

【原 著】 産業動物

乳房炎原因菌に対するアカエゾマツ (*Picea glehnii*) 精油の抗菌活性

醍醐由香里¹⁾ 村田 亮¹⁾ 鈴木 一由¹⁾ 横田 博¹⁾
 内田 郁夫¹⁾ 菊池 直哉^{1,2)}

1) 酪農学園大学獣医学群獣医学類 (〒069-8501 江別市文教台緑町582番地)

2) 天使大学 (〒065-0013 札幌市東区北13条東3丁目1-30)

要 約

アカエゾマツ (*Picea glehnii*) はマツ科トウヒ属の常緑針葉樹であり、抗菌成分を含有することが報告されているが、詳細な情報はほとんど知られていない。そこで、主要な乳房炎原因菌に対するアカエゾマツの抗菌活性を評価した。ペーパーディスク試験において、アカエゾマツ精油は、黄色ブドウ球菌や大腸菌など、全ての供試菌に明確な阻止円を形成し、他のマツ科植物と比較しても抗菌活性が高いことが示された。また、精油の分子量を4つの分画に分けて活性を評価した結果、30 kDa以下の成分中に抗菌成分が含まれていることが推測された。黄色ブドウ球菌では精油と直接接触しなくとも阻止円を形成したことから、揮発性成分に対しても感受性が認められた。一方、大腸菌には抗菌活性を示さなかったことから、両者に対して抗菌活性を示す成分は異なる物質であることが示唆された。MICおよびMBC値はグラム陰性菌において高値を示したため、グラム陰性菌はアカエゾマツ精油への感受性が低い傾向にあると考えられた。

キーワード：アカエゾマツ、精油、牛、乳房炎、抗菌活性

-----北獣会誌 62, 135~139 (2018)

牛乳房炎は乳牛の病傷事故件数1,322,747件の約30%を占め^[1]、乳質・泌乳量の低下や抗生物質治療による診療費や出荷制限により、経済的な損失が大きい^[2]。牛乳房炎の原因は主に細菌性であり^[3]、環境性連鎖球菌30.2%、大腸菌群20.4%、コアグラゼ陰性ブドウ球菌19.6%、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*) 12.8%、その他17%であり、環境性乳房炎が問題となっている^[4,6]。乳房炎治療は抗菌剤の投与が主であるが、乳房炎治療目的の抗菌剤使用量は抗菌性飼料添加物を含めた家畜への抗菌剤使用量のおよそ半分を占める^[7]。従って、乳房炎治療に関わる抗菌剤使用による薬剤耐性菌出現が危惧されるため、獣医師や生産者が抗菌剤に対する正しい認識を持つこと^[8]、および抗菌剤を使わない代替療法が求められている。抗生物質の代替療法として注目されている揮発性芳香化合物を含有する植物由来の精油は、害虫や有害病原体の忌避作用、昆虫

や鳥への誘引効果、アトピー性皮膚炎の炎症抑制の他に、多くの細菌に対して抗菌活性が報告されている^[9-15]。

アカエゾマツは樹高30 m以上、胸高直径1.5 m以上に達し、マツ科トウヒ属に分類される高木である^[16]。北海道を中心に分布し、岩手県の一部、サハリン島南部や択捉島に小規模の自生地が観察される^[16]。北海道における針葉樹の森林蓄積では、トドマツ、カラマツ類、エゾマツに続いて、アカエゾマツは約6%を占めており、栄養の乏しい土壌でも発育することから人工林は増加傾向にある^[17-19]。ピアノの反響板、盆栽、パルプ材の原料となるが、耐久性が低いため建築材には向かず、需要はそれほど多くない。また、アカエゾマツに限らず、間伐材や伐採後の林地残材は多くが森林内に放置され、年間約2,000万 m³の未利用材が生じていることが報告されている^[20]。「木材は循環利用が可能な優れた資源」とされており、これらを有効利用できる可能性がある^[20,21]。

連絡責任者：村田 亮 酪農学園大学獣医学群 獣医学類感染病理学分野
 〒069-8501 江別市文教台緑町582番地
 TEL/FAX : 011-388-4899 E-mail : ryomurata@rakuno.ac.jp

アカエゾマツに含まれる抗菌成分の全様は明らかになっておらず、澁谷ら^[22]と佐野ら^[23]の報告があるのみである。抗菌成分の1つであるデヒドロアピエチン酸は、*S. aureus*のバイオフィルム形成に影響を与えるとされる^[22,24]。しかし、他の細菌への抗菌活性に関する報告はほとんどされていないのが現状である。

本研究では、アカエゾマツの乳房炎原因菌に対する抗菌活性を評価し、これらを予防や治療に利用して乳房炎の発生減少につなげることを目的とした。

材料と方法

1. 供試菌株

乳房炎乳汁由来の*S. aureus* (9-D)、*Streptococcus* (*Str.*) *agalactiae* (ATCC27956^T)、*Str. uberis* (9-48-1A)、*Str. dysgalactiae* (ATCC43078^T)、*Corynebacterium* (*C.*) *bovis* (ATCC7715^T)、*Escherichia* (*E.*) *coli* (ATCC25922^T)、*Klebsiella* (*K.*) *pneumoniae* (MK-5) の7菌種を用いた。*S. aureus*、*E. coli*、*K. pneumoniae*はTrypticase Soy Broth (日本BD、東京)、その他はBrain Haert Infusion Broth (日本BD) に接種し、37℃で18~24時間培養したものを菌液とした。感受性試験では、マクファーランド濁度0.5となるように滅菌生理食塩水で調整を加えた。

2. 材料採取

アカエゾマツは、2016年8月に酪農学園大学構内、また同年9月に北海道標茶町において採取した枝葉を用いた。さらに、アカエゾマツの新芽も抽出原料として使用した。

精油には、アカエゾマツ、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、ヒバ (*Thujopsis dolabrata var. hondae*)、トドマツ (*Abies sachalinensis*)、カラマツ (*Larix kaempferi*) の5種類を用いた。ヒノキ、ヒバは市販の精油を購入し、トドマツ、カラマツは一般社団法人マザーフォレストから分与されたものを使用した。アカエゾマツは風乾後、枝切りバサミで枝葉を細断して原料とした。この他、新芽のみを原料として抽出に用いた。原料から水蒸気蒸留法で精油と芳香蒸留水を抽出し、試験に使用するまで遮光瓶に入れて4℃で冷蔵保管した。なお、アカエゾマツ精油は50%ジメチルスルホキシド (DMSO: 和光純薬、大阪) で、分子量を30 kDa以上、30 kDa以下、3 kDa以上、3 kDa以下の4分画に調整分離した。

3. ペーパーディスク試験

抗菌物質として精油と芳香蒸留水を用いた。アカエゾマツ精油には、4つの分画に分けたものと、新芽および枝葉の2つの部位から抽出したものを用意した。*S.*

aureus、*E. coli*、*K. pneumoniae*にはMuller Hinton II Agar (MHA: 日本BD)、残りの菌種にはMHAに5%脱線維素馬血液を添加した血液寒天培地を使用した。調整済みの菌液100 µlを培地に接種し、抗菌物質20 µlを添加したペーパーディスク (直径8 mm、Thick、ADVANTEC、東京) を培地上に設置した。その後、37℃で18~24時間培養して形成された阻止円の直径を計測し、抗菌活性の評価を行った。アカエゾマツ精油のみ、ペーパーディスクを培地に接触しないようにシャーレの蓋側内壁に設置し、揮発性成分の抗菌活性も評価した。

4. 最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC)

20% DMSOに溶解したアカエゾマツ精油を抗菌物質として用いた。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のガイドラインに準拠した微量液体希釈法により、MICを決定した。抗菌物質は終濃度0.048828 µl/ml~25 µl/mlの範囲で2倍階段希釈を行った。MBC試験はMIC試験に続けて実施した。細菌増殖が見られなかったウェルから菌液100 µlをMHAに接種し、37℃で18~24時間培養後、コロニーの形成が見られなかった最小の濃度をMBCとした。

成 績

1. 被験菌に対する精油の抗菌活性

供試菌全てに明確な阻止円を形成したのは、ヒバとアカエゾマツのみであった (図1および表1)。最も大きな阻止円が観察されたのはヒバであり、アカエゾマツはヒバに続いて大きな阻止円を形成した。ヒノキ、トドマツ、カラマツは*S. aureus* (グラム陽性菌) に対しては阻止円を形成したが、*E. coli*や*K. pneumoniae* (グラム陰性菌) に対しては阻止円を形成しなかった。いずれの精油においてもグラム陽性菌と比べてグラム陰性菌では阻止円が小さい傾向にあった。

アカエゾマツ精油を4つの分画に分けてペーパーディスク試験を行った結果、30 kDa以上の分画では阻止円が形成されなかったが、3~30 kDaの分画にだけ抗菌活性が認められた (表2)。

培地上にディスクを直接置かず、蓋部分に貼り付けることによって揮発性成分の抗菌活性を評価した。その結果、*S. aureus*では阻止円が形成されたが、直接培地接触法の場合に比べ、小さく不明瞭であった。また、*E. coli*では阻止円が形成されなかった (図2)。

表 1. 各種樹木の精油におけるディスク試験

樹木精油	<i>S. a</i>	<i>Str. aga</i>	<i>Str. ube</i>	<i>Str. dys</i>	<i>C. b</i>	<i>E. c</i>	<i>K. p</i>
ヒノキ	+ (15)	+ (17)	-	+ (11)	++++ (>40)	-	-
ヒバ	+++ (36)	++ (27)	+ (15)	++ (21)	++++ (>40)	+ (16)	+ (12)
トドマツ	+ (10)	NT	NT	NT	++++ (>40)	-	-
アカエゾマツ	++ (21)	+ (15)	++ (20)	++ (23)	++++ (>40)	+ (11)	+ (10)
カラマツ	+ (10)	NT	NT	NT	++++ (>40)	-	-

阻止円の直径 10 mm 以上 : +、20 mm 以上 : ++、30 mm 以上 : +++、40 mm 以上 : ++++、- : 阻止円形成なし
NT : 試験未実施 () : 阻止円の直径の実数値

S. a : *S. aureus*、*Str. aga* : *Str. agalactiae*、*Str. ube* : *Str. uberis*、*Str. dys* : *Str. Dysgalactiae*、*C. b* : *C. bovis*、*E. c* : *E. coli*、*K. p* : *K. pneumoniae*、

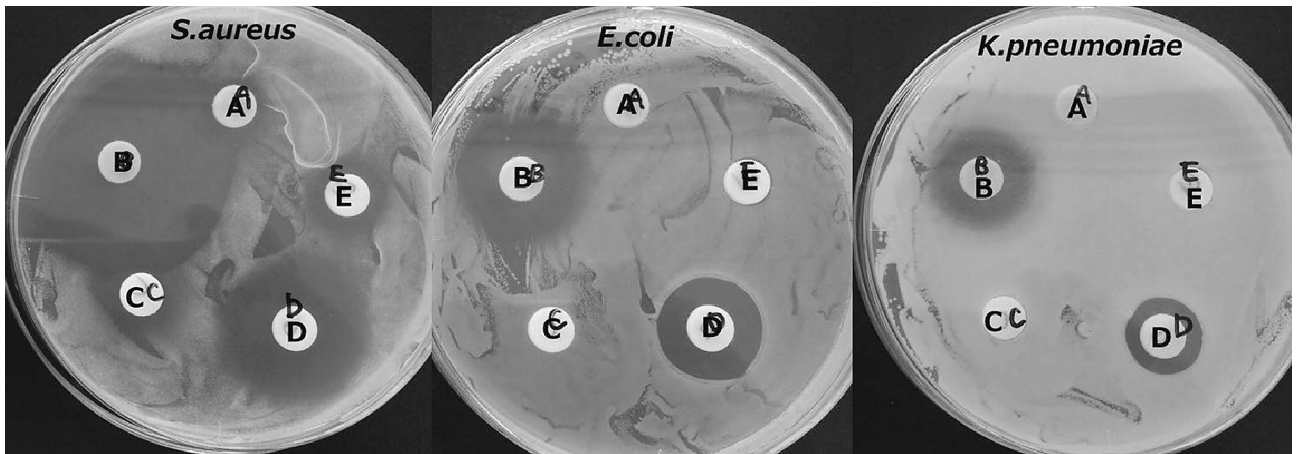


図 1. 各種樹木の精油におけるディスク試験
A : ヒノキ、B : ヒバ、C : トドマツ、D : アカエゾマツ、E : カラマツ

表 2. 各分画のアカエゾマツ精油成分におけるディスク試験

精油分画	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
①30 kDa 以上	-	-
②30 kDa 以下	+ (12)	+ (14)
③3 kDa 以上	+ (11)	+ (12)
④3 kDa 以下	+ (10)	+ (10)
アカエゾマツ	+ (11)	+ (12)
50% DMSO	-	-

阻止円の直径 10 mm 以上 : +、- : 阻止円形成なし

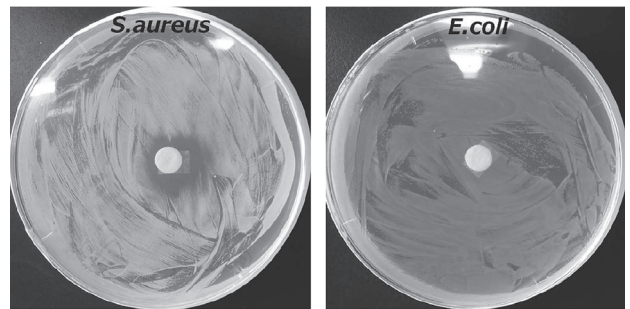


図 2. 揮発性成分におけるディスク試験

2. アカエゾマツ精油の被験菌に対する MIC および MBC 値

精油の各種細菌に対する MIC 値は *S. aureus*、*Str. agalactiae*、*Str. uberis* で 1.56 $\mu\text{l/ml}$ 、*E. coli* で 3.12 $\mu\text{l/ml}$ 、*K. pneumoniae* で 6.25 $\mu\text{l/ml}$ であり、ディスク試験の結

果と関連した (表 3)。MBC 値は *S. aureus* で 6.25 $\mu\text{l/ml}$ 、*Str. agalactiae* で 3.12 $\mu\text{l/ml}$ 、*Str. uberis* で 12.5 $\mu\text{l/ml}$ で、MIC の 2 ~ 8 倍の値を示した。*E. coli*、*K. pneumoniae* では同様に 4 ~ 8 倍の値を示したが、MBC は 25 $\mu\text{l/ml}$ と高い値を示した。

以上の結果より、ディスク試験の結果と同様にグラム陰性菌に対する作用は低い傾向にあった。また、MIC/MBC が 4 倍以下であったことから、アカエゾマツ精油

表3. アカエゾマツ精油による各種乳房炎起因菌に対するMICおよびMBC試験

供試菌	MIC ($\mu\text{l/ml}$)	MBC ($\mu\text{l/ml}$)
<i>S. aureus</i>	1.56	6.25
<i>Str. agalactiae</i>	1.56	3.12
<i>Str. uberis</i>	1.56	12.50
<i>E. coli</i>	3.12	25.00
<i>K. pneumoniae</i>	6.25	25.00

は*S. aureus*、*Str. agalactiae*には殺菌的に作用することが示された^[25]。

考 察

ディスク試験の結果より、アカエゾマツ精油は全ての供試菌に阻止円を形成したことから、*S. aureus*以外の主要な乳房炎原因菌にも作用し、他のマツ科植物と比べて抗菌活性が強いことが示された。

同じアカエゾマツ精油を使用したにも関わらず、*S. aureus*に対する阻止円の直径に差が見られたのは、これらの精油を抽出してからの期間の差により揮発性成分が気化、または酸化し変性したことが要因として考えられた。これは、揮発性成分が*S. aureus*にのみ作用した結果とも一致する。アカエゾマツ精油に含まれる複数の成分が*S. aureus*に作用していることが示唆された。

精油を4つの分画に分けて試験を行った結果、分子量が30 kDa以下、3 kDa以上、3 kDa以下の分画で阻止円が形成されたことから、30 kDa以下の成分中に抗菌活性を有することが明らかとなった。30 kDa以下の成分では、*S. aureus*、*E. coli*共に分画前の精油と同等の活性が見られたため、30 kDa以下の成分はグラム陽性菌およびグラム陰性菌の両者に作用する物質であり、かつアカエゾマツ精油の抗菌成分の主成分であるといえる。しかし、精油に含まれる成分は数多く存在するため、抗菌活性を示す物質の特定は今後の課題である。

MICおよびMBC試験の結果より、アカエゾマツ精油は*S. aureus*、*Str. agalactiae*に殺菌的に作用し、*Str. uberis*、*E. coli*、*K. pneumoniae*には静菌的に作用すること、グラム陽性菌と比べてグラム陰性菌ではMIC・MBC値が高いことが示された。ペーパーディスク試験での結果もふまえると、グラム陰性菌はアカエゾマツ精油への感受性が低く、これは他の精油と同様であった^[9,14]。精油は、細菌の細胞膜に損傷を与え、物質の輸送機構に影響を与えることで抗菌活性を示すという報告がある^[9,14]。細胞壁を持たないマイコプラズマに抗

菌活性を示すことから、精油は細胞膜に影響を与えている可能性がうかがえる^[26]。細胞壁を経なければ細胞膜へは到達できず、またグラム陽性菌とグラム陰性菌とでは細胞壁構造が異なることから、細胞壁が両者の感受性の違いを生じる要因の一つにあげられる。

以上の結果より、アカエゾマツの精油は主要な乳房炎原因菌に有効であることが示唆された。従って、アカエゾマツ精油は乳房炎治療における抗生物質の代替、または敷料などに添加することで感染予防などへの応用が期待できるとともに、北海道の未利用材であるアカエゾマツの利用促進にもつながると思われる。

この研究は、2016年度酪農学園大学共同研究の助成を受けたものである。

引用文献

- [1] 農林水産省：都道府県別統計表 事故別頭数等 病傷事故別件数（病名別）、平成27年度農業災害補償制度家畜共済統計表、[http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001166643\(2016\)](http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001166643(2016))
- [2] 日本家畜臨床感染症研究会事務局：乳牛における乳房炎の診断、治療、予防に関する全国アンケート、日本家畜臨床感染症研究会誌、5、63-74 (2010)
- [3] 江口正志：動物の感染症、明石博臣他編、第3版、118-120、近代出版、東京 (2011)
- [4] 永幡 肇：動物の衛生、鎌田信一編、第1版、185、文永堂、東京 (2001)
- [5] Paduch J, Mohr E, Krömker V: The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle, *J Dairy Res*, 80, 159-164 (2013)
- [6] Tsutsumi A, Oga T, Akitomo I: Research on production and use of recycled compost, *Bulletin of the Yamaguchi Prefectural Agriculture and Forestry General Technology Center*, 4, 61-64 (2013)
- [7] 岩野英知：牛乳房炎のファージセラピー、臨床獣医、31、18-21 (2013)
- [8] 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議：薬剤耐性 (AMR) 対策の6分野と目標、薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン (本体)、http://www.kantei.go.jp/jp/singi/kokusai_kansen/index.html (2016)
- [9] 姚 群：アロマセラピーに関する研究第一報 慣用精油10種類の成分と作用に関する知見、愛国学園大学

- 人間文化研究紀要、13、31-54 (2011)
- [10] Williams G D: 精油の化学、川口健夫訳、フレグランスジャーナル社、東京、9 (2000)
- [11] 平澤康史、小里一友、山田貴男、大津尚子、松井ゆかり、三輪洋司、岩崎 栄、清水雅良、久木浩平、肥後正一: イヌカラマツエキスの抗アレルギー作用ならびにアトピー性皮膚炎に対する有効性の検討、日本薬理学誌、124、271-283 (2004)
- [12] Kimura R: Beneficial effects of essential oils on adult T-cell leukemia, *Jpn J Aromather*, 16, 15-24 (2015)
- [13] Ohira T: Improvement of air quality by volatile compounds from woody plants, *J Jpn Assoc Odor Environ* 42, 27-37 (2011)
- [14] Dai M, Peng C, Wan F, Peng F: Antibacterial activity and mechanism of *Pogostemon cablin* against bacteria from milk of dairy cows suffering with mastitis, *J Anim Vet Adv*, 11, 3289-3297 (2012)
- [15] Zhu H, Du M, Fox L, Zhu M: Bactericidal effects of *Cinnamon cassia* oil against bovine mastitis bacterial pathogens, *Food Control*, 66, 291-299 (2016)
- [16] Matsuda K: Regeneration and growth in the *Picea glehnii* fores, *Res Bull Coll Exp For Hokkaido Univ*, 46, 595-717 (1989)
- [17] 北海道水産林務部: 森林面積および蓄積、平成27年度北海道林業統計、<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/sum/kcs/rin-toukei/25rtk.htm> (2017)
- [18] 北海道水産林務部: 造林、平成27年度北海道林業統計、<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/sum/kcs/rin-toukei/25rtk.htm> (2017)
- [19] Yamada K: Growth of *Picea glehnii* in artificial stands, *Bull Hokkaido For Res Inst*, 33 (1996)
- [20] 東京農業大学農山村支援センター: 再生可能エネルギーを活用した地域活性化の手引き、木質バイオマスエネルギー編、第2章、12-15 (2015)
- [21] 山田健太、武田圭斗、佐藤 真、高田勝己、村上篤司: ヒノキ間伐材抽出成分の組成分析、常葉大学社会環境学部紀要、4 (2017)
- [22] Shibutani S, Samejima M, Saburi Y: Antimicrobial activities of extractives from the barks of Japanese coniferous trees, *東京大学農学部演習林報告*, 99, 219-233 (1998)
- [23] Sano Y, Tanaka K: Studies on chemical components of Akaezomatsu (*Picea glehnii*) bark I. distribution of chemical components. *Res Bull Coll Exp For Hokkaido Univ*, 33, 223-233 (1976)
- [24] Manner S, Vahermo M, Skogman M E, Krogerus S, Vuorela P M, Yli-Kauhaluoma J, Fallarero A, Moreira V M: New derivatives of dehydroabietic acid target planktonic and biofilm bacteria in *Staphylococcus aureus* and effectively disrupt bacterial membrane integrity, *Eur J Med Chem*, 102, 68-79 (2015)
- [25] Fuchs P, Barry A, Brown S: In vitro bactericidal activity of daptomycin against staphylococci, *J Antimicrob Chemother*, 49, 467-470 (2002)
- [26] Sleha R, Mosio P, Vydralova M, Jantovska A, Bostikova V, Mazurova J: In vitro antimicrobial activities of cinnamon bark oil, anethole, carvacrol, eugenol and guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158, 208-211 (2014)