

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Equol inhibits growth and spore formation of Clostridioides difficile
別タイトル	エクオールはクロストリディオイデス・ディフィシルの成長と芽胞形成を阻害する
作成者（著者）	田中, 裕美
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：澁谷和俊 / タイトル：Equol inhibits growth and spore formation of Clostridioides difficile / 著者：Yumi Tanaka, Soichiro Kimura, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda / 掲載誌：Journal of Applied Microbiology / 巻号・発行年等：127(3):932-940, 2019
著者版フラグ	none
報告番号	32661 甲第930号
学位記番号	甲第635号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD97979244

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

田中裕美より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 635 号

学位申請者 : 田 中 裕 美

学位論文 : Equol inhibits growth and spore formation of *Clostridioides difficile*

(エクオールはクロストリディオイデス・ディフィシルの成長と芽胞形成を阻害する)

著 者 : Yumi Tanaka, Soichiro Kimura, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公表誌 : Journal of Applied Microbiology 127 (3) : 932-940, 2019

論文内容の要旨 :

【研究背景】

Clostridioides difficile は、芽胞形成と毒素を産生するグラム陽性の嫌気性菌であり、偽膜性大腸炎などの *C. difficile* 感染症 (*C. difficile* infection, CDI) を引き起こす。CDI の標準的な治療は抗菌薬投与であり奏効率が高いが 15-35% の割合で再発し、抗菌薬に耐性である芽胞を形成することが再発の要因の 1 つであると考えられている。そのため、*C. difficile* を除去するだけでなく、芽胞形成を抑制させることが CDI 発症・再発防止に繋がる可能性がある。大豆イソフラボンはエストロゲン様骨格を有しエストロゲンに似た作用を示すため、骨粗鬆症の予防に効果があると言われている。大豆イソフラボンは経口より摂取すると腸内細菌により代謝され、最終産物としてエクオールが産生される。マウスに大豆イソフラボンを投与することでも腸管内でエクオールが産生されるが、この時の腸内細菌叢が変化し、*Clostridium* 属の細菌数が減少することが報告されていることから、エクオールが *Clostridium* 属に対して増殖抑制作用を持つことが推察される。そこで本研究では、エクオールの *C. difficile* に対する直接的な作用を調べるために、*C. difficile* の増殖性、毒素産生性、芽胞形成性に及ぼすエクオールの作用を調べた。

【実験結果】

培地にエクオールを添加して *C. difficile* BI/NAP1/027 株を培養したところ、濃度依存的に *C. difficile* の生育が阻害された。また、エクオールの増殖抑制作用は、他の 3 つの臨床分離株でも同様の傾向を示した。次に、エクオールの毒素産生への

影響をイムノクロマト法および定量的リアルタイムPCR法を用いて評価した。経時的に回収した *C. difficile* の培養上清液中の毒素量を調べたところ、エクオール未添加での培養上清液からは経時的に毒素量が増加していることが確認できた。一方、エクオール添加培地での培養上清液からは、培養開始18時間目までは毒素の産生が抑制されていたが、それ以降は毒素が産生されていた。同様の検討を定量的リアルタイムPCR法にて遺伝子発現量を比較したが、同じ傾向が観察された。この結果から、エクオールは *C. difficile* の毒素産生を抑えることができないことが分かった。続いて、エクオールの *C. difficile* の芽胞形成に対する影響を検鏡下で評価した。培養開始から経時的に芽胞数を測定した結果、エクオール未添加培地では1視野あたり約600個の芽胞が形成されていたのに対して、エクオール添加培地では芽胞数が6個となり、エクオールが芽胞の形成を抑制していることが示された。以上の結果から、エクオールは *C. difficile* の増殖および芽胞形成を抑制する作用を持つことが分かった。

腸内では様々な菌種による細菌叢を形成していることから、他の細菌種に対するエクオールの作用を検討した。大腸内に存在する代表的な3菌種へのエクオールの影響を評価した結果、嫌気性菌である *C. perfringens* および *Bacteroides fragilis* では *C. difficile* と同様に生育阻害がみられたが、通性嫌気性菌である *E. coli* への生育阻害効果は確認できなかった。このことから、エクオールによる成長阻害効果には菌種差があることが推定された。

大豆が摂取されると腸内細菌の作用によって、大豆の主成分であるダイジンからダイゼイン、ジヒドロダイゼインを経てエクオールに代謝されることが知られている。これらの中間生成物はエクオールと類似構造を有することから、ダイゼイン、ジヒドロダイゼインについても *C. difficile* への影響を確認した。同濃度で比較した結果では、ダイゼインよりもジヒドロダイゼインの方が、ジヒドロダイゼインよりもエクオールの方が *C. difficile* の生育を阻害していることが確認できた。エクオールには女性ホルモン様活性が報告されていることから、女性ホルモンのエストロン、エストラジオール、エストリオールを用いて *C. difficile* への影響を評価したが、いずれの女性ホルモンも *C. difficile* の生育を阻害しなかった。以上のことから、エクオールの *C. difficile* の増殖、芽胞形成への影響は、女性ホルモン様活性の影響ではなくイソフラボン様骨格に起因する可能性が示唆された。

【 考 察 】

CDIの発生率は、欧米諸国では10,000人/日あたり4.1-8.4症例であり、日本の発生率も欧米のそれとは差がないことが報告されている。一方、欧米では罹患してから30日間の死亡率は9.0-38.0%であるが、日本では6.9-15.1%であり、欧米と日本とではCDI発症後の傷害性の違いが死亡率に起因している可能性が推察される。腸内でのエクオール産生性には地域差があり、欧米では人口の25-30%がエクオールを産生できるが、日本、韓国、中国では50-60%に達することが報告されている。CDIの発症には大腸内に保菌している *C. difficile* が関与することからも、欧米と日本でのCIDによる死亡率の差は、腸内でのエクオールの産生性が起因している可能性が考えられる。ただし、日本でCDIをもたらす主要な流行株は *C. difficile* 018株、014株、002株であることが知られているが、欧米では本研究に使用した高病原性の027株が主である。このことから、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 635 号	氏 名	田 中 裕 美
学位審査担当者	主 査	澁 谷 和 俊
	副 査	瓜 田 純 久
	副 査	渡 邊 学
	副 査	五 十 嵐 良 典
	副 査	松 岡 克 善
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>2019年9月25日(水)19:30-20:30 医学部第2セミナー室にて、5名の審査委員出席の下で(2名の書類による事前審査を含む)学位審査会が行われた。</p> <p>研究の要旨：</p> <p>背景：<i>C. difficile</i> 感染症は、本邦発症例に比して欧米での症例で重篤化が知られている。一方で、大豆イソフラボンの代謝産物であるエクオール腸内産生能を有する人の割合は、欧米に比して東アジアでは多いことが知られている。</p> <p>目的：エクオールの <i>Clostridium</i> 属に対する増殖抑制作用を明らかにする。</p> <p>結果：エクオールを添加して <i>C. difficile</i> BI/NAP1/027 株を培養したところ、濃度依存的に <i>C. difficile</i> の生育が阻害された。エクオール添加培地での培養上清をイムノクロマト法および定量的リアルタイム PCR 法を用いて評価したところ、培養開始18時間目までの毒素産生抑制とそれ以降の毒素が産生を確認した。エクオール添加培地における芽胞形成の低下(600個/視野 vs 6個/視野)を確認した。エクオールは偏性嫌気性菌である <i>C. perfringens</i> および <i>Bacteroides fragilis</i> の発育を抑制したが、通性嫌気性菌である <i>E. coli</i> に対する生育阻害効果は示さなかった。イソフラボン・エクオール系の中間代謝物は、<i>C. difficile</i> に対する発育抑制効果を示した。女性ホルモン(エストロゲン、プロゲステロン)は <i>C. difficile</i> に対する生育阻害効果は示さなかった。</p> <p>結論：本研究結果に加えて先行研究である人種間疫学調査の結果により、大豆イソフラボンの代謝産物である腸内エクオールの有無あるいはその量が、<i>C. difficile</i> 感染症の症状軽減に関与している可能性を指摘した。</p> <p>質疑及び審査：エクオールの作用機序、エクオール産生能の有無が人種依存性であるか?、菌数と毒素産生能との乖離理由、実臨床における用途は、予防か治療か?、今後の研究課題、利益相反状態の管理状況等の質問に対し、適切に回答すると同時に、研究計画の限界や将来の展望について明確な見解を示した。</p> <p>審議：本研究は、<i>C. difficile</i> 感染症の重症化に対するエクオールの抑止効果を示唆した有意義なものであり、学位授与に相当するものと審査委員全員一致で認定した。</p>		