

# 抗菌活性を持つ沖縄県産生物資源の探索

松本亜里奈

沖縄県産生物資源のアクネ菌(*Cutibacterium acnes*)に対する抗菌活性試験を行い、化粧品原料としての有用性について評価した。亜熱帯生物資源ライブラリから試験に供した50%エタノール抽出液576点のうち、終濃度0.125~1 mg/mLの範囲で抗菌活性を持つ素材オキナワハイネズ・実など6点を見出した。これらの素材を液体クロマトグラフィーにて分画し、抗菌成分の画分情報を得た。

## 1 はじめに

アクネ菌(*Cutibacterium acnes*)は通性嫌気性のグラム陽性桿菌であり、皮膚常在菌の1種である。アクネ菌は多くのヒトの皮膚表面や毛穴に存在しており、皮脂を資化してプロピオン酸やオレイン酸などの脂肪酸を生成することで私たちの皮膚を弱酸性に保ってくれている。一方で、ストレスやホルモンバランスの変化により皮膚の正常な代謝サイクルが乱れ、毛穴が古い角質で詰まるなどして皮脂分泌が滞ると、アクネ菌が過剰に増殖し、炎症の誘発などニキビが悪化する要因になることが知られている<sup>1)</sup>。

アクネ菌に対する天然由来の抗菌活性素材に関する報告はいくつかあるが<sup>2), 3)</sup>、沖縄県産の植物素材に関する知見はまだ少ない。本研究では工業技術センターで保有する亜熱帯生物資源ライブラリを活用し、沖縄県産生物資源のアクネ菌に対する抗菌活性の評価を行い、化粧品原料としての有用性について検討した。

## 2 実験方法

### 2-1 試料

亜熱帯生物資源ライブラリに保存されている50%エタノール抽出液をサンプルとして抗菌活性試験のスクリーニングに用いた。抽出液は、県産植物素材等の凍結乾燥物を既報<sup>4)</sup>の通り高速溶媒抽出装置(Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extractor、サーモフィッシャー社製)または振とう抽出法にて得られたものを直前まで-30℃で保管し試験に供した。

### 2-2 アクネ菌に対する抗菌活性

アクネ菌は理化学研究所バイオリソース研究センターより分譲された菌株(*Cutibacterium acnes* JCM 6425T)を用いた。試験方法は既報<sup>5)</sup>の手順に従い、96穴マイクロプレートを用いて液体培養法により行った。GAM液体培地180 μLと種菌培養液(3~5日培養)10 μL、サン

プル液10 μLを分注した後、酸素吸収・二酸化炭素発生剤(アネロパウチ・ケンキ)とともにパウチへ封入して37℃で48時間培養した。対照は50%エタノール、陽性対照として0.5%塩化ベンザルコニウムを用い、抗菌活性は48時間培養前後(0時間と48時間)の吸収波長660 nmにおける吸光度の増加量(ΔAbs 660 nm)で評価し、スクリーニングにおいて増加量0.1以下のものを活性有りと判定した。なお、抗菌活性を示したサンプルについては、遠心エバポレーター(Savant SpeedVac Concentrator SPD2010、サーモフィッシャー社製)にて濃縮乾固し、固形物の重量を求め、それぞれ終濃度1、0.5、0.25、0.125、0.063 mg/mLの5点で濃度を振り、アクネ菌の増殖を抑える最小発育阻止濃度を調べた。

### 2-3 アクネ菌に対する抗菌活性を持つ素材の分離

抗菌活性を示した素材6点を分取カラムにかけ、抗菌活性成分の分離を試みた。装置はSeparations module 2690及びPhotodiode array detector 996(共にWaters社製)を用いて行った。分離条件を表1に示す。分離後の画分は減圧乾固し、それぞれ50%エタノール50 μLを加え、再溶解したものを抗菌活性試験に供した。

表1 液体クロマトグラフィー条件

カラム	YMC ODS-A 100×4.5 mm i.d., S-5 μm			
検出波長	190~500 nm			
溶媒	A:0.1%ギ酸 B:0.1%ギ酸含有アセトニトリル			
流量・分取	1.0 mL/min、4.5 min/本			
インジェクション	50 μL			
グラジエント				
時間(min)	0	17.3	23	36
B(%)	5	55	95	95

## 2-4 統計解析

対照に対する各素材の抗菌活性の統計解析はStudentのt検定にて行った。

## 3 実験結果および考察

### 3-1 抗菌活性を持つ素材のスクリーニング

アクネ菌に対する抗菌活性試験を行った50%エタノール抽出物576点の内、55素材に抗菌活性がみられた(表3)。これらの抽出液を濃縮乾固させたところ、固形分濃度が概ね10~20 mg/mLであったことからスクリーニング時の各素材の終濃度は0.5~1 mg/mLの範囲であったと考えられる。そこで終濃度0.063~1 mg/mLの範囲で濃度を振り、アクネ菌の増殖を抑える最小発育阻止濃度を調べたところ、6素材が抗菌活性を示した(表3)。

オキナワハイネズ・実、サルカケミカン・枝、マンジェリコン全草、コヘンルウダ・葉の4素材については、最小発育阻止濃度がそれぞれ0.125 mg/mL、0.25 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mLであった。一方で、シイクワシャー・果皮、ハマグルマについては終濃度1 mg/mLにおいてΔAbs 660 nmの値が0.1を超えていたが、対照と比較して有意(p<0.05)にアクネ菌の増殖を抑えており、対照に対するΔAbs 660 nmの割合は57.7±6.1%、75.8±0.7%であった。最小生育阻害濃度が求められなかった素材については、今後より高濃度で抗菌活性試験を行う必要がある。この他の素材については、対照と比較して全く抗菌活性を示さないか、有意な結果を示さなかったことから乾固時に活性物質が揮発したか、変性した可能性が考えられる。

表2 アクネ菌に対する抗菌活性を示した素材

No.	和名・部位	Δabs 660 nm
1	コヘンルウダ・莖葉(葉)	0.022 ± 0.002
2	ツボクサ・全草	0.080 ± 0.018
3	ニガウリ・実	0.090 ± 0.022
4	ヒハツモドキ・地上部	0.066 ± 0.072
5	リュウキュウイトバシヨウ・葉	0.059 ± 0.012
6	コヨメナ・全草	0.071 ± 0.005
7	ゲッキツ・枝	0.088 ± 0.013
8	シマクワ・葉	0.088 ± 0.005
9	タイワンイチビ・地上部	0.097 ± 0.001
10	タマシダ・地上部	0.084 ± 0.009
11	デイコ・樹皮	0.043 ± 0.010
12	ナンテン・莖	0.092 ± 0.003
13	ニガニガクサ・地上部	0.046 ± 0.015
14	ハマコウ・根・莖	0.095 ± 0.002
15	ハマサルトリイバラ・枝	0.092 ± 0.022

16	ハマナレン・莖葉	0.065 ± 0.017
17	ビョウヤナギ・枝	0.083 ± 0.004
18	シイクワシャー・果皮	0.088 ± 0.015
19	ヒレザンシヨウ・実	0.076 ± 0.017
20	ヒレザンシヨウ・枝	0.027 ± 0.009
21	フウトウカズラ・地上部	0.017 ± 0.006
22	フジマメ・莖葉(莖)	0.092 ± 0.018
23	ブソウゲ・枝	0.067 ± 0.025
24	ヘチマ・実	0.045 ± 0.024
25	ヘチマ・葉	0.054 ± 0.013
26	ヘチマ・莖	0.058 ± 0.009
27	モクビヤッコウ・全草	0.066 ± 0.029
28	ヤブカラシ・地下部	0.097 ± 0.017
29	ヤブカラシ・地上部	0.029 ± 0.009
30	ロブスターユーカーリ・樹皮	0.048 ± 0.014
31	ワケギ・地上部	0.028 ± 0.014
32	ウイキョウ・全草	0.037 ± 0.039
33	ブソウゲ・葉	0.073 ± 0.022
34	ハマボウフウ・葉	0.065 ± 0.027
35	サルカケミカン・葉	0.062 ± 0.004
36	カラシナ・可食部	0.088 ± 0.006
37	エンサイ・可食部	0.071 ± 0.016
38	アオモグサ・藻体	0.082 ± 0.082
39	アマチャヅル・葉	0.063 ± 0.022
40	イチヂク・葉	0.067 ± 0.009
41	オオオナモミ・地上部	0.095 ± 0.012
42	ハマグルマ・	0.063 ± 0.016
43	ギムネマ・	0.039 ± 0.014
44	キンセンレン・	0.079 ± 0.002
45	クマザサ・葉	0.073 ± 0.019
46	サルカケミカン・枝	0.045 ± 0.009
47	シソ・葉	0.094 ± 0.017
48	ホオズキ・地上部	0.029 ± 0.002
49	ハマササゲ・莖	0.033 ± 0.011
50	ナスナ・全草	0.045 ± 0.003
51	マンジェリコン・地上部	0.041 ± 0.012
52	タカナ・全草	0.088 ± 0.102
53	メジロホオズキ・地上部	0.039 ± 0.006
54	チシャノキ・葉	0.033 ± 0.002
55	オキナワハイネズ・実	0.066 ± 0.002

表3 抗菌活性を示した素材の最小発育阻止濃度

和名・部位	最小発育阻止濃度 (mg/mL)	Δ abs 660 nm
オキナワハイネズ・実	0.125	0.084 ± 0.003 (8.3)
マンジェリコン・地上部	0.25	0.102 ± 0.047 (19.8)
サルカケミカン・枝	0.25	0.107 ± 0.007 (19.7)
コヘンルウダ・莖葉(葉)	0.5	0.100 ± 0.018 (15.2)
シイクワシャー・果皮	1<	0.297 ± 0.001 (57.7)
ハマグルマ	1<	0.413 ± 0.001 (75.8)

※()内は対照Δabs 660 nmに対する割合(%)

### 3-2 抗菌活性をもつ成分の分離

終濃度0.125~1 mg/mLの範囲で抗菌活性を示した6素材の分離クロマトグラム及び抗菌活性試験の結果を図1~12に示す。

オキナワハイネズ・実、サルカケミカン・枝、マンジェリコン・地上部、シイクワシャー・果皮、ハマグルマ、コヘンルダ葉の全6素材において複数の画分で抗菌活性が有意にみられた。オキナワハイネズ・実の画分6、サルカケミカン・枝の画分3及びマンジェリコン・地上部の画分6については $\Delta\text{Abs } 660 \text{ nm}$ の値が0.1よりも低く(0.003 $\pm$ 0.004、0.051 $\pm$ 0.008、0.01 $\pm$ 0.002)、アクネ菌の増殖を強く抑制していることがわかった。特に、オキナワハイネズ・実の画分6及びマンジェリコン・地上部の画分6については、分離クロマトグラムにおいて面積の大きいピークが集中しており、素材そのものの抗菌活性に寄与する成分は比較的少なく、分離しやすい可能性がある。

一方で、コヘンルダ茎葉(葉)やシイクワシャー・果皮については、抗菌活性試験において $\Delta\text{Abs } 660 \text{ nm}$ の値が0.1よりも低い画分はみられず、弱い抗菌活性を持った成分が複数含まれているか、揮発性の抗菌成分が素材の抗菌活性に関与している可能性が考えられた。今後これらの抗菌成分の単離・同定を行っていく上で抽出効率の検討や、前処理の方法などなんらかの工夫が必要である。

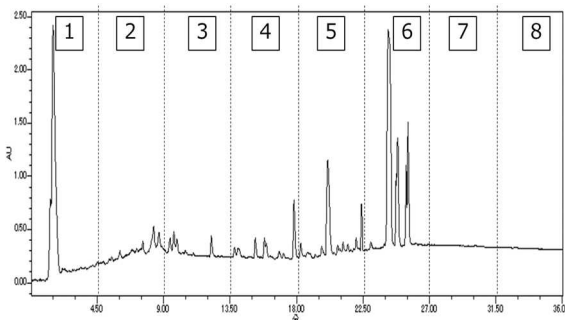


図1 オキナワハイネズ・実の分離クロマトグラム

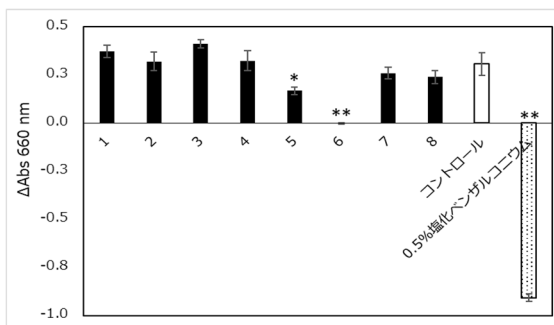


図2 オキナワハイネズ・実の画分ごとの抗菌活性 (\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ )

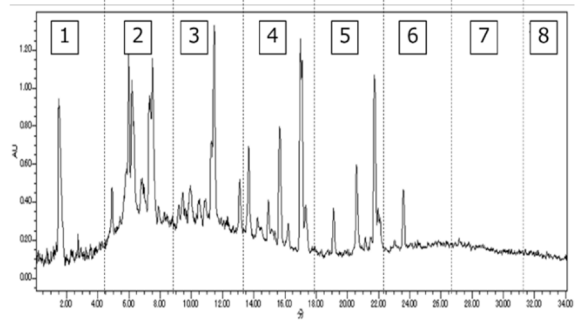


図3 サルカケミカン・枝の分離クロマトグラム

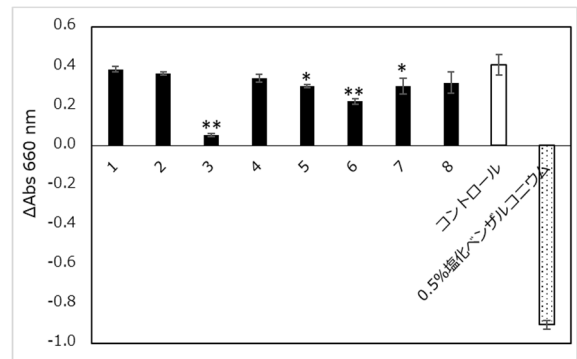


図4 サルカケミカン・枝の画分ごとの抗菌活性 (\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ )

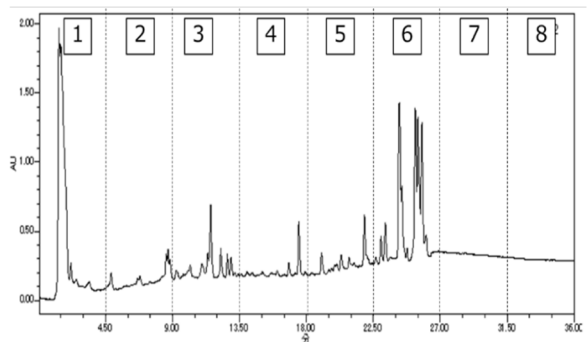


図5 マンジェリコン・地上部の分離クロマトグラム

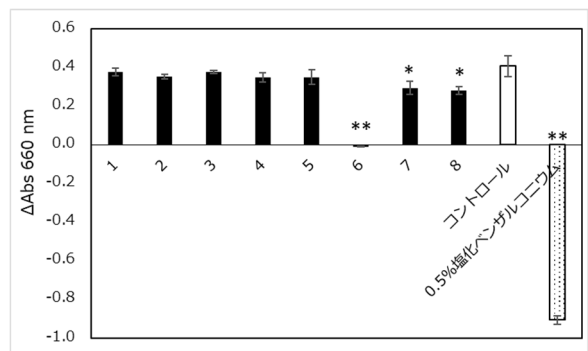


図6 マンジェリコン・地上部の画分ごとの抗菌活性 (\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ )

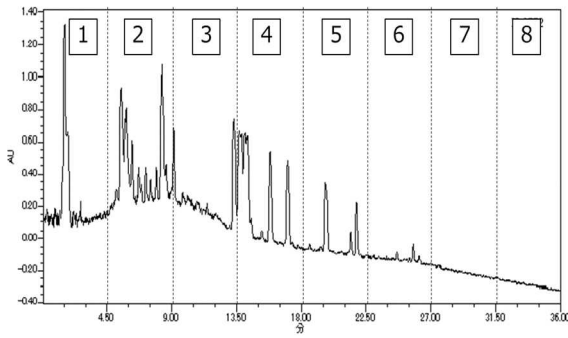


図7 コヘンルウダ・茎葉(葉)の分離クロマトグラム

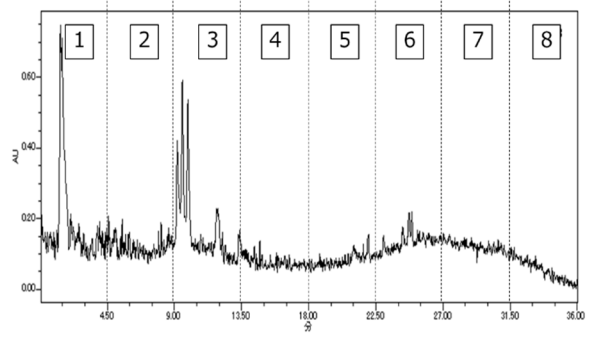


図11 ハマグルマの分離クロマトグラム

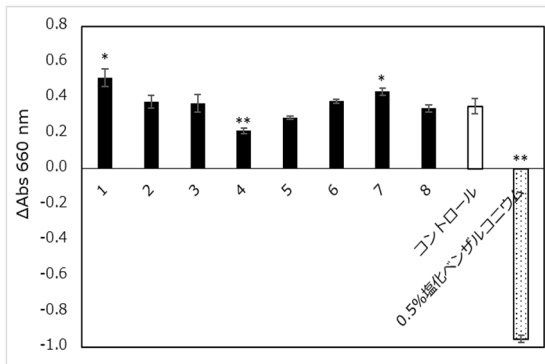


図8 コヘンルウダ・茎葉(葉)の画分ごとの抗菌活性 (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ )

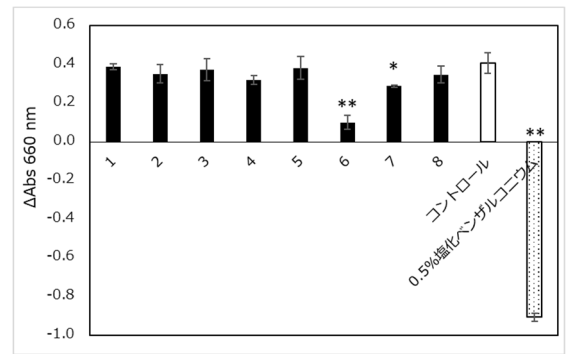


図12 ハマグルマの画分ごとの抗菌活性 (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ )

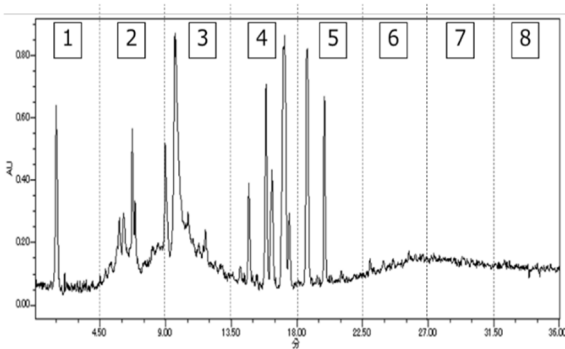


図9 シイクワシャー・果皮の分離クロマトグラム

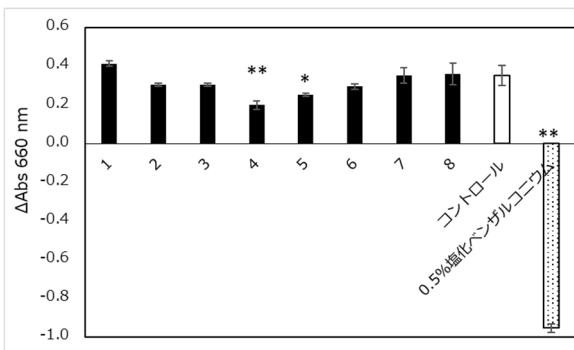


図10 シイクワシャー・果皮の画分ごとの抗菌活性 (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ )

#### 4 まとめ

アクネ菌に対する抗菌活性を持つ沖縄県産生物資源について調べ、終濃度0.125~1 mg/mLの範囲で抗菌活性を持つ素材6点を見出した。これらの素材を液体クロマトグラフィーにて分画し、抗菌成分の分離を試みた。

今後は各素材の活性成分の同定や量を調べ、香料品素材としての有用性についてより詳細に評価する必要がある。

本研究は、令和2年度~4年度の工業研究費(単独)「抗菌活性を持つ沖縄県産生物資源の探索(2020技010)」として実施した。

#### 参考文献

- 1) B.Dréno, S.Pécastaings, S.Corvec, S.Veraldi, A. Khammari and C.Roques : *Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acnes vulgaris: a brief look at the latest updates.* JEDEV, **32**(Supple.2), 5-14, doi:10.1111/jdv.15043(2018)
- 2) Irmanida Batubara and Tohru Mitsunaga : Use of Indonesian medical plants products against acne., *Reviewa in Agricultural Science*, 1:11-30, doi:10.7831/ras.1.11(2013)
- 3) 末吉美幸, 寺田竜太, 亀井勇統 : 日本沿岸海藻由来の抗アクネ起因菌*Propionibacterium acnes*活性の探索および活性物質の分離, 海と台地, 15 : pp.43-52(2002)

- 4) 豊川哲也, 鎌田靖弘, 与座江利子: 県産資源を活用した機能性食品素材の開発, 沖縄県工業技術センター研究報告第2号, 35-57 (2000)
- 5) 荻貴之, 松本亜里奈, 世嘉良宏斗、Idam Hermawan, 宇佐美徹: 沖縄県産テリハボク (*Calophyllum inophyllum*) の皮膚に関連する有用性の評価, 沖縄県工業技術センター研究報告第22号, 14-21(2020)

## **Exploration of bioresource produced in Okinawa Prefecture having antibacterial activity**

Arina MATSUMOTO

Okinawa Industrial Technology Center

We conducted antibacterial activity test for *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) that is bioresource produced in Okinawa Prefecture and evaluated the usefulness as a raw material for perfumery. Among the 576 points of the 50% ethanol extraction liquid provided to test from a subtropical resource library, we found 6 points consisting of *Juniperus taxifolia* var. *lutchuensis* seeds that have antibacterial activity in the final concentration range of 0.125 – 1 mg/mL. We fractionated these raw materials by liquid chromatography to obtain fraction information on the antibacterial component.

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。