

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：23102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 年～2011 年
 課題番号：21500811
 研究課題名（和文） 植物天然成分の抗菌作用を活用した給食食材洗浄剤と褥瘡患部洗浄剤の開発
 研究課題名（英文） Development of washing agent for food or bedsore to use antibacterial activity of plant extract.
 研究代表者
 田村 朝子（TAMURA ASAKO）
 新潟県立大学・人間生活学部・教授
 研究者番号：60240991

研究成果の概要（和文）：食用とされながら廃棄される部分、フキ葉、キク葉、クズ葉、オトギリ草から抗菌成分を抽出し、安価で安全な給食施設用または褥瘡患部用の洗浄剤の開発を目的とした。その結果、カット野菜に対して植物抽出液は次亜塩素酸ナトリウムと同等の洗浄効果が得られた。また手指及び調理台に対しては石けん、アルコールと同等の細菌数の減少を示し、ATP 測定でも同様の洗浄・消毒効果を示した。褥瘡患部より分離した緑膿菌、ブドウ球菌に対しても高い洗浄・消毒効果を示した。

研究成果の概要（英文）：Japanese butterbur is an edible plant, but those leaves are disposed. A leaf of chrysanthemum and kudzu are similar disposed, too. This investigational purpose is to develop the washing agent which used antibacterial ingredients extracted from those plant leaves. The depression effect of the Japanese butterbur extract against bacterial growth on shredded vegetable leaves was observed. The effect of the extract was higher than that of a sodium-hypochlorite solution. As for the washing/disinfection effects on a hand and cooking utensils, butterbur, chrysanthemum, and kudzu extracts demonstrated a washing effect nearly equivalent to that obtained by the treatment using alcohol. In the ATP measurement, these plant extracts were showed a similar washing/disinfection effects. In the antibacterial tests against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wounds of bedsore, the these plant extracts were demonstrated high antibacterial activities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：天然成分、抗菌性、洗浄剤、給食食材、褥瘡

1. 研究開始当初の背景

昨今、農薬や産地偽装など「食の安全」を

脅かす問題が頻発している。特定給食施設においては、安全な食材を用いて徹底した衛生

管理の下、給食を毎日提供している。給食調理作業中、生食用の食品の殺菌・消毒には、薬液（次亜塩素酸ナトリウム、酢酸等）が用いられている。食品に薬液を残留させないためには、殺菌後の流水洗浄が欠かせない。洗浄作業がプラスされることで調理作業が増加する上、水溶性栄養成分も損失する。電気分解水による殺菌が一部で実施されているが、専用の設備・配管を必要とすることから実施施設は少ない。

このようなことから、安全で安価、なおかつ殺菌・消毒後に流水洗浄作業を必要としない殺菌方法として、天然植物および成分（ハーブ、カテキンなど）を活用することが検討されつつある。

また、褥瘡については、医療機関や老人介護施設で最も問題とされているのが、寝たきり高齢者の低栄養と褥瘡である。現在、NST（医師、看護師、管理栄養士、薬剤師などからなるチーム）による「褥瘡ケア」が盛んに行われている。褥瘡患部の治療には、皮膚科的ケアのほか、低栄養の改善、皮膚コラーゲン形成を促進するビタミンC、亜鉛、鉄、アミノ酸の強化も必要となる。皮膚科的ケアでは、患部のイソジンなどによる薬液消毒が欠かせないが、次第に薬液耐性がおこり効果が低下することが問題となっている。

そこで、ビタミンC、アミノ酸などの栄養成分に富み、ポリフェノールなどの抗菌成分を含んだ天然植物を褥瘡のスキンケアに用いれば薬液耐性の改善、栄養成分の補足が可能になるとされ、緑茶などが実際に医療機関で利用されつつある。

平成14～15年度科学研究費補助金（若手研究B）により、山形県で新芽のみ食用とされているウコギ葉には、ビタミンC、アミノ酸、クロロゲン酸が多く含有され、大腸菌、ブドウ球菌、セレウス菌に対する抗菌作用があることを見出した。さらに食材の洗浄剤として活用する場合、流水洗浄をしなくとも料理に利用できることも明らかにした。しかし、ウコギは山形県の一部でしか栽培されていない。「おとぎり草」「よもぎ」などのように全国各地に自生し、入手しやすい素材や、「ふき」のように、茎のみが食用とされ「葉」は廃棄される食材も多く見られる。以上のような入手しやすく利用されていない食材の有用成分を抽出すれば、安全な洗浄剤としての新たな活用方法を見出すことができると考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 生食野菜と調理器具に対する植物抽出液の洗浄・消毒効果

特定給食施設では、生食用食材の洗浄には次亜塩素酸ナトリウム等が用いられている。しかし、次亜塩素酸ナトリウムのような薬剤

を用いた洗浄作業では、食品中に薬剤や塩素臭が残留するため、大量の水道水で洗浄する必要があり、洗浄作業の量的な増加や、食品中の水溶性成分の損失が懸念される。一方、生食用食材の洗浄に喫食可能な植物由来の天然成分を活用すれば、たとえ洗浄後、食品にそれらの成分が残留していても食味に問題が無く、変色等がなければ、水道水を用いた洗浄が不要となり、調理作業が軽減されるだけでなく、人体や環境にとってより安全で安心なものになると考えられる。

野草抽出物のポリフェノール化合物が、生鮮食品、調理器具に対して洗浄・消毒効果を示したことが報告されている。本研究では、身近に自生する植物のフキの葉、キクの葉、おとぎり草を試料とすることとした。

(2) 褥瘡部より分離した細菌に対する植物抽出液の抗菌効果

褥瘡とは、体の接触面から受ける圧迫のために組織の末梢血管が閉塞し壊死をおこす病態であると定義されている。超高齢社会の中、寝たきり高齢者の増加に伴い、褥瘡を発生する高齢者の増加が懸念される。したがって、褥瘡の予防や治療は医療機関や福祉施設などにおいて重要な課題となっている。近年、カテキンの抗菌効果を利用して、瘡部を緑茶抽出液で洗浄し、効果をあげた報告が多くみられるようになった。しかし、これらの報告は、いずれも褥瘡の回復変化を検証したものであり、褥瘡部に存在する細菌に対するカテキンなどの緑茶成分の抗菌性を検証した報告はほとんどみられない。

これまでにカテキンが多くの病原性細菌や食中毒菌に対して抗菌活性を示すことが報告がなされている。カテキンはポリフェノール類の一種であり、カテキン以外のポリフェノール類についても、多くの抗菌効果の報告が認められる。このことから、カテキン以外のポリフェノール類にも褥瘡に対する抗菌効果が期待できると考えられる。そこで本研究では、フキ葉、キク葉、クズ葉からポリフェノール類を抽出し、実験試料とすることとした。

3. 研究の方法

(1) 生食野菜と調理器具に対する植物抽出液の洗浄・消毒効果

① 植物抽出液の調製および総ポリフェノール量、抗酸化活性の測定

キク、フキ、クズ葉凍結乾燥粉末 0.5、1.0、2.0、3.0g にそれぞれ蒸留水(20 or 80°C)を加え、30分間攪拌抽出し、100ml に定容した。それを、遠心分離(3000 rpm、15分)後、ろ過したものを水又は湯抽出液(0.5、1.0、2.0、3.0%)とした。また、凍結乾燥粉末 0.5、1.0、2.0、3.0g に蒸留水(100°C)100ml を加え、1

