

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)	石川 匠(神奈川県)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第505号
学位授与年月日	令和2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	Antibacterial activity of the probiotic candidate <i>Lactobacillus gasseri</i> against methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> に対する口腔内プロバイオティクス候補菌 <i>Lactobacillus gasseri</i> の抗菌作用) Asian Pacific Journal of Dentistry 第20巻 第1号 1頁~8頁掲載 令和2年2月16日発行
論文審査委員	主査 教授 五味 一博 副査 教授 下田 信治 副査 教授 河原 博

内容の要旨

【緒言】

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は100か国以上の病院, 特に集中治療室(ICU)で頻繁に分離されており, 病院内で分離される耐性菌として最も分離頻度が高く, 人工呼吸器関連肺炎 ventilator associated pneumonia (VAP) の原因菌の一つである. 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, VAPのケアのために口腔内ケア, 手指消毒による予防や抗菌剤投与などの周術期管理が行われている. これに加えて, 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でVAPのさらなるリスクの低減に繋がる可能性が考えられる.

本研究は口腔領域のプロバイオティクス候補菌 *Lactobacillus gasseri* を用いてVAPの重篤化に関与するMRSAの増殖抑制に関して検証することを目的とする.

【材料と方法】

1. 供試細菌と培地

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 gasseri* YIT 12321 (*Lg*), *Lactobacillus crispatus* YIT 12319 (*Lc1*), *Lactobacillus crispatus* YIT 12945 (*Lc2*), *Lactobacillus fermentum* YIT12320 (*Lf*) を使用した. 日和見感染菌は *Staphylococcus aureus* JCM 8702 (MRSA-JCM) を使用した. それぞれ培地は *Lactobacillus* では Difco™ Lactobacilli MRS Broth (MRS培地) を, MRSA-JCM では Bacto™ Tryptic Soy Broth (TS培地) を使用した.

2. 抗菌活性試験

① Competition assay

37℃, 18時間嫌気培養(80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) した *Lactobacillus* 属とMRSA-JCMを4℃, 3,000回転, 15分間遠心分離し, 菌体をPBSに懸濁してOD_{540nm}=0.5に調整した. それぞれの菌体懸濁液を6mmの間隔をあけて5μlずつTS:MRS=1:1の寒天培地へ滴下し10分間静置後, 37℃, 18時間嫌気培養を行った.

② Radial diffusion assay (RDA)

37℃, 18時間嫌気培養したMRSA-JCMをTS寒天培地に100μl加えた後, よく攪拌しシャーレに分注した. 固化後

に TS 寒天培地上に直径 2 mm の Well を作製した後各供試乳酸菌を 5 μ l ずつ注入，さらに二倍濃度寒天培地を重層して 37 $^{\circ}$ C，18 時間嫌気培養を行った。培養後に，発育阻止円（透明帯）の直径を測定した。

3. *Lg* の加熱，タンパク質分解処理後活性の確認

Lg 飽和硫酸画分の耐熱試験では，加熱条件は 80 $^{\circ}$ C と 100 $^{\circ}$ C とし，対照群に非加熱試料を使用し RDA を行った。また，同様にプロテイナーゼ K (1 mg/ml)，トリプシン (1 mg/ml) 処理後に RDA を行った。

4. 共培養による増殖抑制効果の分析

前培養した *Lg* と MRSA-JCM を 4 $^{\circ}$ C，3,000 回転，15 分間遠心分離し，菌体を PBS に懸濁して OD_{540nm} = 0.5 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，37 $^{\circ}$ C のインキュベータで 0，4，8，16 時間静置後 TS:MRS = 1:1 の寒天培地にスパイラルシステムを使用して菌体懸濁液を播種した。37 $^{\circ}$ C，48 時間嫌気培養後，顕微鏡下で両菌の Colony forming unit (CFU) を算定した。

5. SDS-PAGE によるタンパク質活性染色試験

飽和硫酸画分から得られた *Lg* 上清を PBS 溶液で透析し SDS-PAGE 後 CBB 染色を行った。続けて 0.1% (v/v) トリトン X-100 処理後に活性染色を行った。活性染色後のゲルを MRSA-JCM を含む TS 寒天培地上に重層し，37 $^{\circ}$ C，18 時間嫌気培養した。

6. バクテリオシン様物質の性状解析

Lg 試料各 10 μ l を 12well にアプライし SDS-PAGE，CBB 染色を行った。活性が確認できたバンド相当部を切り出し，nano LC-MS/MS 後に性状解析し，Mascot Search を用いて NCBI-BLAST，UniProtKB にて検索した。

【結 果】

Competition assay では *Lg* が MRSA-JCM を半月上に侵食し増殖抑制をした。RDA では乳酸菌群 4 菌種のうち *Lg* が最も MRSA-JCM の増殖を抑制できた。また，80 $^{\circ}$ C，100 $^{\circ}$ C 加熱処理後の飽和硫酸画分には，非加熱の硫酸画分と同様に抗菌活性を認めた。*Lg* と MRSA-JCM の共培養試験の結果，*Lg* は，MRSA-JCM による阻害を受けず，共培養でも単独培養でも *Lg* 菌数に変化はなかった。一方，共培養時の MRSA-JCM の菌数は，時間経過と共に減少し共培養 16 時間後にはコロニー数は 0 に減少した。なお，MRSA-JCM 単独培養では 16 時間後では菌数が増加はするも減少は認めなかった。SDS-PAGE によるタンパク質活性染色試験では分子量 6.5 KDa 相当部に MRSA-JCM 増殖抑制を認め，性状解析結果から，分子量 6,673 Da，アミノ酸残基 65，保有遺伝子 *gat X* (*gae X*) の II 型バクテリオシン（ガセリシン T）であることが分かった。

【考 察】

Competition assay では *Lg* が MRSA-JCM を半月上に侵食し，*Lg* の触れた MRSA-JCM 部分には MRSA-JCM のコロニーが形成されていなかったことから，*Lg* によって MRSA-JCM が増殖抑制したと考えられる。RDA では乳酸菌群 4 菌種のうち *Lg* が最も強く MRSA-JCM の増殖を抑制した。*Lg* 培養上清の飽和硫酸画分の加熱処理，タンパク質分解処理後の抗菌活性試験で，非加熱の硫酸画分と同様に抗菌活性を認めたことより，*Lg* の抗菌活性物質は耐熱性のタンパク質であることが考えられた。これは，乳酸菌 II 型バクテリオシンの条件である分子量 5-10 KDa の範囲内，耐熱性に合致する。また，SDS-PAGE を基にした *Lg* 抗菌活性物質の性状解析結果から活性物質が II 型バクテリオシンであることが分かったが，ガセリシン T は保有遺伝子 *gat X*，*gat A* の二成分を有するラクタシン F ファミリーに属した二成分性バクテリオシンであるため *Lg* もガセリシン T であることが示唆された。今後，*Lg* から生成されたバクテリオシンが口腔内の多剤耐性病原菌における抗生物質などの投薬処置との併用サプリメントになる可能性があるとも考えられる。そのため，今後も継続して臨床分離株を含めて，より多くの MRSA の菌株や他の口腔内細菌についても検討していく必要がある。

【結 論】

Lactobacillus gasseri YIT 12321 は，MRSA-JCM8702 の増殖を抑制するプロバイオティクス候補菌であることが示唆された。

審査の結果の要旨

人工呼吸器関連肺炎 (VAP) は，気管挿管下の人工呼吸患者に，人工呼吸開始 48 時間以降に新たに発生した肺炎で，重要なデバイス関連院内感染である。この対策として口腔内ケアが重要であるが，これに加えてプロバイオティクス (PB) を用いた菌叢の改善が期待できる。そこで PB の候補菌である *Lactobacillus gasseri* の VAP の原因菌の 1 つであるメチリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する増殖抑制効果について検討した。

PB 候補菌として *Lactobacillus gasseri* YIT 12321 (*Lg*), *Lactobacillus crispatus* YIT 12319 (*Lc1*), *Lactobacillus crispatus* YIT 12945 (*Lc2*), *Lactobacillus fermentum* YIT12320 (*Lf*) を使用した。日和見感染菌として *Staphylococcus aureus* JCM 8702 を使用した。抗菌活性試験 ① competition assay : PB 候補菌と MRSA を 6 mm の間隔をあけ培養し MRSA の増殖抑制状態を調べた。この結果, *Lg* において増殖抑制認められた。② radial diffusion assay : MRSA を懸濁させ固めた寒天培地上に PB 候補菌を播種し発育阻止円を測定したところ *Lg* で最も強い発育阻止を認められた。次いで *Lg* について以下の実験を行った。③加熱した *Lg* で試験を行ったところ, 同様の抗菌活性を認められた。④ *Lg* と MRSA を共培養させたところ, *Lg* には細菌数の変化は認めなかったが MRSA では菌数の減少が認められ 16 時間後ではコロニー形成が認められなかった。⑤ *Lg* の上清を分画し抗菌活性を調べたところ分子量 6.5 KDa 相当部に MRSA の増殖抑制を認められた。⑥ MRSA の増殖抑制を認められた分画の性状を調べたところ II 型バクテリオシンであることが分かった。

本研究により VAS 関連菌である *Lactobacillus gasseri* YIT 12321 が MRSA に抑制的に作用すること, その成分が II 型バクテリオシンであることを明らかとしたことは, 今後の VAP 抑制のための有用な研究であると考えられる。

よって, 本論文は博士(菌学)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。