

大気汚染と地衣類の抗菌成分の含有量の関係

井之上 あかり 井本 浩之 上田 菜央 岡 亮太 酒井 希 LUC KHAI THIEN
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2 年

地衣類の中には抗菌成分を含む種があることが知られている。我々は地衣類が環境指標生物であることに着目した。使用する地衣類をウメノキゴケに絞り、高校周辺を起点として様々な地点に生えている地衣を採取した。抗菌成分の含有量を阻止円で比べた結果、各地点の NO_2 濃度と抗菌成分の含有量との関係に相関性が見られたので、この 2 つには関係性があると考えられる。

1. はじめに

抗菌成分とは、その成分を含む生物の周辺に生息する生物の発育や代謝、増殖を阻害、抑制する有機物質である。今日では多くの耐性菌が出現しており、新たな抗菌成分の発見、開発、実用化が課題となっている。

これまで 68, 69 回生が地衣類について研究してきた。68 回生の先行研究では、地衣類に抗菌成分を生成する種が存在することを証明した。また 69 回生の先行研究では、地衣類に含まれる抗菌物質の同定を試みたが特定には至らなかった。^{[3][4]}

地衣類はその種類の多様性から環境指標生物として指定されている。^{[8][10]} しかし、環境指標生物としての利用はいまだ普及されていない。さらなる地衣類の活用を目指し、我々は同種の地衣類に含まれている抗菌成分と、地衣類の生息地点の大気汚染とに関係があると仮定した。先行研究で地衣類の生育と大気の NO_2 濃度に相関性があると示唆されている。^[11] そのため、地衣類の抗菌成分の含有量を阻止円の大きさ、大気汚染度を NO_2 濃度のデータとして比較し検証した。

2. 本研究の目的

地衣類の抗菌成分の含有量と大気汚染物質である NO_2 濃度との相関性を見つける。

3. 用いた地衣類と試験菌、阻止円について

本研究で、地衣類は予備実験・本実験ともにウメノキゴケ(ウメノキゴケ科ウメノキゴケ属 *Parmotrema tinctorum*, 写真 1)を使用した。この種は、68・69 回生の先行研究をもとに決定した。文献を参考に目視で種を確認し、採集した。^{[1][2]}



(図 1) ウメノキゴケ

また、抗菌活性の有無を調べるため、*Bacillus subtilis* (独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー-NBRC、以下 *B. s* または *B. subtilis* と略す。), *Micrococcus luteus* (和光純薬、以下 *M. l* または *M. luteus* と略す。) を SCD 寒天培地 (一般細菌用、ケニス) で培養しつつ、使用した。

また、本研究では阻止円の大きさを抗菌成分の含有量の指標とする。阻止円とは菌の無生息地域であり、一様に菌を撒いた培地上に抗菌活性のある物質を置くことで発生する (写真 2)。さらに、抗菌活性の強弱によって大きさが異なる。このことから、実験によって阻止円が現れることはその物質に抗菌成分が含まれていることを示し、大きさによってその量を比べることが可能であると考えられる。



(図 2) 阻止円

4. 予備実験 1

4.1. 目的

二種類の試験菌の地衣成分に対する感受性を調べ、それを基に今後実験に使用する菌を決定する。

4.2. 材料

- ・乾燥地衣（ウメノキゴケ）
- ・試験菌（*M. luteus*, *B. subtilis*）
- ・SCD 寒天培地
- ・ペーパーディスク（直径 10 mm、枝肉の抗菌性物質検査用、アドバンテック東洋株式会社）
- ・抽出液（酢酸エチル：エタノール＝1：1）
- ・滅菌チューブ

4.3. 方法

- ① 乾燥ウメノキゴケを、粉末状にした。
- ② 抽出液と①を 10 mL：0.10 g の割合で混ぜて、滅菌チューブに入れて、3 日間放置した。
- ③ 遠心分離（3500rpm, 2330G）を 15 分間行い、分離した液体の上澄み液を試験液とした。これ以降の操作④～⑦は、クリーンベンチ内で行った。
- ④ 培養している二種類の菌のコロニーをループでとりマイクロピペットで、滅菌した水を 0.20 mL 加えた。
- ⑤ マイクロチューブをボルテックスミキサーにかけた。
- ⑥ マイクロピペットで⑤のマイクロチューブ内の溶液を 0.20 mL 吸い取りスプレッターで培地にまんべんなく広げた。各菌をそれぞれ一つの培地に広げるため、二つの培地を用いた。
- ⑦ 試験液（①～③で作成したもの）1.0 mL にペーパーディスクを十分に浸し、各培地に 2 枚ずつ置いた。
- ⑧ 培地が入ったシャーレをビニルテープで密閉し、30 °C に設定したインキュベーターで 24 時間培養した。
- ⑨ 培養後の培地を観察し、阻止円の有無と直径を計測した。

