

原著論文

イソフラボン資化性菌由来の虫歯菌 (*Streptococcus mutans*) 生育阻害物質の単離・精製とその生育阻害活性

籠原将人, 山本花菜, 古田汐里, 石田康行, 塚本義則

中部大学応用生物学部

要 旨

口腔細菌学という研究分野の中で、口腔の病原細菌が原因とされる二大疾患として、う蝕と歯周病が問題視されている。また、細菌そのもの以外に歯周病菌の巣で生産された菌体成分、毒素、酵素などが生体に害を及ぼすとして、口腔内の細菌の中でも特に歯周病原細菌と全身疾患（動脈硬化、脳梗塞、虚血性心疾患、糖尿病、アルツハイマー病、骨粗鬆症など）とのかかわりが注目されている。

口腔内のバイオフィルム（菌膜）はデンタルプラーク（歯垢）と呼ばれ、消毒剤が深部まで届きにくい、内部にいくほど嫌気度が高いといった特徴があり、病原細菌の温床となっている。

本研究では口腔の病原細菌の中でも、虫歯菌である *S. mutans* の生育を阻害する物質を微生物由来の脂質成分を対象にスクリーニングした結果、*Bacillus subtilis* ないしは *B. methylotrophicus* に帰属されると推定されたイソフラボン資化性微生物由来の脂質抽出物中に *S. mutans* の生育を強力に阻害する抗菌性を有する物質が見出され、当該物質は GC/MS 分析よりパルミチン酸やステアリン酸を含有する脂質であることが示唆された。

1. 緒言

現在、口腔細菌学という研究分野の中で、口腔の病原細菌が原因とされる二大疾患として、虫歯と歯周病が問題視されている。

また、細菌そのもの以外に歯周病菌の巣で生産された菌体成分、毒素、酵素などが生体に害を及ぼすとして、口腔内の細菌の中でも特に歯周病原細菌と全身疾患（動脈硬化、脳梗塞、虚血性心疾患、糖尿病、アルツハイマー病、骨粗鬆症など）とのかかわりが注目されている。

口腔内のバイオフィルム（菌膜）はデンタルプラーク（歯垢）と呼ばれ、消毒剤が深部まで届きにくい。内部にいくほど嫌気度が高いといった特徴があり、病原細菌の温床となっている。

古くから虫歯予防を目的として非発酵性の糖類の虫歯菌 (*Streptococcus mutans* 以下、*S. mutans*) に対する生育阻害効果が研究されてきており、特に、キシリトールの虫歯の予防効果については各種の報告が

なされている^{1~8)}。

本研究では口腔の病原細菌の中でも、う蝕の原因菌である *S. mutans* に焦点を当て、*S. mutans* の生育を阻害する安全性の高い抗菌物質のスクリーニング及びその構造解析を行ったので報告する。

2. 材料と方法

2-1. 試薬類

クロロホルム（特級：富士フィルム和光純薬㈱）、メタノール（特級：関東化学㈱）、ヘキサン（特級：関東化学㈱）、酢酸エチル（特級：関東化学㈱）、ジメチルスルホキシド（特級 富士フィルム和光純薬㈱：以下、DMSO）、フルクトース（特級 富士フィルム和光純薬㈱）、シリカゲル 60（カラムクロマトグラフ用 60~230 メッシュ：ナカライテスク㈱）、脂肪酸メチル化キット（ナカライテスク社製）、シリル化剤 TMSI-H（ジーエルサイエンス株式会社製）を用いた。

2-2. 使用菌株

虫歯菌の被験菌としては理研 JCM より分譲された *S. mutans* (JCM *S. mutans* Clarke 1924)を用いた。また、上記虫歯菌に対する生育阻害物質の分離源としては、イソフラボン資化性菌(47株)、テルペン系炭化水素資化性菌(33株)、酢酸耐性菌(71株)の合計151株の乾燥菌体を用いた。

