九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

植物成分を利用する抗菌性綿布 : タンニン酸結合綿布の抗菌作用

福田, 史恵
九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門生物材料機能学講座資源高分子科学研究室

山口, 東彦
九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門生物材料機能学講座資源高分子科学研究室

樋口, 光夫
九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門生物材料機能学講座資源高分子科学研究室

https://doi.org/10.15017/21105

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 56 (2), pp.153-161, 2002-02. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第56巻　第2号　153-161　(2002)

植物成分を利用する抗菌性綿布
―タンニン酸結合綿布の抗菌作用―

福　田　史　恵*・山　口　東　彦**・樋　口　光　夫**
九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門生物材料機能学講座資源高分子科学研究室
（2001年10月30日受付，2001年11月20日受理）

Antimicrobial Cotton Cloth Utilizing Chemicals of Plant Origin
―Antibacterial Action of the Cotton Cloth Fixed with Tannic Acid―

Fumie FUKUDA*, Haruhiko YAMAGUCHI** and Mitsuo HIGUCHI**
Laboratory of Polymer Science of Forest Resources,
Division of Bioproducts and Biotechnology Sciences,
Depertment of Forest and Forest Products Sciences, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581

緒　　言

我々は，植物由来の抗菌成分であるタンニン酸をセルロース繊維（綿布）に結合させた，天然物からなる抗菌性綿布を調製し，医療機関における院内感染防止などに役立てることを検討している．

タンニン酸は，五倍子，没食子から得たタンニンであり，その組成は現在も未解決であるが，Fischer, Freudenbergによるとブドウ糖の5つの水酸基とガロイル没食子酸のカルボキシル基がエステル結合しているという（日本公定書協会，1986）．タンニン酸は蛋白質や金属，アルカロイドと難溶性化合物をつくるために，収斂，解毒，火傷面の被覆などの効果があり，現在医薬品として利用されている（日本公定書協会，1986）．しかし，その抗菌活性を利用した材料への利用はされていない．

前報において（Fukuda *et al.*, 2001），タンニン酸処理綿布が，大腸菌（*Escherichia coli* W3110），非病原性黄色ブドウ状球菌（*Staphylococcus aureus* IFO13276）に対し優れた抗菌性能を有すること，中性洗剤を用いた20回の洗濯操作の後も抗菌性能を保持することを報告した．

そこで我々は，タンニン酸処理布の抗菌機構について，さらに詳しく調べていくことにした．

本研究では，タンニン酸の抗菌活性をフェノール性水酸基によるものと推定し，活性発現機構解明の一手段として，フェノール性水酸基またはカルボキシル基を持つモデル化合物の抗菌活性や，これらを用いた抗菌処理綿布の抗菌性を調べ，フェノール性水酸基数と抗菌活性との相関について検討した．

実　験　方　法

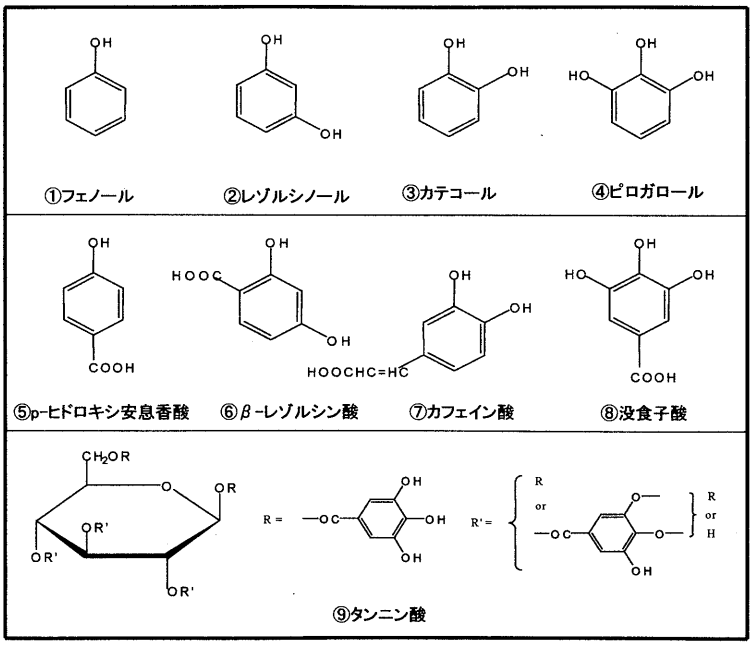
1．フェノールモデル化合物の24時間最小発育阻止濃度（MIC）の測定

表1に示すフェノール性水酸基数の異なる化合物9種（それぞれ，和光純薬工業（株）製，試薬特級）について，大腸菌，非病原性黄色ブドウ状球菌に対する最小24時間発育阻止濃度（MIC）を求めた．

PY液体培地（ポリペプトン5g，NaCl 5g，粉末酵母エキス1gに蒸留水を加えて1lとし，1N-NaOHでpH7.0～7.2に調整したもの）に表1の化合物を，濃度を変えて添加した．これを試験管に5ml

* 九州大学大学院生物資源環境科学府林産学専攻生物材料機能学講座資源高分子科学研究室
** Corresponding auther（E-mail: haruhiko@agr.kyushu-u.ac.jp）

表1　フェノール化合物



づつ分注し，これをフェノール化合物添加培地とした．

大腸菌（*E. coli*），非病原性黄色ブドウ状球菌（*S. aureus*）をそれぞれ試験管のPY液体培地中で30℃，約12時間振とう培養し，660nmの吸光度が0.5程度（生菌数10^5個程度）となったものを菌の前培養液とした．

各菌の前培養液50μlを，滅菌した試験管中のフェノール化合物添加液体培地5mlにそれぞれ接種し，37℃で振とう培養した．2時間間隔で24時間，吸光度（660nm）を測定し，各菌の増殖曲線を作成し，最小24時間発育阻止濃度を求めた．

2．フェノール化合物処理綿布の調製と分析

1）フェノール化合物処理綿布の調製

表1に示すフェノール性化合物のうち，カルボキシル基を有する⑤～⑨を，前報（福田ら，2001）で示した方法で調製したアミノエチル化綿布に結合させ，抗菌処理綿布試料を調製した．

すなわち，以下に示す7種類の綿布試料を調製した．

A：未処理綿布；晒し綿布50gを純水3l中80℃，15分間攪拌洗浄し，さらに各3lの純水で常温，3回水洗し，風乾した．

B：アミノエチル化綿布；同様にして調製した未処理綿布20gを1N-NaOH水溶液400mlに浸漬し，常温で10分間処理した後，アクリルアミドを2mol加え，40℃に昇温して2時間処理した．綿布を取り出し，0.1N酢酸水溶液400mlに浸漬し中和した後，さらに1.4N-NaOCl水溶液400ml中で20℃以下，1時間処理した．水洗後，1N-NaOH水溶液400mlで80℃，30分間処理し，十分水洗した後，風乾した．

C：p-ヒドロキシ安息香酸処理綿布；アミノエチル化綿布約10gを約0.0125M-p-ヒドロキシ安息香酸水溶液400ml中で常温，16時間処理した後，十分水洗，乾燥した．以下，これをp-ヒドロキシ安息香酸処理綿布とする．

D：β-レゾルシン酸処理綿布；アミノエチル化綿布約10gを約0.0125M-β-レゾルシン酸水溶液400ml中で80℃，1時間処理した後，十分水洗，乾燥した．以下，これをβ-レゾルシン酸処理綿布とする．

E：カフェイン酸処理綿布；アミノエチル化綿布約10gを約0.0125M-カフェイン酸水溶液400ml中で80℃，1時間処理した後，十分水洗，乾燥した．以下，これをカフェイン酸処理綿布とする．

F：没食子酸処理綿布；アミノエチル化綿布約10gを約0.0125M-没食子酸水溶液400ml中で常温16時間処理した後，十分水洗，乾燥した．以下，これを没食子

酸処理綿布とする.

G：タンニン酸処理綿布：アミノエチル化綿布約10gを約0.0125M-タンニン酸水溶液400ml 中で常温16時間処理した後，十分水洗，乾燥した．以下，これをタンニン酸処理綿布とする.

