

カカオハスク抽出物のう蝕抑制作用

大嶋 隆 (大阪大学大学院歯学研究科助教授)

はじめに

チョコレートは、砂糖を多量に含むにもかかわらず、う蝕（むし歯、Dental Caries）を発生させる力は弱いと考えられている。これは、第二次世界大戦直後にスウェーデンで行われたヒト実験（Vipeholm Study；パイプホルム研究）で、間食にチョコレートを与えると、う蝕の発生は認められるものの、キャンディーやトフィーほど強いう蝕を発生しなかったことに起因している。その後行われた動物実験でも、チョコレートを混入した飼料をハムスターに自由に摂取させるとう蝕の発生が抑制されることが明らかにされている。このチョコレートに認められるう蝕抑制作用は、う蝕原性細菌ミュータンスレンサ球菌の主要な病原因子であるグルカン合成を抑制する物質が、チョコレートの主原料であるカカオマスに存在するためと考えられている。

われわれはそこで、このカカオマスのう蝕抑制作用を、*in vitro*及び*in vivo*の実験系で調べた。カカオマスを熱水で抽出した標品（CM）は、不溶性グルカン合成などのミュータンスレンサ球菌の主要な病原因子に対する阻害作用は弱いものの、ミュータンスレンサ球菌の歯面への初期付着に関与する菌体疎水性を明確に低下させた。そこでこのCM標品を飼料および飲料水中に混和してラットに与えると、発生するう蝕の程度は、統計的に有意の差は認められないものの、低下する傾向を示した。これらの結果は、カカオマスの抗う蝕作用がスクロースのう蝕誘発能を抑制する程明確でないことを示している。しかしこの研究に用いたカカオマス濃度は、製品としてチョコレートに含まれる濃度よりも低く、この研究結果がチョコレートのう蝕抑制作用を否定するものではないことは留意すべきである。

カカオ豆の外皮であるカカオハスクは、多量のポリフェノールと食物繊維を含むものの、チョコレート産業においては、その多くが廃棄されている。しかし最近の我々の研究では、このカカオハスクにう蝕を抑制する成分が含まれており、その作用はチョコレートの主成分であるカカオマス標品よりもはるかに明確であることが明らかになっている。この小論においては、カカオハスク抽出物のう蝕に対する抑制作用について、*in vitro*の研究成果を明らかにする。

1. カカオハスクの抗う蝕物質

(1) 不溶性グルカン合成酵素に対する阻害効果の計測法

日本人小児より最も高頻度に検出されるう蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* は3種のグルカン合成酵素（GTFB、GTFC、GTFD）を産生する。それぞれ不溶性グルカン、不溶性グルカン+水溶性グルカン、および水溶性グルカンを合成する。これら3種のGTFをコードする遺伝子を含むプラスミド、それぞれpSK6、pSKI6およびpYT104を組み込んだ大腸菌XL-2株を、アンピシリンおよびテトラサイクリンを含むルリア・ベルタニー培地で37℃で18時間培養した。菌体を遠心分離で集め、

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で懸濁後、超音波発生機で菌体を破碎し、その遠心上清をリコンビナント (r) GTFとして実験に供した。

カカオハスク標品のrGTFに対する作用は下記の方法で調べた。20mUのrGTFと¹⁴Cグルコース標識したスクロースをカカオハスク標品 (0-1mg/ml) と混合し、37℃で1時間反応させた。この反応液を小濾紙の上にスポットし、メタノールで洗浄後、濾紙に残った放射活性を測定した。カカオ豆外皮をセルラーゼ処理後、エタノール抽出して得たCBH標品のグルカン合成阻害率は、1mg/mlの濃度で、rGTFBで57%、rGTFCで24%、rGTFDで26%であった。このため、この項におけるカカオハスク標品のグルカン合成阻害作用はrGTFBを用いて計測した。

(2) 抗菌作用の計測法

カカオハスク標品の抗菌活性は、*S. mutans* MT8148R株を用いて調べた。ブレイン・ハート・インフュージョン (BHI) 培地 (Difco) で37℃で18時間培養した菌体を遠心分離により集めた後、PBSで洗浄した。この菌体をPBSで懸濁し、 $4-6 \times 10^6$ 集落形成単位 (CFU) /mlになるように調製した。この菌液とカカオハスク標品 (最終濃度; 0-1mg/ml) を混合し、室温で3時間反応させた。反応後、この混合液をPBSで連続10倍希釈し、BHI寒天平板上に播種した。この寒天平板を37℃で2日間培養し、平板上のコロニー数を計測した。カカオハスク標品の抗菌性は、反応後の生菌数が 10^6 CFU/ml以上の時は (-)、 $10^6 > \text{CFU} > 10^5$ の時は (+)、 $10^5 > \text{CFU} > 10^3$ の時は (++)、 10^3 CFU/ml以下の時は (+++) と判定し、評価した。

(3) カカオハスク標品の分画とその抗う蝕作用

カカオ豆外皮をセルラーゼ処理後、エタノール抽出して凍結乾燥すると、ポリフェノールを12.6%含むCBH標品が得られる。このCBH標品は、0.9mg/mlの濃度で*S. mutans*の産生する不溶性グルカン合成酵素 (GTFB) の活性を50%抑制 (ID50値) した。また1.0mg/mlの濃度では、*S. mutans* MT8148R株の倍加時間を70%近く遅延させるものの、抗菌作用はきわめて低かった。

そこでCBH標品をカラムクロマトグラフィーに供し、活性成分の分画を行った。最初にCBH標品をダイアイオンHP-20 (三菱化成) カラムに吸着させ、0%、20%、40%、60%、80%、100%エタノールで段階的に溶出させた。最も強いGTFB阻害活性は40%エタノール溶出画分 (CH3) に回収された (図1)。一方、*ミュータンスレンサ球菌*に対する抗菌活性は80%および100%エタノール溶出画分 (CH5、CH6) に回収された (表1)。

画分CH3はポリフェノールを43%含み、不溶性グルカンの合成を50%抑制する濃度 (ID50) は75 μ g/mlであった。一方の画分CH5およびCH6はポリフェノール含量がきわめて低く、100 μ g/mlの濃度で明瞭な抗菌作用を示した。これらの結果は、カカオハスク抽出物に認められる抗う蝕作用が、

図1 カカオハスク抽出物 (CBH) 分画画分の不溶性グルカン合成阻害作用

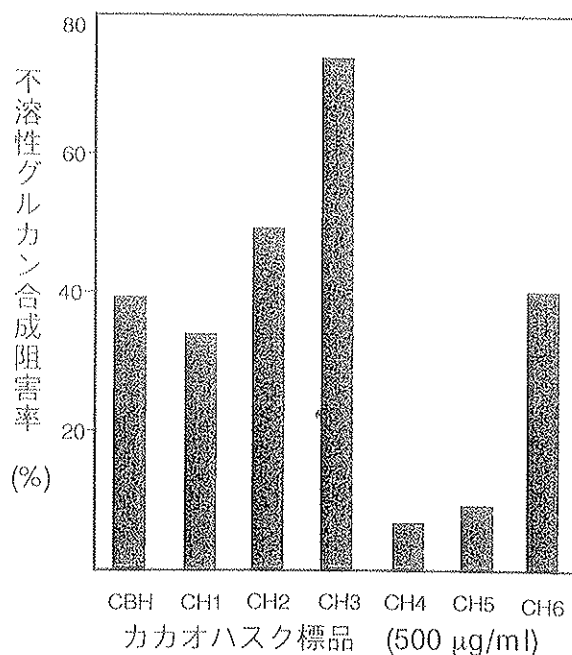


表1 カカオハスク分画標品の抗菌作用

カカオハスク標品*	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	抗菌性**
CBH	1,000	+
CH1	1,000	-
CH2	1,000	-
CH3	1,000	+
CH4	1,000	++
CH5	1,000	+++
	100	++
CH6	1,000	+++
	100	+++

* CBH をダイアイオン HP-20 に吸着させ、水とエタノールで段階的に溶出させた分画標品

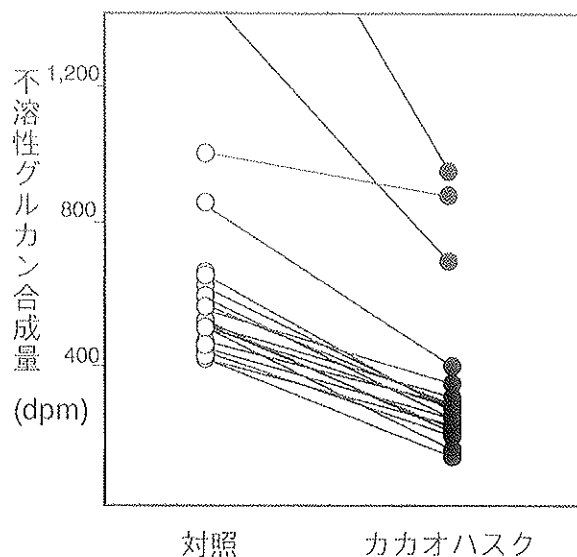
** $4-5 \times 10^6$ CFU 含む *S. mutans* MT8148R の菌液にカカオハスク標品を添加し、3時間反応させた。反応後の生菌数が、 10^6 CFU/ml 以上の時は (-), $10^6 > \text{CFU} > 10^5$ の時は (+), $10^5 > \text{CFU} > 10^3$ の時は (++)、 10^3 CFU/ml 以下の時は (+++) と判定した。

ミュータンスレンサ球菌に対する抗菌作用とグルコシルトランスフェラーゼに対する不溶性グルカン合成阻害作用に立脚していることを示している。そこで、カカオハスク抽出物をヒトに応用する予備研究として、ヒト口腔より採取したプラーク（歯垢、dental plaque）にカカオハスク抽出物を作用させた時、プラーク内部でのグルカン合成および、プラーク中ミュータンスレンサ球菌数にどのような変化が生じるかを、*in vitro*の実験系で調べた。

2. プラーク内グルカン合成に及ぼす作用

大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診した小児患者（4歳から15歳）22名の歯面から可及的に多量のプラークを採取した。このプラークサンプルをリン酸バッファーで懸濁した後、その一定量を ^{14}C -グルコースでラベルしたスクロース、CBH標品（0あるいは1mg/ml；最終濃度）および防腐剤存在下で37℃、16時間反応させた。反応後、反応液をフィルターにスポットし、メタノール処理することにより合成されたグルカンをフィルターに沈殿させ、その放射活性を測定した。その結果を図2に示す。CBH標品で反応させたプラークにおけるグルカン合成は、22名のプラークすべてにおいて対照（生理食塩水）

図2 カカオハスク抽出物のヒトプラーク内グルカン合成に及ぼす阻害作用



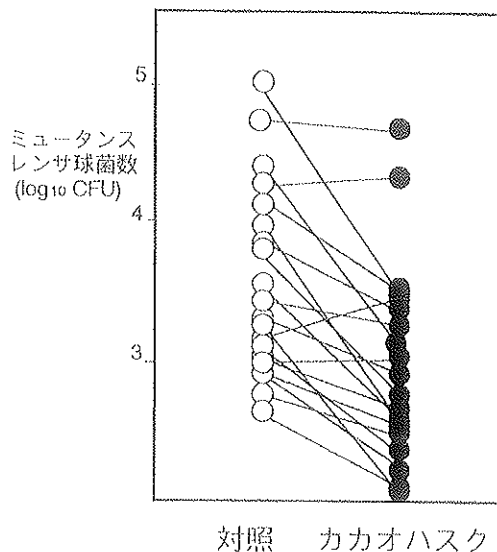
よりも低い値を示し、その差は統計的に有意であった。なお同様の方法で、チョコレートの原料に用いられるカカオマスの熱水抽出物（10.2%ポリフェノールを含む）の作用を調べると、カカオハスクと同様の傾向を認め、22名中20名において対象よりも低い値を示した。

3. プラーク内ミュータンスレンサ球菌数に及ぼす作用

5歳から14歳の日本人小児21名から採取したプラークをリン酸バッファーで懸濁した後、一定量をCBH標品（0あるいは1mg/ml；最終濃度）存在下で37℃、1時間反応させた。反応後、プラーク懸濁液を生理食塩水で連続10倍希釈し、ミュータンスレンサ球菌の選択培地であるMSB培地に播種した。37℃で48時間培養後、平板上に生じたコロニー数を計測した。その結果を図3に示す。CBH標品の処理により、21名のプラークサンプルのうち18名においてミュータンスレンサ球菌数の減少が認められ、その差は有意であった。

これらの結果は、カカオハスク抽出物がヒトプラークのう蝕誘発能を減弱させる強い作用を有することを示しており、カカオハスク抽出物をヒト応用した場合にも、う蝕発生に抑制的に作用する可能性の高いことを示唆している。

図3 カカオハスク抽出物のヒトプラーク内ミュータンスレンサ球菌数に及ぼす作用



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。