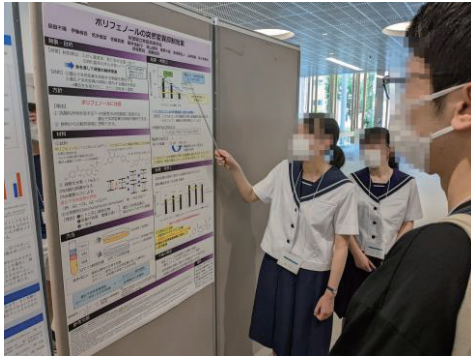


ヒトの健康に作用する化学物質に関する研究



実施担当者 秋田県立秋田高等学校
教諭 遠藤 金吾

1 背景

本校生物部には緑茶班と突然変異班があり、以下のような研究を行っている。

1-1 緑茶班

薬剤耐性菌感染症の問題¹⁾²⁾を解決するため、既存の抗生物質をより効果的に利用方法を検討することを目的として、研究活動を行っている。これまで、緑茶成分である(-)-エピカテキン(以下(-)-Ec)が、抗生物質であるアンピシリン(Ap)の抗菌効果を抑制すること³⁾、(-)-エピカテキンから合成できる(+)-タキシフォリン((+)-Tx)がアンピシリンの抗菌効果を抑制すること、そして(+)-タキシフォリンによってアンピシリンの抗菌効果が促進されることも明らかにした⁴⁾。本申請では、その他の抗生物質の抗菌効果に関与するかどうかを解明することを目的とした。

1-2 突然変異班

秋田県は全国ワーストレベルのがん死亡率であることが課題となっている⁵⁾。がんの原因の一つである突然変異を抑制する物質を探索することで、健康の維持増進を実現したいと考え、研究を行った。そこで今回は、抗変異原性を持つという報告があるカルコン類⁶⁾の中から探索を行った。

2 材料と方法

2-1 緑茶班

抗生物質の抗菌力を評価する指標菌として、大腸菌(*Escherichia coli*) AB1157株を用いた。緑茶由来物質として(-)-Ec、(+)-カテキン((+)-Ct)、(+)-Txを用いた。抗生物質はアミノグリコシド系抗生物質のカナマイシン(Km)、指標菌用培地はLB培地を用いた。LB培地の組成はNaCl 0.5 g、Yeast Extract 1.0 g、Bacto Trypton 2.0 g (Agar 2.5 g、dH₂O 200 mL、である。また、指標菌液の希釈液として、リン酸緩衝液を用いた。リン酸緩衝液の組成はNaHPO₄ 2.4 g、KH₂PO₄ 2.2 g、dH₂O 500 mL である。

大腸菌 AB1157 株を 37℃で 1 晩振とう培養し、これを LB 液体培地で 1/10 に希釈し、その 980 μL に適当な濃度になるよう Km 水溶液を 10 μL、(-)-Ec、(+)-Ct は 0.70mM、(+)-Tx は 2.0mM の濃度になるように加え、37℃で 3 時間振とう培養した。なお Km 水溶液を加えない対照実験区として、Km の溶媒である水を、(-)-Ec、(+)-Ct、(+)-Tx を加えない実験区には、これらの溶媒であるジメチルスルホキシド(以下 DMSO)をそれぞれ同量添加した。培養後の各菌液をリン酸緩衝液で適当に

希釈し、LB寒天培地に 100 μL 撒いて 37°Cで 20 時間晩培養した。培地に生えたコロニー数を計測し、これに希釈率を乗じて菌数を求めた。そして、緑茶由来物質も Km も添加していない無処理実験区の菌数に対する各実験区の菌数の相対値を以下の式(1)の通り算出し、これを生存率とした。

$$\text{生存率} = (\text{各実験区の菌数}) / (\text{無処理実験区の菌数}) \quad (1)$$

群全体の有意差を有意水準 5%で *Kruskal-Wallis* 検定を行い、有意差が認められた場合、有意水準 5%で *Mann-Whitney U* 検定による 2 群比較と *Bonferroni* による調整を行った。