2）処理綿布の化学修飾度の測定

アミノエチル化綿布のアミノエチル化度は，セルロースの水酸基のアミノエチル基への置換度を酸滴定法およびセミミクロケルダール法による窒素定量によって求めた.

また，各フェノール性化合物処理綿布のフェノール化合物結合量は，各処理液の処理前後のフェノール濃度の変化を吸光度（280nm）の変化から求めた.

3．処理綿布の抗菌性の測定

調製したフェノール化合物処理綿布の抗菌性能を，細菌類に対する繊維製品の抗菌性能試験法である JIS L 1902_{-1998}に準じて評価した.

1）菌数測定法

JIS L 1902_{-1998}の定量試験に準じた．すなわち，化合物処理綿布試料に直接菌を接種し一定時間培養した後，綿布試料を緩衝液中で振とうすることによって液中に菌を分散させた．この液を10段階に希釈した後，寒天培地に混釈して培養し，出現するコロニーから生菌数を求めた.

抗菌試験で用いた綿布試料は，それぞれのフェノール化合物処理綿布ごとに，次のように準備した.

a：未処理綿布試料：3検体

b：未処理綿布試料：3検体

c：化合物処理綿布試料：4検体

いずれも1検体につき2cm×2cmを4枚（合計約0.4g）を重ねて，50ml 容バイアル瓶に入れた.

E. coli, *S. aureus* の前培養液を節1の MIC 測定の場合と同様にして調製し，その0.2ml を滅菌した50ml 容バイアル瓶に入れた各綿布試料上に接種した．その後，b，c の試料は，37℃で18時間培養した.

菌接種直後（a）および培養終了後（b，c）の試料容器中に，緩衝生理食塩水（0.2M リン酸二ナトリウム72ml，0.2M リン酸一ナトリウム28ml を混合し NaCl 5.0g を加えた後，全容を蒸留水で1 l としたもの.）20ml を加え，振とう機で3分間振とうして，試料綿布中の生菌を液中に分散させた．この分散菌液を緩衝生理食塩水で順次希釈して10倍希釈系列を作り，各段階の希釈液1ml をシャーレの寒天培地に混釈した．これを30℃で48時間培養し，出現したコロニー数に希釈倍数を乗じて試料中の生菌数を算出した.

2）ハロー測定法

JIS L 1902_{-1998}の定性試験に準じた.

ハロー試験に用いた試料綿布は，未処理綿布，アミノエチル化綿布およびフェノール化合物処理綿布とし，それぞれ直径28mm の円形1枚を1検体として3検体準備し，121℃，20分間オートクレーブ滅菌した.

37℃で24時間 PY 液体培地に前培養した *E. coli* または *S. aureus* の菌培養液1ml を，滅菌して溶解させた PY 寒天培地15ml に混釈した後，シャーレ中で2時間固化，乾燥させた．この上に前記の試料検体各1枚をのせ，37℃で24時間培養した．培養後，菌発育阻止帯（ハロー）の有無，およびハロー幅の測定を行った.

結果および考察

1．フェノール化合物の24時間最小発育阻止濃度（MIC）

表2に，用いたフェノール化合物の *E. coli* および *S. aureus* に対する24時間最小発育阻止濃度（MIC）を示す．両菌に対する各化合物の MIC に大差はなく，一分子あたりのフェノール性水酸基数の増加にしたがって低濃度でも増殖が抑制され，一つのフェノール核に3つのフェノール性水酸基を持つピロガロール，タンニン酸が最も抗菌活性は高かった．なお，この重量%による結果をモル濃度に換算すると，ピロガロールよりも一分子あたりのフェノール性水酸基数が多いタンニン酸の MIC はさらに小さな値となる．また，フェノール性水酸基のみを有する化合物の抗菌活性は，フェノール性水酸基とカルボキシル基を有する化合物のそれよりかなり大きかった.

