

## 加熱殺菌した乳酸菌 E.フェカリスの C. デイフィシル (*C. difficile*) に対する増殖抑制効果

### はじめに

クロストリディオイデス・デイフィシル (*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原菌として知られる<sup>1)</sup>。

#### ●芽胞状態で長期生存、 除去は極めて困難

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存する<sup>1)2)</sup>。芽胞のままで菌が増殖することはないが、熱や乾燥、アルコール消毒条件下でも死滅せず<sup>1)3)</sup>、一旦院内環境への汚染が生じると、芽胞状態で長期間存在するため<sup>2)</sup>、芽胞の除去は極めて困難である。

#### ●抗菌薬等の投与で腸内細菌叢が攪乱されると…

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乱されることで *C. difficile* が定着・増殖すると、*C. difficile* 感染症 (*Clostridioides difficile* infection: CDI) を発症する<sup>1)</sup>。症状としては、ブリストルスケール5以上の下痢、腹痛、偽膜性腸炎等がみられる。

#### ●抗菌薬による治療においては慎重投与が求められる

治療法としては抗菌薬の投与や見直し、予防としてはプロバイオティクス製剤の投与等が行われる。標準治療薬と



東邦大学医療センター  
大森病院  
栄養治療センター 部長  
栄養部 部長  
東邦大学医学部  
臨床支援室 教授

鷺澤尚宏 先生

して、抗菌薬のメロニダゾールやバンコマイシン、フィダキシソマイシン等が推奨されている<sup>2)</sup>。CDIは抗菌薬使用自体が発症リスク因子としてあげられ<sup>1)</sup>、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)<sup>4)</sup>を参照し、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。

#### ●CDIの主な危険因子は、高齢者、経管栄養の使用、 ICU入室患者

CDIは、長期入院<sup>5)</sup>、免疫力が低下した高齢者や経管栄養の使用などが危険因子となる<sup>6)</sup>。急性期では特にICU等の集中治療室での発生が多く、一旦発症すると再発を繰り返す患者も少なくない。

欧米ではCDIの発生率が高い上、特に北米では偽膜性腸炎、中毒性巨大結腸症など重症化し死に至る例も多く、社会問題化し、CDIに対する関心度は高い<sup>7)8)</sup>。日本においては、北米のような重症化したCDI症例に遭遇する例はそれほど多くはないのが実状であろう。

#### ●注目される加熱殺菌した乳酸菌の*C. difficile*に対する 増殖抑制効果

近年、薬剤耐性菌の対応策の一環として、いくつかの乳酸菌の加熱殺菌菌体を用いた薬剤耐性菌への効果が検討されている。同様に院内感染症対策の一つとして *C. difficile* への乳酸菌の効果を期待し、その使用が検討されている。今回は、最近発表された、乳酸菌加熱殺菌菌体 E. フェカリスの、特に *C. difficile* に対する効果に関する2論文を取り上げレビューしたい。

### 原著①

#### 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

ニュートリー株式会社 中尾光治、原 浩祐、松尾知恵、川口 晋  
新薬と臨床 Vol.69, No.3, 276-287, 2020

本論文は

■ 多剤耐性緑膿菌 (Multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, 以下, MDRP)

■ 肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, 以下, *S. pneumoniae*)

■ クロストリディオイデス・デイフィシル (*Clostridioides difficile*, 以下, *C. difficile*)

の感染動物を用いて乳酸菌の投与効果を検討した報告である。ここでは、*C. difficile* のハムスター感染試験結果について紹介する。

## C. difficileハムスター感染試験(試験方法の概要: 表1、図1参照)

加熱殺菌した乳酸菌E.フェカリス(Heat-killed lactic acid bacteria *Enterococcus faecalis*, 以下, *HkEf*)の経口からの事前あるいは事後投与による感染防御効果を*C. difficile*ハムスター感染モデル試験により検証した。

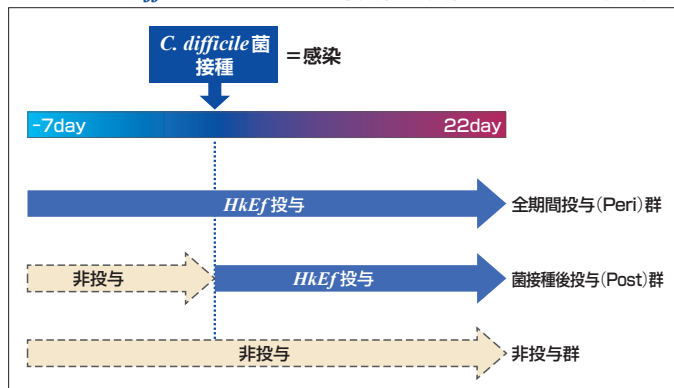
試験終了時の生存率は、非投与群20%に対して、菌接種の前後(全期間)に*HkEf*を投与した群(Peri群)で90%、菌接種後に*HkEf*を投与した群(Post群)で80%であり、両群とも有意に生存率が高い結果となった(図2)。さらに*C. difficile*は、糞便中の生菌数が*HkEf*投与群において有意に少なく、芽胞菌である*C. difficile*に対する直接的な作用も示唆した結果となった(図3)。

▼表1 《C. difficileハムスター感染試験》試験方法概要

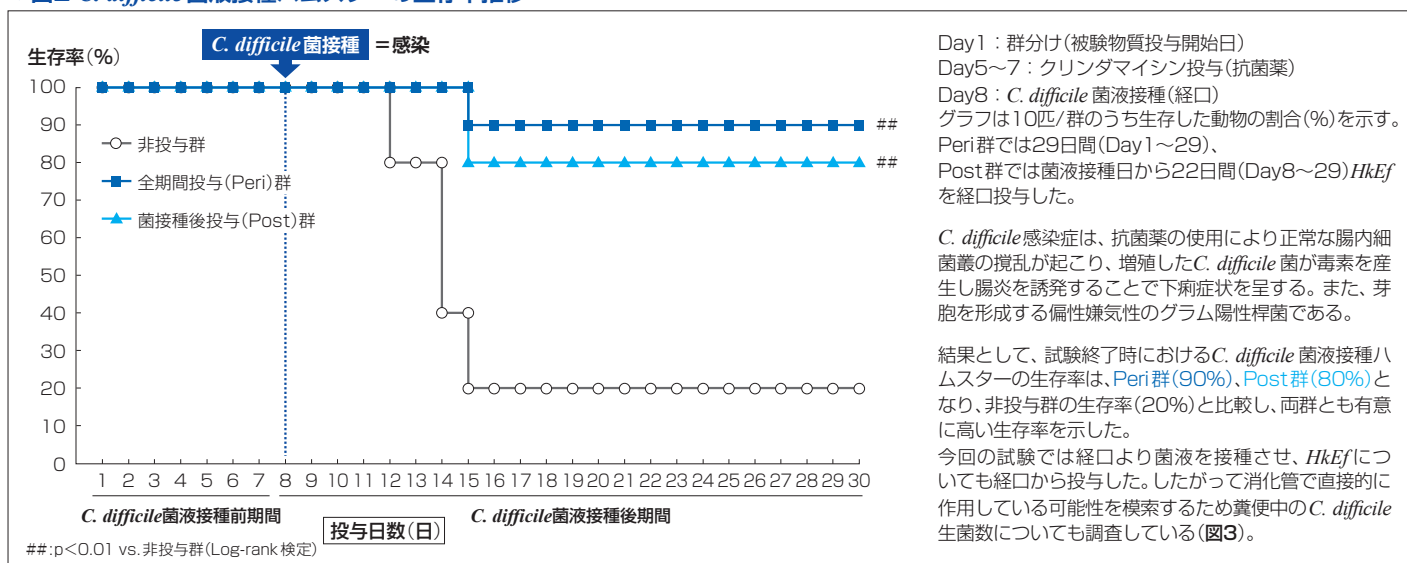
- ◆使用動物: 3週齢のSyrian系(Slc: Syrian)雄ハムスター
  - ※*C. difficile*はマウスの感受性が低く、感染モデルを作製することが困難であり、感受性の高いハムスターにて試験を実施した。
  - ※正常な腸内細菌叢を攪乱させるために抗菌薬のクリンダマイシンを腹腔内投与
- ◆*C. difficile*の接種: 経口投与
- ◆被験物質の投与: 経口投与(*HkEf*を120億個/kg/日)

群	<i>HkEf</i> の投与期間	<i>HkEf</i> の投与量
非投与群	非投与	注射用蒸留水
全期間投与(Peri)群	全期間	120億個/kg/日: ヒト換算量(体重50kg): 6,000億個/日
菌接種後投与(Post)群	<i>C. difficile</i> 接種後のみ	6,000億個/日

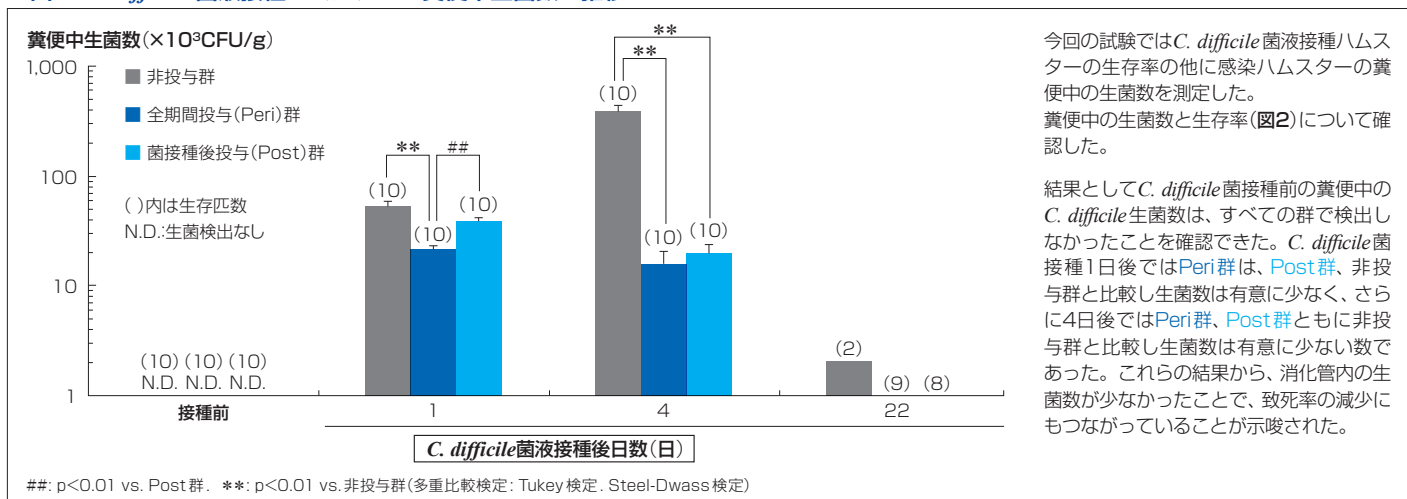
▼図1 《C. difficileハムスター感染試験》試験スケジュール概要



▼図2 C. difficile菌液接種ハムスターの生存率推移



▼図3 C. difficile菌液接種ハムスターの糞便中生菌数の推移



## 原著②

### 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

ニュートリー株式会社 松尾光恵、中尾光治、原 浩祐、川口 晋  
薬理と治療 (JPT) Vol. 48 No. 4, 721-725, 2020

## 論文概要

原著①の *C. difficile* を経口で接種させたハムスター腸管感染モデル試験において、*HkEf* 投与群 (経口投与) では、非投与群と比較して有意に高い生存率と、感染直後の早い段階で糞便中 *C. difficile* 生菌数の抑制が確認された。この結果より、*HkEf* には宿主生体への免疫賦活作用だけでなく、腸管粘膜上における *C. difficile* への直接的な接触による相互作用の可能性が推察された。そこで、著者らは *HkEf* の *C. difficile* に対する直接的な増殖抑制効果を確認するため、*HkEf* と *C. difficile* との混合培養試験を実施した。*C. difficile* 生菌数は対照群に対し、低濃度群、高濃度群では12時間後、24時間後、48時間後において有意な低値が認められた (図4、表4)。

