

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12032

研究課題名(和文) 食品原料ブラッククミンの抗菌・口臭抑制効果と作用機作解明

研究課題名(英文) Antibacterial and oral malodour suppressing effects of black cumin food materials and elucidation of these mechanisms

研究代表者

石川 正夫 (Ishikawa, Masao)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：50597250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ブラッククミン種子および精油(BC)は、機能性食品、栄養補助食品、医薬品等、広く使用されている。近年、BCと含有成分チモキノン(TQ)は口臭原因成分メチルメルカプタン(CH₃SH)に対し高い消臭活性を示すことが報告された。しかし、口臭産生菌*Fusobacterium nucleatum*(Fn)に対する抗菌活性、代謝系およびメチオニナーゼ阻害活性についての報告はない。そこで、これら影響をBC、TQで調べた。その結果、BC、TQはFnに対し抗菌活性、CH₃SH産生抑制、メチオニナーゼ活性阻害を示したことから消臭活性の他に、抗菌、代謝および酵素阻害の3つの働きにより、口臭軽減する可能性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口臭は、働き盛りのサラリーマンの7割が自覚しており(企業調査：2004)、口臭との関連性が高い歯周病の有病率も30代以上の男性で8割以上(厚労省調査：2014)との報告があり、国民の口臭に対する意識は高い。口臭研究は、学術的に、う蝕、歯周病の研究と比べ報告数は少なく、ニーズの高い分野であるにもかかわらず、メカニズムに基づいた基礎研究や、実効性が期待できる天然成分についての研究は殆どない。さらに、口臭抑制成分に使われている多くは、合成殺菌剤やカチオン性界面活性剤であり、安全性面での問題点も指摘されている。その中、天然物の口臭抑制成分に対する関心は高まってきた。

研究成果の概要(英文)：Objectives: Black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds and its essential oil (BC) have been widely used in functional foods, nutraceuticals and pharmaceutical products. Recently BC had deodorizing activity to methyl mercaptan that is a main cause of oral malodor and produced by *Fusobacterium nucleatum* (Fn). To utilize BC as a preventive material of oral malodor, we examined the effect of antibacterial and metabolic activity of Fn by BC and their components. Results: BC and thymoquinone (TQ) had antibacterial activity on Fn at 0.003%～0.006%. These compounds had inhibited methioninase at sub-MIC level (0.001%). Kinetic study of methioninase indicated Michaelis constant (K_m) is 4.6mM and the inhibition of TQ showed as mixed non-competitive inhibition. From these results, BC or TQ had more than 3 effective mechanisms to decrease oral malodor by antibacterial effect, L-methionine metabolic inhibition and by methioninase inhibition on Fn. BC is a useful material for prevention of oral malodor.

研究分野：口腔衛生学

 キーワード：ブラッククミン チモキノン 口臭 メチルメルカプタン *Fusobacterium nucleatum* メチオニナーゼ
殺菌作用 酵素阻害作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国民の健康増進が国策として推進されているなか、健康に寄与する食品への期待は極めて高い。また、健康に寄与する食品中の成分を利用した機能性食品、口腔衛生商品のニーズも高まっている。国の「保健機能食品制度」も整い、国民の特定保健用食品への志向の高さもマスコミ等に取り上げられている。

2. 研究の目的

古くから民間の食材や香料等として用いられてきたブラッククミン(*Nigella sativa* L.)に着目し、ブラッククミン種子精油および含有有効成分の口腔細菌、とりわけ口臭原因細菌 *Fusobacterium nucleatum* (Fn 菌) に対する抗菌効果、代謝への影響ならびに口臭産生酵素に対する影響を明らかにし、口臭抑制機能を有する食品、化粧品への展開を試みる。

3. 研究の方法

(1) ブラッククミン種子精油および含有成分の抗菌力

ブラッククミン種子精油 (BC) は、稲畑香料株式会社より入手した。BC に含まれる成分は、中杉らの報告¹⁾より得られた 17 成分について、市販の試薬 (特級レベル) を用いた。抗菌力は、*F. nucleatum* ATCC25586 を用い、TSB 培地中で 37、48 時間嫌気条件下 (10% H_2 、10% CO_2 、80% N_2) 培養後の OD₆₅₅ を測定し、最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

(2) バイオフィルムの作製と殺菌力評価

Streptococcus mutans GS-5 の膜小胞 (国立感染症研究所調製) を TSB (0.25% Sucrose) に添加した培地に Fn 菌を加え、37、2 日間嫌気培養しバイオフィルムを作製した。バイオフィルムに対する薬剤の効果は、薬剤を室温下、バイオフィルムと 3 分反応、PBS 洗浄後、Live/Dead 染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(3) Fn 菌の代謝活性評価

Fn 菌の L-メチオニン代謝活性は、ミリポアフィルター上で吸引・洗浄した Fn 菌の菌塊を用いた。代謝活性評価は、0.01% の BC、TQ、チモール、殺菌剤 CPC、グルコン酸クロロヘキシジン (CHX)、イソプロピルメチルフェノール (IPMP) を室温下、30 秒 Fn 菌と処理、PBS 洗浄後、50mM L-メチオニン含有 PBS を含む試験管中で 37、一定時間反応した。代謝産物として、気相中の CH_3SH 量は、ガスクロマトグラフで、液相中の α -ケト酪酸量は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンで発色し、OD₄₂₀ より評価した。

(4) メチオニナーゼの阻害活性評価

反応に用いたメチオニナーゼは、Fn 菌の遺伝子 (FN1419) に His タグを付加した pE-SUMOstar をベクターとし、*E. coli* BL21 (DE3) に形質転換した。次いで、1mM IPTG により誘導、発現したタンパクを、Ni カラムにより精製し酵素を採取した。分子量は、SDS-PAGE 電気泳動により決定し、活性染色は、Native-PAGE 電気泳動により行った。

メチオニナーゼ阻害活性は、各濃度の試薬と 0.02mM ピリドキサル-5-リン酸を含む 10mM L-メチオニン PBS 溶液 (pH8.0) 1mL に、精製酵素液 30 μ L を加え、37、30 分間反応し評価した。反応後、生成した α -ケト酪酸量を、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンで発色後、OD₄₂₀ を測定した。酵素阻害率は、コントロールとして薬剤を含まない時のメチオニナーゼの α -ケト酪酸産生量を 100 とし、各薬剤を含んだ時の α -ケト酪酸産生量の相対値 (%) より比較した。

4. 研究成果

(1) BC とその含有成分の抗菌力

BC 中の含有成分を同定した結果、Thymoquinone、p-Cymene-8-ol、Thymol、Carvacrol 等、17 成分を確認した。また、BC 及び含有成分の Fn 菌に対する MIC は、BC が 0.0063%、Thymoquinone 0.0031%、Thymohydroquinone 0.0013% であり、Thymol、Carvacrol もそれぞれ 0.0125% を示した。その他の成分は、MIC が 0.025% ~ 0.1% の範囲であった (表 1)。

表 1 ブラッククミン種子精油 (BC) と含有成分の Fn 菌に対する抗菌力

試料	MIC	試料	MIC
BC	0.0063		
β -Pinene	0.05	Piperitone	0.1
Limonene	0.05	Thymoquinone	0.0031
1,8-Cineole	>0.1	Methyl salicylate	0.0063
p-Cymene	0.1	Cuminaldehyde	0.05
Ocimene oxide	0.1	p-Cymene-8-ol	0.05
Linalool	0.1	Thymol	0.0125
Terpinen-4-ol	0.1	Carvacrol	0.0125
α -Terpineol	0.025	Thymohydroquinone	0.0013
l-Carvone	0.05	CPC (参考)	0.0001

MIC 単位: W/V%

CPC: 塩化セチルピリジニウム

(2) Fn 菌含有バイオフィルムに対する殺菌力

Fn 菌と *S. mutans* GS-5 膜小胞の組合せにより作製したプレート内のバイオフィルムおよびその走査型電顕画像 (SEM) 画像を図 1a と図 1b に示す。また、各濃度の BC、TQ、チモール、イソ

プロピルメチルフェノール (IPMP)、CPC を配合した洗口剤のバイオフィルムに対する浸透・殺菌効果を Live/Dead 比で調べた結果を図 2 に示す。0.01% 配合では TQ、CPC、BC の順で浸透・殺菌効果が認められ、0.05% ではチモール、CPC、IPMP の効果が高くなる傾向が認められた。

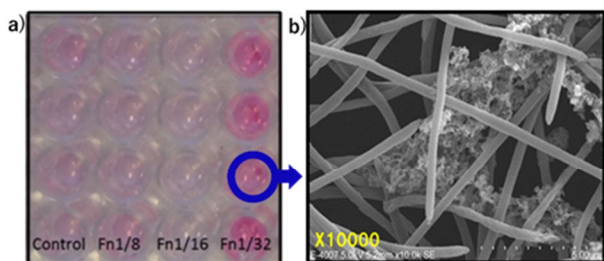


図 1 Fn菌含有バイオフィルム

a) プレート内のバイオフィルム b) バイオフィルムのSEM画像

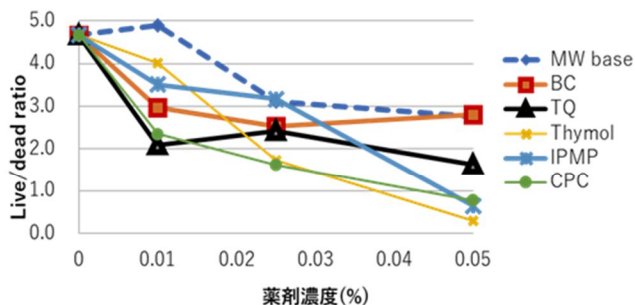


図 2 Fn菌含有バイオフィルムに対する薬剤の殺菌効果

(3) Fn 菌の L-メチオニン代謝に対する阻害活性

図 3 a にミリポアフィルター (0.45 μm) と図 3 b に、ミリポアフィルター処理した Fn 菌の SEM 画像をそれぞれ示す。Fn 菌は、ミリポアフィルター上でバイオフィルム様の菌塊状態を呈した。また、Fn 菌の L-メチオニン代謝活性は、ミリポアフィルター処理 Fn 菌とミリポアフィルター濾液について、L-メチオニンの代謝産物 α -ケト酪酸を指標に評価した。その結果、図 4 に示すように、ミリポアフィルター濾液には L-メチオニンの代謝活性が認められず、L-メチオニン代謝酵素は、ミリポアフィルター処理 Fn 菌のみに活性を示したことから、菌体内酵素であることが示唆された。

ミリポアフィルター処理 Fn 菌に 0.01% 薬剤を反応させた後の L-メチオニン代謝産物である CH_3SH および α -ケト酪酸の産生量を測定した結果を図 5、図 6 に示す。

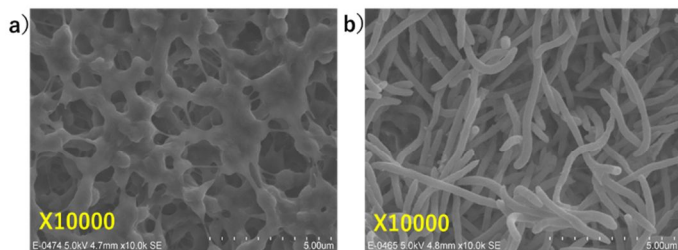


図 3 ミリポアフィルターとフィルター処理Fn菌のSEM画像

a) ミリポアフィルター (0.45 μm) b) フィルター処理Fn菌

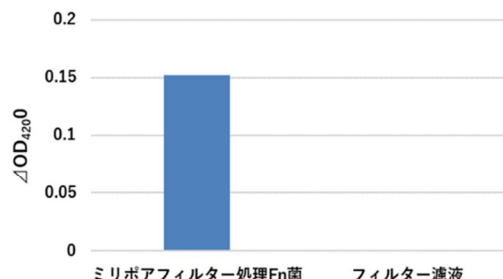


図 4 ミリポアフィルター処理Fn菌と濾液の代謝活性

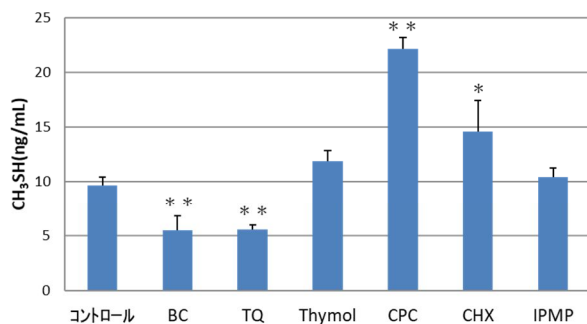


図 5 各薬剤処理後のメチルメルカプタン産生量

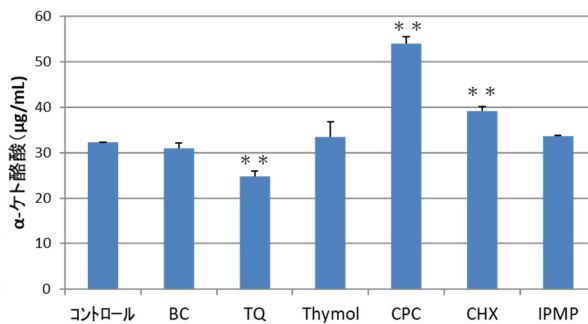


図 6 各薬剤処理後の α -ケト酪酸産生量

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

CH_3SH の産生量は、コントロールに比べ BC、TQ 処理後で有意に減少し、CPC、CHX 処理後で増加した。 α -ケト酪酸の産生量は、TQ 処理後で減少し、CPC、CHX 処理後で増加した。各薬剤処理後の Fn 菌を SEM 観察した結果、BC、TQ、チモール処理後は、菌表面に変化を認めなかったが、CPC 処理後では、菌の膜表面に破壊が認められ、0.05% CPC では破壊が顕著であった (図 7)。代謝産物量が増加した原因として、菌体内酵素であるメチルメチルナーゼの菌体内からの流出を CPC が促進し増加した可能性が示唆される。なお、0.05% の他薬剤処理による Fn 菌表面の破壊は認められなかった (データ示さず)。

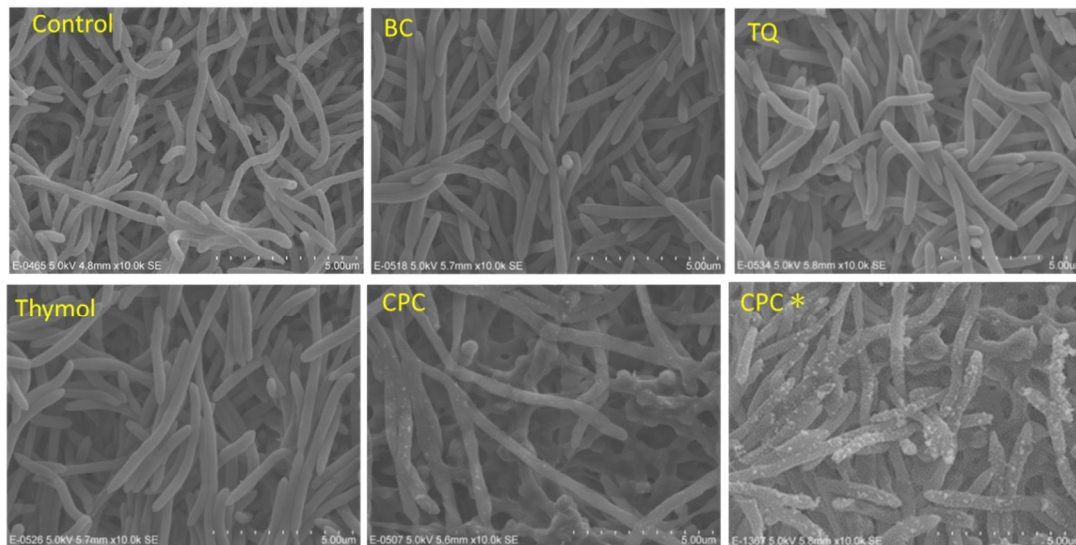


図7 0.01%薬剤処理後におけるミリポアフィルター処理Fn菌のSEM画像

* : 0.05% CPCの画像

(4)メチオニナーゼに対する酵素阻害活性

Ni カラムより溶出した E1 フラクシヨンの SDS-PAGE 電気泳動像を図 8 a に示す。精製フラクシヨンは単一のバンドを示し、分子量は 64kDa であり、タグを除くと 44kDa と思われた。また、Native-PAGE 電気泳動後の活性染色は、基質 L-メチオニンで染色されず、L-システニンに変更して行った結果、単一のバンドが得られた(図 8 b)。従って、本酵素は、L-メチオニン以外の基質に対しても活性を示すことが明らかとなった。

本酵素の L-メチオニン分解に及ぼす BC、TQ、チモール、IPMP、CPC の阻害効果を調べた結果を図 9 に示す。BC は、0.001% でメチオニナーゼを 64% の阻害を示し、TQ は、0.1mM で 85% の阻害を示した。

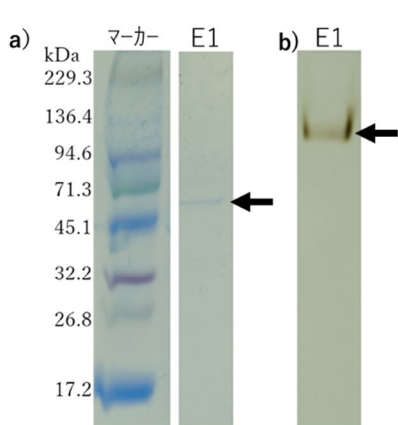


図8 精製メチオニナーゼの電気泳動像
a) SDS-PAGE 電気泳動 (クーマシー染色)
b) Native-PAGE 電気泳動 (H₂S 染色)
← : メチオニナーゼ

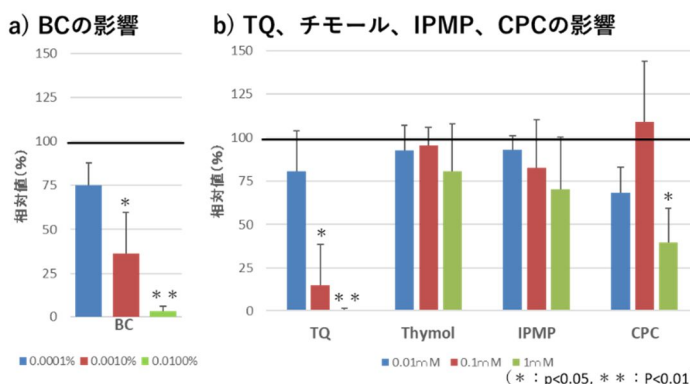


図9 BCと含有成分およびCPCのメチオニナーゼ阻害活性

a) BCのメチオニナーゼ阻害活性 (%濃度)
b) TQ、チモール、CPCのメチオニナーゼ阻害活性 (モル濃度)
— : コントロール酵素活性ライン

一方、CPC は、0.1mM で阻害活性を示さず、1mM (0.03%) で 60% の阻害を示した。

酵素阻害効果の認められた TQ について、Lineweaver-Burk プロットを行った結果を図 10 に示す。メチオニナーゼの K_m 値は 2.5 mM であり、V_{max} は 0.01 μmole/min/mg であった。さらに、TQ は混合型の酵素阻害作用を示した。

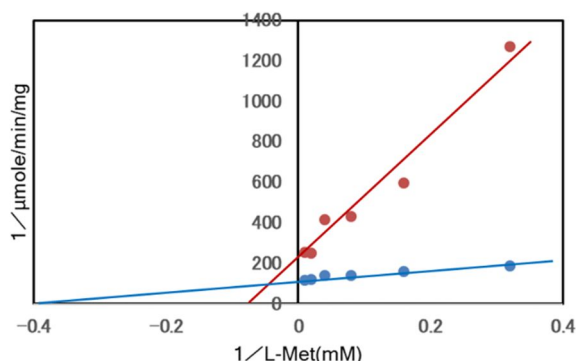


図10 メチオニナーゼのLineweaver-Burk プロット

● : コントロール ● : 0.1mMTQ添加時

(5)まとめ

本研究では、BC とその含有成分 TQ、チモール等 17 成分について Fn 菌に対する抗菌力を確認するとともに、Fn 菌と *S. mutans* GS-5 膜小胞の組合せにより作成したバイオフィルムに対し、0.01%濃度の BC、TQ が殺菌剤 CPC と同等レベルの浸透・殺菌効果を示すことを確認した。

さらに、Fn 菌の L-メチオニン代謝を BC、TQ が阻害し代謝産物の CH_3SH と α -ケト酪酸量を減少したのに対し、CPC、CHX は、これらを増加させた。この原因として、CPC 処理後の Fn 菌の SEM 画像より、菌体表面に破壊を観察したことから、メチオニナーゼ等の菌体内酵素が細胞外に溶出し、代謝産物量を増加させた可能性が考えられた。

メチオニナーゼを用いた酵素阻害評価では、BC と TQ が Fn 菌の MIC (0.0063%、0.0031%) よりも低濃度の 0.001%レベル (BC は 0.001%、0.1mM TQ は、0.0016%相当) でメチオニナーゼ活性を阻害することを確認した。さらに、チモール、IPMP は、メチオニナーゼを阻害せず、CPC も 1mM (0.03%相当) と高濃度で阻害活性を示したことから、市販歯磨、洗口剤での CPC 実質使用量(0.01%レベル)での酵素阻害作用は起こりにくいと思われた。

以上より、BC およびその含有成分である TQ は、口臭原因成分の CH_3SH に対する消臭作用¹⁾の他に、Fn 菌の L-メチオニン代謝阻害、メチオニナーゼ阻害活性により口臭抑制を行う、多機能性の天然物素材であることが明らかとなった。

引用文献：

1) Nakasugi T, Murakawa T, Shibuya K, Morimoto M. Deodorizing Substance in Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seed Oil : J Oleo Sci. 66(8):877-882, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tada A, Nakayama-Imaohji H, Yamasaki H, Elahi M, Nagao T, Yagi H, Ishikawa M, Shibuya K, Kuwahara T	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of thymoquinone on <i>Fusobacterium nucleatum</i> -associated biofilm and inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 643-650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2020.11136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Murata T, Yamashita M, Ishikawa M, Shibuya K, Hanada N	4. 巻 Sep 14
2. 論文標題 Purification of a High Molecular Mass Protein in <i>Streptococcus mutans</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vis Exp.	6. 最初と最後の頁 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/59804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata T, Ishikawa M, Shibuya K, Hanada N	4. 巻 13
2. 論文標題 Method for functional analysis of a gene of interest in <i>Streptococcus mutans</i> : gene disruption followed by purification of a polyhistidine-tagged gene product.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Microbiol Methods	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 石川正夫、村田貴俊、岡本公彰、泉福英信、花田信弘、渋谷耕司
2. 発表標題 ブラッククミンおよび殺菌剤のカンジダに対する抗真菌活性について
3. 学会等名 第68回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渋谷耕司, 石川綾子, 花田信弘, 石川正夫
2. 発表標題 銅含有ガラス粉末のメチルメルカプタンに対する消臭効果
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2019年度春季学術大会 (第150回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田彩乃, 石川正夫, 渋谷耕司, 桑原知巳
2. 発表標題 チモキノンのFusobacterium nucleatum混合バイオフィルムに対する効果
3. 学会等名 第67回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川正夫, 村田貴俊, 泉福英信, 花田信弘, 渋谷耕司
2. 発表標題 ブラックミンおよび殺菌剤のFusobacterium nucleatumのメチルメルカプタン産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第67回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田彩乃, 石川正夫, 渋谷耕司, 桑原知巳
2. 発表標題 チモキノンのフソバクテリウム含有バイオフィルムに対する効果
3. 学会等名 第38回日本歯科薬物療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川正夫, 村川拓士, 村田貴俊, 花田信弘, 渋谷耕司
2. 発表標題 ブラックミン種子精油の口臭産生菌のメチルメルカプタン産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第66回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masao Ishikawa, Takatoshi Murata, Nobuhiro Hanada, Hidenobu Senpuku, Koji Shibuya
2. 発表標題 Effect of Black Cumin Seed Oil on Methionine gamma-lyase from <i>Fusobacterium nucleatum</i>
3. 学会等名 CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Ishikawa, Hidenobu Senpuku, Takatoshi Murata, Nobuhiro Hanada and Koji Shibuya
2. 発表標題 Antibacterial Effects of Black Cumin Seed Components on <i>Fusobacterium</i> Biofilm
3. 学会等名 The 96th General Session of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishikawa M., Senpuku H., Shibuya K., Nakasugi T., Murata T., Hanada N.
2. 発表標題 Effects of Black Cumin Seed Oil on <i>Streptococcus mutans</i> Biofilm
3. 学会等名 IADR General Session & Exhibition, 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村田 貴俊 (Murata Takatoshi) (10313529)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	
研究分担者	泉福 英信 (Senpuku Hidenobu) (20250186)	国立感染症研究所・細菌第一部・室長 (82603)	
研究分担者	花田 信弘 (Hanada Nobuhiro) (70180916)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	