

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17057

研究課題名(和文) 歯周病予防のためのプロバイオティクスの構築およびバイオジェニクスへの展開

研究課題名(英文) Construction of probiotics for prevention of periodontal disease and application to biogenics

研究代表者

河井 智美 (Kawai, Tomomi)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：70783877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では乳酸菌の代謝産物が歯周病を予防するプロバイオティクスを構築し、さらに代謝産物を用いて、より安定性が図れるバイオジェニクスへ展開させるための基礎研究を目的とした。プロバイオティクス候補菌株の中で有効な菌株をスクリーニングし、最も有効な株として *L. fermentum* ALAL020 (Lf020) を見出した。また、繊維芽細胞を用いた *P. gingivalis* 感染モデルを作成し、炎症性サイトカインをELISA測定したところ、Lf020培養上清はIL-6を抑えることができた。さらに培養上清の有効成分をHPLCにて分画し、バイオジェニクスへの基盤作りをすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた乳酸菌を用いて菌叢を改善することで腸管の健康を図る「プロバイオティクス」は口腔内菌叢のバランスの不均衡を改善する可能性があるだけでなく、耐性菌を誘導しないことから口腔への応用が期待できるが、効果のメカニズムはわかっていない。さらに生菌を用いるプロバイオティクスだけでなく、死菌体や代謝産物で独自の効果を示す「バイオジェニクス」という新しいコンセプトは、生菌定着における問題点を解決し、歯周病予防に寄与する可能性が期待できる。本研究の成果は、歯周病予防において乳酸菌の代謝産物による有効な成分の存在を示し、さらなる成分特定に至れば、生菌を用いるよりもより確実に有効性を発揮できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to construct a probiotic that uses metabolites of lactic acid bacteria to prevent periodontal disease, and to further develop the use of metabolites for more stable biogenics.

Among probiotic candidate strains the effective strains were screened and *L. fermentum* ALAL020 (Lf020) was found to be the most effective strain. In addition, we created a *P. gingivalis* infection model using fibroblasts and measured inflammatory cytokines using ELISA. Lf020 culture supernatant was able to suppress IL-6. Furthermore, the active ingredients of the culture supernatant were fractionated by HPLC, and the basis for biogenics could be established.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：プロバイオティクス バイオジェニクス 歯周病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プロバイオティクス (probiotics) とは抗生物質 (antibiotics) に対比するものとして、生物間の共生関係 (symbiosis) を意味する生物学的用語を起源とした用語である。従来、腸内環境の疾患予防や治療に常用されてきた。しかし、最近になってプロバイオティクスに利用する細菌が免疫増進作用を持つことや、腸だけでなく尿路や呼吸器感染症の予防に有効であること、乳幼児のアトピーなどのアレルギーを抑制する能力があることに注目が集まってきた。さらに、プロバイオティクスが口腔の健康に適用できることを示唆する報告も増えつつある。

最も一般的にプロバイオティクスに利用される *Lactobacillus* に代表される乳酸菌には腸内環境を整える働きがあるだけでなく、ピロリ菌のような病原細菌の定着を阻止し、アレルギー予防作用などの多彩な有効性があることを示す研究がある。近年、口腔での応用について可能性が期待されつつあるが、効果とメカニズムを含め、研究の蓄積は未だ不十分である。さらに、プロバイオティクス菌の死菌体や代謝産物にも独自の効果があり、「バイोजェニクス」という新しいコンセプトが提唱されている。

歯周病は現在の日本で、平成 28 年歯科疾患実態調査 (厚生労働省) において 4mm 以上の歯周ポケットがある人の割合は、年齢が高くなるにしたがって高い割合を示している。さらに、なんらかの歯周疾患の所見がある人の割合は、35~69 歳の年齢層では、約 80% と非常に高い値を示しており、歯周疾患は生活習慣病の一つとして位置付けられている。近年歯周病は、糖尿病、動脈硬化を含む心臓・血管疾患、誤嚥性肺炎、早産・低体重児出産など全身の疾患や状態と深く関わっていることが明らかになり、歯周病の治療、予防の重要性が示されている。

歯周病は、病原性微生物 (歯周病原細菌) によって引き起こされる。歯周病を予防・治療するために化学物質を利用してきたが、化学物質は宿主の細胞を障害する可能性がある。

また、歯周病の急性症状の治療に用いられている抗菌薬や消毒薬は、原因菌の減少・除去に有用であるが、前述したように人体への有害作用を発現する危険性を持ち合わせており、さらに耐性菌の問題も常につきまといっている。そのため、これらを用いずに口腔病原微生物を抑制することは、国民の QOL を向上させるための価値がある。たとえばヨーグルト、チーズは近年腸管のためのプロバイオティクスとして注目されており、また世界中の人々の食生活に浸透している。

