

原著論文

宮城県で栽培したチュニジア産オリーブ葉抽出物の ポリフェノール含量と抗菌活性

山口政人¹、庭野道夫¹、渡邊圭¹、磯田博子²

¹東北福祉大学 ²筑波大学

Polyphenol Content and Antibacterial Activity of Leaf Extracts of Tunisian Olive Cultivars Grown in Miyagi Prefecture

YAMAGUCHI Masato¹, NIWANO Michio¹,
WATANABE Kei¹ and ISODA Hiroko²

¹ Tohoku Fukushi University ² Tsukuba University

Abstract

The purpose of this study was to determine the total polyphenol content and antibacterial activity of leaf extracts of three olive cultivars, i.e., “Chetoui, Arbequina, and Koroneiki”, grown in cold climate, in three locations of Miyagi Prefecture. Total polyphenol content was highest (87.3 - 89.4 mg GAE/gDW) in the leaves of Chetoui and Koroneiki cultivars grown in Yamamoto-Ushibashi coastal area, south of Miyagi Prefecture. All crude extracts had antibacterial activity. In particular, two extracts of Chetoui cultivar grown in Ishinomaki-Ajishima and Yamamoto-Ushibashi areas showed the highest antibacterial activity, between 12.5 - 25 mg/mL, against *Escherichia coli*. High antibacterial activity of Chetoui leaves could be attributed to the high total polyphenol content. These results are interesting findings in the cold climate cultivation of Tunisian olives in Japan.

Keywords : Olive leaves, Polyphenol, antibacterial activity, cold climate, Tunisia

1. 諸言

我々は東北宮城の地域振興を目的として、寒冷地におけるオリーブの試験栽培を2018年5月から9月にかけて開始した。栽培地は宮城県内3地域、即ち、石巻市網地島、仙台市国見ヶ丘、山元町牛橋地区 (Fig. 1.) とし、当該地域の関係者並びに住民と共に、人々が集うきっかけとして、長い目でオリーブを育てて行こうという主旨の下に実践研究を始めた¹⁾。オリーブ (*Olea europaea*) はモクセイ科の常緑種で地中海沿岸国を中心に栽培されている。本研究ではチュニジア原産の Chetoui (シェトウイ) の他、スペイン原産 Arbequina (アルベキナ)、ギリシャ原産の Koroneiki (コロネイキ) の3品種を栽培している。北アフリカに位置するチュニジアは農地の3分の1以上がオリーブ畑であり、輸出農産物の50%をオリーブが占めている。オリーブオイル主要生産国としては世界で4番目である。主力品種は、全体の70%を占める Chemlali (ケムラリ) と10%を占める Chetoui (シェトウイ) がある。チュニジア産オリーブの特徴はヨーロッパ産オリーブと比べて、ポリフェノール含量が10倍も多いことが筑波大学とチュニジアの研究機関の共同研究により報告されている²⁾³⁾。ポリフェノールは抗酸化作用、抗菌作用、抗炎症作用、血糖値上昇抑制作用などの機能が知られているが⁴⁾⁵⁾⁶⁾、Yamada らは、チュニジア産オリーブ葉抽出物が抗がん作用や抗アレルギー作用を示す事⁷⁾、Nakazaki らは、ヒト白血病細胞分化誘導作用を示すなど興

味深い報告をしている⁸⁾。我々は、チュニジアの種苗会社とチュニジア農業省の協力を得て、貴重な Chetoui 種を試験研究用として寄贈を受け、寒冷地の東北宮城での栽培を開始した。今年（2020年度）で2年目を迎え、2度目の越冬に挑戦している。苗木の背丈は移植時には約30cm 程度であったが現在では100～150cm までに成長している。元々オリーブの葉は冬季の剪定時に大量に廃棄されていた未利用資源であったが、上述したような生理活性を有することから、葉茶を始めとする食品素材、保健機能素材、飼料として再び注目され、商品開発の研究も進んでいる⁹⁾¹⁰⁾。本研究ではチュニジア産 Chetoui と、同時に栽培した Arbequina、Koroneiki の3品種を用いて、オリーブ葉抽出物中のポリフェノール含量と抗菌活性について調べたので報告する。将来的には寒冷地宮城で栽培したチュニジア産オリーブ等から、健康機能に寄与する成分を明らかにし、付加価値向上と地域振興に寄与することを目指す。



Fig. 1. 宮城県内のチュニジア産オリーブの試験栽培地

1. 石巻市網地島オリーブ農園、2. 仙台市国見ヶ丘キャンパス、3. 亶理郡山元町牛橋区民会館花壇
地図：都道府県サーチ <https://expo.minnade.jp/> より抜粋改変

2. 試料及び実験方法

2-1. 試料と栽培地

試料となるオリーブの葉は、石巻市網地島オリーブ農園（採取日：2020年1月16日）、仙台市国見ヶ丘キャンパスの教育実践農園並びに感性福祉研究所の中庭の花壇（採取日：2020年1月17日）、山元町牛橋区民会館花壇（採取日：2020年1月31日）において、試験栽培中の3品種のオリーブ葉（Chetoui、Arbequina、Koroneiki）を用いた。3地域の場合を Fig. 1. に示す。石巻市網地島オリーブは2018年5月25日に苗木を植樹、仙台市国見ヶ丘キャンパスのオリーブは2018年8月12日に苗木を植樹、山元町牛橋オリーブは2018年9月19日に苗木を植樹した。3地域とも島民や住民、大学生、教職員が協力して植樹作業を実施した。以上の通り、本実験では、各農園で苗木を植樹して約2年半が経過し、2度の越冬を経験したまだ若いオリーブの葉を使用した。3地域の位置情報、気象条件などは Table 1. にまとめた。但し、気象条件は栽培地に観測所がないため最も近接する観測地の情報を参考に掲載した。Nabilらはチュニジアの Chetoui 栽培地3か所（Selten、Ousletia、Jelma）に関する地理情報を掲載している。北緯35°～36°、東経9°～10°、標高は17～410m、年間平均気温は19.5～21.3℃、年間平均降水量は189.4～438mmである¹¹⁾。一方、宮城県では年間平均気温が12.5～13.6℃、年間平均降水量が1310.5～1389.5mmであるので、チュニジアと比べて年間平均気温は約10℃低く、年間平均降水量は3～7倍多い。このような気象条件の

下で寒冷地オリーブがどのように生育していくのか、また成分に与える影響についてなどは今後調査を継続していきたい。

Table 1. 宮城県内オリーブ試験栽培地の立地・気象条件およびオリーブ葉の収穫日

site	Ishinomaki -Ajishima	Sendai -Kunimigaoka	Yamamoto -Ushibashi
Latitude	38° 15'N	38° 17'N	37° 59'N
Longitude	141° 29'E	140° 50'E	140° 53'E
Altitude	101m	151m	2m
Annual mean temperature (°C)	12.5	13.6	12.9
Highest temperature	34.1	36.1	33.5
Lowest temperature	-6.5	-3.6	-6.3
Annual mean Rainfall (mm)	1359.5	1389.5	1310.5
Hours of sunlight (h)	2112.1	2056.0	1995.6
Soil pH	6.1-6.7	6.5-6.8	6.0-6.6
Harvest date	1/16/2020	1/17/2020	1/31/2020

緯度、経度、標高：国土地理院ホームページ、地理院地図、電子国土WEBより抜粋。気象データ：気象庁ホームページ・過去の地域平均気象データ（2019年度）抜粋改変。（尚、石巻網地島の気象データは石巻市の観測地、仙台国見ヶ丘の気象データは仙台市宮城野区の気象庁観測所での観測値、山元牛橋の気象データは隣接の亘理町の観測地を示す）。

2-2. 試料の調製

採取した各オリーブの葉100～200枚程度を蒸留水で洗浄後、乾燥機（Food Dehydrator LT-81）で80℃、2時間乾燥し（Fig. 2）、粉碎機（Multi Grinder, BioloMix700）で粉末にした。乾燥の目的は3つあり、葉中のポリフェノール酸化酵素や加水分解酵素を失活させる事、水分を除去して葉中の代謝活性を極力無くす事、保存性を高める事である。予備実験において80℃、2時間の処理条件が、乾燥葉を最短時間で安定的に得られることがわかった。尚、乾燥前の重量に対する乾燥後の重量から、水分含量を算出した（Table 2）。3品種の水分含量は47.8～53.3%の範囲にある事、特に Chetoui は全ての栽培地において他の2品種と比べて水分含量が多い傾向を示した。各種オリーブ葉の乾燥粉末1.0gを遠沈管に入れ、70%エタノール10mLを加え、室温（24℃±2℃）、暗所下で3日間振とうした。その後、遠心力5,500×g、10分間遠心分離し、上清を回収、10mLに定容し、ポリフェノール抽出液とした。各種分析実験を実施するまで4℃下で遮光保存した。



Fig. 2. 各種オリーブ葉の試料調製（乾燥前と乾燥後）の様子

Table 2. 3種のオリーブ葉の水分含有率 (%)

site	Cultivation style	Cultivar		
		Chetoui	Arbequina	Koroneiki
Ishinomaki -Ajishima	Open field	51.0	49.0	47.8
Sendai -Kunimigaoka	Open field	49.0	48.8	48.2
	Semi-indoor (Potted planting)	52.3	50.9	50.4
Yamamoto -Ushibashi	Open field	53.3	47.7	48.9

2-3. 総ポリフェノール含量の測定

Folin-Ciocalteu 法によりオリーブ葉に含まれる総ポリフェノールを定量した。抽出液は ISO14502-1:2005 に基づき、エタノール濃度が20%を超えない範囲で適宜純水により希釈し1.0mLとし、フェノール試薬（関東化学）5 mLを加えた後、5分後に7.5% (W/V) 炭酸ナトリウム溶液4.0mLを加え、室温で60分放置後、分光光度計（Novaspec II Spectrophotometer）により765nmにおける吸光度を測定した。ブランクは純水とした。検量線は、10、20、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に溶解した没食子酸一水和物（FUJIFILM Wako）を用いて作成し（Fig. 3）、試料中の総ポリフェノール含量を没食子酸相当量（mg-GAE/gDW）として求めた¹²⁾。GAEはGallic acid equivalent、DWはDry weightを示す。総ポリフェノール量の計算式は次の通りである。

$$W_t = \frac{(D_{\text{sample}} - D_{\text{intercept}}) \times V_{\text{sample}} \times d}{S_{\text{std}} \times M_{\text{sample}}}$$

W_t ：試料中の総ポリフェノール量、 D_{sample} ：試料溶液の吸光度、 $D_{\text{intercept}}$ ：検量線 Y 軸切片の吸光度、 S_{std} ：検量線の傾き、 M_{sample} ：試料量（g）、 V_{sample} ：試料抽出液量（mL）、 d ：比色定量した時の試料希釈倍率。

2-4. オリーブ葉抽出物の抗菌活性試験

抗菌活性試験に用いた試料は網地島と山元町で栽培した3品種オリーブ葉の抽出液とした。また、抗菌活性試験のモデル細菌として、大腸菌 DH5 α （NIPPON GENE）を用いた。LB培地（NIPPON Genetics）を希釈液とし、96穴マイクロプレート上でオリーブ葉抽出液の2倍希釈列を調製し、抽出液の濃度は0.078~25mg/mLの範囲とした。事前に培養しておいた大腸菌（ $5 \times 10^3 \text{CFU}/\text{mL}$ ）、50 μl を各希釈列のウェルに加え、1分間マイクロプレートを攪拌した後、室温24°C \pm 2°C、3時間放置した。尚、オリーブ葉抽出液の代わりに純水を用いたものをポジティブコントロール、大腸菌を加えず純水を加えたものをネガティブコントロールとした。その後、各試料液をペトリフィルム ECプレート（3M）に塗布し、37°C、24時間培養し、ペトリフィルム上に認められた大腸菌コロニー数を測定した。尚、抗菌活性の評価には、試料の代わりに純水を加えたポジティブコントロールの大腸菌コロニー数に対する割合を生存率として算出した。

3. 結果並びに考察

3-1. オリーブ葉抽出物のポリフェノールの含量

オリーブ葉中のポリフェノール含量は、Folin-Ciocalteu 法を用い、Fig. 3. に示した没食子酸の検量線 ($R^2=0.9969$) 並びに前述した計算式に基づき、乾燥葉 1g 当たりの重量 (mg) を没食子酸換算 (mg-GAE/gDW) で表し、得られた定量値を Table 3. にまとめた。

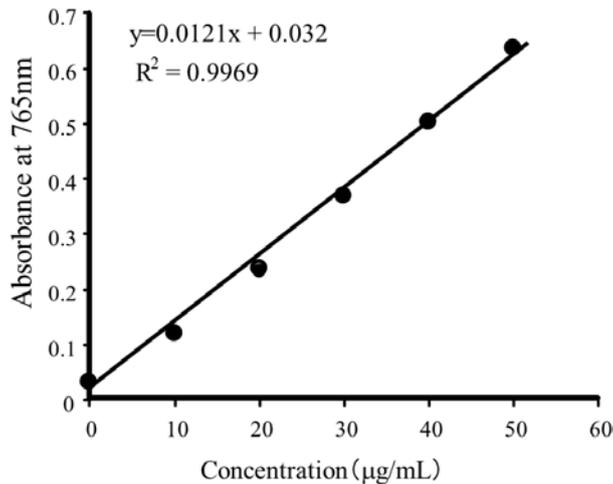


Fig. 3. ポリフェノールの定量に用いた没食子酸の検量線

その結果、栽培地あるいは品種間によって含量に差異が認められた。まず栽培地ごとに見てみると、網地島では Arbequina が 61.8 ± 0.10 mgGAE/gDW と含量が最も高く、Koroneiki と Chetoui は若干少ないものの同レベルの 59.3 ± 0.85 , 59.1 ± 0.10 mgGAE/gDW であった。一方、山元町では Chetoui と Koroneiki がそれぞれ 87.3 ± 0.19 mg、 89.4 ± 0.17 mgGAE/gDW であり、顕著に高かった。また、国見ヶ丘キャンパスでは、露地栽培と併せて感性福祉研究所の中庭での鉢植え栽培も実施しているが、両者に差異は見られず 3 品種とも $27.2 \pm 0.25 \sim 36.7$ mgGAE/gDW であり、3 地域の中で最も低い含量であった。

次に、品種に着目すると、Chetoui においては山元町の 87.3 mgGAE/gDW が最も含量が高かったのに対して、最も少なかった国見ヶ丘キャンパス (27.5 mgGAE/gDW) の約 3.2 倍の差異があった。Koroneiki においては山元町の 89.4 mgGAE/gDW が最も含量が高かったのに対して、最も少ない国見ヶ丘キャンパス (33.2 mgGAE/gDW) の約 2.7 倍の差異があった。Arbequina では網地島の 61.8 mgGAE/gDW が最も含量が高かったのに対して、最も含少ない国見ヶ丘キャンパス (27.2 mgGAE/gDW) の約 2.3 倍の差異があった。

以上の通り、同一品種が常にポリフェノール含量が高いという傾向は見られず、栽培地によって多様な値を示した。しかし、明らかに差異が認められた事として、石巻市網地島と山元町のオリーブ葉のポリフェノール含量は、仙台市国見ヶ丘キャンパスのそれと比べて 2～3 倍多かったことが挙げられる。また網地島では 3 品種共に含量が類似していること、山元町の Chetoui と Koroneiki は他の 2 地域と比べて約 3 倍も多かったことが特徴である。宮城県内の栽培において、これほど含量に差異が出るのは興味深い。網地島及び山元町は沿岸部に位置しており、仙台市国見ヶ丘は 3 地域の中で最も北側かつ西側（内陸）に位置し、標高が 151m と最も高い位置にある (Table 1.)。これらのことから気象条件が影響していると思われる。尚、Table 1. の仙台市の気象データは仙台管区気象台が所在する宮城野区の観測値であり（宮城野区の標高は 39m かつ平野部）、国見ヶ丘地区の観測値ではない。今回、試験栽培地の気象情報を基に考察が出来ない点が課題であることを述べておく。

Table 3. 宮城県内で栽培したオリーブ葉抽出物の総ポリフェノール含量

site	Cultivation style	Cultivar		
		Chetoui	Arbequina	Koroneiki
Ishinomaki -Ajishima	Open field	59.1 ± 0.10	61.8 ± 0.10	59.3 ± 0.85
Sendai -Kunimigaoka	Open field	27.5 ± 0.67	27.2 ± 0.25	36.7 ± 0.50
	Semi-indoor (Potted planting)	34.9 ± 0.17	29.1 ± 0.25	33.2 ± 0.33
Yamamoto -Ushibashi	Open field	87.3 ± 0.19	48.7 ± 0.25	89.4 ± 0.17

Polyphenol content: mgGAE/g-DW, GAE: Gallic acid equivalent, DW: Dry weight
Data represent the mean of three determination ± standard deviation.

Nakazaki らは、7種のチュニジア産オリーブ葉の抽出物を用いてヒト白血球細胞の分化誘導作用についての報告の中でオリーブ含有ポリフェノールは品種だけでなく、気候、水、土壌によっても影響を受けると考えられると述べている⁸⁾。Myriam らは、同じ気候、地理的条件で栽培されたチュニジア産オリーブ葉において、ポリフェノール量に違いが見られるのは、各品種遺伝的特徴に関連していると述べている¹³⁾。また、東らは、チュニジア北部の6つの圃場を対象に土壌中の金属含有量とオリーブ葉及びオリーブオイルに含まれるポリフェノール性化合物含有量の相関関係について解析する¹⁴⁾ など、これらは興味深い報告である。寒冷地東北でのオリーブ栽培を成功させるためにも地理的条件、気象条件、地質がオリーブの生育や成分変化にどのように影響を与えているかについて検証する必要がある。我々はこれらの課題解決する試みとして、2019年12月に網地島に気象センサーを設置し、今後、仙台市国見ヶ丘にも順次設置する計画を立てているところである。尚、山元町の気象データは隣接する亘理町の観測地のデータを使用することで特に問題はないと思われる。ポリフェノール含量に影響を与える因子が何かについて、今後、気象観測を含めた新たな知見が得られれば報告していきたい。

ところで、チュニジア原産オリーブの Chetoui を始めとするオリーブ葉中のポリフェノールの定量に関して幾つかの報告がある。Myriam らは、チュニジアで栽培している8品種のオリーブ葉を用いて、その粉末に70% エタノールを加え、最低7日間静置したものを抽出液とし定量している。葉の乾燥方法や温度設定条件は述べられていない。ポリフェノール含量は73mg~144mgGAE/gDWの範囲にあり、Chetoui については、Linouni、Gerboura、Meski、Lucques に続いて5番目に多く102.32mgGAE/gDWであった¹³⁾。Hayet らは、チュニジアで栽培された4品種のオリーブの葉を用いて、70℃、24時間乾燥後、メタノールで24時間静置したものを抽出液としている。メタノール濃度、葉の処理方法（裁断または粉末等）については述べられていない。Chetoui が47.47mgGAE/gDW と他の3品種（Meski、Oueslati、Jarbouni）と比べて最も含量が高いと報告している¹⁵⁾。Leila らは、チュニジア産 Chetoui の葉を4種の溶媒抽出によるポリフェノール含量の影響を調べている。即ち、80%メタノール、70%エタノール、80%アセトン、水を用いて、葉の粉末にそれぞれ一定量加えて、暗所で24時間、室温静置したものを抽出液としている。葉の乾燥方法や加熱条件については述べられていない。ポリフェノール含量は溶媒の順に、24.09、24.36、24.93、16.52mgGAE/gDW と報告している¹⁶⁾。Ines らは、チュニジア産 Chetoui の葉を4種の溶媒で抽出条件を検討している。即ち、ヘキサン、酢酸エチル、メタノール、80%メタノールを加えて浸漬したものを抽出液としている。葉の処理方法や各種溶媒の濃度など詳細は述べられていない。葉の乾物当たりの含量ではなく抽出液1gあたりの含量として報告している。ポリフェノール含量は溶媒の順に、15.87、86.64、105.21、185.54mgGAE /g of extract と報告している¹⁷⁾。大山らは、香川県産オリーブ葉3種（Mission、Nevadillo blanco、Lucca）を用いて、葉を熱湯で2秒間浸漬後、80℃、2時間乾燥

後粉末にし、80%メタノールを一定量加えて室温20分間浸漬したものを抽出液としている。ポリフェノール含量は、Missionが82.4、Nevadillo blancoが80.2、Luccaが73.4mgGAE/gDWと報告している¹⁸⁾。文献では乾物100g当たりの含量で掲載しているため、ここでは乾物1g当たり換算したものを記述した。

以上の通り、抽出条件がそれぞれ異なっているため、品種間による単純比較はできないが、例えばChetouiを1つ取り上げてみてもポリフェノール含量は様々であることがわかった。また我々の寒冷地栽培したChetouiのポリフェノール含量(87.3±0.19mgGAE/gDW)のほうがAbaza、Hayetのチュニジアで栽培したChetoui(24.36±0.85mgGAE/gDW、47.47±0.45mgGAE/gDW)よりも1.8~3.5倍も多いという結果となった。我々が用いた抽出方法は、可能な限り簡便でかつ人体に安全な試薬で抽出することを重視した。即ち80℃、2時間の乾燥後、粉末にし、遮光条件下70%エタノールで3日間浸漬したものである。一方、MyriamらのChetouiのポリフェノール含量(102.32mgGAE/gDW)は、我々の定量値(87.3mgGAE/gDW)よりも1.2倍多いという結果ではあった。Myriamらの抽出時の浸漬時間は7日間である。浸漬時間による抽出効率の影響は検証していないため現時点で考察するには難があるが、抽出効率は浸漬時間に依存するのかも知れない。尚、Guexらはウイスター系ラットを用いて、オリーブ葉のエタノール抽出物の安全性評価試験を実施し、毒性や異常が認められなかったことを報告している¹⁹⁾。

ところで、オリーブの葉の採取時期は、一般にオリーブの剪定作業期である1月~3月に実施するのが樹木に負荷を与えず、また作業効率も良いと言える。我々は1月末頃に剪定作業を行い、それに併せた形で葉の採取も実施した。しかし、季節によってポリフェノール含量に変動があるのかどうかについて基礎情報を得ることは今後の研究においては必要条件である。次回は紫外線強度が強いと思われる夏季に葉を採取してポリフェノール含量を調査し、比較検討を試みたい。

今回、オリーブ葉中のポリフェノールを定量したが、オリーブポリフェノールの主要成分の一つであるオレウロペインは、高い抗酸化作用、血糖降下作用、骨形成促進作用、抗菌作用が知られている。Shibazakiはオリーブ葉の乾燥条件の検討の中で、乾燥温度80℃または100℃、2時間の処理が、他の温度(40℃、60℃)と比べて3~4.5倍もオレウロペイン含量が増大することを実験的に証明している²⁰⁾。この乾燥条件は我々が用いた条件と合致している。今後は同様の抽出条件において、オリーブ葉ポリフェノールの機能性の要である抗酸化活性についても調査していきたい。

3-2. オリーブ葉抽出物による抗菌活性試験

3種のオリーブ葉抽出物による抗菌活性試験の結果をFig. 4.に示す。試験に用いた抽出液は、3地域の中でポリフェノール含量が1番目と2番目に多かった山元町と石巻網地島で栽培した各々3品種Chetoui、Arbequina、Koroneikiとした。抽出液の2倍希釈列と一定数の大腸菌液を混合したものをペトリフィルムに塗布し、培地上に認められたコロニーを計測し、大腸菌の生存率をグラフで表した。その結果、全てのオリーブ葉抽出液において抗菌活性が認められた。特に、網地島の3品種全てが抽出液12.5mg/mLで大腸菌生存率が50%を下回った。中でもChetouiは抽出液12.5mg/mLで大腸菌生存率20%を示した。また、山元町のChetouiの抽出液は25mg/mLで大腸菌生存率が0%を示し、他のどの抽出液よりも低い濃度で大腸菌を全滅させた。即ち、ポリフェノール含量の多いChetouiにこの現象が見られた。上述した葉の乾燥条件により、オレウロペイン濃度が高まり、抗菌作用が発現したのではないかと思われる。

Inesらは、チュニジア産Chetouiの葉、種子、枝の様々な溶媒抽出物の抗菌活性について、マイクロコッカス菌、エンテロコッカス菌、アグロバクテリウム菌、緑膿菌、リステリア菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、大腸菌、カンジダ菌の計9種の細菌及び真菌を用いて調べており、全ての細菌、真菌に対して抗菌活性が認められ、その最小発育阻害濃度(MIC: Minimum inhibitory concentration)は31.25~250 µg/

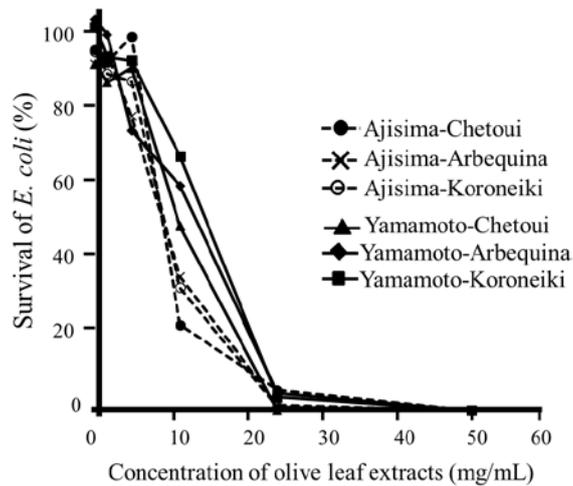


Fig. 4. オリーブ葉抽出物による抗菌活性試験

mL の範囲であると報告している¹⁷⁾。Hayet らは、チュニジア産オリーブ 4 種 (Chetoui、Meski、Oueslati、Jarbou) の葉抽出物の抗菌活性について、グラム陽性菌のシュードモナス菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌の 4 種 9 株、グラム陰性菌の大腸菌、クレブシエラ菌、エンテロコッカス菌の 3 種 5 株、真菌のカンジダ菌 1 種 4 株を用いて網羅的に調べており、全ての細菌、真菌に対して抗菌活性が認められ、その最小発育阻止濃度は 32~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であったと述べている¹⁵⁾。これら Ines、Hayet らの抗菌活性試験は、最小発育阻止濃度 (MIC) として評価している。即ち、細菌の分裂増殖が、どの濃度で抑制されるかについて、マイクロプレートのウェル中の細菌数を吸光度法 (600nm) により測定するものである。この方法では、分裂増殖はしていないが生きている菌も吸光度に含まれている。試料濃度の単位は μg オーダーとなり、一度に多数の検体を短時間で結果が得られるという利点がある。

一方、我々の抗菌活性試験は、培地上での実際の生菌数を目視で計測し、細菌の生存率を求めている。即ち、分裂増殖が可能な生き残った細菌が明確に観察でき、生存率を求めて評価するものであり、試料濃度が mg オーダーになる点や試験結果が得られるまで時間を要する点などが異なる。以上の通り、評価方法が異なるため、試料濃度による単純比較はできないが、大腸菌に対する抗菌活性が認められたという点においては彼らと共通する結果が得られた。今後はオレウロペインを定量し、併せて抗菌活性についても検証したい。尚、日本の寒冷地で栽培したオリーブの葉抽出物の抗菌活性の報告は、現時点では他に見当たらない。

ところで、ポリフェノールの抗菌メカニズムについては幾つかの報告がある。Nakayama らは、カテキンを始めとする緑茶ポリフェノールについて調べている。緑茶抽出物が大腸菌や黄色ブドウ球菌の表面タンパク質に付着して高分子量複合体を形成したり、細菌の酵素活性の阻害を示唆する結果やタンパク質を変性させるなど報告している²¹⁾。Lynda らは、35種類の植物ポリフェノールを用いて病原細菌や食中毒細菌の抗菌メカニズムを調べており、ほとんどのポリフェノールの抗菌活性が細菌細胞表面との相互作用に依るものと報告している²²⁾。

害虫に対する忌避作用に関する知見はまだ見当たらないが、我々の農園では、Arbequina や Koroneiki の葉は、初夏から秋にかけて害虫による被害が著しい。一方、Chetoui の葉は害虫被害が少なかったため、農薬散布がほとんど不要であった。このような違いが見られたのは、Chetoui のポリフェノール含量が高い事に由来しているのかも知れない。今後この現象を検証するための実験系の開発も検討していきたい。多くの植物抽出物にはフェノール化合物が含まれていることが知られているが、最近は食品や化粧品に使用されている合成防腐剤が植物由来の代替品に移行しつつあり、それらの研究開発も盛んになってきてい

る²³⁾²⁴⁾。我々の研究成果も医療、福祉、農業分野の健康環境の構築に寄与できるよう発展させていきたい。

4. 結言

宮城県3地域（石巻市網地島、仙台市国見ヶ丘、山元町牛橋地区）で試験栽培している3種のオリーブ（Chetoui、Arbequina、Koroneiki）の葉抽出物のポリフェノール含量と抗菌活性を調べた。その結果、ポリフェノール含量は、Chetouiは27.5（仙台市）～87.3mgGAE/gDW（山元町）、Arbequinaは27.2（仙台市）～61.8mgGAE/gDW（石巻網地島）、Koroneikiは33.2（仙台市）～89.4mgGAE/gDW（山元町）であった。品種間や栽培地域によって差異が認められたが、山元町で栽培しているChetouiとKoroneikの葉中ポリフェノール含量は他の全てのオリーブの中で最高値を示した。文献より、チュニジアで栽培しているチュニジア原産Chetoui葉中のポリフェノール含量は、我々の定量値の1.2倍の含量であった。即ち、寒冷地栽培でも原産国に近い含量を有していることがわかった。ポリフェノール含量は、地理的条件、気象条件、地質条件などの環境因子、実験者によるポリフェノール抽出条件によっても変動する事が考えられた。また大腸菌を用いた抗菌活性試験においては、3品種共に活性が認められた。特に網地島の3品種は全ての抽出液（12.5mg/mL）で大腸菌生存率が50%以下、中でもChetouiは12.5mg/mLで大腸菌生存率20%を示した。山元町のChetouiは25mg/mLで大腸菌生存率が0%を示し、3品種の中でChetouの葉抽出物は最も抗菌活性が高かった。今後は供試細菌の種類を増やして検証するほか、オリーブのポリフェノール主要成分のオレウロペインやヒドロキシチロソールなどの定量とこれらの種々の機能性についても調べる必要がある、将来的には寒冷地栽培のオリーブの価値を高めていくと共にオリーブ栽培をきっかけとして網地島、山元町の地域振興に繋げていきたい。

謝辞

本研究は、東北福祉大学感性福祉研究所において、文部科学省の研究施設運営支援の助成を得て行なわれました。

本研究は、チュニジア種苗会社のMuhamed Gahbi Mahjoub社長、チュニジア農業大学元学長のHarrabi教授、石巻市牡鹿総合支所、NPO法人ジョイフル網地島の阿部孝博代表他事務局の皆様、山元町牛橋区民の皆様、東北福祉大学の鈴木玲子特任准教授、地域共創推進室、感性福祉研究所事務局、本学指定団体オリーブクラブ、プロジェクト実践活動履修学生他、多くの方の協力の下で行なわれました。ご関係の皆様へ深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 庭野道夫、山口政人、渡邊圭、磯田博子「チュニジア産オリーブ栽培の実践的研究Ⅰ」『感性福祉研究所年報』20, 79-94, 2019
- 2) 「チュニジア国 高機能性オリーブを用いた商品開発事業 準備調査（BPO ビジネス連携促進）ファイナルレポート」（独）国際協力機構（JICA）、（株）アレナビオ、（株）ヤマヒサ、（株）アグリオリーブ小豆島、（国）筑波大学、JICA 報告書 PDF 版, 2017
- 3) JSTNews jst.go.jp/pr/jst-news/backnumber/2010/201011/pdf/2010_11_p14.pdf 1 バックナンバー 11月号（独）科学技術振興機構発行, 7（8）, 2010
- 4) Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K. and Balansard, G. “Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves” *Journal of Agricultural Food chemistry* 49, 618-621, 2001
- 5) Gonzales, M., Zarzuelo, A., Gamez, M.J., Utrilla, M.P., Jimenez, J. and Osuna, I. “Hypoglycemic

- activity of olive leaf" *Planta Med* **58**, 513-515, 1992
- 6) Bisignano, G., Tomaino, A., LoCascio, R., Crisafi, G., Ussella, N. and Saija, A. "On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol" *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **51** (8), 971-974, 1999
 - 7) Parida, Y., Junkyu, H. and Hiroko, I. 「オリーブ由来ポリフェノール成分の抗がん・抗アレルギー活性解析」『*沙漠研究*』 **18** (4), 183-187, 2009
 - 8) Nakazaki, E., Junkyu, H. and Hiroko, I. 「チュニジア産オリーブ葉抽出物のヒト白血病細胞分化誘導作用」『*New Food Industry*』 **52** (7), 21-27, 2010
 - 9) Bouarab, C., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J. and Oulahi, N. "Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives" *Journal of Food Agriculture* **15:99** (4), 1457-1474, 2018
 - 10) 大山憲一、大西茂彦、松岡博美、東畑 顕、石田典子、小川 雅廣 「オリーブ葉添加飼料を投与した養殖ブリ筋肉の脂質および呈味評価」『*Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*』 **64** (10), 507-514, 2017
 - 11) Nabil B.Y., Abaza, L., Ouni Y., Salma, Nmm, Debbech, N., Abdelly, C. and Zarrouk, M "Influence of the site of cultivation on Chetoui olive (*Olea europaea* L).oil quality" *Plant Production Science* **15:3**, 228-237, 2012
 - 12) Folin, O. and Denis, W. "A Colorimetric method for the determination of phenols (and phenolderivatives) in urine" *Journal of biological chemistry* **22**, 305-308, 1915
 - 13) Myriam, B.S., Hafedh, A., and Manef, A. "Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia" *Medicinal chemistry* **2** (5), 107-111, 2012
 - 14) 東照雄、末屋早紀、Mokhtar Zarrouk、菅沼秀樹、磯田博子 「チュニジアのオリーブ栽培における土壌中の金属元素量とオリーブオイル中のフェノール性化合物量」『*沙漠研究*』 **18** (4), 167-170, 2009
 - 15) Hayet, E., Raouf, J., Hechmi, C., Luc, V., Guido, F., Dalenda, B., Mohamed, H., Mahjoub, A. and Maha, M. "A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars" *Heliyon* **5** (5), 1-8, 2019
 - 16) Leila, A., Nabil, B.Y., Hedia, M., Faouzia, M.H., Kaouther, M. and Mokhtar Zarrouk. "Chétoui olive leaf extracts: Influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities" *Grasas y aceites*, **62** (1), 96-104, 2011
 - 17) Ines, K., Karim, J., Thomas, M., Maria, H.i, Alexios, L. and Nouredine, A. "Characteristics, phytochemical analysis and biological activities of extracts from Tunisian chetoui *Olea europaea* Variety" *Journal of Chemistry* Article ID 418731, 1-11, 2015
 - 18) 大山憲一、柴崎博行、大西茂彦、柴田英明、小川雅廣 「香川県産飼料用オリーブ葉のポリフェノール含量に及ぼす保存方法の影響」『*Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*』 **63** (12), 570-574, 2016
 - 19) Guex, C.G, Reginato, F.Z, Figueredo, K.C da Silva, A., Pires, F.B., Jesus, R.D.S, Lhamas, C.L, Lopes, G.H.H.8. and Bauermann, L.F. "Safety assessment of ethanolic extract of *Olea europaea* L. leaves after acute and subacute administration to Wistar rats" *Regul Toxicology Pharmacology* **95**, 395-399, 2018
 - 20) 柴崎博行 「オリーブ葉の乾燥条件の検討」『*農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター研究報告*』 **18**, 85-87, 2018
 - 21) Motokazu, N., Naofumi, S., Takashi, T., Hitomi, J., Tomoyo, M., Yoko, M., Masahiro, K. and

- Takahisa, M. "Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7" *Food control* **25** (1), 225-232, 2012
- 22) Lynda, B.C, Valerrian, F., Pierre, L., Yohann, C., Lucie, L.A, Nadia, O., Pascal, D. and Clarie, B. "Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models" *Frontiers in Microbiology* 18, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019>
- 23) Bouarab, C.L, Degraeve P, Ferhout H, Bouajila J. and Oulahal N. "Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives" *Journal of the science of food agriculture* **99** (4), 1457-1474, 2019
- 24) Kočevár, G.N. and Lunder, M. "Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion." *International Journal of cosmetic science* **40** (3), 276-284, 2018