

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 5 月 8 日現在

機関番号：16401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21780128  
 研究課題名（和文）ニラのピロリ菌増殖抑制効果と関与成分の解明

研究課題名（英文）Elucidation of antimicrobial activity of Chinese chive against *Helicobacter pylori*

研究代表者  
 島村 智子 (TOMOKO SHIMAMURA)  
 高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
 研究者番号：50350179

研究成果の概要（和文）：

ニラのピロリ菌増殖抑制効果と関与物質の解明に取り組んだ。その結果、ニラ抽出液が、試験に用いたピロリ菌株（51株）全てに対して増殖抑制効果を示すこと、ならびにその効果に殺菌作用の関与があることを明らかとした。また、この抗菌作用にはニラ中に含まれる揮発性物質の関与が大きく、特にメチンから誘導される*S*-methyl methanethiosulfinateの寄与率が高いことを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried to elucidate the antimicrobial activity of Chinese chive (*Allium tuberosum*) against *Helicobacter pylori*. As a result, the extract of Chinese chive showed the growth inhibitory effect against all of the 51 *H. pylori* strains. In addition, it had the bactericidal activity. It was also showed that the volatile compounds in the extract of Chinese chive contributed to the antimicrobial activity against *H. pylori*. In particular, *S*-methyl methanethiosulfinate derived from methiin was the main active component.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,665,290	499,587	2,164,877
2010年度	534,710	160,413	695,123
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：農産物・食品機能・抗菌活性

1. 研究開始当初の背景

日本人のピロリ菌感染率は40-70%であるとされており、世間の強い関心を集めている。

ピロリ菌が胃癌等の消化器疾患の原因となることは周知の事実であるが、臨床の間では、特に、胃・十二指腸潰瘍、胃MALTリンパ腫との関連が重要視されている。事実、「ピロリ菌感染の診断と治療のガイドライン 改訂版」(日本ヘリコバクター学会)では、胃・十二指腸潰瘍と胃MALTリンパ腫が除菌治療適応疾患のAランクに挙げられている。つまり、ピロリ菌除菌治療が疾病の治療に大きく貢献することを意味している。日本では、3剤併用処方(プロトンポンプ剤1剤、抗生物質2剤)が2000年に保険適用となり、標準的なピロリ菌除菌治療の処方として用いられている。

しかしながら、臨床の間では抗生物質耐性菌の増加が問題となっている。例えば、クラリスロマイシン(CAM)の場合、2005年に耐性菌の検出率が25%に達した。また、1996年までは確認されなかったアモキシシリン耐性菌が、1997-2003年の調査では最高で8.8%も認められた。このような耐性菌の増加に伴い、3剤併用処方による除菌失敗例も増加傾向にある。この状況を解決するため、再除菌処方の改善が試みられる一方で、ピロリ菌除菌効果を有する新規物質の検索も重要な課題と認識されるようになった。近年では、耐性菌を生じにくい食品素材を利用したピロリ菌除菌の試みにも注目が集まっている。具体的には、乳製造用乳酸菌、緑茶などが報告されており、抗生物質との併用が検討されている。しかし、食品素材に関する報告例は少なく、新規有用食品素材の検索は大きな可能性を秘めていると言える。

## 2. 研究の目的

著者らは、以前より地域資源の高付加価値化を目的とした研究を実施しており、一連の研究の中で、高知県が全国上位の産出高を誇るニラ、ショウガ、シシトウ、シソのピロリ

菌増殖抑制効果を調べた。その結果、ピロリ菌増殖抑制効果、ならびに関与成分に関する既報が存在するショウガと比較して、ニラが高いピロリ菌増殖抑制効果を示すことを見出した。本研究課題は、これまで報告の存在しないニラのピロリ菌増殖抑制効果について、その関与成分の特定と抑制発現メカニズムを系統的に解明しようとするものである。将来的には、本研究期間中に得た学術的知見を基に、新規食品、ならびに新規薬剤素材の提案を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料とピロリ菌

ニラは地元量販店で購入した。ピロリ菌株は、高知大学医学部保有の臨床分離株と標準株の合計51菌株を用いた。全てのピロリ菌は10%ウマ血清含有のブルセラ寒天培地(寒天濃度1.4%)にて37°Cで微好気培養(CO<sub>2</sub>濃度10%)した。

### (2) ニラ抽出液の調製

1cm角に切断したニラを乳鉢に入れ、水を添加し、乳棒により磨砕した。磨砕試料を遠心分離(15000rpm, 30分, 4°C)し、得られた上清を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過した。その後、一定容量に定容した水抽出液を実験に用いた。

### (3) ディスク拡散法

ブルセラ寒天培地にて2日間微好気培養したピロリ菌をブルセラ液体培地に混和し、波長600nmで0.5-0.6の吸光度を示す菌体懸濁液を調製した。その後、懸濁液をブルセラ寒天培地に塗布し、ニラ抽出液20μLを染み込ませた直径6mmのろ紙を置いた。3日間の微好気培養の後、形成した増殖阻止円の直

径により抗ピロリ菌活性を評価した。全ての試験を2回繰り返した。

#### (4) 寒天希釈法

試料の最小発育阻止濃度 (MIC) は、寒天希釈法により評価した。24穴マイクロプレートの各wellに試料を15  $\mu$ L添加した後、直ちに凝固前のブルセラ寒天培地 (57°C) を285  $\mu$ L添加し、振とうにより試料の均質化を行った。培地が固まった後、ピロリ菌懸濁液 ( $OD_{600}=0.5-0.6$ ) の10倍希釈系列10  $\mu$ Lを滴下した。3日間の微好気培養の後、形成したコロニー数をカウントした。コントロールとして、試料を含まないメタノールを用いて同様の試験を行った。コントロールと比較して、 $1 \times 10^4$ 個の菌の増殖を抑制する最小試料濃度をMICとして決定した。すべての試験を2回繰り返した。

#### (5) 殺菌効果試験 (Killing assay)

ブルセラ寒天培地 (ウマ血清 10%含有) にて2日間微好気培養 ( $CO_2$ 濃度 10%) し、十分に増殖させたピロリ菌をブルセラ溶液に混和し、600 nmで0.5-0.6の吸光度を示す懸濁液を調製した。これを等量ずつマイクロチューブへ移した後、遠心分離 (10000 rpm, 1分) にて菌体を沈殿させた。上清を除去後、試料を含むブルセラ溶液 (ウマ血清 10%含有) で再懸濁させた後、微好気環境下で振とう培養を行った。各培養液は経時的 (1, 3, 5時間) にサンプリングし、10倍希釈系列 ( $10^0-10^5$ 希釈) を作製後、ブルセラ寒天培地に10  $\mu$ Lを滴下し、3日間微好気培養後、形成したコロニー数をカウントした。コントロールとして、試料溶液の代わりに滅菌水を用いて同様の試験を行った。試験は4回繰り返し、有意差検定 (t検定) を行った。

#### (6) 揮発性化合物の捕集

Tenax TAをシャーレに入れ、120°Cに設定した定温乾燥器内で、1時間静置した。その後、ガラス管 (8 mm I. D.  $\times$  20 cm) にTenax TAを充填し、ジエチルエーテル 100 mLを流した。その後、再度120°Cの定温乾燥器にて1時間活性化させたものをTenax TAカラムとした。Tenax TAカラムの一端を吸引鐘 (ガラス内径 180 mm  $\times$  250 mm) に、もう一端をエアーステーションの吸引口に接続した。同様に、パスツールピペットにTenax TAを充填し、ジエチルエーテル 23 mLを流し、120°Cの定温乾燥器にて1時間活性化させたものを吸引鐘の首部分に取り付けた。ニラ抽出液を直径 90 mmのろ紙4枚に1.0 mLずつ含ませた後、吸引鐘内にセットし、6時間吸引を行った (9.2 L/min)。その後、吸入口にセットしたTenax TAカラムを取り外し、ジエチルエーテル 100 mLを用いて吸着物質を溶出させた。窒素気流下で、4.0 mLに濃縮したものを試料とし、GC-MS分析及び微生物試験に供した。

## 4. 研究成果

### (1) ニラ抽出液の抗ピロリ菌活性

全51菌株 (日本株46株, アメリカ株2株, ヨーロッパ株2株, オーストラリア株1株) のピロリ菌に対するニラ抽出液 (8.4 g/mL) の抗菌活性をディスク拡散法にて評価したところ、全ての菌株に対して増殖阻止円の形成が認められた。その阻止円直径は8.5~41 mmの範囲にあり、分離元の疾患、性別、地域、遺伝子型に対する依存性は認められなかった。また、抗生物質感受性株、ならびに耐性株のどちらにも抗菌活性を示した。このことからニラ抽出液は、抗生物質耐性株の除菌や、日常的な摂取によるピロリ菌感染リスク

の軽減に利用できる可能性が高いと考えられた。

### (2) ニラ抽出液の MIC

ニラ抽出液のピロリ菌に対する MIC の決定を行った。寒天希釈法により培地中のニラ抽出液の濃度を 3-7% まで 1% ずつ変化させ、 $1 \times 10^4$  の細胞の増殖を抑制する培地中の試料濃度を MIC とした。抗生物質耐性や由来国の異なるピロリ菌株 5 株 (NY31, TK1402, KMT127, KMT130, SS1) を試験に供した。その結果、その全てにおいて試料 4% 含有時が MIC であることが判明した。凍結乾燥前後の重量比較により導き出したニラの乾燥重量 (DW) は 7.3% であったことから、ニラ抽出液の MIC は 2.45 mg DW/mL であることが明らかとなった。これまでに、ニラと同じネギ属植物であるニンニクのピロリ菌及び *Campylobacter* 種に対する MIC がそれぞれ、5.0 mg DW/mL、及び 4.0 mg DW/mL であると報告されている。従って、ニラは、同じネギ属植物であり、機能的食品素材として世界中で認識されているニンニクよりも高い抗ピロリ菌活性を示すことが明らかとなった。

### (3) ニラ抽出液の殺菌作用

ニラ抽出液の抗ピロリ菌活性が静菌作用によるものか、殺菌作用によるものかを調べるために、MIC とその 5 倍濃度の試料溶液を用いて殺菌効果試験 (Killing assay) を行った。CAM 耐性株の NY31 株に対する結果を図 1 に示した。縦軸は細胞数を対数表示で、横軸は培養時間を示している。コントロールと比較した場合、MIC では培養 1 時間で 1 桁 ( $p < 0.05$ ) の、3 時間で 2 桁 ( $p < 0.01$ ) の細胞数の減少が認められた。また、MIC の 5 倍濃度で試験を行ったところ、培養 1 時間で 2 桁 ( $p < 0.01$ ) の、3 時間ですべての細胞の

死滅 ( $p < 0.01$ ) が確認された。以上の結果から、ニラ抽出液はピロリ菌に対して、MIC で殺菌作用を示し、その作用は濃度依存的に高まることが明らかとなった。

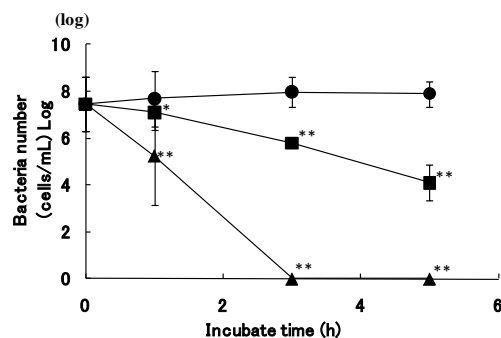


図 1 ニラ抽出液の NY31 株に対する殺菌効果

● : Control, ■ : 1 × MIC, ▲ : 5 × MIC

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

### (4) ニラ抽出液中の揮発性成分の抗ピロリ菌活性評価、及び成分分析

ニラ抽出液 (ニラ相当量 1.0 g/mL) に含まれる揮発性成分を揮発性成分捕集装置により回収し、抗ピロリ菌活性と GC-MS による成分分析を行った。ディスク拡散法による抗ピロリ菌活性測定の結果を表 1 に示した。ニラ抽出液 (ニラ相当量 15 mg) には、TK1402 株に対して 14 mm, NY31 株に対して 17 mm の増殖阻止円の形成が認められた。一方で、捕集した揮発性成分の抗ピロリ菌活性は、ニラ相当量 15 mg を含むろ紙では増殖阻止円の形成が認められなかった。一方、ニラ相当量 30 mg を含むろ紙ディスクでは、TK1402 株に対して 10 mm, NY31 株に対して 8 mm の増殖阻止円の形成が認められた。以上の結果から、ニラ抽出液に認められた抗ピロリ菌活性に揮発性成分が関与していることが明らかとなった。

次に、GC-MS により、ニラ抽出液に含まれる揮発性成分の分析を行った。各ピークをデータベースと照合し、成分を推定したところ、ニラ水抽出液は多くの含硫化合物を含むこ

とが明らかとなった。推定された揮発性含硫化合物うち、dimethyl disulfide, methyl allyl disulfide, methyl propenyl disulfide, S-methyl methanethiosulfinate, dimethyl trisulfide, S-methyl methanethiosulfonate, diallyl disulfide, 3-vinyl-3,4-dihydro-1,2-dithiine は既にニラに含まれる揮発性含硫化合物として報告されているものと一致した。ニラには、揮発性含硫化合物の前駆体のうち、メチンが最も多く含まれていることが報告されている。今回の結果において、主要なピークとして検出された S-methyl methanethiosulfinate や S-methyl methanethiosulfonate はメチンが酵素アリナーゼと反応することで生成することが報告されている。以上の結果から、ニラ抽出液で認められた抗ピロリ菌活性には、メチン由来揮発性含硫化合物が寄与している可能性が高いことが示唆された。

表1 ニラに含まれる揮発性化合物の抗ピロリ菌活性

Sample (equivalent volume)	Inhibition zone (mm)	
	TK1402	NY31
Water extract (15 mg eq./disk)	14	17
Volatile component (15 mg eq./disk)	n.d.	n.d.
Volatile component (30 mg eq./disk)	10	8

また、メチンから誘導される S-methyl methanethiosulfinate は加熱に伴い減少することが判明した。この減少に伴いニラ抽出液の抗ピロリ菌活性も低下する傾向にあったことから、本物質が抗菌活性発現の中心物質であると判断した。

## 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1件)

- ①Hayato Kudo, Hiroaki Takeuchi, Tomoko Shimamura, Youshu Kadota, Tetsuro Sugiura, Hiroyuki Ukeda, *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese chive (*Allium tuberosum*), Food Science and Technology Research, 査読有, Vol. 17, 2011, 505-513.

[学会発表] (計3件)

- ①工藤 勇人, 竹内啓晃, 杉浦哲朗, 島村智子, 受田浩之, ニラ由来抗菌性物質の抗 *Helicobacter pylori* 活性, 第58回日本臨床検査医学会学術集会, 2011年11月17-20日, 岡山.
- ②H. Kudo, H. Takeuchi, T. Shimamura, T. Kashiwagi, T. Sugiura, H. Ukeda, Anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese chive (*Allium tuberosum*), 111th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2011年5月21-24日, New Orleans, LA.
- ③工藤 勇人, 原暢宏, 竹内啓晃, 島村智子, 柏木丈広, 杉浦哲朗, 受田浩之, ニラに含まれる抗ピロリ菌関与成分の探究, 日本農芸化学会2011年度大会, 2011年3月25-28日, 京都.

[図書] (計1件)

- ①Hiroaki Takeuchi, Tomoko Shimamura, Hayato Kudo, Hiroyuki Ukeda, and Tetsuro Sugiura, Research Media, Antimicrobial Activity of Natural Products and Food Components, Current Research in Agriculture and Food Chemistry, 2012, 1-12.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島村 智子 (TOMOKO SHIMAMURA)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
研究者番号：50350179