

酵母の純粋分離に使用する抗生物質に代わる天然由来抗菌剤の探求・開発 ～スクリーニング～

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部 宇田川 翼

はじめに

私は、校内の花や果実などを分離源とし、酵母を純粋分離していた。その際、抗生物質のクロラムフェニコールを使用して細菌の生育を抑制した。

近年、抗菌薬（抗菌薬等）の不適切な使用等により、抗菌薬等に耐性を持つ（抗菌薬等が効かない）菌の発生が問題になっている¹⁾。薬剤耐性菌による感染症は、現代医療をもってしても治療が困難であり²⁾、何も対策を講じない場合、2050年には世界で1000万人の死亡が想定され、がんによる死亡者数を超える、とした報告がある³⁾。かと言って新しい抗生物質・抗菌剤をつくるには、お金も時間もかかる⁴⁾。薬剤耐性菌の対策には、抗生物質の使用を減らすことが大切だと考える。

そして、抗生物質以外にも抗菌作用をもつ植物、例えばニンニクのようなものが存在することを科目「バイオサイエンス基礎（実験）」で知った。

これらを踏まえて、酵母の純粋分離には抗生物質を使用せずに天然由来の抗菌剤で代用できるのではないかと考えた。さらに、カビの生育も抑制したいと思った。そこで私は、さまざまな植物等の抗菌・抗真菌力の有無等を探索し、さらに天然由来の抗菌剤を開発することにより、抗生物質の使用を避けて酵母を純粋分離することを目的として本研究を行った。

実験方法

試料調製

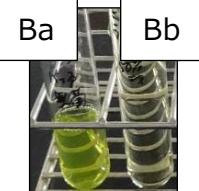
【I. 抗生物質（クロラムフェニコール [略：CP]）】

エタノールで溶解した CP と滅菌した蒸留水を混合し、CP の濃度を 128, 64, 32, 16 μg / mL になるようにそれぞれ調製した。

【II. 固形試料】

試料を水洗・拭き取り、不要部分の除去後、2種類の溶媒（a：10 mM 酢酸バッファー、b：50 %エタノール）にそれぞれ入れ、ミキサーでミキシングし、その懸濁液を 7 °C で 1 晩振とう抽出した。振とう抽出した懸濁液を遠心分離機により上澄み液と凝固物に分離し、上澄み液を回収・無菌ろ過した。

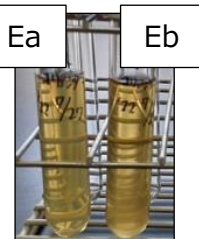
A：ニンニク、B：ニラ、C：長ネギ、D：アロエ、E：ヘチマ



【III. 粉末試料】

試料を 2 種類の溶媒（a：10 mM 酢酸バッファー、b：50 %エタノール）にそれぞれ入れ混合し、7 °C で 1 晩振とう抽出した。振とう抽出した懸濁液を遠心分離機により上澄み液と凝固物に分離し、上澄み液を回収・無菌ろ過した。

F：クローブ、G：ウコン、H：コリアンダー、I：ローズマリー



【IV. 液体試料】

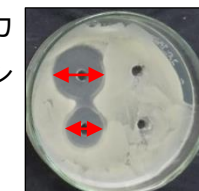
試料が既に液体なので特に調製せず、原液のまま使用した。

J：木酢液、K：竹酢液

抗菌力・抗真菌力試験

シャーレ 5 枚に YM 寒天培地を平板化させ、培地上に検定菌（大腸菌〔グラム陰性〕、枯草菌〔グラム陽性〕、コウジカビ、クモノスカビ、酵母）の前培養液 5 種類をそれぞれ 100 μL 滴下しコンラージ棒で塗抹した。次に、直径 6 mm の穿孔を培地上に作成し、その穿孔に試料を 30 μL 注入し 30 °C で約 3 日間の培養後、阻止円の有無と直径を計測した。

※右写真の ←→ が阻止円の直径、4 つの ● が穿孔。



試料：ニンニク
検定菌：酵母

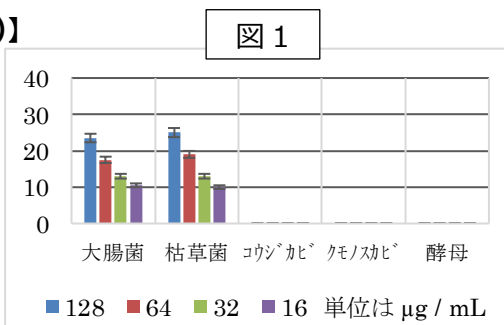
結果と考察

抗菌力・抗真菌力試験 ※グラフの縦軸は阻止円の直径（mm）を表す。試料無添加のコントロールでは、阻止円が形成されなかったため図から削除した。

【I. 抗生物質（クロラムフェニコール）】

クロラムフェニコールでの阻止円の直径を図 1 に示した。

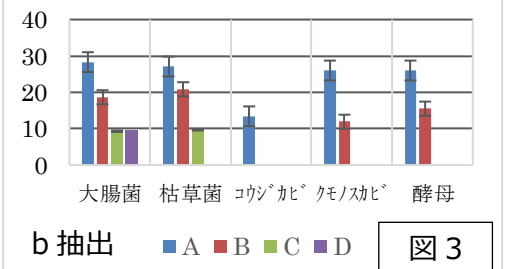
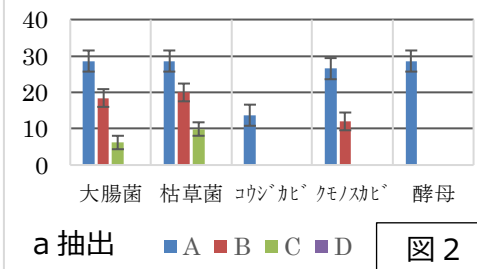
やはりグラム陰性・陽性どちらの細菌にも同等程度の抗菌力が見られた⁵⁾。また、真菌には阻止円が形成されておらず、クロラムフェニコールは真菌に対して抗菌スペクトルをあまり持たないと考えられる。



