

アクネ桿菌 (*Propionibacterium acnes*) などの 皮膚常在菌代謝産物の解析

広島大学大学院医系科学研究科

松 浪 勝 義

Propionibacterium acnes is a Gram-positive anaerobic rod-shaped bacteria found on the skin and in the intestinal tract. It is widely known as the causative agent of acne vulgaris, but has recently attracted attention for its involvement in pustulosis, prostatitis, hyperostosis, synovitis, sarcoidosis (granuloma), and implant-related infections. Therefore, it is an important issue to clarify what mechanisms influence pathogenesis. In this study, we investigated the cytotoxicity of culture extracts obtained under various culture conditions together with *Staphylococcus aureus* against human skin-derived fibroblast cell line KMST-6. The results showed that the cytotoxicity of the culture extracts varied depending on the culture medium. For example, *S. aureus* was active in LB and MH media, but not in GAM and BHI media, which suggests that the culture conditions, including the culture medium, are important in the study of metabolites. As no significant differences were observed in TLC and LC-MS analyses, it is possible that the compounds that are primarily responsible for the activity are trace amount that is difficult to isolate and purify, or that the difference in activity is not dependent on a specific compound but on the overall activity of various compounds such as lipids that have weak activity. However, as observed in the co-culture in LB medium, the activity was stronger in the co-culture than in the monoculture, this observation may provide an interesting feature for future research on the interaction of these indigenous skin bacteria.

1. 緒 言

ヒトの皮膚表面には皮膚常在菌と呼ばれる細菌や酵母が存在し均衡状態を保っている。皮膚常在菌は肌を弱酸性に保ち、病原菌の侵入に対しバリア機能の役割を果たす一方、バランスが崩れ、ある種の菌が多量に増殖すると種々の皮膚炎症を引き起こす。代表的な皮膚常在菌は表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、アクネ桿菌 (*Propionibacterium acnes*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) である^{1, 2)}。表皮ブドウ球菌は黄色ブドウ球菌の増殖を防ぐ抗菌ペプチドや皮膚のバリア機能を高めるグリセロールを産生することが知られている。一方、黄色ブドウ球菌は皮膚炎や創傷部位の化膿を引き起こし、アクネ菌はニキビの誘発に関係が深い。しかし、代謝産物としてはこれまでに histamine, tryptamine, propionic acid などの短鎖脂肪酸などが報告されているが^{2, 3)}、いずれも HPLC によるあらかじめ想定した標品との比較によるもので化学的研究は十分ではない。一方、放線菌などのゲノム配列研究の結果、単一の培養条件では一部の2次代謝産物しか活性化しておらず眠っている遺伝子 (cryptic genes) から本来さらに多様な2次代謝産物を産生する能力があることが報告されている。そのため、培地などの培

養条件の変更や他の微生物との共培養法などで休眠遺伝子の活性化⁴⁾を行うなど詳細に代謝産物を検討することが必要である。

以上の観点から、美容などのコスメトロジー領域において重要な疾患であるニキビに注目し、その原因菌であるアクネ桿菌 (*P. acnes*) や黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) について種々の条件で培養 (単独および共培養) を行い、皮膚細胞に対する細胞毒性を評価することとした。

2. 方 法

2. 1. 微生物株および培養について

使用菌株アクネ菌 *Propionibacterium acnes* (GTC 00154, 嫌気性グラム陽性桿菌) は岐阜大学の微生物コレクションから分与いただいた。アクネ菌 (*P. acnes*) は嫌気性細菌のため角型ジャー・ケンキシステム (三菱ガス化学, A-41) あるいはパウチ袋 (三菱ガス化学, A-94) に入れ、アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学, 脱酸素剤 A-04) による嫌気培養を行った。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (JCM 20624, 理研微生物材料開発室 (RIKEN BRC)) は好気性のため前培養は通常の好気条件下 (35℃, 150rpm) で培養を行った。共培養の場合は、それぞれの菌株を上記条件にて前培養後に混合し、嫌気培養条件で培養した。使用培地は、嫌気性細菌用培地 (GAM: Gifu Anaerobic Medium) や一般的な細菌類の培養に用いられる Luria-Bertani Broth Medium (LB) 培地、Mueller Hinton Broth (MH) 培地、Brain Heart Infusion (BHI) 培地をベースに人工皮脂としてヒト皮脂の代わりに入手しやすい馬油 (井藤漢方製薬, 純馬油) を 0.5w/v% 添加し培養した。LB 培地を用いたアクネ菌と黄色ブドウ球菌の共培養については1



