

バイオフィルム殺菌活性を有する食材(エタノール抽出物)の探索： 甘草の主要フラボノイドであるグラブリジン単独およびε-ポリ-L-リジン併用 におけるバイオフィルム殺菌活性

塚谷 忠之*¹ 黒田 理恵子*¹ 川口 友彰*¹

Screening biofilm eradication activity of ethanol extracts from foodstuffs: Potent biofilm eradication activity of glabridin, a major flavonoid from licorice (*Glycyrrhiza glabra*), alone and in combination with ε-poly-L-lysine

Tadayuki Tsukatani, Rieko Kuroda, Tomoaki Kawaguchi

微生物が産生するバイオフィルムは、歯周病やう蝕（虫歯）など口腔感染症の原因となることが知られている。そこで、本研究ではバイオフィルム殺菌活性スクリーニング法を用いて、薬用植物を含む155種類の食材のエタノール抽出物からバイオフィルム殺菌活性を有する食材の選抜を試みた。その結果、甘草のエタノール抽出物が歯周病菌及びう蝕菌の産生バイオフィルムに対して高い殺菌活性を示した。甘草のエタノール抽出物の主要活性成分は glabridin と推察された。さらに、glabridin と ε-poly-L-lysine を併用することで黄色ブドウ球菌、大腸菌、緑膿菌を含めた幅広い菌種の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。

1 はじめに

バイオフィルムは、微生物や微生物が産生する菌体外物質などが集合してできた構造体である。歯の表面に形成されるプラークはバイオフィルムの代表例であり、歯周病やう蝕（虫歯）など口腔感染症の原因となることが知られている。

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用いて、薬用植物を含む155種類の食材のエタノール抽出物からバイオフィルム殺菌活性を有する食材の探索を行った。

2 研究、実験方法

2-1 バイオフィルムの形成

バイオフィルム形成用培地で調製した微生物懸濁液を96ウェルマイクロプレートへ分注し、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下記5菌株を使用した。

- ・歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* JCM12257
- ・う蝕菌 *Streptococcus mutans* NBRC13955

- ・黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* NBRC13276

- ・大腸菌 *Escherichia coli* NBRC15034

- ・緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275

2-2 バイオフィルム殺菌活性の測定

96ウェルマイクロプレートへミューラーヒントンブロス(MHB)190μl及び食材エタノール抽出液10μlを分注し、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、37℃で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生理食塩水で3回洗浄後、検出試薬含有MHBを分注した受けプレートへ移し、一定時間反応させた。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(460nm)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（成分）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：≤0.5、相加（不関）：>0.5、拮抗：≥4.0 と定義した。

3 結果と考察

3-1 バイオフィルム殺菌活性を有する食材の探索

*1 生物食品研究所

食材のエタノール抽出物155種類を本スクリーニング法へ適用し、歯周病菌及び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ところ、両バイオフィルムに対して99%以上の殺菌活性を示したのは甘草と黄柏であった。さらに、甘草は黄色ブドウ球菌産生バイオフィルムにも99%以上の殺菌活性を示した。しかし、甘草は大腸菌及び緑膿菌産生バイオフィルムに対して殺菌活性を示さなかった。

3-2 甘草成分の最小バイオフィルム殺菌濃度

甘草の代表的なエタノール可溶性抗菌成分である glabridin, licochalconeA, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritin, isoliquiritigenin の最小バイオフィルム殺菌濃度 (MBEC) を表1に示す。Glabridin は歯周病菌、う蝕菌及び黄色ブドウ球菌産生バイオフィルムへ高い殺菌活性を示した (MBEC=25~50)。一方、大腸菌及び緑膿菌産生バイオフィルムに対しては活性を示さなかった (MBEC>400)。この結果は、甘草のエタノール抽出物のバイオフィルム殺菌活性の結果と一致しており、甘草の主要活性成分は glabridin と推定された。

3-3 Glabridin及びε-poly-L-lysineの併用効果

Glabridinはグラム陰性菌である大腸菌及び緑膿菌

の産生バイオフィルムに対しては活性を示さなかった。そこで、グラム陰性菌に対して殺菌効果が期待できる ε-poly-L-lysine (ε-PL) と glabridin の併用効果を検討した。表2に示すように、ε-PLは単独で大腸菌及び緑膿菌産生バイオフィルムに対して殺菌活性を示した (MBEC=25, 400)。ε-PLと glabridin の併用では相乗効果を示さなかったものの (FIC: ≥1.0, 2.0<), グラム陰性菌に対する拮抗作用はなかったことから、両者の併用は可能であることが確認された。一方、glabridinとε-PLの併用により、う蝕菌ではFIC=0.5, 黄色ブドウ球菌ではFIC<0.50を示し、これらの併用による相乗効果が示された。

4 まとめ

甘草の主要活性成分である glabridin と ε-PL の併用により幅広い菌種のバイオフィルムの制御が可能であることが示された。特に、両者の併用は特にグラム陽性菌産生バイオフィルムの殺菌に対して有効であった。

5 掲載論文

World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 38, Article number 24 (2022).

表1 甘草成分の最小バイオフィルム殺菌濃度

甘草成分 (μg/ml)	う蝕菌 <i>S. mutans</i>	歯周病菌 <i>P. gingivalis</i>	黄色ブドウ球菌 <i>S. aureus</i>	大腸菌 <i>E. coli</i>	緑膿菌 <i>P. aeruginosa</i>
Glabridin	25	25	50	>400	>400
LicochalconeA	200	25	200	>400	>400
Liquiritin	>400	>400	>400	>400	>400
Liquiritigenin	>400	>400	>400	>400	>400
Isoliquiritin	>400	>400	>400	>400	>400
Isoliquiritigenin	>400	>400	>400	>400	>400

表2 Glabridin及びε-poly-L-lysineの併用効果

バイオフィルム 産生菌	Glabridin	ε-Poly-L-lysine	併用 (glabridin and ε-poly-L-lysine)		
	MBEC (μg/ml)	MBEC (μg/ml)	MBEC (μg/ml)	FIC	効果
<i>S. mutans</i>	25	400	6.25 / 100	0.5	相乗
<i>S. aureus</i>	50	>400	12.5 / 25	<0.5	相乗
<i>P. gingivalis</i>	25	>400	25 / 0 - 400	≥1.0 and <2.0	相加(不関)
<i>E. coli</i>	>400	25	0 - 400 / 25	≥1.0 and <2.0	相加(不関)
<i>P. aeruginosa</i>	>400	400	0 - 400 / 400	≥1.0 and <2.0	相加(不関)