

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462514

研究課題名(和文) 難治性・再発性尿路感染症に対する乳酸菌プロバイオティクスに関する研究

研究課題名(英文) Studies on Lactobacillus probiotics for refractory or recurrent urinary tract infections

研究代表者

石井 亜矢乃 (ISHII, AYANO)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：00423294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性・再発性尿路感染症患者に対し、抗菌薬以外の新しい予防法・治療法を創出することが求められている。そこで、臨床研究として、過酸化水素産生能が高い乳酸菌膣坐剤を用いて難治性・再発性尿路感染症患者に対する有用性を評価した。その結果、尿路感染症の発症頻度は明らかに減少した。一方、基礎実験では、過酸化水素産生能が高い乳酸菌は、緑膿菌、大腸菌、MRSAのバイオフィーム形成を抑制した。また、この乳酸菌は緑膿菌、大腸菌、MRSAの増殖を抑制し、抗菌薬の使用により抑制効果の増強を認めた。難治性・再発性尿路感染症に対して、抗菌薬以外の予防法・治療法として、乳酸菌プロバイオティクスが有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：For patients with refractory or recurrent urinary tract infections, it is required to develop new preventive and therapeutic strategies other than antimicrobial therapy. Therefore, as a clinical study, we evaluated the effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories with high hydrogen peroxide producing ability against patients with refractory or recurrent urinary tract infections. On the other hand, in basic experiments, this *L. crispatus* strain inhibited biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, MRSA. In addition, the inhibitory effects of this *L. crispatus* strain against *P. aeruginosa*, *E. coli*, MRSA were enhanced by using antimicrobial agents. It was suggested that Lactobacillus probiotics are useful as a preventive and therapeutic strategy other than antimicrobial therapy for refractory or recurrent urinary tract infections.

研究分野：医歯薬学

キーワード：尿路感染症 プロバイオティクス 乳酸菌 バイオフィーム 緑膿菌 大腸菌 MRSA

### 1. 研究開始当初の背景

単純性尿路感染症の多くは膣前庭部に定着した腸内細菌がリザーバーとなって再発を繰り返し、時には慢性感染症へと移行して難治性となる。複雑性尿路感染症における難治例の代表はカテーテル関連尿路感染症 (CAUTI) である。CAUTI は通常臨床症状に乏しく比較的穏やかな感染症であるが、一旦尿流障害を合併すると尿性敗血症に移行して重篤化する。軽快してもその多くは慢性感染となってバイオフィームを形成した細菌が院内感染の原因となる。また、尿路感染症において最も分離頻度が高い大腸菌 (*Escherichia coli*) は、泌尿器科領域において最も重要な菌種であり、近年薬剤耐性株が単純性尿路感染症患者からも多く分離されるようになってきている。それに伴って薬剤耐性菌による尿路感染症の治療難例が出現しており、既存の抗菌薬以外の治療法を確立することは喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

我々が以前施行して有効性を実証した乳酸菌膣坐剤に再度着目し、難治性・再発性尿路感染症患者に対して、乳酸菌膣坐剤を投与する臨床研究を実施して、乳酸菌プロバイオティクスの有効性を検証する。主要評価項目として尿路感染症再発抑制効果を、副次評価項目として尿および膣分離菌の変化、有害事象を検討する。基礎研究では、抗バイオフィーム効果や抗菌効果のある乳酸菌株を探索する。本研究において得られた知見に基づいて、新たな乳酸菌株でさらなる臨床研究や実験研究を計画し、難治性・再発性尿路感染症に対する乳酸菌プロバイオティクスを用いた新規治療法・予防法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 反復性膀胱炎に対する乳酸菌膣坐剤の予防効果に関する臨床試験

##### 対象

急性膀胱炎もしくは慢性複雑性膀胱炎の急性増悪のエピソードが2回/年以上ある女性細菌性尿路感染症患者で、開始時に尿路感染症の治療が完了している20~79歳の外来患者とした。泌尿器科的処置を要する患者、尿道カテーテル留置患者、重篤な基礎疾患を有する患者、乳製品、乳酸菌製品にアレルギーのある患者は除外とした。

##### 投与方法

1年間、膣坐剤1個を週3回、就寝前に投与した。

##### 検査項目

投与開始前と開始後1ヶ月毎に尿沈渣、尿・膣培養を行い、細菌性尿路感染症の発症頻度と分離菌の変化を比較検討した。投与終了後1年間は、膀胱炎症状時に尿沈渣、尿培養を行った。

##### 乳酸菌膣坐剤化

坐剤は過酸化水素産生能の高い

*Lactobacillus crispatus* (GAI 98322) を使用し、膣坐剤1個に $1.0 \times 10^8$  CFU 含まれる量 (乾燥菌量として0.2g) とし、当院薬剤部にて乳酸菌粉末とコーンスターチを混合し、ホスコH-15で包埋し、坐剤化した。

同一菌種検出時のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

BIO-RAD社のプロトコールに準じた。ゲルブロックを制限酵素 (*Spe* や *Xba*) で処理後、アガロースゲルに埋め込み、Bio-Rad CHEF DR- System を使用して泳動を行った。泳動終了後、ゲルをSYBR Green で染色し、デンドログラムを作成した。

#### (2) 乳酸菌タブレットの直腸・膣内細菌叢に及ぼす効果に関する臨床試験

##### 対象

尿路感染症のない閉経後の女性とした。

##### 投与方法

毎日1回乳酸菌タブレット (カゴメのラブレ) 1錠を4週間 (±7日) 経口投与した。

##### 検査項目

投与前、投与後でアンケートにて膣および直腸の自覚的变化を調査した。また直腸・膣内細菌叢の変化を比較した。

#### (3) 基礎研究

##### フローセルシステム

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* OP14-210) と過酸化水素産生能が高い乳酸菌 (*Lactobacillus crispatus* GAI98322) を用いた。人工尿中、マイクロデバイス (bio観る) に形成された96時間後のバイオフィームをZEISSのLSM780倒立型共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。さらに、尿路感染症由来の*E. coli* OE-89およびMRSA OS-60を用いて、同様の検討を行った。

##### コロニーバイオフィーム法

MRS寒天培地上に置いたメンブランに緑膿菌または乳酸菌の菌液を滴下し、37 (あるいは37、5%CO<sub>2</sub>下) で24時間培養した。形成された初期段階のバイオフィームに他菌種の菌液を滴下し、メンブラン上の生菌数 (緑膿菌および乳酸菌) を24時間毎3回測定した。緑膿菌は*P. aeruginosa* OP14-210を用い、乳酸菌は過酸化水素産生能が異なる3株 (*L. crispatus* GAI98322, GAI99099, GAI99098) を用いた。さらに、*E. coli* OE-128およびMRSA OS-3を用いて、同様の検討を行った。

また、LVFXもしくはABKを添加したミュラーヒントン寒天培地上に置いたメンブランに緑膿菌、大腸菌、MRSAのいずれかとお酸化水素産生能が高い乳酸菌 (*L. crispatus* GAI98322) の菌液を滴下し、37、5%CO<sub>2</sub>下で培養し、メンブラン上の生菌数 (緑膿菌、大腸菌、MRSA) を24時間毎に3回測定し、乳酸菌との併用効果を検討した。

##### マウス膀胱内異物モデル

緑膿菌 (*P. aeruginosa* PA01 Plac lux1)

の前培養液を用い、螺旋形に形状記憶したポリエチレンチューブ(PT)を8時間浸漬・振盪してバイオフィルムを形成させた後、経尿道的に麻酔下のマウスの膀胱内に挿入し、外尿道口を2時間クランプした。そのマウス膀胱異物モデル(緑膿菌尿路バイオフィルム感染症)に対し、翌日過酸化水素産生能の高い乳酸菌(*L. crispatus* GA198322)を膀胱内に注入し、1時間もしくは2時間クランプした。2、3日目にPT付着緑膿菌数および尿中生菌数を測定し、リアルタイム *in vitro* イメージングシステム(IVIS® Lumina)により観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 反復性膀胱炎に対する乳酸菌膣坐剤の予防効果に関する臨床試験

膣坐剤投与前・中・後での尿路感染症発症頻度の比較

平成28年度までに難治性尿路バイオフィルム感染症(神経因性膀胱などの基礎疾患を有する尿路感染症)患者2名と、明らかな基礎疾患はなく膀胱炎を繰り返す再発性膀胱炎患者15名に対し、過酸化水素産生能が高い乳酸菌膣坐剤を投与し、難治性1名、再発性10名の計11名で1年投与が終了した(2名脱落)。

1年投与が終了した難治性尿路感染症1例は78歳で、乳酸菌投与前後での尿路感染症発症頻度は、投与前6回/年、投与中7回/年であり、尿路感染症の発症頻度の変化はなかったが、自覚的な尿路感染症症状は軽度となった。

1年投与が終了し解析が可能であった再発性膀胱炎患者10例の年齢は51~79歳(平均 $65.4 \pm 10.3$ 歳)であり、閉経前の症例は1例のみであった。尿路感染症発症頻度は1年間の比較で、膣坐剤投与による尿路感染症発症頻度の改善が緩やかであった症例が1例、発症頻度の減少を認めなかった症例が2例いるが、多くは著効しており、全体で投与前2~11回(平均 $5.1 \pm 2.7$ 回)投与中0~5回(平均 $2.0 \pm 1.8$ 回)であり、尿路感染症の発症頻度は明らかに減少していた( $P=0.004$ )。投与終了後1年以上経過した5例中4例で再発抑制効果が持続していた。

膣坐剤投与前・中・後での尿および膣内分離菌の変化

乳酸菌膣坐剤投与前の尿路感染分離菌は判明する症例ではすべて大腸菌であった。2例で膣坐剤投与開始時に膣内より大腸菌が分離されていた。尿路感染症の発症頻度の減少が緩やかであった1例と発症頻度に変化がなかった2例に関しては投与中の急性膀胱炎時に膀胱炎の原因菌(それぞれ*E. coli* (ESBL)と*Klebsiella pneumoniae*)と同種の菌が膣からも検出されていた。それ以外の症例では病原性細菌の膣内定着が阻止され、尿路感染症の再発が抑制できたと推測できる。また投与前1例で*L. crispatus*が分離された。

膣坐剤投与中に尿と膣から同日に検出さ

れた同一菌種のPFGE法による解析

再発性尿路感染症の発症頻度の減少が緩やかであった1例でのPFGEによる解析では、乳酸菌膣坐剤投与中、膣および尿より*E. coli* (ESBL)が検出されており、同一株であった。発症頻度に変化がなかった2例でのPFGEによる解析では、膣および尿より*K. pneumoniae*が検出されており、同一株であった。

有害事象

有害事象の発現は認めていない。

##### (2) 乳酸菌タブレットの直腸・膣内細菌叢に及ぼす効果に関する臨床試験

平成28年度23例に乳酸菌タブレットを投与した(1例脱落)。現在も継続して症例を重ねている。直腸・膣内細菌叢の変化については50例終了後に次世代シーケンサーによる解析を行う予定である。アンケート結果では投与中、尿路感染症を発症する症例はなかった。膣内の変化(帯下の増加)を自覚する症例が2例、便の性状の改善を6例で認めた。

##### (3) 基礎研究

フローセルシステム

フローセルシステムでは、乳酸菌により緑膿菌バイオフィルムの剥離現象が観察され、大腸菌とMRSAに対してはバイオフィルム形成抑制効果が認められた。

コロニーバイオフィルム法

メンブラン上の緑膿菌バイオフィルム形成は乳酸菌により抑制された。また、乳酸菌バイオフィルムは緑膿菌の発育を抑制した。これらの抑制効果は、過酸化水素産生能が高い乳酸菌(*L. crispatus* GA198322)で顕著であり、通常培養よりもCO<sub>2</sub>インキュベーターでの培養において顕著であった。乳酸菌の抑制効果は、緑膿菌>大腸菌>MRSAであり、緑膿菌に対する効果が最も高かった。

また、LVFXもしくはABKと併用することで各菌のバイオフィルム形成能の抑制効果も示唆された。

マウス膀胱内異物モデル

乳酸菌による明らかな抗バイオフィルム効果は認めなかった。

##### (4) 考察

尿路感染症は尿路に基礎疾患のない単純性と基礎疾患のある複雑性とに分けられる。単純性尿路感染症の多くは膣前庭部に定着した腸内細菌がリザーバーとなって再発を繰り返し、時には慢性感染症へと移行して難治性となる症例も見られる。複雑性尿路感染症には様々な病態があるが、難治例の代表はカテーテル関連尿路感染症(CAUTI)である。CAUTIは通常臨床症状に乏しく比較的穏やかな感染症であるが、一旦尿流障害を合併すると尿性敗血症に移行して重篤化する。軽快してもその多くは慢性感染となってバイオフィルムを形成した細菌が院内感染の原因となる。なかでも「緑膿菌性尿路バイオフィル

ム感染症」は、潜伏・持続感染の様相を呈することが多く難治性であり、抗菌薬に暴露されることで薬剤耐性を獲得する。また、大腸菌は尿路感染症において最も分離頻度が高く、宿主に対して強い病原性を発揮することから、泌尿器科領域において最も重要な菌種であり、近年薬剤耐性株が単純性尿路感染症患者からも多く分離されるようになっていいる。実際、我が国におけるフルオロキノロン系抗菌薬に耐性を示す大腸菌（キノロン耐性大腸菌）および基質拡張型 -ラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌の分離頻度は近年増加傾向にあり、岡山大学泌尿器科でもキノロン耐性大腸菌と ESBL 産生大腸菌の全大腸菌に占める割合は、2007 年はそれぞれ 1.4%、1.4%であったが、2011 年は 14.1%、3.8%、2015 年は 40.2%、24.7%に増加している<sup>1)</sup>。それに伴って薬剤耐性菌による尿路感染症の治療困難例が出現しており、限られた既存の抗菌薬以外の治療法を確立することは喫緊の課題である。

尿路感染症に対する抗菌薬以外の治療法として 2001 年に朝原ら<sup>2)</sup>は、マウスの尿路大腸菌感染モデルに対する *Lactobacillus casei* の経尿道的投与の有効性を報告した。また、2006 年に岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学、感染症研究班の上原ら<sup>3)</sup>が反復性膀胱炎患者に対し、過酸化水素の産生能が高い *Lactobacillus crispatus* を使用する膣坐剤の安全性と有効性を報告した。これらの報告は乳酸菌自体の一般細菌に対する抗菌効果と、乳酸菌による腔内細菌叢の再構築がもたらす尿路感染症の予防効果を示唆するものである。今回、我々が乳酸菌プロバイオティクスに再度着目し、難治性・再発性尿路感染症患者に対する乳酸菌プロバイオティクスの有効性を示したことは、薬剤耐性化の歯止めとなり、抗菌薬投与に伴う有害事象の減少や医療経済的な貢献も期待されると思われる。

#### <引用文献>

- 1) Wada K., Uehara S., Yamamoto M., Sadahira T., Mitsuhashi R., Araki M., Kobayashi Y., Ishii A., Kariyama R., Watanabe T., Nasu Y., Kumon H.: Clinical analysis of bacterial strain profiles isolated from urinary tract infections: A 30-year study. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(4) : 478-482, 2016
- 2) Asahara T., Nomoto K., Watanuki M., Yokokura T.: Antimicrobial activity of intraurethraly administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(6): 1751-1760, 2001.
- 3) Uehara S., Monden K., Nomoto K., Seno Y., Kariyama R., Kumon H.: A pilot study evaluating the safety and effectiveness of

*Lactobacillus vaginal suppositories* in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 28: 30-34, 2006.

#### (5) 結語

臨床研究で独自に作製した *L. crispatus* (GAI 98322) を含む乳酸菌膣坐剤を難治性尿路バイオフィーム感染症と頻回再発性尿路感染症患者に投与した。難治性尿路バイオフィーム感染症症例は少なく効果が確認できなかったが、頻回再発性尿路感染症症例では、乳酸菌膣坐剤の膀胱炎再発抑制効果が示され、有害事象の発現も認めなかった。投与終了後も再発抑制効果が持続する症例を経験した。今後も症例数を増やして、無効例の原因や投与終了後の効果も検討する予定である。

