

糞便微生物移植から見出した高齢者における難治性疾患に対する 新規治療および予防戦略

北里大学医学部 微生物学
講師 阪口 義彦

(共同研究者)

北里大学医学部 微生物学

岡山大学学術研究院 医歯薬学域病原細菌学分野

藤田医科大学 先端光学診療学講座

助教 武 晃

助教 後藤 和義

教授 大宮 直木

はじめに

*Clostridioides difficile*感染症 (CDI) は、*C. difficile*が原因で発症する再発率が高い難治性の下痢症・腸炎である。特に、高齢者において再発率が高く、高齢者の多い医療施設や介護施設内で感染拡大を引き起こす。また、*C. difficile*の健常人における保菌率が高く、無症状であっても知らないうちにCDIが発症する恐れがある。アメリカでは毎年多くの罹患者が報告され、高額な医療コストを費やしており、日本でも同様に問題とされている。難治性CDIの治療法として、糞便微生物移植(FMT)が世界的に注目されている。FMTとは、提供者(ドナー)の糞便を患者の腸内に移植することで、腸内微生物叢を改善する治療法である。我々は、CDI患者に対してFMTを行いCDIの寛解に成功したが、ドナーの糞便中の何が効果を示しているのか明らかでなかった。そこで、我々は、本症例の糞便細菌叢解析を行ったところ、大変興味深いことにFMT実施後およびドナーの糞便にのみ、様々な放線菌が検出されることを明らかにした⁽¹⁾。これらの事象において、我々は、腸内において放線菌がCDIの寛解に重要な役割を担っていると推察した。放線菌は、通常好気的環境(土壌、食物など)に生息し^(2, 3)、腸内に常在する報告がない。また、放線菌は、様々な生理活性物質を生産することが知られている^(4, 5, 6)。このようなことから、我々は、放線菌およびその活性物質を利用し、高齢者において発症率の高いCDIの治療および予防への応用に着目した。本研究課題では、ヒト糞便(異なる年齢、食生活)から放線菌を分離し、分離株の病原菌(*C. difficile*など)に対する活性評価を行った。

結 果

1. ヒト糞便のメタゲノム解析

異なる年齢および食生活(肉食系、草食系)の健常人50名の糞便DNAを精製した。本

DNAを次世代シーケンサー (MiSeq) により、DNAの塩基配列を網羅的かつ定量的に調べ、放線菌の構成を調べた。その結果、10名の糞便から多種多様な放線菌DNAが検出されたが、今回の結果において、肉食系と草食系では放線菌DNAの検出率の差が認められなかった。

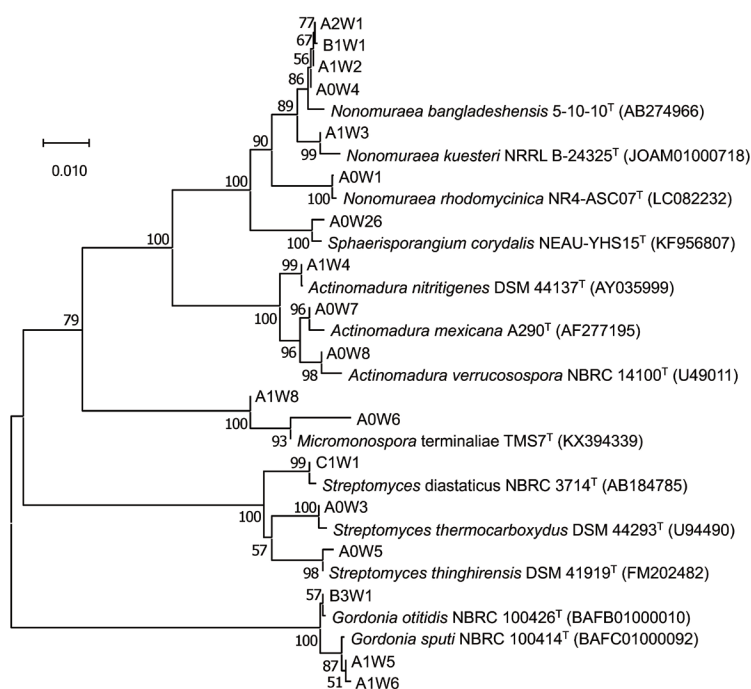
2. ヒト糞便からの放線菌の分離

ヒト糞便のメタゲノム解析データに基づいて、まずは肉食系健康人3名の糞便から放線菌の分離を試みた。腸内は、嫌気的環境であることから、嫌気チャンバー装置を利用した嫌気的培養法により分離を試みたが⁽⁷⁾、放線菌を分離することができなかった。そこで、従来の好氣的培養法にて分離することにした⁽²⁾。ヒト糞便を抗生物質含有分離寒天培地に混釈して1～4週間培養した。その結果、19株の放線菌を分離することに成功した(表1)。種々の分離株のDNAを精製し、PCRにより16S rRNA 遺伝子を増幅した。得られたPCR産物の塩基配列を決定し、DNAデータベースとの相同性解析を行うことにより、6属14種に分類された(図1)。また、分離株の16S rRNA 遺伝子塩基配列をneighbor joining methodにより系統解析を行ったところ、多様性が高く新種と推定される放線菌も含まれていた。

表1 ヒト糞便から分離した放線菌

Human No.	BLAST top hit	Similarity (%)	Number of isolates
A	<i>Actinomadura mexicana</i>	99.8	1
A	<i>Actinomadura nitritigenes</i>	100	1
A	<i>Actinomadura verrucosospora</i>	100	1
A	<i>Gordonia sputi</i>	99.9	2
A	<i>Micromonospora terminaliae</i>	99.6	1
A	<i>Micromonospora terminaliae</i>	98.8	1
A	<i>Nonomuraea bangladeshensis</i>	99.6	3
A	<i>Nonomuraea kuesteri</i>	99.9	1
A	<i>Nonomuraea rhodomycinica</i>	99.9	1
A	<i>Sphaerisporangium corydalis</i>	99.5	1
A	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	99.9	1
A	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	99.8	1
A	Unknown	-	1
B	<i>Gordonia otitidis</i>	100	1
B	<i>Nonomuraea bangladeshensis</i>	99.3	1
C	<i>Streptomyces diastaticus</i>	100	1

図1 分離放線菌の系統樹



3. 分離放線菌の消化液耐性試験

分離株14種をそれぞれ人工胃液に37°Cで1時間、人工腸液に37°Cで4時間処理した。本処理液をInternational *Streptomyces* Project 2 (ISP 2、放線菌培養用寒天培地) に塗布し、

室温で2週間培養した。本寒天上にコロニーの生育が認められたものを消化液耐性と判定した。その結果、14種全ての放線菌が生育することが明らかとなった。また、過剰の消化酵素を添加した人工胃液および人工腸液で放線菌を処理しても14種の放線菌中で11種がコロニーを形成した。

4. 分離放線菌の代謝産物の解析

分離株14種を個別に種々の生産培地で培養し、*C. difficile*に対する生理活性試験を行ったところ、2種が301培地、1種が60培地およびスキムミルク培地において活性が認められた(表2)。また、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、枯草菌および緑膿菌についても生理活性を調べた。その結果、2種がMSSAおよびMRSA、2種が枯草菌、1種が緑膿菌に活性を示した。各培養液の液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)を行ったところ、*Streptomyces thinghirensis*から deferoxamine類、*Nonomuraea bangladeshensis*から kitasetaline類、*N. kuesteri*から venturicidin類が検出された。また、*N. rhodomycinica*および *S. thermocarboxydus* から未同定である多種の物質が検出された。

表2 放線菌培養液の病原細菌に対する生理活性評価

Human No.	BLAST top hit	Production Medium	<i>Clostridioides difficile</i>				MSSA	MRSA	B. sub	PAO-1
			001	027	017	No				
A	<i>Nonomuraea bangladeshensis</i>	301	-	-	-	-	11B	18A	-	-
		60	-	-	-	-	-	11B	-	-
		Skim Milk	-	-	-	-	-	11C	-	-
A	<i>Nonomuraea kuesteri</i>	Skim Milk	-	-	-	-	-	-	13B	
A	<i>Nonomuraea rhodomycinica</i>	Skim Milk	-	-	-	-	10A	10A	10A	-
A	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	301	-	9C	-	-	-	-	-	-
A	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	301	24A	20A	20A	20A	-	-	11A	-
		60	24A	25A	22A	26A	-	-	-	-
		Skim Milk	11A	12A	9B	10A	-	-	-	-

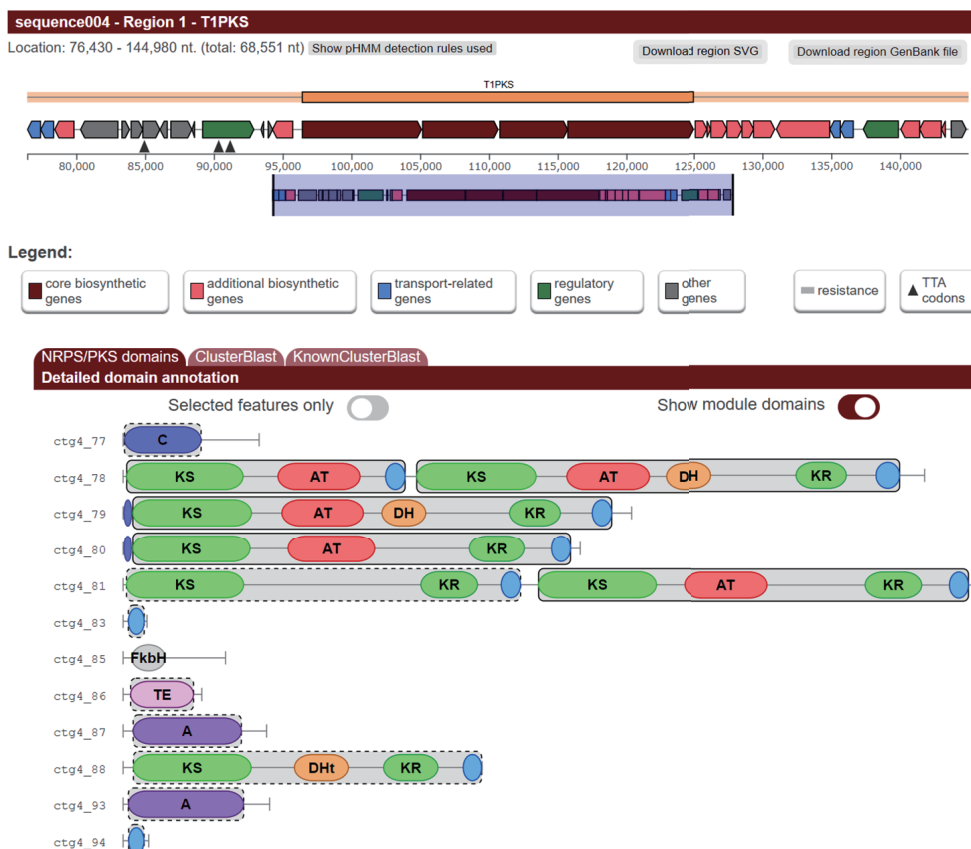
001: JCM 1296^T (Type strain), 027: ATCC BAA-1870 (Virulent strain), 017: ATCC 43598 (Attenuated strain), No: ATCC 43593 (Nontoxic strain), MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA: *S. aureus* (clinical isolates), *B. sub*: *Bacillus subtilis* (clinical isolates), PAO-1: *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1.

本表の数値は阻止円の大きさ(mm)、アルファベットは円の透明度を示している。

5. 放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの解析

分離株 *S. thermocarboxydus* の全ゲノム塩基配列の決定を行い、Anti-SMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) により二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを解析した。*S. thermocarboxydus* において、58の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが予想され、生理活性を有するポリケチド合成酵素(PKS)5種類、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)2種類がゲノム上に存在することが示唆された。7種類の中で化合物の合成に必須な遺伝子が保存されている遺伝子クラスターを図に示した(図2)。これは、Type

図2. 分離放線菌の二次代謝産物生成遺伝子クラスター



I PKSに分類され、本クラスターは6つモジュール（化合物合成の構成単位）から構成される巨大な遺伝子クラスターであり、既知のものとは異なっていた。

これらの研究成果は、第95回 日本細菌学会総会および日本薬学会第142年会および第36回 日本放線菌学会大会で発表した。

考 察

1. ヒト糞便検体のメタゲノム解析では、予想よりも放線菌の検出率が低かった。これは、糞便中の放線菌DNAが相対的に低いことにある。放線菌を高感度に検出するには、本菌に特異的なプライマー対を用いたPCR法を確立することで解決できる。また、肉食系と草食系において、放線菌の検出率に差が認められなかったことについては、今後、糞便検体数を増やし有意差を検証する必要がある。
2. 肉食系健康人の糞便からの放線菌の分離では、19株と予想よりも少ない株数であった。このことは、腸内における放線菌の割合が少ないことにある。従って、より多くの放線菌を分離するためには、放線菌のみスクリーニング可能な選択性の高い分離法の検討が必要である。

3. 興味深いことに、分離株は、19株であるのに対して6属12種と多様性がみられた。通常、環境中に生息する放線菌門においては、このような多様性はみられない。従って、ヒトの腸内では、放線菌は、自然環境と比べて多様化していると推察される。今後、様々なヒト糞便（異なる年齢、食生活）から放線菌を分離することで、より多くの種類の放線菌が得られると考えられる。
4. 分離株の消化液耐性試験では、全ての放線菌が耐性化していた。一般的に、放線菌は疎水性の高い孢子を形成する。従って、pHの低い胃酸や分解酵素に曝露されても孢子形態になることで耐性を示したと考えられる。
5. また、放線菌は、通常、植物などに生息していることから、私たちが野菜などの食物を摂取することで放線菌が腸内に届いていることが推察された。
6. *C. difficile*に対する抗菌活性試験において、14種中2種が活性物質生産能を有していた。分離放線菌*Streptomyces thinghirensis*の生産物質には、鉄イオンを吸収することで活性を示すdeferoxamineが含まれていた。本物質は、デンプンとアミノ酸を含む301培地にて生産されていることから、食事により腸内でdeferoxamineが合成されると推論できる。
7. 分離放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus*からは、未知の*C. difficile*活性物質が検出されたことから、本菌の全ゲノムを解析し二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを推測した。通常、放線菌は、約20の遺伝子クラスターを有しているが、今回分離された株では58の遺伝子クラスターを有していた。このことは、他の放線菌と比べ多種多様な物質生産能を有していると予想される。
8. 58の遺伝子クラスターの中で、6つのモジュールから構成されるType I PKSを有することから、未知の大環状のマクロライド化合物が生産できると推察された。本物質を単離・構造解析し、*C. difficile*に対する活性評価を行うことで、高齢者において再発率が高い難治性のCDIの治療および予防への貢献が期待される。

要 約

*Clostridioides difficile*感染症 (CDI) は、*C. difficile*により引き起こされる難治性の疾患である。我々は、その治療として糞便微生物移植 (FMT) を行い寛解に成功し、その因子が放線菌である可能性を見出した。そこで、本研究課題では、健常人の腸内にどれくらいの割合で放線菌が存在するかを調査した。健常人50名の糞便のメタゲノム解析を行ったところ、

10名から放線菌DNAが検出された。そこで、まずは肉食系健常人3名の糞便から放線菌の分離を試みたところ、合計19株の放線菌を得ることができた。これらの分離株は、6属14種に分類され、多様性に富んでおり新種の放線菌も含まれていた。また、分離株の全てが人工消化液に耐性であった。従って、私たちが植物などに生息する放線菌を摂取することで、腸内に移行し存在していると推察された。さらに、天然成分を含む培地にて2種の放線菌が *C. difficile* に対して生理活性を示したことから、食事により体内で代謝された物質を腸内の放線菌が利用し、生理活性物質を生産すると思われる。今後、活性物質の詳細な解析を進めることで、難治性のCDIの治療および予防に貢献できると期待される。

文 献

1. Gotoh, K., Sakaguchi, Y., Kato, H., Osaki, H., Jodai, Y., Wakuda, M., Také, A., Hayashi, S., Morita, E., Sugie, T., Ito, Y., Ohmiya, N., Fecal microbiota transplantation as therapy for recurrent *Clostridioides difficile* infection is associated with amelioration of delirium and accompanied by changes in fecal microbiota and the metabolome. *Anaerobe*, 73, 102502, 2022.
2. Také, A., Inahashi, Y., Ōmura, S., Takahashi, Y., Matsumoto, A., *Streptomyces boninensis* sp. nov., isolated from soil from a limestone cave in the Ogasawara Islands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 68(5), 1795–1799, 2018.
3. Phạm, H. T. T., Suwannapan, W., Koomsiri, W., Inahashi, Y., Také, A., Matsumoto, A., Thamchaipenet, A., *Fodinicola acaciae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of *Acacia mangium* willd. and its genome analysis. *Microorganisms*, 8 (4) , 467, 2020.
4. Matsuo, H., Noguchi, Y., Také, A., Nakanishi, J., Shigemura, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S., Nakashima, T., Nanaomycin I and J: New nanaomycins generated by mycothiol-mediated compounds from "*Streptomyces rosa subsp. notoensis*" OS-3966. *J. Biosci. Bioeng.*, 127 (5) , 549–553, 2019.
5. Suga, T., Kimura, T., Inahashi, Y., Iwatsuki, M., Nonaka, K., Také, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Ōmura, S., Nakashima, T., Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12-0794. *J. Antibiot.*, 71 (7) , 619–625, 2018.
6. Inahashi, Y., Shiraishi, T., Také, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Ōmura, S., Kuzuyama, T., Nakashima, T., Identification and heterologous expression of the actinoallolide biosynthetic gene cluster. *J. Antibiot.*, 71 (8) , 749–752, 2018.
7. Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Také, A., Gotoh, K., Sakaguchi, M., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Hosomi, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S., Hayashi, S., Oguma, K., Analysis of a plasmid encoding botulinum neurotoxin type G gene in *Clostridium argentinense*. *Anaerobe*, 66, 102281, 2020.