

微生物熱量計による抗カビ薬剤TBZ及びBCM の最小生育阻止濃度 (MIC) の測定

狩野文雄*, 大河内正一**, 丸山将宣**,
内田浩子**, 小俣耕司**

Mesurement of Mimimal Inhibitory Concentration in Antifungal Agents TBZ and BCM by Microbe Calorimeter

FUMIO KANO*, SHOUICHI OKOUCHI**, MASANOBU MARUYAMA**,
HIROKO UCHIDA** and KOHJI OMATA**

Antifungal activity of two typical agents against *Aspergillus niger* was evaluated by the conduction-type Calorimeter. The thermograms associated with the growth of *Aspergillus niger* were shifted toward a longer incubation period as the antifungal agent concentration in the medium increased. The growth rate and minimal inhibitory concentration were calculated using the inhibition kinetic model proposed by Takahashi et al. The antifungal efficacy curve of TBZ and BCM was drawn based on the kinetic parameters obtained. Therefore, the calorimetric method was considered useful for qualitative evaluation of antifungal agents.

Keywords : 熱量計 calorimeter , 抗カビ活性 antifungal activity, TBZ 2-(4-thiazolyl)-benzimidazol, BCM methyl-2-benzimidazole carbamate , クロコウジカビ *Aspergillus niger* , 拮抗阻害モデル inhibition kinetic model , 最小生育阻害濃度 minimum inhibitory concentration(MIC)

緒 言

住宅の快適環境のため省エネルギー化が推進され、高気密化、高断熱化したことに伴い、従来の日本家屋になかった新たな室内汚染問題が発生しつつある¹⁾。非生物的粒子や揮発性化学物質 (VOC) による汚染や、カビや微生物などの生物的粒子 (バイオエアロゾル) が原因になる各種の疾病が増加傾向にあり、行政的な対応が求められてつつある。特にカビなどを主体とするハウスダストは乳幼児と高齢者に対してアレルギー性疾患や真菌症の原因となることが知られており、安全な住宅内環境確保のために防カビ性能を保持させることが重要である。当研究室では、建材などのカビ抵抗性を判定評価するため、日本工業規格のJIS Z2911に準じた定性試験を従来より実施している。そこで著者らは、抗カビ剤について

のより感度の高い定量的評価法を検討する目的で、微生物熱量計を用いて、カビの増殖に伴う発熱量 (サーモグラム) を測定し、薬剤添加による発熱パターンの解析から最小生育阻止濃度 (MIC) を測定し、従来の目視法によるMICとの比較を行い、評価法としての実用性について検討した。

実験方法

1. 使用カビ

今回の試験用真菌種は *Aspergillus niger* (FERM S-1) を用い、ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地 (栄研化学製) で継代した²⁾。

2. 熱量計による測定法

微生物熱量計 (バイオサーモアナライザーH-201, 日本医科器械株式会社) を用いた。(Fig.1.)

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 法政大学工学部物質化学科 184-8584 東京都小金井市梶野町 3-7-2

** Hosei University, Department of Engineering, Section of Material Chemistry
3-7-2, Kazino-cho, Koganei-shi, Tokyo, 184-8584 Japan

