

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：52201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02377

研究課題名(和文) ヨモギ由来の新奇抗菌成分を用いた健康低リスク・環境低負荷な革新的体臭予防剤の開発

研究課題名(英文) Development of innovative antimicrobial deodorant with low risk and low environmental impact from Artemisia sp.

研究代表者

高屋 朋彰 (Kouya, Tomoaki)

小山工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：90515553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：「スメルハラスメント」や「香害」の社会問題化など体臭に悩む人は増加の一途をたどっており、簡便で安全な体臭(腋臭)の予防法・治療法が切望されている。本研究では、健康低リスク・環境低負荷な「植物由来の新奇抗菌成分」を用いて革新的な体臭予防剤を開発し、予防医学的観点からQuality of Life(QOL)を向上させることを目的とした。具体的には、生活(浴用・食用)に活用されているヨモギ属から、腋臭原因菌を選択的に抑制する耐熱性・親水性の新奇抗菌成分について精製・同定・安全性評価を実施し、腋臭原因菌を選択的に抑制でき、安全性の高い体臭予防剤として利用可能な基盤技術の構築を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヨモギ属(Artemisia)由来の抗菌成分に関する研究は国内外で数多くの研究グループが取り組んでいるが、その報告の多くは疎水性成分であり、また、皮膚環境や体臭に密接に関連する腋臭原因菌に対する研究・報告例はほとんどない。本研究の特色は、耐熱性の高い親水性成分であること、腋臭原因菌に対して選択的な抗菌性を示すこと、浴用・食用として利用されている環境低負荷で安価な植物を用いること、である。本研究で得られる知見によって、体臭に対する予防医学や天然物化学の基礎的・応用的研究の活性化や、サニタリー・化粧品・医薬品・繊維産業を含む多種多様な分野への利用など、QOLを高める生活の実現が期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, people who suffer from body odor such as axillary odors are increasing. It is thought that axillary odor is caused by decomposition or oxidation of perspiration and lipids secreted from the apocrine sweat glands by bacteria axillary underarm odor. The purpose of this study is to develop an innovative body odor preventive agent using a novel plant-derived antimicrobial ingredient with low health risk and environmental impact, and to improve the quality of life from the perspective of preventive medicine.

Purification and identification of some novel hydrophilic antimicrobial agents from the wormwood, which is used in daily life (for bathing and eating), that selectively inhibit axillary odor-causing bacteria were performed. Furthermore, its safety was also evaluated.

Based on this research, we tried to establish the basic technology for developing a highly safe body odor preventive method using a selective antibacterial activity against underarm odor-causing bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ヨモギ属植物 Artemisia 抗菌効果 デオドラント作用 環境低負荷

## 1. 研究開始当初の背景

近年、清潔志向の高まりや「スメルハラスメント」の社会問題化など、体臭に悩む人が増加しており、特に日本人の約7人に1人が発症している腋臭(わきが)が問題となっている。その治療法として、①手術によるアポクリン汗腺の除去、②殺菌剤を用いた腋臭原因菌の除去、③穀物や野菜を主とした食生活の改善、などが挙げられる。しかし、「手術痕が残る」・「有益な皮膚常在菌が殺菌されて皮膚のバリア機能が低下する」・「食生活に制限がかかる」などの肉体的・精神的苦痛を伴うことも多く、発症者の Quality of Life(QOL)が脅かされており、体臭の克服に向けた国民的関心は非常に高い。腋臭の予防や治療に用いられている抗菌成分には石油や石炭から合成されるイソプロピルメチルフェノールやトリクロサンがあるが、健康や環境への負荷が大きい。また、2014年に発見された新規の腋臭原因菌である *Anaerococcus* 属はこれらの薬剤に対する耐性が高く、十分な殺菌効果が得られないことが報告されている。そのため、より簡便・安全な腋臭の予防法・治療法の確立が切望されている。

## 2. 研究の目的

筆者らは腋臭原因菌を選択的に抑制する未知の耐熱性の抗菌成分がヨモギ中に含まれていることを見出した。ヨモギ属 (*Artemisia*) 由来の抗菌成分に関する研究成果が数多く報告されているが、主にアルコールで抽出される疎水性物質が多く、また、対象としている微生物も食中毒細菌やカビなどの真菌類、マラリアの原因となる原虫であり、皮膚環境や体臭に密接に関連する腋臭原因菌に対する研究・報告例はほとんどない。そこで本研究では、腋臭原因菌(*Anaerococcus* 属)を選択的に抑制するヨモギ由来の新奇抗菌成分を精製・同定し、その抗菌作用や安全性を明らかにすることにより、これまでにない革新的な体臭予防剤を開発することを目的とした。具体的には、日本で古来より浴用や食用に活用されてきたヨモギ属(*Artemisia princeps Pampanini* や *Artemisia montana Pampanini*)から発見した耐熱性・親水性の新奇抗菌成分について、(1)腋臭原因菌を選択的に抑制するヨモギ由来新奇抗菌成分の精製条件の確立、(2)構造解析によるヨモギ由来新奇抗菌成分の同定、および(3)多層培養ヒト表皮モデルを用いた *in vitro* 実験系による新奇抗菌成分の安全性評価、について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 腋臭原因菌を選択的に抑制するヨモギ由来新奇抗菌成分の精製条件の確立

#### ①腋臭原因菌を選択的に抑制するヨモギ由来新奇抗菌成分の抽出

乾燥ヨモギ：超純水 = 1 : 10 (w/v) となるように混合し、0-100°Cで1h加熱して植物成分の抽出を行った。得られた成分を遠心分離 (13,500 × g, 10 min)、圧搾した後に、2回反復抽出 (等量の1-ブタノールを加えて遠心分離 (10,000 × g, 5 min)) を行い、水相および1-ブタノール相を回収し、凍結乾燥した後に滅菌水への再溶解によって濃縮した。指標菌として *Anaerococcus prevotii* JCM 6490 を用いて、Stainless Cup 法による抗菌活性の評価を行った。

#### ②逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いた抗菌成分の粗精製

RP-HPLC (溶媒: 0.1% trifluoroacetic acid およびアセトニトリル (AcCN), カラム: Aeris PEPTIDE XB-C18 4.6×150 mm, 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C) を用いた Stepwise 法 (Abs 215 nm) による粗分画 (AcCN 濃度 0%: 20 min, AcCN 濃度 15%: 25 min, AcCN 濃度 25%: 15 min, AcCN 濃度 100%: 10 min, AcCN 濃度 0%: 10 min) を行った。得られた各ピークを凍結乾燥後に滅菌水を用いて再溶解し、Stainless Cup 法 (指標菌: *A. prevotii* JCM 6490) により抗菌活性を評価した。抗菌活性を示した AcCN 濃度 0% (非吸着) の画分に対して、RP-HPLC (カラム: InertSustain AQ-C18 4.6×250 mm, 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C) を用いて、抗菌成分の更なる精製を行った。得られた画分は凍結乾燥機に備え付けられた遠心エバポレーターを用いて濃縮・再溶解し、Stainless Cup 法 (指標菌: *A. prevotii* JCM 6490) により抗菌活性を評価した。

#### ③HILIC-HPLC を用いた抗菌成分の精製条件の検討

②の RP-HPLC による粗精製で得られた抗菌成分について、3種類の異なる官能基を有する HILIC カラム (カラム A (アミド基): InertSustain Amide 1.9μm (2.1 × 150 mm), カラム B (ジオール基): Inertsil HILIC 3μm (2.1 × 150 mm), カラム C (カルボキシル基): HILICpak VC-50 2D (2.0 × 150 mm)) を用いて、HILIC LC/MS 分析に適したカラムの検討を行った。高速液体クロマトグラフ質量分析装置: LCMS-2020 (Shimadzu, Japan) を用いて、溶媒として 90% AcCN (0.1% formic acid 含有) を用い、流速は 0.2 mL/min, カラム温度は 40°C で分画を行った。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI), イオンモードは Positive/Negative, Mass range は *m/z* 100-2000 で分析を行った。

### (2) 構造解析によるヨモギ由来新奇抗菌成分の同定

#### ④HILIC LC/MS による抗菌成分の構造推定

②の RP-HPLC の精製で得られた抗菌成分について、③で選択したカラム C: HILICpak VC-50 2D (2.0 × 150 mm) を用いて、溶媒: 90% AcCN (0.1% formic acid 含有), 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40°C で HILIC LC/MS 分析を行った。

(3) 多層培養ヒト表皮モデルを用いた *in vitro* 実験系による新奇抗菌成分の安全性評価

⑤新奇抗菌成分の安全性評価および皮膚常在菌や腋臭原因菌に対する抗菌性との比較

②の粗精製で得られた AcCN 濃度 0% (非吸着) の画分について、OECD テストガイドライン (TG439: 皮膚刺激性試験) に従って、安全性を評価した。AcCN 濃度 0% (非吸着) の抗菌成分を凍結乾燥し、10 mg/mL となるように滅菌水に再溶解して段階希釈を行い、LabCyte EPI-MODEL24 を皮膚モデル細胞としてプロトコルに従った評価を行った。細胞生存率の評価は MTT Assay で行い、細胞生存率 50%以上を刺激性なし、50%未満を刺激性ありと判定した。また、AcCN 濃度 0% (非吸着) の抗菌成分を凍結乾燥・再溶解した (10 mg/mL) 画分の段階希釈を行い、腋臭原因菌の指標菌として *A. prevotii* JCM 6490、皮膚常在菌の指標菌として *Staphylococcus epidermidis* JCM 2414<sup>T</sup> を用いた Stainless Cup 法による評価を行った。

#### 4. 研究成果および考察

(1) 腋臭原因菌を選択的に抑制するヨモギ由来新奇抗菌成分の精製条件の確立

ヨモギ抽出液 (水相) およびヨモギ抽出液 (1-ブタノール相) の抗菌性を評価した結果、ヨモギ抽出液 (水相) が強い抗菌性を示したことから、RP-HPLC を用いて Stepwise 法によるヨモギ抽出液 (水相) の粗精製を行った (図1)。その結果、最もピーク面積が大きかったのは AcCN 濃度 15% で溶出した画分であり、次いで AcCN 濃度 25% で溶出した画分、AcCN 濃度 0% (非吸着) で溶出した画分、AcCN 濃度 100% で溶出した画分であった。*A. prevotii* JCM 6490 に対する抗菌活性の評価を行った結果、AcCN 濃度 0% (非吸着) で得られた画分が強い抗菌性を示した (図2)。このことから、ヨモギ抽出液 (水相) に含まれる抗菌成分は、極性が高い親水性成分であることが改めて明らかとなった。その一方で、目的とする抗菌成分は一般的な逆相カラム (C18 カラム) には非吸着であり、そのほとんどが保持できずに初期段階で溶出してしまうことが明らかとなった。

そこで、水 100% に近い溶離液条件下でも親水性 (高極性) 化合物を保持しやすく、逆相分析が可能な InertSustain AQ-C18 カラムを用いて、AcCN 濃度 0% (非吸着) で得られた画分の更なる精製を行った (図3)。その結果、Aeris PEPTIDE XB-C18 カラムと比較して各成分の保持時間が改善し、20 個以上の画分を得ることが可能となった。得られた画分について、*A. prevotii* JCM 6490 に対する抗菌活性の評価を行った結果、複数の画分が強い抗菌性を示したことから、抗菌成分の精製に成功した (図4)。しかし、抗菌性を示した画分 (I) ~ (III) のピークは完全に分離されていなかったことから、抗菌成分を単一成分にまで精製し、その構造を明らかにするためには、更なる精製が必要であることが示唆された。

次に、親水性の抗菌成分の更なる精製と構造推定のために、InertSustain AQ-C18 カラムを用いた画分によって得られた抗菌性の画分 (I) ~ (III) について、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) による画分条件の検討を行った。親水性相互作用に加えてイオン交換作用による分離能の改善を目的として、アミド基、ジオール基、およびカルボキシル基の官能基を備えた 3 種類の HILIC カラムを

