

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380162

研究課題名（和文）乳酸菌およびビフィズス菌の日和見感染機構の解明と安全性向上

研究課題名（英文）Studies on opportunistic infection mechanisms of lactobacilli and bifidobacteria

研究代表者

戸羽隆宏（TOBA TAKAHIRO）

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：10108483

研究成果の概要（和文）：乳酸菌およびビフィズス菌株から Caco-2 細胞 monolayer に侵入性を有する株を見出した。最も侵入性が高かった *Lactobacillus crispatus* JCM 5810 を用いて、侵入経路および侵入機構を調べた。その結果、頂端側が主な侵入経路で、他の病原菌により tight junction が破壊された場合には側面からも効率的に侵入するが、基底面からは殆ど侵入は見られなかった。侵入には菌体タンパク質の合成と細胞側のマイクロフィラメントの再構成が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We find out that several *Lactobacillus strains* can invade Caco-2 cell monolayer. Among those, the most invasive strain *Lactobacillus crispatus* JCM 5810 was used further studies on an invasive site and mechanism. It was shown that the bacterium enters the cells via apical side, and protein synthesis in the bacteria and rearrangement of microfilaments inside Caco-2 cells are essential for the invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：乳酸菌

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトに対する健康の維持・増進機能が期待されて、腸管由来の乳酸桿菌やビフィズス菌がプロバイオティクスとして使われる機会が増えている。一方で、発酵乳や整腸剤に使われているヒト腸管由来の *Lactobacillus gasseri* や *L. rhamnosus* は、バイオセーフティーレベル分類では日和見病原体に分類されている。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では腸管上皮細胞モデルとしてヒト腸管由来株化細胞である Caco-2 細胞を用いて、①乳酸桿菌やビフィズス菌の単独および他の病原体との共侵入性の有無の評価および②侵入機構の解明を行うとともに、③侵入性株と非侵入性株の簡便・迅速な鑑別法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

乳酸桿菌やビフィズス菌株は菌株保存機関から入手した菌株およびヒトや発酵乳から当研究室で分離した株を用いた。乳酸桿菌の分離には MRS や GAM 寒天培地を、ビフィズス菌の分離には BL 寒天培地を用いた。菌種の同定は菌種特異的プライマーを用いた PCR により行った。付着・侵入性の評価は、24 ウェルプレート上でコンフルエントとした Caco-2 細胞を用い、gentamicin protection assay で行った。Gentamicin protection assay に先立ち、菌株毎に感受性試験を行い、被検株が 99.99% 以上の死滅率を与える濃度を用いた。gentamicin protection assay で侵入性が認められた菌株は、走査型および透過型電子顕微鏡による侵入像の観察も行った。侵入機構の解明のために、タンパク質合成阻害剤や細胞骨格阻害剤を用いた。側底部からの侵入の可能性を確認するために、トランスウェル上で培養した細胞を用いて侵入試験を行った。タイトジャンクションに対する障害活性はミリセル-ERS を用いた経上皮電気抵抗値の測定により評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 乳酸菌の侵入性

菌株保存機関から入手した 10 菌株の *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus* および *L. gasseri* の Caco-2 細胞 monolayer への付着および侵入性を調べた。その結果、図 1 に示したように、試験した全ての菌株は 10~50% の高い付着率を示した。一方、侵入性を示したのは *L. acidophilus* JCM 1132, *L. crispatus* JCM 5810, *L. crispatus* MH 307, *L. crispatus* MH 53 および *L. gasseri* MH 410 の 5 菌株で、侵入率は 0.05~0.25% であった。このうち、*L. crispatus* JCM 5810 は繰り返し実験した場合の侵入率の再現性が高いことから、以下の実験には本菌株を用いることとした。

次いで、前述と同様にして発酵乳から分離した 10 菌株の *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* および *L. gasseri* を用いて付着・侵入性を調べた。その結果、図 2 に示したように、全ての菌株で付着性が見られ、特に *L. gasseri* NW 2 および *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NW 8 では 40~50% と、図 1 の高付着性菌株と同程度の高い付着率を示した。一方、侵入性は見られなかった。

ビフィズス菌に関しては、菌株保存機関から入手した *Bifidobacterium longum* JCM 1217, *B. adolescentis* JCM 1275, *B. bifidum* JCM 1255, *B. breve* JCM 1192 および *B. infantis* JCM 1222 および発酵乳および整腸剤から分離した 17 株を用いて、付着試験のみを行ったが、付着率は 1.4~6.6% で、

