

「第21回日本臨床環境医学会学術集会特集」

原 著 奨励賞発表論文

ゲッケイジュ葉の口腔内細菌に対する作用

— 口腔の健康から全身の健康へ —

猪野千恵子¹⁾ 福山則明²⁾ 小林憲忠³⁾
鈴木由美子³⁾ 楊金緯⁴⁾ 折原裕²⁾

- 1) イノデンタルクリニック
- 2) 東京大学大学院薬学研究科付属薬用植物園
- 3) 北里大学メディカルセンターバイオメディカルラボ
- 4) 株式会社 常磐植物化学研究所

Antimicrobial effects of *Laurus nobilis* leaf extract in combatting oral bacteria

— Good oral health does contribute to good general health —

Chieko Ino¹⁾ Noriaki Fukuyama²⁾ Noritada Kobayashi³⁾
Yumiko Suzuki³⁾ Jinwei Yang⁴⁾ Yutaka Orihara²⁾

- 1) Ino Dental Clinic
- 2) Experimental Station for Medicinal Plant Studies, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo
- 3) Bio Medical Laboratory, Division of Bio Medical Research, The Kitasato Institute Medical Center Hospital, Kitasato University
- 4) TOKIWA PHYTOCHEMICAL CO., LTD

要約

口腔内の炎症性疾患である歯周病と全身疾患との関連が明らかとなり、口腔内の歯周病原性菌が生活習慣病である糖尿病、脳梗塞、心疾患や誤嚥性肺炎、低体重児出産などの一因となっていることが示唆されている。

我々はクスノキ科薬用植物に歯周病原菌に対する抗菌活性物質を求め本研究を行った。

クスノキ、ニッケイ、ジャワニッケイ、セイロンニッケイ、ゲッケイジュ、テンダイウヤクそれぞれの葉と枝に分け、抗菌活性を指標に植物の抽出物を分離精製し、ゲッケイジュの葉の抽出物から、活性本体

受付：平成25年1月27日 採用：平成25年6月4日

別刷請求宛先：猪野千恵子

〒364-0026 北本市荒井3-371 イノデンタルクリニック

Received: January 27, 2013 Accepted: June 4, 2013

Reprint Requests to Chieko Ino, Ino Dental Clinic, 371-3 Arai, Kitamoto, Saitama 364-0026, Japan

である、deacetyl laurenobiolide を単離し、構造を明かにした。

さらに、deacetyl laurenobiolide より laurenobiolide と新規化合物である deacetyl laurenobiolide の閉環化合物を合成し、抗菌活性を検討した。その結果、上記3種の deacetyl laurenobiolide 類化合物が歯周病原性菌ばかりでなく、ウ蝕原性菌に対しても抗菌活性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、deacetyl laurenobiolide、及びその関連化合物による口腔における健康の向上に伴い、全身の健康へと効果を発揮することを期待するものである。(臨床環境 22 : 47-58, 2013)

《キーワード》 ゲッケイジュ、歯周病、生活習慣病、口腔内細菌、オーラルケア

Abstract

Periodontitis, a well known inflammatory gum disease caused by periodontal pathogens in oral bacteria, has been proven to be linked to systemic disease.

Periodontal pathogens are believed to be linked systemically to diseases, such as stroke, heart attack, diabetes mellitus, and premature birth.

We tried to find antimicrobial components in six medicinal *Lauraceae* plants that could combat periodontal pathogens. Extracted branches and leaves of six *Lauraceae* plants, *Cinnamomum sieboldii*, *Cinnamomum camphora*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cinnamomum burmannii*, *Lindera strychnifolia* and *Laurus nobilis* were examined in relation to antimicrobial activity combatting periodontal pathogens. Only leaf extracts from *Laurus nobilis* showed distinctive antimicrobial activity against periodontal pathogen *A. viscosus*. Isolation of the antibacterial component from *Laurus nobilis* leaf extract was performed. The structure determination of the isolated component was achieved by experimental analysis, and found to be deacetyl laurenobiolide.

Cyclization of deacetyl laurenobiolide afforded a new synthesized compound. Furthermore, acetylation of deacetyl laurenobiolide produced laurenobiolide. Each of them, especially deacetyl laurenobiolide, showed antimicrobial activities - not only in periodontal pathogens, but also cariogenic pathogens.

With this combined evidence we prospect deacetyl laurenobiolide and its derivatives will be used to contribute to physical human health through the concept that good oral health contributes to good general health.

(Jpn J Clin Ecol 22 : 47-58, 2013)

《Key words》 *Laurus nobilis*, oral pathogens, systemic disease, periodontal disease, oral care

I. 緒言

日本が迎えた高齢化社会において、高齢者の健康を維持し、介助を必要としない生活を保つことは、我々の社会を健全に維持するために必要不可欠と考えられる。

歯周病は口腔内細菌が感染して生じる炎症性疾患であるが、その進行とともに歯の周囲にある歯周組織を破壊し、コラーゲン線維の融解や周囲骨組織の崩壊を伴い、最終的には歯の脱落を起す病変と認識されてきた。

しかし近年、口腔科学の研究が目覚ましく発展し、単なる口腔内の疾患と考えられていた歯周病が全身疾患と深く係っているということが明らかにされるようになった。

日本歯周病学会の「歯周病の診断と治療の指針(2007年)」では30歳から69歳の成人における歯周病の罹患率は80%になっている。

歯周病を引き起こす歯周病原性菌が血液を介し全身に影響をあたえ、脳梗塞、心疾患、糖尿病、誤嚥性肺炎、低体重児出産などの一因をなしていることが明らかにされている¹⁾。

高齢者においては、誤嚥性肺炎の原因のなかに、*Porphyromonas gingivalis*をはじめとする歯周病原性菌の感染があることが報告されている。嚥下反射の低下と、口腔内清掃の不足により口腔内細菌が口腔内のさまざまな部位に繁殖し唾液と一緒に誤嚥され感染を引き起こすと考えられている²⁾。

今日、口腔ケア用品は消毒薬としての使用が目的に開発されたものが多く、口腔粘膜に対し刺激性のある物が多く販売されている。そのため高齢者や幼少児には使用しづらい製品であると考えられる^{3,4)}。

高齢者が長期にわたり、日和見感染をおこさず安全に使用することができ、かつ低刺激性で作用が緩和な口腔衛生用品が求められている。

人類は植物を薬として用いてきた。民間療法や漢方薬の原材料もほとんど植物である。植物に含まれる有効成分を利用してきたのである。たとえば、オオバコ科植物であるジキタリスは別名キツネノテブクロともいわれるが、葉の抽出物から強心薬としてジゴキシン、ジキトキシンが得られている。クスノキ科植物には、樟脳の原材料であるクスノキ (*Cinnamomum camphora*)、その根の皮からニッキが取れ食品用の香料として用いられているニッケイ (*Cinnamomum sieboldii*) がある。また、セイロンニッケイ (*Cinnamomum zeylanicum*) やジャワニッケイ (*Cinnamomum burmannii*) からはシナモンが取られている。クスノキ科のテンダイウヤクは塊根を烏薬といい漢方で芳香健胃薬として使用される。その、芳香成分にはボルネオールであるモノテルペンや、リンデラン、リンデレンなどのセスキテルペノイドがある⁵⁾。

クスノキ科植物の一種であるゲッケイジュは、地中海沿岸原産の植物で世界中に分布している。ゲッケイジュの葉はスパイスとしておもに使用されている。また、その果実は芳香性健胃薬として用いられている。ヨーロッパでは民間療法として、ゲッケイジュの葉を煎じて下痢、リュウマチ痛、喘息などに使用している⁶⁾。葉には主としてはゲラニオール、シネオールやユージノールなどの精油成分であるモノテルペンが含まれている⁷⁾。

モノテルペンは植物、特にハーブの精油成分として知られ、ハッカの香気成分であるメントールやレモンの香気成分であるリモネンもモノテルペンに属している⁸⁾。

本研究において、我々はクスノキ科植物に口腔内細菌に対する抗菌活性を求め、*P. gingivalis* と *A.*

viscosus に対し抗菌活性を示す物質の検索を行い、活性本体を単離し構造を deacetyl laurenobillide であると明らかにした。さらに、歯周病原性菌とウ蝕原性菌に対する抗菌活性を検討した結果、抗菌物質であるトリクロサンのように強い活性では無いが laurenobiolide 類に歯周病原性菌とウ蝕原性菌に対し抗菌活性が認められた。

今回、我々がゲッケイジュの葉より得た、deacethyl laurenobiolide の実用化を期待するものである。

II. 実験材料と方法、および結果

1. クスノキ科 (*Lauraceae*) 薬用植物の歯周病原性菌に対する抗菌活性のスクリーニング

(1) クスノキ科薬用植物の試料の抽出

材料: クスノキ (*Cinnamomum camphora*)、ニッケイ (*Cinnamomum sieboldii*)、セイロンニッケイ (*Cinnamomum zeylanicum*)、ジャワニッケイ (*Cinnamomum burmannii*)、テンダイウヤク (*Lindera strychnifolia*) とゲッケイジュ (*Laurus nobilis*)

抽出溶媒: メタノール、水、酢酸エチル、ブタノール

抽出方法: 上記6種類の植物の葉と枝をそれぞれ分け、細かく剪断し別々にメタノール溶液に浸して室温にて抽出を行った。抽出したメタノール溶液は葉や枝を除去した後、メタノール溶液をエバポレーターで濃縮した。濃縮した葉のメタノールエキス、また枝のメタノールエキスは水に溶解する物質と酢酸エチルに溶解する物質とに分けるため、分液ロートを使用し水と酢酸エチルで振り分けた。さらに、水に溶解する物質を水とブタノールに溶解する物質に振り分けた。そこで、植物の葉、または枝のメタノール溶液から酢酸エチルに溶解する物質、水に溶解する物質と、ブタノールに溶解する物質の含まれるそれぞれ3種類のエキスを得た。このようにして1種類の植物から6種類の抽出エキスを得た。最終的には36種の抽出エキスを得ることができた。これらの抽出エキスの歯周病原性菌 *Porphyromonas gingivalis* と *Actinomyces viscosus* にたいする抗菌活性実験をディスク法にて、嫌気培養条件下でおこなった。

(2) 歯周病原性菌 *Porphyromonas gingivalis* と

Actinomyces viscosus に対する36種類の抽出エキスの抗菌活性スクリーニング

実験材料：葉と枝の抽出エキス36種類（クスノキの酢酸エチル抽出エキス、クスノキの水抽出エキス、クスノキのブタノール抽出エキス、ニッケイの酢酸エチル抽出エキス、ニッケイの水抽出エキス、ニッケイのブタノール抽出エキス、セイロンニッケイの酢酸エチル抽出エキス、セイロンニッケイの水抽出エキス、セイロンニッケイのブタノール抽出エキス、ジャワニッケイの酢酸エチル抽出エキス、ジャワニッケイの水抽出エキス、ジャワニッケイのブタノール抽出エキス、テンダイウヤクの酢酸エチル抽出エキス、テンダイウヤクの水抽出エキス、テンダイウヤクのブタノール抽出エキスとゲッケイジュの酢酸エチル抽出エキス、ゲッケイジュの水抽出エキス、ゲッケイジュのブタノール抽出エキス。それぞれのエキスにつき葉と枝があるため36種類となる）。

使用菌類：*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277、*Actinomyces viscosus*（明海大学歯学部分離株）。

使用培地：ミューラーヒントンSヒツジ血液寒天培地（栄研薬品、東京）、変法 GAM 寒天培地（日水製薬、東京）。

実験方法：*P. gingivalis* をミューラーヒントンSヒツジ血液寒天培地に接種し、アネロパックジャー（三菱ガス化学、東京）内で、Aneropack・嫌気

（三菱ガス化学）を用い嫌気培養条件下37℃、暗所にて10日間前培養を行った。培養して得た菌を掻きとり、リン酸緩衝液に溶解し、リン酸緩衝液で10倍希釈をくりかえし菌液を調整した。菌液を血液寒天培地に撒き、その上に8mmのペーパーディスクを置きDMSOで溶解した抽出エキスをペーパーディスクに40μl 載せ前培養と同じ条件で14日間培養を行った後、ペーパーディスク周囲に観察される阻止円の測定を行った。阻止円は直径で計測を行った。ペーパーディスクの直径が8mmなので阻止円の観察されない場合は8mmとした。結果を表1に示す。試料の全ての酢酸エチル抽出エキスに*P. gingivalis* に対し抗菌活性が認められた。

A. viscosus を変法 GAM 寒天平板培地に接種し、上記嫌気培養条件下で4日間前培養を行った。前培養した菌を掻きとり、リン酸緩衝液に溶解し、菌液を調整した後、変法 GAM 寒天平板培地に撒き、8mmのペーパーディスクを置き、DMSOで溶解した抽出エキスをペーパーディスクに40μl 載せて7日間同条件で嫌気培養を行った後、阻止円の測定を行った。実験結果を表2に示す。*A. viscosus* に対しゲッケイジュ葉の酢酸エチル抽出エキスのみ抗菌活性を示した。

表1 Antimicrobial Activity (Inhibitory Area) against *P. gingivalis*

	Branches			Leaves		
	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O
<i>C. sieboldii</i>	12.0 [22.3]	16.4 [21.9]	14.5 [24.9]	13.0 [22.8]	12.0 [24.0]	8.0 [20.4]
<i>C. camphora</i>	14.2 [24.2]	15.8 [27.0]	8.0 [20.0]	11.2 [28.0]	11.2 [26.0]	8.0 [27.6]
<i>C. zeylanicum</i>	11.5 [27.2]	17.0 [17.3]	9.0 [19.5]	27.0 [42.2]	13.5 [19.6]	8.0 [19.8]
<i>C. burmanni</i>	13.4 [21.4]	16.0 [24.8]	12.5 [25.6]	27.0 [20.6]	13.5 [23.0]	8.0 [29.9]
<i>Lindera strychnifolia</i>	16.4 [23.0]	8.0 [20.9]	8.0 [23.1]	17.9 [22.7]	17.6 [17.8]	8.0 [19.2]
<i>Laurus nobilis</i>	20.0 [17.6]	14.6 [21.2] 26.4 [21.2]	8.0 [27.2]	24.6 [16.6]	14.0 [20.7]	8.0 [20.0]

mm [mg]

表2 Antimicrobial Activity (Inhibitory Area) against *Actinomyces viscosus*

	Branches			Leaves		
	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O
<i>C. sieboldii</i>	8.0 [2.1]	8.0 [5.3]	8.0 [9.0]	weak [4.1]	8.0 [6.4]	weak [3.8]
<i>C. camphora</i>	8.0 [7.7]	8.0 [5.4]	8.0 [6.2]	8.0 [13.0]	8.0 [10.6]	8.0 [8.1]
<i>C. zeylanicum</i>	8.0 [2.7]	8.0 [2.5]	8.0 [2.1]	weak [6.2]	weak [2.3]	weak [3.2]
<i>C. burmannii</i>	8.0 [2.7]	8.0 [3.2]	weak [2.1]	8.0 [4.5]	8.0 [2.4]	weak [3.8]
<i>Lindera strychnifolia</i>	8.0 [11.5]	8.0 [7.1]	8.0 [9.4]	8.0 [9.4]	8.0 [8.7]	8.0 [5.7]
<i>Laurus nobilis</i>	8.0 [18.2]	8.0 [8.8]	8.0 [9.3]	12.0 [9.6]	8.0 [12.7]	8.0 [6.6]

mm [mg]

2. ゲッケイジュ葉酢酸エチル抽出エキスからの抗菌活性物質の単離と構造決定

材料と方法: 図1にあるように、ゲッケイジュ葉の酢酸エチル抽出エキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ *A. viscosus* に対する抗菌活性を指標に分離精製を繰り返し行い、さらに図1に示した条件で高速液体クロマトグラフィーにかけ分離精製し、compound A と表した抗菌活性物質を単離した。

目的とする抗菌活性物質を *P. gingivalis* だけでなく *A. viscosus* にも抗菌活性をしめしたゲッケイジュ葉の酢酸エチル抽出物に求めた理由を以下に説明する。*A. viscosus* は菌の菌面に Biofilm (菌垢) が形成される際に初期段階で菌面に付着し他の口腔内細菌がさらに付着しやすくなる環境をつくる細菌であることから、*A. viscosus* にも抗菌活性を示すということは、Biofilm の形成を予防するという観点からより口腔衛生につながると考えられたからである⁹⁾。

結果: 図1に示してある目的とした抗菌活性物質 compound A の構造を deacetyl laurenobiolide (compound 1) と決定した (図2)。構造決定に関しては、“Natural Product Research” Vol.25, no.14, August 2011, 1295-1303に掲載した。

また、deacetyl laurenobiolide のアセチル化により laurenobiolide (compound 2) を誘導した (図3)。さらに、deacetyl laurenobiolide の7位と8位を閉環し合成した、新規化合物 deacetyl laurenobiolide

cyclization compound (compound 3) を得た (図4)。

以上実験については、上記論文に詳細が記載されている¹⁰⁾。

3. ペーパーディスク法による deacetyl laurenobiolide (compound 1)、laurenobiolide (compound 2) と deacetyl laurenobiolide cyclization compound (compound 3) の歯周病原性菌とウ蝕原性菌に対する抗菌活性実験

(1) ウ蝕原性菌に対する抗菌活性実験

材料: 試料として deacetyl laurenobiolide (compound 1)、laurenobiolide (compound 2)、deacetyl laurenobiolide cyclization compound (compound 3)

使用菌類: ウ蝕原性菌 *Streptococcus salivarius* ILD 5223、*Streptococcus sangius* ILD5224、*Streptococcus mitis* ILD 685、*Streptococcus mutans* IFO13955

使用培地: Brain Heart Infusion 寒天平板培地 (日本ベクトン、ディッキンソン、東京)

実験方法: 4種類のウ蝕原性菌を Brain Heart Infusion (B.H.I.) 寒天平板培地に接種し、37°C、暗所で48時間前培養した。培養した菌を掻きとり、リン酸緩衝液に溶解し、さらにリン酸緩衝液で10倍希釈をくりかえし菌液を調整した。菌液は10⁷cfuになるよう調整した。調整した菌液を100μl 取り B.H.I. 寒天平板培地の上に撒きコンラージ棒で伸転した後8mmのペーパーディスクを載せ、そこに compound 1、compound 2と compound 3の試料をそれぞれのペーパーディスクに1mg/40μlになるよう DMSO で調整して40μl 浸み込ませ、48時間、

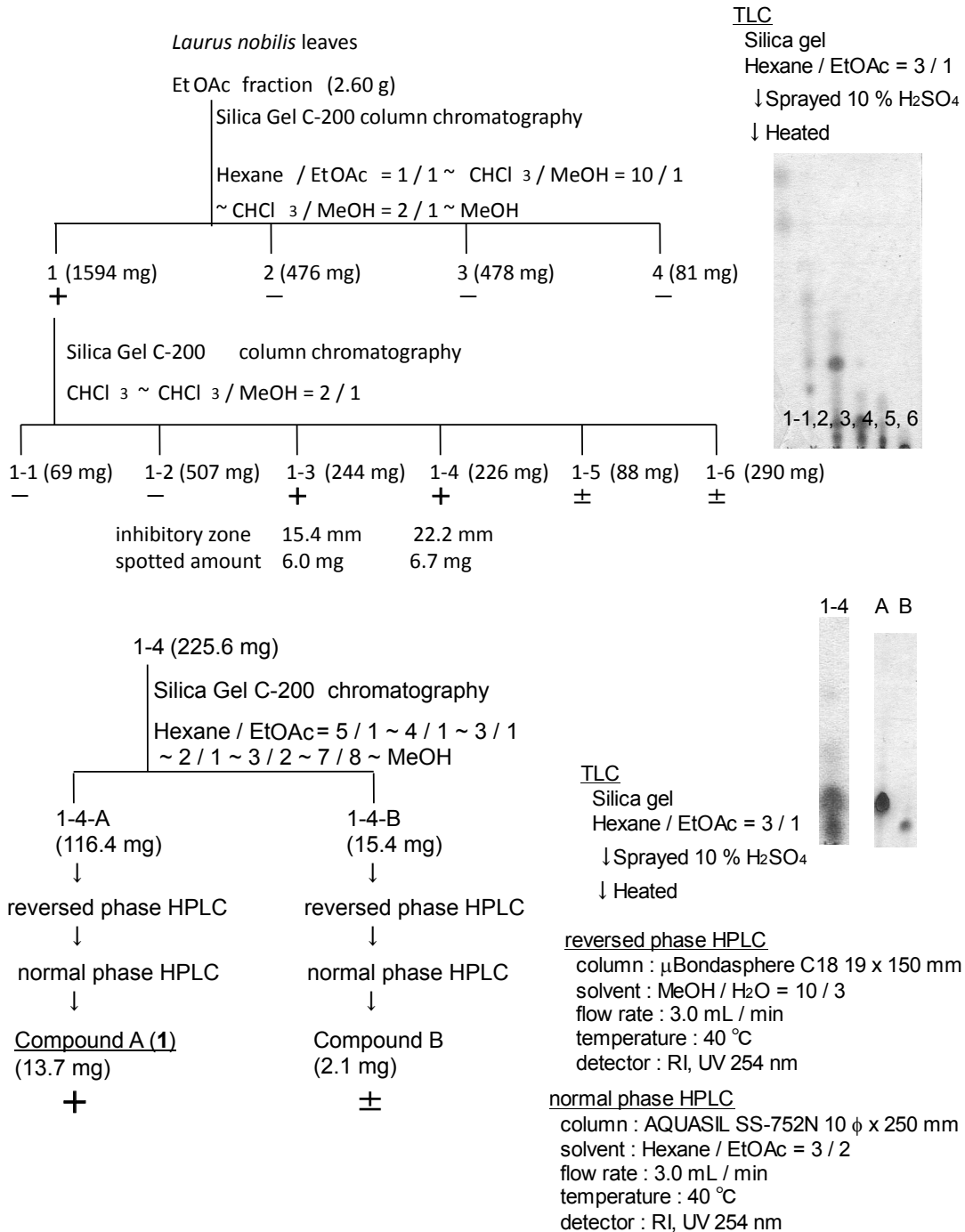


図1 Purification of Antimicrobial Compounds against *Actinomyces viscosus*

37°C、暗所にて、培養後、ペーパーディスクの周囲に観察される阻止円を直径で計測し、抗菌活性の判定結果とした。結果を表3に示す。

(2) 歯周病原性菌に対する抗菌活性実験

材料：試料として deacetyl laurenobiolid (com-

pound 1)、laurenobiolide (compound 2)、deacetyl laurenobiolide cyclization compound (compound 3)

