The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	クルクミンの歯周病予防素材への応用
Author(s)	泉井, 秀介
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61653
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学位論文

クルクミンの歯周病予防素材への応用

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻　口腔分子免疫制御学講座
予防歯科学分野
泉井　秀介

緒言

歯牙喪失の主たる原因のひとつである歯周炎は、歯周病菌によって引き起こされる慢性感染症である[1)]。中でも、*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia* から成る red complex は、歯周炎の病態進行に大きな影響を及ぼす細菌種であると考えられている[2)]。

近年、健康な歯周組織を維持するための栄養素や機能性食品の臨床応用を目指した研究が進んでいる。例えば、マスチックノキに含まれるポリフェノール化合物やユーカリから抽出されるマクロカルパールが、歯周組織の健康を維持するための研究対象となっている[3)~5)]。クルクミン (図 1) は、多機能性ポリフェノールとして知られるウコンの根茎に含まれる成分である[6)]。近年、クルクミンが有する抗炎症作用[7), 8)]、抗酸化作用[9)~12)]、抗腫瘍作用[13)~15)]が広範にわたり研究されている。また種々の細菌に対し、静菌作用を示すことも明らかになっている[16)]。例えば、クルクミンは *Trichomonas vaginalis* および *Helicobacter pylori* 対して静菌作用を有し[17), 18)]、*Candida albicans* や *Paracoccidioides brasiliensis* などのカンジダ種に対しても抗真菌作用を示すことが報告されている[19), 20)]。さらにクルクミンは *Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Klebsiella pneumonia* および *C. albicans* のバイオフィルム形成を阻害することも示されている[21)~23)]。口腔細菌に関しては、クルクミンはう蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* のソルターゼ A を阻害し、結果的に、*S. mutans* のバイオフィルム形成を抑制することが報告されている[24)]。しかしながら、クルクミンが歯周病原性菌そのものに及ぼす影響に関しては、いまだ不明な点が多い。一方、クルクミンは、*P. gingivalis* のリポ多糖により刺激を受けたヒト末梢血単球およびマクロファージによって産生される腫瘍壊死因子-α (TNF-α) 、インターロイキン (IL) - 1 β、単球走化性タンパク質 (MCP) - 1 α、IL-6、プロスタグランジン E_2 (PGE_2) 、マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) -9 などの産生を阻害することが報告されている[25), 26)]。しかし、その作用機序については未だ不明な点が多い。

本研究では、クルクミンの歯周病予防素材としての機能を評価する目的で以下の検討を行った。まず、クルクミンの *P. gingivalis* や *T. denticola* などの歯周病原性菌の増殖および *P. gingivalis* のプロテアーゼ活性に及ぼす影響について検討を行った。さらに、*P. gingivalis* の単一バイオフィルム形成および *Streptococcus gordonii* - *P. gingivalis* 混合バイオフィルム形成に及ぼすクルクミンの抑制効果についても検討を行った。また、宿主因子に及ぼす影響として、*P. gingivalis* の有力な傷害因子である外膜小胞 (outermembrane vesicle:以下、ベシクルと

略す) の刺激を受けたヒト歯肉上皮 (human gingival epithelial:以下、HGE と略す) 細胞の炎症反応に及ぼすクルクミンの影響を評価した。*P. gingivalis* ベシクルには、リポ多糖、線毛、プロテアーゼなど様々な傷害性因子が含まれていることが知られており [27), 28)]、種々の酵素、毒素、細胞間コミュニケーションシグナルおよび抗原などを通じて、免疫システムに影響を及ぼすことが報告されている [29)]。さらに、クルクミンが *P. gingivalis* ベシクルの刺激を受けた HGE 細胞の遊走能と増殖能に及ぼす影響についても検討を行った。また、ベシクルはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることによって、アポトーシスなど様々な細胞傷害性を引き起こし、歯周組織にダメージを与えると考えられている [30)]。そこで、クルクミンがベシクルでコーティングされた蛍光ビーズの HGE 細胞への付着・侵入に及ぼす阻害作用についても評価し、クルクミンの歯周病予防素材としての可能性について検討を加えた。

材料および方法

1. 菌株と培養状態

P. gingivalis ATCC 33277 株、*Prevotella intermedia* ATCC 49046 株、*Fusobacterium nucleatum* ATCC 23726 株、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 株/29523 株、*T. denticola* ATCC 33520 株および *S. gordonii* G9B 株は凍結保存菌株を使用した。臨床分離株の *P. gingivalis* OMZ 314 は、van Winkelhoff 教授（Academic Centre for Dentistry Amsterdam, the Netherlands）から供与を受けた。グラム陰性菌株の培養は、heamin (Wako Pure Chemical Industries) 5 μg/mL および menadione (Sigma-Aldrich) 1 μg/mL を含む trypticase soy broth (BD Microbiology systems : 以下、TSB と略す) に播種し嫌気条件下で行った。*S. gordonii* は凍結保存した菌を brain heart infusion broth (BD Microbiology systems) に播種し、37°C で 16 時間培養した。

2. 細胞と培養状態

HGE 細胞 2 株、すなわち Epi4 細胞 [31)]と Ca9-22 細胞 (Health Science Research Resources Bank) を用いた。Epi4 細胞は、HuMedia KG-2 (Kurabo) を用いて、Ca9-22 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (NACALAI TESQUE) を用いて培養した。すべての実験において、3 ~ 10 代継代培養した細胞を使用した。

3. 歯周病原性菌の増殖阻害実験

歯周病原性菌は、10 mL の TSB を用いて嫌気条件下で 48 時間培養し、培養細菌液 (500 μL) を、各濃度 (0、5、10、15、20 μg/mL) のクルクミン (Wako Pure Chemical Industries) を添加した 10 mL の TSB に播種した。培養開始後 60 時間までの 12 時間毎に、各培養液の濁度を分光光度計 (UV-1600; Shimadzu) を用いて測定した。さらに、培養開始 48 時間後において、菌の増殖が観察されなくなる ($OD_{600\ nm} < 0.05$) クルクミンの最低濃度を、最小発育阻止濃度 (MIC) とした。

4. アルギニンおよびリジン特異的プロテアーゼ活性の測定

クルクミンが *P. gingivalis* がもつアルギニンおよびリジン特異的プロテアーゼ、arginine-specific cysteine proteinase (RGP) および lysine-specific cysteine proteinase (KGP) の活性に与える影響を Nagata [4)]らの方法に従って評価した。*P. gingivalis* ATCC 33277 株および OMZ 314 株を嫌気条件下で 48 時間培養し、その後、遠心分離を行い培養上清を採取した。次に、その上清 100 μL を 10 mM の cysteine、100 mM の NaCl および 5 mM の $CaCl_2$ を添加した 20 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) と混合し 1 mL とし、各濃度のクルミン (0、5、10、20 μg/mL) 存在下にて合成基質と反応させた。Benzoyl-L-arginine 4-methylcoumaryl-7-amide および t-butyl-oxycarbonyl-L-valyl-L-leucyl-L-lysine 4-methylcoumaryl-7-amide (Peptide Institute Inc) を RGP と KGP の合成基質として用いた。37°C で 15 分間培養し、2 mM の N^{α}-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride を加えて反応を終了させた。プロテアーゼによる基質分解に伴い放出された 7-amino-4-methylcoumarin を、マルチレーベルカウンター (ARVO MX 1420; PerkinElmer Japan Co) を用いて波長 460 nm にて測定した。

5. *P. gingivalis* の単一バイオフィルム形成

P. gingivalis OMZ 314 株 (1.5×10^9 CFU/mL) を 6 μg の fluorescein isothiocyanate (FITC; Molecular Probes) で 30 分間染色し、リン酸緩衝生理食塩水 [PBS (pH 7.4); Wako Pure Chemical Industries] で 3 回洗浄した。この染色菌体に各濃度のクルクミン (0、5、10、20 μg/mL) を 30 分間作用させ、PBS で 3 回洗浄した後、ヒト唾液でコーティングしたチャンバー (μ-Slide 8 well ibidi Treat; ibidi) にて、37°C で 16 時間、嫌気条件下で遮光を行い、振盪機上 (Mini-Shaker 3D; BIOSAN) で培養した。ヒト唾液は、健康な歯周組織をもつ 3 人のボランティア (28 歳 ~ 43 歳) から採取した。食後 2 時間以上経ってから氷冷した遠沈管に 3 人の混合した唾液を集め、遠心分離を行い上清を本研究に用いた。

6. *S. gordonii* と *P. gingivalis* の混合バイオフィルム形成

クルクミンが、*S. gordonii* と *P. gingivalis* の混合バイオフィルム形成に及ぼす影響を、Nagata[32)]らの方法に修正を加えて評価した。*S. gordonii* 菌体を hexidium iodide (HI; Molecular Probes) を用いて 15 分間染色し、PBS で 3 回洗浄した。その後、懸濁菌液 (5×10^7 CFU) をヒト唾液でコーティングしたチャンバーに播種し、37°C で 16 時間、嫌気条件下で振盪培養し、*S. gordonii* のバイオフィルムを作成した。*P. gingivalis* は前述のとおり FITC で染色し、各濃度のクルクミン (0、5、10、20 μg/mL) を 30 分間作用させ、PBS で 3 回洗浄した後、その懸濁菌液 (5×10^6 CFU) を *S. gordonii* バイオフィルムを形成させたウェルに添加し、37°C の嫌気条件下で遮光し 24 時間培養した。

7. 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルム観察

共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal laser scanning microscopy LSM510 version 3.2; Carl Zeiss : 以下、CLSM と略す) を用いてバイオフィルムを観察した。ウェルを PBS で洗浄後、ウェルの底面に形成された単一または混合バイオフィルムを 40 倍に拡大して観察した。ヘリウムネオンレーザーによる励起波長は 543 nm、アルゴンレーザーによる励起波長は 488 nm とし、HI 染色した *S. gordonii* と FITC 染色した *P. gingivalis* を可視化した。各 CLSM 像から無作為に 6 つの視野を選択して、Imaris Software (version 5.0.1; Bitplane AG) を用いて *P. gingivalis* と *S. gordonii* の体積を算出した。

8. ベシクルの調製およびベシクルでコーティングした蛍光ビーズの準備

ベシクルの調製は Rosen[33)]らの方法に従った。すなわち、*P. gingivalis* 培養上清を、細孔径 0.22 μm のフィルター (Millex) で濾した後、超遠心機 (CP－80α; Hitachi Koki Co. Ltd) で分離 (100,000 × g、4°C、60 分間) した。ベシクルを含む沈殿物は PBS により懸濁した。ベシクルのタンパク質含有量は、Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Pierce) を用いて定量した。ベシクルでコーティングされた蛍光ビーズを Nakagawa[24)]らの方法に従って調整した。まず、Fluorescent Microspheres (Molecular Probes) を、50 mM の 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer (pH 6.0; Sigma) を用いて、2.0 μg/mL のベシクルとともに室温で 15 分間培養した。1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Dojindo Molecular Technologies) を添加し、最終濃度を 0.4 mg/mL とした。混合物を室温で 3 時間培養して、反応を 0.1 M の glycine を用いて停止させた。調製したベシクルビーズは、PBS を用いて 3 回洗浄し、1% bovine serum albumin (Sigma) を含む PBS 中で 4°C にて保存した。

9.　ベシクル刺激時の歯肉上皮細胞における炎症反応の評価

Epi4 細胞を、20 μg/mL のベシクルとともに種々の濃度のクルクミン存在下にて培養した。培養 6 時間後、RNA 抽出キット (RNeasy Micro Kit; QIAGEN) を用いて全 RNA を細胞から抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) キット (PrimeScript RT Master Mix; TAKARA BIO INC) を用いて cDNA に逆転写した。PCR キット (SYBR FAST Universal qPCR Kit; Kapa Biosystems Inc.) およびサーマルサイクラー (Roter-Gene6000; QIAGEN) を用いてリアルタイム RT-PCR を行い、IL-6、IL-1β、TNF-α の mRNA 発現量を評価した。cDNA を鋳型として、95°C で 10 秒間の増幅反応と、 (表 1) に示す特異的プライマーを用い、62°C で 30 秒間の増幅反応を 40 サイクル行った。発現量は、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を用いて標準化した。また、Epi4 細胞におけるタンパクレベルでのサイトカインの産生量を、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Biolegend) を用いて測定した。

10.　歯肉上皮細胞の遊走能と増殖能の評価

ベシクルにより刺激された Epi4 細胞の遊走能と増殖能にクルクミンが及ぼす影響を scratch wound assay により評価した。ピペットチップを用いてコンフルエント状態の歯肉上皮細胞層の一部を擦過し、人工的に創傷面を作成した。その後、20 μg/mL のベシクルを添加し培養した後、クルクミン存在下における、24 時間後の創傷の治癒程度を位相差顕微鏡 (Axiovert 40 C; Carl Zeiss Co. Ltd) を用いて評価した。創傷面積の割合は、Rincon[34)]らの方法に従い、NIH-Image を用いて画像処理を行い測定した。また、クルクミンの細胞増殖能に及ぼす影響を検討するために、細胞を 20 μg/mL のベシクルとともに 1.5 時間培養した後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、クルクミンを種々の濃度で培地に添加した。さらに 3 時間培養した後に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies) を用いて細胞増殖度を評価した。培地中に 10 μL の cell counting solution を添加し、37℃で 2 時間培養後、マルチレーベルカウンターを用いて各ウェルの吸光度を 450 nm の波長で測定した。次に、上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor:以下、EGF と略す) の産生に及ぼすクルクミンの影響を ELISA (R&D Systems) を用いて評価した。各種濃度のクルクミン存在下にて、Epi4 細胞を 20 μg/mL のベシクルとともに培養し、24 時間後に上清を採取し ELISA を行った。

11. ベシクルビーズを用いた歯肉上皮細胞への付着・侵入阻害効果の評価

Ca9-22 細胞を、種々の濃度のクルクミン存在下にて 30 分間培養し、その後、ベシクルビーズ (5.0×10^5/well) を培養液中に添加した。37°C で 3 時間培養した後に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、4% paraformaldehyde (NACALAI TESQUE) を用いて 20 分間の固定を行った。次に、細胞を 0.1% Triton X-100 (Wako Pure Chemical Industries) を用いて 3 分間透過処理し、1% BSA を用いて 30 分間の処理を行った。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、10 μg/mL の streptavidin conjugated dye (Streptavidin-Oregon Green 488 conjugate; Molecular Probes) を用いて細胞骨格を 10 分間染色した。クルクミンがベシクルビーズの Ca9-22 細胞への付着・侵入に及ぼす影響を、CLSM を用いて検討した。細胞内に侵入したベシクルビーズを定量化するために、各視野の細胞内および細胞外のビーズを計測した。各実験において少なくとも 8 つの視野を分析した。

尚、これら全ての実験において、クルクミンは dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich : 以下、DMSO と略す) の中で溶解し、最終的な DMSO 濃度を 1%とし培地に添加した。DMSO の濃度は、歯周病原性菌の増殖や歯肉上皮細胞の発育に影響を与えないことを確認した。

12. 統計分析

全てのデータを平均＋標準偏差 (SD) で表した。両側 t 検定または両側 Dunnett 検定により、各サンプル群間の有意差を検討した。データは $P < 0.05$ で有意差があると定義した。濃度依存度は、Jonckheere-Terpstra 検定と統計ソフト (XLSTAT 2006 for Excel; SSRI) を用いて分析した。

結果

1. クルクミン が歯周病原性菌に及ぼす静菌作用

クルクミンは、*A. actinomycetemcomitans* を除いて、試供された全ての歯周病原性菌の増殖を有意に抑制した (表 2) 。*P. gingivalis* に対するクルクミンの MIC は 10 ~ 15 μg/mL であり、*P. intermedia*、*F. nucleatum*、*T. denticola* においても同様の結果が得られた。10 μg/mL のクルクミンにより歯周病原性菌の増殖は著しく抑制されることが明らかになった。一方、*A. actinomycetemcomitans* の ATCC 29522 株および 29523 株に対しては、100 μg/mL の濃度でも効果は認められなかった。

P. gingivalis は長線毛の遺伝子型に基づいて 6 つの異なるタイプに分類されており、とりわけ II 型線毛遺伝子を有する *P. gingivalis* は歯周病患者から高頻度で検出される [35]。従って本研究では *P. gingivalis* がもつ線毛遺伝子型に着目し、非歯周病成人から最も高頻度で検出される線毛タイプ I 型の代表菌株である ATCC 33277 株および線毛タイプ II 型の OMZ 314 株の増殖にクルクミンが及ぼす影響を検討した。その結果、いずれの菌の増殖も、5 μg/mL のクルクミン添加により抑制され、15 μg/mL 以上で著しく阻害されることが明らかになった (図 2) 。これらの結果は、線毛遺伝子型の如何にかかわらず、クルクミンが低い濃度で *P. gingivalis* に対して強い静菌作用を発揮することを示している。

2. *P. gingivalis* プロテアーゼに及ぼすクルクミンの阻害作用

P. gingivalis は線毛やプロテアーゼなどの様々なビルレンス因子を有している。その中でも、RGP と KGP は歯周病の発症と進行において重要な役割を果たしていると考えられている [36), 37)]。クルクミンの *P. gingivalis* の RGP と KGP の活性に及ぼす影響を検討した結果、*P. gingivalis* ATCC 33277 株および *P. gingivalis* OMZ 314 株のいずれにおいても、RGP と KGP の活性を濃度依存的に阻害することが示された (図 3) 。クルクミン濃度 20 μg/mL において、両菌株の RGP の活性は約 80%抑制され、KGP の活性は、*P. gingivalis* ATCC 33277 株では約 55%、*P. gingivalis* OMZ 314 株では約 45%阻害された。

3. 単一菌種および混合菌種のバイオフィルム形成にクルクミンが及ぼす影響

P. gingivalis OMZ 314 株を実験に供し、*P. gingivalis* 単一および *S. gordonii* との混合バイオフィルム形成に及ぼすクルクミンの影響を検討した。その結果、クルクミンは *P. gingivalis* OMZ 314 株のバイオフィルム形成を濃度依存的に阻害した (図 4) 。阻害作用は 10 μg/mL の濃度で 70%に達し、20 μg/mL の濃度では 80%を越えた。

さらに、*S. gordonii* G9B 株と *P. gingivalis* OMZ 314 株による混合バイオフィルム形成では、前述の結果と同様に、クルクミンは *S. gordonii* 上における *P. gingivalis* のバイオフィルム形成を濃度依存的に阻害した (図 5) 。クルクミン濃度が 5、10、20 μg/mL における *S. gordonii* - *P. gingivalis* バイオフィルム形成阻害率は、それぞれ約 55%、80%、90%であった。

4. ベシクル刺激による歯肉上皮細胞の炎症性サイトカインの産生に及ぼすクルクミンの影響

まず、ベシクルによる刺激が Epi4 細胞において IL-1β、IL-6、TNF-α の mRNA 発現とタンパク産生を顕著に誘発することを確認した。次にベシクル刺激を受けた Epi4 細胞におけ

るサイトカイン産生にクルクミンが及ぼす影響を検討した。Epi4 細胞を、20 μg/mL のベシクルとともに種々の濃度のクルクミン存在下にて 6 時間培養し、全 RNA を細胞から抽出した。リアルタイム RT-PCR により、IL-6、IL-1β、TNF-α の mRNA 発現量を評価したところ、クルクミンは、IL-6、IL-1β、TNF-α の mRNA 発現を濃度依存的に抑制した (図 6A) 。また Epi4 細胞におけるサイトカインタンパクの産生量を、ELISA により測定したところ、クルクミンは、サイトカイン産生を濃度依存的に抑制することが示された (図 6B) 。尚、ベシクル刺激を受けていない Epi4 細胞においてはサイトカイン産生量は検出限界以下であった。

5.　ベシクル刺激を受けた歯肉上皮細胞の遊走能と増殖能に及ぼすクルクミンの影響

コンフルエント状態の歯肉上皮細胞層の一部を、ピペットチップを用いて擦過し、人工的に創傷面を作成した (図 7A) 。24 時間後の創傷の治癒程度を、位相差顕微鏡を用いて観察したところ、周囲細胞が遊走して創傷を受けた細胞層の修復が観察された (図 7B) 。一方、ベシクルを添加した群では、創傷面の細胞被覆が著しく阻害されていた (図 7C) 。さらに、ベシクルを作用させた後、10 μg/mL のクルクミンを添加して培養した群では、創傷の周囲細胞の遊走ならびに増殖による創傷面の細胞被覆が観察され、ベシクルによる刺激を受けていない細胞と同等のレベルでの創傷面積の縮小が観察された (図 7D) 。

次に、ベシクル刺激を受けた歯肉上皮細胞の増殖能に及ぼすクルクミンの影響を検討するために、細胞を 20 μg/mL のベシクルとともに 1.5 時間培養した後、クルクミンを種々の濃度で培地に添加し、3 時間培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖を評価した。ベシクル添加群では、細胞増殖が有意に抑制された (図 8) 。一方、クルクミンを添加した群では、ベシクルの存在にかかわらず、Epi4 細胞の増殖を濃度依存的に促進した。0.5 μg/mL のクルクミン添加により、ベシクル刺激を受けた Epi4 細胞の増殖が正常レベルに戻ることが確認された。

6.　歯肉上皮細胞の EGF 産生に及ぼすクルクミンの影響

歯肉上皮細胞における EGF 産生に及ぼすクルクミンの影響について検討した。各種濃度のクルクミン存在下にて、Epi4 細胞を 20 μg/mL のベシクルとともに培養し、24 時間後に上清を採取し ELISA を行った。その結果、Epi4 細胞の EGF 産生へのベシクルの影響は認められなかった。しかし、クルクミンは、ベシクル存在下においても、Epi4 細胞の EGF の産生を濃度依存的に促進することが明らかとなった (図 9) 。特に、EGF の産生は 20 μg/mL のクルクミン添加で顕著に増大していた。

7.　ベシクルビーズの歯肉上皮細胞への付着・侵入にクルクミンが及ぼす効果

Ca9-22 細胞を、種々の濃度のクルクミン存在下にて 30 分間培養し、その後、ベシクルビーズを培養液中に添加した。37°C で 3 時間培養した後に、ベシクルビーズの Ca9-22 細胞への付着・侵入を、CLSM を用いて観察した。クルクミンは、ベシクルビーズの細胞に対する付着・侵入を濃度依存的に阻害することが示された (図 10) 。10 μg/mL のクルクミンを添加した場合では、対照群と比較して 88%の阻害率を示した。

考察

Socransky らは、red complex (*P. gingivalis*、*T. denticola* および *T. forsythia*) がそれぞれユニークな感染因子を具備し、歯周病の発症ならびに進行に関与していることを示唆した [2)]。本研究では、クルクミンは、極めて低い濃度 (5 μg/mL) で、*P. gingivalis* と *T. denticola* の増殖に対して強い阻害作用を発揮することが示された。一方、*T. forsythia* に及ぼすクルクミンの増殖抑制作用に関しては、菌の発育が非常に限られているため本研究で用いた方法が適さず、検討を行っていない。これまでに、ウコンのメタノール抽出物に関して、*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、メチシリン耐性 *S. aureus* に対する MIC が、それぞれ 16、128、125 ~ 250 μg/mL であると報告されている [16)]。また、クルクミンに関して、*Helicobacter pylori* および *Candida albicans* に対して、それぞれ 5 ~ 50 μg/mL と 100 μg/mL の MIC を示すことが報告されている [18), 23)]。歯周病原性菌については、*A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 株、*P. gingivalis* ATCC 33277 株、*F. nucleatum* ATCC 10953 株に対するクルクミンの MIC は、それぞれ 15.6、7.8、31.3 μg/mL であることが報告されている [38)]。本研究の結果、*P. gingivalis* ATCC 33277 株と *F. nucleatum* ATCC 23726 株に対する MIC は、それぞれ 15 μg/mL および 10 μg/mL であり、これまでの報告とほぼ一致する。しかし、*A. actinomycetemcomitans* 菌株の ATCC 29522 株および ATCC 29523 株に対しては、100 μg/mL のクルクミンでも静菌効果はみられなかった。このことは、*A. actinomycetemcomitans* 菌株間でのクルクミンへの感受性に差異がある可能性が考えられ、今後の検討が待たれる。

次に、*P. gingivalis* は RGP および KGP を産生し、直接的あるいは間接的に歯周組織の破壊を引き起こすと考えられている。ポリフェノールが有する酵素活性阻害作用に関しては、カテキン誘導体が、*P. gingivalis* の RGP と KGP[39)]、真核細胞と原核細胞に由来するコラゲナーゼ [40)]、および *P. intermedia* のチロシンホスファターゼ [41)]の活性を阻害することが報告されている。本研究の結果では、クルクミンが *P. gingivalis* の RGP および KGP の活性を濃度

依存的に阻害することが示された。RGP および KGP は多彩な機能をもっており、*P. gingivalis* の病原性発揮には欠かせない因子である [42]。クルクミンが、RGP と KGP の活性を抑制することで、歯周病予防の強力な素材として機能する可能性が示された。

本研究におけるバイオフィルム実験では、クルクミン処理をした *P. gingivalis* を、バイオフィルム形成における早期付着菌である *S. gordonii* が形成したバイオフィルム上に、または唾液でコーティングしたウェル上に添加した。その結果、クルクミンは *P. gingivalis* 単独によるバイオフィルム形成および *S. gordonii* 上における *P. gingivalis* のバイオフィルム形成を濃度依存的に阻害した。しかし、この阻害効果発現に関与する分子基盤は未だ不明である。近年、クルクミンの成熟バイオフィルムに及ぼす効果が報告されている。複数菌種 (*Streptococcus mitis*、*F. nucleatum*、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*) が 7 日間かけて形成した成熟バイオフィルムを、MIC 濃度のクルクミンで 24 時間処理し、走査型電子顕微鏡を用いて構造変化を観察したところ、クルクミンで処理したバイオフィルムでは、細菌の代謝活性が有意に抑制され、細胞外基質が失われていた [38]。Nagata らは *P. gingivalis* 長線毛とレンサ球菌表層の GAPDH の結合がバイオフィルムの初期形成に関与していると報告している [32), 43), 44]。従って、クルクミンは、*P. gingivalis* 長線毛に付着することでレンサ球菌体上の GAPDH との結合を阻害してバイオフィルム形成を抑制しているのかもしれない。さらにクルクミンが、長線毛の自己凝集および唾液タンパクとの相互作用を阻害し、その結果、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成を抑制する可能性も考えられる。クルクミンの作用機序については、今後さらなる検討を加える予定である。

P. gingivalis の有力なビルレンス因子であるベシクルは、様々な歯周病原性を発揮することが知られている [27]。例えば、ヒト歯肉上皮細胞をベシクルで刺激すると、シクロオキシゲナーゼ-2、L-6、IL-8、MMP などが過剰発現する [45]。炎症性サイトカインの過剰発現は、歯周炎の発症と進行に大きく関わっている [46]。本研究では、ベシクルの刺激を受けた Epi4 細胞において、クルクミンは IL-1β、IL-6、TNF-α の発現を濃度依存的に抑制した。クルクミンは、nuclear factor κ-β、activator protein- 1 および activator of transcription-3 などの炎症に関連する転写因子を標的にすることが知られている [47]。例えば、Shishodia らは、クルクミンが Iκ-β (inhibitor of κ-β) キナーゼの活性化を抑制することにより、細胞質に存在する nuclear factor κ-β の核内移行を阻害し、炎症性サイトカイン遺伝子の転写活性を抑制することを報告している。従って、クルクミンとこれらの転写因子が相互に作用し合うことにより、サイトカイン産生を抑制した可能性が考えられる。

本研究ではベシクルの刺激を受けた Epi4 細胞における細胞の遊走能と増殖能にクルクミンが及ぼす影響についても検討を行った。細胞の遊走と増殖は、創傷治癒には欠かせない過

程である。口腔内において、歯肉上皮細胞層は歯周組織のバリアとしての機能を有し、有害な物質や細菌の侵入を防いでいる[48]。従って、このバリアが損傷を受けると、歯周病原性菌が歯周組織の深部まで侵入し組織破壊へとつながる[49]。Furuta らは、*P. gingivalis* ベシクルが歯肉上皮細胞の遊走と増殖を有意に阻害することを報告している[50]。さらに Furuta らは、野生型のベシクルと KGP 欠損ベシクルが細胞の遊走を有意に阻害すること、一方、RGP 欠損ベシクルにおいては細胞の遊走への影響をほとんど与えないことを示した。本研究において、クルクミンが、ベシクルの細胞毒性による歯肉上皮細胞の遊走と増殖に及ぼす影響を阻害することが示された。さらに、クルクミンは歯肉上皮細胞における EGF の産生を促進することも認められた。

EGF は、血小板、ケラチノサイト、マクロファージなどによって産生され、創傷治癒の初期段階に多量に発現されることが知られている[51]。EGF は、受容体である EGFR と結合することにより、細胞の遊走や増殖を促す成長因子である。また、EGFR は創傷面においてケラチノサイトの増殖をつかさどる主要調節因子であると考えられている[52), 53]。これらの結果から、クルクミンには、細胞がベシクルによる刺激を受けていても、歯肉上皮細胞の遊走と増殖を促進する能力を有する可能性が考えられる。一方で、クルクミンは、特定の腫瘍細胞において、EGFR 発現を抑制することが報告されている[54]。クルクミンが細胞の遊走と増殖に影響を及ぼすメカニズムには今後の検討が必要である。

本研究ではベシクルビーズの歯肉上皮細胞への付着・侵入における、クルクミンの影響についても検討を加えた。ベシクルはエンドサイトーシス経路を介して宿主細胞の中に効率よく侵入することが報告されている[30]。さらに、ベシクルの宿主細胞への侵入と同時に、ベシクルが有するプロテアーゼによって、トランスフェリン受容体、パキシリン、接着キナーゼなどといった細胞タンパクが分解され細胞機能が阻害されることが示されている[50]。本研究で用いたビーズアッセイは、*P. gingivalis* の細胞侵入を評価する簡便かつ信頼性の高い分析法である[55]。Epi4 細胞を用いて実験を行ったところ、ベシクルビーズにより 40%以上の細胞が培養ディッシュから剝離した。そのため、培養ディッシュから剥離しにくい Ca9-22 細胞 (ヒト歯肉扁平上皮癌細胞) を歯肉上皮細胞として供試した。その結果、クルクミンが、ベシクルビーズの歯肉上皮細胞への付着および侵入を有意に阻害することが示された。このことは、クルクミンが、*P. gingivalis* の歯肉上皮細胞への付着・侵入を阻害する可能性を示している。RGP と KGP は、*P. gingivalis* の細胞侵入に関与しているとの報告があり[56]、クルクミンのこれらプロテアーゼへの阻害活性が、*P. gingivalis* の歯肉上皮細胞への付着・侵入を阻害する理由のひとつかもしれない。

本研究で示されたように、クルクミンは歯周病原性菌に対して静菌作用や抗バイオフィルム作用といった多様な生理活性を発揮する。近年、歯周組織の健康を維持するために植物の抽出物が有する静菌作用に関する研究が行われている。例えば、*Eucalyptus globulus* の葉の抽出物であるマクロカルパールは、*P. gingivalis* と *T. denticola* に対して 1 ~ 10 μg/mL の MIC を示し、50 ~ 100 μg/mL で *P. gingivalis* の RGP と KGP の活性を阻害した [4)]。さらに、二重盲検無作為化比較対照研究が行われ、ユーカリの抽出物を含むチューインガムがプラークの蓄積と歯肉の炎症を有意に抑制することが示されている [5)]。*P. gingivalis* と *T. denticola* に対するクルクミンとユーカリ抽出物の MIC はほぼ同等 (1 ~ 15 μg/mL) であるが、クルクミンは *F. nucleatum* の増殖を抑制する一方、ユーカリ抽出物には明確な抑制効果は認められておらず、クルクミンによる今後の臨床研究が待たれる。

本研究によりクルクミンが有する炎症抑制作用などの特徴が示された。Sasidharan らは、1000 μg/mL のクルクミンでは正常線維芽細胞に対して有意な細胞毒性は観察されないと報告しており [57)]、Cheng らは、クルクミンは 8000 mg/day (平均最大血中濃度:652.03 ng/mL) までは経口投与であれば人体に有毒ではないことを報告している [58)]。さらにクルクミンは、健康食品や医薬部外品など幅広い分野ですでに応用されており、高い安全性から容易に臨床応用可能であることが予想され、本研究の結果から、歯周病予防へのクルクミンの臨床応用への展開が期待できる。

結論

クルクミンは種々の歯周病原性菌の増殖を抑制し、*P. gingivalis* の有力なビルレンス因子である RGP と KGP の活性を阻害した。さらに、クルクミンは、*P. gingivalis* 単一および *S. gordonii* - *P. gingivalis* 混合バイオフィルムの形成を抑制した。また、クルクミンは、*P. gingivalis* ベシクルの刺激を受けた歯肉上皮細胞において、IL-6、IL-1β、TNF-α などの炎症性サイトカインの発現を抑制し、歯周ポケット内潰瘍面の創傷治癒を促す効果を有することも示唆された。さらに、*P. gingivalis* ベシクルの歯肉上皮細胞への付着・侵入をクルクミンが阻害することも示唆された。これらの結果から、本研究によりクルクミンが有力な歯周病予防素材として応用できる可能性が示された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、終始にわたり御懇篤なる御指導と御教授を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座予防歯科学分野・天野敦雄教授に深甚なる謝意を表します。本研究を遂行するにあたり、直接の御指導と御鞭撻を賜りました同口腔分子免疫制御学講座予防歯科学分野・永田英樹准教授（現・関西女子短期大学教授）、関根伸一講師に深謝致します。

最後に、本研究に際し、様々な御援助と御協力を頂きました予防歯科学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

1. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000* 2013;62:59-94.
2. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
3. Takahashi K, Fukazawa M, Motohira H, et al. A pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in the oral cavity. *J Periodontol* 2003;74:501-505.
4. Nagata H, Inagaki Y, Yamamoto Y, et al. Inhibitory effects of macrocarpals on the biological activity of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:159-163.
5. Nagata H, Inagaki Y, Tanaka M, et al. Effect of eucalyptus extract chewing gum on periodontal health: a double-masked, randomized trial. *J Periodontol* 2008;79:1378-1385.
6. Kavirayani IP. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules* 2014;19:20091-20112
7. Ammon HP, Safayhi H, Mack T, et al. Mechanism of anti-inflammatory actions of curcumin and boswellic acids. *J Ethnopharmacol* 1993;38:113-119.
8. Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of turmeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 2003;9:161-168.
9. Ramirez-Bosca A, Soler A, Gutierrez MA. Antioxidant curcuma extracts decrease the blood lipid peroxide levels of human subjects. *Age* 1995;18:167-169.
10. Sugiyama Y, Kawakishi S, Osawa T. Involvement of the β-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol* 1996;52:519-525.
11. Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, et al. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett* 1995;94:79-83.

12. Mortellini R, Foresti R, Bassi R, et al. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agents, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1303-1312.
13. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, et al. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-κB signaling. *Int J Cancer* 2004;111:679-692.
14. LoTempio MM, Veena MS, Steele HL, et al. Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:6994-7002.
15. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, et al. Chemopreventive and therapeutic effect of curcumin. *Cancer Lett* 2005;223:181-190.
16. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Res Int* 2014;186864.
17. Wachter B, Syrowatka M, Obwaller A, et al. In vitro efficacy of curcumin on *Trichomonas vaginalis*. *Wien Klin Wochenschr* 2014;126:S32-S36.
18. De R, Kundu P, Swarnakar S, et al. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1592-1597.
19. Upendra RS, Khandelwal P, Reddy AHM. Turmeric powder (*Curcuma longa* Linn.) as an antifungal agent in plant tissue culture studies. *Int J Eng Sci* 2011;3:7899-7904.
20. Martins CVB, da Silva DL, Neres ATM, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinic interest. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:337-339.
21. Packiavathy IASV, Priya S, Pandian SK, et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chem* 2014;148:453-460.

22. Magesh H, Kumar A, Alam A, et al. Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia*. *Indian J Exp Biol* 2013;51:764-772.

23. Shahzad M, Sherry L, Rajendran R, et al. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:269-273.

24. Hu P, Huang P, Chen MW. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. *Arch Oral Biol* 2013;58:1343-1348.

25. Gu Y, Lee HM, Napolitano N, et al. 4-methoxycarbonyl curcumin: a unique inhibitor of both inflammatory mediators and periodontal inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:329740.

26. Chen D, Nie M, Fan MW, et al. Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmacology*. 2008;82:264-9.26.

27. Veith PD, Chen YY, Gorasia DG, et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. *J Proteome Res*. 2014;13:2420-32.

28. Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, et al. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PLoS One*. 2011;6:e26163.

29. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*. 2012;80:1948-57.

30. Furuta N, Tsuda K, Omori H, et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect Immun*. 2009;77:4187-96.

31. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol*. 2004;75:370-9.

32. Nagata H, Iwasaki M, Maeda K, et al. Identification of the binding domain of *Streptococcus oralis* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun* 2009;77: 5130-5138

33. Rosen G, Naor R, Rahamim E, et al. Proteases of *Treponema denticola* outer sheath and extracellular vesicles. *Infect Immun*. 1995;63:3973-9.

34. Rincon JC, Haase HR, Bartold PM. Effect of Emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound-healing model. *J Periodontal Res*. 2003;38:290-5.

35. Kuboniwa M, Inaba H, Amano A. Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010:136-59.

36. Nakayama K, Kadowaki T, Okamoto K, et al. Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. *J Biol Chem* 1995;270:23619-23626.

37. Okamoto K, Nakayama K, Kadowaki T, et al. Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 1998;273:21225-21231.

38. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, et al. Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food Funct* 2015;6:719-729.

39. Okamoto M, Sugimoto A, Leung KP, et al. Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:118-120.

40. Makimura M, Hirasawa M, Kobayashi K, et al. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol* 1993;64:630-636.

41. Okamoto M, Leung KP, Ansai T, et al. Inhibitory effects of green tea catechins on protein tyrosine phosphate in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:192-195.

42. Guo Y, Nguyen KA, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol 2000*. 2010;54(1):15-44.

43. Maeda K, Nagata H, Nonaka A, et al. Oral streptococcal gluceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates interaction with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Microbes Infect* 2004;6:1163-1170.

44. Maeda K, Nagata H, Yamamoto Y, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2004;72:1341-1348.

45. Kou YR, Pan YP. *Porphyromonas gingivalis* vesicle induced cellular inflammatory responses of gingival epithelial cells in vitro. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2007;42:564-7.

46. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2008;79:1585-91.

47. Shishodia S, Amin HM, Lai R, et al. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol*. 2005;70:700-13.

48. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res*. 1989;68:750-60.

49. Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, et al. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infect Immun*. 2006;74:703-10.

50. Furuta N, Takeuchi H, Amano A. Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment. *Infect Immun*. 2009;77:4761-70.

51. Vranckx JJ, Hoeller D, Velander PE, et al. Cell suspension cultures of allogenic keratinocytes are efficient carriers for ex vivo gene transfer and accelerate the healing of full-thickness skin wounds by overexpression of human epidermal growth factor. *Wound Repair Regen*. 2007;15:657-64.
52. Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;4;276:75-81.
53. Chang KM, Lehrhaupt N, Lin LM, et al. Epidermal growth factor in gingival crevicular fluid and its binding capacity in inflamed and non-inflamed human gingiva. *Arch. Oral Biol.* 1996;41:719–724.
54. Hung CM, Su YH, Lin HY, et al. Demethoxycurcumin modulates prostate cancer cell proliferation via AMPK-induced down-regulation of HSP70 and EGFR. *J Agric Food Chem*. 2012;60:8427-34.
55. Tsuda K, Amano A, Umebayashi K, et al. Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle. *Cell Struct Funct*. 2005;30:81-91.
56. Takeuchi H, Takada A, Kuboniwa M, et al. Intracellular periodontal pathogen exploits recycling pathway to exit from infected cells. *Cell Microbiol*. 2016;18:928-48.
57. Sasidharan NK, Sreekala SR, Jacob J, et al. In vitro synergistic effect of curcumin in combination with third generation cephalosporins against bacteria associated with infectious diarrhea. *Biomed res Int* 2014:doi:10.1155/2014/561456.
58. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 2001;21:2895-2900.

表 **1.** 本研究で使用したプライマー

Gene	**Sense (5'-3') and Antisense (5'-3') Primer**
IL-6	CCTAGAGTACCTCCAGAACAG CTGACCAGAAGAAGGAATGCC
IL-1β	CCGCCTCAGCCTCCCAAAG GCCTTCGGTCCAGTTGCCTT
TNF-α	AGGCGCTCCCCAAGAAGACA TCCTTGGCAAAACTGCACCT
GAPDH	GTCTTCACCACCATGGAGAAG GTTGTCATGGATGACCTTGGC

表 **2.** 歯周病原性菌の増殖に及ぼすクルクミンの影響

歯周病原性菌	**MIC (μg/mL)**
***F. nucleatum* ATCC 23726**	10
***P. gingivalis* ATCC 33277**	15
***P. gingivalis* OMZ 314**	10
***P. intermedia* ATCC 49046**	10
***T. denticola* ATCC 33520**	5
***A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522**	> 100
***A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523**	> 100

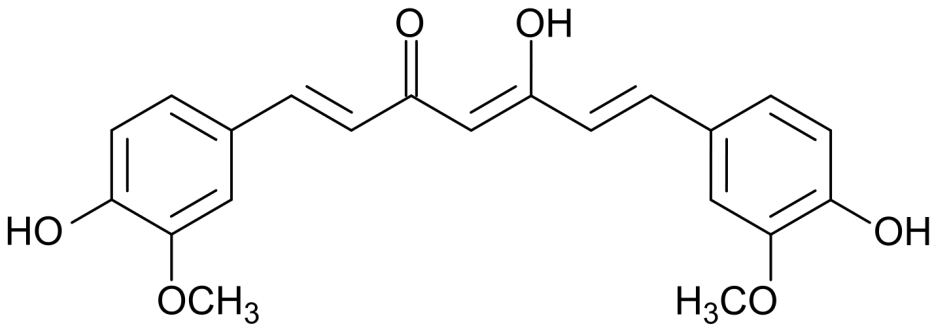


図 **1.** クルクミンの構造式

クルクミンはフェノール基を持つポリフェノールの一種。鮮やかな黄色を持つことから、天然の食用色素として用いられる。

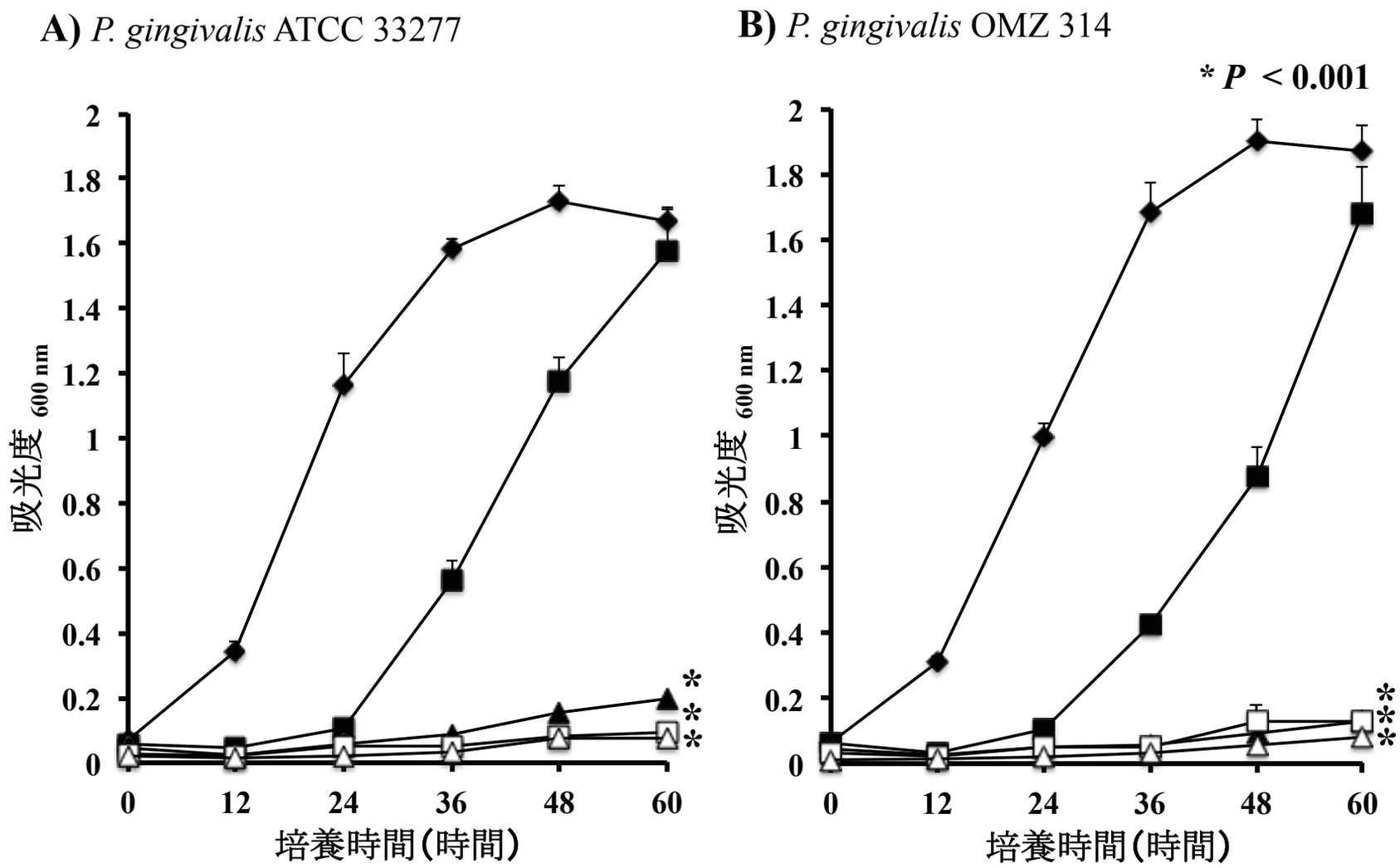


図 2. *P. gingivalis* の増殖に及ぼすクルクミンの影響

添加クルクミン量；◆:0 μg/mL　■:5 μg/mL　▲:10 μg/mL　□:15 μg/mL　△:20 μg/mL

培養開始時間を 0 時間とし、12 時間から 60 時間まで 12 時間ごとに培養液の吸光度を測定した。

* P < 0.001 (両側 Dunnett 検定により算出)

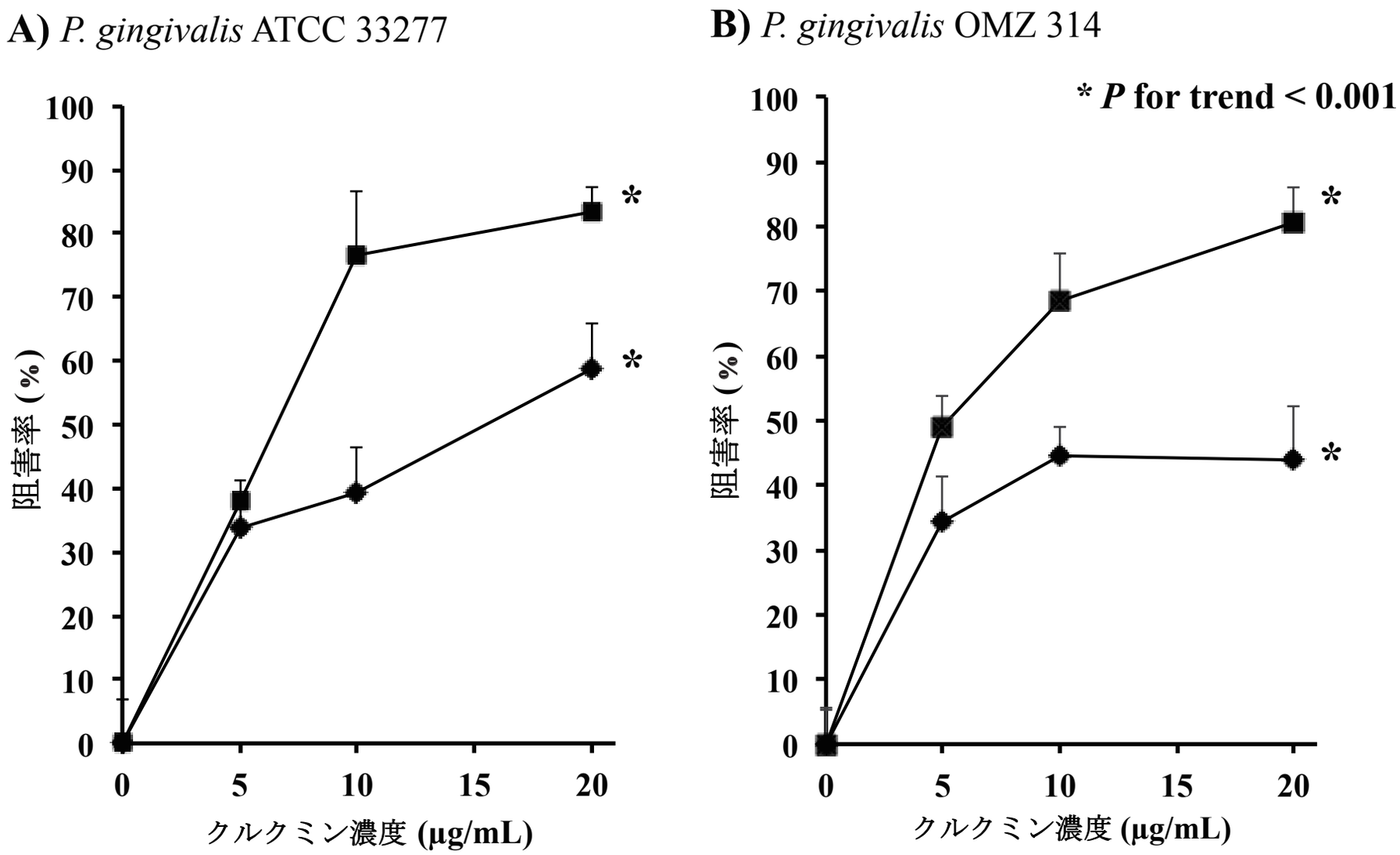


図 3. *P. gingivalis* プロテアーゼに及ぼすクルクミンの影響

■ : RGP　◆ : KGP

濃度依存度は、Jonckheere-Terpstra 検定と統計ソフト (XLSTAT 2006 for Excel; SSRI) を用いて分析した。* P <0.001

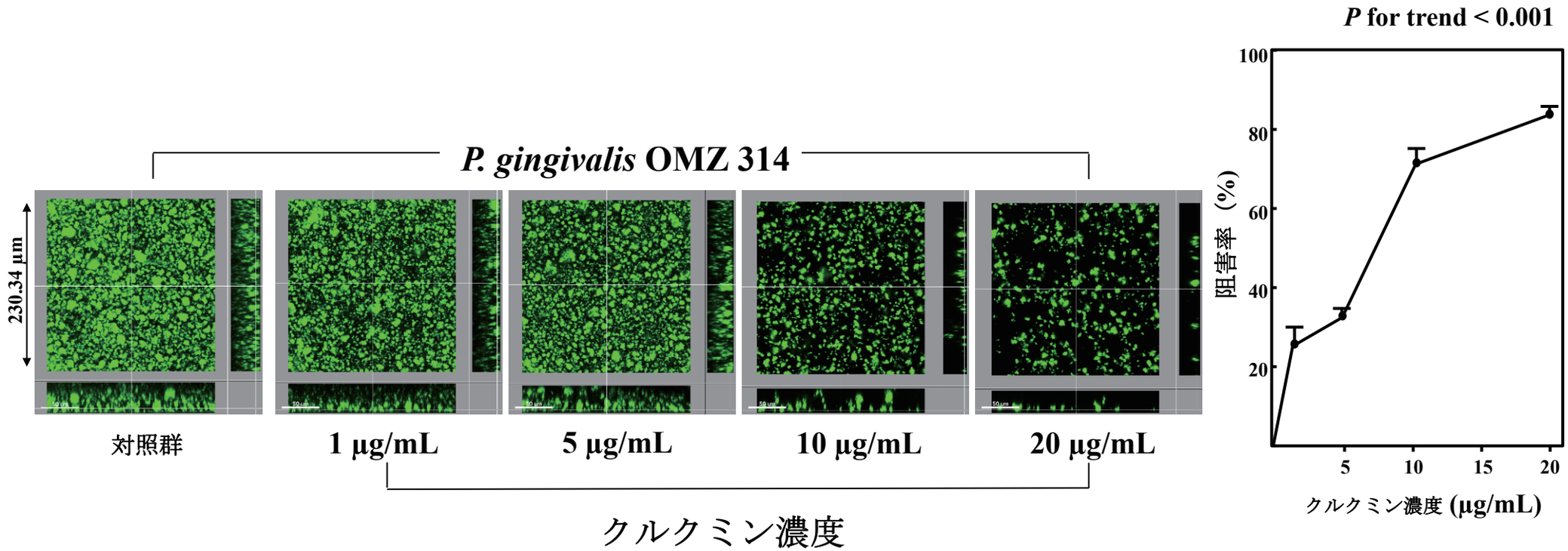


図 4. *P. gingivalis* の単一バイオフィルム形成に及ぼすクルクミンの影響

P. gingivalis OMZ 314 による単一バイオフィルム形成に及ぼすクルクミンの阻害効果を CLSM を用いて観察した (*P. gingivalis*: 緑、観察倍率 : x 40) 。図は 6 視野のうち代表的な像を表示した。バイオフィルム形成阻害率は Imaris Software を用いて算出した。濃度依存度は、Jonckheere-Terpstra 検定と統計ソフト (XLSTAT 2006 for Excel; SSRI) を用いて分析した。P <0.001

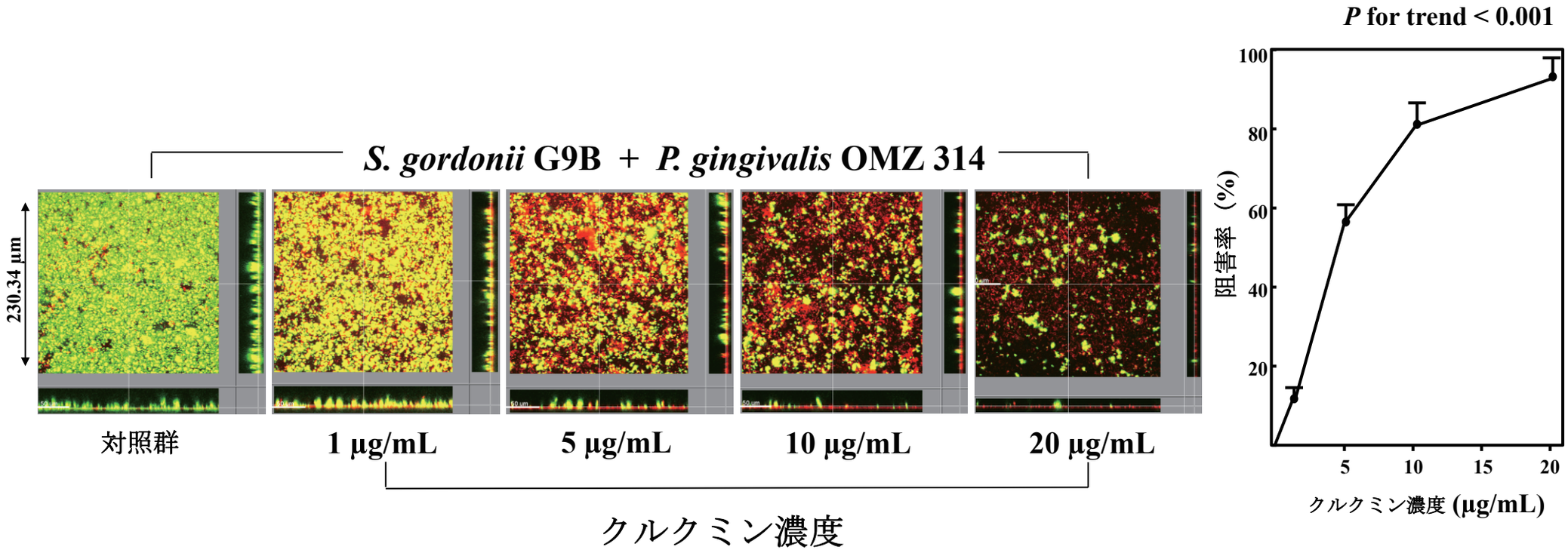


図 5. *S. gordonii* - *P. gingivalis* 混合バイオフィルム形成に及ぼすクルクミンの影響

S. gordonii - *P. gingivalis* 混合バイオフィルム形成に及ぼすクルクミンの阻害効果を CLSM を用いて観察した (*S. gordonii*: 赤、*P. gingivalis*: 緑、観察倍率 : x 40) 。図は 6 視野のうち代表的な像を表示した。バイオフィルム形成阻害率は Imaris Software を用いて算出した。濃度依存度は、Jonckheere-Terpstra 検定と統計ソフト (XLSTAT 2006 for Excel; SSRI) を用いて分析した。P <0.001

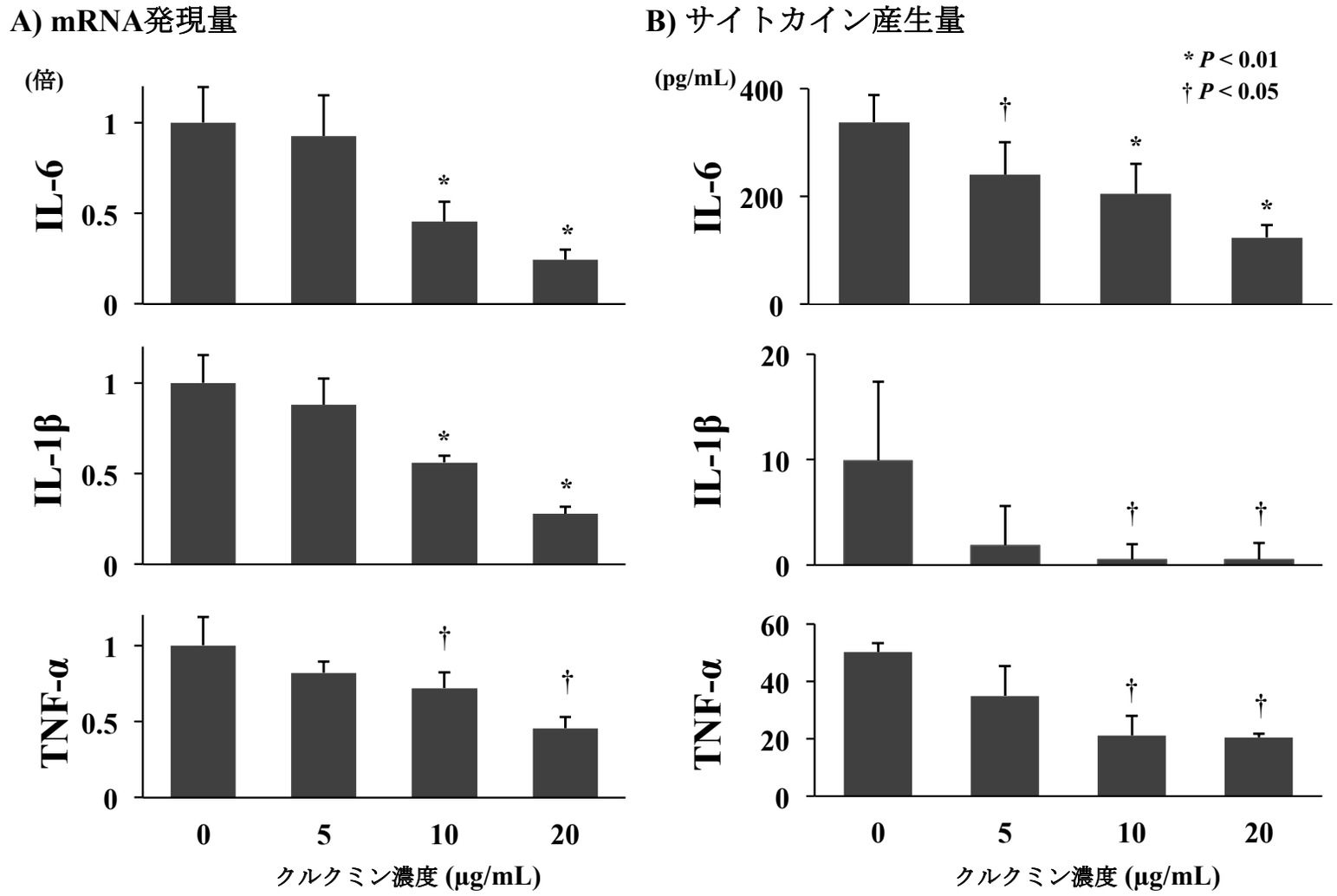
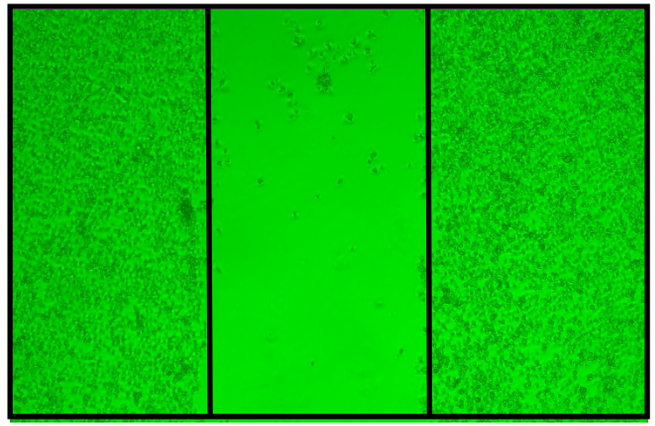


図 6. ベシクル刺激による歯肉上皮細胞の炎症性サイトカインの遺伝子発現およびタンパク産生に及ぼすクルクミンの影響

Epi4 細胞を、20 μg/mL のベシクルとともに種々の濃度のクルクミン存在下にて培養した後、IL-6、IL-1β、TNF-αの mRNA 発現量を評価した。また、Epi4 細胞におけるタンパクレベルでのサイトカインの産生量は、ELISA を用いて測定した。

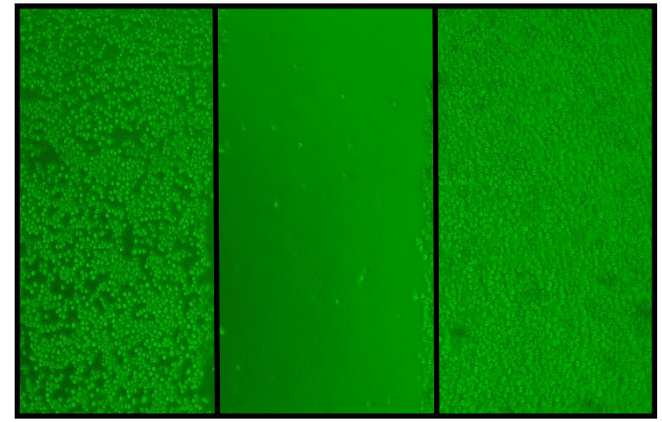
* P < 0.01 (両側 Dunnett 検定により算出)　† P < 0.05 (両側 Dunnett 検定により算出)

A) スクラッチ直後



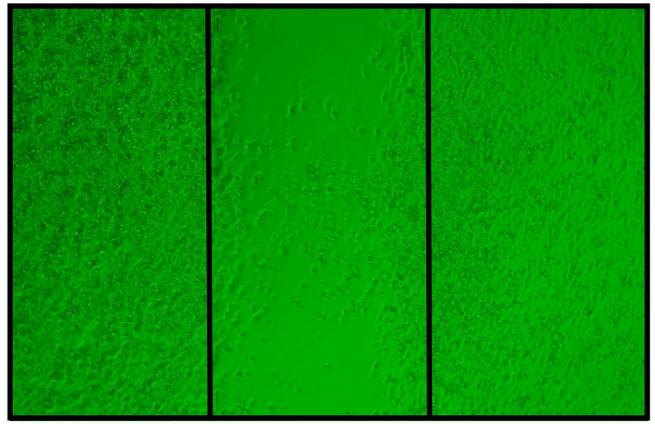
[100 (%)]

C) ベシクル刺激**24**時間後



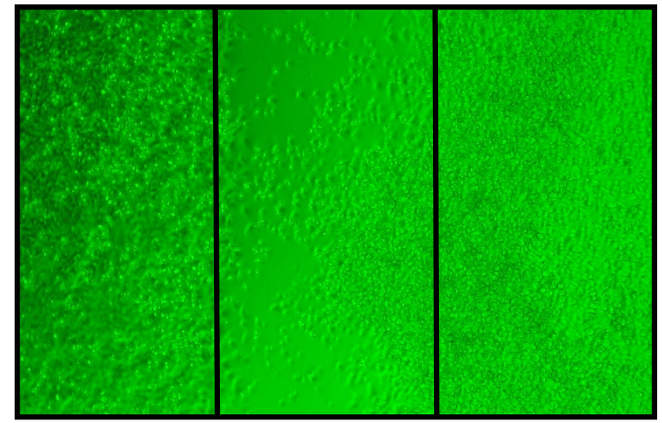
[91.4 + 4.2 (%)]

B) スクラッチ**24**時間後



[41.4 + 1.5 (%)]

D) ベシクル刺激およびクルクミン添加



[38.3 + 3.2 (%)]

図 7. ベシクル刺激を受けた歯肉上皮細胞の遊走に及ぼすクルクミンの影響

人工的に作成した創傷面の治癒程度を位相差顕微鏡にて観察した (観察倍率 : x 100) 。
治癒程度は当初の創傷面積と比較した割合で表示した。

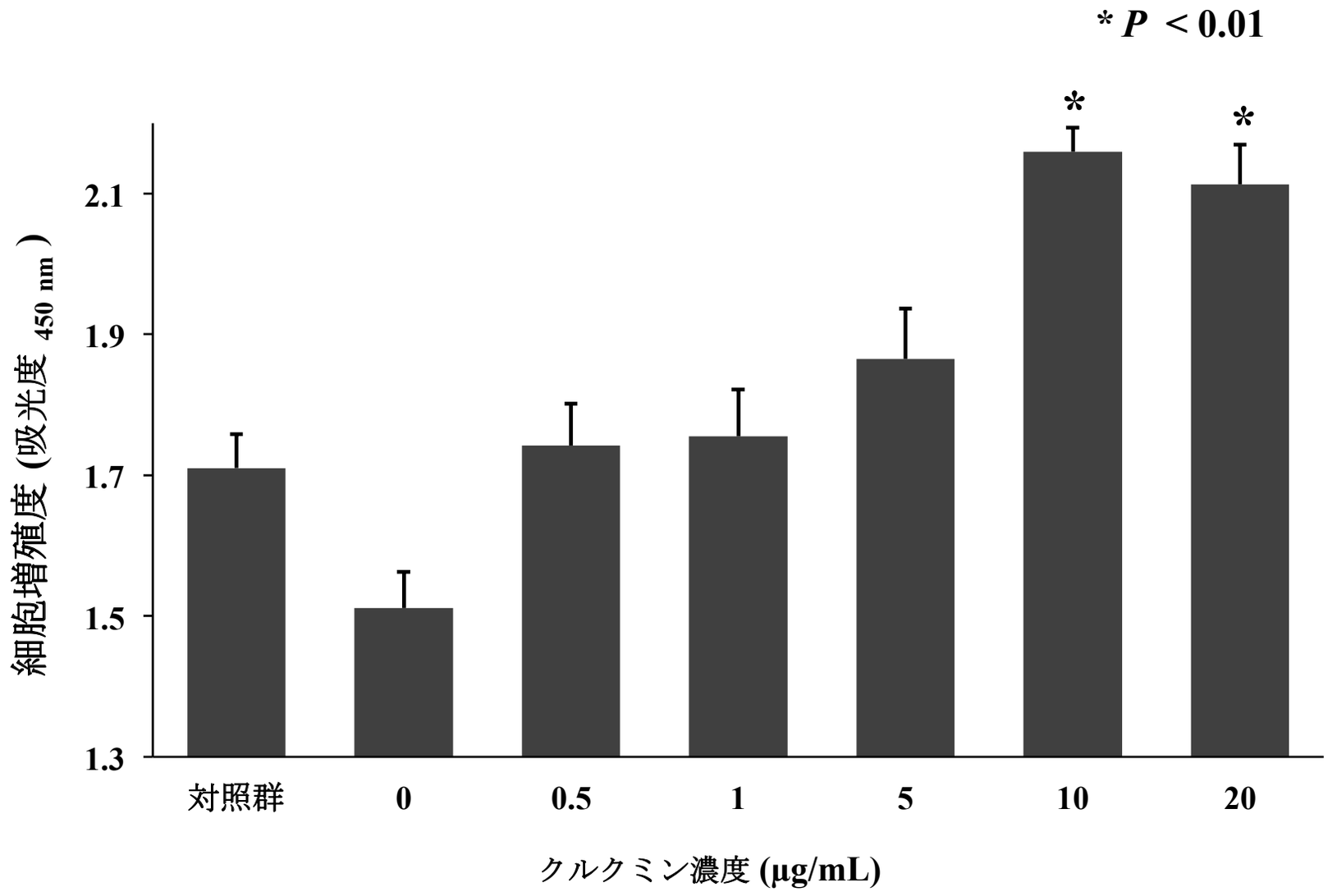


図 8. ベシクル刺激を受けた歯肉上皮細胞の増殖能に及ぼすクルクミンの影響

クルクミンが細胞増殖に及ぼす影響を検討するために、細胞をベシクルとともに 1.5 時間培養した後、クルクミンを種々の濃度で培地に添加し、細胞増殖を評価した。* P < 0.01 (両側 Dunnett 検定により算出) 濃度依存度は、Jonckheere-Terpstra 検定と統計ソフト (XLSTAT 2006 for Excel; SSRI) を用いて分析した。P < 0.01

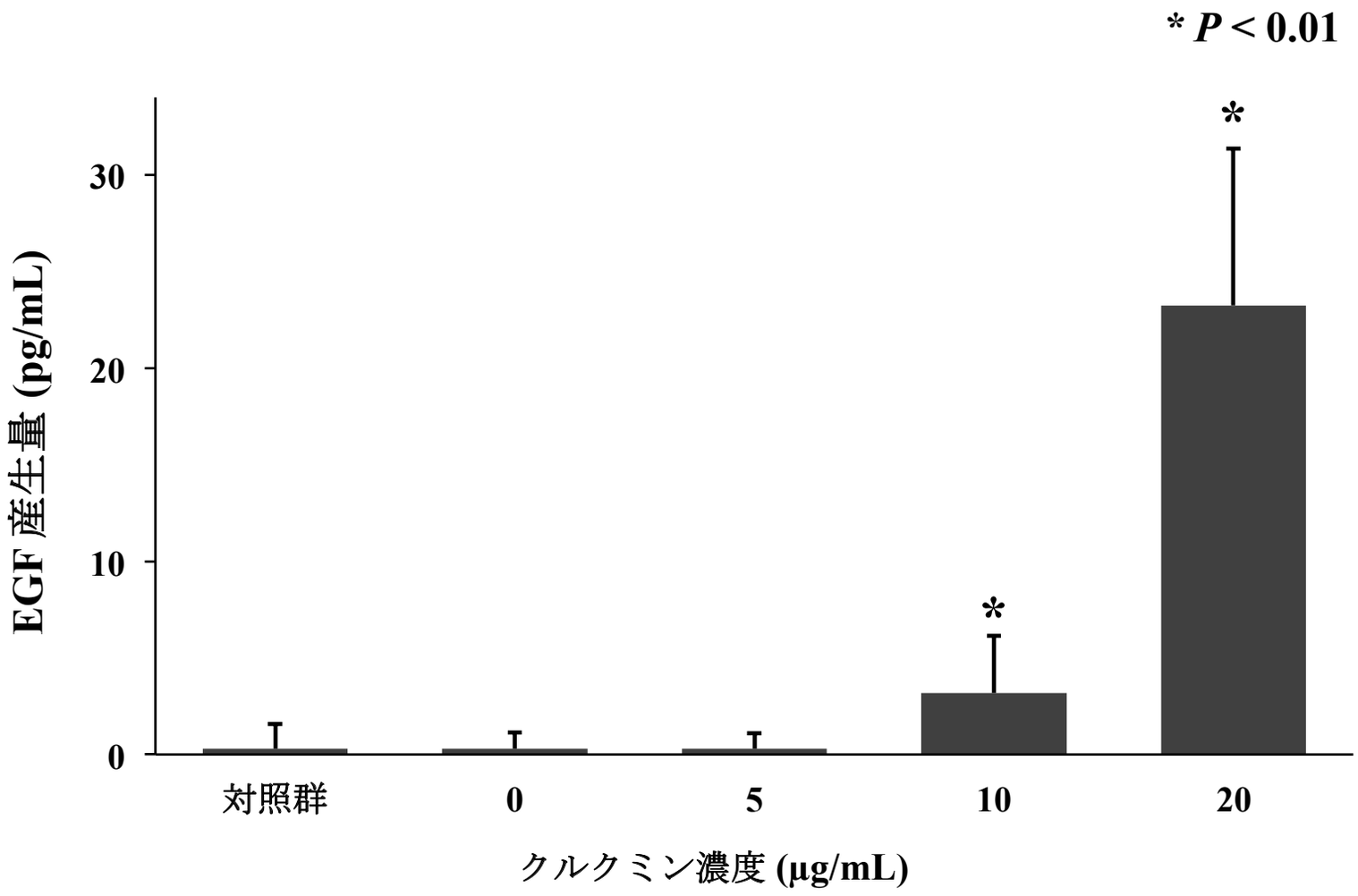


図 9. 歯肉上皮細胞の EGF 産生に及ぼすクルクミンの影響

各種濃度のクルクミン存在下にて、Epi4 細胞を 20 µg/mL のベシクルとともに培養し、24 時間後に上清を採取し ELISA を行った。* P < 0.01 (両側 Dunnett 検定により算出)

濃度依存度は、Jonckheere-Terpstra 検定と統計ソフト (XLSTAT 2006 for Excel; SSRI) を用いて分析した。P < 0.01

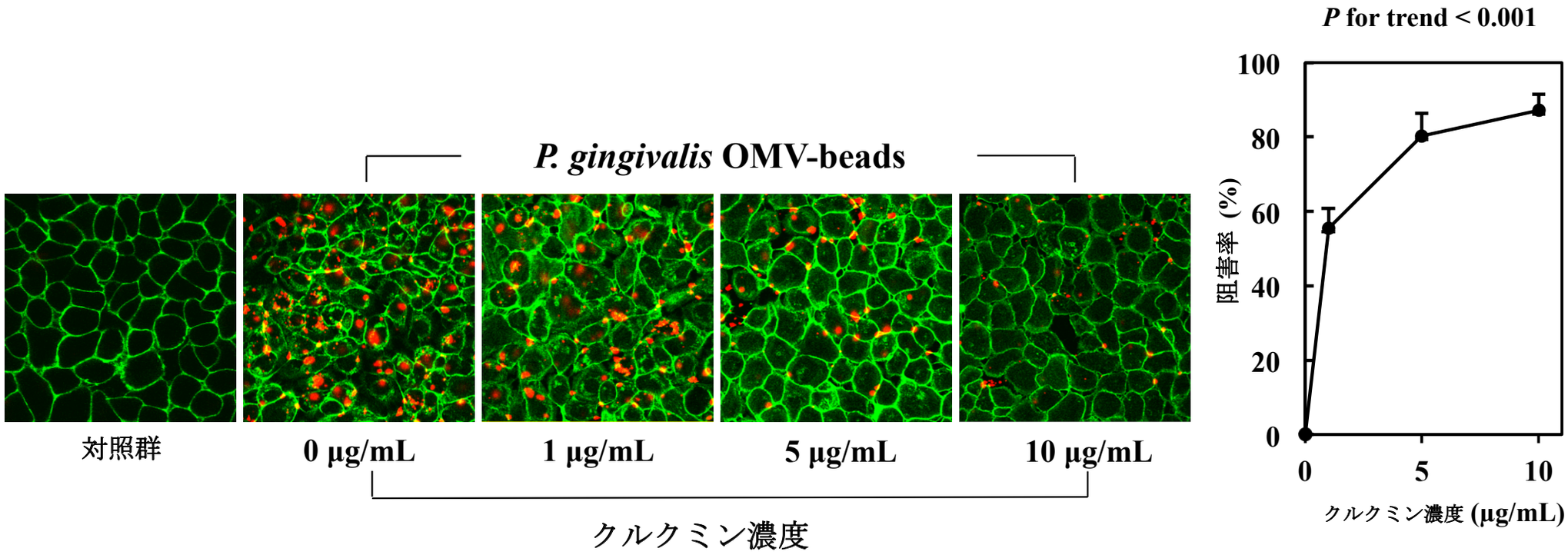


図 10. ベシクルビーズの歯肉上皮細胞への付着・侵入に及ぼすクルクミンの影響

クルクミンがベシクルビーズの Ca9-22 細胞への付着・侵入に及ぼす影響を、CLSM を用いて観察した (ベシクルビーズ : 赤、Ca9-22 細胞 : 緑、観察倍率 : x 40)。細胞内に侵入したベシクルビーズを定量化するために、各視野の細胞内および細胞外のビーズを計測した。各実験において少なくとも 8 つの視野を分析した。

侵入阻害率は、各視野の細胞内および細胞外のビーズを計測し算出した。図は 8 視野のうち代表的な像を表示した。

濃度依存度は、Jonckheere-Terpstra 検定と統計ソフト (XLSTAT 2006 for Excel; SSRI) を用いて分析した。$P < 0.001$