

## プロポリス中の抗う蝕性物質について

西尾 美緒, 田淵 彰彦, 渋谷 孝,  
茶園 博人, 福田 恵温, 栗本 雅司

蜂の巣由来の樹脂状物質プロポリスは、東欧諸国を中心に古くから民間療法薬として用いられている。プロポリスはフラボノイドをはじめとして多種類の植物成分を含有しており、抗菌作用、鎮痛作用、抗腫瘍作用、マクロファージ活性化作用など多くの薬理活性が知られている(阿賀ら, 1992; 新井・栗本, 1994; 松野, 1992)。また、抗菌作用の観点から、プロポリスは微生物が関与する疾患、例えばう蝕に対する予防効果が期待されている(池野ら, 1994)。

う蝕は歯面に付着したミュータンス連鎖球菌の代謝産物によって歯の硬組織が崩壊をきたす感染性疾患のことである。すなわち、ミュータンス連鎖球菌のグルコシルトランスフェラーゼ(GTase)によってスクロースから不溶性グルカンが生成し、これが歯表面に付着し、歯垢が形成される。次いで、歯垢に付着したミュータンス連鎖球菌によりグルコース、スクロースなどの糖質から酸が生成して歯のエナメル質が脱灰し、う蝕が発生する。その発症には飲食物中の糖質、口腔内の微生物、歯の質など多くの因子が複雑かつ微妙に関係している(Gibbons and van Houte, 1975)。ミュータンス連鎖球菌によって酸発酵を受けない糖質、GTaseによる不溶性グルカン合成を阻害する糖質が非う蝕性糖質あるいは抗う蝕性糖質として種々食品に利用されている。

我々はプロポリスの生理的作用研究のひとつとして、プロポリスエキスおよび当研究所でプロポリスから単離した数種の物質について、ミュータンス連鎖球菌に対する抗菌活性、ミュータンス連鎖球菌の酸生成能およびGTaseによる不溶性グルカン合成能に対する作用を検討し

たので報告する。

### 材料および方法

#### 1. プロポリスエキスの調製および単離物質

ブラジル産プロポリス原塊 100g をトリオペレンダーで粉碎し、これに脱イオン水、50 または 90% (v/v) エタノール水溶液をそれぞれ 250ml 加え、60°C で 2 時間攪拌した。一夜冷室に放置後、ケイソウ土を用いて濾過、濃縮、乾固し、プロポリスエキスを得た。水抽出エキス、50 または 90% (v/v) エタノール抽出エキスの固形分収率はそれぞれ 5.8、30.8 および 34.4% であった。プロポリスからの単離物質として、当研究室で単離し、同定した桂皮酸化合物; 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (アルテピリン C) [I], 3-prenyl-4-dihydrocinnamoloxy-cinnamic acid [II], および 3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid (ドゥルパニン) [III] を使用した (Aga et al., 1994)。

#### 2. 抗菌活性の測定

試験には *Streptococcus sobrinus* 6715, *S. mutans* OMZ-176, *S. mutans* Ingbritt, *S. cri-cetus* OMZ 61 (a), *S. mutans* OMZ-65, *S. mutans* OMZ-175 および *S. mutans* B-13D の 7 菌株を使用した。ブレインハートインフュージョン培地 (Difco) を用いて 37°C, 24 時間、嫌気下で培養した培養液を菌懸濁液とした。抗菌試験は日本化学療法学会の嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法に準じて行った。最高試験濃度を固形分として 800  $\mu$ g/ml とし、25% (v/v) エタノール水溶液で順次 2 倍希釈を行って試験寒天平板を作製した。感受性測定用寒天培地としてブレインハートインフュー

表1 ミュータンス連鎖球菌に対するプロポリスエキスおよび単離物質の抗菌活性

菌 株	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	プロポリスエキス			単離物質		
	水抽出	50%エタノール	90%エタノール	[I]	[II]	[III]
<i>S. sobrinus</i> 6715	>800	800	800	200	200	>400
<i>S. mutans</i> OMZ-176	>800	400	200	100	100	400
<i>S. mutans</i> lngbritt	>800	800	800	100	100	400
<i>S. cricetus</i> OMZ61(a)	>800	800	800	100	100	>400
<i>S. mutans</i> OMZ-65	>800	200	200	50	50	200
<i>S. mutans</i> OMZ-175	>800	800	800	100	200	400
<i>S. mutans</i> B-13D	>800	800	400	50	100	200

ージョン寒天培地 (Difco) を用いた。各菌懸濁液を試験寒天平板培地に径約 1mm の白金耳で画線し、37°C で 24 時間嫌気培養し、MIC を求めた。

### 3. スクロースからの酸生成に及ぼす影響

ミュータンス連鎖球菌による酸発酵性試験は Stephan の方法 (Stephan and Hemmens, 1947) に準じて行った。*S. sobrinus* 6715 をブレインハートインフュージョン培地を用いて、37°C で 24 時間嫌気培養し、遠心分離して菌体を回収した。この菌体をステファン緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し、同緩衝液に懸濁して菌体懸濁液を調製した。反応は、最終濃度 25% (v/v) の湿菌体、10mM スクロースおよびエタノールに溶解したプロポリスエキスあるいは単離物質 (エタノール最終濃度 5%) を含むステファン緩衝液中、37°C で行い、経時的に pH を測定した。対照には被検液の代わりに同濃度のエタノールを含むステファン緩衝液を加えた。

### 4. 不溶性グルカン合成に及ぼす影響

ブレインハートインフュージョン培地を用いて *S. mutans* OMZ-176 を培養し、その培養上清から粗 GTase を調製した。最終濃度 1% のスクロース、0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8)、粗 GTase およびエタノールに溶解したプロポリスエキスあるいは単離物質 (エタノール最終濃度 2.5%) を含む反応液 2ml をガラス製試験管 (10×100mm) に入れて、30° の仰角で固定し、酵素反応を 37°C で 16 時間行った。対照には被検液の代わりに同濃度のエタノールを含む緩衝液を加えて反応させた。酵素反応液を遠心

分離して沈殿を回収した。これを 1M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、アンスロン-硫酸法により全糖量を測定した。これを不溶性グルカン量とした。

## 結果

### 1. 抗菌活性

ミュータンス連鎖球菌に対するプロポリスエキスおよびプロポリスからの単離物質の抗菌活性を表に示した。水抽出エキスは 800  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でもミュータンス連鎖球菌の生育に影響しなかったが、エタノールエキスおよび単離物質は抗菌作用を示した。とくに、*S. mutans* OMZ-65 に対して物質 [I] および [II] が強い抗菌作用を示した (MIC 50  $\mu\text{g/ml}$ )。90% (v/v) エタノールエキスを原料としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した標品の抗菌活性を調べたが、物質 [I]、[II] を含む画分以外にこれらより強い活性を有する画分は得られなかった。したがって、ブラジル産プロポリスの成分の中で物質 [I]、[II] がミュータンス連鎖球菌に対して最も強い抗菌活性を示す成分であると判断された。

### 2. 酸生成抑制作用

図 1 に *S. sobrinus* 6715 によるスクロースからの酸生成に及ぼすプロポリスエキスおよび単離物質の影響を示した。対照の pH は反応 15 分で pH 4.5 以下となったが、物質 [I] および [II] を 2.5mg/ml 添加した反応液では pH が 6 付近で一定となり、これらの物質が同菌によるスクロースからの酸生成を抑制することが

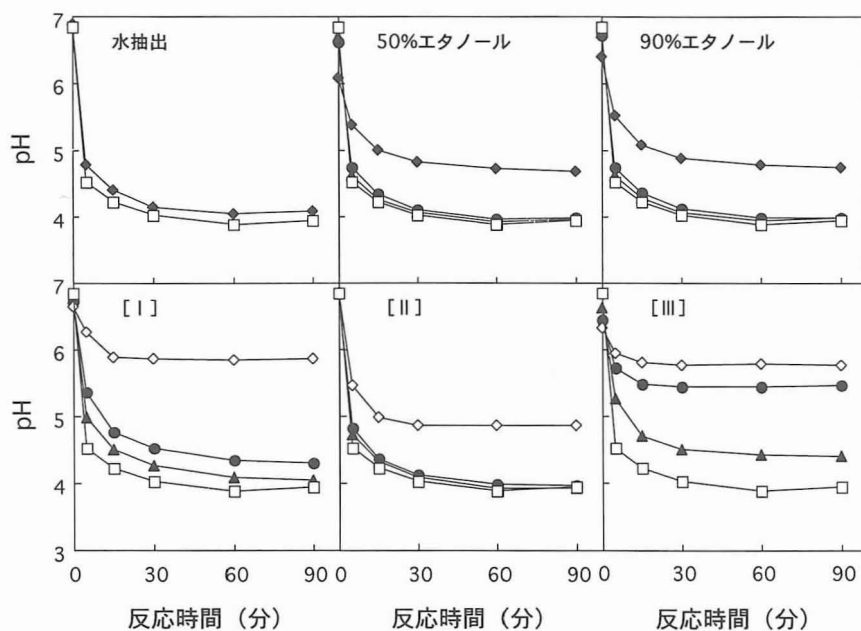


図1 *S. sobrinus* 6715 によるスクロースからの酸生成に及ぼすプロポリスエキスおよび単離物質の影響  
 —□— 対照 —◆— 5mg/ml —◇— 2.5mg/ml —●— 1mg/ml —△— 0.5mg/ml

わかった。プロポリスエタノールエキスおよび物質[II]もそれらよりは弱かったが、酸生成を抑制した。

### 3. 不溶性グルカン合成に及ぼす影響

*S. mutans* OMZ-176 の粗 GTase を用いたスクロースからの不溶性グルカン合成に対するプロポリスエキスおよび単離物質の影響を調べた結果を図2に示した。プロポリスエタノールエキスおよび物質[I]はGTaseによる不溶性グルカン合成を阻害した。濃度400 $\mu$ g/mlにおける阻害率は、90%(v/v)エタノールエキスで29.1%、物質[I]で33.5%であった。

### 考察

プロポリスエキスは細菌、カビ、酵母など広範囲にわたって抗菌作用を示す(Grange and Davey, 1990; 阿賀ら, 1992)。池野ら(1994)は中国産プロポリスを用いたラットう蝕に対する効果を調べている。彼らはその研究の中で、プロポリスエキスの一成分である桂皮酸がミュータンス連鎖球菌に対して抗菌作用を示したと報告している。さらに桂皮酸はGTase活性を阻害し、これがラットう蝕の予防効果を示す主要物質であろうと述べている。

本報において、ブラジル産プロポリスからの単離成分であるアルテピリンC, 3-prenyl-4-dihydrocinnamoloxy-cinnamic acidなどの桂皮酸化合物が、ミュータンス連鎖球菌に対して強い抗菌作用を有することがわかった。また、これらの桂皮酸化合物はミュータンス連鎖球菌によるスクロースからの酸生成を抑制した。その抑制の程度はアルテピリンC, ドゥルパニンが強く、抗菌活性と酸生成抑制力との間に特に相関はみられなかった。これら化合物による酸生成の抑制は、抗菌作用と糖代謝系酵素に対する阻害作用との複合的な作用によるものと考えられる。さらに、ミュータンス連鎖球菌のGTaseによる不溶性グルカン合成に対して、プロポリスエタノールエキス、アルテピリンCが阻害を示した。アルテピリンCによる不溶性グルカン合成阻害は、パラチノースなどの抗う蝕性糖質(Minami et al., 1990)よりも数倍強いと思われる。

プロポリスエタノールエキスは、う蝕発生要因に対して阻害的作用を示し、その活性物質として桂皮酸化合物が明らかとなった。プロポリスには百数十種以上の薬理活性物質が存在すると言われている。従って、桂皮酸化合物以外に

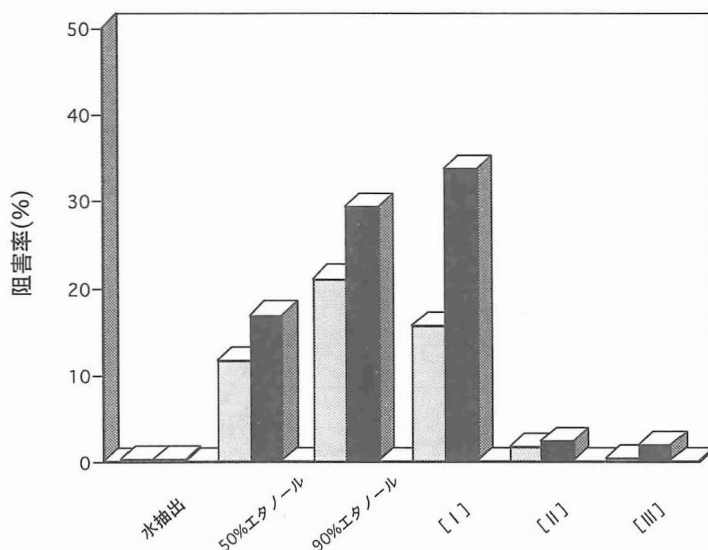


図2 プロポリスエキスおよび単離物質による GTase の不溶性グルカン合成阻害対照の不溶性グルカン量, 1.04mg/ml GTase : *S. mutans* OMZ-176 からの粗酵素標品

□: 200μg/ml ■: 400μg/ml

もミュータンス連鎖球菌に対して何らかの阻害作用を示す化合物が存在している可能性があるが、池野らにより GTase 活性阻害が明らかにされている桂皮酸も含めて、アルテピリン C などの桂皮酸化合物がその中心的な物質であると考えている。プロポリスエタノールエキスのう蝕に対する予防効果が期待される。

(〒700 岡山市天瀬南町 7-7

(株)林原生物化学研究所 天瀬研究所)

#### 引用文献

- 新井成之・栗本雅司. 1994. ミツバチ科学. 15(4): 155-162.
- 阿賀創ら. 1992. Med. Biol. 124(5): 205-209.
- Aga, H. et al. 1994. Biosci. Biotech. Biochem. 58(5): 945-946.
- Gibbons, R. J. and D van Houte. 1975. Annu. Rev. Microbiol. 29: 19-44.
- Grange, J. M. and Davey, R. W. 1990. J. Royal Soc. Medicine, 83, 159-160.
- 池野久美子ら. 1994. ミツバチ科学. 15(1): 1-6.
- 松野哲也. 1992. ミツバチ科学. 13(2): 49-54.
- Minami, T. et al. 1990. Oral Microbiol. Immunol. 5: 189-194.
- Stephan, R. M. and Hemmens, E. S. 1947. J. Dent. Res. 26: 15-41.
- NISHIO, M., A. TABUCHI, T. SHIBUYA, H. CHAEN, S. FUKUDA and M. KURIMOTO. Anti-dental caries

compounds in Brazilian propolis. *Honeybee Science* (1996) 17(4): 151-154. Amase Institute, Hayashibara Biochem. Labs., Inc., 7-7, Amase-minami machi, Okayama 700, Japan.

Extracts of Brazilian propolis and three cinnamic acid compounds isolated from propolis were investigated for antimicrobial activities towards mutans streptococci, and for the inhibition of acid-formation from sucrose by the microorganism and inhibition of the synthesis of insoluble glucan by glucosyltransferase from the microorganism.

The ethanol extract of propolis showed antibacterial activity towards mutans streptococci, and inhibition of both acid-formation and synthesis of insoluble glucan. The cinnamic acid compounds, 3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (1), 3-prenyl-4-dihydrocinnamoxycinnamic acid (2) and 3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid (3), isolated from propolis showed stronger antibacterial activity towards mutans streptococci than that of the extract. Compounds (1) and (3) strongly inhibited acid formation and compound (1) inhibited the synthesis of insoluble glucan.

The ability of propolis extracts to inhibit factors causing dental caries was suggested to be due to cinnamic acid compounds.