Chemical analysis of secondary metabolites of *Propionibacterium acnes*
Katsuyoshi Matsunami

Department of Pharmacognosy,
Graduate School of Biomedical and
Health Sciences, Hiroshima University

週間にわたって毎日一部を回収、抽出、乾固して被験物質とし、以下に示す方法でヒト皮膚由来線維芽細胞 KMST6 に対する細胞毒性を MTT 法により評価した。

抽出は培養液と等量の酢酸エチルを加え、十分に攪拌、静置の後、上層を酢酸エチル可溶画分として回収した。また、エマルジョンを形成した培養物についてはスクリーキャップ付き試験管に入れ、遠心操作 (2000rpm) により十分に分離させた上で上層を回収し、減圧下で溶媒を除去することで抽出物を得た。

また、大量培養については、1L の三角フラスコ 2 本にそれぞれ 500mL の培地を調製し、オートクレーブにより滅菌した培地を用いて行った。まず、平板培養から得たコロニーを、試験管培地 (2mL) に摂取し前培養 (増殖に差があるため *S. aureus* は好気下で 1 日、*P. acnes* は嫌気下で 5 日、35℃) を行った。そのうち 1mL を 100mL フラスコ (培地 20mL) に接種し同様の条件で中間培養を行い、最後にこの中間培養物 10mL を摂取することで、上記 1L のフラスコを用いて大量培養を行った。抽出は等量の酢酸エチルを加え、分液ロートでよく攪拌、混合したのち、静置し、必要に応じて遠心操作 (2000rpm) により上層を酢酸エチル可溶画分として回収した。さらに、エバポレーターで濃縮を行い、残存した水分をオイルポンプで除去することで抽出物を得た。

2.2. HPLC 分析および分離精製について

少量培養抽出物はメタノールに溶解あるいは懸濁し、Sep-pack C18 カートリッジ (Waters) に通液したものをサンプルとした。HPLC の使用カラムは Inertsil ODS-3 (6.5mm×250mm、GLサイエンス) で分離を行った。得られた化合物の同定は Bruker Avance III 500 核磁気共鳴装置 (Bruker) (共鳴周波数 ^1H NMR : 500MHz、 ^{13}C NMR : 125MHz) を使用し、溶媒中の D シグナルを internal lock signal とした。ケミカルシフト値の表示は調製に用いた重水素化溶媒の残存軽水素シグナルの δ 値 (ppm) で補正した。また、ハイブリッド型質量分析システム LTQ Orbitrap X (Thermo Fisher Scientific) を使用し質量分析を行った。また、活性の見られた抽出物との代謝物の差異を見るため LC-ESI-MS による分析を行った。使用カラムは上記と同様に Inertsil ODS-3 (6.5mm×250mm、GLサイエンス) を用い、移動相 A (0.1% 酢酸- H_2O)、移動相 B (0.1% 酢酸-アセトニトリル)、流速 0.5mL/min、0-10min (A: 90%, B: 10%)、10-120min (A: 90%, B: 10% から A: 0%, B: 100%、グラジエント溶出)、イオン化: ESI, positive モード、Spray voltage: 5kV、Sheath gas flow rate: 60、Aux gas flow rate: 20 で分析を行った。

2.3. ヒト皮膚由来線維芽細胞株に対する細胞毒性評価

抽出物添加条件での培養および吸光度測定には平底 96 well plate (Nunc microwell 167008, Thermo Fisher Scientific) を使用した。ヒト皮膚由来線維芽細胞株 KMST-6 (RCB1955, Riken BRC 細胞材料開発室) は培地として Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D5796, SIGMA) に非働化済み牛胎児血清 10%、Amphotericin B (SIGMA A9528)、Kanamycin sulfate (WAKO 119-00703) をそれぞれ、5.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう加えたものを使用した。5% CO_2 、37℃、湿度 95% の条件下で培養を行い、0.05% Trypsin-EDTA 溶液により細胞をはがし、得られた細胞懸濁液を継代およびアッセイに使用した。培養抽出物は DMSO に溶解し、培地を加えることで終濃度 500、200、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調整した。各 well には 5×10^3 個の細胞を播種し、化合物を添加後 72 hr 培養を行った。終濃度 1% の DMSO 溶液のみで培養した well を比較対象として、抽出物の有無による細胞増殖率の変化を吸光度測定により評価した。具体的には、72 hr の培養の後、上清を吸引除去し、MTT (0.5mg/mL) を含む培地を 100 μL 加え、さらに 1.5 hr 培養を行った。その後培地を吸引し、生成した MTT formazan を DMSO 100 μL を加えることで溶解し、マイクロプレートリーダーにより 540nm の吸光度を測定した。また、細胞の形態変化を調べるため、通常の明視野観察に加えて、細胞の染色像として MTT を添加・培養したものについても写真撮影を行った。

増殖抑制率は下記の式を用いて算出し、細胞毒性を評価した。

増殖抑制率 (%)

$$= [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$$

A_{sample} : サンプルを添加して培養した場合の吸光度

A_{blank} : Plate や培地に由来する吸光度

A_{control} : DMSO を添加して培養した場合の吸光度

3. 結果

3.1. KMST-6 に対する増殖阻害活性の経時変化

まず、一般的な細菌用培地である LB 培地を用い、*P. acnes* と *S. aureus* の共培養条件下で、培養日数による活性の変化について検討を行った。前培養で十分増殖したそれぞれの培養液を混合し (Day1)、35℃ の嫌気培養下で Day7 まで培養を継続した。培養期間中、一日ごとに培養液の一部を回収し、酢酸エチルを加えて混合し、静置して得られた上層を酢酸エチル可溶画分として回収した。減圧下で有機溶媒を留去し、得られた培養粗抽出物のヒト KMST-6 細胞に対する細胞増殖抑制率を MTT 法により求めた (図 1)。その結果、培養開始の初期 (Day1-2) にはそれほど活性は見られないが、培養 4 日目あたりで十分な

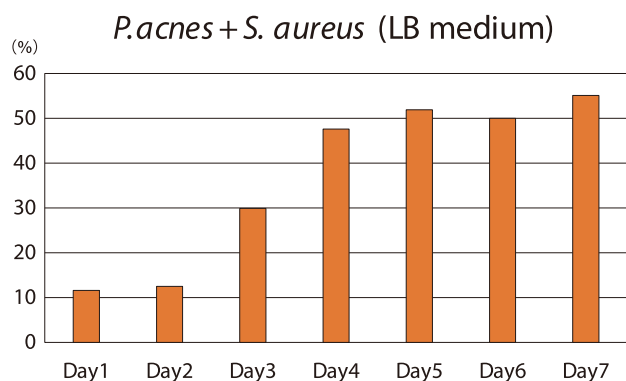


図1 ヒト皮膚由来線維芽細胞 KMST-6 に対する増殖阻害活性 *P. acnes* と *S. aureus* との共培養代謝産物の経時変化(35℃、嫌気培養)。抽出物濃度：500μg/mL, LB (Luria-Bertani) 培地

活性が見られるようになり、その後はほとんど活性の変化はなかったことから、培養は4-7日で行えば十分に活性が見いだされることが示された。そこで、今後の実験では7日間の培養期間で活性を評価することとした。一方、500μg/mLの濃度では活性が見られたが、200μg/mL以下では活性は見いだされなかったことから、それほど強い毒性ではなく、さらに、培地の変更や単独培養についても併せて検討を行うこととした。

3. 2. 種々の培地条件における単独および共培養による活性の変化

培養条件の違いにより代謝産物に変化することが知られていることから⁵⁾、LB培地に加え、動物脳と心臓組織由来のBrain Heart Infusion broth (BHI培地)や牛肉、カゼ

インにデンプンを加えたMueller-Hinton broth (MH培地)、嫌気性細菌用培地のGifu Anaerobic Medium (GAM培地)など組成が大きく異なるものを用い、単独培養および共培養を行い、KMST-6に対する細胞毒性評価を行った(図2)。それぞれの菌株の至適条件を考慮し、*P. acnes*単独(PA)および*P. acnes*と*S. aureus*の混合培養(PA+SA)は嫌気培養、*S. aureus* (SA)は前培養のみ好気下で行った。培養は上述の結果をもとに7日間、35℃で行った。

LB培地では図1同様に共培養で活性が見られ、500μg/mLの濃度で阻害率 $46.5 \pm 7.6\%$ の増殖阻害活性を示したが、*S. aureus*単独でも $34.8 \pm 3.3\%$ の活性が見られることから主に*S. aureus*に由来する代謝産物であると考えられた(図2、3)。一方、MH培地では*S. aureus*で $95.0 \pm 0.01\%$ の阻害活性が見られたが、200μg/mLでは活性は見られなかった。一方、共培養条件(PA+SA)では活性が見られなかったことから、*S. aureus*単独による条件が重要であると考えられた。逆に、嫌気培養用培地であるGAM培地では*P. acnes*単独培養のみ活性が見いだされた(抑制率 $82.1 \pm 11.9\%$)。共培養では細胞毒性を示さなかったことから*S. aureus*の共存により*P. acnes*による2次代謝に変化が起こったか、*S. aureus*による毒性成分の代謝が起こった可能性がある。このGAM培地での*P. acnes*単独培養では200μg/mLで $17.3 \pm 1.0\%$ の細胞毒性が示されたが100μg/mLでは毒性は見られなかった(図2)。また、増殖率には影響しなかったが、BHI培地(SA, PA+SA)でも細胞形態の変化は見られ、同様の形態変化はGAM(SA, PA+SA), LB(PA, SA, PA+SA), MH(PA, PA+SA)の場合でも観察されたことから、何らかの影響を及ぼしている

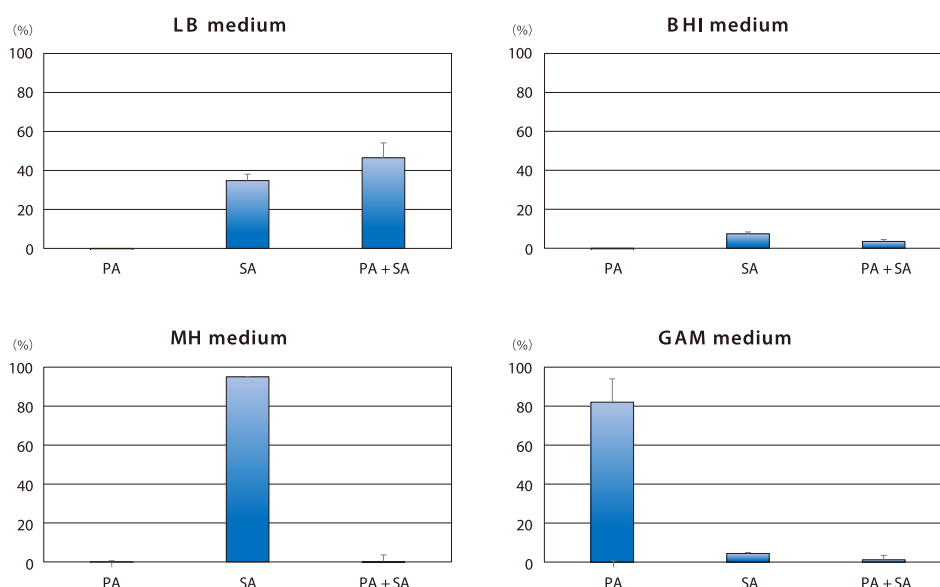


図2 各種培地における単独培養および共培養代謝産物の KMST-6 に対する増殖阻害活性 PA:*P. acnes*, SA:*S. aureus*, PA+SA: 混合培養, LB: Luria-Bertani medium, MH: Mueller-Hinton medium, BHI: Brain Heart Infusion medium, GAM: Gifu Anaerobic Medium, 35℃, 抽出物濃度: 500μg/mL, n=3

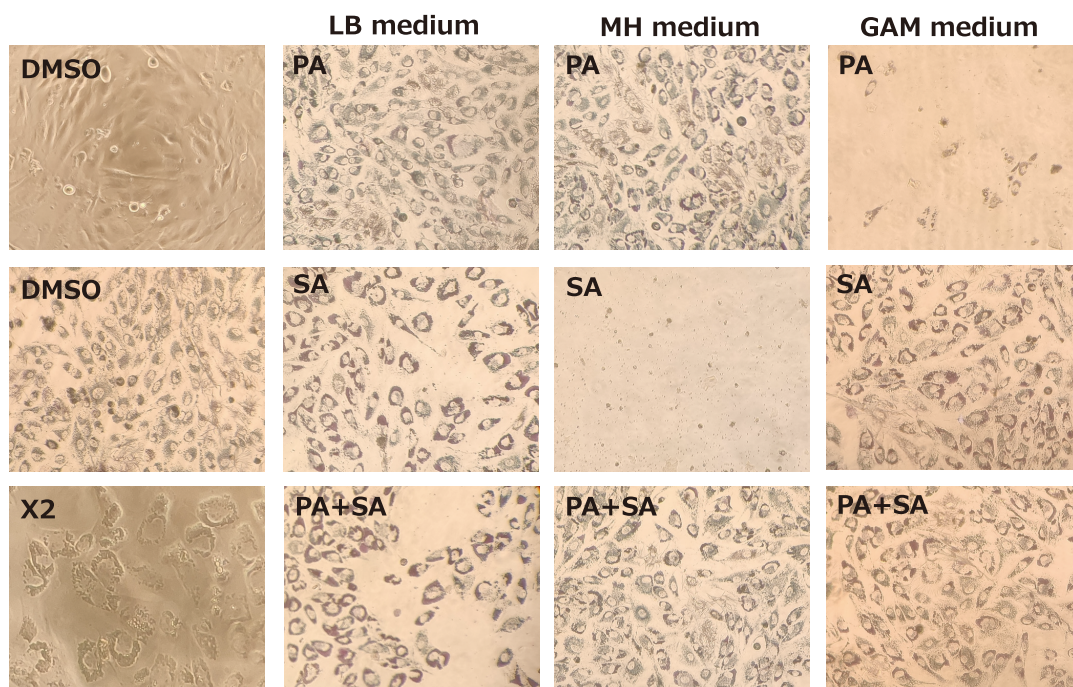


図3 各種培地における単独培養および共培養代謝産物の KMST-6 に対する影響

PA: *P. acnes*, SA: *S. aureus*, PA+SA: 混合培養, LB: Luria-Bertani medium, MH: Mueller-Hinton medium, BHI: Brain Heart Infusion medium, GAM: Gifu Anaerobic Medium, 35 °C, 抽出物濃度: 500µg/mL, DMSO: 通常の明視野観察像と MTT 発色後, X2: PA+SA に見られる形態変化(通常明視野, X 2 倍に拡大, 同様の形態変化は BHI 培地 (SA, PA+SA), GAM (SA, PA+SA), LB (PA, SA, PA+SA), MH (PA, PA+SA) にも観察される。

ことが示唆された(図3)。以上の結果から、最も強い細胞毒性の見られたMH培地による *S. aureus* の単独培養、およびGAM培地による *P. acnes* の単独培養に注目し、代謝物について検討を行うこととした。

3. 3. 培養抽出物に含まれる代謝産物の解析

次に細胞毒性の見られたMH培地による *S. aureus* 培養抽出物 (MH-SA)、およびGAM培地による *P. acnes* 培養抽出物 (GAM-PA) について含有化学成分の化学的解析を行うこととした。まず、MH培地による *S. aureus* の大量培養の後、得られた抽出物についてシリカゲルTLC分析 (CHCl_3 :MeOH=20:1 および 7:1 で展開後、0.5% 硫酸/加熱発色) を行い、確認されたスポットについて高分解能TLC (HPTLC) を用いて薄層分取を行った。次に得られた成分について ^1H および ^{13}C NMR、MSの測定を行い化合物の同定を試みたところジグリセリドの混合物であると推定された。さらにHPLCなどで分離を試みる必要があるが、培地の添加物として馬油を用いていることから、*S. aureus* に由来するものかについても含めて今後詳細に検討する必要がある。一方、上述の3.2.の結果(図2)から、MH培地による *P. acnes* 培養抽出物 (MH-PA)、および、GAM培地による *S. aureus* 培養抽出物 (GAM-SA) に毒性が見られなかったことから、グラジエント溶出によ

るHPLCクロマトグラムの比較により、活性に関わる成分が見い出せないか検討することとした。培養抽出物をメタノールに溶解あるいは懸濁し、Sep-pack C18 カートリッジに通液することでメタノール溶出液を得た。0.1%のギ酸存在下、10%アセトニトリルから100%アセトニトリルまで溶出強度を変化させてグラジエント溶出を行った。クロマトグラムはLC-ESI-MSによるTIC (Total Ion Count) でプロットしクロマトグラムプロファイルと比較したものを図4に示す。溶出時間43.6、46.9、100.5、115.6minなどの主要な成分は毒性の見られたGAM-PAおよび毒性の見られなかったGAM-SAで共通に存在することから細胞毒性に関与するとは考えにくい。その他、マイナー成分についても顕著な差異を見出すことは難しく、前処理条件や分析条件を検討する余地はあるものの、毒性に関係する成分は検出されない程度の微量であることが示唆され、同定は困難であると予想される結果となった(図4)。なお、MH培地を用いた *S. aureus* の毒性成分についても同様にLC-MS分析を行ったが、差異を見出すことは困難であった。

4. 考 察

Propionibacterium acnes (ゲノム解析により *Cutibacterium acnes* に変更⁶⁾) はグラム陽性嫌気性桿菌で、皮膚や腸管などに存在するヒトの常在菌の一つである。ニキビ(尋常性

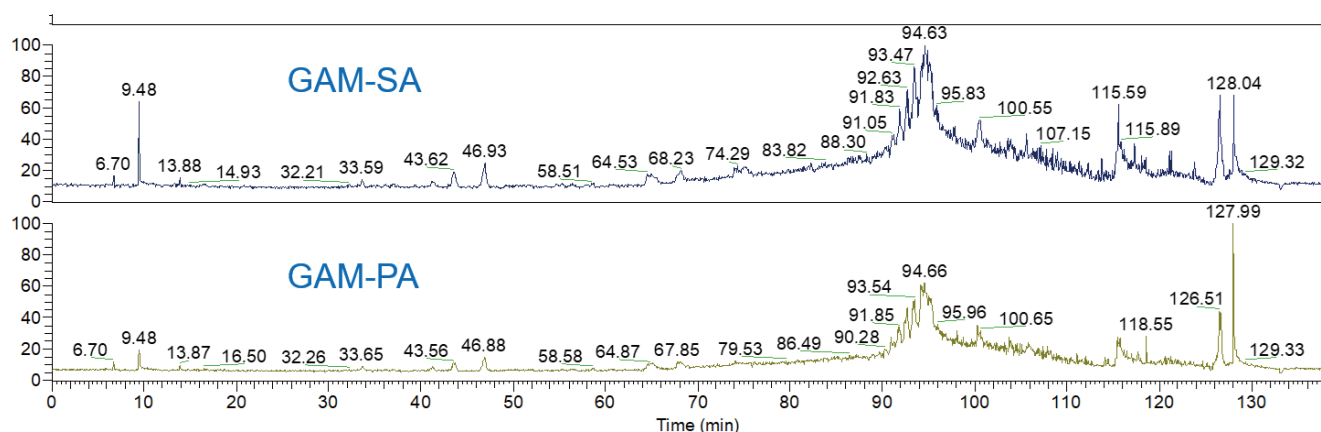


図4 *S. aureus* (GAM-SA) および *P. acnes* (GAM-PA) 培養代謝産物の LC-ESI-MS クロマトグラム
GAM 培地, 嫌気培養, 35℃, 10% アセトニトリルから 100% アセトニトリルでグラジエント溶出。縦軸は Total ion count の相対値を示す。横軸は溶出時間。

瘡瘍)の原因菌として広く知られるが、近年、前立腺がんの原因にもなる前立腺炎、滑膜炎、膿疱症、骨化過剰症、骨炎症候群、サルコイドーシス(肉芽腫)、坐骨神経痛、インプラント関連感染症に関与するとして注目されている⁷⁾。そのため、どのような機構が発症に影響するかを明らかにすることは重要な課題となっている。本研究では、同じく皮膚常在菌の一つである黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* と合わせて種々の培養条件で得られる培養抽出物についてヒト皮膚由来線維芽細胞株 KMST-6 に対する細胞傷害、LC-ESI-MS による含有代謝物の基礎的解析を行った。

その結果、種々の培地にて培養産物を得たところ、培地によって細胞毒性が変化することが示された。例えば、*S. aureus* については LB や MH 培地では活性が見られるものの、GAM や BHI 培地では活性が見られなかった。一方、*P. acnes* については GAM 培地で活性が見られたものの、他の3種の培地では活性が見られなかったことから代謝産物の研究にあたっては培地を含めた培養条件の検討が重要であることを示している。しかし、GAM 培地の組成には LB 培地にも含まれるペプトン類や BHI や MH 培地に含まれるような動物組織由来の抽出物も含まれるなど炭素源や窒素源は他の培地と類似しているともとれる。大きな違いとしてはシステインやチオグリコール酸などの還元性の成分が含まれることから、嫌気的環境が細胞毒性成分の生成には重要である可能性がある。今回は活性本体の同定には至らなかったが、過去の論文ではグリセロリン脂質やホスファチジルイノシトールが、また、同属の *P. propionicum* からは糖脂質が報告されている⁸⁾。これら脂質類は一般の細菌にも見られる膜成分であるが、培養動物細胞の細胞膜に影響することから細胞毒性成分として同定されることも多い。そのため、今回の研究で見出された培養条件の違いによる細胞毒性活性の発現の差異は含有脂質成分の種類お

よび量の差に起因する可能性がある。実際、細胞毒性が見られた濃度は 500 µg/mL と比較的高い濃度であり、また、TLC 分析および LC-MS 分析で目立った差異が見られなかったことから、活性を中心的に担う成分は単離・精製が難しい微量成分であるか、または、特定成分に依るのではなく、弱い活性をもつ脂質などの種々の成分の活性が総合的に差異となって現れた可能性がある。今後のより網羅的なメタボローム解析手法などにより詳細が明らかになることを期待する。

5. 総括

皮膚の表面にはアクネ菌や黄色ブドウ球菌が常在し、皮脂などを代謝することで様々な代謝物を産生している。ヒト皮膚由来細胞に対する細胞毒性は、これらの微生物の皮膚に対する炎症などに関係すると考えられ、活性化化合物を明らかにすることは皮膚科学、コスメトロジー研究にとって重要であり、創薬標的の発見も期待できると期待される。今回の結果から、抗生物質産生菌に見られるような特定物質の産生は見られないか、あるいは微量なため活性本体を明らかにすることが困難な可能性が示唆された。しかし、LB 培地での共培養で見られたように単独培養よりも共培養の方が活性が強く見られた結果も得ており、これら皮膚常在菌の相互作用について今後の研究に興味をもたれる結果となった。

(引用文献)

- 1) Alexandra P, Peter L, *Propionibacterium acnes*: infection beyond the skin, *Expert Rev Anti Infect Ther*, **9** (12):1149-56, (2011). doi: 10.1586/eri.11.137.
- 2) Allaker RP, Greenman J, Osborne RH, The production of inflammatory compounds by *Propionibacterium acnes* and other skin organisms, *Br J Dermatol*, **117**: 175-183

- (1987). doi.org/10.1111/j.1365-2133.1987.tb04114.x
- 3) Tax G, Urbán E, Palotás Z, Puskás R, Kónya Z, Bíró T, Kemény L, Szabó K, Propionic acid produced by *Propionibacterium acnes* strains contributes to their pathogenicity. *Acta Derm Venereol*, **96**: 43–49 (2016).
 - 4) Abdelmohsen UR, Grkovic T, Balasubramanian S, Kamel MS, Quinn RJ, Hentschel U, Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes, *Biotech Adv*, **33**: 798–811 (2015).
 - 5) Pan R, Bai X, Chen J, Zhang H, Wang H, Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review, *Front Microbiol*, **10**: 294 (2019). doi: 10.3389/fmicb.2019.00294.
 - 6) Christian FPS, Mogens K, The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov., *Int J Syst Evol Microbiol*, **66** (11):4422–4432 (2016). doi: 10.1099/ijsem.0.001367.
 - 7) Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S, *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance, *Med Mal Infect*, **44** (6):241–50 (2014). doi: 10.1016/j.medmal.2014.02.004.
 - 8) Mariola P, Otto H, Buko L, Halina M, Andrzej G, Novel bacterial polar lipids containing ether-linked alkyl chains, the structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T), *J Biol Chem*, **278** (6):3948–56 (2003). doi: 10.1074/jbc.M206013200.