4.4. 結果

（表 1） 予備実験 1 結果

試験菌	<i>M. l</i>	<i>B. s</i>
直径 (mm)	28.0	25.2

4.5. 考察

それぞれの培地で阻止円を観察できた。ゆえに、この地衣には抗菌成分が含まれていることが分かる。

また、阻止円の大きさから、地衣中の抗菌成分は *M. luteus* のほうがより活性を示すことが分かった。よって、以降の実験には、*M. luteus* を用いることにした。

5. 予備実験 2

5.1. 目的

2 か所（芦屋市、神戸市北区）から採取した地衣の抗菌成分の含有量と各地点の NO₂ 濃度に関係性があるかどうかを検証し、仮定の妥当性を判断するとともに本実験実行の意義を確認する。

5.2. 材料

- ・乾燥地衣（ウメノキゴケ、芦屋市と神戸市北区の 2 か所から採取）
- ・試験菌（*M. luteus*）

上記以外は予備実験 1 と同様のものを使用

5.3. 方法

予備実験 1 の方法①～③の手順に従って二か所から採取した地衣類の試験液をそれぞれ作成し、方法④～⑨と同様の手順で阻止円の直径を計測する。また、両地点の NO₂ 濃度は各自治体の環境調査等^{[5][6][7]}のデータを用いて、阻止円の結果とともに検証した。

5.4. 結果

（表 2） 予備実験 2 結果

場所	芦屋市	神戸市北区
直径 (mm)	25.1	22.2
NO ₂ 濃度 (ppb)	37.0	18.1

5.5. 考察

NO₂ 濃度がより高い芦屋市の地衣のほうが低濃度の神戸市北区の地衣より阻止円が大きかったため、阻止円直径と NO₂ 濃度に関係性があることが示唆された。また、この結果により本実験実行の意義が確認された。

6. 本実験

6.1. 目的

NO₂ 濃度の異なる 5 か所に生息するウメノキゴケの抗菌成分量の差を *M. luteus* の阻止円を利用して調べ、地点による抗菌成分の含有量の差を比較する。

6.2. 材料

- ・乾燥地衣（芦屋、夙川、神戸市北区、桜トンネル（神戸市灘区）、摩耶山よりそれぞれ採集）
- 上記以外は予備実験と同様のものを使用

6.3. 方法

各自治体の環境調査等^{[5][6][7]}のデータをもとに NO₂濃度の異なる5地域から3か所ずつ地衣を採集した。

(表3) 採集地の NO₂濃度

場所	芦屋	夙川	桜ト	北区	摩耶
濃度	37.0	26.5	20.8	18.1	15.3

(濃度の単位は ppb)

(表4) 採集地の詳細

採集地		環境
芦屋① ② ③	芦屋市前田町	芦屋川沿い (交通量多め)
	芦屋市浜芦屋町	
	芦屋市浜芦屋町	
夙川① ② ③	西宮市御家所町	JR線・阪急線 周辺の公園
	西宮市安井町	
	西宮市大井手町	
桜ト① ② ③	神戸市灘区五毛通	市バス路線沿 い
	神戸市灘区高尾通	
	神戸市灘区高尾通	
北区① ② ③	神戸市北区ひよどり台	しあわせの村 周辺
	神戸市北区山田町下谷 上中一里山	
	神戸市北区山田町下谷 上中一里山	
摩耶① ② ③	神戸市灘区摩耶山町	山中の公園 周辺
	神戸市灘区摩耶山町	
	神戸市灘区摩耶山町	



(図3) 採集地地図

赤：芦屋 黄：夙川 緑：桜トンネル
青：北区 紫：摩耶

以下、予備実験1の④～⑨の手順を各地点で複数回行った。

6.4. 結果

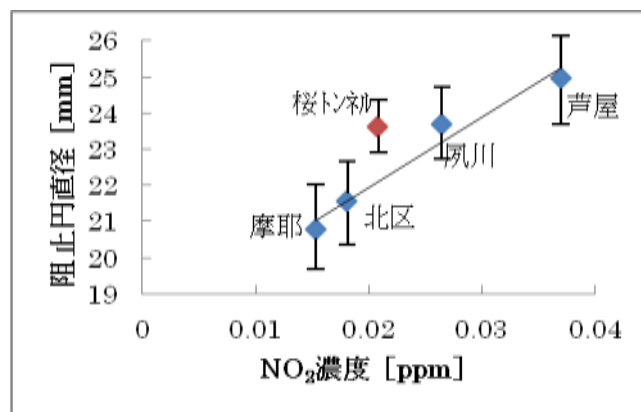
(表5) 本実験結果

場所	芦屋	夙川	桜ト	北区	摩耶
直径(mm)	25.0	23.7	23.6	21.6	20.8
標準誤差	1.28	1.01	0.66	1.12	1.17

7. 考察

阻止円直径の大きい順に芦屋、夙川、桜トンネル、北区、摩耶山となり、NO₂濃度の大きい順に並べた場合と同順になった。このことから、地衣の生息地の大気汚染度とその抗菌成分量には関係性があると考えられる。

本実験の結果と NO₂濃度のデータをもとにグラフを作成した。



(図4) 阻止円直径と NO₂濃度のグラフ

桜トンネル以外の4か所に高い正の相関性が見られた。しかし、桜トンネルのみ相関性が低く見られた。この理由としては、地衣を採集した場所が市バスの路線に沿っており交通量の高い所であったため、測定局がある場所と環境が大幅に異なっていたと考えられる。また NO₂濃度の高い地点から採集した地衣は NO₂濃度の低い地点から採集した地衣よりも阻止円直径がより大きいと読み取れ、これは地衣が NO₂低濃度地域の地衣と比べて有害物質からより身を守るため、より抗菌成分を産生する必要があるからだとも考えることもできる。

8. 今後の展望

今回の実験では測定局の NO₂ データを採集地のその代表値とし、交通量の差や、地上と採取した地衣の高低差による気温の変化等を考慮しなかった。そのため、今後誤差を小さくするためにも実験方法を検討する必要がある。

- ・測定局にできるだけ近い場所での地衣の採集
- ・異なる試験菌を用いての実験
- ・NO₂以外の汚染物質での検証

また、今後この分野の研究が進めば生息地の大気汚染環境を利用した有用性の高い地衣成分の効率的な搾取が可能になり、さらなる地衣類の活用に期待できる。

[謝辞]

本研究をまとめるにあたり、研究方針や方法についてのご助言を頂いた神戸薬科大学薬学部の竹仲由紀子先生、69 回生の先輩方、そしてサイエンスアドバイザーの方々に深く感謝申し上げます。

そして、本研究班を担当して頂いた南先生には終始多大なご指導を賜りました。この場を借りて、深く感謝申し上げます。

[参考文献・参考URL]

- [1] 山本好和, 地衣類初級編 第2版, 三恵社, 2012
- [2] 山本好和, 近畿の地衣類, 三恵社, 2009
- [3] 神戸高校課題研究, 2014 年, 「地衣類から新抗生物質を見つける」
- [4] 神戸高校課題研究, 2015 年, 「地衣類に含まれる抗生物質の同定」
- [5] 神戸市の大気監視の在り方見直しに係る報告 (平成 17 年度) について
<http://www.city.kobe.lg.jp/information/committee/environment/preservation/img/siryou2.3.pdf>, 2017 年 1 月 24 日最終閲覧
- [6] 平成 26 年度版<第 45 号> (平成 26 年 4 月～平成 27 年 3 月) 芦屋市の環境 (環境調査等の概要)
<http://www.city.ashiya.lg.jp/kankyou/documents/h26.pdf>, 2017 年 1 月 24 日最終閲覧
- [7] そらまめ君, 環境省大気汚染物質広域監視システム
<http://soramame.taiki.go.jp/MstPosition.php?Pref=2&Type=1>, 2017 年 1 月 24 日最終閲覧

- [8] 環境指標としての地衣類 中川吉弘 [ライケン 10(2): 17-20, 1996]
http://lichenjapan.jp/?page_id=625, 2017 年 1 月 25 日最終閲覧
- [9] 高萩敏和, 地衣共生藻の分離培養法の確立と地衣成分による光合成阻害, 2014 年 9 月
https://akita-pu.repo.nii.ac.jp/index.php?action=repository_action_common_download&item_id=45&item_no=1&attribute_id=20&file_no=3&page_id=13&block_id=21, 2017 年 1 月 25 日最終閲覧
- [10] 志波敬, 高校生のための地衣類の紹介《地衣類は環境のバロメーター》
<http://www.nkc.city.narashino.chiba.jp/narako/tosyo4gatu/20112/archieves/tiirui.pdf>, 2017 年 1 月 26 日最終閲覧
- [11] 大橋泰浩 吉澤一家, 山梨県における葉状地衣の分布及び生息環境調査
<https://www.pref.yamanashi.jp/eikanken/documents/58-14tiirui.pdf>, 2017 年 1 月 26 日最終閲覧