

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：87402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：15K21703

研究課題名(和文) 3脂肪酸/キトサンコアシェル口腔ケア粒子開発とニュートリションデリバリーの実現

研究課題名(英文) Preparation of omega 3 fatty acid/chitosan core shell particles for oral care and nutrition delivery applications

研究代表者

林 佳菜子(齋田佳菜子)(Saita, Kanako)

熊本県産業技術センター(ものづくり室、材料・地域資源室、食品加工室)・その他部局等・研究主任

研究者番号：60466315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オメガ3脂肪酸を前駆体とする脂質メディエーターの中には、歯周病やそれに関与する循環器疾患に対して生理活性が報告されているものがある。本研究では、無毒で生体適合性が高いキトサンとオメガ3脂肪酸である γ -リノレン酸を豊富に含むアマニ油を γ -カラギーナンを介して複合した、アマニ油/ γ -カラギーナン/キトサンコアシェル粒子を調製した。調製した粒子は一定の酸化安定性やグラム陰性細菌に対する抗菌効果を持つことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カラギーナンは海藻などに多く含まれる天然多糖であり、カラギーナンの油脂を乳化させる作用と、カラギーナンの硫酸基とキトサンのアミノ基とのイオン結合を形成する作用に着目し、アマニ油とカラギーナン及びキトサンを混合するという単純な方法で複合し、アマニ油/ γ -カラギーナン/キトサンコアシェル粒子の調製に至った。アマニ油/ γ -カラギーナン/キトサンコアシェル粒子を摂食することで、歯周病進行に伴って口腔で増加するグラム陰性細菌へのキトサンの抗菌効果と、アマニ油中に多く含まれるオメガ3脂肪酸が代謝され、歯周病や循環器疾患に対して生理活性をもつという両方の側面から、歯周病へのアプローチが期待される。

研究成果の概要(英文)：Many studies of lipid mediators which are produced from omega 3 fatty acids as precursor have shown the positive effects on periodontal disease and cardiovascular disease related periodontal disease. In this work, linseed oil/ γ -carrageenan/chitosan core shell particles could be prepared using linseed oil containing rich γ -linolenic acid, namely omega 3 fatty acids and chitosan with nontoxic and biocompatible properties crosslinking by γ -carrageenan. The obtained particles might be use for the oral care materials that have both oxidative stability and antibacterial activity.

研究分野：材料化学、応用微生物学

キーワード：キトサン オメガ3脂肪酸 カラギーナン 粒子 酸化安定性 抗菌性 口腔ケア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病などの循環器系疾患と歯周病の関与が明らかとなってきた。歯周病とは、歯周病原菌が歯周組織に感染することによって、歯周組織に生体防御反応として慢性炎症が生じ、組織が破壊されていく病態である。歯周病に冒された組織で慢性的に生産される炎症性サイトカインや、グラム陰性細菌の細胞壁から分泌されるエンドトキシンであるリポ多糖によって誘導されるサイトカインが血流を通して全身に運ばれることで、循環器系疾患の発症リスクを上昇させる。

エイコペンタエン酸やドコサヘキサエン酸に代表される ω 3 脂肪酸には抗炎症作用があることが明らかとなってきた。歯周病においては、歯周ポケットの深さの改善、歯肉浸出液中のインターロイキン(IL)-1 β 、IL-10 といったサイトカインが緩和された等の報告がある。

また、本研究の ω 3 脂肪酸/キトサンコアシェル粒子の原料の一つであるキトサンはセルロースに次ぐ天然資源であり、無毒で、生体適合性に優れた特徴を持ち、バイオマテリアルとして医療、化粧品、食品など様々な分野での応用が期待されているものの、キトサンは分子内・分子間水素結合による高度な結晶構造を持つことから、加工性に乏しく、酸性条件でのみ溶解するため、用途や利用が限られている。研究代表者らは、環境に負荷が少ない、シンプルな粒子化技術である、イオン交換相分離法によるキトサン微粒子調製方法を開発している。

2. 研究の目的

歯周病やそれに関与する循環器疾患に対して、キトサンの直接的な効果と ω 3 脂肪酸による生理活性によってアプローチするための ω 3 脂肪酸/キトサンコアシェル粒子の開発を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

ω 3 脂肪酸/キトサンコアシェル粒子は、 ω 3 脂肪酸である α -リノレン酸を豊富に含むアマニ油と海藻などに含まれる天然多糖である κ -カラギーナンを利用して、イオン交換相分離法をもとに調製を行った。 κ -カラギーナンの油脂を乳化させる作用と、 κ -カラギーナンの硫酸基とキトサンのアミノ基との静電的相互作用による粒子化を行った。 κ -カラギーナン-アマニ油懸濁液をキトサン-乳酸溶液に滴下、攪拌、さらに、水酸化ナトリウム水溶液を添加によるアルカリ不溶化を行い、コアシェル粒子を調製した。調製した粒子について、粒径測定、元素分析、脂肪酸組成分析、保存性試験、保湿試験、抗菌試験を行なった。

4. 研究成果

キトサン-乳酸溶液に κ -カラギーナン-アマニ油エマルジョンを滴下したところ、液滴状の粒子の形成が観察された。一定時間攪拌し、さらに、粒子の硬化と、粒子からのコアのアマニ油の漏出を抑えるために、水酸化ナトリウム水溶液を添加し、シェルのキトサンのアルカリ不溶化を行った。得られた粒子の粒径を実体顕微鏡で測定したところ、3 mm 程度であった。

キトサン- κ -カラギーナンコアシェル粒子(Ch-Cara)、キトサン- κ -カラギーナン-アマニ油コアシェル粒子(Ch-Cara-Lin)の元素分析の結果(Table 1)、共にキトサンのアミノ基に由来する N

Table 1 キトサン、 κ -カラギーナン、Ch-Cara、Ch-Cara-Lin の元素分析の結果(重量比)

	C%	H%	O%	N%	S%
キトサン	40.402	7.026	44.707	7.741	0.124
κ -カラギーナン	26.722	5.320	62.127	0.037	6.239
キトサン- κ -カラギーナンコアシェル粒子	28.306	4.414	61.74	0.072	5.468
キトサン- κ -カラギーナン-アマニ油コアシェル粒子	64.984	5.320	26.128	0.134	0.395

原子、 κ -カラギーナンの硫酸基に由来するとみられる S 原子が検出され、粒子へのキトサン、 κ -カラギーナン複合を確認した。また、S 原子、N 原子の存在比を S/N 比で示したところ(Fig. 1)、Ch-Cara と比較して、Ch-Cara-Lin で S/N 比が 1/30 に減少し、N 原子の割合が増大した。これは、アマニ油を添加することで、 κ -カラギーナンの三次元ゲル構造がアマニ油によって押し広げられ、 κ -カラギーナン-アマニ油懸濁液中で表面に露出する負電荷を持つ硫酸基が増加し、キトサンの正電荷を持つアミノ基と静電的相互作用するポイントが増えたため、結果的に複合するキトサンが増加したものと考えられる。

粒子の調製に利用した原料のアマニ油及び Ch-Cara-Lin を GC-MS で測定し、脂肪酸組成、オイル含量、カプセル化効率を Table 2 に示した。Ch-Cara-Lin 中に占める油脂の割合は約 66% であった。調製時に添加した原料のアマニ油に対する粒子中の油脂の量を示した粒子化効率は、約 87% であった。原料アマニ油脂肪酸組成は ω 3 脂肪酸である α -リノレン酸が約 58 %、他の不飽和

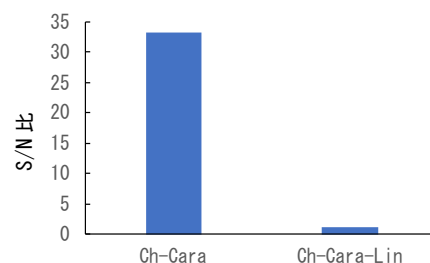


Fig. 1 Ch-Cara、Ch-Cara-Lin に含まれる S 原子、N 原子の存在比(S/N 比)

脂肪酸(リノール酸,オレイン酸)約33%,飽和脂肪酸(ステアリン酸,パルミチン酸)を約9%であった。Ch-Cara-Linについても原料アマニ油とほぼ同様の脂肪酸組成を持つことが確認された。今回の粒子化方法は、調製時のアマニ油のロスが少なく、調製の操作によってアマニ油の変質を伴わず、結果として、アマニ油を多く含む粒子を調製可能であることが分かった。

アマニ油に主に含まれる α -リノレン酸は高度不飽和脂肪酸であるが、高度不飽和脂肪酸は二重結合が多く、光や温度、酸素などの周辺環境に由来する酸化が起きやすい。また、高度不飽和脂肪酸の自動酸化で生じる過酸化物は風味の劣化につながるばかりか、体内で吸収されれば有害となる。従って、高度不飽和脂肪酸を含む製品は、酸化を抑えながら保存する必要がある。原料のアマニ油及びCh-Cara-Linを40℃もしくは4℃で、4週間保存後の脂肪酸組成についてTable 3に示した。原料のアマニ油については4℃に比較して40℃では、全体に占める α -リノレン酸の割合が1/6、リノール酸ではおおよそ1/2と減少した。逆に、オレイン酸は約3倍、飽和脂肪酸は約4倍と増加した。不飽和脂肪酸は二重結合が多くなればなるほど酸化安定性が低下することが知られている。そのため、原料のアマニ油については4℃に比較して40℃では α -リノレン酸、リノール酸の酸化が進行し、大幅に減少したものと考えられる。また、 α -リノレン酸、リノール酸の酸化に伴い、酸化生成物であるオレイン酸と飽和脂肪酸については増加したものと考えられる。Ch-Cara-Linにおいては、全体に占める α -リノレン酸の割合が4℃に比較して40℃では8%低かったものの、他の脂肪酸の割合の増減については数%以内に留まった。これは、アマニ油をキトサンで被覆することによって酸化が抑えられたものと考えられる。加えて、Ch-Cara-Linを高温多湿(40℃,80%湿度)の環境下に5日間放置したところ、重量変化は認められなかった。結果として、Ch-Cara-Linは一定の保存性を有することが確認された。

Table 3 アマニ油(原料),Ch-Cara-Linの40℃もしくは4℃,4週間保存後の脂肪酸組成

	アマニ油(原料)	Ch-Cara-Lin	
		4℃	40℃
α -リノレン酸 C18:3 [%]	60.03	10.34	59.90
リノール酸 C18:2 [%]	15.47	8.19	15.22
オレイン酸 C18:1 [%]	15.62	48.22	15.94
ステアリン酸 C18:0 [%]	3.77	14.49	3.82
パルミチン酸 C16:0 [%]	4.66	17.22	4.57
その他 [%]	0.46	1.54	0.54

Table 2 アマニ油(原料),Ch-Cara-Linの脂肪酸組成,オイル含量,カプセル化効率

	アマニ油(原料)	Ch-Cara-Lin
α -リノレン酸 C18:3 [%]	57.61	57.77
リノール酸 C18:2 [%]	16.70	16.54
オレイン酸 C18:1 [%]	16.64	16.39
ステアリン酸 C18:0 [%]	3.76	3.78
パルミチン酸 C16:0 [%]	4.83	4.86
その他 [%]	0.64	0.65
オイル含量 [%]	-	65.60
粒子化効率 [%]	-	87.36

歯周病はデンタルプラーク中の細菌が感染して、歯肉炎を発症することから始まる。歯肉炎の進行とともに口腔内の細菌の分布は変化し、グラム陽性細菌が減少してグラム陰性細菌が増加する。さらに、歯肉炎が歯周炎へと進行すると、グラム陰性細菌が大部分を占めるようになり、多種多様な種が見られるようになる。ここでは、グラム陰性細菌として、大腸菌をモデルに抗菌試験を行った(Fig. 2)。その結果、Control(サンプル未添加)における大腸菌の生存率を1とした時に、大腸菌接種直後ですでにCh-CaraはControlの7割、Ch-Cara-Linは5割の生存率となった。接種10分後では、Ch-CaraはControlの5割、Ch-Cara-Linは3割の生存率となった。Ch-Cara及びCh-Cara-Linは大腸菌に対して速やかに抗菌活性を示すことが確認された。キトサンは2位のアミノ基が正荷電を持ち、負に荷電する細菌表面の構造をかく乱することにより、抗菌活性を発揮する。そのため、Ch-Cara-LinがCh-Caraよりも活性が高いのは、キトサンの複合量がCh-Cara-Linで高いためと考えられる。一般的なキトサンは通常酸性条件でのみ抗菌性を発揮するが、歯のエナメル質は酸で溶解するため利用できない。今回は中性付近の条件下で抗菌性が確認された。Ch-Cara-Linは歯周病の進行に伴って増加するグラム陰性細菌に対して速やかな抗菌活性を示すことから、口腔ケア材料として利用できる可能性があると考えられる。

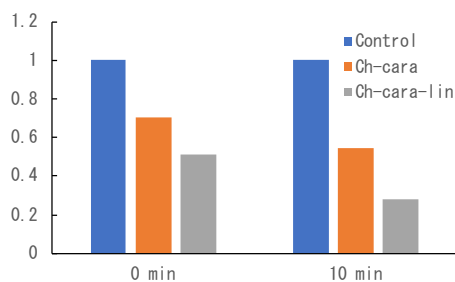


Fig. 2 Ch-Cara, Ch-Cara-Linの大腸菌に対する抗菌活性. Control(サンプル添加なし)を1とした時の生存率.

速やかに抗菌活性を示すことが確認された。キトサンは2位のアミノ基が正荷電を持ち、負に荷電する細菌表面の構造をかく乱することにより、抗菌活性を発揮する。そのため、Ch-Cara-LinがCh-Caraよりも活性が高いのは、キトサンの複合量がCh-Cara-Linで高いためと考えられる。一般的なキトサンは通常酸性条件でのみ抗菌性を発揮するが、歯のエナメル質は酸で溶解するため利用できない。今回は中性付近の条件下で抗菌性が確認された。Ch-Cara-Linは歯周病の進行に伴って増加するグラム陰性細菌に対して速やかな抗菌活性を示すことから、口腔ケア材料として利用できる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saita Kanako, Nagaoka Shoji, Shirosaki Tomohiro, Horikawa Maki, Ihara Hiroataka	4. 巻 84
2. 論文標題 Dispersible chitosan particles showing bacteriostatic effect against Streptococcus mutans and their dental polishing effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1265 ~ 1273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1723402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 齋田佳菜子, 永岡昭二, 堀川真希, 城崎智洋, 伊原博隆
2. 発表標題 口腔ケアを指向した脂肪酸 / カラギーナン / キトサンコアシェルカプセルの開発とその特性
3. 学会等名 第33回日本キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanako Saita, Shojj Nagaoka, Tetsuya Yamamoto, Kazuhiko Okuzono, Satoshi Hirano, Hiroataka Ihara
2. 発表標題 Development of chitosan submicron particles using ion-exchange phase separation method and their application to oral and dental care materials
3. 学会等名 14th International Chitin and Chitosan Conference & 12th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Saita, S. Nagaoka, T. Yamamoto, K. Okuzono, S. Hirano, H. Ihara
2. 発表標題 Preparation of chitosan particles with antibacterial activity and application of oral care
3. 学会等名 The 4th International Cellulose Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永岡 昭二 (Nagaoka Shoji)		
研究協力者	佐藤 崇雄 (Satoh Takao)		
研究協力者	堀川 真希 (Horikawa Maki)		
研究協力者	城崎 智洋 (Shirosaki Tomohiro)		
研究協力者	山本 哲也 (Yamamoto Tetsuya)		
研究協力者	伊原 博隆 (Ihara Hirotaka)		