

# レジオネラ属菌に対するグレープフルーツ種子抽出物の 抗菌作用

*Antibacterial Activities of Grapefruit (Citrus paradisi) Seed Extract  
against Legionella pneumophila from Whirlpool Bath Waters*

古畑勝則, 山本静雄, 鈴木 潤

麻布大学大学院環境保健学研究科

Katsunori Furuhata, Shizuo Yamamoto, Jun Suzuki

School of Environmental Health, Azabu University

**Abstract.** We investigated the antibacterial effect of commercial grapefruit seed extract (GSE, Liquid), which has recently been attracting attention as a food additive, on *Legionella pneumophila*. The sensitivity test was performed using the disc method. All 25 strains tested were sensitive to GSE, and formed clear inhibition zones in its presence. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were measured by the agar dilution method. The MIC of GSE in the strains was in the range of 97.7 mg/l to 390.6 mg/l, and the MIC<sub>90</sub> was 390.6 mg/l. The minimum bactericidal concentration (MBC) values for the test strains were also determined. MBC<sub>90</sub> was 50,000, 6,250, and 3,125 mg/l when the exposure time was 1, 10, and 60 minutes, respectively. These bactericidal test results demonstrate that GSE has a bactericidal effect on *L. pneumophila*.

## 緒 言

*Legionella pneumophila* は、空調用冷却塔水をはじめ、給湯水、循環式浴槽水、温泉水などの人工的水環境<sup>1)</sup>、あるいは土壌中<sup>2)</sup>にも広く分布していることが明らかにされてきた。厚生労働省の指導<sup>3)</sup>により、2001年から循環式浴槽では塩素系薬剤による衛生的な維持管理が行われるようになったが、浴槽水のpHが高い時や有機物が高濃度に存在する場合には十分な消毒効果が期待できない。2002年7月には宮崎県日向市の特殊公衆浴場において7名が死亡し、患者295名に及ぶ大規模なレジオネラ症が発生した<sup>4)</sup>。ここでは、エアレーションなどの付加的設備によって塩素の残留効果が激減していた可能性も指摘された。

一般に浴槽水の消毒には塩素系薬剤を使用するが、温泉水では低pHの場合やFe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>を含む浴槽水では、塩素ガスの発生や酸化物の生成による浴槽水の着色、あるいは塩素臭の問題がある。一方で、1985年頃から柑橘類の種子抽出物を用いた抗菌試験が行われ<sup>5)</sup>、*Escherichia coli*、*Salmonella*および*Staphylococcus aureus*などに対して抗菌力があることが報告されている<sup>6)</sup>。そこで著者らは、塩素系薬剤に替わる天然抗菌剤の検索を行うため、日持ち向上剤として注目されているグレープフルーツ (*Citrus paradisi*) 種子抽出物 (GSE) を取り上げ、*L. pneumophila* に対する抗菌効果を検討した。

## 材料および方法

### 1. 供試材料

市販のグレープフルーツ種子抽出物 (GSE) (CAP-10, カルファケミカル(株)) を用いた。

### 2. 供試菌株

*L. pneumophila* 血清群 1 群 IID 5232 株 (No.26) と都内浴槽水由来 *L. pneumophila* 血清群 1 群 4 株 (No.1 ~ No.4), 同 3 群 5 株 (No.5 ~ No.9), 同 4 群 2 株 (No.10, No.11), 同 5 群 9 株 (No.12 ~ No.20) および同 6 群 5 株 (No.21 ~ No.25) の計 26 株を用いた。

### 3. GSE 感受性試験

供試 GSE をポアサイズ 0.2  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm のディスクポア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)) でろ過滅菌した。この試料を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 50  $\mu\text{l}$  を吸収させて抗菌試験用ディスクとした。

供試菌株は BCYE $\alpha$  寒天培地 ((株)日研生物医学研究所) に塗抹し, 37 $^{\circ}\text{C}$  で 3 日間培養後, 菌苔を白金耳で掻き取って滅菌蒸留水に浮遊させ, McFarland No.1 (10 $^8$ CFU/ml) 相当の濁度に調整した。この菌液 100  $\mu\text{l}$  を BSYE 寒天培地<sup>7)</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, 菌液が十分に吸収されてから先に作製した抗菌試験用ディスクを培地表面に密着させ, 37 $^{\circ}\text{C}$  で 7 日間培養した。培養後, 各ディスク周辺の阻止円の有無を判定し, その直径を測定した。

