

奈良県産シャクヤク未利用部位の抗菌性評価

立本 行江^{*1)}, 西原 正和^{*2)}

Antibacterial Evaluation of Unused Parts of Peonies

TATSUMOTO Yukie^{*1)}, NISHIHARA Masakazu^{*2)}

生薬となるシャクヤクの根以外の未利用部位を活用するため、シャクヤクの花に含まれる抗菌性成分 penta-*O*-galloyl- β -*D*-glucose に着目した。奈良県産シャクヤクのつぼみ、花弁、葉の抗菌性成分含量を測定し、JIS 規格試験法による抗菌活性を確認したところ、penta-*O*-galloyl- β -*D*-glucose 含量は平均で、つぼみ 13.9%、花弁 12.2%、葉 5.1%を示した。また、抗菌性試験において、つぼみ、花弁、葉に黄色ブドウ球菌及び大腸菌に対する抗菌活性を確認できたことから、県産シャクヤクの抗菌性素材としての利用可能性が示された。

1. 緒言

シャクヤク *Paeonia lactiflora* (ボタン科) の根を乾燥したものは生薬として当帰芍薬散、芍薬甘草湯などの漢方処方に繁用され、奈良県はその主要産地のひとつである。生薬採取を目的として栽培されるシャクヤクの花は、薬用部位である根の生育のために、摘蕾・摘花し廃棄されることから、当センターではその未利用部位を活用するため、機能性成分等の分析を進めているところである。

本研究では、シャクヤクの花に抗菌性成分 penta-*O*-galloyl- β -*D*-glucose (以下、PGG) が含まれていること^{1,2)}に着目し、コロナ感染症時代に求められている抗菌性素材としての活用を目的に、県産のシャクヤク花及び葉の抗菌性成分含量を測定し、黄色ブドウ球菌および大腸菌に対する抗菌活性を JIS 規格試験方法 (ハロー法及び菌液吸収法) により確認した。

2. 実験方法

2.1 試料

2021~2023 年 4~5 月に県内のシャクヤク栽培地からつぼみ、花弁、葉を収穫した (表 1)。なお、「和シャクヤク (和)」は生薬採取用に栽培されているもの、「洋シャクヤク (洋)」は観賞用に栽培されているものとした。

収穫したものを -20°C で凍結後、凍結真空乾燥機 (東京理化器械 (株) 製 EYELA FDU-2100) で乾燥し、粉碎机 (輸入発売元 (株) 東京ユニコム T-429) で粉碎し試料とし、検査まで -20°C で保管した。

表 1 試料概要

No.	採取地	採取年月日	和洋	種別	花色	形状
1※	橿原市	2022.4.30	和		赤紫	一重
2※	橿原市	2022.4.30	和		ピンク	一重
3	桜井市	2023.5.4	和	梵天	白	八重
4	桜井市	2023.5.4	洋	コーラルチャーム	オレンジ	八重
5	桜井市	2023.5.6	洋	ラテンドレス	白	八重
6	桜井市	2023.5.6	洋	リチャード	赤紫	冠
7	桜井市	2023.5.6	洋	フレーム	赤	一重
8	桜井市	2023.5.6	和	春の粧	ピンク	八重
9	桜井市	2023.5.6	洋		赤紫	一重
10	桜井市	2023.5.13	洋	冠	赤紫	八重
11	桜井市	2023.5.13	洋	かげろう	淡ピンク	バラ
12	桜井市	2023.5.13	洋	夕映	赤紫	八重
13	桜井市	2023.5.13	洋	ポウルオブビューティー	ピンク	翁
14	桜井市	2023.5.13	洋	ピロドクイーン	赤紫	翁
15	桜井市	2023.5.13	洋	麒麟丸	赤白絞り	八重
16	桜井市	2023.5.13	洋	うらら	赤	一重
17	桜井市	2023.5.13	和		ピンク	一重
18	桜井市	2023.5.13	和		白	一重
19	桜井市	2023.5.13	和		淡ピンク	一重
20※	御所市	2023.4.28	和	華燭の典	赤紫	八重
21	御所市	2023.4.28	和	滝の粧	白	八重
22※	御所市	2023.4.28	和	梵天	白	八重
23※	下市町	2023.5.8	洋		赤	一重
24	下市町	2023.5.8	洋		ピンク	一重
25	下市町	2023.5.8	洋		白	一重

