原 著

厚朴エキスのう蝕予防効果に関する実験的研究

Influence of Magnoliae Cortex Extracts on Experimental Dental Caries in the Hamster

尾崎 文子* 品田佳世子* 小田切敬子*
岡田昭五郎* 中島清光** 早川和彦**

Fumiko OZAKI*, Kayoko SHINADA*, Keiko ODAGIRI*,
Shogoro OKADA*, Kiyomitsu NAKAJIMA**
and Kazuhiko HAYAKAWA**

Received April 15, 1988; accepted May 21, 1988

Abstract: Magnolol and Honochiol were administrated to hamsters in diet and water. This mixture was made up of 400 μ g per gram in Diet #2000 and 200 μ g per ml in water for the test group ration.

After inoculation with *S. mutans* #10449, the experimental group was fed the experimental diet and water, and the control group was fed Diet #2000 and distilled water. After 60 days on the diet and water, the animals were killed and the plaque and caries scores were taken. The plaque score decreased in the experimental group compared to the control group significantly ($p < 0.05$). The caries score in the experimental group was less than in the control group ($p < 0.05-0.10$). The first and second molars had more effective plaque and caries reduction than the third molars. It appeared that the effects of this agent are so mild, that only the tooth surfaces exposed regularly to it were affected.

索引用語: 厚朴エキス, *S. mutans*, 実験う蝕

Key words: Magnoliae Cortex Extract, *S. mutans*, Experimental Dental Caries

緒 言

実験動物のう蝕が *S. mutans* の感染により発症することは、Keyes 等の研究で明らかにされ¹⁻³⁾、そのメカニズムについては各分野で多くの報告があるが、*S. mu-*

tans の増殖や歯面への付着を抑制するために抗生物質⁴⁾や抗菌剤^{7,8)}を投与したり、菌体外多糖類を分解する酵素^{9,10)}などを応用してう蝕を予防する研究も行われている。けれども、*S. mutans* は、人や齧歯類の口腔内に常在する細菌で、他の多種類の菌と共に一つの生態系を

* 東京医科歯科大学歯学部予防歯科学教室 (主任: 岡田昭五郎教授)

* Department of Preventive Dentistry and Public Health, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University (Director: Prof. Shogoro OKADA)

** 日産化学工業株式会社

** Nissan Chemical Industries LTD

形成している。そのために、う蝕予防手段を講ずるために特定の細菌だけを抑制することは非常に困難である。そこで現在、歯垢の除去やう蝕予防に用いられている方法は、*S. mutans* を含む細菌叢を物理的に除去するためのブラッシングと、これを補助する歯磨剤の中に、クロールヘキシジン¹¹⁾などの殺菌剤やデキストラナーゼ¹²⁾などの多糖類分解酵素を添加してその効果を高めようとしているものが多い。しかし、一方では特定の微生物に効果が強く現われる殺菌剤や抗菌剤の使用は副作用や口腔内生態系に対する影響を考えると、予防薬としての応用には問題があるとする意見もある¹³⁾。

難波らは従来各種の生薬成分に抗菌作用があることに着目し、多種類の生薬のスクリーニングを行い、和厚朴、唐厚朴等に *S. mutans* に対する強い抗菌作用があることを発見した¹⁴⁾。我々は、この厚朴成分をう蝕予防薬として応用することを前提として、ハムスターを用いて *S. mutans* 増殖抑制とう蝕抑制効果について実験を行い、二、三の知見を得たので報告する。

Fig. 1 Standard points (X) for plaque score.

実験材料及び方法

1. 試験薬の調整

厚朴より29%エタノール抽出で調整した厚朴エキスを

Table 1 Condition and results of experiment I (30-day group)

Group		No. of Animals	Weight gain(g)	Total intake for 30 days		Plaque Score	Caries Score	<i>S. mutans</i> (log)
				Food(g)	Water(g)			
Exp.	Males	15	45.8±13.5	234.5±10.1	527.9±38.3	57.8±23.3	52.3±17.8	7.51±0.58
	Females	18	44.8±12.8	230.3±7.9 *	468.4±136.6***	60.4±12.7 *	48.9±15.7	7.98±0.40
Control	Males	19	52.1±12.6	242.8±9.6	467.0±48.3	72.9±6.8 *	63.3±19.1	7.93±0.40
	Females	15	45.4±13.9	211.2±9.4	428.9±46.6	71.1±8.7	55.5±14.2	8.14±0.63

*** <0.001 * P<0.05

Table 2 Conditions and results of the experiment I (60-day group)

Group		No. of Animals	Weight gain(g)	Total intake for 60 days		Caries Score	<i>S. mutans</i> (log)
				Food(g)	Water(g)		
Exp.	Males	21	69.1±12.3	413.0±32.1	881.2±179.1	69.8±19.1	5.57±0.4
	Females	20	64.3±10.2 ***	394.6±8.7	953.3±30.75 ***	68.6±22.3 *	5.82±0.25
Control	Males	21	97.1±20.4	429.0±46.1 ***	701.8±18.63 ***	85.4±18.6 ***	5.87±0.34
	Females	22	76.5±9.4 ***	421.8±20.7	609.3±36.0	91.4±8.1 ***	5.82±0.33

