

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870786

研究課題名(和文)新規プロバイオティクスの歯周疾患に対する効果の検討

研究課題名(英文)Effects of novel probiotics on periodontal disease

研究代表者

齋藤 真規 (SAITO, Masanori)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：30434096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳児腸管から分離されたLactobacillus crispatus KT-11の歯周病に対する効果を検討したところ以下の結果が得られた。

KT-11生菌と歯周病原細菌との混合培養において各種歯周病原細菌の殺菌効果認められた。また、歯周病原細菌であるPorphyromonas gingivalis (P. g)を口腔内接種した歯周病モデルマウスにKT-11死菌を混合した食餌を与えたところ、血液中のIgG量と唾液中のIgA量の増加、P. g特異的抗体価上昇および歯槽骨吸収抑制を認めた。これらの結果から、KT-11経口摂取が歯周病を予防・改善できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Influence of Lactobacillus crispatus KT-11, which isolated from the healthy infant feces, on periodontal disease is as follows:

In, mix culture, several periodontopathogens were killed after viable KT-11 reached maximal cell density. Mice orally infected with Porphyromonas gingivalis (mouse periodontitis model) exhibited significantly more bone loss compared with that of sham-infected mice. Mouse periodontitis model that ingested the KT-11-containing feed was significantly attenuated alveolar bone resorption. Induction of total IgG in plasma and total secretory IgA in saliva was observed. A specific plasma IgG antibody response to P. gingivalis also was induced. Based on the immune response to P. gingivalis infection induced by ingestion of KT-11, this study suggests that oral administration of KT-11 is effective in preventing chronic periodontitis.

研究分野：微生物免疫学

キーワード：プロバイオティクス 歯周病 乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

健康な乳児の腸内から分離された *Lactobacillus crispatus* KT-11 は様々な免疫調節機構が報告されているが、口腔に対する KT-11 の細菌学的あるいは免疫学的研究は行われていない。一方、歯周病は長年研究されているにも関わらずその予防法や治療法は確立されていない。

2. 研究の目的

KT-11 のプロバイオティクス効果について歯周疾患を中心に検討し、歯周疾患に対する KT-11 摂取の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) KT-11 の胃酸抵抗性を検討するため、人工胃液 (pH3.0 および 4.0) に  $5 \times 10^5$  CFU/ml KT-11 を添加し 37℃, 3 時間培養後の KT-11 生菌数を測定した。

(2) KT-11 の腸管上皮細胞付着能を検討するため、ヒト胎児腸管上皮細胞 INT-407 に  $1 \times 10^6$  CFU KT-11 を添加後 2 時間培養した。培養後は、INT-407 を PBS で 3 回洗浄し、細胞に付着している菌数を測定し、各種乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* および *Lactobacillus vaginalis*) と比較した。

(3) 腸管上皮細胞の LPS 処理に対する KT-11 の作用を検討するため、INT-407 に 10 µg/ml LPS および  $1 \times 10^6$  CFU KT-11 を添加後、48 時間培養した培養上清で、IL-8 産生量 (ELISA) を、培養細胞で細胞の生存数および Toll 様レセプター 4 (TLR4) の発現量 (Flow cytometry) を測定し、各種乳酸桿菌および *Lactobacillus rhamnosus* GG と比較した。

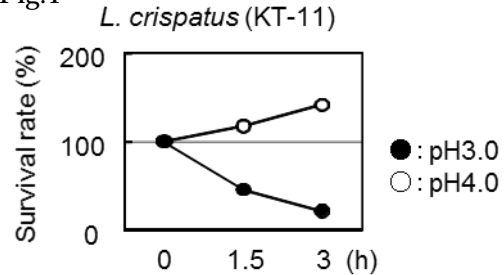
(4) 歯周病原細菌に対する KT-11 の殺菌効果を検討するため、 $1 \times 10^7$  CFU/ml 各種歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) と  $1 \times 10^7$  CFU/ml KT-11 を培地内で混合培養後、経時的にそれぞれの生菌数を測定した。

(5) 歯周疾患の予防に KT-11 が有効か検討するため、動物を用いた実験を試みた。BALB/c マウスを用いて加熱死菌体 KT-11 を 6 週間にわたり市販粉末飼料と共に自由摂取させ、摂取 4 週間後に  $10^9$  CFU の *P. gingivalis* を 2 週間で計 15 回口腔感染させた (KT-11 摂取群)。また、死菌体 KT-11 を含まない粉末飼料を自由摂取させたマウスにも同様に *P. gingivalis* 口腔感染させた (KT-11 非摂取群)。実験期間終了後、唾液、血漿および糞便中の全 IgG または全分泌型 IgA (S-IgA) を ELISA 法にて定量した。*P. gingivalis* 最終感染後 30 日経過した KT-11 摂取群、KT-11 非摂取群の歯槽骨の損失レベルを顕微鏡下で評価した。

4. 研究成果

(1) KT-11 に対する胃酸抵抗性について検討した結果、pH3.0 では生菌数が著しく減少したが、pH4.0 では生菌数の減少は認められなかった (Fig. 1)。また、*L. acidophilus* および *L. vaginalis* が pH3.0 に耐性を示した。

Fig.1



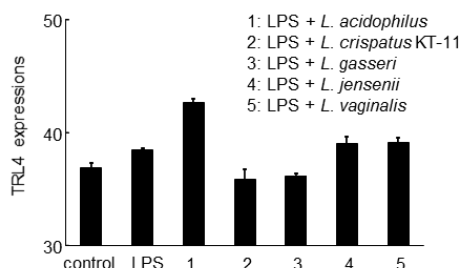
(2) KT-11 の腸管上皮細胞付着能を検討した結果、KT-11 は INT-407 に対する付着量は  $2.5 \times 10^4$  CFU/ml だった。最も多く付着したのはプロバイオティクス細菌である *L. rhamnosus* GG ( $1.6 \times 10^5$  CFU/ml) であり、KT-11 は腸管粘膜に付着しにくいと判断された。

(3) 腸管上皮細胞の LPS 刺激による IL-8 産生は KT-11 および *L. gasseri* で優位に減少した (Table 1)。また、同様に TLR4 の発現量も KT-11 および *L. gasseri* で優位に減少した (Fig. 2)。これらの結果から、KT-11 および *L. gasseri* は TLR4 の down-regulation によって LPS 由来の炎症を抑制することが示唆された。

Table1

	Survivalrate (%)	IL-8 (ng/mL)
Control	56.9±10.3	285.4±37.6
LPS	57.9±0.8	405.9±59.5
LPS + <i>L. acidophilus</i>	49.8±1.6	400.9±22.4
LPS + <i>L. crispatus</i>	67.9±1.3*	375.1±28.1
LPS + <i>L. gasseri</i>	63.6±5.8	293.4±29.0
LPS + <i>L. jensenii</i>	48.2±1.7	403.4±5.2
LPS + <i>L. vaginalis</i>	47.8±6.4	461.8±19.5

Fig.2



(4) 歯周病原細菌に対する KT-11 の殺菌効果を検討したところ、*P. gingivalis* 381, ATCC 33277 および A.

*actinomycetemcomitans* 高ロイコトキシン産生株 ATCC 700685 は KT-11 との 9 時間の共培養で完全に死滅した。また *P. intermedia* ATCC 25611 は 15 時間の共培養で完全に死滅した (Fig. 3)。*P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* の菌数は KT-11 の対数増殖期と一致 (共培養 3~6 時間) して急激に減少した。*Lactobacillus crispatus* はバクテリオシン (crispacin A) を産生することが知られており (文献), 増殖過程におけるバクテリオシン産生によって殺菌されたと考えられた。*P. intermedia* においては対数増殖期と一致せず, 共培養 9 時間で急激に減少した。*P. intermedia* は培養後の最低 pH が 5.2 であるが, 共培養 9 時間で pH5.0 を下回ったことから急激に菌数が減少したと考えられた (Table 2)。

Fig. 3

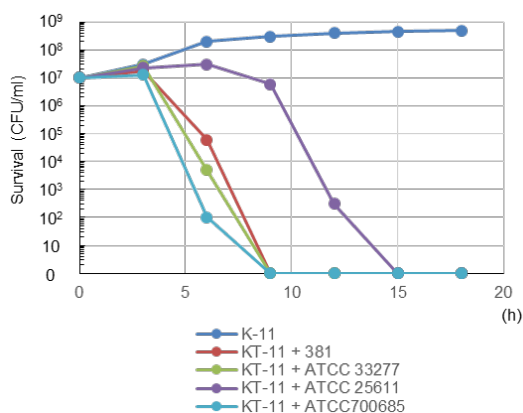


Table 2

	pH fluctuations				
	Incubation time				
	0	6	9	12	24
KT-11	6.5	6.1	4.8	4.5	4.2
381	6.5	6.5	6.5	6.5	5.3
ATCC 33277	6.5	6.5	6.5	6.5	5.4
ATCC 25611	6.5	6.5	6.5	6.5	5.2
ATCC 700685	6.5	6.5	6.5	6.4	5.3

(5) 歯周疾患の予防に KT-11 が有効か検討するため, 動物を用いた実験を試みたところ, KT-11 摂取群は, KT-11 非摂取群と比較し, 歯槽骨の吸収レベルが顕著に抑えられていた (Fig. 4)。また, KT-11 摂取群では血漿中全 IgG と唾液中全 S-IgA 抗体の誘導が示された (Fig. 5)。以上のことから *L. crispatus* KT-11 の自由摂取により口腔内局所での免疫応答を調節する可能性が示唆され, *P. gingivalis* 口腔感染による歯周組織の炎症抑制に有用であると考えられる。

Fig. 4

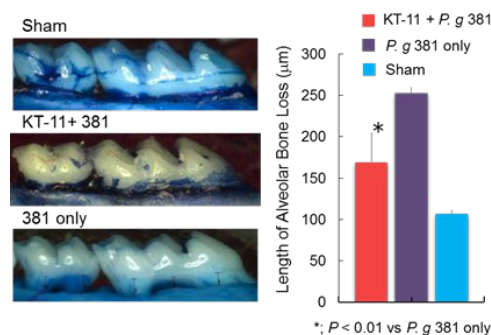
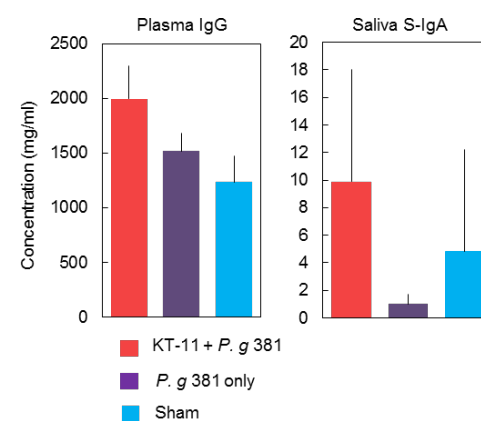


Fig. 5



## 引用文献

Tahara T, Kanatani K, Isolation and characterization of crispacin A, a cell-associated bacteriocin produced by *Lactobacillus crispatus* JCM 2009., FEMS Microbiol Lett, vol.147, 1997, 287-290

## 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 12 件)

Saito M, Hirasawa M, Kuwahara M, Okada T, Umezawa K, Kobayashi T, Okamoto M, Naito M, Hirasawa M, Takada K, Complete Genome Sequence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Serotype g Strain NUM4039 (JCM 30399), Genome Announc, 査読有, vol.4, No.2, 2016, e00158-16  
DOI: 10.1128/genomeA.00158-16

Tamamura R, Gotouda H, Shinozaki-Kuwahara N, Saito M, Okada H, A study on concomitant infections of cariogenic bacteria and the risk of dental caries 日大口腔科学, 査読有, 42 巻 1 号 2016, 12-17

Tamamura R, Gotouda H,

Shinozaki-Kuwahara N, Saito M, Okada H, Caries activity in adults with high level of *Lactobacillus* 日大口腔科学, 査読有, 42 巻 1 号, 2016, 7-11

齋藤 真規, 栗原 紀子, 續橋 治, 小林 良喜, 平澤 正晃, 落合 智子, 歯周病原性黒色集落嫌気性桿菌群のため増殖培地の検討, 日大口腔科学, 査読有, 41 巻 3・4 合併号, 2016, 103-109

Saito M, Shinozaki-Kuwahara N, Hirasawa M, Takada K, *Streptococcus oricebi* sp. nov. isolated from the oral cavity of tufted capuchin., Int J Syst Evol Microbiol, 査読有, vol.66, No.2, 2016, pp. 1063-1067  
doi: 10.1099/ijsem.0.000834.

Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Saito M, Umezawa K, Ohta M, Shinozaki-Kuwahara N, A selective medium for the isolation of *Microbacterium* species in oral cavities., J Microbiol Meth, 査読有, vol.116, 2015, 60-65  
doi: 10.1016/j.mimet.2015.06.016.

Taguchi C, Arikawa K, Saito M, Uchiyama T, Watanabe I, Tobita K, Kobayashi R, Kurita-Ochiai T, Nasu I, Orally ingested *Lactobacillus crispatus* KT-11 inhibits *Porphyromonas gingivalis*-infected alveolar bone resorption., Int J Oral Med Sci, 査読有, vol.13, 2015, pp.102-109  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/130005076109>

Shinozaki-Kuwahara N, Saito M, Hirasawa M, Takada K, *Streptococcus oriloxodontae* sp. nov., isolated from the oral cavity of elephants., Int J Syst Evol Microbiol, 査読有, vol.64, 2014, pp. 3755-3759  
doi: 10.1099/ijms.0.064048-0.

Saito M, Shinozaki-Kuwahara N, Hirasawa M, Takada K, *Streptococcus loxodontisalivarius* sp. nov. and *Streptococcus saliviloxodontae* sp. nov. isolated from oral cavity of elephants., Int J Syst Evol Microbiol, 査読有, vol.64, 2014, pp.3288-3292  
doi: 10.1099/ijms.0.063263-0.

Tsuzukibashi O, Saito M, Kobayashi T, Umezawa K, Nagahama F, Hiroi T, Hirasawa M, Takada K, A gene cluster for the synthesis of serotype g-specific polysaccharide antigen in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*., Arch Microbiol,

査読有, vol.196, No.4, 2014, pp.261-265  
doi: 10.1007/s00203-014-0965-3.

Tsuzukibashi O, Uchibori S, Shinozaki-Kuwahara N, Saito M, Kobayashi T, Fukumoto M, New primer design for identification of oral rothia, including *R. aeria*, using multiplex PCR., Int J Oral Med Sci, 査読有, vol.12, No.2, 2013, pp.85-89  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/130003386570>

齋藤 真規, 小泉 直哉, 鈴木英明, 池見宅司, オゾンジェルを用いた齲蝕予防の可能性, 日大口腔科学, 39 巻 1 号, 2013, 26-30  
[http://jglobal.jst.go.jp/detail?JGLOBAL\\_ID=201302258035976061&q=%E3%82%AA%E3%82%BE%E3%83%B3%E3%82%B8%E3%82%A7%E3%83%AB%E3%82%92%E7%94%A8%E3%81%84%E3%81%9F%E9%BD%B2%E8%9D%95%E4%BA%88%E9%98%B2%E3%81%AE%E5%8F%AF%E8%83%BD%E6%80%A7&t=2](http://jglobal.jst.go.jp/detail?JGLOBAL_ID=201302258035976061&q=%E3%82%AA%E3%82%BE%E3%83%B3%E3%82%B8%E3%82%A7%E3%83%AB%E3%82%92%E7%94%A8%E3%81%84%E3%81%9F%E9%BD%B2%E8%9D%95%E4%BA%88%E9%98%B2%E3%81%AE%E5%8F%AF%E8%83%BD%E6%80%A7&t=2)

〔学会発表〕(計 21 件)

齋藤 真規, 栗原 紀子, 續橋 治, 小林 良喜, 落合 智子, *Streptococcus oricebi* sp. nov., isolated from the oral cavity of tufted capuchin, 日本細菌学会, 2016 年 3 月 23 日, 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

落合 智子, 小林 良喜, 齋藤 真規, 續橋 治, 栗原 紀子, 口腔細菌叢が腸内細菌フローラおよび腸管免疫系に及ぼす影響, 日本細菌学会, 2016 年 3 月 23 日, 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

續橋 治, 内堀 聡史, 齋藤 真規, 小林 良喜, 栗原 紀子, 落合 智子, 口腔 Rothia 属菌選択培地の開発とその口腔内分布, 日本細菌学会, 2016 年 3 月 23 日, 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

栗原 紀子, 齋藤 真規, 續橋 治, 小林 良喜, 高田 和子, 落合 智子, *Streptococcus dentasini* が産生する非水溶性グルカン合成酵素遺伝子の解析, 日本細菌学会, 2016 年 3 月 23 日, 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

落合 智子, 小林 良喜, 瀧澤 智美, 栗原 紀子, 續橋 治, 齋藤 真規, *Porphyromonas gingivalis* で増悪する動脈硬化および歯周病における NLRP3 インフラマソームの活性化, 歯科基礎医学会, 2015 年 9 月 13 日, 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

栗原 紀子, 齋藤 真規, 續橋 治, 瀧澤 智美, 小林 良喜, 落合 智子, *Aggregatibacter*



番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 真規 (SAITO, Masanori)  
日本大学・松戸歯学部・助教  
研究者番号：30434096

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：