

論文の内容の要旨

論文題目 健常者および歯周病患者の口腔から検出される *Bifidobacterium* の生態学的研究

氏名 北條研一

ヒト口腔には多種多様な細菌が生息し、それぞれ共生あるいは拮抗・競合しながら口腔特有の常在菌叢を形成している。歯周病は歯周局所の複数の嫌気性細菌群から構成されるバイオフィルムが主な原因となって発症する感染症である。デンタルプラーク(歯垢)や舌苔は典型的なバイオフィルムであり、デンタルプラーク 1 g 当たりには約 10^{11} 個もの細菌が生息する。口腔細菌が口腔の健康、または歯周病の発症や病態に深く関係することから、口腔内常在菌叢を形成する菌種と機能を正確に把握することが重要である。

近年、歯周病の予防に *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* などのプロバイオティクスの利用が試みられている。プロバイオティクスは現在「適切な量を摂取することで宿主に有益に作用する生きて微生物」と定義されている。試験管内で *L. salivarius* が歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* の増殖を抑制し、さらに生菌をヒトに投与することで唾液中の歯周病菌の菌数が減少したことが報告されている。また、健常者および歯周病患者において唾液中の *Lactobacillus* の菌種構成を解析した研究では、両者から *L. fermentum*、*L. gasseri*、*L. salivarius* などが分離されるが、健常者からは歯周病患者に比べて *L. gasseri* の検出率が有意に高かったことが報告されている。一方、*Bifidobacterium* に関しては *Bifidobacterium* sp. を歯周病患者に投与することで口腔内常在菌叢が正常化したことが報告されている。ヒト口腔から検出される *Bifidobacterium* およびその近縁細菌として、*B. adolescentis*、*B. dentium*、*Alloscardovia omnicolens*、*Parascardovia denticolens*、*Scardovia inopinata* などが報告されてい

る。しかし、これまで健常者および歯周病患者の口腔における *Bifidobacterium* の菌種構成を比較した研究はなく、これらの菌種構成を明確にすることは *Bifidobacterium* の口腔内での機能を明らかにするために重要である。また、*Bifidobacterium* が *P. gingivalis* の増殖に及ぼす影響は明らかではない。*Bifidobacterium* は *Lactobacillus* とは異なり偏性嫌気性菌であることから、嫌気環境下において同じく偏性嫌気性菌である *P. gingivalis* の増殖や口腔内への定着に影響を及ぼすことが考えられる。本研究では健常者および歯周病患者の口腔内における *Bifidobacterium* の生態、機能研究を目的に、ヒト口腔内の *Bifidobacterium* の菌種構成の解析、口腔細菌が産生する *Bifidobacterium* の増殖促進因子、並びに口腔定着機構について検討した。

第一章では、16名の健常者(Healthy subjects, HS 群; 平均年齢 ± 標準偏差, 21.0 ± 2.0 才)、16名の歯周病患者(Periodontitis patients 群, PP 群; 51.6 ± 13.8 才)および歯周病の治療を終了した 14名の被験者(Well-maintained patients 群, WP 群; 60.2 ± 9.6 才)の唾液から、*Lactobacillus* 673株および *Bifidobacterium* 323株を分離し菌種同定を行った。*Lactobacillus* は何れの群においても *L. fermentum*、*L. gasseri* および *L. salivarius* の検出率が高値であることが明らかとなった。しかし、HS 群に特異的な菌種はみられなかった。一方、*Bifidobacterium* は PP 群および WP 群から *B. dentium* が分離されたが、HS 群からは *B. adolescentis*、*B. dentium*、*B. longum* および近縁細菌である *A. omnicolens* が分離された。特に、今回 HS 群の *B. adolescentis* の検出率が有意に高値であり、*Bifidobacterium* の菌種構成が口腔内環境または宿主の年齢に関係している可能性が示唆された。分離株の代謝物が *P. gingivalis* の増殖に及ぼす影響を検討したところ、*P. gingivalis* に抗菌活性を示すバクテリオシンは見出せなかったが、*Lactobacillus* または *Bifidobacterium* の産生する乳酸および酢酸が *P. gingivalis* の増殖を強く抑制することが明らかとなった。