*lactobacilli* と比較して低かった。

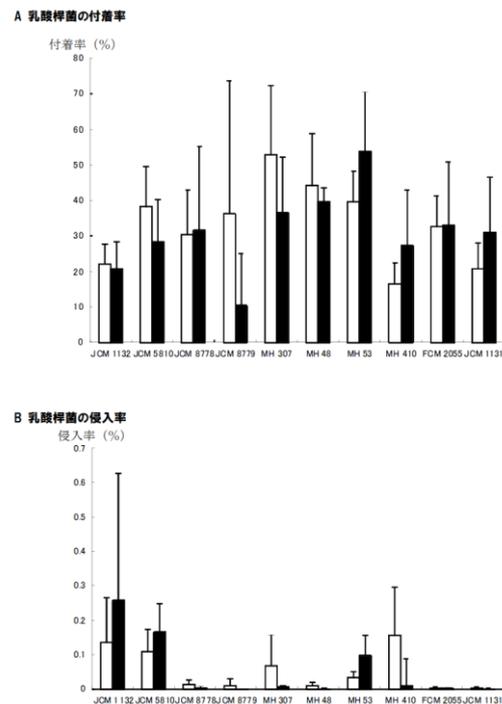


図 1 菌株保存機関からの入手あるいはヒト糞便から分離した lactobacilli の Caco-2 細胞 monolayer への付着・侵入性  
菌株保存機関から入手した菌株：*L. acidophilus* JCM 1132, *L. crispatus* JCM 5810, *L. crispatus* JCM 8778, *L. crispatus* JCM 8779, *L. gasseri* JCM 1131.  
ヒト糞便から分離した菌株：*L. crispatus* MH 307, *L. crispatus* MH 48, *L. gasseri* MH 410, *L. gasseri* FCM 2055.

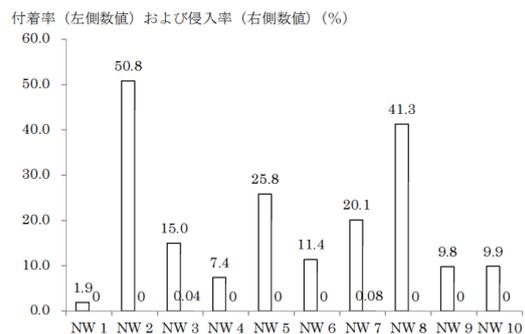


図 2 市販発酵乳から分離した lactobacilli の Caco-2 細胞 monolayer への付着・侵入性  
*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NW1, *L. gasseri* NW 2, *L. brevis* NW 3, *L. acidophilus* NW 4, *L. casei* NW 5, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NW6, *L.*

*gasseri* NW 7, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NW8, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NW9, *L. casei* NW 10.

## (2) Caco-2 細胞への侵入経路の推定

### ①tight junction の障害性

トランスウエル上で培養した Caco-2 細胞 monolayer の tight junction に与える *L. crispatus* JCM 5810 (侵入株) と JCM 8779 (非侵入株) の影響を調べた。その結果、菌体を添加しないウエルでは TER は変化しなかったが、どちらの菌株を添加したウエルでも、TER は添加 0 時間の約 800Ω から 48 時間で約 400Ω に減少した。

Tight junction を破壊することにより、細胞側底面からの侵入の可能性も示唆された。

### ②細胞側底面からの侵入の可能性

1 あるいは 5mMEGTA で前処理し tight junction を破壊した Caco-2 細胞 monolayer への侵入性を、未処理細胞への侵入性と比較した。その結果、図 3 に示したように、無処理の場合に比べ、侵入率が約 2.5 倍に増加した。

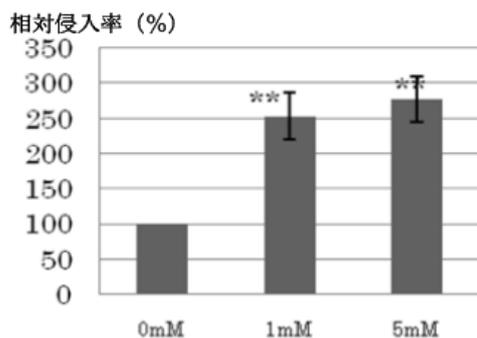


図 3 EGTA 処理 Caco-2 細胞 monolayer への *L. crispatus* JCM 5810 の侵入性

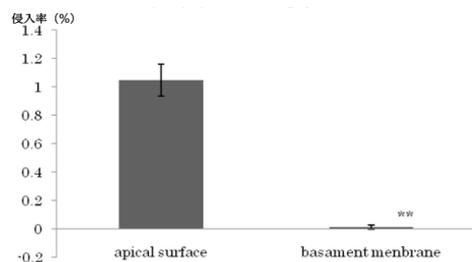


図 4 *L. crispatus* JCM 5810 の Caco-2 細胞 monolayer の基底面からの侵入性

次いで、トランスウエル上でコンフルエントになるまで培養した Caco-2 細胞を用いて底面からの侵入性を調べた。その結果、図 4

に示したように、基底面からの侵入率は 0.01% と非常に低かった。図 3 と図 4 の結果から *L. crispatus* JCM 5810 株は頂端面と側面からの侵入性が高く、底面からは殆ど侵入しないと考えられた。

### (3) 侵入機構の推定

侵入への Caco-2 細胞におけるタンパク質合成の関与を調べるため、真核細胞のタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CyH) で前処理した Caco-2 細胞 monolayer への *L. crispatus* JCM 5810 の侵入性を調べた。その結果、図 5 に示したように、CyH は侵入性に影響しなかった。

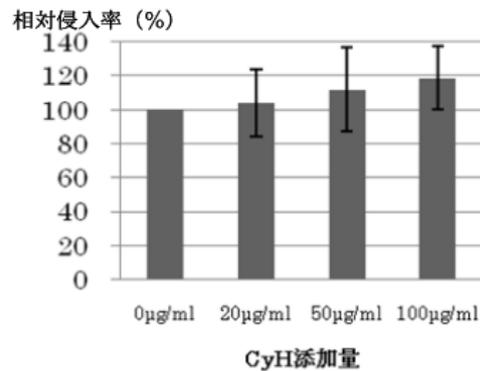


図 5 Cycloheximide 処理 Caco-2 細胞 monolayer への *L. crispatus* JCM 5810 の侵入性

次いで、*L. crispatus* JCM 5810 の Caco-2 細胞への侵入への細胞骨格の関与を調べるため、微小管あるいはマイクロフィラメントの再構成阻害剤で Caco-2 細胞を前処理後、侵入性を調べた。その結果、図 6 および 7 に示したように微小管の脱重合剤である colchicine (Co) および nocodazole (No) で

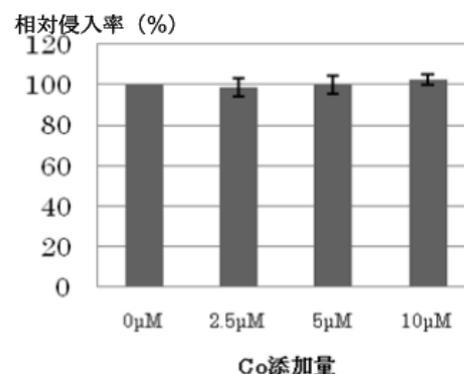


図 6 Colchicine 処理 Caco-2 細胞 monolayer への *L. crispatus* JCM 5810 の侵入性

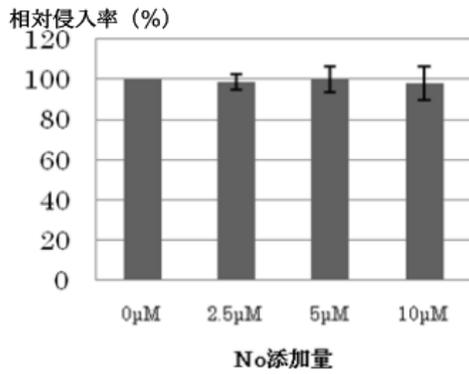


図7 Nocodazole 処理 Caco-2 細胞 monolayer への *L. crispatus* JCM 5810 の侵入性

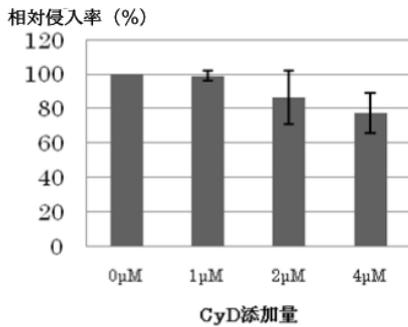


図8 Cytochalasin-D 処理 Caco-2 細胞 monolayer への *L. crispatus* JCM 5810 の侵入性

Caco-2 細胞を前処理した場合には、侵入性には変化が無かったが、図8に示したように、cytochalasin-D で処理した場合に、侵入性が減少したことから、*L. crispatus* JCM の侵入には微小管は関与せず、マイクロフィラメントが関与している可能性が示された。

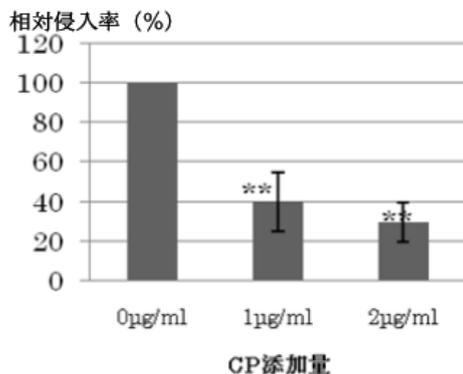


図9 Chloramphenicol 処理 *L. crispatus* JCM 5810 の Caco-2 細胞 monolayer への侵入性

さらに、侵入に関わる菌体側の要因を推定するため、原核細胞のタンパク質合成阻害剤 chloramphenicol (CP) の共存下で、*L. crispatus* JCM 5810 の Caco-2 細胞への侵入性を評価した。その結果、処理は付着性に影響しなかったが、図9に示したように、侵入性は急激に低下したことから、侵入には菌体側での侵入因子の生合成が必要であることが示唆された

#### (5) アポトーシスおよびネクローシス誘導活性

Caco-2 細胞に対するアポトーシス誘導活性およびネクローシス誘導活性を、*L. crispatus* JCM 5810 (侵入株) と JCM 8779 (非侵入株) を用いて、TUNEL assay および MTT assay で評価した。その結果、アポトーシスの誘導活性は観察されなかったが、ネクローシスの誘導活性は、図10に示したように陽性標準として用いた *Arcobacter butzleri* の2株よりは弱いものの、*L. crispatus* の2株でも細胞障害活性が見られた。

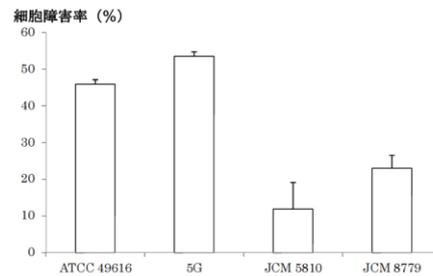


図10 *L. crispatus* JCM 5810, *L. crispatus* JCM 8779, *Arcobacter butzleri* ATCC 49616 および *A. butzleri* 5G の Caco-2 細胞に対する障害活性 (MTT assay)

#### (6) 電子顕微鏡による Caco-2 細胞との相互作用の観察

図11に示したように、走査電顕による観察では、細胞内に取り込まれようとしているようにも理解できる像が、観察されたが、ruffling 膜は明瞭には観察されなかった。また、透過電顕では、図12に示したように、観察視野数が少ないためか、侵入を疑わせる像は観察されなかった。

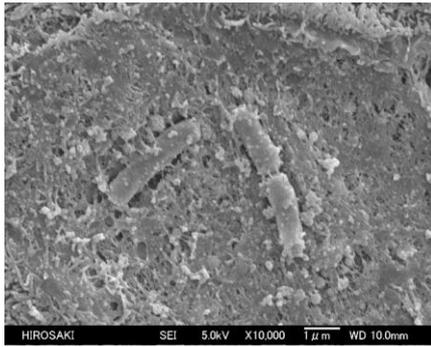


図 11 走査型電子顕微鏡による Caco-2 細胞 monolayer 上の *L. crispatus* JCM 5810 の観察



図 12 透過型電子顕微鏡による Caco-2 細胞 monolayer 上の *L. crispatus* JCM 5810 の観察

(7) 病原菌の侵入に与える影響

細胞侵入性の病原菌株として *Arcobacter butzleri* YW 49 および YW 57 を用いて、侵入性に与える乳酸桿菌の共存の影響を調べた。乳酸菌は病原菌の 10 倍量濃度となるように、添加した。その結果、試験したいずれの lactobacilli も *A. butzleri* の caco-2 細胞への侵入性をわずかに亢進した。

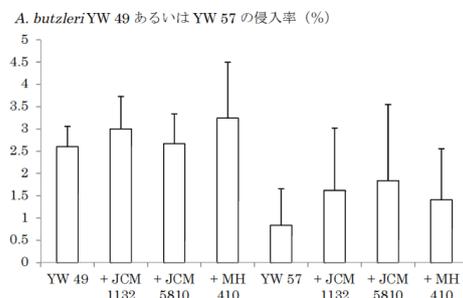


図 13 *Arcobacter butzleri* YW 49 および YW 57 の Caco-2 細胞 monolayer への侵入に与える *L. acidophilus* JCM 1132, *L. crispatus* JCM 5810 および *L. gasseri* MH

410 株共存の影響

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①藤村江里子、梅澤沙織、戸羽隆宏、

*Arcobacter butzleri* の細胞侵入性および炎症性サイトカインの産生に与える乳酸菌の影響、日本畜産学会第 112 回大会、明治大学駿河台キャンパスにて口頭発表

[図書] (計 2 件)

①戸羽隆宏他、日本ビフィズス菌センター、世紀を越えるビフィズス菌の研究、2011、20-24

②戸羽隆宏他、京都大学学術出版会、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、2010.、95-105、125-129

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸羽 隆宏 (TOBA TAKAHIRO)  
弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：10108483

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：