

# *Legionella pneumophila* に対する ドライハーブ抽出液の抗菌作用

*Antibacterial Activities of Several Herbs on Legionella pneumophila*

古畑 勝則<sup>1</sup>, 堂ヶ崎知格<sup>1</sup>, 原 元宣<sup>2</sup>, 福山 正文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>麻布大学・環境保健学部, <sup>2</sup>麻布大学・獣医学部  
〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71

Katsunori FURUHATA<sup>1</sup>, Chikaku DOGASAKI<sup>1</sup>, Motonobu HARA<sup>2</sup>, and Masafumi FUKUYAMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Environmental Health, Azabu University and <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine,  
1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

**Abstract:** The use of dried herbs has frequently been incorporated into daily life in Japan in recent years. The antibacterial activity of dried herbs on *Legionella pneumophila*, which has been attracting attention as an emerging infectious disease, was investigated, and the following were obtained.

1) The antibacterial activity of extract solutions of 28 dried herbs on *L.pneumophila* was investigated by the disc method, and zone inhibition of the bacteria was observed with 22 herbs (78.6%) including raspberry leaf, common sage, lemon balm, and peppermint, showing an antibacterial activity of herbs on *L.pneumophila*. Herbs of the perilla family in particular had a strong activity.

2) Bactericidal experiments were performed with various concentrations of the herb extracts. The herbs had a bactericidal effect on *L.pneumophila*, and the activity was concentration dependent. Among the herbs with a 100% bactericidal rate, the maximal dilution factor was  $\geq 16$ -fold that of savory and hibiscus extracts, and the second highest was 8-fold that of common thyme extract.

3) Time-course changes in the bacterial count of *L.pneumophila* were measured in the extract solutions of peppermint, common sage, and common thyme of the perilla family, which had strong antibacterial activity. In all these herbs, the inoculated bacterial count of  $10^6$  CFU/ml became undetectable after three to 12 hours. Therefore, it was shown that although the action is not immediate, herbs have a bactericidal activity on *L.pneumophila*.

**Key words:** *Legionella pneumophila*, Herb, Antibacterial activities

## 緒 言

ハーブの語源はラテン語の「草」や「緑色野菜」を意味するヘルバ(Herba)であり、古くから薬草などとして知られている。近年、ハーブはガーデニングやアロマセラピーなどのブームにより一段と身近になっ

た。また、健康志向の高まりからハーブはスパイスや香料に限らず、ハーブティーや、消炎、保湿、抗菌、収斂など様々な生理活性があるためメディカルハーブとして用いられるなど、様々な用途で日常生活に取り入れられている<sup>2)</sup>。しかし、*Legionella pneumophila* に対する殺菌活性の報告はみられない。

著者らは、先に嗜好飲料の一つであるコーヒーに注目し、わが国でも院内感染<sup>3)</sup>や循環式浴槽水からの感染<sup>4)</sup>でクローズアップされ、新興感染症として関心が高まっている *L.pneumophila* に対する殺菌活性について検討を行い、コーヒーに抗菌作用があることを明らかにした<sup>5)</sup>。

そこで、今回は上述のことを加味して各種ドライハーブを取り上げ、その抽出液を用いて *L.pneumophila* に対する抗菌活性について検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1. 供試ハーブ

市販ハーブティーのローマンカモミール、ハイビスカス、ペパーミント、マローコモン、リンデン(以上、日本緑茶センター)、ドッグローズ、ジャーマンカモミール、ジャパニーズミント、フェネル(以上、ピボットインジャパン)、通信販売で購入したアグリモニー、アニスヒソップ、エキナセア、ギムネマ、キャラウェイ、コーンフラワー、コモンセージ、セボリー、コモンタイム、タラゴン、チャービル、フィーバーフュー、マーシュマロー、ヤロー、ユーカリ、ラズベリーリーフ、ラベンダー、レモングラスおよびレモンバーム (AROMA ハーブティ通販) の計 28 種のドライハーブを用いた。

### 2. 供試菌株

*L.pneumophila* 血清群 1 群標準株 (IID 5232 株) 1 株と冷却塔水由来 *L.pneumophila* 血清群 1 群 16 株、同 2 群 1 株、同 5 群 1 株および同血清群別不能 (7 群～14 群) 9 株の計 28 株を用いた。

### 3. 各種ハーブ原液の調製および抗菌試験用ディスクの作製

供試ドライハーブ各 10 g を沸騰蒸留水 100 ml に入れて 100 °C で 10 分間抽出したものをハーブ原液とした。この各種ハーブ原液をポアサイズ 0.2 μm、直径 25 mm のディスポーザブルメンブランフィルターユニット (日本ジェネティクス (株)) でろ過滅菌後、乾熱滅菌した感受性試験用ペーパーディスク (直径 8 mm、厚さ 1.5 mm、アドバンテック東洋 (株)) に少量

ずつ乾燥させながらしみ込ませ、最終的に 100 μl ずつ吸収させたものを抗菌試験用ディスクとした。

### 4. *L.pneumophila* に対する抗菌試験

供試菌株は BCYEα 寒天培地 ((株) 日研生物医学研究所) で 37 °C、3 日間培養後、菌体を集菌して滅菌蒸留水に浮遊させ、McFarland No.1 (10<sup>8</sup> CFU/ml) 相当の濁度に調整した。この菌液 0.2 ml を BSYE 寒天培地<sup>6)</sup> ((株) 日研生物医学研究所) に滴下後、コンラージ棒で全面に塗抹し、菌液が十分に吸収してから先に作製したハーブディスクを培地表面に密着させ、37 °C で 7 日間培養した。培養後、各ディスクによる阻止円の有無を判定し、その大きさを測定した。

### 5. 各種ハーブの殺菌試験

平底の 96 穴マイクロプレート ((株) グライナー・ジャパン) の各穴に滅菌蒸留水を 200 μl ずつ分注し、これに抽出した各種ハーブ原液を同量入れ、2倍から 16 倍までの 2 倍段階希釈系列を作製した。これらの各穴に抗菌試験と同様に作製した供試菌液を 10 μl ずつ加え、ミキサーで混和してから 24 時間反応させた。その後、速やかに各穴から 10 μl ずつ抜き取り BCYEα 寒天培地 ((株) 日研生物医学研究所) 上に滴下した。この平板を 37 °C、7 日間培養後、滴下したスポット内の集落形成を確認し、供試菌が発育しない最大希釈倍数を測定した。なお、原液についても同様に試験を行った。

### 6. ハーブ抽出液中での *L.pneumophila* の菌数変化

ハーブ原液を滅菌蒸留水で 2 倍希釈したハーブ抽出液 10 ml に、最終濃度が 10<sup>6</sup> CFU/ml となるように菌液を接種して室温に放置した。接種後 1, 3, 5, 12 および 24 時間経過後に試料を抜き取り、適宜希釈して BCYEα 寒天培地 ((株) 日研生物医学研究所) に塗抹して経時的菌数変動を測定した。

## 結果

### 1. *L.pneumophila* に対する各種ハーブ抽出液の抗菌活性

Fig. 1 には BSYE 寒天培地での *L.pneumophila* (IID 5232 株) に対するラズベリーリーフの抗菌試験結果

を示した。ハーブ抽出液を浸潤させたペーパーディスクの周囲には明瞭な阻止円がみられ、*L.pneumophila* に対するラズベリーリーフの抗菌活性が明らかに認められた。

供試した 28 株に対する各種ハーブの抗菌状況とその阻止円の大きさを Table 1 に示した。28 種類のハーブのうち 22 種類 (78.6%) に抗菌活性が認められ、その大きさはレモンバームの 28 mm が最大であった。また、ハーブごとに阻止円の大きさを平均値で比較すると、ラズベリーリーフの 21.6 mm が最も大きく、次にコモンセージの 20.4 mm、レモンバームの 19.5 mm、ペパーミントの 17.7 mm と続いた。また、最も小さいものはリンデンとマローコモン of 10.0 mm であり、ハーブの種類によって抗菌活性が異なった。

### 2. *L.pneumophila* に対する各種ハーブ抽出液の殺菌活性

供試菌株に対して抗菌活性を示した 22 種類のハーブのうち、特に強い抗菌活性を示した 13 種類を用い、ハーブ抽出液の濃度を変えて殺菌活性を検討した。Table 2 にはこれらの殺菌活性をハーブの希釈倍数で示した。

13 種類のハーブ抽出液はそれぞれの原液において供試菌株のすべてを殺菌した。しかし、希釈倍数が高くなるにつれて、その殺菌率は減少傾向を示すものが多く、殺菌活性は濃度依存であることが明らかになった。また、供試菌株の殺菌率が 100% であった各種ハーブの最大希釈倍数をみると、最も高い最大希釈倍数を示したものはセボリーとハイビスカスの  $\geq 16$  倍で、次にコモンタイムの 8 倍であった。しかし、レモンバーム、ラズベリーリーフおよびチャービルでは原液のみでしか殺菌活性は認められず、ハーブの種類によって殺菌活性の程度に大きな差がみられた。

### 3. ハーブ抽出液中での *L.pneumophila* の経時的菌数変化

供試菌株の多くに抗菌活性を示したシソ科のハーブの中で、知名度の高いペパーミント、コモンセージおよびコモンタイムを用い、*L.pneumophila* 3 株 (血清群 1 群, 2 群および 5 群, 各 1 株) に対する殺菌活性を検討したところ、Fig. 2 に示すように、 $10^6$ CFU/ml

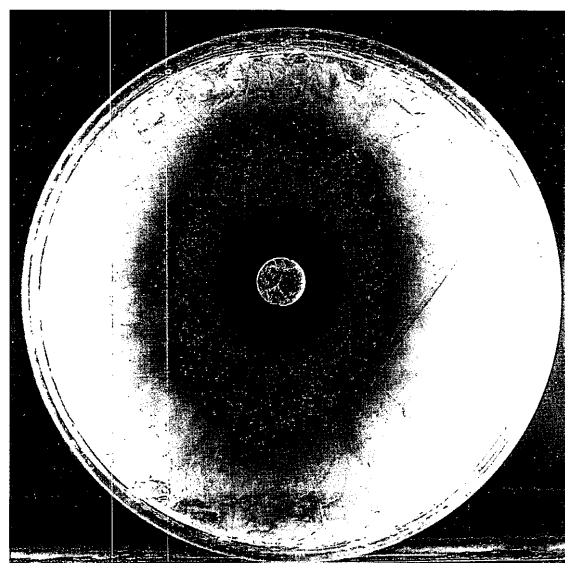


Fig. 1 Antibacterial activities of Raspberry Leaf against *L.pneumophila* IID 5232 (BSYE agar)

Table 1. Antibacterial activities of herbs against *L.pneumophila*

tested herbs	No. of positive strains (%)	mean (range)*
1 Raspberry Leaf	28 (100.0)	21.6 (15-27)
2 Common Sage	28 (100.0)	20.4 (15-25)
3 Lemon Balm	28 (100.0)	19.5 (12-28)
4 Pepper Mint	28 (100.0)	17.7 (13-22)
5 Common Thyme	27 (96.4)	16.7 (13-20)
6 Savory	26 (92.9)	14.3 (10-22)
7 Dog Rose	23 (82.1)	12.7 (9-20)
8 Chervil	20 (71.4)	13.8 (9-20)
9 Eucalyptus	20 (71.4)	12.3 (9-16)
10 Tarragon	17 (60.7)	13.0 (10-16)
11 Hibiscus	15 (53.6)	13.0 (10-18)
12 Japanese Mint	15 (53.6)	11.5 (9-13)
13 Lavender	14 (50.0)	12.2 (9-17)
14 Feverfew	9 (32.1)	10.8 (9-15)
15 Roman Chamomile	6 (21.4)	10.3 (9-11)
16 Marsh Mallow	5 (17.9)	12.2 (10-13)
17 Yarrow	5 (17.9)	11.8 (10-16)
18 Agrimony	4 (14.3)	10.6 (9-12)
19 Echinacea	3 (10.7)	11.3 (9-15)
20 Cornflower	2 (7.1)	11.0 (10-12)
21 Linden	2 (7.1)	10.0 (10)
22 Mallow Common	1 (3.6)	10.0 (10)

\* ; Size of the inhibition zones (mm)

n = 28 strains

Table 2. Bactericidal activities of herbs against *L.pneumophila*

tested herbs	No. of tested strains*	dilution numbers of herbs				
		0	×2	×4	×8	×16
1 Savory	26	26 (100)**	26 (100)	26 (100)	26 (100)	26 (100)
2 Hibiscus	15	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)
3 Common Thyme	27	27 (100)	27 (100)	27 (100)	27 (100)	20 (74)
4 Pepper Mint	28	28 (100)	28 (100)	28 (100)	27 (96)	7 (25)
5 Common Sage	28	28 (100)	28 (100)	28 (100)	27 (96)	3 (11)
6 Eucalyptus	20	20 (100)	20 (100)	20 (100)	7 (25)	1 (5)
7 Japanese Mint	15	15 (100)	15 (100)	15 (100)	3 (20)	1 (7)
8 Tarragon	17	17 (100)	17 (100)	14 (82)	0 (0)	0 (0)
9 Dog Rose	23	23 (100)	23 (100)	13 (57)	1 (4)	0 (0)
10 Lavender	14	14 (100)	14 (100)	3 (21)	0 (0)	0 (0)
11 Lemon Balm	28	28 (100)	26 (93)	2 (7)	0 (0)	0 (0)
12 Raspberry Leaf	28	28 (100)	26 (93)	1 (4)	0 (0)	0 (0)
13 Chervil	20	20 (100)	6 (30)	1 (5)	0 (0)	0 (0)

\* ; Strains formed inhibition zones

\*\* ; No. of Killed strains (%)

の接種菌数は、いずれのハーブにおいても経過時間とともに減少傾向を示し、12時間以内にはすべてのハーブで検出されなくなった。

ペパーミントにおいては (Fig.2, a), 血清群1群は初期接種菌数  $4.0 \times 10^6$  CFU/ml が3時間後に  $2.8 \times 10^5$  CFU/ml, 5時間後に  $6.2 \times 10^4$  CFU/ml と緩やかに減少し、12時間後には検出されなくなった。この傾向は5群においても同様であった。しかし、2群はこれらより速やかに殺菌され、初期接種菌数  $8.4 \times 10^5$  CFU/ml が1時間後には  $9.1 \times 10^4$  CFU/ml に減少し、3時間後には急激に減少して検出されなくなった。

コモンセージにおいては1群と5群で共通した減少傾向がみられ (Fig. 2, b), 初期接種菌数の  $10^6$  CFU/ml は3時間後でもおよそ  $10^6$  CFU/ml とほとんど変化はなく、5時間後に  $10^5$  CFU/ml に減少し、12時間後には検出されなくなった。ところが、2群は初期接種菌数  $4.2 \times 10^5$  CFU/ml が3時間後には  $1.0 \times 10^2$  CFU/ml に激減し、5時間後には検出されなくなった。

コモンタイムにおいては前二者より顕著な減少傾向を示し (Fig. 2, c), 1群と5群は初期接種菌数の  $10^6$  CFU/ml が3時間後にはそれぞれ  $10^4$  CFU/ml,  $10^5$  CFU/ml, 5時間後には  $10^1$  CFU/ml,  $10^3$  CFU/ml と急激に減少し、ともに12時間後には検出されなくなった。また、2群はさらに殺菌速度が速く、初期接種菌数  $1.1 \times 10^6$  CFU/ml が1時間後には  $3.1 \times 10^5$  CFU/ml に減

少し、3時間後には検出されなくなった。

以上のように、各種ハーブは *L.pneumophila* に対して即効性はないものの明らかな殺菌活性が認められた。また血清群別では、*L.pneumophila* 2群はいずれのハーブでも3時間後から5時間後と比較的短時間に殺菌されたが、1群と5群では12時間と長い接触時間を要し、血清群によってハーブの殺菌活性が異なった。

## 考 察

近年、ハーブは美容に対する関心や健康志向の高まりとともに急速に人々の生活に身近なものとなってきた。こうしたハーブにはさまざまな薬用効果が認められている<sup>2)</sup>。例えば、セージ、タイム、ユーカリなどでは抗菌作用が、ハイビスカス、マーシュマロー、リンデンなどでは利尿作用が、ラベンダー、ペパーミント、カミツレなどは鎮静、鎮痙作用があるとされている<sup>7)</sup>。

今回著者らは、院内感染や日和見感染の起因菌として注目されている *L.pneumophila* について各種ハーブの抗菌活性をスクリーニングしたところ、28種類のハーブのうち、ラズベリーリーフ、コモンセージ、レモンバーム、ペパーミント、コモンタイムなど22種類 (78.6%) のハーブで *L.pneumophila* に対する抗菌

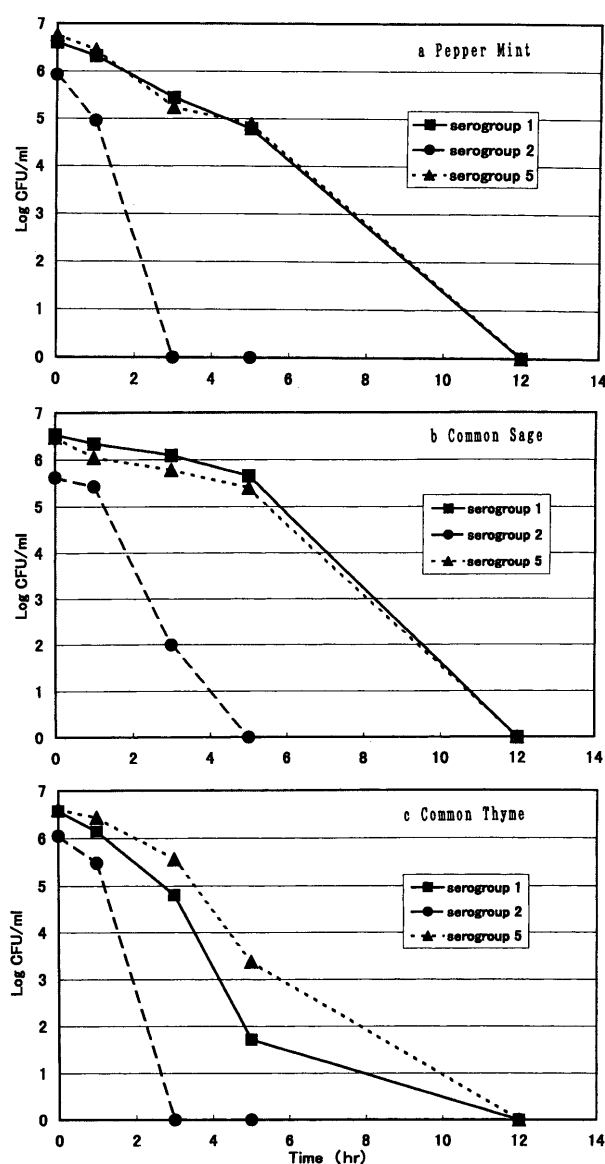


Fig. 2 Bactericidal activities of Pepper Mint, Common Sage and Common Thyme against *L.pneumophila*

活性が認められた。文献的にはローズマリー<sup>8)</sup>, ユーカリ<sup>9)</sup>, カミツレ<sup>10)</sup>, ラベンダー<sup>10)</sup>, セージ<sup>11)</sup>, ペパーミント<sup>12)</sup>, レモングラス<sup>13)</sup>などのハーブが種々の微生物に対して抗菌活性を有することが報告されているが, *L.pneumophila* に対する抗菌試験はみられず, 今回の報告が最初であると思われた。

次に, 抗菌活性が認められた各種ドライハーブ抽出液を用いて, ハーブの抗菌作用が静菌的作用, ある

いは殺菌的作用であるかを確認するためにハーブ抽出液の濃度を変えて定量的に殺菌試験を行った。その結果, 各種ハーブは *L.pneumophila* に対して殺菌的に作用し, しかもその活性は濃度依存性であることがわかった。しかし, ラズベリーリーフでは形成された阻止円は大きく, 抗菌活性は高かったにもかかわらず, 殺菌試験では原液でしか100%の殺菌活性を示さず, 抗菌活性と殺菌活性とが必ずしも一致しないことが示された。

さらに抗菌活性の強かったペパーミント, コモンセージおよびコモンタイムにおける経時的殺菌活性を検討したところ, いずれのハーブでも経過時間とともに *L.pneumophila* の菌数は減少し, すべて12時間以内には検出されなくなった。このように, ハーブの殺菌作用は塩素剤のような即効性ではなく, かなりの作用時間が必要であることがわかった。こうしたハーブの遅効性はハーブ抽出液中の抗菌物質の濃度によるものか, あるいは *L.pneumophila* を殺菌するメカニズムが異なるためか, 今後の検討課題である。

以上のような *L.pneumophila* に対するハーブの抗菌活性を植物学的分類からみると, コモンセージ, ペパーミント, コモンタイム, セボリーなどのシソ科のハーブが比較的強い殺菌活性を示した。菊崎もハーブの中でシソ科のハーブがすぐれた抗菌力を示すことを記載している<sup>1)</sup>。ところが, エキナセア, ローマンカモミール, フィバーフューなどのキク科のハーブでは *L.pneumophila* に対する抗菌活性は示したものの, 強い殺菌活性は認められなかった。また, イネ科やセリ科のハーブではほとんど抗菌活性は認められなかった。

ドライハーブの原料部分としては花部, 葉部, 根部などがある。今回の抗菌活性を原料部分別にみると, ラズベリーリーフとレモングラスのように同じ葉部を使用しているが, 前者では強い抗菌活性が認められたが, 後者ではまったく活性が認められなかった。このように, ハーブの種類によって抗菌活性は様々であり, 今回の実験では使用部分と抗菌活性の顕著な関連は認められなかった。

ハーブティーの一般的な入れ方は, 茶葉の量や蒸らし時間は種類により多少異なるが, 通常は2~10gのドライハーブに熱湯を注ぎ, 3分~5分間蓋をして蒸らしながら抽出している<sup>2)</sup>。今回の試験では, 少

し多めのドライハーブ10gを沸騰水中に加え、100℃で10分間煮出したものをハーブ原液として抗菌試験を行った。これらのことから、*L.pneumophila* に対する抗菌活性物質は加熱によって分解されず、耐熱性の物質である可能性が示唆された。菊崎<sup>1)</sup>は、抗菌活性を示したシソ科のハーブに含まれる精油成分としてチモール、カルバクロール、ペリルアルデヒド、イソボルネオールなどを共通成分としてあげている。今回、*L.pneumophila* に対して抗菌活性を示したハーブにもこれらの精油成分が含まれるものと考えられ、今後はこれらの抗菌物質について検討を進める予定である。

### 結 語

28種類のドライハーブ抽出液を用いて、ディスク法により *Legionella pneumophila* に対する抗菌活性を調べたところ、ラズベリーリーフ、コモンセージ、レモンバーム、ペパーミントなど22種類(78.6%)のハーブで抗菌活性が認められた。また、ハーブ抽出液の濃度を変えた殺菌試験の成績から、ハーブの抗菌活性は殺菌的に作用し、その活性は濃度依存性であることがわかった。さらに、ハーブ抽出液中での *L.pneumophila* の経時的菌数変化を測定した結果、 $10^6$  CFU/ml の接種菌数は3時間後から12時間後には検

出されなくなった。以上のように、各種ハーブは速効性ではないものの *L.pneumophila* に対して殺菌活性を示すことが明らかとなり、天然抗菌剤として有用であると考えられた。

なお、本研究の概要は日本防菌防黴学会第27回年次大会(東京)において発表した。

### 文 献

- 1) 菊崎泰枝：*aromatopia*, No.9, 42-46 (1994).
- 2) 林真一郎：メディカルハーブ LESSON, 主婦の友社, 東京 (1996).
- 3) 山下直哉, 他：日本小児科学会雑誌, 102, 323 (1998).
- 4) 峯下昌道, 他：感染症誌, 73, 臨時増刊号, 156 (1999).
- 5) 古畑勝則, 杉山順一, 堂ヶ崎知格, 福山正文：防菌防黴, 28, 87-91 (2000).
- 6) 猿渡克比孔, 他：Chemotherapy, 32, 718-723 (1984).
- 7) 萩尾エリ子：ハーブの図鑑, 池田書店, 東京 (1999).
- 8) 菊崎泰枝：*aromatopia*, No.4, 40-42 (1993).
- 9) 村田容常：*aromatopia*, No.9, 26-29 (1994).
- 10) 小島弘之, 内藤岳仁：*aromatopia*, No.9, 47-49 (1994).
- 11) 衣川湍水：*aromatopia*, No.9, 50-52 (1994).
- 12) 石川久史：*aromatopia*, No.10, 68-73 (1995).
- 13) 秋山 靖, 松村晋一：*aromatopia*, No.10, 82-84 (1995).