

糞便微生物移植から見出した有用生理活性物質の発掘～腸内希少放線菌を利用した難治性疾患の治療法の開発～

阪口 義彦

徳島文理大学薬学部微生物学

研究の目的

私たちの食と健康は、腸内環境と密接に関連しており、その中心的役割を担うのが「腸内フローラ」である。我々は、この腸内フローラの乱れに起因する *Clostridioides difficile* 感染症（CDI）に着目し、腸内の有益細菌を活用した治療・予防法の開発を目指して研究を進めている。CDI は、*C. difficile* を原因とする難治性の下痢症・腸炎であり、再発を繰り返すため治療が困難である。*C. difficile* は、健常人の腸内にも常在していることから、無症状であっても突発的に CDI を発症する可能性がある。我々は、CDI 患者に対して糞便微生物移植療法（FMT）を行ったところ、症例の治癒に伴い多様な放線菌の割合が増加することを見出した¹⁾。放線菌は、通常、好氣的環境に生息することが知られており、ヒト腸内に常在するという事実は極めて意義深い発見である。そこで、本研究ではこれらの知見を基盤として、健常人糞便から放線菌を分離し、病原菌に対する抗菌活性を評価するとともに、*C. difficile* 毒素に対する阻害効果についても検討した。

方法

1. 放線菌の分離・同定

培地成分、培養温度、培養時間、嫌氣的・好氣的条件など様々な培養条件を検討し、ヒト糞便から腸内放線菌を分離した。得られた分離株については、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 解析を行った。また、推定された菌種および分離株の塩基配列を用い、近隣結合法による分子系統解析を行い菌種を同定した。

2. 分離株代謝産物の抗菌活性評価

分離株を3種類の培地（30 培地、60 培地、301 培地）で1週間培養後、エタノールにより代謝産物を抽出した。抽出物についてペーパーディスク法を用い、*Clostridioides difficile*、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、多剤耐性緑膿菌に対する抗菌活性を評価した。

3. 分離株代謝産物の *C. difficile* 毒素に対する阻害活性評価

腸内放線菌由来代謝産物と毒素（*C. difficile* のトキシン A、トキシン B）を 37℃で

30 分間反応させた後、培養細胞（MDCK-2、Caco2）に作用させた。24 時間後、に細胞を固定し、クリスタルバイオレット染色により細胞生存率を評価した。

結果と考察

1. ヒト糞便からの放線菌の分離・同定

一般に、自然環境（土、野菜など）から希少放線菌を分離できる割合は、極めて低いとされているが、腸内では多く存在していた。そこで、ヒト腸内フローラの解析データに基づき、独自に確立した培養技術^{2,3)}を応用することで、合計 20 株の腸内放線菌を分離することに成功した（図 1）。これらの分離株について、16S rRNA 遺伝子配列を決定し、DNA データベースを用いた相同性解析を行った結果、20 株は 6 属 14 種に分類された。その中には新種を含む希少放線菌が多く存在していた。また、腸内放線菌は、土壌・野菜由来の放線菌に比べ、系統的に高い多様性を示した（図 2）。これらの結果から、腸内放線菌は、腸内環境において進化・多様化してきた可能性が示唆される。さらに、一部の腸内放線菌は、食生活を通じて取り込まれ、腸内に定着した可能性も考えられる。今後、食生活の異なるヒト糞便から腸内放線菌を分離・比較することで、食生活と腸内放線菌との関連性が明らかになると期待される。



図 1. ヒト糞便から分離した放線菌のコロニー

2. 分離株における代謝産物の抗菌活性評価

分離した腸内放線菌を各種培地で培養し、ペーパーディスク法により病原菌（*C. difficile*、MSSA、MRSA、枯草菌、緑膿菌）に対する抗菌活性を評価した。その結果、*Nonomuraea bangladeshensis* は MRSA に、*N. kuesteri* が緑膿菌に、*N. rhodomycinica* が MSSA、MRSA および枯草菌に、*Streptomyces thinghirensis* は、*C. difficile* に対してそれぞれ抗菌活性を示した。これらの結果から、腸内放線菌の代謝産物は、病原菌に対して選択的な抗菌活性を有することが明らかとなった。今後、代謝産物の病原菌特異性を分子レベルで解明することにより、原因菌を標的とした新たな感染症治療法の開発につながる可能性がある。

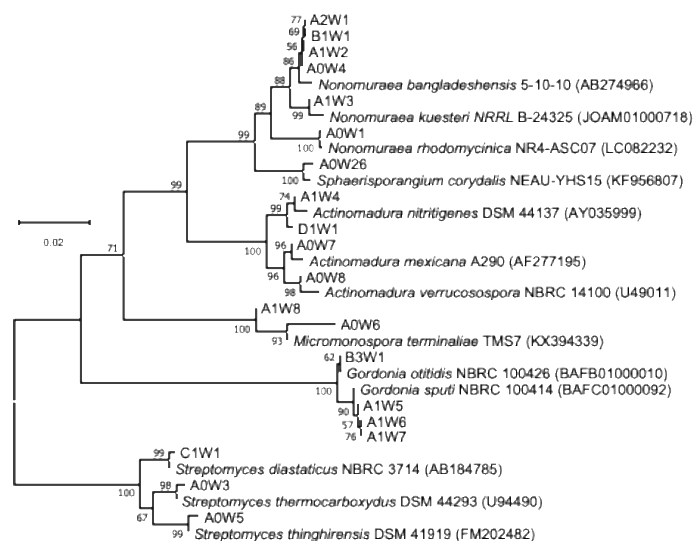


図 2. ヒト糞便から分離した放線菌の系統樹（近隣結合法）

3. 分離株の代謝産物による *Clostridioides difficile* 毒素の阻害効果

C. difficile が産生する毒素（トキシン A、トキシン B など）は、培養細胞（MDCK）に対して強力な細胞毒性を示すことが知られている。そこで、腸内放線菌代謝産物の毒素阻害活性を評価した。その結果、*Gordonia sputi* および *G. otitidis* が *C. difficile* 毒素に対して阻害（抑制）効果を示した。興味深いことに、これらの株は、*C. difficile* 自体に対する抗菌活性は認められなかった。今後は、代謝産物中の活性化合物を単離し、毒素の対する特異的な作用メカニズムを解明するとともに、その生理活性評価や安全性を評価することで、新たな治療薬候補としての可能性を検討する必要がある。

結論

本研究では、嫌気的環境であるヒト糞便から、世界で初めて腸内放線菌の分離に成功した。得られた分離株の中には、*C. difficile* およびその毒素に対して抗菌活性や阻害活性を示すものが認められた。今後、腸内放線菌代謝産物が病原菌に対して発揮する選択的作用機構を解明することで、新たな感染症治療法の開発につながることを期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人野田産業科学研究所ならびに関係者の皆様に、心より御礼申し上げます。また、共同で実験を実施いただきました山梨大学の武 晃 助教、岡山大学の後藤和義 准教授、順天堂大学の竹原正也 准教授、徳島文理大学の永浜政博 教授、藤田医科大学の大宮直木 教授に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) Gotoh, K. *et al.* (2022) 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.
- 2) Sakaguchi, Y. *et al.* (2005) The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102(48)**: 17472-17477.
- 3) Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Sakaguchi, Y., Andreu, J. M. (2012) Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109(20)**: 7711-7716.