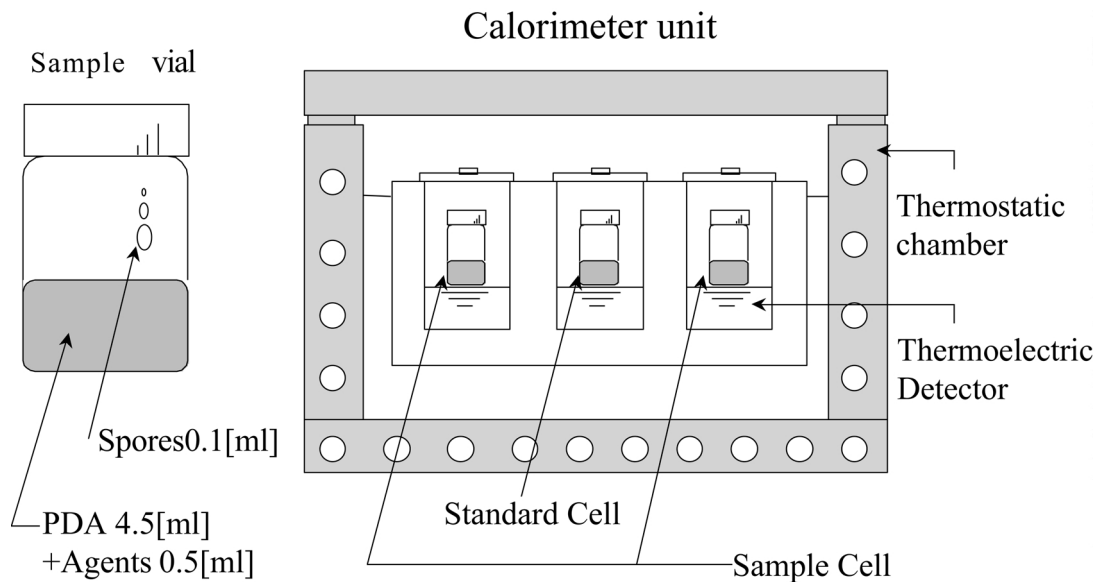


Fig.1 . Conduction-type batch Calorimeter Apparatus

実験はTBZ (2-(4'-チアゾリル)-ベンツイミダゾール)とBCM (メチル-2-ベンツイミダゾールカルバメート)について³⁾, 以下に示す熱量計測定と24ウエルプレート法を用いた目視法を並行して行い, 両者を比較した.

TBZあるいはBCMを添加した寒天培地 5 ml を, 30ml (直径2.4cm) のガラス製バイアル瓶に分注固化し, カビ孢子懸濁液 1 ml を滴下したものを27°Cに維持した微生物熱量計内の恒温槽に設置し, カビの生育に伴う発熱を増殖サーモグラムとして測定した. 添加したカビ孢子量の測定は, スパイラルプレーター (モデルD型: グンゼ産業株式会社) を用いて, PDA培地上に生育したコロニー数から求めた.

3. 目視法によるMIC測定法

目視法⁴⁾による24ウエルプレート測定は, TBZあるいはBCMを5段階濃度に添加調製したPDA培地 2 ml にカビ孢子懸濁液0.1mlを滴下し, 27°Cで7日間培養後, カビの生育を目視観察した.

実験結果及び考察

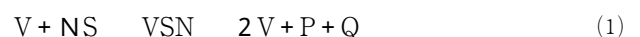
1. カビの増殖サーモグラムと形態変化

Fig.2.は27°Cにおける増殖サーモグラムを示す. 図から明らかのように, カビの菌糸生長に伴う発熱が確認できる. カビの生活環には栄養体期と孢子形成期がある. そこで, 熱量計に用いるバイアル瓶内に計測と同一条件でのカビの形態変化を時間的に追跡した結果がカラー写真である. サーモグラム上のAからGに形態変化の各ポイントが一致する. 栄養培地に撒かれた孢子は, 4時間以内に発芽し, 栄養細胞である菌糸を伸長させる. この

時期に細胞内ATP濃度が急激に増加し (データ未発表), 発熱が指数的増加を見せる. B (25時間) からC (34時間) のサーモグラムが最も急勾配となる. さらに菌糸が濃密となるD (40時間) は分生子形成期へと移行する. E (44時間) では孢子の形成がなされ, 発熱はほぼ飽和し, 黒色の色素細胞へと変化し, 形態形成を完了する. F (70時間) からG (150時間) にかけて発熱が緩慢になるのは, 孢子の再発芽による発熱が加わったためと思われる. 従って, こうしたカビの発熱パターンは菌糸の生長過程における代謝熱と考えられ, 著者らが, 以前に行った花粉管の伸長¹²⁾や大根種子の発芽に伴う発熱パターンともよく一致した.

2. 増殖サーモグラムの解析理論

熱量計によるバクテリア増殖熱に関する解析は, 高橋らにより理論化されている⁵⁾⁶⁾⁷⁾. そこで, 著者らは同じ方法がカビの菌糸生長発熱にも適用できるか検討した. すなわち, カビ菌糸細胞Vが栄養Sによって増殖する場合, 代謝副生物Pと発熱Qが生じる反応様式は, Michaelis-Mentenの式と同様な(1)式に従うものと仮定する.



なお, ここで, VSNは中間体を示す.

栄養細胞が増殖期にある時, 培養時間tにおける総発熱量Q(t)は(2)式で定義できるとする.

$$Q(t) = AN_0 \exp(\mu t) + BN_0 \quad (2)$$

ここで, N_0 は初期細胞数, μ は細胞増殖速度定数, A及びBは定数を示す. また, 総発熱量Q(t)と熱量計出力g(t)との関係は(3)式で与えられる.

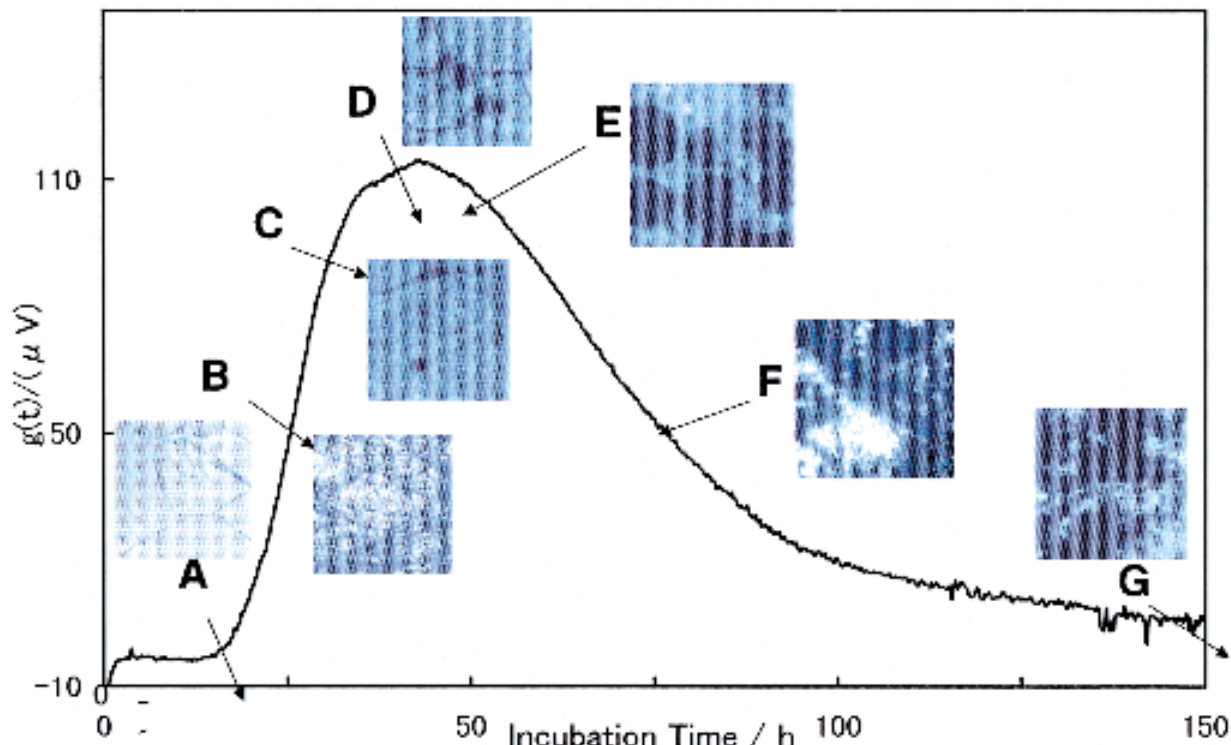


Fig. 2 . Growth thermogram observed for the culture of *Aspergillus niger*
A~G : symbols indicating the different stages of fungal growth.

$$Q(t) = g(t) + K \int g(t) dt \quad (3)$$

ここで、Kは熱量計のニュートン冷却定数を示す。

従って、(2)及び(3)式を解析することにより μ が決定できる。そこで、高橋らのバクテリア増殖抑制（非拮抗阻害）モデルをカビ菌系生長抑制効果に適用することを試みた。それらの関係を(4)、(5)式に示す。

$$V + mI \quad VIm \quad (4)$$

$$VS_n + mI \quad VS_nIm \quad (5)$$

ここで、Iは抗カビ剤、VIm及びVS_nImは抗カビ剤の作用による不活性化状態を示し、増殖できない細胞を示す。(1)及び(4)、(5)式を(2)及び(3)式との対応で解析すると、(6)式が得られる。

$$\mu / \mu_0 = [(K_s / [S]^n) (1 + [I]^m / K_d') + 1 + [I]^m / K_d]^{-1} \quad (6)$$

