

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08961

研究課題名（和文）消化管粘膜免疫が左右するバクテリアル・トランスロケーションと全身感染

研究課題名（英文）Bacterial translocation and systemic infection influenced by mucosal immunity of the gastrointestinal tract

研究代表者

松本 哲哉（Matsumoto, Tetsuya）

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：10256688

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：バクテリアル・トランスロケーション（BT）は腸管内の菌がリンパ行性あるいは血行性に腸管以外の部位に広がる現象であり、さらに菌血症や敗血症などの重症感染症に移行する可能性がある。本研究においては、菌側の要因に与えるプロバイオティクスの検討を行い同じ菌種でも感染予防効果には差があることが確認できた。宿主側に影響を及ぼす因子として、腸管に重要な栄養素であるグルタミンに着目して検討を行った結果、グルタミンの用量依存的にマウスの緑膿菌敗血症誘導後の生存率が上昇していることが明らかとなった。これらにより、BTを制御する因子としてプロバイオティクスや栄養素の可能性が示唆され、その特徴が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バクテリアル・トランスロケーションは免疫不全患者においては臨床的にも重視すべき現象であり、その有効な予防策を研究することは意義があると考えられる。今回得られた情報を基に、診療面で活用することによって抗がん剤治療や臓器移植後の患者などにおける重症感染症の予防に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Bacterial translocation (BT) is a phenomenon in which bacteria in the intestinal tract spread to sites outside the intestinal tract via the lymphatic or blood circulatory systems, and there is a possibility that this may progress to serious infectious diseases such as bacteremia and sepsis. In this study, we investigated the effects of probiotics on bacterial factors and confirmed that there are differences in the efficacy of preventing infection even for the same bacterial species. As a factor that affects the host, we focused on glutamine, an important nutrient for the intestinal tract, and as a result of our investigation, it became clear that the survival rate of mice after induction of sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* increased in a dose-dependent manner. These results suggest the possibility of probiotics and nutrients as factors that control BT, and their characteristics have become clear.

研究分野：細菌学、免疫学、感染症学

キーワード：バクテリアル・トランスロケーション 緑膿菌 菌血症 敗血症 プロバイオティクス 腸管免疫 グルタミン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

バクテリアル・トランスロケーション (BT) は腸管内の菌がリンパ行性あるいは血行性に腸管以外の部位に広がる現象である。BT が起こる要因はさまざまであり、宿主側の要因として、腸管上皮の障害、腸管の粘膜免疫の低下などが考えられる。さらに菌側の要因としては、細菌の異常増殖、各種病原因子の発現などが考えられる。

宿主側の要因として、腸管上皮の障害をもたらすものは栄養障害や炎症などが挙げられ、腸管の粘膜免疫の低下は悪性腫瘍や抗がん剤投与など宿主の免疫能を低下させるものが挙げられる。

BT の病態解明のために、これまでマウスの腸管由来敗血症モデルを用いて、宿主側および菌側の両面から各種解析を行い、BT に伴う菌血症、敗血症がどのような機序で起こるのかについて多角的に研究をすすめてきた。その結果、明らかになった点としては、BT を成立させるためには、まず腸管内における緑膿菌の異常増殖が必要であり、そのために抗菌薬の投与などによって常在菌を死滅させ、緑膿菌の増殖を容易にすることが BT のきっかけになると考えられた。緑膿菌以外の他の菌でも BT を起こすことはあるが、抗菌薬によっても死滅しないで増殖できるという条件を満たすためには、耐性を獲得していることが前提になると思われる。さらにどの緑膿菌の菌株でも BT を起こすわけではなく、BT を起こすには腸管上皮内に侵入し、さらに深部に到達できる能力を有することが必要と考えられた。そのため、緑膿菌の病原因子として、各種の菌体外酵素や毒素などを産生できる能力が BT を起こす重要な要因と考えられる。

宿主側の要因としては、通常、腸管から門脈を経由して肝臓に運ばれた菌は Kuppfer 細胞に捉えられ、貪食殺菌を受ける。ところが免疫不全状態で Kuppfer 細胞の機能が低下していると、その貪食殺菌がうまくいかず、さらに下大静脈から全身循環系に菌が運ばれると考えられる。また、リンパ行性に運ばれた菌はリンパ節に到達するが、これも免疫不全状態下ではそこで菌を処理することができず、血管系に到達すると考えられる。

BT から菌血症を起こした菌は、好中球やマクロファージを刺激して IL-1 や IL-6、および TNF などの炎症性サイトカインの産生を誘導し、その刺激によって過剰なサイトカイン産生が行われると、敗血症あるいは敗血症性ショックに陥ると考えられる。

このように BT およびそれから引き起こされる菌血症・敗血症については、各種の要因が絡んでいるため、その対策を立てる場合においても、単純に 1 つの手段だけで十分な成果が得られるとは限らない。そのため、BT に対する対策は多角的なアプローチが必要になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は BT を引き起こす各種要因の中で、菌側因子と宿主側因子の両方に着目し、そのコントロールによってどこまで BT のリスクを軽減し、菌血症や敗血症を予防できるかを研究することを目的としている。具体的には、菌側因子については、まず緑膿菌の増殖を抑制することを目的としてプロバイオティクスを用いた感染予防効果を検討する。ただし、プロバイオティクスといっても最近では各種の菌株が各用途を目的として用いられるようになってきており、実際に菌株間の差がどの程度生じるのかについて検討することが、プロバイオティクスの選定にも重要な役割を果たすと考えられる。

一方、宿主側因子としては、免疫機能の低下以外にも栄養不足が BT の要因になる可能性があ

り、immunonutrition という概念によって重要な栄養素が腸管の免疫機能にも影響することを確認するために、今回はグルタミンに着目してBTの抑制効果を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 緑膿菌の増殖抑制をもたらす乳酸菌株の検討

Bifidobacterium longum の各種菌株を液体培地を用いて試験管内で培養し、遠心後にその培養上清を採取する。緑膿菌を 10^8 CFU/ml となるように液体培地に接種し、さらに採取していた *Bifidobacterium longum* の各菌株の培養上清をそれぞれ加えた。その後、時間経過毎に一部、培養液を採取して、希釈後に寒天培地上に接種し、24 時間培養後、発育したコロニーをカウントして菌数を求めた。

(2) 腸管由来マウス緑膿菌敗血症モデルの作成

マウスにアンピシリンを投与して腸管内の常在菌を攪乱するとともに、経口的に緑膿菌 D4 株を接種して腸管内に定着させた。さらに、サイクロフォスファミドを投与してマウスを免疫不全状態とした。その後、マウスは腸管内から緑膿菌が BT を起こし、菌血症・敗血症を発症させ、マウスの生存率を確認した。

(3) グルタミンの投与によるマウス生存率の観察

上記のマウス実験系を用いて、グルタミン 200mg/kg 投与群、グルタミン 40mg/kg 投与群、グルタミン非投与コントロール群に 3 群 (各群 n=10) にグループを分けた。グルタミン投与群は連日 7 日間、1 回目のサイクロフォスファミド投与後から経口的にマウスに投与した。その後、敗血症誘導後に各グループのマウスの生存率を比較した。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌の増殖抑制をもたらす乳酸菌株の検討

プロバイオティクスの菌株と同じ菌種の菌株を 6 株用いて、緑膿菌の増殖に及ぼす影響を評価した。その結果、緑膿菌の増殖を抑制する菌株は 3 株みられたが、ほとんど影響を示さない菌株も 3 株確認された (図 1)。このように同じ菌種でも感染予防効果には差があることが確認できた。菌株間の差が出た要因としては、乳酸などの産生性に違いがあると考えられる。

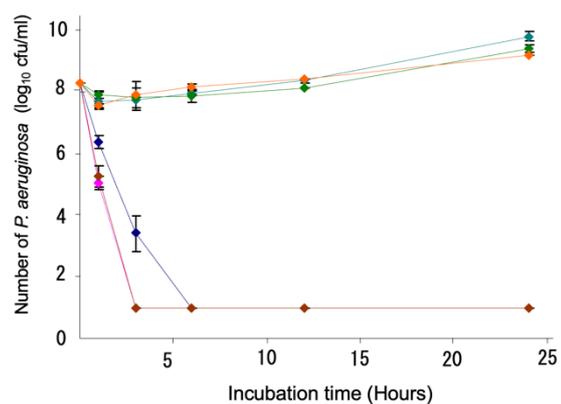


図 1. 緑膿菌の増殖に及ぼす *Bifidobacterium longum* 培養上清の影響 (菌株間の比較)

今回はまだ検討した各菌株の乳酸産生性などは比較できていないが、それと緑膿菌の増殖抑制が相関していれば、仮説を裏付ける有用な情報になると考えられる。

(2) 緑膿菌敗血症に与えるグルタミンの影響

宿主側に影響を及ぼす因子として、腸管にも重要な栄養源であり、腸管の免疫機能にも影響する栄養素としてグルタミンに着目して BT の抑制効果を検討した。その結果、グルタミン 200mg/kg 投与群のマウスの生存率はコントロール群に比べて有意に高い結果であった。ただし、グルタミン 40mg/kg 投与群はコントロール群との有意な差は認めなかった。このように、グルタミンの用量依存的にマウスの緑膿菌敗血症誘導後の生存率が上昇していることが明らかとなった。これにより、栄養素を適切な量で投与することによって腸管由来の敗血症を予防する効果が示唆された。

