



2022年9月14日

報道関係者各位

慶應義塾大学薬学部

摂取するタンパク質源の違いが腸内細菌を介して

感染性下痢症の病態を変化させることを発見

—食事と腸内細菌を標的とした

Clostridioides difficile 感染症予防法開発に期待—

慶應義塾大学、京都大学を中心とする研究グループは、抗菌剤投与後に摂取する食事のタンパク質源の違いが、腸内細菌を介して *Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) の病態を変化させることを発見しました。本研究は慶應義塾大学大学院薬学研究科博士課程の矢加部恭輔 (やかべ きょうすけ)、同薬学部の金倫基 (きむ りんぎ) 教授、京都大学を中心とする研究グループの成果です。

CDI は、抗菌剤投与による腸内細菌叢 (注1) の乱れをきっかけに、*C. difficile* が腸内で増殖し、毒素を産生することにより発症し、下痢・下腹部痛・発熱・白血球増加などを引き起こす感染症です。CDI に対しては、健常人の腸内細菌を患者に移植する便微生物移植 (Fecal microbiota transplantation: FMT) (注2) が非常に有効であることから、CDI の発症や予防には腸内細菌叢が大きく影響しているといえます。腸内細菌叢の構成や、それらが産生する代謝物は、我々が日々摂取する食事によって変動します。そのため、摂取する食事成分の違いが腸内細菌叢を介して CDI 病態を変化させるのではと考えました。

本研究では、食事に含まれるタンパク質源が CDI 病態に影響を与えることを見出しました。すなわち、タンパク源として大豆タンパク質を摂取すると、カゼインを摂取した場合と比べて、*C. difficile* の腸内での増殖が促進され、CDI 病態が悪化することが分かりました。また、大豆タンパク質が腸内の *Lactobacillus* 属細菌を増加させ、その際に放出されるアミノ酸が *C. difficile* の増殖を促進させていることが分かりました。さらに、*Lactobacillus* 属細菌によるアミノ酸産生には、タンパク質を菌体外で消化する酵素 (PrtP) が関与していることも明らかとなりました。実際に、PrtP 遺伝子を欠損した *Lactobacillus* 属細菌では、アミノ酸の産生能が低下し、*C. difficile* の増殖促進作用も減弱しました。

CDI は、抗菌薬起因性の下痢症の 20-30% を占め、入院患者で最も多い感染性下痢症です。CDI のリスク因子として、抗菌薬の他に、高齢・入院期間・プロトンポンプ阻害薬 (胃酸分泌抑制)・基礎疾患などがこれまでに報告されてきました。本研究により、抗菌剤投与後の CDI の発症や病状に食事成分、特に、摂取するタンパク質の種類が大きく影響することが明らかになりました。今後、食事に着目したより安全で簡便な CDI 予防法の確立や、腸内のアミノ酸濃度を低下させる新規 CDI 予防薬の開発が期待されます。

本研究成果は 2022 年 9 月 13 日 (米国東部標準時) に国際学術誌『Cell Reports』(電子版) に掲載されました。

1. 本研究のポイント

・大豆タンパク質食は *Clostridioides difficile* 感染症(CDI)を悪化させる。

その機序としては

- ・抗菌剤投与後の大豆タンパク質食は、*Lactobacillus* 属菌の相対的存在量を高める。
- ・*Lactobacillus* 属菌は大豆タンパク質を消化し、*C. difficile* の増殖を促進する腸内アミノ酸量を増加させる。

抗菌剤投与マウス

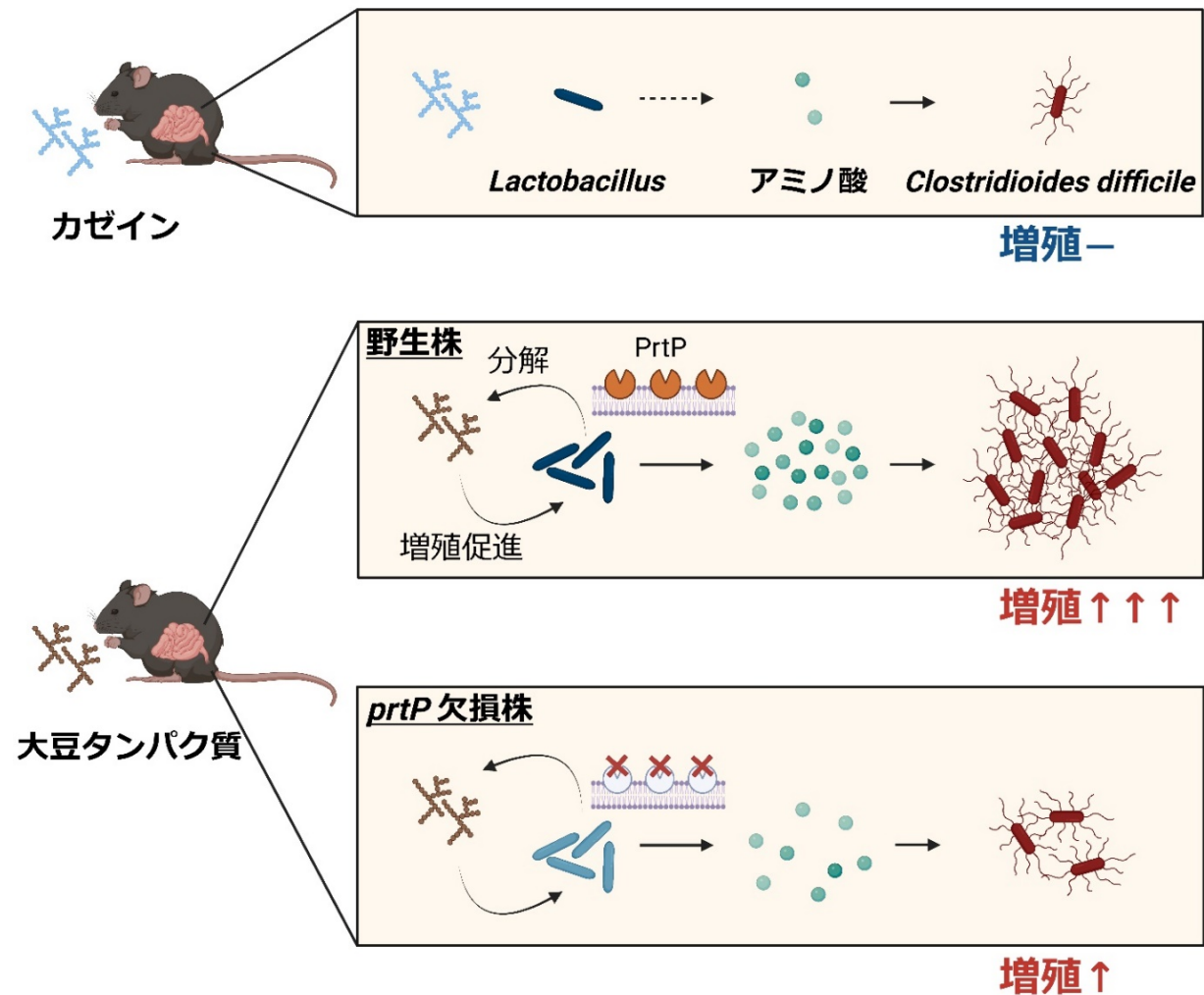


図 1. 本研究の概念図

食事時のタンパク質源の違いが腸内細菌を介して CDI の病態を変化させる。抗菌剤投与マウスにタンパク質源として大豆タンパク質を与えると、カゼインを与えた場合と比べて、*C. difficile* の増殖が促進され、CDI 病態が悪化する。大豆タンパク質は、腸内のアミノ酸量を増加させることにより *C. difficile* の増殖を促進させる。大豆タンパク質による腸内アミノ酸の増加には、*Lactobacillus* 属細菌が関与している。すなわち、*Lactobacillus* 属細菌は大豆タンパク質を栄養源として増殖するが、PrtP という酵素を用いて大豆タンパク質を消化する際にアミノ酸を作り出す。実際に、PrtP を欠損する *Lactobacillus* 属細菌 (*prtP* 欠損株) は野生株と比べてアミノ酸産生量が減少し、その結果、*C. difficile* の増殖促進も減弱する。

2. 研究の背景

CDIは、毒素を産生する *C. difficile* が腸管内で増殖することにより、引き起こされる感染症です。CDIでは、1日10回以上に及ぶ水様性の下痢や発熱・腹痛などの症状が現れ、大腸内視鏡検査で偽膜性大腸炎が認められることもあります。*C. difficile* は抗菌剤投与などによる腸内細菌叢の乱れをきっかけに大腸において増殖します。また、CDIに対しては、健康人の腸内細菌を患者に移植する便微生物移植が著効します。

これらのことから、CDIの発症や予防には腸内細菌叢が深く関わっているといえます。腸内細菌叢の構成や代謝は、我々が摂取する食事によって大きな影響を受けます。そのため、摂取する食事成分が腸内細菌叢を介してCDIの病態を変化させる可能性が考えられますが、一部の知見を除き、その実際については不明な点が多く残されていました。

そこで本研究では、CDI病態に影響を及ぼす特定の食事成分および腸内細菌種を同定し、その詳細を明らかにすることを目的としました。

3. 研究の内容・結果

まず、食事成分の違いがCDIの病態を変化させるかどうかを検証するため、三大栄養素である炭水化物、タンパク質、脂質の配合比率はほぼ同等である一方、含有成分が大きく異なる2種類の飼料（標準天然飼料：RD、標準精製飼料：PD）を用いて検討しました。具体的には、炭水化物源として、RDは小麦粉やコーンスターチを、PDはコーンスターチやグラニュー糖を含み、タンパク質源として、RDは大豆タンパク質や白身魚粉を、PDはカゼインを含み、脂質源として、RDは穀物胚芽や大豆油を、PDは大豆油を含んでいます。抗菌剤投与後のマウスにRDおよびPDをそれぞれ与え、*C. difficile* の芽胞（注3）を経口投与しました。その結果、PD摂餌マウスでは50%が10日間生存したのに対し、RD摂餌マウスは全てのマウスが2日目に死亡しました（図2A）。感染後1日目の大腸の病理組織像を観察したところ、RD摂餌マウスの大腸組織では、腸上皮細胞の過形成や免疫細胞の浸潤が確認されましたが（図2B左）、PD摂餌マウスの大腸組織ではそのような病理像は確認されませんでした（図2B右）。また、炎症マーカーとしてリポカリン-2の糞便中濃度を測定したところ、PD摂餌群と比べて、RD摂餌群で有意に高い値を示しました（図2C）。さらに、腸内の *C. difficile* の細菌数を算定したところ、RD摂餌群では糞便1gあたりおよそ 10^8 colony-forming unit (CFU) の細菌が検出されたのに対し、PD摂餌群では、ほとんどが検出限界以下でした（図2D）。*C. difficile* は、毒素を産生することで腸上皮バリアを傷害することが知られています。そこで、*C. difficile* の毒素遺伝子の量を定量PCR法（注4）にて確認しました。その結果、*C. difficile* が産生する主な毒素（TcdA、TcdB）に対応する遺伝子（*tcdA*、*tcdB*）の量が、PD摂餌群と比べてRD摂餌群で有意に高くなることが分かりました（図2E）。以上の結果から、抗菌剤投与後のRD摂餌によって、腸内における *C. difficile* の定着が促進し、CDI病態が悪化することが示唆されました。

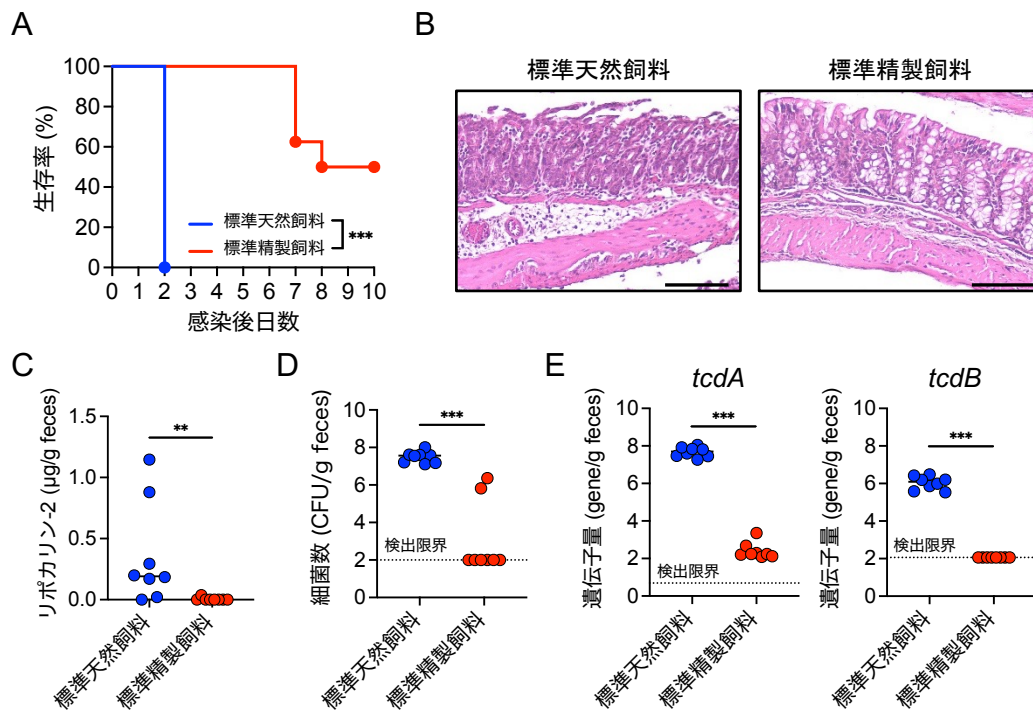


図 2. 抗菌剤投与後の標準天然飼料摂餌により、CDI 病態が増悪する。

抗菌剤投与後、標準天然飼料 (RD) と標準精製飼料 (PD) をそれぞれ摂餌したマウスに *C. difficile* の芽胞を経口投与にて感染させた。

(A) *C. difficile* 感染後 10 日間のマウスの生存率。

(B-E) *C. difficile* 感染後 1 日目について CDI 病態を解析した。(B) 大腸の組織病理写真 (ヘマトキシリン・エオジン染色)。右下黒線は 100 µm を示す。(C) 糞便中リポカリン-2 濃度。(D) 糞便中の *C. difficile* の細菌数。(E) *C. difficile* の毒素 (TcdA、TcdB) それぞれに対応する遺伝子 (*tcdA*、*tcdB*) の存在量を定量 PCR にて定量した。 ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

次に、RD 摂餌による CDI の病態悪化の原因を探索するため、感染直前の糞便について、代謝物組成を網羅的に解析するメタボローム解析 (注 5) を実施しました。その結果、RD 摂餌群では PD 摂餌群に比べてアミノ酸およびアミノ酸関連代謝物が腸内に多く存在していることが分かりました (図 3A、原著論文参照)。そこで、飼料中のタンパク質成分の違いに着目しました。RD は主に大豆タンパク質を、PD は主にカゼインを含んでいます。我々は PD のカゼインを RD 由来の大豆タンパク質に置換した大豆タンパク質飼料 (SD) を作製しました。抗菌剤を投与したマウスに PD および SD をそれぞれ摂餌させると、PD 摂餌群と比べて SD 摂餌群で腸内アミノ酸濃度が顕著に高くなることが分かりました (図 3B)。続いて、両マウスに *C. difficile* を感染させたところ、SD 摂餌群では PD 摂餌群と比べて生存率が低く、糞便中の *C. difficile* が多くなることが観察されました (図 3C、D)。すなわち、抗菌剤投与後に大豆タンパク質を含む飼料 (RD および SD) を摂取することで、腸内のアミノ酸濃度が高まり、CDI 病態が悪化することが示されました。さらに、抗菌剤投与後の SD 摂餌によるアミノ酸濃度の上昇が *C. difficile* の増殖促進に関わっているのかどうかを確認するため、感染直前時の PD および SD 摂餌マウスの盲腸内容物成分を添加し、試験管内で *C. difficile* を培養しました。その結果、PD 摂餌マウスよりも SD 摂餌マウス由来の盲腸内容物成分を添加することにより、*C. difficile* の増殖が促進されました (図 3E 左)。この

増殖促進作用はアミノ酸を分解する酵素（L-アミノ酸オキシダーゼ）を添加することにより消失したことから（図 3E 右）、SD 摂餌群における *C. difficile* の増殖促進は腸内のアミノ酸に依存していることが示されました。

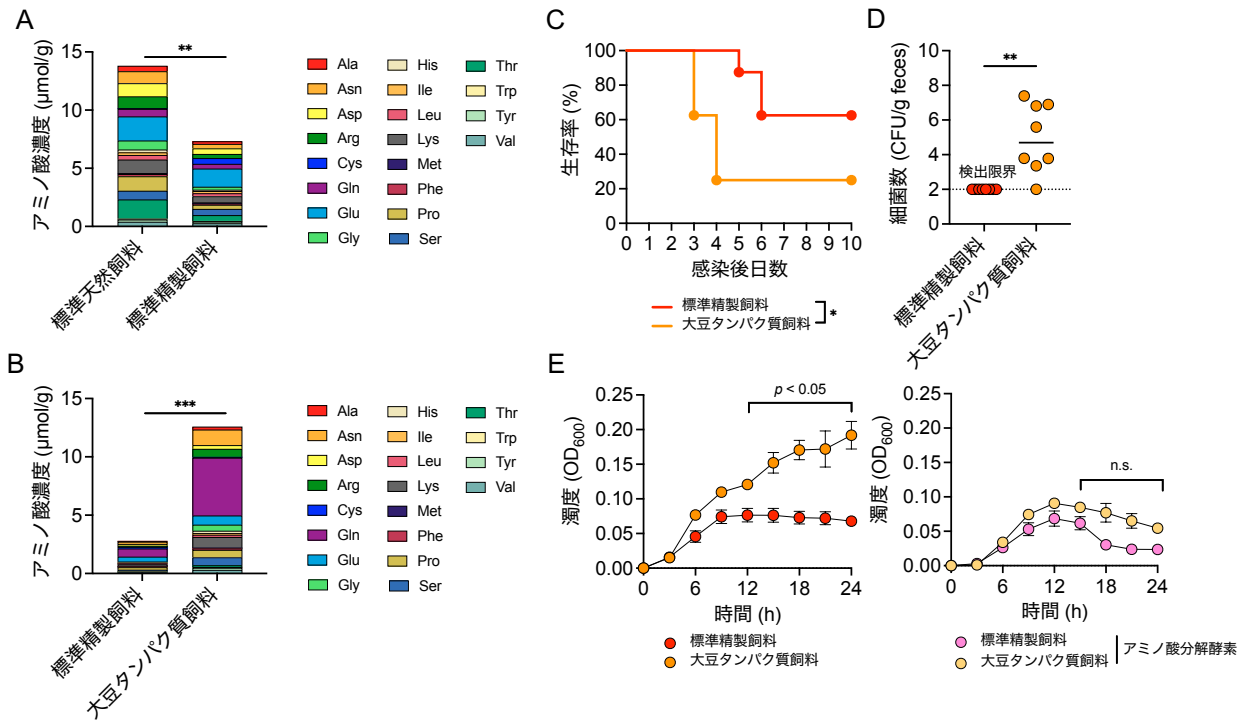


図 3. 抗生物質投与後の大豆タンパク質摂餌は腸内のアミノ酸濃度を高め、*C. difficile* の定着を促進する。

(A、B) *C. difficile* 感染直前時のマウス糞便中のアミノ酸濃度を測定した。(A) 標準天然飼料摂餌群と標準精製飼料摂餌群の比較。(B) 標準精製飼料摂餌群と大豆タンパク質飼料摂餌群の比較。色は各アミノ酸に対応。

(C、D) 抗菌剤投与後、標準精製飼料と大豆タンパク質飼料それぞれを摂餌させたマウスに *C. difficile* の芽胞を経口投与することで感染させた。(C) 感染後のマウスの生存率。(D) *C. difficile* 感染後 1 日目の *C. difficile* の細菌数。

(E) *C. difficile* 感染直前のマウスの盲腸内容物を採取し、その上清を用いて、試験管内において *C. difficile* を培養した。24 時間 3 時間おきに培養液の濁度を測定することで、*C. difficile* の増殖を確認した。(左) アミノ酸分解酵素非添加時、(右) アミノ酸分解酵素添加時。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s.有意差なし。

そこで次に、RD および SD 摂餌群における CDI 病態の悪化に腸内細菌が関与しているかを調べるため、16S rRNA 遺伝子解析（注 6）を行いました。この結果、感染直前時において、大豆タンパク質を含む飼料である RD、SD を摂餌した群では共通して、*Lactobacillus* 属の細菌の相対存在量が増加していることが分かりました（図 4A）。一方で、カゼインを含む PD を摂餌した群では、*Lactobacillus* 属の細菌はほとんど検出されませんでした（図 4A）。そのため、*Lactobacillus* 属細菌が *C. difficile* の増殖促進に関わっているのではと考えました。これを実際に検証するために、RD 摂餌マウスの糞便から *Lactobacillus* 属細菌の単離を試みたところ、*Lactobacillus murinus*（現在は *Ligilactobacillus murinus* に名称変更）を得ることができました。まず、新たに単離した *L. murinus* をカゼインあるいは大豆タンパク質を唯一のタンパク質源とする培地中で培養しました。

その結果、*L. murinus* は大豆タンパク質を含む培地中で増殖が促進され (図 4B)、カゼインよりも大豆タンパク質をより分解することが分かりました (図 4C)。さらに、*L. murinus* は大豆タンパク質を含む培地中で、カゼインを含む培地中より多くのアミノ酸を産生することも分かりました (図 4D)。これらの結果から、*L. murinus* はカゼインよりも大豆タンパク質を好んで栄養源とすること、大豆タンパク質を消費する際にアミノ酸を産生する可能性が示唆されました。

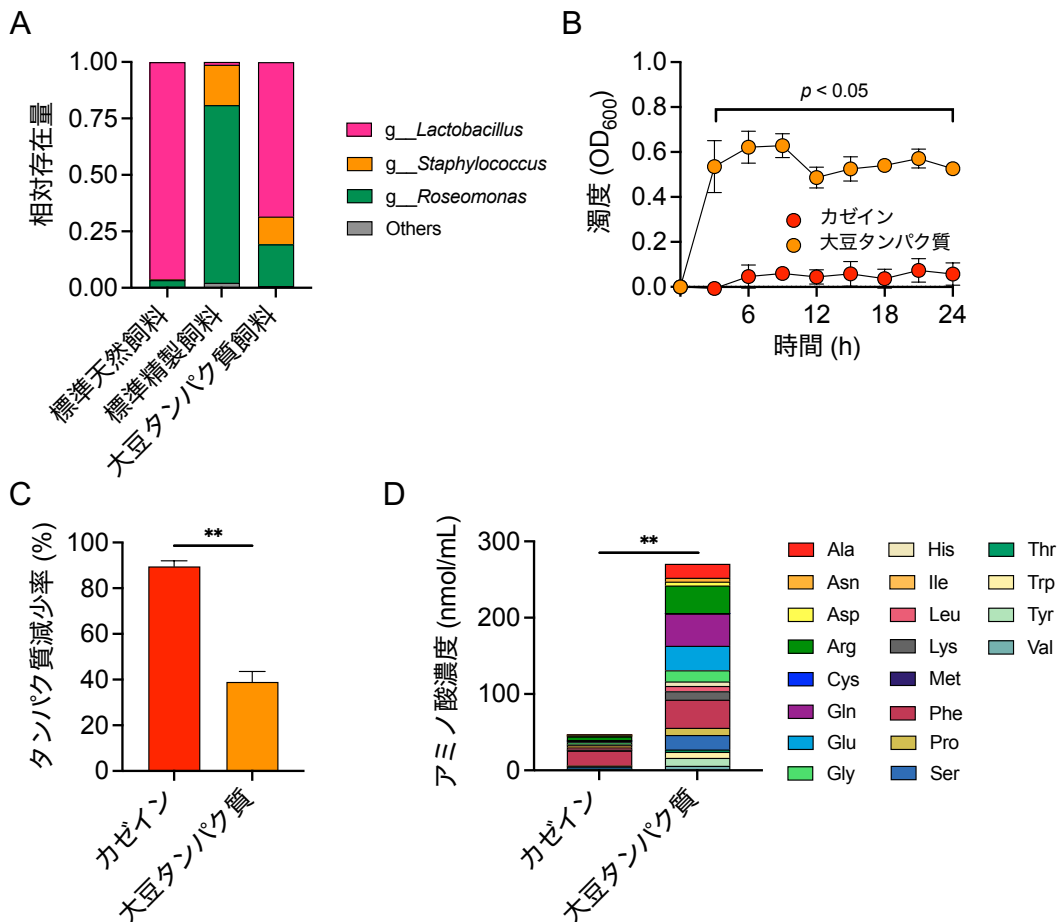


図 4. *L. murinus* はカゼインよりも大豆タンパク質を分解することで増殖し、アミノ酸を産生する。
 (A) *C. difficile* 感染直前の腸内細菌叢組成 (相対存在量)。色は各細菌属に対応。
 (B-D) カゼインまたは大豆タンパク質のみをタンパク質源として含む培地中で *L. murinus* を培養した。(B) 培養開始から 24 時間の *L. murinus* の増殖の推移。(C) 培養前後のタンパク質量を定量し、その差分から減少率を求めた。(D) *L. murinus* 培養後の、培養液上清中のアミノ酸濃度。色は各アミノ酸に対応。** $p < 0.01$ 。

Lactobacillus 属細菌は、細胞の外膜に存在するプロテアーゼを用いて、菌体外でタンパク質を分解した後に菌体内に取り込み、利用することが知られています。*L. murinus* の全ゲノム解析の結果、当該細菌は細胞外膜プロテアーゼとして PrtP を保有していることが明らかとなりました (原著論文参照)。そこで、*L. murinus* における PrtP がアミノ酸の産生に関わっているのかを明らかにするために PrtP を欠損した株 (*Lm ΔprtP*) を作出し、検証を行いました。その結果、*Lm ΔprtP* は野生株 (*Lm WT*) と比較して増殖能は変わらない一方で、アミノ酸産生量が有意に低下することが分かりました (図 5A、B)。最後に、*L. murinus* が PrtP 依存的に *C. difficile* の増殖を促

進するかどうかを調べるため、SD を摂餌させた無菌マウス、Lm WT 定着マウス、または Lm Δ prtP 定着マウスの盲腸内容物成分を培地に添加し、*C. difficile* を培養しました。その結果、無菌マウス由来の盲腸内容物成分を添加した場合と比べて、Lm WT 定着マウス由来の盲腸内容物成分を添加した場合に、*C. difficile* の増殖は促進されましたが、Lm Δ prtP 定着マウス由来の盲腸内容物成分を添加した場合には、増殖促進傾向は見られましたが、有意な差は見られませんでした（図 5C、D）。以上の結果から、*L. murinus* は PrtP を介して大豆タンパク質を分解し、アミノ酸を産生することで *C. difficile* の増殖を促進することが分かりました。

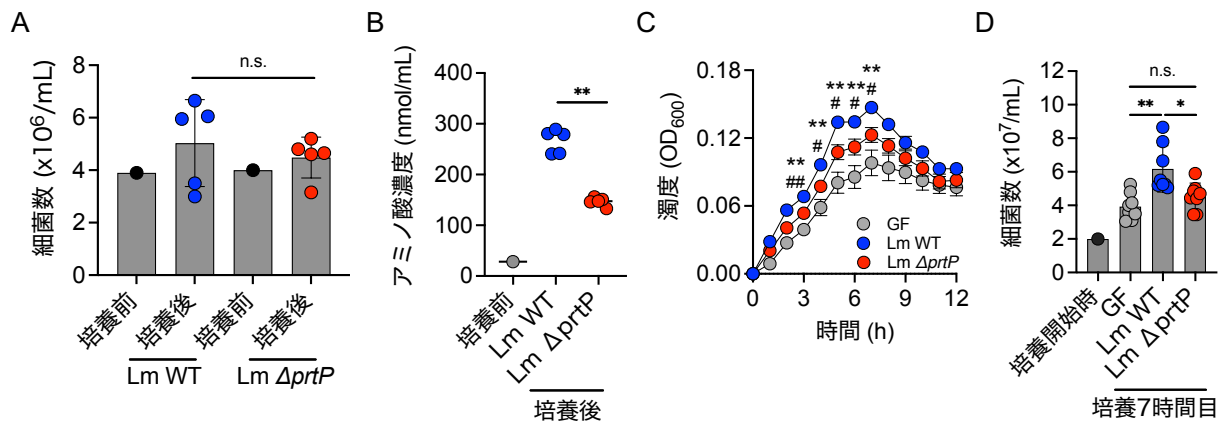


図 5. *L. murinus* は PrtP 部分依存的にアミノ酸を産生し、*C. difficile* の増殖を促進する。

(A、B) 試験管内において大豆タンパク質のみを含む培地で、Lm WT と Lm Δ prtP をそれぞれ培養した。(A) 培養前および 24 時間培養後の Lm WT と Lm Δ prtP の細菌数。(B) 培養前および 24 時間培養後の培養液上清中のアミノ酸濃度。

