

ポリフェノールとゼラチンの共存がリン酸カルシウム沈殿物形成に与える影響

日高 三郎,^{a)} 塚本 末廣,^{b)} 岡本 佳三^{c)}

^{a)}福岡医療短期大学・歯科衛生学科

^{b)}福岡歯科大学・成長発達歯学講座・障害者歯科学分野

^{c)}福岡歯科大学・歯科医療工学講座・生体工学分野

The influences of gelatin in combination with polyphenols on the formation of calcium phosphate precipitates

Saburo HIDAKA,^{a)} Suehiro TSUKAMOTO^{b)} and Yoshizo OKAMOTO^{c)}

^{a)}Department of Dental Hygiene, Fukuoka College of Health Sciences, 2-15-1, Tamura, Sawara-ku, Fukuoka 814-0193, Japan.

^{b)}Department of Growth and Development, Section of Dentistry for Persons with Disabilities, Fukuoka Dental College, 2-15-1, Tamura, Sawara-ku, Fukuoka 814-0193, Japan.

^{c)}Department of Dental Engineering, Section of Bioengineering, Fukuoka Dental College, 2-15-1, Tamura, Sawara-ku, Fukuoka 814-0193, Japan.

(Received June 24, 2002. Accepted July 31, 2002.)

Abstract

The influences of gelatin (from porcine skin) in combination with polyphenols (tannic acid and black tea infusion) on *in vitro* formation of calcium phosphate precipitates were studied. The inhibitions by gelatin, tannic acid and black tea infusion were little, while those by gelatin in combination with either tannic acid or black tea infusion were largely enhanced. When the ratio of gelatin/polyphenols is 20, the induction times were higher than 4.9 times over the control. This may be caused by the complex formed between gelatin and polyphenols. This result suggests that the gelatin in combination with polyphenols may be useful as the anti-calculus agent.

Key words gelatin-polyphenol mixture, anti-calculus agent, tannic acid, black tea infusion, hydroxyapatite.

緒 言

近年、高齢社会の到来と共に、高齢者や要介護者の精神的・肉体的な健全性維持のために口腔ケアの重要性が知られるようになってきた¹⁾。そのため、自分で口腔ケアができない要介護者、障害者に対して副作用の少ないお茶類が抗菌的洗口剤として用いられている^{2,3)}。ところで、唾液分泌によって流動的である口腔内を薬剤で処置するに当たっては、薬剤の持続的効果を図る必要があり、そのためにはできるだけ長期にわたって薬剤を口腔内に留まらせなければならない。この目的のためには、

粘着性に富んだゼラチン⁴⁾や多糖体が材料として考えられるが、誘う蝕性が少ない点から見れば、多糖体よりもゼラチンが適当である。口腔内で薬剤を長時間滞留させるためにゼラチンを、また抗う蝕・抗歯石効果のためポリフェノール⁵⁻⁸⁾を併用した“ゼラチン-ポリフェノール混合物”を、要介護者や障害者の口腔内の歯牙表面または歯肉に噴霧するか塗布することが考えられる。そこで、ゼラチンとポリフェノールが歯石形成にどのように影響を与えるのか予め調べておくことは重要である。

ここでは、ゼラチン、ポリフェノール（タンニン酸と紅茶浸出液）単独と、ゼラチン-ポリフェノール共存での *in vitro* リン酸カルシウム沈殿物形成に対する効果を

*To whom correspondence should be addressed. e-mail : sabnrm@college.fdcnet.ac.jp

pH 低落法⁹⁾を用いて研究したところ、それらの共存による口腔内での相乗的歯石形成抑制の可能性を示唆するデータを得たので報告する。

材料と方法

(1) 試薬：ゼラチン（豚皮膚由来）はシグマ社（St. Louis, MO, U.S.A.）のものを使用した。タンニン酸（中国産五倍子）とその他すべての試薬は ABIOZ（大阪）から購入した。

(2) 紅茶浸出液：紅茶（T.J. Lipton, Incorp. PK Co. Ltd, Tokyo, Japan）：製品番号 49-02203-10126-2）浸出液はティーバッグ1袋（平均 2.1 g/袋）を 105 ml の 100°C のお湯に 3 分間浸して調製した。ティーバッグを取り除いて得られた浸出液は室温まで冷却して実験に使用した⁸⁾。

(3) pH 測定：記録計に接続した pH メーター（F-21, 堀場, 東京）と pH 電極（6378-10D, 堀場, 東京）を用いた。反応液の容量は 2 ml, 温度は $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 反応液は攪拌し pH の変化を記録した。

(4) pH 変化による無定形リン酸カルシウム（ACP）形成とハイドロキシアパタイト（HAP）への転換反応の測定：100 mM の硝酸カルシウムと 100 mM のリン酸二水素カリウムのストック溶液を 2 mM Hepes 緩衝液（pH 7.4）で作製した。2 mM Hepes の 1.88 ml に、60 μl の 100 mM 硝酸カルシウム溶液を加え、次いで 60 μl の 100 mM リン酸二水素カリウム溶液を加えて反応を開始した。カルシウム、リン酸共に 3 mM を最終濃度として用いた。ゼラチン（10~2000 $\mu\text{g/ml}$ ）、タンニン酸（5~20 $\mu\text{g/ml}$ ）、紅茶浸出液（タンニン酸として 2~20 $\mu\text{g/ml}$ ）をリン酸を加えて反応を開始する 5 分前に反応液に加えた。また、この pH 低落法で測定した ACP 形成と HAP への転換反応の 1 分当たりの pH 変化を消費カルシウム濃度（ppm/min）に換算した^{9,10)}。誘導時間（induction time）は第 2 の pH 低落スロープに対する接線の延長とベースラインとの交点より決定した¹⁰⁾。

(5) 総ポリフェノール量の測定：総ポリフェノール量はフォリン・シオカルトール試薬を用いて測定した⁸⁾。

(6) ゼラチンによる凝集タンニンの沈殿：2.6 M NaCl 存在下で、ゼラチン 500 $\mu\text{g/ml}$ とタンニン酸 250 $\mu\text{g/ml}$, または紅茶浸出液 250 $\mu\text{g/ml}$ （タンニン酸として）を混合し 5 分間室温に静置した。遠心（8,700g, 4 分）して上清中の残存タンニン酸量を測定した。沈殿物形成量は残存タンニン量の対照タンニン酸量に対する % 値を 100 から引いた値（%）で表した¹¹⁾。

(7) 統計：本実験のデータは 3~5 回の実験から得られたものであり、平均値 $\pm$ SD で表した。統計的検定

は ANOVA と Scheffé's Test を用いて行った。P<0.05 の時、有意差ありとした。

結 果

1. ゼラチン、タンニン酸、紅茶浸出液の効果

Table I に示したように、ゼラチンは 10~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で全く効果が見られなかった。500~2000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲では誘導時間（induction time）を延長させたが、ハイドロキシアパタイト（HAP）への転換反応には影響がなかった。タンニン酸は 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でリン酸カルシウム沈殿物形成反応の誘導時間を延長させた。20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では ACP 形成と HAP への転換反応を抑制し、さらに誘導時間も対照の 1.5 倍に増加させた。紅茶浸出液は 2 $\mu\text{g/ml}$ （タンニン酸量として）ではなんら効果を示さなかったが、5~20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で HAP への転換反応を抑制し（25~45%）、誘導時間を増加させた（1.4~2.4 倍）。また 5~20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で ACP 形成反応を対照の 19~53 % にまで抑制した。

2. ゼラチンとタンニン酸もしくは紅茶浸出液との共存効果

Table II に示したように、ゼラチン濃度の 10 と 100 $\mu\text{g/ml}$, タンニン酸濃度の 5 $\mu\text{g/ml}$ が、各々単独では抑制効果を示さないのに（Table I）、ゼラチン（10 $\mu\text{g/ml}$ ）とタンニン酸（5 $\mu\text{g/ml}$ ）が共存すると（ゼラチン：ポリフェノール=2:1）、誘導時間が対照のおよそ 2 倍となった。さらにゼラチン 100 $\mu\text{g/ml}$ とタンニン酸 5 $\mu\text{g/ml}$ の共存では（ゼラチン：ポリフェノール=20:1）、誘導時間を 4.9 倍以上に延長させた。また、ゼラチン 100 $\mu\text{g/ml}$ が紅茶浸出液の 2 $\mu\text{g/ml}$ （タンニン酸量として）と共存する時（ゼラチン：ポリフェノール=50:1）、HAP への転換反応を対照の 47% にまで抑制し、誘導時間を対照の 3.8 倍に増加させた。また、ゼラチン 100 $\mu\text{g/ml}$ が紅茶浸出液 5 $\mu\text{g/ml}$ と共存する時は（ゼラチン：ポリフェノール=20:1）、ACP 形成の抑制がなくなり、HAP への転換反応と誘導時間に対し、紅茶浸出液単独の効果を大幅に上回る阻害効果を示した（誘導時間は対照の 6.8 倍以上）。

3. ゼラチンによる凝集タンニンの沈殿

NaCl が存在しない時は、タンニン酸、紅茶浸出液共に残存タンニン酸量は対照の 100 % であったが（データ表示なし）、2.6 M NaCl 存在下では、対照タンニン酸量が $246 \pm 2.7 \mu\text{g/ml}$ の時、残存タンニン酸量はゼラチンとタンニン酸で $51 \pm 1.6 \mu\text{g/ml}$, ゼラチンと紅茶浸出液で $130 \pm 7.0 \mu\text{g/ml}$ となった。

Table I. Effects of porcine skin gelatin, tannic acid and black tea infusion on the amorphous calcium phosphate (ACP) formation and hydroxyapatite (HAP) transformation

	Concentration used (μ g/ml)	Ca ²⁺ consumption (ppm/min)		Induction time (min)
		ACP	HAP	
None	0	123 $\pm$ 12	13.0 $\pm$ 1.3	14.8 $\pm$ 1.5
Porcine skin gelatin	10	124 $\pm$ 12	13.1 $\pm$ 1.3	15.0 $\pm$ 1.5
	100	135 $\pm$ 13	11.5 $\pm$ 1.2	18.3 $\pm$ 1.5
	500	135 $\pm$ 12	14.0 $\pm$ 1.3	19.0 $\pm$ 1.5*
	2000	127 $\pm$ 12	15.0 $\pm$ 1.3	22.6 $\pm$ 1.7*
Tannic acid	5	123 $\pm$ 12	13.2 $\pm$ 1.3	16.0 $\pm$ 1.5
	10	115 $\pm$ 12	13.0 $\pm$ 1.3	19.5 $\pm$ 1.5*
	20	87.0 $\pm$ 5.7*	10.0 $\pm$ 1.1*	22.5 $\pm$ 1.7*
Black tea infusion	2	123 $\pm$ 12	12.2 $\pm$ 1.3	16.1 $\pm$ 1.5
	5	100 $\pm$ 10*	9.75 $\pm$ 0.80*	20.1 $\pm$ 1.5*
	10	91.5 $\pm$ 7.1*	9.49 $\pm$ 0.77*	22.5 $\pm$ 2.5*
	20	58.1 $\pm$ 6.0*	7.15 $\pm$ 0.65*	35.5 $\pm$ 2.7*

The ACP formation and the HAP transformation were measured by the pH drop method. The concentrations of calcium and phosphate were 3 mM each. Additives were added to the reaction mixture 5 min before the addition of 3 mM phosphate. The final volume of assay solution, which contains 2 mM Hepes (pH 7.4), was 2 ml. The reaction mixture was stirred at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Values were presented as the rate of consumption of calcium (parts/10⁶/min). Appropriate volumes of black tea infusion were added as a tannic acid.

*Significant difference ($p < 0.05$) when compared to the no addition.

Table II. Effects of porcine skin gelatin in combination with either tannic acid or black tea infusion on the amorphous calcium phosphate (ACP) formation and hydroxyapatite (HAP) transformation

	Concentration used (μ g/ml)	Ca ²⁺ consumption (ppm/min)		Induction time (min)
		ACP	HAP	
None	0	123 $\pm$ 12	13.0 $\pm$ 1.3	14.8 $\pm$ 1.5
Gelatin	10	125 $\pm$ 12	13.0 $\pm$ 1.3	14.8 $\pm$ 1.5
Tannic acid	5	125 $\pm$ 12	13.0 $\pm$ 1.3	16.0 $\pm$ 1.5
Gelatin + Tannic acid	10			
	5	132 $\pm$ 13	11.6 $\pm$ 1.1	31.2 $\pm$ 2.6*
Gelatin	100	131 $\pm$ 13	11.6 $\pm$ 1.2	18.1 $\pm$ 1.5
Gelatin + Tannic acid	100			
	5	132 $\pm$ 13	ND	>73.0
Black tea infusion	2	125 $\pm$ 12	12.6 $\pm$ 1.3	17.0 $\pm$ 1.6
Gelatin + Black tea infusion	100			
	2	130 $\pm$ 13	6.16 $\pm$ 0.60*	56.3 $\pm$ 4.5*
Black tea infusion	5	99.1 $\pm$ 10*	9.85 $\pm$ 0.90*	19.5 $\pm$ 1.5*
Gelatin + Black tea infusion	100			
	5	131 $\pm$ 13	ND	>100

Details as shown in Table I.

Appropriate volumes of black tea infusion were added as a tannic acid.

ND; Could not be determined

*Significant difference ($p < 0.05$) when compared to the no addition.

考 察

植物界に広く存在しているポリフェノールはゼラチンとの反応で、加水分解型 (gelatin-soluble) と重合型 (gelatin-precipitable) ポリフェノール、の2種類に分類される¹²⁾。お茶類の中でも、緑茶ポリフェノールには抗う蝕効果、歯垢形成抑制効果、口腔粘膜細胞付着阻止効果、コラゲナーゼ活性阻害効果、活性酸素消去効果などが知られ^{5-7, 13)}、さらに歯石形成抑制効果の可能性も提唱されており⁸⁾、口腔衛生学的に非常に重要な飲料物である。お茶類はその発酵度により緑茶、ウーロン茶、紅茶の別があるが、含有されるポリフェノール量にほとんど差はないので [2% (w/v) 浸出液中に、1.2~1.3 mg/ml 含有する]⁸⁾、今のところ歯石抑制に関する効果は同じと見てよい。

低濃度のタンニン酸と紅茶浸出液は、リン酸カルシウム沈殿物形成のハイドロキシアパタイト (HAP) 転換反応と誘導時間に対してやや抑制的に働いている (Table I)。ところが、ゼラチンとタンニン酸、ゼラチンと紅茶浸出液の共存ではそれぞれ単独の時よりも、明らかに HAP への転換反応と誘導時間の延長効果を見ると、抑制が大幅に増大していた (Table II)。さらに、その共存効果はゼラチンとポリフェノールの比が 20:1 の時に両者共に最大値となったので、この近傍に最適の比率があることが示唆される。この大幅な抑制の増大はゼラチン-ポリフェノール間に複合体 (重合型ポリフェノール; 凝集タンニン)¹²⁾ が形成されることが原因であると考えられる。ゼラチンとタンニン酸の間、もしくは紅茶浸出液の間で複合体の形成が報告されており¹¹⁾、今回もゼラチンとタンニン酸間で 79%、ゼラチンと紅茶浸出液間で 47% 形成されていた。このポリフェノールとの複合体はゼラチンだけでなく、化学合成物のポリビニルピロリジン (PVP)、仔牛血清アルブミン (BSA)、リゾチーム、唾液とも形成されるので¹⁴⁾、口腔中では唾液-ポリフェノール複合体形成反応も加わって複雑な阻害効果を発揮するものと考えられる。

さらに複合体の働きとして、ゼラチンと紅茶浸出液が共存すると ACP 形成の抑制がなくなっていた (Table II)。このことは複合体形成がキレート能を消去させることを示唆する。また、加えるゼラチンの濃度によりこの混合物の性状をコロイド状から固形状にまで変えることができる。しかしながら、今回実験に使用した濃度の 0.01% (w/v) では粘着性が弱いので、このような場合は別の粘着剤 (例えば、カルボキシメチルセルロース、グリセリン) を付加することが考えられる。

*〒814-0193 福岡市早良区田村 2-15-1

福岡医療短期大学 日高三郎

References

- 1) Clay, M.: Oral health in older people. *Nurs. Older People* **12**, 21-25, 2000.
- 2) Hayashi, Y., Yamasaki, M., Nagai, N. and Yamada, S.: Study on oral care improvement—Comparison of the antibacterial activities of isogen gargle and green tea and their complementary usage. *Ann. Rep. Asahikawa* **21**, 43-52, 2000 (in Japanese).
- 3) Wu, C.D. and Wei, G.X.: Tea as a functional food for oral health. *Nutrition* **18**, 443-444, 2002.
- 4) Schrieber, R. and Seybold, U.: Gelatine production, the six steps to maximum safety. *Dev. Biol. Stand.* **80**, 195-198, 1993.
- 5) Ryu, E.: Prophylactic effect of tea on pathogenic micro-organism infection to human and animals. (1) Growth inhibitive and bactericidal effect of tea on food poisoning and other pathogenic enterobacterium *in vitro*. *Int. J. Zoonoses* **7**, 164-170, 1980.
- 6) Rosen, S., Elvin-Lewis, M., Beck, F.M. and Beck, E.N.: Anticariogenic effects of tea in rats. *J. Dent. Res.* **63**, 658-660, 1984.
- 7) Otake, S., Makimura, M., Kimura, T., Nishihara, Y. and Hirasawa, M.: Anticariogenic effect of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res.* **25**, 438-443, 1991.
- 8) Hidaka, S., Ouchi, K., Yamada, Y. and Okamoto, Y.: Influences of tea infusions and glycyrrhiza solution on both the formation of calcium phosphate precipitates and the calcium chelating ability. *J. Trad. Med.* **15**, 147-154, 1998.
- 9) Hidaka, S., Abe, K. and Liu, S.Y.: A new method for the study of the formation and transformation of calcium phosphate precipitates: Effects of several agents and Chinese folk medicines. *Archs Oral Biol.* **36**, 49-54, 1991.
- 10) Hidaka, S., Abe, K., Niina, M. and Liu, S.Y.: *In vitro* study on the inhibition of the formation of calcium phosphate precipitates I. Influences of Chinese traditional (Kampo) medicine, Rikko-san and saliva. *Jpn. J. Oral Biol.*, **34**, 226-273, 1992 (in Japanese).
- 11) Hidaka, S., Nakajima, K., Suekawa, M. and Liu, S.Y.: Saliva and gelatin form precipitates with some Chinese traditional herbs and herbal formulas. *Int. J. Ori. Med.* **20**, 169-176, 1995.
- 12) Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T.: New methods for analyzing tannins. *J. Nat. Prod.* **52**, 1-31, 1989.
- 13) Kuroda, Y. and Hara, M.: Why is tea good for health? —Secret of catechin power (in Japanese). 1st edn, Shokabo, Tokyo, 1999. 黒田行昭, 原 征彦: お茶はなぜ体によいのか—カテキンパワーの秘密—. 第1版, 裳華房, 東京, 1999.
- 14) Fickel, J., Pitra, Ch., Joest, B.A. and Hofmann, R.R.: A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **122**, 225-229, 1999.