

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10036

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌制御における腸内細菌フローラに関する探索研究

研究課題名(英文) Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection

研究代表者

國島 広之(Kunishima, Hiroyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：60339843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：現在、医療施設においては様々な感染対策を行っているものの、MRSAや、ESBLs産生菌やClostridium difficile、近年ではカルバペナーゼ産生腸内細菌も検出されつつある。腸管のマイクロバイオームは薬剤耐性の保菌を考慮する上で重要である。これらは腸管内で保菌し得るものの、通常の微生物検査での培養や、除菌は困難である。

近年のゲノム解析技術を用いた研究の進歩に伴い、ヒトMicrobiotaが健康および病原菌も含めた健康寿命と密接に関連していることが明らかになりつつある。本研究では、腸内細菌における薬剤耐性菌制御をゲノムレベルで探索し、病原微生物の抑制効果などについて評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の薬剤耐性菌に関する研究では、臨床分離株の耐性遺伝子を探索することや、感染制御においては手指衛生など交差感染対策の遵守が強調されて行われてきたものの、依然として薬剤耐性菌の発生と伝播がみられ、我々ヒトが感染症についてコントロールしているとは言い難い。プロバイオティクス製剤と薬剤耐性菌に関して我が国における知見はなく、本研究課題に着目した研究は世界的にもない。本検討は我が国が薬剤耐性菌分野において強固な知的基盤を有するとともに、世界に先立ち薬剤耐性菌対策に関して、大きく寄与することも期待される。

研究成果の概要(英文)：Currently, various infection control measures are being taken at healthcare settings. However, MRSA, ESBLs, Clostridioides difficile, and carbapenemase-producing enterobacteria (CRE) have been observed.

The gut microbiome is critical in providing resistance against colonization by exogenous microorganisms. These are microorganisms that can carry bacteria in the intestinal tract, and it is difficult to evaluate and eradicate them by conventional bacterial culture. It is becoming clear that the human Microbiome is closely associated with healthy life expectancy by genome analysis. In this study, we searched for drug-resistant bacterial control in gut microbiota at the genomic level and evaluated its inhibitory effect on pathogenic microorganisms.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Microbiota 薬剤耐性 プロバイオティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

市中ならびに病院、高齢者施設では様々な薬剤耐性菌が検出されている。近年では、ヒトだけではなく、伴侶動物や環境からも薬剤耐性菌がみられ、One Health の概念のもと、抗菌薬適正使用の推進が行われている。一方、多くの検出される薬剤耐性菌については、保菌しうる微生物であることから、いまだその実態は明らかではなく、伝播対策や抗菌薬適正使用以外のアプローチもないのが現状である。薬剤耐性の主たる保菌部位である腸管の microbiota ならびにその制御について探索することが求められている。

2. 研究の目的

現在、医療施設においては様々な感染対策を行っているものの、MRSA のほか、基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌 (ESBLs) や *Clostridium difficile*、近年ではカルバペネマーゼ産生腸内細菌 (CRE) など様々な薬剤耐性菌が検出されている。これらは腸管内で保菌し得る微生物であり、通常の微生物検査では現状を評価することは困難である。従来、MRSA に対しては術前の mupirocin やクロールヘキシジン含有のシャワー・入浴による除菌や、MRSA 感染症の低減効果が報告されている。しかしながら、ESBLs は MRSA のような有効な除菌方法は確立されておらず、治療に際してもカルバペネム薬のような広域抗菌薬となるなど選択肢が極めて限られ、近年では海外で増加している CRE などの我が国における検出例やアウトブレイク事例も報告されている。近年、新規抗菌薬の開発が困難になるなか (Clin Infect Dis. 2011 May; 52 Suppl 5: S397-428)、多様なアプローチで耐性菌制御を行うことが求められており、表皮ブドウ球菌による黄色ブドウ球菌の抑制 (Nature. 2010 20; 465(7296): 346-9.)、非トキシン産生性 *C. difficile* によるトキシン産生株の抑制 (Antimicrob Agents Chemother. 2013 57(11): 5266-70.)、腸球菌によるカンジダ抑制 (Infect Immun. 2013 81(1): 189-200.) や、プロバイオティクス製剤によるカンジダ抑制 (Crit Care Med. 2013 41(2): 565-72.) など、様々な微生物により、病原微生物を阻害する研究が進んでいる。現在、生物学的研究の発展に伴い、マイクロバイーム (Microbiome) に関する研究が急速に進歩しつつあり、高齢者はその生活環境から腸管内フローラが変化することが知られており、近年では脳腸相関に関する検討も広く行われているとともに、ヒトが共存する様々な微生物についてメタゲノム解析が実施されている。これらの知見により、様々な新型薬剤耐性菌が発生するなか、既存の抗菌化学療法および感染症対策では限界となっており、新たなアプローチが必要となることから、ヒトフローラの解析および薬剤耐性菌制御に対する検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

