

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21037

研究課題名（和文）ラットう蝕モデルを用いたピロリ菌定着抑制に対する乳酸菌の有効性の検討

研究課題名（英文）Efficacy of lactobacillus species in inhibiting Helicobacter pylori colonization using caries-induced rat models.

研究代表者

門田 珠実（Kadota, Tamami）

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：10908643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：204名の被験者から採取した口腔サンプルの細菌DNAを解析したところ、61名の被験者からピロリ菌が検出され、そのうち38名の抜去歯は象牙質に及ぶう蝕に罹患していた。16Sメタゲノム解析の結果、口腔からピロリ菌が検出されず、う蝕が認められなかった被験者はLactobacillus delbrueckiiの検出率が高い傾向にあった。ミュータンスレンサ球菌、L. delbrueckii およびピロリ菌を共培養したものをMitis-Salivarius Bacitracin寒天培地へ播種したところ、ミュータンスレンサ球菌を単独培養したものを播種した場合と比較して形成されたコロニーが大きく減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見は、Lactobacillus delbrueckii がミュータンスレンサ球菌とピロリ菌の共存により促進されるバイオフィルムの形成や、ミュータンスレンサ球菌の増殖を抑制できる可能性を示すことができたという点に学術的意義を有するといえる。また、ピロリ菌はミュータンスレンサ球菌により誘発されるう窩を介して胃への感染が成立する可能性を有することから、これらの知見はう蝕予防だけでなく、ピロリ菌の定着抑制や定着予防にもつながると考えられ、L. delbrueckii の応用がう蝕予防とピロリ菌感染予防の両方に寄与できる可能性を示した点に社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Oral specimens were obtained from 204 subjects, with Helicobacter pylori organisms detected in 61, while teeth extracted from 38 subjects were found to be affected by caries into the dentin. Furthermore, 16S metagenomic analysis showed that the detection rate of Lactobacillus delbrueckii tended to be higher in subjects with no caries and H. pylori not detected in oral specimens. Also, the number of colonies formed by Streptococcus mutans, L. delbrueckii, and H. pylori cultured in mitis-salivarius bacitracin agar medium was lower than the number formed by S. mutans alone.

The present findings indicate that L. delbrueckii inhibits formation of biofilms promoted by coexisting S. mutans and H. pylori, as well as the growth of S. mutans. It is possible that H. pylori is transmitted to the stomach via caries cavity induced by S. mutans, thus this study may contribute to not only strategies for dental caries prevention, but also inhibition and prevention of H. pylori colonization.

研究分野：口腔科学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ菌 乳酸菌 ミュータンスレンサ球菌 う蝕

# 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ菌は消化器疾患の原因細菌として知られており、小児期に経口感染すると考えられている。これまでに研究代表者は、ピロリ菌はう蝕の主要な原因細菌であるミュータンスレンサ球菌により誘発されるう窩を介して胃への感染が成立する可能性を示した。ピロリ菌感染者には抗菌薬による除菌療法が行われるが、ピロリ菌の薬剤耐性により成功しない症例が年々増加しており、その対策として乳酸菌を添加した食品を同時に摂取することでその割合が低下する可能性が考えられている。さらに、乳酸菌の中にはう蝕原性細菌のバイオフィーム形成を抑制する菌種の存在が報告されていることから、う蝕抑制およびピロリ菌の定着抑制の両方に有効な乳酸菌種が存在するのではないかという問いが生まれた。

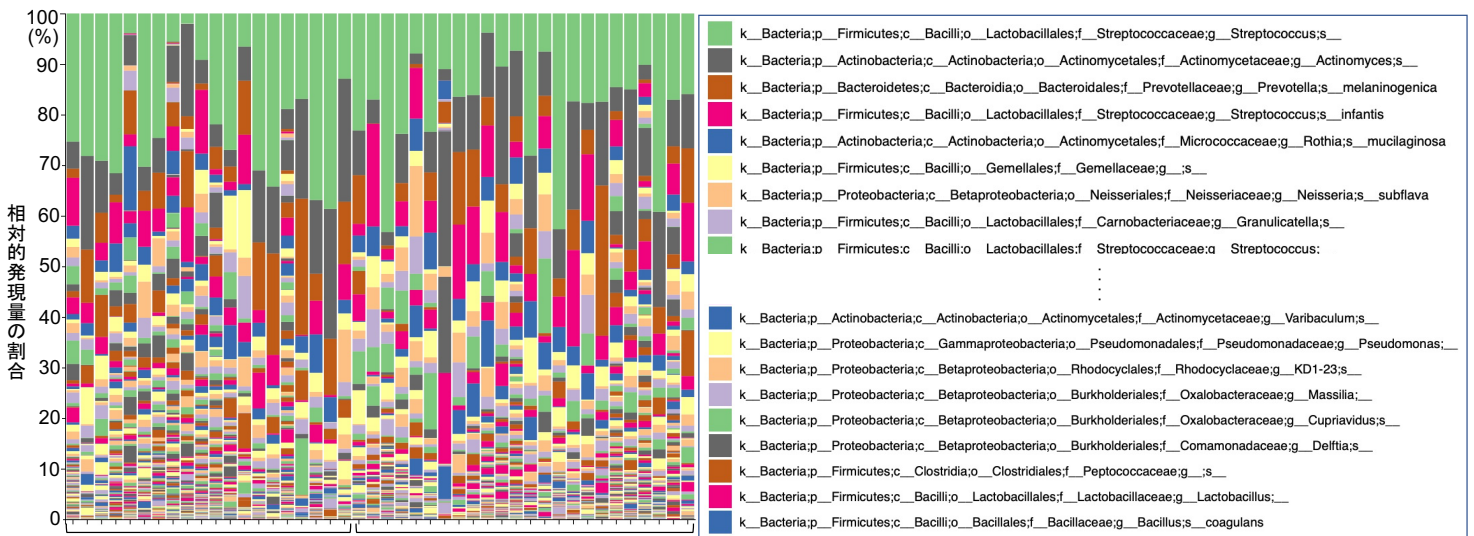
## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ミュータンスレンサ球菌と乳酸菌が共存することで、う蝕の重症度やピロリ菌の定着および病原性にどのような影響を及ぼすのかを解明することである。これにより、歯科の観点からピロリ菌の定着抑制や定着予防につながる見識が得られることを期待している。

## 3. 研究の方法

### (1) 本研究において着目する乳酸菌種の選出

乳酸菌は 300 菌種以上存在することが報告されていることから、本研究では最初にヒト口腔内に存在し、う蝕の重症度やピロリ菌の定着に関与する可能性を有する乳酸菌種の選出を実施した。204 名の被験者を対象として唾液サンプルおよび抜去歯を採取し、抜去歯のう蝕罹患状態を記録するとともに、採取した口腔サンプルから細菌 DNA を抽出してピロリ菌の検出を目的とした Nested PCR 法を実施した。次に、ピロリ菌が検出された被験者 20 名および検出されなかった被験者 20 名の細菌 DNA を対象として 16S メタゲノム解析による細菌叢の分析を行った (図 1)。



<図1> 16Sメタゲノム解析により検出された細菌の相対的発現量の分布図

各色に該当する細菌の情報

### (2) ピロリ菌および乳酸菌の共存によるミュータンスレンサ球菌の増殖への影響の検討

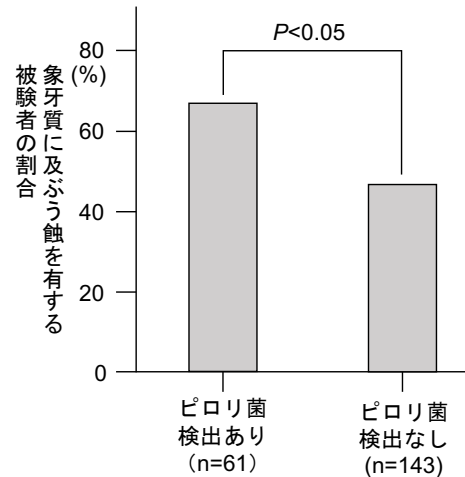
抜去歯にう蝕が認められず、口腔サンプルにおいてピロリ菌が検出されなかった被験者の口腔から検出された乳酸菌種に着目し、ミュータンスレンサ球菌やピロリ菌の共存による生育や増殖の違いについて検討を行った。ミュータンスレンサ球菌、ピロリ菌、乳酸菌をそれぞれ単独培養および共培養し、Mitis-Salivarius Bacitracin (MSB) 寒天培地へ播種して形成されたコロニーを観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 口腔サンプルの解析

204名の被験者を対象として採取した唾液および抜去歯から抽出した細菌DNAを解析したところ、61名(29.9%)の被験者においてピロリ菌が検出された。また、そのうち38名(62.3%)の抜去歯は象牙質に及ぶう蝕に罹患していた。一方で、ピロリ菌が検出されなかった被験者143名のうち、抜去歯が象牙質に及ぶう蝕に罹患していた被験者は66名(46.2%)であった。ピロリ菌が検出された被験者は、ピロリ菌が検出されなかった被験者と比較して抜去歯がC2以上のう蝕に罹患している割合が有意に高いことが明らかとなった(図2)。このことから、象牙質に及ぶう蝕の存在はピロリ菌の口腔への定着のリスク因子になる可能性が考えられた。

さらに、16Sメタゲノム解析の結果、口腔サンプルからピロリ菌が検出されず、う蝕が認められなかった被験者においては、*Lactobacillus coleohominis*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus pontis*の検出率が高い傾向にあることが判明した。これらのことから、乳酸菌種の中でも*L. coleohominis*、*L. delbrueckii*、*L. pontis*は、ピロリ菌の定着やう蝕の発生を抑制できる可能性を有するのではないかと考えた。中でも、*L. delbrueckii*はヨーグルトから発見されたことが報告されている乳酸菌種であり、食品応用にも柔軟に対応できると考えられることから、以降の検討は*L. delbrueckii*に着目することとした。



<図2> 口腔におけるピロリ菌の検出とう蝕罹患率の関係

##### (2) ピロリ菌および乳酸菌の共存によるミュータンスレンサ球菌の増殖への影響

ミュータンスレンサ球菌、*L. delbrueckii* およびピロリ菌を共培養したものをMSB寒天培地へ播種したところ、ミュータンスレンサ球菌単独培養やミュータンスレンサ球菌と*L. delbrueckii*を共培養したものをMSB寒天培地へ播種した場合と比較して、形成されたコロニーが大きく減少した。また、研究代表者は以前の研究において、ピロリ菌は口腔バイオフィームにおいて単独よりもミュータンスレンサ球菌と共存することで形成されるバイオフィームの厚さが増加することをすでに示している(Nomura et al, 2020)。これらのことから、口腔内にピロリ菌が存在することでバイオフィームの形成は促進され、ミュータンスレンサ球菌は本来増殖しやすい環境となるはずであるが、*L. delbrueckii*が同時に存在することでその増殖が抑制できる可能性が示されたと考えられる。

本研究で得られた知見は、*L. delbrueckii*がミュータンスレンサ球菌とピロリ菌の共存により促進されるバイオフィームの形成や、ミュータンスレンサ球菌の増殖を抑制できる可能性を示すことができたという点に学術的意義を有するといえる。また、研究代表者は以前にラットう蝕モデルにおいて、ピロリ菌はミュータンスレンサ球菌により誘発されるう蝕を介して胃への感染が成立する可能性を示していることから(Nomura et al, 2020)、これらの知見はう蝕予防だけでなく、ピロリ菌の定着抑制や定着予防にもつながると考えられ、*L. delbrueckii*の応用がう蝕予防とピロリ菌感染予防の両方に寄与できる可能性を有することを示した点に社会的意義があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------