Streptococcus mutans のエナメル質付着に対する セラック配合歯磨剤の影響

東海林良彦 石川 博之 前田 伸子* 新井 高

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室, *細菌学教室

(主任: 新井 高教授)

(平成9年11月10日受付)

Effect of Dentifrice Containing Shellac on Adherence of *Streptococcus mutans* to Human Enamel Surface

Yoshihiko Shoji, Hiroyuki Ishikawa, Nobuko Maeda* and Takashi Arai

Department of Periodontics and Endodontics, *Department of Bacteriology

Tsurumi University School of Dental Medicine

2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501, Japan

(Chief: Prof. Takashi Arai)

The purpose of this study was to evaluate the effect of dentifrice containing shellac on the adherence of *Streptococcus mutans* to the enamel surface of the human tooth.

Each enamel surface was polished with dentifrice containing 0.5% or 1% shellac, dentifrice without shellac, and with water (control). After polishing, each enamel specimen was placed into culture medium with *S. mutans* for 72 hours. Adherence of *S. mutans* to the enamel surface was assessed by scanning electron microscopy.

Masses of *S. mutans* were observed on the enamel

surfaces polished with water. When the enamel surfaces were polished with the dentifrice that did not contain shellac, only a few *S. mutans* were observed on the enamel surface. In contrast, almost no *S. mutans* were observed on the enamel surfaces polished with dentifrice containing 0.5% or 1% shellac.

These results suggest that dentifrice not containing shellac inhibit the adherence of *S. mutans* to the enamel surface and that dentifrices containing 0.5% or 1% shellac strongly inhibit the adherence of *S. mutans* to the enamel surface.

Key words: Dentifrice, Shellac, *Streptococcus mutans*, Enamel, Adherence of bacteria

要旨: 本研究は, *Streptococcus mutans* のエナメル質付着に対するセラックの影響を検討するために, 水, セラックを配合していない歯磨剤 (DNV), セラックを0.5% および1% 配合した歯磨剤 (SDNV) で研磨したヒト抜去歯エナメル質を, *S. mutans* を接種した培地で72時間培養した後, エナメル質表面の *S. mutans* 付着状態および付着数を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

その結果, 試料に付着した *S. mutans* 数は, DNV, 0.5% SDNV および1% SDNV で試料を研磨した場合には, 水で研磨した場合に比べて有意に少なかった。さらに, *S. mutans* 数は0.5% SDNV および1% SDNV で研磨した場合には, DNV で研磨した場合よりも有意に少なかった。

以上の結果より, ヒト抜去歯エナメル質を歯磨剤で機械的に研磨するとエナメル質表面の *S. mutans* 付着が抑制されること, セラックを配合した歯磨剤を使用すると *S. mutans* 付着が著しく抑制されることが示唆された。

索引用語: 歯磨剤, セラック, *Streptococcus mutans*, エナメル質, 細菌付着

緒 言

プラークコントロールの方法には、機械的方法と化学的方法があるが¹⁾、ブラッシングやフロッシングなどの機械的方法では清掃が困難な歯の小窩、裂溝や隣接面のプラークコントロールを補うために、歯磨剤や洗口剤に配合された薬剤の効果を期待した化学的プラークコントロールが必要になる場合がある。

歯磨剤に配合される薬剤としては、殺菌剤、酵素剤、フッ化物などがあり、それぞれ、う蝕原性細菌の殺菌、歯垢の分解、歯質強化の働きをするが²⁾、細菌の歯面付着を物理的に阻止する薬剤を配合した歯磨剤はない³⁾。

セラックは、錠剤や菓子の被膜剤および光沢剤として、また、毛髪化粧品や電気絶縁体材料など種々の製品に使用されている天然樹脂である⁴⁻⁷⁾。セラックをアルコールに溶解して塗布すると、溶剤が揮発した後は滑らかで耐摩耗性、耐久性に富んだ薄い皮膜が得られるため、製品は傷ついたり、湿気を帯びたり、変色したりせず、長く保持できる。われわれは、このような特徴をもつセラックをエナメル質表面に作用させることによって、細菌の付着を抑制できる可能性があるのではないかと考えた。

そこで本研究では、セラック配合した歯磨剤で研磨したヒト抜去歯エナメル質を *Streptococcus mutans* を接種した培地中で培養した後、エナメル質表面の *S. mutans* 付着状態を走査型電子顕微鏡で観察し、*S. mutans* のエナメル質付着に対するセラックの影響を検索した。

材料および方法

1. 実験材料

研磨試料には、矯正治療のために3名の患者(A:17歳, B:22歳, C:19歳のいずれも女性)から抜去した上下顎左右第1小臼歯の頬側エナメル質を用いた。10%中性緩衝ホルマリン中に保存した抜去歯のホルマリン成分を流水下で完全に除去後、タービン用ダイヤモンドバーおよびエンジン用カーボラダムポイントで、約5×5mmの大きさの頬側エナメル質試料片を作製した。この際、1歯の頬側エナメル質から1つの試料を作製した。エナメル質上の沈着物を除去するために、試料のエナメル質表面を水道水で湿潤させながらエンジン用ブラシコーンを用いて3分間研磨した。

研磨材料には、水(水道水)、Denivit®(エーザイ

表1 Denivit®歯磨剤成分一覧表

配 合 成 分
湿 潤 材: ソルビット, プロピレングリコール
研 磨 材: アルミナ, 軽質炭酸カルシウム
粘 結 剤: カルボキシメチルセルロースナトリウム
可溶化剤: ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油
薬用成分: モノフルオルリン酸ナトリウム
香 味 剤: 香料(スペアミント), サッカリンナトリウム
保 存 剤: パラベン

表2 研磨材料と抜去歯との組み合わせ

患者	A	B	C
水	4	4	4
DNV	4	4	4
0.5% SDNV	4	4	4
1% SDNV	4	4	4

A:17歳, B:22歳, C:19歳の女性

株式会社 東京、以下DNVと略す)(表1)、DNVにセラックを0.5%配合した歯磨剤(以下0.5%SDNVと略す)、DNVにセラックを1%配合した歯磨剤(以下1%SDNVと略す)の4種類を用いた。

2. 実験方法

実際の口腔内では、歯は常に唾液にさらされているので、この状態になるべく近づけるために以下のような処理をした。まず、試料を人工唾液(シュール、三金工業株式会社 栃木)に2時間浸漬した後、水、DNV、0.5%SDNVおよび1%SDNVの4種類の研磨材料で、試料のエナメル質表面をエンジン用ブラシコーンを用いて3分間研磨した。この際、試料間の差をできるだけ小さくするために、同一患者の抜去歯で作製した試料を用い、1つの研磨材料につき3試料を研磨した(表2)。研磨は同一の験者が行った。研磨後、試料上に付着している細菌を除去するために、70%アルコールで消毒し、滅菌水でアルコール分を完全に除去した後、オートクレーブ滅菌した人工唾液内に浸漬し、37°Cで8時間振盪した。その後5%蔗糖含有Tryptic Soy Broth(TS Broth, BBL USA)10ml中にあらかじめTS Broth中で前培養した50μlの*S. mutans* ATCC 25175(約10⁹CFU/ml)を接種した試験管内に投入し、72時間好氣的に培養した。

培養後、試料は2.5%グルタルアルデヒドおよび2%オスミウムで固定し、エタノール系列で脱水後、ヒータノール凍結乾燥装置(ID-2, エイコーエンジニアリング社 東京)で凍結乾燥した。クイックオー

トコーター (SC 701 AT, サンヨー電子株式会社 東京) で金パラジウム蒸着後, 各試料表面の *S. mutans* 付着状態を走査型電子顕微鏡 (JSM-840, 日本電子株式会社 東京) を用いて 2,000 倍の倍率で観察した。試料表面に付着した *S. mutans* 数の測定は山本⁸⁾の方法に準じて行った。すなわち, 試料中央部の任意の 6 区画 (1 区画は $44 \times 59 \mu\text{m}$) を写真撮影し, 写真上の *S. mutans* 数を計測して, その平均値を試料の付着菌数とした。1 種類の研磨材料につき患者 A, B, C の計 3 試料の付着菌数を測定した。研磨試料間の付着菌数の有意差を Mann-Whitney 検定で判定した。

結 果

図 1~4 に患者 A の抜去歯で製作した試料を用いた場合の各研磨材料ごとの電子顕微鏡写真を示す。水で研磨した場合には, 試料表面全体に直径約 $0.5 \mu\text{m}$ の *S. mutans* が多数付着していた (図 1)。*S. mutans* は数珠状に連鎖しており, 一部はエナメル質表面に直角に積層して集塊状に付着していた。図 2 に DNV で研磨した場合の試料の電顕写真を示す。*S. mutans* はエナメル質表面に散在し, 部分的に連鎖していたが, 付着状態は水で研磨した場合よりも明らかに少なかった。

図 1 水道水で研磨した試料の走査電顕像
S. mutans がエナメル質表面に大量に付着している。(×2,000) 写真中のバーの長さは $10 \mu\text{m}$

図 2 DNV で研磨した試料の走査電顕像
S. mutans がエナメル質表面に散在している。(×2,000)

図 3 0.5% SDNV で研磨した試料の走査電顕像
エナメル質表面に *S. mutans* の付着は認められない。(×2,000)

図 4 1% SDNV で研磨した試料の走査電顕像
エナメル質表面に *S. mutans* の付着は認められない。(×2,000)

図5 水、DNV、0.5% SDNV および 1% SDNV で研磨した試料に付着した *S. mutans* の数 (n=3)

た。図3に0.5% SDNVで研磨した試料の電顕写真を、図4に1% SDNVで研磨した試料の電顕写真を示す。両試料ともに、エナメル質表面には凹凸や不定形の構造物が認められるものの、*S. mutans* は全く認められなかった。また、患者BまたはCの抜去歯から作製した試料の*S. mutans* 付着状態も、0.5%および1% SDNVで研磨した試料に*S. mutans* がわずかに認められたことを除いて、患者Aの試料の結果と同様であった。図5に、研磨材料ごとの*S. mutans* 数の平均と標準偏差を示す。*S. mutans* 数の平均と標準偏差は、水では733±817、DNVでは129±62、0.5% SDNVでは11±20、1% SDNVでは17±19であった。Mann-Whitney検定の結果、水とDNV、0.5% SDNVおよび1% SDNVとの間に、また、DNVと0.5% SDNVおよび1% SDNVとの間に統計学的に有意差が認められた。すなわち、試料に付着した*S. mutans* 数は、DNV、0.5% SDNVおよび1% SDNVで試料を研磨した場合には、水で研磨した場合に比べて有意に少なかった。さらに、*S. mutans* 数は0.5% SDNVおよび1% SDNVで研磨した場合には、DNVで研磨した場合よりも有意に少なかった。

考 察

本実験で歯磨剤に配合したセラックは、ラックカイガラ虫が特定の樹木に寄生し、その樹液を吸って体外に分泌する樹脂状物質であり、紀元前より織物の染料、木製品や竹製品の艶出しなどに用いられてきた^{4,5)}。セラックの主成分(約95%)は樹脂で、その

Aleuritic acid

Shellolic acid

図6 セラックの構造式

他に約5%のロウと少量の色素を含んでいる。緩やかな塩基性加水分解により、脂肪酸および脂環式オキシ酸の混合物となり、aleuritic acidおよびshellolic acidはそれぞれ主たる脂肪酸および脂環式成分である⁶⁾(図6)。

セラックには、1) そのアルコール溶液は速乾性で、種々の物質の表面に永続性のある被膜を形成する、2) 耐油性、耐酸性である、3) 絶縁性が高く、誘電率が小さい、4) 熱可塑性、熱硬化性である、5) 無毒である、などのさまざまな特性がある⁴⁾。そのために、菓子や薬剤の被膜および光沢剤として、また、食品以外でも酒精ニス、水性ワニス、電気絶縁体材料、印刷インキ、化粧品、接着剤など多くの製品に使用されている⁴⁻⁷⁾。歯科では、ベースプレート、スティッキーワックス、分離剤などの製造に用いられる^{9,10)}。

われわれは、セラックの特性である被膜形成に着目し、エナメル質表面にセラックによる被膜が形成されれば、細菌の付着が物理的に抑制される可能性があるのではないかと考えた。そこで本実験では、Denivit® にセラックを 0.5% または 1% 配合した歯磨剤を試作して用いた。セラックの配合を歯磨剤量の 1% 以下にした理由は、配合が多すぎるとセラックが歯磨剤から分離してしまう可能性があるため、あるいは歯磨剤が渋くなるという味覚上の問題が生じるためである。

本実験の結果から、セラックを 0.5% または 1% 配合した歯磨剤で研磨した場合には、水で研磨またはセラックを配合しない歯磨剤で研磨した場合に比べて S. mutans の付着が著しく抑制されることが分かった。口腔内のエナメル質表面は、唾液中のムチンなどが Ca イオンによって結合してできたペリクルによって覆われている。このペリクル上へ特定の細菌が吸着し、それが増殖を開始すると、さらにそこに同種または異種細菌が凝集、定着し、集落化することによりプラークの形成が始まる¹¹⁾。特定の細菌の歯面への付着機序に関しては、非特異的静電的相互作用、レクチン・レセプター型相互作用、粘着性多糖合成による付着作用、非特異性疎水の相互作用などが知られている¹²⁻¹⁴⁾。非特異的静電的相互作用の機序によれば、細菌およびペリクルの表面は負に荷電しているため、唾液中に豊富に存在する 2 価の陽イオンである Ca^{2+} が両者を架橋することにより、細菌が歯面へ吸着していく¹⁵⁻¹⁹⁾。これは EDTA などのキレート剤でプラークを分解できることや、 Ca^{2+} と強固にイオン結合するリン酸塩やフッ素がペリクルやプラーク形成を抑制する事実から強く示唆されている¹²⁾。したがって、静電的な吸着を何らかの方法で阻害することができれば、プラーク形成の出発点である細菌の吸着を阻止できる可能性がある。例えば、O'Brien ら²⁰⁾は、ハイドロキシアパタイトの表面を化学処理して、S. mutans との電位差をなくすと、菌の付着が抑制されると報告している。前述したように、セラックは電気絶縁剤としても使用されており、電気的に不導体である⁴⁾。本実験においてセラックを配合した歯磨剤で研磨した試料上の S. mutans の付着が抑制されたのは、エナメル質表面にセラックの被膜が形成され、細菌の静電的な吸着が阻止されたためではないかと思われる。実際にセラックによる皮膜がエナメル質表面にどのように形成されているかは重要な問題であるが、本実験の走査電子顕微鏡による観察では試料上のセラック被膜を確認することはできなかった。

本研究の結果から、セラックを配合した歯磨剤でエナメル質表面を研磨することによって、同表面への

S. mutans 付着が抑制されることが示唆された。このことから、セラックは S. mutans 以外のう蝕原性細菌や歯周病原性細菌に対しても、歯面付着抑制効果がある可能性が考えられ、セラック配合歯磨剤の使用が、う蝕および歯周病の予防の一手段になることが期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、電子顕微鏡による観察および写真撮影においてご協力をいただいた、本学解剖学教室助手、田中 倫先生に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 木下四郎：歯垢と歯石の抑制について，口病誌，37：1-11，1970.
- 2) 江口泰輝：歯磨剤の機能性（その 2），飯塚喜一，丹波源男，日本歯磨工業会，歯磨剤を化学する，学建書院，東京，1994，59-76.
- 3) 山本洋一：歯磨剤の機能性（その 3），飯塚喜一，丹波源男，日本歯磨工業会，歯磨剤を化学する，学建書院，東京，1994，80-97.
- 4) 塩山敬三：シェラック-こん虫によって作り出される珍しい樹脂-，化学と工業，51：356-361，1977.
- 5) 岐阜セラック：天然樹脂・天然物製品案内 Part 1，岐阜セラック製造所，1995，9-11.
- 6) 日本薬学会：医薬品添加物ハンドブック，丸善株式会社，東京，1988，143-144.
- 7) 奥田拓男：天然薬物・生薬学，広川書店，東京，1996，157-158.
- 8) 山本光人：Streptococcus mutans の白金電極への吸着に関する研究，歯基礎誌，28：424-449，1986.
- 9) 石川梧朗，小椋秀亮，塩田重利，砂田今男：新歯学大辞典，第 1 版，永末書店，京都，1985，332.
- 10) 山根正次：歯科材料学辞典，第 1 版，学建書院，東京，1987，170-171.
- 11) 口腔細菌学談話会：歯学微生物学，第 5 版，医歯薬出版，東京，1992，383-387.
- 12) 池田 正：歯垢の細菌学，須賀昭一，図説齶蝕学，医歯薬出版，東京，1990，109-119.
- 13) 古賀敏比古：Streptococcus mutans のグルカン合成とその付着メカニズム，日本細菌学雑誌，41：679-691，1986.
- 14) Gibbons, R.J. : Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth ; J. Dent. Res., 63 : 378-385, 1984.
- 15) 並河 勇：口腔微生物叢，藤田 浩，並河 勇，北野繁雄，梅本俊夫，新図説口腔微生物学，第 2 版，学建書院，東京，1996，302-305.
- 16) Sanz, M. and Newman, M.G. : Dental plaque and

- calculus, Nisengard, R.J. and Newman, M.G. : Oral microbiology and immunology, W.B. Saunders company, Philadelphia, 1994, 320-340.
- 17) Rosan, B. : Mechanisms of oral colonization, Slots, J. and Taubman, M.A., Contemporary oral microbiology and immunology, Mosby, St. Louis, 1992, 283-298.
- 18) Menaker, L. : 池田 正, 小野瀬英雄, 久米川正好, 斎藤 滋 (監訳) : 齲蝕—その基礎と臨床—, 医歯薬出版, 1983, 268-285.
- 19) Rolla, G. : Formation of dental integuments—some basic chemical considerations. Swed. Dent. J., 1 : 241-251, 1977.
- 20) O'Brien, W.J., Fan, P.L., Loesche, W.J., Walker, M.C. and Apostolids, A. : Adsorption of *Streptococcus mutans* on chemically treated hydroxypapatite. J. Dent. Res., 57 : 910-914, 1978.

連絡先 :

鶴見大学歯学部 第二歯科保存学教室

〒 230-8501 神奈川県横浜市鶴見区鶴見 2-1-3