

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07508

研究課題名（和文）クロストリディオイデス・ディフィシル感染症の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment method for Clostridioides difficile infection

研究代表者

妹尾 充敏（Senoh, Mitsutoshi）

国立感染症研究所・細菌第二部・室長

研究者番号：20646624

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）：世界各国で医療関連感染として問題となっているClostridioides difficile感染症の治療法の1つである糞便移植療法を安全性の高い方法へ改善するため、糞便中に存在するC. difficileの増殖を抑制する因子を同定することを目的とし、精製を試みたが、部分精製の段階で他の菌株とは異なる性質を示した菌株が認められたことや糞便検体の由来が異なるとそれまでの精製プロトコルを適用できないことが認められたなど、研究を進めることが極めて困難になる問題が頻発し、原因究明に時間を要したことから、思わしい進捗ではなかったが、少なくとも因子同定に向けて、問題点を整理することができたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Clostridioides difficile感染症の治療法の1つである糞便移植療法は、効果は非常に高いが、現状の施術方法では、危険性やリスクを伴っていることから、本研究では、この治療法の安全性を高めるため、ドナーの糞便中から治療の鍵となる因子を同定することを目的とした。因子を同定することにより、糞便移植療法のデメリットである危険性やリスクを取り除いた新たな治療法に発展させようと試みたが、目的を達成することはできなかった。しかしながら、因子同定の問題点を整理し、今後の研究の地盤を固めることはできたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Clostridioides difficile infection (CDI) is a global health concern because of the high recurrence rate after standard antibiotic therapy. Fecal microbiota transplantation (FMT) is one of treatments for CDI with high effectiveness, however, it has risk to suffer diseases from donor or donor's feces under current methods. The objective of this study is development of FMT without such risks, that is, high safety methods. I tried to purify a factor which suppresses growth of C. difficile in containing donor's feces. To progress the research was very tough because of several reasons, such as, one of C. difficile strains used in this study showed different characteristics than the others, and some of purification methods were not applicable for fecal samples which were not used to examine the purification method. Percent complete was low for such reasons but at least important information for purification and identification of the factor were obtained.

研究分野：細菌学

キーワード：Clostridioides difficile 糞便移植療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

*Clostridioides difficile* は抗菌薬関連下痢症・腸炎を引き起こす主要な原因菌であり、医療施設内でアウトブレイクを起こすなど院内感染が世界的に問題となっている上、死亡例も稀ではないため、本菌の引き起こす感染症 (CDI) の対策は急務である。CDI の治療には抗菌薬が使用されるが、再発率が高いことや、それらの抗菌薬に対する低感受性株が出現したことから、新たな治療法が必要とされており、現在、糞便移植療法 (Fecal microbiota transplantation: FMT) が注目を集めている。FMT とは、ドナーの糞便を生理食塩水に懸濁し、フィルター等でろ過した物を内視鏡を用いて患者の腸管に注入する方法である (図 1)。つまり、ドナーの糞便中の繊維などの大きな固形物以外は全て患者の腸管に注入されることになり、その中には腸内細菌叢も含まれる。近年、腸内細菌叢については盛んに研究が行われており、アレルギー (Azad et al., Clin. Exp. Allergy, 2015, 45:632-43; Stefka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2014, 111:13145-50) や神経系疾患 (Sampson et al., Cell, 2016, 167:1469-80) など様々な疾患に大きな影響を与えていることや肥満と関連がある (Ridaura et al., Science, 2013, 341:1241214) ことも明らかになっているが、まだ研究の初期段階であるため、分かっていないことも数多く存在する。よって、現在の FMT は、ドナーの潜在的な疾患を引き継ぐ危険性がある上、未知なるリスクも伴うと言える。実際にアメリカでは、FMT 施術後の患者 2 名から基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌が検出され、1 名が死亡した例があり、後の調査でドナーの糞便からも ESBL 産生大腸菌が検出されたことから、アメリカ食品医薬局が FMT の施術に対し、注意喚起している (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/important-safety-alert-regarding-use-fecal-microbiota-transplantation-and-risk-serious-adverse>)。しかし、一方で、CDI の FMT による治癒率は非常に高いことが数多く報告されている (Ooijevaar et al., Clin. Microbiol. Infect., 2018, 24:452-62; Cammarota et al., Gut, 2017, 66:569-80) ことから、有効性については証明されている。以上のことから、ドナーの糞便中の何が治療の鍵となっているのかを解明し、治療へ応用することにより、FMT の危険性やリスクを排除できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、CDI に対する FMT において、治療の鍵となっている因子を探索・同定し、その機能を解明することを目的とした。現状では、ドナーの糞便懸濁液を全て患者の腸管に注入しているが、これはドナーの糞便懸濁液中のどのような成分が CDI の治療に効果があるのか分かっていないためである。CDI の FMT について研究を行っている他の研究者の多くは、ドナーの腸内細菌叢の組み合わせが治療に重要であると考えており、その組み合わせを 16S rRNA 解析を行うことで明らかにしようと試みている。しかし、菌ではなく、治療の鍵となる因子が糞便中にあると想定し、予備実験を行うと、ドナーの糞便懸濁液をフィルター滅菌した液体中に、*C. difficile* の増殖を抑制する因子が含まれていることが明らかになった。この因子を同定することで、CDI の治療が大きく変わることが期待される。まず、腸管へ本因子を注入するだけで効果があるため、アメリカで起こった FMT 施術後の死亡例のような腸内細菌叢を移植することによる危険性や糞便移植による未知なるリスクを回避できる。さらに、現在 CDI の治療に広く使用されているメトロニダゾール、バンコマイシン、フィダキソマイシンは全て抗菌薬であるため、耐性株の出現が問題となるが、本因子は抗菌薬ではないため、耐性菌問題も解決できる。しかも、本因子はもともと生体内に存在するため、副作用の懸念もなくなる。これらに加え、本因子が菌に対してどのように作用しているかを解明することができれば、科学的根拠に基づいた治療法に発展させることも可能となる。このように、本研究により、治療の鍵となる因子を同定すれば、CDI の治療法の改善に大きく寄与できると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用菌株

本研究では、全て臨床検体より分離された *C. difficile* 菌株を用いた。*C. difficile* strain JND12-008 (PCR ribotype: RT001)、JND12-136 (RT002)、JND13-016 (RT014)、JND13-022 (RT018)、JND12-139 (RT017)、JND13-028 (RT369)、JND13-017 (RT027)、JND13-119 (RT078)、VPI 10463 (RT087) の計 9 株を使用した。

#### (2) 因子の精製

糞便検体を等量の PBS に懸濁した後、10,000  $\times g$ , 4℃ で 15 分間遠心し、上清を孔径 0.2  $\mu m$  フィルターに通した後、塩析および透析を行ったものを糞便上清サンプルとして実験に使用した。液体クロマトグラフィーシステムは AKTA go (Cytiva 社) を使用した。陰イオン交換クロマトグラフィーでは、カラムは RESOURCE Q (Cytiva 社)、平衡化緩衝液は 20 mM Phosphate buffer (pH 7.0)、溶出緩衝液は 1 M NaCl 20 mM Phosphate buffer (pH 7.0) を使用した。ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーでは、カラムは CHT2-1 (Biorad 社)、平衡化緩衝液は 10 mM Phosphate buffer (pH 6.8)、溶出緩衝液は 500 mM Phosphate buffer (pH 6.8) を使用した。ゲ

ル濾過クロマトグラフィーでは、カラムは Superdex 200 Increase10/300 GL (Cytiva 社) 平衡化および溶出緩衝液は 150 mM NaCl 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0) を使用した。疎水性相互作用クロマトグラフィーでは、カラムは HiScreen Phenyl HP (Cytiva 社) 平衡化緩衝液は 0.64 M Ammonium sulfate 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0)、溶出緩衝液は 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0) を使用した。

### (3) 菌増殖阻害の確認

糞便上清サンプルやクロマトグラフィー後の各フラクションが *C. difficile* 増殖阻害活性を有するかを調べるため、得られたフラクションをフィルター滅菌した後、等量の *C. difficile* 菌液 ( $OD_{600}=0.5$ ) と混合し、室温で 1 時間静置した後、変法 GAM 寒天培地に播種し、嫌氣的条件下で 37、48 時間培養した後、コロニー数を計数することで菌の増殖の有無を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 陰イオン交換クロマトグラフィー

糞便上清サンプルについて、RESOURCE Q を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、各溶出フラクションについて、活性測定を行った。pH 7.0 の条件下では図 1 の溶出パターンが得られ、フロースルーフラクションおよび A5 フラクションに活性が認められたが、いずれも活性はわずかであり、また、由来の異なる糞便検体では再現性が認められなかった。pH 8.5 の条件下でも同様の実験を行ったが、良好な結果は得られなかった。

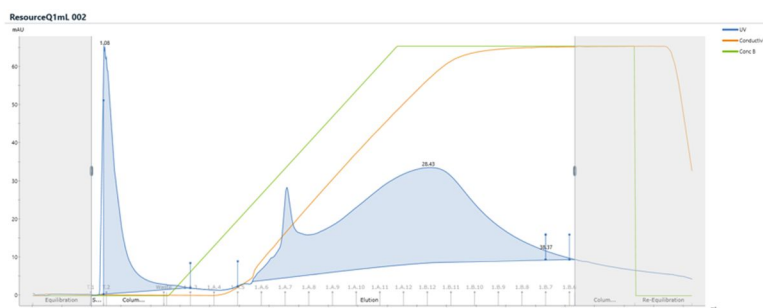


図 1. 陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターン。サンプル：糞便上清サンプル、カラム：RESOURCE Q、平衡化バッファー：20 mM Phosphate buffer (pH 7.0)、溶出バッファー：1 M NaCl 20 mM Phosphate buffer (pH 7.0)

### (2) ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

糞便上清サンプルについて、CHT2-1 を用いたハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行い、各溶出フラクションについて、活性測定を行った。溶出パターンとして図 2 が得られ、活性はフロースルーフラクションに認められた。再現性は良好であった。

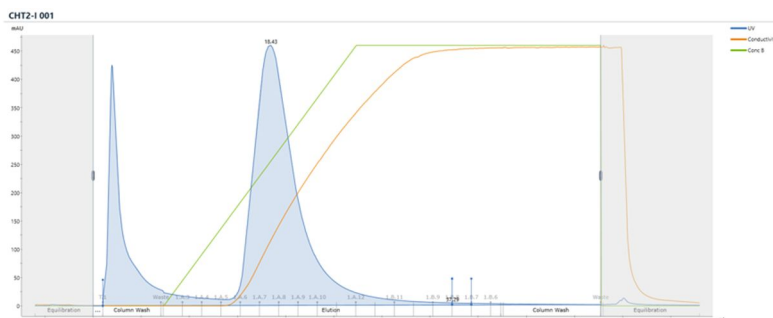


図 2. ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーの溶出パターン。サンプル：糞便上清サンプル、カラム：CHT2-1、平衡化バッファー：10 mM Phosphate buffer (pH 6.8)、溶出バッファー：500 mM Phosphate buffer (pH 6.8)

### (3) ゲル濾過クロマトグラフィー

糞便上清サンプルについて、Superdex 200 Increase10/300 GL を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行い、各溶出フラクションについて、活性測定を行った。溶出パターンとして図 3 が得られ、活性は A12 フラクションに認められた。再現性は良好であった。

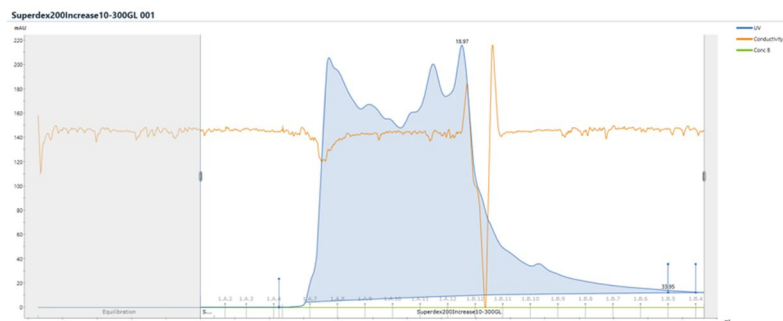


図 3. ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出パターン。サンプル：糞便上清サンプル、カラム：Superdex 200 Increase10/300 GL、平衡化および溶出バッファー：150 mM NaCl 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0)

#### (4) 疎水性相互作用クロマトグラフィー

糞便上清サンプルについて、HiScreen Phenyl HP を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーを行い、各溶出フラクションについて、活性測定を行った。溶出パターンとして図 4 が得られ、活性はクロマトグラフィー後の洗浄フラクションに認められた。しかしながら、同一サンプルを用いた場合でも再現性に乏しく、由来の異なる糞便検体では再現性が認められなかった。

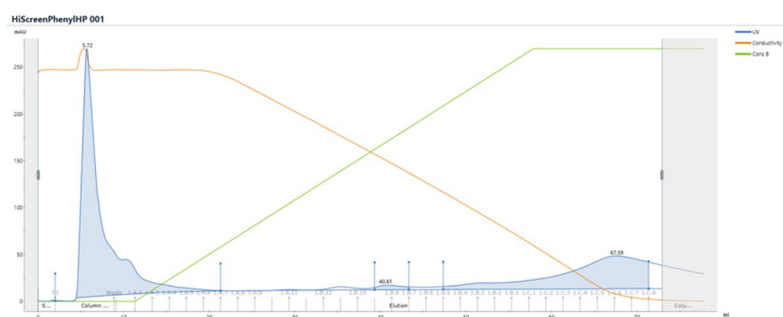


図 4. 疎水性相互作用クロマトグラフィーの溶出パターン。サンプル：糞便上清サンプル、カラム：HiScreen Phenyl HP、平衡化バッファー：0.64 M Ammonium sulfate 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0)、溶出バッファー：50 mM Phosphate buffer (pH 7.0)

本研究では、糞便上清サンプルから *C. difficile* の増殖を抑制する因子を精製し、同定することを目的に研究を進めたが、以上の結果のように精製ステップとして確定できた条件とさらに検討が必要なステップがあることが示された。部分精製の段階で他の菌株とは異なる性質を示した菌株が認められたことや糞便検体の由来が異なるとそれまでの精製プロトコルを適用できないことが認められたなど、研究を進めることが極めて困難になる問題が頻発し、原因究明に時間を要したことで、計画通りに研究を進められなかったため、思わしい進捗ではなかったが、少なくとも因子同定に向けて、問題点を整理することができたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------