

研究者：秋友 達哉（所属：広島大学大学院 医系科学研究科 小児歯科学）

研究題目：天然由来成分 Hydroxy- α -Sanshool の有する齲蝕抑制効果の解明

目的：

小児の齲蝕は減少傾向にあるが、重症化した症例が一定の割合で存在し続けており、齲蝕のさらなる低減化が喫緊の課題となっている。現在までに様々な齲蝕予防法が確立されているが、物質によっては投与法を誤った場合に有害事象へと発展するようリスクもあり得る。Hydroxy- α -Sanshool（Sanshool）は山椒特有の痺れるような辛味を引き起こす天然由来成分である。我々は過去に Sanshool が味覚受容に与える影響を報告したが、齲蝕抑制効果に関する報告は行われていない。また、からしやワサビに含まれる辛み成分である Allyl isothiocyanate（AITC）についても高い抗菌効果が報告されているが、齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* に対する報告はほとんど存在しない。そこで本研究では、安全性の高い天然由来成分に着目し、Sanshool および AITC の齲蝕病原性細菌に対する抑制効果を明らかにすることを目的とした。

対象および方法：

1. 供試菌株、各天然由来成分の調整

日本人小児口腔由来の *S. mutans* MT8148 株（血清型 c）を供試菌として選択し、Brain Heart Infusion（BHI）液体培地にて 37℃ で 18 時間培養したものを実験に使用した。Sanshool はジメチルスルホキシド（DMSO）にて 10 mM/ml と調整されたものを使用し、最終濃度が 0.001%、0.01%、0.1% となるよう添加することで分析に用いた。AITC については、DMSO にて 5 mM/ml となるよう調整し、Sanshool 同様に最終濃度が 0.001 %、0.01%、0.1% となるよう添加した。いずれも DMSO を 0.1% となるよう添加したものをコントロール（非添加群）として使用した。

2. 抗菌効果の分析

滅菌リン酸緩衝生理食塩水にて 1.0×10^9 CFU/ml となるよう調整した菌液に対して各濃度の天然由来成分を添加し、37℃ で 24 時間培養した後に Mitis-Salivarius-Bacitracin（MSB）寒天培地に播種した。この MSB 寒天培地を 37℃ で 48 時間培養した後に、*S. mutans* のコロニー数をカウントした。*S. mutans* の生存率は、非添加群の菌数を 100% とした時の添加群の菌数の割合 {生存率 (%) = (添加群のコロニー数) / (非添加群のコロニー数) $\times$ 100} を求めることにより算出した。

3. 増殖抑制効果の分析

BHI 液体培地にて 1.0×10^7 CFU/ml となるよう調整した菌液に対して各濃度の天然由来成分を添加し、37℃ で 24 時間培養した後に菌液を MSB 寒天培地に播種した。この MSB 寒天培地を 37℃ で 48 時間培養した後に *S. mutans* のコロニー数をカウントし、非添加群を 100% とした時

の添加群の菌数の割合を算出することにより増殖抑制効果を求めた。

4. バイオフィーム形成阻害の分析

1% スクロース含有 BHI 液体培地にて 1.0×10^7 CFU/ml となるよう調整した菌液に対して各濃度の天然由来成分を添加し、96 穴マイクロプレートに 200 μ l ずつ分注した。このプレートを 37°C で 24 時間通気環境にて培養した後に、クリスタルバイオレットにて *S. mutans* の染色を行った。バイオフィーム形成能に対する抑制効果は、非添加群の OD₅₉₅ 値を 100% とした時の添加群の OD₅₉₅ 値の割合を算出することにより求めた。なお、AITC は揮発性であることを踏まえ、培養時密閉環境における 0.1% の AITC についても併せて比較を行った。

5. 統計学的解析

統計学的解析にはスチューデントの *t* 検定を用い、有意水準は 5% 以下を有意差ありとした。

結果および考察：

1. 抗菌効果

Sanshool では、濃度依存的に *S. mutans* の生存率が低下したが、どの濃度においても有意差は認めなかった。一方、AITC では 0.001% 添加した群において *S. mutans* の生存率が有意に低下した ($P < 0.05$) (図 1)。また、0.01% および 0.1% 添加した群においては *S. mutans* の生菌がほとんど存在せず、生存率の有意な低下を認めた ($P < 0.01$)。

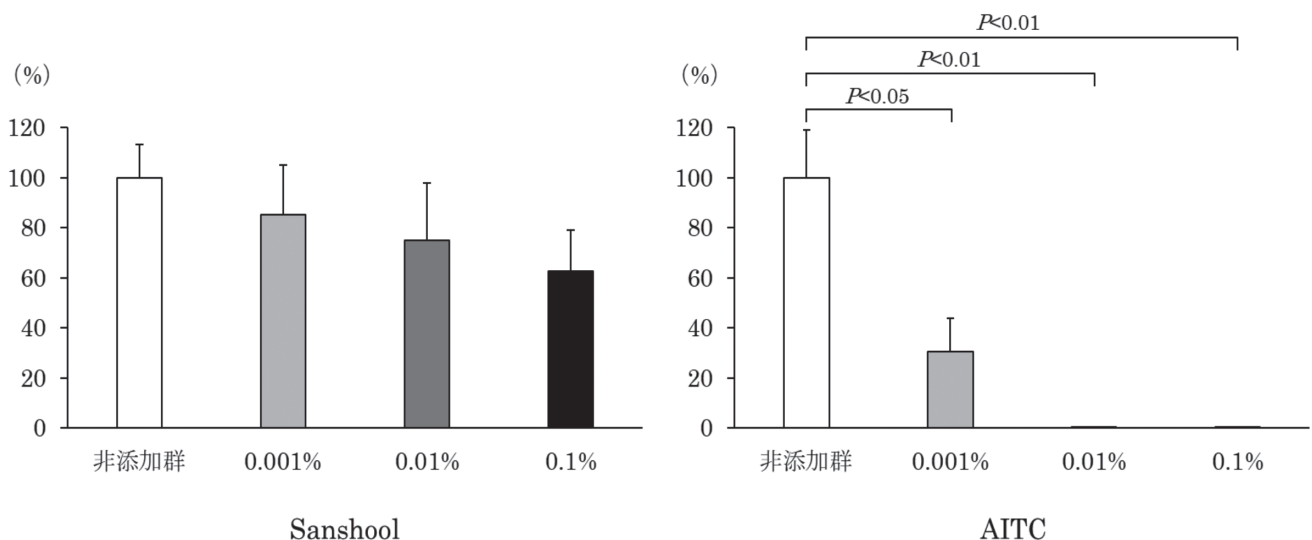


図 1 抑制効果

2. 増殖抑制効果

Sanshool を 0.01% 以下の濃度で添加した群では非添加群と比較して、*S. mutans* の増殖能に有意差を認めなかった (図 2)。一方、Sanshool を 0.1% 添加した群では *S. mutans* の増殖を有意に抑制した ($P < 0.05$)。AITC においては 0.01% 以下では効果を認めないものの、0.1% 添加した群においては *S. mutans* の増殖を有意に抑制した ($P < 0.01$)。

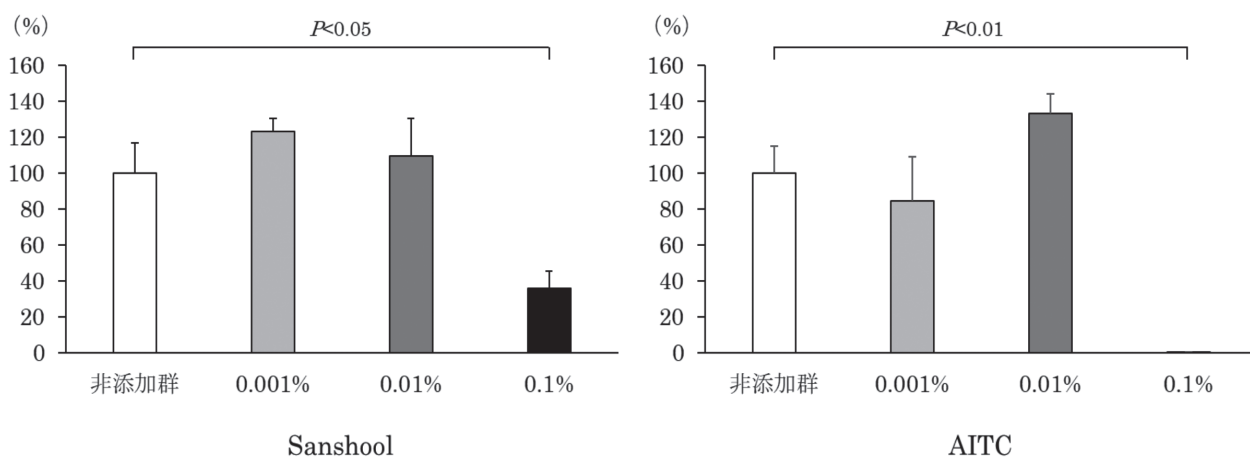


図2 増殖抑制効果

3. バイオフィーム形成阻害

Sanshool を添加した群では非添加群と比較して、いずれの濃度においてもバイオフィーム形成量に有意差を認めなかった。AITC においても通気環境下では非添加群と添加群に有意差を認めなかった (図3)。一方、密閉環境下では 0.1% AITC 添加群において有意にバイオフィーム形成が阻害された ($P < 0.05$)。

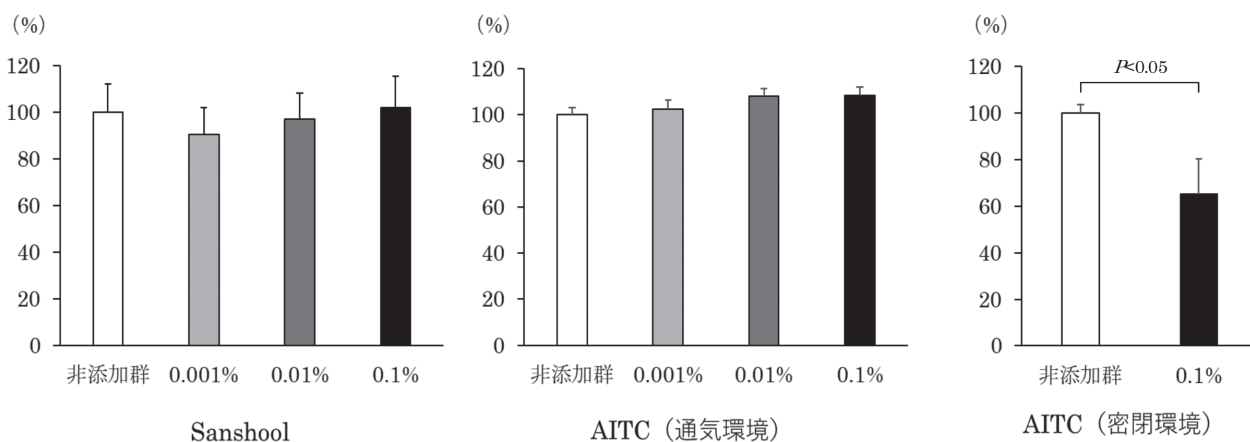


図3 バイオフィーム形成阻害

本研究結果から、Sanshool は *S. mutans* に対して 0.1% の濃度において増殖抑制効果を有することが明らかとなった。また、AITC においても高い抗菌効果および増殖抑制効果を有し、密閉環境下ではバイオフィーム形成阻害効果も有することが明らかとなった。本研究結果から、Sanshool および AITC は天然由来の生体安全性の高い齲蝕抑制物質として応用できる可能性が示唆された。今後さらなる検討を加え、*S. mutans* に対する齲蝕抑制効果の詳細なメカニズムを明らかにすることで、安全性の高い新しい齲蝕予防法の確立を目指していきたい。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

令和5年5月に長崎で開催される第61回日本小児歯科学会大会において一部を発表予定。