

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11125

研究課題名(和文) デンタルプラークを抑制するホップ飲料の開発 超高齢社会の基礎疾患予防を目指して

研究課題名(英文) Development of hop beverages to control dental plaque

研究代表者

尾立 達治 (ODACHI, Tatsuji)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：60214152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホップは、生体に対し安全性を有するとともに、デンタルプラークの原因となる口腔細菌に対する抗菌作用や抗炎症作用を有し、これらの複合的な作用により抗デンタルプラーク作用が期待できる。しかし、これまでにホップの成分による種々のグラム陽性菌に対する抗菌作用に関する報告はあるが、ホップがう蝕病原細菌*S. mutans*や歯周病原細菌*P. gingivalis*に対してどのように作用するかについては報告がない。本研究では、ホップの抗菌成分(キサントフモール)の*S. m.*、*P. g.*および歯肉上皮細胞への影響を評価した。キサントフモールは、*P. g.*の発育に必要な鉄の取り込みを阻害する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hops are safe for living bodies and have antimicrobial and anti-inflammatory effects on oral bacteria which cause dental plaque, and anti-dental plaque action can be expected by their combined action. However, there have been reports on antimicrobial activity against various gram-positive bacteria by components of hops, but how hops act on caries pathogenic bacteria *S. mutans* and periodontal pathogenic bacteria *P. gingivalis* There is no report. In this study, the influence of antibacterial component (xanthohumol) of hops on *S. mutans*, *P. gingivalis* and gingival epithelial cells was evaluated. It was suggested that xanthohumol could inhibit iron uptake necessary for the growth of *P. gingivalis* at a concentration not showing cytotoxicity to gingival epithelial cells.

研究分野：保存修復学

キーワード：ホップ キサントフモール

## 1. 研究開始当初の背景

ビールは主に水、大麦、ホップ、酵母を原料にして作られるアルコール飲料である。ビールはアルコールの他にも様々な栄養素と化学成分を含んでいる。アルコールの過剰摂取は健康を損なう恐れがあるのに対し、ビールに含まれる栄養素と化学成分は健康に良い効果を与える可能性があるといわれている。近年、ビールの健康増進効果が明らかになりつつある。ビールの健康増進効果には、心臓病、骨粗しょう症、認知症の予防効果に加え、抗がん、アンチエイジング作用がある。ホップ自体に抗酸化作用、エストロゲン作用、鎮静作用、さらにはがんの化学的予防作用があると報告されているため、ホップが健康増進効果の主因であるとも考えられる。近年の研究では、糖尿病患者にホップ有効成分イソフムロンを摂取させ、空腹時血糖値、HbA1c、BMI が低下した、高脂肪食摂取マウスにイソフムロンを摂取させ、血中トリアシルグリセロールが減少、糞便中への脂肪排泄量が増加、膵臓リパーゼ活性が抑制されたという報告から、肥満抑制効果も認められ注目されている。また、ホップの有益な作用としては、主に *Streptococcus*、*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Mycobacterium* に属するグラム陽性菌に対する抗菌作用が挙げられる。

ビール原料の一つであるホップに含まれるキサントフモールは、フラボノイドである。近年、抗炎症作用、抗酸化作用、および抗癌作用といった様々な効果が明らかになってきている。しかしながらう蝕や歯周病におけるキサントフモールの効果についてはほとんど知られていない。

デンタルプラークの形成は、*S. mutans* などの菌群が歯の表面の唾液由来ペリクルに付着することから始まる。*S. mutans* は染色体上に非水溶性グルカン合成酵素であるグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) をコードする遺伝子である *gtf-B*、水溶性グルカン合成酵素をコードする *gtf-C* および *gtf-D* の3種類の *gtf* 遺伝子を持ち、それぞれの発現により GTF-B、GTF-C、GTF-D を分泌する。GTF は、口腔内に取り込まれたスクロースをグルコースとフルクトースに加水分解し、産生されたグルコースを結合することで水溶性グルカンと不溶性グルカンを合成する。*S. mutans* がエナメル質に付着する際、初めに GTF-D の存在下で形成された GTF-C の不溶性グルカンが粘着性を持つため、*S. mutans* 付着の基礎となる。次に GTF-B が大量の不溶性グルカンを産生することで、菌体を歯面に付着させプラーク (バイオフィーム) を形成する。これによって、初期のプラークの粘着性が増加し、種々の口腔細菌のプラークへの定着も増強され、プラークの成熟が始まる。

歯周ポケットには、*P. gingivalis* をはじめとする多くのグラム陰性菌が存在している。それらの菌体の細胞壁外膜には、Lipopolysaccharide (LPS) が存在している。

歯肉上皮細胞などの歯周組織を構成する細胞は、LPS などの菌体成分や菌体外産物からさまざまな刺激を受ける。刺激に対して歯肉上皮細胞は反応し、炎症性サイトカインや Matrix metalloproteinase を分泌することにより、細胞外基質が分解され歯周組織の破壊が進行する。近年、これらの口腔細菌の形成するバイオフィームによって肺炎、心疾患、糖尿病、高血圧など種々の基礎疾患が増悪することが報告されている。

平成 23 年歯科疾患実態調査において、20 本以上の歯を有する者の割合は増加傾向にある。しかし、現在歯に対してう蝕を持つ者の割合は、過去の調査と比較すると、5 歳以上 25 歳未満の各年齢階級では減少する傾向を示したが、45 歳以上では、増加傾向を示した。また、4 mm 以上の歯周ポケットを持つ者の割合について前回調査 (平成 17 年) と比較すると、30~60 歳代では概ね低値を示した。一方、75 歳以上の高齢者層では今回調査のほうが高値を示した。今後、超高齢社会がさらに進展することで、う蝕 (根面う蝕、二次う蝕) や歯周炎に罹患した現在歯数はさらに増加することが予想されるため、それらを予防し、口腔細菌に由来する基礎疾患の発症および進行を防止することも重要である。

## 2. 研究の目的

ホップは、生体に対し安全性を有するとともに、デンタルプラークの原因となる口腔細菌に対する抗菌作用や抗炎症作用を有し、これらの複合的な作用により抗デンタルプラーク作用が期待できる。しかし、これまでにホップの成分による種々のグラム陽性菌に対する抗菌作用に関する報告はあるが、ホップがう蝕病原細菌 *S. mutans* や歯周病原細菌 *P. gingivalis* に対してどのように作用するかについては報告がない。本研究では、ホップの抗菌成分 (キサントフモール) の *S. mutans*、*P. gingivalis* および歯肉上皮細胞への影響を評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) う蝕病原細菌 *S. mutans* へのキサントフモールの影響

*S. mutans* JCM5705 株および UA159 株 (ATCC) を 37 嫌気条件下で (10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>) TY 培地 (30 g/l Tryptic soy broth, 5 g/l Yeast extract) で培養した。TY 寒天培地には寒天を 15 g/l 濃度で添加した。最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) 測定は、菌液を吸光度 600 nm (OD600) で調整した。その菌液をキサントフモールの 2 段階希釈系列に播種した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) をコントロールとして使用した。24 時間培養後、MIC を測定した。MBC 測定は、菌液を TY 寒天培地に播種し、24 時間培養して行った。キサントフモールと TY 培地に細菌を播種し、24 時間培養した。WST-8 試薬を用い吸光度を測定した。MIC の濃度を基準

とし、培養後にトータル RNA 抽出キットを用いて RNA の抽出を行った。抽出した RNA から cDNA を合成しシーケンスを行った。マッピング後、遺伝子発現の解析および発現領域を確認した。次世代シーケンサーを用いた mRNA-Seq による網羅的解析と定量的 RT-PCR を組合せることにより、細菌転写産物の解析を行った。

#### (2) 歯周病原細菌 *P. gingivalis* へのキサントフモールの影響

次世代シーケンサーを用いた mRNA-Seq による網羅的解析と定量的 RT-PCR を組合せることにより、細菌転写産物の解析を行った。キサントフモール (XT) を用いた。歯周病原細菌として *P. gingivalis* W83 株 (ATCC) を用いた。XT の添加濃度は、あらかじめ最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、その濃度を基準とした。XT 添加した培地と未添加の BHI 培地を用いて 48 時間嫌気条件下で *P. gingivalis* を培養後、トータル RNA 抽出キットを用いて RNA の抽出を行った。抽出した RNA から cDNA を合成しシーケンスを行った。マッピング後、遺伝子発現の解析および発現領域を確認した。

#### (3) 歯肉上皮細胞へのキサントフモールの影響

ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP) に対する細胞毒性を WST-1 試薬で XT 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の増殖活性の測定を行なった。また、炎症性サイトカイン (IL-1b, IL-6, TNF-a) の産生について ELISA で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) う蝕病原細菌 *S. mutans* へのホップの影響

24 時間培養後の XT の最小発育阻止濃度は、4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。トランスクリプトーム解析で発現が低下していたものに、glycosyltransferase 関連遺伝子が認められた。初期のプラークの粘着性増加や、種々の口腔細菌のプラークへの定着も抑制することが可能であると考えられる。

#### (2) 歯周病原細菌 *P. gingivalis* へのキサントフモールの影響

24 時間培養後の XT の最小発育阻止濃度は、2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。トランスクリプトーム解析で発現が低下していたものに、Fe-S cluster assembly protein SufB、Fe-S cluster assembly protein SufD および Fe-S cluster assembly ATPase SufC などの遺伝子が認められた。これらの遺伝子は、鉄の取り込みや鉄-硫黄クラスターの形成において重要な役割を果たしていると考えられることから、キサントフモールは、*P. gingivalis* の発育に必要な鉄の取り込みを阻害する可能性が示唆された。

#### (3) 歯肉上皮細胞へのキサントフモールの影響

24 時間培養後の WST-1 による HGEP の増殖活性は、XT 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では低下したが、XT 1.0

$\mu\text{g}/\text{ml}$  では、コントロールと比較し、統計学的な有意差は認められなかった。XT 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で 24 時間培養し、ELISA で測定した細胞上清中のサイトカインについても、統計学的な有意差は認められなかった。

### 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 0 件)

〔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

尾立 達治 (ODACHI, Tatsuji)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号：60214152

#### (2) 研究分担者

川上 智史 (KAWAKAMI, Tomofumi)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：00169682

舞田 健夫 (MAIDA, Takeo)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：40229282

安彦 善裕 (ABIKO, Yoshihiro)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：90260819

齊藤 正人 (SAITOH, Masato)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：50337036

植原 治 (UEHARA, Osamu)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号：00709248

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )