

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670886

研究課題名(和文)複数菌種を用いたオーラルプロバイオティクスの開発

研究課題名(英文)Development of oral probiotics using multi-bacteria

研究代表者

藤原 奈津美 (FUJIWARA, Natsumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：50596913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、プロバイオティクスの口腔特に歯周疾患予防製剤としての応用を目的とし、*Lactobacillus reuteri*の歯周病原菌に対する効果を検討し、増殖抑制効果があることを明らかにした。また、*L. reuteri*より産生される抗菌物質reuterinにおいて、歯周病原菌に対する抗菌効果およびバイオフィルム抑制効果を有する可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified inhibitory effect of periodontopathic bacteria on *Lactobacillus reuteri*. Moreover, we identified that antimicrobial agents, reuterin produced from *L. reuteri* have antimicrobial and antibiofilm effects against periodontopathic bacteria.

研究分野：医歯薬学

キーワード：プロバイオティクス 歯周病

1. 研究開始当初の背景

(1) プロバイオティクスは生体に有益に働く生菌製剤で、その作用はプロバイオティクス中の細菌が産生するバクテリオシン、有機酸あるいは過酸化水素代謝産物による強い殺菌活性と、栄養成分を病原細菌と競合的に摂取することでもたらされる病原細菌の増殖抑制である。プロバイオティクスは腸管内における下痢症などの細菌感染症への応用のみならず、口腔内でも齲蝕原性菌の増殖抑制の効果が報告されている (Nikawa et al., Int J Food Microbiol, 2004; Mayanagi et al., J Clin Periodontol, 2009)。近年では、プロバイオティクスによる口臭抑制効果も報告されている (Iwamoto et al., Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010)。口腔では、*Lactobacilli*、*Streptococci* の乳酸産生菌が多く用いられ、齲蝕原性菌の増殖抑制に対する効果は多数の報告があるものの、歯周病原性細菌に対する詳細な検討はこれまでにほとんどされていない。

(2) *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) はプロバイオティクスのうちの一つで、下痢症などの腸管内の効果以外に口腔領域でも用いられている菌種の一つである。*L. reuteri* は強力な抗菌性を発揮するバクテリオシン様抗菌物質 reuterin を産生し、これが口腔に対して影響を及ぼしている可能性があるが、それに関して着目した検討はなされていない。

2. 研究の目的

本研究において、齲蝕原性菌の増殖抑制や殺菌効果、バクテリオシン様抗菌物質 reuterin を産生することが知られているプロバイオティクスのうちの一つの *Lactobacillus reuteri* を中心に、歯周病原性菌の増殖、臭気物質産生、バイオフィーム形成に対する効果を *in vitro* で詳細に検討し、歯周病に対する臨床応用の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 種々の *L. reuteri* を用いて、歯周病原菌の増殖抑制効果を *in vitro* で詳細に検討した。(2) *L. reuteri* が産生する reuterin が歯周病原菌の増殖、臭気物質産生、バイオフィーム形成に及ぼす効果を検討するために、reuterin の産生に関与する *L. reuteri* の glycerol dehydratase (GD) の活性を欠失させた遺伝子改変株を作製し、歯周病原菌に対する reuterin の影響を探索することとした。

(1) 種々の *L. reuteri* の歯周病原菌に対する増殖抑制効果：*L. reuteri* は、JCM1112、JCM1084、JCM2762、JCM2764 を用い、MRS 培地にて培養を行った。*Porphyromonas*

gingivalis ATCC33277 (*P. gingivalis*) および *Fusobacterium nucleatum* JCM8532 (*F. nucleatum*) の増殖抑制効果を検討した。BHI (hemin および menadione 添加) 培地中に *L. reuteri* の培養上清を一定量添加し、*P. gingivalis* または *F. nucleatum* を増殖させ、経時的に吸光度を測定した。*L. reuteri* は代謝産物に乳酸を大量に産生することが知られており、培養液は pH4.4 の酸性に変化し、大量の酸性代謝産物が産生されていた。一方、歯周病原菌 (*P. gingivalis* および *F. nucleatum*) は pH7.0 以下での生存が困難だったことから、*L. reuteri* の培養上清を限外濾過し、pH の影響を与えない量を BHI (hemin および menadione 添加) 培地に添加することで、歯周病原菌の増殖抑制効果を吸光度測定にて経時的に検討した。

