

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18815

研究課題名（和文）う蝕原性細菌とカンジダ属の相互作用に及ぼすプロバイオティクス候補菌の影響

研究課題名（英文）Effects of the oral probiotic candidate *Lactobacillus crispatus* YIT 12319 on *Candida albicans* biofilm formation

研究代表者

曾我部 薫 (SOGABE, KAORU)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：40758489

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：*Candida albicans* ATCC 18804、*Streptococcus mutans* ATCC 25175および *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478に対するプロバイオティクス候補菌 *Lactobacillus crispatus* YIT 12319のプロバイオティクス効果を調べた結果、*L. crispatus* YIT 12319は、*C. albicans*および *S. mutans*の増殖と *C. albicans*、*S. mutans*および *S. sobrinus*のバイオフィーム形成を抑制し、これらの微生物に対してプロバイオティクス効果を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、欧米諸国や日本を含む先進国諸国では医療の発展に伴い強い感染力を有する細菌由来の感染症は減少した。一方で高齢者や周術期の患者など免疫力が減弱した宿主への日和見感染症が問題になっている。世界に目を向ければ、COVID-19患者の日和見感染が増加しているとの報告が増えている。重度COVID-19患者の合併症として真菌感染症が増加しており、真菌のカンジダ属に関する基礎と臨床研究が再燃している。本研究ではプロバイオティクス候補菌を用いてカンジダ属やう蝕原性細菌のバイオフィーム形成と増殖を抑制する事に成功している。これを応用することで薬に頼らない治療法や予防の一助となる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Objective: The purpose of this study was to investigate the probiotic effect of *Lactobacillus crispatus* on *Candida albicans* and *mutans streptococci*. Design: Competition assays were employed to examine the growth suppression effects of the probiotic candidate *L. crispatus* YIT 12319 against *C. albicans* ATCC 18804, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, and *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478. Furthermore, the formation of the biofilm composed of *L. crispatus* and the other microbe was monitored using the real time cell analyzer xCELLigence. Results: *L. crispatus* showed a strong and moderate inhibitory effect on the growth of *C. albicans* and *S. mutans*, respectively. *L. crispatus* inhibited the formation and maturation of biofilm of *C. albicans*, *S. mutans* or *S. sobrinus*. Conclusions: *L. crispatus* YIT 12319 was suggested to demonstrate the probiotic effect on *C. albicans*, *S. mutans*, and *S. sobrinus*.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：Probiotics *Lactobacillus crispatus* Biofilm formation *Candida albicans* *Streptococcus mutans* *Streptococcus sobrinus*

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

日和見感染菌として知られている *Candida albicans* (*C. albicans*)は、病原性を持ち、免疫能の低下した宿主に口腔カンジダ症を引き起こし、内臓真菌症や真菌性肺炎を惹起する。しかし近年、*C. albicans* がカンジダ症を引き起こすだけでなく、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*)と結合し、相乗的に関与する事や幼少期のう蝕経験と *C. albicans* の検出に正の相関がある事が報告されている。その一方で *C. albicans* による感染症の治療で抗真菌薬を使用した影響で細菌叢が変化し、*Candida glabrata* (*C. glabrata*)の検出率が増加傾向となっている。*C. glabrata* は *C. albicans* に感受性を持つ抗真菌薬に耐性を持つ割合が高い。そのため、*C. glabrata* が他の病原性細菌と相互に作用する事で宿主に悪影響を及ぼす事が危惧されている。特にう蝕や歯周病などの歯科疾患は不可逆性であり、進行度によっては歯の喪失に繋がる。*C. albicans* および *C. glabrata* を制御し、う蝕原性細菌との相互作用を抑制する事は、う蝕の発生および進行を阻害し、歯の喪失のリスク低減の一因となり得るか検証する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はプロバイオティクス候補菌である乳酸菌 *Lactobacillus crispatus* (*L. crispatus*)や *Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*)を用いて、日和見感染菌である *C. albicans* および *C. glabrata* に対する抗菌活性や *S. mutans* および *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*)に対する抗菌活性を検証すること、また、*C. albicans* および *C. glabrata* とう蝕原性細菌の *S. mutans*、*S. sobrinus* との相互作用を検証し、それらに対するプロバイオティクス候補菌の効果を検証することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用菌株および培養方法

*L. crispatus* YIT 12319 は、ヤクルト本社中央研究所微生物研究所微生物機能研究室から提供を受け、鶴見大学歯学部旧探索歯学講座実験室に保管しているストックを使用した[28、30]。*L. crispatus* YIT 12319 は、*Lactobacilli* MRS Broth (MRS, Bacto, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)を用いて、嫌気条件下 (37℃、80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>) で 16 時間培養した。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で懸濁した (OD<sub>540</sub> nm = 0.2)。次に、遠心分離 (1,710 ×g, 20 min) を行い、培養上清を 4℃ で保存した。さらに培養上清に 50%飽和硫酸アンモニウムを加え、遠心操作 (1,710 ×g, 20min)後に、透析を行い、硫酸塩析画分を準備した。

カンジダ属である *C. albicans* ATCC 18804、*C. glabrata* ATCC 2001、う蝕原性細菌である *S. mutans* ATCC 25175 および *S. sobrinus* ATCC 33478 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。2 種の真菌は YM 培地 (YM, Bacto, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) を用いて、嫌気条件下で 24 時間培養した。その後、PBS 中で懸濁した (OD<sub>540</sub> nm = 0.2)。2 種のう蝕原性細菌は Tryptic soy broth (TS, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) を用いて、嫌気条件下で 16 時間培養した。その後、PBS 中で懸濁した (OD<sub>540</sub> nm = 0.2)。

#### (2) 増殖拮抗試験

*L. crispatus* YIT 12319 のカンジダ属とう蝕原性細菌に対する増殖拮抗活性を検証するために Competition assay を実施した:i) *L. crispatus* YIT 12319 と *C. albicans* ATCC 18804、ii) *L. crispatus* YIT 12319 と *C. glabrata* ATCC 2001、iii) *L. crispatus* YIT 12319 と *S. mutans* ATCC 25175、iv) *L. crispatus* YIT 12319 と *S. sobrinus* ATCC 33478 の組み合わせとした。*L. crispatus* YIT 12319 と真菌の Competition assay では、MRS : YM = 4:1 に調整した寒天培地に 5 mm の間隔を開け、各菌 5 μl ずつ植菌した。各群 n = 3 で、3 回実施し、再現性を確認した。*L. crispatus* YIT 12319 とう蝕原性細菌の Competition assay では MRS:TS=1:1 に調整した寒天培地に 5 mm の間隔を開け、同様に植菌した。植菌後に、それぞれの寒天プレートを嫌気条件下で 37℃、48 時間培養し、微生物間の増殖への影響を観察した。

#### (3) 抗菌活性測定

*L. crispatus* YIT 12319 のカンジダ属とう蝕原性細菌に対する抗菌活性を検証するために、Radial diffusion assay を実施した。サンプルとして、*L. crispatus* YIT 12319 の上清と *L. crispatus* YIT 12319 由来の 50%飽和硫酸塩析画分を使用した。コントロールとして、PBS と 10 μg/ml イトラコナゾールおよび 5 μg/ml テトラサイクリンを使用した。カンジダ属の Radial diffusion assay では、YM 培地を 1/10 に希釈した培地 (A 培地) と YM 培地を 2 倍量にした培地 (B 培地) を準備した。*C. albicans* ATCC 1880 懸濁液を 50

で保温した A 培地に添加し、シャーレに流し込み、固化させた。寒天固化後に、直径 2 mm の穴を開け、各サンプルを 5  $\mu$ l 滴下し、クリーンベンチ内で 15 分間静置した。次に、B 培地を A 培地上に流し込み、固化させた。固化後に嫌気条件下で 37、48 時間培養した。培養後に発育阻止円（透明帯）の直径を測定した。*C. glabrata* ATCC 2001 についても同様に実施した。

う蝕原性細菌の Radial diffusion assay では、TS 培地を 1/10 に希釈した培地（C 培地）と TS 培地（D 培地）を 2 倍量にした培地を準備した。*S. mutans* ATCC 25175 懸濁液を 50  $\mu$ l で保温した C 培地に添加し、シャーレに流し込み、固化させた。寒天固化後に、直径 2 mm の穴を開け、各サンプルを 5  $\mu$ l 滴下し、クリーンベンチ内で 15 分間静置した。次に、D 培地を C 培地上に流し込み、固化させた。固化後に嫌気条件下で 37、48 時間培養した。培養後に発育阻止円（透明帯）の直径を測定した。*S. sobrinus* ATCC 33478 についても同様に実施した。

#### （４）リアルタイム・バイオフィーム形成試験

バイオフィーム形成を経時的に定量するために、先行研究[31]と同様に、Real Time Cell Analyzer (RTCA, xCELLigence®, ACEA Bioscience Inc., San Diego, CA) を採用した。このシステムは、付属の Electronic microtiter plate (E-plate) 内の well にサンプルを分注し、well 下部に設置された電極の電子インピーダンス (Cell Index: CI) を測定することで定量する[32,33]。

本研究では、E-plate の well に、MRS : TS : YM = 2 : 2 : 1 に調整した混合培地を 180  $\mu$ l 分注した。各 well に、i) *L. crispatus* YIT 12319 懸濁液 10  $\mu$ l、ii) *C. albicans* ATCC 18804 懸濁液 10  $\mu$ l、iii) *C. glabrata* ATCC 2001 懸濁液 10  $\mu$ l、iv) *S. mutans* ATCC 25175 懸濁液 10  $\mu$ l、v) *S. sobrinus* ATCC 33478 懸濁液、vi) *L. crispatus* YIT 12319 懸濁液 10  $\mu$ l と *C. albicans* ATCC 18804 懸濁液 10  $\mu$ l、vii) *L. crispatus* YIT 12319 懸濁液 10  $\mu$ l と *C. glabrata* ATCC 2001 懸濁液 10  $\mu$ l、viii) *L. crispatus* YIT 12319 懸濁液 10  $\mu$ l と *S. mutans* ATCC 25175 懸濁液 10  $\mu$ l、ix) *L. crispatus* YIT 12319 懸濁液 10  $\mu$ l と *S. sobrinus* ATCC 33478 懸濁液 10  $\mu$ l を分注した。その後 RTCA 内に設置し、37、70 時間培養した。

### 4. 研究成果

#### （１）増殖拮抗試験

Competition assay の結果を図 1 に示す。*L. crispatus* YIT 12319 と *C. albicans* ATCC 18804 の試験では、*L. crispatus* YIT 12319 コロニ - から離れた位置では、*C. albicans* ATCC 18804 が三日月形に一部増殖を認めたケースもあったが、*L. crispatus* YIT 12319 に近接した位置では、まったく増殖を示さなかった。*L. crispatus* YIT 12319 と *C. glabrata* ATCC 2001 の試験では、互いに増殖し、円形上のコロニ - が形成された。*L. crispatus* YIT 12319 と *S. mutans* ATCC 25175 の試験では、*L. crispatus* YIT 12319 コロニ - から離れた位置では、*S. mutans* ATCC 25175 の増殖を認めたが、*L. crispatus* YIT 12319 に近接した位置では、わずかな増殖しか認められなかった。*L. crispatus* YIT 12319 と *S. sobrinus* ATCC 33478 の試験では、互いに増殖し、円形上のコロニ - が形成された。(図 1)

#### （２）リアルタイム・バイオフィーム形成量

RTCA の結果を図 2 と図 3 に示す。

*L. crispatus* YIT 12319 単独培養群、*C. albicans* ATCC 18804 単独培養群、および *L. crispatus* YIT 12319 と *C. albicans* ATCC 18804 の共培養群を比較した結果を図 2-a に示す。*L. crispatus* YIT 12319 群は、緩やかに増殖し、約 14 時間で最大 CI 値に達し、その後は安定した。*C. albicans* ATCC 18804 群は、約 12 時間を過ぎた頃から著しく増殖し、約 16 時間で最大 CI 値に達した。共培養群については、約 14 時間で最大 CI に達した。70 時間後の *L. crispatus* YIT 12319 バイオフィーム量は、CI = 0.11 を示した。共培養バイオフィーム量は CI = 0.28 を示し、*C. albicans* ATCC 18804 バイオフィーム量 (CI = 0.48) と比較して小さかった。

*L. crispatus* YIT 12319 単独培養群、*C. glabrata* ATCC 2001 単独培養群および *L. crispatus* YIT 12319 と *C. glabrata* ATCC 2001 の共培養群を比較した結果を図 2-b に示す。*C. glabrata* ATCC 2001 群は、*L. crispatus* YIT 12319 群と比較し、培養直後から急激に増殖し、約 9 時間で最大 CI 値に達した。共培養群については、*C. glabrata* ATCC 2001 群と同様に培養直後から著しく増殖した後、緩やかに増殖し、約 16 時間で最大 CI 値に達した。70 時間後のバイオマスについては、共培養バイオフィームが最も大きな値を示した (CI = 0.49)。

*L. crispatus* YIT 12319 単独培養、*S. mutans* ATCC 25175 単独培養および *L. crispatus* YIT 12319 と *S. mutans* ATCC 25175 の共培養の結果を図 3-a に示す。*S. mutans* ATCC 25175 群は、26 時間後まで緩やかに増殖を続けた。共培養バイオフィームは、*L. crispatus* YIT 12319 群と同様の動態を示し、約 15 時間で最大 CI 達した。バイオマスについては、共培養バイオフィームの CI 値は 0.05 を示し、*S. mutans* ATCC 25175 バイオフィーム (CI

= 0.28) より小さかった。

*L. crispatus* YIT 12319 単独培養群、*S. sobrinus* ATCC 33478 単独培養群および *L. crispatus* YIT 12319 と *S. sobrinus* ATCC 33478 の共培養群を比較した結果を図 3-b に示す。*S. sobrinus* ATCC 33478 群は、約 12 時間を過ぎた頃から著しく増殖し、20 時間から 29 時間にかけて緩やかに増殖した。共培養群は、*L. crispatus* YIT 12319 群と同様の動態を示しながらも、増殖は約 18 時間まで続いた。70 時間後のバイオマスについては、共培養バイオフィルム (CI = 0.14) は、*S. sobrinus* ATCC 33478 バイオフィルム (CI = 0.38) と比較して小さかった。

(図 1) *L. crispatus* YIT 12319 とカンジダ属またはう蝕原性細菌との増殖拮抗

A) *L. crispatus* YIT 12319 とカンジダ属との拮抗

a) *L. crispatus* YIT 12319 (左) と *C. albicans* ATCC 18804 (右)

b) *L. crispatus* YIT 12319 (左) と *C. glabrata* ATCC 2001 (右)

B) *L. crispatus* YIT 12319 とう蝕原性細菌との拮抗

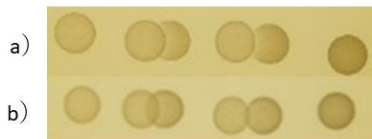
a) *L. crispatus* YIT 12319 (左) と *S. mutans* ATCC 25175 (右)

b) *L. crispatus* YIT 12319 (左) と *S. sobrinus* ATCC 33478 (右)

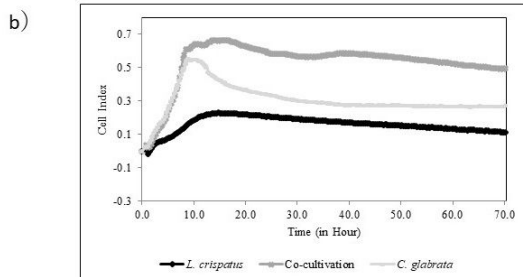
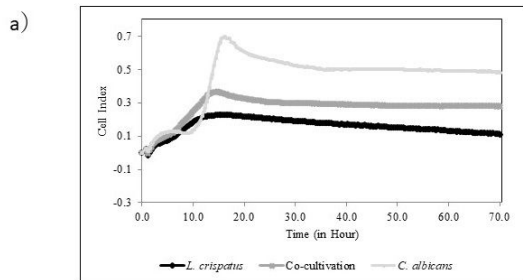
A)



B)



(図 2) *L. crispatus* YIT 12319 と *C. albicans* ATCC 18804 または *C. glabrata* ATCC 2001 のリアルタイム・バイオフィルム形成

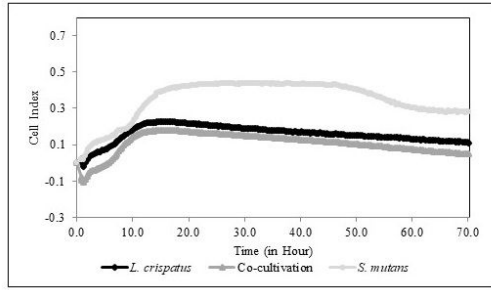


a) *L. crispatus* YIT 12319 と *C. albicans* ATCC 18804

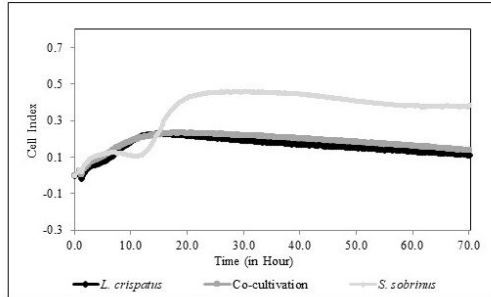
b) *L. crispatus* YIT 12319 と *C. glabrata* ATCC 2001

(図 3) *L. crispatus* YIT 12319 と *S. mutans* ATCC 25175 または *S. sobrinus* ATCC 33478 のリアルタイム・バイオフィルム形成

a)



b)



a) *L. crispatus* YIT 12319 と *S. mutans* ATCC 25175

b) *L. crispatus* YIT 12319 と *S. sobrinus* ATCC 33478

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nomura Yoshiaki, Inai Yuko, Shimpo Yudai, Okada Ayako, Yamamoto Yuko, Sogabe Kaoru, Wada Naohisa, Hanada Nobuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Incidence of Postoperative Pneumonia and Oral Microbiome for Patients with Cancer Operation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 2920 ~ 2920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app12062920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimpo Yudai, Nomura Yoshiaki, Sekiya Toshiko, Arai Chihiro, Okada Ayako, Sogabe Kaoru, Hanada Nobuhiro, Tomonari Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of the Dental Caries Preventive Procedure on the White Spot Lesions during Orthodontic Treatment-An Open Label Randomized Controlled Trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 854 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11030854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 角田 衣理加、野村 義明、岡田 彩子、大塚 良子、曾我部 薫、花田 信弘	4. 巻 71
2. 論文標題 高齢者施設入居者における歯の喪失パターン	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 口腔衛生学会雑誌	6. 最初と最後の頁 153 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5834/jdh.71.3_153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 岡田 彩子、村田 貴俊、大塚 良子、曾我部 薫、有吉 芽生、マティン カイルール、花田 信弘	4. 巻 71
2. 論文標題 Dental Drug Delivery Systemを導入した保健指導プロトコルの有効性を検討する：予備的臨床試験	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 口腔衛生学会雑誌	6. 最初と最後の頁 102 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5834/jdh.71.2_102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Yoshiaki, Ishii Yoshimasa, Suzuki Shunsuke, Morita Kenji, Suzuki Akira, Suzuki Senichi, Tanabe Joji, Ishiwata Yasuo, Yamakawa Koji, Chiba Yota, Ishikawa Meu, Sogabe Kaoru, Kakuta Erika, Okada Ayako, Otsuka Ryoko, Hanada Nobuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Nutritional Status and Oral Frailty: A Community Based Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2886 ~ 2886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12092886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura Yoshiaki, Ishii Yoshimasa, Chiba Yota, Suzuki Shunsuke, Suzuki Akira, Suzuki Senichi, Morita Kenji, Tanabe Joji, Yamakawa Koji, Ishiwata Yasuo, Ishikawa Meu, Sogabe Kaoru, Kakuta Erika, Okada Ayako, Otsuka Ryoko, Hanada Nobuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure and Validity of Questionnaire for Oral Frail Screening	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Healthcare	6. 最初と最後の頁 45 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/healthcare9010045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura Yoshiaki, Ishii Yoshimasa, Chiba Yota, Suzuki Shunsuke, Suzuki Akira, Suzuki Senichi, Morita Kenji, Tanabe Joji, Yamakawa Koji, Ishiwata Yasuo, Ishikawa Meu, Sogabe Kaoru, Kakuta Erika, Okada Ayako, Otsuka Ryoko, Hanada Nobuhiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Does Last Year 's Cost Predict the Present Cost? An Application of Machine Learning for the Japanese Area-Basis Public Health Insurance Database	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 565 ~ 565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18020565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 曾我部 薫、今井 奨、花田 信弘
2. 発表標題 う蝕原性細菌とカンジダ属に及ぼす乳酸菌の影響
3. 学会等名 第 11 回口腔保健用機能性食品 研究会・総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------