

14. 廃棄松葉の機能性の研究

静岡県立静岡農業高等学校
松葉研究班 2年 増田彩香

1 動機

三保松原では、景観を保つため多くの松葉が定期的に伐採されるため廃棄松葉が多く出る。現在「松枯れ」の促進で景観が損なわれるなどの問題が目立ってきた。松枯れの原因として落ち松葉による土壌の富栄養化が挙げられる。松は根粒菌と共生関係にあるため富栄養化した土壌では育ちにくい傾向にある。そうして弱った松はマツノザイセンチュウへの耐性もなくなるため松枯れが促進された。と私達は考える。放置松葉を活用すれば松枯れの抑制ができると考え研究に乗り出した。

2 枯松葉の基礎研究

廃棄松葉のうち青松葉に注目して研究を行っていたが、三保での活動を行っていく中で枯松葉による景観の悪化、松枯れの促進に気が付きこの枯松葉を使った商品開発をするため研究を開始した。枯松葉と松葉の抗酸化作用の比較

(1) 松葉に対する枯松葉の抗酸化力の減少率分析

DPPH法で松葉に対する枯松葉の抗酸化力の減少率を分析した。

松葉 2g	70%	枯松葉 2g
797ABS	→→→	533ABS

(2) 松葉と枯れ松葉が及ぼす血管への作用分析

ラットの大動脈の血管平滑筋細胞に、メタノール・KHBで溶解した松葉パウダー溶液を投射し血管に対する松葉と枯れ松葉の効果を調べた。

松葉溶液と枯松葉溶液を下記のように累積投与していき最大弛緩を示す濃度を調べた。

結果

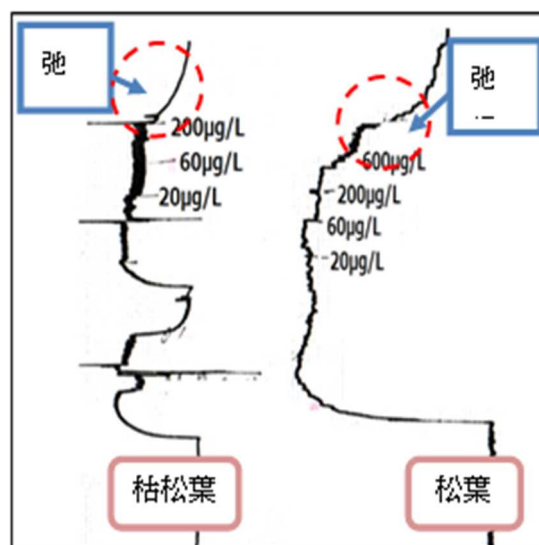
松葉は 635 μ l、枯松葉は 160.3 μ l でそれぞれ最大弛緩を示した。

このことから、換算計算し、

枯れ松葉は、0.16 g/l、松葉は、0.63g/l で血管を弛緩させることがわかった。

↓
松葉にも枯松葉にも血管を弛緩させる作用があると分かった。また、松葉より枯松葉のほうが少ない量で最大弛緩作用を発揮することが検証できた。

このことから、枯松葉の方が弛緩作用が強いと分かり血管を弛緩させる成分が多いと考えられる。

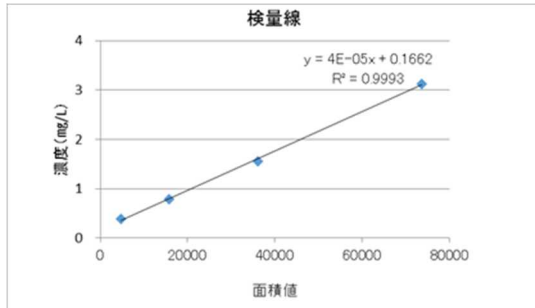


(3) 血管を弛緩させている物質の検証

この興味深い結果の解明に挑戦した。様々な文献を調べ、一酸化窒素の働きによって血管が弛緩し、活性酸素が阻害物質であることを知った。強い抗酸化物質が、青松葉よりも枯松葉のほうが多く含まれているのではないかと仮説を立てた。

そこで、抗酸化物質含量の定量分析を行った。

ア ケルセチンの定量 (高速液体クロマトグラフィー)



試料溶液測定

試料	面積値	濃度 (mg/L)	試料秤量値 (g)	100g 中濃度 (mg)	平均
A-1 (青松葉①)	29863	1.357	2.00	17.0	18.6
A-2 (青松葉②)	36571	1.624	2.00	20.3	
B-1 (枯松葉①)	62393	2.654	2.00	33.2	33.4
B-2 (枯松葉②)	63179	2.685	2.00	33.6	

〈結果〉青松葉のケルセチン量=18.6mg

枯松葉のケルセチン量=33.4mg

イ クロロフィルの定量 (分光光度計)

① 松葉、枯松葉 1 g ずつをジメチルホルムアミド 6 ml に 2、3 日つけておく。

② 吸光度の測定。クロロフィル a を 633.8nm、クロロフィル b を 646.8nm、比較として 750nm の 3 つの波長で吸光度を測定する。

〈結果〉松葉…58.9 μg/ml、枯松葉…8.4 μg/ml

ウ ビタミンCの定量 (ジクロロインドフェノール滴定法)

試薬と試料をそれぞれ調整し、マイクロビュレットを用いて滴定する。

① ビュレットに色素溶液を、三角フラスコにメタリン酸 2% で調節した試料溶液を入れる
→滴定→ビタミンC含量算出

〈結果〉松葉…0 μg/ml 枯松葉…0 μg/ml

エ β -カロテンの定量 (分光光度計)

調整した資料溶液と松葉、枯松葉の資料溶液を分光光度計 (453nm) で吸光度を測定し、濃度と検量線から含有量を計算で割り出す。

標準原液濃度	面積値 (ABS)	〈面積値〉	
200.0 μg/ml	2.7994	松葉…1.8306	枯松葉…0.1543
1.0 μg/ml	0.7788	(結果)	
0.5 μg/ml	0.4043	松葉…28.5	
0.25 μg/ml	0.2177	枯松葉…2.4	(mg/100ml)
0.125 μg/ml	0.1267		
0.0625 μg/ml	0.0797		

<結果のまとめ>

	ケルセチン	クロロフィル	アスコルビン酸	B-カロテン
松葉	18.6mg/100g	58.9mg/100g	0mg/100g	28.5mg/100g
枯松葉	33.4mg/100g	8.4mg/100g	0mg/100g	2.4mg/100g
方法	HPLC	分光光度計	ジクロロインドフェノール滴定法	HPLC

※アスコルビン酸は粉末にした際の熱による酸化で変質したため検出されなかった
 枯松葉は松葉よりケルセチン含量が多く、松葉は枯松葉よりもケルセチン以外の抗酸化物質が多かったため「ケルセチン」のみが血管の弛緩に関わっていると言える。
 このことより仮説が証明されたと同時に血管の弛緩に関しては松葉よりも枯松葉のほうが機能性に優れていると言える。

(4) 血管弛緩作用の応用研究

基礎研究で証明した血管弛緩作用を有効利用するための商品開発を行った。青松葉・枯松葉とも強い血管弛緩作用を示した為放置松葉を活用することにした。また地面に落ちた枯松葉を口に入れるのは抵抗があるだろうと考え、入浴料にした。この入浴料は、三保のみやげとして販売、現在100万円以上の売り上げを得ている。また、地元の温泉旅館で、日替わり湯として活用されている。このことによって、松枯れの一つの原因である落ち松葉から利益が生まれ、観光客や、地元の人の健康増進にも役立っている



(5) アレルギー症状の緩和

松葉パンのテストユーザーの方から「松葉パンを食べるようになってから花粉症の症状が軽くなった」というお話を聞いた。このことから松葉にアレルギーを緩和する作用があるのではないかと考えた私達は常葉大学と共同で研究を行った。

ア 抽出液の作成

- ① 試料を有機溶媒で抽出し濃縮する
- ② 培養しておいた脂肪細胞に①を与える
- ③ 二日間静置し細胞の様子を観察

イ 試料溶液の濃縮

- ① 100ml のメチルアルコールに 20 g の試料を漬ける
 - ② 20 時間静置した試料溶液を濾過
 - ③ エバポレーターで減圧乾固 (70℃水浴中)
 - ④ メチルアルコールをホールピペットで 10ml 測りとり乾固を終えたナス型フラスコに加える
 - ⑤ フラスコ内に残ったものを溶かし込む
- ※20/10 (g/ml) の濃度にする



ウ 試料

a 松葉 b 枯松葉 c 茶 各 20 g

d 松葉+そば (茹で) e そば (茹で)

d・e →そば：小麦：松葉=400：100：13.2 (松葉2.6%)

20ml のメチルアルコールを加え乳鉢ですりつぶす

粉々になったら三角フラスコに注ぎメチルアルコール 80ml を足す

f 松葉+そば (粉) g そば (粉)

f・g →そば：小麦：松葉=16：4：0.52 (g) =20.52

エ 操作

- ① 肥満細胞を培養液中に培養しておく
- ② 古い培養液を吸引チューブで吸い取る
- ③ 生理食塩水 (以下 PBS) 2~1.5ml とり、容器に流し入れ、吸引 (繰り返す)
二回目にトリプシン EDTA トリューションと PBS が 1：9 の割合になるようにする
(EDTA で細胞のたんぱく質を軽く溶かしペトリ皿から細胞をはがす)
- ⑤ CO₂インキュベータ内で 5 分静置
- ⑥ PBS を①の容器に加えピペットで数回かき混ぜ細胞をはがしサンプルカップに入れる
- ⑦ 細胞の入ったカップを 2 つ培養液の入ったカップを 1 つ遠心分離にかける
- ⑧ 吸引チューブで培養液のみ吸引し細胞のみをカップ内に残す
- ⑨ IMDM を 3ml 入れピペットで細胞を懸濁する
- ⑩ ピペットで少量摂り血球計算版に注入し細胞数をカウント
- ⑪ 細胞液を 0.123μl 摂り別のサンプルカップに入れる。(以下サンプル B)
- ⑫ サンプル B に IMDM を 13.878ml 加える (100 倍)
- ⑬ 100μl 摂りプレートに流し込む
- ⑭ プレートの外側一列に滅菌水を入れる→内側の列の水分が飛ぶのを防ぐ
- ⑮ 10 倍 → 原液：メタノール = 5μl：45μl
100 倍 → 10 倍液：メタノール = 5μl：45μl
- ⑯ 上記とは別のサンプルカップに IMDM を 350μl
- ⑰ 試料を 0.7μl 入れる (control はメタを 1.34μl)
- ⑱ ピペットで混ぜ、プレートに一穴 100μl ずつ入れる。
- ⑲ CO₂インキュベータ (5%) 内に 2 日間静置

オ 吸光分析結果

- ① 各ウェルから 120μl 摂る (細胞は張り付いているので取れることはない)
蒸発による減少を 10μl と仮定すると 200 - (10+120) = 70 となる
高価な試薬を用いるため節約が必要だから培養液の量を減らした。
- ② 培養液の一穴 70μl に対して「CCK-8」溶液を 7マイクロリットル注入する。
一枚 60 穴 × 2 枚 × 7μl = 840μl
トレーの中で培養液 420μl と CCK-8 を 420μl とを混ぜ、各穴に 7μl 注入する
「CCK-8」→生細胞の数が多ければ多い程濃い橙色を呈する。
- ③ 2 時間 CO₂インキュベータ内で静置
- ④ 450・630 nm の波長で吸光分析する
計算 D (デルタ) = 450 nm の値 - 630 nm の値
ブランク (BLK) も同様に値をとる
試料 A の吸光度 = A の D - BLK の D (細胞が試料によって変化したことを表す)
プレートの穴事態に吸光度の差が生じるため 650 nm の値で補正を行う

カ 結果

	blank	松葉	枯松葉	茶	松葉+茶	枯松+茶	そば	茹でそば	松葉そば	茹で松葉そば
	0.299	0.14	0.083	0.162	0.15	0.183	0.305	0.326	0.314	0.308
原液	0.278	0.132	0.081	0.168	0.156	0.183	0.29	0.333	0.298	0.303
	0.271	0.138	0.083	0.154	0.151	0.179	0.299	0.326	0.293	0.289
	-0.003	0.335	0.346	0.323	0.32	0.319	0.318	0.312	0.306	0.283
10倍希釈	0.002	0.329	0.348	0.331	0.301	0.324	0.32	0.321	0.307	0.308
	0.002	0.322	0.343	0.337	0.303	0.317	0.351	0.317	0.313	0.324
	↑ control									

blank⇒0.282 松葉⇒0.137 枯松葉⇒0.0823

松葉枯松葉ともblankよりも増殖が抑えられた。このことから松葉・枯松葉ともアレルギー症状の緩和作用があると分かった。

3 応用研究

三保での話し合いで見えてきた課題

- ・観光客の偏り→三保松原にしか人が訪れない

せっかく三保地域に人が訪れているのに松原だけ見てすぐに帰ってしまうというのが現状（三保での販売活動で観光客の様子を見て私たちが思った事）

- ・三保の名産品がない→観光客に「三保のお土産は何かないの？」と聞かれることが多い（三保で飲食店を営む方からのお話し）

⇒アレルギー社会である現代において話題性があるアレルギー緩和の機能性を松葉から見出し、商品化することを計画している。これにより三保に経済効果をもたらし、松葉の効能を多くの方に知っていただくと考え「松葉うどん」の試作を行っている。

(1) うどん試作

ア 材料

中力粉…500g 食塩…20g 水…250g 打ち粉…少々 松葉濃縮液…小さじ2.5

- ① こね合わせ…生地を水を加え耳たぶほどの硬さにこねる。このとき松葉の濃縮液を添加
- ② ねかし…10分ほどこねた生地を室温で30～60分ねかせる
- ③ 伸ばし…綿棒で均一に伸ばす
- ④ 切りだし…伸ばした生地を屏風型にたたむ。麺は3～4mmの幅に切る

※現在は昆布と鰹でとっただしに松葉醤油で味をつけている（既存の松葉商品との併用が可能だと分かった）

4 終わりに

この研究を通じて、松葉・枯松葉の持つ血管平滑筋の弛緩作用を実証した。また、松葉と枯松葉では弛緩率に差があることからそれぞれに含まれる抗酸化物質に注目し、定量分析を行うことで「ケルセチン」が血管を弛緩させる物質であると確認することができた。さらに、研究を入浴料の開発に生かした。この入浴料は地元の入浴施設でも使われており、三保松原のPRと枯松葉の消費につながっている。枯松葉から商品を作ることで、枯松葉が引き起こす土壌の富栄養化の抑制をし、三保松原の松枯れを抑制できると考えている。

また、アレルギー症状緩和作用の検証を行ったことでアレルギー社会である現代において松葉は有用な効果を示すことが分かった。松葉の効能を有効利用したご当地商品を作ろうと考え、現在「松葉うどん」の試作・開発を行っている。

