

## 抗菌剤の簡易評価法の開発

細井永次\* 鳴嶋善聡\*\*

### Study on Simple Assessment of Antimicrobial

HOSOI Eiji\*, NARUSHIMA Yoshiaki\*\*

#### 抄録

水溶性抗菌剤の最小発育阻止濃度（以下、MIC）及び最小殺菌濃度（以下、MBC）について、マイクロプレートを用い多検体化と希釈濃度の細分化を検証し、企業ニーズに沿った簡易法を開発した。また、微生物増殖曲線から生存菌数を推定する方法を応用し、容易に90%死滅速度（以下、D値）を求める方法を検証し、従来方法と遜色ない結果を得た。

キーワード：抗菌試験，MIC，MBC，D値，マイクロプレート

## 1 はじめに

近年、一般消費者向けの生活消費材としての抗菌剤や抗菌加工製品への関心の高まりから、抗菌性を謳った数多くの製品が市場に流通している。そのため、この分野への商品開発を手がける企業は数多いが、抗菌性の評価について外部に依頼するしかない中小企業も多く、経費負担や試験結果がでるまでの期間が商品開発の重荷となっている。当所でも、多くの抗菌試験の依頼があり可能な限り迅速に対応してきたが、従来から行ってきた試験方法では、準備、試験及び後処理等に多くの時間と経費が必要であり、一回の試験で可能な検体数も限られていた。そこで当所で現在所有する機器を利用し、抗菌試験を迅速かつ安価に実施できないか検討を行った<sup>1),2)</sup>。

これまで試験依頼のあった抗菌剤の特徴として、抗菌力が医薬品等より劣っても、天然物由来で安全なものというコンセプトで開発を行っているものが多かった。従って、まずMIC及びMBC試験を96穴マイクロプレートで行い<sup>3),4)</sup>、多検体化操作の習得を行い、次に、低希釈で使用する抗菌剤の開

発を想定した上で、製造工程等の違いによる性能比較や日常的な製造品質管理を迅速かつ容易に行うために、抗菌剤を任意の濃度で等間隔に細分化して試験を行った。

また、D値は90%の微生物が死滅するのに要する時間のことであり、抗菌剤を実際に消毒や殺菌に用いる際の重要な指標の一つであるが、その試験は一度に多くの検体が必要で、特に生存菌数の試験操作が煩雑で時間がかかっていた。そこで、「同じ微生物の対数増殖期の増殖速度は初発菌数によらず一定<sup>5)</sup>」という性質を利用し、マイクロプレートリーダーで未知菌数の微生物増殖曲線を求め、一定の吸光度に達した時間から、初発菌数を推定できないか検討を行った。

## 2 実験方法

### 2.1 菌液の調製

グラム陰性菌から大腸菌 (*Escherichia coli* NBRC3972)、グラム陽性菌から黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* NBRC12732)を試験菌として選択した。

まず日水製薬(株)製の感受性測定用ブイヨン培地を使用し 37℃で 18 時間前後振とう培養

\* 北部研究所 生物学担当

\*\* (株)ERCテクノロジー

(120rpm、振幅 30mm。以降、全ての試験で同じ振とう)した。次に 10,000rpm で 5℃、10 分間遠心分離した沈殿を、日本製薬(株)製のペプトン食塩緩衝液で任意の菌数になるように調製した。菌数の計数には、バクテリア計算盤を用いた。

## 2.2 増殖曲線と初発菌数の測定

10<sup>8</sup> cfu/mL に調製した菌液を、SCDLP ブイオン培地で 10 倍ずつ段階的に希釈してゆき、96 穴マイクロプレートに移した。可視光透過性の高い PET 製プレートシールで密閉した後、コロナ電気(株)製マイクロプレートリーダー SH-8100Lab(波長 600nm、温度 37℃、測定 10min 間隔、測定前 180 秒振とう。以降、全ての試験で同設定)で測定を行った。また、従来の方法と比較するため、栄研化学(株)製の SCDLP 寒天培地を使用した平板表面塗抹法で初発菌数を計数した。

## 2.3 抗菌試験

抗菌剤として、日本製薬(株)製の塩化ベンザルコニウム水溶液(殺菌剤)及び和光純薬(株)製のクロラムフェニコール(静菌剤)及び ERC テクノロジーが開発中の抗菌剤を使用した。

### 2.3.1 MIC 試験

以下の試験の結果、目視で白濁した抗菌剤希釈列のうち最も低い濃度を MIC とした。

#### (1)試験管(従来法)

抗菌剤を感受性試験用ブイオン培地で段階的に希釈し、合計 10mL の抗菌剤希釈列(ただし目的濃度の 1.1 倍)を調製した。そこに 10<sup>8</sup> cfu/mL に調製した菌液を 1mL 添加し、37℃で 24 時間振とう培養した。

#### (2)96 穴マイクロプレート

同上培地で 200 μL の抗菌剤希釈列(ただし目的濃度の 1.1 倍)を調製し、10<sup>8</sup> cfu/mL の菌液を 20 μL 添加し、マイクロプレートミキサーで 37℃、24 時間振とう培養(2,000rpm)した。

### 2.3.2 MBC 試験

以下の試験の結果、目視で白濁した抗菌剤希釈列のうち最も低い濃度を MBC とした。

#### (1)試験管(従来法)

MIC 試験後の抗菌剤希釈列を 0.1mL 採取し、

栄研化学(株)製の SCDLP ブイオン培地 10mL の入った試験管に移し、37℃、24 時間振とう培養した。

#### (2)96 穴マイクロプレート

MIC 試験後の抗菌剤希釈列を 2 μL 採取し、同上培地 200 μL の入ったマイクロプレートに移し 37℃、24 時間マイクロプレートミキサーで振とう培養(2,000rpm)した。

### 2.3.3 D 値試験

#### (1)平板表面塗抹法(従来法)

MBC を基点として、4 段階の濃度(目的濃度の 1.1 倍)の①抗菌剤希釈列をペプトン食塩緩衝液で 10mL 調製した。②菌液は 10<sup>8</sup> cfu/mL に調製した。また、抗菌剤の効果を消す③希釈液として 9.9mL の SCDLP ブイオン培地が入った試験管(4 段階の濃度×5 時系列分)を準備した。

まず、これらをクールバスで 5℃に冷却した後、①抗菌剤希釈列に②菌液を 1mL 添加し、正確に殺菌時間を計りながら、設定した時間(5 点)に到達したら③希釈液に 0.1mL ずつ移して抗菌剤の活性を消した。

菌数の測定は、別途用意(20 本×5 段階希釈)したペプトン食塩緩衝液で 10 倍に希釈してゆき、SCDLP 寒天平板培地(100 枚×3)に 0.1mL 又は 0.5mL ずつ塗布し、37℃で 24 時間培養後、出現したコロニーを計数した。

#### (2)マイクロプレートリーダー法

96 穴マイクロプレート(1 枚)をペルチェ冷却器で 5℃(自作のため温度管理機能なし)に冷却しながら、2.3.3(1)前段のとおり調製した③希釈液を 0.2mL ずつ移した(1 希釈液につき 3 点)。また、検量線用に菌数の分かっている②菌液を 10 倍に希釈しながら、マイクロプレートに移した。最後に、PET 製プレートシールで密閉した後、マイクロプレートリーダーで、2.2 の設定で吸光度を測定した。

## 2.4 迅速化の評価

迅速化の評価について MIC、MBC については 40 検体分、D 値については 4 濃度で 5 点の殺菌時間(20 検体)で試験を実施した場合を評価した。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 増殖曲線

まず、図1に大腸菌の増殖曲線を示す。縦軸は600nmでの吸光度を、横軸は培養時間を示す。グラフ内の数値は初発菌数を示す。その結果、それぞれの初発菌数で良好な増殖曲線を得た。初発菌数120cfu/mL(1試料0.2mLなので24cfu/0.2mL)が定量限界付近で、12cfu/mLでは確率的に増殖する時としない時があった。

