

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-179268

(P2005-179268A)

(43) 公開日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K</b> 7/16	A 6 1 K 7/16	4 C 0 8 3
// <b>C 0 7 K</b> 7/08	C 0 7 K 7/08 Z N A	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-422472 (P2003-422472)	(71) 出願人	000181217 株式会社ジーシー 東京都板橋区蓮沼町76番1号
(22) 出願日	平成15年12月19日(2003.12.19)	(74) 代理人	100070105 弁理士 野間 忠之
		(72) 発明者	泉福 英信 神奈川県横浜市金沢区富岡西6-37-5
		(72) 発明者	鱒沢 諭美子 東京都板橋区蓮沼町76番地1号 株式会社ジーシー内
		(72) 発明者	岡田 淳一 東京都板橋区蓮沼町76番地1号 株式会社ジーシー内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 口腔用組成物

(57) 【要約】

【課題】 口腔内に使用する組成物として、対象とする菌に耐性を生じさせないものであって人体に安全且つ短時間で効果があり、更には口腔内のバイオフィーム形成には関係のない常在菌や唾液に作用しないバイオフィームの形成を有効に抑制することが可能な口腔用組成物を提供すること。

【解決手段】 下記のアミノ酸配列から成るペプチドを含むことを特徴とする口腔用組成物とする。

Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Ala Ala Tyr Gln Lys Glu Leu

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列から成るペプチドを含むことを特徴とする口腔用組成物。

## 【請求項 2】

配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列から成るペプチドを 0.001 ~ 20 重量 % 含む請求項 1 に記載の口腔用組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

本発明は、口腔内細菌の歯牙及び歯周組織への初期の付着を抑制する効果、即ち口腔内でのバイオフィーム形成を防止する効能を有する口腔用組成物に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

バイオフィームとは、細菌等の微生物が物や生体組織の表面に付着して増殖する際に、細菌自体が分泌する物質や沈澱物と共に菌体表面を覆ってしまう膜のことを示し、口腔内に於いてはプラーク（歯垢）がバイオフィームの代表的なものである。口腔内でのバイオフィームの形成は、唾液中の蛋白質等の有機成分がエナメル質表面に接触し、その一部がエナメル質に吸着することでペリクル（獲得被膜：acquired pellicle）が形成されるこ

20

## 【0003】

その後、唾液中の口腔内細菌が歯面近くに接近し、ペリクルと接触するとストレプトコッカス・サンゲイス菌等の口腔内細菌はこのペリクルに吸着し、一部の菌はそのままペリクル上に付着する。この付着した口腔内細菌は唾液中の栄養分等を利用してグルカンやフルクタンと呼ばれる粘着性のある多糖体により更に他の細菌等の接着等が生じることで強固なバイオフィームに発展していく。そしてバイオフィーム内の細菌は増殖を繰り返しながら酸を産生したりすることにより、う蝕や歯周病等を生じる要因となる。

## 【0004】

これらの問題を解決するために、様々な方法が研究されてきた。例えば、抗菌剤とその助剤としてキシリトールやファルネソール等のバイオフィーム抑制助剤を含む口腔用組成物として抗菌防黴助剤が提案されている（例えば、特許文献 1 及び 2 参照。）。しかしながら、これらの抗菌防黴助剤はバイオフィームの除去を主目的としているため抗菌剤の使用が不可欠である。この抗菌剤には耐性菌が生じてしまう問題が知られているばかりでなく、更に口腔内に存在する常在菌まで殺菌してしまうこともあるので口腔用組成物として利用するには限界があった。また、蛋白質を分解する酵素であるプロテアーゼ等を添加することが試みられた（例えば、特許文献 3 参照。）。しかし、プロテアーゼは酵素であるため効果が出るまでの時間が必要であったり、唾液に含まれる有益な蛋白質も分解してしまうこともあるという問題があった。更には、ストレプトコッカス・ミュータンス菌がグルカンを産生する時に分泌する酵素であるグルコシルトランスフェラーゼを抑制するモノクローナル抗体を添加することが試みられたが（例えば、特許文献 4 参照。）、一旦バイオフィームを形成してしまった口腔内細菌の増殖に対しての効果は殆ど得られず、またマウス由来のモノクローナル抗体を人の口腔内に適用することの安全性に於いても問題があった。

30

40

## 【0005】

【特許文献 1】特開 2002 - 302404 号公報

【特許文献 2】特開 2002 - 284604 号公報

【特許文献 3】特開平 6 - 262165 号公報

【特許文献 4】特開 2002 - 114709 号公報

## 【発明の開示】

50

**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

従って本発明は口腔内に使用する組成物として、対象とする菌に耐性を生じさせないものであって人体に安全で且つ短時間で効果があり、更には口腔内のバイオフィルム形成には関係のない常在菌や唾液に作用しないバイオフィルムの形成を有効に抑制することが可能な口腔用組成物を提供することを課題とする。

**【課題を解決するための手段】****【0007】**

本発明者らは前記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、バイオフィルムを形成する口腔内細菌を殺すのではなく細菌の口腔内組織への初期付着を抑制する物質を用いることによりバイオフィルムの形成を抑制することに着目し、特定のアミノ酸配列から成るペプチドがその効果を持つことを究明して本発明を完成した。

10

**【0008】**

より詳細に述べると、口腔内細菌の中で特にストレプトコッカス属の細菌は、ペリクルに覆われた歯面等の口腔内組織への初期付着が強いことが知られている。そして、これらの細菌の歯面上のペリクルへの付着が、更に他の細菌の付着する場を与えることでバイオフィルムが形成される。従ってストレプトコッカス属の口腔内組織への初期付着を抑制することが重要となる。例えば、ストレプトコッカス・ミュータンスの初期付着は、分子量約19万のPAc (Protein Antigen cerotype C) と呼ばれている細菌の表面に存在する蛋白質に依存していることが確認されている。

20

**【0009】**

このPAcのA領域を元に、初期付着に関する最も重要な部分に関して研究した結果、ストレプトコッカス・サンゲイス菌の表面上の蛋白質の中で配列表の配列番号1に示す特定のアミノ酸配列のペプチド(以下、SSP-5(390-402)と記す)部分がストレプトコッカス属の口腔内細菌の歯面への初期付着に直接関与していることを特定したのである。その結果、この特定のアミノ酸配列から成るペプチドを予め歯面等の口腔内に適用しておくこと、本来ならばストレプトコッカス属の口腔内細菌がこのアミノ酸配列のペプチド部分を利用して歯面に付着するところを先にこのペプチドで歯面上を覆ってブロックしているので細菌の初期付着を短期間で効果的に抑制することが可能であることを究明したのである。

30

**【0010】**

即ち本発明は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列から成るペプチドを含むことを特徴とする口腔用組成物である。

**【発明の効果】****【0011】**

本発明に係る口腔用組成物は、アミノ酸を用いているので従来の抗菌剤等と比較して生体に安全であり、歯面等に適用すると本来ならば細菌がこのアミノ酸配列のペプチド部分を利用して歯面に付着するところを先に歯面上を覆ってブロックしているので細菌の初期付着を短期間で効果的に抑制することが可能であり、更に口腔内のバイオフィルム形成には関係のない常在菌や唾液に全く作用しないバイオフィルム形成を有効に抑制することが可能な優れた口腔用組成物である。

40

**【発明を実施するための最良の形態】****【0012】**

本発明に係る口腔用組成物に用いる特定のアミノ酸配列から成るペプチド(SSP-5(390-402))を得るためには、このようなアミノ酸配列を得ることができる手法であれば特に限定されないが、一般的にはアミノ酸シンセサイザーを用いるのが便利である。ペプチドの合成に際しては上記アミノ酸配列内には余計なアミノ酸配列を有していないことが重要である。もし、余計なアミノ酸配列部位があると、本来のバイオフィルム形成を抑制する効果が得られなくなってしまう。勿論、効果を妨げない細菌の初期付着に対して非特異なペプチドであれば上記ペプチドの片端、あるいは両端に接続していてもかまわない。

**【0013】**

50

本発明に係るの口腔用組成物は、常法に従ってあらゆる形態で使用することができ、水やその他の人体に安全な溶媒に特定のアミノ酸配列から成るペプチドを単に配合して口腔用組成物としてもよいし、粉歯磨、練歯磨、液状歯磨等にも利用することができる。他の配合成分はペプチドの働きを阻害するものでなければ特に限定するものではなく、通常、従来から口腔用組成物に用いられる成分を自由に配合できる。具体的には、練歯磨であれば研磨剤、粘結剤、湿潤剤、甘味剤、香料、防腐剤、他の薬効剤等が適宜配合できる。

**【0014】**

より具体的には、粉歯磨であれば炭酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、シリカ微粉末、非晶質含水シリカ、疎水性シリカ、第2リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、ピロリン酸カルシウム、不溶性メタリン酸ナトリウム、水酸化アルミニウム、無水ケイ酸等の研磨剤に対して本発明に用いる特定のアミノ酸配列から成るペプチドを配合したり、練歯磨剤であれば、一般的には水やグリセリン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、ソルビット、キシリット、ラクチット、マンニトール、エタノール、乳酸ナトリウム等を基材として本発明に用いる特定のアミノ酸配列から成るペプチドを配合し、この基材に対して必要により前述の粉歯磨に用いた研磨剤を配合してもよい。

10

**【0015】**

また、他にも従来の歯磨組成物と同様に、スルホ脂肪酸アルキルエステル又はその水溶性塩、アルキル硫酸エステル塩、N-アシルアミノ酸塩等のアニオン界面活性剤、脂肪酸モノグリセリド、脂肪酸アルカノールアミド、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ショ糖脂肪酸エステル等の非イオン界面活性剤、アルキルベタイン、イミダゾリニウムベタイン、スルホベタイン等の両性界面活性剤、アルキルアミンオキシド等の半極性界面活性剤等の各種界面活性剤や、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸プロピレングリコールエステル、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、デンプングリコール酸ナトリウム、デンプンリン酸エステルナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、カルボキシポリメチレン、メチルセルロース、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、グァーガム、カジブピーンガム、タラガム、タマリンドシードガム、アラビアガム、トラガントガム、カラヤガム、アルギン酸、カラギナン、キサンタンガム、ジェランガム、カードラン、ラクトース、キチン、キトサン、キトサミン等の増粘剤を便宜配合してもよい。

20

30

**【0016】**

更に、モノフルオロリン酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、クロルヘキシジン塩類、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム等の殺菌剤、アラントイネート等抗炎症剤、リン酸ナトリウム、ピロリン酸ナトリウム、トリポリリン酸ナトリウム、テトラポリリン酸ナトリウム等のリン酸化合物、塩化ナトリウム等の無機塩類を薬効成分として配合したり、色素、保存剤等を含んでもよいことは言うまでもない。

**【0017】**

本発明に係る口腔用組成物は、以上述べたような種類の歯磨剤の他にも、マウスウォッシュ、チューインガム、うがい液、トローチ、クリーム、軟膏剤、貼付剤、錠剤(タブレット)の如き歯磨類や医薬品とすることができる。

40

**【0018】**

本発明に係る口腔用組成物において特定のアミノ酸配列から成るペプチドは、口腔用組成物中に0.001~20重量%配合することが好ましく、特に0.01~5重量%が好ましい。医薬品の場合であれば、内服の場合は成人1日当たりペプチド量として5~50mg、外用の場合はペプチド量として1回に1~数10mgの用量で有害な副作用無しにう蝕や歯周病の予防に用いることができ、歯磨類の場合は、これらの用量を勘案して常法に従って使用する。

**【実施例】****【0019】**

以下、実施例により本発明に係る口腔用組成物を具体的に説明するが、本発明は下記実

50

施例に制限されるものではない。

【0020】

<実施例1>

《ペプチドの合成》

SSP-5(390-402)のアミノ酸配列を持つペプチドをステップワイスの固相ペプチド合成法から得た。合成器には、Model 350 Multiple Peptide Synthesizer (Advanced Chemitech, Louisville, KY, USA)を使用し、TSK-GEL カラム(30×1)を用いた逆相のHPLC(10-45%アセトニトリルのグラジエントを0.1%TFA)にて行った。最終精製度は95%以上であることを上記の逆送HPLCを用いて確認した。

【0021】

《付着抑制能の確認》

<細菌の調整>

口腔内細菌として、*S. sanguis*(ATCC10556, ATCC10558), *S. mutans* (ATCC25175)を用いた。全ての細菌は、Brain Heart Infusion broth(BHI; Difco Laboratory, Detroit, MI)を培地として嫌気下で培養を行った。

【0022】

<唾液の調整>

3名の被験者(A~Cとする)がパラフィンワックスを3分間噛むことにより分泌される刺激唾液を検体とした。唾液検体は回収後、5分間4℃で静置し、それを4℃で10分間10000×gで遠心し上清を唾液検体とした。

【0023】

<センサーチップ>

歯牙の代用としてセンサーチップを用いて細菌の付着抑制能を確認した。センサーチップとしてはバイオニア センサーチップF1(BIAcore社製)を用いた。センサーチップF1は70μLの400mM N-ethyl-N'-(3-diaethylaminopropyl)carbodiimide と100mM N-hydroxy succinimide solution にて、1分間10μLのFlow rateで活性化した。次に、前述の唾液検体を20倍希釈したものの70μLでチップ上に唾液を結合させた(以後、唾液処理センサーチップと呼ぶ。)

【0024】

<付着抑制能の確認方法>

BIAcore™ Biosensor system (BIAcore社製)による付着抑制能の確認方法を説明する。まず、唾液処理センサーチップに対して各細菌をそれぞれ、O.D. = 1(550nm), Flow Speed 20μL/min.で流し、その後、細菌とペプチド処理無し時のセンサーチップ面の唾液との結合状態(Response Unit:RU)を測定した。

【0025】

次に細菌を付着させた唾液処理センサーチップとは別の唾液処理センサーチップに対して、リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)にて溶解したSSP-5(390-402)ペプチド溶液(1mg/mL)を流速10μL/min.でセンサーチップ上に流し、唾液処理センサーチップ表面をペプチドにて処理を行った。その後、各細菌をそれぞれO.D. = 1(550nm), Flow Speed 20μL/min.で流し、各々の細菌とセンサー面の唾液との結合状態(Response Unit:RU)を測定した。これらを下記式1を用いてペプチド処理による最終的な細菌の付着抑制率を求めた。その結果を表1に示す。

【0026】

【数1】

付着抑制率(%) = 100 × {[細菌と唾液との結合状態(RU)] - [細菌と唾液との結合状態(ペプチド処理後)(RU)]} / [細菌と唾液との結合状態(RU)]

【0027】

10

20

30

40

【表 1】

付着抑制率

Saliva sample	S. sanguis (ATCC10556)	S. sanguis (ATCC10558)	S. mutans (ATCC25175)
A	61%	59%	55%
B	57%	63%	60%
C	65%	61%	58%

10

## 【0028】

&lt;実施例 2&gt;

本発明に係る特定のアミノ酸配列から成るペプチドを含むことを特徴とする口腔用組成物として練歯磨剤を以下の組成で調整した。後述する試験により歯垢の付着抑制能を評価した。

炭酸カルシウム 40.0重量%

カルボキシメチルセルロースナトリウム 1.0重量%

グリセンリン 8.0重量%

ラウリル硫酸ナトリウム 1.5重量%

ソルビット 10.0重量%

メントール 0.3重量%

特定のアミノ酸配列から成るペプチド 1.0重量%

水 38.2重量%

20

## 【0029】

&lt;実施例 3&gt;

本発明に係る特定のアミノ酸配列から成るペプチドを含むことを特徴とする口腔用組成物としてタブレット状の口腔用組成物を以下の組成で調整した。後述する試験により歯垢の付着抑制能を評価した。

ラクトース 65重量%

結晶セルロース 26重量%

ステアリン酸マグネシウム（滑沢剤） 4重量%

キシリトール 3重量%

特定のアミノ酸配列から成るペプチド 2重量%

30

## 【0030】

実施例 2 の口腔用組成物の効果を以下の方法で確認した。被験者 3 名（A～C とする）の歯面を歯科医院で洗浄研磨してもらい、この 3 名の被験者各々の口腔内左片側のみを実施例 2 に係る歯磨剤で 1 日 3 回食後に歯磨きをしてもらい、更に口腔内右側のみを実施例 2 の特定のアミノ酸配列から成るペプチドの代わりに水を配合した歯磨材にてブラッシングしてもらい、1 週間後に口腔用染色材（商品名：プロスペックジェル，株式会社ジーシー製）による染め出し法により左右の歯垢の量を目測にて比較した。結果を表 2 に纏めて示す。

40

## 【0031】

【表 2】

被験者	口腔内左側	口腔内右側
A	歯垢は殆ど染め出されない。	歯垢が僅かに赤く染まり確認可能。
B	歯垢は殆ど染め出されない。	歯垢が僅かに赤く染まり確認可能。
C	歯垢は殆ど染め出されない。	歯垢が僅かに赤く染まり確認可能。

50

## 【0032】

実施例3の口腔用組成物の効果を以下の方法で確認した。被験者3名(D~Fとする)の歯面を歯科医院で洗浄研磨してもらい、この被験者3名各々に歯磨剤無しで1日3回歯磨きをしてもらい1週間後に前述の方法と同様にして染め出し法で歯垢の量を確認した。その後、再び被験者3名の歯面を歯科医院で洗浄研磨し、食後に歯磨剤無しで1日3回歯磨きしてもらい、その後1日3回実施例3に係るタブレット状の口腔用組成物を食してもらった。1週間後に再び口腔用染色材(商品名:プロスペックジェル,株式会社ジーシー製)による染め出し法により歯垢の量を確認した。結果を表3に纏めて示す。

## 【0033】

## 【表3】

10

被験者	口腔用組成物無し	口腔用組成物あり
D	歯垢が僅かに赤く染まり確認可能。	歯垢は殆ど染め出されない。
E	歯垢が僅かに赤く染まり確認可能。	歯垢は殆ど染め出されない。
F	歯垢が僅かに赤く染まり確認可能。	歯垢は殆ど染め出されない。

## 【配列表】

[2005179268000001.app](#)

## 【手続補正書】

【提出日】平成17年2月9日(2005.2.9)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0008】

より詳細に述べると、口腔内細菌の中で特にストレプトコッカス属の細菌は、ペリクルに覆われた歯面等の口腔内組織への初期付着が強いことが知られている。そして、これらの細菌の歯面上のペリクルへの付着が、更に他の細菌の付着する場を与えることでバイオフィルムが形成される。従ってストレプトコッカス属の口腔内組織への初期付着を抑制することが重要となる。例えば、ストレプトコッカス・ミュータンスの初期付着は、分子量約19万のPAc(Protein Antigen serotype C)と呼ばれている細菌の表面に存在する蛋白質に依存していることが確認されている。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0014】

より具体的には、粉歯磨であれば炭酸カルシウム, ケイ酸カルシウム, シリカ微粉末, 非晶質含水シリカ, 疎水性シリカ, 第2リン酸カルシウム, ピロリン酸カルシウム, 不溶性メタリン酸ナトリウム, 水酸化アルミニウム, 無水ケイ酸等の研磨剤に対して本発明に用いる特定の amino acid 配列から成るペプチドを配合したり、練歯磨剤であれば、一般的には水やグリセリン, エチレングリコール, ジエチレングリコール, ポリエチレングリコール, プロピレングリコール, ポリプロピレングリコール, ソルビット, キシリット, ラクチット, マンニトール, エタノール, 乳酸ナトリウム等を基材として本発明に用いる特定の amino acid 配列から成るペプチドを配合し、この基材に対して必要により前述の粉歯磨に用いた研磨剤を配合してもよい。

---

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C083 AB322 AC122 AC132 AC242 AC782 AD212 AD262 AD272 AD411 AD412  
AD532 CC41 DD15 DD22 EE33  
4H045 AA10 BA16 CA11 DA50 EA25 FA34 GA25