

氏名

Ulamnemekh Hulan

授与した学位

博士

専攻分野の名称

歯学

学位授与の番号

博 甲 第 号

学位授与の日付

平成 16 年 3 月 25 日

学位授与の要件

歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名

In vitro antibacterial effects of the crude extracts of *Sophora alopecuroides* against oral microorganisms

(*In vitro*における*Sophora alopecuroides*抽出液の口腔内細菌に対する抗活性に関する研究)

論文審査委員

教授 北山 滋雄 教授 福井 一博 教授 下野 勉

学位論文内容の要旨

【緒言】 *Sophora alopecuroides* L.(*S.alopecuroides*) は、ゴビ砂漠とその周辺に生息するモンゴルの伝統医療に広く用いられる野草であり、内服として様々な呼吸器疾患の解熱剤に、また皮膚の感染症にも用いられる。外用には腫脹や傷、皮膚の発疹や炎症の湿布薬として、また扁桃腺炎、歯肉炎や歯痛のために口腔含漱剤としても用いられる。Mutans streptococci の中でもとりわけ *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) と *Streptococcus sobrinus* (*S.sobrinus*) は、う蝕の主な病因菌として考えられている。両菌はスクロースから菌体外多糖体を合成し、口腔内の菌叢に生息し、う蝕の初発菌として乳酸を産生するといった特徴を兼ね備えている。う蝕症はその本態から考えて通常の抗生剤による治療法が適用できない、最近、う蝕をはじめとし他の口腔内疾患の予防と治療に薬草が治療薬として用いられることが多くなってきている。本研究の目的は、*in vitro*における *S.alopecuroides* 抽出液が、*S.mutans*、*S.sobrinus* の増殖、付着能ならびに *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) の増殖能に及ぼす影響について調べることである。

【材料と方法】モンゴルか国ゴビ砂漠で採集された *S.alopecuroides* の根を乾燥し粉末状にした。メタノール抽出液(ME)と蒸留水抽出液 (WE)を作製した。ME からは4分画の抽出液が得られ、それぞれ Fraction-1,2,3,4 とした。*S.alopecuroides* の WE と全ての分画の ME は、抗菌活性を測定した。菌の増殖阻害効果を調べる方法としてディスク法が用いられ、同時に最小阻止濃度(MIC)と最小細菌濃度(MBC)を希釈法で求めた。*S.alopecuroides* の存在の有無によるグルコース発酵能を調べた。また、1%グルコース含有フェノールレッド液中で試供菌とそれぞれの抽出液を10^{-0.001}mg/mlの濃度で培養した。そして、培養後、9時間と18時間後にpHを測定した(Orion, model 920A)。MICにおける mutans streptococci 存在下における酸産生能は、カリオスタット(CAT)液体培地を用いて調べた。培地の色調の変化とpHを培養24時間後と48時間後に測定した。また、*S.alopecuroides* の *S.mutans* と *S.sobrinus* の付着阻止効果については、1%スクロースと種々の濃度(0-10mg/ml)の抽出液を含有した2ml Brain Heart Infusion (BHI)液体培地を用いて調べた。以上を含有したテストチューブは30度に傾斜し、37°Cで18時間培養した。培養後、付着した細菌量と付着しなかった細菌量は分光光度計で測定した。さらに、抽出液存在下でガラス壁に付着した菌を視覚的に明らかにするためにエリスロシンで染色した。

【結果】(1) *S.alopecuroides* の Fraction-1,3 と4はWEとFraction-2より非常に強い増殖抑制能を *S.mutans*、*S.sobrinus* と *S.aureus* に対して示した。

(2) *S.alopecuroides* の WE の *S.mutans*、*S.sobrinus* と *S.aureus* に対する MIC はそれぞれ10mg/ml、10mg/mlと2.5mg/mlであった。Fraction-1については、4.9 µg/ml、9.8 µg/mlと2.4 µg/mlであった。Fraction-2については、10mg/ml、10mg/mlと1.25mg/mlであった。Fraction-3については、0.156 µg/ml、0.312 µg/mlと0.078 µg/mlであった。

Fraction-4については、0.039 µg/ml、0.039 µg/mlと0.005 µg/mlであった。

(3) *S.mutans*, *S.sobrinus* と *S.aureus* に対する Fraction-1 の MBC は、それぞれ 156 μ l/ml、78 μ l/ml と 9.8 μ l/ml であった。Fraction-3 については、0.625 μ l/ml、0.625 μ l/ml と 9.8 μ l/ml であった。Fraction-4 については、0.625 μ l/ml、0.156 μ l/ml と 0.078 μ l/ml であった。

(4) *S.alopecuroides* の 2 倍希釈濃度と菌数との間に負の有意な相関関係 ($p < 0.05$, Pearson) があった。

(5) Fraction-1, 3 と 4 は MIC より 10mg/ml までの濃度で mutans streptococci によるグルコースの発酵能を完全に阻止した。また WE と Fraction-2 は 10mg/ml の濃度でグルコース発酵能を阻害した。さらに Fraction-1, 3 と 4 は、それぞれの MIC 以下の濃度でも多糖体合成を阻止した。

(6) テスト抽出液は CAT 液体培地中でそれぞれの MIC で酸産生を阻止した。

(7) Fraction-1, 3, 4 は、MIC から 10mg/ml の間で *S.mutans* と *S.sobrinus* のスクロース依存性付着能を阻止した。また Fraction-2 は 10mg/ml で *S.sobrinus* の付着能を完全に阻止し、*S.mutans* は 10mg/ml で 82% の付着能阻止された。一方、WE は *S.mutans* を 10mg/ml でその付着能を完全に阻止し、*S.sobrinus* は同濃度 83% の付着能が阻止された。

[考察と結論] 有史以来、世界中で薬草は用いられてきた。ハーブの中に含まれる有効成分が、新しい治療薬の成分モデルとして開発されてきた。*S.alopecuroides* は、様々な疾患に対する治療のための使用と効果によってモンゴルの人々から万能薬と呼ばれてきた。本研究では、*S.alopecuroides* の *S.mutans* と *S.sobrinus* に対する抗菌効果を示した。また、*S.aureus* に対する強い増殖阻止効果も示した。メタノール抽出液の中の Fraction-4 は、mutans streptococci のみならず *S.aureus* に対しても最も強い抗菌効果を示した。ついで Fraction-3、Fraction-1 と続く。しかし、*S.alopecuroides* の WE と Fraction-2 の抗菌作用は弱かった。以上の結果から、蒸留水を用いて *S.alopecuroides* の成分の抽出は本研究における試供菌に対しても十分な成果を得られず、抗菌効果も弱い。それに比べ有機物、メタノールによって抽出したものの中には有効な成分が含まれており、試供菌に対して明らかな増殖阻止効果を認めた。しかしながら、Fraction-2 の水溶性分画はメタノール抽出液の中で最も弱い効果を示した。*S.alopecuroides* の有効成分は非可溶性で同じく非可溶性の部分に含まれると推測される。さらに、本研究では、*S.alopecuroides* が *S.mutans* や *S.sobrinus* がもつスクロース依存性付着能や乳酸産生を阻止することも示した。よって、*S.alopecuroides* は口腔内の病原体を抑制しう蝕の予防や治療ならびに *S.aureus* によって引き起こされる様々な疾病にも効果的であると思われる。さらに、*S.alopecuroides* 中、Fraction-1, 3 と 4 に含まれる有効成分の分離と抗細菌性についての研究が望まれる。

論文審査結果の要旨

ゴビ砂漠とその周辺に生息するモンゴルの伝統医療に広く用いられる野草 *Sophora alopecuroides* (*S. alopecuroides*) は、内服として様々な呼吸器疾患の解熱剤に、また皮膚の感染症にも用いられる。外用には腫脹や傷、皮膚の発疹や炎症の湿布薬として、また扁桃腺炎、歯肉炎や歯痛のために口腔含漱剤としても用いられる。

う蝕の主な病因菌として考えられている *Mutans streptococci* は口腔内の菌叢に生息し、スクロースから菌体外多糖体を合成し、歯牙の表面に定着するとともに齲蝕の初発原因としての酸を産生する特徴を備えている。

本研究では *in vitro* における *S. alopecuroides* 抽出液が、*S. mutans*, *S. sobrinus* の増殖、付着能ならびに *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) の増殖能に及ぼす影響について調べた。その結果、*S. alopecuroides* の蒸留水抽出成分はいずれの試供菌に対しても十分な抗菌効果を示さなかった。それに比べメタノール抽出液中には有効な成分が含まれており、試供菌に対して明らかな増殖阻止効果を認めた。そのうち水溶性分画は最も弱い抗菌効果を示した。したがって *S. alopecuroides* の有効成分は疎水性であると推測される。さらに、本研究では、この有効成分が *S. mutans* や *S. sobrinus* がもつスクロース依存性付着能や乳酸産生を阻止することも示した。よって、*S. alopecuroides* は口腔内の病原体を抑制し、齲蝕の予防や治療ならびに *S. aureus* によって引き起こされる様々な疾病にも効果的であると思われる。さらに、*S. alopecuroides* メタノール抽出液に含まれる疎水性有効成分の分離と抗細菌性についての研究が望まれる。

以上のように本研究は、モンゴル伝統薬草について新知見を示した重要な研究と考えられる。よって、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。