

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：	基盤研究（C）
研究期間：	2007～2008
課題番号：	19580306
研究課題名（和文）	乳酸菌による病原菌と上皮細胞とのクロストークへの干渉と感染症予防への応用
研究課題名（英文）	Intervention by lactic acid bacteria on cross-talk between pathogens and intestinal epithelial cells, and application of this properties to develop prophylactic agent
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: 上皮細胞への侵入性を有する病原菌に対する乳酸菌の影響を調べたところ、*Lactobacillus amylovorus*、*L. crispatus* および *L. gasseri* は *Salmonella Typhimurium* および *Arcobacter butzleri* の Caco-2 細胞への侵入を 40～50% 低下させた。その機構について以下のように推定した。*L. acidophilus* では Caco-2 細胞のアクチンフィラメントの再構成を促進することが見いだされたことから、細胞骨格タンパク質への作用が lactobacilli の侵入阻止活性と関連していると推定された。また、*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* F、*B. longum* M および *B. breve* Y は *A. butzleri* による細胞障害を軽減する効果を有していたことから、lactobacilli においても毒素の中和作用が侵入阻止活性と関連している可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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： 乳酸桿菌、ビフィズス菌、培養細胞、細胞侵入、細胞骨格タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 腸管における病原菌感染の分子機構

腸管感染症は病原菌が上皮細胞に付着あるいは付着・侵入することが感染成立の初期段階として欠かせない。近年、付着・侵入の分子機構がかなり解明され、付着・侵入は病原菌が腸管上皮細胞に注入したエフェクター分子の作用により引き起こされる上皮細胞の病変形成（病原菌と上皮細胞とのクロス

トーク）により起こることが明らかにされている。

## (2) 病原菌と乳酸菌の相互作用

ごく最近、ヒト腸管由来培養細胞を使った実験で、乳酸桿菌が腸管出血性大腸菌 O157:H7（以下 O157 という）の付着を阻害すること、阻害は大腸菌の付着に必要な上皮細胞の A/E 病変を乳酸桿菌が抑制すること

がその機構であることが示された (Sherman et al. 2005)。さらに彼等は O157 に対する付着阻害因子が S-layer タンパク質であると推定している (Johnson-Henry et al. 2006)。

### (3) S-layer タンパク質に関する研究代表者の研究

研究代表者は 1995 年に乳酸桿菌の S-layer タンパク質が付着因子として作用することを初めて見出した。その後、S-layer タンパク質 (CbsA) の結合ドメインを解明するとともに、CbsA が腸管毒素原性大腸菌の付着を阻害することも明らかにしている。現在も S-layer タンパク質および他の菌体表層タンパク質の研究を継続している。

## 2. 研究の目的

### (1) 細胞侵入性病原菌に対する阻止活性

本研究は Sherman et al. が行った非侵入性病原菌の上皮細胞への付着阻止の研究を参考にしつつ、応募者の S-layer タンパク質および菌体表層タンパク質に関する研究成果を基礎に、細胞侵入性病原菌の上皮細胞への侵入阻止活性を乳酸菌とビフィズス菌で明らかにしようとするものである。

### (2) 乳酸菌やビフィズス菌による感染症の予防

本研究は両菌の感染防御活性の新しい作用機構を解明するとともに、感染症予防への応用研究に貢献すると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 継上皮電気抵抗値 (TER) 測定法による病原菌の侵入性と乳酸菌による阻止活性の評価

TER の測定は Millicell-ERS® (Millipore) で行った。Caco-2 細胞を 12 ウェルプレート用 ThinCert™ インサート中で TER が 1,000 Ω に達するまで約 14 日間培養した。侵入性の評価の場合、被検菌懸濁液を MOI として 20、200 および 2,000 となるよう Caco-2 細胞に添加し、2 時間培養した。侵入阻止活性を評価する場合、乳酸菌懸濁液を MOI として 200 となるよう添加して 1 時間培養後、菌体を除去し、病原菌を MOI として 2,000 となるよう添加し 2 時間培養した。病原菌を添加して 2 時間後に菌懸濁液を除去し、次いでゲンタマイシン (GM) 溶液を添加し 1 時間培養した。GM 溶液を除去後、Caco-2 細胞に培地を添加した。その後 24 時間まで経時的に TER を測定した。

### (2) ゲンタマイシン法による病原菌の侵入

### 性と乳酸菌による阻止活性の評価

Caco-2 細胞を 24 ウェルプレートで約 14 日間培養した。侵入性の評価の場合、被検菌懸濁液を MOI として 20、100 および 200 となるよう Caco-2 細胞に添加し、2 時間培養した。侵入阻止活性を評価する場合、乳酸菌懸濁液を MOI として 20 あるいは 200 となるよう添加して 1 時間培養後、菌体を除去し、病原菌を MOI として 20 となるよう添加し 2 時間培養した。病原菌を添加して 2 時間後に菌懸濁液を除去し、次いでゲンタマイシン (GM) 溶液を添加し 1 時間培養した。Caco-2 細胞を 0.1% Triton X-100 溶液で剥離後、細胞内に侵入した菌数を生菌数として計数した。

### (3) Caco-2 細胞内のアクチンフィラメントの蛍光顕微鏡による観察

Caco-2 細胞を *L. acidophilus* を添加し 1 時間培養後に、単層の一部を剥離した。4% パラホルムアルデヒドで固定化後、アクチンフィラメントを TRITC-conjugated phalloidin で染色した。標本はデジタルカメラと落射蛍光装置を装着したオリンパス BX51 顕微鏡で観察した。

### (4) 病原菌の細胞障害活性とビフィズス菌による軽減効果の評価

無細胞抽出液は病原菌あるいはビフィズス菌を 0.15% polymyxin B を含む PBS に  $10^8 \sim 10^9$  cells/ml となるよう懸濁し 30 分培養後、遠心分離、ろ過除菌を行って調製した。24 ウェルプレートで 3 日間培養した Caco-2 細胞に添加し 72 時間培養後に、細胞形態を観察した。細胞形態に異常 (膨張、空胞化あるいは多核化など) が見られた細胞の割合を細胞障害率 (%) とした。

## 4. 研究成果

### (1) TER の測定による病原菌の Caco-2 細胞への侵入性の評価と乳酸菌による侵入阻止活性

腸管侵入性 *Escherichia coli* (2 株)、*Listeria monocytogenes* (2 株)、*Salmonella Typhimurium* (1 株)、*Shigella flexneri* (2 株) および *Yersinia enterocolitica* (1 株) の侵入性を TER の測定で評価したところ、*Salmonella Typhimurium* で TER の経時的減少が見られた。そこで、*Salmonella Typhimurium* と各 1 株の *Lactobacillus acidophilus*、*L. crispatus* および *L. gasseri* を用いて、侵入阻止活性を評価したところ、

lactobacilli に阻止活性は見られなかった。

(2) ゲンタマイシン法による病原菌の Caco-2 細胞への侵入性と乳酸菌による阻止活性の評価

*S. Typhimurium* の侵入に対する阻止活性を *L. acidophilus* (1 株)、*L. amylovorus* (1 株) および *L. crispatus* (3 株) について調べたところ、*L. amylovorus* (1 株) および *L. crispatus* (1 株) が *S. Typhimurium* の侵入を無添加と比較して約 40% 低下させた (図 1)。

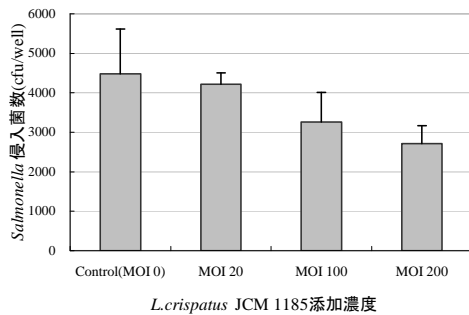


図 1 *Lactobacillus crispatus* JCM 1185 が *Salmonella Typhimurium* JCM 1652 の Caco-2 細胞への侵入に与える影響

*S. Typhimurium* の侵入率は 0.15% 程度だが、当研究室で鶏肉から分離した *Arcobacter butzleri* 菌株では 3% 程度にも達することを見出した。そこで、*A. butzleri* (2 株) の侵入に対する阻止活性を *L. crispatus* (1 株) および *L. gasseri* (1 株) について調べたところ、いずれの菌株も *A. butzleri* (2 株) の侵入を無添加の場合と比較して 40~50% 低下させた (図 2)。

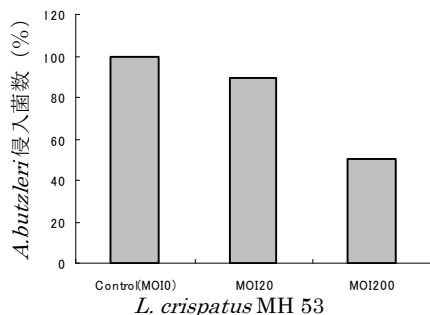


図 2 *Lactobacillus crispatus* MH 53 が *Arcobacter butzleri* YW 33 の Caco-2 細胞への侵入に与える影響

*A. butzleri* 侵入菌数は *L. crispatus* 無添加時 (control) の侵入菌数を 100% とした

(3) Caco-2 細胞内のアクチンフィラメントに与える *L. acidophilus* 添加の影響

*L. acidophilus* の添加は無添加の場合と比較してアクチンフィラメントの再構成が促進された。従って、lactobacilli による細胞骨格タンパク質への作用が lactobacilli の侵入阻止活性と関連している可能性が推定された。

(4) *A. butzleri* の Caco-2 細胞に対する細胞障害活性のピフィズス菌による軽減効果

*A. butzleri* YW 24 および *A. butzleri* YW 39 無細胞抽出液は約 20% の細胞障害率を示したが、*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* F、*B. longum* M および *B. breve* Y の無細胞抽出液の添加により細胞障害率は約 5% 減少した。従って、lactobacilli においても毒素の中和作用が侵入阻止活性と関連してい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)

[学会発表] (計 1 件)

戸羽隆宏、「鶏肉からの *Arcobacter* の分離と分離株の細胞毒性および細胞侵入性に与える乳酸菌およびピフィズス菌の影響」、日本畜産学会第 110 回大会、2009 年 3 月 29 日、神奈川県藤沢市、日本大学生物資源科学部

[図書] (計 1 件)

Antikinen Y, Korhonen TK, Kuparinen V, Toba T, Roos S, Caister Academic Press, *Lactobacillus Molecular Biology, from Genomics to Probiotics*, 2009, pp.95-114.

## 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