

Streptococcus mutans に対する茶葉カテキンの 抗菌作用について

川村 淳*・竹尾忠一*

Antibacterial Activity of Tea Catechin to *Streptococcus mutans*

Jun KAWAMURA* and Tadakazu TAKEO*

* Central Research Institute Itoen, Co., 21 Mekami,
Sagara-cho, Haibara-gun, Sizuoka, 421-05

Catechin fraction A (CF-A) containing (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin, fraction B (CF-B) containing (-)-epicatechin gallate and (-)-epigallocatechin gallate, CF-A and CF-B mixture (CF-mix), and (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) were prepared from green tea by using the method of YAYABE *et al.*, and the antibacterial activity of catechins on the *S. mutans* was investigated. On the antibacterial effects to *S. mutans*, minimal inhibitory concentration (MIC) of CF-A, CF-B, CF-mix, and EGCg was 400 ~ 100, 100 ~ 50, 200 ~ 100, and 100 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively. MIC of chlorohexidine gluconate solution was less than 1.6 $\mu\text{g/ml}$. On the sterilization effect, an addition of 20 mg/ml of CF-B decreased the number of *S. mutans* from 10^7 to 10^2 after 3 min, while a chlorohexidine gluconate solution showed about 10 times higher sterilization activity. Although the antibacterial and sterilization effects of the CF-B were mild compared with those of chlorohexidine gluconate, it may be useful as a natural antibacterial reagent for a dentifrice or a mouthwash liquid etc. due to its reasonable antibacterial activity to *S. mutans*. (Received Aug. 25, 1988)

茶葉ポリフェノールであるカテキン類は茶の可溶成分中最も含有量が多く、主に遊離型カテキンである(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキン、エステル型カテキンである(-)-エピカテキンガレート、(-)-エピガロカテキンガレートの4種から構成されている。またカテキンには抗酸化作用¹⁾⁻⁴⁾・抗菌作用⁵⁾⁻⁸⁾、血中コレステロール増加抑制作用⁹⁾・抗腫瘍作用¹⁰⁾・抗ウイルス作用¹¹⁾¹²⁾などの生理活生作用を有することが報告されている。茶抽出物の抗菌性については、梶本²⁾、丹野らの報告⁵⁾、西山らによる乳酸菌阻害因子の報告⁶⁾、坂中らの茶に含まれる抗虫歯成分⁸⁾、または茶以外のカテキン類を用いた研究では森らのフラボン類の抗菌活性と作用機構について⁷⁾など報告されている。

これまでのう蝕に対するさまざまな研究により口腔内細菌のうち連鎖球菌の一種のみがう蝕誘発能を持つこと

が明らかとなり、これらに共通した性状としてマンニトとソルビットを発酵し、スクロースから菌体外グルカンを合成することによって歯のエナメル質表面に強固に付着できること、およびほとんどの実験動物でう蝕を惹起できることなどが知られている。一般的にこの細菌は *S. mutans* と呼ばれているが血清学的に a ~ h の8つの型に分類され、さらに COYKENDALL¹³⁾ は血清型 c/e/f 型を *S. mutans*, d/g/h 型を *S. sobrinus*, a 型を *S. cricentus*, b 型を *S. rattus*, c 型の一部を *S. ferus* としている。特に世界各地でヒトのう蝕病巣からもっとも多く分離されるのは血清型 c/e/f 型の *S. mutans* であり、このうち全分離菌の70~100%はc型菌である。

そこで我々は茶カテキンの新たな利用法を検討するため、ヒトのう蝕にもっとも重要と思われるc型菌の *S.*

* 株式会社伊藤園 中央研究所 (〒421-05 静岡県榛原郡相良町女神21)

mutans, *Ingbritt* に対する抗菌活性を試験し、さらにはう蝕予防剤としての利用を前提としたいいくつかの試験を行ったので報告する。

実験方法

1. 実験材料および供試菌

粗カテキンは良辺ら¹³⁾の方法で A 分画 (CF-A と略)・B 分画 (CF-B と略) に分けて分離・濃縮し、凍結乾燥したものを試料とした。CF-A の遊離型カテキン [(−)-エピカテキン・(−)-エピガロカテキン] の純度は 80.3% W/V, CF-B のエステル型カテキン [(−)-エピカテキンガレート・(−)-エピガロカテキンガレート] の純度は 81.5% W/V のものを使用した。また A 分画・B 分画を等量ずつ混ぜこれと粗カテキンミックス (CF-mix と略) とした。純カテキンとして (−)-エピガロカテキンガレート (EGCg と略) を HPLC を用いて分離・精製し純度 90.1% W/V のものを試料とした。

またグルコン酸クロルヘキシジン・ラウリル硫酸ナトリウム・D-ソルビトール・安息香酸ナトリウムなどは市販試薬を用い、これらおよび以下注釈のない試薬はいずれも和光純薬工業より購入した。

供試菌は県立神奈川歯科大学短期大学部微生物学教室より分譲された *Streptococcus mutans*, *Ingbritt* (血清型 c 型) を 3 世代以上継代したものをを使用した。

2. 生育阻害最低濃度の検定

培地は通常の細菌用の培地ではカテキンを添加した際タンパク質などが沈殿するため、タンパク質を極力少なくし、かつ *S. mutans* が十分に増殖可能な培地 (Yeast nitrogen base W/O Amino acids Difco 社製 4g・Dextrose Difco 社製 2.5g・硫酸アンモニウム 2.5g・ポリペプトン S 大五栄養化学社製 1g・リン酸一カリウム 0.5g・水 1000 ml を水酸化ナトリウム溶液で pH 7.1 に調製。これを以後カテキン用培地と略す) を考案し使用した。

このカテキン用培地を試験管に 9/10 量入れ、別に作製しておいた試料の希釈系列を 1/10 量添加し、これにブレインハートインヒュージョンブイオン培地 (日水製薬社製) で 24 時間培養した供試菌を一滴ずつ接種し、その後 37°C 24 時間培養した。

生育阻害の判定は島津自記分光光度計 UV-240 を用い 660 nm での吸光度を測定し、試料を添加しないコントロールとの比較により判定した。

3. 殺菌活性の検定

カテキン用培地に *S. mutans* を接種し 37°C 24 時間培養したのち、ブレインハートインヒュージョン寒天培地 (日水製薬社製) で初菌数のプレートカウントを行い、その菌液に試料の希釈系列を添加し 3 分間後に添加後の菌数のプレートカウントを行った。

4. カテキンの抗菌作用におよぼす歯磨剤の主成分の影響

カテキン用培地を試験管に 9/10 量入れ、別に作成しておいた CF-B の希釈系列を 1/20 量添加し、さらに試験を行なう歯磨剤の成分の希釈系列を 1/20 量添加し、これにブレインハートインヒュージョンブイオン培地で 24 時間培養した供試菌を一滴ずつ接種し、その後 37°C 24 時間培養した。

生育阻害の判定は 2 と同様に 660 nm での吸光度を測定し判定した。

実験結果および考察

1. カテキンの生育阻害最低濃度

S. mutans に対するカテキンの生育阻害最低濃度 (Minimal inhibitory concentration 以後 MIC と略す) は試験によって多少ばらつきがでたが、Table 1 に示すように CF-A は $n=10$ で試験した結果 400~100 $\mu\text{g/ml}$ であった。また CF-B は $n=30$ で試験した結果 100~50 $\mu\text{g/ml}$ であった。また CF-mix では $n=10$ で試験した結果 200~100 $\mu\text{g/ml}$ であった。また EGCg は $n=3$ で試験した結果 100~50 $\mu\text{g/ml}$ であった。これは水溶液中にカテキンが 0.01~0.04% W/V 含まれるだけで増殖を抑制することとなり、抗菌剤として十分な効力を持つといえる。また遊離型カテキン (CF-A) よりエステル型カテキン (CF-B) の方がより抗菌活性が高かった。さらに両者のミックスしたものはほぼ中間の値を示した。また EGCg は CF-B とほぼ同じ濃度で生育阻害を示した。

これらの結果により以後の実験は CF-B を中心に行った。

2. カテキンの殺菌効果

S. mutans に対する殺菌効果の検定は歯磨剤などへの使用を前提として行った。

カテキン剤としては CF-B を試験した結果、Table 2 に示すように $2.5 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ の添加では初菌数 3.3×10^7 が 7.0×10^6 に、 $5.0 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ では 5.5×10^5 、 $1.0 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ では 3.6×10^4 、 $2.0 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ では 1.0×10^2 にまで減少した。

Table 1 Minimal inhibitory concentration (MIC) of catechin

Sample type	Sample concentration ($\mu\text{g/ml}$)							MIC
	800	400	200	100	50	25	12.5	
CF-A	-	-	±	+	+	+	+	400~100 $\mu\text{g/ml}$
CF-B	-	-	-	-	+	+	+	100~ 50 $\mu\text{g/ml}$
CF-mix	-	-	-	+	+	+	+	200~100 $\mu\text{g/ml}$
EGCg	-	-	-	-	+	+	+	100~ 50 $\mu\text{g/ml}$

Symbols in the table represent the degree of multiplication of *S. mutans*.

- ; No

± ; Scanty

+ ; Moderate

+

+

Table 2 Sterilizing action of crude catechin fraction B

Number of <i>S. mutans</i>	Sample concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	2.0×10^4	1.0×10^4	5.0×10^3	2.5×10^3
Before addition	3.3×10^7			
After addition	1.0×10^2	3.6×10^4	5.5×10^5	7.0×10^6

Sterilizing action of crude catechin fraction B to *S. mutans* was tested by counting the decreasing number of *S. mutans*. The number of *S. mutans* was counted before and 3 min after the addition of crude catechin fraction B.

Table 3 The sterilizing action and MIC of chlorohexidine gluconate

Number of <i>S. mutans</i>	Sample concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	2000	1000	500	250
Before addition	3.3×10^7			
After addition	3.0×10^3	1.0×10^4	7.8×10^5	1.6×10^6
MIC	$1.5625 \mu\text{g/ml} <$			

Sterilizing action of a chlorohexidine gluconate solution to *S. mutans* was tested by counting the decreasing number of *S. mutans*. The number of *S. mutans* was counted before and 3 min after the addition of each chlorohexidine gluconate solution.

ちなみに現在口内菌抑制剤として使用されているグルコン酸クロルヘキシジンの MIC は Table 3 に示すように $1.6 \mu\text{g/ml}$ 以下で、また殺菌効果の検定は初菌数 3.3×10^7 が $2.0 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ で 3.0×10^3 にまで減少した。

これらから CF-B は水溶液中に 2% W/V の濃度で $1/330\,000$ 、1% W/V で $1/1\,000$ 、0.5% W/V で $1/60$ まで菌数が減少することから、口内菌抑制剤として有効な殺菌効果を持つといえよう。

3. カテキンの抗菌作用におよぼす歯磨剤の主成分の影響

次に歯磨剤などのう蝕予防剤としての利用を検討する

ため、歯磨剤に含まれる主な成分が CF-B による MIC に影響を与えるかを試験した。

その結果を Fig. 1 に示す。発泡剤として多く使用されているラウリル硫酸ナトリウムを $10 \mu\text{g/ml}$ 以下添加した場合はカテキンの生育阻害に影響はみられず、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上ではラウリル硫酸ナトリウムの MIC ($100 \mu\text{g/ml}$) と同じ値に変わった。これらからラウリル硫酸ナトリウムは CF-B の生育阻害効果に影響を与えないと思われた。

また湿潤剤として多く使用されている D-ソルビトール (ソルビット) は Fig. 2 に示すように $1.0 \times 10^3 \mu\text{g/}$