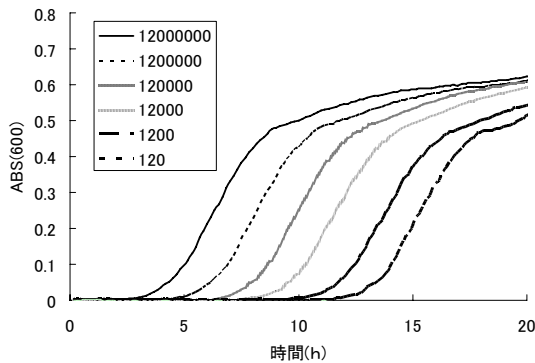


図1 増殖曲線と初発菌数(大腸菌)

次に、初発菌数を逆算する方法を示す。

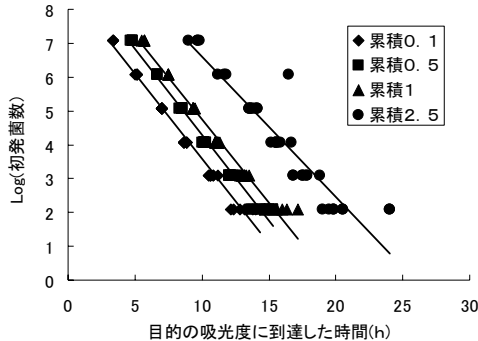


図2 初発菌数と吸光度上昇時間

吸光度が累積0.1、0.5、1.0及び2.5に到達するまでの時間をプロットした。(n=8)

縦軸に「初発菌数」を、横軸に「目的の吸光度に到達した時間」をとり試験結果をプロットしていくと、最小二乗法により、図2の一次式が求められた。(例 累積0.5:  $Y = -0.5083X + 9.3828$ ,  $R^2 = 0.9871$ )

この式に試験試料の「目的の吸光度に到達した時間」を代入し初発菌数を逆算した。

図2中の「累積」とは、その時間のほか直前2回分、直後2回分の計5点の吸光度の合計を表す。それは吸光度の単位時間あたりの吸光度の変化がわずかなため、近傍の値を加算して測定誤差補正を試み

たためである。その結果、表1の決定係数が示すとおり、吸光度累積0.1~1.0間の範囲で高い相関が見られた。しかしながら、菌の増殖が進むと増殖曲線同士の間隔がずれてゆき(図1)、相関関係が取れなくなっていくことから、初発菌数の少ない場合、定量結果に注意が必要である。なお、黄色ブドウ球菌を含む複数の微生物で同試験を行ったところ、同様の結果を得ることができた。

表1 決定係数(図2の相関式より)

定量下限	累積0.1	累積0.5	累積1.0	累積2.5
120以上	0.9831	0.9871	0.9819	0.8788
1200以上	0.9974	0.9967	0.9972	0.8776

定量下限：初発菌数の検量線下限を120又は1200とした場合

また、初発濃度 $10^3$ /mL以上あれば高い精度が期待できることから、本法はD値以外の抗菌試験や微生物を温度、培地の種類、pH及び添加物等様々な条件下での生育速度等を調査する試験に応用できると考えられる。

#### 3.2 抗菌試験

##### 3.2.1 MIC及びMBC試験

まず、MIC及びMBC試験を、塩化ベンザルコニウムとクロラムフェニコールで実施した。500ppmの抗菌剤(感受性測定用ブイヨン培地中)を1/2ずつ同培地で希釈してゆき、抗菌剤希釈列を調製した。その結果、表2のとおり、従来法と96穴マイクロプレート法で同じ結果を得た。また、MBC試験結果では殺菌剤と静菌剤で想定された結果となった。

表2 MIC及びMBC試験結果

単位:ppm

菌種	試験	塩化ベンザルコニウム	クロラムフェニコール
大腸菌	MIC	25	6.3
	MBC	25	>500
黄色ブドウ球菌	MIC	1.6	6.3
	MBC	13	>500

従来法3回、マイクロプレート法24回実施  
両方法ともに同じ結果のため、分けずに表示

次に、製造工程を変化させたり、製造ロットによる品質変化を迅速かつ容易に試験するため、共同研究企業が開発中の抗菌剤を使用し、抗菌剤濃度を等間隔に細分化した希釈列で抗菌試験を行った。すで

におおよその抗菌力を把握しているという前提で、0.5%~1.5%を0.05%刻みで抗菌剤希釈列(21段階)を調製し試験を行った。

その結果、表3に示されるとおり従来法と96穴マイクロプレートを使用した方法では若干の差が生じるもののほぼ同一の値を示した。また、抗菌剤を1/2ずつ希釈する方法では把握できなかった製造工程20時間反応と24時間反応の抗菌力の差や製造ロットごとの抗菌力の違いを把握することができた。

表3 MIC、MBC試験結果

単位：w/w%

製造ロット	96穴マイクロプレート		試験管(従来法)	
	20h反応	24h反応	20h反応	24h反応
91106	1.1 (1.25)	0.85 (1.25)	1.1 (1.25)	0.85 (1.25)
91107	1.1 (1.25)	0.85 (1.25)	1.1 (1.25)	0.90 (1.25)
91110	1.4 (2.5)	1.2 (1.25)	1.3 (2.5)	1.2 (1.25)
91111	0.95 (1.25)	0.9 (1.25)	1.0 (1.25)	0.9 (1.25)

()内は、1/2ずつ希釈する方法で実施した結果  
微生物：黄色ブドウ球菌

### 3.2.2 D値試験

D値は殺菌効果を試験することから、殺菌剤である塩化ベンザルコニウムを選択した。大腸菌の試験結果を本報告書で示す。

図3-1~4は縦軸に生存菌数、横軸に殺菌時間を示すが、従来法とマイクロプレートリーダー法で同様な傾向を示した。実際には対数表示のため生存菌数は2倍程度離れていた場合もあったが、D値を求める要素の傾きについて、概ね一致した。

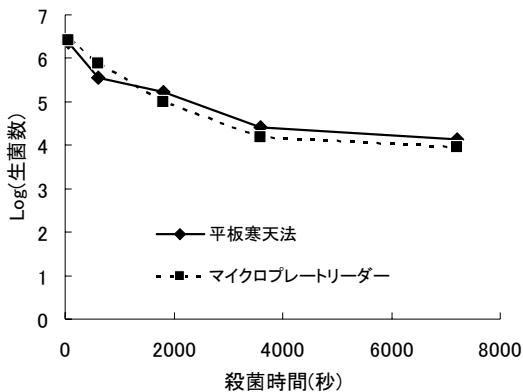


図3-1 計数法による生菌数の差 (塩化ベンザルコニウム30ppm)

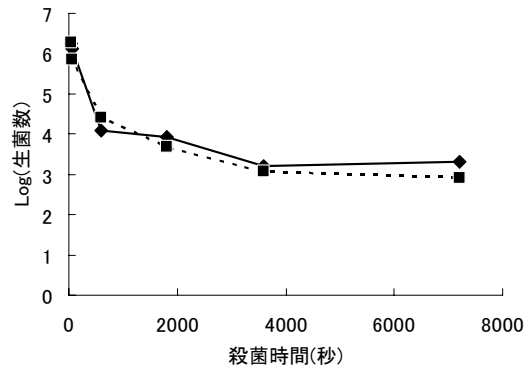


図3-2 計数法による生菌数の差 (塩化ベンザルコニウム40ppm)

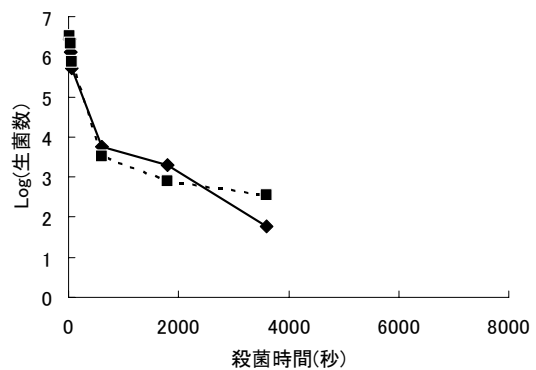


図3-3 計数法による生菌数 (塩化ベンザルコニウム50ppm)