T-RFLP 分析および次世代シーケンサーによる細菌叢解析を行い要因分析を行った。qPCR 法により、アミノグリコシド耐性遺伝子 (aac6'-aph2')、メチシリン耐性遺伝子 (mecA)、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (blaSHV、blaTEM、blaCTX-M)、カルバペネマーゼ (blaIMP-1)、キノロン耐性遺伝子 (qnrB、qnrS)、バンコマイシン耐性遺伝子 (vanA、vanB)、バンコマイシン耐性遺伝子、マクロライド耐性遺伝子 (ermB) 等を評価し、プロバイオティクス製剤による薬剤耐性菌の制御の可能性についても検討した。

4. 研究成果

腸内細菌を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。OTU 構成比 (属レベル) とクラスター解析では 6 パターンに分類された。属レベルの腸内細菌叢組成は 6 つのクラスター (クラスター A-F) に分類され、最優勢な菌叢は、クラスター A-F のそれぞれにおいて *Lactobacillus* spp.、*Bifidobacterium* spp.、*Streptococcus* spp.、*Bacteroides* spp.、*Blautia*、*Ruminococcaceae* であった。クラスター A は *Lactobacillus* spp. が 30.1% と最も多く、次いで *Blautia* が 9.5%、*Streptococcus* 7.6%、*Ruminococcaceae* 6.8%、*Bacteroides* 6.8% であった。クラスター B は *Bifidobacterium* 30.1% と最も多く、次いで *Ruminococcaceae* が 9.4%、*Bacteroides* 7.9%、*Blautia* 6.8%、*Clostridiales* 5.3% であり、乳酸菌産生株が多くみられた。クラスター C は *Streptococcus* が 28.5% と最も多く、次いで *Clostridiales* 8.2%、*Ruminococcaceae* 7.3%、*Lachnospiraceae* 6.6%、*Bacteroides* 4.8% であった。クラスター D は *Bacteroides* が 19.2% と最も多く、次いで *Enterobacteriaceae* 16.5%、*Ruminococcaceae* 6.3%、*Clostridium* 5.7%、*Blautia* 4.8% であった。クラスター E は *Blautia* が 21.5% と最も多く、次いで *Clostridiales* 11.2%、*Ruminococcaceae* 9.3%、*Ruminococcus* 7.1%、*Lachnospiraceae* 6.8% であった。クラスター F は *Ruminococcaceae* が

10.9%と最も多く、次いで *Blautia* 7.7%、*Bacteroides* 6.6%、*Ruminococcus* 6.1%、*Clostridiales* 5.7%であった。菌の種類と量で類似性を評価したところ、いずれも類似性は認められなかった。経時的な変化を検討したところ、期間とともに変化がみられた。

qPCR 法により、アミノグリコシド耐性遺伝子(*aac6'*-*aph2'*)は 21/70 (30.0%)、メチシリン耐性遺伝子(*mecA*: 21/70 (30.0%))、基質特異性拡張型-ラクタマーゼ(*blaSHV*:3/70 (4.3%)、*blaTEM*: 24/70 (34.0%)、*blaCTX-M*:2/70 (2.8%))、カルバペネマーゼ(*blaIMP-1*:3/70 (4.3%))、キノロン耐性遺伝子(*qnrB*: 2/70 (2.8%)、*qnrS*: 0/70 (0%))、バンコマイシン耐性遺伝子(*vanA*: 0/70 (0%)、*vanB*: 3/70 (4.3%))を評価した。*Pseudomonas aeruginosa*では、主要な薬剤耐性関連遺伝子として *bla_{oxa}-2*、*blaGES-5* 及び *blaGES-9* を保有しており、高度、低度及び非 BF 形成株であった(Abs 550nm=2.95±0.68、0.43±0.02 及び 0.02±0.01)。また、IV 型線毛の伸長収縮による運動性は Pa1 にのみ認められた。*psI* 遺伝子群は Pa1 及び Pa5 のみが保有していた。さらに *pil* 遺伝子群は 3 株に共通して認められたが、一部の遺伝子(*pilM*、*pilT* 及び *pilV*)において、アミノ酸配列は Pa1 のみ異なる相同性を示したことから、線毛構造の違いが BF 形成能の程度に関与している可能性が示唆された。

