

<平成25年度助成>

スパイスを用いた歯周病バイオフィーム制御法に関する研究

中尾 龍馬

国立感染症研究所細菌第一部第六室(口腔細菌感染症室)

背景と目的

薬剤耐性菌、エボラ、新型インフルエンザ、ジカ熱など、世界各地で新興・再興感染症が頻発し、医学的かつ社会的な懸案事項となっている。このような背景のもと、新たな感染症治療法への応用可能性を秘めた抗菌活性を有する食品に注目が集まっている。食品は安全性に優れ、また使用者に安心感を与えることから、様々な感染症分野での応用が期待されている。本研究で対象疾患となった歯周病は、ヒトにおいて最も罹患率の高い感染症であり、口腔のみならず様々な全身疾患とも関連している¹⁾。

歯周病原性細菌としてRed complexと呼ばれる細菌群が知られている。これらはいずれも偏性嫌気性のグラム陰性桿菌であり、歯周ポケット内という嫌気環境下でバイオフィームを形成し生息している。たとえばジンジャー(Gi)、クローブ(CI)については、歯周病原性細菌に対する抗菌効果が示されている^{2,3)}。カレーリーフ(Cu)については、インフルエンザや下痢、がんなどに対する民間療法として用いられてきた歴史がある。またプロポリスは、樹液や花粉等にミツバチの唾液を混ぜ合わせて作られる樹枝状の物質であるが、歯周病原性細菌に対する抗菌効果が報告されている⁴⁾。しかしながら、これら食品による殺菌作用機序やその殺菌過程の詳細な検討は行われていない。また、過去の文献を渉猟した限り、歯周病臨床で汎用される歯周ポケット用軟膏という剤形での投与、歯周病への治療効果についての報告はなされてい

ない。本研究では、このような歯周病原細菌の中でも、特に病態形成に深く関与すると考えられている*Porphyromonas gingivalis*に対し、Cu, Gi, CIの3種類のスパイス、特にCuを中心とした抗菌作用、およびCu含有軟膏の歯周病患者への投与による治療効果について検討した。

方 法

P. gingivalis、および8株の口腔レンサ球菌を実験に供試した(表1)。各スパイスからエタノール抽出物を得て、各実験に供試した。各種細菌の生育に対する効果は、CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) ガイドラインに準じた最小発育阻止濃度(MIC)の決定⁵⁾、殺菌性試験等により評価した。各食品添加による菌体の形態変化は電子顕微鏡観察、および原子間力顕微鏡を用いたリアルタイム動画撮影システムにより評価した。さらに、歯周病患者の歯周ポケットへのカレーリーフ軟膏投与による歯周病の改善効果につき、被験者23名のランダム化比較介入試験により調べた(図1)⁶⁾。評価項目は、歯肉溝滲出液および

表1 MIC of ethanol-extracted curry leaf to strains used in this study

Strains		MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Streptococcus mutans</i>	UA159	48
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 6245	48
<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 3397	48 <
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 6715	48
<i>Streptococcus gordonii</i>	ATCC 10558	48
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 9795	48 <
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556	48
<i>Streptococcus oralis</i>	No.10	48 <
<i>P. gingivalis</i>	ATCC 33277	32

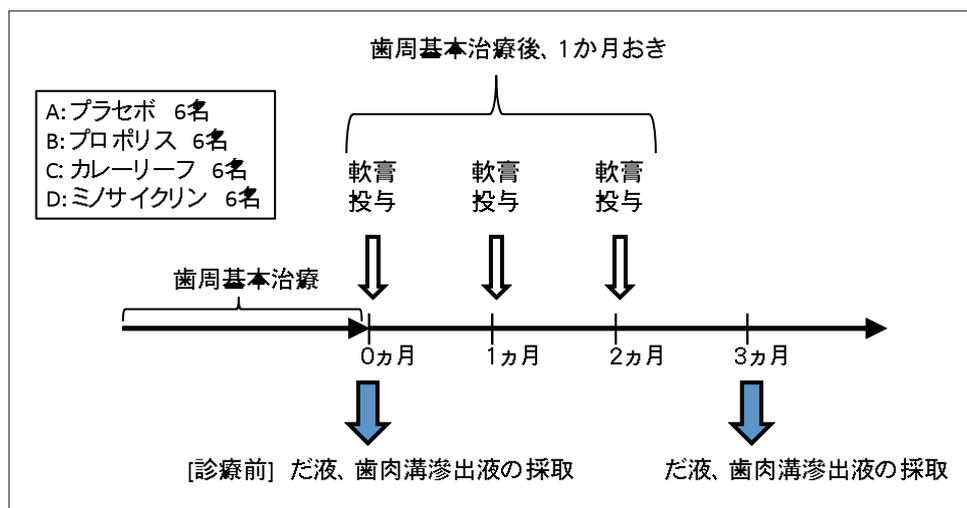


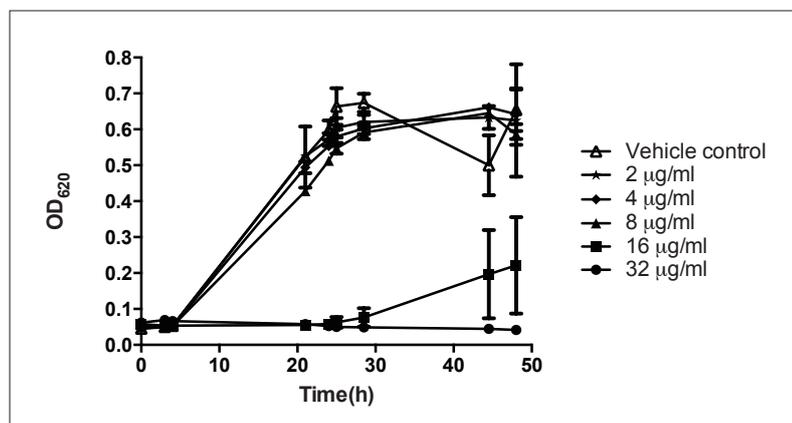
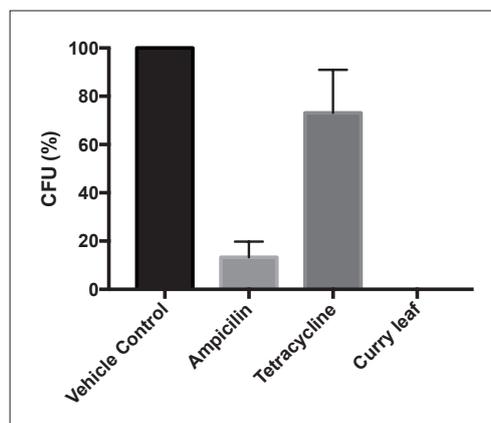
図1 臨床研究の流れ

唾液中の各種口腔細菌数のリアルタイムPCRによる定量、歯周病の臨床評価項目の測定であった。

結 果

Cu, Gi, Clの *P. gingivalis* に対するMICは、それぞれ32、16、64 $\mu\text{g/ml}$ であった(表1 & data not shown)。これら3種のスパイスはいずれも *P. gingivalis* に対して増殖を阻害(図2 (Cu) & data not shown)した。Cu, Gi, Clのうち2種を同時投与した時に、相加効果は認められたが、相乗効果は認められなかった(data not shown)。殺菌試験では、30分間のCu処理により *P. gingivalis* を完全に殺菌することができた(図3)。またCu, Giは100℃、20分の熱処理でその殺菌活性が維持された(data not shown)。Cuの発育阻止効果

は、口腔レンサ球菌群よりも *P. gingivalis* に対して高かった(表1)。電子顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いた観察(図4、5)では、Cu添加により *P. gingivalis* 菌体表層に直径100 nm以下の小胞を形成することが明らかとなった。またGiを *P. gingivalis* に添加すると、Cuを添加した時と同様に菌体表層に小胞を形成したが、Cuの時よりも大きな100 nm程度の小胞を形成することが明らかとなった。またClを *P. gingivalis* に添加すると、菌体表層に亀裂が生じ、その後溶菌することが明らかとなった。一方、アンピシリン処理では、一部の菌において溶菌している像が観察されたが、形態変化を伴わない菌体も多かった(data not shown)。テトラサイクリンは *P. gingivalis* の形態変化を引き起こさなかった(data not shown)。

図2 Growth curve of *P. gingivalis* in the presence of Cu at different concentrations図3 各種薬剤で30分間処理後の *P. gingivalis* のコロニー形成単位(CFU)の比較

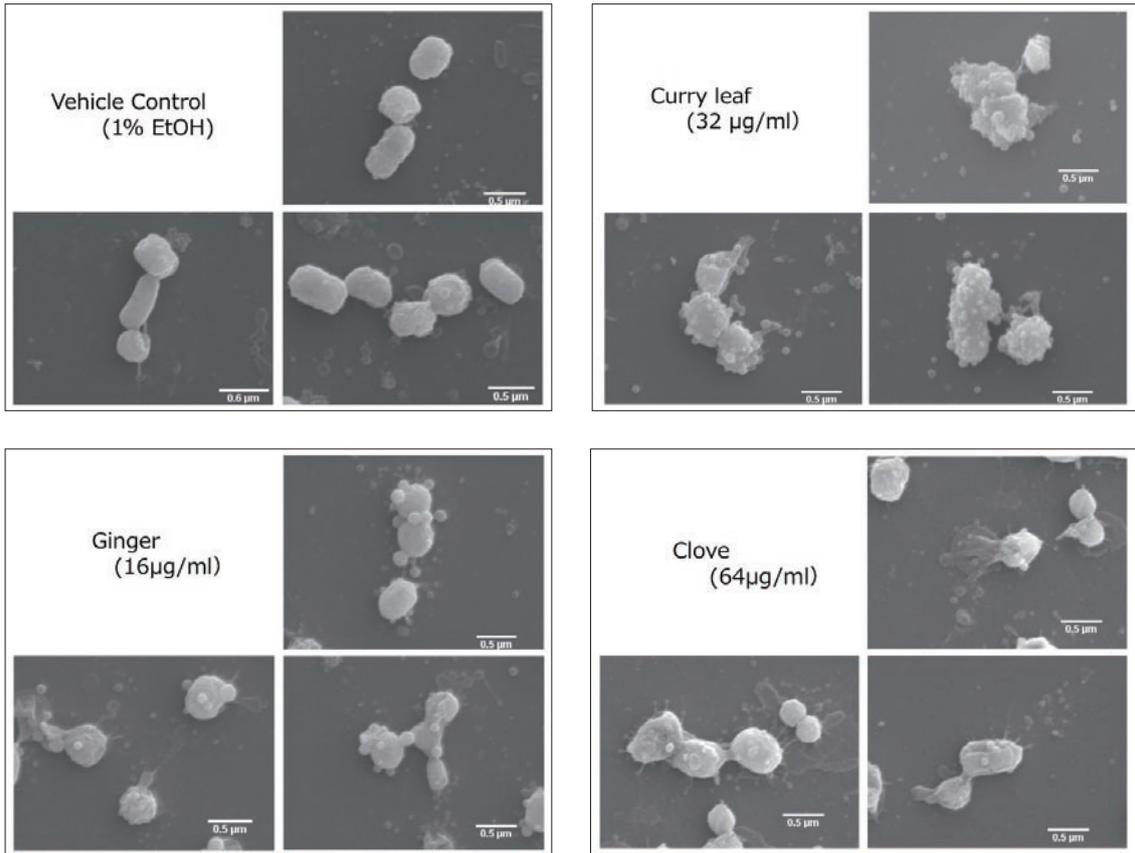


図4 各種薬剤で30分間処理後の*P. gingivalis*形態の比較(走査型電子顕微鏡)

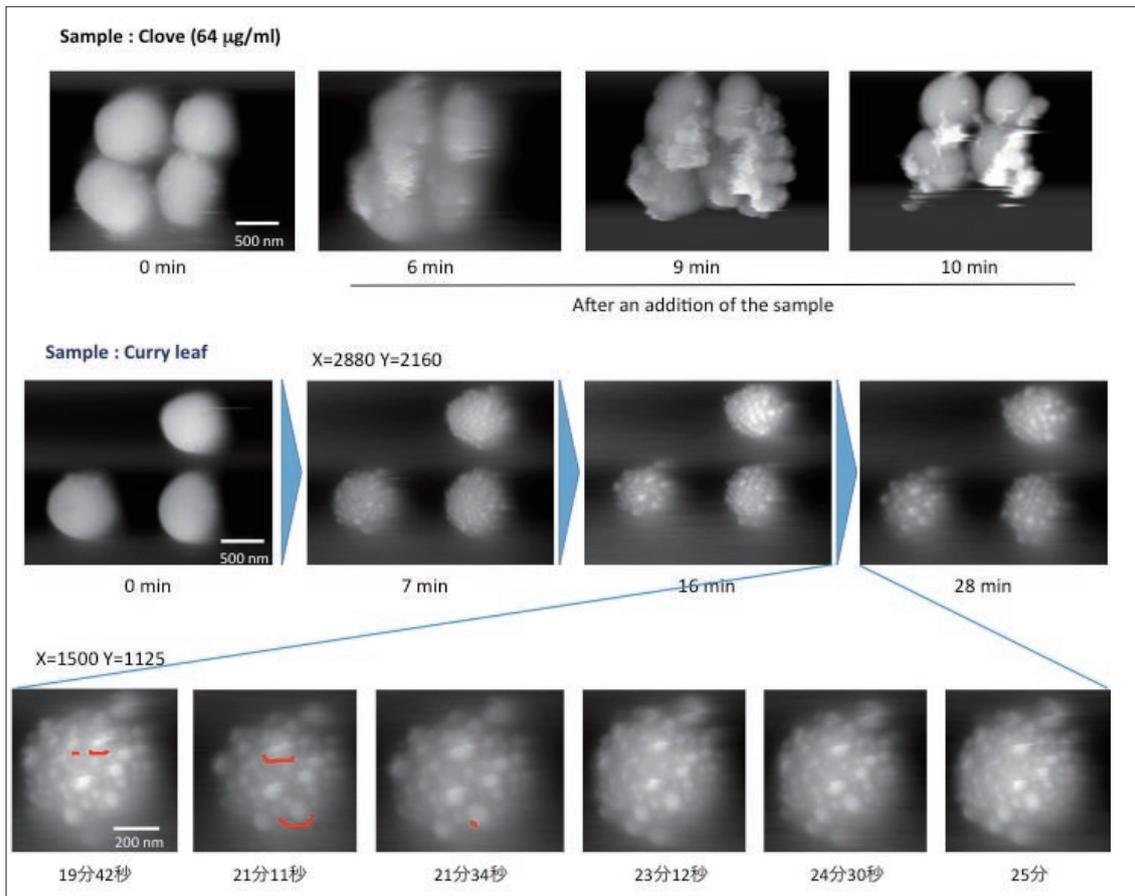


図5 各種薬剤添加後の*P. gingivalis*の経時的形態観察(高速AFM、上: Cl、下: Cu)

In vitro で *P. gingivalis* への効果が高かった Cu と、先行研究でやはり効果の高かったプロポリスを用いて介入型の臨床研究を行った。Cu およびプロポリスを含む含有軟膏の歯周ポケット内投与し、口腔内の微生物学的プロファイリング (図 6) と歯周病に対する治療効果などを調べた。唾液中の総菌数は、ミノサイクリン抗菌薬投与群では全 6 名において増加した一方で、プロポリス投与群では 6 名中 5 名が減少した。また、プロポリス群の 6 名の歯肉溝滲出液中 *P. gingivalis* 菌数については、介入前には 6 名全員から *P. gingivalis* 菌が検出されたが、介入後には 3 名で検出限界 (菌数 2.5×10^2) 以下となった。Cu 投与群 5 名の唾液中の *P. gingivalis* の菌数 4 名において減少したが、統計学的な有意差は認められなかった。また歯周ポケット深さについては、プラセボ群に比べプロポリス投与群で有意な改善が認められた ($p < 0.05$, data not shown) が、Cu 介入による臨床的パラメータ改善の効果は認められなかった。

考 察

今回、Cu については、口腔常在菌の主たる構成細菌であるグラム陽性の口腔レンサ球菌 8 種 8 株の MIC も同時に調べたが、その感受性は *P.*

gingivalis などの歯周病原性細菌群に比べていずれも低い結果となった (表 1)。歯周病に使用する抗菌薬としては、口腔常在菌叢には影響が少なく歯周病原性細菌に選択的に作用するものが望ましい。この点で、Cu は歯周病予防・治療薬としての好ましい性質を有しているといえる。また、Cu は静菌性のテトラサイクリンとは異なり、歯周病原性細菌 *P. gingivalis* に対して殺菌的に作用した (図 3)。殺菌性の抗菌薬であるアンピシリンも *P. gingivalis* に対し殺菌的に作用したが、30 分間の処理によってもコロニー形成は完全に阻害できず 10% 程度の菌が生き残った。一方で、Cu は、30 分間処理によりコロニー形成を完全に阻害した (図 3)。これはアンピシリンよりも Cu の方が *P. gingivalis* を速やかに殺菌できることを示している。また、原子間力顕微鏡による形態観察から、Cu による菌体表層でのナノレベルでの経時的な細菌破壊のプロセス、すなわち菌体表層の異常な小胞形成のイメージングに成功した (図 5)。上記の原子間力顕微鏡と電子顕微鏡による観察 (図 4、5) から、Cu は菌体の膜に作用し溶菌させていることが示唆された。アンピシリンの作用機序は細胞壁合成過程での阻害であり殺菌までのタイムラグがあるが、Cu の場合は、おそらく菌体膜に

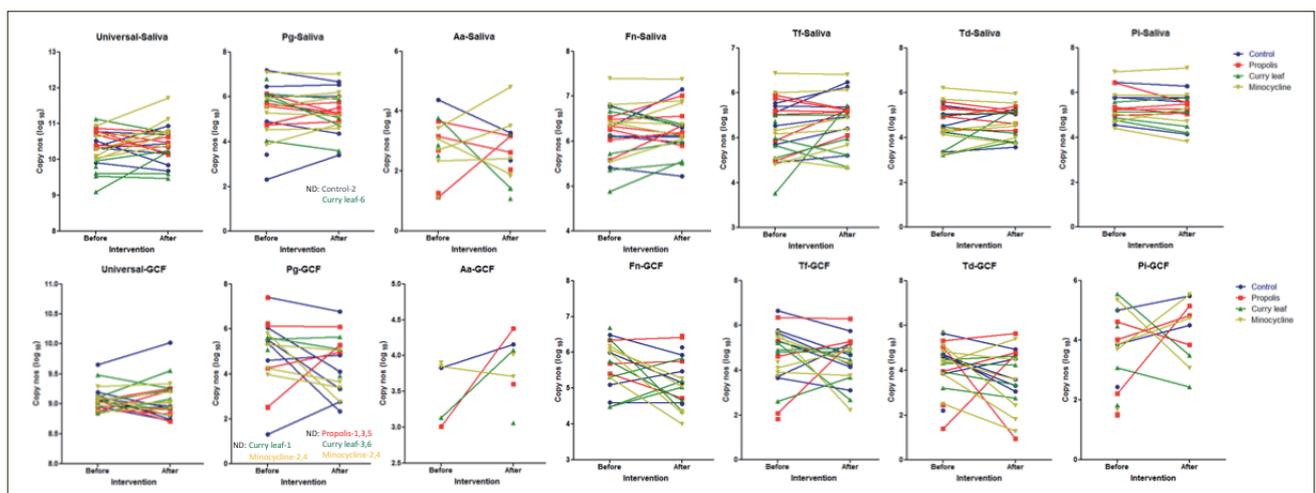


図 6 介入による被験者の各種口腔細菌の定量 (上列、下列は、それぞれ唾液、歯肉溝滲出液由来サンプルのリアルタイム PCR 解析結果を示す。

Pg: *Porphyromonas gingivalis*, Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Fn: *Fusobacterium nucleatum*, Tf: *Tannerella forsythia*, Td: *Treponema denticola*, Pi: *Prevotella intermedia*)

直接作用するため、迅速な殺菌が可能であるものと考えられた。このような菌体に対する作用機序の違いにより、殺菌に要する時間にラグが生じたものと推測された。以上より、本研究では、Cuの*P. gingivalis*に対する速やかな殺菌性とその実際の殺菌過程における形態変化を明らかにすることができた。今後は、Cu中の抗菌物質の同定、および細菌側の作用点の詳細な解明が課題である。

一方で、歯周病患者を被験者として、Cu軟膏等による介入研究を行った。Cu投与群において、一部の歯周病原性細菌を減少させる傾向は見られたが有意差は見られず、また歯周病の病態（歯周ポケット深さ等）改善は認められなかった。したがって現時点では、Cuが歯周病の病態改善に効果があるのかどうかは明らかではない。今後は、歯周病治療に効果的な投与量、回数（頻度）などについて詳細に検討することで、これを明らかにできる可能性がある。

結 論

Cuは*P. gingivalis*に対して、その菌体表層での速やかな小胞形成を促し、30分という短時間でほぼ完全に殺菌する。またCu軟膏による唾液中の*P. gingivalis*が減少する傾向が見られたことから、歯周病の予防・治療薬としての応用の可能性が示唆された。

謝 辞

研究助成のご支援いただいた（公財）浦上食品・食文化振興財団に深く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、日本大学小方頼昌先生とご教室の皆様、日本大学森永康先生、日本大学古川壯一先生、感染研小原佳子様、感染研齊藤典子様、感染研吉益由莉様、感染研松本千奈様、株式会社オリンパス医療イメージング開発本部MST推進部開発2Gの皆様にご指導とご協力をいただきました。謹んで御礼申し上げます。

文 献

- 1) Lamont RJ, Jenkinson HF (1998) Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62: 1244-1263.
- 2) Math MV, Balasubramaniam P. (2004) Curry leaves. *Br Dent J.* 13;197(9):519.
- 3) Cai L, Wu CD. (1996) Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Nat Prod.* 59(10):987-90.
- 4) Park M, Bae J, Lee DS. (2008) Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother Res.* 22(11):1446-9.
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). www.clsi.org/
- 6) 臨床試験登録情報「プロポリスおよびカレーリーフの歯周ポケット内投与による口腔細菌叢に対する効果の検討」ID:UMIN000013850.

Antimicrobial effect of herbs on periodontopathic bacteria

Ryoma Nakao

*Laboratory of Oral Bacterial Infection, Department of Bacteriology I
National Institute of Infectious Diseases*

Periodontitis is an oral disease characterized by destruction of periodontal tissues and ultimately exfoliation of the teeth in humans. Recent reports have shown association between periodontitis and systemic diseases such as diabetes mellitus, cardiovascular disease, and atherosclerosis. In our *in vitro* screening of a wide range of natural products, curry leaf, clove, and ginger, were found to be potential antibacterial agents against periodontal pathogens. We investigated the antimicrobial effect in details of these three different spices on periodontopathic bacteria, especially *Porphyromonas gingivalis* as an important pathogen for the commonest infectious disease. *P. gingivalis* showed the higher sensitivity to curry leaf than all tested 8 oral streptococci, regarded as major commensals. Curry leaves showed marked bactericidal action against *P. gingivalis*, and the complete killing was accomplished within 30 min. The killing speed was superior to those of two standard antibiotics, tetracycline and ampicillin. We also succeeded in real-time imaging showing the process of cell death of *P. gingivalis* after curry leaf treatment by using atomic force microscope, demonstrating that aberrant membrane blebbing followed by bleb fusion events were induced by addition of curry leaves.

We also examined whether the topical administration reduces the amounts of periodontopathic bacteria and further improves clinical parameters of periodontal tissues. Four of 5 subjects in curry leaf group decreased the numbers of *P. gingivalis* after the interventions.

We suggest a possible therapeutic application using curry leaves to periodontal diseases, which may achieve rapid elimination of *P. gingivalis* from periodontal pockets to keep minimum influence on microbial homeostasis in oral cavity.