

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

長岡 誠二

2016

目次

第1章 緒論

口腔疾患と全身の健康	1
日本人の歯科健康実態	1
口腔疾患と口腔細菌	2
口腔疾患の予防	4
本研究の目的	5
図表	7

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

緒言	9
材料および方法	10
結果	14
考察	16
図表	20

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

緒言	26
材料および方法	28
結果	31
考察	32
図表	36

第4章 ヨーグルト中における <i>Bifidobacterium</i> の生残性向上に関する研究	
緒言	46
材料および方法	47
結果	49
考察	51
図表	56
第5章 総括	61
謝辞	64
引用文献	65
著作目録	79
論文の内容の要旨	80

第1章 緒論

口腔疾患と全身の健康

栄養物の摂取の第一段階である咀嚼行動において歯は重要であり、歯の喪失は身体の健康に多大な悪影響を及ぼす。例えば、口腔の二大疾病といわれる齲蝕や歯周病が進行した結果、歯を喪失すると、噛みにくい食品の摂取を避けるといった食品の選択行動の変化が生じ、栄養の偏りや食欲の低下による低栄養状態を引き起こす [1, 2]。低栄養状態が長期間続くと、タンパク質の不足による筋力低下、運動能力の低下、ひいては身体的自立が損なわれる。その他に咀嚼機能の低下は、視覚、聴覚、脳機能に悪影響を与えるといわれており [3]、高齢期における生活の質（QOL）を低下させる一因ともなりうる。

さらに、近年では口腔疾患（特に歯周病）の原因菌自体が、全身疾患の発症に直接関与することが報告されている。通常は口腔内で増殖する歯周病原菌であるが、血流にのって全身の器官に到達・増殖し、心疾患、脳血管疾患、糖尿病などの生活習慣病に関与していることが示唆されている [4-9]。また、嚥下機能と免疫力が低下した高齢者では、病原性のある口腔細菌が気道に入り肺炎などの呼吸器系の感染症を引き起こすこと [10]、また、妊婦では早産や低体重児出産の要因になることも報告されている [11]。加えて、疾病ではないものの口臭も口腔内の衛生状態の悪化が主要因であり、多くの人において口腔の関心事の一つである。

以上のことから、口腔内の環境を良好に保つことは、全身の健康維持と日々のQOL向上に関わる重要なテーマといえる。

日本人の歯科健康実態

近年の我が国の齲蝕患者は、歯磨剤や塗布剤等へ配合したフッ化物の普及に

より、若年層を中心に減少傾向を示している [12, 13]。その一方で、歯周病の罹患患者数は依然多い。2011 年に厚生労働省にて実施した歯科疾患実態調査では、進行した歯周炎（歯槽膿漏）のある人の割合は、30 歳以上の 2 割にのぼり、特に 50 歳代では 4 割、60 歳代では半数以上と高い罹患率を示している (Fig. 1-1)。軽度の歯周病（歯肉炎）を併せると、日本人の半数以上は歯周病を発症しており、本疾患は国民病ともいえる。加えて、加齢に伴って罹患率が増加していることから、今後の高齢化に伴ってさらに歯周病人口の増加が予測される。内閣府の調査 [14]によると、60 歳以上の高齢者の 47.5%は、「普段の楽しみ」として「食事」をあげており、歯の喪失原因の第 1 位（47.5%）である歯周病 [15]が、人生、特に高齢期における生きがいを楽しむ上での阻害因子となりうることを示している。また、前述の通り、歯周病は口腔だけではなく全身の健康との関係が深く、高齢期における健康寿命や QOL に大きく影響する疾患である。一方で、歯科関連の国民医療費は毎年年間 2.5 兆円を超え、癌や高血圧疾患と並ぶほどの財政負担となっている [16]。以上より、口腔環境を改善することは国民の健康および国家財政において重要な課題である。

口腔疾患と口腔細菌

口腔疾患や口臭の主な原因は口腔細菌である。ヒトの口腔内には多種多様な細菌が生息し、その菌種は約 300 種にのぼるといわれている [17]。口腔内では、それぞれの細菌が共生あるいは拮抗・競合しながら口腔特有の常在菌叢を形成している。口腔細菌の多くは、バイオフィームと呼ばれる、細菌や細菌が作り出す多糖体などで構成されるゲル状の被膜物質を歯面、歯肉、舌上等に形成し、その中で口腔細菌特有の生態系を構築している。デンタルプラーク（歯垢）や舌苔は典型的なバイオフィームであり、プラーク 1 g 当たりには約 10^{11} 個もの細菌が生息する [5]。

口腔バイオフィルムの形成過程を **Fig. 1-2** に示した。最初に歯の表面に唾液中のタンパク質が付着し、ペリクルとよばれる被膜を形成する。続いて、ペリクルを構成する特定のタンパク質を認識するアドヘジン（付着因子）を有する初期付着菌がコロニーを形成する。そこへ、初期付着菌群の表層のタンパク質をレセプターとして付着（共凝集）する能力を有する後期付着菌が付着し、バイオフィルムは複数の菌種で少しずつ大きくなっていく [18]。Kolenbrander ら[19] は、ペリクルへの初期付着能や口腔細菌同士の特異的な共凝集能について空間モデルを示している。本モデルでは、*Fusobacterium nucleatum* が多くの口腔細菌種との共凝集能を有し、初期付着菌と後期付着菌との橋渡しの役割を担っていることを示している。バイオフィルムが増大すると、細菌間での栄養素の受け渡しが行われるとともに、特定の細菌が合成する菌体外多糖によってバイオフィルムはより強固になり、唾液中の抗菌成分に対しても抵抗性を持つようになる。

プラークの蓄積が昂進し、厚さの増加と菌種変化が同時に進行することで、病原性の強い細菌を主要な構成とするプラークとなり、それが口腔疾患の発症に関与することが知られている。例えば歯周病の発症過程においては、プラーク形成の初期段階では streptococci を中心としたグラム陽性の通性嫌気性菌が主体であるが、プラーク蓄積が昂進すると *Porphyromonas* や *Prevotella* などのグラム陰性の偏性嫌気性菌の割合が高くなる。*Porphyromonas* や *Prevotella* などの歯周病原菌は健常者口腔からの検出率および菌数は極めて低いが、歯周病患者口腔からは高頻度・高菌数で検出される [20]。*Porphyromonas gingivalis* は *F. nucleatum* のような主要なプラーク構成細菌に付着し、さらに *Veillonella*、*Propionibacterium* などが産生するビタミン K 類を利用して増殖すると考えられている [21]。その結果、歯周病原菌の構成成分であるリポ多糖（LPS）などの毒素成分により、慢性的な炎症反応が引き起こされ、歯周組織の破壊が起こると

いわれている。

また、疾患ではないものの約半数の一般成人が有するといわれる口臭 [22]も、その主な発生源は口腔細菌である。近年の研究では、口臭と舌苔の蓄積に強い相関があることが報告されている [23-27]。舌苔は、細菌と脱落した口腔上皮細胞、食品残渣の塊であるが、これらから構成されるタンパク質成分が口腔細菌のプロテアーゼによってアミノ酸に分解される。その結果、システインやメチオニンが、舌苔中に常在する *Fusobacterium*、*Veillonella*、*Prevotella*、*Actinomyces* など口腔細菌由来の含硫アミノ酸リアーゼによってさらに分解され、口臭の原因物質である硫化水素およびメチルメルカプタンなどの揮発性硫黄化合物 (Volatile Sulfur Compounds, VSC) が生成することが報告されている [27]。

口腔疾患の予防

歯周病は、一般に進行が遅く痛みを伴わないことが多いため、自覚した段階においては病状が進行していることが多い。また、治療にも長期間を有することから、発症前の予防が重要といえる。前述の通り、口腔疾患の主原因は口腔細菌であることから、口腔細菌によって形成されるバイオフィルムを除去することが口腔疾患を予防する上で重要である。形成初期のバイオフィルムは、歯磨きに加えて洗口液、歯間ブラシ等の補助用品を活用したセルフケアによって除去が可能であるが、歯周ポケット深くに形成されたバイオフィルムは除去が困難となる。従って、歯科医などによる定期的な診察や、スケーリング (専用の器具を使った歯石の除去)、PMTC (Professional Mechanical Tooth Cleaning, 専用の機器を使用した歯面の清掃と研磨) などのメンテナンスを受けることが重要である。しかし、後者の予防行為は多くの日本人に浸透しているとはいえない。2012年に実施された調査 [28]によると、直近1年間における歯科医での定期健診受診回数は、アメリカでは「2回」が最多で34.9%、スウェーデンでは

「1回」が最多で57.1%であるのに対し、日本は「受けていない」が57.5%と最多であった。すなわち、多くの日本人にとって歯科は治療行為が目的であり、口腔疾患を未然に防ぐという予防歯科の意識は未だに低い。このような中、厚生労働省が推進する健康日本21において歯科保健の「8020運動」が進められており、治療から予防へと国民のセルフケアの意識が今後さらに高まっていくことが予想される。

本研究の目的

そこで本研究では、口腔細菌に起因する歯周病等の疾患や口臭の発生を予防することを目的に、口腔環境を改善する効果のある食品を開発するための基盤となる知見を得ることを目標とした。具体的には、口腔状態を悪化させる原因となる細菌に対して、抑制作用のある食品素材の評価および作用機序の解明を行い、最終的には本素材を食品へ配合することを目指した。このような食品を摂取することで、日常の生活スタイルを大きく変えることなく継続的な予防行為が可能となると考えられる。近年のオーラルケア食品の市場は拡大傾向にあることから [29]、口腔の健康維持に対する国民の関心が高まっていることが伺われる。そこで、本研究では以下の検討を実施した。

第2章では、食品に利用される抗菌物質の中で最も代表的な素材の一つである有機酸に着目し、なかでもクエン酸ナトリウム (Na) が有する特異的な抗菌性について、「肺炎球菌」や「口臭原因菌」を代表とする各種口腔細菌をターゲットとした際の効果や作用メカニズムを検討した。

第3章では、プロバイオティクスによる口腔環境改善の可能性を探るため、代表的な歯周病原菌である *P. gingivalis* に対して、口腔内の定着部位および栄養素を競合する可能性のある *Bifidobacterium* 株を歯周病モデル動物に投与し、*P. gingivalis* に対する抑制効果を評価した。

第4章では、第3章にて *P. gingivalis* への抑制効果が確認された *Bifidobacterium* 株を日本人に馴染みのあるヨーグルトに配合した際に冷蔵保存中に減衰する生菌数を維持するため、生残性低下因子である過酸化水素蓄積量の少ないヨーグルト製造法の確立を試みた。

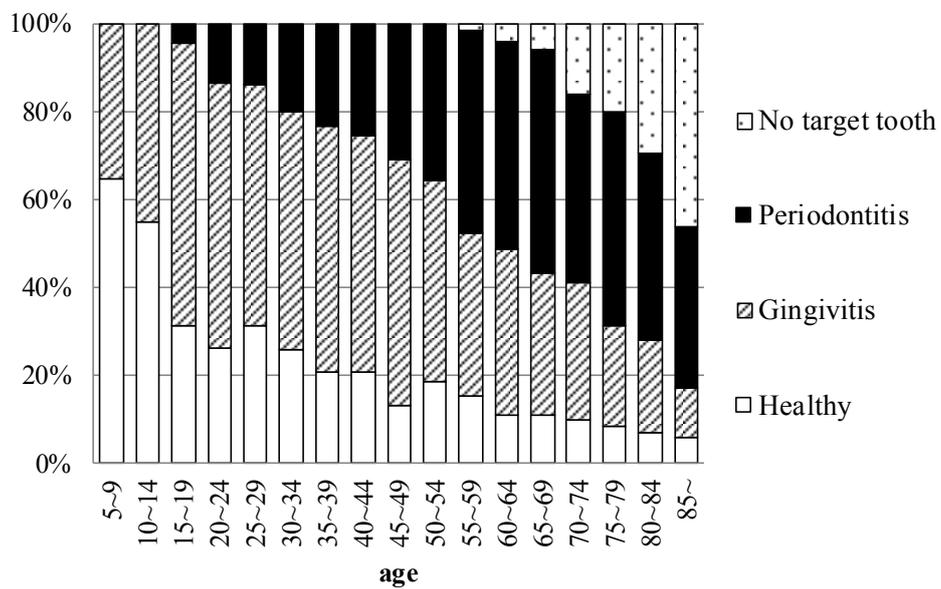


Fig. 1-1. The healthy state of the gingiva in each age. Created based upon the data from the reference [12].

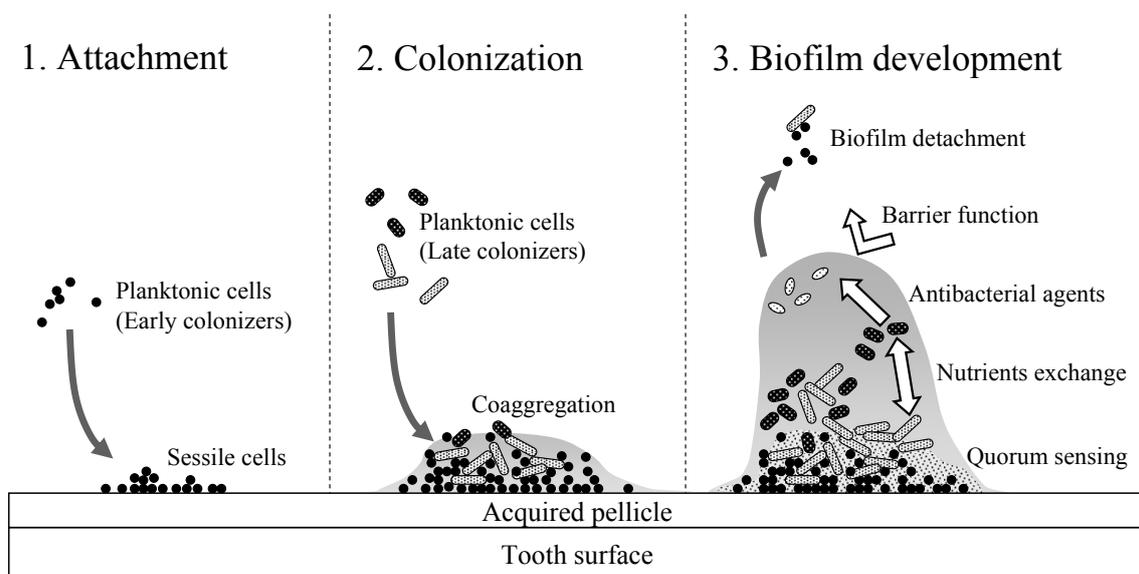


Fig. 1-2. A diagrammatic representation of biofilm formation on tooth surface and potential roles of bacterial interactions. Tooth surface with acquired pellicle is colonized by early colonizers. Coaggregation contributes to sequential binding and colonization. Dental biofilm that consists of complex species and extracellular matrix functions as barrier against bactericidal agents. A certain bacterial metabolite becomes a substrate for other bacteria, while a certain metabolite suppresses other bacteria. Cited from the reference [18].

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

緒言

有機酸は、微生物が産生する最も代表的な抗菌物質の一つといえる。その抗菌性を利用して、食品製造では品質維持の向上などに広く利用されている。例えば、ヨーグルトにおいては、主に乳酸菌によって生成される乳酸が、乳の pH を低下させることで製造及び流通における他の有害微生物による汚染を抑制する。一方、ヒトの体内に常在する微生物が産生する有機酸は、宿主であるヒトの健康に寄与していることが報告されている。例えば、腸内においては、常在細菌が産生する乳酸、酢酸、酪酸などの有機酸が周囲の pH を低下させ、病原微生物による感染を防御することが示されている [30-33]。

このように有機酸は、宿主に悪影響を及ぼす細菌を低減・排除することが期待できる成分と考えられる。そこで本章では、有機酸の抗菌効果を利用した口腔環境改善の可能性を探るため、各種口腔細菌に対する有機酸の抗菌作用を評価することとした。ターゲットとしては、以下の2点である。

一つ目は、肺炎の主要な原因菌であり、健常者の口腔からも検出される肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に対してである[26]。肺炎は我が国での死亡原因第3位であり、高齢化と耐性菌の出現を背景に罹患者数が増加している[34]。宿主の口腔衛生状態の悪化や免疫力の低下などが発病リスクとなり、*S. pneumoniae* を含むいくつかの口腔細菌が誤嚥性肺炎を引き起こすことが報告されている[35]。従って、健常な口腔環境を維持することが肺炎予防につながると考えられている。

二つ目は、口臭発生の原因となる口腔細菌に対してである。口臭の主な原因物質は、硫化水素およびメチルメルカプタンなどの揮発性硫黄化合物 (VSC) であ

り、これらは *Fusobacterium* や *Veillonella* などの口腔細菌の代謝産物である [27]。従って、これらの細菌を抑えることで、口臭が予防できると考えられる。

本章では、口腔環境の悪化から引き起こされる肺炎と口臭について、その原因となる細菌に対する有機酸の効果を確認した。その結果、クエン酸 Na が高い抗菌効果を有することに着目し、詳細な検討を行った。クエン酸はレモンや梅干などに多く含まれるほか、pH 調整剤や酸味料として広く用いられている安全で安価な食品素材である。加えて、乳酸や酢酸などの有機酸と同様に、その抗菌効果を利用して食品の微生物汚染防止に利用される[36-39]ほか、種々の生理効果 [40, 41]を有することが知られている。これまで、各種細菌に対するクエン酸 Na の抗菌力を調べた報告 [42-44]はいくつかあるが、ほとんどは食中毒菌に対するものであり、またその抗菌作用機序に不明な点が多い。そこで本章では、各種口腔細菌、特に「肺炎球菌」および「口臭原因菌」に対するクエン酸 Na の抗菌効果とその作用メカニズムを検討することを目的とした。

材料および方法

1. 供試菌株

Streptococcus pneumoniae NBRC102642^T は NITE Biological Resource Center (Chiba, Japan) より、*Streptococcus mutans* JCM5705^T、*Streptococcus salivarius* JCM5707^T、*Streptococcus sanguinis* JCM5708^T、*Streptococcus gordonii* JCM12995^T、*Anaerococcus prevotii* JCM6490、*Actinomyces naeslundii* JCM8350、*Fusobacterium nucleatum* JCM8532^T および *Prevotella intermedia* JCM11150^T は Japan Collection of Microorganisms (RIKEN BioResource Center, Japan) より、*S. pneumoniae* ATCC6303 および ATCC6305、*Veillonella parvula* ATCC17745^T は American Type Culture Collection より購入した。*Streptococcus mitis* OLS3293 および *Porphyromonas*

gingivalis OB7124 は、鶴見大学歯学部からの分与株を使用した。*Staphylococcus aureus* OB7008、*S. epidermidis* OB7010、*E. faecium* OB7084、および *K. pneumoniae* OB7088 は株式会社明治の保有菌株を使用した。また、健康人の舌苔からの分離株 (*Actinomyces naeslundii* 27 株、*Prevotella histicola* 13 株、*Prevotella melaninogenica* 7 株、*Streptococcus parasanguinis* 14 株、*Streptococcus salivarius* 13 株、*Veillonella atypica* 9 株および *Veillonella disper/parvula* 12 株) は株式会社明治で単離した [45]。各菌株は、Todd-Hewitt broth (THB ; Becton、Dickinson & Co. (BD)、USA) または brain heart infusion (BHI ; BD、USA) にてアネロパックケンキを用いた嫌気条件下で 37°C・24 時間培養した。*P. gingivalis*、*P. nigrescens* および *P. intermedia* の培養では、BHI に対して最終濃度 1 µg/mL のメナジオン、および 5 µg/mL のヘミンを添加した。

2. 各種有機酸塩の抗菌効果

THB に各濃度の有機酸塩 (クエン酸 Na、乳酸 Na、酢酸 Na) を添加した培地 (pH 6.5) を調製した。本培地 (5 mL) に *S. pneumoniae* NBRC102642^T を接種し、37°C・9 時間および 18 時間培養後の OD₆₀₀ を測定した。

3. 最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration; MIC) および最小殺菌濃度 (Minimum bactericidal concentration; MBC) の測定

クエン酸 Na に対する各種細菌の抗菌感受性は、日本化学療法学会の微量液体希釈法 [46-48] を一部改変して行った。すなわち、Muller-Hinton 培地 (BD) に CaCl₂ および 25 mg/L の MgCl₂ を添加したもの、又は添加しないものを調製し、各濃度のクエン酸 Na (0.4~102.4 mg/mL) を添加して測定用培地とした。ただし、*Streptococcus* の試験のみ本測定用培地に 5 %馬溶血液を添加した。*C. perfringens*、*F. nucleatum* および *Veillonella* には BHI 培地を、*Prevotella*、*P. gingivalis*

には 5 mg/L ヘミンと 1 mg/L メナジオンを添加した BHI 培地 (BHI-HK) を使用した。血液平板培地で一夜培養した各種細菌を、生理食塩水を用いて MacFarland 濁度 0.5 に調整した菌液 (5 μ L) を測定用培地 (100 μ L) に添加し、96 穴 U 字型マイクロプレート上で 35°C・18~24 時間、嫌気下で培養した。MIC は肉眼で菌の発育が認められない最小のクエン酸 Na 濃度とした。引き続き、発育が認められなかった培養液 5 μ L を、クエン酸 Na を含まない新たな測定用培地 (100 μ L) に添加し、同様に培養した。MBC は肉眼で菌の発育が認められない最小のクエン酸 Na 濃度とした。

4. 培地 pH がクエン酸 Na の抗菌作用に与える影響

25 mM クエン酸 Na または 100 mM 乳酸 Na を添加した THB および BHI-HK の pH を、1N HCl または 4N NaOH を用いて 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 および 8.0 に調整した。それぞれの培地に *S. pneumoniae* NBRC102642^T および *P. melaninogenica* JCM6325^T を接種した。*S. pneumoniae* NBRC102642^T は 37°C・18 時間、*P. melaninogenica* JCM6325^T は 35°C・72 時間培養後の OD₆₀₀ を測定した。

5. 金属イオンがクエン酸 Na の抗菌作用に与える影響

最終濃度 25 mM になるようにクエン酸 Na および各種金属イオン化合物 (ZnCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂) を添加した THB に *S. pneumoniae* NBRC102642^T を接種し、37°C・18 時間培養後の OD₆₀₀ を測定した。

6. TEM (Transmission electron microscopy, 透過型電子顕微鏡) 観察

(1) 菌体の調製

S. pneumoniae NBRC102642^T を THB にて 37°C で培養した。OD₆₀₀=0.3 に達した時点で、最終濃度 25 mM になるようにクエン酸 Na を添加し、さらに 37°C・2

時間インキュベートした。その後、菌体を回収し、PBS で 2 回遠心洗浄 (3,000 rpm, 20 min) を行った。

(2) 固定

以降の操作は、「よくわかる電子顕微鏡技術 (朝倉書店)」 [49] に準じて行った。1.5 mL 容遠心チューブ内の菌体ペレットを 2.5 % グルタルアルデヒド (Electron Microscopy Science, Japan) 1 % を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) 1 mL で懸濁し、4°C で一夜静置した (前固定)。翌日、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) にて 3 回洗浄を行った後、1 % 酸化オスミウムを含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) 1 mL で懸濁し、4°C・1 時間静置した (後固定)。その後、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) にて 3 回洗浄を行った。

(3) 脱水・包埋

50°C で加温溶解した 2 % 寒天溶液 500 μ L を菌体ペレットに加え、素早く懸濁した後遠心した (12,000 rpm, 1 min, 30°C)。マイクロスパーテルを用いてチューブから寒天を取り出し、エタノールで脱脂した片刃カミソリを用いて寒天内の菌塊部分を 3~5 mm 角に切り出した。本操作は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) に浸しながら行い、試料の乾燥を防止した。切り出した菌塊はピンセットを用いて専用の試料メッシュに入れ、オートティッシュプロセッサ 'ROTEX' (ABC 社) を用いて、エタノール希釈系列 (50, 70, 80, 90, 95 および 100 %) による脱水、および Spurr 樹脂 [50] への置換を行った。置換後の試料は、包埋用チューブ内で Spurr 樹脂を用いて 70°C・8 時間硬化させた。

(4) 超薄切片作製

硬化後の試料をチューブから取り出し、脱脂した片刃カミソリを用いて実体顕微鏡の観察下で菌塊部分をトリミングした。さらに、ウルトラマイクロトーム (Reichert ULTRACUTE) 上でさらにトリミングした後、ガラスナイフを用いて面出しを行った。ポート付ダイヤモンドナイフを用いて水面に超薄切片 (75 nm)

を作製し、グリッドメッシュに付着させた後、風乾した。

(5) 電子染色

試料が付着したグリッドメッシュを専用のサンプル台に並べ、染太郎（日新 EM）を用いて、5%酢酸ウラニル溶液（20 μ L/メッシュ）で2分間、クエン酸鉛溶液（20 μ L/メッシュ）で1分間染色した。

(6) 観察

TEM 試料は、透過型電子顕微鏡 JEM 1200EX（JEOL）にて観察を行った。加速電圧は 80 kV に設定した。

結果

1. 各種有機酸塩による肺炎球菌への増殖抑制効果

各種有機酸が有する *S. pneumoniae* NBRC102642^T への増殖抑制効果を確認した。その結果、*S. pneumoniae* NBRC102642^T の増殖を完全に抑制するために必要な有機酸塩濃度は、乳酸 Na および酢酸 Na が 409.6 mM であったのに対して、クエン酸 Na は 12.8 mM であった（Fig. 2-1）。クエン酸 Na は、他の有機酸塩に比べて *S. pneumoniae* NBRC102642^T に対して強い増殖抑制作用を示すことが確認された。

2. 各種口腔細菌に対するクエン酸 Na の抗菌作用

(1) 各種口腔細菌を用いた試験結果

Table 2-1 より、*E. faecium* OB7084 や *K. pneumoniae* OB7088 はクエン酸 Na に対して高い耐性を有していたが、それ以外の細菌に対しては、MgCl₂ と CaCl₂ の非存在下では低い MIC、MBC を示した。注目すべきことに、口腔疾患の原因となる歯周病菌（*P. gingivalis*、*P. intermedia*）、肺炎球菌（*S. pneumoniae*）、口臭原因菌（*F. nucleatum*）に対して高い抗菌効果を有していた。一方、MgCl₂ と CaCl₂

の存在下においては、多くの細菌において MIC、MBC が高くなる傾向を示した。例えば、*P. gingivalis* OB7124 はクエン酸 Na に対する感受性が高い菌株であり、MgCl₂ と CaCl₂ の非存在下における MIC、MBC はそれぞれ 0.8 および 0.8 mg/mL であったが、これらのカチオンを添加することでそれぞれ 3.2 および 102.4 mg/mL まで上昇した。一方で、*S. gordonii* JCM12995^T や *S. mitis* OLS3293 のようにカチオン添加が抗菌作用に殆ど影響しない菌株も存在した。

(2) 舌苔分離株を用いた試験結果

本研究では、舌苔細菌叢の中で優勢である硫化水素産生株として *P. histicola*、*P. melaninogenica*、*V. atypica* および *V. dispar/V. parvula* を試験に供した。Table 2-2 に示した通り、多くの硫化水素産生菌株におけるクエン酸 Na に対する MIC が 0.4~25.6 mg/mL の範囲であり、一部の *A. odontolyticus* や *P. histicola* では 51.2~102.4 mg/mL の高い MIC を示した。一方、硫化水素非・低産生菌種である *S. parasanguinis* や *S. salivarius* も、硫化水素産生菌と同様にクエン酸 Na に対する感受性を示した。

3. 培地 pH がクエン酸 Na の抗菌作用に与える影響

クエン酸 Na に比べて乳酸 Na の抗菌作用が穏やかであったことから (Fig. 2-1)、本試験ではクエン酸 Na 濃度 (25 mM) よりも高い乳酸 Na 濃度 (100 mM) にて試験を行った。Fig. 2-2 より、*S. pneumoniae* NBRC102642^T と *Prevotella melaninogenica* JCM6325^T いずれにおいても、乳酸 Na の抗菌効果は pH が酸性から中性に近づくほど弱くなる pH 依存的な性質を有していたのに対して、クエン酸 Na は pH 5.0~7.5 の範囲において高い抗菌作用を示した。

4. 金属イオンがクエン酸 Na の抗菌作用に与える影響

クエン酸 Na は強力なキレート作用を有することが知られている。そこで、各

種金属イオンの添加がクエン酸 Na の *S. pneumoniae* NBRC102642^T に対する抗菌効果に及ぼす影響を調べた。その結果、ZnCl₂ および MnCl₂ を添加した場合は抗菌効果に影響は認められなかったが、MgCl₂ および CaCl₂ を添加した場合は顕著な抗菌作用の阻害が認められた (Table 2-3)。

5. TEM 観察

S. pneumoniae NBRC102642^T の細胞構造を TEM を用いて観察した。25 mM クエン酸 Na で 2 時間処理した場合、菌体の細胞壁は不明瞭になり、いくつかの菌体は細胞壁が破壊され、細胞内容物が流出している様子が確認された (Fig. 2-3A)。未処理の場合は、分裂中の菌体とその正常な細胞壁が明瞭に確認された (Fig. 2-3B)。

考察

S. pneumoniae は、肺炎、急性副鼻腔炎、中耳炎、髄膜炎、菌血症、敗血症などの感染症を引き起こす病原菌である [51]。本菌は通常、ヒトの上咽頭や上気道から検出されるが [52]、口腔から検出される例もある [26, 53]。本章では、*S. pneumoniae* NBRC102642^T について、各種有機酸塩の抗菌効果を確認した。その結果、興味深いことにクエン酸 Na は乳酸 Na や酢酸 Na の約 1/40 の濃度で、本菌株の生育を強く抑制することが示された (Fig. 2-1)。

そこで次に、各種口腔細菌に対するクエン酸 Na の抗菌効果を調べた。ここで使用した微量液体希釈法は、病原菌に対する抗生物質の効果確認に広く採用されている方法であるが、その結果は培地中の遊離カチオンの濃度に影響を受けることが知られている [54]。それゆえ、培地中のカチオン濃度を一定に調整して試験に供することが重要となる。本研究では、日本化学療法学会の方法に則り、カ

チオン (Mg^{2+} と Ca^{2+}) の非添加系と添加系にて試験を行った。その結果、カチオンの非添加系では、*E. faecium* や *K. pneumonia* を除く多くの口腔細菌に対して高い抗菌作用を示した。特に、肺炎球菌 (*S. pneumoniae*)、歯周病原細菌 (*P. gingivalis*、*P. intermedia*)、口臭原因菌 (*F. nucleatum*、*P. melaninogenica*) などの口腔疾患に関与する細菌に対して、クエン酸 Na は高い抗菌作用が認められたことは注目すべき点である。クエン酸 Na の抗菌作用は、食中毒細菌や齲蝕原因菌 (*Streptococcus mutans*) に対しては既に報告されているが [55]、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。一方、肺炎球菌は、菌体表面に莢膜と呼ばれる多糖体を有することで、単球やマクロファージによる食作用に抵抗性を示し、宿主の免疫系から逃れることで病原性を発揮することで知られている [56]。本研究で使用した *S. pneumoniae* NBRC102642^T、ATCC 6303、ATCC 6305 はそれぞれ血清型として 1、3、5 型を有しているが、いずれの株も $MgCl_2$ と $CaCl_2$ の非存在下でクエン酸 Na への感受性が高いことが示された (Table 2-1)。本結果はすなわち、*S. pneumoniae* の血清型に関わらず、クエン酸 Na が抗菌効果を発揮する可能性を示しており、今後は病原性に関与する臨床株への抗菌効果の確認が期待される。一方、カチオン存在下では、MIC と MBC が増加する傾向を示した。*S. aureus* や *S. epidermidis* においては、Lee ら [43] が報告する結果よりも極めて高い MBC の値を示していたことから、この違いはカチオン濃度の違いに起因すると考えられた。

本研究において注目すべき点は、*S. pneumoniae* NBRC102642^T や *P. melaninogenica* JCM6325^T に対するクエン酸 Na の抗菌作用が、酢酸 Na および乳酸 Na とは異なり、酸性 pH から中性 pH において高い効果を示していた点である (Fig. 2-2)。一般的に、細菌に対する有機酸の抗菌作用は、環境中の pH が低下することによって非解離型となった有機酸分子が菌体内部に移行し、その結果放出されたプロトンによって菌体内 pH が低下して菌を死滅させるためといわれ

ている [57, 58]。従って、抗菌効果は環境中の pH と各有機酸の解離定数 (pK_a) に強く依存する。実際に本研究においても、*S. pneumoniae* NBRC102642^T や *P. melaninogenica* JCM6325^T に対する乳酸 Na の抗菌作用は pH 依存的であり (Fig. 2-2)、これは、乳酸 Na は非乖離型の乳酸を生成するためと考えられた。Abou-Zeid ら [59] は、乳酸 K の抗菌効果は pH が上昇するに伴い減少することを報告しており、筆者の結果と一致している。しかしこれとは対照的に、クエン酸 Na の抗菌作用は pH 5.0~8.0 において pH の影響を受けなかった。すなわち、上述した非乖離型有機酸が有する抗菌効果とは異なる作用機序が機能しているものと推察された。

クエン酸 Na が有する pH 非依存型の抗菌作用に関する詳細なメカニズムは不明であるが、本研究の結果から 2 つの異なる作用機序が機能している可能性が示された。一つ目は、クエン酸 Na による直接的な菌体細胞壁の破壊作用である。TEM 観察の結果から、25 mM クエン酸 Na を短時間処理することによって細胞壁が破壊されている様子が認められた (Fig. 2-3A)。本作用は、クエン酸 Na が有するキレート作用によって菌体細胞壁外膜に局在する金属イオンと結合し、その機能が失われた結果、最終的に細胞内容物の溶出につながったと推察している。同様のメカニズムは、強いキレート作用を有する Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) でも報告されている。すなわち、EDTA はグラム陰性細菌の細胞壁外膜に局在する金属イオンと結合し、外膜の浸透性を増加させることで溶菌作用を示す [60-63]。実際に本研究においても、EDTA の添加は *S. pneumoniae* NBRC102642^T の生育を強く阻害した (データ未掲載)。

二つ目の作用機序は、クエン酸 Na のキレート作用によって、細菌の増殖に必要な培地中の Ca^{2+} や Mg^{2+} を奪うことによるものと考えられる。実際に、*S. pneumoniae* がその増殖に Ca^{2+} を必要とすること [64] や、強力なキレート作用を示す EDTA が多価陽イオンと結合した結果、グラム陽性細菌の増殖を阻害する

こと [60, 65]が過去に報告されており、今回のデータはそれを支持する結果であった。

以上より、EDTA と同様にキレート作用を有するクエン酸 Na は、肺炎球菌の外膜障害と、 Ca^{2+} または Mg^{2+} の菌体への取り込み障害に関与した結果、抗菌効果を発現している可能性が考えられた。多くの細菌で培地中に Ca^{2+} および Mg^{2+} を添加すると、クエン酸 Na への感受性が低下したことから (Table 2-1)、本メカニズムは *S. pneumoniae* 以外の菌種でも作用している可能性が考えられる。

本章では、肺炎球菌や *Fusobacterium*、*Veillonella* などの口腔細菌に対するクエン酸の抗菌効果について検討した。口腔細菌の多くは常在でありながら、宿主の免疫力の低下や口腔衛生状態の悪化などにより日和見的に病原因子となるものが多い。そのため、日常における継続的な口腔ケアは重要である。クエン酸は、本研究で明らかとなった抗菌効果を有するほか、良好な口腔環境の維持に必要な唾液の分泌を促進するため、口腔ケアに適した素材のひとつといえる。加えて、本素材が酸性から中性という幅広い pH 域において抗菌作用を示す点は、将来的に食品に配合した際に齲蝕リスクのある酸性 pH 域を避けることができるというメリットといえる。今後は、クエン酸 Na を配合した食品のヒト投与試験を行うことで、口腔細菌叢や口臭にどのような影響を与えるかを調べる必要がある。

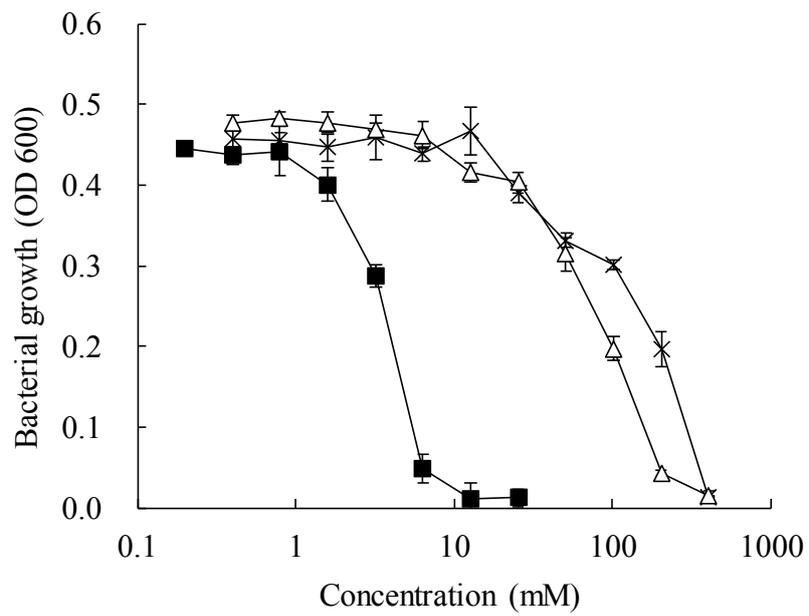


Fig. 2-1. Bacteriostatic activity of organic acid salts in the medium (pH 6.5) against *Streptococcus pneumoniae* NBRC102642^T. ■, Sodium citrate; ×, sodium acetate; Δ, sodium lactate. Tests were performed as three separate measurements.

