

IB 課題論文

教科：生物

# 緑茶の抽出温度と抗菌作用の 強さの関係性

緑茶を抽出する際の水の温度

(15°C, 35°C, 55°C, 75°C) と緑茶の落下菌に対する  
抗菌作用の強さにはどのような関係性があるのか。

文字数： 7975 字

Candidate code: kbx008

# 目次

リサーチクエスチョン	2
概要	2
背景	2
動機	2
先行研究	2
実験方法の選択	6
仮説	9
実験方法	10
用具	10
変数	11
手順	12
結果	14
考察	17
実験結果の議論	17
実験方法の評価	18
結論	21
付録	22
参考文献	31

## リサーチクエスト

緑茶を抽出する際の水の温度（15℃, 35℃, 55℃, 75℃）と緑茶の落下菌に対する抗菌作用の強さにはどのような関係性があるのか。

## 背景

### 動機

日本は世界的に見ても緑茶の消費・生産が活発で私自身も幼いころから緑茶を口にしてきた。そこで私は緑茶に興味を持ち、インターネットで緑茶が持つ性質に関して調べていると緑茶はカテキンを含んでおりそれにより抗菌作用を持つことを知った。緑茶の飲み方は複数存在し、冷水で抽出したりして飲む場合もあり私は緑茶を抽出する際の水の温度と緑茶の持つ抗菌作用の強さの関係性について非常に興味を持った。緑茶は日本に住む多くの人々にとって身近な存在であるため、緑茶の抗菌作用に関する研究を行うことは私個人にとって重要であるだけでなく多くの人にとっても重要であると考え、私は緑茶を抽出する際の水の温度と緑茶の抗菌作用の強さの関係を研究することに決めた。

### 先行研究

まず本稿では落下菌を用いるため細菌と真菌の両方が採集されるので「抗菌作用」を「細菌や真菌の増殖を抑制する働き」と定義する。どのように「抗菌作用の強さ」を測定するかは後ほど説明する。

緑茶の抗菌作用に関しては既に多くのことが分かっている。例えば石田佳代らは *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) や *Pseudomonas Aeruginosa* (緑膿菌) に対する抗菌作用を実証した<sup>1</sup>。また、丹野憲二らは緑茶が *Vibrio metschnikovii* (ビブリオ・メチニコフイ) 及び *Alcaligenes faecalis* (アルカリゲネス・フェーカリス) などの細菌に対して特に強い抗菌作用を示すことを実証した<sup>2</sup>。そして空気中には *Escherichia coli* (大腸菌) や *Bacillus subtilis* (枯草菌)、緑膿菌などの多くの種類の菌が存在している<sup>3</sup>が緑茶はそれらの多くの種類の菌に対して抗菌作用を示すことが分かっている<sup>4 5</sup>。

緑茶の抗菌作用の主な原因物質はカテキンであることが分かっている<sup>6</sup>。カテキンは緑茶葉成分の 10~18%を満たすものであり<sup>7</sup>、細菌の細胞膜を破壊することにより細菌を殺したりして細菌の増殖を抑制する<sup>8</sup>。緑茶葉に含まれるカテキ

---

<sup>1</sup> 石田佳代, 城生弘美, 市村禎宏, 霧島正浩. (2007). 「褥瘡に多く存在する MRSA と緑膿菌に対する抗菌作用を示す緑茶の濃度に関する研究」『群馬パース紀要』4号, p486.

<sup>2</sup> 丹野憲二, 野々村英夫. (1974). 「緑茶抽出液中の抗菌性物質」『日本食品工業学会誌』21巻9号, p446.

<sup>3</sup> 太田垣寛. (2015). 「環境検査の方法実技」. P8.

[https://www.nirs.qst.go.jp/rd/quality\\_assurance/gmp/document/08\\_gmptraining\\_textbook/day1\\_07\\_merck.pdf](https://www.nirs.qst.go.jp/rd/quality_assurance/gmp/document/08_gmptraining_textbook/day1_07_merck.pdf) (2022年3月26日参照).

<sup>4</sup> 池晶子, 糸満多佳子, 河野みずき, 滝上詩織, 宮本真衣. (2017). 「緑茶の抗菌効果に及ぼす水の硬度の影響」『日本食品微生物学会雑誌』34巻1号, p. 9.

<sup>5</sup> 宮井輝幸, 秋山正行, 中川稔, 矢野陽一郎, 池田三知男, 市橋信夫. (2012). 「コーヒー, 紅茶及び緑茶飲料における *Bacillus* 属細菌の挙動」『日本食品科学工学会誌』59巻11号, p592.

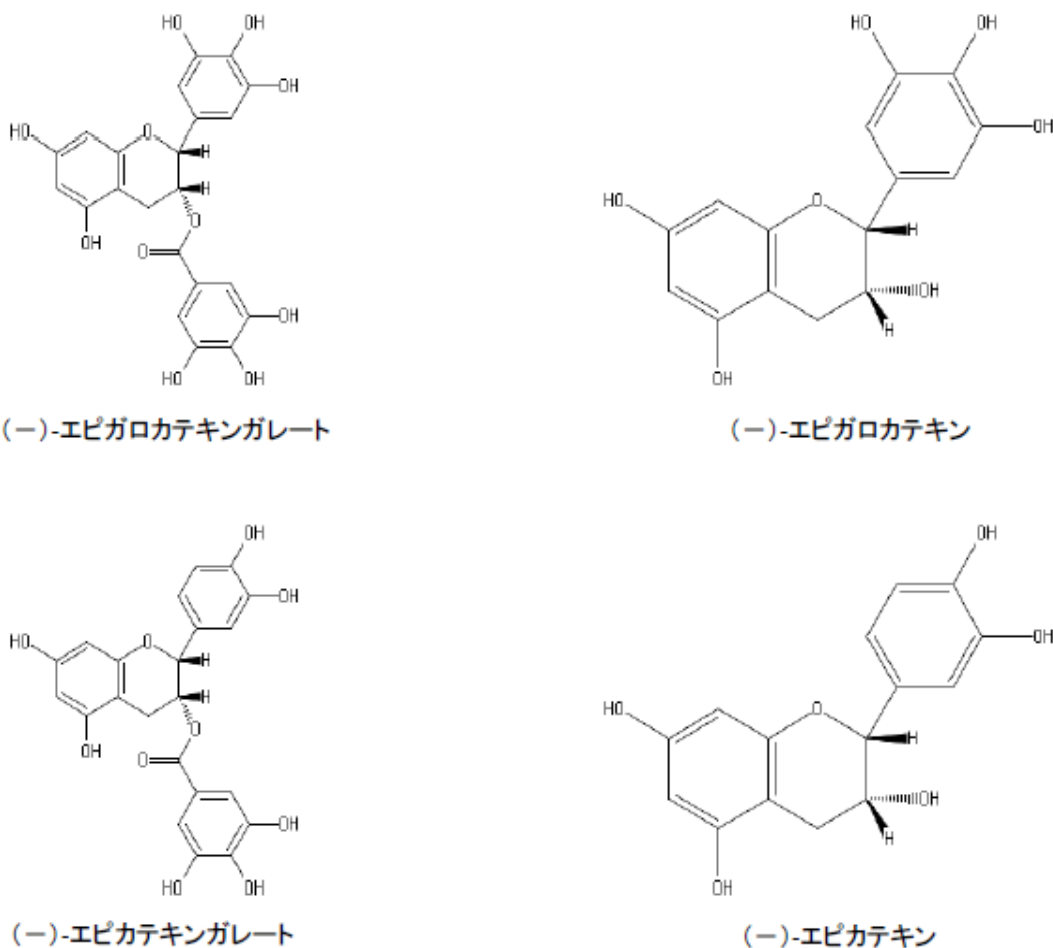
<sup>6</sup> 島村忠勝. (2000). 『奇跡のカテキン お茶に潜む驚異のパワー』. PHP 研究所, p14.

<sup>7</sup> 和田侑子, 石井文由. (2008). 「カテキンの秘めたるパワー」『オレオサイエンス』8巻9号, p372.

<sup>8</sup> 島村忠勝. (2000). 『奇跡のカテキン お茶に潜む驚異のパワー』. PHP 研究所, p51.

ンには複数の種類があり、エピガロカテキнгаレート(EGCg)は緑茶カテキンの約半分を占め、それに加えてエピカテキнгаレート(ECg)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキン(EC)の順で多く占め、緑茶葉中のカテキンはこの4種のカテキンによって約9割以上構成されている<sup>9</sup>。図1に4種類のカテキンの構造式を示す。

図1：4種類のカテキンの構造式<sup>10</sup>



<sup>9</sup> 和田侑子, 石井文由. (2008). 「カテキンの秘めたるパワー」『オレオサイエンス』8巻9号, p372.

<sup>10</sup> 図1の画像の出典：食品分析開発センター. (2016). 「カテキンについて」『食品分析開発センター』. <<http://www.mac.or.jp/mail/160901/04.shtml>>(2022年3月25日参照).

また、カテキンの種類によって抗菌作用の強さが異なることが報告されている。戸田真佐子らの実験では、*S. Aureus*（黄色ブドウ球菌）に対する 最小発育阻止濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）が ECG, EGCg, EGC, EC の順番で低く、*V cholerae O1 classical 569B*（クラシカル型コレラ菌 569B 株）に対しての MIC も ECG の値が最も低く、EC の値が最も高い結果となっており戸田らは抗菌効果の強さは ECG > EGCg > EGC > EC の順であると結論付けている<sup>11</sup>。ちなみに最小発育阻止濃度とは、一般に菌の増殖を抑制するのに必要な抗菌性物質の最小濃度のことであるため、MIC の値が低ければ低いほど抗菌作用は強いといえる。しかし原征彦の実験では多くの食中毒菌に対する MIC において EGCg の値が最も低い結果となっている<sup>12</sup>。そのため、菌種によってそれぞれのカテキンの抗菌作用の強さの順番はさまざまであることが考えられるが、どちらの実験においても多くの菌種で EGCg と EGC の MIC の値が比較的 low、EC の MIC の値が比較的高いため多くの細菌に対して EGCg と EGC は比較的強い抗菌作用を持っており、EC は比較的弱い抗菌作用を持っていると考えられる。

緑茶の抽出方法は多様であり、冷水で抽出する場合もあれば、熱湯で抽出する場合もある。そのため抽出する際の水の温度が緑茶の成分に及ぼす影響に関しては既に多くの研究が行われ、様々なことが明らかになっている。例えば煎茶（緑

---

<sup>11</sup> 戸田真佐子, 大久保幸枝, 生貝初, 島村忠勝. (1990). 「茶カテキン類およびその類造類似物質の抗菌作用ならびに抗毒素作用」『日本細菌学雑誌』45 巻 2 号, p562, 565.

<sup>12</sup> 原征彦. (2000). 「茶カテキン類の機能性とそれらの応用例」『日本食品保蔵科学会誌』26 巻 1 号, p49.

茶の一種)の低温での抽出では、茶葉に含まれるカフェイン、カテキンなどの成分が抽出されづらいことが報告されている<sup>13</sup>。また、堀江らが行った2分間の煎茶の抽出の実験では、20℃での抽出では、エステル型カテキン類(EGCgとECG)がほとんど抽出されず、遊離型カテキン類(EGCとEC)は数%~約10%しか抽出されていない一方で、90℃での抽出ではエステル型カテキン類が約20%~約30%抽出され、遊離型カテキン類は約40%~約50%抽出されている<sup>14</sup>。そのため、抽出温度によって緑茶の持つ抗菌作用の強さが大きく異なることや、低温での抽出では緑茶の抗菌作用があまり発揮されないことが考えられる。

## 実験方法の選択

### ① 菌の採集方法

研究の当初私は大腸菌、乳酸菌もしくは落下菌を採集することを考えていた。その中で落下菌を用いることを選んだ理由は主に2つある。1つ目は私たちの身の回りの空気中に存在する菌に対する抗菌作用を調べることはとても有意義であると私は考えたからである。というのも緑膿菌や黄色ブドウ球菌は空気中によくみられる<sup>15</sup>が、それらのような菌は時に私たちの健康に重篤な被害を及ぼしかね

---

<sup>13</sup> 堀江秀樹, 氏原ともみ, 木幡勝則. (2001). 「茶主要成分の茶浸出液への溶出特性」『茶業研究報告』91号, p31.

<sup>14</sup> 堀江秀樹, 氏原ともみ, 木幡勝則. (2001). 「茶主要成分の茶浸出液への溶出特性」『茶業研究報告』91号, p31.

<sup>15</sup> 太田垣寛. (2015). 「環境検査の方法実技」.

<[https://www.nirs.qst.go.jp/rd/quality\\_assurance/gmp/document/08\\_gmptraining\\_textbook/day1\\_07\\_merck.pdf](https://www.nirs.qst.go.jp/rd/quality_assurance/gmp/document/08_gmptraining_textbook/day1_07_merck.pdf)>(2022年3月26日参照).

ず、それらに対する抗菌作用と抽出温度の関係性を調べ新たな知識を生み出すことができれば、私たちの日々の生活に応用できる可能性があるからだ。また2つ目の理由として、落下菌を採集するための落下菌法は特別な実験器具を必要とせずコストがかからずに簡易に採集できる<sup>16</sup>といった利点をもつということが挙げられる。これは学校という設備が制限された環境での研究においては非常に大きな利点となった。一方落下菌法では菌数が採集する場所の空気の流れに大きく影響されてしまうという指摘もある<sup>17</sup>が、本稿では落下菌を採集する際に採集場所の窓を閉め換気扇を切り、人の出入りを禁止するなどの工夫を施し空気の流れを可能な限り抑制した。

菌の採集場所としては、トイレの個室を選択した。これはトイレは人間が排泄を行う場所であるため様々な菌が存在し、さらに身近であると私は考えたためである。また私はトイレの個室は学校の中の他の場所と比べて人の出入りを制御しやすく、空気の流れが比較的穏やかであると考えた。

## ②シャーレの殺菌方法

本稿ではシャーレの殺菌方法として、シャーレを沸騰水に10分間沈める方法を選択した。私の学校にはガラスのシャーレに限られた数しかなかったため、本稿ではプラスチックのシャーレを用いた。プラスチックのシャーレは耐熱性が低

---

<sup>16</sup> 柳沼健史. (n. d.) 「落下菌法について」. <<https://www.eiken.co.jp/uploads/es13c.pdf>> (2022年5月5日参照).

<sup>17</sup> 柳沼健史. (n. d.) 「落下菌法について」. <<https://www.eiken.co.jp/uploads/es13c.pdf>> (2022年5月5日参照).



くオートクレープでの滅菌は非常に高温であるため、私はオートクレープを用いた滅菌は適切ではないと考えた。代わりに私は沸騰水であれば、オートクレープよりも低い温度であり多くの菌を死滅できると考え、沸騰水にシャーレを沈めることによって殺菌を試みた。株式会社東邦微生物研究所によるとサルモネラ菌は10分間60°Cで加熱することによって死滅し、黄色ブドウ球菌は2.5分間60°Cで加熱することで死滅する<sup>18</sup>ことから、私は沸騰水にシャーレを10分間沈めることで多くの菌を殺菌できると考えたため、10分間という期間に設定した。この殺菌方法の限界やこの方法が実験結果に与えた影響に関しては、後ほど「実験の評価」にて議論する。

### ③ 緑茶の抗菌作用の強さの測定方法

本稿において、緑茶の抗菌作用を測定する方法を選択する際には池晶子らの研究<sup>19</sup>を参考にした。その研究においては緑茶の抗菌作用を調べる方法として、寒天培地と緑茶を混ぜ合わせ「緑茶培地」を作成し、その緑茶培地を使って菌を採集する方法が採用されていた<sup>20</sup>。そしてその研究では、この方法を用いて統計処理により水培地と緑茶培地の菌数に有意差が存在する ( $p \leq 0.05$ ) ことが示さ

---

<sup>18</sup> 株式会社東邦微生物研究所. (n. d.). 「細菌増殖と温度管理について」.  
<<https://www.toholab.co.jp/info/archive/16153/>>(2022年5月5日参照)

<sup>19</sup> 池晶子, 糸満多佳子, 河野みずき, 滝上詩織, 宮本真衣. (2017). 「緑茶の抗菌効果に及ぼす水の硬度の影響」『日本食品微生物学会雑誌』34巻1号, p7-12.

<sup>20</sup> 池晶子, 糸満多佳子, 河野みずき, 滝上詩織, 宮本真衣. (2017). 「緑茶の抗菌効果に及ぼす水の硬度の影響」『日本食品微生物学会雑誌』34巻1号, p. 8.

れ、緑茶の大腸菌に対する抗菌作用が実証されており<sup>21</sup>、この方法は緑茶の抗菌作用の測定に適切であると私は考えたため、本稿ではこの方法を参考にして寒天培地と緑茶を混ぜた「緑茶培地」を作成し、菌を採集することにした。

また本稿では落下菌をグリーンベンチにて5日間室温で培養するが、抗菌作用の強さを測定するためにコロニーの面積を測定することにした。当初は池晶子らの研究<sup>22</sup>を参考にアプリを用いて菌の個数を測定することを考えていた。しかし個数ではなく面積を採用した主な理由は、今回は1つの菌種を培養するわけではないため菌が作るコロニーの大きさがばらつくこ可能性が高く大きなコロニーが複数個だけある培地と小さなコロニーが無数にある培地がある結果も考えられ、そんな場合において菌の個数を抗菌作用の強さの指標とするのは適切ではないと私は考えたからだ。測定方法に関しては後ほど「手順」にて詳しく説明する。

## 仮説

私は緑茶を抽出する際の水の温度と、緑茶の落下菌に対する抗菌作用の強さには正の相関関係があると推測する。なぜなら、堀江らの研究では20℃、50℃、70℃、90℃の異なる抽出温度において抽出温度が高ければ高いほど緑茶の抗菌作用の主な原因物質である4種類のカテキン（EGC、EC、EGCg、ECg）の抽出量が高

---

<sup>21</sup> 池晶子, 糸満多佳子, 河野みずき, 滝上詩織, 宮本真衣. (2017). 「緑茶の抗菌効果に及ぼす水の硬度の影響」『日本食品微生物学会雑誌』34巻1号, p. 9.

<sup>22</sup> 池晶子, 糸満多佳子, 河野みずき, 滝上詩織, 宮本真衣. (2017). 「緑茶の抗菌効果に及ぼす水の硬度の影響」『日本食品微生物学会雑誌』34巻1号, p7-12.

まっており<sup>23</sup>、抽出温度が高ければ緑茶のカテキン濃度が高まり、緑茶の抗菌作用が強くなると考えたからだ。

## 実験方法

### 用具

- ・緑茶の茶葉（4袋）

伊藤園の緑茶プレミアムティーバッグを使用。

- ・粉末寒天（20g）
- ・プラスチックシャーレ 12枚（1つの温度につき3枚）
- ・味の素のコンソメ（20g）
- ・100%グルコース（20g）
- ・25ml メスシリンダー（2本）
- ・5ml ピペット（2本）
- ・2000ml ビーカー（1個）
- ・電子天秤（±0.001g）
- ・15cm 定規（±0.05cm）
- ・電気ケトル
- ・アナログ温度計（4個）（±0.5℃）

---

<sup>23</sup> 堀江秀樹，氏原ともみ，木幡勝則．（2001）．「茶主要成分の茶浸出液への溶出特性」『茶業研究報告』91号，p31.

- 500ml ビーカー (±25ml)
- 200ml ビーカー (±12.5ml)
- 純水 (500ml)

## 変数

独立変数: 緑茶を抽出する際の水の温度 (15°C, 35°C, 55°C, 75°C)

35°C, 55°C, 75°Cに関しては、電子ケトルを用いて水を熱した後、それらを冷ましてアナログ温度計を用いながら温度を調節した。15°Cに関しては常温の水に氷を入れてアナログ温度計を用いて温度を調節した。

従属変数: 培養から 5 日後のコロニーの面積

## 制御変数

- 培養した環境の温度 (約 25°C、室温)

安全性を考慮し本稿では室温での培養を行った。

- 培養期間 (5 日間)
- 菌の採集場所と時間 (トイレの個室、10 分間)
- 培地の種類 (緑茶培地)
- ティーバッグを振る回数 (20 回)

私は実験の準備の際にティーバッグを振る回数によって緑茶の色が大きく変化することに気が付いた。これはティーバッグを振る回数が緑茶の成分の抽出量に大きな影響を与えたためだと考えティーバッグを振る回数を制御することにした。

- ・緑茶を抽出する時間（2分）

スマートフォンにあるストップウォッチを用いて時間を計測した。

## 手順

シャーレの殺菌

- ② 2000ml ビーカーに沸騰した水を入れる。
- ④ 10 分間、6 枚のシャーレを沸騰水に沈める。
- ⑤ もう一度 2000ml ビーカーに沸騰した水を入れる。
- ⑥ 10 分間、6 枚のシャーレを沸騰水に沈める。

緑茶培地の作成

- ① 500ml の水とそれぞれ 20g の粉末寒天、ブドウ糖、コンソメ（後ほど緑茶と混ぜるため通常の 2 倍の濃度）を 500ml ビーカーに入れる。
- ② 500ml ビーカーを 700W で 4 分 30 秒間電子レンジにて加熱する。  
4 分 30 秒間の電子レンジでの加熱で溶液が沸騰したため、熱により多くの菌が死滅し寒天が溶けたと考えこの期間に設定した。
- ③ 4 つの 200ml ビーカーに 100ml のそれぞれの温度の水（15℃，35℃，55℃，75℃）を入れ、それらのビーカーに 2 分間ティーバッグを入れお茶を抽出する。
- ④ 作成した 4 つの 100ml のお茶のうちそれぞれ 25ml と①，②で作成した溶液 25ml を 12 枚のシャーレに入れる。

⑤ シャーレを放置し、それぞれの抽出温度の緑茶培地を固体化させる。

菌の採集（採集している様子の写真は附録に添付されている）

① トイレの個室に机を設置する。

② 設置した机の上に 12 個のシャーレを 10 分間、蓋を開けて設置する。

菌の培養

約 25°C の室温でクリーンベンチの中にシャーレを設置し菌を 5 日間培養する。

コロニーの面積の測定

当初コロニーの面積を測定するにあたり ImageJ という画像ソフトウェアを用いることを考えていた。しかし文献<sup>24</sup>から、もしコロニーが円形であればコロニーを円に近似して直径を測ることで面積を求めることができることを知った。そして培養後のコロニーを観察すると多くのものが円形をしていたため、最終的にコロニーを円に近似し定規でその直径を測りその値を半分にして半径を求め、以下の式を用いることでコロニーの面積を求めることにした。またシャーレの上から無数のコロニーを測定することは困難であったため、写真を撮影しそれを印刷して写真から定規を使って測定を行った。

$$A = \pi r^2$$

( $A$ はコロニーの面積、 $r$ はコロニーの半径を表す)

そして 1 つ 1 つのコロニーの面積を求めた後、それらを足し合わせることで 1 つの培地におけるコロニーの総面積を求める。

---

<sup>24</sup> Andrivon, Didier. (2017). Re: How to calculate area of a fungal colony?. (2022 年 5 月 28 日参照).  
<<https://www.researchgate.net/post/How-to-calculate-area-of-a-fungal-colony/58ef381fb0366de70b790b7e/citation/download>>.

## 結果

それぞれのサンプルの写真と測定した直径のデータは附録に記載している。

表 1 : コロニーの総面積 (cm<sup>2</sup>)

抽出温度 (°C)	コロニーの総面積 (cm <sup>2</sup> )
15	2.969
15	24.50
15	19.56
35	42.74
35	1.367
35	1.885
55	17.77
55	1.186
55	8.302
75	3.676
75	0.558
75	0.157

次に、私の「緑茶を抽出する際の水の温度と、緑茶の落下菌に対する抗菌作用の強さには正の相関関係がある」という仮説を検証するために、P 値を「抗菌作用の強さ指数」と定義し、その P 値と抽出温度の相関関係を調べる。

P 値は以下の式で定義する。

$$P = [(30\pi - A) \div 30\pi] \times 100$$

前のページの式の $30\pi$ は写真上のシャーレの面積であり（半径約 5.5cm）、 $A$ は表 1 のコロニーの総面積を表している。そして $[(30\pi - A) \div 30\pi]$ は緑茶培地において菌が繁殖していない部分の割合である。P 値はその値を 100 倍することによって%の値にしたものである。つまり、この P 値は緑茶がどれだけのパーセントの培地の面積を菌の繁殖から守ったかを示すものである。表 2 にそれぞれの抽出温度での P 値を示す。

表 2 : 抽出温度と P 値

抽出温度 (°C)	P 値
15	96.8
15	74.0
15	79.2
35	54.7
35	98.5
35	98.0
55	81.1
55	98.7
55	91.2
75	96.1
75	99.4
75	99.8

また、表 2 のデータを次のページの図 2 に散布図として表した。



図 2 : P値と抽出温度 (°C)

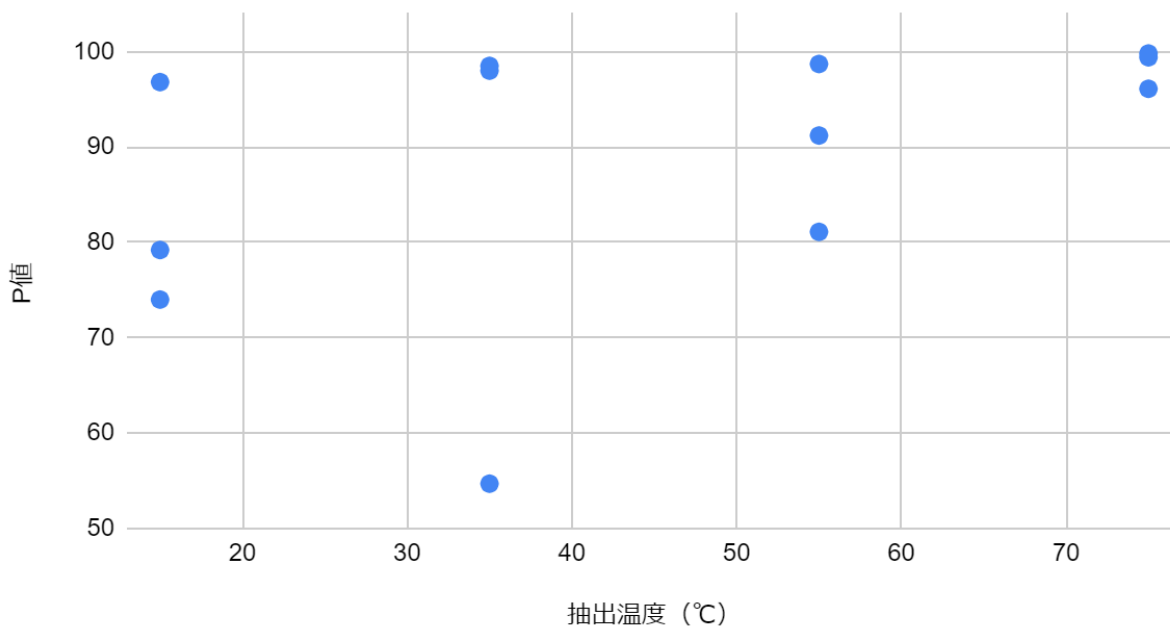


図 2 より、抽出温度 35°C のグループに外れ値 (P 値 = 54.7) が存在することが分かる。しかし、これは測定ミスや記録ミスによるものとは考えられないため、除外せずに次の相関係数の計算においても用いる。この外れ値の存在は、実験中の人為的ミスによるものとは考えづらく、それよりも実験方法の問題点が大きな原因であることが考えられる。それらの問題点に関しては後ほど議論する。

次に、抽出温度と P 値 (抗菌作用の強さ指数) の相関関係を調べるために 2 つの変数間の相関係数 (r) を計算する。相関係数は次の式を用いて計算できる。

$$r = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \times \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

( $x_i$ :各抽出温度の値,  $\bar{x}$ :抽出温度の平均,  $y_i$ :各 P 値,  $\bar{y}$ :P 値の平均)

前のページの式で算出される相関係数は-1 から 1 の値を取るが今回は文献<sup>25</sup>をもとに相関係数を表 3 のように解釈する。

表 3 : 相関係数と相関関係の強さ

$ r $	相関の強さ
$ r  \geq 0.7$	強い相関あり
$0.4 \leq  r  < 0.7$	中程度の相関あり
$0.2 \leq  r  < 0.4$	弱い相関あり
$ r  < 0.2$	ほとんど相関なし

表計算ソフトであるグーグルスプレッドシートを用いて相関係数を計算した結果、相関係数 (r) は 0.432 となった。r の値は正であり、表 3 を参考にすると抽出温度と P 値 (抗菌作用の強さ指数) には中程度の正の相関関係があることが分かった。この結果や実験方法の問題点に関して、次の「考察」にて議論していく。

## 考察

### 実験結果の議論

実験結果より、抽出温度と P 値 (抗菌作用の強さ指数) には中程度の正の相関関係 (r=0.432) があることが分かった。本稿では抗菌作用の強さを P 値を基準としているため、私の「緑茶を抽出する際の水の温度と、緑茶の落下菌に対する

<sup>25</sup> 首都大学東京 大学教育センター 情報教育担当. (n. d.). 「第六講 相関分析」『Tokyo Metropolitan University』. <<https://infolit.uec.tmu.ac.jp/2014/2a/06/mac06.html>>(2022年5月5日参照).

抗菌作用の強さには正の相関関係がある」という仮説は肯定される。この結果は堀江らの研究<sup>26</sup>が示すように、抽出温度が高ければ緑茶の抗菌作用の主な原因物質であるカテキンの抽出量が高まり、緑茶のカテキン濃度が高まったことによるものであると考えられる。75℃のグループのP値はそれぞれ96.1、99.4、99.8と他の温度のもの比べて高く、抗菌作用が強かったことが示されている。また、15℃のグループのP値には74.0、79.2と比較的小さいものがあり、比較的抗菌作用が弱いことが示されている。しかし図2の散布図からも分かるように同じ抽出温度のもの、つまり条件が一定であるはずのものであってもP値に大きなばらつきがあった。例えば35℃のグループのP値は54.7、98.5、98.0と大きくばらついていた。これは本稿において採用した実験方法に大きな問題があることを示している。そのため次に実験方法の評価を行う。

### 実験方法の評価

まず本稿では菌を採集する方法として落下菌法を採用したがこの方法には大きな問題点があった。1つ目の問題点はそれぞれの培地に落下する菌の量が均一ではなく異なってしまうことである。緑茶の抽出温度と抗菌作用の強さの関係性に関してより信頼性の高い結果を得るには採集される菌の量は均一になっていることが非常に重要であるためこの方法は適切ではなかった。落下菌法の2つ目の問

---

<sup>26</sup> 堀江秀樹, 氏原ともみ, 木幡勝則. (2001). 「茶主要成分の茶浸出液への溶出特性」『茶業研究報告』91号, p31.

題点としてそれぞれの培地に落下する菌種が異なってしまうことが挙げられる。丹野憲二らの研究<sup>27</sup>では緑茶はいくつかの種類の糸状菌や酵母には抗菌作用を示さないことが実証されており、緑茶の抗菌作用の強さは菌種によって大きく異なることが考えられる。そのため特定の抽出温度の培地に緑茶があまり抗菌作用を示さない菌が入ってしまった可能性も考えられる。抽出温度と緑茶の抗菌作用の関係性を調べるには採集する菌の種類が均一になっていることが重要であるため落下菌法の採用は適切ではなかった。そしてこれらの菌採集に関わる方法論の問題点が、35℃のグループに外れ値が存在していたことの大きな原因であることが考えられる。

また本稿では結果の信頼性を高めるために1つの抽出温度につき3つのサンプルを用意したが、それでもなお偶然特定の抽出温度の培地に多くの菌が落下した可能性が存在する。そのためサンプル数をさらに増やすことでより偶然性の低い信頼性の高いデータを採集することができ、信憑性のある科学的知識を生み出すことができる。

加えて菌を採集する前の殺菌方法にも大きな問題点があった。本稿ではシャーレを10分間沸騰水に沈めることによって殺菌した。確かに「実験方法の選択」で述べたようにこの殺菌方法ではいくつかの菌を死滅することができたと考えら

---

<sup>27</sup> 丹野憲二, 野々村英夫. (1974). 「緑茶抽出液中の抗菌性物質」『日本食品工業学会誌』21 巻 9 号, p446.

れるが、10 分間沸騰水に沈めるだけでは死滅しない菌も存在する<sup>28</sup>。また培地の作成に際してはビーカーが沸騰するまで（4 分 30 秒間）加熱したがボツリヌス菌といった熱に強い細菌も存在し<sup>29</sup>、そのような菌はこの方法では死滅するとは考えられない。今回は培地を作成した日に菌を採集したため菌を採集する前から培地に菌が存在したかは観察できなかったが、今回の方法論の限界により菌を採集する前からいくつかの培地にすでに菌が存在してしまっていた可能性は否定できない。菌を採集する前には全ての培地において菌が死滅していることが重要であるためプラスチックのシャーレの代わりにガラスのシャーレを用い、オートクレーブを用いて滅菌するなどの方法を採用して改善する必要がある。

最後に定規を用いた面積の測定にも複数の問題点が存在した。一つ目の問題点としてコロニーの数は非常に多く人による目視での測定は測定者のミスを引き起こしやすいということが考えられる。さらに確かに多くのコロニーが円形になっていたが、いくつかのコロニーは楕円形になっておりコロニーを円に近似した測定には誤差が生じた。しかし、研究の振り返りの当初私は定規での測定は適切ではなかったと考えていたが、やはり菌の大きさは様々であったため菌の個数を測定するのではなく菌の面積を測定したことは抗菌作用の強さを考えるうえでは信頼性が高く、定規での面積の測定は本稿の実験方法の長所でもあった。

---

<sup>28</sup> 株式会社東邦微生物研究所. (n. d.). 「細菌増殖と温度管理について」.  
<<https://www.toholab.co.jp/info/archive/16153/>>(2022 年 5 月 5 日参照).

<sup>29</sup> 株式会社東邦微生物研究所. (n. d.). 「細菌増殖と温度管理について」.  
<<https://www.toholab.co.jp/info/archive/16153/>>(2022 年 5 月 5 日参照).

## 結論

実験結果より、緑茶を抽出する際の水の温度と緑茶の落下菌に対する抗菌作用の強さには中程度の正の相関関係 ( $r=0.432$ ) があることが分かった。しかし本稿の実験方法にはいくつかの問題点が存在するためより正確なデータを取得し結果の信頼性を上げるためにも「実験方法の評価」で私が提案した方法などを採用し実験方法を改善することが求められる。

## 付録



写真1：トイレの個室での落下菌の採集



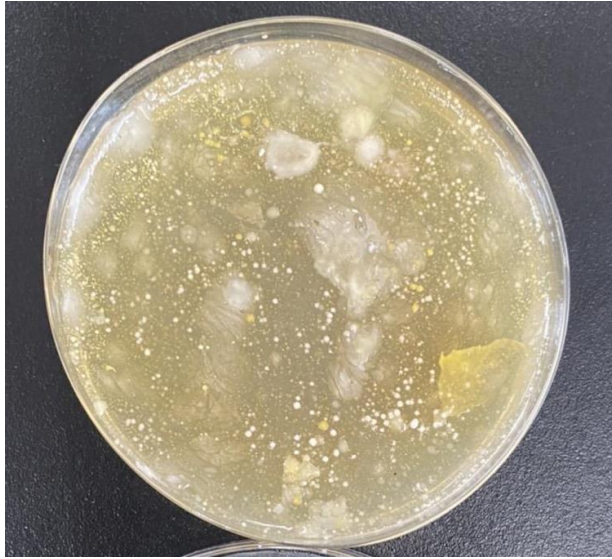


写真 2 : 5 日後の抽出温度 15°C ①

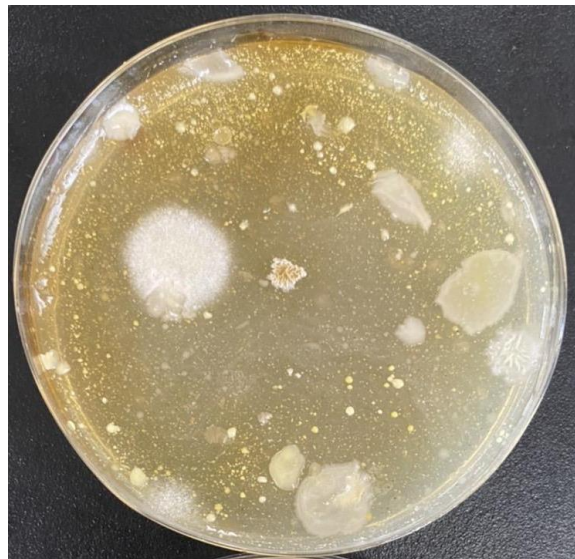


写真 3 : 5 日後の抽出温度 15°C ②

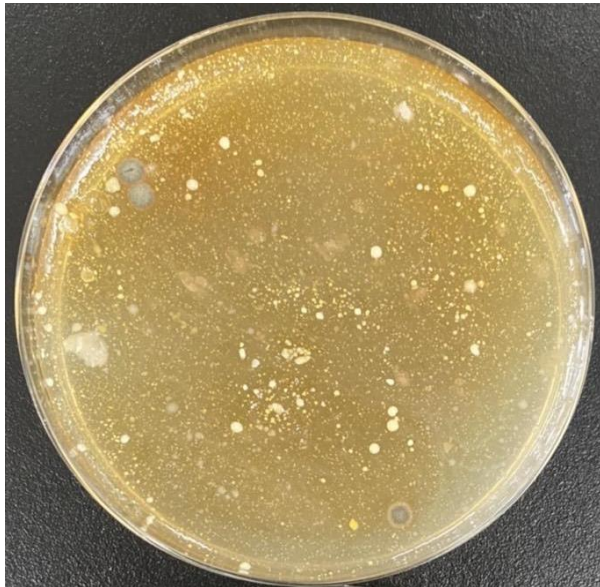


写真 4 : 5 日後の抽出温度 15°C ③

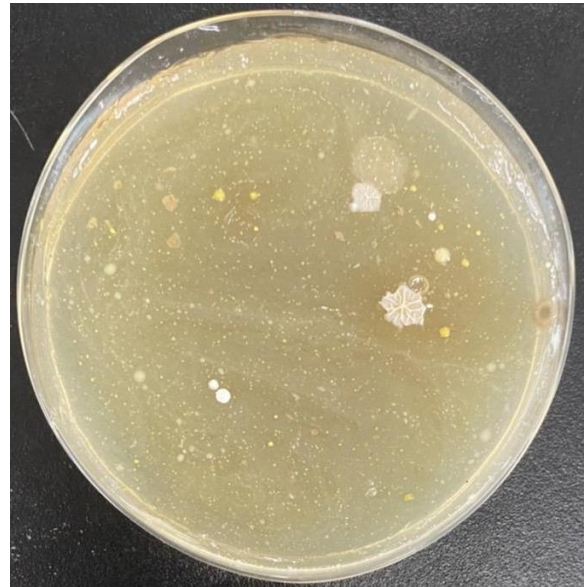


写真 5 : 5 日後の抽出温度 35°C ①



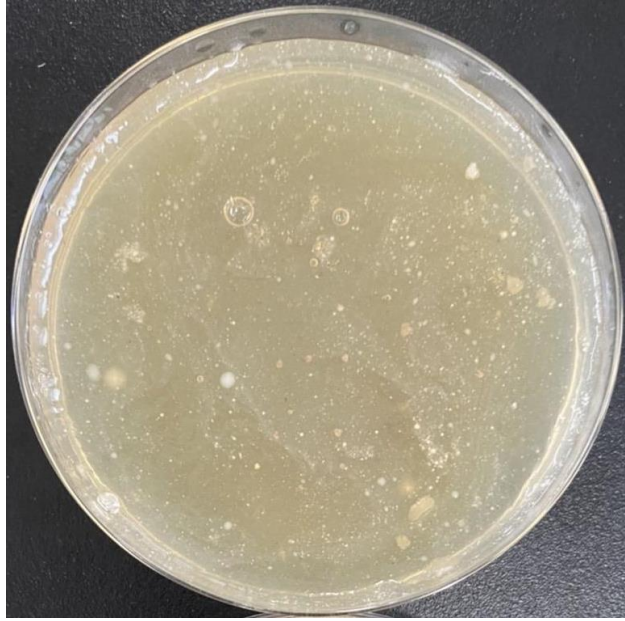


写真 6 : 5 日後の抽出温度 35°C ②

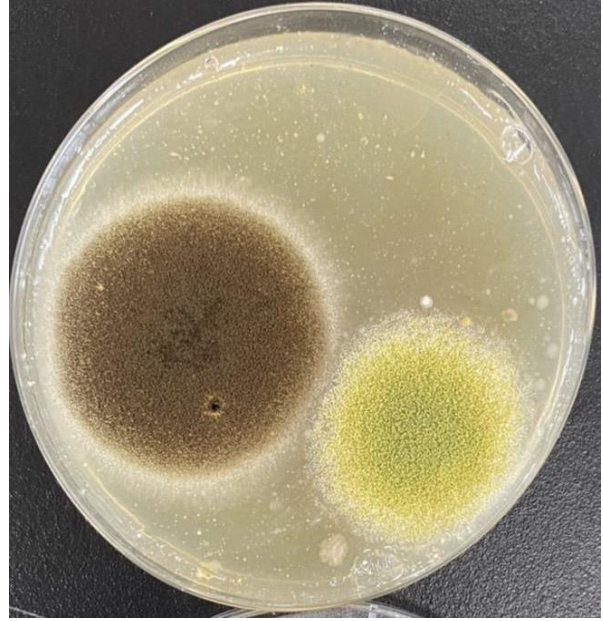


写真 7 : 5 日後の抽出温度 35°C ③

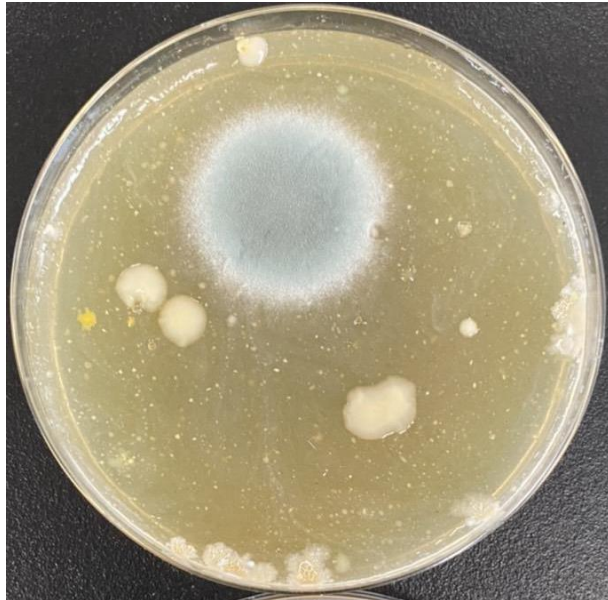


写真 8 : 5 日後の抽出温度 55°C ①



写真 9 : 5 日後の抽出温度 55°C ②



写真 10 : 5 日後の抽出温度 55°C ③



写真 11 : 5 日後の抽出温度 75°C ①



写真 12 : 5 日後の抽出温度 75°C ②



写真 13 : 5 日後の抽出温度 75°C ③

表4：抽出温度 15°C ①におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	84
0.2	5
0.3	1
0.4	4
0.8	5
0.9	2
1.0	1
1.1	1
1.2	2
1.3	1
2.3	1
2.5	1

表5：抽出温度 15°C ②におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	15
0.2	16
0.3	4
0.4	4
0.5	1
0.7	3
0.8	1

0.9	1
1.0	2
1.2	1
1.3	2
1.5	1
1.7	1
1.9	1
2.1	1
2,5	1

表 6 : 抽出温度 15°C ③におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	17
0.2	25
0.3	6
0.4	2
0.5	3
1.0	1

表 7 : 抽出温度 35°C ①におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	11
0.2	8
0.3	4

0.4	1
0.8	1
0.9	1

表8：抽出温度 35°C ②におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	19
0.2	1
0.3	5
0.4	2
0.5	1
0.7	1

表9：抽出温度 35°C ③におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	1
0.2	2
0.3	3
0.5	1
0.6	1
4.7	1
5.6	1

表 9 : 抽出温度 55°C ①におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	4
0.2	1
0.3	3
0.5	2
0.6	2
0.9	2
1.0	2
1.2	1
4.0	1

表 10 : 抽出温度 55°C ②におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	3
0.2	1
1.2	1

表 11 : 抽出温度 55°C ③におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	16
0.2	1
0.3	2
0.7	2
1.1	1

1.2	1
1.6	1
2.0	1

表 1 2 : 抽出温度 75°C ①におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	2
0.4	1
0.5	1
0.6	1
1.0	1
1.7	1

表 1 3 : 抽出温度 75°C ②におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	11
0.3	1

表 1 4 : 抽出温度 75°C ③におけるコロニーの直径 (cm) とその数

コロニーの直径 (cm) ( $\pm 0.05$ )	コロニーの数
0.1	3
0.2	1
0.8	1



## 参考文献一覧

石田佳代, 城生弘美, 市村禎宏, 霧島正浩. (2007). 「褥瘡に多く存在する MRSA と緑膿菌に対する抗菌作用 を示す緑茶の濃度に関する研究」 『群馬パース紀要』 4 号, p63-68.

丹野憲二, 野々村英夫. (1974). 「緑茶抽出液中の抗菌性物質」 『日本食品工業学会誌』 21 巻 9 号, p445-449.

太田垣寛. (2015). 「環境検査の方法実技」.

<[https://www.nirs.qst.go.jp/rd/quality\\_assurance/gmp/document/08\\_gmptraining\\_textbook/day1\\_07\\_merck.pdf](https://www.nirs.qst.go.jp/rd/quality_assurance/gmp/document/08_gmptraining_textbook/day1_07_merck.pdf)>(2022 年 3 月 26 日参照).

池晶子, 糸満多佳子, 河野みずき, 滝上詩織, 宮本真衣. (2017). 「緑茶の抗菌効果に及ぼす水の硬度の影響」 『日本食品微生物学会雑誌』 34 巻 1 号, p7-12.

宮井輝幸, 秋山正行, 中川稔, 矢野陽一郎, 池田三知男, 市橋信夫. (2012). 「コーヒー, 紅茶および緑茶飲料における Bacillus 属細菌の挙動」 『日本食品科学工学会誌』 59 巻 11 号, p591-594.

島村忠勝. (2000). 『奇跡のカテキン お茶に潜む驚異のパワー』. PHP 研究所.

和田侑子, 石井文由. (2008). 「カテキンの秘めたるパワー」 『オレオサイエンス』 8 巻 9 号, p371-378.

食品分析開発センター. (2016). 「カテキンについて」 『食品分析開発センター』.  
<<http://www.mac.or.jp/mail/160901/04.shtml>>(2022 年 3 月 25 日参照).



戸田真佐子, 大久保幸枝, 生貝初, 島村忠勝. (1990). 「茶カテキン類およびその構造類似物質の抗菌作用ならびに抗毒素作用」 『日本細菌学雑誌』 45 巻 2 号, p561-566.

原征彦. (2000). 「茶カテキン類の機能性とそれらの応用例」 『日本食品保蔵科学会誌』 26 巻 1 号, p47-54.

堀江秀樹, 氏原ともみ, 木幡勝則. (2001). 「茶主要成分の茶浸出液への溶出特性」 『茶業研究報告』 91 号, p29-33.

柳沼健史. (n. d.) 「落下菌法について」.

<<https://www.eiken.co.jp/uploads/es13c.pdf>>(2022 年 5 月 5 日参照).

株式会社東邦微生物研究所. (n. d.). 「細菌増殖と温度管理について」.

<<https://www.toholab.co.jp/info/archive/16153/>>(2022 年 5 月 5 日参照).

Andrison, Didier. (2017). Re: How to calculate area of a fungal colony?. (2022 年 5 月 28 日参照). <<https://www.researchgate.net/post/How-to-calculate-area-of-a-fungal-colony/58ef381fb0366de70b790b7e/citation/download>>.

首都大学東京 大学教育センター 情報教育担当. (n. d.). 「第六講 相関分析」 『Tokyo Metropolitan University』.

<<https://infolit.uec.tmu.ac.jp/2014/2a/06/mac06.html>>(2022 年 5 月 5 日参照).