

## 原 著

天然由来成分ヒノキチオールが *Streptococcus mutans* の増殖  
およびバイオフィーム形成に与える影響

吉松 英樹<sup>1)</sup> 河村佳穂里<sup>1)</sup> 黄 哲麒<sup>1,2)</sup> 楊 世傑<sup>1,2)</sup>  
 李 前穎<sup>1,2)</sup> 北山 貴也<sup>1,2)</sup> 小柳 圭代<sup>3)</sup> 加納 慶太<sup>1)</sup>  
 土居 貴士<sup>1)</sup> 小野 圭昭<sup>3)</sup> 片岡 宏介<sup>1,4)</sup> 三宅 達郎<sup>1)</sup>

**概要**：*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) は、う蝕病原細菌として知られており、グルコシルトランスフェラーゼ (GTF) によって不溶性グルカンを合成する。そのため、*S. mutans* の GTF はバイオフィーム形成に深く関与する重要な病原因子であると考えられている。

ヒノキチオール (HNK) は、細菌や真菌に対して抗菌作用を有しているが、*S. mutans* に対する抗菌作用やバイオフィーム形成に与える影響についての報告は少ない。本研究では、*S. mutans* に対する HNK の抗菌効果、およびバイオフィーム形成抑制効果を検討した。HNK を添加した培地に *S. mutans* を加え、経時的に濁度を測定することにより増殖阻害効果を調べた。次に、*S. mutans* バイオフィーム形成に対する阻害効果を検討するため、HNK を添加した培地に *S. mutans* を加え、24 時間作用させた後、バイオフィーム形成量を測定した。また、バイオフィーム形成関連遺伝子 (*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*) の発現量の比較を RT-qPCR 法にて行った。その結果、HNK は濃度依存的に *S. mutans* の増殖を阻害し、バイオフィーム形成を抑制することが示された。また、HNK 添加群では、*S. mutans* バイオフィーム形成関連遺伝子に対する発現が有意に抑制されていた。

以上の結果から、HNK は *S. mutans* バイオフィーム形成を抑制するとともに、バイオフィームに対し殺菌効果を有し、う蝕予防に対し有効であることが示唆された。

索引用語：ヒノキチオール, バイオフィーム, *Streptococcus mutans*

口腔衛生会誌 74 : 52-58, 2024

(受付：令和 5 年 6 月 9 日 / 受理：令和 5 年 11 月 9 日)

## 緒 言

近年、日本の小児のう蝕は減少しているものの、令和 3 年の学校保健統計調査では、う蝕有病者率が小学生 39.0%、幼稚園児 26.5% で最も有病率の高い疾患である<sup>\*1</sup>。この有病率の高さは、医療費の負担にもつながっており、令和 2 年の 0~14 歳の歯科診療医療費は 2,504 億円であり、呼吸器系の疾患に次いで高く<sup>\*2</sup>、その多くがう蝕治療に費やされている。また、世界保健機構は、

世界の疾病負担研究 (The Global Burden of Disease 2019 Study; GDB 2019) において、世界で最も有病率の高い疾患が永久歯の未治療のう蝕であると報告している<sup>\*3</sup>。Aida らの報告では、う蝕およびう蝕治療後の根尖病巣やポスト破折などによる後遺症が、日本人の歯の喪失原因の 43.3% を占め、歯周病の 41.8% と並んで歯の喪失の最大の原因となっている<sup>1)</sup>。よって、高齢期の残存歯数を増加するためにも、幼児期から行うう蝕予防は口腔保健の向上のために重要である。

<sup>1)</sup> 大阪歯科大学歯学部口腔衛生学講座

<sup>2)</sup> 大阪歯科大学大学院歯学研究科口腔衛生学専攻

<sup>3)</sup> 大阪歯科大学附属病院障がい者歯科

<sup>4)</sup> 徳島大学大学院医歯薬研究部口腔保健福祉学分野

<sup>\*1</sup> 文部科学省：令和 3 年度学校保健統計, [https://www.mext.go.jp/content/20221125-mxt\\_chousa01-000023558.pdf](https://www.mext.go.jp/content/20221125-mxt_chousa01-000023558.pdf) (2023 年 5 月 30 日アクセス)。

<sup>\*2</sup> 厚生労働省：令和 2 年度国民医療費の概況, <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/20/dl/toukei.pdf> (2023 年 5 月 30 日アクセス)。

<sup>\*3</sup> World Health Organization: The Global Burden of Disease (GBD) 2019 Study; GDB 2019, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health> (2023 年 5 月 30 日アクセス)。

う蝕は、多要因疾患である。Keyes は、う蝕発生要因を宿主、食餌性基質および細菌因子の3つに<sup>2)</sup>、Newbrun は Keyes の分類に時間因子を加えた4つに要因を分類しており<sup>3)</sup>、う蝕リスク判定や予防は因子別に対応する必要がある。

口腔内は細菌の増殖に適した環境であり、レンサ球菌を主体とした700種類以上の口腔常在細菌が存在していることが知られている<sup>4)</sup>。これらがペリクルを介して歯面に付着し歯垢が形成される<sup>5)</sup>。歯垢中細菌の中でグラム陽性通性嫌気性菌 *S. mutans* は、歯の脱灰の直接的原因となる酸を産生するだけでなく、バイオフィーム形成においても重要な役割を果たしている<sup>6)</sup>。*S. mutans* の菌体表層にはその病原性と関与するタンパク構成成分が存在し、グルコシルトランスフェラーゼ (GTF)、グルカン結合タンパク (Gbp)、および高分子結合タンパク抗原 *c* (Pac) などが知られている<sup>7,8)</sup>。Pac がペリクル中の唾液成分と疎水結合することで、*S. mutans* は歯面に付着し<sup>9)</sup>、*S. mutans* 自身の産生する GTF がスクロースからグルカンを合成することにより *S. mutans* 同士が付着し<sup>10)</sup>、さらにそのグルカンと Gbp が結合することによって *S. mutans* と歯面の付着を強固にし、堆積することでバイオフィームが形成される<sup>11)</sup>。その後、バイオフィーム中の細菌が産生した酸によって歯の表面が脱灰され、う蝕が発病する<sup>12)</sup>。

GTF には GTFB, GTFC, および GTFD の3つのタイプが存在し、それぞれをコードする遺伝子 *gtfB*, *gtfC*, および *gtfD* がクローニングされ、それらの塩基配列が決定されている<sup>13)</sup>。GTFB は菌体表面に結合して存在し、スクロースから分解されて生成したグルコースを  $\alpha$ 1,3 結合することで非水溶性グルカンを合成する。GTFC も同様に菌体表面に結合して存在し、非水溶性グルカンを合成するが、グルコースが  $\alpha$ 1,6 結合した水溶性グルカンも合成する<sup>14)</sup>。GTFD は培養上清中に分泌され、グルコースが  $\alpha$ 1,6 結合した水溶性グルカンを合成する<sup>15)</sup>。これら3つの GTF が相互に作用することが、バイオフィーム形成に重要である<sup>16)</sup>。

ヒノキチオール (HNK) は、 $\beta$ -ツヤプリシンとしても知られるトロポロン関連化合物であり、天然ヒバから抽出した精油に含まれている<sup>17)</sup>。HNK は抗菌性、抗真菌性、抗腫瘍性、抗炎症性および抗酸化活性などを有することが報告されている<sup>18-22)</sup>。特に HNK は、歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* および口腔カンジダ症の原因真菌である *Candida albicans* に対する抗菌・抗真菌作用が報告されており<sup>23-25)</sup>、歯周

病や口臭予防を目的とした歯磨剤や口腔ケアジェルに応用されている<sup>26,27)</sup>。しかしながら、HNK の *S. mutans* に対する抗菌性についての報告はあるが<sup>23,24,28)</sup>、HNK の *S. mutans* バイオフィーム形成に対する報告はない。

本研究では、HNK の *S. mutans* への抗菌効果、*S. mutans* に対する抗バイオフィーム効果と、各種バイオフィーム形成関連遺伝子の転写レベルの変化について解析を行うことを目的とした。

## 対象および方法

### 1. 供試菌株および培養条件

本研究では、当研究室で冷凍保存していた *S. mutans* JCM 5705 株を使用した。*S. mutans* は 0.5% スクロース添加 Brain Heart Infusion (BHI; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) (BHI-S) を用い、嫌気条件下 (80%N<sub>2</sub>, 10%CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>) にて 37°C で静置培養した。

### 2. 供試薬

HNK ( $\beta$ -ツヤプリシン: C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) は東京化成工業株式会社 (東京) より購入し、60°C に加温した純水により 100 mg/mL に溶解後、0.22  $\mu$ m のフィルターを用いて濾過滅菌した。各実験に供試する際には、使用培地を用いて適切な濃度に希釈して使用した。

### 3. 最小発育阻止濃度および最小殺菌濃度の測定

HNK の *S. mutans* に対する最小発育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) は、Clinical and Laboratory Standards Institute 法<sup>29)</sup> に準拠して行った。*S. mutans* は、BHI-S 培地で前培養し菌体を集菌、洗浄後、BHI-S 培地で懸濁し、菌液の吸光度 (OD<sub>600</sub>) を分光光度計 (BioSpectrometer, Eppendorf, Hamburg, Germany) にて測定し、菌液の濃度は、OD<sub>600</sub>=0.1 に調整した。

HNK 含有 BHI-S 液体培地の段階希釈液を 96 ウェルプレートに作製し (200  $\mu$ L)、菌液を 10  $\mu$ L 加えた。24 時間嫌気培養後に MIC を判定した。なお、MIC の測定は独立に 3 回行った。

最小殺菌濃度 (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) は MIC を示した培地を含め、発育抑制のみられた培地から培養液を 100  $\mu$ L 採取し、BHI-S 寒天培地に塗抹して 37°C 嫌気条件下で 24 時間培養した。培養後、コロニーの形成が認められなかった状態を殺菌されたと判定し最小濃度を MBC とした。

### 4. 増殖阻害実験

*S. mutans* の増殖を確認するため吸光度を測定した。6.3 および 12.5  $\mu$ g/mL HNK 添加あるいは非添加の BHI-S

液体培地を 10 mL を作成した。作成した液体培地に前培養した *S. mutans* を 100  $\mu$ L 加え、37°C で嫌気条件下にて培養した。*S. mutans* の増殖は、培養開始時および培養開始後 4 時間ごとに 32 時間、各培養液の濁度を分光光度計 (OD<sub>600</sub>) で測定した。なお、測定はいずれも 3 回行った。

5. *S. mutans* バイオフィーム形成への影響

HNK の *S. mutans* バイオフィーム形成に対する影響は、Nomura らの報告を一部改変し行った<sup>30)</sup>。すなわち、HNK を 6.3  $\mu$ g/mL および 12.5  $\mu$ g/mL になるように添加した BHI-S 培地に *S. mutans* を OD<sub>600</sub>=0.1 になるように調整した。これらの菌液を 200  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレート (住友ベークライト, 東京) に分注し、37°C で 24 時間嫌気培養した。その後、プレートを PBS で 3 回洗浄し、浮遊した細菌を除去し、プレート上に残留形成したものをバイオフィームとした。形成されたバイオフィームを 25% ホルムアルデヒドにより 10 分間固定後、各ウェルに 0.05% クリスタルバイオレット水溶液 (ナカライテスク, 京都) を 200  $\mu$ L ずつ分注して 5 分間室温で染色した。染色後のプレートを PBS で洗浄し、バイオフィームに吸着したクリスタルバイオレット色素を 95% エタノール 15 分間の作用により菌体から抽出した。バイオフィーム中に存在する細菌量は、クリスタルバイオレット色素濃度をマイクロプレートリーダー (SpectraMax MS500, Molecular Devices, San Jose, Ca, USA) により 550 nm の波長で測定した。

6. バイオフィーム形成関連遺伝子の発現動態の解析

*S. mutans* バイオフィーム形成関連遺伝子の転写レベルの変化を調べるために、6 ウェルマイクロプレート (住友ベークライト, 東京) を用いて 6.3  $\mu$ g/mL および 12.5  $\mu$ g/mL HNK 含有 BHI-S 液体培地 4 mL に *S. mutans* (OD<sub>600</sub>=0.1) を 80  $\mu$ L 加え、37°C 嫌気条件下で 24 時間培養した。浮遊菌液を取り除いた後に、0.22  $\mu$ m のフィルターを用いて濾過滅菌した PBS で 3 回洗浄した。洗浄後、セルスクレーパー (TPP Techno Plastic Products) を用いてバイオフィームを剥離し回収した。回収したバイオフィームから、NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel GmbH, Duren, Germany) を用いて mRNA を抽出後、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix (TOYOBO Co. Ltd, 大阪) を用いて cDNA を合成した。16srRNA 遺伝子をハウスキーピング遺伝子とし、Step One Real time PCR Systems (Version 2, Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, USA) を用いて、遺伝子発現量を Real-time PCR 法 ( $\Delta\Delta$ Ct 法) で解析した。本実験では、*gtf* 遺伝子を解析対象とし<sup>31,32)</sup>、表 1 に示す遺伝子とプライマーを解析対象とした。

表 1 本研究で使用したプライマー

Gene	Sequences (5' → 3')	References
16s rRNA	Forward: CCATGTGTAGCGGTGAAATGC	31
	Reverse: TCATCGTTTACGGCGTGGAC	
<i>gtfB</i>	Forward: GATCAAGATGTTCCGCGTTGC	32
	Reverse: ACACATACTGCGGTGCCATT	
<i>gtfC</i>	Forward: GATCAAGAAGCGGCTGGTTT	32
	Reverse: ACATGACGCGTGAATCAAGG	
<i>gtfD</i>	Forward: ATTAAATATGCCCGCGTGG	32
	Reverse: ATGCGCAGTCCCCATATTGA	

7. 統計処理

*S. mutans* に対する増殖抑制効果、バイオフィーム形成への影響、遺伝子の発現動態の解析を 3 回実施して平均値と標準偏差 (SD) を算出した。統計学的解析は GraphPad Prism 9 を用いて一元配置分析を行い、有意差が認められた場合にはさらに Dunnett 検定による多重比較解析を行い、有意水準 5%, 1% 未満で検定した。

結 果

HNK の *S. mutans* に対する MIC は 25.0  $\mu$ g/mL, MBC は 100  $\mu$ g/mL であった。6.3  $\mu$ g/mL および 12.5  $\mu$ g/mL の HNK 添加 BHI-S 液体培地中で培養された *S. mutans* の増殖は、培養開始後 32 時間の時点まで抑制された (図 1)。

HNK の *S. mutans* バイオフィーム形成に対する影響を検討する目的で、濃度の異なる HNK 溶液を *S. mutans* 培養液に添加し 24 時間培養後のバイオフィーム形成への影響を評価した。6.3  $\mu$ g/mL および 12.5  $\mu$ g/mL HNK 添加時において、*S. mutans* バイオフィーム形成は HNK 非添加時と比較して有意に抑制した ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (図 2)。また、*S. mutans* バイオフィームに対して、HNK は濃度依存的に優位な抑制効果を示した。その抑制率は 6.3  $\mu$ g/mL HNK では、25.2%, 12.5  $\mu$ g/mL HNK では 74.8% であった。

