

抗菌性物質研究の材料としての植物種子の実用性について

Application of Plant Seeds as a Source of Antimicrobials

汐満 幸知 Sachi Shiomitsu

(家政学部管理栄養士専攻卒業生)

外城 寿哉 Hisaya Sotoshiro

(家政学部管理栄養士専攻)

抄 録

植物は高度に分化した生体防御機構をもっていることは良く知られている。ある種の植物の二次代謝産物は、微生物感染から自らを守る生体防御機構として働いていると考えられている。この研究では植物の種子を材料にして、その抗菌性を調査した。63 種類の植物種子の抗菌性を調査し、そのうち 13 種類が 6 株の *Bacillus* 属菌のいずれかに抗菌性を示すことが認められた。これら 13 種類の種子のうち 10 種類がアブラナ科植物のものであった。また、ピーマン、へちまおよびししとうの種子にも抗菌性があることが認められた。これらの結果から、植物種子は抗菌性物質探索の研究材料として優れていることが示された。

キーワード

植物種子 plant seeds、 抗菌性 antimicrobials、 *Bacillus* 属 genus *Bacillus*、
協会酵母 701 号 *Saccharomyces. cerevisiae* K-701

目 次

- 1 はじめに
- 2 材料と方法
- 3 結果
- 4 考察

1 はじめに

植物は高度に分化した生体防御機構をもっていることはよく研究されている。ある種の植物の二次代謝産物もまた、微生物感染から自らを守る生体防御機構として働いているとされている¹⁾。これらの植物は、食品の腐敗防止や伝統療法のために古くから利用されてきた経験がある²⁾。特に、ヒガンバナ科ネギ属およびアブラナ科に分類される植物は、効果的に用いられてきた歴史がある^{3,4,5)}。

植物は移動性をもたないことから、生育に向かない環境変化に適応するために植物体の一部を休眠器官として分化させている。例えば、種子、塊根、塊茎、鱗茎、樹木の冬芽およびムカゴなどがそれである⁶⁾。種子には、発芽に必要なタンパク質、炭水化物、脂質あるいは酵素・補酵素などが蓄積されていることが知られている⁷⁾。したがって、抗菌性物質

を含めた二次代謝物も種子などの休眠器官に蓄積させていると予想される。

本研究では、種苗会社から販売されている植物種子を無作為抽出し、その中から *Bacillus* 属菌および酵母に抗菌性を示す植物種子をスクリーニングし、抗菌性の強度と特異性を種子ごとに比較した。さらに、種子が抗菌性物質研究の材料として実用性があるかどうか考察した。

2 材料と方法

2.1 微生物株

実験に用いた *Bacillus* 属菌は、B①:*Bacillus subtilis* ATCC6051 (IFO13719)、B②:*Bacillus pumilus* ATCC12092 (IFO12092)、B③:*Bacillus licheniformis* ATCC12200(IFO14580)、

B⑤: *Bacillus cereus* ATCC11778(IFO3836)、
B⑦: *Bacillus coagulans* (IFO3557)および
B⑧: *Bacillus subtilis* ATCC6633 (IFO3134,13720)
である。これらの菌株には本論の表記上、B+○ (数字) として略号を割り当てた。また、酵母には
Saccharomyces cerevisiae K-701 を用い、S⑦という略号を割り当てた。

2.2 微生物株の増菌

Bacillus 属菌は、斜面培地に保存されていた菌株の一部を白金耳で釣菌し、5ml の SCD (トリプトソーヤブイヨン) 液体培地 (ニッスイ) を用い 30℃5 日間培養した。これらの懸濁液を標準寒天培地 (ニッスイ) に画線培養し、その中の独立した 1 コロニーを実験に用いた。*S. cerevisiae* も同様に保存菌株から白金耳で釣菌し、5ml の YPD 液体培地 (Difco) を用い 30℃5 日間培養し、懸濁液をポテトデキストロース寒天培地 (ニッスイ) 上に画線培養したのち、1 コロニーを実験に用いた。

