

令和元年6月18日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11871

研究課題名(和文)ポリフェノールの生体内動態と歯周炎予防機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of plant-derived polyphenols in the prevention of periodontal diseases

研究代表者

渡辺 清子 (Watanabe, Kiyoko)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：70148021

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)：植物ポリフェノール類による歯周炎予防機序について解明する目的で、P.g感染により惹起される歯肉微小循環障害に対する改善作用について検討した。鶏血藤の経口投与により、P.g感染で認められる毛細血管のネットワーク障害が、非感染コントロールレベルまで回復することが確認された。また、鶏血藤および松樹皮抽出物の投与は、口蓋歯肉の虚血性充血を改善した。さらに、松樹皮抽出物はP.g, A.aおよびS.mによるバイオフィーム形成を濃度依存的に抑制した。以上の結果から、植物ポリフェノールは、歯周炎惹起に関わる歯垢形成を抑制し、さらに歯肉局所の血流改善を促すことで歯周炎発症を抑制する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎は細菌感染に起因する炎症性疾患であり、歯周組織の破壊は局所で産生される活性酸素種(ROS)の関与が指摘されている。様々な生理活性が認められる植物ポリフェノールは、抗酸化作用を有するとともに実験的歯周炎での歯槽骨吸収を抑制することが報告されている。その抑制機序の一環として、鶏血藤や松樹皮抽出物が歯垢形成抑制作用を有し、P.gingivalisにより惹起される実験的歯周炎における歯周組織の毛細血管障害を改善することが本研究で明らかとなった。このことは、日常的に摂取する安全性の高い食品類を用いて歯周炎予防が可能であることが示されたことになる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism of preventive actions by plant-derived polyphenols for periodontal diseases, we examined the ameliorating effect of Jixueteng and French pine bark extract on gingival microcirculation disorder caused by P.g infection. Administration of Jixueteng to P.g-infected mice improved the gingival capillary network disorders to non-infected control levels. In addition, administration of Jixueteng or pine bark extract showed significant improvement in hyperemia of the palate gingiva caused by ischemia. Furthermore, the inhibitory effects of the pine bark extract on the biofilm formation by P.g, A.a and S.m were evaluated. The number of viable bacteria was dose-dependently decreased and the accumulation of bacterial cells was inhibited. The results suggest that plant-derived polyphenols may be useful to prevent periodontal diseases by suppressing plaque formation and improving gingival blood circulation.

研究分野：微生物学

キーワード：植物由来ポリフェノール 歯周炎予防 バイオフィーム形成抑制 抗酸化作用 歯肉微小循環の改善

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

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、歯周組織の破壊と歯槽骨吸収を特徴とする慢性炎症性疾患である。歯周組織の炎症は、細菌感染に対抗する宿主の応答として炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF- α) や活性酸素種 (ROS) の産生によって惹起されると考えられているが、近年、これらの過剰な産生は、歯周組織破壊や歯槽骨吸収を引き起こすために歯周炎を増悪させることが報告されている (Ohnishi *et al.*, 2009)。

ポリフェノール (多価フェノール) とは、分子内のベンゼン環上に水酸基を 2 個以上持つフェノール化合物の総称であり、強い抗酸化作用を有することから、酸化ストレス刺激による生活習慣病の発症や増悪の予防に有効であると考えられている。その他の生理作用として各種ポリフェノールには抗炎症作用、ホルモン様作用、抗菌作用などが報告されており、申請者も、平成 24 年~26 年の科学研究費補助金を受けた研究において、植物由来ポリフェノールである松樹皮抽出物が *P. gingivalis* に対する抗菌活性を有し、*P. gingivalis* 感染により惹き起こされる実験的歯周炎での歯槽骨吸収を抑制する働きがあることを明らかにした (Sugimoto *et al.*, 2014)。しかしながら、歯周炎も細菌感染に起因する慢性炎症性疾患であるため、松樹皮抽出物の歯周炎予防効果が単なる抗菌作用によるものか、その他の因子が関与していたかについて、その抑制機序については不明な点が多い。

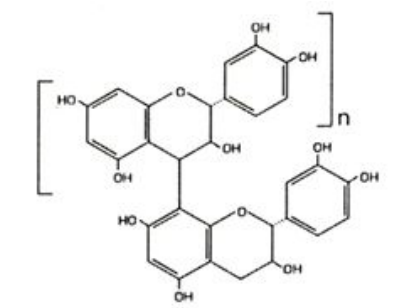


図1 松樹皮抽出物の基本構造

2. 研究の目的

本研究では松樹皮抽出物を含む植物由来ポリフェノールの歯周炎予防作用機序について解明する目的で、種々の口腔内細菌の口腔内定着予防効果・口腔バイオフィーム形成抑制について評価を行った。さらに、*P. gingivalis* 感染により誘導する実験的歯周炎モデルを用い、歯周局所での抗炎症作用について、歯肉微小循環に対する影響、炎症性サイトカイン産生抑制性、ならびに抗酸化作用について検討した。

3. 研究の方法

(1) 植物ポリフェノール

本研究で使用する植物由来ポリフェノールは、フランス海岸松抽出物、漢方薬である鶏血藤およびカカオ豆抽出物を用いた。

(2) 口腔バイオフィーム形成抑制効果の検討

被験菌は *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* および *S. mutans* とした。バイオフィーム形成に対するフランス海岸松抽出物 (PYC) の抑制効果の検討は、24 穴プレート中で 1×10^7 CFU に調整した各菌液を種々の濃度の PYC 溶液を含む培地中で 24 時間、嫌氣的に培養し、培養終了後、プレートは PBS を用いて 3 回洗浄し、バイオフィーム形成細菌を血液寒天培地上で培養し生細菌数を求めることにより評価した。また、カバースリップ上で形成させた各菌のバイオフィームを Molecular Probes 社製の LIVE/DEAD 染色キットを用いて染色し、生菌および死菌の分布について蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、PYC によるバイオフィーム形成抑制作用について検討した。

フランス海岸松抽出物 (PYC) の歯垢形成抑制性

フランス海岸松抽出物 (PYC) 含有チューイングガムを作製し、全身疾患を有さず、現在歯周病治療を行っていない被験者を対象に、実験群には 1 回当たり 5 mg の PYC 含有ガムを 1 日 6 回、1 回につき 15 分間、対照群には PYC を含有しないプラセボガムを同様の条件で 4 週間に渡って噛むよう指示した。実験開始時、2 週間後、ならびに 4 週間後に口腔内診査を行って PII、GI、BOP ならびに PD を測定し歯垢形成量を比較した。なお、本実験は、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認を受けて行われた。

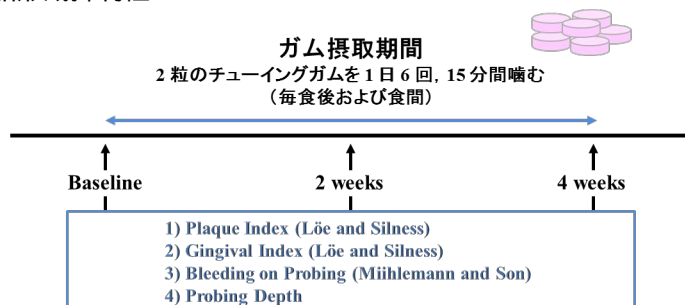


図1 実験の概要

(3) 実験的歯周炎モデルを用いた歯肉微小循環の解析

レーザードップラー法

マウスあるいはラットの口腔内に *P. gingivalis* を感染させた後、口蓋歯肉を 1 分間圧迫解放することで生じた反応性充血の血流量をプローブによるレーザードップラー法にて測定した。測定は 1 週間間隔で行った。実験期間中、フランス海岸松抽出物は食餌に混合して動物に与え、

鶏血藤は飲料水に混合して摂取させた。それぞれ、植物ポリフェノール摂取群と非摂取群との比較によりポリフェノール類の歯肉微小循環改善効果を比較した。

歯肉血管鑄型標本による血管障害程度の解析

マウス歯周炎モデル実験を用い、血管にレジンを注入を行い歯肉局所の血管鑄型標本を作製し、*P. gingivalis* 感染による微小血管の障害程度を鶏血藤摂取群および非摂取群間で比較した。

