

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06700

研究課題名(和文) 歯科領域における術後感染予防としてのプロバイオティクスの応用

研究課題名(英文) Application of probiotics for the prevention of bacterial infection after operation in dental field

研究代表者

曾我部 薫 (SOGABE, Kaoru)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：40758489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：Lactobacillus crispatus LBS 17-11の菌体外産生物質がStreptococcus pneumoniae およびHaemophilus influenzaeに対して抗菌活性を示した。S. pneumoniaeに対する抗菌活性を指標にしてバクテリオシン様物質の精製を行った。強い抗菌活性は培養上清からの35～80%飽和硫酸沈殿画分に回収された。硫酸沈殿画分を透析後、抗菌活性物質をクロロホルムで抽出した。抗菌活性物質は2,045倍精製され、回収率は19%で推定分子量は7kDaであった。本バクテリオシン様物質は耐熱性でタンパク質分解酵素によって部分的に分解された。

研究成果の概要(英文)：Lactobacillus crispatus LBS 17-11 was isolated from an oral cavity of human subject, and possess growth inhibition activity against Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae. The objective of this study was to purify a bacteriocin-like substance, and to determine its characteristic properties. Antibacterial activities against oral bacteria were determined by a radial diffusion assay. Purification procedure for bacteriocin-like substance was achieved with ammonium sulfate precipitation of culture supernatant, and subsequent extraction with chloroform. Antibacterial substance was partially purified up to 2045-fold specific activity (unit/mg protein). The inhibitory activity was shown against S. pneumoniae, but Gram negative periodontopathic bacteria. The antimicrobial activity was heat stable and partially lost by the treatment with trypsin and proteinase K. The molecular mass of bacteriocin-like substance was estimated to be approximately 7 kDa based on SDS-PAGE.

研究分野：歯科学

キーワード：プロバイオティクス バクテリオシン様物質 Lactobacillus crispatus Streptococcus pneumoniae

1. 研究開始当初の背景

歯科領域における術後感染症は、外科的無菌技法の進歩や抗菌薬の開発の結果、外因性感染による発症は減少したが、患者自身の持つ常在菌などによる内因性感染による発症は依然として存在する。特に口腔・咽頭領域では、外毒素を産生するグラム陽性菌と内毒素を産生するグラム陰性菌など毒性を有する日和見菌が多数常在しているため、内因性感染による術後感染症の発症が懸念される。したがって、周術期における口腔・咽頭部における細菌叢の制御は必要不可欠である。

2. 研究の目的

これまで病原菌を制御し細菌叢を健全化する“リプレースメントセラピー”に注目し、口腔・咽頭におけるプロバイオティクスの研究を行ってきた。本研究では、一連の研究から選択されたプロバイオティクス候補菌の生理活性の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試薬

トリプシン、プロテイナーゼK、NAD、乳酸ナトリウムはWAKO純薬から購入した。ナイシンはMP Biomedicalから購入し対照として使用した。

(2) 菌株と培養条件

Lactobacillus crispatus LBS17-11、*Streptococcus pneumoniae* ATCC 33400、*Haemophilus influenzae* ATCC 9795、*Streptococcus mutans* ATCC 25175、*Streptococcus sobrinus* ATCC 33478、*Fusobacterium nucleatum* JCM8532、*Prevotella intermedia* ATCC 25261、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277は鶴見大学の保存株から使用した。

*L. crispatus*はMRS培地に、その他のグラム陽性菌はTryptic soy broth (TSB)に植菌し、嫌気ボックス(N₂:CO₂:H₂=8:1:1)内で37℃にて培養した。*H. influenzae*はNAD含有Muller-Hinton培地で、*P. gingivalis*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*はTSBにヘミンとメナジオンを添加し、37℃、嫌気条件下で培養した。

(3) バクテリオシン様物質の活性測定

L. crispatus LBS17-11はMRS Brothにて37℃で嫌気培養した。各精製段階における*S. pneumoniae* ATCC33400といくつかの口腔内細菌に対する抗菌活性はRadial diffusion法で測定した。指標菌の*S. pneumoniae*を含むTS寒天培地のウェルに各精製段階の濃縮画分(5~10μl)を加えて嫌気培養した。ウェル周囲の透明帯の直径を計測して抗菌活性とした。最小発育阻止濃度(MIC)は日本化学療法学会(1990)の液体微量希釈法により行った。MICは増殖を阻害する最小濃度と定義した。

(4) バクテリオシン様物質の精製

L. crispatus LBS 17-11 培養上清を35~80%飽和硫酸アンモニウムにより塩析した。遠心操作後の沈渣を透析し、バクテリオシン様物質とした。

(5) タンパク濃度の定量およびTricine-SDS-PAGE

上記飽和硫酸画分をTricine-SDS-PAGE(15%アクリルアミドゲル)により分離した。さらにゲルを2分し、半面はタンパク染色し、もう半面は*S. pneumoniae*懸濁液を加えた寒天培地に重層して嫌気培養した。培養後、抗菌活性を示す透明帯に相当するバンドを検証した。

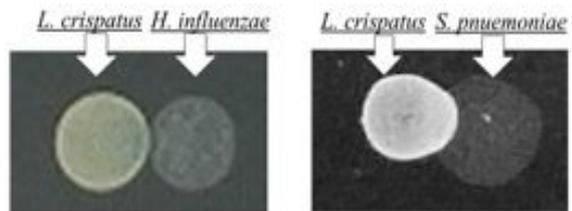
(6) バクテリオシン様物質の特性解析

飽和硫酸画分を100℃、10分で加熱して耐熱性を調べた。また、プロテイナーゼK(1mg/mL)およびトリプシン(1mg/mL)に対する感受性を調べた。

4. 研究成果

(1) 拮抗試験による抗菌活性の検討

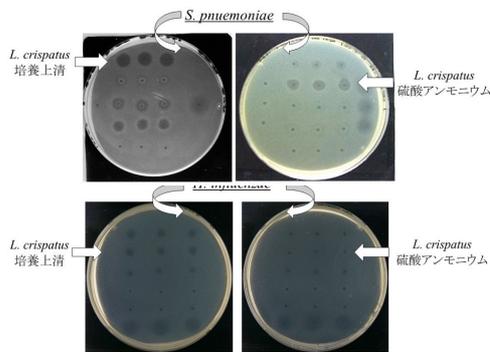
L. crispatus LBS17-11が*S. pneumoniae*および*H. influenzae*に対して抗菌活性を有するか拮抗試験で検証した。その結果、*L. crispatus* LBS17-11は隣接する*H. influenzae*および*S. pneumoniae*の増殖を阻害した(図1)



(図1) Competition assay (拮抗試験)

(2) Radial diffusion法による抗菌活性の検討

L. crispatus LBS17-11が*S. pneumoniae*および*H. influenzae*に対して抗菌活性を有することが拮抗試験で検証されたので、次いで*L. crispatus* LBS17-11の培養上清、その上清から80%飽和硫酸アンモニウム塩析で得られた画分の*H. influenzae*および*S. pneumoniae*の増殖に対する抗菌活性をRadial diffusion assayで検討した。その結果、*L. crispatus* LBS17-11の培養上清、80%飽和硫酸アンモニウム塩析画分ともに*H. influenzae*および*S. pneumoniae*の増殖に対して抗菌活性を示した(図2)



(図 2) Radial diffusion 法 (抗菌活性測定)

(3) L. crispatus LBS 17-11 のバクテリオシン様物質の精製

S. pneumoniae ATCC 33400 株に対する抗菌活性を指標にしてバクテリオシン様物質の精製を行った。L. crispatus LBS 17-11 の培養上清中にバクテリオシン様物質が確認された。強い抗菌活性は上清からの 35%~80% 飽和硫酸沈殿画分に回収された。培養上清からのタンパク質の回収率は 5.2% で、抗菌活性は 15 倍精製された。硫酸沈殿画分の透析後、抗菌活性物質はクロロホルムで抽出された。抗菌活性物質は 2,045 倍精製され、本活性の培養上清からの回収率は 19% であった。

(4) L. crispatus LBS 17-11 のバクテリオシン様物質の性状

S. pneumoniae に対する本バクテリオシン様物質の抗菌活性は静菌的活性であった。Radial diffusion 法のクリアーゾーンの中に幾つかの菌体が観察され、また、Microdilution 法において MIC より高濃度のウェル中にも菌体が観察された。S. mutans、S. sobrinus などのグラム陽性菌および P. gingivalis、P. intermedia、F. nucleatum などのグラム陰性菌は Radial diffusion 法で本バクテリオシン様物質に感受性を示さなかった。

電気泳動による分析で、本バクテリオシン様物質の活性バンドは一本のバンドを示し、その分子量は約 7 kDa であった。このバンドはタンパク質染色で見られた一本のバンドと一致したことから、高精製度のバクテリオシン様物質であることが示唆された (図 3)

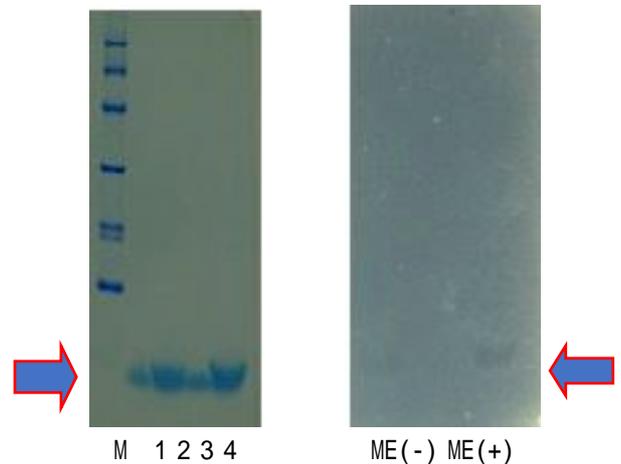


図 3 バクテリオシン様物質の電気泳動図 (左 : CBB 染色、右 : 活性染色、M (マーカー) は上から分子量 97.2、66.4、45.0、29.0、20.0、14.3kDa 左矢印がバクテリオシン様物質。右矢印の抗菌活性バンドと一致している)

この抗菌活性は 100%、10 分の熱処理に安定であった。この抗菌活性はトリプシンまたはプロテイナ - ゼ K の処理で部分的にそれぞれ 40% または 45% 失われることからタンパク質性の物質と思われた (表 1)

表 1 抗菌物質に対するタンパク分解酵素の影響と耐熱性 (平板法による評価)

Treatment	Condition	Antimicrobial activity (%)
Control		100
Trypsin	1 mg/mL,	60
	37°C,	
Proteinase K	1 mg/mL,	55
	37°C,	
Heat stability	100 °C,	100
	10 minutes	

本研究において、被験者口腔より単離された L. crispatus LBS 17-11 によって産生され、S. pneumoniae に対して抗菌活性を示すバクテリオシン様物質を精製し性状を調べた。バクテリオシン様物質は耐熱性であり、トリプシン、プロテイナ - ゼ K によって部分的に失活してタンパク質様の性質を示した。本バクテリオシン様物質は S. pneumoniae に対して殺菌的ではなく静菌的な効果を示した。この物質は既報のバクテリオシンの定義

とは少し異なることからバクテリオシン様物質または部分精製物質と考えられる。

本バクテリオシン様物質の精製過程で、硫酸沈殿画分からのクロロホルム抽出によって抗菌活性が上昇したことは高度に精製されたことを示唆している。これはバクテリオシンが自然状態では脂質などの分子と凝集していることで説明されるかもしれない。この凝集体の抗菌活性は部分的にマスクされているかもしれない。このような混合物がクロロホルムによって除去された可能性がある。簡単なメタノール-クロロホルム抽出で硫酸沈殿したバクテリオシンからほとんどの脂質を除去し、精製バクテリオシンを得たという報告もある。本研究においてバクテリオシン様物質がクロロホルムで抽出されたことは、本物質が疎水性であることを示している。

一般に細菌は低 pH に感受性であり、酸性 pH で増殖速度が低下する。通常プロバイオティクス候補菌のスクリーニングは有機酸の影響を避けるため、培養上清を中和して行う。しかし、乳酸ナトリウムはクエン酸ナトリウム同様に *S. pneumoniae* や他の細菌の潜在的増殖抑制因子である。

S. pneumoniae は口腔や上気道で優勢であり、ヒトの肺炎、髄膜炎、敗血症の主要な原因菌である。静菌的な物質は肺炎予防への直接的な応用に適していないかもしれない。

バクテリオシン様物質の阻害機序は他のバクテリオシンの機序と異なるかもしれない。バクテリオシンはクオラムセンシングを介した他の細菌へのシグナル伝達や細菌叢内での細菌間の対話あるいは宿主免疫システムへのシグナル伝達など、シグナルペプチドとしての機能をもつとの報告もある。

バクテリオシン様物質の静菌的特性は口腔内細菌の生態系の解析に寄与するかもしれない。また、口腔の健康や口腔疾患の予防に対する新たなアプローチになるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Gaku Akimaru, Susumu Imai, Kaoru Sogabe, Ayako Okada, Tomohiko Terai, Takekazu Okumura, Nobuhiro Hanada, Hiroshi Kawahara. Characterization and purification of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus crispatus* LBS 17-11 isolated from an oral cavity of human subject. *Asian Pacific Journal of Dentistry*. 2017; 17:9-14. (査読有)

西辻直之, 古藤真実, 福澤洋一, 矢吹義秀, 上谷公之, 久保宏史, 吉野浩和, 長井博昭, 中曽根隆一, 矢島正隆, 岡田彩子, 有吉芽生, 曾我部薫, 菊地朋宏, 宮之原真由, 山田秀則, 村田貴俊, 野村義明, 花田信弘. 歯

周病を対象とした唾液生化学検査に対する受診者の意識調査. *口腔衛生学会雑誌* 67 巻 2 号; 2017, 89-93. (査読有)

Ayako Okada, Yoshiaki Nomura, Kaoru Sogabe, et al., (24 persons). Comparison of Salivary Hemoglobin Measurements for Periodontitis Screening. *Journal of Oral Science* 2016; 59 : 63 - 69. DOI: 10.2234/josnusd.16-0204. (査読有)

Ayako Okada, Kaoru Sogabe, Hiroaki Takeuchi, Masaaki Okamoto, Yoshiaki Nomura, Nobuhiro Hanada. Characterization of the Sampling Specimens for the Evaluation of Periodontal Bacteria. *Journal of Oral Science* 2016; in press. (査読有)

Chiyoko Hakuta, Ayako Okada, Kaoru Sogabe, Erika Kakuta, Keiko Endo, Susumu Imai, Masaaki Okamoto, Yoshiaki Nomura, Nobuhiro Hanada. Opportunistic Bacteria in Tonsil and Dental Plaque are the Indicator for the Oral Care. *International Journal of Oral and Craniofacial Science* 2016; 2:30-34. (査読あり)

中村泰輔, 山本徹, 館野健, 鈴木将之, 福田瑠美, 曾我部薫, 堂下幹司, 阿部佳子, 河原博. 全身麻酔下歯科口腔外科手術後に角膜障害をきたした2症例. *日本歯科麻酔学会誌* 2016; 44: 26-28. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

曾我部薫, 岡田彩子, 今井奨, 花田信弘. *Haemophilus influenzae* に対するプロバイオティクス候補菌 *Lactobacillus crispatus* の効果 第6回口腔保健用機能性食品研究会・総会. 平成29年1月29日 鶴見大学会館(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我部 薫 (SOGABE Kaoru)
鶴見大学・歯学部・学部助手
研究者番号: 40758489