

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 芦垣 薫(神奈川県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第432号
学位授与年月日 平成27年3月13日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Effects of *Lactobacillus crispatus* as a candidate for oral probiotic bacteria on *Haemophilus influenzae*
(*Haemophilus influenzae* に対するプロバイオティクス候補菌, *Lactobacillus crispatus* の効果)
Asian Pacific Journal of Dentistry 第15巻 1号 3頁~11頁掲載 平成27年3月31日発行
論文審査委員 主査 教授 桃井保子
副査 教授 花田信弘 副査 教授 河原博

内容の要旨

【緒言】

Haemophilus influenzae (Hi) はヒトの鼻咽腔の共生菌としてしばしば検出されており、呼吸器疾患の主原因として注目されている。また、Hiは敗血症・気管支炎・肺炎・急性中耳炎・慢性閉塞性肺疾患(COPD)の重篤化および小児における重症敗血症・髄膜炎・喉頭蓋炎にも関与している。肺炎やCOPDは全身麻酔において憂慮すべき問題の1つである。現在では口腔ケアや抗菌剤投与などの周術期管理を行っているが、これらに加えて、菌叢の改善が期待できるプロバイオティクスを応用することにより、さらなるリスクの低減に繋がる可能性が考えられる。本研究ではプロバイオティクス候補菌のHiに対する効果の検証を行った。

【対象と方法】

・供試細菌

Haemophilus influenzae ATCC 9795, *Haemophilus influenzae* GTC 15014, *Lactobacillus crispatus* YIT 12319 (L.c1), *Lactobacillus crispatus* LBS 17-11 (L.c2), *Lactobacillus fermentum* YIT 12320 (L.f), *Lactobacillus gasseri* YIT 12321 (L.g) および *Streptococcus mitis* YIT 12322 (S.m) を使用した。

・Competition assay

上記供試細菌を前培養し、遠心分離を行った。菌体を $OD_{540} = 0.2$ に調整し、寒天培地に $5 \mu\text{l}$ ずつ植菌し、嫌気培養を行った (37°C , 24時間)。

・Radial diffusion assay (RDA)

Hi以外の上記供試細菌を前培養後、遠心分離した。その培養上清群、培養上清を中和した群および硫酸アンモニウムによる塩析法で沈殿させた群をそれぞれ準備した。対照群としてリン酸緩衝食水(PBS)および 1.6 mg/ml テトラサイクリン溶液を用いた。Hiを寒天培地に加えた後、シャーレに分注し、固化後に作成したWell (2mm) に各試薬を $5 \mu\text{l}$ ずつ入れ、さらに寒天培地を重層して嫌気培養を行った (37°C , 48時間)。培養後に、発育阻止円(透明帯)の直径を測定した。

・CFUによる解析

前培養したHiを遠心分離し、PBSで $OD_{540} = 0.6$ に調整した。再度遠心分離し、L.c1培養上清、培養上清中和物および80%飽和硫酸アンモニウムを $500 \mu\text{l}$ 加え、 37°C で5分静置した。遠心分離後 10^{-2} に希釈し寒天培地に播種し、48時間嫌気培養後にコロニーの計測を行った。

・有機酸の解析

L.c1 の培養上清を 0, 6, 12, 24 および 48 時間で採取し, HPLC で有機酸の解析を行った。

【結 果】

Competition assay で L.c1 のみが Hi 2 株に対して最も強い抗菌活性を示した。Radial diffusion assay において, L.c1 に最も強い抗菌活性が認められ, S.m では抗菌活性が認められなかった。培養上清中和物および 80%飽和硫酸画分ではどの候補菌も抗菌活性を示さなかった。L.c1 の培養上清, 培養上清中和物および 80%飽和硫酸画分を Hi 懸濁液に直接添加し, コロニー形成の有無を調べたところ, L.c1 培養上清のみ強い殺菌効果を示した。さらに L.c1 培養上清の組成を HPLC システムで調べた。その結果, 4 種の有機酸が検出され, 乳酸, 酢酸, コハク酸及びプロピオン酸の順に多く検出された。特に乳酸は培養時間に比例して増加し, 48 時間では 118.22 mM の濃度に達した。他の 3 種の有機酸も時間とともに濃度が増加していたものの, 検出された全有機酸の大部分は乳酸 (78.83%) であり, 乳酸が Hi の増殖抑制の主要な役割を果たしている事が示唆された。実際, 乳酸は 0.1 ~ 1.0 M で明らかに Hi に対して抗菌活性を示した。

【考 察】

本研究では, Hi に対する口腔プロバイオティクス候補菌の抗菌性を検討した。L.c1 では Hi の 2 株に対して同等の強い活性を有しており, Hi に対して最も効果が期待できる。L.c2, L.g, L.f でも L.c1 には劣るものの抗菌活性が認められたが, S.m では抗菌活性は認められなかった。L.c1 培養上清中の抗菌物質は分子量 3 kD のフィルターを通過したため, 低分子量化合物により抗菌活性が得られていると考えられる。低分子量化合物としては, 酸, アルコール, ペプチド類, バクテリオシンおよび他の代謝物が候補として挙げられる。

