

原 著

Lactobacillus salivarius TI 2711 による *Porphyromonas gingivalis*
殺菌の作用機序の解明

松岡隆史*^{1,2} 中西 睦*¹ 相場勇志*² 古賀泰裕*²

*¹株式会社 フレンテ・インターナショナル

*²東海大学医学部感染症研究室

(2004年4月17日受理)

Mechanism of *Porphyromonas gingivalis* Killing by *Lactobacillus salivarius* TI 2711

Takashi Matsuoka*^{1,2}, Mutsumi Nakanishi*¹, Yuji Aiba*² and Yasuhiro Koga*²

*¹Frente International Co., Ltd.

*²Laboratory for Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine

Accepted for publication 17 April 2004

We identified the bactericidal substance, generated by *Lactobacillus salivarius* TI 2711 (LS 1), that kills *Porphyromonas gingivalis* (Pg). In an LS 1/Pg coculture system, LS 1 completely killed Pg even when added to Pg at a bacterial ratio of 1 to 1 million. Measurement of the culture supernatant of these cocultures showed an accumulation of lactic acid with 40 to 50 mmol/l at pH 6.0 or less. Incubating Pg in a culture medium containing this amount of lactic acid at a pH of 6.0 also killed a significant number of this bacterium. This suggests that the killing effect in the coculture system was exerted by either the amount of lactic acid or the pH. In the treatment of Pg with sodium hydrochloride or sodium lactate instead of lactic acid, we found that nondissociated lactic acid but not lactate anions or lower pH, is directly involved in killing Pg by LS 1 in the coculture system. J Jpn Soc Periodontol, 46 : 118~126, 2004.

Key words : *Lactobacillus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, lactate, periodontal disease, probiotics

要旨 : 歯周病は歯周病菌により引き起こされるが、本研究は口腔内フローラをコントロールするプロバイオティクスによって歯周病の予防を行うことを目的としている。本論文は歯周病菌殺菌効果のある *Lactobacillus salivarius* TI 2711 (LS 1) の歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) に対する殺菌に関わる物質について明らかにすることを検討したものである。

実験は Pg/LS 1 混合培養系で生菌数と pH, 乳酸量を測定した。また Pg 単独培養系に乳酸や pH を変化させて生菌数の測定を行った。

その結果, Pg/LS 1 混合培養系において, LS 1 菌数を Pg 菌数の 100 万分の 1 加えた場合でも Pg を完全に殺菌した。培養上清中の乳酸蓄積量と pH 値の測定から, 40~50 mmol/l の乳酸量, もしくは pH 値の 6.0 以下へ

連絡先: 古賀泰裕

〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台 東海大学医学部感染症研究室

Yasuhiro Koga

Laboratory for Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine

Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

E-mail yasuhiko@is.icc.u-tokai.ac.jp

の低下が Pg の殺菌を引き起こしていると予想された。Pg 単独培養系でも同様の結果となった。

次に乳酸と pH のどちらが Pg 生菌数の減少に直接関与しているかを調べる為に、乳酸と塩酸を添加して生菌数を調べた。その結果、乳酸を添加したときの方が生菌数の減少ははるかに大きかった。次に乳酸と乳酸ナトリウムを用いて解離型と非解離型乳酸のどちらが生菌数減少に関わっているかを調べたところ、乳酸のほうにはるかに大きい効果が認められ、LS 1 の Pg 殺菌作用は非解離型乳酸によるものであることが示された。

索引用語: *Lactobacillus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, 乳酸, 歯周病, プロバイオティクス

緒 言

ヒトの口腔内には 400 種に及ぶ菌種、数にして 100 億を超える細菌が生息している。これらの細菌は舌背、歯の表面、歯肉溝、唾液など特有の生息場所でフローラを形成し、デンタルプラークを形成している。そしてプラークは不十分な口腔清掃により付着増大していき、歯周病の原因となる¹⁾。

プラークは歯肉縁上と歯肉縁下に分けられている。歯肉縁上プラーク中からは *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* 等のグラム陽性球菌や *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces maeslundii*, *Actinomyces israelii* 等のグラム陰性桿菌が検出される。一方、歯肉縁下プラークからはほとんどグラム陰性桿菌が検出されており、*Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* などの細菌が検出されている。この中でも特に早期発症型歯周炎の活動部位では *P. intermedia*, *A. actinomycesetemcomitans*, *F. nucleatum*, Pg が検出され²⁾, 成人性歯周炎の活動部位では Pg, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *A. actinomycesetemcomitans* が検出されている³⁾。この中でも Pg は成人性歯周炎の炎症が起こっている部位から最も高い頻度で分離されており、成人性歯周炎において最も重要な細菌であると考えられている。中垣⁴⁾によると、歯周ポケット内の歯周炎急性発症部位では Pg はコラゲナーゼ産生菌の 53.7%, DNase 産生菌の 60.0%, トリプシン産生菌の 91.3% を占め、いずれの酵素でも Pg がもっとも優勢であった。

Pg は黒色色素産生嫌気性桿菌の中で糖分解能のない細菌で、血液平板上で黒色で悪臭のあるコロニーを形成する⁵⁾。Pg の菌体表層には莢膜があり、貧食細胞の食菌作用に抵抗性を示す⁶⁾。さらにタンパク質分解酵素により IgA や IgG などの免疫グロブリンを分解する⁷⁾。一方、菌体の表層にあるリポ多糖により骨吸収を促進させたり⁸⁾, Pg の線毛により粘膜上皮細胞や赤血球に付着定着する能力を有している^{9,10)}。こ

のように Pg は口腔内細菌の中でも強い病原性を有しており、さらに成人性歯周炎から高頻度で分離されることから、もっとも重要な歯周病菌であると考えられている^{11,12)}。

一方 *Lactobacillus salivarius* TI 2711 (LS 1) はグラム陽性乳酸桿菌であり健康なヒトの唾液中より分離した細菌である。以前の報告¹²⁾で我々はこの LS 1 が試験管内実験においても臨床試験でも歯周病菌を死滅あるいは抑制させる効果があることを示した。すなわち LS 1 の歯周病菌への殺菌効果を調べるために、歯周病菌である Pg, *P. intermedia*, *P. nigrescens* に LS 1 を添加して培養した。その結果、LS 1 無添加のコントロールはどの歯周病菌でも生菌数が増加したのに対して、LS 1 を添加したときは 24 時間で 3 菌とも死滅した。次に各種の乳酸桿菌の乳酸に対する耐性を調べたところ、腸管内プロバイオティクスとして一般に用いられている *Lactobacillus acidophilus* は 100 mmol/l の乳酸に対しても強い耐性を示したのに対し、LS 1 は 50 mmol/l の乳酸で急激に死滅した。このことは LS 1 は、ある程度乳酸を作ると自ら死滅するため、過剰な乳酸を作り続けることはないことを示唆する。この結果は LS 1 服用が多量の乳酸菌により口腔内を酸性化し、齲蝕の原因となることは少ないことを予想させる。次に 57 名の被験者に対し臨床試験を行った¹³⁾。LS 1 を 2×10^7 含んだ錠菓を毎日 8 週間服用したところ、唾液中の黒色色素産生嫌気性桿菌の菌数は 4 週間目には 1/20 に減少した。さらに唾液の pH は服用前が 5.4~8.5 だったのに対し、服用後には中性の 7.3 付近に集束した。以上から、LS 1 は試験管内でも臨床試験においても歯周病菌を殺菌あるいは抑制することで歯周病予防に役立つ可能性を示した。一方、LS 1 が *in vitro* で乳酸に比較的弱いこと、および口腔内投与では唾液 pH を中性化すること等の結果より、齲蝕を助長する可能性は低いことが予想された。しかし、これら LS 1 による歯周病菌の殺菌または抑制の作用機序はこれまでの検討では未だ不明である。

乳酸菌が産生する物質で抗菌性を有する物質としては、乳酸や酢酸などの有機酸、過酸化水素、バクテリオシンのような抗菌物質などがあげられる。有機酸は

pH の低下を引き起こし、細菌の生育を阻害する。また、乳酸菌は過酸化水素を酸素存在下でフラビン酵素により生成し、ラジカルによって細胞質脂質の酸化を促進、細胞膜での物質の透過を促進させて細胞内の酸化反応の増加を引き起こす¹⁴⁾。バクテリオシンは近縁の細菌に対してのみ抗菌作用を示すタンパク質性物質である¹⁵⁾。通常の乳酸菌のバクテリオシンはグラム陰性菌には作用せず、キレート剤のような外膜の構造に影響を与える物質で処理した場合にのみ作用する¹⁶⁾。乳酸菌ではこれらの抗菌物質の中でも特に最終発酵代謝産物である乳酸が主要な抗菌物質として作用しているものと考えられる^{17,18)}。

本論文では、LS1 の歯周病菌に対する殺菌作用の機序解明を目的とし、特に LS1 の産生する唯一の有機酸である乳酸の役割に焦点を当てて検討を行った。歯周病菌の中でも特に Pg は成人性歯周炎から高い頻度で分離される上に強い病原性を持っていることから、本研究では Pg を用いて LS1 による歯周病菌に対する殺菌効果の作用機序を解析した。

材料および方法

1. 供試菌株および培養

菌株としてヒト口腔内より分離した *L. salivarius* TI 2711¹³⁾ (LS1)、および独立行政法人 理化学研究所 微生物系統保存施設より入手した *P. gingivalis* JCM 8525 (Pg) を使用した。なお、LS1 の同定は前報¹³⁾において API 50 CHLKit (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) を用いて行った。

培地は GAM Broth (日水製薬, 東京) にグルコースを 0.7% 添加したものを使用した。Pg は 30 時間、LS1 は 18 時間 37°C で AnaeroPack・ケンキ (三菱ガス化学, 東京) を利用した嫌気条件下で予備培養を行った。次にこの LS1 予備培養菌浮遊液を GAM Broth (日水製薬) で連続して 100 倍ずつ 4 段階希釈した LS1 菌浮遊液を作り、それらをそれぞれを新鮮な Pg 培養液に加えて、AnaeroPack・ケンキ (三菱ガス化学) を利用して嫌気条件下 37°C で Pg/LS1 の混合培養を行った。その後、経時的にこの混合培養菌浮遊液を採取し、GAM Broth (日水製薬) で 10 倍ずつ段階的に希釈した後、選択培地に塗抹し Anaero Pack・ケンキ (三菱ガス化学) で嫌気条件下 37°C で形成されたコロニー数を計数してコロニー形成単位 (CFU) を求めた。LS1 生菌数を測定するための選択培地は LBS 寒天培地 (Becton Dickinson, Sparks, MD) を、Pg 生菌数を測定するための選択培地は 5% 馬脱繊維血と 10 mg/l ゲンタマイシンを

添加した EG 寒天培地 (日水製薬) を使用した。

培養液の pH 値は pH メーター KS 701 (新電元工業, 東京) を用いて測定した。

2. 乳酸量の測定¹⁹⁾

混合培養液中の乳酸蓄積量は、F キット L-乳酸/D-乳酸 (Roch Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて測定した。これは、乳酸脱水素酵素の働きにより乳酸からピルビン酸が生成される際に NAD が還元されて NADH が生成され、その生成された NADH の生成量を吸光度 340 nm の増加量で測定するキットである。混合培養菌浮遊液の培養上清 100 μ l を反応液 2 ml (3.5 mg/ml NAD, 15 U/ml グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ, 7.5 mg/ml L-グルタミン酸, グリシルグリシンバッファー, pH 10.0) 中に添加し 5 分後に 340 nm の吸光度, E_1 を測定した。次にこの反応液にさらに 100 U D-乳酸脱水素酵素を添加して 20 分間反応させ、340 nm の吸光度 E_2 を測定した。同様にこの反応液に 100 U L-乳酸脱水素酵素を添加して 20 分間反応させ、340 nm の吸光度 E_3 を測定した。ブランクは試料である培養上清を加えずに同様に測定した。試料とブランクの吸光度の差を D-乳酸は $(E_2 - E_1)$ 、L-乳酸は $(E_3 - E_2)$ から $\Delta E_{D-乳酸}$ $\Delta E_{L-乳酸}$ を求め、NADH の分子吸光計数 $6.3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (340 nm) を用いて乳酸量を求めた。

結 果

1. LS1 株 による Pg の殺菌作用

ヒト口腔より採取した唾液を検体として用いた前回の臨床試験では、LS1 の服用により Pg を含む黒色素産生嫌気性桿菌の菌数を減少させる効果が認められた¹³⁾。そこで試験管内での LS1 と Pg の混合培養系を用いて、LS1 菌数の Pg 殺菌に及ぼす効果について検討した (図 1)。LS1 を加えなかった場合 (control)、Pg 生菌数は 24 時間には約 10 倍に増加した。次に Pg の生菌数を 10^8 CFU/ml に固定し、混合培養として加える LS1 菌数を変えて、混合培養を行ったときの Pg 生菌数の変化を調べた。LS1 を 1.0×10^8 接種したときは 9 時間で Pg の生菌数は検出限界以下となった。次に加える LS1 の生菌数を段階的に減らしたところ、 1.0×10^2 接種時でも 18 時間後に Pg の生菌数が検出限界以下となった。さらに、臨床分離株 2 菌株でも混合培養試験を行ったが、LS1 に対する感受性は同様であった (データ未発表)。

次に、この Pg/LS1 混合培養系の LS1 の生菌数についても測定した (図 2)。接種した LS1 生菌数にかかわらず、いずれも 12 時間後には生菌数はほぼ 10^9

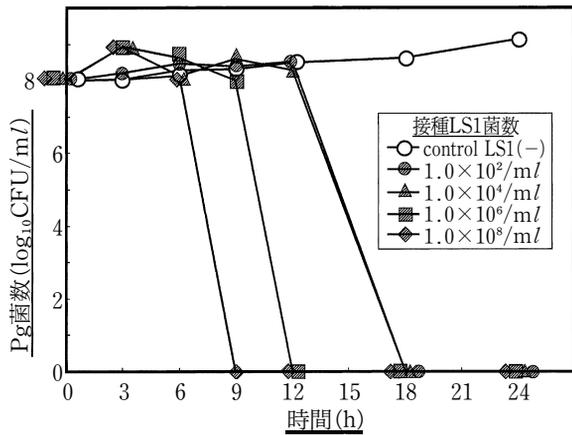


図 1 Pg と LS 1 混合培養時の Pg 生菌数の変化
Pg と LS 1 の混合培養時における Pg の生菌数の変化を測定した。Pg を 10⁸/ml に固定した培養液に LS 1 を最終菌濃度として 1.0×10²/ml から 1.0×10⁸/ml 添加し、37°C で培養した。経時的に Pg の生菌数を測定した。測定は 3 回繰り返す、典型的な結果を図にした。

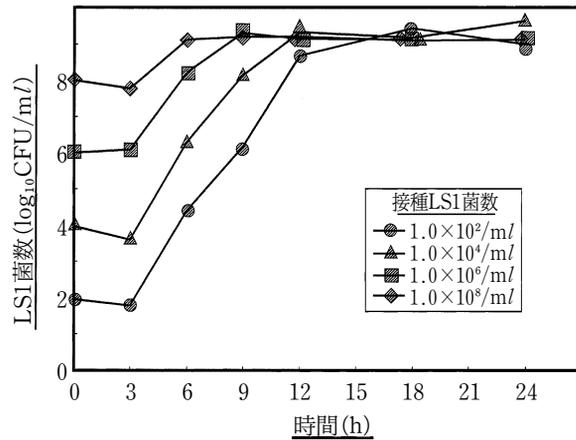


図 2 混合培養時における LS 1 菌数の変化
図 1 と同じ条件で、Pg/LS 1 混合培養時における LS 1 の生菌数の変化を測定した。測定は 3 回繰り返す、典型的な結果を図にした。

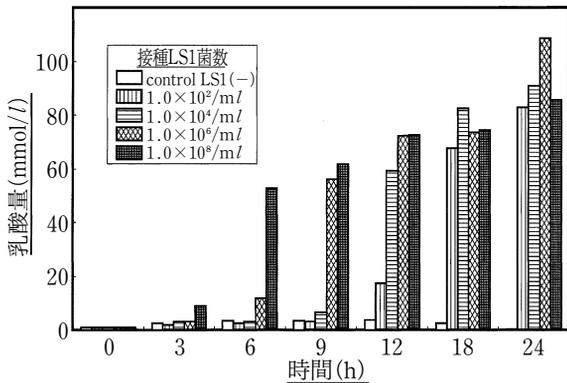


図 3 混合培養菌液中の乳酸蓄積量の変化
図 1 と同じ条件で Pg/LS 1 混合培養を行い、培養上清中の乳酸蓄積量を経時的に測定した。測定は「材料および方法」に記載した。測定は 3 回繰り返す、典型的な結果を図にした。

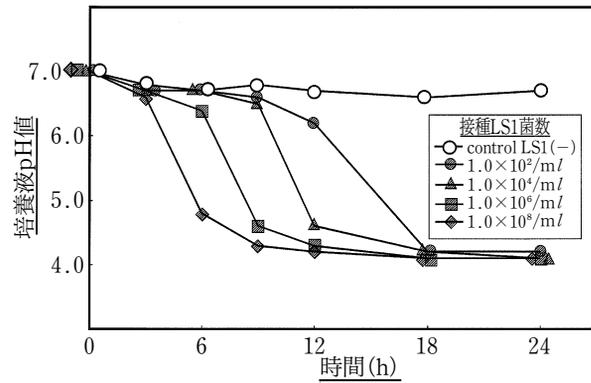


図 4 混合培養菌液中の pH 値変化
図 1 と同じ条件で Pg/LS 1 混合培養を行い、培養上清中の pH 値を経時的に測定した。測定は 3 回繰り返す、典型的な結果を図にした。

CFU/ml まで上昇し、以後 24 時間目までの測定においてこの値を維持した。また、図 1 と比較対照すると LS 1 が増殖しプラトーに到達すると Pg 生菌数の減少が起きることが読みとれる。

2. LS 1 による Pg の殺菌機序

LS 1 との混合培養時に起こる Pg の生菌数の減少が何に起因するかを調べるために、混合培養時の培養液中に蓄積された乳酸量 (図 3) と培養液の pH 変化 (図 4) について調べた。その結果、乳酸の蓄積量は LS 1 の増殖 (図 2 参照) と並行して増加することが

認められた。図 1 と比較参照すると、図 3 の乳酸蓄積量が 40~50 mmol/l 以上になる時点から、Pg の生菌数の急激な減少が始まることが認められる。さらに pH 値も乳酸蓄積量が増加するに従って低下し (図 6), pH 6.0 を下回るようになると同様に Pg 生菌数の急激な減少が起きた (図 1 参照)。すなわち、約 50 mmol/l 乳酸量もしくは 6.0 以下への pH 値の低下が Pg 生菌数の急激な減少を引き起こしているものと予想された。

この仮説を確かめるために、Pg 単独培養系に濃度と pH 値が異なるように乳酸を添加して、Pg 生菌数に及ぼす影響を調べた (図 5)。(a) の実験は pH 値を 6.0 に固定し、乳酸濃度を 20~80 mmol/l に変えた

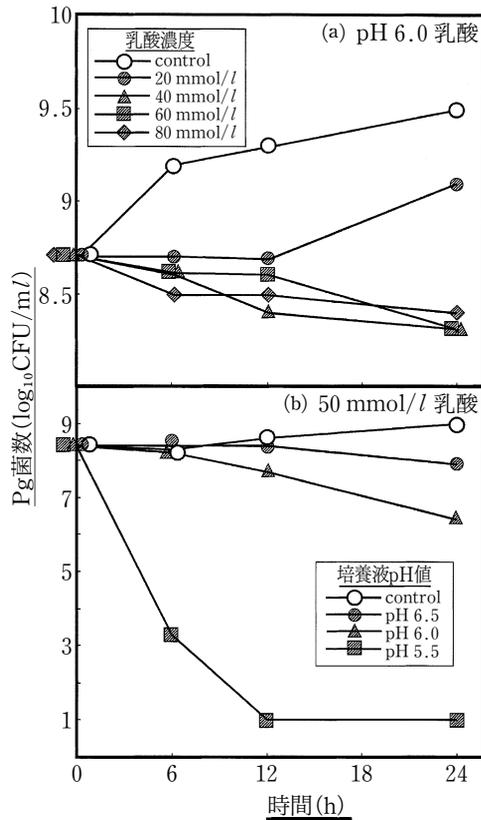


図5 乳酸濃度および pH を変化させたときの Pg 生菌数への影響

(a) 乳酸を最終濃度 0, 20, 40, 60, 80 mmol/l とするように加え、pH 値 6.0 に調整した培養液を作成、これに Pg を接種して培養を行い、経時的に生菌数の測定を行った。測定は 3 回繰り返し、典型的な結果を図にした。

(b) 乳酸を最終濃度 50 mmol/l とするように加え、pH 値を 6.5, 6.0, 5.5 に調整した培養液を作成し、これに Pg を接種して培養を行い、経時的に生菌数の測定を行った。測定は 3 回繰り返し、典型的な結果を図にした。

ときの Pg 生菌数の変化を追ったものである。その結果、コントロール (0 mmol/l) と比較して最終濃度 40 mmol/l で加えた場合、生菌数は有意に減少し 24 時間後には 1/10 以下となった。次に (b) の実験では乳酸濃度を 50 mmol/l に固定して、pH 値を変化させたときの Pg 生菌数の変化を調べた。コントロール (乳酸非添加) と比較して、乳酸添加培養液を pH 6.0 に調整したとき Pg 生菌数は減少し、24 時間後には約 1/100 に減少した。さらに pH 5.5 に調整した場合は生菌数はほとんど消失した。すなわち、混合培養系 (図 3, 4 参照) で Pg 生菌数の急激な減少が認められ

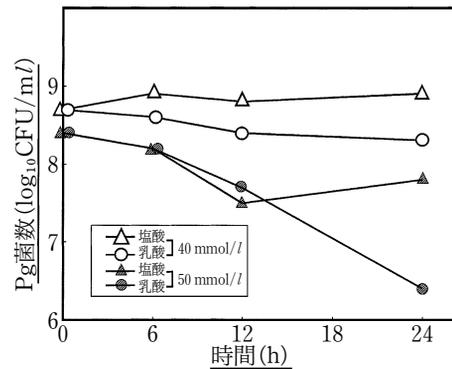


図6 乳酸および塩酸添加による Pg 生菌数への影響
塩酸または乳酸を最終濃度 40 または 50 mmol/l とするように加え、pH 値を 6.0 に調整した培養液を作製し、これに Pg を接種して培養を行い、経時的に生菌数の測定を行った。測定は 3 回繰り返し、典型的な結果を図にした。

た培養液中の乳酸濃度 50 mmol/l, pH 6.0 を、Pg 単独培養系に乳酸を加え pH を調整することで人工的に再現したところ、同様の Pg 生菌数の急激な減少が生じた。従って、この蓄積された乳酸もしくは pH 値の低下が LS 1 添加による Pg 生菌数の減少に直接関与したと考えられる。

次に乳酸と pH のどちらが Pg 生菌数の減少に直接関与しているかを調べるために、pH 値を 6.0 に固定する条件のもとで、乳酸と対照としての塩酸を同濃度 (40 あるいは 50 mmol/l) に添加して培養したときの生菌数の違いについて調べた (図 6)。同じ pH 値条件下にもかかわらず、乳酸を添加したときの方が同濃度の塩酸よりも生菌数の減少が大きかった。すなわち培養 24 時間後において、40, 50 mmol/l では乳酸添加の場合が塩酸添加の場合に比べ Pg 生菌数はそれぞれ約 10 分の 1, 約 100 分の 1 に低下した。なお図 6 に示した実験では 12 時間後においては 50 mmol/l 塩酸の方が 50 mmol/l 乳酸よりも Pg 菌数がわずかに少なかったが、同様の他の 2 回の実験 (図には表していない) では Pg 菌数は 50 mmol/l 乳酸の方が少なかった。従って、乳酸添加によって生じた水素イオン濃度の上昇、すなわち pH 値の低下よりも、むしろ乳酸分子そのものが Pg に殺菌効果を及ぼしていると考えられた。

3. 乳酸のイオン化の Pg 殺菌作用に及ぼす影響

乳酸は水溶液中で一部が解離して乳酸イオンと水素イオンが生じるため、水溶液中では乳酸、乳酸イオンと水素イオンが混在して存在している (図 7)。先の実験で水素イオン自体の Pg 殺菌への直接関与は否定

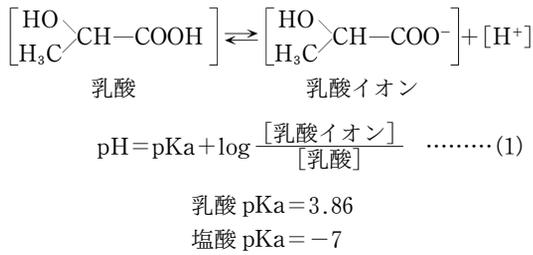


図 7 乳酸の水溶液中の化学平衡

された。そこで次に乳酸と乳酸イオンのどちらが Pg 生菌数の減少に関わっているかを乳酸あるいは乳酸ナトリウム添加培養液を用いて調べた。乳酸は弱酸のため解離度はやや低いが、乳酸ナトリウムは弱酸と強塩基の塩であるために水溶液中で完全解離する。Henderson-Hasselbalch の式 (図 7, (1)式) に従うと pH 6.0 では乳酸は 99.3% が解離しているのに対し乳酸ナトリウムはほぼ 100% 解離している。さらに pH 5.5 では乳酸は 93.2% が解離しているが乳酸ナトリウムは同様にほぼ 100% 解離している。図 8 (a) では乳酸, (b) では乳酸のナトリウム塩である乳酸ナトリウムをいずれも最終濃度 50 mmol/l となるように添加し, 異なる pH 値に調整したときの Pg 生菌数の変化を示している。pH 6.5 では乳酸あるいは乳酸ナトリウム添加群のいずれもが, 24 時間後においても生菌数の明らかな減少は認められなかった。しかし, pH 6.0 では, 乳酸添加群はコントロール群 (乳酸非添加) に比べ, 24 時間後に約 100 分の 1 の減少を示したが, 乳酸ナトリウム添加群では減少は殆ど認められなかった。さらに pH 5.5 では, 乳酸添加群では 24 時間後において生菌数はほとんど消失していた (コントロール [乳酸非添加] 群の 1,000 万分の 1 以下) のに対し, 乳酸ナトリウム添加では軽度の減少 (コントロール [乳酸非添加] 群の 300 分の 1) にとどまった。このように, pH 値を調整することで乳酸添加培養液中の非解離乳酸分子の割合を増やすと, Pg 殺菌効果も増大した。先に示したように pH 5.5 での乳酸添加溶液中では非解離の乳酸分子は 6.8% 程度存在するのに対し, 乳酸ナトリウム添加溶液中での非解離乳酸分子はほぼ 0 であることを考えると, Pg に対して殺菌効果を発揮する乳酸は, 解離した乳酸イオンではなく非解離の乳酸分子であることが予想される。

考 察

先に我々が行った LS 1 を用いた臨床試験では, ヒトの口腔内で歯周病の原因となる Pg 等の黒色素産

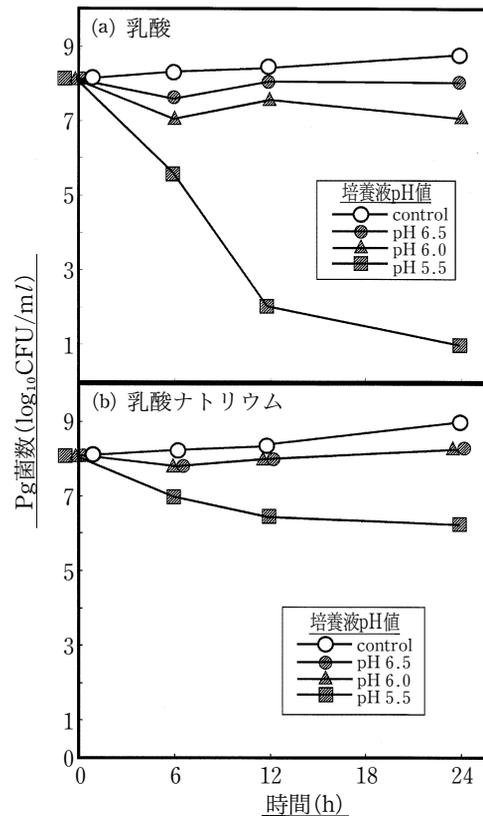


図 8 乳酸および乳酸ナトリウムの Pg 生菌数への影響

(a) 乳酸を最終濃度 50 mmol/l で pH 値を 6.5, 6.0 あるいは 5.5 に調整した培養液を作成し, これに Pg を接種して培養を行い, 経時的に生菌数の測定を行った。測定は 3 回繰り返す, 典型的な結果を図にした。

(b) 乳酸ナトリウムを最終濃度を 50 mmol/l で pH 値を 6.5, 6.0 あるいは 5.5 に調整した培養液を作成し, これに Pg を接種して培養を行い, 経時的に生菌数の測定を行った。測定は 3 回繰り返す, 典型的な結果を図にした。

生嫌気性桿菌を減少させることが認められた¹³⁾。すなわち LS 1 を毎日 2.0×10^7 CFU 服用させたところ唾液中の黒色素産生嫌気性桿菌の菌数は 4 週間で 1/20 に減少した。同時に, 唾液の pH を中性域にすることから齲蝕形成を助長する可能性はなく, LS 1 は歯周病予防に新たな可能性を示す有用な生菌であることが示唆された。

一方, 現在の口腔衛生あるいは歯科臨床においては, 歯周病の予防あるいは治療のために歯周ポケット内のプラークを物理的に取り除くことが広く行われている。これに従い一般家庭でも通常のブラッシングによりプラークを取り除くことが勧められているが, こ

の方法では歯周ポケット内までブラシは十分届かず歯周ポケット内のプラークの完全除去は困難である。従って歯周ポケット内のプラーク、すなわち歯肉縁下プラークについては歯科診療の場においてスクレーリングやルートプレーニングにより除去することが必要となる^{20,21)}。さらに重症となると歯周外科手術を行い、明視下にて歯石やプラークの除去を行う²²⁾。しかしこれらの方法は、既に十分に確立しているにもかかわらず、日本国内における歯周病罹患患者の数には減少の傾向は認められない。歯周病診療におけるこのような現状から、これまでの物理的なプラーク除去に加え、我々がこれまで報告してきた乳酸菌 LS1 を用いた歯周病菌抑制の方法は歯周病の予防に新たな可能性を加えるものと思われる。ブラッシングやスクレーリングによりプラークを物理的に取り除く方法がプラークコントロールと呼ばれているのに対し、本論文で述べた口腔内フローラ環境を有用生菌でコントロールし、歯周病菌等の病原菌をフローラから排除する方法をフローラコントロールとして提唱したい。そして本論文では、この LS1 による Pg 殺菌を担当する有効物質についての検討を行った。

乳酸菌 LS1 の Pg 殺菌のメカニズムとしては乳酸菌の病原菌抑制作用としてこれまで報告されてきた免疫賦活化作用²³⁾や細胞への付着防止²⁴⁾などもあげられる。しかし LS1 は口腔内のみならず試験管内でも Pg に対する殺菌効果を発揮していたので、このような宿主の生体防御系を介した間接的作用ではなく、Pg 菌体に直接作用する殺菌効果によるものと考えられる。乳酸菌が産生する殺菌あるいは抗菌物質としては、これまで乳酸や酢酸などの有機酸、過酸化水素¹⁴⁾、バクテリオシン¹⁵⁾が報告されている。この中でも有機酸、特に乳酸が乳酸菌の産生する主要な抗菌物質であるとの考えが有力である^{17,18)}。

本論文での試験管内 Pg/LS1 混合培養系において、LS1 は Pg に対する強力な殺菌効果を示した。すなわち LS1 は Pg の 100 万分の 1 の菌数でも Pg を完全に殺菌することが可能であった (図 1)。この混合培養時の培養上清中の乳酸蓄積量と pH 値の検討から、40~50 mmol/l の乳酸量、もしくは pH 値の 6.0 以下への低下が Pg 生菌数の急激な減少を引き起こしていると予想された。次に Pg 単独培養系に乳酸 40 mmol/l 以上または pH 6.0 以下の条件を人工的に再現したところ、Pg 生菌数の減少が同様に見られた。次に乳酸と pH のどちらが Pg 生菌数の減少に直接関与しているかを調べるために、乳酸と、対照として塩酸を pH 6.0 で 40 または 50 mmol/l 添加して生菌数の違いを調べた (図 6)。その結果同じ pH 値にもか

かわらず、乳酸を添加した時の方が塩酸を添加したときよりも生菌数の減少がはるかに大きかったので、pH 値の低下よりも乳酸分子そのものが殺菌効果を及ぼしていると考えられた。

乳酸は水溶液中では解離して、乳酸と乳酸イオンとが混在した状態になっているので、このうちのどちらが Pg 生菌数の減少に直接関わっているかを、水溶液中で完全には解離しない乳酸と、完全解離する乳酸ナトリウムを用いて調べた (図 8)。その結果、乳酸の方が乳酸ナトリウムよりも Pg 生菌数減少の効果がはるかに大きく、Pg 殺菌効果は非解離型の乳酸によるものであることが示された。

乳酸は弱酸であり、酸解離定数 (pKa) は 3.86 である。Henderson-Hasselbalch の式 (図 7(1)式) より pH 6.0 の時に乳酸イオン/乳酸=138 となり、99.3% が解離しており、非解離型の乳酸は 0.7% である。また、pH 5.5 のときは 6.8% が非解離型の乳酸となる。一方、図 8 より非解離型の乳酸の割合が多くなるほど Pg 生菌数の減少は顕著となっている。すなわち非解離型乳酸が直接殺菌効果を持っていると考えられる。乳酸は pH 値が低下するほど非解離型の割合が増えるが、水素イオンそのものは図 6 より Pg 生菌数の減少には直接関与していなかった。よって pH 低下により観察される Pg 生菌数の減少は、pH 低下による非解離型乳酸の増加により間接的に生菌数の減少に働いたためであると考えられる。

乳酸は解離型でイオン化している状態では脂質二重膜を透過することは出来ないが、非解離型では疎水性となり透過することが出来る。細胞内の pH はおよそ 7 なので、細胞内に流入した乳酸はほとんどすべてが解離して乳酸イオンとなるが、同時に水素イオンを放出し、細胞内を酸性化する²⁵⁾。この酸性化により細胞内の酵素の機能低下や失活、代謝異常を引き起こし細菌を死に至らしめる^{26,27)}。

好気性細菌の細胞内 pH 調節は、植物のように細胞膜に強力な H⁺-ATPase²⁸⁾ が存在せず、主に電子伝達系で水素イオンの排出が行われている²⁹⁾。一方、Pg については、ゲノムの全塩基配列をもとに、代謝系や輸送系についての推測される構成タンパク分子が報告されている³⁰⁾。この報告では、Pg においては水素イオンを排出する可能性のあるのは V 型 H⁺-ATPase 1 種類のみであり、細菌における主要な水素イオン排出系である電子伝達系や、乳酸菌において水素イオンの排出を行っている F 型 H⁺-ATPase は存在しない。このため、非解離型乳酸が細胞内に流入して細胞内が酸性化しても水素イオンを十分排出して元の pH に戻ることが出来ないと考えられる。この事象

が、本論文で明らかにしたところの Pg の乳酸に対する非常に高い感受性を分子レベルで説明するものと思われる。

齶蝕の最大の原因は pH の低下である³¹⁾。本論文で明らかにした LS 1 が産生する Pg 殺菌物質は、pH 低下をもたらす水素イオンよりもむしろ非解離の乳酸分子であった。このことは水素イオンを放出する乳酸の解離は、LS 1 の Pg 殺菌過程においては必須ではないことを示すものであり、乳酸菌 LS 1 の副作用としての pH 低下による齶蝕助長と Pg 殺菌効果とは切り離されることを示している。

参考文献

- 1) Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS : Advances in pathogenesis of periodontitis : summary of developments, clinical implications and future direction. *Periodontol* 2000, 14 : 216-248, 1997.
- 2) Darby I, Curtis M : Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol* 2000, 26 : 33-53, 2001.
- 3) 遠藤憲行 : 成人性歯周炎患者の病変部歯肉組織からの歯周病原性細菌の検出. *日歯周誌*, 43 : 33-42, 2001.
- 4) 中垣直毅 : 歯周ポケットにおける病原酵素産生菌の分布. *歯科医学*, 56 : 497-508, 1993.
- 5) Holt JG : *Bergey's manual of determinative bacteriology*. (9th ed.) Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- 6) Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T : Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000, 14 : 79-111, 1997.
- 7) Gronbaek EV : Bacterial degradation of immunoglobulin A 1 in relation to periodontal disease. *APMIS Suppl*, 87 : 1-54, 1999.
- 8) Chiang CY, Kyritsis G, Graves DT, Amar S : Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 67 : 4231-4236, 1999.
- 9) Amano A : Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells : implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74 : 90-96, 2003.
- 10) Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ : *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun*, 69 : 3048-3056, 2001.
- 11) Slots J : Update on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *J Int Acad Periodontol*, 1 : 121-126, 1999.
- 12) Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*, 13 : 570-577, 1986.
- 13) Ishikawa H, Aiba Y, Nakanishi M, Oh-hashii Y, Koga Y : Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of humans by the administration of *Lactobacillus salivarius* TI 2711. *J Jpn Soc Periodontol*, 45 : 105-112, 2003.
- 14) Higuchi M, Shimada M, Yamamoto Y, Hayashi T, Koga T, Kamio Y : Identification of two distinct NADH oxidases corresponding to H₂O₂-forming oxidase and H₂O-forming oxidase induced in *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*, 139 : 2343-2351, 1993.
- 15) Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW : Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 40 : 722-756, 1976.
- 16) Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR : Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 57 : 3613-3615, 1991.
- 17) Marteau P, Vesa T : Pharmacokinetics of probiotics and biotherapeutic agents in humans. *Biosci Microflora*, 17 : 1-6, 1998.
- 18) Borriello SP : The application of bacterial antagonism in the prevention and treatment of *Clostridium difficile* infection of the gut. In : *Anaerobes Today* (ed. by Hardie JM and Borriello SP), John Willey & Sons Ltd, Chichester, 195-202, 1988.
- 19) Gutmann I, Wahalefeld AW : in methods of enzymatic analysis (Bergmeyer HU, ed.) 2nd ed., vol. 3 1464-1468, 1974.
- 20) Schaffer EM : Periodontal instrumentation : scaling and root planing. *Int Dent J*, 17 : 297-319, 1967.
- 21) Tagge DL, O'Leary TJ, El-Kafrawy AH : The clinical and histological response of periodontal pockets to root planing and oral hygiene. *J Periodontol*, 46 : 527-533, 1975.
- 22) Donnenfeld OW, Glickman I : A biometric study of effects of gingivectomy. *J Periodontol*, 37 : 447-452, 1966.
- 23) Kato I, Yokokura T, Mutai M : Macrophage

- activation by *Lactobacillus casei* in mice. Microbiol Immunol, 27 : 611-618, 1983.
- 24) Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL : *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut, 35 : 483-489, 1994.
- 25) Siegumfeldt H, Rechinger KB, Jakobsen M : Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to rapid drop in extracellular pH. Appl Environ Microbiol, 66 : 2330-2335, 2000.
- 26) Carlsson J, Hamilton IR : Differential toxic effects of lactate and acetate on the metabolism of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Oral Microbiol Immunol, 11 : 412-419, 1996.
- 27) Iwai Y, Kawarada K, Kojima I, Miyasawa H, Kakuta H, Mayanagi H, Takahashi N : Intracellular and extracellular pHs of *Streptococcus mutans* and efflux of a fluorescent pH indicator in streptococcal cells. Oral Microbiol Immunol, 17 : 239-244, 2002.
- 28) Morsomme P, Boutry M. Related : The plant plasma membrane H⁺-ATPase : structure, function and regulation. Biochim Biophys Acta, 1465 : 1-16, 2000.
- 29) Booth IR : Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. Microbiol Rev, 49 : 359-378, 1985.
- 30) Nelson K, Fleishmann R, DeBoy R, Paulsen I, Fouts D, Eisen J, Daugherty S, Dodson R, Durkin A, Gwinn M, Haft D, Kolonay J, Nelson W, White O, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin J, Duncan M, Dewhirst F, Fraser C : Complete Genome Sequence of the Oral Pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* Strain W 83. J Bacteriol, 185 : 5591-5601, 2003.
- 31) Carter WJ, Englander HR, Fosdick LS : The formation of lactic acid in dental plaques. III. Caries-immune individuals. J Dent Res, 35 : 792-799, 1956.
-