

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02729

研究課題名(和文) 腸管感染型ボツリヌス症を制御する腸内因子のin vivoを中心とした解析

研究課題名(英文) In vivo analysis of gut microbiota which prevents the intestinal botulism

研究代表者

藤永 由佳子 (Fujinaga, Yukako)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60252954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳児ボツリヌス症は、生後1歳未満の乳児がボツリヌス菌の芽胞を経口摂取し、腸管内で発芽増殖、毒素を産生することで発症する。一方で、健常成人は本菌に感染耐性である。腸内細菌叢が本菌の感染感受性に関与すると考えられているが、詳細な機構は不明である。本研究では、ボツリヌス菌感染防御を担う腸内細菌群としてClostridia綱を見出した。さらに、単一で強固な防御効果が得られるClostridia綱腸内細菌株を同定した。本研究成果は乳児ボツリヌス症発症機構の理解を大きく広げるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳児ボツリヌス症は、日本においては年間数例と比較的稀な疾患ではあるが、罹患した場合は、治療法が存在しない。本疾患の罹患リスクを下げるために、一歳未満の乳児には、ボツリヌス菌芽胞を含んでいる可能性が高いことで知られている蜂蜜の摂取を控えるといった予防法が採られているのみである。本感染症を抑制する腸内細菌が同定できれば、これまでに実現できなかった本疾患の根本的な予防法や治療法を確立するための鍵となる基礎的知見が得られる。

研究成果の概要(英文)：Colonization of the host intestines by Clostridium botulinum causes infant botulism with severe paralysis. Healthy adults are resistant to C. botulinum infection, whereas infants are susceptible. Past studies revealed that adult intestinal microbiota is crucial for protection against C. botulinum infection. However, specific bacterial species and the detailed mechanism of colonization resistance currently remain unknown. In this study, we found Clostridia is responsible for colonization resistance against C. botulinum. Furthermore, we identified single Clostridia strain enough to protect against C. botulinum infection. The results of this study expand our understanding of the pathogenesis of infant botulism.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス菌 Clostridium botulinum 腸内細菌 ボツリヌス症

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管ボツリヌス症は、経口摂取したボツリヌス菌芽胞が腸内で発芽・増殖し、産生される神経毒素により発症する。本症の疫学的特徴の一つとして、生後およそ 1 歳未満の乳児で多く見られ(乳児期に起こる場合乳児ボツリヌス症と呼ぶ)、それ以前と以降では報告が非常に少ないことがある。このことから、成人の腸管には本菌芽胞の感染に対する耐性機構が存在すると考えられる。成人の感染耐性には発達した腸内細菌叢が関与することが示されている(Wells et al., J. Infect. Dis.146,791,1982)。抗菌薬を大量投与された成人においては本菌が感染する事例があること(成人腸管ボツリヌス症)、無菌マウスや抗生物質処理マウスは成獣においてもボツリヌス菌感染感受性であるという過去の研究から、成人の持つ腸内細菌叢は本菌に対して定着抵抗性(colonization resistance: CR)を有すると考えられている(*Infect. Immun.* 25, 653–657. 1979., *Infect. Immun.* 36, 103–106. 1982.)。しかしながら、動物モデルを用いたボツリヌス菌感染実験は上記の研究を行った H. Sugiyama らによる 1980 年代の論文以降は全く報告されておらず、本菌に対する CR に寄与する具体的な腸内細菌(叢)や抑制因子は明らかとなっていない。このような学術的背景の中で、申請者らの先行研究により、*in vitro*で腸内細菌によって産生される二次胆汁酸がボツリヌス菌芽胞の発芽を抑制することを見出していた。一方で、二次胆汁酸等の抑制因子を介さず、腸内細菌の直接的な競合、腸内細菌による宿主応答などによるボツリヌス菌の排除機構が存在する可能性についても検討する必要がある。そこで本研究課題では、二次胆汁酸による感染抑制を *in vivo*で検証するとともに、二次胆汁酸以外の因子によりボツリヌス菌芽胞の感染抑制が生じる可能性についても解析を進める。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ボツリヌス菌の腸管感染を制御する腸内細菌を明らかにすることである。具体的には、ヒト腸内細菌叢のなかで二次胆汁酸産生菌のボツリヌス菌感染抑制における役割を明らかにすること、腸内細菌の直接的な競合による本菌の感染抑制があるかどうかを明らかにすることである。これらの知見はこれまで未知であった乳児ボツリヌス症発症機構の全容解明だけでなく、腸内細菌を利用したボツリヌス菌芽胞を制御する新規の早期治療等の開発につながる。

3. 研究の方法

無菌マウス、種々の菌叢(菌株)移植マウスおよび抗菌薬投与マウスに対してボツリヌス菌 A 型 62A 株の芽胞を経口感染させる腸管ボツリヌス症マウスモデルを構築する。本実験系を用い、ボツリヌス菌の定着量およびボツリヌス症の病態解析に加え、腸内細菌叢のメタゲノ

ム解析、腸内代謝物のメタボローム解析を行い、感染防御に寄与する腸内細菌および分子の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) 二次胆汁酸による感染抑制の *in vivo* における検証

二次胆汁酸の一種である DCA を無菌マウスに飲水投与すると、糞便中の DCA が成人糞便移植マウス（感染耐性）と同等に検出され、ボツリヌス菌の腸管増殖を顕著に抑制したが、定着そのものは阻止できず、わずかに発症が遅延するものの全個体が致死となった。ただし、この実験では DCA 単剤の効果しか確認できず、実際には LCA などの他の二次胆汁酸や CA 等の一次胆汁酸との総和としてボツリヌス菌に作用する可能性がある。そこで、二次胆汁酸が存在しないもののベースとなる一次胆汁酸は十分に存在するマウスとして、既知の 8 種の腸内細菌のみが定着した ASF マウスを用いることとした。本マウスはボツリヌス菌感染感受性であることが報告されている。ASF マウスに二次胆汁酸産生菌を追加定着させると、DCA や LCA などの二次胆汁酸が成人糞便移植マウス（感染耐性）と同等以上に誘導された。しかしながら、糞便中のボツリヌス菌量が減少し発症が遅延するものの、感染自体を阻止することはできなかった。二次胆汁酸（特に IsoalloLCA）は共生細菌を含むグラム陽性細菌全般に強い増殖抑制作用を持つことが報告されており、腸内細菌の過剰な増殖を抑制していると考えられる（*Nature*. 599, 458–464. 2021.）。一方、ボツリヌス毒素はごく少量でも死に至る強力な神経毒素であり、成人（成獣）ではボツリヌス菌の腸管定着そのものが完全に阻止されている。このため、二次胆汁酸はボツリヌス菌の腸管増殖を抑制する作用を有してはいるものの、グラム陽性細菌に対する一般的な抑制作用を逸脱するものではなく、感染感受性を決定する因子である可能性は低いと考えられた。以上の結果から、二次胆汁酸以外の真の責任因子の探索を試みた。

(2) ボツリヌス菌感染感受性を特徴づける腸内細菌叢の解明

上記の結果から、代謝物などの分子の作用を *in vitro* でスクリーニングする系と *in vivo* での結果には乖離があり、真のボツリヌス菌防御機構を明らかにするためにはマウスモデルを用いた探索が必須であると考えられた。そこで、ボツリヌス菌感染感受性を特徴づける腸内細菌叢の構成を明らかにし、*in vivo* で感染防御に寄与する腸内細菌を絞り込むという方針に計画を変更した。まず、異なる日齢の新生仔 SPF マウスの腸内細菌叢を成獣無菌マウスに移植し、ボツリヌス菌の感染感受性を比較した。その結果、4 日齢、10 日齢の腸内容物を移植したマウスは無菌マウスと同様に感染感受性であったのに対し、18 日齢の移植マウスは完全な感染耐性となった。そこで、これらの移植マウスの腸内細菌叢を解析したところ、感染感受性の腸内細菌叢には Clostridia 綱および Bacteroidia 綱に属する腸内細菌が見られないことが明らかとなった。これらは乳児には少なく離乳後の大人型の菌叢で増加する腸内細菌群として知られる。次に、成獣 SPF マウスに抗菌薬を投与し、その種類による

感染感受性の違いを比較検討した。その結果、アンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾールを投与したマウスは感染感受性であったのに対し、ポリミキシン B またはエリスロマイシンを投与したマウスは完全な感染耐性であった。これらのマウスの腸内細菌叢を解析したところ、感染感受性となるマウスの腸内細菌叢では Bacteroidia 綱ではなく Clostridia 綱に属する腸内細菌が共通して減少していた。そこで、無菌マウスに SPF マウス腸内容物または成人糞便から作製したクロロホルム耐性菌 (CRB: 無菌マウスに移植するとほぼ Clostridia 綱からなる腸内細菌叢となる) または *Bacteroides* 属 (Bacteroidia 綱) 4 種 4 株の菌株カクテルを移植したところ、CRB を移植したマウスのみ感染耐性となることを見出した。以上の結果から、Clostridia 綱に含まれる腸内細菌がボツリヌス菌感染防御を担っていると考えられた。

(3) ボツリヌス菌感染防御効果を有する腸内細菌の同定

次に、市販菌株を抗菌薬処理マウスに事前投与し、ボツリヌス菌管防御に寄与する腸内細菌の同定を試みたところ、強力な抑制効果を持つ Clostridia 綱菌種として *Clostridium sporogenes* を同定した。本菌はボツリヌス菌 (グループ 1) と極めて近縁の腸内細菌であるが、二次胆汁酸産生菌ではなく、未知の機構により CR を発揮していると考えられる。*C. sporogenes* を無菌マウスに移植した単独定着マウス、および ASF マウスに追加定着させたマウスのいずれにおいても完全な感染耐性を示したことから、*C. sporogenes* は単独でも、また他の腸内細菌が多量に存在する条件下においても感染防御効果を発揮できることが明らかになった。次に、*C. sporogenes* 栄養菌体とボツリヌス菌芽胞を *in vitro* で共培養したところ、ボツリヌス菌の増殖が顕著に抑制された。また、メンブレンチャンバーを用いて *C. sporogenes* 栄養菌体とボツリヌス菌芽胞を隔離して共培養した場合でも増殖が抑制されたことから、菌体同士が接触している必要はなく、培地を介していると考えられた。*C. sporogenes* の培養上清中ではボツリヌス菌芽胞の増殖は抑制されたが、高濃度培地を添加すると抑制効果は失われた。このことから、*C. sporogenes* は抑制因子を分泌しているのではなく、培地中の成分を消費することで抑制効果を発揮していることが示唆された。実際、グループ 1 のボツリヌス菌と *C. sporogenes* は系統分類的に最も近縁で毒素産生以外の生化学的性状が一致しており、栄養要求性や発芽に必要な因子はほとんど同じであると予想される。そこで、*C. sporogenes* 存在下における腸内環境を明らかにすべく *C. sporogenes* 単独定着マウスの盲腸内容物および培養上清のメタボローム解析を行ったところ、無菌マウスや未処理培地と比較して共通して増減が認められる分子を多数同定した。特に、*C. sporogenes* の増殖に重要であることが報告されているアルギニンなどのアミノ酸が顕著に減少しており、栄養競合への関与が示唆された。

研究成果のまとめと展望

本研究開発課題の結果、ボツリヌス菌感染防御を担う腸内細菌群として Clostridia 綱を見出

した。また、単一菌株で強固な防御効果が得られる Clostridia 綱腸内細菌として、*C. sporogenes* を同定した。本研究課題では具体的な分子メカニズムの解明には至らなかったが、*C. sporogenes* 単独定着マウス盲腸内容物のメタボローム解析を元に、今後は分子メカニズムを詳細に解析するとともに、感染感受性のヒト乳児菌叢移植マウスを用いて責任分子や責任細菌の存在量を検証する必要がある。過去に着目していた二次胆汁酸に関しては成人の感染耐性を決定する因子である可能性は低いと考えている。しかしながら、二次胆汁酸産生菌の移植により腸管内でのボツリヌス菌の増殖がある程度抑制され、病態が緩和される。また、既知の二次胆汁酸産生菌は全て Clostridia 綱に属する。環境中に広く芽胞として存在するボツリヌス菌に対して、Clostridia 綱の近縁菌による競合、二次胆汁酸による増殖阻害といった複数のステップで強固な感染耐性を維持していると推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Amatsu Sho, Matsumura Takuhiro, Zuka Masahiko, Fujinaga Yukako	4. 巻 299
2. 論文標題 Molecular engineering of a minimal E-cadherin inhibitor protein derived from Clostridium botulinum hemagglutinin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102944 ~ 102944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.102944	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 Wang Ziyu, Iida Noriho, Seishima Jun, Okafuji Hirofumi, Yutani Masahiro, Fujinaga Yukako, Hashimoto Yusuke, Tomita Haruyoshi, Mizukoshi Eishiro, Kaneko Shuichi	4. 巻 57
2. 論文標題 Patient-derived Enterococcus faecium with inflammatory genotypes promote colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 770 ~ 783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01905-4	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 Kobayashi Nobuhide, Abe Kimihiro, Akagi Sachiyo, Kitamura Mayu, Shiraishi Yoshitake, Yamaguchi Aki, Yutani Masahiro, Amatsu Sho, Matsumura Takuhiro, Nomura Nobuhiko, Ozaki Noriyuki, Obana Nozomu, Fujinaga Yukako	4. 巻 13
2. 論文標題 Membrane Vesicles Derived From Clostridium botulinum and Related Clostridial Species Induce Innate Immune Responses via MyD88/TRIF Signaling in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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) 10.3389/fmicb.2022.720308	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 Takemori-Sakai Y, Satou K, Senda Y, Nakamura Y, Otani H, Maekawa A, Oe H, Oshima M, Yoneda-Nakagawa S, Miyagawa T, Sato K, Ogura H, Mori M, Wada T, Sakai Y, Yutani M, Matsumura T, Fujinaga Y, Gabata T, Wada T, Iwata Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Rare toxin A-negative and toxin B-positive strain of Clostridioides difficile from Japan lacking a complete tcdA gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 651 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.01.015	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 Okafuji Hirofumi, Iida Noriho, Kitamura Kazuya, Seishima Jun, Wang Ziyu, Yutani Masahiro, Yoshio Takatoshi, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Honda Masao, Yamashita Tatsuya, Fujinaga Yukako, Shinkura Reiko, Hamaguchi Yasuhito, Mizukoshi Eishiro, Kaneko Shuichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Oral Corticosteroids Impair Mucin Production and Alter the Posttransplantation Microbiota in the Gut	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1~18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000522039	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 Iida Noriho, Mizukoshi Eishiro, Yamashita Tatsuya, Yutani Masahiro, Seishima Jun, Wang Ziyu, Arai Kuniaki, Okada Hikari, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Masuo Yusuke, Agustina Rina, Kato Yukio, Fujinaga Yukako, Oshima Masanobu, Honda Masao, Lebreton Francois, Gilmore Michael S., Kaneko Shuichi	4. 巻 2
2. 論文標題 Chronic liver disease enables gut Enterococcus faecalis colonization to promote liver carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cancer	6. 最初と最後の頁 1039~1054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43018-021-00251-3	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 Yutani Masahiro, Matsumura Takuhiro, Fujinaga Yukako	4. 巻 65
2. 論文標題 Effects of antibiotics on the viability of and toxin production by Clostridium botulinum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 432~437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12928	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 Yamamoto Riku, Sakakibara Ryo, Kim Mee-Hae, Fujinaga Yukako, Kino-oka Masahiro	4. 巻 137
2. 論文標題 Growth prolongation of human induced pluripotent stem cell aggregate in three-dimensional suspension culture system by addition of botulinum hemagglutinin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 141~148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2023.11.010	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 Kihara Keigo, Kajiyama Yuta, Kimura Yasuyoshi, Okazaki Shuhei, Esa Naoya, Nobe Ryosuke, Shimizu Kentaro, Ohno Kiyoshi, Motooka Daisuke, Matsumura Takuhiro, Shimazu Takeshi, Nakamura Shota, Fujinaga Yukako, Mochizuki Hideki	4. 巻 29
2. 論文標題 Adult-onset botulism in a Japanese woman with prolonged spore excretion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1172 ~ 1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2023.08.009	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 Gregg Brieana M., Matsumura Takuhiro, Wentz Travis G., Tepp William H., Bradshaw Marite, Stenmark Pal, Johnson Eric A., Fujinaga Yukako, Pellett Sabine	4. 巻 15
2. 論文標題 Botulinum neurotoxin X lacks potency in mice and in human neurons	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 mBio	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) 10.1128/mbio.03106-23	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Fujinaga Y.
2. 発表標題 New insights into the pathobiology of Clostridium botulinum enteric infection
3. 学会等名 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fujinaga Y.
2. 発表標題 New insights into the pathobiology of Clostridium botulinum enteric infection
3. 学会等名 第15回日韓国際微生物学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Amatsu S., Saito K., Nariya H., Fujinaga Y.
2. 発表標題 Development of genetic manipulation methods for group I Clostridium botulinum.
3. 学会等名 59th IBRCC 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukako Fujinaga
2. 発表標題 New insights on the pathophysiology of intestinal Clostridium botulinum infection : Learning from intestinal botulism.
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤永由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス菌の腸管感染：ボツリヌス菌と腸内細菌叢の相互作用に関する新知見
3. 学会等名 微生物病研究所アドバンスドセミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤永由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス菌感染症の新知見
3. 学会等名 日本嫌気性菌感染症学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤永由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス菌から学ぶ -毒素の巧妙な体内侵入機構-
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤永由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス菌に魅せられて30年・・・
3. 学会等名 リトリート「若手道場」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤永由佳子
2. 発表標題 乳児ボツリヌス症の病態形成機構および臨床的研究
3. 学会等名 石川県小児科ネットワークセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kobayashi N., Abe K., Akagi S., Kitamura M., Shiraishi Y., Yamaguchi A., Yutani M., Amatsu S., Matsumura T., Nomura N., Ozaki N., Obana N., Fujinaga Y.
2. 発表標題 Analysis of host response against membrane vesicles derived from Clostridium botulinum.
3. 学会等名 57th IBRCC 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤永由佳子	4. 発行年 2024年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 688
3. 書名 標準微生物学 第15版	

〔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	松村 拓大 (Matsumura Takuhiro) (00456930)	金沢大学・医学系・准教授 (13301)	
研究 分担者	小林 伸英 (Kobayashi Nobuhide) (30712799)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	

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