

ユーカリノキ (*Eucalyptus globulus*) の齲蝕原因菌に対する抗菌活性 及びグルコシルトランスフェラーゼ阻害効果

大澤 謙二,^a 佐伯 貴央,^a 安田 英之^a
森田 博史,^b 竹谷 孝一,^b 糸川 秀治^b

^a (株) ロッテ中央研究所, ^b 東京薬科大学薬学部

Antibacterial Activity of *Eucalyptus globulus* on Cariogenic Bacteria and its Inhibitory Effect on Glucosyltransferase

KENJI OSAWA,^a TAKAHISA SAEKI,^a HIDEYUKI YASUDA,^a
HIROSHI MORITA,^b KOICHI TAKEYA^b and HIDEJI ITOKAWA^b

^aDepartment of Basic Research, Lotte Central Laboratory Co., Ltd., 3-1-1 Numakage, Urawa, Saitama 336, Japan

^bDepartment of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1
Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

(Received April 30, 1997)

The leaves of *Eucalyptus globulus* contain unique macrocarpals consisting of a phrologlucinol and sesquiterpene having an antibacterial activity on oral bacteria and an inhibitory effect on glucosyltransferase (GTase). In this paper, a 60% ethanol extract of *E. globulus* leaves (extract A) and its EtOAc-soluble fraction (extract B) containing most of macrocarpals were examined for the cariostatic effects *in vitro*. The extracts A and B inhibited the growth of cariogenic bacteria at concentrations of 6.25-50 and 3.13-25 µg/ml, respectively, but their antibacterial activities on the intestinal bacteria were relatively low. The extracts A and B strongly inhibited the glucan synthesis, especially adhesive-insoluble glucan synthesis by GTase prepared from *S. sobrinus* 6715.

Keywords—*Eucalyptus globulus*; macrocarpal; antibacterial activity; cariogenic bacteria; mutans Streptococci; intestinal bacteria; glucosyltransferase

ユーカリノキ (*E. globulus*) は、オーストラリアに自生する常緑高木である。葉にはシネオールを主成分とするユーカリ油を含有し、去痰剤や喘息時の吸入剤として用いられるほか、蚊の忌避剤として利用されている。前報¹⁾において、ユーカリノキ葉抽出物及びその成分である macrocarpal 類は口腔内細菌に対して強い抗菌活性を示し、さらに齲蝕原因菌の産生するグルコシルトランスフェラーゼ (GTase) 阻害効果を有することをみいだした。そこで今回、さらにユーカリノキ抽出物の基礎的な抗齲蝕効果を確認することを目的として、ユーカリノキ葉の 60%エタノール抽出物 (エキス A) 及び高 macrocarpal 含有画分である酢酸エチル可溶部 (エキス B) を調製し、各エキス中の macrocarpal A, B, C の含有量を明らかにするとともに、その齲蝕原因菌

(ミュータンス連鎖球菌) 及び腸内細菌に対する抗菌活性及び *Streptococcus sobrinus* 6715 の産生する GTase により生成する 3 種類のグルカン (付着性不溶性, 非付着性不溶性, 水溶性グルカン) に対する阻害効果の検討を行った。

実験の部

1. 実験材料

材料 ユーカリノキ (*E. globulus*) 葉はカリス成城 (東京) より購入した。緑茶は静岡産市販品を用いた。

試薬 Thymol は Sigma 社製を用いた。

2. 試験試料の調製

1) ユーカリノキ抽出物の調製: ユーカリノキ葉は細切した後、水蒸気蒸留により精油分を除去し、乾燥、粉碎したものを用いた。粉末ユーカリノキ葉

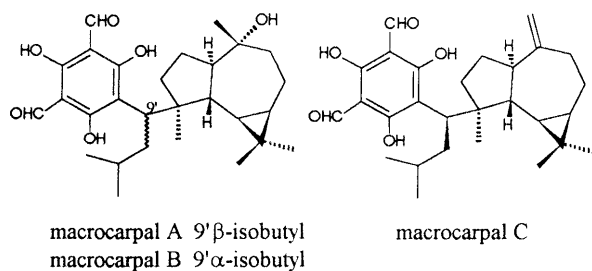


Fig. 1. Structure of Macrocarpal A, B and C

1kg を 10 l の 60% エタノールで還流抽出を行い、濾液を減圧濃縮、さらに凍結乾燥を行うことにより抽出物 215g が得られた。本抽出物はエキス A とし、試験に用いた。さらに、エキス A 50g を水(2000ml) - 酢酸エチル(2000ml) で 3 回分配し、酢酸エチル可溶部を減圧濃縮することにより、抽出物 20.8g が得られた。本画分は macrocarpal 類を高濃度に含有するものであり、エキス B として同様に試験に用いた。

2) 緑茶抽出物の調製：緑茶 100g を粉碎した後、80℃の熱水で 1 時間抽出を行い、抽出液を濾別、凍結乾燥することにより、抽出物 25g が得られた。本抽出物を緑茶抽出物とし、試験に用いた。

3. 試験試料の分析

1) 試料溶液の調製：分析試料約 20mg を精秤、ネジ栓付き試験管に入れ、メタノール 10ml を加えた。超音波処理 (10 分間) を行った後、メンブランフィルター (0.22μm) で濾過したものを試料溶液とした。

2) HPLC 条件：ポンプは島津 LC-9A 高压グラジエントシステム、検出器は島津 SPD-6AV、インテグレーターは島津 C-R4A を使用した。カラム；Senshu Pak ODS-1251-SH (4.6 φ × 250mm, 5μm, センシユー科学)。移動相；メタノール - 10% 酢酸水混合液 (85 : 15 → 90 : 10 ; 0 ~ 15 分, 90 : 10 → 100 : 0 ; 15 ~ 20 分, 100 : 0 ; 20 ~ 35 分)。流速；1ml/分, カラム温度；40℃, 検出波長；275nm, 注入量；20μl。

3) 検量線：macrocarpal A, B, C は、前報¹⁾に示した方法により単離したものを、24 時間室温で減圧乾燥させ用いた。個々の化合物の検量線は絶対検量線法により求めた。回帰方程式及び相関係数を以下に示した。

macrocarpal A ; $y = 2.940 \times 10^{-8}x - 4.066 \times 10^{-5}$ ($r = 0.9997$), macrocarpal B ; $y = 4.031 \times 10^{-8}x + 8.932 \times 10^{-5}$ ($r = 0.9993$), macrocarpal C ; $y = 3.545 \times 10^{-8}x + 1.022 \times 10^{-4}$ ($r = 0.9986$), x はピーク面積, y は濃度 (mg/ml)。

4. 試験菌株及び使用培地

齧蝕原因菌 (*Streptococcus mutans* MT8148R, Ingbritt, *S. sobrinus* 6715, B13, *Streptococcus sanguis* ATCC 10566, *Streptococcus salivarius* ATCC 9759, *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Lactobacillus casei* ATCC 393) は brain heart infusion (BHI) 寒天培地 (DIFCO) を用いて継代を行い、好氣的に培養を行った。腸内細菌 (*Bifidobacterium longum* JCM 1217, *Bifidobacterium adreuscentis* M101-4, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741, *Eubacterium aerofaciens* S-601, *Bacteroides fragilis* M-601, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Clostridium difficile* JCM 1296, *Clostridium butyricum* ATCC 14823) は EG 寒天培地²⁾を用いて継代を行い、嫌氣的 (CO₂ 100%) に培養を行った。すべての菌は継代後 3 日間培養したものを試験に用いた。

5. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

1) 試料液の調製：試料規定量にエタノール及び滅菌水を加えた後、超音波処理し、試料を分散させたものを試料液とした。エタノール濃度は 2% とした。

2) 試験菌液の調製：齧蝕原因菌は試験菌を BHI 液体培地に接種し、37℃, 24 時間好氣的に培養を行った。2 倍濃度で調製した BHI 液体培地にそれぞれの前培養菌液を 50 分の 1 量接種したものを試験菌液とした。腸内細菌は、EGF 液体培地²⁾に接種し、37℃, 48 時間で嫌気培養 (CO₂ 100%) を行った。2 倍濃度で調製した PYFG 液体培地²⁾にそれぞれの前培養菌液を接種したものを試験菌液とした。

3) 試験方法：96 穴マイクロプレート中で 2% エタノール溶液を用いて試料液の 2 倍希釈系列 (100μl) を調製した (コントロールとして 2% エタノール溶液を用いた)。試験菌液 100μl を各ウェルに添加し、齧蝕原因菌は 37℃ で 24 時間好氣的に、腸内細菌は 48 時間嫌氣的 (CO₂ 10%、H₂ 10%、N₂ 80%) に培養した。菌の増殖は、マイクロプレートリーダーにより吸光度 (550nm) を測定することにより判定し、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

6. 齧蝕原因菌に対する生育阻害効果の検討

試料規定量をエタノールに溶解または分散させたものを試料液とした。*S. mutans* MT8148R を BHI

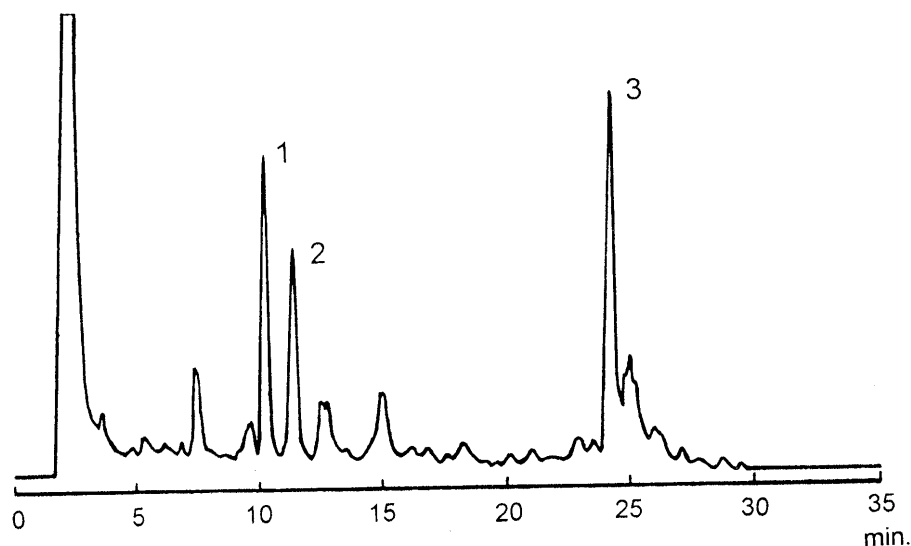


Fig. 2. HPLC Chromatogram of Extract A from *E. globulus*
Peaks: 1, macrocarpal A; 2, macrocarpal B; 3, macrocarpal C

液体培地に接種し、37℃、24 時間好氣的に培養を行ったものを菌液とした。グラスチューブに BHI 液体培地を 4.9ml ずつ分注し、滅菌した後、試料液 50μl (ブランクはエタノール 50μl) 及び菌液 50μl を添加し、37℃で好氣的に培養した。規定時間培養した後、培養液を滅菌生理食塩水により希釈し、BHI 平板上に塗抹した。BHI 平板は 37℃で 48 時間好氣的に培養し、平板上のコロニーの数よりそれぞれの試料濃度及び作用時間における Colony forming units (CFU)/ml を求めた。

7. GTase 阻害効果の検討

1) グルカンの生成：試験方法は前報¹⁾に従った。試料規定量を 50%メタノールで溶解し、さらに 50%メタノールで適宜希釈したものを試料溶液とした。62.5mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.5) 中に、sucrose 1.25%, アジ化ナトリウム 0.025%を加えたものを基質溶液とした。試料溶液 40μl, 基質溶液 800μl, GTase

