

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593172

研究課題名(和文)植物由来成分の歯周病予防薬としての役割に関する研究

研究課題名(英文)Roles of plant extracts in therapeutic and preventive agents for periodontitis

研究代表者

渡辺 清子(Watanabe, Kiyoko)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：70148021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物由来ポリフェノールの歯周病予防効果について検討する目的で、フランス海岸松抽出成分(PYC)の抗菌活性および実験的歯周炎における歯槽骨吸収抑制能について検討した。その結果、PYCには明らかなP. gingivalisに対する抗菌活性が認められ、P. gingivalis感染による誘導されるラット歯槽骨吸収を抑制することが明らかとなった。さらに、本抽出物は共培養系を用いた破骨細胞分化誘導を濃度依存的に阻害するとともに破骨細胞の延命時間を短縮することが判明した。以上の結果から、フランス海岸松抽出物は歯周炎の治療や予防に有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We examined the inhibitory effects of Pycnogenol (PYC) on alveolar bone resorption induced by P. gingivalis and osteoclast differentiation. In rat periodontitis model, rats were fed a regular diet or PYC mixed diet (0.025%: w/w). Administration of PYC along with P. gingivalis infection significantly reduced alveolar bone resorption. Treatment of P. gingivalis with 1 µg/ml PYC reduced the number of viable bacterial cells. Addition of PYC to epithelial cells inhibited adhesion and invasion by P. gingivalis. PYC treatment significantly inhibited osteoclast formation. Addition of PYC (100 µg/ml, 10 µg/ml or 1 µg/ml) to purified osteoclasts culture induced cell apoptosis. These results suggest that PYC may prevent alveolar bone resorption through its antibacterial activity against P. gingivalis and by suppressing osteoclastogenesis. Therefore, PYC may be useful as a therapeutic and preventative agent for bone diseases such as periodontitis.

研究分野：微生物学

キーワード：植物由来ポリフェノール 歯周炎 抗菌活性 歯槽骨吸収抑制効果 付着・定着阻害 口臭抑制 唾液細菌 歯周健康

### 1. 研究開始当初の背景

ポリフェノール(多価フェノール)とは、分子内のベンゼン環上に水酸基を2個以上持つフェノール化合物の総称である。近年、各種のガンや動脈硬化の引き金となる生活習慣病発症と酸化ストレスとの関係が明らかになるにつれ、ポリフェノール類の抗酸化作用がこれらの病気の予防に關与し、健康増進に有効であるとして脚光を浴びている。その他の生理作用として各種ポリフェノール類には抗炎症作用、ホルモン様作用、抗菌作用などが報告されており、口腔領域の疾患と關係してカテキン類をはじめクランベリー由来成分が齶蝕原性細菌および歯周病原細菌に対して抗菌活性を有し、また、口腔内への定着を阻害することなどが報告されている(Duarte S et al., 2006, Blanco AR et al., 2005, Yamanaka A et al., 2007)。申請者も、フランス海岸松樹皮成分が齶蝕原性細菌および歯周病原細菌を含む10種類の細菌に対して高い抗菌活性を有していることを明らかにした(渡辺ら 2007)。

しかしながら、*in vitro* 実験では抗菌活性を有するこれらポリフェノール類の臨床応用を目的とした検討については、チューイングガムなどに配合されて歯垢形成の抑制や歯肉の炎症、出血の軽減について検討したものがあつた程度であり、歯周炎の典型的な臨床症状の一つである歯槽骨吸収に対する抑制効果についての報告はない。

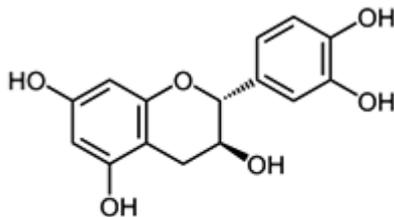


図1 カテキンの構造

### 2. 研究の目的

本研究は、日常的に摂取する食品やサプリメントによって歯周病が予防できないかという点について検討することを目的とした。特に、抗酸化作用のほかホルモン様作用、抗菌活性など多彩な作用が認められる植物由来ポリフェノール(緑茶カテキン、ウーロン茶ポリフェノール、松樹皮など)が歯周炎における歯槽骨吸収を抑制するかという点について、ラットを用いた *Porphyromonas gingivalis* 感染による実験的歯周炎モデル(*in vivo*)での阻害実験、および破骨細胞の分化誘導の阻害実験(*in vitro*)で検討し、骨吸収抑制の機序を解明する。本研究により、安全性の高い植物由来ポリフェノール類を食品やサプリメントに応用することにより慢性歯周炎の予防を計る。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物ポリフェノール

本研究で使用する植物由来ポリフェノールは、緑茶カテキン、ウーロン茶ポリフェノール、松樹皮由来ポリフェノール、およびライチ由来ポリフェノールとする。およびは、フラバン 3 オール(カテキン類)であり、およびはカテキン類が縮合したプロアントシアニジン類である。緑茶カテキン中の主要成分であるエピカテキン、エピガロカテキン、エピガロカテキンガレート、エピカテキンガレートは購入するが、松樹皮およびライチ由来ポリフェノールは研究協力者である松下氏より提供を受けた。

#### (2) 抗菌活性の測定

まず、上記ポリフェノール類の歯周病原細菌を含む口腔細菌に対する抗菌活性を求める必要があるため、各成分を適当な濃度に添加した細菌培養用培地中を用いてそれぞれの細菌を培養し、発育阻害が認められる希釈倍率について検討した。また、各種ポリフェノール類の *P. gingivalis* 菌に対する殺菌作用についても検討した。

#### (3) 実験動物による口腔内感染実験(ラット歯周病モデル)

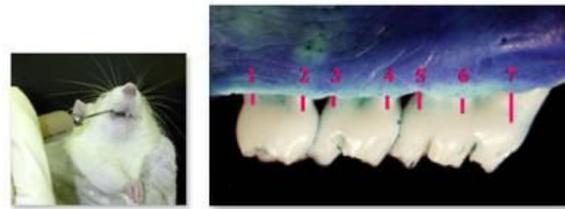


図2 *P. gingivalis* 感染モデル

生後3週 of ラットを使用して、ラット口腔内への *P. gingivalis* ATCC 33277 株の感染実験を行った。まず、sulfamethoxazole-trimethoprim を加えたイオン交換水を4日間与え、その後3日間は抗生物質を与えず、口腔内の常在菌を除菌した。その後、*P. gingivalis* 接種群:*P. gingivalis* 生菌をPBSで作製した5% cellulose 溶液に懸濁し、その0.5 ml を口腔および食道に2日間おきに接種した。ポリフェノール群:各ポリフェノール類の影響は、*P. gingivalis* 生菌を接種する時期と前後して短期的に抗菌活性の認められた濃度を目安にラットに接種した。

コントロール群:コントロールは、5% cellulose 溶液のみを接種した。最終感染後、42日後に安楽死させ、歯槽骨の吸収量は、上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を FLOVEL タブレット操作型ビデオマイクロメータ(申請者の研究施設に設置されている)で測定した(図2)。

また、実験終了時に、*P. gingivalis* がラット口腔内に定着していたかについて、ラット

口腔内試料を採取し DNA を抽出して *P. gingivalis* 特異的プライマーを用いた PCR 法にて確認した。

#### (4) ヒト歯肉上皮細胞への付着性

初代培養のヒト歯肉上皮細胞への *P. gingivalis* の付着性については以下のように検討した。即ち、 $10^9$  CFU/ml に調整した *P. gingivalis* 菌を  $10^5$  cells/ml に調整した細胞に  $10 \mu\text{l}$  加えた後、37 で 90 分間 インキュベートして細菌を付着させ、PBS で 2 回洗浄後滅菌蒸留水を 1 ml 加えて細胞を破壊し細胞に付着した細菌数を BHI 血液平板に塗抹して測定した。この際、*P. gingivalis* 菌を各種ポリフェノールを用いて前処理を行い、同様に付着させ未処理の場合と比較してポリフェノールによる菌の付着阻害について検討した。

#### (5) 破骨細胞分化誘導能の抑制の検討

Type I-P コラーゲンで表面処理した 48 well plate に 5-10 週齢の C57BL/6 マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞と破骨細胞の分化支持能を持つ細胞である MC3T3-G2/PA6 を 10%FCS、M-CSF、ビタミン D3、デキサメタゾンを含む  $\alpha$ -MEM 培地で 7 日間共培養した。培養終了後、TRAP 染色を行い、TRAP 陽性で 3 核以上の細胞を破骨細胞とした。以上の培養系に種々の濃度のポリフェノール類を添加した時の破骨細胞分化誘導の抑制について検討した。

#### (6) 破骨細胞の活性化抑制の検討

5-10 週齢の C57BL/6 マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を M-CSF、RANKL を含む  $\alpha$ -MEM 培地で 7 日間培養し破骨細胞を形成した。これに無刺激あるいは種々の濃度のポリフェノールを添加しさらに 2 日間培養を行い、ポリフェノールによる破骨細胞のアポトーシス誘導を測定した。

#### (7) ポリフェノール刺激による骨芽細胞上の RANKL および M-CSF の発現の検討

破骨細胞の分化支持細胞である MC3T3-G2/PA6 細胞を骨芽細胞の代わりに実験には使用し、ビタミン D3 は骨芽細胞の RANKL 発現を増強することが分かっているので、本培養系においてビタミン D3 をコントロールとして、さらにポリフェノール類を添加した場合の RANKL の mRNA 発現について定量 RT-PCR で測定した。

#### (8) フランス海岸松抽出物 (Pycnogenol®) の口臭抑制効果の検討

*P. gingivalis* 感染ラットの歯槽骨吸収を抑制した Pycnogenol® (PYC) を含有するチューイングガムを作製した。ガムは実験協力者より供与を受けた。全身疾患を有さず、現在歯周病治療を行っていない被験者を対象に、実験群には 1 回当たり 5 mg の PYC 含有ガムを 1

日 6 回、1 回につき 15 分間、対照群には PYC を含有しないプラセボガムを同様の条件で 4 週間に渡って噛むよう指示した。口臭の測定は、口気中の揮発性硫化物量 (VSCs) を実験開始時、2 週間後、ならびに 4 週間後に OralChroma™ を用いて行った。VSCs 測定時に舌苔量の変化を肉眼的に判定し、さらに、唾液中の硫化水素産生細菌数について 0.05% cysteine、0.12% glutathione ならびに 0.02% lead acetate を含有するブルセラ血液寒天培地を用いて培養し、PYC ガム口臭抑制効果について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 植物由来成分

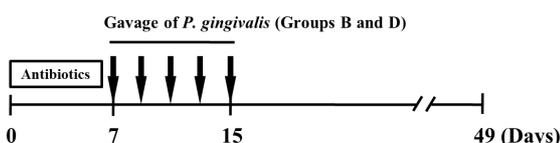
本研究では、フランス海岸松抽出物 (Pycnogenol®: PYC) を中心に研究を遂行した。それ以外の植物由来成分として、漢方薬である十全大補湯および鶏血藤を使用した。

### (2) 抗菌効果の測定

*P. gingivalis* ATCC 33277 株に対する PYC の抗菌活性について検討した結果、 $1 \mu\text{g/ml}$  濃度の PYC を用いて 30 分間処理することにより有意な生菌数の減少が認められた。さらに、 $1000 \mu\text{g/ml}$  濃度の PYC 液での 30 分間処理では、顕著な殺菌作用が確認された。さらに、同濃度の PYC 処理により *P. gingivalis* のヒト歯肉上皮細胞に対する付着・侵入に対する抑制も認められた。

同様に、十全大補湯処理によっても *P. gingivalis* に対する抗菌活性が認められた。なお、鶏血藤の抗菌活性については既に報告されている。

### (3) ラット実験歯周炎に対する歯槽骨吸収抑制効果



#### Animal Group

- A: Control (fed on standardized diet)
- B: *P. gingivalis* challenge (standardized diet)
- C: PYG control (fed on 0.025% PYG diet)
- D: PYG - *P. gingivalis* (PYG diet)

Fig.3 実験スケジュール

ラット実験的歯周炎は、4 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットを *P. gingivalis* 非接種群 (A)、*P. gingivalis* 感染群 (B)、Pycnogenol® 投与群 (C) ならびに *P. gingivalis* 感染および Pycnogenol® 投与群 (D) の 4 群 (各 6 匹) に分け、5% カルボキシメチルセルロース溶液 (CMC) で調製した *P. gingivalis* ATCC 33277 株の菌液 ( $1.5 \times 10^9$  cells/ml) を 5 回、口腔内へ接種することにより惹起した。Pycnogenol® 投与は固形飼料に 0.025% (wt/wt) 濃度となるよう

に Pycnogenol® 粉末を混合し、実験期間中給餌して行った。P. gingivalis 非接種群には 5% CMC 溶液のみを投与し、さらに 6 週間飼育した。Pycnogenol® による歯槽骨吸収抑制効果は、ラット上顎標本の歯槽骨吸収量を測定することにより評価した。P. gingivalis 感染群は非感染コントロール群と比較して歯槽骨吸収量が増加したが、Pycnogenol® 投与により骨吸収量は非感染群と同程度までに抑制された。

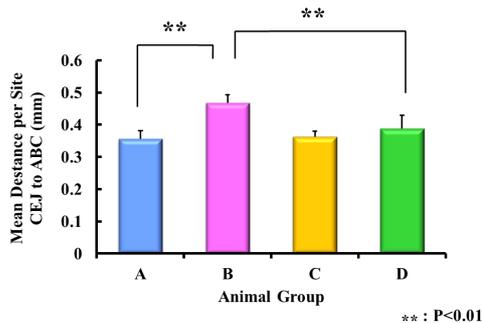


Fig. 4 ラット歯槽骨吸収量

(4) 破骨細胞の分化誘導は、BALB/c マウス大腿骨より採取した骨髄細胞を 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> および dexamethasone 存在下で破骨細胞分化支持細胞である MC3T3-G2/PA6 との共培養系により検討し、100 µg/ml、10 µg/ml ならびに 1 µg/ml 濃度の Pycnogenol® 溶液を培地中に添加することにより、非添加群と比較して有意な TRAP 陽性破骨細胞数の減少が認められた。また、RANKL 刺激による破骨細胞延命活性に対する Pycnogenol® 溶液の阻害効果について、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> および prostaglandin E<sub>2</sub> を含有する -MEM 培地で 7 日間培養することにより得た成熟破骨細胞を 200 ng/ml の RANKL 存在下でさらに 48 時間培養した後、生存する TRAP 陽性破骨細胞数を計測することにより評価した結果、Pycnogenol® 溶液の添加は濃度依存的に有意に生存破骨細胞数を減少させた。

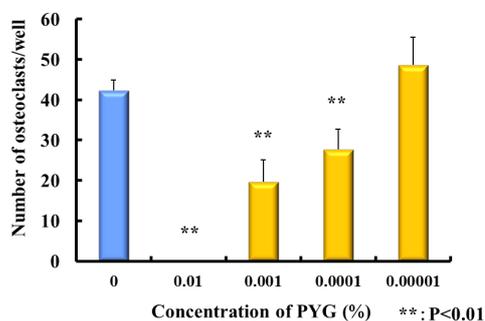


Fig. 5 破骨細胞分化抑制作用

(5) Pycnogenol® 含有ガムの口臭抑制効果  
実験開始時における各被験者の総 VSCs 量はいずれも認知閾値を超えていた。PYC ガム群、プラセボガム群での総 VSCs 量はそれぞれ 337.8 ± 168.8 ppb、349.6 ± 223.3 ppb であり、グループ間で有意な差は認められなかった。PYC ガム群では 2 週間ガムを摂取することにより、硫化水素量、メチルメルカプタン量、シメチルサルファイド量ならびに総 VSC 量が有意に減少しており、4 週間後では、対照群と比較して硫化水素量および総 VSCs 量が有意に減少していた。試験開始 4 週間後において、PYC ガム群の舌苔量は対照群と比較して明らかな減少が認められ、唾液中の硫化水素産生細菌数が有意に減少していた。

Table 1. Levels of VSCs at baseline

VSCs	Threshold Level	PYC Group	Placebo Group	P
H <sub>2</sub> S	112	226.1 ± 132.9	263.0 ± 166.5	NS
CH <sub>3</sub> SH	26	81.1 ± 49.5	71.1 ± 72.1	NS
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	8	30.6 ± 29.2	15.5 ± 11.6	NS
Total VSCs	146	337.8 ± 168.8	349.6 ± 223.3	NS

Data was shown as mean ± SD (ppb).

NS: No statistical differences were observed between the groups at baseline

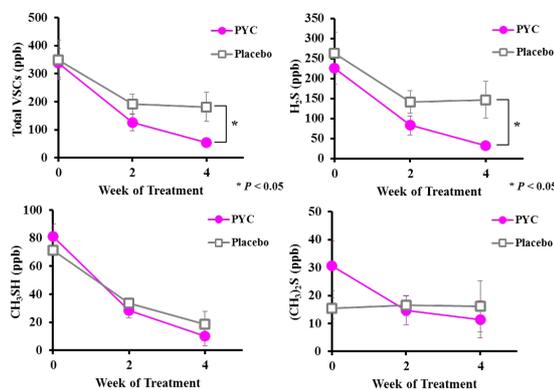


Fig. 6 口臭抑制効果

## 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 3 件)

Takeda O, Toyama T, Watanabe K, Sato T, Sasaguri K, Akimoto S, Sato S, Kawata T, Hamada N. Ameliorating effects of Juzentaihoto on restraint stress and P. gingivalis-induced alveolar bone loss. Archives of Oral Biology. 2014. 59: 1130-1138. 査読有  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996914001745#>

Toyama T, Wada-Takahashi S, Takamichi M, Watanabe K, Yoshida A, Yoshino F, Miyamoto C, Maehata Y, Sugiyama S, Takahashi SS, Todoki K, Lee

MC, Hamada N. Reactive oxygen species scavenging activity of Jixueteng evaluated by electron spin resonance (ESR) and photon emission. *Natural Product Communications*. 2014. 9: 1755-1759. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632478>

Sugimoto H, Watanabe K, Toyama T, Takahashi SS, Sugiyama S, Lee MC, Hamada N. Inhibitory effects of French pine bark extract, Pycnogenol®, on alveolar bone resorption and on the osteoclast differentiation. *Phytotherapy Research*. 2015. 29: 251-259. 査読有  
DOI: 10.1002/ptr.5245

〔学会発表〕(計 10 件)

渡辺清子:破骨細胞分化誘導に対するフランス海岸松抽出成分の抑制効果. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 奥羽大学(郡山市), 2012. 9. 15.

渡辺清子:ピクノジェノール®の破骨細胞分化誘導に対する阻害効果の検討. 神奈川歯科大学学会第 47 回総会 神奈川歯科大学(横須賀市), 2012. 12. 1.

Toyama T (遠山歳三): Ameliorating effect of *Jixueteng* on *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. 99<sup>th</sup> Annual Meeting of American Academy of Periodontology, Philadelphia (USA), 2013. 9. 28-10. 1.

Watanabe K (渡辺清子): Effects of pine bark extract chewing gum on oral malodor. 92<sup>nd</sup> General Session and Exhibition of the IADR, Cape Town (South Africa), 2014. 6. 23-28.

Hamada N (浜田信城): Pycnogenol® gum reduces gingivitis, plaque formation and oral malodor. 7<sup>th</sup> World Congress on Preventive & Regenerative Medicine, Taipei (Taiwan), 2014. 11. 4-7.

Toyama T (遠山歳三): Antioxidant effects of *Jixueteng*. 7<sup>th</sup> World Congress on Preventive & Regenerative Medicine, Taipei (Taiwan), 2014. 11. 4-7.

武田織英:十全大補湯のストレス負荷と *P. gingivalis* 感染ラットにおける歯槽骨吸収に対する改善効果. 神奈川歯科大学学会第 144 回例会 神奈川歯科大学(横須賀市), 2014. 6. 12.

渡辺清子:フランス海岸松抽出成分含有ガムの口臭抑制効果の検討. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場(福岡市), 2014. 9. 25-27.

遠山歳三:マウス実験的歯周炎モデルにおける生薬「鶏血藤」の循環改善効果. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場(福岡市), 2014. 9. 25-27.

渡辺清子:ピクノジェノール含有ガムの口臭抑制効果の検討. 神奈川歯科大学学会第 145 回例会 全日空ホテル(広島市) 2014. 10. 25.

〔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 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
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

渡辺 清子 (WATANABE, Kiyoko)  
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号: 7 0 1 4 8 0 2 1

### (2) 研究分担者

浜田 信城 (HAMADA, Nobushiro)  
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 2 0 2 4 7 3 1 5

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: