マヌカハニーを用いたリップクリーム型抗菌薬の作製

永田有

要旨

マヌカハニーに特異的に含まれるメチルグリオキサール（以下 MGO）の抗菌作用に着目し、携帯性に優れた形状であるリップクリーム型抗菌薬の作製と抗菌作用の評価を行った。評価方法として寒天拡散法を用い、抗菌薬を培地上にスタンプする方法と、切断して静置する方法の 2 通りで阻止円形成の有無を観察した。その結果、切断して静置した場合にのみ阻止円が形成され、スタンプした場合にはマヌカハニーの配合割合を増加させた条件において阻止円が形成されることが分かった。

キーワード：マヌカハニー、抗菌、阻止円

Ⅰ．はじめに

近年、薬剤耐性菌の存在や日常的な感染予防を目的として、天然由来の抗菌性物質が注目されている。その一例がマヌカハニーである。マヌカハニーは一般的なハチミツと比べて高い抗菌作用を持つことが報告されており、その抗菌作用の主な要因はマヌカハニーに特異的に含まれるメチルグリオキサール（Methylglyoxal,以下 MGO）である。高橋（2003）によると、MGO は黄色ブドウ球菌（グラム陽性菌）、ヘリコバクター・ピロリ（グラム陰性菌）に対して抗菌作用を示す。

そこで、この特性を創傷の治療に活かすため、一般的な治療方法との関連を考える。

従来の創傷の治療方法として湿潤療法と殺菌療法が挙げられる。湿潤療法は傷口を乾燥させずに湿潤状態に保つことで滲出液中の成分が細胞の再生を促し、傷口の治癒を早める方法である。しかし、Szilvia Neuhaus et al.（2023）は、湿潤療法に用いられるワセリンなどの基材は傷口が乾燥しないための保湿の役割を果たすが、それ自体に抗菌作用はないと示している。一方、殺菌療法は過酸化水素などの強い殺菌力をもつ製剤を利用することである。しかし、高野（2015）はこれらの製剤が有害な細菌だけでなく正常な細胞にも影響を及ぼす可能性を指摘している。そこで、マヌカハニーは高い保湿性をもち、湿潤環境を維持することができるとともに、MGO による穏やかな抗菌作用を示すため、湿潤療法と殺菌療法の利点を併せ持つと考えた。また、マヌカハニーは実際に医療現場で創傷、火傷、化膿等の皮膚疾患の治療に使われており、医薬品による殺菌消毒と比較して、患部の細菌が早期に消失し、痛み、傷からの悪臭なども消失するという結果が報告されている。（高橋,2003）

しかしマヌカハニー単体が MGO による抗菌作用を示すことは報告されている一方で、創傷治療を目的として固形化した場合にもその抗菌作用が維持されるかについては、十分な研究がなされていない。また、マヌカハニーは流動性が高く、粘性のある液体であるため、持ち運びや使用の面で不便であるという課題がある。

さらに、本抗菌薬は歩き始めて屋外で遊ぶ機会が増える幼児の創傷処置に保護者が使用することを想定している。このような保護者は着替えや軽食、おもちゃなど多くの荷物を持ち歩く場合が多く、創傷処置に用いる製剤も携帯が容易な形状であることが望ましい。そのため、マヌカハニーや液体製剤のように液漏れする心配がなく、蓋を外せば片手でも使用しやすい形状として、小型のリップクリーム型を考えた。

そこで、本研究の目的は、抗菌作用および保湿力をもつマヌカハニーを主成分とするリップクリーム型抗菌薬（以下、抗菌薬）を作製し、その抗菌作用および保湿力について検討するこ

とである。また、本製品は皮膚の創傷部に使用することを想定しているが、使用環境によっては小児が誤って口に運ぶ可能性も考えられるため、食品添加物としての使用例が多くある成分および使用量を用いた。

II. 手法

1） リップクリーム型抗菌薬の作製

表 1 に示した材料を湯煎しながら 3 分間混合した後リップクリームケースに入れ、静置して固化させた。カルナバワックスは手作りリップクリームにおいて硬さの調整に用いられるワックスであり、本研究ではミツロウの硬さを高める目的で添加した。また、界面活性剤である Tween80 を乳化剤として使用した。Tween80 の量は厚生労働省（2007）の基準に定められた量を用いた。

表 1　リップクリーム型抗菌薬の材料と用量

材料名	用量
マヌカハニー	6.0 g
ミツロウ	3.0 g
カルナバワックス	0.75 g
Tween80	46 μL

2） 寒天拡散法による抗菌作用の評価

試験菌は大腸菌（*Escherichia coli*）を用い、LB 寒天培地を使用した。LB 寒天培地は、表 2 の試薬を蒸留水 1 L に添加・溶解し、オートクレーブ滅菌を行った後、シャーレに流し込み固化させたものを使用した。　37℃で 30 分間培養した大腸菌を塗り広げた LB 寒天培地に、陰性対照(大腸菌を LB 寒天培地に塗布した後、試料を設置しない)、陽性対照（マヌカハニーを染み込ませたペーパーディスク)、Tween80 を 46 μL 染み込ませたペーパーディスクを置き、37℃で 15 時間培養した。Tween80 の条件は、抗菌薬の抗菌作用がマヌカハニー由来であることを確認するためである。抗菌薬については、抗菌薬を培地にスタンプする方法と、切断して培地上に静置する方法の 2 通りで、同様に 37℃で 15 時間培養した。

15 時間後、それぞれの培地上に阻止円が形成されているかを観察した。阻止円とは、抗菌物質の周りに形成される、細菌が繁殖していない円状のエリアのことである。試料の周りに阻止円が見られると、その試料に抗菌効果がある可能性が示唆される。

表 2　LB 寒天培地の組成

薬品名	含量(g/L)	製造元
寒天(粉末)	15	関東化学株式会社
極東ペプトン	10	極東製薬工業株式会社
YEAST EXTRACT	5	富士フイルム和光純薬株式会社
NaCl	10	—

－：汎用試薬のため製造元は特定しない。

3） 組成の調整

表 3 のようにミツロウの量のみを変化させて、マヌカハニーの割合を増やした抗菌薬を作成し、同様の方法で抗菌作用を評価した。表 3 において、評価方法の項目は、スタンプした場合を「スタンプ」、切断し静置したものを「切断」と表現した。

表 3　抗菌薬の組成と評価方法

ミツロウ(g)	評価方法
1.5	スタンプ
1.5	切断
0.75	スタンプ
0.75	切断

なお、本研究で使用した実験材料とその製造元は表 4 の通りである。また、本研究で使用する大腸菌は「潜在的危険性のある生物由来物質に関する規定」の「生物由来物質のリスクグループの分類」で BSL-1 に分類される。

表 4　実験材料とその製造元

材料名	製造元
マヌカハニー MGO573＋	Manuka Health NZ Ltd.
ミツロウ(国産ピュア蜜蝋 100 g)	合同会社ミカンハウス
カルナバワックス	株式会社自然化粧品研究所
Tween80	関東化学株式会社

III. 結果

表 1 の条件で混合した抗菌薬は固形化した。抗菌作用の評価の結果は、表 5、図 1 の通りである。

各条件について別日に 3 回実験を行い、いずれも同様の結果が見られた。陰性対照では、大腸菌の全面的な増殖が確認された。陽性対照(マヌカハニーを染み込ませたペーパーディスクを置いた場合)、Tween80 46 μL を染み込ませたペーパーディスクを置いた場合には阻止円が形成された。抗菌薬については、切断し静置した場合にのみ阻止円が観察された。

表 5　抗菌薬における阻止円形成の有無

試料	阻止円形成の有無
試料を設置しない(陰性対照)	―
マヌカハニー(陽性対照)	有
Tween80	有
抗菌薬(スタンプ)	無
抗菌薬(切断し静置)	有

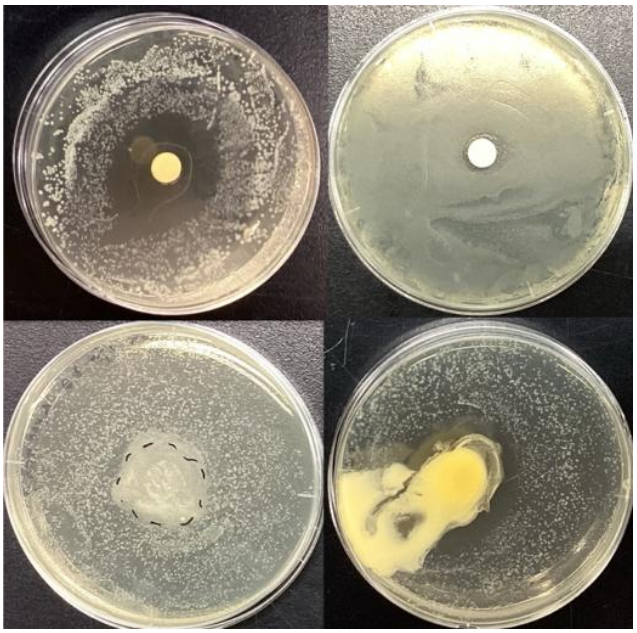


図 1　抗菌薬の抗菌作用の評価
左上 マヌカハニー　　右上 Tween80
左下 スタンプ　　右下 切断・静置

図 1 中の左下の写真の点線は、点線の中に抗菌薬をスタンプしたことを表している。

マヌカハニーの割合を増やした抗菌薬の評価をした結果については、ミツロウが 1.5 g の場合も 0.75 g の場合も、抗菌薬は固形化しなかった。
抗菌作用の評価の結果は、次の表 6、図 2、図 3、の通りである。

表 6　ミツロウ量の変化と阻止円形成の有無

ミツロウ量(g)	評価方法	阻止円形成の有無
1.5	スタンプ	無
1.5	切断・静置	有
0.75	スタンプ	有(1 回目) 無(2 回目)
0.75	切断・静置	有

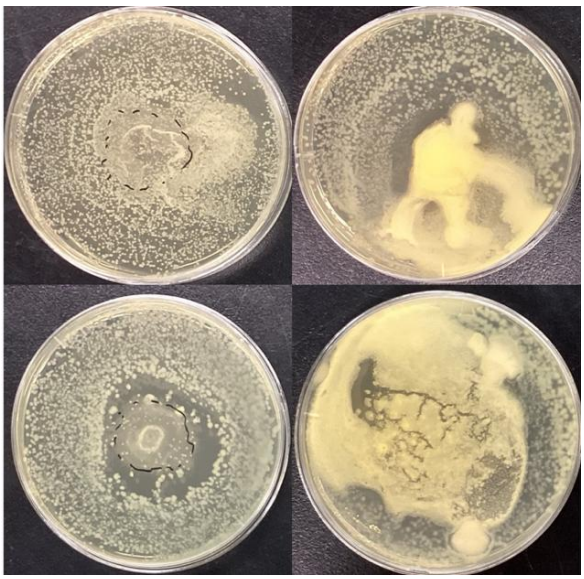


図２　ミツロウ量の変化と阻止円の有無

図２において、
左上：ミツロウ 1.5 g、スタンプ
右上：ミツロウ 1.5 g、切断・静置
左下：ミツロウ 0.75 g、スタンプ
右下：ミツロウ 0.75 g、切断・静置

左上、左下の写真の点線は、点線の中に抗菌薬をスタンプしたことを表している。

また、右下の写真では、抗菌薬が固形化せず流れて広がったため、明確な阻止円の判定は困難となった。しかし流れた抗菌薬の隙間に大腸菌の生育が認められなかったことから、阻止円が形成されていると判断した。

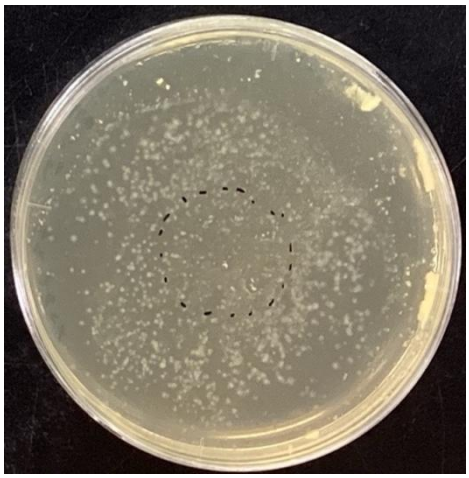


図３　ミツロウ 0.75 g、スタンプの再実験

図３中の点線は、点線の中に抗菌薬をスタンプしたことを表している。

ミツロウ 1.5 g の条件では、スタンプした場合には阻止円が形成されず、切断し静置した場合には阻止円が形成された。ミツロウ 0.75 g の条件では、切断し静置した場合には阻止円の形成が観察できた。スタンプした場合には、初回の実験において阻止円の形成が確認されたが、同一条件で再度実験を行ったところ、明確な阻止円は形成されなかった。しかし図３より、スタンプ部周辺では周囲と比較して大腸菌の生育がやや抑制されている様子が観察された。

IV. 考察

最初に作成した抗菌薬の評価をした図１の結果より、マヌカハニー、Tween80、抗菌薬を切断し静置したものには阻止円が観察できたため、これらは抗菌効果があることが示唆された。
しかし、抗菌薬の阻止円がマヌカハニー単独での阻止円より小さかったことから、マヌカハニーとTween80 による抗菌作用の明確な相加効果は認められなかった。抗菌薬の阻止円が小さくなった原因として、油脂性成分であるミツロウ、カルナバワックスがマヌカハニーを包み込み、寒天培地における拡散を妨げた可能性が考えられる。

また、抗菌薬を LB 寒天培地にスタンプした場合には阻止円が認められなかったのに対し、切断し静置した場合にのみ阻止円が形成された。このことから、後者では抗菌薬内部に培地の水分が浸透し、マヌカハニー中の MGO が溶出して培地中へ拡散した結果、大腸菌の生育を阻止するのに十分な濃度に達したのだと考えられる。さらに、固形の抗菌薬が培地上に存在することで、培地へ供給される MGO の総量が増加し、溶出量が多くなったことが抗菌作用の発現につながったと考えられる。
以上より、本抗菌薬の抗菌効果の発現には水分の存在及び大腸菌の生育を抑制するのに十分な MGO の量が必要であると示唆された。

図１の結果より、抗菌薬を切断して静置した場合には阻止円が形成されたのに対し、スタンプした場合には阻止円が形成されなかったことから、培地へ供給される MGO の量が阻止円形成の有無

に関与している可能性が考えられた。そこで、抗菌薬中の MGO 含有量を増加させることで、スタンプした場合にも阻止円形成が確認されるかを検討するため、マヌカハニーの配合割合を増加させた抗菌薬を作成し、実験 1 と同様の方法で抗菌作用を評価した。

その結果、スタンプした場合にはミツロウ量を 1.5 g とした条件では阻止円が形成されなかったが、0.75 g とした条件では 1 回目の実験において阻止円が形成された。

したがって、0.75 g から 1.5 g 付近の条件でミツロウ量を調整することにより、スタンプした場合においても阻止円が形成される条件が存在する可能性が示唆された。

しかし、阻止円形成を促進する目的でミツロウ量を減らすとマヌカハニーの割合が高まり、MGO の培地への供給量は増加する可能性がある一方で、抗菌薬が固形化しない恐れがある。実際に、後述する固形化の検討結果からは、ミツロウが少なすぎる条件では抗菌薬が固形化しない可能性が示されており、両者を満たす条件について考察を深める必要がある。

次に、抗菌薬の固形化について検討する。ミツロウが 1.5 g および 0.75 g の場合において固形化しなかった要因として、液体成分であるマヌカハニーの配合割合が高かったことに加え、カルナバワックスが作用する対象であるミツロウ量が少なかった可能性が考えられる。よって、抗菌薬の固形化には、ミツロウとカルナバワックスの量のバランスが重要であると示唆された。

V. 結論

本研究では、抗菌作用および保湿力を持つマヌカハニーを主成分とするリップクリーム型抗菌薬を作成し、その抗菌作用を検討した。抗菌作用の評価方法として、抗菌薬をスタンプする方法と、切断して培地上に静置する方法の 2 通りで阻止円形成の有無を観察した。その結果、抗菌薬を切断して LB 寒天培地に静置した条件のみ阻止円が形成され、本抗菌薬が抗菌作用を示すことが確認された。抗菌作用の発現には十分量の MGO が培地上へ拡散することが重要であると示唆された。そこでマヌカハニー配合割合を増加させた場合、ミツロウ量のみを変更し 0.75 g から 1.5 g 付近で調整することにより、スタンプした場合においても阻止円が形成されることが明らかになった。しかし、この条件では、再現性が十分に取れておらず、加えて抗菌薬が安定して固形化しないことが今後の課題となった。

本抗菌薬の特徴の一つである抗菌作用の評価を行ったが、もう一つの特徴である保湿効果については検証を行っていない。したがって、今後は抗菌作用の再現性の向上および固形化条件の検討、保湿効果の定量的な評価を行う必要がある。また、本実験では高校の実験環境の制約上、実際の生体における抗菌作用を直接示したわけではないことと、本来は実際創傷部に存在する黄色ブドウ球菌の抗菌作用を検討することが望ましいが、病原性を有しない大腸菌を使用したことに留意する必要がある。

謝辞

本研究を行うにあたり、授業内外を通して多大なご指導、ご助言を賜りました島田亮輔先生に、心から感謝申し上げます。

併せて、本研究の遂行に対し、多方面にわたるご支援をいただきました生物科教員の皆様に、深く感謝いたします。

文　献

厚生労働省(2007).『ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65 及びポリソルベート 80 の食品添加物の指定に関する添加物部会報告書』

Szilvia Neuhaus,Stefan Brockmann,Sascha Al Dahouk,Ral Dieckmann(2003).Journal of Applied Microbiology.Oxford University Press

高橋襄（2003）.『ミツバチ科学』.玉川大学ミツバチ科学研究所

高野海哉(2015).『培養細胞を用いた過酸化水素による細胞毒性の検討』.東京医療保健大学大学院学位論文