

虫歯・歯周病を抑えるL8020乳酸菌を利用 産学連携で新しいタブレットが誕生



2010年10月



歯磨きしなくても虫歯にならない

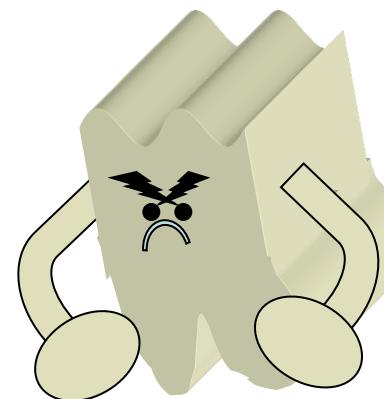
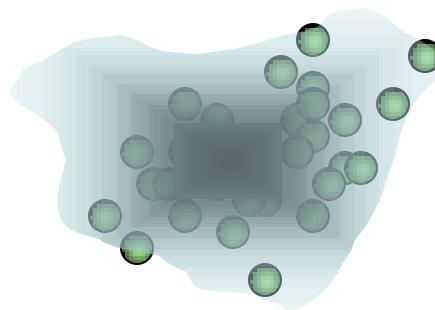
昭和47年6月29日生まれ、30歳、女性 FJ

○○病院



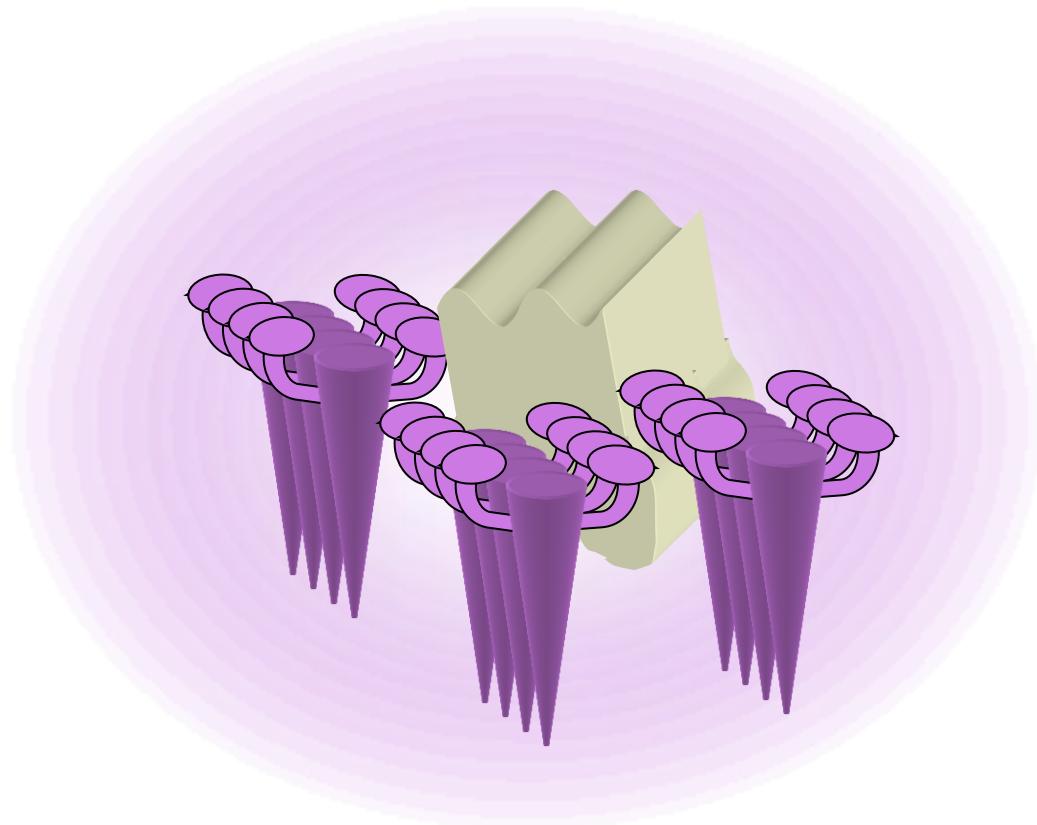


むし歯の治療歴のないFJさん、昭和47年6月29日生まれ、30歳、女性の口腔内写真。必ずしも口腔内衛生状態は良いわけではない。

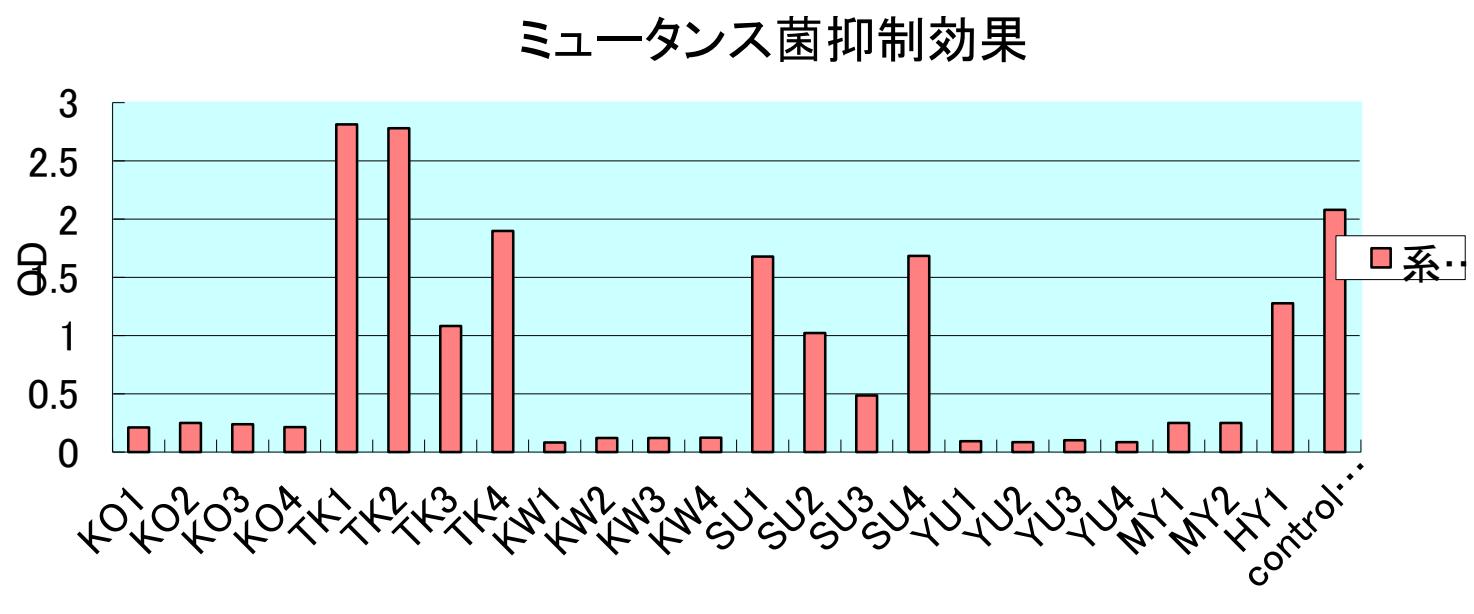


むし歯菌がない

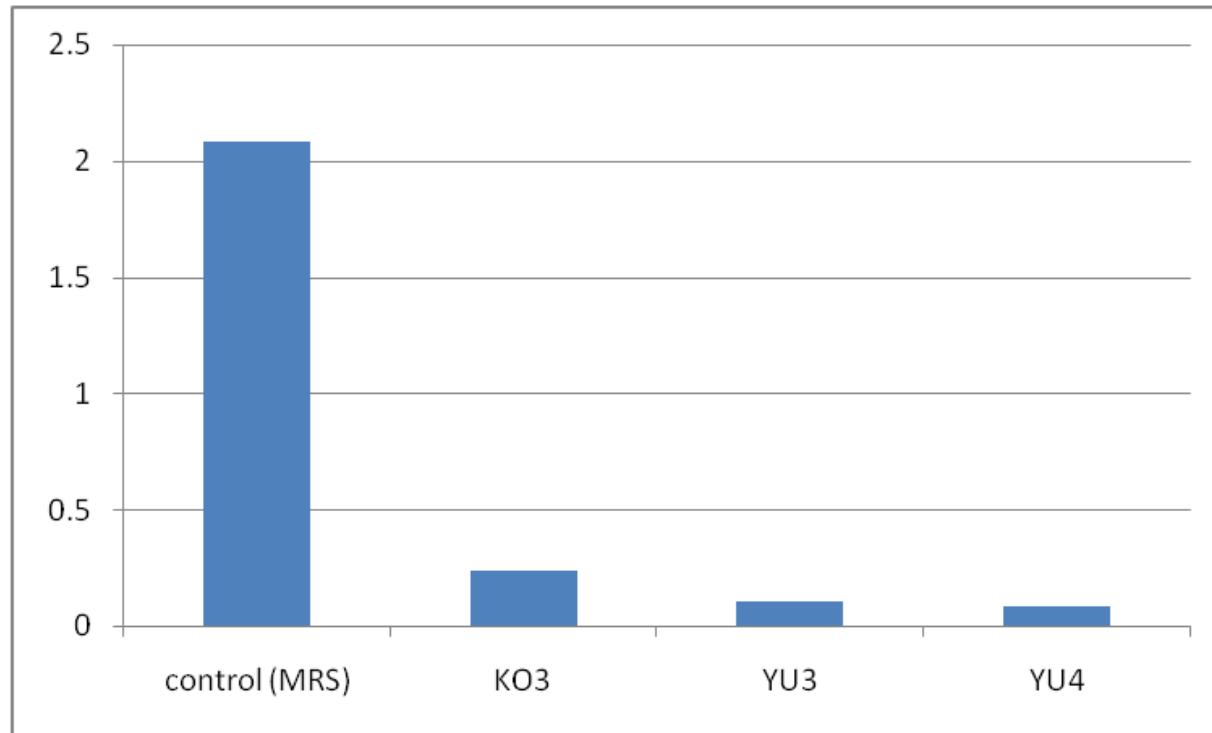
ひよつとして、ミュータンス菌を抑制する
乳酸菌が口腔内にいるのではないか？



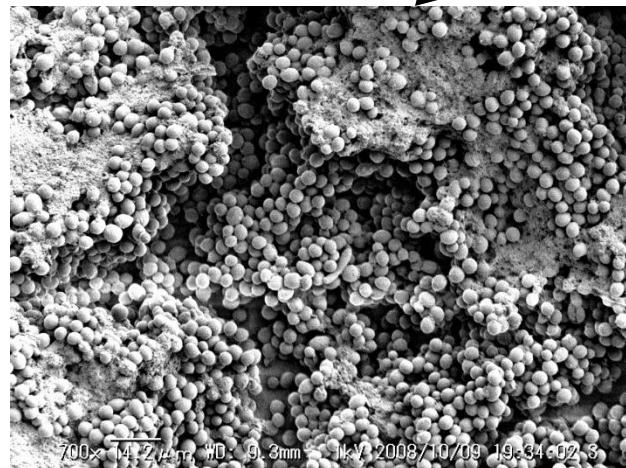
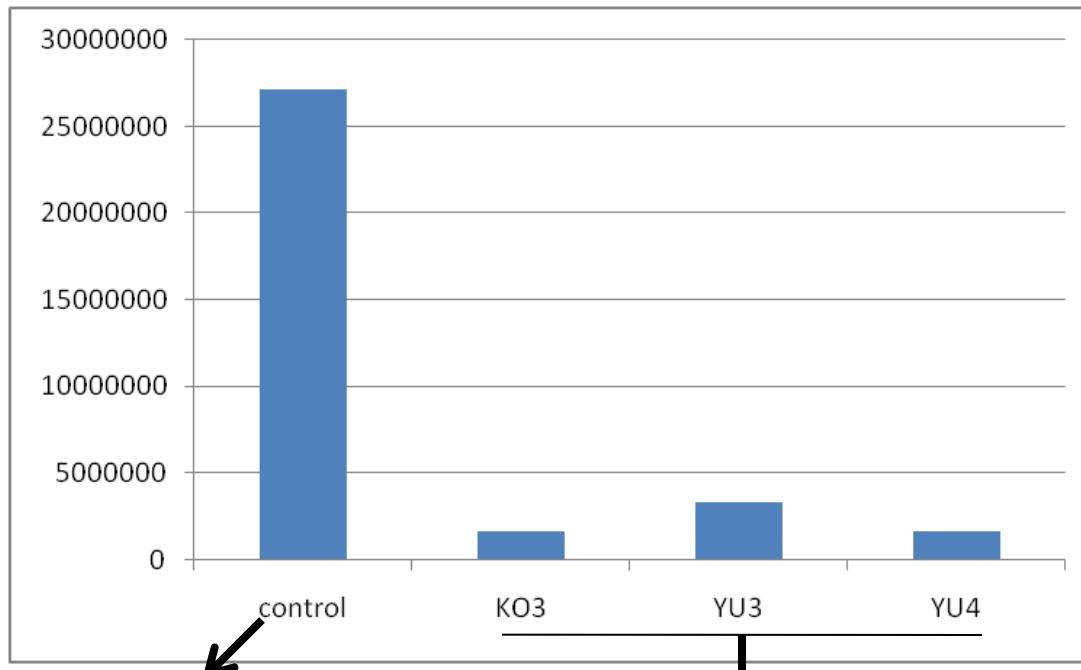
13名の口腔内から 42菌株



歯周病菌 (*P. gingivalis*) に対する抑制効果



カンジダバイオフィルム(*C. albicans* GDH18株)に対する抑制効果



>KO3

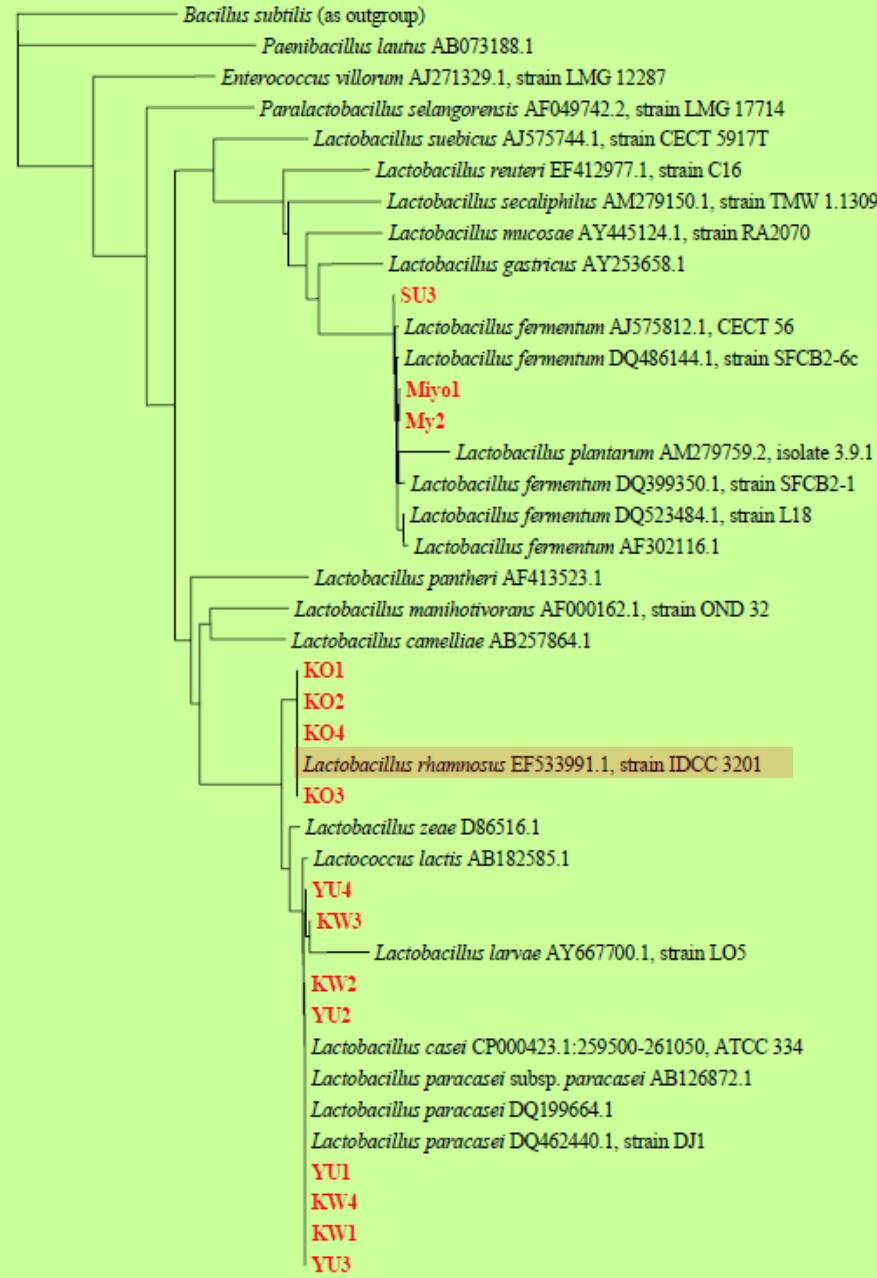
TCAGGATGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTT
TGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTGATTTAACGGAGTGGCG
ACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCCTAACGGGATAACATT
GGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTCTTGGC
TGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGC
TAGTTGGTGANGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAC
GAGGTTGATCGGCCACATTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGAACTCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAAC
GCCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTGGGTGTAAGACTCTGTTGGAGA
AGAATGGTCGGCAGAGTAACGTGTCGGCGTACGGTATCCAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTATCGGATTATTGGCGTAAGCGAGCGCAGCGGTTTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCTCGGCTAACGAGGAAGTGCATCGGAAACTGGG
AACTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGGCGCTGTCGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCTGAAAGCATGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
GGTAGTCCATGCCGTAACCGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCC
CTTCAGTGCCGAGCTAACGATTAAGCATTCCGCCCTGGGGAGTACGACC
GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTAACCGAAGCAACCGCGAAGAACCTTACAGGTCTGACAT
CTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTCCCTCGGGGCAAATGACAG
GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTATGACTAGTGTCCAGCATTAGTTGGCACT
CTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTAAA
TCATCATGCCCTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTA
CAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTTAAAGCATTCTC
AGTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGCTTGTACACA
CCGCCCGTCACACCAGAGAGTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAAC
CCTTTAGGGAGCGAGCCGCTAACGGTGGACAAA

[BLAST top 20]

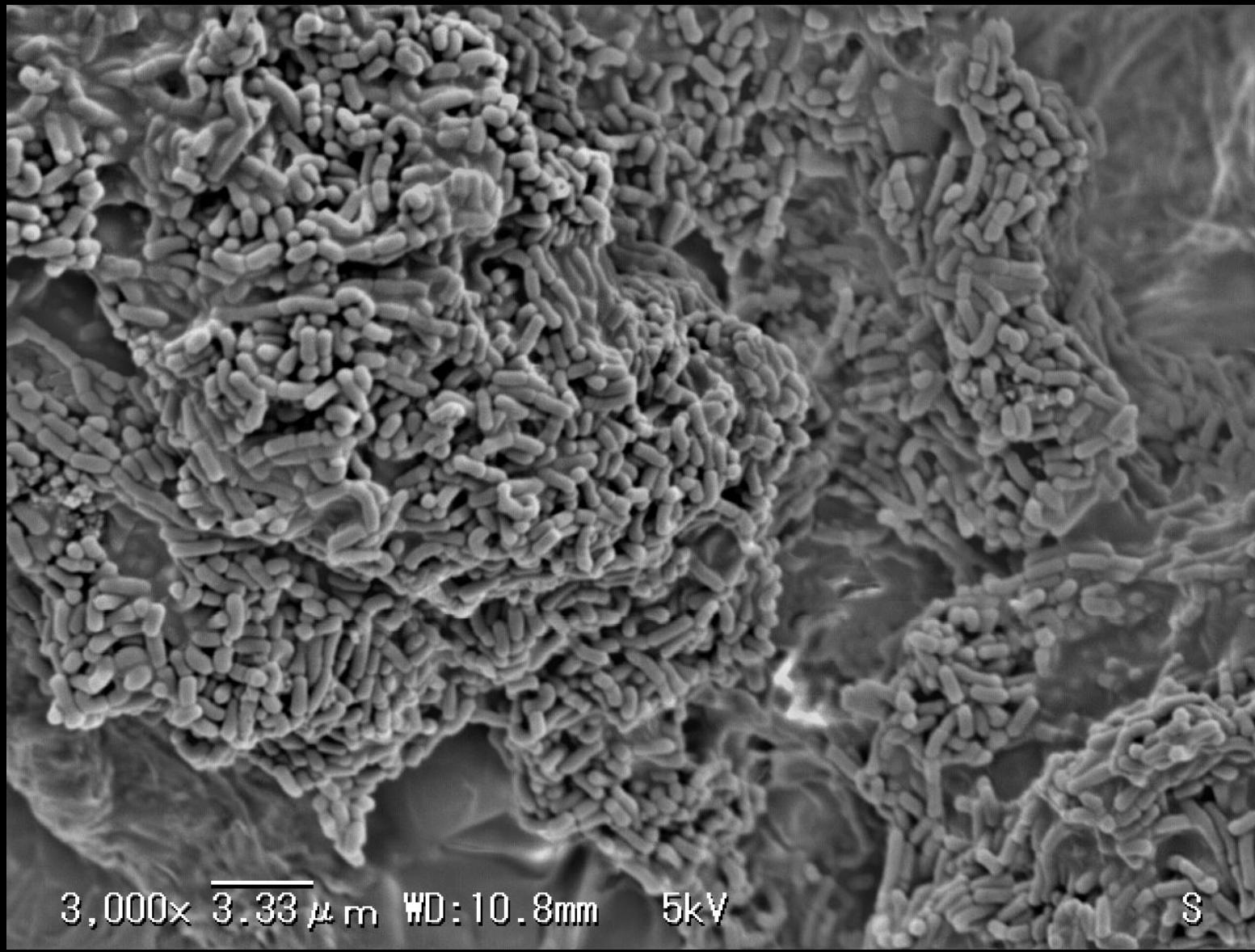
Score E

(Bits) Value

gb EF533991.1	Lactobacillus rhamnosus strain IDCC 3201 16S r...	2743	0.0
gb EF534204.1	Lactobacillus rhamnosus strain LV108 16S ribos...	2737	0.0
gb EF510433.1	Uncultured bacterium clone P2D1-508 16S riboso...	2732	0.0
emb AM491821.1	Lactobacillus rhamnosus partial 16S rRNA gene, i	2732	0.0
gb AF526388.1	Lactobacillus casei 16S ribosomal RNA gene, parti	2732	0.0
gb AY363376.1	Lactobacillus sp. rennanqifly10 16S ribosomal ...	2732	0.0
gb AY363384.2	Lactobacillus sp. rennanqifly16 16S ribosomal ...	2726	0.0
dbj AB288235.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, pa...	2724	0.0
gb AY773946.1	Lactobacillus sp. BCRC16000 16S ribosomal RNA ...	2721	0.0
gb AY675254.1	Lactobacillus rhamnosus strain LR2 16S ribosom...	2721	0.0
gb AY094065.1	Lactobacillus sp. IDLAc 16S ribosomal RNA gene...	2721	0.0
gb AY363373.2	Lactobacillus sp. rennanqifly15 16S ribosomal ...	2715	0.0
gb AF243146.1	Lactobacillus rhamnosus strain F11 16S ribosom...	2712	0.0
gb AY699577.1	Lactobacillus casei strain LC2 16S ribosomal R...	2708	0.0
gb AY370680.1	Lactobacillus rhamnosus strain LCG SHARDINGER ...	2708	0.0
dbj D16552.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA	2708	0.0
gb AY675253.1	Lactobacillus rhamnosus strain LR3 16S ribosom...	2704	0.0



Phylogenetic tree



3,000 \times 3.33 μ m WD:10.8mm 5kV

S

以下追加データ

スターとして *S. thermophilus* を用いて、*L. bulgaricus* と *L. rhamnosus* KO3 株を用いて発酵させ L8020 ヨーグルトを作成した。
また、スターとして *S. thermophilus* を用いて、*L. bulgaricus* のみにより プラセボ ヨーグルトを作成した。
その組成を下記に示す。

L8020 ヨーグルト

配合成分

100gあたり

エネルギー

たんぱく質

脂質

炭水化物

ナトリウム

カルシウム

乳脂肪分 2%

無脂乳固形

プラセボ ヨーグルト

6Kcal

5g

3g

3g

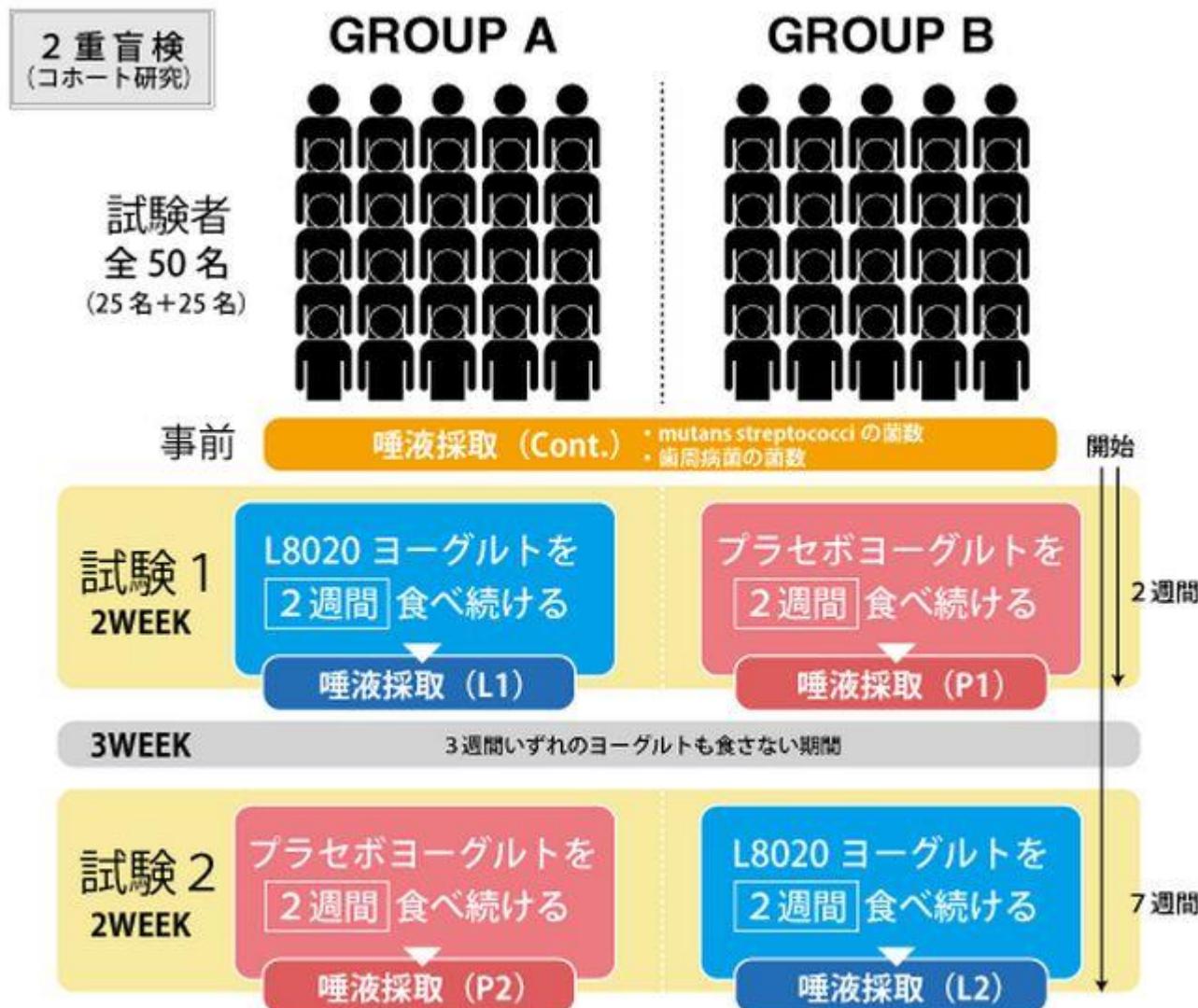
22mg

22mg

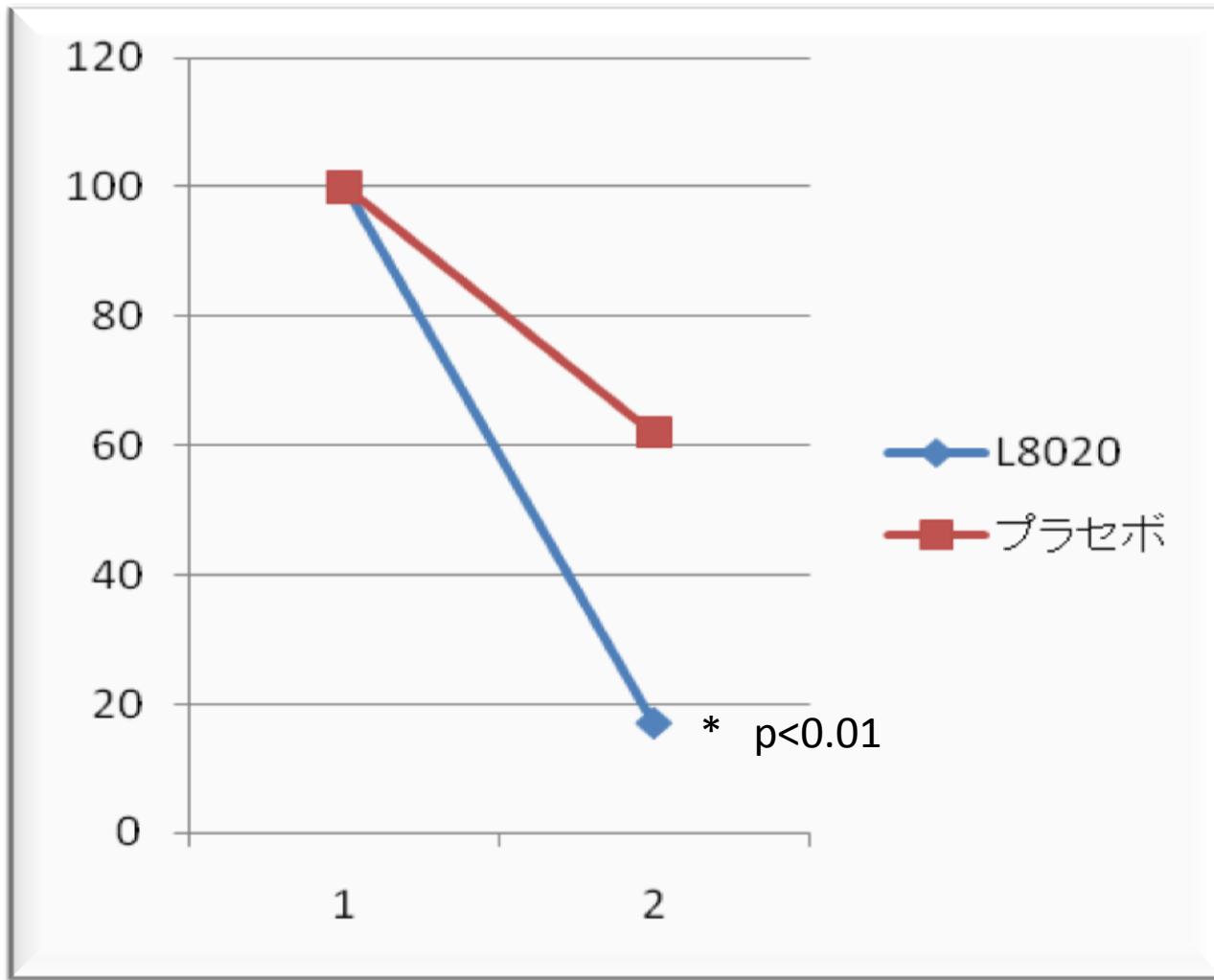
0.5%



Q. L8020ヨーグルトを食べると 口の中のむし歯菌・歯周病菌が減るか？



ミュータンス菌の口腔内保菌の変化

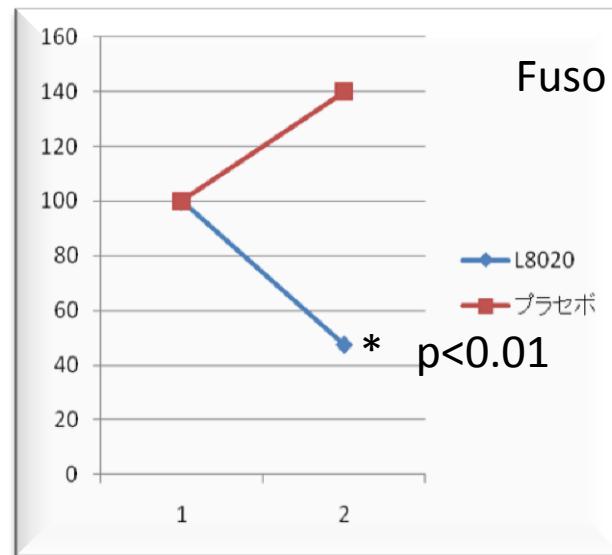
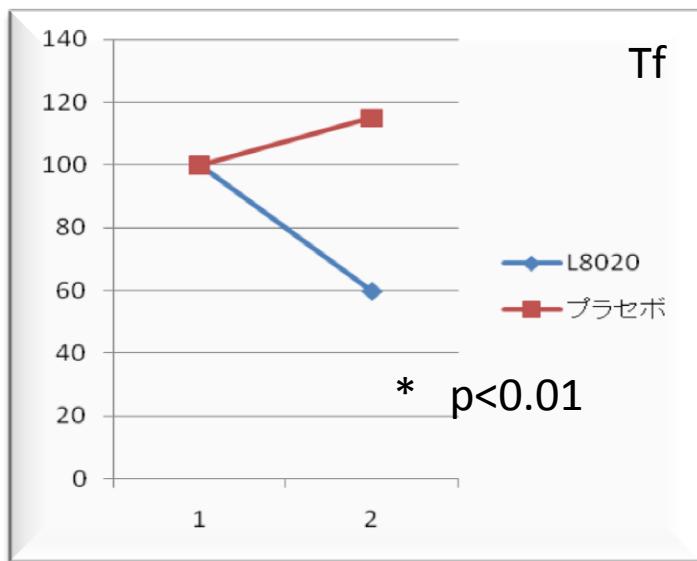
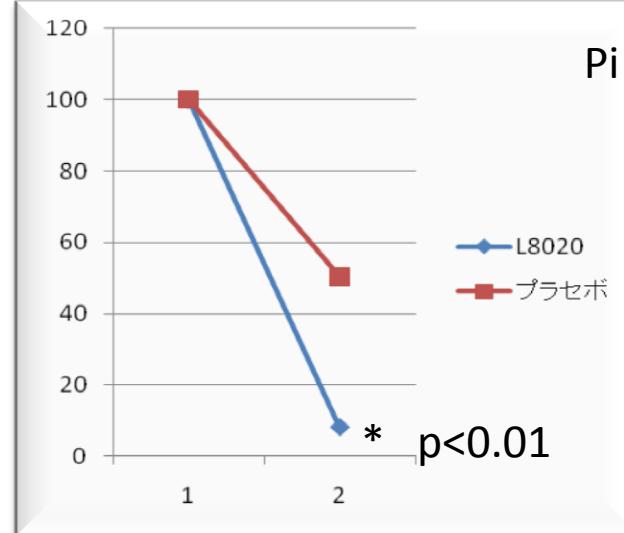
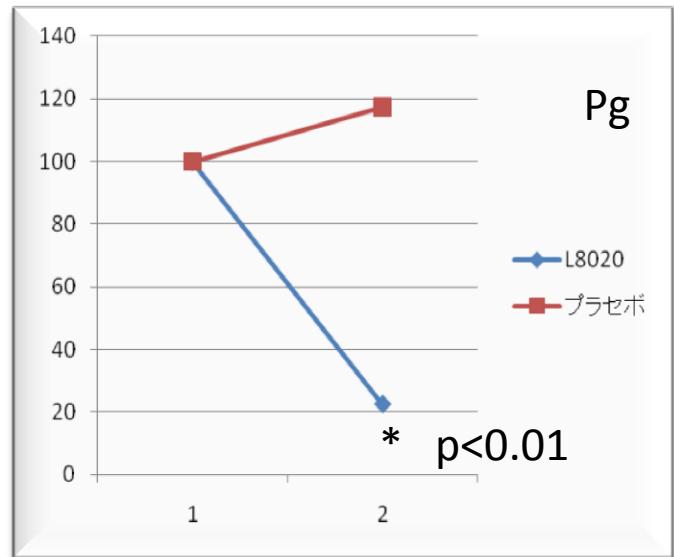


齒周病菌

It is reported that periodontal diseases are commonly associated with *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Dialister pneumosintes*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium* species, *Selenomonas sputigena*, *Peptostreptococcus micros* and spirochetes, including *Treponema denticola* (Kamma et al 2004).

Porphyromonas gingivalis,
Prevotella intermedia,
Tannerella forsythia,
Fusobacterium species

歯周病菌の口腔内保菌の変化



ORIGINAL ARTICLE

■ xxxx

Bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* L8020 decreases the oral carriage of *Streptococci mutans* and the burden of periodontal pathogens

Hiroki Nikawa¹, Yu Tomiyama¹, Minako Hiramatsu¹, Kaori Yushita¹, Yuko Takamoto¹, Hitomi Ishii¹, Sumiyo Mimura¹, Aya Hiyama¹, Hisako Sasahara¹, Kazuko Kawahara¹, Seicho Makihira¹,
Takahiro Satoda¹, Toshinobu Takemoto¹, Hiroshi Murata², Yuichi Mine¹ & Tsuyoshi Taji¹

¹ Department of Oral Biology and Engineering, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

² Department of Prosthodontics, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Lantibiotics

Lantibiotic	Producing Strain	Reference
Nisin A	<i>Lactococcus lactis</i> NIZOR5, 6F3, NCFB894, ATCC11454	Gross & Morell (1971)
Nisin Z	<i>Lactococcus lactis</i> N8, NIZO22186	Mulders et al. (1991); de Vos (1993)
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ481, ADRIA85LO30	Piard et al. (1993), van den Hooven et al. (1996)
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147, IFLP105	Ryan et al. (1996), Martinez-Cuesta
Lactocin S	<i>Lactobacillus sake</i> L45	Mortvedt et al. (1991)
Plantaricin C	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Turner et al. (1999)
Plantaricin W	<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 2379	Holo et al. (2001)
Cytolysin	<i>Enterococcus faecalis</i> FA22	Booth et al (1996)

バクテリオシン(Bacteriocin)は、細菌類が產生する、おもに同種や類縁種に対する抗菌活性をもったタンパク質やペプチドの総称。

通常、個々のバクテリオシンの抗菌スペクトルは狭く、同属から同門程度である。

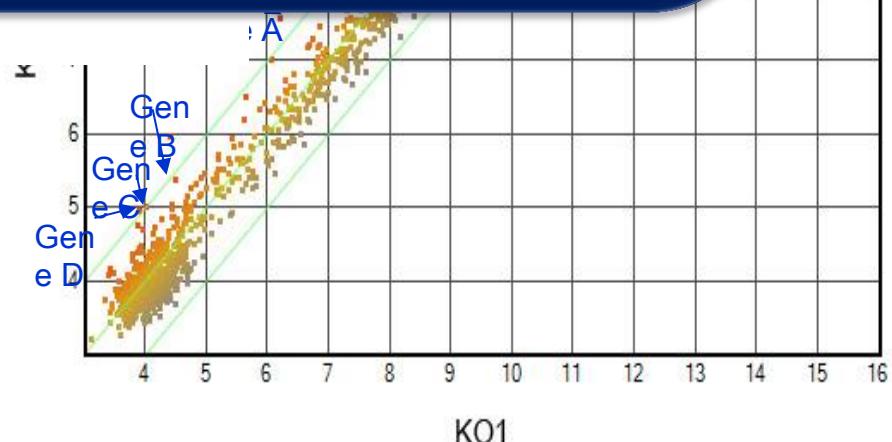
Bacteriocin → Genome解析

Sequence 19
atgaagaaggc a
ctatggctgg cg
tacgtcatta ttg
agaaaatttgtt ga

Sequence 12
atgaccaaag ta
gctcgcgctc ag
agttaa 126

atggccaaag cc
gctcacgctc ac
ttcgttatcg aaaag

- 抗菌スペクトルが広い → 哺乳類(ヒト)由来の塩基性抗菌ペプチドに類似している
- 疎水性アミノ酸・塩基性アミノ酸
- pI値が高い



Bacteriocin → Genome解析

Sequence 19
atgaagaaggc a
ctatggctgg cg
tacgtcattttt tg
agaaaatttgtt ga

Sequence 12
atgacccaaagg t
gctcgcgctc ag
agttaa 126

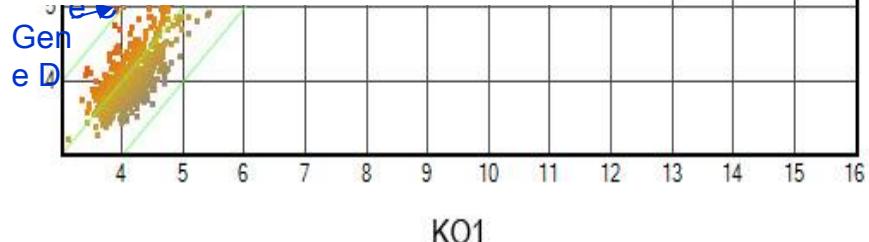
atggccaaagg c
gctcacgctc ac
ttcggtatcg aaaab

- 抗菌スペクトルが広い → 哺乳類(ヒト)由来の塩基性抗菌ペプチドに類似している
- 疎水性アミノ酸・塩基性アミノ酸
- pI値が高い

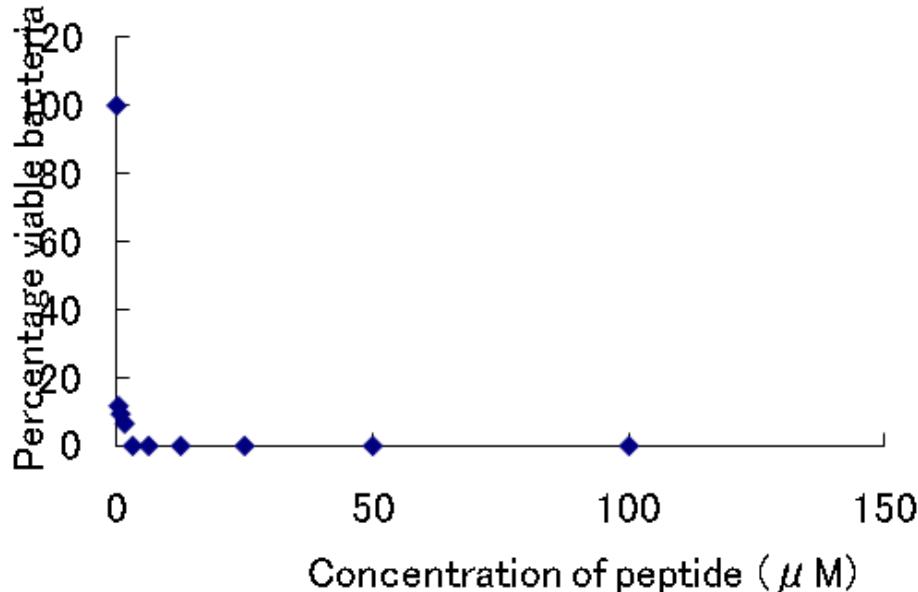
LRH_05489.pep
MKKHSRHSEGVWLDIVCCISLWLAVGSLVAAATVIHINRPYVIIVLALAFCAIGETLTVFERNW

HMPREF0539_2969.pep Isoelectric Point = 12.90
MAKARPSRPRPLTLRSLTAPAHAKKWASRWILSMRLARVFGIEKPHG

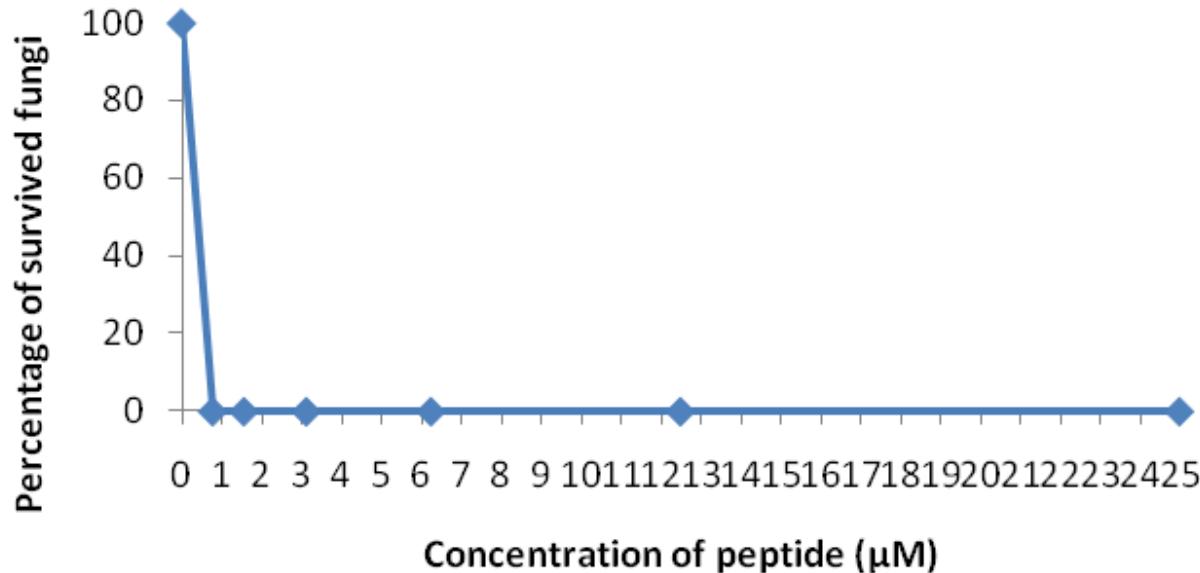
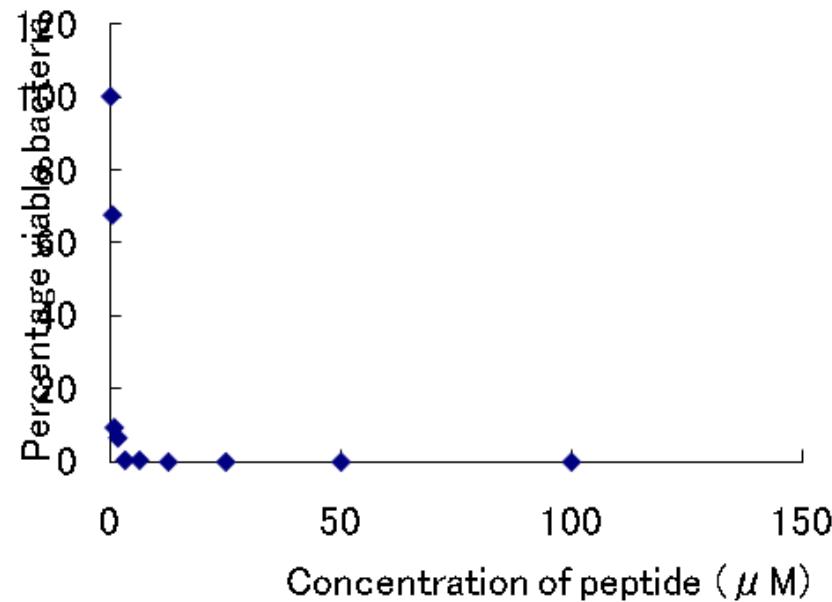
HMPREF0539_1169.pep Isoelectric Point = 12.38
MTKVRSSRLRPLTLRLSAPARAQFLTIACRAILRYDLINS

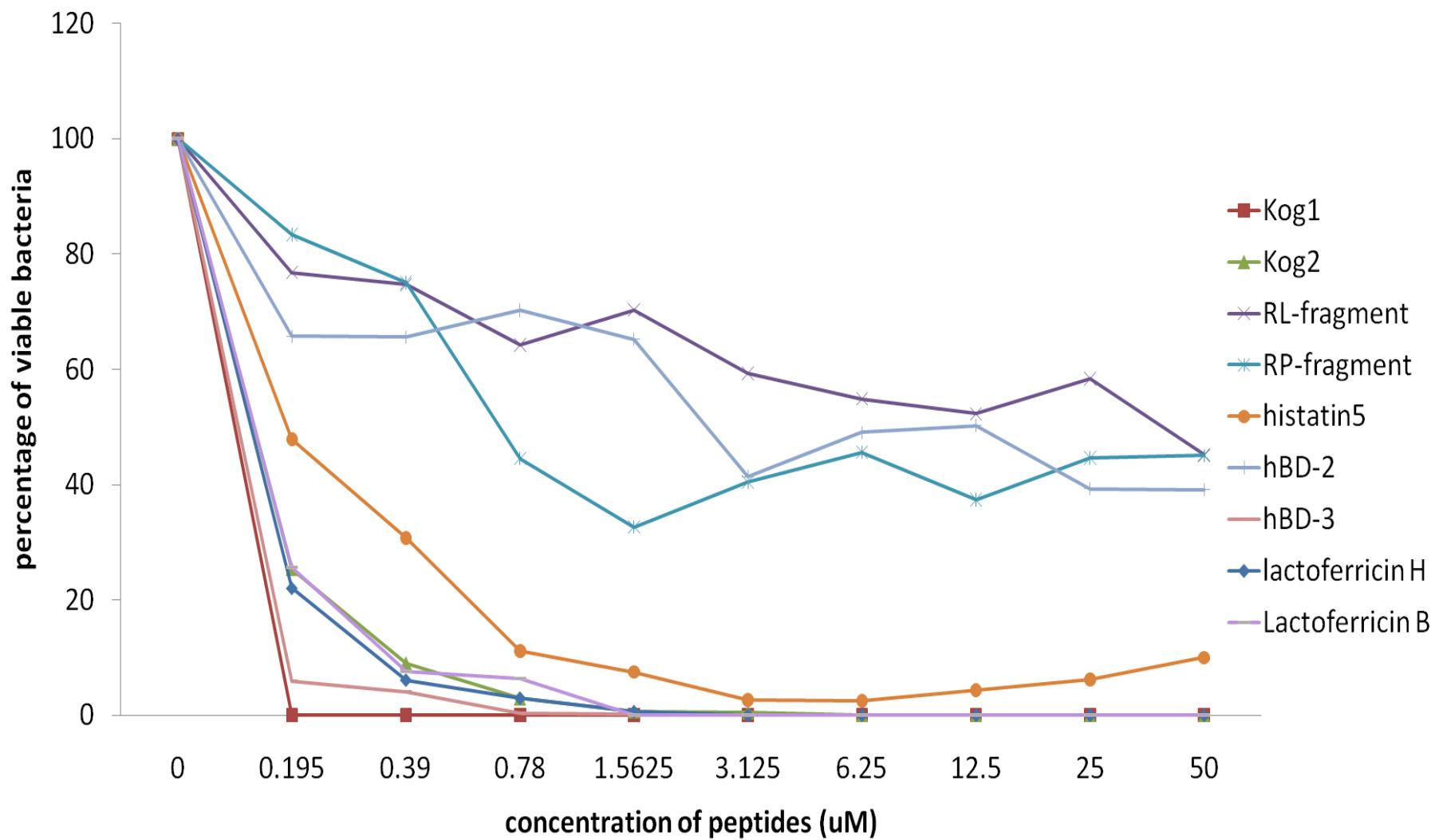


kog1



kog2

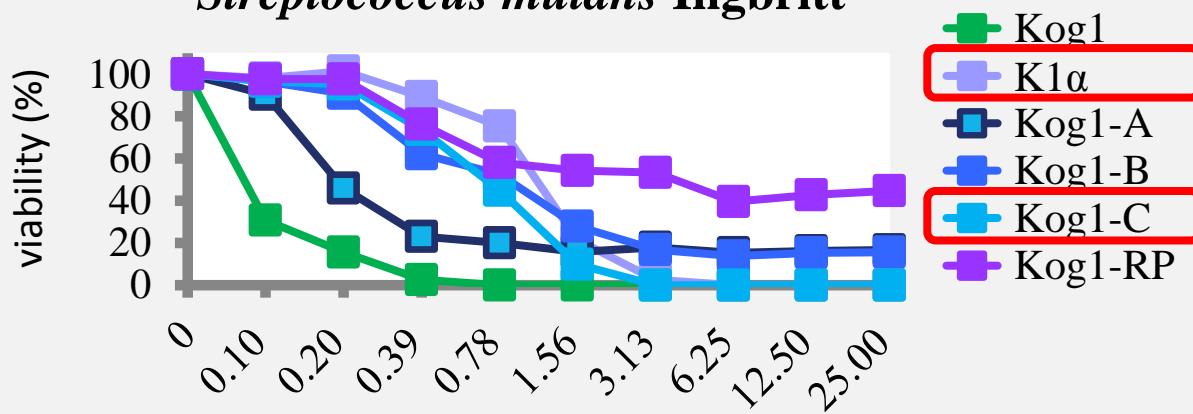




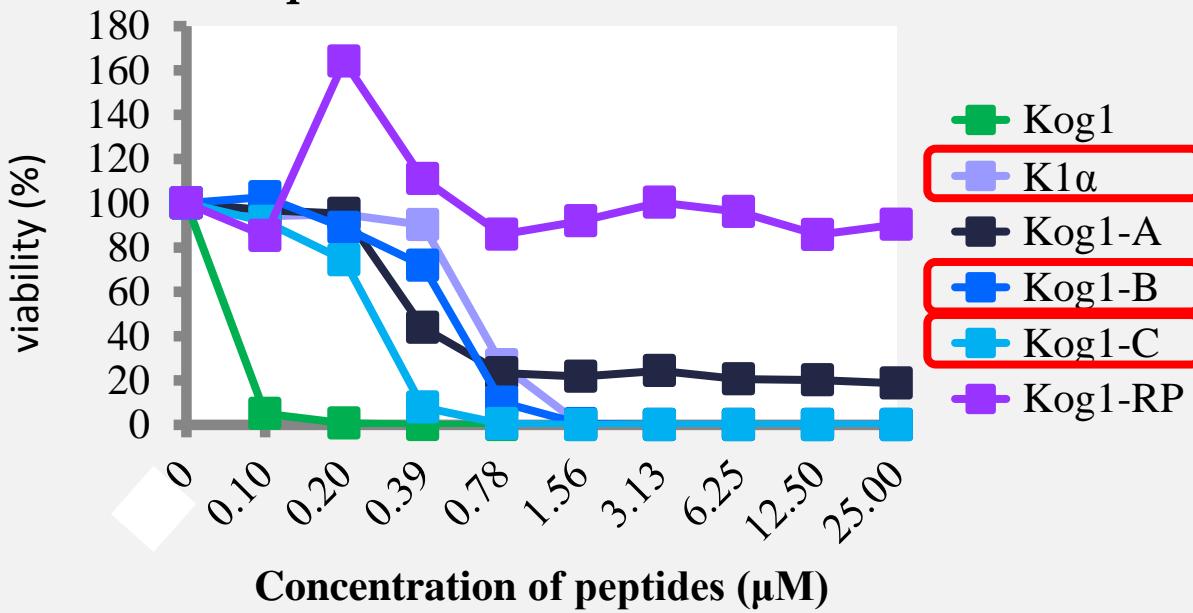
Peptide	Sequence	pI	MW	AA
Kog1	MAKARPSRPRPLTLRSLTAPAHAHKKWASRWILSMRLARVFGIEKPHG	12.90	5485.50	48
K1α	MAKARPSRPRPLTLRSLTAPAHAHKKWASRWILSMRLARVFGIEKPHG	12.31	2662.20	22
Kog1-A	MAKARPSRPRPLTLRSLTAPAHAHKKWASRWILSMRLARVFGIEKPHG	12.48	1750.14	15
Kog1-B	MAKARPSRPRPLTLRSLTAPAHAHKKWASRWILSMRLARVFGIEKPHG	12.02	2003.30	17
Kog1-C	MAKARPSRPRPLTLRSLTAPAHAHKKWASRWILSMRLARVFGIEKPHG	11.73	3004.60	25
Kog1-RP	MAKARPSRPRPLTLRSLTAPAHAHKKWASRWILSMRLARVFGIEKPHG	12.30	1757.07	16
Kog2	MTKVRSSRLRPLTLRLSAPARAQFLTIACRAILRYDLINS	12.39	4686.60	41

本実験に用いた抗菌ペプチドのアミノ酸配列 (Sequence), 分子量 (MW), 等電点 (pI), アミノ酸残基数 (AA) を示す

Streptococcus mutans Ingbritt

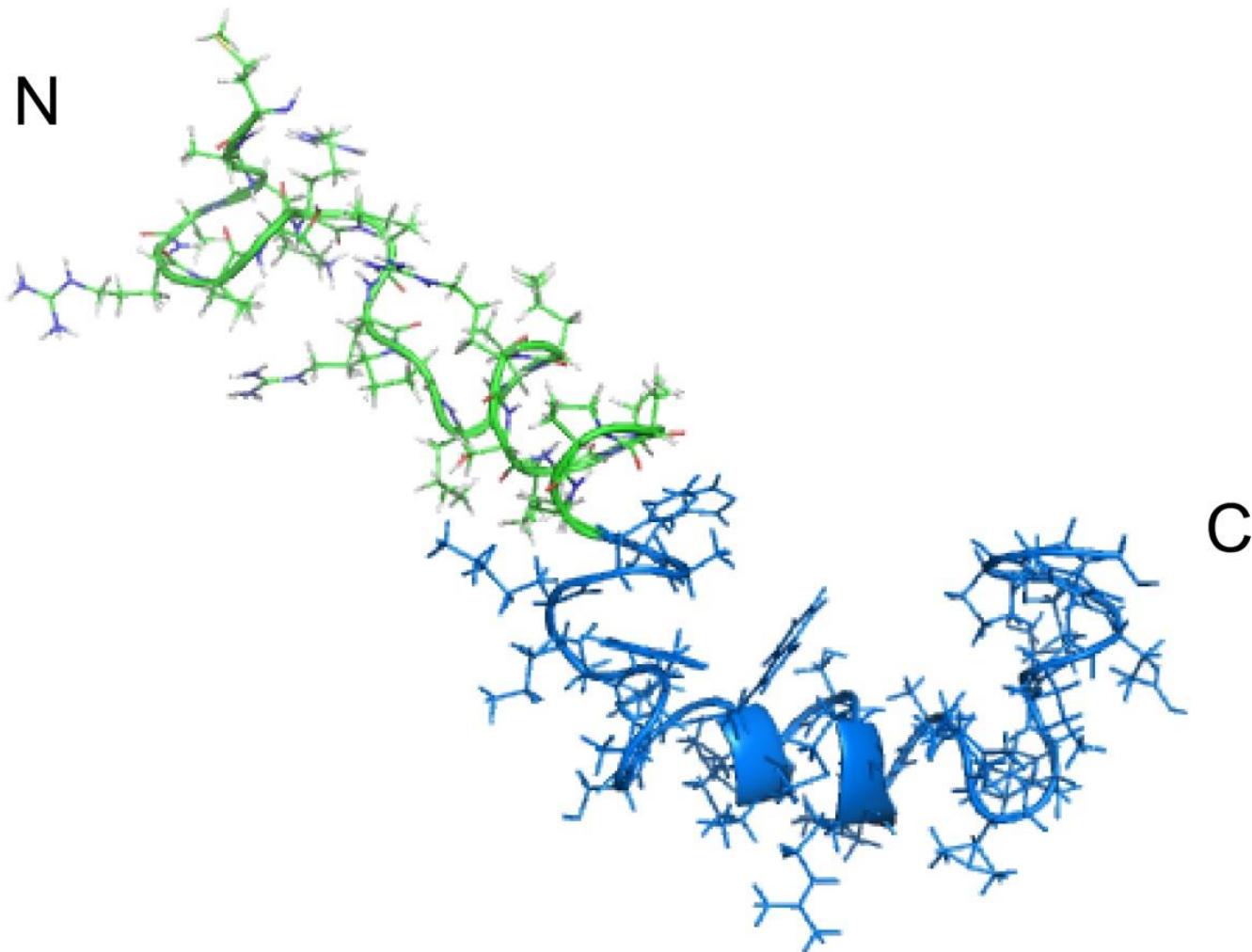


Streptococcus sobrinus B13



Concentration of peptides (μM)

ミュータンスレンサ球菌に対する抗菌性



residues 22-48

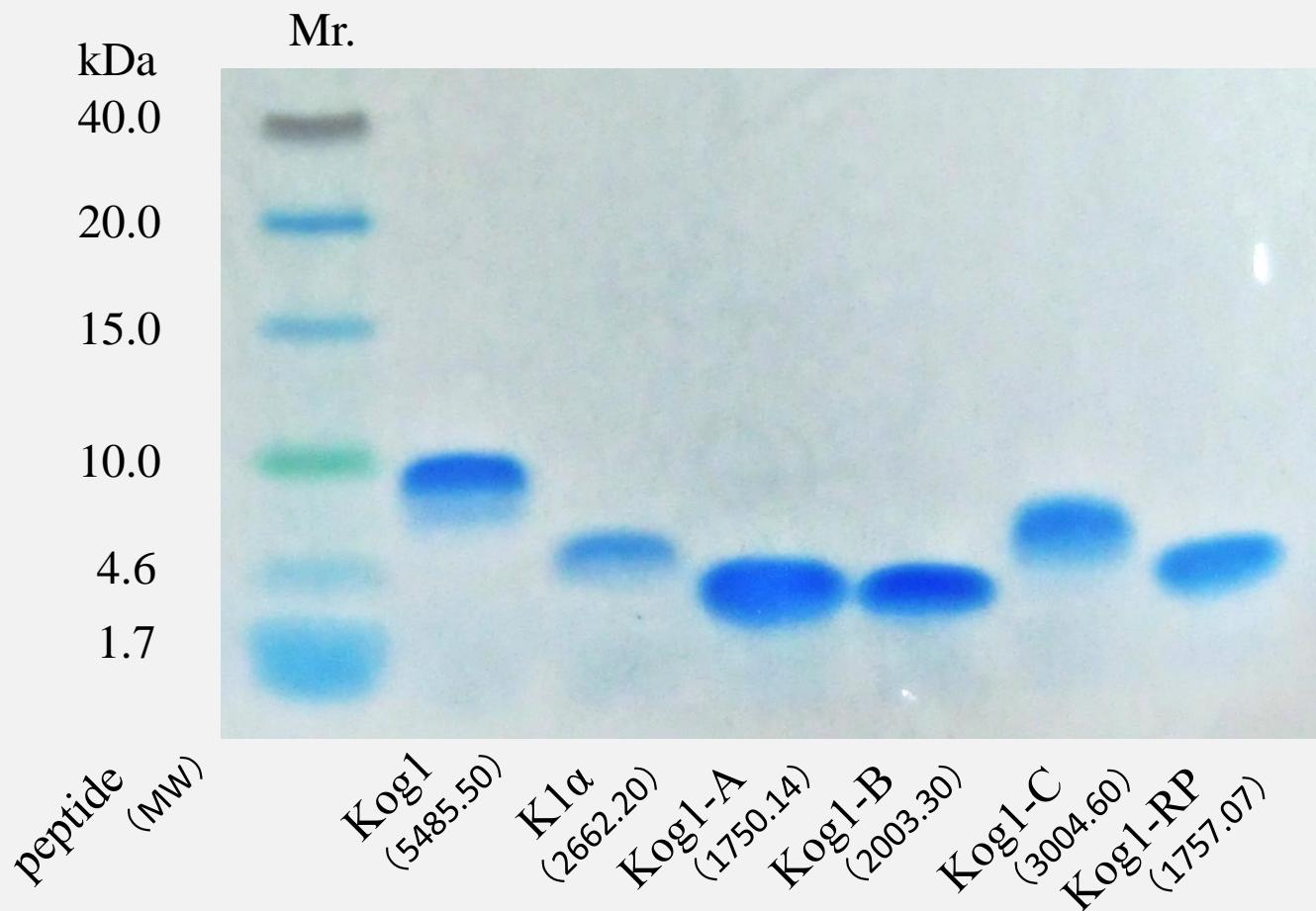
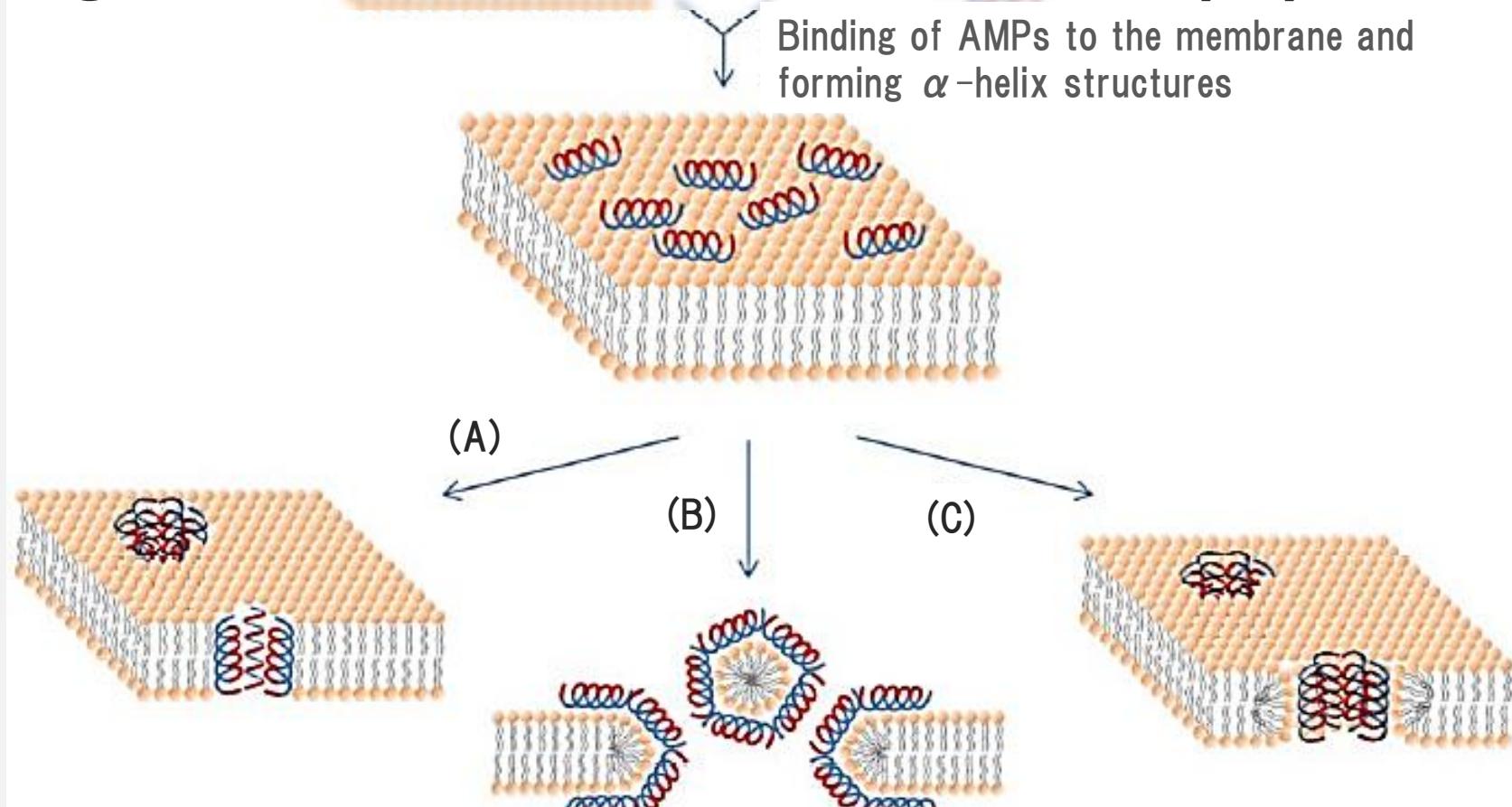


図2. Tricine-PAGEによるバンドの検出結果
Mr. はマーカーを示す
Tricine-PAGE後, CBB染色を行った

Cell membrane

AMPs in aqueous solution

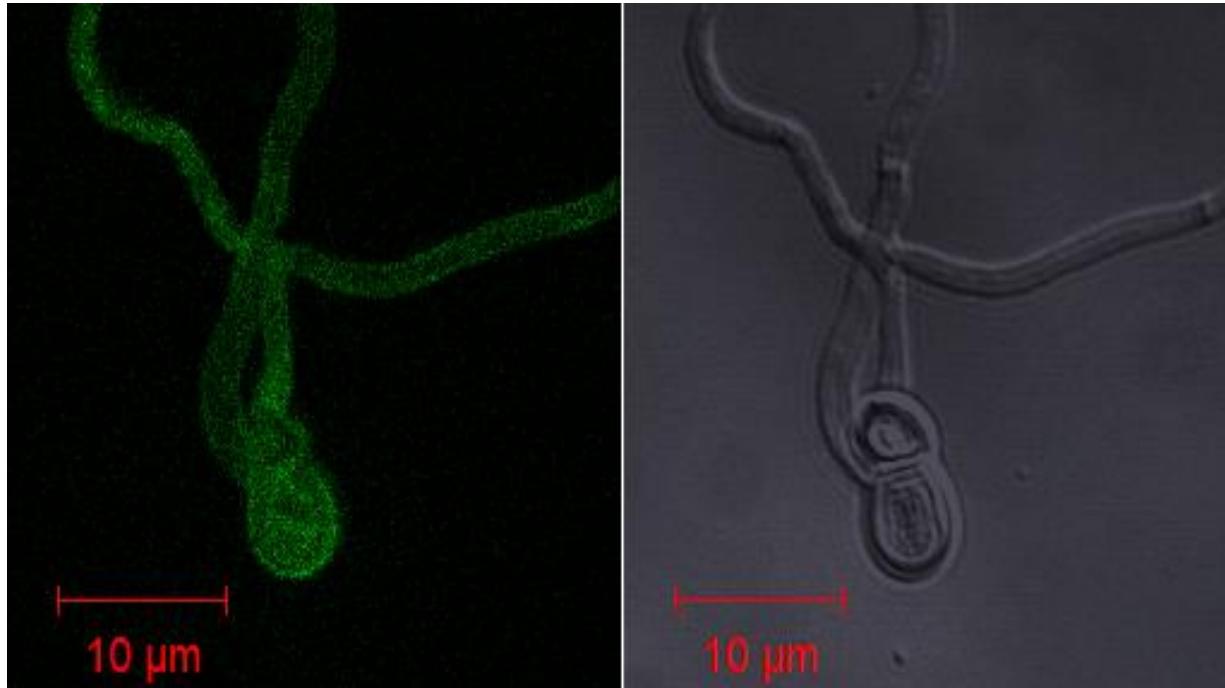
(eg.)Mechanism of antimicrobial peptides



Bahar, A. A., et al.,(2013). *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.

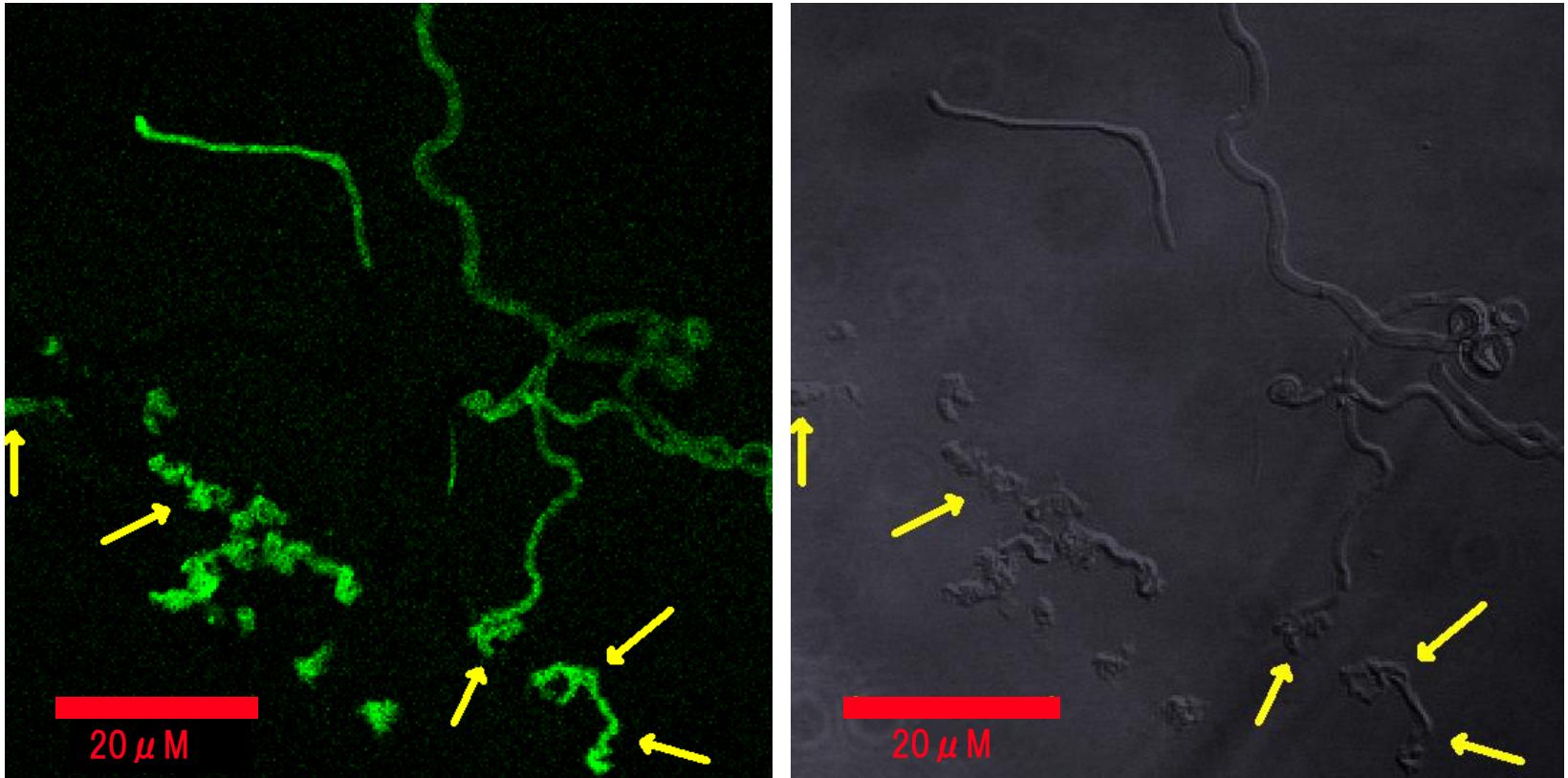
This is the possible mechanisms of antimicrobial peptides, and Kog1 might kill the microorganisms through similar manner.

FITC-labeled Kog1 and Candida (3min)



When we used the FITC-labeled Kog1, Kog1 gathers candida cells within 3min.

FITC-labeled Kog1 and Candida (5min)



Then Candida cells (including hyphae) are destroyed by Kog1.

歯周病患者の症例

患者： 42歳 女性

主訴： 奥歯が腫れて痛い

—初診時処置—

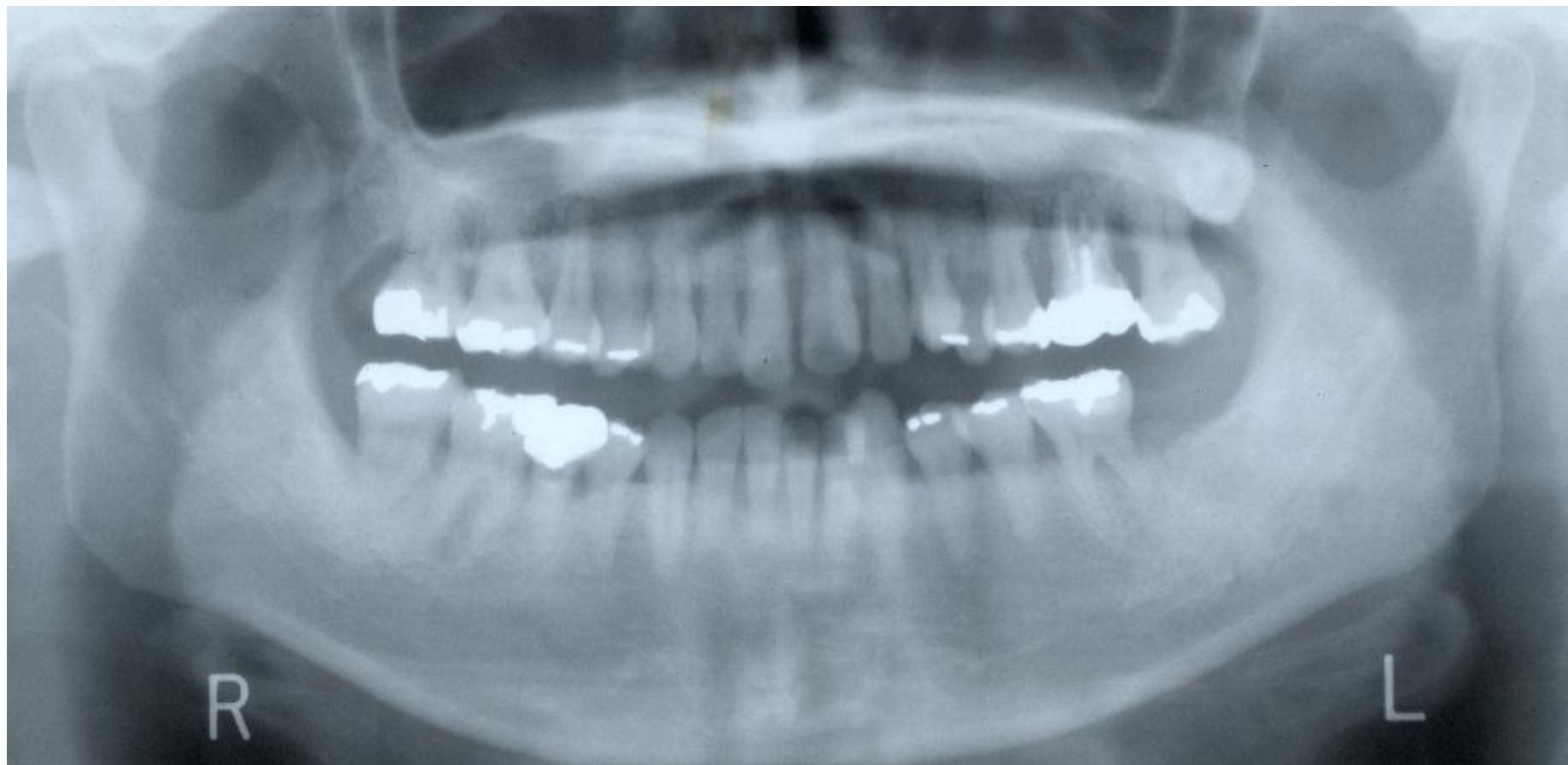
- ・歯肉膿瘍切開

—2回目処置—

- ・切開部SP
- ・歯周閏連検査



パントモ所見



Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature

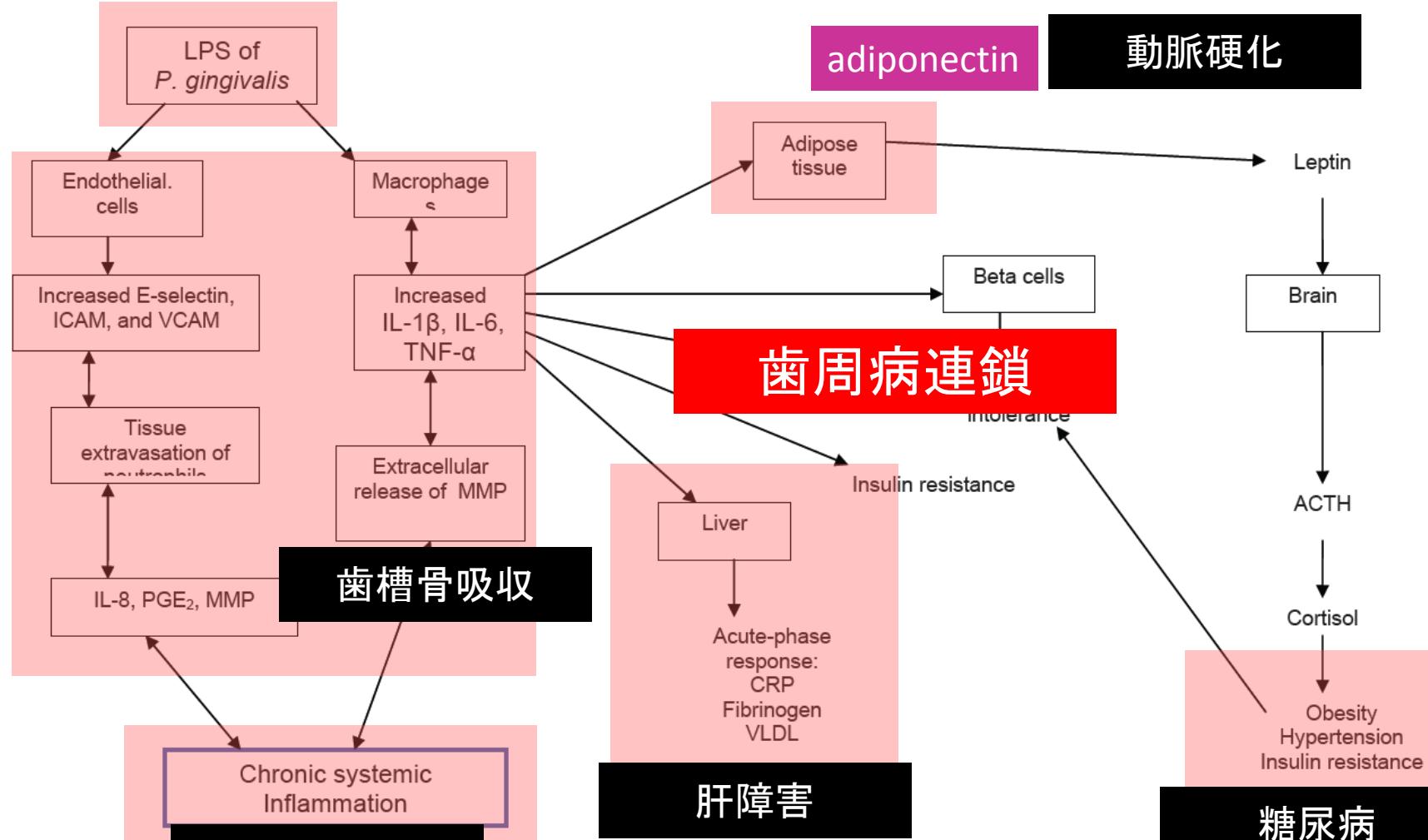
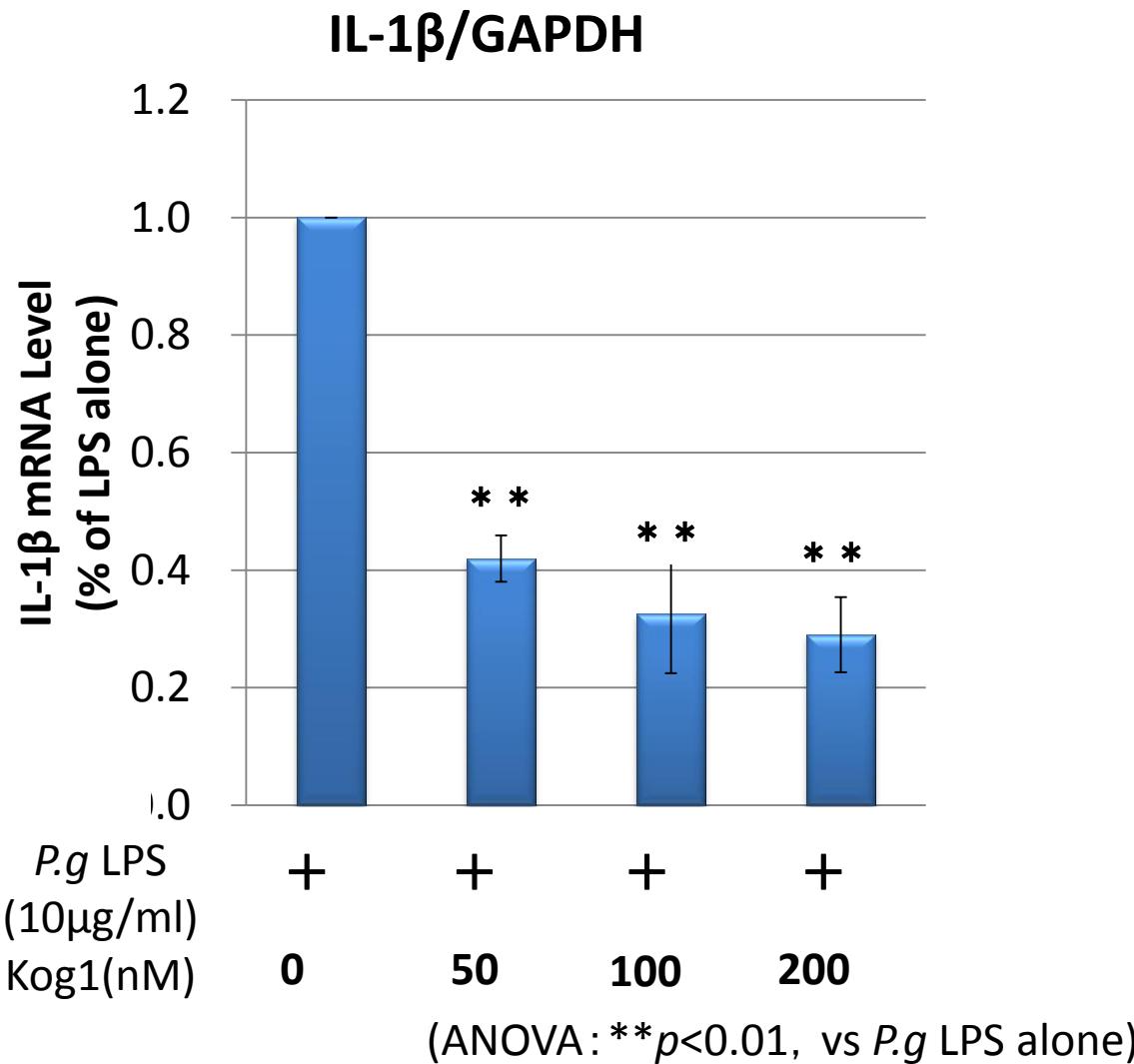
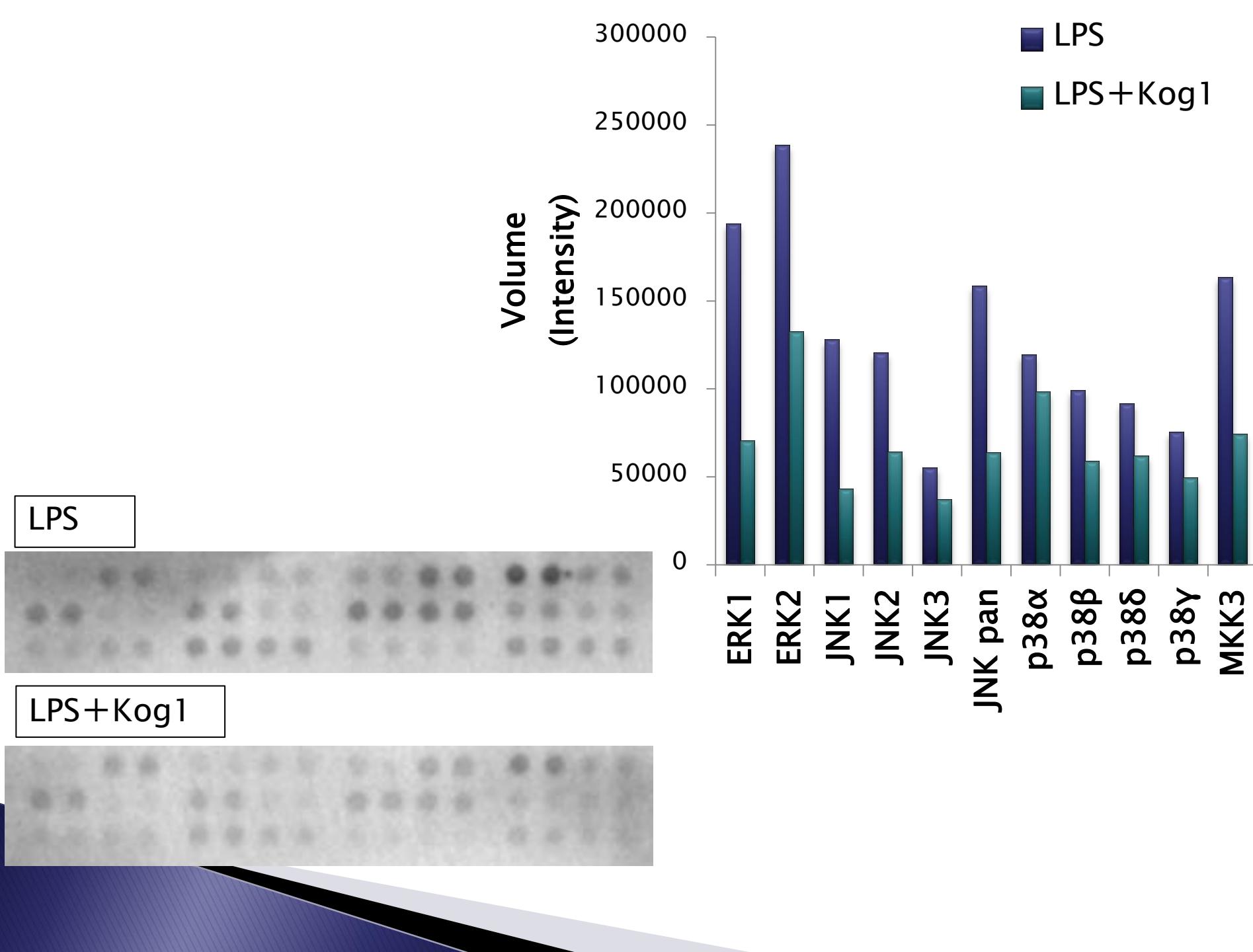


Fig. 2. Mode of action of *P. gingivalis* infection. *P. gingivalis* infection could contribute to systemic inflammation, impairing sugar balance and diabetes. Several expected tissue reactions may have two-way interactions. LPS = lipopolysaccharide, ICAM = intercellular adhesion molecule, VCAM = vascular cell adhesion molecule, IL-8, IL-1 β , -6 = interleukin-8, -1 β , -6, PGE2 = prostaglandin E2, MMP = matrix metalloproteinase, CRP = C-reactive protein, VLDL = very low-density lipoprotein, ACTH = adrenocorticotropic hormone. Modified from Grossi.

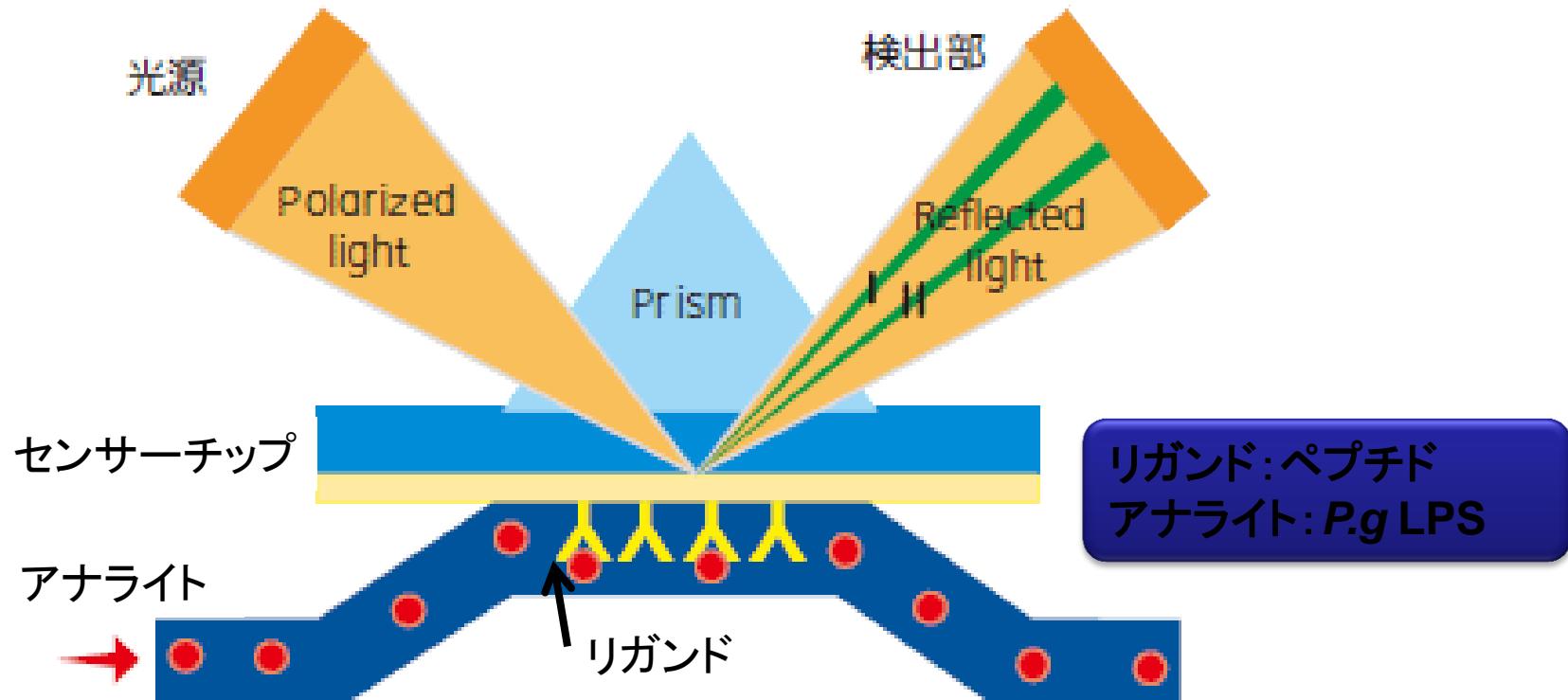
結果① Kog1および*P.g* LPSを同時に添加 ～Kog1がIL-1 β mRNAの発現に与える影響～

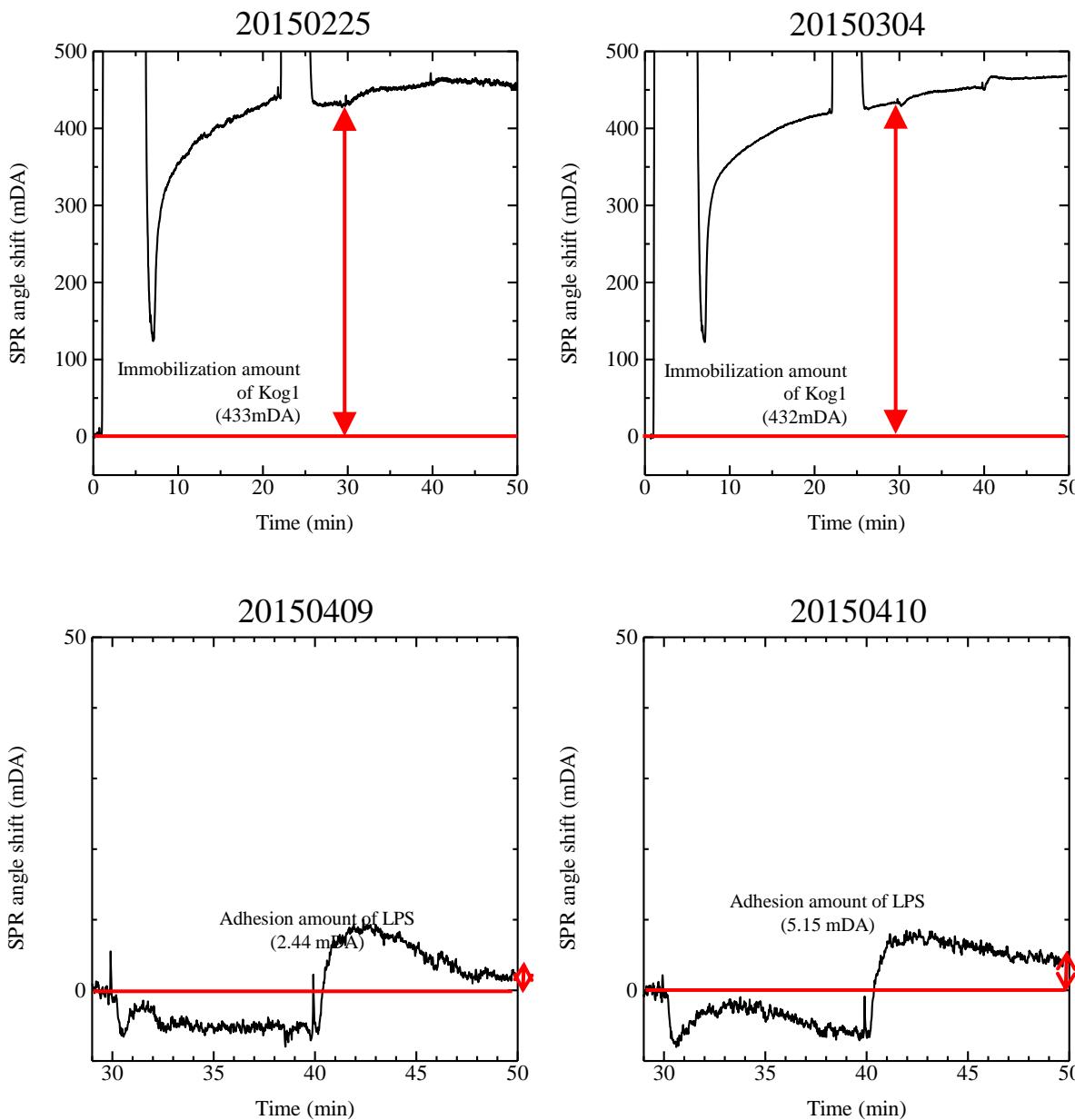




SPR法

SPRを利用して、分子間相互作用による表面への有機および生体分子の吸脱着挙動を膜厚あるいは膜の屈折率変化として検出する方法





平均: 2.52 mDA

BK7 COOH in PBS

PBS 1min -> EDC.NHS 5min -> PBS 1min -> Histatin5 PBS 15min->NH₂EtOH3min->
PBS5min->LPS10min->PBS10min

	結合量(mDA)	LPSとの結合量 (mDA)
Kog1	426	25
Histatin5	247	2.25

<M.W>

Kog1 :
5485.62
Histatin5 :
3036.29

Kog1 77.66×10^{-3} 321.9

Histatin5 81.35×10^{-3} 27.65

Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature

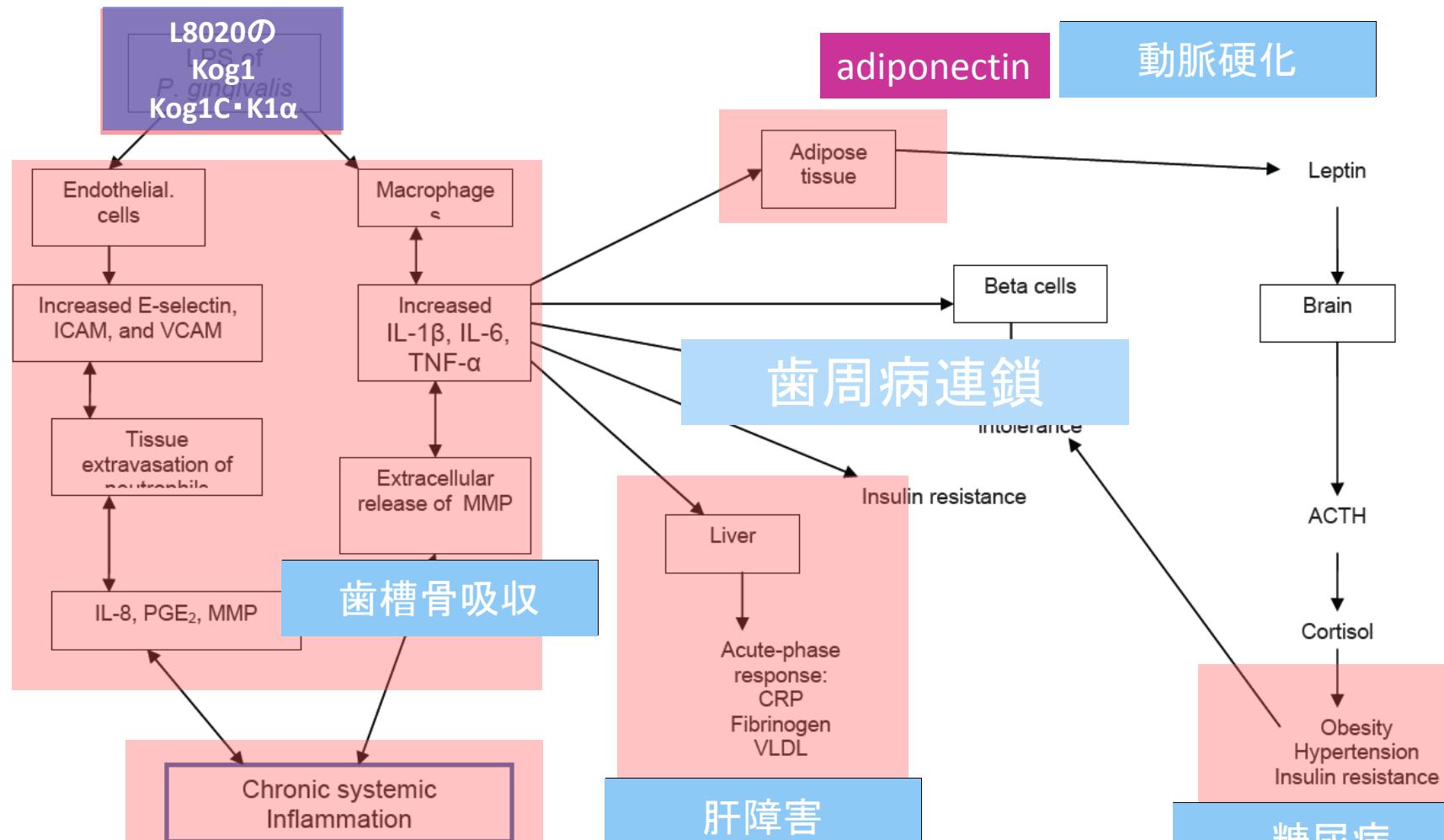


Fig. 2. Mode of action of *P. gingivalis* infection could contribute to systemic inflammation, impairing sugar balance and diabetes. Several expected tissue reactions may have two-way interactions. LPS = lipopolysaccharide, ICAM = intercellular adhesion molecule, VCAM = vascular cell adhesion molecule, IL-8, IL-1 β , -6 = interleukin-8, -1 β , -6, PGE2 = prostaglandin E2, MMP = matrix metalloproteinase, CRP = C-reactive protein, VLDL = very low-density lipoprotein, ACTH = adrenocorticotropic hormone. Modified from Grossi.

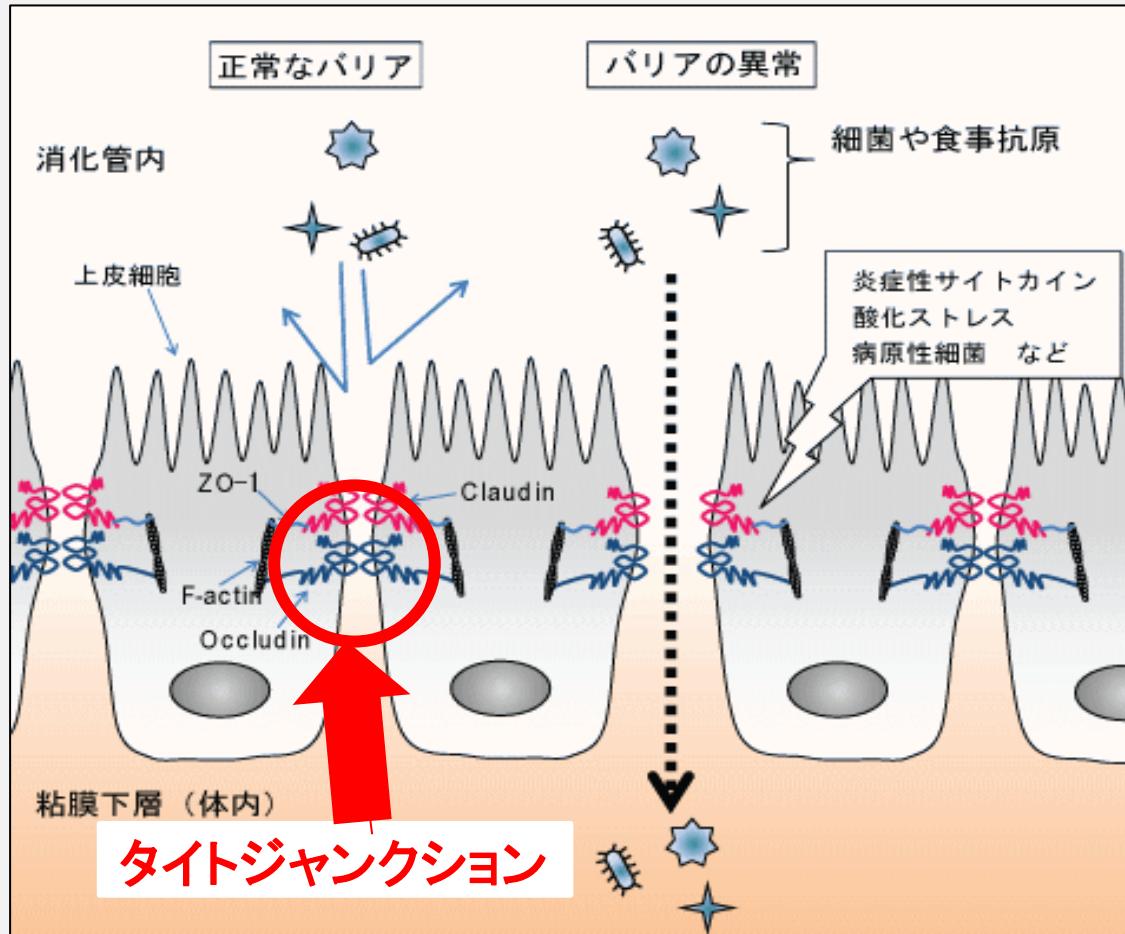
タイトジャンクションとは

内部及び外部環境間にある細胞に存在する、バリア機能の1つ

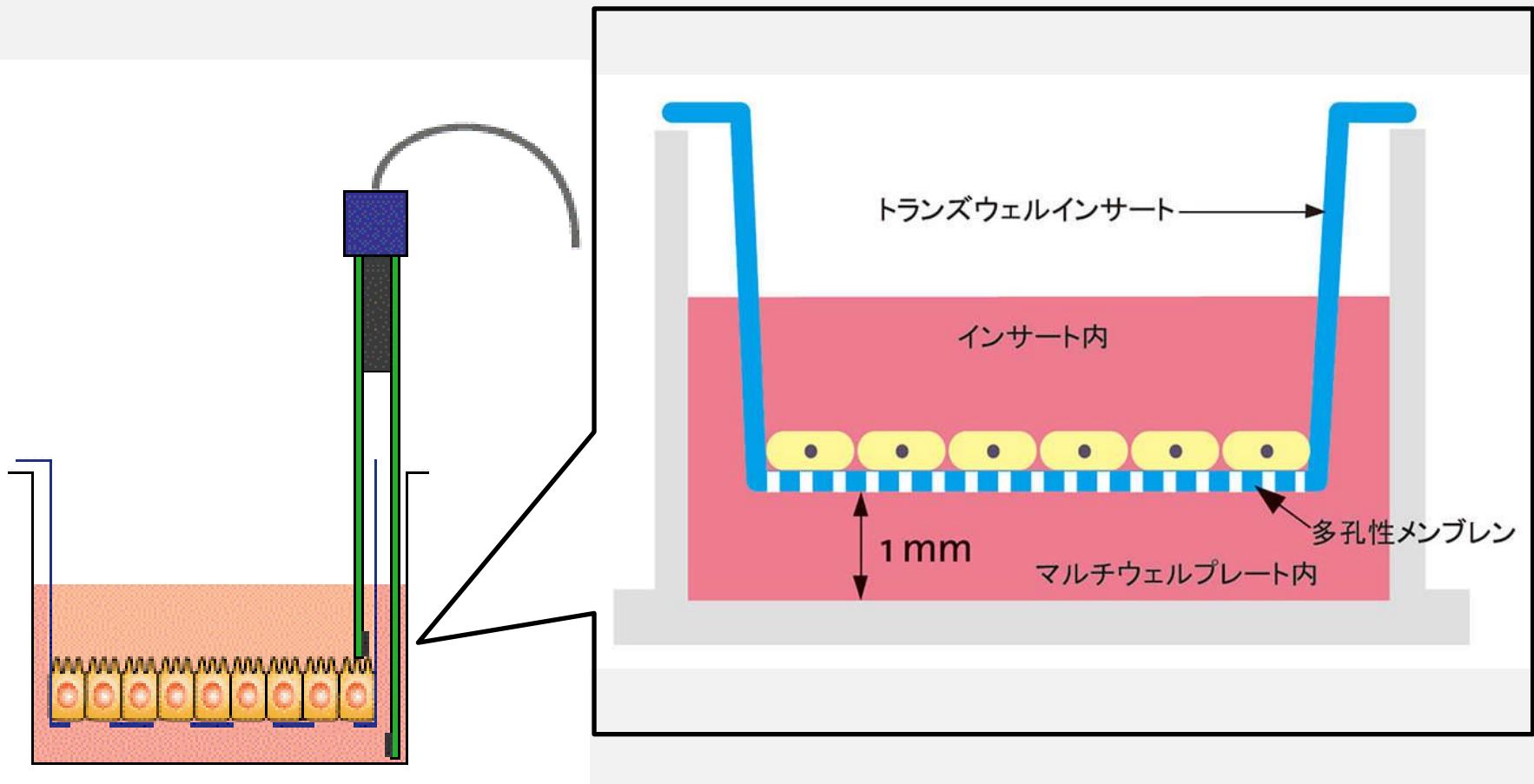
主な機能

- ・物質透過制御
- ・**異物・病原体の侵入阻害
(生体防御機能)**
- ・過剰な水分喪失の防止
- ・恒常性の維持

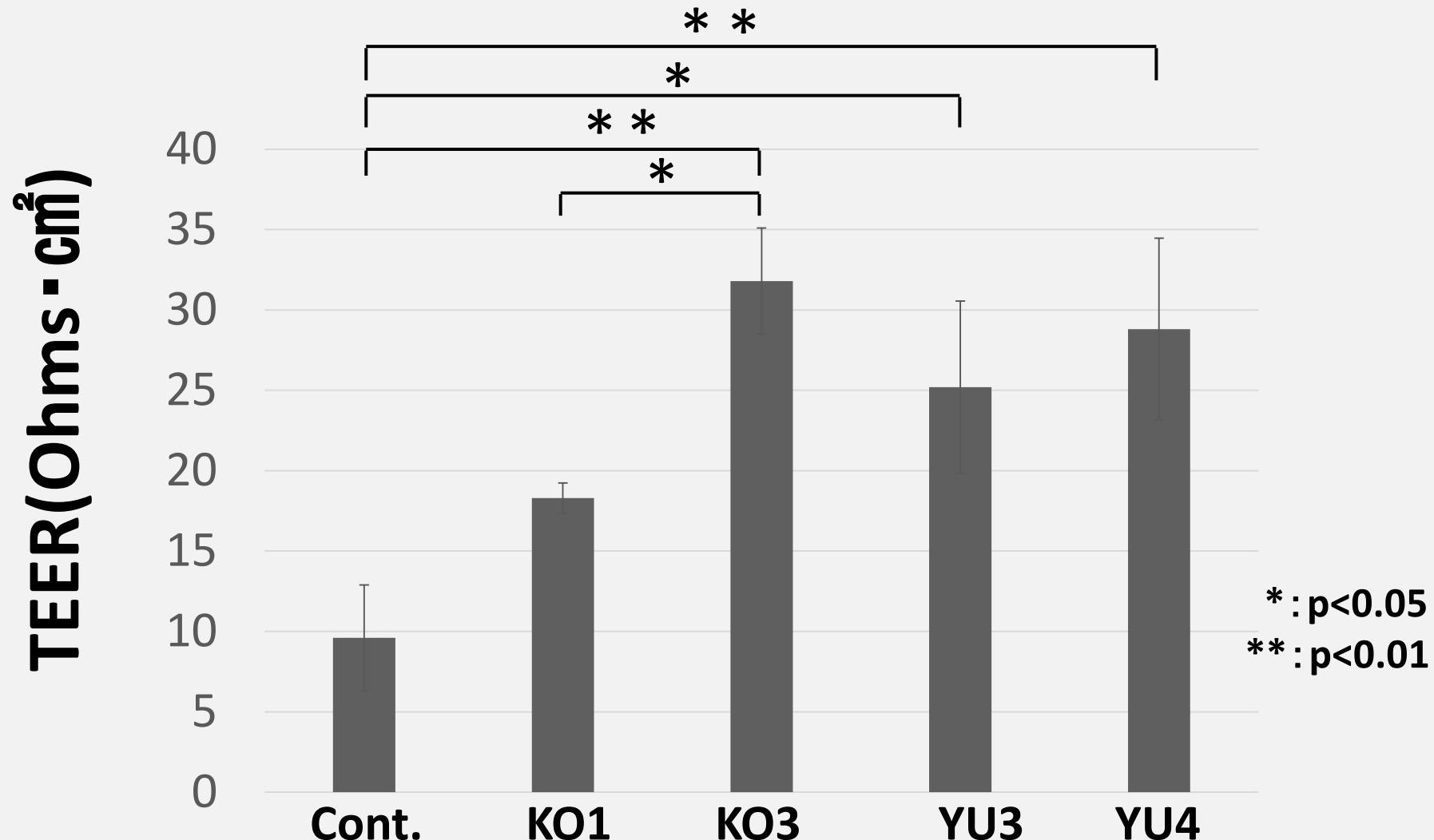
(Yuki et al. 2011)



TEER値の測定方法



乳酸菌溶菌液がGE-1のTEER値に与える影響

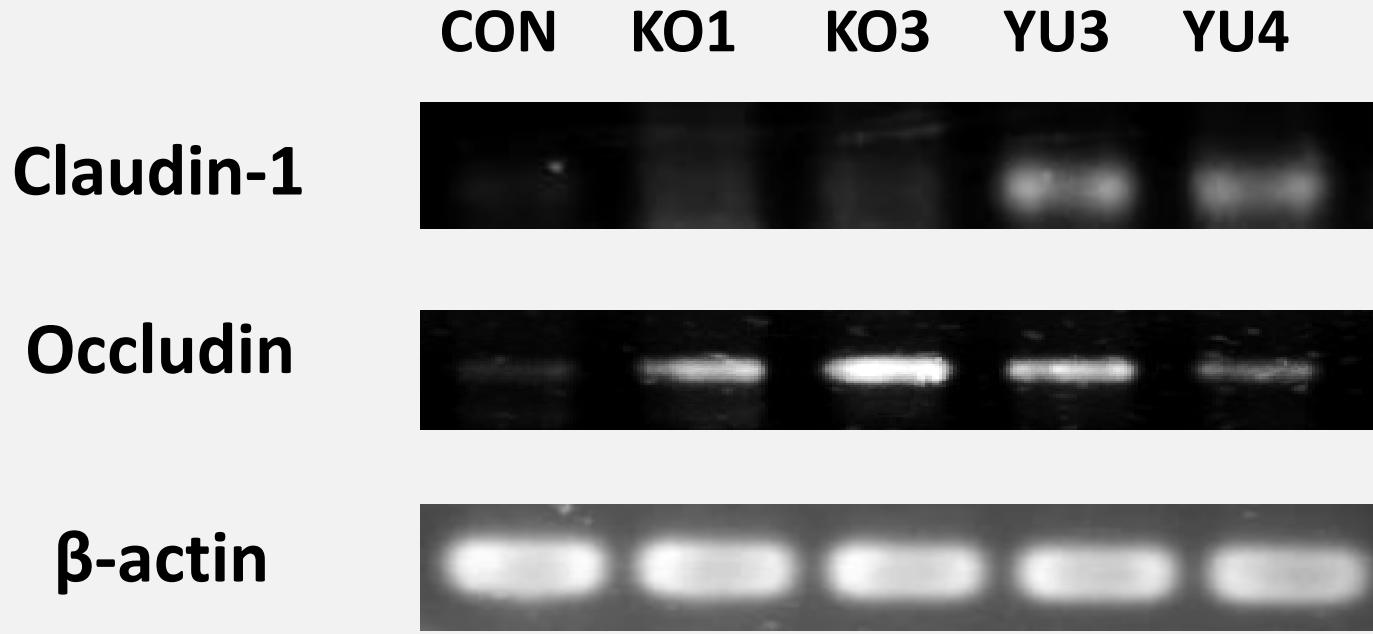


KO3,YU3およびYU4の溶菌液はTEER値を増加させた
KO1,KO3の溶菌液間には有意な差が認められた

* : p<0.05

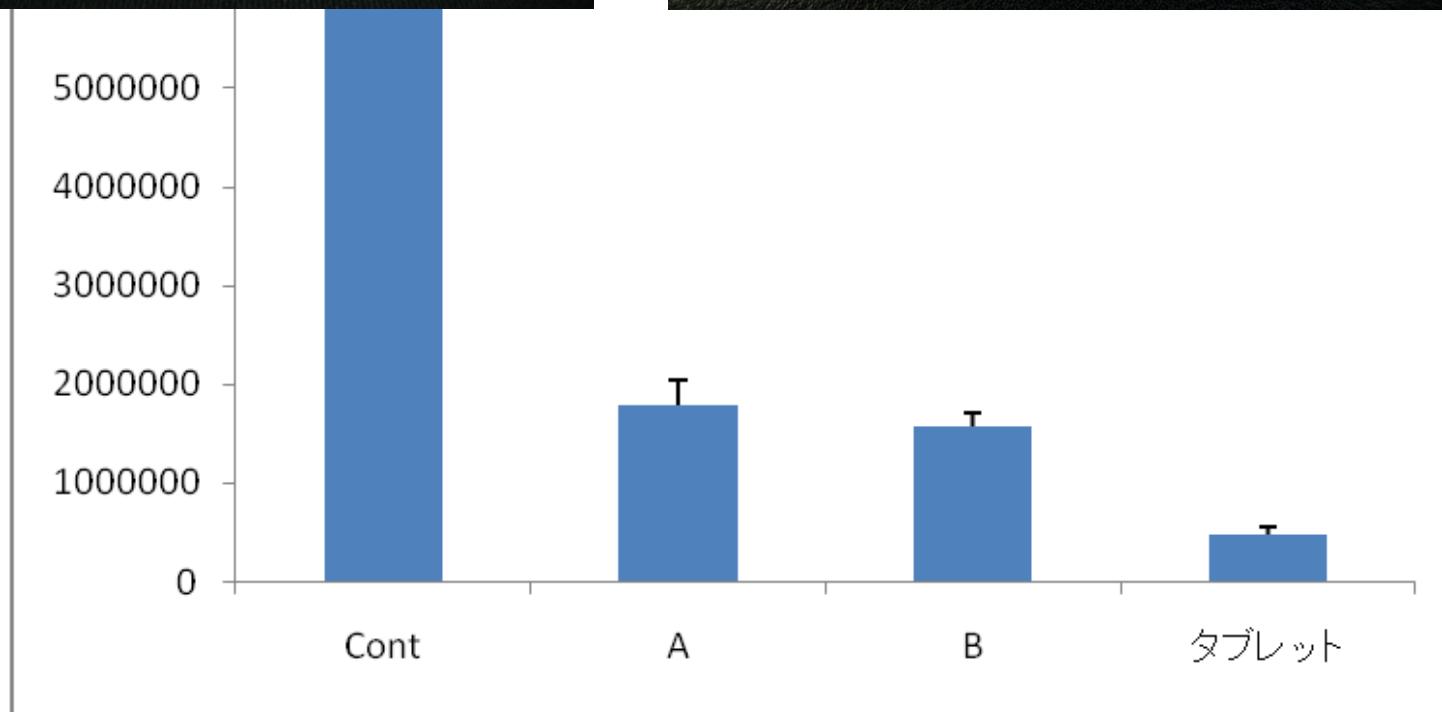
** : p<0.01

乳酸菌溶菌液がタイトジャンクション 関連遺伝子の発現に与える影響



Claudin-1 : YU3およびYU4の溶菌液で発現上昇
Occludin : 全ての乳酸菌溶液で発現上昇







エルハチマルニイマル
話題のL8020乳酸菌*
虫歯・歯周病になりにくい人の
口内環境に着目!



*高濃度発酵エキスを使用しています。

※L8020乳酸菌は、虫歯・歯周病になりにくい人から発見された、新しい乳酸菌です。



広島大学 歯学部
二川 浩樹 教授が発見



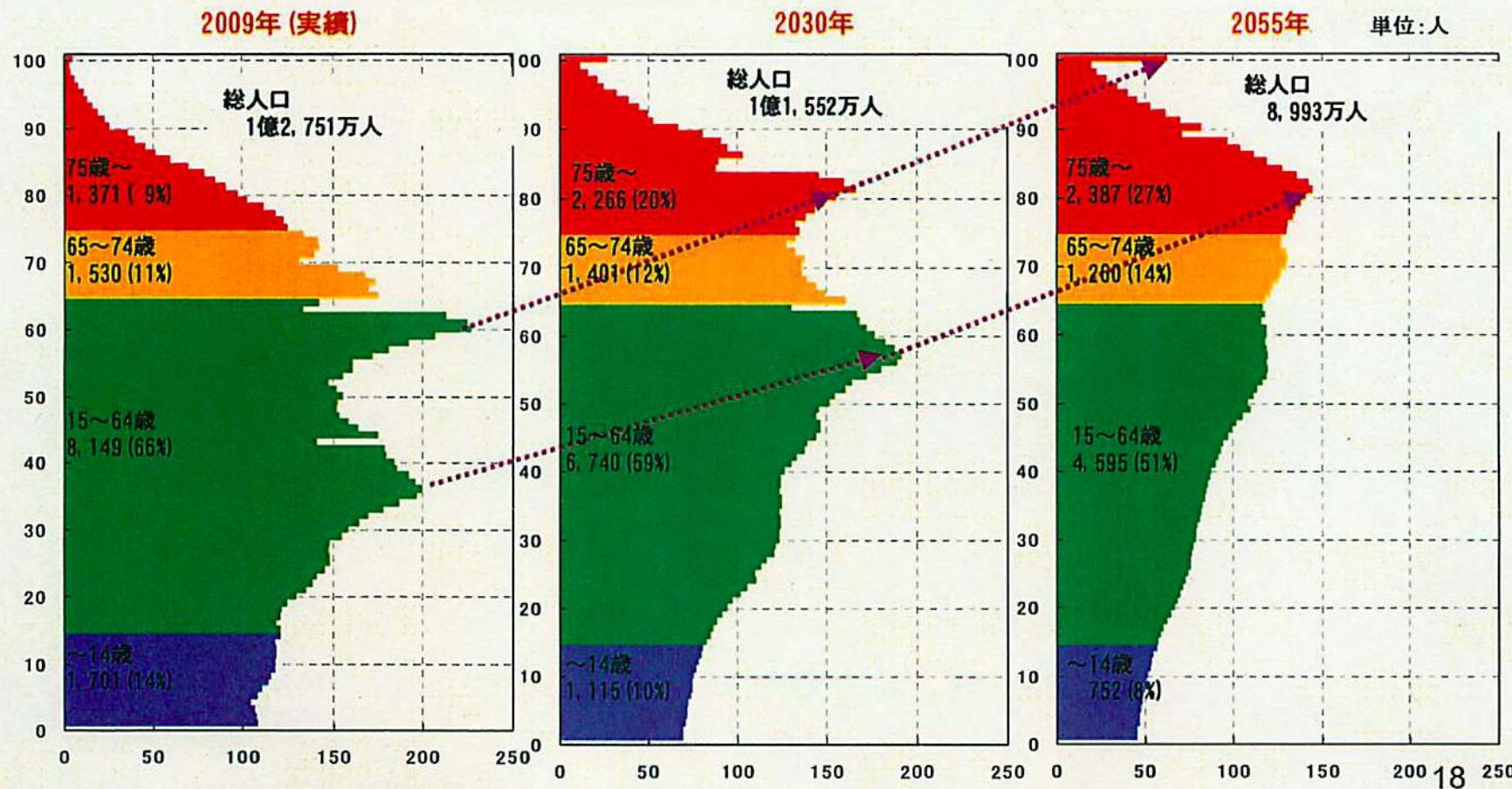
虫歯菌、歯周病菌の発育を阻止
することで、お口の中の菌バランス
(口内フローラ)を整える働きが注目
されています。



●少子高齢化、人口構造の変化

総人口に占める高齢者の割合は、2009年には20%程度であるが、2055年には、40%を超え、2.5人に1人が高齢者となる。

図表 日本における年代別人口



資料:総務省「国政調査」(平成22年度)

死因順位別死亡数の年次推移

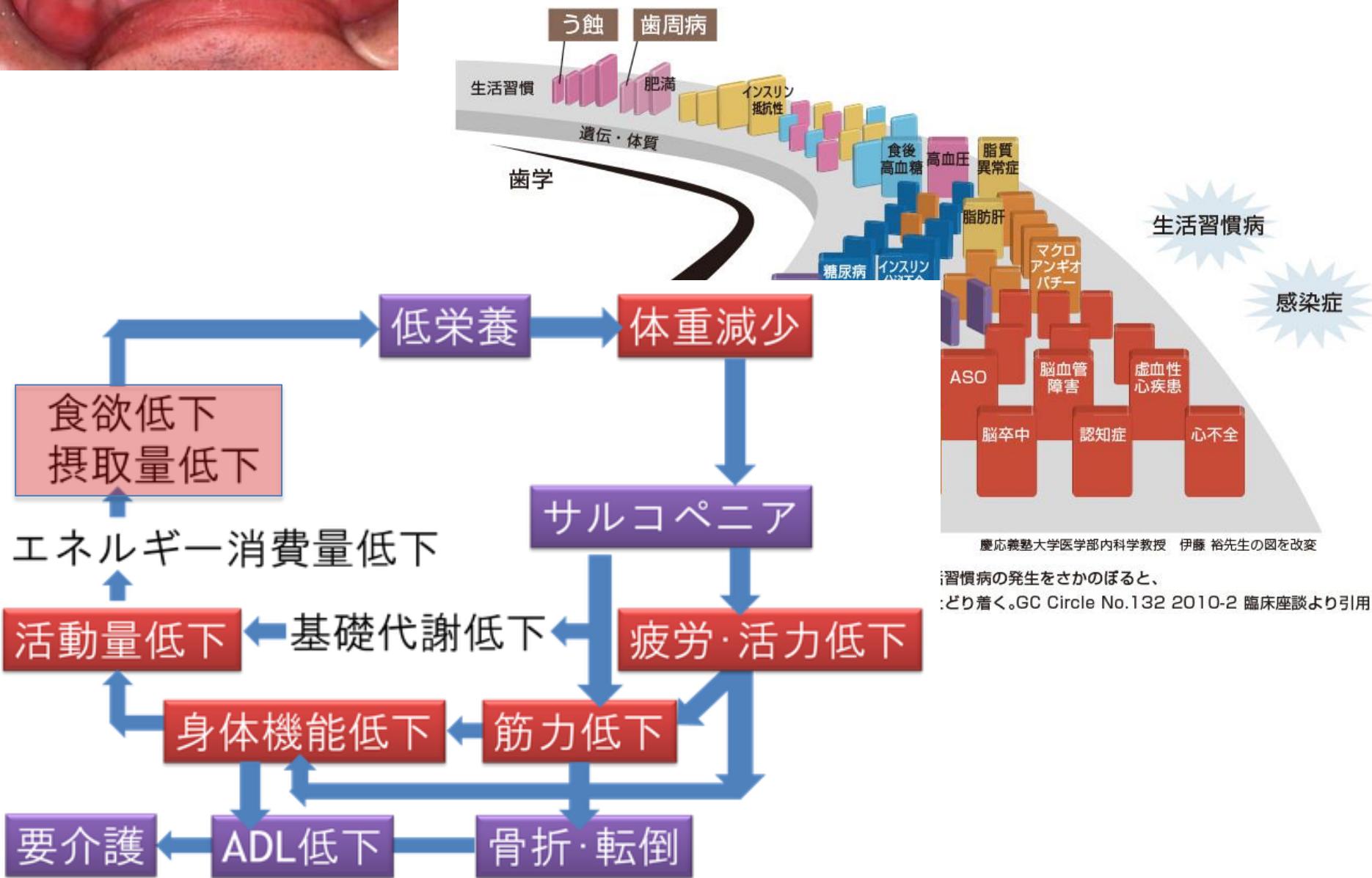
死因 順位	平成12年 (2000)		17年 (2005)		22年 (2010)		23年 (2011)		24年 (2012)	
	死因	死亡数	死因	死亡数	死因	死亡数	死因	死亡数	死因	死亡数
第1位	悪性新生物	295 484	悪性新生物	325 941	悪性新生物	353 499	悪性新生物	357 305	悪性新生物	361 000
第2位	心疾患	146 741	心疾患	173 125	心疾患	189 360	心疾患	194 926	心疾患	196 000
第3位	脳血管疾患	132 529	脳血管疾患	132 847	脳血管疾患	123 461	肺炎	124 749	肺炎	123 000
第4位	肺炎	86 938	肺炎	107 241	肺炎	118 888	脳血管疾患	123 867	脳血管疾患	121 000

注：平成23年までは確定数、平成24年は推計数である。



メタボリック・ドミノ

できるだけ上流で止める



ご清聴どうもありがとうございました



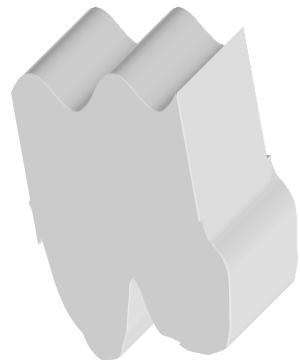
よくある質問

フツ素と違うの？

キシリトールとどう違うの

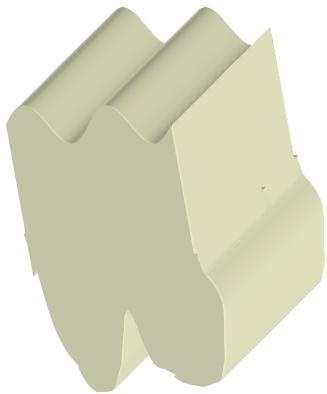
よくある質問

フッ素塗布



よくある質問

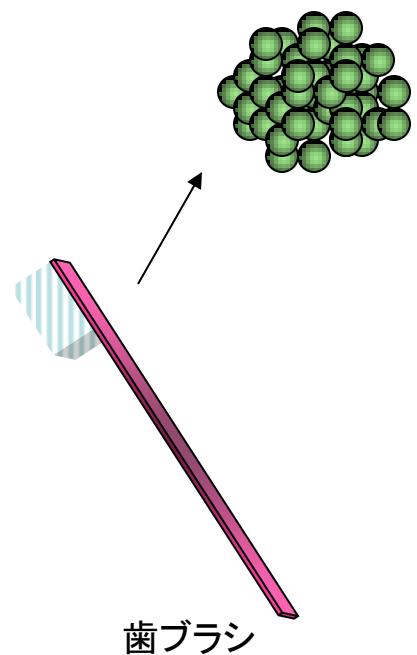
フッ素塗布



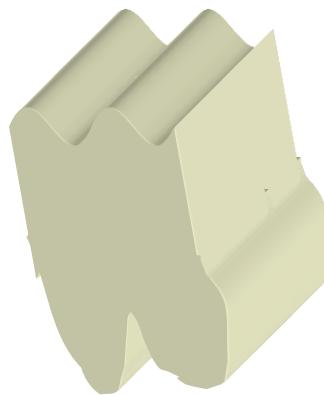
歯質の強化

よくある質問

フッ素塗布



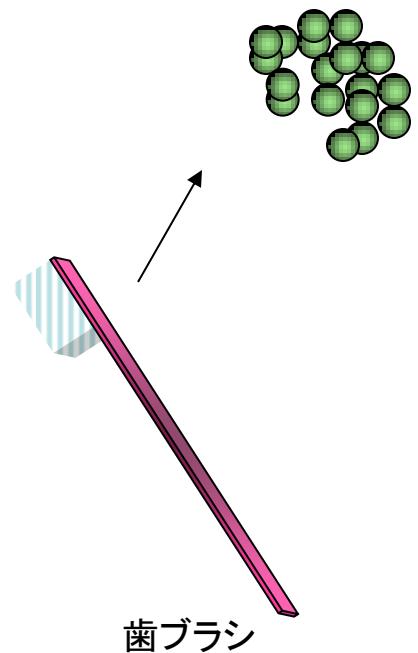
歯ブラシ



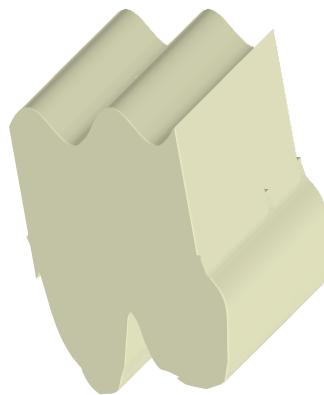
歯質の強化

よくある質問

フッ素塗布



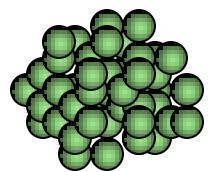
歯ブラシ



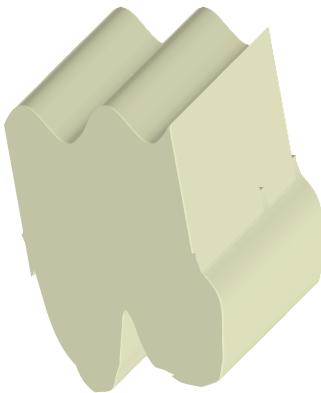
歯質の強化

よくある質問

フッ素塗布



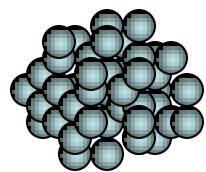
キシリトール



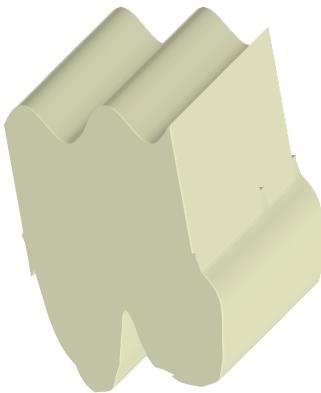
歯質の強化

よくある質問

フッ素塗布



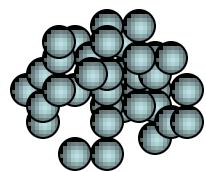
キシリトール



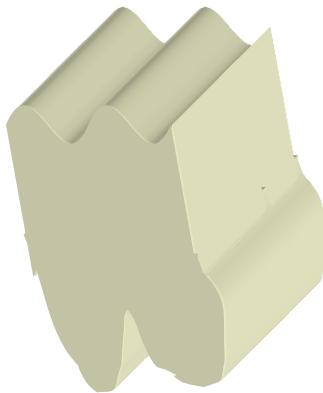
歯質の強化

よくある質問

フッ素塗布



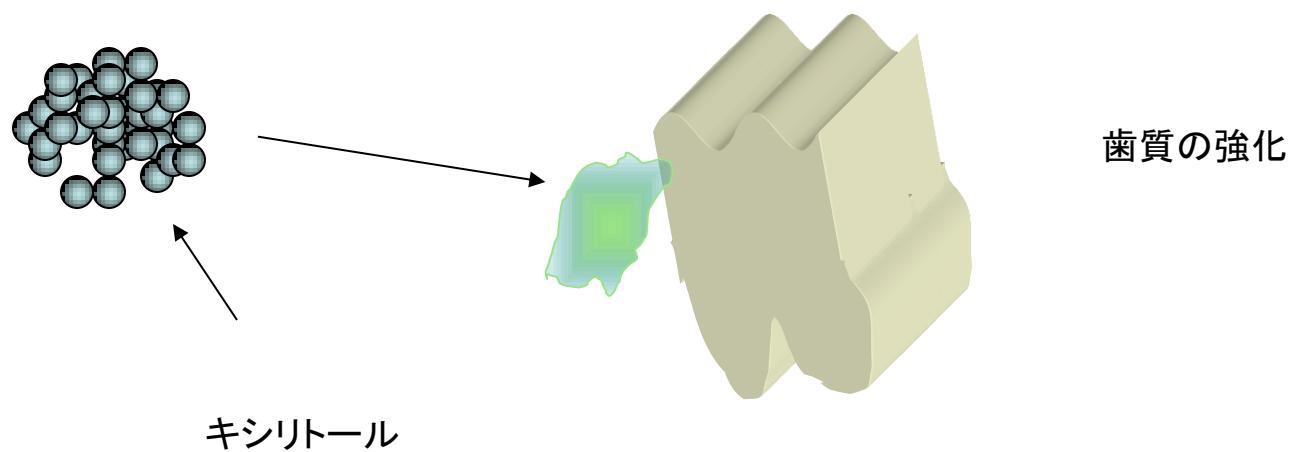
キシリトール



歯質の強化

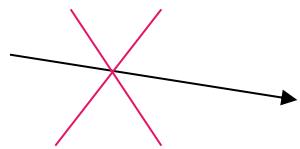
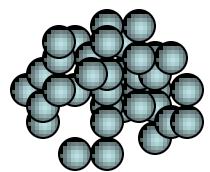
よくある質問

フッ素塗布

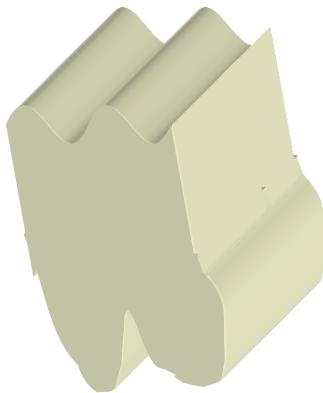


よくある質問

フッ素塗布



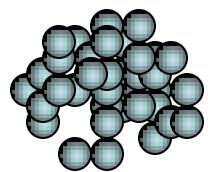
キシリトール



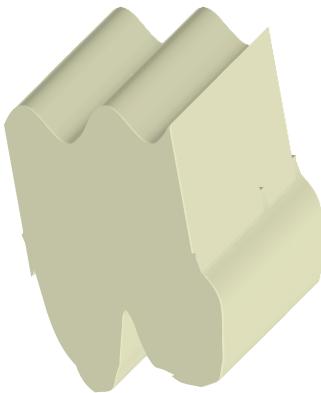
歯質の強化

よくある質問

フッ素塗布



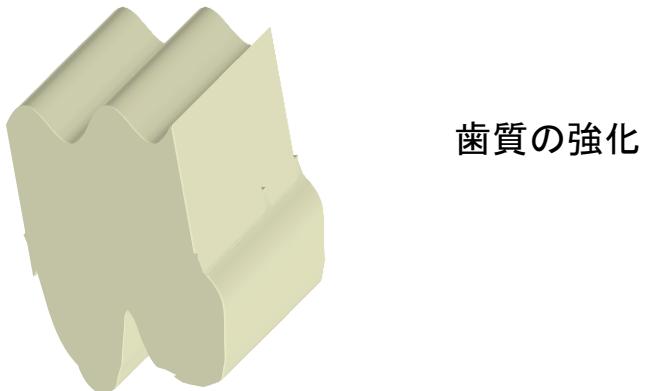
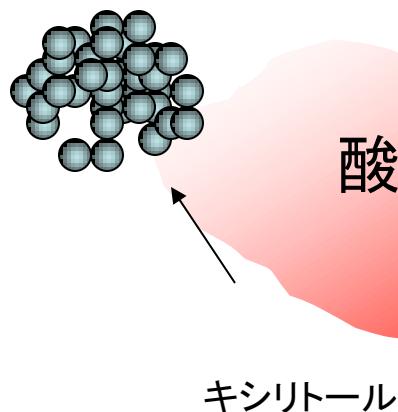
キシリトール



歯質の強化

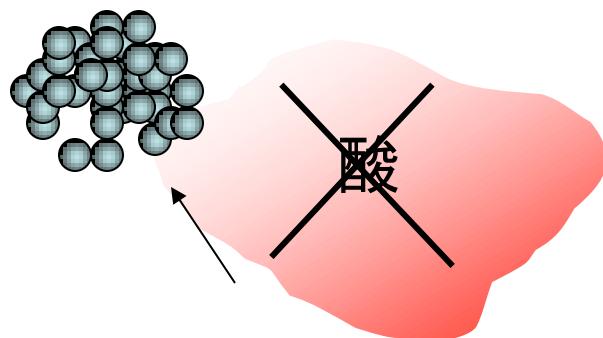
よくある質問

フッ素塗布

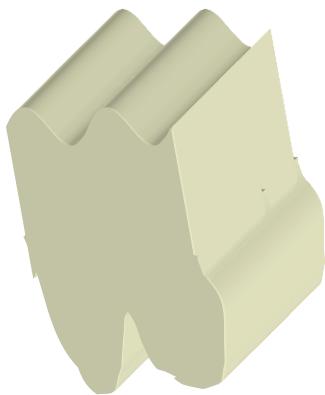


よくある質問

フッ素塗布



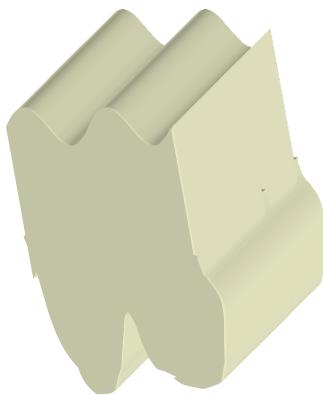
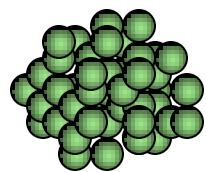
キシリトール



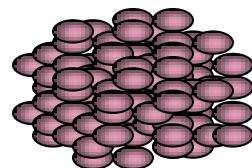
歯質の強化

よくある質問

フッ素塗布



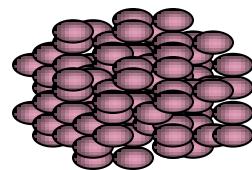
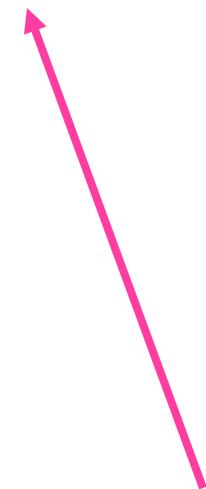
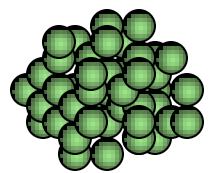
歯質の強化



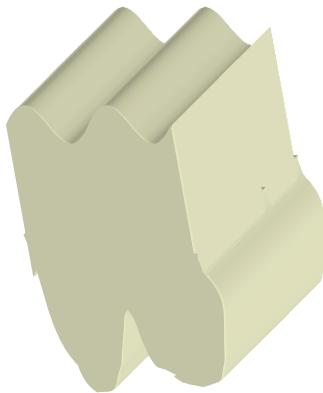
8020菌

よくある質問

フッ素塗布



8020菌



歯質の強化