

# タンニン酸の抗う蝕作用に関する基礎的研究

齋 藤 さ つ き

## Basic Studies on Anti-Caries Activity of Tannic Acid

Satsuki Saito

(平成5年1月20日受付)

### 緒 言

近年、歯科修復材料は、理工学的諸性質が改良されるとともに、抗菌性、歯質強化作用など生物学的機能の付与を目的とした材料の開発もなされている<sup>1)</sup>。なかでもタンニン・フッ化物合剤を配合した歯科用セメントは、基礎的研究とともに<sup>2-7)</sup> 幅広く臨床応用されている抗う蝕作用を有する修復材料である。この合剤の主成分の一つであるタンニン酸は、古くはお歯黒の成分として含まれ、生体為害性が少なく、歯面に塗布することによって抗う蝕作用を示すことが知られている<sup>8)</sup>。

植物界に広く分布するタンニン酸は、多数のフェノール性水酸基を持つ芳香族化合物であり、その特徴としてタンパク凝固作用に基づく収斂・防腐作用を有し<sup>9-13)</sup>、口腔内に応用した場合、歯質有機質の強化<sup>2,14,15)</sup>、細菌増殖の抑制<sup>16,17)</sup>、グルコシルトランスフェラーゼなど酵素の阻害<sup>17-21)</sup>によって、抗う蝕作用を示すと考えられている。高齢化社会を迎え、露出根面に対する修復処置の頻度が増加している現在の状況を考慮すれば、抗菌性とともに象牙質有機質強化作用を示すタンニン酸は、効果的で応用範囲の広い抗う蝕剤と考えられる。

しかしながら、抗う蝕剤としてのタンニン酸についての研究<sup>2-7,22-24)</sup>は、臨床応用への目的が先行し、作用時間や濃度といった基本的条件の設定が不明であったり、フッ化物など、他の薬剤との併用やセメント、レジンなどの基材と複合された状態でその効果を

評価したものがほとんどで、タンニン酸単独での抗う蝕作用について詳細に論じたものは少ない。そこで、タンニン酸を抗う蝕剤としてより有効に使用するため、タンニン酸が細菌および歯質に及ぼす影響について、基礎的研究を行った。すなわち、細菌に関しては、タンニン酸の抗菌性を作用時間と濃度との関係について調べるとともに、細菌の付着にタンニン酸が及ぼす影響を検討し、歯質に関しては、主に象牙質コラーゲンを対象として、タンニン酸がコラーゲンの溶解性に及ぼす影響を生化学的および形態学的に検討した。

### 材料および方法

#### I. タンニン酸の口腔レンサ球菌に対する作用

##### 1. 抗菌性の検索

###### (1) 使用薬剤

使用薬剤として市販のタンニン酸 (和光純薬 (株), 大阪) を用いた。

###### (2) 使用菌株および培養条件

広島大学歯学部口腔細菌学教室より供与された *Streptococcus mutans* OMZ 175 株, *S. sobrinus* OMZ 176 株, *S. sanguis* ATCC 10556 株, *S. sanguis* ATCC 10557 株, *S. salivarius* ATCC 9222 株および Eastman Dental Center (Rochester, NY) より供与された *S. mutans* Ingbritt 1600 株, *S. sobrinus* 6715-13 株の 7 菌株を用いた。

各菌株は、Trypticase Soy Broth (Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD, 以下 TSB と略す) を用い、37°C にて培養を行った。

###### (3) 最小発育阻止濃度の測定

最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration, 以下 MIC と略す) は寒天平板希釈法<sup>25)</sup>により求めた。すなわち、300, 400 および 500  $\mu\text{g/ml}$  のタンニ

広島大学歯学部歯科保存学第一講座 (主任: 新谷英章教授) 本論文の要旨は、平成3年12月の39回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会、および平成4年6月の第25回広島大学歯学会総会において発表した。

ン酸を含む Brain Heart Infusion (Difco laboratories, Detroit, MI) 寒天平板培地に、対数増殖期 ( $O.D._{600}=0.7$ ) の培養液を白金耳にて画線塗抹し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、24時間嫌気培養した後、タンニン酸を含まない対照の寒天培地と比較して増殖が完全に阻止された最小濃度を MIC とした。

#### (4) 殺菌力の検索

##### 1) 石炭酸係数の測定

石炭酸およびタンニン酸の5%溶液を滅菌蒸留水で希釈し、それぞれ1, 5, 10および15倍水溶液を調整した。これに菌液を最終菌数が約  $10^8$  cells/ml になるように接種し、2.5, 5, 10および15分後に各試験管より1白金耳の菌液を後培養用の TSB に接種した。18時間培養後、菌の発育の有無を肉眼的に判定し、接触時間5分で死滅せず、10分では死滅するタンニン酸の最大希釈倍数と同じ結果を得る石炭酸の最大希釈倍数との比を石炭酸係数とした<sup>26)</sup>。なお、使用菌株として、*S. mutans* OMZ 175 株と *S. sobrinus* 6715-13 株を用いた。

##### 2) 静止期にある細菌に対する短時間での殺菌力の測定

対数増殖期 ( $O.D._{600}=0.7$ ) の培養液を遠心分離 ( $10,000\times\text{g}$ , 15分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) により集菌後、0.01 M phosphate buffered saline (pH 7.2, 以下 PBS と略す) に懸濁した。これを冷却下で超音波発生装置 (Ultrasonic Disruptor UR-200P, Tomy Seiko Co., 東京) を用いて40秒間、20 kHz で超音波処理を行った<sup>27)</sup>。菌体はグラム染色を施し、光学顕微鏡で菌体の連鎖がほぐれていることと菌体の破壊やグラム陰性化が起っていないことを確認した。

菌液をタンニン酸を含む PBS に接種し、菌濃度  $7\times 10^8$  colony forming unit/ml (以下 CFU と略す)、タンニン酸濃度 100, 300 および  $500\ \mu\text{g/ml}$  になるように調製した。接種後10秒, 3, 6, 15および30分に各液を  $10^{-7}$  まで希釈し、TSB 寒天培地を用いて平板培養法<sup>25)</sup>により CFU を測定した。対照としてタンニン酸を含まない PBS を用い、各濃度および各時間タンニン酸作用後における生菌数を対照と比較することにより、生存率(%)を算出した。*S. mutans* Ingbritt 1600 株については、タンニン酸 10, 100, 200 および  $1000\ \mu\text{g/ml}$  について検討を加えた。

##### (5) 菌体へのタンニン酸吸着量の測定

タンニン酸の抗菌作用の機序の一端を明らかにするために、菌体へのタンニン酸吸着量について検討した。使用菌株には、*S. mutans* Ingbritt 1600 株、*S. sobrinus* 6715-13 株、*S. sanguis* ATCC 10557 株および *S. salivarius* ATCC 9222 株を用いた。

対数増殖期 ( $O.D._{600}=0.7$ ) の培養液を遠心分離 ( $10,000\times\text{g}$ , 15分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) により集菌後、0.05 M Tris-HCl buffered saline (pH 7.2) にて2回洗浄した。これを、0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) に懸濁し、超音波処理 (40秒間, 20 kHz, 冷却下) を行い菌体を拡散した後、同緩衝液で  $3.13\times 10^{12}$  cells/ml に調製した。これに、 $40\ \mu\text{g/ml}$  になるようにタンニン酸を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で15秒, 30, 60および120分間処理後遠心分離 ( $10,000\times\text{g}$ , 10分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) した。上清に含まれているタンニン酸量を測定し、加えたタンニン酸量との差を算出し、これを菌体吸着タンニン酸量とした。次に、処理時間を30分とし、タンニン酸濃度を 40, 100, 200 および  $300\ \mu\text{g/ml}$  と変化させた場合についても同様に実験を行った。なお、タンニン酸量は、0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) に溶解させたタンニン酸の最大吸収を示す 277 nm の波長での検量線から求めた<sup>22)</sup>。

## 2. 菌付着に及ぼす影響

### (1) 使用菌株および菌液の調製

使用菌株は *S. mutans* Ingbritt 1600 株、*S. mutans* OMZ 175 株、*S. sanguis* ATCC 10556 株、*S. sanguis* ATCC 10557 株および *S. salivarius* ATCC 9222 株とした。

菌液は、菌体へのタンニン酸吸着量の測定実験 (1. (5)) と同様の方法で  $3.65\times 10^8$  cells/ml に調整した。

### (2) 被着材料

実験に使用した被着材料を表1に示す。修復材料としては、 $10\times 20\times 1\ \text{mm}$  の形状のモールドに充填し、スライドガラスにて圧接後硬化させ作製した4種の光重合型コンポジットレジンと  $10\times 20\times 1\ \text{mm}$  の形状に鑄造後研磨した歯科用金銀パラジウム合金 Castwell-MC の計5種を用いた。歯質としては、エメリー紙で #2000 まで研磨したヒト抜去歯牙のエナメル質面および象牙質面 (約  $7\times 10\ \text{mm}$ ) を用いた。なお、いずれの被着材料の表面あらさも細菌の付着に影響を与えないとされる  $1.0\ \mu\text{m}$  以下<sup>28)</sup>であることを確認した。

### (3) 被着材料の処理

健康成人の無刺激全唾液を氷冷下にて採取し、駒込ピペットを用いて吸引排出を繰り返して、粘性を低下させた。これを遠沈 ( $10,000\times\text{g}$ , 20分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) 後、上清を採取し、唾液として実験に用いた。タンニン酸溶液としては、*S. mutans* の MIC である  $300\ \mu\text{g/ml}$  水溶液を使用した。

被着材料を室温で1時間唾液またはタンニン酸に浸漬した後、蒸留水で洗浄し、唾液処理またはタンニン酸処理試料とした。唾液およびタンニン酸処理試料は、同様の方法で唾液処理試料をさらにタンニン酸処

表1 被着材料

| 材 料              | 略号 | 製 造 社                   | Batch No. |
|------------------|----|-------------------------|-----------|
| <u>コンポジットレジン</u> |    |                         |           |
| Graft LC         | GR | GC, Japan               | 910913    |
| Silux            | SI | 3M, USA                 | 1EB2      |
| Heliomolar       | HE | Vivadent, Liechtenstein | 11004     |
| Clearfil Bright  | CB | Kuraray, Japan          | 11139     |
| <u>金銀パラジウム合金</u> |    |                         |           |
| Castwell MC      | CW | GC, Japan               | —         |
| <u>ヒト抜去歯牙</u>    |    |                         |           |
| エナメル質            | E  | —                       | —         |
| 象牙質              | D  | —                       | —         |

理することにより作製した。また、蒸留水に浸漬したものを未処理試料とした。

#### (4) 菌付着実験

各試料片をビーカーの円周に添って被着面を中心にに向けて固定し、菌液を注ぎ、スターラーでゆるやかに攪拌した。37°Cで2時間処理後、試料片を取り出し、十分量の蒸留水で洗浄した。続いて2.5%グルタルアルデヒドで30分間4°Cで固定を行い、1%アクリジンオレンジで染色した<sup>29)</sup>。付着菌数は各試料について任意の20視野中に付着している菌数を、蛍光顕微鏡 (BHF, オリンパス(株), 東京) を用いて計測し、修復材料は6枚、歯質は3枚の試料片についての1mm<sup>2</sup>あたりの平均付着菌数と標準偏差を求めた。

#### (5) 接触角の測定

被験菌体および各処理被着材料の表面の物理化学的性質を調べるために、これらの表面の蒸留水に対するヤングの接触角を測定した<sup>30)</sup>。被験菌の接触角は菌懸濁液 10 ml (O.D.<sub>600</sub>=1.0, 約 10<sup>10</sup> cells) を直径 35 mm のメンブランフィルター (pore size: 0.45 μm, Tokyo Membrane Filters TM-2, Tokyo Roshi Co., 東京) 上に集菌した菌層上で乾燥状態下にて Contact angle meter (協和科学(株), 東京) を用い、10点液滴法により測定した<sup>30,31)</sup>。唾液およびタンニン酸処理試料は、変性を防ぐため<sup>32)</sup>、湿润状態下で垂直板法<sup>30)</sup>により、各処理試料につき各々5個の試料の接触角を測定した。

なお、接触角の測定は、温度 18°C 湿度55%の恒温恒湿室中で行った。

#### (6) ζ-電位の測定

各処理被着材料と被験菌体の ζ-電位は、顕微鏡電気泳動法により求めた<sup>33)</sup>。Face Zeta Potential Meter (ZP-OM 型, 協和界面化学(株), 東京) を用い、0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) 中における泳動度を10回ずつ測定し、Helmholtz-Smoluchowski の式から、ζ-電

位を算出した<sup>35)</sup>。なお、被着材料は微細に粉碎<sup>34)</sup>した後各処理を施し、実験に供した。

#### (7) 検定

統計学的有意差の有無は、Student-t test により求め、Peasonの相関係数についても有意性を検討した。

## II. タンニン酸のコラーゲンに対する作用

### 1. ハイドロキシプロリン溶出量の測定

#### (1) 象牙質粉末の調製

冷凍保存された成牛下顎骨より抜去した前歯根部の歯髓、軟組織およびセメント質を除去し、十分冷却水で洗浄した後、液体窒素中で粉碎し、20-40 mesh の篩にかけて粒径 0.42-0.84 mm の粉末とした。これを冷生理食塩水および冷蒸留水で十分洗浄後凍結乾燥し、象牙質粉末 (dentin powder, 以下 DP と略す) とした。

#### (2) タンニン酸処理

20°C の10%タンニン酸溶液に DP を 50 mg/ml になるように浸漬し、1, 3, 6, 12および24時間後、タンニン酸溶液の40倍量の蒸留水で洗浄し、凍結乾燥を行い、タンニン酸処理 DP とした。次に、作用時間を6時間とし、1, 3, 5および10%タンニン酸にて同様に処理を行った。なお、水洗、凍結乾燥した DP を対照として用いた。

#### (3) リン酸およびトリブシン処理

20°C の40%リン酸 (片山化学工業(株), 大阪) にタンニン酸処理 DP を 50 mg/ml になるように浸漬し、30秒後、リン酸溶液の40倍量の蒸留水で洗浄し、凍結乾燥した。これを、トリブシン (Sigma chemical, St. Louis, MO) を 0.1 mg/ml 含有する 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) に 20 mg/ml になるように加え、37°C で16時間処理後、反応液を 60°C で30分間保留した。次いで、12,000×g で15分間遠心し上清を分離した。

## (4) 可溶性コラーゲンの定量

リン酸およびトリプシン処理により可溶化されたコラーゲンを含む試料を乾燥後、6N 塩酸 (片山化学工業(株), 大阪) を加え、110°C で20時間加水分解した。塩酸を除去した後、水解物を十分洗浄した。Woessnerの方法<sup>36)</sup>により含有されるヒドロキシプロリン (hydroxyproline, 以下 Hyp と略す) を定量し、可溶化されたコラーゲン量の指標とした。

## 2. 走査型電子顕微鏡による観察

コラーゲンの溶解性に及ぼすタンニン酸の影響を形態学的に観察するため、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope, 以下 SEM と略す) を観察を行なった。象牙質コラーゲンの主体を占めるのはI型コラーゲンであるため同じI型の牛アキレス腱コラーゲン (Collagen Insoluble Type I, Sigma Chemical, St. Louis, MO) を用いた。40%リン酸にて30秒間処理したものと、5%タンニン酸にて6時間処理した後40%リン酸にて30秒間処理したものを試料とし、未処理のものを対照とした。試料は各処理を施した後、凍結乾燥し、通法に従い金蒸着を行い SEM 観察 (JSM 6300-F, 日本電子(株), 東京) に供した。

## 結 果

## I. タンニン酸の口腔レンサ球菌に対する作用

## 1. 抗菌性

## (1) 最小発育阻止濃度

各菌株の MIC を表2に示す。*S. mutans* 2菌株では300 µg/ml, その他の被験菌株では400 µg/ml となり、*S. mutans* に対するタンニン酸の抗菌性が他の被験菌株に比較して高いことが示された。

表2 口腔レンサ球菌に対するタンニン酸の最小発育阻止濃度 (MIC)

|                                | MIC (µg/ml) |
|--------------------------------|-------------|
| <i>S. mutans</i> Ingbritt 1600 | 300         |
| <i>S. mutans</i> OMZ 175       | 300         |
| <i>S. sobrinus</i> 6715-13     | 400         |
| <i>S. sobrinus</i> OMZ 176     | 400         |
| <i>S. sanguis</i> ATCC 10556   | 400         |
| <i>S. sanguis</i> ATCC 10557   | 400         |
| <i>S. salivarius</i> ATCC 9222 | 400         |

## (2) 石炭酸係数

石炭酸係数測定の結果を表3に示す。タンニン酸の石炭酸係数は *S. mutans* OMZ 175 株では0.6であ

表3 口腔レンサ球菌に対するタンニン酸の石炭酸係数

*S. mutans* OMZ 175

| 薬 剤   | 希 釈    | 作用時間 (分) |   |    |    |
|-------|--------|----------|---|----|----|
|       |        | 2.5      | 5 | 10 | 15 |
| タンニン酸 | 1 : 1  | -        | - | -  | -  |
|       | 1 : 5  | +        | + | -  | -  |
|       | 1 : 10 | +        | + | +  | +  |
|       | 1 : 15 | +        | + | +  | +  |
| 石 炭 酸 | 1 : 1  | -        | - | -  | -  |
|       | 1 : 5  | +        | - | -  | -  |
|       | 1 : 10 | +        | + | +  | -  |
|       | 1 : 15 | +        | + | +  | +  |

石炭酸係数: 0.6

*S. sobrinus* 6715-13

| 薬 剤   | 希 釈    | 作用時間 (分) |   |    |    |
|-------|--------|----------|---|----|----|
|       |        | 2.5      | 5 | 10 | 15 |
| タンニン酸 | 1 : 1  | +        | + | +  | +  |
|       | 1 : 5  | +        | + | +  | +  |
|       | 1 : 10 | +        | + | +  | +  |
|       | 1 : 15 | +        | + | +  | +  |
| 石 炭 酸 | 1 : 1  | -        | - | -  | -  |
|       | 1 : 5  | +        | + | +  | +  |
|       | 1 : 10 | +        | + | +  | +  |
|       | 1 : 15 | +        | + | +  | +  |

石炭酸係数: 測定不可

+: 死滅しなかったもの

-: 死滅したもの

作用時間5分で死滅せず10分で死滅する消毒薬の最大希釈倍数と、同じ結果を得る石炭酸の最大希釈倍数との比を石炭酸係数とする。

り、殺菌力は石炭酸の6割程度であった。*S. sobrinus* 6715-13 株では5%の原液でも菌は死滅しなかったため、石炭酸係数は求めることができなかったが、10%タンニン酸を用いた場合には、15分間の作用で菌は死滅した。従って、*S. sobrinus* 6715-13 株よりも *S. mutans* OMZ 175 株に対するタンニン酸の殺菌力が強いことが示された。

## (3) 静止期にある細菌に対する短時間での殺菌力

各菌株の生存率の変化を図1に示す。タンニン酸の殺菌作用は、ほぼその濃度と作用時間に依存し、約15分でその効果はプラトーに達した。*S. mutans* Ingbritt