※抗菌性試験実施

2.2 標準品、試薬

標準品は、富士フィルム和光純薬株式会社製 paeoniflorin (純度: 90.0%)、albiflorin (純度: 98.0%)、Sigma-Aldrich 製 penta-*O*-galloyl- β -*D*-glucose 水和物 (純度 >96%) を用いた。

その他の試薬には、市販特級品または LC-MS 用を用いた。

2.3 Paeoniflorin 類の定量法

既報³⁾により Albiflorin, Paeoniflorin を測定した。

分析条件は表 2 のとおり。

試料約 0.5 g に、メタノール/超純水 (7:3) 100 mL を

*1) メディカル技術支援科 (当時: バイオ・食品グループ), *2) 奈良県薬事研究センター

加え、超音波抽出により 30 分間抽出した後、ろ紙ろ過を行い、上澄液にメタノール/超純水 (7:3) を加えて 100 mL とし、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターを通し試料溶液とした。

表 2 Paeoniflorin 類分析条件

装置	株式会社島津製作所製 LC20 Prominence
カラム	Inertsil ODS-3, 粒子径 5 μm , 内径 4.6 mm×長さ 150 mm
検出器	UV 232 nm
移動相	水/アセトニトリル/りん酸 (850:150:1)
カラム温度	30 $^{\circ}\text{C}$
注入量	1 μL
流速	0.7 mL/min

2.4 PGG の定量法

「2.3 Paeoniflorin 類の定量法」の試料溶液を用い、PGG を奈良県薬事研究センターで測定した。分析条件は表 3 のとおり。

表 3 PGG 分析条件

装置	日立製作所製 Chromaster
カラム	YMC-Triart C18, 粒子径 5 μm , 内径 4.6 mm×長さ 150 mm
検出器	UV 232 nm
移動相	水/アセトニトリル/りん酸 (800:200:1)
カラム温度	30 $^{\circ}\text{C}$
注入量	1 μL
流速	1.0 mL/min

2.5 抗菌性試験

2.5.1 試料

抗菌性試験に供した試料は、県内で栽培が多い生薬栽培用シャクヤクと観賞用シャクヤク 5 検体のつぼみ、花弁、葉とした。(表 1※, 図 1)



図 1 抗菌性試験使用シャクヤク

「2.3 Paeoniflorin 類の定量法」の試料溶液を用い、つぼみ及び花弁は 500 mg/mL, 葉は 1 g/mL の濃度に調整し、

ハロー試験の検液とした。

また、抗菌性成分の確認として Albiflorin, Paeoniflorin, PGG の標準品を用い、黄色ブドウ球菌に対して 5 mg/mL, 大腸菌に対しては 10 mg/mL にメタノールで調製した試料溶液により、ハロー試験を同様に実施し評価した。

2.5.2 供試菌

JIS L1902:2015 「繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果」に準拠し、供試する細菌は、独立行政法人製品評価技術機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) より入手した黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* NBRC 12732), 大腸菌 (*Escherichia coli* NBRC 3972) とした。

2.5.3 ハロー法

JIS L1902:2015 「繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果」の定性試験方法である「8.4 ハロー法」に準じて試験を行った。⁴⁾

前培養 A として、各菌を脱水酵母エキス 0.25%, カゼイン製トリプトン 0.5%, グルコース 1%, 寒天 1.2% を含む混積平板培養法用寒天培地上に、筋状に塗り付け、37 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間培養した。

前培養 B として、前培養 A をブイヨン培地 (肉エキス 0.5%, ヘプトン 1%, 塩化ナトリウム 0.5%) に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間培養した。

前培養 B の菌培地を生理食塩水により $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU/mL (1 mL 当たりのコロニー形成単位) に調整し、シャーレに菌液 1 mL とハロー試験用普通寒天培地 (肉エキス 0.5%, ヘプトン 1%, 塩化ナトリウム 0.5%, 寒天 1.5%) 15 mL を添加し、培地が乾いた後、検液を 100 μL しみこませた試験片を密着させ、37 $^{\circ}\text{C}$, 48 時間培養した。試験片は FILTER PAPER 5C (ADVANTEC 製) を直径 28 mm に裁断し、オートクレーブ (121 $^{\circ}\text{C}$, 20 分間) で滅菌処理をしたものとした。

2.5.4 菌液吸収法

JIS L1902:2015 「繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果」の定量試験方法である「8.1 菌液吸収法」に準じて試験を行った。⁴⁾

前培養 A として、各菌を混積平板培養法用寒天培地 (脱水酵母エキス 0.25%, カゼイン製トリプトン 0.5%, グルコース 0.1%, 寒天 1.2%) に筋状に塗りつけ、37 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間培養した。

次に、前培養 B として、20 mL のニュートリエント培地 (肉エキス 0.3%, ペプトン 0.5%) に、前培養 A の平板のコロニーを接種し、37 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間培養を行った。

次に、前培養 C として、20 mL のニュートリエント培地に、前培養 B の培養液から 0.4 mL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間培養を行い、 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ CFU/mL (1 mL 当たりの

コロニー形成単位) に調製した。

試験接種菌液の調製として、前培養 C の培養後の菌濃度を、滅菌水によって 20 倍希釈した、ニュートリエント培地を用いて、 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ CFU/mL (1 mL 当たりのコロニー形成単位) に調製した。

試料は、ハロー試験と同じシャクヤクつぼみ、花卉と葉の凍結真空乾燥後の粉碎粉末とし、約 0.4 g 量り使用した。試料数は各 12 検体とし、黄色ぶどう球菌および大腸菌に対して各 6 検体使用した。

対照試料は綿白布 (川本産業 (株) 製のガーゼ、綿 100%) とし、裁断し 0.4 g 量り使用した。対照試料数は 12 検体とし、黄色ぶどう球菌および大腸菌に対して各 6 検体使用した。

試料はバイアル瓶に入れ、オートクレーブ (121°C, 20 分間) で滅菌処理をした。

調製した試験接種液を 0.2 mL ずつ試料上に接種した。6 検体のうち 3 検体は接種直後に、残りの 3 検体は 37°C, 18 時間培養した後に、生理食塩水を用いて洗い出しを行った。

各菌それぞれの洗い出し液を 1 mL ずつ採取し、混積平板培養法による定量法により菌濃度を求めた。このときのシャーレの繰り返し数は 2 とし、培養は 37°C, 24 時間とした。

菌濃度は次式で算出した。

菌濃度の算出式

$$\text{菌濃度 } (C_B) = Z \times R \text{ (CFU/mL)}$$

Z : 2 つのシャーレのコロニーの平均値, R : 希釈倍率

生菌数の算出式

$$\text{生菌数 } (M) = C_B \times 20$$

CB : 菌濃度, 20 : 洗い出し液量 (mL)

抗菌活性値の算出式と効果基準 (表 4) により抗菌活性性を評価した。

$$\text{抗菌活性値 } (A) = F - G$$

F は対照試料の増殖値 ($\log Ct - \log Co$)

Log Ct : 18 時間培養後の対照試料 3 検体の生菌数の算術平均の常用対数

Log Co : 接種直後の対照試料 3 検体の生菌数の算術平均の常用対数

G は試験試料の増殖値 ($\log Tt - \log To$)

Log Tt : 18 時間培養後の試験試料 3 検体の生菌数の算術平均の常用対数

Log To : 接種直後の試験試料 3 検体の生菌数の算術平均の常用対数

表 4 抗菌性試験における効果基準分析条

抗菌活性値 A	抗菌効果
$2.0 \leq A < 3.0$	効果が認められる
$3.0 \leq A$	強い効果が認められる

3. 結果及び考察

3.1 Albiflorin, Paeoniflorin, PGG 定量結果

定量測定結果 (%) を図 2~4 に示す。

Albiflorin の含量は、つぼみ 0.0~1115.0 mg/100 g (0.0~1.1%), 花卉 0.0~587.3 mg/100 g (0.0~0.6%), 葉 0.0~1768.0 mg/100 g (0.0~1.8%) となり、全ての検体で 2% 以下であった。

Paeoniflorin の含量は、つぼみ 386.0~3381.3 mg/100 g (0.39~3.38%), 花卉 103.3~1604.0 mg/100 g (0.10~1.60%), 葉 370.2~4664.0 mg/100 g (0.37~4.66%) となり、一部のつぼみや葉は日本薬局方各条のシャクヤクで規定されている 2.0% 以上の含量を示した。

PGG の含量は、つぼみ 8662.8~17757.6 mg/100 g (平均 13.9%), 花卉 7663.3~18145.4 mg/100 g (平均 12.2%), 葉 1991.5~8036.7 mg/100 g (平均 5.1%) となり、つぼみと花卉は同程度で、葉よりも高い含量を示した。生薬栽培用 (和シャクヤク) と観賞用 (洋シャクヤク) で含量の差はなかった。

