

## 論 文 要 旨

Antibacterial activity of disodium succinoyl glycyrrhettinate,  
a derivative of glycyrrhettinic acid against *Streptococcus mutans*

グリチルレチン酸誘導体である  
サクシニルグリチルレチン酸二ナトリウムの  
*Streptococcus mutans* に対する抗菌効果について

山下 剛史

## 【序論及び目的】

*Streptococcus mutans* は口腔常在細菌であり、う蝕病原細菌としても知られている。近年、一人当たりのう蝕罹患本数は減少傾向にあるが、歯周病と共に口腔の主な細菌感染症である。本菌がう蝕病原細菌とされる理由は大きく2つある。1つは本菌の産生するグルコシルトランスフェラーゼは、スクロースを基質として、デンタルプラークの形成に関与する粘着性の不溶性のグルカンを産生することであり、2つ目に、本菌は種々の糖を代謝し、主に乳酸を産生することで菌の成分であるハイドロキシアパタイトを溶解することである。

う蝕の予防にはデンタルプラークを物理的に除去するブラッシングが基本であるが、その他に種々の抗菌剤を含有する洗口剤が補助的に使用される。洗口剤に含まれる抗菌剤は消毒剤が多いが、近年天然由来成分の抗菌性物質が安全性の面から着目されるようになった。

本研究では、抗炎症作用を持つことが知られている天然由来成分である甘草由来グリチルレチン酸 (GRA) とその誘導体に着目し、う蝕病原細菌に対する抗菌効果を検証した。

## 【材料及び方法】

1. *S. mutans* に対する抗菌効果の検証

*S. mutans* 臨床分離株 100 株に対する GRA とその誘導体 (5 種) の抗菌効果を、最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法により検証した。

*S. mutans* 臨床分離株に対し抗菌効果が認められた GRA および 3-サクシニルオキシグリチルレチン酸ナトリウム (GR-SU) については、GRA あるいは GR-SU を添加した TSB 培地で *S. mutans* UA159 株を培養し、濁度と生菌数を経時的に測定する方法、ならびに PBS に *S. mutans* UA159 株と GRA あるいは GR-SU を添加し一定時間後の生存率を算出する方法でさらに抗菌効果を検証した。

## 2. ATP 定量法による殺菌効果の検証

*S. mutans* UA159 株に種々の濃度の GR-SU を添加後、菌体外への ATP 放出量を BacTiter-Glo reagent (Promega, Madison, WI) を用いて検証した。

## 3. バイオフィーム形成阻害実験

1%スクロースを添加した TSB 培地に種々の濃度の GR-SU を添加し、24 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターにて *S. mutans* UA159 株を培養した。培養後は上清を取り除き、滅菌 PBS で 3 回洗浄後、1%

サフラニンにてバイオフィルムを染色し、マイクロプレートリーダーを用い、波長 OD<sub>530</sub> でサフラニンを計測し、バイオフィルム量を定量した。

#### 4. pH drop 実験

*S. mutans* UA159 株のグルコース代謝における GR-SU の効果を検証する目的で、種々の濃度の GR-SU を添加したグルコース含有リン酸カリウムバッファーに一定量の *S. mutans* UA159 株を添加し、経時的に pH の変化を計測した。

#### 5. 遺伝子発現検証方法

pH drop 実験時に、*S. mutans* UA159 株菌体を回収後、acid phenol 法により RNA 抽出を行った。抽出した RNA から cDNA を作成し、種々の遺伝子発現を定量的 PCR 法により検証した。

### 【結果】

#### 1. *S. mutans* 臨床分離株 100 株に対する GRA とその誘導体の MIC 検証結果

*S. mutans* 臨床分離株 100 株に対する GRA とその誘導体の抗菌効果を MIC 法で検証した結果、GRA と GR-SU が *S. mutans* に対して強い抗菌作用を示した。特に GR-SU は GRA よりも抗菌力が高いこと、水に対する溶解性が高いという点から、以後の検証は GR-SU を用いた。

#### 2. GR-SU の *S. mutans* UA159 株に対する生育阻害効果検証

*S. mutans* UA159 株を TSB 培地に GR-SU を添加培養し、細菌濁度を吸光度計でモニタリングした結果、sub-MIC 濃度から増殖阻害を認めた。

#### 3. GR-SU の *S. mutans* UA159 株に対する殺菌効果の検証

生存率の検証ならびに ATP 定量法により、GR-SU は *S. mutans* UA159 株に対して静菌作用を有することが示された。

#### 4. GR-SU の *S. mutans* UA159 株バイオフィルムに対する効果

GR-SU は sub-MIC 濃度からバイオフィルム形成を阻害することが明らかになった。

#### 5. *S. mutans* UA159 株のグルコース代謝における GR-SU の効果検証

GR-SU 添加後の pH の変化を検証した結果、GR-SU は *S. mutans* UA159 株のグルコース代謝による酸産生を抑制した。

#### 6. 酸産生遺伝子 (*ldh*, *eno*, *pykA*) ならびに酸耐性遺伝子 (*aguD*, *atpD*) 発現検証

GR-SU による *S. mutans* UA159 株のグルコース代謝時における酸産生遺伝子発現ならびに酸耐性遺伝子発現への影響を検証した。その結果、いずれの遺伝子群も GR-SU 添加時に遺伝子発現の有意な抑制を認めた。

### 【結論及び考察】

抗菌作用検証から、GRA と GR-SU は *S. mutans* に対し抗菌効果を持ち、特に GR-SU で最も強い抗菌作用を認めた。GR-SU の抗菌作用は静菌的であり、sub-MIC 濃度から増殖を抑制した、また、GR-SU は、*S. mutans* の重要なう蝕病原因子であるバイオフィルム形成抑制効果を認めること、さらに酸産生ならびに酸耐性遺伝子発現を抑制することによるグルコース代謝低下を生じることで、抗菌力を発揮することが示唆された。本研究から、GR-SU は抗炎症作用に加え、う蝕病原細菌に対する抗菌作用を持つ天然由来成分であることが明らかになり、将来的に臨床応用の可能性が示唆された。