*in vivo* 実験系では乳酸菌による明らかな抗バイオフィーム効果は認めなかったが、*in vitro* 実験系では難治性・再発性尿路感染症で問題となる尿中バイオフィームの形成予防や治療において *L. crispatus* (GAI 98322) の有用性を示唆する成績であり、抗菌薬との併用効果も示唆する結果であった。

以上より、難治性・再発性尿路感染症に対して、既存の抗菌薬以外の予防法・治療法として、過酸化水素産生能の高い *L. crispatus* (GAI 98322) は有用であることが示唆された。さらなる臨床研究や実験研究を計画し、乳酸菌プロバイオティクスを用いたより有効な治療法・予防法の開発を目指す予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Wada K., Uehara S., Ishii A., Sadahira T., Yamamoto M., Mitsuhashi R., Takamoto A., Araki M., Kobayashi Y., Watanabe M., Watanabe T., Hotta K., Nasu Y.: A phase clinical trial evaluating the preventive effectiveness of *Lactobacillus vaginal suppositories* in patients with recurrent cystitis. *Acta Med Okayama*, 70 (4) : 299-302, 2016 (査読有)  
<http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/en/54508>

狩山玲子、光畑律子、石井垂矢乃、和田耕一郎、公文裕巳：緑膿菌バイオフィームに対する乳酸菌プロバイオティクスの基礎的検討、*Bacterial Adherence & Biofilm*, 28:41-45, 2015 (査読無)

狩山玲子、公文裕巳：泌尿器科領域における緑膿菌感染症の治療戦略 基礎的アプローチ、*緑膿菌感染症研究会講演記録*、49:39-41, 2015 (査読無)

Sako S., Kariyama R., Mitsuhashi R., Yamamoto M., Wada K., Ishii A., Uehara S.,

Kokeguchi S., Kusano N., Kumon H.:  
Molecular epidemiology and clinical  
implications of metallo-β-lactamase-  
producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated  
from urine. Acta Med Okayama, 68:89-99,  
2014 (査読有)  
[http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/68\\_2\\_89.pdf](http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/68_2_89.pdf)

〔学会発表〕(計8件)

光畑律子、尿路バイオフィルム感染症に対する乳酸菌プロバイオティクスに関する基礎的検討、第86回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2016/11/26、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

石井亜矢乃、乳酸菌膾坐剤の膀胱炎再発抑制効果に関する臨床的検討、第64回日本化学療法学会西日本支部総会、2016/11/25、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

石井亜矢乃、頻回再発性膀胱炎に対する乳酸菌膾坐剤の臨床効果、第64回日本化学療法学会総会、2016/06/10、神戸国際会議場(神戸市)

石井亜矢乃、頻回再発性膀胱炎に対する乳酸菌膾坐剤の予防効果に関する臨床的検討、第85回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2015/10/17、奈良春日野国際フォーラム(奈良市)

光畑律子、難治性・再発性尿路感染症に対する乳酸菌プロバイオティクスに関する基礎的検討、第84回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2014/10/24、岡山コンベンションセンター(岡山市)

狩山玲子、緑膿菌バイオフィルムに対する乳酸菌プロバイオティクスの基礎的検討、第28回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2014/07/09、都市センターホテル(東京)

光畑律子、緑膿菌バイオフィルム形成に及ぼす乳酸菌の抑制効果について、第88回日本感染症学会学術講演会、2014/06/18、ヒルトン福岡シーホーク(福岡市)

山本満寿美、岡山大学泌尿器科における尿中分離菌および薬剤感受性の動向～30年間の変遷～、第62回日本化学療法学会総会、2014/06/18、ヒルトン福岡シーホーク(福岡市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石井 亜矢乃 (ISHII, Ayano)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：00423294

### (2)研究分担者

和田 耕一郎 (WADA, Koichiro)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：20423337

狩山 玲子 (KARIYAMA, Reiko)

岡山学院大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：40112148

### (3)連携研究者

公文 裕巳 (KUMON, Hiromi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授

研究者番号：30144760

### (4)研究協力者

山本 満寿美 (YAMAMOTO, Masumi)

光畑 律子 (MITSUHATA, Ritsuko)

堀 賢司 (HORI, Kenji)