### 4. GSE の MIC 測定

抗生物質の MIC 測定法である寒天平板希釈法に準拠した。すなわち, 供試 GSE を適宜 2 倍段階希釈し, 各 2 ml をシャーレに分注し, これに BSYE 寒天培地を 18 ml ずつ入れて混合し, 各濃度の GSE 平板培地を作製した。接種菌液は感受性試験と同様に作製し, ミクロプランター MIT-P ((株)佐久間製作所) を用いて各平板培地に接種した。これを 37 $^{\circ}\text{C}$  で 7 日間培養後, 各濃度の平板培地における供試菌株の発育の有無を観察して MIC 値を求めた。

### 5. GSE の MBC 測定

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 100  $\mu\text{l}$  ずつ分注し,

これに供試 GSE (10 倍希釈済み) を同量入れて順次希釈し, 2 倍段階希釈系列を作製した。これらの各穴に感受性試験と同様に作製した菌液を 10  $\mu\text{l}$  ずつ加えて室温で 1 分間, 10 分間, 60 分間静置後, 各経過時間ごとに速やかに各穴から 10  $\mu\text{l}$  ずつ採取して BCYE $\alpha$  寒天培地 ((株)日研生物医学研究所) 上にスポットした。この平板を 37 $^{\circ}\text{C}$  で 7 日間培養後, スポット内の集落の有無を観察し, 供試菌が発育しない最小 GSE 濃度を判定して MBC 値とした。

### 6. GSE による殺菌実験

pH7.0 のリン酸緩衝液 200 ml に供試 GSE を添加して 1,000 倍希釈溶液 (1,000 mg/l) と 10,000 倍希釈溶液 (100 mg/l) を作製した。各溶液に菌数が 10 $^6$ CFU/ml となるように *L. pneumophila* IID 5232 株 (No.26) と浴槽水由来 *L. pneumophila* 血清群 5 群 (No.12) の各 1 株をそれぞれ接種して 40 $^{\circ}\text{C}$  に放置した。接種後, 1 分, 3 分, 5 分経過ごとに試料を採取し, 直ちに BCYE $\alpha$  寒天培地 ((株)日研生物医学研究所) に 100  $\mu\text{l}$  ずつ塗抹し, 37 $^{\circ}\text{C}$  で 7 日間培養後, 生残菌数を計数した。また, pH9.0 に調整した緩衝液でも同様の実験を行って比較した。さらに, pH7.0 の緩衝液の中に生薬 (葉仁湯, 森下仁丹(株)) を 1% の割合に入れて 60 分間放置後, 供試 GSE を同量添加して殺菌実験を行った。なお, 対照には GSE 無添加の各緩衝液を用いた。

## 結果

### 1. *L. pneumophila* に対する GSE の抗菌活性

各供試菌株は 17 mm ~ 25 mm の範囲で明瞭な阻止円を形成し, 平均値 20.8 mm, 標準偏差 2.4 mm であり, 菌株による差はほとんど認められなかった。また, 阻止円の大きさを血清群別に比較しても, 平均値は 20 mm ~ 22 mm で, 特に差は認められなかった。このように, GSE は *L. pneumophila* に対して明らかな抗菌作用を示した。

### 2. *L. pneumophila* に対する GSE の MIC 値

供試菌株の MIC 累積分布を Fig. 1 に示した。MIC 値の範囲は 97.7 mg/l ~ 390.6 mg/l を示し, MIC 値は 3 管 (8 倍) 以内に分布していた。また, MIC<sub>50</sub> と MIC<sub>90</sub> はいずれも 390.6 mg/l であった。

### 3. *L. pneumophila* に対する GSE の MBC 値

MIC 値と同様に, 接触時間ごとの MBC 累積分布

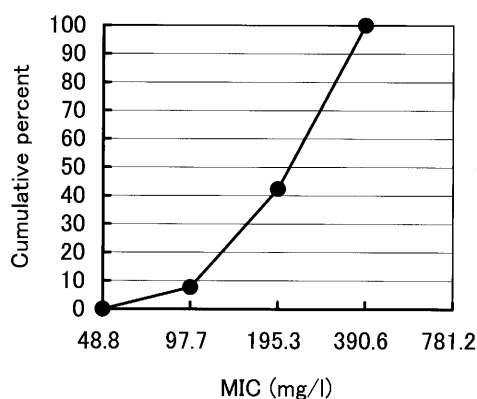


FIG. 1 Cumulative distribution of MIC of the grapefruit seed extract against *L. pneumophila* from whirlpool bath waters.

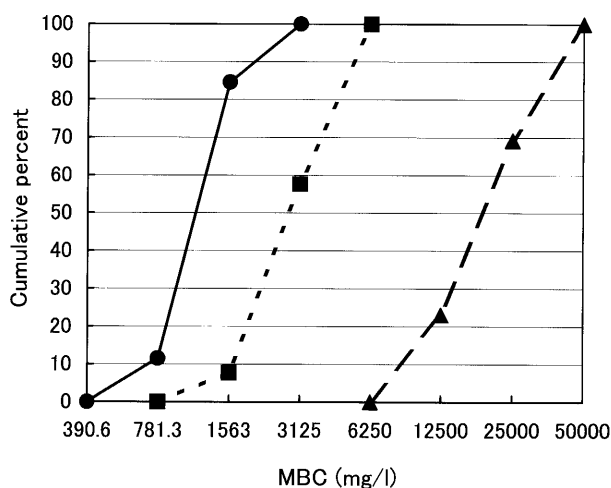


FIG. 2 Cumulative distribution of MBCs of the grapefruit seed extract against *L. pneumophila* from whirlpool bath waters.

▲: 1 min, ■: 10 min, ●: 60 min

を Fig. 2 に示した。接触時間が長くなるに伴って低濃度でも殺菌される傾向が認められた。MBC 値の範囲は、接触時間 1 分では 12,500 mg/l ~ 50,000 mg/l に分布したのに対し、接触時間 10 分では 1,563 mg/l ~ 6,250 mg/l と低濃度になり、接触時間 60 分では 781.3 mg/l ~ 3,125 mg/l であった。いずれの接触時間内でも 3 管 (8 倍) 以内の分布を示し、類似した傾向であった。また、各接触時間での MBC<sub>50</sub> は、接触時間 1 分、10 分、60 分では、それぞれ 25,000 mg/l、3,125 mg/l、1,563 mg/l であったが、MBC<sub>90</sub> は、それぞれ 50,000 mg/l、6,250 mg/l、3,125 mg/l であった。

#### 4. 各種実験条件下における GSE 中での *L. pneumophila* の菌数変化

pH7.0 と pH9.0 のリン酸緩衝液および pH7.0 のリン

酸緩衝液に生薬を添加した溶液に GSE を 100 mg/l および 1,000 mg/l の濃度で加え、これに *L. pneumophila* を接種して接触時間ごとの経時的菌数変化を調べた。その結果、供試した標準株の IID5232 株と浴槽水由来株は、ともに接種後 1 分以内に 99.99 % 以上に殺菌効果が認められ、菌株間の差異は認められなかった。

#### 考 察

近年、グレープフルーツ種子抽出物 (GSE) は天然抗菌剤として注目され、広い抗菌スペクトルを持つことが明らかになっている<sup>8,9)</sup>。わが国では、仁科ら<sup>6)</sup>が各種微生物に対して抗菌活性を認め、有効な日持ち向上剤であると報告しており、その安全性についても確認している。また、GSE 中の抗菌活性を示す主要物質は塩化ベンゼトニウムであることが解明され、そのメカニズムとして、この物質が微生物の細胞質膜や細胞壁を壊し、細胞質を遊離することにより微生物を破壊することが明らかにされている<sup>10,11)</sup>。

今回、著者らは上述のことを踏まえ、*L. pneumophila* に対する GSE の抗菌効果を検討するために、ディスク法による抗菌活性試験を行ったところ、すべての供試菌株で阻止円が認められ、明確な抗菌作用を示した。また、阻止円の大きさは 17 mm ~ 25 mm であり、菌株間による差は認められなかった。GSE を用いた各種微生物に対する抗菌作用についての報告は多数見られるが<sup>6, 8, 9)</sup>、*L. pneumophila* に対する抗菌作用に関する報告はなく、今回の結果と比較することは困難であった。なかでも、GSE の販売元であるカルファケミカル (株) の技術資料<sup>12)</sup>では、*Escherichia coli*、*Salmonella* および *Staphylococcus aureus* の MIC<sub>90</sub> はそれぞれ 200 mg/l、100 mg/l、25 mg/l であった。今回の結果では、*L. pneumophila* に対する GSE の MIC<sub>90</sub> は 390.6 mg/l であり、これらの菌種と比較すると、約 2 倍から 16 倍低い抗菌活性を示した。しかしながら、コーヒー<sup>13,14)</sup> やハーブ<sup>15)</sup> の有効性が報告されている中で、特に抗菌活性の高いコーヒー飲料由来カフェイン酸やクロロゲン酸の 625 mg/l と比較すると、抗菌活性がやや高いことがわかった。また、MBC 値の比較では、接触時間 60 分において、GSE の MBC<sub>90</sub> は 3,125 mg/l であり、コーヒー飲料由来プロトカテ

キユ酸の5,000 mg/l やクロロゲン酸の>5,000 mg/l より殺菌活性は高かった。さらに、各種殺菌実験における経時的な生菌数の変化では、GSE100 mg/l と1,000 mg/l のいずれの濃度においても、1分以内に99.99%以上が殺菌された。これらのことから、GSE100 mg/l を添加することにより、*L. pneumophila* に対して殺菌活性が高まることから、GSEは有効な天然殺菌剤であると考えられた。

### 要 約

レジオネラ属菌の除去を目的として、塩素系薬剤に替わる天然抗菌剤の検索を行うため、グレープフルーツ種子抽出物 (GSE) について、*L. pneumophila* に対する抗菌効果を検討したところ、以下の成績が得られた。

1. *L. pneumophila* に対する GSE の抗菌活性試験を行ったところ、供試した25菌株は17~25 mm の範囲に明瞭な阻止円の形成を示し、平均値は20.8 mm であった。
2. *L. pneumophila* に対する GSE の MIC 値を測定したところ、範囲は97.7 mg/l から390.6 mg/l を示し、MIC<sub>90</sub>は390.6 mg/l であった。
3. *L. pneumophila* に対する GSE の MBC 値を測定したところ、範囲は接触時間1分、10分、60分で12,500~50,000 mg/l、1,563~6,250 mg/l、781.3~3,125 mg/l を示し、MBC<sub>90</sub>は1分、10分、60分で、それぞれ50,000 mg/l、6,250 mg/l、3,125 mg/l であった。
4. 40℃に保温したpH7.0とpH9.0のリン酸緩衝液およびpH7.0のリン酸緩衝液に生薬を添加した溶液中にGSE100 mg/l および1,000 mg/l を含む溶液を用いて標準株と浴槽水由来株に対するGSEの殺菌効果を検討したところ、いずれの条件でも菌接種後1分以内で99.99%が殺菌された。

以上のことから、GSEは*L. pneumophila* に対して抗菌活性や殺菌効果を示すことが明らかとなった。

### 文 献

- 1) 古畑勝則：水環境におけるレジオネラ属菌の汚染と制御。日食微誌, 15: 1-9, 1998.
- 2) 古畑勝則, 岡部弥穂, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福

山正文：土壌からのレジオネラ属菌の分離状況。防菌防黴誌, 30: 555-561, 2002.

- 3) 厚生労働省健康局生活衛生課：循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル (平成13年9月11日健衛発第95号), 2001.
- 4) 藪内英子, 縣 邦雄：日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生。感染症誌, 78: 90-98, 2004.
- 5) Ali R, Hasnain A and Khan KA: Preliminary studies on the Use of Sceds and Peels from Citrus reticulata as Food Preservaties. *Pakistan. J. of Biochem.*, 19: 43-47, 1986.
- 6) 仁科淳良, 木原 浩, 内堀 毅, 大井 高：グレープフルーツ種子抽出物 DF-100 中の抗菌成分。防菌防黴誌, 19: 401-404, 1991.
- 7) 猿渡克比孔, 伊藤直美, 長沢正夫, 中里博子, 古賀宏延, 渡辺講一, 田中 光, 藤田紀代, 重野芳樹, 山口恵三, 泉川欣一, 斉藤 厚, 原 耕平：Legionella に対する新しい薬剤感受性用培地 (B-SYE 寒天培地) について。Chemotherapy, 32: 718-723, 1984.
- 8) 渡辺隆夫, 山口正之：グレープフルーツ種子抽出物の利用。BIO INDUSTRY, 12: 42-46, 1995.
- 9) 柞川洋一：グレープフルーツ種子抽出物の特性とその応用。月刊フードケミカル, 8: 36-43, 2001.
- 10) Takeoka G, Dao L, Wong RY, Lundin R, and Mahoney N: Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3316-3320, 2001.
- 11) von Woedtke T, Schluter B, Pglegel P, Lindequist U and Julich WD: Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie*, 54: 452-456, 1999.
- 12) カルファケミカル(株)：C.A.P 技術資料 (日本食品分析センター, 試験報告書, 第42051985号), 1989.
- 13) 古畑勝則, 杉山順一, 堂ヶ崎知格, 福山正文：Legionella pneumophila に対するコーヒーの抗菌作用。防菌防黴誌, 28: 87-91, 2000.
- 14) 古畑勝則, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文：Legionella pneumophila に対するコーヒー飲料由来フェノール化合物の抗菌作用。防菌防黴誌, 30: 291-297, 2002.
- 15) 古畑勝則, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文：Legionella pneumophila に対するドライハーブ抽出液の抗菌作用。麻大誌, 1/2: 15-20, 2001.