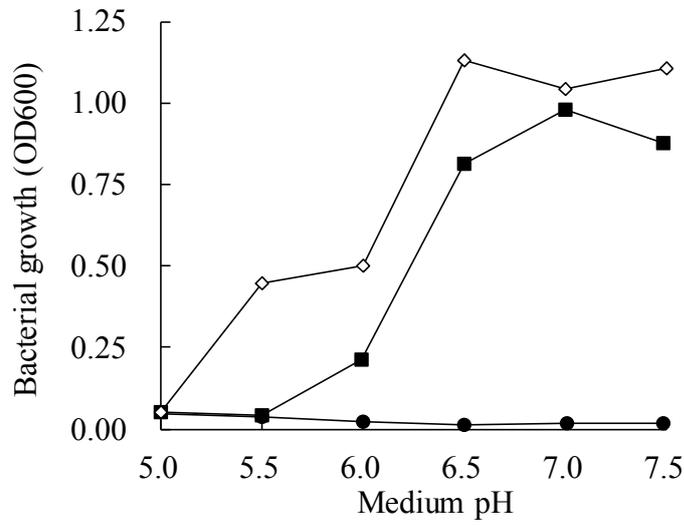
Table 2-1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of sodium citrate for several bacteria detected in human oral cavity.

Tested strains	With MgCl ₂ and CaCl ₂		Without MgCl ₂ and CaCl ₂	
	MIC (mg ml ⁻¹)	MBC (mg ml ⁻¹)	MIC (mg ml ⁻¹)	MBC (mg ml ⁻¹)
<i>Actinomyces naeslundii</i> JCM8350	25.6	25.6	6.4	12.8
<i>Anaerococcus prevotii</i> JCM6490	12.8	12.8	6.4	6.4
<i>Enterococcus faecium</i> OB7084	>102.4	>102.4	51.2	>102.4
<i>Fusobacterium nucleatum</i> JCM8532 ^T	12.8	12.8	6.4	6.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OB7088	>102.4	>102.4	102.4	102.4
<i>Porphyromonas gingivalis</i> OB7124	3.2	>102.4	0.8	0.8
<i>Prevotella intermedia</i> JCM11150 ^T	3.2	>102.4	1.6	1.6
<i>Staphylococcus aureus</i> OB7008	25.6	>102.4	3.2	51.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> OB7010	51.2	>102.4	12.8	12.8
<i>Streptococcus gordonii</i> JCM12995 ^T	3.2	25.6	3.2	12.8
<i>Streptococcus mitis</i> OLS3293	3.2	25.6	3.2	6.4
<i>Streptococcus mutans</i> JCM5705 ^T	6.4	51.2	3.2	6.4
<i>Streptococcus pneumoniae</i> NBRC102642 ^T	12.8	51.2	3.2	12.8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC6303	12.8	102.4	1.6	1.6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC6305	12.8	51.2	1.6	3.2
<i>Streptococcus salivarius</i> JCM5707 ^T	12.8	102.4	1.6	1.6
<i>Streptococcus sanguinis</i> JCM5708 ^T	6.4	25.6	0.8	3.2
<i>Veillonella parvula</i> ATCC17745 ^T	25.6	51.2	12.8	25.6

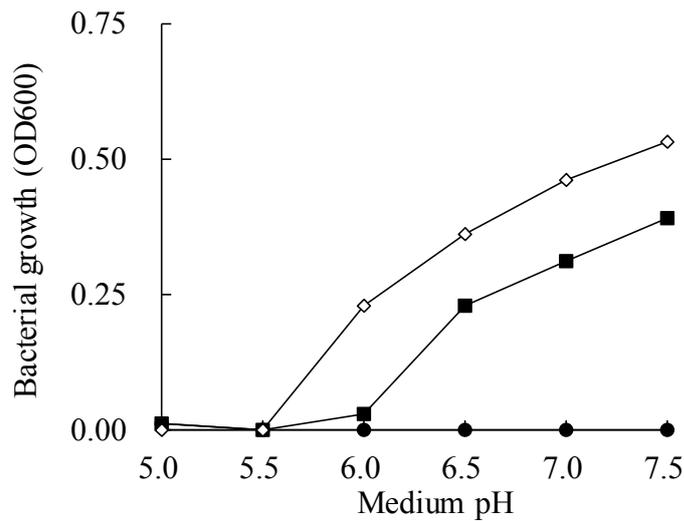
Assessment was performed independently at least three times.

Table 2-2. Minimum inhibitory concentration of sodium citrate on representative oral bacteria isolated from tongue coating.

Organism	No. of isolates tested	No. of isolates with MIC at sodium citrate (mg/mL)								
		0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6	51.2	102.4
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	27	-	-	-	-	3	2	7	12	3
<i>Prevotella histicola</i>	13	-	-	-	-	4	6	2	1	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	7	-	-	-	-	4	-	3	-	-
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	14	-	-	-	-	2	11	1	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	13	-	-	-	-	-	13	-	-	-
<i>Veillonella atypica</i>	9	1	1	1	-	1	-	5	-	-
<i>Veillonella disper/parvula</i>	12	-	-	-	-	-	-	12	-	-



(A)



(B)

Fig. 2-2. Effect of the medium pH on the bacteriostatic activity of sodium citrate and sodium lactate against *Prevotella melaninogenica* JCM6325^T (A) and *Streptococcus pneumoniae* NBRC102642^T (B). Symbols: ◇, control; ●, 25 mM sodium citrate; ■, 100 mM sodium lactate. The experiment was carried out three times independently. The average values were plotted.

Table 2-3. Effect of metal ions on bacteriostatic activity of sodium citrate against *S. pneumoniae* NBRC102642^T

	Bacterial growth ^a	
	9 h	18 h
Control (without sodium citrate)	0.26 ± 0.08	0.38 ± 0.01
25 mmol l ⁻¹ sodium citrate	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
25 mmol l ⁻¹ sodium citrate + 25 mmol l ⁻¹ ZnCl ₂	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
25 mmol l ⁻¹ sodium citrate + 25 mmol l ⁻¹ MnCl ₂	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01
25 mmol l ⁻¹ sodium citrate + 25 mmol l ⁻¹ MgCl ₂	0.17 ± 0.13	0.38 ± 0.02
25 mmol l ⁻¹ sodium citrate + 25 mmol l ⁻¹ CaCl ₂	0.23 ± 0.14	0.45 ± 0.01

^a Bacterial growth was measured by optical density at 600 nm.

Values are expressed as means ± SD from independent triplicate experiments.

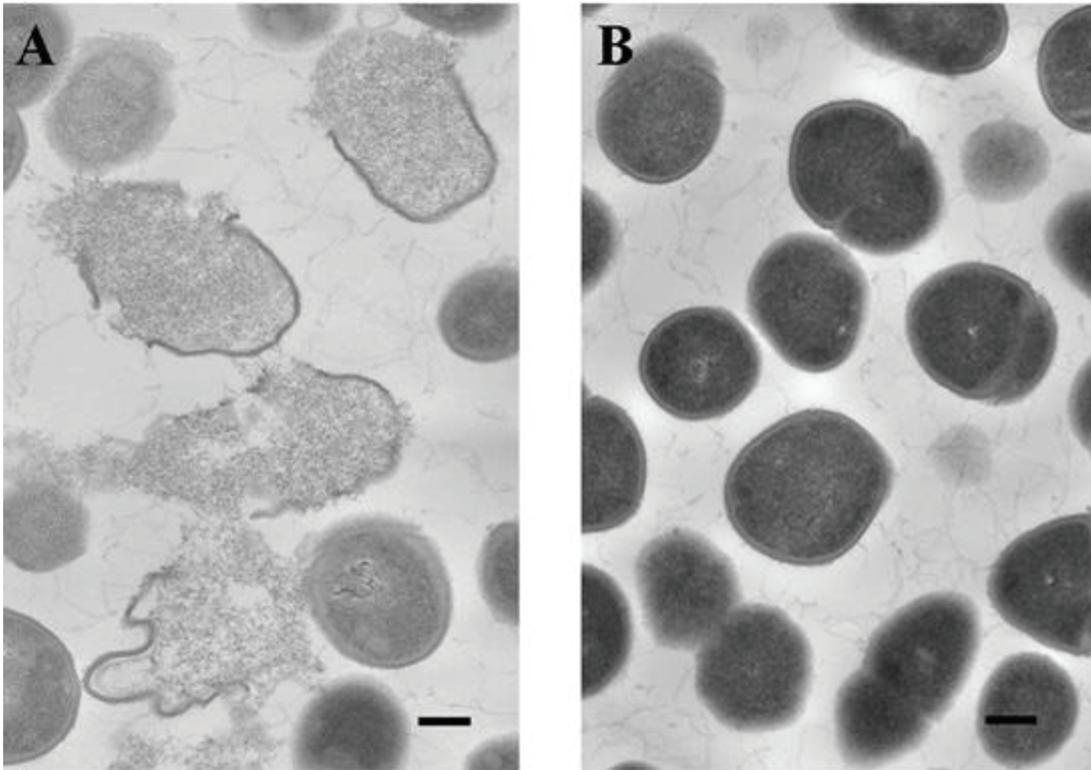


Fig. 2-3. Transmission electron microscopic images ($\times 20,000$ magnification) of *Streptococcus pneumoniae* NBRC102642^T grown in Todd-Hewitt broth with (A) or without (B) 25 mmol sodium citrate. Scale bar indicate 200 nm.

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

緒言

近年、様々な生理効果を有する乳酸菌や *Bifidobacterium* などのプロバイオティクス (probiotics) を含む食品が注目を集めている。プロバイオティクスはもともと、「常在菌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きた微生物」という定義で抗生物質 (antibiotics) の対義語として Fuller [66] によって提唱された概念である。現在は、FAO/WHO (2002) によって「適切な量を摂取することで宿主に有益に作用する生きた微生物」として世界標準化されている。プロバイオティクスの応用例としては、従来は整腸作用 [67]、腸管感染症 [68]、抗生物質関連下痢症の予防や治療 [69] などが中心であったが、近年はアレルギー症状の低減作用 [70, 71]、胃内 *Helicobacter pylori* の除菌作用 [72]、免疫賦活作用 [73, 74] など幅広く利用されている。しかし、齲蝕や歯周病などの口腔疾患の予防や治療を目的としたプロバイオティクスの研究報告は、上述の応用例に比べて極めて少ない。

これまで筆者らの研究グループは、歯周病予防プロバイオティクスの開発を目的に、口腔細菌叢における乳酸菌や *Bifidobacterium* の生態学研究を実施してきた [75-77]。その中で、歯周病患者に比べて健常者の口腔 (唾液) から特異的に *Bifidobacterium adolescentis* が検出され、*Bifidobacterium* の菌種構成が被験者の口腔内環境に関係している可能性を示唆した [75]。また、試験管内試験により *Bifidobacterium* 口腔分離株が歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* [20] とビタミン K およびその類似物質である栄養成分を拮抗・競合する可能性を見出した [21, 76]。さらに、口腔内への付着機構を検討した結果、*Bifidobacterium* は歯面に直接付着するのではなく、*Fusobacterium nucleatum*、*Veillonella parvula* と

いった他の口腔常在細菌と菌体表面の付着因子を介して共凝集することで定着している可能性を示した [77]。

これら一連の研究で明らかにしたヒト口腔内に生息する *Bifidobacterium* と他の口腔細菌との生態学的な関係性を **Fig. 3-1** に示した。偏性嫌気性菌である *Bifidobacterium* が共凝集反応を介して口腔内に定着できれば、同じく偏性嫌気性菌である *P. gingivalis* と生息部位を拮抗する可能性が考えられる。そして、その環境中において、*Propionibacterium* や *Veillonella* などが産生したビタミン K やその類似物質を競合する可能性が高い。従って、ビタミン K の消費能力が高く、且つ口腔内への定着能の高い *Bifidobacterium* を使用することで、歯周病原菌である *P. gingivalis* の増殖を抑制し得るプロバイオティクスを開発できると考えた。

本研究では、上述した歯周病予防プロバイオティクス選抜の指標に基づき、特徴の異なる *B. adolescentis* 株を 3 種類選定した (**Table 3-1**)。いずれの株も、ビタミン K 消費能が高く、ビタミン K 添加によってその増殖が著しく促進される点は共通である [76]。但し、*B. adolescentis* OLB6398 および OLB6410 がヒト唾液由来であるのに対して、*B. adolescentis* OLB6056 はヒト糞便由来である。また、*B. adolescentis* OLB6410 および OLB6056 は、口腔内への定着性に重要といわれている口腔常在細菌 (*F. nucleatum*) との共凝集株であるのに対して、*B. adolescentis* OLB6398 は非共凝集株である。これらの菌株の特徴はいずれも *in vitro* の実験系による検証を基にしたものである。すなわち、実際にヒトおよびモデル動物に対して本菌株を投与したときの、*P. gingivalis* の定着および増殖に及ぼす影響は検証されてはいない。そこで本研究では、プロバイオティクス候補菌であるこれら *Bifidobacterium* 株を歯周病モデル動物に投与し、その口腔内定着性と *P. gingivalis* に対する排除作用を確認することを目的とした。

材料および方法

1. 供試菌株

Bifidobacterium 菌株には *B. adolescentis* OLB6056、*B. adolescentis* OLB6398、*B. adolescentis* OLB6410 を用いた。*B. adolescentis* 菌株はホエイ分解培地にて 37°C・18 時間アネロパック（三菱ガス化学）にて嫌気培養した。*P. gingivalis* OB7124 の培養は 5 µg/mL ヘミン、1 µg/mL メナジオンを含有する GAM 培地にて 37°C・24 時間嫌気培養を行った。

2. 供試動物

ゴールデンシリアンハムスター、5 週齢雄を 5 匹毎に金網敷きのプラスチックケージにて飼育し、水および飼料（CE-2）を自由摂取させた。供試動物は動物飼育装置中で温度 23°C、湿度 53~65 %、明暗 12 時間サイクルの環境下で飼育した。

3. 実験 1

実験は鶴見大学歯学部動物倫理規定に基づき実施した。供試動物を平均体重がほぼ同じになるように 1 群 10 匹の計 3 群（対照群、*B. adolescentis* OLB6398 投与群、*B. adolescentis* OLB6410 投与群）に分け、1 週間馴致飼育した。ハムスターにペントバルビタールナトリウム（ネンブタール、大日本製薬）20 mg/kg を腹腔内注射し、補助的にジエチルエーテルを吸入させて麻酔し、右下顎第 1 臼歯に絹糸を結紮した。3 週間後、結紮した絹糸を切除し、同部位に新たな絹糸を再結紮した。*P. gingivalis* は絹糸を結紮してから 3 週間後に、3 日間連続で培養液（約 1×10^{10} cfu/mL）を 0.1 mL 投与することで感染させた（Fig. 3-2）。*Bifidobacterium* 菌株は *B. adolescentis* OLB6398 または OLB6410 を投与した。

Bifidobacterium の各培養液は、土日を除く週 5 日、5 週間にわたり 1 日 0.1 mL 投与した。対照群にはホエイ分解培地を培養液と同様に投与した。なお、培養液に含まれる *Bifidobacterium* の菌数は約 1×10^9 cfu/mL であった。試験開始から 3 週間後と 5 週間後に結紮糸を回収し、細菌検査に供した。

4. 実験 2

実験 1 と同様、鶴見大学歯学部動物倫理規定に基づき実施した。供試動物を平均体重がほぼ同じになるように 1 群 10 匹の計 2 群（対照群および *B. adolescentis* OLB6056 投与群）に分け、1 週間馴致飼育した。ハムスター第 1 臼歯への絹糸の結紮は実験 1 と同様に行った。本実験では絹糸の再結紮は行なわなかった（**Fig. 3-3**）。*P. gingivalis* は絹糸を結紮してから 3 週間後に、3 日間連続で培養液を 0.1 mL 投与することで感染させた。*Bifidobacterium* の各培養液は、土日を除く週 5 日、5 週間にわたり培養液を 0.1 mL 投与した。対照群にはホエイ分解培地を培養液と同様に投与した。結紮から 5 週間後に結紮糸を回収した。なお、培養液に含まれる *B. adolescentis* OLB6056 菌数は、約 2×10^9 cfu/mL であった。

5. DNA の抽出

ハムスター第 1 臼歯に結紮した絹糸をハサミおよびピンセットを用いて Instagene matrix (Bio-Rad) 0.2 mL 入りのチューブに回収した。絹糸に付着した細菌の DNA は Instagene matrix の取扱説明書に従って抽出した。

6. PCR

結紮糸からの *B. adolescentis* OLB6398 および OLB6410 の検出は Matsuki ら[78, 79]の方法に準じて種特異的プライマーを用いた PCR 法で行なった。PCR 反応液

(50 μ L) は鋳型 DNA 溶液を 1 μ L、Takara Ex Taq (Takara Bio, Japan) を 1.25 U、10 \times Ex Taq buffer を 5 μ L、dNTP mixture (2.5 mM each) を 4 μ L、プライマー (5'-CTC CAG TTG GAT GCA TGT C-3', 5'-CGA AGG CTT GCT CCC AGT-3') をそれぞれ 0.5 μ mol とした。Perkin Elmer thermal cycler (PE Applied Biosystems) を用いて 94°C 5 分の初期反応後、94°C 20 秒、55°C 20 秒、72°C 30 秒のサイクルを 35 回、72°C 5 分の反応を行なった。なお、それぞれのプライマーの特異性は基準株を含む複数の菌株で確認した。

7. Real-time PCR

Real-time PCR は Maeda ら [80] 及び Sakamoto ら [81] の方法に準じて、ABI PRIZM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) と QuantiTect SYBR Green PCR Kit (キアゲン) を用いて行った。PCR 反応液 (20 μ L) は鋳型 DNA 溶液を 2 μ L、2 \times SYBR Green を 10 μ L とし、総菌数および *P. gingivalis* 用の各プライマーを 0.4 μ mol、*B. adolescentis* の特異的なプライマーは 1.0 μ mol とした。各プライマーの塩基配列は **Table 3-2** に示した。総菌数および *P. gingivalis* の PCR は、95°C 15 分の初期反応後、94°C 15 秒、54°C 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 45 回の反応を行なった。*B. adolescentis* 特異的 PCR の反応は、95°C 15 分の初期反応後、94°C 15 秒、54°C 30 秒、72°C 45 秒のサイクルを 45 回とした。なお、検量線は投与菌株を Brain Heart Infusion (Difco) にて培養した際の菌数と、Real-time PCR のサイクル数から作成した。また、総菌数の検量線は *P. gingivalis* OB7124 にて作成した。

結果

1. 実験 1

B. adolescentis 投与 3 週間目 (*P. gingivalis* 感染前) において、結紮糸に付着した *B. adolescentis* を種特異的 PCR にて検出した結果、*B. adolescentis* OLB6410 投与群の全個体 (10/10) と、*B. adolescentis* OLB6398 投与群の 1 個体 (No. 9 のみ) から *B. adolescentis* が検出された (Fig. 3-4)。しかし、*B. adolescentis* OLB6410 および *B. adolescentis* OLB6398 のいずれの投与群においても、5 週間目 (*P. gingivalis* 感染後) の結紮糸から *B. adolescentis* は検出されなかった (Fig. 3-4)。

5 週間目の結紮糸からは、いずれの群においても *P. gingivalis* が検出されたが、総菌数、*P. gingivalis* 菌数はともに群間で差が認められなかった (Fig. 3-5)。しかし、*B. adolescentis* OLB6410 投与群の総菌数に対する *P. gingivalis* 占有率 ($3.6 \pm 5.1\%$) は、対照群 ($6.7 \pm 5.7\%$) に比較して低値傾向 ($P = 0.096$) を示した (Fig. 3-6)。*B. adolescentis* OLB6398 投与群の *P. gingivalis* 占有率は $4.2 \pm 2.9\%$ であり、対照群との差は認められなかった。

2. 実験 2

実験 1 において、3 週間後に結紮した絹糸を切除して新たに結紮する理由は、*P. gingivalis* が生育するのに適した歯肉溝を形成させた後、結紮糸に付着していた口腔細菌を一度排除し、*P. gingivalis* の感染を容易にするためである [82]。しかし、実験 1 では再結紮することで *B. adolescentis* OLB6410 が検出限界以下となり、結紮糸を切除することなしで検討する必要性が考えられた。そこで、予備検討として 3 週後の絹糸の切除、再結紮を行なわないで *P. gingivalis* を接種したところ、*P. gingivalis* の定着が確認でき、再結紮が *P. gingivalis* の感染に必須ではないことが明らかとなった (データ未掲載)。従って、実験 2 では再結紮を行なわ

ない試験系で、*Bifidobacterium* が *P. gingivalis* の感染に及ぼす影響を検討した。

5 週間目の結紮糸に付着した *B. adolescentis* を種特異的 PCR にて検出した結果、*B. adolescentis* OLB6056 投与群は 10 匹中 6 匹から検出された。結紮糸中の総菌数、*P. gingivalis* の菌数および占有率において群間に有意な差は認められなかった (Fig. 3-7)。しかし、*B. adolescentis* OLB6056 投与群のうち、*Bifidobacterium* が検出された 6 検体の総菌数、*P. gingivalis* の菌数および占有率を対照群と比較した結果、対照群と *B. adolescentis* OLB6056 投与群の総菌数 (9.7 ± 0.1 vs. 9.6 ± 0.3 , \log_{10} cells/ligature) には有意な差は認められなかったが、*B. adolescentis* OLB6056 投与群の *P. gingivalis* 菌数 ($8.1 \pm 0.3 \log_{10}$ cells/ligature) は対照群 ($8.4 \pm 0.4 \log_{10}$ cells/ligature) に比較して低値傾向 ($P=0.056$, Wilcoxon 検定; $P=0.044$, t 検定) を示した (Fig. 3-7)。さらに、*B. adolescentis* OLB6056 投与群の *P. gingivalis* 占有率 ($4.6 \pm 3.8\%$) は、対照群 ($9.4 \pm 7.6\%$) に比較して低値傾向を示した (Fig. 3-8)。

考察

マウス口腔に *P. gingivalis* を塗布するだけで持続的に感染するとの報告もあるが [83]、一般にマウス、ラット、ハムスターなどのげっ歯類はヒトに比べて歯肉溝が浅いことから、*P. gingivalis* の持続的感染は困難であるとされている。本研究ではこの問題を解決するため、ハムスター下顎第 1 臼歯の歯頸部に絹糸を結紮し、歯肉溝を形成させた上で、*P. gingivalis* を接種・感染させた。本モデルの結紮糸から検出される細菌構成は、ヒト歯周炎の発症部位から検出される細菌構成と少なくとも属レベルでは類似していることが明らかとなっている [84]。

これまでに、筆者らは *Bifidobacterium* が *P. gingivalis* に対して栄養素 (ビタミン K 類) および定着部位を拮抗・競合する可能性を報告してきた [76, 77]。そこで今回、*B. adolescentis* を歯周病モデル動物に投与した際の、*P. gingivalis* の感染

に及ぼす影響を検討した。本研究では *B. adolescentis* OLB6410 投与群及び *B. adolescentis* OLB6056 が検出された個体において、対照群に比較して有意差は無いものの *P. gingivalis* の菌数が低い傾向であったことから、*B. adolescentis* OLB6410 及び OLB6056 が *P. gingivalis* の感染に対して抑制的に働く可能性が考えられた。以前、実験 1 と同様のモデルにおいて、*Lactobacillus* が *P. gingivalis* の感染に及ぼす影響を検討したが、*Lactobacillus* は *P. gingivalis* の定着・増殖には影響しなかった（データ未掲載）。また今回、モデル動物の口腔から検出されなかった *B. adolescentis* OLB6398 投与群の *P. gingivalis* 菌数および占有率が、対照群と差がなかったことから、口腔内に定着した *B. adolescentis* OLB6410 及び OLB6056 が *P. gingivalis* に対して拮抗・競合した可能性が支持される。我々の知る限り、本結果は歯周病に対するプロバイオティクスの効果を動物実験モデルにて確認した初めての報告である。

本研究では、過去の *in vitro* 研究 [77]において口腔常在菌である *F. nucleatum* との共凝集能を持たない *B. adolescentis* OLB6398 が結紮糸から検出されなかった一方で、共凝集能を有する *B. adolescentis* OLB6410（ヒト口腔由来）及び OLB6056（ヒト糞便由来）は検出された（**Fig. 3-4**）。本結果はすなわち、*Bifidobacterium* の口腔内定着機構には、分離源よりもむしろ *F. nucleatum* などの口腔細菌との共凝集作用が強く関与していることを示している。過去の筆者らの研究において、*B. adolescentis* と *F. nucleatum* との共凝集には、両菌種の菌体表面のタンパク成分が関与していることが示唆されている [77]。多くの報告において、細菌の口腔定着性には口腔細菌との共凝集が最も重要な要素の一つと考えられているが [18, 19, 85-89]、*Bifidobacterium* においても同様のメカニズムが働いており、栄養素の競合が起こった結果、本実験で示したような *P. gingivalis* の生育阻害が起こったものと考えられる。

しかしながら本研究では、*B. adolescentis* OLB6410 及び OLB6056 の有する *P.*

gingivalis への拮抗・阻害作用は強力なものとはいえず、また、最終的に *B. adolescentis* が口腔から排除されたことから (Fig. 3-4)、口腔内への定着性は *P. gingivalis* と比較して弱いと考えられた。この理由として、以下の 2 点が考えられる。一つ目は、口腔常在細菌が、投与した *B. adolescentis* や *P. gingivalis* の定着に影響した可能性である。本研究のハムスター実験モデルでは、歯周病部位における細菌叢はヒトと同様に非常に複雑であり、*Actinomyces*、*Bacteroides*、*Eubacterium*、*Streptococcus*、*Veillonella* などが優勢菌種として検出される [84]。Hojo ら [84]は、これらの口腔細菌から成るバイオフィルムが *P. gingivalis* の定着を促進することを報告している。従って、増殖した歯周病原菌叢によって、*B. adolescentis* の定着が阻害され、排除された可能性が考えられる。実際に、実験 1 では、一旦結紮糸を切除して新しい結紮糸にしたことで、プラークの蓄積が昂進しすぎて、結果的に接種した *P. gingivalis* を含むグラム陰性嫌気性細菌などの口腔常在細菌に *B. adolescentis* OLB6410 が排除されてしまった可能性が考えられた。二つ目は、本モデルが 5 週間という極めて短い期間で激しい歯周炎を惹起させることから、年単位で進行するとされるヒト歯周病と比較して極めて進行速度が速い点である。すなわち、試験期間中のハムスター口腔内においては急激な菌叢変化と生体防御反応が進行していると考えられ、その環境変化に *B. adolescentis* が適応できなかつた可能性が考えられる。

しかしながら、本モデル系で一定の成績が得られたことは、年単位で進行するとされるヒト歯周病の予防に、*Bifidobacterium* が応用できる可能性を示したといえる。今後、更なる効果検証として、健常人または歯周病のメンテナンス患者などを対象に *B. adolescentis* OLB6056 を投与することで、実際に *P. gingivalis* の感染が予防できるかどうかを明らかにする必要がある。その際の評価指標としては、*P. gingivalis* 菌数だけではなく、歯周ポケットの深さ、歯槽骨吸収度、歯根の後退度などの歯周病罹患に伴う臨床マーカーが改善されるかを確認する

必要がある。

本研究をまとめると、口腔細菌との共凝集能を有する *B. adolescentis* を歯周病モデル動物に投与した結果、有意差は得られなかったものの *P. gingivalis* 菌数や総菌数に占める占有率に低下傾向が認められたことから、本菌の定着を抑制する傾向が確認された。一方、口腔細菌との共凝集能をもたない *B. adolescentis* は投与後も口腔から検出されず、*P. gingivalis* 菌数も対照群と差がなかったことから、口腔定着性が歯周病原菌の低減作用において重要な要素であり、*Bifidobacterium* を口腔内に滞留させる工夫が必要であると考えられた。今後は、ヒト投与試験により *B. adolescentis* の *P. gingivalis* 抑制効果を明らかにすることが課題である。

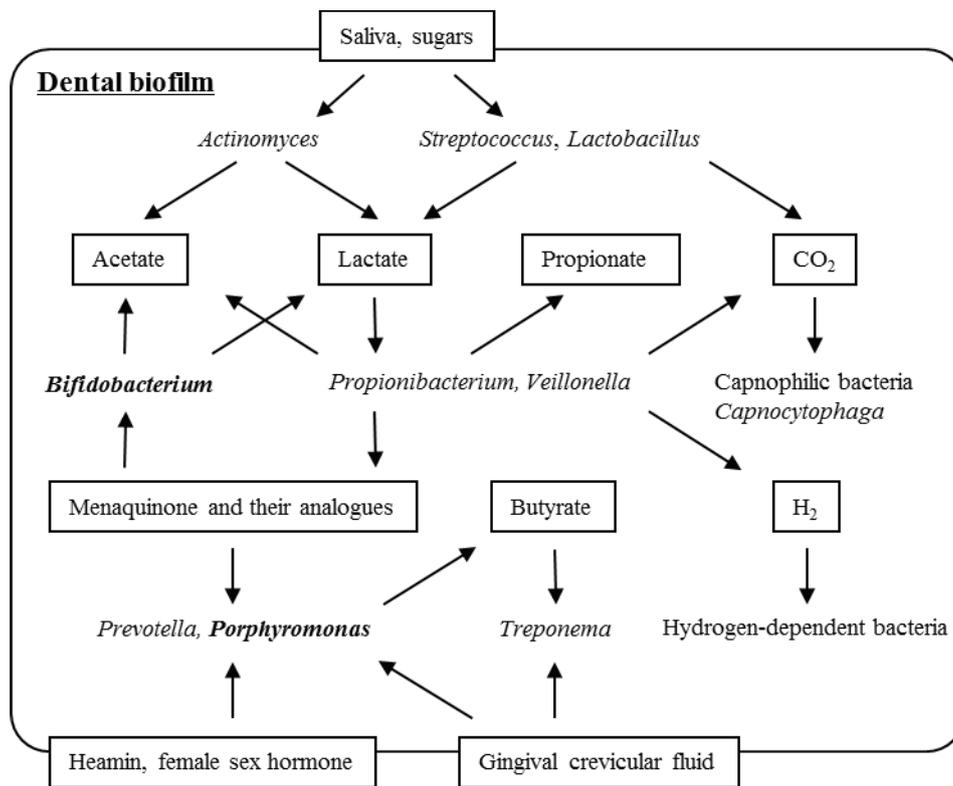


Fig. 3-1. Illustration of representative metabolic relationship among oral bacteria within the dental biofilm communities. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, and *Actinomyces* secrete lactate, and it is utilized by *Veillonella* and *Propionibacterium* as a carbon source [21, 90]. *Veillonella* and *Propionibacterium* produce menaquinone and its analogues, which promote the growth of vitamin K-auxotrophic bacteria such as *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Bifidobacterium* [21, 76]. Carbon dioxide, produced by aerotolerant *Propionibacterium*, heterofermentative *Lactobacillus*, and *Veillonella*, is utilized by capnophilic bacteria such as *Capnocytophaga* [91]. A certain micro-aerophilic motile bacterium depends on hydrogen produced by other oral bacteria, e.g., *Veillonella* [92].

Table 3-1. Characteristic of *B. adolescentis* strains used in this study.

	<i>B. adolescentis</i> strains		
	OLB6398	OLB6410	OLB6056
Origin	Human saliva	Human saliva	Human feces
Growth-stimulated by vitamin K [†]	+	+	+
Co-aggregation with <i>F. nucleatum</i> [§]	—	+	+

[†] Growth stimulation was determined in trypticase/phytone/yeast extract/glucose medium supplemented with or without vitamin K at 37°C for 24 h [76].

[§] Co-aggregation assay was performed optically in a cuvette [77].

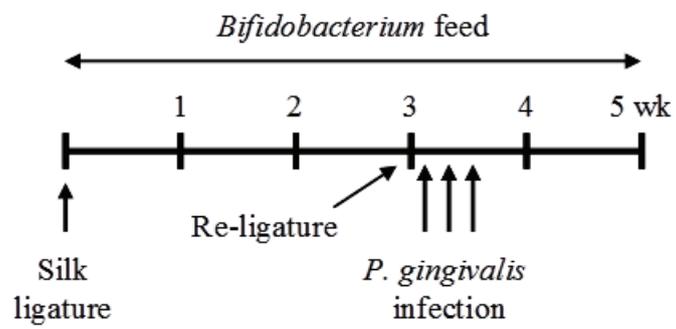


Fig. 3-2. Experimental design 1 of this study.

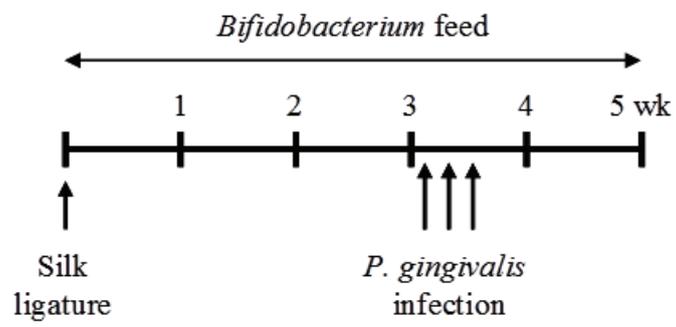


Fig. 3-3. Experimental design 2 of this study.

Table 3-2. Species-specific primers used in this study.

Bacteria	Primer sequence	References
<i>B. adolescentis</i>	5'-CTC CAG TTG GAT GCA TGT C -3'	[78]
	5'-CGA AGG CTT GCT CCC AGT -3'	
<i>P. gingivalis</i>	5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG -3'	[81]
	5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT -3'	
Total bacteria	5'-GTG STG CAY GGY TGT CGT CA -3'	[80]
	5'-ACG TCR TCC MCA CCT TCC TC -3'	

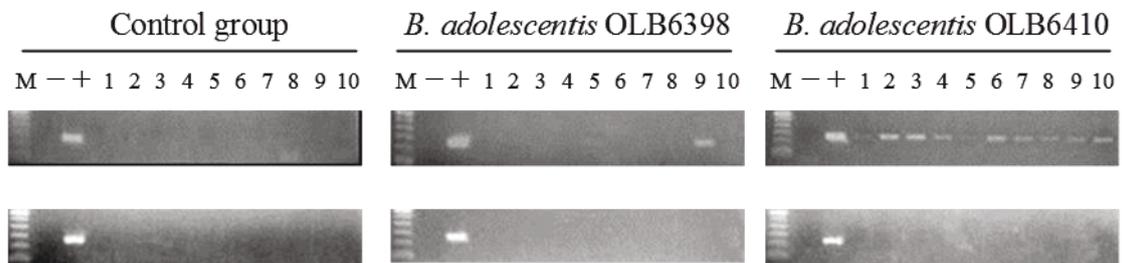


Fig. 3-4. PCR analysis of silk-ligature samples in experiment 1. The samples were collected at 3 weeks (top) and at 5 weeks (bottom) from the start of this study. Lane M, DNA ladder, lane -, negative control containing the primers but no target DNA; lanes 1 to 10, silk-ligature samples from individual hamsters.

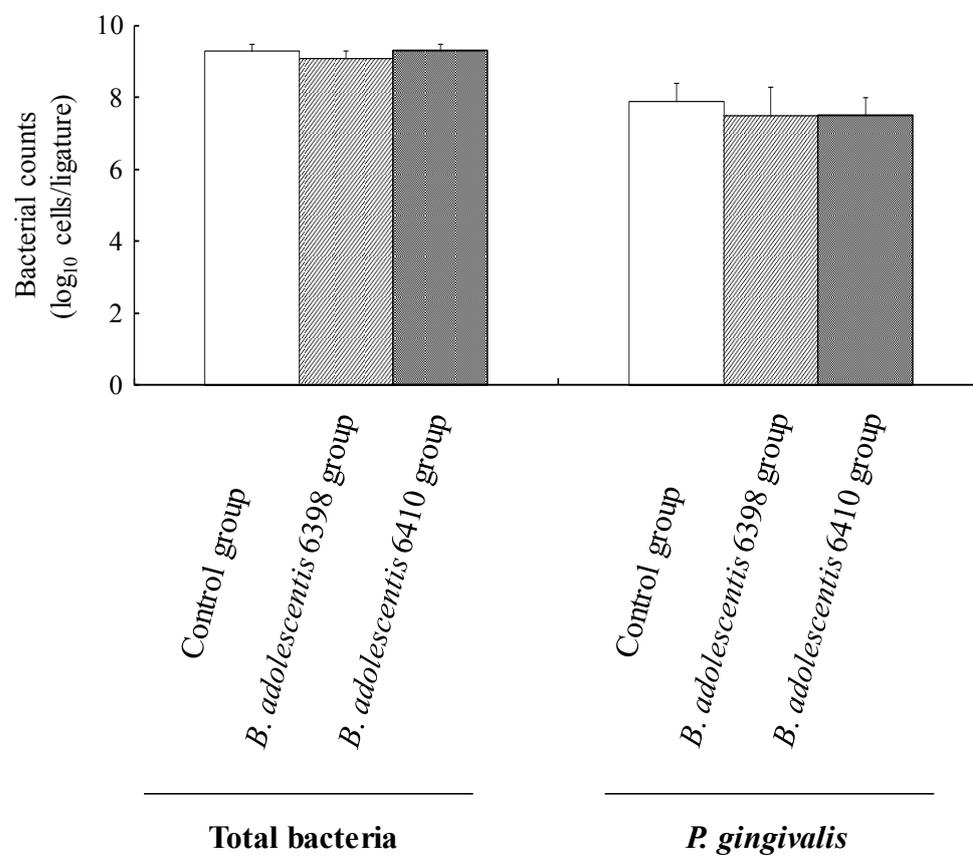


Fig. 3-5. Bacterial counts of total bacteria and *P. gingivalis* in experiment 1. Bars represent standard deviation.

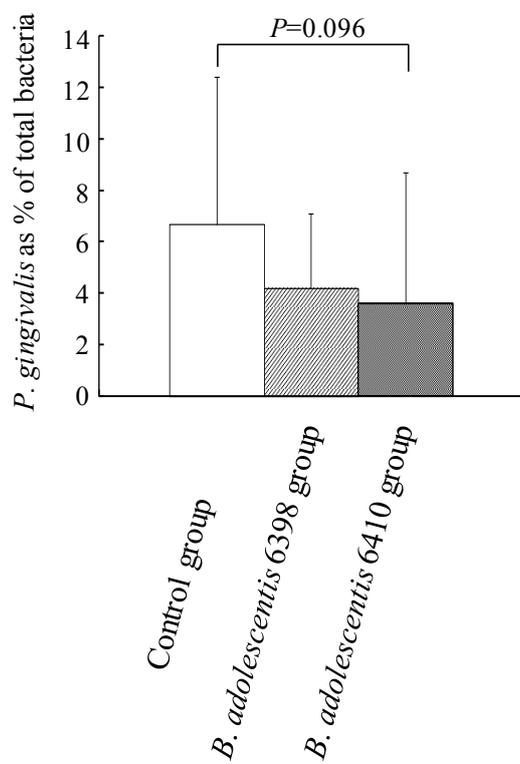


Fig. 3-6. Percentage of *P. gingivalis* cell counts to total bacterial cell counts in experiment 1. Bars represent standard deviation. Statistical analysis performed with StatView 5.0 software (SAS Institute Inc.). Differences between the groups were evaluated by the Mann-Whitney U test.

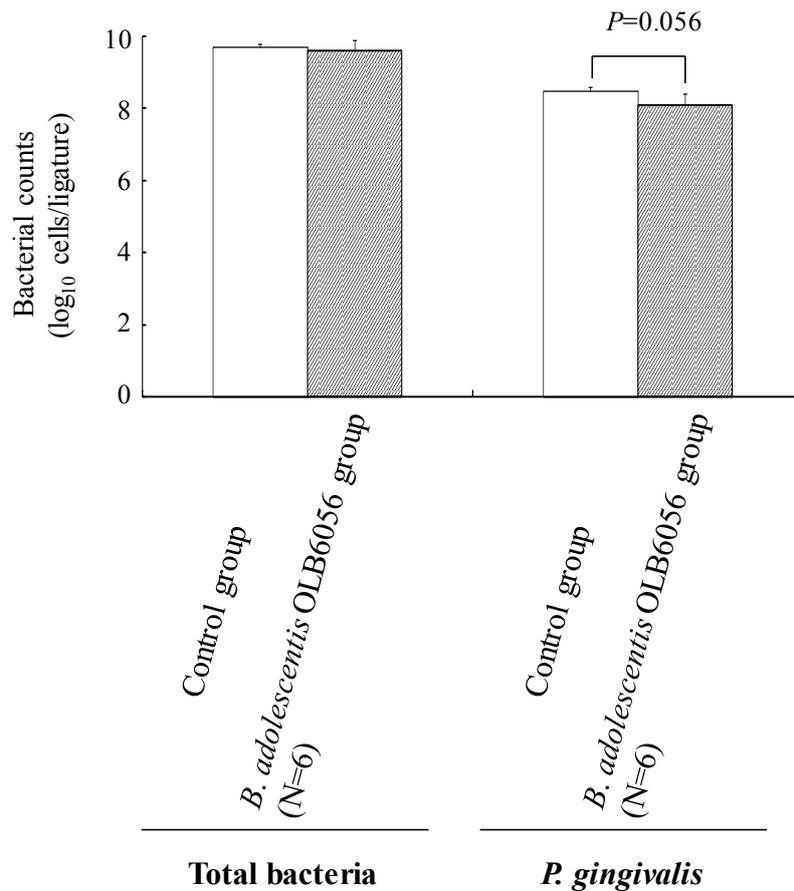


Fig. 3-7. Bacterial counts of total bacteria and *P. gingivalis* in experiment 2. Bars represent standard deviation. Statistical analysis performed with StatView 5.0 software (SAS Institute Inc.). Differences between the groups were evaluated by the Mann-Whitney U test.

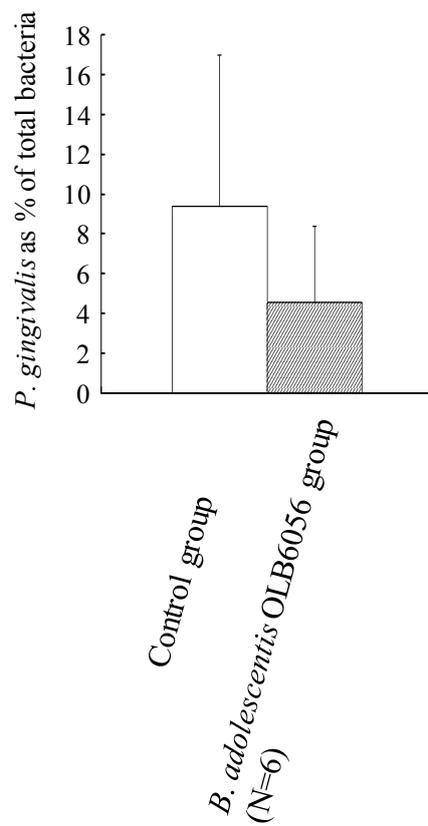


Fig. 3-8. Percentage of *P. gingivalis* cell counts to total bacterial cell counts in experiment 2.

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

緒言

前章において、*Bifidobacterium* 3 菌株を歯周病モデル動物に投与した結果、*B. adolescentis* OLB6410 および OLB6056 の菌株投与群では対照群に比較して *P. gingivalis* の菌数または占有率が低い傾向であったことから、これらの菌株が *P. gingivalis* と拮抗・競合し、その増殖を抑制し得る可能性が示された [93]。そこで次に、これらの菌株を食品に配合することを試みた。本研究では、口腔環境を改善する食品の対象として、日本人に馴染みがあり日常的に継続摂取し易いヨーグルトに着目した。しかし、一般的に *Bifidobacterium* は偏性嫌気性菌であるため酸素 (O_2) 感受性が高く、 O_2 そのものに加えて自身の O_2 消費機構により生成された過酸化水素 (H_2O_2) から細胞障害を受け、ヨーグルト保存期間中にその生残性が大きく低下することが知られている [94]。前章で動物実験に供した *B. adolescentis* OLB6410 および OLB6056 においてもその傾向が認められ、特に OLB6410 において顕著であった。*Bifidobacterium* をヨーグルトに利用するための解決手段として、 O_2 透過性の低いバリア容器を使用したり、 O_2 や H_2O_2 耐性が高い *Bifidobacterium* 菌株を選抜・育種したり、菌体をカプセル内に保護する技術などが試されている [95, 96]。しかし、これらの技術は製品のコストアップにつながるほか、使用できる菌株にも制約が生じるため、ヒトへの保健効果が確認された *Bifidobacterium* を商品化することは大きな技術的ハードルといえる。

そこで本研究では、一般的なヨーグルトの賞味期限である 2 週間における *B. adolescentis* OLB6056 の生残性を向上することで、本菌株を含むプロバイオティクスの実用化を目指した。上述の通り、ヨーグルト中における *Bifidobacterium* の生残性には H_2O_2 の酸化ストレスが関与していることが知られている。

Bifidobacterium の H₂O₂ 産生機構に関しては過去に多数の報告があるが、筆者らは *Bifidobacterium* を含まないヨーグルト中にも H₂O₂ が含まれていることに着目した [97, 98]。この H₂O₂ 蓄積にはヨーグルトスターターが関与していると考えられているが、それが *Bifidobacterium* の生残性にどの程度影響を与えているかは不明な点が多い。また、ヨーグルトスターターと H₂O₂ 蓄積の関連性に関する報告は少なく、その多くが限られた菌株で且つ乳以外の培地で実施されたものとなっている。

そこで本章では、伝統的なヨーグルトスターターである *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) および *Streptococcus thermophilus* について、ヨーグルト中における H₂O₂ 産生能を評価し、これら乳酸菌による H₂O₂ 蓄積メカニズムの一端を解明することで、H₂O₂ 蓄積量の少ないヨーグルトを開発し、*B. adolescentis* OLB6056 の生残性を改善できるかを検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

いずれも株式会社明治の保有菌株を使用した。*L. bulgaricus* および *S. thermophilus* の各菌株は、それぞれ MRS 培地 (Difco) および M17 培地 (Difco) に 1 %接種し、37°C で 16 時間静置培養した。*B. adolescentis* OLB6056 は、変法 GAM ブイヨン培地 (日水製薬) に 1 %接種し、37°C で 18 時間嫌氣的に静置培養した。

2. 乳酸菌の産生する H₂O₂ 濃度の測定

各乳酸菌株をポリプロピレン製試験管に分注した 0.1 %酵母エキス (Difco) 含有 10 %脱脂粉乳培地に 1 %接種し、好気またはアネロパック (三菱ガス化学)

を用いた嫌気条件下にて 37°C・16 時間静置培養した。培養液を氷冷後、1 mL を遠心チューブに採取し、1,500×g、10 分間遠心分離し、得られた上清 100 μL を Hydrogen Peroxide Assay Kit (コスモバイオ) に供し H₂O₂ 濃度を測定した。なお、H₂O₂ 以外の活性酸素種による影響を排除するため、98 units/200 μL のカタラーゼ (和光純薬工業) を添加した系にて得られた測定値を上述の測定値から減ずることで正味 H₂O₂ 濃度を算出した。

3. 乳酸緩衝液中における乳酸菌の H₂O₂ 産生量と O₂ 消費量の測定

L. bulgaricus 2038 および *S. thermophilus* 1131 の培養液につき、6,000×g、10 分間遠心分離にて菌体を回収し、生理食塩水を用いて 1 回洗浄後、予め O₂ で飽和させた乳酸緩衝液に対して、所定の菌濃度になるように懸濁した。乳酸緩衝液は、140 mM NaCl および 2.7 mM KCl を含む 100 mM 乳酸溶液と、100 mM NaCl および 2.7 mM KCl を含む 100 mM 乳酸ナトリウム溶液を混合し、pH を 4.0, 4.3 および 4.6 に調整した。本懸濁液を 37°C で 2 時間静置した際の H₂O₂ 濃度を前述の方法で測定した。同時に、溶存酸素濃度を SevenGo Duo pro (METLER TOREDO) を用いて測定し、O₂ 消費量を算出した。

4. ヨーグルトの調製と品質評価

95°C 達温殺菌した後に 43°C まで冷却した 0.1 %酵母エキス含有 10 %脱脂粉乳溶解液に、予め同培地で培養した *L. bulgaricus* 2038 および *S. thermophilus* 1131 の培養液 (それぞれ約 3×10⁸ cfu/mL および約 1×10⁹ cfu/mL) をスターターとして合計 2 %になるように接種した。本調合液を紙カップ (東罐工業) に 100 g 充填し、43°C で乳酸酸度 0.7 %に達するまで発酵させた。冷蔵庫で一夜冷却した後、*L. bulgaricus* 2038、*S. thermophilus* 1131 菌数を BCP 加プレート寒天培地 (日水製薬) にて測定した。同時に、H₂O₂ 濃度を前述の方法にて測定した。

5. *Bifidobacterium* を含むヨーグルトの調製と品質評価

前述の方法にてヨーグルトを調製した。ただし、スターター接種と同時に *B. adolescentis* OLB6056 の培養液 (約 2×10^8 cfu/mL) を接種した。本ヨーグルトにつき、 $10^\circ\text{C} \cdot 2$ 週間保存中の *B. adolescentis* OLB6056 菌数、 H_2O_2 、溶存酸素濃度、pH を測定した。*B. adolescentis* OLB6056 菌数は、TOS プロピオン酸寒天培地 (ヤクルト本社) で計測した。

6. 乳酸緩衝液中における *Bifidobacterium* の生残性評価

最終濃度 $80 \mu\text{M}$ となるように H_2O_2 (和光純薬工業) を添加した乳酸緩衝液 (pH 4.0, 4.3 および 4.6) に窒素ガスを吹き込み除酸素した。対照には、 H_2O_2 無添加の乳酸緩衝液を同様に除酸素して用いた。その後、*B. adolescentis* OLB6056 の培養液 (約 2×10^8 cfu/mL) を 3 % 添加し、 5°C で 3 時間保持した。1 時間毎の *B. adolescentis* OLB6056 菌数を TOS プロピオン酸寒天培地で計測した。

結果

1. 乳酸菌の産生する H_2O_2 濃度

ヨーグルトスターター11株 (*L. bulgaricus* 6株および *S. thermophilus* 5株) について、10%脱脂粉乳培地中で好気培養した際の H_2O_2 産生能を測定した。その結果、*L. bulgaricus* の H_2O_2 産生量は $63.7 \sim 83.7 \mu\text{M}$ (平均 $74.6 \mu\text{M}$) であり、*S. thermophilus* の産生量 $10.1 \sim 21.0 \mu\text{M}$ (平均 $15.5 \mu\text{M}$) よりも約5倍大きいことが確認された (Fig. 4-1)。一方、嫌気培養下における H_2O_2 産生量は、*S. thermophilus* 1131 では好気培養時とほとんど違いがなかったのに対して、*L. bulgaricus* 2038 では約3分の1に減少した。

2. 乳酸緩衝液中における乳酸菌の H₂O₂ 産生量と O₂ 消費量

pH 4.6、4.3、4.0 に調整した乳酸緩衝液に洗浄菌体を懸濁させて培養を行ったところ、*L. bulgaricus* 2038 は O₂ 消費と同時に H₂O₂ 産生が認められたのに対して、*S. thermophilus* 1131 は O₂ を消費するにも関わらず殆ど H₂O₂ を産生しなかった (Table 4-1)。両菌種ともに、H₂O₂ 産生と O₂ 消費量は pH が高い条件ほど多くなる傾向にあった。

L. bulgaricus 2038 と *S. thermophilus* 1131 を様々な菌数比で混合して乳酸緩衝液 (pH 4.3) 内で培養したときの O₂ 消費量及び H₂O₂ 蓄積量を測定した。その結果、*S. thermophilus* 1131 の菌数が 3.4×10^7 cfu/mL から 3.4×10^8 cfu/mL に増加した時は O₂ 消費量及び H₂O₂ 蓄積量に大きな変化が認められなかったのに対して、*L. bulgaricus* 2038 の菌数が 4.5×10^7 cfu/mL から 4.5×10^5 cfu/mL に減少した時は、H₂O₂ 蓄積量の顕著な低減が認められた (Table 4-1)。

3. ヨーグルトの調製と品質評価

L. bulgaricus 2038 と *S. thermophilus* 1131 の接種比率を変えて2種類のヨーグルトを調製した (Table 4-2)。スターター中の *L. bulgaricus* 2038 比率が低いヨーグルトは、製造後1日目の *L. bulgaricus* 2038 菌数と H₂O₂ 蓄積量が少ない傾向が認められた。いずれのヨーグルトも保存中の H₂O₂ 蓄積量が減少していく一方で、溶存酸素濃度は増加していく現象が認められた。ただし、溶存酸素濃度増加の程度は、*L. bulgaricus* 2038 菌数の少ないヨーグルトの方が大きかった。

4. *Bifidobacterium* を含むヨーグルトの調製と品質評価

スターター中の *L. bulgaricus* 2038 と *S. thermophilus* 1131 の比率の異なる3種類の *B. adolescentis* OLB6056 配合ヨーグルトを調製した (Table 4-3)。Table 4-2

の結果と同様に、スターター中の *L. bulgaricus* 2038 比率が低くなるほど、製造後 1 日目の *L. bulgaricus* 2038 菌数と H₂O₂ 蓄積量が少ない傾向が認められた。10°C・2 週間保存後の *B. adolescentis* OLB6056 菌数は、H₂O₂ 蓄積量の最も高いヨーグルトが 2.1×10² cfu/mL (生残率 0.003%) であったのに対して、H₂O₂ 蓄積量の最も少ないヨーグルトは、2.4×10⁶ cfu/ml (生残率 1.714 %) であった。

5. 乳酸緩衝液中における *Bifidobacterium* の生残性評価

乳酸緩衝液 (pH 4.0, 4.3 および 4.6) 中における *B. adolescentis* OLB6056 の生残性を確認した結果、pH による違いは僅かであった (Fig. 4-2)。一方、いずれの pH においても、緩衝液中に 80 μM の H₂O₂ が含まれていた場合には、大きく生残性が低下することが確認された。

考察

一般的に、乳酸菌はチトクロム系の呼吸鎖やカタラーゼなどのヘムタンパク質合成能を欠くことから、分子状 O₂ をエネルギー代謝に直接利用できない。しかし、電子供与作用のあるフラボプロテインを補酵素に持つオキシダーゼ (NADH オキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼなど) を有し、これらが分子状 O₂ に直接作用して乳酸菌の代謝において様々な機能を担っていることが知られている [99, 100]。なかでも NADH オキシダーゼは最も研究がなされており、O₂ を 2 電子還元して H₂O₂ を生成する H₂O₂ 生成型 NADH オキシダーゼと、4 電子還元して水 (H₂O) を生成する H₂O 生成型 NADH オキシダーゼの 2 種類が存在する。Marty-Teyssset ら [101]は、*L. bulgaricus* B107 の H₂O₂ 産生には主に H₂O₂ 生成型 NADH オキシダーゼが寄与していると報告している。一方 Sasaki ら [102]は、*S. thermophilus* 1131 の H₂O 生成型 NADH オキシダーゼ遺伝子ノックア

ウト株の O₂ 消費能が野生株に比べて約 65 %低減したことから、本酵素が酸素消費において重要な働きを持つことを示している。本研究では、ヨーグルトスターター11株 (*L. bulgaricus* 6株および *S. thermophilus* 5株) について、乳中で好気培養した際の H₂O₂ 産生能を比較したところ、*L. bulgaricus* の H₂O₂ 産生量 (平均 74.6 μM) は、*S. thermophilus* のそれ (平均 15.5 μM) よりも約 5 倍大きいことが確認された (Fig. 4-1)。本結果から、過去に報告されているような O₂ 存在下において発酵中に H₂O₂ を産生するという *L. bulgaricus* の特徴 [101-104]が、乳培地においても多くの *L. bulgaricus* 菌株で再現された。本結果は、乳の発酵過程における H₂O₂ の蓄積には、*L. bulgaricus* が大きく関与していることを示唆している。

本研究では、嫌気培養下における H₂O₂ 産生量は、*S. thermophilus* 1131 では好気培養時とほとんど違いがなかったのに対して、*L. bulgaricus* 2038 では約 3 分の 1 に減少した (Fig. 4-1)。加えて、供試した全ての菌株において、好気培養開始時に 6~7 ppm あった培地中の溶存酸素 (DO) が発酵終了後には 1 ppm 以下まで減少した (データ未掲載)。従って、両菌種において NADH オキシダーゼが機能したものと推察された。そこで両菌種の O₂ 消費能を調べるため、一般的なヨーグルトの pH である 4.6、4.3、4.0 に調整した乳酸緩衝液に洗浄菌体を懸濁させて培養を行った。その結果、*L. bulgaricus* 2038 は O₂ 消費と H₂O₂ 産生が同時に認められたのに対して、*S. thermophilus* 1131 は O₂ を消費するにも関わらず H₂O₂ 産生量が極めて少なかった (Table 4-1)。本結果はすなわち、*L. bulgaricus* 2038 が H₂O₂ 生成型 NADH オキシダーゼを有し、一方 *S. thermophilus* 1131 は H₂O 生成型 NADH オキシダーゼを有するという過去の報告を強く支持するものである。ヨーグルト製造では伝統的に、*L. bulgaricus* と *S. thermophilus* の 2 菌種をスターターとして用いるが、その発酵過程においても乳中の溶存酸素が減少することはよく知られている [105]。過去の報告より、*S. thermophilus* の増殖が盛ん

なヨーグルト発酵初期には DO が急激に低下するものの H₂O₂ 蓄積は認められず、*L. bulgaricus* の生育が活発化した発酵中期から H₂O₂ が検出され [102]、製造直後の蓄積量が最も多いことが報告されている [98]。以上のことから、ヨーグルト中に蓄積している H₂O₂ の多くは、*L. bulgaricus* の H₂O₂ 産生型 NADH オキシダーゼによって、乳中の溶存酸素から発酵中に変換生成されたものであると考えられる。

本研究では、*L. bulgaricus* 2038 と *S. thermophilus* 1131 を混合して乳酸緩衝液 (pH 4.3) 内で培養したときの O₂ 消費量及び H₂O₂ 蓄積量を測定した。筆者は、*S. thermophilus* 1131 が *L. bulgaricus* 2038 と酸素を競合することで、*L. bulgaricus* 2038 の H₂O₂ 産生量が低減すると考えたが、予想に反して低減は起こらなかった (Table 4-1)。しかし、*L. bulgaricus* 2038 菌数を 4.5×10^5 cfu/mL に低減した時には、H₂O₂ 低減効果が極めて高かった (Table 4-1)。すなわち、H₂O₂ 蓄積には *S. thermophilus* よりも *L. bulgaricus* の菌数が大きく影響していることが示唆された。従って、ヨーグルト中の H₂O₂ 蓄積量を低減するためには、ヨーグルト中の *L. bulgaricus* 菌数を減少させることが有効であると考えられた。

ヨーグルト中の *L. bulgaricus* 菌数を低減するためには、スターター接種時に *L. bulgaricus* の接種比率を低減する必要がある。しかし、ヨーグルト発酵において *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* は相互の代謝生成物を利用する共生関係にあるため [106]、スターター中の *L. bulgaricus* 菌数の低減は発酵遅延に繋がるのが工業上の課題である。そこで本研究では、培地に *S. thermophilus* に対して発酵促進作用のある酵母エキス [107] を添加することで 2 菌種間の共生関係を排除し、*S. thermophilus* が単菌でも十分増殖できる環境を形成させることで発酵遅延の問題を解決した。本法により調製したヨーグルトの製造後 1 日目の乳酸菌数および H₂O₂ 蓄積量を測定したところ、筆者の期待通り、*L. bulgaricus* 菌数が少ないヨーグルトほど、H₂O₂ 蓄積量が少なくなる傾向を認めた (Table 4-2)。本ヨーグ

ルトを 10°C 下で保存した結果、 H_2O_2 蓄積量が次第に減少していったことから、培地や菌体成分の酸化反応により H_2O_2 が還元されたものと推察される。過去、Dave [98] や Sasaki ら [102] も同様の現象を認めている。また、*L. bulgaricus* 菌数が多いヨーグルトほど、冷蔵保存中の溶存酸素濃度の増加が少ないことから、保存過程においても、実測した見かけの H_2O_2 蓄積量を上回る H_2O_2 が産生され、酸化反応に消費されたことが推察される。すなわち、*L. bulgaricus* 菌数を低減することは、初発の H_2O_2 蓄積を抑えるだけでなく、保存中の H_2O_2 産生をも抑制する効果があることが示唆された。

最後に、前章の歯周病モデル動物実験にて歯周病原菌に対して一定の抑制効果が認められた *B. adolescentis* OLB6056 を含むヨーグルトを調製した。上述の方法と同様、スターター中の *L. bulgaricus* 2038 の接種比率を変えることで、 H_2O_2 蓄積量が異なる 3 種類の *B. adolescentis* OLB6056 含有ヨーグルトを得た (Table 4-3)。これらのヨーグルトは期待通り、*L. bulgaricus* 2038 の菌数が低いものほど、14 日間冷蔵保存したときの *B. adolescentis* OLB6056 の生残性が顕著に改善された。ここで、ヨーグルト中における *Bifidobacterium* の生残性に影響する因子はいくつか報告されているが、 O_2 や H_2O_2 による酸化反応と並んで重要な因子として酸性 pH があげられる [94]。一般に、スターター乳酸菌によって産生した乳酸によって冷蔵保存中のヨーグルト pH が徐々に低下していく現象を後酸性化 (post-acidification) と呼ばれる [98]。本研究では、*L. bulgaricus* の菌数が多いヨーグルトでは、後酸性化の程度が大きいことから、このことが *B. adolescentis* OLB6056 の生残性を低下させる可能性も考えられた。しかし、乳酸緩衝液を用いた試験結果から、*B. adolescentis* OLB6056 の生残性には後酸性化よりもむしろ H_2O_2 蓄積が大きく影響していることが示された (Fig. 4-2)。

以前より、ヨーグルト中の溶存酸素を低減することで *Bifidobacterium* の生残性を向上する試みは報告されている。これらは、 O_2 や H_2O_2 除去能の高い乳酸菌

や酵母 (*Lactobacillus acidophilus* [94, 108]、*Lactobacillus casei* [108, 109]、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [110]、*Saccharomyces cerevisiae* [94]) を付加することを特徴としている。しかし、これらの微生物は日本人が好むヨーグルトとは調和しない香気物質を産生するケースが多く、嗜好性が低下することが課題であった。本研究で開発した製造方法は、伝統的ヨーグルトスターターである *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* のみを用いて、簡便且つ低コストで風味の良好なプロバイオティクスヨーグルトを製造できることが利点である。

本章をまとめると、歯周病原菌抑制効果を有する *B. adolescentis* OLB6056 のヨーグルト中での生残性向上を目的に、*Bifidobacterium* の生残性を低下させる要因の一つである H_2O_2 産生メカニズムを検討したところ、ヨーグルト中に蓄積している H_2O_2 の多くは、*L. bulgaricus* の H_2O_2 産生型 NADH オキシダーゼによって、乳中の溶存酸素から発酵中に変換生成されたものであると考えられた。そこで、*L. bulgaricus* 菌数を低減したヨーグルトを調製した結果、製造後における H_2O_2 蓄積量は大きく減少し、 10°C で 14 日間保存後の *B. adolescentis* OLB6056 の生残性は顕著に改善された。今後は、本章で開発した *B. adolescentis* OLB 6056 含有ヨーグルトを用いて、健常人または歯周病患者などを対象としたヒト投与試験を実施することにより、歯周病予防プロバイオティクスの商品化が大きく前進すると考えている。

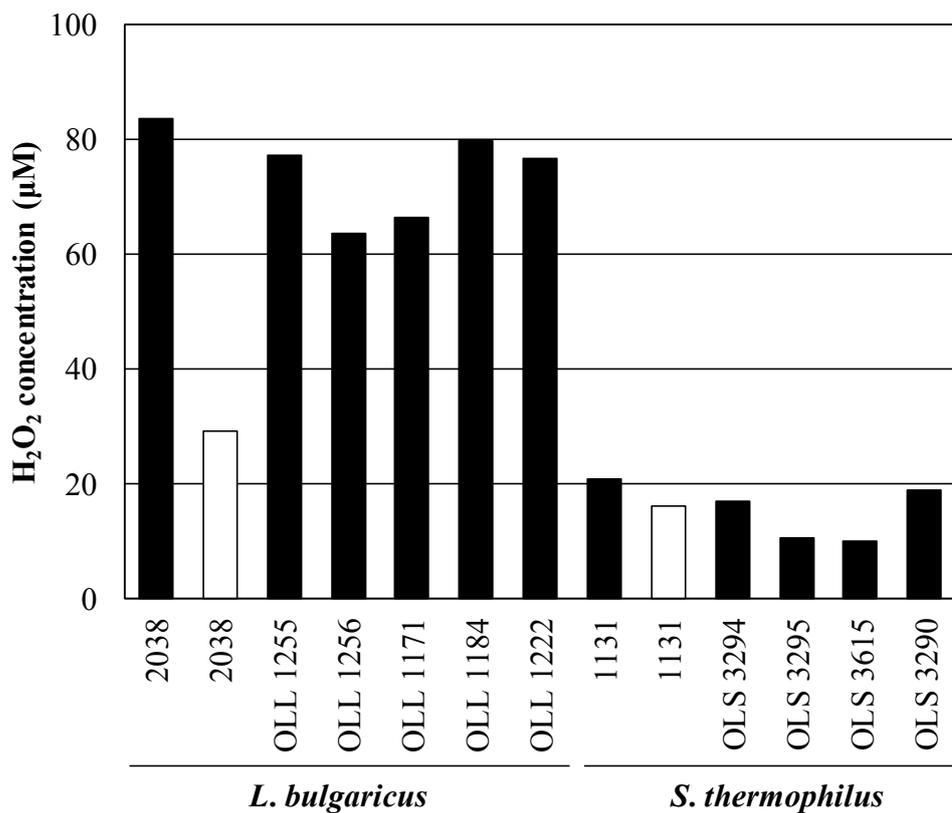


Fig. 4-1. Hydrogen peroxide production by monocultures of *L. bulgaricus* or *S. thermophilus* strains after incubation in 10 % skim milk medium at 37°C for 16 h. Black and white bars represent aerobic and anaerobic conditions, respectively. Values are expressed as the means from 4 separate measurements.

Table 4-1. Hydrogen peroxide generation and dissolved oxygen consumption after incubation in lactate buffer suspended with bacterial cells of *L. bulgaricus* 2038 and/or *S. thermophilus* 1131 at 37°C for 2 h.

Bacterial counts (cfu/mL)		pH	H ₂ O ₂	O ₂
<i>L. bulgaricus</i> 2038	<i>S. thermophilus</i> 1131		generation (μM)	consumption (μM)
4.5×10 ⁷	—	4.0	43.0	47.7
4.5×10 ⁷	—	4.3	75.1	61.4
4.5×10 ⁷	—	4.6	87.8	71.9
—	3.4×10 ⁸	4.0	0.4	18.6
—	3.4×10 ⁸	4.3	1.1	24.2
—	3.4×10 ⁸	4.6	9.7	66.7
4.5×10 ⁷	3.4×10 ⁷	4.3	70.6	55.6
4.5×10 ⁷	3.4×10 ⁸	4.3	61.6	59.8
4.5×10 ⁵	3.4×10 ⁸	4.3	1.2	31.3

Table 4-2. The concentration of hydrogen peroxide and dissolved oxygen in yogurt during storage at 10°C for 14 days.

Inoculation (%)		Initial bacterial counts (cfu/mL)		H ₂ O ₂ (μM)			O ₂ (mg/kg)		
<i>L. bulgaricus</i> 2038	<i>S. thermophilus</i> 1131	<i>L. bulgaricus</i> 2038	<i>S. thermophilus</i> 1131	D1	D7	D14	D1	D7	D14
1	1	6.8×10 ⁸	2.8×10 ⁸	88.5	30.7	13.7	0.21	1.07	2.59
0.0005	1.9995	1.0×10 ⁷	6.2×10 ⁸	26.7	8.7	6.2	1.1	3.58	7.01

Table 4-3. The viability of *B. adolescentis* OLB6056 and concentration of hydrogen peroxide and dissolved oxygen in yogurt during storage at 10°C for 14 days.

Inoculation (%)		Initial bacterial counts (cfu/mL)		<i>B. adolescentis</i> OLB6056 (cfu/mL)		H ₂ O ₂ (μM)		O ₂ (mg/kg)		pH	
<i>L. bulgaricus</i> 2038	<i>S. thermophilus</i> 1131	<i>L. bulgaricus</i> 2038	<i>S. thermophilus</i> 1131	D1	D14	D1	D14	D1	D14	D1	D14
1	1	9.4×10 ⁸	1.6×10 ⁸	8.1×10 ⁷	2.1×10 ²	71.9	17.2	0.51	4.03	4.38	4.24
0.05	1.95	2.7×10 ⁸	4.1×10 ⁸	1.3×10 ⁸	1.3×10 ³	42.8	12.5	0.75	6.21	4.48	4.32
0.005	1.995	3.0×10 ⁷	2.9×10 ⁸	1.4×10 ⁸	2.4×10 ⁶	29.9	12	0.98	7.15	4.62	4.47

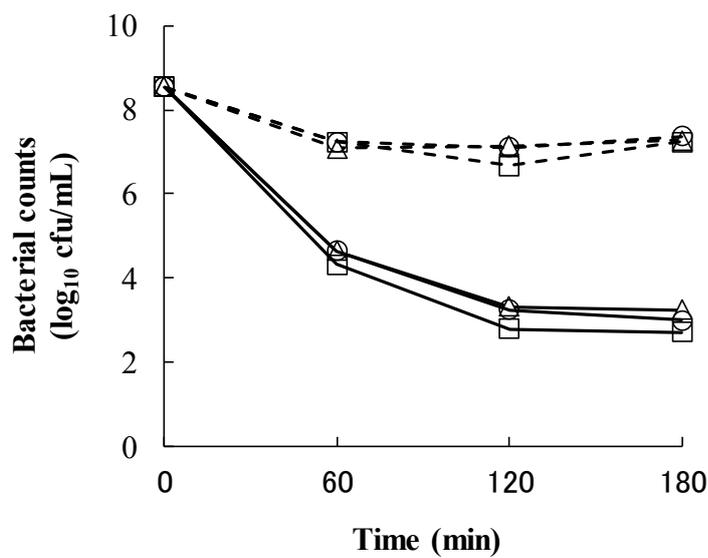


Fig. 4-2. Sensitivity of *B. adolescentis* OLB6056 to hydrogen peroxidase and low pH. Bacterial cells were suspended in lactate buffer at pH 4.6 (○), 4.3 (△), and 4.0 (□) and kept for 3 h at 5°C under anaerobic conditions. The solid line and dotted line indicate the presence or absence of 80 μM hydrogen peroxide, respectively. Values are expressed as the means from 4 separate measurements.

第5章 総括

第1章では、口腔疾患が全身の健康にも影響を及ぼすことを示した。例えば、齲蝕や歯周病に罹患すると、歯の喪失によって栄養バランスに偏りが生じ、高齢期における運動能力や脳機能の低下につながるだけでなく、心疾患、脳血管疾患、糖尿病、肺炎、口臭の発生にも影響する。したがって、口腔環境の健康を保つことは、口腔だけではなく全身の健康や生活の質（QOL）を維持する上で重要である。そこで本研究では、口腔疾患や口臭の主な原因である口腔細菌の増殖を抑制しうる素材の探索を行い、それを継続的に摂取しやすい食品に配合することを試みた。

第2章では、有機酸が有する口腔細菌への抗菌効果を検討した。酢酸 Na および乳酸 Na と比較してクエン酸 Na が *S. pneumoniae* NBRC102642^T の生育を強く抑制する作用を有していたことから、クエン酸 Na の抗菌効果に着目した。各種口腔細菌に対するクエン酸 Na の抗菌効果を検討したところ、カチオン（ Mg^{2+} と Ca^{2+} ）の非存在下において *E. faecium* や *K. pneumoniae* を除く多くの口腔細菌に対して高い抗菌作用を確認した。また、注目すべきことに、*S. pneumoniae* NBRC102642^T や *P. melaninogenica* JCM6325^T に対するクエン酸 Na の抗菌作用が、酢酸 Na や乳酸 Na とは異なり pH 非依存的であったことから、他の有機酸が持つ一般的な抗菌メカニズムとは異なることが示唆された。そこで *S. pneumoniae* を用いてクエン酸 Na の有する抗菌効果の作用機序を検討した。その結果、クエン酸 Na が有するキレート作用によって、主に2つの抗菌メカニズムが機能しているものと考えられた。

一つ目は、クエン酸 Na がそのキレート作用により菌体細胞壁外膜に局在する金属イオンと結合することで菌体細胞壁の機能が失われ、最終的に細胞内容物の溶出に繋がったと考えられる。二つ目は、細菌増殖に必要な環境中の Ca^{2+} や Mg^{2+} 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

ことが考えられる。広く食品に用いられる素材であるクエン酸 Na が、口腔疾患や口臭に関与する口腔細菌に対して pH 非依存的に抗菌効果を示したことから、今後、広範な食品への利用の可能性が期待できる。

第 3 章では、過去の *in vitro* 研究において歯周病予防を目的に選抜したプロバイオティクス候補である *Bifidobacterium* 菌株を歯周病モデル動物に投与した際の、歯周病原菌 *P. gingivalis* に対する除菌効果を確認した。偏性嫌気性菌である *Bifidobacterium* は、同じく口腔内の嫌気環境下に生息する *P. gingivalis* と定着部位や栄養素（ビタミン K）を競合すると考えられる。今回、口腔内への定着性に重要な要素である口腔常在細菌との共凝集能が高い *B. adolescentis* 菌株を歯周病モデル動物に投与した結果、有意差は得られなかったものの *P. gingivalis* 菌数や総菌数に対する *P. gingivalis* 菌数の占有率に低下傾向が認められた。一方、口腔常在細菌との共凝集能をもたない *B. adolescentis* は、投与後も口腔から検出されず、*P. gingivalis* 菌数も対照群と差がなかった。従って、口腔定着性がプロバイオティクス効果に重要な要素であることが示された。

第 4 章では、ヨーグルト中における *B. adolescentis* OLB6056 の生残性向上を試みた。ヨーグルト中には *Bifidobacterium* の生残性を低下させる要因の一つである H_2O_2 が含まれている。そこで、ヨーグルト中の H_2O_2 低減による *Bifidobacterium* の生残性向上を目的に、ヨーグルト製造に用いられるスターター乳酸菌 11 株を用いて、乳中における $37^\circ\text{C} \cdot 16$ 時間培養時の H_2O_2 産生量を評価した。その結果、*L. bulgaricus* は *S. thermophilus* に比べて約 5 倍の H_2O_2 を産生した。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は 65 % 減少したことから、*L. bulgaricus* の酸素消費機構によって生じた H_2O_2 がヨーグルトに蓄積しているものと推察された。次に、ヨーグルト環境を模した乳酸緩衝液に様々な菌数比となるように乳酸菌体を懸濁させた時の H_2O_2 蓄積量は、*L. bulgaricus* 菌数が増えるほど高くなり、一方 *S. thermophilus* 菌数の増加はあまり影響しな

った。以上より、 H_2O_2 産生菌である *L. bulgaricus* 菌数が、直接的に H_2O_2 蓄積量に影響を与えていると考えられた。そこで、*L. bulgaricus* 菌数を低減したヨーグルトを調製した結果、製造後における H_2O_2 蓄積量は大きく減少し、 10°C で 14 日間保存後の *B. adolescentis* OLB6056 の生残性は顕著に改善された。

以上、本研究を通じて、口臭や肺炎に関与する口腔細菌に対して pH 非依存的に抗菌効果を示す「クエン酸 Na」と、栄養素および生息環境競合の観点から動物モデルにて一定の歯周病原菌抑制効果が確認された「*Bifidobacterium* 菌株」が、将来的な口腔環境改善食品の創成に向けた素材として有用である可能性が示された。加えて、継続的に摂取するために適したヨーグルトという食品に *Bifidobacterium* を配合する上で、重要な課題の一つである生残性の維持に対しては、 H_2O_2 蓄積量を低減する製造法という解決策を提示した。本研究で得られた基礎的知見は、歯科領域を対象としたプロバイオティクス食品を開発する上で重要である。今後は、これらのヒト投与試験を実施し、臨床項目を評価することで、これらの素材の有効性を実証できると考えている。

謝辞

本研究を遂行と論文作成に際して、ご指導、ご鞭撻、並びにご高閲を賜りました日本大学大学院 生物資源科学研究科 ミルク科学研究室 増田哲也教授、川井泰准教授に心より厚く御礼申し上げます。また、論文作成に際して、ご助言とご高閲を賜りました、日本大学大学院 生物資源科学研究科 食品創成科学研究室 小田宗宏教授、同大学大学院 生物資源科学研究科 海洋生物資源利用学研究室 松宮政弘教授に厚く感謝の意を表します。また、本研究の遂行、並びに論文作成にあたり、ご指導を賜りました鶴見大学歯学部 前田伸子教授、大島朋子准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行できる環境を与えてくださいました株式会社明治 研究本部長 伊藤裕之博士、同社食品開発研究所長 岡本隆雄氏、同社中尾治彦博士、同社村尾周久氏、同社森毅氏、同社木村勝紀博士に深く感謝いたします。本研究の遂行と論文作成において丁寧かつ貴重なご助言とご高閲を賜りました株式会社明治 北條研一博士に御礼申し上げます。また、多くのご助言をいただきました株式会社明治の伊澤佳久平氏、堀内啓史博士、石田達也博士に感謝申し上げます。本研究を遂行にご協力いただきました渡部玲子女史、高橋沙織女史、浦山春香女史、高橋美帆女史に感謝いたします。電子顕微鏡撮影の際にご指導を頂きました岩崎秀子女史に御礼申し上げます。モデル動物の作出、飼育および解剖に御協力頂きました鶴見大学歯学部 口腔微生物学講座の皆様はこの場を借りてお礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただきました株式会社明治 研究本部 発酵乳開発研究部並びに乳酸菌研究部の皆様に深く感謝いたします。最後に、論文執筆を応援してくれた家族と両親に心から感謝します。

引用文献

- [1] Walls, A, W., Steele, J, G., Sheiham, A., Marcenes, W. and Moynihan, P, J. (2000) Oral health and nutrition in older people. J. Public Health Dent., 60, 304-307.
- [2] 神森秀樹, 葭原明弘, 安藤雄一, 宮崎秀夫 (2003) 健常高齢者における咀嚼能力が栄養摂取に及ぼす影響, 口腔衛生会誌, 53, 13-22.
- [3] 小林義典 (2011) 咬合・咀嚼が創る健康長寿, Ann. Jpn. Prosthodont., 3, 189-219.
- [4] Beck, J, D., Offenbacher, S., Williams, R., Gibbs, P. and Garcia, R. (1998) Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? Ann. Periodontol., 3, 127-141.
- [5] 奥田克爾 (2004) 口腔内バイオフィルム デンタルプラーク細菌との戦い, 医歯薬出版, 東京.
- [6] Soskolne, W, A. and Klinger, A. (2001) The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. Ann. Periodontol., 6, 91-98.
- [7] Becker, M, R., Paster, B, J., Leys, E, J., Moeschberger, M, L., Kenyon, S, G., Galvin, J, L., Boches, S, K. and Dewhirst, F, E. (2002) Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J. Clin. Microbiol., 40, 1001-1009.
- [8] Socransky, S, S., Smith, C. and Haffajee, A, D. (2002) Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 29, 260-268.
- [9] Sbordone, L. and Bortolaia, C. (2003) Oral microbial biofilms and plaque-related disease: microbial communities and their role in the shift from oral health to

disease. Clin. Oral. Investig., 7, 181-188.

- [10] 奥田克爾, 君塚隆太, 阿部修, 加藤哲男, 石原和幸, 西條みのり (2005) 口腔ケアによる誤嚥性肺炎予防, 歯科学報, 105, 129-137.
- [11] 安藤雄一, 青山旬, 花田信弘 (2003) 口腔が健康状態に及ぼす影響と歯科保健医療, J. Natl. Inst. Public Health, 52, 23-31.
- [12] 厚生労働省, 平成 23 年歯科疾患実態調査.
- [13] 安藤雄一, 川崎浩二, 内藤徹, 坂本友紀, 葭原明弘, 牧茂, 花田信弘, 杉山精一, 豊島義博 (2013) う蝕のない社会の実現に向けて, 口腔衛生学会雑誌, 63, 399-411.
- [14] 内閣府, 平成 26 年度 高齢者の日常生活に関する意識調査結果
- [15] 財団法人 8020 推進財団, 永久歯の抜歯原因調査報告書 (平成 17 年 3 月).
- [16] 厚生労働省, 平成 25 年度国民医療費.
- [17] 小川知彦 (2001) 図説口腔微生物学 (梅本俊夫編), 学建書院, 東京, 293-327.
- [18] Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T. and Maeda, N. (2009) Bacterial interactions in dental biofilm development. J. Dent. Res., 88, 982-990.
- [19] Kolenbrander, P. E., Palmer, J. R., Periasamy, S. J. and Jakubovics, S. N. (2010) Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. Nat. Rev. Microbiol., 8, 471-480.
- [20] Maeda, N., Okamoto, M., Kondo, K., Ishikawa, H., Osada, R., Tsurumoto, A. and Fujita, H. (1998) Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. Immunol., 42, 583-589.
- [21] Marcotte, H. and Lavoie, M. C. (1998) Oral microbial ecology and the role of

salivary immunoglobulin A. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 71-109.

- [22] Pratibha, P, K., Bhat, K, M. and Bhat, G, S. (2006) Oral malodor: a review of the literature. J. Dent. Hyg., 80, 8.
- [23] Scully, C., el-Maaytah, M., Porter, S, R. and Greenman, J. (1997) Breath odor: etiopathogenesis, assessment and management. Eur. J. Oral Sci., 105, 287-293.
- [24] Haraszthy, V, I., Zambon, J, J., Sreenivasan, P, K., Zambon, M, M., Gerber, D., Rego, R. and Parker, C, J. (2007) Identification of oral bacterial species associated with halitosis. J. Am. Dent. Assoc., 138, 1113-1120.
- [25] Kakuta, E., Ohshima, T., Nakagawa, Y. and Maeda, N. (2009) Relationship between two bacterial species and oral malodor. Tsurumi Univ. Dent. J., 35, 1-8.
- [26] Kazor, C, E., Mitchell, P, M., Lee, A, M., Stokes, L, N., Loesche, W, J., Dewhirst, F, E. and Paster, B, J. (2003) Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. J. Clin. Microbiol., 41, 558-563.
- [27] Washio, J., Sato, T., Koseki, T. and Takahashi, N. (2005) Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. J. Med. Microbiol., 54, 889-895.
- [28] ライオン株式会社(2014) 日本・アメリカ・スウェーデン 3カ国のオーラルケア意識調査 Vol.1.
- [29] オーラルケア関連市場マーケティング総覧(2014), 富士経済, 東京.
- [30] Gibson, R, G. (1999) Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. J. Nutr., 129, 1438S-1441S.
- [31] Shin, R., Suzuki, M. and Morishita, Y. (2002) Influence of intestinal anaerobes

and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *E.coli* O157:H7. J. Med.Microbiol., 51, 201-206.

- [32] Maier, R, B., Onderdonk, B, A., Baskett, C, R. and Hentges J, D. (1972) *Shigella*, indigenous flora interactions in mice. Am. J. Clin. Nutr., 25, 1433-1440.
- [33] Su, J, W., Waechter, J, M., Bourlioux, P., Dolegeal, M., Fourniat, J. and Mahuzier, G. (1987) Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *Clostridium difficile* in gnotobiotic mice. Infect. Immun., 55, 1686-1691.
- [34] 厚生労働省, 平成 26 年(2014) 人口動態統計の年間推計.
- [35] Awano, S., Ansai, T., Tanaka, Y., Soh, I., Akifusa, S., Hamasaki, T., Yoshida, A. and Sonoki, K. (2008) Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. J. Dent. Res., 87, 334-339.
- [36] Boskou, G. and Debevere, J. (2000) Shelf-life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmospheres. Food Addit. Contam., 17, 17-25.
- [37] Sallam, K, I. and Samejima, K. (2004) Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. Lebenson Wiss Technol., 37, 865-871.
- [38] Sallam, K, I. and Samejima, K. (2004) Effects of trisodium phosphate and sodium chloride dipping on the microbial quality and shelf life of refrigerated tray-packaged chicken breasts. Food Sci. Biotechnol., 13, 425-429.
- [39] Williams, S, K. and Phillips, K. (1998) Sodium lactate affects sensory and objective characteristics of tray-packed broiler chicken breast meat. Poult Sci., 77, 765-769.

- [40] Chuda, Y., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Matsumoto, K., Nagata, T. and Kikuchi, Y. Mume-fural, citric acid derivative improving blood fluidity from fruit-juice concentrate of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). J Agric Food Chem., 47, 828-831.
- [41] Jain, P., Jain, P., Tandon, H, C. and Babbar, R. (2003) Effect of sodium citrate ingestion on oxygen debt & exercise endurance during supramaximal exercise. Indian J Med Res., 118, 42-46.
- [42] Phillips, C, A. (1999) The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*. Lett Appl Microbiol., 29, 424-428.
- [43] Lee, Y, L., Thrupp, L., Owens, J., Cesario, T. and Shanbrom, E. (2001) Bactericidal activity of citrate against Gram-positive cocci. Lett Appl Microbiol., 33, 349-351.
- [44] Lee, Y, L., Cesario, T., Owens, J., Shanbrom, E. and Thrupp, L, D. (2002) Antibacterial activity of citrate and acetate. Nutrition, 18, 665-666.
- [45] Watanabe, R., Hojo, K., Nagaoka, S., Kimura, K., Ohshima, T. and Maeda, N. (2011) Antibacterial activity of sodium citrate against oral bacteria isolated from human tongue dorsum. J. Oral. Biosci., 53, 87-92.
- [46] 日本化学療法学会(1990) 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法) —日本化学療法学会標準法—. Chemotherapy, 38, 102-105.
- [47] 日本化学療法学会 (1993) 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法)の一部修正, 栄養要求性の厳しい菌種を対象とした培地の調整と感受性測定法,微量液体希釈法による嫌気性菌に対する MIC 測定法. Chemotherapy, 41, 183-189.

- [48] 菅野治重 (1990) 抗菌薬感受性測定法 日本化学療法学会標準法 (微量液体希釈法) 検査と技術, 18, 1283-1287.
- [49] 平野寛, 宮澤七郎 (1992) よくわかる電子顕微鏡技術 (医学・生物学電子顕微鏡技術研究会), 朝倉書店, 東京.
- [50] Spurr, A, R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res., 26, 31-43.
- [51] Bogaert, D., de Groot, R. and Hermans, P. (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. The Lancet infectious diseases, 4, 144-154.
- [52] Kadioglu, A., Weiser, J, N., Paton, J, C. and Andrew, P, W. (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nat. Rev. Microbiol., 6, 288-301.
- [53] Suzuki, N., Yuyama, M., Maeda, S., Ogawa, H., Mashiko, K. and Kiyoura, Y. (2006) Genotypic identification of presumptive *Streptococcus pneumoniae* by PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae*. J. Med. Microbiol., 55, 709-714.
- [54] Barry, A, L., Reller, L, B., Miller, G, H., Washington, J, A., Schoenknecht, F, D., Peterson, L, R., Hare, R, S. and Knapp, C. (1992) Revision of standards for adjusting the cation content of Muller-Hinton broth for testing susceptibility of *Pseudomonas Aeruginosa* to aminoglycosides. J. Clin. Microbiol., 30, 585-589.
- [55] 平田佳子 (1978) *Streptococcus mutans* の発育に及ぼすクエン酸ナトリウムの阻害作用. 日本細菌学雑誌, 33, 395-402.
- [56] AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A, F., Verhoef, J. and Snippe, H. (1995)

Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiol. Rev., 59, 591-603.

- [57] Davidson, M, P. (1997) Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, Washington, D.C., ASM Press.
- [58] Siegumfeldt, H., Bjorn Rechinger, K. and Jakobsen, M. (2000) Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Appl. Environ. Microbiol., 66, 2330-2335.
- [59] Abou-Zeid, K, A., Yoon, K, S., Oscar, T, P., Schwarz, J, G., Hashem, F, M. and Whiting, R, C. (2007) Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in broth as a function of temperature, pH, and potassium lactate and sodium diacetate concentrations. J. Food Prot., 70, 2620-2625.
- [60] Kraniak, J, M. and Shelef, L, A. (1988) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and metal ions on growth of *Staphylococcus aureus* 196E in culture media. J. Food Sci., 53, 910-913.
- [61] Gray, G, W. and Wilkinson, S, G. (1965) The effect of ethylenediaminetetra-acetic acid on the cell walls of some gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol., 39, 385-399.
- [62] Haque, H. and Russell, D, A. (1974) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and related chelating agents on whole cells of gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother., 5, 447-452.
- [63] Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev., 56, 395-411.
- [64] Trombe, -C, M., Clavé, C. and Manias, -M, J. (1992) Calcium regulation of

- growth and differentiation in *Streptococcus pneumoniae*. Microbiology, 138, 77-84.
- [65] Bulgarelli, A, M. and Shelef, A, L. (1985) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on growth from spores of *Bacillus cereus*. J. Food Sci., 50, 661-664.
- [66] Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol., 66, 365-378.
- [67] Koebnick, C., Wagner, I., Leitzmann, P., Stern, U. and Zunft, H, J. (2003) Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. Ca. J. Gastroenterol., 17, 655-659.
- [68] Marteau, P, R., de Vrese, M., Cellier, C, J. and Schrezenmeir, J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Am. J. Clin. Nutr., 73, 430S-436S.
- [69] Hickson, M., D'Souza, A, L., Muthu, N., Rogers, T, R., Want, S., Rajkumar, C. and Bulpitt, C, J. (2007) Use of probiotic *Lactobacillus preparation* to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. BMJ, 335, 80.
- [70] Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E. and Salminen, S. (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. Clin. Exp. Allergy, 30, 1604-1610.
- [71] Ishida, Y., Nakamura, F., Kanzato, H., Sawada, D., Yamamoto, N., Kagata, H., Oh-Ida, M., Takeuchi, H. and Fujiwara, S. (2005) Effect of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on symptoms of Japanese cedar pollen allergy: A randomized placebo-controlled trial. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69, 1652-1660.

- [72] Sakamoto, I., Igarashi, M., Kimura, K., Takagi, A., Miwa, T. and Koga, Y. (2001) Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. J. Antimicrob. Chemother., 47, 709-710.
- [73] Makino, S., Ikegami, S., Kume, A., Horiuchi, H., Sasaki, H. and Orii, N. (2010) Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. Br. J. Nutr., 104, 998-1006.
- [74] Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T. and Oda, M. (2006) Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. J. Dairy Sci., 89, 2873-2881.
- [75] Hojo, K., Mizoguchi, C., Taketomo, N., Ohshima, T., Gomi, K., Arai, T. and Maeda, N. Distribution of salivary *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in periodontal health and disease. Biosci. Biotechnol. Biochem., 71, 152-157.
- [76] Hojo, K., Nagaoka, S., Murata, S., Taketomo, N., Ohshima, T. and Maeda, N. (2007) Reduction of vitamin K concentration by salivary *Bifidobacterium* strains and their possible nutritional competition with *Porphyromonas gingivalis*. J. Appl. Microbiol., 103, 1969-1974.
- [77] Nagaoka, S., Hojo, K., Murata, S., Mori, T., Ohshima, T. and Maeda, N. (2008) Interactions between salivary *Bifidobacterium adolescentis* and other oral bacteria: *in vitro* coaggregation and coadhesion assays. FEMS Microbiol. Lett., 281, 183-189.
- [78] Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. and Tanaka, R. (2004) Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted

- species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol., 70, 167-173.
- [79] Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M. and Oyaizu, H. (1999) Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. Appl. Environ. Microbiol., 65, 4506-4512.
- [80] Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeyuchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F. and Takashiba, S. (2003) Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 39, 81-86.
- [81] Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishikawa, I. and Benno, Y. (2001) Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol. Immunol., 45, 39-44.
- [82] Okamoto, M., Hasegawa, N., Sugahara, N. and Maeda, N. (2001) Effects of *Porphyromonas gingivalis* infection and feeding with high carbohydrates in experimental periodontitis in hamsters. J. Jpn. Soc. Periodontol., 43, 65-71.
- [83] Baker, P. J., DuFour, L., Dixon, M. and Roopenian, D. C. (2000) Adhesion molecule deficiencies increase *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. Infect. Immun., 68, 3103-3107.
- [84] Hojo, K., Tamura, A., Mizoguchi, C., Ohshima, T., Kato, D. and Maeda, N. (2008) Predominant bacteria recovered from a periodontitis site in a hamster model raised by silk-ligature with *Porphyromonas gingivalis* infection. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 1348-1351.

- [85] Kolenbrander, P. E. (1988) Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. Annu. Rev. Microbiol., 42, 627-656.
- [86] Kolenbrander, P. E. (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu. Rev. Microbiol., 54, 413-437.
- [87] Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S. and Palmer, R. J. (2002) Communication among oral bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66, 486-505.
- [88] Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N. and Moore, L. V. (1989) Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selemonoas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. Infect. Immun., 57, 3194-3203.
- [89] Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Rickard Jr., A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I. and Diaz, P. I. (2000) Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontol., 42, 47-79.
- [90] Chalmers, I. N., Palmer Jr., J. R., Cisar, O. J. and Kolenbrander, P. E. (2008) Characterization of a *Streptococcus* sp.-*Veillonella* sp. community micromanipulated from dental plaque. J. Bacteriol., 190, 8145-8154.
- [91] Kapke, A. P., Brown, T. A. and Lillich, T. T. (1980) Carbon dioxide metabolism by *Capnocytophaga ochracea*: identification, characterization, and regulation of a phosphoenolpyruvate carboxykinase. Infect. Immun., 27, 756-766.
- [92] van Palenstein Helder, H. W. and Rosman, I. (1976) Hydrogen-dependent organisms from the human gingival crevice resembling *Vibrio succinogenes*. Antonie van Leeuwenhoek, 42, 107-118.

- [93] Nagaoka, S., Hojo, K., Mori, T., Kato, D., Ohshima, T. and Maeda, N. (2009) Potential antagonistic activity of *Bifidobacterium adolescentis* against *Porphyromonas gingivalis* in a hamster periodontitis model. J. Oral Biosci., 51, 224-229.
- [94] 馬田三夫 (1988) ビフィズス菌の科学, 137-149, ヤクルト本社, 東京.
- [95] Shah, N, P. (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci., 83, 894-907.
- [96] Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I, U. and Fernando, L. (2000) Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. J. Dairy Sci., 83, 1946-1951.
- [97] 宮本文夫, 佐伯政信 (1990) 市販加工食品中の過酸化水素含有量について, 千葉衛研報告, 14, 6-10.
- [98] Dave, I, R. (1998) Factors affecting viability of yoghurt and probiotic bacteria in commercial starter cultures. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at Victoria university of technology.
- [99] Yamamoto, Y., Gaudu, P. and Gruss, A. (2011) Oxidative stress and oxygen metabolism in lactic acid bacteria. Caister Academic Press, 90-102.
- [100] Condon, S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Reviews, 46, 269-280.
- [101] Marty-Teyssset, C., de la Torre, F. and Garel, -R, J. (2000) Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. Appl. Environ. Microbiol., 66, 262-267.

- [102] Sasaki, Y., Horiuchi, H., Kawashima, H., Mukai, T. and Yamamoto, Y. (2014) NADH oxidase of *Streptococcus thermophilus* 1131 is required for the effective yogurt fermentation with *Lactococcus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. Biosci. Microbiota Food Health, 33, 31-40.
- [103] Dahiya, R. S. and Speck, L. M. (1968) Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci., 51, 1568-1572.
- [104] Kot, E., Furmanov, S. and Bezkorovainy, A. (1996) Hydrogen peroxide production and oxidation of ferrous iron by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Dairy Sci., 79, 758-766.
- [105] Horiuchi, H., Inoue, N., Liu, E., Fukui, M., Sasaki, Y. and Sasaki, T. (2009) A method for manufacturing superior set yogurt under reduced oxygen conditions. J. Dairy Sci., 92, 4112-4121.
- [106] Veringa, H. A., Galesloot, T. E. and Davelaar, H. (1968) Symbiosis in yoghurt (II). Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk Dairy J., 22, 114-120.
- [107] Horiuchi, H. and Sasaki, T. (2012) Effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. J. Dairy Sci., 95, 2904-2909.
- [108] Cheng, C. C. and Nagasawa, T. (1983) Associative relationships between bifidobacteria and lactobacilli in milk. Jpn. J. Zootech. Sci., 54, 740-747.
- [109] Cheng, C. C. and Nagasawa, T. (1984) Effect of peptides and amino acids produced by *Lactobacillus casei* in milk on the acid production of bifidobacteria. Jpn. J. Zootech. Sci., 55, 339-349.

- [110] Odamaki, T., Xiao, J., Z., Yonezawa, S., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K. (2011)
Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by co-cultivation with
Lactococcus lactis ssp. *lactis*. J. Dairy Sci., 94, 1112-1121.

著作目録

1. Nagaoka, S., Urayama, H., Takahashi, M., Hojo, K., Kawai, Y. and Masuda, T. (2015) Improvement effect of the viability for probiotic *Bifidobacterium adolescentis* KH 96 in a yogurt that reduced hydrogen peroxide accumulation. Milk Sci., 64, 201-206.
2. Nagaoka, S., Murata, S., Kimura, K., Mori, T. and Hojo, K. (2010) Antimicrobial activity of sodium citrate against *Streptococcus pneumoniae* and several oral bacteria. Lett. Appl. Microbiol., 51, 546-551.
3. Nagaoka, S., Hojo, K., Mori, T., Kato, D., Ohshima, T. and Maeda, N. (2009) Potential antagonistic activity of *Bifidobacterium adolescentis* against *Porphyromonas gingivalis* in a hamster periodontitis model. J. Oral Biosci. 51, 224–229.

論文の内容の要旨

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。例えば、齲蝕や歯周病といった口腔疾患によって歯を喪失すると、咀嚼できる食品に制約が生まれるだけでなく、栄養の偏りによる低栄養状態を引き起こし、運動能力や脳機能の低下にもつながるリスクが生じる。さらに近年の研究では、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、脳血管疾患、糖尿病、肺炎などの発症や、早産の要因になることが報告されている。また、疾患ではないものの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、口腔だけではなく全身の健康や生活の質（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、また日本人は欧米に比べて口腔の健康に対する意識が低いことから、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、細菌や細菌が作り出す多糖体などで構成されるゲル状の被膜物質を歯面、歯肉、舌上に形成し、各細菌が共生・拮抗しながら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。したがって、日々の歯磨きに加えて定期的な歯科医によるメンテナンスや、洗口液、歯間ブラシ等の補助用品を活用した予防が重要である。しかし、これらはコストや労力を要することから多くの人において徹底されていない現状がある。

そこで本研究では、バイオフィーム形成を阻止するうえで重要な口腔細菌の増殖を抑制しうる素材を日常的に摂取しやすい食品に配合し、日々の生活スタイルを変えることなく継続的に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とその検証を行った。一つ目は、有機酸塩が有する口臭原因菌に対する抗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

有機酸はその抗菌性を利用して食品の品質維持の向上など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抗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、酢酸Naおよび乳酸Naは低pHのみに抗菌作用を有していたが、クエン酸Naは酸性pHから中性域で強い活性を示した。また、クエン酸Naの抗菌作用はCa²⁺、Mg²⁺などの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多数観察された。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Ca²⁺やMg²⁺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、口腔細菌23種113株に対するクエン酸Naの抗菌効果について検討を行った。その結果、肺炎球菌 (*S. pneumoniae*) だけではなく、歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia*)、口臭原因菌 (*Fusobacterium nucleatum*、*Prevotella melaninogenica*) など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、食中毒細菌や齲蝕原因菌 (*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が口腔菌叢の改善や口臭の低減に有用な素材となり得る可能性が示唆された。

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

プロバイオティクスは整腸作用や感染症予防効果等で近年注目を集めているが、歯周病などの口腔疾患の予防や治療を目的とした研究報告は少ない。これまで申請者らは *in vitro* 研究で、口腔健常者から高頻度で分離され、歯周病原菌である *P. gingivalis* と口腔内で生育環境や栄養素（ビタミン K およびその類似物質）を競合する *Bifidobacterium adolescentis* 菌株を有用な歯周病予防プロバイオティクスとして選抜してきた。本章では *in vivo* 研究として、口腔内における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、歯を絹糸で結紮して強制的に炎症を惹起させたハムスターに、5 週間にわたって $1\sim 2\times 10^9$ cfu/mL の *B. adolescentis* 菌株を含む培養液を投与した後（対照群には *B. adolescentis* を含まない培地成分を投与）、実験開始から 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 株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。本結果は歯周病に対するプロバイオティクスの効果を動物実験モデルにて確認した初めての報告であり、ヒト歯周病の予防に *Bifidobacterium* が応用可能であると考えられた。

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

前章にて *P. gingivalis* への抑制効果を確認した *B. adolescentis* 2 菌株 (OLB6410 および OLB6056) は、口腔定着後に歯周病原菌 *P. gingivalis* との栄養素競合によりその生育を抑制したことから、ヨーグルト等の食品への利用性が期待される。しかし、一般的にヨーグルト中の *Bifidobacterium* は冷蔵保存中にその生残性が大きく低下することが知られており、これまでの検討で上記 2 菌株にも同様な結果が得られている。特に OLB6410 株では顕著な低下傾向が認められたことから、本章ではヨーグルト中における *B. adolescentis* OLB6056 の生残性向上について各種検討を試みた。

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、その詳細な蓄積メカニズムは明らかでない。そこで、ヨーグルトスターター 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 μM) は、*S. thermophilus* の産生量 (平均 15.5 μM) 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。

次に、*L. bulgaricus* と *S. thermophilus* を様々な菌数比で乳酸緩衝液に懸濁した

後の H₂O₂ 蓄積量を測定したところ、H₂O₂ 蓄積量は *S. thermophilus* の菌数に影響は受けず、*L. bulgaricus* 菌数が 4.5×10^5 cfu/mL 以下になった場合に顕著に低減した。本結果より、ヨーグルト中の H₂O₂ 蓄積量を低減するためには、ヨーグルト中の *L. bulgaricus* の菌数を減少させることが有効であることが示唆された。

続いて、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 H₂O₂ 蓄積量が少ないことが明らかになった。さらに、製造直後は約 1×10^8 cfu/mL であった本ヨーグルト中の *B. adolescentis* OLB6056 菌数は、H₂O₂ 蓄積が多いヨーグルトでは 2 週間後には 2.1×10^2 cfu/mL まで低下していたが、H₂O₂ 蓄積が少ないヨーグルトでは 2.4×10^6 cfu/mL であり、生残性が顕著に改善された。以上、本研究で開発した手法により、簡便かつ低コストで歯周病予防プロバイオティクスヨーグルトが製造できると考えられた。

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、口臭や肺炎に関与する口腔細菌に対して、酸性だけでなく中性 pH 域においても高い抗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* OLB6056 および OLB6410 が、歯周病動物モデル動物において口腔内に定着し、栄養素の摂取競争により歯周病原菌 *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維持・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 H₂O₂ 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と共に、コスト面からも実用性に優れた素材・手法であると考えられる。今後は、本研究で開発した食品を用いた大規模なヒト投与試験を実施し、臨床項目の評価から、これらの両素材の有効性に関する実証を目指していきたい。