

令和2年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏	よしむら ともき 吉村 友希	学部 学科	薬学部薬学科	学年	1年
ふりがな 共同 研究者氏名	いとう たろう 伊藤 多朗	学部 学科	薬学部薬学科	学年	1年
	うらや ゆうせい 浦谷 悠生		薬学部薬学科		1年
	かいあみ ともみ 貝阿彌 朋実		薬学部薬学科		1年
	なんば たつゆき 難波 龍之		薬学部薬学科		1年
	はやし みう 林 美佑		薬学部薬学科		1年
	ふじい ゆうみ 藤井 佑未		薬学部薬学科		1年
	ふじもり まさゆき 藤森 大志		薬学部薬学科		1年
	まつえ りりこ 松江 梨々子		薬学部薬学科		1年
	ろくじょう ひろき 六城 宏紀		薬学部薬学科		1年
アドバイザー教員 氏名	なかがわ しんさく 中川 晋作	所 属	薬学部		
研究課題名	天然・伝承に学ぶ「スパイス調合」の可能性 ～モデル感染性病原体への殺菌効果と香り・色合いの追究～				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【研究目的】

新型コロナウイルスの影響で現在、感染性病原体に係る院内感染等が懸念される医療機関を含め、致命的かつグローバルに消毒液・消毒剤が不足しており、例えば、アルコール等の不足は社会現象にもなっている。そのため、学術的にも社会的にも、身近なものを活用した『新たな消毒液・消毒剤』の開発が望まれている。この背景から、殺菌効果を有することが知られている、身近なスパイス類を調合することで『新たな消毒液・消毒剤』が開発できないかと考えた。スパイス類はスーパーやネットで容易に入手でき、その殺菌作用から、ヨーロッパやインド、東南アジア諸国、日中韓では、古くから食品保存や薬食同源（漢方薬・薬膳）に利用されてきた。これらの事例は、スパイス類は安全性に優れていることを示しており、消毒液・消毒剤の利用範囲を考えると、極めて望ましい性質であり、このような天然、そして伝承に我々は学ぶことを考えた。一方で、生薬の例に観られるように、スパイス各々の殺菌作用は古くから追究されてきた。しかし、数種類のスパイスをブレンドした際の殺菌効果に関しては、まだまだ検討の余地があり、そのうえ、ブレンドによる香りや色合いといった付加価値に関しては未解明な部分が多い。この香りや色合いは、嗅覚・視覚を介した心身の健康サポートに直結するものであり、抗菌殺菌効果の向上を期待させるものである。

以上より、スパイスを数種類ブレンドした際、単体で使う場合に比べて互いの効果に影響を及ぼすことがあるのか研究することにした。抗菌効果を示すものにはさまざまな作用機序があり、スパイスの組み合わせにより相乗効果が生じる可能性が期待できる。その可能性が証明されれば、現在のような感染症が蔓延し消毒液が手に入れづらい状況下において手に入りやすい身近なものから消毒液を作るために利用することができる食品の探索ができる。また、私たちから日常生活を送るうえで出会う可能性のある常在菌を用いることで具体的にどのような菌に対して抗菌殺菌効果があるのか調べることができる。本研究においては時間の関係上、香り、色合いについての実験には至っていない。

【研究方法】

研究者の手から取った菌を寒天培地上で培養し、そのうちの3種類のコロニーから菌を採取した。

採取した菌をLBへと移し、振とう培養を行った。

培養した菌液をグリセロールと混合し、菌のストックソリューションを作製した。

以下の実験ではこの菌液を用いた。

なお、菌に関してはグラム染色を実施することで菌の種類の同定を行った。

実験1 スクリーニング

- ① スパイスを秤量し、LB培地を入れることで40 mg/mlの濃度のサンプル溶液を作製した。この際、粒が大きいものはすりつぶして使用した。遠心分離にかけた後、オートクレーブにて121℃、20分で熱抽出し、遠心分離器にかけたのち0.45 μmのフィルターでろ過を行った。
- ② 上記①のサンプル溶液200 μlに菌液200 μlをそれぞれ入れ、インキュベーターにて37℃で振とう培養した。
- ③ 培養したサンプル溶液を96ウェルマイクロプレートに200 μlずつ分注しOD 600で濁度を測定することで菌の増減について評価した。

実験2 ドーズレスポンス

- ① 実験1と同様にサンプル溶液を作製した。この際40 mg/mlを1倍として1/2倍,1/4倍,1/8倍,1/16

倍の 5 つの濃度のものを作製した。実験 1 と同じ手順で抽出からろ過まで行った。

- ② 実験 1 と同様にインキュベーターにて 37℃で振とう培養し、濁度測定を行った。

実験 3 かけ合わせ

- ① スパイスを 2 種類秤量し、同じ試験管に入れ、LB 培地を入れることでスパイス単体の濃度が 20 mg/ml の濃度のサンプル溶液を作製した。これを濃度 1/2 倍と定義し、1/4 倍、1/8 倍についても作製した。その際スパイス同士の重量差は混合した後の重量の 5%までとした。また、かけ合わせに使う 2 種類のスパイスについても 40 mg/ml を 1 倍として 1/2 倍、1/4 倍、1/8 倍の 4 通りの濃度のサンプル溶液を作製した。その後実験 1 と同様に抽出からろ過までを行った。
- ② サンプル溶液 250 μl に菌液 250 μl をそれぞれ入れ、インキュベーターにて 37℃で振とう培養した。
- ③ 実験 1 と同様に濁度を測定した。

実験 1,2,3 全てにおいて、コントロールにおける菌の増殖量に対するサンプルを入れたときの菌の増殖量の割合を数値化しそれを比較した。なお結果欄に載っているグラフについて、一つのグラフで比較されている数値は全て同じタイミングで秤量から濁度測定まで行ったものである。

菌の増殖量の割合の数値化は、以下の数式を用いて行った。

$$\text{菌の増殖量の割合} = \frac{\{(\text{サンプルに菌液を加えたものの濁度}) - (\text{サンプルのみの濁度})\} \times 100}{(\text{菌のみのサンプルの濁度}) - (\text{LBのみのサンプルの濁度})}$$

グラム染色

- ① 振とう培養した菌液をスライドガラスに数滴、滴下したのちピペットで広げ、菌液を乾燥させた。
- ② スライドガラス状に滴下し、乾燥させたものにメタノールを加え固定を行った。
- ③ 固定を行ったものにビクトリア青溶液を数滴滴下し、20 秒から 60 秒放置した後に水洗いを行った。
- ④ サフラニン溶液を数滴滴下し、20 秒から 60 秒放置した後に青色がなくなるまで水洗いを行った。
- ⑤ ピクリン酸溶液を数滴滴下し、20 秒から 60 秒放置した後に水洗いを行った。
- ⑥ 以上の処理をしたものを顕微鏡で観察を行った。

【実験 1 スクリーニング】

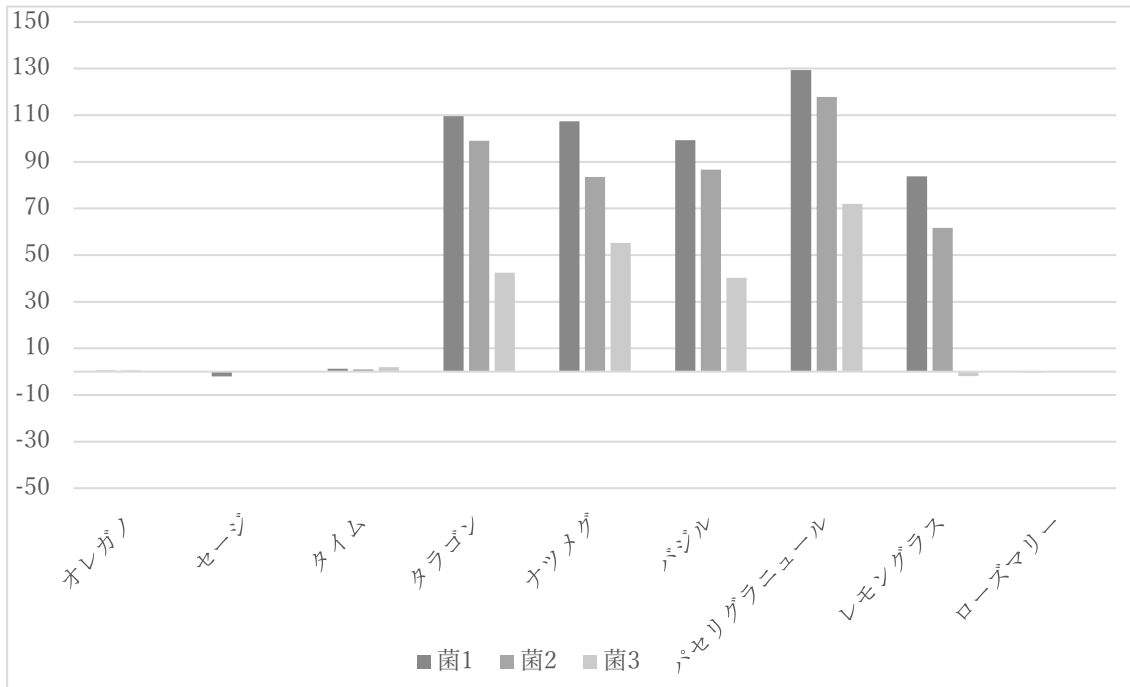
サンプルとして購入したスパイス 47 種類を用いて、それぞれのスパイスが菌 1~3 に対してもつ抗菌活性を調べるスクリーニングを行った。

〈結果 1〉

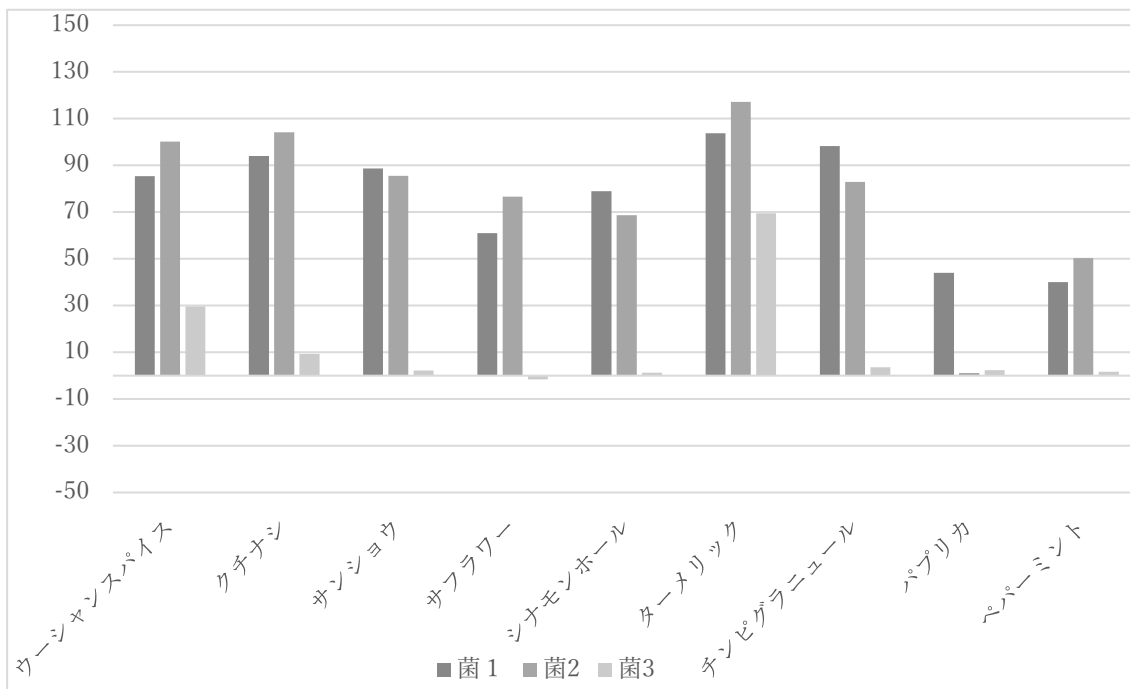
47 種類のサンプルのうち、オレガノ、セージ、タイム、ローズマリー、リコリス、クローブホール、クミン、ゆずの 8 種類は菌の増殖の割合がすべての菌に対して 5%以下の値を示した。一方、パセリグラニュール、ターメリック、オニオン、セロリシード、ディルウィード、カルダモンホール、ガーリックスライス の 8 種類は 2 つの菌に関して菌の増殖の割合が 100%以上であった。

