

Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) に対する *Bifidobacterium breve* の抗菌活性と活性物質の精製

奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

井上 敦子

ANTI-MRSA ACTIVITY OF *BIFIDOBACTERIUM BREVE* AND ITS PURIFICATION

ATSUKO INOUE

Department of Otorhinolaryngology, Nara Medical University

Received March 30, 1994

Abstract: The staphylococci, known to be members of the normal flora of the nose, are sometimes involved in chronic sinusitis. Recently, non-chemotherapeutic approaches have assumed importance in the treatment of chronic staphylococcal infections, since the rapid emergence of resistance to commonly-employed antimicrobial drugs has made it difficult to eradicate resistant staphylococci such as a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from the lesion. Thus, the present study was done to show the antimicrobial activity of *Bifidobacterium breve* to MRSA isolated from a patient with chronic sinusitis.

Using MRSA resistant to acidic condition, MRSA could not survive after day 1 in the culture supernatant of *B. breve*, but in the control of 0.01 M phosphate-buffered saline containing tryptic soy broth of which pH was adjusted to 4.3, growth of MRSA was not affected. This anti-MRSA activity by the culture supernatants of *B. breve* is active only in the acidic condition under pH 4.5. But using tryptic soy soft agar containing 1% lactose, the activity was effective at pH 7.0. Purification of the active moiety from the culture supernatant of *B. breve* was done with ion exchange chromatography. Investigation of the main ingredient of the active moiety was done with the Anthron, Lowry, and Orcinol methods, and the absorption spectrum was calculated. The main component of the active moiety is considered to contain nucleotide and the molecular weight of the moiety will be around 8000. Our study is in progress to isolate the active moiety exhibiting anti-MRSA activity.

Therefore it may be possible to apply this anti-MRSA activity of *B. breve* for clinical use in future.

Index Terms

anti-MRSA activity, culture supernatant, *Bifidobacterium breve*

はじめに

慢性副鼻腔炎は、栄養状態や生活環境の向上にもな

い、化膿型のような重症例は近年減少傾向にあり、病態の軽症化が認められているが、未だ耳鼻咽喉科疾患のなかで約8%を占める重要な疾患である¹⁾。そして、嫌気性

培養など培養技術の向上という点も見逃せないものの、治療法の変遷により抗生物質の使用頻度が高まり、起因菌種の多彩化が見られるようになった。また、この疾患では内科的、外科的治療を行っても、その成果が判然としないこともあり、新しい治療概念を見いだすことも必要かと思われる。

一方、慢性副鼻腔炎上顎洞内貯留液中の検出菌は、他の疾患に比較し菌陰性例も62%²⁾と多く見られ、急性副鼻腔炎に比較すると常在菌以外に *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) の検出頻度は増加する傾向にあると言われている³⁾。

S. aureus の中で、methicillin resistant *S. aureus* (以下 MRSA) は、近年、多剤に耐性を示すものが増加し、本菌による感染症が成立すると治療の困難なことがあり、社会的にも注目されている⁴⁾⁵⁾。耳鼻咽喉科領域においては、MRSA は常在菌として存在する場合もあり、また、全身状態の良好な場合には本菌による感染症は、あまり重篤にならない場合が多いが、一度感染症が成立すると除菌が困難で難治であることが多く、院内感染などの感染源としての問題が生ずる。

そこで今回、筆者は病原性がなく、ある程度の抗菌作用を有し、腸内 normal flora を control する⁶⁾、と言われているビフィズス菌に注目し、この菌を常在菌感染症が多く、近年では、MRSA も検出される慢性副鼻腔炎⁷⁾ の治療に役立てることができないか、と考え、ビフィズス菌属の中の *Bifidobacterium breve* (以下 *B. breve*) と MRSA の混合培養で、MRSA のコロニー形成の発育阻止が認められ、さらに、この抗 MRSA 活性が、*B. breve* 培養上清に存在することを確認し、その活性物質について検討したので報告する。

材料および方法

1. 使用菌株

MRSA とビフィズス菌を用いた。MRSA は慢性副鼻腔炎患者鼻汁をウサギ血液寒天培地に塗布し得られた株を、さらに gradient plate 法により、ストレプトマイシン(以下 SM)にも耐性にした株①を2と5の1)の実験で使い、それ以後の実験では pH 4.3 の酸性状態でも増殖可能な株②を作成して用いた。ビフィズス菌は、ヤクルト社から提供された *B. breve* を用いた。

2. *B. breve* と MRSA の混合培養法

10倍希釈 tryptic soy broth (以下 TSB) 添加 0.01 M phosphate buffered saline (以下 PBS), 各 10 ml 中に *B. breve* 製剤の 1 g (1×10^9 cfu/g) を添加した生菌浮遊液と、対照として同量の *B. breve* を 60°C, 30 分間加熱し

た死菌液を作成し、各々に 10 μ l の MRSA 菌液 (2×10^8 cfu/ml) を接種し、11 日間混合培養した。毎日培養液の 1 ユーゼを Drigalski 寒天平板培地に塗布し、24 時間培養後、平板培地上の MRSA のコロニー数を計測し、Fig. 1 に示す規準に従い、経日的な MRSA のコロニー数にて活性を測定した。

3. *B. breve* の培養法

B. breve と MRSA の混合培養によって見られた *B. breve* の抗 MRSA 活性が、菌の直接作用によるものか、上清に含まれる菌からの代謝産物によるものか検索するため、種々の培養法による *B. breve* 培養上清を採取した。

1) galacto oligo saccharide (以下 TOS) PBS : 2:1 の 0.01 M PBS 溶液に 1% TOS と 10 倍希釈の TSB を混入させた溶液を濾過滅菌し、無菌試験の後、*B. breve* 製剤の 20 g を接種し、密封ボトル内で 72 時間培養し、12000 rpm, 40 分間遠心分離し、その上清を得た。

2) LOGOSA medium: ヤクルト社の方法により、ビフィズス菌特有の培地成分を作成し、auto clave にて滅菌した後、この溶液 1 l 中に *B. breve* 製剤の 1 g を接種し、ボトル内の空気を CO₂ に置換した状態で 24 時間培養した。この時点で菌の増殖を認めたため培養を中止し、12000 rpm, 40 分間遠心分離し、その上清を得た。

3) 10% skim milk : 10% skim milk 1 l 中に *B. breve* 製剤の 50 g を接種し、ボトル内の空気を CO₂ に置換した状態で 72 時間培養し、6000 rpm, 30 分間遠心分離を 2 回繰り返し、その上清を得た。

4) 超音波破碎: *B. breve* 製剤の 5 g を 20 ml の 0.01 M PBS (pH 4.3) に浮遊せしめ、3000 rpm, 10 分間遠心分離し、その沈査を超音波で菌体破碎し、その後、再び 300 ml の 0.01 M PBS (pH 4.3) に溶解し、6000 rpm, 20 分間の遠心で得られた上清をさらに、15000 rpm, 30 分間、遠心分離して菌体抽出液を得た。

4. pH 測定法

1) *B. breve* の培養上清の経時的 pH を BECKMAN 10 pH meter を用いて測定した。

2) 抗菌活性測定の際、乳酸およびリン酸 2 水素ナトリウムにて反応液の pH 調整を行なった。

5. 抗 MRSA 活性の測定

1) *B. breve* 培養上清の活性検索法

培養法 3 の 1) の *B. breve* 培養上清 1.8 ml に TSB 200 μ l を添加し、計 2 ml 中に MRSA 菌液 2×10^8 cfu/ml (100 μ l) を接種し、37°C で 24 時間反応させた。その 10 μ l を SM 添加 tryptic soy agar (以下 TSA) 平板培地に塗布し 24 時間培養後、Fig. 1 の規準に従い、TSA

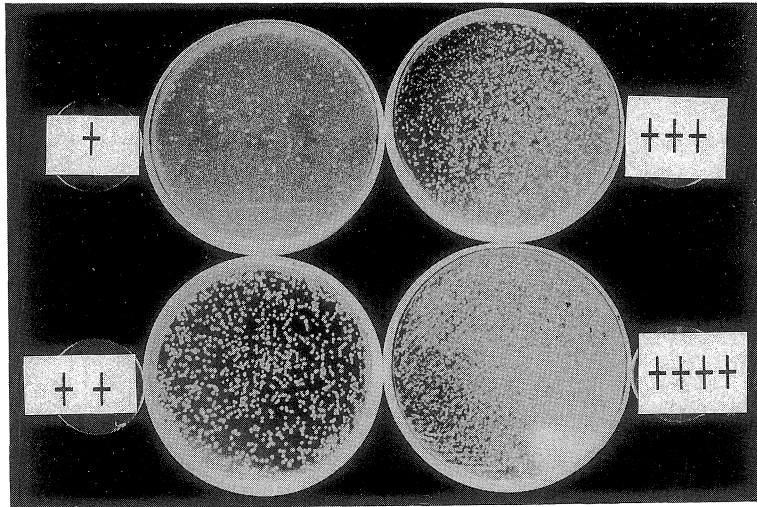


Fig. 1. MRSA colony count for the judgement of Anti-MRSA activity.

+ : 10^{1-2} , ++ : 10^{3-4} , +++ : 10^{5-6} , ++++ : 10^{7-8}

平板培地上の MRSA のコロニー数にて、定量的に活性の判定を行なった。対照は、同量の 0.01 M PBS(pH 4.3)に TSB 200 μ l を添加し、同量の MRSA を接種したものをを用いた。

2) 種々の培養法による *B. breve* 培養上清、および培養上清透析内液と外液の活性検索性

種々の培養法による *B. breve* 培養上清や培養法 3 の 1) の各々の透析内液と外液を採取し、pH 4.3 に調整し、HITACHI 100-10 spectrophotometer にて、波長 260 nm における吸光度を 1.0 ± 0.3 に調整後、その 100 μ l に、TSB 100 μ l を加え、計 200 μ l 中に MRSA 菌液 2×10^5 cfu/ml (20 μ l) を接種し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させた。その 10 μ l を SM 添加 TSA 平板培地に塗布し 24 時間培養後、Fig. 1 の標準に従い、TSA 平板培地上の MRSA のコロニー数にて、定量的に活性の判定を行なった。対照は、0.01 M PBS(pH 4.3)を用い、同量の TSB と MRSA を添加したものをを用いた。また、0.01 M PBS (pH 4.3)を用いて、倍数希釈系列を作成し、活性の強度も検討した。

3) pH の影響

MRSA は①の株を用い、*B. breve* は培養法 3 の 1) の培養上清につき、pH 4.3 と pH 7.0 に調整した上清および、対照として、pH 4.3 と pH 7.0 に調整した 0.01 M PBS を用いて上記の方法にて活性を検索した。

4) 耐熱性

B. breve 培養法 3 の 1) の培養上清につき、60 $^{\circ}$ C、30 分間および 100 $^{\circ}$ C、10 分間加熱処理し、抗 MRSA 活性を検

索した。また、-4 $^{\circ}$ C および -30 $^{\circ}$ C にて 2 カ月間保存した上清についても活性を検索した。対照として、0.01 M PBS(pH 4.3)を用いて上記の方法で活性を検索した。

5) 沈渣の分離

B. breve 培養法 1) の培養上清を YAMATO RE-41 rotary evaporator で濃縮時、TAIYO thermo minder mini-80 にて加温し 42 $^{\circ}$ C 以上で出現する白濁物質を遠心分離し、沈渣と残存上清につき、各 pH 4.3, conductivity 2000 に調整し、上記の方法にて活性を検索した。対照として、0.01 M PBS(pH 4.3)を用いた。

6) イオン交換クロマトグラフィー

経時的に、培養上清カラム通過貯留液を採取し、pH 4.3, conductivity 2000 に調整後、その 100 μ l に、TSB 100 μ l を添加し、計 200 μ l に MRSA 菌液 2×10^5 cfu/ml (20 μ l) を接種し、24 時間反応させた後、その 10 μ l を SM 加 TSA 平板培地に塗布し、24 時間、培養後、TSA 平板培地上の MRSA のコロニー数にて定量的に活性の判定を行なった。

