

# 緑茶ポリフェノール及び鶏卵抗体の 抗齲蝕作用の評価

太陽化学株式会社 新素材営業部  
津田 憲

## 1、はじめに

人生80年の時代を迎え、21世紀には超高齢化社会の到来が予想されている今日、人が元気で楽しく健やかに生き続けるためには何が必要かが問われている。人は動物である。よって人は生き続ける限り、食べ続けなければならない。美味しい食べ物を美味しいと感じながら食べられることほど幸せなことではない。近い将来の高齢化時代に向けて、健康で幸福な生活を営むためにも健全な食生活は第一条件と考えられる。

人が生きている間、豊かで楽しい食生活を続けていくための条件とは何であろうか。身体的、生理的条件に限って言えば、まず歯が大切である。厚生省は80歳の時に自分の歯を20本以上残すことを目的とした「8020運動」なるものを提唱しているが、まさに健康な歯の維持、すなわちオーラルケアこそが健全な食生活につながるものと思われる。

本講ではオーラルケアを目的とした機能性素材として、当社で開発された緑茶ポリフェノール及び鶏卵抗体について紹介するとともに、その薬理学的効果を概説する。

## 2、齲蝕発生のメカニズム

人間の歯は全部で28本ある。厚生省の歯科疾患実態調査<sup>1)</sup>によると、喪失歯の平均数は20歳で約1本であるのに対して60歳では約12本、80歳では実に25本も失って、自分の歯はわずか3本となっているのが現状である。これら歯を失う最大の原因は齲蝕すなわちむし歯である。とくに近年の急激な砂糖消費量の増大に伴い、齲蝕の罹患率は著しく増加している。

齲蝕は、歯面に付着した細菌の産生する酸の作用によって、歯の組織（エナメル質や象牙質）が徐々に脱灰されて崩壊していく病理学的な現象であり、一般的にごく初期を除いては不可逆的で元の状態に復することはない。齲蝕の発現過程を図1<sup>2)</sup>に示す。齲蝕の発生には大きく分けて2つの段階がある。第一段階は歯垢の形成である。口腔内には数百種類の微生物が生息しているが、その中のひとつ Streptococcus mutans (S. mutans) はグルコシルトランスフェラーゼ (G T a s e) の作用により、飲食物中の砂糖を原料として非水溶性で粘着性のあるグルカンを生産する。グルカンをまとった S. mutans は歯面に強固に付着し、歯垢を形成する。一度歯垢が作られると物理的に削ぎ落とす以外に自然に

脱落することはない。

齲蝕の第二段階は菌垢の中での酸の産生である。砂糖、ブドウ糖、果糖などのいわゆる醱酵糖は比較的速やかに菌垢の中に浸透していく。菌垢の中では S. mutans の他、乳酸桿菌などの口腔内常在菌が繁殖しており、これらの糖類を醱酵して乳酸や酢酸などの有機酸を産生する。酸が菌垢の外へ拡散する速度は糖類が菌垢内へ浸透する速度よりも遅く、従って歯の表層は常に酸に覆われている状態となり、脱灰が進んでいく。ごく初期の段階での脱灰であれば、唾液により菌垢中の酸が中和され、唾液中のリン酸カルシウムがエナメル質に再沈着して歯が修復されるが、修復の速度を超えてあるレベル以上に脱灰が進んだ場合、ついには齲蝕の発生に至る。

### 3、齲蝕予防素材としての緑茶と卵

齲蝕は口腔内の細菌による一種の感染症であるが、不可逆的な現象であり、他の疾病と異なり自然に治癒することはない。従って齲蝕の罹患率を低下させるためには治療よりも予防に重点を置く必要がある。歯磨により菌垢を落とし、口腔内を常に清潔に保つことが最も手っ取り早く、かつ有効な手段であるが、各個人が日常的にこのような衛生的処置を完全に行うことは期待できない。歯面へのフッ素塗布や水道水へのフッ素添加によって歯のエナメル質の耐酸性を向上させることにより齲蝕を予防しようという試みもあるが、安全性の面から日本ではほとんど普及していない。一方では砂糖代替品（非醱酵性甘味料）を使用する動きもあるが、砂糖の甘みは我々にとって最も慣れ親しんだものであり、現在の食品から完全に砂糖を除外することは不可能である。このような状況下において、当社では齲蝕予防効果があり、かつ安全な素材を身近な食品の中から探してきた。予防的に用いるため、長期間しかも日常的に摂取しても全く問題がないことが条件となる。そこで、日本人にとっては最も身近な食品と言える緑茶と卵から抗齲蝕作用のある素材を見出だし、応用開発を行ってきた。以下、これらの素材について紹介する。

#### 1) 緑茶ポリフェノール

緑茶に齲蝕予防効果があることは、東京医科歯科大学の故大西教授らによる詳細な疫学調査により明らかにされている<sup>3)</sup>。その中で、新潟県下の小学校児童298名に給食後コップ一杯の緑茶を250日間与え、齲蝕好発部に現れた病変数を緑茶を与えないグループと比較したところ、緑茶を飲むことにより約50%程度齲蝕の発生を抑制することが報告されている。一方、我々は「日常茶飯事」という言葉に着目し、緑茶と食事の関係について探った。すなわち食後にお茶を飲むという習慣の中には齲蝕に対する何らかの作用があるものと類推し、緑茶中に含まれている生理活性物質を調べた。その結果、緑茶中に多く含まれているポリフェノール化合物には S. mutans に対する強い増殖抑制作用があることが

明らかとなった(表1、図2)<sup>41)</sup>。さらに、これらの緑茶ポリフェノールは齶蝕の第一段階である歯垢形成過程においても重要な影響を与えることがわかった。すなわち、緑茶ポリフェノールは *S. mutans* 由来グルコシルトランスフェラーゼの酵素活性を強く阻害し、歯垢の主成分である粘着性グルカンの生成を顕著に抑制した<sup>5)</sup>。

以上述べたように、緑茶ポリフェノールには、*in vitro*において *S. mutans* の増殖抑制作用とグルカンの生成抑制作用があることが証明されたので、次に実験動物を用いて、*in vivo* の系での抗齶蝕作用について調べてみた。実験は以下の要領で実施した。SPFのSD系ラットを用いて口腔内常在菌を抗生物質で予め無菌状態にした後、*S. mutans* (serotype c型)を接種し、齶蝕誘発飼料(Diet-M2000、56%砂糖含有)を基本飼料として、56日間飼育した。その後ラットを屠殺し、Keyesの方法に準じて齶蝕の程度を齶蝕スコアとして算定した。その結果、基本飼料又は飲水に緑茶ポリフェノールを0.05%以上含んでいた場合、有意に齶蝕スコアが低下し、齶蝕の発生が抑制されることがわかった(表2)<sup>6)</sup>。同様の結果はコンベンショナルWistar系ラットを用いた実験系でも得られている<sup>7)</sup>。この際、同時に測定した増体重、臓器重量及び血液生化学的分析結果に異常は全く見られなかった。次に実際の人への応用を考慮して、緑茶ポリフェノール入りの菓子(キャンディ、キャラメル、ビスケット)を作製し、この菓子を用いての齶蝕予防効果をラットを用いて試験した。実験方法は前述に準ずるが、基本飼料に含まれている砂糖をすべて菓子に置換えて供試した。その結果、いずれの菓子の場合でも、緑茶ポリフェノールを添加した群の方がやはり有意に齶蝕スコアが低下し、明らかに齶蝕の発生が抑制されることが確認された<sup>8)</sup>。

最後に直接人の口腔内への緑茶ポリフェノールの作用について試験した。まず25歳から35歳までの男性40名の被験者に対して口腔内の歯垢を完全に除去した後、緑茶ポリフェノールを添加した洗口液で1日3回食後に口を濯ぐことを3日間行った。この間、被験者に対して食事、嗜好品等に制限はしなかったが歯磨だけは禁止した。最終試験日に歯垢染色液で歯牙表面を染色し、写真撮影した後、写真上で歯垢付着量を算定した。その結果、緑茶ポリフェノール0.05%溶液で洗口した被験者の歯垢付着量は、対照群に対して38.7%の減少率を示した(表3)<sup>9)</sup>。また同時に測定した歯垢中の総細菌数も減少する傾向を示した。このように人における試験でも緑茶ポリフェノールが歯垢の形成を抑制することが証明された。間食を含めた通常の食生活の中で齶蝕予防につながる知見が得られたことの意義は大きいと考える。

## 2) 鶏卵抗体

鶏卵中には鶏の血液中の抗体が移行した鶏卵抗体が含まれている。特に卵黄中に多く、Immunoglobulin YolkすなわちIgYと呼ばれている。そもそもの生物学的存在意義は親鶏の獲得免疫を子孫すなわちヒヨコに伝え

ることであるが、人為的に鶏を過免疫することにより、ある種の抗原（細菌、ウイルス、タンパク質等）に対して特異的なIgYを鶏卵中に蓄積させることができる。一般的に鶏は年間250個もの卵を産み、卵1個の中には約100mgの鶏卵抗体が含まれているため、大量の抗体を確保する上で鶏卵は最も適した原料であるといえる。当社ではこの鶏免疫システムを利用して、S. mutansに対する鶏卵抗体を大量に作製し、齶蝕予防素材としての応用を検討した。

まず、S. mutans (serotype c型)を5%砂糖含有培地で培養し、そのホルマリン死菌を抗原として鶏を免疫した。免疫後、最初に血液中の特異的抗体力価が上昇し、約2週間遅れて鶏卵卵黄中にもS. mutansに対する特異的抗体力価の上昇が見られた(図3)。それぞれの抗体力価は徐々に低下したが、追加免疫を行うことにより再度上昇した。また、高力価の卵から精製した鶏卵抗体を試験管内でS. mutansと混合すると、菌体は速やかに凝集し、沈殿することがわかった。そこで免疫後4~10週の鶏卵より得た卵黄をスプレードライ法で粉末化し、これをS. mutansに対する鶏卵抗体として以下のラットを用いた動物実験に供した。実験方法は緑茶ポリフェノールの場合とほぼ同様であるが、基本飼料に36%砂糖及び20%鶏卵抗体(卵黄粉末)を含有するものを与えた。対照区には免疫をしていない市販の鶏卵の卵黄粉末を用いた。その結果、対照区の齶蝕スコアが $104.9 \pm 1.9$ であったのに対して、S. mutansに対する鶏卵抗体2%添加区 $81.4 \pm 6.5$ 、同6.6%添加区 $71.1 \pm 4.1$ 、同20%添加区 $42.8 \pm 2.8$ となり、それぞれ対照区と危険率1%の有意差をもって鶏卵抗体により齶蝕の発生が抑制されたことがわかった(表4)<sup>10)</sup>。

#### 4、おわりに

以上、緑茶ポリフェノール及び鶏卵抗体による抗齶蝕作用について、当社で得られた知見を中心に紹介した。鶏卵抗体については、*in vitro*及びラットを用いた動物実験が終了したところであるが、緑茶ポリフェノールの方はヒトを対象とした臨床試験においてもその効果が確認されつつあり、食品用の齶蝕予防素材としては現在最も研究が進んでいる。また平成5年4月には日本健康・栄養食品協会より特定保健用食品の内部評価(保健の用途:「虫歯菌増殖抑制効果」、「菌垢形成抑制効果」)も出ており、今後の一般市場での動向が注目されている。

<参考文献>

- 1) 厚生省健康政策局歯科衛生課編：昭和62年歯科疾患実態調査報告、  
口腔保険協会、東京(1989)
- 2) 浜田茂幸、日本歯科評論、No. 495、47(1984)
- 3) M. Onishi, J. Dent. Hlth., 31, 13 (1981)
- 4) S. Sakanaka, Agric. Biol. Chem., 53, 2307(1989)
- 5) S. Sakanaka, Agric. Biol. Chem., 54, 2925(1990)
- 6) S. Otake, Caries Res., 25, 438(1991)
- 7) S. Sakanaka, Biosci. Biotech. Biochem., 56, 592, (1992)
- 8) 西原由恭、日大口腔科学、19, 217~223(1993)
- 9) 大岩俊子、小児歯科学雑誌、31, 247(1993)
- 10) S. Otake, J. Dent, Res., 70, 162(1991)

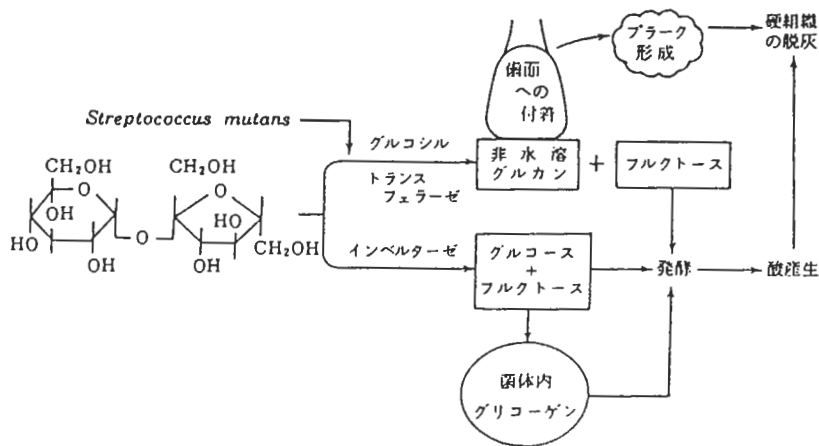


図1 虫歯発生のメカニズム

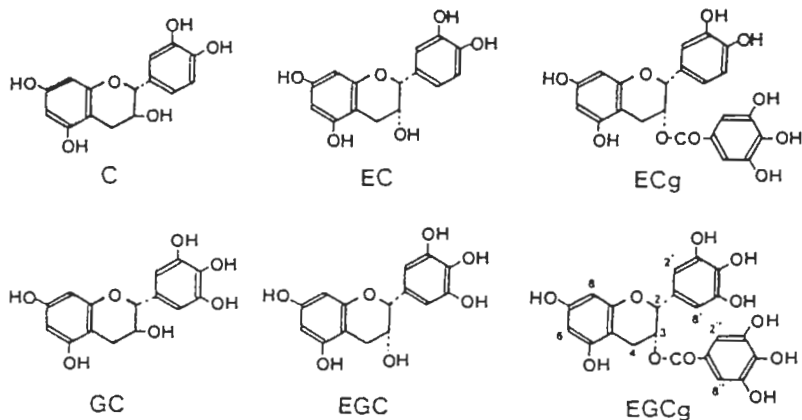


図2 Structures of isolated polyphenols

表1 Minimum inhibitory concentrations (MIC) of tea polyphenols isolated for cariogenic bacteria

Test compounds <sup>3)</sup>	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	<i>S. mutans</i> MT8148		<i>S. mutans</i> IFO 13955		<i>S. mutans</i> 6715DP	
	a <sup>1)</sup>	b <sup>2)</sup>	a	b	a	b
C	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
EC	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
GC	250	250	250	250	250	250
EGC	500	250	500	250	500	250
ECg	> 1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
EGCg	1000	500	1000	500	1000	500

1) BHI agar medium

2) Sensitive meat extract agar medium

3) Test compounds: C, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin; GC, (-)-gallocatechin; EGC, (-)-epigallocatechin; ECg, (-)-epicatechin gallate; EGCg, (-)-epigallocatechin gallate

表 2 *S.mutans* 感染ラットのう蝕に対する緑茶ポリフェノール(サンフェノン)の抑制効果

サンフェノン濃度 (%)	う蝕スコア (Mean ± SE)	
飼料	飲水	
0	0	109.3 ± 8.6
0.025	0	94.0 ± 7.3
0.05	0	64.6 ± 6.8**
0.1	0	64.3 ± 4.8**
0	0.025	96.0 ± 8.1
0	0.05	66.1 ± 9.2**
0	0.1	67.9 ± 6.1**
0.05	0.05	66.9 ± 7.0**

う蝕スコアは78日齢にカイスの方法により評価した。

\*\* P<0.01

表 3 緑茶ポリフェノールによるヒト歯垢形成の抑制

サンフェノン濃度 (%)	歯垢付着区画数			合計	歯垢抑制率 (%)
	減少区画数	変化なし	増加区画数		
0.05	22.8	21.0	4.2	48.0	38.7
0.1	20.3	21.7	4.3	46.3	34.5
0.2	20.6	24.4	3.0	48.0	36.6
0.5	20.9	23.6	2.5	47.0	39.2

$$\text{歯垢抑制率 (\%)} = \frac{\text{歯垢付着減少区画数} - \text{歯垢付着増加区画数}}{\text{総歯面区画数}} \times 100 (\%)$$

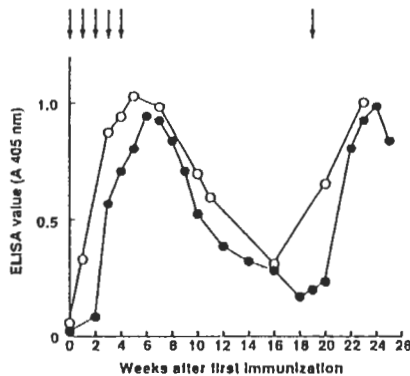


図 3

Egg-yolk and serum antibody values against *Streptococcus mutans*.

Closed (●) and open (○) circles indicate antibody levels in egg yolk and serum, respectively, of hens immunized with *S. mutans* MT8148. Arrows indicate the immunization schedule. Intramuscular immunization was performed once a week for four weeks after initial immunization. Boosting was also done at 19 weeks. The data in this Fig. are representative of results obtained from ten immunized hens.

表 4

Mean caries scores in mandibular molars of specific pathogen-free rats infected with *S. mutans* MT8148 (c) and fed with diet M2000 for 58 days<sup>†</sup>

Groups (Ratio of Immune/Control Yolk Powder in Diet) :	Mean Caries Score ( $\pm$ SE) <sup>‡</sup>			
	Sulcal	Buccal	Approximal	Total
A(100/0)	40.1 $\pm$ 2.5*	2.1 $\pm$ 0.3*	0.5 $\pm$ 0.3*	42.8 $\pm$ 2.8*
B(33/67)	64.1 $\pm$ 3.7*	5.6 $\pm$ 0.4**	1.4 $\pm$ 0.6*	71.1 $\pm$ 4.1*
C(10/90)	71.1 $\pm$ 5.0*	7.3 $\pm$ 1.2	3.0 $\pm$ 0.8	81.4 $\pm$ 6.5*
D(0/100)	90.4 $\pm$ 1.1	9.6 $\pm$ 1.1	4.9 $\pm$ 0.8	104.9 $\pm$ 1.9

\* 56% sucrose in diet 2000 was replaced by 36% sucrose and 20% egg-yolk powder containing different ratios of immune and control powders.

† Different ratios of egg-yolk powder prepared from immunized and normal hens were added to diet M2000. For example, diet M2000 used in group B contained a ratio of 33 to 67 of immune and control powder, respectively, in the 20% egg-yolk powder. Each group contained seven rats. The average weight of the rats was 234.1  $\pm$  3.2 g, and the weights of rats in the four different groups were very similar.

‡ Statistical analyses (*t* tests) were carried out between group D and the other groups.

\* Significance of difference,  $p < 0.01$ .

\*\* Significance of difference,  $p < 0.05$ .