機能的食品に代表されるプロバイオティクスは、細菌叢のバランスを改善する効果を持つ有益細菌を定着させることで、またプレバイオティクスは腸管内にプロバイオティクス菌の定着・増殖を補助する物質として良く知られている。長い間、両者は腸内の健康を維持/促進するために用いられてきたが、その作用メカニズムはほとんど不明である。また、口腔の健康に対する効果に関しては未だ確定していない。

また、機能的食品の機構として重要なもう一つである「バイोजェニクス」は、発酵乳・乳酸菌の効用の作用機序として大きな可能性を持っていることが *Lactobacillus helveticus* 発酵乳より見出された「ラクトトリペプチド」に関する研究で指摘されている (中村, 1999)。発酵の過程で乳酸菌プロテアーゼにより乳蛋白から 2 種類のトリペプチド (Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro) が生成され、体内で昇圧物質を作る酵素 (ACE) の働きを抑え、高血圧を抑制することが示されている。さらに、乳酸菌は多種多様の抗菌成分を産生・分泌することが知られている。有機酸、過酸化水素、過酸化炭素、低分子物質、バクテリオシンなどであり (Meurman, 2005)、その効果により殺菌性を示すことも考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では乳酸菌の代謝産物による効果が**歯周病に対して明確かつ有効な効果を発揮するバイोजェニクスを確立する**ことが目的である。そのためには、有効性の基盤となる**メカニズムを解明**することが不可欠である。

さらに、バイोजェニクスにおいてはプロバイオティクス菌の**有効成分の同定**とそのメカニズムを解明し、さらなる**有効性の増強を図る**ことで、より強化された「(プロ)バイोजェニクス」を構築し、国民の日々の生活に取り入れることで、歯周病をコントロールし、なおかつ口腔から全身の健康に寄与し Quality of life の向上に努めるものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 菌株の培養条件

プロバイオティクス候補菌株を MRS 液体培地に 37 °C で 24 時間嫌気培養した。指標菌株として *P. gingivalis* ATCC33277 株を使用し、BHI 改変液体培地を用い、37 °C で 48 時間嫌気培養した。

#### (2) 乳酸菌のスクリーニング

各乳酸菌培養液を遠心分離し、培養上清を pH 7.0 に調製後、0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過したものを被験サンプルとした。被験サンプルを BHI 改変液体培地で段階希釈し、指標菌 *P. gingivalis* を接種し、37 °C で 48 時間嫌気培養した。培養後 620 nm の吸光度を測定し、対照との吸光度差 0.1 以下を増殖抑制と判定した。

#### (3) 培養上清の分画

培養上清を硫酸アンモニウムによる塩析法で 40%、60%、80% で沈殿させ、各硫酸サンプルを PD-10 にて脱塩し、PH 調整、タンパク量測定、抗菌試験を行った。

抗菌試験にて最も強い抗菌性を示した硫安サンプルを HPLC (BioRad) にて HiPrep26/10Desalting カラムを用いて 3 つのフラクションに分け、AmiconUltra-15 にて濃縮を行い、抗菌試験を行った。

さらに 3 つのフラクションで最も抗菌性を示したサンプルを HPLC (SHIMADZU) にて分離条件検討を行った。

#### (4) 感染細胞モデルによる炎症抑制活性の検出

正常線維芽細胞 (828Hf, TKf305) を Medium106 と Low Serum Growth Supplement Kit (LSGS Kit) にて培養した。24Well プレートを用いて  $1 \times 10^4$  個/well ずつ分注し、pH7 に調整した乳酸菌培養上清を 25  $\mu$ L 加え 16 時間培養し、*Porphyromonas gingivalis* を  $10^6$  CFU/mL 加え 8 時間接触させ、感染細胞培養モデルとした。培養上清を回収し、ELISA 法にて炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF-) を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 乳酸菌のスクリーニング

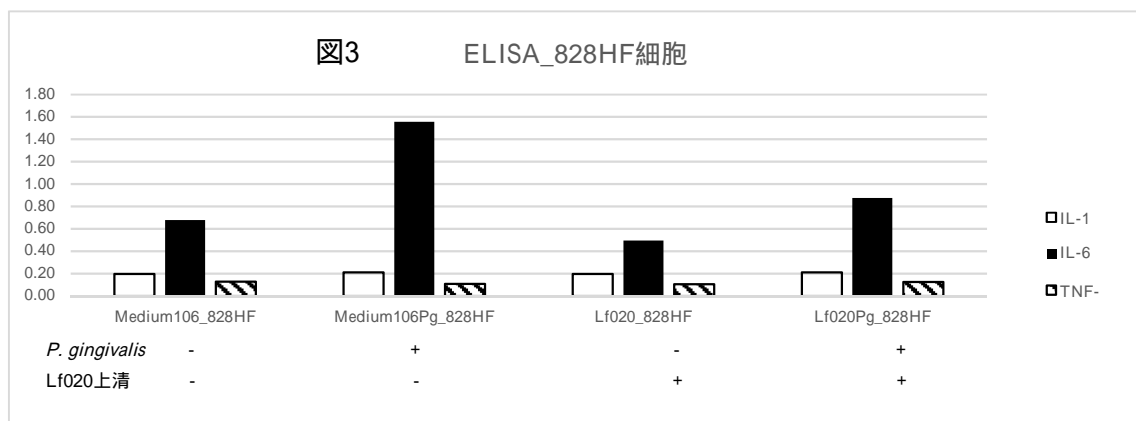
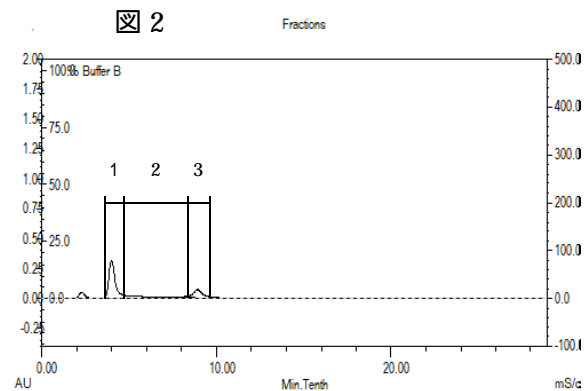
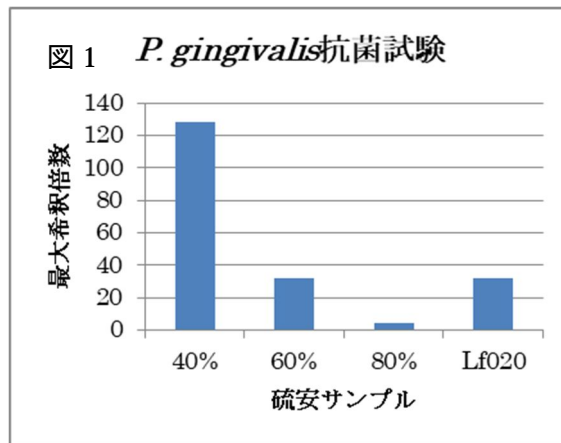
50 株の乳酸菌をスクリーニングした結果、最も有効性の高かったのは *Lactobacillus fermentum* ALAL020 (Lf020) だった。その培養上清中の有効成分の特性を解析した。

#### (2) 培養上清の分画

80%, 60%, 40% の硫安沈殿を行ったところ、40%硫安沈殿での抗菌活性が特に強かった (図 1)。タンパク量としては、40%硫安サンプルが最も少なかった。抗菌活性を示すタンパク量として、80%硫安サンプルは 308.78  $\mu$ g、60%硫安サンプルは 61.70  $\mu$ g、40%硫安サンプルは 2.67  $\mu$ g であった。この 40%硫安沈殿サンプルを HPLC (BioRad) にて分画したところ、ピークが 2 本検出され、フラクション 3 つに分けて、粗生成物が得られた (図 2)。これらに対して抗菌試験を行ったところ、Fr. 1 のみ抗菌性を示し、活性分画を得ることができた。

#### (3) 感染細胞モデルによる炎症抑制活性の検出

正常線維芽細胞 (828Hf, TKf305) を培養し、*P. gingivalis* を接種した感染細胞モデルを作成した。炎症性サイトカインを ELISA 測定したところ Lf020 培養上清を加えることで IL-6 を抑えることができた (図 3)。



したがって、プロバイオティクス菌 Lf020 の培養上清中に炎症性サイトカイン産生を抑制する成分があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomoko Ohshima, Tomomi Kawai, Nobuko Maeda	4. 巻 1
2. 論文標題 Prebiotics and Probiotics - Potential Benefits in Nutrition and Health	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IntechOpen	6. 最初と最後の頁 137-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5772/intechopen.73714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomomi Kawai, Ryoichi Shin, Yukie Ito, Satoshi Ikawa, Takeshi Tanaka, Nobuko Maeda, Tomoko Ohshima
2. 発表標題 Anti-periodontal bacterial activity in culture supernatant of probiotic Lactobacillus fermentum
3. 学会等名 2020 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井 大地, 酒井 湧志, 河井 智美, 前田 伸子, 大島 朋子
2. 発表標題 代表的歯周病原菌である Porphyromonas 属を抑制するプロバイオティクス菌代謝産物の探索
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----