

## 歯周病原菌に対するプロバイオティクス菌の効果

### Effect of Probiotics on Periodontal Pathogens

前田憲成<sup>1)</sup>, JAFFAR Norzawani<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>九州工業大学大学院生命体工学研究科, <sup>2)</sup>スルタンザイナルアビディン大学保健学科

Toshinari MAEDA<sup>1)</sup>, Norzawani JAFFAR<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Kyushu Institute of Technology, <sup>2)</sup> Universiti Sultan Zainal Abidin

E-mail address: toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

#### 1. はじめに

現在、約八割の成人男女が歯周病に感染している。この高い歯周病の罹患率は、歯磨きでは行き届かない箇所形成される歯周病原菌のバイオフィルムが大きな要因であり、このバイオフィルムを効果的に取り除く新しい技術開発が強く求められている。近年、バイオフィルムの形成阻害に関する研究は多く報告がなされているが、形成したバイオフィルムの除去に関する知見は十分に得られていない。また、口腔内で繁殖した歯周病原菌が引き金となって骨吸収などの炎症反応を誘発することは知られている[1]が、その病原発現誘発因子は未解明である。歯周病原菌としては、若年性歯周炎の病巣からよく検出される *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) を標的に研究を行った。特に乳酸菌などのプロバイオティクス菌は、腸内細菌群において善玉菌として働き、ヒトの健康にも関わる[2]ことが報告されてから、プロバイオティクス菌の効能調査の研究が進んでいる。そこで本研究では、*A. a.* 菌が形成したバイオフィルムに対する各種乳酸菌の効果を検証すること、乳酸菌による *A. a.* 菌のバイオフィルム分解機構を解明すること、さらに *A. a.* がもつ病原発現誘発因子を探索することを目的に研究調査を行った。

#### 2. 材料と方法

##### 2. 1 材料

本研究では、歯周病原菌として、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 株、プロバイオティクス菌としては、乳酸菌である *L. acidophilus* JCM 1021 株、*L. casei subsp. rhamnosus* NBRC 3831 株、*L. delbrueckii subsp. casei* JCM 1012 株、*L. fermentum* JCM 1137 株、*L. fermentum* NBRC 15885 株、*Lactococcus lactis* NBRC 12007 株、*L. casei* NBRC 15883 株、*Leuconostoc fructosum* NBRC 3516 株、*Leuconostoc mesenteroides* IAM 1046 株、*L. plantarum* NBRC 15891 株、*L. johnsonii* NBRC 13952 株、*L. sake* NBRC 3541 株、*L. paracasei subsp. paracasei* NBRC 3533 株を用いた。*A. a.* Y4 株は、1%酵母エキスを添加した BHI 培地を使い、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 48 時間培養した。全ての乳酸菌株は、1 mL/L の濃度で Tween 80 を添加した MRS 培

地で嫌氣的に 37°C、48 時間培養した。

##### 2. 2 方法

*A. a.* を 37°C、5%の CO<sub>2</sub> 存在下で前培養した後、さらに 3 日間培養することでバイオフィルムを形成させた。バイオフィルム形成後、上清を除去し、乳酸菌を添加した。ただし、*A. a.* と乳酸菌の初期濁度を 0.05 に調整した。この状態で、1 日間培養し、バイオフィルム形成量を測定した。乳酸菌によるバイオフィルム分解作用のメカニズムを明らかにするために、乳酸菌に対してリパーゼ阻害剤 (テトラヒドロリプスタチン 5 µg/mL) を作用させ、乳酸菌が産生するリパーゼの機能を阻害した。この処理を行った乳酸菌を用いて、上述と同様の操作を行い、*A. a.* バイオフィルム形成量の比較を行った。

ヒト細胞 THP-1 を 37°C、CO<sub>2</sub> 5%存在下で培養した後、細胞を刺激しマクロファージに分化させるために、PMA (100 ng/mL) を添加した。各酵素処理 (100 µg/mL) を施した *A. a.* をマクロファージに添加し、炎症性サイトカイン IL-1β の発現量を比較した。

##### 3. 結果と考察

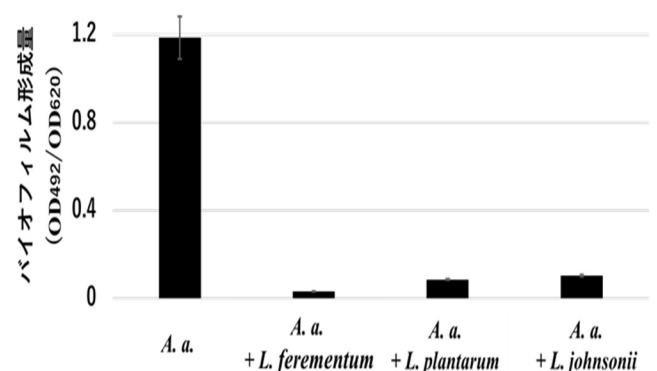


Fig.1 : *A. a.* 菌が形成したバイオフィルムに対する 3 種の乳酸菌株の効果

*A. a.* 菌が形成したバイオフィルムに対して、プロバイオティクス菌である乳酸菌を添加して、培養したところ、乳酸菌未添加の系と比べて、バイオフィルム形成量が顕著に減少することがわかった (Fig. 1)。この結果は、乳酸菌には *A. a.* 菌のバイオフィルムを効率的

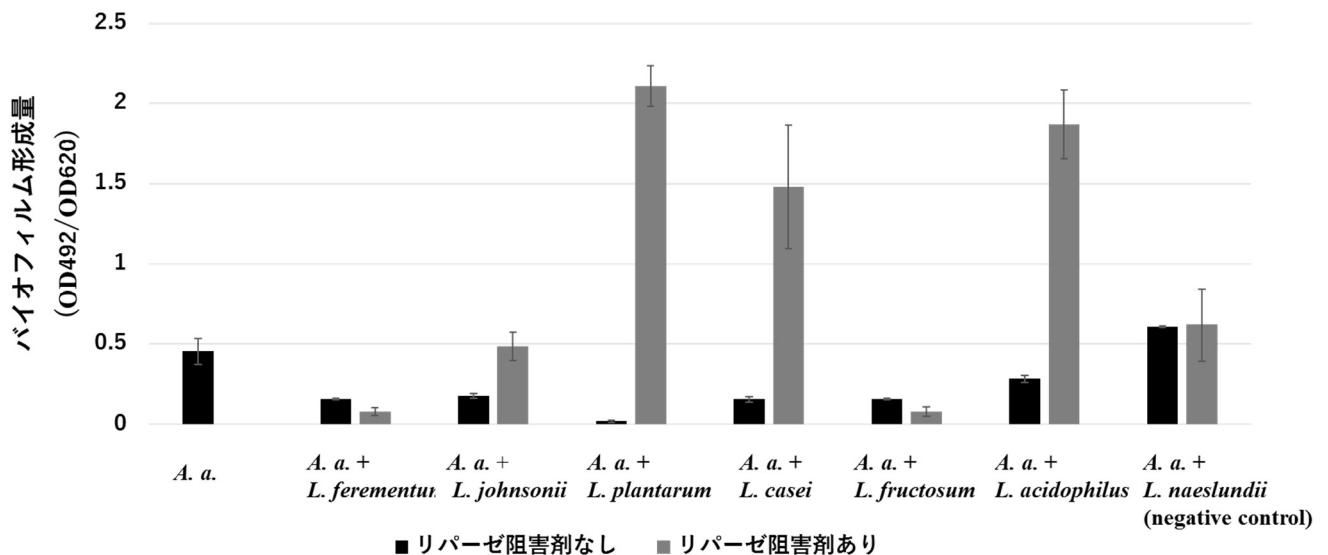


Fig. 2 : 乳酸菌による *A.a.* 菌バイオフィルムの分解におけるリパーゼ阻害剤の効果検証

に分解する能力をもっていることが示唆している。バイオフィルムを分解する因子を明らかにするために、はじめにバイオフィルムの構成成分がタンパク質、脂質、炭水化物であることから、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼなどの酵素を添加したところ、プロテアーゼおよびリパーゼを添加した系では、バイオフィルム形成が阻害されることが分かった。さらに、乳酸菌に対してプロテアーゼ阻害剤およびリパーゼ阻害剤で処理したところ、乳酸菌による *A.a.* 菌バイオフィルム分解が抑制されることが明らかとなった。特に、Fig. 2 に示したように、乳酸菌に対してリパーゼ阻害剤を作用させた場合、試験した多くの乳酸菌においてバイオフィルム分解機能が低下した。以上の

結果から、*A.a.* 菌が形成したバイオフィルムに対しては、乳酸菌が産生するリパーゼがバイオフィルムの分解に大きく関与していることがわかった。

実際に、口腔内における歯周病の進行は、歯周病原菌に対する抗菌効果のみではなく、口腔内における生体防御機構との関係性も調査する必要がある。そこで、マクロファージに対して、歯周病原菌および乳酸菌を作用させて、マクロファージの生存率を比較したところ、歯周病原菌 *A.a.* を添加した系ではマクロファージの高い死滅率を示したのに対し、乳酸菌を添加した系ではマクロファージの死滅が起こりにくくなることが明らかとなった (Fig. 3)。また、これに関連して、*A.a.* 菌と乳酸菌の混合系では、マクロファージ由来の炎症性サイトカインの生成も抑制されることがわかった。

#### 4. おわりに

本研究では、乳酸菌による *A. a.* バイオフィルム分解およびメカニズムの解明などを行った。結果として、乳酸菌には *A. a.* バイオフィルムを分解する機能があり、それには乳酸菌が産生するリパーゼが関与することがわかった。乳酸菌が混合することで、*A. a.* 菌によって発生する炎症性サイトカインの生成が抑制されることが明らかとなった。

#### 参考文献

- [1] Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885–891.
- [2] Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. 2007. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology* 226(5):1065–1073.

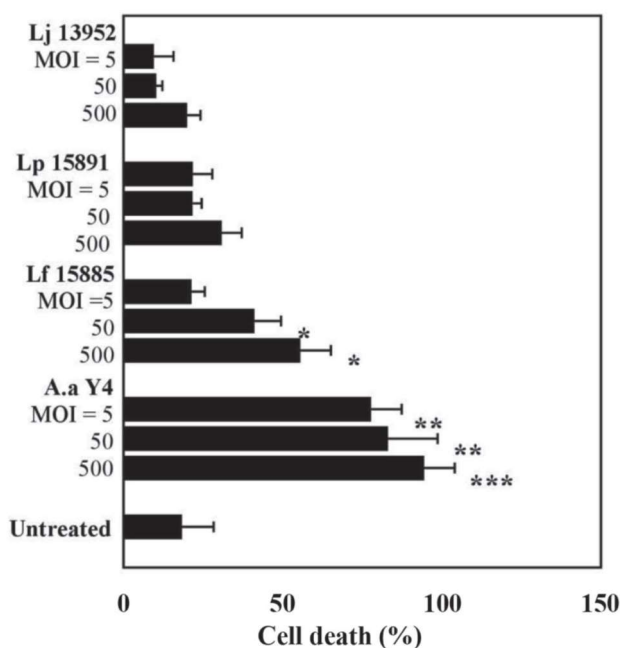


Fig.3 : マクロファージの生存における歯周病原菌および乳酸菌の効果