

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591491

研究課題名(和文) バクテリアル・トランスロケーションの機序と制御に関する研究

研究課題名(英文) Study of mechanism and control of bacterial translocation from the gastrointestinal tract

研究代表者

松本 哲哉 (Matsumoto, Tetsuya)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10256688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000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、免疫不全状態においては敗血症など重症感染の原因となりうる。今回の研究では、BTが起こるメカニズムを解明するとともに、それを抑制する手段について検討を行った。マウスを用いた実験で、抗癌剤による免疫抑制状態を誘導するとBTが高率に起こり、特に緑膿菌など一部の病原菌は他の菌よりもBTを起こしやすい現象が認められた。緑膿菌に抗菌活性を有しないペニシリン系抗菌薬を投与することによって、BTの頻度は上昇し、マウスの生存率にも影響を与えることが示された。

研究成果の概要(英文)：Bacterial translocation (BT) is defined as the passage of viable bacteria from the gastrointestinal tract to extraintestinal sites via lymphatic and/or blood vessel routes. We studied the mechanisms of BT by using immunosuppressive mouse model with cyclophosphamide treatment and the results showed intragastric administration of *Pseudomonas aeruginosa* frequently cause systemic spread of translocating bacteria to cause lethal sepsis. Administration of ampicillin induced exacerbation of BT and sepsis.

研究分野：感染症

キーワード：バクテリアル・トランスロケーション 腸内細菌 プロバイオティクス

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、腸管の防御機構が障害や抗菌薬投与が BT の誘因になると考えられる。また、細菌側の条件として、BT を起こしやすい菌とそうでない菌があることも知られており、腸管内にどのような菌が定着しているかによっても BT が影響を受ける可能性が考えられる。

2. 研究の目的

今回の研究では、炎症性腸疾患を含めて BT が起こるメカニズムを解明するとともに、腸管に定着している菌の影響や抗菌薬投与の影響を解明することを目的に検討を行った。

3. 研究の方法

- 1) 腸炎の作成：マウスに経口的に Dextran sulfate sodium (DSS) を接種し、腸炎を作成する。腸炎の状態は経過観察中の体重変化や下血の程度等を用いて行う。また BT の評価は腸間膜リンパ節など各種臓器を採取し、培養を行う
- 2) 被験動物
マウスは SPF の ICR マウス 4 ~ 6 週令、雌 (日本チャールスリバー社) を用いた。飼育と管理は東京医科大学動物実験センター内にて行った。
- 3) 培地
bacterial translocation の実験においては腸管内常在菌をターゲットとし、好気培養用に TSA 培

地、嫌気培養用に BL 培地を用いて検討を行った。

4) 試薬

免疫不全動物の作成には Cyclophosphamide (エンドキサン, 塩野義製薬) を用いた。

4. 研究成果

(1) DSS 腸炎モデル作成における条件設定

マウスをコントロール群、DSS1%群、3%群、5%群に分けて体重推移の経過観察を行ったところ、5%DSS 投与群では有意な体重減少を認めた。

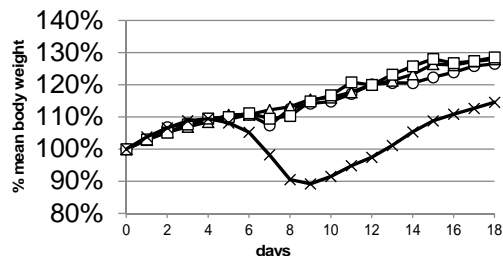


図1. DSS 腸炎モデルにおけるマウスの体重の変化

コントロール群 (DSS 非投与: ○) 、
DSS 投与 1%投与群 (□) 、3%投与群
(△) 、5%投与群 (×)

(2) DSS 腸炎モデルにおける腸管常在菌のバクテリアル・トランスロケーションの誘導

コントロール群、DSS1%群、3%群、5%群に分け、DSS 群はいずれも7日間経口的に DSS を内服させた後、各臓器の培養を実施した。しかしこの条件下においては、血液や肝臓、腸間膜リンパ節などの培養によって分離される菌は少なく、顕著なバクテリアル・トランスロケーションを誘導することは困難であった。

(3) DSS 腸炎モデルにおける緑膿菌の
 バクテリアル・トランスロケーション
 の誘導

DSS 腸炎における常在菌によるトランスロケーションの誘導は発生頻度が低かったため、腸炎モデルの作成前にマウスに経口的に緑膿菌 D4 株を接種し、その後、DSS 投与を行い検討した。その結果、図 2 に示すように DSS の 5 日間投与群に比べ、7 日間投与群はマウスの死亡率が高いという結果が得られた。