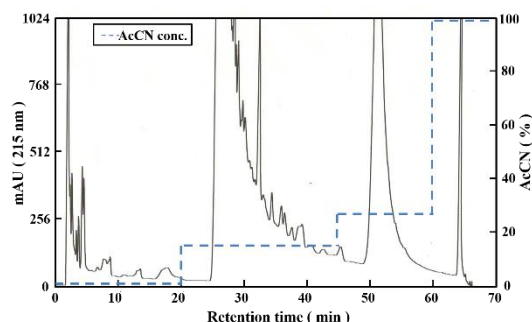


図1 RP-HPLC を用いたヨモギ抽出液 (水相) の溶出プロフィール

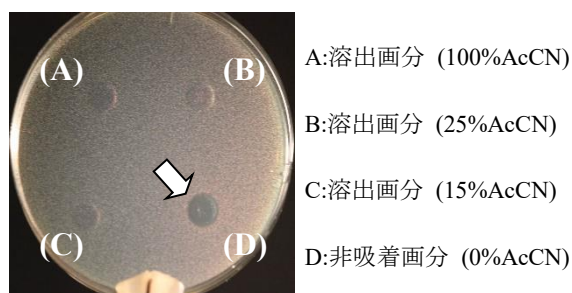


図2 ヨモギ由来新奇成分の抗菌活性 (⇐: 腋臭原因菌に対する抗菌円)

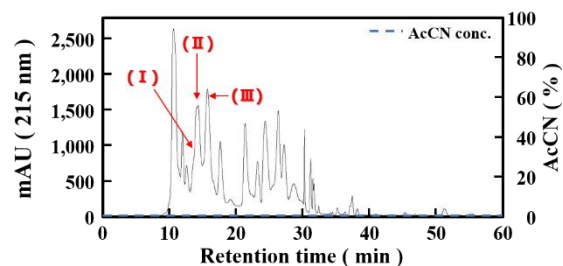


図3 InertSustain AQ-C18 カラムを用いた AcCN 濃度 0% (非吸着) 画分の溶出プロフィール

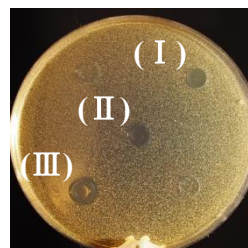


図4 InertSustain AQ-C18 カラムを用いて得られた画分の抗菌活性

選択し、抗菌性の画分(Ⅱ)を指標として、分離能の評価を行った(図5)。その結果、HILICpak VC-50 2Dを用いた場合に、positive イオンモードと negative イオンモードの両方においてピーク形状ならびにピーク数が良好な結果が得られた。

### (2) 構造解析によるヨモギ由来新奇抗菌成分の同定

HILICpak VC-50 2Dを用いて、画分(Ⅰ)~(Ⅲ)の精製およびMSスペクトル解析を行った(図6)。その結果、抗菌性の画分(Ⅰ)と(Ⅱ)では主に0~6 minにおいて共通したピークが観測された。抗菌性の画分(Ⅲ)では、0~2 minにおいて、画分(Ⅰ)や(Ⅱ)とは異なるピークが検出された。また、4~6 minでは画分(Ⅰ)~(Ⅲ)のいずれにおいても類似したピークが検出された。これらのピークについてMSスペクトル解析を行い過去の文献との比較を行った結果、quinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 5-O-coumaroylquinic acidなどで報告例のあるMSスペクトルのピークが検出された。しかし、完全な構造の解明のためには、今後、LC/MSMSによるフラグメントイオンの解析が必要である。

### (3) 多層培養ヒト表皮モデルを用いた in vitro 実験系による新奇抗菌成分の安全性評価

ヨモギ抽出液(水相)のAcCN濃度0%(非吸着)の画分を用いた皮膚刺激性試験の結果を図7に示す。PBSの細胞生存率を100%とした場合、ヨモギ抽出液(水相)のAcCN濃度0%(非吸着)の画分の10 mg/mLの濃度における細胞生存率は102.7%であり、その他の濃度においてもすべて細胞生存率が50%以上であったことから、10 mg/mLの濃度まで皮膚刺激性を示さないことが明らかとなった。

次に、腋臭原因菌(*A. prevotii* JCM 6490)および皮膚常在菌(*S. epidermidis* JCM 2414<sup>T</sup>)のそれぞれの指標菌に対するヨモギ抽出液(水相)のAcCN濃度0%(非吸着)の画分の濃度が及ぼす影響を評価した(図8)。その結果、*A. prevotii* JCM 6490に対しては5 mg/mLおよび10 mg/mLにおいて抗菌性を示したが、*S. epidermidis* JCM 2414<sup>T</sup>に対しては10 mg/mLの濃度でも抗菌性を示さなかった。これらの結果から、皮膚刺激性を示さず、皮膚常在菌の生育にも影響を与えない濃度(10 mg/mL)において、腋臭原因菌を選択的に抗菌できることが明らかとなった。

以上の研究成果から、見出したヨモギ由来新奇抗菌成分は皮膚に刺激を与えずに腋臭原因菌を選択的に抑制でき、安全性の高い体臭予防剤として利用可能となる基盤技術を構築できたと考えられる。今後は、さらなる精製・単離を行い、より正確な構造の決定と発育阻止濃度を明らかにしていく。

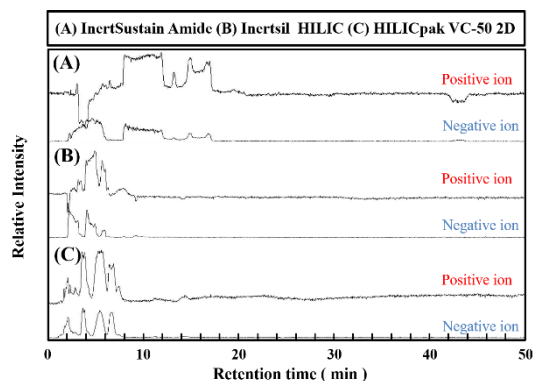


図5 HILIC カラムの種類がヨモギ由来抗菌成分の分離に及ぼす影響

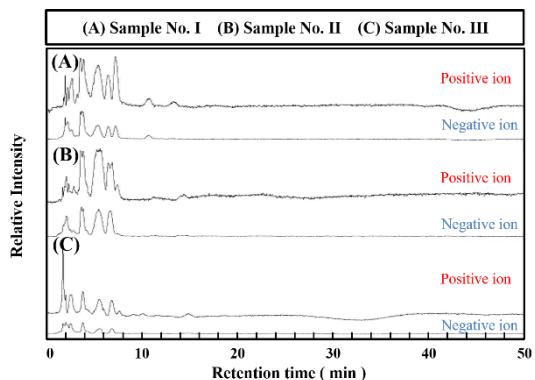


図6 HILIC LC/MSを用いたヨモギ由来抗菌成分の分離・精製および解析

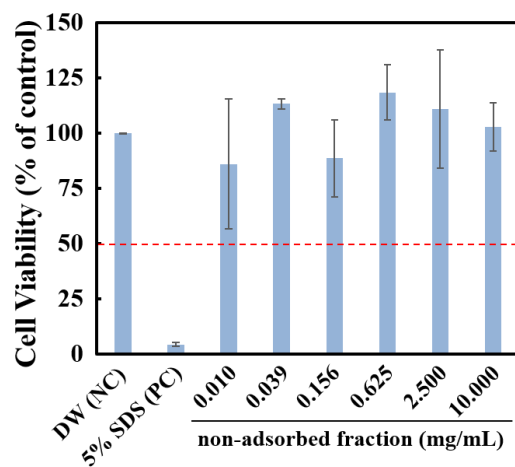


図7 LabCyte EPI-MODEL24を用いたヨモギ由来抗菌成分の皮膚刺激性試験

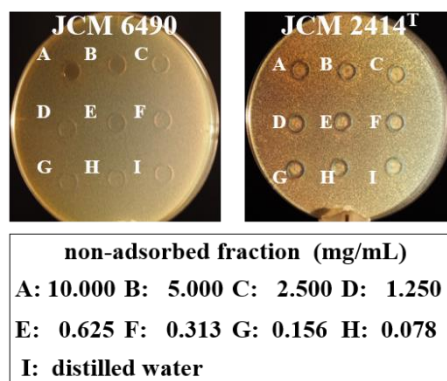


図8 腋臭原因菌および皮膚常在菌に対するヨモギ由来抗菌成分の濃度の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 腋臭原因菌を抑制する植物由来の抗菌物質に関する研究
2. 発表標題 高屋 朋彰、鈴木 伸太郎
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会、1E05-12
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木伸太郎、高屋朋彰
2. 発表標題 腋臭原因菌を抑制するヨモギ由来増殖阻害物質に関する研究
3. 学会等名 第8回関東磐越地区化学技術フォーラム、PP-40
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 空、大川 全、高屋 朋彰
2. 発表標題 腋臭発生要因菌を抗菌する植物成分の探索およびその精製と解析
3. 学会等名 第6回関東磐越地区化学技術フォーラム、B-15
4. 発表年 2020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
---------	---------