

琉球藍染めの抗菌成分

世嘉良宏斗、湧田裕子、池原幹人*

リュウキュウアイ等の植物に藍色素インディゴとともに含まれている抗菌成分トリプタンスリンについて、藍染めによる布への吸着量を調べたところ、抗菌活性に有効な濃度（0.13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ -布）で存在していることが分かった。トリプタンスリンが含まれている藍染め布は、微生物の生育を阻害することで微生物由来の異臭発生を抑制する効果等が期待できる。また吸着機構について調べたところ、インディゴとの相互作用によってトリプタンスリンの吸着量が増加することも分かった。さらに、トリプタンスリンの藍還元菌に対する影響について調べた結果、発酵建てにおける生育阻害効果はないことを確認した。

1 はじめに

植物由来の色素を用いる藍染めでは染料の製造や染色を伝統的な技法で行うことで合成色素を用いた製品よりも付加価値を高めている。藍染めの染料に含まれる植物由来色素には藍色のインディゴ以外にも赤色や茶色等の成分が微量に含まれており、純度の高い合成インディゴとは異なる藍色を呈する^{1, 2)}。また、藍染めした布には伝承的にいくつかの効能が期待されており、肌荒れや冷え性の改善、防虫効果、抗菌効果、消臭効果等が挙げられている。

藍の効能について科学的な根拠を明らかにするための研究も行われている。例えば、沖縄で藍の原料として利用されているリュウキュウアイ (*Strobilanthes cusia*) は水虫の治療薬としても利用されていたことからその有効成分の研究が行われ、抗菌成分トリプタンスリンが分離・同定されている³⁾。トリプタンスリンはその後、タデアイ (*Polygonum tinctorium*) やタイセイ (*Isatis tinctoria*) といった他の藍含有植物にも含まれていることが明らかとなり³⁾、抗アレルギー作用や抗ガン作用等の様々な生理活性も報告されている^{5, 6)}。

藍染めした布に関しては、インディゴで染めた布に紫外線遮蔽効果があることが報告されているが⁷⁾、トリプタンスリン等の機能性成分が布に含まれているのかどうかや、染めた布の抗菌効果については十分な知見が得られていない。植物原料による藍染め製品の合成インディゴ製品に対する優位性を示すためにはインディゴ以外の植物由来成分が布に存在していることやその機能性を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、藍染めした布に含まれる藍含有植物由来成分を調べるとともに、藍染め製品の機能性について考察した。

2 実験方法

2-1 試料の調製

藍植物の栽培・収穫及び藍染料（泥藍）の製造、藍染め布の調製は藍ぬ葉あ農場にて行った。藍染め布は綿製のガーゼを発酵建てで染色したもの（染色後に酢酸・水道水で洗浄して風乾）から一部を裁断して分析に供した。

2-2 抗菌成分の吸着と分析

トリプタンスリン（抗菌成分）及びインディゴ（色素）の布への吸着（染色）は、炭酸ナトリウム緩衝液（ Na_2CO_3 - NaHCO_3 、pH10）にヒドロサルファイトナトリウム（亜ジチオン酸ナトリウム）8.8 mg/mLと抗菌成分あるいは色素（各2 mg/mL）を加えて調製した液2 mLに1 cm角に裁断した綿製ガーゼを10分間浸した後、空气中で酸化させてからイオン交換水ですすぎ洗いを行い、風乾・調製した。調整した布片に含まれる成分の定量は、布片をジメチルスルホキシド（DMSO）2 mLに浸して40°Cで適宜攪拌しながら2時間加熱したあとで抽出液を分取し、必要に応じてこの抽出操作を1～3回繰り返した抽出液を合わせたものを分析に供した。

抗菌成分及び色素の定量分析はLC/Q-TOFMS Agilent6530で行った。カラムはWaters社製SymmetryC18（3.5 μm 、4.6 \times 100mm）、移動相流速は0.5 mL/分、グラジエントは0.1%ギ酸溶液：アセトニトリル=50：50 → 40：60/0 → 10分で行い、ESI（+）モードで m/z 263（ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、indigo / 保持時間8.1分、indirubin / 保持時間7.1分）及び m/z 249（ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、tryptanthrin / 保持時間5.8分）のクロマトグラムから定量した。

2-3 消臭試験

評価は日本食品分析センターによる脱臭効果試験⁸⁾を改変した方法で行った。すなわち、図1に示すようにコ

*藍ぬ葉あ農場（沖縄県国頭郡本部町字伊豆味508）

ック付テドラーバッグ内に調製した臭気ガスを、評価試料を封入した他方のテドラーバッグへ移して試験を開始し、一定時間経過後に検知管で臭気成分の濃度を測定した。臭気成分はそれぞれ単独で評価を行い、酢酸とイソ吉草酸は40 μL 、アンモニア（0.1%水溶液）は500 μL を添加した（いずれも和光純薬工業、特級）。検知管はガステック社製No.81L（測定範囲：酢酸0.125～25.0 ppm、イソ吉草酸0.35～15.0 ppm）及びNo.3L（アンモニア測定範囲：0.5～78 ppm）を使用した。

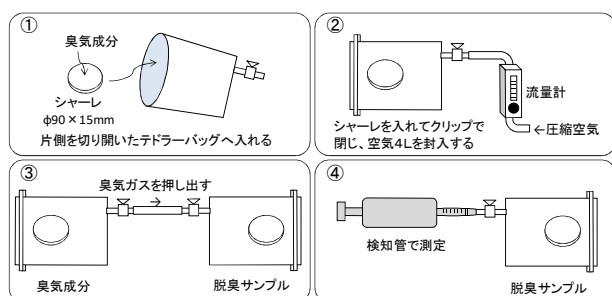


図1 消臭試験法

2-4 微生物生育試験

生育試験は藍還元菌1株（*Alkalibacterium* sp. OITC51-61）と酵母3株（*Saccharomyces cerevisiae* NBRC2043, *Schizosaccharomyces pombe* NBRC1628^T, *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC 1130^T）に対するトリプタンスリンの生育阻害効果を調べた。培地はアルカリ性培地（pH10、藍還元菌用、組成は既報参照^{9,10}）又はYM培地（酵母用、組成：酵母エキス10 g/L、ペプトン20 g/L、グルコース20 g/L）を用いて、トリプタンスリンをDMSOに溶かした液（5 mg/mL）を終濃度10、20、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えて調製し、DMSOだけを添加した試験区も調製した。それぞれの培地へ種菌を1%接種した培養液を30℃で3日間培養（藍還元菌は静置培養、酵母は振とう培養）した後、培地の濁りの有無で生育を判定した。

3 実験結果および考察

3-1 藍染め布に含まれる植物由来成分の分析

リュウキュウアイ等の藍含有植物には抗菌成分トリプタンスリンが含まれているが、これらの植物染料で藍染めした布に含まれる抗菌成分の有無についてはこれまで報告がなかった。トリプタンスリンは水に溶けにくい性質を有し、カルボニル基を有する構造は部分的に藍色素インディゴと類似している（図2）。不溶性のインディゴが藍染めによって布へ浸透・吸着するのと同様にトリプタンスリンが布に定着しているのかを調べた。

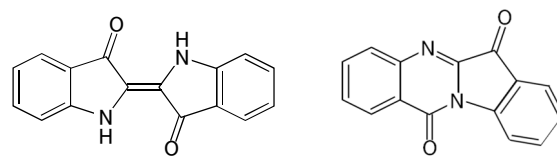


図2 インディゴ（左）とトリプタンスリン

藍染め布はリュウキュウアイから製造した泥藍を用いて発酵建てした液で綿製ガーゼ布を1回染色し、酢酸洗浄及び水道水で洗浄して風乾したものを1cm角に5カ所裁断して抽出・分析し、その平均値を求めた（図3）。

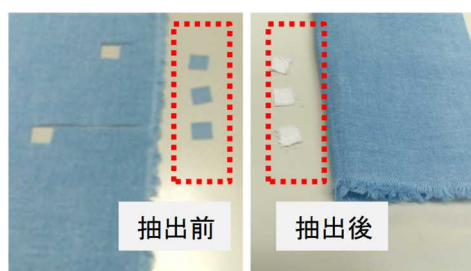


図3 琉球藍染め布

染色した布の一部を切りだしてDMSOで成分抽出した

分析結果を表1に示す。藍染め布には色素成分（藍色のインディゴ、赤色のインジルビン）とともに抗菌成分トリプタンスリンが吸着されていることが確認された。

トリプタンスリンは、食中毒の原因菌である黄色ブドウ球菌（MRSA）に対する抗菌活性（MIC：最少発育阻止濃度＝0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）やアトピー性皮膚炎に関連する微生物（*Malassezia furfur*）に対する抗菌活性（MIC＝4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が報告されている¹¹。今回用いた藍染め布の場合、1 cm^2 （約12 mg）あたり0.03 mL以下の水分量であればトリプタンスリンが4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度となり、1回染めでも抗菌効果が期待できることが分かった。

表1 藍染布（1回染色）に含まれる成分

成分名	$\mu\text{g}/\text{g}$ -布	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ -布
インディゴ （藍色）	15.5	184
インジルビン （赤色）	61.8×10^{-2}	729×10^{-2}
トリプタンスリン （抗菌成分）	11.4×10^{-3}	134×10^{-3}

3-2 抗菌成分の吸着機構

トリプタンスリンの布への吸着がどのように起こるのかを知るために、インディゴ存在下で還元反応を行って布への吸着量を調べた。なお、今回はヒドロサルファイトナトリウムを用いたいわゆる化学建て（化学的な還元方法）で還元反応を行った。

インディゴを還元して水に溶かした溶液を布へ浸透させてから空気酸化することで図4に示すように布へ吸着（染色）することができる。抗菌成分トリプタンスリンについても同様の操作を行ったところ、図5に示すとおり、還元剤の作用により布へ吸着することが確認された（ $0.39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）。さらに、抗菌成分トリプタンスリンをインディゴと混合した液（2成分混合）では、インディゴの吸着量は変化しなかったが、抗菌成分の吸着量は4.2倍に増加していた（ $1.64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）。

以上のことから、抗菌成分トリプタンスリンはインディゴと同様に還元・酸化反応によって布へ浸透・吸着するとともに、インディゴとの相互作用によって吸着量が増加することが分かった。

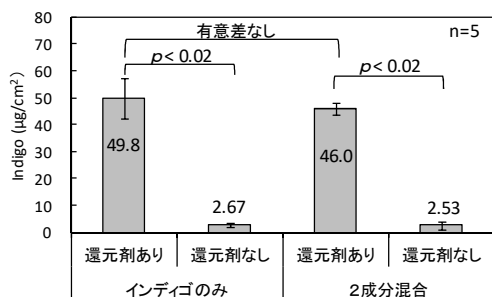


図4 インディゴの布への吸着量
p値：ウィルコクソン順位検定による

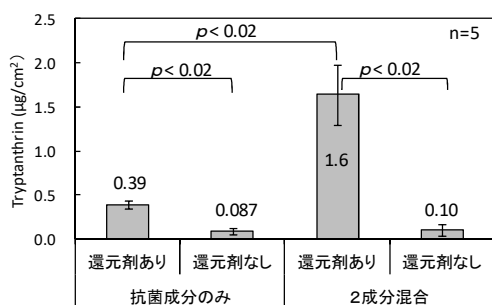


図5 抗菌成分の布への吸着量
p値：ウィルコクソン順位検定による

3-3 藍染め布の消臭効果

藍染め製品は消臭効果も期待されていることから、臭気除去に関する機能について検討した。藍染め布は琉球藍で10回染めたものを5cm角に裁断して用いた。臭気成分は体臭等の不快臭として知られる3種類を使用した。

藍染めした布と染色していない布で2時間後の臭気成分残存率を比較したが、いずれの臭気成分に対しても明確な差は見られなかった（表2）。

以上のことから藍染め製品は抗菌効果によって微生物由来の臭気発生を抑制する効果が期待できるものの、発生した臭気を除去する効果は大きくないことが分かった。

表2 臭気成分残存率 (%)

	酢酸	イソ吉草酸	アンモニア
藍染め布	43	67	78
布(無染色)	42	65	71

3-4 藍還元菌に対する抗菌成分の影響

発酵建てと呼ばれる藍染めでは、微生物機能を利用してインディゴを還元し、布を染めている。この還元能力を有する藍還元菌は抗菌成分トリプタンスリンを含む藍染め液中で生育し、還元機能を発揮する必要がある。抗菌成分トリプタンスリンが藍還元菌の生育にどのような影響を与えるのか調べた。

表3に示すように、トリプタンスリンは3菌株中2菌株の酵母の生育を阻害して抗菌活性を示したが、藍還元菌に対しては高濃度（ $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）でも生育を阻害しないことが分かった。藍ぬ葉あ農場で製造した泥藍（2017年産）を藍染めに使用する濃度（約10%）に調整すると約 $0.47 \mu\text{g}/\text{mL}$ のトリプタンスリン濃度となる。このことから、藍染め液に含まれる濃度のトリプタンスリンでは藍還元菌の生育を阻害しないことが分かった。

表3 トリプタンスリン含有培地での生育試験

微生物名	トリプタンスリン (終濃度、 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	10	20	500
藍還元菌 (<i>Alkalibacterium</i> sp.)	○	○	○
酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	○	○	
酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	○	NG	
酵母 (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)	NG	NG	

○: 生育あり, NG: 生育なし

4 まとめ

発酵建てで藍染めした布を分析した結果、藍含有植物由来の抗菌成分トリプタンスリンが抗菌効果の期待できる濃度で布へ吸着していることを明らかにした。また、トリプタンスリンの布への吸着量は藍染料成分であるインディゴとの相互作用によって増加することが分かった。

藍染め布による明確な消臭効果は認められなかったが、

抗菌効果によって微生物由来の異臭発生を抑制する効果が期待できる。

藍染め布の抗菌効果及び微生物由来の異臭発生抑制効果はトリプタンスリンを含有する植物由来染料を用いることで付与されることから、植物原料による藍染め製品と合成インディゴ製品との異なる機能性を示すことができた。

本研究は、平成30年度企業連携共同研究開発支援事業「琉球藍の消臭効果（2018技016）」で実施した。

参考文献

- 1 川人美洋子, 安川涼子, 天然藍で染めた色と合成藍で染めた色の比較, 繊維と工業, Vol.63, No.2 (2007) 48-53
- 2 牛田智他, 不純物赤色色素を利用した天然藍染色布と合成藍染色布の識別, 日本家政学会誌, 1996, Vol.47, No.10, 1031-1033
- 3 G. Honda, M. Tabata, Isolation of antifungal principle tryptanthrin, from *Strobilanthes cusia* O. Kuntze, *Planta Med.* 1979, 36 (1), 85-90
- 4 G. Honda et al., Isolation of an antidermatophytic tryptanthrin from indigo plants *Polygonum tinctorium* and *Isatis tinctoria*, *Planta Med.* 1980, 38 (3), 275-276
- 5 北原晴男他, 藍由来アトピー性皮膚炎治療薬 Tryptanthrinの免疫応答に及ぼす影響, 天然有機化合物討論会講演要旨集, 2005, 457-462
- 6 K. McClay et al. Indole trimers with antibacterial activity against Gram - positive organisms produced using combinatorial biocatalysis. *AMB Express*, 2015, 5:38, DOI:10.1186/s13568-015-0125-4
- 7 Ajoy K Sarkar, An evaluation of UV protection imparted by cotton fabrics dyed with natural colorants. *BMC Dermatology*, 2004, 4:15, DOI:10.1186/1471-5945-4-15
- 8 日本食品分析センターNEWS, 2007年, No.66
- 9 世嘉良宏斗他, 沖縄県工業技術センター研究報告, 2009, 第12号, 1-4
- 10 H. Yokaryo, Y. Tokiwa, Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2014, 60, 270-275
- 11 J. Kawakami et al., Antibacterial and antifungal activities of tryptanthrin derivatives, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 2011, 603-606