表2　フェノール化合物の MIC（重量%）

	E. coli	*S. aureus*
①フェノール	0.2	0.2
②レゾルシノール	0.5	0.2
③カテコール	0.02	0.02
④ピロガロール	0.02	0.01
⑤p-ヒドロキシ安息香酸	5.0	5.0
⑥β-レゾルシン酸	2.0	2.0
⑦カフェイン酸	0.1	0.05
⑧没食子酸	0.05	0.05
⑨タンニン酸	0.02	0.02

すなわち，フェノール化合物の抗菌活性は，カルボキシル基ではなくフェノール性水酸基によるものであり，フェノール化合物一分子あたりのフェノール性水酸基数と MIC とは相関することが明らかとなった．また，グラム陰性細菌である *E. coli* とグラム陽性細菌である *S. aureus* のどちらに対してもほぼ同等の MIC を示したことから，フェノール性水酸基の抗菌作用は，グラム陰性菌に対してもグラム陽性菌に対しても同様に作用するものと考えられる．このことは，フェノール類が細菌細胞の細胞膜の蛋白質と反応し変性させることによって細胞膜機能に障害を与えて，静菌または殺菌を導く，という報告と一致する（橋本，1998）．フェノール化合物中にカルボキシル基が存在することによるフェノール化合物の抗菌活性の低下は，カルボキシル基が抗菌性に関与せず，むしろフェノール性水酸基の抗菌性を阻害すると考えられる．

フェノール性水酸基を 2 個持つレゾルシノールとカテコールを比較した場合，あるいは β-レゾルシン酸とカフェイン酸を比較した場合，それぞれ後者の抗菌活性が前者のそれに比べてはるかに大きく，活性はフェ

表 3　処理綿布の化学修飾度

	アミノエチル基への置換度（DS）[a)]	フェノール化合物への置換度（DS）[a)]	フェノール化合物結合量[b)]
アミノエチル化綿布	0.044	−	−
P-ヒドロキシ安息香酸処理綿布	0.044	0.039	89
β-レゾルシン酸処理綿布	0.044	0.057	110
カフェイン酸処理綿布	0.044	0.042	96
没食子酸処理綿布	0.044	0.035	78.9
タンニン酸処理綿布	0.044	0.028	63.6

a）：アミノエチル基数/グルコース単位中の全水酸基数 3
b）：（フェノール化合物への置換度/アミノエチル基への置換度）×100

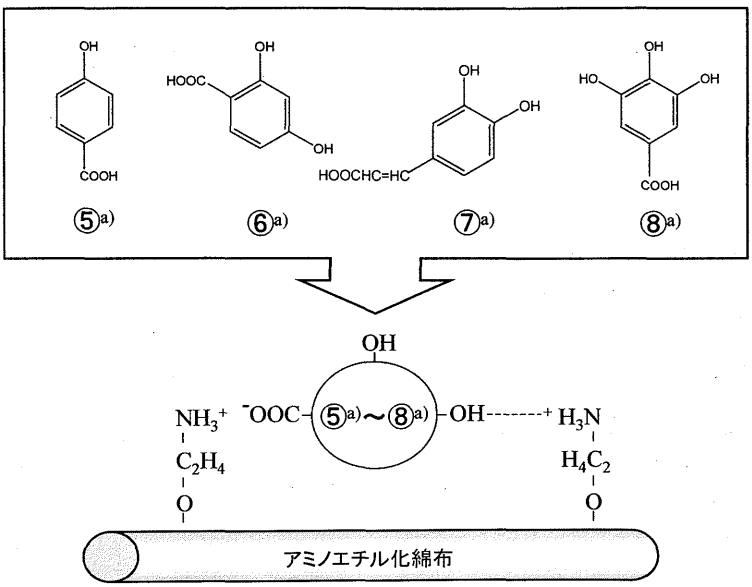


図 1　フェノール化合物処理綿布の結合模式図
a）表 1 より⑤：p-ヒドロキシ安息香酸，⑥：β-レゾルシン酸，⑦：カフェイン酸，⑧：没食子酸

ノール性水酸基間の距離が近いほど高いようである．

2．化合物処理綿布の化学修飾度

表3に各化合物処理綿布の化学修飾度を，綿布セルロースのグルコース単位の水酸基の置換度で示す．グルコース単位の水酸基が全て置換された場合，置換度は3である．

アミノエチル化綿布のアミノエチル基との置換度は0.044であった．これは，セルロースの全水酸基数の1.47%に相当し綿布の繊維表面の全水酸基のほぼ100%がアミノエチル基と置換されていると考えてよい値である．

また，各フェノール化合物は，すべてアミノエチル基に結合していると考えられ，タンニン酸の若干低い結合量を除いてそれ以外のフェノール化合物は，アミノエチル基のほぼ100%に結合した．

なお，タンニン酸以外の各フェノール化合物とアミ

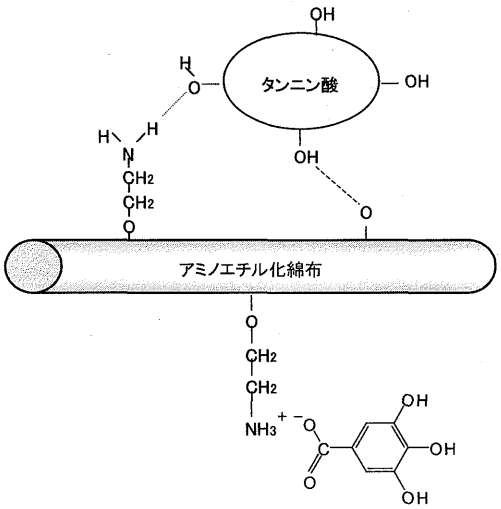


図2　タンニン酸処理綿布の結合模式図

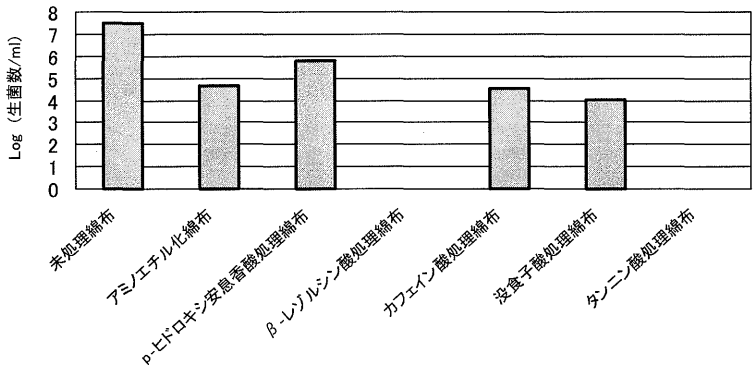


図3　*E. coli* に対する各処理綿布の抗菌性能

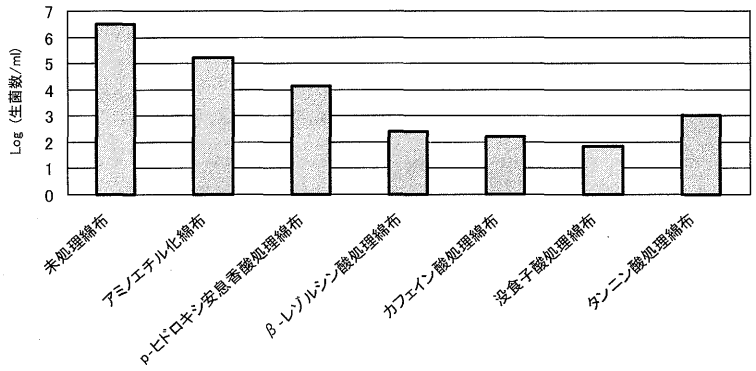


図4　*S. aureus* に対する各処理綿布の抗菌性能

ノエチル化綿布との結合は，カルボキシル基とアミノエチル基のイオン結合，またはフェノール性水酸基とアミノエチル基の水素結合であると推測される（図1）．また，タンニン酸とアミノエチル化綿布の結合は，フェノール性水酸基とアミノエチル基の水素結合，または，タンニン酸から遊離した没食子酸のカルボキシル基とアミノエチル基のイオン結合であると推測される（図2）．

3．フェノール化合物処理綿布の抗菌活性

図3に，*E. coli* を用いた菌数測定法による抗菌試験の結果を示す．β-レゾルシン酸処理綿布を例外として，MICと同様に，1分子あたりのフェノール性水酸基数が多くなるほど，生菌数が減少し，抗菌活性は高かった．β-レゾルシン酸のMICはカフェイン酸のそれより低かったが，綿布に結合すると抗菌活性は飛躍的に向上した．この理由については，現在検討中である．

図4に，*S. aureus* に対する菌数測定法による抗菌試験の結果を示す．*E. coli* の場合と同様に，1分子あたりのフェノール性水酸基数が多くなるほど，抗菌活性は高くなる傾向があった．また，*E. coli* の場合に見られたβ-レゾルシン酸処理綿布の抗菌活性の向上は，*S. aureus* では見られなかった．

表4に，ハロー測定法による抗菌試験の結果を示す．ハローが確認されたのは，全試料中タンニン酸処理綿布の *S. aureus* に対してだけであった．また，抗菌試験後の試料綿布の観察から，タンニン酸処理綿布にのみ周囲に溶脱を示す着色が見られた（図5）．すなわち，タンニン酸処理綿布からタンニン酸が徐放的に溶脱したと考えられる．しかし，*S. aureus* に対してのみ生じたハローの幅もきわめて小さく，*E. coli* の場合にはハローが観察されなかった．これは，タンニン酸が培地，または細菌と接触し，一部溶出するが，これだけでは十分な抗菌性を持たず，大部分は布に固定された状態で高い抗菌性を持つものと考えられる．

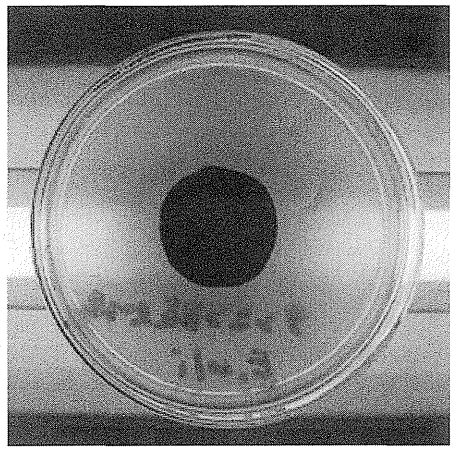
すなわち，タンニン酸処理綿布を含め，すべてのフェノール化合物処理綿布は，フェノール化合物が綿布に固定された状態で抗菌活性を発揮していると示唆された．

現在，医療機関や家庭などで使用されている抗菌性繊維は，そのほとんどが銀化合物や第四級アンモニウム塩などの抗菌剤を繊維原料に練り込み紡糸したものであり，それらは主に抗菌剤の徐放性により抗菌活性を発現する（西野ら，1997）．これに対して，本研究で調製したフェノール化合物固定抗菌性綿布は，抗菌剤が綿布に固定されたままで抗菌性を発現すると言える．

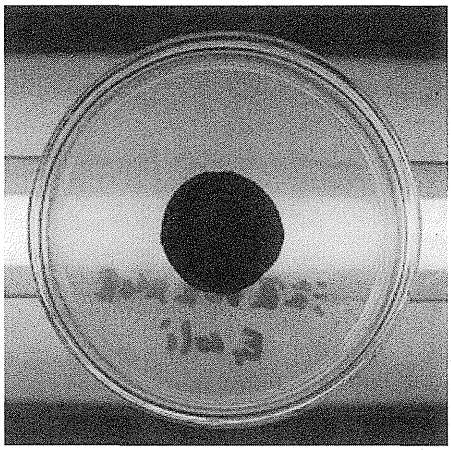
これまでに，天然または合成の様々なフェノール性化合物の抗菌活性について検討した報告は多数あり，一般にフェノール核を有する化合物は抗菌性能を有すると認識されてきた（Yoshida *et al.*, 2000. Hugo, 1978）．また，フェノール類と類似の構造をもつ芳香族アルコール類の抗菌性能も検討されており（Lang and Rye, 1972. O'Neal Ingram, and Buttle, 1984），これらフェノール化合物または芳香族アルコール類の抗菌作用機構は，細胞質膜変性を引き起こすためという共通の結論が得られている（Gilbert *et al.*, 1977. Kroll and Anagnostopoulos, 1981. Silva *et al.*, 1976. Silver and Wendt, 1967. Woldringh, 1973）．さらにこれらの化合物のいくつかについては物理化学特性と抗菌性能との関係について明らかにしたものもある（Gilbert *et al.*, 1978. Grassy *et al.*, 1985. Wilson *et al.*, 1981）．本実験の結果はこれらの報告とほぼ一致し，さらに新たな知見を加えるものであった．

