

抗菌加工繊維製品中のヒノキチオール分析法と 光分解による抗菌効果の増強

中 島 晴 信¹⁾, 宮 野 直 子¹⁾, 高 塚 正²⁾, 荒 川 泰 昭³⁾

(¹⁾大阪府立公衆衛生研究所*, (²⁾大阪府立産業技術総合研究所**, (³⁾静岡県立大学***)

Analytical method of hinokitiol contained in antimicrobial-processed textiles and enhancement of antimicrobial effects by photolysis

Harunobu NAKASHIMA¹⁾, Naoko MIYANO¹⁾, Tadashi TAKATUKA²⁾, Yasuaki ARAKAWA³⁾

¹⁾*Osaka Prefectural Institute of Public Health*

²⁾*Technology Research Institute of Osaka Prefecture*

³⁾*The University of Shizuoka*

Since an antimicrobial ingredient of hiba oil (*Japanese cypress* oil), hinokitiol, has a wide antimicrobial spectrum, it has long been added to toothpaste and hair cosmetics. Hinokitiol is approved as a food additive for preservation. Currently, hinokitiol is chemically synthesized. Recently, addition of hinokitiol and hinoki oil, as a safe natural antimicrobial agent, to antimicrobial-processed textiles has rapidly increased. However, patients with allergic disorders caused by hinokitiol and its teratogenicity have been reported, indicating that the safety of hinokitiol has not been sufficiently established. First, we developed an analytical method for measuring the concentration of hinokitiol used in commercially available antimicrobial products. There had been no reproducible methods for analysis of hinokitiol due to its characteristics, such as photodegradability, sublimation ability, and high metal complex formation ability. We established a method for the detection of hinokitiol at a level of $\mu\text{g/ml}$ by HPLC using a photodiode array detector. We also established a method for the extraction of hinokitiol with methanol from fabric samples prepared by treating with hiba oil, and a purification method using sodium dihydrogen phosphate buffer/cyclohexane partition and a C_{18} cartridge column. We examined commercially available textiles with which processing with hiba oil or hinokitiol was indicated by the analytic method, but did not detect hinokitiol in any sample.

To clarify the causes, we produced standard fabric samples by fixing microcapsules filled with synthesized hinokitiol, hinoki oil, or hinoki leaf oil, performed the JIS light fastness test of the fabric samples, and examined the amount of residual hinokitiol at intervals by HPLC. As a result, the major cause of the disappearance of hinokitiol was photolysis. We also examined the antimicrobial activity of hinokitiol by the new agar plate method using gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria *Klebsiella pneumoniae*, and found that the hinokitiol-treated fabric samples after photoirradiation showed higher antimicrobial activity, suggesting that degradation products of hinokitiol by photoirradiation had higher antimicrobial activity. It will be necessary to evaluate the safety of degradation products of hinokitiol by photoirradiation.

*所在地：大阪市東成区中道1-3-69 (〒537-0025)

**所在地：和泉市あゆみ野2-7-1 (〒594-1157)

***所在地：静岡市谷田52-1 (〒422-8526)

最近の清潔志向に伴って、抗菌加工した繊維製品が増えてきている。抗菌剤の中でも、ヒノキチオール (HNと略す) やヒバ油は安全な天然系抗菌剤として製品への使用が急増してきている¹⁻⁴⁾。ヒバ油は、ヒバの心材部を水蒸気蒸留法で抽出して得られる淡黄色透明の精油で、約41種類の構成成分が確認されている。ヒバ油中の代表的な抗菌性成分であるHNは、野副により発見され⁵⁾、七員環炭素化合物 (トロポロン誘導体) の構造を持つことが決定された⁶⁾。現在は天然抽出物だけではなく工業的に合成もされている。HNは、抗菌スペクトルも広いことから、古くから歯磨き剤や頭髮用化粧品に配合されている⁷⁾。また、食品の保存料として既存食品添加物にもなっている⁸⁾。しかし、整髪料や育毛剤中のHNに感作されたアレルギー患者の症例報告^{9, 10)}や、HNによる催奇形性発現報告¹¹⁾もあり、必ずしも安全性が確認された訳ではない。そこで、市販製品中に使用されているHN濃度を調査するための分析法を検討した。HNは光分解性、昇華性、金属との易錯体形成能等の性質をもつため再現性のある分析法はなかった。今回、フォトダイオードアレイ検出による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析法を開発し、市販繊維製品の分析を行ったところ、全ての製品からHNが検出されなかった。そこで、その原因を探るため、マイクロカプセル (MC) 化したヒバ油、合成HN、ヒノキ葉抽出物を付着させた各標準加工布に、JIS (日本工業規格) の耐光試験 (キセノンアーク灯光染色堅ろう度試験) を行い、HNの残存率の経時変化を観察した。さらに、各時点での加工布の抗菌力試験を行い、HNの残存量と比較した。

実験方法

1. 試料

HN又はヒバ油加工と表示の繊維製品5試料を購入し、試験試料とした。

2. HPLC分析

2-1 試薬：HN標準試薬は高砂香料工業製ヒノキチオールSPを、ヒバ油の標準試薬は環境科学開発社製を用いた。標準溶液や試料溶液の希釈には、600 μ Mのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) を溶解した水-メタノール (3:7) 溶液を用いた。メタノール、アセトニトリル、シクロヘキサンは関東化学製のHPLC用を、リン酸二水素カリウム、リン酸二水素ナトリウムは和光純薬製試薬特級を、EDTAは同人化学研究所製試験研究用を用いた。C₁₈ミニカートリッジカラムはウォーターズ社製セブパックプラスを用いた。