対照として、2%炭酸アンモニウム溶液(pH 4.3)100 μ l と、TSB(pH 4.3)100 μ l の混合液、計 200 μ l を用いた。

培養上清希釈系列の作成は、0.01 M PBS(pH 4.3)を用いて、 $\times 2$, $\times 4$, $\times 8$, $\times 16$ まで各希釈した溶液 100 μ l に、TSB 100 μ l を各々添加した。対照の希釈系列も同様に、0.01 M PBS(pH 4.3)を用いて、 $\times 2$, $\times 4$, $\times 8$, $\times 16$ 希釈まで各々希釈した溶液 100 μ l に、TSB 100 μ l を添加した。各々の溶液に、MRSA 菌液 2×10^5 cfu/ml (20

μl)を接種し、37°Cにて24時間反応させ、その10 μl をSM添加 TSA 平板培地に塗布し、24時間培養後、TSA 平板培地上の MRSA のコロニー数にて、定量的に活性の判定を行なった。

6. 抗 MRSA 物質の精製について

培養法 3 の 1) の培養上清につき精製を試みた。

1) 透析: 18/32 の透析膜を用い、培養上清 20 ml を 400 ml の蒸留水に透析し、透析内液および外液の抗 MRSA 活性を上記の方法で検索した。

2) 加温時出現する白濁物質の除去: *B. breve* 培養上清を TAIYO thermo minder mini-80 恒温槽にて加温し、42°C 以上になった時点で生ずる白濁物質を、あらかじめ 60°C に温めたローターを用い、6000 rpm, 30 分間の遠心分離で回収した沈査と上清の抗 MRSA 活性を検索した。

3) 濃縮: 沈査除去後の残存する *B. breve* 培養上清を rotary evaporator で約 6 倍に濃縮した。

4) イオン交換クロマトグラフィー: 直径 2 cm, 長さ 30 cm のカラム内に、pH 4.3 に調整した 0.01 M PBS で平衡化した陰イオン交換体 DEAE Sephadex A-25(ファルマシア社)を充填し、6 の 3) の方法にて得られた培養上清 20 ml を 200 ml の 0.01 M PBS(pH 4.3)で希釈した後、このカラムを通過させて、吸着させ、150 ml の 0.01 M PBS にて洗浄後、2%炭酸アンモニウム溶液 90 ml にて溶出させた。培養上清添加吸着時のカラム通過液を A、その後、PBS にて洗浄した際のカラム通過液を B、2%炭酸アンモニウム溶液を添加した際のカラム通過液を C とし、各々の活性を検索した。第一に、この活性物質は透析性であり、第二に、炭酸アンモニウム溶液は、乾燥させることにより、完全に除去できるため、今回、溶出液として炭酸アンモニウム溶液を用いた。

次に、C につき、さらに精製するため、再度同量の培養上清溶解液を添加し、150 ml の 0.01 M PBS にて洗浄後、200 ml の 0.2~2% の濃度勾配の炭酸アンモニウム溶液にて溶出させ、その溶出液を fraction collector にて 5 ml ずつ採取し、pH 4.3 に調整後、各々の活性を検索した。

次に、各々の fraction について、波長 260 nm における吸光度を測定した。

活性の認められた画分について、さらに希釈系列を作成し、活性の強度を検討した。活性の強度は、各希釈倍数時の TSA 平板培地上の MRSA のコロニー数の各希釈倍数時の対照液中のコロニー数に対する割合の平均(a)を算出し、 $100-a \times 100(\%)$ にて活性の強度を表示した。

5) 濃縮: イオン交換クロマトグラフィーにて精製された活性の見られた各々の fraction の吸光度スペクトラム曲線に差異を認めなかったため、同様の物質と考え、これらを集め、rotary evaporator にて濃縮し完全に乾燥して炭酸アンモニウムを完全に除去した後、5 ml の蒸留水に溶解、上記の方法で tryptic soy soft agar(以下 TSSA)内に添加して活性を検索した。

7. 抗 MRSA 物質の成分検索法

1) HITACHI U-3210 spectrophotometer にて、*B. breve* 培養上清の吸光度スペクトラムを計測した。

2) 化学成分は、Anthrone 法⁹⁾にて還元糖を、Lowry 法⁹⁾にて蛋白成分を、Orcinol 法¹⁰⁾にて核酸物質を検索した。

8. 臨床応用

1) TSSA を用いた実験

臨床応用の第一歩として、溶液全体の pH を下げずに活性を発揮できる方法を考慮した。まず、MRSA 菌体周辺の微小空間における pH のみを低下させるため、乳糖を添加した。また、硝酸ナトリウムを TSSA 内に添加することにより、亜硝酸ナトリウムに還元されて試験管底部まで好氣的条件になり、TSSA 内の MRSA のコロニーの大きさの一定化に役立った。これらを添加した TSSA を用いて、crude な *B. breve* の培養上清および *B. breve* の培養上清精製濃縮液につき、活性を検索した。

TSSA(0.5% agar)に乳糖 1%, 硝酸ナトリウム 0.1% を加え、autoclave にて滅菌し、50°C に保温しながら各々 4.5 ml ずつ試験管に分注した。その 1 本に、crude な *B. breve* の培養上清 0.5 ml を添加し計 5 ml とし、よく振盪した後、MRSA 1×10^4 cfu/ml(20 μl)を接種した。対照は、同上の TSSA 4.5 ml に、0.5 ml の 0.01 M PBS(pH 4.3)を添加し、同量の MRSA を接種した。希釈系列は、0.01 M PBS(pH 4.3)を用いて $\times 2, \times 4, \times 8, \times 16$ 希釈まで希釈系列を作成し、各々、同上の TSSA 4.5 ml に添加し、同様に MRSA を接種した。その後 37°C, 48 時間培養し、試験管内のコロニー数にて判定した。

2) 点鼻療法

モルモットの一侧鼻腔内に、0.01 M PBS(pH 7.0)10 ml 中に接種した 1 g の *B. breve* 製剤の 100 μl を接種し、3 日後に両側鼻粘膜を採取した。また、*B. breve* 培養上清(pH 4.0)100 μl を別のモルモットの一侧鼻腔内に注入し、同様に 3 日後鼻粘膜を採取した。採取された標本は 10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋し、ヘマトキシリンエオジン染色し、光学顕微鏡(以下光顕)にて観察した。

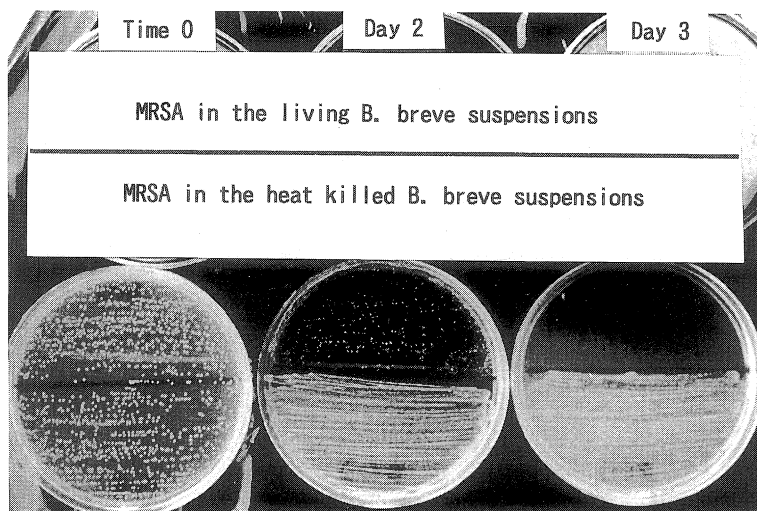


Fig. 2. The kinetics of anti-MRSA activity of *B. breve*.

The plate is divided into upper side and lower side, the upper half of each plate is demonstrating a decrease in the number of MRSA with time, in the bacterial suspensions of living *B. breve* and the lower one is demonstrating the absence of the anti-MRSA activity of heat killed *B. breve*.

結 果

1. *B. breve* の抗 MRSA 活性の測定

1) *B. breve* と MRSA の混合培養における抗 MRSA 活性

MRSA は、使用菌種①の株を用い、培養 2 日後から *B. breve* 生菌液中の MRSA はコロニーの形成障害が認められたが、*B. breve* 死菌液中では MRSA は増殖した (Fig. 2).

2) *B. breve* 培養上清における抗 MRSA 活性

B. breve 生菌の上記の抗 MRSA 活性の由来につき検索するため、まず、方法 3 の 1) に記載した方法で *B. breve* 培養上清を採取し、抗 MRSA 活性を検索した。

a) *B. breve* 培養上清 (pH 4.0) の活性

①の株を用い活性の検索を行なうと、培養法 3 の 1) の *B. breve* 培養上清中 (pH 4.0) では 1 日後から MRSA はコロニーの形成が認められなくなり、活性は、*B. breve* 菌そのものの作用より、培養上清の成分であると考えられた。

b) *B. breve* の培養上清の pH について

培養法 3 の 1) の培養上清の pH は、1 日後は 5.5、2 日後は 4.0 であり、それ以後は、4.0 で安定していた (Fig. 3).

c) 耐熱性

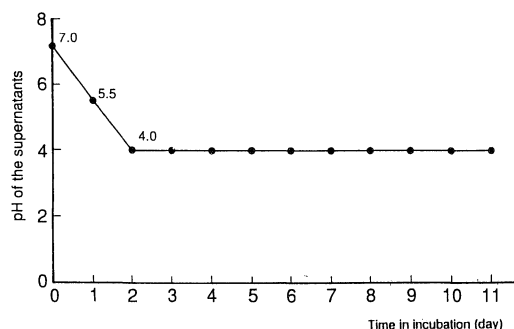


Fig. 3. pH change of the culture supernatants of *B. breve*. At the starting time it was 7.0, but after day 1, it was reduced to 5.5, and after day 2, it was reduced to 4.0, then it remained stable.

B. breve の培養上清の 60°C 30 分間および 100°C 10 分間加熱した後の活性に低下は認められなかった。また、-4°C および -30°C にて 2 カ月間保存した上清も活性の低下は認められなかった。

d) pH による差異

この抗 MRSA 活性の機序が、*B. breve* 培養上清の pH の作用によるということも念頭に置き、種々の pH における抗 MRSA 活性を検索した。

i) MRSA の①の株について

種々の pH における抗 MRSA 活性は、培養法 3 の 1) の *B. breve* 培養上清(pH 4.3 adjusted)では培養 1 日後から *B. breve* 生菌液中の MRSA はコロニーの形成は認められなくなった。対照液中(pH 4.3)の MRSA は、培養 2 日後からコロニーの形成は、認められなくなった。しかし、pH 7.0 に調整した *B. breve* 培養上清および対照液中では、MRSA は増殖した。つまり、対照液中(pH 4.3)では、*B. breve* の培養上清中より、MRSA のコロニー形成障害に、より多くの時間を要した。また、上清を pH 7.0 にした場合は抗菌活性は見られず、酸性状態(pH 4.5 以下)でのみ有効であった(Table 1)。

ii) MRSA の②の株について

B. breve の培養上清中(pH 4.3)では、培養 1 日後から、MRSA はコロニーの形成が認められなくなった。対照液中(pH 4.3)では、MRSA は増殖した(Table 2)。

e) 培養法による差異

B. breve の培養上清中の抗 MRSA 物質を得るための最良の条件を検索するため、種々の培養法にて、*B. breve* の培養上清を採取し、MRSA は、②の株を用いた。培養

法 1) ~ 4) の培養上清および各々の希釈系列の抗菌活性の結果は、×1 では、1) ~ 3) の培養上清に活性が認められたが、4) には活性は認められなかった。希釈系列では、1) は×4 まで活性が認められたが、2) は×1 のみ、3) は×2 までであり、1) の活性が最も強かった(Table 3)。

2. 抗 MRSA 物質の精製について

B. breve の培養上清中の抗 MRSA 物質の精製のため、以下の手法で精製を試みた。

1) 透析

活性の強かった *B. breve* 培養法 1) の培養上清を透析し、透析外液、および内液の活性検索では、透析外液に×4 まで活性が認められ、透析内液は、×2 まで活性が認められたが、×4 では活性は認められず、透析外液の活性の方が強かった。しかし、透析前の活性(Table 3)に比較し、活性の上昇は認められなかった(Table 4)。

2) 加温時出現する白濁物質の除去

同様に *B. breve* の培養法 1) による培養上清について、この培養上清の加温時出現する白濁物質と残存上清について活性を検索した結果、残存上清の活性の方が強く認められた(Table 5)。この白濁物質は 42℃ 以上になると生じ、冷却により溶解し、可逆性のものであった。

3) イオン交換クロマトグラフィー

上記の方法で濃縮した残存上清の経時的カラム通過貯留液のうち、A、B には活性は認められなかったが C の 2% 炭酸アンモニウム溶液にて溶出された画分には活性が認められた(Table 6)。再度、残存上清をカラムに添加し、0.2% ~ 2% の炭酸アンモニウム溶液の濃度勾配にて溶出させ、fraction collector で 5 ml ずつ採取した各 fraction 1 ~ 40 のうち、27 ~ 31, 33 ~ 37 に活性が認められ、希釈系列の活性の結果から各々の活性の強度を Fig. 4 に図示した。

3. *B. breve* 培養上清の成分検索法

1) 吸光度スペクトラム

B. breve 培養上清加熱時に出現する沈査を除去した、残存上清の吸光度スペクトラムは、200 nm 付近に高いビ

Table 1. The Anti-MRSA activity of the culture supernatant of *B. breve* at several pH

Time (Day)	Supernatant of living <i>B. breve</i>		controls	
	pH4.3	pH7.0	0.01M PBS pH4.3	0.01M PBS pH7.0
Time 0	+	+	+	+
Day 1	-	+++	+	+++
Day 2	-	++++	-	++++

Table 2. The Anti-bacterial activity of the culture supernatant of *B. breve* to MRSA which is resistant to acidic condition

Time (Day)	Supernatant of living <i>B. breve</i> (pH4.3)	control (pH4.3)
Time 0	+	+
Day 1	-	+++
Day 2	-	++++

Table 3. The Anti-MRSA activity of the culture supernatants of *B. breve* which cultured by several methods, and the activity of each dilution (Time 24)

	control	①0.01MPBS	②LOGOSA medium	③10% skim milk	④crushed by ultrasonic waves
×1	+	-	-	-	+
×2		-	+	-	++
×4		-	++	++	++
×8		+	++	+	++
×16		+	++	+	++

Table 4. The anti-MRSA activity of outer and inner fluids of dialyzed *B. brevis* supernatant (Time 24)

	Control	inner fluids	outer fluids
×1	+	-	-
×2		±	-
×4		+	±
×8		++	±
×16		++	+

Table 5. The anti-MRSA activity of the sediment appearing upper 42°C and its residue supernatant. The activity was seen in both, but the activity of the residue supernatant was stronger (Time 24)

	Control	sediment	residue supernatant
×1	+	-	-
×10		+	-
×100		+	+

Table 6. The activity of the pooling solutions which passed through the column. The activity was seen in the C solution which was eluted by 2% ammonium carbonate

Time (Day)	Control	A (apply supernatant)	B (apply PBS)	C (apply ammonium carbonate)
Time 0	+	+	+	+
Day 1	+++	+++	++	-

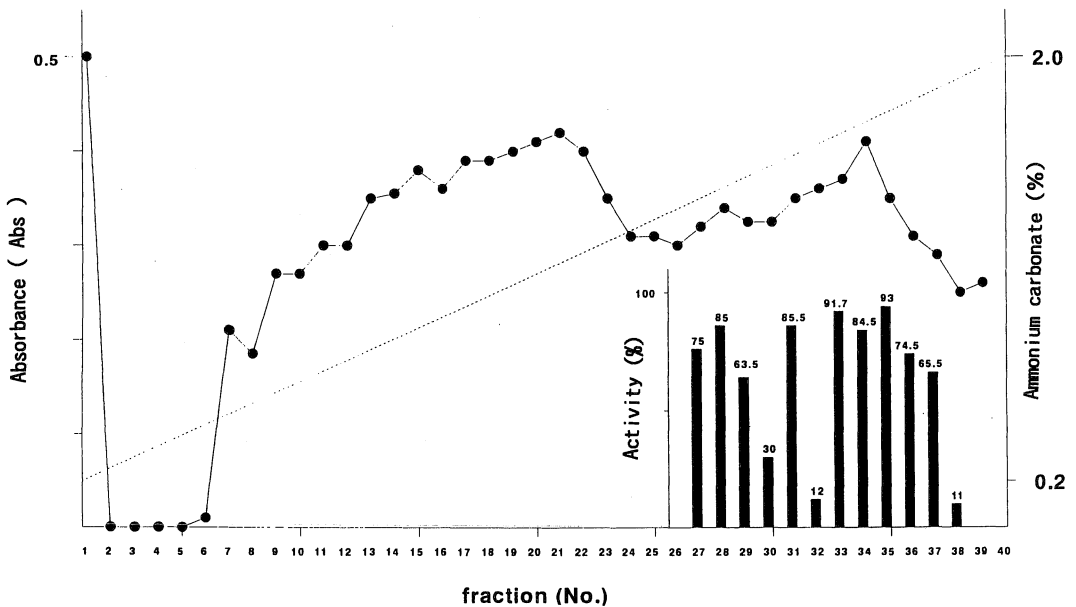


Fig. 4. The absorbance at 260nm of each fraction eluted by ammonium carbonate. Two peaks of absorption were seen. The activity was seen in the second peak.

ークが認められ、260~270 nm に緩やかなピークが認められた (Fig. 5).

2) 成分検査法

Anthron 法陽性、Lowry 法陰性、Orcinol 法陽性であった。

4. 臨床応用

1) TSSA を用いた実験

crude な *B. brevis* 培養上清および *B. brevis* 培養上清精製濃縮液の TSSA 内での活性は、crude な *B. brevis* 培養上清を 10% に添加したものおよび対照には活性は認められなかった。しかし、精製された *B. brevis* の培養上清を 10% 添加したものでは、完全にコロニーの形成が認められなくなり、希釈系列では 5% 添加したのものにも対照との間に明かな差が認められた (Fig. 6).

2) モルモット鼻腔内に対する点鼻療法

各々、一側鼻腔内に *B. brevis* の菌液または、培養上清を接種したモルモットの 3 日後の両側鼻粘膜を採取し光

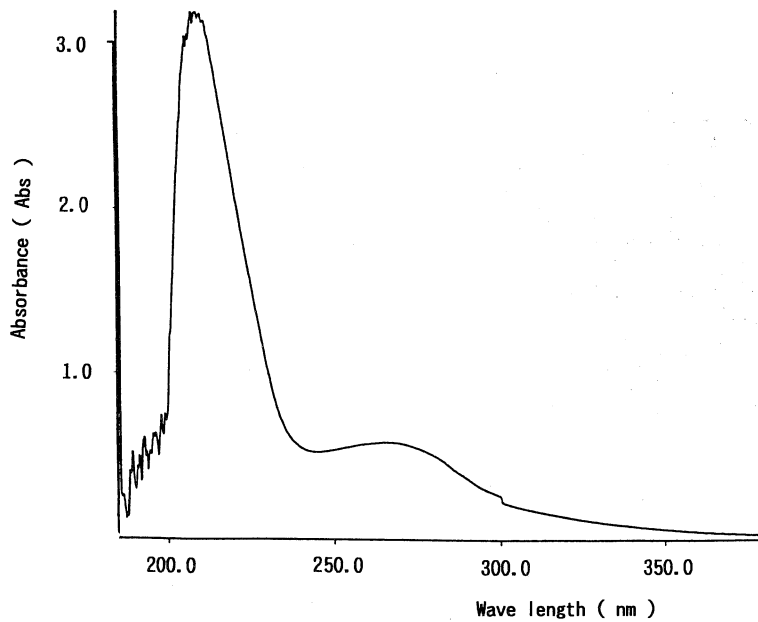


Fig. 5. The absorption spectrum of culture supernatant of *B. breve* exhibits a broad band in the 260~270nm region, and an intense band around 200 nm.

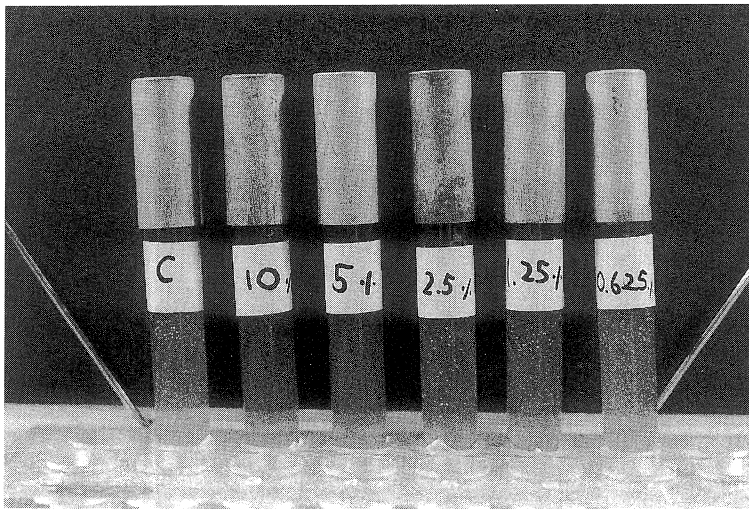


Fig. 6. The activity of purified supernatant of *B. breve*.
The activity was seen down to 5% of the purified supernatant.

顕的に観察したが、明らかな粘膜障害は認められなかった(Fig. 7).

考 察

MRSA を含め、*S. aureus* は、よく鼻前庭部、外耳道、

手指などに常存しているが¹¹⁾¹²⁾、近年、MRSA による感染症は社会的問題にまで発展し、一般的には非常に恐れられている菌種である。耳鼻咽喉科領域においては、全身状態の良好な場合、MRSA による感染症は、あまり重篤にならない場合が多いが、除菌の困難なこともあり、

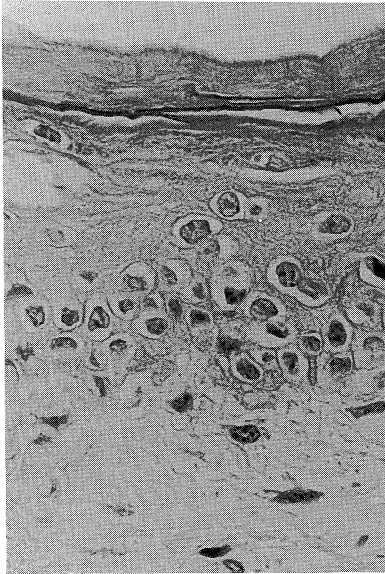


Fig. 7. The nasal mucosa of a guinea pig which was applied the supernatant of culture *B. breve* suspension (Day 3).

また手術後や compromised host などの抵抗力の低下している症例では、警戒しなければならない菌種でもある。一方、乳酸菌のなかのピフィズス菌は、人体に病原性がなく、腸内の normal flora を control し、ある程度の抗菌作用を有すると言われている⁹⁾。乳酸菌の中には、種々の抗菌性物質を産生するものもあり、いくつかの報告がある。Lactobacillus 属からは、Lactocidin¹³⁾、Acidophilucin A¹⁴⁾、Acidolin¹⁵⁾、Lactolin¹⁶⁾、Lactocin¹⁷⁾¹⁸⁾などの抗菌性物質が産生されることが報告されている。また、Streptococcus 属からは、Nisin¹⁹⁾²⁰⁾、Diplococcin²¹⁾が報告されている。また、Nadia²²⁾は、*Lactobacillus bulgaricus* から産生される抗菌性物質の精製も試みており、芳香属を含む分子量 700 以下の物質であろうと推定している。また、Susan²³⁾は、*Lactobacillus acidophilus* から産生される Lactacin B について分子量約 100,000 であろうと報告している。しかし、Bifidobacterium 属の産生する抗菌性物質についての報告は少なく、Anaud²⁴⁾らの *Bifidobacterium bifidum* の産生する Bifidin のみで、*B. breve* に関しては、そのような酸以外の抗菌性物質の産生についての報告はされていない。

そこで今回、常在菌感染症の多い耳鼻咽喉科領域感染症の中でも特に慢性副鼻腔炎に対し、新しい観点から、腸内 normal flora を control すると言われる *B. breve* を将来臨床的に利用できないか、と考えた。現在も MRSA は臨床の場において増加しており、これを阻止す

るため、この *B. breve* を用いて検討してみた。まず、*B. breve* と MRSA を混合培養し、MRSA のコロニーの形成が不可となることを認め、またそれが *B. breve* の培養上清中に存在する pH 以外の作用によるということを見だし、その抗 MRSA 活性につき、種々の検討を行った。

通常、臨床材料から検出される MRSA は、pH 4.3 の条件では長く生存できない株が多い。このような株を使用した場合、pH 4.3 の対照液中で incubate すると、2 日後にはコロニーの形成障害が認められる。しかし、pH 4.3 の *B. breve* 培養上清中では、すでに 1 日後にコロニーの形成障害が認められる。後半の実験では、この差を明らかにするため、pH 4.3 の酸性状態でも増殖できる株を使用した。この株を使用すると、pH 4.3 の対照液中では菌の増殖が認められるが、同じ pH 4.3 の *B. breve* 培養上清中では、1 日後にコロニーの形成障害が見られた。このことから、菌から産生される酸による pH 低下作用以外の抗菌活性物質が存在すると思われる、この活性物質につき、さらに検討した。

B. breve を種々の方法で培養し、活性物質を得るのに最適な方法および培養時間を検索した。今回の実験では、*B. breve* 特有培地で 24 時間、培養し、菌を積極的に増殖させたものよりも、0.01 M PBS 内にて *B. breve* を 72 時間、培養した培養上清の活性の方が、より強力であった。このことから活性物質は、24 時間培養では不十分で、72 時間培養の方が良い、と思われた。また培養せず、対照液に接種した *B. breve* の菌体を超音波にて破碎し菌体内成分を抽出させた溶液には活性は認められなかった。このため、この活性物質は、培養して初めて得られる菌由来の代謝産物と考えられた。Nadia²²⁾は、*Lactobacillus bulgaricus* から産生される抗菌性物質を採取する際、10 % skim milk にて 5 % の菌を 96 時間培養している。そこで、我々も、この方法で *B. breve* を 72 時間培養し、培養上清を採取したが、0.01 M PBS 内にて *B. breve* を 72 時間培養した培養上清の活性の方が、より強力であった。これらの結果から、この菌の場合、活性物質を得るのに最適な方法および培養時間は、0.01 M PBS 内にて *B. breve* を 72 時間、培養するのが良いと考えられた。

Shahani²⁵⁾らの報告した、acidophilin は、5℃にて 30 日間は安定であったと報告している。また、Reddy²⁶⁾らは bulgarican について、室温にて 9 日間安定だったと報告している。Anaud²⁴⁾らの報告した Bifidin は、100℃にて 30 分間、4℃にて 3 カ月以上経過しても活性の低下は見られていない。また、Susan²³⁾の報告した Lactacin B は、100℃、60 分でも耐熱性であったと報告している。本

邦では、戸羽¹⁴⁾は、Acidophilucin A について、50℃10 分間の加熱には安定だが 70℃10 分間の加熱で失活すると報告している。今回の報告で認められた抗 MRSA 物質も同様に耐熱性で、耐冷性であり、60℃、30 分間、100℃、10 分間、4℃および-30℃にて 2 か月以上経過しても活性の低下は認められなかった。

また、活性の認められなかった *B. breve* の菌体を培養せずに超音波にて破碎し得られた、菌体内成分を含む溶液中にも、42℃以上にて白濁が出現し、冷却時溶解する、という可逆性物質が観察された。そこで、この物質と活性には直接の関連性は少ない、と思われた。また、この白濁物質と残存上清の分離は難しく、本研究では、60℃に加温したローターを用いて、白濁したままの状態で遠心分離したが、完全に分離するのは難しいと考えられた。また、活性は認められなかったが、*B. breve* 上清中の加温時、白濁するという、この興味深い物質については、さらに検索してゆきたい。

活性物質の精製について、透析にて、透析外液に主な活性が認められたが、活性の上昇は認められず、かえって活性の強度は低下した。また、透析内液にも弱い活性が認められたことより、この抗 MRSA 物質は、透析膜の間をぎりぎり通過する分子量(約 8000 前後)のもの、と考えられ、透析することにより、一部は透析膜の間に挟まれて損失し、活性の上昇が認められなかったのだろう、と考えられた。そこで、透析以外にイオン交換クロマトグラフィーによる精製を試み、pH 4.3、0.01 M PBS にて平衡化した DEAE Sephadex A-25 を使用することで活性物質の精製に成功し、活性の上昇を認めた。

活性物質の成分の検索について、吸光度スペクトラムにて、200 nm 付近に大きなピークがあり、260~270 nm にもピークが認められた。このことから、この物質は芳香族を含んでおり、Orcinol 法陽性という結果からも、ヌクレオチドを多く含む物質である、と推定された。

臨床応用に関して、モルモットの鼻腔内に *B. breve* を接種しても、光学的に粘膜障害は認められないものの、この菌の常在場所ではないため、定着させるのは容易ではないと思われた。また木村²⁷⁾は、薬物の鼻粘膜吸収は、分子量に依存し、分子量 1000 以下のものは、極めて吸収が良好であるのに対して、それ以上では、吸収率の低下が見られると報告している。本研究での、この抗 MRSA 物質は分子量約 8000 と考えられるため、現時点では、この上清を直接点鼻しても分子量の点からは効果は認められないと考えられた。次に試験管内にて in vivo 様の状態として、TSSA(0.5% agar pH 7.0)を作成した。一般に、人鼻粘膜線毛運動は pH 6 以下で停止すると言われ

ている²⁸⁾が、現在検索している抗 MRSA 物質は、pH 4.5 以上では、活性は認められない。そこで、TSSA(pH 7.0)内に 1%乳糖を加えると、TSSA 全体の pH を下げずに、接種された MRSA が菌周囲の乳糖を分解することにより、MRSA 周囲のみ pH を下げ、活性が発揮されるのではないかと考えられた。まず、crude な *B. breve* 培養上清を TSSA に添加した場合、活性は認められなかったが、イオン交換クロマトグラフィーにて精製された活性物質を含む溶液を同量添加すると、TSSA 全体の pH は下げずに、MRSA のコロニーの形成障害を認めることができた。この結果をワンステップとして臨床応用の可能性も追求してゆきたい。また、TSSA 内に硝酸ナトリウム 0.1%を加えると、亜硝酸ナトリウムに還元されることにより、試験管底部まで好氣的条件になるため、MRSA のコロニーの大きさの一定化に役立った。

また、他菌種に対する抗菌活性、動物による毒性実験、詳細な成分検索や電顕的な菌の形態変化の観察による抗菌的作用機序の解明は、今後の問題である。

ま と め

1. *B. breve* と MRSA の混合培養で MRSA のコロニー形成の発育阻止を認めた。
2. *B. breve* 培養上清中に pH の作用以外に抗 MRSA 活性物質の存在が認められた。
3. 活性物質は、開始 buffer を酸性にして conductivity を下げることにより、陰イオン交換体に吸着され、2%炭酸アンモニウム溶液にて溶出された。
4. 抗 MRSA 活性は、pH 4.5 以下の酸性状態でのみ発揮された。
5. 成分検索法の結果から、活性物質は分子量約 8000 で、ヌクレオチドを多く含むと考えられた。
6. 臨床応用について、精製後の活性物質を用いると 1%乳糖を TSSA に添加することにより、TSSA 全体の pH は 7.0 でも活性が認められ、また鼻粘膜に対する障害もなく臨床応用の可能性も示唆された。

稿を終えるに臨み、始終懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った恩師、松永 喬教授ならびに本学細菌学教室 榎葉周三教授および第 2 解剖学教室 山本浩司教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に御助言、ご協力を頂いた 兵 行和非常勤講師、本学細菌学教室 喜多英二助教授、耳鼻咽喉科学教室ならびに水野文子先生、奥 大介先生を始め、細菌学教室の諸先生方に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は、第 32 回日本鼻科学会および第

245 回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会にて発表した。

文 献

- 1) Ogino, S., Harada, T., Okawachi, I., Irifune, M., Nagano, T. and Matsunaga, T.: Aspirin-induced asthma and nasal polyp. *Acta Otolaryngol. (Suppl.)* **430**: 21, 1986.
- 2) 石田 稔, 荻野 仁, 松永 享, 堀 哲二, 林 治博: 副鼻腔貯留液および粘膜表層上に認められた検出菌について. *日耳鼻*. **86**: 1455, 1983.
- 3) 馬場駿吉: 上気道感染症の成立機序とその臨床. *日耳鼻*. **90**: 1713, 1987.
- 4) 菅野治重: MRSAの予防と治療. *Medicament News* **1403**: 1, 1993.
- 5) 中村 徹, 大水幸雄, 上原信之, 植野佳子: MRSAの検出状況とFMOXおよび他薬剤の感受性試験. *基礎と臨床* **25**: 1665, 1991.
- 6) 馬田三夫: ビフィズス菌と人の健康. ビフィズス菌の科学. ヤクルト本社, 東京, p69, 1988.
- 7) 寺菌富朗, 大島 渉, 灸 俊之, 中尾美穂, 竹上永祐, 紀平晋也, 竹内泰子: 当科におけるMRSA検出の動向. *日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌*. **9**: 117, 1991.
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randail, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265, 1951.
- 9) 山本 章: 脂質の分別および純化法. *生化学実験講座* 3. 東京化学同人, 東京, p41, 1975.
- 10) Winzler, R. J.: *Methods of biochemical analysis*. Interscience **2**: 279, 1955.
- 11) Na'was, T. and Fakhoury, J.: Nasal carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by hospital staff in north Jordan. *J. Hosp. Infect.* **17**: 223, 1991.
- 12) 馬場駿吉: 耳鼻咽喉科領域の感染症—その細菌検査における留意点. *臨床検査MOOK* 8. 金原出版, 東京, p96, 1981.
- 13) Vincent, J. G., Veomett, R. C. and Riley, R. F.: Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* **78**: 477, 1959.
- 14) 戸羽隆宏, 吉岡恵美子, 伊藤敏敏: Acidophilucin A, *Lactobacillus acidophilus* LAPTI 060 により生産されるバクテリオシン. 第83回日本畜産学会講演要旨. p85, 1990.
- 15) Hamdan, I. Y. and Mikolajcik, E. M.: Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Antibiotics* **27**: 631, 1974.
- 16) 児玉礼次郎: 乳酸菌に関する研究第2報. 乳酸菌の生産する新抗菌性物質 Lactolin について. *J. Antibiotics* **5**: 72, 1952.
- 17) Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W.: Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 722, 1976.
- 18) Upreti, G. C. and Hinsdill, R. D.: Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**: 139, 1975.
- 19) Hurst, A.: Interaction of food starter cultures and food-borne pathogens: the antagonism between *Streptococcus lactis* and sporeforming microbes. *J. Milk Food Technol.* **35**: 418, 1972.
- 20) Mattick, A. T. R. and Hirsch, A.: A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature* **154**: 551, 1944.
- 21) Oxford, A. E.: Diplococcin, an antibacterial protein elaborated by certain milk streptococci. *Biochem. J.* **38**: 178, 1994.
- 22) Nadia, A. B., Natholyn, D. H. and Randolph, L. R.: Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food. Sci.* **52**: 411, 1987.
- 23) Susan, F. B. and Todd, R. K.: Detection and activity of Lactacin B, a Bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1808, 1983.
- 24) Anaud, S. K., Srinivasan, R. A. and Rao, L. K.: Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-II. *Cult. Dairy Prod. J.* **6**: 21, 1985.
- 25) Shahani, K. M., Vakil, J. K. and Kilara, A.: Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. II. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. *Cult. Dairy Prod. J.* **12**: 8, 1977.
- 26) Reddy, N. S. and Ranganathan, B.: Preliminary studies on antimicrobial activity of *Streptococcus lactic* subsp. *diacetylactis*. *J. Food. Prot.* **46**: 222, 1983.

- 27) 木村聰城郎：医薬品の新しい投与経路(3) 鼻粘膜からの薬物吸収. クリニカルファーマシー 5: 46, 1989.
- 28) 長谷川寛治：各種ガス体及び細菌毒薬の気管粘膜線毛運動に及ぼす影響. 気食会報. 27: 270, 1976.