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Fig. 2 Experimental Schedule (Experiment I)

Note : Diet 2000E : contained experimental agents

Exp. water : contained experimental agents

35%, 甘草から同様に抽出した甘草エキスを15%に含有する配合粉末を製し 試験薬とした。この配合粉末は1g 中に有効成分として Magnolol 15.4mg, Hono-chiol 4.2mg を含有する。

2. 動物

22日齢のゴールデンハムスターを用い、雌雄別に5匹ずつステンレス製底網ケージで飼育した。

飼育環境は温度 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度60%である。

3. 飼料及び飲料水

飼料には、う蝕誘発性飼料 Diet-2000¹⁵⁾を固型に調製して与えた。又これに試験薬を2%の割合で混入したものを調製して実験食とした。飲料水は脱イオン水又は、試験薬の1%水溶液を与えた。実験食中の有効成分は約 $400\mu\text{g/g}$ 、飲料水は約 $200\mu\text{g/ml}$ に相当する。実験期間中飼料及び飲料水は自由に摂取させた。

4. 動物実験の概要

ハムスターを22日齢で離乳し、Streptomycin 0.02%溶液を飲料水として1日与え、口腔内細菌を抑制した。その後、雌雄別に各々、実験群、対照群にふり分け、23日齢より5日間全ての動物に *Streptococcus mutans* 10449株を小ピペットを用いて1滴ずつ1日1回、口腔内に接種した。接種用菌液は10449株を BHI broth 300 ml に18時間培養し、生理食塩水を用いて洗浄、集菌したものを10ml の生理食塩水に浮遊させて用いた。実験期間中週2回体重、飲料水及び飼料の摂取量を測定した。実験終了後、動物をクロロホルム麻酔下で殺し、上下顎を摘出、歯垢付着量、う蝕の状態を観察した。

5. 口腔内細菌の算定

1) *S. mutans* 定着の確認

S. mutans の口腔内接種終了時(28日齢)に小綿球で動物の口腔内を拭い、滅菌生理食塩水1ml に懸濁し

Table 3 Plaque score of each tooth surface (30-day group)

			Exp.	Cont.
Females	Upper Jaw	M ₁	B 1.88±0.48	1.86±0.42
			O 3.16±1.72	3.73±1.15
			L 1.72±0.58	1.65±0.56
		M ₂	B 1.78±0.42	1.96±0.20
			O 2.41±1.04 *	2.92±0.27
			L 0.66±0.48	0.88±0.33
	Under Jaw	M ₃	B 1.0 ±0.36	0.96±0.20
			O 2.69±0.59	2.40±0.82
			L 0.84±0.37	0.64±0.49
		M ₁	B 1.91±0.39	1.93±0.38
			O 2.84±1.76 *	3.77±1.42
			L 1.84±0.51	2.0 ±0
Males	Upper Jaw	M ₂	B 1.81±0.40	1.96±0.20
			O 1.31±1.15 ***	2.46±0.76
			L 0.84±0.37	0.93±0.20
		M ₃	B 1.0 ±0.25	1.04±0.34
			O 1.63±1.16 ***	2.58±0.86
			L 0.84±0.37	0.92±0.27
	Under Jaw	M ₁	B 1.61±0.74 *	2.0±0
			O 3.32±1.94	3.23±1.55
			L 1.38±0.86 *	1.80±0.48
		M ₂	B 1.75±0.65	1.83±0.38
			O 2.36±1.03	2.73±0.52
			L 0.71±0.53 **	1.0 ±0
		M ₃	B 1.0 ±0.47	0.94±0.25
			O 2.32±1.06	2.68±0.54
			L 0.68±0.48 ***	0.80±0.41
		M ₁	B 1.75±0.59 *	2.0 ±0
			O 3.26±1.85	4.0 ±1.34
			L 1.68±0.72 *	2.0 ±0
		M ₂	B 1.82±0.55	1.87±0.35
			O 1.54±1.07 ***	2.52±0.72
			L 0.81±0.49	1.0 ±0
		M ₃	B 0.93±0.54	0.97±0.18
			O 1.86±1.11	2.37±0.85
			L 0.71±0.46 **	0.97±0.18

*** <0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Table 4 Cares score of each tooth surface
(30-day group)

			Exp.	Cont.		
Females	Upper Jaw	M ₁	B	53.01%	55.84%	
			O	16.44	20.19	
			L	23.13	25.88	
		M ₂	B	79.38	*	87.88
			O	54.97		66.31
			L	28.03		37.23
		M ₃	B	48.86		56.52
			O	51.68		47.04
			L	15.93		10.64
	Under Jaw	M ₁	B	67.59		77.42
			O	53.78		64.23
			L	64.91		76.69
		M ₂	B	71.34		79.34
			O	52.50	*	70.27
			L	53.31	*	69.38
		M ₃	B	39.16		46.00
			O	46.84		54.96
			L	29.44		28.04
Males	Upper Jaw	M ₁	B	57.18		65.85
			O	25.27		33.71
			L	29.64		35.09
		M ₂	B	82.54		78.88
			O	63.27		69.62
			L	34.91	*	53.64
		M ₃	B	54.91		61.03
			O	50.68		61.34
			L	14.27	**	33.22
	Unde Jaw	M ₁	B	72.27		80.79
			O	58.73		72.64
			L	73.82		83.68
		M ₂	B	73.91		86.12
			O	62.86		75.29
			L	54.64	*	71.68
		M ₃	B	44.14		57.06
			O	48.41	*	66.41
			L	40.00		52.79

** P<0.01 * P<0.05

Table 5 Caries score of each tooth surface
(60-day group)

			Exp.	Cont.		
Females	Upper Jaw	M ₁	B	69.98%	86.42%	
			O	45.02	***	78.89
			L	37.93	***	67.76
		M ₂	B	88.98		100.00
			O	78.48	***	96.61
			L	49.00	***	78.03
		M ₃	B	74.25	***	94.35
			O	75.21	***	95.29
			L	63.93		77.84
	Under Jaw	M ₁	B	86.25*		96.82
			O	72.23	***	94.71
			L	73.54	***	96.44
		M ₂	B	97.70		100.00
			O	89.18	**	100.00
			L	77.34	***	100.00
		M ₃	B	67.23	***	86.82
			O	67.89	***	92.61
			L	44.23	***	77.26
Males	Upper Jaw	M ₁	B	65.21	*	78.53
			O	47.64	**	70.44
			L	37.33	***	68.32
		M ₂	B	91.95		91.92
			O	82.09		90.47
			L	45.07	***	71.87
		M ₃	B	71.32		83.45
			O	72.10	*	86.61
			L	53.90	**	74.18
	Under Jaw	M ₁	B	89.33	*	97.61
			O	78.38	**	93.74
			L	73.69	*	91.66
		M ₂	B	97.62		99.89
			O	88.74	*	98.39
			L	75.88	***	94.50
		M ₃	B	64.67	**	86.13
			O	67.12	**	86.05
			L	42.26	***	76.34

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Fig. 3 Experimental Schedule (Experiment II)

Note: Diet 2000-28: contained 28 % confectionary sugar, 28 % starch and other elements
Diet 2000E, Diet 2000-28E: contained experimental agents

て試料とした。これを Sonicator により 4 mA 30 秒間 Sonicate したものを 0.05ml ずつ、Gold の MSB agar¹⁸⁾ 上に展開し、37°C 48時間 BBL Gas-Pack を用いて嫌気培養した。

2) 口腔内菌数について

実験終了時に同様の方法で採取、調整した試料を生理食塩水で10倍段階希釈で培地に展開し、37°C 48h、嫌気培養を行い、*S. mutans* 菌数を算定した。

6. 歯垢付着量の評価

摘出した上下顎を1%中性紅溶液で1分間染色し、水洗後、実体顕微鏡下で観察し Fig. 1 に示す基準点の歯垢の付着の有無を評価した。基準点は臼歯を頬面、咬合面、舌面から見て歯垢付着部位を M₁ 9 カ所、M₂ 6 カ所、M₃ 5 カ所とした。試料の各歯垢付着部位にそれぞれ1点ずつを与え、合計点をその動物の Plaque score とした。最高点は片側上下6歯で40点、両側で80点である。

7. う蝕の評価

歯垢付着状態を評価した後、上下顎を10分間オートクレーブで加熱し、軟組織を除去、水洗乾燥し、歯及び顎骨の標本作製してう蝕を評価した。う蝕の評価方法は各臼歯を頬面、咬合面、舌面の3面に分け、それぞれの崩壊状態を型紙上に画いて切り抜き、秤量して基準面積に対する崩壊面積の割合(崩壊率)として算出し Caries score とした。2群間の差の検定はこの崩壊率の数値について、t 検定により有意性を判定した。

実験結果

1. 実験 I (飼育期間との関係についての実験)

22日齢のゴールデンハムスター雄76匹、雌75匹を用いて Fig. 2 に示す実験スケジュールに従って実施した。*S. mutans* の接種期間(23日齢~28日齢)は全ての動物に Diet-2000と脱イオン水を与え、28日齢より実験群には試験薬を混入した実験食、実験水を与えて飼育した。飼育期間は試験薬の投与開始後30日及び60日とした。

結果を Table 1 (30日飼育群) Table 2 (60日飼育群) に示す。

1) 体重増加量

30日飼育群、60日飼育群のいずれも、対照群の方が体重増加量が多く、60日飼育群では雌雄とも0.1%以下の危険率で有意の差が見られた。

2) 摂食量及び飲水量

飼育期間中の一匹当りの総摂食量を算出した結果では、30日飼育の実験群の雄、60日飼育の実験群の雌ではそれぞれの対照群に比べて有意に摂食量が少なかった。総飲水量は、実験群が多く飲む傾向があり、30日飼育群の雄、60日飼育群の雌雄でそれぞれの対照群に比較して0.1%以下の危険率で有意の差が見られた。

3) Plaque score

30日飼育群の歯垢付着量は雌雄共に実験群が対照群に比べて5%以下の危険率で有意に低い数値を示した。Table 3 に示すように Plaque score を歯面別に比較すると、下顎では咬合面、上顎では雄の舌面が対照群に比べてどの歯でも低い傾向がみられた。

60日飼育群では歯牙の崩壊量が大きく残根状態のものが多かったため歯垢付着量は評価しなかった。

4) う蝕の発生状態

う蝕は実験群、対照群共すべての動物に発症したが、歯冠部の崩壊率で比較すると、30日飼育群、60日飼育群とも実験群の方が崩壊率が低く、60日飼育群では雌雄ともその差は5%以下の危険率で有意な差が認められた。60日飼育群の対照群では、上下顎臼歯のすべての歯の歯冠が全く崩壊し、残根状態となった動物が雌で4匹(26%)、雄で8匹(42%)に達した。

各歯牙別に比較すると、30日飼育群(Table 4)、60日飼育群(Table 5)共に雌雄のいずれも上下顎 M₂ の崩壊が著しく、歯面別では頬面が大きく崩壊し、舌面の崩壊は少ない傾向があった。30日飼育群の実験群では大部分の歯のほとんどの歯面で対照群に比較して崩壊率が低かったが有意な差異の認められたものは少なかった。し

Table 6 Conditions and results

Group	No. of Animals	Diet	Water	Weight gain(g)	Total intake
					Food(g)
A-1	20	Diet-2000 E	EPX.W	56.8±6.4	415.7±8.9
A-2	18	Diet-2000 E	EXP.W	55.4±6.2	427.0±24.4
A-3	17	Diet-2000	D.W	56.0±5.7	420.0±12.3
B-1	20	Diet-2000-28 E	EXP.W	62.2±10.7	472.8±19.7
B-2	17	Diet-2000-28 E	EXP.W	58.9±8.0	449.0±16.7
B-3	18	Diet-2000-28	D.W	70.6±8.8	512.9±17.4

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

かし、60日飼育群では実験群のほとんどの咬合面、舌面の崩壊率が5%以下の危険率で有意に少なかった。この崩壊率を基にう蝕抑制率を算出すると、30日飼育群では雌11.9%、雄17.4%、60日飼育群では雌24.9%、雄18.3%という数値が得られた。

5) 口腔内の細菌数について

S. mutans の接種終了時の口腔内定着率はどの群も100%であった。実験終了時の口腔内 *S. mutans* 菌数は Table 1, Table 2 に示すように実験群、対照群の間に有意な差はみられなかった。

2. 実験 II (試験薬の投与開始期の差異による実験)

この実験には雄の動物を使用した。

実験スケジュールを Fig. 3 に示す。食餌は Diet-2000 を基本にしてその中の蔗糖量の 1/2 を α 澱粉で置換した Diet-2000-28 と Diet-2000 の 2 種類を用意し、各々の実験食には試験薬を 2% 混入した。食餌はすべて固型に調整して与えた。動物は飼料により A, B 2 群に分け、A 群は Diet-2000 を B 群は Diet-2000-28 を基本食として与えた。各群をさらに 3 群に分け A-1, B-1 群は離乳時(22日齢)より試験薬を混入した餌、水を与え、A-2, B-2 群は *S. mutans* 接種期間(23日齢~27日齢)は基本食で飼育し、28日齢から試験薬を混入した餌、水を与えた。A-3, B-3 群はそれぞれの対照群として基本食、脱イオン水で飼育した。飼育期間は 60 日とした。結果を Table 6 に示す。

1) 体重増加量

A 群 (D-2000 投与群) よりも砂糖含有量の少ない食餌

を与えた B 群 (D-2000-28 投与群) の方が体重増加量が多く、B-3 群と B-1 群、B-2 群の間には 5% 以下の危険率で有意の差が認められた。

2) 摂食量及び飲水量

摂食量、飲水量共に A 群 (D-2000 投与群) よりも B 群 (D-2000-28 投与群) が多く、飲水量では 26 日齢より試験薬を与えた A-2 群、B-2 群が非常に多かった。

3) Plaque score

Table 6 に示すように A 群では試験薬投与群が対照群に比べて 5% 以下の危険率で有意に Plaque score が低く特に 28 日齢から試験薬を投与した A-2 群の Plaque score が低かった。部位別では Table 7 に示すように M₁, M₂ の多くの歯面で有意の差がみられた。

B 群では 28 日齢から試験薬を投与した B-2 群の Plaque score は B-3 群に比べて 5% 以下の危険率で有意に低い値であった。しかし B-1 群では B-3 群との間に有意な差は認められなかった。

4) う蝕の発生状態

Table 6 に示すように A 群ではすべての動物にう蝕が発症したが、B 群では各群ともう蝕の発生しない動物が存在し、その比率は有意ではないが B-1, B-2 群に多い傾向が見られた。各歯牙の崩壊率は A 群では試験薬を投与した A-1, A-2 群は減少したが、B 群では 28 日齢から試験薬を投与した B-2 群のみが減少し、離乳時から試験薬を投与した B-1 群では崩壊率が対照群 (B-3 群) より多い傾向がみられた。しかし、A-1, A-2, A-3 群の間、B-1, B-2, B-3 群のそれぞれの間に有意な差異は認めら

of experiment II

for 60 days	Plaque Score	Caries Score		<i>S. mutans</i> (log)
Water(g)		Prevalence	Caries Area	
633.1±97.5	57.1±17.1	100%	28.1±21.0	5.0±0.3
696.1±49.9	49.8±18.6	100	21.5±22.1	4.9±0.4
612.9±93.3	71.0±9.9	100	37.2±25.7	4.9±0.4
645.1±84.2	34.5±16.0	80.0	8.3±13.9	4.5±0.6
861.3±57.1	20.8±7.1	77.8	2.1±5.5	4.2±0.4
718.4±79.0	31.8±10.3	88.9	2.5±6.6	4.4±0.5

Table 7 Plaque score of each tooth surface (group of D-2000)

	A-1	A-2	A-3
Upper Jaw	B 1.54±0.72*	1.08±0.84***	2.0 ±0
	M ₁ O 2.83±1.57	2.22±1.76***	4.29±1.06
	L 1.13±0.72	1.08±0.65	1.94±0.24
	B 1.68±0.66*	1.28±0.81***	1.80±0.41
	M ₂ O 1.55±0.85	1.34±0.94***	2.41±0.78
	L 0.43±0.50	1.44±0.50***	0.97±0.17
	B 0.93±0.27	1.0 ±0	1.03±0.30
	M ₃ O 2.28±0.93	2.58±0.6	2.74±0.75
	L 0.95±0.22	1.0 ±0	1.06±0.24
	B 1.80±0.56	1.50±0.77***	1.91±0.29
	M ₁ O 3.50±2.08*	2.42±2.21	4.20±1.23
	L 1.70±0.69	1.53±0.74	1.91±0.29
Under Jaw	B 1.54±0.68	1.53±0.61***	1.97±0.17
	M ₂ O 1.58±1.03	1.39±1.02***	2.18±0.73
	L 0.50±0.51	0.47±0.51***	1.06±0.24
	B 1.05±0.39*	1.0±0	1.09±0.23
	M ₃ O 2.58±0.71	2.35±0.86	2.67±0.96
	L 0.93±0.26	0.97±0.16	1.06±0.24

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Table 8 Caries score of each tooth surface (group of D-2000)

	A-1	A-2	A-3
Upper Jaw	B 29.69%	17.66% *	34.74%
	M ₁ O 19.26	7.43 ***	31.33
	L 12.81	9.18 *	20.52
	B 26.21	22.43 ***	50.89
	M ₂ O 19.43	11.40 ***	39.27
	L 3.89	1.87	4.01
	B 19.07	21.61 *	36.76
	M ₃ O 21.35	20.23	33.28
	L 15.12	11.36	7.19
	B 74.25 *	55.46 ***	80.38
	M ₁ O 64.02 ***	38.06 ***	76.34
	L 76.40 *	60.19 ***	86.70
Under Jaw	B 40.77	35.36*	50.16
	M ₂ O 14.50	17.14 *	31.81
	L 12.68	18.82	21.03
	B 27.97	20.32	28.67
	M ₃ O 21.54	15.41	23.20
	L 7.31	2.60 *	13.39

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Table 9 Caries score of each tooth surface (group of D-2000-28)

		B-1	B-2	B-3
Upper Jaw	M ₁	B 8.73% **	5.10% *	1.10%
		O 3.07	0.88	0.34
		L 0.67	0.44	0
	M ₂	B 5.53	1.05	1.57
		L 5.27	1.34	1.68
		O 1.19	0	0
	M ₃	B 5.36	2.98 *	11.14
		O 3.98	3.43	5.82
		L 2.09	1.90	2.39
Under Jaw	M ₁	B 28.42 ***	4.82 ***	8.09
		O 16.90 ***	0.08 ***	0.92
		L 31.51 ***	6.18 ***	11.18
	M ₂	B 15.12 *	4.31	6.27
		O 5.86	0.64	1.35
		L 8.02 *	0.62 ***	1.16
	M ₃	B 5.58	3.43	4.60
		O 3.56	1.78	0.60
		L 0.64	0.55	2.34

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

れなかった。う蝕抑制率はA群では離乳時から投与した A-1 群で24.5%, 26日齢から投与した A-2 群で42.2%, B群では26日齢から投与した B-2 群で40.0%であったが, 離乳時から投与した B-1 群では崩壊率の大きい動物が多く, 抑制効果はみられなかった。

歯牙別に比較するとA群では Table 8 に示すように, A-1 群の上顎 M₂, A-2 群の上顎 M₁, 上顎 M₂, 下顎 M₁ で対照群に比べて有意に崩壊率の低い歯面が多い傾向がみられた。B群では Table 9 に示すように B-2 群の上顎 M₃, 下顎 M₁ の抑制率が高い傾向があるが, これらはいずれも有意なものではなかった。

5) 口腔内細菌数について

S. mutans を23日齢まで5日間接種した後の定着率は100%であった。実験終了時の *S. mutans* 菌数は Table 6 に示すように B群がA群より少ない傾向にあるが, 各群間には有意な差は認められなかった。

考 察

難波らは厚朴の *S. mutans* に対する抗菌作用を有する成分は厚朴樹皮の精油成分中の phenol 性化合物 Magnolol, Honochiol であり, *S. mutans* に対する最小発育阻止濃度は6.25 μ g/ml, sucrose 存在下では12.5 μ g/ml, 最小殺菌濃度70 μ g/ml であること又, グルカン形成作用の阻害効力はないことを報告している^{17,18)}。

甘草エキスについては Mitscher¹⁹⁾ らが甘草から抽出した数種の物質には Staphylococcus, Candida などに対する抗菌作用があることを報告している。又, Namba らは甘草のメタノール抽出物が 10~30 μ g/ml で *S. mutans* の平滑面付着作用を阻止し, Glucan の合成を125 μ g/ml で阻害することを報告し, 有効成分としては glycyllol, isoglycyllol²⁰⁾ をあげている。今回の実験に用いた配合薬の有効成分は, 飲料水では200 μ g/ml, 食餌では400 μ g/ml の濃度になるように調整した。これは予備実験から動物に投与する適量として決定したものである。

1. 実験 I の考察

う蝕誘発性食餌を投与したハムスターのう蝕は歯頸部を中心に作られる厚い歯垢とその下のエナメル質の脱灰で始まる平滑面う蝕が特徴である。

実験 I では試験薬を飼料及び水に混入して与えた場合の薬剤の効果を検討する場合, 飼育期間をどの位にすべきかを検討するために飼育期間を30日, 60日として実験した。又, ハムスターのう蝕発生は雌雄により差があるという報告^{21,22)}もあるので性差についても併せて検討した。実験群の摂食量は対照群より少なかったが, 飲水量は有意に多い傾向があり, この濃度での厚朴エキスの味に対する嫌忌作用はないものと考えられた。体重増加量は実験群が少なく, 特に60日間の飼育では雌雄共有意の差があったが, 外見上実験群の体調に異常は見られなかった。予備実験で, ラットの血清の生化学的検査をしたところ, Diet-2000 を与えても厚朴エキス飲用群は T-G 値, A/G 比等が普通飼料飼育群に近かったことから体調は良好であったことが推察できる。30日飼育群の歯垢付着量は実験群が雌雄とも有意に少なく, 30日の飼育でも試験薬による歯垢付着の抑制効果が認められた。

う蝕は30日飼育の場合も60日飼育の場合も実験群, 対照群両群のすべての動物に発症しており, う蝕抑制効果

Table 10 The effect of active components on plaque and caries

Exp. group	Active components (mg/day)	Plaque score	Carries score
A-1	2.11	57.1	28.1
A-2	2.32	49.8	21.5
A-3	0	71.0	37.2
B-1	2.15	34.5	8.3
B-2	2.87	20.8	2.1
B-3	0	31.8	3.5

はそれほど強くないと考えられた。また、う窩面積（崩壊率）で比較すると30日飼育群では実験群、対照群の間に有意な差は認められなかったが、雌雄とも実験群が低い数値を示しており、60日飼育群では雌雄とも有意な差異が認められた。摂食量は、実験群、対照群とも雄が多い傾向にあるが、飲水量は60日飼育の実験群では雌が高い傾向がみられた。歯垢付着量、う蝕による崩壊率は30日飼育群、60日飼育群のいずれも雌雄の間に有意な差異は認められなかった。

2. 実験 II の考察

実験 II では実験 I の結果を踏えて動物は比較的入手しやすい雄のみとし、飼育期間は60日とした。この実験では試験薬の投与を離乳時から始め、*S. mutans* の定着を抑制することを1つのねらいとした。又難波らによると Sucrose 存在下では厚朴の抗菌力が低下することも報告¹⁸⁾されているので食餌中の砂糖量を1/2に減じた場合、う蝕抑制効果が増強されるのではないかと考え、その効果も併せて検討した。

A 群 (Diet-2000 投与群) では体重増加量、摂食量共、各群間に差は見られなかったが B 群 (Diet-2000-28 投与群) では摂食量、体重増加量とも対照群の方が多かった。総飲水量は28日齢より試験薬を投与した A-2 群、B-2 群が他の群に比べて最も多く、対照の A-3、B-3 群との間に、B 群では離乳時より投与した B-1 群との間にも有意の差がみられた。この A-2 群、B-2 群がなぜ飲水量が多かったのかは不明であるが、総飲水量中の有効成分量を算出して Plaque score、Caries score と比較すると Table 10 に示すように1日当り有効成分摂取量の多い群の Plaque score が減少し、それにともなって Caries score も減少する傾向にあることは興味ある点である。しかし、歯牙別、歯面別に plaque の付着抑制率とう蝕抑制率を比較すると、A-2 群では上顎 M₁、M₂ の全歯面、下顎 M₁ 咬合面に相関傾向がみられたが、他の歯

面では歯垢の付着と歯面の崩壊との間には相関関係が認められないことが多く、また口腔内の *S. mutans* 菌数は各群間に差の見られなかったことから、試験薬の作用は口腔全体の菌数に影響を及ぼす強さではなく、試験薬が作用しやすいごく局所的な部位で抗菌作用を示すにとどまったものと考えられる。

実験 II では離乳時から試験薬を投与することで *S. mutans* の口腔内への定着を抑えることを目的としたが、接種終了時の菌の定着率はどの群も100%であり、動物の口腔内では *S. mutans* の定着を完全に抑制するような効果は見られなかった。特に B-1 群では当初の目的に反して Plaque score、う蝕共、B-3 群 (対照群) より大であった。これは離乳直後から試験薬を与えたため初期の飲水量が特に少なかったことも関係しているのかもしれない。又、実験 II では実験 I の結果から飼料中の砂糖によるう蝕誘発能が高いこと、また Sucrose が抗菌作用を低下させるという *in vitro* の結果¹⁸⁾ から試験薬の効果があらわれにくいのではないかと考え、砂糖含有量を1/2にした Diet-2000-28 投与群を実験群の1つに加えた。この群では、砂糖の影響が少なく、薬効が長時間作用することを期待したが、Diet-2000 投与群に比べて Diet-2000-28 を投与した各群では歯垢付着量、う蝕罹患率、歯牙崩壊率のいずれも低く、今回の実験では試験薬の効果を増大させることにはならなかった。しかし、Diet-2000 群では見られなかったう蝕罹患率が B-1、B-2 群で減少する傾向にあること、B-2 群では Plaque score、歯牙崩壊率も減少していることから、Diet-2000-28 を与えた B 群でもこの試験薬の効果はあるものと考えられた。

実験 I、II 各グループの歯垢及び、う蝕の抑制率は Table 11 に示すとおりで、B-1 群を除くすべての実験群で抑制効果がみられた。実験 II、A-2 群と A-3 群は実験 I、60日飼育群の雄、実験群、対照群と飼育条件は同様である。この2つの実験で、実験 I では実験群が対照群に比べ、Caries score が有意に低い値を示した。しかし実験 II では、A-2 群と A-3 群との間に5%以下の危険率では有意な差異は認められなかったが、A-2 群は実験 II の中でも最も高いう蝕抑制率を示し、A-2 群と A-3 群との間には10%以下の危険率で有意な差異が認められた。また、歯牙別、歯面別とう蝕抑制の状態を見ると A-2 群では M₁、M₂ の歯に有意にう蝕が抑制されている傾向がみられる。

以上のハムスターの動物実験を通して、この厚朴エキス、甘草エキスの歯垢付着の抑制、う蝕の発生抑制の効

Table 11 Reduction rate in plaque and caries score compared with control group

Exp. No.	Group	Period of Experiment (days)	Experimental diet	Reduction rate	
				Plaque (%)	Caries (%)
I	Males	30	Diet-2000	20.67	17.37
	Males	60		—	18.29
	Females	30		14.87	11.94
	Females	60		—	24.92
II	A-1	60	Diet-2000	19.57	24.46
	A-2			29.85	42.20
	B-1		Diet-2000-28	N	N
	B-2			34.59	40.0

果は、試験管内の研究の成績から直ちに口腔内で強い効果が認められるというものではないが長期間繰返し、試験薬が作用するような場合には歯垢付着が少なく、また、う蝕の発生もそれに伴って少なくなる傾向があるように思われる。特に試験薬が直接作用しやすい歯、または歯面でその効果が大きいことが示唆された。

う蝕の予防に生薬を応用しようとする試みには神田らの大棗のメタノール抽出成分を用いた *S. mutans* の不溶性グルカン合成阻害効果の報告²⁸⁾もある。口腔内細菌を目標にしたう蝕予防薬のように長期間持続的に使用する必要がある場合には、漢方薬のように作用のおだやかな副作用のないものが適している。厚朴は古くから多くの漢方処方の中で一般的に用いられている生薬で、毎日服用することに問題は全くないとされている。しかし、口腔内細菌の生態系や環境因子を考えると、*in vitro* での厚朴エキスの *S. mutans* に対する抗菌力を人の口腔内にそのまま適用させることは難しいが、口腔内に歯垢が堆積しやすい状態、歯垢の除去が困難な場合等、対象や使用方法を考えることにより、特に平滑面う蝕の予防に応用できることが示唆された。

総 括

ハムスターを用い、*S. mutans* に抗菌作用がある厚朴エキスと甘草エキスを配合した餌、飲料水を与え、歯垢の付着、う蝕の発生状況を検討して次のような結果を得た。

1. *S. mutans* 接種後、試験薬を2%混入した餌、1%混入した飲料水の両者を与えて飼育した動物では歯垢付着量が対照群より少なかった。

2. 上記の試験薬を混入した餌、飲料水を与えて60日間飼育した動物では対照群よりう蝕による歯牙の崩壊率

が少ない傾向が認められた。特に試験薬が直接作用しやすい第1臼歯、第2臼歯ではその効果が大きいことが示唆された。

文 献

- 1) Keyes, P. H.: The infectious and transmissible nature of experimental dental caries, Arch. Oral Biol., 1: 304, 1960.
- 2) Fitzgerald, R. J. and Keyes, P. H.: Demonstration of the etiologic role of Streptococci in experimental caries in the hamster, J. Am. Dent. Ass., 61; 9, 1958.
- 3) Zinner, D. D., Jablon, J. M., Aran, A. P. and Saslaw, M. S.: Experimental caries induced in animals by Streptococci of human origin, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118; 766, 1965.
- 4) Krasse, B.: Human Streptococci and experimental caries in hamsters, Arch. Oral Biol., 11; 29, 1966.
- 5) Tanzer, J. M.: Essential dependence of smooth surface caries on, augmentation of fissure caries by, sucrose and *Streptococcus mutans* infection, Infect. and Immun., 25; 526, 1979.
- 6) Stephan, R. M., Fitzgerald, J., McClure, F. J., Harris, M. R. and Jordan, H.: The comparative effects of penicilin, bacitracin, chloromycetin, aureomycin and streptomycin on experimental dental caries and on certain oral bacteria in rat, J. Dent. Res., 31; 421, 1952.
- 7) Loe, H. and Schiott, C. R.: The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man, J. Periodont. Res., 5; 79, 1970.

- 8) 竹村金造：クロールヘキシジンの歯苔抑制機序の *in vitro* における解析，日本歯科保存学雑誌，18；35，1975.
- 9) Guggenheim, B., Regolati, B., Schmid, R. and Muhleman, H. R. : Effects of the topical application of mutanase on rat caries, Caries Res., 14；128, 1980.
- 10) 嶋田一夫，須藤正美，秋山正尊，久保 隆，天野恒久，井上公蔵：Mutanase 及び Dextranase のう蝕予防効果に関する研究，第一報，ハムスター実験う蝕について，口腔衛生会誌，33；89，1983.
- 11) Gjermo, P. and Rølla, G. : The plaque inhibiting effect of chlorhexidine containing dentifrices, Scand. J. Dent. Res., 79；126, 1971.
- 12) 網元愛子，斉藤邦男，二上捷之：Chaetomium gracile 由来の Dextranase 添加歯磨剤の歯垢除去効果に関する臨床評価（2）—特に時系列解析による考察について，口腔衛生会誌，28；276, 1978.
- 13) Fitzgerald, R. J. : The potential of antibiotics as caries-control agents, J. Am. Ass., 87；1006, 1973.
- 14) Namba, T., Tsunezuka, M., Bae, K. H. and Hattori, M. : Studies on dental prevention by traditional Chinese medicines (Part 1). Screening of crude drugs for antibacterial action against *Streptococcus mutans*, Shoyakugakuzasshi, 35；295, 1981.
- 15) Keyes, P. H. and Jordan, H. V. : Periodontal lesions in the Syrian hamster III Findings related to an infectious and transmissible component, Arch. Oral Biol., 9；377, 1964.
- 16) Gold, O. G., Jprdan, H. G. and Van Houte, J. : A selective medium for *Streptococcus mutans*, Arch. Oral Biol., 18；1357, 1973.
- 17) Namba, T., Tsunezuka, M. and Hattori, M. : Dental caries prevention by traditional Chinese medicines. part II, Potent antibacterial action of Magnoliae cortex extracts against *Streptococcus mutans*, J. Med. Plant. R., 44；100, 1982.
- 18) Namba, T., Hattori, M., Tsunezuka, M., Yamagishi, T. and Konishi, K. : Studies on dental caries prevention by traditional Chinese medicine part III *In vitro* susceptibility of a variety of bacteria to Magnolol and Honochiol, the components of Magnoliae Cortex, Shoyakugakuzasshi, 36；227, 1982.
- 19) Mitscher, L. A., Park, Y. I. and Clark, D. : Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial isoflavonoids and related substances from Glycyrrhiza Glabra L. var. Typica, J. Natural Products, 43；250, 1980.
- 20) Namba, T., Tsunezuka, M., Dissana YAKE, D. R. B., Kakiuchi, N. and Hattori, M. : Studies on dental caries prevention by traditional medicines (part VII) Screening of ayurvedic medicines for antiplaque action, Shoyakugakuzasshi, 32；146, 1985.
- 21) Keyes, P. H. : Dental caries in the syrian hamster III The effect of gonadectomy on caries activity and body growth, N. Y. J. Dentistry, 18；172, 1948.
- 22) 矢沢正人：モリブデンによるハムスターのう蝕抑制に関する研究，口病誌，48；277, 1981.
- 23) 神田博史，日高和幸，金谷裕敏，山崎和男，小池哲央，吉田昭義，林 信一：*Streptococcus mutans* の不溶性グルカン合成阻害に及ぼす生薬の影響，日本薬学会第105年会講演要旨，495, 1985.