ESBLs および CRE について、プロバイオティクス・腸内細菌の培養上清との、発育、 β -ラクタマーゼ活性に係る影響および、*blaCTX-M* 発現量ならびに、 β -ラクタマーゼの伝達頻度を検討したところ、ESBL 産生菌の発育抑制・ β -ラクタマーゼ活性抑制が CRE を含め認められ、*C. butyricum* は、ESBLs の *blaCTX-M* 発現の抑制がみられた。*C. butyricum*、*C. difficile*、*E. faecium* は、ESBLs および CRE の薬剤耐性の伝達頻度の抑制がみられた。

従来の高齢者に関する薬剤耐性菌の検出状況は、大腸菌などの腸内細菌科細菌における基質拡張型 β -ラクタマーゼ産成菌(ESBLs)やキノロン系薬に対する耐性菌が多くみられ、One Health の観点からも家畜・伴侶動物においても同様の傾向とされている。一方、本研究においては、ESBLs やキノロン耐性は比較的少なく、それ以外の *vanB*、*blaTEM*、*mecA* などの耐性遺伝子が検出された。これらの結果から、ヒト腸管内のマイクロバイオータならびにマイクロバイオームにおいて、従来と異なる薬剤耐性がみられることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kunishima Hiroyuki, Ishibashi Noriomi, Wada Kaoruko, Oka Kentaro, Takahashi Motomichi, Yamasaki Yukitaka, Aoyagi Tetsuji, Takemura Hiromu, Kitagawa Miho, Kaku Mitsuo	4. 巻 25
2. 論文標題 The effect of gut microbiota and probiotic organisms on the properties of extended spectrum beta-lactamase producing and carbapenem resistant Enterobacteriaceae including growth, beta-lactamase activity and gene transmissibility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 894 ~ 900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.04.021	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 -

1. 著者名 山崎行敬、國島広之、廣瀬雅宜、和田薫子、青柳哲史、遠藤史郎、岡健太郎、高橋志達、賀来満夫	4. 巻 20
2. 論文標題 介護老人施設における腸内細菌叢と抗菌薬耐性遺伝子の保有率に関する検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床腸内微生物学会誌	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yamasaki Yukitaka, Kudo Hayami, Oka Kentaro, Takahashi Motomichi, Kunishima Hiroyuki.
2. 発表標題 Biofilm formation abilities, whole genomic and phenotypic characteristics of clinical multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates in Japan.
3. 学会等名 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Kunishima, Y. Yamasaki, K. Wada, M. Hirose, K. Oshima, T. Aoyagi, S. Endo, K. Oka, M. Takahashi, H. Takemura, M. Kaku.
2. 発表標題 Analysis Of The Relationship Between Gut Microbiota And Prevalence Of Antimicrobial Drug Resistance Gene, And The Possibility Of Resistance Gene Acquisition In Elderly Nursing Home Residents
3. 学会等名 ASM microbe 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 國島広之
2. 発表標題 地域社会の中における拡散への対応
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会 環境感染学会合同シンポジウム2 薬剤耐性グラム陰性菌拡散のピットフォール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國島広之
2. 発表標題 AMR(薬剤耐性)に関する最近の話題
3. 学会等名 第42回日本骨・関節感染症学会 第309回ICD講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國島広之
2. 発表標題 2020年を踏まえた腸内細菌感染症
3. 学会等名 第22回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会 教育講演3
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國島広之
2. 発表標題 感染症診療におけるプロバイオティクス
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会総会 スポンサーシップシンポジウム Microbiota
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 國島広之	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社じほう	5. 総ページ数 5
3. 書名 月間薬事「プロバイオティクス製剤の使い方」	

〔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	大岡 正道 (Ooka Seido) (30367370)	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授 (32713)	
研究分担者	遠藤 史郎 (Endo Shiro) (40614491)	東北医科薬科大学・医学部・准教授 (31305)	
研究分担者	竹村 弘 (Takemura Hiromu) (80301597)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	

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