

原 著

*Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1)の服用による  
ヒト歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌抑制効果

松岡隆史<sup>\*1,\*2</sup> 菅野直之<sup>\*3,\*4</sup> 瀧川智子<sup>\*5</sup> 高根正敏<sup>\*3,\*4</sup>  
吉沼直人<sup>\*3,\*4</sup> 伊藤公一<sup>\*3,\*4</sup> 古賀泰裕<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup>株式会社 フレンテ・インターナショナル

<sup>\*2</sup>東海大学医学部感染症研究室

<sup>\*3</sup>日本大学歯学部歯周病学講座

<sup>\*4</sup>日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

<sup>\*5</sup>日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(受付日：2006年8月22日 受理日：2006年11月10日)

Effect of Oral *Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1)

Administration on Periodontopathic Bacteria in Subgingival Plaque.

Takashi Matsuoka<sup>\*1,2</sup>, Naoyuki Sugano<sup>\*3,4</sup>, Satoko Takigawa<sup>\*5</sup>, Masatoshi Takane<sup>\*3,4</sup>,  
Naoto Yoshinuma<sup>\*3,4</sup>, Koichi Ito<sup>\*3,4</sup>, and Yasuhiro Koga<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup>Frente International Co., Ltd.

<sup>\*2</sup>Laboratory for Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine

<sup>\*3</sup>Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

<sup>\*4</sup>Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

<sup>\*5</sup>Nihon University Graduate School of Dentistry

(Received : August 22, 2006 Accepted : November 10, 2006)

**Abstract** : To determine the efficacy of probiotics on periodontal diseases, *Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1) was orally administered to volunteers. The 87 subjects were divided into two administration (n=49) and one placebo (n=38) group. Administration groups took either  $2 \times 10^8$  (n=39) a day for 12 weeks. At baseline, 4 and 12 weeks after LS1 administration and 4 weeks after the termination of LS1 administration (at week 16), subjects were clinical by examined for probing depth (PD), bleeding on probing (BOP), and plaque control record (PCR), and, subgingival plaque samples were collected from all subjects to measure the number of *Porphyromonas gingivalis* and *L. salivarius* bacteria in plaque using real-time PCR.

A significant reduction in the number of *P. gingivalis* bacteria was found in the administration group from  $1.12 \times 10^5$  to  $2.97 \times 10^4$  at 12 weeks ( $P < 0.05$ ), but, not at week 16 compared to baseline. The number of *L. salivarius* bacteria increased at 4 and 12 weeks and decreased at week 16. No significant change in the number of *L. salivarius* bacteria was observed in the placebo group. These results imply a reverse correlation between the

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, 259-1193, Japan

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

numbers of *P. gingivalis* and LS1. This means that LS1 translocates to subgingival plaque, then decreased the number of *P. gingivalis*. This data also suggests that LS1 is an effective probiotic. Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 48 : 315-324, 2006.

**Keywords** : probiotic, *Lactobacillus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, subgingival plaque

**要旨** : 乳酸菌 *Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1) が歯肉縁下プラーク中の *Porphyromonas gingivalis* 菌数を減少させ、かつ臨床症状を改善した第1報の臨床試験の結果をふまえ、長期服用時のLS1の効果の持続性と服用中止後の菌数の変化を調べるために、試験期間、被験者を拡大した臨床試験を実施した。

総数87名(開始時103名,途中脱落者16名)の被験者にLS1含有の錠菓(1日当たりのLS1菌数  $2.0 \times 10^8$ )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て試料とした。試料中に含まれる歯周病原菌と *L. salivarius* の菌数はリアルタイムPCRで測定した。歯肉縁下プラーク採取時に、臨床所見としてPD, BOP及びPCRを記録した。

その結果、12週間のLS1服用により、LS1服用群では *P. gingivalis* 菌数は平均で  $1.12 \times 10^5$  から  $2.97 \times 10^4$  へと有意 ( $P < 0.05$ ) に減少し、服用中止すると菌数は増加した。逆に *L. salivarius* 菌数はLS1を服用すると増加し、服用中止すると減少した。*P. gingivalis* と *L. salivarius* の菌数の関係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。臨床症状の改善はLS1服用群、プラセボ服用群の両者に見られた。

従って12週間服用時においてもLS1は *P. gingivalis* 菌数抑制効果を持ち、服用中止により服用前と同レベルに菌数が回復することが示された。本研究においてもLS1のプロバイオティクスとしての有用性が示された。

**キーワード** : プロバイオティクス, *Lactobacillus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, 歯肉縁下プラーク

## 緒言

歯周病に対する治療として、歯ブラシやスクレーラーを用いた機械的プラークコントロールは、歯周病の原因であるプラークの除去に最も有効な手段である<sup>1)</sup>。一方、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もあるが、プラーク中の細菌は菌体外マトリックスにより保護されているため<sup>2)</sup> 抗菌剤に対して抵抗性を示し<sup>3),4)</sup>、急性期を除いた歯周治療においては有効な方法ではない。また、歯周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<sup>5)</sup>。

近年、抗菌剤に頼らない感染予防の手段としてプロバイオティクスと呼ばれる有用微生物を用いた感染予防が注目されている。プロバイオティクス (probiotics) は抗生物質 (antibiotics) に対比される言葉で、生物間の共生関係 (probiosis) を意味する用語を起源とする造語である。プロバイオティクスは“腸内フローラ (細菌叢) のバランスを改善し、それによって宿主に有益な効果をもたらす生菌”と定義されている<sup>6)</sup>。

口腔内は腸管と同様に多種多様の細菌が生息している。腸管では、有用な細菌による腸管内フローラの改善、つまりプロバイオティクスの効果に関する研究が多くなされており、プロバイオティクスは既に健康食

品としても広く用いられている<sup>6)</sup>。口腔内についても同様に、悪玉菌である歯周病原菌に対してプロバイオティクスを応用する試みがなされている。これまでに我々は、口腔内プロバイオティクスとして、*Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1) が歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌を抑制することを報告している<sup>7)</sup>。歯周病原菌の中でも病原性の高い *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* を対象とし、LS1を含む錠菓を1回1錠(1錠当たりの菌数  $6.6 \times 10^7$ ) 1日3回4週間、計30名を対象に服用させ、歯肉縁下プラーク中でのこれらの菌の割合を歯周病の臨床症状の変化について解析を行った。その結果、LS1服用群では有意 ( $P=0.01$ ) に *P. gingivalis* 菌数の総菌数に占める割合の減少が認められた。一方、プラセボ服用群ではこれらいずれの歯周病菌においても有意な増減は見られなかった。また、臨床症状についてもプラセボ服用群に比べ、LS1服用群で改善傾向が見られた。

以上のようにLS1は服用開始4週後で歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌 *P. gingivalis* 菌数を減少させる効果が認められた。しかし、4週間以上の服用時における *P. gingivalis* 菌数減少効果の持続性や、服用中止後にLS1が歯肉縁下プラーク中に滞留し、フローラを改善する働きがあるのかは未検討の課題である。これらの点はLS1を口腔内プロバイオティクスとして使用する場合の服用方法や期間、さらには安全性を検

討する上で重要な課題である。服用を中止しても長期間滞留する場合は短期間の服用のみでも効果の持続が期待できるが、齲蝕等の問題が懸念される。一方、服用を中止してから短期間しか滞留しない場合は継続して服用する必要があるが、安全性は確保される。そこで、本研究では、LS1のプロバイオティクスとしての有用性をより詳しく確認する目的で、被験者数と服用期間を拡大して長期服用時の経過観察を行い、さらに服用期間中止後の観察期間を設けた研究を行った。さらに、歯肉縁下プラーク中の *L. salivarius* についても第1報は定性的測定であったが、今回はリアルタイムPCRを用いてその菌数を測定し、歯肉縁下プラーク中の *L. salivarius* と歯周病原菌数の変化についてより詳細に検討した。

## 材料および方法

### 1. 被験者と摂取スケジュール

本研究は東海大学医学部倫理委員会および日本大学歯学部倫理委員会の承諾を得て行った。募集に応募した一般成人150名について予備的口腔内診査を行った。歯肉炎、もしくは4mm以上の歯周ポケットを1カ所以上有し、全身疾患がなく、1ヵ月以内に抗生物質等の薬物投与も受けていない計103名を被験者とした(途中脱落により12週目の被験者数は87名)。被験者には事前に本研究の主旨について文章を用いて十分な説明を行い、書面にて本研究参加の同意を得た。被験者は年齢、歯周ポケットの深さにより層別化した後、これらの因子が均一化するように無作為に3群に割りつけた。1群(開始時46名、途中脱落により12週目39名)には1錠当たりLS1菌数  $6.6 \times 10^7$  含む錠菓を、もう1群(10名)には1錠当たりLS1菌数  $6.6 \times 10^6$  含む錠菓を、いずれも1回1錠、1日3回、12週間連日服用させた(1日当たりに服用するLS1の菌数はそれぞれ  $2.0 \times 10^8$ 、 $2.0 \times 10^7$  となる)。残り1群(開始時47名、途中脱落により12週目38名)にはLS1を含まないプラセボ錠菓を同様に服用させた。なお、菌数はLS1が唾液中の歯周病原菌数を減少させたときの菌数<sup>8)</sup>、及び歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数を減少させた前報の菌数<sup>7)</sup>を元に設定した。LS1含有錠菓の組成は、ソルビトールを賦形剤として配合しており、食品用ラクトバシラス・サリバリウスTI2711株(LS1)菌末(LS1は健康なヒトの口腔内より分離した)を1錠当たりの菌数が  $6.6 \times 10^7$  または  $6.6 \times 10^6$  となるように配合したものである。歯肉縁下プラークの採取および口腔内診査は服用前と服用4週後、12週後、及び服用中止後4週後(服用開始時よ

り16週後)に実施した。歯肉縁下プラークの採取と口腔内診査は日本大学歯学部にて、歯肉縁下プラーク中の菌数の測定は東海大学医学部にて実施した。

### 2. 口腔内診査

前報に記述した方法<sup>7)</sup>と同様に16、11、24、36、31、44の6歯を対象に1歯6点法で歯周ポケットの深さ(probing depth, PD)を計測した。プロービング時の出血(bleeding on probing, BOP)の有無はプロービング30秒後に確認した。口腔清掃状態の指標にはO'Leary<sup>9)</sup>らのプラークコントロールレコード(PCR)を用いた。

### 3. 歯肉縁下プラークの採取

服用前の口腔内診査時に4mm以上のポケットが見られた部位を対象に、歯肉縁下プラークを採取した。LS1服用群では50部位、プラセボ服用群では45部位、LS1低量服用群では13部位からプラークの採取を行った。

プラーク採取は採取部位をコットンロールで簡易防湿し、歯肉縁上プラークを注意深く除去後、#30ペーパーポイント(ピヤス、東京)をポケット内に挿入し、抵抗のあるところで静置、30秒後に取り出して100  $\mu$  l滅菌水を入れた1.5mlのマイクロチューブ中に入れた。マイクロチューブをvortex mixerでよく懸濁した後に15,000rpmで5分間遠心分離し、沈殿物からDNAを抽出して、サンプルとして使用した。DNA抽出はWizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI)を用い、Kitに添付された説明書の方法に従って抽出した。

### 4. リアルタイムPCRによる歯周病原菌数の定量

リアルタイムPCRに使用するプライマーとTaq-Manプローブは前報と同じものを使用した。なお、*L. salivarius*用のプローブは新たに設計したものの(5'-FAM-ATTCACCGTAAGAAGTTGAGTGGC-TAMRA-3')を使用した。リアルタイムPCRは前報に記載した方法で行った<sup>7)</sup>。

### 5. 統計学的解析

各項目間の有意差を検定するための統計学的方法としてウィルコクソン符号付順位和検定を用い、群間の比較にはスチューデントのt検定またはマン・ホイットニ検定を用いた。なお、試験期間中に口腔内清掃や歯周病治療、抗生物質の使用を行った被験者のデータは除外した。

## 結 果

### 1. 歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌の変化

開始時のLS1服用群、プラセボ服用群の両群は年

齢, 最大PD値についてあらかじめ層別化してこれらについて均一になるよう割り付けをした。両群の各パラメータの初期値を比較検討したところ, 採取プラーク中の総菌数, 採取プラーク中の *P. gingivalis* 菌数いづれについても, スチューデント t 検定またはマン・ホイットニ検定を用いた両群間の比較で有意差は認められなかった (表1)。

被験者に LS1 またはプラセボ錠菓を連日服用させ, 服用開始前, 4 週後, 12 週後に歯肉縁下プラークを採取, リアルタイム PCR で歯周病原菌 *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *L. salivarius* 菌数および総菌数を測定した。その結果を表2に, *P. gingivalis* 菌数の分布及び平均値を図1に示す。その結果, LS1 服用群では服用4 週後で平均値が  $1.12 \times 10^5$  から  $2.75 \times 10^4$  へと統計学的に有意 ( $P < 0.01$ ) に *P. gingivalis* 菌数の減少が見られた。12 週後も有意な菌数減少が維持されていた ( $2.97 \times 10^4$ ,  $P < 0.05$ )。さらに服用中止期間を4 週間の服用中止期間後 (服用開始時点からは16 週後) に, 再度歯肉縁下プラークの採取を行ったところ, LS1 服用群において *P. gingivalis* 菌数は再び増加し, 服用開始前と同程度となった ( $2.97 \times 10^4 \rightarrow 1.82 \times 10^5$ )。一方 *T. forsythensis* 菌数については有意な変化は認められなかった。プラセボ服用群では両歯周病原菌において有意な増減は見られず, かつ服用中止による *P. gingivalis* 菌数の増加も生じなかった。LS1 低量服用群の *P. gingivalis* は, 服用4 週後, 12 週後に菌数の減少傾向は見られたが, 統計学的に有意な差は認められなかった。しかし服用を中止した12 週より菌数

の増加傾向が見られた ( $5.73 \times 10^4 \rightarrow 9.67 \times 10^4$ )。LS1 低量服用群の *T. forsythensis* についても全実験期間において変化は認められなかった。総菌数に関しては, LS1 服用群, プラセボ服用群, LS1 低量服用群いづれにおいても服用12 週後に有意に減少し, それぞれ  $2.06 \times 10^9$  から  $5.39 \times 10^8$ ,  $1.69 \times 10^9$  から  $3.94 \times 10^8$ ,  $6.47 \times 10^9$  から  $5.98 \times 10^8$  となった。

前報<sup>7)</sup>では LS1 服用後に歯肉縁下プラーク中から *L. salivarius* を定性的に検出したことを報告した。今回は歯肉縁下プラーク中の *L. salivarius* 菌数をリアルタイム PCR で定量的に測定した (図2)。その結果, *L. salivarius* の検出率においては LS1 服用群では服用前が10%であったのに対し, 4 週後, 12 週後では, それぞれ90%, 72%と高い検出率が得られた。しかし, 服用中止4 週後 (服用開始時より16 週後) には20%と大きく減少した。*L. salivarius* 菌数については, LS1 服用群の平均値は0, 4, 12, 16 週においてそれぞれ  $3.16 \times 10^1$ ,  $1.08 \times 10^4$ ,  $3.75 \times 10^5$ ,  $2.62 \times 10^4$  であり, 0 週目と比較して4 週, 12 週の菌数は有意に増加した (表2)。表2, 図1で示した同検体の *P. gingivalis* 菌数の平均値が  $1.12 \times 10^5$ ,  $2.75 \times 10^4$ ,  $2.97 \times 10^4$ ,  $1.82 \times 10^5$  であることを考慮すると, 歯肉縁下プラーク内の *L. salivarius* の検出率及び菌数は共存する *P. gingivalis* 菌数と逆相関の傾向にあることが示された。LS1 低量服用群でも *L. salivarius* の検出率は, 同様に0 週では0%であったのに対し4 週後で92%, 12 週で62%であったが, 16 週では23%に減少していた (LS1 低量服用群は限定的に実施したので,

表1 LS1 服用群及びプラセボ服用群の被験者の各パラメーターの比較

	LS1 服用群 ( $2 \times 10^8$ )	プラセボ服用群	両群の同等性の 比較検定
被験者数	開始時	46名	47名
	4週目	43名	44名
	12週目	39名	38名
	16週目	39名	38名
年齢(開始時) <sup>3)</sup>	46.1 (23-63)	45.6 (19-63)	N.S. <sup>1)</sup>
総菌数(開始時) <sup>3)</sup>	$2.09 \times 10^9$ ( $1.53 \times 10^4$ - $5.80 \times 10^{10}$ )	$1.69 \times 10^9$ ( $137 \times 10^5$ - $2.23 \times 10^{10}$ )	N.S. <sup>2)</sup>
<i>P. gingivalis</i> 菌数(開始時) <sup>3)</sup>	$1.12 \times 10^5$ ( $0.00$ - $3.25 \times 10^6$ )	$2.97 \times 10^4$ ( $0.00$ - $4.97 \times 10^5$ )	N.S. <sup>2)</sup>
最大PD <sup>4)</sup> 値(開始時) <sup>3)</sup>	4.5 (2-9)	4.5 (2-9)	N.S. <sup>1)</sup>

1) スチューデントの検定 N.S.  $p > 0.05$

2) マン・ホイットニ検定 N.S.  $p > 0.05$

3) 上段は平均値、下段は範囲を示す

4) PD: probing depth

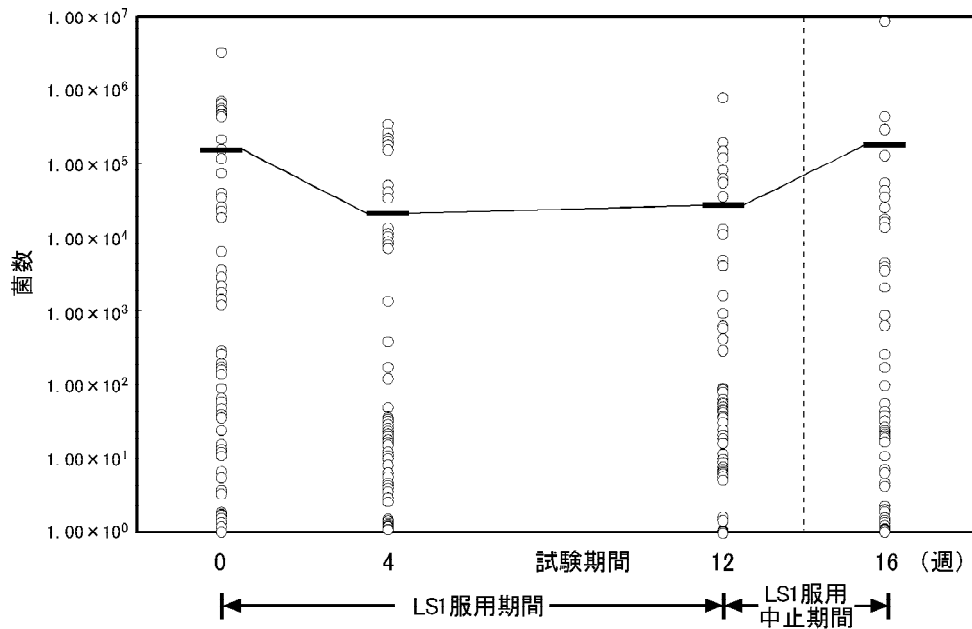


図1 歯肉縁下プラーク中の *Porphyromonas gingivalis* 菌数の継続的变化 (LS1 服用群)  
 LS1 含有錠薬またはプラセボ錠薬を 12 週間服用させ、服用前、服用 4 週間後、12 週間後及び服薬中止後 4 週間後 (16 週間後) に歯肉縁下プラークを採取し、リアルタイム PCR で *P. gingivalis* 菌数を測定した。実線は平均値の推移を表す。

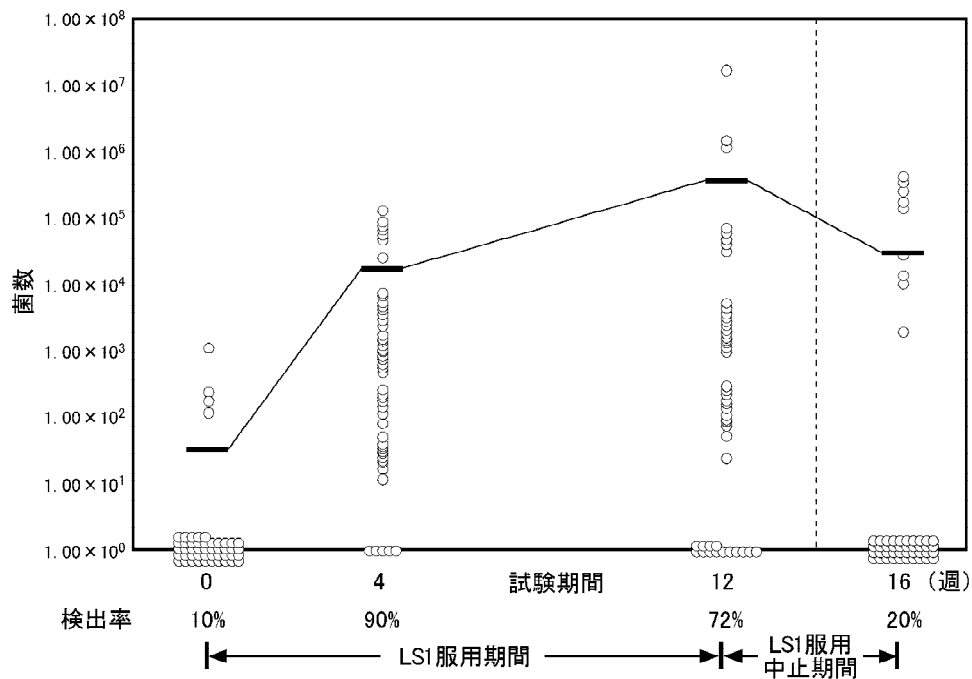


図2 歯肉縁下プラーク中の *Lactobacillus salivarius* 菌数の継続的变化 (LS1 服用群)  
 LS1 含有錠薬またはプラセボ錠薬を 12 週間服用させ、服用前、服用 4 週間後、12 週間後及び服薬中止後 4 週間後 (16 週間後) に歯肉縁下プラークを採取し、リアルタイム PCR で *L. salivarius* 菌数を測定した。実線は平均値の推移を表す。

表2 歯肉縁下プラーク中の菌数の変化

		0週目	4週目	12週目	16週目	
		← LS1服用期間 →			← LS1服用中止期間 →	
総菌数	LS1服用群 ( $2 \times 10^8$ ) (n=50)	$2.06 \times 10^9 \pm 7.71 \times 10^8$	$3.99 \times 10^9 \pm 1.76 \times 10^{10}$	$5.39 \times 10^8 \pm 8.06 \times 10^8$	$1.35 \times 10^8 \pm 3.32 \times 10^8$	
	LS1低量服用群 ( $2 \times 10^7$ ) (n=13)	$6.47 \times 10^9 \pm 2.45 \times 10^{10}$	$7.15 \times 10^9 \pm 1.87 \times 10^{10}$	$5.98 \times 10^8 \pm 1.21 \times 10^9$	$1.63 \times 10^8 \pm 2.86 \times 10^8$	
	プラセボ服用群 (n=45)	$1.69 \times 10^9 \pm 4.70 \times 10^9$	$3.96 \times 10^9 \pm 1.57 \times 10^{10}$	$3.94 \times 10^8 \pm 1.08 \times 10^9$	$2.74 \times 10^8 \pm 5.66 \times 10^8$	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	LS1服用群 ( $2 \times 10^8$ ) (n=50)	$1.12 \times 10^5 \pm 4.48 \times 10^5$	$2.75 \times 10^4 \pm 6.83 \times 10^4$	$2.97 \times 10^4 \pm 1.18 \times 10^5$	$1.82 \times 10^5 \pm 1.19 \times 10^6$	
	LS1低量服用群 ( $2 \times 10^7$ ) (n=13)	$1.05 \times 10^5 \pm 1.42 \times 10^5$	$9.07 \times 10^4 \pm 1.79 \times 10^5$	$5.73 \times 10^4 \pm 9.90 \times 10^4$	$9.67 \times 10^4 \pm 1.58 \times 10^5$	
	プラセボ服用群 (n=45)	$2.97 \times 10^4 \pm 7.73 \times 10^4$	$3.39 \times 10^4 \pm 1.23 \times 10^5$	$6.61 \times 10^4 \pm 1.52 \times 10^5$	$4.27 \times 10^4 \pm 1.28 \times 10^5$	
<i>Tannerella forsythensis</i>	LS1服用群 ( $2 \times 10^8$ ) (n=50)	$2.51 \times 10^4 \pm 6.41 \times 10^4$	$3.63 \times 10^4 \pm 1.07 \times 10^5$	$1.68 \times 10^4 \pm 3.79 \times 10^4$	$1.46 \times 10^4 \pm 4.16 \times 10^4$	
	LS1低量服用群 ( $2 \times 10^7$ ) (n=13)	$4.44 \times 10^4 \pm 8.13 \times 10^4$	$6.95 \times 10^4 \pm 1.24 \times 10^5$	$2.26 \times 10^4 \pm 4.28 \times 10^4$	$5.71 \times 10^4 \pm 9.43 \times 10^4$	
	プラセボ服用群 (n=45)	$2.45 \times 10^4 \pm 5.54 \times 10^4$	$3.06 \times 10^4 \pm 9.10 \times 10^4$	$3.75 \times 10^4 \pm 1.20 \times 10^5$	$2.20 \times 10^4 \pm 4.52 \times 10^4$	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS1服用群 ( $2 \times 10^8$ ) (n=50)	$3.16 \times 10^1 \pm 1.60 \times 10^2$	$1.08 \times 10^4 \pm 2.64 \times 10^4$	$3.75 \times 10^5 \pm 2.32 \times 10^6$	$2.82 \times 10^4 \pm 8.39 \times 10^4$	

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01

図表に結果は示していない)。一方プラセボ服用群の *L. salivarius* 検出率は0週, 12週, 16週で9%, 20%, 20%であり, LS1服用群とは異なり, *L. salivarius* 菌数の有意な増加は見られなかった。

## 2. 口腔内診査

口腔内診査は歯肉縁下プラークの採取時であるLS1服用前, 4週服用後, 12週服用後, および服用中止後4週後に行った。その結果, 表3に示すように, 服用開始後4週以降でLS1服用群, プラセボ服用群共にBOP, 平均PD, 最大PDで値が減少し, 症状の改善が見られたが, LS1服用群プラセボ服用群で改善の程度は同程度であった。LS1低量服用群では有意差は見られなかったが, BOP, 平均PD, 最大PDの平均値は減少していた。PCRに関してはいずれの群でも変化は見られなかった。さらに, 全被験者の口腔内診査において, 齲蝕の新たな発生あるいは悪化の所見, 副作用などは認められなかった。

## 考 察

先に我々が行ったLS1を用いた研究では, ヒト唾液中の黒色素産生嫌気性桿菌(*P. gingivalis*を含む)がLS1服用により減少することが認められた<sup>8)</sup>。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, 唾液中の細菌検査は口腔内全体の細菌分布を知る上で有意義である<sup>10)</sup>。また, 歯周病の直接の病巣部位である歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌が減少していること, そして, その歯肉縁下プラーク中には*L. salivarius*がLS1服用時には存在していることを定性的に確認した<sup>7)</sup>。さらにLS1服用による臨床症状の改善傾向を確認した。これらの結果は, LS1が主要な歯周病原菌である*P. gingivalis*の菌数を抑制して, 歯周病の症状を改善する可能性を示唆した。

これら過去2回の臨床試験では, いずれも4週間のLS1服用期間で効果が十分に認められていた。しかしプロバイオティクスであるLS1の作用は薬剤と比較してゆるやかであるので, 前報の検体数であっても傾

表3 臨床所見の変化

		0週目	4週目	12週目	16週目
		← LS1服用期間 →			← LS1服用中止期間 →
PCR(%)	LS1服用群( $2 \times 10^8$ )	62.4±15.7	59.5±16.0	63.8±17.7	63.2±16.7
	LS1低量服用群( $2 \times 10^7$ )	67.1±13.5	65.8±17.1	62.1±12.0	65.0±13.9
	プラセボ服用群	61.0±15.5	62.1±19.2	63.5±17.5	61.6±21.4
BOP(%)	LS1服用群( $2 \times 10^8$ )	33.7±21.1	29.3±16.8	24.7±16.8	20.9±14.4
	LS1低量服用群( $2 \times 10^7$ )	35.7±24.3	30.3±17.8	27.2±18.8	28.3±19.7
	プラセボ服用群	33.3±16.8	24.3±14.6	23.0±15.8	21.0±13.0
平均PD (mm)	LS1服用群( $2 \times 10^8$ )	2.3±0.6	2.1±0.7	2.2±0.7	2.1±0.6
	LS1低量服用群( $2 \times 10^7$ )	2.3±0.5	2.2±0.5	2.2±0.5	2.2±0.5
	プラセボ服用群	2.2±0.7	2.1±0.7	2.1±0.7	2.0±0.7
最大PD (mm)	LS1服用群( $2 \times 10^8$ )	4.5±1.4	4.1±1.2	3.7±1.2	3.7±1.1
	LS1低量服用群( $2 \times 10^7$ )	4.2±1.3	4.1±1.0	3.9±0.5	3.6±1.0
	プラセボ服用群	4.5±1.5	4.0±1.4	3.9±1.7	3.8±1.4

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01

向を見るのには十分でも、効果を検討するには不十分であり、さらに多くの被験者で試験を行う必要性があった。また、LS1の服用は、常に服用し続ける必要があるのか、それとも4週間の服用のみで効果が持続するのかについて、もしくは安全性の観点から、長期服用時の経過の観察と服用を中止後の歯周病原菌やLS1の菌数変化について検討する必要がある。そこで、本研究ではこれらの未検討課題についてより詳細に検討するため、被験者数と服用期間を拡大し、服用期間中止後に後観察期間を設けた試験を実施した。同時に、歯肉縁下プラーク中の*L. salivarius*についても前回は定性的測定であったが今回は定量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より詳細に検討した。

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加することはない。しかし、LS1服用期間中は歯肉縁下プラーク内の*P. gingivalis*菌数を減少させる状態を維持することから、歯周病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、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* 菌数をリアルタイム 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 (図 2)。検出されなかった残りの 10% に関しても、8 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 20% まで減少した。LS1 服用時は口腔内全体の菌数が高いため、歯肉縁下プラーク中にも LS1 は存在することができる。しかし 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<sup>8)</sup>、歯肉縁下プラークに存在した LS1 も定着できずに、比較的短時間で死滅し、服用中止により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、LS1 は服用 4 週後に歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数が減少するが、*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 (図 1, 2)。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の存在が示されたと考えられる。*P. gingivalis* は莢膜<sup>11)</sup>、タンパク質分解酵素<sup>12)</sup>、リポ多糖<sup>13)</sup>、付着能<sup>14, 15)</sup> など、強い病原性を有していることから、もっとも重要な歯周病原菌であると考えられている<sup>16-18)</sup>。LS1 の服用により歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* が有意に減少したことは、歯肉縁下プラークの病原性を低下させていることになり、LS1 は歯周病のリスクを低減させていることを示すものである。

本臨床試験では低服用量である LS1  $2.0 \times 10^7$  服用の設定による試験も行った。あくまで LS1 の低量服用時の菌数の傾向を知るためであり、人数は 10 名程度と設定した。人数が少ないために有意差は認められないものの、*P. gingivalis* 菌数の減少は LS1  $2.0 \times 10^8$  服用群程著明ではないが、減少傾向を示しており、12 週目の段階で初診時菌数の約半数となった。歯肉縁下プラーク中の *L. salivarius* 菌数の推移についても LS1  $2.0 \times 10^8$  服用群と同様に、LS1 服用により菌数は増加し、服用を中止すると 77% の被験者で検出限界以下まで減少した。歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数の増減と *L. salivarius* 菌数との関係は LS1  $2.0 \times 10^8$  服用群と類似しており、服用した菌数が

1/10 であっても *P. gingivalis* 菌数の抑制に一定の効果があることが示唆された。

前報の臨床所見において、LS1 服用群とプラセボ服用群とを比較すると、LS1 服用群の方がプラセボ服用群よりも各臨床パラメータ (BOP, PD, PCR) の改善の程度は大きかった。しかし今回の臨床試験において、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、両群間には顕著な差は認められなかった。臨床試験参加被験者の初診時における診査所見を比較すると、今回の臨床試験被験者は、前回の臨床試験被験者より平均年齢は 10 歳以上高く、最大 PD の平均値も約 1mm 深かった。すなわち今回は前回に比べて、年齢層も高く症状も進行した被験者を対象にしている。一般に歯周病は慢性細菌感染症であることから、歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌数が減少すれば、時間の経過と共に炎症が消失して歯周組織が修復され、その結果各臨床パラメータが改善すると考えられる。この歯周病巣の炎症消失及び組織修復の一連の治癒過程に大きな影響を及ぼす因子として、歯周病の進行度があげられる。今回の臨床試験被験者は前回に比べ年齢層も高く症状の進行した被験者を対象にしたことから、LS1 服用により *P. gingivalis* が減少しても、その後の治癒が起こりにくい可能性がある。そして、このことが今回の観察期間中に臨床パラメータにおいて LS1 服用群とプラセボ服用群との間に有意な差が認められなかった原因と思われる。また、プラセボ服用群における一定の改善は、定期的な口腔内診査による口腔衛生への関心の高まりや、錠剤服用による唾液量の増加などが原因ではないかと推測される。LS1 服用群における歯周病原菌減少が、歯周病の臨床症状に与える影響については、より軽度な症例での検討やさらに長期間に及ぶ観察が必要と思われる。

LS1 低量服用群では、臨床症状に変化が見られなかった。*P. gingivalis* 菌数の減少傾向は LS1 低量服用群では緩やかであった。臨床症状の改善は菌数が減少し、病原物質が病巣部位より除かれた後に起こる。低量服用群では 12 週間では菌数の減少によってリスク自体は低減しているものと考えられるが、菌数の減少が緩やかであったために症状の改善にまでは至らなかったものと考えられる。

また、本研究では LS1 は *P. gingivalis* 菌数は減少させたものの *T. forsythensis* 菌数は変化しなかった。前報でも *T. forsythensis* と *T. denticola* 菌数は変化が見られなかった。LS1 が *P. gingivalis* を殺菌する作用機序は LS1 産生する乳酸が *P. gingivalis* を殺菌するというものであった<sup>19)</sup>。しかし、*T. denticola* は酸に強

いため<sup>20)</sup>前報では菌数は減少しなかったと考えられる。*T. forsythensis* は液体培養が非常に困難であるため、酸感受性に関する知見は得られていないが、乳酸に対する感受性が低いためにLS1による菌数減少は起こらないものと考えられる。

LS1は乳酸を産生する為、齲蝕の発生、進行が懸念される<sup>21)</sup>。しかしすでに報告<sup>8)</sup>したようにLS1は周囲の乳酸濃度上昇によって死滅するため、過剰な乳酸の産生は起こらず、齲蝕を引き起こすには到らないと考えられる。前報同様、本研究においても新たな齲蝕発生や進行は12週間の観察期間中では見られなかった。また、同時に実施した唾液のpH値測定でも、服用前と服用4週後の比較でpH値の有意な変化は観察されなかった(LS1服用群  $7.3 \pm 0.41 \rightarrow 7.2 \pm 0.44$  (n=43)  $p > 0.05$ , プラセボ服用群  $7.3 \pm 0.36 \rightarrow 7.2 \pm 0.44$  (n=44)  $p > 0.05$ )。さらに、多くの被験者で服用を中止すると歯肉縁下プラーク中の*L. salivarius* 菌数が検出限界以下にまで減少することからも、安全性は高いと考えられる。

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<sup>22)</sup>。抗菌剤等はバイオフィーム中へ浸透することができず、殺菌効果を発揮することができない<sup>23, 24)</sup>。しかし、前報<sup>7)</sup>および本研究においてLS1は歯肉縁下のバイオフィームに取り込まれ、歯周病原性の高い*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。

## 文 献

- 1) Donnenfeld OW, Glickman I: A biometric study of effects of gingivectomy. J Periodontol, 37 : 447-452, 1966.
- 2) Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM: Microbiol biofilms. Ann Rev Microbiol. 49 : 711-745, 1995.
- 3) Anwar H, Strap J, Consterton J: Establish of aging biofilms : a possible mechanism of bacterial resistance to antimicrob therapy. Antimicrob Agents Chemother, 36 : 1347-1351, 1992.
- 4) Jensen E, Kharazmi A, Larn K, Costerton J : Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Infect Immun, 58 : 2383-2385, 1990.
- 5) Rodrigues RM, Goncalves C, Souto R, Feres-Filho EJ, Uzeda M, Colombo AP : Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. J Clin Periodontol, 31 : 420-427, 2004.
- 6) Fuller R : Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 66 : 365-378, 1989.
- 7) 松岡隆史, 菅野直之, 伊藤公一, 古賀泰裕 : *Lactobacillus salivarius* TI2711の服用が臨床症状およびプラーク中の歯周病原菌に及ぼす効果, 日歯周誌, 47 : 194-202, 2005.
- 8) 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 Periodontal, 45 : 105-112, 2003.
- 9) O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE : The plaque control record. J Periodontol, 43 : 38, 1972.
- 10) Kaufman E, Lamster IB : Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review, J Clin Periodontol, 27 : 453-465, 2000.
- 11) 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.
- 12) Gronbaek EV : Bacterial degradation of immunoglobulin A1 in relation to periodontal disease. APMIS Suppl, 87 : 1-54, 1999.
- 13) 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.
- 14) Amano A : Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells : implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol, 74 : 90-96, 2003.
- 15) Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ : *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. Infect Immun, 69 : 3048-3056, 2001.
- 16) Slots J : Update on *Actinobacillus actinomyetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. J Int Acad Periodontol, 1 : 121-126, 1999.
- 17) Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford

- RG, Machtei EE, Nordery OM, Genco RJ : Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicator for attachment loss. J Periodontol, 65 : 260-267, 1994.
- 18) 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.
- 19) 松岡隆史, 中西睦, 相場勇志, 古賀泰裕 : *Lactobacillus salivarius* TI2711 による *Porphyromonas gingivalis* 殺菌の作用機序の解明, 日歯周誌, 46 : 118-126, 2004.
- 20) Grenier D : Antagonistic effect of oral bacteria towards *Treponema denticola*. J Clin Microbiol, 34 : 1249-1252, 1996.
- 21) Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N : Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol, 42 : 3128-3136, 2004.
- 22) Marsh P, Bradshaw D : Dental plaque as a biofilm. J Industrial Microbiol, 15 : 169-175, 1995.
- 23) Anwar H, Strap J, Costerton J : Susceptibility of biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal actions of whole blood and serum. FEMS Microbiol Lett, 92 : 235-242, 1992.
- 24) Anwar H, Strap J, Consterton J : Establish of aging biofilms : a possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrob Agents Chemother, 36 : 1347-1351, 1992.
-