

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860327

研究課題名(和文) クロストリジウム・ディフィシル感染症の新しい対策 -定着因子ワクチンの開発-

研究課題名(英文) Development of vaccine for Clostridium difficile infection using membrane fraction

研究代表者

妹尾 充敏 (Senoh, Mitsutoshi)

国立感染症研究所・その他部局等・主任研究官

研究者番号：20646624

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)：医療関連感染の一つであるClostridium difficile感染症(CDI)の新たな予防法として、定着因子ワクチンを考え、毒素非産生性C. difficile膜画分(ntCDMF)を調製し、CDIワクチン候補とした。まず、培養細胞を用いたin vitro実験系において、ntCDMFの有用性が示された。次に、マウス及びハムスターを用いたin vivo実験系での効果を調べたところ、in vitro同様in vivoにおいてもntCDMFの効果が認められた。これらの結果から、ntCDMFがCDIワクチンとして有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Diarrhea and pseudomembrane colitis caused by Clostridium difficile infection (CDI) is a global health concern because of the high recurrence rate after standard antibiotic therapy. Vaccination presents a powerful countermeasure against disease recurrence. In this study, mice vaccinated with the nontoxigenic C. difficile membrane fraction (ntCDMF) generated a marked immune response to the antigen, as demonstrated by the serum IgG and intestinal fluid IgA levels. Significantly, pretreatment with harvested IgG- and IgA-containing fluids was sufficient to prevent in vitro adhesion of C. difficile to Caco-2 cells. Furthermore, it was examined whether ntCDMF has an effect on in vivo situation. The number of C. difficile in feces of mice that were immunized by ntCDMF decreased than that of control mice. The survived number of hamsters that were immunized by ntCDMF was more than that of control hamsters. These results highlight the potential of ntCDMF as a vaccine candidate for CDI.

研究分野：細菌学

キーワード：Clostridium difficile ワクチン 定着因子

1. 研究開始当初の背景

Clostridium difficile は、抗菌薬関連下痢症・腸炎の主要な原因菌である。ヨーロッパやアメリカなどの先進国では、1980年代から院内感染の原因菌として *C. difficile* に注目しているため、医療関係者の認知度は高く、入院患者に対し、*C. difficile* 感染症と予防について適切な説明が行われている。さらに、*C. difficile* 感染症対策や *C. difficile* 研究も活発に行われている。しかし、それでも未だに *C. difficile* 感染症をコントロールすることはできていない。一方、わが国においては、1980年代から *C. difficile* の病原性に関する研究は行われているが、臨床応用に繋がる成果は得られていない。そのため、医療関係者の認知度は低く、多くの医療施設で *C. difficile* 感染症対策が行われていない。しかしながら、*C. difficile* 感染症の重症例では大腸全摘などの腸切除を行わなければならないことや死亡例の報告も稀ではないため、本菌の対策は急務であると考えられる。

2. 研究の目的

C. difficile 感染症をコントロールするためには解決しなければならない問題点が3つある。これらは積極的に *C. difficile* 感染症対策を行っている欧米でさえ、未だに *C. difficile* 感染症をコントロールできていない理由である。医療施設内環境問題：*C. difficile* は、芽胞産生能を有するため、アルコールやクロルヘキシジン等の一般的な消毒薬に耐性を示す。また、偏性嫌気性菌であるが、好気的環境や乾燥状態に曝されても死滅しないため、医療施設内の環境整備が困難である。耐性株問題：*C. difficile* 感染症の治療は、原因と思われる抗菌薬の投与を中止することであるが、それでも症状が改善しない場合、症状が軽度から中程度の場合はメトロニダゾール、重症の場合はバンコマイシンの投与による治療を行う。しかし、近年、バンコマイシン低感受性 *C. difficile* の出現が報告された。再発問題：*C. difficile* 感染症は、再発する症例が非常に多い。つまり、バンコマイシン等での治療後、再び *C. difficile* を獲得してしまい、再感染することや、治療で完全に除去できなかった芽胞状態の *C. difficile* が治療後に増殖することにより再燃することがある。これらの問題点を解決する新しい対策として、本研究ではワクチンに着目した。*C. difficile* は、芽胞状態の菌を経口的に獲得することにより、体内に取り込まれ、腸管内に定着する。腸内細菌叢が正常に保たれている場合、腸管内に定着した *C. difficile* は芽胞状態のまま増殖しないため、消化管症状を引き起こすことはない。しかし、抗菌薬等の使用により、正常な腸内細菌叢が乱された場合、*C. difficile* は増殖を始め、毒素を産生する。消化管症状はこの毒素により引き起こされる。ゆえに、ワクチンとして、毒素をホルムアルデヒドで無毒化したトキシドが考え

られるが、トキシドにはホルムアルデヒドによる変性が元に戻り再び毒素活性を有することになる可能性がある。そこで本研究では、*C. difficile* が腸管に定着することを阻害するワクチンを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vitro 実験

毒素非産生性 *C. difficile* 膜画分 (nontoxicogenic *C. difficile* membrane fraction: ntCDMF) の調製
毒素非産生性 *C. difficile* JND13-23 を培養し、菌体を回収した後、超音波破碎を行った。その後、遠心分離及び超遠心分離を行い、膜画分を得た。回収した分画が膜画分であることを確かめるために、膜タンパク質の一つである SleB のペプチド抗体を作成し、western blot を行った。

マウスの免疫

2週間毎に3回、マウスに ntCDMF をアジュバントと共に皮下投与し、3回目の投与から2週間後に全採血し、血清を得た。また、全採血後、腸管を取り出し、腸液を回収した。

血清及び腸液の抗体価測定

血清及び腸液の抗 ntCDMF 抗体価は ELISA 法を用いて測定した。

培養細胞への *C. difficile* 付着

C. difficile の培養細胞への付着はヒト腸管由来培養細胞株である Caco-2 を用いて行った。血清及び腸液の効果を調べる場合には、血清及び腸液で *C. difficile* を処理した後、Caco-2 と共培養させた。

(2) In vivo 実験

投与方法の比較

(1)- と同様のスケジュールでマウスを免疫し、血清及び腸液を回収した。投与方法は、皮下投与、経口投与、経直腸投与、経鼻投与の4つの方法を用いた。

C. difficile のマウス腸管への付着

(1)- と同様のスケジュールで経直腸投与にてマウスを免疫した。抗菌薬で腸内細菌叢を乱した後、*C. difficile* を経口投与した。その後、7日間に1度、28日目まで糞便中に排出される *C. difficile* を計数した。

致死活性

(1)- と同様のスケジュールで経直腸投与にてハムスターを免疫した。抗菌薬で腸内細菌叢を乱した後、*C. difficile* を経口投与した。投与後7日目まで生死を観察した。

4. 研究成果

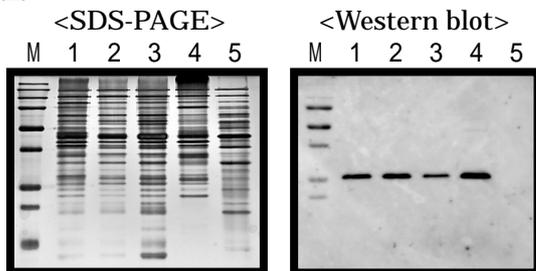
(1) In vitro 実験

SDS-PAGE 及び western blot

C. difficile JND13-23 の膜画分が回収できて

いるかを確認するために SDS-PAGE 及び western blot を行った。

図 1



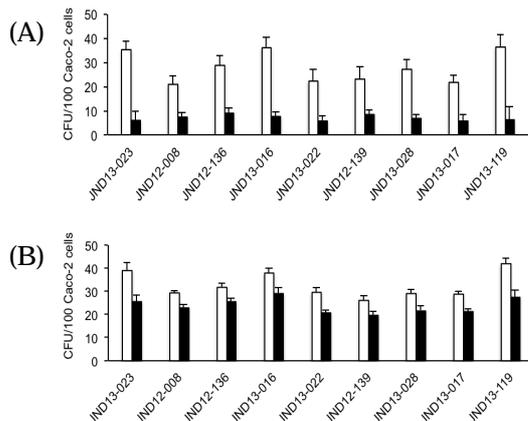
M: 分子量マーカー (下から 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa), 1: 超音波破碎後, 2: 遠心分離後上清, 3: 超遠心分離後上清, 4: 超遠心分離後沈殿, 5: 培養上清; western blot の 1 次抗体には抗 SleB 抗体を使用。

超遠心後の沈殿物は多くのタンパク質を含み、超遠心後上清に比べ、膜タンパク質のひとつである SleB のバンド強度が高いことから、この画分を膜画分として以後の研究に用いることにした。

培養細胞への *C. difficile* の付着

得られた膜画分でマウスを免疫し、得られた血清及び腸液が *C. difficile* の培養細胞への付着を阻害することができるか調べた。

図 2



血清(A)および腸液(B)と *C. difficile* を 37 で 1 時間反応させた後、*C. difficile* と Caco-2 を共培養し、Caco-2 へ付着した *C. difficile* 菌数を計数した。:コントロールマウス、:免疫マウス

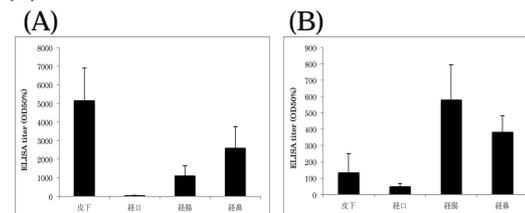
ntCDMF で免疫したマウスの血清および腸液で処理した *C. difficile* は、コントロールマウスの血清および腸液で処理した *C. difficile* に比べ、Caco-2 への付着数が少なかった。これは免疫マウスの血清や腸液中に *C. difficile* の腸管細胞への付着を妨げることのできる抗体が存在することを示している。

(2) In vivo 実験

投与方法の比較

腸管での *C. difficile* の付着が最も阻害できる投与方法を探すため、皮下投与、経口投与、経直腸投与、経鼻投与で免疫した後、血清中の抗 ntCDMF IgG および腸液中の抗 ntCDMF IgA を測定した。

図 3

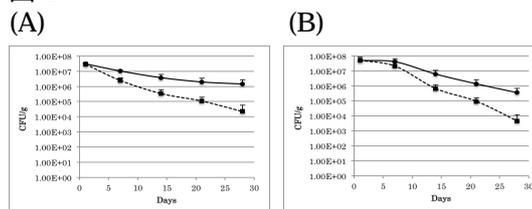


(A)血清中の抗 ntCDMF IgG、(B)腸液中の抗 ntCDMF IgA

4 つの方法を比較したところ、血清 IgG は皮下投与が最も高い抗体価を示したが、腸液 IgA は経直腸が最も高かった。よって以後の実験は経直腸投与を用いることにした。

C. difficile のマウス腸管への付着 ntCDMF で免疫したマウスの腸管にどの程度 *C. difficile* が付着するのかを調べた。

図 4



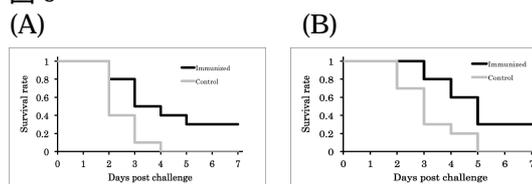
(A)*C. difficile* JND13-22、(B)*C. difficile* VPI10463 を経口投与した後、7 日ごとに糞便中の *C. difficile* 菌数を計数した。実線: コントロールマウス、破線: 免疫マウス

免疫マウスとコントロールマウスは共に糞便中の *C. difficile* 菌数が時間経過と共に減少したが、減少率が異なり、28 日後はコントロールマウスの糞便中の *C. difficile* 菌数は約 10^6 CFU/g であったのに対し、免疫マウスでは約 10^4 CFU/g であった。よって in vivo においても ntCDMF の効果が示された。

致死活性

C. difficile による死亡率が ntCDMF を免疫することによってどの程度下がるのかをハムスターを用いて調べた。

図 5



(A)*C. difficile* JND13-22、(B)*C. difficile* VPI10463 を経口投与した後、生死を7日間観察した。黒線: 免疫ハムスター、灰色線: コントロールハムスター

図5より、コントロールハムスターが観察中にすべて死亡したのに対し、免疫ハムスターは3割程度が生存した。これによりntCDMFが間接的に*C. difficile*の致死作用を防ぐことができることが示された。本研究の結果から、ntCDMFはCDIワクチンとして有用であることが示された。

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6件)

Senoh M, Kato H, Fukuda T, Niikawa A, Hori Y, Hagiya H, Ito Y, Miki H, Abe Y, Furuta K, Takeuchi H, Tajima H, Tominaga H, Satomura H, Kato H, Morita S, Tanada A, Hara T, Kawada M, Sato Y, Takahashi M, Higuchi A, Nakajima T, Wakamatsu Y, Toyokawa M, Ueda A, Roberts P, Miyajima F, Shibayama K. (2015) Predominance of PCR-ribotypes, 018 (smz) and 369 (trf) of *Clostridium difficile* in Japan: a potential relationship with other global circulating strains? J Med Microbiol. 64:1226-36. doi:10.1099/jmm.0.000149. 査読有

Senoh M, Iwaki M, Yamamoto A, Kato H, Fukuda T, Shibayama K. (2015) Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to human intestinal cells after treatment with serum and intestinal fluid isolated from mice immunized with nontoxicogenic *C. difficile* membrane fraction. Microb Pathog. 81:1-5. doi:10.1016/j.micpath.2015.03.001. 査読有

Senoh M, Kato H, Murase T, Hagiya H, Tagashira Y, Fukuda T, Iwaki M, Yamamoto A, Shibayama K. (2014) Reverse transcription polymerase chain reaction-based method for selectively detecting vegetative cells of toxigenic *Clostridium difficile*. Microbiol Immunol. 58:615-20. doi: 10.1111/1348-0421.12189. 査読有

[学会発表](計7件)

Mitsutoshi Senoh, Masaaki Iwaki, Akihiko Yamamoto, Haru Kato, Tadashi Fukuda, Keigo Shibayama. Effect on in vivo experiments of vaccine

for *Clostridium difficile* infection using membrane fraction. 第89回日本細菌学会総会 2016年3月 大阪国際交流センター(大阪市)

Mitsutoshi Senoh, Masaaki Iwaki, Akihiko Yamamoto, Haru Kato, Tadashi Fukuda, Keigo Shibayama. Nontoxicogenic *Clostridium difficile* membrane fraction as a vaccine candidate. 6th Congress of European Microbiologists FEMS 2015 2015年6月 Maastricht (Netherlands)

Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Tadashi Fukuda, Paul Roberts, Fabio Miyajima, Keigo Shibayama. Prevalence of two PCR ribotypes, smz (018) and trf (369) of *Clostridium difficile* in Japan. 5th International *Clostridium difficile* Symposium 2015年5月 Bled (Slovenia)

Mitsutoshi Senoh, Masaaki Iwaki, Akihiko Yamamoto, Haru Kato, Tadashi Fukuda, Keigo Shibayama. Development of vaccine for *Clostridium difficile* infection using membrane fraction. 第88回日本細菌学会総会 2015年3月 長良川国際会議場(岐阜市)

妹尾充敏, 加藤はる, 福田靖, 柴山恵吾 毒素産生性 *Clostridium difficile* の新規遺伝学的検査法の開発 第61回トキシンシンポジウム 2014年9月 ルネッサンスリゾートナルト(鳴門市)

妹尾充敏, 加藤はる, 福田靖, 柴山恵吾 毒素産生性 *Clostridium difficile* 栄養型菌の新規遺伝学的検査法の開発 第88回日本感染症学会学術講演会 第62回日本化学療法学会総会 合同学会 2014年6月 ヒルトン福岡シーホーク(福岡市)

Mitsutoshi Senoh, Haru Kato, Tadashi Fukuda, Keigo Shibayama. Epidemiological study of *Clostridium difficile* infection in Japan. 第87回日本細菌学会総会 2014年3月 タワーホテル船堀(江戸川区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

妹尾 充敏 (SEN OH, Mitsutoshi)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官
研究者番号: 20646624