ここで、K_sは基質定数、K_d及びK_d'は解離定数を示す。

なお、(6)式は最大細胞増殖速度定数をあらわす。ここでは抗カビ剤無添加の場合に対応する。

また(6)式は栄養[S]が十分にありK_s [S]ⁿが仮定できる場合、より簡単な(7)式を得る。

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

そこで、この式を試験から得られたデータに応用した。

3 . TBZ及びBCMのMIC決定

TBZにおける実験サーモグラムのデータをFig. 3 に示した。各濃度のTBZを培地に添加し、27 ℃にセットした

熱量計から得られた発熱曲線（増殖サーモグラム）からg(t)が得られた。図から明らかなように、培地のみでは発熱は観察されない。一方、培地にTBZを添加したものはいずれもコントロール（0ppm）と比較して、濃度依存的に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ている。すなわち濃度依存的にカビ菌系生長を抑制することが明らかになった。Fig. 4にTBZのサーモグラムから求めたt(0)/t(i) (= μ / μ_0) とTBZ濃度との関係を示す。なお、Fig. 4で示した実線及び破線は表1に示した各パラメータを用いてプロットした結果である。図中の[I]_{1/2}は増殖速度が1/2となるTBZ濃度、MICは最小生育阻止濃度を示している。Fig. 4から明らかなようにTBZ濃度が高くなるにしたがって発熱時間が遅れ、増殖速度は減少した。先の(7)式は以下の式に置き換えることができる。

$$t(0) / t(i) = (1 + [I]^m / K_d)^{-1} \quad (8)$$

この式から対数変換した以下の式を得る。

$$\ln(t(i) / t(0) - 1) = m \ln[I] - \ln K_d \quad (9)$$

そこで、(9)式に基づきプロットした結果をFig. 5に示す。この直線関係からパラメータm=1.7及びK_d=2.9が求められ、[I]_{1/2} (=K_d^{1/m}) = 1.9ppmが決定できる。なお、Fig. 5の実線は、Table. 1のパラメータを用いて表示した。以上の解析結果を、従来法のMICと比較するため、以下

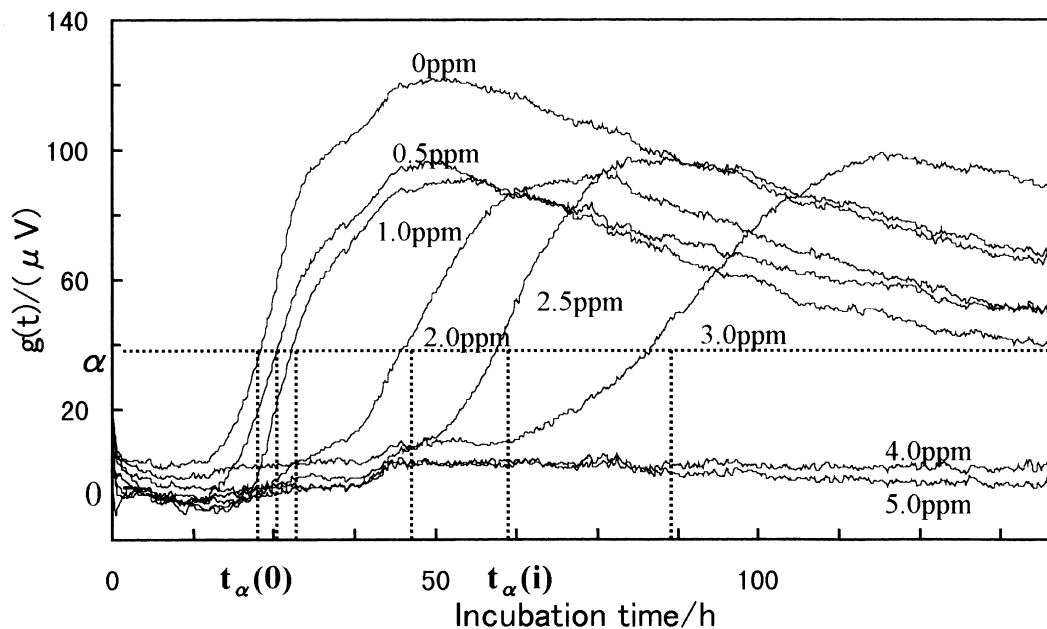


Fig.3 . Growth thermograms observed for the culture of *Aspergillus niger* on the medium containing various amounts of TBZ at 300 K
 $t_{\alpha}(0)$ and $t_{\alpha}(i)$: incubation times at which the fungal activities reach a definite value of α for TBZ concentration, zero and I, respectively

の式を仮定した .

$$(1 - t_{\alpha}(0) / t_{\alpha}(i)) = a[I]^b \quad (10)$$

ここで, aは比例定数を示す . MICは $t_{\alpha}(i) =$ での抗カビ薬剤濃度に対応することから, 以下の式で定義することができる .

$$MIC = [I]_{t_{\alpha}(i)} = (1/a)^{1/b} \quad (11)$$

Table 1 . Antifungal potency parameters of TBZ and BCM

	m	Kd	$[I]_{1/2}^{*})$	a	b	MIC ^{*)}
TBZ	1.70	2.90	1.9	0.20	1.10	4.0
BCM	0.98	0.42	0.4	0.66	0.34	3.4

*) Unit of ppm (mg/kg)

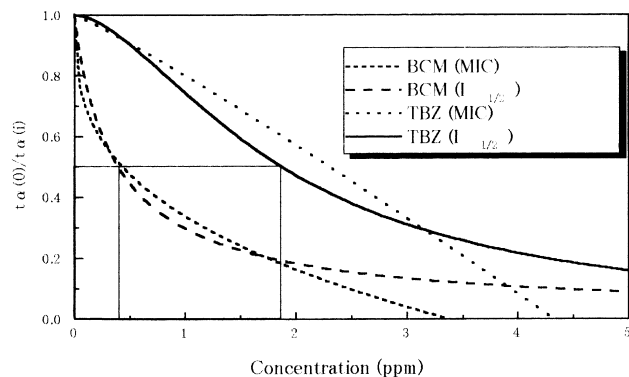


Fig. 4 . Agent potency curves of BCM and TBZ
 solid line : calculated from the parameters, m and Kd in TBZ
 dotted line : calculated from the parameters, a and b in TBZ
 $[I]_{1/2}$: concentration at which the specific growth activity is repressed by 50%, MIC : minimum inhibitory concentration

(10)式対数変換式によってプロットしたTBZの結果を Fig. 6 に示す .

$$\ln(1 - t_{\alpha}(0) / t_{\alpha}(i)) = b \ln[I] + \ln a \quad (12)$$

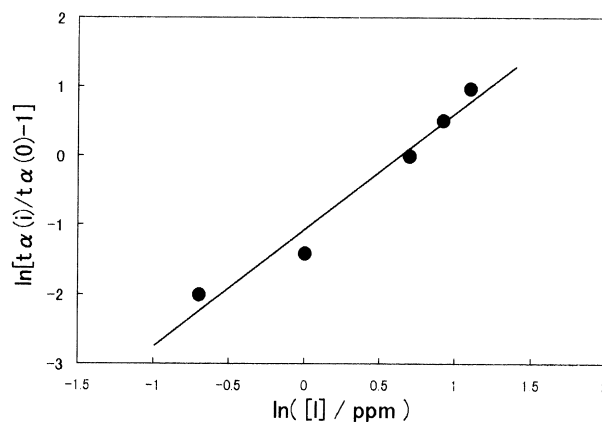


Fig. 5 . Plots of $\ln(t_{\alpha}(i)/t_{\alpha}(0) - 1)$ vs $\ln [I]$

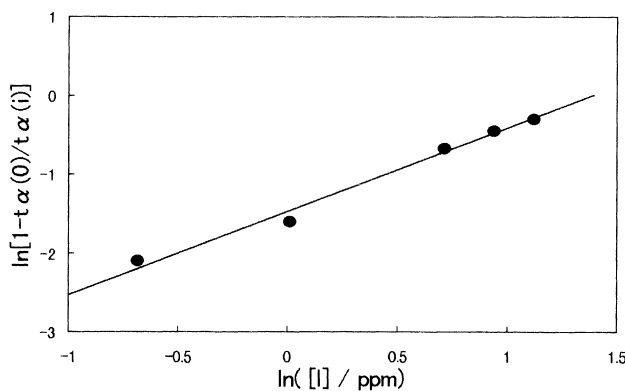


Fig. 6 . Plots of $\ln(1 - t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i))$ vs $\ln [I]$

図のように、良好な直線関係が得られ、それらの切片と勾配から、 $a=0.2$ 及び $b=1.1$ が求められ、(11)式よりTBZのMIC値を4.0ppmと決定できた。

4. 24ウェルプレート法によるMIC測定

従来法によるMIC値と熱量計による値を比較するため24ウェルプレート法によりBCMの生育抑制試験を行った結果を、Table. 2, Fig. 7 に示した。結果から明らかのように、目視による値と熱量計の値は同じ領域に入り、両者が極めてよく一致することがわかる。従って、カビの増殖に伴う代謝熱を測定して抗カビ性を評価する本法は、抗カビ薬剤の活性を定量的に精度正しく評価する極めて有効な方法であることが確認できた。

Table 2. Comparizon between Calorimeters and 24 well Assays of MIC in TBZ and BCM

	Calorimeter	24 well Assay
TBZ	4.0 [*])	3.2<6.4
BCM	3.4	2.5<5.0

*) Unit of ppm (mg/kg)

BCMと全く同様な方法を用いて、TBZのMICを測定した結果を同じくTable. 2, に示した。DNA合成阻害作用を持つBCMとは異なる電子伝達系の阻害薬剤であるTBZに対しても、同様な拮抗阻害解析によりMICを決定できたことから、本法が汎用性のあるデータを与えるものと期待できる。

結 論

従来から抗カビ薬剤を評価する方法として採用されてきた方法¹³⁾は定性試験であり、精度に乏しい。それらの試験法が実際的な用途に応用できない背景として、カビの生育条件(温度、湿度、栄養)などの環境条件及びカビの生育基物自体の水分活性などの複雑な要因があげられる。カビの生育阻害という現象についても、現在統一した基準がない。すなわち、殺カビ、静カビ、坑カビなど用語はさまざまに使われており、それぞれの厳密な定義はない。最近、通産省生活産業局の「生活関連新機能加工製品懇談会報告書」(平成10年12月)の中に、「抗菌」の定義がある。すなわち、「抗菌加工製品における抗菌とは、当該製品の表面における細菌の増殖を抑制することをいう。」と記載されている。ここで言う抗菌とは細菌に限定されたものであり、環境中に多く生息する真菌類(糸状菌及び酵母)は対象からはずされている。しかも、健康上からも問題となる真菌汚染は、今後も増えることが予想され、早急に抗カビの定量評価法の確立が望まれる。今回、著者らが試みた熱量計による定量評

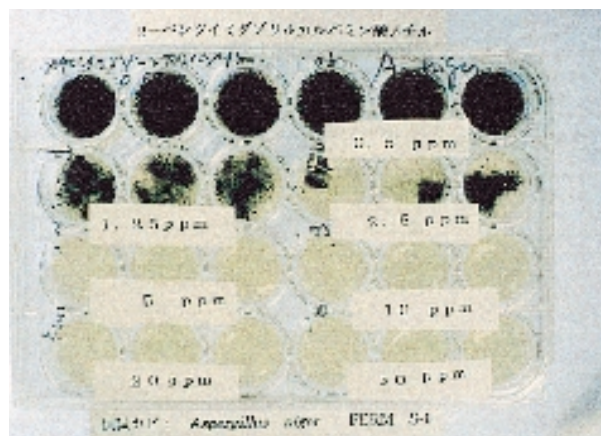


Fig. 7. 24 wellplate assay of BCM

価法は、そうした要望に答えるに充分な方法である。それは、非破壊的方法であるため、日用加工製品の抗カビ評価にも応用できる。さらに、従来法の欠点であった非溶出タイプの抗菌性試験にも適用できる。すなわち、本法はトータルの発熱量を測定するため表面に付着した細菌や真菌類などの生育状況も測定できる。今後、そうした加工製品における抗菌性、抗カビ性などを測定し、熱量計の適用範囲を広げ、新たな評価法としての実用性を高めていきたい。

(本研究の概要は日本防菌防黴学会第24回から26回の年次大会1997~1999年5月で発表した。)

文 献

- 1) 中井里史：日本公衆衛生誌，43，183 - 195，1996。
- 2) 宇田川俊一：菌類図鑑，1986，講談社。
- 3) 日本防菌防黴学会編：防菌防黴剤辞典，1986。
- 4) 高鳥浩介：図説かび検査・操作マニュアル法，1991，テクノシステム。
- 5) 高橋克忠：熱測定，18，9，1990。
- 6) 河本由香：防菌防黴誌，24，321 - 327，1996。
- 7) 高橋克忠：防菌防黴誌，24，313 - 320，1996。
- 8) 奥田幸子，高橋克忠：防菌防黴誌，24，397 - 405，1996。
- 9) 大河内正一，狩野文雄，小俣耕司：日本食品科学工学会誌，46，4，230 - 235，1999。
- 10) 狩野文雄，大河内正一：第23回日本防菌防黴学会抄録，127，1996。
- 11) 丸山将宣，狩野文雄，大河内正一：第26回日本防菌防黴学会要旨集，79，1999。
- 12) 鈴木由臣，稲葉慎，大河内正一：花粉学会誌，40，113，1996。
- 13) 日本工業規格，かび抵抗性試験方法：JIS Z2911 - 1992。