

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) | 中野拓也(神奈川県) |
| 博士の専攻分野 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 甲第492号 |
| 学位授与年月日 | 平成31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 | Studies on suppression of opportunistic infectious bacteria by lactic acid bacteria and antibacterial drugs (乳酸菌と抗菌薬による日和見感染性細菌の抑制に関する研究) Asian Pacific Journal of Dentistry 第19巻 第1号 17頁~25頁掲載 2019年6月発行 |
| 論文審査委員 | 主査 教授 前田伸子 副査 教授 鶴本明久 副査 教授 河原博 |

内容の要旨

【緒言】

周術期における日和見感染は、患者の予後および術後治療過程に大きな影響を与える。さらに、周術期における日和見感染の治療および予防は、多剤耐性細菌の出現およびバイオフィーム形成のために容易ではない。近年、プロバイオティクスによる日和見感染菌の抑制に関する研究が行われている。乳酸菌はインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) や肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に対して抗菌活性を有することが報告されている。抗菌薬は日和見感染症の治療に使用されているが、血中濃度が上昇しても十分な量の抗菌薬は唾液に移行しない。日和見感染菌の制御には口腔ケアが重要であり、プロバイオティクスによる制御が期待されている。

本研究は、肺炎球菌の増殖に対する抗生物質とプロバイオティクスの併用による阻害効果を調べることを目的とする。

【材料と方法】

供試細菌

寺井らにより選定された口腔プロバイオティクス候補菌 *Lactobacillus crispatus* YIT 12319 (*L. c* 1), *Lactobacillus crispatus* YIT 12945 (*L. c* 2), *Lactobacillus gasseri* YIT 12321 (*L. g*), *Lactobacillus fermentum* YIT12320 (*L. f*), *Streptococcus mitis* YIT 12322 (*S. m*) を使用した。日和見感染菌として *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) ATCC 9795, *H. influenzae* GTC 15014, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) ATCC 49619, *S. pneumoniae* GTC 261, *S. pneumoniae* ATCC 33400 を使用した。

Minimal inhibitory concentration (MIC)

MIC 測定方法は日本化学療法学会の MIC 測定ガイドラインを参考にした。抗菌薬として ampicillin, erythromycin, gentamicin, ofloxacin, tetracycline, vancomycin を使用した。細菌を OD_{540nm} = 0.25 に調整し 37°C, 24 時間嫌気培養した。

Radial diffusion assay (RDA)

前培養した各細菌を OD_{540nm} = 0.25 に調整し寒天培地に加えた後、シャーレに分注した。固化後に作成した well (2 mm) に各試薬を 5 μl ずつ入れ、さらに寒天培地を重層して 37°C, 24 時間嫌気培養した。培養後に発育阻止円 (透明帯) の直径を測定した。

Competition assay

前培養した *Lactobacillus* 属と *S. pneumoniae* ATCC 33400 (*S. p*) 菌体の PBS 懸濁液を $OD_{540nm} = 0.25$ に調整し、TS と MRS 4:1 の寒天培地に 5 mm および 6 mm の間隔をあけて $5 \mu l$ ずつ滴下し、10 分間静置後、 $37^{\circ}C$ 、24 時間嫌気培養した。

共培養による増殖抑制効果の検討

前培養した *L. g* と *S. p* 菌体の PBS 懸濁液を $OD_{540nm} = 0.25$ に調整した。それぞれ単独または両菌を 1:1 で混合した菌体懸濁液を作製し、抗菌薬存在下または非存在下、 $37^{\circ}C$ で 0 分、30 分、60 分、120 分および 6 時間培養後、TS と MRS 4:1 の寒天培地にスパイラルシステムを用いて播種した。 $37^{\circ}C$ 、48 時間嫌気培養後 Colony forming unit (CFU) を算定した。

肺炎球菌のバイオフィーム形成のリアルタイムモニタリング

xCELLigence[®]用 E-プレートの各ウェルに *L. g* 由来の 30%飽和硫酸画分、gentamicin (0 ~ 25 $\mu g/ml$) を含む TS 培地、*S. p* の菌体懸濁液を加え、 $37^{\circ}C$ で培養して *S. p* のバイオフィーム形成をリアルタイムで観察した。

SDS-PAGE による活性染色試験

L. g の飽和硫酸画分の SDS-PAGE を行い、一部を CBB 染色した。残りのゲルを *S. p* を含む TS 寒天プレート上に重ね、 $37^{\circ}C$ で嫌気培養して抗菌活性を調べた。

【結 果】

プロバイオティクス候補細菌 5 株に対する 6 種類の抗菌薬の MIC は *S. mitis* を除いて比較的高く、*H. influenzae* および *S. pneumoniae* などの日和見感染菌に対する MIC は比較的低かった。RDA で調べた *S. p* に対する各抗菌薬の最小濃度はそれぞれの MIC に比べて高かった。Competition assay では *Lactobacillus* 属は *S. p* に対して増殖を抑制した。*L. g* と *S. p* の共培養 6 時間後に、*S. p* は *L. g* との共培養および gentamicin 存在下での共培養により消失した。xCELLigence[®] で調べた *S. p* のバイオフィーム形成曲線は gentamicin により用量依存的に阻害された。*L. g* の飽和硫酸画分の SDS-PAGE で見られた 2 ~ 3 kDa のバンド相当部に活性染色像が認められた。以上の結果から *S. p* は *L. g* によって増殖抑制されることが確かめられた。

【考 察】

日和見感染菌は口腔プロバイオティクス候補菌に比べて抗菌薬の MIC が低く、特に *S. pneumoniae* は用いた 6 種の抗菌薬に対して感受性を示した。*S. p* は *L. g* との共培養および gentamicin 存在下での共培養によりその増殖が強く抑制されたことから、*L. g* は口腔プロバイオティクスとしての可能性を有することが示唆された。xCELLigence[®] は、細胞増殖、形態変化および細胞-基質付着をリアルタイムで定量するための装置である。本研究では、*L. g* 由来の飽和硫酸画分存在下で *S. p* のバイオフィーム形成が gentamicin の濃度に依存して阻害された。xCELLigence[®] は細菌のバイオフィーム形成の解析に利用されつつあり、今後さらにその有用性が認識されるものと思われる。SDS-PAGE では 2 ~ 3 kDa のバンド相当部に *S. p* に対する抗菌活性が見られたが、これと従来 *L. gasseri* で報告されている gasserin との相動性については不明で今後更なる研究が必要である。

重症呼吸器感染症に罹患した患者は *H. influenzae* と *S. pneumoniae* に感染している確率が高い。高齢者や小児など細菌に対して抵抗性の低い人の呼吸器疾患の発生や増悪を防ぐために日常的に口腔プロバイオティクスを応用することで口腔環境の改善に役立つことが期待される。

【結 論】

L. gasseri YIT 12321 は口腔プロバイオティクスの候補であることと、抗生物質との併用で *S. pneumoniae* を抑制できる可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

周術期における日和見感染予防・治療は患者の予後および術後治療過程に大きな影響を与えるため必須であるが、多剤耐性菌の出現やバイオフィーム形成のため容易ではない。一方、近年、口腔プロバイオティクスによる日和見感染菌の抑制に関する研究が行われ、乳酸菌がインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) や肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に対し抗菌活性があることが報告されている。そこで、本研究では抗菌薬と口腔プロバイオティクスの併用が肺炎球菌に対して阻害効果があるかどうかを調べた。

口腔プロバイオティクス候補菌として *Lactobacillus crispatus* YIT 12319, *L. crispatus* YIT 12945, *L. gasseri* YIT 12321, *L. fermentum* YIT 12320, *Streptococcus mitis* YIT 12322 を、日和見感染菌として *Haemophilus influenzae* ATCC

9795, *H. influenzae* GTC 15014, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *S. pneumoniae* GTC 261, *S. pneumoniae* ATCC 33400 を使用した。

MIC 測定：日本化学療法学会のガイドラインを参考とし、抗菌薬は ampicillin, erythromycin, gentamicin, ofloxacin, tetracycline, vancomycin を使用した。被検菌を $OD_{540nm} = 0.25$ に調整し、37℃で24時間嫌気培養した。Radial diffusion assay (RDA)： $OD_{540nm} = 0.25$ に調整した被検菌を寒天培地に加え、シャーレ内で固まった後に作成した well に各試薬を入れ、さらに寒天培地を重層し、嫌気培養後、発育阻止円の直径を測定した。Competition assay：*Lactobacillus* 菌株と *S. pneumoniae* ATCC 33400 の PBS 懸濁液を TS と MRS 4：1 の寒天培地に 5 mm と 6 mm の間隔をあけて滴下し、嫌気培養した。共培養による増殖抑制効果：*L. gasseri* と *S. pneumoniae* を単独または両菌を 1：1 で混合した PBS 懸濁液を作製し、抗菌薬存在下・非存在下で 0 分、30 分、60 分、120 分、6 時間培養後、TS と MRS 4：1 の寒天培地に播種し、Colony forming unit (CFU) を算定した。肺炎球菌のバイオフィーム形成リアルタイムモニタリング：xCELLigence 用 E-プレートに *L. gasseri* の 30%飽和硫酸画分と gentamicin (0～25 μ g/ml) を含む TS 培地、*S. pneumoniae* 菌体懸濁液を加え、培養後、バイオフィーム形成をリアルタイムで観察した。SDS-PAGE による活性染色試験：*L. gasseri* の 30%飽和硫酸画分の SDS-PAGE を行い、一部を CBB 染色し、残りのゲルを *S. pneumoniae* を含む TS 寒天プレートに重ね、培養後、抗菌活性の有無を調べた。

以上の結果、プロバイオティクス候補 5 菌株に対する 6 種の抗菌薬の MIC は *S. mitis* 以外は比較的高かった一方で、日和見感染菌に対する MIC は低かった。Competition assay の結果から、被検 *Lactobacillus* は *S. pneumoniae* の増殖を抑制することがわかり、共培養による増殖抑制効果は *S. pneumoniae* が *L. gasseri* との共培養および gentamicin 存在下の共培養により 6 時間後に消失した。*S. pneumoniae* のバイオフィーム形成は gentamicin により用量依存的に阻害された。

また、*L. gasseri* 飽和硫酸画分の SDS-PAGE で確認された 2～3 kDa のバンド相当部に抗菌活性があることが認められた。これらの結果から、*S. pneumoniae* は *L. gasseri* により増殖が抑制することが明らかになった。

本研究はプロバイオティクス候補菌である *L. gasseri* が日和見感染菌 *S. pneumoniae* に対し、増殖抑制する効果を持つことと、gentamicin が *S. pneumoniae* のバイオフィーム形成抑制があることを確認している。以上のことから、プロバイオティクスを日常的に応用することで、周術期において、抗菌薬との併用で日和見感染予防・治療に寄与する可能性が示唆され、歯科臨床における価値が高いと思われる。また、今後、*L. gasseri* が産生する新しい抗菌物質の存在の確定も期待出来る。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値を有するものと判定した。