バイオフィーム中の *gtfB*, *gtfC* および *gtfD* の遺伝子発現量を、HNK 非添加で形成したバイオフィーム (コントロール群) での遺伝子発現量を 1.0 として相対的に比較した結果、*gtfB* では 6.3  $\mu$ g/mL HNK で約 0.7, 12.5  $\mu$ g/mL HNK では約 0.4, *gtfC* では 6.3  $\mu$ g/mL HNK で約 0.8,

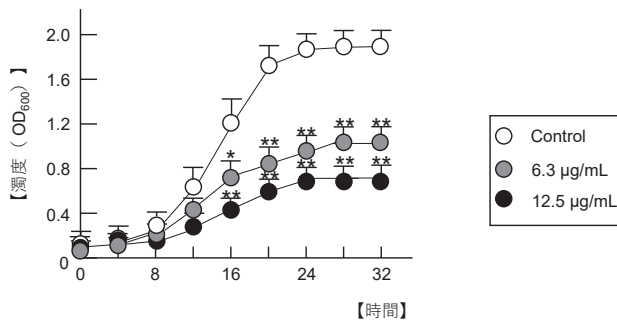


図1 HNKが*S. mutans*の増殖に及ぼす影響

各種濃度のHNK添加BHIS液体培地で培養後、0、8、16、24、32時間後に分光光度計を用いて600 nmにおける細菌培養液の濁度を測定した。グラフは独立した3回の平均値を示し、平均値±SDで表した。  
(\* $p<0.05$ ) (\*\* $p<0.01$ ).

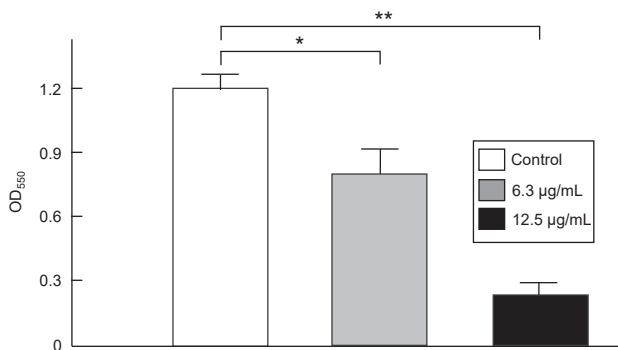


図2 HNKの*S. mutans*バイオフィーム形成への影響

比較対象に用いたHNK非添加群および各濃度のHNKのバイオフィーム形成への影響を吸光度を測定し、平均値±SDで表した(\* $p<0.05$ )(\*\* $p<0.01$ ).

12.5 µg/mL HNKでは約0.5、*gtfD*では6.3 µg/mL HNKで約0.6、12.5 µg/mL HNKでは約0.3と有意に減少し、HNKによる、濃度依存的なバイオフィーム形成関連遺伝子の発現抑制が確認された(図3、 $p<0.05$ ).

## 考 察

本研究では、HNKの*S. mutans*に対する抗菌効果を検討するとともに増殖抑制効果、およびバイオフィーム形成抑制効果の観察を行った。*S. mutans*は、う蝕原因菌であり<sup>33)</sup>、う蝕に関わる代表的な細菌に対するHNKの効果の評価することはHNKの臨床的有用性を検討するうえで重要である。

HNKによる*S. mutans*の増殖抑制効果を評価した結果、6.3 µg/mL以上のHNK溶液では、培養後32時間まで菌の増殖抑制が濃度依存的に認められた(図1)。

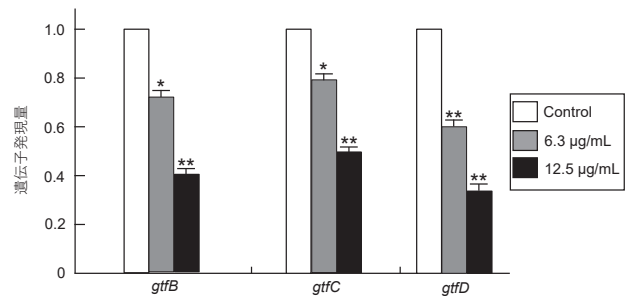


図3 RT-qPCRによる*gtf*遺伝子発現の比較

HNK非添加群を1.0とし、各濃度のHNK作用時の相対的な遺伝子発現を算出し、平均値±SDで表した(\* $p<0.05$ )(\*\* $p<0.01$ ).

バイオフィーム形成抑制実験では、培養24時間においてHNK非添加群と比較してHNK添加群においてバイオフィーム形成を抑制した。

*S. mutans*は、GTFB、GTFC、GTFDの3種類のGTFを産生する<sup>34)</sup>。GTFBは、大量の不溶性グルカンを産生することで、菌体を歯面に付着させ歯質脱灰力の強いう蝕原性プラークを形成することが知られている<sup>35)</sup>。さらに、う蝕の重症度とGTFBの産生に強い関連性も指摘されている<sup>36)</sup>。また、*S. mutans*の菌体表面に結合して存在するGTFB、GTFCは*gtfB*遺伝子、*gtfC*遺伝子にエンコードされ、不溶性グルカンを合成するが、これらの遺伝子が不活化することでバイオフィーム形性能が著しく低下することが報告されており<sup>37)</sup>、効率的にう蝕予防を行うには、不溶性グルカンの生成を抑制することが有効である。これらのことから、6.3 µg/mL以上のHNKはバイオフィーム形成関連遺伝子である*gtfB*、*gtfC*、*gtfD*の転写を減少させることで、*S. mutans*の付着を抑制させる可能性があると考えられた。

ヒト難治性細菌感染症の80%以上はバイオフィームが関与しているとされており<sup>38)</sup>、デンタルプラークも口腔内バイオフィームと考えられている<sup>39)</sup>。また、*S. mutans*は、細菌性心内膜炎の発症に関与していると報告されており<sup>40,41)</sup>、近年の超高齢社会のわが国における高齢者の全身管理との関係からも、プラーク形成を抑制する材料の開発は重要であると考えられる。HNKは、天然由来の安全性の高い歯科材料として予防歯科医療に貢献すると考える。

結論として、HNKは*S. mutans*に対する抗菌効果を有し、増殖抑制効果を有するとともにバイオフィーム形成を抑制することで、う蝕予防に役立つ可能性が示された。

## 謝 辞

研究手法についてご助言いただいた大阪歯科大学薬理学講座 佐々木由香講師, 医療イノベーション研究推進機構 神田龍平助教に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Aida J, Ando Y, Akhter R et al.: Reasons for permanent tooth extraction in Japan. *J Epidemiol* 16: 214-219, 2006.
- 2) Keyes HP: Present and future measures for dental caries control. *J Am Dent Assoc* 79: 1395-1404, 1969.
- 3) Newbrun E: Chapter 2. Current concepts of caries etiology. *Cariology*. Williams & Wilkins Co, United states, 1978, pp. 290.
- 4) Aas JA, Paster BJ, Stokes LN et al.: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43: 5721-5732, 2005.
- 5) Siquiera WL, Custodio W, McDonald EE: New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 91: 1110-1118, 2012.
- 6) Hamada S, Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44: 331-384, 1980.
- 7) Kuramitsu HK: Virulence factors of mutans streptococci: Role of molecular genetics. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 159-176, 1993.
- 8) Hamada S, Koga T, Ooshima T: Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J Dent Res* 63: 407-411, 1984.
- 9) Koga T, Okahashi N, Takahashi I et al.: Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype *c*. *Infect Immun* 58: 289-296, 1990.
- 10) Cross ES, Kreth J, Zhu L et al.: Nanomechanical properties of glucan and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. *Microbiology* 153: 3124-3132, 2007.
- 11) Banas JA, Vickerman MM: *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Brazilian Oral Res* 24: 135-141, 2010.
- 12) Nishimura J, Saito T, Yoneyama H et al.: Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and related bacteria. *Adv Microbiol* 2: 208-215, 2012.
- 13) Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T et al.: Contributions of three glucosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 80: 1672-1677, 2001.
- 14) Fukushima K, Ikeda T, Kuramitsu HK et al.: Expression of *Streptococcus mutans* *gtf* Genes in *Streptococcus milleri*. *Infect Immun* 60: 2815-2822, 1992.
- 15) Vacca-Smith AM, Bowen WH: Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Crit Rev Oral Biol Med* 43: 103-110, 1998.
- 16) Ventaraman RA, Vacca-Smith AM, Kopec KL et al.: Characterization of glucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. *J Dent Res* 74: 1695-1701, 1995.
- 17) Erdtman H, Gripenberg J: Antibiotic substances from the heart wood of *Thuja plicata* Don. *Nature* 13: 719, 1948.
- 18) Yamato M, Hashigaki K, Yasumoto Y et al.: Synthesis and antitumor activity of tropolone derivatives. *J Med Chem* 30: 1245-1248, 1987.
- 19) Lee JH, Moon JH, Lee YJ et al.: SIRT1, a class III histone deacetylase, regulates LPS-induced inflammation in human keratinocytes and mediated the anti-inflammatory effects of hinokitiol. *J Invest Dermatol* 137: 1257-1266, 2017.
- 20) Xu Y, Wang S, Miao Q et al.: Protective role of hinokitiol against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury in human corneal epithelium. *Curr Eye Res* 42: 47-53, 2017.
- 21) Trust TJ, Coombs RW: Antibacterial activity of  $\beta$ -thujaplicin. *Can J Microbiol* 19: 1341-1346, 1973.
- 22) Van der Kamp BJ: Effects of heartwood inhabiting fungi on thujaplicin content and decay resistance of western redcedar (*Thuja-Plicata Donn*). *Wood Fiber Sci* 18: 421-427, 1986.
- 23) Wang TH, Hsia SM, Wu CH et al.: Evaluation of the antibacterial potential of liquid and vapor phase phenolic essential oil compounds against oral microorganisms. *PLoS One* 11: e0163147, 2016.
- 24) Shih YH, Chang KW, Hsia SM et al.: *In vitro* antimicrobial and anticancer potential of hinokitiol against oral pathogens and oral cancer cell lines. *Microbial Res* 168: 254-262, 2013.
- 25) Osawa K, Matsumoto T, Maruyama T et al.: Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their constituents against periodontopathic bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll* 31: 17-21, 1990.
- 26) Nagao Y, Sata M: Effect of oral care gel on the quality of life for oral lichen planus in patients with chronic HCV infection. *Virol J* 8: 348, 2011.
- 27) Iha K, Suzuki N, Yoneda M et al.: Effect of mouth cleaning with hinokitiol-containing gel on oral malodor: A randomized, open-label pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 116: 433-439, 2013.
- 28) Domon H, Hiyoshi T, Maekawa T et al.: Antibacterial activity of hinokitiol against-resistant and -susceptible pathogenic bacteria that predominate in the oral cavity and upper airways. *Microbiol Immunol* 63: 213-222, 2019.
- 29) Wikler MA, Low DE, Cockerill FR et al.: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-Seventh edition. *Clinical Laboratory Standards Institute Document* 26: 3-36, 2006.
- 30) Nomura R, Morita Y, Matayoshi S et al.: Inhibitory effect of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate against adhesion and colonization by *Streptococcus mutans*. *Sci Rep* 8: 5056, 2018.
- 31) Dong L, Tong Z, Linghu D et al.: Effects of sub-minimum

- inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. Int J Antimicrob Agents 39: 390-395, 2012.
- 32) Sun M, Kang Q, Li T et al.: Effects of high-fructose corn syrup on *Streptococcus mutans* virulence gene expression and on tooth demineralization. Eur J Oral 122: 216-222, 2014.
- 33) Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB: Dental caries. Lancet 369: 51-59, 2007.
- 34) Kuramitsu HK, Wondrack H: Insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* serotype c strains. Infect Immun 42: 763-770, 1983.
- 35) Idone V, Brendtro S, Gillespie R et al.: Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. Infect Immun 71: 4351-4360, 2003.
- 36) Yoshida A, Kuramitsu HK: *Streptococcus mutans* biofilm formation: Utilization of *gtfB* promoter-green fluorescent protein (*pgtfB::gfp*) construct to monitor development. Microbiology 148: 3385-3394, 2002.
- 37) Narisawa N, Kawarai T, Suzuki N et al.: Competence-dependent endogenous DNA rearrangement and uptake of extracellular DNA give a natural variant of *Streptococcus mutans* without biofilm formation. J Bacteriol 193: 5147-5154, 2011.
- 38) Davis D: Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov 2: 114-122, 2003.
- 39) Marsh PD: Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res 38: 204-211, 2004.
- 40) Nakano K, Nomura R, Ooshima T: *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. Jpn Dent Sci Rev 44: 29-37, 2008.
- 41) Nakatani S, Ohara T, Ashihara K et al.: JCS 2017 guideline on prevention and treatment of infective endocarditis. Circ J 83: 1767-1809, 2019.

著者への連絡先：吉松英樹 〒573-1121 大阪府枚方市樟葉花園町 8-1 大阪歯科大学歯学部口腔衛生学講座  
TEL : 072-864-3059 FAX : 072-864-3159  
E-mail : yoshimatsu@cc.osaka-dent.ac.jp

Effect of Hinokitiol on Growth and Biofilm Formation of *Streptococcus mutans*

Hideki YOSHIMATSU<sup>1)</sup>, Kahori KAWAMURA<sup>1)</sup>, Zheqi HUANG<sup>1,2)</sup>, Shijie YANG<sup>1,2)</sup>,  
Qianying LI<sup>1,2)</sup>, Takaya KITAYAMA<sup>1,2)</sup>, Kayo KOYANAGI<sup>3)</sup>, Keita KANO<sup>1)</sup>,  
Takashi DOI<sup>1)</sup>, Yoshiaki ONO<sup>3)</sup>, Kosuke KATAOKA<sup>1,4)</sup> and Tatsuro MIYAKE<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Preventive and Community Dentistry, Osaka Dental University

<sup>2)</sup>Graduate school of Dentistry, Osaka Dental University

<sup>3)</sup>Department of Special Care Dentistry, Osaka Dental University Hospital

<sup>4)</sup>Department of Oral Health Science and Social Welfare, Graduate School of Biomedical Sciences,  
Tokushima University

**Abstract:** Dental caries is the most common disease of the human mouth. *Streptococcus mutans* is a major cariogenic bacterium. Hinokitiol (HNK), a natural substance extracted from plants such as *Chamaecyparis obtusa* var., is known for its antibacterial and antifungal properties. Although the antibacterial effect of HNK against periodontal bacteria and fungi has been studied in detail, little is known about its antibacterial effect on cariogenic bacteria, specifically *S. mutans*. The purpose of this study was to investigate the antibacterial activity of HNK against *S. mutans*, and evaluate its potential as a preventive agent against cariogenic diseases. HNK marked remarkable antimicrobial activity against cariogenic bacteria. Moreover, it also inhibits the formation of *S. mutans* biofilms and exhibits bactericidal activity within the biofilms. Furthermore, HNK can inhibit key virulence factors of *S. mutans* associated with cariogenicity. In conclusion, HNK may be a new agent with anticariogenic potential not solely via inhibition of the growth of cariogenic bacteria.

J Dent Hlth 74: 52-58, 2024

**Key words:** Hinokitiol (HNK), Biofilm, *Streptococcus mutans*

**Reprint requests** to H. YOSHIMATSU, Osaka Dental University, 8-1, Kuzuhahanazono, Cho, Hirakata-shi, Osaka, 573-1121, Japan

TEL: 072-864-3059/FAX: 072-864-3159/E-mail: yoshimatsu@cc.osaka-dent.ac.jp