

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890134

研究課題名(和文)人工・天然抗菌物質を組み合わせた口腔感染制御システムの新規開発

研究課題名(英文)Development of Oral Infection Control System with Natural and Artificial materials

研究代表者

伊東 孝(Ito, Takashi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30636238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、人工物であるリン酸化プルラン、および天然物であるレクチンの2つのマテリアルを併用し、最適な口腔感染制御システムとしての組み合わせの知見を集積する事が目的である。相互作用の解析では適応方法の工夫で各マテリアルの有効性を向上させた、また天然レクチンは新規の有効性を持つ種類を見いだした。今後、天然レクチンは食品として応用し、リン酸化プルランは口腔ケア剤として応用する予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate interaction of artificial phosphated pullulan and natural lectin as oral infection control systems. Contriving adaptation of these materials improved efficacy by analyzing interaction. The algal lectin used in this study may offer a novel strategy to reduce development of infection on saliva-coated surface by inhibiting the initial adhesion and subsequent biofilm formation of *S. mutans*. In future, natural lectin is applied as a food, phosphated pullulan as oral care agent.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

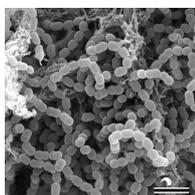
キーワード：口腔内感染症 糖類 多糖

1. 研究開始当初の背景

う蝕や歯周病を予防するには、原因となる菌の増殖を抑える必要がある。抗菌剤は菌の増殖を押さえる上で極めて有効であり、実際、口腔ケア製品の中にも抗菌剤を含有するものが数多く見受けられる。しかしながら、一般の利用者や歯科医師は、これらの口腔ケア製品に対し、十分な効果を実感していないのが現状である。

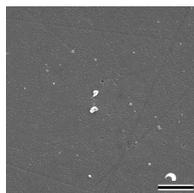
この原因としては、抗菌物質が歯質表面に留まることができないためと考えられる。

人工物である塩化セチルピリジニウム (CPC) などの抗菌剤はアパタイトに吸着する機能を有していないため、口腔内の自浄作用によって歯質表面から容易に洗い流されてしまう。10% CPC水溶液中にハイドロキシアパタイト板を浸漬し、抗菌効果を検討した。結果は驚くべきことに、10%という高濃度のCPC溶液を用いても、軽い洗浄でアパタイト表面から流されてしまい、抗菌効果を発揮しないことが明らかとなった (下図)。



市販口腔ケア製品も、簡単な洗浄で抗菌剤が流れてしまい、う蝕原菌の増殖を抑えることができない。

そこで、申請者らは抗菌剤を歯質表面に運ぶ担体を開発すべく、生体に安全な多糖プルランをリン酸化したリン酸化プルランを合成した。プルランは、①食品・医薬部外品添加物である②リン酸基との結合が強固である③水に溶けやすい④粘性が低いなど、担体として機能的であるだけでなく、薬事法上の許認可を得る上で有利な点が揃っている。さらに、ポリリン酸のように歯質の再結晶を阻害するピロリン酸を分解産物として産生しない。このリン酸化プルランは歯質接着性を有し、かつ、抗菌剤CPCを歯質表面に運ぶ担体として機能する。リン酸化プルランとCPCを配合した溶液でその抗菌効果を検証したところ、洗浄後も優れた抗菌効果を発揮することが明らかとなった (右上図)。



リン酸化プルランを併用すると、洗浄後も優れた抗菌効果を発揮する。

一方、申請者らはキノコ類が含有するレクチンに注目し、有用な薬理効果を持つレクチンのスクリーニング研究を行ってきた。これまでの研究で、マッシュルームやヤナギマツタケから抽出されたレクチンには代表的なう蝕原細菌である *Streptococcus mutans* のバイオフィーム抑制効果があることが明らかとなった。

細菌の初期付着機構に着眼し、歯表面へのバイオフィーム抑制効果を利用した予防剤はこれまでに使用されている予防剤とは全く作用が異なるコンセプトであり、その効能において既存添加物と競合することなく、むしろ新しい市場を開拓すると予想される。

薬剤を効果的に徐放するための担体として種々の材料が検討されているが、歯面に特異的に吸着する担体は現在有効なものがない。これに対し、リン酸化プルランはアパタイトに強固に吸着することが既に確認されており、かつ、口腔内で分解されないため口腔ケア用抗菌物質デリバリーシステムの担体として期待される。さらに、濃度を検知して機能を発現するドラッグデリバリーシステムは他にはない。またマッシュルームレクチンに関しては口腔内細菌の初期付着を阻害するというシステムから他にはない根本的な予防効果が期待できる。上記のように単体で実用化できる段階まで昇華されている両マテリアルの併用を「効果的にする」ことを目的とした本研究は、出口研究のスタートとして非常に重要な意義を持つと考えた。

2. 研究の目的

抗菌剤を歯の表面に運び、極微量でう蝕・歯周病抑制効果を発揮するキャリアの創製は、口腔ケア製品開発における究極の目標である。

申請者らは、この課題に取り組むべく、独自に開発した多糖誘導体であるリン酸化プルランをキャリアとして用いた抗菌

物質デリバリー型の口腔ケア製品を開発した。通常は濃度依存的に抗菌効果を発揮するが、リン酸化プルランと併用することで、濃度を検知し、低濃度になると抗菌効果を発現するメカニズムを解明している。

一方、天然物を応用した口腔内細菌の歯面への初期付着を阻害するマテリアルにも着目し、マッシュルームレクチンが有効な作用を示すことを解明した。本研究では、この2つのマテリアルを併用することにより、最適な口腔内感染制御システムとしての組み合わせの知見を集積した。

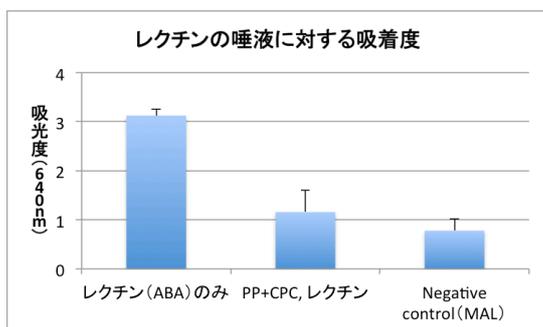
3. 研究の方法

(1) 相互作用の解析

人工物であるリン酸化プルラン、および天然物であるレクチンの2つのマテリアルにおける相互作用の解析を中心に、生体環境に則した条件での検討を行った。

天然物由来レクチンの介在により、上記のシステムが阻害されていないかどうかを確認する必要がある。予備実験において肉眼的な干渉作用はなかった。分子レベルでの検討を行うために、バインディングアッセイを用いてリン酸化プルランによるマッシュルームレクチンの唾液への吸着に対する阻害の有無を検討した。

結果、0.01%リン酸化プルラン-0.01%CPC (PP+CPC) 溶液中ではマッシュルームレクチンの唾液成分への吸着が阻害されていることを確認した (下図)。



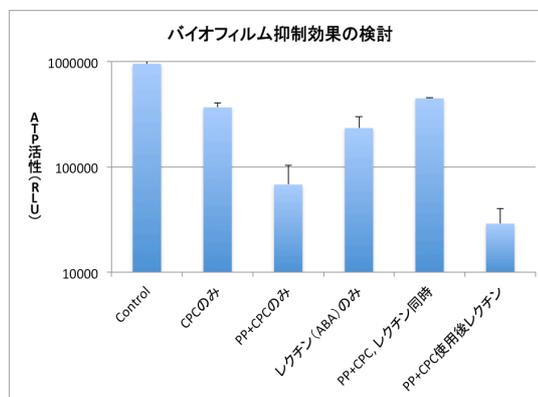
ビオチン化レクチンを用いて唾液に対する吸着度を検討した。PP+CPC を混合した場合、マッシュルームレクチン (ABA) の吸光度が negative control であるイヌエンジュレクチン (MAL) と同等の値まで減少した。

灌流条件での相互作用の検討ではリン酸化プルランがヒドロキシapatiteプレ

ート (HAp) でしか効果を発揮しないため HAp 上での検討を行った。相互作用の効果は抗菌効果で評価した。すなわち、HAp 上に形成された *Streptococcus mutans* 標準株のバイオフィームに対し、ATP 活性測定法 (ルシフェール HS キット, キッコマン, 日本) を用いて定量化した。

結果、リン酸化プルランおよび CPC (PP+CPC) 使用後にレクチンを使用した場合、抗菌効果をさらに高める事が判明した (下図)。

レクチンと PP+CPC を同時に適応した場合、HAp や唾液成分への吸着の前にレクチンが CPC によって変性する等の相互干渉によって本来の抗菌効果が消失したものと推測した。



レクチンおよび PP+CPC における HAp 上でのバイオフィーム抑制効果を ATP 活性測定によって検討した (ATP 活性が低い程、抑制効果が高い)。PP+CPC とレクチンを同時に適応した場合と比較して PP+CPC 適応後にレクチンを適応させて場合、従来の単剤使用よりも ATP 活性は低い値を示した。

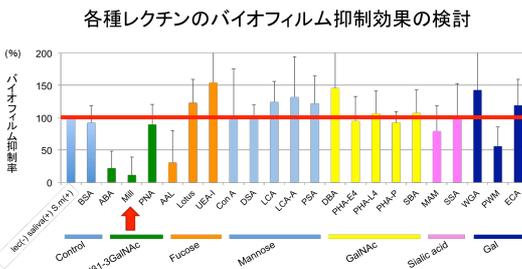
(2) リン酸化プルランの抗菌性の最適化

PP+CPC 溶液中ではマッシュルームレクチンの唾液成分への吸着が阻害されていることを確認したため、添加物および適応方法の工夫で効果的な組み合わせを検討した。研究期間中の検討では最適な添加物を発見する事ができなかったため、適応方法の工夫として、PP+CPC 適応後にレクチンを適応する組み合わせ方法が最適であると判断した。

(3) レクチンの抗菌性の最適化

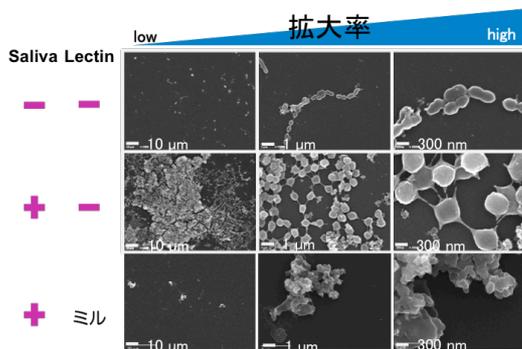
従来の検討ではマッシュルームレクチンが最も有効なレクチンであったが、さらに探索を重ねる事でより有効なレクチンを探索した。*Streptococcus mutans* ATCC25175 株における唾液への付着度の測定によって各レクチンの有効性評価を行った。96穴マイクロプレート上にヒト唾液を固相し、唾液を各種レクチンで被覆し、更に唾液上に *S. mutans* を付着させ、クリスタルバイオレットで染色・抽出し、菌体数の定量を行った。同時に走査電子顕微鏡 (SEM) で *S. mutans* の付着状態を観察した (下図)。

結果、海松 (ミル) 由来レクチンがマッシュルームレクチン以上の有効性を発揮するレクチンである事を確認した。



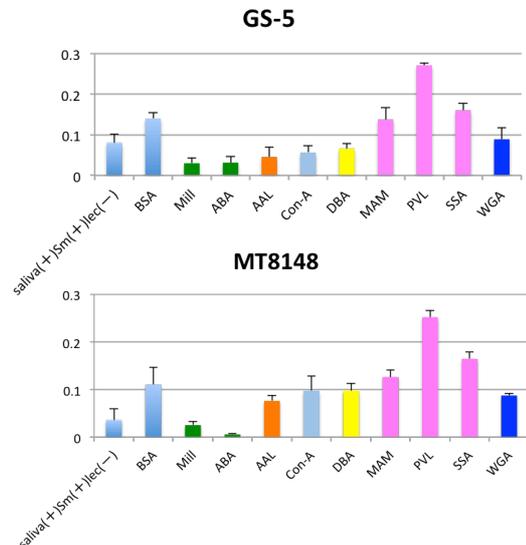
Streptococcus mutans ATCC25175 株における唾液への付着度の測定によってレクチンの抗菌性のスクリーニングを行った。Galβ1-3GalNAc 認識レクチングループの中でもミルレクチンは高い付着阻害効果を示した (赤矢印)。

ミルレクチンの抗菌効果 (SEM)



上図のスクリーニングでは、Galβ1-3GalNAc 認識レクチンの中でもミルレクチンは有意に高い付着阻害効果を示した。同時に、*S. mutans* に対する付着阻害効果は SEM でも顕著に観察することができた。

また、効果効能を確定的にする目的で標準株のみでなく、供与された *Streptococcus mutans* の2菌株におけるバイオフィーム抑制効果を確認した (下図)。

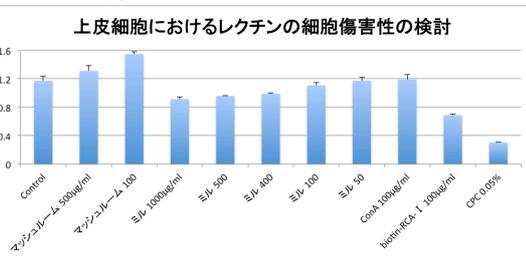


S. mutans 標準株以外の菌株に対する抗菌効果を、前述の手法と同様に検討した (タイトルは各菌株名)。いずれの株でも陽性対照条件 (添加なし) に対してミルレクチンは高い抗菌効果を示した。また、他のレクチンに関しても対象とした2菌株は標準株と同様の傾向を示した

(4) レクチンの安全性の検討

上皮細胞における細胞増殖活性に対するレクチンの影響を検討するため、3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 法を用いて検討を行った (下図)。

結果、殺菌剤に用いられる CPC と神経毒性のあるレクチンである RCA-1 よりも遙かにマイルドであり、臨床的に使用可能な傷害性に留まると考えられた。(代表データは下図)



KB 細胞を対象としたレクチンの細胞毒性試験の結果。レクチン刺激 24 時間後に MTT 試薬 (SIGMA, USA) を添加し、吸光度を測定した。マッシュルーム由来レクチンおよびミル由来レクチンともに有効濃度では control (レクチン添加なし) と比較して差を認めなかった。

4. 研究成果

相互作用の解析の結果、リン酸化プルランと天然レクチンを同時併用した場合、有効性の阻害が示唆された。よって適応方法の工夫によって効果を最適化した。本研究ではPP+CPC適応後にレクチンを適応する組み合わせ方法が最適であると判断し、灌流条件でのバイオフィーム形成阻害の効果を検討する事でその有効性を確認した。

また、レクチンの抗菌性の最適化では、さらに探索を重ねる事でより有効なレクチンを発見でき、且つ標準株以外での菌株を用いて検討する事で効果効能を確定的にした。

さらに、レクチンに関してはin vitroでの安全性試験を行い、口腔内の細胞に対して為害作用を持たない事を確認した。

今回の成果は有効性があるマテリアルの効果的な使用方法を最適化できた点で非常に重要な意味を持つ。実験結果だけでなく、検討方法に関しても今後の橋渡し研究に役立つ事は間違いない。

今後、天然レクチンの応用は常に口腔内へ滞在させるマテリアルとして食品への応用を検討する。リン酸化プルランは口腔感染対策を目的とした口腔ケア剤として応用する。この2つのマテリアルの組み合わせによって、効果的な口腔内感染制御システムへ実用化する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

1. 伊東 孝, Development of Functional food with Infection Control Effect by Mushroom Extract, 日本歯科保存学会 2014 年春期学術大会 (第 140 回), 2014 年 06 月 19 日~2014 年 06 月 20 日, 滋賀
2. 塩田 康祥, 海藻由来レクチンによる口腔感染制御能を有した機能性食品の開発, 第 20 回日本未病システム, 2013 年 11 月 09 日~2013 年 11 月 10 日, 東京
3. 塩田 康祥, Oral Biofilm Inhibition Effect and the Cytotoxicity Test of *Codium Fragile* Extract, 10th Asian Pacific Society of Periodontology

Meeting, 2013 年 09 月 03 日~2013 年 09 月 04 日, 奈良

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊東 孝 (Ito Takashi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 30636238

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し