

脂肪酸、精製ツバキ油およびオリーブ油の黄色ブドウ球菌に 対する増殖抑制作用について

新井 武利・濱島 肇・笹津 備規

昭和薬科大学微生物学研究室*

(平成8年5月9日受付・平成8年8月27日受理)

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* FDA 209 P に対するリノール酸、オレイン酸、局方ツバキ油、精製ツバキ油、オリーブ油、精製ホホバオイル、スクワランおよび流動パラフィンの増殖抑制作用を検討した。これらの試料を培地に加え 80 $\mu\text{g/ml}$ にしたものを標準液としてさらに培地を加え、二段階希釈系列を作製した。一夜培養後の菌液を 1.0×10^7 cfu/ml になるようそれぞれに加えた。光学的に菌の増殖を測定し、試料による増殖抑制作用を測定した。その結果、リノール酸、オレイン酸および局方ツバキ油には強い増殖抑制作用が認められた。精製ツバキ油とオリーブ油には比較的弱い増殖抑制作用があった。精製ツバキ油の 50% 阻止率 (ID 50) を脂肪酸および他の植物油脂の ID 50 と比較した。ID 50 の比較により精製ツバキ油にはオリーブ油よりも強い増殖抑制作用があることが明らかになった。精製ホホバオイル、スクワランおよび流動パラフィンは測定した濃度では増殖抑制は認められなかった。精製ツバキ油とオリーブ油はアトピー性皮膚炎の皮膚病変部のスキンケアに有用であろう。

Key words: fatty acid, plant oil, *Staphylococcus aureus*, skin care, atopic dermatitis

アトピー性皮膚炎患部からは高率に黄色ブドウ球菌が分離され、二次感染あるいは増悪因子と考えられている^{1,2)}。このため皮膚表面の黄色ブドウ球菌を考慮してアトピー性皮膚炎の対策および治療は抗菌薬治療と外用薬療法およびスキンケアが行われている。外用薬としてヒノキチオール軟膏が有用であった例が報告されておりヒノキチオールの抗菌性はすでに明らかにされている³⁾。スキンケアには白色ワセリンおよび植物油脂のオリーブ油あるいは精製ツバキ油等が用いられている^{4,5)}。すでに白色ワセリンには抗菌性がないことが記載されている⁶⁾ので主に乾燥性皮膚症状の改善を期待するものではないかと思われる。一方、精製ツバキ油にもアトピー性皮膚炎のスキンケアに用いられ有用であった例が報告されているが⁷⁻⁹⁾、その効果も主に乾燥性皮膚を改善するスキンケア効果の間接的なものと思われる⁹⁾。

しかし著者らは精製ツバキ油のアトピー性皮膚炎に対する効果は、スキンケア効果だけでなくトリグリセリドとして含まれるオレイン酸の黄色ブドウ球菌の増殖抑制作用による可能性もあるのではないかと考えた。なぜなら脂肪酸およびそのエステルの一部に抗菌活性あるいは増殖抑制作用の存在が報告^{10,11)}されているからである。しかしながら、天然油脂についての黄色ブドウ球菌の増殖抑制作用の報告は見られない。ここでは精製ツバキ油、オリーブ油などの植物油脂による黄色ブドウ球菌の増殖抑制作用について検討し、脂肪酸のリノール酸とオレイン酸、化粧品基剤のスクワランと流動パラフィンについて比較した。

I. 材料と方法

脂肪酸はリノール酸 (和光純薬株式会社) およびオレイン酸 (和光純薬株式会社) を用いた。植物油脂として局方ツバキ油 (大島椿株式会社)、精製ツバキ油 (アトピコススキンケアオイル[®]; 大島椿株式会社)、オリーブ油 (Cropure oil[®]; クロージャパン株式会社) および精製ホホバオイル (Jojobal[®]; ミツバ貿易株式会社) を用いた。その他、スクワラン (Squalane-M[®]; ミツバ貿易株式会社) および流動パラフィン (松村石油株式会社) を使用した。

10 ml のブレインハートインフュージョンプロス (BHI; Difco) 培地に各試料をそれぞれ 80 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、バイオフィトレコーダー TN-2612 (アドバンテック) 用 L 字型試験管に分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、40 rpm にて 24 時間振盪し、均一な試料原液とした。この試料原液に BHI 培地を加え 2 倍希釈系列を作製した。BHI 培地で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、一夜培養した黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* FDA 209 P) を 1.0×10^7 CFU/ml になるように各試料の 2 倍希釈系列に接種した。バイオフィトレコーダー TN-2612 を用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、振盪 (40 rpm) 培養し、10 分おきに 660 nm における吸光度を測定し菌の増殖を記録した。試料によっては *S. aureus* FDA 209 P の増殖につれ、L 字管の管壁に菌体の付着する現象が認められた。この付着は OD 1.8 以上になると顕著になるため、菌の増殖は OD 1.8 まで記録した。いずれの試料についても少なくとも 2

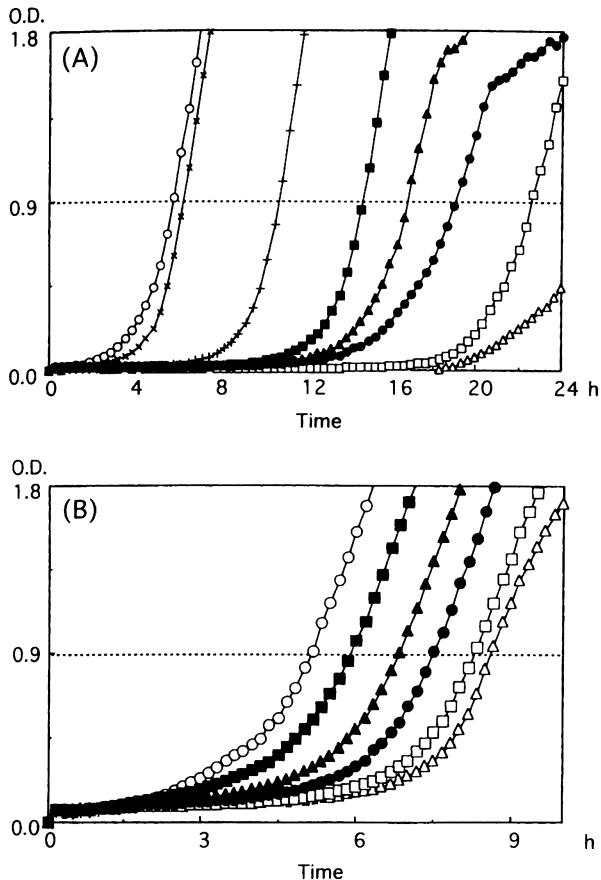


Fig. 1. Inhibitory effect of fatty acids on the growth of *Staphylococcus aureus* FDA 209 P. (A), linoleic acid; (B), oleic acid.

S. aureus FDA 209 P was inoculated into BHI broth media containing no fatty acids (○) or broth containing 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 or 80 (×, +, ■, ▲, ●, □, △) µg of fatty acids per ml. Cell growth was monitored at 660 nm with a biophotorecorder.

回以上の実験を行った。

試料を含まない培地における増殖と比較し、それぞれの試料が増殖に影響を与える最小濃度 (Minimum effective concentration) を求めた。また培地のみにおける *S. aureus* FDA 209 P の増殖と各試料の 40 µg/ml におけるそれを比較して OD 0.9 に達するまでの時間の遅れ (Delay in growth time) として求めた。さらに培地のみにおける *S. aureus* FDA 209 P が OD 1.0 達したとき各濃度段階ごとの増殖を比較し阻止率を計算し、50%阻止率 (ID 50) として表した。

II. 結果

1) 脂肪酸による増殖の抑制

リノール酸およびオレイン酸により *S. aureus* FDA 209 P の増殖抑制が認められた。もっとも強い抑制作用が認められたのはリノール酸であり、1.25 µg/ml から 80 µg/ml の間で濃度に応じた増殖抑制が認められた (Fig. 1 A)。増殖に影響をおよぼす最小濃度は 1.25 µg/ml であった。40 µg/ml における OD 0.9 に達するまでの時間の遅れを表した Delay in growth time は 16.8 時間であった (Table 1)。

一方、オレイン酸にも増殖抑制作用があり、5 µg/ml から 80 µg/ml の間では濃度に応じた増殖抑制が認められた (Fig. 1 B)。増殖に影響をおよぼす最小濃度は 5 µg/ml であった。オレイン酸の Delay in growth time は 3.2 時間であった (Table 1)。

2) 植物油脂 (局方ツバキ油, 精製ツバキ油, オリーブ油および精製ホオバオイル) による *S. aureus* FDA 209 P の増殖抑制作用

局方ツバキ油は 2.5 µg/ml から 40 µg/ml の間で濃度に依存した増殖抑制作用が認められた (Fig. 2 A)。しかし 80 µg/ml の局方ツバキ油については菌の増殖によらない濁りが生じたため測定できなかった。次に精製

Table 1. Relative inhibitory effects of fatty acids, plant oils, squalane and liquid paraffin on growth of *Staphylococcus aureus* FDA 209 P

	Minimal effective concentration (µg/ml) ^{a)}	Delay in growth time (h) ^{b)}	ID 50 (µg/ml)
Linoleic acid	1.25	16.8	1.6
Oleic acid	5	3.2	6.0
Camellia oil	2.5	4	3.5
Purified camellia oil	10	1.3	35
Olive oil	20	0.5	≥100
Joboba oil	NI ^{c)}	NI	NI
Squalane	NI	NI	NI
Liquid paraffin	NI	NI	NI

^{a)} Minimal effective concentration of samples which showed an inhibitory effect on the growth of *S. aureus* FDA 209 P.

^{b)} *S. aureus* FDA 209 P was inoculated into free BHI broth medium and broth media containing 40 µg of one of the sample materials per ml. Delays in growth time were calculated from the growth curve.

^{c)} NI: Not inhibitory at the concentrations tested.

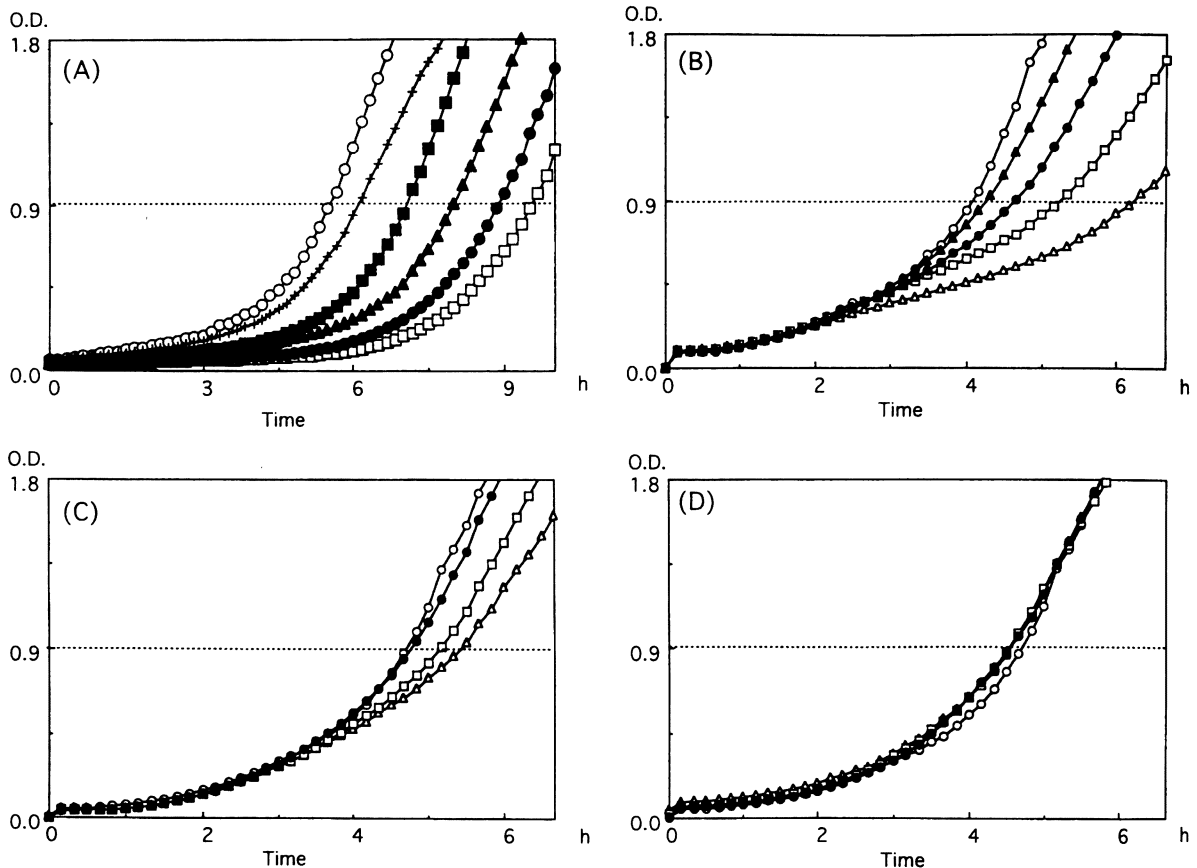


Fig. 2. Inhibitory effects of plant oils on the growth of *Staphylococcus aureus* FDA 209 P. (A), camellia oil; (B), purified camellia oil; (C), olive oil; (D), jojoba oil.

S. aureus FDA 209 P was inoculated into BHI broth medium containing no oil (○) or broth media containing 2.5, 5, 10, 20, 40 or 80 (+, ■, ▲, ●, □, △) μg of oil per ml. Cell growth was monitored at 660 nm with a biophotorecorder.

ツバキ油は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ に明確な濃度に依存した増殖抑制作用が認められた (Fig. 2 B)。またオリーブ油にも $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間に濃度に依存した増殖抑制作用が認められた (Fig. 2 C)。Delay in growth time は局方ツバキ油, 精製ツバキ油およびオリーブ油についてそれぞれ 4 時間, 1.3 時間および 0.5 時間であった (Table 1)。

精製ホオバオイルによる増殖抑制作用は認められなかった (Fig. 2 D)。

3) スクワランおよび流動パラフィンによる *S. aureus* FDA 209 P の増殖抑制作用

測定した範囲ではスクワランおよび流動パラフィンによる増殖抑制は認められなかった (Fig. 3 A, B)。

III. 考 察

油脂のような一般に水に不溶性の物質の抗菌活性の測定はさきわめて困難である。Kabara らもその論文のなかで脂肪酸とその誘導体が水に不溶性のため抗菌活性の測定は困難であることを述べている¹⁰⁾。彼らは 95 % エタノールを用いて液体培地に加えた後, 70°C に加温, さらに超音波をかけて可溶化を試みている。我々は精製ツバキ油およびその他の試料を 95 % エタノールある

いはアセトンを用いて液体培地に加えようと試みたが, 油滴を生じ完全に可溶化できない場合があった。また溶剤としてのアセトンには *S. aureus* FDA 209 P に対して 0.25 % (v/v) でも増殖抑制作用が認められた。以上のように油脂の増殖抑制作用あるいは抗菌活性の測定にあたっては培地に難溶性であることおよび溶剤の検定菌への影響に注意が必要である。さらに精製ツバキ油あるいはオリーブ油が直接皮膚に用いられることを考慮して溶剤を用いないで測定することとした。このため試料の最少量を培地に加え, 十分混和し試料原液とした。この試料原液より調整した希釈系列に菌液の一定量を加え絶えず振盪しながら吸光度を測定し, 菌の増殖を記録した。

各試料の増殖抑制作用の比較のため Minimum effective concentration および Delay in growth time を求めた。まず Minimum effective concentration を比較するとリノール酸はオレイン酸の 4 分の 1 濃度でも増殖に影響した。局方ツバキ油はオレイン酸の 2 分の 1 濃度で影響し, 植物油脂のなかではもっとも低濃度で影響した。次に Delay in growth time を比較すると, $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリノール酸により 16.8 時間の差が生じた。他

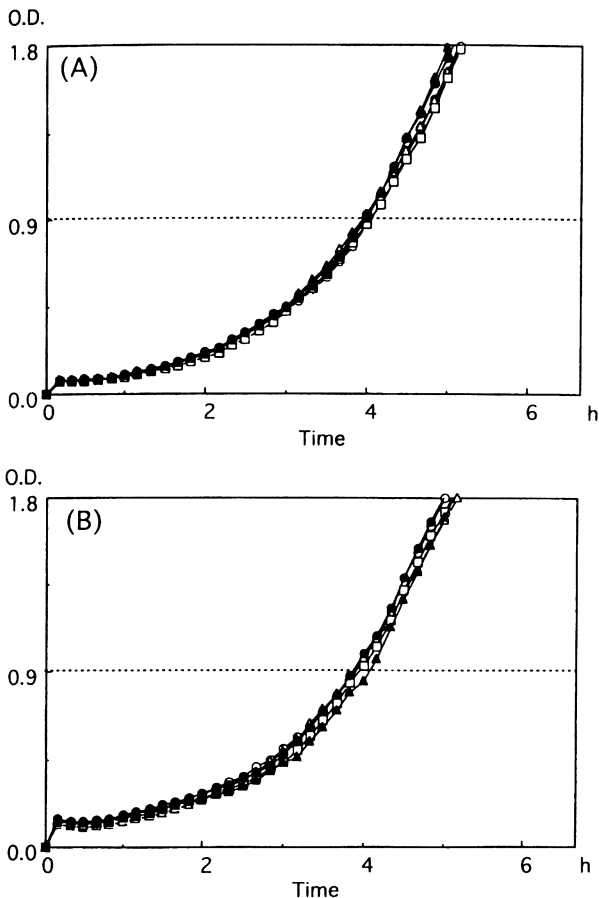


Fig. 3. Inhibitory effects of squalane and liquid paraffin on the growth of *Staphylococcus aureus* FDA 209 P. *S. aureus* FDA 209 P was inoculated into BHI broth medium containing no oil (○) or broth media containing 10, 20, 40 or 80 (▲, ●, □, △) µg of oil per ml. (A), squalane; (B), liquid paraffin. Cell growth was monitored at 660 nm with a biophotorecorder.

の試料によっても 0.5~4 時間の差を生じた。このようにリノール酸には他の試料に比べかなり強い増殖抑制作用が確認された。またオレイン酸の黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制作用も明らかになった。さらにオレイン酸を主成分とする植物油脂にも測定した範囲で抑制作用が確認された。このように菌の増殖への影響を経時的に測定しているため、比較的弱い増殖抑制作用も測定可能であった。Minimum effective concentration および Delay in growth time によって判定すると増殖抑制作用の比較が可能であったが、測定した範囲では精製ホオバオイル、スクワランおよび流動パラフィンによる増殖抑制は認められなかった。

Kabara らはリノール酸とオレイン酸およびその他の脂肪酸の抗菌性を連鎖球菌および黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌 12 種、グラム陰性菌 8 種に対する最小発育阻止濃度 (MIC) として報告している¹⁰⁾。そのなかで黄色ブドウ球菌には myristoleic acid, palmitoleic acid および linolenic acid の阻止が認められたが、測定

した濃度 (1 mg/ml) ではリノール酸とオレイン酸には効果がなかったとしている。これはリノール酸およびオレイン酸の溶解性からすれば 1 mg/ml の値の信頼性は低いように思われる。一方, Willet and Morse は *Streptococcus agalactiae* についてリノール酸およびオレイン酸の増殖抑制作用を測定し, それぞれ ID 50 が 2.0 および 1.3 µg/ml であったと報告している¹²⁾。また Coonrod らは肺炎球菌に対する抗菌性として, リノール酸およびオレイン酸の ID 50 をそれぞれ 25 および 114 µg/ml としている¹³⁾。このように方法や検定菌が異なるものの, リノール酸およびオレイン酸に抗菌性あるいは増殖抑制作用があることはすでに報告されている。本論文の実験方法では *S. aureus* FDA 209 P は 10 µg/ml のリノール酸により 12 時間は増殖を抑制されたが, その後増殖することが明らかになった。オレイン酸によっても 6 時間は濃度に応じた増殖抑制作用が認められたが, 18 時間後の判定では増殖抑制作用は認められない結果となった。また局方ツバキ油, 精製ツバキ油およびオリーブ油にも約 6 時間は濃度に応じた増殖抑制作用を認めた。したがって MIC の測定法¹⁴⁾ のように 18~20 時間培養後に判定する方法では油脂の増殖抑制作用あるいは抗菌活性は検出されない可能性を示している。このため本論文の実験方法では菌増殖抑制効果を検出できたが, Kabara らはリノール酸とオレイン酸の黄色ブドウ球菌に対する効果を MIC としては測定できなかったことも考えられる。本論文の実験方法は測定可能な範囲は 80 µg/ml 以下と限られるものの菌の増殖への影響を経時的に測定しているため増殖抑制作用の測定は可能となった。

さらに試料を含む培地における *S. aureus* FDA 209 P の増殖を培地のみにおけるそれとを比較して増殖抑制曲線が得られた (Fig. 4)。この増殖抑制曲線から求められた各試料の ID 50 を比較し, 増殖抑制作用をさらに詳細に評価した。局方ツバキ油とオレイン酸はほぼ同様の増殖抑制曲線を示した。Fig. 4 からリノール酸の ID 50 は 1.6 と *S. aureus* FDA 209 P に対するかなり強い作用があった。またオレイン酸にも強い作用があり ID 50 は 6.0 µg/ml であった。一方, 植物油脂の局方ツバキ油, 精製ツバキ油およびオリーブ油の ID 50 はそれぞれ 3.5 µg/ml, 35 µg/ml および 100 µg/ml 以上であった (Table 1)。このように局方ツバキ油にはオレイン酸よりやや強い作用が認められた。また局方ツバキ油は精製ツバキ油の 10 倍の作用を示したが, この強い作用は共存する物質によるものか不明である。ツバキ油の主成分はオレイン酸のグリセリンエステルであり, 主な植物油脂の中では含有率ももっとも高く, オレイン酸とリノール酸がそれぞれ 8.5% および 4.1% 含まれている¹⁵⁾。一方, オリーブ油にはオレイン酸とリノール酸がそれぞれ 73.4% および 11.1% 含まれてい

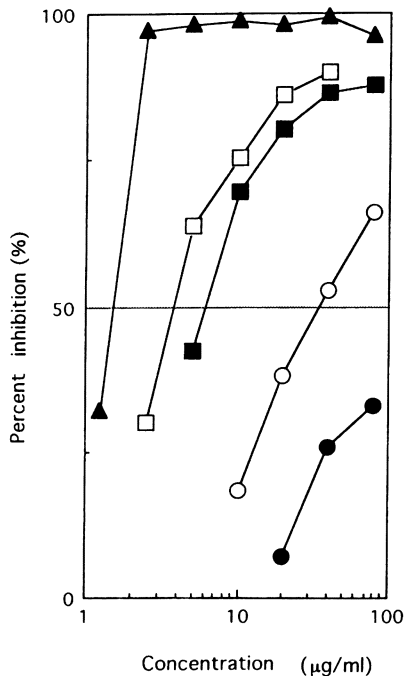


Fig. 4 Relative inhibitory effects of fatty acids and oils on the growth of *Staphylococcus aureus* FDA 209 P. Fatty acids and oils at concentrations ranging from 1.25 to 80 µg/ml were used to determine the ID 50 for fatty acids and oils. symbols: ▲, linoleic acid; ■, oleic acid; □, camellia oil; ○, purified camellia oil; ●, olive oil.

る¹⁵⁾。このため精製ツバキ油とオリーブ油の ID 50 の差は主に脂肪酸の含量によるものと思われるが、単に含量の差だけでは説明できないのでさらに検討が必要であると思われる。以上のことから、ツバキ油およびオリーブ油の *S. aureus* FDA 209 P に対する効果は主成分のオレイン酸によるものと考えられる。

Stillman らは脂肪酸のヒトの皮膚への刺激を調べており、リノール酸に刺激性がありオレイン酸には刺激性は見られなかったと報告している¹⁶⁾。アトピー性皮膚炎患者の皮膚はかなり敏感になっていると思われるので、精製ツバキ油あるいはオリーブ油に比べ強い黄色ブドウ球菌の増殖抑制作用を示したオレイン酸および局方ツバキ油はアトピー性皮膚炎患者の皮膚に対してはかなりの刺激性が予想される。このためスキンケアに精製ツバキ油あるいはオリーブ油が使用できているのは刺激が少ないめと考えられる。以上のことから精製ツバキ油がアトピー性皮膚炎患者に対し有用であった⁷⁻⁹⁾のは使用感によるものと黄色ブドウ球菌に対する穏やかな増殖抑制作用による可能性が高いと考えられる。ID 50 では精製ツバキ油に劣るオリーブ油もスキンケアに有用であると思われる。しかしながら、天然油脂では主要物質の構成比や不純物の含量がロットごとに違うことが推測され、皮膚への刺激性のないこと

のほかに物質構成の安定性と酸化安定性が重要であると思われる。

オレイン酸を主成分とする植物油の黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制作用を Minimum effective concentration, Delay in growth time および ID 50 について比較することにより明らかにした。すでにアトピー性皮膚炎患者より分離された黄色ブドウ球菌についての増殖抑制作用について検討しており、興味ある知見が得られているので近く報告する予定である。

文 献

- 1) 秋山尚範, 下江敬生, 多田譲治, 荒田次郎: 皮膚病変部における *Staphylococcus aureus* の検出について。日本皮膚科学会雑誌 103: 1315~1322, 1993
- 2) 秋山尚範, 多田譲治, 鳥越利加子, 戸井洋一郎, 神崎寛子, 荒田次郎: アトピー性皮膚炎の皮膚病変部における *Staphylococcus aureus* の定量的検討。日本皮膚科学会雑誌 104: 1249~1257, 1994
- 3) 秋山尚範, 鳥越利加子, 神崎寛子, 荒田次郎: アトピー性皮膚炎に対する自家製ヒノキチオール軟膏の使用経験。Chemotherapy 42: 1202~1211, 1994
- 4) 西岡 清: アトピー性皮膚炎のスキンケア。(アトピー性皮膚炎テキスト) p. 63~64, 南江堂, 東京, 1994
- 5) 吉池高志: アトピー性皮膚炎に対する局所療法。Pharma Medica 10 (7): 79~83, 1992
- 6) 高野正彦: 軟膏剤。(今日の皮膚外用剤) p. 163~498, 南山堂, 東京, 1982
- 7) 溝口昌子, 竹島 真: 精製ツバキ油による湿疹・皮膚炎の治療成績。西日本皮膚科 50: 119~125, 1988
- 8) 斉藤胤曠: アトピー性皮膚炎への精製ツバキ油の応用。新薬と臨床 38: 1327~1331, 1989
- 9) 飯塚万利子, 伊崎誠一, 北村啓次郎: アトピー性皮膚炎ならびに乾皮症に対する精製ツバキ油の効果。日本小児皮膚科学雑誌 11: 153~158, 1992
- 10) Kabara J J, Swieczkowski D M, Conley A J, Truant J P: Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 2: 23~28, 1972
- 11) 加藤信行, 芝崎 薫: 脂肪酸およびそのエステル抗菌作用の比較。J Ferment Technol 53: 793~801, 1975
- 12) Willet N P, Morse G E: Long-chain fatty acid inhibition of *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined medium. J Bacteriol 91: 2245~2250, 1966
- 13) Coonrod J D: Role of surfactant free fatty acids in antimicrobial defenses. Eur J Respir Dis 153: 209~214, 1987
- 14) Japan Society of Chemotherapy, Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 15) 鈴木 修, 他: 主要油脂の脂肪酸組成。油脂化学便覧(日本油脂化学協会編) pp. 104~105, 丸善, 東京, 1990
- 16) Stillman M A, Maibach H I, Shalita A R: Relative irritancy of free fatty acids of different chain length. Contact Dermatitis 1: 65~69, 1975

Inhibitory effects of fatty acids purified camellia oil and olive oil on the growth of *Staphylococcus aureus*

Taketoshi Arai, Hajime Hamashima and Masanori Sasatsu

Department of Microbiology, Showa College of Pharmaceutical Sciences Machida, Tokyo 194, Japan

Linoleic acid, oleic acid, camellia oil, purified camellia oil, olive oil, jojoba oil, squalane and liquid paraffin were examined for inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* FDA 209 P. Standard solutions of oils at 80 $\mu\text{g/ml}$ were serially diluted two-fold with additional broth. An overnight culture was added to each dilution to give approximately 1.0×10^7 colony-forming units per ml (cfu/ml). The inhibitory activity of samples on growth was monitored turbidimetrically. The results showed that linoleic acid, oleic acid and camellia oil had strong inhibitory activity against *S. aureus* FDA 209 P. Both purified camellia oil and olive oil showed relatively low inhibitory activity against *S. aureus* FDA 209 P. The 50% inhibitory dose (ID 50) of purified camellia oil was compared with that of other fatty acids and oils. A comparison of the ID 50 of purified camellia oil with those of other fatty acids and oils revealed that purified camellia oil exerted stronger inhibitory activity than that of olive oil. Jojoba oil, squalane and liquid paraffin showed no inhibitory activity against *S. aureus* FDA 209 P at the concentrations tested. The results suggest the purified camellia oil and olive oil are potentially useful skin care products for skin affected by atopic dermatitis.