

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：32703

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06697

研究課題名(和文) カカオ豆抽出物による歯周病の改善効果に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The improvement effect of periodontal disease by cacao bean extract

研究代表者

佐々木 悠 (Sasaki, Haruka)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特別研究員

研究者番号：50757200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：カカオ豆抽出物は、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (P. g) のコラーゲン分解酵素産生抑制作用を有している事が報告されている。そこで、P. g に対するカカオ豆抽出物 (CBP および PW-VE-R) の歯周病改善効果について検討を行った。CBP および PW-VE-R のどちらにも P. g に対する抗菌効果が認められ、P. g バイオフィームに対しても明らかな殺菌効果が認められた。さらに、カカオ豆抽出物は、活性酸素種であるスーパーオキシドおよびヒドロキシルラジカルの消去能を有することが明らかとなった。以上から、カカオ豆抽出物は歯周組織破壊の改善効果を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is reported that cocoa bean extract has the inhibition effects of the collagenase produced by *Porphyromonas gingivalis* (P. gingivalis) such as the periodontal pathogenic bacteria. Therefore, we assessed the improvement effect of periodontal disease using cocoa bean extract (CBP and PW-VE-R) against P. gingivalis. The antimicrobial activity of cocoa bean against P. gingivalis and biofilm was recognized by using CBP and PW-VE-R. In addition, the scavenging activities against the reactive oxygen species such superoxide and hydroxyl radical were indicated with cocoa bean extract. These results suggested that cocoa bean extract might have the improvement effect on periodontal tissue destruction.

研究分野：微生物

キーワード：カカオ抽出物

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周組織の破壊を特徴とする口腔バイオフィルムが原因となる慢性炎症性疾患である。歯周病との関連性において重要視されている細菌は、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)、*Treponema denticola* ならびに *Tannerella forsythia* であるが、なかでも *P. gingivalis* が最も強力な病原性を発揮することが知られている。また、歯周病と心・血管疾患、糖尿病、早産・低体重児出産、誤嚥性肺炎などの全身疾患との関連性が指摘され、歯周病はこれら全身疾患のリスクファクターとなる可能性が示唆されている。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、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し、歯周炎を増悪させていることが近年報告されている。歯周病治療には、歯周病原細菌の排除が必須であるが、複数の細菌が強固なバイオフィルムを形成する上、歯周病原細菌は思春期以降の口腔に安定して定着している常在細菌であるため、その完全な除去は非常に困難である。したがって、スクレーピングやルートプレーニングによる専門的メカニカル清掃を行ってもなかなか改善が認められない場合は、外科的治療を施さなければならないという現状がある。このような一般的な歯周病治療に加えて、生薬や植物由来成分によるバイオフィルム形成抑制を施すことは重要であり、近年、多くの研究が行われている。本研究では、単にバイオフィルム形成を抑制するだけにとどまらず、積極的な歯周組織破壊の軽減を目的として、*P. gingivalis* に対して抗菌活性の認められたカカオ豆の活性酸素消去能、歯肉微小循環破壊の抑制ならびに歯槽骨吸収抑制作用について評価する。カカオ豆は、豊富なポリフェノールを含むため、医学領域では動脈硬化の予防や、コレステロール値減少効果が明らかにされていることから、局所的あるいは全身的投与により、口腔領域の炎症性疾患の改善にとどまらず、内科的アプローチによる全身を健全な状態に保つ効果は大いに期待できると考えられる。

2. 研究の目的

歯周病感染領域における治療は、歯周外科治療や抜歯などの外科処置が主であり、口腔内の血管や歯槽骨喪失に対する内科的アプローチはほとんど行われていない。カカオ豆抽出物は、*Streptococcus mutans* の産生するグルコシルトランスフェラーゼを阻害して細菌の付着性を減少することや *P. gingivalis* のコラゲナーゼ活性を抑制することから、歯周組織破壊を健全に保つ可能性を秘めている。また、カカオ豆は抗菌作用に加え循環改善作用など多様な薬理作用を有しており、病巣に対し多面的にアプローチできる可能性に着目

し、本研究ではカカオ豆抽出物による歯周病の改善効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗菌効果の測定は、BHI-YHK 培地に最終濃度 CBP 100,10,1 mg/ml と PW-VE-R 100,10,1 mg/ml になるように調整した BHI-YHK 培地に各々 100 μ l 添加し、さらに *P. gingivalis* 18 時間培養菌を遠心集菌し、550 nm の波長で吸光度 1.0 に調整した菌液を 10 μ l 加え、嫌気条件下室温で 1 時間作用後、BHI 血液寒天培地に塗抹し生菌数測定を行った。細菌の培養は BHI-broth に yeast extract (5 mg/ml)、hemin (5 μ g/ml)、vitamin K1 (0.5 μ g/ml) を添加した培地に接種し、嫌気ガス (70% N₂, 15% H₂, 15% CO₂) を満たした Anaerobox 内で 37°C 18 時間培養したものをを用いた。

(2) バイオフィルム形成は、*P. gingivalis* を円形カバーガラスをいれた 24 ウェルマイクロプレート内に BHI-YHK 培地を用いて 16.5 時間嫌気培養後、ウェル内をリン酸緩衝液 (pH 7.2) で浮遊菌を除去し、新鮮培地に交換後 24 時間培養して行った。形成したバイオフィルムに対して、CBP 100,10,1 mg/ml および PW-VE-R 100,10,1 mg/ml 濃度になるよう添加し 1 時間嫌気条件下室温で作用後、LIVE/DEAD 染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) 活性酸素種であるヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドの消去率測定は、活性酸素種を特異的に検出可能な電子スピン共鳴 (ESR) 装置を用いて行った。活性酸素種を補足するためのスピントラップ材として、5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide を使用し、in vitro X-band ESR 法を用いて各種濃度のカカオ豆抽出物の活性酸素種消去率を測定した。測定条件は、マイクロ波 8.0 mW、磁場掃引幅 7.5 mT、中心磁場 335.8 mT、掃引時間 1 分、変調磁場 0.079 mT、応答時間 0.03 秒とし室温にて、ヒドロキシルラジカルは 10 秒間、スーパーオキシドは 1 分間 (100.0 mW/cm²) UV 照射 (365nm) を行い測定した。

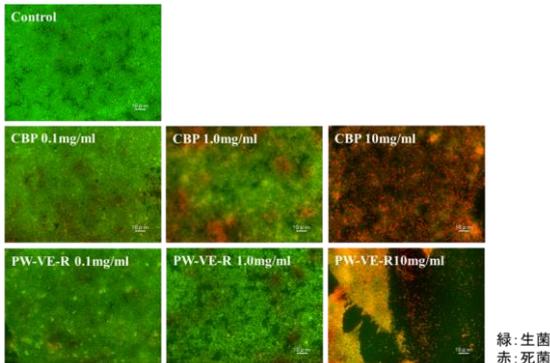
(4) 実験的歯周炎はラットを用いて、コントロール群・*P. g* 感染群・カカオ豆抽出物摂取群・カカオ豆抽出物+*P. g* 感染群の 4 群に分け行った。口腔常在菌を減少させる目的で、イオン交換水中に最終濃度 1 mg/ml のサルファメトキサゾールと 200 μ g/ml のトリメトプリムを混合したものを飲料水として 4 日間与え、その後、3 日間抗生物質を含まないイオン交換水を与えた。コントロール群は、5% カルボキシメチルセルロース溶液 (CMC)、*P. g* 感染群は、5% CMC で調製した *P. g* 菌体浮遊液 (10⁹ CFU/ml) を 1 日毎に 3 回、ラット口腔内へ直接接種した。カカオ豆抽出物摂取群は、最終濃度 10 mg/ml になるように 5% CMC で調整したカカオ豆抽出物溶液を

P. g 接種 2 時間後に投与した。最終投与日より 40 日目にすべてのラットをエーテル麻酔下で断頭渦血により屠殺した。歯槽骨の吸収量は、上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を 7 箇所測定して行った。7 箇所の測定値を平均して個体当たりの骨吸収量とし、それぞれ 6 匹分の平均値を実験群の骨吸収量としてミリメートルで表し、平均値と標準偏差 (SD) を求めた。

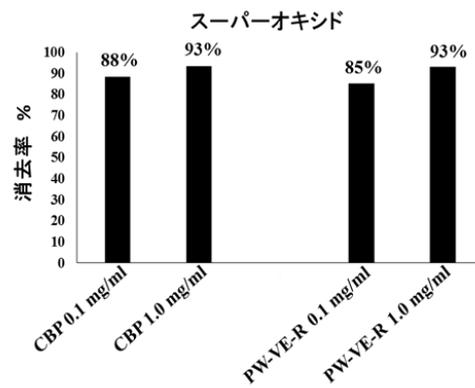
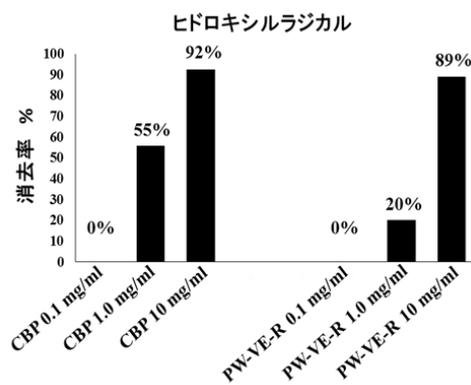
4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* に対する抗菌効果は、CBP および PW-VE-R のどちらにも認められたが、PW-VE-R に比較して CBP の方が強い効果が認められた。

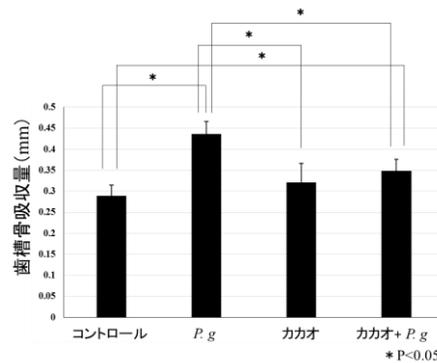
(2) カバーガラス上にバイオフィーム形成させた *P. gingivalis* に CBP および PW-VE-R を作用させ、LIVE/DEAD 染色した結果、CBP および PW-VE-R どちらも濃度依存的にバイオフィーム形成細菌の死滅が認められた。



(3) 2 種類のカカオ豆抽出物は、活性酸素種であるヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシド消去能を有することが ERS 分析によって明らかとなった。ヒドロキシルラジカル消去率は、抗菌効果と同様に、PW-VE-R に比べ CBP の方が強く、スーパーオキシド消去率では、CBP および PW-VE-R に大きな違いは認められなかった。



(4) 実験的歯周炎では、*P. gingivalis* 感染ラットモデルで、歯槽骨吸収が 카카오豆抽出物 CBP 投与群で抑制され、歯槽骨吸収量は非感染のカカオ豆抽出物単独投与群とほぼ同様であった



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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① 佐々木悠、渡辺清子、浜田信城：*Porphyromonas gulae* 線毛タンパク質の歯周組織細胞への影響について 第 98 回細菌学会関東支部総会 2015.10.29-30.

② Sasaki H., Watanabe K, Hamada N: Detection of *Porphyromonas gulae* from dogs and their owners, 第 65 回日本口腔衛生学会・総会 東京医科歯科大学 2016.5.27.

③ Sasaki H., Watanabe K, Hamada N: Epidemiology and transmission of *Porphyromonas gulae* among dogs and owners, 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会 札幌 2016.8.24-26.

④ Sasaki H., Watanabe K, Hamada N: Transmission and pathogenesis of *Porphyromonas gulae* in humans, FDI Poland 2016.9.7-10.

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 悠 (SASAKI, Haruka)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・
特別研究員
研究者番号：50757200

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：