

白癬菌に対する木酢液の発育抑制・殺菌作用

渡邊久美, 住吉和子, 金子典代, 横田憲治¹⁾, 川田智恵子

要 約

足白癬は糖尿病患者で合併しやすく, 高齢者にも多発する。近年, 白癬菌に対する木酢液の抗菌作用が知られており, この最適有効濃度を明らかにするため本研究を企画した。白癬菌は *Trichophyton mentagrophytes* と *Trichophyton rubrum* の2菌種を用い, 木酢液は市販品を用いた。発育抑制テストは終濃度2, 3, 4, 5%の木酢液を含んだ寒天平板希釈法で行った。殺菌テストは2.5, 5, 10%溶液を胞子と接触後, 寒天平板培地に接種し, 菌の発育の有無を観察した。発育抑制作用は, 両菌種とも3%以上で7日培養後の菌糸の発育は見られなかった。殺菌作用は, *T. mentagrophytes* では10%, 5%においては6時間接触で, 2.5%においては24時間接触で菌糸の発育が見られず, *T. rubrum* では, 10%以上においては24時間接触で, 5%においては48時間接触で菌糸の発育が見られなかった。足浴等の看護ケアに木酢液を応用するためには, 今後より短時間の接触で効果が得られる方法の検討が必要である。

キーワード: 木酢液, 白癬菌, 発育抑制作用, 殺菌作用, 足部白癬

緒 言

日本医真菌学会疫学調査委員会の調査(1995)によれば, 皮膚真菌症総数のうち白癬患者は88%を占めている。なかでも, 白癬の病型別では足白癬が3分の2弱を占め, 次いで爪白癬, 体部白癬となっており, 全体に罹患年齢の分布が高年齢層に増加している¹⁾。更に, 皮膚科受診患者約2万例の無作為抽出調査では, 足にトラブルを持つ患者は64.6%で, そのうち足・爪白癬患者は40%にも及ぶ²⁾。

このように罹患率の高い白癬であるが, 治療として抗真菌剤の効果が認められているものの, 治療におけるコンプライアンスが低いこと³⁾, 一旦治療しても再発を繰り返すこと^{4,5)}などの問題から完治が難しい。特に, 治癒後の再発率が非常に高い点において継続的に行える効果的なケア方法の開発が重要である。

薬剤以外に白癬菌に対して効力を有するものとして, これまで緑茶を用いた清拭や足浴が白癬に有効であるとの研究や, 木酢液の白癬菌に対する殺菌能が報告されている。しかし, これらの基礎実験についての報告は少なく, 実際の白癬患者に対する有効

濃度や接触時間を設定するための根拠となるデータは存在しない。

これらの経過をふまえて, 本研究は足白癬の患者に木酢液を用いたケアの際の指標とするために, 木酢液の白癬菌に対する発育抑制作用及び殺菌作用について明らかにすることを目的として, 最適有効濃度の基礎的検討を行った。

方 法

1. 材料と方法

1) 菌株

白癬菌は千葉大学真菌センターより分与された *Trichophyton mentagrophytes* (IFM5214) と *Trichophyton rubrum* (IFM41012) を用いた。

2) 木酢液

市販の「蒸留・精製木酢液」(Aprot社, 神奈川)を, 用時希釈して用いた。本標品はアセトアルデヒド, ホルムアルデヒド, メタノール, タール他の有害物質が蒸留・精製により除去されている。

3) 菌 (分生子) の調整

Trichophyton は, 山口らの方法⁶⁾により調整した。Sabouraud glucose 寒天斜面培地に37°C, 10日間培養し, 0.05% Tween80 添加生理食塩水を加え, 白金耳でこすりながら分生子を遊離, 浮遊させた。この浮遊液を滅菌ガーゼで濾過し, 寒天片を除去した後, 比濁計 (530nm) を用いて菌液を調整した。90% 透過度を 10^{6-7} cell/ml とし, これを用時希釈して用いた。

4) 発育抑制及び殺菌テスト

発育抑制及び殺菌テストには Sabouraud 変法培地を用いた。発育抑制テストに用いた培地の生成は, 蒸留水1000ml 中に glucose 40g, pepton 5g, east extract 5g, agar 15g を加えたものである。適宜, 木酢液を用時希釈して, Sabouraud 変法寒天培地中に 0% (control), 2%, 3%, 4%, 5% になるよう調整した。これらの平板上に $1 \times 10^{6-7}$ /ml に調整した菌液を $5 \mu\text{l}$ ずつ 5 個所にスポット法によって接種し, 30°C 培養で4日後にコントロール群が十分に発育したことを確認した後判定した。

殺菌テストには, 寒天以外の成分を 2 倍濃度に調整した Sabouraud 変法液体培地に 2×10^5 /ml の分生子を浮遊させたものと 2.5, 5, 10% 濃度の木酢液を同量混和した後 30°C で培養し, 経時的に Sabouraud 寒天平板培地に $5 \mu\text{l}$ ずつ 5 個所に spot して菌の発育の有無を観察した。

結 果

1. 白癬菌に対する木酢液の最小発育阻止濃度

木酢液添加寒天培地上に, *T. mentagrophytes* 及び *T. rubrum* $1 \times 10^{6-7}$ /ml の分生子浮遊液を $5 \mu\text{l}$ ずつ 5 個所に spot し, 30°C 培養した結果を, 表 1 に示す。コントロールでは肉眼で 3 日目に菌糸の発育が観察されたのに対して, 木酢液混入培地では, 3% 以上では, 両菌種ともに 7 日培養で菌糸の発育は見られなかった。

2. 白癬菌に対する木酢液の殺菌作用

木酢液添加液体培地中に *T. mentagrophytes* $1 \times 10^{6-7}$ /ml の分生子浮遊液を加え, 経時的に $5 \mu\text{l}$ ずつ Sabouraud 寒天平板培地の 5 個所に spot し, 30°C 培養した結果を表 2 に示す。コントロールでは, 48 時間接触で 2 日目から, 20分接触で 3 日目から, 菌糸の発育が観察された。木酢液添加液体培地への接触では, 5% 及び 10% で, 6 時間接触した場合に 4 日目以降の菌糸の発育は見られなかったが, 2.5%

Table 1. Antifungal activities of Mokusaku-Eki

| Concentration of Mokusaku-Eki (%) | Mokusaku Eki (%) | | | | |
|------------------------------------|------------------|---|---|---|---|
| | 0 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | + | + | - | - | - |
| <i>Trichophyton rubrum</i> | + | + | - | - | - |

observed for 7 days (+); growth, (-); no growth

Table 2. Fungicidal activity of Mokusaku-Eki to *Trichophyton mentagrophytes*

| Concentration of Mokusaku-Eki (%) | Growth (days) | Contact time (hrs) | | | | |
|-----------------------------------|---------------|--------------------|---|---|----|----|
| | | 0.33 | 1 | 6 | 24 | 48 |
| 0 (control) | 2 | - | - | - | - | + |
| | 3 | + | + | + | + | + |
| | 4 | + | + | + | + | + |
| 2.5 | 2 | - | - | - | - | - |
| | 3 | + | + | + | - | - |
| | 4 | + | + | + | - | - |
| 5 | 2 | - | - | - | - | - |
| | 3 | + | - | - | - | - |
| | 4 | + | + | - | - | - |
| 10 | 2 | - | - | - | - | - |
| | 3 | + | - | - | - | - |
| | 4 | + | + | - | - | - |

(+); growth, (-); no growth

Table 3. Fungicidal activity of Mokusaku-Eki to *Trichophyton rubrum*

| Concentration of Mokusaku-Eki (%) | Growth (days) | Contact time (hrs) | | | | |
|-----------------------------------|---------------|--------------------|---|---|----|----|
| | | 0.33 | 1 | 6 | 24 | 48 |
| 0 (control) | 2 | - | - | - | - | + |
| | 3 | + | + | + | + | + |
| | 4 | + | + | + | + | + |
| 2.5 | 2 | - | - | - | - | + |
| | 3 | + | + | + | - | - |
| | 4 | + | + | + | + | + |
| 5 | 2 | - | - | - | - | - |
| | 3 | + | + | + | - | - |
| | 4 | + | + | + | + | - |
| 10 | 2 | - | - | - | - | - |
| | 3 | + | + | + | - | - |
| | 4 | + | + | + | - | - |

(+); growth, (-); no growth

では24時間接触させなければ 4 日目以降の菌糸の発育を阻止できなかった。

同様に, *T. rubrum* $1 \times 10^{6-7}$ /ml の分生子浮遊液を加え, 経時的に $5 \mu\text{l}$ ずつ Sabouraud 寒天平板培

地の5個所にspotし、30℃培養した結果を表3に示す。コントロールでは *T. mentagrophytes* の場合と同様、48時間接触で2日目から、20分接触で3日目から菌糸の発育が観察された。木酢液添加液体培地への接触では、5%で、48時間接触すると菌糸の発育は見られず、10%では24時間接触で菌糸の発育が見られなかった。

考 察

木酢液の白癬菌に対する発育抑制作用及び殺菌作用が本研究でも実証された。本研究の研究方法について、通常30℃での培養が一般的とされている真菌の培養温度を、山口らの方法にならない37℃としたが、これは以下の理由による。すなわち、白癬菌を経代培養により菌を発育させることが目的であり、より活性化した菌を実験に供与するための初回培養を目的とし、また、白癬菌は30℃より37℃培養が菌糸の発育が良好であること等によるものである。

木酢液の真菌に対する有効成分については、池上による *T. mentagrophytes* に対する活性を指標とした研究において、木酢液原液の抗真菌活性成分は炭焼きの副産物として産生された artifact のフェノール化合物であり、主な抗真菌活性成分は2-methoxyphenol 誘導体であると推測されている⁷⁾。木酢液の活性は、miconazole (1000 μ g/ml) より劣る弱い活性であるが、入浴や足浴時に簡便に利用することが可能なため、今後の看護ケアに大きな期待が持てる。これまでの看護ケアにおいては緑茶を用いた入浴や清拭の効果が報告されており⁸⁾、またカテキンの発育抑制・殺菌作用についての基礎研究も行われている⁹⁾。しかしながら、木酢液の臨床応用は行われておらず、臨床への導入のためには基礎研究として白癬菌に対する有効濃度を明らかにする必要があると考え、本研究で明らかにした。その結果、発育抑制作用については、3%以上で有効であることが示され、殺菌作用においては、最短時間でも *T. mentagrophytes* において5%濃度で6時間の接触時間を必要としていることが明らかとなった。足浴への応用を考えると、まず、本研究で用いたAprot社製の標品は、入浴時に0.0002%程度で用いることが推奨されている。また、所要時間を考慮すると、6時間の接触時間は現実的に不可能である。今後は、低濃度及び短期の接触時間で皮膚への吸収率を向上させる方法を考案する必要がある。

この一方法としては、近年、イオントフォoresisという方法によって薬物の経皮吸収率を上げる研究

が盛んであり¹⁰⁾、この方法を用いて薬物の経皮的な吸収率を向上させることで、短時間で症状への効果が得られる可能性がある。また、これらの結果を基にした臨床事例の蓄積も必要である。

菌種別では、発育抑制作用における差は見られなかったが、殺菌作用においては *T. rubrum* の方が抵抗性を示した。抵抗性の菌種による差異については、木炭に用いる木の種類によると考えられる。本研究では1種数の木酢液標品を用いたのみであるが、岩垂は、「木酢はその成分が樹木によって全く異なっているため、水虫には広葉樹がよいか、針葉樹がよいか、(中略)竹がよいかという研究も必要である」と述べている¹¹⁾ことから、今後、より白癬菌に効力のある木酢液について検討の必要があると考えられた。

結 論

1. 本研究で用いた木酢液の *T. mentagrophytes* と *T. rubrum* に対する発育抑制作用濃度は、両菌種とも3%以上であった。
2. 殺菌作用は、*T. mentagrophytes* では、6時間接触すると10%及び5%木酢液で菌糸の発育が見られず、24時間接触すると2.5%では菌糸の発育が見られなかった。また、*T. rubrum* では、24時間接触すると10%以上で菌糸の発育が見られず、48時間接触すると5%で菌糸の発育が見られなかった。
3. 足浴等の看護ケアに木酢液を応用するためには、今後より短時間の接触で効果が得られる方法の検討が必要であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、白癬菌を患与していただきました千葉大学真菌医学研究センター横山耕治先生に深謝いたします。また、実験を御指導いただきました元岡山大学大学院医歯学総合研究科助手藤浪良仁先生に深謝いたします。なお、本研究の一部は、文部科学省科学研究費の補助(14771370)によるものである。

文 献

- 1) 笠井達也：1996年次皮膚真菌症疫学調査成績。日医真菌会誌，41(3)：187-196，2000。
- 2) 渡辺晋一，西本勝太郎，浅沼廣幸，楠 俊雄，東 禹彦，古賀哲也，原田昭太郎：本邦における足・爪白癬の疫学調査成績。日皮会誌，111(4)：2101-2112，2001。
- 3) 福田知雄：爪白癬 多様化してきたその治療法。日医

- 真菌会誌, 43(2): 85-89, 2002.
- 4) 榎村浩一: 白癬の再発・再感染について. 日本医事新報, 3867: 37-41, 1998.
 - 5) 富澤尊儀: 薬剤の臨床 浅在性白癬治療後に見られる再発・再感染の問題. 診断と治療, 86(4): 618-626, 1998.
 - 6) 山口英世: 抗真菌剤の感受性試験. 検査と技術, 17: 889-894, 1989.
 - 7) 池上文雄, 関根利一, 藤井祐一: 木酢液の抗真菌活性成分. 薬誌, 118(1): 27-30, 1998.
 - 8) 加藤由紀子, 石内智子, 浦むつ江, 中川利子: 抗白癬菌に注目した緑茶入浴・清拭の検討. 日看会第27回集録 看護総合, 47-49, 1996.
 - 9) 久保幸枝, 戸田真佐子, 原 征彦, 島村忠勝: 白癬菌に対する茶およびカテキンの抗菌・殺菌作用. 日細菌誌, 46(2): 509-514, 1991.
 - 10) 田代芳一, 佐味麻里, 七辺省三, 加藤泰己, 早川栄治, 伊藤邦雄: イオントフォレシスによる経皮吸収に及ぼす薬物の脂溶性及び極性表面積. Drug Delivery Syst, 16(5): 419-423, 2001.
 - 11) 岩垂荘二: くん液の新規利用. 木酢液の活用と課題 (日本樹木協会編), 54-60, 日本木酢液協会: 東京, 1996.

Antifungal effect of “Mokusaku-Eki” against *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*

Kumi WATANABE, Kazuko SUMIYOSHI, Noriyo KANEKO,
Kenji YOKOTA¹⁾ and Chieko KAWATA

Abstract

The Mokusaku-Eki is a kind of pyroligneous acid and a dark brown colored solution which obtained from the charcoal burner of *Quercus* spp. woods as a by-product. In Japan, the antifungal effects of this solution are well known in public. However, it is not clear that minimal inhibitory concentration (MIC) of Mokusaku-Eki against *Trichophyton* spp. In this study, we examined their antifungal activities in view of MIC and germicidal effect. To examine MIC of Mokusaku-Eki against *Trichophyton* spp, agar, dilution assay were used. Sabouraud agar plates containing 2%, 3%, 4%, or 5% of Mokusaku-Eki were prepared. Then the spores of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* inoculated onto each agar plate respectively and incubate the plates at 30 °C. The growth of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* were completely inhibited on the agar plates contained more than 3% Mokusaku-Eki. Furthermore, we investigated the fungicidal effect of Mokusaku-Eki against these fungus. We exposed the spores of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* respectively to 2.5%, 4% or 10% Mokusaku-Eki for 20 min, 1 hr, 6 hr, 24 hr, and 48 hr, and then inoculated them onto Sabouraud agar plates. Exposures of the spores to 5% of the Mokusaku-Eki for 24 hr and 48 hr completely killed them and we could show that Mokusaku-Eki have also germicidation activity against both *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*.

Key Words : Mokusaku-Eki, Trichophyton, Antifungal effect, Trichophytosis

Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, Okayama University Medical School

1) Department of Bacteriology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry