

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861749

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌の口腔内定着を阻害する新規口腔由来抗菌因子の探索

研究課題名(英文) Evaluation of novel antibacterial agents derived from oral cavity against *Staphylococcus aureus* to inhibit oral colonization.

研究代表者

松尾 美樹 (Kawada-Matsuo, Miki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：20527048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌の口腔内定着を阻害する新規口腔由来抗菌性因子を検索するために、口腔内から黄色ブドウ球菌に抗菌活性を持つ *Streptococcus sanguinis* と *Streptococcus parasanguinis* を分離した。これらの細菌の持つ抗菌因子は、過酸化水素であることも明らかにした。また、黄色ブドウ球菌の持つ二成分制御系因子(TCS)のひとつが、乳酸菌や *Staphylococcus warneri* が産生する抗菌性因子(バクテリオシン)に対する耐性獲得システムであることも明らかにした。本TCSを賦活化することで、黄色ブドウ球菌の口腔内定着も阻害することが可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated a novel antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* to inhibit oral colonization. We isolated *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus parasanguinis* which have antibacterial activity against *S. aureus*. These bacteria produce hydrogen peroxide as antibacterial agent. Furthermore, two-component systems of *S. aureus* are revealed that related to the resistant system against hydrogen peroxide of *S. sanguinis* and bacteriocins produced by *L. lactis* and *S. warneri*. We consider that TCSs can be applied as a fixing inhibitors preventing oral colonization of *S. aureus*.

研究分野：口腔細菌

キーワード：黄色ブドウ球菌 口腔内定着 バクテリオシン 二成分制御系

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚や粘膜に常在する細菌である。最も分離頻度の高い部位は鼻前庭や鼻咽腔であり、およそ 20-30% のヒトに定着している。その他の定着部位としては皮膚、口腔、咽頭、消化管、膣などからも分離される。しかし、一方で黄色ブドウ球菌はヒトに種々の疾患を引き起こす主要な病原菌の 1 つである。本菌はヒトに種々の化膿性疾患、食中毒、腸炎、肺炎など非常に多様な疾患を引き起こす。黄色ブドウ球菌感染症の治療の際には化学療法剤が頻用されるが、特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に代表されるように、 β -ラクタム剤をはじめとする多くの薬剤に耐性を示す多剤耐性菌が問題視されている。MRSA の有効な治療薬にバンコマイシンがあるが、近年この薬剤に対しても低感受性あるいは耐性を示す菌の出現が報告されている。また、これまで MRSA 感染症の多くは病院内で起こる院内感染型であったが、入院などの医療行為の既往のないヒトに感染症を起こす市中型の MRSA の出現も問題視されている。

歯科領域においても黄色ブドウ球菌は顎骨骨髓炎、インプラント埋入後の歯周炎、歯根膿瘍などの原因菌である。また、近年特に問題となっている高齢者に多く見られる誤嚥性肺炎の原因菌としても知られている。したがって、黄色ブドウ球菌感染症の問題は医科領域のみならず歯科領域においても非常に重要であり、口腔内の黄色ブドウ球菌を含めた口腔内細菌のコントロールの重要性が認識されており、特に高齢者や要介護者などの口腔ケアの実践は必要不可欠のものとなってきている。

2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌は化膿性疾患や食中毒などを引き起こす病原性細菌であるが、一方でヒト常在菌の一つでもある。口腔内から分離される黄色ブドウ球菌は、誤嚥性肺炎や顎骨骨髓炎などを惹起することが知られている。そのため、口腔内の黄色ブドウ球菌を含めた口腔内細菌のコントロールの重要性が認識されており、特に高齢者や要介護者などの口腔ケアの実践は必要不可欠のものとなってきている。本研究は、新規口腔由来因子による黄色ブドウ球菌の口腔定着阻害法開発を目標とし、そのための基礎的研究を行うことを目的としていた。新規口腔由来因子の候補としては、常在菌由来因子であるバクテリオシン (細菌の産生する抗菌性因子) の 2 つについて検討を行った。

口腔内細菌の産生するバクテリオシンによる黄色ブドウ球菌への抗菌活性

細菌の産生するバクテリオシンは、他菌を排除し、自身の生存領域を確保する役割を果たしており、各菌により産生されるバクテリオシンには多くの種類があり、各々の抗菌スペクトルも異なる (Current Pharm. Biotech., 2009, 10, 2-18)。私は黄色ブドウ球菌のバクテリオシン耐性機構についての研究を進めており、その過程でいくつかの細菌の産生するバクテリオシンが黄色ブドウ球菌に対し抗菌活性を持つことを明らかにしている (論文投稿中)。そこで、唾液中から口腔内細菌を約 200 株分離し、その中から黄色ブドウ球菌の生育を阻害する菌株を複数見出した。口腔内常在菌のうち、*Streptococcus salivarius* や *Streptococcus mutans* などはバクテリオシンを産生することが報告されているが、口腔内細菌の産生するバクテリオシンによる黄色ブドウ球菌への抗菌活性についての報告は少ない。私は、本研究で、黄色ブドウ球菌の口腔内への定着を阻害するバクテリオシンを明らかにし、抗菌剤やプロバイオティクスへの応用に向けての検証を行う予定である。

3. 研究の方法

2 年間の研究期間において口腔常在細菌が黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果を持つ口腔常在細菌の分離・同定ならびに黄色ブドウ球菌の持つこれらの抗菌性因子に対する耐性機構の解明を行った。

(1) 黄色ブドウ球菌の生育を阻害する口腔内常在菌のスクリーニング

ボランティア 1 名の唾液中から分離した口腔内常在菌を用いて、黄色ブドウ球菌 MW2 株に対する増殖阻害作用を認める口腔内常在菌の分離を試みる。検証の方法としては、competition assay、direct 法を用いることにより、収集した口腔細菌の産生するバクテリオシン感受性を評価した。(鹿児島大学疫学研究等倫理委員会承認番号：第 372 号)

(2) バクテリオシン産生菌の同定

バクテリオシン産生菌の同定は、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法を用いて行った。

(3) バクテリオシンの精製

バクテリオシンの粗精製は micro prep を用いて行った。

(4) バクテリオシン産生菌におけるバクテリオシン産生・耐性機構の解明

種々のバクテリオシンを産生することで知られている *Bacillus* 属は、二成分制御系 (TCS) の支配下にある ABC トランスポーターにより、バクテリオシンの産生・排出を行うが、同時にこれらのバクテリオシンが自身

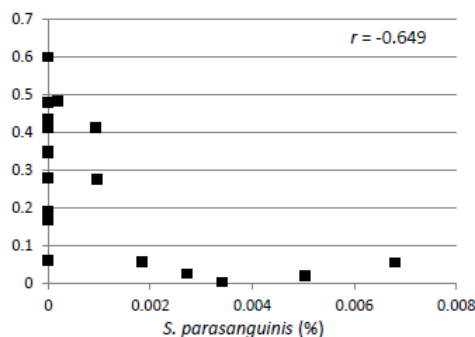
に作用しないための immunity factor である別の ABC トランスポーターによってバクテリオシン耐性を獲得していることが報告されている (Mol Microbiol. 2002, PMID:11972779)。黄色ブドウ球菌は、他菌の産生するバクテリオシン耐性に TCS と ABC トランスポーターの関与が報告されている (Mol Microbiol. 2011, PMID:21696458)。そこで、2 で同定したバクテリオシン産生菌のゲノム情報が明らかになっている際は、TCS ならびに ABC トランスポーターの consensus 領域の相同性検索を行い、3 で精製したバクテリオシン作用時における発現誘導の認められる TCS もしくは ABC トランスポーターのスクリーニングを行う。スクリーニングにより選択された遺伝子の破壊株の作製を試み、バクテリオシン産生性ならびに耐性の検証を、direct 法にて検証する。これにより、バクテリオシン産生菌のバクテリオシン産生・耐性因子を同定し、産生・耐性機構の解明を目指す。

4. 研究成果

口腔内から 96 株細菌を分離し、黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を持つ菌を検証した結果、18 株が強い抗菌作用を示し、これらは *Streptococcus parasanguinis* と *Streptococcus sanguinis* が黄色ブドウ球菌に対し抗菌作用を持つことが明らかになった。過去の文献等から、*S. sanguinis* は過酸化水素を産生することが考えられたため、*S. sanguinis* を好気(過酸化水素産生可能条件)、嫌気(過酸化水素産生不可能条件)下にて各々培養し、黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を検証した。その結果、嫌気下では黄色ブドウ球菌に対する両菌の抗菌効果は認められなかった。このことから、*S. sanguinis* の黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果は過酸化水素であることが示唆された。(学会発表)また、*S. parasanguinis* は、*S. sanguinis* と遺伝子学的派生が近いことから、同様の抗菌作用を持つことが考えられたため、好気下ならびに嫌気下での黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果の検証を行った。その結果、*S. sanguinis* 同様 *S. parasanguinis* も好気下でのみ抗菌活性を認めた。このことから、*S. sanguinis*, *S. parasanguinis* は共に過酸化水素により、黄色ブドウ球菌の口腔内定着を阻害していることが示唆された。

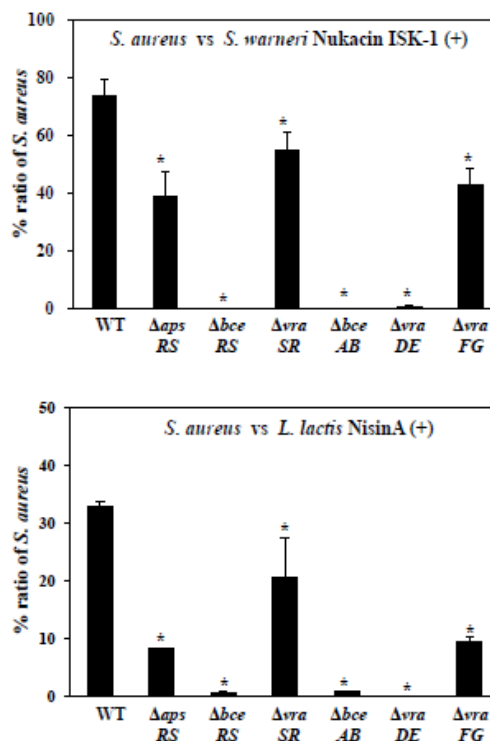
さらに、黄色ブドウ球菌が分離された被験者 10 名、非分離被験者 10 名の計 20 名から唾液を分離し、定量性 PCR 法にて *S. sanguinis* ならびに *S. parasanguinis* の定量を行った。その結果、*S. parasanguinis* の菌量は黄色ブドウ球菌と負の相関関係にあったが(図 1)、*S. sanguinis* の菌量と黄色ブドウ球菌の検出率との間に相関関係は認められなかった。一方、黄色ブドウ球菌の持つ二成分制御系因子の一つが、*S. sanguinis* が産生する過酸化水素に対し耐性を示すことを明らかにした(学会発表-2)。

図1. 黄色ブドウ球菌と *S. parasanguinis* の唾液中の割合



また、黄色ブドウ球菌の持つバクテリオシン耐性因子として、MRSA 株の持つ TCS がランチビオティクス(バクテリオシンの一種)に対し耐性機構として働くこと(図 2, 発表論文、学会発表-1)、ETB 産生性黄色ブドウ球菌がバクテリオシンを産生し、その immunity factor である遺伝子を明らかにした(学会発表-3)このことから、これら TCS や immunity factor の機能を阻害するペプチドや抗体等は、生体から黄色ブドウ球菌を排除するために有効であると考えられる。

図2. ランチビオティクス産生菌と MRSA 野生株、TCS 欠損株の共培養試験



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 1 件)

1. Kawada-Matsuo M, Yoshida Y, Zendo T, Nagao J, Oogai Y, Nakamura Y, Sonomoto K, Nakamura N, Komatsuzawa H, Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, Nukacin ISK-1 and nisin A, in *Staphylococcus aureus*, PLoS One, Vol.22, No.8(7), (2013). 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 松尾 美樹、加藤 紀文、菅井 基行、小松澤均、ETB 産生黄色ブドウ球菌が産生するバクテリオシンに対する自己耐性機構の解明, 2015 年 3 月 26 日、長良川国際会議場、岐阜

2. 松尾美樹、小松澤均、黄色ブドウ球菌の 3 組の二成分制御系因子による class I バクテリオシン耐性機構, 2014 年 9 月 26 日、第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡

3. 泉 彩夏、松尾 美樹、小松澤均、病原性細菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA の口腔内定着を阻害する口腔内細菌の検索, 2014 年 9 月 26 日、第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Saikin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 美樹 (Miki Kawada-Matsuo)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号：20527048

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし