

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861615

研究課題名(和文)プロバイオティクスがう蝕にもたらす影響の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the effect of probiotics on caries

研究代表者

藤本 暁江 (FUJIMOTO, Akie)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：60707983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：Lactobacillus salivarius WB21株(WB21)は歯周病や口臭の改善効果をもたらすことが報告されている。本研究では乳酸菌の口腔利用に際し、齲蝕に対する影響についてもさらに確認するため、齲蝕原因菌Streptococcus mutans (Sm)に対するWB21の作用を調べた。混合培養実験において、WB21はSm増殖を抑制することがわかった。また、不溶性グルカンに対する影響ではWB21の添加によりSmが産生する不溶性グルカンが減少することがわかった。本研究において、WB21は齲蝕のリスクを高めないだけでなく、齲蝕抑制効果を持つ可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lactobacillus salivarius WB21 (WB 21) has been reported to improve periodontal disease and halitosis. In this study, the effect of WB 21 on the caries-causing microorganism Streptococcus mutans (Sm) was investigated to further confirm the effect of the oral use of lactic acid bacteria. In mixed culture experiments, it was found that WB21 suppressed Sm growth. In addition, it was found that the addition of WB21 reduced the amount of insoluble glucan produced by Sm. The results of the present study suggested that WB21 did not increase the risk of dental caries and that it may even have a caries suppression effect.

研究分野：歯科 保存修復学

キーワード：プロバイオティクス う蝕菌原因菌

1. 研究開始当初の背景

近年、疾病を治療するという考えから予防するといった予防医学の考えが高まりつつある。その中でも、プロバイオティクスを用いた研究や治療が注目されている。

プロバイオティクスとは、「消化管内の細菌叢を改善し、宿主に有益な作用をもたらすうる有能な微生物とそれらの増殖促進物質」と定義される。つまり、プロバイオティクス機能を持つ微生物を摂取すると、それが消化管内のフローラに作用し、フローラの健全化をはかりながら、疾病の予防、改善などを行うというものである。プロバイオティクスは益虫に例えられ、作用は穏やかであるが環境(宿主)への害はほとんどない。このため、抗菌薬やワクチンに代わる予防・治療法として注目されている。

代表的なプロバイオティクスとしては、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属、*Enterococcus* 属などが挙げられる。近年、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属の投与が腔内や腸管内の細菌叢を変化させ、健康に寄与することが報告されている¹⁾。また、Köllらは、*in vitro* 実験で口腔由来の乳酸菌のプロバイオティクスとしての特性を評価し、有用性の高い4菌種 *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. paracasei* をみいだした²⁾。さらに、プロバイオティクスの全身応用として、ヒトに対する免疫機能の調節や、抗菌活性、抗アレルギー作用など、様々な機能を有することが明らかになっている。

口腔内において利用されるプロバイオティクスとしては、*Lactobacillus* 属がよく知られている。これまでに、*Lactobacillus salivarius* TI2711 株配合錠菓口腔投与がプラーク付着率や歯周組織を改善することや^{3) 4)}、*Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 株配合ヨーグルト摂取がう蝕原因菌である *Streptococcus mutans* の菌数が減少したことが報告されている⁵⁾。*Lactobacillus salivarius* WB21 株は、*Helicobacter pylori* の除菌能力を持つ *L. salivarius* 1004 株として分離された後、口腔環境に安定性を持つ変異株として改良されたもので、すでに動物実験において生体への安全性も確認されている⁶⁾。

2. 研究の目的

申請者らの研究グループはこれまでに、*L. salivarius* WB21 株を配合錠菓(わかもと製菓)を利用して、口臭患者や歯周病患者を対象に、本製品のプロバイオティクス効果を検証し、口臭や歯周組織の炎症の改善に有効であることを報告してきた^{7) 8)}。しかしながら、その作用メカニズムに関しては不明なところが多く、*L. salivarius* WB21 株のう蝕に対する影響を臨床的に評価した研究はほとんどない。

また、乳酸菌は糖を分解し、乳酸を産生し殺菌作用を有するがその一方で、酸により歯のエナメル質を脱灰し、う蝕進行を促進する可能性もある。また乳酸菌の種類によっては、う蝕病巣より多く分離されるため一般にう蝕に関係すると認識されている場合が多いが、乳酸菌がプロバイオティクスとしてう蝕の発生を抑制するとの報告もある⁹⁾。

本研究では、*L. salivarius* WB21 株のう蝕原因菌に対する働きを検証し、本菌のプロバイオティクスとしての有用性を評価した。さらに申請者は、プロバイオティクスとカテキンとの併用についても研究した。カテキンとは茶の抽出物であり、血中のコレステロール調整作用、抗酸化作用等、様々な作用があることが報告されている。また、カテキンには抗菌、抗う蝕作用もあることが報告されており、含有されるカテキンのうち、エピガロカテキンガラート(EGCg)は抗菌作用や口臭抑制作用等がある事が明らかになっており、今後口腔内への応用が期待される。プロバイオティクスとカテキンの相乗効果およびう蝕原因菌に対する影響についても評価を行った。

3. 研究の方法

(1) *Lactobacillus salivarius* WB21 株がう蝕原因細菌におよぼす影響について

Streptococcus mutans および *Streptococcus sobrinus* に対する増殖抑制作用

試験菌株は、*Streptococcus mutans* JCM5705 株と *Streptococcus mutans* MT8148 株および *Streptococcus sobrinus* ATCC33478 株とした。

まず0.7%グルコース添加 GAM 培地 10ml に、各試験菌液を 10^7 CFU となるように添加した。次に、*L. salivarius* WB21 株 (*Ls* WB21) を 10 、 10^3 、 10^5 、 10^7 CFU/ml となるように添加した。37℃で静置培養後、10、20、24、38時間後に生菌数を測定した。

不溶性グルカンの抑制実験

2%スクロース添加 GAM 培地に *S. mutans* JCM5705 株および *S. mutans* JCM5705 株と Ls WB21 を混合した菌液を添加し、仰角 30° に置き 37 °C 24 時間嫌気培養を行った。その後、不溶性グルカンを回収し、硫酸-フェノール法にて不溶性グルカン量を測定した。

(2) 茶カテキンと *Lactobacillus salivarius* WB21 株が口腔内細菌におよぼす影響について

Porphyromonas gingivalis JCM8525 株を OD 値が 1 になるように調整し、試験菌液とした。また、Ls WB21 培養ろ液は遠心後、上清をフィルターにてろ過し調整した。被験物質である茶カテキン EGCg (サンフェノン EGCg-OP) をエタノールで溶解し、5%濃度に調整した。

茶カテキンに対する口腔内細菌の感受性試験

L. salivarius WB21 株、*P. gingivalis* (ATCC33277 株、JCM8525 株)、*S. mutans* JCM5705 株、*Prevotella intermedia* ATCC25611 株、*Fusobacterium nucleatum* JCM8532 株、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JCM8577 株 の茶カテキン (EGCg) に対する感受性を、寒天平板希釈法で調べた。

Porphyromonas gingivalis に対する Ls WB21 ろ液と茶カテキン (EGCg) の混合培養の影響

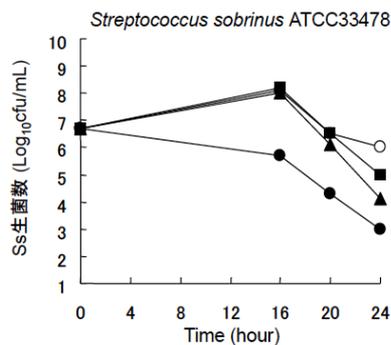
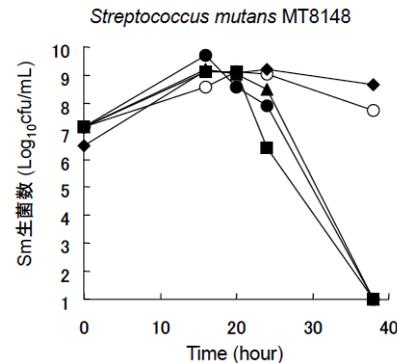
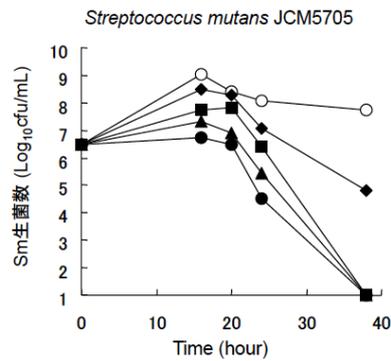
P. gingivalis (ATCC33277 株、JCM8525 株) と Ls WB21 培養ろ液および EGCg を混合後、37 °C、嫌気下にて培養し、6 時間後に *P. gingivalis* の生菌数を測定した。

4. 研究成果

(1) *Lactobacillus salivarius* WB21 株がう蝕原因細菌におよぼす影響について

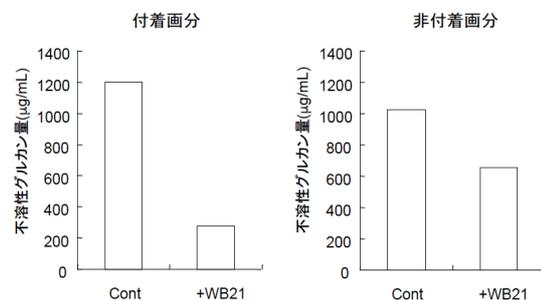
Streptococcus mutans および *Streptococcus sobrinus* に対する増殖抑制作用

S. mutans JCM5705 株および *S. mutans* MT8148 株とともに、Ls WB21 の添加菌数に依存的に減少した。*S. sobrinus* ATCC33478 においては、Ls WB21 の添加菌数に依存的に減少しなかった。



不溶性グルカンの抑制実験

S. mutans JCM5705 株および *S. mutans* JCM5705 株より産生される不溶性グルカン量は、付着画分、非付着画分ともに Ls WB21 の添加により減少した。



(2) 茶カテキンと *Lactobacillus salivarius* WB21 が口腔内細菌におよぼす影響について

茶カテキンに対する口腔内細菌の感受性試験

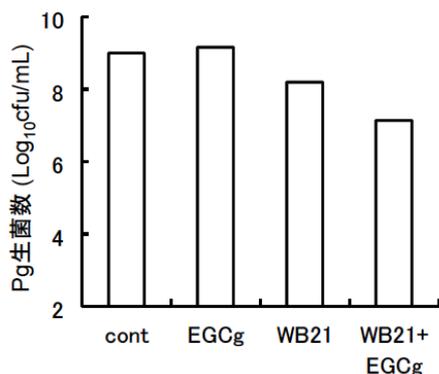
P. gingivalis と *P. intermedia* は他の細菌と比較した結果、茶カテキンに対する感受性が高かった。

菌株	MIC(mg/mL)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC33277	2.5
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC25611	2.5
<i>Fusobacterium nucleatum.subsp.nucleatum</i> JCM8532	2.5
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> JCM8577	10
<i>Streptococcus mutans</i> JCM5705	5
<i>Lactobacillus salivarius</i> WB21	25

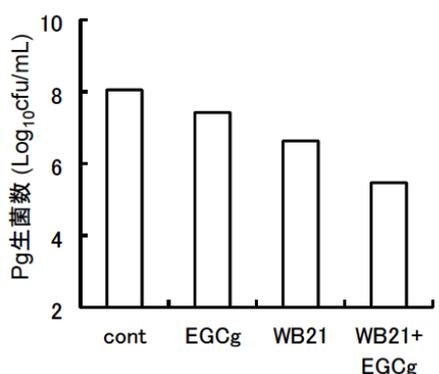
Porphyromonas gingivalis に対する Ls WB21 ろ液と茶カテキンの混合培養の影響

P.gingivalis の菌数は Ls WB21 ろ液の添加により減少し、EGCg の添加でさらに減少した。*P.gingivalis* JCM8525 および *P.gingivalis* ATCC33277 の菌数は WB21 ろ液の添加により減少し、茶カテキンの添加でさらに減少した。

Porphyromonas gingivalis JCM8525



Porphyromonas gingivalis ATCC33277



引用文献

- 1) Larsson PG, Stray-Pederson B, Rytting KR, Larsen S. Human lactobacilli as supplementation of clindamycin to patients with bacterial vaginosis reduce the recurrence rate; a 6-month, double-blind, randomized, placebo-controlled study. BMC Womens Health. 8:3, 2008. DOI 10.1186/1472-6874-8-3.
- 2) Köll P, Mändar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarström L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. Oral Microbiol Immunol. 23:139-147, 2008.
- 3) 松岡隆史, 菅野直之, 瀧川智子, 高根正敏, 吉沼直人, 伊藤公一, 古賀泰裕. *Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1) の服用による歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌抑制効果. 日本歯周病学会学会誌. 48(4):315-324, 2006.
- 4) 松岡隆史, 菅野直之, 伊藤公一, 古賀泰裕. *Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1) の服用が臨床症状およびプラークの歯周病原菌におよぼす効果. 日本歯周病学会学会誌 47(3):194-202, 2005.
- 5) Nikawa H, Makihara S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, Darmawan S, Hamada T, Hara K, Matsumoto A, Takamoto T, Aimi R. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. Int J Food Microbiol. 95(2):219-223, 2004.
- 6) 花岡裕吉, 内藤聡, 豊田好洋, 松川英彦, 鈴木信之, 平田晴久, 野津克忠, 小田重人, 枝本洋. 乳酸菌 (*Lactobacillus salivarius* WB21 株) のラットを用いた 13 週反復混餌投与毒性試験. 応用薬理. 66:27-36, 2004.
- 7) Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Yoneda M, Iwamoto T, Oshiro S, Yamashita Y, Hirofuji T. Effects of oil drops containing *Lactobacillus salivarius* WB21 on periodontal health and oral microbiota producing volatile sulfur compounds. J Breath Res. 6(1):017106, 2012. Doi:10.1088/1752-7155/6/1/017106.
- 8) Iwamoto T, Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Hirofuji T. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 110:201-208, 2010.

9) Jindal G, Pandey RK, Agarwal J, Singh M. A comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children. *Eur Arch Paediatr Dent*. 12:211-215, 2011.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Suzuki N, Higuchi T, Nakajima M, Fujimoto A, Morita H, Yoneda M, Hanioka T, Hirofuji T. Inhibitory effect of *Enterococcus faecium* WB2000 on volatile sulfur compound production by *Porphyromonas gingivaris*. *Int J Dent*. 2016:8241681, 2016.
DOI:10.1155/2016/8241681.

Suzuki N, Fujimoto A, Yoneda M, Watanabe T, Hirofuji T, Hanioka T. Resting salivary flow independently associated with oral malodor. *BMC Oral Health*. 19:17(1):23, 2016.
DOI:10.1186/s12903-016-0255-3.

Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Yamada K, Iwamoto T, Masuo Y, Hirofuji T. *Lactobacillus salivarius* WB21 –containing tablets for the treatment of oral malodor: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. *Oral surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol*. 117(4):462–470, 2014.
DOI:10.1016/j.oooo.2013.12.400.

[学会発表](計5件)

樋口拓哉, 谷口奈央, 藤本暁江, 米田雅裕, 埴岡 隆, 廣藤卓雄. *Porphyromonas gingivalis* の増殖及び揮発性硫黄化合物産生に対する *Enterococcus faecium* WB2000 株の抑制作用. 第 144 回日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会 2016. 6. 9-10.

藤本暁江, 谷口奈央, 米田雅裕, 森田浩光, 埴岡 隆, 廣藤卓雄. 口腔の乾燥状態が口臭におよぼす影響について. 第 7 回日本口臭学会学術大会 2016. 6. 18-19.

藤本暁江, 谷口奈央, 米田雅裕, 森田浩光, 埴岡 隆, 廣藤卓雄. 口臭における唾液分泌量と口腔粘膜水分量の関係について. 第 23 回日本歯科医学会総会 2016. 10. 21-23.

藤本暁江, 米田雅裕, 鈴木奈央, 榎尾陽介, 山田和彦, 森田浩光, 廣藤卓雄. S-PRG イオン溶出液が口腔内バクテリアバイオフィルムにお

よぼす影響. 第 142 回日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会 2015. 6. 25-26.

藤本暁江, 谷口奈央, 米田雅裕, 森田浩光, 廣藤卓雄, 埴岡 隆. 唾液分泌量と口腔粘膜水分量が口臭に与える影響. 第 6 回日本口臭学会学術大会 2015. 7. 4-5.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
福岡歯科大学・福岡医療短期大学 研究業績データベース
www.fdcnet.ac.jp/research/gyouseki/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 暁江 (FUJIMOTO, Akie)

福岡歯科大学 総合歯科学講座 助教

研究者番号: 60707983

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし