

カカオ豆熱水抽出物の抗う蝕作用

福島 和雄

(日本大学・松戸歯学部)

虫歯病因論の概略

図1は虫歯病因論の概略を示したものである。詳細は、先の今井先生のお話にもあり、また昨年の本シンポジウムでも述べたので、ごく簡単に触れるだけにする。

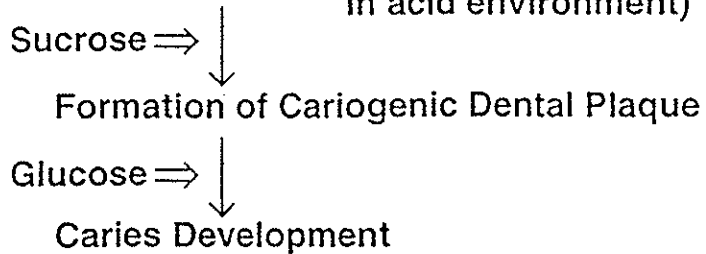
昨年の第一回シンポジウムにおいて、カカオエキスパウダーの熱水抽出物(CEPWS)に、虫歯の原因菌 *Streptococcus sobrinus* (以下、ソプリヌス菌)の主要な病原因子である glucosyltransferase (以下、GTF) 活性を阻害し、その菌を感染させたラットの虫歯発生を有意に抑制する作用があることを報告した。今回は、チョコレートタイプの改良飼料を用いてラットに対するCEPWSの虫歯抑制効果を調べた結果と、CEPWS中の有効成分を部分精製し若干の性状を調べた結果につき報告する。CEPWSの阻害作用は特異的で、ソプリヌス菌が産生する四種のGTFのうちI酵素とS₂酵素と呼ばれる二種のグルカン合成活性を特異的に阻害する。そこで、I酵素とS₂酵素が虫歯の発症にいかに重要な働きをしているかについて前半で少しお話ししてから、本題に入りたいと思う。

虫歯は、ミュータンスレンサ球菌群 (*mutans streptococci*) と総称される一群の口腔常在性のレンサ球菌による細菌感染症である。本菌群はシヨ糖から粘着性で非水溶性のグルカンを合成する能力と酸性環境下で乳酸等の酸をつくる能力を持ち、シヨ糖が存在すると歯面上に付着集積し、虫歯を誘発する作用の強い歯垢(プラーク)を形成する。虫歯誘発性のプラークを持つ人が頻繁にブドウ糖や果糖、シヨ糖などの発酵基質を接種すると、酸が大量にプラーク内に産生貯留され、その酸により菌をつくっているハイドロキシアパタイトが溶かされて、虫歯が発生することになる。

シヨ糖を添加した培地に菌を吊してミュータンスレンサ球菌群の菌を植えると、菌は粘着性グル

Cariogenic Factors of Mutans Streptococci

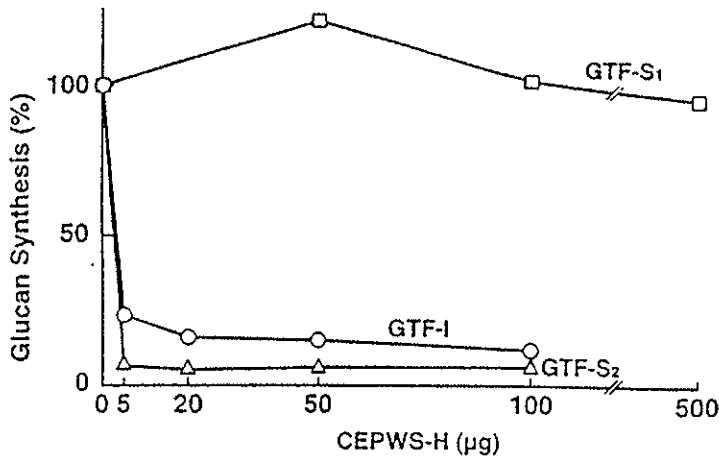
- ☆ Adhesive-WIG Synthesis
- ☆ Acid Resistance (Lactate production in acid environment)



カン合成を介して歯に付着して増殖し、人工プラークと称する菌の集積物を形成する。

このような人工プラークを形成する能力を持つミュータンスレンサ球菌群の仲間には七菌種が知られているが、人の口腔から検出されるのはミュータンス菌とソプリヌス菌の二菌種のみである。ミュータンス菌は大多数の人の口腔から検出されるのに対し、ソプリヌス菌が検出されるのは一〇名中一ないし三名程度である。この検出頻度の違

いから一般にミュータンス菌が重要視されているが、昨年のシンポジウムで紹介したように、最近の疫学研究の結果は、ソプリヌス菌がミュータンス菌に優るとも劣らず重要であることを強く示唆している。なお、このソプリヌス菌は、従来、d/g血清型の *S. mutans* と呼ばれていたもので、虫歯の病因論研究において中心的な役割を果たしてきた古くからよく知られている菌である。



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

図 2

虫歯誘発性のプラーク形成

ミュータンス菌は、GTF-I、GTF-SI という二種の非水溶性グルカン (WIG) を合成する酵素と GTF-S という水溶性のグルカン (WSG) を合成する酵素の計三種の *glucosyltransferase* を、ソプリヌス菌は、GTF-I という WIG 合成酵素と GTF-S₁、S₂、S₃ という三種の WSG 合成酵素の計四種の *glucosyltransferase* を菌体外に産生分泌し、異なる機序で虫歯誘発性のプラークをつくると考えられている。ソプリヌス菌の四種の GTF のうち最も重要な GTF は I 酵素であり、次いで重要なものが S₂ 酵素である。

ソプリヌス菌が産生する主要な GTF 三種は次のように分離精製できる。B13N 株培養上清のエタノール分画物を DEAE Bio. Gel A カラムに供し食塩の濃度勾配で溶出させると、S₂ 酵素、I 酵素、S₁ 酵素の順に出てくる。各ピークを再クロマトするとそれぞれの酵素が分離される。S₃ 酵素の産生量は微量なためピークとしては検出できないが、S₂ のピークと I のピークの間マイナー成分として溶出することが最近わかつている。なお、S₂ 酵素はショ糖から分岐の少ない高分子量の α-1, 6 グルカンで、S₁ 酵素は高分子の分岐度のきわめて高い α-1, 6 グルカンで、S₃ 酵素は低分子量の直鎖状の α-1, 6 グルカンで合成する WSG 合成酵素で、それらがつくる 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、それを水に溶けない WIG にする酵素が I 酵素です。

このようにして純化した I 酵素の一定量にいろいろな割合で S₂ 酵素と S₁ 酵素を添加した反応系で、どのような WIG 合成と粘性 WIG 合成が起きるかを調べてみた。反応試験管の管壁に付着し洗浄操作で離れない WIG を粘性 WIG として評価した。バーの全体の長さは生成された総 WIG 量を、そのうちの白抜き部分の長さは管壁に付着した粘性 WIG 量を示している。これより、総 WIG および粘性 WIG の合成に最適な酵素の組み合わせは I 酵素と S₂ 酵素のペアであることがわかる。

無酵素系、I 酵素単独系、I 酵素と S₂ 酵素の共存系、I 酵素と S₁ 酵素の共存系にプラークを構成する各種レンサ球菌の加熱死菌体を添加して反応させ、WIG 合成を介して試験管壁に付着した菌体量を比較した結果がこのスライドである。斜線バーはバイプレクターによっても管壁から脱離しない強固に付着した菌体量を示している。これらの結果は、I 酵素と S₂ 酵素の共存系が菌体付着に最適であることを強く示唆している。

カカオエキスの抗う触性

虫歯の原因菌として重要視されつつあるソプリヌス菌の病原因子のなかで、I 酵素と S₂ 酵素がと

Partial purification of anti-GTF factor from CEPWS-H

表 1

	Dry weight (g)	IC ₅₀ (μg/ml)	Yield (%)	Purification (fold)
CEPWS-H	3.7	1.2	100	1
CEPWS-HA	1.1	0.40	89	3
CEPWS-BT	0.36	0.20	59	6

くに重要な働きをしていることはおわかりいただけたかと思う。したがって、カカオエキスパウダー熱水抽出物の高分子画分 CEPWS-H がこれら両酵素の活性を特異的に強く阻害するという、昨年のシンポジウムで報告した結果は、この種の作用特性を示すものが他にないだけに、きわめて興味深いものといえる。

しかし CEPWS には、他のポリフェノール系 GTF 阻害剤と同様、高濃度にカゼイン等の蛋白質が共存すると阻害作用が減弱してしまうという

共通の欠点がある。そこで昨年の動物実験では、アルブミンをゾンデで経胃投与するという手法により CEPWS-H の虫歯抑制効果を立証した。しかし、蛋白質不足によると思われるラットの発育不良が認められ、結果の正当性には問題を残している。そこで今回は、減弱作用の低い大豆ペプチドを蛋白源とする三五%のシヨ糖を含む粉末およびチヨコタイプの飼料を創製し、CEPWS の虫歯抑制効果を調べてみた。この表 2 は、今回の実験に使用した五種の飼料の組成を示したものである。コントロールとして用いた粉末飼料は、三五%シヨ糖、二四%大豆ペプチド、二四・九%コーンスターチに、コーンオイル、セルロース、ミネラル、メチオニン、ビタミン類から成る。さらにその基本飼料の組成からコーン油とコーンスターチを除去または減量して、カカオバター(二四%)とレシチン(〇・五%)を添加し固形化したホワイトチヨコ(WC)タイプ、これにカカオマス(一〇%)を添加したスイートチヨコ(SC)タイプ、両者に CEPWS-H (〇・五%)を添加した CEPWS 加ホワイトチヨコ(CEPWS-WC)、CEPWS 加スイートチヨコ(CEPWS-SC)タイプの飼料を創製した。

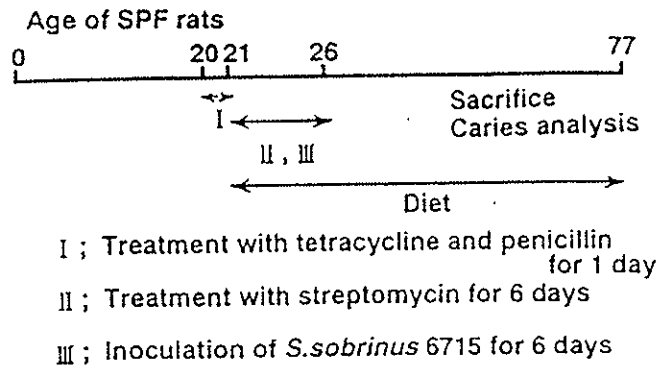
図 3 は、動物実験のスケジュールを示したものである。二日齢より SDS 系 SPF ラットの口腔にストマイ耐性のソプリヌス菌六七一五株を六日間連続接種して菌を定着させ、接種開始時より前述の五種の飼料を与えて七七日齢まで五日間飼育後、下顎に発生した虫歯を Keyes 法で数値化し比較した。なお、非感染ラットを基本粉末飼料と同様に飼育し、これを陰性コントロール群とした。

図 4 は各実験群ラットの発育曲線を比較したものである。いずれの飼料も良好な発育を示すが、ホワイトチヨコ群の発育がとくに良好である。これは各実験群のラット下顎に発生した虫歯の

表 2

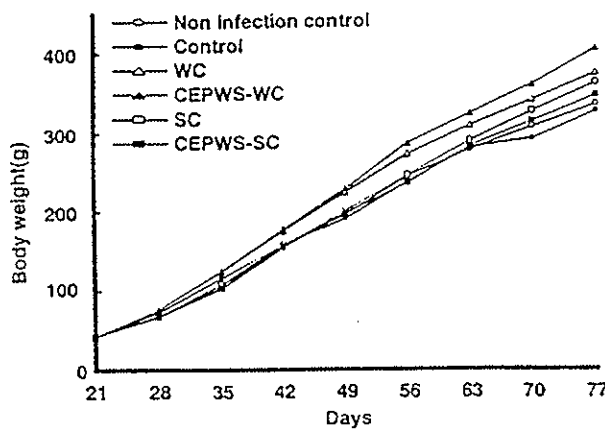
Composition of diets

Component%	Control	WC	CEPWS-WC	SC	CEPWS-SC
Sucrose	35	35	35	35	35
Soybean peptide	24	24	24	22	22
Methionine	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5
Corn starch	24.9	6.9	6.4	1	0.5
Corn oil	6				
Cellulose	5	5	5	5	5
Minerals	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamines	1	1	1	1	1
Cacao butter		24	24	22	22
Cacaomass				10	10
CEPWS			0.5		0.5
Lecithin		0.5	0.5	0.5	0.5



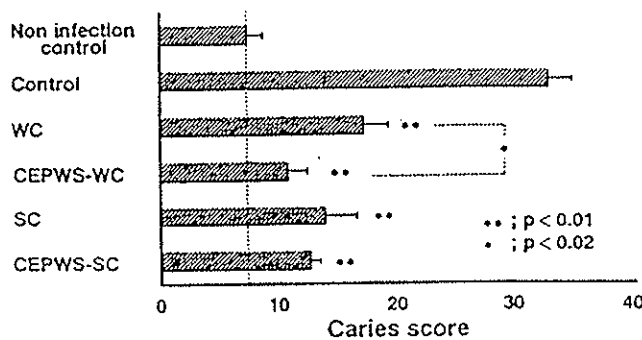
Experimental design

図 3



Time course of growth curve of rats

図 4



Anti-carries effect of CEPWS on SPF rats infected with *S.sobrinus* 6715

図 5

程度を数値化し、棒グラフにより比較した結果である。陰性コントロール群、陽性コントロール群、ホワイトチョコ群、スイートチョコ群、CEPWS加ホワイトチョコ群および、CEPWS加スイートチョコ群の平均虫歯スコアはそれぞれ7・4、32・9、17・2、14・1、10・8および12・8であり、カカオバターを加え創製したチョコタイプの飼料はいずれも基本粉末飼料より1%危険率で有意に、CEPWSを添加したホワイトチョコタイプの飼料は非添加のものより2%危険率で有意に、虫歯誘発性が低いことが判明した。スイートチョコ飼料ではCEPWSの添加効果に有

意差が認められないが、これは10%含有のカカオマスが同じ効果を発揮したためか、カカオマス中の蛋白成分によりCEPWSの阻害活性が減弱されたためと思われる。以上の動物実験の結果から、ソプリヌス菌による虫歯発症を抑制する作用がCEPWSにあることが確認された。さらに、チョコレートの虫歯誘発性は同濃度の他のシヨ糖含有食品のそれより低い可能性が、また、より虫歯になりにくいチョコレートをCEPWS添加により創製できる可能性が強く示唆された。

それでは次に、CEPWS中の有効成分の精製

を試みた結果をご紹介する。粗酵素標品のWIG合成活性性に対する阻害能を指標として、CEPWS中の有効成分をハイドロキシアパタイト(HA)やブチルトヨパール(BT)のカラムクロマト処理により部分精製した。両クロマト処理により、CEPWS-H段階から六倍濃縮の標品が約60%の収率で得られた。図6はCEPWS-H、CEPWS-HA、CEPWS-BTの各画分について蛋白質、炭水化物、ポリフェノールの含量を測定し、百分率で比較した結果である。精製が進むにしたがい蛋白質の割合が増加しており、最終標品CEPWS-B

表3
Elemental analysis of CEPWS-BT

	Weight %	Molar ratio
C	46.8	9
H	5.3	12
N	5.9	1
O	40.6	6
S	<0.3	—
P	<0.3	—
Ash	1.3	—

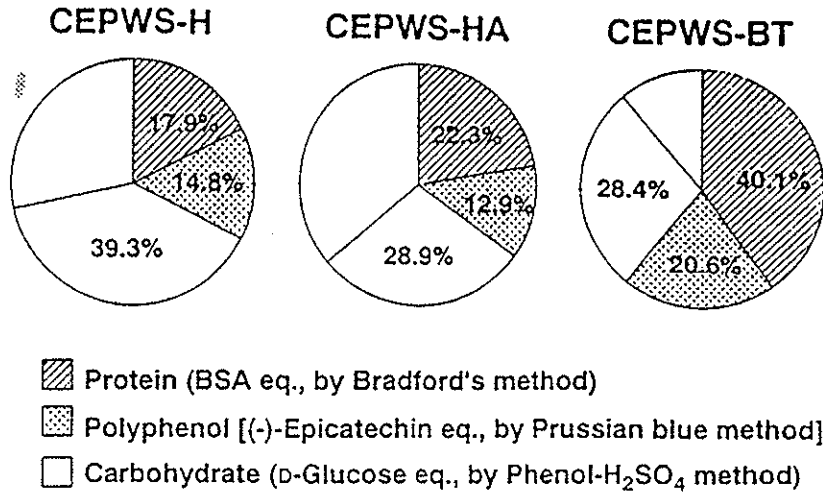
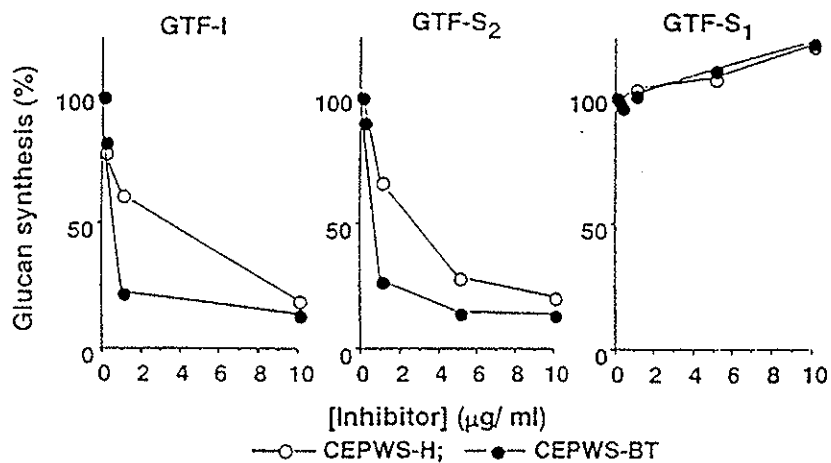


図6

Tの蛋白、炭水化物、ポリフェノールの組成比はおおよそ四：三：二である。
表3はCEPWS・BT画分を元素分析した結果で、主として炭素、水素、窒素、酸素からなり、それらのモル比は九：一二：一：一六である。
表4は同画分のアミノ酸分析の結果である。酸性アミノ酸の含有率がきわめて高く、四五%を占めている。



Effects of CEPWS-H and CEPWS-BT on glucan syntheses by the GTFs purified from *S. sobrinus* B13N

図7

表4
Amino acid composition of CEPWS-BT

	Weight %	Mole %
Glx	6.05	33.4
Asx	2.06	11.4
Arg	1.74	9.6
Ser	0.95	5.3
Gly	0.88	4.9
Lys	0.69	3.8
Leu	0.69	3.8
Pro	0.67	3.7
Tyr	0.61	3.4
Thr	0.59	3.3
Phe	0.59	3.3
Val	0.57	3.1
Ala	0.57	3.1
Ile	0.30	1.7
His	0.23	1.3
Met	0.19	1.0
Cys	0.16	0.9

この図7は、B13N株の培養上清から分離精製したI酵素、S₂酵素、S₁酵素のグルカン合成活性に対するCEPWS・HとCEPWS・BTの阻害能を比較した結果である。これより、CEPWS・BTの作用特性はCEPWS・Hと同一で、I酵素とS₂酵素の作用を特異的に阻害することが確認された。
表5は、CEPWS・BTの阻害活性に対する加熱処理、各種酵素処理、Pollicar 10処理の効果を調べた結果である。100°C、二六分間の加熱、デキストラナーゼ処理、プロナーゼ処理、タナーゼ処理によつてはまったく影響を受けないが、Pollicar 10処理では阻害活性の七五%が吸着除去された。
以上の結果は、CEPWS中の主要阻害成分

Effects of various treatments on the anti-GTF activity of CEPWS-BT

表 5

Treatment	Residual activity (%)
None	100
Heat (100°C, 20 min)	100
Dextranase	100
Pronase	100
Tannase	98
Polyclar 10 (PVPP)	25

が、水に易溶性のきわめて安定な糖・蛋白・ポリフェノールからなる高分子物質であることを示唆しており、市販のポリフェノール系GTF阻害剤サンウーロンやサンフェノンとは異なる構造と作用特性を示す新しいタイプのGTF阻害物質と推定される。今後は、さらに精製を進めて本体および阻害メカニズムを追求するとともに、人を対象とした虫歯抑制実験などを行って、虫歯予防に有用な食品素材として本物質を開発することができればと考えている。