

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11456

研究課題名(和文) 抗菌成分含有口腔ケア剤による高齢者の口腔および全身疾患発症予防の可能性について

研究課題名(英文) Possibility antimicrobial gel to control of oral pathogens and prevent of systemic diseases among elderly

研究代表者

田村 宗明 (TAMURA, Muneaki)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：30227293

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)：申請者は、これまで天然抗菌成分カテキン含有ジェルを開発し、*in vitro*で口腔正常維持に関わる菌群に影響を与えず、齲蝕原因菌や歯周病原菌などに対して抗菌効果を示すことを確認した。今回、このジェルの臨床でのパイロット実験を実施した結果、日和見感染症の起因菌を含め、口腔の微生物叢・数のコントロールと長期使用の可能性を見出した。一方、新たな天然抗菌成分としてアリルイソチオシアネートおよびイオン水を見出し、これらが歯周病原菌および*C. albicans*に対して顕著な抗菌効果を発揮することを確認した。したがってこれらの抗菌成分は高齢者の健康維持とQOLの向上に貢献できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed an antimicrobial agent utilizing natural ingredient catechin-containing gel and recognized that this gel does not affect the streptococci group involved in normal maintenance of the oral cavity. We received clinical pilot experiments for elderly people requiring long-term care. Results obtained were consistent with *in vitro* results, we found out the possibility of controlling the microbial flora and oral microbial number. On the other hand, we tried to search for a new natural antibacterial component. Allyl isothiocyanate and six types of mixed positive and anionic water significantly inhibited growth and pathogenic factors of periodontal pathogens and *C. albicans*. From these results, it is suggests that these antibacterial ingredients may contribute to health maintenance and improvement of QOL for elderly people.

研究分野：老年歯科学

キーワード：高齢者 医療・福祉 口腔ケア 老化

1. 研究開始当初の背景

口腔細菌叢は極めて多種多様の微生物で構成されており、これらはバランスを保ちながら外来微生物の定着・増殖を阻止する重要な役割が報告されている。しかし、日常的な口腔ケアが欠如するとこのバランスが崩れ、その結果、常在微生物の増加と菌種遷移が惹起されて口腔内感染症のみならず、口腔疾患、特に歯周病が関連する様々な全身疾患が惹起されてしまう。特に免疫機能の著しい低下が見られる高齢者、特に要介護高齢者の口腔感染症予防および口腔衛生向上において極めて重要な問題となる。

そこで申請者らは、これら疾患の予防を目的として「日本人が日常生活で摂取している天然成分による抗菌効果」を企画し、*in vitro* で口腔の正常維持に関わるレンサ球菌属には影響を与えないが、病原性を発揮する菌群の発育を阻害して口腔常在菌叢のコントロールに有用と思われるカテキン含有ジェルを開発した。

2. 研究の目的

今回、このジェルの高齢者の口腔ケアおよび QOL の向上、さらに口腔疾患関連性の全身疾患（誤嚥性肺炎など）の予防に利用できる可能性について、臨床での実験が必要と考えた。さらに、カテキン以外で抗菌効果を有し、かつ、口腔での使用が可能な成分の検索およびその機序の解明など、新たな抗菌成分の発見と実用化についても試みることとなった。

(1) カテキンジェルの臨床応用の可能性について

In vivo での臨床研究を行い、培養法、real-time PCR 法、次世代シーケンスを用いて口腔常在菌叢への影響を観察するとともに、齲蝕や歯周病およびカンジダ症の原因菌数の減少効果を確認して新しい口腔疾患ならびに関連する全身疾患の予防の可能性について検討する。

(2) 新しい抗菌成分の発見とその抗菌機序の解析、臨床応用の可能性

In vitro において、新たな抗菌効果を発揮する天然植物成分やイオンなど、口腔ケア剤として使用可能な成分の検索を行い、その抗菌機序の解明と臨床応用の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 臨床実験 (*in vivo*)

実験（日本大学歯学部倫 2010-23）に賛同を得た被験者（要介護高齢者 45 名、健康高齢者 65 名および障害者 15 名）の唾液を採取し、実験前のサンプルとした。4 週間プラセボジェルを口腔内に塗布した後、唾液を採取してプラセボサンプルとした。その後、同様にカテキンジェルと塗布してから得た唾液をカテキンサンプルとした。唾液を希釈して選択培地に塗抹して培養遠心、形成コロニー数を算定した。さらに唾液から DNA を抽出し、

real-time PCR 法と次世代シーケンス解析を行い、カテキンジェル塗布が要介護高齢者、健康高齢者および障害者の口腔微生物に及ぼす影響を解析した。

(2) 新たな抗菌成分の検索 (*in vitro*)

様々な天然植物抽出成分、食品添加剤や無機物と口腔微生物を供試し、比濁法および改良型寒天拡散法にて発育阻害作用を観察し、新たに口腔で使用可能な抗菌成分を検索した。

(3) 新たに見出した抗菌成分の抗菌実験 (*in vitro*)