2.3 植物種子

植物種子は、岡崎市内のホームセンターおよびネット通信において販売されているものを用いた。用いた種子は、鷹の爪、ほうれん草、スイカ、はつか大根、キャベツ、ニンジン、かいわれ、レタス、えごま、ピーマン、小松菜、つるむらさき、パセリ、ヘチマ、モロヘイヤ、タアツアイ、オクラ、黒ゴマ、からし菜 (むらさき)、京水菜、ズッキーニ、かぶ、チンゲンサイ、チャイブ、ししとう、エンツァイ、おかひジキ、かぼちゃ、メロン、アスパラガス、ネギ、ゴボウ、九条ねぎ、ブロッコリースプラウト、きゅうり、大葉にら、白ごま、アーティチョーク、ゴーヤ、ミニトマト、三つ葉、にら、パプリカ、あしたば、セルリー、ブロッコリー、ヒョウタン、キヌア、ルッコラ (スプラウト)、白菜、水菜、菜花、

クレソン、カリフラワー、からし菜、コールラビ、ロマネスコ、野沢菜、ケール、芽キャベツ、ルッコラの計 63 種類であった。なお、上記の種子の名称は商品ラベルに記載されているものを漢字、ひらがな等を変換せずにそのまま用いており、和名表記ではない。

これらの種子は、中性洗剤を用いて表面の農薬を落としホモゲナイザーで破砕した。破砕物を乳鉢に入れ、種子重量の 5 倍量 (V/W) の 0.85%NaCl 溶液を加えさらに細かく破砕した。これらを遠沈管に移し 2,500rpm、5 分間遠心処理を行い、上清を抗菌性試験の試料とした。

2.4 抗菌性試験

ディスク拡散法は次の通り行った。培養した *Bacillus* 属菌懸濁液を 0.1ml 取り φ90mm シャーレ内の標準寒天培地 (ニッスイ) に塗抹した。同様に、*S. cerevisiae* の懸濁液を 0.1ml 取りシャーレ内のポテトデキストロース寒天培地 (ニッスイ) に塗抹した。先に述べた通り用意した種子の遠心上清を 75μL とり、φ8mm 円形ろ紙 (ADVANTEC) に浸潤させ寒天培地上に並べた。寒天培地上には対照としてクロラムフェニコール (CP) 含有ろ紙 (栄研化学) を置いた。これらを 30℃で 1~2 日培養し、培地上に出現した阻止円を観察した。

液体培地の透過率は次の通り求めた。SCD 液体培地と試料を表 1 の容量で混和・調整した。これらを 48 穴プレートに入れ *Bacillus* 属菌懸濁液を 1 白金耳接種した。24 時間培養し SCD 液体培地で 4 倍希釈した後、660nm における吸光度から透過率を求めた。透過率は培地のみの透過率を 100 とした相対比で表した。クロラムフェニコール混和培地を陽性コントロールとした。液体培地の透過率による実験では *S. cerevisiae* は用いなかった。

表 1

	CP 混和培地	5 倍希釈	25 倍希釈	125 倍希釈	625 倍希釈	315 倍希釈	試料なし
SCD	499.5μL	400μL	480μL	496μL	499.2μL (499μL)	499.84μL (500μL)	500μL
試料	—	100μL	20μL	4μL	0.8μL	0.16μL	—
CP	0.5μL	—	—	—	—	—	—
全量	500μL	500μL	500μL	500μL	500μL	500μL	500μL

3 結果

3.1 ディスク拡散法

ディスク拡散法によって抗菌性の認められた植物種子と *Bacillus* 属菌または *S. cerevisiae* の対応関係は以下の通りである。

B①: *B. subtilis* ATCC6051 に対しては、キャベツ、かいわれ、小松菜、つるむらさき、ししとう、ブロッコリースプラウト、ブロッコリー、コールラビ、ロマネスコ、ケールに抗菌性が見られた。B②: *B. pumilus* に対しては、キャベツ、つるむらさき、ししとう、ブロッコリースプラウト、ブロッコリー、コールラビで抗菌性が見られた。B③: *B. licheniformis* に対しては、キャベツ、かいわれ、ピーマン、からし菜、ブロッコリースプラウト、ブロッコリー、コールラビ、ケールで抗菌性が見られた。B⑤: *B. cereus* に対しては、はつか大根、キャベツ、かいわれ、ブロッコリースプラウト、ブロッコリー、コールラビ、ロマネスコで抗菌性が見られた。B⑦: *B. coagulans* に対しては、キャベツ、かいわれ、つるむらさき、コールラビ、ケールで抗菌性が見られた。B⑧: *B. subtilis* ATCC6633 キャベツ、かいわれ、つるむらさき、ブロッコリー、コールラビ、ロマネスコ、ケールで抗菌性が見られた。

他方、S⑦: *S. cerevisiae* では、ほうれん草、ピー

マン、ヘチマに抗菌性がみられた。表 2 は、上記の結果および目視による阻止円の直径比を示したものである。

3.2 透過率

B①: *B. subtilis* ATCC6051 では 5 倍希釈キャベツ、かいわれ、ブロッコリー、ブロッコリースプラウト、コールラビおよびケールの値が高く、種子の抗菌性が強いことが示された（表 3、図 1a）。25 倍では、キャベツおよびブロッコリースプラウトの透過率が 80 を超えていることから、これらの種子には *B. subtilis* ATCC6051 に対する強い抗菌性物質が含まれていることが示唆された。特に、キャベツの場合 125 倍希釈においても透過率が 59.78 となっているため、これらの種子のなかでは最も強い抗菌性物質が含まれていることが示された。

B②: *B. pumilus* では 5 倍希釈キャベツ、ブロッコリースプラウト、ブロッコリー、コールラビ、ロマネスコおよびケールで値が高くなったが、25 倍希釈以降は、どの種子も透過率が 50 以下となった（表 4、図 1b）。*B. pumilus* は、SCD 液体培地では増殖が比較的弱く、試料なしの場合でも透過率が 40 前後であることから、5 倍希釈試料が種子の抗菌性検出の限界と考えられた。

表 2

	B①	B②	B③	B⑤	B⑦	B⑧	S⑦
ほうれん草							+
はつか大根				+++			
キャベツ	++	+	++	+++	+	++	
かいわれ	++		+	+++	+	+	
ピーマン			+				++
小松菜	+						
つるむらさき	+	+			+	+	
へちま							+
からし菜			+				
ししとう	+	+++					
ブロッコリースプラウト	+	++	+	++			
ブロッコリー	++	+	+	+		+	
コールラビ	+++	++	++	+++	+	++	
ロマネスコ	+++			++		+	
ケール	+		++		+	+	

表 3

B①	CP	5倍	25倍	125倍	625倍	3125倍	試料なし
キャベツ	100.20	97.68	86.98	59.78	14.06	38.76	32.05
かいわれ	99.92	90.94	67.25	13.62	10.32	24.96	18.90
小松菜	100.07	32.90	18.89	17.62	25.89	16.28	13.83
つるむらさき	100.10	41.82	11.80	12.41	26.41	33.83	14.12
ししとう	99.88	24.37	9.78	28.19	15.98	22.73	20.78
ブロッコリースプラウト	99.45	90.18	91.39	21.78	15.10	41.38	20.33
ブロッコリー	100.23	97.64	59.79	13.16	12.97	28.42	12.21
コールラビ	101.27	91.06	65.28	7.57	12.35	10.15	12.56
ロマネスコ	100.77	69.56	39.03	18.01	17.65	15.92	21.56
ケール	22.61	91.82	31.80	13.50	10.76	16.65	8.01
カリフラワー	101.40	61.87	12.74	10.29	10.16	13.84	8.95

表 5

B③	CP	5倍	25倍	125倍	625倍	3125倍	試料なし
キャベツ	100.20	91.28	59.96	55.21	56.05	55.37	55.16
かいわれ	100.67	95.86	51.17	61.99	70.09	60.08	51.59
ピーマン	102.17	4.54	1.63	11.76	65.39	51.31	51.25
からし菜	104.00	46.07	43.63	55.92	52.36	55.61	56.14
ブロッコリースプラウト	106.43	95.77	58.16	54.15	73.94	63.36	51.59
ブロッコリー	109.90	107.50	66.62	59.28	52.78	61.01	62.84
コールラビ	114.63	104.90	—	62.68	63.57	59.44	62.15
ケール	97.93	83.20	65.37	63.11	69.13	68.53	65.09
なばな	98.17	71.78	74.08	73.78	74.52	98.63	64.19
カリフラワー	97.29	64.78	73.27	73.78	70.85	66.47	59.78

表 7

B⑦	CP	5倍	25倍	125倍	625倍	3125倍	試料なし
キャベツ	97.50	78.96	55.50	53.23	49.21	49.21	54.03
かいわれ	98.45	86.16	54.95	51.42	52.46	50.22	49.97
つるむらさき	98.08	20.73	65.91	62.91	62.06	66.32	57.84
コールラビ	98.32	86.69	69.41	68.66	66.54	65.00	66.16
ケール	98.04	77.45	86.34	72.47	64.53	53.23	65.69

B③: *B. licheniformis* では 5 倍希釈キャベツ、かいわれ、ブロッコリースプラウト、ブロッコリー、コールラビおよびケールで透過率が 80 以上となった (表 5、図 1c)。しかし、*B. pumilus* は試料なしの場合でも透過率が 50 以上であることから、SCD 液体培地における増殖性は弱いと考えられた。したがって、5 倍希釈試料における種子の抗菌性が検出の限界であると考えられた。なお、ピーマンの 5 倍希釈液と 125 倍希釈液では、透過率が特別に低値となっていることから、実験操作に問題があることが疑われた。

B⑤: *B. cereus* の場合、5 倍希釈ではブロッコリー、コールラビおよびロマネスコの透過率が 80 を超えて検出されたことから、これらの種子は *B. cereus* に対して抗菌性を持つと考えられた。さらに、試料の希釈倍率を 25 倍、125 倍と上昇させると透過率は漸減していったことから、これらの種子には低濃度でも作用する比較的強い抗菌性物質の存在が示唆された (表 6、図 1d)。

B⑦: *B. coagulans* では 5 倍希釈かいわれおよびコールラビで透過率が 80 を超えていた。また、

表 4

B②	CP	5倍	25倍	125倍	625倍	3125倍	試料なし
キャベツ	100.23	93.21	40.58	35.06	41.42	38.69	37.30
つるむらさき	102.00	50.57	14.46	36.46	49.15	50.35	47.94
ししとう	100.23	5.85	8.36	14.74	15.04	49.73	41.05
ブロッコリースプラウト	100.03	90.79	29.30	42.10	44.95	43.61	41.16
ブロッコリー	102.00	92.08	38.86	45.82	43.12	47.97	48.47
コールラビ	100.40	93.17	26.08	27.13	46.36	25.64	44.82
ロマネスコ	101.90	86.84	19.73	37.51	45.07	46.00	43.49
ケール	100.47	91.14	29.12	38.19	45.81	45.93	44.00

表 6

B⑤	CP	5倍	25倍	125倍	625倍	3125倍	試料なし
はつか大根	97.82	27.21	53.32	57.35	59.12	59.77	55.40
キャベツ	97.82	74.83	66.72	51.43	48.23	49.68	47.77
かいわれ	96.58	78.34	65.01	53.53	44.55	52.08	44.71
ブロッコリースプラウト	95.81	69.87	58.69	50.66	43.36	42.71	41.51
ブロッコリー	97.42	90.70	55.40	48.62	48.63	42.71	43.85
コールラビ	96.81	82.89	47.27	34.08	42.69	44.64	41.03
ロマネスコ	97.43	85.93	24.69	46.87	39.42	37.91	37.45

表 8

B⑧	CP	5倍	25倍	125倍	625倍	3125倍	試料なし
キャベツ	98.24	76.04	66.36	62.01	81.56	82.68	81.55
かいわれ	98.65	84.02	82.28	83.59	74.65	82.45	79.49
つるむらさき	97.93	22.31	46.02	59.56	62.03	68.13	80.61
ブロッコリー	98.09	95.18	53.63	63.48	75.93	79.12	78.73
コールラビ	98.25	87.97	53.19	1.45	56.11	58.35	55.33
ロマネスコ	98.57	61.95	47.91	49.33	59.87	73.24	75.49
ケール	98.58	74.22	60.79	80.20	80.56	84.28	83.37
カリフラワー	98.04	71.65	53.03	53.14	49.99	70.32	61.30

ケールの場合、125 倍希釈試料においてもなお弱い抗菌性が認められることから、この場合も低濃度で作用する強い抗菌性物質の存在が示唆された (表 7、図 1e)。

B⑧: *B. subtilis* ATCC6633 では 5 倍希釈かいわれ、ブロッコリー、コールラビで透過率が 80 を超えていた。ほかのバチルス属菌に比べて、希釈しても透過率の大きな減少は見られなかったことから、SCD 液体培地における増殖性は非常に弱いと考えられた (表 8、図 1f)。なお、つるむらさきの 5 倍希釈液とコールラビの 125 倍希釈液では、透過率が特別に低い値となっていることから、実験操作に問題があったと考えられた。

4 考察

本研究では、63 種類の植物種子の抗菌性を調査し、そのうち 13 種類が 6 株の *Bacillus* 属菌のいずれかに抗菌性を示すことが認められた。これら 13 種類の種子のうち 10 種類がアブラナ科植物のものであった。アブラナ科の植物が、抗菌性を持つことは良く知られている。したがって、本研究で用いられた

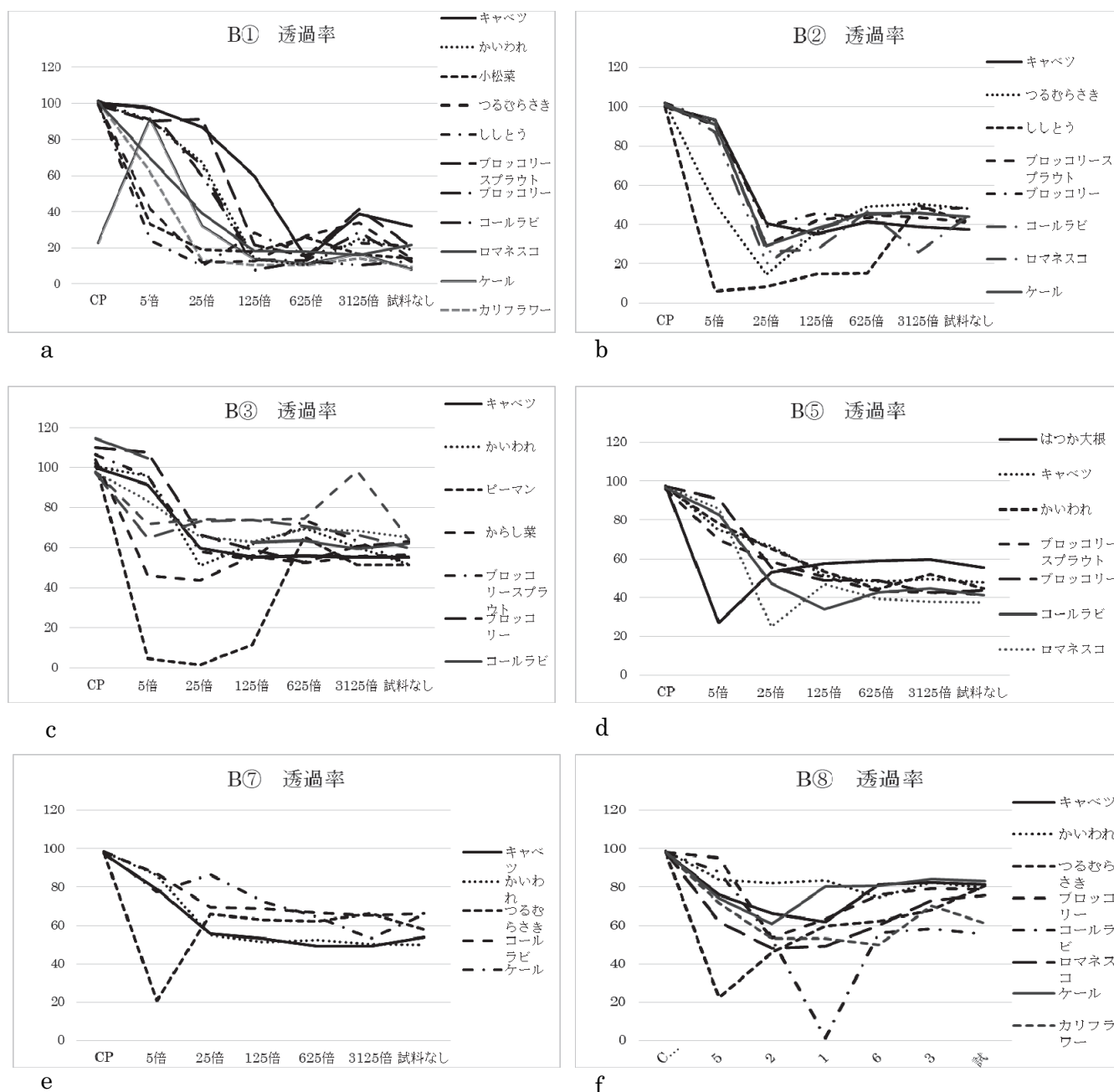


図1 *Bacillus* 属菌に対する種子抽出液の抗菌性。各菌株は SCD（トリプトソーヤブイヨン）液体培地 2.25ml および種子抽出液 0.25ml を混合した培地に摂取し、24 時間後 660nm における吸光度を測定した。

アブラナ科植物の種子にも栄養体と同様な抗菌性物質が存在することが示唆された。

アブラナ科植物には、多硫化物の一種であるグルコシノレートが含まれていて、これにミロシナーゼが作用するとイソチオシアネート類に変化することが知られている。これらイソチオシアネート類が、細菌に対して広く抗菌スペクトルをもっていることに関しては多くの研究がある^{8,9,10)}。したがって、アブラナ科植物の種子の抗菌作用も、イソチオシアネート類による作用ではないかと考えられる。

本研究では、ナス科のピーマンの種子にも、*Bacillus* 属菌に対する抗菌作用が認められた。すでに、分類学上ピーマンと同種であるパプリカの抗菌活性が調べられている¹¹⁾。したがって、ピーマンにはパプリカと同様の抗菌作用があるのではないかと考えられる。

また、*S. cerevisiae* K-701 に対しては、ディスク拡散法により、ほうれんそう、ピーマンおよびへちまの種子に抗菌性が認められた。特に、ほうれんそうとへちまは、*Bacillus* 属菌には抗菌性を示さず、

S. cerevisiae に対してのみ抗菌性を示したことから、これらの種子には真菌に特異的に作用する抗菌性物質が存在することが示唆された。

市販の園芸用植物種子の表面は、殺菌剤による消毒が行われているものがある¹²⁾。したがって、種子洗浄の不徹底による残留農薬が抗菌性に関与した可能性も完全には否定できない。しかし、種子試料がどの菌株に対しても非特異的に抗菌性を示していないことから、ここで見られた抗菌スペクトルは、薬剤消毒によるものではなく、植物と微生物との相互関係によって示されたものである考えられる。

植物、特に野菜・果物の生体成分を研究する場合、マーケットで小売りされている可食部を材料に用いると、品種、産地、収穫時期が様々であることから個体差が大きく、実験に再現性がない事態がしばしば起こる。一方、野菜の種子は種苗会社によりその生産が厳重に管理されており、種子の休眠状態や発芽率は均一に保たれているため、同一品種内の個体差は極めて小さい¹³⁾。また、種子には超低温フリーザーといった設備は必要なく、冷暗所に放置するだけで比較的長期間生体成分を維持できるという研究材料として優れた性質がある。さらに、発芽後のスプラウトでは、成長に伴い種子で認められた抗菌性が徐々に低下する結果も得られている¹⁴⁾。このことから、種子にはスプラウト以上の抗菌性を示す物質の存在が期待される。

今回の研究によって、植物種子が抗菌性物質探索の研究材料として、その保存性、品種の均質性、生理的斉一性に優れていることが示された。また、植物種子には、種子独自の抗菌性物質が存在する可能性も考えられることから、今後は研究材料として実用的に用いられることが期待される。

引用文献

- 1) 大東肇, 三井哲夫: 高等植物に含まれる抗菌性物質, 防虫科学, **38(3)**, 165-180(1973)
- 2) 宮本悌次郎: 香辛料の抗菌性と食品保蔵への応用, 調理科学, **25(2)**, 57-63(1992)
- 3) 宮本悌次郎, 池田扶実子: ガーリックの大腸菌増殖に及ぼす影響, 日本家政学会誌, **38(9)**, 811-816(1987)
- 4) 佐藤昭子, 寺尾通徳, 石橋美也子: 魚肉中の腸炎ビブリオに及ぼすニンニク抽出液の抗菌作用, 食品衛生学雑誌, **34(1)**, 63-67(1993)
- 5) 一色賢司, 徳岡敬子: アリルイソチオシアネートによる食品の健全性確保, 食品と微生物, **10(1)**, 1-6(1993)
- 6) 福岡教育大学, <https://ww1.fukuoka-edu.ac.jp/~fukuhara/keitai/>

- 7) 東京農業大学 変わり種工房, <https://kawaridane-kobo-tuat.jimdo.com/>
- 8) Gutierrez, R., M., P. and Perez, R., L.: *Raphanus sativus*(Radish): Their Chemistry and Biology, *The Scientific World JOURNAL*, **4**, 811-837(2004)
- 9) Dufour, V., Stahl, M., and Baysse, C.: The antibacterial properties of isothiocyanates, *Microbiology*, **161**, 229-243(2015)
- 10) Romeo, L., Iori, R., Rollin P., Bramanti, P., and Mazzon, E.: Isothiocyanates: An Overview of Their Antimicrobial Activity against Human Infections, *molecules*, **23(3)**, 624, 1-18(2018)
- 11) Liu, Z.-H. and Nakano, H.: Antibacterial Activity of Spice Extracts against Food-related Bacteria, *J. Fac. Appl. Biol. Sci.*, Hiroshima Univ., **35**, 181-190(1996)
- 12) 鈴木一平, 菅原祐幸, 戸高重信: 蔬菜の種子消毒に関する研究(第1報), 園芸学会雑誌, **28(4)**, 257-266(1959)
- 13) 農林水産省, 指定種苗制度 <http://www.maff.go.jp/j/shokusan/tizai/syubyo/>
- 14) 四谷彩乃: パチルス属菌に対するカイワレダイコンの抗菌性, 愛知学泉大学家政学部 卒業論文, 11月(2018)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重なご意見をいただいた本学管理栄養士専攻の諸先生方に感謝申し上げます。また、本研究の実験を補佐し、研究室の学究的環境気作りに貢献してくださった、愛知学泉大学外城研究室の学生諸君に敬意を表します。

(原稿受理年月日 2018年12月5日)