

Title	腸内環境の改善とプロバイオティクスが病原細菌に与える影響の解析
Author(s)	大野, 誠之
Citation	平成27年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2016
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54654
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

平成 27 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	おおの まさゆき 大野 誠之	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4年
ふりがな 共同 研究者名	もりおか れおん 森岡 怜音	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4年 年
アドバイザー教員 氏名	山口 雅也	所属	大学院歯学研究科口腔細菌学教室		
研究課題名	腸内環境の改善とプロバイオティクスが病原細菌に与える影響の解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				
<p>1 研究目的</p> <p>近年、腸内細菌叢と健康とのかかわりに関する研究が数多くなされ、健康なヒトとある種の疾患を持つ患者では腸内細菌叢に違いが見られることが分かってきた¹⁾。炎症性腸疾患などの腸内細菌と宿主の均衡が破綻することにより発症する疾患ではもちろん、肥満などの生活習慣病においても相違が認められる。このため腸内環境を健康なヒトのそれに近づけることにより疾患を予防・改善する方法が考案されてきており、プロバイオティクスや便移植はその一例である²⁾。プロバイオティクス製品は手軽に摂取することが可能である反面、一定量を日常的に摂取し続けなければならない。対して便移植では、健康な腸内細菌叢を効率的に獲得できるが、生活習慣病といった比較的軽度の疾患は適応ではない。そこで、健康な細菌叢における優位菌種、すなわち善玉菌の増殖に適した腸内環境の確立により、プロバイオティクスの効果をより高めたいと考えた。</p> <p>本研究では、善玉菌に分類されプロバイオティクスとして利用される <i>Bifidobacterium</i> 属および <i>Lactobacillus</i> 属の菌が、(A)いかなる環境において他菌群の成長を抑制し優位に増殖できるか、(B)生体への実際の影響はどのようなものかを実験にて明らかにすることを目的とした。善玉菌群の宿主や他菌群への影響を観察し、善玉菌の最適増殖環境を解明することで、将来的には“理想的”腸内環境獲得のための食生活をはじめとしたライフスタイルの提案を目指すことができる。</p> <p>2 研究計画</p> <p>1. <i>Bifidobacterium</i> 属および <i>Lactobacillus</i> 属菌の培養</p> <p>RIKEN バイオリソースセンターより標準株を購入し、培地に播種する。<i>Bifidobacterium</i> 属菌は偏性嫌気性菌のため、嫌気的環境下にて培養する。</p>					

2. 他菌群との混和・生存試験

他菌群として *Streptococcus* 属菌を用いる。善玉菌群が病原細菌を抑制できる最適な環境を検索するため、これらと善玉菌群とを濃度を変えて同じ BHI 培地にて培養する。各条件において培養前後の各菌の菌数を算出・比較する。

3 研究方法

1. *Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属菌の培養

培養したのは *Bifidobacterium longum subsp. longum* JCM1217 (以下 *B. longum*)、*Lactobacillus casei* JCM1134 (以下 *L. casei*)、およびエリスロマイシン耐性である M4 血清型 *Streptococcus pyogenes* strain 4063-05 pDCerm (以下 *S. pyogenes*) の 3 菌種である。

B. longum の培養には BHI 培地、*L. casei* には MRS 培地を用いた³⁾。

2. 他菌群との混和・生存試験

B. longum、*L. casei* および *S. pyogenes* を BHI 液体培地に植え継ぎ、37℃にて対数増殖期初期 ($OD_{600} = 0.1$) まで培養した。

(1) 菌体同士の混和実験

S. pyogenes と *B. longum* または *L. casei* をそれぞれ 9:1, 9:0.1, 9:0.01 の割合で混和し、37℃にて 3 時間培養した。PBS で希釈した菌液を BHI 寒天平板培地と、5 μg/ml エリスロマイシン含有 BHI 寒天平板培地にそれぞれ播種し、培養した。抗菌薬を含まない寒天培地で得られた菌数を総菌数、抗菌薬を含む培地で得られた菌数を *S. pyogenes* の菌数としてそれぞれの菌数を算定した。

また、コントロールとして *B. longum*、*L. casei*、および *S. pyogenes* のみを含む菌液も、培養開始時(以下 0 時間)と 3 時間後において PBS で希釈し、菌数を算定した。

(2) 菌体と菌上清の混和実験

L. casei と *S. pyogenes* の菌液をそれぞれ 20℃、12,500 rpm で 5 分間遠心し、上清のみ抽出して 0.2 μm のフィルター処理をすることにより培養上清を得た。そして *L. casei* 液と *S. pyogenes* 上清液とを 1:9 で混和したもの、*L. casei* 上清液と *S. pyogenes* 液とを 1:9 で混和したものの 2 サンプルを作製した。これらに加え、*L. casei* または *S. pyogenes* のみを含む菌液を、段階希釈し、菌数を算定した。

4 研究経過

1. *Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属菌の培養

L. casei および *S. pyogenes* は良好に発育したが、*B. longum* については BHI 寒天培地に播種すると生育できなかった。このため以下の実験は *L. casei* と *S. pyogenes* のみで行うこととした。

2. 他菌群との混和・生存試験

(1)菌体同士の混和実験

L. casei と *S. pyogenes* の混和実験の結果は以下のようになった(図 1)。

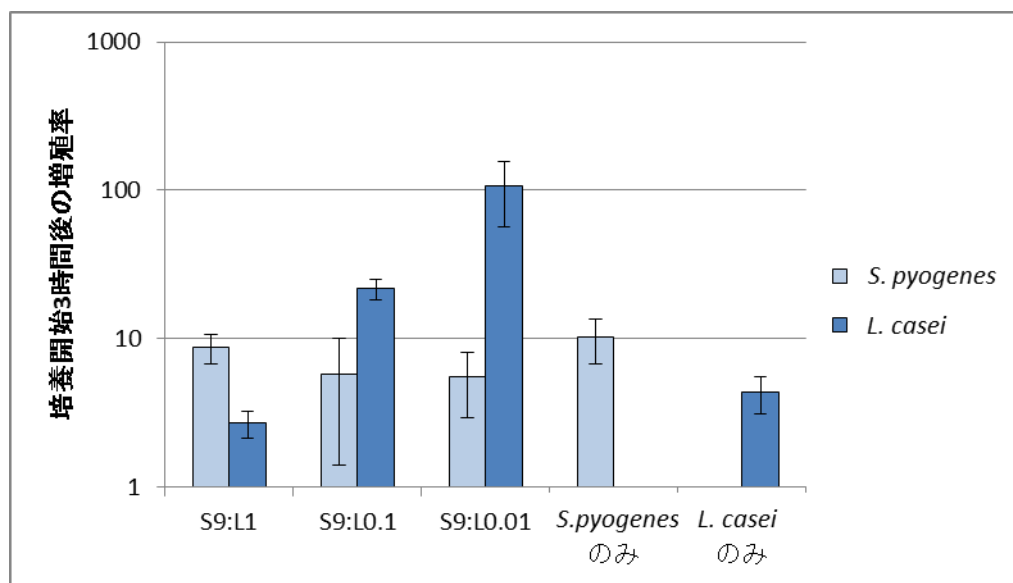


図 1 *L. casei* と *S. pyogenes* の混合培養による両菌の増殖率の変化(対数値)

なお S9:L1,S9:L0.1,S9:L0.01 はそれぞれ *S. pyogenes* と *L. casei* の混合比を表す。

L. casei の増殖率は、*L. casei* のみで培養した時より S9:L1の方がわずかに低下した。しかし S9:L0.1,S9:L0.01 と、菌液中の L 菌の含有率が下がるにつれて *L. casei* の増殖率が有意に上昇した。

対して *S. pyogenes* の増殖率は各サンプルでほとんど差は見られなかった。このことから、*L. casei* は *S. pyogenes* の増殖は促進も抑制もしないことが示唆された。

以上から、*L. casei* は相対的に *S. pyogenes* 濃度が高い周囲環境においてより増殖することが示された。考えられる機序として、*S. pyogenes* の分泌する菌体外物質が *L. casei* の増殖を促す、もしくは *S. pyogenes* 体自身もしくは菌体表層物質が *L. casei* の増殖を促す可能性が考えられる。そこで、次に示す実験(2)を行った。

(2)菌体と菌上清の混和実験

L. casei 体と *S. pyogenes* 上清、*L. casei* 上清と *S. pyogenes* 体の混和実験の結果は図 2 の通りである。

予想に反して、*L. casei* 単独よりも *S. pyogenes* 上清を混合した方が増殖率は低下した。

S. pyogenes の増殖率は *L. casei* 上清の存在に関わらずほぼ一定であった。

この結果から *L. casei* の増殖に *S. pyogenes* 上清は寄与しないと考えられる。

5 今後の目標

以上の結果から、*S. pyogenes* の菌体表層物質が *L. casei* の増殖に関与するかどうかを検証する必要があると考える。また、さらに温度や培地の pH、栄養素等のパラメータを変化させ、*L. casei* がより増殖できる環境を検索していきたい。

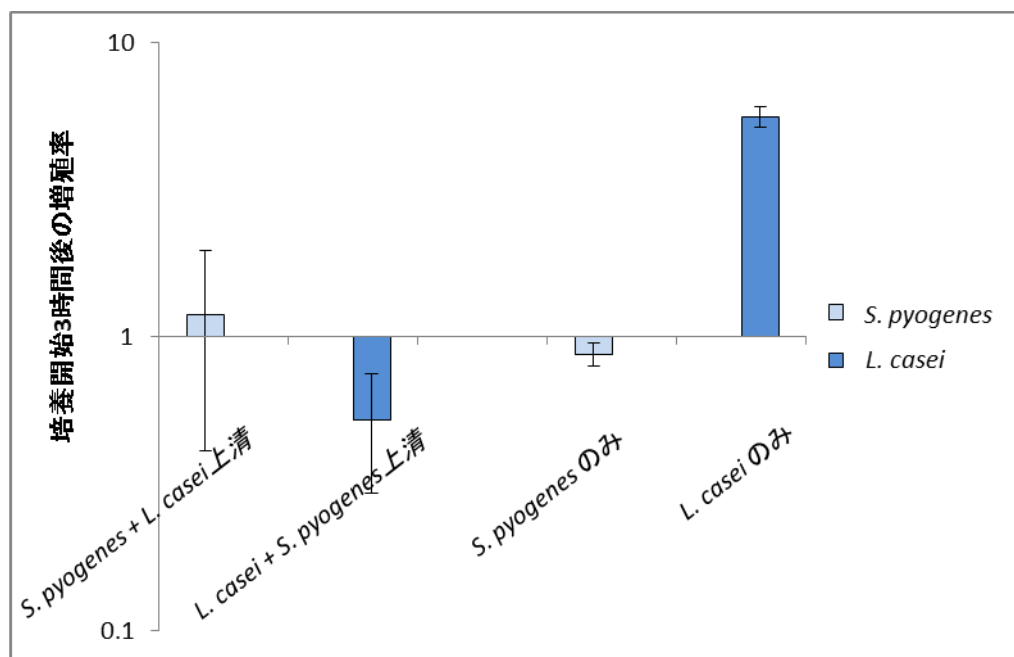


図2 *L. casei* と *S. pyogenes* の上清混合培養による両菌の増殖率の変化(対数值)

6 参考文献

- 1) 日本乳酸菌学会: 腸内共生系のバイオサイエンス, 京都大学学術出版会
- 2) 日本ビフィズス菌センター: 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 丸善出版
- 3) H. Mäkeläinen et al.: **Beneficial Microbes**, June 2010; 1(2): 139-148