

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2023  
課題番号：20K18117  
研究課題名（和文）乳酸菌バイオサーファクタントを用いた反復性/難治性膀胱炎の予防的治療の新戦略

研究課題名（英文）A new strategy for preventive treatment of recurrent / refractory cystitis with lactic acid bacteria biosurfactant

研究代表者  
岩田 健宏（Iwata, Takehiro）  
岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00803082  
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）：我々はこれまでの基礎/臨床研究において、膣に常在する乳酸菌に注目し、それが産生するバイオサーファクタントがQS阻害剤として機能することを見出している。また、*L. Crispatus*上清に含まれるいくつかのペプチド(特にAggregation-promoting factor)が抗菌活性を持つと予測され、乳酸や過酸化水素に加え、*L. crispatus*のもう一つの抗菌機構である可能性が示された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

膣に常在する乳酸菌に注目し、それが産生するバイオサーファクタントがクオラムセンシング阻害剤として機能することを見出している。また、*L. Crispatus*上清に含まれるいくつかのペプチド(特にAggregation-promoting factor)が抗菌活性を持つと予測され、乳酸や過酸化水素に加え、*L. crispatus*のもう一つの抗菌機構である可能性が示された。  
反復性/難治性膀胱炎に対するクオラムセンシング阻害剤の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In our previous basic/clinical studies, we have focused on lactic acid bacteria endemic to the vagina and found that biosurfactants produced by them function as QS inhibitors. In addition, several peptides (especially Aggregation-promoting factor) in *L. crispatus* supernatant were predicted to have antimicrobial activity, indicating that they may be another antimicrobial mechanism in *L. crispatus*, in addition to lactic acid and hydrogen peroxide.

研究分野：感染症

キーワード：クオラムセンシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膀胱炎は Common disease であり、再発に対し、繰り返し抗菌薬加療を行うことで、病原菌の多剤耐性化を来し、反復性/難治性膀胱炎となる。一つの解決策として、病原性細菌の病原因子の産生のみを特異的に抑制するクオラムセンシング (Quorum Sensing: QS) 阻害剤の開発が、今世紀における感染症治療のブレイクスルーとして世界的に注目されている。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでの基礎/臨床研究において、膣に常在する乳酸菌に注目し、それが産生するバイオフィーム形成因子が QS 阻害剤として機能する可能性を見出している。反復性/難治性膀胱炎に対する QS 阻害剤の臨床応用に向けての橋渡し研究として、先進的リアルタイムイメージング法による実験モデル系と分子生物学的手法を駆使して、乳酸菌の産生するバイオフィーム形成因子のうち、QS 阻害剤として作用する化合物の同定、その作用機序解明を目指す。反復性/難治性膀胱炎に対する QS 阻害剤の臨床応用に向けての橋渡し研究として、先進的リアルタイムイメージング法による実験モデル系と分子生物学的手法を駆使して、新規 QS 阻害剤の作用機序解明を目指す。さらに、次世代シーケンサーを用いて、QS 阻害剤使用前後の臨床検体を多元的かつ網羅的に解析し、QS 阻害剤の選択圧の有無を確認する。

### 3. 研究の方法

#### バイオフィーム形成因子の抽出とその組成分析

乳酸菌株の培養上清の pH を HCl によって 2.0 に調整した後、4℃ で一晩静置する。生じた沈殿を遠心によって回収し、蒸留水に溶解させ、クロロホルムとメタノールで抽出する。エバポレーターで有機溶媒を留去した後、任意の溶媒に溶解させ、preparative TLC 法により活性物質を精製する。フーリエ変換赤外分光法を用いて構成する有機物の組成を定性・定量的に測定する。