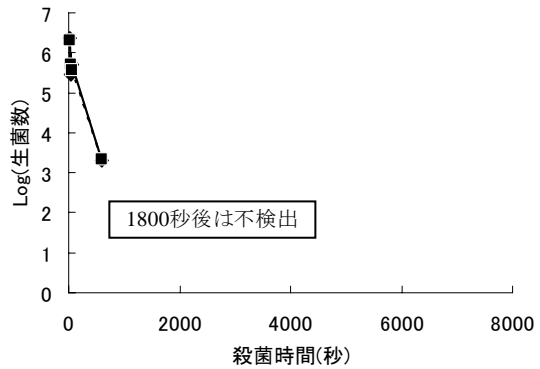


図3-4 計数法による生菌数の差 (塩化ベンザルコニウム60ppm)

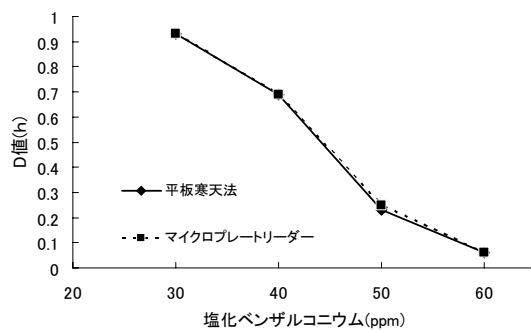


図4 D値と抗菌剤濃度

それぞれの抗菌剤濃度を横軸にD値を縦軸にプロットしたものを図4に示す。その結果、両方ともほぼ同じ値を示した。

### 3.3 迅速化の評価

試験を行った結果を、表3及び表4の通り評価した。MIC及びMBCでは従来法に比べ1度に可能な検体数が増加することが大きかった。

表3 MIC及びMBC試験の迅速化

	本法	従来法	比
検体数	40検体	5検体×8回	—
容器数	マイクロプレート10枚	試験管800本	1.3
培地量	0.2L	8L	2.5
拘束時間	0.5h(準備) 4h(試験) 0.5h(後処理)	24h(準備) 48h(試験) 24h(後処理)	5.2
試験日数	3日	24日	13

MICとMBCを連続して試験した場合  
従来法は1回の試験検体数を5検体とした。  
比は従来法を100としたときの本法の割合

D値試験では、同じ試験日数ながら拘束時間を縮減できたことから、数値に現れる差以上に心身への負担を軽減することができた。

表4 D値試験の迅速化

項目	本法	従来法	比
検体数	20検体	20検体	—
容器数	試験管24本 マイクロプレート1枚	試験管124本 シャーレ300枚	5.9
培地量	0.1L(scdlp液体)	0.1L(scdlp液体) 3L(scdlp寒天) 1L(希釈液)	2.4
拘束時間	0.5h(準備) 4h(試験) 1h(解析) 0.5h(後処理)	4h(準備) 10h(試験) 3h(計数) 4h(後処理)	29
試験日数	3日	3日	100

比は従来法を100としたときの本法の割合

## 4 まとめ

抗菌試験の迅速化により、依頼試験や受託研究を依頼してきた企業に対して、試験料の低減や試験結果の納期の短縮が期待できる。

### (1) 増殖曲線と初発菌数の測定

初発濃度  $10^3$ /mL以上あれば一定の吸光度に達した時間から初発菌数を高い精度で推定できることが期待でき、D値等の抗菌試験以外にも応用できると考えられる。

### (2) MIC 及び MBC 試験について

96穴マイクロプレートを使用し、企業等の要望に沿った試験（多検体、任意の抗菌剤希釈列等）が可能であることが示された。

### (3) D値試験について

マイクロプレートリーダーを使用し、平板表面塗抹法と遜色のないD値を得ることができることが示された。また、従来法に比べて検体数を増やせるため、さらに詳細な試験が可能となった。

### (4) 迅速化の評価

抗菌試験の迅速化とともに、試験実施者の負担の低減や経費の縮減にも効果があった。

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、客員研究員として御指導いただきました東京家政大学の宮尾茂雄教授に感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 登成健之介：職業能力開発報文誌, **15**, (2003)61
- 2) 福島由美子, 大河内正一：熱測定, **33**, (2006)223
- 3) 日本化学療法学会：微量液体希釈によるMIC測定法(微量液体希釈法), *Chemotherapy*, **38**, (1990)103
- 4) (社)日本食品科学工学会：食品機能性評価マニュアル集第II集, **51**, (2008)93
- 5) 微生物研究法懇談会：微生物学実験法, 講談社(1975)153