HPLC システムでの解析より, L.c1 培養上清中の乳酸濃度が培養時間と共に増加し, 産生された有機酸のうち, 乳酸が最も強力かつ効果的な成分である事が示唆された。また, 乳酸を用いた RDA でも強い抗菌活性が認められた。L.c1 の培養上清で抗菌活性を示した pH は 3.8-4.1 であった。それに対して S.m の培養上清は pH4.7 で Hi の両株で抗菌効果を示さなかった。その一方で, タンパク質, ペプチド, またはタンパク質分解酵素の抗菌活性への関与も考えられるが, カルボキシペプチダーゼで酵素処理した L.c1 培養上清, 熱処理を行った L.c1 培養上清を用いて RDA を行ったところ, 処理前の培養上清とほぼ同じ抗菌活性が認められた。したがって, タンパク質やペプチド, タンパク質分解酵素の可能性は低く, 有機酸が Hi の増殖阻害および死滅に関与していると思われる。

Hi は COPD の急性増悪に関与しており, 全身麻酔後に増悪する危険性がある。現在では, そのリスクを軽減するために抗菌剤投与などの周術期管理を行っているが, アレルギーや抗菌剤の長期投与による耐性菌の出現など, 様々な問題もある。プロバイオティクス候補である乳酸桿菌 L.c1 は Hi の増殖抑制効果を示した。プロバイオティクスにより, 口・咽頭及び上気道領域の健康に有益な細菌叢を優勢にし, COPD の増悪や日和見感染の危険性を減らすのに重要な役割を果たし得ると考えられる。また, 老人ホームに住む高齢者や集中治療室で治療中の高リスク患者において呼吸器疾患の発生や増悪を防ぎ, さらに口腔の改善の補助的な役割として使用する事が期待される。プロバイオティクスの適用は長期的な予防を見据えた口腔衛生のメンテナンスツールとして役立つ可能性が高い。本研究は, 乳酸桿菌が, Hi の増殖を妨げることを示しており, さらに様々な疾患に対する治療的アプローチの期待も出来る。

今後, 口・咽頭および上気道に生息する他のグラム陰性菌に対して, 口腔プロバイオティクス候補細菌を用いた詳細な研究の必要性があるといえる。

【結 論】

L. crispatus (L.c1) は呼吸器疾患の原因菌である *H. influenzae* に対して抗菌活性を示した。この活性は主に L.c1 の産生する乳酸によることがわかった。

審査の結果の要旨

ヒトの鼻咽腔に検出され, 呼吸器疾患の原因となる *Haemophilus influenzae* (Hi) は全身麻酔後の慢性閉塞性肺疾患の急性増悪に関与する。現在, そのリスク低減として周術期管理に抗菌剤投与が行われているが, これには抗菌剤の副作用や長期投与による耐性菌出現が伴う。芦垣氏は, このリスク低減に, 抗生物質 (antibiotics) とは対比的に宿主と共生するプロバイオティクス (probiotics) を用いるという着想を得, 本研究においてプロバイオティクス候補菌の Hi に対する抗菌効果を検証した。

検証は, *Haemophilus influenzae* 2 株 (ATCC 9795, GTC 15014) に対する, プロバイオティクス候補菌 5 種, ①

Lactobacillus crispatus YIT 12319 (L.c1), ② *Lactobacillus crispatus* LBS 17-11, ③ *Lactobacillus fermentum* YIT 12320, ④ *Lactobacillus gasseri* YIT 12321, ⑤ *Streptococcus mitis* YIT 12322 の抗菌効果を, ・ Competition assay, ・ Radial diffusion assay, ・ CFU による解析, ・ 有機酸の解析の 4 試験で評価することにより行われた。

Competition assay : 供試細菌の菌体を寒天培地に植菌し嫌気培養したところ, L.c1 が Hi に対し最も強い抗菌活性を示した。Radial diffusion assay : Hi を寒天培地に加え供試細菌の培養上清を分注し嫌気培養した。発育阻止円の直径を測定したところ, L.c1 に最も強い抗菌活性が認められ, S.m では抗菌活性が認められなかった。CFU による解析 : L.c1 の培養上清を, Hi 懸濁液に直接添加し嫌気培養後にコロニー数を計測したところ, L.c1 のみ強い殺菌効果を示した。有機酸の解析 : L.c1 培養上清について HPLC で有機酸を解析したところ大部分が乳酸であり, 乳酸が Hi 増殖阻害に主要な役割を果たしている事が示唆された。

以上, 本研究において, プロバイオティクス候補菌である *Lactobacillus crispatus* YIT 12319 は, *Haemophilus influenzae* (ATCC 9795, GTC 15014) に対し強い抗菌活性を有し, 全身麻酔後の慢性閉塞性肺疾患の急性増悪低減を始め, 高齢者や集中治療室で治療中の患者における呼吸器疾患の発生や増悪を防ぐのに有効であることが示唆された。よって, 本論文はきわめて臨床的価値が高く, 博士(歯学)の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。