

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592664

研究課題名（和文） 要介護高齢者のための口腔細菌叢改善用カテキンジェルの開発

研究課題名（英文） Possibility of the oral microorganism control in the elderly by a gel-entrapped catechin

研究代表者

田村 宗明（TAMURA MUNEAKI）

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30227293

研究成果の概要（和文）：

カテキンジェルは、歯垢肥厚に関与する菌、う蝕原因菌、歯周病原菌および *Candida* 症原因菌に対して抗菌活性を認めたが、正常な口腔環境維持に重要な菌群には発育阻止作用を示さなかった。また、カテキンの抗菌機序には過酸化水素の産生が深く関与していた。一方、臨床試験において、上記 *in vitro* の実験結果とほぼ同様な抗菌効果を示していた。これらの結果から、カテキンジェルは高齢者の口腔ケアおよび QOL の向上に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Microbial inhibition zones against oral microorganisms using gel-entrapped catechin (GEC) were found for all of the strains of *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and periodontopathic bacteria *in vitro* assay. By contrast, no inhibitory effect was observed for oral streptococci which play an important role in indigenous oral flora. The anti-microbial activity of GEC is related with hydrogen peroxide. On the other hand, *in vivo* assay, same anti-microbial activity was observed by the application of GEC.

These results suggest that GEC could be useful for oral care in the elderly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口腔ケア

1. 研究開始当初の背景

口腔細菌叢は数百種を超える極めて多くの細菌によって構成されており、これらは複雑な相互作用によりそのバランスを保ち、外来微生物の定着および増殖を阻止する重要な役割を担っている。しかし、日常的な口腔ケアの欠如によりバランスが崩れた場合、細菌叢が変化し様々な感染症の原因となる。常在微生物の増加と菌種遷移は、口腔内感染症

の原因となるばかりでなく、様々な全身性疾患を起こすことが報告されており、特に近年、高齢化社会のため歯周病罹患率上昇および免疫機能低下から惹起される感染性心内膜炎や心筋梗塞、嚥下および咳反射低下が原因の誤嚥下性肺炎の発症率は急上昇しており、高齢者、特に要介護高齢者の口腔感染症予防および口腔衛生向上が極めて重要な問題となっている。

一方、お茶成分「カテキン」は抗菌、抗真菌、抗ウイルスなど多様な作用を持つ天然成分であるが、これまで、口腔細菌へのカテキン抗菌効果報告は極めて少ない。さらに、*in vitro*での顕著な抗菌効果が発表されているにもかかわらず、口腔への応用もほとんどない。日本人になじみの深い、この抗菌性天然成分を口腔ケアに用いられるのでは、と考え、これまで利用できなかった理由を「カテキンの摂取法が主に飲料のために口腔内滞留時間が短いからでは」と推測した。

これらの背景から、老人の口腔乾燥症のために開発された保湿ジェルに抗菌性天然成分をカテキンを添加し、カテキンの口腔内長時間滞留により口腔微生物数をコントロールし、高齢者の口腔疾患ならびに関連する全身疾患を予防できるのでは、と仮説を立てた。

2. 研究の目的

*In vitro*では、より多種の口腔由来微生物を被験菌とし、カテキンジェルの口腔内抗菌スペクトルを作製する。次に、ジェルの有用性について、さらにカテキンジェルと過酸化水素との関わりについて検討し、抗菌機序を明らかにする。

一方 *in vivo*では、大規模な臨床治験を行い、主に *S. mutans*, *C. albicans* および歯周病原菌に対するカテキンジェル抗菌効果を検討する。

これらの結果から、カテキンジェルを用いることによる、高齢者の口腔ケアおよび QOL 向上に利用できる可能性を導き出す。

3. 研究の方法

(1)カテキンの抗菌効果実験 (*in vitro*)

う蝕症、歯周病など口腔病原性微生物数を像増加し、各菌混和寒天培地に対して滅菌シリンドラーで形成したウェルにサンプルを充填する改良型寒天拡散法で培養後、形成した発育阻止帯の大きさで抗菌効果を判定、カテキンジェル抗菌スペクトルを作製する。さらに、市販の保湿剤との比較検討を行う。

(2)カテキン抗菌作用と過酸化水素との関連性 (*in vitro*)

カテキン抗菌機序として過酸化水素の推測、初期歯垢形成レンサ球菌の大量過酸化水素産生能について化学蛍光量測定法で計測し、(1)で確立した抗菌スペクトルと比較、過酸化水素産生性とカテキンに対する各菌感受性・抵抗性の関連性を解明する。

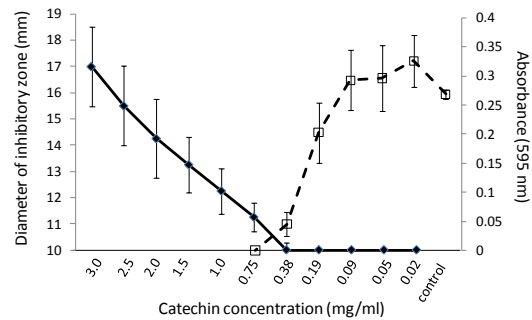
(3)ヒト口腔ケア応用の検討・・・臨床治験 (*in vivo*)

治験前に被験者の唾液をサンプルとし、総菌数、総レンサ球菌数、*S. mutans* 数、*C. albicans* 数および、歯周病原菌数について培養法、PCR 法で計測する。摂取方法は被験者に 1 日に 1 回、就寝前にカテキンジェル 20

mg/ml を口腔内に塗布してもらう。摂取期間は 2 ヶ月とし、サンプルとして唾液を採取、前述の微生物数を調べる。プラシーボ群も設定し、統計処理により臨床でのカテキンジェル抗菌効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 寒天拡散法と既法濁度法との比較



寒天拡散法と既法濁度法の MIC の比較、*S. mutans* の結果を示す。寒天拡散法と濁度法では MIC 濃度が同じであった。

(2)カテキンの抗菌効果実験

寒天拡散法の結果、菌種により MIC 濃度に差が認められた。特に凝集能が高く、歯垢成熟・肥厚に関与する *Actinomyces* や *Fusobacterium*, う蝕の原因菌である *S. mutans*, 化膿性炎症に関与する *S. aureus* や MRSA, カンジダ症の原因菌である *C. albicans* ならびに歯周病原群に顕著な抗菌効果を示した。(mg/ml)

a) Gram positives			b) Fungi		
<i>S. mutans</i>	ATCC25175	0.75	<i>C. albicans</i>	NUD-201	0.38
	MT8148	0.75		NUD-202	0.38
<i>S. mitis</i>	ATCC903	> 3.00	c) Gram negatives		
<i>S. sanguinis</i>	ATCC10556	> 3.00	<i>P. gingivalis</i>	ATCC33277	0.09
<i>S. oralis</i>	ATCC10557	> 3.00		FDC381	0.19
<i>S. gordonii</i>	ATCC10558	> 3.00	<i>P. intermedia</i>	ATCC25611	0.05
<i>A. naeslundii</i>	ATCC12104	0.09	<i>P. nigrescens</i>	ATCC33563	2.50
	WVU627	0.18	<i>A. a.</i>	Y4	0.75
<i>L. casei</i>	IFO3353	> 3.00	<i>F. nucleatum</i>	JCM6328	0.05
<i>L. salivarius</i>	TI2711	> 3.00		JCM11023	0.05
<i>S. aureus</i>	209P	0.38	<i>E. coli</i>	12D-5203	> 3.00
	Cowan I	0.38		K12-C100	> 3.00
MRSA	NUD-101	0.38			

しかし、口腔を正常に保つために働く一群の口腔レンサ球菌には抗菌効果は認められなかった。

(3)カテキン残留に対するジェルと溶液の差

	<i>S. mutans</i> ATCC25175	<i>A. naeslundii</i> ATCC12104	<i>S. aureus</i> 209P
GEC (fresh)	0.75	0.09	0.38
Solution (24 h)	1.50	0.38	1.00
GEC (24 h)	0.75	0.09	0.38

溶液と比較し、ジェルはカテキン成分を長時間保持するとともに、酸化を防ぐことによって抗菌効果が維持されることが判明した。

(4) 他の市販菌との抗菌効果の比較

市販されている抗菌成分含有口腔ケア剤 2 種を供試し、寒天拡散法で抗菌効果を比較したところ、GEC は市販品 2 種よりも抗菌効果が確認される菌に対して、発育阻止帯直径が大きかった。しかし、口腔を正常に保持することに重要な口腔レンサ球菌に対して、市販品 2 種は抗菌効果を示したが、GEC はまったく示さないことが判明した。(図示さず)

(5)カテキン抗菌作用と過酸化水素の関連性

	<i>S. mutans</i> ATCC25175	<i>A. naeslundii</i> ATCC12104	<i>S. aureus</i> 209P	<i>C. albicans</i> NUD-202
GEC	17.05 (1.52)	33.20 (2.76)	22.85 (1.35)	22.10 (1.55)
+catalase	10.00	11.00 (0.25)	16.20 (0.30)	22.00 (0.75)

寒天拡散法にて、培地にカタラーゼを添加して実験を行ったところ、*S. mutans* ならびに *A. naeslundii* に対する抗菌効果にカテキンが産生する過酸化水素が関与していることが判明した。

(6) 臨床治験

① コロニー算定法

カテキンジェルならびにプラセボジェル塗布前と塗布 1 ~ 4 週間後の唾液サンプル中の *Candida* 属菌数と総菌数をコロニー算定した。

<i>Candida</i>			
Placebo	Before	- 1, 2, 3, 4 wks	No significant
GEC	Before	- 1, 2 wks	No significant
		- 3 wk	
		- 4 wk	
			$p < 0.01$
Total microorganisms			
Placebo	Before	- 1, 2, 3, 4 wks	No significant
GEC	Before	- 1, 2, 3, 4 wks	No significant

その結果、プラセボジェルは塗布 4 週間目まで *Candida* 属菌数に影響を与えなかったが、カテキンジェルでは塗布 3 週間後から有意的に菌数が減少した。一方、カテキンジェルもプラセボジェルも総菌数には影響を与えなかった。

② Real Time PCR 法

被験者の塗布 4 週間目の唾液をサンプルとして Real Time PCR を行った結果を下に示す。

1) <i>Streptococcus</i> spp.	プラセボ群 カテキン群	有意差なし 有意差なし	
2) <i>S. mutans</i>	プラセボ群 カテキン群	有意差なし 有意差あり	$p < 0.05$
3) <i>Actinomyces</i> spp.	プラセボ群 カテキン群	有意差なし 有意差あり	$p < 0.01$
4) <i>P. gingivalis</i>	プラセボ群 カテキン群	有意差なし 有意差あり	$p < 0.01$
5) <i>F. nucleatum</i>	プラセボ群 カテキン群	有意差なし 有意差あり	$p < 0.05$
6) <i>C. albicans</i>	プラセボ群 カテキン群	有意差なし 有意差あり	$p < 0.05$

カテキンジェル塗布では総レンサ球菌数に影響を与えなかったが、他の病原性を有する口腔微生物に対して顕著な抗菌効果を示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Tamura M, Ochiai K. Exploring the possible application of catechin (gel) for oral care of the elderly and disabled individuals. JDSR 2012, in press.
- ② Ochiai K, Imai K, Tamura M, Kurita-Ochiai T. Butyric acid effects in the development of periodontitis and systemic diseases. J Oral Biosci 2011, 53 (3), 213-220.
- ③ 田村宗明, 齋藤秀雄, 阿部和正, 石上友彦, 清水典佳, 落合邦康. Hydroxyapatite 不織布を用いたラット歯周病実験モデルの開発. 日大歯学 2011, 85 (3), 125-128.
- ④ Tamura M, Saito H, Kikuchi K, Ishigami T, Toyama Y, Takami M, Ochiai K. Antimicrobial activity of gel-entrapped catechins toward oral microorganisms. Biol Pharm Bull 2011, vol. 34 (5), 638-643.

[学会発表] (計 43 件)

- ① 田村宗明, 齋藤秀雄, 今井健一, 落合邦康. 「*Candida albicans* に対する抗菌ジェルの病原性抑制効果と臨床応用」 第 85 回細菌学会総会、2012 年 3 月 28 日 (長崎ブリックホール・長崎県)
- ② Tamura M, Saito H, Ochiai K. 「Clinical application of gel-entrapped catechin against the oral microorganisms」 IUMS 2011 & 第 84 回細菌学会総会、2011 年 9 月 10 日 (札幌コンベンションセンター・北海道)
- ③ 田村宗明, 落合邦康. 「カテキンジェルの口腔微生物叢に及ぼす影響と要介護高齢者の口腔ケアへの応用」 第 27 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い、2011 年 1 月 8 日 (日本歯科医師会館・東京都)
- ④ 田村宗明, 落合邦康. 「カテキンジェルの口腔微生物に対する抗菌効果と臨床応用の可能性」 第 16 回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会シンポジウム 1 摂食・嚥下リハビリテーションの新しい臨床を開く基礎研究、2010 年 9 月 3 日 (新潟朱鷺メッセ・新潟県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 保存安定性に優れた口腔用抗菌剤および口腔ケア用組成物

発明者: 齋藤洋祐、高見正雄、草間なぎさ、田村宗明、落合邦康

権利者：株式会社明治、日本大学
種類：特許
番号：特開 2011-287441
出願年月日：平成 23 年 12 月 28 日
国内外の別：国内

名称：口腔常在菌叢調整剤およびこれを用いた口腔常在菌叢調整方法
発明者：高見正雄、外山義雄、田村宗明、落合邦康
権利者：明治乳業株式会社、日本大学
種類：特許
番号：特開 2010-64961
出願年月日：平成 20 年 9 月 9 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.nihon-u.ac.jp/bact/result/theme03.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 宗明 (TAMURA MUNEAKI)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号：30227293

(2)研究分担者

今井 健一 (IMAI KENICHI)
日本大学・歯学部・講師
研究者番号：60381810
落合 邦康 (OCHIAI KUNIYASU)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：50095444
山田 潔 (YAMADA KIYOSHI)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号：30313076
泉福 英信 (SENPUKU HIDENOBU)
国立感染症研究所・技官
研究者番号：20250186

(3)連携研究者

なし