

解 説

熱量計による抗菌・抗かび評価

福島由美子, 大河内正一

(受取日: 2006年10月2日, 受理日: 2006年11月7日)

Calorimetric Evaluation of Antimicrobial and Antifungal Activity

Yumiko Fukushima and Shoichi Ohkohchi

(Received October 2, 2006; Accepted November 7, 2006)

Antimicrobial activities were investigated using a calorimeter capable of measuring the heat evolved when soil microbes multiplied in the soil. The peak of heat evolution due to microbial growth with metabolic degradation of glucose in the soil shifted toward a longer incubation as the concentration of antimicrobial agent in soil increased. Their values of MIC (minimum inhibitory concentration) for the antimicrobial activities were determined using the non-competitive inhibition kinetic model proposed by Takahashi *et al.* Antifungal activities of TBZ (2-(4'-Thiazolyl)-benzimidazole) against *Aspergillus niger* were evaluated by this method.

1. はじめに

抗菌評価におけるバクテリアの増減を観測する手段としては, これまでに直接的にバクテリアを計測する方法および阻止円や濁度, 電気伝導度^{1,2)}などから間接的に計測する方法が用いられてきた。また, 抗菌対象のバクテリアとしては, 大腸菌や黄色ブドウ球菌などがよく知られている。しかし, これまでの方法では, 難溶性抗菌剤への適用に問題があると同時に, 抗菌剤がバクテリアに対してそれぞれ抗菌特性が異なるため, 大腸菌や黄色ブドウ球菌を含めた何種類ものバクテリアを用いてテストする必要がある, そのための煩雑さがあった。

そこで, これらの問題をクリアーする方法として, バクテリアの増減を熱量計でバクテリアの増殖代謝熱として測定し, それらの発熱特性から, 抗菌力を解析する手法と, 抗菌対象として土壌微生物を用いる組み合わせによる新たな抗菌評価法が提案されている。³⁻⁸⁾ この評価法では, 特に土壌を用いることから, その取り扱いが簡便であるだけでなく, バクテリアの培養, 維持管理にかかわる設備も不要

で, しかも日常環境で遭遇する土壌中の無数のバクテリアを抗菌対象とすることができる。それゆえ, 本法は総合的な抗菌評価法として期待でき, 抗菌剤開発における薬剤のスクリーニング法としても有効な方法と考えられている。

筆者らは本法を用い, これまでに焼成ドロマイトの抗菌力を提案してきた。⁸⁾ 天然無機系鉱物であるドロマイトを焼成することにより, 抗菌活性が発現し, その活性はCaOおよびMgOの生成⁹⁾にあることを明らかにした。また, 天然ホウ素系鉱物として, コレマナイト (Ca₂B₆O₁₁・5H₂O) を焼成することにより, 抗菌・抗かび効果を有することを明らかにした。⁹⁾

さらに, 有機系として, 植物精油, 香辛料および茶カテキンなどについても抗菌活性があることを明らかにしてきた。特に植物精油に, 沈静, 抗鬱, 強壮, 解熱, 消炎, 抗菌, 抗かび等の様々な作用が知られてきており, 家庭用, 美容・健康用, 医薬用等の利用に用いられてきている。香辛料や茶カテキンにおいても, その様々な効能がうたわれ, 効能成分を医薬品, 化粧品などに応用させる例も多い。

そこで今回, 熱量計を用いて上記の無機および有機系の

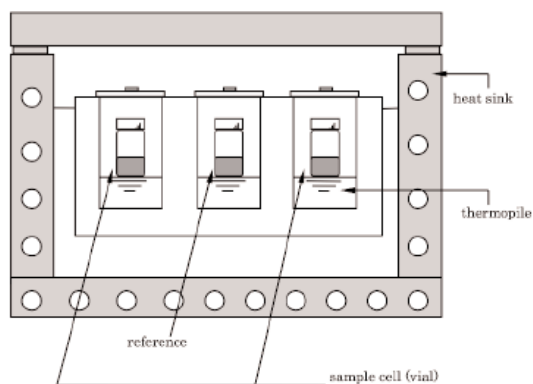


Fig.1 Bio Thermo Analyzer.

抗菌剤の抗菌活性について解説すると同時に、本法の応用としてかびの発育増殖熱から解析する抗かび評価法^{3,4,10)}についても述べる。

2. 実験

2.1 実験装置

実験装置として、土壤微生物にグルコース等の栄養源を与えることで、土壤微生物の増殖発熱量が測定できる微生物熱量計 (Bio Thermo Analyzer H-201, 株式会社日本医科器械製作所) を用いた。装置の概要を Fig.1 に示す。アルミニウム製の恒温槽 (heat sink) に 25 個の円筒状の穴が穿設されている。その底部に、それぞれ半導体熱電対素子 (thermopile) が配置された銅製容器がおかれ、熱電対素子の片面は銅製容器の底面にもう一方の片面は恒温槽に密着するように設置され、銅製容器の温度と恒温槽間の温度差を検知する。構成の計 25 個の熱測定ユニットのうち、中央の 1 個は基準ユニットとして機能し、その他の 24 個のユニット (試料ユニット) で検知される熱起電力と基準ユニットからの熱起電力の差を示差的に取り出すことで環境温度の変動に対するノイズを打ち消し、各熱測定ユニット中の物理的、化学的、生物的变化に基づく温度変化が観察可能となっている。

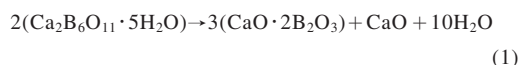
2.2 抗菌評価

実験は、土壌 5 g に微生物の栄養源として、グルコース 2.5 wt%, 硫酸アンモニウム 2.5 wt% の混合水溶液を 1.0 ml 及び土壌に対する各濃度の抗菌試料を 30 ml のガラス製バイアル瓶に採る。

この試料容器を、25℃の恒温に維持した微生物熱量計にセットし、土壤微生物の増殖に伴う熱を増殖サーモグラムとして観察する。

使用した試料は、無機系として、コレマナイトを 500℃

で 1 時間焼成した焼成コレマナイト、焼成反応は以下に示す。



また、焼成ドロマイトの抗菌主成分の CaO および MgO, さらに無機系抗菌剤として良く知られている銀ゼオライトも併せて抗菌評価を行った。

一方、有機系として、植物精油 (LAVENDER, LEMON), 香辛料はわさび、シナモンとそれぞれの抗菌主成分とされるイソチオシアネ酸アリル、シンナムアルデヒド、および茶カテキン (三井農林株式会社製, ポリフェノン 60) を用いた。

土壌は法政大学工学部校内の花壇から採取し、自然乾燥した後、粒径 1 ~ 2 mm に分級したものをを用いた。

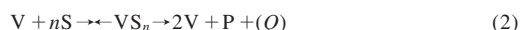
2.3 抗かび評価

実験は、抗かび剤として知られている TBZ (2-(4'-Thiazolyl)-benzimidazole) を添加した寒天培地 5 ml を 30 ml (直径 2.4 cm) のガラス製バイアル瓶に調製し、かび胞子液 (供試かびは *A.niger*) 0.1 ml を滴下したものを、25℃の恒温に維持した微生物熱量計にセットする。そして、かびの発育に伴う熱を増殖サーモグラムとして観察した。寒天培地はポテトデキストロース寒天培地 (PDA 培地) を用いた。

3. 結果および考察

3.1 抗菌評価

土壤微生物の増殖発熱に関する解析は、Takahashi^{2-5,11)}らの手法に従った。すなわち、土壤微生物 V が栄養源 S により増殖する際、代謝生成物 P と発熱 Q を伴い、その反応様式は、Michaelis-Menten 式と同様の (2) 式に従うとする。



ここで VS_n は中間体を示す。

バクテリアが対数増殖期にあるとき、培養時間 t における総発熱量 $Q(t)$ は (3) 式で表される。

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

N_0 は初期微生物数、 μ は土壤微生物の増殖速度定数、 A , B は定数、 t は時間を表す。

また、 $Q(t)$ と熱量計出力 $g(t)$ との関係は (4) 式で与えられる。

$$Q(t) = g(t) + K \int g(t) dt \quad (4)$$

ここで、 K はニュートン冷却定数を示す。

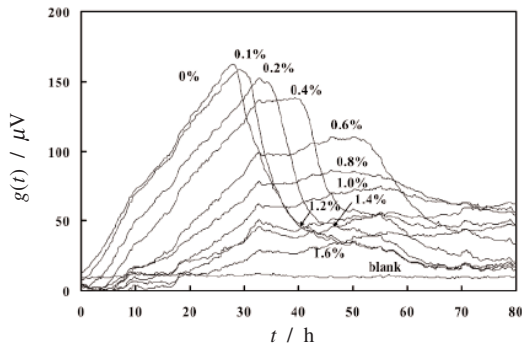


Fig.2 Effect of calcined colemanite at 500°C on soil microbe growth.

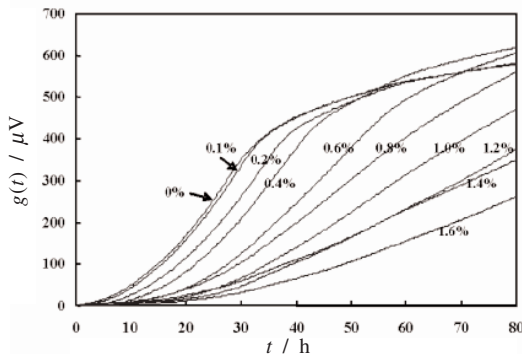


Fig.3 Heat evolution process, $Q(t)$, transformed from $g(t)$ in Fig.2.

したがって、(3)および(4)式を解析することにより増殖速度定数 μ が決定できる。

Fig.2に500℃で焼成したコレマナイトを土壤に混入させたときの発熱特性を表す増殖サーモグラム $g(t)$ の一例を示す。図から明らかなように、土壤だけのブランクでは発熱しないが、栄養源を添加したコントロールでは発熱が観察でき、その後バクテリアにより栄養源が消費された時点で、発熱曲線は急激に低下し、増殖が抑制されたことを示した。一方、土壤に焼成コレマナイトを添加したものはいずれもコントロールと比較して、その濃度が大きくなるにつれて、発熱の時間的遅れが見られるとともに、発熱曲線の立ち上がりが緩やかになった。それゆえ、焼成コレマナイトは土壤微生物の増殖を明らかに抑制することが分かった。その他の試料についても、Fig.2の焼成コレマナイトと同様に増殖サーモグラムの時間的遅れが観察され、いずれも土壤微生物の増殖を抑制する結果が得られた。

Fig.3は増殖速度定数 μ を得るためにFig.2の $g(t)$ 曲線を

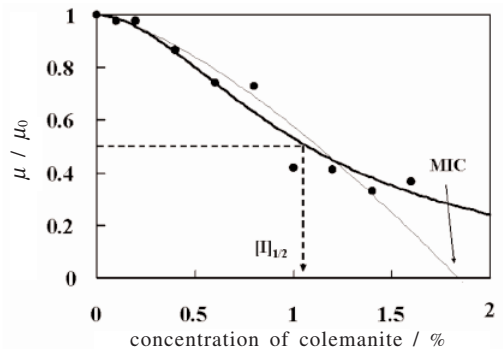


Fig.4 Drug potency curves of calcined colemanite against soil microbes.

$Q(t)$ 曲線に変換した結果である。増殖サーモグラム $Q(t)$ は、Fig.2と同様に焼成コレマナイト濃度の増加に伴い、発熱の時間的遅れが見られると同時に、それらの初期勾配が小さくなった。初期勾配は(3)式を時間 t で微分すれば容易に分かるように、増殖速度定数の関数となる。それゆえ、コントロールの初期勾配との比を取ることで、抗菌活性を増殖速度定数比 μ/μ_0 （下添文字0はコントロール）として表すことができる。

Fig.4には増殖速度定数比 μ/μ_0 と焼成コレマナイト濃度との関係（薬剤作用曲線）を示す。なお、解析方法等は後述するが、図中の細線の増殖速度定数比が0になる薬剤濃度がMIC（最小増殖阻止濃度）、太線の増殖速度定数比が1/2になる薬剤濃度が $[I]_{1/2}$ となる。

焼成コレマナイトの濃度上昇に伴い、指数関数的に抗菌効果が現れた。この結果は、(5)および(6)式に基づいたTakahashi²⁻⁵⁾らの微生物増殖抑制モデルで解析した。



ここで I は抗菌剤、 VI_m 及び $VS_n I_m$ は増殖できない不活性体である。

(2)式および(5),(6)式を(3)および(4)式との対応で解析すると(7)式を得る。

$$\mu/\mu_0 = [(K_s/[S]^n)(1 + [I]^m/K_d) + 1 + [I]^m/K_d]^{-1} \quad (7)$$

ここで K_s は基質定数（ $= [V][S]^n/[VS_n]$ ）、 K_d および K_d' は解離定数でそれぞれ $[VS_n][I]^m/[VS_n I_m]$ と $[V][I]^m/[VI_m]$ を示す。

(7)式から、栄養源 $[S]$ が十分で、 $K_s \ll [S]$ であると仮定できる場合、(8)式を得る。

$$\mu/\mu_0 = (1 + [I]^m/K_d)^{-1} \quad (8)$$

さらに(8)式は(9)式のように対数形で書き改めることができる。

$$\ln(\mu_0/\mu - 1) = m \ln[I] - \ln K_d \quad (9)$$

そこで(9)式に基づきプロットした焼成コレマナイトの結果を、**Fig.5**に示す。それらの良好な直線関係から決定したパラメータ m および K_d を、**Table 1**に示す。**Table 1**には焼成コレマナイトと同様に決定できた他の試料についても示した。なお、表中には、土壌微生物の増殖速度が $1/2$ になる抗菌物質濃度 $[I]_{1/2} = K_d^{1/m}$ の値も併せて示した。

次に抗菌評価法として従来から用いられてきた最小発育阻止濃度MIC (minimum inhibitory concentration) による抗菌物質の抗菌活性を表す方法について検討する。すなわち比増殖率の低下 $(1 - \mu/\mu_0)$ が(10)式に示すように抗菌物質の濃度 $[I]$ の β 乗に比例すると仮定する。

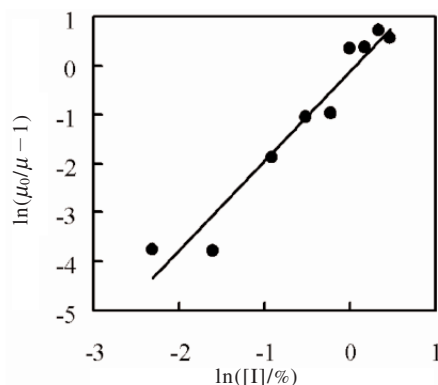


Fig.5 Plots of $\ln(\mu_0/\mu - 1)$ vs $\ln[I]$ of calcined colemanite against soil microbes.

$$(1 - \mu/\mu_0) = \alpha [I]^\beta \quad (10)$$

ここで α は比例定数を示す。

最小発育阻止濃度MIC は $\mu = 0$ での抗菌物質濃度に対応することから、(11)式で定義される。

$$\text{MIC} = (1/\alpha)^{1/\beta} \quad (11)$$

Fig.6 は(10)式を対数形で表した(12)式に基づきプロットした焼成コレマナイトの結果の一例を示す。

$$\ln(1 - \mu/\mu_0) = \beta \ln[I] + \ln \alpha \quad (12)$$

Fig.6 から明らかなように、良好な直線関係が得られた。その直線の切片と勾配から α および β が求められ、(11)式より MIC が決定できた。**Table 1** にそれらの値を示した。

