植物由来の抗菌液を作る

5年B組　大竹 凜央
指導教員　櫻井　昭

1. 要約

植物由来の抗菌液を作ることを目的に，レモン・レモンマートル・ドクダミ・キンカン・タイム・ローズマリー・ラベンダーの抗菌作用を調べた。その結果，ローズマリーが比較的強い抗菌作用を示すことが分かった。また，植物の抗菌作用は含まれるポリフェノール量に比例するという先行研究[1]に基づき，ローズマリー水溶液中のポリフェノール量を求めた。結果として，生のローズマリー10 g の抽出液には見かけ上 11 mg/100 mL，乾燥ローズマリー1 g の抽出液には見かけ上 5.2 mg/100 mL のポリフェノールが含まれることが分かった。また，抽出液を滅菌フィルターに通したり冷凍したりしてもポリフェノール量は変化しないことも分かった。

キーワード　抗菌作用，消毒，ローズマリー，ポリフェノール

2. 研究の背景と目的

昨今のコロナ禍において，エタノールを用いて手指などを消毒する機会が増加した。しかし，友人に皮膚の弱さからエタノールを使用することができない者がいたため，エタノールを使わず，なおかつ家庭でも作成できる抗菌液を作れないかと考えた。そのような抗菌液のレシピは既にインターネット上で公開されているが，レシピに抗菌作用が本当にあるのか示されていない。よって，科学的根拠に基づく，家庭で手軽に作成可能な抗菌液の開発を目指して，研究を始めた。

本研究では，まず，抗菌作用を持つ植物を確定するため，様々な植物液に対する抗菌試験を行った。次いで，より簡便に，より大量に抗菌液を作成できるレシピにするため，植物液に含まれるポリフェノール量を求め，抗菌作用の強さを数値化することを目指した。この時，生の葉より乾燥した葉の方が入手が容易であることから，ポリフェノール量を基に，実験対象を乾燥させたものに置き換えることにした。さらに，植物液の保存が問題になったため，冷凍しても抗菌作用が認められるか，また，含有ポリフェノール量が変化していないかについても実験を行うことにした。

3. 研究内容

3-1　研究材料

3-1.1　植物

本研究に用いたレモン，レモンマートル，ドクダミ，二種類のラベンダーの葉は自家栽培のものを譲り受けた。キンカン，キョウチクトウについては学校に生えていたものを採取した。生タイム，生ローズマリーはエスビー食品が食用に販売していたものを使用したほか，生ローズマリーについては一部を自家栽培のものを譲り受けた。乾燥ローズマリーはエスビー食品が販売する

ローズマリー(ホール)を使用した。

3-1.2　薬品

精製寒天末，LB 培地(1 L 中，トリプトン 10 g，酵母エキス 5 g，塩化ナトリウム 10 g)はナカライテスク株式会社製を使用した。ブドウ糖ペプトン培地(1 L 中，ブドウ糖 20.0g，酵母エキス 2.0 g，硫酸マグネシウム 0.5 g，ペプトン 5.0 g，リン酸二水素カリウム 1.0 g，pH±0.1)と，マンニット食塩培地(1 L 中，肉エキス 1.0 g，ペプトン 10.0 g，塩化ナトリウム 75.0 g，マンニット 10.0 g，フェノールレッド 0.025 g，カンテン 15.0 g，pH7.4±0.2)は日本製薬株式会社製を使用した。

3-1.3　菌類・細菌類

Escherichia coLi(*E.coLi*)(以下，大腸菌)

グラム陰性細菌。人間の大腸内に最も多く存在する好気性共生細菌である。無菌部位に侵入した場合，感染症を引き起こしうる。LB 培地を用い 42℃で一晩培養した。

Saccharomyces cerevisiae(*S.cerevisiae*)(以下，イースト菌)

ビールやパンの発酵に利用される。糖分の多い食物の傷みの原因となる他，人が長時間晒されると過敏性肺炎を引き起こすことがある。ブドウ糖ペプトン培地を用いて 37℃で一晩培養した。

AspergiLLus brasiLiensis(A. *brasiLiensis*)(以下，アスペルギルス)

免疫力が低下している者の体内に取り込まれた場合，日和見感染症の一つであるアスペルギルス症を引き起こすことがある。空調設備などに生息する。ブドウ糖ペプトン培地を用いて 37℃で一晩培養した。

Candida aLbicans(*C.aLbicans*)(以下，カンジダ)

皮膚や腸内，口腔内に存在する常在菌の一種。何らかの原因で大量発生した場合にカンジダ症を引き起こす。LB 培地を用いて 37℃で一晩培養した。

Pesudomonas aeruginosa(*P.aeruginosa*)(以下，シュードモナス)

グラム陰性細菌。免疫力が低下している者の体内に取り込まれた場合，日和見感染症の一つである緑膿菌感染症を引き起こすことがある。LB 培地を用いて 39℃で一晩培養した。

StaphyLococcus aureus(*S.aureus*)(以下，黄色ブドウ球菌)

グラム陽性細菌。常在菌の一種で，毒素を生産し食中毒を引き起こす。皮膚で化膿した場合，ニキビの原因となる。マンニット食塩培地を用いて 39℃で一晩培養した。

3-2　研究方法

3-2.1　植物抽出液の作製

3-2.1-1　冷浸法

レモン，レモンマートル，ドクダミ，キンカン(抗菌実験 1，2 で使用)，キョウチクトウの抽出液作製に利用した。

植物の生の葉 10 g に対し，蒸留水 100 mL の割合で，瓶に入れた。その後一ヵ月放置することで植物内成分を抽出した。得た抽出液は滅菌フィルター(0.20 μm)に通し滅菌した。その後は冷蔵庫で保存した。

3-2.1-2　煎出法

タイム，ローズマリー，ラベンダー，キンカン(抗菌実験 3 以降で使用)の抽出液作製に利用した。

試料(特筆しない限り 5 g)と蒸留水 50 mL を同じ 200 mL ビーカーに入れ，ビーカーの水面の部分にペンかテープを使用して印

をつけた。次に蒸留水を 100 mL 追加し，ガスバーナーで水面が印と重なるまで加熱した。保存は冷蔵庫で行った。

3-2.2　抗菌試験

3-2.2-1　培地作成

LB 培地(培地粉末 5 g，精製寒天末 3 g)，ブドウ糖ペプトン培地(培地粉末 5.7 g，精製寒天末 3 g)，マンニット食塩培地(培地粉末 22.2 g)をそれぞれ 500 mL フラスコに入れた。次に蒸留水を 200 mL 加え，オートクレーブを用いて 120℃で 20 分間滅菌した。約 80℃まで冷まし，シャーレに分注した。

3-2.2-2　予備実験

手指に付着した細菌類・菌類を調べるため，人差し指を LB 培地，ブドウ糖ペプトン培地の両方にそれぞれ 5 秒間押し付けた。その後，LB 培地は 42℃，ブドウ糖ペプトン培地は 37℃で 3 日間培養した。

黄色い細菌，白い細菌，黄色い菌，白い菌が得られた。

3-2.2-3　菌の塗布

3-2.2-3-1　白金耳を使う方法

ガスバーナーで白金耳全体を加熱して滅菌したのち，塗布したい菌か細菌を 1 コロニー取って培地全体に塗り広げた。

3-2.2-3-2　コンラージ棒を使う方法

菌か細菌を滅菌水 500 mL に対し 1 コロニー混ぜて菌液を作成した。これを培地の中央に 200 mL ずつ注ぎ，コンラージ棒を用いて培地に満遍なく広げた。コンラージ棒は使用前と使用後に火炎滅菌した。

3-2.2-4　ディスク拡散法

ディスク拡散法とは菌あるいは細菌を塗布した培地に調べたい液体を染み込ませたディスクを置き，培地中の水分を吸収させることで液体を拡散させる方法である。調べたい液体が抗菌作用を示すと，ディスク周辺に阻止円(コロニーが発生していない範囲が円状に現れたもの)ができる。阻止円の有無，大きさによりその感受性を確認することができる。今回の実験では培地を 4 つに区分してそれぞれの中央にペーパーディスクを置き，調べたい液体を 50 µL か 100 µL 注ぐことで行った(図 1)。

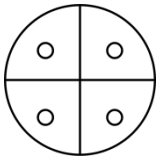


図 1　抗菌実験の模式図

3-2.2-5　抗菌実験

以下，行った実験の条件を記す。

抗菌実験 1

試料 : レモン，キンカン，レモンマートル，ドクダミ，キョウチクトウ

陽性対照	陰性対照	器具	実験対象
エタノール	液体なし	白金耳	大腸菌　黄色い細菌　白い細菌
エタノール	液体なし	コンラージ棒	イースト菌　黄色い菌　白い菌

抗菌実験 2

試料:タイム, ローズマリー, ラベンダーA, ラベンダーB

陽性対照	陰性対照	器具	実験対象
カナマイシン	液体なし	コンラージ棒	カンジダ　アスペルギルス

抗菌実験 3

試料:タイム, ローズマリー, ラベンダーA, ラベンダーB

陽性対照	陰性対照	器具	実験対象
アンピシリン	液体なし	コンラージ棒	カンジダ　シュードモナス

抗菌実験 4

試料:タイム, ローズマリー, ラベンダーA, ラベンダーB

陽性対照	陰性対照	器具	実験対象
カナマイシン	液体なし	コンラージ棒	カンジダ　シュードモナス

抗菌実験 5

試料 : ローズマリー，キンカン

陽性対照	陰性対照	器具	実験対象
カナマイシン	液体なし	コンラージ棒	カンジダ　シュードモナス

抗菌実験 6

試料：ローズマリー，キンカン

陽性対照	陰性対照	器具	実験対象
カナマイシン	滅菌水	コンラージ棒	シュードモナス

抗菌実験 7

試料：ローズマリー1 g，ローズマリー2g，
ローズマリー(生)

陽性対照	陰性対照	器具	実験対象
カナマイシン	滅菌水	白金耳	シュードモナス 黄色ブドウ球菌

抗菌実験 8

試料：保存条件の違うローズマリー溶液

陽性対照	陰性対照	器具	実験対象
カナマイシン	滅菌水	コンラージ棒	シュードモナス 黄色ブドウ球菌

3-2. 3-1　ポリフェノール量測定

ポリフェノールの定量測定には，フォーリン・デニス法[2]を用いた。

試料，蒸留水，0.5～2.0 mg/100 mL で 0.5 mg おきに 4 段階調製したタンニン酸標準溶液をそれぞれ 5 mL ずつ遠沈管にとり，フォーリン試薬を加えて 3 分間放置した。次に 10%(w/ｖ)炭酸ナトリウム溶液 5 mL を加えて 60 分間放置した。その後，遠心分離(3000 rpm，5 分間)し，上澄み液の 760 nm の吸光度を測定した。ポリフェノールの量は同時に操作して得た検量線から求めた。なお，フォーリン・デニス法はビタミン C の影響を受けるため，今回求めたポリフェノール量は見かけのポリフェノール量とした。

3-2. 3-2　ポリフェノール量測定

乾燥にあたり水分が 9 割飛ぶと考え[3]，生ローズマリーは 10 g，乾燥ローズマリーは 1 g を抽出したものを使用した。

乾燥ローズマリー溶液は 100 倍希釈，生ローズマリー溶液は 200 倍希釈で，ポリフェノール量が測定可能な範囲に収まった。

この際，本来 10 %(w/ｖ)炭酸ナトリウム溶液 5 mL を使うべきところ，誤って 10%(w/ｔ)炭酸ナトリウム溶液を使っていた。

再度，10 %(w/ｖ)炭酸ナトリウム溶液 5 mL を用い，乾燥ローズマリー溶液 100 倍希釈でポリフェノール量の測定を行い，検量線を得ることができた。

4. 結果

各実験の条件と結果は以下の通りである。阻止円がはっきりと確認された場合「＋」，僅かに確認された場合，あるいは発生していると推測された場合「±」，確認されなかった場合「－」を表に書き入れた。また，菌や細菌が増殖しなかった場合は「×」を書き入れた。

例えば抗菌実験 1 において，大腸菌に対するエタノールの結果は 1 回目に阻止円が形成され，2 から 4 回目では阻止円が確認できなかったことを示す。

抗菌実験 1

使用した菌 / 試料(50μℓ)	大腸菌	黄色い細菌	白い細菌	イースト菌	黄色い菌	白い菌
エタノール	＋－－－	－＋－－	＋－××	＋＋＋±	－±××	±±××
液体なし	－－－－	－－－－	－－××	－－－－	－－××	－－××
キンカン	－－	－－	－×	＋＋	－×	－×
ドクダミ	－－	－－	－×	－－	－×	－×
キョウチクトウ	－－	－－	－×	－－	－×	－×
レモン	－－	－－	－×	－－	－×	－×
レモンマートル	－－	－－	－×	－－	－×	－×

抗菌実験 2

使用した菌 / 試料(50μℓ)	カンジダ	アスペルギルス
カナマイシン	－－	＋＋
液体なし	－－	－－
タイム	－－－	－－－
ローズマリー	－－－	±±－
ラベンダーA	－－－	－－－
ラベンダーB	－－－	－－－

抗菌実験 3

使用した菌 / 試料(50μℓ)	カンジダ	シュードモナス
アンピシリン	－－	－－
液体なし	－－	－－
タイム	－	－
ローズマリー	－	－
ラベンダーA	－	－
ラベンダーB	－	－

抗菌実験 4

使用した菌 / 試料(50μℓ)	カンジダ	シュードモナス
カナマイシン	－－	＋＋
液体なし	－－	－－
タイム	－	－
ローズマリー	－	－
ラベンダーA	－	－
ラベンダーB	－	－

抗菌実験 5

使用した菌 / 試料(100μℓ)	カンジダ	シュードモナス
カナマイシン	－－	＋＋
液体なし	－－	－－
ローズマリー	－－	＋＋
キンカン	－－	＋＋

抗菌実験 6

使用した菌 / 試料(100μℓ)	シュードモナス
カナマイシン	＋＋＋
滅菌水	－－－
ローズマリー	－＋＋
キンカン	－－±

抗菌実験 7

使用した菌 / 試料(100μℓ)	シュードモナス	黄色ブドウ球菌
カナマイシン	＋＋	＋＋
滅菌水	－－	－－
ローズマリー1g	－	＋
ローズマリー2g	－	＋
ローズマリー(生)	－	＋

抗菌実験 8

使用した菌 / 試料(100μℓ)	シュードモナス	黄色ブドウ球菌
カナマイシン	××＋＋	××＋＋
滅菌水	××－－	××－－
冷蔵　フィルターあり	××＋＋	××＋＋
冷蔵　フィルターなし	××＋＋	××＋＋
冷凍　フィルターあり	××＋＋	××＋＋
冷凍　フィルターなし	××＋＋	××＋＋

ポリフェノール量測定(1 回目)

図 2 より以下のような見かけのポリフェノール量が求められた。

乾燥ローズマリー抽出液：5.2 mg/100 mL

生のーズマリー抽出液：11 mg/100 mL

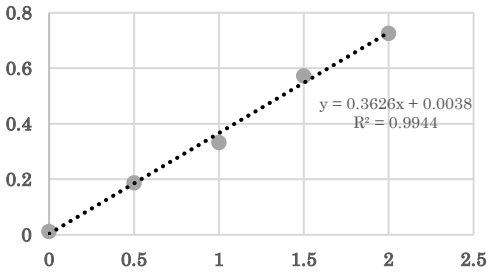


図 2　ポリフェノール量測定 1 回目の検量線

ポリフェノール量測定(2 回目)

図 3 より見かけのポリフェノール量は以下の表のように求められた。

	フィルターあり	フィルターなし
冷凍保存	11	8.6
冷蔵保存	8.6	8.6

(単位：mg/100mL)

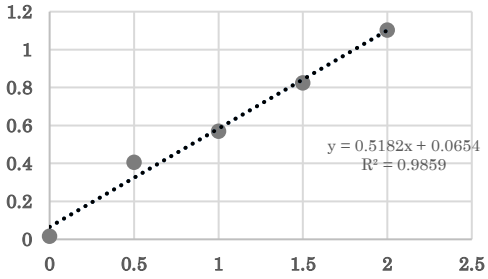


図 3　ポリフェノール量測定 2 回目の検量線

5. 考察

抗菌実験 1～3 より, キンカンはイースト菌に抗菌活性を，シュードモナスに弱い抗菌活性を持つと考えられた。また，抗菌実験 2 と 3 より，ローズマリーはアスペルギルスに弱い抗菌活性を，シュードモナスに抗菌活性を持つと考えられた。よってこの時点で，抗菌液の原料をローズマリーが有用だと定めた。

ポリフェノール量 1 回目の実験から，生ローズマリー10 g の抽出液に含まれるポリフェノール量は乾燥ローズマリー1 g の抽

出液に含まれるポリフェノール量のおよそ2倍であることが分かった。よって抗菌実験4では，この実験で用意した抽出液に加えて乾燥ローズマリー2 gの抽出液も用意した。

抗菌実験4から，いずれの抽出液にも黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用があることが分かった。

抗菌実験5から，冷蔵保存した抽出液にも冷凍保存した抽出液にもシュードモナスと黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用があることが分かった。

また，ポリフェノール量測定2回目より，滅菌フィルターを通して冷凍保存した抽出液以外は概ねポリフェノール量が等しいことが分かった。滅菌フィルターに通してから冷凍保存した抽出液のポリフェノール量が突出していた理由は不明である。

よって，作成する抗菌液は乾燥ローズマリーを原料として冷凍保存するのがよいと分かった。

6. 今後の展望

可能な限り安く，大量に製作できる抗菌液のレシピを作るには，抽出液の濃度を最低限にする必要がある。今後はフォーリン･デニス法と，l抗生剤を倍々希釈して，どの濃度で菌及び細菌の発育が阻害されるか調べる方法。ディスク拡散法と違い，最小発育阻害濃度をμg/mLで求めることができるMIC法[4]を併用し，ローズマリー抽出液が抗菌作用を持つときの最低ポリフェノール量を求めたい。

7. 参考文献

[1]　小山さくら　ほか，手指から分離した細菌に対する植物抽出液の抗菌効果，人間生活学研究　第6号，2015，P.41～51

[2]　安井明美　ほか編，日本食品標準成分表，建帛社，2015，P.200～201

[3]尾谷覧　ほか，各種乾燥法によるアオジソの乾燥特性，北海道立工業試験場報告No.290，1991，P.81～91

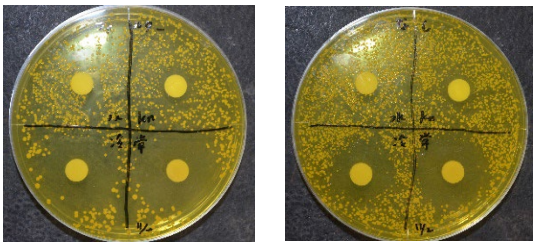
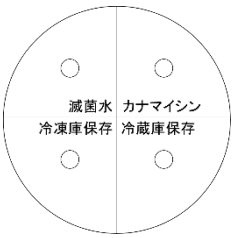
[4]検査科細菌部門「薬剤感受性検査MIC(最小発育濃度)について」，広島市医師会だより　第518号

8. 謝辞

今回の研究を行うにあたり，指導教員の櫻井先生には多大なご指導を賜りました。

また，柏尾春奈様には実験にご協力いただいたほか，阿久津優衣様，武村優様は実験材料を提供してくださいました。

皆様に深くお礼申し上げます。

9. 資料

抗菌実験 8　黄色ブドウ球菌への実験の結果である。左がフィルターあり，右がフィルターなしの結果となっている。