

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：18791632  
 研究課題名 (和文) 腸管出血性大腸菌に対する茶の増殖抑制効果と変異に関する基礎的研究  
 研究課題名 (英文) Study on the growth inhibitory activity and the morphological changes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by the Green tea extract  
 研究代表者  
 吉井 美穂 (YOSHII MIHO)  
 富山大学・大学院医学薬学研究部・講師  
 研究者番号：30334733

研究成果の概要：茶には抗菌作用があること、またEHEC O157に茶を接触させると、接触直後より菌体表面全体に小胞が出現し、4時間後には菌体の伸長や細胞壁・細胞膜の剥離や破壊を認めることを確認した。この事実に基づき、細菌以外の細胞 (RAW細胞) を用いた毒性試験、さらにカテキン類を除去した茶を用いた抗菌作用についての検討を行った。その結果、茶抽出液及び精製されたカテキンを添加した培養細胞のMTT法において、ある一定量までは細胞増殖が促進されているという結果を得た。さらに、PVPPを用いて茶抽出液からカテキンを除去して抗菌作用を確認した。PVPPにより、3.88mg/mlから0.058mg/mlにまでカテキン量を減らしたものをカテキン除去液として細菌増殖実験を行った結果、抗菌作用は認められなかった。

以上より、茶は細菌の菌体を破壊することで増殖が抑制されていること、また細菌以外の細胞においてカテキンはある一定量までは増殖を促進させるが、多量の使用においては細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。さらに、茶抽出液の抗菌作用はカテキン影響が大きいものと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,100,000	0	3,100,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	150,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：看護技術

キーワード：細菌, 看護学, 茶, 電子顕微鏡, EHEC O157, カテキン, RAW細胞

## 1. 研究開始当初の背景

緑茶カテキンのもつ優れた薬効は、看護ケア大きな貢献をなすことが期待されており、実際、看護の領域においても、緑茶やカテキンの口腔ケアやスキンケアなどへの応用、ま

たその効果についての報告が徐々にではあるが蓄積されつつあった。しかしながら、いまだ民間療法的な位置づけで、その導入も消極的なことが現実であり、その効果の裏付けの

ためのエビデンスを提示することが必要であったため、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

腸管性出血性大腸菌 0157 (enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157, EHEC 0157) は食中毒を起こす菌の中でも感染力が強く、少ない菌の数でも食中毒を引き起こし、1996年に集団感染が相次ぎ発生してから今日まで、毎年引き起こされている感染症の一つである。一方で、茶や茶の主成分であるカテキン類の働きが研究される中、一つの効果として細菌の増殖抑制が挙げられ、EHEC 0157に対しても抗菌活性といった側面から多く報告されるようになった。

今回、EHEC 0157:H7に対し、茶エキスおよびカテキンを接触させた際の抗菌作用と菌体の形態への影響の関連、また細胞への影響を調べるところを目的に検討を行ったので報告する。

## 3. 研究の方法

(1)菌株と菌液の調整：富山県より分与を受けたEHEC 0157:H7株を使用した。被験菌株はミューラーヒントン培地で37°C一晩培養し、終濃度 $10^{4-5}$ cfuになるようリン酸緩衝食塩水(PBS)で用時調整して用いた。

(2)緑茶抽出液(茶エキス)の調整：茶業組合のホームページを参考に、市販煎茶茶葉3gを80°Cに温めたPBS80mlで1分間抽出し、濾過滅菌を行ったものを茶エキスとして使用した。

(3)(-)-Epigallocatechin (EPiC)：緑茶から精製されたEPiC(Sigma)をPBSで適宜希釈して用いた。

(4)カテキン(-)茶エキスの調整：茶エキス1mlに対し、ポリビニルプロリドン(PVPP, MERCK) 150 $\mu$ gを混合した後、3000rpmで20分遠心した上清をカテキン(-)液として使用し

た。

## 方法

(1)最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration:MIC)の測定：新鮮培養菌を用い、日本化学療法学会標準法に準拠し測定した。

(2)生菌数測定：希釈した菌液を茶エキスに加え、25°Cの恒温槽に入れた。その後で一時間毎にサンプリングし、普通寒天培地に塗布した後、37°Cで一晩培養して生じたコロニー数により生菌数を算定した。対照として、茶エキスの代わりにPBSを用いた。

(3)電子顕微鏡観察：走査顕微鏡用サンプルは、菌液を茶エキスに0時間、1時間、4時間接触させ、2.5%グルタルアルデヒドと1%OsO<sub>4</sub>で二重固定し、凍結乾燥して観察を行った。透過顕微鏡用サンプルは、茶エキスに4時間接触させた後、走査顕微鏡用サンプル同様に二重固定しEpon812に包埋細切を行い観察した。コントロールにはPBSを用い同様にを行った。

## (4)細胞毒性試験

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)法により茶エキスおよびEPiCの細胞毒性を検討した。96穴プレートにサブコンフルエントに培養したRAW細胞に濃度調整した各溶液を添加し、5%炭酸ガス存在下37°Cで24時間培養した。対象は薬剤不含MEMにて同様に培養した。24時間後、MTT試薬(50mg/well)を添加し37°Cで24時間培養した。24時間後、MTT試薬(50 $\mu$ g/well)を添加し37°Cで4時間反応させた後、攪拌溶解し、マイクロプレートリーダーにて580nmの吸光度を測定した。統計学的有意差の検討はStudent's-testを用い、 $p<0.01$ を有為と判定した。

## 4. 研究成果

(1)カテキン量測定：酒石酸法によるカテキン比色定量にて測定した結果，茶抽出液中のカテキン量は 3.88mg/ml であった。また，PVPP 処理後のカテキン量は 0.058mg/ml であった。

(2)MIC 測定：使用菌株の茶エキスに対する MIC は原液のみ増殖抑制効果が認められた。

(3)生菌数測定：対照群では，培養 1 時間でやや減少するものの，その後経時的に生菌数が増加する傾向があった。それに対し，茶エキスおよび EPiC 接触群は培養 1 時間後にわずかな増加が認められたが，その後経時的に生菌数が減少し 5 時間で検出限界になった。また，カテキン (-) 茶エキス群では対照群同様，生菌数の増加が認められた。

(4)電子顕微鏡観察：走査電子顕微鏡で観察した結果，コントロール群では時間が経過した後も正常な大腸菌の像が確認できた。一方，茶エキスを接触させた群では，接触直後より菌の表面に小胞が形成され始め，4 時間後には菌体表面全体を小胞が覆い，中には小胞が剥離したのも認められた。また，透過電子顕微鏡で観察した結果では，コントロール群は核構造が明瞭であり，その周囲を細胞膜がしっかりと取り囲んでいる様子が確認できた。一方，茶エキス接触群では，内膜と外膜の剥離や細胞壁の破壊，また細胞質が流出しゴースト化している様子が確認できた。

(5)細胞毒性試験：茶抽出液の量を変えて添加し細胞培養を行った後に MTT 法を行った結果，300  $\mu$ l まではコントロールに比べ細胞数が増加していたが，400  $\mu$ l からは細胞数が減少していた。一方，精製されたカテキンを添加して同様に行った結果，カテキン量が 80  $\mu$ g/ml の時に 145%と最も細胞数が多いという結果を得た。

以上の結果より，茶には抗菌作用がある

こと，また EHEC 0157 に茶を接触させると，接触直後より菌体表面全体に小胞が出現し，4 時間後には菌体の伸長や細胞壁・細胞膜の剥離や破壊を認め，これらは茶に含まれるカテキンの作用であることが示唆された。さらに，RAW 細胞を用いた毒性試験の結果，カテキンはある一定量までは増殖を促進させるが，その範囲を超えると増殖を抑制させる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者，研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) 吉井美穂，八塚美樹，安田智美：小型ペットボトル飲料使用における安全性の検討．日本看護研究学会雑誌 32(1)：125-129，2009.
- (2) 吉井美穂，八塚美樹，塚原節子，落合宏：看護学生の臨地実習における感染防止対策に関する意識と実際．富山大学看護学会誌 8(1)：63-67，2008.
- (3) 境美代子，吉井美穂，小尾信子，落合宏：看護師の試験的使用を通じたゲル状擦式手指消毒剤の評価．富山大学看護学会誌 8(1)：33-40，2008.
- (4) 河野彩，小尾信子，吉井美穂，宮原龍郎，落合宏：Lamp 法によるセラチア菌の迅速診断に関する研究．富山大学看護学会誌 7(1)：13-22，2007.
- (5) Matsubara H.，Yoshii M.，Miyahara T.，Obi N.，and Ochiai H.：Study on the infection-preventive characteristics of Japanese green tea. J. Nursing Soc. of Univ. Toyama 7:23-31，2007.
- (6) 安田智美，八塚美樹，吉井美穂，寺境夕起子：男性オストメイトのセクシャリティと夫婦の関係性．日本ストーリーナビゲーション学会誌 23(3)，2007.

〔学会発表〕（計 8 件）

(1) 吉井美穂，小尾信子，境美代子：清潔操作演習における「口切り」指導の必要性. 第 24 回日本環境感染学会総会，2009. 2，横浜.

(2) 小尾信子，吉井美穂，落合宏：ティートリー精油の抗インフルエンザウイルス作用に関する研究. 第 24 回日本環境感染学会総会，2009. 2，横浜.

(3) 吉井美穂，小尾信子，宮原龍郎，落合宏：茶抽出液が細胞に及ぼす影響. 第 9 回富山大学看護学会学術集会. 2008，12，富山.

(4) 吉井美穂，坪田恵子，西谷美幸：看護学生に対するゲル状速乾性擦式手指消毒剤使用に関する指導方法の検討. 第 34 回日本看護研究学会総会，2008，7，神戸.

(5) 境美代子，吉井美穂：ゲル状速乾式手指消毒剤の消毒効果と使用感の検討. 第 23 回日本環境感染学会総会，2008. 1，長崎.

(6) 吉井美穂，境美代子，落合宏：看護学生における速乾式手指消毒剤の使用法に関する認識と実態. 第 23 回日本環境感染学会総会，2008. 1，長崎.

(7) 小尾信子，中平比沙子，吉井美穂，宮原龍郎，落合宏：乾姜エキスの A 型インフルエンザウイルス増殖抑制に関する研究. 第 44 回日本細菌学会中部支部総会，2007. 10，愛知.

(8) 吉井美穂，中平比抄子，小尾信子，落合宏，太田美智雄.：茶抽出液による EHEC 0157 の増殖抑制効果とその形態学的変化. 第 44 回日本細菌学会中部支部総会，2007，10 月 11 日，愛知.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉井 美穂 (YOSHII MIHO)

富山大学・医学薬学研究部 (医学)・講師

研究者番号：30334733