▼表2 << *C. difficile* 混合培養試験 >> 試験方法概要

- ◆被験物質: *HkEf* 粉末
- ◆病原微生物: *Clostridioides difficile* (ATCC43255)
- ◆サンプル数: n=5
- ◆試験方法: 試験管で接種菌液に検体液を添加して培養し、培養開始時、培養12、24および48時間後取り出し、適宜希釈した後、培地で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。

試験概要

**ポイント①** *HkEf* の濃度の設定は、生体内の環境を試験管で再現することはできないが、低濃度群は *HkEf* を6,000億個/125mLとなるように設定し、高濃度群はこれ以上混ぜられない限界に近い濃度として低濃度群の100倍濃度の60兆個/125mLとした。

**ポイント②** 生菌数の測定ポイントは、ハムスター感染試験で糞便中生菌数がPeri群の1日後(24時間後)で有意に少なかったことから混合培養試験においても24時間後で有意な生菌数の変化が確認できると想定し、その1/2の12時間後、2倍の48時間後にも観察時間を設定した。

▼表3 *HkEf* と *C. difficile* 菌の最終濃度

群	<i>HkEf</i> 濃度 (mg/mL)	<i>C. difficile</i> 菌液濃度 (CFU/mL)
対照群 (CD菌のみ培養)	0	$1.7 \times 10^5$
低濃度 <i>HkEf</i> 群 (CD菌+低濃度 <i>HkEf</i> )	0.64	$1.7 \times 10^5$
高濃度 <i>HkEf</i> 群 (CD菌+高濃度 <i>HkEf</i> )	64	$1.7 \times 10^5$

表示濃度は混合後の最終濃度

試験管に調整した *C. difficile* 菌液 1mL ( $2.8 \times 10^5$  CFU/mL) に対して、調整した *HkEf* 検体液 1.63mg/mL (低濃度)、163mg/mL (高濃度)、対照として GAM ブイヨン<sup>\*1</sup> をそれぞれ 0.65mL の割合で添加し、嫌気ジャーに入れて 37°C で培養した (表2)。*HkEf* と *C. difficile* 菌の最終濃度は表3に示した通りである。開始時、12、24、48時間後に取り出して、培養液の一部を採取し、適宜希釈して *C. difficile* 菌を選択的に培養する CCFA 培地<sup>\*2</sup> に塗抹後、37°C で5日間培養。コロニー数を計測し生菌数を算出した。

