

# 口腔内及び食品関連有害細菌に対するハーブ・スパイス抽出物の バイオフィルム殺菌活性

塚谷 忠之\*1 坂田 文彦\*1 黒田 理恵子\*1 赤尾 哲之\*2

## Biofilm Eradication Activity of Herb and Spice Extracts Alone and in Combination Against Oral and Food-Borne Pathogenic Bacteria

Tadayuki Tsukatani, Fumihiko Sakata, Rieko Kuroda, Tetsuyuki Akao

微生物が産生するバイオフィルムは、う蝕や歯周病などの感染症、食品変敗、食中毒の大きな要因となっている。そこで、本研究では新たに開発したバイオフィルム殺菌活性スクリーニング法を用いて、104種類のハーブ及びスパイスのエタノール抽出液から口腔細菌（う蝕菌，歯周病菌）及び食中毒菌（大腸菌，黄色ブドウ球菌）が産生するバイオフィルムに対して殺菌活性を有する素材の選抜を試みた。その結果，クローブとユーカリ，あるいはクローブとローズマリーのエタノール抽出液を併用することで，相加的あるいは相乗的殺菌効果により口腔細菌及び食中毒菌産生バイオフィルムの制御が可能であることが明らかとなった。クローブ，ユーカリ，ローズマリーの主要活性成分はそれぞれオイゲノール，マクロカルパール類，カルノシン酸と推定された。

### 1 はじめに

バイオフィルムとは，微生物が菌体外に多糖類を中心とする成分を産生することで固体表面に付着して堆積し，除去しにくい固まりの状態になった微生物の集合体のことである。バイオフィルムは，虫歯や歯周病などの口腔内疾病の大きな要因となっている。また，食品業界でも食品の変敗や食中毒を防止するためにバイオフィルムの制御は大きな課題となっている。このため，特に安全性の高い食材から抗バイオフィルム素材を探索する研究が活発化している。

そこで，本研究では96ピンマイクロプレート（フタ）へのバイオフィルム形成法と水溶性テトラゾリウム塩WSTを用いた微生物検出法を組み合わせたバイオフィルム殺菌活性スクリーニング法を使用して，ハーブ及びスパイスのエタノール抽出液からバイオフィルム殺菌活性を有する素材の探索を行った。

### 2 研究，実験方法

#### 2-1 バイオフィルムの形成

96ウェルマイクロプレートへバイオフィルム形成用培地で調製した微生物懸濁液を分注し，これに96ピンマイクロプレート（フタ）を被せて37℃で一定時間

インキュベーションし，96ピンへバイオフィルムを形成させた。バイオフィルム産生菌として，大腸菌 *Escherichia coli* NBRC15034，歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* JCM12257，黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* NBRC13276，う蝕菌 *Streptococcus mutans* NBRC13955を用いた。

#### 2-2 バイオフィルム殺菌活性の測定

ミュラーヒントンブロス (MHB) 190 µl及びエタノール抽出液10 µlを分注した96ウェルマイクロプレートへ，バイオフィルムを形成させた96ピンマイクロプレート（フタ）を被せ，20時間インキュベーションした。さらに，96ピンに形成させたバイオフィルムを滅菌生理食塩水で3回洗浄後，WST検出試薬含有MHBへ移し，一定時間反応させた。2～5時間反応後，マイクロプレートリーダーを用いて受けプレートの吸光度測定 (460 nm)を行った。阻害率はコントロールの吸光度に対するサンプルの吸光度の比から求めた。阻害率99%以上をバイオフィルム殺菌活性ありと判定した。また，阻害率99%以上を示す被検試料の最小濃度を最小バイオフィルム殺菌濃度 (MBEC) とした。

#### 2-3 併用効果

併用効果は Fractional Inhibition Concentration (FIC) index を用いて算出した。FIC は，相乗： $\leq 0.5$ ，相加： $> 0.5$ ，1.0<，不関： $\geq 1.0$ ，4.0<，拮抗： $\geq 4.0$ と定義した。

\*1 生物食品研究所

\*2 株式会社久留米リサーチ・パーク

### 3 結果と考察

#### 3-1 バイオフィルム殺菌活性を有するハーブ及びスパイスの探索

ハーブ及びスパイスのエタノール抽出液104種類を本スクリーニング法へ適用し、大腸菌、歯周病菌、黄色ブドウ球菌、う蝕菌産生バイオフィルムに対する殺菌活性を測定した。4菌株のうち1菌株以上に対して殺菌活性（99 %以上）を示したハーブ・スパイスは18種類であった。このなかで、クローブは大腸菌、歯周病菌、う蝕菌のバイオフィルムに対して、ユーカリは歯周病菌、黄色ブドウ球菌、う蝕菌のバイオフィルムに対して、ローズマリーは歯周病菌及びう蝕菌のバイオフィルムに対して99 %以上の殺菌活性を示した。しかし、4菌株すべてのバイオフィルムに殺菌活性を有するハーブ・スパイスは得られなかった。

#### 3-2 ハーブ・スパイスの併用によるバイオフィルム制御

そこで、大腸菌、歯周病菌、黄色ブドウ球菌、う蝕菌の産生バイオフィルムに対して、クローブとユーカリ、あるいはクローブとローズマリーのエタノール抽出液の併用効果を検討した。表1に示すように、クローブとユーカリの併用では、歯周病菌のFIC=0.38、う蝕菌のFIC=0.50であり、相乗効果を示した。大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対するFICは0.5~1.0であり、相加効果を示した。

表1 クローブとユーカリ抽出液の併用効果

バイオフィルム産生菌	クローブ	ユーカリ	クローブとユーカリの併用		
	MBEC (µg/ml)	MBEC (µg/ml)	MBEC (µg/ml)	FIC	併用効果
大腸菌	871	>1572	435.5 / 786	>0.5 and <1.0	相加
歯周病菌	435.5	49.1	54.4 / 12.3	0.38	相乗
黄色ブドウ球菌	>1742	393	108.9 / 196.5	>0.5 and <1.0	相加
う蝕菌	871	393	217.8 / 98.3	0.50	相乗

一方、クローブとローズマリーの併用では、いずれも菌株に対しても FIC は 0.5~1.0 であり、相加効果を示した（表2）。

表2 クローブとローズマリー抽出液の併用効果

バイオフィルム産生菌	クローブ	ローズマリー	クローブとローズマリーの併用		
	MBEC (µg/ml)	MBEC (µg/ml)	MBEC (µg/ml)	FIC	併用効果
大腸菌	871	>1564	435.5 / 782	>0.5 and <1.0	相加
歯周病菌	435.5	195.5	217.8 / 6.1	>0.5 and <1.0	相加
黄色ブドウ球菌	>1742	1564	871 / 782	>0.5 and <1.0	相加
う蝕菌	871	97.8	435.5 / 1.5	0.52	相加

#### 3-3 ハーブ及びスパイス成分の最小バイオフィルム殺菌濃度

クローブ、ユーカリ、ローズマリーの代表的なエタノール可溶性抗菌成分であるオイゲノール、マクロカルパール類、カルノシン酸の最小バイオフィルム殺菌濃度 (MBEC) を表3に示す。オイゲノールは大腸菌及び歯周病菌へ活性を示した。マクロカルパール類及びカルノシン酸は、歯周病菌、黄色ブドウ球菌、う蝕菌へ活性を示した。

表3 ハーブ及びスパイス成分の最小バイオフィルム殺菌濃度

活性成分	大腸菌	歯周病菌	黄色ブドウ球菌	う蝕菌
クローブ				
オイゲノール	800	800	>800	>800
ユーカリ				
マクロカルパールA	>800	6.25	50	25
マクロカルパールB	>800	3.125	50	50
マクロカルパールC	>800	12.5	50	400
ローズマリー				
カルノシン酸	>800	25	200	12.5

(µg/ml)

さらに、4菌株に対するオイゲノールとマクロカルパール類、あるいはオイゲノールとカルノシン酸の併用効果を調べた（データ未掲載）。オイゲノールとマクロカルパール類の併用では、歯周病菌及びう蝕菌に相乗効果、大腸菌及び黄色ブドウ球菌に相加効果を示した。一方、オイゲノールとカルノシン酸の併用では、いずれの菌株についても相加効果を示した。この結果は、表1及び2のエタノール抽出液の結果と一致しており、クローブ、ユーカリ、ローズマリーの主要活性成分はそれぞれオイゲノール、マクロカルパール類、カルノシン酸と推定された。

### 4 まとめ

クローブ（オイゲノール）とユーカリ（マクロカルパール類）、あるいはローズマリー（カルノシン酸）の併用は、幅広い菌種のバイオフィルム制御に有効であることが明らかとなった。

### 5 掲載論文

Current Microbiology, Vol. 77, No. 9, pp. 2486-2495 (2020)