

令和元年5月28日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11860

研究課題名(和文)ブルーベリー抽出ポリフェノールを機能性食品として活用した口腔保健支援

研究課題名(英文)Oral health promotion utilizing the blueberry extract polyphenol as the functional food

研究代表者

日野出 大輔 (HINODE, Daisuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：70189801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高濃度ポリフェノール含有ブルーベリー抽出物を用い、キウイフルーツ抽出物との比較において、基礎研究および臨床研究を行った。その結果、基礎研究では両者にFusobacterium nucleatumによる揮発性硫黄化合物(VSC)産生及び同菌発育の阻害が認められた。一方、臨床予備研究においてブルーベリー抽出物によるVSC産生抑制は観察できなかった。キウイフルーツ抽出物では、32名を対象とした臨床試験にてVSC産生抑制および舌苔中の口腔細菌数を減少させる効果が得られた。このように、両者に口腔保健推進のための機能性食品としての可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて用いたブルーベリー抽出物、キウイフルーツ抽出物は日本においても食品の素材として用いられている。基礎研究において、上記2つの素材に全身疾患との関連性でも注目されている歯周病原細菌Fusobacterium nucleatumの発育抑制や口臭の原因物質である揮発性硫黄化合物産生抑制が認められたことから、トランスレーショナルリサーチのシーズとなる点で学術的意義が認められる。特にキウイフルーツ抽出物では、すでに製品化された素材を用いた臨床研究においてもその効果が認められたため、機能性表示食品としての利用の可能性も広がり、本研究結果を社会へ還元できる点で社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：The basic research and the clinical study using the blueberry extract containing high concentration polyphenol were performed in this study by the comparison with the kiwifruit extract. As the result in basic research, inhibitory activity against volatile sulfur compound (VSC) production and growth by Fusobacterium nucleatum was observed in both materials. On the other hand, the suppression of VSC production could not be observed using blueberry extract in clinical preliminary studies. In the clinical trial against 32 subjects, the kiwifruit extract was effective in suppressing VSC production and reducing the number of oral bacteria in tongue coating.

These results suggest that both material possessed the potential as the functional food for oral health promotion.

研究分野：口腔保健学

キーワード：ブルーベリー抽出物 キウイフルーツ抽出物 揮発性硫黄化合物 口腔細菌 Fusobacterium nucleatum
機能性食品 口腔保健支援

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯・口腔の健康は栄養と密接な関連性があり、観察研究から口腔保健と抗酸化作用を含む栄養素摂取との関連が報告されている。ブルーベリーは抗酸化ポリフェノールの存在からサプリメントとしても広く受け入れられており、眼疾患改善効果に加え *Helicobacter pylori* 発育阻害なども報告されている。近年、共同研究者のカナダ・ラバル大学 Grenier 教授のグループは野生種ブルーベリー抽出物に歯周病関連細菌への抗菌作用を見出した。また、歯周病関連細菌のうち、*Fusobacterium nucleatum* (Fn)は口臭に関連する細菌としても注目されているが、初期定着細菌と成熟に伴い増加する細菌を結び付けるなど、バイオフィーム形成に強く関与しており、我々は舌苔中にも Fn が多く存在することを見出している。

2. 研究の目的

口臭は、主に歯周病原性細菌によって生成される揮発性硫黄化合物 (VSC) によって引き起こされるが、食品によっては口臭抑制に有効であることが知られている。本研究では、基礎研究としてポリフェノールを多く含むブルーベリー抽出物を用い、キウイフルーツ抽出物を比較対象として、Fn の生育抑制、バイオフィーム形成抑制および、Fn による VSC 産生に対する阻害物質としての影響を調べる。更に、臨床研究として上記 2 種の食品を用い、舌苔中の Fn を含む口腔細菌の低減および口臭改善作用を調べる。これらの臨床的効果を検証することにより、機能性食品としての可能性を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

ポリフェノールを多く含むブルーベリーエキス粉末はフランスのダイアナフード社から、キウイフルーツエキス粉末および BREO EX[®]は、江崎グリコ株式会社から提供された。

<基礎研究>

(1) Fn 菌成育抑制実験

Fn ATCC25586 株を THB 培地にて嫌気培養を行った後、96 ウェルプレートに THB にて段階希釈したブルーベリー抽出液またはキウイフルーツ抽出液を 150 μ l ずつ分注し、培養した Fn 菌株を添加後、嫌気条件下にて、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養し、プレート内の菌量を吸光度 (OD₆₅₅) にて測定した。

(2) バイオフィーム形成抑制実験

TSB 培地にて段階希釈したブルーベリー抽出液 150 μ l ずつ分注し、培養した Fn JCM8532 株を 5 μ l ずつ添加後、嫌気条件下にて 37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養した。培養液を吸引後、生理食塩水 150 μ l にて洗浄し、クリスタルバイオレット溶液を添加して形成されたバイオフィームを 10 分間染色した。生理食塩水で洗浄後、エタノールを 200 μ l 添加して 10 分間放置し、色素抽出液を吸光度 (OD₅₉₅) にて測定した。

(3) Fn による VSC 産生に対する阻害物質としての影響

Fn ATCC25586 株を嫌気的に増殖させ、膜フィルター (直径 13mm) 上の Fn バイオフィームを調製した。それを各抽出溶液または PBS (対照) で前処理し、次いで膜を 2mL-メチオニン溶液 (3ml) に浸漬し、密封したチューブ中にて 37 $^{\circ}$ C で 20 分間培養した。その後、チューブ中の CH₃SH 生成物をオーラルクロマ[™] (エフアイエス) により測定した。

<臨床研究>

(4) リアルタイム PCR 法による舌苔サンプル中の細菌数測定

細菌数の測定は細菌カウンタ[®] (パナソニックヘルスケア) を使用した。付属の綿棒を使用し、舌後方部の舌苔を後ろから手前へ 3 回擦過して採取し、操作手順に従って細菌数を測定した。一方、舌苔検体中の総細菌数に加えて Fn 菌数をリアルタイム PCR 法を用いて定量した。検体から DNA を抽出した後に、16S rRNA 遺伝子を増幅させることによって解析を行った。測定液 20 μ l に分注した各検体に InstaGene[™] Matrix (Bio-Rad Laboratories) 180 μ l を加え、56 $^{\circ}$ C・30 分の加熱、30 秒間ボルテックスミキサーにて攪拌、100 $^{\circ}$ C・8 分間の加熱の順で処理を行い、4 $^{\circ}$ C、10000 \times g で 10 分間遠心分離後、その上清を DNA テンプレートとして用いた。MiniOpticon システム (Bio-Rad Laboratories) にて SYBR Green I 検出系を使用し、PCR 反応液 18 μ l に対し、DNA テンプレート 2 μ l を加えて熱処理を行った。PCR 反応液の内容は SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix 10 μ l、100 μ M のプライマー (Forward, Reverse) 各 0.04 μ l、Diethylpylocarbonate 処理水 7.92 μ l である。PCR 反応条件は 95 $^{\circ}$ C・3 分 (初期熱変性)、95 $^{\circ}$ C・5 秒 (変性)、60 $^{\circ}$ C・10 秒 (アニーリング/伸長反応) を 1 サイクルとし、プライマーの塩基配列および各細菌のサイクル数は Yokoyama M, Hinode D らの方法 (Oral Microbiol Immunol 23, 55-59, 2008) に従い実施した。

(5) 口臭および口腔内細菌に影響する因子の解明

臨床研究の対象となる口腔細菌叢および口臭について健常者を非喫煙者と喫煙者に分けて調査した。徳島大学病院口臭外来受診者 37 名を対象とし、VSC の測定にはガスクロマトグラフィーを、唾液及び舌苔中の細菌数はリアルタイム PCR 法にて測定した。なお、本研究は徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した (承認番号 218-2)。

(6) ポリフェノール含有ブルーベリー摂取による口臭および口腔内細菌への影響

非喫煙者 5 名に対してポリフェノール含有ブルーベリー摂取による口臭および口腔内細菌

への影響に関する予備的臨床研究を行った。とろみ剤を添加したブルーベリー溶液（1 mg/ml）とブルーベリー非含有溶液（コントロール溶液）をそれぞれ 100ml 用意した。被験者へはブルーベリー溶液または非含有溶液をスプーン 1 杯とり、舌背の上に 1 分間静置後、嚥下することを 4 ~ 5 回繰り返すよう指示した。検査前および摂取 1 時間後での Winkel Tongue Coating Index (WTCI) による舌苔スコア、オーラルクロマ™ による口臭測定結果および細菌カウタによる細菌数を比較した。