#### 生育阻害活性と抗付着活性の評価

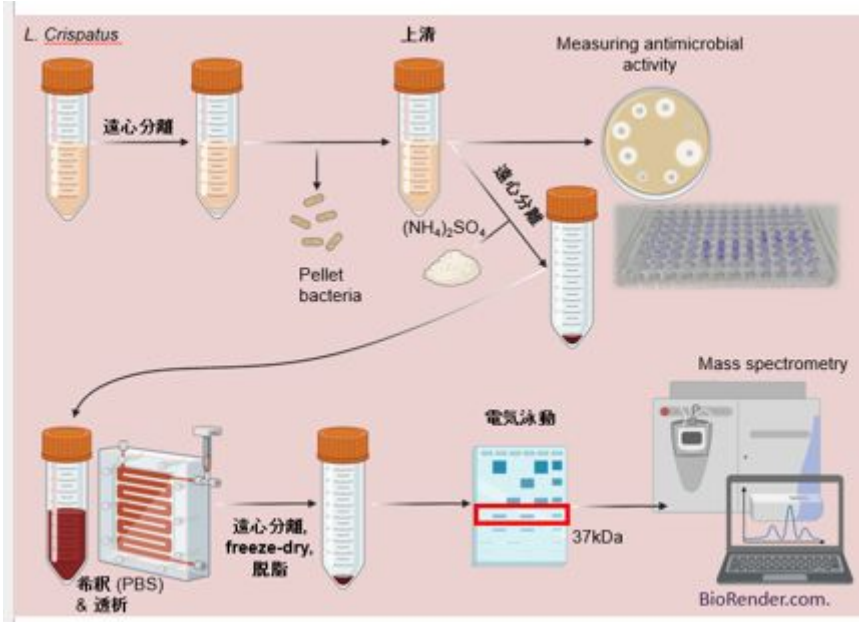
バイオフィーム形成因子 (QS 阻害剤) の大腸菌に対する生育阻害とバイオフィーム形成阻害作用を微量液体希釈法で評価する。さらに、大腸菌を対数増殖期まで培養し、抽出したバイオフィーム形成因子 (QS 阻害剤) を加え、継続的に CFU を測定し、生存率を算出する。

#### 病原因子の産生試験

QS により直接発現が制御されている病原因子である  $\alpha$ -hemolysin (細胞毒性)、uropathogenic specific protein (DNase 活性)、cytotoxic necrotizing factor typr1 (細胞壊死毒素)、S 線毛 (接着因子)、P 線毛 (接着因子)、K 抗原 (免疫防御作用) などの産生について QS 阻害剤の添加による影響を検討する。

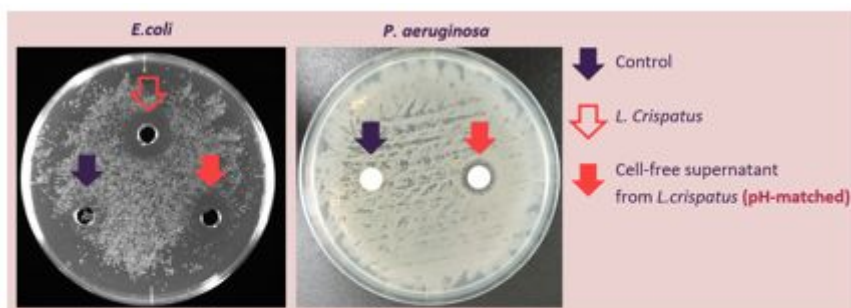
#### 乳酸菌バイオフィーム形成因子高産生条件の検討

一般的に乳酸菌の培養に用いられる MRS 培地では、培地成分中に界面活性剤の成分が含まれているため、バイオフィーム形成因子産生用培地としては相応しくない。そこで、将来的に膣内に直接投与の可能性も視野に入れ、人体に利用可能かつ安全な培地を検討する。



#### 4. 研究成果

腔に常在する乳酸菌に注目し、それが産生するバイオフィラクタンがクオラムセンシング阻害剤として機能することを見出した。また、*L. Crispatus* 上清に含まれるいくつかのペプチド(特に Aggregation-promoting factor)が抗菌活性を持つと予測され、乳酸や過酸化水素に加え、*L. crispatus* のもう一つの抗菌機構である可能性が示された。反復性/難治性膀胱炎に対するクオラムセンシング阻害剤の臨床応用が期待される。



◆*L. crispatus*無細胞上清は*E. coli*および*P. aeruginosa*の増殖を抑制。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomofumi Watanabe, Takuya Sadahira*, Tomoaki Yamanoi, Naoya Nagasaki, Yuki Maruyama, Takehiro Iwata, Kohei Edamura, Yasuyuki Kobayashi, and Motoo Araki
2. 発表標題 Discovery of antimicrobial peptides from <i>Lactobacillus crispatus</i>
3. 学会等名 European association of urology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田 健宏、定平 卓也、渡部 智文、関戸 崇之、吉永 香澄、丸山 雄樹、片山 聡、西村 慎吾、和田 耕一郎、枝村 康平、小林 知子、小林 泰之、山本 満寿美、石井 亜矢乃、光畑 律子、渡邊 豊彦、荒木 元朗
2. 発表標題 乳酸菌由来抗菌ペプチドの探索
3. 学会等名 第71回日本化学療法学会学術集会 合同学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------