

令和元年6月25日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18193

研究課題名(和文)ポリフェノールの抗加齢作用による歯周組織改善効果

研究課題名(英文)Improvement of periodontal tissue by the anti-aging effects of polyphenol

研究代表者

佐藤 武則 (Sato, Takenori)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40638904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物由来のポリフェノールであるピクノジェノール(PYC)を配合した歯磨剤を口腔内応用性について検討する目的で、本研究はPYC歯磨剤の口腔内細菌に対する殺菌効果やバイオフィーム除去効果、抗酸化作用を評価した。また加齢ラットを用いてPYC歯磨剤の骨吸収抑制効果を検討した。その結果、抗酸化作用を示すPYCを配合した歯磨剤では供試した口腔細菌に対して優れた殺菌効果とバイオフィーム除去効果を示した。また、PYC歯磨剤の投与により破骨細胞の減少し加齢ラットの骨吸収量が抑制されたことが認められた。以上の結果からPYCが歯周組織の加齢変化を予防できる天然由来成分であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリフェノール類であるピクノジェノールを歯磨剤成分に配合し、口腔細菌への影響を評価したところ、口腔細菌に対する殺菌効果やバイオフィーム形成抑制効果が示され、う蝕や歯周病の原因となる歯垢の形成抑制に期待できることが確認できた。また加齢動物を用いた実験では、骨吸収を行なう破骨細胞の数が減少し、骨吸収量の減少を抑制したことが明らかになり、加齢変化に伴う歯周組織の脆弱化を予防できることが示唆された。高齢化社会が進行し、全身疾患と口腔細菌の関連性が指摘されている社会的背景から、本研究で用いたピクノジェノールは口腔内の健康維持に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To examine the effect of a toothpaste containing Pycnogenol (PYC) which is a plant polyphenol on oral cavity, we investigated the bactericidal effects and antioxidant effects of a toothpaste on oral bacteria. The biofilm removal effect of a toothpaste containing PYC was also examined. In addition, we evaluated the inhibitory effect of alveolar bone resorption by the toothpaste in aged rats. PYC indicated an antioxidant activity. The tooth paste containing PYC had great bactericidal and biofilm removal effects on oral bacteria. Moreover, the administration of toothpaste containing PYC was suppressed osteoclasts, and inhibited age-related alveolar bone loss in rats. Therefore, we suggest that PYC can be a natural ingredient for the prevention of age-related changes in periodontal tissue.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：ポリフェノール 歯周炎予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔内の加齢変化では、歯の動揺や歯肉退縮、歯槽骨吸収などを認めることが知られている。さらに加齢変化は全身の免疫力低下を招き、口腔細菌が歯周ポケット内から血流を介して侵入し、誤嚥性肺炎や糖尿病、アテローム性動脈硬化症などの全身疾患が誘発する原因にもなると考えられている。そのため、歯ブラシや洗口液などを用いた口腔ケアが、口腔内細菌の除去だけでなく、全身の健康維持と疾患の予防につながると考えられている。洗口液や歯磨剤に含まれる薬用成分には、う蝕や歯周病などの病的な状態を対象とするものが多く含まれているが、加齢変化による正常な歯周組織への改善効果を期待したものは少ない。近年、全身疾患の予防と健康維持が期待できる植物由来成分としてピクノジェノールが注目されている。ピクノジェノール (PYC) はフランス海岸松の *Pinus pinaster* の樹皮から抽出されるプロシアニジンとフラボノイドを主成分とするポリフェノールで、生理活性物質として全身に対して優れた抗炎症作用や抗酸化作用を示すことが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は植物由来成分であるピクノジェノール (PYC) を配合した歯磨剤の口腔内応用性を検討する目的で、PYC 含有歯磨剤の口腔内細菌に対する殺菌効果、バイオフィーム除去効果、加齢ラットを用いた歯槽骨吸収抑制効果および ESR 装置を用いた抗酸化作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) PYC 含有歯磨剤の口腔内細菌に対する殺菌効果

供試菌には *Streptococcus mutans* Ingbritt 株、*Actinomyces naeslundii* T14V 株および *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株を用いた。これらの細菌はイーストエクストラクト、ヘミンおよびビタミン K1 を添加したブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地で 37 °C、18 時間嫌気条件下で培養し実験に供試した。供試菌を単一で BHI 寒天培地に無菌的に塗抹した後、直径 6 mm の滅菌ろ紙に PYC 含有歯磨剤 10 µl を付着させて培地上に静置した。その後 37 °C、7 日間嫌気培養し、培養後にディスク周囲に形成された発育阻止円の直径を測定した。比較対象には歯磨剤に含まれる 1% PYC、0.05% 塩化セチルピリジニウム (CPC)、5% カルボキシメチルセルロース (CMC) を用いた。

(2) PYC 含有歯磨剤のバイオフィーム除去効果

24 ウェルプラスチックプレート内に直径 12.0 mm、厚さ 0.15 mm の円型滅菌カバーガラスを静置後 *S. mutans*、*A. naeslundii* および *P. gingivalis* を各々単一で 37 °C、18 時間嫌気培養し、カバーガラス上にバイオフィームを形成させた。浮遊細菌を除去後、PYC 含有歯磨剤と含有成分である PYC、CPC、CMC 単体 1.0 ml をそれぞれ 5 分間作用させた。各試料を除去後、カバーガラス表面に残留したバイオフィームに対して Live/Dead 染色を行ない、蛍光顕微鏡下でバイオフィーム中の細菌を観察した。

(3) 加齢動物を用いた PYC 含有歯磨剤の歯槽骨吸収抑制効果

実験動物は 7 週齢 SD 系雄性ラットを用いて行なった。ラットの健康状態を確認後、小動物用経口ゾンデを用いて週 5 回、ラット 1 匹あたり歯磨剤 0.5 ml を継続して経口投与した。実験開始から 100 日後に両側上顎骨を摘出した。左側上顎骨は乾燥顎骨標本を作製し、メチレンブルー染色後、実体顕微鏡下で歯槽骨頂からセメントエナメル境までの距離を生理学的骨吸収量として評価した。右側上顎骨は通法に従って連続薄切片を作製後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行ない、上顎臼歯部歯周組織中の TRAP 陽性細胞を破骨細胞として評価した。コントロール群は CMC を単独で経口投与した。

(4) PYC 含有歯磨剤成分の抗酸化効果

PYC 溶液および CPC 溶液の抗酸化作用を検討する目的で、活性酸素種であるヒドロキシラジカルや一重項酸素を標的として ESR 反応装置を用いて抗酸化効果を評価した。

4. 研究成果

(1) PYC 含有歯磨剤の口腔内細菌に対する殺菌効果

PYC 含有歯磨剤は成分である PYC、CPC、CMC 単体と比較して大きな発育阻止円を示し、すべての供試菌に対して優れた殺菌効果が得られた。

(2) PYC 配合歯磨剤のバイオフィーム除去効果

各試料を作用させた供試菌のバイオフィームに対して Live/Dead 染色を行ない、蛍光顕微鏡観察を行なったところ、*A. naeslundii* と *P. gingivalis* バイオフィームにおいて細菌の減少が認められ、歯磨剤処理群が単独成分処理群に比べてバイオフィーム除去効果が高いことが明らかとなった。

(3) 加齢動物を用いた PYC 含有歯磨剤の歯槽骨吸収抑制効果

加齢ラットの上顎骨歯槽骨吸収量を測定したところ、PYC 含有歯磨剤投与群ではコントロール

群に比べて有意な骨吸収抑制効果が認められ、19.3%の骨吸収抑制率が得られた ($p < 0.05$)。また、上顎臼歯部直下の歯周組織における破骨細胞の出現について TRAP 染色を用いて評価したところ、PYC 含有歯磨剤投与により破骨細胞数がコントロール群と比較して 28.3%減少した ($p < 0.05$)。

(4) PYC 含有歯磨剤成分の抗酸化効果

PYC 単独では活性酸素種を減少させることが明らかにされており、本研究でも同様の効果が得られた。現在はこれに加え CPC 単体および PYC と CPC の混合液の抗酸化効果について解析を進めている。

以上の結果、本研究に用いた PYC 含有歯磨剤は口腔細菌に対して優れた殺菌効果を示し、なおかつ加齢変化による歯槽骨吸収を抑制したことから、加齢変化による歯周組織の変化を軽減し、口腔内環境を改善する効果が期待できるものと示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Sato T, Watanabe K, Sasaki H, Hiramine H, Goda S, Hamada N. Antimicrobial activity and inhibitory effect of alveolar bone loss of toothpaste containing a natural plant extract. 神奈川歯学, 査読有, 53 (1, 2) 40-44, 2018.

Sasaki H, Yoshida A, Yoshino F, Inaba K, Sato T, Hiramine H, Watanabe K, Hamada N. The bactericidal and antioxidant effects of cacao bean extracts against periodontal pathogen. 神奈川歯学, 査読有, 53 (1, 2), 45-48, 2018.

佐藤武則: *Actinomyces naeslundii* 線毛による口腔バイオフィーム形成機構の解明. 神奈川歯学, 53(1,2), 査読有, 69-73, 2018.

〔学会発表〕(計 2 件)

佐藤武則, 鈴木二郎, 藤巻龍治, 石井信之, 合田征司, 浜田信城. アルカリ性根管洗浄液が *E. faecalis* バイオフィームに与える影響. 歯科基礎医学会第 157 回学術大会, 博多, 2018.9.5.

佐藤武則, 渡辺清子, 合田征司, 浜田信城. 太陽電池付与酸化チタン内蔵電動歯ブラシの口腔バイオフィーム除去効果. 平成 29 年度日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 京都, 2017.12.16.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。