

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11144

研究課題名(和文) 口腔ケアへの応用に向けたポリフェノール光照射殺菌法の確立

研究課題名(英文) Devalopment of antimicrobial technique utilizing photo-irradiated polyphenol for oral care

研究代表者

中村 圭祐 (Keisuke, Nakamura)

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：30431589

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)：本研究では、ポリフェノール光照射殺菌法を新しい口腔ケアの手法として応用することを最終目標として基礎試験を行った。殺菌試験では、Streptococcus mutansのバイオフィルムを対象とした。ポリフェノールの代表として、カフェイン酸、クロロゲン酸、プロアントシアニジンを用いた。その結果、カフェイン酸が最も強い殺菌作用を示すことが分かった。ハムスターを用いたin vivo試験では、本殺菌法が口腔粘膜に対して軽度の刺激性を有することが分かった。従って、本殺菌法を臨床応用するためには、今後、殺菌作用と安全性の観点から殺菌処理条件を詳細に検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this project, in vitro and in vivo tests were performed to evaluate the antimicrobial chemotherapy utilizing photo-irradiated polyphenols. Streptococcus mutans biofilm was treated with the technique using caffeic acid, chlorogenic acid and proanthocyanidin as a representative polyphenol. The results showed that the technique using caffeic acid exerted the highest bactericidal activity. In vivo study where oral mucosal irritation potential of the antimicrobial technique was evaluated demonstrated that it exerted slight irritation potential. Therefore, in order to apply this technique to clinical dentistry, it is suggested that future studies should evaluate the bactericidal effect (benefit) and the oral mucosal irritation potential (risk) more in detail.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ポリフェノール 殺菌 光照射

1. 研究開始当初の背景

我が国では総人口に対する 65 歳以上の老年人口の占める割合が 21%以上となり、超高齢化社会を迎えている。老年人口の増加に伴い、病院や施設、在宅療養を受ける高齢者の人口も増加しており、そういういった高齢者の QOL (生活の質) を向上させることが今後の社会の課題となっている。高齢者の QOL の向上には口腔ケアの実施が非常に重要となる。特に口腔清掃を定期的に行い、衛生状態を維持し種々の疾患の原因となる細菌の繁殖を抑えることで健康増進につながる。

そこで本研究では、申請者がこれまでに研究してきたポリフェノール光照射殺菌法を口腔ケアに応用することを検討した。ポリフェノールとは植物によって合成されるファイトケミカルであり、化学構造の中にフェノール性水酸基を複数持つ物質の総称である。特に、果物や野菜に豊富に含まれ、その抗酸化機能が健康増進に役立つとされ機能性食品の成分として注目されている。このように食べても安全な食品の成分を殺菌活性の主体として用いることで安全性を担保することができる。ポリフェノールに光照射を行っている間のみヒドロキシルラジカルが生成され、光照射を停止すると活性酸素生成反応も終了する。さらに、ヒドロキシルラジカルの半減期は非常に短い(約 10 ナノ秒) 残存毒性のリスクも極めて低い。

ポリフェノールが光照射を受けた時に、光酸化によって過酸化水素が生成され、さらに過酸化水素が光分解されることで生成されるヒドロキシルラジカルが殺菌効果を発揮する。殺菌効果に加えてポリフェノールには、細菌の内毒素や種々のストレスから細胞を保護する効果を得られることを実証してきた。これらの知見はポリフェノールが創傷治癒を促進する効果を有することを示唆している。したがって、口腔ケア時に口内炎などの創傷部位の治癒を促進することも期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ポリフェノール光照射殺菌法のバイオフィルムに対する殺菌効果の検証および in vivo での安全性の評価を行い、新しい口腔ケアの手法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)カフェイン酸、クロロゲン酸、プロアントシアニジンを用いたポリフェノール光照射殺菌法の比較

水溶性ポリフェノールの代表としてカフェイン酸 (CA)、クロロゲン酸 (ChA) およびプロアントシアニジン (PA) を用いた。各ポリフェノールを純水中に溶解し、最終濃度が 1 mg/mL となるように調製した。

齧蝕原因菌である *Streptococcus mutans* の懸濁液を用いた殺菌試験を行った。96 ウェ

ル・マイクロプレートにポリフェノール水溶液と細菌懸濁液を入れて光照射を行った。光源には、波長 400 nm と 365 nm の LED を用いた。放射照度が 1000 mW/cm² となるように出力を調整して 5 分間光照射を行った。照射後に 10 倍希釈系列を作製し、寒天平板塗沫法によって生菌数の評価を行った。

(2)CA に対する光照射で得られる殺菌効果に影響を及ぼす因子の検討

上記(1)の実験で最も高い殺菌効果を示した CA を用いて *S. mutans* バイオフィルムに対する殺菌効果の検証を行った。本実験では、*S. mutans* のバイオフィルムをヒドロキシアパタイト状に形成して実験を行った。バイオフィルム試料を 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL に調製した CA に浸漬し、波長 365, 385, 400 nm の LED 光を放射照度 500, 1000, 2000 mW/cm² で照射した。照射時間は 1, 2, 4 分とした。処理後のバイオフィルムを滅菌綿棒で回収し、生理食塩水に懸濁した。懸濁液中の生菌数は寒天平板塗沫法で評価した。

また、電子スピン共鳴分析法により、CA に対する光照射で生成されるヒドロキシルラジカルの定量分析を行った。

(3)CA を用いたポリフェノール光照射殺菌法の口腔粘膜刺激性試験

安全性検証のための動物実験 (口腔粘膜刺激性試験) を、東北大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した (承認番号: 2017 歯動-040)。シリアンハムスターの頬袋を口腔外に引き出して 1 mg/mL の CA と波長 365 nm の LED 光で処理を行った。試験群としては、水処理群 (LED 照射なし)、CA 処理群 (LED 照射なし)、水 + LED 照射処理群、CA + LED 照射処理群を設定した。LED は放射照度 280 mW/cm² で用いた。また、処理時間は 2 分と 5 分を設定した。処理後に紅斑および痂皮形成について肉眼的評価を行い、その後、生検を採取して、組織学的に炎症の状態を評価した。

4. 研究成果

(1)カフェイン酸、クロロゲン酸、プロアントシアニジンを用いたポリフェノール光照射殺菌法の比較

試験に用いたポリフェノールの中で CA を用いた処理で高い殺菌効果が認められた。対照群 (純水での処理、LED 照射のみ、CA 単独処理) では高い殺菌効果は認められなかったが、CA に光照射を行った試験群では、3-log 程度の殺菌効果を認めた。また、その効果は 400 nm の光よりも 365 nm の方が高いことが分かった。

(2)CA に対する光照射で得られる殺菌効果に影響を及ぼす因子の検討

一連の実験の結果、CA の濃度の影響はわずかであり、1 mg/mL の時に最大の殺菌作用が認められた (図 1)。波長については、365 nm

の光は CA に吸収されてバイオフィームまで効果的に到達しないため、385 nm の LED 照射で最大の殺菌効果が得られることが分かった(図2)。放射照度は高いほど、処理時間は長いほど殺菌作用が強くなることが分かった(図3)。1 mg/mL のカフェイン酸に *S. mutans* バイオフィームを浸漬し、波長 385 nm の LED 光を放射照度 2000 mW/cm² で 4 分間照射した場合に、最大の殺菌作用が発揮され、5-log の生菌数の減少が得られた。

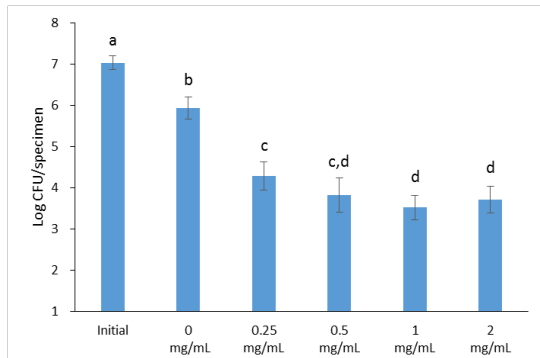


図1. カフェイン酸濃度が殺菌作用に及ぼす影響

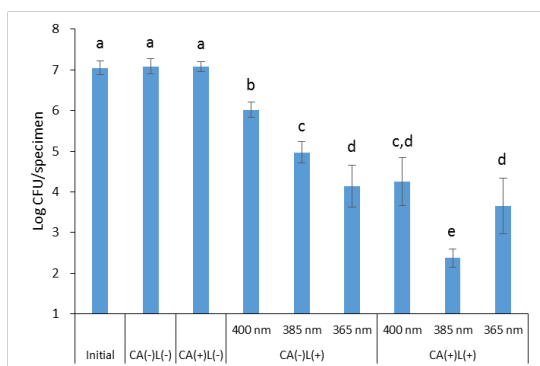


図2. 波長が殺菌作用に及ぼす影響

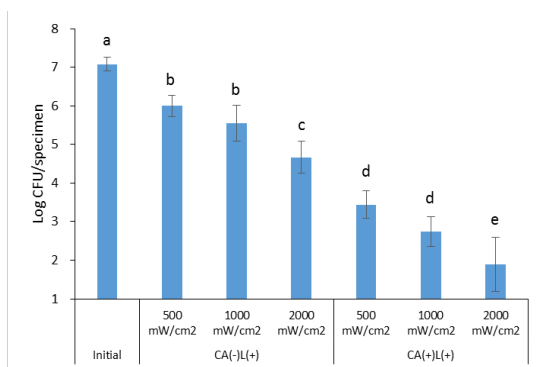


図3. 放射照度が殺菌作用に及ぼす影響

また、CA に対する光照射で得られる殺菌作用は、ヒドロキシルラジカル生成と関連性があることが電子スピン共鳴分析によって明らかとなった。

(3)CA を用いたポリフェノール光照射殺菌法の口腔粘膜刺激性試験

動物実験の結果、CA 処理は口腔粘膜刺激性がないことが分かった。一方、LED 照射を併用すると、照射時間依存的な炎症の発生が認められた。肉眼的観察および組織学的分析の結果、CA + LED 照射処理を 2 分間および 5 分間行った場合の口腔粘膜刺激性は、それぞれ「ごく軽度」と「中等度」であった(図4)。同様に水 + LED 照射処理群でも 2 分間および 5 分間の処理で、それぞれ「ごく軽度」と「中等度」と判定されたことから、口腔粘膜刺激性は波長 365 nm の LED 照射に起因すると考えられた。

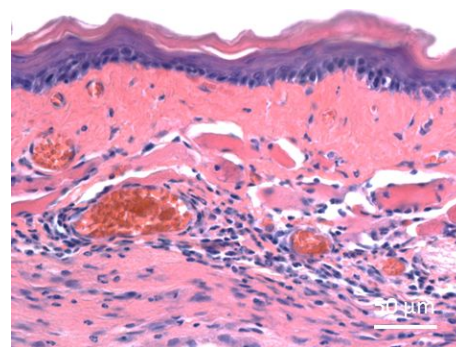
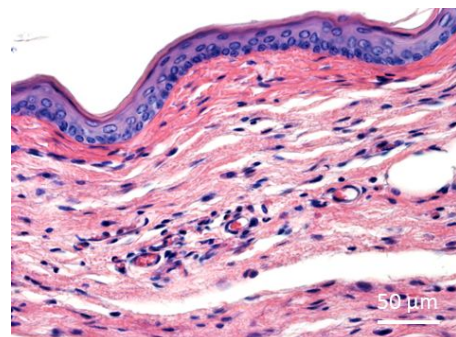
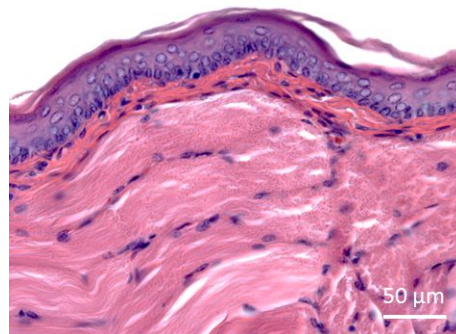


図4. CA + LED 照射処理群の病理組織像。上段: CA 処理群、中段: CA + LED 照射処理群(2分間処理)、下段: CA + LED 照射処理群(5分間処理)。

以上の一連の研究により、CA を用いたポリフェノール光照射殺菌法はバイオフィームを形成した細菌に対しても殺菌効果を発揮するため、口腔ケアにおいて新しい抗菌療法として応用できる可能性が示唆された。しかしながら、紫外線照射による口腔粘膜刺激性もあるため、治療時間はできるだけ短くすべきであることも併せて示唆された。

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5件)

- (1) Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Ortengren U, Lingstrom P, Niwano Y. Photo-irradiated caffeic acid exhibits antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* biofilms via hydroxyl radical formation. *Sci Rep* 7, 6353, 2017. Doi:10.1038/s41598-017-07007-z. (査読有)
- (2) Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Ortengren U, Lingstrom P, Niwano Y. Antimicrobial activity of hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide photolysis against *Streptococcus mutans* biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, 48, 373-380, 2016. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.007 (査読有)
- (3) 中村圭祐. 活性酸素・フリーラジカルを応用した殺菌技術. *日本防菌防黴学会誌* 44, 191-197, 2016. (査読有)
- (4) Ishiyama K, Nakamura K, Kanno T, Niwano Y. Bactericidal action of photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with photosensitizers used as plaque disclosing agents against experimental biofilm. *Biocontrol Sci* 21, 187-191, 2016. Doi: 10.4265/bio.21.187 (査読有)
- (5) 中村圭祐. 活性酸素を応用した殺菌技術. *クリーンテクノロジー* 8月号, 43-47, 2015. (査読無し).

〔学会発表〕(計5件)

- (1) Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Ortengren U, Lingstrom P, Niwano Y. Anti-biofilm effect of hydroxyl radicals generated in UVA-irradiated caffeic acid. CED-IADR 2017
- (2) 中村圭祐、白土翠、菅野太郎、庭野吉己. 齲蝕原因菌 (*Streptococcus mutans*) のバイオフィルムに対する長波長紫外線照射の殺菌作用. 第44回日本防菌防黴学会年次大会. 2017.
- (3) 中村圭祐、白土翠、菅野太郎、Ulf Ortengren, Peter Lingstrom、庭野吉己. 抗生剤に対する抵抗を獲得した *Streptococcus mutans* バイオフィルムに対する過酸化水素光分解殺菌法の殺菌作用. 第43回日本防菌防黴学会年次大会. 2016.
- (4) 白土翠、中村圭祐、菅野太郎、Peter Lingstrom、庭野吉己、Ulf Ortengren. 過酸化水素光分解殺菌法と各種殺菌処理法の *Streptococcus mutans* バイオフィルムに対する殺菌効果の比較検討. 第43回日本防菌防黴学会年次大会. 2016.

(5) Katsuda Y, Niwano Y, Nakamura K, Kanno T, Egusa H. Protective effects of grape seed extract on human gingival fibroblasts exposed to oxidative stressors. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 圭祐 (NAKAMURA, Keisuke)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：30431589