2-2 装置及び分析条件：HPLC装置は、ヒューレットパッカード社製HP1100シリーズ (ポンプ、低圧グラジュエント装置、カラム恒温槽、自動注入装置、フォトダイオードアレイ検出器) を、カラムは (財) 化学品検査協会製のL-column ODS (4.6 mm ϕ $\times$ 150 mm) を用いた。移動相はアセトニトリル/20 mMリン酸二水素カリウム (30/70) を、流量1 ml/min、恒温槽温度40℃で流した。注入量は10 μ lにし、240 nmと320 nmの波長で測定した。

3. 標準加工布の作製

①ヒバ油 (ヒバ材の幹や根から抽出したもの)、②HN合成品を鉱石油に溶解したもの、③ヒノキ葉油 (ヒノキ葉を水蒸気蒸留して得た成分) ④鉱石油のみ (対照、ブランク) を、それぞれMC化し、それを繊維に付着させた4種の抗菌加工布を作製した。①ヒバ油は環境科学開発社製のMCを用いたが、②、③および④はMCの作製から行った。

3-1 ヒバ油加工布：ヒバ油を充填したMCと樹脂バインダーを分散させた加工原液を水で希釈し、その希釈液に綿添付白布を浸した後マングルで絞り、絞り率100% (布と溶液の重量比が1:1) に調製する。この布を100℃に設定した熱風循環式ベーキング試験機で1時間乾燥し、MCを布に固着させた。加工原液の希釈倍率が100倍の加工布を1%加工布という。加工原液の希釈倍率を変え、同様に2% (50倍希釈)、4%、8%、16%の加工布を作製した。加工布は加工後すぐに遮光保存した。

ヒバ油、ヒバ油充填MC (ヒバ油をセラミック製MCに充填したもの) 及び加工布作製用原液 (コート剤、重量比でヒバ油充填MC2と樹脂バインダー8を水90に分散したもの) は、環境科学開発社製を用いた。標準加工布作製用添付白布は、(財) 日本規格協会製のJIS染色堅ろう度試験用 (JIS L 0803準拠) 綿 (かなきん3号) を用いた。マングルは、辻井染機(株)製の電動・空気圧式試験用マングルを、ベーキング試験機は (株) 大栄科学精器製作所製を用いた。

3-2 合成HN加工布：鉱石油80 gにHN 1.6 gを溶解し、分散剤46 gを加えた。これに13%壁材溶液400 gと水酸化ナトリウム0.5 gを混合したものを加えた。溶液の液温を20～30℃に保つように氷冷しながら、ホモミキサー（特殊機化製）を用い、回転速度1,200 r.p.mで1時間攪拌して乳化した。粒径は顕微鏡で目視判定した。次に、その乳化液（Emulsion）に硬化剤3.0 gを溶解した水酸化ナトリウム溶液（水40 g、水酸化ナトリウム1.5 g）を加え、液温を40℃に昇温し、カプセル壁材の硬化反応を促進させるために1～2時間保持した。この原液を吸着剤濃度5%、固定剤濃度1%の展着液で5倍希釈し、3-1項で行ったと同様に綿添付白布を浸し、絞り率100%に調製した後乾燥し、MCを布に固着させた。

HNは高砂香料工業製ヒノキチオールSPを、鉱石油は日本石油化学（株）製の日石ハイゾールSAS296を用いた。壁材は日本合成化学工業（株）製 ゴーセノールGL-05Rを、分散剤は住友バイエルウレタン（株）製のスミジュールN-75Sを、硬化剤は油化シェルエポキシ（株）製のエピキュアU（変性脂肪ポリアミン、エポキシ樹脂硬化剤）を、吸着剤はロゼノン102を、固定剤はニッコー技研製の ニッコーソフナCWを用いた。

3-3 ヒノキ葉油加工布：ヒノキ葉油（バイオビコール（株）製 バイオコール油）を、前述の3-2項のHN溶解油と同様にMC化し、展着液（吸着剤と固定剤）を加えて綿添付白布に加工した。

3-4 鉱石油加工布（対照加工布、ブランク）：使用した薬剤等による抗菌効果のバックグラウンドを知るためHN無添加の鉱石油だけをMC化し、同様に綿添付白布に加工した。

4. 標準加工布中のHNの分析

細切した加工布5 gを500 mlナスフラスコにとり、メタノール250 mlを加え70℃で1時間還流抽出した。抽出液をガラスフィルター（G-2）でろ過し、500 mlのナスフラスコにとった。100 mlのメタノールでガラス器具を洗い、洗液はろ液とあわせた。その溶液を5 mlに濃縮し、目盛り付きの10 ml試験管にとった。さらに高純度アルゴンを吹き付けて2 mlに濃縮し、フィルターでろ過して試験溶液とした。濃度が高い場合には希釈してHPLCに注入した。ガラス器具類はすべてEDTA溶液で洗浄し、実験操作は出来る限り遮光して行った。

5. 市販製品中のHNの分析

細切した試料5 gを500 mlナスフラスコにとり、メタノール250 mlを加え70℃で1時間還流抽出した。抽出液をガラスフィルター（G-2）でろ過し、500 mlのナスフラスコにとった。100 mlのメタノールでガラス器具を洗い、洗液はろ液とあわせた。その溶液を10 mlに濃縮し50 ml遠沈管にとる。20 mMリン酸二水素ナトリウム（pH=2.4）15 ml及びシクロヘキサン10 mlを加え5分間振とうし3000 r.p.m.で5分間遠心した。その上澄み液（シクロヘキサン相）を200 mlナスフラスコにとった。さらにシクロヘキサン10 mlを加え同様の操作を2回行った。シクロヘキサンを濃縮し、メタノール10 mlに転溶した。その溶液を、予め調製したC₁₈カートリッジカラムに負荷した。さらにカラムにメタノール20 mlを流しHNを溶出させた。溶出液を10 mlに濃縮し、さらに高純度アルゴンを吹き付けて2 mlに濃縮し、フィルターでろ過して試験溶液とした。前項同様にガラス器具類はすべてEDTA溶液で洗浄し、実験操作は出来る限り遮光して行った。

6. キセノンアーク灯光染色堅ろう度試験（7.5 KW 水冷式、直射法）

JIS L 0843-88 キセノンアーク灯光に対する染色堅ろう度試験方法（ISO 105-B02と同規格）に準じ、強エネルギーキセノンロングライフウエザーマーター SC-750（スガ試験機製）を使用し、ブラックパネル温度63℃、湿度50%、降雨なし、弱エネルギー密度で、作製した標準加工布試料面を30分、1時間及び10時間照射した。

7. 抗菌力試験

新寒天平板法（NAP法）による抗菌力評価を行った。試験菌はグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus* IFO12732）及びグラム陰性菌である肺炎かん菌（*Klebsiella pneumoniae* ATCC4352）の2種類の菌を用いた。

1 試料から0.1 gの試験布を3枚採取し、試料ビンに入れ120℃で15分間滅菌した。試験菌液はニュートリエントブロス（Difco製）を用いて一晩振とう培養した後、100倍希釈して3時間振とう培養した。この培養液を冷却遠心分離して集菌し、その菌を冷却した緩衝生理食塩水で洗浄した。この菌を1%トリプトン溶液で10⁵ cell/mlとなるように調製し

た。

緩衝生理食塩水に寒天末 (NAKARAI TESQ, 半井製薬製) を 1.5% の濃度になるように加え、加熱溶解後、高圧蒸気滅菌し寒天平板を調製した。調製した寒天平板上に試験布を置き、菌液を 0.1 ml 含浸させ、37℃ で 20 時間培養した。試験布からの菌の洗い出しには非イオン界面活性剤の tween 80 (Polyoxyethelene sorbitan monooleate, 片山化学製) を 0.2% 含む滅菌緩衝生理食塩水を用いた。氷冷した 0.2% tween 80 含有滅菌緩衝生理食塩水 10 ml 中に試験布を入れ、フラッシュミキサーで攪拌 (5 秒間, 2 回) した。洗い出した液は滅菌緩衝生理食塩水で段階希釈した後、標準寒天平板で生菌数を測定した。

抗菌力評価には加工布と未加工布とも各 3 枚を使用して、菌数はその平均値をとった。植菌数は未加工布 (2 枚) に菌液 0.1 ml を含浸させた直後に回収した菌数の平均値とした。抗菌力の評価は植菌数を a, 培養後の未加工布の菌数を b, 試験布の菌数を c とすると, $a < c < b$ となれば静菌活性 (Bacteriostatic Activity, SA) とし、式 (1) を用いて算出した。また, $a > c$ となれば、殺菌活性 (Bactericidal Activity, CA) とし、式 (2) を用いて算出した。

$$SA (\%) = \{(b-c) / (b-a)\} \times 100 \cdots (1)$$

$$CA (\%) = \{(a-c) / a\} \times 100 \cdots (2)$$

結果及び考察

1. HPLC 測定

1-1 検出: Fig. 1 に HN の化学構造を示す。HN の分析法としては、化粧品中 HN の分析法報告例が幾つかある。古くは HN と 3 価の鉄イオン錯体発色を利用して、比色定量する方法¹²⁾ が一般的に用いられてきたが、この方法は操作法も煩雑で共存物質の妨害の影響が大きいため HPLC による定量法が検討されてきた。しかし、HN は共存する金属イオンと容易に錯体を形成する¹²⁾ ことなどから、再現性よく良好なクロマトグラムが得られないことが多かった。著者らが検討した装置及びカラムのなかにも良好なクロマトグラムが得られない場合があった。そこで、HPLC の移動相に銅イオンを添加して定量する方法¹³⁾ や、トリフルオロボロンと反応させジフルオロボロン化合物とし定量する方法¹⁴⁾ などが報告されている。しかし、これらの方法も、金属イオンが装置に影響を与えたり、反応操作が煩雑である。繊維製品中の HN を分析するには、測定までの前処理法も必要であり、しかも微量測定が要求される。そこでやはり試験溶液をそのまま HPLC で測定できる方法が望ましい。最近になり、金属イオンの影響の少ない HPLC 装置やカラムが改良されてきている。そこで種々検討した結果、実験の部に記載した装置及びカラムにより比較的良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 2)。又、検出法としてはクロマトグラムピークの同定確認ができるフォトダイオードアレイ検出器を用いた。つまり、HN が極大吸収を持つ紫外部 240 nm 及び 320 nm の波長で定量し、HN と同じ保持時間の試料ピークの波長をスキャンし同定確認することとした。

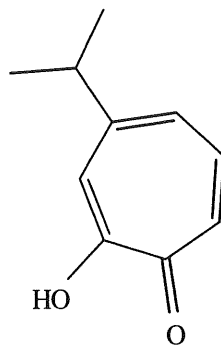


Fig. 1 Chemical Structure of Hinokitiol

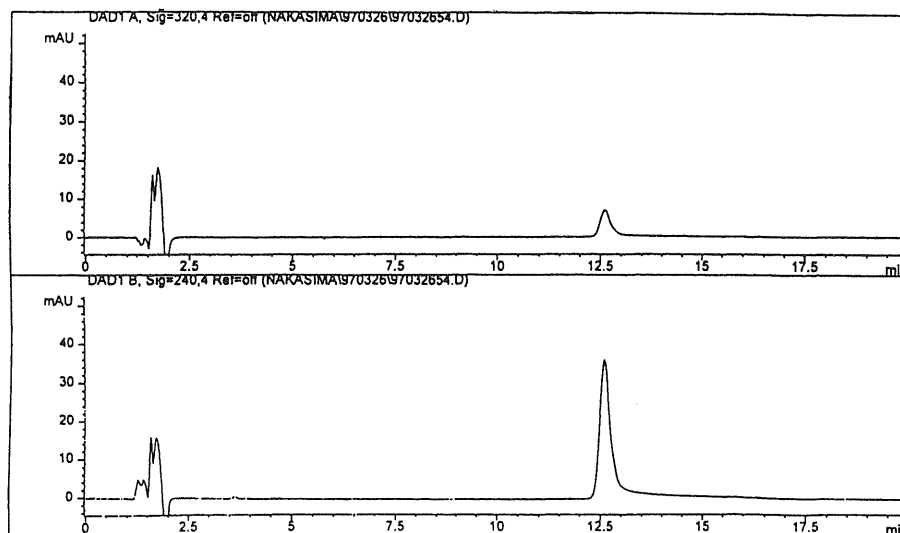


Fig. 2 HPLC Chromatogram of Hinokitiol (100 ng) at 320 nm and 240 nm UV Wavelength

1-2 移動相条件：繊維製品の加工にはHN単独の加工ではなくヒバ油を加工したものが多く考えられる。ヒバ油はセスキテルペン類からなる中性油分と、フェノール類からなる酸性油分から構成されており知られているだけでも41種類はある¹⁵⁾。Fig. 3に中性油分を構成する各物質を、Fig. 4に酸性油分を構成する各物質を示す。HNの含有量はその1~20%といわれている¹⁵⁾。そこでHNを他の成分と相互分離できる移動相条件の検討を行った。ヒバ油1 gをメタノールで100倍に希釈し、波長240 nm及び320 nmにおける他の成分との相互分離を検討した。その結果、前述したHPLC条件により、他の成分の妨害なくHNを相互分離できた (Fig. 5)。このHNと同一保持時間のピークのUVスペクトルはHN標準品と一致した。さらにピークの純度検定を行い、purity factorが98%であり、ほとんど単一品であることが分かった。今回使用したヒバ油中のHN含有量を定量したところ、0.4% (重量比) であった。

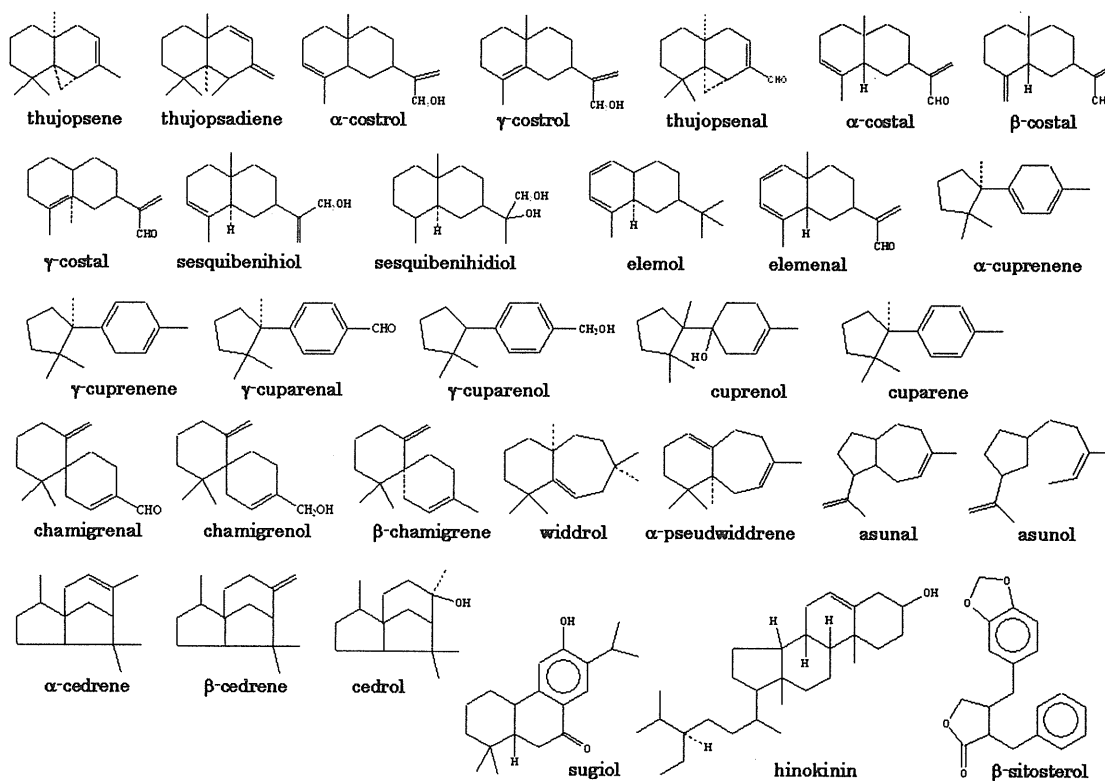


Fig. 3 Neutral Ingredients of Hiba Oil

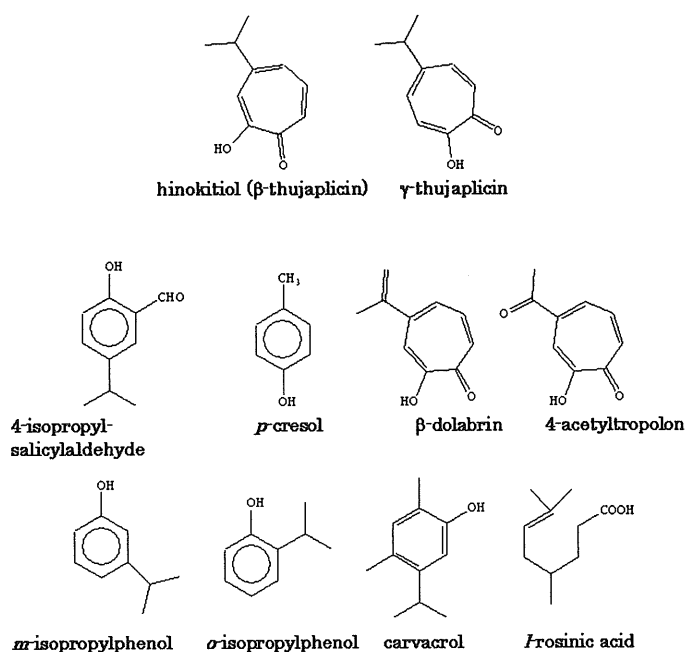


Fig. 4 Acid Ingredients of Hiba Oil

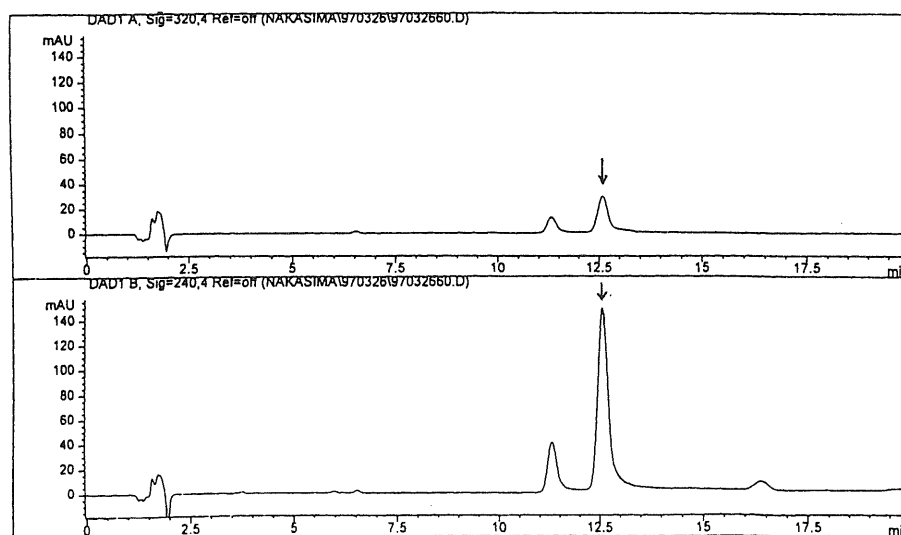


Fig. 5 HPLC Chromatogram of Hiba Oil (100 times dilute solution) at 320 nm and 240 nm UV Wavelength

1-3 検量線：10 $\mu\text{g/ml}$ のHN標準溶液10 μl をHPLCに供し、5回繰り返し実験により精度を求めたところ、波長240 nmでの変動係数はピーク面積で3.1%，ピーク高さで4.3%であり、波長320 nmでの変動係数はピーク面積で3.4%，ピーク高さで4.1%でありいずれもピーク面積のほうが再現性は良好であった。そこで、ピーク面積による検量線を求めたところ2～100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でいずれも良好な直線性を示した ($R^2=0.99$ 以上)。また240 nmでの検出限界はS/N=5として3 ngであり、320 nmでの検出限界はS/N=5として10 ngであった。

2. 分析試料の前処理法

化粧品などのHNの定量にはほとんど前処理法を必要としないが、繊維製品中のHN含有量は化粧品よりも微量で、しかも界面活性剤や染料などの様々な物質が多量に共存していると考えられる。また、繊維に加工する場合ヒバ油などをMCに充填し、それを繊維に付着させるなどの方法をとる場合が多い¹⁵⁾。そこで、標準加工布を作製し、抽出法・精

製法を検討した。

2-1 抽出：まず、ヒバ油充填MC中のヒバ油の重量を求めるために、ヒバ油充填MCをマッフル炉中で灰化し(1100℃, 4時間)、残った無機成分重量を求めたところ48.3%であった(加熱減量法)。この条件では、ヒバ油の99.8%が消失し、セラミック製MCは96%が残存するので、ヒバ油充填MC中のヒバ油重量はほぼ半分である事が分かった。次に、MCからHNを抽出するための抽出溶媒及び抽出法を検討した。メタノール及びアセトニトリルを用い、振とう抽出法、超音波抽出法、環流抽出法(70℃)の三法を比較検討した。その結果、最高の抽出効率、メタノールを用い、70℃、1時間還流抽出した時に得られた。ヒバ油中のHN含有量(0.4%)及びMCの重量から計算すると、その抽出効率は、70-80% (n=5)であった。

2-2 共存極性物質の除去：試料のメタノール抽出液には多量に共存物質が混在する。そこでまず、共存極性物質の除去のための液-液分配法を検討した。HN 10 µg及び100 µgをメタノール10 mlに添加し、20 mMリン酸二水素ナトリウム(pH=2.4)水溶液15 ml及びシクロヘキサン10 mlを加え5分間振とうしたところ70~85%のHNがシクロヘキサン相に移行していることが分かった。そこで、シクロヘキサン-水分配による極性物質の除去を行うこととした。この抽出操作を3回行ったところ、90~98%の回収率が得られた。なお、抽出溶媒としてn-ヘキサン、ジクロロメタンも検討したが、抽出効率はシクロヘキサンが一番良かった。さらに、酸性の水溶液として0.1 M塩酸なども検討したがリン酸二水素ナトリウム(pH=2.4)水溶液と同様の結果であった。

2-3 C₁₈カートリッジカラムによる共存非極性物質の除去：10 µg及び100 µgのHNメタノール溶液1 mlを、予め調製したC₁₈カートリッジカラムに負荷し、カラムにメタノール10 mlずつ100 mlを流し10画分を得た。その結果最初の2画分(20 ml)までにどちらの濃度のHNも100%溶出できた。そこで、メタノール30 mlでカラムからHNを溶出させることとした。

2-4 ヒバ油加工布中のHNの分析：HN 10 µg及び100 µgを添付白布に添加し、実験の章4項に前述した操作を行ったところ、いずれの濃度でも回収率は100%であった。次に、各加工濃度(1%, 2%, 4%, 8%, 16%加工)の布を、同様の操作方法で処理し測定したところ、4~16 µg/gのHNが検出できた(各濃度の試料数n=3)。原液の希釈率とHN濃度は正比例しなかったが、この理由は、加工原液希釈率とMCの布に対する付着率が必ずしも正比例しないためと考えられる。本加工法は実際の市販製品に行われている加工方法及び加工濃度である。この加工布は作製後すぐに遮光保存し、HNの測定を行った。従って、加工後に遮光保存しておいた加工布中には確かにHNが存在することが分かった。

2-5 添加回収実験：Table 4に示す製品No.5(シーツカバー)に4種の標準溶液(10 µg及び100 µgのHN溶液, 10 µg及び100 µgのHNを含有するヒバ油溶液)を添加し、風乾後、実験の章5項に前述した操作法に従って添加回収実験を行ったところ、いずれも10 µg添加で10~14%, 100 µg添加で40~55%の回収率しか得られなかった。また回収率の再現性も良くなかった。各操作段階での回収率は良好なのに、一連の全操作を行うと回収率が悪い。この理由として以下のことが考えられる。①HNは光により短時間で分解しやすい。10 µg/ml溶液の濃度だと調製後の翌日は分解していることもある。しかし、一連の全操作を行うと短時間では処理できず、さらに実験室を完全に遮光して実験することは困難であるためにHNが光分解している。②繊維製品に含有されているHNは微量でしかも共存物質の除去が必要なため、濃縮操作を何回かしなければならぬ。ところが、HNは昇華性があるため(そのため沸点は分からない)、濃縮操作時に損失している。③金属イオンとすぐに錯体を形成してしまうため器具類に残存している微量の金属とも錯体を作って変化してしまっている。従ってこのような試料における低濃度のHNの定量分析はかなり困難である。しかし、濃縮操作を注意して迅速に行えば、10 µg程度のHN定性分析は可能と考えられる。

3. 市販繊維製品の分析

前述の分析操作により市販繊維製品を分析した結果、全製品からHNが検出されなかった。分析製品はTable 4に記載した。HNの定量は難しいが、標準加工布の分析及び添加回収実験結果から考えて、通常の濃度で加工されHNが10 µg以上(製品中の含有濃度になると2 µg/g以上)残存していれば検出は可能である。従って、今回分析した製品は加

工していないか、加工したとしてもHNが消失してしまったものと考えられた。

4. キセノンアーク灯光染色堅ろう度試験によるHNの減少

前述したように、HN加工と表示のある市販繊維製品5試料を分析したところ、すべての試料からHNが検出されなかった。HNは光分解性、昇華性、易錯体形成能の性質を持つ。消失の主な原因を探るため耐光性試験を行い、照射前後の布中HN量を比較した。

まず、加工後すぐに遮光保存しておいた1%加工の①ヒバ油加工布、②合成HN加工布、③ヒノキ葉油加工布、各々3枚の布中のHN量を実験の章4項に記載した方法により定量した。ヒバ油加工布には $5.4 \mu\text{g/g}$ 、合成HN加工布には $45.7 \mu\text{g/g}$ のHNが検出されたが、ヒノキ葉油加工布からは検出されなかった。HNは主に木の根や幹の部分に含有されており、ヒノキ葉油にはもともと含有されていないためと考えられる。

次に、キセノンアーク灯光染色堅ろう度試験（耐光性試験）を30分間行った各々3枚の布中のHN量を定量した。ヒバ油加工布には検出されず、合成HN加工布では $45.7 \mu\text{g/g}$ から $0.4 \mu\text{g/g}$ と激減していた。さらに、1時間と10時間のキセノンアーク灯光染色堅ろう度試験を行った布中のHN量を定量した。これらの照射時間では、全ての加工布からHNは検出されなかった。各々の定量結果をTable 1に示す。

Table 1 Analytical Results of Hinokitiol Residual Amounts in Processed Fabric after Photoirradiation

Photoirradiation time (Xenon lamp)	0 min	30 min	1 hour	10 hours
Hiba Oil	$5.4 \mu\text{g/g}$	N.D.	N.D.	N.D.
Synthetic Hinokitiol	$45.7 \mu\text{g/g}$	$0.4 \mu\text{g/g}$	N.D.	N.D.
Hinoki Leaf Oil	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: Not detected

