

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09781

研究課題名（和文）枯草菌のプロバイオティクス効果を応用した口腔内環境改善および口臭の抑制

研究課題名（英文）Probiotic effect of *Bacillus subtilis* restraint of the halitosis and improve oral environment

研究代表者

古賀 千尋 (Chihiro, Koga)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：80258417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：われわれはプロバイオティクス *Enterococcus faecium* WB2000 がバイオフィルム抑制効果を示すことを示した。また、口臭患者に *Lactobacillus salibarius* WB21 を含むタブレットやオイルを摂取させると口腔内状態が改善し、口臭が減少することを報告した。一方、プロバイオティクスは歯磨剤へ応用しても有効であることも明らかになり、*L. salibarius* が齲蝕原性細菌を減少させることを報告した。また、最近われわれは *E. faecium* WB2000 が *P. gingivalis* の増殖を抑制し、揮発性硫黄化合物産生を減少させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口臭は主に歯周病原性細菌によって産生される。これまでは抗生剤や消毒薬によって歯周病原性細菌を減らすことが行われてきたが、耐性菌や菌交代現象の問題がある。われわれが取り組んでいるプロバイオティクスによる口臭抑制は、細菌を殺すことなく、細菌叢のバランスを改善する方法である。身体にやさしい方法で口腔内環境を整え、口臭を減らす研究であり、今後、さらなる進展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We revealed that probiotic bacteria *Enterococcus faecium* WB2000 had biofilm-suppressive effect. We also reported that tablets and oil, which contain *Lactobacillus salibarius* WB21 could improve the oral condition and reduce the oral malodor. On the other hand, probiotic bacteria were found to be effective in tooth paste. We reported that *L. salibarius* reduce the number of cariogenic bacteria. Recently, we have shown that *E. faecium* WB2000 suppressed the growth of *P. gingivalis* and reduced the production of volatile sulfur compounds.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口臭 プロバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、清潔志向の高まりから口臭を気にする人が増えており、本学の口臭クリニックの患者数は平成 11 年の開設以来増加傾向にある。また、平成 24 年にはサテライト病院でも口臭クリニックを開始したが、こちらにも多くの患者が来院している。

口臭にはさまざまな臨床的原因があるが、基本的には *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia* 等のグラム陰性菌やいくつかのグラム陽性菌の増加が影響していると考えられる。消毒薬や抗生物質を使用すると一時的に総細菌数が減少し口臭が弱くなるが、これらの薬剤を多用、連用すると耐性菌や菌交代現象などあらたな問題が生じてくる。

口腔内も腸内環境と同様に多種類の細菌が複雑な生態系を構築しているため、プロバイオティクス効果を応用して歯周病原性細菌や一部のグラム陽性菌のような「悪玉菌」を減らすことが口腔内環境の改善および口臭抑制に有効だと考える。本研究課題ではこれまで蓄積してきた乳酸菌実験系を応用し、プロバイオティクスの効果を *in vitro* および *in vivo* で確認するものである。

2. 研究の目的

本プロジェクトは最近注目されているプロバイオティクスを用いて口腔疾患に関する *in vitro* および *in vivo* 研究を行うものである。これまで国内外で多くの興味深い知見が報告されているが、枯草菌による歯周病予防効果や口臭減少効果を明らかにしたものはなく、研究が進展すれば国民の多くを悩ませる口腔領域の問題解決に近づくと期待される。

プロバイオティクスの概念はわかりやすいため一般市民にも浸透してきているが、その一方で根拠のないイメージ戦略が広まっているのも事実である。申請者らの研究グループはこれまで乳酸菌に関する基礎研究、臨床研究を行いエビデンスを蓄積してきた。多くの人を悩ませる口臭を乳酸菌で安全に抑制する研究は国内外で注目を集めている。本課題はこれまで蓄積された研究手法を用い、斬新な着想で研究を行う先駆的な研究である。

プロバイオティクスは抗生物質と違って副作用や耐性菌の問題がないため、口腔領域だけでなく他の領域の慢性疾患治療や健康食品への応用が進むと期待される。また、バイオフィルム抑制効果、口臭ガス抑制効果が確認できれば医学だけでなく他分野への応用など、発展性の高い研究課題だと考える。

3. 研究の方法

プロバイオティクスおよびプロバイオティクス由来成分を用いた *in vitro* 実験を行い、歯周病原性細菌の生物活性抑制、バイオフィルム抑制効果等を確認する。

プロバイオティクスおよび菌体抽出物、培養上清等の成分が *P. gingivalis* その他細菌の増殖や生物活性におよぼす影響を調べる。まず液体培地、寒天培地を用いて *P. gingivalis* その他細菌への増殖抑制を確認する。また、*P. gingivalis* の各種生物活性(プロテアーゼ活性、赤血球凝集活性、溶血反応等)へおよぼす影響を検討する。

歯周組織は多くの種類の細菌が棲息しているので、細菌同士の相互作用への影響も調べる。*P. gingivalis* は他の細菌と共凝集して組織に定着することが知られているので、

*P. gingivalis*の共凝集能におよぼす影響を調べる。また、われわれは唾液サンプルのバイオフィルム形成実験を行っているので、この実験系にもプロバイオティクスおよびプロバイオティクス成分を応用して影響を調べる。

次に歯周病原性細菌が産生する揮発性硫黄化合物の抑制効果について検討する。歯周病原性細菌の液体培養時にプロバイオティクスおよびプロバイオティクス成分を添加し、試験管上部 head space の揮発性硫黄化合物の濃度をガスクロマトグラフィーで測定する。また、すでに生成されたガスの消臭効果については揮発性硫黄化合物の標準ガスにプロバイオティクスを加え消臭効果を確認する。

4 . 研究成果

プロバイオティクスのひとつである *Enterococcus faecium* WB2000 が *in vitro*でのバイオフィルム抑制効果を示すことを示した。また、口臭患者に別のプロバイオティクスである *Lactobacillus salibarius* WB21 を含むタブレットやオイルを摂取させると口腔内状態が改善し、口臭が減少することを報告した。さらに、われわれは *L. salibarius* WB21 含有タブレットの口臭抑制効果を double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial によって確認した。

一方、プロバイオティクスは歯磨剤へ応用しても有効であることも明らかになり、*L. salibarius* が齶蝕原性細菌を減少させることを報告した。

われわれは *E. faecium* WB2000 が *P. gingivalis* の増殖を抑制し、口臭の原因物質である揮発性硫黄化合物産生を減少させることを明らかにした。

また、口臭と関連した因子や他の細菌による口臭の影響についても報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ishii A, Yoneda M, Matsuo T, Omagari S, Suzuki N, Yamamoto S, Morita H, Taniguchi Y, Koga C and Hirofujii T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Inhibition of protease activity of periodontopathogens by purified lactoferrin and lactoferrin supplement.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Oral Hyg Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2332-0702.1000250.	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 -
1. 著者名 Masahiro Yoneda, Ayako Ishii, Tadayuki Matsuo, Sami Omagari, Nao Suzuki, Takashi Tsuzuki, Yusuke Taniguchi, Hiromitsu Morita, Chihiro Koga, Yutaka Takahashi, and Takao Hirofujii.	4. 巻 6
2. 論文標題 Evaluation of a new ceramic-containing toothbrush bristle 1. Questionnaire survey on dental hygienist students about its usability and first impressions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Hyg Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2332-0702.1000240	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 -
1. 著者名 Yusuke Taniguchi, Takashi Tsuzuki, Kae Kakura, Masahiro Yoneda, Kota Isshi, Takashi Tsutsumi, Tomohiro Kawaguchi, Chihiro Koga, Hirofumi Kido.	4. 巻 8
2. 論文標題 Research concerning abutment placement training using a navigation system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dentistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2161-1122.1000517	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 -
1. 著者名 Suzuki N, Nakano Y, Watanabe T, Yoneda M, Hirofujii T, Hanioka T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Two mechanisms of oral malodor inhibition by zinc ions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Appl Oral Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1590/1678-7757-2017-0161	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 -

1. 著者名 T. Higuchi, N. Suzuki, S. Nakaya, S. Omagari, M. Yoneda, T. Hanioka, T. Hirofuji.	4. 巻 98
2. 論文標題 Effects of Lactobacillus salivarius WB21 combined with green tea catechins on dental caries, periodontitis, and oral malodor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch. Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 243-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 N. Suzuki, R. Beppu, M. Yoneda, T. Takeshita, M. Asakawa, Y. Yamashita, T. Hanioka, T. Hirofuji, T. Shinohara.	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of eradication of Helicobacter pylori on oral malodor and the oral environment: a single-center observational study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Research Notes.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-020-05253-5.	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
研究分担者	米田 雅裕 (Yoneda Masahiro) (10253460)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	

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
---------	---------