(C、D) 無菌マウス (GF)、Lm WT、Lm Δ prtP それぞれを定着させたマウスから盲腸内容物を回収し、試験管内において *C. difficile* を培養した。(C) 培養開始から 12 時間の *C. difficile* の増殖の推移。

* : GF と Lm WT との比較 ; # : Lm WT と Lm Δ prtP との比較。(D) 培養開始時および培養開始後 7 時間目における各培養液中の *C. difficile* の細菌数。* p < 0.05; ** p < 0.01; # p < 0.05; ## p < 0.01; n.s.有意差なし。

4. 結論

病院や介護施設では、入院患者や入居者の CDI の集団発生が見られます。CDI の原因となる *C. difficile* は、酸素に弱い偏性嫌気性菌なのですが、熱やアルコールに強い芽胞という形態に変化することができます。そのため、*C. difficile* は芽胞の形で拡散されやすい厄介な病原菌です。CDI の治療には、使用抗菌薬投与の中止、*C. difficile* に感受性を有する抗菌薬の経口投与が行われています。また、再発性もしくは治療抵抗性 CDI に対しては、海外を中心に FMT や腸内細菌を投与する治療法が検討・実用化されています。一方、やむを得ない抗菌剤の投与後でも *C. difficile* が腸内で増殖しないようにする方策も必要です。本研究では、抗菌剤投与後の腸内での *C. difficile* の増殖に、摂取するタンパク質源が腸内細菌（腸内アミノ酸）を介して影響することを明らかにすることができました。今後、CDI の予防を目的として、抗菌剤投与前後における食事療法（摂取するタンパク質源を含む）の確立や、腸内のアミノ酸濃度を低下させる腸内細菌などの新規 CDI 予防薬の開発が期待されます。

5. 論文情報

〈タイトル〉 Dietary-protein sources modulate host susceptibility to *Clostridioides difficile* infection through the gut microbiota

〈著者名〉 Kyosuke Yakabe, Seiichiro Higashi, Masahiro Akiyama, Hiroshi Mori, Takumi Murakami, Atsushi Toyoda, Yuta Sugiyama, Shigenobu Kishino, Kenji Okano, Akiyoshi Hirayama, Aina Gotoh, Shunyi Li, Takeshi Mori, Takane Katayama, Jun Ogawa, Shinji Fukuda, Koji Hase, and Yun-Gi Kim* (*責任著者)

〈雑誌〉 『Cell Reports』 (電子版)

〈DOI〉 10.1016/j.celrep.2022.111332

<用語説明>

- (注1) 腸内細菌叢：ヒトの腸管内には数百種類、100兆個ほどの細菌が絶えず増殖を続けている。これらは腸内細菌と呼ばれ、複雑な生態系を構築している。この腸内細菌集団のことを腸内細菌叢と呼んでいる。
- (注2) 便微生物移植：健常人の便中に存在する腸内微生物を患者に移植することで、腸内細菌叢の乱れた患者の腸内環境を整え、感染症などの疾患を治療する方法。
- (注3) 芽胞：乾燥や高温、放射線、毒性物質などによる殺菌に対して抵抗性を示す菌の形態。*C. difficile* を含む一部の *Clostridium* 属や、*Bacillus* 属細菌に見られる。
- (注4) 定量PCR法：鋳型となるDNAの増幅を経時的に測定することで、増幅率に基づいて、鋳型DNAを定量する解析手法。
- (注5) メタボローム解析：低分子化合物を網羅的に解析する技術。糖やアミノ酸、有機酸など生体の代謝活動によって産生される物質を検出する。生体や糞便検体中の代謝活動の包括的理解だけでなく、創薬やバイオマーカー探索にも用いられる。
- (注6) 16S ribosomal RNA 遺伝子解析：細菌がDNA中に共通して保有する16S ribosomal RNA 遺伝子の特定の領域をPCRによって増幅し、解析することで、糞便など検体中に含まれる細菌の構成を調べる手法。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

<研究内容についてのお問い合わせ先>

慶應義塾大学薬学部 創薬研究センター
教授 金 倫基 (きむ ゆんぎ)

TEL : 03-5400-2624

E-mail : ykim@keio.jp

本発表資料のお問い合わせ先

慶應義塾広報室 (山中)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

Email : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>