

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593168

研究課題名(和文)高齢者の口腔病原菌コントロールと関連性全身疾患予防の可能性 - 抗菌ジェルの効果 -

研究課題名(英文) Oral bacterial control and prevention of systemic disease among elderly : effects and possible applications of oral antimicrobial gel

研究代表者

田村 宗明 (TAMURA, Muneaki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30227293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：開発したカテキンジェルは口腔内病原真菌*C. albicans*の発育と病原因子を抑制した。*C. albicans*感染ラットの口腔にカテキンジェルを塗布したところ、口腔内と糞便中の*C. albicans*菌数が顕著に減少した。一方、要介護高齢者の口腔にカテキンジェルを塗布した結果、口腔の正常維持に関わる菌には影響を示さず、う蝕原因菌、歯周病原菌群、*C. albicans*および一般病原性細菌数を減少させた。これらの結果から、カテキンジェルは長期間の使用が可能で、高齢者の口腔ケアおよびQOLの向上に役立つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A newly developed catechin-gel inhibited *C. albicans* (a dominant fungus in oral cavity) growth, adhesion activity, dimorphism, and proteinase activity. Gel component used xanthan gum, helps with the slow-release activity and preserve antioxidation of the catechin component encapsulated by the gel (GEC). Intraoral treatment of *Candida*-infected rats with catechin gel showed that the number of *Candida* cells detected in the oral cavity and feces decreased conspicuously.

In clinical applications of catechin gel in the oral cavity of bed-bounded elderly, no inhibitory effect was observed for oral streptococci which play an important role in indigenous oral flora. More importantly, the number of *S. mutans*, bacteria-related thickening of dental plaque, periodontopathic bacteria, *Candida*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were decreased significantly. These results suggest that GEC could be useful in maintaining elderly oral care.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：口腔ケア 高齢者 抗微生物作用 医療・福祉 老化

1. 研究開始当初の背景

口腔細菌叢は 700 種を超える極めて多くの細菌によって構成されており、これらは複雑な相互作用によりそのバランスを保ち、外来微生物の定着および増殖を阻止する重要な役割を担っている。しかし、日常的な口腔ケアの欠如によりバランスが崩れた場合、細菌叢が変化し様々な感染症の原因となる。常在微生物の増加と菌種遷移は、口腔内感染症の原因となるばかりでなく、様々な全身性疾患を起こすことが報告されている。平成 23 年の報告以降高齢者死因の第 3 位は肺炎であり、そのうち摂食・嚥下機能の低下から惹起される誤嚥性肺炎は実に 70% を占めており、誤嚥性肺炎のみならず口腔が原因となる全身疾患の発症率は急上昇していることから、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が極めて重要な問題となっている。さらに、2050 年には 65 歳以上が 40% を超す計算となり、今後免疫機能の低下する老人医療の解決が急務である。

申請者らはこれら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、カテキン成分をジェルと混和した新しい口腔ケア剤を開発した。そして *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することを見出した。

そこで、申請者らは臨床における高齢者の口腔ケアおよび QOL 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と、カテキン以外で、抗菌効果を有し、かつ、口腔内で使用可能な成分成分の検索など、新たな抗菌成分の発見と実用化が必要であると考えた。

2. 研究の目的

In vitro:

より多種の口腔由来微生物を被験菌とし、カテキンジェルの口腔内抗菌スペクトルを作製する。特に、抗菌効果が顕著であった歯周病原菌群と、高齢者の誤嚥性肺炎および義歯性口内炎の原因菌である *Candida albicans* に対するカテキンの抗菌効果について、エビデネティックな解析を含めて検討する。同様に、カテキン以外の抗菌作用が報告されている天然成分(ケルセチンや金属イオンなど)を供試し、その抗菌効果について検討する。

In vivo:

ラット動物実験モデルを用いたカテキンジェルの抗菌効果の実験、特に口腔 *C. albicans* 感染ラットに対するカテキンジェルの抗菌効果について検討すると同時に、口腔内軟組織、さらには

は全身への影響について Real Time PCR 法や ELISA 法で明らかにする。

一方、大規模な臨床治験を行い、主にう蝕原因菌である *S. mutans*、歯垢成熟に深く関与する *Actinomyces* 属菌や *Fusobacterium nucleatum*、*C. albicans* および歯周病原菌群に対するカテキンジェルの抗菌効果を検討する。これらの検出試験により口腔と下部消化管などの他臓器との関連性のエビデンスを得るとともに、カテキンジェルによる口腔が原因となる全身疾患の予防の可能性を検討する。研究進行度によっては上記新抗菌成分ジェルも用いる。

3. 研究の方法

In vitro 実験:

(1)カテキンジェルによる *C. albicans* の発育と病原性の抑制効果

口腔内で病原性を発揮する真菌 *C. albicans* は高齢者で装着率の高い義歯のレジンに付着しやすいことから、カテキンジェルの義歯床用材(軟および硬質義歯床用材)への付着への影響について検討した。さらに菌の ATP 産生量、菌糸形変換能、さらにタンパク分解酵素(SAP)産生能に及ぼすカテキンジェルの影響について、培養法、比色法および Real-time PCR 法にて解析した。

(2)ジェル成分によるカテキンの徐放効果と抗酸化作用

ジェル成分のキサントガムのカテキン徐放効果と、含有カテキンに対する抗酸化作用について HPLC と比色法で測定した。

In vivo 実験:

(3)カテキンジェルの *C. albicans* 感染ラットの口腔内と糞便中の菌数減少効果

最初に *C. albicans* を口腔に接種して感染ラットの作成を試みた。次に、このラットの口腔にカテキンジェルを 4 週間塗布後の唾液と糞便中の菌数への影響について培養法と real-time PCR 法で検討した。

(4)カテキンジェルのラット血液中の抗酸化作用への影響

若年と中年ラットの口腔にカテキンジェルを 4 週間塗布した後に血液を採取し、血液中の細胞内過酸化水素と SOD 量を kit で測定した。

(5)臨床実験:カテキンジェルの口腔内微生物数への影響

本実験に賛同し、インフォームドコンセントを得た要介護高齢者の口腔にカテキンジェルを 4 週間塗布した。塗布前後の唾液を採取し、抽出した DNA をサンプルとして real-time PCR 法で各菌種数を算定して臨床におけるカテキンジェルの効果を検討した

4. 研究成果

In vitro 実験:

(1)カテキンジェルによる *C. albicans* の発育と病原性の抑制効果

カテキンジェルは、義歯床用材(軟および硬質義歯床用材; 抗菌効果発揮までの作用時間に差が認められた)上の *C. albicans* に対して顕著に発育抑制効果を示し、菌の ATP 産生量も抑制された(図1)。さらに、酵母形から菌糸形への形態変換率が低下し、SAP 産生量も著しく低下した。また、菌糸形変換に關与する細胞内シグナルの代表的 2 経路に關連する mRNA 発現量の減少が認められ、両経路が阻害されることが確認された。

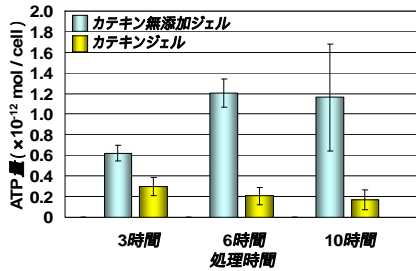


図1 ATP 産生量

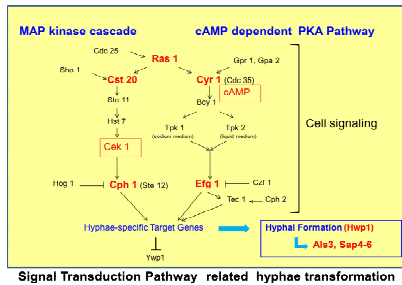


図2 菌糸形変換関与細胞内シグナル経路

(2)ジェル成分によるカテキンの徐放効果と抗酸化作用

ジェル成分であるキサンタンガムは長時間のカテキン徐放性を示す(図3)とともに、カテキン自身の酸化を抑制することがわかり、長期間保存の可能性が示唆された。

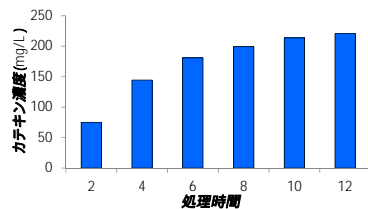


図3 ジェルからのカテキン徐放量

In vivo 実験:

(3)カテキンジェルによる *C. albicans* 感染ラットの口腔内と糞便中の菌数減少効果

ラット口腔に *C. albicans* を接種後、口腔内への菌定着に成功し、定着した菌の一部が消化器官への移行が確認されるとともに糞便中からも検出された。この感染ラットの口腔にカテキンジェルを塗布したところ、13日目以降に口腔内および糞便中から検出される菌数は著しく減少した(図4, 5)。

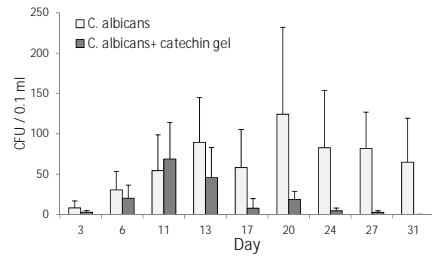


図4 口腔内菌数

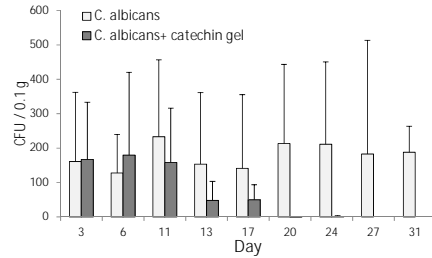


図5 糞便中菌数

(4)カテキンジェルによるラット血液中の抗酸化作用への影響

若年および中年ラット口腔にカテキンジェルを塗布することにより、血液細胞中の過酸化水素量は減り、反対に SOD 量が増加した。特にこの現象は中年ラットに顕著に認められ、カテキンジェルの抗酸化効果は老化予防に役立つものと推察された。

(5)臨床実験:カテキンジェルの口腔内微生物数への影響

採取した唾液より回収したDNAをサンプルとして real-time PCR 法を行った結果、口腔の正常維持に関わる一群のレンサ球菌数には影響が認められなかったが、う蝕原因菌、歯周病原菌、歯垢肥厚に関わる菌、*Candida* 菌および一般病原菌の黄色ブドウ球菌、肺炎レンサ球菌および緑膿菌数の有意な減少が認められた。この結果、カテキンジェルの長期使用と、口腔内微生物叢コントロールの可能性が示唆された。

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9件)

Saito H, Tamura M, Imai K, Ishigami T, Ochiai K. Catechin inhibits *Candida albicans* dimorphism by disrupting Cek1 phosphorylation and cAMP synthesis. *Microbial Pathogenesis*, 査読有, Vol. 56, No. 1, 2013, 16-20, DOI:10.1016/j.micpath.2013.01.002

田村宗明, 藤井航, 永田千里, 坂口貴代美, 齋藤洋祐, 宮野浩平, 高見正雄, 落合邦康. カテキンジェルの口腔細菌叢に及ぼす影響と要介護高齢者の口腔ケアへの応用. *日歯医学会誌*, 査読有, 32 巻, 1 号, 2013, 49-53

<http://www.jads.jp/activity/publication.html>
Cueno ME, Tamura M, Imai K, Ochiai K. Orally supplemented catechin increases heme amounts and catalase activities in rat heart blood mitochondria: A comparison between middle-aged and young rats. *Experimental Gerontology*, 査読有, Vol. 48, 2013, 1319-1322,
DOI:[10.1016/j.exger.2013.08.014](https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.08.014)

〔学会発表〕(計32件)

田村宗明, 大屋 学, 関 啓介, 阿部 和正, 落合邦康, 障害者に対する口腔ケアジェルの臨床応用について, 第88回日本細菌学会総会, 2015年3月28日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

田村宗明, 藤井 航, 永田千里, 坂口貴代美, 大屋 学, 落合邦康, 茶カテキンを応用した口腔ジェルが経口および経管栄養高齢者の口腔細菌数に及ぼす影響, 第20回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会・共催学術大会, 2014年9月6日, NSビル(東京都・新宿区)

田村宗明, 大屋 学, 阿部和正, 落合邦康, 口腔ケアジェルによる口腔内カンジダ症および消化管移行抑制効果, 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013年9月22日, 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

田村宗明, 藤井 航, 永田千里, 坂口貴代美, 齋藤洋祐, 宮野浩平, 高見正雄, 落合邦康, 高齢者の口腔ケアを目的とした抗菌ジェルの開発と臨床応用について, 第28回日本静脈経腸栄養学会, 2013年2月23日, 金沢都ホテル(石川県・金沢市)

田村宗明, 落合邦康, 抗菌ジェルによる要介護者口腔微生物数のコントロール効果, 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2012年9月16日, 奥羽大学歯学部(福島県・郡山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: 保存安定性に優れた口腔用抗菌剤および口腔ケア用組成物

発明者: 齋藤洋祐, 高見正雄, 草間なぎさ, 田村宗明, 落合邦康

代理人: 葛和清司

権利者: 株式会社明治

種類: 特許

番号: 特許願 PCT/JP2012/83965 (受付51202757816)

整理番号 PCT2546ME

出願年月日: 平成24年12月27日(2012年)

国内外の別: 国外

名称: 口腔内嫌気性細菌用静菌剤

発明者: 伊藤秀行, 山田益巳, 前野正夫,

落合邦康, 川戸貴行, 田村宗明

権利者: 理研ビタミン株式会社, 日本大学

種類: 特許

番号: 特許願2012-241583

出願年月日: 平成24年11月1日(2012年)

国内外の別: 国内

名称: 口腔内好気性細菌用静菌剤

発明者: 伊藤秀行, 山田益巳, 前野正夫, 落合邦康, 川戸貴行, 田村宗明

権利者: 理研ビタミン株式会社, 日本大学

種類: 特許

番号: 特許願2012-241588

出願年月日: 平成24年11月1日(2012年)

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/microbiology/results/theme03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 宗明(TAMURA, Muneaki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 30227293

(2) 研究分担者

落合 邦康(OCHIAI, Kuniyasu)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号: 50095444

植田 耕一郎(UEDA, Kouichiro)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号: 80313518

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