

令和元年9月4日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21041

研究課題名（和文）ヨーグルトの抗菌-整腸作用に着目した術後難治性炎症病態に対する新規治療法の開拓

研究課題名（英文）A new treatment for postoperative intractable inflammatory condition focusing on antibacterial effect and intestinal regulation of yogurt

研究代表者

田島 陽介 (Tajima, Yosuke)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30757505

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヤスダヨーグルトのMRSAに対する抗菌活性成分は、ヤスダヨーグルトに含まれる乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* が産生する乳酸および過酸化水素であることが、本研究により示唆された。今回の研究期間中にヨーグルトの潰瘍性大腸炎術後「回腸囊炎」に対する感染免疫学的効果を検証するには至らなかったが、今後ヤスダヨーグルトによる回腸囊炎に対する治療効果を検証する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性菌であるMRSAは、従来の抗生物質での感染制御が困難である。本研究により、ヤスダヨーグルトのMRSAに対する抗菌活性成分が乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* が産生する乳酸および過酸化水素であることが示唆された。安価で安全性の高い食品であるヨーグルトがMRSAに対する抗菌効果を有することは、抗生物質が中心である現在の感染症治療に大きな変化をもたらす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This research suggests that the antibacterial active ingredient of Yasuda yogurt against MRSA is lactic acid and hydrogen peroxide produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Now we plan to examine the immunological effects of the infection and the therapeutic effect of Yasuda yogurt on ileal pouchitis after surgery for ulcerative colitis.

研究分野：消化器外科・下部消化管外科

キーワード：ヨーグルト MRSA 乳酸菌 乳酸 過酸化水素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロバイオティクスであるヨーグルトの抗菌効果および腸内細菌叢是正効果に着目し、潰瘍性大腸炎術後「回腸囊炎」に対する感染免疫学的効果の検証を目的に研究を開始した。潰瘍性大腸炎の炎症は本来大腸に限局するため、治療として大腸全摘を行う。残存した小腸を袋状に形成して便貯留機能を備えた回腸囊を作成するが、この回腸囊に新たに持続性炎症をきたす病態が回腸囊炎である。回腸囊炎の原因として異常増殖した腸内細菌感染が示唆されているが、回腸囊炎に対する抗生物質の効果は限定的である。理由として、抗生物質による腸内細菌叢バランスの崩壊が示唆されている。

一方、ヨーグルトは腸内細菌叢バランスの是正効果を有することが示唆されている。さらに、我々はすでに予備試験により新潟県産のヤスダヨーグルト(以下、YYG)が MRSA に対して非常に強い抗菌活性を示すことを明らかにしていた。すなわち、ヨーグルトは回腸囊炎の理想的な治療法となる可能性がある。

そこでヨーグルトによる回腸囊炎治療の実現に向けて、まずはヤスダヨーグルトの MRSA に対する抗菌活性の機序を解明することに着手した。

2. 研究の目的

YYG の MRSA に対する抗菌活性成分を同定すること。

3. 研究の方法

抗菌活性の評価: MRSA 菌液を OD600 が 0.1 となるよう調整し、BHI 寒天培地上に塗布した。その後、抗菌活性を調べたい検体を培地上に直接 50 μ l 滴下、または培地上に作成した 7mm 径の孔内に 200 μ l 滴下した。37 $^{\circ}$ C・12 時間の好気培養後に阻止円の有無・径を評価した。

YYG の遠心分離成分の抗菌活性の評価: YYG を 4000rpm・15 分で遠心分離を行い、得られた上清および沈澱物成分についてそれぞれ抗菌活性を評価した。

抗菌活性を示す乳酸菌の YYG からの分離: MRSA 菌液を添加した MRS 寒天培地に YYG を塗布し、37 $^{\circ}$ C・24 時間の好気培養を行った。阻止円を有するコロニーを採取し、それらを MRS 液体培地により各種条件下で培養した。増殖した乳酸菌に関して 16S-rDNA 解析を行い、抗菌活性を示す乳酸菌を同定した。

乳酸菌が産生する抗菌活性成分の抽出: 上記で単離培養した乳酸菌を MRS 液体培地で各種条件(好気/嫌気培養、6-48 時間、遮光の有無など)で培養した。後に培養液を 4000rpm・15 分の条件で遠心分離し、抗菌活性を評価するための上清を得た。

乳酸菌が産生する抗菌活性成分の同定: 上記で得られた上清に加熱・限外濾過・消化液曝露等の負荷を与えることによる抗菌活性の変化より、抗菌活性成分の推定を試みた。

培養条件が乳酸菌増殖に与える影響: 下記 1)2)の諸条件下での培養により得られた乳酸菌培養液の OD₆₀₀、および遠心分離(4000 rpm, 15 分)後の上清の pH および MRSA に対する阻止円径を測定し、MRSA に対する抗菌活性を評価した。培養液 OD₆₀₀ および培養液上清 pH の差は Mann-Whitney の U 検定を、培養液上清 pH と阻止円径との相関は Pearson の相関係数により解析した。

- 1) 通気条件: 単離・同定した乳酸菌を 48 時間静置または振盪培養(37 $^{\circ}$ C, 好気条件)した。
- 2) 酸素濃度: 好気培養は室内気における培養とした。嫌気培養はアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)を用いた。単離・同定した乳酸菌を 37 $^{\circ}$ C、静置条件下で 48 時間好気または嫌気培養した。

4. 研究成果

抗菌活性の評価: 上記方法で適切に抗菌活性を半定量的に評価することができた。

YYG の遠心分離成分の抗菌活性の評価: YYG の遠心分離成分のうち、沈澱物に強い抗菌活性を認めた。また YYG をペースマッシュした後に遠心分離すると、沈澱物の抗菌活性は消失することがわかった。これらの結果より、抗菌活性成分は YYG に含まれる乳酸菌が産生している可能性が示唆された。

抗菌活性を示す乳酸菌の YYG からの分離：
16S-rDNA 解析の結果、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (以下、LDB 菌) を同定した (図 1)。

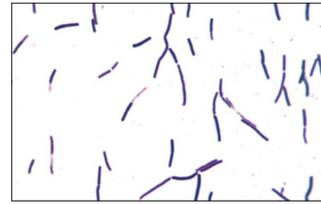


図1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の鏡検像グラム染色, ×1000倍.

乳酸菌が産生する抗菌活性成分の抽出：
LDB 培養液を 37℃、好気条件下で静置培養した結果、18-24 時間経過時より培養液 OD600 および上清 pH がプラトーに達することが判明した (図 2)。24 時間静置培養 (37℃, 好気条件) した LDB 培養液上清を遠心分離 (4000 rpm, 15 分) した結果、抗菌活性を示す上清を得ることができた。

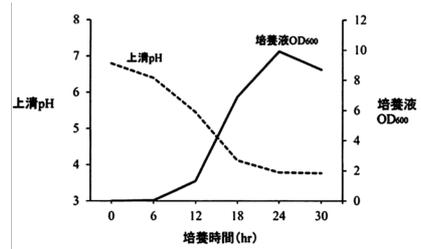


図2. LDBの培養時間と上清pHおよび培養液OD₆₀₀

乳酸菌が産生する抗菌活性成分の同定：
上記で得られた上清を加熱処理した結果、95℃ 10 分までの加熱では抗菌活性が保たれることがわかった (図 3)。また、限外濾過を行った結果、抗菌活性成分は 3kDa 以下の小分子物質であることがわかった (図 4)。

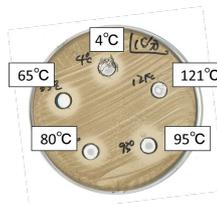


図3. 加熱したLDB培養液上清の抗菌活性評価

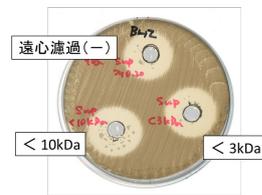


図4. 遠心濾過したLDB培養液上清の抗菌活性評価

HCl または NaOH により上清の pH を変化させると、pH と抗菌活性に負の比例関係を認めた (図 5)。さらに、各種消化酵素に暴露させた結果、ペプシン・トリプシン・キモトリプシン・胆汁添加では抗菌活性が保たれたが、カタラーゼ添加により抗菌活性は著明に減弱した (図 6)。

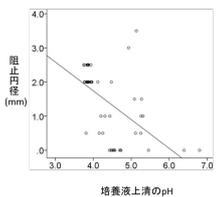


図5. LDB培養液上清のpHと抗菌活性の関係

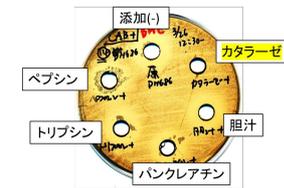


図6. 各種消化酵素を添加したLDB培養液と抗菌活性評価

以上より、YYG の産生する LDB 菌が産生する乳酸および過酸化水素が、MRSA に対する抗菌活性を示すことが示唆された。

培養条件が乳酸菌増殖に与える影響：

1) 通気条件：静置培養は振盪培養と比べて LDB 培養液 OD₆₀₀ が有意に高値であり ($P = 0.002$) LDB 培養液上清 pH が有意に低値であり ($P = 0.002$) LDB 培養液上清の MRSA に対する抗菌活性が大きかった ($P = 0.002$) (図 7)。

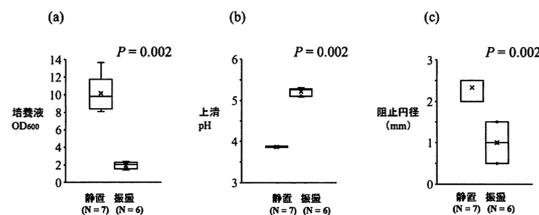


図7. 通気条件による(a)LDBの増殖, (b)培養液上清pH および(c)抗菌活性の比較 (48時間好気培養)。

2) 酸素濃度：嫌気培養と好気培養では LDB 培養液 OD₆₀₀、LDB 培養液上清 pH, および LDB 培養液上清の MRSA に対する抗菌活性に有意差を認めなかった ($P = 0.310$, $P = 0.589$, $P = 1.000$) (図 8)。

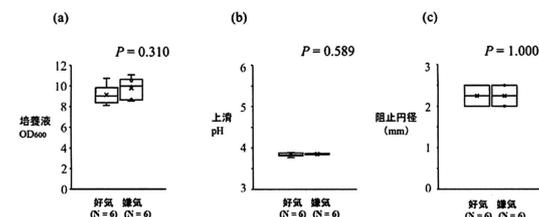


図8. 酸素濃度による(a)LDBの増殖, (b)培養液上清pH および(c)抗菌活性の比較 (48時間静置培養)。

3) LDB 培養液の上清 pH と阻止円径との間に強い負の相関関係を認めた (相関係数 = -0.875 , $P < 0.001$) (図 9)。

【まとめ】ヤスダヨーグルトの MRSA に対する抗菌活性成分は、ヤスダヨーグルトに含まれる乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* が産生する乳酸および過酸化水素であることが、本研究により示唆された。今回の研究期間中にヨーグルトの潰瘍性大腸炎術後「回腸嚢炎」に対する感染免疫学的効果を検証するには至らなかったが、今後ヤスダヨーグルトによる回腸嚢炎に対する治療効果を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) 田島陽介, 立石善隆, 亀山仁史, 松本壮吉, 若井俊文. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対するヤスタヨーグルトの抗菌活性の検討. 新潟医学会雑誌. 2018;131;645-653.

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 田島陽介, 亀山仁史, 山田沙季, 山本潤, 堀田真之介, 橋本喜文, 田村博史, 八木亮磨, 八木 寛, 細井 愛, 岩城孝和, 市川 寛, 岡村拓磨, 木戸知紀, 中野雅人, 永橋昌幸, 島田能史, 坂田 純, 小林 隆, 若井俊文. ヨーグルトの MRSA に対する抗菌活性の検討. 第 117 回日本外科学会定期学術集会(神奈川県横浜市) 2017.04.27
- 2) 田島陽介, 岡村拓磨, 中野麻恵, 中野雅人, 島田能史, 亀山仁史, 若井俊文. なぜ外科医がヨーグルトを研究するのか. 第 29 回新潟厚生連外科医会(新潟県新潟市) 2016.06.11

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 若井 俊文

ローマ字氏名: WAKAI, Toshifumi

研究協力者氏名: 松本 壮吉

ローマ字氏名: MATSUMOTO, Sohkiichi

研究協力者氏名: 立石 善隆

ローマ字氏名: TATEISHI, Yoshitaka

研究協力者氏名: 倉元 三八子

ローマ字氏名: KURAMOTO, Miyako

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。