使用菌類：歯周病原性菌 *Actinomyces viscosus* (明海大学歯学部分離株)、*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277、*Prevotella intermedia* ATCC25611、

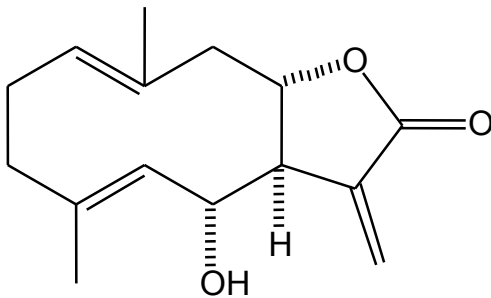
Aggregabacter actinomycetemcomitans Y4,
Fusobacterium nucleatum ATCC25566

使用培地: ミューラーヒントンSヒツジ血液寒天培地、変法 GAM 寒天培地、B.H.I. 寒天平板培地。

実験方法: *A. viscosus* を変法 GAM 寒天平板培地に接種し、前培養をアネロパックジャー内で Aneropack・嫌気を使用し、37℃、暗所にて48時間嫌気培養を行った。培養した菌を掻きとりリン酸緩衝液に溶解し、10倍希釈をリン酸緩衝液で線

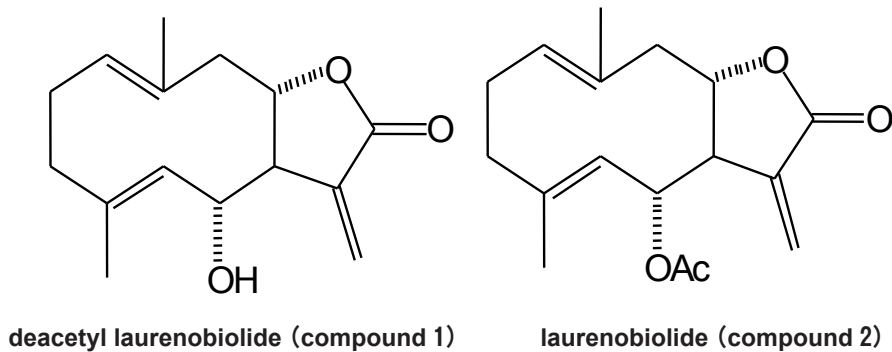
り返し行い菌液の濃度が 5×10^8 cfu になるよう調整した。調整した菌液を100 μ l 取り変法 GAM 寒天平板培地に撒きコンラージ棒で伸転し、その上に8mmのペーパーディスクを置き、1mg/40 μ l になるように DMSO で調整した試料 compound 1、compound 2と compound 3を40 μ l ペーパーディスクに浸み込ませた。菌の培養を前培養と同条件下で48時間行った。培養後ペーパーディスクの周囲に観察される阻止円の測定を行った。結果を表3に示す。

P. gingivalis を、ミューラーヒントンSヒツジ血液寒天平板培地に接種し、上記の嫌気培養条件下で7日間前培養を行った。培養した菌を掻きとりリン酸緩衝液に溶解後、希釈を行い、菌液の濃度を 5×10^8 cfu に調整した。菌液を100 μ l 採取しミューラーヒントンSヒツジ血液寒天平板培地に撒きコンラージ棒で伸転した。その培地の上に8mmのペーパーディスクを置き、1mg/40 μ l になるように DMSO で調整した試料 compound 1、compound 2と compound 3を40 μ l ずつ、それぞれのペーパーディスクに浸み込ませた。菌の培養を



Compound 1

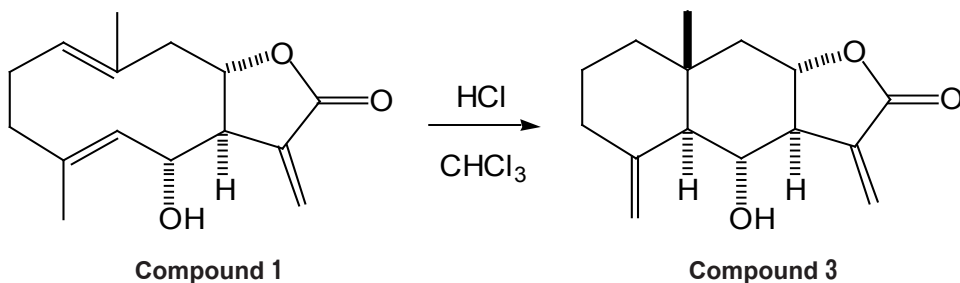
図2 Compound A was identified as deacetyl laurenobiolide



deacetyl laurenobiolide (compound 1)

laurenobiolide (compound 2)

図3 Structures of compounds 1 and 2



Compound 1

Compound 3

図4 Synthesis of compound 3

表3 Antimicrobial effects of Laurenobiolide derivatives

Antimicrobial effect to Cariogenic Pathogens			
	Deacetyl laurenobiolide	Laurenobiolide	Cyclization compound
<i>St. mutans</i>	11.0 x 11.0	0 x 0	0 x 0
<i>St. salivarius</i>	11.2 x 11.2	10.0 x 10.0	14.6 x 14.6
<i>St. sanguis</i>	16.0 x 16.0	16.9 x 16.9	14.0 x 14.0
<i>St. mitis</i>	9.0 x 9.0	17.0 x 17.0	0 x 0 [mm]

Antimicrobial effect to Periodontal Pathogens			
	Deacetyl laurenobiolide	Laurenobiolide	Cyclization compound
<i>A. viscosus</i>	18.2 x 18.0	18.3 x 18.3	16.2 x 16.2
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	39.8 x 39.8	38.4 x 36.0	36.0 x 36.0
<i>P. gingivalis</i>	26.6 x 26.6	25.6 x 25.6	15.2 x 15.2
<i>P. intermedia</i>	25.0 x 25.0	27.7 x 27.9	11.8 x 11.8
<i>F. nucleatum</i>	23.2 x 23.2	16.6 x 16.6	22.2 x 22.2 [mm]

前培養と同条件下で11日間行った。培養後ペーパーディスクの周囲に観察される阻止円の測定を行った。結果を表3に示す。

F. nucleatum の培養には、変法 GAM 寒天培地を用いた。上記の嫌気培養条件下で48時間前培養を行った。培養した菌を掻きとりリン酸緩衝液に溶解後、希釈を行い、菌液の濃度を 3×10^6 cfuとした。菌液を変法 GAM 寒天平板培地に撒き、8mmのペーパーディスクを置き、1mg/40 μ lになるようにDMSOで調整した試料 compound 1、compound 2、compound 3を40 μ lづつ、それぞれのペーパーディスクに浸み込ませた。菌の培養を前培養と同条件下で48時間行った。培養後ペーパーディスクの周囲に観察される阻止円の測定を行った。結果を表3に示す。

A. actinomycetemcomitans の培養に B.H.I. 寒天平板培地を使用した。上記の嫌気培養条件下で4日間前培養を行った。培養した菌を掻きとりリン酸緩衝液に溶解後、希釈を行い、菌液の濃度を 5×10^6 cfuとした。菌液を B.H.I. 寒天平板培地に撒き、8mmのペーパーディスクを置き1mg/40 μ lになるようにDMSOで調整した試料 compound 1、compound 2と compound 3を40 μ lづつ、別々のペー

パーディスクに浸み込ませた。菌の培養を前培養と同条件下で4日間行った。培養後ペーパーディスクの周囲に観察される阻止円の測定を行った。結果を表3に示す。

P. intermedia の培養にはミューラーヒントンSヒツジ血液寒天平板培地を用いた。上記の嫌気培養条件下で5日間前培養を行った。培養した菌を掻きとりリン酸緩衝液に溶解後、希釈を行い、菌液の濃度を 10^7 cfuとした。菌液をミューラーヒントンSヒツジ血液寒天平板培地に撒き、8mmのペーパーディスクを置き、1mg/40 μ lになるようにDMSOで調整した試料 compound 1、compound 2と compound 3を40 μ lづつ、別々のペーパーディスクに浸み込ませた。菌の培養を前培養と同条件下で5日間行った。培養後ペーパーディスクの周囲に観察される阻止円の測定を行った。結果を表3に示す。

4. 歯周病原性菌に対する deacetyl laurenobiolide、laurenobiolide と deacetyl laurenobiolide cyclization compound の最小有効阻止濃度 (MIC)

材料：試料として deacetyl laurenobiolide (compound 1)、laurenobiolide (compound 2)、deacetyl

laurenobiolide cyclization compound (compound 3) と triclosan (トリクロサン) (和光純薬、大阪)

使用菌類: 歯周病原性菌 *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277、*Prevotella intermedia* ATCC25611、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4、*Actinomyces viscosus* (明海大学歯学部分離株)

使用培地: ミューラーヒントンS ヒツジ血液寒天培地、変法 GAM 寒天培地、Brain Heart Infusion (B.H.I.) 寒天平板培地、変法 GAM ブイヨン培地 (日水製薬)、Brain Heart Infusion プロス (日本ベクトン、ディッキンソン)

実験方法: 試料の調整: 5 ml の試験管を10本並べ、最初の 5 ml の試験管に変法 GAM ブイヨン培地 1.9ml を入れ、そこに DMSO で溶解した試料を 0.1ml 加え 2 ml とした。この時、試料 compound 1、compound 2、compound 3 とトリクロサンの濃度は 0.5mg/ml になるよう DMSO で調整して加えた。最初に試料を入れ 2 ml にした試験管の培地をよく混和した後、ピペットでそこから 1 ml 採取し、次に並べてある変法 GAM ブイヨン培地 1 ml の入った 5 ml の試験管に採取した 1 ml を注入する。このことにより、2 番目の 5 ml の試験管の試料濃度は最初の試料濃度 0.5mg/ml の 1/2 の濃度 0.025mg/ml になる。このようにして試料濃度を倍々希釈して 10 本目まで希釈した。

P. gingivalis の菌液の調整。ミューラーヒントン S ヒツジ血液寒天培地に *P. gingivalis* を接種し 10 日間前培養をアネロパックジャー内でアネロパック・嫌気を使用し嫌気培養で行った。培養した菌を掻きとりリン酸緩衝液で溶解した後、希釈を行い 10^6 cfu に調整したものをを用いた。倍々希釈された濃度の試料の入った試験管全てに調整した菌液を 10 μ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、暗所で 48 時間嫌気培養を同条件下でおこなった。培養後、液体培地の懸濁を目視で判定し、懸濁していない培地の最小試料濃度を最小有効阻止濃度とした。結果を表 4 に示す。

P. intermedia の菌液の調整。ミューラーヒントン S ヒツジ血液寒天培地に *P. intermedia* を接種し 5 日間前培養をアネロパックジャー内でアネロパック・嫌気を使用し行った。菌を掻きとりリン

酸緩衝液で溶解した後、希釈を行い 10^8 cfu に調整したものをを用いた。*P. intermedia* での MIC 実験の希釈培養培地には変法 GAM ブイヨン培地を用いた。倍々希釈された濃度試料の入った試験管全てに調整した菌液を 10 μ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、暗所で 48 時間嫌気培養を同条件下でおこなった。培養後、液体培地の懸濁を目視で判定し、懸濁していない培地の最小試料濃度を最小有効阻止濃度とした。結果を表 4 に示す。

A. actinomycetemcomitans の菌液の調整。B.H.I. 寒天平板培地に *A. actinomycetemcomitans* を接種し、アネロパックジャー内でアネロパック・嫌気を使用し、4 日間、前培養した菌を掻きとりリン酸緩衝液で溶解した後、希釈を行い 10^8 cfu に調整したものをを用いた。*A. actinomycetemcomitans* の MIC 測定には、Brain Heart Infusion プロス液体培地を使用した。同様に倍々希釈された濃度の試料の入った試験管全てに調整した菌液を 10 μ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、暗所で 24 時間嫌気培養を同条件下でおこなった。

培養後、液体培地の懸濁を目視で判定し、懸濁していない培地の最小試料濃度を最小有効阻止濃度とした。結果を表 4 に示す。

A. viscosus の菌液の調整。変法 GAM 寒天平板培地に *A. viscosus* を接種し、アネロパックジャー内でアネロパック・嫌気を使用し嫌気培養を 37 $^{\circ}$ C、暗所で 48 時間行った。前培養した菌を掻きとりリン酸緩衝液で溶解した後、希釈を行い 10^8 cfu に調整したものをを用いた。MIC 測定液体培地には変法 GAM ブイヨン培地を使用した。倍々希釈された濃度の試料の入った試験管全てに調整した菌液を 10 μ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、暗所で 24 時間嫌気培養を同条件下でおこなった。培養後、液体培地の懸濁を目視で判定し、懸濁していない培地の最小試料濃度を最小有効阻止濃度とした。結果を表 4 に示す。Laurenobiolide 類の最小有効阻止濃度をトリクロサンと比べると 100~200 倍以上の阻止濃度である。

**表4 Laurenobiolide derivatives MICs ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
against periodontal pathogens**

bacteria	compound 1	compound 2	compound 3	triclosan
<i>P. gingivalis</i>	500.0	250.0	250.0	3.1
<i>P. intermedia</i>	125.0	63.0	250.0	7.8
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	63.0	63.0	125.0	0.2
<i>A. viscosus</i>	375.0	188.0	750.0	3.1

5. 市販洗口剤（5種類）、deacetyl laurenobiolide とトリクロサンの歯周病原性菌とウ蝕原性菌に対する消毒殺菌効果実験。

材料：市販洗口剤：薬用デンターシステマ（ライオン、東京）、GUM メディカルガーグル（サンスター、大阪）、Con Cool（ウエルテック、大阪）、アズノールうがい液（日本新薬、京都）、イソジンガーグル（明治製菓、東京）、deacetyl laurenobiolide、トリクロサン（和光純薬、大阪）。

使用菌類：*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277、*Streptococcus mutans* IFO13955、*Actinomyces viscosus*（明海大学歯学部分離株）。

使用培地：ウマ血液寒天培地（三光純薬、東京）。

実験方法：ウマ血液寒天培地にてそれぞれの菌を7日間前培養した後、菌液の濃度が 10^6 cfu になるよう調整し試験菌液とした。

P. gingivalis と *A. viscosus* は BBL 嫌気シテム（日本ベクトン、ディッキンソン）を用い 37°C 暗所にて7日間嫌気培養した。*St. mutans* 菌は 37°C 、暗所で7日間培養を行った。それぞれの菌を培養した後、掻きとりリン酸緩衝液に溶解し、希釈して菌液の濃度を 10^6 cfu に調整した。

上記5種類の洗口剤をそれぞれの使用説明書に従い希釈し、調整したものを10mL 試験管に9.9mL 分注して検査薬液とした。

検査薬液の中に調整した菌液100 μL を加えよく混和した後、15、30、60、120、180、300秒経過時間毎に検査薬液100 μL を採取して0.9mL の中和液用液体培地の入った試験管に加え混和した。混和した検査薬液を入れた中和液体培地から10 μL 採取してウマ血液寒天培地の上に載せ培養を行い菌の生育の有無を判定した。*P. gingivalis* と *A. viscosus*

の両嫌気性菌には GPLP 液体培地（日本製薬、京都）を検査薬液の中和に、*St. mutans* 菌では検査薬液の中和に SCDLP 液体培地（栄研化学、東京）を使用した。*P. gingivalis* と *A. viscosus* の菌の生育の有無の培養は、BBL 嫌気シテムを用い 37°C 暗所にて7日間行った。また、*St. mutans* 菌の生育の有無の培養は 37°C 暗所で7日間培養を行った。15秒で採取した検査薬液から菌の生育が認められ、30秒経過後に採取した検査薬液に菌の生育が認められなければ、その検査薬液の被検菌に対する消毒殺菌効果を発現させるのに30秒必要であると考えられる。結果を表5に示す。市販洗口剤には全く殺菌作用を示さないものが2種類あった。

Deacetyl laurenobiolide とトリクロサンの殺菌効果については DMSO で溶解し各々500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調整し薬液とした。上記方法にて同様の実験をおこなった。結果を表5に示す。Deacetyl laurenobiolide は歯周病菌に対する殺菌作用が180秒で発現した。トリクロサンは殺菌力のかなり強力な化合物であり15秒で全ての菌に対し抗菌活性を示した。

III. 考察

今回、我々はクスノキ科植物の一種であるゲッケイジュの葉から、歯周病原性菌である *P. gingivalis*、*P. intermedia*、*A. actinomycetemcomitans* や *A. viscosus* に対する抗菌活性物質 deacetyl laurenobiolide を単離し構造を決定した。この化合物の誘導体である laurenobiolide や deacetyl laurenobiolide の閉環物質にも、歯周病原性菌に対する抗菌活性が認められた。

トリクロサンは歯周病原性菌に対する抗菌活性

表5 市販洗口剤の口腔内細菌に対する殺菌作用

Sample	Bacteria	時間 (sec.)					
		15	30	60	120	180	300
薬用デンターシステム	<i>Porohyromomas gingivalis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Actinomyces viscosus</i>	+	+	-	-	-	-
GUM メデイカルガーゲル	<i>Porohyromomas gingivalis</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Actinomyces viscosus</i>	+	+	-	-	-	-
Con Cool	<i>Porohyromomas gingivalis</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Actinomyces viscosus</i>	+	+	+	+	+	+
アズノールうがい液	<i>Porohyromomas gingivalis</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Actinomyces viscosus</i>	+	+	+	+	+	+
イソジンガーゲル	<i>Porohyromomas gingivalis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	-	-	-
	<i>Actinomyces viscosus</i>	+	-	-	-	-	-
deacetyl laurenobiolide	<i>Porohyromomas gingivalis</i>	+	+	+	+	-	-
	<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Actinomyces viscosus</i>	+	+	+	+	+	+
トリクロサン	<i>Porohyromomas gingivalis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Actinomyces viscosus</i>	-	-	-	-	-	-

(+) bacteria growth observed (-) no bacteria growth observed

物質であり、歯磨き粉や口腔ケア商品に配合されている^{11, 12)}。

近年、トリクロサンに対する環境への悪影響が懸念されるようになった。トリクロサンの化学構造から分解されず、環境に蓄積され、ホルモン様物質として環境に作用する可能性があるとして示唆されている¹³⁾。トリクロサンと laurenobiolide 類の歯周病原性菌に対する MIC (最小有効阻止濃度) を検討したところトリクロサンと比較して、それらの MIC はほぼ100倍近い高濃度になったが、長い間食品として愛用され、ゲッケイジュ葉は比較的安全性に信頼性があると言える。この研究により食品であるゲッケイジュの葉にその用途とは異なる口腔内細菌にたいする抗菌活性が存在することを認識することができた。口腔内洗口剤の抗菌殺菌活性実験で、deacetyl laurenobiolide の抗菌活性

発現までに3分間必要であることが認められた。また、laurenobiolide 類に *St. mutans* などのウ蝕原性菌に対しても抗菌活性が認められた事は、口腔内を衛生的に保つという観点から非常に有効である。

温故知新ではないが、改めて身近にあり、馴染みのある生薬に従来の用途以外に有用性が存在することを再発見することができたことは、生薬のさらなる利用価値を再認識させられた。

また、今回の発見が口腔ケア用品に応用されることを期待するものである。さらに、口腔の健康から全身の健康へと繋がることを確信するものである。

文献

- 1) 中原泉、鴨井久一 (編). 口腔と全身疾患—歯科医

- 療は医学を補完する、クインテッセンス出版株式会社、2009
- 2) 奥田克爾 (編). ORAL AND WHOLE BODY HEALTH オーラルヘルスと全身の健康、プロクター・アンド・ギャンプ・ジャパン株式会社、2007、pp7-8
 - 3) 竹中彰治. 洗口液とバイオフィルム、第59回日本口腔衛生学会・総会ランチョンセミナー、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター 10月8日 2010年
 - 4) Pizzo G, La Cara M, et al. The effects of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse on supragingival plaque regrowth, *J Periodontol* 79: 1177-1183, 2008
 - 5) 木村康一、木島正夫. 薬用植物学各論 改稿版 (16版)、廣川書店、1981、pp.114~117
 - 6) Dall'Acqua S, Viola G, et al. Two new sesquiterpene lactones from the leaves of *Laurus nobilis*. *Chem Pharm Bull* 54: 1187-1189, 2006
 - 7) Marazouki H, Piras A, et al. Essential oil composition and variability of *Laurus nobilis* L. growing in Tunisia,, comparison and chemometric investigation of different plant organs. *Nat Prod Res* 23: 343-354, 2009
 - 8) 柴田承二、糸川秀治、他. (編). 薬用天然物質、第1版、南山堂、1982、pp320-338
 - 9) Wolf H, Hassell T. *Color Atlas of Dental Hygiene - Periodontology*. Thieme Stuttgart, New York, U.S.A., 2006, p24
 - 10) Fukuyama N, Ino C, et al. Antimicrobial sesquiterpenoids from *Laurus nobilis* L. *Natural Product Research* 25: 1295-1303, 2011
 - 11) Pangakkos FS, Cummins D: A Dentifrice for the 21st Century, *Inside Dentistry* 2, special issue1, 2006
 - 12) Sanders KA, Greenman J, et al. Ecological effects of triclosan and triclosan monophosphate on defined mixed cultures of oral species grown in continuous culture. *JAC*45, 447-452
 - 13) F.D.A. U.S Food and Drug Administration Web site: www.fda.gov.