

サルシノクリシス (*Sarcinochrysis* sp.) の抗菌物質の探索

西尾恵里子^{1*}・榎 節子²・山口 裕司²・富田 純史³・竹中 裕行²

¹九州共立大学共通教育センター, ²マイクロアルジェコーポレーション株式会社,

³九州共立大学スポーツ学部

(2012年5月16日受付 2012年9月6日受理)

Screening for antibacterial active compounds from microalga, *Sarcinochrysis* sp.

Eriko Nishio^{1*}, Setsuko Sakaki², Yuji Yamaguchi², Yoshifumi Tomita³, and Hiroyuki Takenaka²
(Career and General Education Center, Kyushu Kyoritsu University, 1-8 Jiyugaoka, Yahatanishiku, Kitakyushu, Fukuoka 807-8585¹; MicroAlgae Corporation, 4-15 Akebono, Gifu 500-8148²; Faculty of Sports Science, Kyushu Kyoritsu University³) Seibutsu-kogaku **90**: 676–683, 2012.

The antimicrobial activity of the 50% ethanol extract from a microalga, *Sarcinochrysis* sp. (*Pelagophyceae Sarcinochrysidales*) and further fractions of the extract were examined against five challenge organisms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger*, using the preservative-effective test. The most susceptible species to the extract was *S. aureus* followed by *P. aeruginosa* and *E. coli*, whereas the extract wasn't active against *A. niger*. The diethyl ether fraction of the 50% ethanol extract showed the most effective antimicrobial activity to the *S. aureus* and *P. aeruginosa*, and the ethyl acetate fraction of the extract to *P. aeruginosa*. It is suggested that active substance(s) in the extract may have the polarity which is soluble in diethyl ether or ethyl acetate. Further experiments are needed to clarify the active component(s) and their action mechanism(s).

[**Key words**: microalga, antimicrobial activity, *Sarcinochrysis*, *Staphylococcus aureus*, fraction]

藍藻, 緑藻, 紅藻などの微細藻類はさまざまな環境に生息しており, 多様化している¹⁻³). この多様性に加えて, 微細藻類は限られた微小環境下で限られた資源を求めて他の細菌や真菌などの微生物と闘いながら生存するために生体防御機能を高めてきたことから, 未知の有効物質を含むことが期待される⁴). 微細藻類の生理活性物質のうち抗菌性に関する研究はまだあまり行われていないがいくつかの報告がある. 緑藻 *Dunaliella salina* から得たパルミチン酸, α -リノレン酸, オレイン酸, α -, β -イオンやフィトールを含有する抽出物は, *Aspergillus niger* に対してはほとんど抗菌性を示さなかったが *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* に対して抗菌作用を示した⁵). 珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* 由来の多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸を多く含む抽出物は, *Candida* sp. などの真菌の増殖は抑制しなかったが, グラム陽性菌とグラム陰性菌に対する広範

な増殖抑制スペクトルを示し, さらに多剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する抗菌作用が報告されている⁴).

現在, 化粧品, 医薬品や食品等の防腐剤としてパラベンが幅広く使用されているが⁶), 化粧品や湿布薬に用いられた場合のアレルギー性接触皮膚炎や⁷), パラベンが弱いながらエストロゲン活性を示すことから乳がんのリスクへの影響が懸念されている⁶). また安全性だけでなく, 化粧品業界ならびに消費者の天然物志向の高まりから天然物由来の抗菌活性剤の研究が注目されており⁸), これまでに緑茶⁹), ニンニク¹⁰), オレガノ¹¹)や竹エキス¹²)などの植物由来の抗菌活性剤は, すでに数多く報告されている.

今回筆者らは, 微細藻類の化粧品保存剤としての実用性に関する基礎データを得る目的で, 探索されていない *Chromophyta* (黄色植物門) *Pelagophyceae* (ペラゴ藻綱) *Sarcinochrysidales* (サルシノクリシス目) *Sarcinochrysis*

*連絡先 E-mail: eriko@kyukyuo-u.ac.jp

sp. (サルシノクリシス) について検討を行った。まず、*Sarcinichrysis* sp. の50%エタノール抽出物を10%DMSOに溶解して抗菌試験を行った後、異なる極性に従って分画したものを、抗菌作用を示した菌に対してさらに抗菌試験を行い抗菌活性物質の性状について考察を加えた。抗菌試験は、化粧品品の保存効力試験法¹³⁾に基づき、*Escherichia coli* (*E. coli*)、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)、*Candida albicans* (*C. albicans*) および *Aspergillus niger* (*A. niger*) を対象として試験した。

実験方法

細菌液の調製 -80°Cで冷凍保存(超低温フリーザー MDF-192, 三洋電機(株))していた *E. coli* (ATCC8739)、*S. aureus* (ATCC6538) と *P. aeruginosa* (ATCC9027) を各々 Soybean-Casein Digest Agar DAIGO (SCD) (日本製薬(株)) 平板培地に10 µlの白金耳(アズワン(株))で菌を3~4回塗抹し、30°C(プロコン低温恒温器 IL72, ヤマト科学(株))で24時間培養した。培養した各々の細菌を10 µl白金耳でかき取り、15 mlの滅菌生理食塩水で懸濁して約10⁹ cfu/mlの菌液を調製した。

真菌液の調製 -80°Cで冷凍保存していた *C. albicans* (ATCC10231) をねじ口試験管(アズワン(株))の Difco™ Potato Dextrose Agar (PDA) 斜面培地に10 µlの白金耳で3~4回塗抹し、25°C(プロコン低温恒温器 IL72, ヤマト科学(株))で2日間培養した。滅菌生理食塩水を約10 mlねじ口試験管に入れ蓋をし、斜面培地上を数回洗い流して生菌を含む浮遊液を調製した。その後、その滅菌生理食塩水をピペットで取り、ガラスウール(Quartz Wool, 東ソー(株))でろ過をして、約10⁷ cfu/mlの菌液を調製した。

-80°Cで冷凍保存していた *A. niger* (ATCC16404) をねじ口試験管のPDA斜面培地に10 µlの白金耳で3~4回塗抹し、25°Cで1週間培養した。0.05% tween80 (Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate) (和光純薬工業(株))を添加した滅菌生理食塩水を約10 mlねじ口試験管に入れ蓋をし、斜面培地上を数回洗い流して胞子を含む浮遊液を調製した。その後、その滅菌生理食塩水をピペットで取り、ガラスウール(Quartz Wool, 東ソー(株))でろ過をして、約10⁷ cfu/mlの菌液を調製した。

***Sarcinichrysis* sp. の50%エタノール抽出物の調製**
Sarcinichrysis sp. は、1996年、沖縄県糸満市米須海岸で採取した。採取後、あらかじめ2 l扁平フラスコで、f/2培地¹⁴⁾を用いて30 µmol/m²/s (24時間明) 25°Cで2週間培養した。その *Sarcinichrysis* sp. 乾燥体120 gを50%エタノール(和光純薬工業(株))1440 mlと混ぜ、

90°C以上で3時間還流抽出した。次に3000 rpmで10分間遠心分離(卓上多本架遠心機 LC-200, (株) トミー精工)し吸引ろ過した。その後エバポレーター(ロータリーエバポレーター NAJ-100, 東京理化工業(株))を用いてエタノールを除去した後、凍結乾燥(凍結乾燥機 FD-1型, 東京理化工業(株))して *Sarcinichrysis* sp. の50%エタノール抽出物(以降“抽出物”と表示する)を得た。収率は、6.97%であった。

抽出物の溶媒分画 *S. aureus* と *P. aeruginosa* に対する抽出物の溶媒分画の抗菌試験を行うために、次の溶媒分画を2回行った。1回目の抽出量を示すが、2回目の抽出量もほぼ同じであった。

凍結乾燥させた抽出物0.41 gにヘキサン(和光純薬工業(株))80 mlを加え、15分間超音波洗浄機(東京理化工業(株))で溶解した。その後水80 mlを加え10分間振とうし、3000 rpmで5分間遠心分離しヘキサン層を取った。その後ヘキサンを80 ml加え10分間振とうし、3000 rpmで5分間遠心分離しヘキサン層を取った。この操作をさらに繰り返し、ヘキサン層をエバポレーターで乾固し凍結乾燥して、ヘキサン画分0.025 gを得た。次に水層を約8 ml取り凍結乾燥して、ヘキサン分配の水画分0.035 gを得た。

残りの水層約72 mlにジエチルエーテル(和光純薬工業(株))72 mlを加え、10分間振とうした。振とう後、3000 rpmで5分間遠心分離しジエチルエーテル層を取った。この操作をさらに2回繰り返し、ジエチルエーテル層をエバポレーターで乾固し凍結乾燥して、ジエチルエーテル画分0.045 gを得た。次に水層を約7.2 ml取り凍結乾燥して、ジエチルエーテル分配の水画分0.030 gを得た。

残りの水層約64.8 mlに酢酸エチル(和光純薬工業(株))64.8 mlを加え、10分間振とうした。振とう後、3000 rpmで5分間遠心分離し酢酸エチル層を取った。この操作をさらに2回繰り返し、酢酸エチル層をエバポレーターで乾固し凍結乾燥して、酢酸エチル画分0.040 gを得た。次に水層を約6.6 ml取り凍結乾燥して、酢酸エチル分配の水画分0.027 gを得た。

残りの水層約58.2 mlにブタノール(和光純薬工業(株))58.2 mlを加え、10分間振とうした。振とう後、3000 rpmで5分間遠心分離しブタノール層を取った。この操作をさらに2回繰り返し、ブタノール層をエバポレーターで乾固し凍結乾燥して、ブタノール画分0.081 gを得た。次に水層を全量取り凍結乾燥して、ブタノール分配の水画分0.11 gを得た(Fig. 1)。

検体液の調製 ①0.2 w/v %パラベン(陽性対照): 陽性対照の濃度は、多くの化粧品において使用されてい

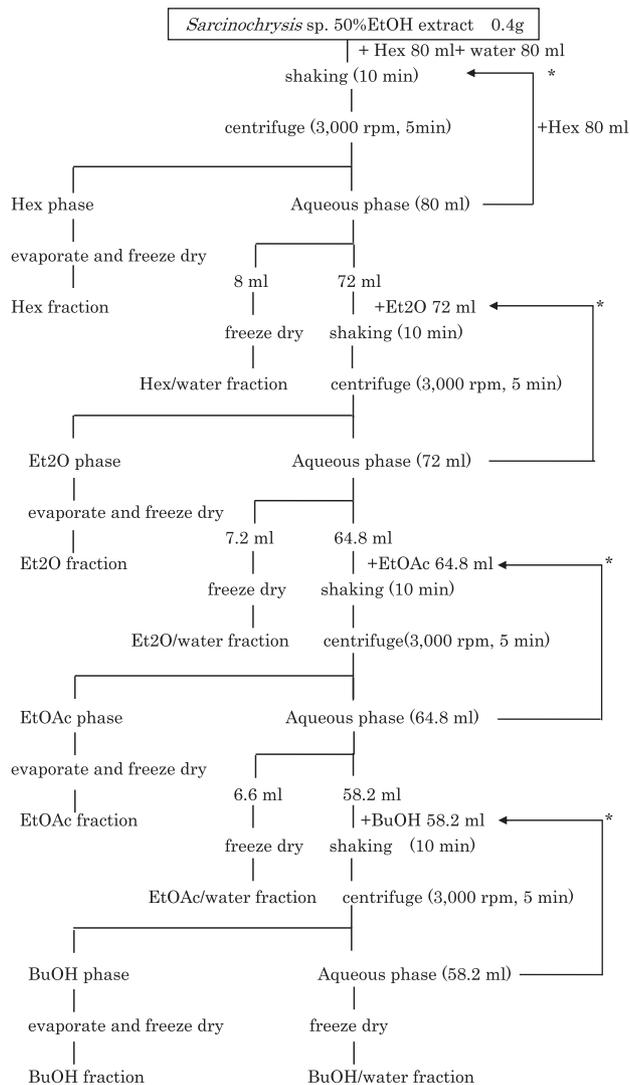


Fig. 1. Fraction process of *Sarcinochrysis* sp. 50%EtOH extract. *, twice repeat; EtOH, ethanol; Hex, hexane; Et2O, diethyl ether; EtOAc, ethyl acetate; BuOH, butanol.

るパラベンの濃度0.01～0.3%のうち、大腸菌、黄色ブドウ球菌の繁殖を防ぐ最低使用量0.2%で設定した。パラベン（パラオキシ安息香酸メチル）（上野製薬（株））の濃度が0.2w/v%となるように10%ジメチルスルホキシド（DMSO（和光純薬工業（株）））を加え調製した。

②0.0002～2%抽出物：抽出物の濃度が2%となるように10%DMSOを加えて調製した後に、10%DMSOで希釈して各々10 mlずつ調製した。

③0.002～0.2%ヘキササン画分：ヘキササン画分の濃度が0.2%となるように10%DMSOを加えて調製した後に0.22 μmのメンブレンフィルター（Whatman）でろ過した。この溶液を10%DMSOで希釈して各々10 mlずつ調製した。

④0.002～0.2%ジエチルエーテル画分：ジエチルエー

テル画分の濃度が0.2%となるように10%DMSOを加えて調製した後に0.22 μmのメンブレンフィルターでろ過した。この溶液を10%DMSOで希釈して各々10 mlずつ調製した。

⑤0.002～0.2%酢酸エチル画分：酢酸エチル画分の濃度が0.2%となるように10%DMSOを加えて調製した後に0.22 μmのメンブレンフィルターでろ過した。この溶液を10%DMSOで希釈して各々10 mlずつ調製した。

⑥0.002～0.2%ブタノール画分：ブタノール画分の濃度が0.2%となるように10%DMSOを加えて調製した後に0.22 μmのメンブレンフィルターでろ過した。この溶液を10%DMSOで希釈して各々10 mlずつ調製した。

①から⑥で調製した溶液に対して、前記で調製した細菌の菌液は約 10^8 cfu/mlに希釈したものを、前記で調製した真菌は希釈せずに原液 10^7 cfu/mlを100 μlずつ加え、25°C、50 rpmで1時間インキュベート（BR-160LF、タイテック（株））して検体液とした。

抗菌試験 上記の各検体液を25°Cで保存し、検体液調製後0日目（1時間後）、1日目、3日目、7日目に試験を行った。

細菌は検体液を希釈平板法により適当な濃度にし、希釈した液0.1 mlをSCD平板培地に撒き、コンラージ棒で全体に広げ、裏返しにして30°Cで約2日間培養しコロニー数を計測した。真菌は、検体液を希釈平板法により適当な濃度にし、0.1 mlをPDA平板培地に撒き、コンラージ棒で全体に広げ、裏返しにして25°Cで*C. albicans*は5日間、*A. niger*は7日間培養した。*A. niger*に関しては7日間の培養中に菌が広がりカウントが困難になるため、培養2日目にコロニー数を計測し、その後、培養7日目まで毎日新たなコロニーの発生の有無を観察した。3～7日目にコロニーが発生した場合は、2日目に計測したコロニー数に加算した。なお、1濃度に対して3枚のシャーレを使い、コロニー計測可能な2～3濃度の平均の結果とした。

