

う蝕原性レンサ球菌の増殖抑制効果検定法の改良と 農産物抽出物の増殖抑制効果

深堀奈保子・山下純隆・久保田朗
(生産環境研究所)

従来から行われているう蝕原性レンサ球菌 (*Streptococcus mutans*) の増殖抑制効果検定法を改良した。また、この改良法を用いて、農産物抽出物による増殖抑制効果を検討した。あらかじめファーメンターで培養した大量の対数増殖期の *S. mutans* 菌液に被検試料を添加し、菌の比増殖速度で評価することにより、検定時間を7時間程度に短縮できた。さらに、この改良法を用いて、農産物抽出物の *S. mutans* 増殖抑制効果を検討した結果、ニンジン、ネギ、ブロッコリー、イチジク、ナスの抽出物で効果が認められた。

[キーワード：う蝕原性レンサ球菌、増殖抑制、比増殖速度、農産物抽出物]

Improvement of the Method for Estimating Inhibitory Effects on Multiplication of *Streptococcus mutans* MT8148 and Inhibitory Effects of Extracts from Some Edible Plants. FUKAHORI Naoko, Sumitaka YAMASHITA and Akira KUBOTA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Rec. Cent.* 17:106-109 (1998)

An improvement was made to the standard method for evaluating the inhibitory effects on multiplication of *Streptococcus mutans* MT8148. An extracted sample of 0.2ml was added to 9.8ml of the bacterial solution incubated with a fermenter, and then the mixed solution was cultured in test tubes for 7 hours. With the method the inhibitory effects were evaluated for samples extracted from several edible plants. Extracts from carrot, welsh onion, broccoli, fig, and eggplant were shown to inhibit multiplication of *S. mutans*.

[Key words : *Streptococcus mutans*, inhibition of multiplication, logarithmic phase, specific growth rate, extracts from edible plants]

緒 言

う蝕(虫歯)は、う蝕原性レンサ球菌 (*Streptococcus mutans*) により引き起こされる細菌性疾患であり、そのメカニズムは次のとおりである^{4,5,8)}。まず、う蝕原性レンサ球菌に、スクロース等の糖質が供給されると、う蝕原性レンサ球菌が生産するグルコシルトランスフェラーゼの働きで不溶性グルカンが生成される。次いで、他の菌体等を巻き込んで歯の表面に付着して菌垢が形成される。さらに、糖質を利用した酸発酵により乳酸を主とする有機酸が生成され、歯の硬組織であるエナメル質が溶解される。このように、う蝕は、う蝕原性レンサ球菌、基質(スクロース等の糖質)、宿主(歯)が揃ってはじめて発症する。

これまで、う蝕予防について様々な研究が行われてきた^{3,4,5)}。まず、要因の一つであるう蝕原性レンサ球菌を、抗生物質や殺菌剤を用いて、口腔内から完全に排除する試みが検討されてきた¹⁾。しかし、アレルギーや副作用等の問題が生じ、実用化には至っていない。

近年、う蝕原性レンサ球菌の口腔内での増殖を抑制し、う蝕予防に有効な植物由来の成分の探索が行われ、ポリフェノール^{9,11,13)}やフラボノイド¹⁰⁾の効果が報告されている。しかし、う蝕原性レンサ球菌に対する増殖抑制効果の検定に5日間を要することから、より効率的な検定法の開発が求められてきた。

そこで、筆者らはう蝕原性レンサ球菌増殖抑制効果を短時間で評価するために従来法を改良し、この改良法により農産物の各種抽出物のう蝕原性レンサ球菌に対する増殖抑制効果について検討した。

試 験 方 法

試験1 *Streptococcus mutans*の増殖抑制効果検定法の改良

(1) *S. mutans*の培養方法

試験には、大阪大学歯学部口腔細菌学講座より分譲された *Streptococcus mutans* MT8148 (serotype c) を用いた。培地にはBrain Heart Infusion Broth 3.5%培地³⁾(ニッスイ、牛脳エキス末7.5g/l、ハートエキス末8.0g/l、ペプトン10.0g/l、ブドウ糖2.0g/l、塩化ナトリウム5.0g/l、リン酸一水素カリウム2.5g/l、pH7.2、以下BHI培地と略)を用いた。

BHI培地を10ml入れた直径18mmのねじ口試験管に、高層培地の保存菌株から白金線で接種し、37℃で18時間、前培養を行った³⁾。

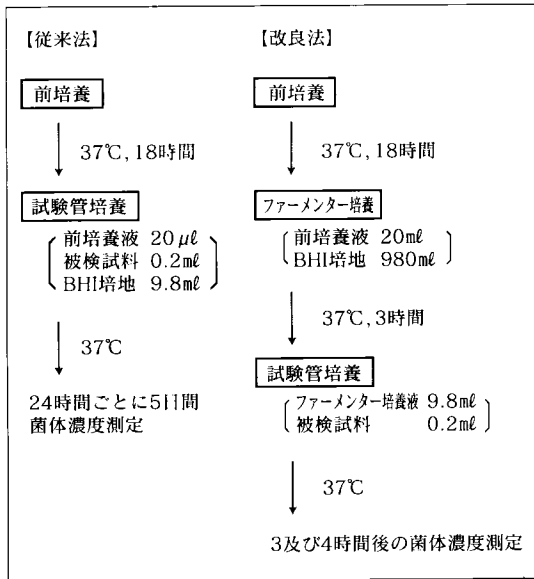
2,000ml容攪拌式ファーメンター(サクラ精機製TBR-2, 190mmL×110mmID)にBHI培地980ml、前培養液20mlを入れ、炭酸ガスポンプを用いてヘッドスペースを炭酸ガスで置換後、37℃、攪拌速度50rpmで3時間、培養を行い、対数増殖期に移行させた。

(2) *S. mutans*の増殖抑制効果検定法

従来法及び改良法の検定手順を第1図に示した。

従来法³⁾は、直径18mmのねじ口試験管に、被検試料0.2ml、前培養菌液20μl、BHI培地9.8mlを入れて37℃で培養し、5日間にわたって24時間ごとの菌体濃度を測定した。

これに対し、改良法では、直径18mmのねじ口試験管に、前述の対数増殖期に移行した菌液9.8ml、被検試料0.2mlを入れて37℃で培養し、3及び4時間後の菌体濃度を測定した。



第1図 従来法および改良法の検定手順

試験2 農産物抽出物が*S. mutans*の増殖に及ぼす影響

(1) 農産物抽出物の調製と検定

農産物は、茶(玉露)、ハウレンソウ‘ベガサス’、ネギ‘九条細’、ナバナ(京築在来種)、ナス‘筑陽’、ニンジン‘黒田五寸’、ブロッコリー‘みよ緑28号’、イチジク‘蓬莱柿’及び、カキ‘富有’を用い、新鮮物を凍結乾燥後に粉碎し、供試した。

各材料に20倍量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、10℃以下で1夜浸漬し、ろ過及び遠心分離(10,000rpm, 10分間)した上清を水に対して透析(画分分子量12,000~14,000のセルロースチューブ)し、透析内液を凍結乾燥した。

検定は改良法により行い、検定時の試料は、凍結乾燥試料をPBSに溶解して供試した。

(2) 分析方法

菌体濃度は、660nmの濁度を測定し、乾燥菌体重に換算した。

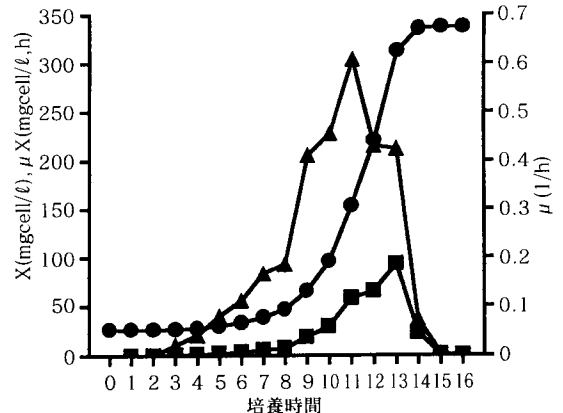
乳酸濃度は、培養液を2倍に希釈し、0.45μmメンブランフィルターでろ過した後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により定量した。

ポリフェノール含量はFolin-Denis法⁷⁾、タンパク質含量は、BCA Protein Assay Reagent (PIERCE CHEMICAL COMPANY)を用いて測定した。

結果及び考察

試験1 *S. mutans*の増殖抑制効果検定法の改良

従来行われてきた*S. mutans*の増殖抑制効果検定法³⁾は、被検試料の抑制効果を*S. mutans*の増殖における誘導期(微生物が新しい環境に適応し、増殖を開始するまでの期間)の延長程度により判断するものである。したがって、その抑制効果が高い物質ほど誘導期が長くなり、効果の判定に長時間を要するという欠点があった。従来法による*S. mutans* MT8148の増殖曲線を第2図に示した。培養開始から8時間後に誘導期から対数増殖期に入り、増殖速度は13時間後、比増殖速度は11時間後に最大になり、15時間後にはともに定常状態に達した。これは、新しい培地に20μlという極微量の菌液を被検試料とともに添加することにより、誘導期に戻されているためと考えられる。そこで、筆者らは対数増殖期に達した大量の菌液に直接試料を添加すれば、誘導期に戻ることなく、短時間で菌体の増殖抑制効果を検定できると考えた。しかし、この方法には、均一で大量の菌液が必要となるため、ファーマンターを用いて*S. mutans* MT8148を培養した。

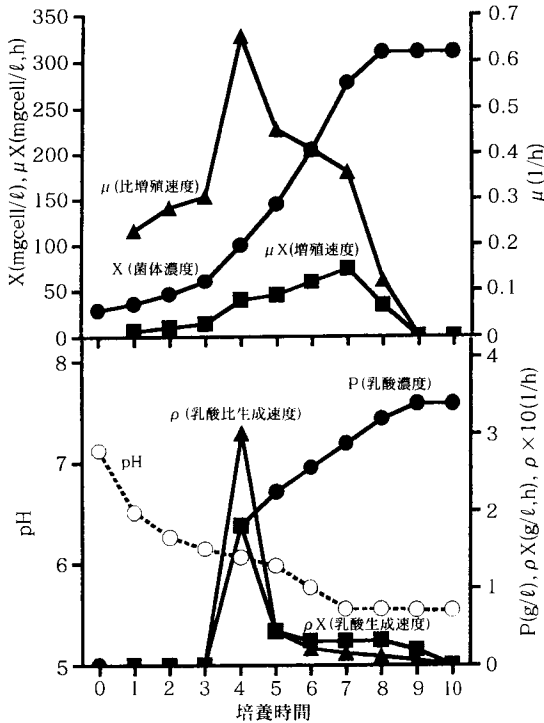


第2図 *S. mutans* MT8148の従来法における増殖曲線
● X(菌体濃度) ■ μ X(増殖速度) ▲ μ(比増殖速度)

第3図に、ファーマンターで培養した*S. mutans* MT8148の増殖曲線を示した。ファーマンターでは、培養開始から3時間後に誘導期から対数増殖期へ移行し、増殖速度は7時間後に、比増殖速度は4時間後に最高になった。培養開始から9時間後には、定常状態に到達し、短時間で大量の菌液を得ることができた。

さらに、ファーマンターであらかじめ3時間培養した菌液と、被検試料としてPBSのみを試験管に分注して37℃で培養した。その結果、第4図に示すように増殖速度、比増殖速度ともに分注して4時間後に最高になり、短時間で増殖抑制効果を判断できると考えられた。

また、第3図に示したように、う蝕に大きく影響する乳酸比生成速度と菌体の比増殖速度を比較すると、ともに培養開始から4時間後に最高になっている。このことから、*S. mutans* MT8148は、増殖と同時に乳酸を生成していることがわかる。つまり、菌体の比増殖速度が低くなれば、菌の増殖が抑制され、乳酸の生成も抑制されることになる。従って、菌体濃度だけでなく、菌体の比増殖速度を評価することで、増殖抑制効果と乳酸生成



第3図 *S. mutans* MT8148のファーメンター培養における増殖曲線

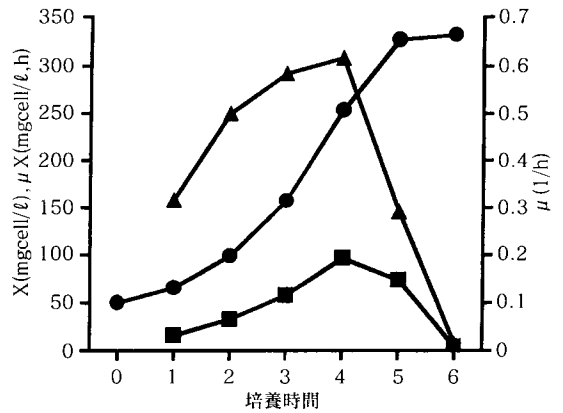
抑制効果を同時に検定できるものと考えられる。

既に *S. mutans* MT8148の増殖抑制効果が報告されている緑茶抽出物のサンフェノン^{9,11)} (株太陽化学) 及びキシリトール¹²⁾ (株和光純薬) を用いて、この改良法を評価した。その結果、第5図に示すように、菌体濃度、比増殖速度ともに低くなり、*S. mutans* MT8148の増殖抑制効果を従来法と同様に高い精度で検定することができた。

従って、第1図に示すように、ファーメンターを用いて菌を大量培養し、試験管分注後増殖程度が最高になる4時間後の比増殖速度を評価すれば、培養開始から7時間後に *S. mutans* MT8148の増殖抑制効果が検定でき、従来法に比べて大幅に検定時間を短縮できることが明らかとなった。

試験2 農産物抽出物が *S. mutans* の増殖に及ぼす影響

ファーメンターを用いた改良法により、農産物抽出物が *S. mutans* MT8148の増殖に及ぼす影響について検討し、その結果を第5図に示した。



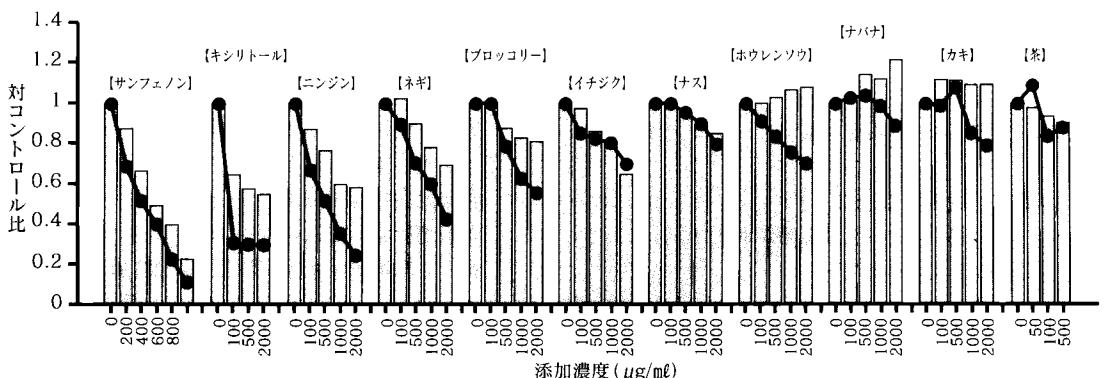
第4図 *S. mutans* MT8148を改良法で培養した増殖曲線

● X (菌体濃度) ■ μX (増殖速度) ▲ μ (比増殖速度)

農産物抽出物の低分子成分については、抗う蝕性の検討が既に行われている^{9,10,11,13)}が、高分子成分については報告がない。よって、農産物抽出物の高分子画分を用いた。今回供試した農産物抽出物で、最も強い増殖抑制効果を示したのは、ニンジンの抽出物であった。ニンジン抽出物は培地中に2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加すると、サンフェノンを800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加、キシリトール5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加とほぼ同等の増殖抑制効果が認められ、その比増殖速度はPBSのみ添加した場合の25%に抑制された。また、ネギ抽出物を2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加するとサンフェノンの600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加とほぼ同等の効果があった。ブロッコリー、イチジク、ナスでも増殖抑制効果が認められた。

一方、ホウレンソウ、ナバナ、カキの抽出物は、比増殖速度は低くなったが、菌体濃度は高くなっている。これは、分注後比増殖速度が最高になる4時間よりも早い時期に急激な増殖が起こっていることが考えられる。つまり、これらの抽出物は増殖を促進している可能性があり、今後、分注後の菌体濃度測定時間を変えて検討を行い、*S. mutans* MT8148の増殖促進効果についても明らかにする必要がある。

本試験では、農産物抽出物の高分子成分の増殖抑制効果を検討するために、ポリフェノールなどの低分子成分を取り除く目的で透析を行った。しかし、抽出物中のポリフェノール含量を測定したところ、残存していた。北村ら⁹⁾は、緑茶ポリフェノールが *S. mutans* MT8148の



第5図 農産物抽出物が *S. mutans* MT8148の増殖に及ぼす影響

□ 菌体濃度 ● 比増殖速度

第1表 農産物抽出物中のポリフェノール及びタンパク質含量

農産物抽出物	ポリフェノール (mg/g)	タンパク質 (mg/g)
茶	31.7±1.05	505±14.1
ホウレンソウ	27.8±0.89	770± 5.3
ナス	30.4±0.16	527±14.4
ニンジン	11.8±0.13	341±17.7
葉ネギ	25.3±0.24	433±16.8
ブロッコリー	13.0±0.38	678±13.2
ナバナ	33.6±0.69	767± 9.6
イチジク	3.4±0.33	95± 6.5
カキ	16.3±0.17	687±13.7

増殖を抑制することを報告している。そこで、第5図の *S.mutans* MT8148の増殖抑制効果とポリフェノール含量との関係を検討したが、相関は認められなかった ($R^2 = 0.241$)。このことから、抽出物中には、ポリフェノール以外の増殖抑制効果を示す成分が存在するものと推察される。

また、同時にタンパク質含量も測定した。第1表に示すように、抽出物中のタンパク質含量は高く、その中には各種の酵素も含まれていると考えられる。イチジクやキャベツなどの植物には、グラム陽性菌の細胞壁分解作用を持つ酵素 (Lysozyme) が存在することが認められており^{2,6)}、この酵素が抽出物中に存在すれば、*S.mutans* MT8148の増殖に影響を与えている可能性も考えられる。今後、Lysozyme等、酵素活性についても検討を行う必要がある。

謝 辞

本試験を実施するにあたり、快く菌体を分譲していただいた大阪大学歯学部口腔細菌学講座の浜田茂幸教授に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) FITZGERALD, R.J. (1973) The potential of antibiotics as caries-control agents. *J. Amer. Dent. Assoc.* **87**:1006 - 1009.
- 2) GLAZER, A.N., BAREL, A.O., HAWARD, J.B. and BROWN, D.M. (1969) Isolation and characterization of fig lysozyme. *J. Biol. Chem.* **244**:3583 - 3589.
- 3) 浜田茂幸 (1974) 細菌学からみたう蝕予防. 日本歯科評論 **378**:32 - 39.
- 4) 浜田茂幸 (1981) *Streptococcus mutans* の生態学的及び病因論的研究. 日本細菌学雑誌 **36**:557 - 564.
- 5) 浜田茂幸, 古賀敏比古 (1981) う蝕の細菌学と生化学. 化学と生物 **19**:695 - 705.
- 6) 井本泰治 (1982) 酵素ハンドブック (丸尾文治, 田宮信雄監修), 東京:朝倉書店, pp.498 - 499.
- 7) 片山 脩 (1975) 栄養診断のための栽培植物分析測定法 (作物分析法委員会 編), 東京:養賢堂, pp.422 - 423.
- 8) KEYES, P.H. (1962) Recent advances in dental caries research. *Int. Dent. J.* **12**:443 - 464.
- 9) 北村京一, LOYOLA, J.P., 祖父江鎮 (1990) 日本茶の熱水抽出物 (サンフェノン) のミュータンス・レンサ球菌に対する増殖抑制効果. 日本小児歯科学会 **28**(3):618 - 622.
- 10) 松田 良 (1996) 天然物 (カキフラボノイド) を利用した抗菌剤の開発. 食品と開発 **31**(10):17 - 18.
- 11) 阪中専二 (1990) 緑茶ポリフェノールの抗う蝕効果. フレグランスジャーナル **11**:42 - 49.
- 12) 崎山淳子 (1997) キシリトールの特性と食品への応用. 月刊フードケミカル **146**:23 - 28.
- 13) 田辺正行 (1994) リンゴポリフェノールの機能性. 食品流通技術 **23**(8):10 - 14.