

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00867

研究課題名(和文) 未利用食品資源を利用した歯周病原細菌に対する抗菌物質の開発

研究課題名(英文) Development of antibacterial substances against periodontal pathogens by using unused food resources

研究代表者

神谷 重樹 (KAMITANI, SHIGEKI)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究科・教授

研究者番号：60379089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：未利用食品資源由来のプルニンラウリン酸エステルが慢性歯周病の病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) に対して増殖阻害やバイオフィーム形成阻害を含む抗菌作用を持つことを見出した。また歯周病感染モデルマウスにおいて、プルニンラウリン酸エステルを含む飼料を給餌したところ、*P. gingivalis* 感染による歯周病による歯槽骨の骨吸収の抑制傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は全ライフステージにおいて適切な予防をすることが重要な疾患であると言われている。しかしながら、世の中に流通している口腔衛生用品は殺菌を目的とした刺激の強いものが多く、高齢者や幼少児には使用しづらいものが多い。本研究では天然の未利用食品資源由来のプルニンラウリン酸エステルが試験管レベル及び生体内レベルの歯周病抑制効果を持つことが明らかになった。これらの知見は、天然物質由来であることから刺激の弱いという利点を活かした、高齢者や幼少児を含む全ライフステージの人々が使用しやすい口腔衛生用品の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was found that prunin lauroyl ester derived from an unused food resource showed an antibacterial activity including the inhibition of the bacterial growth and the biofilm formation against *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), which is a pathogen of chronic periodontal disease. In addition, we observed that prunin lauroyl ester possibly suppressed the bone resorption of alveolar bone in periodontal disease model mice by *P. gingivalis* infection when a diet containing prunin lauroyl ester was fed.

研究分野：病原細菌学

キーワード：機能的食品 歯周病 未利用食品資源 抗菌作用

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

未利用食品資源は主に食品加工産業から発生し、その食品廃棄量は日本国内で年間 1,700 万トンに達すると言われている。食品リサイクル法により 100 トン以上の食品廃棄物を排出する食品関連事業者にはリサイクルが求められているが、現状、未利用食品資源は肥料や飼料以外にはほとんど利用されていない。これらの未利用食品資源中には糖質やポリフェノールなどの二次代謝産物が含有されており、種々の用途が期待される有用物質生産の出発材料として高い可能性を持つと考えられる。

一方、我が国は現在高齢者の割合が 25%を超えた超高齢社会となっており、高齢者の QOL

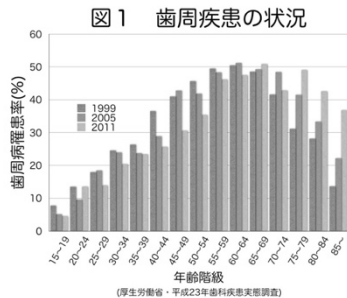
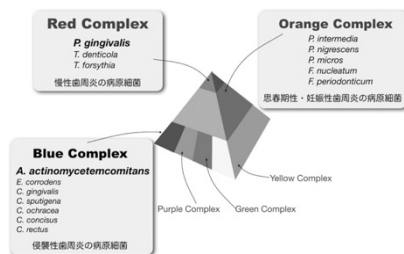


図2 プラーク細菌ピラミッド



には口腔の健康が重要な問題である。特に歯周病原細菌の感染によって引き起こされる炎症性疾患である歯周病は 50 歳以上では 50%以上の有病率であり、日本人全体の問題となっている(図1)。歯周病は歯周病原細菌が口腔内に長期間存在することにより、歯肉が炎症を起こし、さらに歯周組織が破壊される。進行すると歯を支える歯槽骨が骨吸収され、最終的には抜歯などにより歯数の減少につながる。歯周病の3大リスク因子は①喫煙、栄養、飲酒などの環境因子、②糖尿病や加齢などの宿主因子、③歯周病原細菌の細菌因子であるが、細菌因子はトリガー因子として必須である。歯周病原細菌には多くの口腔内細菌が含まれるがその病原性によりピラミッド型に分類され、ピラミッドの頂点に行くほどリスクの高いものである(図2)。Red Complex と呼ばれる3菌種(*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*)は慢性歯周炎の原因菌であり、Blue Complex に属す *A. actinomycetemcomitans* は侵襲性歯周炎の原因菌である。近年、歯周病は糖尿病、骨粗鬆症、誤嚥性肺炎や心血管疾患との関連が強く示唆され、口腔ケアにより糖尿病が改善することなどが明らかになってきている。

これまでに歯周病原細菌(*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*)に対する増殖阻害活性を持つ物質

を探索してきた。その結果、未利用食品資源由来フラボノイド誘導体2種が 10-100 μM の低濃度で完全に細菌増殖を阻害することを発見した。これら増殖阻害活性が認められた物質について増殖阻害を示した濃度でバイオフィーム形成を完全に阻害すること、また歯周病原細菌に作用させると作用後2時間で生菌数が0となり、殺菌作用を持つことを確認していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は未利用食品資源由来物質から歯周病原細菌に対する抗菌物質を開発することである。これまでに同定した未利用食品資源由来のプルニンラウリン酸エステルについて①誘導体を作製し、水溶性や抗菌活性の上昇を検討する。②試験管レベルでの抗菌活性及び細胞毒性を評価する。③歯周病の感染動物モデルを用いて、抗菌物質を投与した場合の歯周病の発症、進展に対する予防・抑制効果を評価する。本研究の成果をもって、未利用食品資源の高付加価値の創出とともに高齢者や幼少児にも使用可能な低刺激性で安全な食品由来抗菌物質を開発し、歯周病予防に有用な食品添加物などへの応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細菌培養

全ての *in vitro* 実験は、慢性歯周病の原因細菌である *P. gingivalis* 33277 株を用いて行った。また、動物実験では *P. gingivalis* W83 株を用いて実験を行った。*P. gingivalis* 33277 株は、Brain-Heart Infusion, 5 $\mu\text{g/mL}$ Hemin, 1 $\mu\text{g/mL}$ Menadione を含む tryptic soy broth (TSB) broth またはこれに寒天を添加した TSB agar plate を用い、角形ジャーとアネロパック・ケンキを用いて嫌気条件下、37°C で培養した。*P. gingivalis* W83 株は上記の培地に羊脱繊維血液を終濃度 5% になるように添加して同様に培養した。

(2) プルニンラウリン酸エステルとその類縁体

植物由来フラバノンであるプルニンおよびその類縁体と植物由来脂肪であるラウリン酸を *R. miehehi* 由来リパーゼを用いてエステル化したエステル化合物を作製した。

(3) 細菌増殖阻害試験

P. gingivalis 33277 株を TSB 寒天培地上で 3-5 日間嫌気培養したのち、TSB broth で 600 nm の吸光度が 0.1 になるように懸濁し、限界希釈した上記の物質を加え、37°C で 48 時間培養した。培養後、プレートリーダーを用いて濁度を測定し、細菌の生育を判定した。

(4) バイオフィーム形成阻害試験

P. gingivalis 33277 株を 600 nm の吸光度が 0.5 になるように播種し、上記の物質を加え、72 時間

の培養によりバイオフィルムを形成させた。培養後にバイオフィルムを 2%クリスタルバイオレットで染色し、その後、脱色液を加えて脱色液の 595 nm の吸光度を測定し、バイオフィルム形成能を判定した。

(5) 細胞毒性試験

ヒト由来の HeLa 細胞に限界希釈した上記の物質を加え、24 時間培養した。培養後、MTT 試薬を用いて細胞生存率を判断し、細胞毒性の有無を判定した。

(6) 動物実験

6 週齢で雌性の Balb/c マウスを使用し、口腔内に *P. gingivalis* W83 株を塗布して感染させた。塗布開始時からプルニンラウリン酸エステル含有飼料を自由に飲食させ、6 週間後に麻酔下でマウスを屠殺したのち上顎骨を摘出し、上顎骨をメチレンブルー染色し、セメントエナメル境-歯槽骨頂(CEJ-ABC)間距離を測定した。