分または5分間抽出し、ろ過したものを沸騰水抽出液(0.5、1.0、2.0、3.0%)としてそれぞれ調製した。

この抽出液を用いて、総ポリフェノール量はFolin-Denis法で測定し、抗酸化活性はDPPHラジカル捕捉活性を液体クロマトグラフを用いて測定した。

②植物抽出液の食中毒菌に対する増殖抑制効果

食中毒菌(大腸菌、ブドウ球菌、サルモネラ菌、セレウス菌)4菌株を用い、フキ葉抽出液に対する増殖量を測定した。

抗菌試験は希釈平板法で行った。普通寒天培地(で前培養(37°C、24時間)した各菌株に、生理的食塩水10mlを加え、順次希釈し、供試菌懸濁液(10⁻⁷)を調製した。供試菌懸濁液(10⁻⁷)1.0mlと各試料液1.0ml及び、50°Cに加温した普通寒天培地15mlをそれぞれ加え、平板培地を作成し、37°Cで24時間培養した。なお、対照培地には、フキ葉抽出液の代わりに生理的食塩水を用いた。培養後、コロニー数を計測し、抗菌活性(%)を算出した。

③植物抽出液の生食野菜に対する洗浄・消毒効果

1) 洗浄・消毒効果

試料液には、フキ葉沸騰水抽出液(1%、1分間)、100ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液、水道水を用いた。試料液に、千切りキャベツを10分間浸漬し、5分間水道水で流水洗浄した。なお、フキ葉沸騰水抽出液に浸漬したキャベツは、浸漬後流水洗浄を行わなかったものと、浸漬後流水洗浄を行ったものの2種類を調製した。抗菌処理済みキャベツを、滅菌済みシャーレに15gずつ入れ、4°C及び37°Cで保存し、0、2、6、24時間で取り出した。それを滅菌済み生理的食塩水に懸濁させ、10⁻⁷まで順次希釈したものを試料液とした。総菌数の測定は、希釈試料液25μlを普通寒天培地に接種し、37°Cで24時間培養した。大腸菌群及びブドウ球菌の菌数測定は、同様の希釈試料液を用いた。培養後、各培地上に出現したコロニーを計測し、抗菌処理済みキャベツ1g当たりの菌数を対数(log/g)で算出した。

2) 食味試験

女子大学生19名(20.6±0.8歳)をパネルとし、抗菌処理済みキャベツの色、食感、かたさ、味、総合の5項目を5段階で評価してもらった。

④植物抽出液の調理器具・手指に対する洗浄・消毒効果

1) 調理器具(調理台・まな板・包丁)

フキ葉、キク葉沸騰水抽出液(1%、1分間)、消毒用エタノールを洗浄・消毒液とし、ルミテスターPD-20を用い、ATPふき取り検査法で洗浄・消毒効果を検討した。

調理台の洗浄・消毒は、大量調理施設衛生

管理マニュアルに準じ、以下の①、②、③の3つの方法で実施した。その方法は、調理台を①：水道水で3回水洗い後、中性洗剤で洗浄。その後、水洗いし、乾燥させた後、70%アルコールを噴霧したもの、②：水道水で3回水洗い後、中性洗剤で洗浄。その後、水洗いし、植物抽出液を噴霧し、再び水道水で洗浄したもの、③：水道水で3回水洗い後、中性洗剤を使わず、植物抽出液を噴霧した後、水道水で洗浄したもの、である。上記①～③で洗浄・消毒後、調理台に残存したATP量をそれぞれ測定した。

まな板、包丁の洗浄・消毒は、大量調理施設衛生管理マニュアルに準じ、以下のA、Bの2つの方法で実施した。その方法は、A：水道水で3回水洗い後、中性洗剤で洗浄し、乾燥した後、アルコールを噴霧したもの、B：水道水で3回水洗い後、中性洗剤で洗浄し、植物抽出液を噴霧後、水道水で洗浄したものの2通りである。まな板および包丁をA、Bの方法で洗浄・消毒後、それぞれのATP量を測定した。

2) 手指

手指の洗浄・消毒は、大量調理施設衛生管理マニュアルに準じ、以下のA～Dの4つの方法で実施した。その方法は、A：石けんで2回洗浄後、植物抽出液に30秒手指を浸漬、水道水ですすぎ、B：植物抽出液に30秒浸漬を2回繰り返し、水道水ですすぎ、C：石けんで2回洗浄後、アルコールを噴霧(常法)、D：水道水で2回流水洗浄したもの、である。上記A～Dで洗浄・消毒後、手指に残存したATP量を測定した。

