

令和元年6月7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：16K11859

研究課題名(和文)天然ハーブ・キャットクローの抗酸化作用と歯周病予防に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Antioxidant Activity of Cat's claw Extract as Natural Herb and its Preventive Effects on Periodontal Disease

研究代表者

三木 かなめ (MIKI, Kaname)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：30243710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：天然ハーブ・キャットクロー抽出物による歯周病原菌への抗菌作用およびヒト歯肉由来の線維芽細胞を用いた抗酸化作用・抗炎症作用の評価を行った。その結果、キャットクロー抽出物を添加することで歯周病原菌の生育を抑制した。またヒト歯肉由来の線維芽細胞においてLPS刺激で誘導された炎症性サイトカインの産生も抑制し、さらに酸化ストレスを想定した培養系での抗酸化作用と創傷治癒効果も認められたことからキャットクロー抽出物の歯周病予防・改善への応用にむけての有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で注目した天然ハーブ・キャットクローは、関節リウマチの改善などに利用されている伝統ハーブで、多種多様な成分と作用があるのが特徴である。しかし歯周病の予防効果については、不明であった。そこでキャットクロー抽出物について歯周病に対する有効性について基礎的研究として歯周病原菌への抗菌作用およびヒト歯肉由来の線維芽細胞培養系における抗酸化作用および抗炎症作用の効果を明らかにしたことは、キャットクロー抽出物の歯周病への応用の可能性のみならず、歯周病と関連のある全身疾患の予防への応用にも大いに役立つことが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cat's claw is usually taken as a decoction herb tea of the bark, and it has been used in traditional medicine to treat arthritis in Peru. This study aimed to examine whether Cat's Claw inhibits periodontopathogenic bacterial growth, suppresses the production of inflammatory cytokines mRNA expression stimulated by *P. gingivalis* LPS and promotes wound healing, and depresses hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human gingival fibroblast (HGF). Results indicated that Cat's Claw extract has antibacterial activity against some periodontopathogenic bacteria, and has anti-inflammatory activity and antioxidant activity in HGF. Therefore, the use of Cat's Claw extract would be a useful application on the prevention of periodontal disease.

研究分野：予防歯科学

キーワード：天然ハーブ キャットクロー 抗菌作用 抗炎症作用 抗酸化作用 酸化ストレス 歯周病予防

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

1. 研究開始当初の背景

近年様々な疾患の発症や進行に酸化ストレスの関与が明らかにされている。歯周病においても歯槽骨吸収などの歯周組織の破壊を酸化ストレスが促進することが示されている。活性酸素種 (ROS) による障害を抑制することが歯周病の予防や進行抑制に有効であると考えられる。そこで抗酸化作用を示すポリフェノール類を多く含有することで知られている天然ハーブに注目した。その中の特にキャットクローは南米ペルーで樹皮を煎じて飲むという手軽なハーブティーとして利用されており、リウマチや関節炎、神経痛などに効果があるといわれ、有効成分も数多く報告されている。その有効成分には、抗酸化作用を有するポリフェノール類であるプロアントシアニジンやタンニンが含まれている。さらに免疫力の増強やマクロファージの働きを亢進する五環系オキシインドールアルカロイド類、抗炎症や鎮痛作用を持つトリテルペノイド類や抗炎症作用をもつステロイド類などが多く含まれていることが明らかとなっている。

抗酸化作用について、ヒト赤血球でのヘモグロビン酸化を低下させ、ROS や脂質過酸化を抑制するという報告や、また *in vitro* 系で ROS などのフリーラジカル捕捉能を持つことも示された (Food Chem. Toxicol. 49, 2202-2211, 2011 and Bioorg. Med. Chem, 17, 1876-1883, 2009)。さらに抗炎症作用について、LPS により誘導される炎症性サイトカインの産生抑制 (J. Ethnopharmacol., 143, 801-804, 2012) やカラギナンで誘発するラットの足の浮腫の抑制やヒト皮膚の DNA 修復を促進する (J. Nat. Prod., 54, 453-459, 1991 and Phytother Res. 20, 178-183, 2006) など数多くの生理活性がすでに報告されていた。

世界保健機関では 1994 年にサプリメントとして、「内臓に障害を与えず、炎症抑制効果がある薬用植物」として認定され、現在ヨーロッパでは抗炎症薬として医薬品に分類されている。日本でも機能性食品素材として注目を集めつつあり、健康食品のサプリメントとして販売されているが、歯周病の予防効果については全く不明であり、またキャットクロー抽出物の歯周病原菌に対する抗菌作用およびヒト歯肉由来細胞における、抗酸化作用、抗炎症作用についてもまだ明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

天然ハーブ・キャットクローは、ペルーでは関節リウマチの改善に手軽なハーブティーとして利用されている。近年キャットクローには鎮痛作用、免疫能活性化、抗酸化作用、抗炎症作用などの様々な生理活性が報告されており、我が国でも機能性食品素材として注目されつつある。本研究はキャットクロー抽出物の歯周病原菌に対する抗菌作用を評価するとともに、酸化ストレス抑制作用および抗炎症作用についてヒト歯肉由来の線維芽細胞を用いて評価し、歯周病の予防・改善への応用に向けての有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗菌作用の解析

4 種類の歯周病原菌 (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*) を連続段階希釈したキャットクロー抽出物を含む増殖液体培地で培養し、24 時間嫌気培養後の菌の増殖を OD₆₅₅ 値の測定を行い評価した。キャットクロー抽出物は、ハーブティーを想定した熱水抽出したもの (hCat 's Claw) とチンキ剤を想定した 50%エタノールで抽出したもの (eCat 'Claw) の 2 種類を調製し、生育抑制効果の比較を行った。

(2) HGF 細胞への細胞毒性試験

HGF-1 株細胞を使用し、キャットクロー抽出物を様々な濃度を用いた培養系に同時に添加し、24 時間培養後、WST-1 試薬を添加し細胞増殖への影響を OD₄₅₀ 値の測定をマイクロプレートリーダーにより行った。

(3) 酸化ストレス抑制作用の解析

HGF 培養系に過酸化水素を添加して酸化ストレス状態を想定した実験系に、キャットクロー抽出物を添加し、ROS 産生への影響を ROS 検出用試薬である CellRox Green を用いた蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

(4) 抗炎症作用の解析 - 炎症性サイトカイン産生抑制

HGF 培養系にキャットクロー抽出物と歯周病原菌である *P. gingivalis* LPS を同時に添加し、産生される炎症性サイトカイン IL-8 と IL-6 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した。

(5) 抗炎症作用の解析 - 創傷治癒の促進

キャットクロー抽出物で前処理を行った後、コンフルエントな培養細胞単層に一定の創傷を作成し、その後過酸化水素添加した酸化ストレス条件下、損傷した領域の回復する様子を位相差顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) 歯周病原菌に対する抗菌効果

表1 歯周病原菌に対するCat's claw 抽出物の抗菌効果の比較

菌種	エタノール抽出物	熱水抽出物	エピガロカテキンガレート
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	(-)	(-)	(++)
<i>F. nucleatum</i>	(-)	(-)	(++)
<i>P. gingivalis</i>	(++)	(-)	(+++)
<i>P. intermedia</i>	(++)	(-)	(+++)

キャットクロー抽出物およびエピガロカテキンガレートを含む増殖培地に各菌液添加後、24時間培養した。菌の生育度をOD₆₅₅値を測定した。100%生育阻害濃度について、(+++), 200-400μg/ml; (++) , 400-800μg/ml; (+), 800-1600μg/ml; (-), ≥1600μg/mlで示す。

エタノール抽出したものは、エピガロカテキンガレートと同様に顕著な生育阻害を示した。データには示していないが熱水抽出したもので、濃度 1600 μg/ml で 50%の生育抑制が認められた。また *P. intermedia* に対して、*P.g.*と同様でエタノール抽出したもので顕著な生育阻害が認められた。以上の結果から、検討した歯周病原菌の *P.gingivalis* と *P. intermedia* に対して、エタノール抽出したものは抗菌作用が示された。これらの結果は、第 29 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会(2018 年)で報告した。

緑茶成分で知られるエピガロカテキンガレートは抗菌効果のポジティブコントロールとして用いて比較を行った。

表 1 に示したように、*A. actinomycetemcomitans* では、生育抑制および阻害は認められなかった。*F. nucleatum* についても顕著な生育抑制効果は認められなかった。データには示していないが、エタノール抽出物の濃度 1600 μg/ml でようやく 50%の生育抑制効果が認められたに過ぎなかった。

一方 *P.gingivalis* については、

(2) HGF における細胞増殖への影響

図 1 と図 2 に示すように、エタノール抽出(eCat's claw)および熱水抽出した(hCat's claw)キャットクロー抽出物を培養系に添加しても顕著な細胞毒性は認められなかった。しかし、両方の抽出物ともに 200 μg/ml 以上の濃度ではわずかな細胞生育抑制が認められ、** p>0.01, * p>0.001 で統計学的に有意な差を示した。その後の細胞培養系に用いるキャットクロー抽出物の濃度は、100 μg/ml までに設定した。

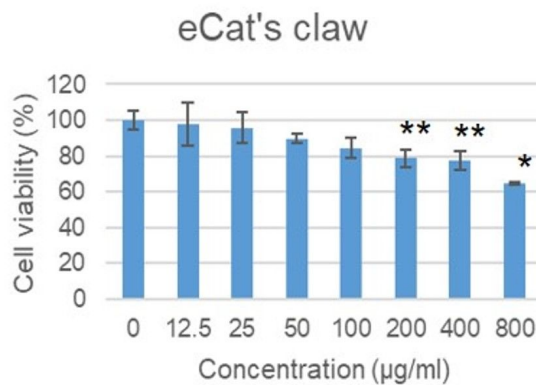


図1 Cat's claw エタノール抽出物の細胞への影響

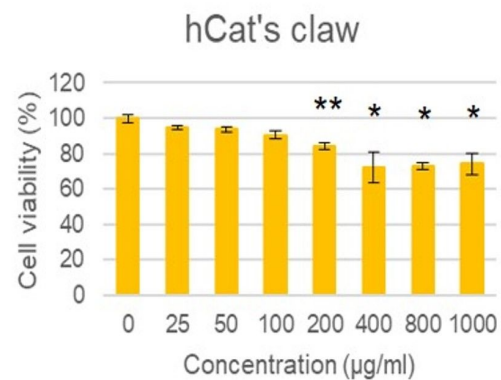


図2 Cat's claw 熱水抽出物の細胞への影響

(3) HGF 培養系における酸化ストレス抑制効果

図 3 に結果を示した。過酸化水素処理を行った酸化ストレス状態の細胞では、ROS 検出試薬により緑色に検出され、ROS の産生が確認できた。青色の染色は、核染色を示す。

過酸化水素と同時にキャットクロー抽出物、特にエタノール抽出したものを添加することで、ROS 検出が顕著に減少する傾向が観察された。一方熱水抽出したのもわずかに緑色の ROS 検出抑制が認められた。キャットクロー抽出物の添加により過酸化水素による ROS 産生を抑制することが示された。データには示さないがコントロールや抗酸化物質であるレスベラトロールの添加では、ROS

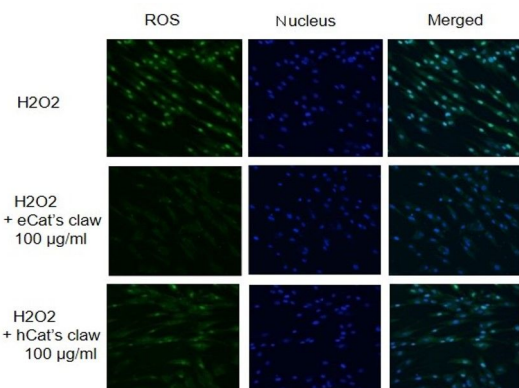


図3 Cat's claw 抽出物の酸化ストレス抑制効果

検出は認められなかった。その後 ROS 産生の定量を行っており現在研究は進行中である。

(4) HGF 培養系における炎症性サイトカイン産生抑制効果

結果を図 4 と図 5 に示したように、HGF 培養系における *P.gingivalis* LPS 刺激で増加した炎症性サイトカインの IL-8、IL-6 の mRNA 発現をキャットクロー抽出物の添加により抑制することが認められた。一方、抗酸化物質であるレスベラトロールでは、使用した 50 μ M 濃度では顕著な発現抑制は示さなかった。さらにキャットクロー抽出物の低濃度から様々な濃度を用いた濃度依存性における炎症性サイトカイン産生発現抑制効果についての研究を現在進行中である。また炎症性サイトカインの分泌産生量への影響についても調べる予定にしている。

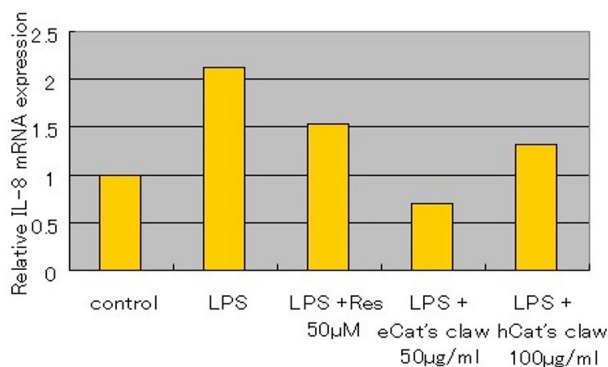


図4 Cat's claw 抽出物のIL-8 mRNA 発現抑制効果

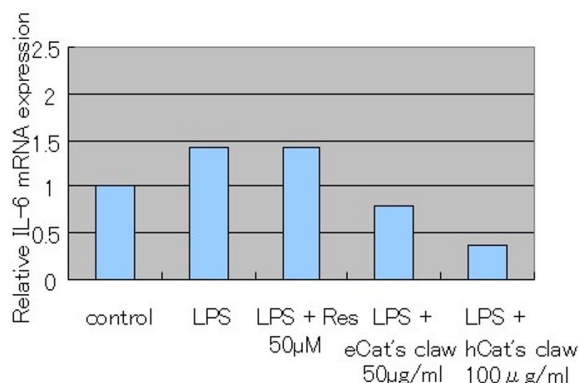


図5 Cat's claw 抽出物のIL-6 mRNA 発現抑制効果

(5) HGF 培養系における酸化ストレス条件下での創傷治癒促進効果

キャットクロー熱水抽出物で 24 時間前処理し、一定の創傷を作成した後に過酸化水素 0.5 mM を添加後、さらにキャットクロー抽出物の添加も行い、24 時間培養後、傷の修復度を調べた。その結果は、図 6 に示すように 24 時間後、過酸化水素のみでは細胞増殖による回復は認められなかったが、一方キャットクロー抽出物の添加により顕著な細胞増殖促進が観察され、創傷の回復を認める傾向を示した。さらに低濃度からの様々な濃度を用いた濃度依存性における細胞増殖促進効果についての研究を現在進行中である。

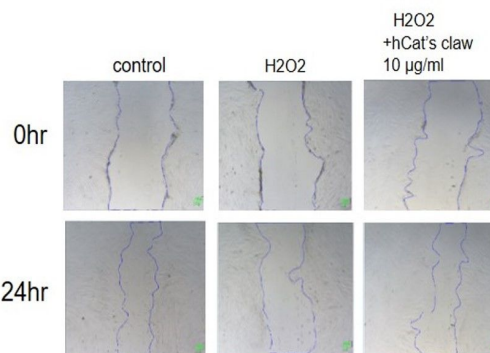


図6 酸化ストレス下でのCat's claw 熱水抽出物の創傷回復効果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kaname Miki, Naofumi TAMAKI and Hiro-o ITO, Utility of Natural Herbs -Focusing on Dental Field Use-, Journal of oral health and biosciences, 査読有, 32(1),1-9 (2019). DOI: https://doi.org/10.20738/johb.32.1_

〔学会発表〕(計 2 件)

三木 かなめ,天然ハーブの有用性-歯科領域を中心に-, 四国歯学会第 53 回例会・第 37 回総会, 2018 年

三木 かなめ,福井 誠,陳 舒, 玉木 直文, 伊藤 博夫,天然ハーブ・キャットクロー抽出物の歯周病原菌に対する抗菌効果,第 29 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会, 2018 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：福井 誠

ローマ字氏名：(FUKUI, Makoto)

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：講師
研究者番号（8桁）：50325289

研究分担者氏名：伊藤 博夫
ローマ字氏名：(ITO, Hiro-o)
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：教授
研究者番号（8桁）：40213079

(2)研究協力者 なし

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。