

抗う蝕作用

福島和雄

(日本大学松戸歯学部教授)

・はじめに

虫歯と俗称されている「dental caries」は、口腔に常在する *Mutans streptococci* と呼ばれる一群のレンサ球菌により歯という人体で最も硬い組織が侵される特異な内因感染症で、歯周病とともにヒトが歯を失う二大原因の一つである。永年にわたる数多くの研究者、臨床家の努力によって原因菌の特定と病因論の追求が進み、歯科医療技術の著しい進歩と保健衛生意識の向上とが相まって、近年、う蝕罹患歯数の漸減傾向が認められている。しかし、現在でもなお国民の九〇%以上に発症して健康や生活に多大な影響を与え続けており、高リスク者を的確に選別するための診断法や、歯磨きに替わり得るような有用な科学的予防法の開発が囑望されている。

この本菌群の中でヒトの口腔に棲息する主な菌種は *S. mutans* と *S. sobrinus* である。筆者らはここ十数年来、これら菌種の主要病原因子である Glucosyltransferase (以下 GTF) の構造と機能に

関する分子生物学的研究を続けてきた結果、最近、う蝕発症に最も重要と思われる *S. mutans* と *S. sobrinus* の GTF をほぼ特定できた。

現在、それら最重要 GTF をターゲットとした新しい診断・予防法の開発研究を多面的に押し進めている。本研究はその一環として、有用な天然抗う蝕剤を開発すべく、古くから抗う蝕作用が知られているカカオ豆成分のう蝕抑制効果を、最新のう蝕病因論のもとに再検討したものである。

ここではまず前半で、現代におけるう蝕病因論を私見を交えて解説させていただき、後半でカカオ抽出物の抗う蝕作用に関する知見を紹介したい。なお、*Mutans streptococci* の細菌学的性状、病原因子、およびう蝕発症機序の詳細については文末に記した参考文献¹⁾²⁾³⁾を参照していただきたい。

・う蝕の病因菌と主要病原因子

う蝕の原因菌である *Mutans streptococci* は、複数種の GTF を菌体外および菌体表面に産出し、飲食物中のショ糖を基質として非水溶性と水

表1 Classification of Mutans Streptococci

Species	GC-content mol%	Serotype	Aerobic Growth	Bacitracin
<i>S. cricetus</i>	42-44	a	-	+
<i>S. rattus</i>	41-43	b	+	-
<i>S. mutans</i>	36-38	c, e, f	+	-
<i>S. ferus</i>	43-45	c	-	+
<i>S. macacae</i>	35-36	c	-	+
<i>S. sobrinus</i>	44-46	d, g	+	-
<i>S. downei</i>	44-46	h	-	+

溶性の α -グルカンを多量に合成する能力をもつ。この非水溶性グルカン (WIG) は α -1, 3 鎖と α -1, 6 鎖からなる高分子量の粘性多糖で、本菌のみならず各種の口腔細菌を菌面等の平滑面に付着・蓄積させる作用を持っており、水溶性のグルカン (以下 WSG) による菌体凝集作用も加わって、それら多糖をマトリックスとした密で強固なう蝕誘発性の菌垢が歯面上に形成される。耐酸性の本菌群と拡散障壁となる WIG に富むう蝕誘発性菌垢内では多量の酸 (乳酸等) が代謝産物

表2 Characteristics of 7 GTFs from *S. mutans* and *S. sobrinus*

Species	GTF	MW (kDa)	pI (pH)	Activation by dextran (fold)	Main product from sucrose	Main linkage in glucan	Gene
<i>S. mutans</i>	GTF-I*	158	-	1~3	High-MW WIG	α -1,3	<i>gtfB</i>
	GTF-SI*	140	-	2~6	High-MW WIG	α -1,3	<i>gtfC</i>
	GTF-S	155	-	6~8	High-MW WSG	α -1,6	<i>gtfD</i>
<i>S. sobrinus</i>	GTF-I	171	4.8	>100	High-MW WIG	α -1,3	<i>gtfI</i>
	GTF-S ₁	176	4.0	2.7	High-MW WSG	α -1,6 α -1,3,6	<i>gtfU</i>
	GTF-S ₂	158	5.8	0	High-MW WSG	α -1,6	<i>gtfT</i>
	GTF-S ₃ *	140	6.1	0	Low-MW WSG	α -1,6	<i>gtfS</i>

* Recombinant GTFs from *S. milleri* or *E. coli* transformants.

として産生・貯留され、その結果歯垢内の水素イオン濃度が五・四・五・六（歯質が溶け出す臨界

pH）以下に長時間低下するため、直下の歯質が酸により脱灰（溶解）され、う蝕が発生する。

現在、本菌群は、表1に示すように、七菌種八血清型に分類されている。本菌群中ヒトの口腔に棲息する菌種は *S. mutans* と *S. sobrinus* の二菌種であり、中でもc血清型の *S. mutans* が最も高頻度（ $\sim 80\%$ ）に、次いでd血清型の *S. sobrinus*（ $\sim 10\%$ ）が、口腔から分離される。*S. mutans* は二種のWIG合成酵素（GTF-Iおよび-SI）と一種のWSG合成酵素（GTF-S）の計三種のGTFを、*S. sobrinus* は一種のWIG合成酵素（GTF-I）と三種のWSG合成酵素（GTF-S₁、-S₂および-S₃）の計四種のGTFを菌体外および菌体表層に産生し、それぞれ異なる機序でう蝕誘発性歯垢の形成を行うと考えられている。表2に、それら七種のGTFの一般性状をサマライズして示した。GTF遺伝子はすでに両菌種染色体からすべて分離されており、現在、遺伝子サイドからの発症機序の追求が進められている。

S. sobrinus によるう蝕誘発性歯垢の形成機序に関しては、酵素精製が比較的容易なこともあって、著者らを含む多数の研究者により古くから追求がなされ、GTF-IとGTF-Sの協同作用による *De novo* の粘着性WIG (ad-WIG) 合成の重要性が示唆されている。その一例としてB13N株から純化したGTF-IとGTF-S₂酵素を用いて著者らが行った再構成実験の結果を表3に示す。

表3 Glucan synthesis by a cooperative action of GTF-I and GTF-S₂ enzymes purified from culture fluids of *S. sobrinus* strain B13N.

Reconstruction system			Glucan formed after 18 h reaction *		
GTF-I (μ g)	GTF-S ₂ (μ g)	S ₂ /I Ratio	ad-WIG (mg)	non-ad WIG (mg)	WSG (mg)
0.5	0.0	0.00	0.01	0.05	0.00
0.5	0.05	0.10	0.14	0.89	0.00
0.5	0.125	0.25	2.96	0.02	0.01
0.5	0.25	0.50	6.05	0.02	0.18
0.5	0.375	0.75	0.24	6.65	1.23
0.5	0.5	1.00	0.06	8.46	1.96
0.5	0.75	1.50	0.09	6.74	4.29

S. sobrinus のGTF-I酵素は、*S. mutans* のものと異なり、 α -1,6グルカン（デキストラン）をプライマーとして絶対的に要求するタイプのWIG合成酵素で、単独では反応初期にごく微量の非粘着性WIG (non-ad WIG) を合成するの

みである。GTF-S₂酵素を共存させた系では著明なWIG合成が惹起し、○・二五〇・五のS₂/Iモル比の再構成系で合成されるWIGはほとんどがガラス壁付着性となる。ad-WIG合成に最適なモル比は約〇・四である。GTF-S₂のみならずGTF-S₁および-S₃もまたWIG合成のプライマー供給系として働き得るが、その作用はGTF-S₂が最も強く、GTF-S₁、GTF-S₃の順である。

古くから、変異剤処理で得た各種の *Mutans streptococci* 変異株のう蝕誘発能を比較して主要病原因子を明らかにしようとする試みが数多く行われている。その結果として、水に不溶な菌体外WIGをシヨ糖から合成しそれを介して平滑歯面上に固着できる本菌群の能力が注目され、それを基幹とする現在のう蝕病因論が確立された。*S. sobrinus* に関してはとくにad-WIG合成能の重要性が指摘されており、筆者らもまた、変異剤処理後のB13N株から分離したGTF-I欠損変異株がad-WIG合成能と人工菌垢形成能をまったく欠き、かつラットに対するう蝕誘発能も低いことを見出している。かくして、*S. sobrinus* の最も重要な病原因子は、WSGの α -1、6グルカン鎖に α -1、3グルカン鎖を伸長させて水溶性のWSGを粘着性で非水溶性のad-WIGに変える作用を持つGTF-I酵素(*gtfI* 遺伝子産物)である、ということができよう。

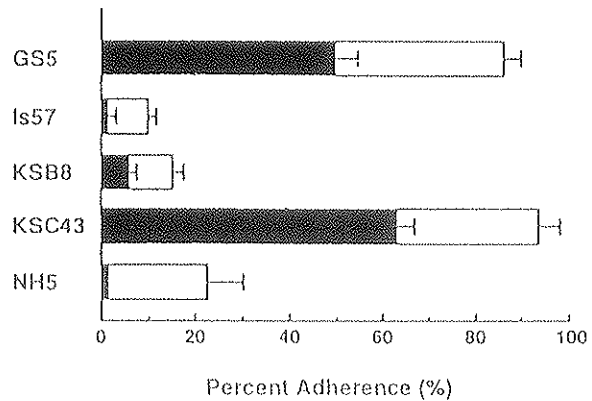


図1 Sucrose-dependent colonization tests of three transformants and reference strains.

Each cell was grown at 37°C at a 30° angle for 20 hr in BHI broth supplemented with 5% sucrose, the firm-adherent and loose-adherent cells were separated by a Vortex treatment (10 sec), and quantitated turbidimetrically.

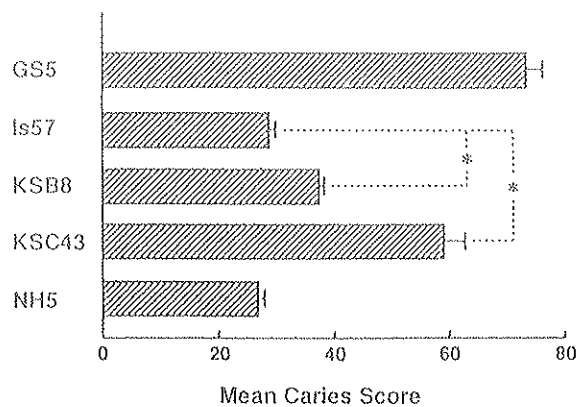


図2 *In vivo* cariogenicity test with gnotobiotic rats.

Germ-free WA rats were mono-infected with three transformants and reference strains, fed with diet 2000 for 40 days, and mandibular mean caries score was evaluated by the method of KEYES. Significance of difference: * $p < 0.01$.

一方、酵素の分離精製が困難であった *Mutans* 株の菌垢形成機序についてはまだ十分に解明が進んでいないが、最近筆者らが行った以下に紹介する遺伝子工学研究の結果からは、GTF-SI酵素(*gtfC* 遺伝子産物)の重要性が強く示唆される。*S. mutans* GS5株由来の *gtfB*、*gtfC*、*gtfD* の各遺伝子をGTF非産生性の口腔レンサ球菌 *S. milleri* Is57株に導入して *gtfB* 発現株KSB8、*gtfC* 発現株KSC43および *gtfD* 発現株NH5の三形質転換株を作出し、それらの *In vivo* および *In vitro* う蝕誘発能を比較検討した。図1は人工菌垢形成能テスト、すなわち5%シヨ糖加液体

培地に一夜培養後、試験管壁に付着増殖した菌体を、非付着菌体、バイプレーター処理で離脱する弱付着菌体、離脱しない強付着菌体に分けて濁度測定し、各菌株の%付着率を算出、比較した結果である。

GTF-SI発現株であるKSC43株はGS5株と同様に壁に強く付着するのに対し、GTF-IおよびGTF-S発現株であるKSB8株とNH5株の付着能はいずれも微弱である。唾液でコートした試験管を用いても同様の結果が得られる。図2は、三種の *S. milleri* 形質転換株のラットに対するう蝕誘発能をGS5株およびNH5株のそれと

比較した結果である。

形質転換株と対照株の五菌株を単独感染させたノトバイオートラットをう蝕誘発食 (Diet200) で四〇日間飼育後、各感染群の下顎の総う蝕スコアを $\Sigma\%$ の方法で測定した。GS5株感染ラット群のそれには及ばないものの、三種の形質転換株の中でKSC43株を感染させたラット群のう蝕スコアが最も高く、次いでKSB8株感染ラット群であり、いずれもIsot株感染ラット群のスコアとの間に一%危険率で有意差が認められた。なお、部位別に見ると平滑面および咬合面のう蝕スコアはKSC43株感染ラット群が高く、頬側面のう蝕スコアはKSB8株感染ラット群が高い。これらの結果は、GTF-SI酵素またはGTF-III酵素の単独作用でもう蝕が誘発されること、*S. mutans* によるう蝕発症には *gtfC* 遺伝子産物 (GTF-SI酵素) が最も重要であること、を強く示唆している。

ところで、*S. sobrinus* と *S. mutans* のいずれが本疾患の発症により深く関わっているのであろうか。分離頻度の高さから *S. mutans* のほうがより重要との見解が常識的であり、これまでの診断・予防法に関する研究はそれを前提として進められてきた。しかし、筆者らが最近行った高う蝕者と無う蝕者からの菌の分離同定実験の結果や、Kobayashiらの疫学研究結果は、*S. sobrinus* の重要性を強く示唆するものである。すなわち、四五〇名の

大学生から高う蝕者 (現在および過去にう蝕に罹患した歯の数が二八本中一六本以上ある者) 一〇名と無う蝕者 (罹患経験ゼロの者) 一一名を選別し、彼らの口腔から *Mutans streptococci* を分離して厳密に菌種同定を行った結果、*S. mutans* は無う蝕者一名を除く全員から検出されたが、*S. sobrinus* が検出されたのは高う蝕者五名のみからであった。しかも、両菌種を保有する人の *Mutans streptococci* のレベルは *S. mutans* のみを保有する人のそれより有意に高かった。スウェーデン人小児を対象としてKöhlerらが行った疫学調査の結果も、両菌種を保有している群は一菌種のみ保有する群よりう蝕罹患率が有意に高いことを示している。また、*S. sobrinus* の酸産生能は *S. mutans* のそれより強いことを示唆する結果も二〇三報告されている。したがって、*S. sobrinus* のう蝕発症との関連性は *S. mutans* のそれと同等またはそれ以上と考えるべきかもしれない。しかしながら、どちらの菌がより重要かという問いに正しく答えるためには、菌種構成に加え分離菌株の病原性の強弱に立脚したより詳細な検討が不可欠である。何となれば、筆者らは最近、*S. mutans* の三種のGTFを識別する特異単クローン抗体を用いてヒト口腔から新鮮分離した *S. mutans* 株のGTF-SIとGTF-III産生能が菌株ごとに異なる事象を見出しており、また実際に、ラットに対するう蝕誘発能が新鮮分離株間で大きく異なる事

実もいくつか報告されている。

・カカオ抽出物のう蝕抑制効果

上述したようなう蝕病因論に立脚した新しいう蝕の予防手段を開発すべく、菌垢形成抑制剤の検索、単クローン抗体使用の受動免疫、多価ペプチドワクチンの開発研究など、いくつかの細菌サイドからのアプローチを試みている。その中で、予防法の一つとしてすぐにも実用化可能なものに、*S. sobrinus* のう蝕誘発能に対してとくに強い抑制作用を示すカカオ豆成分が挙げられる。以下に、*S. sobrinus* B13Z株 (d血清型) のGTF系に及ぼすカカオ豆水抽出物等の抑制効果に関する *in vitro* および *in vivo* 実験の結果を供覧しよう。

本研究の供試サンプルであるカカオ豆熱水抽出物粉末 (カカオエキスパウダー、明治製菓) からの水抽出物CEPWS、その高分子画分CEPWS-Hおよび低分子画分CEPWS-Lの調製法を図3に示した。また、限外ろ過膜処理により得られた高分子画分CEPWS-Hの化学組成を表4に示した。このものは、主として糖 (四〇%)、蛋白質 (二九%)、ポリフェノール (一九%) からなる分子重一万以上の高分子物質である。

まず、カカオエキスパウダーから調製した三標品の *S. sobrinus* B13Z株のWIG合成活性に対する阻害効果を、すでに抗う蝕剤として商品化されている三種のGTF阻害剤のそれと比較してみ

た。図4は、B13N株培養上清の五〇%エタノール沈澱画分(粗酵素、五・二mU)、一〇〇mM酢酸緩衝液(pH五・五)、五〇mMシヨ糖からなる反応系に、各種濃度になるようCEPWS、CEPWS-L、CEPWS-H、サンフェノン(太陽化学)、サンウーロン(サントリー)、またはムタステイン(合同酒精)を添加して三七℃下で一六時間反応させ、生成されたWIGをフェノール硫酸法にて定量した結果である。CEPWSの阻害効果はムタステインのそれと同等で、サンフェノンやサンウーロンのそれより若干低かった。しかし、その高分子画分CEPWS-Hの阻害能はいずれのもの

より勝り、五〇%阻害を引き起こすCEPWS-H濃度(μg/ml)は〇・二μg/mlと最低値を示した。また、データとしては示さないが、図4の系より酵素濃度を一〇倍高めたWIG合成系では、CEPWS-HのみならずCEPWSもサンフェノンやサンウーロンより強い阻害能を発揮した。

図5は、B13N株培養上清より精製したGTF-I、GTF-S₁およびGTF-S₂純化標品のグルカシン合成活性に対するCEPWS-Hの阻害効果を調べた。次に、GTF-IとGTF-S₂の共同作用による

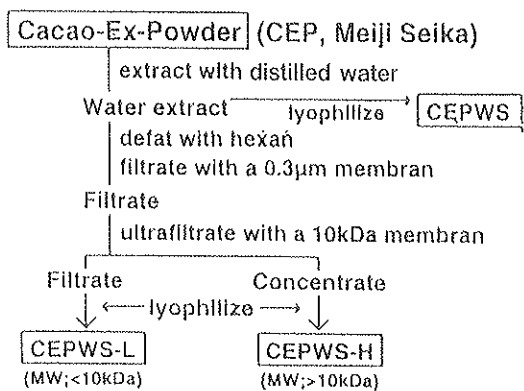


図3 Preparation of CEPWS, CEPWS-L and CEPWS-H

表4 Chemical Composition of CEPWS-H

Component (Method)	Content (%)
Moisture	8.6
Ash	6.8
Protein (Kjeldahl)	19.2
Carbohydrate (Phenol-H ₂ SO ₄)	39.9
Polyphenol (Folin)	19.4
Others	6.1
Caffeine (HPLC)	70 mg/100g
Theobromine (HPLC)	170 mg/100g
Catechin (HPLC)	1.9 mg/100g
Epicatechin (HPLC)	0.71 mg/100g

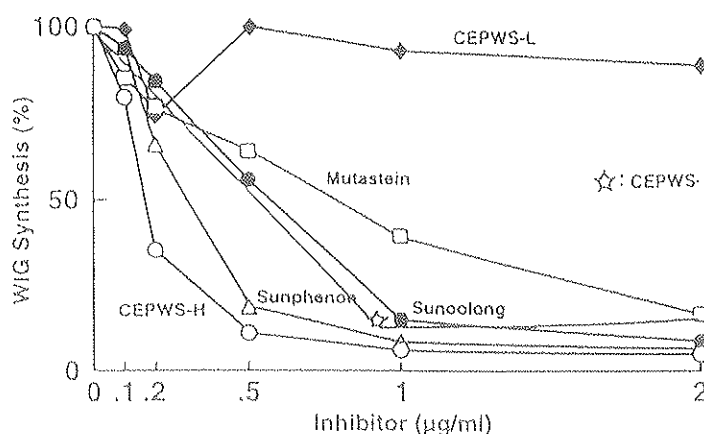


図4 Inhibitory Effects of CEPWS, -H, -L, and Three Known Inhibitors on WIG synthesis by Crude GTFs from *S. sobrinus* B13N

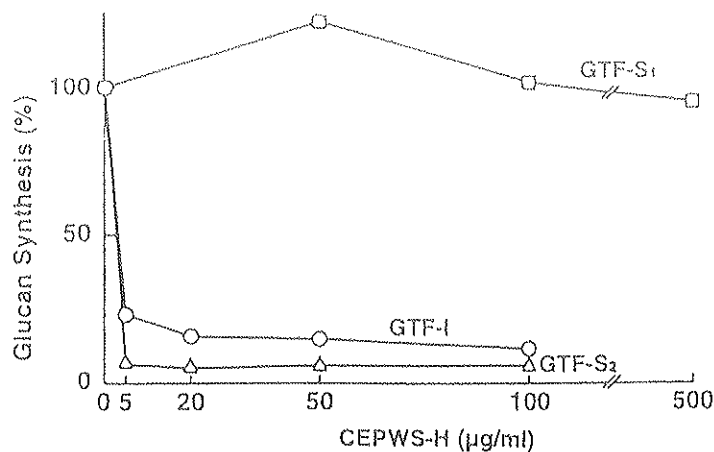


図5 Inhibitory Effects of CEPWS-H on Glucan Synthesis by Purified GTFs from *S. sobrinus* B13N

粘着性WIG合成とそれを介したガラス管壁への菌体付着に及ぼすCEPWS-Hの阻害効果を調べてみた。CEPWS-Hは、純化酵素GTF-IとGTF-S₂の再構成系(S₂/Iモル比10・三三)におけるシヨ糖からの粘着性WIG合成を濃度依存的に抑制し、その抑制率は100ug/ml以上の濃度において顕著(九五%)であった。CEPWS-Hはまた、同再構成系によるシヨ糖依存性菌体付着に対しても強い抑制作用を示した(図6)。

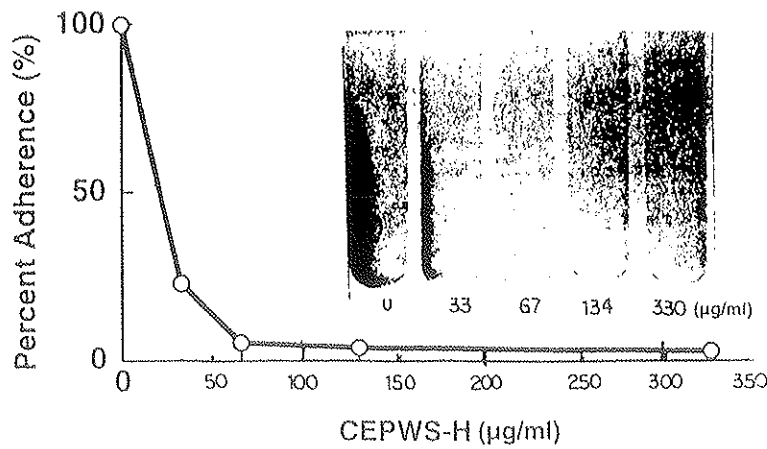


図6 Inhibitory Effect of CEPWS-H on Cellular Adherence by Combined Action of GTF-I and GTF-S₂ from *S.sobrinus* B13N

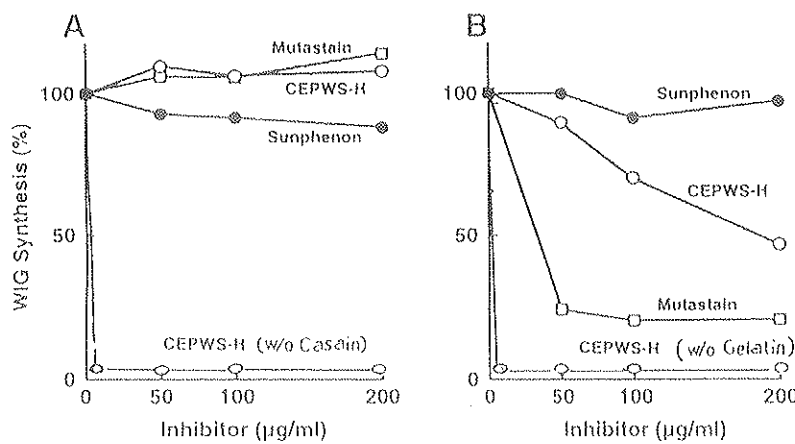


図7 Reduction of The Inhibitory Effects (WIG Synthesis) by Addition of 0.1% Casain (A), 0.1% Gelatin (B)

表5 Composition of Diets

Component	%
Diet*	
Sucrose	35
Corn starch	24.5
Corn oil	6
Minerals	3.5
Vitamins	1
Cellulose	4.8-5
CEPWS-H	0-0.2
Albumine**	25

*protein-free
** adminl. by sonde

方法で数値化し比較した結果である。○・○二%および○・二%濃度にCEPWS-Hを添加した飼料で飼育したラット群のう蝕スコアは無添加飼料飼育

したものに○・二%になるようCEPWS-Hを添加した表5に示すようなう蝕誘発飼料を調製し、それを用いて*In vivo*におけるCEPWS-Hのう蝕抑制効果を動物う蝕実験により調べてみた。表6は、ストレプトマイシン耐性(SAT) *S.sobrinus* 6715株(血清型g)を感染させた二日齢のSPFラットを、CEPWS-H添加あるいは非添加のう蝕誘発飼料を経口的に与え、必要量のアルブミンを毎日一回ゾンデで経胃投与して五七日間飼育後、下顎に発生したう蝕程度をKeysの方法で数値化し比較した結果である。○・○二%および○・二%濃度にCEPWS-Hを添加した飼料で飼育したラット群のう蝕スコアは無添加飼料飼育

阻害剤Freeの場合、バイブレーター処理(三秒)後においても添加したB13N株加熱死菌体(乾重二mg)の七六%がガラス管壁へ付着残存したが、CEPWS-Hが共存する系では濃度依存的な残存菌体量(付着率)の急減が認められた。図6中の写真は、反応試験管壁に付着残存した菌体をメチレンブルーで染色したものが、100ug/ml以上の添加系では付着菌体はまったく認められない。なお、菌体付着のC₅₀は約200ug/mlであった。

CEPWS-HのWIG合成活性に対する阻害作用や菌体付着に対する抑制作用は、反応系にタンパク質や唾液が高濃度に存在すると著しく減弱された。また、ムタステイン、サンフェノン、およびサンウィロンにおいても同様の減弱現象が認められた。その一例として図7に、○・一%濃度のカゼインとゼラチン共存下における粗GTF標品のWIG合成活性に対するCEPWS-H、ムタステインおよびサンフェノンの阻害挙動を示した。そこで、Diet 3000の組成からカゼインを除去

表6 Caries Scores of SPF Rats Infected with *S.sobrinus* 6715 and Fed with Diets with 0~0.2% CEPWS-H for 57 Days

Diet with	Infection with	Number of rat	Mean caries score ^a (mandible)	Inhibition %
0.0% CEPWS-H	None	5	21.8±2.8	—
0.0% CEPWS-H	6715 (SM ¹)	5	61.8±2.8	—
0.02% CEPWS-H	6715 (SM ¹)	7	38.6±1.5 ^b	58
0.2% CEPWS-H	6715 (SM ¹)	7	36.6±2.8 ^b	69

^a Evaluated by Keyes method and expressed as mean ± SE
^b p<0.01

のラット群のそれよりいずれも有意に低く、SE PWS-Hに*S. sobrinus*のラットに対するう蝕誘発能を抑制する効果があることが判明した。なお、無添加飼料で飼育した感染および非感染のコントロールラット群のスコアとの比較から、う蝕抑制率はそれぞれ五八%、六九%と算出された。

まとめ

以上の結果から、カカオ豆熱水抽出物中の高分

子画分CEPWS-Hは、筆者らがう蝕発症の原因因子として最も重要視している*S. sobrinus*のGTF-1とGTF-5₂の両活性を強く阻害し、シヨ糖からのad-WIG合成、それを介した平滑面への菌体付着、さらには本菌のラットに対するう蝕誘発作用をいずれも有意に抑制することが明らかとなり、同標品の抗う蝕性素材としての有用性が強く示唆された。

なお、*S. sobrinus*の酵素系ほど著明ではないものの、CEPWS-Hはもう一種のう蝕原因菌*S. mutans*のWIG合成系に対しても阻害的に働く。本標品は、糖、蛋白、ポリフェノールを主成分とする分子量一万以上の高分子物質で、その阻害活性は活性炭処理、加熱処理、プロテアーゼ処理等では影響されないが、反応系に蛋白や唾液が高濃度に共存すると著しく減弱される。この減弱現象は既存のポリフェノール系阻害剤ムタステイン、サンフェノンおよびサンウーロンにおいても認められた。サンフェノンの阻害作用を担う本体はあ

る種のポリフェノール重合体であることが示唆されている。したがって、カカオ抽出物中の阻害物質もまたサンウーロンのもとと類似した構造のポリフェノール化合物である可能性が考えられる。筆者らの共同研究グループでは、現在、CEPWS-H中の有効成分の分離と構造・機能特性の解明、う蝕抑制効果が減弱せずに持続化できるような技法・用法の開発など、実用化に向けての努力を鋭意続けている。

参考文献：

- 1) Loesche, W. J. : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbial. Rev., 50 : 353-380 (1986).
- 2) 浜田茂幸：ニュートンスレンサ球菌 (*mutans streptococci*) の細菌学的性状とヒルレンス因子、医学細菌学四巻、葉根出版 p二七—三二四 (一九八九)。
- 3) 福島和雄： *Streptococcus mutans* 群 Glucosyltransferase の分子生物学—虫歯発症機序の解析—、応用糖質科学 第四巻 第二号 p一五七—一六七 (一九九五)。