(4) ラット歯周炎モデルを用いた炎症性サイトカイン量の測定

P. gingivalis 接種 2 週間後、ならびに 4 週間後にラットを安楽死させ、歯肉組織を採取した。採取した歯肉組織をホモジナイズ後、総 RNA を抽出し、炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6 および TNF- α) のメッセージ発現レベルを RT-PCR 法にて検討した。また、血中 TNF- α 量を ELISA kit を用いて測定した。

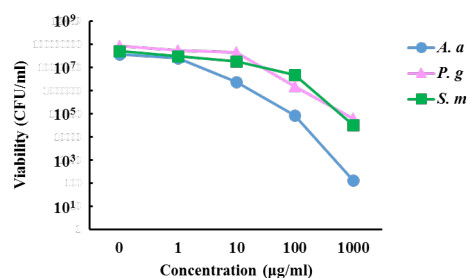
(5) 抗酸化作用の測定

カカオ豆抽出物の抗酸化活性は、Electron Spin Resonance (ESR) 法にて測定した。

4. 研究成果

(1) 口腔バイオフィーム形成抑制効果

P. gingivalis および *A. actinomycetemcomitans* は、BHI broth に Yeast extract, hemin, vitamin K₁ を添加した培地で 24 時間培養した。フランス海岸松抽出物 (PYC) を 0 mg/ml、10 mg/ml、100 mg/ml、あるいは 1000 mg/ml 濃度になるように培養液中に添加すると、濃度依存的に生菌数は減少した。また、*S. mutans* は、0.25% 蔗糖を含有する Tryptic soy broth を用いて培養したが、やはり PYC の濃度依存的にバイオフィーム形成の抑制が認められた。



また、カバースライド上に形成されたバイオフィームの蛍光顕微鏡観察では、*P. gingivalis* は、明らかにカバースリップへの付着が認められ、PYC 添加による殺菌作用が認められた。一方、*S. mutans* は強固にカバースリップに付着していたが、PYC 処理によるガラス面への付着・蓄積の抑制が明らかに認められた。

フランス海岸松抽出物による歯垢形成抑制効果

実験開始時の各パラメーターには差異は認められなかったが、PYC ガム摂取群では、開始 4 週間後にプラセボ群と比較して有意な PII の減少が認められた ($P < 0.01$)。

(2) 歯肉微小循環の解析

C57/6N マウスは、非感染コントロール群、鶏血藤摂取群、*P. gingivalis* 感染群、*P. gingivalis* 感染+鶏血藤摂取群の 4 群に分けられ、*P. gingivalis* 感染後、1 週~5 週まで口蓋歯肉の血流量の測定を行った。*P. gingivalis* 感染前の血流量には 4 群間で差異は認められなかったが、感染 5 週後では、*P. gingivalis* 感染群において有意な反応性充血量の増加が認められた。しかしながら、*P. gingivalis* 感染+鶏血藤摂取群では、コントロール群と同様の反応しか示さず、歯肉局所の循環改善効果が認められた。また、歯肉毛細血管鑄型の観察からも、*P. gingivalis* 感染後群では、顕著な毛細血管の破壊が認められたのに対し、*P. gingivalis* 感染+鶏血藤摂取群では、非感染コントロール群と同程度の毛細血管像が確認された。

ラット歯周炎モデルでは、*P. gingivalis* 感染後 7 週で、フランス海岸松抽出物摂取による反応性充血の顕著な軽減が観察され、植物由来ポリフェノールが *P. gingivalis* 感染による歯周組織破壊を抑制する働きがあることが明らかとなった。

(3) 炎症性サイトカイン産生性

P. gingivalis 感染によるラット歯周炎モデルを用いて、感染 2 週間および 4 週後の歯肉中の炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6 および TNF- α) の遺伝子発現について検討した結果、いずれの群においても明瞭な遺伝子発現が認められなかった。

(4) 抗酸化作用

抗酸化作用は ESR 法にて測定したが、カカオ豆抽出物は、濃度依存的にヒドロキシラジカル量を減少させ、0.1mg/ml、1.0 mg/ml ならびに 10 mg/ml 濃度でラジカル消去率はそれぞれ 0%、55%、ならびに 92%であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Kan P, Sasaki H, Inaba K, Watanabe K, Hamada N, Minabe M: Inhibitory effects of azithromycin on the adherence ability of *Porphyromonas Gingivalis*. Journal of Periodontology, doi: 10. 1002/JPER.18-0559, 2019. (査読有)

