

令和 5 年 4 月 1 8 日現在

機関番号：4 7 1 1 3

研究種目：若手研究

研究期間：2021 ~ 2022

課題番号：2 1 K 1 4 8 1 1

研究課題名（和文）食品の香気成分の抗菌活性を用いた新たな感染症対策

研究課題名（英文）Infectious disease control using the antibacterial activity of food aroma components

研究代表者

山口 孝治（Yamaguchi, Takayoshi）

香蘭女子短期大学・その他部局等・准教授

研究者番号：9 0 4 4 1 7 2 4

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では様々なテルペノイドの組み合わせの中で、Carvacrol、Thymol、Nootkatone、Eugenolの4つの組み合わせが有効であることを明らかにした。さらにこの組み合わせは、ある種の細菌に対して、5分の処理で完全な殺菌を示したことから、けがなどの皮膚感染症の治療に有効である可能性が示唆された。しかし、グラム陽性球菌に対しては効果が弱かったため、他の組み合わせも調べる必要があると考えられる。

一方、軟膏やコーティングといった応用に関しては、その可能性につながる明確な結果は得られなかった。この点に関しては、実験方法や他の応用方法などを改めて調べる必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではテルペノイドの抗菌効果についての研究を行った。テルペノイドの抗菌効果には、高濃度が必要かつ、抗菌活性を示す細菌に限られるという問題点があったが、複数のテルペノイドを組み合わせることにより、単独使用よりも低濃度で広域スペクトラムの抗菌剤として使用できる可能性を明らかとした。

一方で、この組み合わせを感染症治療薬や感染予防対策といった社会への応用へつなげる点に関しては、明確な結果を残すことができなかった。しかし、in vitroでは明確な抗菌活性を示すことは明らかのため、うがい薬など他の応用方法についての研究を行うことで、様々な感染症対策として利用できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, among various combinations of terpenoids, four combinations of Carvacrol, Thymol, Nootkatone and Eugenol were found to be effective. Furthermore, this combination showed complete sterilization of certain bacteria in about 5 minutes of treatment, suggesting that it may be effective in treating skin infections such as wounds and pressure ulcers. However, it was less effective against Gram-positive cocci such as Staphylococcus aureus and Enterococcus, so other combinations should be investigated.

On the other hand, regarding applications such as ointments and coatings, no clear results leading to that possibility were obtained. Regarding this point, it is necessary to reexamine experimental methods and other application methods.

研究分野：細菌学

キーワード：テルペノイド 組み合わせ 増殖抑制 殺菌作用 軟膏 コーティング剤

1．研究開始当初の背景

近年、感染症に対する治療・予防法として、果物の果皮や香草に含まれる精油が注目されており、様々な細菌に対する抗菌活性に関する報告が出されている。その中でも最も注目されているのが、果実の果皮などに含まれる精油の構成物質のテルペノイドである。申請者もグレープフルーツの果皮に含まれる Nootkatone が、グラム陽性桿菌であるリステリア菌とセレウス菌に対して殺菌作用を示すことを明らかにしている。

一方で、実際にテルペノイドを用いた抗菌剤を実用化するには、「高濃度必要である」「対象となる細菌に限られている」という問題があり、依然として抗菌薬としての使用は行われていない。

これまでの研究で申請者は、Carvacrol と Thymol の組み合わせが、単独使用の場合よりも、低濃度かつ、広範囲の細菌に対して抗菌作用を示すことを明らかにしており、この組み合わせにさらにテルペノイドを加えることにより、低濃度で広域スペクトラムの組み合わせを開発できることが期待できる。

また、これまでの研究でテルペノイドの経口投与により、テルペノイドの血中濃度を高めることができることが報告されているが、抗菌活性を示すまで血中濃度を上げることは不可能であることが考えられるため、高濃度でも使用できる方法を開発する必要があると考えられる。

