

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593173

研究課題名(和文) 口腔感染症予防のためのシンバイオティクスおよびバイオジェニクスの構築

研究課題名(英文) A trial of establishment of synbiotics and biogenics for the prevention of oral infection

研究代表者

大島 朋子 (Ohshima, Tomoko)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50233101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔環境の健全化および疾患予防のために、薬剤や化学物質を用いず、プロバイオティクスとプレバイオティクスの融合である「シンバイオティクス」と、有効成分を使った「バイオジェニクス」を構築するための基礎的研究を行った。

3種類の糖では乳酸菌が増殖できたのに対し、むし歯(う蝕)原性菌と口腔カンジダ真菌は増殖できず、プレバイオティクスとして望ましいと示された。う蝕原因菌、口腔カンジダ真菌、歯周病原菌に共通の有効なプロバイオティクス株は5株候補となり、歯周病原菌に有効な2株の乳酸菌培養上清から有効成分を精製した結果、1株は乳酸である可能性が高く、もう1株は乳酸に依存しない低分子物質である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For improvement of human oral health environment and disease prevention without using medicine and chemicals, a basic research to create the "synbiotics" which is fusion of probiotics and prebiotics, and "biogenics" using active ingredient was performed.

Although lactobacilli could grow with three kinds of sugar, dental cariogenic bacteria and oral candidiagenic fungus could not be multiplied; therefore it was indicated that those were desirable as prebiotics. Five strains were selected as probiotics candidates, which suppressed the cariogenic bacteria, periodontal bacteria, and oral candidiagenic fungus in common. Active ingredients against the periodontal bacillus were refined from the culture supernatant of two lactobacilli strains, and a possibility was suggested that one major effective component was lactic acid and the other was a low molecular weight substance which did not depend on lactic acid.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：プロバイオティクス シンバイオティクス バイオジェニクス

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 (probiosis) を意味する生態学的用語を起源として作られた用語である。従来、「腸内微生物叢のバランスを改善することにより、宿主に有益に働く生菌添加物」として定義され、腸管感染症の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、尿路や呼吸器感染症の予防に有効であること、乳幼児のアレルギーやアトピーなど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若干増えつつある。

一般的にプロバイオティクスに利用される *Lactobacillus* と *Bifidobacterium* 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たり、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、「プレバイオティクスとプロバイオティクスの融合」として「シンバイオティクス」という呼称が提案されている。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。

<問題点>

むし歯 (う蝕)、歯周疾患やカンジダ症のような口腔 3 大疾患は、口腔細菌叢に混在する病原微生物によって引き起こされる。これらを予防・治療するために一般に消毒・抗菌性のある化学物質を利用した口腔ケア製品が市販されて来たが、化学物質は宿主の細胞を傷害する。

現在の日本では、う蝕について 12 歳児で比較すると他の先進国の 2 倍以上も多く、歯周疾患は生活習慣病の一つとして位置付けられ、成人のどの年齢層でも 80% 以上が罹患している。さらに高齢化社会では義歯性口内炎を含む口腔カンジダ症やカンジダ性誤嚥性肺炎が大きな問題となっている。これら口腔病原微生物による疾患を防ぐために用いられている抗菌薬や消毒剤などの薬剤は、感染症の原因菌の減少・除去に有用であるが、前述したように人体への為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っている。そのため、これらを用いずに自然に口腔病原微生物を抑制する食生活を構築することは、国民の QOL を向上させるためにもたいへん価値がある。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。

これら機能性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、プレバイオティクスは腸管内にプロバイオテ

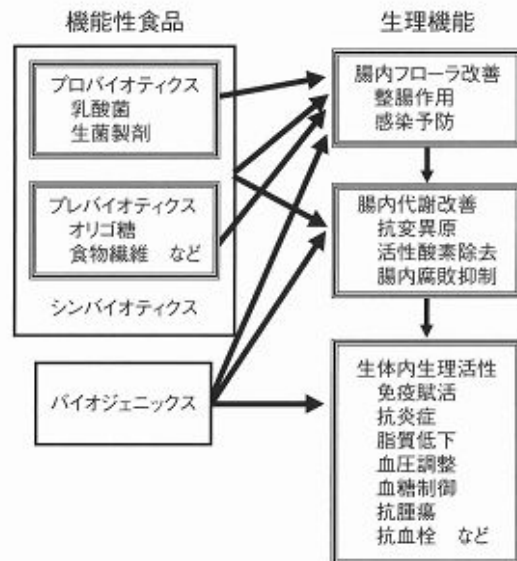


図1 乳酸菌の生理機能

イクス菌の定着・増殖を補助する物質として良く知られている (図 1)。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、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。

発酵乳・乳酸菌の健康効果は、20 世紀初頭にロシア出身の免疫科学者のメチニコフが「ブルガリアに長寿者が多いのは発酵乳を沢山食べているからだ」との不老長寿説を提唱して以来、数多くの研究が行われており、科学的解明が進みつつある。その効果は作用機構からみると、大きく 2 つに分けられる (光岡, 1976、図 1)。1 つ目は生きている微生物の効果で、これには 1) 微生物の腸内増殖によりもたらされる効果と、2) 菌体成分が直接或いは腸内菌叢を介しての作用がある。1) がいわゆる「プロバイオティクス」であり日本を初めとして世界中で整腸作用及びそれから派生する効果の優れた菌株に関する研究がなされている。さらに、プロバイオティクス菌が生体に定着しやすいような増殖環境を提供する栄養素としてプレバイオティクスがあり、これらが同調して「シンバイオティクス」とされる。

2 つ目の作用機構は微生物により生成された有効物質の効果であり、これには「バイोजェニクス」という名前が提唱されている (光岡, 1988)。これは「腸内フローラを介することなく、直接、血圧降下作用、免疫賦活作用、コレステロール低下作用、整腸作用、抗腫瘍作用などの生体調節・生体防御・疾病予防・老化制御などに働く食品成分」であり、広義には、生理活性ペプチド、植物性ポリフェノール、カロチノイド、DHA、ビタミンなどがこれに該当する。

「バイोजェニクス」が発酵乳・乳酸菌の効用の作用機序として大きな可能性をもっていることは、*Lactobacillus helveticus* 発酵乳より見出された「ラクトトリペプチド」に関する研究で明らかとなった (中村, 1999)。発酵の過程で乳酸菌のプロテアー

ぜにより乳蛋白から 2 種類のトリペプチド (Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro) が生成され、それを摂取すると腸管から吸収され、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性成分を産生・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、低分子抗菌物質、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。しかし、これら抗菌成分は一般病原細菌に対してであり、口腔細菌や真核生物の真菌である *Candida* に対しての効果は不明である。

2. 研究の目的

本研究では乳酸菌と数種の糖との組み合わせとそれらの代謝産物による効果が口腔の健康に対して明確かつ有効な効果を発揮するシンバイオティクスとバイオジェニクスを確立することが目的である。

さらに、バイオジェニクスにおいては有効成分を同定し、その成分の増強を図ることで、より強化された「シンバイオジェニクス」を構築し、国民の日々の生活に取り入れることで、Quality of life の向上に努めるものである。

3. 研究の方法

シンバイオティクスおよびバイオジェニクス候補の 1 次スクリーニング

(1) 有用糖質、有効乳酸菌株および産生物スクリーニング

乳酸菌株の分離・培養方法

乳酸菌標準菌株 7 種に加え 46 の分離菌株は乳酸菌選択培地でヒト口腔および市販の発酵乳製品 (ヨーグルト、チーズ、豆乳発酵食品) から分離し、スクリーニングを行った。

以下の 4 つの試験の指標口腔病原微生物として、*Candida albicans* ATCC18804 (カンジダ症原因真菌)、*Streptococcus mutans* ATCC25175 (う蝕原菌)、*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 (歯周病菌) を用いた。

(2) プレバイオティクススクリーニング

糖資化性試験：各 12 糖 (glucose, galactose, xylose, xylitol, cellobiose, sucrose, maltose, lactose, trehalose, arabinose, melezitose, raffinose) 存在下で各乳酸菌株と *C. albicans*, *S. mutans* の増殖試験を行った。

(3) プロバイオティクス/バイオジェニクススクリーニング

乳酸菌生菌体および培養上清による *C. albicans* 生育阻害試験 (CFU アッセイ)

乳酸菌培養上清による *P. gingivalis* 生育阻害試験 (ディスク法による阻止円の測定および濁度試験)

乳酸菌生菌体および培養上清による *S. mutans* の不溶性菌体外多糖体量の測定 (フェノール硫酸法)

(4) 有効成分の精製および特性解析

候補菌培養上清を酢酸エチルまたはアセトン分画し、その上清成分をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分け、得られた抗菌性分画を HPLC で分離し質量分析を行った。

4. 研究成果

(1) プレバイオティクス スクリーニング
糖資化性試験を 12 種類の糖を用いて行ったところ、乳酸菌はすべての糖で増殖した。口腔病原性菌のうち、う蝕原性菌の *S. mutans* とカンジダ症原因真菌 *C. albicans* も糖資化性があるので、同様の試験を行ったところ、3 種類の糖には資化性がなかった。これらの利用されにくい糖をプレバイオティクスとして使用すると、同時に口腔病原微生物の増殖阻害効果が期待できるものとして、望ましいと考えられた。

(2) プロバイオティクス/バイオジェニクススクリーニング

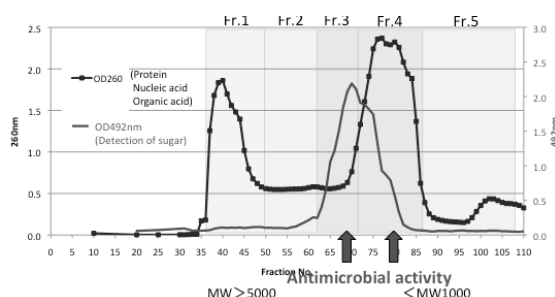
歯周病原菌に対する ヒト口腔および発酵食品から分離した乳酸菌株について、歯周病原性菌 *P. gingivalis* の抑制性を検討したところ、ほとんどの菌株が産生する乳酸によって抑制を示した。しかし、乳酸は *S. mutans* と *C. albicans* には無効であり、口腔内では歯の脱灰のリスクも考えられる。そこで乳酸菌の培養上清を中性に調整後、*P. gingivalis* の抑制性を MIC で検討したところ、有効なものは 2 株に絞られた。

C. albicans に対する抑制効果を持つ乳酸菌株を選択するため、同様に培養上清を用いて酵母型 *C. albicans* の CFU アッセイで検討した結果、8 株が有効であった。さらにその中で *S. mutans* の不溶性グルカン産生に与える影響をフェノール硫酸法で検出した結果、阻害するものは 5 株であった。より病原性が高いとされる菌系型 *C. albicans* への抑制効果をその 5 株で検討した結果、2 株が特に阻止効果を発揮した。

バイオジェニクスへ応用するための有効成分の同定

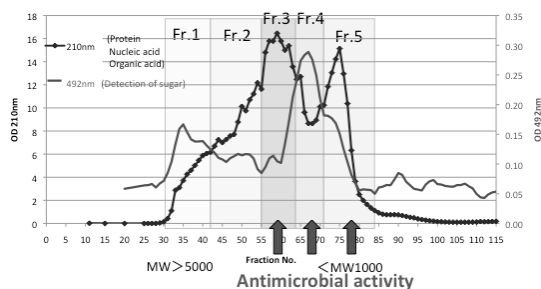
歯周病菌に対し抑制効果を持つ 2 菌株の産生抗菌性物質の精製と特性解析を行った。

A. 候補菌 A の培養上清を酢酸エチル分画により水溶性と脂溶性成分に分け、水溶性成分を質量分画カラムクロマトグラフィーで分離し、抗菌性分画を得た (下図)。抗菌活性は乳酸依存性が高いことが示された。しかし、HPLC での解析結果からは、乳酸ピーク以外にも多数の活性ピークが検出されたことから、ペプチドなどの乳酸以外の成分からな



る抗菌物質の存在も示唆された。

B. 候補菌 B の培養上清を A. と同様に分画し抗菌活性を検討した結果（下図）、乳酸に依存せず、低分子物質である可能性が示唆された。そこで、アセトン沈殿による上清成分の濃縮を行い、HPLC で分離し抗菌活性分画を得て、分子量分析したところ、500Da 未満で、既知の抗菌物質ではない可能性が示唆された。そこで、さらに詳細に分析するために LC-MS で分子量を確定し、分子組成を推定したところ、ペプチドではなく新規物質である可能性が示唆された。



今後はこれらの有効菌種、有効成分の臨床応用の可能性や、その際に、常在菌叢に与える影響を調べる必要があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

Kawai T, Ohshima T, Shin R, Gomi K, Maeda N. “Analysis of the antimicrobial constituent of Lactobacillus against periodontal pathogen.” 93rd International Association of Dental Research (IADR) General Session & Exhibition, Hynes Convention Center (Boston, USA). 2015.3.11-14.

河井智美、大島朋子、新良一、水谷武夫、三浦竜介、前田伸子、五味一博． 乳酸菌の歯周病原菌に対する抗菌成分の解析． 第 57 回日本歯周病学会秋季学術大会 2014 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2014.10.18-19 .

大島朋子 「口腔 Candida のさまざまな病原性とそのマネージメント法の探索」 第 17 回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会 東京慈恵会医大 高木 2 号館 B1 南講堂(東京都 港区) 2014. 10. 4.

Kojima Y, Ohshima T, Seneviratne C J A A & Maeda N. “Development of new synbiotics, fusion of prebiotics and probiotics, to suppress oral pathogens.” 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 サテライトシンポジウム 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2014.9.25 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大島 朋子 (OHSHIMA, Tomoko)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50233101