ノ ー ト

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol. 68, No. 2, pp. 241~243, 1994]

茶葉成分の歯周病原菌に対する抗菌作用

角田隆巳, 瀧原孝宣, 坂根 巖

Kristien Mortelmans*

(伊藤園中央研究所, *SRI International,
Life Sciences Division)

平成 5 年 8 月 9 日 受理

Antimicrobial Activity of Tea Extracts against Periodontopathic Bacteria

Takami KAKUDA, Takanobu TAKIHARA, Iwao
SAKANE, and Kristien MORTELMANS*

Itoen, Central Research Institute, 21 Mekami,
Sagara-cho, Haibara, Shizuoka 421-05

* Life Sciences Division, SRI International,
333 Ravenswood Avenue, Menlo Park,
California 94025, U. S. A.

The antimicrobial activities of three kinds of green tea extracts, an ethanol extract, a crude catechin extract and (–)-epigallocatechingallate (EGCg) extract, were studied by calculation of the minimum inhibitory concentrations (MIC) against eight species of periodontopathic bacteria such as *Porphyromonas gingivalis*, the most common periodontopathic bacterium in adults. A suitable growth medium for each bacterium was identified in preliminary tests. A glucose-mineral-biotin medium was selected for use as the basic medium and a small amount of brain-heart-infusion broth was added as necessary. The growth of all bacteria tested was inhibited by each extract. The EGCg extract had the lowest MIC. Against *P. gingivalis*, the MIC was 5.0 mg/ml. Against the other bacteria, the MIC was less than 1.0 mg/ml.

(Received August 9, 1993)

歯の喪失率は、子供のような低年齢では虫歯が問題になるが、高齢化とともに歯周病が問題になっている⁽¹⁾。歯周病は、歯肉炎と歯槽骨吸収を伴う歯周炎の総称であるが、近年これらの疾病に特異的に存在する口腔内細菌

が分離同定され、これらの菌の産生する内毒素などの病原因子と歯周病の関係が明らかにされつつある^(2,3)。また、口臭も問題であるが、その多くは局所性口臭で、歯周病原菌などの口腔内細菌由来の揮発性硫黄化合物が、その主な原因と考えられている⁽⁴⁾。他方、茶葉成分の虫歯菌などに対する抗菌作用の報告がある^(5~7)。しかし、歯周病原菌に対する茶葉成分の抗菌活性に関する報告はなかったので、今回それを検討した。抗菌活性は、各種の歯周病原菌に対する最少生育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) で表した。

茶葉成分は、100 g の静岡産の中級煎茶を用い、1 l の熱水 (95~100°C) で1時間抽出した。残渣をさらに 1 l のエタノール (60~65°C) で1時間抽出した。この抽出液をそれぞれ凍結乾燥して、水溶性分画とエタノール抽出分画を得た。収率 (% , w/w) は、それぞれ 22% および 11% であった。この水溶性分画より、さらに良辺らの方法⁽⁸⁾によって粗カテキンの調製および (–) エピガロカテキンガレート (EGCg) の精製を行った。この場合の粗カテキンは、EGCg を 69.5%, (–) エピカテキンガレート (ECg) を 18.9% 含有し、残りはカテキンの酸化重合物であった。また、精製した EGCg の純度は 95% 以上であった。対象菌株は、口腔内細菌のうち、歯肉炎や歯周炎に関与していると考えられている菌の中から下記の 8 種類を用いた。

Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277)

Actinomyces viscosus (ATCC 19246)

Porphyromonas thetaiotaomicron (ATCC 29148)

Actinomyces naeslundii (ATCC 19039)

Capnocytophaga gingivalis (from SRI)

Fusobacterium nucleatum (from SRI)

Pseudomonas fluorescens (ATCC 17568)

Actinobacillus actinomycetemcomitans (ATCC 29522)

嫌気性菌の培養は、窒素 90%, 二酸化炭素 5% および水素 5% の混合ガスを還流した嫌気性菌培養装置 (Anaerobe Systems 製 Model-800) 内で行った。

MIC 試験の前に、Brain-heart-infusion broth (BHI 培地, Anaerobe Systems 製) および Glucose-mineral-biotin (GMB 培地, Anaerobe Laboratory Manual を参照) を基本培地にして、対象菌株に対する増殖用培地を検討した。その結果、BHI 培地で菌の増殖はみられたが、被験 3 種類の茶抽出物をこの培地に 0.1 mg/ml 以上添

Table I. The Suitable Media for the Periodontopathic Bacteria in the MIC Tests, and the MIC of Tea Extracts on the Bacteria

Bacteria species	Culture condition	Suitable media	Ethanol extract (mg/ml)	Crude catechin (mg/ml)	EGCg (mg/ml)
<i>P. gingivalis</i>	(AN)	GMB with 1% BHI	10.0	5.0	5.0
<i>A. viscosus</i>	(A)	GMB with 5% BHI	2.5	2.5	1.0
<i>P. thetaiotaomicron</i>	(AN)	GMB	10.0	5.0	0.25
<i>A. naeslundii</i>	(AN)	GMB	5.0	2.5	1.0
<i>C. gingivalis</i>	(A)	GMB with 5% BHI	1.0	1.0	0.5
<i>F. nucleatum</i>	(AN)	GMB with 5% BHI	5.0	1.0	0.25
<i>P. fluorescens</i>	(A)	GMB with 5% BHI	0.5	0.1	0.05
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	(AN)	GMB with 2.5% BHI	1.0	2.5	1.0

(A) Aerobic condition; (AN), Anaerobic condition. The GMB media was used for basic media which was supplemented a small amount of BHI media because of prevention of making precipitate with tea extracts. EGCg was the highest active component in tea extracts against periodontopathic bacteria used in this assay.

加すると沈殿を生じたので、GMB 培地を基本にして菌株に応じて BHI 培地の添加を検討した。その結果、Table I に示したように *P. thetaiotaomicron* および *A. naeslundii* は、GMB 培地単独で良好な増殖がみられ、3 種類の茶抽出物も 100 mg/ml 以上まで溶解できた。それ以外の菌は、BHI 培地の添加が必要で、1~5% (v/v) 添加した。その結果、それぞれの菌に適した培地が得られ、3 種類の茶抽出物も 50 mg/ml まで添加可能になった。被験試料の茶抽出物は、対象菌株に対する培地で一定濃度に溶解して、適時希釈し、この被験試料溶液と培地を $\phi 13 \times 100$ mm の試験管にそれぞれ適量とり、最終濃度が 0~10.0 mg/ml で、容量が 0.9 ml になるように調製した。これらの試験管に前培養した菌株 ($8 \times 10^6 \sim 9 \times 10^7$) を 0.1 ml 添加して、37°C で 24 時間培養した。結果は、菌の増殖による濁度を肉眼的または 650 nm の吸光度で判定した。ここで増殖の認められなかった試験管の培養液を Brucella Blood Agar 培地 (Anaerobe Systems 製) に 0.1 ml 塗抹して、さらに 48 時間培養した。この寒天培地上で菌の生育を認めなかった濃度を MIC とした。

それぞれの菌に対する 3 種類の被験試料の MIC の結果を Table I に示した。その結果、3 種類の茶抽出物は、試験に用いたすべての菌に対していずれも抗菌活性を示した。茶カテキン類には EGCg, EGC, ECg, EC 等があるが、ガレート基の結合した EGCg および ECg は生物学的活性が高いという報告があり^(5,6)、今回の試験では、おもに EGCg と ECg が混合した粗カテキンおよび EGCg について活性を検討した。その結果、粗カテ

キンに比べて、菌の種類にもよるが歯周病原菌に対し、EGCg のほうが高い抗菌活性を示した。EGCg に対する菌の種類別の感受性は、歯肉炎に多い *P. fluorescens* では 0.05 mg/ml で、最も高い感受性を示した。他方、成人性歯周炎の原因として注目されている *P. gingivalis* では、5.0 mg/ml で感受性は低かった。若年性歯周炎の原因として最近注目されている *C. gingivalis* では 0.5 mg/ml であり、比較的高い感受性を示した。その他の菌は、1.0 mg/ml 以下で抗菌活性を示した。川村ら⁽⁹⁾によると、虫歯菌である *Streptococcus mutans* に対する EGCg の抗菌作用は 0.1 mg/ml 程度であり、今回の結果と比較すると、歯周病原菌の茶カテキンに対する感受性は、菌の種類にもよるが虫歯菌に比べてやや低いと考えられる。われわれが日常飲用するお茶に含まれる総カテキン濃度は、約 1000 ppm である⁽⁹⁾。EGCg は総カテキン中の約 50% で、その濃度は約 0.5 mg/ml になる。以上のことから、今回の試験に用いた歯周病原菌に対しては、通常のお茶の飲用濃度の数倍のカテキン濃度で抗菌作用を示すと考えられる。現在、歯周病の治療には抗生物質が使用されており、連用が問題になっている⁽¹⁰⁾。また、茶カテキンによる歯周病原菌に対する生育阻止によって、口臭の原因となる揮発性硫黄化合物の産生も抑制されると考えられる。このような観点から、茶カテキンが歯周病原菌に対して抗菌活性を示したことは、歯周病予防や口臭予防の点で大変興味深いことである。

本研究に際し、ご助言をいただきました神奈川歯科大学薬理学教室の伊藤教授および松井講師に深謝致します。

-
- (1) 加藤 熙, 篠田 登:「歯科衛生士教本, 歯周療法」, 医歯薬出版, 東京, 1986, pp. 20—35.
 - (2) 浜田茂幸: 化学療法の領域, **6**, 1, 91—104 (1990).
 - (3) 斉藤和子: 医学, **78**, 1124—1130 (1991).
 - (4) 内田安信: 製薬工場, **7**, 341—345 (1987).
 - (5) 川村 淳, 竹尾忠一: 日食工誌, **36**, 463—467 (1989).
 - (6) 原 征彦, 石上 正: 日食工誌, **36**, 969—999 (1989).
 - (7) S. Sakanaka, M. Kimu, and M. Taniguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2307—2311 (1989).
 - (8) 良辺文久, 衣笠 仁, 竹尾忠一: 農化, **63**, 845—847 (1989).
 - (9) 静岡県茶業会議所編:「新茶業全書」, 静岡県茶業会議所, 静岡, 1983, pp. 414—417.
 - (10) 中島光一, 水道裕久, 江口 徹, 中村正一, 杉原邦夫, 村山洋二: 日本歯周誌, **29**, 463—471 (1987).
-