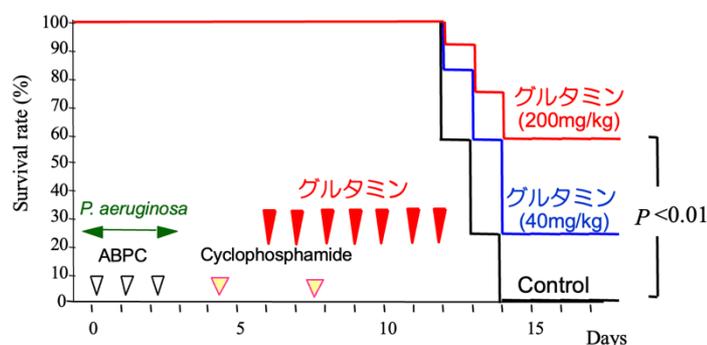


図2. グルタミンの経口投与による緑膿菌内因性敗血症の感染防御効果

グルタミンが敗血症の予防に有用であったことは興味深いデータであると考えられる。その機序としては、まずグルタミンが腸管上皮の萎縮を防ぐ効果があった可能性が考えられる。ただしこれを証明するためには腸管の病理所見を確認する必要があると、今後の検討が課題になると思われる。さらにグルタミンが免疫系に作用して抵抗性を高めた可能性も考えられる。敗血症を誘導した際には白血球減少が起こっている状態であるが、その減少の程度が抑えられた可能性や、残っている白血球の活性を高めた可能性が考えられる。これについても、さらに検討が必要と思われる。

(3) 今後の研究の方向性について

今回の研究の成果としては、プロバイオティクスに用いる菌株には有効性に差があるため、同じ菌種であっても菌株の選択は慎重に行う必要があることが示された。また、グルタミンの経口投与は腸管由来の敗血症の予防効果を示すことが明らかになった。ただし用量依存的な効果であったため、臨床に応用する場合には投与量を含めて有効性を示す条件設定を確認しなければならない。

試験管内および動物実験などによる基礎的研究成果が今後の臨床応用に生かせるように、引き続き研究を進展させていくことが必要と思われる。

<引用文献>

T Matsumoto, H Ishikawa, K Tateda, T Yaeshima, N Ishibashi, K Yamaguchi. Oral administration of Bifidobacterium longum prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. J Appl Microbiol. 104(3):672-80. 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計22件（うち査読付論文 22件／うち国際共著 12件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Matsumoto T, Mikamo H, Ohge H, Yanagihara K, Weerdenburg E, Go O, Spiessens B, van Geet G, van den Hoven T, Momose A, Hagiwara Y, Nakayama Y, Poolman J, Geurtsen J, Kaku M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Distribution of extraintestinal pathogenic Escherichia coli O-serotypes and antibiotic resistance in blood isolates collected from patients in a surveillance study in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 1445-1451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2022.07.001.	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 Khalifa HO, Oreiby A, Abd El-Hafeez AA, Abd El Latif A, Okanda T, Kato Y, Matsumoto T.	4. 巻 11
2. 論文標題 High β -Lactam and Quinolone Resistance of Enterobacteriaceae from the Respiratory Tract of Sheep and Goat with Respiratory Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 2258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani11082258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yang X, Haque A, Matsuzaki S, Matsumoto T, Nakamura S.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Efficacy of Phage Therapy in a Murine Model of Pseudomonas aeruginosa Pneumonia and Sepsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 682255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.682255	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 該当する
1. 著者名 Khalifa HO, Oreiby AF, Okanda T, Kato Y, Matsumoto T.	4. 巻 11
2. 論文標題 High β -lactam resistance in Gram-negative bacteria associated with kennel cough and cat flu in Egypt	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82061-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iafify M, Khalifa HO, Al-Ashmawy M, Elsherbini M, El Latif AA, Okanda T, Matsumoto T, Koseki S, Abdelkhalek A.	4. 巻 3
2. 論文標題 Prevalence and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing Escherichia coli in milk and dairy products in Egypt.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Environ Sci Health B.	6. 最初と最後の頁 265-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03601234.2019.1686312.	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本哲哉
2. 発表標題 腸内細菌研究の新たな知見と今後の展開
3. 学会等名 第26回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本哲哉
2. 発表標題 腸内細菌の新たな知見と臨床での活用法
3. 学会等名 第3回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 (招待講演)
4. 発表年 2023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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------