2-2 突然変異班

遺伝子突然変異を検出する指標菌として、1 倍体出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YAS106 株⁷⁾を用いた。変異原物質として過酸化水素 (H₂O₂) を、試料として、カルコン類であるカルコン、4'-ヒドロキシカルコン、リコカルコン A(4', 4-ジヒドロキシ-3-α, α-ジメチルアリル-6-メトキシカルコン)を用いた。培地は YPD 培地、カナバニン含有 SC 培地を用いた。YPD 培地の組成は、Yeast extract 2g、Hipolypepton 4 g、Glucose 4 g、Agar 4 g(寒天培地のみ)、dH₂O 200 mL、カナバニン含有 SC 培地の組成は、Yeast Nitrogen base w/o amino acids 1.33 g、Glucose 4 g、Agar 4 g、dH₂O 200 mL とした。

30°Cで 72 時間培養した 1 倍体出芽酵母 YAS106 株に、試料と H₂O₂を加え、30°Cで 3 時間振とう培養した。各試料の濃度は 0、1.5、15 μM で行い、各試料を加えない対照実験区にはこれらの溶媒であるジメチルスルホキシドを同量加えた。H₂O₂は、500 μM で処理するものとし、H₂O₂を加えない対照実験区には溶媒である H₂O を同量加えた。培養後の菌液 1mL を 5 分間、4°C、12000rpm で遠心分離し、上澄みを捨てた後、H₂O を 1 mL 加えることで培養液を H₂O に置換し、再度遠心分離した。上澄みを捨て、H₂O を 0.1 mL 加えることで菌液を濃縮した。これを 10⁻⁶に希釈して YPD 寒天培地に 0.1 mL、原液をカナバニン含有 SC 寒天培地に 0.1 mL 撒いた。これらを 30°Cで 72 時間静置培養した後、それぞれの培地に生育したコロニー数を数えた。YPD 寒天培地のコロニー数に希釈倍率を乗じることで全菌数を、カナバニン含有 SC 寒天培地のコロニー数に希釈倍率を乗じることでカナバニン耐性となる遺伝子突然変異を生じた菌数をそれぞれ算出し、式(1)によって遺伝子突然変異頻度を求めた。

$$\text{遺伝子突然変異頻度} = \frac{\text{カナバニン耐性の菌数}}{\text{全菌数}} \quad \text{式(1)}$$

群全体の有意差を有意水準 5%で *Kruskal-Wallis* 検定を行い、有意差が認められた場合、有意水準 5%で *Mann-Whitney U* 検定による 2 群比較と *Bonferroni* による調整を行った。

3 結果

3-1 緑茶班

大腸菌 AB1157 株において Km 10 μM と緑茶由来物質を同時処理した際の抗菌効果を検証した。その結果、無処理実験区に対する生存率(±標準誤差)は、Km 単独処理時は 0.38(±0.071)、Km と (-)-Ec 同時処理時は 0.46(±0.084)、Km と (+)-Ct 同時処理時は 0.44(±0.091)であり、これらの間には有意な差は認められなかった(図 1)。Km と (+)-Tx 同時処理時は 0.48(±0.077)となり、Km 単独処理との間に有意な差はみられなかった(図 1)。さらに、これらは無処理、(-)-Ec 単独処理時、(+)-Ct 単独処理時、(+)-Tx 単独処理時からそれぞれ有意に低下しており、(-)-Ec、(+)-Ct 単独処理時から Km を投与した際の生存率の低下は、無処理から、Km を投与した際の生存率の低下と同程度であった。従って、(-)-Ec、(+)-Ct は Km の抗菌効

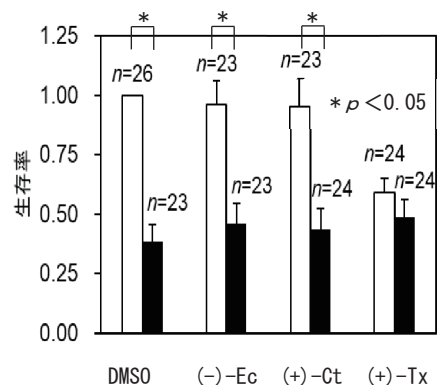


図 1 大腸菌 AB1157 株の各緑茶由来物質と Km 処理時の生存率

エラーバーは標準誤差を示している。

果に影響がないことが明らかになった。一方、(+)-Tx は単独処理時、生存率が 0.50 から 0.48 とわずか 0.02 しか生存率が低下せず有意差もみられなかった。従って、(+)-Tx は Km と併用しても抗菌効果の相乗効果を示さないことが分かった。これは(+)-Tx が Ap に対して抗菌効果を促進させたのとは異なる傾向であった。

3-2 突然変異班

・実験結果①

H₂O₂ 存在下/非存在下でのカルコンの出芽酵母 YAS106 に対する効果

無処理時、カルコン 1.5 μM、15 μM 処理時の遺伝子突然変異頻度はそれぞれ、 $7.5(\pm 3.7) \times 10^{-7}$ 、 $9.5(\pm 5.4) \times 10^{-7}$ 、 $6.7(\pm 3.3) \times 10^{-7}$ であり、これらに有意な差はなかった(図 2A□)。H₂O₂ 500 μM 単独処理時の遺伝子突然変異頻度は $1.1(\pm 0.72) \times 10^{-5}$ になり、自然突然変異頻度から有意に上昇した(図 2A■)。これにカルコン 1.5 μM、15 μM を追加添加したときの遺伝子突然変異頻度は、 $5.9(\pm 2.3) \times 10^{-6}$ 、 $3.5(\pm 2.0) \times 10^{-6}$ であり、H₂O₂ 500 μM 単独処理時と比べて有意差は認められなかった(図 2A■)。このことから、カルコンは H₂O₂ 存在下/非存在下ともに遺伝子突然変異頻度に影響を及ぼしていないことが考えられた。

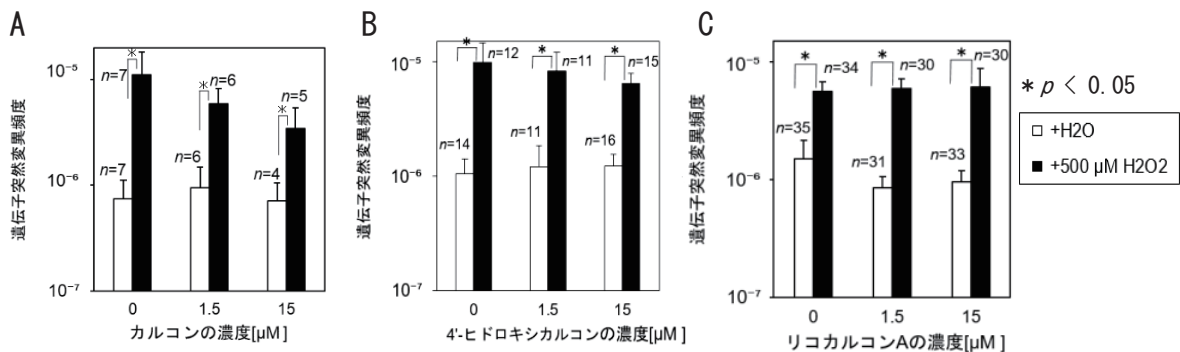


図 2 カルコン(A)、4'-ヒドロキシカルコン(B)、リコカルコン A(C) 処理時の出芽酵母の遺伝子突然変異頻度
 エラーバーは標準誤差を示している。

・実験結果②

H₂O₂ 存在下/非存在下での 4'-ヒドロキシカルコンの出芽酵母 YAS106 に対する効果

無処理、4'-ヒドロキシカルコン 1.5 μM、15 μM 処理時の遺伝子突然変異頻度はそれぞれ、 $1.0(\pm 0.36) \times 10^{-6}$ 、 $1.2(\pm 0.65) \times 10^{-6}$ 、 $1.2(\pm 0.32) \times 10^{-6}$ であり、これらに有意な差はなかった(図 2B□)。H₂O₂ 500 μM 単独処理時の遺伝子突然変異頻度は $9.8(\pm 4.7) \times 10^{-6}$ になり、自然突然変異頻度から有意な上昇を示した(図 2B■)。これに 4'-ヒドロキシカルコン 1.5 μM、15 μM を追加添加したときの遺伝子突然変異頻度は、それぞれ $8.3(\pm 3.6) \times 10^{-6}$ 、 $6.4(\pm 5.6) \times 10^{-6}$ であり、H₂O₂ 500 μM 単独処理時と比べて有意差は認められなかった(図 2B■)。このことから、4'-ヒドロキシカルコンは H₂O₂ 存在下/非存在下ともに遺伝子突然変異頻度に影響を及ぼしていないことが考えられた。

・実験結果③

H₂O₂ 存在下/非存在下でのリコカルコン A の出芽酵母 YAS106 に対する効果

無処理時の遺伝子突然変異頻度(自然突然変異頻度)は、 $1.5(\pm 0.64) \times 10^{-6}$ となった。リコカルコン A 1.5 μM、15 μM 処理時の遺伝子突然変異頻度は、 $0.85(\pm 0.21) \times 10^{-6}$ 、 $0.96(\pm 0.23) \times 10^{-6}$ であり、自然突然変異頻度から有意な変化はなかった(図 2C□)。H₂O₂ 500 μM 単独処理時の遺伝子突然変異頻度は $5.6(\pm 1.1) \times 10^{-6}$ になり、自然突然変異頻度から有意に上昇した(図 2C■)。ここにリコカルコン A 1.5 μM、15 μM を追加添加したときの遺伝子突然変異頻度は、それぞれ $6.0(\pm 6.4) \times 10^{-6}$ 、 $6.1(\pm 2.6) \times 10^{-6}$ であり、H₂O₂ 500 μM 単独処理時と比べて有意差は認められなかった(図 2C■)。このことから、リコカルコン A は実験により H₂O₂ 存在下/非存在下ともに遺伝子突然変異頻度に影

響を及ぼしていないことが考えられた。

4 結果

4-1 緑茶班

今年度の研究では、使用する抗生物質を β -ラクタム系抗生物質 Ap からアミノグリコシド系抗生物質 Km に変えたことで各緑茶由来物質に生じた効果の違いについて以下に述べる。

異なる効果が見られたのは、(-)-Ec と (+)-Tx であった。(-)-Ec は Ap の抗菌効果を抑制したのに対し、Km に対しては影響を及ぼさなかった(図 1)。また、(+)-Tx は Ap の抗菌効果を促進したのに対し、Km との抗菌効果の相乗効果を示さなかった(図 1)。

今後は、今までの研究で用いた抗生物質とは異なる機序を持つ抗生物質を用いて実験を行うことで、(+)-Tx を併用するための、有効な組み合わせを発見していきたい。

4-2 突然変異班

カルコンには抗変異原性が見られた⁶⁾という記述の参考文献があるにも関わらず、本実験ではそれが見られなかった。これは今回の実験では指標菌として真核生物である出芽酵母を使用したのが、参考文献では原核生物であるサルモネラ菌を使用していたことに原因があると考えた。今後は、ポリフェノールの中でも多数の OH 基を持ち、高い抗酸化力が期待できるタンニン酸を検討していく。

成果発表

- ・ジュニア農芸化学会 2023：銅賞（全国ベスト 10）
- ・日本学生科学賞：秋田県知事賞（1 位）
- ・秋田県小中高等学校児童生徒理科研究発表大会：最優秀賞(R5 年度全国高総文祭代表内定)
- ・日本農芸化学会和文誌「化学と生物」2022 年 9 月号に査読付き論文掲載

謝 辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の助成により行われました。この場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 農林水産省：動物医薬品検査所検査第二部抗生物質製剤検査室 web サイト(2022/12/30 確認)：薬剤 耐性菌についての Q&A、2010.
- 2) M. Cecchini, J. Langer & L. Slawomirski: G7 OECD Report (2015).
- 3) 山田優衣、住谷夏梨、後藤雪琉、白鳥遥菜、水谷菜月、鈴木理紗、武内温哉、佐藤託海、遠藤金吾 (2021) 緑茶成分(-)-エピカテキンは大腸菌(*Escherichia coli*) AB1157 株において抗生物質アンピシリンの抗菌効果を抑制する. *Journal of Science EGGS*, 4(2130001):p1-6.
- 4) 荒井優菜、金子聡、佐藤真美、平川青空、遠藤金吾(2022)カテキン類と抗生物質 アンピシリンの抗菌効果に関する化学構造、化学と生物、60(9)、p486-489.
- 5) 厚生労働省健康局がん・疾病対策課 2016.平成 28 年全国がん登録 罹患数・率 報告 *CANCER INCIDENCE OF JAPAN 2016*,p61.
- 6) 木苗直秀、増田修一(2002)、抗変異原に関する研究、 *Environ. Mutagen Res*, 24:p129-144.
- 7) Ohnishi G, Endo K, Doi A, Fujita A, Daigaku Y, Nunoshiro T, Yamamoto K(2004). Spontaneous mutagenesis in haploid and diploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 325(3):p928-933.

以上