

自生ハマナス (*Rosa rugosa*) の精油成分とその抗菌活性 ～コスメトロジーへの有効利用を目的とした基礎的研究～

弘前大学大学院 理工学研究科

長 岐 正 彦

The essential oils and distilled-water extracts of *Rosa rugosa* flower, leaf, and fruit were analyzed by flame ionization detector-gas chromatography and mass spectrometer-gas chromatography. The principle components in the flower oil and water were citronellyl acetate, citronellol, and geranyl acetate, and citronellol and geraniol, respectively. For the leaf oil and water, it was γ -muurolene and geraniol and linalool, respectively. The main component in fruit water was terpinen-4-ol. Fruit oil, on the other hand, could not be extracted. Additionally, combining the *Rosa rugosa* distilled-water with one of the isoprenoids geraniol, farnesol, or citral showed higher antibacterial activity than the isoprenoid alone.

1. ハマナスの成分分析

1.1 緒 言

isoprenoidは植物や昆虫、菌類など多くの生物の生体内でisoprene (C₅) から合成される生体物質である。また、isoprenoidは植物から発散される香り成分としても知られており、森林浴やアロマセラピー等の分野で注目されている。アロマセラピーにおいて、バラの精油は古くから人気が高いが、現在その殆どはトルコなどで栽培されるダマスクローズ (*Rosa damascena*) から精製されている¹⁻¹⁾。ハマナス (*Rosa rugosa*) は東アジアに広く分布するバラの原種の一つであり、日本に於いては北海道から山陰地方までの日本海沿岸に広く分布する。青森県では、青森市や鱒ヶ沢町がハマナスの花を市町村の花に指定しており、県民に広く親しまれている。ハマナスの花の成分に関しては、中国産のものを中心に幾つか報告されているが^{1-2)~1-6)}、葉や実等その他の部位に関する研究は少ない。我々は、県産ハマナスが含有する有用成分を検索するため、花や葉、実について成分を分析し、部位による成分の違いを調査した。また、ハマナスの花の香りについて研究する目的で、Head-Space法 (HS法) GC-MS測定による香気成分の分析も行った。

1.2 実 験

1.2.1 植物原料

ハマナスの花及び葉は青森県西津軽郡鱒ヶ沢町で2009年の6月に採取し、実は同年9月に採取した。



Composition and antimicrobial activity of the essential oil and water extract from Japanese wild *Rosa rugosa* ~Fundamental study on the effective use to cosmetology~

Masahiko Nagaki

Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University

1.2.2 成分抽出

植物からの成分の抽出には水蒸気蒸留法を使用した。蒸留は6時間行い精油を分取した。ハマナスの花2.5kgからは精油が0.15g (蒸留量に対し0.0058%) 得られた。また、ハマナスの葉634gからは精油が0.39g (0.062%) 得られたが、実からは精油は得られなかった。

水蒸気蒸留により得られた蒸留湯は、それぞれ1Lに対してhexaneを用いて4回 (100ml, 80ml, 60ml, 60ml、全量300ml) 抽出を行い、無水硫酸マグネシウムを用いた乾燥の後、溶媒を留去した。

1.2.3 分析

精油、及び蒸留湯からの抽出物の成分分析はGas chromatography-Flame ionization detector (GC-FID) 及びGas chromatography-Mass spectrometer (GC-MS) により行った。GC-FID分析はHitachi Gas Chromatograph G-5000Aにより行い、carrier gasはN₂を60ml/minで使用した。カラムはpoly (alkylene glycol) カラム (Sigma-Aldrich, 30m×0.25mm i.d.) を用い、昇温プログラムは40℃ (5min) - 10℃ /min - 200℃で行い、Injector、及びDetectorはそれぞれ150℃、250℃で使用した。GC-MS分析はJEOL Q1000 GC-Mk-IIを使用してHP-5カラム (Agilent, 30m×0.32mm i.d.) により分離した。carrier Heガスは1ml/minで用い、温度プログラムは50℃ (4.7min) - 15℃ /min - 280℃ (2min) で行った。injectorとGC-transfer lineは共に200℃に設定した。

HS法GC-MS測定は、JEOL12031 Headspace auto samplerと結合させたJEOL Q1000GC-Mk-IIにより行い、カラムはACUATIC (Agilent, 60m×0.32mm i.d.) を使用した。carrier Heは圧力15psiで使用し、昇温プログラムは40℃ (3min) - 10℃ /min - 170℃ - 20℃ /min - 200℃ (12.5min) で行った。Sample Loopモード、sample加熱は68℃により香気成分をGC部へ導入し、HS-transfer line及びGC-transfer lineはそれぞれ150℃、200℃で使用した。

成分の同定には、GC-MSにより得られたマススペクトルとNIST MSスペクトルライブラリデータ (<http://www>.)

nist.gov/srd/nist1a.cfm との比較、GC retention time (RT) の比較により行った。保持時間の一致は、標品との co-injection 測定、n-alkane (C₇ - C₄₀) のピーク時間から算出される Retention Index (RI) の文献値との比較により行った。また、各成分の割合は GC ピーク面積比から算出した。

1.3 結果と考察

1.3.1 ハマナスの花

ハマナスの花から得られた精油、及び蒸留湯からの抽出物成分を Table 1-1 に示す。精油からは全体の 85.2% に相当する 37 成分が同定され、citronellyl acetate を 12.1% と最も多く含有していた。Babuらの報告によれば、バラの精油生産に世界的に用いられているダマスクローズ (*Rosa damascena*) の精油は、citronellol と nerol の 2 成分で 35% を構成しており、geraniol も 21% と高い含有率で見られる¹⁻⁷⁾。これに対して、ハマナスの花から得られた精油は citronellol が 7.7%、nerol が 1.4% と、その合計 9.1% はダマスクローズの精油と比較して 3分の1以下であり、geraniol もハマナスの花の精油には 1.5% しか見られなかった。また、ダマスクローズでは、ハマナスの花の精油の最多成分である citronellyl acetate は殆ど見られていない¹⁻⁷⁾。この事から、ハマナスはダマスクローズよりも acetate 体を生成しやすいのではないかと考えられる。ハマナスの花の蒸留湯から抽出された成分は精油とは異なり citronellol を 31.4%、geraniol を 13.4%、nerol を 11.1% 含有と多く含有

しており、全体的に精油より alcohol 体の成分比が高く、acetate 体の成分比が低く見られた。geraniol や citronellol はその甘い香りにより香料等に広く用いられており、ハマナスの蒸留湯に含まれる成分も香水などへの応用に有用ではないかと考えている。

1.3.2 ハマナスの葉

葉の精油及び蒸留湯に含まれる成分を Table 1-2 に示した。葉の精油に最も多く見られた成分は γ -muurolene (10.4%) であるが、この化合物は蒸留湯抽出物では全く見られなかった。ハマナスは葉に於いても、geraniol、linalool の成分比が精油の 0.4%、0.2% に比べて蒸留湯では 4.2%、3.9% と高く見られた。青臭い香りにもかかわらず、ハマナスの葉がバラやラベンダーの花の香り成分である geraniol や linalool を含有していると言う事実は興味深い結果である。

1.3.3 ハマナスの実

ハマナスの実から得られた蒸留湯に含まれる成分は全体の 92.3% に相当する 52 成分が同定された (Table 1-3)。実の成分は樟脳様の香りを持つ terpinen-4-ol とラベンダー様の香りを持つ linalool がそれぞれ 19.1%、15.6% と非常に多く見られた。また、花・葉の蒸留湯では何れの acetate 化合物も 1% 未満の含有率だったのに対し、実の蒸留湯では lavandulyl acetate (6.6%)、linalyl acetate (3.4%)、geranyl acetate (3.2%) など比較的多く見られた。

1.3.4 ハマナスの花の香気成分

HS法GC-MS測定によるハマナスの花の香気成分を

Table1-1 ハマナスの花に含まれる成分

No.	components	EO (%)	DW ex. (%)	RT	RI	CI	No.	components	EO (%)	DW ex. (%)	RT	RI	CI
1	α -pinene	-	0.1	5:40	938	○	24	geranyl acetate	5.5	0.2	11:46	1385	○
2	β -myrcene	-	0.8	6:56	994	○	25	methyl eugenol	0.5	2.3	11:58	1405	-
3	α -terpinene	-	0.2	7:21	1019	○	26	β -cedrene	0.9	-	12:08	1426	-
4	<i>p</i> -cymene	0.7	1.4	7:29	1027	○	27	α -bergamotene	1.6	-	12:17	1443	-
5	limonene	1.6	3.7	7:34	1032	○	28	epi- β -santalene	0.6	-	12:23	1454	-
6	γ -terpinene	-	0.4	8:03	1063	-	29	γ -muurolene	6.1	-	12:31	1469	-
7	acetophenone	-	0.6	8:10	1071	-	30	α -curcumene	1.0	-	12:41	1489	-
8	<i>cis</i> -linalool oxide	-	0.5	8:17	1078	-	31	2-tridecanone	6.0	-	12:45	1496	-
9	linalool	0.5	9.0	8:38	1100	○	32	8-isopropyl-1,5-dimethyl cyclodeca-1,5-diene	5.5	-	12:53	1520	-
10	2-phenylethanol	0.9	8.1	8:50	1116	○	33	nerolidol	0.7	-	12:59	1524	-
11	<i>trans</i> -rose oxide	-	0.1	9:02	1132	-	34	caryophyllene oxide	0.3	-	13:32	1590	-
12	menthone	0.6	0.5	9:22	1158	○	35	widdrol	-	0.4	13:46	1620	-
13	terpinen-4-ol	-	0.7	9:40	1183	○	36	nerolidyl acetate	0.5	-	14:10	1672	-
14	α -terpineol	-	5.2	9:49	1195	○	37	β -bisabolol	0.5	0.1	14:21	1696	-
15	citronellol	7.7	31.4	10:13	1227	○	38	2-pentadecanone	1.4	-	14:23	1700	-
16	nerol	1.4	11.1	10:23	1242	-	39	farnesol	1.0	0.2	14:35	1728	○
17	neral	0.2	0.1	10:30	1254	○	40	farnesal	0.4	-	14:44	1748	-
18	geraniol	1.5	13.4	10:33	1260	-	41	hexadecanal	0.2	-	15:15	1819	-
19	2-phenyl ethyl acetate	-	0.7	10:41	1267	-	42	hexadecanol acetate	0.4	-	16:33	2008	-
20	geranial	0.2	0.1	10:42	1270	-	-	n-alkane (C ₂₁ ~C ₂₇)	23.2	-	-	-	-
21	citronellyl formate	1.4	-	11:29	1355	○		Total	85.2	96.3			
22	citronellyl acetate	12.1	0.8	11:34	1365	○							
23	eugenol	-	4.1										

EO : essential oil
DW ex. distilled water extract

Table1-2 ハマナスの葉に含まれる成分

No.	components	EO (%)	DW ex. (%)	RT	RI	CI	No.	components	EO (%)	DW ex. (%)	RT	RI	CI
1	1-octen-3-ol	-	0.1	6:44	981	-	32	1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl naphthalene	0.2	-	11:31	1360	-
2	β -myrcene	-	0.2	6:55	993	○	33	eugenol	-	0.1	11:33	1363	-
3	<i>p</i> -cymene	0.1	tr	7:30	1028	○	34	4-methylene-2,8,8-trimethyl-2-vinyl-bicyclo[5.2.0]nonane	1.0	-	11:44	1382	-
4	limonene	-	0.1	7:33	1031	○	35	β -damascenone	-	0.2	11:50	1393	-
5	benzyl alcohol	-	tr	7:40	1039	-	36	2,5-diisopropyl phenol	-	0.2	11:58	1408	-
6	<i>trans</i> -ocimene	-	tr	7:44	1043	-	37	β -cedrene	1.7	-	12:08	1426	-
7	benzenacetaldehyde	tr	tr	7:50	1050	-	38	α -cedrene	0.7	-	12:12	1434	-
8	ocimene (isomer)	-	0.1	7:54	1054	-	39	α -bergamotene	1.2	-	12:16	1442	-
9	<i>trans</i> -linalool oxide	-	0.7	8:16	1077	-	40	elemene	0.9	-	12:19	1447	-
10	<i>cis</i> -linalool oxide	-	0.5	8:30	1087	-	41	α -amorphene	3.7	-	12:23	1455	-
11	linalool	0.2	3.9	8:39	1101	○	42	γ -muurolene	10.4	-	12:31	1470	-
12	nonanal	0.3	0.3	8:43	1107	-	43	α -curcumene	1.2	-	12:41	1489	-
13	2-phenylethanol	-	0.2	8:50	1116	○	44	calamenene	0.1	-	13:09	1544	-
14	methoxy citronellol	0.1	-	9:17	1153	-	45	spathulenol	0.3	-	13:24	1574	-
15	2-nonenal	-	0.2	9:26	1165	-	46	caryophyllene oxide	0.8	-	13:32	1590	-
16	menthone	-	tr	9:30	1169	○	47	aromadendrene oxide	2.7	3.5	14:06	1663	-
17	nonyl alcohol	tr	-	9:34	1174	○	48	α -bisabolol oxide	-	1.0	14:09	1670	-
18	terpinen-4-ol	tr	1.2	9:39	1181	○	49	isolongifolol, methyl ether	-	0.8	14:11	1672	-
19	2-methyl acetophenone	tr	0.3	9:44	1188	-	50	β -eudesmol	0.3	-	14:15	1683	-
20	α -terpineol	tr	1.5	9:49	1195	○	51	α -bisabolol	1.6	-	14:20	1685	-
21	decanal	0.1	-	9:58	1207	-	52	2,2,7,7-tetramethyl tricyclo[6.2.1.0(1,6)]undec-4-en-3-one	3.1	0.9	14:27	1709	-
22	citronellol	tr	0.4	10:13	1231	○	53	eudesma-5,11(13)-dien-8,12-olide	1.4	-	15:00	1784	-
23	neral	-	0.1	10:23	1247	○	54	isophytol	0.3	-	16:09	1948	-
24	2-butanoic acid, hexyl ester	0.1	-	10:27	1253	-	55	parthenium	0.8	-	16:11	1960	-
25	geraniol	0.4	4.2	10:29	1256	○	56	phytol	1.9	-	17:13	2114	-
26	piperitone	-	0.8	10:32	1260	-	-	n-alkane (C ₂₃ ~C ₂₇)	1.5	-	-	-	-
27	geranial	-	0.5	10:41	1275	○	-	Total	37.2	23.6	-	-	-
28	nonanal dimethyl acetal	0.1	-	10:43	1278	-	-	-	-	-	-	-	-
29	geranyl formate	tr	0.5	10:59	1303	-	-	-	-	-	-	-	-
30	undecanal	0.1	-	11:02	1307	-	-	-	-	-	-	-	-
31	4-hydroxy-3-methyl acetophenone	-	1.3	11:05	1313	-	-	-	-	-	-	-	-

tr : trace<0.1%

Table1-3 ハマナスの実に含まれる成分

No.	components	DW ex. (%)	RT	RI	CI	No.	components	DW ex. (%)	RT	RI	CI
1	ethyl tiglate	0.1	5:50	947	-	27	carvacrol	0.4	10:58	1302	-
2	6-methyl-5-hepten-2-one	0.2	6:50	990	-	28	undecanal	tr	11:01	1305	-
3	β -myrcene	1.5	6:52	992	○	29	neryl acetate	1.7	11:34	1365	○
4	<i>p</i> -cymene	0.1	7:27	1025	-	30	geranyl acetate	3.2	11:45	1384	○
5	limonene	0.5	7:31	1029	○	31	β -caryophyllene	5.1	12:10	1430	○
6	<i>trans</i> -ocimene	0.4	7:42	1041	-	32	α -bergamotene	0.3	12:16	1442	-
7	ocimene (isomer)	0.6	7:52	1052	-	33	β -farnesene	4.1	12:25	1458	-
8	γ -terpinene	0.2	8:00	1060	-	34	α -caryophyllene	0.2	12:28	1464	-
9	<i>trans</i> -linalool oxide	0.4	8:14	1075	-	35	γ -muurolene	0.1	12:31	1470	-
10	<i>cis</i> -linalool oxide	0.4	8:28	1089	-	36	eremophilene	0.1	12:39	1485	-
11	linalool	15.6	8:37	1099	○	37	β -bisabolene	0.1	12:54	1514	-
12	nonanal	0.8	8:41	1104	-	38	γ -cadinene	1.7	12:59	1524	-
13	1-octen-3-yl-acetate	0.8	8:48	1113	-	39	calamenene	0.3	13:03	1532	-
14	camphor	0.1	9:14	1148	-	40	caryophyllene oxide I	0.3	13:20	1566	-
15	borneol	1.0	9:30	1169	○	41	caryophyllene oxide II	3.5	13:36	1598	-
16	nonyl alcohol	0.1	9:33	1173	-	42	cubenol	0.3	13:50	1628	-
17	terpinen-4-ol	19.1	9:37	1179	○	43	γ -eudesmol	0.1	13:58	1643	-
18	<i>p</i> -cymen-8-ol	0.2	9:40	1183	-	44	τ -cadinol	4.2	14:01	1652	-
19	α -terpineol	6.4	9:47	1192	○	45	<i>cis</i> -Z- α -bisabolene epoxide	0.7	14:10	1672	-
20	citronellol	0.4	10:12	1230	○	46	cadalene	0.2	14:18	1689	-
21	nerol	0.9	10:12	1230	○	47	longipinocarvone	0.4	14:49	1759	-
22	geraniol	2.9	10:29	1256	○	48	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone	0.8	15:27	1847	-
23	linalyl acetate	3.4	10:29	1256	○	-	n-alkane (C ₂₁ , C ₂₃ , C ₂₅ , C ₂₇)	1.4	-	-	-
24	carvenone	0.2	10:33	1263	-	-	Total	92.3	-	-	-
25	geranial	0.1	10:40	1273	○	-	-	-	-	-	-
26	lavandulyl acetate	6.6	10:51	1290	-	-	-	-	-	-	-

Table1-4 ハマナスの花の香気成分

No.	compound	RT	proportion (%)	MS agreement (%)	No.	Compound	RT	proportion (%)	MS agreement (%)
1	2-methy pentanal	9:23	1.0	88	19	benzaldehyde	17:51	0.6	83
2	2-pentanone	10:19	0.1	72	20	citronellol epoxide	18:51	0.1	79
3	2-methyl butanal	10:31	0.3	95	21	linalool	19:06	0.5	86
4	unknown	11:11	0.6	-	22	benzyl alcohol	19:12	2.4	92
5	4-methyl-1-hexene	11:15	0.6	86	23	rose oxide	19:27	5.2	95
6	acetoin	11:37	0.1	85	24	rose oxide	19:54	1.8	97
7	2,6-dimethyl-3-octene	12:02	0.3	86	25	citronellal	20:16	0.2	88
8	hexanal	12:59	0.2	95	26	2-nonenal	20:31	0.7	91
9	3-methyl-1-pentanol	14:24	0.4	94	27	cucumbaraldehyde	20:39	0.3	81
10	cis-2-hexen-1-ol	14:30	0.1	88	28	2-phenylethanol	20:54	37.6	93
11	5-methyl-2-hexanol	14:57	0.3	94	29	citronellol	21:43	37.5	99
12	methylonylketone	15:02	0.1	88	30	geraniol	22:37	1.9	97
13	4-methyl hexanal	15:17	0.3	89	31	citral	23:24	0.2	81
14	1-octen-3-ol	16:43	1.0	97	32	2-phenethyl acetate	23:45	0.3	96
15	2-pentyl fran	16:59	2.1	95	33	citronellyl acetate	24:24	0.5	96
16	octhyl oxirane	17:05	0.1	84	34	γ-cadinene	26:01	0.7	87
17	6-methyl-5-hepten-2-one	17:13	tr	78	35	methyl eugenol	28:36	1.5	98
18	trans-2-(2-pentenyl)fran	17:21	0.3	88	36	α-farnesene	29:43	0.2	90

Table1-4 に示す。ハマナスの花の香気成分は35成分が見られ、中でも2-phenylethanol (37.6%) と citronellol (37.5%) の2成分で75%以上を構成していた。このことから、ハマナスの花の香りにはこの2成分が大きく寄与していると考えられる。また、花の蒸留湯抽出物にのみ、0.1%と微量に含まれていた rose oxide の割合が合計7%と高く見られた。

1. 4 総括

ハマナスの花、葉からは蒸留重量に対してそれぞれ0.0058%、0.062%の精油が得られたが、実からは精油は得られなかった。ハマナスの花の精油は、一般的なダマスクローズオイルには殆ど見られない citronellyl acetate を12.1%と多く含有していた。この結果から、ハマナスの花の精油はダマスクローズとは異なる香気特性を持つ香料としての応用が期待される。また、花の蒸留湯から得られた成分は精油と比べ citronellol (31.4%) 等の flower like な香りを有するアルコール成分の含有率が高く見られ、化粧品などへの有用性が示された。また、ハマナスの葉はその青臭い香りにもかかわらず、geraniol や linalool といった花の香り成分を含有していた。ハマナスの実は、樟脳様の terpinen-4-ol を19.1%、ラベンダー様の linalool を15.6%と、香りの大きく異なる2つの成分を非常に多く含有している事が分かった。ハマナスの香気成分分析を行い、ハマナスの花の香りは2-phenylethanol (37.6%) と citronellol (37.5%) の2成分でその7割以上を構成していることが分かった。

(References)

1-1) N. G. Baydar, H. Baydar, T. Debener, Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in turkev by using AFLP and microsatellite makers. *J. Biotechnol.*, 111, 263-267 (2004).

1-2) Y. Wensheng, S. Lihua, Z. Dezhi, et al., Study on the Chemical Constituents of Essential Oil from Flower of *Rosa rugosa* Thunb. Var. alba Warb. *J. jilin For. Inst.*, 2, 7-11 (1992).

1-3) L. Zhaolin, Z. Fanxuzhi, C. Nengyu, et al., Study on Chemical Constituents of Fragrance Volatiles and Essential Oil of Lanzhou Rose (*Rosa rugosa* Thunb.). *Chin. J. Chromatogr.*, 1, 18-23 (1988).

1-4) P. Yan-li, Z. Bing-zhen, M. Zong-hui, et al., Study on Constituents of Volatile Oils from Flos Rosae Rugosa in Different Areas by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food and Drug*, 2, 2009.

1-5) Y. Ueyama, S. Hashimoto, H. Nii, et al., The essential oil from the flowers of *Rosa rugosa* Thunb. Var. *plema* Regel. *Flavor Fragr. J.*, 5 (2), 219-222 (1990).

1-6) Y. Hashidoko, THE PHYTOCHEMISTRY OF ROSA RUGOSA. *Phytomedicine*, 43 (3), 535-549 (1996).

1-7) K. G. D. Babu, B. Singh, V. P. Joshi, et al., Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures. *Fravor Fragr. J.*, 17, 136-140 (2002).

2. 抗菌活性試験

2.1 緒言

現代は地球のグローバル化が進む中、世界の小さな村などで発生した感染症もすぐに全世界へと蔓延してしまう可能性が高いといえる。また、その世界の中でちょうど日本は歴史上類を見ないほどの少子高齢化を迎えている。そして、最近ニュースでも話題になった多剤耐性菌の出現による院内感染なども報告されるようになってきている。このような状況の中で21世紀は感染症の時代と言われている。NDM-1 遺伝子を持った毒性の強い細菌による感染症や、鳥や豚からによる新型インフルエンザやSARSなどの新興感染症や黄色ブドウ球菌感染症、麻疹や結核などの再興感染症などが危惧されている²⁻¹⁾。

植物にはロシア語で「樹木から放散されて周囲の微生物などを殺すはたらきをもつ物質」を意味するフィトンチッドと呼ばれる森林浴の効果の元が含まれている。1930年頃、旧ソ連のB. P. トーキン博士は、この植物の不思議な力を発見し、フィトン(植物が)チッド(殺す)と名付けた。そのフィトンチッドとは植物が発する揮発性のイソプレノイド類のことである。そのイソプレノイド類には植物自らが大きく成長して繁殖するために、他の植物に対する成長阻害や自己防衛、アリやダニなどの小動物に対する摂食阻害、蛾や蝶などの昆虫に対する忌避・誘引、そしてカビなどに対する殺菌効果という働きを示すことが知られている²⁻²⁾。その中で、本研究ではイソプレノイド類の殺菌効果に着目し、院内感染の予防や公衆衛生に利用できる消臭・除菌剤の開発を目指している。さまざまな菌類に対してのイソプレノイド類の抗菌活性を明確にすることを目的とし、さらに天然の植物から抽出した精油や蒸留湯を使用した商品の開発を最終的な目標としている。

2.2 実験

試験は日本化学療法学会で推奨する寒天平板希釈法に従って行い、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。寒天培地にはMüller-Hinton Agar培地(MHA培地)を使用し、界面活性剤として5%HCO-50で濃度調整した被試験薬のイソプレノイド類を加えておく。その培地に植菌する菌類はOD550値を測定し、 1×10^6 CFU/mlに濃度を調整して播種する。また「MICの値が800 µg/ml以下で抗菌活性があると判断する」という日本化学療法学会の判定基準に従って、イソプレノイド類の抗菌活性の有無を判断する(Fig. 2-1)。

・グラム陽性菌とグラム陰性菌について

使用した菌類はグラム陽性菌とグラム陰性菌、真菌を用いた。そのグラム陽性菌とグラム陰性菌の違いは細胞壁の構造にある。グラム陽性菌は細胞膜の外側に分厚いペプチドグリカン層のみを持っている。一方、グラム陰性菌は薄いペプチドグリカン層の外側にさらに外膜を有している。この構造の違いをグラム染色法によって判断される。グラム染色によりペプチドグリカン層と外膜が青紫色になる。しかし、アルコールなどで処理すると、グラム陰性菌の染色された外膜は容易に壊れ流れ落ち、脱色される。グラム陽性菌ではペプチドグリカンの層が厚いため脱色されず色素が残り、青紫色が保持される。そのような染色の違いからグラム陽性菌とグラム陰性菌を区別することができる(Fig. 2-2)^{2-3, 2-4)}。

・真菌類について

真菌は微生物の中で、核が核膜に包まれた真核細胞で、細菌より大きく真核生物中もっとも原始的な生物であり、ミトコンドリアや小胞体などの細胞器官を持っている。また細菌と異なり、細胞壁は主に多糖類(グルカン、マンナン、キチン)で構成され、蛋白質や脂肪が存在する(Fig. 2-3)。

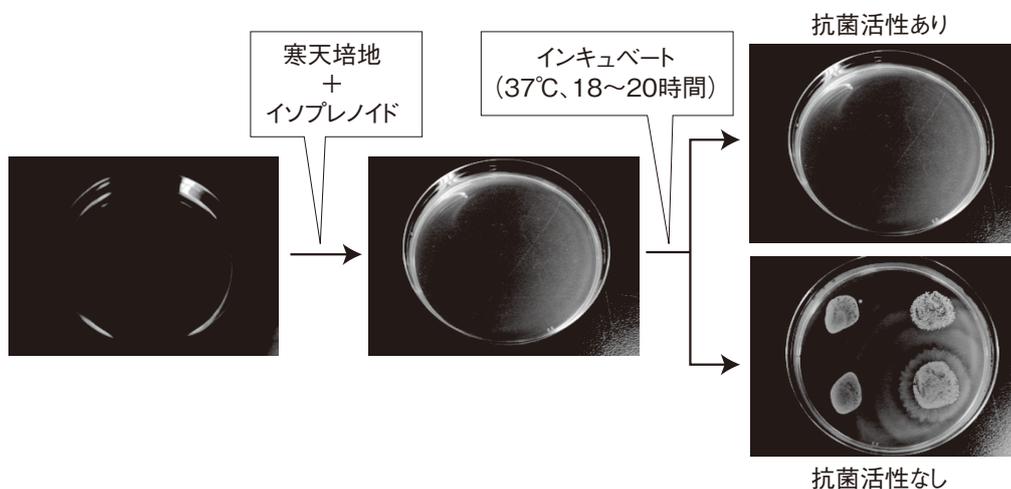


Fig. 2-1 寒天平板希釈法

・使用した菌株

グラム陽性菌 (Gram-positive bacteria) ^{2-5~2-7)}

- ・ *Staphylococcus aureus* 209P
: 黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*)
- ・ *Staphylococcus aureus* 834
: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)
- ・ *Listeria monocytogenes* 1b-1684
: リステリア・モノサイトゲネス (*L.monocytogenes*)

グラム陰性菌 (Gram-) ^{2-8, 2-9)}

- ・ *Escherichia coli* IFO-3806
: 大腸菌 (*E.coli*)
- ・ *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* χ 3306
: サルモネラ・ネズミチフス菌 (*S.Typhimurium*)
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC7853
: 緑膿菌 (*P.eruginosa*)
- ・ *Serratia marcescens*
: セラチア・マルセッセンス (*S.marcescens*)
- ・ *Shigella sonnei*
: 赤痢菌 (*S.sonnei*)
- ・ *Proteus mirabilis*
: プロテウス・ミラビリス (*P.mirabilis*)

真菌 (fungus/(複) fungi)

- ・ *Candida albicans*

: カンジダ菌 (*C. albicans*)

- ・ *Trichophyton sp.*
: 白癬菌
- ・ *Malassezia furfur*
: マラセチアフルフル真菌 ²⁻¹⁰⁾

・被試験薬

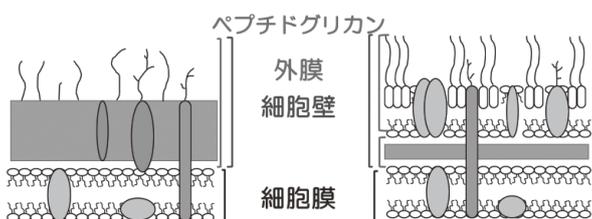
ハマナスの花の蒸留湯のヘキササン抽出物に含まれる geraniol、citronellol やラベンダーの精油成分に含まれている linalool、terpinen-4-ol など、本抗菌・抗真菌試験に用いた被試験薬のイソプレノイド類を構造式とともに Fig. 2-4 に記載する ²⁻¹¹⁾。

・寒天培地

Müller-Hinton Agar 寒天培地 (MHA 培地) は蒸留水に対して培地を 21g/L、寒天 15g/L の割合で加える。加熱攪拌して溶解させ、ピペットで試験管に 12 mL/本の割合で分注し、121℃、15 分間オートクレーブにて滅菌する。

Müller-Hinton Broth の成分 (1L 分)

Beef Extract Powder	2.0g
Acid Digest of Casein	17.5g
Soluble Starch	1.5g
(pH7.3±0.1)	



グラム陽性菌

グラム陰性菌

Fig. 2-2 グラム陽性菌とグラム陰性菌の違い

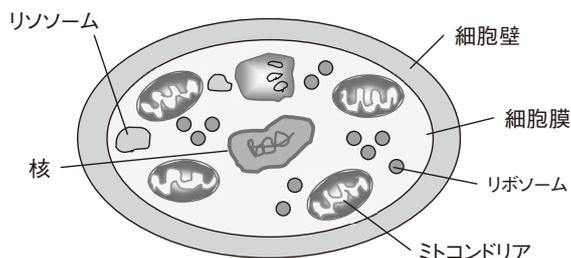


Fig. 2-3 真菌類の細胞構造

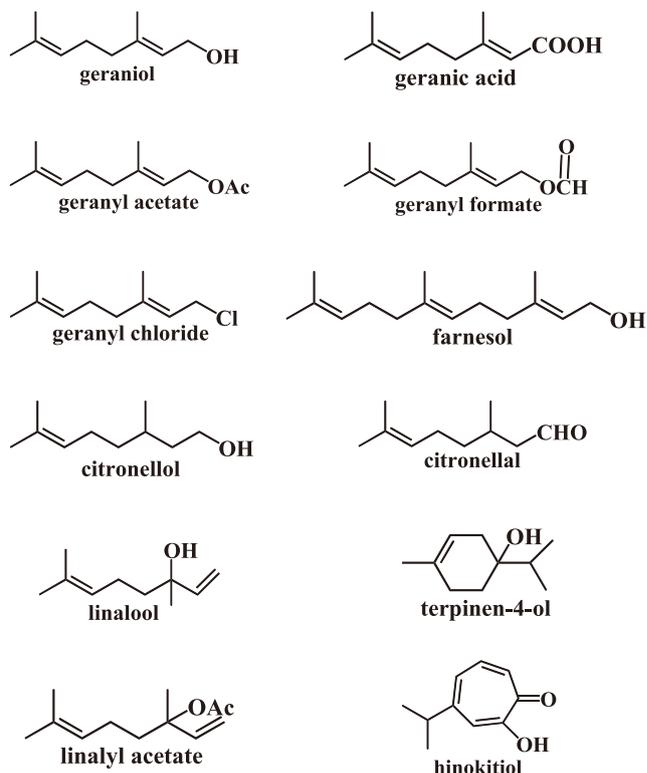


Fig. 2-4

・界面活性剤

被試験薬の親油性であるイソプレノイド類を寒天培地と円滑に混合させるために、界面活性剤であるHCO-50 (NIKKOL) を使用した^{2-12~2-16})。HCO-50はポリオキシエチレン硬化ヒマシ油で白色～微黄色のワセリン様又はろう状物質で、わずかに特異なにおいが特徴の界面活性剤である。また、皮膚に対する刺激や溶血性がほとんどなく、脂溶性物質の水への可溶化剤として優れている。実験に用いるときは蒸留水で5%に濃度にした状態の5%HCO-50にしてイソプレノイド類と混合させて使用した。

2.3 結果

・単一試験

Table 2-1 グラム陽性菌に対する単一試験の MIC

	MIC (µg/ml)		
	Gram-positive bacteria		
	<i>S.aureus</i>	MRSA	<i>L.monocytogenes</i>
geraniol	534	534	378
geranic acid	1900	1900	970
citral	720	720	720
farnesol	184	184	133
farnesal	40	40	n.t.
citronellol	279	321	321
linalool	1310	1310	n.t.
terpinen-4-ol	1400	1400	n.a.
hinokitiol	40	1.25	0.68

800 µg/ml以下で抗菌活性があるものは太字で示している。バラの香りの成分である geraniol は黄色ブドウ球菌と MRSA に対して 534 µg/ml で抗菌活性を示した。また farnesol は geraniol よりもグラム陽性菌に対して高い抗菌活性を示した。しかし、ラベンダーに含まれる linalool と terpinen-4-ol はグラム陽性菌に対して抗菌活性を示さなかった。

Table 2-2 グラム陰性菌に対する単一試験の MIC

	MIC (µg/ml)				
	Gram-negative bacteria				
	<i>E.coli</i>	<i>S.Typhimurium</i>	<i>S.marcesens</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>S.sonnei</i>
geraniol	445	400	700	540	445
geranic acid	1900	1900	7800	1900	1900
citral	1800	1800	7200	720	900
farnesol	-	-	-	-	-
farnesal	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
citronellol	-	-	-	-	471
linalool	656	n.t.	n.t.	n.t.	656
terpinen-4-ol	676	n.t.	793	n.t.	700
hinokitiol	34	34	n.t.	n.t.	25

geraniol は大腸菌、赤痢菌に対して 445 µg/ml で抗菌活性を示し、他のグラム陰性菌にも抗菌活性があることがわかった。しかし、グラム陽性菌に対して geraniol よりも高い抗菌活性を示していた farnesol はグラム陰性菌に対して

は全く抗菌活性を示さなかった。そして注目すべき点は、その farnesol とは逆にグラム陽性菌に対して抗菌活性を示さなかった linalool と terpinen-4-ol が大腸菌と赤痢菌に対して抗菌活性を示した。一般的にグラム陽性菌よりグラム陰性菌の方が抗菌活性を示しにくいといわれていることから、linalool と terpinen-4-ol の結果は興味深い結果と思われる。

Table 2-3 真菌に対する単一試験の MIC

	MIC (µg/ml)	
	Fungi	
	<i>C.albicans</i>	<i>Trichophyton</i> sp.
geraniol	378	88
geranic acid	750	18
farnesol	-	3.5
citronellol	340	34
citronellal	340	180
linalool	523	830
terpinen-4-ol	467	438
hinokitiol	n.t.	17

水虫の原因で知られる白癬菌に対して、ファルネソールは 3.5 µg/ml と非常に高い抗菌活性を示し、そのほかのイソプレノイド類も高い抗菌活性を示した。

・併用試験

Table 2-4 geraniol と farnesol を併用させ MRSA に対しての抗菌試験

Against MRSA	geraniol (µg/ml)			単一の MIC geraniol : 700 µg/ml farnesol : 180 µg/ml
	880	88	8.8	
farnesol (µg/ml)	880	+	+	+
	88	+	+	+
	70	+	+	+
	35	+	+	+
	18	+	+	+
	8.8	+	-	-

MRSA に対して単一の場合で geraniol は 700 µg/ml、farnesol は 180 µg/ml で抗菌活性を示すのに対し、併用すると geraniol は 8.8 µg/ml、farnesol は 18 µg/ml で抗菌活性を示した。単一に比べ 10 倍以上高い抗菌活性を示すことがわかった。

Table 2-5 farnesol と hinokitiol を併用させ *Trichophyton* sp. に対しての抗菌試験

Against <i>Trichophyton</i> sp.	farnesol (µg/ml)		単一の MIC farnesol : 3.5 µg/ml hinokitiol : 17 µg/ml
	8.8	0.88	
hinokitiol (µg/ml)	8.4	+	+
	6.8	+	+
	3.4	+	-
	1.7	+	-
	0.84	+	-

Trichophyton sp. に対して単一の場合で farnesol は 3.5 µg/ml、hinokitiol は 17 µg/ml で抗菌活性を示すのに対

し、併用すると farnesol は 0.88µg/ml、hinokitiol は 6.8µg/ml で抗菌活性を示した。これは単一の結果と比較すると飛躍的に高い抗菌活性を示した。

Table 2-6 citral と farnesol を併用させ MRSA に対する抗菌試験

Against MRSA	citral (µg/ml)			単一の MIC citral : 720 µg/ml farnesol : 180 µg/ml
	850	90	9.0	
880	+	+	+	
88	+	+	+	
farnesol (µg/ml)	70	+	+	
35	+	+	+	
18	+	+	+	
8.8	+	-	-	

MRSA に対して単一の場合で citral は 720µg/ml、farnesol は 180µg/ml で抗菌活性を示すのに対し、併用すると citral は 9.0µg/ml、farnesol は 180µg/ml で抗菌活性を示した。これは単一の結果と比較すると非常に高い抗菌活性を示している。

Table 2-7 citronellol と farnesol を併用させ S. aureus に対する抗菌試験

Against S. aureus	citronellol (µg/ml)				単一の MIC citronellol : 279 µg/ml farnesol : 184 µg/ml
	257	214	171	150	
133	+	+	+	+	
farnesol (µg/ml)	111	+	+	+	
89	+	+	-	-	

S. aureus に対して単一の場合で citronellol は 279µg/ml、farnesol は 184µg/ml で抗菌活性を示すのに対し、併用すると citronellol は 171µg/ml、farnesol は 111µg/ml で抗菌活性を示した。これは単一の結果と比較すると高い抗菌活性を示している。

・相加・相乗効果の検討

単一時より併用させた方が抗菌活性が高まること明らかになったが、その併用時に働いている効果が相加効果であるのか、相乗効果であるのかを明らかにするためにアイソボログラム (Isobologram) を用いて実験を試みた。

アイソボログラムについて

薬物の相乗作用について検討するためによく用いられる方法であり、ここでは併用発育阻止濃度指数 (Fractional Inhibitory Concentration index : FIC index) を測定する。FICindex が 0.5 以下 (Fig. 2-5 の (I) のエリア) では相乗効果を示し、FICindex が 0.5 ~ 1 (Fig. 2-5 の (II) のエリア) では相加作用を、FICindex が 1 以上 (Fig. 2-5 の (III) のエリア) では拮抗作用を示す。

$$FICindex = \frac{MICa (併用)}{MICa (単一)} + \frac{MICb (併用)}{MICb (単一)}$$

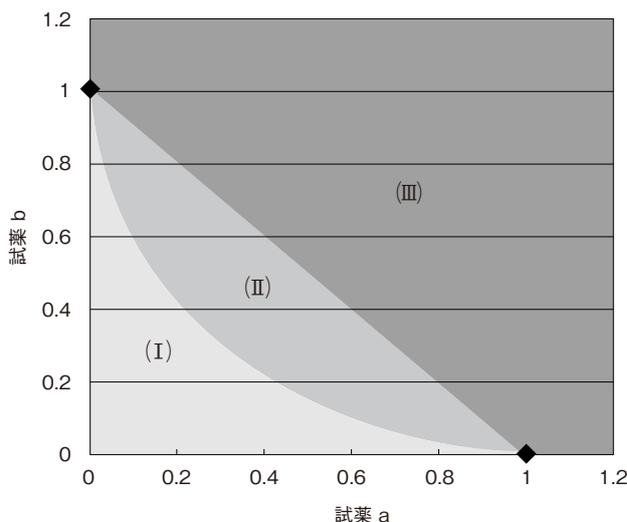
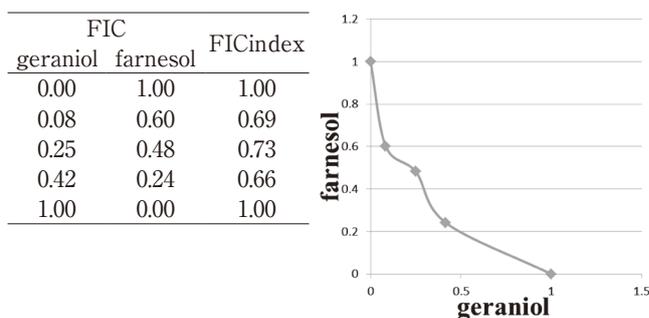


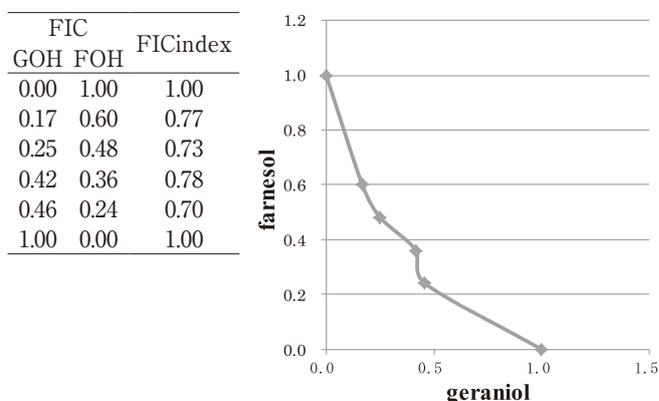
Fig. 2-5 試薬 a と試薬 b の併用の場合

Table 2-8 S. aureus に対して geraniol と farnesol 併用での抗菌試験のアイソボログラム



S. aureus に対して geraniol と farnesol 併用での抗菌試験で、FICindex が 0.66 ~ 0.73 で 0.5 以上であった。相乗効果は確認できなかったものの、相乗効果に近い相加効果が働いていることが今回初めて判明した。

Table 2-9 MRSA に対して geraniol と farnesol 併用での抗菌試験のアイソボログラム



MRSA に対して geraniol と farnesol 併用での抗菌試験で、FICindex が 0.70 ~ 0.78 で 0.5 以上であった。相乗効果は確認できなかったものの、相乗効果に近い相加効果が働いていることが判明した。

Table 2-10 ハマナス蒸留湯 MHA 培地に geraniol を添加した結果

geraniol (µg/ml) (+Floral water of <i>rosa rugosa</i>)	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria	
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>
467	+	+	+	+
445	+	+	+	+
423	+	+	+	+
400	-	-	-	-
378	-	-	-	-
Each of MIC (µg/ml)	534	534	445	445

Table 2-11 ハマナス蒸留湯 MHA 培地に farnesol を添加した結果

farnesol (µg/ml) (+Floral water of <i>rosa rugosa</i>)	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria	
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>
155	+	+	-	-
133	+	+	-	-
111	+	+	-	-
89	-	-	-	-
67	-	-	-	-
Each of MIC (µg/ml)	184	184	-	-

抗菌活性のあるイソプレノイド類を併用すると抗菌効果が高まることから、蒸留湯を使用した培地にイソプレノイドを添加した抗菌試験を行った。

ハマナス蒸留湯MHA培地にgeraniolを添加すると、Table 2-10のようにgeraniol単一MICの値よりグラム陽性菌の*S.aureus*とMRSAに対しては534µg/mlから423µg/mlまでにMICが減少し、抗菌活性が高まった。またグラム陰性菌の*E.coli*と*S.sonnei*に対しては445mg/mlから423µg/mlと抗菌活性のわずかであるが高められた。

ハマナス蒸留湯MHA培地にfarnesolを添加すると、Table 2-11のようにfarnesol単一MICの値よりグラム陽性菌の*S.aureus*とMRSAに対しては184µg/mlから111µg/mlまでにMICが減少し、抗菌活性が高まった。

2.4 考察

ハマナスの花に含まれるgeraniolやfarnesol、citronellolなどのイソプレノイド類には抗菌活性があることが明らかになり、その作用機序についてはわかってはいないが併用して用いるとその抗菌作用は高まる。そしてgeraniolとfarnesolを併用し、*S.aureus*とMRSAに対してはFICindexの値が0.66～0.78と相乗効果に近い相加効果が働いていると考えられる。そして、その効果でgeraniol、farnesolのどちらかの試薬に対しての濃度依存などはあまりしていないと考えられる。さらに、蒸留湯を使用した培地だけでは、グラム陽性菌とグラム陰性菌に対して抗菌活性は全くないにも関わらず、イソプレノイド類を添加することでそのイソプレノイド類の抗菌作用が高まることから、ハマナス蒸留湯には抗菌作用を補助する作用があると考えられる。

(References)

- 2-1) Po-Ren Hsueh *J Formos Med Assoc* **109** (10) (2010) 685-687.
- 2-2) S. Limsuwan, E. N. Trip, T. R. H. M. Kouwen, et al., *Phytomedicine* **16** (2009) 645-651.
- 2-3) 東匡伸、小熊恵二編 『シンプル微生物学(改訂第3版)』 南江堂 (2000)
- 2-4) C. M. Mann, S. D. Cox, J. L. Markham, *Lett Appl Microbiol* **30** (2000) 294-297.
- 2-5) I. Kubo, K. Fujita, K. Nihei, *Bioorg. Med. Chem.*, **11** (2003) 4255-4262.
- 2-6) A. Tanitame, Y. Oyamada, K. Ofuji, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **12** (2004) 5515-5524.
- 2-7) Stuart B. Levy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57** (2005) 1446-1450.
- 2-8) E. John Threlfall, *FEMS Microbiol. Rev.*, **26** (2002) 141-148.
- 2-9) P. L. Winokur, D. L. Vonsterin, L. J. Hoffman, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **Vol. 45** No. 10 (2001) 2716-2722.
- 2-10) V. Nalamothu, A. L. O'Leary, S. Kandavilli, et al., *MD Clinics in Dermatology* **27** (2009) S41-S43.
- 2-11) 弘前大学 21年度 理工学部 卒業論文 後藤嘉文 『青森県産植物(ハマナス)の精油・香気成分について』
- 2-12) 「Nikko Chemicals」 サイト内
< http://www.nikkol.co.jp/jp/nikkol/nikkol_hco-50.html > (2010/03/11 アクセス)
- 2-13) Harihara M. Mehendale: *Int. J. Toxicology*, **16** (3), 269 (1964).
- 2-14) 小西宏明: 信州医誌, **25** (3), 246 (1977).
- 2-15) 美間博之ほか: 薬学雑誌, **77** (1), 1201 (1957).
- 2-16) 鈴木守ほか: 表面, **6** (6), 392 (1968).