

加熱殺菌した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* の クロストリディオイデス・ディフィシルに対する 増殖抑制効果



The Effect of a Heat-killed Lactic Acid Bacteria *Enterococcus faecalis* for Inhibiting the Proliferation of *Clostridioides (Clostridium) Difficile*



松尾 知恵 中尾 光治
原 浩祐 川口 晋

ABSTRACT

Objectives In this study, we evaluated the effect of a Heat-killed lactic acid bacteria *Enterococcus faecalis* (*HkEf*) for inhibiting the proliferation of *Clostridioides difficile* (*C. difficile*). A *in vitro* study was performed to assess the direct effect between *HkEf* and *C. difficile*.

Methods *C. difficile* was co-cultured with *HkEf* (0.64 mg/mL or 64 mg/mL) in an anaerobic condition, the amount of viable bacteria was estimated by counting the number of colonies immediately after incubated, after 12h, 14h and 48h.

Results Under the both condition, the number of *C. difficile* are significantly decreased at 12h, 14h and 48h after incubated, compared to the control group. The number of viable bacteria colonies at 48h after incubated, are decreased to about 1/1000 (*HkEf*: 0.64 mg/mL) and to about 1/10,000 (*HkEf*: 64 mg/mL), compared to the control group.

Conclusions The results suggested that *HkEf* has a direct effect to inhibit the proliferation of *C. difficile*.

(Jpn Pharmacol Ther 2020 ; 48 : 721-5)

KEY WORDS Heat-killed lactic acid bacteria, *Enterococcus faecalis*, *C. difficile*, Direct effect

はじめに

クロストリディオイデス・ディフィシル (*Clostridioides (Clostridium) difficile*, 以下, *C. difficile*) は, 偏性嫌気性グラム陽性桿菌の一つであり, 院内

感染や抗菌薬関連腸炎の起因菌として知られる¹⁾。生存に適さない環境下では芽胞を形成し休眠するが, 生存に適した環境になると再び増殖を開始することで生残する^{1,2)}。芽胞のままでは菌が増殖することはないが, 熱や乾燥, アルコール消毒などの過酷な

条件下でも死滅せず^{1,3)}、いったん、院内環境への汚染が生じると、病室等の院内環境中でも芽胞状態で長期間存在する²⁾ため、芽胞の除去はきわめて困難である。患者および無症候キャリアとの接触感染、あるいは医療スタッフの手指などを介した伝播がおもな感染経路となり、重篤な基礎疾患などの背景因子に加え、抗菌薬投与などにより正常な腸内細菌叢が攪拌されることで*C. difficile*が定着・増殖すると、*C. difficile*感染症 (*Clostridioides difficile* infection: CDI) を発症する¹⁾。また、*C. difficile*は患者の体内で菌体外毒素(トキシン)を産生し、大腸炎や重篤な下痢、発熱や腹痛といった臨床症状をきたすため、実臨床において非常に治療に難渋する。一般的に抗菌薬投与に伴う下痢は、抗菌薬関連下痢症(antibiotic-associated diarrhea: AAD)とよばれる。抗菌薬関連下痢症(AAD)のうち約10~25%が*C. difficile*に起因するものと報告されており⁴⁾、偽膜性大腸炎(pseudomembranous colitis: PMC)は、そのほとんどが本菌に由来し院内感染症のなかでもっとも頻度が高い疾患と考えられている⁵⁾。

欧米ではメトロニダゾールやバンコマイシンが*C. difficile*感染症(CDI)の標準治療薬として推奨されており^{6,7)}、本邦においても2018年7月にフィダキソマイシンの製造販売が承認された⁸⁾。しかし、*C. difficile*感染症(CDI)は、抗菌薬使用自体がその発症リスク因子としてあげられ¹⁾、治療薬の使用に際しては、「抗微生物薬適正使用の手引き」(厚生労働省)⁹⁾を参照し、薬剤投与の必要性を十分に判断すべきであり、薬剤の原則投与期間を超えて投与する場合には、ベネフィットリスクを考慮して投与継続を慎重に判断することに留意する必要がある。さらに、長期入院¹⁰⁾、経管栄養の使用なども危険因子となり、*C. difficile*感染症(CDI)既往歴のある患者や65歳以上の高齢者、免疫不全患者、重症CDI患者では再発リスクが高い患者であると報告されている²⁾。

著者らはすでに、この院内感染で問題となる*C. difficile*の腸管感染モデル動物に対する、加熱殺菌した乳酸菌(Heat-killed lactic acid bacteria *Enterococcus faecalis*, 以下、*HkEf*)の効果に関する検討を行い、生存率の上昇と感染動物の糞便中の*C. difficile*生菌数の検出菌数抑制を報告した¹¹⁾。この*HkEf*

による感染防御効果は、宿主生体の免疫賦活作用だけではない、別のなんらかの乳酸菌体直接作用によるものの可能性が推察された。今回我々は、*HkEf*と*C. difficile*との混合培養による*in vitro*試験を実施し、*HkEf*の*C. difficile*に対する直接的な増殖抑制効果を確認したため報告する。

I 材料および方法

1 被験物質

被験物質である*HkEf*粉末(75億個/mg)は、必要量を秤量(電子天秤:XP205DR, メトラー・トレド(株))し、GAMブイヨン培地(日水製薬(株))で1.63 mg/mLおよび163 mg/mLとなるように用時調製した。

2 病原微生物

使用菌株は、*Clostridioides difficile* (ATCC43255, 以下*C. difficile*)を使用した。菌株は、GAM寒天培地に接種し、脱酸素剤を充填した嫌気ジャーに入れ、37°C設定の恒温器(ILE800, ヤマト科学(株))で5日間培養した。培養後、コロニーを釣菌し、GAMブイヨン培地に加え、脱酸素剤を充填した嫌気ジャーに入れ、37°C設定の恒温器で2日間培養した。培養後の培養液を接種菌原液とした。接種菌原液をGAMブイヨン培地で10倍希釈したものを接種菌液とした。

生菌数確認は、接種菌液の一部を採取し、生理食塩液で適宜希釈し、GAM寒天培地に塗抹後、脱酸素剤を充填した嫌気ジャーに入れ、37°C設定の恒温器で5日培養した。培養後のコロニー数をハンディコロニーカウンター(CC-1, アズワン(株))で計測し、接種菌液1 mL中に含まれる生菌数を算出した。その結果、接種菌液濃度は 2.8×10^5 CFU/mLであった。

3 試験方法

試験管に接種菌液1 mLに対して、調製した検体液(1.63 mg/mL液および163 mg/mL液)をそれぞれ0.65 mLの割合で添加し、脱酸素剤を充填した嫌気ジャーに入れ、37°C設定の恒温器で培養した。培養開始時、培養12, 24および48時間後にそれぞれ試験管を取り出し、培養液の一部を採取し、適宜希釈して、CCFA培地(日本ベクトン・ディッキンソン(株))に培養液原液、希釈液を塗抹後、37°C設定の

表 1 試験群構成

群	試験群	被験物質濃度 (mg/mL)	<i>C. difficile</i> 菌液濃度 (CFU/mL)
1	対照	0	1.7×10^5
2	低濃度 <i>HkEf</i>	0.64	1.7×10^5
3	高濃度 <i>HkEf</i>	64	1.7×10^5

表示濃度は混合後の最終濃度

表 2 *C. difficile* 生菌数

群	対照群	低濃度 <i>HkEf</i> 群	高濃度 <i>HkEf</i> 群
サンプル数	5	5	5
培養時間 0	360.0 ± 75.9	306.0 ± 22.7	300.0 ± 22.1
12	3680.0 ± 239.6	33.2 ± 4.9**	12.0 ± 1.1**
24	3880.0 ± 475.8	27.1 ± 6.7**	8.4 ± 3.4**
48	33020.0 ± 2267.5	15.7 ± 4.9**	5.7 ± 3.2**

Mean ($\times 10^3$ CFU/mL) ± SE

** $P < 0.01$ vs. 対照群

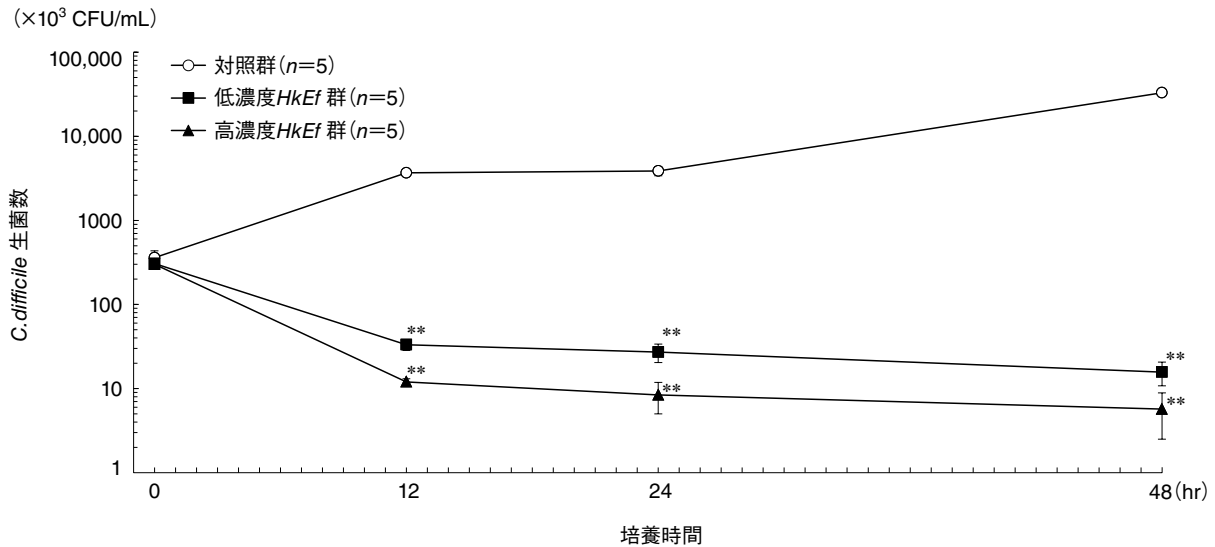


図 1 *C. difficile* 生菌数の推移

** $P < 0.01$ vs. 対照群

恒温器で5日間嫌気培養した。培養後のコロニー数をハンディコロニーカウンターで計測し、生菌数を算出した。対照として、検体液の代わりにGAMブイオンを加えた。サンプル数は5とした。試験群構成を表1に示す。

4 統計処理

生菌数は平均値および標準誤差を算出した。有意差検定は、生菌数について、対照群 vs. 検体群でWilcoxonの順位和検定を用いて行った。危険率は

5%を有意とし、それぞれ5%未満および1%未満に分けて表示した。

なお、統計解析は市販の統計プログラム(SASシステム:SASインスティテュートジャパン)を用いた。

II 結 果

試験結果を表2、図1に示した。対照群の*C. dif-*

ficile の生菌数は、培養開始時で 360.0 ± 75.9 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 12 時間後で 3680.0 ± 239.6 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 24 時間後で 3880.0 ± 475.8 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 48 時間後で 33020.0 ± 2267.5 ($\times 10^3$ CFU/mL) であった。

低濃度 *HkEf* 群 (0.64 mg/mL) の *C. difficile* の生菌数は、培養開始時で 306.0 ± 22.7 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 12 時間後で 33.2 ± 4.9 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 24 時間後で 27.1 ± 6.7 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 48 時間後で 15.7 ± 4.9 ($\times 10^3$ CFU/mL) であった。対照群と比較して、培養後 12 時間、24 時間及び 48 時間で有意な生菌数の減少が認められた。高濃度 *HkEf* 群 (64 mg/mL) の *C. difficile* 菌の生菌数は、培養開始時で 300.0 ± 22.1 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 12 時間後で 12.0 ± 1.1 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 24 時間後で 8.4 ± 3.4 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養 48 時間後で 5.7 ± 3.2 ($\times 10^3$ CFU/mL) であった。対照群と比較して、培養後 12 時間、24 時間および 48 時間で有意な生菌数の減少が認められた。

III 考 察

今回の *HkEf* と *C. difficile* との混合培養による *in vitro* 試験の結果から、低濃度 *HkEf* 群 (0.64 mg/mL) および高濃度 *HkEf* 群 (64 mg/mL) とともに、培養後 12 時間、24 時間および 48 時間で、対照群と比較して *C. difficile* 生菌数の有意な減少が認められた。48 時間培養における *C. difficile* 生菌数は対照群にくらべて、低濃度 *HkEf* 群では約 1/1000 に、高濃度 *HkEf* 群では約 1/10,000 まで抑えられていた。このことから、*HkEf* の *C. difficile* に対する明らかな増殖抑制効果が確認された。

Ishijima ら¹²⁾ は、*Candida albicans* (以下、*C. albicans*) と *HkEf* を共培養したところ、*HkEf* が *C. albicans* を取り囲むような直接的な接触により、*C. albicans* のプレートへの接着を抑制したことを確認している。また、口腔カンジダ症モデルマウスにおける *HkEf* の事前または事後の経口投与が、口腔カンジダ症に対して防御的に働き、その効果は *HkEf* と *C. albicans* との直接的な接触による作用を反映していると報告している。これらは、今回われわれの得た結果を後押しするものである。また、Yamazaki

ら¹³⁾ も、*in vitro* 試験において、口腔カンジダ症の患者から分離された *C. albicans* の菌糸の成長を *HkEf* が抑制することを確認しており、さらに、口腔カンジダ症患者を対象に行った臨床試験において、*HkEf* を 7 日間摂取した患者における *C. albicans* 生菌数減少を明らかにし、*HkEf* の経口摂取が口腔カンジダ症の予防および治療に効果的であることを報告している。

C. albicans は、通常、健常者の口腔、皮膚、咽頭などの正常細菌叢に存在する二形性真菌で、病原性を発揮する際には、酵母形から菌糸形へと形態を変化させる。生体組織に定着して増殖し標的となる組織に傷害を与え、感染の進行によって真菌血症や全身感染を引き起こす^{14,15)}。細菌である *C. difficile* は、真菌である *C. albicans* のような菌糸はもたず、運動性のある周毛性鞭毛をもつが、芽胞を形成し休眠するなどの共通点がある。*HkEf* と *C. albicans* の直接的な接触における結合の分子機構については、まだ解明されていないが¹²⁾、今回われわれは、*C. albicans* と同じく病原性を有する *C. difficile* を用いた *in vitro* 試験において、*HkEf* の同様の直接的な増殖抑制効果を明らかにした。

また、著者らは先行研究において、*C. difficile* 腸管感染モデル動物に対する *HkEf* の事前および/または事後の経口投与により、生存率の上昇と糞便中の *C. difficile* 生菌数の検出菌数抑制を報告し、*HkEf* による *C. difficile* 生菌数の増殖抑制が生存率に寄与したことを明らかにしている¹¹⁾。*HkEf* は、腸管粘膜を介して腸管リンパ組織に取り込まれ、生体にシグナルをもたらすことで、宿主生体の免疫反応に深く関与することが明らかになっている¹⁶⁾。しかし、*C. difficile* 腸管感染モデル動物に対する感染防御効果は、それとは異なる機序、つまり宿主生体の免疫賦活作用だけではない、*HkEf* の *C. difficile* に対するなんらかの乳酸菌体直接作用によるものの可能性が推察された。その理由として、通常、正常な腸内細菌叢においては、腸内細菌の影響により *C. difficile* の増殖は抑制されるが、*C. difficile* 腸管感染モデル動物はクリンダマイシン処理により腸内細菌叢の破綻を起こしているにもかかわらず、*HkEf* の投与により *C. difficile* 生菌数の増殖が抑制されたことにある¹¹⁾。これは、腸内細菌による *C. difficile* の増殖抑

制作用,あるいは腸管粘膜を介した宿主生体の免疫反応とも異なる機序であり, *HkEf*が *C. difficile* に直接接触することによる作用の可能性があるといえる。

今回,われわれが得た *in vitro* 試験の結果は, *HkEf* の *C. difficile* に対するなんらかの直接的な相互作用を裏づけるものであり, *C. difficile* 腸管感染モデル動物の糞便中の *C. difficile* 生菌数の急激な増殖を抑制した機序の一つと考えられる。*C. difficile* のように発症するまでに時間がかかるような病態では,経口摂取した *HkEf* が生体内において *C. difficile* の増殖時期に,粘膜上で直接的な接触による相互作用を起こしている可能性が大いに推察される。

本検討は培養試験であり,ただちに動物やヒトへの効果を担保したものではないが, *HkEf* のもつ *C. difficile* に対する感染防御機構における作用機序を明確にする大きな一歩であり,今後,臨床においてその効果を検証するさらなる研究が期待される。

結 論

HkEf は *C. difficile* に対して,直接的な増殖抑制効果を有することが確認された。

【利益相反】 著者らは,本論文を公開するに際しなんら利益相反はないことを宣言する。

文 献

- 1) 国公立大学附属病院感染対策協議会編, 病院感染対策ガイドライン, 2018年版, 株式会社じほう; 2018.
- 2) 公益社団法人日本化学療法学会・一般社団法人日本感染症学会, *Clostridioides (Clostridium) difficile* 感染症診療ガイドライン, 日化療会誌 2018; 66 (6): 645-90.
- 3) Oughton MT, Loo VG, Dendukuri N, Fenn S, Libman MD. Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of clostridium difficile. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2009; 30 (10): 939-44.
- 4) Bartlett JG. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clinical Infectious Diseases* 1994; 18: S265-72.
- 5) 厚生労働省, 重篤副作用疾患別対応マニュアル 偽膜性大腸炎, (平成20年3月)
<https://www.mhlw.go.jp/topics/2006/11/dl/tp1122-1g05.pdf>
- 6) McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, et al. Clinical practice guidelines for clostridium difficile Infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases* 2018; 66 (7): e1-48.
- 7) Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20 (Suppl 2): 1-26.
- 8) 『クロストリジウム・ディフィシルによる感染性腸炎治療薬として日本における「ダフクリア®錠」の製造販売承認取得』
https://www.astellas.com/jp/system/files/news/2018-07/180702_2_Jp.pdf
- 9) 厚生労働省 健康局結核感染症課, 抗微生物薬適正使用の手引き, 第2版,
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000573655.pdf>
- 10) McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989; 320 (4): 204-10.
- 11) 中尾光治, 原浩祐, 松尾知恵, 川口晋, 感染動物に対する加熱殺菌した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* の投与効果に関する検討, 新薬と臨 2020; 69 (3): 276-87.
- 12) Ishijima SA, Hayama K, Ninomiya K, Iwasa M, Yamazaki M, Abe S. Protection of mice from oral candidiasis by heat-killed *Enterococcus faecalis*, possibly through its direct binding to *Candida albicans*. *Med Mycol J* 2014; 55E: E9-E19.
- 13) Yamazaki T, Ushikoshi-Nakayama R, Shirone K, Suzuki M, Abe S, Matsuomoto N, et al. Evaluation of the effect of a heat-killed lactic acid bacterium, *Enterococcus faecalis* 2001, on oral candidiasis. *Beneficial Microbes* 2019; 10 (6): 661-9.
- 14) Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4 (2): 119-28.
- 15) Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10 (1): 85-93.
- 16) Ou CC, Lin SL, Tsai JJ, Lin MY. Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. *J Food Sci*. 2011; 76 (5): M260-7.

受理日 (2020-2-19), 採択日 (2020-3-24)