Sato T, Watanabe K, Sasaki H, Hiramane H, Goda S, Hamada N: Antimicrobial activity and inhibitory effect of alveolar bone loss of toothpaste containing a natural plant extract. 神奈川歯学, 53(1, 2), 40-44, 2018. (査読有)

Sasaki H, Yoshida A, Yoshino F, Inaba K, Sato T, Hiramane H, Watanabe K, Hamada N: The bactericidal and antioxidant effects of cacao bean extract against periodontal pathogen. 神奈川歯学, 53(1, 2), 45-48, 2018. (査読有)

Suzuki M, Toyama T, Watanabe K, Sasaki H, Sugiyama S, Yoshino F, Yoshida A, Takahashi S, Wada-Takahashi S, Matsuo M, Todoki K, Hamada N: Ameliorating Effects of *Jixueteng* in a Mouse of *Porphyromonas gingivalis*-induced Periodontitis: Analysis Based on Gingival Microcirculatory System. Natural Product Communications, 13(12), 1699-1703, 2018. (査読有)

Watanabe K, Hiramane H, Toyama T, Hamada N: Effects of French Pine Bark Extract Chewing Gum on Oral Malodor and Salivary Bacteria. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 64(3), 185-191, 2018. Doi: 10.3177/jnsv.64.185. (査読有)

〔学会発表〕(計 14件)

渡辺清子: フランス海岸松抽出物による揮発性硫化物産生関連遺伝子発現の抑制作用. 神奈川歯科大学学会第53回総会, 2018.

渡辺清子: フランス海岸松抽出物による揮発性硫化物産生抑制性の検討. 第60回歯科基礎医学会学術大会, 2018.

Watanabe K (渡辺清子): Reduction of Bacterial VSCs Production by Pine Bark Extract. The 96th General Session & Exhibition of the IADR, 2018.

遠山歳三: マウス実験的歯周炎モデルにおける生薬「鶏血藤」の循環改善効果. 日本歯周病学会60周年記念京都大会, 2017.

渡辺清子: フランス海岸松樹皮抽出物による口腔バイオフィルム形成抑制効果の検討. 日本歯周病学会60周年記念京都大会, 2017.

佐藤武則: フランス海岸松樹皮抽出物含有歯磨剤の抗菌効果と歯槽骨吸収抑制効果. 神奈川歯科大学大学院大講座分野融合型基幹研究(1). 神奈川歯科大学学会総会第52回総会, 2017.

佐々木悠: カカオ豆抽出物による歯周病改善効果に関する基礎的研究. 神奈川歯科大学大学院大講座分野統合型基幹研究(1). 神奈川歯科大学学会総会第52回総会, 2017.

平嶺浩子: Pycnogenolの揮発性硫化物産生抑制効果の検討. 神奈川歯科大学学会総会第52回総会, 2017.

Watanabe K (渡辺清子): Effects of Pine Bark extract on Bacterial Volatile Sulfur Compounds Production. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017.

Tomiya K (富山潔): Effects of astringent persimmon tannin on bacterial diversity of biofilms. CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress 2017, 2017.

Watanabe K (渡辺清子): Inhibitory Effects of Pine Bark Extract on Biofilm Formation. 95th General Session & Exhibition of the IADR, 2017.

渡辺清子: フランス海岸松抽出物の歯垢形成抑制効果の検討. 神奈川歯科大学学会第51回総会, 2016.

渡辺清子: フランス海岸松樹皮抽出物の歯垢形成抑制効果. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016.

Watanabe K (渡辺清子): Effects of pine bark extract chewing gum on periodontal health. 104th FDI Annual World Dental Congress 2016, 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：浜田 信城
ローマ字氏名：HAMADA, Nobushiro
所属研究機関名：神奈川歯科大学
部局名：大学院歯学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：20247315

研究分担者氏名：高橋 俊介
ローマ字氏名：TAKAHASHI, Shunsuke
所属研究機関名：神奈川歯科大学
部局名：大学院歯学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：60206810

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。