

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3726135号

(P3726135)

(45) 発行日 平成17年12月14日(2005.12.14)

(24) 登録日 平成17年10月7日(2005.10.7)

(51) Int. Cl.⁷

A01N 65/00

F I

A01N 65/00

A

請求項の数 5 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2002-282487 (P2002-282487)	(73) 特許権者	504145308
(22) 出願日	平成14年9月27日(2002.9.27)		国立大学法人 琉球大学
(65) 公開番号	特開2004-115453 (P2004-115453A)		沖縄県中頭郡西原町字千原1番地
(43) 公開日	平成16年4月15日(2004.4.15)	(74) 代理人	100072051
審査請求日	平成14年9月27日(2002.9.27)		弁理士 杉村 興作
		(74) 代理人	100100125
			弁理士 高見 和明
		(74) 代理人	100101096
			弁理士 徳永 博
		(74) 代理人	100086645
			弁理士 岩佐 義幸
		(74) 代理人	100107227
			弁理士 藤谷 史朗
		(74) 代理人	100114292
			弁理士 来間 清志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 殺菌剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

モモタマナの葉を水で抽出した抽出物を有効成分とする殺菌剤。

【請求項2】

前記抽出を、80～100で行うことを特徴とする請求項1に記載の殺菌剤。

【請求項3】

前記抽出を、窒素雰囲気下で行うことを特徴とする請求項1又は2に記載の殺菌剤。

【請求項4】

前記モモタマナの葉を水で抽出した抽出物の濃度が6.25～46000 μg/mLであることを特徴とする請求項1から3の何れかに記載の殺菌剤。

【請求項5】

前記抽出物は、モモタマナの葉100質量%から14～46質量%の割合で得られたものであることを特徴とする請求項1から3の何れかに記載の殺菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、殺菌剤に関し、特にモモタマナの葉を水で抽出した抽出物を有効成分とする殺菌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

10

20

近年、植物由来の抗菌物質が明らかにされ、中でも緑茶については多くの研究があり、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)及び多くの下痢起炎菌の発育を阻止するカテキンはよく研究されている。また、病原性グラム陽性菌に対する抗菌活性が、多くの植物、例えばミロバランノキ(*Terminalia chebula*)において報告されている(非特許文献1参照)。

【0003】

これに対し、モモタマナ(*Terminalia catappa* L.)は、ミロバランノキと同じシクンシ(*Terminalia*)科に属し沖縄等に自生する植物であるが、該モモタマナから殺菌物質を分離したとの報告はこれまでなされていない。

【0004】

一方、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対して有効な薬剤としては、バンコマイシンが存在するのみであり、新規な殺菌剤の開発が要望されている。

【0005】

また、殺菌剤・抗菌剤の中には、殺菌・抗菌効果を有するものの、変異原性を有するため、使用に制限のあるものがある。従って、新規な殺菌剤を開発するに当たっては、変異原性にも充分留意する必要がある。

【0006】

【非特許文献1】

グローバー・アイ・エス(Grover IS)及びバラ・エス(Bala S), "ネズミチフス菌におけるターミナリア・チェブラ(ミロバラン)の抗変異原活性(Antimutagenic activity of *Terminalia chebula* (myroblan) in *Salmonella typhimurium*)", 「インディアン・ジャーナル・オブ・エクスペアリメンタル・バイオロジー(Indian Journal of Experimental Biology)」, 1992年, 30号, p. 339 - 341

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明の目的は、変異原性を有さない新規な殺菌剤、特にMRSAに対し有効な殺菌剤を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、モモタマナの葉の抽出物が殺菌効果及び抗変異原活性を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

即ち、本発明の殺菌剤は、モモタマナの葉を水で抽出した抽出物を有効成分とすることを特徴とする。

【0011】

本発明の殺菌剤の他の好適例においては、前記抽出を、80~100で行う。

【0012】

本発明の殺菌剤の他の好適例においては、前記抽出を、窒素雰囲気下で行う。

【0013】

本発明の殺菌剤の他の好適例においては、該殺菌剤が液状の場合、前記モモタマナの葉を水で抽出した抽出物の濃度が6.25~46000µg/mLである。

【0014】

本発明の殺菌剤の他の好適例においては、前記抽出物は、モモタマナの葉100質量%から14~46質量%の割合で得られたものである。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明を詳細に説明する。本発明で用いるモモタマナ(*Terminalia catappa* L.)は、シクンシ(*Terminalia*)科の高木で、別名「コパデイシ」とも呼ばれる。該モモタマナは、沖縄、小笠原諸島、東南アジア及び南太平洋の海岸等に広く生育している。

【0017】

10

20

30

40

50

本発明では、上記モモタマナの葉を採取し、水で抽出した抽出物を用いる。抽出の前処理として、モモタマナの葉を破碎することが好ましく、破碎により効率よく抽出を行うことができる。抽出に用いる溶媒は、抽出効率及び安全性の観点から、水である。

【0018】

上記抽出は、80～100 で加温して行うのが好ましく、80 未満では、抽出効率が低く、100 を超えると、抽出物が化学変化することがある。

【0019】

上記抽出は、空気、酸素を窒素で置換し、窒素ガスを充満した容器中、即ち窒素雰囲気下で行うのが好ましい。窒素雰囲気下で抽出を行う方が、空気中で抽出を行うよりも、安定性及び抽出効率が良い。

【0020】

抽出後は、遠心分離により固相と液相に分離したり、又はろ過を行うことにより、モモタマナの葉の残骸と抽出液とを分離する。なお、抽出液中には後述するようにポリフェノール類が存在するため、抽出液は酸性を示す。そこで、使用目的に応じてNaOH水溶液等で抽出液を中和してもよい。

【0021】

上記抽出物は、水抽出液としてそのまま用いてもよいが、抽出物を精製して用いることもできる。例えば、加温下で抽出液を減圧濃縮した後、凍結乾燥を行って、抽出物の精製品を得る。

【0022】

例えば、窒素雰囲気下で、上述の好適温度範囲で、水を用い、モモタマナの葉1gに対し水10mLを用いて抽出を行った場合、得られた抽出液を乾燥させると、0.14～0.46gの抽出物が得られる。従って、好適抽出条件下で得られる抽出物の割合は、モモタマナの葉100質量%に対し14～46質量%である。

【0023】

上記抽出物は、エロモナス ハイドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*)、エロモナス キャビエ (*Aeromonas caviae*)、エロモナス ソブリア (*Aeromonas sobria*)、バチルス メガテリウム ATCC 6630 (*Bacillus megaterium* ATCC 6630)、バチルス ズブチリス (*Bacillus subtilis*)、エンテロコッカス フェカーリス ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212)、エンテロコッカス アビウム R252 (*Enterococcus avium* R252)、病原血清型大腸菌 O111 (*Enteropathogenic Escherichia coli* O111)、プロテウス ミラビリス (*Proteus mirabilis*)、プロビデンシア ストゥアーティ SY2 (*Providencia stuarti* SY2)、シュードモナス エルギノーザ ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)、セラチア マルセツセンス (*Serratia marcescens*)、チフス菌 (*Salmonella typhi*)、パラチフス A 菌 (*Salmonella paratyphi* A)、パラチフス B 菌 (*Salmonella paratyphi* B)、フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*)、ソンネ赤痢菌 (*Shigella sonnei*)、黄色ブドウ球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)、黄色ブドウ球菌 FDA 209P (*Staphylococcus aureus* FDA 209P)、黄色ブドウ球菌 MRSA J3 (*Staphylococcus aureus* MRSA J3)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、コレラ菌 C154 (クラシカル) (*Vibrio cholerae* C154 (classical))、コレラ菌 A-85 (E1-Tor) (*Vibrio cholerae* A-85 (E1-Tor))、エルシニア エンテロコリチカ血清型 O-3 (*Yersinia enterocolitica* sero type O-3)等に対して抗菌及び殺菌効果を有する。本発明で用いるモモタマナの葉を水で抽出した抽出物は、上記のようにグラム陽性菌のみならず、グラム陰性菌に対しても強い活性を有するため、該抽出物は感染症治療薬としても有効である。

【0024】

特に、本発明で用いるモモタマナの葉を水で抽出した抽出物は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対しても抗菌及び殺菌効果を有するため、該抽出物はMRSA治療薬として有効である。また、MRSAに対する消毒液としても有効である。MRSA用薬剤として用いる場合、モモタマナの葉の水抽出液は、濃縮してペースト化、乾燥化又は乳化等が可能のため、剤型は特に限定されず、錠剤、粉末、液体であってよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

本発明の殺菌剤は、有効成分である上記モモタマナの葉を水で抽出した抽出物を含み、必要に応じて他の成分を含む。他の成分としては、殺菌剤を液状で用いる場合は、水、エタノール、プロパノール、グリセロール等の溶媒が挙げられる。ここで、液状殺菌剤中のモモタマナの葉を水で抽出した抽出物の濃度は、6.25～46000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が好ましく、6.25～6000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がより好ましく、12.5～1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が特に好ましい。6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満では、殺菌効果が充分でなく、46000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えると、殺菌効果が飽和する。また、本発明の殺菌剤を錠剤等の固体状で用いる場合は、他の成分としては、通常の医薬用配合剤が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

また、上記モモタマナの葉を水で抽出した抽出物は、変異原性を有さず、むしろ抗変異原性（変異阻害活性）を有する。従って、該抽出物を有効成分とする殺菌剤は、副作用が少なく、安全である。

【 0 0 2 7 】

本発明で用いるモモタマナの葉を水で抽出した抽出物は、上記のように種々の菌に対して殺菌効果を有し、更に抗変異原性を有するため、種々のアイテムに配合することにより、人体に対し安全で且つ殺菌性を発現させることができる。ここで、アイテムとしては、化粧料、フィルター等が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明は下記の実施例に何ら限定されるものではない。

【 0 0 2 9 】

（抽出液の調製）

60 の温風で乾燥させたモモタマナの葉を、5mmのワイヤメッシュを具えたブレンダーで破碎した。該破碎物1gに蒸留水10mLを加え、37 で1時間振盪した。次に、10,000 $\times g$ で10分間遠心した後、上清を採取し、10% NaOH水溶液を用いて、該上清のpHを7.0 \pm 0.1に調整した。最後に、孔径0.22 μm のメンブレンフィルターを用いて濾過し、濾液を10%水抽出液として使用した。

【 0 0 3 0 】

（凍結乾燥標品の調製）

破碎されたモモタマナの葉530gを蒸留水5300mLに加え、90 で1時間インキュベートした。次に、濾紙（TOYO, 5C）を用いて濾過し、濾液を70 で減圧濃縮後、凍結乾燥を行った。該凍結乾燥標品を適宜秤量し、蒸留水に溶解させて使用した。

【 0 0 3 5 】

（抗菌活性テスト）

（1）ディスク法

表1に記載の各菌をムーラーヒントンブロス(Difco)で培養し、生理食塩水で10⁶cfu/mLに調整し、ムーラーヒントン寒天培地に接種した。予め乾熱滅菌したディスク（直径8mm、東洋ろ紙）に、上記10%水抽出液50 μL を滴下し乾燥させた。次に、該ディスクを、前記被験菌を接種した培地上に置き、37 で一晚培養した。培養後、ディスク周囲に出現した阻止円の直径を、ノギスを用いて測定した。結果を表1に示す。

【 0 0 3 6 】

（2）最小発育阻止濃度(MIC)

日本化学療法標準法（日本化学療法学会編(1981)：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改定について、Chemotherapy 29: 76-79)に準拠して、最小発育阻止濃度を寒天平板希釈法にて測定した。接種菌量は10⁶cfu/mLで、培地にはムーラーヒントン寒天培地(Difco)を用いた。なお、MICは細菌の発育を阻止する最も低い濃度で表した。結果を表1に示す。また、上記凍結乾燥標品を用いMICを測定し、タンニン酸(Tannic acid)及び没食子酸(gallic acid)のMICと比較した。結果を表2に示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

【表 1】

菌種	阻止円の直径	MIC (%)
エロモナス ハイロフィラ	+++	0.25
エロモナス キヤビエ	+++	0.25
エロモナス ソブリア	+++	0.25
バチルス メガテリウム ATCC 6630	++	0.25
バチルス スブチリス	++	0.25
エンテロコッカス フェカリス ATCC 29212	++	>1
エンテロコッカス アビウム R252	+++	1
病原血清型大腸菌 O111	+	1
プロテウス ミラビリス	+++	0.25
プロビデンスシア ストゥアーティ SY2	+++	0.25
シュードモナス エルギノーザ ATCC 27853	++	1
セラチア マルセッセンス	+++	>1
チフス菌	+++	0.25
パラチフスA菌	+++	1
パラチフスB菌	+++	0.25
フレクスナー赤痢菌	+++	0.13
ソネ赤痢菌	+++	0.5
黄色ブドウ球菌 ATCC 25923	+++	0.13
黄色ブドウ球菌 FDA 209P	+++	0.25
黄色ブドウ球菌 MRSA J3	+++	0.25
表皮ブドウ球菌	+++	0.13
コレラ菌 C154 (クラシカル)	+++	0.25
コレラ菌 A-85 (E1-Tor)	+++	0.25
エルシニア エンテロリチカ血清型 O-3	+++	0.5

+++は直径が 15mm 超、++は 12~15mm、+は 8~12mm であることを示す。

【 0 0 3 8 】

表 1 の結果から、モモタマナの葉を水で抽出した抽出物は、病原性グラム陽性菌及びグラム陰性菌に対し抗菌性を有し、食中毒等の腸管下痢症の起炎菌、シュードモナス、セラチア、MRSA 等の院内感染菌の増殖を阻害することが分かる。

【 0 0 3 9 】

【表 2】

10

20

30

40

菌種	MIC (µg/mL) *1		
	凍結乾燥 標品 *2	タンニン 酸	没食子酸
エロモナス ハイドロフィラ	25	50	100
エロモナス キャビエ	25	100	100
エロモナス ソブリア	25	100	100
バチルス マガテリウム ATCC 6630	25	100	>100
バチルス スプツチス	25	100	>100
エンテロコッカス フェカーリス ATCC 29212	>100	>100	>100
エンテロコッカス アビウム R252	100	100	>100
病原血清型大腸菌 O111	>100	>100	>100
プロテウス ミラビリス	12.5	100	50
プロビデンシア ストウアーティ SY2	25	100	100
シュートモナス エルキノーザ ATCC 27853	>100	>100	>100
セラチア マルセッセンス	>100	>100	>100
チフス菌	25	100	>100
パラチフスA菌	25	100	>100
パラチフスB菌	25	100	>100
フレクスナー赤痢菌	12.5	50	>100
ソネ赤痢菌	12.5	50	>100
黄色ブドウ球菌 ATCC 25923	12.5	50	25
黄色ブドウ球菌 FDA 209P	25	50	50
黄色ブドウ球菌 MRSA J3	25	50	50
表皮ブドウ球菌	25	50	50
コレラ菌 C154 (クラシカル)	25	50	100
コレラ菌 A-85 (E1-Tor)	25	50	100
エルシニア エンテロコリチカ血清型 O-3	50	100	>100

*1 溶媒は蒸留水

*2 モモタマナの葉の抽出物の凍結乾燥標品

【 0 0 4 0 】

表 2 の結果から、モモタマナの葉を水で抽出した抽出物は、タンニン酸及び没食子酸に比べ、エロモナス、バチルス、プロテウス、プロビデンシア、ブドウ球菌、赤痢菌及びコレラ菌に対して抗菌活性が強いことが分かる。

【 0 0 4 1 】

(MRSA に対する MIC 値測定)

表 1 及び表 2 の結果より、モモタマナの葉の水抽出液が黄色ブドウ球菌に抗菌活性を示すことが明らかになったので、表 3 に示す 7 株の MRSA に対して上記と同様の方法で MIC 値を測定し、バンコマイシン等の 8 種の薬剤と比較した。結果を表 3 に示す。

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

50

【表3】

	メシチリン高耐性黄色ブドウ球菌に対するMIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
	92016K	92024B	92048S	92051H	92063C	92077H	92078G
凍結乾燥標品 *1	25	12.5	25	25	12.5	25	25
ABPC *2	64	32	32	32	64	32	32
IPM *3	16	64	64	32	64	16	8
MCIPC *4	128	>128	>128	>128	128	128	128
CEZ *5	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
GM *6	64	>128	128	128	64	0.5	0.5
EM *7	>128	>128	>128	0.25	>128	>128	>128
CLDM *8	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
VCM *9	1	1	1	1	1	1	1

*1 モモタマナの葉の抽出物の凍結乾燥標品

*2 アンピシリン(Ampicillin)

*3 イミペネム(imipenem)

*4 クロキサシリン(cloxacillin)

*5 セファゾリン(cefazolin)

*6 ゲンタマイシン(gentamicin)

*7 エリスロマイシン(erythromycin)

*8 クリンダマイシン(clindamycin)

*9 バンコマイシン(vancomycin)

【0043】

表3より、モモタマナの葉を水で抽出した抽出物は、概ねバンコマイシンに次いで低いMIC値を示し、抗菌活性が強いことが分かる。

【0044】

(生菌数の測定)

抗菌テストでモモタマナの葉の抽出物に対して感受性であった、グラム陽性菌の黄色ブドウ球菌 MRSA J3、黄色ブドウ球菌 FDA 209P及び表皮ブドウ球菌と、グラム陰性菌のフレクスナー赤痢菌、パラチフスA菌及びコレラ菌 C154とを被験菌とした。対数増殖期の培養菌を $1:10^5$ まで希釈した。この菌浮遊液1mLに上記10%水抽出液を等量加え混合した後、37℃でインキュベートした。適宜取り出し、希釈後生菌数を混釈法により、ミューラーヒントン寒天培地を用いて測定した。結果を図1に示す。

【0045】

図1より、0.63%以上の濃度のモモタマナ葉水抽出液で24時間処理することにより総ての菌が死滅することが分かる。また、この結果から、上記発育阻止能が殺菌によるものであることが分かる。

【0046】

(抗変異原試験)

AmeS法により変異原性を試験した。変異原にはアジ化ナトリウム(NaN_3)と代謝酵

10

20

30

40

50

素賦活型の 2-A F を使用した。菌株はネズミチフス菌 LT-2 (Salmonella Typhimurium LT-2) 株由来 TA 97 a、TA 98 (フレイムシフト試験株)、TA 100 (塩基対置換試験株：カリフォルニア大学バークレイ校の Ames BN 博士より分与) を用いた。新鮮培養菌 0.1mL に変異原 0.1mL 及びモモタマナの葉の水抽出液 0.1mL を加え、37 で 20 分間インキュベートした後、0.5mM のヒスチジン/ビオチン含有の上層軟寒天培地 2mL を加え、予め作製した最小培地からなる下層培地に重層した。37 で 48 時間培養した後、出現した復帰変異株のコロニーを計数した。同時に、陽性コントロール (変異原のみ)、陰性コントロール (モモタマナの葉の抽出液のみ) についても試験した。S 9 依存性の変異原 2-A F の場合は、0.5mL の S 9、0.1mL の菌液、変異原 0.1mL 及びモモタマナの葉の抽出液を加え、同様に行った。コントロールは S 9 の代わりにリン酸緩衝液を使用した。復帰変異株の計数は 48 時間後に行った。活性は、次の式を用いて求めた。結果を図 2 に示す。

【0047】

式：活性 (%) = (a - b) × 100 / (a - c)

(式中、a は変異原の作用のみで誘導されたコロニー数、b は抽出液存在下の変異原の作用で出現したコロニー数、c はモモタマナの葉の水抽出液の作用のみで出現したコロニー数である。)

【0048】

図 2 より、直接作用性変異原 NaN_3 によって生じる塩基置換型の復帰変異株の生成が最大 68% 阻害され、S 9 依存性の 2-A F によって生じるフレイムシフト型変異株の生成が最大 100% 阻害されることが分かる。この結果から、モモタマナの葉の水抽出液は、変異原性を有さないだけでなく、むしろ抗変異原活性を有することが分かる。

【0049】

【発明の効果】

本発明によれば、種々の菌に対し抗菌・殺菌作用を有し、特に M R S A 殺菌作用を有し、変異原性を有さず、むしろ抗変異原活性を有する殺菌剤が提供でき、かかる殺菌剤を用いることにより、殺菌性が高く、人体に対して害の無い化粧品、フィルター等の様々な商品が提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 生菌数の測定結果である。

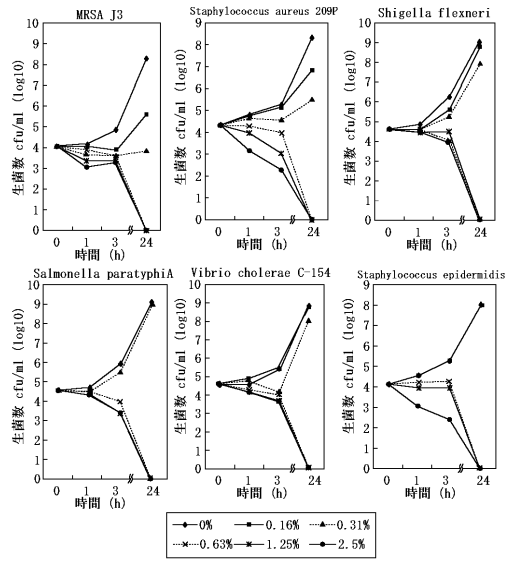
【図 2】 抗変異原試験の測定結果である。

10

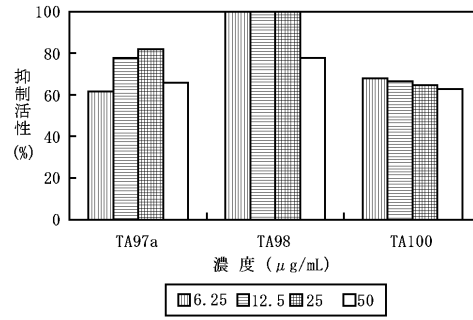
20

30

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(74)代理人 100119530

弁理士 富田 和幸

(72)発明者 安仁屋 洋子

沖縄県那覇市首里石嶺町4 - 3 1 4 - 9 0 2

(72)発明者 高嶺 房枝

沖縄県中城村南上原7 0 5 - 1 2

(72)発明者 市場 俊雄

沖縄県宜野湾市喜友名1 - 1 1 - 1 3 ライオンズマンションヒルズ喜友名8 0 7号室

審査官 吉住 和之

(56)参考文献 特開2 0 0 3 - 3 4 2 1 9 0 (J P , A)

Chemical & Pharmaceutical Bulletin , 1 9 8 6年 , Vol.34, No.3 , p.1039-1049

Planta Medica , 1 9 9 5年 , Vol.61, No.4 , p.365-366

Planta Medica , 1 9 9 9年 , Vol.65, No.5 , p.444-446

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷ , D B名)

A01N 65/00

CA(STN)

REGISTRY(STN)