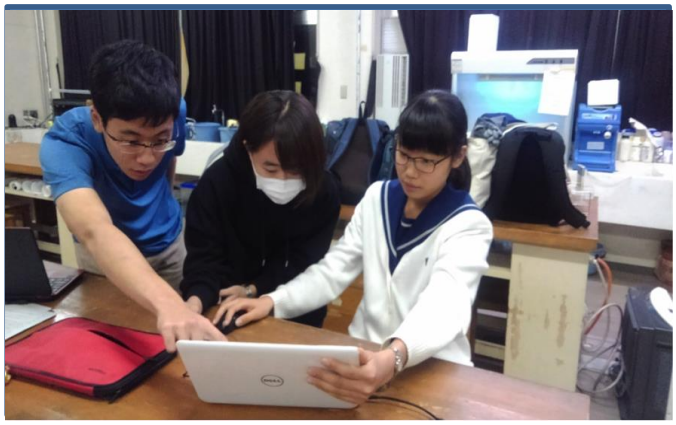
緑茶と抗生物質の飲み合わせを科学的に考える



秋田県立秋田高等学校
教諭　遠藤　金吾

1　背景、目的

「緑茶で薬を服用してはならない」という俗説があり、これまで緑茶成分物質による薬の効果の抑制、促進が起きる報告例が共に報告されている [1)2)]。また薬剤に耐性をもつ薬剤耐性菌による感染症の拡大が問題となっているように薬が効果を示さないのは重大な問題である。しかし、新規の抗生物質の開発は停滞している [3)]。そこで本校生徒たちはこの俗説の真偽の検証と既存の抗生物質の効果的な利用方法の提唱をすることを目的とした。また、本助成による研究活動を通して、論理的思考力やディスカッション能力、プレゼンテーション能力と科学に対する興味、関心を高めることによって、科学に対して夢と希望を持って未来に向かって邁進する人材を育成することも目的とし、本助成による人材育成の成果をアンケート調査によって評価することとした。以下に、本校生徒が作成した研究活動のレポートを掲載する。

2　研究活動

2－1　方法

2つの方法で、緑茶成分物質とアンピシリンを同時処理した際のアンピシリンの抗菌効果を評価した。使用した細菌は、大腸菌 DH5α 株、納豆菌 NBRC3009 株、枯草菌 NBRC13719 株、使用した緑茶成分物質は(－)－エピカテキンである。

1) コロニー計測による評価

各細菌を 5 mL の LB 液体培地に加え、納豆菌 NBRC3009 株は 30 ℃で、大腸菌 DH5α 株は 37 ℃で一晩振とう培養した。この処理をしたものを LB 液体培地で 1/10 に希釈し、適切な濃度になるようにアンピシリン水溶液を、2.0 μM の濃度になるように(－)－エピカテキン溶液を加え、納豆菌 NBRC3009 は 30 ℃で、大腸菌 DH5α は 37 ℃で 3 時間振とう培養した。なお、アンピシリン水溶液を加えない対照実験区には、アンピシリン水溶液の溶媒である水を、(－)－エピカテキン溶液を加えない対照実験区には、(－)－エピカテキン溶液の溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO)同量を加えた。また、(－)－エピカテキンは DMSO に飽和するまで溶解させたときの濃度が 200 μM であり、これを DMSO が細胞に毒性を示さない程度菌液に投与した場合、2.0 μM となることから処理濃度を決定した。3 時間の培養後、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 ずつ撒き、納豆菌 NBRC3009 株は 30 ℃で、他の細菌は 37 ℃で一晩培養した。LB 寒天培地に生育したコロニー数を計測し、③での各々の希釈率を乗じて元々の菌液 100 μL 中の菌数

を算出した。同様に無処理時の実験区の菌数を算出し、次の式の通り、各実験区の生存率を求めた(式(1))。

$$生存率 = \frac{各実験区の菌数[\frac{個}{10\,\mu L}]}{無処理区の菌数[\frac{個}{100\,\mu L}]} \quad ・・・式(1)$$

これらの手順をくり返し、各実験区での生存率の平均値を求め、平均値の取りうる範囲を比較、評価するために、各実験区の生存率平均値の標準偏差 σ および標本数を n として、標準誤差を次の式(式(2))に従って算出した。また、アンピシリンが同濃度で(−)−エピカテキンを添加した実験区と添加していない実験区について、有意水準 5%で両側検定の t 検定を行い、有意に差があるかどうかを検討した。

$$標準誤差=\frac{\delta}{\sqrt{n}} \quad ・・・式(2)$$

(2)阻止円計測による評価

各細菌を 5 mL の LB 液体培地に加え、納豆菌 NBRC3009 株は 30 ℃で、大腸菌 DH5α 株は 37 ℃で一晩振とう培養した。この処理をしたものをリン酸緩衝液で 1/100 に希釈し、50 μL を LB 寒天培地に撒いた。マイクロピペットのチップの先端で各菌液を撒いた培地に穴をあけ、アンピシリンと(−)−エピカテキンを各細菌に対して適切な濃度になるように混ぜ合わせた溶液 10 μL を流し込んだ。なお、アンピシリンを加えない対照実験区には、アンピシリン水溶液の溶媒である水を、(−)−エピカテキンを加えない対照実験区には、(−)−エピカテキン溶液の溶媒である DMSO を加えた。

納豆菌 NBRC3009 株は 30 ℃で、大腸菌 DH5α 株は 37 ℃で一晩培養した。投与した薬剤が拡散し、その抗菌効果によって細菌の生育が阻害された範囲には円形に細菌の生えていない領域が形成される。これを阻止円(図 2)という。広範囲にわたって阻止円が生じているほど、投与した薬剤の抗菌効果が強いと評価できる。阻止円の直径を測定し、アンピシリン単独での抗菌効果に比べ、(−)−エピカテキンを追加処理することで抗菌効果がどのくらい変化したのかを、阻止円の大きさの変化の割合で判断できるように阻止円の変化率を求めた。アンピシリン単独処理時の阻止円の直径を A[cm]、アンピシリンと(−)−エピカテキンの同時処理時の阻止円の直径を B[cm]として、阻止円の変化率の求め方は次の式の通りである(式(3))。

$$変化率(\ \%)=\frac{B-A}{A}\times 100 \quad ・・・式(3)$$

2−2　結果

1) いずれも(−)−エピカテキン単独での抗菌は見られなかった。また、同じ濃度の実験区では、(−)−エピカテキンの有無に関わらず、生存率平均に有意な差は見られなかった。
2) アンピシリン単独処理時と、アンピシリンと(−)−エピカテキンの同時処理時での阻止円の大きさに大きな差は見られなかった。

2−3　考察

今回調べた 2 種類の細菌においても、(−)−エピカテキンによってアンピシリンの抗菌効果は変化しなかった。2 種類の実験によってこれが確かめられたため、この結果は信頼性が高いと判断した。

前年度の実験では、「大腸菌 AB1157 株において、(−)−エピカテキンによってアンピシリンの抗菌効果は抑制される」という結果が得られた[4]が、今回の結果は、それとは異なる傾向にあった。もし(−)−エピカテキンがアンピシリンに作用しているならば、今回の実験でも、アンピシリンの抗菌効果は抑制されるはずである。しかし、そうならなかったことから、(−)−エピカテキンがアンピシリンに作用し、不活性化させているのではなく、(−)−エピカテキンは細菌に直接作用していることが分かった。また、グラム陰性菌である大腸菌 AB1157 株では抑制が見られたのに対し、今回の研究で、同じくグラム陰性菌である大腸菌 DH5α 株では抑制が見られなかったことから、抗

菌効果の抑制は、細菌による細胞壁の厚さの違いや、外膜の有無とは関係なく起こる現象であることが分かった。

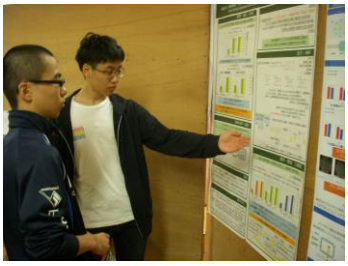
そこで私たちは大腸菌 AB1157 株と、大腸菌 DH5α 株の遺伝子に注目し、遺伝子型の違いを比較すれば、アンピシリンの抗菌効果の抑制のメカニズムを明らかにできると考えた。調べてみると、大腸菌 AB1157 株では、*mgl* と呼ばれる、薬剤を細胞内から細胞外へ排出する膜輸送に関するタンパク質に関わる遺伝子が欠損していることが分かった [5)]。この膜輸送タンパク質は ABC トランスポーターと呼ばれ、細菌から高等動物まで幅広く共通して有するものである。またカテキン類はヒト Caco-2 細胞で ABC トランスポーターによって細胞外に排出される報告がある [6)]。これにより、大腸菌 AB1157 株では、細胞内に入った(－)－エピカテキンが細胞外に排出されず、細胞内での(－)－エピカテキンの濃度が上昇し、何らかの構造に作用するため、アンピシリンの抗菌効果が抑制されるのではないかと考えた。

２－４　結論

市販の緑茶に含まれている(－)－エピカテキンの濃度は約 430 μM であり、私たちが実験で用いた濃度の実に約 215 倍である [7)]。このことから、ヒトがアンピシリンを緑茶で服用する場合、アンピシリンの抗菌効果が抑制されてしまう危険性はあると考えることもできる。しかし、今回用いた大腸菌 DH5α 株、納豆菌 NBRC3009 株、枯草菌 NBRC13719 株それぞれでは抑制が見られず、昨年度用いた大腸菌 AB1157 株のみでしか抑制が見られていないため緑茶と抗生物質の飲み合わせについては好ましくない結果が起こるのは稀である可能性が示唆された。

また今回の実験の結果からグラム陰性菌、グラム陽性菌という違いはこの抗生物質の抗菌効果を抑制するメカニズムには関係ないといえる。同じ大腸菌でも大腸菌 AB1157 株、大腸菌 DH5α 株で結果が異なることから、このメカニズムには、何らかの膜輸送に関するタンパク質の遺伝子の欠損が影響していることが示唆された。その欠損により、緑茶成分物質の細胞内での濃度が高くなったことで緑茶成分物質が細菌自体に作用してこの抑制がおこった可能性がある。

２－５　研究活動



我々は今年度、学会や発表会など多くの研究を発表する機会をもつことができた。多くの人と研究についてディスカッションしたり、いただいたアドバイスを研究活動に生かしたりすることができた。それにより深い研究ができ、何かを追究する楽しさを感じ、論理的に物事を考える考察力を養うことができた。

【発表・受賞実績】

① 日本動物学会東北支部大会(令和元年 7 月 20 日，岩手大学)：優秀賞

② 第 63 回日本学生科学賞秋田県審査会(令和元年 12 月 2 日)：秋田県知事賞

③ 読売新聞秋田版(令和元年 11 月 26 日)：掲載

④ 第 54 回秋田県小･中･高等学校児童生徒理科研究発表大会(令和元年 11 月 16 日,秋田大学)：斎藤憲三・山﨑貞一賞

⑤ 公益財団法人　中谷医工計測技術振興財団科学教育振興助成成果発表会(令和元年 12 月 26 日,東京大学)：奨励賞

⑥ つくば Science Edge 2020(令和 2 年 3 月 20,21 日,つくば国際会議場)英語口頭発表：新型コロナウイルス感染症拡大につき、中止

⑦ 環境探究フォーラム 2020(令和 2 年 3 月 28 日～30 日,オンライン上での実施)

２－６　謝辞

本研究は「公益財団法人中谷医工計測技術振興財団」、東北大学大学院生命科学研究科　小松千春様、古井瑛恵様、東北大学大学院生命科学研究科　准教授　日出間純先生の支援のもとで行われたものです。この場を借りてお礼申し上げます。

２－７　参考文献

1） Jeppesen U, Loft S, Poulsen HE, Brśen K.A fluvoxamine-caffeine interaction study.*Pharmacogenetics*,1996 Jun;6(3):213-22.

2） 山崎勉、遠藤一博、富永一則、福田正高、前崎繁文、橋北義一、板橋明.当院より分離された arbekacin 耐性メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)株の疫学的検討:日本感染症学会,1996 Apr.

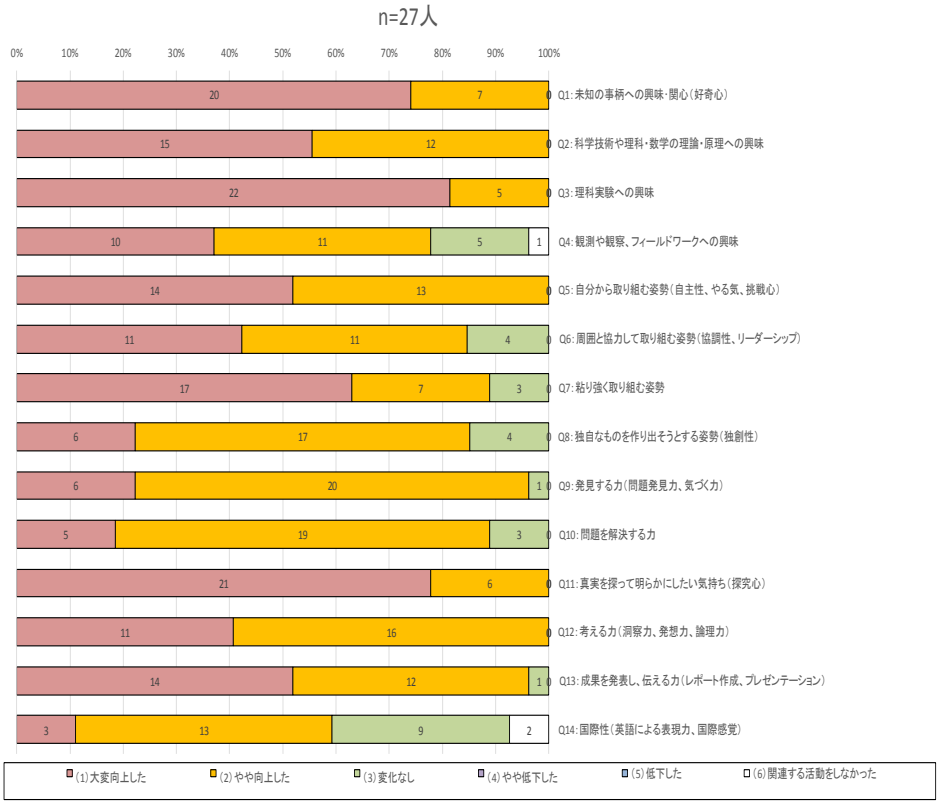
3） Schäberle TF , Hack IM, Overcoming the current deadlock in antibiotic research.*Trends Microbiol*,2014;22:165-7.

4） 住谷夏梨、白鳥遥菜、鈴木理紗、水谷菜月、後藤雪琉、武内温哉.緑茶成分と抗生物質: 第 62 回日本学生科学賞,2018 年 11 月.

5） *E.coli* Genetic Resources at Yale CGSC,The *Coli* Genetic Stock Center(2019/11/04)https://cgsc2.biology.yale.edu/

6） Ai Z, Liu S, Qu F, Zhang H, Chen Y, Ni D. Effect of Stereochemical Configuration on the Transport and Metabolism of Catechins from Green Tea across Caco-2 Monolayers.*Molecules*. 2019 Mar 26;24(6). pii: E1185. doi: 10.3390/molecules24061185.

7） 寺田志保子、前田有美恵、増田俊夫、鈴木裕介、伊奈和夫.各種茶（緑茶，半発酵茶，紅茶）浸出液およびティードリンクス中のカフェイン，カテキン組成:日本食品工業会誌,1987 Apr;1:20-7

３　まとめ

上記研究報告は、本校部員が書き上げたものであり、日々の実験や考察などの研究活動や学会等での発表活動、研究論文の執筆活動を通して、自分たちの研究についてデータをまとめ、考察し、文章で順序だてて説明し、表現する能力や情報収集力といった基本的な研究遂行能力を身に付けたことの証であると思われます。また、本校の生徒に、研究活動を通して科学に対する興味・関心や自己の能力の伸長に関しての自己評価のアンケートを行った結果、全ての項目で研究活動が良好な影響を与えたことが明らかとなった(右図)。本校の生徒たちが、このような能力を育むことができたのは、ひとえに、御財団の助成によるものであることを特記するとともに、ここに深く御礼申し上げます。