

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K08843
研究課題名（和文）ESBL産生菌の腸内定着に寄与するマイクロバイオームの解明と新規制御法への展開

研究課題名（英文）The analysis of microbiota for intestinal colonization of ESBL-producing bacteria

研究代表者
柳原 克紀（Yanagihara, Katsunori）
長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・教授

研究者番号：40315239
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）：マウスを抗菌薬で前処理すると、細菌叢の乱れである「ディスバイオーシス」が誘導され、ESBL産生菌の臨床分離株が定着する。腸内容物を抗菌薬を含む選択培地で培養し、細菌種の同定と定量を行った。定着群および対象群から糞便サンプルを採取し、構成細菌種の同定と菌種組成の解析を行った。抗菌薬による腸内細菌叢のディスバイオーシス誘導が薬剤耐性菌（ESBL-E.coli）の定着に影響することが示された。また、腸内細菌叢の一部の構成細菌群がESBL-E.coliのコロニー形成抵抗性に関与していることが示唆された。これらの結果は、マイクロバイオームが耐性菌の定着を抑止する有用なツールになり得ることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌や肺炎桿菌などの腸内細菌科細菌は、近年増加傾向にあり、通常の感染対策では効果が乏しい。腸内に定着するこれらの菌をコントロールすることは難しい。本研究では、マイクロバイオームを活用した耐性菌の定着抑止が可能であることを明らかになった。これは、薬剤耐性腸内細菌科細菌の新しい制御法につながるものである。AMR（薬剤耐性菌）は世界的に問題になっており、解決すべき課題である。本研究結果が対策の一助になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Pretreatment of the mouse intestinal environment with antimicrobials induces “dysbiosis”, a disturbance of the bacterial flora, and the establishment of clinical isolates of ESBL-producing bacteria. Intestinal contents are cultured on selective media containing antimicrobials for identification and quantification of bacterial species. Fecal samples from the settled and target groups were collected for identification of the constituent bacterial species and analysis of species composition. It was shown that induction of dysbiosis of the intestinal microflora with antimicrobial agents affects the establishment of drug-resistant bacteria (ESBL-E. coli). It was suggested that some constituent bacterial groups of the gut microbiota are involved in the resistance of ESBL-E.coli to colonization. These results indicate that the microbiome can be a useful tool for deterring the establishment of resistant bacteria.

研究分野：感染症学

キーワード：ディスバイオーシス 腸内細菌科細菌 マイクロバイオーム

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌は公衆衛生上最も重要な課題の一つである。従来から大きな問題であったメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や薬剤耐性緑膿菌などは、多くの研究成果に基づく適切な対策が進められたため、わが国では減少傾向にある。一方、腸内細菌科細菌の多剤耐性や高度耐性化が深刻になってきた。特に ESBL 産生腸内細菌は、2000 年以降急速に増加し、大腸菌の 20 - 30%、肺炎桿菌の 10% 以上を ESBL 産生菌が占めるようになった。(図 1)

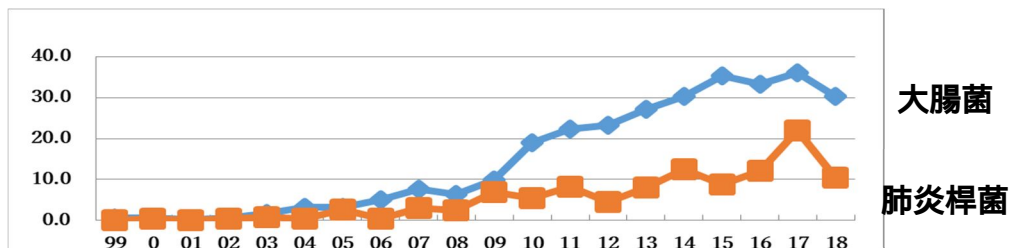


図 1 長崎大学病院における ESBL 産生菌の年次推移 (%)

ESBL とは基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended-spectrum β -lactamase) の略称で、ペニシリンなどの β -ラクタム環を持つ抗生物質を分解する酵素である。この ESBL は、大腸菌や肺炎桿菌が保有する伝達性プラスミド (R プラスミド) 上にコードされている β -ラクタマーゼ産生遺伝子が、突然変異により分解可能な薬剤の種類を広げ、第三世代のセフェム系をも分解する β -ラクタマーゼを産生するようになったものである。ESBL 産生菌は多くの β -ラクタム薬に耐性を示し、感染対策において重要な薬剤耐性菌である。

本菌の制御が難しい理由として、常在細菌の一種であるため、腸管内に定着するとその排除は困難であることが指摘されている。定着に寄与する腸内細菌叢が明らかになれば、腸内環境を変化させることで制御することが可能になる。抗菌薬で選択的に除去することは困難であるため、腸内細菌叢 (マイクロバイオーーム) を活用した耐性菌の定着抑止が新しい方法として期待される。

腸内細菌叢は宿主の代謝機能や免疫系の発達・維持に重要な役割を果たしているが、病原微生物の定着・侵入を阻止する作用 (colonization resistant: CR) も有している。CR は古くは 1950 年頃から知られていたが、詳細な機序に関しては不明であった。次世代シーケンズの普及に伴い、マイクロバイオーームの解析が進み、少しずつ解明されてきた。乳幼児の腸内細菌が、Clostridiales 属群の増殖を促進することで腸管病原細菌を抑え込んでいることが明らかにされた (Kim YG, Science. 2017)。また、腸内細菌叢に存在する Clostridioides 属が、代表的な耐性グラム陽性球菌であるバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の定着を抑制していることも報告されている (Kim SG et al. Science 2019)。腸内細菌叢による病原微生物の定着抵抗性は、ESBL 産生菌に対しても応用できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、【1】 ESBL産生腸内細菌が感染した患者の疫学的解析を行う、【2】臨床分離菌をマウスモデルに定着させ、検証実験を行う、【3】腸内環境を変化させることで定着を抑制できるかを明らかにする、を目的とする。(図2)

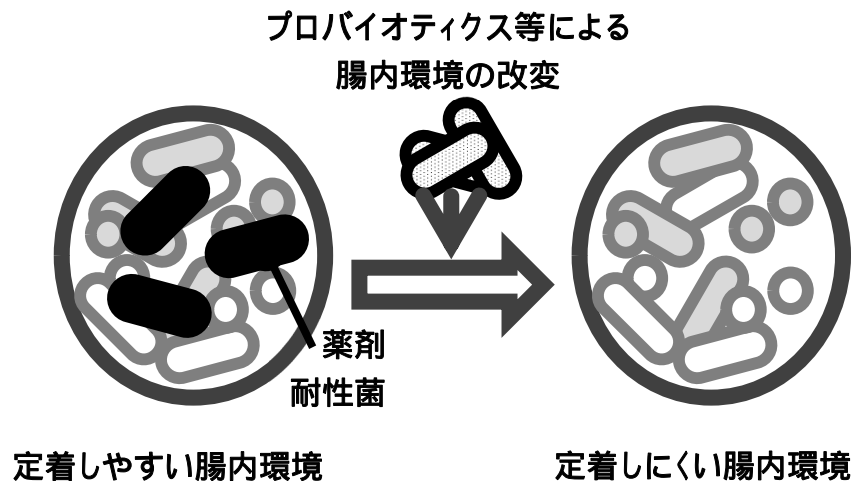


図2 腸内環境整備による薬剤耐性菌の排除

3. 研究の方法

ESBL産生菌の代表的な菌種である肺炎桿菌が血液培養から分離された患者を対象にして、臨床的背景、薬剤感受性ならびに分子疫学的解析を実施した。

マウスの腸内環境を抗菌薬(バンコマイシン、ゲンタマイシン、コリスチン等)で前処理することで細菌叢が攪乱した“dysbiosis”(腸内細菌叢を構成する細菌種や細菌数が減少することにより、細菌叢の多様性が低下した状態)を誘導し、臨床分離ESBL産生菌を定着させる。抗菌薬を含む選択培地を用いて、腸管内容物を培養し、菌種の同定と定量を行う。投与した菌と同一菌種である場合は、プラスミドの伝播かどうかの判断ができないため repetitive-sequence-based PCR法による同一性解析を実施する。Co-housingを行い、定着群と対象群の糞便を採取し、OTU(operational taxonomic unit)などにより構成細菌種の特定や菌種組成の解析を行った。

4. 研究成果

ESBL産生菌の代表的な菌種である肺炎桿菌の病態を解析するために分子疫学的解析を実施した。本研究では血液培養から分離された肺炎桿菌を対象にした。高病原性肺炎桿菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKp)のマーカである *rmpA* の検出や荚膜血清型の決定、MLSTによる菌のタイピングを行った。対象となった268株のうち *rmpA*陽性株は36株(13.4%)であった。*rmpA*陽性株では陰性株と比較して、他の病原因子の保有率や、血清型K1、K2である割合が有意に高い結果となった。MLSTでは *rmpA*陽性36株のうちST23/K1が最も多く、次いでST86/K2であった。一方、ST412、ST268を多く認めた。臨床像では *rmpA*陽性群において肝膿瘍を生じた症例が22.2%(陰性群7.4%)と有意に多く、抗癌剤の投与歴は8.3%(陰性群26.9%)と有意に少なく、侵入門戸が胆道系感染症である割合は8.3%(陰性群27.8%)と有意に低い結果となった。併存症、既往歴、重症度、死亡率では有意差を認めなかった。肺炎桿

菌の分子疫学的特徴および血流感染症の臨床像が明らかになった。(Kikuchi S, Yanagihara K, et al, Sci. Rep. 2023)

マウスモデルを用いた実験では、腸内環境を抗菌薬で前処理することで細菌叢が攪乱した“dysbiosis”（腸内細菌叢を構成する細菌種や細菌数が減少することにより、細菌叢の多様性が低下した状態）を誘導し、臨床分離ESBL産生菌を定着させる。マイクロバイオームの構成変化がESBL-E.coliのクリアランスにも影響を与える。腸内細菌叢の一部の構成細菌群がESBL-E.coliの定着抵抗性に関与していることが示唆された。これらの結果はマイクロバイオームを活用した耐性菌の定着抑止が有用であることを示した。これからは、マイクロバイオームを活用した予防戦略が必要になるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kikuchi Shota, Kosai Kosuke, Ota Kenji, Mitsumoto-Kaseida Fujiko, Sakamoto Kei, Hasegawa Hiroo, Izumikawa Koichi, Mukae Hiroshi, Yanagihara Katsunori	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infection caused by <i>Klebsiella pneumoniae</i> harboring <i>rmpA</i> in Japanese adults	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-33265-1	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 Kondo Tsubasa, Sakamoto Kei, Morinaga Yoshitomo, Miyata Yasuyoshi, Yanagihara Katsunori, Sakai Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 <i>Escherichia coli</i> ST131 isolated from urological patients can acquire plasmid mediated extended spectrum lactamase from other bacteria with high frequency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	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） 10.1111/iju.14845	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 Kosai Kosuke, Yamagishi Yuka, Mikamo Hiroshige, Ishii Yoshikazu, Tateda Kazuhiro, Yanagihara Katsunori	4. 巻 29
2. 論文標題 Epidemiological analysis and antimicrobial susceptibility profile of Gram-negative bacilli that cause bacteremia in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1091 ~ 1096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2023.08.012	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 Kawata Soichiro, Morimoto Shimpei, Kosai Kosuke, Kawamoto Yasuhide, Nakashima Yumiko, Morinaga Yoshitomo, Yanagihara Katsunori, Yoshida Lay-Myint, Moriuchi Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 The fecal carriage rate of extended-spectrum -lactamase producing or carbapenem-resistant Enterobacterales among Japanese infants in the community at the 4-month health examination in a rural city	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1168451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2023.1168451	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 Kawamoto Yasuhide, Kaku Norihito, Akamatsu Norihiko, Sakamoto Kei, Kosai Kosuke, Morinaga Yoshitomo, Ohmagari Norio, Izumikawa Koichi, Yamamoto Yoshihiro, Mikamo Hiroshige, Kaku Mitsuo, Oishi Kazunori, Yanagihara Katsunori	4. 巻 59
2. 論文標題 The surveillance of colistin resistance and mobilized colistin resistance genes in multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Antimicrobial Agents	6. 最初と最後の頁 106480 ~ 106480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijantimicag.2021.106480	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村田美香、森永芳智、柳原克紀
2. 発表標題 薬剤耐性菌感染症のリスク低下に向けた新しい制御法の確立
3. 学会等名 第69回 日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳原克紀
2. 発表標題 感染症検査の現状と展望 With/after コロナ時代の役割を考える
3. 学会等名 第70回 日本臨床検査医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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