結 果

*E. coli*に対する抽出物の抗菌作用の結果をFig. 2に示す。

陽性対照の0.2%パラベンでは1日目に0日目の約10分の1まで減少し、3日目以降はコロニーを形成しなかった。0.2%抽出物では7日目に約60倍、0.02%抽出物では約10倍コロニー数が増えた。0.002%抽出物の3日目に約1000分の1まで減少したが、3日目から7日目にかけて100倍に増えた。0.0002%抽出物は7日目に約100分の1まで減少した。

予備的に行った各種有機溶媒分画において、0.2%ヘキササン画分と0.2%酢酸エチル画分では7日目のコロニー

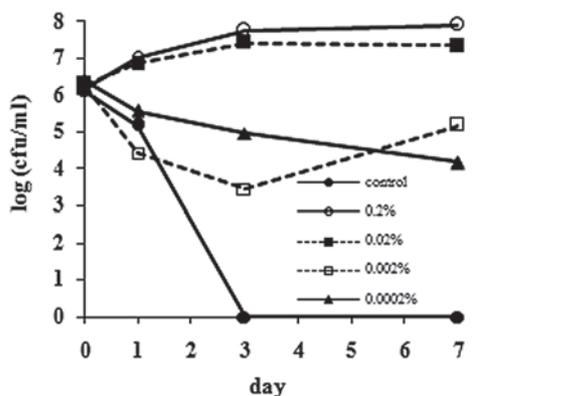


Fig. 2. Antimicrobial activity of 50%EtOH extract of *Sarcinochrysis* sp. against *E. coli*. The closed circle (●) indicates the positive control (0.2% paraben). The open circle (○), closed square (■), open square (□), and closed triangle (▲) indicate 0.2, 0.02, 0.002, and 0.0002% *Sarcinochrysis* sp. extract respectively.

数は0日目とほとんど変化なかったが、0.2%ブタノール画分では約20倍に増えた。一方、0.2%ジエチルエーテル画分では7日目に0日目の約1000分の1まで減少した(データ未掲載)。

*S. aureus*に対する抽出物、抽出物のヘキササン画分、ジエチルエーテル画分、酢酸エチル画分およびブタノール画分の抗菌作用の結果をFig. 3に示す。陽性対照の0.2%パラベンでは1日目に0日目の約1000分の1まで減少し、3日目以降はコロニーを形成しなかった。

0.2%抽出物は7日目に0日目の約10分の1まで減少した。0.02%抽出物の0日目は 4.5×10^5 cfu/ml, 1日目は7 cfu/mlであり、0.002%抽出物の0日目は 1.1×10^6 cfu/ml, 1日目は 6.5×10^1 cfu/mlであり、いずれも3日目以降はコロニーを形成しなかった(Fig. 3-A)。

0日目の0.1%ヘキササン画分は 5.7×10^2 cfu/ml, 0.02%ヘキササン画分は 3.8×10^3 cfu/ml, 0.002%ヘキササン画分は 7.2×10^4 cfu/mlであり、いずれも1日目以降はコロニーを形成しなかった(Fig. 3-B)。

0.2%ジエチルエーテル画分は、0日目以降コロニーを形成しなかった。0日目の0.02%ジエチルエーテル画分は 1.6×10^2 cfu/ml, 0.002%ジエチルエーテル画分は 1.2×10^3 cfu/mlであり、いずれも1日目以降はコロニーを形成しなかった(Fig. 3-C)。

0日目の0.2%酢酸エチル画分は 7.8×10^3 cfu/ml, 0.02%酢酸エチル画分は 6.1×10^3 cfu/ml, 0.002%酢酸エチル画分は 1.4×10^5 cfu/mlであり、いずれも1日目以降はコロニーを形成しなかった(Fig. 3-D)。

0日目の0.2%ブタノール画分は 6.7×10^4 cfu/ml, 1日目は 1.3×10^5 cfu/ml, 3日目は 9.1×10^3 cfu/ml, 7日

目はコロニーを形成しなかった。0日目の0.02%ブタノール画分は 1.2×10^5 cfu/ml, 0.002%ブタノール画分は 1.6×10^5 cfu/ml, 1日目は 3.9×10^2 cfu/ml, いずれも3日目以降はコロニーを形成しなかった(Fig. 3-E)。

*P. aeruginosa*に対する抽出物、抽出物のヘキササン画分、ジエチルエーテル画分、酢酸エチル画分およびブタノール画分の抗菌作用の結果をFig. 4に示す。陽性対照の0.2%パラベンでは1日目以降はコロニーを形成しなかった。

0.2%抽出物の0日目は 3.3×10^4 cfu/ml, 1日目は 1.1×10^2 cfu/ml, 3日目以降はコロニーを形成しなかった。0.02%抽出物の0日目は 2.2×10^3 cfu/ml, 1日目は 2.3×10^2 cfu/ml, 3日目は 5.6×10^1 cfu/ml, 7日目はコロニーを形成しなかった。0.002%抽出物の0日目は 9.6×10^4 cfu/ml, 7日目に約100分の1まで減少した(Fig. 4-A)。

0.2%ヘキササン画分では培養0日目は 1.2×10^4 cfu/ml, 1日目は 1.1×10^3 cfu/ml, 3日目以降はコロニーを形成しなかった。0.02%ヘキササン画分の0日目は 5.2×10^4 cfu/ml, 7日目に約700分の1まで減少した。0.002%ヘキササン画分の0日目は 1.9×10^5 cfu/ml, 7日目に約300分の1まで減少した(Fig. 4-B)。

0.2%ジエチルエーテル画分では培養0日目は 8.0×10^3 cfu/ml, 1日目は 9.2×10^2 cfu/ml, 3日目以降はコロニーを形成しなかった。0.02%ジエチルエーテル画分の0日目は 1.6×10^4 cfu/ml, 1日目は 2.2×10^3 cfu/ml, 3日目は 1.0×10^2 cfu/ml, 0.002%ジエチルエーテル画分の0日目は 5.8×10^4 cfu/ml, 1日目は 8.8×10^3 cfu/ml, 3日目は 5.3×10^1 cfu/ml, いずれも7日目はコロニーを形成しなかった(Fig. 4-C)。

0.2%酢酸エチル画分では培養0日目は 2.4×10^3 cfu/ml, 1日目は 4.1×10^2 cfu/ml, 3日目以降はコロニーを形成しなかった。0.02%酢酸エチル画分の0日目は 4.0×10^4 cfu/ml, 1日目は 5.8×10^3 cfu/ml, 3日目は 4.6×10^1 cfu/ml, 0.002%酢酸エチル画分の0日目は 2.0×10^5 cfu/ml, 1日目は 6.1×10^3 cfu/ml, 3日目は 1.6×10^2 cfu/ml, いずれも7日目はコロニーを形成しなかった(Fig. 4-D)。

0.2%ブタノール画分では培養0日目は 9.3×10^3 cfu/ml, 1日目は 5.6×10^2 cfu/ml, 3日目は 1.3×10^2 cfu/ml, 0.02%ブタノール画分の0日目は 4.0×10^3 cfu/ml, 1日目は 1.9×10^2 cfu/ml, 3日目は 1.7×10^1 cfu/mlであり、いずれも7日目はコロニーを形成しなかった。0.002%ブタノール画分の0日目は 2.5×10^5 cfu/ml, 7日目に約300分の1まで減少した(Fig. 4-E)。

*C. albicans*と*A. niger*に対する抽出物の抗菌作用の結果をFig. 5とFig. 6に示す。

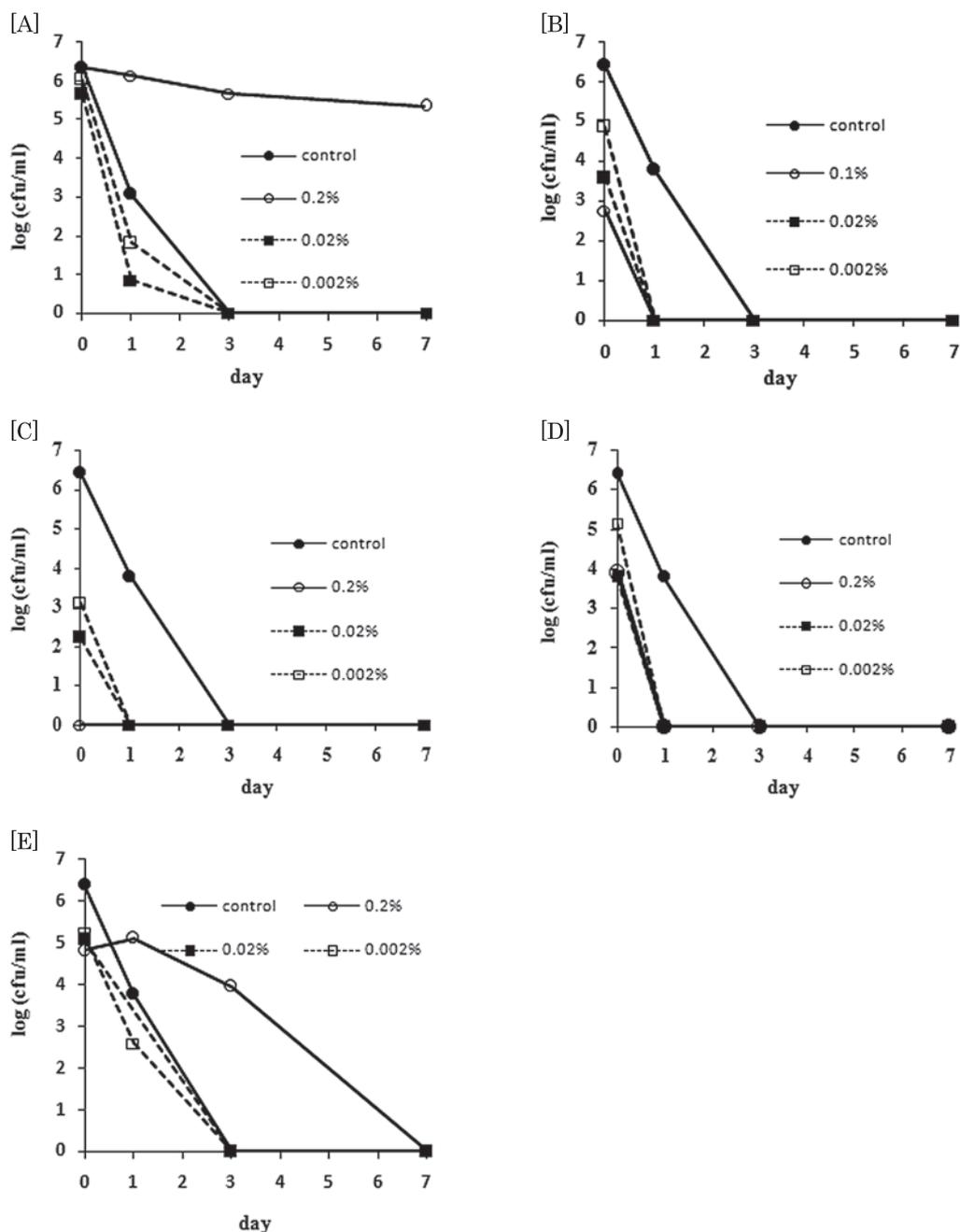


Fig. 3. Antimicrobial activity of 50%EtOH extract of *Sarcinochrysis* sp. [A] and Hex [B], Et₂O [C], EtOAc [D], and BuOH [E] fractions of the extract against *S. aureus*. The closed circle (●) indicates the positive control (0.2% paraben). The open circle (○), closed square (■), and open square (□) indicate 0.2 or 0.1, 0.02, and 0.002% *Sarcinochrysis* sp. extract or fraction respectively.

*C. albicans*は陽性対照の0.2%パラベンでは7日目にコロニーを形成しなかった。2%抽出物では7日目に0日目の約100分の1、1%抽出物では約40分の1、0.2%抽出物では約30分の1まで減少した。0.02%抽出物と0.002%抽出物では、コロニー数の変化がほとんどなかった。

*A. niger*は陽性対照の0.2%パラベンでは7日目に約5000分の1まで減少した。2%抽出物、1%抽出物および0.2%抽出物では、コロニー数の変化がほとんどなかった。

考 察

Sarcinochrysis sp.抽出物の抽出方法には熱水抽出や100%エタノール抽出、エタノール以外の溶媒での抽出などがある。予備試験で熱水抽出物には*S. aureus*に対しては抗菌作用が認められなかったため(データ未掲載)、今回は50%エタノール抽出物の抗菌作用の有無について実験を行った。

今回 *Sarcinochrysis* sp.抽出物は、*P. aeruginosa*と*S.*

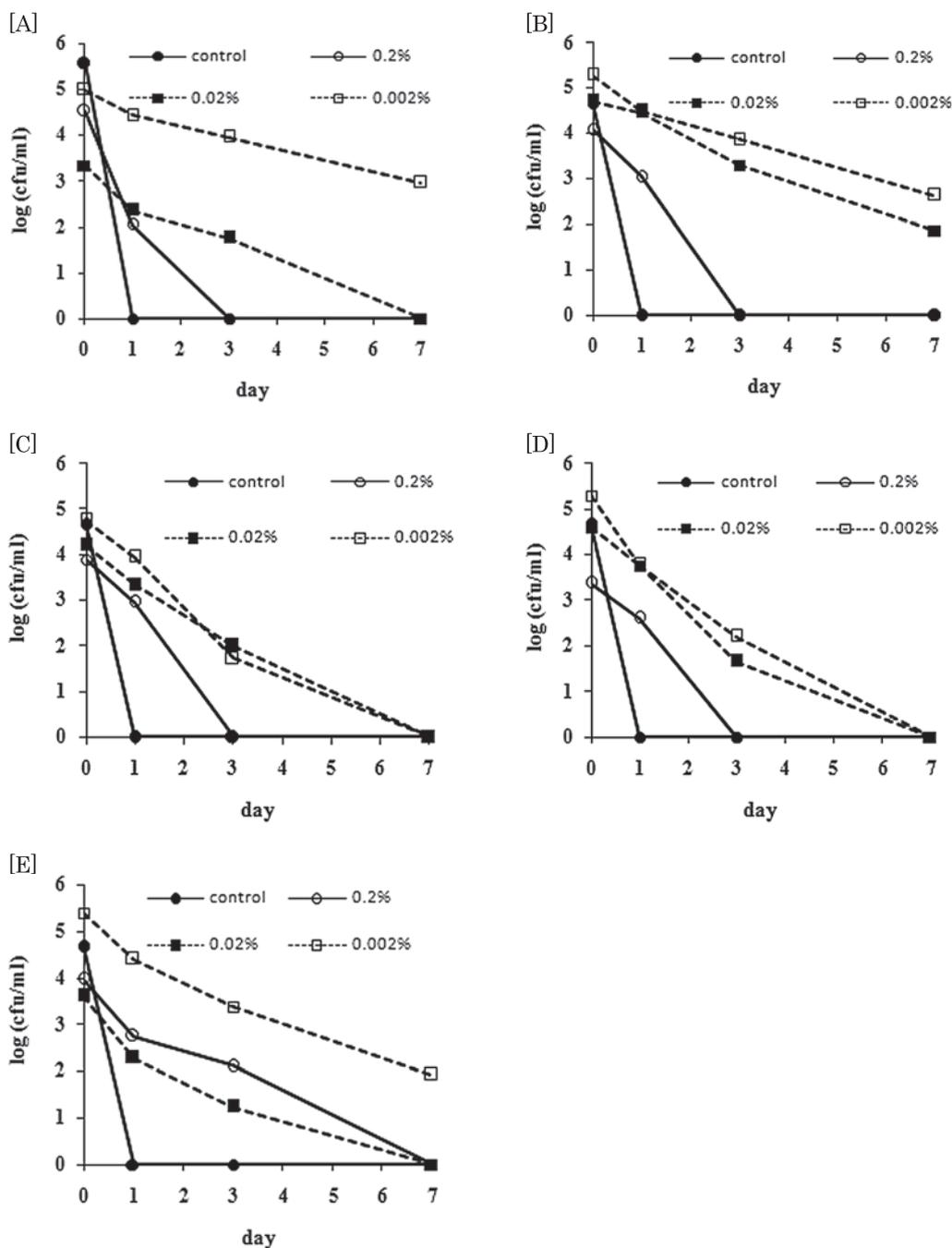


Fig. 4. Antimicrobial activity of 50%EtOH extract of *Sarcinochrysis* sp. [A] and Hex [B], Et₂O [C], EtOAc [D], and BuOH [E] fractions of the extract against *P. aeruginosa*. The closed circle (●) indicates the positive control (0.2% paraben). The open circle (○), closed square (■), and open square (□) indicate 0.2, 0.02, and 0.002% *Sarcinochrysis* sp. extract or fraction respectively.

aureus に対して抗菌作用を示した。0.2%抽出物では *S. aureus* に対してあまり抗菌作用を示さなかった。0.02%と0.002%抽出物では0.2%パラベンよりも抗菌性を示し、もっとも効果が強かった。

一方、*E. coli* に対しては、0.0002%抽出物においてわずかに抗菌作用を示した。0.002~0.2%抽出物では菌数の増加がみられた。予備的に行った各種有機溶媒分画においては、0.2%ジエチルエーテル画分では7日目

に約1000分の1まで減少したが、極性の大きな物質が溶けている0.2%ブタノール画分においてだけ菌数が増えたことも考え合わせると、抽出物の抗菌性よりも抽出物中の成分が菌により資化された可能性が考えられた。*C. albicans* に対しては2%抽出物で7日目に菌の減少が見られ弱いながら抗菌作用があると考えられた。1%、0.2%、0.02%および0.002%抽出物では菌数の変化が認められなかった。*A. niger* では2%、1%および0.2%抽

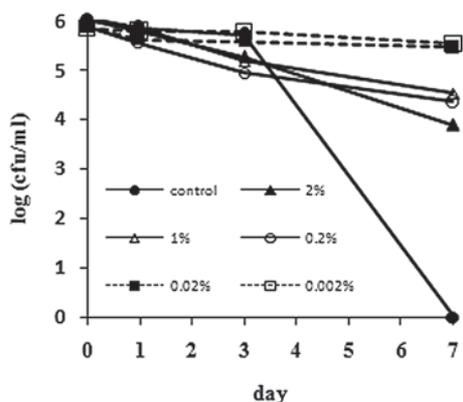


Fig. 5. Antimicrobial activity of 50%EtOH extract of *Sarcinochrysis* sp. against *C. albicans*. The closed circle (●) indicates the positive control (0.2% paraben). The closed triangle (▲), open triangle (△), open circle (○), closed square (■), and open square (□) indicate 2, 1, 0.2, 0.02, and 0.002% *Sarcinochrysis* sp. extract respectively.

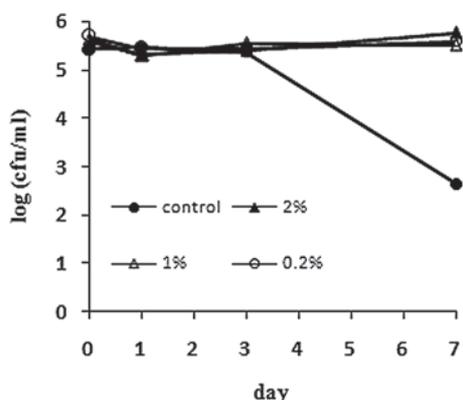


Fig. 6. Antimicrobial activity of 50%EtOH extract of *Sarcinochrysis* sp. against *A. niger*. The closed circle (●) indicates the positive control (0.2% paraben). The closed triangle (▲), open triangle (△), and open circle (○) indicate 2, 1, 0.2% *Sarcinochrysis* sp. extract respectively.

出物では抗菌作用が示されなかった。

Zhengらは、不飽和脂肪酸のパルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸やアラキドン酸は*S. aureus*に対して抗菌作用を示したが、パルミチン酸やステアリン酸のような飽和脂肪酸は抗菌作用を示さなかったことを報告した¹⁵⁾。褐藻の*Sargassum muticum*由来のガラクトグリセロ脂質は、細菌の*Shewanella putrefaciens*と*Polaribacter irgensii*とテストした真菌類に対して抗菌作用を示した¹⁶⁾。Desboisらは、珪藻*Phaeodactylum tricornutum*由来のエイコサペンタエン酸は、多剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対して抗菌作用を示すことを報告している⁴⁾。さらにある種の不飽和遊離脂肪酸の過酸化作用や細菌細胞膜に対する損傷作用が殺菌メカニ

ズムではないかと推定している⁴⁾。一方、*Sarcinochrysis* sp.抽出物に含まれる生理活性成分はまだ同定されていないが、50%エタノールによる抽出であることから不飽和遊離脂肪酸以外の物質が効果を示している可能性がある。

そこで抗菌活性物質の性状についての知見を得るために、50%エタノール抽出物を極性の異なる溶媒で分画して抗菌試験を行った。その結果、ジエチルエーテル画分は抽出物より*S. aureus*に対して強い抗菌作用を示し、0.2%ジエチルエーテル画分では、菌接種1時間後(0日目)のコロニー数は認められなかった(Fig. 3-C)。*P. aeruginosa*に対してはジエチルエーテル画分と酢酸エチル画分が強い抗菌作用を示した。ヘキサン分配およびジエチルエーテル分配の水画分で抗菌試験を行ったところ、7日目に各々0.2%抽出物において0日目の1000倍、0.02%抽出物において100倍に菌数が増加していた(データ未掲載)。これは、抽出物中の糖などの有機物が水に溶けて菌に資化されたことが推定された。

Herreroらは、緑藻*D. salina*の石油エーテルとヘキサン抽出物は、*E. coli*と*S. aureus*に対してエタノール抽出物よりも抗菌作用を示したということを報告している。石油エーテルとヘキサン抽出物は、抗菌作用が既に報告されている脂肪酸(パルミチン酸、 α -リノレン酸やオレイン酸)や β -cyclocitral、 α -、 β -イオンンやフィトールをエタノール抽出物よりも含有していた。一方、水抽出物は抗菌作用を示さなかったことも報告されている⁵⁾。藍藻*Synechocystis* sp.のエタノール抽出物はパルミトオレイン酸を多く含み、ヘキサン抽出物や水抽出物よりも*E. coli*と*S. aureus*に対して抗菌作用を示した²⁾。一方、本実験の*Sarcinochrysis* sp.に由来する抗菌活性物質は、ジエチルエーテル画分や酢酸エチル画分において強い抗菌作用を示したことから、ジエチルエーテルや酢酸エチルに溶解する極性を持つ物質の中に含まれていると推定される。今後ジエチルエーテル画分と酢酸エチル画分に含まれている物質を同定していくとともに、化粧品添加の有用性が示唆された場合には実用化に備えたパッチテストや皮膚アレルギーテストを実施する予定である。

要 約

微細藻類の一つである*Sarcinochrysis* sp.の50%エタノールの抽出物は、*Aspergillus niger*に対しては抗菌性を示さなかったが、*Staphylococcus aureus*および*Pseudomonas aeruginosa*に対して強い抗菌作用を示した。抗菌活性物質の性状について検討するために、抽出物を極性によって分画し抗菌試験を行った。*S. aureus*に対してはジエチルエーテル画分においてもっとも強い

抗菌作用を示した。 *P. aeruginosa* に対してはジエチルエーテルと酢酸エチル画分において強い抗菌作用を示した。このことから抗菌物質は、ジエチルエーテルまたは酢酸エチルに溶解する極性を持つものと推定される。今後は抗菌物質を同定する予定である。

文 献

- 1) Guedes, A. C., Amaro, H. M., and Malcata, F. X.: *Mar. Drugs*, **9**, 625-644 (2011).
- 2) Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Garcia-Blairsy Reina, G., Herrero M., Senorans, F. J., and Ibanez, E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 450-455 (2010).
- 3) 竹中裕行：生命の源マイクロアルジェ，成山堂書店 (2004).
- 4) Desbois, A. P., Mearns-Spragg, A., and Smith, V. J.: *Mar. Biotechnol.*, **11**, 45-52 (2009).
- 5) Herrero, M., Ibanez, E., Cifuentes, A., Regiero, G., and Santoyo, S.: *J. Food. Prot.*, **69**, 2471-2477 (2006).
- 6) Crinnion, W. J.: *Altern. Med. Rev.*, **15**, 190-196 (2010).
- 7) 皆本景子： *Jpn. J. Hyg.*, **65**, 20-29 (2010).
- 8) 人見 潤：FRAGRANCE JOURNAL, **2**, 17-21 (2011).
- 9) Taylor, P. W., Hamilton-Miller, J. M., and Stapleton, P. D.: *Food. Sci. Technol. Bull.*, **2**, 71-81 (2005).
- 10) Fani, M. M., Kohanteb, J., and Dayaghi, M.: *J. Indian. Soc. Pedod. Prev. Dent.*, **25**, 164-168 (2007).
- 11) Si, H., Hu, J., Liu, Z., and Zeng, Z. L.: *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, **53**, 190-194 (2008).
- 12) 寺岡文雄, 高橋純造：歯科材料・機械, **14**, 219-224 (1995).
- 13) 日本薬局方解説書編集委員会：第十四改正日本薬局方解説書, p.1250-1252, 廣川書店 (2006).
- 14) Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H.: *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239 (1962).
- 15) Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho H. Y., Kim, Y. H., and Kim, W. G.: *FEBS Lett.*, **579**, 5157-5162 (2005).
- 16) Plouguerne, E., Ioannou, E., Georgantea, P., Vagias, C., Roussis, V., Hellio, C., Kraffe, E., and Stinger-Pouvreau, V.: *Mar. Biotechnol.*, **12**, 52-61 (2009).