

カカオハスク抽出物における う蝕抑制作用の検定

大嶋 隆 (大阪大学歯学部助教授)

はじめに

う蝕 (むし歯; Dental Caries) は、他の感染症とは異なり、う蝕原性細菌 *ミュータンスレンサ球菌* (*mutans streptococci*) の口腔への感染により直ちに発症する疾患ではない。口腔内に侵入した細菌が歯面に定着してエナメル質を脱灰するまでに幾つもの過程と長い時間を必要とする。この特異な感染症を成立させる鍵となる性状を与えるのがスクロース (Sucrose) である。う蝕原性細菌 *ミュータンスレンサ球菌* が産生する酵素グルコシルトランスフェラーゼ (GTase) は、スクロースのもつ $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ グルコシル結合を開裂してフルクトースを遊離するとともに、粘着性で水に不溶性のグルカンを合成する。このグルカンが *ミュータンスレンサ球菌* を歯面に付着させ、初めてその強力な病原性を発揮させることになる。

我々はこれまでにさまざまな食品素材のう蝕抑制作用を実験動物を用いたう蝕誘発系で検定してきた。これは、この動物実験系がヒトう蝕の発生過程を凝縮して再現した、極めて信頼性の高いモデルシステムであるためである。しかし、対象となるすべての素材についてこの動物実験系を利用して調べるわけではない。最初にう蝕発生の鍵となる性状を *in vitro* の実験系で調べ、目的とする性状を有すると認められた素材についてのみ、この動物実験系で検定することになる。この小論では、カカオハスク抽出物のう蝕抑制作用の検定方法とその結果について記載する。

1. 検定標品

in vitro 試験と動物実験に用いる試料は同じロットで作製されたものでなければならない。カカオハスク抽出物の場合、カカオ豆外皮 (4kg) を 50°C、4 時間セルラーゼ処理後、30% エタノール抽出して凍結乾燥した標品 (CBH; 600g) を実験に供した。なお同時に検定をおこなったカカオマス抽出物の場合、カカオ豆 (4kg) を 80°C の熱水で 1 時間抽出し、凍結乾燥してえられた標品 (CM; 520g) を供した。

2. う蝕原性細菌

ヒト口腔からは 2 種類の *ミュータンスレンサ球菌* が検出される。最近の日本人小児口腔からの検出頻度をみると、*Streptococcus mutans* が約 9 割、*Streptococcus sobrinus* が約 1 割を占めている。しかしその病原性は *S. sobrinus* の方が強いと考えられており、検定試験にはそれぞれの代表株である MT8148R 株 (血清型 c) と 6715 株 (血清型 g) を用いた。

3. *in vitro* 試験

1) *ミュータンスレンサ球菌* に対する抗菌作用

ミュータンスレンサ球菌に対して特異的な抗菌作用を示す場合を除いて、食品素材が抗生物質のように強い抗菌作用を示すことは好ましくないと考えられている。口腔内の細菌叢が変化し、予期せぬ感染症を引き起こす可能性があるからである。しかしミュータンスレンサ球菌に対する抗菌物質がう蝕予防の有効な手段の1つであることは間違いない。

抗菌作用の検定には、一般的には液体培地を用いての最小阻止濃度を測定する方法で調べられる。カカオハスク抽出物(CBH)の場合、1 mg/mlの濃度でも抗菌作用は認められなかった。そこで液体培地で培養した時の培養液の濁度の変化を経時的に調べたところ、CBHの添加はミュータンスレンサ球菌の増殖速度を明確に抑制することが明らかとなった。この増殖速度を抑制する作用はカカオマスには認められなかった。このミュータンスレンサ球菌の増殖速度を抑制する作用は他の口腔レンサ球菌に対しても認められたが、特に *S. mutans* に対して顕著であった(表1)。

表1 カカオ抽出物の口腔レンサ球菌の増殖速度に及ぼす影響

口腔レンサ球菌	倍加時間 (分)		
	対照	カカオマス	カカオハスク
<i>S. mutans</i> MT8148R	75	77 (3%)	127 (69%)*
	71	79 (11%)	122 (72%)
<i>S. sobrinus</i> 6715	64	62 (− 3%)	92 (44%)
<i>S. gordonii</i> ATCC10558	60	58 (− 3%)	62 (3%)
<i>S. sanguis</i> SK4	48	54 (13%)	56 (17%)
<i>S. oralis</i> ATCC10557	48	40 (−17%)	55 (15%)
<i>S. mitis</i> ATCC903	43	48 (12%)	58 (35%)
<i>S. salivarius</i> HHT	56	46 (−18%)	77 (38%)

*括弧内数値は対照に対する倍加時間の増加の割合を示す。

2) 酸産生の抑制

う蝕発生の最終病変であるエナメル質の脱灰は、ブランク中の pH が 5.5 以下に下がった時点で始まり、酸産生の抑制はう蝕抑制をもたらすと考えられる。一般的には 48 時間培養した時の培地の最終 pH を測定することにより調べるが、CBH の場合、*S. mutans* の増殖速度の阻害が認められたため、液体培地の pH 変化を経時的に調べた(図1)。1mg/ml の CBH の添加は、*S. mutans* MT8148R 株の増殖抑制に対応するような酸産生の抑制が見られた。24 時間培養した時の最終 pH には有意の差が認められないものの、pH 5.5 に達するまでの時間に大きな差が認められ、う蝕発生の抑制に働く可能性が示唆された。

3) グルカン合成阻害作用

スクロースからの不溶性で粘着性のグルカン合成は、ミュータンスレンサ球菌の主要な

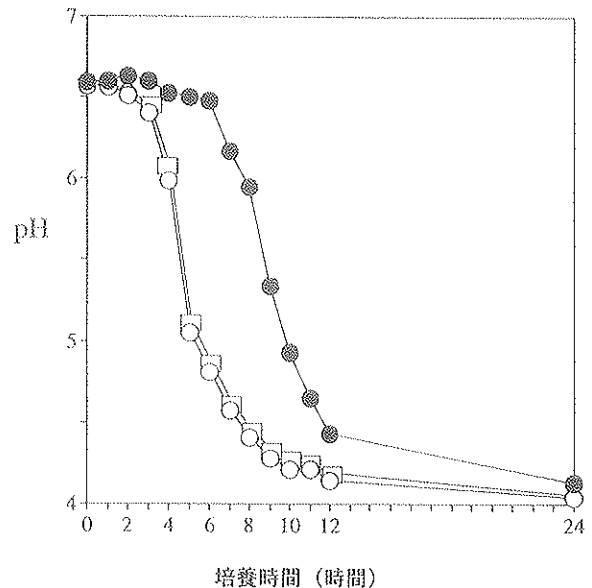


図1. カカオハスク抽出物の *S. mutans* MT8148R による酸産生に及ぼす作用

Symbols: ○— カカオマス (CM; 1 mg/ml)
●— カカオハスク (CBH; 1 mg/ml)
□— コントロール

病原因子と考えられる。この反応をつかさどる酵素（GTase）は複数（3種）あり、大きく水溶性グルカン合成酵素と不溶性グルカン合成酵素に分類される。in situ で病原性を発揮する不溶性で粘着性のグルカンはこれらの酵素が同時に働いた時に合成されるが、不溶性グルカンの合成能がその指標となる。本研究では、極めて強い不溶性グルカン合成作用を有する *S.sobrinus* 6715 株および *S.mutans* MT8148R 株由来の部分精製 GTase を用いた。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 550 nm の波長で測定することにより、合成された不溶性グルカン量を測定した。その結果、*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。

4) 付着抑制作用

ミュータンスレンサ球菌はスクロースから合成した粘着性で不溶性のグルカンを介して歯面に付着する。*S.mutans* MT8148R 株および *S.sobrinus* 6715 株を 1%スクロース液体培地に接種し、水平面に対して 30 度の角度で培養すると、これらのミュータンスレンサ球菌は試験管壁に強固に付着する。この実験系にカカオハスクを添加した時のスクロース依存性平滑面付着への抑制作用を調べたところ、1 mg/ml の濃度で *S.sobrinus* 6715 の付着は約 50%、*S.mutans* MT8148R の付着は約 15%抑制した。5 mg/ml の濃度にする、いずれの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も 80%以上抑制するのが認められた。

5) 菌体疎水性に及ぼす作用

ミュータンスレンサ球菌はその菌体表層にある疎水性タンパク質とエナメル質表面に付着したペリクル成分の疎水性相互作用によってエナメル質表層に吸着する。カカオハスクでの処理がミュータンスレンサ球菌の菌体疎水性にどのような影響を及ぼすかをヘキサデカン法を用いて調べた（図 2）。*S.sobrinus* 6715 の菌体疎水性は、カカオマスおよびカカオハスクの添加により有意に低下するのが認められ、その作用はカカオマスでより明瞭であった。一方 *S.mutans* MT8148R の菌体疎水性の変化はカカオハスクでは認められず、カカオマス 1mg/ml 存在下ではじめて低下した。

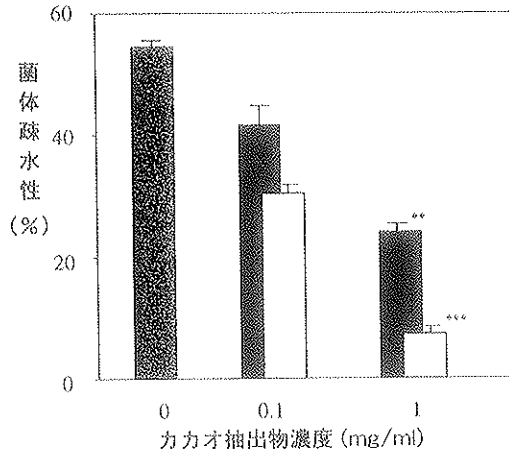


図 2. カカオ抽出物の *S.sobrinus* 6715 の菌体疎水性に及ぼす作用

統計的有意の差が対照と 1 mg/ml 濃度の時に認められた (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

Symbols: □: カカオマス (CM)
 ■: カカオハスク (CBH)
 ▨: コントロール

4. 動物実験

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。動物実験のタイム・スケジュールを図 3 に示す。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 (実験 1, 2) あるいは

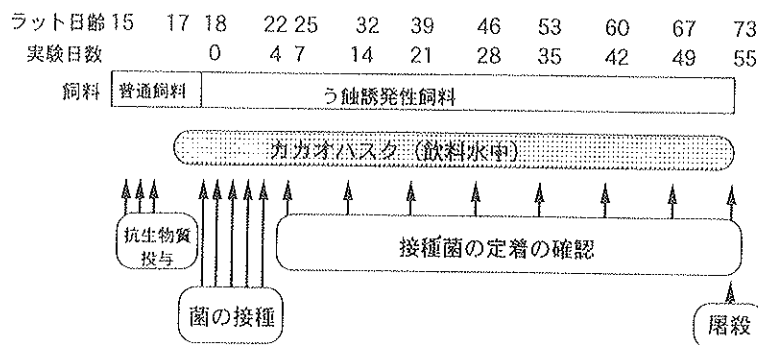


図3. カカオハスク抽出物のう蝕抑制作用を調べる動物実験のスケジュール

S.mutans MT8148R 株 (実験3) 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、実験1においては飼料中には0~2.5 mg/mlの濃度になるよう添加し、飲料水中にも滅菌蒸留水に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。また実験2および3においては、カカオハスク抽出物を飲料水中にのみ0~2 mg/mlの濃度になるよう添加した。生後72日目にラットを屠殺し、上下顎白歯のう蝕をOoshimaらの方法により算出した。

実験1において、カカオハスクを飲料水中に0.1 mg/mlと飼料中に2.5 mg/g, 1.0 mg/gの濃度で配合して与えると、非添加の対照群よりう蝕の発生は有意に低下した。カカオマスの投与においてもう蝕の発生が抑制されるのが認められたが、その差は有意ではなかった。

次にカカオハスクによるう蝕抑制の最小濃度を調べる実験を行った。*S.sobrinus* 6715株(実験2)あるいは*S.mutans* MT8148R株(実験3)のいずれを用いた場合にも、カカオハスクを飲料水中にのみ1.0 mg/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(表2)。また、カカオハスクを2.0 mg/mlの濃度で配合した飲料水を与えたラットにおいて、下顎からの供試菌の回収に、*S.sobrinus* 6715株では有意の差は認められないものの、*S.mutans* MT8148R株の回収は対照より有意に低いことが示された(表には示されていない)。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2 カカオハスクの実験動物におけるう蝕抑制作用

群	カカオハスク濃度(mg/ml)	ブランク指数		う蝕スコア	
		MT8148R	6715	MT8148R	6715
A	0	0.89	1.17	57.8	53.9
B	2.0	0.56***	0.66***	40.6**	27.7***
C	1.0	0.54***	0.73***	43.0*	35.5***
D	0.5	0.68*	0.83*	45.4	47.3
E	0.1	0.83	0.93	54.7	56.3

A群との間に統計的に有意の差が認められる (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)。

カカオハスクにはミュータンスレンサ球菌の不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、*S.sobrinus* 6715株あるいは*S.mutans* MT8148R株を用いたラット実験う蝕系において明瞭なう蝕抑制効果を示した。特に、日本人小児から最も高率に検出され、抗GTase作用を受けにくい*S.mutans* MT8148R株が誘発する実験う蝕を明瞭に抑制す

る作用を示したことは、このカカオハスク標品がヒト歯の予防を目的とした食品添加物として利用できる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)：「歯の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。