

「腸内細菌叢を基軸とした難治性腸管感染症の病態解明と新規治療法の確立」

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授

北本 宗子

要旨

Clostridioides difficile 感染症 (*C. difficile* infection: CDI) は世界的に増加の一途を辿る致死性の腸管感染症である。*C. difficile* は一部の健常人の腸管内に定着する常在細菌であり、通常は正常な腸内細菌叢によりその増殖は抑制されている。しかし、治療に伴う抗菌薬の使用や腸炎などにより正常な腸内細菌叢が攪乱されると、*C. difficile* は腸管内で異常増殖し、抗菌薬関連下痢症や偽膜性大腸炎を引き起こす毒素を放出し結果として腸炎ひいては死をもたらす。つまり“腸内細菌叢の乱れ”が CDI の病態形成に関与していると考えられる。近年、CDI 患者に対して健常人の糞便を移植 (Fecal Microbiota Transplantation: FMT) することで、攪乱された腸内細菌叢が是正された結果、CDI の病態を減弱することが報告された。しかし FMT 処置は、多剤耐性細菌の感染による死亡例が一部報告されており、ドナー細菌の選択や標準化の難しさなどいくつかの問題点を含んでいる。よって、CDI に対する新規治療法の確立が求められている。そこで本研究では「腸内細菌叢を基軸とした CDI 機序の解明及び新規治療法の確立」を目指す。

背景・目的

Clostridioides difficile (*C. difficile*) 感染症 (CDI) は致死性の腸管感染症で、世界的に患者数が増加の一途を辿っている。これまでの研究より、*C. difficile* の腸管内増殖異常には、腸内細菌叢の乱れが寄与していると考えられているが、如何なる細菌が如何様にして、*C. difficile* の増殖を幫助しているのかについては不明である。一方、乱れた腸内細菌叢を正常な腸内細菌叢を移植 (FMT) し是正することで、*C. difficile* の増殖を抑制できることが報告されているが(1)、実際には CDI 抑制細菌の同定もなされていない。これまでに我々は、ヒトの腸内細菌叢を無菌マウスの腸内に再現したヒト化ノトバイオート (Human Microbiota Associated: HMA) マウスを作製し(2)、HMA マウスを用いて生体内において細菌叢と宿主の相関関係を理解することを可能としている(3)。よって、本研究では、HMA マウスを用いて、ヒト腸内細菌叢の中から CDI 惹起細菌の同定及び腸内細菌を基盤とした CDI 発症機序の詳細な解明に取り組んだ。さらに並行して臨床的な側面から、CDI を抑制し得るヒト腸内細菌の同定にも試みた。

方法

ヒト化ノトバイオート (HMA) マウス作製

嫌気環境下でヒト健常人(Healthy control: HC)の糞便から移植用ヒト腸内細菌叢の調整を行った。調整した糞便を無菌マウスに経口投与し(10 mg/100 ul/マウス)、マウスはそのまま無菌環境下で飼育した。糞便移植から 2 週間経過したマウスを、HC-HMA マウスとして用いた。また、HC-HMA マウスの腸内

細菌叢を攪乱させるため、抗生剤カクテル（カナマイシン、ゲンタマイシン、バンコマイシン、コリスチン、メトロニダゾール、クリンダマイシン）を経口/腹腔投与により施した。

C. difficile 感染

C. difficile 株 VPI 10463 (ATCC 43255) の芽胞は、栄養型細菌を死滅させるため 65°C で 20 分間培養。HMA マウスは、経口投与により *C. difficile* 芽胞 (10³ 芽胞/マウス) を感染。CDI マウスからは、感染後 1 日目、3 日目、7 日目、10 日目、14 日目に糞便サンプルを採取した。これらのサンプルを用いて、嫌気条件下で *C. difficile* 選択寒天培地 (TCCFA) に播種することで、*C. difficile* の定量を行なった。

結果

結果 1 : CDI を幫助するヒト腸内細菌の同定

HMA マウスを用いた結果より、無菌マウスに *C. difficile* を感染させるとマウスは感染後 1 日で腸管内異常増殖を引き起こし、感染 2 日目には全てのマウスの死亡を確認した。一方、健常人の腸内細菌叢が腸管定着した HC-HMA マウスの腸管においては、*C. difficile* は検出されず、感染 2 週間後でもマウスは生存していた。そこで、抗生剤投与により HC-HMA マウスの腸内細菌叢攪乱を誘導すると、*C. difficile* が異常増殖し一部のマウスの死亡を確認した (data not shown)。さらに、抗生剤投与した HC-HMA マウスの腸内細菌叢解析を行なった結果、細菌科 X が抗生剤投与群では増加しており、この細菌科に属する腸内細菌が CDI 惹起細菌であることを見出した (図 1) (未発表論文のため、伏字記載/細菌科名も未記載)。

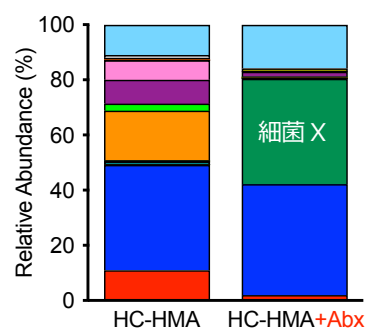


図 1. 腸内細菌叢解析

結果 2 : 腸内細菌に着目した CDI 機序の解明

前述の通り、抗生剤投与により腸内細菌叢攪乱を誘導した HC-HMA マウスでは *C. difficile* が腸管増殖することを確認した。そこで、CDI 機序を明らかにするため、腸管粘膜固有層を回収しフローサイトメトリーにより免疫細胞の解析を行なった。その結果、抗生剤投与後の HC-HMA マウスは、T 細胞および樹状細胞から産生される因子 Y の産生が優位に減少していることを見出した。さらに、ここで同定した因子 Y は、健常人と比較して CDI 患者において発現が低下していることを確認しており、臨床所見と一致する傾向を認めた (data not shown)。

結果 3 : CDI を抑制し得るヒト腸内細菌の同定

我々は以前、炎症性腸疾患 (IBD) 患者の腸内細菌叢を無菌マウスに定着させた HMA マウス (IBD-HMA) の腸管では、*C. difficile* が異常増殖を引き起こすことを明らかとしている。さらに、IBD-HMA マウスに健常人由来の正常な腸内細菌叢を経口投与 (FMT) することで、乱れた腸内細菌叢を是正したところ、*C. difficile* の腸管定着/増殖を抑制し得ることを確認した。よって本研究では、CDI 抑制細菌を特定するため、これらマウスの細菌叢解析を行なった。結果、IBD-HMA マウスと IBD-HMA マウスに FMT を施したマウスの腸内細菌叢は大きく異なっていることを確認した。特に細菌科 Z が FMT 投与群では増加しており、これらの細菌科に属する腸内細菌が CDI 抑制細菌となり得ることを見出した。興味深いことに、上述で同定した、CDI 惹起細菌科 X は FMT 処理群では減少していることも確認した (data not

shown)。

考察

腸内細菌叢の観点から、*C. difficile* 腸管定着/増殖機序の解明に取り組んだ。その結果、*C. difficile* が腸管で異常増殖する環境下では細菌科 X の増加に伴い宿主免疫応答も変化していることを確認した。引き続き、細菌 X-宿主 Y を基軸とした CDI 病態形成機序について、詳細な解析を進めている。

一方、細菌科 Z に属する腸内細菌は、*C. difficile* 腸管定着抑制細菌として考えられ、現在細菌の単離を進めている。本研究が遂行され CDI の症状を緩和/治癒することが可能となれば、全人類に与える医療及び社会福祉への貢献は計り知れないと考える。

共同研究者

該当なし。

引用論文

1. Nood Ev, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, Vos WMd, et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. New England Journal of Medicine. 2013;368(5):407-15.
2. Nagao-Kitamoto H, Shreiner AB, Gilliland MG, 3rd, Kitamoto S, Ishii C, Hirayama A, et al. Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease-Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2016;2(4):468-81.
3. Nagao-Kitamoto H, Leslie JL, Kitamoto S, Jin C, Thomsson KA, Gilliland MG, 3rd, et al. Interleukin-22-mediated host glycosylation prevents *Clostridioides difficile* infection by modulating the metabolic activity of the gut microbiota. Nat Med. 2020;26(4):608-17.

助成研究に関連した発表論文

該当なし。