粗酵素 20μl, 精製水 140μl をグラスチューブ中で混合し、水平面に対して 30 度に傾け、37℃で 16 時間静置しグルカンを生成させた。

2) 付着性不溶性, 非付着性不溶性, 水溶性グルカンの分離：反応終了後、デカンテーションにより反応上清液を除去し、さらに精製水 4ml で 2 回緩やかに洗浄した。グラスチューブに 0.5N 水酸化ナトリウム 4ml を加え、37℃, 1 時間振とうし、グルカンを溶解させたものを付着性不溶性グルカン溶液とした。反応上清液及び洗浄液をあわせ、遠心分離 (11000g, 15min, 4℃) し、沈殿と上清液とに分離した。沈殿に 0.5N 水酸化ナトリウム 4ml を加え、37℃, 1 時間振とうし、溶解させたものを非付着性不溶性グルカン溶液とした。上清液にエタノールを加え (最終濃度が 60%), -20℃で 2 時間静置し、析出する水溶性グルカンをメンブランフィルター (0.22μm) で分離した。水溶性グルカンの付着したフィルターに 0.5N 水酸化ナトリウム 4ml を加え、37℃, 1 時間振とう, グルカンを溶解させ、水溶性グルカン溶液とした。

3) グルカンの定量：各グルカン溶液中のグルカン量は、フェノール硫酸法³⁾により全糖量を定量することにより求めた。適宜希釈した各グルカン溶液 1ml に 5%フェノール水溶液 1ml を加え、さらに濃硫酸 5ml を加えた。10 分後に攪拌, 冷却し、さらに 10 分後に 490nm の吸光度を測定した。グルコース溶液

TABLE I. Contents of Macrocarpal A, B and C in Extracts A and B from *E. globulus*

Sample	Content (%)			Total
	M-A	M-B	M-C	
Extract A	0.98	1.02	1.67	3.67
Extract B	2.22	2.29	3.96	8.47

M-A, macrocarpal A; M-B, macrocarpal B;
M-C, macrocarpal C

TABLE II. Antibacterial Activity of Extracts A and B from *E. globulus* against Cariogenic Bacteria

Sample	MIC ^a (μg/ml)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Extract A	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	25	6.25	25	50
Extract B	6.25	6.25	3.13	6.25	3.13	12.5	6.25	12.5	25
Tea extract	>400	>400	400	200	400	>400	>400	>400	>400
Thymol	200	200	400	200	400	200	200	200	400

^aBacterial species: A, *S. mutans* MT8148R; B, *S. mutans* Ingbritt; C, *S. sobrinus* 6715; D, *S. sobrinus* B13; E, *S. sanguis* ATCC 10566; F, *S. salivarius* ATCC 9759; G, *S. mitis* ATCC 9811; H, *E. faecalis* ATCC 19433; I, *L. casei* ATCC 393

TABLE III. Antibacterial Activity of Extracts A and B from *E. globulus* against Intestinal Bacteria

Sample	MIC ^a (μg/ml)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Extract A	200	100	200	200	200	200	200	400	200
Extract B	50	50	100	100	50	100	100	200	50
Thymol	100	100	200	200	100	200	200	200	200

^aBacterial species: A, *B. longum* JCM 1217; B, *B. adreuscentis* M101-4; C, *L. acidophilus* ATCC 4356; D, *L. salivarius* ATCC 11741; E, *E. aerofaciens* S-601; F, *B. fragilis* M-601; G, *C. perfringens* ATCC 13124; H, *C. difficile* JCM 1296; I, *C. butyricum* ATCC 14823.

を用い検量線を作成し、全糖量の定量を行った。

結果と考察

1. ユーカリノキ抽出物中の macrocarpal A, B, C 含有量

ユーカリノキ葉は、1%程度の精油(ユーカリ油)を含有するが、ユーカリ油は齧蝕原因菌に対しては抗菌活性は弱く、(MIC; *S. mutans* Ingbritt: >200μg/ml, *S. sobrinus* 6715: >200μg/ml) GTase 阻害活性もみられなかったことから、水蒸気蒸留によりユーカリ油を除去した後、エキスの抽出を行った。前報¹⁾において、我々は *E. globulus* 葉よりフロログルシノール誘導体である macrocarpal A, B, C, D, H, I, J 及び eucalyptone を単離した。これらの成分の中で macrocarpal A, B, C の含有量が有意に高いことより、今回その含有量を明らかにする目的で、HPLC による定量を試みた。ODS-カラムを用い、MeOH-10% 酢酸溶液混合系で溶出させることにより良好なクロマトグラムが得られた。エキスA分析時のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。そこで macrocarpal A, B, C を用い検量線を作成し、その含有量を算出した。各成分の定量結果を Table I に示した。抽出物A及びB中の macrocarpal A, B, C 含有量は、それぞれ 0.98,

1.02, 1.67%及び 2.22, 2.29, 3.96%であった。最も含有量の高い成分は macrocarpal C であり、以下 macrocarpal B, A の順であった。また、エキスB中にはエキスAのほぼ2.3倍の macrocarpal 類が含まれていた。エキスA 50 g よりエキスBは 20.8 g 得られることより、エキスA中の macrocarpal 類はほぼ全量エキスBに移行していることがわかった。

2. 齧蝕原因菌及び腸内細菌に対する抗菌活性

我々は、ユーカリノキの齧蝕原因菌 (*S. mutans*, *S. sobrinus*) に対する抗菌活性成分として macrocarpal 類を単離した。その中で macrocarpal A, B, C は他のフロログルシノール誘導体と比較し、強い抗菌活性を有することを報告した。¹⁾ 今回試料に用いたエキスA及びB中には macrocarpal A, B, C がトータル量として 3.67%, 8.47% 含まれており、その抗菌活性を評価するため齧蝕原因菌(ミュータンス連鎖球菌)に対する抗菌活性試験を行った。エキスA及びBの齧蝕原因菌に対する抗菌活性試験結果を Table II に示した。エキスA及びBの MIC 値は、それぞれ 6.25-50μg/ml, 3.13-25μg/ml であり、いずれの菌株に対しても強い抗菌活性を示した。エキスBはエキスAの約2.3倍の macrocarpal 類を含有することから、

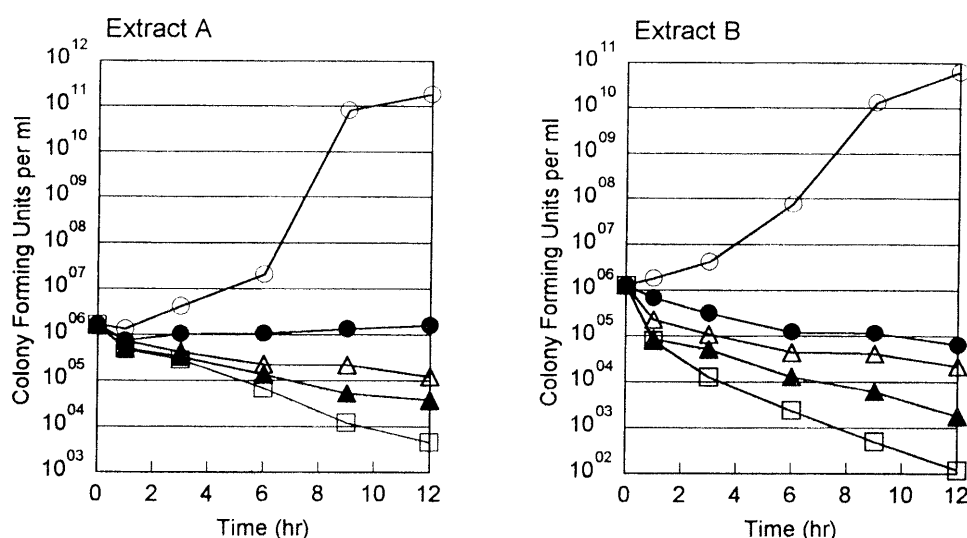


Fig. 3. Relationship between Surviving Cells (*S. mutans* MT8148R) and Exposure Time to Extracts A and B from *E. globulus* in BHI Medium. Symbols: ○, control; ●, 10mg/ml; △, 50mg/ml; ▲, 100mg/ml; □, 200mg/ml.

MIC 値も 9 菌株中 6 菌株において半分の値を示した。緑茶抽出物は (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate 等のカテキン類を含有しており、齧蝕原因菌に対して抗菌活性を有することが知られている。⁴⁾ しかし今回の試験においてそれほど強い抗菌活性はみられず、いずれの菌株においても MIC 値は 200 μ g/ml 以上であった。

次に、ユーカリノキ抽出物を口腔内で用いることを考慮し、腸内細菌に対する抗菌活性の検討を行った。試験結果を Table III に示した。今回試験に用いた腸内細菌に対して、その MIC 値はエキス A で 100-400 μ g/ml, エキス B で 50-200 μ g/ml であった。齧蝕原因菌に対する抗菌活性と比較すると、その MIC 値は大きく、ユーカリノキエキスに対する腸内細菌の感受性は、比較的低いことがわかった。対照物質として用いた thymol は齧蝕原因菌、腸内細菌いずれに対しても MIC 値は 200 μ g/ml 程度であり、感受性にそれほど差はみられなかった。

3. 齧蝕原因菌に対する生育阻害効果

ユーカリノキエキスの齧蝕原因菌に対する抗菌活性をさらに詳細に検討するために、ユーカリノキエキスを添加した BHI 培地中に *S. mutans* MT8148R を接種後一定時間作用させ、生菌数の推移を調べた。試験結果を Fig. 3 に示した。エキス A は 10 μ g/ml で *S. mutans* MT8148R の増殖を阻害するが、12 時間作用後においてもほとんど生菌数は減少しなかった。

また添加濃度の増加に伴い、生菌数の減少効果がみられるが、200 μ g/ml で 12 時間作用させた場合においても菌数はゼロにはならなかった。エキス B においては、エキス A と比較して作用の増強傾向が認められたが、各添加濃度における生菌数の推移はほぼ同様であった。以上の結果より、ユーカリノキエキスは低濃度で齧蝕原因菌に対して強い増殖抑制効果を示すが、その作用は殺菌的でなく、むしろ静菌的であることがわかった。このような作用特性は長期間の適用においても口腔内の菌叢を著しく変化させる可能性が少ないことから、抗齧蝕素材として局所での応用に適したものと考えられる。

4. GTase によるグルカン生成に及ぼす効果

S. soburimus の培養上清には、不溶性グルカン生成酵素である GTase-I, 水溶性グルカン生成酵素である GTase-Sa 及び -Sb が存在する。⁵⁾ これらの酵素の複合作用により、蔗糖を基質として齧蝕発生に大きく関与する付着性不溶性グルカンが形成されることが知られている。⁶⁾ そこで今回、ユーカリノキエキスのグルカン生成阻害効果を詳細に検討するために、酵素反応を行った後、付着性不溶性グルカン、非付着性不溶性グルカン、水溶性グルカンに分離、定量し、それぞれのグルカン生成に対する阻害効果の検討を行った。試験結果を Table IV に示した。付着性不溶性グルカン生成に関してはエキス A 及び B は濃度依存的に非常に強い阻害効果を示し、コン

TABLE IV. Inhibitory Effects of Extracts A and B from *E. globulus* for Glucan Synthesis by GTase

Sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Amount of glucan synthesis (μg)			
		AIG	IIG	SG	TG
Control		873 $\pm$ 15	320 $\pm$ 34	97 $\pm$ 5	1290
Extract A	10	421 $\pm$ 6	195 $\pm$ 4	311 $\pm$ 2	927
	50	95 $\pm$ 12	211 $\pm$ 22	217 $\pm$ 27	523
	100	18 $\pm$ 2	298 $\pm$ 9	143 $\pm$ 22	459
Extract B	10	270 $\pm$ 9	215 $\pm$ 3	299 $\pm$ 5	784
	50	94 $\pm$ 12	198 $\pm$ 9	222 $\pm$ 22	514
	100	19 $\pm$ 2	260 $\pm$ 11	179 $\pm$ 12	458
Tea extract	10	814 $\pm$ 13	160 $\pm$ 9	165 $\pm$ 12	1139
	50	698 $\pm$ 33	142 $\pm$ 5	191 $\pm$ 8	1031
	100	614 $\pm$ 32	126 $\pm$ 6	218 $\pm$ 13	958

Each value represents the mean $\pm$ SD. AIG, adhesive insoluble glucan; IIG, inadhesive insoluble glucan; SG, soluble glucan; TG, total glucan.

コントロールの生成量が 873 μg であるのに対して、それぞれ 50 $\mu\text{g/ml}$ の添加で 95, 94 μg , 100 $\mu\text{g/ml}$ の添加で 18, 19 μg にまで低下した。また、これらの濃度において、エキス A 及び B に阻害活性の差がみられないことから、macrocarpal 類以外の極性成分も、グルカンの生成阻害に関与していることが示唆された。緑茶抽出物はその成分であるカテキン類の作用により GTase 阻害効果を有することが知られているが、⁷⁾ 同様に試験を行い、効果の比較を行ったところ、50 $\mu\text{g/ml}$ の添加においても付着性不溶性グルカンの生成量は 698 μg であり、コントロールと比較して 20% 程度の阻害効果であった。非付着性不溶性グルカン産生に関してはエキス A 及び B とはいずれの濃度においてもコントロールより減少していたが、濃度依存性はみられなかった。水溶性グルカン産生に関しては、ユーカリノキエキスの添加量の増加にともない産生量の減少がみられたが、その減少の度合いは小さかった。しかも、コントロールと比較するとむしろ生成量は増加していた。これはユーカリノキエキスの添加により不溶性グルカンが一部水溶性グルカンに変化したためと考えられる。よって、ユーカリノキエキスはすべてのグルカンの生成量を減少させているわけではなく、齧蝕の発生に大きく関わる付着性不溶性グルカンの産生を特異的に抑制していることがわかった。

以上の結果より、ユーカリノキエキスはインビト

ロ試験において、齧蝕原因菌（ミュータンス連鎖球菌）に対する強い抗菌活性とその定着に大きく関与する付着性不溶性グルカン産生阻害活性を合わせ持つことから、齧蝕予防素材としての有用性が示唆された。

引用文献

- 1) K. Osawa, H. Yasuda, H. Morita, K. Takeya, H. Itokawa, *J. Nat. Prod.*, **59**, 823 (1996); K. Osawa, H. Yasuda, H. Morita, K. Takeya, H. Itokawa, *Phytochemistry*, **40**, 183 (1995).
- 2) 光岡知足編, “腸内細菌学”, 朝倉書店, 東京, 1990, PP. 473-480.
- 3) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Analyt. Chem.*, **28**, 350 (1959).
- 4) 川村淳, 竹尾忠一, 日本食品工業学会雑誌, **36**, 463 (1989); S. Sakamoto, M. Kim, M. Taniguchi, T. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2307 (1989).
- 5) 岸光男, 口腔衛生学会雑誌, **41**, 2 (1991)
- 6) 浜田茂雄編, “齧蝕と歯周病第 2 巻”, 日本歯科評論社, 東京, 1982, PP. 69-108.
- 7) M. Hattori, T. Kusumoto, T. Namba, T. Ishigami, Y. Hara, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 717 (1990); S. Sakanaka, T. Sato, M. Kim, T. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2925 (1990).