HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the Effect of Lactoferrin and Lactoperoxidase on Oral Health and Its Mechanisms [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中野, 学
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(ソフトマター科学)
Dissertation Number	乙第7083号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76090
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Manabu_NAKANO_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（ソフトマター科学）　氏 名 中 野　　学

学 位 論 文 題 名

Study on the Effect of Lactoferrin and Lactoperoxidase on Oral Health and Its Mechanisms
（ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの口腔衛生に対する効果とその作用機序に関する研究）

ヒトの口腔内にはおよそ 300～500 種類の細菌が存在し，口腔内の病原菌は齲蝕や歯周病，口臭などの口腔疾患の原因のみならず，糖尿病などの生活習慣病，肺炎，関節リウマチ，腎臓病など全身疾患との関連を示唆する報告が年々増加している。ラクトフェリン（LF）とラクトパーオキシダーゼ（LPO）は，乳や唾液などの外分泌液に含まれる生体防御成分である。LF は鉄結合性の糖タンパク質であり，歯周病菌を含む多くの病原菌に対する抗菌作用をはじめ，抗炎症作用，抗バイオフィルム作用など多くの機能が報告されている。一方，LPO はヘム結合性の糖タンパク質であり，唾液成分であるチオシアン酸イオンと過酸化水素の共存下において次亜チオシアン酸の生成を触媒し，歯周病菌を含む病原菌に対して強い抗菌活性を示す。この抗菌系は LPO システムと呼ばれている。本研究では LF と LPO システム の機能性に着目し，*in vitro* でこれら成分の口腔内における生体防御作用機序を検討し，臨床研究にて口腔衛生に対する効果を検証した。

まず初めに，LPO システムの口臭産生抑制機構を検討した。口腔内の嫌気性細菌はタンパク質やアミノ酸を分解し，硫化水素やメチルメルカプタンなどの揮発性硫黄化合物（VSC）を産生する。VSC は口臭の原因となるだけでなく，歯周組織にも障害性を示すことが報告されており，口腔内の健康を保つうえでも重要なターゲットである。代表的な歯周病菌である *Fusobacterium nucleatum* および *Porphyromonas gingivalis* に対する LPO システムの影響を検討し，短時間のうちに抗菌作用および VSC 産生に関わるリアーゼに対する阻害作用を示すことを明らかにした。リアーゼの不活性化は還元剤である DTT の添加により回復することから，LPO システムの活性成分である次亜チオシアン酸がリアーゼの活性中心にあるチオール基と反応することで不活性化作用を示す可能性が考えられた。

口腔カンジダ症の主な原因菌である *Candida albicans* に対する LF と LPO システムの影響を *in vitro* で評価した。*C. albicans* に各成分を作用させ，形態学的に観察したところ，LF や LPO システム単独と比較して，LF と LPO システムの併用物は菌糸量を減少させ、細胞の形状にも影響を与えた。菌糸形発育量を定量し，併用物による顕著な相乗作用を確認した。さらに，AlamarBlue を用いた代謝能抑制作用の評価では，LF や LPO システム単独では代謝能抑制作用を殆ど示さなかったが，併用物は低濃度条件でも代謝能を完全に抑制した。以上の結果から，LF と LPO システムの併用により，*C. albicans* に対し強力な阻害作用を示すことが確認された。これら相乗作用は生体内に近い濃度域でも効果を発揮したことから，LF と LPO が外分泌液中に共存する理由のひとつとして推察される。

次に，LF と LPO システムの臨床効果を検証した。口臭がある健康な成人男女 40 名を対象とし，LF と LPO システムを含む試験食品の単回摂取による口臭抑制効果をランダム化二重盲検クロスオーバー試験で評価した。試験食品摂取前，摂取 10，30 分後に，ガスクロマトグラフィーで口腔内空気中の総 VSC 濃度を測定した。試験食品の摂取 10 分後において，口腔内空気中の総 VSC および硫化水素濃度はプラセボ群と比べて有意に低値を示した。さらに，試験群では，摂取 10 分および 30 分後において，硫化水素およびメチルメルカプタン濃度が嗅覚閾値を下回った。部分集団解析では男女間や世代間で口臭抑制効果に差はみられなかった。以上の結果から，LF と LPO システムを含む食品の口臭抑制に対する有用性が確認された。

最後に，LF と LPO システムの口腔内細菌叢に与える影響を臨床研究にて検討した。口腔衛生が悪化しやすい高齢者 46 名を対象とし，LF と LPO システムを含む試験食品またはプラセボ食品を 8 週間摂取してもらい，舌苔および歯肉縁上プラークの細菌叢の変化を次世代シーケンサーで評価した。試験群では歯周病菌を含むグラム陰性菌を中心に占有率が減少した。グラム陰性菌の減少は口臭やプラーク付着などの指標の改善と相関していた。一方，試験群で占有率が有意に増加した菌種はグラム陽性菌が殆どであり，口腔衛生状態の悪化と相関するものはみられなかった。LPO の抗菌系は，グラム陰性菌には殺菌作用を示し，グラム陽性菌には静菌作用を示すことが報告されている。試験群でみられた細菌叢変化は， LPO の作用の違いが一因だと推測された。以上の結果から， LF および LPO 配合食品の継続摂取は，口腔衛生の悪化に関わる細菌を抑制する一方で，悪化に関与しない細菌の割合を増加させ，口腔内細菌叢を改善する可能性が示唆された。唾液中にも含まれる抗菌成分である LF や LPO によって，口腔内細菌叢が本来あるべきバランスへ調整されたと考えられる。

本研究では，*in vitro* 試験にて LPO システムの口臭抑制作用機序，*C. albicans* に対する LF および LPO システム併用物の相乗作用を明らかにし，臨床研究にて LF および LPO システム含有食品の口臭抑制作用および口腔内細菌叢改善作用を検証した。高齢者は唾液の減少によって口腔衛生状態が悪化しやすいといわれており，本研究で明らかにした LF と LPO システムの作用が良好な口腔衛生状態の維持の一端を担っている可能性がある。