また、レモングラス、サンショウ、サフラワー、シナモンホール、チンピグラニュール、ペパーミント、ピックリッグスパイス、スペアミント、ローレル、ミョウガの 10 種類は菌 1,2 の増殖の割合が

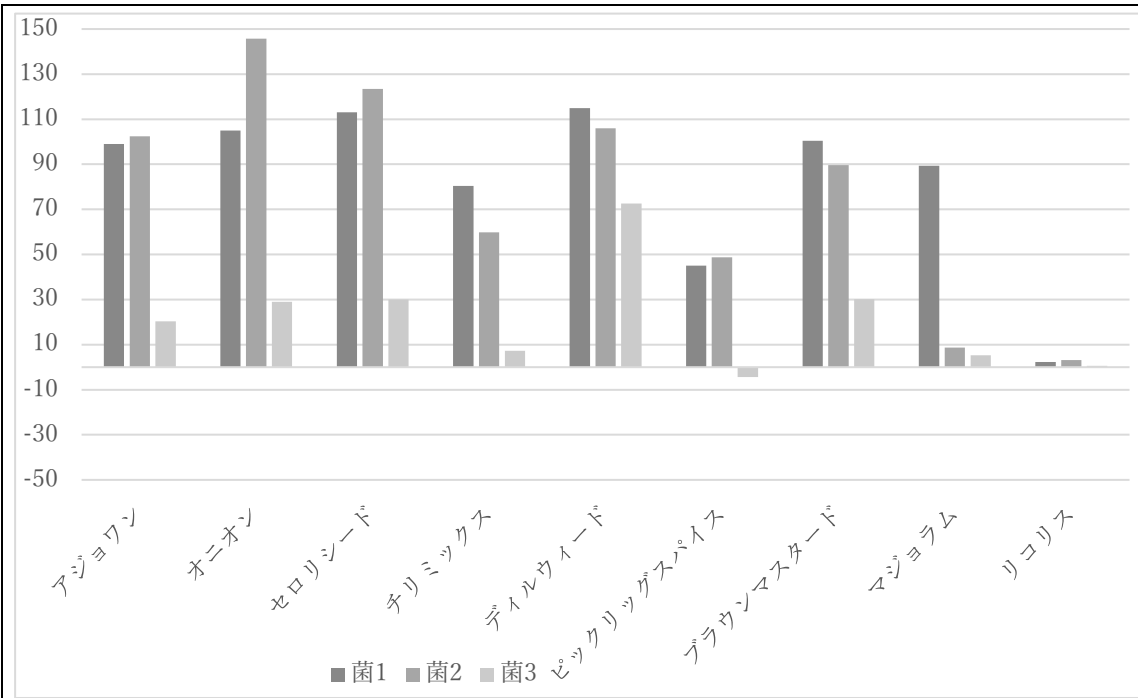
5%以上であるにもかかわらず、菌3の増殖の割合が5%以下となった。



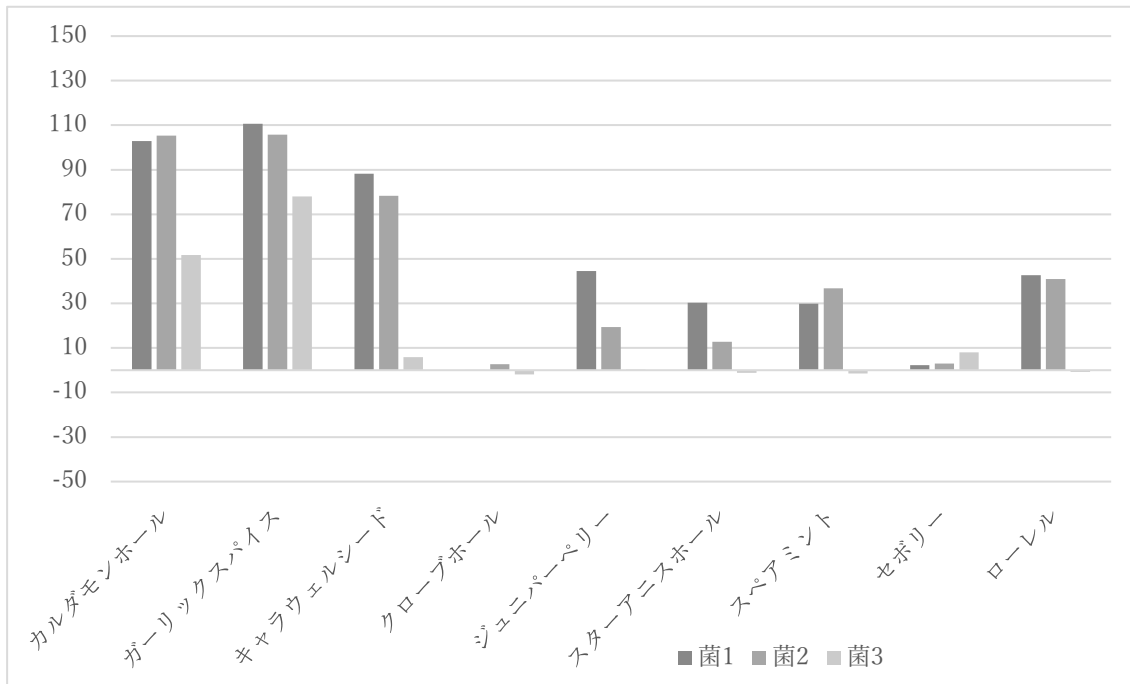
(縦軸は%を表す)



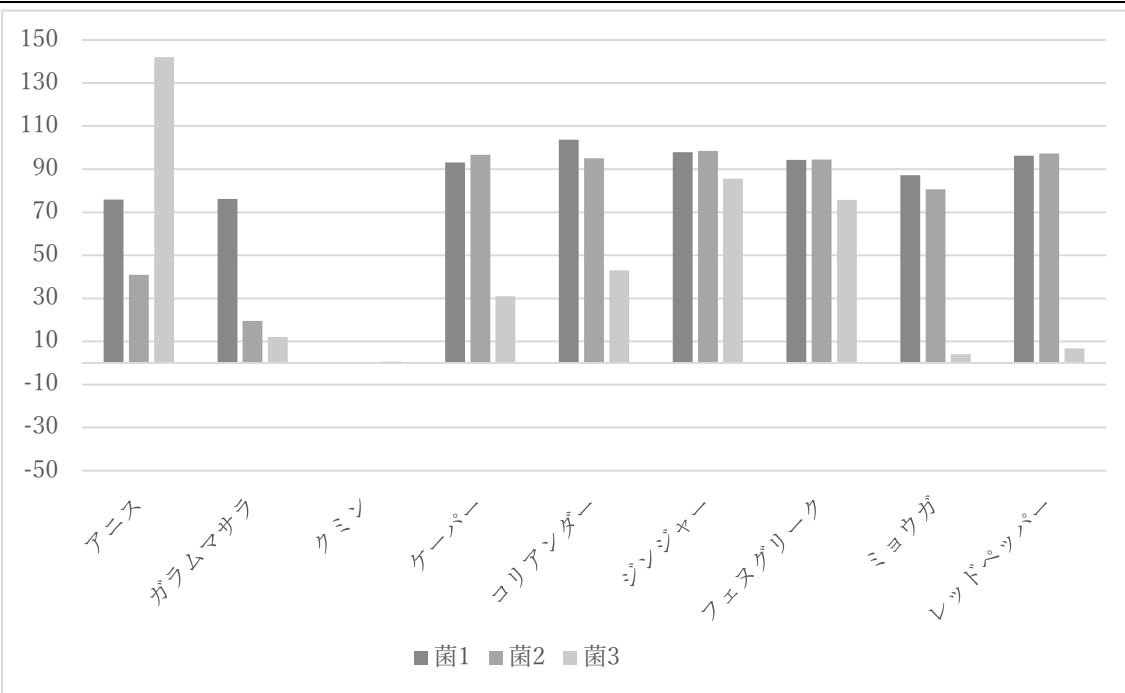
(縦軸は%を表す)



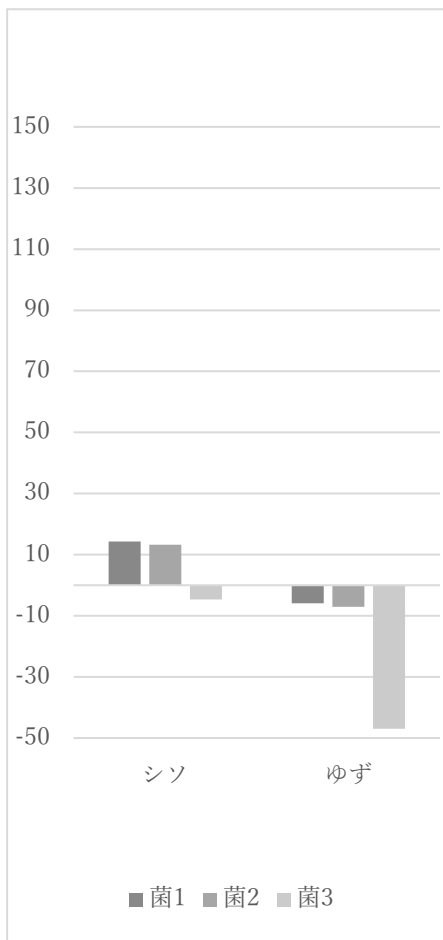
(縦軸は%を表す)



(縦軸は%を表す)



(縦軸は%を表す)



(縦軸は%を表す)

〈考察 1〉

オレガノ、セージ、タイム、ローズマリー、クミン、クローブホール、リコリス、ゆずの 8 種類が主に菌 1,2,3 全てに対し効果的な活性を示したため、抗菌効果を持つということがわかった。

また、それぞれのサンプル菌 1 と菌 2 に対する抗菌活性が似ていることからこの二つの菌は同系統の菌であり、菌 3 は別の系統の菌ではないかと考えられた。この仮説の検証を行うために、菌 1,2,3 に対してグラム染色を行った。

尚、本研究では優れた抗菌活性を持つサンプルを食品に添加することを考慮し、可能な範囲でその濃度を薄めたとしても抗菌活性を発揮できるような点を知る必要があると考えられる。また、本来の目的の一つであるサンプルの掛け合わせによる抗菌活性の調査(以下、実験 3)に対象とするサンプルを選ぶべく、実験 1 の結果を踏まえ、ドーズレスポンス(以下、実験 2)を調査した。

【実験 2-1 ドーズレスポンス】

実験 1(スクリーニング)の結果から、菌 1~菌 3 のすべての菌に対して菌の増殖の割合が 5%以下の値を示した明らかに効果のあると考えられるものとして、オレガノ、セージ、タイム、ローズマリー、クミン、クローブホール、リコリス、ゆずの 8 つ選んだ。また、二つの菌に関して菌の増殖量の割合が 100%以上であったものを効果がないと考え、このうちオニオン、セロリシード、ターメリック、パセリグラニューール、ガーリックスライス、カルダモンホール、ディルウィード、レッドペッパーの 8 つ選んだ。8 つのみに絞ったのは、全ての組み合わせを調べるだけの時間がないと判断したためである。

それぞれの結果を以下にグラフで示す。

〈結果 2-1〉

オレガノ：すべての菌において濃度の低下につれ、菌が増殖した。

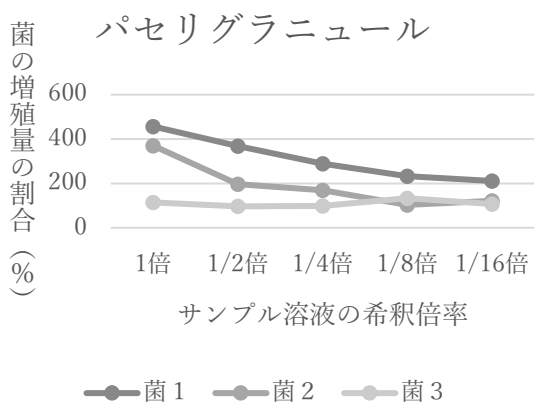
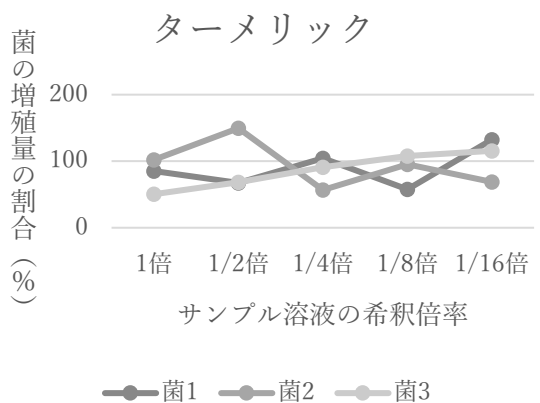
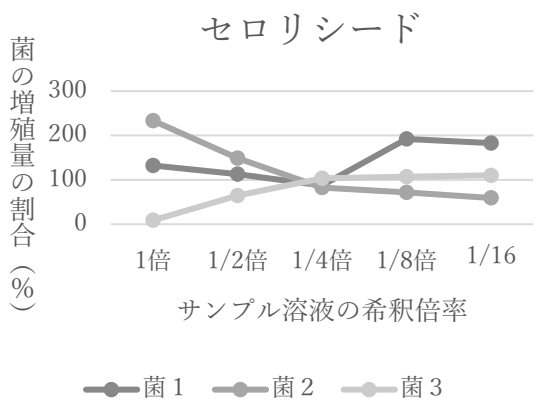
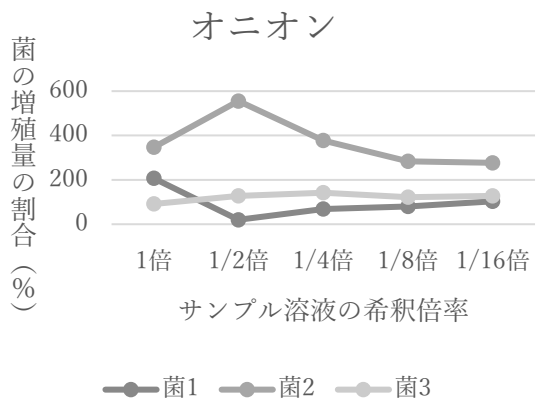
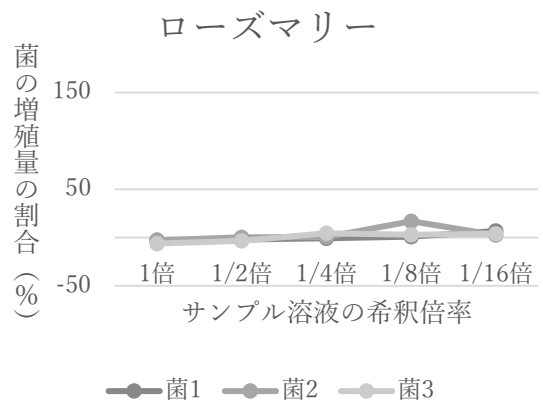
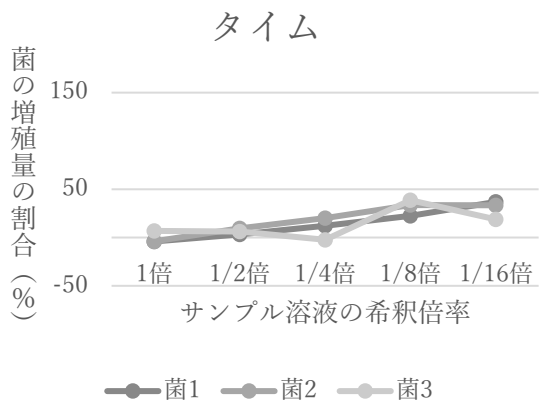
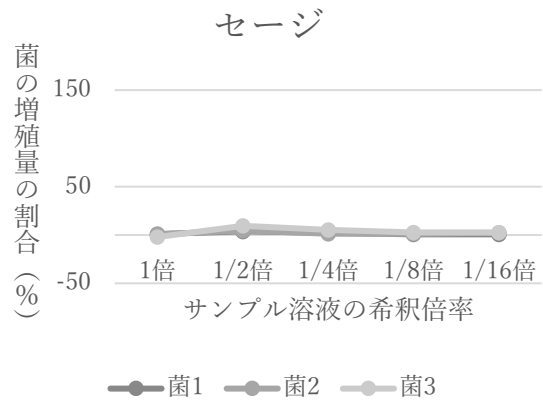
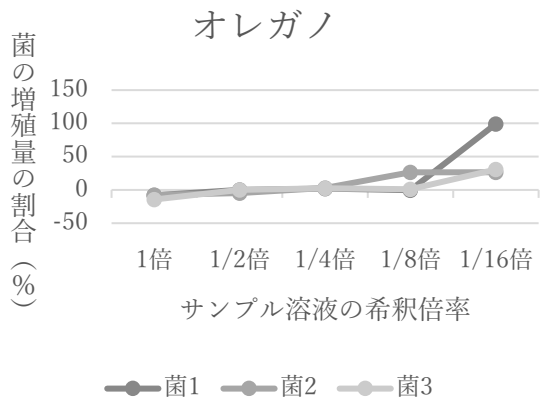
セージ・ローズマリー：濃度 1/16 まではローズマリーの菌 2 での 1/8 の結果を除きほぼすべての点で 10%以下の菌の増殖率を示した。

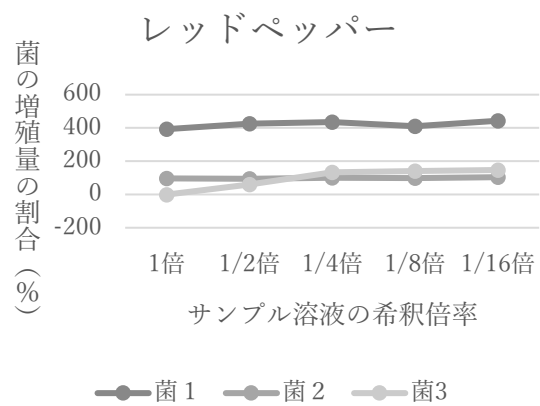
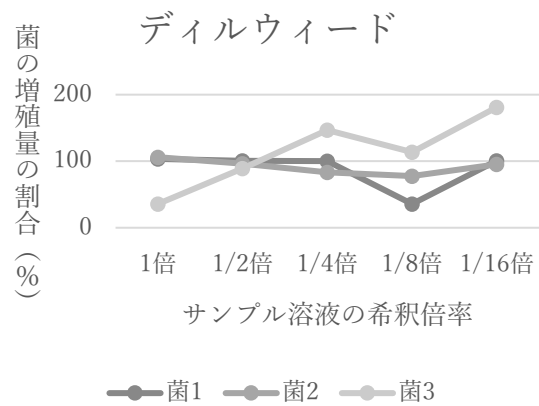
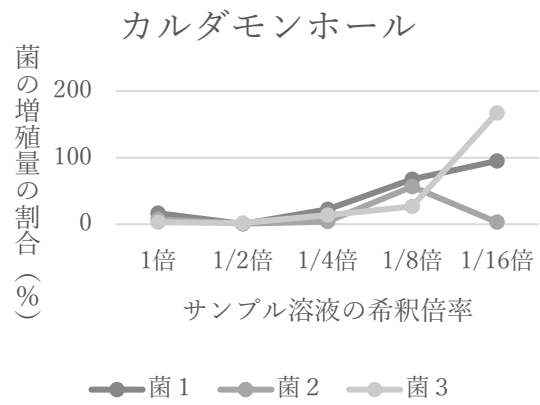
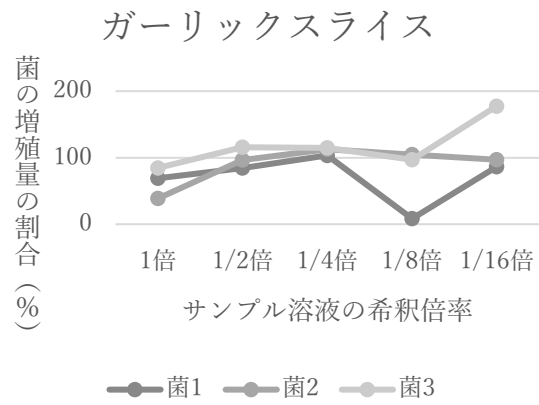
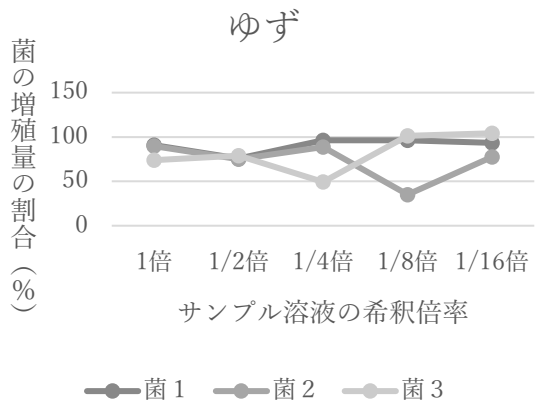
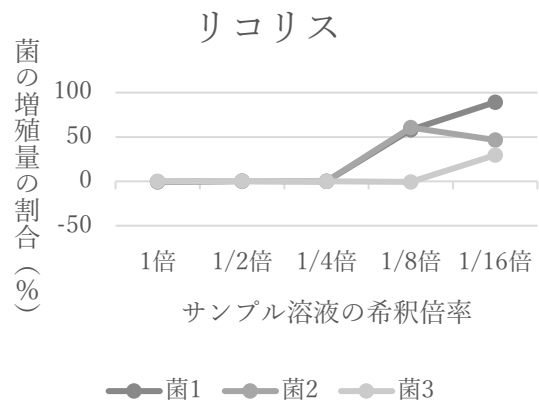
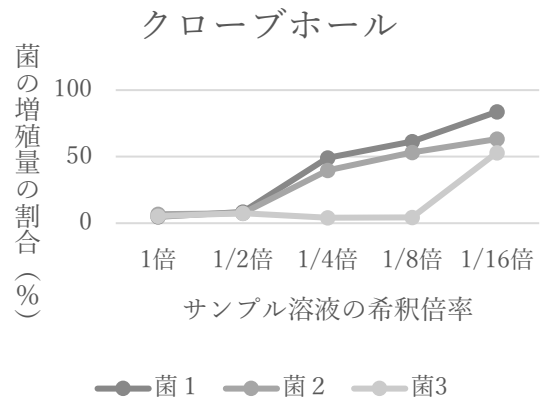
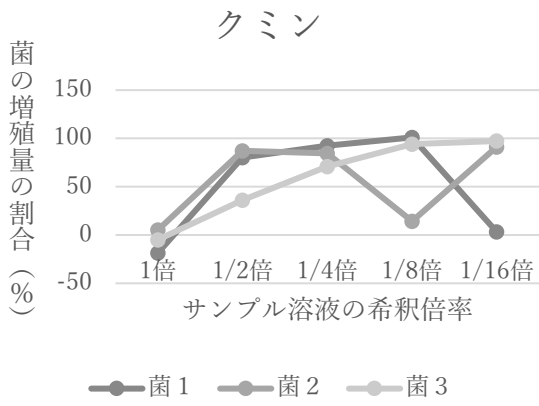
セロリシード：菌 1 では、濃度 1~1/4 まではほぼ横ばいであったが、濃度 1/8、1/16 ではより菌が増殖した。菌 2 では濃度の低下につれ、菌が増殖しなくなった。菌 3 では濃度の低下につれ、菌が増殖した。

クローブホール：すべての菌において濃度の低下につれ、菌が増殖した。

リコリス：すべての菌において濃度 1/4 まではすべての菌に関して菌の増殖度合いが 1%以下に抑制されていた。菌 1、2 に関しては濃度 1/8、1/16 で濃度の低下に伴い菌の増殖度合いが増加し、菌 3 に関しては濃度 1/8 まで菌の増殖を抑制した後、濃度 1/16 で菌の増殖が認められた。

ゆず：実験 1 では菌の増殖率がすべての菌に対して 5%以下の値を示し効果があるサンプルとしたが、実験 2 ではすべての菌において 5%を大幅に越えた菌の増殖率を示した。





【実験2-2 ドーズレスポンス】

抗菌・殺菌効果のないスパイスの場合は濃度が低くなるにつれて菌の増殖が抑制できなくなるため、グラフは右肩上がりになり、菌の増殖効果のあるスパイスの場合は濃度が低くなるにつれて増殖促進効果が弱まるため、グラフは右肩下がりになると考えられる。また、抗菌・殺菌効果も増殖促進効果もないスパイスの場合、グラフは横ばいになり変化がないと考えられる。

これらのことを踏まえて、2-1 グラフの挙動が、誤差と認められないほど不自然だと判断したものについて再度測定を行った。

〈結果2-2〉

タイム：菌1~3で濃度1/2倍までは10%以下の抗菌効果を示していた。菌1、菌2では濃度1/4から抗菌効果の急激な低下が見られ、菌3では濃度1/16でも約10%まで菌の増殖を抑えていた。

クミン：濃度1では菌1~菌3で30%以下という比較的高い抗菌効果を示しているが、菌1・菌2では濃度1/2から100%を越え菌が増殖し、菌3では濃度1/2から抗菌効果が低下し、濃度1/8・濃度1/16では抗菌効果は80%であった。

ゆず・カルダモンホール：菌1・菌2では濃度1~1/4は100%を越えているものの、ゆずの菌1での1/16を除いて、次第に抗菌効果を示している。菌3では濃度の低下につれ、抗菌効果が弱まっていった。

オニオン：菌1~菌3の菌3の濃度1・濃度1/16を除くほぼ全てにおいて100%を越えていた。

ターメリック：菌1は濃度1/4をのぞき、濃度を薄めるにつれて比較的緩やかに菌が増殖していた。菌2は80%~110%でほぼ横ばいであった。菌3は濃度の低下につれ、菌が増殖していた。

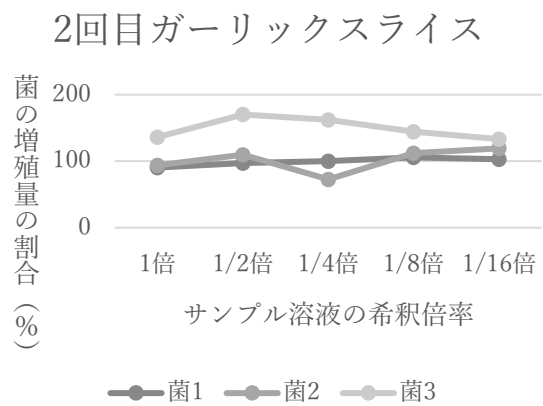
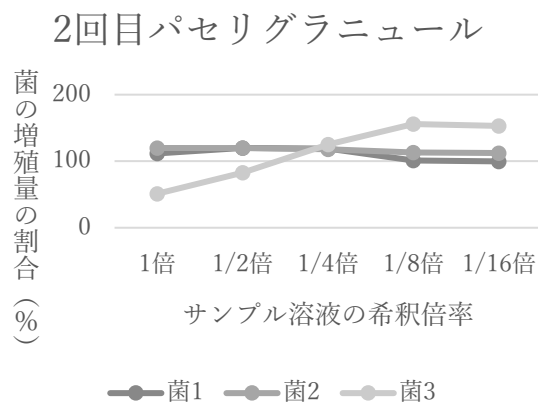
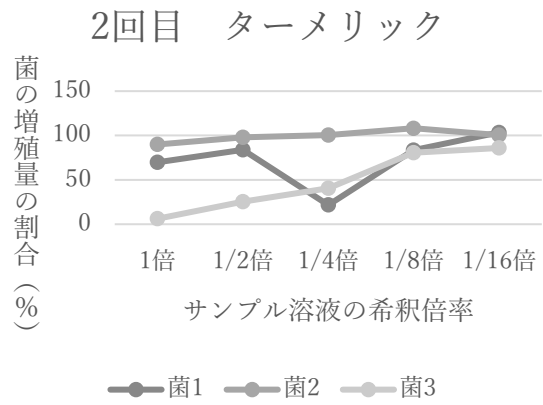
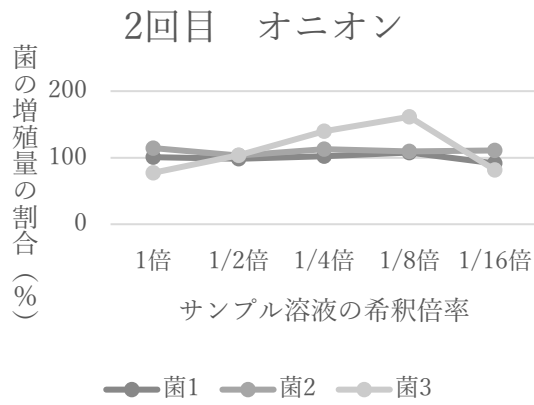
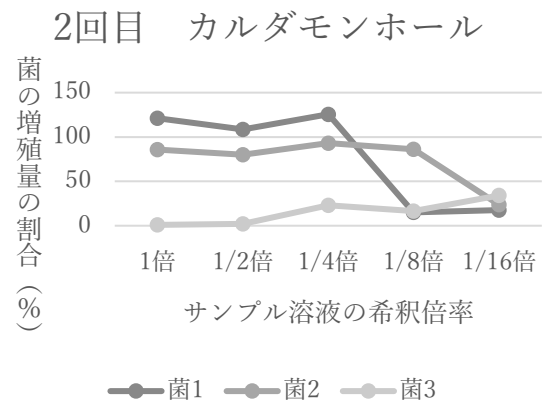
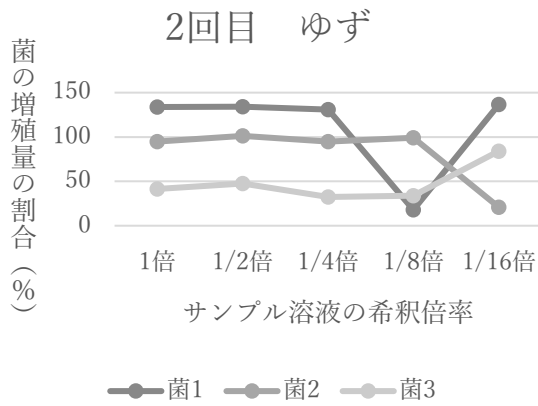
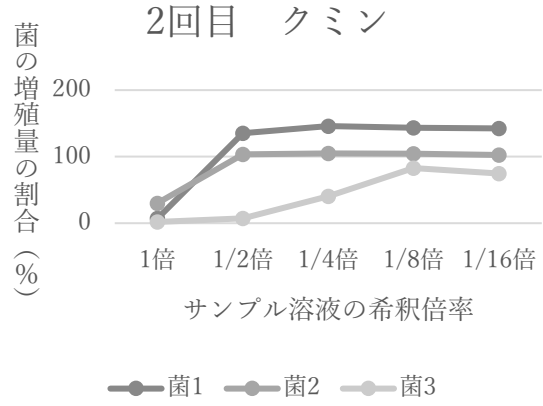
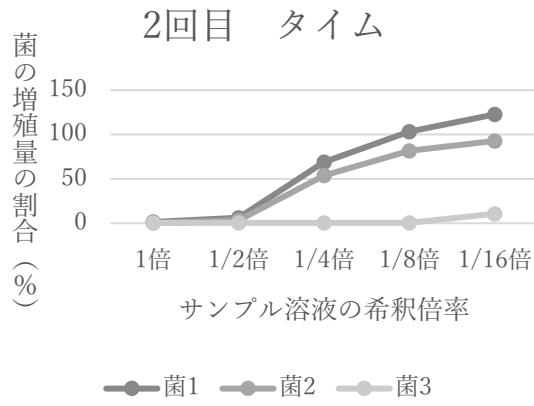
パセリグラニュール：菌1・菌2は100%~120%でほぼ横ばいであり、菌3は濃度の低下につれ、菌が増殖した。

ガーリックスライス：菌1の濃度1・1/2では90%代であり、菌2では濃度1で93%、濃度1/4で72%であったが、菌1~3のほぼ全体で100%を越えていた。

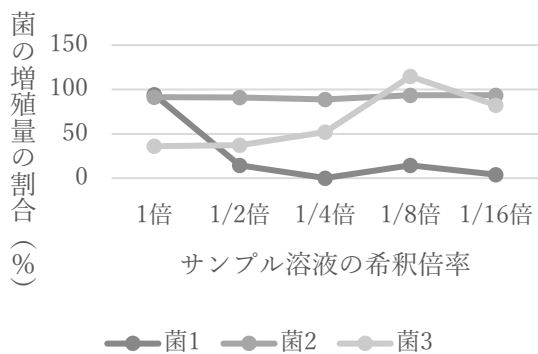
3回目カルダモンホール：菌1では濃度1/2から20%を下回る結果となった。菌2は80~95%でほぼ横ばいであった。菌3では濃度1~1/8では濃度の低下につれ、菌が増殖しているが、濃度1/16で82%まで増殖が抑えられていた。全体として2回目の結果と異なるものとなった。

ディルウィード：菌1・菌2では濃度1/8をのぞきほぼ横ばいであった。菌3では濃度1/8をのぞき、112%から175%まで菌が増殖した。

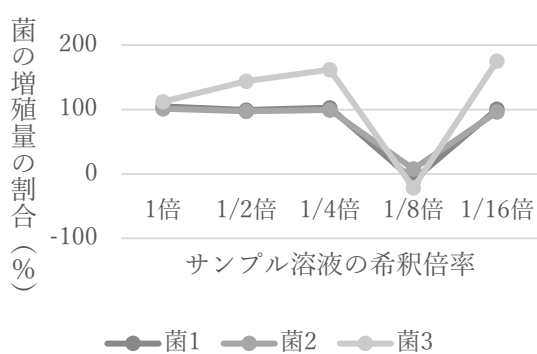
レッドペッパー：菌1・菌2では85%~103%でほぼ横ばいであった。菌3では濃度の低下につれ、2%から148%まで菌が増殖した。



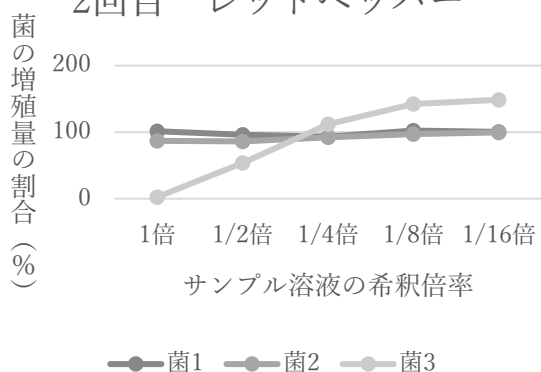
3回目 カルダモンホール



2回目 デイルウイード



2回目 レッドペッパー



〈考察2〉

以上の結果から、セージとローズマリーは濃度を 1/16 に薄めても菌 1~3 の全ての菌で高い抗菌効果を維持していることが分かった。オレガノ、タイム、クミン、クローブホール、リコリスは実験 1 でも抗菌効果があるとされていたが、特に高濃度で抗菌効果があることが分かった。

また、結果 2-1、結果 2-2 から菌 1, 2 で効果がなく、菌 3 では効果のあったスパイスについてはいずれも濃度が低くなるにつれて、抗菌効果が減衰することが分かった。

【実験3 かけ合わせ】

実験 1、実験 2 において効果のあるものの中でも特に高い効果が見られたセージとローズマリーについて、他のスパイスと掛け合わせてその効果を調べた。掛け合わせでの効果の調査の対象は、ドーズレスポンスを調べたサンプルの中から効果があるものすべてと効果がないものから菌 3 にだけ効果がないものを 3 つ選んだ。

選んだスパイスを以下に示す。

効果あり	菌 3 にのみ効果なし
オレガノ	カルダモン
クミン	ターメリック
クローブ	レッドペッパー
タイム	
リコリス	

〈結果 3〉

まず初めに、オレガノの菌 1 のように不自然な挙動を持ちその値から考察を進めるのが困難なものが確認されたため以下にその一覧をまとめる。

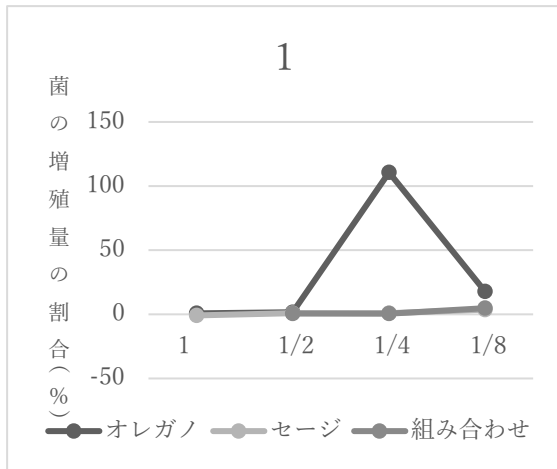
- ・オレガノ菌 1
- ・クミン+セージにおけるクミンの菌 1,2
- ・クミン+セージにおけるセージの菌 1,2,3
- ・ターメリック菌 3
- ・リコリス菌 2

それ以外のものについて、ほとんどが 1/8 倍まで薄めても強い抗菌作用を示した。唯一、リコリスはリコリス+セージの菌 1,2、リコリス+ローズマリーの菌 1,2,3 において強い抗菌作用を示さなかった。

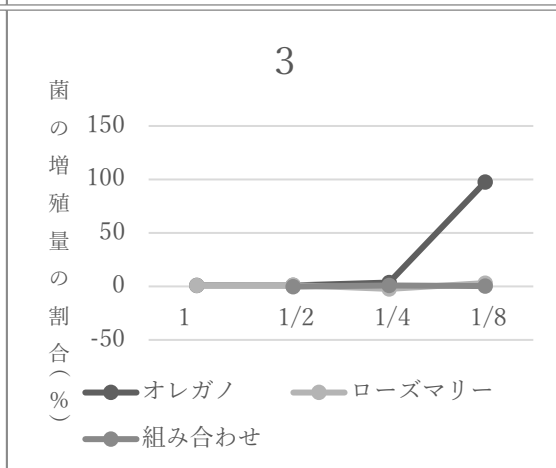
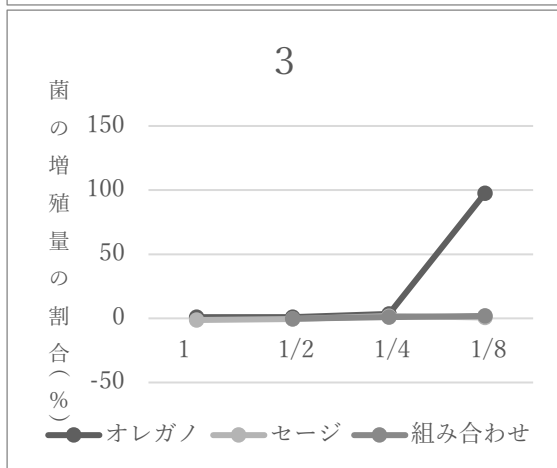
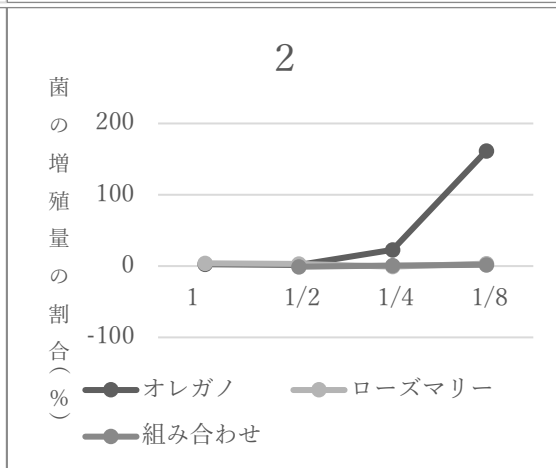
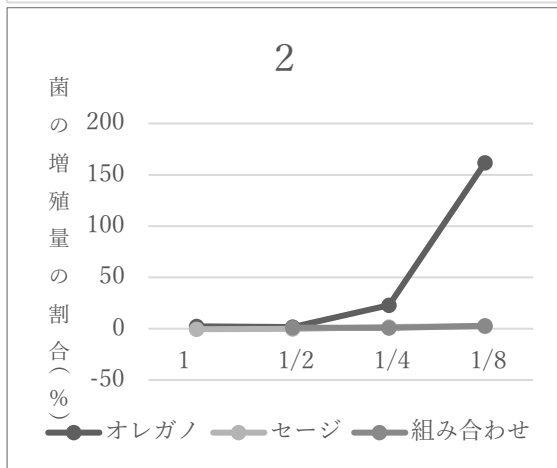
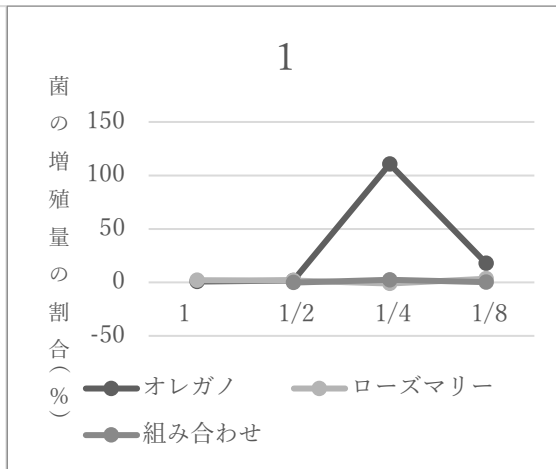
結果の詳細は次ページ以降にグラフで示す。ページの左上にセージ・ローズマリーと組み合わせるスパイス名を、グラフの上にはスパイスの組み合わせを、そしてグラフタイトルには菌の番号を記載した。

オレガノ

オレガノ+セージ



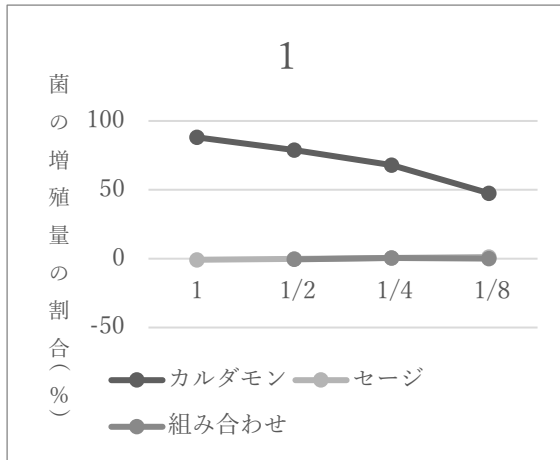
オレガノ+ローズマリー



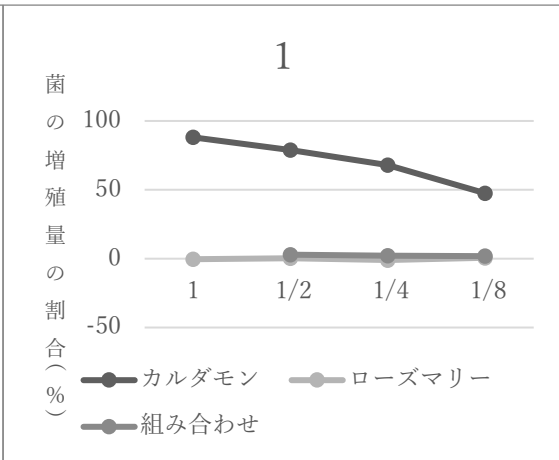
※グラフタイトルの番号は、それぞれ菌につけた番号を表す

カルダモン

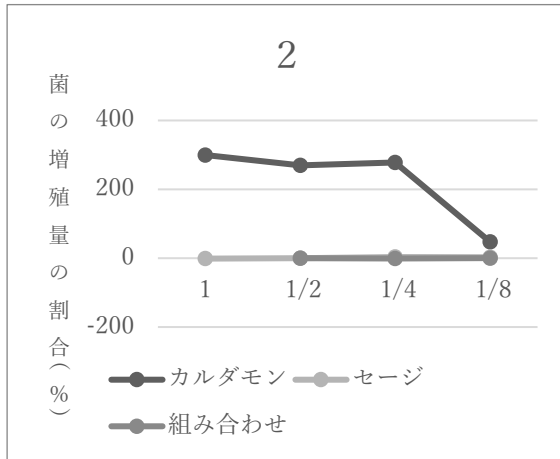
カルダモン+セージ



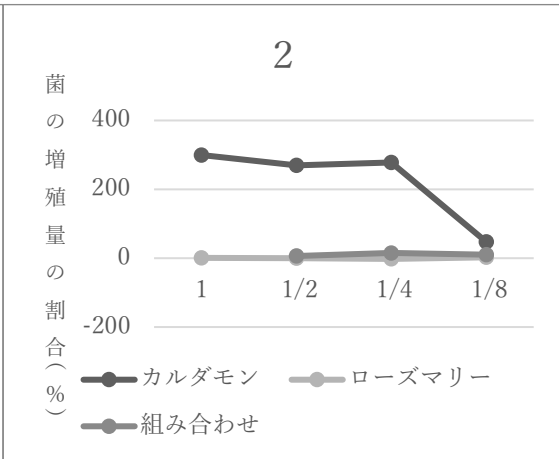
カルダモン+ローズマリー



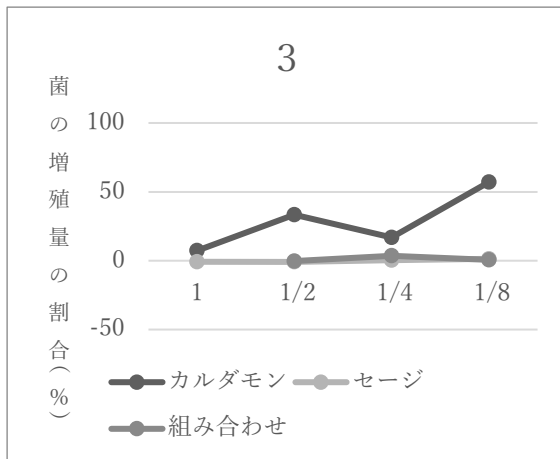
2



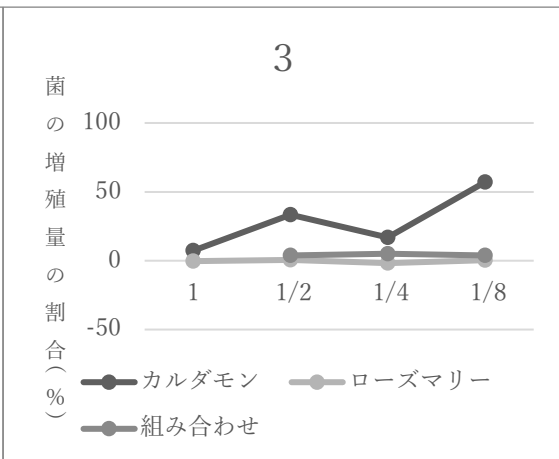
2



3



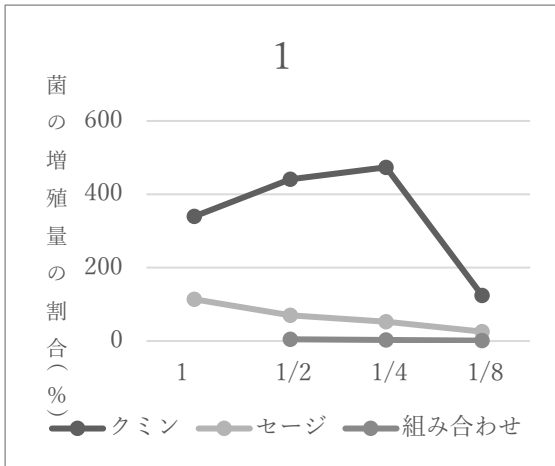
3



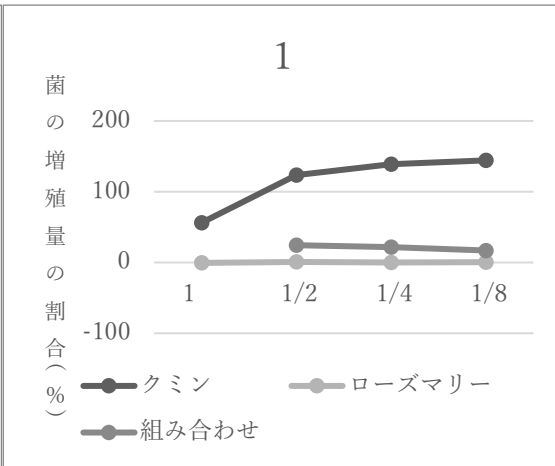
※グラフタイトルの番号は、それぞれ菌につけた番号を表す

クミン

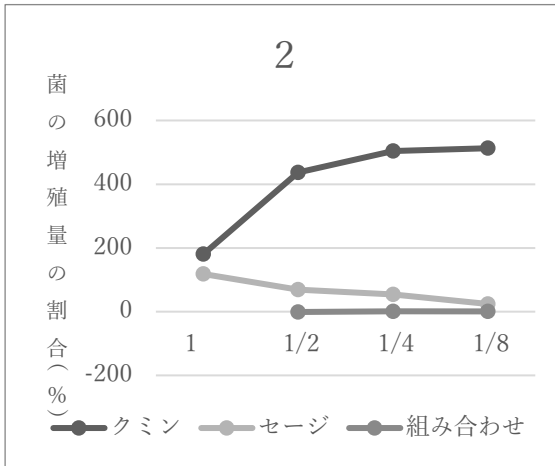
クミン+セージ



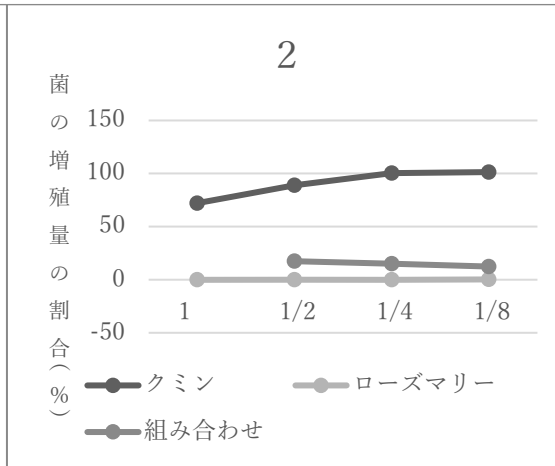
クミン+ローズマリー



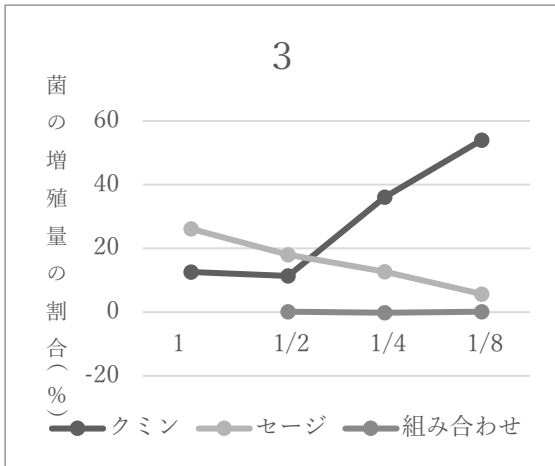
2



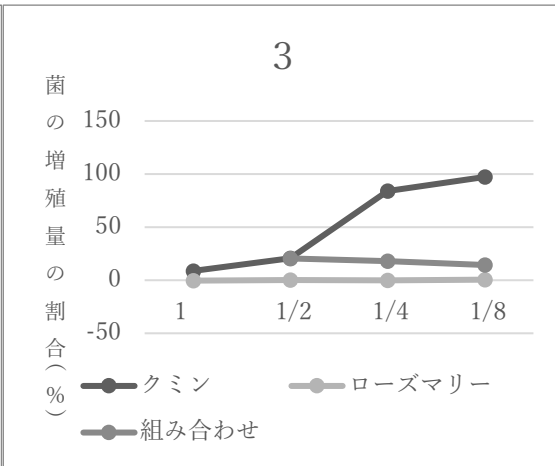
2



3



3

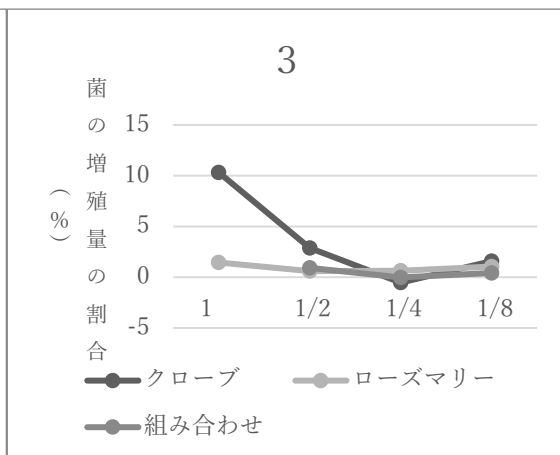
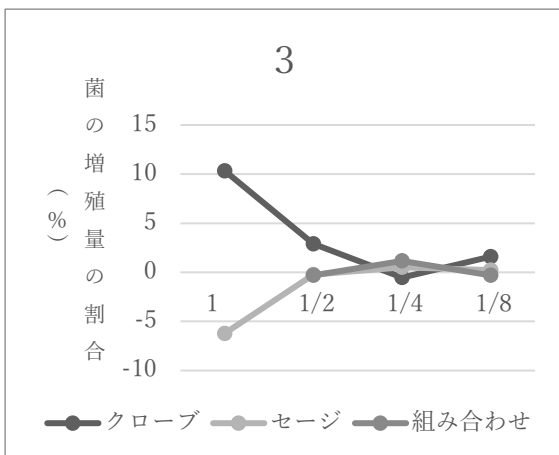
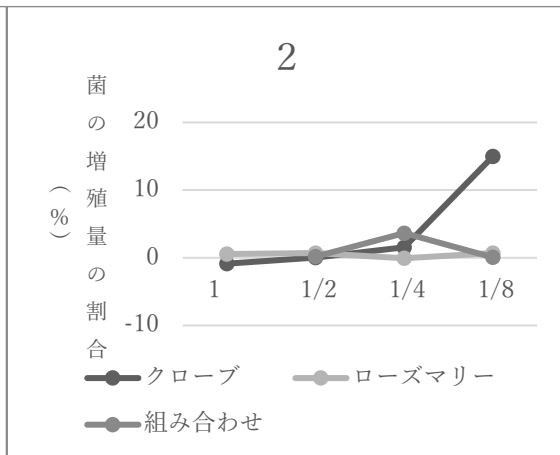
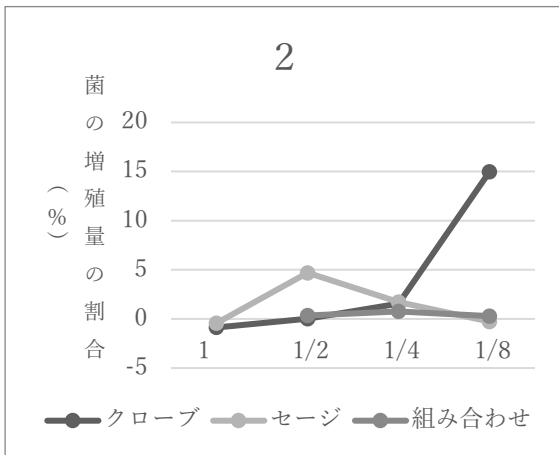
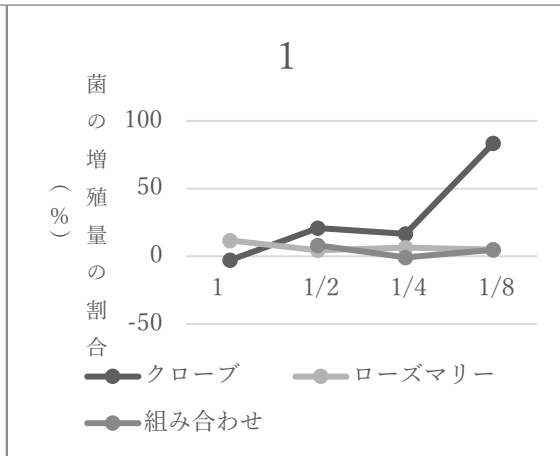
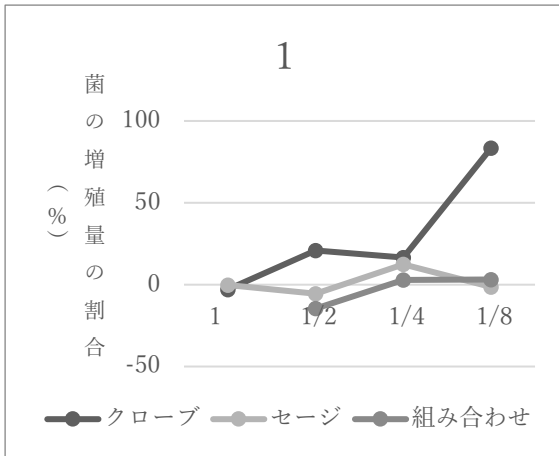


※グラフタイトルの番号は、それぞれ菌につけた番号を表す

クローブ

クローブ+セージ

クローブ+ローズマリー

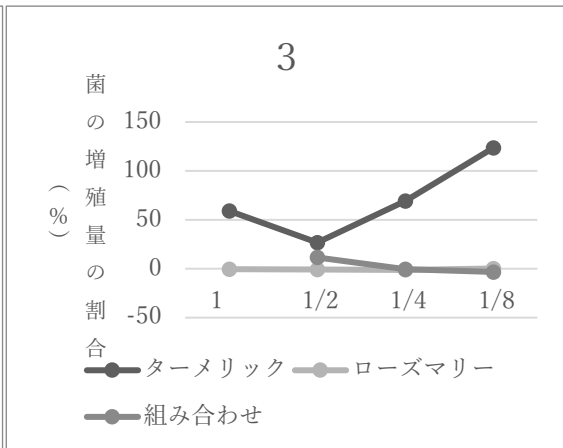
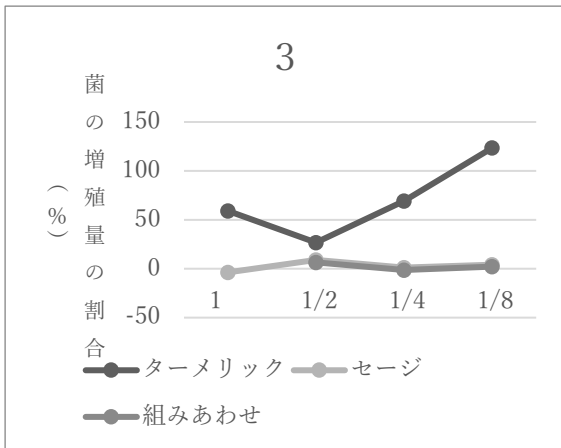
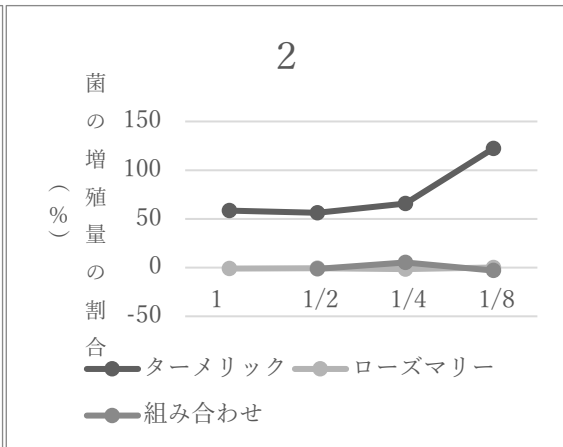
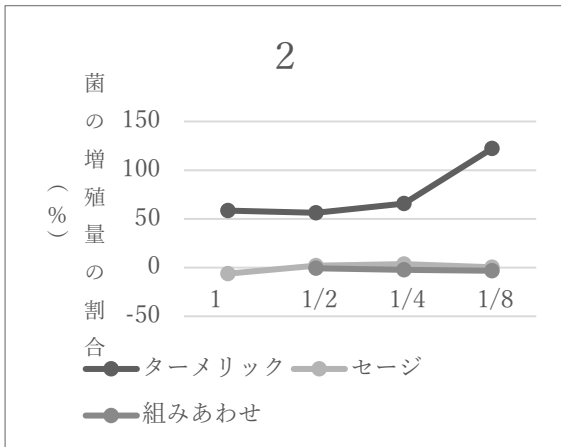
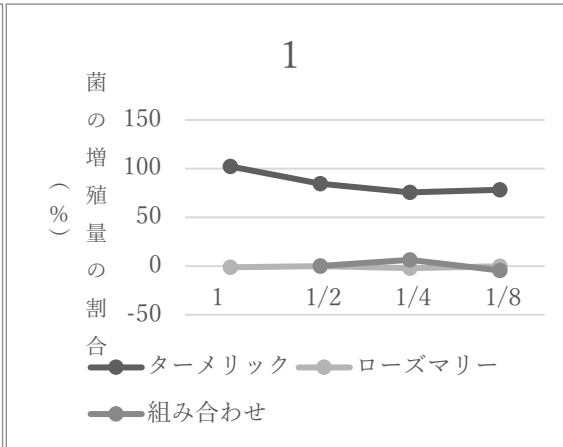
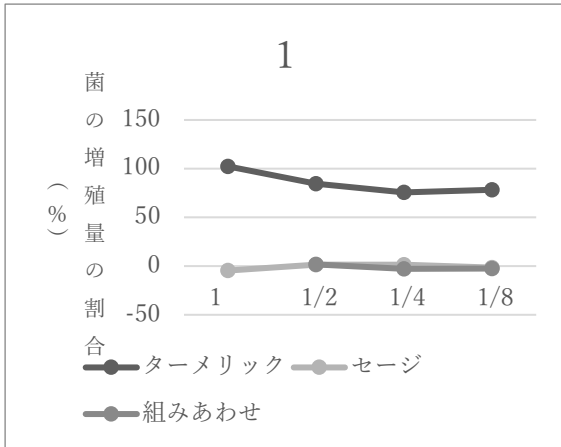


※グラフタイトルの番号は、それぞれ菌につけた番号を表す

ターメリック

ターメリック+セージ

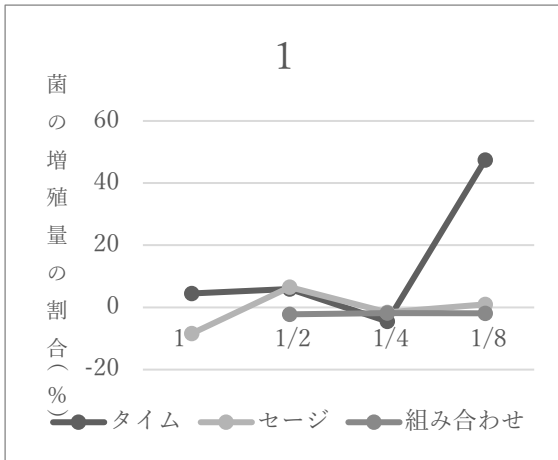
ターメリック+ローズマリー



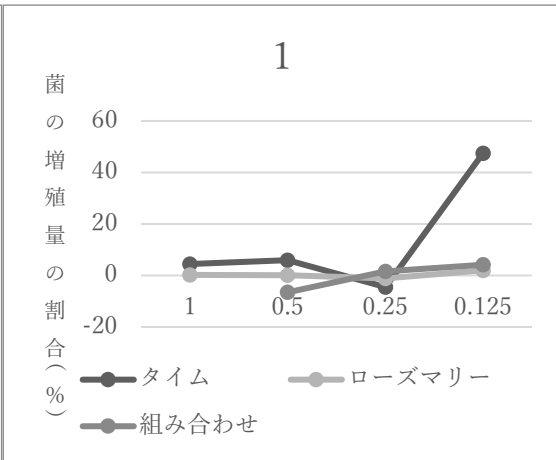
※グラフタイトルの番号は、それぞれ菌につけた番号を表す

タイム

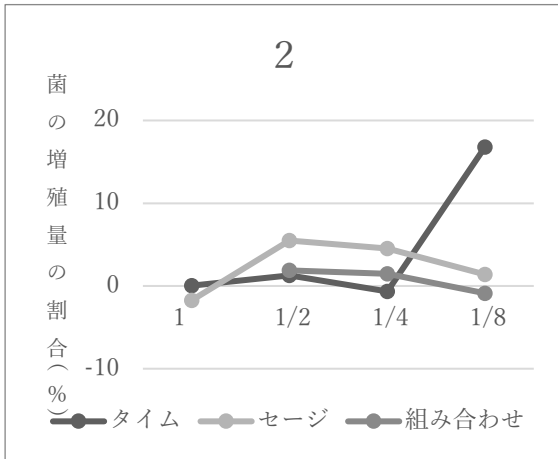
タイム+セージ



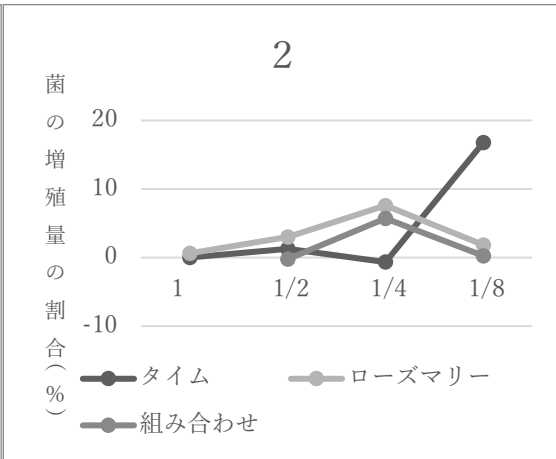
タイム+ローズマリー



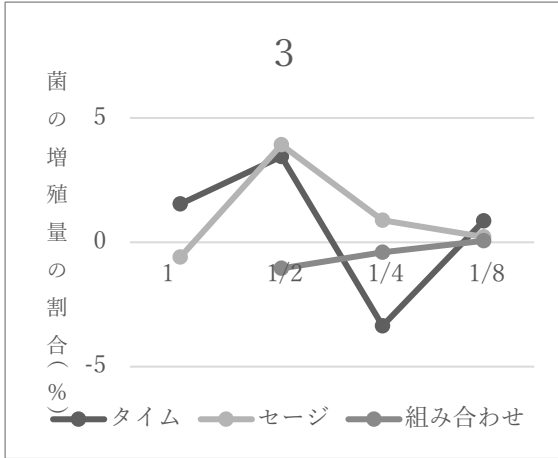
2



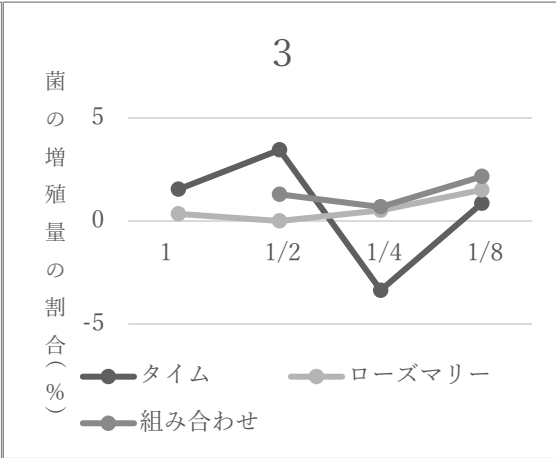
2



3



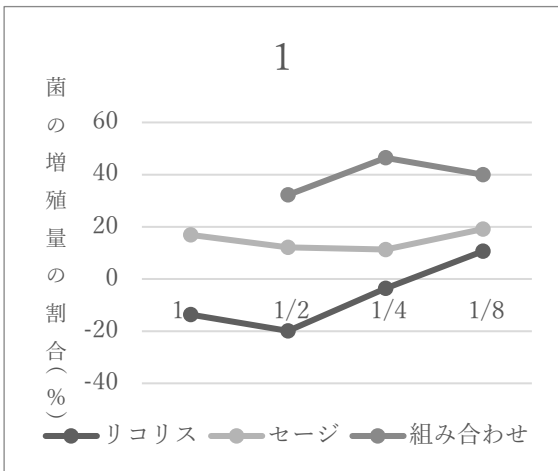
3



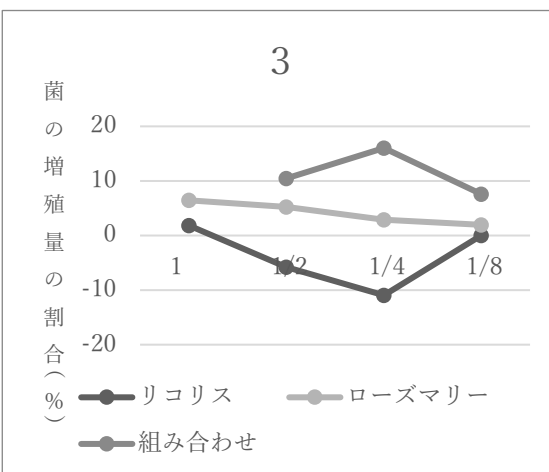
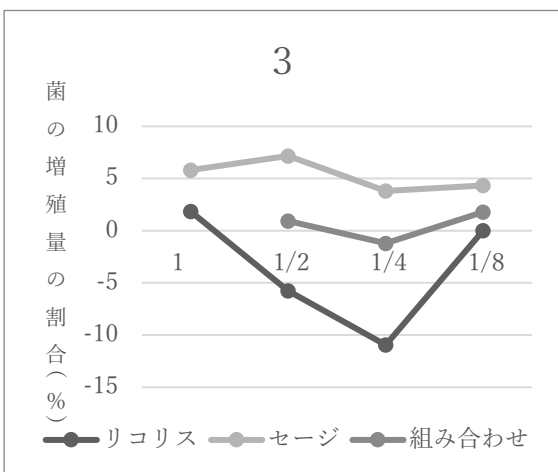
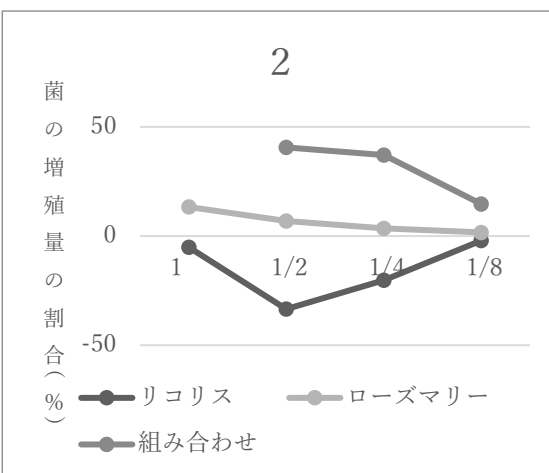
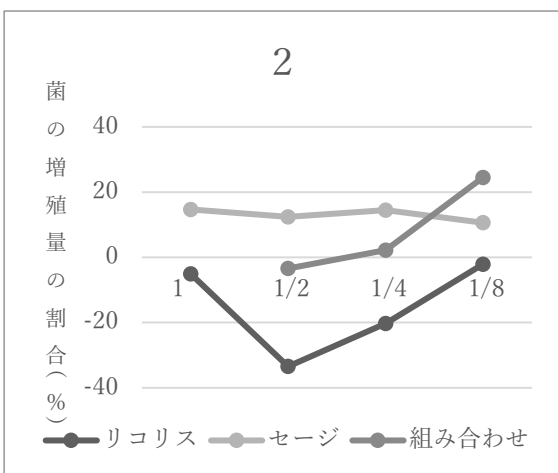
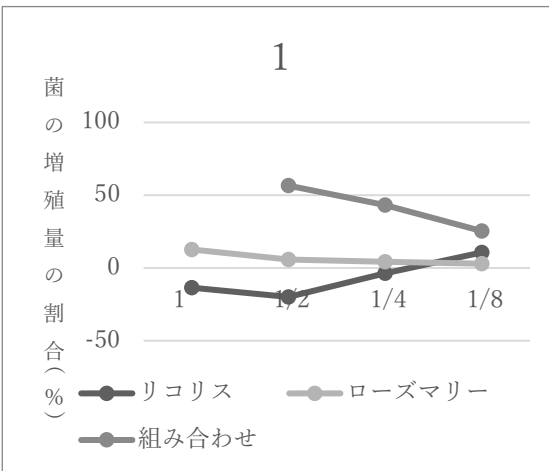
※グラフタイトルの番号は、それぞれ菌につけた番号を表す

リコリス

リコリス+セージ



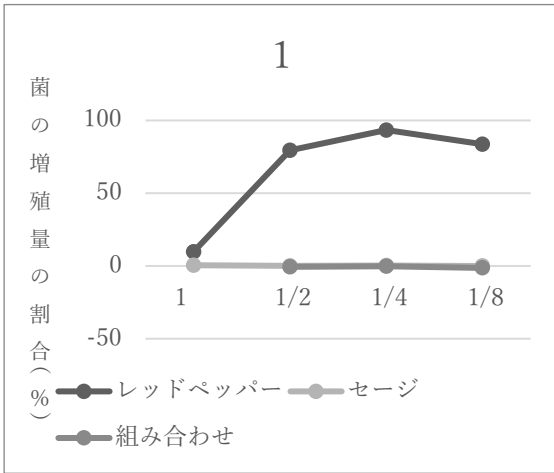
リコリス+ローズマリー



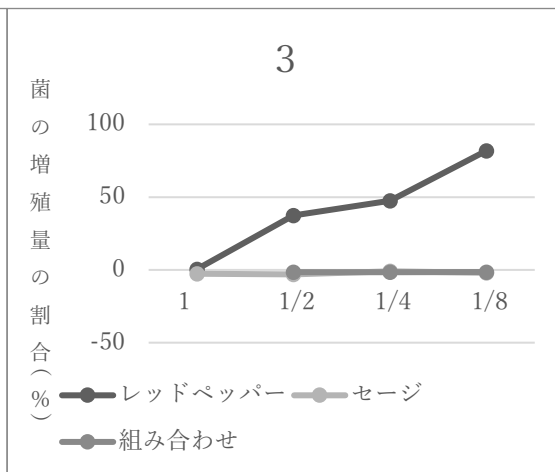
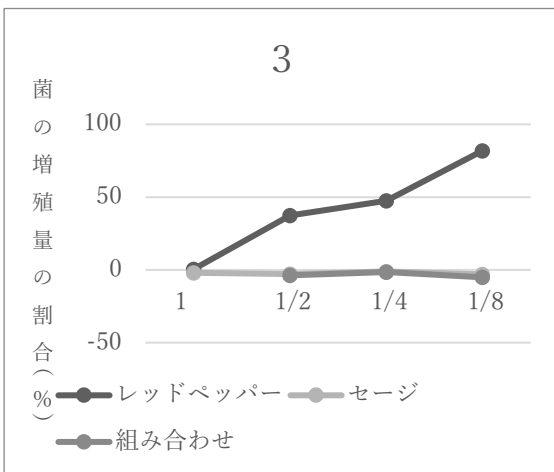
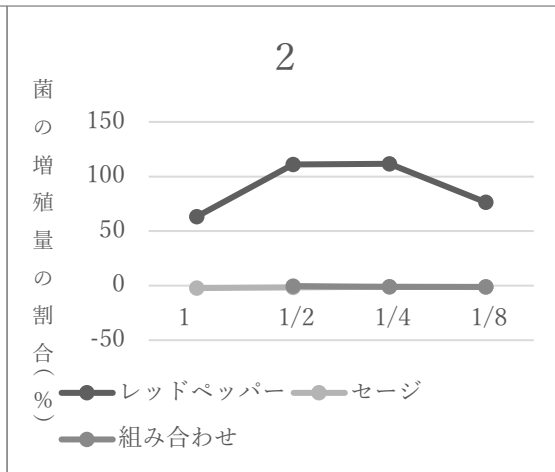
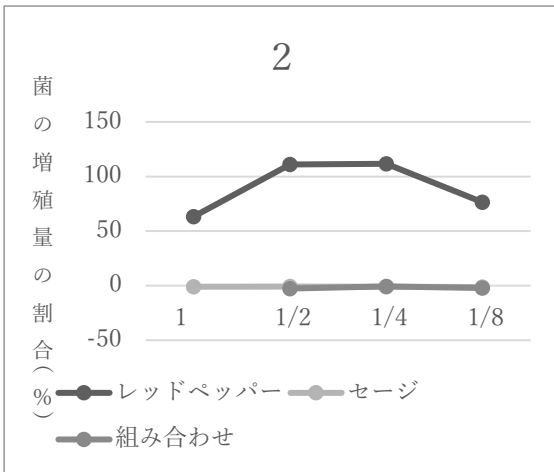
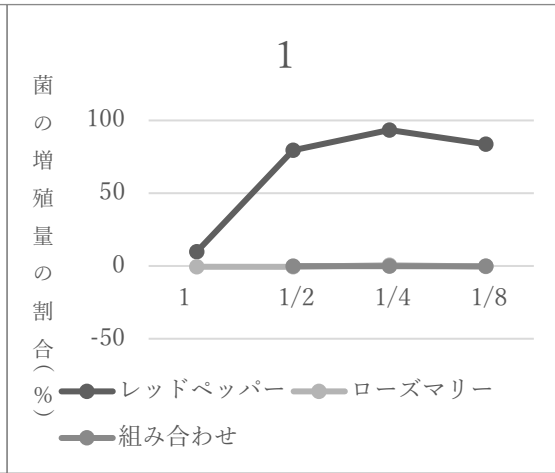
※グラフタイトルの番号は、それぞれ菌につけた番号を表す

レッドペッパー

レッドペッパー+セージ



レッドペッパー+ローズマリー



※グラフタイトルの番号は、それぞれ菌につけた番号を表す

考察3

かけ合わせることによる抗菌効果の強さの変化については以下の4パターンを想定した。

- 1.セージやローズマリーの抗菌作用が強いため他のスパイスが効果を発揮しなくてもかけ合わせとしては強い抗菌効果を持つ場合。
- 2.セージやローズマリーとかけ合わせてもそれぞれが単体の時の同じ抗菌効果を発揮する場合、いわゆる相加効果を持つ場合。
- 3.セージやローズマリーと掛け合わせることによってそれぞれが単体の時より強い抗菌効果を発揮する場合、いわゆる相乗効果を持つ場合。
- 4.セージやローズマリーの強い抗菌効果を他のスパイスが阻害しかけ合わせの抗菌作用が強くない場合。

結果のグラフからほとんどが1/8倍の濃度でも0%付近であり強い抗菌作用を持つことが分かる。つまりほとんどが上記の1~3のいずれかに含まれることは確実だが、今回の実験方法では0%付近になったもの同士では抗菌作用の強さの比較が行えないため1~3の中でどれに当てはまるかは特定できないが、単体のサンプルの抗菌効果を損ねることがないということが推定される。一方、リコリスとのかけ合わせは唯一4に当てはまる。×セージ、×ローズマリー共に単体の時より抗菌作用が弱まっていることからリコリス自体が他の抗菌作用を弱める効果を持つと推測できる。

【グラム染色】

〈結果〉

今回使用した菌1~3について、グラム染色した結果を写真1に示した。写真から、菌1,2はグラム陽性桿菌、菌3はグラム陰性桿菌であることが判明した。

【今後の展望】

かけ合わせたものについて、ほとんどが強い抗菌作用を示すことと、組み合わせによって弱めあう組み合わせが存在することがわかった。強い抗菌作用を持つことが分かったものについて、飲料や調味料として使える程度の濃度まで薄めた状態での抗菌作用を調べることによって日々の料理に応用することも可能であると考えられる。反対に、濃度を濃くすることによって日常生活で消毒液として活用できる濃度も検証することができる。これによって当初の目的であったアルコール除菌に取って代わる消毒液を身近なものから作ることが可能になるかもしれない。消毒液に作製にあたってはスパイスの持つ特有の臭いや色についても使用意欲の向上する色や臭いの探求、加えて料理に使用する際には食欲の増進につながるような味の探求も必要となってくる。また、今回はスパイスが持つ抗菌作用について調べたが、今後はすでに培養した菌とサンプルを混ぜることによってそれらのサンプルによる殺菌作用を検討していきたいと考えている。

【参考文献】

80のスパイス辞典 著者:武政三男

https://www.jstage.jst.go.jp/article/cookeryscience1968/25/2/25_159/pdf