この結果から、加工布からはHNは速やかに光分解、もしくは昇華によって消失することが分かった。さらに、耐光性試験機（強エネルギーキセノンロングライフウエザーメーター）内の環境温度を測定したところ 29°C であり、MC付着時の 100°C と比べてもかなり低い温度であるため、昇華による消失は少ないと思われる。従って消失原因は主に光分解によるものと考えられる。今回の染色堅ろう度試験での照射条件下の20時間照射は、太陽光による真夏の日中1日分（10時間程度）の自然照射に相当する。従って10時間照射は半日分（5時間）であり、30分照射でほとんど消失するというのは、非常に弱い堅ろう度である。この結果は、市販製品からHNが検出されなかった事を裏付けた。

5. 抗菌力試験

HNは光分解し、加工布中から消失することが分かった。HNの消失により、布の抗菌効果は変化すると考えられた。そこで、照射前後の加工布に抗菌力評価を行った。

5-1 黄色ブドウ球菌に対する抗菌力評価 (Table 2)

Table 2 Antimicrobial Activity Evaluation for Processed Fabrics to *S.aureus* after Photoirradiation

Photoirradiation time (Xenon lamp)	0 min	30 min	10 hour
Hiba Oil	0	0	0
Synthetic Hinokitiol	SA 99%	SA 99%	CA 91%
Hinoki Leaf Oil	0	SA 17%	0
The Mineral Oil (Control)	0	0	0

CA : bactericidal activity SA : bacteriostatic activity

遮光保存の加工布（キセノンアーク灯光未照射の布）の中で、合成HN加工布のみに静菌活性（SA 99%）が認められた。他の加工布には抗菌活性は認められなかった。次に、キセノンアーク灯光染色堅ろう度試験を、30分及び10時間行った加工布に対しても抗菌力試験を行った。染色堅ろう度試験を30分行った合成HN加工布は、行っていない加工布

と同程度の抗菌活性が認められ、さらに10時間行った加工布は殺菌活性 (CA 91%) までに抗菌力が上昇していた。ランプ照射後、HNは残存していないにも拘わらず、ランプ照射後のほうがこの菌に対しては、抗菌力が高くなった。対照加工布 (鉱石油のみの加工布) は、照射後も抗菌活性は認められなかった。つまり、HN以外の使用薬剤の影響で抗菌活性は上昇しないことが分かった。

他の2種の加工布も照射による抗菌力の変化はなく、いずれも抗菌活性は認められなかった。この菌に対しては、ヒバ油やヒノキ葉油に含まれる他の成分の抗菌活性は弱いものと考えられる。

5-2 肺炎かん菌に対する抗菌力評価 (Table 3)

Table 3 Antimicrobial Activity Evaluation for Processed Fabrics to *K.pneumoniae* after Photoirradiation

Photoirradiation time (Xenon lamp)	0 min	30 min	10 hour
Hiba Oil	SA 55%	SA 33%	SA 63%
Synthetic Hinokitiol	SA 39%	0	0
Hinoki Leaf Oil	SA 71%	SA 29%	SA 67%
The Mineral Oil (Control)	SA 23%	0	0

SA : bacteriostatic activity

遮光保存の加工布 (キセノンアーク灯光未照射の布) では、全種類の加工布に静菌活性 (SA 55%, 39%, 71%, 23%) が認められた。対照加工布 (HN無添加油使用加工布) にも認められた。次に、キセノンアーク灯光染色堅ろう度試験を30分及び10時間行ったヒバ油加工布及びヒノキ葉油加工布には静菌活性が残ったが、合成HN加工布及び対照加工布には抗菌活性は残らなかった。弱い抗菌力を示す静菌活性値はデータの再現性も良くないために、明瞭な結論を述べにくい、ヒバ油やヒノキ葉油中の含有成分によって、この菌に対する抗菌力が発揮されているのかもしれない。

5-3 市販抗菌加工繊維製品の抗菌力評価

我々は既に天然系抗菌剤 (HN, キトサン等) 使用と表示がある市販抗菌防臭繊維製品20試料の抗菌力評価を行い、無機系や有機系抗菌剤使用製品と比べて抗菌効果は弱かった事を報告した¹⁶⁾。今回、同じNAP法で、分析試料 (HN加工と表示があるが、HNは検出されなかった5製品) の抗菌力評価も行った。その結果、1製品 (便座カバー) は黄色ブドウ球菌に対し、非常に強い抗菌活性 (CA 100%) を示した (Table 4)。この製品にはHN以外の抗菌剤の表示はなかった。この原因は判明しないが、他の使用薬剤によって抗菌力が発揮されているのか、もしくは、HNの光分解物が抗菌活性を発揮していることも一因として考えられる。

Table 4 Antimicrobial Activity Evaluation for Marketing Antimicrobial/Deodorant Processed Textile Products (There was a label, when these products were processed using hinokitiol)

Sample	Material	Labelling	SEK mark *	<i>S.aureus</i>	<i>K.pneumoniae</i>
1 Underwear (for babies)	Cotton	Antimicrobial/insecticidal processing, Hinokitiol	Not indicated	SA 42%	SA 28%
2 Socks	Cotton, Acryl	Antimicrobial/deodorant processing, Hinokitiol	Not indicated	SA 99%	SA 60%
3 Toilet seat cover	Nylon, Polyurethane	Antimicrobial/deodorant processing, Hinokitiol	Indicated	CA 100%	SA 35%
4 Dish towel	Acryl 85% Nylon 15%	Antimicrobial/deodorant processing, Hinokitiol	Indicated	SA 39%	SA 49%
5 Bedding cover	Cotton	Antimicrobial/insecticidal processing, Hiba oil	Indicated	0	0

CA : bactericidal activity SA : bacteriostatic activity

* SEK mark : A designated label used with permission of Japanese Association for the Function Evaluation of Textiles (JAFET).

今回の実験結果からHNは速やかに光分解するが、分解の程度や細菌の種類によっては、逆に抗菌活性が高くなることが示唆された。現在までHNの抗菌効果^{15, 17-20)}や毒性発現^{9-11, 21, 22)}に関して多くの報告がある。その抗菌性を利用して食品添加物にも許可されているが⁸⁾、食品中のHNも速やかに光分解するとの報告²³⁾もある。しかし、光分解産物と抗菌活性の関連性を述べた報告や、光分解で抗菌活性が上がったとの報告は見あたらない。HNによる抗菌力や毒性の発現メカニズムを、光分解産物も含めて詳細に解明していくことが、今後の課題として残された。

文 献

- 1) Nakashima, H., Ohmori, Y., Isama, K., Matsunaga, I., Miyano, N., Asano, Y., Teraji, Y. and Kaniwa, M. (1998): Studies on evaluation of antimicrobial/deodorant agents, Establishment of research method and research results of commercially available products, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 44(2), 138-149.
- 2) 中島晴信 (1998), “抗菌のすべて, 基礎編, 第13章 (13-3)” : 抗菌加工剤の使用実態 - 大阪府における調査結果から -, 繊維社 (大阪), pp360-pp374.
- 3) Nakashima, H., Matsunaga, I., Miyano, N., Miyauchi, R., Serikawa, H., Masuda, Y., Isama, K., Ikarashi, Y. and Kaniwa, M. (2000): Studies on evaluation of antimicrobial/deodorant agents: Marketing research on antimicrobial/deodorant in Osaka Prefecture (from 1991 to 1999). *Bulletin of Osaka Prefectural Institute of Public Health*, 38, 21-32.
- 4) 中島晴信 (2003) : 平成14年度厚生労働科学研究分担研究報告書 (食品・化学物質安全総合研究事業), 抗菌製品による健康障害の原因究明と未然防止のための製品表示法の評価に関する研究.
- 5) Nozoe, T. (1936): Uber die farbstoffe im Horzteil des “Hinoki” baums. I. Hinokitin und hinokitiol, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 11, 295-298.
- 6) 野副鉄男, 桂 重雄 (1944) : HNの構造に就いて, 薬誌, 64, 181-185.
- 7) 化粧品原料基準 第二版 注解, (1984).
- 8) 俣野和夫編 (1991) : 化学的合成品以外の食品添加物リスト注解書, p.142, 日本食品添加物協会.
- 9) Fujita, M. and Aoki, T. (1983): Allergic contact dermatitis to pyridoxine ester and hinokitiol, *Cont. Dermat.*, 9, 61-65.
- 10) 細野久美子, 脇田素子 (1997) : 育毛剤中のHNとパントテニルエチルエーテルによる接触皮膚炎の2例, 皮膚, 39(1), 42-47.
- 11) Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y., Nagasawa, A., Ogawa, H., Yasuda, K. and Aoki, N. (1999): Teratogenicity of thujapulicin in ICR mice, *Fd. Chem. Toxicol.*, 37, 1097-1104.
- 12) Maclean, H. and Gardner, J.A.F. (1956): *Anal. Chem.*, 28, 509.
- 13) 花房文人, 中村 淳, 梶野清作, 太田忠男 (1989) : 高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中のHNの定量, 分析化学, 38, 124-128.
- 14) Endo, M., Mizutani, T. and Matsumura, M. (1988): High-performance liquid chromatographic determination of hinokitiol in cosmetics by the formation of difluoroborane compounds, *J. Chromatogr.*, 455, 430-433.
- 15) 岡部敏弘, 斉藤幸司 (1993) : 青森ヒバ油の繊維への応用, 加工技術, 29, 689-693.
- 16) Miyano, N., Nakashima, H. and Matsunaga, I. (1999): Evaluation of antibacterial activity for antimicrobial/deodorant processed textile products using natural ingredients. *Bulletin of Osaka Prefectural Institute of Public Health*, 37, 23-26.
- 17) Okabe, T., Saito, K. and Ohtomo, Y. (1988) : 木材成分HNの物理化学的性状と抗菌作用, *Food Chemical*, 2, 45-52.
- 18) Okabe, T., Saito, K. and Ohtomo, Y. (1990) : 木材成分HNの保存剤としての利用について, *Food Chemical*, 5, 40-46.

- 19) Okabe, T., Hiraoka, K., Saito, K. and Iinuma, K. (1992) : 木材抽出成分青森産ヒバ油の心理的ストレス緩和効果, *Fragrance J.*, 8, 106 - 111.
- 20) Saito, K., Okabe, T., Fukui, T. and Inamori, Y. (1997) : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する HN の抗菌活性 (第2報), *Mokuzaigakkaishi*, 43, 882 - 891.
- 21) Inomata, Y., Tsujibo, H., Ohishi, H., Ishii, F., Mizugaki, M., Aso, H. and Ishida, N. (1993): Cytotoxic effect of hinokitiol and tropolone on the growth of mammalian cells and on blastogenesis of mouse splenic T cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 16 (5), 521 - 523.
- 22) Noda, T., Yamano, T. and Shimizu, M. (1998): Allergenicity evaluation of chemicals for use in household products (III): Contact allergenicity of TPN, BIT, HICHO and DAHQ in guinea pigs. *Annual Report of Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences*, 60, 32 - 42.
- 23) Ogawa, H., Katsuki, Y., Suzuki, K., Matsumoto, H., Suzuki, J., Yasuda, K. and Tomomatsu, T. (1997): Analysis of hinokitiol in food, *Annual Report of The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health*, 48, 129 - 134.