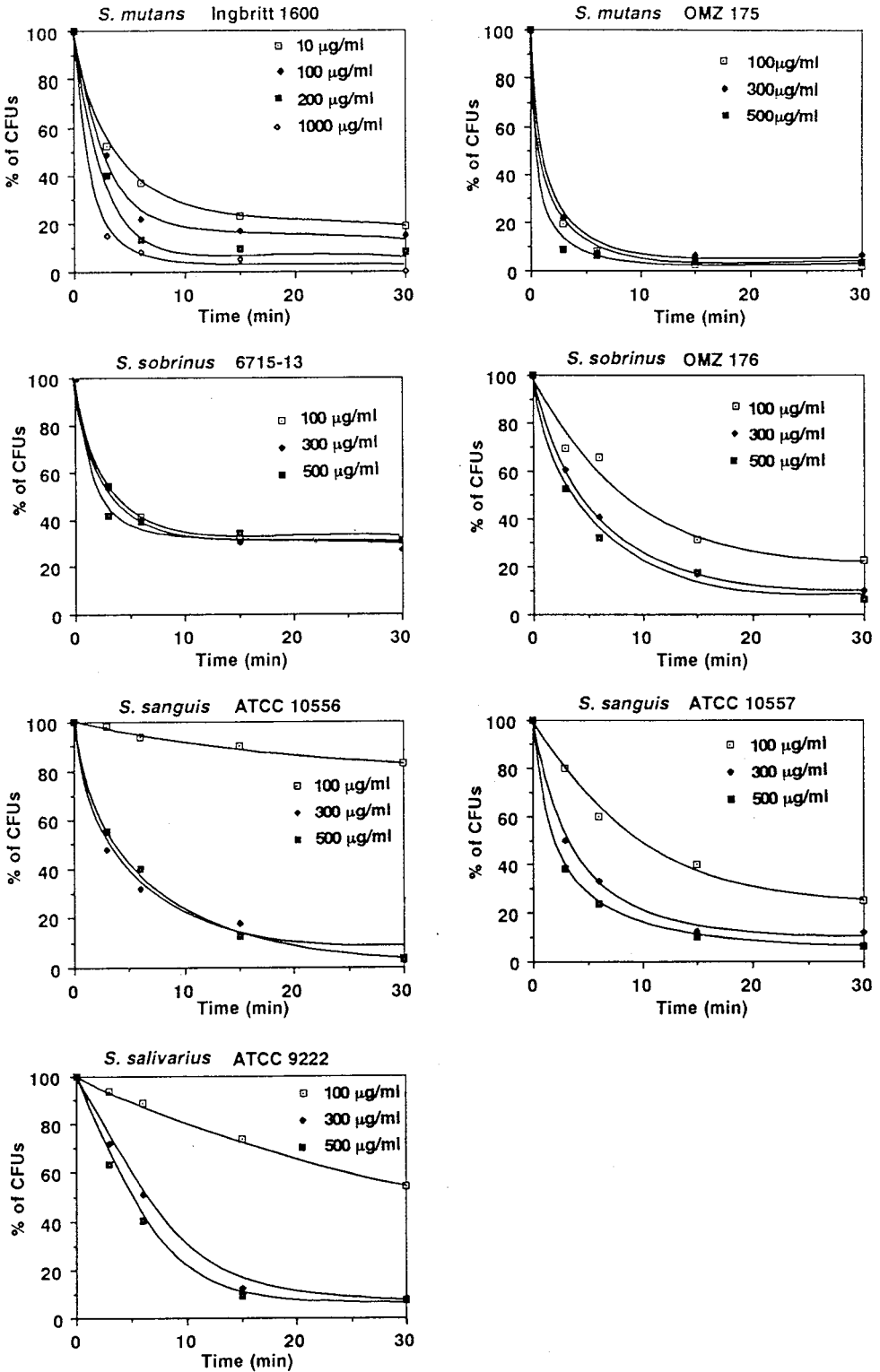


図1 各菌株のタンニン酸処理後の生存率の変化。  
対照を100%とした場合の百分率で示す。

1600 株では、200  $\mu\text{g/ml}$  タンニン酸による約15分間の作用により生存率は9%に減少した。*S. mutans* OMZ 175 株では、各濃度でほぼ同程度に生存率は約2%に減少し、実験に使用した濃度では、作用時間依存性に殺菌力を示した。*S. sobrinus* 6715-13 株は、7 菌株のうち最も抵抗性が高く、作用時間15分で、どの濃度においても生存率30%を示した。*S. sanguis* と *S. salivarius* に対しては 300  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度では殺菌力に差が少ないことが示された。

各濃度タンニン酸処理15分後の被験菌株の生存率の比較を図2に示す。どの濃度においても、*S. mutans*, 特に OMZ 175 株に対し、タンニン酸は高い殺菌力を示した。

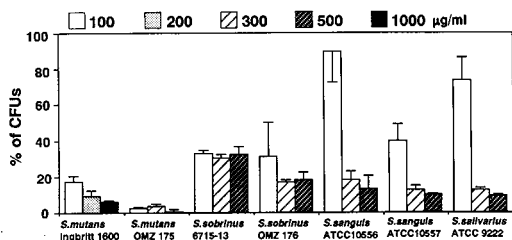


図2 各濃度タンニン酸処理15分後の被験菌株の生存率の比較。

#### (4) 菌体へのタンニン酸吸着量

タンニン酸処理時間による菌体吸着タンニン酸量の変化を図3aに示す。 $10^{12}$  cell 当たりの菌体吸着タンニン酸量は、その増加率が小さいものの経時的に増加した。図3bはタンニン酸濃度による菌体吸着タンニン酸量の変化を示す。濃度の増加と共に菌体吸着タンニン酸量も増加し、タンニン酸濃度 200  $\mu\text{g/ml}$  で最大値を示した。4 菌株間では、タンニン酸吸着量は *S. mutans* について最も高い値を示した。

## 2. 菌付着に及ぼす影響

### (1) 付着菌数

各処理試料への各菌株の付着菌数を図4に示す。*S. mutans* では、修復材料より歯質への付着が多く認められた。未処理に比較してタンニン酸処理では50~60%の、また唾液処理に対しては唾液およびタンニン酸処理で20~50%の付着菌数が減少した。*S. sanguis* では、歯質より修復材料に対する付着が多く、*S. mutans* とは異なった付着傾向が見られたが、*S. mutans* と同様にタンニン酸による付着抑制効果が認められた。*S. salivarius* でも同様の付着抑制効果が認められたが、他の菌株に比べ、付着減少率が未処理に対し唾液処理で5~40%と低く、唾液処理に対し唾液

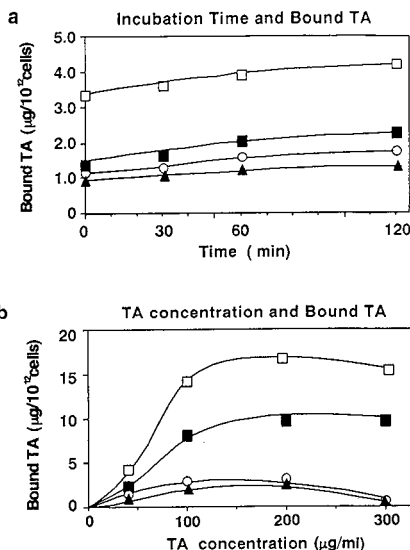


図3 菌体吸着タンニン酸量の変化。  
a: タンニン酸処理時間の影響、タンニン酸濃度: 40  $\mu\text{g/ml}$ , 温度: 37°C  
b: タンニン酸処理濃度の影響、タンニン酸処理時間: 30分, 温度: 37°C  
□: *S. mutans* Ingbritt 1600 株  
■: *S. sobrinus* 6715-13 株  
▲: *S. sanguis* ATCC 10557 株  
○: *S. salivarius* ATCC 9222 株

およびタンニン酸処理で40~60%と高い値を示した。

### (2) 接触角および $\zeta$ -電位

各処理試料の接触角および $\zeta$ -電位を図5に示す。すべての試料において、 $\zeta$ -電位は負の値を示した。未処理に対しタンニン酸処理で、また、唾液処理に対し唾液およびタンニン酸処理試料で、接触角は減少し、 $\zeta$ -電位は負に増加した。従って、唾液の有無にかかわらず、タンニン酸は修復材料および歯質表面を親水性にし、負の荷電を増加させることが明らかとなった。

各菌株の接触角および $\zeta$ -電位を表4に示す。接触角については、*S. sanguis* が *S. mutans*, *S. salivarius* より高い値を示し、より疎水性であった。 $\zeta$ -電位はすべての菌株で負の値を示し、*S. sanguis* に比較して *S. mutans*, *S. salivarius* が高い負の荷電を有していた。

### (3) 付着菌数と被着体表面の接触角および $\zeta$ -電位との関係

各菌株の各処理試料への付着菌数と被着体表面の接触角および $\zeta$ -電位との相関関係を表5と図6~図8に示す。*S. mutans* では、未処理、唾液処理、唾液およびタンニン酸処理試料への付着菌数と被着体表面の $\zeta$ -電位との間に相関が認められたが(未処理: Ing-

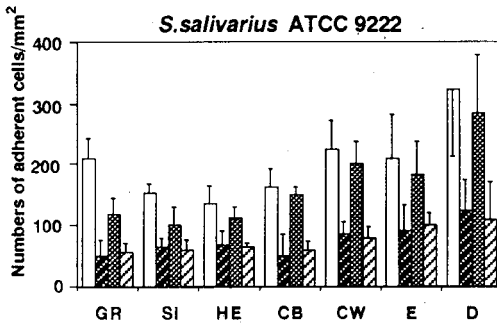
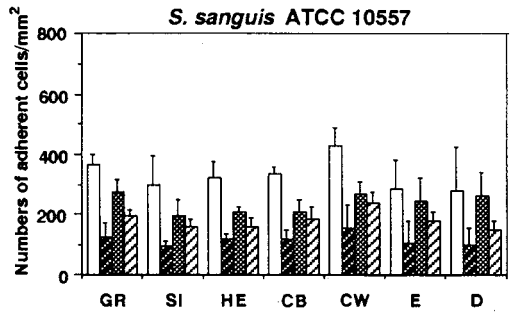
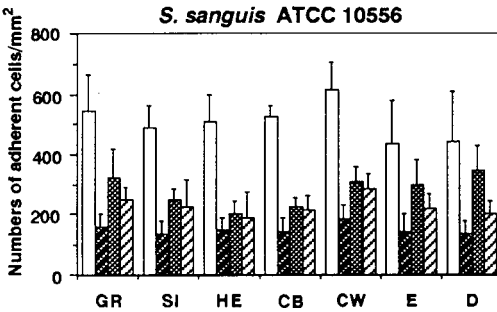
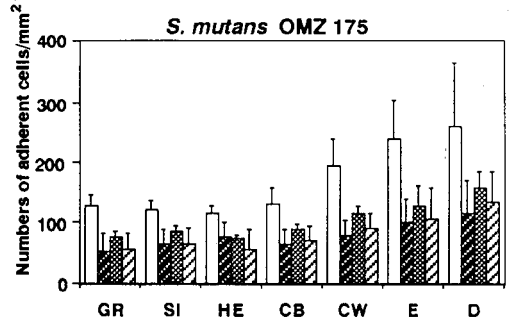
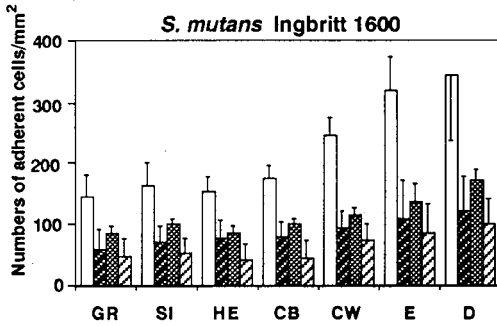


図4 各処理試料への口腔レンサ球菌の付着菌数。  
菌懸濁液濃度： $3.65 \times 10^8$  cells/ml,  
付着温度： $37^\circ\text{C}$ ，付着時間：2時間  
□：未処理，  
■：タンニン酸処理，  
▨：唾液処理，  
▧：唾液およびタンニン酸処理

britt 1600 株，OMZ 175 株； $p < 0.01$ ）（唾液処理：  
Ingbritt 1600 株； $p < 0.01$ ，OMZ 175 株； $p < 0.02$ ）  
（唾液およびタンニン酸処理：Ingbritt 1600 株； $p < 0.02$ ，OMZ 175 株； $p < 0.05$ ），タンニン酸処理では認められなかった。また，いずれの処理でも，付着菌数と被着体表面の接触角との相関は認められなかった（表5，図6）。

*S. sanguis* では，未処理およびタンニン酸処理試料への付着菌数と被着体表面の接触角との相関が認められたが（未処理：10556 株； $p < 0.01$ ，10557 株； $p < 0.05$ ）（タンニン酸処理：10556 株，10557 株； $p < 0.02$ ），唾液処理と唾液およびタンニン酸処理では認められなかった。また，いずれの処理でも，付着菌数

と被着体表面の  $\zeta$ -電位との相関は認められなかった（表5，図7）。

*S. salivarius* では，すべての処理試料への付着菌数と被着体表面の  $\zeta$ -電位との相関が認められたが（未処理； $p < 0.05$ ，タンニン酸処理； $p < 0.01$ ，唾液処理； $p < 0.05$ ，唾液およびタンニン酸処理； $p < 0.05$ ），接触角との相関は認められなかった（表5，図8）。

## II. タンニン酸のコラーゲンに対する作用

### 1. ハイドロキシプロリン溶出量

タンニン酸処理時間が Hyp 溶出量に及ぼす影響を図9aに示す。Hyp 溶出量は，処理時間が長くなるに従って減少しており，6時間処理で対照の約55%に抑

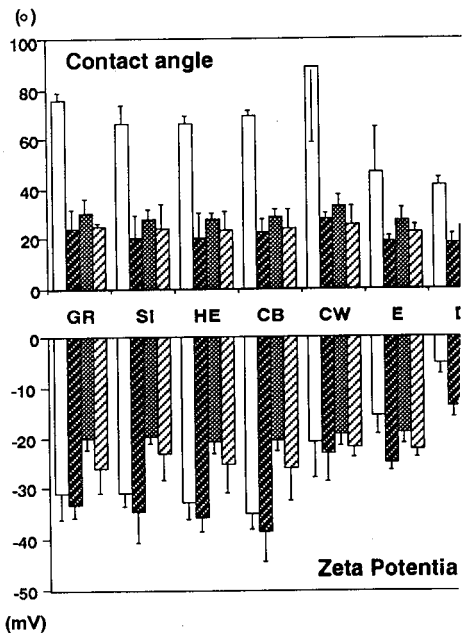


図5 各処理試料の接触角と ζ-電位.

- : 未処理
- : タンニン酸処理
- ▨ : 唾液処理
- ▩ : 唾液およびタンニン酸処理

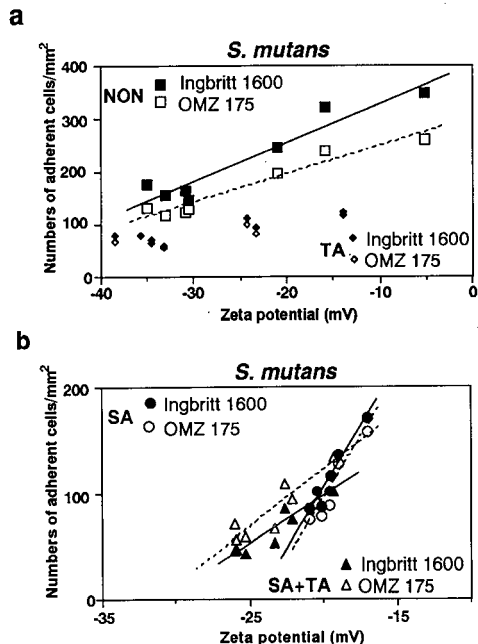


図6 *S. smutans* 2 菌株の付着菌数と試料表面の ζ-電位との相関関係.

- a : 未処理 (NON), タンニン酸処理 (TA)
- b : 唾液処理 (SA), 唾液およびタンニン酸処理 (SA+TA)

表4 口腔レンサ球菌の接触角と ζ-電位

|                                | 接触角 (度) <sup>1</sup> | ζ-電位 (mV) <sup>2</sup> |
|--------------------------------|----------------------|------------------------|
| <i>S. mutans</i> Ingbritt 1600 | 25.2±2.1             | -30.0±3.0              |
| <i>S. mutans</i> OMZ 175       | 25.0±1.4             | -34.2±2.1              |
| <i>S. sanguis</i> ATCC 10556   | 48.2±2.8             | -25.8±3.5              |
| <i>S. sanguis</i> ATCC 10557   | 44.5±2.8             | -24.3±1.7              |
| <i>S. salivarius</i> ATCC 9222 | 39.9±1.5             | -31.2±3.1              |

<sup>1</sup> : 平均値±標準偏差, 10点液滴法

<sup>2</sup> : 平均値±標準偏差, 顕微鏡電気泳動法, n=10

表5 各処理試料への付着菌数と被着体表面の接触角および ζ-電位との相関係数

|      |       | <i>S. mutans</i><br>Ingbritt 1600 | <i>S. mutans</i><br>OMZ 175 | <i>S. sanguis</i><br>ATCC 10556 | <i>S. sanguis</i><br>ATCC 10557 | <i>S. salivarius</i><br>ATCC 9222 |
|------|-------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| ζ-電位 | NON   | 0.917***                          | 0.936***                    | 0.185                           | 0.078                           | 0.819*                            |
|      | TA    | 0.741                             | 0.750                       | 0.009                           | 0.001                           | 0.894***                          |
|      | SA    | 0.902***                          | 0.867**                     | 0.577                           | 0.202                           | 0.764*                            |
|      | SA+TA | 0.882**                           | 0.824*                      | 0.001                           | 0.028                           | 0.763*                            |
| 接触角  | NON   | 0.422                             | 0.353                       | 0.935***                        | 0.839*                          | 0.184                             |
|      | TA    | 0.161                             | 0.265                       | 0.837**                         | 0.867**                         | 0.155                             |
|      | SA    | 0.284                             | 0.165                       | 0.001                           | 0.083                           | 0.084                             |
|      | SA+TA | 0.213                             | 0.286                       | 0.715                           | 0.726                           | 0.377                             |

NON : 未処理, TA : タンニン酸処理, SA : 唾液処理, SA+TA : 唾液およびタンニン酸処理

\* : p<0.05, \*\* : p<0.02, \*\*\* : p<0.01, n=7



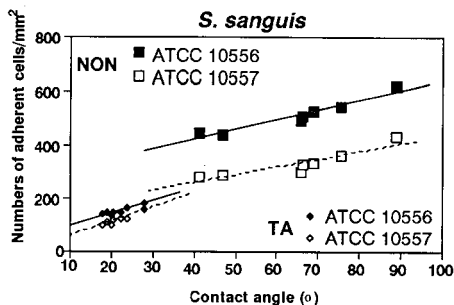


図7 *S. sanguis* 2菌株の付着菌数と試料表面の $\zeta$ -電位との相関関係。

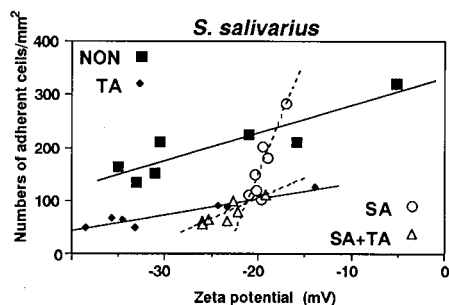


図8 *S. salivarius* ATCC 9222株の付着菌数と試料表面の $\zeta$ -電位との相関関係。

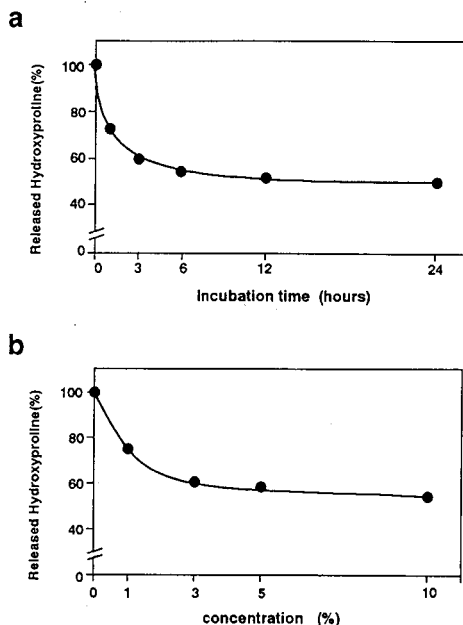


図9 タンニン酸処理時間および濃度が象牙質粉末からのヒドロキシプロリン溶出量に与える影響。  
a: タンニン酸処理時間の影響, タンニン酸濃度10%  
b: タンニン酸処理濃度の影響, 作用時間6時間

制されることが示された。

次に、タンニン酸濃度を变化させた場合の結果を図9bに示す。Hyp溶出量は、タンニン酸の濃度が高くなるに従い減少し、濃度5%で対照の約60%に抑制されることが示された。

## 2. 走査型電子顕微鏡観察像

図10に牛アキレス腱由来コラーゲン線維のSEM観察像を示す。未処理コラーゲン (CONT) では、コラーゲンの線維構造および横紋構造が観察されたが、これにリン酸処理 (PA) を施すと、コラーゲンの線維構造は失われ、無構造を呈した。タンニン酸処理を施した後、リン酸処理を行ったコラーゲン (TA+PA) では、未処理コラーゲンに比べると溶解されている像がみられるものの、線維構造は認められ、リン酸処理したものに比べると線維構造が残っていることが観察された。

## 考 察

### I. タンニン酸の口腔レンサ球菌に対する作用について

#### 1. 抗菌性について

被験菌株に対するタンニン酸の抗菌性の指標としてMICを調べたところ、*S. mutans* 2菌株では300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、その他の被験菌株では400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった(表2)。現在、う蝕抑制剤として臨床応用されている代表的な薬剤であるクロールヘキシジン、フッ化ナトリウムと比較すると、クロールヘキシジンの口腔レンサ球菌に対するMICは約1-12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>37)</sup>、フッ化ナトリウムの*S. mutans* K1-R株、Ingbritt株に対するMICは約1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>38)</sup>であり、タンニン酸は、クロールヘキシジンには及ばないが、フッ化ナトリウムより強い抗菌性を示すことが明らかとなった。フッ化ナトリウムはその抗菌性よりもむしろエナメル質の強化作用を目的として用いられているが、タンニン酸も、MICの結果より、抗菌性のみでは抗う蝕作用を期待できるものではないが、この他に菌付着抑制作用、象牙質強化作用を有していることを考え合わせると、う蝕に対し総合的に働く薬剤として有効であると考えられる。しかしながら、う蝕原因菌として重要な*S. mutans*に対するタンニン酸の抗菌性が、他の被験菌株に比較して高く(表2)、また、殺菌力も*S. mutans*に対し高かったこと(図1, 図2, 表3)は、弱いながらもタンニン酸の抗菌性の有用性を示すものと考えられる。*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius* および*S. mitis*を被験菌株として用いた寺岡の報告<sup>16)</sup>においても、本研究と同様に、他の口腔レンサ球菌に

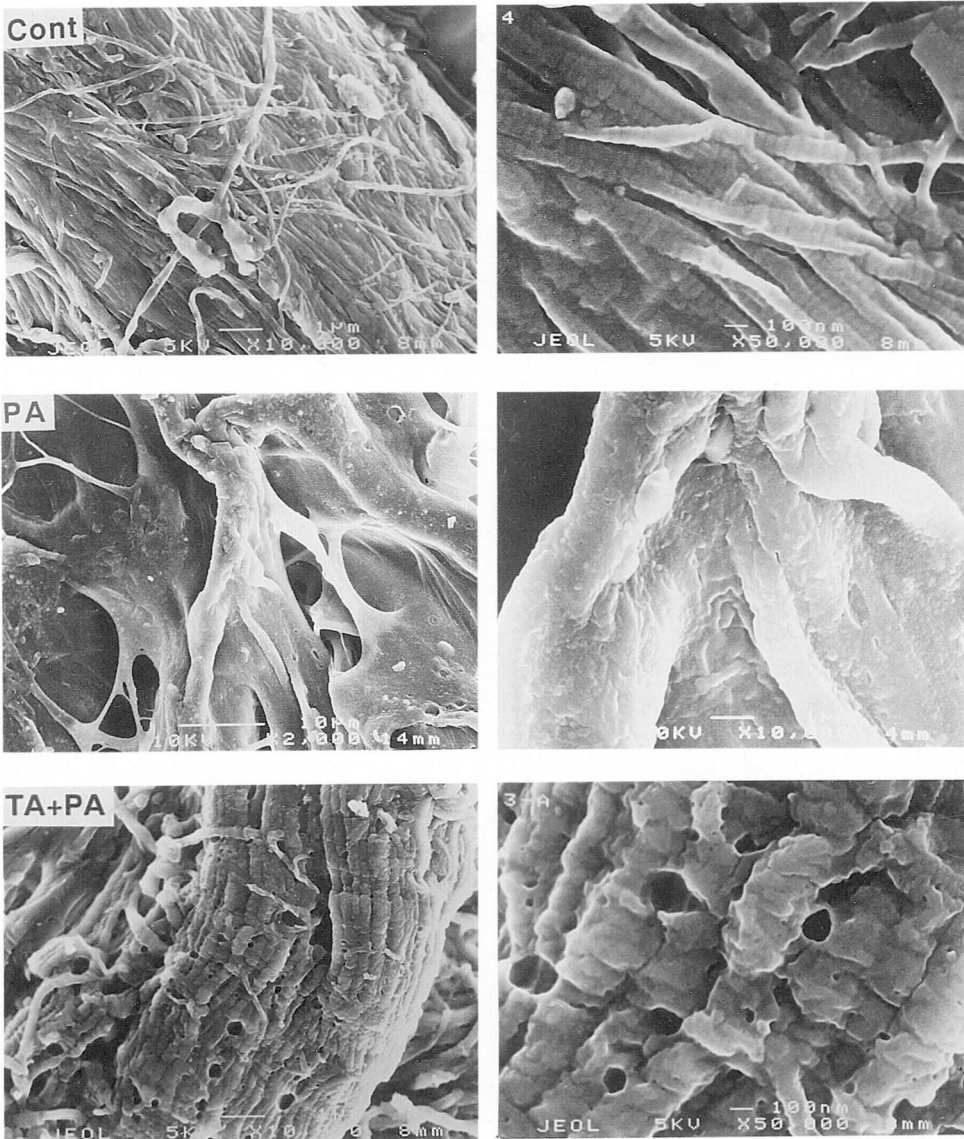


図10 コラーゲン線維のSEM観察像。

CONT：未処理コラーゲン（左；×10,000，右；×50,000）

PA：リン酸処理コラーゲン（左；×2,000，右；×10,000）

TA+PA：タンニン酸およびリン酸処理コラーゲン（左；×10,000，右；×50,000）

比較して *S. mutans* に対するタンニン酸の抗菌性が高いことが示されている。

タンニン酸は 300~400  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で口腔レンサ球菌に対し抗菌性を有していることが、MIC の測定により明らかとなったが、この濃度に基づいて、タンニン酸の短時間での殺菌力について検討した。口腔内では増殖中の菌より静止期にある菌が多いと考えられるので、静止期にある菌を実験に用いた。その結果、殺菌力は作用時間と濃度に依存し、300  $\mu\text{g/ml}$  タンニ

ン酸を約15分間作用させることにより、生存率は減少することが判明した（図1）。完全に菌を死滅させることはできないものの、比較的短時間、低濃度の作用でタンニン酸は口腔内細菌数を減少させることができることが示唆された。タンニン酸を臨床応用する際には、これらの作用条件を考慮することが必要であると考えられる。

タンニン酸の抗菌性の機序については、タンニン酸がタンパクと結合し収斂作用を発揮することや、金属

イオンと結合し不溶性の沈殿物を作るとの報告<sup>9,10)</sup>から推察すると、そのタンパク収斂作用によって、細菌の細胞壁へ結合し、何らかの作用を及ぼしていると考えられる。そこで、タンニン酸の菌体への吸着量を測定した結果、他の菌株に比較して *S. mutans* への吸着量が最も多かった (図3)。他の口腔レンサ球菌に比較して *S. mutans* に対しタンニン酸の抗菌性が高かったことを考え合わせると、タンニン酸の菌体への吸着と抗菌性との間に何らかの関係のあることが推察される。しかしながら、タンニン処理した *S. sobrinus* B13 の透過型電子顕微鏡観察では、細菌の構造の変化は認められなかったという報告<sup>39)</sup>も見られる。また、細菌の酵素反応には金属イオンが必要であるが、タンニン酸がこれらの金属イオンと結合することにより、細菌の酵素反応を阻害し、抗菌性を発現することも考えられ、その作用機序も多岐にわたっているものと推察される。

## 2. 菌付着に及ぼす影響について

歯質や修復材料への菌付着は、歯垢形成の第一段階であり、歯質、修復材料、歯周組織への為害作用発現において重要な因子と考えられる。このような微生物の固体表面への付着機構として、van der Waals 力、疎水相互作用、静電的相互作用などの非特異的な物理化学的因子およびレクチンなどに代表される adhesin-receptor 間の相互作用による特異的因子の関与が考えられている<sup>40,41)</sup>。本研究では、歯面や修復材料表面を薬剤で処理することで、表面の物理化学的性質を変化させ、菌付着を抑制することが可能であると考え、タンニン酸の菌付着に及ぼす影響を検討した。

### (1) 未処理面への菌付着について

微生物の固体表面への初期付着は、van der Waals 力や疎水相互作用による引力と静電的反発力の均衡 (第二の極小) によると DLVO 理論で説明されており<sup>42)</sup>、個々の付着に関与する力は、菌体および被着体表面の物理化学的性質に依存して変化すると考えられている。本研究の未処理試料への付着においても、表面の負の荷電の高い *S. mutans*, *S. salivarius* では静電的相互作用の、疎水性の高い *S. sanguis* では疎水相互作用の関与が示され (表5, 図6~図8)、従来の報告<sup>33,43-51)</sup>に一致する結果が得られた。

タンニン酸処理試料では、未処理試料に比較し、表面の負の荷電は増加し、より親水性へと変化した (図5)。また、すべての菌株で、付着菌数は減少した (図4)。*S. mutans* では、表面の負の荷電による反発力の増大により付着が減少したと考えられるが、静電的相互作用の関与は明らかにされなかった (表5、

図6)。これは、タンニン酸の *S. mutans* への吸着量が最も多かったこと (図3) から、菌体とタンニン酸との特異的な吸着が存在するためではないかと推察される。*S. salivarius* では、付着菌数と  $\zeta$ -電位との間に相関が認められ (表5, 図8)、静電的相互作用の関与が示され、*S. sanguis* では、接触角との相関が認められ (表5, 図7)、疎水相互作用の関与が示された。従って、タンニン酸処理表面への付着においても、未処理と同様、負の荷電の高い菌株の付着においては静電的相互作用がより重要であり、疎水性の高い菌株では疎水相互作用がより強く関与していると考えられる。そして、菌体表面の物理化学的性質によりこれらの非特異的因子の関与のしかたは異なるものの、タンニン酸処理による付着菌数の減少は、静電的反発力の増大、疎水相互作用の減少によると考えられる。

### (2) 唾液処理面への菌付着について

口腔内では歯面や修復材料には唾液によるペリクルが形成され<sup>52)</sup>、このペリクルの存在下での菌付着には、静電的相互作用、疎水相互作用などの非特異的因子がより複雑に関与し、さらに唾液タンパクの表面の糖残基などの特異的因子が関与する<sup>53-56)</sup>と考えられている。そこで、このようなペリクル表面への菌付着にタンニン酸処理の与える影響について検討した。

試料を唾液で処理すると、未処理面と比較して、いずれの被験菌株でも付着菌数は減少した。この理由としては、唾液処理により修復材料の表面の荷電は減少 (静電的反発力の減少) するが、表面がより親水性になったこと (疎水相互作用の減少)、唾液成分の吸着による表面の構造および荷電の分布状態が変化したこと、さらに、唾液の特異的結合基の影響が強かったことなどが考えられる。

しかしながら、唾液処理面でも、*S. mutans*, *S. salivarius* では、付着菌数と  $\zeta$ -電位との間に正の相関が認められ、これらの菌株の付着に静電的相互作用が重要であることを示したものとされた。特に、*S. salivarius* では、他の菌株と比較して、唾液処理面での付着減少率 (唾液処理面の付着菌数/未処理面の付着菌数×100%) が低かった。これは、この菌株の付着に、静電的反発力の減少の影響が大きかったことによるものと推察される。また、*S. sanguis* では、付着菌数と物理化学的性質との相関が認められず、この菌では、すでに報告されているように唾液タンパクのシアル酸との結合<sup>27,53-56)</sup>のような特異的結合が優先していると考えられる。

唾液処理後さらにタンニン酸で処理すると、唾液処理試料に比較して試料表面の負の荷電は増加し、よ

り親水性に変化した。また、すべての被験菌株で付着菌数は減少した。*S. mutans*, *S. salivarius* では、試料表面の $\zeta$ -電位と付着菌数間に正の相関が認められ(表5, 図6, 図8), 唾液処理面と同様に, 付着に静電的相互作用の関与が示された。これに対し, 特異的結合が優先すると考えられる *S. sanguis*<sup>57)</sup> では, 唾液およびタンニン酸処理面でも付着菌数と非特異的因子との間に有意な相関は認められなかった(表5, 図7)。しかし, 付着菌数と試料表面の接触角の相関係数は, 唾液処理試料では10556株で0.001, 10557株で0.083と低かったのに対し, 唾液およびタンニン酸処理では10556株で0.715, 10557株で0.726と増加した。これは, タンニン酸のタンパク収斂作用により, ベリクルの表面構造が変化し, 鍵と鍵穴という様な特異的結合<sup>58)</sup> が阻害され, 疎水相互作用の影響が相対的に高まったためと推察される。また, *S. mutans* の付着については, ハイドロキシアパタイトへ吸着させた唾液中の acidic proline-rich な糖タンパクは, adhesin となり付着を促進することが報告されている<sup>59-61)</sup> が, タンニンは特に proline-rich な糖タンパクと安定な化合物を作りやすい<sup>62,63)</sup> ため, タンニン酸処理により, ベリクル中の proline-rich な糖タンパクと細菌との付着を抑制することも考えられる。これらのことから, タンニン酸の唾液処理表面への菌付着阻害機構として, 静電的反発力の増大や, 親水性への変化による疎水相互作用の減少, さらに, 表面の構造変化による特異的結合基の減少があげられ, 付着因子として非特異的因子の寄与が大きくなるものと考えられる。

以上のことより, タンニン酸は, 唾液処理および未処理の試料表面で, 静電的相互作用の増大や疎水相互作用の減少などの非特異的因子の阻害により, 付着菌数を減少させると考えられた。唾液処理試料では, 特異的結合を阻害していると思われる所見も得られた。修復材料や歯質表面の負の荷電を増加させ, 親水性へと変化させるタンニン酸のような薬剤は, 細菌の付着抑制に有効と考えられる。

## II. コラーゲンに対する作用について

コラーゲンに対するタンニン酸の作用については, 酵素によるコラーゲンの溶解がタンニン酸により抑制されるという報告がなされている<sup>2)</sup> が, う蝕における歯質有機質の溶解は酵素のみではなく酸による侵襲も加わっていると考えられる<sup>14,64)</sup>。そこで, 本研究では, 酸と酵素による侵襲を加えた場合に生じる象牙質コラーゲンの溶解に, タンニン酸が及ぼす影響を検討するために, タンニン酸処理未脱灰象牙質粉末にリン酸処理を施した後, トリブシン処理を行い, コラーゲ

ンの溶解量を測定した。その結果, タンニン酸は, 濃度および処理時間に依存して象牙質コラーゲンの溶解を抑制し, 5%タンニン酸で6時間処理することにより, コラーゲン溶解量は約60%に減少した(図9)。従って, 象牙質強化作用を目的として臨床応用する場合には, 5%程度のタンニン酸を徐放的に長時間作用させることが効果的であると考えられた。タンニン酸は, 一般に生体に為害性の少ない薬剤であるが<sup>10,65)</sup>, 大量の内服や粘膜塗布による副作用も認められている<sup>11)</sup> ため, 口腔内への高濃度や長時間の応用には, 局所的な歯面塗布や塗布後にタンニン酸が口腔内に溶出しないような工夫が必要であると考えられる。

また, タンニン酸によるコラーゲンの耐酸性の向上は, SEM 観察によって形態学的にも示された。未処理試料は, 横紋を備えた多数のコラーゲン原線維として観察された(図10, CONT)。リン酸処理を施した場合には, 線維構造は失われ, 無構造な像が認められた(図10, PA)。これに対し, あらかじめタンニン酸処理を施した場合には, 横紋構造は失われたものの, 線維構造は維持されていた(図10, TA+PA)。すなわち, タンニン酸はリン酸による侵襲に対し, コラーゲンの構造を維持する作用があると考えられる。

コラーゲンの構造の維持は, タンニン酸がコラーゲンと結合することにより, 分子間の架橋構造を形成しているためと考えられる。タンニン酸とタンパクの結合について, Hargrman<sup>62)</sup> はタンニンのフェノール性水酸基とタンパクの =CO との水素結合によると述べており, Pankhurst<sup>66)</sup> は, タンニンとコラーゲンの結合はタンニンのフェノール性水酸基とコラーゲンの -NH- が水素結合するか, コラーゲンの側鎖がイオン結合し架橋構造を形成すると報告している。

酵素によるコラーゲンの溶解について岡本らは, 非常に安定したタンパクである象牙質コラーゲンは, 未変性状態ではトリブシンによりごくわずかしが溶解しないが, リン酸で前処理することにより, コラーゲンの溶解量が増加することを報告<sup>67)</sup> している。SEM 観察の結果, タンニン酸処理は, コラーゲンをリン酸による破壊から守り, 未変性状態に近い構造を維持することが示されたが, そのためにトリブシンによる Hyp 溶出量が減少したと考えられる。

今回の実験では観察試料として, 軟組織のコラーゲンをを用いたが, これは, 象牙質そのものでは石灰化しており, コラーゲンの構造が見にくく, 硬組織コラーゲンでは抽出操作上の構造の変化が起こる可能性があり, 構造の観察には不向きと考えたからである。軟組織のコラーゲンは, 硬組織のコラーゲンと比較すると酸に対する膨潤性, 酵素に対する感受性が高いこと<sup>68)</sup>

などを考慮すれば、象牙質でのタンニン酸の作用は、SEMで観察された所見ほど明らかではないと推察される。

## 総 括

タンニン酸を抗う蝕剤として、より有効に利用するために、口腔レンサ球菌に対するタンニン酸の抗菌性と歯質および修復材料への菌付着に及ぼす影響を調べるとともにコラーゲンへの作用を調べ、以下の結果を得た。

1. タンニン酸の口腔レンサ球菌に対するMICは、*S. mutans* 2菌株で300  $\mu\text{g/ml}$ 、その他の被験菌株では400  $\mu\text{g/ml}$ であり、う蝕原因菌として重要な*S. mutans*に対してタンニン酸は高い抗菌性を示した。

2. タンニン酸は、口腔レンサ球菌に対し殺菌力を有していた。タンニン酸の石炭酸係数は、*S. mutans* OMZ 175株で0.6であった。また、静止期にある細菌に対し、タンニン酸300  $\mu\text{g/ml}$ を15分間作用させることにより、タンニン酸が最も高い殺菌力を示した*S. mutans* OMZ 175株の生存率は、約2%に減少した。

3. 唾液処理、未処理の修復材料および歯質表面は、タンニン酸処理により負の荷電が増加するとともに、より親水性に変化し、これらの被着材料に対する付着菌数は減少した。また、付着菌数と被着体表面の $\zeta$ -電位および接触角との間にはそれぞれ相関が認められた。すなわち、タンニン酸処理による菌付着の抑制は、静電的相互作用の増大や疎水相互作用の減少など非特異的因子の阻害によるものと考えられた。

4. タンニン酸は、リン酸およびトリブシンによる象牙質コラーゲンの溶解を抑制し、その作用は処理時間と濃度に影響された。5%タンニン酸を6時間作用させることにより、コラーゲンの溶解量はタンニン酸未処理の約60%に減少した。また、タンニン酸は、リン酸処理によるコラーゲンの構造破壊を抑制する作用のあることがSEM観察像からも明らかとなり、タンニン酸のコラーゲン強化作用が示唆された。

以上のことより、口腔レンサ球菌に対するタンニン酸の抗菌性および殺菌力が、その作用条件とともに示された。また、タンニン酸は、歯質や修復材料表面の物理化学的性状を変化させることにより菌付着を抑制すること、象牙質コラーゲンに対してはリン酸やトリブシンによる溶解を抑制し、歯質有機質を強化することが示され、タンニン酸の抗う蝕作用の一端が基礎的に明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜った広島大学歯学部歯科保存学第一講座新谷英章教授に衷心より感謝の意を表します。また、御教示、御校閲を賜った本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授ならびに歯科理工学講座山本昌雄教授に深謝致します。さらに本研究遂行上、貴重な御助言と御支援を頂きました本学口腔細菌学講座三宅洋一郎助教授に慎んでお礼申し上げます。また、終始温かい御指導と御助言を頂きました本学歯科保存学第一講座佐藤尚毅講師、佐藤淳子博士に心よりお礼を申し上げます。最後に、御協力、御援助を頂きました本学保存学第一講座教室員各位に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 土谷裕彦, 竹村金造: 保存修復材料とブラークとの関係についての今日の問題. 国際歯科ジャーナル 3, 32-38, 1976.
- 2) 谷崎幸司: タンニン・フッ化物合剤による二次う蝕の抑制に関する基礎的研究. 日歯保誌 21, 279-296, 1978.
- 3) 佐野敬一: 歯肉の義歯側隣接面におけるタンニン・フッ化物合剤による齲蝕抑制に関する研究. 阪大歯学誌 24, 1-20, 1979.
- 4) 松村和良, 内海信子, 和田ゆかり, 青山光徳, 風呂川彰, 永峰道博, 遠藤 亨, 井上 清: タンニン・フッ化物合剤配合カルボキシレートセメントの深部う蝕中の細菌に及ぼす影響. 日歯保誌 31, 1033-1042, 1988.
- 5) 角南整司, 内藤あかし, 中山雅博, 西谷 展, 永峰道博, 寺地陸久, 松村和良, 井上 清: タンニン・フッ化物合剤配合カルボキシレートセメント裏層による深部う蝕の治療 第4報 ハイボンドテンポラリーセメントソフトの応用. 日歯保誌 32, 1397-1403, 1989.
- 6) 小島武彦: タンニン・フッ化物配合セメント(ポリカルボセメントおよびジंकセメント)の歯髄に及ぼす影響に関する臨床病理学的研究. 日歯保誌 33, 1200-1232, 1990.
- 7) 石塚直治, 山賀谷一郎: HY剤を添加した石こう系仮封材に関する研究—とくにHY剤の歯質への影響について—. 歯材器 9, 247-256, 1990.
- 8) 山賀禮一: お歯黒から予防歯科材料へ. 日本歯科医学会会報 5, 14-17, 1979.
- 9) 西岡五夫: タンニンの研究. ファルマシア 18, 475-479, 1982.
- 10) 奥田拓男: タンニンの化学. 化の領域 35, 264-272, 1981.
- 11) 日本公定書協会: 日本薬局方解説書. 第11改定, 廣川書店, 東京, 1068-1070, 1986.
- 12) Harvey, S.C.: Topical drugs; in Remington's

- Pharmaceutical Sciences, (Osol, A., editor). ed. 15, Mack Publishing Co., Pennsylvania, 712-730, 1975.
- 13) Mota, M.L.R., Thomas, G. and Barbosa, F.J.M.: Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L.. *J. Ethnopharmacol.* **13**, 289-300, 1985.
  - 14) Armstrong, W.G.: Modification of the organic matrix of sound dentin to collagenase-resistant forms. *J. Dent. Res.* **37**, 1016-1034, 1958.
  - 15) Strålfors, A.: Effect on hamster caries by purine derivatives vanillin and some tannin-containing materials. *Arch. Oral Biol.* **12**, 321-332, 1967.
  - 16) 寺岡加代: 酢酸亜鉛・酢酸ストロンチウム・タンニン酸合剤によるう蝕予防に関する基礎的研究. 阪大歯学誌 **23**, 42-58, 1978.
  - 17) 鹿野美弘, 浅香 睦, 野尻百合子, 斉藤謙一, 木島正夫: 菱の抗菌活性成分について. 生薬誌 **35**, 62-64, 1981.
  - 18) Zhang, J. and Kashket, S.: Salivary amylase inhibitors in teas. *J. Dent. Res. Abst.* **72** (Sp. Iss.), 644, 1992.
  - 19) Kashket, S., Paolio, V.J., Lewis, D.A. and van Houte, J.: *In-vitro* inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. *Arch. Oral Biol.* **30**, 821-826, 1985.
  - 20) Kakiuchi, N., Hattori, M., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Okuda, T. and Namba, T.: Studies on dental caries prevention by traditional medicines. VIII. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) **34**, 720-725, 1986.
  - 21) Wolinsky, L.E. and Sote, E.O.: Isolation of natural plaque-inhibiting substances from 'Nigerian Chewing Sticks'. *Caries Res.* **18**, 216-225, 1984.
  - 22) 田中孝明: *Candida albicans* の有床義歯裏装材への吸着に対するタンニン酸の効果. 日大口腔科学 **14**, 111-122, 1988.
  - 23) 窪田一彦: 粘膜調整材への *Candida* 属菌の定着に対するタンニン酸の効果. 日大口腔科学 **14**, 429-440, 1988.
  - 24) 岡本芳明, 佐藤さつき, 妹尾博文, 新谷英章: ボンディング材へのタンニン酸配合の試み. 日歯保誌 **33**, 485-488, 1990.
  - 25) 青山友三, 池田日出男, 岩下新太郎, 白井美津子, 内田元清, 加藤 巖, 勝田 甫, 川村明義, 熊澤教真, 田所一郎, 田中 寛, 田村 昇, 檀原宏文, 積田 亨, 鳥羽和億, 中村 弘, 藤原公策, 松橋 直, 松本 稔, 山口和克, 山口宣生, 山本 正, 吉野亀三郎, 渡辺 貞: 菌量の測定法, 抗菌作用の測定法; 微生物学実習提要 (東京大学医科学研究所学会編). 丸善(株), 東京, 102-112, 1988.
  - 26) 新井 浩, 今村 晋, 内田清二郎, 内田久雄, 内田元清, 遠藤元繁, 川西信彦, 勝田 甫, 加藤 巖, 川村明義, 草野信男, 工藤正四郎, 小松信彦, 沢井芳男, 下条寛人, 鈴木 清, 田所一郎, 常松之典, 西岡久寿弥, 本間 遜, 宮崎正之助, 渡辺 貞, 山本 正: 消毒薬の検定法 (石炭酸係数測定法); 細菌学実習提要 (東京大学医科学研究所学会編). 丸善(株), 東京, 335-339, 1958.
  - 27) Stinson, M.W., Levin, M.J., Cavese, J.M., Prakhobphol, A., Murray, P.A., Tabak, L.A. and Reddy, M.S.: Adherence of *Streptococcus sanguis* to salivary mucin bound to glass. *J. Dent. Res.* **61**, 1390-1393, 1982.
  - 28) 若林 学: コンポジットレジン of の表面あらさが細菌付着性に及ぼす影響. 日歯保誌 **34**, 1333-1341, 1991.
  - 29) Ørstavik, D., Kraus, F.W. and Henshaw, L.C.: In vitro attachment of streptococci to the tooth surface. *Infect. Immun.* **9**, 794-800, 1974.
  - 30) 玉井康勝: 接触角とその測定; 新実験化学講座 (立花太郎編). 丸善(株), 東京, 93-99, 1983.
  - 31) Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Pelt, A.W.J., de Jong, H.P. and Arends, J.: Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 980-983, 1984.
  - 32) 皆木省吾: 義歯床用レジンへのカンジダ属の付着機構における疎水相互作用の関与. 広大歯誌 **18**, 1-14, 1986.
  - 33) Olsson, J., Glantz, P.O. and Krasse, B.: Electrophoretic mobility of oral streptococci. *Arch. Oral Biol.* **21**, 605-609, 1976.
  - 34) Satou, J., Fukunaga, A., Satou, N., Shintani, H. and Okuda, K.: Streptococcal adherence on various restorative materials. *J. Dent. Res.* **67**, 588-591, 1988.
  - 35) Davies, J.T. and Rideal, E.K.: *Interfacial Phenomena*. Academic Press, New York, 1963; from Satou, J., Fukunaga, A., Satou, N., Shintani, H. and Okuda, K.: Streptococcal adherence on various restorative materials. *J. Dent. Res.* **67**, 588-591, 1988.
  - 36) Woessner, J.F., Jr.: The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 440-447, 1961.
  - 37) 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. 日歯保誌 **18**, 35-56, 1975.
  - 38) 鈴木俊行, 堤 脩朗, 祖父江鎮雄, 杉中秀寿: フッ化ジアミン銀の *Streptococcus mutans* によるプラーク形成におよぼす影響 II. プラーク形成抑制機序. 歯基礎誌 **18**, 268-278, 1976.

- 39) Wu-Yuan, C.D., Chen, C.Y. and Wu, R.T.: Gal-  
lotannins inhibit growth, water-insoluble glucan  
synthesis, and aggregation of mutans streptococci.  
*J. Dent. Res.* **67**, 51-55, 1988.
- 40) Gibbons, R.J.: Adhesion of bacteria to surfaces  
of the mouth; in *Microbial adhesion to surfaces*  
(Berkerliy, R.C.W., Lynch, J.M., Melling, J., Rut-  
ter, P.R. and Vincent, B., editors). Soc. Chem.  
Indust., Ellis Horwood, Ltd., Chichester, 351-  
388, 1980.
- 41) Rutter, P.R., Dazzo, F.B., Freter, R., Gigell, D.,  
Jones, G.W., Kjellenberg, S.L.A., Marshall, K.C.,  
Mrozek, H., Rades-Rohkohl, E., Robb, I.D.,  
Silverman, M. and Tylewska, S.: Mechanisms of  
adhesion; in *Dahlem workshop on microbial adhe-  
sion and aggregation* (Marshall, K.C., editors).  
Springer-Verlag, Berlin, 5-19, 1984.
- 42) Watt, P.J. and Ward, M.E.: Long-range attrac-  
tion (the DLVO theory); in *Bacterial Adherence*  
(Beachey, E.H. editor). Chapman and Hall, Lon-  
don, 273-275, 1980.
- 43) Satou, N., Satou, J., Shintani, H. and Okuda, K.:  
Adherence of streptococci to surface-modified  
glass. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1299-1305, 1988.
- 44) Olsson, J., Jontell, M. and Krasse, B.: Effect of  
macromolecules on adherence of *Streptococcus*  
*mutans*. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **24**, 173-  
178, 1980.
- 45) Abbott, A., Rutter, P.R. and Berkely, R.C.W.:  
The influence of ionic strength, pH and a protein  
layer on the interaction between *Streptococcus*  
*mutans* and glass surfaces. *J. Gen. Microbiol.*  
**129**, 439-445, 1983.
- 46) Reynolds, E.C. and Wong, A.: Effect of ab-  
sorbed protein on hydroxyapatite zeta potential  
and *Streptococcus mutans* adherence. *Infect. Im-  
mun.* **39**, 1285-1290, 1983.
- 47) Abbott, A. and Hayes, M.L.: The conditioning  
role of saliva in streptococcal attachment to hy-  
droxyapatite surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **130**,  
809-816, 1984.
- 48) Nesbitt, W.E., Doyle, R.J. and Taylor, K.G.:  
Hydrophobic interactions and the adherence of  
*Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Infect.*  
*Immun.* **38**, 637-644, 1982.
- 49) Gibbons, R.J. and Etherden, I.: Comparative hy-  
drophobicities of oral bacteria and their adherence  
to salivary pellicles. *Infect Immun.* **41**, 1190-  
1196, 1983.
- 50) McBride, B.C., Morris, E.J. and Ganeshkumar,  
N.: Relationship of streptococcal cell surface pro-  
teins to hydrophobicity and adherence; in *Molecu-  
lar basis of oral microbial adhesion* (Mergenhagen,  
S.E. and Rosan, B., editors). ASM, Washington,  
D.C., 85-93, 1985.
- 51) Weerkamp, A.H., Uyen, H.M. and Busscher, H.  
J.: Effect of zeta potential and surface energy on  
bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated  
human enamel and dentin. *J. Dent. Res.* **67**,  
1483-1487, 1988.
- 52) Bennick, A., Chau, G., Goodlin, R., Abrams, S.  
and Tustian, D.: The role of human salivary aci-  
dic proline-rich proteins in the formation of ac-  
quired dental pellicle *in vivo* and their fate after  
adsorption to the human enamel surface. *Arch.*  
*Oral Biol.* **28**, 19-27, 1983.
- 53) Levine, M.J., Herzberg, M.C., Levine, M.S., Elli-  
son, S.A., Stinson, M.W., Li, H.C. and van Dyke,  
T.: Specificity of salivary-bacterial interactions:  
Role of terminal sialic acid residues in the interac-  
tion of salivary glycoproteins with *Streptococcus*  
*sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Infect. Im-  
mun.* **19**, 107-115, 1978.
- 54) Murray, P.A., Levin, M.J., Tabak, L.A. and Red-  
dy, M.S.: Specificity of salivary-bacterial interac-  
tions: II. Evidence for a lectin on *Streptococcus*  
*sanguis* with specificity for a NeuAca2, 3Gal $\beta$ 1,  
3GalNAc sequence. *Biochem. Biophys. Res. Com-  
mun.* **106**, 390-396, 1982.
- 55) Gibbons, R.J., Etherden, I. and Moreno, E.C.:  
Association of neuraminidase-sensitive receptors  
and putative hydrophobic interactions with high-  
affinity binding sites for *Streptococcus sanguis* C5  
in salivary pellicles. *Infect. Immun.* **42**, 1006-1012,  
1983.
- 56) Gibbons, R.J., Etherden, I. and Moreno, E.C.:  
Contribution of stereochemical interactions in the  
adhesion of *Streptococcus sanguis* C5 to experi-  
mental pellicles. *J. Dent. Res.* **64**, 96-101, 1985.
- 57) 新谷英章: 各種修復材料並びにペリクルへの口  
腔レンサ球菌の付着機構に関する研究. 歯医学  
誌 **11**, 22-27, 1992.
- 58) 森崎久男, 服部黎子: 界面と微生物. 学会出版  
センター, 東京, 13-32, 1986.
- 59) Hay, D.I., Gibbons, R.J. and Spinell, D.M.:  
Characteristics of some high molecular weight con-  
stituents with bacterial aggregating activity from  
whole saliva and dental plaque. *Caries Res.* **5**,  
111-123, 1971.
- 60) Gibbons, R.J. and Hay, D.I.: Adsorbed salivary  
acidic proline-rich proteins contribute to the adhe-  
sion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic sur-  
faces. *J. Dent. Res.* **68**, 1303-1307, 1989.
- 61) Gibbons, R.J.: Bacterial adhesion to oral tissues:  
A model for infectious diseases. *J. Dent. Res.*  
**68**, 750-760, 1989.
- 62) Hagerman, A.E. and Butler, L.G.: The specific-  
ity of proanthocyanidin-protein interactions. *J.*  
*Biol. Chem.* **256**, 4494-4497, 1981.
- 63) Mehansho, H., Ann, D.K., Butler, L.G., Rogler,

- J. and Carlson, D.M.: Induction of proline-rich proteins in hamster salivary glands by isoproterenol treatment and an unusual growth inhibition by tannins. *J. Biol. Chem.* **26**, 12344-12350, 1987.
- 64) Burnett, G.W. and Scherp, H.W.: The effects of dentin of proteolytic and acidogenic bacteria isolated from the carious lesion. *J. Dent. Res.* **32**, 46-57, 1953.
- 65) 五十嵐清治, 佐藤和夫, 渡部 茂, 市田篤朗, 小田島武志, 佐藤尚子, 尾西みほ子, 松本 茂, 岡田順子, 佐藤誠二: 新しいう蝕予防・進行抑制剤に関する亜急性毒性試験 酢酸亜鉛・酢酸ストロンチウム・タンニン酸合剤 (TW 剤) とタンニン酸・フッ化亜鉛・フッ化ストロンチウム合剤 (HY 剤) について. 北海道歯科医師会誌 **36**, 147-151, 1981.
- 66) Pankhurst, K.G.A.: Monolayer studies of tanning reactions; in *Surface Phenomena in chemistry and biology* (Danielli, J.F., Pankhurst, K.G.A. and Ridiford, A.C., editors). Pergamon Press, London, 100-116, 1958.
- 67) 岡本芳明, I. Leon Dogon, 新谷英章: 象牙質コラーゲンのリン酸に対する安定性. 日歯保誌 **30**, 1397-1440, 1987.
- 68) 永井 裕, 藤本大三郎: コラーゲン実験法. 講談社, 東京, 21-24, 1985.



誤

正

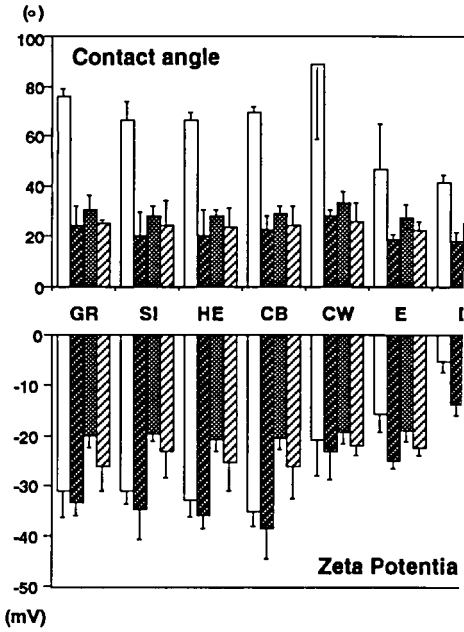


図5 各処理試料の接触角と ζ-電位.

- : 未処理
- ▨ : タンニン酸処理
- ▩ : 唾液処理
- ▧ : 唾液およびタンニン酸処理

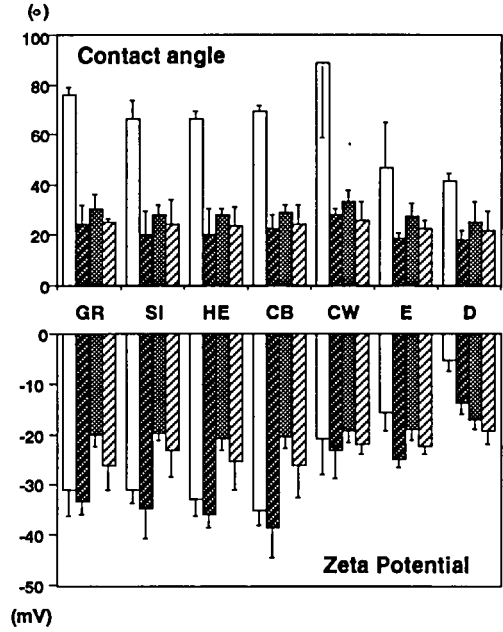


図5 各処理試料の接触角と ζ-電位.

- : 未処理
- ▨ : タンニン酸処理
- ▩ : 唾液処理
- ▧ : 唾液およびタンニン酸処理