

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11426

研究課題名(和文)唾液を用いた胃・腸管感染症リスク診断応用への可能性の探索

研究課題名(英文) Analysis for the possibility of diagnosis of gastric/intestinal infected diseases using saliva

研究代表者

米澤 英雄 (Yonezawa, Hideo)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60453528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内う蝕原因細菌であるStreptococcus mutansが産生するランチピオティックスバクテリオシン(LB)は、腸内細菌Clostridioides difficile、Clostridium perfringens、MRSAに対して抗菌活性を示した。56人の小児検体よりLB産生S. mutansの保菌とC. difficileの保菌の相関性を調べた。C. difficile陽性者は4人であり、そのうち3人がLB産生S. mutans陽性者であった。以上より口腔内にLB産生S. mutansを保菌すると、腸内細菌叢の攪乱が起きC. difficileが異常増殖する可能性が推測された。

研究成果の概要(英文)：Lantibiotics bacteriocin produced by Streptococcus mutans which is an oral bacterium and cariogenic bacterium showed antibacterial activity against intestinal bacteria Clostridioides difficile, Clostridium perfringens, MRSA which are involved in inflammatory bowel disease. We collected saliva and fecal specimens from 56 children, and the correlation between colonization of lantibiotics bacteriocin-producing S. mutans and C. difficile colonization was examined. C. difficile positive samples were found from four people and three of them were lantibiotics bacteriocin producing S. mutans positive specimens. This result indicated that lantibiotics bacteriocin produced by S. mutans in the oral cavity killed the curtained intestinal bacteria and caused unbalance of intestinal microbiota.

研究分野：細菌学

キーワード：ランチピオティックスバクテリオシン

1. 研究開始当初の背景

口腔は食物・飲料といった外界物を摂取するための開口部であり、細菌学的にも消化管に匹敵するような多種類、そして多数の常在細菌が棲息している。一部の口腔内細菌は抗菌物質(バクテリオシン)を産生することが報告されている。特に口腔内う蝕原因細菌である *Streptococcus mutans* はグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を示すバクテリオシン、ランチピオティックスバクテリオシンを産生することが報告されている。こうした細菌およびその産生物は唾液と共に絶えず消化管へと流出している。ランチピオティックスバクテリオシンはペプチド性であり、酸や消化酵素耐性であるため、抗菌活性を保ったまま腸管へ流出している。ヒトは生後1年程度から歯の萌出が始まり、3歳頃に臼歯(乳臼歯)が生えそろう。その後5-6歳頃大臼歯が生え始める。*S. mutans* は臼歯部に定着しやすいことから3-6歳くらいに定着が起こりやすい。ランチピオティックスバクテリオシン産生 *S. mutans* が口腔内に定着したヒトでは、唾液中に抗菌物質が含有されるようになる。しかし高齢者になると、歯牙の喪失や、唾液の分泌量の低下により、腸管に辿り着く抗菌物質は減少する、もしくは無くなると推測出来る。

ヒトの腸管内は500-1000種類、数にして100-1000兆個の細菌が棲息し、腸内細菌叢を形成している。これら細菌叢は個人ごとに大きな多様性を有する。近年一部の腸内常在細菌が炎症性腸疾患に関与することが明らかとなっている。その中でも抗菌薬関連下痢症(antibiotics-associated diarrhea: AAD)の原因菌として *Clostridioides difficile* が挙げられる。こうした細菌を保有しているヒトは、抗菌薬治療などにより、腸内細菌叢が変化し、AADを発症する。*C. difficile* はグラム陽性嫌気性細菌であり、院内、医療機関内で発生する感染性の下痢の多くは本菌感染によるものである。本菌は新生児の糞便からは70%以上で検出されるが、5歳頃になると30%未満、成人での検出率は5%程度である。しかし高齢者となるとまた検出率は増加する(Rupnik et al, Nat Rev Microbiol, 2009)。この検出率の変化は、上記に記述の唾液中の抗菌物質の量と相関的な関係となっている。腸管感染症の原因微生物としての診断・治療や、医療関連感染症の感染制御において、これらの細菌が腸内に存在しているのかが、重要な診断基準で有るとともにその制御メカニズムの解明が重要な対策となっている。

Helicobacter pylori はヒト胃内に定着し、急性および慢性的胃炎を惹起するとともに、本菌感染により十二指腸潰瘍の再発因子、胃癌のリスクファクターとなる。*H. pylori* はヒト胃粘膜表層にバイオフィルムを形成し存在している。これまで日本人胃・十二指腸潰瘍患者由来の臨床分離株であるTK1402株が、非常に強いバイオフィルム形成能を保有す

ることを見いだしている。細菌の形成するバイオフィルムは、定着そして慢性的な疾患の発症に強く関与している。*H. pylori* バイオフィルム形成のメカニズムを解明することは、本菌感染の定着メカニズム解明に深く関与している。

2. 研究の目的

本研究は唾液中に含まれる細菌およびそれらの細菌が産生した抗菌物質が、胃・腸管感染症を起こす細菌にどのような影響を与えているかについて解明することを目的とする。口腔内細菌叢や種々の細菌の性状を解析することで、胃・腸管感染症の予防や感染リスクを知ることが可能であるか、についての基礎的な解析を行なう。腸管感染症は抗菌薬関連下痢症原因細菌を対象として、これら細菌の定着に口腔内細菌が及ぼす影響の解析を行う。胃感染症とである *H. pylori* に関しては、定着メカニズム解明の一端としてバイオフィルム形成メカニズムの解明を行なう。これらの結果は胃・腸管感染症の新たな感染メカニズム解明に繋がるものである。全身疾患と口腔を科学的証明により結びづけする研究である。唾液中の細菌叢を調べることで、全身のマネージメントとしての容易な健康診断を行うことができる、そのための第一歩の研究となると考える。

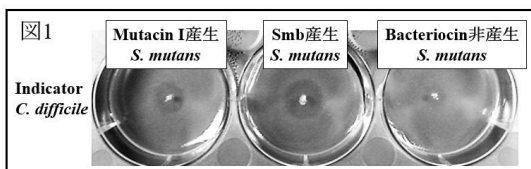
3. 研究の方法

腸管感染症原因細菌を対象とした研究は、抗菌薬関連下痢症原因細菌を主として、これら細菌の腸管への定着に口腔内細菌が産生するバクテリオシンが影響を与えているかについて確認を行なう。具体的には *C. difficile*、*C. perfringens*、MRSA に対する *in vitro* での *S. mutans* 産生ランチピオティックスバクテリオシンの抗菌活性の確認を行なう。確認方法は *S. mutans* Smb 産生株および Mutacin I 産生株による Agar diffuse assay にて行なう。また小児唾液・糞便検体を採取、細菌DNAを抽出し、それぞれの特異的なプライマーを使用したPCRにより、口腔内ランチピオティックスバクテリオシン産生細菌の保有と抗菌薬関連下痢症原因細菌検出の相関性を確認する。胃感染症の対象としては、*H. pylori* の株間における定着メカニズムの解明を行う。バイオフィルム形成に関わる因子の探索を行ない、バイオフィルム形成メカニズムの解明を行なう。以上の結果より、唾液を用いた口腔内細菌叢の解析が、胃・腸管感染症のリスク診断に応用できるかについて検討する。

4. 研究成果

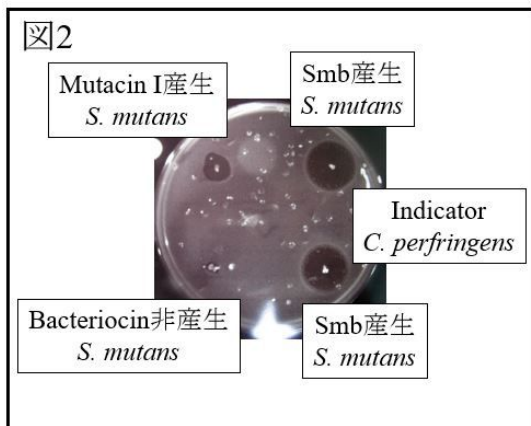
(1) *S. mutans* ランチピオティックスバクテリオシン Mutacin I および Smb の *C. difficile*、*C. perfringens* および MRSA に対する抗菌活性の確認：*S. mutans* が産生するランチピオティックスバクテリオシン (Mutacin I および Smb) が、*C. difficile* 標準株に対して抗菌性を

示すかについて確認を行なった。*C. difficile* 標準株に対しては、Mutacin I および Smb 両方共に抗菌活性を示した (図 1)。



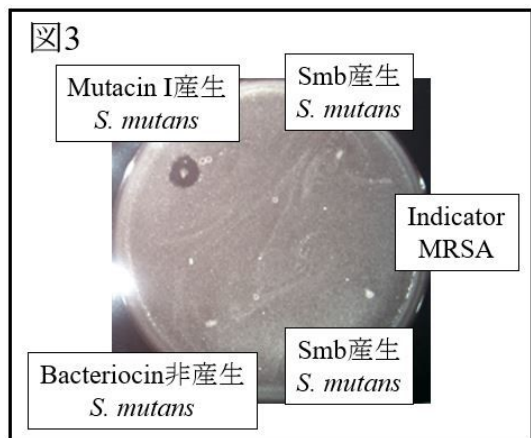
一方 *C. difficile* 臨床分離株に対しては、Mutacin I は *C. difficile* 臨床分離株 13 株全てに強い抗菌活性を示したのに対して、Smb は 10 株に対して強い抗菌活性を認めた。以上の結果より *C. difficile* 臨床分離株は、ランチビオティックスバクテリオシンに対する感受性が、それぞれの株で異なることが明らかとなった。

S. mutans ランチビオティックスバクテリオシン Mutacin I および Smb の *C. perfringens* に対する抗菌活性を検討した。*C. perfringens* 標準株に対して *S. mutans* ランチビオティックスバクテリオシンは強い抗菌活性を認め



た (図 2)。

次に MRSA 臨床分離株 10 株に対する抗菌活性を確認した。Mutacin I は全ての MRSA 臨床分離株に対して抗菌活性を認めたのに対して、Smb は全ての MRSA 臨床分離株に対して抗菌活性を認めることはなかった (図 3)。



(2) 小児唾液および便検体由来細菌 DNA 中のバクテリオシン産生 *S. mutans* および *C. difficile* の検出: 上記結果より、*S. mutans* ラン

チビオティックスバクテリオシンは *C. difficile* に対して抗菌活性を示したことから、口腔内にランチビオティックスバクテリオシン産生細菌を保菌するヒトでは、*C. difficile* が腸管内にいないか、または非常に少ない菌数となることが推測できた。そこで比較的 *C. difficile* の保菌率の高い小児、3 歳から 10 歳までの 76 人の唾液と便を採取し、細菌 DNA を抽出し、唾液中の Mutacin I および Smb 産生細菌の保有、そして便検体より *C. difficile* の腸管内保有の解析を行なった。Mutacin I 産生 *S. mutans* 保菌者は 5 人 (6.5%)、Smb 産生 *S. mutans* 保菌者は 9 人 (11.8%) であった。*C. difficile* 陽性者は 4 人 (5.3%) と少人数であった。少数ではあるものの *C. difficile* 陽性者 4 人のうち 3 人は Mutacin I および Smb 産生 *S. mutans* 保菌者 (Mutacin I 産生 *S. mutans* 保菌者 1 人、Smb 産生 *S. mutans* 保菌者 2 人) であり、当初の予測とは反対の結果となった。*C. difficile* はグラム陽性嫌気性細菌であり、院内、医療機関内で発生する感染性下痢の多くは本菌感染によるものである。*C. difficile* 腸炎は抗菌薬投与により腸内細菌叢が攪乱され、腸内に棲息していた本菌が異常増殖することによって誘発される。本研究の結果から、口腔内にランチビオティックスバクテリオシンを産生する細菌を保菌することで、その抗菌活性がより感受性の高い腸内細菌に發揮され、ランチビオティックスバクテリオシン感受性細菌が減少した結果、腸内細菌叢の攪乱が起き、*C. difficile* が異常増殖をおこしている可能性が推測された。しかしながら *C. difficile* の検出率が低いため、はっきりとした結果とはなっていない。今後検体数を増やすことで、より明確な口腔内ランチビオティックスバクテリオシン産生細菌の保菌と *C. difficile* の保菌の関係について明らかとする予定である。

(3) *H. pylori* の株間における定着メカニズムの解明: 今回 TK1402 の強いバイオフィーム形成に関わる因子の探索を行なった。本株バイオフィーム形成には Outer membrane vesicle (OMV) が関与していることが明らかとなっている。本研究では抗菌薬処理により発生した TK1402 株低バイオフィーム形成変異株より OMV を採取し、OMV 中タンパク質を比較した。その結果、本菌外膜タンパク質 AlpB が、変異株中に顕著に減少していたことから、TK1402 株由来の *alpB* 欠損株を作成し、バイオフィーム形成能を検討したところ、変異株で親株と比較して有意にバイオフィーム形成能が減少した。この結果から、TK1402 株の強いバイオフィーム形成能には本菌外膜タンパク質 AlpB が強く関与していることが明らかとなった。AlpB はこれまでゲノムシークエンスが明らかとされている全ての *H. pylori* が保有している膜貫通型タンパク質である。膜貫通型タンパク質であることから AlpB アミノ酸配列のほとんどは、全ての株で保存さ

れていたが、アミノ酸配列 121-146 残基領域はどれ 1 つとして同じ配列を示さない多様性領域であった。そこで TK1402 株 AlpB 121-146 領域を、バイオフィーム低形成株の配列に置き換えた変異株を作成すると、そのバイオフィーム形成能は顕著に減少した。以上の結果は、AlpB 121-146 領域が *H. pylori* のバイオフィーム形成能に強く関与していることを示している。また AlpB 121-146 領域を置き換えた変異体では、胃上皮細胞への付着能も有意に減少した。AlpB の Topology 解析より、多様性領域である AlpB 121-146 は、外膜の外側の空間に位置することから、本菌のバイオフィーム形成および細胞への付着に強く関与していることが示唆された。以上の結果から、AlpB 121-146 領域は、バイオフィーム形成および胃上皮細胞への付着能にも強く関与していることから AlpB 121-146 領域アミノ酸配列が本菌の細胞への付着能の強弱の指標となり得ることが示唆され、本菌における感染力の強い株の検知に応用できる可能性が示唆された。

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 8 件、全て査読あり)

1. Osaki T, Zaman C, Yonezawa H, et al. Influence of intestinal indigenous microbiota on intrafamilial infection by *Helicobacter pylori* in Japan. *Front Immunol.* 21;9:287. 2018.
2. Senpuku H, Yonezawa H, Yoneda S, et al. SMU.940 regulates dextran-dependent aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol.* 33(1):47-58. 2018.
3. Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, et al. Diversification of the AlpB outer membrane protein of *Helicobacter pylori* affects biofilm formation and cellular adhesion. *J Bacteriol.* 28;199(6). 2017.
4. Osaki T, Mabe K, Zaman C, Yonezawa H, et al. Usefulness of detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from fecal specimens for young adults treated with eradication therapy. *Helicobacter.* 22(5). 2017.
5. Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its involvement for antibiotic resistance. *Biomed Res Int.* 2015:914791. 2015.
6. Okuda M, Osaki T, Lin Y, Yonezawa H, et al. Low prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in children: A population-based study in Japan. *Helicobacter.* 20(2):133-8. 2015.
7. Furuta Y, Konno M, Osaki T, Yonezawa H, et al. Microevolution of virulence-related genes

in *Helicobacter pylori* familial infection. *PLoS One.* 15;10(5):e0127197. 2015.

8. Hanawa T, Kamachi K, Yonezawa H, et al. Glutamate limitation, BvgAS activation and (p)ppGpp regulate the expression of the *Bordetella pertussis* type 3 secretion system. *J Bacteriol.* 2;198(2):343-51. 2015.

[学会発表](計 53 件) 代表的なもの

1. Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Involvement of AlpB as a key role in in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. 18th International workshop on Campylobacter, Helicobacter and related organisms, New Zealand, 2015 .
2. 米澤英雄, 大崎敬子, 花輪智子, 蔵田訓, 北条史, Zaman Cynthia, 神谷茂: *Helicobacter pylori* が産生する outer membrane vesicle の役割. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪, 2016 年
3. 米澤英雄, 大崎敬子, 蔵田訓, 神谷茂: *Helicobacter pylori* AlpAB の多様性とバイオフィーム形成. 第 90 回日本感染症学会総会, 仙台, 2016 年 .
4. Yonezawa H, Osaki T, Hojo F, Kamiya S : Critical role of AlpA and AlpB for biofilm formation and cell adhesion of *Helicobacter pylori*. European Helicobacter and Microbiota Study Group – EHMSG XXIXth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer, Germany, 2016.
5. 米澤英雄, 大崎敬子, 花輪智子, 蔵田訓, 神谷茂: *Helicobacter pylori* 外膜タンパク質 AlpB の多様性が及ぼす構造変化とバイオフィーム形成. 第 91 回日本感染症学会総会・学術集会, 東京, 2017 年 .
6. Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Zaman C, Hojo F, Kamiya S: Diversification of AlpA and AlpB outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* affects biofilm formation. The Joint Congress of the 19th International Symposium on Gnotobiology, the 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology and the 39th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Tokyo, 2017.
7. Yonezawa H, Osaki T, Hojo F, Kamiya S: AlpA, an outer membrane protein of *Helicobacter pylori* is involved directly and indirectly in biofilm formation. XXXth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer, France, 2017.

[図書](計 2 件)

1. 米澤英雄(分担執筆): *Helicobacter pylori* が形成するバイオフィームの構造. バイオフィーム制御に向けた構造と形成過程 - 特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ. 松村吉信監修 .

- 東京,シーエムシー出版,2017.p.35-45.
2. 米澤英雄(分担執筆):第4章第13節 食
と胃内微生物~胃の中に棲む微生物.食
と微生物の事典.北本勝ひこ,春田伸,
丸山潤一,後藤慶一,尾花望,齋藤勝晴
編集.東京,朝倉書房,2017.p344-345.

〔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
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

米澤 英雄 (YONEZAWA, Hideo)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号:60453528

(2)研究分担者

茂木 瑞穂 (MOTEGI, Mizuho)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・助教
研究者番号:60422474

大石 敦之 (OISHI, Atsushi)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・医員
研究者番号:50645166

(3)連携研究者

神谷 茂 (KAMIYA, Shigeru)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号:10177587

大崎 敬子 (OSAKI, Takako)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号:90255406

花輪 智子 (HANAWA, Tomoko)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号:80255405

蔵田 訓 (KURATA, Satoshi)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号:00383670

(4)研究協力者
なし