

論	文
---	---

# 酵母に対するエタノールの増殖抑制効果の定量的解析と その理論的背景

Oana-Arina Antoce<sup>a</sup>, Vasile Antoce<sup>a</sup>, 高橋克忠<sup>a</sup>, 新田康則<sup>a</sup>, 深田はるみ<sup>a</sup>, 川崎東彦<sup>b</sup>

(平成7年12月25日)

## Quantitative Analysis of the Action of Ethanol on Growth Activity of Yeast and Its Theoretical Background

Oana-Arina Antoce<sup>a</sup>, Vasile Antoce<sup>a</sup>, Katsutada Takahashi<sup>a</sup>, Yasunori Nitta<sup>a</sup>, Harumi Fukada<sup>a</sup> and  
Haruhiko Kawasaki<sup>b</sup>

(Received December 25, 1995)

A calorimetric analysis was made to characterize quantitatively the action of ethanol on the growth activity of yeast cells at 30°C. By using the multiplex calorimeter previously designed, the growth thermograms of the yeast grown in liquid media containing ethanol at different concentrations were observed and the inhibitory effect of ethanol on the growth was analyzed in terms of the effect on specific growth activities as evaluated from (1) the change in growth rate constant and (2) the extent in retardation of growth. The ethanol concentration at which the specific growth activity is repressed by 50%,  $K_i$ , the index term to express the cooperativity of ethanol action,  $m$ , and the minimum inhibition concentration, MIC, determined from the two different view points were found to be in good agreement. From the result obtained it was concluded that the theoretical background employed for the analysis is a reasonable one and that the method of analysis developed here is useful for the quantitative study of the interactions between drugs and microbial cells.

### 1. 緒 論

細胞の代謝熱計測を原理とする微生物系熱測定は、分析手段としての応用、特に抗微生物作用を示す薬剤と細胞の間の相互作用を定量的に観測する上で有用であることをすでに紹介した<sup>1) - 3)</sup>。これは一般の微生物学的手段とは異なり、非破壊的立場の方法として、定量的な把握に大きな困

難を伴う気体、液体、固体を含む不均一な媒体中の微生物活性も何ら区別なく検出できる特徴を持っている。この方法をさらに有効に利用するための一つの方策は、多くの試料を同時に計測するシステムを開発することである。すなわち、生理状態がさまざまな要因で変化する微生物細胞を対象とする場合、同時計測は信頼性の高い実験値を得る上で重要である。そうした理念にもとづく装置として先に24

a 大阪府立大学農学部生物物理化学研究室：〒593 堺市学園町1-1

b 大阪府立大学農学部醗酵制御化学研究室：〒593 堺市学園町1-1

Laboratories of <sup>a</sup>Biophysical Chemistry and of <sup>b</sup>Fermentation Chemistry, College of Agriculture, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 593, Japan

個の熱測定ユニットを有する多試料微生物活性計測装置を試作し報告した<sup>4)</sup>。そこで次の段階としては、この装置を使用して、熱測定により観測されるシグナルから必要な情報を導くための一般性のある解析法を確立することが必要である。このような立場から、液体培地中での酵母の増殖系を選び、これに対するエタノールの効果を観測し、これを事例として、抗微生物作用を示す薬剤の熱測定法による解析法を開発したので報告する。

## 2. 実験

### 2.1 試料ならびに装置

試験に用いた微生物種は研究室保有の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* No.9302 であり、培地はグルコース・ペプトン培地 (pH6.8) を使用した。抗微生物薬剤としてのエタノールは市販特級試薬を用いた。装置はすでに報告した24個の熱測定ユニットを有する多試料同時計測微生物活性解析装置 ((株) 日本医化器械製作所製 Bio Thermo Analyzer H-201 : 略称 BTA) を使用した<sup>4)</sup>。

### 2.2 実験操作

グルコース・ペプトン培地5mlずつを25個の30mlガラス培養容器<sup>4)</sup>にとりオートクレーブ殺菌した。この培地にエタノールを各種濃度になるよう無菌的に添加し、これを試験用培地とした。

酵母は保存斜面培地から1白金耳をとり、まずアルコールを含まないグルコース・ペプトン培地について、同じ培養容器中で24時間前培養(静置)を行った。これを滅菌水で100倍に希釈した後、その菌懸濁液を1mlずつ上述の培養容器中の培地に添加(植菌)した。これらの容器をBTA中に設置し、細胞増殖に伴う熱生成シグナルを観測した。植菌量は上述の懸濁液1ml当たり  $1.1 \times 10^5$  であった。また、培地濃度は1%、培地中のエタノールは最終濃度が0~10% (v/v) になるよう添加量を調整した。測定はすべて30℃の条件で行なった。

## 3. 結果

### 3.1 増殖サーモグラムにおよぼす影響

Fig.1にエタノールを0~5.92% (v/v) の濃度で含む培地で60h培養した時に観測した酵母の増殖サーモグラムを示す。これを  $g(t)$  曲線と呼ぶ。縦軸は熱検出体が示す熱起電力で、単位は  $\mu V$ 、また、横軸は培養時間(単位は h)である。熱検出体の熱起電力感度は  $18mV/^\circ C$  であり、このことから、本測定条件では最大約0.01℃の温度差を観測していることがわかる。

シグナルはこの種の回分培養に特徴的な形状を示し<sup>5)</sup>、細胞の増殖を反映していることは明らかである。熱量の生成と増殖との関係については次節で述べる。

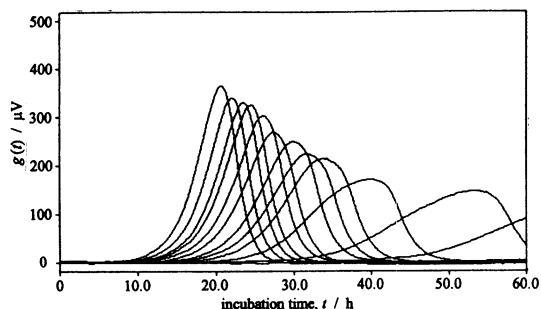


Fig.1 Calorimetric observation of the yeast growth at 30℃ in glucose/peptone medium containing various amounts of ethanol. The 12 curves shown correspond (from left to right) to the ethanol concentration, 0.00; 0.45; 0.89; 1.33; 1.77; 2.20; 2.63; 3.05; 3.47; 4.30; 5.12; 5.92% (v/v). (Copy of the computer display).

Fig.1から明らかなように薬剤の濃度が増加するに伴い、サーモグラムの立ち上がりの勾配はゆるやかになり、みかけのピーク時間も培養の長時間側に移動していることがわかる。ここでは観測している24個のシグナルの内、見やすいように12個のシグナルのみを示している。このようなパターンの変化はエタノールの増殖抑制作用によるものであることは言うまでもない。

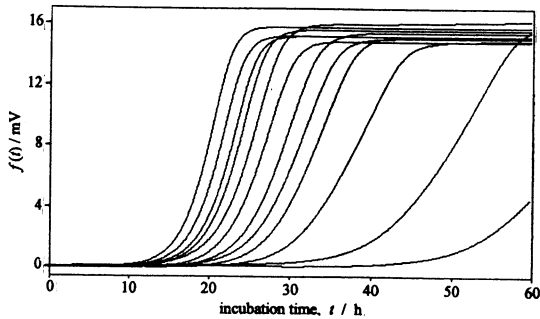
### 3.2 熱測定的に得られた増殖曲線

Fig.1の  $g(t)$  曲線は熱測定ユニットの中の温度の経時変化をあらわすが、熱変化としてはあくまでみかけのものであり、周囲への熱伝導による逃散(熱伝導損失)も含めた結果である。今、試料を含む熱測定ユニットの熱伝導定数(Newtonの冷却定数)を  $K$  とすると、周囲との熱交換に基づく熱損失を補正した真の熱生成量  $f(t)$  に相当するシグナルは次式で与えられる<sup>1) -3), 6) -8)</sup>。

$$f(t) = g(t) + K \int g(t) dt \dots\dots\dots (1)$$

ここで  $K$  の値は熱伝導理論に基づく既報の方法<sup>4), 8)</sup> で求め、 $K = 0.1175 \sim 0.1730 \text{min}^{-1}$  と決定された。(  $K$  の値は試料容器中の培地量の関数であり、測定の都度、試料条件により異なる)

Fig.1の結果をもとに(1)式を用いて求めた  $f(t)$  曲線がFig.2である。ここで、縦軸は熱起電力の単位(電圧)で表示してあるが、本計測システムの熱量換算係数  $\beta = 4.928 \text{mJ } \mu V^{-1}$  を用いて<sup>4)</sup>、熱量単位(J)に換算することができる。熱生成が細胞の増殖に対応することはすでに良く言われているが、本実験でもこれを確かめた。すなわち、熱測



**Fig.2** Calorimetrically obtained growth curves for the yeast growth at 30°C in glucose/peptone medium containing various amounts of ethanol. The 12 curves shown correspond to the  $g(t)$  curves shown in Fig.1 and were calculated on the basis of eq. 1. (Copy of the computer display)

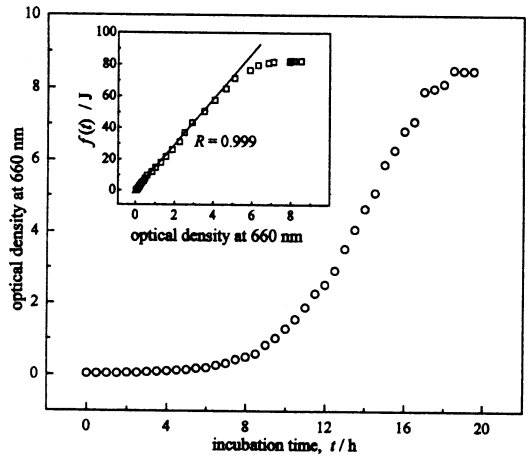
定と同じ条件で培養を行い、通常の微生物学的方法に従い、培養液の濁度の経時変化で増殖を観測した。得られた結果をもとに、エタノール濃度が0の時の熱生成  $f(t)$  (Fig.1の左端の曲線の各時間毎の読み取り値) と濃度の関係を見ると Fig.3 に示すように培養時間が16hまでのところできわめて良い相関 (相関係数  $R = 0.999$ ) のあることが確認された。16h以降で徐々に直線関係からはずれるのは栄養源の濃度の低下により細胞の生理状態が微妙に変化し、細胞当たりの代謝熱生成が培養初期とは変化してきていることを反映している。実際の解析は、培養初期の部分のみに行うので、これは問題とならない。このように熱生成が細胞の増殖に対応し、 $f(t)$  曲線を熱的にみた増殖曲線と見做せることから、Fig.2の結果はエタノールの増殖抑制効果を明確に示していることが理解される。すなわち、培地中に含まれるエタノール濃度の増加とともに、 $f(t)$  曲線のパターンは次の点の特徴として変化する。(1)  $g(t)$  ならびに  $f(t)$  曲線の立ち上がりの勾配がゆるやかになる、(2)  $f(t)$  曲線 (増殖曲線) が培養の長時間側に移動し、増殖の時間遅れが観測される。このことをさらに定量化するために以下の解析を行なった。

### 3.3 増殖速度定数でみる比増殖活性

微生物の増殖速度定数の定義に基づき、対数増殖期にある細胞の培養時間  $t$  における細胞数  $N$  は次の指数関数式で与えられる<sup>6), 9)</sup>。

$$N = N_0 \exp \{ \mu (t - \tau) \} \quad \dots \dots \dots (2)$$

ここで、 $\mu$  は細胞の増殖速度定数、 $N_0$  は初菌数、 $\tau$  は誘導時間である。



**Fig.3** Growth curve of yeast in glucose/peptone medium as measured by turbidity measurement.  $\lambda = 660$  nm. Inset shows the correlation between the heat evolution  $f(t)$  and the turbidity.

同じ式を熱生成曲線にあてはめて考える。今、誘導期ならびに対数増殖期にある培養細胞が単位時間当たり生成する熱量 (単位細胞当たりの熱生成速度) をそれぞれ、 $q_0$  ( $J s^{-1} cell^{-1}$ ) ならびに  $q_1$  ( $J s^{-1} cell^{-1}$ ) とすると、対数増殖を行っている細胞培養系が培養時間  $t$  の間に示す全熱生成量  $f(t)$  は次式で表わされることをすでに報告した<sup>6)</sup>。

$$f(t) = AN_0 \exp \mu t + BN_0 \quad \dots \dots \dots (3)$$

ここで、 $A, B$  は以下の内容を持つものである。

$$A = \frac{q_1}{\mu e^{\mu \tau}} \quad \dots \dots \dots (4)$$

$$B = \int_0^{\tau} q_0 dt - \frac{q_1}{\mu} \quad \dots \dots \dots (5)$$

すなわち、一定の条件下では  $A, B$  は定数であるので、熱生成  $f(t)$  もその経時変化は  $N$  と同様に指数関数で与えられる。したがって、実験的に得られた  $f(t)$  曲線の (3) 式に対する回帰分析から、増殖速度定数  $\mu$  を数値解析的に決定することができる。これを Fig. 2 の結果に適用すると、各々のエタノール濃度における酵母の増殖速度定数が Table 1 の第2欄のように決定された。ただし、ここで以下の注意が必要である。すなわち、培養時間の経過とともに栄養源の量が低下して対数増殖からはずれてくると、 $f(t)$  は (3) 式で表わせなくなる。実際には、数値解析で  $\mu$  を決定する範囲は経験的に  $f(t)$  曲線がその最大値に対して 3% から 30% の値

を示す培養時間が最も適切であることを見出した。このようにして  $f(t)$  曲線より数値解析的に得た増殖速度定数の再現性は  $\pm 1.3\%$  であり<sup>4)</sup>、以下に示す薬剤の効果の定量的解析には十分な精度を持つことがわかる。

次に薬剤（この場合はエタノール）が存在する場合の増殖速度定数について考える。増殖抑制効果を示す薬剤が濃度  $i$  で存在する時の増殖速度定数  $\mu_i$  は Monod の増殖速度式<sup>9), 10)</sup> を基本にして、次式で与えられることをすでに示した<sup>1)-3)</sup>。

$$\mu_i = \frac{\mu_m}{1 + \frac{i^m}{K_d}} \quad \dots\dots\dots (6)$$

ここで、 $\mu_m$  は薬剤濃度が 0 であるときの増殖速度定数、 $K_d$  は仮想的な微生物細胞-薬剤複合体の解離定数、 $m$  は同じく仮想的な薬剤結合の化学量論数であり、薬剤の濃度が  $\text{mol l}^{-1}$  で与えられている時には、1 個の細胞が複製するのを抑制するに要する薬剤のモル数であると定義される。(6) 式は Monod の式<sup>9), 10)</sup> を実際上拡張したものであると同時に酵素反応速度論における非拮抗阻害式<sup>11)-13)</sup> に対応するものである。

ここで薬剤の解離定数をサイト当たりの平均値  $K_i$  で表わすとすれば次式が成り立つ

$$K_i = K_d^{(1/m)} \quad \dots\dots\dots (7)$$

(7) 式を (6) 式に代入することにより、(8) 式を得る：

$$\frac{\mu_i}{\mu_m} = \frac{1}{1 + \left(\frac{i}{K_i}\right)^m} \quad \dots\dots\dots (8)$$

**Table 1** Growth parameters obtained for the yeast growth at 30 °C in liquid media with different ethanol concentrations.

$i/\%$ (v/v)	$\mu_i/\text{min}^{-1}$	$\mu_i/\mu_m$	$t_\alpha(i)/\text{h}$	$t_\alpha(0)/t_\alpha(i)$
0.00	0.00641	1.000	15.67	1.000
0.45	0.00617	0.962	16.83	0.931
0.89	0.00591	0.921	18.00	0.870
1.33	0.00564	0.879	18.83	0.832
1.77	0.00532	0.829	20.00	0.783
2.20	0.00519	0.809	21.33	0.734
2.63	0.00489	0.763	23.33	0.671
3.05	0.00455	0.710	25.00	0.627
3.47	0.00443	0.690	26.83	0.584
4.30	0.00386	0.601	30.67	0.511
5.12	0.00277	0.432	41.50	0.378
5.92	0.00290	0.452	55.50	0.282

$\mu_m$  was taken to be  $0.00461 \text{ min}^{-1}$ .  $t_\alpha(0)$  was taken to be 15.67 h.

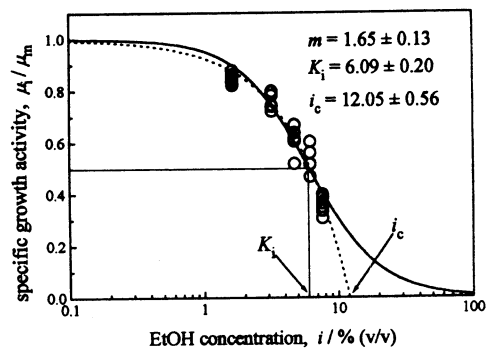
このように、 $\mu_i$  は薬剤濃度  $i$  の  $m$  乗に関して双曲線関数で与えられることがわかる。

(8) 式における  $\mu_i$ ,  $\mu_m$  はそれぞれ実験的に求められる数値であり、薬剤濃度 0 の時の増殖速度定数に対する薬剤濃度  $i$  の時の増殖速度定数の比、 $\mu_i/\mu_m$  はその条件における増殖速度定数の低下率を表わすから、これをもって増殖速度定数でみた薬剤存在下における比増殖活性 (specific growth activity as evaluated from the growth rate constant) と呼ぶことにする。**Fig.1, Fig.2** に示す実験結果より得られた各薬剤濃度における  $\mu_i/\mu_m$  の値を **Table 1** の第 3 欄に示す。

これらのデータをもとに比増殖活性の薬剤濃度依存性を示したものが **Fig.4** である。○印は実験点であり、(8) 式に基づき最適化して描いた理論曲線が実線である。なお、ここでは **Table 1** にあるデータ以外に、測定により得た計 36 組のすべての実験データを示し、それをもとに最適化している。(8) 式から明らかのように  $K_i$  は増殖速度定数でみた微生物活性が 50% に抑制される薬剤濃度であり、 $m$  は薬剤作用の協同性を反映している。すなわち、 $K_i$  の値が小さい程、その薬剤は低濃度で薬剤効果を発現し、 $m$  の値が大きい程、より狭い濃度範囲で薬剤がその効果を発現する。**Table 1** に示す実験データについて、(3) 式に基づき数値解析で得たこれらの値は  $K_i = 6.09 \pm 0.20\%$  (v/v),  $m = 1.65 \pm 0.13$  であった (**Table 2**)。

**3.4 増殖の時間遅れでみる比増殖活性**

**Fig.1, Fig.2** に示す  $g(t)$  曲線および  $f(t)$  曲線の形状から明らかのように、薬剤の効果は増殖の時間的な遅れとし



**Fig.4** Potency curves of ethanol for the growth of yeast in glucose/peptone medium at 30 °C. The specific growth activities are those evaluated from the growth rate constant. The solid and dotted lines were drawn by least squaring on the basis of eqs. (8) and (15), respectively.

でも観測される。次にこの増殖の遅れを定量的に取り扱うことを考える。

熱生成でみる増殖曲線  $f(t)$  の1階微分をとると, (3), (4), (5) 式より

$$f'(t) = A' N_0 \exp(\mu t) \dots\dots\dots (9)$$

を得る。ここで  $A'$  は (4) 式から明らかなように

$$A' = \frac{q_1}{e^{\mu\tau}} \dots\dots\dots (10)$$

で表わされる定数である。この  $f'(t)$  は単位時間当たりの熱生成, すなわち熱生成速度であり, 培養時間  $t$  における培養容器の中の微生物活性を反映している。薬剤の存在しない場合ならびに存在する場合にこの微生物活性  $f'(t)$  がある一定値  $\alpha$  に達するまでのそれぞれの培養時間,  $t_\alpha(0)$  および  $t_\alpha(i)$  を考える。これを模式的に示したものが **Fig.5** である。ここで, (9) 式より次の関係が成り立つ。

$$i=0 \text{ の時 } \quad \alpha = A'_0 N_0 \exp(\mu_m t_\alpha(0)) \quad \dots (11)$$

$$i \neq 0 \text{ の時 } \quad \alpha = A'_i N_i \exp(\mu_i t_\alpha(i)) \quad \dots\dots (12)$$

ここで, 下付きの記号 (0 または  $i$ ) は薬剤の存在しない場合ならびに存在する場合を表わしている。

薬剤が存在しない場合に微生物活性が一定値に達するに要する培養時間と薬剤が存在する場合に同一活性に達するまでに要する培養時間の比, すなわち増殖の遅延度を  $t_\alpha(0)/t_\alpha(i)$  で定義すると, (11) 式, (12) 式より (13) 式を得る。

$$\frac{t_\alpha(0)}{t_\alpha(i)} = \frac{\mu_i}{\mu_m} \left\{ \frac{\ln \alpha - \ln A'_0 N_0}{\ln \alpha - \ln A'_i N_i} \right\} \dots\dots\dots (13)$$

(13) 式は増殖遅延度が増殖速度定数における低下率  $\mu_i/\mu_m$  と一

**Table 2** Potency parameters of ethanol on the growth activity of yeast at 30 °C.

Specific growth activity	Parameter
$\mu_i/\mu_m$	$K_1 = 6.09 \pm 0.20\%$ (v/v)
	$m = 1.65 \pm 0.13$
	$i_c$ (MIC) = 12.05 ± 0.56% (v/v)
$t_\alpha(0)/t_\alpha(i)$	$i_m = 6.21 \pm 0.50\%$ (v/v)
	$K_1 = 5.81 \pm 0.12\%$ (v/v)
	$m = 2.31 \pm 0.15$
	$i_c$ (MIC) = 10.04 ± 0.21% (v/v)
	$i_m = 6.03 \pm 0.15\%$ (v/v)

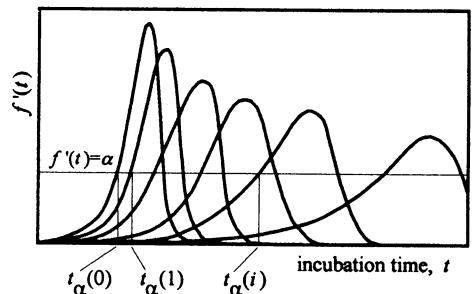
次の相関があることを表わしている。すなわち,  $t_\alpha(0)/t_\alpha(i)$  薬剤による増殖活性の変化を反映していることになる。そこで, この  $t_\alpha(0)/t_\alpha(i)$  を増殖の時間的遅れでみた比増殖活性 (specific growth activity as evaluated from the retardation of growth) を示す指標として定義し, その薬剤濃度依存性を考えることにする。

**Fig.2** に示す  $f(t)$  曲線について Stirling の方法で数値微分を行い, それから  $f'(t) = \alpha$  における  $t_\alpha(t_\alpha(0))$  ならびに  $t_\alpha(i)$  を求めた。その結果を **Table 1** の第4欄に,  $t_\alpha(0)/t_\alpha(i)$  を第5欄に合わせて示している。ここで  $\alpha$  を  $A'_0 N_0$  あるいは  $A'_i N_i$  より十分大きな値に選ぶと, その範囲を幅広く変えても結果には影響がないことを確認した。**Table 1** の結果は,  $f'(t)$  の最大値の約10%の値を  $\alpha$  として選び ( $\alpha = 50 \mu\text{V}$ ), 計算したものである。

また, 上述の関係から(13)式の右辺の積の第2項  $(\ln \alpha - \ln A'_0 N_0) / (\ln \alpha - \ln A'_i N_i)$  はきわめて1に近いので, (8) 式は次のように変換できる。

$$\frac{t_\alpha(0)}{t_\alpha(i)} = \frac{1}{1 + \left(\frac{i}{K_1}\right)^m} \dots\dots\dots (14)$$

このことから, 増殖速度定数からみた比増殖活性も増殖の時間的遅れからみた比増殖活性も, 数学的に同じ関数形で与えられることがわかる。ただし, **Table 1** から明らかなように, 3.3 で示した比増殖活性 ( $\mu_i/\mu_m$ ) と本節で示した比増殖活性 ( $t_\alpha(0)/t_\alpha(i)$ ) は完全に一致しない。これは最適化に伴う誤差も含むものの, 薬剤 (この場合エタノ



**Fig.5** Schematic illustration of the procedures for the determination of extent in the retardation of growth. The extent in the retardation of the microbial growth was determined by taking the incubation time,  $t_\alpha(0)$  or  $t_\alpha(i)$ , at which the microbial activities reach a definite value of  $f'(t) = \alpha$ .

ール)の作用機構に関係する本質的な違いを反映している。このことについては4の考察で述べることにする。

以上の立場から、Fig.1, Fig.2のデータをもとに増殖の時間的遅れからみた比増殖活性 $t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i)$ の薬剤濃度依存性を示したものがFig.6である。○印は実験点であり、(14)式に基づき最適化して描いた理論曲線が実線である。なお、ここでは前節の場合と同様に、Table 1にあるデータ以外に、測定により得たすべての実験データ(計36組)を示し、それをもとに最適化している。前節で述べたと同様に(14)式をもとに微生物活性が50%に抑制される薬剤濃度ならびに薬剤作用の協同性を示すパラメーターは数値解析により、 $K_i = 5.81 \pm 0.12\%$  (v/v),  $m = 2.31 \pm 0.15$ と得られた(Table 2)。この値を上述の増殖速度定数から得られたものと比較すると、その偏差は*m*については若干大きいものの、 $K_i$ についてはわずか2.3%でしかない。このことは本節で述べた取扱いならびにその理論的背景が適切なものであることを示している。*m*の違いについては後段で論ずる。

### 3.5 熱測定的に得られる最小阻止濃度

前節までの取扱いによれば、増殖活性を50%に抑制する薬剤濃度は数値解析で決められるが、100%これを抑制する薬剤濃度は数学的に無限大でなければならない(8)式、(14)式)。実際の薬剤は、ある濃度以上になれば殺菌的に作用し、微生物の増殖を完全に阻害してしまう場合が多いので、この取扱いは感覚的になじみにくい面もある。したがって、100%増殖を阻害するような数学的モデルを考え解

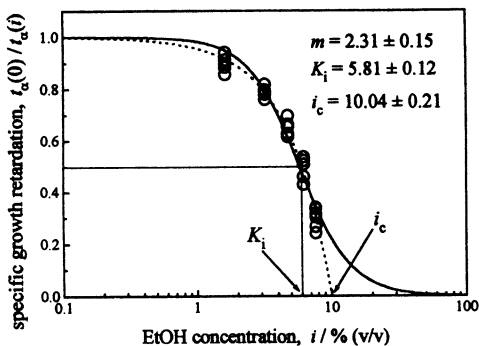


Fig.6 Potency curves of ethanol for the growth of yeast in glucose/peptone medium at 30°C. The specific growth activities are those evaluated from the extent in the retardation of growth. The solid and dotted lines were drawn by least squaring on the basis of eqs. (14) and (16), respectively.

析する方法論も必要である。そこで、比増殖活性の薬剤濃度依存性から最小阻止濃度 (minimum inhibition concentration, MIC) を導く方法について次に考える。

薬剤による比増殖活性の低下を  $(1 - \mu_i/\mu_m)$  あるいは  $(1 - t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i))$  で表わし、これが薬剤濃度 *i* の  $m_i$  乗に比例するとする。すなわち、

$$\left(1 - \frac{\mu_i}{\mu_m}\right) = k_i i^{m_i} \dots\dots\dots (15)$$

$$\left(1 - \frac{t_{\alpha}(0)}{t_{\alpha}(i)}\right) = k_i i^{m_i} \dots\dots\dots (16)$$

ここで、 $k_i$ は比例定数である。

(15)式、(16)式より、増殖活性が完全に失われる薬剤濃度は

$$i_c = \left(\frac{1}{k_i}\right)^{1/m_i} \dots\dots\dots (17)$$

で与えられる。同様に50%に増殖活性を抑制する薬剤濃度は

$$i_m = \left(\frac{1}{2k_i}\right)^{1/m_i} \dots\dots\dots (18)$$

となる。

(15)式あるいは(16)式に対する回帰分析より、二つの未知数 ( $k_i$ および $m_i$ )を決定することができ、その結果、 $i_c$ 、 $i_m$ が(17)式、(18)式によって求められる。Fig.4ならびにFig.6の点線はそれぞれ(15)式ならびに(16)式に対する回帰分析より得られた $k_i$ 、 $m_i$ をもとに描いた理論曲線であり、その横軸との交点が $i_c$ である。この $i_c$ の値はその性格から最少阻止濃度であることは明らかであろう。

Fig.1ならびにFig.2に示す実験データに対し、(15)～(18)式をあてはめて求めた二種の $i_c$ ならびに $i_m$ の値をそれぞれTable 2に示している。ここでも両者は最大9%の偏差で一致し、数学的な取扱いが妥当なものであることがわかる。

## 4. 考 察

本実験では(1)増殖速度定数の低下でみた比増殖活性 $\mu_i/\mu_m$ 、ならびに(2)増殖の時間遅れでみた比増殖活性 $t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i)$ の二つを指標として、エタノールの酵母増殖抑制効果を解析する方法を示した。これらの指標はい

ずれも無次元の0と1の間の相対値であり、試料の性質や測定条件に左右されない。しかも増殖に伴って観測される  $g(i)$  曲線の再現性が非常に良いため ( $\pm 1.3\%$ )<sup>4)</sup>、それから求められる  $\mu_i$ ,  $\mu_m$ ,  $t_{\alpha}(0)$ ,  $t_{\alpha}(i)$  の精度はきわめて高い。したがって、これらをもとに導いた二つの指標の信頼性は非常に優れていると云ってよいであろう。実際、同一のデータから、(1) 増殖速度定数の低下ならびに (2) 増殖の時間遅れでみた比増殖活性、の二つの立場から独立に得た薬剤効果を示すパラメーターの違いは **Table 2** に示すように  $K_i$  については2.3%,  $i_c$  (=MIC) については9.1%でしかない。微生物の取扱いは、このような薬剤作用パラメーターの10%の偏差は誤差として許容される範囲にあるので、**Table 2** に示す数値は、二つの立場から独立に得たパラメーターが薬剤効果に関して、同じ結果を与えているとみなして差し支えないと思われる。

しかし、ここでは敢えてその違いについて考察しておく。 $\mu_i/\mu_m$ ,  $t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i)$  の各々から導かれたパラメーターの精度は、**Table 2** に示すようにまったく差がなかった。したがって、同じ結果が同じ精度で得られるなら、いずれを指標として比増殖活性を解析して良いと言える。けれども、どちらを選ぶかを精度によって決定するのは妥当ではない。なぜならば、 $\mu_i/\mu_m$  と  $t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i)$  が常に同じ性質を表わすという保証がないからである。両者が同じ性質でないという場合の実際的な例は、静菌的な作用を示さないで理想的な殺菌作用のみを示す薬剤の場合である。そのような薬剤では増殖速度定数に影響を与えず、増殖の時間遅れのみが観測されるはずである。もちろんこれは極端な場合であるが、実験の都合でどちらかの指標を選択するというのではなく、むしろ  $\mu_i/\mu_m$  と  $t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i)$  の違いを薬剤作用機構に関係したものと位置づけ、これを積極的に活用すべきであると考えている<sup>14), 15)</sup>。 $\mu_i/\mu_m$  と  $t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i)$  が等価でないのは、数学的には (13) 式の右辺の積の第2項  $(\ln \alpha - \ln A_0 N_0) / (\ln \alpha - \ln A_i N_i)$  が薬剤濃度  $i$  に依存して変わる場合である。厳密に言えば、**Table 2** に示す二つの立場から導いた  $K_i$  値、 $i_c$  値などには“統計的”にわずかながら有意な差があるとみられるが、特に  $m$  値における差は大きい。 $m$  は薬剤作用の協同性を示す指標であり、二つの  $m$  値における大きな差はエタノールの作用機構を特徴づける一つの重要な結果であると考えられる。静菌作用と殺菌作用の関係を含むこれらのパラメーターの比較については後日あらためて独立した論文として論ずるつもりである。

本方法におけるもう一つの特徴は  $K_i$ ,  $m$ ,  $i_c$  (=MIC),  $i_m$  などのパラメーターが同時計測で得られる多くの実験データを母集団として、数値解析により導かれるものであり、統計学的な偏差や精度の範囲が同時に示されることである。このような情報を従来の微生物学的手段で得ることは困難

であるのは言うまでもない。相乗効果なども含め、抗微生物作用を示す各種薬剤の効果をより定量的に議論する場合には、上述のような統計学的処理は不可欠であり、その意味で本論文で示した解析法が種々の薬剤作用の定量的把握のための新しい手段として、幅広く活用されることが望ましいと考えている。

## 5. 結論

熱測定法によりエタノールの酵母に対する増殖抑制作用を観測し、その定量的解析をすすめるための方法論を開発した。増殖速度定数の低下からみた比増殖活性ならびに増殖の時間遅れからみた比増殖活性の二つを指標として、50%増殖活性抑制濃度、最小阻止濃度などのエタノールの効果を示すパラメーターを導いたところ、異なった指標から一般の微生物学的手段では区別できない同じ結果が得られることがわかった。このことから解析の基礎となる理論的背景が適切なものであり、ここに開発した方法論が一般の微生物学分野にも応用できる妥当なものであると結論した。

## 文 献

- 1) 高橋克忠, 熱測定 **18**, 9-18 (1991) .
- 2) K. Takahashi, *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **15**, 387-394 (1990) .
- 3) K. Takahashi, *Thermochim. Acta* **163**, 71-80 (1990) .
- 4) 高橋克忠, 防菌防黴 **24**, 313-320 (1996) .
- 5) K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2743-2747 (1973) .
- 6) M. Hashimoto and K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1559-1564 (1982) .
- 7) T. Kimura and K. Takahashi, *J. Gen. Microbiol. (London)* **131**, 3083-3089 (1985) .
- 8) 高橋克忠, 微少熱測定法, 生化学実験講座, 第12巻, pp.19-33 (日本生化学会編) 東京化学同人, (1976) .
- 9) N.S. Panikov, *Microbial Growth Kinetics*, p. 21, Chapman and Hall, London (1995) .
- 10) J. Monod, *Ann. Rev. Microbiol.* **3**, 371-394 (1949)
- 11) M. Dixon and E.C. Webb, VIII Enzyme Inhibitors. In *Enzymes*, 2nd edition, pp. 315-359, Longmans, Green and Co., London (1964) .
- 12) 新田康則, 入門酵素反応速度論, pp.111-137 (小野宗三郎編) 共立出版 (1975) .
- 13) Y. Nitta, K. Hiromi and S. Ono, *J. Biochem.* **69**, 577-588 (1971) .
- 14) 小林亜紀, 岡田文裕, 藤原延規, 高橋克忠, 第22回日

本防菌防黴学会年次大会講演要旨集, p.119 (1995) .

- 15) F. Okada, A. Kobayashi, N. Fujiwara, K. Matsuyama and K. Takahashi, Proceedings of 2nd Scientific Conference of Asian Societies of Cosmetic Scientists, Seoul, Korea, pp.626-637 (1996) .

### 要 旨

酵母細胞の30℃における増殖活性に対するエタノールの影響を定量的に評価するため熱測定法による解析を行なった。先に報告した多試料同時計測微生物活性解析システムを用い、エタノールを種々の濃度で含む液体培地中での酵

母増殖に伴う増殖サーモグラムを観測した。エタノールの影響を(1)増殖速度定数の低下、(2)増殖の時間的遅れ、の二つの観点から解析することにより、比増殖活性を50%に抑制するエタノール濃度( $K_i$ )、エタノール効果の協同性指数( $m$ )、エタノールが増殖を阻止する最小阻止濃度(MIC)を導き、それぞれの立場から得られた各パラメーターが良く一致することを示した。この結果から、想定した解析のための理論的背景が適切なものであり、ここに開発した方法論が微生物と薬剤の相互作用の定量的解析に有効であると結論した。

### 【 国際会議のお知らせ 】

#### International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry ICTAC

11th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry, August 12-16, 1996, at University of Pennsylvania/Drexel University Philadelphia, PA USA

Conference Organization by the North American Thermal Analysis Society

Sponsors include the University of Pennsylvania and Drexel University

An associated organization of IUPAC

Continuously updated information on the Congress can be obtained through the Internet at [www.Isrm.upeen.edu/ictac/](http://www.Isrm.upeen.edu/ictac/)

#### Call for Papers

**Deadline for poster submission is June 1, 1996.**

Papers will be accepted in all areas of thermal analysis and calorimetry. Presentations will be primarily by poster with selected oral presentations in specific symposia. The Proceedings will be published in the Journal of Thermal Analysis and all papers will be given in English. As of January, 1996, over 400 people filed preliminary registration from more than 50 countries and over 200 abstracts had been received. Poster presentations are still being solicited. Although the official deadline for oral presentations has passed, papers may still be accepted at the discretion of the Symposia Chairman.

**Symposia:** The Current State of Calorimetry / Archelogy / Interfaces / Adsorption / Catalysis / Inorganics and Ceramics / Environment / Fossil Fuels/Energy /

Geosciences / Hazards / Pyrotechnics and Explosives / Proceeding of Thermoplastics / Thermosetting Polymers / Polymer Blends and Block Co-polymers / Life Science / Pharmaceuticals / Food / Theory and Instrumentation / General Papers

**Workshops:** Kinetics / Controlled Rate Thermal Analysis / Calorimetry

Geosciences / Environment / Standardization / New Materials / Dynamic DSC / Polymers / 'Semi-crystalline Polymers

**Plenary Speakers:** Prof.A.Kettrup, Germany / Dr.V.Mathot, Netherlands / Prof.R.Kemp, U.Wales, UK / Dr.M.Todoki, Japan / Dr.E.Mendeelovici, I.V.I.C., Venezuela

抄録送付、発表などの問合先:

Prof.Patrick K.Gallagher

Dept. of Chemistry

Ohio State University

Columbus, OH 43210-1173

FAX. (614) 2992-3010 (or 292-1685)

#### Further Information

##### General Information:

The Complete Conference, Inc.

1540 River Park Dr.Suite 111,

Sacramento CA 95815

Tel. (916) 922-7032 ; Fax. (916) 933-7379

E-mail. 5905528@mccimail.com.

##### Scientific Program:

Prof. Patrick K.Gallaagher

Dept. of Chemistry, Ohio State Univ.,

Columbus OH 43210-1173 Tel. (614) 292-6783

Fax. (614) 292-1685 (or 292-3010)

E-mail. pgallagh@magnus.acs.ohio-state.edu.