

## 論文の内容の要旨

氏名：長岡 誠二

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：口腔環境改善効果を有する食品の開発に向けた基礎的研究

### 第1章 緒論

口腔環境の変化は身体に様々な悪影響を及ぼす。近年の研究では、いくつかの口腔細菌やその菌体成分が血流や気道を通じて全身の様々な器官に到達し、心疾患、糖尿病、肺炎等の要因になることが報告されている。また、口臭も口腔内の衛生状態の悪化が主要因である。したがって、口腔環境を健全に維持することは、全身の健康やQOLを維持する上で重要である。更なる高齢化に伴い歯科疾患人口が増加することから、口腔環境の改善は国民の健康において重要な課題といえる。

口腔疾患や口臭の主な原因は口腔細菌である。口腔細菌の多くは、バイオフィームと呼ばれる、細菌や細菌が産生する多糖体等で構成されるゲル状物質を歯面に形成し、生態系を構築している。成熟状態に達したバイオフィームは病原性の強い細菌が優勢となり、通常の歯磨きでは除去が困難となるため、歯科医による定期的な健診が重要であるが、多くの人において徹底されていない。

そこで本研究では、口腔疾患の原因となる細菌の増殖を抑制しうる素材を含む食品を摂取することで、口腔疾患や口臭を予防することを目標として、2つの口腔環境改善素材の効果検証を行った。一つ目は、有機酸塩が有する口腔細菌に対する静菌作用の解明であり、効果の高いクエン酸Naを選抜し、その作用機構について確認した。二つ目は、プロバイオティクスである *Bifidobacterium* が有する歯周病原菌への抑制効果を動物実験にて検証し、選抜した *Bifidobacterium* の高い生残性を維持したヨーグルト製造法の確立を試みた。

### 第2章 口腔細菌に対する有機酸塩の抗菌効果とその作用機序に関する研究

有機酸は、食品の品質維持等に広く利用される安価な抗菌素材である。はじめに、口腔細菌の一種である肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に対する各種有機酸の静菌効果を検証したところ、クエン酸Naに強い生育抑制作用が認められたことから、その作用機序を検討した。その結果、他の有機酸Naは低pHのみで静菌作用を有していたのに対し、クエン酸Naは酸性から中性のpH域で強い活性を示した。また、クエン酸Naの静菌作用はCa<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>といった二価イオンによって強く抑制されることが明らかとなった。透過型電子顕微鏡による観察では、クエン酸Naを作用させることによって崩壊した菌体が観察された。これらの結果から、クエン酸Naの抗菌作用機序として、細菌増殖に必要な環境中のCa<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>をクエン酸Naがキレートすることで栄養素の取り込み阻害が起きていること、またはクエン酸Naが菌体の細胞表面に作用することで菌体そのものを破壊していることが示唆された。

次に、各種口腔細菌に対するクエン酸Naの抗菌効果について検討を行った。その結果、肺炎球菌だけではなく、歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、口臭原因菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 等の多くの口腔細菌に対して高い抗菌作用が認められた。クエン酸Naの抗菌作用は、食中毒細菌や齶蝕原因菌 (*Streptococcus mutans*) に対しては既に報告されているが、歯周病原細菌や口臭原因菌に対する作用を確認したのは本報告が初めてである。以上の結果から、クエン酸Naが口腔疾病予防や口臭の低減に有用な素材となり得る可能性が示された。

### 第3章 *Bifidobacterium* による歯周病原菌の除菌作用に関する研究

近年注目を集めるプロバイオティクスにおいて、歯周病の予防や治療を目的とした研究報告は少ない。過去の申請者らの研究では、口腔健常者から高頻度で分離され、歯周病原菌 *P. gingivalis* と口腔内で生育環境や栄養素（ビタミン K）を競合する *Bifidobacterium adolescentis* 菌株を歯周病予防プロバイオティクス候補として選抜した。本章では *in vivo* 研究として、口腔への定着性に重要な因子である口腔常在細菌（*Fusobacterium nucleatum*）との共凝集能を有する *B. adolescentis* 2 菌株（OLB6410 および OLB6056）と、非凝集株（OLB6398）を歯周病モデル動物へ投与し、*P. gingivalis* に対する除菌作用について検討を行った。

実験は鶴見大学歯学部動物倫理規定に基づき実施した。歯を絹糸で結紮して炎症を惹起させたハムスターに、5 週間にわたって  $2 \times 10^9$  cfu/mL の *B. adolescentis* 菌株を含む培養液を投与（5 日/週・0.1mL）した後（対照群には *B. adolescentis* を含まない培地成分を投与）、3 週間後に *P. gingivalis* に感染させた。3 週間後の絹糸中の *Bifidobacterium*、および 5 週間後の *P. gingivalis* 菌数について、種特異的プライマーを用いた定量的 PCR によって計測した。

その結果、口腔常在細菌との共凝集能をもたない *B. adolescentis* OLB6398 は口腔から検出されず、*P. gingivalis* の菌数に対照群と有意差は認められなかった。一方、共凝集能を有する *B. adolescentis* OLB6410 および OLB6056 には、*P. gingivalis* 菌数または総菌数に対する *P. gingivalis* の占有率に低下傾向が認められ、口腔内への *Bifidobacterium* の定着性が *P. gingivalis* の抑制効果に重要な要素であることが明らかになった。本結果は歯周病原菌に対するプロバイオティクスの効果を動物実験にて確認した初の報告であり、ヒト歯周病予防への *Bifidobacterium* の応用可能性が示された。

### 第4章 ヨーグルト中における *Bifidobacterium* の生残性向上に関する研究

本章では、歯周病原菌に対する抑制効果を確認した *B. adolescentis* 2 菌株（OLB6410 および OLB6056）を配合したプロバイオティクスヨーグルトの開発を試みた。一般に、ヨーグルト中の *Bifidobacterium* は冷蔵中にその生残性が大きく低下することが知られており、上記 2 菌株も同様である。そこで本章では、ヨーグルト中における *B. adolescentis* の生残性向上について検討を試みた。

ヨーグルト中で *Bifidobacterium* の生残性を低下させる要因の一つは、ヨーグルトスターターにより生成される過酸化水素（ $H_2O_2$ ）といわれているが、その詳細な蓄積機序は明らかでない。そこで、スターター 11 株（*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 6 株および *Streptococcus thermophilus* 5 株）について、乳中で好気培養した際の  $H_2O_2$  産生能を比較した。その結果、*L. bulgaricus* の  $H_2O_2$  産生量（平均 74.6  $\mu$ M）は、*S. thermophilus* の産生量（平均 15.5  $\mu$ M）よりも約 5 倍大きいことが確認された。また、*L. bulgaricus* の  $H_2O_2$  産生量は、好気培養に比べて嫌気培養で約 65 %減少したことから、*L. bulgaricus* の酸素消費機構によって乳中の溶存酸素から生じた  $H_2O_2$  がヨーグルトに蓄積しているものと推察された。さらに、*L. bulgaricus* と *S. thermophilus* を混合した系における  $H_2O_2$  蓄積量を測定した結果から、*L. bulgaricus* 菌数が  $H_2O_2$  蓄積に大きく影響していることが示された。

そこで、スターター中の *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* の接種比率を変更し、*L. bulgaricus* 菌数が異なる 3 種類のヨーグルトを調製した結果、*L. bulgaricus* の菌数が低いものほど  $H_2O_2$  蓄積量が少ないことが明らかになった。製造直後は約  $1 \times 10^8$  cfu/mL であった本ヨーグルト中の *B. adolescentis* OLB6056 菌数は、 $H_2O_2$  蓄積が多いヨーグルトでは 2 週間後には  $2.1 \times 10^2$  cfu/mL まで低下していたが、 $H_2O_2$  蓄積が少ないヨーグルトでは  $2.4 \times 10^6$  cfu/mL であり、生残性が顕著に改善された。本法は、ヨーグルト中のプロバイオティクスの生残性を向上するための有用な製造法として期待できる。

## 第5章 総括

本研究では、口腔疾患や口臭の原因となる口腔細菌の増殖を抑制することを目的に2つの素材に着目して検討を行い、以下の成果を得た。

一つ目は、安価な素材であるクエン酸 Na が、口腔疾病に関わる口腔細菌に対して、酸性から中性の pH 域で高い静菌効果を有することを明らかにした。また、クエン酸 Na の抗菌機序仮説として、金属イオンの取り込み阻害と直接的な細胞破壊作用が関与している可能性が示唆された。

二つ目は、口腔常在菌との共凝集能を有する *B. adolescentis* 菌株が、歯周病モデル動物において口腔内に定着し、栄養素の競合により歯周病原菌 *P. gingivalis* の生育を抑制する可能性を明らかにした。また、*B. adolescentis* をヨーグルトに配合する上で課題となる生残性向上の検討から、ヨーグルトスターターの一つである *L. bulgaricus* の菌数を低減することにより、*Bifidobacterium* に障害作用のある  $H_2O_2$  蓄積量を低減出来る解決法を見出した。

本研究で得られた知見は、口腔環境改善を目的とした食品を開発する上で有用である。今後は本研究で開発した素材を用いた大規模なヒト投与試験から、更なる有効性に関する実証を目指したい。