上記(2)の実験の結果のひとつとして、ワサビの主要成分であるアリルイソチオシアネートとイオン水 (S-PRG filler から放出するイオン) に着目し、口腔微生物の発育阻害効果を改良型寒天拡散法にて評価した。さらに歯周病原菌および *C. albicans* に顕著な抗菌効果を発揮したことからそれぞれへの抗菌機序について検討した。

4. 研究成果

(1) カテキンジェルが要介護高齢者の口腔内の一般細菌に及ぼす影響

被験者唾液のサンプルから DNA を抽出して real-time PCR にて緑膿菌、ブドウ球菌および肺炎レンサ球菌数を算定したところ、プラセボジェルを塗布した実験系では変化が見られなかったがカテキンジェルの実験系では減少が見られ、緑膿菌と肺炎レンサ球菌では塗布 4 週間後に、黄色ブドウ球菌では 2 週間後に有意差が認められた。

(2) カテキンジェルが健康高齢者の口腔微生物に及ぼす影響

被験者唾液のサンプルから DNA を抽出して real-time PCR と次世代シーケンス解析を実施した。まず、次世代シーケンスで検出菌属の検出比率を検討したところ、400 を超える菌属が検出された。その内、口腔内疾患に関与する細菌に着目したところ、カテキンジェルの塗布前後で全菌属に対する検出比率の減少が認められた。さらに、real-time PCR にて主に歯周病原菌の検出菌数を算定したところ、*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola* などで有意な減少が確認された。(図 1)

	Pre-placebo	Pre-catechin gel
<i>P. gingivalis</i>	$p = 0.2076$	$p = 0.0384$
<i>T. forsythia</i>	$p = 0.2380$	$p = 0.0482$
<i>T. denticola</i>	$p = 0.2594$	$p = 0.0488$
<i>C. albicans</i>	$p = 0.3898$	$p = 0.00388$
<i>Streptococcus</i> spp.	$p = 0.8104$	$p = 0.2628$

(Wilcoxon signed-rank test)

(図 1 健康高齢者サンプルの real-time PCR 解析の結果)

(3) カテキンジェルが障害者の口腔微生物に及ぼす影響

被験者唾液のサンプルから DNA を抽出して real-time PCR と次世代シーケンス解析を

実施した。検出された菌属数は健康高齢者のその半数ほどで少なかった。また、カテキンジェル塗布による歯周病原菌の減少傾向は見られたが、有意差が見られたのは *T. denticola* のみであり、口腔内の清掃状態が結果に深く関与しているものと示唆された。(図2)

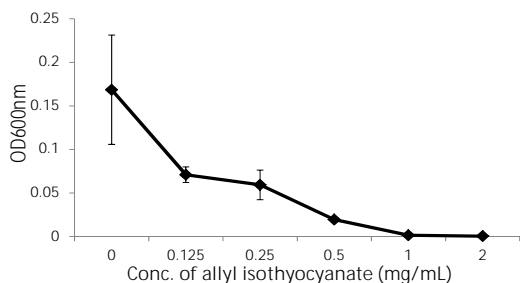
	各菌種の塗布前⇒4週間塗布後の比較	
	Placebo群	Catechin群
1) <i>P. gingivalis</i>	$p = 0.4840$	$p = 0.0827$
2) <i>T. forsythia</i>	$p = 0.7948$	$p = 0.5222$
3) <i>T. denticola</i>	$p = 0.2040$	$p = 0.0284$
4) <i>C. albicans</i>	$p = 0.1872$	$p = 0.0548$
5) <i>Streptococcus</i> spp.	$p = 0.7114$	$p = 0.3124$

(wilcoxonの符号順位検定)

(図2 障害者サンプルの real-time PCR 解析の結果)

(4)アリルイソチオシアネートが口腔微生物に及ぼす影響

改良型寒天拡散法で抗菌効果を評価した結果、カテキンジェルと同様に選択的抗菌効果が認められたが、その違いはグラム陽性菌には影響を示さず、グラム陰性菌に対して発育阻害効果を示していた。また、*C. albicans* に対しても発育阻害効果(図3)、病原因子(付着能、菌糸形変換およびタンパク分解酵素産生能)を抑制し、カテキンよりもはるかに低濃度で抗菌効果を示していた。



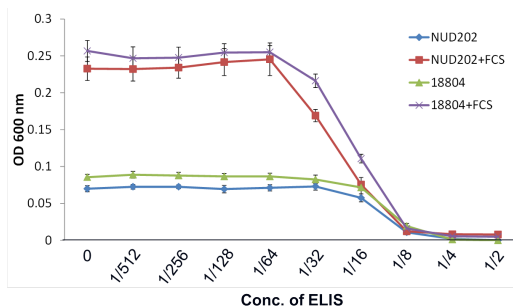
(図3 アリルイソチオシアネートの *C. albicans* 発育阻害効果)

(5)S-PRG フィラーから放出したイオン水が歯周病原菌に及ぼす影響

比濁法にて発育阻害効果を評価したところ、*P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *T. denticola* などの歯周病原菌に著しい発育阻害効果を示した。特に、*P. gingivalis* ではイオン水の濃度依存的に赤血球凝集能およびタンパク分解酵素(ジンジパイン)活性の阻害が認められた。

(6)S-PRG フィラーから放出したイオン水が *C. albicans* に及ぼす影響

S-PRG フィラーから放出したイオン水は *C. albicans* の発育阻害効果(図4)の他、レジック片への付着阻害、菌糸形変換の抑制、タンパク分解酵素(分泌型アスパラギン酸プロテアーゼ)の活性阻害効果を示した。



(図4 S-PRG フィラーから放出したイオン水の *C. albicans* 発育阻害効果)

(7) S-PRG フィラージェルの有用性

臨床への応用を想定してイオンを放出するフィラーをキサンタンガムと混和して改良型寒天拡散法で抗菌効果を評価したところ、フィラーの濃度依存的に口腔微生物の発育阻害が認められた。

<引用文献>

Tamura M, Saito H, Kikuchi K, Ishigami T, Toyama Y, Takami M, Ochiai K. Antimicrobial activity of gel-entrapped catechins toward oral microorganisms. *Biol Pharm Bull* 34, 638-643, 2011

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9件)

神尾宜昌, 田村宗明, 今井健一. 口腔細菌と呼吸器疾患との関連性 口腔ケアの重要性 歯科医療, 査読有, 第31巻4号, 20-27, 2017

田村宗明. 抗菌成分含有口腔ケア剤による高齢者の口腔および全身疾患発症予防の可能性について. 細胞, 査読有, 第49巻11号, 25-28, 2017

Ohtsu M, Tamura M, Sasaki H, Sato S, Asano M. Effects of bitter water on cariogenic bacteria and saliva secretion. *J Oral Sci*, 査読有, 59(3), 453-456, 2017

Hirohata N, Komine-Aizawa S, Tamura M, Ochiai K, Sugitani M, Hayakawa S. *P. gingivalis* suppresses trophoblast invasion by soluble factors. *J Periodontol*, 査読有, 28, 1-18, 2017

吉田幸弘, 三田千和子, 今井光子, 青柳康子, 遠山和子, 内田琢也, 田村宗明, 相澤恒. カテキンジェルが障害者のプラークコントロールレコードおよび口腔細菌に及ぼす影響. 日本障害者歯科学会雑誌, 査読有, 第38巻, 第2号, 148-153, 2017

Ibi H, Hayashi M, Yoshino F, Tamura M, Yoshida A, Lee M-C, Imai K, Ogiso B.

Bactericidal effect of hydroxyl radicals generated by the sonolysis and photolysis of hydrogen peroxide for endodontic applications. *Microbial Pathogenesis*, 査読有, 103, 65-70, 2017
Cueno ME, Tamura M, Seki K, Ohya M, Ochiai K. Utilizing the age-related widening of the gingival crevice as a potential non-invasive vaccination route: prospects for elderly vaccination. *Experimental Gerontology*, 査読有, 75, 37-41, 2016

Ohya M, Cueno ME, Tamura M, Ochiai K. Varying hemin concentrations affect *Porphyromonas gingivalis* strains differently. *Microbial pathogenesis*, 査読有, 94, 54-59, 2016
Cueno ME, Tamura M, Ochiai K. Middle-aged rats orally supplemented with gel-encapsulated catechin favourably increases blood cytosolic NADPH levels. *Phytomedicine*, 査読有, 22, 425-430, 2015

[学会発表](計 49 件)

田村宗明, 今井健一. S-PRG フィラーが *Candida albicans* のバイオフィルム形成および菌糸形変換に及ぼす影響. 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年

小出知次郎, 田村宗明. ジグリセリンジカプリル酸エステルが *Candida albicans* に及ぼす影響. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

田村宗明, 落合 邦康. S-PRG フィラーイオン水が *Candida albicans* に及ぼす影響 - バイオフィルム形成抑制効果と酸化ストレスについて -. 第 3 回生体機能性材料 'S-PRG フィラー' 研究会, 2018 年

田村宗明, 関 啓介, 今井健一. S-PRG フィラー とジェルが歯周病原菌に及ぼす影響. 日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 2017 年

田村宗明, 吉田幸弘, 今井健一. 口腔ケア剤が障害者口腔細菌に及ぼす影響 - 次世代シーケンスおよび Real-time PCR 解析 -. 第 34 回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2017

田村宗明, 今井健一. カテキンジェル使用時における健康高齢者および障害者口腔細菌変動についての網羅的解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2017 年

田村宗明, 神尾宜昌, 今井健一. S-PRG フィラー とジェルが歯周病原菌および一般病原菌に及ぼす影響. 第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年

田村宗明, 落合 邦康. ELIS と S-PRG ジェルが歯周病原菌および一般病原菌に及ぼす影響. 第 2 回生体機能性材料 'S-PRG フィラー' 研究会, 2016 年

上記ほか 41 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 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

田村 宗明 (TAMURA, Muneaki)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号: 30227293

(2) 研究分担者

植田 耕一郎 (UEDA, Kouichiro)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 80313518

落合 邦康 (OCHIAI, Kuniyasu)
日本大学・歯学部・特任教授
研究者番号: 50095444

泉福 英信 (SENPUKU, Hidenobu)
国立感染症研究所・細菌第一部・室長
研究者番号: 20250186

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()