

天然物由来画分の抗菌活性 —ヒバ, ヒノキ—

Anti-bacterial activity of natural products derived from the family *Cupressaceae*

藤原 永年*

FUJIWARA Nagatoshi

Hiba and Hinoki, Japanese native conifers belong to the family *Cupressaceae*. These woods are traditional and suitable timber for Japanese wooden buildings. It is reported that hinokitiol is extracted from Hiba and shows anti-bacterial activity. We predicted Hiba and Hinoki had anti-bacterial activity as natural products.

In this study, we tried to extract some components from Hiba and Hinoki and screened the anti-bacterial substances. It was shown that some natural products in Hiba and Hinoki reduced the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. As the results, we screened the natural products which have anti-bacterial activity, and applied the development of anti-bacterial car wax.

We hope that our study will contribute to screen natural products which have useful activities, and develop the valuable goods.

1. 緒言

日本の国土の 2/3 は森林であり、その 4 割はスギやヒバ、ヒノキなどの針葉樹の人工林となっている。これらの針葉樹は日本人に好まれる特有の色と香りを有し、建築用材として多用されるとともに様々な用途に有用であると考えられる。

ヒバ、ヒノキの心材は抗かび・抗菌効果があり、湿潤状態でも黴びにくく、腐り難いといわれる。また、健康に関連して、匂いを嗅がせることでマウスの運動量が増加すること、心地よい睡眠時に現れる脳波として知られている α 波がラットにおいて増加することなど、種々の機能が報告されている¹⁾。ヒバ、ヒノキの精油含有率は 1.0-3.0% であり、これら香り成分を抽出して芳香剤や入浴剤に利用したり、さらに防かび・抗菌効果や健康増進作用などを保持した芳香建材の開発など多方面への利用が期待できる²⁾。

本研究では、日本人が古来より嗜好する木材ヒバ、ヒノキに焦点を当て、抗菌効果を有する天然物由来画分のスクリーニングを実施した。親水性、親油性、茎、葉の成分を抽出して分画した天然物由来画分の抗菌活性を評価した。さらに、光触媒ワックス（商品名；ピカコート）へ追加混合することで新たな抗菌活性機能を付加価値として追加できるか、その可能性を検討した。

2. 方法

2.1 ヒバ、ヒノキの成分分画

ヒバ、ヒノキの親水性、親油性、茎、葉の成分を抽出して分画した各種試料は、車工房株式会社（兵庫県たつの市）より分与頂いた (Table 1)。ヒバ、ヒノキはともにヒノキ科の樹木であり、

* 学科 食物栄養学科 教授

強度（引張強度、圧縮強度、曲げ強度、せん断強度）や硬度はほとんど変わらない。ヒバは見た目が青く黄色味が強いのに比べ、ヒノキはピンクがかった色合いである。本研究で使用したヒバは 1966 年に青森県の木として指定され、県内で生育している「青森ヒバ」である。青森ヒバは、学術的には本多静六博士が 1901 年に従来のアスナロと違うアスナロの一変種として発見し、ヒノキアスナロと命名されたものである。学術名は *Thujopsis dolaburata* SIEBOLD et ZUCCARINI var. *hondai* MAKINO として登録・公認されている。

Table 1. ヒバ、ヒノキの抽出サンプル

サンプル No.	抽出画分
1	青森ヒバ+ヒノキ（1）
2	青森ヒバ+ヒノキ（2）
3	ヒノキ精油画分
4	青森ヒバ精油画分
5	ヒノキ親水画分（茎）
6	ヒノキ親水画分（葉）
7	青森ヒバ親水画分
8	ヒバ親水画分+ヒノキ親水画分（葉 1）
9	ヒバ親水画分+ヒノキ親水画分（葉 2）
10	ヒノキオイル（葉）

2.2 抗菌効果画分のスクリーニング（ディスク拡散法）

抗菌効果のスクリーニングのために、ディスク拡散法を応用して抗菌活性を評価した。黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus* ATCC 29213）および大腸菌（*Escherichia coli* ATCC 11775^T）を LB 液体培地で 16 時間振とう培養した。培養液 200 μ l を LB 寒天培地表面へ完全に染み込むまでコンラージ棒で塗抹した。ペーパーディスク（薄手, 6 mm, ADVANTEC, 東京）を培地表面にのせ、ヒバ、ヒノキの各抽出サンプル 5, 10 μ l ずつをペーパーディスクに染み込ませた。37℃、24 時間培養した後、その阻止円の形成度合いから抗菌効果を評価した。

2.3 抗菌活性の測定（希釈法）

抗菌効果を数値化するために、希釈法による抗菌活性から最小発育阻止濃度（MIC）を算出した。LB 液体培地を 1.8 ml 入れた試験管に各抽出サンプルを 0.2 ml 添加して 10% 溶液を作製した。順次 2 倍希釈することで 2 倍希釈系列を準備した。16 時間振とう培養した黄色ブドウ球菌 20 μ l を各試験管培地に植菌して、24 時間培養した。培地の濁度でブドウ球菌の増殖有無を確認し、MIC を決定した。

2.4 抽出成分の薄層クロマトグラフィー分析

各抽出サンプルに含まれる成分を検出するため、ヒバに含まれる抗菌成分として報告されているヒノキチオール（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪）を標準品として、薄層クロマトグラフィー（TLC）で成分パターンを分析した。薄層プレートは蛍光剤入り TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S（20×20 cm, Merck, Darmstadt, Germany）を用い、各サンプルを 5 μ l スポットして、酢酸エチル:トルエン（3:4, v/v）の溶媒で展開した³⁾。乾燥後、254 nm の紫外線を照射して、蛍光剤によるスポットとして検出た。

3. 結果

3.1 ヒバ、ヒノキの抗菌効果画分

Table 1 のヒバ、ヒノキ抽出画分についてディスク拡散法で、黄色ブドウ球菌および大腸菌に対する抗菌効果のスクリーニングを実施した。茎、葉を含む親水性画分には抗菌効果を認めなかったが、親油性である No. 3, 4, 10 の精油画分は 5 μ l, 10 μ l で容量依存的な阻止円が確認され、抗菌

効果があることが明らかとなった。No. 4 の青森ヒバ精油画分は No. 3 のヒノキ精油画分よりも強い抗菌効果を示した。各画分の抗菌効果のスクリーニング評価を Table 2 および Fig. 1 に示した。

Table 2. ヒバ、ヒノキ画分の抗菌効果スクリーニング

サンプル No.	抽出画分	阻止円形成 (ディスク法)	
		ブドウ球菌	大腸菌
1	青森ヒバ+ヒノキ (1)	±	±
2	青森ヒバ+ヒノキ (2)	±	±
3	ヒノキ精油画分	+	+
4	青森ヒバ精油画分	+	+
5	ヒノキ親水画分 (茎)	-	-
6	ヒノキ親水画分 (葉)	-	-
7	青森ヒバ親水画分	-	-
8	ヒバ親水画分+ヒノキ親水画分 (葉 1)	-	-
9	ヒバ親水画分+ヒノキ親水画分 (葉 2)	-	-
10	ヒノキオイル (葉)	+	+

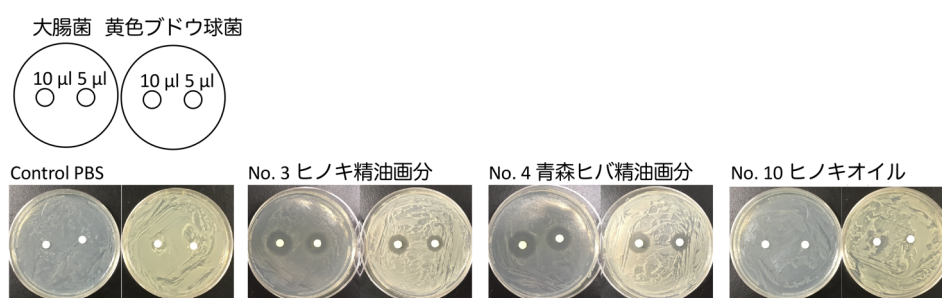


Fig. 1 ヒバ、ヒノキ画分の抗菌効果

3.2 最小発育阻止濃度

抗菌効果が認められた No. 3, 4 の各抽出画分について、MIC に準じてブドウ球菌に対する抗菌活性を数値化した。ヒノキ精油画分は 0.31%以上、ヒバ精油画分は 0.016%以上の濃度でブドウ球菌の発育を阻止した。ヒバ精油画分には強い抗菌活性を有することがわかった (Fig. 2)。

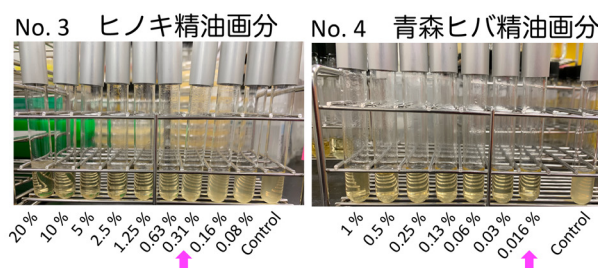


Fig. 2 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

3.3 抗菌活性物質の検索

抗菌活性を示す抽出画分に、既知の抗菌活性物質ヒノキチオール類似物質が含まれることが想定されたので、TLC でヒノキチオール類似物質の存在を検討した。ヒノキチオール標準品に相当する移動度 (Rf 値) に近いスポットが検出され、量的にはヒノキ精油画分よりヒバ精油画分の方が多かった。ヒノキチオール類似物質がヒノキ精油画分、ヒバ精油画分に含まれることが確認された (Fig. 3)。

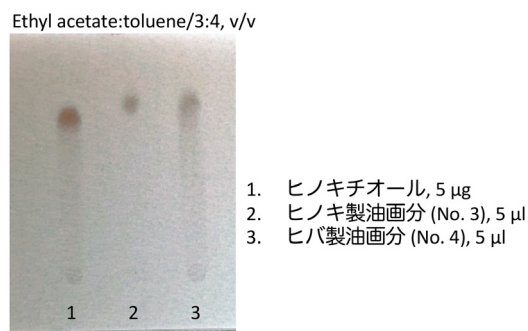


Fig. 3 TLC によるヒノキチオールの検出

3.4 光触媒ワックスへの応用

車工房株式会社で開発された光触媒を利用した抗菌コーティング用ワックス（商品名；ピカコート）にヒバ精油画分を追加混合することを試みた。ピカコートにヒバ精油画分を 9:1, 8:1, 7:1 (v/v) の割合で混合した試作品を作製して、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性をディスク拡散法で検討した。紫外線が照射されていない暗室の培養器で培養を行った結果、ピカコートの光触媒による抗菌効果は抑制された。ヒバ精油成分の割合増加に比して阻止円が大きくなり、濃度依存的に抗菌活性が認められた (Fig. 4)。

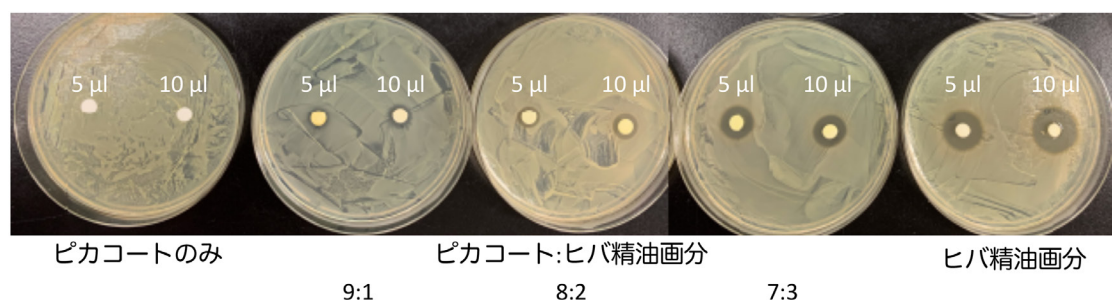


Fig. 4 ヒバ精油画分追加によるピカコートの抗菌活性効果

4. 考察

本研究では、天然物由来の抗菌物質をスクリーニングすることを第一の目的として実施した。日本で生産される伝統的な木材に含まれる抗菌物質を想定して、ヒバ、ヒノキ由来抽出物質の抗菌活性について検討した。実際に木材からの抽出物質を溶媒分画法で、親水性、親油性を中心に茎や葉の成分を分画した試料を入手し、グラム陽性菌の代表である黄色ブドウ球菌とグラム陰性菌の代表である大腸菌に対する抗菌活性を検討した。親水性画分に抗菌活性は認められなかったが、親油性画分には十分な抗菌活性があり、さらに、ヒバ、ヒノキを比較すると明らかにヒバの方に強い活性を認めた。ヒバにはヒノキチオールと呼ばれる抗菌成分が豊富に含まれており、ヒノキチオールの名からヒノキに豊富に含まれていると考えられたが、日本のヒノキに含まれているヒノキチオールの量はヒバと比較すると微々たるものであるとの報告がある^{1,2)}。本実験の結果からもヒノキに比べヒバの抗菌活性が強く、ヒノキチオールによる抗菌活性であることが示唆された。TLC でヒノキチオール標準品と比較すると、確かに Rf 値の非常に近いスポットが確認されたが、ヒノキチオール類似物質である可能性も想定される。質量分析等のさらなる解析が今後必要である。

次に、抗菌活性を有する天然物由来物質の応用について検討した。車工房株式会社の開発したピカコートは光触媒による抗菌ワックスであり、紫外線照射により抗菌活性を発揮する⁴⁾。紫外線照射を受けないところでは抗菌活性を認めず、それを補う目的で、天然物由来抗菌成分として本研究で検討したヒバ精油画分を追加することを試みた。ヒバ精油画分を 10-30%追加混合することで、光照射のないところでも十分な抗菌活性を有することが明らかとなった。当初はワックス自体も親油性でヒバ精油画分の溶解性が高いと想定していたが、実際にはピカコートとヒバ精油画分は混合後時間が経過すると 2 層に分かれる。溶解方法についても実用化に向けて検討が必要である。光触媒ワックスにヒバ由来成分を追加混合することで、抗菌活性以外にも、日本人の嗜好に合った特有の木材由来の香りが漂い、ストレス解消や健康増進作用も含め、付加価値の高い商品開発につながる可能性があると考えられる。

本研究では、ヒバ、ヒノキの抗菌成分のスクリーニングから抗菌活性評価、商品開発への取り組みを科学的根拠に基づいて試みた。これに限らず、天然物由来の抗菌効果や有用な活性を含む物質が沢山存在することが想定され、今後さらなる取り組みを継続したい。

参考文献

- 1) 谷田貝光克、土師美恵子：精油のマウスの運動量におよぼす影響とその揮散度について、木材学会誌、Vol. 31. No.5、(pp409)、1985
- 2) 岡野 健ほか編：木材居住ハンドブック、朝倉書店、1995
- 3) 成田廣枝、安藤直人、空閑重則：タイワンヒノキ古材の簡易識別方法、木材学会誌、Vol. 59. No.4 (pp.203-210)、2013
- 4) 野々山登、高山勝行、服部宏治：光触媒コーティングによる窓ガラスセルフクリーニング調査報告(光触媒・反射塗料、材料施工)、日本建築学会誌、(pp.1111-1112)、2006

謝辞

本研究は、研究協力者である帝塚山大学現代生活学部食物栄養学科の藤原ゼミ 2020 年度生・北村都紀が、卒業研究として実験操作を主に担当した。研究成果をまとめるにあたり、心より感謝の意を表す。また、車工房株式会社・岩本哲尚様、株式会社モダンタイムズ・濱部美江様には、試料や有益な情報を提供頂き、深謝致します。