

学位論文

海藻 *Codium fragile* 由来レクチンの バイオフィルム形成抑制効果に関するヒト臨床パイロット研究

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

高本 将司

A Pilot Human Study Toward the Clinical Application of a *Codium fragile*-Derived Lectin with Biofilm Inhibitory Activity

Department of Pathophysiology-Periodontal Science
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,
Okayama University

TAKAMOTO Masashi

(令和 7 年 12 月 5 日受付)

緒言

口腔内には 700 種を超える常在細菌が存在し、歯面上ではバイオフィルムを形成して生育している¹⁾。バイオフィルム中では、う蝕や歯周病の原因菌が他の細菌と共凝集しながら定着している²⁾。これらの口腔感染症は歯の喪失の主因であるだけでなく、誤嚥性肺炎や感染性心内膜炎など全身疾患に関与することが指摘されている³⁾。特に高齢者や要介護者の口腔内ではバイオフィルムの付着が顕著であり、その管理は重要な課題である。

日本では急速な少子高齢化が進行しており、高齢者および要介護者の口腔機能維持と口腔衛生管理の重要性が一層高まっている。現行の口腔感染症対策の中心は機械的清掃であるが、時間的・人的負担が大きく⁴⁾、自立的な口腔清掃が困難な患者や介護施設入所者では誤嚥性肺炎のリスク増加が報告されている^{5,6)}。このため、機械的清掃を補完する化学的アプローチとして、洗口液などの口腔ケア材料の開発が求められている。

欧米ではクロルヘキシジングルコン酸塩（Chlorhexidine gluconate: CHX）がゴールドスタンダードとされている⁷⁾が、日本ではアナフィラキシー様症状の報告⁸⁾を受け、欧米で一般的に用いられる 0.12–0.2 %⁹⁾での使用は認められていない。また、塩化セチルピリジニウム（Cetylpyridinium chloride: CPC）などの殺菌成分は、唾液による希釈の影響を受けやすく、持続性に課題がある^{10,11)}。さらに抗生物質は耐性菌の問題があり^{12,13)}、バイオフィルム内部への浸透性も十分ではない。このような背景から、安全かつ持続的に効果を発揮し得る新規口腔ケア材料の探索が求められている。

歯面におけるバイオフィルム形成は、獲得ペリクルの形成、細菌の初期付着、バイオフィルムの成熟、細菌の分散の4段階で進行する¹⁴⁾。特に初期付着段階では、唾液由来成分により形成されたペリクル中の糖鎖に対し、細菌がレクチン様結合を介して付着する¹⁵⁻¹⁷⁾。したがって、特定の糖鎖に選択的に結合するレクチンは細菌と競合することで初期付着を阻害する。この作用原理は「抗接着療法 (anti-adhesion therapy)」として提唱されている¹⁸⁾。

これまでに、陸生植物レクチンが *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) の初期付着を阻害し、バイオフィルム形成を抑制することが報告されている¹⁹⁾。さらに伊東らは、Gal β 1-3GalNAc (Core 1 構造, Gal : ガラクトース, GalNAc : N アセチルガラクトサミン) を認識するレクチンが *S. mutans* のバイオフィルム形成阻害能を示すこと明らかにした²⁰⁾。近年では海藻由来レクチンの抽出・精製技術が進歩し、その応用範囲が拡大している²¹⁾。海藻レクチンは陸生植物レクチンに比べて低分子かつ抗原性が低く、複数のジスルフィド結合によって高い構造安定性を有する。またムチンに対する高い結合特異性を示し²²⁻²⁴⁾, *S. mutans* に対するバイオフィルム形成阻害効果がより強い可能性が示唆されている²⁰⁾。

ミル (*Codium fragile*) 由来レクチン (ミルレクチン) については、動物実験において 1,000 μ g/mL 投与後も行動変化や臓器障害は認められず、血液生化学的指標も正常範囲内であったことから、安全性が確認されている²⁵⁾。さらに、基礎研究ではミルレクチンと CPC の併用により抗菌作用が増強することが報告されている²⁶⁾がヒトにおける生体内での効果は未だ検証されていない。

現在，口腔ケア製品の効果判定は歯肉炎症や歯周ポケット内細菌叢の変化を指標とすることが多く，歯面表面に付着した細菌量を単位面積あたりで定量的に評価した研究は限られている²⁷⁻²⁹⁾。そこで本研究では，軟組織遮断ジグおよび3D スキャナーを用いた歯面面積測定法を導入し，単位面積あたりの付着細菌由来アデノシン三リン酸（adenosine triphosphate: ATP）量を定量化する検査方法を開発した。

以上の背景を踏まえ，本研究はミルレクチンとCPCを併用した際の細菌付着抑制効果をヒトにおいて検討することを目的とした。併せて，軟組織遮断ジグおよび3D スキャナーを用いた歯面面積測定法の臨床的有用性についても検証した。

材料と方法

1. 洗口液

試験洗口液として、海藻海松（ミル：*Codium fragile*）由来抽出レクチン 1 %と CPC 0.05 %を含有する混合洗口液を用いた。対照洗口液には CPC 0.05 %含有洗口液を使用した。ミルレクチン（分子量 12–30 kDa）は一丸ファルコス（岐阜，日本）より提供を受けたものを使用した。

2. 臨床試験デザインおよび検体採取

本研究は無作為化二重盲検クロスオーバー試験として実施した（図 1）。

試験開始前 2 時間は食事およびブラッシングを禁止した。洗口前に主要評価項目および副次評価項目用の唾液および歯面バイオフィルムを採取した。その後，歯磨剤を使用せず 30 秒間ブラッシングを行わせ，続いて洗口液で 30 秒間洗口させた。検体は洗口直後および洗口 6 時間後に採取した。安全性評価のため各時点で口腔内写真を撮影した。臨床試験中は食事を禁止し，飲水はミネラルウォーター（おいしい水 天然水：アサヒ飲料，東京，日本）のみとした。

洗口液は，管理者が割付表に基づき無作為に割り付けた。対象者 15 名を 2 群（7 名および 8 名）に分け，2 週間の washout 期間を設けたクロスオーバー試験とした（図 2）。

両洗口液は同一形状の容器に充填し，研究対象者および評価者の双方を盲検化した。

3. 研究対象者

対象は 18 歳以上の健常成人とし、研究内容を十分に説明した上で文書による同意を取得した。試験成分に対する既知のアレルギーを有する者、妊娠中または授乳中の者は除外した。必要症例数は先行研究²⁵⁾を基に算出し ($\alpha = 0.05$, $\beta = 0.2$) 10 名と推定された。脱落を考慮し 15 名を登録した。

本研究は、岡山大学臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号：臨 2401-003）。また、大学病院医療情報ネットワークセンター臨床試験登録システム（University Hospital Medical Information Network Clinical Trials Registry: UMIN-CTR）に登録した（試験 ID：UMIN000053076）。

4. 軟組織遮断ジグ作製および歯面表面積測定

上顎歯列弓の印象採得を行い、石膏の研究用模型を作製した。口唇および歯肉の影響を排除するため、歯科用光重合レジン（クリアフィル マジェスティ ES フロー Low：クラレノリタケデンタル，東京，日本）を用い，左右側犬歯間の歯頸部から歯肉を被覆する軟組織遮断ジグ（ジグ）を作製した（図 3A）。

研究用模型を 3D スキャナー（Ein Scan SP：日本 3D プリンター，東京，日本）で読み取り（図 3A），専用ソフトウェア（Geomagic Control X：データ・デザイン，愛知，日本）を用いて左右側犬歯間 6 歯の唇面面積を個歯単位で 3 回測定した（図 3B）。各歯の平均値を合算し，歯面表面積とした。

歯面付着細菌 ATP 量に関する本測定法の妥当性を検証するため、従来法により測定された ATP 量の平均値（承認番号：臨 1612-009）と、本研究で測定した ATP 量の平均値、および歯面表面積で標準化した単位面積あたり ATP 量について、不偏分散を指標として比較した。

5. 評価項目

本研究の主要評価項目は歯面付着バイオフィルム量の変化とし、副次評価項目として唾液成分の変化、細菌叢の変化および安全性評価を設定した。

1) 主要評価項目

歯面付着バイオフィルム量は、ATP 量により定量化した。洗口前、洗口直後、そして洗口 6 時間後に、ジグを装着し、1 名の評価者が上顎両側犬歯間 6 歯からプラークを採取した。ATP 量の測定には、ルミテスターsmart およびルシパック A3（キッコーマンバイオケミファ、東京、日本）を用いた。ジグを装着し、口腔内から 1 歯毎に採取した ATP 量を、3D スキャナーで得た歯面表面積で除して標準化し、洗口前の単位面積あたりの ATP 値を基準として、洗口直後と洗口 6 時間後の変化率を算出した。

なお、ジグは毎測定後に超純水（Milli-Q: Merck Millipore, Burlington, MA, USA）で 70 % に希釈したエタノール（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を噴霧し保管した。

2) 副次評価項目

副次評価項目として、以下の 2 点を評価した。

① 唾液成分の変化

Salivary Multi Test 6 (SMT6 : ライオン歯科材, 東京, 日本)³⁰⁾を用い, 洗口前および洗口 6 時間後に評価した。キットの手順書に従い, 付属の洗口用水 (3 mL) で 10 秒間洗口し, 唾液を含んだ洗口用水を採取し, スポイトで試験紙に滴下後, Salivary Multi Test Meter (ライオン歯科材) を用いて, 以下の 6 項目を測定した。

6 項目は, 「歯の健康に関する項目」, 「歯ぐきに関する項目」, 「口腔清潔度に関する項目」の 3 群に大別され, 「歯の健康に関する項目」は, 「むし歯菌」, 「酸性度」, そして「緩衝能」の 3 項目である。「歯ぐきに関する項目」は, 「白血球」および「タンパク質」の 2 項目である。「口腔清潔度に関する項目」は, 「アンモニア」の 1 項目である。

② 細菌叢の変化

上下顎両側臼歯頬側歯面表面からバイオフィルムを採取し, FLOQ スワブ 502CS01-E, レギュラー, BP80 (Copan Italia S.p.A., Brescia, Italy) で採取後, 1.5 mL のリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline: PBS; pH 7.4: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に懸濁し, 30 秒間ボルテックスミキサー (HM-10 : アズワン, 大阪, 日本) にて攪拌後, 上清 1.0 mL を 1.5 mL チューブに回収して, 外部機関 (タカラバイオ, 滋賀, 日本) へ送付し, 解析を依頼した。

解析は Qiime2 パイプラインにより実施した。16S rRNA の V3-V4 領域を, ユニバーサルプライマー (341F-806R) で増幅し, paired-end シーケンスによりリードを取得した。得

られたリードは DADA2 によりデノイズを行った後、VSEARCH を用いて 99%一致率を閾値にクラスタリングし OTU を構築した。系統分類は、GreenGenes 及び DDBJ データベースの情報に基づいた系統分類を行い、各 OUT のリード数に基づく存在比の算出を行った。

上記のデータをもとに、細菌叢の系統分類、構成比、さらには α 多様性解析を実施した。 α 多様性は 50,000 リードを用いて算出した。

洗口前および洗口 6 時間後の α 多様性を比較し、属レベルでの細菌存在比率は、分類毎に洗口前の存在比率を基準として、洗口 6 時間後の存在比率との差で比較した。

3) 安全性評価項目

両洗口液使用直後と使用 6 時間後に上下顎両側犬歯近傍の粘膜を写真撮影した。この写真を用いて、肉眼的に色調の変化を確認し、さらに下顎中切歯歯間部歯肉の色調を使用して Image J Fiji (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で画像の赤緑青色を各色 256 階調で表示する RGB 値に基づいて色調解析を行った。対照 CPC 洗口液での洗口直後の色調を基準として比較した。加えて、研究対象者に有害事象の有無を問診により確認した。

6. 統計処理

性差比較には Fisher's exact test を用いた。年齢比較には Wilcoxon signed rank test を用いた。3 群間以上の群間比較には Kruskal-Wallis test を用い、多重比較には Dunn's multiple comparisons test を用いた。2 群間比較には Wilcoxon signed rank test を用いた。

以上の解析には GraphPad Prism8 (version-8.4.3: GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

を用い，有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

1. 研究対象者

本研究には男性 7 名および女性 8 名の計 15 名の健常成人が参加した。平均年齢は 27.9 ± 2.5 歳であり、日本人 10 名を含む全員がアジア系人種であった。群 1（8 名）は男性 4 名，女性 4 名，平均年齢 27.9 ± 1.2 歳で，群 2（7 名）は男性 4 名，女性 3 名，平均年齢 27.9 ± 3.1 歳で，性別および年齢に有意差はなかった（図 2）。また，臨床研究期間中の脱落者はなかった。

2. 単位面積あたりの ATP 量

歯面付着細菌の ATP 量の不偏分散値は，3D スキャナーを用いた歯面表面積による標準化により，約 $1/10^3$ へと減少した（図 3C）。一方，ジグの使用のみでは，過去の臨床試験（ジグ未使用・標準化なし，未公表結果；岡山大学臨床研究倫理審査委員会，承認番号：臨 1612-009）との間に不偏分散値に差はなかった。

3. 主要評価項目

歯面表面積で標準化した ATP 量は，両洗口液ともに洗口直後および洗口 6 時間後では有意に減少した（図 4A）。洗口直後と洗口 6 時間後の ATP 量の間に有意差はなかった。

また，洗口 6 時間後における歯面付着 ATP 量の変化率を両洗口液間で比較したところ，有意差はなかった（図 4B）。

4. 副次評価項目

① 唾液性状の変化

洗口前および洗口 6 時間後の各唾液性状項目を洗口液毎に比較したところ、いずれの項目においても有意差はなかった（図 5A）。また、洗口前値を基準とした洗口 6 時間後の変化量についても、両洗口液間で全項目に有意差はなかった（図 5B）。

② 細菌叢の変化

16S rRNA 解析により、約 40,000 リード取得し、属レベルで計 274 分類群が検出された（図 6A, B）。 α 多様性解析は塩基の 50,000 リードに正規化したデータに基づいて行ったところ、洗口前と洗口 6 時間後において両洗口液間に有意差はなかった（図 6C）。

一方、属レベルでの存在比率変化を比較したところ、洗口 6 時間後に *Saccharibacteria* 属および *Anaerovorax* 属がミルレクチン含有 CPC 洗口液群で有意に減少し、*Parcubacteria* 属は対照 CPC 洗口液群で有意に減少していた（図 6D）。

4. 安全性評価項目

洗口直後および洗口 6 時間後に肉眼的な発赤は認められなかった（図 7A）。歯肉色調の RGB 解析においても、各色比率に有意差がなかった（図 7B : R/G 比を代表として表示）。また、研究期間中に対象者から有害事象の報告はなかった。

考察

本研究では、海藻ミル (*Codium fragile*) 抽出レクチンを含有した洗口液の歯面バイオフィルム形成抑制効果を健常成人において検証した。また、歯面付着細菌量をより精度高く評価するため、軟組織遮断および 3D スキャナーを用いた新規解析法を導入した。

従来、歯の近遠心幅径を模型上でノギスにより計測方法³¹⁾では、歯面の豊隆を反映した正確な表面積測定が困難であった。本研究では 3D スキャナーにより歯面を計測し、歯面表面積で細菌 ATP 量を標準化することで、不偏分散値を大幅に低減することができた (図 3C)。一方、ジグ単独の使用では分散値の低減は認められなかった。以上より、本測定法は歯面付着細菌量の定量精度を向上させる可能性が示唆された。今後、測定手法の簡便化を図ることで、口腔ケア製品の客観的評価法や臨床現場における効果判定の標準化への応用が期待される。

主要評価項目である歯面付着 ATP 量は、両洗口液ともに洗口後に有意に減少したが、洗口液間に有意差はなかった。本結果の一因として、CPC 存在下におけるレクチン活性の影響が考えられる。イオン性界面活性剤はタンパク質の立体構造と機能に影響を及ぼすことが知られており、特に疎水基をもつ界面活性剤は帯電残基との静電的相互作用と疎水性相互作用を介してタンパク質の構造変化を誘導することが報告されている³²⁾。コンカナバリン A (concanavalin A: Con A) や大豆由来の Soybean agglutinin を含む複数のレクチンでは、カチオン性および両性界面活性剤により糖鎖結合活性が低下することが示されている³³⁾。さらに、*Streptococcus sobrinus* のグルカン結合レクチンは、CPC により不可逆的に失活する

との報告もある³⁴⁾。これらの知見から、本研究条件下（0.05 % CPC）では、ミルレクチンの糖鎖認識能が部分的に抑制された可能性が考えられる。ただし、本研究ではレクチン活性そのものを直接評価していないため、その機序については今後の検討が必要である。

副次評価項目の唾液性状では有意差は認められなかった。安静時唾液の pH を連続測定した研究では、同一被験者の基礎 pH は数日にわたって変動が小さく、日内変動は存在するものの生理的範囲内に保たれることが報告されている³⁵⁾。さらに、安静時唾液の pH 緩衝能も比較的安定した指標であることが報告されており^{36,37)}、本研究のような単回・短時間介入では明確な変化として検出されにくかった可能性がある。

細菌叢解析では、16S rRNA 遺伝子シーケンス解析により計 274 分類群が検出された。 α 多様性には有意差は認められず、存在比率の比較では 3 つの属に有意な変動が認められた（図 6）。しかし、主要な細菌群と思われるう蝕原性菌や歯周病原性細菌の存在比率には有意な変化がみられなかった。既報では、CPC 洗口液を一定期間使用した場合に α 多様性や特定菌属の存在比率に変化が生じることが報告されている³⁸⁾。当該研究では、CPC 単独洗口液と、水（Negative Control）を用い、1 日 2 回 20 mL で 30 秒間洗口を 21 日間継続した後、口腔内細菌叢を比較している。その結果、 α 多様性は洗口開始前と比較し 21 日後に Negative Control 群で有意に増加し、CPC 群との比較でも有意差が認められた。また、属レベルでは、*Porphyromonas* 属、*Peptostreptococcus* 属、さらには、*Saccharibacteria* 属などが CPC により有意に抑制されたと報告されている³⁸⁾。しかし、本研究は単回使用後 6 時間という短時間評価であったため、細菌叢全体に大きな変動は認められなかったものと考えら

れる。また、本研究では *Saccharibacteria* 属と *Anaerovorax* 属がミルレクチン含有 CPC 洗口液群で有意に減少し、*Parcubacteria* 属が対照 CPC 洗口液群で有意に減少していた。属レベルで存在比率に変動が認められたものの、これらの分類群が細菌叢全体に占める割合は低頻度であった。以上より、本研究で観察された細菌叢の変化には CPC の抗菌作用が主として寄与している可能性が示唆された。一方で、本臨床研究の短時間介入条件下では、ミルレクチンによる明確な付着抑制効果は確認されなかった。

安全性評価では、肉眼的所見および RGB 色調解析において有意差は認められなかった。歯肉炎症の程度と RGB 比との関連については、Gingival Index 値の上昇に伴い R/G 比が増加することが報告されている⁴⁰⁾。本研究では、対照 CPC 洗口液使用直後と比較してミルレクチン含有 CPC 洗口液で R/G 比に差が認められなかったことから、ミルレクチンは少なくとも短期使用において歯肉炎症を惹起する可能性は低いと考えられる²⁷⁾。さらに、CPC 洗口液においても一般的には歯肉刺激性が低い成分であることも報告されており⁴¹⁾、本研究結果はこれらの知見と整合的である。

以上の評価・解析より、本研究は、ミルレクチン含有 CPC 洗口液が短期使用において良好な忍容性を示し、細菌叢全体を大きく変動させることなく歯面付着細菌量の抑制効果を示す可能性を示唆した。

本パイロット試験の限界として、単回使用、短期間評価、対象者数が少ないこと、若年健康者を対象者としたこと、およびブラッシング技量のばらつきが挙げられる。また、CPC とミルレクチンの相互作用機序については直接的検証を行っていない。今後は、機械的衛

生管理による歯面状態の均質化，CPC とミルレクチンの相互作用機構の解明，対象者層の拡大，そして長期使用試験を通じた安全性と持続的効果の検証が必要である。さらに，分子レベルでの糖鎖結合様式解析やバイオフィルムモデルを用いた *in vitro* の検証を進めることで，抗接着メカニズムの科学的根拠を強化し，臨床応用への橋渡し研究を推進することが求められる。

結論

本研究では、3D スキャナーを用いて歯面単位面積を正確に測定し、単位面積あたりの付着細菌 ATP 量を算出することにより、歯面バイオフィルム形成量を定量的に測定する手法を確立した。本手法を用いた検討の結果、ミルレクチン含有 CPC 洗口液は CPC 単独の対照洗口液と比較して有意差のない細菌抑制効果を示し、短期使用において良好な安全を有する可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なるご指導とご校閲を賜った岡山大学学術研究院医歯薬学域歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また，様々な面にわたり貴重なご助力とご協力をくださいました岡山大学病院歯科・歯周科部門の大久保圭祐助教，畑中加珠医員，そして同分野ならびに同部門の諸先生に厚く御礼申し上げます。さらに，本研究の立案当初から貴重なご助力とご協力をくださいました竹内良太様（一丸ファルコス）に厚く御礼申し上げます。あわせて，公益財団法人大本育英会からは3年間にわたるご支援を受け，研究に専念することができました。心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005; 43(11): 5721–5732.
2. Cisar JO, Kolenbrander PE, McIntire FC. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. Infect Immun. 1979; 24(3): 742–752.
3. Hamad M, Nativ-Zeltzer N. Aspiration pneumonia and oral health. Curr Otorhinolaryngol Rep. 2023; 11, 161–165.
4. 8020 推進財団 日本病院歯科口腔外科協議会 厚生労働省委託補助事業 病院歯科における口腔ケア実施に関する実態調査.
https://www.8020zaidan.or.jp/images/about/pdf_list/h16_byouinshika_chosa.pdf (最終アクセス 2025 年 11 月 18 日)
5. Yoneyama T, Yoshida M, Ohrui T, Mukaiyama H, Okamoto H, Hoshiba K, Ihara S, Yanagisawa S, Ariumi S, Morita T, Mizuno Y, Ohsawa T, Akagawa Y, Hashimoto K, Sasaki H; Oral Care Working Group. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. J Am Geriatr Soc. 2002; 50(3): 430–433.
6. Azarpazhooh A, Leake JL. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. J Periodontol. 2006; 77(9): 1465–1482.
7. Lang NP, and Brex MC: Chlorhexidine digluconate-an agent for chemical plaque control and

prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res.* 1986; 21: 74–89.

8. 刑部 敦, 大久保 憲: わが国におけるクロルヘキシジングルコン酸塩によるアナフィラキシー発生についての文献的考察. *環境感染誌.* 2015; 30(2): 127–134.
9. Poppolo Deus F, Ouanounou A. Chlorhexidine in dentistry: pharmacology, uses, and adverse effects. *Int Dent J.* 2022; 72(3): 269–277.
10. Roberts WR, Addy M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol.* 1981; 8(4): 295–310.
11. Aguilera FR, Viñas M, Sierra JM, Vinuesa T, R Fernandez de Henestrosa A, Furmanczyk M, Trullàs C, Jourdan E, López-López J, Jorba M. Substantivity of mouth-rinse formulations containing cetylpyridinium chloride and O-cymen-5-ol: a randomized-crossover trial. *BMC Oral Health.* 2022; 22(1): 646.
12. Fantin B, Leggett J, Ebert S, Craig WA. Correlation between in vitro and in vivo activity of antimicrobial agents against gram-negative bacilli in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(7): 1413–1422.
13. Pallasch TJ, Slots J. Antibiotic prophylaxis and the medically compromised patient. *Periodontol* 2000. 1996; 10: 107–138.
14. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011 ; 2(5):435-444.
15. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res.*

2000; 14: 22–28.

16. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. Arch Oral Biol. 2001; 46(4): 293–303.
17. Yin A, Margolis HC, Yao Y, Grogan J, Oppenheim FG. Multi-component adsorption model for pellicle formation: the influence of salivary proteins and non-salivary phospho proteins on the binding of histatin 5 onto hydroxyapatite. Arch Oral Biol. 2006; 51(2): 102–110.
18. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 38(3): 181–191
19. Teixeira EH, Napimoga MH, Carneiro VA, de Oliveira TM, Cunha RM, Havt A, Martins JL, Pinto VP, Gonçalves RB, Cavada BS. *In vitro* inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. J Appl Microbiol. 2006; 101(1): 111–116.
20. Ito T, Yoshida Y, Shiota Y, Ito Y, Yamamoto T, Takashiba S. Effects of lectins on initial attachment of cariogenic *Streptococcus mutans*. Glycoconj J. 2018; 35(1): 41–51.
21. Rogers DJ, and Hori K. Marine algal lectins: new developments. Hydrobiologia. 1993; 260: 589–593.
22. Benevides N, Sampaio A, Lobato A, Farias W, Costa F, Teixeira D, Freitas A. A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. Journal of Applied Phycology, 1997; 9(6): 495–501.
23. Sampaio AH, Rogers DJ, Barwell CJ, Saker-Sampaio S, Costa FHF, Ramos MV. A new isolation

procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. J

Appl Phycol. 1998; 10(6): 539–546.

24. Nagano CS, Moreno FB, Bloch C Jr, Prates MV, Calvete JJ, Saker-Sampaio S, Farias WR, Tavares TD, Na
25. scimento KS, Grangeiro TB, Cavada BS, Sampaio AH. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. Protein Pept Lett. 2002; 9(2): 159–166.
26. 塩田康祥: 海藻由来レクチンを用いた口腔バイオフィルム感染症の制御
～有効性と安全性の検討～. 岡山歯誌. 2016; 35 (博士論文) .
27. 一丸ファルコス. <https://www.ichimaru.co.jp/research/featured/159> (最終アクセス 2025 年 11 月 28 日)
28. Costa X, Laguna E, Herrera D, Serrano J, Alonso B, Sanz M. Efficacy of a new mouth rinse formulation based on 0.07% cetylpyridinium chloride in the control of plaque and gingivitis: a 6-month randomized clinical trial. J Clin Periodontol. 2013; 40(11): 100715.
29. Boccalari E, Tadakamadla SK, Occhipinti C, Lanteri V, Maspero C. Evaluation of the effectiveness of a novel mouth rinse containing hyaluronic acid and hydrogen peroxide on gingivitis: A randomized pilot controlled trial. Clin Exp Dent Res. 2022; 8(3): 673–679.
30. Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival

inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2008; 6(4): 290–303.

31. 西永英司, 内山千代子, 牧利一, 斉藤浩一, 深澤哲, 鈴木苗穂, 山本高司, 村越倫明, 大寺基靖, 福田功, 大久保章男, 富士谷盛興, 千田彰. 唾液による総合的な口腔検査法の開発—従来の分析法との比較による多項目唾液検査システム (AL-55) の測定値の妥当性および信頼性の検討—. *日歯保存誌*. 2015; 58(4): 321–330.
32. 進来亜希, 森本徳明, 天野有希, 竹本美保, 石塚泰男, 丹根一夫. 歯と顎の大きさの年代的差異. *日矯歯誌*. 1995; 54(2): 112–117.
33. Otzen D. Protein-surfactant interactions: a tale of many states. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1814(5): 562–591.
34. Lotan R, Beattie G, Hubbell W, Nicolson GL. Activities of lectins and their immobilized derivatives in detergent solutions. Implications on the use of lectin affinity chromatography for the purification of membrane glycoproteins. *Biochemistry*. 1977; 16(9): 1787–1794.
35. Denson AM, Doyle RJ. Stabilization of the glucan-binding lectin of *Streptococcus sobrinus* by specific ligand. *Arch Oral Biol*. 1998; 43(1): 33–38.
36. Sato T. Modification of a simple device for measuring pH: demonstration of stable pH values and diurnal variation in human mixed saliva. *Journal of Oral Biosciences*. 1991; 33(4): 281–288.
37. Belardinelli PA, Morelato RA, Benavidez TE, Baruzzi AM, López de Blanc SA. Effect of two mouthwashes on salivary pH. *Acta Odontol Latinoam*. 2014; 27(2): 66–71.
38. Fenoll-Palomares C, Muñoz Montagud JV, Sanchiz V, Herreros B, Hernández V, Mínguez M,

- Benages A. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev Esp Enferm Dig.* 2004; 96(11): 773–783.
39. Teng F, He T, Huang S, Bo CP, Li Z, Chang JL, Liu JQ, Charbonneau D, Xu J, Li R, Ling JQ. Cetylpyridinium chloride mouth rinses alleviate experimental gingivitis by inhibiting dental plaque maturation. *Int J Oral Sci.* 2016; 8(3): 182-190.
40. Matthies C, Evers S, Ludwig W, Schink B. *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50 Pt 4:1591–1594.
41. Kim HN, Kim K, Lee Y. Intra-oral photograph analysis for gingivitis screening in orthodontic patients. *Int J Environ Res Public Health.* 2023; 20(4): 3705.
42. Van Leeuwen MP, Rosema NA, Versteeg PA, Slot DE, Van Winkelhoff AJ, Van der Weijden GA. Long-term efficacy of a 0.07% cetylpyridinium chloride mouth rinse in relation to plaque and gingivitis: a 6-month randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Int J Dent Hyg.* 2015; 13(2): 93–103.

表題脚注

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態
学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- 第16回日本口腔検査学会学術大会（2023年11月：東京）
- 第68回春季日本歯周病学会学術大会（2025年5月：沖縄）

図の説明

図 1. 臨床試験プロトコール

試験期間中に、洗口前、洗口直後、そして洗口後 6 時間の 3 時点で、3 項目を評価した。なお、洗口後は食事を禁止し、飲水のみを可能とした。

図 2. 臨床研究のフローチャート

研究対象者を 2 群に無作為割り付けし、試験洗口液と対象洗口液を各群が使用した。
2 週間の washout 期間後、群と洗口液の組合せを交換した。

図 3. 軟組織遮断ジグを用いた単位面積あたりの ATP 量測定

- A: ジグを装着した上顎歯列模型
- B: 3D スキャナーによる各歯毎の歯面表面積測定
- C: ATP 量の不偏分散値の比較

対象者の歯のサイズによってばらつきやすいが、測定した面積によって除して標準化するとばらつきが減少した。歯面の面積は、3 回測定した平均値を用いた。なお、ジグ無し・標準化無しのデータは従来法による（臨 1612-009：未発表データ）。

図 4. 歯面に付着した細菌の ATP 量の変化

A： 経時変化

洗口開始前の単位面積あたりの ATP 量を基準として，洗口直後と洗口後 6 時間の時点の ATP 量を比較した。

データは平均 ± 標準偏差を示す (n=15)。●は CFL+CPC 溶液を，◇は CPC 溶液を示す。統計解析には統計解析には Kruskal-Wallis test と Dunn's multiple comparisons test を用いた。* : $p < 0.05$

B： 洗口 6 時間後の変化率

洗口前の単位面積あたりの ATP 量を基準として，時間経過による変化率を算出し，各洗口液間の差を比較した。

箱ひげ図の横線は中央値を，箱の下端と上端は第 1 四分位数および第 3 四分位数を，×は平均値を，ひげは四分位数の 1.5 倍を，そして○は外れ値を示す (n=15)。統計解析には Wilcoxon's signed rank test を用いた。

図 5. 洗口前と洗口 6 時後の唾液性状の変化

A： 洗口 6 時間後の唾液性状

洗口 6 時間時点の数値を洗口液毎に比較した。

B： 洗口前と洗口 6 時間後の唾液性状の経時変化量

洗口前の各項目の数値を基準として，洗口 6 時間後の変化量を洗口液毎に比較した。

箱ひげ図の横線は中央値を，箱の下端と上端は第 1 四分位数および第 3 四分位数を，
×は平均値を，ひげは四分位数の 1.5 倍を，そして○は外れ値を示す（n=15）。統計解析
には Wilcoxon's signed rank test を用いた。

図 6．細菌叢解析で検出された菌

16s rRNA 解析により，274 分類が検出された。

A： 細菌存在比率

洗口前（30 検体）と洗口 6 時間後（CPC と CFL+CPC の各 15 検体）の細菌種の
属レベルでの含有率を示す。

B： 検出された菌種

矢印（➡）は，A で対応する細菌（*Neisseria* 属）を示す。㊦ 数字付矢印（⇒）は，
洗口前と洗口後 6 時間の時点での存在比に有意差のあった細菌を示す。

C： 細菌叢のα多様性解析

洗口前と洗口 6 時間後（CPC と CFL+CPC）を比較した。箱ひげ図の横線は中央値
を，箱の下端と上端は第 1 四分位数および第 3 四分位数を，×は平均値を，ひげは四
分位数の 1.5 倍を示す。統計解析には Kruskal-Wallis test を用いた。

D： 洗口前と洗口後 6 時間の時点での存在比率に有意差があった 3 菌種

ミルレクチン含有洗口液 (CFL+CPC) によって洗口 6 時間後の細菌比率が有意に減少した *Saccharibacteria* 属と *Anaerovorax* 属で, そして有意に増加した *Parcubacteria* 属で, 細菌比率変化を示した。

箱ひげ図の横線は中央値を, 箱の下端と上端は第 1 四分位数および第 3 四分位数を, ×は平均値を, ひげは四分位数の 1.5 倍を, そして○は外れ値を示す (n = 15)。

統計処理には Wilcoxon's signed rank test を用いた。

図 7. 洗口直後および洗口 6 時間後の粘膜の変化

A : 洗口直後および洗口 6 時間後の粘膜を観察した 1 例

B : CPC 洗口直後を基準とした歯肉色調変化

CPC 洗口直後の全対象者の下顎中切歯歯間部歯肉の色調を基準とし, RGB 解析から, R/G 値にて比較検討した。

データは, 平均値と標準偏差を示す (n = 15)。統計解析には Kruskal-Wallis test を用いた。