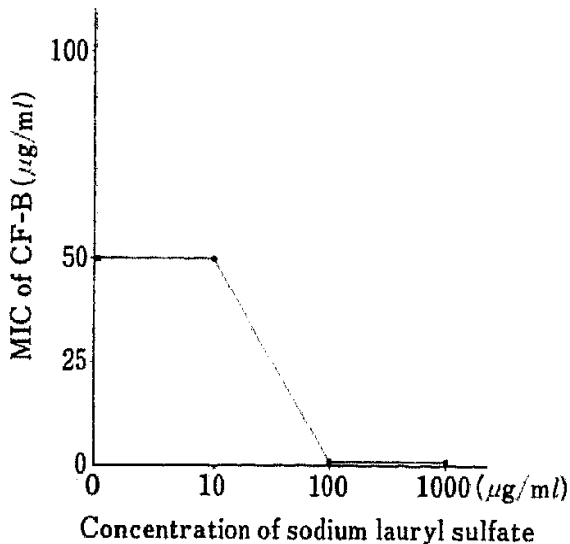


Fig. 1 Effect of sodium lauryl sulfate concentration on the MIC of CF-B

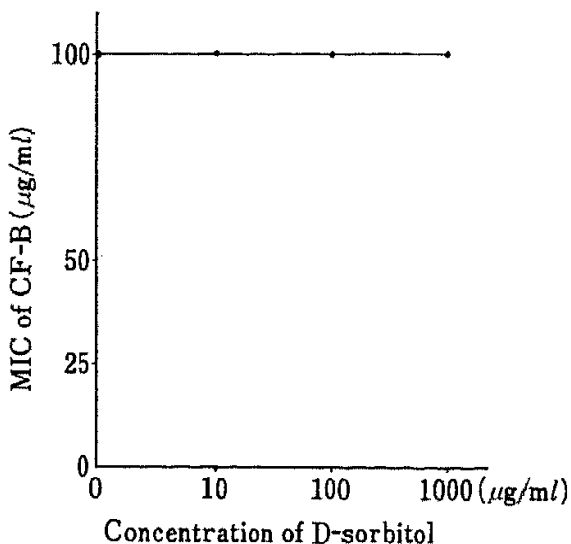


Fig. 2 Effect of D-sorbitol concentration on the MIC of CE-B

ml以下の添加ではカテキンの生育阻害に影響はみられずD-ソルビトール自体のMICは $1.0 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ でも生育は阻害しなかった。これらからD-ソルビトールはCF-Bの生育阻害効果に影響を与えないと思われた。

また保存料として多く使用されている安息香酸ナトリウムは、Fig. 3に示すようにそれ自体のMICは $1.0 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ であったが、カテキンと合せて安息香酸ナトリウムを $1.0 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 以上添加した場合カテキンのMICは $25 \mu\text{g/ml}$ となり、安息香酸ナトリウムはCF-Bの生育阻害効果に対して相乗作用があると考えられた。

研磨剤は水に不溶なのでCF-Bの生育阻害効果に影響

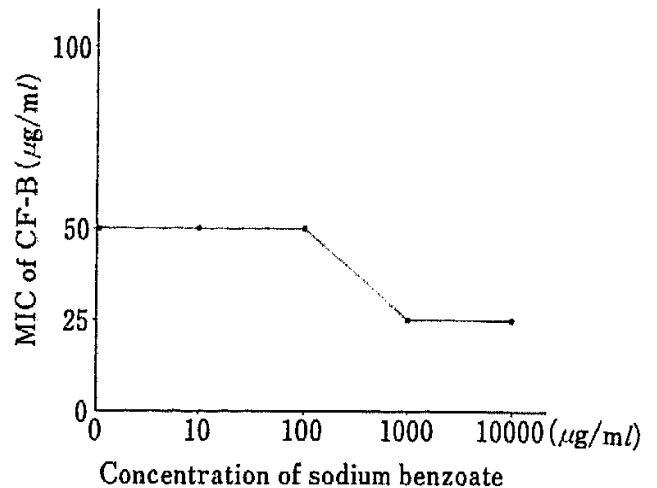


Fig. 3 Effect of sodium benzoate concentration on the MIC of CF-B

響を与えないと思われる。

粘結剤は加熱殺菌では成分が変化する可能性が高く、かつメンブランフィルター等による除菌では粘度がフィルターを通らないなどの理由により試験不可能で、また歯磨剤などにおける含有量は0.5~3.0%と僅かでカテキンの抗菌作用にあまり影響を与えないと考えられたため試験しなかった。

以上の結果により、CF-Bを0.01% W/V添加すると*S. mutans*の増殖が抑制され、0.5%添加ではほとんど殺菌され、2%添加ではほぼ完全に殺菌できることが明らかとなり、う蝕予防剤として十分な効力を有すると思われた。

要 約

茶葉より抽出したカテキン遊離型画分〔(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキン〕である粗カテキンA分画(CF-Aと略)、エステル型画分〔(-)-エピカテキンガレート、(-)-エピガロカテキンガレート〕である粗カテキンB分画(CF-Bと略)、それらの混合物であるCF-mix、および(-)-エピガロカテキンガレート(EGCg)の*S. mutans*に対する抗菌作用について試験し、グルコン酸クロルヘキシジンの抗菌作用と比較した。またう蝕予防剤としての利用を前提としたいくつかの試験を行ない、次の結果を得た。

(1) 生育阻害最低濃度はCF-Aで $400 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 、CF-Bで $100 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 、CF-mixで $200 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 、EGCgで $100 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 、およびグルコン酸クロルヘキシジンで $1.6 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

(2) 殺菌効果の検定では初菌数 3.3×10^7 にCF-Bを

5.0×10^3 , 1.0×10^4 , 2.0×10^4 $\mu\text{g/ml}$ ずつの添加で 5.5×10^5 , 3.6×10^4 , 1.0×10^2 にそれぞれ減少し, グルコン酸クロルヘキシジンでは初菌数 3.3×10^7 に 2.0×10^3 $\mu\text{g/ml}$ 添加で 3.0×10^3 に減少した.

(3) カテキンの抗菌作用におよぼす歯磨剤主要成分の影響はラウリル硫酸ナトリウムおよび D-ソルビトールでは影響はみられず, 安息香酸ナトリウムは僅かに相乗作用がみられた.

なお, 当研究にあたり *Streptococcus mutans*, *Ingbritt* を分譲して頂いた神奈川県立神奈川歯科大学短期大学部微生物学教室, および御指導して頂いた生化学教室中山義之教授に謝意を表します.

文 献

- 1) 松崎妙子・原 征彦：農化, 59, 129 (1985).
- 2) 梶本五郎：日食工誌, 10, 1 (1963).
- 3) 梶本五郎：日食工誌, 10, 3 (1963).
- 4) 梶本五郎：日食工誌, 10, 365 (1963).
- 5) 丹野憲二・野々村英夫：日食工誌, 21, 445 (1974).
- 6) 西山隆造・小崎道雄：農化, 48, 83 (1984).
- 7) 森 彰久・西野親生・小林考次・榎 伸康：日本農芸化学会昭和 61 年度大会講演要旨集. p. 336, 京都 (1986).
- 8) 坂中専二・伊藤よし美・金 式柞・山本式彦・谷口 誠：日本農芸化学会中部支部第 99 回例会講演要旨集, p. 11, 三重, (1987).
- 9) 福興真弓・原 征彦・村松敬一郎：日本栄養・食糧学会誌, 39, 495 (1986).
- 10) KADA, T., MATUZAKI, S., MATUZAKI, T., and HARA, Y: *Mutat. Res.*, 150, 127 (1985).
- 11) 岡田文雄：日本植物病理学会報, 37, 29 (1971).
- 12) 岡田文雄/古谷弘三：茶業技術研究, 42, 39 (1971).
- 13) COYKENDALL, A.L: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 26 (1985).
- 14) 良辺文久・衣笠 仁・竹尾忠一：日本農芸化学会昭和 61 年度大会講演要旨集. p. 336, 京都 (1986).

(昭和 63 年 8 月 25 日受理)