

カカオ抽出物におけるう蝕抑制作用

大嶋 隆 (大阪大学歯学部助教授)

はじめに

小児う蝕の発生は、う蝕原性細菌ミュータンスレンサ球菌の母親から子どもへの感染によって始まる(図1)。この感染の成立には、母親の唾液中ミュータンスレンサ球菌数と子どもへの感染頻度が影響する。母親の唾液中ミュータンスレンサ球菌数が多ければ多いほど、母親のミュータンスレンサ球菌が子どもの歯面に早期に定着する。また子どもへの感染頻度が高ければ母親の唾液中ミュータンスレンサ球菌が少なくてもこの感染は成立する。この場合、前者は母親の口腔清掃度、スクロースの摂取回数および処置されずに放置されたう蝕歯数と強く相関し、後者は日づけや母親の唾液の付いた食器の使用などによる接触回数に相関する。

ミュータンスレンサ球菌の母から子どもへの感染には、子どもの側の因子も影響する。特にミュータンスレンサ球菌は菌や義歯といった硬組織が無ければ口腔内に定着できない性状を有しており、乳歯萌出以前(日本人の平均では生後8月末満)の乳児からは検出されない。ミュータンスレンサ球菌は乳歯の萌出後始めて検出されるようになり、第一乳臼歯の萌出(平均的には1歳5カ月頃)はミュータンスレンサ球菌の口腔内への定着を急激に増加させる。またスクロースの摂取はミュータンスレンサ球菌の感染を容易にし、少量の感染菌量でも子どもへの定着を可能とする。

ミュータンスレンサ球菌が子どもの口腔にうまく感染できても、う蝕発生の前線基地となるプラークの形成までには時間の経過が必要となる。この時点でのスクロース摂取は、いわゆるう蝕誘発性プラークの速やかな形成を促す。丁寧な口腔清掃以外に、このプラークを除去する方法はない。このう蝕誘発性プラークが形成されてしまうと、食品の多くに含まれる炭水化物の摂取によりう蝕

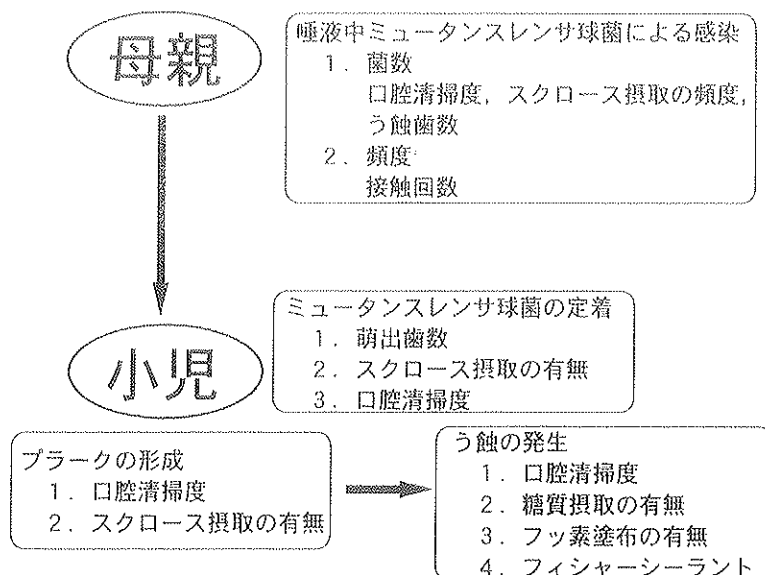


図1 小児う蝕発生のプロセス

を誘発するに十分な酸が産生され、プラーク内の pH が 5.6 以下になるとエナメル質の脱灰が起こり、いわゆる臨床的なう蝕が発生することになる。

このように小児う蝕は多くの過程を経て始めて発生するため、理論的には容易に予防することができる疾患である。特にミュータンスレンサ球菌の病原性を担うスクロース摂取の制限は、スクロースがう蝕発生のあらゆるプロセスで深く関与しているため、う蝕予防を行なう上で最も有効な方法であろう。またミュータンスレンサ球菌は、自ら産生する酵素グルコシルトランスフェラーゼ (GTase) の作用により、スクロースから非水溶性で粘着性のグルカンを生産する。このグルカンを介してミュータンスレンサ球菌は歯面に強固に付着し、プラークを形成し、う蝕を発生する。従ってこの GTase によるグルカン合成を抑制することも、う蝕予防のために有効な一手段と考えられる。最近になりこの GTase を阻害する物質が、我々が日常摂取する食品中にも多く含まれていることが明らかにされてきた。

チョコレートは、ヒトにおけるスクロースのう蝕誘発能を調べた古典的な Vipeholm Study において、間食として摂取させた時、キャラメルやトフィーに比べてそのう蝕誘発能が明らかに低いことから、そのう蝕抑制作用が指摘された。このためチョコレートのう蝕抑制作用がハムスターを用いた実験う蝕系で調べられ、チョコレートの摂取がスクロース摂取ほどにはう蝕の誘発がみられないという結果が示された。また、チョコレートの主成分であるカカオに GTase によるグルカン合成を抑制する作用のあることが示され、この面からもチョコレートのう蝕抑制作用が検討されている。今回我々は、カカオ豆およびカカオ豆外皮の抽出物がミュータンスレンサ球菌によるう蝕発生にどのような影響を与えるかを、*in vitro* および SPF のラット実験う蝕系において検討したので報告する。

カカオ抽出物のう蝕抑制作用

本研究では、カカオ豆を 80°C の熱水で 1 時間抽出したカカオマスと、カカオ豆外皮を 50°C、4 時間セルラーゼ処理後、30% エタノール抽出したカカオハスクを実験に供した。また供試菌として、ヒト口腔内より回収されるミュータンスレンサ球菌の代表株である *Streptococcus mutans* MT8148R 株 (血清型 c) と *Streptococcus sobrinus* 6715 株 (血清型 g) を用いた。

(1) 非水溶性グルカン合成に対する阻害作用：

非水溶性グルカン合成酵素として、*S. sobrinus* 6715 株由来の Crude GTase および *S. mutans* MT8148R 株由来の Crude GTase-I を用いた。いずれの酵素も精製されてはいないが、極めて強い非水溶性グルカン合成作用を有している。これらの酵素を、1% スクロースおよび 0 ~ 1 mg/ml のカカオ抽出物を添加したリン酸緩衝液中で 37°C、18 時間反応させた後、反応液の濁度を 550nm の波長で測定することにより、合成された非水溶性グルカン量を測定した。図 2 に *S. sobrinus* 6715 株由来の GTase に対する抑制作用を示す。*S. sobrinus* 6715 株由来の GTase に対してカカオ抽出物は、濃度依存的に阻害効果を示し、その効果はカカオハスクにおいてより著明であった。一方、*S. mutans* MT8148R 株由来の GTase に対しては、カカオハスクにおいて若干の阻害効果が認められたが、カカオマスでは認められなかった。

(2) スクロース依存性平滑面付着に対する抑制作用：

S. mutans MT8148R 株および *S. sobrinus* 6715 株を 1% スクロースおよび 0 ~ 10mg/ml のカカオ抽出

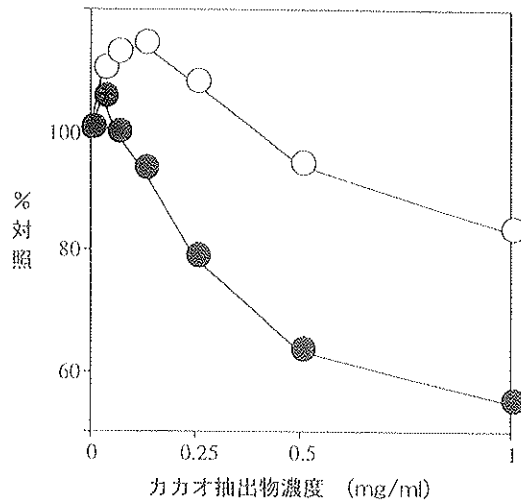


図2 *S. sobrinus* 6715株に由来するGTase 酵素による非水溶性グルカン合成に及ぼすカカオ抽出物の抑制作用

○ : カカオマス
● : カカオハスク

物を添加した Brain heart infusion (BHI, Difco) 液体培地に接種し、水平面に対して30度の角度で、37°C、18時間培養した。培養後、試験管壁に強固に付着した菌量を測定し、全菌量に対する付着菌量の比率を調べた。図3に *S. mutans* MT8148R の結果を示す。*S. mutans* MT8148R においても *S. sobrinus* 6715 においても、カカオマスおよびカカオハスクは共に濃度依存的にミュータンスレンサ球菌のスクロース依存性平滑面付着を阻害した。

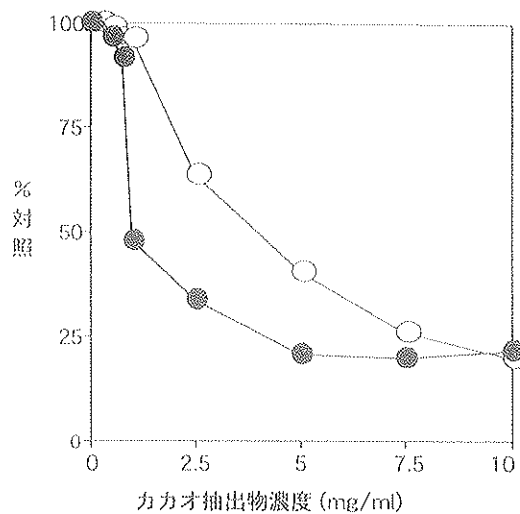


図3 *S. mutans* MT8148R 株のスクロース依存性平滑面付着に及ぼすカカオ抽出物の阻害作用

○ : カカオマス
● : カカオハスク

(3) ミュータンスレンサ球菌の菌体疎水性に及ぼす作用：

菌体疎水性の測定は Rosenberg らのヘキサデカン法を用いて行った。0~1 mg/ml のカカオ抽出物を添加した緩衝液に菌体を懸濁した後、*n*-ヘキサデカンを加え1分間ボルテックスミキサーで激しく混和後静置した。水層とヘキサデカン層を完全に分離させた後、水層の吸光度を測定し、

全菌量に対するヘキサデカン層に移った菌量の割合をもとめて菌体疎水性とした。*S. sobrinus* 6715 においては、カカオマスおよびカカオハスクの添加により菌体疎水性の低下が認められ、その作用はカカオマスでより明瞭であった。一方、*S. mutans* MT8148R においては、カカオハスクの作用で菌体疎水性の変化は認められず、カカオマス 1 mg/ml 存在下ではじめて菌体疎水性の低下が認められた。

(4) ミュータンスレンサ球菌の増殖阻害作用：

S. mutans MT8148R 株および *S. sobrinus* 6715 株の菌体を 1 mg/ml のカカオ抽出物を添加した 100 ml の BHI 液体培地に接種し、37°C で培養した。経時的に培養液をくみ出し、その濁度を 550nm の波長で計測した。図 4 に *S. mutans* MT8148R における濁度の経時変化を示す。カカオハスクの添加はミュータンスレンサ球菌の増殖を阻害する傾向を示した。その濁度の変化から MT8148R 株の倍加時間 (doubling time) を計測すると、非添加のコントロールで 75 分、カカオマス添加培地で 77 分、カカオハスク添加培地で 127 分で、約 70% 近い倍加時間の遅延が認められた。またこの傾向は *S. sobrinus* 6715 株でも認められたが、*S. mutans* MT8148R においてより明瞭であった。

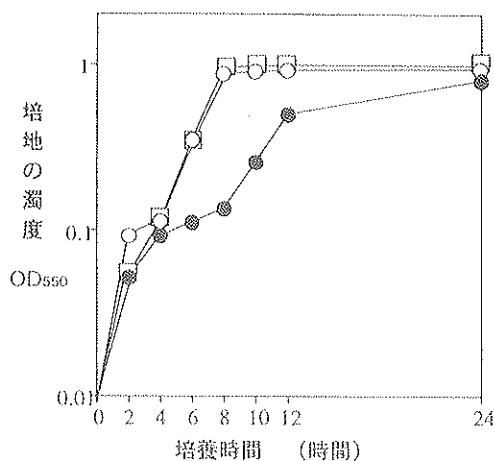


図 4 カカオ抽出物の *S. mutans* MT8148R 株の増殖に及ぼす影響

- : カカオマス
- : カカオハスク
- : 対照 (非添加)

(5) ラットう蝕実験系におけるう蝕抑制効果：

実験動物として生後 15 日齢の SPF の SD ラット (日本チャールズリバー) を用いた。供試菌のラット口腔への定着を容易にする目的で 2 日間抗生物質の投与を行った後、生後 18 日目より 5 日間供試菌 *S. sobrinus* 6715 株の感染をおこなった。同時にスクロースを 40% 含むう蝕誘発飼料 2000 を与え、実験終了時まで自由に摂取させた。カカオ抽出物は、飼料中には 0 ~ 2.5 mg/ml の濃度になるよう添加し、飲料水中には滅菌蒸留水に 0.1 mg/ml のカカオ抽出物を添加したものを与えて飼育した。生後 72 日目にラットを屠殺し、上下顎臼歯部のう蝕を Ooshima らの方法により算出した。表 1 にその結果を示す。カカオハスクを飼料中に 2.5 mg/g、1.0 mg/g の濃度で配合した場合、非添加の対照群よりう蝕の発生は有意な減少を示した。しかしカカオマスにおいては、供試した濃度では有意なう蝕発生の減少は認められなかった。

次にこのカカオハスクによるう蝕抑制の最小濃度を調べるため、飲料水中にのみ 0 ~ 2 mg/ml の

カカオハスクを添加し投与した。飼料としてはスクロースを40%含むう蝕誘発飼料2000を与え、前実験と同様の方法で実験を行った。その結果を表2に示す。カカオハスクを飲料水中に1.0mg/ml以上の濃度で配合した場合のう蝕発生は有意な減少を示したが、それ以下の濃度では有意な減少は認められなかった。なおいずれの動物実験においても、実験期間中の体重の増加に有意な差は無く、明瞭な副作用も認められなかった。

表1 カカオ抽出物のラット実験う蝕系におけるう蝕抑制作用

群	カカオ抽出物濃度 (mg/g)		ブランク指数	う蝕スコア
	飼料	飲料水		
A	非添加 (対照)	-	0.86	52.8
B	カカオハスク	2.5	0.50**	39.7***
C	カカオハスク	1.0	0.69*	41.3***
D	カカオハスク	0.5	0.98	59.0
E	カカオマス	2.5	0.76	48.2
F	カカオマス	1.0	0.72	46.3

A群との間に有意の差が認められる (*P < 0.05, ***P < 0.001)

表2 カカオハスクのラット実験う蝕系における最小う蝕抑制濃度

群	飲料水中の カカオハスク濃度	ブランク指数	う蝕スコア
A	非添加 (対照)	1.17	53.9
B	2.0 mg/ml	0.66***	27.7***
C	1.0 mg/ml	0.73***	35.5***
D	0.5 mg/ml	0.83*	47.3
E	0.1 mg/ml	0.93	56.3

A群との間に有意の差が認められる (*P < 0.05, ***P < 0.001)

以上の結果は、カカオ抽出物、特にカカオハスクには、ミュータンスレンサ球菌の非水溶性グルカン合成を阻害する作用とミュータンスレンサ球菌の増殖を阻害する作用とがあり、ラットを用いた実験う蝕系においても明瞭なう蝕抑制効果を示すことから、う蝕予防を目的とした食品添加物として可能性の高いことを示唆している。

参考図書

大嶋 隆、浜田茂幸(編)：「う蝕予防のための食品科学—甘味糖質から酵素阻害剤まで—」，医歯薬出版，東京，1996