

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 70, No. 7, pp. 787~792, 1996]

## イカ軟甲キトサンのう蝕原性レンサ球菌に対する抗菌作用

下條 学, 正木和好, 栗田恵輔\*, 福島和雄\*\*  
(東洋水産株式会社, \*成蹊大学工学部, \*\*日本大学松戸歯学部)

平成 8 年 1 月 31 日 受 理

## Bactericidal Effects of Chitosan from Squid Pens on Oral Streptococci

Manabu SHIMOJOH, Kazuyoshi MASAKI, Keisuke KURITA,\*  
and Kazuo FUKUSHIMA\*\*

Research and Development Dept. 3 rd. Section, Toyo Suisan Kaisha, Ltd.,  
2-13-40, Kohnan, Minato-ku, Tokyo 108

\*Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Seikei University,  
3-3-1, Kitamachi, Kichijohji, Musashino-shi, Tokyo 180

\*\*Department of Microbiology, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University,  
2-870-1, Sakaecho, Nishi, Matsudo, Chiba 271

Bactericidal effects of various chitosan samples from squid pens (SP-chitosan) against the *Streptococcus mutans* group have been investigated. Antimicrobial action of 0.0005% (5  $\mu$ g/ml) SP-chitosan varied greatly depending on the molecular weight of chitosan as well as the species of oral streptococci. The SP-chitosan samples with molecular weights in the range 70~426 kDa had marked antibacterial activity on all the streptococci tested. *S. mutans*, *S. sobrinus*, and *S. salivarius* turned out to be especially sensitive to the SP-chitosan. The bactericidal effect of the 220 kDa SP-chitosan was observed even in a short incubation time (15 sec.) against *S. mutans* strain GS 5, and its ED<sub>50</sub> was 0.00007% (0.7  $\mu$ g/ml). In addition, its antibacterial activity against the same bacteria was greater with increasing degree of deacetylation of SP-chitosan. These results suggest that the SP-chitosan having a high molecular weight and high degree of deacetylation would be useful as an anti-caries agent.

(Received January 31, 1996)

**Key words** : chitosan ; cariogenic streptococci ; bactericidal effect, molecular weight ; degree of deacetylation

## 結 言

エビ・カニの殻等を構成しているキチンを脱アセチル化して得られるキトサンが, 抗菌性<sup>(1~3)</sup>, 抗カビ性<sup>(4,5)</sup>や凝集性<sup>(6)</sup>等様々な有用な性質を有していることが明らかにされ, 抗菌剤, 抗カビ剤として食品工業<sup>(3)</sup>や繊維工業<sup>(7)</sup>での実用化が進められている。また昨今, 健康への関心が高まるにつれ, キトサンの人に対する生理作用<sup>(8)</sup>についての研究が盛んに行われ, 免疫賦活作用, コレステロール改善作用, 血圧上昇抑制作用および骨粗しょう症に対する改善効果等のあることが明らかとなり,

食品分野のみならず医薬分野への応用研究が急速な進展を見せている。しかし, これらの研究はいずれも,  $\alpha$ -キチンで構成されているエビ・カニの殻由来のキトサンを使用したものである。イカ軟甲(Squid Pen, 以下 SP)を構成している  $\beta$ -キチンおよびそれ由来の SP-キトサンに関する研究は, 郡山ら<sup>(9)</sup>や栗田ら<sup>(10~13)</sup>の物性に関する報告がされているが, SP-キトサンの機能的特性に関する研究報告は全くない。

そこで本研究では, イカ軟甲  $\beta$ -キチンから調製した SP-キトサンの機能的特性を明らかにすることを主目的として, ヒトう蝕の原因菌ミュータンスレンサ球菌を

含む各種口腔レンサ球菌に対する抗菌作用につき検討を行った。その結果、興味ある知見を得たので報告する。

### 実 験 方 法

1. 供試菌株 Table I に示すミュータンスレンサ球菌 (う蝕原性) 2 菌株, 5 菌株及びその他の口腔レンサ球菌 (非う蝕原性) 7 菌株, 9 菌株を本研究に供試した。これらはいずれも日本大学松戸歯学部細菌学教室の保存菌株である。