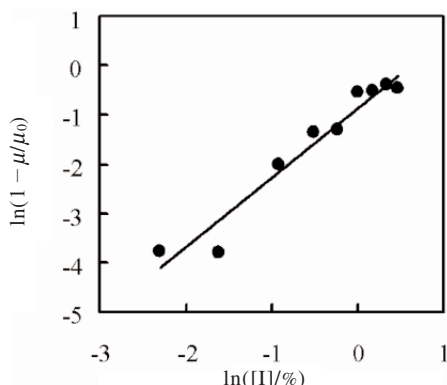


Fig.6 Plots of $\ln(1 - \mu/\mu_0)$ vs $\ln[I]$ of calcined colemanite against soil microbes.

Table 1 Antimicrobial parameters.

			m	K_d	$[I]_{1/2}^*$	α	β	MIC^*
Inorganic		Calcined colemanite	1.83	1.14	1.07	0.42	1.41	1.85
		$\text{CaO} \cdot 2\text{B}_2\text{O}_3$	1.06	1.06	1.06	0.53	0.78	2.24
		CaO	1.66	0.37	0.55	0.73	1.01	1.37
		MgO	1.66	0.92	0.95	0.51	0.50	3.81
		Ag-geolite	1.47	0.18	0.31	0.90	0.54	1.22
Organic	essential oil	LAVANDE	0.48	0.51	0.24	0.82	0.33	1.79
		LEMON	0.53	0.55	0.33	0.77	0.37	2.05
	spice	horseradish	0.79	0.23	0.15	0.8	0.22	2.86
		cinnamone	2.16	0.83	0.48	2.16	1.74	0.64
	antimicrobial components in spice	Allyl-isothiocyanate	1.11	0.67×10^{-2}	0.01	39.48	0.93	0.02
		Cinnamaldehyde	2.26	0.93×10^{-3}	0.05	327	2.00	0.06
		catechin	1.05	1.65	1.62	0.75	0.31	4.71

* : unit: wt%

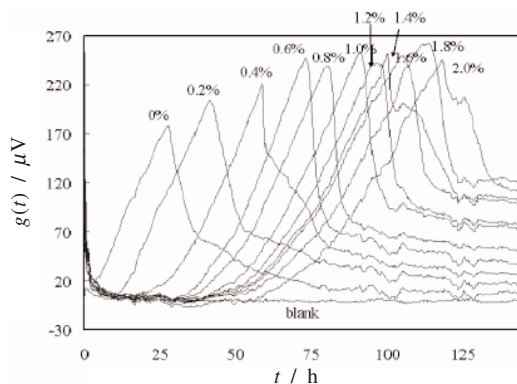


Fig.7 Effect of horseradish on soil microbe growth.

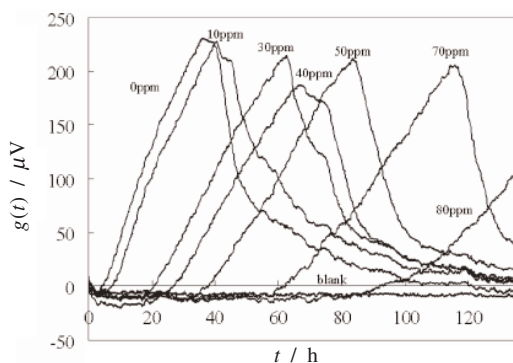


Fig.8 Effect of allylisothiocyanate on soil microbe growth.

3.2 有機系抗菌剤の発熱曲線の特徴

Fig.7にわさびを加えた場合の発熱サーモグラムを、Fig.8にわさびの抗菌主成分とされる、イソチオシアネ酸アリルを加えた場合の発熱サーモグラムを示す。前半部分の発熱サーモグラムは、双方とも無機系の焼成コレマナイト同様、試料濃度が高くなるにつれて、発熱の時間的遅れが見られるとともに、発熱サーモグラムの立ち上がりが緩やかになった。

一方、後半部分の発熱サーモグラムは、イソチオシアネ酸アリルの場合、バクテリアにより栄養源が消費された時点で、発熱サーモグラムは急激に低下しているのに対し、わさびのサーモグラムは一旦発熱が抑えられてから、再び上昇に転じている。これは、試料の濃度上昇とともに高い発熱が観察され、これは抗菌成分の失活後、土壌微生物がわさびの抗菌成分を含めて栄養源になることで高い発熱をしたものと考えられる。

このことから、熱量計の発熱サーモグラムは、微生物による抗菌評価だけでなく、有機物の分解特性についても測

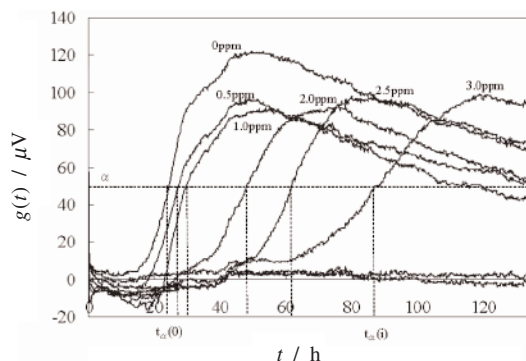


Fig.9 Effect of TBZ on *Aspergillus niger* growth.

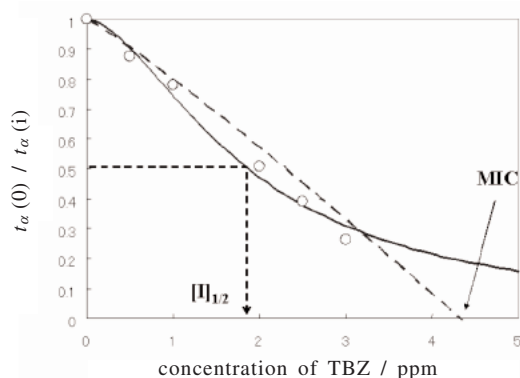


Fig.10 Drug potency curves of TBZ against *Aspergillus niger*.

定できることがわかった。今回用いた物質では、わさびと茶カテキン¹²⁾が測定時間内 (140 時間以内) に分解発熱を起こしている。

3.3 抗かび評価

Fig.9にTBZの濃度を変えて培地に添加したときの増殖サーモグラム $g(t)$ を示す。図から明らかなように、培地のみのブランクでは発熱しないが、TBZ を添加しないコントロール (0 ppm) では発熱が観察された。一方、培地にTBZ を添加したものはいずれもコントロールと比較して、その濃度が高くなるにつれて、発熱の時間的遅れが認められるとともに、発熱曲線の立ち上がりが緩やかになった。したがって、TBZ はかびの細胞増殖をその濃度に依って抑制することを熱量計で観測できる結果が示された。

ここで、かびの細胞増殖速度の遅れを、Fig.9に示す一定の発熱割合 (α) に達するまでの発熱時間の遅れとして、防かび剤が培地に添加されている場合の $t_{\alpha}(i)$ と、添加されていない場合の $t_{\alpha}(0)$ との関係で見ると、 $t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i)$ は、増殖

Table 2 Antifungal parameters.

m	Kd	[I] _{1/2} *	α	β	MIC*
1.70	2.90	1.90	0.20	1.10	4.00

*unit: ppm

速度定数比 μ/μ_0 に等しいと近似できる。⁵⁾ 解析方法の紹介のため、今回は発熱時間の遅れを用いて解析する。 $t_a(0)$ は防かび剤無添加のコントロールに対応する。したがって、抗菌評価で述べた発熱の初期勾配から求める増殖速度定数と全く同様の式で、防かび剤による発熱の時間的遅れを扱うことができる。**Fig.10**の作用曲線は、(7)式および(9)式に基づいて求めたパラメータを用いて描いたもので、実験データとよく一致している。なお、図中の破線の増殖速度定数比が0になる薬剤濃度がMIC（最小増殖阻止濃度）、実線の増殖速度定数比が1/2になる薬剤濃度が[I]_{1/2}となる。

Table 2には防かびパラメータと併せて[I]_{1/2}およびMICの値を示した。これは従来法の発育抑制試験による試験結果とよく一致した。

なお、かびの発熱はサーモグラムとかびの形態観察より検討した結果、かびの形態変化の過程で、菌糸の成長、すなわち細胞増殖による代謝熱であることが分かり、これは花粉¹³⁾や種子¹⁴⁾の発芽に伴う代謝熱と同様に考えられた。ここで解説したかびの細胞増殖熱から解析する新たな定量的防かび評価法は、今後の防かび評価法として有力な手法と思われる。

4. まとめ

無機系および有機系物質の抗菌活性を、土壤微生物の増殖熱が測定可能な熱量計を用いて検討した。抗菌物質の濃度が上昇するにつれ、土壤微生物の増殖発熱の遅れから、抗菌活性を表すMIC（生育最小阻止濃度）を高橋らのバクテリア増殖抑制モデルで決定できた。

無機系抗菌活性物質として、焼成コレマナイト、焼成ドロマイト、銀ゼオライトなどを、有機系抗菌活性物質として、植物精油類、香辛料および香辛料の抗菌主成分、茶カテキンなどを用いた。

また、TBZの*Aspergillus niger*に対する防かび評価も、同様にして決定することができた。

文 献

- 1) J. Sawai, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, and M. Shimizu, *J. Chem. Eng. Jpn* **28**, 288 (1996).
- 2) J. Sawai, E. Kawada, F. Kanou, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, and M. Shimizu, *ibid* **29**, 627 (1996).
- 3) K. Takahashi, *Thermochimica Acta* **163**, 71 (1990).
- 4) 高橋克忠, 防菌防黴 **24**, 313 (1996).
- 5) 奥田幸子, 高橋克忠, 新田康則, 深田はるみ, 中尾英和, 切畑光統, 防菌防黴 **24**, 397 (1996).
- 6) T. Kimura and K. Takahashi, *J. Gen. Microbial.* **131**, 3083 (1985).
- 7) 大河内正一, 村田亮造, 石原義正, 前田信秀, 守吉佑介, 無機マテリアル **3**, 111 (1996).
- 8) 大河内正一, 村田亮造, 杉田裕之, 守吉佑介, 前田信秀, 防菌防黴 **26**, 109 (1998).
- 9) 大河内正一, 高木周平, 大日向鉄夫, 伊部 剛, 守吉佑介, 無機マテリアル誌 **9**, 38 (2002).
- 10) 大河内正一, 狩野文雄, 小俣耕司, 内田浩子, 丸山将宣, 石原義正, 日食工誌 **46**, 231(1999).
- 11) 高橋克忠, 熱測定 **18**, 9 (1991).
- 12) 大河内正一, 高木周平, 石原義正, 日本化学会第75秋季年会講演要旨集, 1A704 (1998).
- 13) 一色堅司, 栖原 浩, 水内健二, 徳岡敬子, 日食工誌 **41**, 135 (1994).
- 14) 栖原 浩, フードインダストリー **38**, 32 (1995).

要 旨

土壤微生物の増殖熱が測定可能な熱量計を用いて、抗菌効果を検討した。抗菌物質の濃度が上昇するにつれ、土壤微生物はグルコースの代謝が低下し、増殖発熱が遅れることから、抗菌活性を表すMIC（生育最小阻止濃度）を高橋らのバクテリア増殖抑制モデルから決定できた。また、TBZの*Aspergillus niger*に対する防かび評価も、同様にして決定することができた。

福島由美子 Yumiko Fukushima

法政大学工学部物質化学科, Hosei Univ., TEL.&FAX. 042-387-6160, e-mail: yumiko.fukushima.rf@gs-eng.hosei.ac.jp



大河内正一 Shoichi Ohkohchi

法政大学工学部物質化学科, Hosei Univ., TEL.&FAX. 042-387-6160, e-mail: okouchi@hosei.ac.jp