集会・総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 和田耕一郎 |
| 2. 発表標題 性感染症の新たな展開 - クラミジア感染症の動向と対応 |
| 3. 学会等名 第85回日本泌尿器科学会東部総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 和田耕一郎, 定平卓也, 山本満寿美, 光畑律子, 石井垂矢乃, 狩山玲子, 渡邊豊彦, 那須保友 |
| 2. 発表標題 尿路性器感染症POCT 外来で求められる迅速検査 - 尿路感染症領域のPOCTと課題 |
| 3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和田耕一郎、定平卓也、石井亜矢乃、山本満寿美、三井将雄、狩山玲子、渡邊豊彦、那須保友 |
| 2. 発表標題 第67回乳酸菌タブレットの直腸および膣内細菌叢に及ぼす影響に関する検討 |
| 3. 学会等名 日本化学療法学会西日本支部総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 和田耕一郎、野口靖之 |
| 2. 発表標題 性感染症のパートナーへの対応 Part 2 |
| 3. 学会等名 日本性感染症学会 第32回学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和田耕一郎、定平卓也、山本満寿美、石井亜矢乃、渡邊豊彦、那須保友 |
| 2. 発表標題 タゾバクタム/セフトロザンの尿路感染症における有用性 |
| 3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和田耕一郎、山本満寿美、定平卓也、石井亜矢乃、渡邊豊彦、那須保友 |
| 2. 発表標題 当科における尿中ESBL産生大腸菌の分離状況と薬剤感受性 |
| 3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 和田耕一郎, 山本満寿美, 三井将雄, 定平卓也, 石井亜矢乃, 渡辺豊彦, 那須保友 |
| 2. 発表標題 当科におけるフロモキシセフの使用経験と臨床的位置づけ |
| 3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 和田耕一郎, 定平卓也, 山本満寿美, 光畑律子, 石井亜矢乃, 狩山玲子, 渡邊豊彦, 那須保友 |
| 2. 発表標題 尿路感染症における多剤耐性の現状 |
| 3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和田耕一郎, 定平卓也, 荒木元朗, 小林泰之, 石井亜矢乃, 渡邊豊彦, 藤田竜二, 竹中 皇, 那須良次, 津川昌也, 津島知靖, 那須保友, 公文裕巳 |
| 2. 発表標題 前立腺生検後の急性前立腺炎における原因微生物の遺伝子解析 |
| 3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石井亜矢乃, 和田耕一郎, 光畑律子, 山本満寿美, 定平卓也, 岩田健宏, 狩山玲子, 小林泰之, 荒木元朗, 渡辺豊彦, 那須保友 |
| 2. 発表標題 反復性膀胱炎に対する乳酸菌膾坐剤の再発予防効果に関する臨床的検討 |
| 3. 学会等名 第71回西日本泌尿器科学会総会(国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koichiro Wada, Takuya Sadahira, Motoo Araki, Takehiro Iwata, Ayano Ishii, Toyohiko Watanabe, Yasutomo Nasu |
| 2. 発表標題 Mycoplasma and non-chlamydia non-gonococcal urethritis |
| 3. 学会等名 AAUS (Asian Ass of UTI & STI) Symposium in UAA (Urological Association of Asia) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Satoko Matsuo, Koichiro Wada, Takuya Sadahira, Ritsuko Mitsuhashi, Masumi Yamamoto, Ayano Ishii, Reiko Kariyama, Toyohiko Watanabe, Yasutomo Nasu |
| 2. 発表標題 Impact of Lactobacillus probiotics on biofilm formed by Pseudomonas aeruginosa |
| 3. 学会等名 European Association of Urology 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 光畑律子、狩山玲子、山本満寿美、定平卓也、石井垂矢乃、和田耕一郎 |
| 2. 発表標題 緑膿菌尿路バイオフィーム感染症に対する乳酸菌プロバイオティクスに関する基礎的検討 |
| 3. 学会等名 第92回日本感染症学会総会・学術講演会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石井垂矢乃、山本満寿美、定平卓也、和田耕一郎、渡辺豊彦、狩山玲子、上原慎也、門田晃一、那須保友、公文裕巳 |
| 2. 発表標題 反復性膀胱炎に対する乳酸菌膾坐剤の再発抑制効果に関する臨床的検討 |
| 3. 学会等名 第66回日本化学療法学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--|---------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 石井 亜矢乃 (Ishii Ayano) (00423294) | 岡山大学・大学病院・准教授 (15301) | |
| 研究 分担者 | 定平 卓也 (Sadahira Takuya) (20733322) | 岡山大学・大学病院・助教 (15301) | |
| 研究 分担者 | 渡邊 豊彦 (Watanabe Toyohiko) (30432644) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|