

原 著

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 学術部

中 尾 光 治
原 浩 祐
松 尾 知 恵
川 口 晋

要 旨

抗菌薬の汎用による薬剤耐性菌への感染は、現代医療において深刻さを増しており、特に免疫低下が危惧される高齢者や、低栄養患者、侵襲の大きい外科手術を受けた患者への対策は喫緊の課題である。本検討では、院内感染症の原因となる代表的ないくつかの病原菌〔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・ディフィシル (*Clostridioides difficile*, 以下, *C. difficile*)〕の感染に対する、加熱殺菌した乳酸菌 (Heat-killed lactic acid bacteria *Enterococcus faecalis*, 以下, *HkEf*) の経口からの感染前あるいは感染後投与による感染防御効果を感染モデル動物試験により検討した。マウス全身感染モデルはMDRPおよび*S. pneumoniae*を腹腔内に投与し、またハムスター腸管感染モデルは*C. difficile*を経口投与することにより作製した。各試験において*HkEf*を120億個/kg/日経口投与した。*HkEf*投与群で、試験を行ったすべての病原菌による感染症に対して、非投与群よりも生存率が高い結果であった。さらに、感染前後の連続投与による予防的効果だけでなく、感染直後の投与でも生存率を高めたことから、感染初期における*HkEf*の効果も期待できる結果が得られた。

責任著者連絡先：ニュートリー株式会社 学術部 中尾光治
〒104-0033 東京都中央区新川2-1-5 THE WALL 4F
Tel 03-3206-0107 Fax 03-3206-0108

Effects of Heat-killed Lactic Acid Bacteria *Enterococcus faecalis* on Life-threatening Antibiotic-resistant Bacteria in Animal Models

Koji Nakao, Kosuke Hara, Tomoe Matsuo and Susumu Kawaguchi

Academic Division, NUTRI Co., Ltd.

Corresponding author : Koji Nakao
Academic Division, NUTRI Co., Ltd.
2-1-5 Shinkawa, Chuo-ku, Tokyo 104-0033, Japan

はじめに

薬剤耐性菌の出現は、抗菌薬の発明から時をおかず観察されてきた。現代においてはその抗菌薬の汎用により、薬剤耐性菌の保菌キャリア人口が増加し感染リスクは高まる一方となっている。加齢とともに免疫機能が低下すること¹⁾、加えて低栄養が重なるとさらに免疫機能の低下が起こること²⁾が報告されており、特に免疫機能の低下が危惧される高齢者や低栄養患者、侵襲の大きい外科手術を受けた患者は、感染の機会やリスクが高く、重症化すると生命にかかわる症状を呈することもあるため、その対策は喫緊の課題である。本邦政府は2016年、“薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン (2016-2020)”³⁾を発表し、薬剤耐性に関する普及啓発、感染予防管理の実践、抗菌薬の適正使用に関する情報提供、国際協力の推進に積極的に取り組んでいる。しかし、根本的な対策は示されておらず、それだけこの薬剤耐性の問題が深刻であることを表わしている。

これまで、病棟や高齢者施設において、生菌である乳酸菌を用いた、いわゆるプロバイオティクス効果として呼吸器ウイルス感染症⁴⁾や敗血症患者の腸炎および人工呼吸器関連肺炎⁵⁾の予防に関する臨床研究が報告されており、一定の成果が得られている。生菌は生体内で

定着し生体とのクロストークを通じて影響を及ぼしていることが分かっている。また、その菌体成分である核酸 (DNAおよびRNA)、細胞壁成分やリポ蛋白質やその糖鎖、菌体の鞭毛成分など⁶⁾⁷⁾、菌体成分そのものが腸管粘膜を介して生体免疫調節作用を有することも分かっている⁸⁾。

近年、生菌だけでなく加熱殺菌した死菌によっても生菌と同様の有益な効果を発揮することがマウス感染モデルで示唆されている⁹⁾。そこで乳酸菌の死菌体に着目し、乳酸菌の中でも比較的菌体粒子径が小さい、Heat-killed lactic acid bacteria *Enterococcus faecalis* (以下、*HkEf*) を用いて動物試験を行った。*HkEf* は1mgに75億個の乳酸菌を含み、生菌では不可能な少量で多くの菌数を投与することが可能である。筆者ら¹⁰⁾はすでにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染マウスに対する *HkEf* の効果に関する検討を行い、生存率を上昇させる結果を報告している。今回はさらに広範囲な感染症に対する *HkEf* の適用可能性を探るため、本検討では医療機関で院内感染を引き起こす代表的ないくつかの病原菌 [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・ディフィシル (*Clostridioides difficile*, 以下、*C. diffi-*

cile) の感染に対する *HkEf* の効果を感染モデル動物を用いて検討した。

I 対象と方法

1. 接種菌株および接種菌液の調整

1) マウス全身感染モデル (MDRP, *S. pneumoniae* 感染試験)

(1) 使用菌株

Multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* P-45, *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303)

(2) 前培養

MDRP は、保存菌株を解凍し、ハートインフュージョンブイヨン培地〔栄研化学(株)〕に接種し、37°C 設定の振盪培養器 (振盪数: 200 回/分) で約 24 時間振盪培養した。培養後、培養液を回収し、遠心分離 (1000rpm, 5 分間) し、上清を廃棄後、沈殿物を生理食塩液で 10mL にし、接種菌原液とした。

S. pneumoniae は、保存菌株を解凍し、ヒツジ血液寒天培地〔日本バクトン・ディッキンソン(株)〕に塗抹後、炭酸ガス培養用炭酸ガス発生剤〔アネロパック®・CO₂, 三菱ガス化学(株)〕を入れた嫌気ジャーに入れ、37°C 設定の恒温器で 2 日間培養し、生理食塩液を加えて菌細胞を遊離させ、滅菌済メッシュ (100μm, セルストレーナー: FALCON®) で濾過して菌細胞塊および不純物を除き、接種菌原液とした。

なお、接種菌原液中の生菌数確認は、MDRP は、接種菌原液を生理食塩液で希釈し、NAC 寒天培地〔栄研化学(株)〕に希釈液を塗抹後、*S. pneumoniae* は、接種菌原液を生理食塩液で希釈し、希釈液をヒツジ血液寒天培地に塗抹後、炭酸ガス培養用炭酸ガス発生剤を入れた嫌気ジャーに入れた後、37°C 設定の恒温器で 1 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、接種菌原液 1mL 中に含まれる生菌数を算出した。

(3) 接種菌液の調製および生菌数確認

菌液接種日に接種菌原液を生理食塩液で希釈し、MDRP の生菌数は、 1×10^7 CFU/mL の濃度に、*S. pneumoniae* の生菌数は、 1×10^2 CFU/mL の濃度に調製された。調製した菌液を各接種菌液とした。

(4) シクロホスファミド投与および菌液接種

本 MDRP 感染試験では免疫抑制マウスを作製するため、被験物質の投与 5 日目にシクロホスファミド〔注射用エンドキサン®100mg, 塩野義製薬(株)〕200mg/kg を腹腔内投与した。MDRP 菌液接種は被験物質の投与 8 日目 (シクロホスファミド投与 3 日後) に、MDRP 接種菌液 0.5mL (5×10^6 CFU) を腹腔内に接種した。菌液接種時刻は、被験物質投与の 2 時間前とした。

本 *S. pneumoniae* 感染試験では、接種菌液 0.5mL (50CFU) を腹腔内に接種した。

2) ハムスター腸管感染モデル (*C. difficile* 感染試験)

(1) 使用菌株

Clostridioides difficile (ATCC43255)

(2) 前培養

保存菌株を解凍し、GAM 寒天培地〔日水製薬(株)〕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〔日水製薬(株)〕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。

(3) 接種菌液の調製および生菌数確認

接種菌原液を生理食塩液で 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 日間培養した。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 1mL 中に含まれる生菌数を

算出した。その結果、接種菌液の生菌数は、 3.5×10^5 CFU/mLであった。

(4) クリンダマイシン投与および菌液接種
本 *C. difficile* 感染試験では *C. difficile* 感染モデルを作製するため、ハムスターを用い、被験物質の投与5日目からクリンダマイシン〔ダラシン®S注射液300mg, ファイザー(株)〕100mg/kgを1回/日、3日間連続で腹腔内投与(液量:10mL/kg)した。*C. difficile* 菌液接種は被験物質の投与8日目(クリンダマイシン最終投与翌日)に接種菌液1mL (3.5×10^5 CFU)を経口接種した。菌液は、被験物質投与の2時間前に接種した。

2. 被験物質

HkEf 粉末は、投与量が120億個/kg/日(ヒト50kg wt./日換算:6000億個/日)となるように注射用水を用いて、12億個/mLを調製し、投与量は投与日の体重値より10mL/kgで算出した。

非投与群には、媒体である注射用水〔(株)大塚製薬工場〕を投与した。注射用水の投与量については、投与日の体重値より、10mL/kgで算出し、投与した。

3. 動物と飼育条件

1) マウス全身感染モデル(MDRP, *S. pneumoniae* 感染試験)

マウス全身感染モデルでは、4週齢のBALB/c系(BALB/c Cr Slc)雌マウス〔日本エスエルシー(株)〕を用い、5日間の予備飼育期間を設け、体重推移および一般状態に異常の認められない動物を群分けに用いた。動物は管理温度:18~28℃、管理湿度:30~80%、明暗各12時間(照明:午前6時~午後6時)に維持された飼育室で、ステンレス製網ケージ(W:100×D:160×H:80mm)を用いて、個別に飼育した。飼料は固型飼料〔CRF-1, オリエンタル酵母工業(株)〕を自由に摂取させた。飲料水は上水道水を自由に摂取させた。

2) ハムスター腸管感染モデル(*C. difficile* 感染試験)

ハムスター腸管感染モデルでは、3週齢のSyrian系(Slc:syrian)雄ハムスター〔日本エスエルシー(株)〕を用い、5日間の予備飼育期間を設け、体重推移および一般状態に異常の認められない動物を群分けに用いた。動物は管理温度:18~28℃、管理湿度:30~80%、明暗各12時間(照明:午前6時~午後6時)に維持された飼育室で、プラスチック製ケージ(W:175×D:245×H:125mm)に金網製スノコを敷き、個別飼育とした。飼料はγ線照射飼料〔30kGy照射CRF-1, オリエンタル酵母工業(株)〕を自由に摂取させた。ただし、菌液接種後20時間絶食した。飲料水は塩素塩酸水を自由に摂取させた。

なお、本研究は厚生労働省通知科発第0601001号「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日)、「日本バイオリサーチセンター実験動物の管理および福祉に関する規定」(平成19年4月2日)を遵守し、すべての動物実験は(株)日本バイオリサーチセンターの動物実験委員会において承認された。

4. 試験方法

1) 群分け

動物の群分けはコンピュータプログラムを用いて、体重を層別に分けたのち、無作為抽出法により各群(n=10)の平均体重および分散がほぼ等しくなるように行った。*HkEf*を①投与しない群(非投与群)、②各菌液接種前後投与群(Peri群)、③各菌液接種前投与群(Pre群)、④各菌液接種後投与群(Post群)の4群(MDRP感染試験についてはPre群の代わりにPost3倍量群を設定)または3群(*C. difficile*感染試験ではPre群を実施せず)に設定した。

2) 被験物質の投与

被験物質(*HkEf*もしくは注射用水)は、群分け終了後より1日1回、マウス全身感染モ

デル試験では、マウス用ゾンデ〔(有)フチガミ器械〕を、ハムスター腸管感染モデル試験では、ラット用ゾンデ〔(有)フチガミ器械〕を用いて、強制的に経口投与した。投与液量は、投与日の体重値より算出し、各群の設定量を投与した。

3) 群構成および試験日程

(1) マウス全身感染モデル試験 (MDRP, *S. pneumoniae* 感染試験)

マウス全身感染モデル試験では、全群、被験物質の投与開始日を1日と起算し、17日間 (Day 1~17) 投与した。非投与群には被験物質として注射用水を17日間 (Day 1~17)、Peri群では各菌液接種前および接種後の17日間 (Day 1~17)、Pre群では各菌液接種前の7日間 (Day 7まで)、Post群では各菌液接種日 (Day 8) から10日間、*HkEf* 120億個/kg/日を投与した。Pre群、Post群ともに*HkEf*投与以外の期間は注射用水を投与した。また本MDRP試験ではPre群に代えてPost 3倍量群を設定し、*HkEf* 120億個/kgを1日3回投与 (8時間間隔) し、360億個/kg/日を投与した。なお、菌液接種日は、接種約2時間後に投与した。

(2) ハムスター腸管感染モデル試験 (*C. difficile* 感染試験)

ハムスター腸管感染モデル試験では、全群、被験物質の投与開始日を1日と起算し、29日間 (Day 1~29) 投与した。非投与群には被験物質として注射用水を29日間 (Day 1~29)、Peri群では*C. difficile* 菌液接種前および接種後の29日間 (Day 1~29)、Post群では*C. difficile* 菌液接種日 (Day 8) から22日間、*HkEf* 120億個/kg/日を投与した。*HkEf*投与以外の期間は注射用水を投与した。なお、菌液接種日は、接種約2時間後に投与した。

4) 感染予防の評価

生存確認は1日1回被験物質の投与前に実施した。

さらに本*C. difficile* 感染試験では、糞便採

取および糞便中の*C. difficile* 菌数測定、糞便量を推定するために摂餌量測定を実施した。

5) 統計処理

生存率は各群で各日算出し、糞便中の*C. difficile* 菌数、摂餌量は各群の平均値および標準誤差を算出した。

有意差検定は生存率では、観察期間全体について、Kaplan-Meier plotを実施しLog-rank検定もしくは一般化Wilcoxon検定により群間比較を行った。なお、群間比較については多重性の調整をするためHolm補正を実施した。*C. difficile* 菌数、摂餌量測定では、多重比較検定により群間比較を行った。すなわち、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合にはTukey検定を用いて行った。一方、等分散と認められなかった場合は、Steel-Dwass検定を用いて行った。

危険率は5%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 Institute Japan(株)〕を用いた。

II 結果

1. MDRP 感染試験

試験終了時におけるMDRP菌液接種マウスの生存率は、非投与群10%、Peri群50%、Post群30%、Post 3倍量群40%であり、Peri群、Post群、Post 3倍量群ともに非投与群と比較して有意に高い生存率であった (図1)。

2. *S. pneumoniae* 感染試験

試験終了時における*S. pneumoniae* 菌液接種マウスの生存率は、非投与群0%、Peri群60%、Pre群20%、Post群10%であり、Peri群では非投与群と比較して有意に高い生存率であった (図2)。

3. *C. difficile* 感染試験

試験終了時における*C. difficile* 菌液接種ハムスターの生存率は、非投与群20%、Peri群

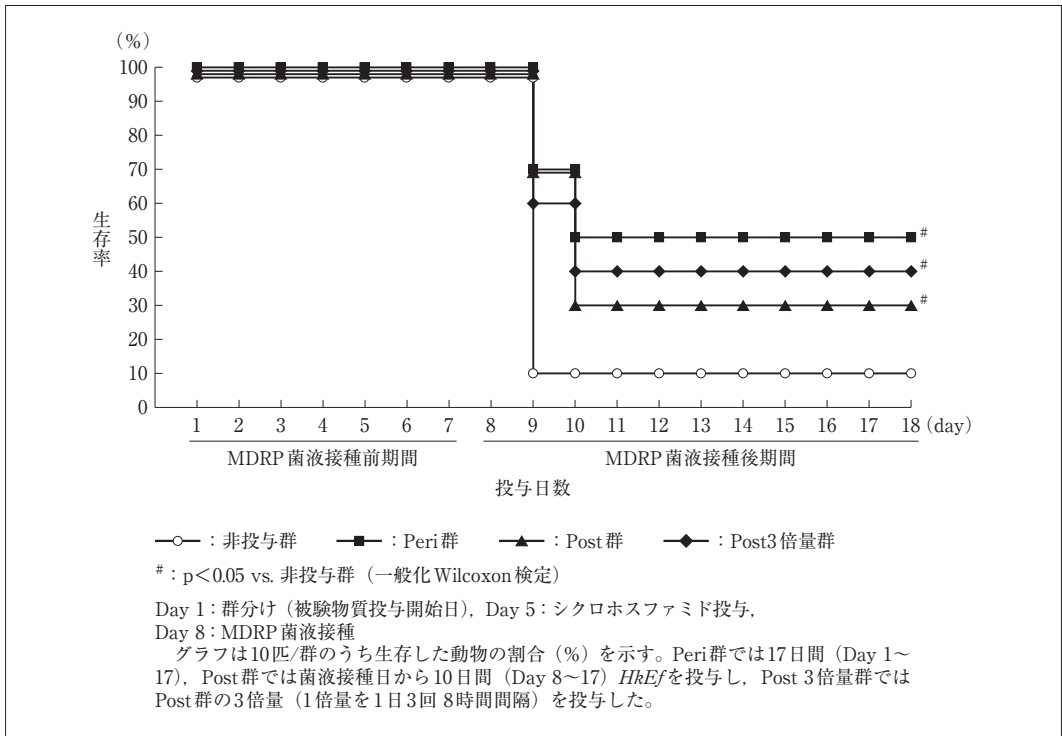


図1 MDRP 菌液接種マウスの生存率推移

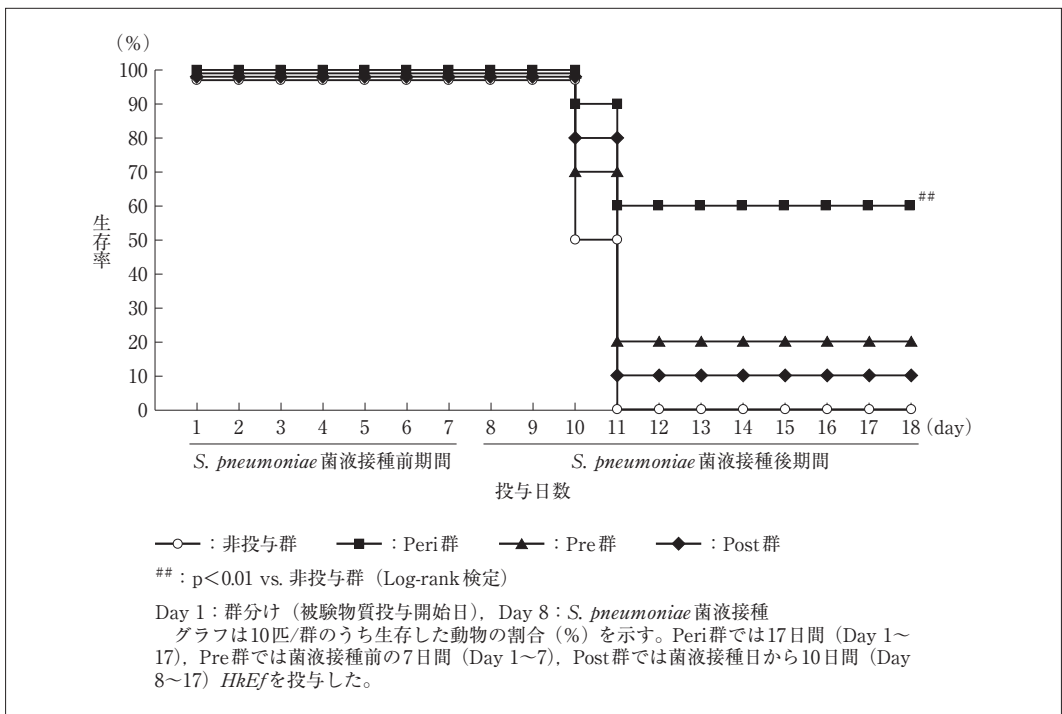


図2 *S. pneumoniae* 菌液接種マウスの生存率推移

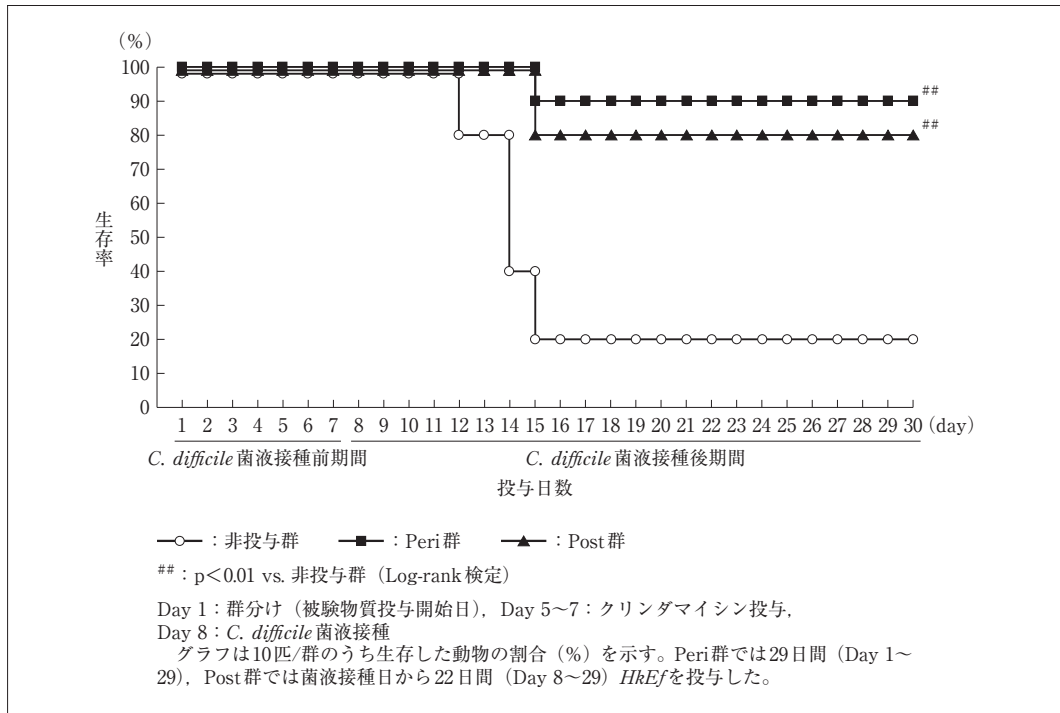


図3 *C. difficile* 菌液接種ハムスターの生存率推移

90%, Post群80%であり, Peri群, Post群ともに非投与群と比較して有意に高い生存率であった(図3)。

糞便中の *C. difficile* 生菌数は菌液接種前日ではすべての群において検出されなかったが, 接種1日後においては, 非投与群で $53.6 \pm 6.4 \times 10^3$ CFU/g, Peri群で $21.6 \pm 1.6 \times 10^3$ CFU/g, Post群で $39.3 \pm 3.3 \times 10^3$ CFU/g, 4日後においては, 非投与群で $397.4 \pm 50.6 \times 10^3$ CFU/g, Peri群で $16.0 \pm 4.9 \times 10^3$ CFU/g, Post群で $19.7 \pm 4.5 \times 10^3$ CFU/gであった(図4)。

接種1日後においては, Peri群で非投与群, Post群と比較して有意な検出菌数の低値を示した。接種4日後においてはPeri群, Post群ともに非投与群と比較して有意な検出菌数の低値を示した。

検出された生菌数の違いは, 各群の摂餌量に大差はなく, 排泄された糞便量も大差はないことから, 排便量の違いによるものではな

いと考えられる(図5)。

III 考察

今回の感染モデル動物試験の結果から, 試験を行ったすべての病原菌(MDRP, *S. pneumoniae*, *C. difficile*)の感染に対して, 乳酸菌 *HkEf* の経口投与により有意に高い生存率が見られ, 広範囲な感染症における *HkEf* の感染防御効果が得られた。筆者らはすでに, MRSA 感染マウスに対する *HkEf* の予防的効果および感染後からの治療的投与における生存率へ寄与の可能性を明らかにしており¹⁰, 試験終了時におけるMRSA菌液接種マウスの生存率は, 非投与群40%, Peri群100%, Pre群60%, Post群80%であり, Peri群では非投与群と比較して有意に高い生存率であった($p = 0.0126$)。また, Post群においても非投与群と比較し, 有意な差は見られなかった($p =$

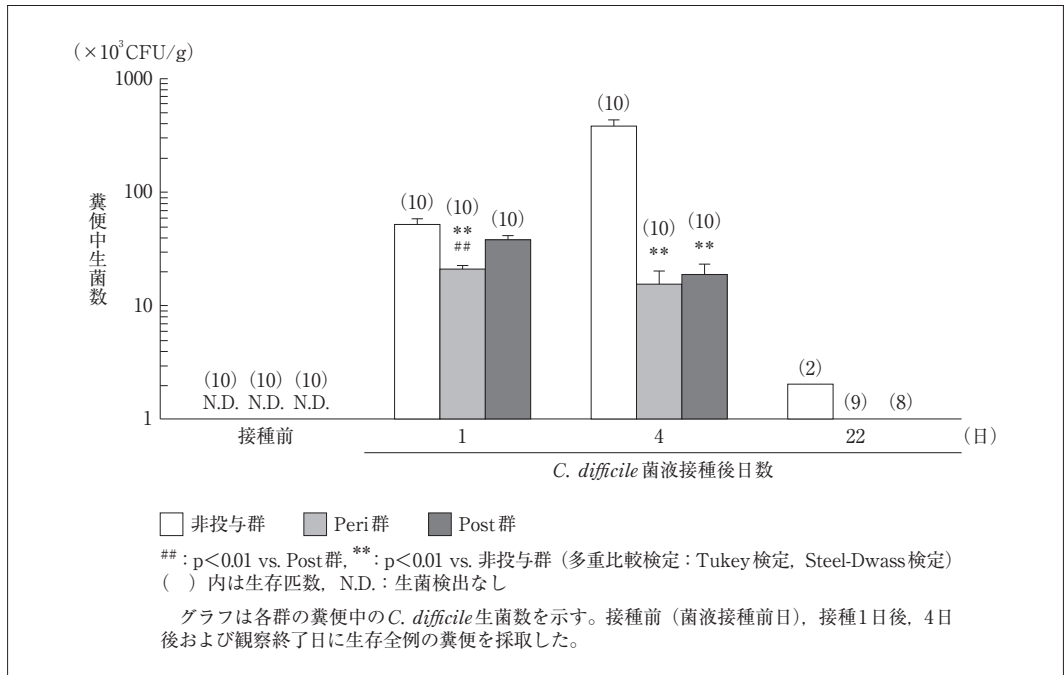


図4 *C. difficile* 菌液接種ハムスターの糞便中生菌数推移

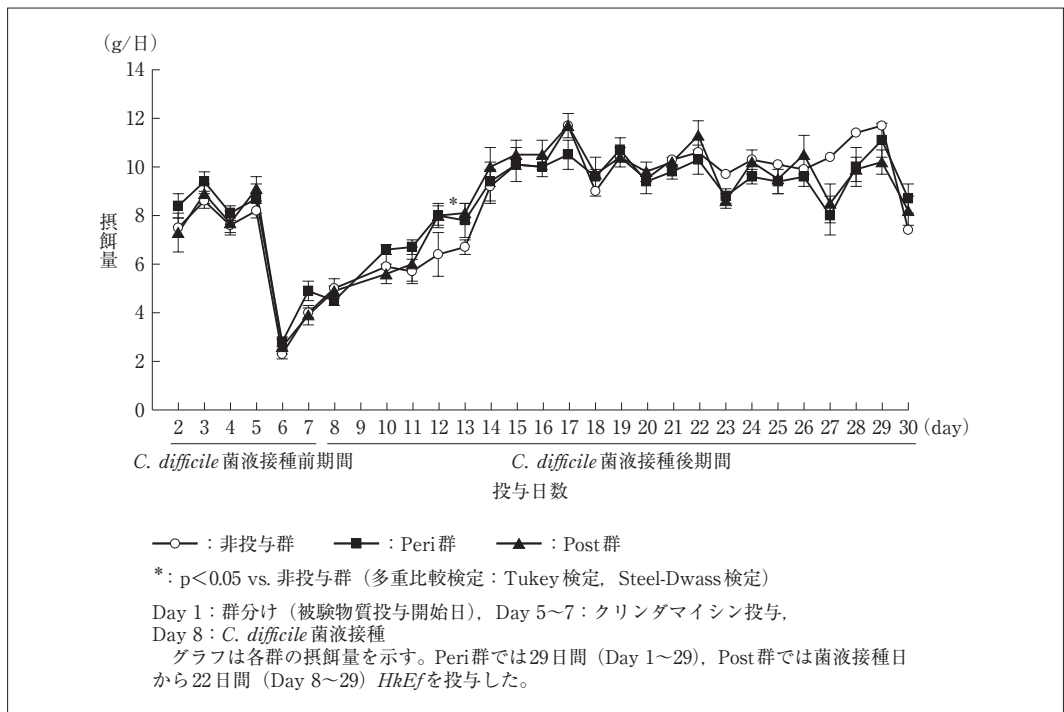


図5 *C. difficile* 菌液接種ハムスターの摂餌量推移

0.089) が、高い生存率であった。さらに今回、院内感染症の原因となる代表的ないくつかの病原菌である MDRP, *S. pneumoniae*, *C. difficile* の感染に対する *HkEf* の感染前および/または感染後の経口投与による感染防御効果を感染モデル動物試験により検討した。

MRSA および MDRP 感染試験における *HkEf* の効果は、菌接種から1日後でも見られたことから、獲得免疫よりも自然免疫による感染防御の寄与が大きいと考えられる。また、通常インフルエンザ桿菌や髄膜炎菌などの莢膜をもつグラム陽性球菌は、好中球の貪食に抵抗するとされるが、莢膜を有する *S. pneumoniae* の感染試験においても *HkEf* 投与により菌接種から2日後で生存率を高めた。したがって、この感染実験の結果からは本防御効果には自然免疫（マクロファージ）の寄与が大きいだろうと推察される。すなわち、病原菌の感染前後の *HkEf* 投与により、感染に対する即時応答である自然免疫がすばやく誘導され、病原菌に対する防御力を増強したことが高い生存率につながった可能性がある。また、*HkEf* の投与が感染直後であっても生存率を高めたことから、その効果は短時間で効力を発揮し、感染初期の投与における治療的效果も得られたものと推察された。

C. difficile 感染試験においては、*HkEf* 投与により有意に高い生存率が見られた。非投与群では糞便中の *C. difficile* 生菌数が菌接種1日後から4日後にかけて急激に増加したが、*HkEf* の投与によってそれが抑制されていた。この *HkEf* 投与での菌数の増加抑制が、生存率の増加に寄与したと考えられる。菌接種4日後の糞便中の *C. difficile* 生菌数は Peri 群と Post 群で有意な差がなく、高生存率が見られたことから、*C. difficile* の感染モデルのように発症するまでに時間がかかるような病態では、Post 投与でも十分な作用が期待できる。

実臨床における *C. difficile* 感染症は、抗菌薬の使用により正常な腸内細菌叢の攪乱が起こ

り、増殖した *C. difficile* が毒素を産生し腸炎を誘発することで下痢などの症状を発症する。*C. difficile* 感染試験では、病原菌の投与経路は異なっており、MDRP および *S. pneumoniae* は腹腔内接種であるのに対し、*C. difficile* は経口接種とした。よって接種菌と被験物質はどちらも経口投与であるため、*HkEf* は *C. difficile* の増殖時期に粘膜上において直接的な接触による相互作用を起こしている可能性がある。Ishijima ら¹¹⁾ は口腔カンジダ症に対して、*HkEf* の経口投与により、*Candida albicans* との直接的な接触による相互作用と用量依存的な効果を報告している。この結果から、*HkEf* 投与による宿主生体の免疫反応によらない、*C. difficile* に対する直接作用が考えられる。また、*C. difficile* 接種4日後の糞便中の *C. difficile* 生菌数において、*HkEf* 投与群では生菌数が減少していることも、そのような直接作用を裏付けているものと考えられる。なお、検出された生菌数の違いは、各群の摂取量、排泄された糞便量に差がないことから、排便量の違いによるものではないと考えられる。

Tsuruta ら¹²⁾ は、マウスの腹腔内マクロファージを用いた *in vitro* の試験により、マクロファージの *HkEf* 取り込みにはマンノース受容体による認識が主要な役割を果たすことを報告している。すなわち、経口摂取された *HkEf* の一部は消化管の M 細胞から取り込まれ、パイエル板や単層粘膜内に存在するマクロファージなどの抗原提示細胞 (APCs) の細胞膜上にあるマンノース受容体が *HkEf* の細胞壁に存在するリポペプチド残基を感知し、貪食するものと考えられる^{13)~15)}。その後 APCs 内のエンドソームで分解された成分はエンドソームの膜上に存在する Toll 様受容体 (Toll-like receptor: 以下、TLRs) に結合することで自然免疫を誘導するものと考えられる。即時的応答である自然免疫は、宿主の病原菌感染に対する初期の免疫機構であり、生体に侵入した病原体固有の成分をパターン認識する TLRs

などの自然免疫受容体が感知する¹⁶⁾¹⁷⁾。TLRsは、マクロファージ、樹状細胞、B細胞などに発現しており、病原菌の核酸（DNAおよびRNA）、リポ蛋白質や糖鎖、鞭毛などのPAMPs（pattern-associated molecular patterns：病原体関連分子パターン）と呼ばれる構成成分を認識する⁶⁾⁷⁾。TLRsはサブタイプごとに違った分子パターンを認識し、その特性は局在性により大まかに区別される。免疫細胞の細胞膜に発現しているTLRsは、微生物の細胞壁や細胞膜などの外膜を構成する脂質、蛋白質、リポ蛋白質、糖鎖を認識する。一方、細胞内小器官（小胞体、エンドソーム、リソソームなど）に発現しているTLRsは、核酸であるDNAやRNAなどを認識する⁶⁾⁷⁾。死菌体である*HkEf*には、菌体成分として細胞壁成分やその糖鎖、核内DNA分子、リボソームRNA、細胞小器官といった様々な免疫応答成分が含まれる。

Nishibayashiら¹⁸⁾は、ヒト単球細胞を用いた試験において、トランスフェクションされた*HkEf*の23SrRNA、16SrRNAがTLR8により媒介され、下流へとシグナル伝達することで、IL-12を分泌することを報告している。TLR8は、ヒトでは単球や未熟樹状細胞（imDCs）に発現していることが知られている¹⁹⁾。また、Itohら²⁰⁾は、マウスの腹腔内マクロファージ様細胞を用いた試験において、*HkEf*によるシグナル伝達と免疫調節作用には、TLR1-TLR2/TLR6の経路の活性が関与すること、また、Inoueら²¹⁾はマウスの抗原提示細胞を用いた試験において、TLR7とTLR9が*HkEf*の核酸RNAを認識しIL-12産生に関与することを報告している。したがって、*HkEf*の分解産物は複数のTLRsによって検知され、IL-12やINF- γ を産生し、自然免疫やTh1を誘導するものと考えられる。健常者では、腸内在住菌である*E. faecalis*は宿主腸管に定着し生存し、その中から一定量離脱しあるいは死滅し、宿主の腸管粘膜を介して腸管リンパ組織に取り込ま

れ、免疫シグナルを生体にもたらしていると考えられる。一方、経口投与された*HkEf*は自然免疫を強力に誘導することで薬剤耐性菌などの感染に対する防御能を一段と高めることができる可能性がある。

ヒトへの応用について、現在医療現場においては、病原菌に潜伏期間が存在し、不特定多数の無自覚キャリアと接触する可能性があるため、感染の瞬間をリアルタイムで特定することは非常に難しい。しかし、様々な院内感染症に備えるためにも*HkEf*の連続投与による予防的アプローチは有効である可能性がある。本検討では医療機関で院内感染を引き起こす代表的ないくつかの病原菌について検討しており、結果から感染症による入院期間の延長や重症化を防ぐことが期待され、より広範囲な感染症に対する宿主生体防御へ寄与できるものと筆者らは考える。

しかし、本検討は動物試験であり、直ちに人への効果を担保したものではないことは付言しておく。また、感染防御機構の作用機序を明確にするためのさらなる研究が必要である。臨床においても感染防御効果を検証していく予定である。

結 論

本動物試験の結果より、試験を行ったすべての病原菌（MDRP、*S. pneumoniae*、*C. difficile*）による感染に対して、病原菌の接種前後に乳酸菌*HkEf*を投与することで予防的効果が得られた。また、感染直後の投与であっても生存率を高めたことから、*HkEf*の投与による効果は短時間で効力を発揮する可能性があり、感染初期の投与における治療的効果も期待できると考えられる。

利益相反

筆者らは、本論文を公開するに際し何ら利益相反はないことを宣言する。

文 献

- 1) Goldstein AL, Thurman GG, Low TLL, et al. Thymosin : The endocrine thymus and its role in the aging process. In : Scott A, Strehler BL, eds. *Physiology and Cell Biology of Aging* (Aging vol.8). New York : Raven Press ; 1979. p. 51-60.
- 2) Lesourd BM. Nutrition and immunity in the elderly : modification of immune responses with nutritional treatments. *Am J Clin Nutr.* 1997 ; **66** : 478S-84S.
- 3) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議. 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020. 厚生労働省. 2016. <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>
- 4) Wang B, Hylwka T, Smieja M, et al. Probiotics to Prevent Respiratory Infections in Nursing Homes : A Pilot Randomized Controlled Trial. *J Am Geriatr Soc.* 2018 ; **66** : 1346-52.
- 5) Shimizu K, Yamada T, Ogura H, et al. Synbiotics modulate gut microbiota and reduce enteritis and ventilator-associated pneumonia in patients with sepsis : a randomized controlled trial. *Critical Care.* 2018 ; **22** : 239-47.
- 6) Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat immunol.* 2010 ; **11** : 373-84.
- 7) Akira S, Uematsu S, Takauchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell.* 2006 ; **124** : 783-801.
- 8) Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. *J Nutr.* 2007 ; **137** : 781S-90S.
- 9) 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** : M260-7.
- 10) 原 浩祐, 中尾光治, 川口 晋. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染マウス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. 新薬と臨牀 2018 ; **67** : 35-44.
- 11) Ishijima SA, Hayama K, Ninomiya K, et al. Protection of mice from oral Candidiasis by heat-killed *Enterococcus faecalis*, possibly through its Direct Binding to *Candida albicans*. *Med Mycol J.* 2014 ; **55** : E9-19.
- 12) Tsuruta T, Inoue R, Nagino T, et al. Role of the mannose receptor in phagocytosis of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 by antigen-presenting cells. *Microbiologyopen.* 2013 ; **2** : 610-7.
- 13) Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, et al. Intestinal villous M cells : An antigen entry site in the mucosal epithelium. *PNAS.* 2004 ; **101** : 6110-5.
- 14) Inoue R, Tsukahara T, Matsukawa N, et al. Rapid Induction of an Immune Response in Rat Peyer's Patch after Oral Administration of *Enterococcus faecalis* Strain EC-12. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013 ; **77** : 863-6.
- 15) Polotsky VY, Fischer W, Ezekowitz RA, Joiner KA. Interactions of human mannose-binding protein with lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1996 ; **64** : 380-3.
- 16) Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002 ; **20** : 197-216.
- 17) Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2004 ; **4** : 499-511.
- 18) Nishibayashi R, Inoue R, Harada Y, et al. RNA of *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 Is a Major Component Inducing Interleukin-12 Production from Human Monocytic Cells. *PLOS ONE.* 2015 ; **10** : e0129806.

- 19) Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J Exp Med.* 2001 ; **194** : 863-9.
- 20) Itoh T, Miyake Y, Onda A, et al. Immunomodulatory effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* TH10 on murine macrophage cells. *Microbiologyopen.* 2012 ; **1** : 373-80.
- 21) Inoue R, Nagino T, Hoshino G, Ushida K. Nucleic acids of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 are potent Toll-like receptor 7 and 9 ligands inducing interleukin-12 production from murine splenocytes and murine macrophage cell line J774.1. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 ; **61** : 94-102.

(受理日 : 2020年1月21日)