## 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）　秋　丸　　学（神奈川県）
博士の専攻分野　博　士（歯　学）
学 位 記 番 号　甲　第　461　号
学位授与年月日　平成 29 年 3 月 14 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　Characterization and Purification of a Bacteriocin-like Substance Produced by *Lactobacillus crispatus* LBS 17-11 Isolated from an Oral cavity of Human Subject
（ヒト被験者の口腔から単離した *Lactobacillus crispatus* LBS 17-11 株が産生するバクテリオシン様物質の精製と性状解析）

Asian Pacific Journal of Dentistry　第 17 巻　第 1 号　9 頁～ 14 頁掲載　平成 29 年 1 月 31 日発行

論 文 審 査 委 員　主査　教授　鶴　本　明　久
副査　教授　花　田　信　弘　　副査　教授　河　原　　博

### 内 容 の 要 旨

【緒　　言】

人工呼吸器関連肺炎（ventilator-associated pneumonia：以下 VAP）は，気管挿管下の人工呼吸開始後 48 時間以降に発症する細菌性肺炎で，*Streptococcus pneumoniae* が主な原因菌とされ，周術期に人工呼吸器を使用する際に重要な臨床上の問題となっている．現在では口腔ケアなどの周術期管理が行われているが，これに加えてプロバイオティクスを併用する事により新たな VAP 予防の可能性が考えられる．主要なプロバイオティクスとして知られる *Lactobacillus* 属が病原体の成長を抑制するメカニズムの一つに有機酸，過酸化水素，バクテリオシンなどの抗菌物質の産生がある．バクテリオシンは細菌により生合成される抗菌ペプチドで，人体における病原体の成長を抑制する能力により菌叢を修飾する重要な物質と考えられている．

本研究の目的は，ヒトの口腔内から単離したプロバイオティクス候補菌である *Lactobacillus crispatus* LBS17-11 により産生される抗菌物質の性状を詳細に検討することである．

【材料と方法】

化学物質

トリプシン，プロテイナーゼ K，乳酸ナトリウムは和光純薬から購入した．ナイシンは MP Biomedical から購入し，比較対照として使用した．

菌株と培養条件

*S. pneumoniae* ATCC 33400，*Streptococcus mutans* ATCC 25175，*Streptococcus sobrinus* ATCC 33478，*Fusobacterium nucleatum* JCM 8532，*Prevotella intermedia* ATCC 25261 および *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 は鶴見大学の保存株から使用した．

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 16 時間培養した．*P. gingivalis*，*P. intermedia*，*F. nucleatum* は TSB にヘミンとメナジオンを添加し，37℃で 48 時間嫌気条件下で培養した．

抗菌物質の活性測定

*L. crispatus* LBS17-11 は MRS Broth にて 37℃で 24 時間嫌気培養した．各精製段階における抗菌活性は平板法で測定した．

*S. pneumoniae* を含む TS 寒天培地のウェルに試料 10 μl を加えて 37℃で 16 時間嫌気培養した．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）は増殖を阻害する最小濃度と定義した．

抗菌物質の精製

*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，さらにクロロホルムによる抽出を行った．クロロホルム層を濃縮した画分を抗菌物質として使用した．

Tricine-SDS-PAGE による解析

上記クロロホルム抽出画分を Tricine-SDS-PAGE（15％アクリルアミドゲル）により分析した．同じクロロホルム抽出画分を二つのレーンで泳動し，そのゲルを 2 分して一つはタンパク染色し，もう一つは 0.1％ Triton X100 で SDS を除いた後，*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．

抗菌物質の性状解析

クロロホルム抽出画分を 100°C，10 分間加熱して耐熱性を調べた．また，プロテイナーゼ K（1 mg/ml）3 時間処理およびトリプシン（1 mg/ml）37°C，3 時間処理によりタンパク分解酵素に対する感受性を調べた．

【結　　果】

*L. crispatus* LBS 17-11 の抗菌物質の精製

*S. pneumoniae* ATCC 33400 株に対する抗菌活性を指標にして抗菌物質の精製を行った．*L. crispatus* LBS 17-11 の培養上清中に抗菌物質が確認された．強い抗菌活性は上清からの 35％～ 80％飽和硫安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 80％で，抗菌物質は 15 倍濃縮された．硫安沈殿画分の透析後，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 倍濃縮され，本活性の培養上清からの回収率は 19％であった．

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

平板法のクリアーゾーンの中に時間と共に菌の増殖が見られたことから，*S. pneumoniae* に対する本抗菌物質の活性は静菌的と考えられた．*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平板法で本抗菌物質に感受性を示さなかった．

電気泳動による分析で，本抗菌物質のタンパク染色バンドは一本のバンドを示し，他のマイナーなバンドが見られないことから高精製度の抗菌物質であることが示唆された．その分子量は約 7 kDa であった．SDS を除去したもう一枚のゲルを *S. pneumoniae* を含む寒天培地に重層して培養した結果，タンパク染色で見られた一本のバンドと一致する部位に透明バンドがみられた．

抗菌物質の性状

本抗菌物質は 100℃，10 分の熱処理に安定であり，トリプシンまたはプロテイナーゼ K の処理で 40％および 45％失われることからペプチド性の物質と思われた．このことから本抗菌物質をバクテリオシン様物質と判断した．

バクテリオシン様物質と乳酸ナトリウムの併用効果

MIC が半分のレベルの乳酸ナトリウム（56 mM）とバクテリオシン様物質の併用ではバクテリオシン様物質単体に比べ MIC が低い値を示した．しかし，乳酸ナトリウム（56 mM）とナイシンとの併用ではナイシン単独と変わらなかった．

【考　　察】

本研究において，ヒト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，プロテイナーゼ K によって部分的に失活してペプチド様の性質を示した．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，クロロホルム抽出によって抗菌活性が上昇したこと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．このような混合物からクロロホルムによって凝集物質が除去された可能性がある．Contreras ら（Appl Environ Microbiol，1997）は簡単なメタノール - クロロホルム抽出で硫安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ことを報告している．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．

通常プロバイオティクスの探索は有機酸の影響を避けるため，培養上清を NaOH で中和して行う．しかし，生成された乳

酸ナトリウムはクエン酸ナトリウムと同様に*S. pneumoniae*や他の細菌の潜在的増殖抑制因子となるので注意が必要である．

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の機能をもつとの報告もある．本バクテリオシン様物質の阻害機序は明らかではないが，さらに精製を進め，その作用メカニズムを解析することがVAPの予防に対する新たなアプローチになるかもしれない．

【結　　論】

1. *L. crispatus* LBS 17-11が産生するバクテリオシン様物質は*S. pneumoniae* ATCC 33400に対して静菌活性を示した．
2. バクテリオシン様物質は培養上清から硫酸アンモニウム塩析，クロロホルム抽出を経て2,045倍に濃縮された．
3. 精製されたバクテリオシン様物質は耐熱性を示し，トリプシン，プロテイナーゼKで活性が部分的に消失してペプチド様性状を示し，トリシンSDS-PAGEにより分子量はおおよそ7kDaと推測された．
4. 本バクテリオシン様物質は*S. mutans*，*S. sobrinus*，*P. gingivalis*，*P. intermedia*および*F. nucleatum*には抗菌効果を示さなかった．

**審査の結果の要旨**

人工呼吸器関連肺炎（VAP）は，気管挿管下に人工呼吸器を使用する周術期管理で大きな問題となっている．本研究は，VAPの予防を目的として細菌性肺炎の主な原因菌とされる*Streptococcus pneumoniae*に対するプロバイオティクスの探索を目指し行われたものである．プロバイオティクスの作用機序として，有機酸，過酸化水素，バクテリオシン産生が考えられるが，本研究では乳酸菌が産生するバクテリオシン様物質を抽出・精製し，*S. pneumoniae*に対する抗菌活性を調べ，さらに耐熱性やプロテイナーゼK（1 mg/ml）およびトリプシン（1 mg/ml）に対する感受性などの特性について調べている．

その結果，*L. crispatus* LBS 17-11の培養上清中にバクテリオシン様物質を確認し，*S. pneumoniae* ATCC 33400株に対する抗菌活性を認めている．強い抗菌活性は上清からの35％～80％飽和硫安沈殿画分に回収され，さらに硫安沈殿画分の透析後，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倍に精製された．このバクテリオシン様物質には耐熱性が認められ，この抗菌活性はトリプシンまたはプロテイナーゼKの処理で40％または45％失われることからタンパク質性の物質と推察している．Radial diffusion法のクリアーゾーンの中や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ることから*S. pneumoniae*に対し殺菌的でなく静菌的活性があるとしている．さらに調べたグラム陽性菌およびグラム陰性菌はRadial diffusion法でバクテリオシン様物質に感受性を示さなかった．*S. pneumoniae*や他の細菌に対する潜在的増殖抑制因子と考えられる乳酸ナトリウムの併用効果も認められた．

以上，本研究はヒト口腔から単離された*L. crispatus* LBS 17-11によって産生された*S. pneumoniae*に対して抗菌活性を示すバクテリオシン様物質の精製とその抗菌活性等の性状を調べたものである．効率的なこのバクテリオシン様物質の精製方法を見いだし，その特徴的な性状を明らかにしている．今後，このバクテリオシン様物質の抗菌的作用機序を解明し，*S. pneumoniae*などに対するプロバイオティクスのあらたな方法を確立することは，VAPやその他の肺炎予防に寄与するものであり，きわめて臨床的価値が高い研究と考える．

よって，本論文は博士（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．