3.2 抗菌性試験

3.2.1 ハロー法

表 5~6 に試験結果を、図 6~7 に No. 20 の黄色ブドウ球菌及び大腸菌の試験終了の状況を示す。

黄色ブドウ球菌及び大腸菌に対して、各検体はハローを有し抗菌性を認めた。

成分の標準品を用いた評価では、PGG は黄色ブドウ球菌に 5 mg/mL で、大腸菌に 10 mg/mL でハローを有し (図 8~9) 抗菌性を確認した。

一方、Albiflorin 及び Paeoniflorin ではハローは無く抗菌性が認められなかったことから、これらは抗菌性成分でないことが確認できた。

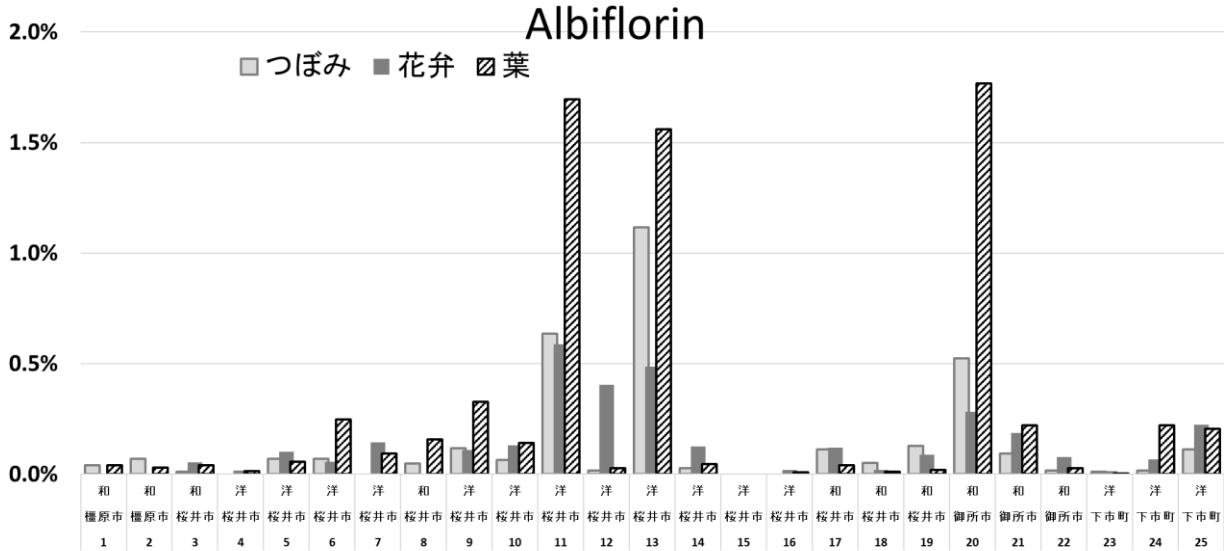


図 2 Albiflorin 分析結果

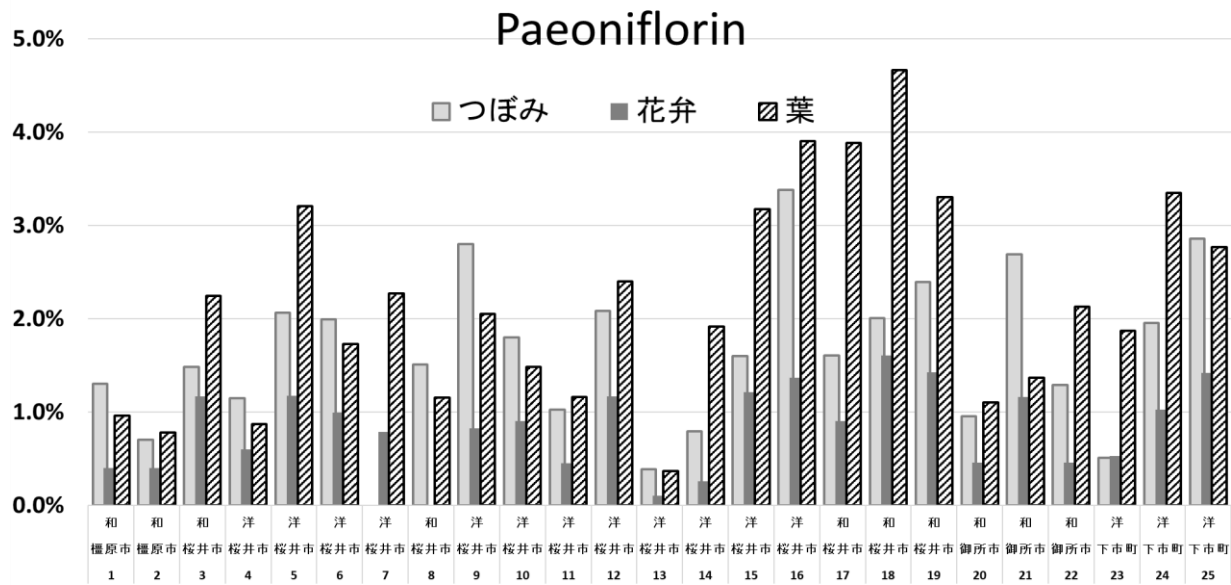


図 3 Paeoniflorin 分析結果

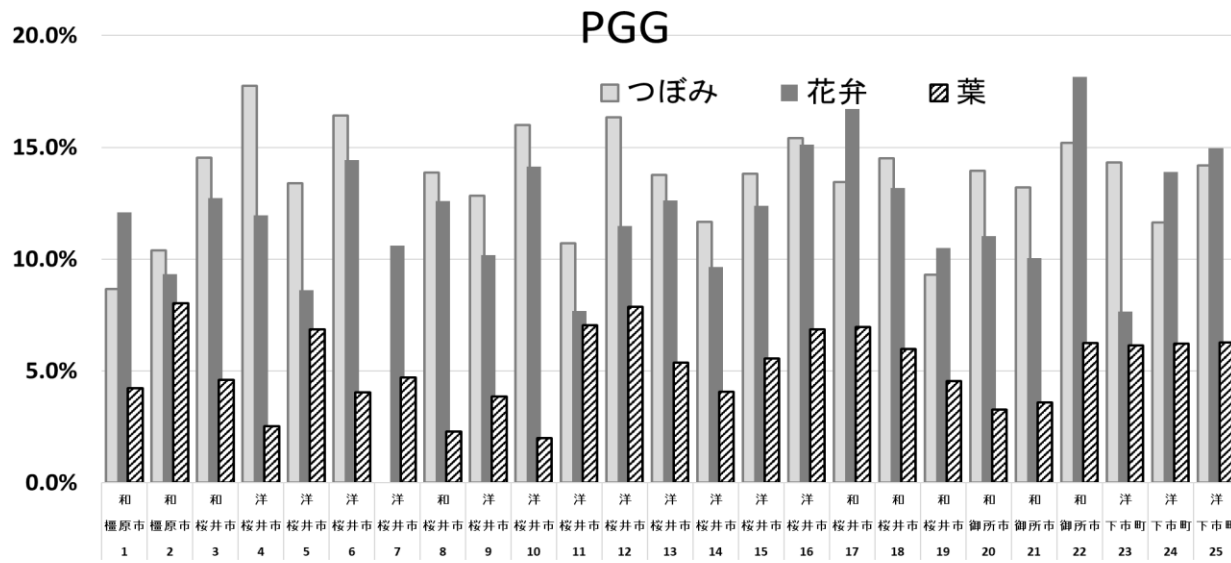
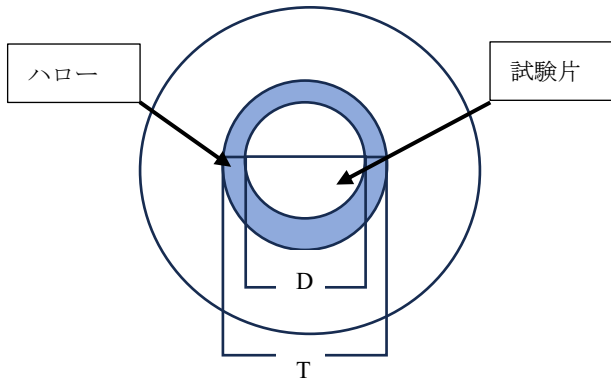


図 4 PGG 分析結果



A: ろ紙の大きさ 28 mm×28 mm の円形を使用

$$W = (T - D) / 2$$

W: ハローの幅 (mm)

T: ろ紙の長さ とハロー幅の合計 (mm)

D: ろ紙の長さ (mm)

図 5 ハロー法

表 5 ハロー法 黄色ブドウ球菌 結果

No.	部位	種別	和洋	T (mm)	D (mm)	W
1	つぼみ	赤紫一重	和	30	28	1
	花弁			30	28	1
	葉			31	28	2
2	つぼみ	ピンク一重	和	30	28	1
	花弁			30	28	1
	葉			31	28	2
20	つぼみ	華燭の典	和	38	28	5
	花弁			35	28	4
	葉			35	28	4
22	つぼみ	梵天	和	36	28	4
	花弁			34	28	3
	葉			35	28	4
23	つぼみ	観賞用赤	洋	34	28	3
	花弁			34	28	3
	葉			34	28	3
Albiflorin (5 mg/mL)				28	28	0
Paeoniflorin (5 mg/mL)				28	28	0
Penta-O-galloyl-β-D-glucose (5 mg/mL)				30	28	2

表 6 ハロー法 大腸菌 結果

No.	部位	種別	和洋	T (mm)	D (mm)	W
1	つぼみ	赤紫一重	和	32	28	2
	花弁			32	28	2
	葉			34	28	3
2	つぼみ	ピンク一重	和	30	28	1
	花弁			30	28	1
	葉			31	28	2
20	つぼみ	華燭の典	和	34	28	3
	花弁			32	28	2
	葉			32	28	2
22	つぼみ	梵天	和	32	28	2
	花弁			34	28	3
	葉			32	28	2
23	つぼみ	観賞用赤	洋	32	28	2
	花弁			34	28	3
	葉			33	28	3
Albiflorin (5 mg/mL)				28	28	0
Paeoniflorin (5 mg/mL)				28	28	0
Penta-O-galloyl-β-D-glucose (5 mg/mL)				30	28	2

3.2.2 菌液吸収法

試験結果を表 7~8, 図 10~11 に黄色ブドウ球菌及び大腸菌の 18 時間後の試験終了の状況を示す。抗菌活性

値は生薬用, 観賞用問わず, 黄色ブドウ球菌に対し, つぼみ 3.1~3.5, 花弁 3.3~3.9, 葉 2.3~2.4 を示し, つぼみ, 花弁は強い抗菌効果が認められた。また, 葉は抗菌効果が認められた。

大腸菌に対し, つぼみ 2.4~2.5, 花弁 2.4~2.6, 葉 1.9~2.0 を示し, つぼみ, 花弁は抗菌効果が認められたが, 葉は一部を除き抗菌効果が認められなかった。ただし, 葉にも PGG が含まれており, ハロー試験においては, つぼみ, 花弁の 2 倍以上の濃度で抗菌性を確認できたことから, 濃度を換算したうえで抗菌性素材としての使用を検討する必要があると考えられる。

表 7 菌液吸収法 黄色ブドウ球菌 結果

No.	試料	種別	和洋	培養時間	生菌数M	増殖値	抗菌活性
対照試料				0	9.0×10 ⁵	2.3	-
綿白布				18	2.0×10 ⁵		
1	つぼみ	赤紫一重	和	0	1.7×10 ⁵	-1.0	3.3
				18	1.8×10 ⁵		
	花弁	赤紫一重	和	0	1.4×10 ⁵	-1.1	3.5
				18	1.0×10 ⁵		
	葉	赤紫一重	和	0	4.4×10 ⁴	0.0	2.3
				18	4.6×10 ⁴		
2	つぼみ	ピンク一重	和	0	1.1×10 ⁵	-1.0	3.3
				18	1.1×10 ⁵		
	花弁	ピンク一重	和	0	1.8×10 ⁵	-1.0	3.3
				18	1.9×10 ⁵		
	葉	ピンク一重	和	0	4.4×10 ⁴	0.0	2.3
				18	4.6×10 ⁴		
20	つぼみ	華燭の典	和	0	1.6×10 ⁵	-1.2	3.5
				18	1.0×10 ⁵		
	花弁	華燭の典	和	0	1.2×10 ⁵	-1.5	3.9
				18	3.4×10 ⁴		
	葉	華燭の典	和	0	1.6×10 ⁵	0.0	2.3
				18	1.7×10 ⁵		
22	つぼみ	梵天	和	0	2.4×10 ⁵	-0.8	3.1
				18	4.2×10 ⁴		
	花弁	梵天	和	0	6.0×10 ⁵	-0.9	3.2
				18	8.4×10 ⁴		
	葉	梵天	和	0	1.8×10 ⁵	0.0	2.3
				18	1.9×10 ⁵		
23	つぼみ	観賞用赤	洋	0	4.2×10 ⁵	-0.8	3.2
				18	6.4×10 ⁴		
	花弁	観賞用赤	洋	0	2.2×10 ⁵	-1.0	3.3
				18	2.4×10 ⁴		
	葉	観賞用赤	洋	0	1.4×10 ⁵	0.0	2.4
				18	1.3×10 ⁵		

表 8 菌液吸収法 大腸菌 結果

No.	試料	種別	和洋	培養時間	生菌数M	増殖値	抗菌活性
対照試料				0	8.0×10 ⁵	2.4	-
綿白布				18	1.9×10 ⁸		
1	つぼみ	赤紫一重	和	0	3.8×10 ⁵	-0.1	2.5
				18	3.0×10 ⁵		
	花弁	赤紫一重	和	0	7.6×10 ⁵	-0.1	2.5
				18	5.8×10 ⁵		
	葉	赤紫一重	和	0	3.0×10 ⁵	0.4	2.0
				18	8.0×10 ⁶		
2	つぼみ	ピンク一重	和	0	1.4×10 ⁶	0.0	2.4
				18	1.4×10 ⁶		
	花弁	ピンク一重	和	0	7.6×10 ⁵	0.0	2.4
				18	8.0×10 ⁵		
	葉	ピンク一重	和	0	3.2×10 ⁵	0.5	1.9
				18	1.0×10 ⁶		
20	つぼみ	華燭の典	和	0	1.2×10 ⁶	-0.1	2.5
				18	9.4×10 ⁵		
	花弁	華燭の典	和	0	1.3×10 ⁶	0.0	2.4
				18	1.3×10 ⁶		
	葉	華燭の典	和	0	1.2×10 ⁶	0.5	1.9
				18	3.4×10 ⁶		
22	つぼみ	梵天	和	0	7.6×10 ⁵	-0.1	2.5
				18	6.2×10 ⁵		
	花弁	梵天	和	0	6.6×10 ⁵	-0.2	2.6
				18	4.4×10 ⁵		
	葉	梵天	和	0	4.0×10 ⁵	0.4	1.9
				18	1.1×10 ⁶		
23	つぼみ	観賞用赤	洋	0	2.0×10 ⁵	0.0	2.4
				18	1.8×10 ⁵		
	花弁	観賞用赤	洋	0	1.0×10 ⁶	-0.2	2.6
				18	6.4×10 ⁵		
	葉	観賞用赤	洋	0	9.0×10 ⁵	0.5	1.9
				18	2.6×10 ⁶		

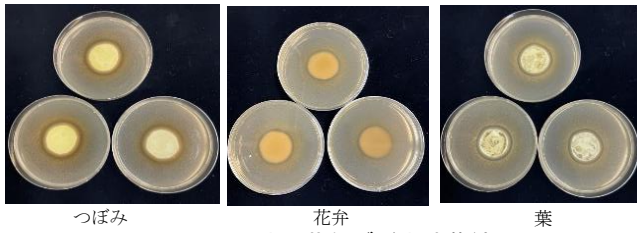


図 6 ハロー法 黄色ブドウ球菌結果

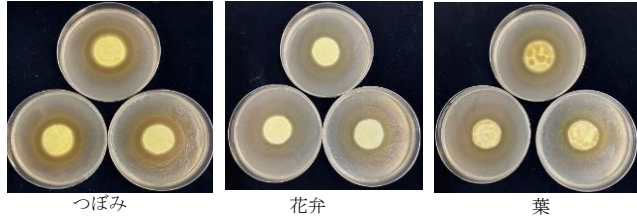


図 7 ハロー法 大腸菌結果

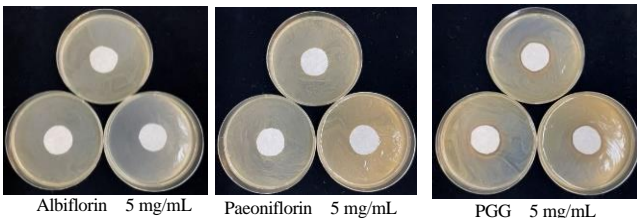


図 8 ハロー法 黄色ブドウ球菌 標準品結果

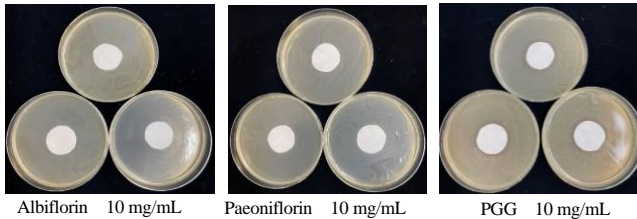


図 9 ハロー法 大腸菌 標準品結果

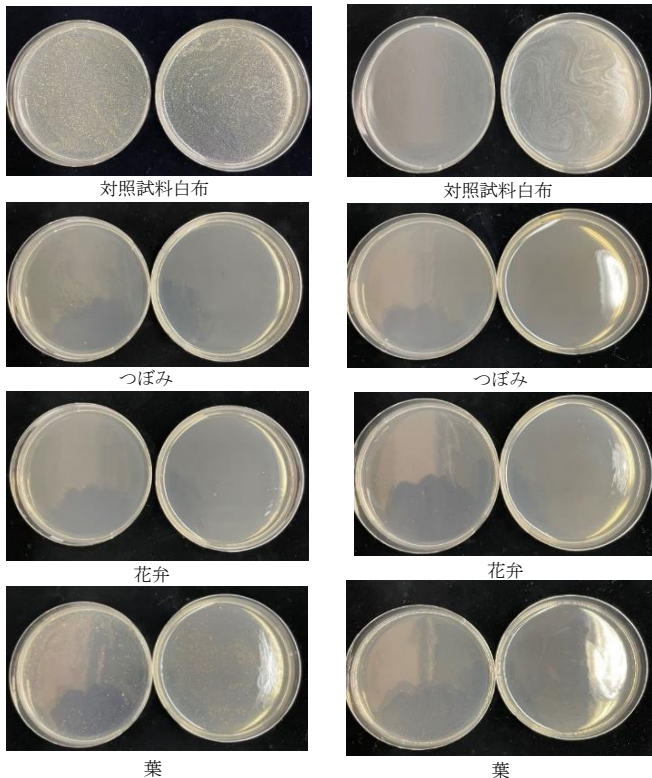


図 10 菌液吸収法
黄色ブドウ球菌
18時間後結果

図 11 菌液吸収法
大腸菌
18時間後結果

4. 結言

本研究での主な結果は次のとおりである。

- 1) 奈良県産シャクヤクの抗菌性成分 PGG 含量 (平均) は、つぼみ 13.9%、花卉 12.2%、葉 5.1%となり、つぼみ、花は同程度で葉より高い含量を示した。
- 2) 抗菌性試験は、JIS L1902:2015 ハロー法で黄色ブドウ球菌と大腸菌に対し、つぼみ、花卉、葉のすべてでハローを確認した。JIS L1902:2015 菌液吸収法の抗菌活性値は、黄色ブドウ球菌でつぼみ、花卉は ≥ 3 で強い抗菌性、葉は ≥ 2 で抗菌性を示した。一方、大腸菌はつぼみ、花卉は ≥ 2 で抗菌性を示したが、葉は一部を除き 1.9で抗菌効果が認められなかった。ただし葉は花の 2 倍の濃度でハローを確認したことから、濃度換算使用が必要と考えられる。また、Albiflorin, Paeoniflorin はつぼみ、花卉、葉のすべてに含有される成分であるが、標準品を用いた評価で抗菌性がないことを確認した。
- 3) 本結果より、抗菌性は PGG によるものであると考えられ、奈良県産シャクヤクの抗菌性素材としての利用可能性が示された。

参考文献

- 1) 生貝初, 下古谷博司, 西川将司, 潮谷和史, 今井邦男, シャクヤクに含まれる抗菌成分及び毒素阻害成分の分離・同定, 日本細菌学雑誌, 61(1), p.114, 2006
- 2) 田島規子, 生貝初, 荒川秀寿, シャクヤクに含まれるペンタガロイルグルコースの抗菌機構, 日本細菌学雑誌, 65(1), p.171, 2010
- 3) 立本行江, 首藤明子, 西原正和, 奈良県産シャクヤク花中の機能性成分の評価について, 奈良県産業振興総合センター研究報告, 48, p.15-21, 2022
- 4) JIS L1902:2015 「繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果」, <https://kikakurui.com/1/L1902-2015-01.html>
- 5) 厚生労働省, 第十八改正日本薬局方, p.1956, 2021