

東海大学大学院平成27年度博士論文

口腔プロバイオティクスによる歯周病原細菌
抑制効果の検討

松 岡 隆 史

・ この学位論文は、INTERNATIONAL JOURNAL OF PROBIOTICS & PREBIOTICS に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

・ INTERNATIONAL JOURNAL OF PROBIOTICS & PREBIOTICS に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

総括

歯周病は細菌が原因となる細菌感染症であるが、歯周病の原因となる細菌は口腔内の常在菌であるため、プロバイオティクスによる持続的な抑制が有効であると考えられる。我々は既に、口腔プロバイオティクスとして *Lactobacillus salivarius* TI2711 株 (LS1) を分離しており、この菌株が *in vitro* で *Porphyromonas gingivalis* を完全に殺菌すること、ヒト臨床試験で *P. gingivalis* を含む黒色色素産生嫌気性桿菌数を減少させることを明らかにしてきた。さらに *P. gingivalis* の歯周病原性の一つである線毛タンパク遺伝子 *fimA* は、配列の違いから 6 種類の遺伝子型に分類されるが、特に II 型と IV 型は歯周病患者より高頻度で分離される。そこで、本研究では、歯周病の病巣部位である歯肉縁下プラーク中での LS1 の効果について、ヒト臨床試験を行うとともに、LS1 の効果が *fimA* の遺伝子型により異なるのかについて検討を行った。

計 2 回の臨床試験を行い、第 1 回目の試験では総数 87 名の被験者に LS1 含有の錠菓 (1 日当たりの LS1 菌数 2.0×10^8 cfu) またはプラセボ錠菓を 1 日 3 錠 12 週間服用させ、歯肉縁下プラークを採取した。そして歯肉縁下プラーク中に含まれる *P. gingivalis* と *L. salivarius* の菌数をリアルタイム PCR で測定した。さらに歯肉縁下プラーク採取時に、臨床所見として PD(probing depth)、BOP(bleeding on probing)及び

PCR(plaque control record)を測定した。次に第 2 回目の試験では歯肉縁下プラークより *P. gingivalis* が検出された 83 名を対象に *fimA* 型を調べ、II 型又は IV 型 *fimA P. gingivalis* を保有する者を被験者としてこれらを行作爲に LS1 服用群とプラセボ服用群に割り付け、前述と同様のスケジュールで臨床試験を実施した。

第 1 回目の臨床試験の結果、LS1 服用群の歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数の平均値は 1.12×10^5 から 2.97×10^4 へと有意 ($p < 0.05$) に減少し、服用中止すると菌数は服用前の値へ戻った。一方、*L. salivarius* 菌数は LS1 を服用すると増加し、服用中止すると前値へ戻った。すなわち *P. gingivalis* と *L. salivarius* の菌数は逆相関の傾向があり、LS1 が実際に歯肉縁下プラークに移行し、プラーク内の *P. gingivalis* を減少させているものと考えられた。臨床症状は LS1 服用群、プラセボ服用群ともに改善した。

さらに、*P. gingivalis fimA* 型による層別化臨床試験を実施したところ、II 型 *fimA* の *P. gingivalis* を保有する被験者において、LS1 服用群では *P. gingivalis* 菌数が 0 週と比較して 12 週で有意な減少が認められた ($p < 0.05$) が、プラセボ服用群では、有意な増減は見られなかった。さらに 12 週では、LS1 群とプラセボ群との群間でも有意差が認められた ($p < 0.05$)。一方 IV 型を保有する被験者でも、LS1 服用群、プラセボ服用群ともに、0 週と比較して 4 週、12 週で有意な *P. gingivalis*

菌数の減少が認められた($p<0.05$)。

これに対して平均 PD 値は II 型 *fimA* 保菌者においては同様に、LS1 服用群で 0 週と比較して 12 週で有意な低下が認められたが($p<0.01$)、プラセボ群では有意な変化は見られなかった。一方、IV 型 *fimA* 保有者は、LS1 群、プラセボ群ともに、0 週と比較して 12 週で PD 値の有意な低下が認められた。これらの結果から、II 型と IV 型の相違により、LS1 に対する *P. gingivalis* の感受性が異なることが示唆された。

研究の背景

厚生労働省が実施した平成 23 年歯科疾患実態調査¹⁾では、80 歳で 20 本以上の歯を有する人は、38.3%と少ない。さらに歯周病は 35 歳以上では 80%以上に初期病変があり、特に 55 歳以上の 40%以上が 4mm 以上の進行した歯周ポケットを有している。いまや歯周病は国民的な生活習慣病となっている。

歯周病は歯周病原細菌が原因となる細菌感染症である²⁾。歯周病が進行すると、炎症の持続により結合組織の破壊や歯槽骨吸収などが起こり、歯周ポケットが形成される³⁾。歯周ポケット中には病原性の高いグラム陰性嫌気性細菌が生息し、歯周病をさらに進行させていく⁴⁾。そして最終的には歯牙が脱落する。さらに近年、歯周病は歯牙の脱落のみならず、糖尿病や呼吸器系疾患、心筋梗塞、動脈硬化等の全身性疾患の原因になることが報告されている⁵⁾。

口腔内には 700 種類以上の細菌が生息しているが、Socransky らは歯周病に関連すると考えられる細菌を 5 種類の群に分類し、その中で最も歯周病の発症や進行に関わりのある細菌である *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola* の 3 菌種を "Red complex" として分類した⁶⁾。この中でも特に歯周病原性の高い細菌は *P. gingivalis* である。*P. gingivalis* を血液平板培地で培養すると、黒い色素を産生し、強い悪臭を発する。*P. gingivalis*

の病原因子として、一つは菌体表層の莢膜があり、食細胞の食作用を妨げる働きがある⁷⁾。*P. gingivalis*の外膜成分であるリポ多糖（LPS）も内毒素として病原性を示す⁸⁾。さらに*P. gingivalis*が産生する酵素も侵襲性に関与している。この酵素としては、IgA や IgG を切断するタンパク質分解酵素や宿主のコラーゲン組織を破壊する強力な酵素、フィブロンectinやラミニンを分解する酵素等があり、これらは歯周病の発症や進行に深く関与していると考えられる⁹⁾。*P. gingivalis*の菌体表面には線毛があり、粘膜上皮細胞、唾液に覆われた歯面、さらに他のプラーク細菌にも付着する¹⁰⁾。そしてこの線毛は*P. gingivalis*の病原性発揮に深く関与することが示唆されている。*P. gingivalis*線毛の構成タンパクの一つに*fimA*がある。*fimA*は塩基配列の違いから6種類の遺伝子型（I, II, III, IV, V, Ib）が存在する¹¹⁾。特に、歯周病患者から分離した*P. gingivalis*はII型、IV型が多いが、健康なヒトから分離した*P. gingivalis*はI型が多く、歯周病の病原性と*P. gingivalis fimA*型との関連が示唆されている¹²⁾。

歯周病は歯周病原細菌により発症、進行することから、歯周病の予防や治療には歯周病原細菌を取り除くことが必要となってくる¹³⁾。現在、歯周病の治療は歯ブラシやスクレーラーを用いてのブラッシングやスクレーリング等による機械的プラークコントロールが最も有効な手段となっている¹⁴⁾。これを補完する手段として

抗菌剤を用いた化学的プラークコントロールがある。しかし、化学的プラークコントロールは、プラーク中の細菌が菌体外マトリックスにより保護されており¹⁵⁾、抗菌剤に対して抵抗性を示すことから¹⁶⁾、急性期以外の歯周病治療においては有効な方法ではない。さらに、歯周病治療における局所投与を含む抗菌剤の使用は、一時的であるが口腔内の耐性菌の増加につながる事が知られている¹⁷⁾。

歯周病原菌は、歯周病を発症していない成人からも多数検出されることから、口腔内常在菌ともいえる¹⁸⁾。したがって、抗菌剤を用いてこれらをいったん完全に除菌しても再定住してしまう可能性が高い。このような体腔内に常在して宿主の健康を障害する細菌、いわゆる”悪玉菌”は腸内にも定住していることは以前からよく知られている。しかし、これら腸内の悪玉菌を抗菌剤で排除することは先に述べたのと同じ理由で医学的には無意味とされている。一方、腸内の悪玉菌を有益な菌で抑えるプロバイオティクスの考え方は一般に広く認められている。そこで我々は、この考え方を口腔内にも応用し、口腔内常在病原菌である歯周病原細菌を有益な菌で持続的に抑制するという口腔内プロバイオティクスの開発を試みた。

プロバイオティクスとは消化管に存在する細菌群に働きかけて、生体に対して有益な効果をもたらす生きた細菌のことである¹⁹⁾。プロバイオティクスはこれま

でヨーグルトなどの食品形態で、主に腸の健康維持を目的として使用されてきた。

一方、我々は口腔内プロバイオティクスとして、健康なヒトの口腔内より歯周病原細菌抑制効果があり耐酸性の低い菌、*Lactobacillus salivarius* TI2711 株 (LS1 と略す) を単離した。我々はこれまで、LS1 には *in vitro* および臨床試験で歯周病原菌を死滅あるいは抑制させる効果があることを報告してきた。すなわち、*in vitro* で LS1 と *P. gingivalis* を混合培養したとき、LS1 菌数が *P. gingivalis* の 100 万分の 1 であっても *P. gingivalis* を殺菌することが可能であった²⁰⁾²¹⁾。また、臨床試験でヒトに LS1 を 4 週間服用させたときの唾液中の黒色色素産生嫌気性桿菌 (black-pigmented anaerobic rods; BPAR) 菌数は、服用後で 1/20 に減少していた²⁰⁾。さらに、これらの細菌を殺菌する LS1 の有効物質はプロトンを解離していない非解離乳酸であることを明らかにした²¹⁾。

本研究ではプロバイオティクスとしての LS1 が、歯周病の病巣であり、薬剤の到達が困難な歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌、特に歯周病原性が高い *P. gingivalis* を抑制することが可能であるかについて検討した。さらに LS1 による効果が *P. gingivalis* の病原因子の一つと考えられる *fimA* の遺伝子型により違いが生じるのかの検討を行った。

考察と展望

これまでの LS1 を用いた研究では、*in vitro* 試験で LS1 が *P. gingivalis* を高い効率で殺菌すること²⁰⁾²¹⁾、ヒト臨床試験で唾液中の *P. gingivalis* を含む黒色色素産生嫌気性桿菌が減少することが認められた²⁰⁾。唾液は口腔粘膜、舌、歯肉、歯周ポケットの細菌叢を反映しており、この結果は、LS1 が歯周ポケット内の *P. gingivalis* の菌数を抑制する可能性を示唆した。そこで本研究では、歯周ポケットに存在する歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数に及ぼす LS1 錠剤服用の効果について検討を行った。同時に、歯肉縁下プラーク中の *L. salivarius* についても定量 PCR を用いて菌数を測定し、歯肉縁下プラーク中の LS1 菌数と *P. gingivalis* 菌数の変化の関係についても検討した。

その結果、LS1 服用群の *P. gingivalis* 菌数は服用 4 週間で、服用開始前と比較して統計学的に有意に減少した。さらに 12 週服用後でも、菌数は低いまま維持されていた。4 週間の服用後と 12 週間の服用後で菌数はほとんど変化のないことから、長期にわたって LS1 を服用し続けても効果が増強することはない。しかし、LS1 服用期間中は歯肉縁下プラーク内の *P. gingivalis* 菌数が減少した状態が維持されることから、LS1 の継続的な服用は歯周病の発症や進行のリスク低減に働くと考えられる。さらに、LS1 服用 12 週間の後に服用を中止し、その 4 週後に再度検査を行ったところ、*P.*

gingivalis 菌数が服用開始前と同程度にまで上昇していた。すなわち、LS1 の *P. gingivalis* 抑制効果は実際に服用している間において有効であり、服用を中止すると少なくとも 4 週後にはその効果は消失すると考えられる。つまり、LS1 による歯周病リスク低減効果は LS1 を服用し続けている間のみ発揮されるということが示された。

次に、歯肉縁下プラーク中の *L. salivarius* を PCR で測定したところ、初診時の被験者の 10%において、*L. salivarius* が検出された。*L. salivarius* は口腔内常在菌であることから、LS1 服用前の歯肉縁下プラークからの検出はあり得ることである。LS1 の服用を開始すると、4 週後の時点で 90%の被験者から *L. salivarius* は検出された。検出されなかった残りの 10%に関しても、12 週目には全員で検出された。しかし服用中止 4 週後の検出率は全員の 20%まで減少した。LS1 は酸に弱く、自身の産生する乳酸で死滅してしまう性質があるため、服用期間中は歯肉縁下プラークに存在した LS1 も、服用中止により定着できずに、比較的短時間で死滅し、菌数が減少したと考えられる。服用中止により菌数が減少、消失することは口腔内における LS1 のコントロールが容易であることを意味し、LS1 がより安全なプロバイオティクスとして使用できることを示すものである。

以上の結果より、歯肉縁下プラーク中の *P.*

gingivalis 菌数は LS1 服用 4 週後に減少するが、*L. salivarius* 菌数は増加する、服用中止 4 週後には *P. gingivalis* 菌数は増加し、*L. salivarius* 菌数は減少するという逆相関の傾向が認められた。つまり歯肉縁下プラーク中に LS1 が移行することで、*P. gingivalis* 菌を抑制し菌数を減少させるという機序が示唆される。*P. gingivalis* は莢膜、タンパク質分解酵素、リポ多糖、付着能など、強い病原性を有していることから²⁷⁾²⁸⁾、もっとも重要な歯周病原菌であると考えられている²⁹⁾。LS1 の服用により歯周病の病巣である歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* が有意に減少したことは、LS1 が歯周病のリスクを低減させることを示唆するものである。

現在、口腔疾患に対するプロバイオティクスとして、数種の菌株が分離されている。これらの中の一つである *L. salivarius* WB21 株を用いた臨床試験では、臨床所見の有意な改善（特に喫煙者）³⁰⁾や、口臭の改善³¹⁾、歯肉縁下プラーク中の *T. forsythia* 菌数の有意な減少³²⁾が認められた。本研究の LS1 により有意な減少が認められた *P. gingivalis* に関しては、*L. salivarius* WB21 株でも減少傾向が見られたが、統計学的有意差は得られていない³²⁾。また、*L. reuteri* を口腔プロバイオティクスとして用いた臨床試験においては、臨床所見の改善³³⁾や唾液中の *Prevotella intermedia* 菌数、歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数の有意な減少

が認められた³⁴⁾。さらに、事前に SRP(scaling and root planning)を行うことで、より大きな臨床症状の改善や *P. gingivalis* 菌数の抑制が認められたことから³⁵⁾、事前の SRP は口腔プロバイオティクスとの併用が有効であることが示唆された。同様に LS1 においても事前の SRP は有効であると考えられることから、今後の検討課題としたい。

本試験において、各臨床パラメータは、LS1 服用群及びプラセボ服用群はいずれにおいても改善したが、両群間の改善の程度は同レベルであった。この理由を説明する可能性の一つとして、LS1 に対する感受性が異なる *P. gingivalis* が混在していることが示唆された。そして *P. gingivalis* の LS1 に対する感受性決定因子の 1 つとして、線毛タンパクである *fimA* に注目して検討を行った。*P. gingivalis* の *fimA* は 6 種類の型があるが、とりわけ II 型と IV 型は歯周病患者より高頻度で分離される¹²⁾。そこで、*fimA* II 型、IV 型の *P. gingivalis* を保有する被験者を対象に、LS1 錠菓またはプラセボ錠菓が *P. gingivalis* へ与える効果の違いを検討するため、再度臨床試験を実施した。その結果 12 週の服用期間で、II 型 *fimA* を保有する被験者の *P. gingivalis* 菌数は、LS1 服用群では有意に減少していたが、プラセボ服用群では有意な増減は見られなかった。一方、IV 型 *fimA* を保有する被験者の菌数は、LS1 群、プラセボ群ともに有意に減少していた。平均 PD

値についても同様であった。

本臨床試験に使用した錠菓には糖アルコール（ソルビトール、マルチトール、エリスリトール）を含有している。これらの糖アルコール、特にエリスリトールは、口腔内のバイオフィルムの結合を弱める働きを持っている³⁶⁾。糖アルコールのみの作用によって、結合が弱まったバイオフィルム中に存在する *P. gingivalis* はバイオフィルムから脱落してしまう可能性がある。

II 型 *fimA* を持つ *P. gingivalis* は、歯肉上皮細胞に強固に付着することが知られており³⁷⁾、糖アルコールによってバイオフィルムの結合が弱くなったとしても、歯周ポケット中に残存すると考えられる。II 型 *fimA* *P. gingivalis* 保有者にプラセボ錠菓を服用させても、*P. gingivalis* 菌数の有意な増減が見られなかったのはこのためであると考えられる。そして、LS1 の働きが加わることで、歯周ポケット中の II 型 *fimA* *P. gingivalis* は殺菌されることから、II 型 *fimA* *P. gingivalis* を保有している被験者は LS1 服用群において *P. gingivalis* 菌数が減少したものと考えられる。

一方、IV 型 *fimA* を持つ *P. gingivalis* は歯肉上皮細胞への結合が、他の型と比較して相対的に弱いことが知られており³⁷⁾、糖アルコールの作用によりバイオフィルムの結合が弱くなっただけでも、*P. gingivalis* がバイオフィルムから脱落し、菌数が減少した可能性がある。プラセボ錠菓であっても、IV 型 *fimA* *P.*

gingivalis 菌数が有意に減少したのは、歯肉上皮細胞への結合力が弱いためであると考えられる。以上より、*fimA* 型により LS1 と糖アルコールの合剤である LS1 錠菓による *P. gingivalis* 菌数減少の作用機序が異なる可能性と、LS1 と糖アルコールによる相互作用により効果的に *P. gingivalis* 菌数を減少させている可能性が示唆された。このように、LS1 含有錠菓は LS1 に加え糖アルコールを含んでいることから、口腔内のバイオフィームである歯肉縁下プラークに作用させるにはより効果的であると言える。

歯肉縁下プラークは複数の細菌が形成するバイオフィームであるため、抗菌剤等はバイオフィーム中へ浸透することができず、十分な殺菌効果を発揮することができない。しかし、本研究では糖アルコールとの相互作用で、LS1 はバイオフィーム中に定住する *P. gingivalis* 菌数を有意に減少させることが確認された。薬剤等により歯周病原細菌の殺菌が困難であり病原性の高い歯肉縁下プラークに対し、LS1 を用いることにより、病原性が低い状態へのフローラコントロールが可能である。つまり LS1 は歯周病リスク低減効果を有する可能性が本研究によっても示された。今後、機械的（物理的）プラークコントロール、化学的プラークコントロールに加え、LS1 というプロバイオティクスを用いた生物的プラークコントロールが、新しい歯周病予防法として発展するものと期待される。

結 論

ヒト臨床試験において口腔プロバイオティクスである乳酸菌 LS1 含有錠菓は、プラセボ錠菓と比較して歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数を有意に減少させた。また、*P. gingivalis* の LS1 錠菓に対する感受性は、*fimA* 型の相違により異なることが示唆された。*P. gingivalis* は歯周病原性が高く、全身疾患との関連も指摘されていることから、乳酸菌 LS1 は歯周病予防や全身疾患の予防に有効であることが示唆された。