

〔学位論文〕

ナタマメエキスが口腔細菌とラット実験的歯周炎に及ぼす効果

中塚 侑子

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

Inhibitory effects of *Canavalia gladiata* on experimental periodontitis induced in rats by *Porphyromonas gingivalis* infection

Yuko NAKATSUKA

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of HokkaidoKey words : *Canavalia gladiata*, *Porphyromonas gingivalis*, alveolar bone loss

緒 言

ナタマメ【学名*Canavalia gladiata* (Sword Beans)】はアジア、アフリカの熱帯地方が原産のマメ科の植物で、排膿、消炎作用があるとされている。古くから中国では漢方生薬として、日本では民間療法でお茶として日常的に用いられてきた。しかし、ナタマメの排膿、消炎効果の詳細な作用機序はこれまでほとんど報告されていない。ナタマメの成分であるcanavanineはアルギニンの構造類似体であり、アルギニンと競合することによって、*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Burkholderia mallei*のアルギニン分解酵素を阻害することが報告されている。このことからナタマメは、ジンジパインに対する阻害作用を有することが予測される。本研究では、歯周炎に対する治療薬としてナタマメエキス (Sword Bean Extract : SBE) の応用を検討する目的で、ナタマメの口腔細菌に対する作用、口腔上皮細胞株に与える細胞傷害性、ジンジパインの活性に与える影響、および*Porphyromonas gingivalis*によるラット実験的歯周炎における歯槽骨吸収抑制効果について検討した。

方 法

本研究では、*in vitro*で、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたcanavanineの定量、最小発育阻止濃度測定法 (MIC法)、最小殺菌濃度測定法 (MBC法) を用いたSBEとcanavanineの抗菌効果の測定、LDH活性

測定法、Trypan Blue染色法を用いたSBEとcanavanineの細胞傷害性の測定、合成基質を用いたSBEとcanavanineのジンジパイン活性 (Rgp活性, Kgp活性) を測定した。また、*in vivo*では、ラットに*P. gingivalis*を経口感染させ、ラット実験的歯周炎モデルを作製した。ラットにSBEを経口投与し、SBEがラット実験的歯周炎に及ぼす効果を歯槽骨吸収量を測定することにより評価した。

結 果

HPLC解析により、SBEはcanavanineを6.4%含有していることが明らかとなった。抗菌効果測定の結果、SBEは*P. gingivalis*と*Fusobacterium nucleatum*に対して、それぞれ59 µg/mL, 1,875 µg/mL、canavanineは、それぞれ1,094 µg/mL, 1,875 µg/mLのMIC値を示した。他の6菌種に対しては、抑制効果を認めなかった。CHXと比較して、SBEとcanavanineはMIC値が高い傾向を示した。MBC値もMIC値と同様の傾向を示し、SBEは*P. gingivalis*と*F. nucleatum*に対してそれぞれ59 µg/mL, 1,875 µg/mL、canavanineは、それぞれ1,094 µg/mL, 2,084 µg/mLのMBC値を示した。他の6菌種に対しては、抑制効果を認めなかった。MIC値と同様にCHXと比較して、SBEとcanavanineのMBC値は高い傾向を示した。細胞傷害性測定の結果、LDH活性測定法、トリパンプルー染色法のどちらとも、SBEとcanavanineはクロルヘキシジンと比較して細胞傷害性が有意に低い値を示した。ジンジパイン活性測定の結果、SBEは2 mg/mL以上、ca-

navanineは4 mg/mL以上の濃度でRgpとKgp活性を有意に抑制した。SBEは、*P. gingivalis*によるラット実験的歯周炎に対して有意に抑制効果を示した。

考 察

SBEとcanavanineは、*P. gingivalis*と*F. nucleatum*に対してのみ抗菌効果を示し、そのMIC値はCHXと比較して高い値であった。その一方、SBEとcanavanineの細胞傷害性は、CHXより有意に低い値を示した。このことは、CHXを洗口液として使用するのと同様に、SBEを抗菌効果のある濃度で日常的に使用することが安全なことを示している。SBEによる*P. gingivalis*に対する抗菌効果の一部は、*P. gingivalis*の病原因子の一つであるジンジパインの分解に関係している可能性が示された。本研究では、SBEの抗ジンジパイン活性は、MIC値に相当する濃度で観察された。canavanineはアルギニンの構造類似体であるため、Rgpによるアルギニンの切断を阻害することが報告されている。今回の研究では、SBEのアルギニン分解阻害剤としての*in vivo*における効果をラット歯周病モデルによって評価した。SBEの濃度は、*P. gingivalis*に対する抗菌効果、KB細胞に対する細胞傷害性、そしてRgp・Kgp活性抑制効果に関する*in vitro*の実験結果を参考に、2 mg/mLとした。今回の結果において、SBE投与が*P. gingivalis*による歯槽骨破壊を抑制したことから、SBEは、アルギニンの分解抑制をそのメカニズムの一部として、歯周病の発現・進行に抑制的に作用することが示唆された。しかしながら、今回の研究では、健康な歯周組織における歯周病の発現・進行への効果を評価したことから、既存の歯周病に対するSBEの効果は不明である。その検索のためには、今回の結果を参考に、SBEの投与時期を変更したプロトコルによる動物実験が必要とされる。

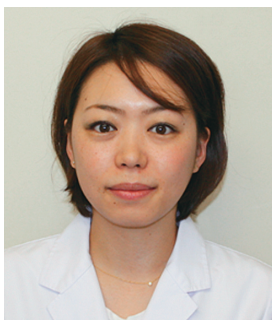
本研究では、SBEはジンジパインの酵素活性を抑制し、*P. gingivalis*が関与する歯周炎に対して抑制的に働

くことが示された。ロイペプチン、エチレンジアミン四酢酸、トシルフェニルアラニルクロロメチルケトンなど既知のプロテアーゼ阻害剤は、RgpとKgpを阻害するが、ジンジパイン阻害に有効な濃度では毒性も高いため、歯周病の予防や治療に使用するのには難しいとされている。今回の結果からSBEとcanavanineは、RgpとKgp活性を抑制する濃度で、KB細胞に対する細胞傷害性がほとんど認められず安全であることが示された。さらにSBEは、*P. gingivalis*によるラット実験的歯周炎に対する抑制効果が認められ、副作用も認められなかったことから、SBEは*in vivo*で*P. gingivalis*による歯周炎の発生、あるいは進行に対する予防薬として安全に応用できる可能性が示された。

CanavanineのRgpとKgpに対する抑制効果の詳細なメカニズムは、十分明らかになっていない。Canavanineは、ナタマメの主要な構成成分であると報告されている。今回の研究において、canavanineは、歯周病原菌とジンジパインに対してSBEと同様の挙動を示す一方で、本動物実験で有効とされたSBEに含まれるcanavanineの濃度では、*in vitro*においてRgpとKgpの酵素活性抑制効果を示さないことが明らかとなった。これらのことからSBEには、抗菌効果とジンジパイン活性抑制効果をもつcanavanine以外の成分が含まれていることも示唆された。

結 論

本研究結果から、SBEは、*in vitro*で口腔上皮細胞株に傷害性が少なく、*P. gingivalis*に対する抗菌効果、及びRgpとKgp活性に対する抑制効果を有し、*in vivo*で*P. gingivalis*によるラット歯周炎を抑制したことが明らかとなった。このことから、歯周炎に対する予防薬や治療薬としてSBEの応用が有効である可能性が示唆された。また、SBEにはcanavanine以外のさらなる他の有効成分が含まれ、相乗効果をもたらしている可能性が示唆された。



中塚 侑子

平成20年 3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業
平成25年 3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了
平成25年 4月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系
歯周歯内治療学分野 任期制助手