表4 ハローによる各処理綿布の抗菌性能の評価

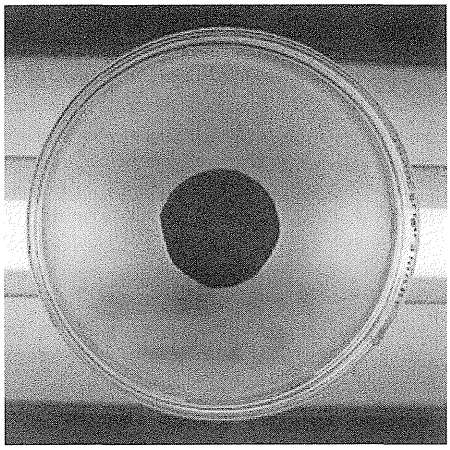
	未処理綿布	アミノエチル化綿布	p-ヒドロキシ安息香酸処理綿布	β-レゾルシン酸処理綿布	カフェイン酸処理綿布	没食子酸処理綿布	タンニン酸処理綿布
	ハローの有無およびハロー幅						
E. coli	無	無	無	無	無	無	無
S. aureus	無	無	無	無	無	無	0.3mm



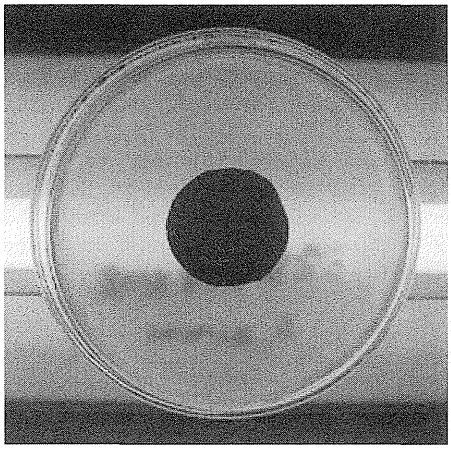
タンニン酸処理綿布　*E. coli*



没食子酸処理綿布　*E. coli*



タンニン酸処理綿布　*S. aureus*



没食子酸処理綿布　*S. aureus*

図5　ハロー試験写真

結　　論

E. coli および *S. aureus* に対するフェノール化合物の MIC を測定した結果，フェノール化合物一分子あたりのフェノール性水酸基数が多いほど，抗菌活性が大きかった．また，フェノール化合物分子中にカルボキシル基が存在する場合，そのフェノール化合物の抗菌活性は，フェノール性水酸基のみの場合より低くかった．すなわち，タンニン酸などのフェノール化合物の抗菌活性は，フェノール性水酸基によって発現し，その数が多いほど抗菌活性は大きいと言える．

フェノール化合物を綿布に固定した場合にも，フェノール化合物は抗菌活性を有し，MIC 測定の場合に見られたフェノール性水酸基数が多いほど抗菌活性が大きいという関係は，布に固定した場合にも保たれていた．

これらのフェノール化合物の抗菌活性は，綿布に固定された状態で発現していると推測された．すなわち本研究において，抗菌剤としてフェノール化合物を固定した抗菌性綿布は，従来の抗菌剤徐放型の抗菌性繊維にない新しいタイプの抗菌性繊維と言え，中でもタンニン酸を固定した綿布は，優れた抗菌性繊維であると言える．

文　　献

日本公定書協会編　1986　第十一改正日本薬局方解説

書, C1068-C1070

Fukuda, F., Yamaguchi, H., and Higuchi, M. 2001 Antimicrobial Cotton Cloth Utilizing Chemicals of Plant Origin, *Biocontrol Science*, in contribution.