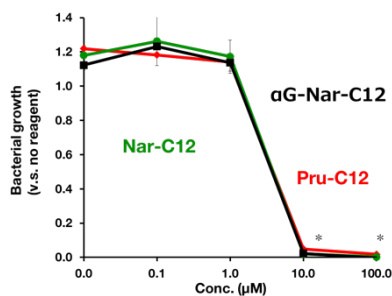
(7) 統計解析

細菌増殖阻害試験、バイオフィルム形成阻害試験、細胞毒性試験の結果は一元配置分散分析で解析し、多重比較は Dunnett 法を用いた。歯槽骨吸収抑制試験も同様に一元配置分散分析で解析し、多重比較は Tukey 法を用いた。統計解析は統計ソフトである Easy R を用いた。

4. 研究成果

(1) 細菌増殖阻害効果

図3 細菌増殖阻害効果



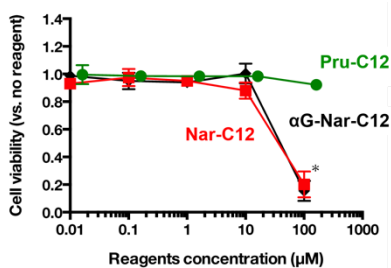
食品由来フラボノイドであるプルニン、ナリンジン、ヘスペリジン、ルチンと植物由来脂肪であるラウリン酸のエステル化合物とそれらにグルコースを付加した化合物を作製し、*P. gingivalis* に対する細菌増殖阻害効果を検討したところ、いずれも糖付加により水溶性は上昇したが、ナリンジンラウリン酸エステル(Nar-C12)とその糖付加誘導体(αG-Nar-C12)のみが、プルニンラウリン酸エステル(Pru-C12)と同程度の 10 µM の最小増殖阻害効果を示した(図3, *P < 0.05)。

(2) バイオフィルム形成阻害効果

次に、上記の物質のうち、細菌増殖阻害効果の強かったプルニンラウリン酸エステル(Pru-C12)とナリンジンラウリン酸エステル(Nar-C12)とその糖付加誘導体(αG-Nar-C12)について、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成に対する阻害作用を調べたところ、いずれも 50 µM の濃度でバイオフィルム形成を完全に阻害した。

(3) ヒト由来細胞に対する細胞毒性

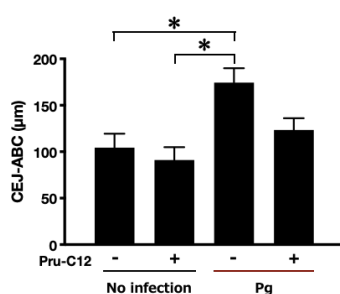
図4 細菌増殖阻害効果



ヒト由来の上皮系細胞である HeLa 細胞に対する細胞毒性を調べたところ、プルニンラウリン酸エステル(Pru-C12)のみが *P. gingivalis* に対して細菌増殖阻害活性を示す濃度で細胞毒性を示さなかった(図4, *P < 0.05)。

(4) 歯周病感染動物モデルマウスによる歯周病抑制効果

図5 歯周病抑制効果



P. gingivalis W83 株を感染させた歯周病モデルマウスにプルニンラウリン酸エステルを添加した飼料を与え、歯周病の抑制効果を検討した。その結果、上顎骨のセメントエナメル境-歯槽骨頂(CEJ-ABC)間距離を歯周病の病態進行の指標としたところ、感染により増大した CEJ-ABC 間距離が低下しており、歯周病の歯槽骨吸収を抑制する傾向が認められた(図5, *P < 0.05)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kitadokoro Kengo, Tanaka Mutsumi, Hikima Takaaki, Okuno Yukiko, Yamamoto Masaki, Kamitani Shigeki	4. 巻 10
2. 論文標題 Crystal structure of pathogenic Staphylococcus aureus lipase complex with the anti-obesity drug orlistat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5469-5469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-020-62427-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yazawa Ayaka, Kamitani Shigeki, Togawa Naoyuki	4. 巻 165
2. 論文標題 Method for absolute quantification of microbial communities by using both microarrays and competitive PCR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 105718 ~ 105718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105718	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 -
1. 著者名 Kitadokoro Kengo, Kakara Mizuki, Matsui Shingo, Osokoshi Ryouhei, Thumarat Uschara, Kawai Fusako, Kamitani Shigeki	4. 巻 286
2. 論文標題 Structural insights into the unique polylactate degrading mechanism of Thermobifida?alba cutinase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 2087 ~ 2098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/febs.14781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Keiji, Shinoda Noriko, Hiramatsu Yukihiro, Ohnishi Shinya, Kamitani Shigeki, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 BspR/BtrA, an Anti- Factor, Regulates the Ability of Bordetella bronchiseptica To Cause Cough in Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 00093-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1128/mSphere.00093-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yazawa A, Okuno Y, Asao S, Maetani M, Shinagawa H, Kawase H, Yoshioka M, Kamitani S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Distribution of Periodontal Pathogens and Lifestyle Habits of Japanese Mothers and their Children.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Anal Bio-Sci	6. 最初と最後の頁 49-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka M, Kamitani S, Kitadokoro K.	4. 巻 74
2. 論文標題 Staphylococcus aureus lipase: purification, kinetic characterization, crystallization and crystallographic study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F	6. 最初と最後の頁 567-570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X18010506.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitadokoro K, Matsui S, Oshkosh R, Nakata K, Thumarat U, Kawai F, Kamitani S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Expression, Purification and Crystallization of Thermostable Mutant of Cutinase Est1 from Thermobifida alba	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Bioscience and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 215-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/abb.2018.95015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 山下 絵美, 高井 雄一郎, 北田 康祐, 山崎 基嘉, 神谷 重樹	4. 巻 2
2. 論文標題 ‘田辺’ダイコンの根部の物性および糖含量の特性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 新近畿中国四国農業研究	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24755/westernagrites.2.0_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ayaka Yazawa, Miki Maetani, Ayumi Takemura, Shigeki Kamitani	4. 巻 15
2. 論文標題 Association between the Porphyromonas gingivalis fimA type II genotype and the nutritional intake of elderly women	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Life Science Research	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chakrabortya S, Kloosa B, Roetza N, Schmidta S, Eigenbroda T, Kamitani S, and Kubatzky KF.	4. 巻 223
2. 論文標題 Influence of Pasteurella multocida Toxin on the differentiation of dendritic cells into osteoclasts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunol	6. 最初と最後の頁 142-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imbio.2017.09.001	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 該当する

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大原由貴子, 小林悠, 尾関百合子, 西山晃史, 立石善隆, 奥田修二郎, 神谷重樹, 北所健悟, 松本壮吉
2. 発表標題 抗酸菌症治療薬を目指した標的蛋白質の発現と精製
3. 学会等名 第75回日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田衣里香, 伊藤千陽, 篠原舞, 前谷実希, 矢澤彩香, 阪本龍司, 安木真世, 三宅眞実, 神谷重樹
2. 発表標題 抗菌活性を持つプルニラウリン酸エステルによる歯周病抑制効果の評価
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢澤彩香, 古宮綾乃, 和田敏美, 徳本勇人, 尾形善之, 小川由紀子, 神谷重樹
2. 発表標題 女子大学生スポーツ選手の口腔細菌叢と生活背景に関する検討
3. 学会等名 日本スポーツ栄養学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北所健悟, 田中睦美, 古澤昌大, 神谷重樹
2. 発表標題 構造生物学から見た寄生適応の分子戦略 黄色ブドウ球菌由来毒素リパーゼと阻害剤のドラッグデザイン
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下絵美, 高井雄一郎, 北田康祐, 山崎基嘉, 神谷重樹
2. 発表標題 'なにわの伝統野菜' '田辺' および '守口' ダイコンの糖含量および物理的特性
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅彩優奈, 宮下千穂, 倉橋雪乃, 藤井智也, 北田康祐, 高井雄一郎, 神谷重樹
2. 発表標題 羽曳野産イチジク葉抽出物の歯周病原細菌に対する抗菌活性の検討
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 プルニンラウリン酸エステル ¹ の歯周病抑制効果の検討
2. 発表標題 和田衣里香, 伊藤千陽, 篠原舞, 前谷実希, 矢澤彩香, 安木真世, 三宅眞実, 阪本龍司, 神谷重樹
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢澤彩香, 古宮綾乃, 和田敏美, 渡邊完児, 松木優也, 徳本勇人, 尾形善之, 小川由紀子, 神谷重樹
2. 発表標題 女子大学生スポーツ選手の口腔細菌叢と口腔ケアに関する検討
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 衣里香、伊藤 千陽、篠原 舞、矢澤 彩香、前谷 実希、神谷 重樹
2. 発表標題 抗菌活性を持つプルニンラウリン酸エステル ¹ の歯周病動物モデルでの評価
3. 学会等名 第57回日本栄養・食糧学会近畿支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢澤 彩香, 奥野 祐子, 浅尾 咲子, 前谷 実希, 品川 英朗, 吉岡 眞知子, 神谷 重樹
2. 発表標題 母子における歯周病原細菌感染状況と生活背景に関する検討
3. 学会等名 第72回日本栄養食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神谷 重樹, 矢澤 彩香, 品川 英朗, 吉岡 眞知子, 徳本 勇人, 尾形 善之, 奥野 祐子, 浅尾 咲子, 酒井 晴菜, 和田 敏美, 河野 楓, 前谷 実希
2. 発表標題 女性のライフステージ別に見た口腔細菌叢と食生活の関連についての疫学研究
3. 学会等名 第72回日本栄養食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下 絵美, 高尾 理樹夫, 小川 由紀子, 吉田 幸恵, 神谷 重樹
2. 発表標題 「なにわの伝統野菜」田辺大根の調理特性
3. 学会等名 第72回日本栄養食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢澤彩香, 有田穂ノ香, 河野楓, 和田敏美, 前谷実希, 神谷重樹
2. 発表標題 女子大学生と高齢女性における歯周病原細菌保有状況と口腔ケアに関する検討
3. 学会等名 第71回日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 篠原舞, 北田千晴, 矢澤彩香, 前谷実希, 神谷重樹
2. 発表標題 歯周病原細菌Porphyromonas gingivalisに対して食品添加物が及ぼす効果
3. 学会等名 第71回日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢澤彩香、和田敏美、杉山由実、西川侑里、酒井晴菜、奥野祐子、前谷実希、品川英朗、神谷重樹
2. 発表標題 女性の歯周病原細菌保有率と生活習慣に関する検討
3. 学会等名 第56回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮下千穂、篠原舞、神吉夏央里、前谷実希、矢澤彩香、宇都義浩、神谷重樹
2. 発表標題 プロポリス成分の歯周病原細菌に対する抗菌活性の検討
3. 学会等名 第56回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田衣里香、伊藤千陽、篠原舞、前谷実希、矢澤彩香、安木真世、三宅眞実、阪本龍司、神谷重樹
2. 発表標題 プルニラウリン酸誘導体による歯周病原細菌に対する抗菌活性の検討
3. 学会等名 56回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井晴菜、岡野凌一、徳本勇人、矢澤彩香、大津巖生、神谷重樹
2. 発表標題 ヒト口腔細菌叢と細菌由来硫黄化合物の関連の検討
3. 学会等名 第91回日本細菌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田衣里香、伊藤千陽、篠原舞、前谷実希、矢澤彩香、安木真世、三宅眞美、坂本龍司、神谷重樹
2. 発表標題 歯周病原細菌P.gingivalisに対するプルニラウリン酸エステルの抗菌活性の検討
3. 学会等名 第91回日本細菌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢澤彩香、徳本勇人、尾形義之、小川由紀子、和田敏美、神谷重樹
2. 発表標題 女性スポーツ選手の口腔内細菌叢の状況と生活背景に関する研究 第2報
3. 学会等名 平成29年度先端ゲノミクス研究所研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinohara M, Maetani M, Yazawa A, and Kamitani S
2. 発表標題 Effect of food additives on the periodontal pathogen P. gingivalis in vitro
3. 学会等名 PgMelborne2017 (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
---------	---------------------------	-----------------------	----