この 2 つの点を解決することができれば、テルペノイドを用いた抗菌剤がもつ濃度の問題を解決することができ、様々な場面で利用可能な抗菌薬としての可能性を大きく広げることができると考えられる。

2．研究の目的

本研究ではテルペノイドの抗菌薬としての実用化に関わる問題点の解決することを目的としている。申請者は「複数のテルペノイドを組み合わせで低濃度で効果的な組み合わせの開発」と「高濃度のテルペノイドを使用できる方法の開発」という二つの観点から問題解決を試みる。

本研究では、低濃度で広域スペクトラムのテルペノイドの組み合わせを作製するため、Carvacrol と Thymol の組み合わせを基盤として、様々なテルペノイドを添加する。この研究によって明らかになった組み合わせを軸にして、軟膏とコーティングといった高濃度で使用できる方法を確認し、テルペノイドの抗菌剤もしくは感染防止策などの応用への可能性を広げることが目的としている。

3．研究の方法

1. テルペノイドの組み合わせによる抗菌活性の評価

本研究では、これまで抗菌作用が確認されている Carvacrol と Thymol の組み合わせに、様々なテルペノイドを加える、もしくは、より効果的な組み合わせを明らかにし、その抗菌活性を調べた。これらのテルペノイドを組み合わせたものを Brain Heart Infusion(BHI)培地に添加し、グラム陰性細菌(*Salmonella* Enteritidis、*Eschericia coli*、*Acinetobacter baumannii*)、グラム陽性球菌(*Staphylococcus aureus*、*Enterococcus faecalis*)、グラム陽性桿菌(*Bacillus cereus*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Listeria monocytogenes*)の最小発育阻止濃度を測定した。また、stationary phase の菌液にテルペノイドを添加し、最小殺菌濃度を測定した。各細菌株の増殖に対する効果は分光光度計を用いた吸光度測定による増殖曲線の変化によって、殺菌効果はコロニーカウント法によって評価した。

2. テルペノイドを加えたワセリンの抗菌活性の評価

本研究では、テルペノイドを含んだ軟膏の原料としてワセリンと流動パラフィンを 1:2 で混合したものを用いた。BHI 寒天培地に各種細菌を塗布し、テルペノイドを添加したワセリンを BHI 寒天培地中央に添加した。その培地を 37℃ で 24 時間培養し、阻止円の直径を測定した。効果が見られたものに関しては、実際に皮膚に塗った場合を想定し、細菌を塗布した培地に、テルペノイドを添加したワセリンをコンラージ棒で塗り広げ、細菌の増殖が抑制されるかを評価した。なおコントロールとしては、テルペノイドを添加していないワセリンを用いた。

3. テルペノイドのコーティングによる感染予防効果の評価

本施設の設備では、テルペノイドをプラスチックなどにコーティングすることはできないため、本研究では寒天培地を用いたコーティングによる感染予防の効果について調べた。

まず、コーティングによる増殖抑制効果を調べる。BHI 寒天培地にコンラージ棒を用いてテルペノイドを広げて乾燥させたこの培地を、テルペノイドをコーティングした状態と見立てて、各菌株の菌液から白金耳を用いて菌液を広げ、細菌を付着させた。その培地を 37℃ で 24 時間培養する。コントロールには DMSO 塗布した BHI 寒天培地を用いた。

次に、殺菌作用を調べるため、同様の方法で 5%寒天にテルペノイドをコーティングし、今ラージ棒で細菌を付着させる。3 時間後に寒天を切り取り、10 ml の PBS で洗浄した。洗浄後の PBS を希釈し、コロニーカウント法により殺菌効果を評価した。

4 . 研究成果

まず、各細菌株の増殖に対するテルペン (Carvacrol、Thymol、Nootkatone、Eugenol、Limonene、Carvone、Geraniol) の影響を調べた。 0.25-4.0 mM テルペンを添加した培地で菌株を培養すると、Carvacrol と Thymol で効果的に増殖抑制が観察された。さらに Nootkatone はグラム陽性菌のみを抑制し、Eugenol は *C. diphtheriae* と *A. baumannii* のみを抑制した (表 1)。一方、Limonene、Carvone、Geraniol では増殖抑制は見られなかった。

表 1 テルペノイドによる細菌の増殖抑制

		Carvacrol	Thymol	Nootkatone	Eugenol	Limonene	Carvone	Geraniol
gram positive cocci	<i>E. faecalis</i>	2 mM	2mM	1 mM	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	2 mM	2 mM	1 mM	-	-	-	-
gram positive bacci	<i>B. cereus</i>	2 mM	1 mM	1 mM	-	-	-	-
	<i>C. diphtheriae</i>	1 mM	0.5 mM	0.5 mM	2mM	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i>	2 mM	1 mM	1 mM	-	-	-	-
gram negative bacci	<i>A. baumannii</i>	0.5 mM	0.5 mM	-	2mM	-	-	-
	<i>E. coli</i>	1 mM	1 mM	-	-	-	-	-
	<i>S. Enteritidis</i>	1 mM	1 mM	-	-	-	-	-

次に、テルペノイドの組み合わせによる成長抑制を評価するために、4 種類の組み合わせ (組み合わせ 1 (C1 : Carvacrol と Thymol、C2 : Carvacrol と Thymol、eugenol、C3 : Carvacrol と Thymol、Nootkatone、C4 : Carvacrol と Thymol、Nootkatone、Eugenol である。)) を作製した。これらの組み合わせによる細菌の増殖抑制については、単回使用と比較して組み合わせでより効果的であることが観察された (表 2)。グラム陰性菌 (*A. baumannii*、*E. coli*、*S. Enteritidis*) ではすべての組み合わせで増殖が効果的に抑制されたが、グラム陽性球菌は組み合わせによる効果が比較的低かった。テルペノイドの組み合わせによる違いについては、*C. diphtheria* 単独では C1 と C2 よりも低い濃度の C3 と C4 で増殖抑制効果を示したが、他の細菌は組み合わせによる相乗効果を示さなかった。

表 2 テルペノイドの組み合わせによる細菌の増殖抑制

Bacteria	combination of terpenoids			
	C1	C2	C3	C4
<i>E. faecalis</i>	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
<i>S. aureus</i>	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
<i>B. cereus</i>	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
<i>C. diphtheriae</i>	0.5 mM	0.5 mM	0.25 mM	0.25 mM
<i>L. monocytogenes</i>	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
<i>A. baumannii</i>	0.25 mM	0.25 mM	0.25 mM	0.25 mM
<i>E. coli</i>	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
<i>S. Enteritidis</i>	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM

次に同じ 4 つの組み合わせの殺菌活性を調べるため、テルペノイドを含む BHI で 30 分間培養した。大腸菌などの腸内細菌では、すべての組み合わせで 1 mM で完全な殺菌が起こった。C4 では、*C. diphtheriae* および *S. Enteritidis* に対して 0.5 mM で非常に強い殺菌活性が観察された。一方、*B. cereus* は他の細菌よりも感受性が低かったが、この理由は、培地中の *B. cereus* の一部が孢子を形成したためと考えられる。グラム陽性球菌(*E. faecalis* および *S. aureus*) については、C1 の組み合わせではほとんど殺菌効果が見られず、3 つまたは 4 つのテルペノイドの組み合わせでは 1 mM が必要だった(表 3)。

表 3 テルペノイドの組み合わせによる殺菌効果

		C.F.U. /ml							
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>
DMSO		1.1×10^9	1.3×10^{10}	1.3×10^{10}	3.8×10^8	3.9×10^9	4.6×10^9	3.8×10^9	1.36×10^{10}
C1	0.5 mM	1.1×10^9	1.2×10^9	1.0×10^5	7.4×10^7	2.8×10^9	5.4×10^9	4.8×10^9	1.0×10^{10}
	1.0 mM	1.2×10^9	5.7×10^8	1.6×10^5	2.0×10^4	1.8×10^4	5.7×10^4	0	0
C2	0.5 mM	1.0×10^9	1.2×10^9	8.2×10^5	2.2×10^3	9.0×10^6	1.9×10^5	3.6×10^6	7.0×10^9
	1.0 mM	3.6×10^6	1.7×10^7	5.9×10^5	0	1.9×10^4	0	0	0
C3	0.5 mM	1.1×10^9	1.1×10^9	5.8×10^5	4.8×10^7	1.8×10^9	2.2×10^9	4.5×10^9	2.8×10^3
	1.0 mM	7.1×10^7	4.9×10^7	5.1×10^5	0	0	0	0	0
C4	0.5 mM	1.2×10^9	1.1×10^9	4.8×10^5	0	5.3×10^4	3.1×10^3	9.2×10^3	0
	1.0 mM	6.9×10^4	5.2×10^5	1.9×10^5	0	0	0	0	0

次に、C4 の殺菌活性の経時変化を評価した。*C. diphtheriae*、*L. monocytogenes*、*A. baumannii*、*E. coli*、*S. Enteritidis* に対して、C4 の添加後 15 分まで明確な殺菌作用が観察された(図 1)。特に、グラム陰性菌(*A. baumannii*、*E. coli*、*S. Enteritidis*)では 5 分後に完全な死滅が起こった。一方、*B. cereus* は C4 を用いても 15 分以内に完全には死滅せず、さらにグラム陽性球菌である *E. faecalis* と *S. aureus* では弱い殺菌効果しか見られなかった(図 1)。

次に殺菌効果が見られた Carvacrol と Thymol、Nootkatone、Eugenol の 4 種類を組み合わせを使った軟膏の作製を行った。軟膏の原料としてはワセリンに流動パラフィン を 1:2 で加えたものを用いた。このワセリンに C4 を加えてテルペノイド軟膏とした。BHI 寒天培地に細菌の菌液を広げ乾燥したものに滅菌綿棒で軟膏を塗って培養したが、軟膏を塗った部分にも細菌の増殖が見られたため、軟膏の効果を明らかにすることはできなかった。そこで、寒天培地ではなく、人口皮膚シートを用いた評価を行った。菌液を塗った人口皮膚シートに軟膏を塗り 6 時間室温放置し人工シート状の菌数を測定したが、変化は見られなかった。

次にコーティングへの応用を調べるため、寒天培地に DMSO で希釈した 0.001 M の C4 を広げ乾燥後、白金耳で菌液を塗り培養したが、テルペノイドでコーティングしたものでも細菌の増殖が見られた。その後、1 M、0.1 M、0.01 M と高濃度のテルペノイドをコーティングしたものでも増殖抑制が見られなかった。さらに 5% 寒天を固めたものに同様の処理を行い、切り取った寒天培地上の細菌数を測定したが、菌数に変化は見られなかった。

以上の結果から、Carvacrol と Thymol、Nootkatone、Eugenol の 4 種類を組み合わせたものは広範囲の細菌に対して抗菌効果を示したが、それを軟膏やコーティングといったものに应用することはできなかった。この原因として、本研究で行った軟膏とコーティングの評価方法が正確ではなかったことが考えられる。よって動物実験を用いた in vivo での評価など、より正確に実用化の可能性を評価できる方法を開発する必要があると考えられる。また、軟膏やコーティング以外の応用も考える必要があると思われる。

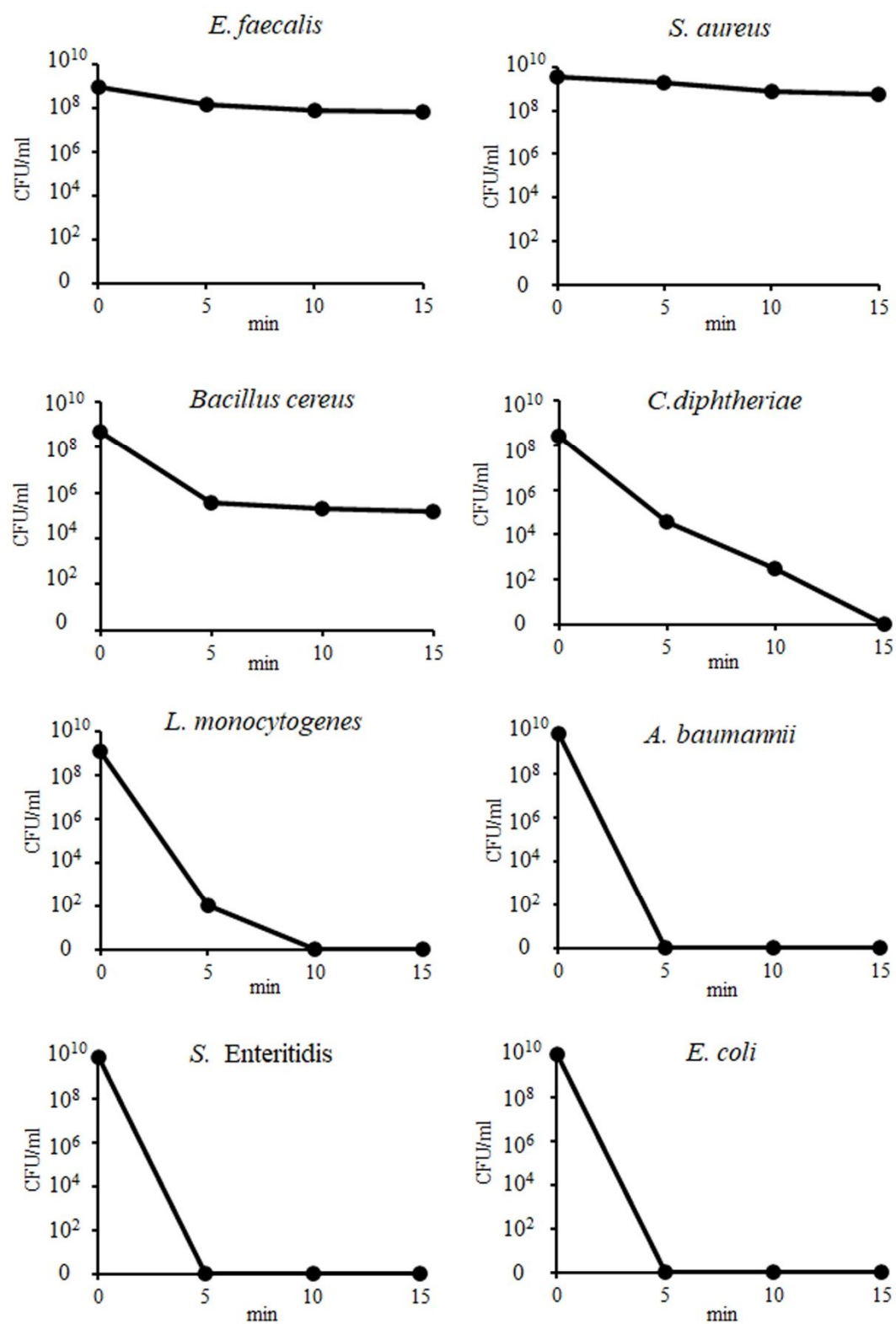


図1 テルペノイドの組み合わせによる殺菌の経時的変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山口孝治	4. 巻 85
2. 論文標題 スマートフォンの汚染状況の調査	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 相模女子大学紀要	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Takayoshi Yamaguchi	4. 巻 204
2. 論文標題 Antibacterial effect of the combination of terpenoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00203-022-03142-y	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口孝治
2. 発表標題 植物モノテルペンの組み合わせによる抗菌活性の評価
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2022
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------