

## ラットう蝕に対するプロポリスの効果

池野 久美子・池野 武行・宮沢 忠蔵

歯牙う蝕（虫歯）誘発性原因菌と言われる連鎖球菌が歯苔形成に関与しているというのは、ショ糖（砂糖）から、不溶性グルカン（IG）を生合成するグルコシルトランスフェラーゼ（GTase）の存在と関係がある（Gibbons and van Houte, 1975）。最近、GTase 阻害剤であるムタステインが *Aspergillus terreus* の培養上清から単離された（Endo et al., 1983）。ムタステインそれ自身はなんら抗菌作用はもたないが、IG の生合成を抑制し、また、*Streptococcus mutans* がガラスに付着するのを阻止する効果を有する（Koga et al., 1982, Endo et al., 1983）。ムタステインはまた *Streptococcus sobrinus* を接種されたラットの歯牙う蝕を低下させた（Nakamura et al., 1985）。これとは異なるタイプの GTase 阻害剤リボシトリン（ribocitrin）は *Streptomyces* sp. の培養上清から発見された（Okami et al., 1981）。

ミツバチが植物から集めた樹脂状物質であるプロポリスには抗菌作用、抗炎症作用、麻酔作用などがあると報告されている（Ghisalberti, 1979）。プロポリスに含まれる化学物質のうち3-アセチルピノバンクシン、ピノセンブリン、ガランギン、p-クマル酸ベンジルエステル、カフェ酸エステルなどに抗菌作用が認められている（Metzner et al., 1975）。プロポリスから単離されたカフェ酸フェネチルエステルはがん細胞に対して毒性を有する（Grunberger et al., 1988）。我々はラットの歯牙う蝕に対するプロポリスの効果を検討するとともに、プロポリスが連鎖球菌の菌成長やグルコシルトランスフェラーゼ活性に与える影響を検討した。

### 実験材料ならびに方法

プロポリス：中国遼寧省、江蘇省産プロポリスならびに郡山（福島県、日本）産プロポリスの3種類を用いた。いずれのプロポリスも黒褐色の硬い樹脂状塊で入手した。これらの塊を砕いてこれに5倍量のエタノールを加えて一晩放置してから濾過し、プロポリスのエタノール抽出液を得た。抗菌作用の実験を行う際にはこれらのエタノール抽出液をエタノールで稀釈して290nmでの吸光度が同一になるように調整した。

プロポリスの成分：3種類のプロポリスの成分を高速液体クロマトグラフィ（HPLC）で分析した。HPLCはウォーターズ社のモデル204、カラムはマイクロボンダスフェア C<sub>18</sub>（0.39×15cm）を使って行った。流速は0.5ml/分で溶媒はメタノール/水/酢酸（75:60:5）であった。プロポリスの最大吸収波長は290nmであるのでHPLCでの検出は280nmで行った。標品として桂皮酸、桂皮酸メチルエステル、桂皮酸エチルエステル、カフェ酸、クリシン、ケルセチン（いずれもシグマ社）を用いた（Kuno, 1987）。

細菌：*S. sobrinus* 6715（旧 *S. mutans*, 血清型 d/g）、*S. mutans* PS14(c)、*Streptococcus cricetus* OMZ61(a) を使った。これら細菌の培養はGAM寒天（ニッスイ）で4日間37℃、嫌気下で行った。

抗菌効果の判定：*S. sobrinus* 6715、*S. mutans* PS14、*S. cricetus* OMZ61の培養は8% w/v ショ糖を含む Soybean-Casein Digest Medium（ディフコ社）を用いた平板寒

天培地で行った。すなわち、各細菌懸濁液 (550 nm での吸光度が 1.00, 細菌数は約  $10^8$  個) をそれぞれ寒天培地に混合, 植菌した。各プロポリスのエタノール抽出液 (プロポリス量として  $100\mu\text{g}$ ) を直径 5mm の無菌濾紙にしみこませて, 寒天培地上に置いて  $37^\circ\text{C}$ , 嫌気下で培養した。培養 48 時間後に各細菌成長抑制ゾーンの直径を測定した。

IG 合成の抑制: *S. sobrinus* 6715, *S. mutans* PS14, *S. cricetus* OMZ61 の各細菌懸濁液 0.1ml を 8% w/v ショ糖とプロポリスのエタノール抽出液  $50\mu\text{l}$  を含む Soybean-Casein Digest Medium (総量 5ml) 中に植菌した。対照としてプロポリスエタノール抽出液のかわりにエタノール  $50\mu\text{l}$  を加えた。この混合液をガラス製試験管 ( $13\times 105\text{mm}$ ) に入れて  $30^\circ$  に傾けて,  $37^\circ\text{C}$  で 48 時間培養した。各細菌の IG 合成能, すなわちガラス付着性は培養後の濁度を 550nm の波長で測定して算出した (Koga et al., 1982)。

GTase 活性の抑制: 粗 GTase は, *S. sobrinus* 6715, *S. mutans* PS14, *S. cricetus* OMZ61 を Soybean-Casein Digest Medium で培養して, その培養液から調整した。GTase 活性はショ糖を基質として, 酵素反応で遊離する果糖量を測定して算出した (Smith et al., 1979)。すなわち, 酵素反応液には 0.25M ショ糖 1.0ml, 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.0) 0.5ml, 遼寧省産プロポリスのエタノール抽出液 0.025 ml ( $2.5\text{mg/ml}$ , 対照にはプロポリスエタノール抽出液のかわりに同量のエタノール), 粗 GTase 抽出液および生理食塩水を加えて総量 2.0ml として, ガラス製試験管 ( $13\times 105\text{mm}$ ) に入れて  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間酵素反応を行った。桂皮酸とその誘導体の GTase 活性におよぼす影響の実験には桂皮酸, 桂皮酸メチルエステル, 桂皮酸エチルエステルそれぞれを  $50\text{mg/ml}$  エタノールの濃度として, いずれもプロポリスのエタノール抽出液のかわりに加えた。酵素反応後に除タンパクを行って, その上清中の総還元糖量を Somogyi-Nelson 法 (Somogyi, 1952) で測定した。

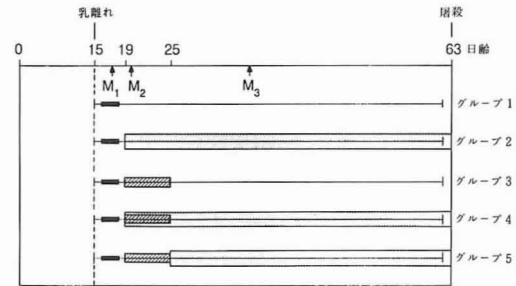


図 1 実験スケジュール

ラットにはう蝕誘発性食餌 (ダイエット No. 2000) を与えた (—|)。■=ストレプトマイシン処理, ▨=*S. sobrinus* 6715 接種, ▩=プロポリス投与。

↑ $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ; 各臼歯萌出時期

ラットの歯牙う蝕: この実験にはウイスター系雄ラット (体重 31g) を用いた。これにストレプトマイシン耐性の *S. sobrinus* 6715 を接種してう蝕誘発性食餌 (ダイエット No. 2000: Keyes and Jordan, 1964) を与えた。実験スケジュールを図 1 に示した。雄ラットは生後 15 日齢で離乳させ, ダイエット No. 2000 で飼育し, 0.05% のストレプトマイシンを含む水を 4 日間与えた。その後, 生後 19 日齢雄ラットに *S. sobrinus* 6715 を以下のようにして植菌した。生後 19 日齢のラットは臼歯 ( $M_1$ ,  $M_2$ ) が萌出直後である。このラットに, GAM 寒天平板培地で培養した *S. sobrinus* 6715 を滅菌生理食塩水に懸濁 (約  $10^8$  個/ml) して, その 0.2ml を毎日一回 7 日間口腔内へ直接注入した。さらに, *S. sobrinus* 6715 懸濁液を飲料水に混合し (3% 溶液) 7 日間飲ませた。実験に用いたラットを 5 群に分けた。グループ 1 は飲料水に 1% のエタノールを与えられたラット (対照); グループ 2 は飲料水に 1% のプロポリスエタノール抽出液 (遼寧省産, 最終濃度は  $1\text{mg/ml}$ ) を与えられたラット; グループ 3 は *S. sobrinus* 6715 を接種されて, 飲料水に 1% のエタノールを与えられたラット; グループ 4 は *S. sobrinus* 6715 を接種されると同時に, 飲料水に 1% のプロポリスエタノール抽出液を与えられたラット; グループ 5 は *S. sobrinus* 6715 を 1 週間接種されてから飲料水に 1% のプロポリスエタノール抽出液を与えられたラットであ

る。グループ2, 4 それに5のラットには同濃度のプロポリスエタノール抽出液を与えた。いずれのグループのラットも餌はダイエツト No. 2000 を摂食させ、それぞれに調整した飲料水も自由に摂取できるようにして48日間飼育した。飼育観察後、屠殺前に17時間絶食した。ラットにペントバルビタールを腹腔内注射(25 mg/kg 体重)して麻酔下に大腿部静脈から採血した。その後断頭屠殺して下顎骨を抽出し、それを10%の中性ホルマリン液中で1週間固定した。その後、下顎を水洗して0.5%の塩基性フクシンで4時間染色した。試料下顎骨を水洗してから近位—遠位方向に二分割した(頬側と舌側から同距離の位置で、ダイヤモンドディスクで切断)。そしてその切片を実体顕微鏡で観察した。ラットの下顎臼歯の裂溝は両側を合わせると10になるので、この内いくつかの裂溝がう蝕になっているかを算出した。裂溝がう蝕になっているかどうかの判定は、切片を実体顕微鏡で観察しながら、象牙質エナメル境界を越えて染色が進んだ裂溝をう蝕とした。断頭屠殺したラットから臓器として唾液腺、膵臓および肝臓を抽出した。

生化学的検査：膵臓中の酵素活性レベルは、

餌の組成によって変化することが既に報告されている(Howard and Yudkin, 1963; Wicker et al., 1984)。そこで、ラットの餌の組成にプロポリスが影響を与えるかどうかを知るためにも、血清と臓器中のアミラーゼ活性ならびに血糖値を測定した。抽出した臓器に生理食塩水を加えてホモゲナイズして、遠心分離後その上清を酵素活性測定に用いた。アミラーゼ活性はブルースターチ(ネオ-アミラーゼテスト、第一純薬)を基質として吸光分析した(Ceska et al., 1969)。血糖値はぶどう糖酸化酵素法(Blood Sugar-GOD-Perid Test, ベーリンガーマンハイム)で測定した。

結果は Student's t test で評価した。p < 0.01 値で有意差検定を行った。

## 結 果

中国遼寧省産のプロポリスの成分を高速液体クロマトグラフィーで分析すると図2のような結果になった。桂皮酸はリテンション時間(RT) 8.20分に検出され、この他に桂皮酸エチルエステル(RT27.90分)、カフェ酸(RT3.02分)、クリシン(RT26.11分)、ケルセチン(RT 6.95分)がそれぞれ同定できた。しかし、桂皮

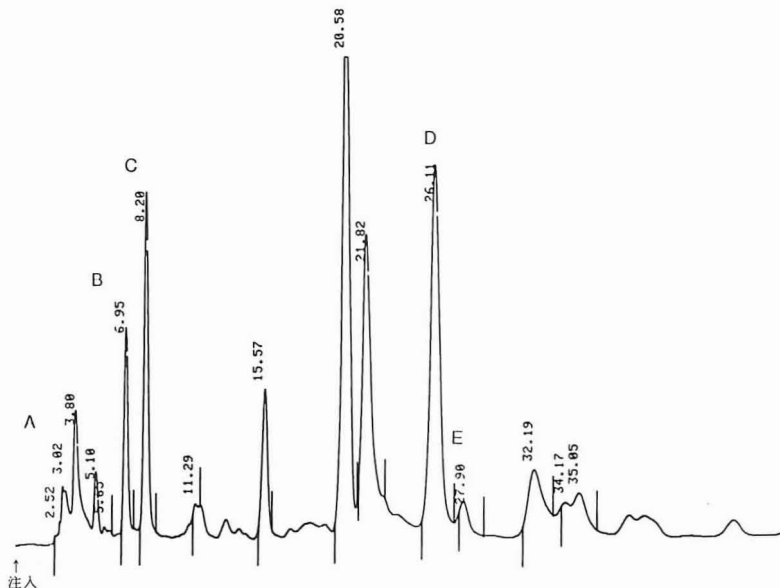


図2 中国遼寧省産プロポリスの HPLC 分析

A = カフェ酸, B = ケルセチン, C = 桂皮酸, D = クリシン, E = 桂皮酸エチルエステル

表1 産地別プロポリスの抗菌作用

プロポリス 産地	細菌成長抑制ゾーン, mm		
	<i>S. sobrinus</i> 6715	<i>S. mutans</i> PS14	<i>S. cricetus</i> OMZ61
遼寧省(中国)	7.50±0.70	6.35±0.45	6.90±0.60
江蘇省(中国)	6.20±0.20	5.55±0.05	6.10±0.10
郡山(日本)	6.25±0.15	5.55±0.05	6.45±0.35
エタノール(対照)	ND	ND	ND

数値は2回の実験の平均値±SEM. 各産地のプロポリスのエタノール抽出液は、波長290nmで同一の吸光度となるように希釈されている。遼寧省(1:22), 江蘇省(1:38), 郡山(1:11), ND=検出されず

酸メチルエステルは検出されなかった。プロポリスの検出パターンは中国遼寧省産, 江蘇省産, 日本郡山産いずれも類似していた。

プロポリスの *S. sobrinus* 6715, *S. mutans* PS14, *S. cricetus* OMZ61 に対する抗菌作用を表1に示した。各産地から得られたどのプロポリスもこれらの細菌に対してはほぼ同じ抗菌効果をもっていた(表1)。

図3と表2にIG合成とGTase活性におよぼすプロポリスの効果をそれぞれ示した。100 µg/ml濃度でプロポリスは *S. sobrinus* 6715, *S. mutans* PS14, *S. cricetus* OMZ61のいずれの菌に対しても、そのIG合成を顕著に抑制した。しかし、プロポリスによるIG合成抑制の程度は、これら3系統の菌種間で幾分かの差異はみられた。2.5mg/ml濃度の遼寧省産プロポリスは *S. sobrinus* 6715, *S. cricetus* OMZ61のGTase活性を40%抑制し、*S. mutans* PS14のGTase活性を60%抑制した(表2)。標品の桂皮酸誘導体(シグマ)を用いてGTase活性に対する効果を実験すると、5.0mg/ml以上の濃度で桂皮酸は *S. cricetus* OMZ61のGTase活性をほぼ100%阻害した(図4)。それに反して、桂皮酸エチルエステルと桂皮酸メチルエステルは全くこの酵素活性を阻害しなかった。また、*S. mutans* PS14から調整した上清中のGTase活性に対しても同様の結果が得られた。

ラットを用いたう蝕実験期間中に、プロポリスがラットの成長に影響するかどうかを観察し

表2 グルコシルトランスフェラーゼ活性におよぼすプロポリスの影響

	グルコシルトランス フェラーゼ活性, mg/2h/ml		
	プロポリス	比	
	-	+	
<i>S. sobrinus</i> 6715(4)	1.86±0.23	1.14±0.15	0.61
<i>S. mutans</i> PS14(3)	6.30±0.58	2.50±0.17	0.40
<i>S. cricetus</i> OMZ61(3)	2.00±0.32	1.21±0.38	0.61

数値は平均±SEM. 実験例数をカッコ内に示した。遼寧省産プロポリスのエタノール抽出液(25µl)を添加した。対照には同量のエタノールを添加した。

た。いずれの実験グループも体重は順調に増加し、実験終了時の体重は185±4g(グループ1), 178±5g(グループ2), 187±3g(グループ3), 183±4g(グループ4), 182±5g(グループ5)であった(実験開始時の体重はいずれのグループも31±1g)。このように対照グループとプロポリス処理グループ(グループ2, 4, 5)とに差は認められなかった。また、ラット血糖値と各組織中のアミラーゼ活性についてもこれらのグループ間で比較した。血糖値はそれぞれ、52±5mg/dl(グループ1), 55±4mg/dl(グループ2), 64±7mg/dl(グループ3), 70±4mg/dl(グループ4), 67±3mg/dl(グループ5)であった。膵臓のアミラーゼ活性は132±12units(グループ1), 152±17units(グループ2), 170±16units(グループ3), 184±14units(グループ4), 219±18units/mg膵臓(グループ5)であった。この他血清、耳下

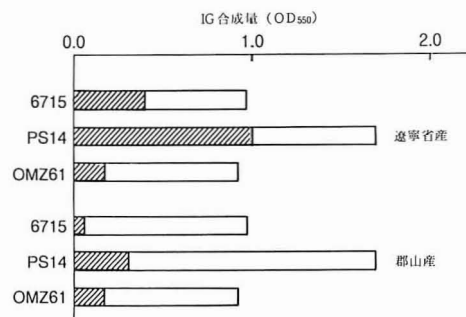


図3 プロポリス存在下における *S. sobrinus* 6715, *S. mutans* PS14, *S. cricetus* OMZ61 のIG産生 □=プロポリスなし(対照), ■=プロポリス存在下

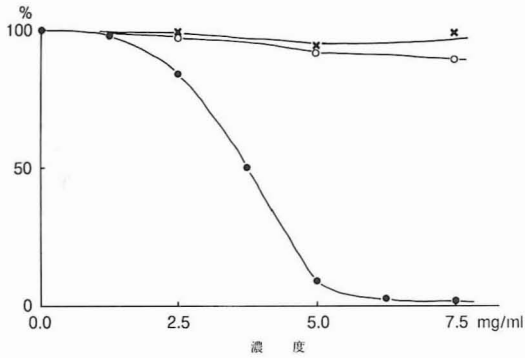


図4 桂皮酸誘導体による *S. cricetus* OMZ61 の GTase 活性阻害率  
●=桂皮酸 (5), ×=桂皮酸エチルエステル (3), ○=桂皮酸メチルエステル (4). 括弧内の数字は実験例数

腺、肝臓中のアミラーゼ活性も同様に対照グループとプロポリス処理グループ（グループ 2, 4, 5）とに差は認められなかった。

ラット一匹当たりの歯牙う蝕裂溝数 (caries fissures, 最大値 10) を計測すると,  $0.4 \pm 0.2$  (グループ 1),  $0.3 \pm 0.2$  (グループ 2),  $4.2 \pm 0.6$  (グループ 3),  $1.8 \pm 0.5$  (グループ 4),  $1.6 \pm 0.5$  (グループ 5) であった. *S. sobrinus* 6715 を接種されたグループ 3 では歯牙裂溝の約半数にう蝕が認められた. これに反して, グループ 4 とグループ 5 のラットでは歯牙う蝕裂溝が極めて減少した. グループ 4 とグループ 5 の歯牙う蝕は, グループ 3 に比べるとそれぞれ, 56.2%と 62.2%阻害された. プロポリス投与と *S. sobrinus* 6715 接種とが同時になされたグループ 4 と *S. sobrinus* 6715 接種後にプロポリスが投与されたグループ 5 とで歯牙う蝕阻害効果に有意な差は認められなかった.

## 考 察

プロポリスは抗菌作用を有することが明らかとなった (表 1). プロポリスは特に連鎖球菌の IG 合成を顕著に抑制し (図 3), GTase 活性も阻害した (表 2). また, プロポリス投与によってラットの歯牙う蝕が著しく減少した (図 5). これらの結果より, プロポリスは単に *S. sobrinus* 6715 に対する抗菌作用を有するのみ

ならず, IG 合成を抑制し, GTase 活性を阻害することによってラットの歯牙う蝕を著しく減少させるものと考えられた. この実験条件下ではプロポリスのラットの成長に対して特に毒性は観察されなかった. 以上のことから, プロポリスはラットの歯牙う蝕を予防するのに有効であることが明らかとなった.

Nakamura et al. (1985) はムタステインがラットの歯牙う蝕を抑制すると報告している. すなわち, ムタステインは *S. sobrinus* 接種ラットのう蝕を 34%抑制したと報告している. 我々の実験ではプロポリス投与と *S. sobrinus* 6715 接種とが同時になされたラットでも (グループ 4), *S. sobrinus* 6715 接種の後にプロポリスが投与されたラットでも (グループ 5) それぞれ 56.2%, 62.2%とかなりの高率でう蝕が抑制された.

プロポリスには多種のフラボノイド配糖体 (フラボン類, フラバノン類) やそれらの誘導体 (フェノール酸, クマリン) などといった特徴的な化学成分が含有されている. 滝野・持田

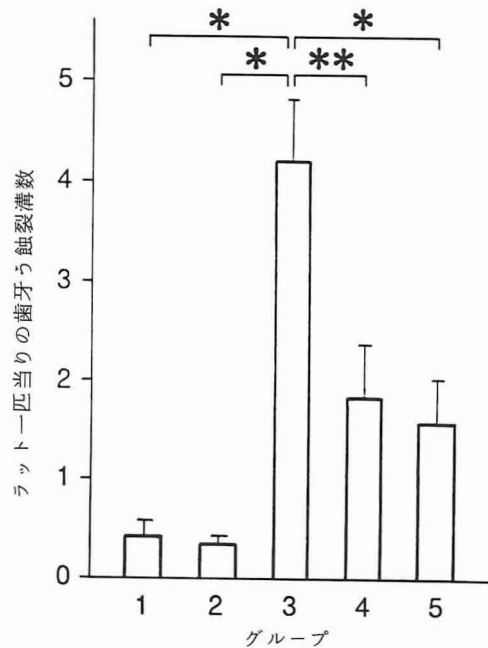


図5 ラットのう蝕裂溝数 (一匹当たり)  
数値は平均±SEM. 1グループ当たり12匹のラットを用いた.  
\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  (Student's t test)

(1982) は日本の愛媛、秋田産プロポリスからいく種類かのフラボン類、フェノール酸等を分離同定した。そして、愛媛、秋田産プロポリス中のピノシルビンとシンナミリデン酢酸が *Bacillus subtilis* あるいは *Mycobacterium phlei* に対して抗菌作用を示す本体であると報告している。Metzner et al. (1975) は *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* に作用するプロポリス中の抗菌物質は主として、ピノセンブリン、ガラングイン、ピノバンクシン (以上フラボノイド)、ベンジル p-クマリン酸およびカフェ酸エステルであると報告している。我々の行った中国遼寧省産のプロポリスの成分分析では、桂皮酸、桂皮酸エチルエステル、カフェ酸、クリシン、ケルセチンがそれぞれ同定できた (図 2)。これらの物質の抗菌作用を *S. mutans* PS 14 と *S. cricetus* OMZ61 を使って検討したところ、桂皮酸とカフェ酸が両菌に対して抗菌作用を有した (未発表)。また、桂皮酸は GTase 活性を阻害することも明らかになった (図 4)。これらのことから、プロポリス中のラットの歯牙う蝕予防効果を発揮する物質は桂皮酸ではないかと推察し、さらに今後検討を加えたい。

### 謝 辞

プロポリスの入手にあたって森永乳業株式会社、伊藤雄彦氏の労に感謝いたします。

(〒500 岐阜市日ノ出町 2-23 岐阜薬局 池野久美子; 〒491 一宮市日光町 6 一宮女子短期大学 池野武行; 〒963 郡山市富田町三角堂 奥羽大学歯学部 宮沢忠蔵, 以上現所属) (翻訳 著者)

### 引用文献

- Ceska, M. et al. 1969. Clin. Chim. Acta 26: 437-444.
- Endo, A. et al. 1983. J. Antibio (Tokyo). 36: 203-207.
- Ghisalberti, E. L. 1979. Bee World 60: 59-84.
- Gibbons, R. J. and J. van Houte. 1975. Annu. Rev. Microbiol. 29: 19-44.
- Grunberger, D. et al. 1988. Experientia 44: 230-232.
- Howard, F. and J. Yudkin. 1963. Br. J. Nutr. 17: 281-293.
- Keyes, P. H. and H. Jordan. 1964. Archs. Oral Biol. 9: 377-400.
- Koga, T. et al. 1982. Infect. Immun. 38: 882-886.
- Kuno, K. 1987. Fragrance J. 83: 36-39.
- Metzner, J. et al. 1975. Pharmazie. 30: 799-800.
- Nakamura, Y. et al. 1985. Jpn. J. Oral Biol. 27: 603-610.
- Okami, Y. et al. 1981. J. Antibio (Tokyo). 34: 344-345.
- Smith, D. J. et al. 1979. Infec. Immun. 23: 446-452.
- Somogyi, M. 1952. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- 滝野慶則・持田俊二. 1982. ミツバチ科学. 3: 145-152.
- Wicker, C. et al. 1984. Eur. J. Biochem. 139: 381-387.
- IKENO, K.<sup>1)</sup>, T. IKENO<sup>2)</sup> and T. MIYAZAWA<sup>3)</sup>. Effects of propolis on dental caries in rats. *Honeybee Science* (1994) 15(1): 1-6. <sup>1)</sup>Gifu Pharmacy Co. Hinode-cho, Gifu-shi, Gifu, 500 Japan, <sup>2)</sup>Ichinomiya Women's Junior College, Nikko-cho, Ichinomiya-shi, Aichi, 491 Japan, <sup>3)</sup>Department of Preventive Dentistry, Ohu University School of Dentistry, Misumido, Tomita-machi, Koriyama-shi, Fukushima, 963 Japan.

Translation from the original article under same title which appeared in *Caries Research* 25: 347-351 (1991) with publisher's permission.

本稿は *Caries Research* 誌 25: 347-351 (1991) の記事を出版社の許諾を得て翻訳、転載したものである。