(7) キウイフルーツパウダー含有タブレット (BREO EX®) 摂取による影響

大学生 32 名を被験者としたクロスオーバー試験のプロトコルを図 1 に示す。介入試験では、舌ブラシを用いた舌清掃を、介入試験では BREO EX® 2 錠を舌背上で舐めて摂取するよう被験者へ指示した。介入試験では、試験前日に BREO EX® を合計 3 錠摂取させた。なお、本研究は徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した(承認番号 2923)。

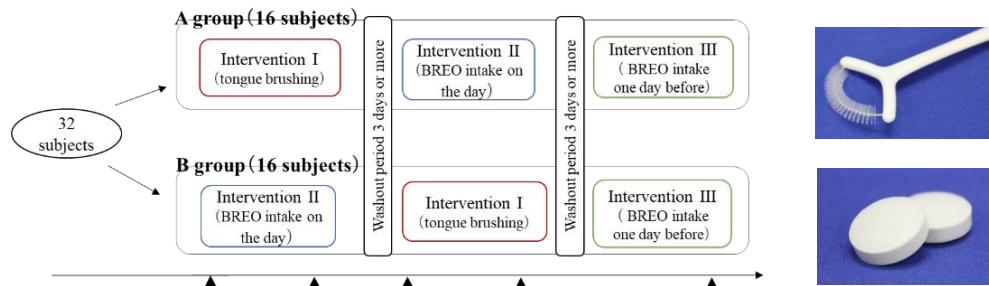


図 1

▲評価: 舌写真撮影(WTCI), 口臭測定(H₂S, CH₃SH, VSC), 舌苔細菌数測定
☆ベースライン: DMFT index, 歯肉正面観写真撮影(PMA index), 現在歯数

4. 研究成果

< 基礎研究 >

(1) Fn 菌成育抑制実験 (図 2)

キウイフルーツ抽出物およびブルーベリー抽出物は、それぞれ 500µg/mL および 250µg/mL の最小濃度で Fn の生育抑制効果を示した。

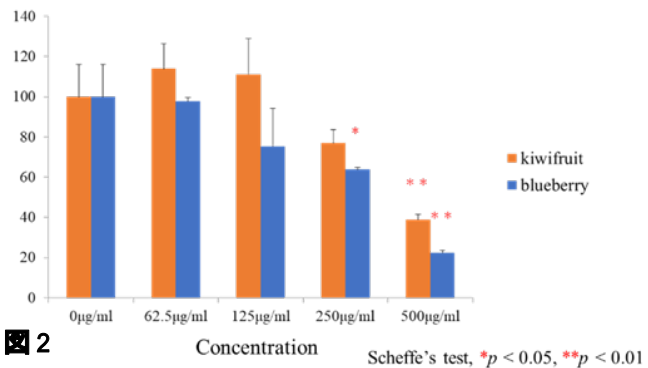


図 2

(2) バイオフィーム形成抑制実験 (図 3)

コントロールと比較したブルーベリー添加時の Fn 菌のバイオフィーム形成抑制を図 3 に示す。濃度 31.25µg/ml を除く全ての添加サンプルにおいて、48 時間後のバイオフィーム形成量は有意に減少していた。おおむねブルーベリー濃度依存的に抑制効果が認められたことから、ブルーベリー抽出液にはバイオフィーム形成抑制があると考えられた。

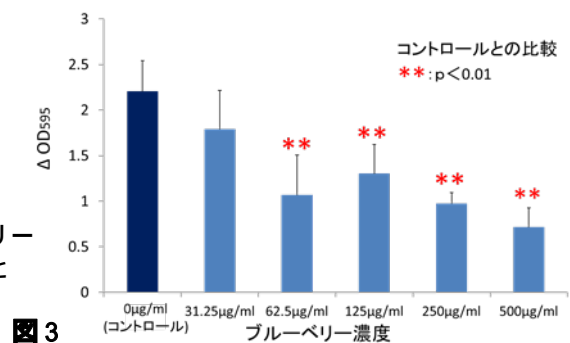


図 3

(3) Fn による VSC 産生に対する阻害物質としての影響 (図 4)

Fn の VSC 生成に対する抽出物の影響では 125, 250 および 500µg/mL の濃度のキウイフルーツ抽出物は、CH₃SH 産生を有意に阻害した。ブルーベリー抽出物は 500µg/mL で CH₃SH 産生を有意に阻害した。

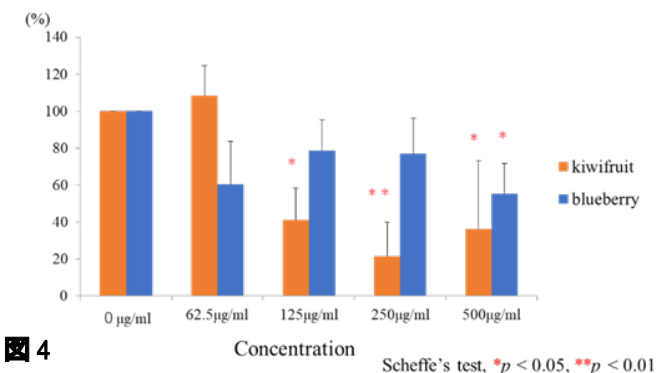


図 4

< 臨床研究 >

(4) リアルタイム PCR 法による舌苔サンプル中の細菌数測定

細菌カウンタ[®]サンプルを用いて、リアルタイム PCR 法による舌苔サンプル中の細菌数測定法を確立した。(雑誌論文)

(5) 口臭および口腔内細菌に影響する因子の解明 (雑誌論文)

分析の結果、図 5 に示すように喫煙者群の H₂S で有意に高い値を示した。喫煙者群では、唾液中の総細菌数、歯周病原細菌である Fn 菌数および *Campylobacter rectus* (Cr) 細菌数が有意に高く、重回帰分析においても喫煙が口腔細菌叢に関与することが明らかとなった。しかし、各細菌数と歯周ポケットの指標との間に関連性は認められなかった。

一方、舌清掃習慣のない 21 名の舌苔中の細菌数を分析した結果、喫煙者群では舌苔細菌の総数に占める Fn 菌数および Cr 菌数の比率は 3.03%および 0.60%と非喫煙者と値と比較しておよそ 5 倍高く (p<0.05), VSC 量との間にも有意な正の相関が認められた (p<0.01)。上記の結果から、喫煙は歯周病原細菌の舌苔への定着を高め、VSC 量の増加により口臭にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

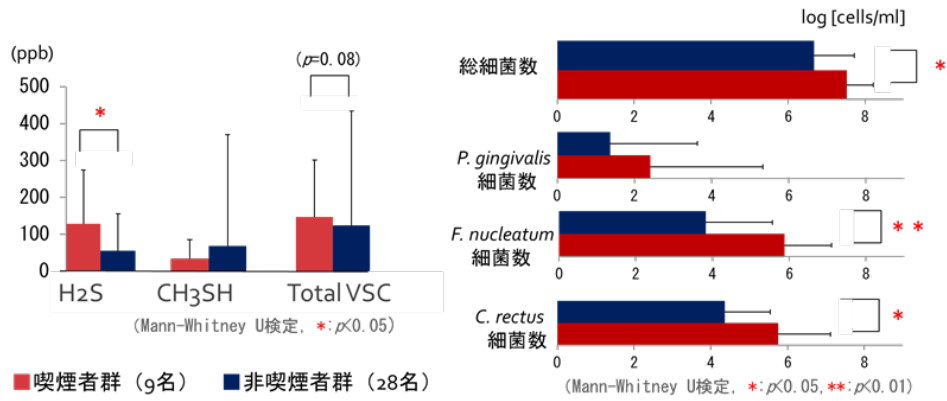


図 5 ■喫煙者群 (9名) ■非喫煙者群 (28名)

(6) ポリフェノール含有ブルーベリー摂取による口臭および口腔内細菌への影響

図 6 に示すように、ブルーベリー溶液摂取時は H₂S 測定値および VSC 量において減少傾向は認められたものの、有意な差は確認できず (p=0.08), 細菌数においても同様であった。ブルーベリー溶液およびコントロール溶液摂取において、その他の指標においても有意な差は見出されなかった。以上のようにポリフェノール含有ブルーベリー摂取において、口臭および口腔内細菌への影響として短期的な効果は認められなかった。

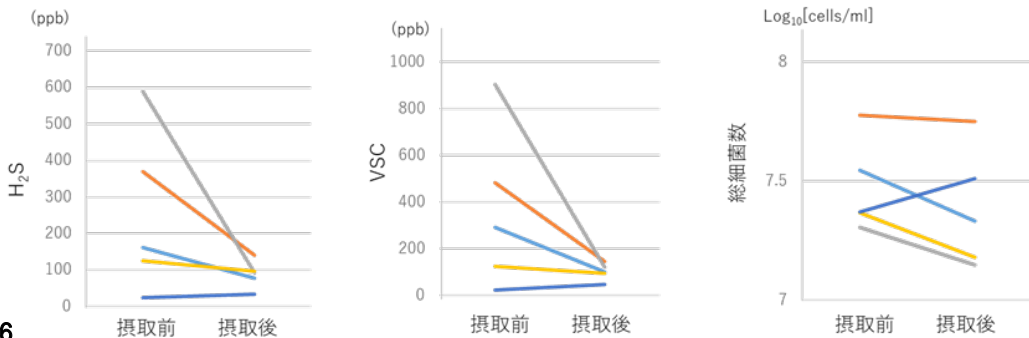


図 6

(7) キウイフルーツパウダー含有タブレット (BREO EX[®]) 摂取による影響

表 1

各介入試験前後での評価結果を表 1 に示す。介入試験の前後では H₂S, VSC および WTCI 測定値で有意な減少が認められた。介入試験の前後では全ての評価項目値で有意な減少が認められた。介入試験の前後では H₂S, VSC, WTCI および細菌数で有意な減少が認められた。

	Intervention I	Intervention II	Intervention III
H ₂ S ^a	p=0.031*	p<0.01**	p<0.01**
CH ₃ SH ^a	p=0.246	p<0.01**	p=0.192
VSC ^a	p=0.021*	p<0.01**	p<0.01**
WTCI ^a	p<0.01**	p<0.01**	p<0.01**
Total bacteria ^b	p=0.327	p<0.01**	p<0.01**
Fn ^b	p=0.923	p<0.01**	p<0.01**

^aWilcoxon signed-ranks test or ^bpaired t test
*: p<0.05, **: p<0.01

クロスオーバー試験の分析結果から、BREQ EX[®]の摂取は舌清掃との比較(介入試験 と)において CH₃SH 測定値、WTCl、細菌数および Fn 菌数において有意差が認められた(図 7)。介入試験 と との比較では、細菌数および Fn 菌数において有意な差が認められた。

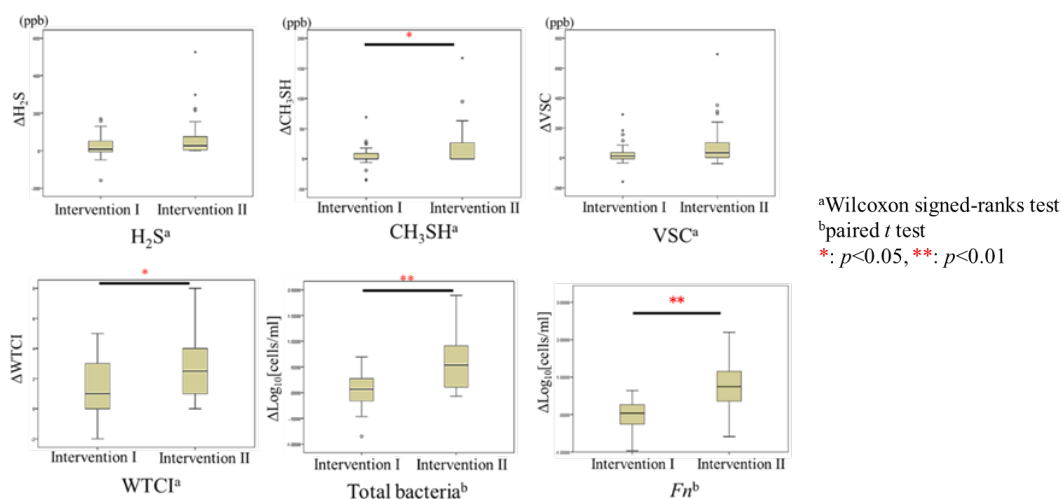


図 7

< 総括 >

以上の結果は、キウイフルーツ抽出物およびブルーベリー抽出物が *F. nucleatum* を含む口腔細菌数の減少や口臭の原因物質である揮発性硫黄化合物の産生抑制に有効であることを示している。本研究から上記 2 つの素材に口腔保健推進のための機能性食品としての可能性が見出された。

< 引用文献 >

Yokoyama M, Hinode D, Yoshioka M, Fukui M, Tanabe S, Grenier D, Ito HO: Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. Oral Microbiol Immunol 23, 55-59, 2008.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Moriyama M, Hinode D, Yoshioka M, Sogawa Y, Nishino T, Tangoku A, Grenier D: Impact of the use of Kampo medicine in patients with esophageal cancer during chemotherapy: a clinical trial for oral hygiene and oral condition, J Med Invest, 65 (3.4):184-190. 2018. doi: 10.2152/jmi.65.184. (査読あり)

Okazawa Y, Hinode D, Yoshioka M, Doi T, Nakae H, Sogawa Y, Grenier D: Comparison of oral malodor and oral microbiome in smokers and non-smokers, Smoking Control Science, 11 (6), 1-9, 2017. https://www.jascs.jp/kinen_kagaku/2017/2017-06/kinen-kagaku/2017-06-P1.pdf#search=%27Comparison+of+oral+malodor+and+oral+microbiome+in+smoker+s+and+nonsmokers%27 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

Matsumura Y, Hinode D, Yoshioka M, Asakuma H, Takii H: Effect of kiwifruit and blueberry extract against bacterial VSC production. 96th General session of the International Association for Dental Research. (July 25-28 2018, London, UK)

松村 佑季, 日野出 大輔, 土井 登紀子, 坂本 治美, 河野 りか, 吉岡 昌美, 滝井 寛, 朝熊 弘樹: 舌苔中の細菌および口臭に対する口中ケアタブレットの有効性の検討, 第 67 回日本口腔衛生学会・総会 (2018 年 5 月 19 日, 札幌市教育文化会館, 北海道札幌市)

Moriyama M, Hinode D, Yoshioka M, Sogawa Y, Nishino T, Tangoku A, Grenier D: Impact of the use of Kampo medicine in patients with esophageal cancer during chemotherapy: a clinical trial, 65th Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research, (November, 17-18, 2017, Showa University, Tokyo, Japan).

松村 佑季, 日野出 大輔, 十川 悠香, 山崎 明香, 吉岡 昌美: ブルーベリーの *Fusobacterium nucleatum* 発育抑制およびメチルメルカプタン産生抑制への関与, 第 27 回 近畿・中国・

四国口腔衛生学会総会（2017年10月1日，広島大学，広島市）

Okazawa Y, Hinode D, Doi T, Yoshioka M, Grenier D: Comparison of Oral Malodor and Microbiome in Smokers and Non-smokers. 95th General session of the International Association for Dental Research. (March 22-25 2017, San Francisco, USA)

岡澤 悠衣，日野出 大輔，土井 登紀子，吉岡 昌美：喫煙者の口臭と唾液中に検出される口腔細菌の特徴，第11回日本禁煙学会学術総会（2016年10月28-29日，京都大学医学部・京都市）

岡澤 悠衣，日野出 大輔，土井 登紀子，中江 弘美，横山 正明，玉谷 香奈子，吉岡 昌美：舌苔中の歯周病関連細菌に対する喫煙の影響について，第65回日本口腔衛生学会・総会（2016年5月29日，東京医科歯科大学・東京都文京区）

〔図書〕（計2件）

日野出 大輔，吉岡 昌美（分担監訳），栄養と歯科医学，稲垣暢也，中屋豊総監訳：A. キャサリン ロス他編集，ロス 医療栄養科学大事典 健康と病気のしくみがわかる，西村書店，2018年11月，p776-794，全1337頁

日野出 大輔（分担執筆）栢 豪洋他編集：歯科衛生士のためのポケット版最新歯科用語辞典クインテッセンス出版，2016年12月． p233-288，全376頁

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉岡 昌美
ローマ字氏名：(YOSHIOKA, Masami)
所属研究機関名：徳島文理大学
部局名：保健福祉学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：90243708

研究分担者氏名：土井 登紀子
ローマ字氏名：(DOI, Tokiko)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）
職名：教務補佐員
研究者番号(8桁)：70747683

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：グレニエ ダニエル
ローマ字氏名：(GRENIER, Daniel)

科研費による研究は，研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため，研究の実施や研究成果の公表等については，国の要請等に基づくものではなく，その研究成果に関する見解や責任は，研究者個人に帰属されます。