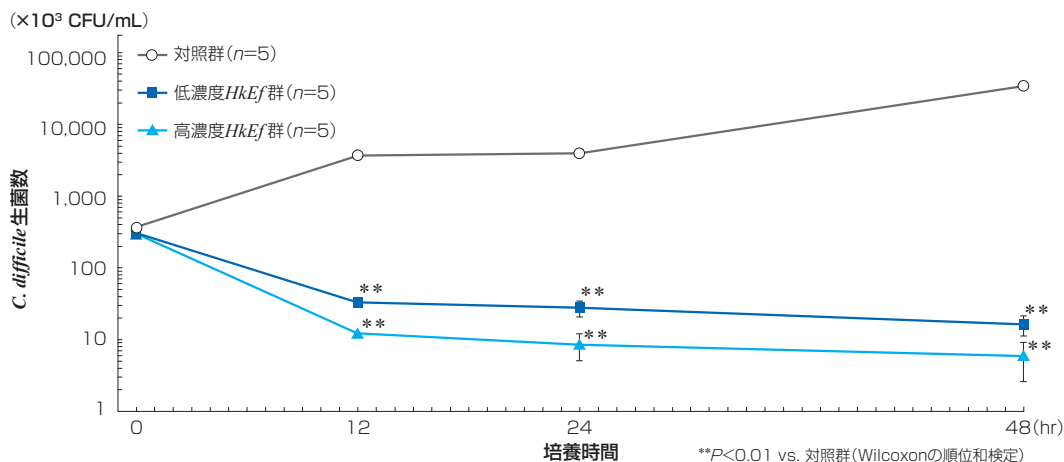
**\*1 GAMブイヨン培地**

- 嫌気性菌を液体培養する際に使用する液体培地
- 今回の試験では *C. difficile* を培養する際の希釈液や対照検体として使用

**\*2 CCFA培地**

- 多種の菌が混在する検体から *C. difficile* を選択分離する培地

▼図4 *C. difficile* 生菌数の推移



混合培養試験結果

*C. difficile* 菌と *HkEf* の混合培養試験の結果として、図4より、*C. difficile* 生菌数は対照群で指数関数的に増加したのに対し、低濃度群、高濃度群では対照群と比較し、ともに12時間後、24時間後、48時間後において生菌数は有意に少ない値が認められた。48時間後の生菌数は対照群と比較して低濃度群では約 1/1,000に、高濃度群では約 1/10,000に抑えられていた (表4、図4)。このことから、*HkEf* の *C. difficile* に対する増殖抑制効果が確認された。

▼表4 *C. difficile* 生菌数

群	培養開始時	培養12時間後	培養24時間後	培養48時間後
対照群 (CD菌のみ培養)	360.0±75.9	3680.0±239.6	3880.0±475.8	33020.0±2267.5
低濃度 <i>HkEf</i> 群 (CD菌+低濃度 <i>HkEf</i> )	306.0±22.7	33.2±4.9**	27.1±6.7**	15.7±4.9**
高濃度 <i>HkEf</i> 群 (CD菌+高濃度 <i>HkEf</i> )	300.0±22.1	12.0±1.1**	8.4±3.4**	5.7±3.2**

Mean ( $\times 10^3$  CFU/mL) ± SE \*\*P<0.01 vs. 対照群 (Wilcoxonの順位和検定)



先行する*C. difficile*ハムスター腸管感染モデル試験(原著①)では、*HkEf*を経口投与した群で高い生存率であった。また糞便中の*C. difficile*生菌数は*HkEf*投与群では非投与群と比較して、感染直後の早い段階から有意に少ない結果が得られた。これらの結果より*HkEf*の宿主生体の免疫反応によらない、腸管内での何らかの直接的作用の可能性が推察された。

原著②の*HkEf*と*C. difficile*混合培養試験においては、直接作用の可能性を検証するために、*HkEf*を低濃度群(125mLあたり6,000億個換算)、高濃度群(125mLあたり60兆個換算)、対照群と設定し、*C. difficile*と混合培養したところ、対照群と比較し、低濃度群と高濃度群で12時間後より有意な*C. difficile*生菌数の低値が認められた。こ

の結果から、*HkEf*の何らかの直接的な静菌あるいは殺菌作用により、増殖抑制効果が確認された。先行研究では、Ishijimaら<sup>9)</sup>がカンジダ菌(*C. albicans*)と*HkEf*の共培養試験で、*HkEf*が*C. albicans*を取り囲むような直接的な接触による相互作用を報告しており、今回の結果を後押しするものとなっている。

今回の2つの研究より、*HkEf*の*C. difficile*に対する増殖抑制効果が、*C. difficile*腸管感染モデル動物の糞便中*C. difficile*生菌数の急激な増殖を抑制した機序の一つであると考えられた。また、*C. difficile*のように発症までの時間のかかる病態では、*C. difficile*の腸管での増殖時期に経口摂取した*HkEf*が粘膜上において直接的な接触を起こしている可能性が推察された。

## 総評

腸管感染症の治療においては抗菌薬、その使用に伴って起こる菌交代現象、薬剤耐性菌の出現などが長年の話題であった。そこにプロバイオティクスによる治療や便秘植などの治療が新しい方法として我々に感動を与えるのは、おそらくマイクロバイオータ\*の調整をすることが生体の調整、生きる調整をするという治療への期待感なのではないか。それによって宿主の免疫能や消化器の機能を改善して、予後の改善が得られるというイメージを持っている。

*C. difficile*感染症(CDI)は北米やヨーロッパを中心に、偽膜性腸炎や中毒性巨大結腸症をおこすことや、強毒株による重症例や死亡例が非常に多い<sup>7,8)</sup>ことから、CDIの診断、治療、感染制御に対する関心が高く、国家レベルでの疫学調査や感染対策がなされている<sup>10)</sup>。一方、我が国は、欧米とは異なり、現在は北米タイプの強毒株のアウトブレイクは見られていないもの<sup>11)</sup>、CDI合併患者の死亡リスクは、加齢に伴い増加するという報告もある<sup>12)</sup>。世界で最も高い高齢化率(28.7%, 2020年; 総務省統計局データ)の

我が国において、今後CDIは深刻な問題になり得ると考えられ、決して軽視できない細菌感染症である。また、日本の医療現場ではCDI検査が適切に行われず多数の患者が見過ごされている可能性があるとの見方もあり<sup>13)</sup>、各医療施設においてCDIに対する認識を高めるための職員への教育・啓発が必要になっていくであろう。

今回の加熱殺菌菌体の投与にさらに直接抑制作用の期待が持たれたことにより、これまでメジャーであったプロバイオティクス、プレバイオティクス、シンバイオティクス領域とは異なる新たな道が拓けるのではなかろうか。今後さらに加熱殺菌した乳酸菌E.フェカリスの有する*C. difficile*に対する感染防御機構における作用機序が明確になれば、臨床的にも腸管内の*C. difficile*の増殖を抑制し、病態の重症化を防ぐ可能性が期待され興味深い。新たな武器のCDIに及ぼす作用が、基礎と臨床の面から十分に解明されていくことにも期待したい。

\*マイクロバイオータ: 微生物叢。生きた微生物集団の全体を指す。<sup>14)</sup>

### 【引用文献】

- 1) 国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. 日化療誌 66(6): 645-90, 2018
- 3) Oughton MT, Loo VG, Dendukuri N et al. Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of *Clostridium difficile*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009;30(10):939-44
- 4) 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. <http://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000573655.pdf>
- 5) McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 1989;320(4):204-10
- 6) 安藤 朗, 馬場 重樹. 特集 主題II: 感染性腸炎-up to date-III. *Clostridium difficile* 感染症の現状. 日本大腸肛門病学会誌71(10): 456-469, 2018
- 7) Jacques Pepin, Louis Valiquette, Marie-Eve Alary et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ. 2004;171(5):466-72.
- 8) Michel Warny, Jacques Pepin, Aiqi Fang et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet. 2005;366(9491): 1079-84
- 9) 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; 55(1):E9-E19.
- 10) 日本の*Clostridioides difficile* 感染症(国立感染症研究所 IASR Vol. 41 p35-36: 2020年3月号) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/tsls-m/tsls-iasrtpc/9501-481t.html>
- 11) 大毛宏喜, 梶原俊毅, 北野弘之. 特集 感染症診療の最前線V. *Clostridioides difficile* 感染症. 日本内科学会雑誌 107(11):2261-2268, 2018
- 12) Takahashi M, Mori N, Bito S. Multi-institution case-control and cohort study of risk factors for the development and mortality of *Clostridium difficile* infections in Japan *BMJ Open* 2014;4:e005665. doi:10.1136/bmjopen-2014-005665
- 13) Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Hitoshi Honda et al. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection burden in Japan: A multicenter prospective study. Anaerobe 2019 Dec;60:102011.
- 14) 福田真嗣. もっとよくわかる腸内細菌叢. 羊土社; 2019.