JIS L 1902-1998, 繊維製品の抗菌性試験方法.

橋本 一監訳 1998 A. D. Russel and I. Chopra : 抗菌作用機序と耐性機構. 広川書店, 東京, 90-109頁

西野 敦, 富岡敏一, 荒川正澄 1997 抗菌剤の科学 Part 2, 工業調査会 (株), 57-79頁

Yoshida, T., Hatano, T., and Ito, H. 2000 Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. *Biofactors*, **13**(1-4), 121-125.

Hugo, W. B. 1978 Phenols: a review of their history and development as antimicrobial agents. *Microbios*, **23**, 83-85.

Lang, M., and Rye, R. M. 1972 The uptake by *E. coli* and growth inhibitory properties of benzyl alcohol and phenethyl alcohol. *J. Pharm. Pharmacol.*, **24**, 219-226.

O'Neal Ingram, L. and Buttle, T. M. 1984 Effects of alcohols on micro-organisms. *Advantec. Microb. Physiol.*, **25**, 253-300.

Gilbert, P., Beveridge, E. G. and Crone, P. B. 1977 Effect of phenoxyethanol on the permeability of *Escherichia coli* NCTC 5933 to inorganic ions. *Microbios*, **19**, 17-26.

Kroll, R. G., and Anagnostopoulos, G. D. 1981 Potassium fluxes on hyperosmotic shock and the effect of phenol and bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol) on deplasmolysis of *P. aeruginosa*. *J. appl. Bact.*, **51**, 313-323.

Silva, M. T., Sousa, J. C. F., Macedo, M. A. E., Polonia, J. and Parente, A. M. 1976 Effects of phenethyl alcohol on *Bacillus* and *Streptococcus*. *J. Bact.*, **127**, 1359-1369.

Silver, S. and Wendt, L. 1967 Mechanism of action of phenethyl alcohol: breakdown of the cellular permeability barrier. *J. Bact.*, **93**, 560-566.

Woldringh, C. L. 1973 Effect of toluene and phenethyl alcohol on the ultrastructure of *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **114**, 1359-1361.

Gilbert, P., Byron, P. R., Beveridge, E. G., Boyd, I. and Crone, P. B. 1978 Correlation between physico-chemical properties and antimicrobial activity for some glycolmonophenyl ethers. *Microbios*, **22**, 203-216.

Grassy, R., Rival, Y., Teurade, J. C., Chapat J. P., Simeon de Buochberg, M. and Attisso, M. 1985 Influence de la lipophilie sur l'activite antibacterienne. Relation avec le caractere de Gram. *Europ. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **20**, 199-206.

Wilson, J. R. J., Lyall, J., McBride, R. J., Murray, J. B. and Smith, G. 1981 Partition coefficients of some aromatic alcohols in an n-heptane/water system and ther relationship to minimum inhibitory concentration against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Hosp. Pharmacol.* **6**, 63-66.

Summary

In our previous paper, aminoethylated cotton cloth fixed with tannic acid was reported to have a high antibacterial activity against *E. coli* W3110 and *S. aureus* IFO13276. In this paper, the results of the experiments carried out to investigate the mechanisms of the antibacterial action of the tannic acid-modified cotton cloth are described.

Antibacterial activities of model compounds having different numbers of phenolic hydroxyl group were evaluated against *E. coli* W3110 and *S. aureus* IFO13276. It was found that the value of minimum inhibitory concentration (MIC) of the model compound decreased with an increase in the number of phenolic hydroxyl group in a molecule. It was also found that the model compound having a calboxyl group had a greater MIC than the corresponding model compound having no calboxyl group did. Thus, the antibacterial activities of phenolic compounds were ascribed to their phenolic hydroxyl groups.

Aminoethylated cotton cloths fixed with model compounds having different numbers of phenolic hydroxyl group and a calboxyl group showed antibacterial activities. In this case, too, the activity increased with an increase in the number of hydroxyl group in the model compound fixed. As no distinct halo was observed in the culture-tests of the both bacteria the phenolic compounds were considered to have antibacterial activities in the state of being fixed on the cotton cloth.