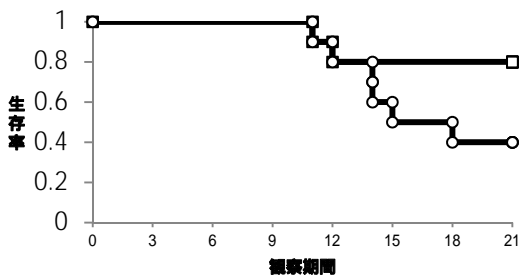


図 2. 緑膿菌定着マウスにおける
 DSS 腸炎誘導後のマウスの生存率
 DSS 5 日間投与群 (□) DSS 7 日
 間投与群 (○)

(4) DSS 腸炎モデルにおける免疫抑制
 の影響

上記の結果により DSS 腸炎モデルにおいても緑膿菌によるトランスロケーションが高率に発生し、敗血症に至ることが明らかとなったため、さらに免疫抑制状態が加わることによる影響を検討した。DSS 腸炎モデルと緑膿菌の接種は上記と同様の実験条件を用いて、さらにサイクロフォスファミド 250mg/kg を投与した。その結果、DSS 単独に比べて免疫抑制状態の誘導によって、さらにマウスの生存率は低下した。

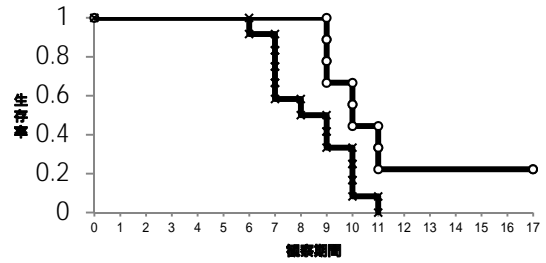
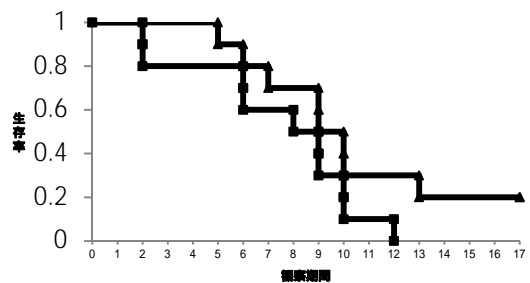


図 3. DSS 腸炎誘導および免疫抑制剤
 追加による生存率

DSS 投与群 (○) DSS 投与 + サイ
 クロフォスファミド追加投与群 (×)

(5) DSS 腸炎モデルにおける抗菌薬投
 与の影響

通常、高度な腸炎を有している患者において、抗菌薬が投与されている頻度は高く、それに伴う常在菌叢への影響は少ない。そこで、さらに緑膿菌には無効なペニシリン系抗菌薬 (ABPC) を投与して、その後のマウスの生存率を確認した。その結果、ABPC 非投与群に比べて ABPC 投与群の方がマウスの生存率は低下した。これは ABPC 投与によって常在菌が抑制され、それに伴って緑膿菌が選択的増殖を行ってより高度なバクテリアル・トランスロケ



ーションを起こしたものと推測された。
 図 4. DSS 腸炎誘導および免疫抑制剤追
 加による生存率

ABPC 非投与群 (○) ABPC 投与群 (×)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1 . Nakamura I, Yamaguchi T, Tsukimori A, Sato A, Fukushima S, Mizuno Y, Matsumoto T. Effectiveness of antibiotic combination therapy as evaluated by the Break-point Checkerboard Plate method for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical use. J Infect Chemother. 20:266-9. 2014 (査読あり)

2. Yamaguchi T, Miura Y, Matsumoto T. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains used in clinical practice as probiotics. J Infect Chemother. 19:1109-15. 2013 (査読あり)

3. Kamiya H, Ehara T, Matsumoto T. Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Chemother. 18:47-52. 2012 (査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

1.Nakamura I, Fujita H, Tsukimori A, Kobayashi T, Sato A, Fukushima S, Mizuno Y, Matsumoto T. Efficacy Of Combination Therapy Against Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Compared With Monotherapy Against Drug-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* ICAAC. Washington DC (USA). Sep. 9th, 2014

〔図書〕(計2件)

1. 松本 哲哉. 耐性病原体 up-to-date. 緑膿菌. 化学療法の領域医薬ジャーナ

ル社. 30:-987-994.2014

2. 松本 哲哉. 緑膿菌(多剤耐性緑膿菌を含む)感染症. 日本臨床別冊 感染症症候群(上) 日本臨床社. 136-142. 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/microbiology/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 哲哉 (MATSUMOTO TETSUYA)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10256688

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし