原 著

Mutanase によるヒト歯垢の *in vitro* および *in vivo* における溶解効果

In vitro and *in vivo* degradation of human
dental plaque by mutanase

谷井小百合* 平松智子*
永福裕子** 井上昌一**

Sayuri TANII*, Tomoko HIRAMATSU*,
Hiroko EIFUKU** and Masakazu INOUE**

Received November 14, 1988; accepted December 2, 1988

Abstract: *In vitro* and *in vivo* effects of mutanase on the release of reducing sugar from human dental plaque were examined.

In vitro, release of reducing sugar was detected with 2.8 units of mutanase, and linearly increased to about 11 units.

In vivo, after rinsing for 1 minute with mouthwash containing 11 units of mutanase, the amount of released reducing sugar was significantly higher ($p < 0.01$) than that after rinsing with placebo (heat-inactivated mutanase solution). However, mouthwash containing 2.8 units of mutanase had no effect.

These results suggest that mutanase degrades human dental plaque, and that the lowest clinically effective level of mutanase is between 2.8 and 11 units.

索引用語: ムタナーゼ, 歯垢, 分解

Key words: Mutanase, Dental plaque, Degradation

緒 言

う蝕原性細菌である *mutans streptococci* は、菌体外に種類の異なったグルコシルトランスフェラーゼを分泌し、食餌中のスクロースを基質として水溶性および非水溶性グルカンを合成する。非水溶性グルカンは粘着性に富み、この菌の歯面への強固な付着を促し、さらに水溶

性グルカンとともに、自身やその他の口腔細菌を凝集することによってう蝕誘発性歯垢を形成する。こうして、歯垢マトリックスの主構成成分となった非水溶性グルカンは、この菌の栄養代謝の結果として排泄された有機酸(乳酸)の歯垢外への拡散を妨げるバリアーとして働き、歯垢中の酸の蓄積を促し、エナメル質の脱灰を招く。このように、非水溶性グルカンは *mutans streptococci* の

* サンスター株式会社研究開発本部 (本部長: 渡辺 猛)

** 鹿児島大学歯学部予防歯科学教室 (主任: 井上昌一教授)

* Department of Research & Development, Sunstar Inc. (Director: Takeshi WATANABE)

** Department of Preventive Dentistry, Kagoshima University Dental School (Chief: Prof. Masakazu INOUE)

特別掲載

定着と歯垢形成, さらにはエナメル質脱灰に積極的な役割を果たしていると考えられ, このう蝕原性レンサ球菌の主要な病原因子は非水溶性粘着性グルカン合成能に求められている¹⁾。

従って *mutans streptococci* の歯面への定着を妨げればう蝕抑制を期待するという観点から, まず非水溶性グルカンに関する種々の検討がなされ, 現在では, α -1, 3グルコシド結合を主とし, α -1, 6グルコシド結合を含む分岐型のグルコース重合体であり, その非水溶性は α -1, 3結合鎖の存在に依存していることが知られている²⁾。そしてこの α -1, 3グルコシド結合を分解する酵素として α -1, 3グルカナーゼ(ムタナーゼ)の歯科臨床への応用について今日までにいくつかの検討がなされてきた^{3,4)}。Guggenheim ら^{5,6)}は, *Trichoderma harzianum* 由来のムタナーゼがラット実験う蝕に対して抑制効果を有することを報告しており, また Simonson ら⁷⁾, 嶋田ら⁸⁾, 須藤ら⁹⁾は, *Pseudomonas* sp. 由来のムタナーゼがラットあるいはハムスターの実験う蝕を抑制することをそれぞれに報告している。ヒトに応用した例としては, Kelstrup ら¹⁰⁾が *Trichoderma harzianum* 由来のムタナーゼをチューインガムに配合して用いて, 歯垢形成や歯肉炎症症の低下を認めており, また野中ら¹¹⁾によっても, 同微生物由来の部分精製ムタナーゼ配合洗口剤が歯垢形成を抑制することが示されている。

本研究では, *Pseudomonas* sp. 由来のムタナーゼの *in vitro* における歯垢分解効果およびムタナーゼ配合洗口液の臨床的歯垢分解効果について検討を行なったので報告する。

材料と方法

1. ムタナーゼ

Pseudomonas sp. 由来のムタナーゼ (endo-1, 3- α -D-glucanase) を用いた¹²⁾。酵素活性の単位は, ムタンを0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.7) に0.5%の割合で懸濁した液0.4ml に, 同緩衝液に溶解した酵素液0.1ml を添加して40°C で10分間反応させた後, 遊離した還元糖量を Somogyi-Nelson 法¹³⁾により測定し, 1分間に1 μ mol のグルコースに相当する還元力を生じるものを1単位とした。

なお, ムタンは Guggenheim の方法に従って *Streptococcus sobrinus* OMZ 176株の菌体外酵素を用いて作製した。

2. *in vitro* における歯垢の分解

歯垢標品を20~35歳の成人34名(男子20名, 女子14名)から採取した。すなわち, 1日間口腔清掃を停止

後, 水道水で1回洗口させたのち, デンタルピックを用いて全ての歯の面から歯垢を採取した。これらを合体して滅菌蒸留水に均一に懸濁し, 蒸留水に対して4°C で2昼夜透析し, その後凍結乾燥した。使用時には, 細粉末としたのち, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.7) で1回洗浄後, 超音波破碎器によって同緩衝液中に均一に懸濁させた。

歯垢の分解試験は, ムタナーゼを0.0, 2.8, 5.6, 11.0, 16.7, あるいは27.8単位/2mlの濃度で含む酵素液2mlを0.5%歯垢懸濁液1mlに加えて, 40°C で10分間反応させた後, 遊離した還元糖量を Park-Johnson 法¹⁴⁾に準ずる方法で測定した。別に各濃度の酵素液および歯垢懸濁液に含まれる還元糖量をそれぞれ測定し, その和を対照(ベースライン値)として, これを先の酵素反応によって遊離した還元糖量から減じて得られた値をもって正味の遊離還元糖量とした。また, 歯垢中の全糖量はフェノール硫酸法¹⁵⁾でグルコースを標準として測定した。

3. 洗口による歯垢の溶解

被験者として20~35歳の成人17名(男子8名, 女子9名)を選び, 1日間口腔清掃を停止後, ムタナーゼ溶液で洗口を行なわせた。即ち, 被験者にまず1回約30mlの水で3回口腔内を洗浄させた後, 加熱失活した酵素液5mlで正確に1分間洗口を行ない試験管に吐出させた。続いて, 蒸留水5mlで同様に洗口させ, 同一試験管に吐出させた。これを直ちに100°Cで10分間加熱したのち, 蒸留水で全量を20mlに調整して遠心分離(17,000rpm, 10分間)し, 得られた上清について Park-Johnson 法で還元糖量を測定し, 対照とした。次いで蒸留水で3回洗口後, さらに失活させない酵素液を用いて洗口させ, 同様の手順に従って還元糖量を得, これと対照との差をもってムタナーゼによる歯垢の溶解量とした。酵素液は2.8, 11.0, 27.8単位/5mlの3種類の濃度を採用した。

実験結果の統計的解析は, t-検定によった。

結 果

1. *in vitro* における歯垢の分解

Table 1 に示すように, 歯垢にムタナーゼを40°Cで10分間作用させた結果, 還元糖の新たな遊離がみられた。その量は作用させたムタナーゼの増量に伴って増加し, 2.8単位で5.5 μ g グルコース相当量の還元糖遊離がみられ, およそ11単位まで直線的に増加したが, それ以上の酵素濃度では増加率が低下する傾向を示した。11.0

Table 1 The release of reducing sugars from pooled dental plaque by mutanase

Mutanase (U)	Reducing sugars released		
	μg as glucose/ reaction mixture	weight ratio to	
		total saccharide (%)	dry weight (%)
0	0.0*	—	—
2.8	5.5	1.1	0.11
5.6	15.3	3.1	0.31
11.0	29.1	5.9	0.58
16.7	40.2	8.2	0.80
27.8	56.4	11.5	1.13

* Reducing sugar content of the control mixture was 132.0 μg as glucose.

単位のムタナーゼを作用させた時の還元糖の遊離量は、29.1 μg グルコース相当量であったが、これは用いた歯垢に含まれる全糖量 (491 μg グルコース相当量) と乾燥重量 (5 mg) のそれぞれ5.9%および0.58%に相当するものであった。なお、ムタナーゼ無添加の場合の歯垢懸濁液中の還元糖量は132.0 μg グルコース相当量であった。

2. 洗口による歯垢の溶解

2.8, 11.0および27.8単位のムタナーゼを含む酵素液 5 ml で洗口させた場合の新たな還元糖の遊離量を Table 2 に示す。ムタナーゼ単位の増加に従って還元糖の遊離量も増加した。即ち、酵素液での洗口で遊離した還元糖の増加量は、11.0単位および27.8単位の酵素量を用いた場合にそれぞれ平均で21.9 μg および28.2 μg グルコース相当量であり、対照に比べて有意な増加が認められた (いずれも $p < 0.01$) が、2.8単位ではその差は有意ではなかった。なお、対照失活酵素液での洗口時の吐出液に含まれていた還元糖量 (ベースライン値) は、2.8, 11.0および27.8単位でそれぞれ平均で136.5 μg (個人の最小値79~最大値212 μg)、171.1 μg および230.2 μg グルコース相当量であった。

考 察

本実験で用いたムタナーゼは、*Pseudomonas* sp. 由来のエンド型 α -1, 3グルカナーゼで、試料酵素中には α -1, 6グルカナーゼ活性はなく、*mutans streptococci* が産生する非水溶性グルカンの特徴づけている α -1, 3グルコシド結合を切断することによってこれを分解するものである。本研究では、ヒトの歯垢にこれを作用させ

Table 2 The release of reducing sugars from the mouth by mutanase rinsing

Subjects	Reducing sugars increased (μg as glucose/20ml) by mouthrinsing with mutanase of		
	2.8 U	11.0 U	27.8 U
1	3	4	6
2	8	17	6
3	3	— 1	31
4	21	31	25
5	12	28	43
6	5	12	55
7	1	29	100
8	30	41	16
9	1	52	60
10	4	— 14	20
11	— 20	18	— 38
12	16	9	— 5
13	2	14	3
14	55	99	126
15	14	20	2
16	6	2	10
17	— 15	11	20
mean	8.59	21.9	28.2
t-test	$t_0 = 2.1119$ NS	$t_0 = 3.53821$ $p < 0.01$	$t_0 = 2.93968$ $p < 0.01$

Reference: Mean value of reducing sugars released by mouthrinsing with heat-inactivated mutanase (base line)

mean $\pm$ S.D. (range)	136.5 $\pm$ 43.1 (79~212)	171.1 $\pm$ 41.8 (104~249)	230.2 $\pm$ 35.4 (178~347)

た場合にその分解が生じるかどうかを調べるため、*in vitro* および *in vivo* での検討を行なった。

その結果、*Pseudomonas* sp. 由来のムタナーゼは *in vitro* でも *in vivo* でもヒトの歯垢を分解し、還元糖を遊離することが確認された。*In vitro* 実験の結果をみると、5 mgの歯垢に含まれる491 μg グルコース相当量の糖成分のうち、11.0単位のムタナーゼによってはその5.9%、27.8単位では11.5%が分解されたことになる (Table 1)。これに裏付けられるように、*in vivo* 実験においても、11.0単位以上のムタナーゼを用いた場合には明らかな歯垢の分解が認められた (Table 2)。これらの所見は、著者の一人が既に報告した¹⁰⁾ように、本研究で用い

た *Pseudomonas* sp. のムタナーゼが、*mutans streptococci* の1株の菌体外酵素をスクロースと反応させて予めガラス表面上に形成したグルカン膜を分解、除去するという事実とよく一致する。従ってムタナーゼは、歯垢マトリックスの主成分として存在している非水溶性グルカンの α -1, 3グルコシド結合を開裂することによって歯垢の排除（ブラークコントロール）に効果を発揮しうると考えられる。

ところで、*in vitro* におけるムタナーゼによる歯垢分解実験では、用いたムタナーゼ単位の増加に伴って還元糖の遊離量も増加し、例えば11単位では10分間に29.1 μ g グルコース相当量の還元糖の遊離がみられた。しかし、11単位のムタナーゼによって10分間に遊離すべき還元糖量の期待理論値が19,800 μ g グルコース相当量であることを考えると、歯垢から遊離された還元糖量は、この場合その約0.15%にすぎないことになる。デキストラナーゼ（ α -1, 6グルカナーゼ）を用いた同様の歯垢分解実験^{17,18)}においてもこれと類似の値が示されている。その理由の1つは、歯垢が全体として構築構造を持っていることに求められる。このためムタナーゼは、ブラークマトリックス中に存在する非水溶性 α -1, 3結合グルカンへの自由な接触を当然大きく妨げられる結果となろう。

一方、洗口実験では、11単位以上の濃度のムタナーゼ溶液を用いた場合には統計的に有意な還元糖量の増加が認められたが、2.8単位では、個人差等の要因によるものと思われるが有意差は認められなかった。従って、今回のような方法で実験を行なった場合のムタナーゼの有効性の検出限界は、2.8単位と11単位の間にあったと考えられる。この結果は、一概に比較すべきではないが、網元ら¹⁸⁾の実験にみられるデキストラナーゼについての値ともほぼ一致している。

In vitro においてムタナーゼの歯垢分解効果をみた実験では、11単位のムタナーゼを用いると10分間に29.1 μ g グルコース相当量の還元糖が遊離した。反応が時間を追って同じ速度で進むと仮定すれば、1分間あたりの還元糖遊離量は2.91 μ g グルコース相当量ということになる。これに対して、11単位で1分間の洗口によって遊離した還元糖量は平均で21.9 μ g グルコース相当量であり、*in vitro* 実験での値より大きいものとなる。デキストラナーゼを用いた Futakami ら¹⁷⁾、網元ら¹⁸⁾の報告でも、1分間の還元糖遊離量は同じように *in vivo* 実験の方が大きい値が得られている。このように、この類の *in vitro* 実験や *in vivo* 実験では、その実験方法の違いによって、こうした一見解釈に苦しむ傾向を示すのが一

般であるように思われる。その理由は明らかではないが、唾液中にグルカナーゼ活性の増強因子が存在するのかも知れない。今後の検討課題の一つであろう。

結 論

Pseudomonas sp. 由来のムタナーゼの *in vitro* における歯垢分解効果およびムタナーゼ配合洗口液の臨床的歯垢分解効果について検討し、以下の結論を得た。

1. *In vitro* において、成人から集めた歯垢に0～27.8単位のムタナーゼを40°C で10分間作用させた結果、2.8単位でも還元糖の遊離が明らかに認められた。分解反応は、11.0単位付近までは酵素単位の増大に比例して増加した。

2. 成人17名を被験者として、ムタナーゼ溶液5mlを用いて1分間の洗口をさせたところ、2.8単位のムタナーゼ溶液での洗口では統計的に有意の量の還元糖の遊離は検出されなかったが、11単位以上のムタナーゼ洗口では明らかな ($p < 0.01$) 還元糖遊離効果が認められた。

以上のことから、ムタナーゼは *in vitro* あるいは *in vivo* においてもヒトの歯垢を分解する作用を発揮することが明らかとなった。また、その臨床的效果を還元糖の遊離を指標として見るかぎり、有効性の検出限界は2.8～11.0単位の間にあることが示された。

文 献

- 1) 浜田茂幸, 古賀敏比古: う蝕の細菌学と生化学, 化学と生物, 19; 695, 1981.
- 2) 井上昌一: 口腔レンサ球菌の産生する菌体外多糖類の化学構造と微細形態. う蝕と歯周病一研究の進歩, 浜田茂幸 (編), 2, 日本歯科評論社, 東京, 1982, 31頁.
- 3) Simonson, L. G. and Lamberts, B. L.: Glucanohydrolases and the control of glucans. In R. J. Doyle and J. E. Ciardi (eds.), Glucosyltransferases, Glucans, Sucrose and Dental Caries. IRL Press, Washington D. C. and Oxford, 1983, p. 211.
- 4) 古賀敏比古: *Streptococcus mutans* のグルカン合成の抑制—おもにグルカナーゼについて. う蝕と歯周病一研究の進歩, 浜田茂幸 (編), 2, 日本歯科評論社, 東京, 1982, 69頁.
- 5) Guggenheim, B., Regolati, B. and Mühlemann, H. R.: Caries and plaque inhibition by mutanase in rats, Caries Res., 6; 289, 1972.
- 6) Guggenheim, B., Regolati, B., Schmid, R. and Mühlemann, H. R.: Effects of the topical application of mutanase on rat caries, Caries Res., 14; 128, 1980.

- 7) Simonson, L. G., Lamberts, B. L., Reiher, D. A. and Walter, R. G.: Prevention of dental caries in Hamsters by an endo-1, 3- α -D-Glucanase, J. Dent. Res., **62**; 395, 1983.
- 8) 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1報ハムスター実験う蝕について, 口腔衛生会誌, **33**; 89, 1983.
- 9) 須藤正美, 嶋田一夫, 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2報ラット実験う蝕について, 口腔衛生会誌, **33**; 132, 1983.
- 10) Kelstrup, J., Holm-Pedersen, P. and Poulsen, S.: Reduction of dental plaque and gingivitis in humans by crude mutanase, Scand. J. Dent. Res., **86**; 93, 1978.
- 11) 野中秀樹, 佐治靖介, 菊池 景, 山本洋一, 中村 亮, 常光 旭: 二重盲検法による Mutanase 含有洗口剤の歯垢形成におよぼす臨床的效果, 口腔衛生会誌, **31**; 21, 1981.
- 12) 嶋田一夫, 秋山正尊, 須藤正美, 茶園正至, 上村高明, 久保 隆, 井上公蔵, 天野恒久, 鳥居光雄: *Streptococcus mutans* の不溶性 glucan を分解する酵素を産生する *Pseudomonas* 属の一菌種について, 日本細菌学雑誌, **33**; 218, 1978.
- 13) Somogyi, M.: Notes on sugar determination, J. Biol. Chem., **195**; 19, 1952.
- 14) Park, J. T. and Johnson, M. J.: A submicrodetermination of glucose, J. Biol. Chem., **181**; 149, 1949.
- 15) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Analytical Chem., **28**; 350, 1956.
- 16) Inoue, M., Yakushiji, T., Katsuki, M., Kudo, N. and Koga, T.: Reduction of the adherence of *Streptococcus sobrinus* insoluble α -D-Glucan by end-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Glucanase, Carbohydrate Research, **182**; 277, 1988.
- 17) Futakami, K., Shibuya, K., Yamazaki, Y., Igarashi, M. and Niwa, M.: The effect of dextranase on the release of reducing sugars from dental plaque, 口腔衛生会誌, **26**; 193, 1976.
- 18) 網元愛子, 岡本 浩, 玉沢 修, 斎藤邦男, 二上捷之: *Chaetomium gracile* 由来の Dextranase による *in vitro* の歯垢溶解効果ならびに洗口液および歯磨剤での臨地試験成績 (1), 口腔衛生会誌, **28**; 187, 1978.