2. 培養条件 供試菌をブレインハートインフュージョン (BHI, 日水製薬(株)) 液体培地又は寒天平板培地に塗抹後 37°C 下で, 15~24 時間嫌気培養した。嫌気培養は丸型嫌気ジャーとアネロパック・ケンキ (三菱瓦斯化学(株)) を用いたガスパック法により行った。

3. SP-キチン及び SP-キトサンの粗標品の調製 SP-キチンの粗標品の調製はアメリカオオアカイカ (*Dasidicus gigas*) の軟甲を原料として, 栗田ら<sup>(10)</sup>の方法で行った。これによりアメリカオオアカイカの軟甲 500 g (湿重量) から白色粉末の粗 SP-キチン標品 50 g を得た。SP-キトサンの粗標品の調製は栗田ら<sup>(10)</sup>の方法に準じて行った。すなわち粗 SP-キチン 30 g を 40% 水酸化ナトリウム 600 ml に懸濁し, 時々攪拌しながら煮沸した。4 時間後中性になるまで固形物を充分洗浄し, 凍結乾燥を行い, 20 g の粗 SP-キトサン標品粉末を得た。

Table I. List of Oral Streptococci Used in this Study

|                                                   |                                                  |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Cariogenic streptococci ( <i>S. mutans</i> group) | <i>S. mutans</i> GS 5 (serotype <i>c</i> )       |
|                                                   | <i>S. mutans</i> PS 14 (serotype <i>c</i> )      |
|                                                   | <i>S. mutans</i> NCTC 10449 (serotype <i>c</i> ) |
|                                                   | <i>S. sobrinus</i> 6715 (serotype <i>g</i> )     |
|                                                   | <i>S. sobrinus</i> B 13 (serotype <i>d</i> )     |
| Non cariogenic streptococci                       | <i>S. mitro</i> NCTC 3138                        |
|                                                   | <i>S. milleri</i> Is 57                          |
|                                                   | <i>S. mitis</i> ATCC 9811                        |
|                                                   | <i>S. sanguis</i> ATCC 10556                     |
|                                                   | <i>S. oralis</i> ATCC 10557                      |
|                                                   | <i>S. gordonii</i> ATCC 10588                    |
|                                                   | <i>S. gordonii</i> Challis                       |
|                                                   | <i>S. salivarius</i> HHT                         |
|                                                   | <i>S. salivarius</i> ATCC 9222                   |

Table II. Preparation of SP-Chitosan Samples with Various Molecular Weights

| Sample | Preparation                                         |
|--------|-----------------------------------------------------|
| I      | (40% NaOH, 100°C, 2 h) × 3<br>→ concHC 1, 68°C, 2 h |
| II     | (40% NaOH, 100°C, 2 h) × 3<br>→ concHC 1, 30°C, 2 h |
| III    | (40% NaOH, 100°C, 2 h) × 4                          |
| IV     | (40% NaOH, 100°C, 2 h)                              |

### 4. 各種 SP-キトサン標品の調製

① 分子量の異なる SP-キトサン標品の調製 Table II に示した条件で, 粗 SP-キトサン標品を 40% 水酸化ナトリウムと濃塩酸を用いた化学的方法により低分子化を行い, 各種分子量を持つ 4 種の SP-キトサン標品 I~IV を得た。

② 脱アセチル化度の異なる SP-キトサン標品の調製 常法<sup>(14)</sup>により, 粗 SP-キチン標品を 40% 水酸化ナトリウム溶液に懸濁し 25°C 下に 68 時間, 95 時間, 192 時間, および 308 時間放置する脱アセチル化処理を行い, 4 種の脱アセチル化度を異にする SP-キトサン標品 V~VIII を得た。さらに標品 VIII に対して 100°C, 2 時間の 40% 水酸化ナトリウム処理を行い, SP-キトサン標品 IX を得た。

5. 平均分子量及び脱アセチル化度の測定 キトサンの平均分子量 (MW) は粘度計 (Ubbelohde 型, 草野科学社製) 使用の粘度法<sup>(15)</sup>により測定した。なお, 分子量既知のキトサンを用いて, 溶媒の種類によって決まる定数  $K$  と  $\alpha$  を求め, 1% 乳酸-0.5 N 水酸化ナトリウム溶液 (pH 5.8) の定数  $K$  と  $\alpha$  をそれぞれ  $2.77 \times 10^{-4}$  と 0.79 とした。また分子量測定は, SP-キトサン標品を 0.1% 濃度になるよう 1% 乳酸溶液に溶解し, 0.5 N 水酸化ナトリウムで pH を 5.8 に調整後, 121°C, 15 分間のオートクレーブ滅菌したものにつき行った。

脱アセチル化度は, SP-キトサン標品を 0.1 N HCl に溶解後, 栗田らの方法<sup>(16)</sup>に従って電気伝導度計 (CM-30 S 型, 東亜電波社製) を用いて測定した。

6. 抗菌作用の評価法 供試菌株に対する SP-キトサンの殺菌効果は, 以下の方法で殺菌率 (%) を算出し評価した。すなわち, 前記 0.1% SP-キトサン-1% 乳酸溶液 (pH 5.8) を 0.0005% (または所定の) キトサン濃度になるよう 1% 乳酸溶液 (pH 5.8) で希釈し全量を 10 ml とした。この SP-キトサン-1% 乳酸溶液

(pH 5.8) 10 ml に供試菌の BHI 培養液 (15~24 時間嫌気培養) 50  $\mu$ l (ca.  $4 \times 10^7$  CFU) を加え、直ちにボルテックスミキサー (NS-8 型, 井内盛栄堂社製) にて攪拌した。断続的に攪拌しながら 1 分間室温下で処理後, 1% 乳酸溶液 (pH 5.8) を用いて適宜段階希釈し, 各希釈液の 50  $\mu$ l を BHI 寒天平板培地に塗抹して 37°C, 24 時間嫌気培養した。なお, 処理時間の影響を見る実験においては, 培養菌添加後, 試験管を手で数回上下に反転させて瞬時に攪拌を行い, 厳密に一定時間 (0.25~10 分間) 室温下でキトサン処理を行った。培養平板に形成されるコロニー数 (CFU) より生菌数を算出し, キトサン無添加の 1% 乳酸溶液 (pH 5.8) で同様に処理した時の生菌数に対する百分率を求め殺菌率 (%) を算出した。

## 実験結果

**1. 各種キトサン標品の平均分子量と脱アセチル化度** 本研究に供試した全キトサン標品の平均分子量と脱アセチル化度の測定結果を Table III に示した。各種 SP-キトサン標品 I~IX の平均分子量はそれぞれ 10

**Table III.** Characteristics of SP-Chitosan Samples Used in this Study

| Sample | MW <sup>a</sup> (kDa) | dd <sup>b</sup> |
|--------|-----------------------|-----------------|
| I      | 10                    | 0.99            |
| II     | 70                    | 0.99            |
| III    | 220                   | 0.99            |
| IV     | 426                   | 0.99            |
| V      | 587                   | 0.54            |
| VI     | 520                   | 0.66            |
| VII    | 361                   | 0.72            |
| VIII   | 347                   | 0.85            |
| IX     | 260                   | 0.99            |

<sup>a</sup> The molecular weight was determined by viscometer.

<sup>b</sup> The degree of deacetylation was determined by conductivity meter.

kDa, 70 kDa, 220 kDa, 426 kDa, 587 kDa, 520 kDa, 361 kDa, 347 kDa および 260 kDa であった。また標品 I~IV の脱アセチル化度は全て 0.99 であり, 標品 V~IX のそれはそれぞれ 0.54, 0.66, 0.72, 0.85 および 0.99 であった。

**2. SP-キトサンの抗菌作用** 平均分子量 10 kDa か

**Table IV.** Antimicrobial Effect of 0.0005% SP-Chitosan Samples with Different Molecular Weights against Various Oral Streptococci

| Oral streptococci              | Bactericidal activity (%) <sup>a</sup> |                     |                       |                      |
|--------------------------------|----------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
|                                | I<br>(MW : 10 kDa) <sup>b</sup>        | II<br>(MW : 70 kDa) | III<br>(MW : 220 kDa) | IV<br>(MW : 426 kDa) |
| Cariogenic streptococci        |                                        |                     |                       |                      |
| <i>S. mutans</i> GS 5          | 60 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>              | 90 $\pm$ 1.5        | >99                   | >99                  |
| <i>S. mutans</i> PS 14         | 16 $\pm$ 0.9                           | 96 $\pm$ 0.6        | >99                   | 81 $\pm$ 2.4         |
| <i>S. mutans</i> NCTC 10449    | 7 $\pm$ 1.0                            | 57 $\pm$ 3.1        | 94 $\pm$ 2.5          | 81 $\pm$ 2.3         |
| <i>S. sobrinus</i> 6715        | 0                                      | 74 $\pm$ 7.8        | 91 $\pm$ 4.1          | 89 $\pm$ 2.0         |
| <i>S. sobrinus</i> B 13        | 13 $\pm$ 7.0                           | 98 $\pm$ 0.9        | >99                   | 66 $\pm$ 1.3         |
| Non-cariogenic streptococci    |                                        |                     |                       |                      |
| <i>S. mitior</i> NCTC 3168     | 20 $\pm$ 1.2                           | 67 $\pm$ 4.5        | 81 $\pm$ 6.1          | 58 $\pm$ 0.7         |
| <i>S. milleri</i> Is 57        | 0                                      | 18 $\pm$ 3.9        | 44 $\pm$ 3.9          | 5 $\pm$ 2.9          |
| <i>S. mitis</i> ATCC 9811      | 33 $\pm$ 1.9                           | 39 $\pm$ 1.5        | 73 $\pm$ 2.9          | 67 $\pm$ 2.7         |
| <i>S. sanguis</i> ATCC 10556   | 0                                      | 16 $\pm$ 3.9        | 65 $\pm$ 1.2          | 72 $\pm$ 1.2         |
| <i>S. oralis</i> ATCC 10557    | 0                                      | 0                   | 26 $\pm$ 3.5          | 16 $\pm$ 1.2         |
| <i>S. gordonii</i> ATCC 10588  | 0                                      | 10 $\pm$ 2.0        | 37 $\pm$ 2.5          | 38 $\pm$ 1.0         |
| <i>S. gordonii</i> Challis     | 33 $\pm$ 4.4                           | 61 $\pm$ 1.5        | 69 $\pm$ 3.2          | 20 $\pm$ 1.2         |
| <i>S. salivarius</i> HHT       | 84 $\pm$ 2.8                           | >99                 | >99                   | 98 $\pm$ 1.2         |
| <i>S. salivarius</i> ATCC 9222 | 60 $\pm$ 1.7                           | >99                 | >99                   | 87 $\pm$ 0.9         |

<sup>a</sup> Bactericidal activity (treatment : room temp., pH 5.8, 1 min.) was expressed as percentage against colony forming units of control.

<sup>b</sup> The molecular weight was determined by viscometer.

<sup>c</sup> Values are means  $\pm$  SEM (n=3)

ら 426 kDa までの分子量を異にする 4 種の SP-キトサン標品 (I, II, III および IV) を用いて各種口腔レンサ球菌に対する殺菌作用を調べた結果を Table IV に示した。0.0005% SP-キトサンの殺菌効果はほぼ全供試菌に対して認められた。しかしその効果はキトサンの分子量により大きく変動し, 最大の殺菌作用は概して平均分子量 220 kDa の標品 III において認められた。また SP-キトサンに対する感受性は供試菌種によりかなりの差異が認められ *S. salivarius*, *S. mutans*, および *S. sobrinus* に対しては他のレンサ球菌種に比べて特に強い殺菌作用を示した。

3. 濃度の影響 *S. mutans* GS 5 株に対する SP-キトサン標品 III (MW: 220 kDa) の殺菌作用に及ぼすキトサン濃度の影響を調べた結果を Fig. に示した。0.0002% 以下のキトサン濃度においては, 濃度依存的に殺菌効果の急激な減弱が認められた。なお, 殺菌率 50% を示す SP-キトサン濃度すなわち  $ED_{50}$  は 0.00007% であった。

4. 脱アセチル化度の影響 脱アセチル化度を異にする 5 種の SP-キトサン標品 (V, VI, VII, VIII および IX) を用いて, *S. mutans* GS 5 株に対する 0.0005% SP-キトサンの殺菌作用に及ぼす脱アセチル化度の影響を調べた結果を Table V に示した。*S. mutans* GS 5 株に対する SP-キトサンの殺菌率は, 脱アセチル化度の上昇に伴い顕著に増大することが認められた。

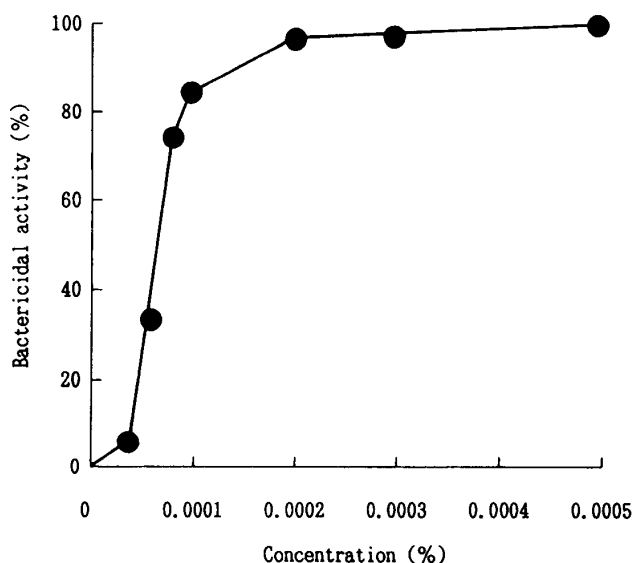


Fig. Effect of Chitosan Concentration on the Bactericidal Activity (treatment: room temp., pH 5.8, 1 min.) of SP-Chitosan III against *S. mutans* GS 5.

Table V. Antimicrobial Effect of 0.0005% SP-Chitosan Samples with Different Degrees of Deacetylation against *S. mutans* GS 5

| Sample                 | Bactericidal activity (%) <sup>a</sup> |
|------------------------|----------------------------------------|
| V (0.54 <sup>b</sup> ) | 29±0.9 <sup>c</sup>                    |
| VI (0.66)              | 50±0.7                                 |
| VII (0.72)             | 71±2.4                                 |
| VIII (0.85)            | 90±3.2                                 |
| IX (0.99)              | >99                                    |

<sup>a</sup> Bactericidal activity (treatment: room temp., pH 5.8, 1 min.) was expressed as percentage against colony forming units of control.

<sup>b</sup> Degree of deacetylation.

<sup>c</sup> Values are means±SEM (n=3)

Table VI. Effect of Treatment Time on the Bactericidal Activity of 0.0005% SP-Chitosan I and III against *S. mutans* GS 5

| Treatment time (min) | Bactericidal activity (%) <sup>a</sup> |     |
|----------------------|----------------------------------------|-----|
|                      | I                                      | III |
| 0.25                 | 51±0.9 <sup>b</sup>                    | >99 |
| 0.5                  | 55±0.6                                 | >99 |
| 1                    | 60±1.0                                 | >99 |
| 5                    | 61±1.9                                 | >99 |
| 10                   | 70±2.6                                 | >99 |

<sup>a</sup> Bactericidal activity (treatment: room temp., pH 5.8) was expressed as percentage against colony forming units of control.

<sup>b</sup> Values are means±SEM (n=3)

5. SP-キトサンによる処理時間の影響 0.0005% の SP-キトサン標品 I および III を用いて *S. mutans* GS 5 株の殺菌作用に及ぼすキトサン処理時間の影響を調べた結果を Table VI に示した。本菌株に対して強い殺菌作用を示す標品 III では, 15 秒という短時間処理においても 99% 以上の高い殺菌率を示したが, 中程度の作用を示す標品 I の場合は, 1 分間処理の殺菌率 (60%) より 15 秒間処理のそれは明らかに低く, 処理時間の延長に伴う殺菌率の漸増が認められた。

## 考 察

う蝕 (虫歯) はミュータンスレンサ球菌と総称される一群の口腔常在レンサ球菌により硬組織である歯のエナメル質が侵される特異な内因感染症である。7 菌種 8 血清型からなる本菌群中, ヒトの口腔に存在する主な菌種は *S. mutans* と *S. sobrinus* である。これらの菌は

複数種の glucosyltransferase (GTF) を菌体外及び菌体表面に産生し、飲食物中のショ糖を基質として粘性で非水溶性の  $\alpha$ -グルカン (WIG) を合成する。本菌群はこの WIG 合成を介して歯面上に付着・集落化し、そこう蝕原性の歯垢を形成する。その歯垢内では酸が多量に産生貯留される結果、歯質が長期間にわたり酸による脱灰を受け、う蝕が発症すると考えられている<sup>(17,18)</sup>。

このようなう蝕病因論に基づいて、本菌群の増殖を特異的に抑制する抗菌物質やそれが産生する GTF による WIG 合成作用を阻害する物質の検索が、う蝕予防を目的として古くから行われている。しかし、ヒトのう蝕予防に著効を示す安全性の高い抗菌物質や抗 GTF 剤はまだ見出されていない。そこで著者らは、最後のバイオマスと呼ばれ、安全で安価な、しかも抗菌性を持つ天然の多糖体であるキトサンの抗う蝕剤としての利用の可能性を探るため、う蝕原因菌を含む各種口腔レンサ球菌に対するキトサンの抗菌性について基礎的な検討を行った。また本研究のキトサン試料として、微生物やヒトに対する生理作用等がこれまで全く追求されていないイカ軟甲  $\beta$ -キチン由来のキトサン (SP-キトサン) を供試し、その機能的特性につき検討を試みた。

その結果、SP-キトサンは 0.0005% (5  $\mu$ g/ml) という低濃度において、う蝕原因菌ミュータンスレンサ球菌を含む全供試レンサ球菌種に対して抗菌作用を有意に発揮したが、その作用はキトサンの分子量や供試菌種により大きく変動する事実が認められた (Table IV)。その抗菌性は 220 kDa の平均分子量を持つ標品 III が概して強く、それ以下でもそれ以上でも明らかに低下する傾向を示し、抗菌性に分子量依存性のあることが強く示唆された。同様の現象はカニ殻 (Crab Crust, 以下 CC) 由来のキトサン (CC-キトサン) においても認められており、内田<sup>(1)</sup> は高分子の CC-キトサンより軽度に分解したキトサンの方が *E. coli* に対する抗菌性が強いと報告している。また柴崎ら<sup>(19)</sup> は、低分子化した CC-キトサン (MW: 1.5 kDa) にはミュータンスレンサ球菌に対する殺菌作用はないことを報告している。

SP-キトサンの抗菌性は供試した菌種、菌株によって大きく異なり、ヒトう蝕の原因菌である *S. mutans*, と *S. sobrinus* および舌背細菌叢の主要構成菌である *S. salivarius* に対し強い抗菌作用を発揮したのに比べて、

非う蝕性の代表的な主要歯垢構成細菌である *S. sanguis* グループの菌、すなわち *S. sanguis*, *S. oralis* および *S. gordonii* に対する抗菌作用は弱かった (Table IV)。*S. mutans*, *S. sobrinus* および *S. salivarius* はいずれも他の口腔レンサ球菌種と異なりショ糖から WIG を合成する能力を持っている<sup>(17,18,20)</sup>。従って SP-キトサンに対する感受性の強弱は WIG 合成能と何らかの関連がある可能性が考えられ、現在この点の究明を行っているところである。なお SP-キトサンには WIG 合成活性に対する阻害作用は認められない (未発表データ)。

平均分子量 220 kDa の SP-キトサン標品 III の *S. mutans* GS 5 株に対する ED<sub>50</sub> は 0.00007% (0.7  $\mu$ g/ml) であった (Fig. 1)。また 0.0005% 以上のキトサン濃度では、ほぼ 100% の抗菌性を示した。抗菌性を発揮する CC-キトサンの濃度に関しては *L. bulgaricus* や *S. faecium* に対する最小増殖阻止濃度 (MIC) が約 0.35 %, また *E. coli* に対する MIC が約 0.02% と報告されている<sup>(3)</sup>。従ってこれらの実験結果から、SP-キトサンの抗菌性は CC-キトサンのそれより強い可能性が示唆される。実際、平均分子量 55 kDa の SP-キトサンと 60 kDa の CC-キトサン (キミツキトサン F) を用いて著者らが行った予備実験の結果は、前者のミュータンスレンサ球菌に対する抗菌作用は後者のそれよりも強い事実を示した<sup>(21)</sup>。しかしこの結論を得るためには、抗菌作用の実験法、キトサン調製法、供試菌種、キトサンの分子量や脱アセチル化度等を十分考慮した詳細な比較検討が今後行われる必要がある。

脱アセチル化度の異なる SP-キトサン標品を用いて *S. mutans* GS 5 株に対する抗菌性を調べた Table V の結果は、脱アセチル化度の高いキトサンほど抗菌作用が強いことを示唆している。内田<sup>(1)</sup> は CC-キトサンを用い、脱アセチル化度が高い、即ちアミノ基が多いキトサンほど抗カビ活性が強い、という同様の結果を報告している。

抗菌性に及ぼす処理時間の影響を調べた Table VI の結果は、SP-キトサンの抗菌作用が極めて短時間内に発揮され得ることを示している。SP-キトサン標品 III で *S. mutans* GS 5 株を処理後に菌体を洗浄しても、洗浄しない場合と同様の殺菌率が得られ、また SP-キトサン標品 III で *S. mutans* GS 5 株を処理後に超音波処理 (50 W, 20 秒間) をしてもしなくても、BHI 平板培地上に出現するコロニー数 (生菌数) にはほとんど差が認め

られなかった(未発表データ)。これらの結果は, SP-キトサン処理に伴うコロニー数の激減が単なる菌体凝集による見かけ上のものではなく殺菌的作用によるものであること, さらにその殺菌的作用は, キトサンが菌体に不可逆的に吸着することにより発揮される可能性があることを強く示唆している。抗菌作用の機序に関しては, Young ら<sup>(4)</sup>や Muzzarelli ら<sup>(22)</sup>の報告のように細胞膜や細胞壁に損傷を与えている可能性などを含め, 今後詳細な検討を行なう予定である。

以上, 今回の検討結果から, 分子量と脱アセチル化度の大きい SP-キトサンはう蝕原因菌ミュータンスレンサ球菌に対し, 低濃度下において短時間内に殺菌作用を発揮することが明らかとなり, SP-キトサンを抗う蝕剤として利用できる可能性が強く示唆された。現在, SP-キトサンと CC-キトサンの抗菌性の差異と抗菌機序に関する基礎的研究と並行して, SP-キトサンを口腔洗口剤として実用化するための応用研究を続行中である。

## 要 約

イカ軟甲由来キトサン(SP-キトサン)のう蝕原因菌ミュータンスレンサ球菌を含む各種口腔レンサ球菌に対する抗菌作用を調べ, 以下の事が明らかとなった。

(1) SP-キトサンは 0.0005% (5  $\mu$ g/ml) の濃度においてう蝕原因菌ミュータンスレンサ球菌を含む各種口腔レンサ球菌に対し抗菌性を示した。

(2) SP-キトサンの抗菌性は分子量と供試菌種により大きく変動し, その分子量範囲 70 kDa~426 kDa において WIG 合成能を有する *S. mutans*, *S. sobrinus*, および *S. salivarius* の 3 菌種に対して特に強い抗菌作用を示した。

(3) SP-キトサン標品 III (MW: 220 kDa) の *S. mutans* GS 5 株に対する抗菌性は極く短時間(15 秒間)の処理により達成された。またその ED<sub>50</sub> は 0.00007% (0.7  $\mu$ g/ml) であった。

(4) SP-キトサンの *S. mutans* GS 5 株に対する抗菌作用は, 脱アセチル化度の高いキトサン標品ほど強かった。

以上の結果から, 分子量と脱アセチル化度の大きい SP-キトサンはう蝕原因菌に対し強い抗菌性を有しており, 抗う蝕剤として利用できる可能性が示唆された。

本研究の一部は平成 6 年 7 月 29 日の第 8 回キチン・キトサンシンポジウム(藤沢市)で発表した。

- (1) 内田 泰: フードケミカル, **2**, 22-29 (1988).
- (2) 三田康蔵: フレグランスジャーナル, **2**, 80-84 (1989).
- (3) 内田 泰: 化学工業, **42**, 793-799 (1991).
- (4) D.H.Young, H.Kohle, and H.Kauss: *Plant Physiol.*, **70**, 1449-1454 (1982).
- (5) D.F.Kendra, and L.A.Hadwiger: *Exp. Mycology*, **8**, 276-281 (1984).
- (6) キチン・キトサン研究会編: 「キチン・キトサンの応用」, 技報堂出版, 東京, 1990, pp.211-235.
- (7) 瀬尾 寛: 機能材料, **13**, 25-32 (1993).
- (8) 戸倉清一, 和田政裕, 奥田拓導, 伊藤不二夫, 次田隆志, 坂本廣司: フードケミカル, **2**, 19-50 (1995).
- (9) 郡山 剛, 佐竹幹雄, 藤田孝夫, 戸倉清一: 第 4 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, 京都, 1990, pp.10-11.
- (10) K.Kurita, K.Tomita, T.Tada, S.Ishii, S.Nishimura, and K.Shimoda: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **31**, 485-491 (1993).
- (11) K.Kurita, K.Tomita, S.Ishii, S.Nishimura, and K.Shimoda: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **31**, 2393-2395 (1993).
- (12) K.Kurita, S.Ishii, K.Tomita, S.Nishimura, and K.Shimoda: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **32**, 1027-1032 (1994).
- (13) K.Kurita, K.Tomita, S.Nishimura, and S.Ishii: *Polym. Bull.*, **30**, 429-433 (1993).
- (14) キチン・キトサン研究会編: 「キチン・キトサン実験マニュアル」, 技報堂出版, 東京, (1991), pp.13-14.
- (15) キチン・キトサン研究会編: 「キチン・キトサン実験マニュアル」, 技報堂出版, 東京, (1991), pp.65-67.
- (16) K.Kurita, H.Yoshino, K.Yokota, M.Ando, S.Ishii, and S.Nishimura: *Macromolecules*, **25**, 3786-3790 (1992).
- (17) S.Hamada and H.D.Slade: *Microbiol. Rev.*, **44**, 331-348 (1980).
- (18) 福島和雄: 応用糖質科学, **42**, 157-167 (1995).
- (19) 柴崎顕一郎, 松久保隆, 高江州義矩: 歯科学報, **95**, 1-17 (1995).
- (20) S.Sato, A.Yoshimitsu, Narita, H.Eifuku and M.Inoue: *Microbios*, **62**, 101-112 (1990).
- (21) 齊藤香織, 下條 学, 福島和雄: 第 8 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, 藤沢, 1994, pp.77-78.
- (22) R.Muzzarelli, R.Tarsi, O.filippini, E.Giovanetti, G.Biagini, and P.E.Varaldo: *Antimicro. Agents Chemother.*, **34**, 2019-2023 (1990).