第二章では、*Bifidobacterium* と *P. gingivslis* の共通の増殖促進物質であるビタミン K (VK) に対する拮抗・競合という観点から、*Bifidobacterium* の VK 要求性を検討した。*P. gingivalis* の増殖は *Veillonella* が産生する VK により促進されると考えられている。一方、*Bifidobacterium* においても VK が増殖促進物質として働くことが報告されている。そこで、*Bifidobacterium* 分離株の増殖が VK または *V. parvula* の培養上清により促進されるか否かを検討した。本検討では 20名の健常者の唾液から得られた *Bifidobacterium* 291株を RAPD-PCR 法にて識別し、最終的に *B. adolescentis* 22 菌株、*B. dentium* 30 菌株、*B. longum* 9 菌株、*A. omnicolens* 4 菌株を供試した。その結果、*B. adolescentis*、*B. dentium* および *B. longum* のほとんどの菌株の増殖が VK および *V. parvula* 培養上清により促進され、さらに要求性は菌株間に差があることが明らかとなった。ヒト口腔由来の *P. gingivslis* OB7124 も VK および *V. parvula* 培養上清により増殖促進されたが、*A. omnicolens* 菌株の増殖は VK および *V. parvula* 培養上清により影響を受けないか、逆に抑制されることが明らかとなった。次に *V. parvula* 培養上清中の VK (メナキノン)の定量を行なったが、予想に反して VK は検出され

なかった。本結果から、*V. parvula* が VK とは異なる活性物質を産生、分泌して *Bifidobacterium* および *P. gingivalis* の増殖を促進していることが示唆された。

VK の消費能力が最も高かった *B. adolescentis* OLB6398 が *P. gingivalis* OB7124 の増殖に及ぼす影響について連続培養装置を用いて検討した。その結果、装置内の pH を中性に制御した系でも *P. gingivalis* の増殖が抑制され、これら細菌が拮抗・競合関係にあることが示唆された。

第三章では、*Bifidobacterium* の口腔定着機構について検討した。口腔細菌は何らかの付着因子を有しているものが多い。ある種の口腔細菌は歯面に存在するペリクルに付着する。ペリクルに付着できない菌も他の口腔細菌と共凝集することでバイオフィルムを構築する。そこで、試験管内凝集反応試験法を用いて *Bifidobacterium* と口腔細菌との共凝集を検討したところ、*B. adolescentis* 22 菌株中 14 菌株、*B. dentium* 30 菌株中 25 菌株、*B. longum* 9 菌株中 6 菌株、*A. omnicolens* のすべての菌株 (4 菌株) が *Fusobacterium nucleatum* JCM 8532 と共凝集した。この共凝集は、*Bifidobacterium* または *F. nucleatum* の菌体を Proteinase K 処理した場合に抑制され、共凝集にそれぞれの菌体表層蛋白質が関係していることが明らかとなった。また、ラクトース、ガラクトースおよびグルコースなどの糖類は共凝集を抑制しなかったことから、共凝集機構がレクチン - 糖鎖の反応とは異なると考えられた。*Bifidobacterium* が唾液処理したハイドロキシアパタイト板上には付着できず、*F. nucleatum* が形成したバイオフィルムに付着したことから、共凝集が *Bifidobacterium* の重要な付着要因であることが明らかとなった。

本研究で示した結果は、ヒト口腔内における *Bifidobacterium* の生態学的な意義や役割を理解するための一助になると考えられる。今後の研究課題として、*V. parvula* が産生する増殖促進物質の同定が挙げられる。また、実際のヒト口腔内において *Bifidobacterium* が *P. gingivalis* の増殖を抑制するか否かを明らかにするためにヒトおよびモデル動物による検証が必要である。今後、本研究を応用・発展させることで歯科領域を対象にしたプロバイオティクス研究にとって新たな方向性、可能性がひらけることが期待される。