2-3. 培地

S. mutans の再分離用寒天培地としては、トリプトン 1% (w/v)、酵母エキス 0.5% (w/v) 及び食塩 0.5% (w/v) を含有するレノックス培地に寒天を 2% (w/v) 加えた培地を用いた。

S. mutans の冷蔵保存用斜面寒天培地は、トリプティックソイ培地(日本ベクトン・ディッキンソン(株):以下、TSB 培地)に寒天を 2%(w/v)を加えた培地を用いて作製された。

S. mutans の生育阻害アッセイ用の種培養並びに本培養にはトリプティックソイ培地を 2% (w/v) とフルクトース(特級 富士フィルム和光純薬(株))を 5% (w/v) 含有する液体培地(以下、TSB 液体培地)を用いた。虫歯菌に対する生育阻害物質の分離源の微生物の菌体増殖用にはペプトン(微生物学用 メルクミリポア(株))と酵母エキス(微生物学用 メルクミリポア(株))をそれぞれ 1% (w/v) 含有する寒天培地(以下、1% (w/v) ペプトン-1% (w/v) 酵母エキス含有寒天培地)を用いた。

2-4. 被験菌の凍結保存用液

上記被験菌の凍結保存には、予め 121℃で 15 分間滅菌処理をした 50%グリセロール溶液 0.5mL に対して被験菌の培養液 0.5mL を無菌的に加えてよく懸濁した後、液体窒素で瞬間的に凍結させたものを -81℃のディープフリーザーにて保存した。

2-5. 虫歯菌(*S. mutans*)の再分離と種培養液の作製

まず、LB 平板寒天培地に上記の凍結保存された *S. mutans* の凍結融解液を 100μL 塗布した後、30℃にて 48 時間培養した。そして、形成されたコロニーを単分離してトリプティックソイ斜面寒天培地に移植して同様に 30℃で 48 時間培養後、冷蔵保存した。

次に、TSB 液体培地を作製し、トリプティックソイ斜面寒天培地で培養しておいた *S. mutans* を 1 白金耳接種し、よく懸濁した後、30℃で 48 時間振盪培養し

て虫歯菌培養液を得、-80℃で凍結保存した。

上記の凍結保存された *S. mutans* の融解液 100μL を *S. mutans* の種培養用の液体培地 10mL に接種した後、30℃で 48 時間培養したものを種培養液として生育阻害アッセイ用の本培養に用いた。

2-6. 生育阻害アッセイ用のサンプルの調製

生育阻害アッセイ用のサンプルの調製は、-81℃で凍結保存されていた前述の 151 株の微生物の凍結融解液 100μL を 1% (w/v) ペプトン-1% (w/v) 酵母エキスを寒天培地に塗布した後、30℃で 48 時間培養して得られた寒天表面の菌体を葉さじで掻きとり、蒸留水に懸濁した懸濁液を凍結乾燥処理した。このようにして得られた菌体の凍結乾燥物に対して、図 1 に示すプロトコールに従って微生物由来の脂質物質を含有するクロロホルム層が得られた。次に、下層のクロロホルム層を全て集めて分液ロートで分離し、分離されたクロロホルム層をエバポレーターで 40℃下減圧蒸留して乾燥物を得た。続いて、この乾燥物の濃度が 1% (w/v) になるように DMSO に溶解したものを生育阻害アッセイ用の試料とした。

2-7. 生育阻害アッセイ系

S. mutans の生育阻害のポジティブコントロールとして酢酸とキシリトールをそれぞれ 0.1% (w/v) 濃度で用いた。*S. mutans* の生育阻害アッセイは 96 ウェルマイクロプレートを用いて TSB 液体培地 98μL と前述の *S. mutans* の種培養液 100μL に前述で調製されたそれぞれの生育阻害アッセイ用の 1%(w/v) 脂質抽出物試料 2μL を加えてよく混合した後、マイクロプレートリーダ(infinite F50 TECAN(株))を用いて波長 570nm で初発の濁度を測定した。

次いで、30℃で 4 日間培養し、その濁度を測定してコントロール(1%DMSO 添加区)の濁度と比較することで *S. mutans* に対する生育阻害効果について有意差検定(student t-test, 両側検定 2, 非等分散 3, n=3~6)を行い、 $p<0.05$, $p<0.01$ 及び $p<0.001$ の有意差が認められたものを有意差ありと判定し、図中にそれぞれ「*」、「**」及び「***」の表記をした。

この生育阻害アッセイ系ではそれぞれの生育阻害アッセイ用の脂質抽出物試料(微生物由来の脂質抽出物 1% (w/v) 含有 DMSO 液) 2μL を TSB 培地 198μL に添加することから、微生物由来の脂質抽出物の濃度は

0.01% (w/v) となる. そこで, 対照区はこの脂質抽出物試料の代わりに 2 μ L の DMSO を TSB 培地 198 μ L に添加した 1% (v/v) DMSO 溶液とした. 尚, DMSO の *S. mutans* の生育に対する影響に関する予備実験において, DMSO 無添加を対照区に対して 2% (v/v) DMSO 溶液でも生育に全く影響の無いことが確認された(データ未掲載).

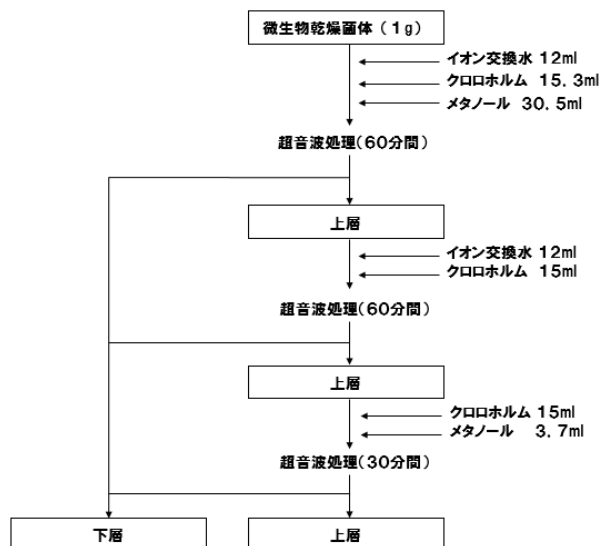


図 1. 微生物乾燥菌体からの脂質抽出のプロトコール

2-8. 生育阻害有効成分の単離と精製

2-8-1 生育阻害効果が認められた微生物菌体の大量培養と脂質成分の抽出

S. mutans に対して有効な生育阻害効果が認められた微生物については, 1% (w/v) ペプトン-1% (w/v) 酵母エキス寒天平板培地 100 枚 (20ml/枚) に対し, 予め-81℃で凍結保存された当該菌株の凍結融解液を 100 μ L ずつ塗布して 30℃恒温器で 48 時間培養して大量の菌体を作製した. この大量培養で得られた菌体を寒天が混ざらないようにかきとり, 蒸留水 50mL に懸濁し, 次いで, この懸濁液を凍結乾燥させて乾燥物を得た. 次に, 当該微生物乾燥菌体は図 1 に示すプロトコールに従って菌体中の脂質成分を抽出した.

2-8-2 カラムクロマトグラフィーによる有効成分の単離と精製

S. mutans に対して有効な生育阻害度が認められた微生物由来の脂質抽出物試料の有効成分の単離と精製

を目的として, シリカゲルを担体としたシリカゲルクロマトグラフィーを行った. カラム(内径 20mm×長さ 500mm)にクロロホルムに懸濁したシリカゲル 60 (70~230 メッシュ)を充填後, 表 1 に示す溶離液を順次用いてフラクションコレクターで分画を行った.

次いで, 各フラクションについては, 特徴的な吸収波長(320nm)を用いて吸光度を測定して, その波長のクロマトグラムを作成した.

表 1. カラムクロマト溶離液

溶離液組成	
①	C:M=100:0
②	C:M=97:3
③	C:M=96:4
④	C:M=95:5
⑤	C:M=90:10
⑥	C:M=2:1
⑦	C:M=1:1

C:クロロホルム
M:メタノール

2-8-3 薄層クロマトグラフィーによる単離と精製

薄層クロマトグラフィー(以下, TLC)はシリカゲル 70FM TLC プレートワコー(薄層クロマトグラフ用 富士フィルム和光純薬株)以下, シリカゲル薄層プレート(200mm×200mm))を必要に応じて細断してサイズを調整して使用した. R_f 測定用には 10~30mm×50mm, 物質のかき取り用には 100mm×100mm ないしは 100mm×200mm の薄層を用いた. カラムクロマトグラフィーによって分画された各フラクション中に含まれる脂質抽出物試料はプラスチックチップ(100 μ L)を用いて TLC 上に 3~5 回スポットした後, 風乾した. 展開溶媒としては, ヘキサンと酢酸エチルの適当な混合溶液やクロロホルムとメタノールの適当な混合溶液から適宜選択して用いた. 有効成分の精製には極性の低いものと極性の高い 2 種類の展開を用いた二次元展開を行って単一スポットが確認できたものが以降の機器分析に供された. 展開を終えた TLC プレートは風乾して溶媒を飛散させた後, りんモリブデン酸・エタノール溶液(りんモリブデン酸 10g/エタノール 100mL)に 5 秒間浸したものを乾熱機で 130℃, 5~10 分間加熱処理を行って発色させた後, 各スポットの R_f 値を測定した. 次いで, か

き取られたシリカゲルはクロロホルムとメタノールの等量混合溶液(v/v)で抽出した後、濾過を行い、エバポレーターでこの濾液を水温 40℃下減圧濃縮で溶媒を飛散させて乾固物の乾燥重量を測定した後、それぞれ乾固物濃度が 1% (w/v)になるように DMSO に溶解して、生育阻害活性の測定に供した。

2-8-4 ガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC/MS)分析

上記 TLC にて単離・精製された *S. mutans* に対して有意な生育阻害活性を有する画分のメチル化物について GC/MS 分析が行われた。メチル化では、まず、試料 1mg を密閉容器に入れ、そこへメチル化試薬 A を 0.5 mL、さらにメチル化試薬 B を 0.5 mL 加えた。密閉後、37℃で 1 時間反応させ、メチル化試薬 C を加え密閉後、37℃で 20 分放置して反応させた。次いで、抽出試薬としてヘキサン 1.0 mL を加え、ボルテックスでよく混合後、二層に分離したら、境界面の白い濁った層が混ざらないように上層を別容器に移した。次に、採取した上層に蒸留水 1mL を加えて攪拌・洗浄し、上層を別容器に移した後に再度蒸留水による攪拌・洗浄を行い、別容器に移した。上層については、リトマス紙で pH が中性付近であることを確認した後、GC/MS 分析に供した。

GC/MS 分析は、フロンティアラボ社製カラム UltraALLOY-5(MS/HT、長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm、固定相ポリ 5 %フェニル 95 %ジメチルシロキサン)を装着したアジレント社製 GC/MS 6890N/5973 Network を用いて、以下の条件下で行った。オープン温度:50~300 °C(10 °C/min)、注入口温度 300 °C、GC/MS インターフェイス温度:320 °C、イオン源温度:230 °C、四重極温度:150 °C、試料注入量 5 μL。

3. 結果

3-1. *S. mutans* に対する生育阻害活性を有する微生物のスクリーニング

DMSO 無添加の対照区に対して前述の 151 株の微生物の乾燥菌体由来の脂質抽出物を 1% (w/v) 含有する DMSO 液 2μL をフルクトース 5% (w/v) 含

有する TSB 培地 198μL(フルクトース含有新鮮 TSB 培地 98μL + *S. mutans* 種培養液 100μL)に添加した試験サンプルの *S. mutans* に対する生育阻害効果を調べた。その結果、イソフラボン資化性菌 2 株と酢酸菌 4 株由来の脂質抽出物に *S. mutans* に対する強い生育阻害活性が認められた。その中でも、イソフラボン資化性菌 No.44-3 株が最も強い活性が認められたことから、当該微生物菌株の 16S rDNA 塩基配列の解析に基づく微生物同定を行った結果、安全性レベル 1 の安全な *B. subtilis* ないしは *B. methylothrophicus* であると推定された。

続いて、イソフラボン資化性菌 No.44-3 由来の生育阻害物質の単離と精製を試みた。

3-2. 生育阻害が認められた微生物菌体の大量培養

2-8-1 に記載した方法で、大量の菌体を作製し、菌体乾燥物 9.15g を得た。次に、当該微生物菌体乾燥物は図 1 に示すプロトコールに従って、微生物菌体乾燥物 9.15g に対し、蒸留水 110mL、クロロホルム 140mL、メタノール 280mL を加え、ソニケーターによる超音波処理を 60 分間行った後、下層のクロロホルム層を回収した。次に、上層の水層にクロロホルム 138mL と蒸留水 110mL を加え、ソニケーターによる超音波処理を 60 分間行った後、同様に下層のクロロホルム層を回収した。上層の水層に対しては、更にクロロホルム 138mL とメタノール 34mL を加え、超音波処理を 60 分間行った後、静置して分液し、下層のクロロホルム層を回収した。そして、これらのすべてのクロロホルム層を集めてエバポレーターを用いて 40℃で減圧濃縮して乾燥物 460.7mg を得た。この乾燥物に対してクロロホルムとメタノール等量混合溶液(v/v)に溶解後、8000rpm で 10 分間遠心分離した後、得られた上清液を乾燥させ、脂質抽出物 410.5mg を得た。

3-3. カラムクロマトグラフィーによる有効成分の単離と精製

得られたイソフラボン資化性菌 No.44-3 の脂質抽出物 410.5mg をクロロホルム 4.2ml に溶解し、シリカゲル 60 を充填したカラムの上部に載せた後、表 1 に示した溶離液をそれぞれ 400ml ずつ順次展開して合

計試験管 1033 本(4ml/試験管)に分画した。これらの全てのフラクションについて、当該脂質抽出物原液で顕著な吸収が認められた 330nm の波長で吸光度を測定してクロマトグラフ(図 2)を作成し、吸光度のピークごとに 29 のフラクション(IF1~IF29)にまとめた。

29 フラクションの試験試料はエバポレーターによる 40℃減圧下で溶媒を除去し、それぞれの乾燥物を得た。

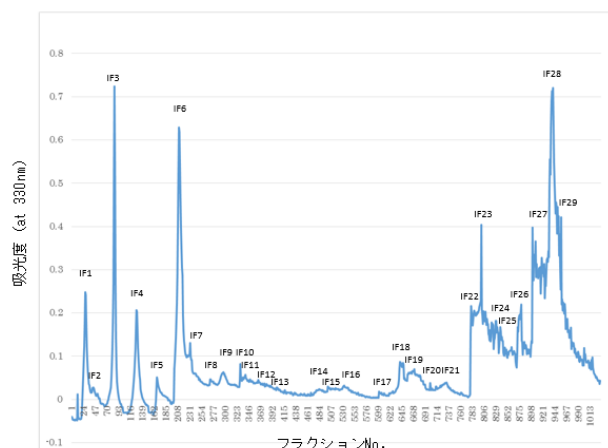


図 2 イソフラボン産化性菌 No.44-3 株の脂質抽出物のシリカゲルカラムクロマトグラム

3-4. 分画フラクションの生育阻害活性の測定

前述の 29 フラクション(IF1~IF29)の乾固物が 1% (w/v) になるように DMSO に溶解した試験試料について、1% (v/v) DMSO 溶液を対照区、酢酸の 0.1% (w/v) 溶液及び又はキシリトール 0.1% (w/v) をポジティブコントロール区として、フルクトース5% (w/v) 含有 TSB 培地 198μL(新鮮 TSB 培地 98μL + *S. mutans* 種培養液 100μL) に対して前述の脂質抽出物試料 2μL を添加した系で、37℃インキュベーターで 4 日間培養して、*S. mutans* に対する生育阻害効果を調べた。その結果、図 3 (A, B) に示す通り、IF6, IF7, IF8, IF9, IF10, IF12 及び IF13 に 0.1% (w/v) 酢酸と同等の生育阻害効果が認められた。

3-5. 薄層クロマトグラフィーによる有効成分の単離と精製

次に、0.1%(w/v)酢酸と同等の生育阻害活性が認められた IF6, IF7, IF8, IF9, IF10, IF11, IF12 及び

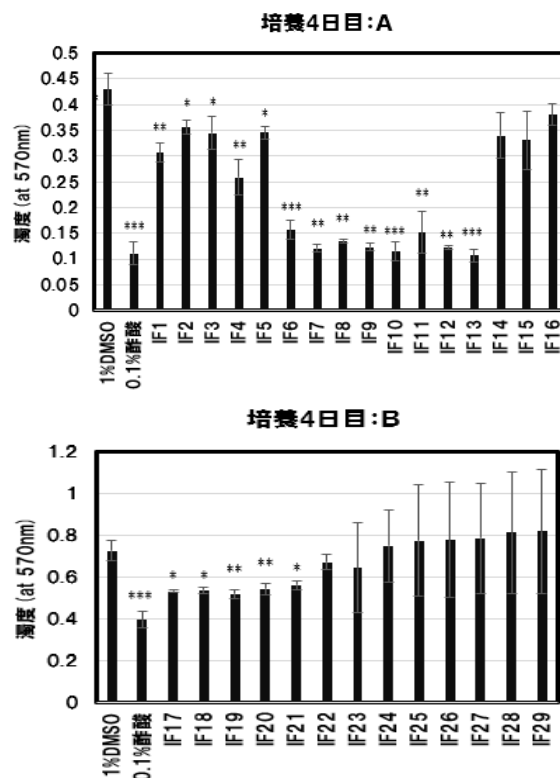


図 3 カラムクロマトグラフィーのフラクション(IF1~IF29)画分 *S. mutans* に対する生育阻害活性

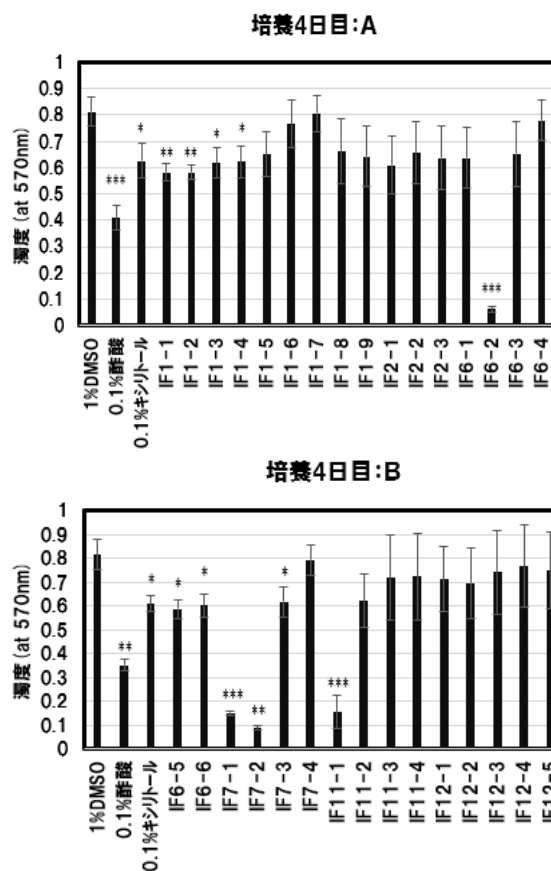


図 4 IF1, IF2, IF6, IF7, IF11 及び IF12 フラクションの TLC 画分の *S. mutans* に対する生育阻害活性

IF13 の内, IF6, IF7, IF11 及び IF12 について, その活性成分の特定のために, さらに TLC 分画を行い, その生育阻害活性を調べた. その結果, 図 4(A,B)に示すように IF6-2, IF7-1, IF7-2 及び IF11-1 に 0.1% (w/v) 酢酸以上の強い生育阻害効果が認められた.

次に, 0.1% (w/v) 酢酸と同等以上の生育阻害効果が認められた TLC かきとり画分 IF6-2 及び IF7-2 についてそれぞれ更に TLC 分画した結果, IF6-2 は更に IF6-2-A, IF6-2-B 及び IF6-2-C の 3 つの画分に分画された. 他方, IF7-2 は更に IF7-2-A と IF7-2-B の 2 つの画分に分画された. そして, これらの 5 つの画分の *S. mutans* に対する生育阻害効果を調べた結果, 図 5 に示す通り, 全てに有意な生育阻害活性が認められたが, 中でも IF6-2-C 画分には 0.1% (w/v) 酢酸と比較して有意な生育阻害効果($p<0.001$)が確認された. 他方, 0.1% (w/v) キシリトールと比較して IF6-2-A, IF6-2-B 及び IF7-2-A には有意な生育阻害効果は認められなかったが IF7-2-B には有意な生育阻害効果($p<0.01$)が認められた.

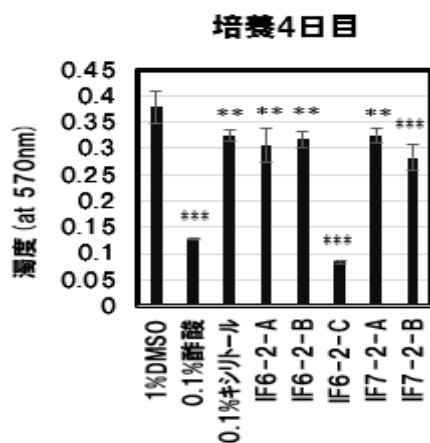


図 5 IF6-2-A, IF6-2-B, IF6-2-C, IF7-2-A 及び IF7-2-B 画分の *S. mutans* に対する生育阻害活性

3-6. 有効成分 IF6-2-C の GC/MS 分析

以上の通り, TLC による分画により単離・精製された IF6-2-C 画分に 0.1%(w/v)酢酸以上の *S. mutans* に対する最も強力な生育阻害効果を有することが確認されたことから, メチル化物を作製して GC/MS 分析による構造解析を試みた.

その結果, 2 つのメチル化成分が検出され, 図 6

と図 7 に示す通り, 成分 1 はパルミチン酸, 成分 2 はステアリン酸のそれぞれメチルエステルと同定された. このことから, IF6-2-C はパルミチン酸やステアリン酸を構成成分とする脂質化合物であることが示唆された. 当該脂質成分としては, モノ又はジアシルグリセロールやスフィンゴリン脂質或いはグリセロリン脂質などが候補物質として考えられたが, 本研究においては, その詳細な構造までは明らかにはできなかった.

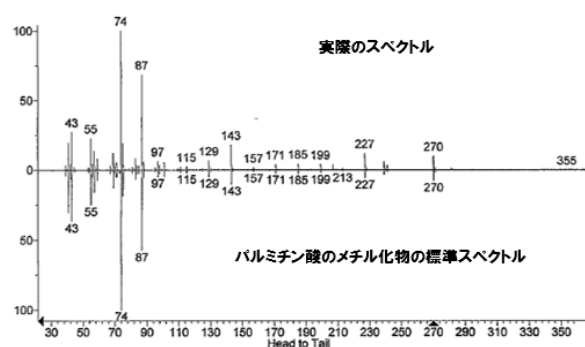


図 6 IF6-2-C のメチル化物(成分 1)の質量スペクトル

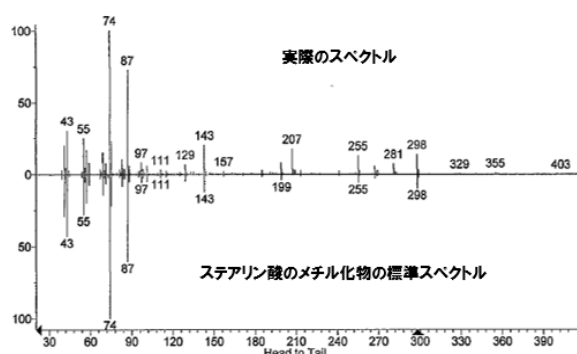


図 7 IF6-2-C のメチル化物(成分 2)の質量スペクトル

4. 考察

本研究により, 自然界にありふれて存在する *B. subtilis* ないしは *B. methyltrophicus* に属する安全性の高い細菌の脂質粗抽出物から精製された画分 IF6-2-C に虫歯菌 (*S. mutans*) に対する強力な生育阻害効果のあることが分かった.

また, 今回見いだされた *S. mutans* に対する強力な生育阻害効果を有する当該画分 IF6-2-C の考えられる化学構造としては, パルミチン酸又は/及びステアリン酸を構成成分とする脂質であることが示唆された. 具体的には, パルミチン酸やステアリン酸を構成成分とするモノ又はジアシルグリセロールやスフィンゴリン

脂質或いはグリセリン脂質などが考えられる。ただし、グリセリン脂質の場合はグリセリンの第2位に不飽和脂肪酸が主として結合していることを考えるとその可能性は低いと予想された。また、トリアシルグリセロールの可能性については、前報同様その TLC の R_f 値から可能性が低いものと考えられた(データは未掲載)⁹⁾。

当該脂質成分の *S. mutans* に対する生育阻害効果については、モノアシルグリセロールと仮定すると、パルミチン酸モノアシルグリセロールとステアリン酸モノアシルグリセロールの分子量はそれぞれ 330, 358 となり、その 0.01% (w/v) 溶液はそれぞれ、0.30mM, 0.28mM に相当することになる。また、ジアシルグリセロール(DAG)であると推定すると、その分子量は 596 となるので、0.01% (w/v) 溶液は 0.168mM に相当することになる。

他方、スフィンゴリン脂質をスフィンゴミエリンと想定した場合、脂肪酸がパルミチン酸あるいはステアリン酸の場合、分子量はそれぞれ 702, 730 となり、それぞれ 0.01% (w/v) 溶液のモル濃度はそれぞれ 0.142mM, 0.137mM に相当することになる。一方、グリセリン脂質ホスファチジルエタノールアミンと想定した場合、パルミチン酸とステアリン酸が 1 分子ずつアシル結合しているとした場合、その分子量は 718 となることから、その 0.01% (w/v) 溶液のモル濃度は 0.139mM となる。

ところで、0.1% (w/v) 酢酸溶液は 16.7mM, キシリトール 0.1% (w/v) 溶液は 6.6mM であることから、IF6-2-C 画分は酢酸対比で 1/60~1/122, キシリトール対比で 1/24~1/48 の低濃度で *S. mutans* に対する高い生育阻害効果が期待されることが示唆された。

本研究により得られた有効成分 IF6-2-C の *S. mutans* に対する生育阻害効果を発揮するメカニズムとしては、IF6-2-C の推定化学構造がいずれも両親媒性のある脂質類であり、界面活性剤の一種とも考えられる。ところで、界面活性剤の微生物に対する抗菌性の機作については、渡辺が以下のように総説している¹⁰⁾。即ち、まず抗菌剤が菌の表面の細胞壁ないしは細胞膜上に濃縮され、次いで作用部位に移動

し、例えば半透過性など膜の正常な働きを妨げたり、膜を透過して細胞内部に入り込み、酵素系を不活性化して核酸やタンパク質の合成を阻害したり、タンパク質を変性させたり、あるいは細胞壁や膜の一部を破壊するなどにより菌細胞を死滅させる。

本研究で推定された IF6-2-C の微生物に対する抗菌性のメカニズムについては、その化学構造の解明が不可欠であるが、おそらく前述の界面活性剤の抗菌機作と同様のメカニズムで虫歯菌に作用しているものと推定される。

ところで、本研究で推定された脂質類の微生物に対する抗菌性については、中山ら¹¹⁾による脂肪酸エステル類の抗菌効果に関する報告の中でモノとジグリセロールの脂肪酸エステルの一部に微生物に対する抗菌性について言及されているものの虫歯菌に対する抗菌効果については報告されていない。

今後は、本研究では検討しなかった IF8, IF9, IF10 及び IF13 の有効成分の特定や IF6-2-C の *S. mutans* 以外の口腔内病原菌、特に 3 種類の主要歯周病菌 (*Treponema denticola*、*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*) に対する抗菌性についても検証していきたい。

引用文献

- 1) Assev, S and Rölla G. (1986). Further studies on the growth inhibition of *Streptococcus mutans* OMZ 176 by xylitol. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B., 94: 97-102.
- 2) Assev S, Wåler SM. and Rölla, G. (1983). Further studies on the growth inhibition of some oral bacteria by xylitol. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B, 91: 261-265.
- 3) Kakuta H, Iwami Y, Mayanagi H and Takahashi N. (2003). Xylitol inhibition of acid production and growth of *Streptococcus mutans* in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions. Caries Res, 37: 404-409.
- 4) Söderling EM, Ekman TC and Taipale TJ. (2008).

Growth inhibition of *Streptococcus mutans* with low xylitol Concentrations. Current Microbiol, 56: 382-385.

- 5) Radmerikhi S, Formantes B, Fajardo KR and Azul E. (2013). Antimicrobial effect of different xylitol concentrations on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* count. Journal of Restorative Dentistry, 1: 95-98.
- 6) Decker E-M, Klein C, Schwindt and Christiane von Ohle. (2014). Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. International Journal of Oral Science, 6:195–204.
- 7) El-Sherbiny GM. (2014). Control of growth *Streptococcus mutans* isolated from saliva and dental caries. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 3: 1-10.
- 8) Nayak PA., Nayak UA And Khandelwal V. (2014). The effect of xylitol on dental caries and oral flora. Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry, 6: 89-94.
- 9) Nishio T, Chikano T and Kamimura M. (1988). Ester synthesis by the lipase from *Pseudomonas fragi* 22.3aB. Agric Biol. Chem, 52: 1203-1208.
- 10) 渡辺昭一郎. (1980). 抗菌性界面活性剤の現状と動向. 油化学, 第29巻, 第8号: 536-542.
- 11) 中山素一, 藤本章人, 樋口 彰, 渡辺 誠, 貞荊季代子, 飯尾雅嘉, 宮本敬久. (2003). 畜肉エキスにおける脂肪酸エステル類の抗菌効果. 日本食品科学工学会誌, 第56巻, 第11号: 537-545.

Title : Isolation of substance inhibiting growth of *Streptococcus mutans* from microorganism using isoflavone as sole carbon source

Authors : Kagohara Masato¹⁾, Yamamoto Kana¹⁾, Furuta Shiori¹⁾, Ishida Yasuyuki¹⁾ and Tsukamoto Yoshinori²⁾

Addresses : ¹⁾ Department of Biological Chemistry, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, ²⁾ College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

Keywords : *S. mutans*, growth inhibition, lipid component, xylitol, acetic acid, diacylglycerol