(2) 褥瘡部より分離した細菌に対する植物抽出液の抗菌効果

① 褥瘡部からの細菌の分離・同定

同意を得た12名の患者の褥瘡部(3×3cm)を滅菌済綿棒でふきとり生理的食塩水10mlに入れて懸濁させた。この懸濁液と、これをさらに10倍希釈した液を細菌分離用試料とした。この試料液25μlずつを以下の3種類の培地(普通寒天培地、DHL寒天培地、PEES寒天培地)に接種した。接種後、37°Cで24時間培養した。培養終了後、各培地上に出現したコロニーを計測し、コロニーの色、形状などを観察後、褥瘡部9cm²あたりの総菌数を算出した。また、細菌の同定は、コロニーを釣菌し、グラム染色、顕微鏡下での形態観察後、生化学試験を行い、API同定システムにより行った。

② 褥瘡部分離細菌の抗菌効果の検討

①で分離・同定した細菌4菌株(大腸菌、ブドウ球菌)と標準株(大腸菌、ブドウ球菌)の合計4菌株を用いて、ディスク拡散法と液体培養法で植物抽出液(フキ葉・キク葉1%沸騰抽出液)に対する抗菌効果を検討した。

4. 研究成果

(1)生食野菜と調理器具に対する植物抽出液の洗浄・消毒効果

①植物抽出液の総ポリフェノール量及び抗酸化活性

総ポリフェノール量は、フキ葉、キク葉、クズ葉抽出液、いずれにおいても葉の濃度が高くなる程、抽出されるポリフェノール量が多くなっていった。また、水抽出に対し、湯抽出や沸騰水抽出でポリフェノール量が有意に多くなる傾向を示した。

抗酸化活性は、水抽出においては、いずれの抽出液においても葉の濃度が高くなる程、抗酸化活性が高くなっていった。また、いずれの濃度においても、湯抽出の抗酸化活性が水抽出に比較して有意に高くなり、いずれの湯抽出液においても1.0%抽出液でピークが完全に消失し、高い抗酸化活性を示したことから、以降の抗菌試験には1.0%湯抽出液を用い、その抗菌効果を比較することとした。

②食中毒菌に対する増殖抑制効果

フキ抽出液において、4菌株すべてに対して抗菌活性が認められた。中でもセレウス菌は他の3菌と比較して高い抗菌活性を示した。また、ブドウ球菌では、水抽出に比べ、湯抽出で2倍以上の抗菌活性が認められた。大腸菌、サルモネラ菌では、いずれの抽出液でも、同程度の抗菌活性を示した。

③生食野菜に対する洗浄・消毒効果

1)洗浄・消毒効果

総菌数、大腸菌群数(*Enterobacteriaceae*)は、いずれの抗菌処理キャベツにおいても、4°Cで保存した場合、0時間(抗菌処理直後)から24時間の間に、大きな細菌増殖は認められなかった。しかし、37°Cで保存した場合は、24時間後には0時間に比較して5 log/g程度の細菌増殖が認められた。また、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)は、いずれの抗菌処理キャベツからも検出されなかった。

総菌数は、4°Cおよび37°Cで保存した抗菌処理なしでは、抗菌処理したキャベツに比較して細菌数が増える傾向がみられた。また、フキ洗浄は、4°Cおよび37°C保存の6時間後までは、他の抗菌処理よりも細菌数が少なく、24時間後においても次亜塩素酸ナトリウムとの間に4°Cでは有意に細菌数が少なくなり、37°Cでは細菌数に有意差が認められなかった。さらに、37°Cにおいては、2、6、24時間保存したフキ洗浄の細菌数は、同時間の次亜塩素酸ナトリウムと有意差が認められなかった。したがって、フキ洗浄は、次亜塩素酸ナトリウムと同等の抗菌効果が得られたといえる。

2)食味試験

色、食感、かたさ、味、総合の5項目を5段階(+2、+1、0、-1、-2)の評点法でそれ

ぞれ評価してもらった。その結果、色では、フキ洗浄は水道水、次亜塩素酸ナトリウムとの間に有意差が認められなかった。食感およびかたさについては、水道水、次亜塩素酸ナトリウム、フキ洗浄の間に有意差は認められなかった。味については、水道水処理を除いてマイナスの評価となった。しかし、有意差はないものの次亜塩素酸ナトリウムに比べ、フキ洗浄が高い評点となった。総合では、水道水、次亜塩素酸ナトリウム、フキ洗浄に、有意差は認められなかった。このことから、抗菌効果、食味ともにフキ抽出液で洗浄・消毒したものは、次亜塩素酸ナトリウムで洗浄・消毒したものと同等の効果が得られたと評価できることから、給食施設等での食材の洗浄・消毒剤として活用できると推測された。

④調理器具・手指に対する洗浄・消毒効果

1)調理器具(調理台・まな板・包丁)

調理台では、洗浄直後、24時間後のATP減少率は、アルコール処理(①)とフキ水道水処理(②)との間に有意差は認められなかった。また、フキ処理(③)は①、②と比較して有意に低いATP減少率を示した。

また、洗浄直後のまな板及び包丁のATP減少率は、アルコール処理(A)とフキ処理(B)との間に有意差は認められなかった。したがって、調理台にアルコール処理の代わりにフキ葉抽出液を用いた場合、まな板・包丁に対して、中性洗剤で洗浄後、フキ葉抽出液を用いた場合、アルコール処理と同等の効果が認められた。このことから調理器具に対しても、フキ葉抽出液の洗浄・消毒剤としての活用の可能性が示唆されたといえる。

2)手指

洗浄前のATP量を100%とした場合、洗浄後のATP量は、C(常法)が9%、アルコールの代わりに植物抽出液を使用したAでは、フキ抽出液が18%、キク抽出液が3%、オトギリ草抽出液が5%となった。石けんとアルコールの代わりに植物抽出液を使用したBでは、フキ抽出液が6%、キク抽出液が9%、オトギリ草抽出液が11%といずれもC(常法)と同等の効果を示した。一般的にATP量が洗浄後1500RLU未満の場合、洗浄効果があったとされており、C(常法)が洗浄後800RLU程度で、A、Bいずれにおいても600~1000RLUであったことから、手指の洗浄に対しても植物抽出液は活用可能であることが示唆されたといえる。

(2)褥瘡部より分離した細菌に対する植物抽出液の抗菌効果

①褥瘡部からの細菌の分離・同定

同意を得た12名の患者の褥瘡部(3×3cm)から平均して総菌数 6.7×10^3 個(log 2.9±0.2)の細菌が検出された。この中から特徴的なコロニーを釣菌し、合計61株の細菌を単離し、

属名などを同定した。

その結果、グラム陰性菌は、大腸菌群に属する *Escherichia coli* や *Proteus mirabilis*、*Pseudomonas aeruginosa* など 22 菌株を単離し、中でも *Pseudomonas* 属が最も多く同定された。グラム陽性菌は、*Bacillus subtilis*、*Streptococcus pyogenes*、*Staphylococcus aureus* など 39 菌株を単離し、そのほとんどが *Staphylococcus* 属の細菌であった。

②褥瘡部分離細菌の抗菌効果

1) ディスク拡散法

供試菌液 10^{-2} の場合、キク、フキ、クズ葉、緑茶の全ての抗菌液において $\times 1$ 、 $\times 10$ まで、供試菌液 10^{-3} の場合は $\times 1$ 、 $\times 10$ 、 $\times 50$ まで、全ての菌株に阻止円の形成が認められた。

菌株ごとにみても、大腸菌標準株では供試菌液 10^{-2} 、 10^{-3} とも、キク、フキ、クズ葉抽出液は $\times 100$ まで希釈しても阻止円が形成された。分離大腸菌株は標準株と同様に供試菌液 10^{-2} 、 10^{-3} ともに、 $\times 50$ まで阻止円を形成していた。ブドウ球菌標準株では、供試菌液 10^{-2} においては、キク葉、緑茶抗菌液では $\times 50$ まで、フキ葉抗菌液では $\times 10$ まで、クズ葉抗菌液では $\times 100$ まで阻止円が形成され、供試菌液 10^{-3} においては $\times 50$ まで阻止円が形成された。また、フキ葉、緑茶の $\times 1$ の抗菌液では、ブドウ球菌標準株、分離ブドウ球菌株に対して顕著に大きな阻止円が形成された。

2) 液体培養法

キク、フキ、クズ葉、緑茶抽出液は全ての菌株に対し、増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。菌株ごとにみても、大腸菌標準株、ブドウ球菌標準株、分離大腸菌株に対しては、1%、10%、いずれの濃度においてもキク、フキ、クズ葉に比較し、緑茶の抗菌液で増殖抑制率が有意に高くなった。分離ブドウ球菌株に対しては、1%でフキ葉抗菌液が緑茶と同程度の増殖抑制率を示した。

以上のことから、植物抽出液は褥瘡より分離した細菌に対して抗菌効果を示すことが示唆された。したがって、褥瘡患部の洗浄・消毒剤として植物抽出液を使用した場合、効果が期待できるものと推察された。

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 3 件)

- ① 黒崎ひとみ、田村朝子、山岸あづみ、木下伊規子、生食野菜と調理器具に対するフキ抽出液の洗浄・消毒効果、日本給食経営管理学会誌、査読有、5 巻、2011 年、17-27
- ② 田村朝子、高山美結、金胎芳子、嶺崎隆幸、馬場眞美子、褥瘡部より分離した細

菌に対する植物抽出液の抗菌効果、日本病態栄養学会誌、査読有、印刷中

- ③ 田村朝子、伊藤梢、山岸あづみ、木下伊規子、ATP 測定による植物抽出液の洗浄・消毒効果の検討、新潟人間生活学会誌、査読有、印刷中

[学会発表] (計 6 件)

- ① 田村朝子、黒崎ひとみ、山岸あづみ、木下伊規子、植物天然成分を活用した給食食材および調理器具の洗浄・消毒効果、第 5 回日本給食経営管理学会学術総会、2009 年 10 月 25 日、女子栄養大学駒込キャンパス
- ② 高山美結、田村朝子、金胎芳子、褥瘡部より分離した細菌に対する植物天然抽出物の抗菌効果、第 57 回日本栄養改善学会学術総会、2010 年 9 月 11 日、女子栄養大学坂戸キャンパス
- ③ 田村朝子、高山美結、金胎芳子、植物ポリフェノールの抗菌効果について、第 14 回新潟栄養・食生活学会学術集会、2010 年 11 月 27 日、新潟ユニゾンプラザ
- ④ 田村朝子、伊藤梢、山岸あづみ、木下伊規子、植物抽出液の手指及び調理台に対する洗浄・消毒効果の ATP 測定による検討、第 7 回日本給食経営管理学会学術総会、2011 年 11 月 6 日、大妻女子大学
- ⑤ 田村朝子、伊藤梢、茶の成分分析値と味覚センサー測定値との相関について、第 15 回新潟栄養・食生活学会学術集会、2011 年 11 月 26 日、新潟ユニゾンプラザ
- ⑥ 田村朝子、伊藤梢、朝倉未幸、跡部知里、大橋美咲、諏佐春華、茶の成分分析値と味覚センサー測定値及びヒト官能評価との相関について、第 35 回日本バイオレオロジー学会年会、2012 年 6 月 1 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 朝子 (TAMURA ASAKO)
新潟県立大学・人間生活学部・教授
研究者番号：60240991

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし