

イチヨウ葉の抗菌性に関する研究

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部

永富 一紗 松原 政脩

1. 研究の背景と目的：

秋には園芸高校のメインストリートをイチヨウの落葉が黄色に染めている。近年、イチヨウ葉エキスが認知機能向上効果など健康効果を謳っている広告をよく目にする。身近に材料が手に入ることもあってイチヨウ葉エキス成分の機能性をしらべ健康効果を検証したいと考えた。機能性の一つである抗菌性について調べた結果を報告する。

2. 実験材料：

2カ年のイチヨウ落葉を入手し天日干しで令和4年1月まで乾燥した。令和2年11月収穫物をA(図1)、令和3年11月収穫物をB(図2)とした。



図1 イチヨウ葉 A 図2 イチヨウ葉 B

3. 試料作成

材料A、Bをミニブレンダー(大阪ケカル製)で粉体化(図3)し、各粉体10gを溶媒50mLに懸濁し、24時間振とう(6℃、120rpm)しエキスの抽出を試みた(図4)。抽出溶媒は10mM酢酸バッファー(1)、50%エタノール(2)、50%メタノール(3)の3種類を用いた。抽出液を濾過、遠心分離(3000rpm)を行い(図5)、上清を無菌濾過(0.45μm mesh)し試料とした(図6)。



図3 材料の粉体化



図4 2種材料及3区分溶媒の混合



図5 遠心分離後の上清と沈殿

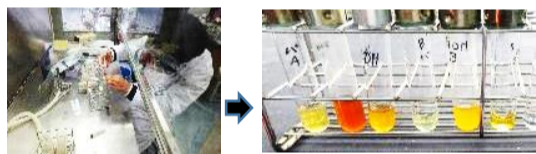


図6 無菌濾過し作成されたイチヨウ葉エキス抽出液

4. イチヨウ葉エキスの抗菌活性試験

準備：試料 区分：A1、B1、C1、A2、B2、C2、A3、B3、C3
イチヨウ葉(A、B)を溶媒3種(1、2、3)で抽出したエキス、Cは各溶媒(コントロール)。
培地 ミューラーヒントン培地
検定菌 3種(コクリア菌、大腸菌、枯草菌 NBRC標準株—図7) 培養液

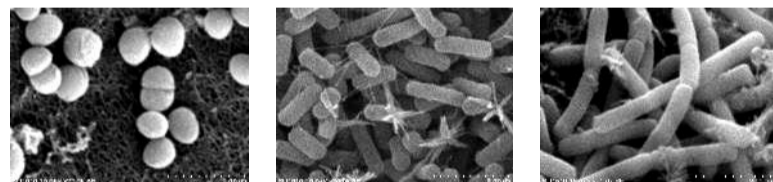


図7 検定菌細胞像(SEM: ×10K)
(左図:コクリア菌、中央図:大腸菌、右図:枯草菌)

方法：シャーレ3枚に溶解培地を流し込み固化した。3種検定菌培養液100μLを添加しコンラージ棒で塗抹した。ストロー(φ6mm)で培地寒天を削り抜き穿孔を9か所作成した(図8)。各穿孔に試料を30μL注入した。30℃で48時間正置培養した。

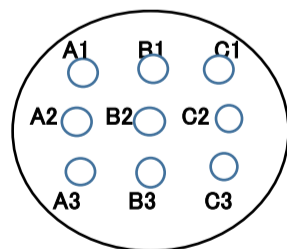


図8 試料を注入する穿孔位置

結果と考察：

培養後の観察(図9)から阻止円の有無(+、-)、その直径(mm)を計測し表1に纏めた。

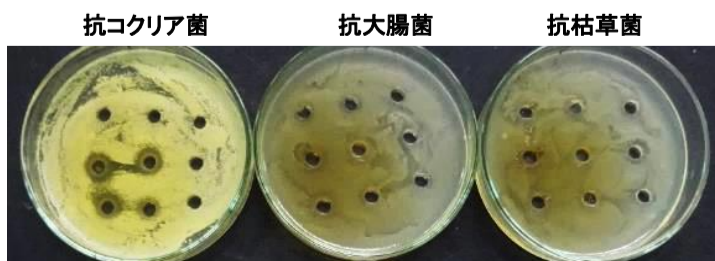


図9 イチヨウ葉エキスの抗菌活性試験

表1 イチヨウ葉エキスの抗菌活性試験(阻止円直径 mm)

試料種類・溶媒	検定菌			
	コクリア菌	大腸菌	枯草菌	
イチヨウA 1	-	+7.5	+9.0	
" 2	+11.0	+7.5	+8.5	
" 3	+11.0	+7.5	+8.5	
イチヨウB 1	-	+8.0	+8.0	
" 2	+11.0	+8.0	+7.5	
" 3	+10.0	+7.5	+8.0	
溶媒C 1	-	-	+7.0	
" 2	-	+6.5	+9.0	
" 3	-	+6.5	+6.5	

イチヨウ葉エキスの抽出方法において溶媒の種類により抗菌活性値に差が生じた。コクリア菌に対しては10mM酢酸バッファーよりも50%のエタノールやメタノールの活性が高かった。大腸菌と枯草菌に対してはほぼ同等の活性がみられたがコントロールの各溶媒にも弱い活性がみられた。この結果からイチヨウ葉には抗菌成分が少ないながらも存在すると思われる。

5. イチヨウ葉エキスの手指常在菌に対する抗菌性

応用実験としてイチヨウ葉エキスによる手指常在菌の抗菌活性試験を試みた。

常在菌の確認と準備

2種の寒天培地(YM、SA)に4本の指を軽く押し付け30℃で48時間培養した。培養結果(図10)から得られた。2種類のコロニー(ア:粒状、イ:同心円状)を走査電子顕微鏡で観察した結果、アはブドウ球菌様、イは桿菌の細胞形状と判明した(図11)。2種類のコロニーを細菌用液体培地に接種し前培養液を作成した。



図10 手指常在菌コロニー(左:YM培地、右:SA培地)

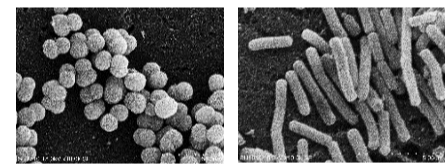


図11 手指常在菌のSEM像(×10K)
(左:コロニーア、右:コロニーイ)

方法：試料(イチヨウエキス6区分)を試験4と同様の方法で2種手指常在菌に対する抗菌活性試験を行った。

結果と考察：

培養後の観察(図12)から阻止円の有無(+、-)、その直径(mm)を計測し表2に纏めた。

抗手指常在菌(ア) 抗手指常在菌(イ)



図12 イチヨウ葉エキスの抗手指常在菌活性試験

表2 イチヨウ葉エキスの抗手指常在菌活性試験(阻止円直径 mm)

試料種類・溶媒	常在菌種類	
	ア(球菌)	イ(桿菌)
イチヨウA 1	+7.0	+6.5
" 2	+11.0	+11.0
" 3	+9.5	+10.0
イチヨウB 1	+6.5	-
" 2	+11.0	+10.0
" 3	+9.5	+7.5
溶媒C 1	-	-
" 2	-	-
" 3	-	-

手指常在菌に対して50%エタノール抽出イチヨウ葉エキスが高い抗菌性を有した(○の部分)。イチヨウ葉の収穫年で比較するとややAがBより抗菌活性が高かった。落葉の熟成期間が関係すると思われる。溶媒Cでは手指常在菌の抗菌効果がみられず、イチヨウ葉エキスに効果があったので、手指の消毒に利用できる可能性が高まった。今後、イチヨウ葉エキスの消毒用効果試験と抗酸化活性測定を試み健康効果の検証に繋げたい。