【II. 固形試料】

固形試料での阻止円の直径を図 2, 図 3 に示した。ニンニク (A) ではどちらの抽出液にも他の試料を大きく上回る阻止円が見られた。ニラでは a 抽出液で細菌とクモノスカビに対して阻止円が見られ、b 抽出液でコウジカビ以外に阻止円が見られた。長ネギではどちらの抽出液にも細菌に対して阻止円が見られ、アロエでは b 抽出で大腸菌に対して阻止円が見られた。また、ヘチマでは阻止円が見られなかったため図から削除した。

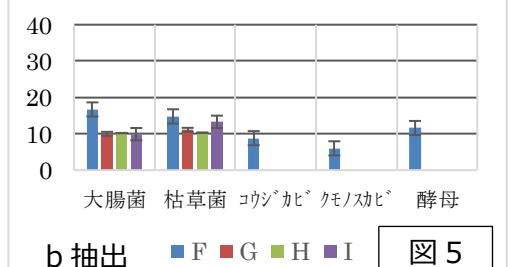
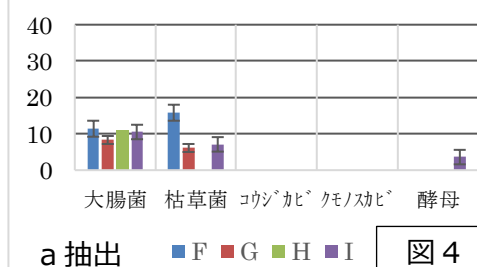
ニンニクとニラに大きな阻止円が見られたが、これはニンニクやニラに含まれるアリインという物質が、ミキシングによって細胞内から出てきた酵素アリイナーゼと出会うことでアリシンという物質に変化し、これが検定菌の生育を阻害した原因と考えられる⁶⁾。



【III. 粉末試料】

粉末試料での阻止円の直径を図 4, 図 5 に示した。クローブでは a 抽出液で細菌に対して阻止円が見られ、b 抽出で検定菌 5 種類すべてに阻止円が見られた。ウコン、コリアンダー、ローズマリーでは細菌に対して阻止円が見られたが真菌には阻止円がほとんど見られなかった。

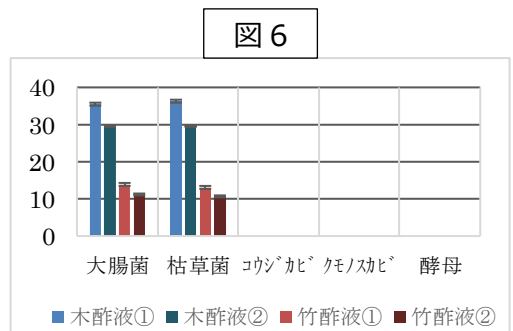
特に、クローブに大きな阻止円が見られたが、これはオイゲノールやアセチルオイゲノールが検定菌の生育を阻害した原因と考えられる⁶⁾。



【IV. 液体試料】

液体試料での阻止円の直径を図 6 に示した。木酢液では細菌に対して 30 mm 程度の大きな阻止円が見られた。竹酢液でも細菌に対して阻止円が見られたが、木酢液ほどではなかった。また、どちらも真菌に対して阻止円が見られなかった。

木酢液では大きな阻止円が見られたが、これはまず、木酢液にフェノール類が含まれていて⁷⁾ それ抗菌性を示した可能性と低い pH が原因と考えられる。



今後の課題

実験 I：スクリーニング、実験 II：候補試料の希釈による抗菌力の変化、実験 III：ニラの a 抽出液の加熱による抗菌力の変化、実験 IV：ニラの a 抽出液の抽出時間変更による抗菌力・抗真菌力の変化、まで進めることができた。今後の課題として、ニラの a 抽出液を加熱以外で濃縮する方法の模索、木酢液の加熱による抗菌力の変化、アリシン化合物や木酢液特有の二オイ軽減などが挙げられる。

参考文献

- 1) 平川 幸子. 薬剤耐性 (AMR) 発生の現状と課題 — 新たな感染症リスクへの対応 —. 安全工学. 2018, 57 巻, 1 号, p.42-47.
 - 2) はらこどもクリニック. “抗生物質の使いすぎは、なぜいけないのか？ その 1”. 2018. (hara-kodomo.com).
 - 3) AMR 臨床リファレンスセンター. “「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」の背景”. 2017. <https://amr.ncgm.go.jp/medics/2-4.html>.
 - 4) 広報誌「厚生労働」. “特集 1 一人ひとりの心がけが大切 抗生物質・抗菌薬の正しい使い方”. 厚生労働省. 2018. https://www.mhlw.go.jp/houdou_kouhou/kouhou_shuppan/magazine/2018/09_01.html.
 - 5) “クロラムフェニコール”. MSD マニュアル プロフェッショナル版. 2018. (msdmanuals.com).
 - 6) 東盛 キヨ子・大城 ちか子. 沖縄産香辛野菜の腐敗細菌に対する抗菌作用. 琉球大学教育学部紀要. 1999, 第 56 集, p.279-286.
 - 7) 駒形 修・本山 直樹. 各種市販および自家製木酢液・竹酢液の主要成分と抗菌活性. 環動昆, 2004 第 15 巻, 第 2 号, p.83-94.
- ・岡本 晃. 新しい殺菌剤開発の試み～薬液の混合による殺菌力の変化～. 大阪府立園芸高等学校, PTA 学習奨励金による研究 (令和 3 年度).