

発酵食品による齲蝕予防の可能性 その2

- 豆味噌、発酵乳 (ヨーグルト) -

相原 英孝、梅本 梓之介、増子 直也

愛知学泉大学

Possibility of the caries prevention with the fermented foods (2) .

— Soybean miso and Fermented milk (Yogurt) —

Hidetaka Aihara, Shinnosuke Umemoto and Naoya Masuko

キーワード：齲蝕 caries, 発酵食品 Fermented foods, 発酵乳 Fermented milk, 豆味噌 Soybean miso

1. はじめに

歯の健康は、栄養摂取に影響を及ぼし、厚生労働省は、80歳で20本の歯を残す8020（ハチマル・ニイマル）運動を提唱・推進している。しかし、実際には、80歳で平均4.6歯である。歯の喪失原因として、齲蝕、歯周病があげられる。齲蝕について、厚生労働省によると歯科保健対策より小児期において、乳歯の齲蝕（所謂虫歯）は明らかに減少かつ軽症化の傾向を示し、永久歯の一人平均齲蝕歯数も、20歳頃まで減少傾向が認められるなど着実に成果が上がってきている。しかし、現在でも13歳で齲蝕有病者率が90%を越えていることも事実である³⁾。8020（ハチマル・ニイマル）運動の為には、幼児期と学齢期の齲蝕予防および成人期の歯周病予防が重要である。ここでは、特に齲蝕について着目した。

齲蝕（虫歯）は、口腔内のpHが低下すると細菌叢に含まれるカルシウムとリン酸が不飽和状態になり、歯に含まれるカルシウムとリン酸が溶け出して、脱灰が起こる。しかし、この脱灰は一時的なもので、唾液が歯に接触すると唾液中のカルシウムとリン酸が沈着して、再石灰化を引き起こす。*Streptococcus mutans*に感染するとpHの低下が続き、脱灰が続き齲蝕が起きると考えられている^{1,2)}。糖分の摂取が乳酸の産生を招き、pHの低下を招き、脱灰が続く。

そこで、歯磨きにより*Streptococcus mutans*を取り除き、再石灰化を速やかに行うことで齲蝕を防

止する方法がとられている。歯磨きにより、*Streptococcus* 細菌数の低下が認められる報告がある²²⁾。しかし、*Streptococcus mutans*は不溶性グルカン（所謂歯垢）を形成して、歯の表面に常在している。そこで、この*Streptococcus mutans*を根本的に取り除くことが齲蝕防止に関して有効な手段と考えられる。しかし、従来の齲蝕防止は、*Streptococcus mutans*に対してでは無く、フッ素によりエナメル質の強化、乳酸発酵の原因となる糖質の摂取制限等であった。最近では、食品由来の成分による齲蝕防止に対しても関心が持たれいくつかの報告がある。富山によると、柿渋由来の縮合タンニンは強力なタンパク質凝固作用を持つことが知られ、多くの細菌への抗菌効果が期待できることから、*Streptococcus mutans*に対する抗菌効果を検討し、その結果、渋柿から抽出した縮合タンニンを含有する食品添加剤であるパルシンは、口腔連鎖球菌の付着阻害作用あるいはバイオフィルムの構造破壊によると思われる多菌種を含むバイオフィルムへの抗菌作用が報告された¹⁷⁾。また、大原らによると、本来飲食用であり安全性に問題がないブドウのブドウ酒搾り粕（パミス）から抽出した生理活性物質が、GTase阻害活性および*Streptococcus mutans*の増殖抑制効果を有し、パミス抽出物の齲蝕抑制物質としての可能性を示唆した¹⁸⁾。鈴木らによると抗酸化作用、抗肝障害作用、視神経機能改善作用、抗炎症作用、動脈硬化改善作用などを有する事が知られているナスの皮に含まれるポリフェノールの1種であるが齲蝕原因菌に対して

in vitro 実験において、顕著な殺菌作用が認められ、抗齶蝕作用を有することが報告された¹⁹⁾。小西らによると日本古来より果実としてなじみの深い食品であるとともに生薬としても用いられ、抗酸化作用、抗炎症作用、抗菌作用などのいくつかの生物学的活性を有する柿の蒂(へた)を乾燥した柿蒂抽出成分であるウルソール酸およびオレアノール酸が齶蝕原因菌に対して顕著な殺菌作用が認め、抗齶蝕作用を有することが報告された²⁰⁾。

このように食品、および食品由来成分による積極的な齶蝕防止について注目を集め始めている。

そこで、本研究では、食品として非常に身近な味噌、発酵乳(ヨーグルト)を用いて *Streptococcus mutans* の増殖抑制について検討する。

この *Streptococcus mutans* の増殖を抑える積極的な方法が、2012年に九州大学大学院農学研究院と鹿児島大学大学院医歯学総合研究科、国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部とバイオベンチャーとの共同研究により日本で開発され、2012年12月19日九州大学記者クラブにて発表されたネオナisinを含むオーラルピースである⁴⁾。しかし、まだ、広く普及していない。これは、乳酸菌が産生する抗菌性物質のバクテリオシンのネオナisinを利用したものである。

バクテリオシンとは、乳酸菌が産生する抗菌性ペプチドである⁵⁾。これは、生産菌の類縁種に対して抗菌性を示し、一般的に無味無臭、低pHで安定、121℃、10分以上の耐熱性を有し、微量(nM濃度)で抗菌性を示す。さらに、ペプチドのため、腸管内で消化酵素により分解され、耐性菌の出現は起こり難く、安全性の高い抗菌物質として注目されている。

バクテリオシンのナisin Aは、1928年に発見され、広く世界中で食品保存料として使用されている⁵⁾。しかし、日本では、2009年3月2日に食品保存料として認可された⁶⁾。善藤 威史らにより、乳酸菌バクテリオシンの検索と利用について纏められた総説がある²¹⁾。その総説によると、バクテリオシンには、乳酸菌をはじめとするグラム陽性細菌が生産するバクテリオシンは、翻訳後修飾によって生じる異常アミノ酸を含むクラスIと、含まないクラスIIに大別される。また、ナisinの作用機作は、細菌細胞の表面に存在するペプチドグリカン前駆体であるリピドIIを標的として作用し、リピドIIを足掛かりとして細胞膜に孔を形成し、ATPやイオンなどの細胞内容物を溶出させることで殺菌的な効果を示す。この一連の過程は瞬時に

起こり、リピドIIがグラム陽性細菌の表面に普遍的に存在することから、ナisinに対する耐性は生じにくいと考えられている。しかし、細胞の最も外側に外膜をもつグラム陰性細菌に対しては、ナisinは細胞膜上のリピドIIに到達することができず、抗菌作用を及ぼすことができないが、外膜を突破しさえすれば、ナisinもグラム陰性細菌に対して、抗菌活性を示す。例えば、外膜の構造を変化させるキレート剤を併用することで、ナisinは外膜を透過することができ、グラム陰性細菌にも抗菌活性を示すことが知られている。また、食品、非食品への利用についても述べられている。1920年代に発見されたナisinは、1950年代にWHO、FAOにより認可され、FDAでも安全性が認められて現在では、50カ国以上で食品保存料として利用されている。前述のように日本では、2009年に認可された。ナisinはグラム陽性細菌に強い抗菌活性を示すため、*Bacillus* 属、*Clostridium* 属、*Staphylococcus* 属、*Listeria* 属などの食品保存上問題になる細菌に対して効果を示す事が知られている。特に、低温での保存ができない食品や、低温で増殖する微生物が問題となる食品、加熱処理ができない食品が使用対象となり、また、味噌がその使用対象となっているのも特徴である。非食品用途への利用について、①ナisinを主剤とした手指用殺菌洗浄剤が陽イオン界面活性剤とナisinを併用することで、グラム陰性菌に対しても十分な殺菌効果を示す事が示された。②牛乳房炎の予防剤・治療剤として、理想的な物として期待されている。③バクテリオシンの高純度、低価格化が求められている。④前述のネオナisinを利用したオーラルピースは、梅エキスとナisinを組み合わせるにより、梅エキスに含まれるキレート作用を持つクエン酸によりグラム陰性菌に対しても効果を示す。これは、グラム陽性菌である齶蝕菌の *Streptococcus mutans* だけでなく、グラム陰性の歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) にも高い抗菌活性を示すことで、口腔内の衛生環境を好ましくするのに役立っている。株式会社M&Pからは、お口ケア乳酸菌バクテリオシンが口腔ケア商品として、2014年より販売されている²³⁾。このように我が国においても、バクテリオシンの食品、非食品分野での利用も盛んになってきている。

乳酸菌を利用した発酵食品のバクテリオシンについて、多くの報告がある。恩田によると、乳・肉製品を主とした食品から多くのバクテリオシン産生

乳酸菌が発見され、また、日本の代表的な発酵食品で有る味噌からもバクテリオシン産生乳酸菌が見つけられている。その応用についても報告がある^{7,8,9)}。

また、フナ寿司などの長い期間保存する発酵食品の保存性にバクテリオシンが関与している可能性も示唆されている¹⁰⁾。

このように、発酵食品に含まれているバクテリオシンは、様々な形で食品の保存性向上に役立ち、その応用についても検討されている。発酵肉製品の汚染細菌の増殖抑制を目的として、市販食肉より、分離した乳酸菌のバクテリオシンの抗菌性について、阿部重人らにより報告されている²⁴⁾。

乳酸菌が産生するバクテリオシンは、近縁の乳酸菌に対して抗菌性を示すことがその特徴であることから、齶蝕の原因細菌に対しても抗菌性を示す可能性が高い。*Streptococcus mutans*の産生するバクテリオシン（ミュータシン）が齶蝕を防ぐ可能性も報告されている¹¹⁾。

愛知県を中心に東海地方で利用されている豆味噌（赤味噌、赤だし）特に八丁味噌は、大豆、大豆麴と食塩だけでつくられ、二夏二冬の長い熟成期間を経て出荷される。味噌製造に、麴と同様、乳酸菌も重要な役割を担っていることは、よく知られている。そこで、豆味噌と八丁味噌、発酵食品としてよく知られているヨーグルトの *Streptococcus mutans* に対する抗菌性の可能性を検討する。

2. 材料と方法

(1) 口腔内の *Streptococcus mutans* の検出と分離

デントカルト SM キットを使用した。デントカルト SM キットの中には、ストリップミュータンス、サイトストリップ、試験管、バシトラシン錠、ガムペレット、ネームシールが入っている。バシトラシン錠は、ミュータンスレンサ球菌以外の細菌の発育を抑制する抗生物質である。

検査の手順としては、

- 1) 検査の15分以上前に、デントカルト SM キットの試験管にバシトラシン錠を1錠入れる。
- 2) ガムペレットを1分間咀嚼し、その際に出た唾液は飲み込む。
- 3) ガムペレットを捨て、ストリップミュータンスの検査面を、舌表面に5往復させる。口唇で余分な唾液を拭きながら引き出す。

- 4) サイトストリップの検査面にフロスなどで採取したプラークを添付する。
- 5) ストリップミュータンスとサイトストリップを背面で合わせ、キャップに差し込む。
- 6) 試験管に垂直に挿入して、キャップを閉め、37°Cで48時培養する。
- 7) 48時間後に、カリエスリスクモデルチャートと比較し、測定を行う。

(2) *Streptococcus mutans* の分離

SM キットで得られた *Streptococcus mutans* のコロニーを液体培地に接種し、単一のコロニーとして培養した。

(3) 使用培地

培地は、ペプトン15g、ダイズペプトン5g、塩化ナトリウム5gを1ℓの蒸留水に溶解し、pH7.2に調製し、121°C、15分の条件で高圧蒸気滅菌して使用した。必要に応じて、15gの寒天を加えて、寒天培地として使用した。

(4) 試料

味噌

八丁味噌 株式会社まるや八丁味噌

愛知県岡崎市八帖町往還通 52

岡崎城より八丁離れた八帖町で作られる豆味噌の1種で食塩、水、大豆、大豆麴のみを原料とし、二年以上熟成させて出荷される。

豆味噌 榊塚味噌 合資会社野田味噌商店

愛知県豊田市榊塚西町南山 6 番地

愛知県を中心に食べられる豆味噌を天然醸造により製造している。

ヨーグルト

明治ブルガリアヨーグルト 450g 株式会社明治

森永ビフィダスヨーグルト 400g 森永乳業株式会社

これらのヨーグルトは、非加熱処理プレーンヨーグルトであり、乳酸菌、牛乳のみで作られている。乳酸菌が生きた状態で含まれる。

試料は市販のものを使用した。

(5) 抗菌性の検討

味噌は、重量の2倍の蒸留水を加え溶解させ3倍に希釈し、ヨーグルトは、そのまま、10000rpm×20minの遠心分離により上澄みを取り、ガンマ線滅菌済みの5 ml テルモシリンジと ADVANTEC 社製 DISMIC-25CS PORESIZ0.45 μm で除菌を行い抗菌性測定試料とした。

上記の滅菌寒天培地をシャーレに分注硬化後、分離した *Streptococcus mutans* の前培養液を生理食塩水で10倍希釈し、1.0mlを寒天培地表面にコンラージ棒で均等に伸ばし、クリーンベンチ内で放置した。滅菌したペーパーディスクにそれぞれの試料を加え、寒天培地上に置き、37℃で48時間培養後、ペーパーディスクの周りに *Streptococcus mutans* の生育していない阻止円の形成の有無により、抗菌性を判定した。

3. 結果と考察

(1) 口腔内の *Streptococcus mutans* の検出と分離

10代の男子大学生、50代の男性からデントカルトSMキットを用いて、*Streptococcus mutans* 分離した。抗菌性の検討には、この分離した *Streptococcus mutans* を使用した。2株の *Streptococcus mutans* を用いて、味噌、ヨーグルトによる抗菌性の検討を行ったが、10代の男子大学生の株はいずれの試料に対しても、感受性が認められなかった。

(2) 抗菌性の検討

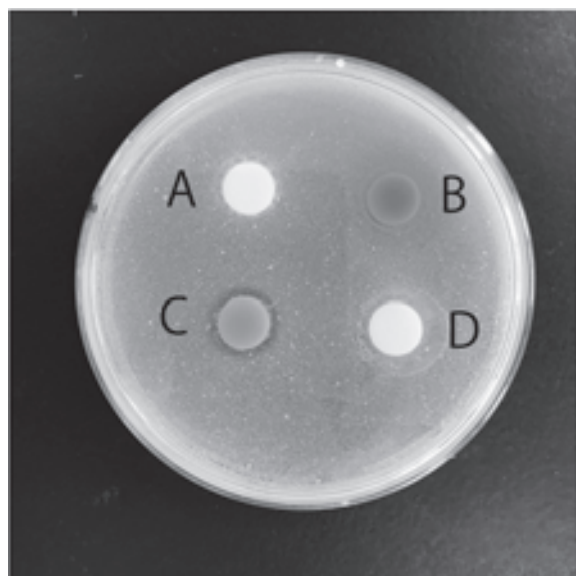


図1 豆味噌とヨーグルトの *Streptococcus mutans* の増殖に対する影響

A:明治ブルガリアヨーグルト

B:八丁味噌

C:榭塚味噌

D:森永ビフィダスヨーグルト

抗生物質の力価測定に用いられる方法を応用した。その結果、榭塚味噌のペーパーディスクの周りに明らかに *Streptococcus mutans* の増殖が見られず、阻止円が認められた。著者らは、以前、市販のヨーグルトに *Streptococcus mutans* の増殖を抑える可能性のある製品を報告した¹⁶⁾。

味噌には、多くの乳酸菌が含まれ、麴が増殖しやすい酸性状態を作り上げるのに貢献している^{7,8,9)}。また、バクテリオシンが味噌製造中に増殖出来る乳酸菌の種類を限定することで、それぞれの味噌の特徴が生まれている可能性が考えられる。八丁味噌は2夏2冬の熟成期間、今回使用した豆味噌は18ヶ月の熟成期間を経て出荷される。豆味噌は他の味噌に比べて熟成期間が長く、乳酸菌の製造過程における役割は大きいといえる。

日本では、各種の漬け物で代表される乳酸菌を利用した発酵食品が古くから摂取されてきている^{7,8,9)}。多くの漬け物は、乳酸発酵により美味しく、保存性が向上する。他には、寿司の原型の一つと言われる数年御飯につけ込まれるなれ寿司がある。なれ寿司は、アジアの国々でも作られている。御飯でつけ込んだ物が多く、特に食中毒の危険性の高い高温多湿のモンスーン地域で利用されてきたのは、バクテリオシンをはじめとする抗菌性物質の存在が貢献している事が推察される。

今回、使用した *Streptococcus mutans* は人の口腔より分離した株を使用したため、抗菌性の感受性は、株により異なり、より抗菌スペクトルの広いバクテリオシンをスクリーニングする必要がある。

バクテリオシンを利用した口腔ケア目的の薬剤が細菌多く市販されてきている。これらの商品は、主に、高齢者、歯磨きなどのケアの難しい障がい者人が使用することを前提としている。一般的に幼児期から、甘い物を間食に多く食べない、口腔内に糖分を残さない、酸性に保たないという齲蝕(虫歯)の原因を取り除く消極的な方法が取られてきた。その方法に加え、原因菌である *Streptococcus mutans* の増殖を直接押さえる積極的な方法をとることで更に、齲蝕防止が可能になると考えられる。そのために伝統的に食べられてきた多くの乳酸菌を利用した発酵食品の *Streptococcus mutans* に対する増殖抑制効果を出来るだけ、摂取する条件に近い形で検討する。

食品は、単独で摂取されることは無く、普通の、一度の食事で複数同時に摂取されている。1日の摂取品目に関しては更に多くなる。厚生労働省が1985年に一日

30品目の食品摂取を推奨したことは、栄養面についてではなく、食品相互作用による危険性を低下させる為であった。このように単独に摂取されることを前提とした条件で無く、複数の食品を組み合わせた実際の食生活に沿って、今後、検討を加える。効果の増大する組み合わせ、効果が減少する組み合わせなど、多くの可能性が考えられる。今後、積極的に齲蝕を防ぐ食生活を検討する。まずそのために、多くの伝統的な発酵食品、及び、最近注目されている機能性を謳う発酵乳の *Streptococcus mutans* に対する増殖抑制効果を検討する。また、食生活と齲蝕菌 *Streptococcus mutans* の口腔内の菌数に関しても検討し、食生活と齲蝕菌の関係について検討し、*Streptococcus mutans* の増殖を抑える可能性のある食品（バクテリオシンを含む可能性）を見だし、更に組み合わせによる抗菌作用の効果の変化を検討する。

引用文献

- 1) Hamada, S. and Slade, H. D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, Microbiol. Rev., 44, 331-384, (1980).
- 2) 鴨井 久一(ほか): 『歯科医師・歯科衛生士のための唾液検査ハンドブック』, 高津征男, 118-119 (2008)
- 3) 厚生労働省 : http://www1.mhlw.go.jp/topics/kenko21_11/b6.html
- 4) オーラルピース : <http://oralpeace.com/oralpeace>
- 5) 益田時光 (ほか) : ナイシン-類希な抗菌物質-ミルクサイエンス, 59, 59-65, (2010)
- 6) 厚生労働省 : <http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/0/8aa11687a2aaf0c4492570650018d5ba?OpenDocument>
- 7) 恩田匠 : 味噌醸造に存在するバクテリオシン産生乳酸球菌, 日本醸造協会誌, 96, 174-181, (2001)
- 8) 加藤 丈雄 : 抗菌性乳酸菌スターターカルチャーを利用した味噌醸造
日本食品科学工学会誌, 47, 752-759, (2000)
- 9) 森地敏樹 : 食品保蔵における乳酸菌の利用, 日本食品科学工学会誌, 49, 207-219, (2002)
- 10) 堀越昌子 : 近江のなれずし, 日本食品微生物学会雑誌, 28, 9-15, (2011)
- 11) 安福美昭 : 齲蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* の産生するバクテリオシン(ミュウシン)の齲蝕抑制作用に関する研究 2 ミュータシンの抗菌作用を妨げる因子について, 小児歯科学雑誌, 25, 395-403, (1987)
- 12) 井上和春 (ほか) : 微生物利用技術に関する研究 (1) -パン種の乳酸菌と酵母の利用-, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 4,
- 13) 進賀知加子 (ほか) : 妊婦における齲蝕原性細菌数と喫煙および食事に関する実態調査, 小児歯科学雑誌, 45, 584-592, (2007)
- 14) 細野明義編 : 『発酵乳の科学-乳酸菌の機能と保健効果-』 森田富子, 58, (2002)
- 15) Shah, Nagendra, Ly Linh: *Streptococcus thermophilus* によって産生される *Bifidobacterium spp.* に対するバクテリオシン Bioscience and Microflora, 1342-1441 Vol. 18, 1999
- 16) 相原 英孝 : 発酵食品による齲蝕予防の可能性-発酵乳 (ヨーグルト) -愛知学泉大学・短期大学紀要, (50), 1-4 (2015)
- 17) 富山 潔 : ポリマイクロバイアルバイオフィルムの退社活性に対する新規抗菌剤の抗菌効果, 神奈川歯科, 51(1), 56-60 (2016)
- 18) 大原 紫 (ほか) : *Streptococcus mutans* に対するブドウ酒搾り粕抽出成分の抑制効果, 小児歯科学雑誌, 49(3), 251-258 (2011)
- 19) 鈴木 秀明 (ほか) : ナスニンの齲蝕原因菌に対する抗菌効果, 日本歯科保存学雑誌, 53(3), 296-303 (2010)
- 20) 小西 美徳 : 齲蝕原因菌に対する柿蒂抽出成分の抗菌効果 日本歯科保存学雑誌, 51(3), 299-307 (2008)
- 21) 斉藤 威史 (ほか) : 乳酸菌バクテリオシンの探索と利用 Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 25(1), 1-10 (2014)
- 22) Hohashi, N and Nakagami, G : Result of oral bacteria among infants brushing their own teeth : using the α -hemolytic *Streptococcus* count on the tooth surface as the indicator, Japan Journal Health & Human Ecology, 73(5), 183-192 (2007)
- 23) 株式会社M&P : お口ケア乳酸菌バクテリオシン、<http://www.mandp.tokyo/wp-content/uploads/2015/02/PDF-4.pdf>
- 24) 岡部 重人 (ほか) : 食肉より分離した乳酸球菌が産生するバクテリオシンの抗菌特性, 岡山大学農学部学術報告, 89, 39-44 (2000)