(2) 抗菌物質 reuterin 産生に係る遺伝子欠失株の作製と歯周病原菌に対する reuterin の影響：*L. reuteri* は、グリセロールから glycerol dehydratase (GD) によって reuterin を産生することが知られていることから、GD 活性を欠失させた遺伝子改変株を作製した。しかしながら、*L. reuteri* への形質転換を行うことができなかった。また、*L. reuteri* の代謝産物より reuterin の抽出を試みたが、一定濃度の reuterin を得るためには大量の *L. reuteri* が必要であり、本研究の遂行において不適と判断した。さらに reuterin そのものが不安定な構造をしていることから、reuterin の構造類似体 (reutein-like-compounds: RLCs) を数種類作成し、これらの歯周病原性菌に対する抗菌効果およびバイオフィーム形成抑制効果を検討した。RLCs の抗菌効果においては、*P. gingivalis* ATCC33277、*F. nucleatum* JCM8532、*Prevotella intermedia* 163、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 を用い、微量液体希釈法を用いて MIC を測定した。バイオフィーム形成抑制効果においては、96 ウェルプレートに形成させた *F. nucleatum* のバイオフィームを用いて Biofilm formation assay により評価した。

4. 研究成果

(1) *L. reuteri* の歯周病原性菌に対する増殖抑制効果：本研究では、乳酸菌の代謝産物である酸性成分の影響を与えないよう培養上清を限外濾過したものを添加し、歯周病原菌の増殖抑制効果を検討した (図 1)。*P. gingivalis* の増殖において、*L. reuteri* JCM1112、JCM1084、JCM2764 が増殖抑制を示していた。また、*F. nucleatum* では、*L. reuteri* JCM1084、JCM2762 において増殖抑制が示された。以上より、*L. reuteri* の菌株によっては歯周病原菌に対する増殖抑制効果を有することが示唆された。

(2) 抗菌物質 reuterin の歯周病原性菌に対

する影響：*L. reuteri* の代謝産物として産生される reuterin は、広いスペクトルで抗菌効果を持つことが知られている。本研究では reuterin の構造類似体 (reutein-like-compounds:RLCs) を数種類作成し、これらの歯周病原性菌に対する抗菌

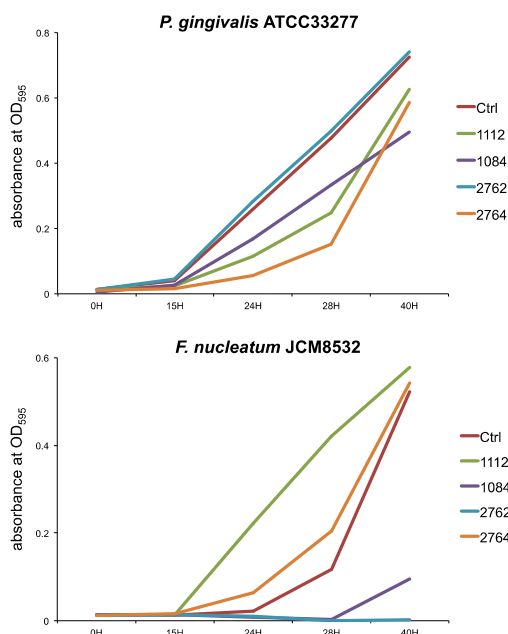


図1 *L. reuteri*の歯周病原菌に対する増殖抑制効果

効果およびバイオフィルム形成抑制効果を検討した。RLCsの抗菌効果においては、いくつかのRLCsにおいて抗菌活性を示した。さらに、大腸菌、緑膿菌のような一般病原細菌にも同様にMIC測定を行ったところ、これらには抗菌活性が見られなかった。以上より、RLCsには歯周病原菌特異的な抗菌活性がある可能性が示唆された。バイオフィルム形成抑制効果においては、いくつかのRLCsにバイオフィルム形成抑制効果を示していた。

以上のように、我々は、*L. reuteri*の歯周病原菌に対する効果を検討し、菌株によって増殖抑制効果を有すること、*L. reuteri*より産生される抗菌物質 reuterin が抗菌活性やバイオフィルム形成抑制効果を有する可能性があることを明らかにした。これら結果を総括し、論文として投稿する予定である。

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は下線)

[雑誌論文](計6件)

1. Fujiwara N, Tsuruda K, Iwamoto Y, Kato F, Odaki T, Yamane N, Hori Y, Harashima Y, Sakoda A, Tagaya A, Komatsuzawa H, Sugai M and Noguchi M. : Significant increase of oral bacteria in the early pregnancy period in Japanese women., Journal of Investigative and Clinical Dentistry, Article first published online:

Sep. 8 2015, DOI: 10.1111/jicd.12189, 査読有

2. 湊 晶帆, 尾崎 和美, 藤原 奈津美, 中江 弘美, 藪内 さつき, 松山 美和 : 歯科衛生士教育における OSCE 形式実技試験の環境構築, 日本歯科衛生教育学会雑誌, 6(1), 30-39, 2015, 査読有
3. 藤原 奈津美, 柳沢 志津子, 中江 弘美, 藪内 さつき, 白山 靖彦, 尾崎 和美 : 歯科衛生士養成臨床実習における学習プロセスに関する質的分析, 日本歯科衛生教育学会誌, 5(1), 39-45, 2014, 査読有
4. Yumoto H, Hirota K, Hirao K, Miyazaki T, Yamamoto N, Miyamoto K, Murakami K, Fujiwara N, Matsuo T and Miyake Y : Anti-inflammatory and protective effects of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on oral epithelial cells., Journal of Biomedical Materials Research. Part A, 103(2), 555-563, 2014, DOI: 10.1002/jbm.a.35201, 査読有
5. 垣内 菜摘, 湊 晶帆, 岡澤 悠衣, 大津 朱里, 藤原 奈津美, 日野出 大輔, 伊賀 弘起 : ヘルシンキ・メトロポリア応用科学大学への短期留学における活動報告, 四国歯学会雑誌, 27(1), 49~53, 2014, 査読有
6. Ishikawa M, Yoshida K, Okamura H, Ochiai K, Takamura H, Fujiwara N and Ozaki K : Oral porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3b signaling pathway., Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1832(12), 2035-2043, 2013, DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.07.012, 査読有

[学会発表](計9件)

1. 藪内 さつき, 中江 弘美, 日野出 大輔, 伊賀 弘起, 尾崎 和美, 白山 靖彦, 松山 美和, 吉岡 昌美, 柳沢 志津子, 藤原 奈津美, 渡辺 朱理, 土井 登紀子, 河野 文昭, 吉本 勝彦 : 歯学部学生の情動知能に対する高齢者交流学习の効果, 第34回日本歯科医学教育学会総会/学術大会, 2015年7月10日, かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
2. 藤原 奈津美, 中江 弘美, 藪内 さつき, 尾崎 和美 : 歯科衛生士学生の自己教育力に関する実態について, 第34回日本歯科医学教育学会総会/学術大会, 2015年7月10日, かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
3. 中江 弘美, 藤原 奈津美, 伊賀 弘起, 吉岡 昌美, 日野出 大輔 : 全人的医療

- を支援する歯科衛生士教育としての病棟実習の取り組みとその効果, 第 34 回日本歯科医学教育学会総会/学術大会, 2015 年 7 月 10 日, かがしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
4. 藪内 さつき, 中江 弘美, 日野出 大輔, 竹内 祐子, 伊賀 弘起, 尾崎 和美, 白山 靖彦, 松山 美和, 柳沢 志津子, 吉岡 昌美, 吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 渡辺 朱理, 土井 登紀子, 中野 雅徳, 河野 文昭, 吉本 勝彦: 地域育成型歯学教育プログラムの評価(第 2 報)地域福祉体験学習における教育効果の変化, 平成 26 年度 FD 推進プログラム 大学教育カンファレンス in 徳島, 2014 年 12 月, 徳島大学常三島キャンパス(徳島県徳島市)
 5. 星野 由美, 溝部 潤子, 中道 敦子, 渡辺 朱理, 藤原 奈津美, 尾崎 和美, 日野出 大輔, 伊賀 弘起, 岩城 重次, 菅 武雄: 口腔ケアシミュレータを応用したリカレント教育の試み-学生実習との比較-, 第 33 回日本歯科医学教育学会総会/学術大会, 2014 年 7 月 4 日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 6. 藪内 さつき, 中江 弘美, 日野出 大輔, 伊賀 弘起, 尾崎 和美, 白山 靖彦, 松山 美和, 柳沢 志津子, 吉岡 昌美, 星野 由美, 藤原 奈津美, 渡辺 朱理, 河野 文昭, 吉本 勝彦: 高齢者交流学習後の歯学部生の高齢者イメージの変化, 第 33 回日本歯科医学教育学会総会/学術大会, 2014 年 7 月 4 日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 7. Yumoto H, Matsuo T, Hirota K, Hirao K, Miyazaki T, Murakami K, Fujiwara N and Miyake Y: Anti-inflammatory and protective effects of 2-methacryloyloxyethyl-phosphorylcholine-polymer on oral epithelial cells., 92th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (Cape Town, South Africa), Jun.25-28, 2014.
 8. 星野 由美, 中道 敦子, 菅 武雄, 渡辺 朱理, 藤原 奈津美, 松山 美和, 尾崎 和美, 岩城 重次, 日野出 大輔, 伊賀 弘起: 歯科衛生士学生を対象とした新しい口腔ケア教育の取り組み-口腔ケアシミュレータを応用したケア実習の効果-, 第 4 回日本歯科衛生教育学会学術大会, 2013 年 11 月 30 日, 千葉県立保健医療大学 講堂(千葉県千葉市)
 9. Yoshida K, Takamura H, Okamura H, Fujiwara N and Ozaki K: Oral porphyromonas gingivalis translocates to liver and regulates hepatic glycogen metabolisms by attenuating insulin signaling, 10 th

Asian Pacific Society of Periodontology Meeting(Nara city, Nara, Japan), Sep. 3-4, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 奈津美 (FUJIWARA, Natsumi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 50596913

(2)研究分担者

村上 圭史 (MURAKAMI, Keiji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 10335804

尾崎 和美 (OZAKI, Kazumi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 90214121

三宅 洋一郎 (MIYAKE, Yoichiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 80136093