

抗カビ剤の簡易評価法の開発

細井永次* 鳴嶋善聡**

Study on Simple Assessment of Antifungal Agents

HOSOI Eiji*, NARUSHIMA Yoshiaki**

抄録

水溶性抗カビ剤の最小発育阻止濃度（以下、MIC）及び最小殺菌濃度（以下、MBC）を測定するために、マイクロプレートを使用した多検体化と希釈濃度の細分化を検討した。また、マイクロプレートリーダーを使用した微生物増殖曲線から、生存孢子数を推定し90%死滅速度（以下、D値）に応用した。その結果、従来法と遜色ない試験精度と試験工程の簡略化が可能となった。

キーワード：抗菌試験，抗カビ試験，MIC，MBC，D値，マイクロプレート

1 はじめに

既報¹⁾では、大腸菌及び黄色ブドウ球菌を使用し、微粒子状の微生物に対する抗菌試験の簡易評価法について報告した。これらの微生物の多くは水溶液中において、容易に拡散することから、マイクロプレートリーダーを利用した吸光度連続測定方法により求めた微生物増殖曲線から初発生菌数を容易に推定することができた。

一般に抗菌抗カビ試験にかかる日数は大腸菌等の主な細菌が2日程度の培養時間で十分なのに対し、カビの場合は生育速度が緩慢なため最低でも4日以上試験期間を必要としていた。したがって、簡易評価法の導入は細菌より、さらに有利な試験方法になると考えられる。

そこで、本報告では、繊維状に増殖するため水溶液中で拡散が期待できないカビ類についても同様の試験方法を用いた場合、どの程度精度が確保できるかを検証した。

また、MIC試験及びMBC試験^{2)・3)}において、既報と同様に抗カビ剤の濃度の細分化を検討した。

2 実験方法

2.1 孢子液の調製

試験全体を通して *Cladosporium cladosporioides* NBRC6348(以下、黒カビ)又は *Penicillium funiculosum* NBRC6345(以下、青カビ)を選択した。

まずサブロー寒天培地 15mL を滅菌済みのシャーレに分注して、28°Cで3日間乾燥させた。次にカビの孢子を培地の表面に均一になるように塗布して、28°Cで7日前後静地培養した。

まず、カビが生育したシャーレにサブロー液体培地を加え、コンラージ棒で表面に繁殖したカビを擦り採り懸濁させた後、キムワイプを詰めたローレット(165°Cで1時間乾熱滅菌)を用いてろ過した。この操作は、安全キャビネット内で行った。

次に、ろ液を 2,500rpm で5分間遠心分離し得られた沈殿物を、更にサブロー液体培地に懸濁して同上条件でさらに遠心分離した。その結果、得られた沈殿物を抗カビ試験用の孢子液とした。

孢子数の計数には、黒カビは血球計算盤、青カビはバクテリア計算盤を用いた。

2.2 増殖曲線と初発孢子数の測定

2.1 で調整した孢子液を、サブロー液体培地で

* 北部研究所 生物工学担当

** (株)ERCテクノロジー

10倍ずつ段階的に希釈していき、96穴マイクロプレートに移しかえていった。次に、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25°C、測定10min間隔、測定前180秒振とうした。以降、全ての試験で同設定)で測定を行った。また、従来方法と比較するため、クロラムフェニコール加サブロー寒天培地を使用した平板表面塗抹法で初発孢子数を計数した。

2.3 抗カビ試験

本試験使用のカビに対しても抗カビ性能を示したことから塩化ベンザルコニウム水溶液及び共同研究企業が開発中の抗菌抗カビ剤を使用した。

2.3.1 MIC試験

以下の試験の結果、白濁や沈殿が生じなかった抗カビ剤希釈列の内、最も低い濃度をMICとした。

(1)試験管(従来法)

抗カビ剤をサブロー液体培地で段階的に希釈し、合計10mLの抗カビ剤希釈列(ただし目的濃度の1.1倍)を調製した。そこに 10^7 cfu/mLに調製した菌液を1mL添加し、25°C、96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 μ Lの抗カビ剤希釈列(ただし目的濃度の1.1倍)を調製し、 10^7 cfu/mLの菌液を20 μ L添加して、マイクロプレートミキサーで25°C、96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、白濁や沈殿が生じなかった抗カビ剤希釈列の内、最も低い濃度をMBCとした。

(1)試験管(従来法)

MIC試験後の抗カビ剤希釈列を0.1mL採取し、サブロー液体培地10mLの入った試験管で希釈し、25°C、96時間振とう培養した。

(2)96穴マイクロプレート

MIC試験後の抗カビ剤希釈列を2 μ L採取し、同上培地200 μ Lの入ったマイクロプレートで希釈し、25°C、96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⁴⁾・⁵⁾

(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)の抗カビ剤希釈列をサブロー液体培地で10mL調製した。孢子液は 10^7 cfu/mLに調製した。また、抗カビ剤接触後の活性消去用として9.9mLのサブロー液体培地が入った試験管(4段階の濃度×5時系列、20試料)を事前に準備した。

まず、上記試験液をクールバスで5°Cに冷却したまま、抗カビ剤希釈列に孢子液を1mL添加し、正確に接触時間を計測しながら、設定時間に到達後、希釈液に0.1mLずつ移していき、抗カビ剤を100倍希釈することで活性を消去した。

孢子数の測定は、別途用意(1試料あたり3段階)したサブロー液体培地9mLの入った試験管で10倍ずつ希釈していき、クロラムフェニコール加サブロー寒天平板培地に0.1mL又は0.5mLずつ塗布し、37°Cで24時間培養後、出現したコロニーを計数した。(最大孢子濃度 10^4 cfu/mL)

(2)マイクロプレートリーダー法

96穴マイクロプレートをペルチェ式冷却器で5°Cに冷却しながら、2.3.3(1)中段の活性消去後の希釈液を0.2mLずつ移していった(1希釈液につき3点)。また、検量線作成用に2.3.3(1)前段の孢子液を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点の接触時間(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に黒カビの増殖曲線を示した。縦軸は600nmでの吸光度を、横軸は培養時間を示し、

グラフ内の数値は初発胞子数を示した。その結果、初発胞子数220cfu/mL(44cfu/0.2mL)が定量限界付近だった。22cfu/mLでは増殖するときと、しないときがあった。

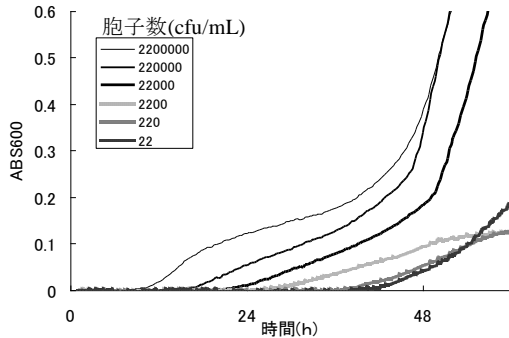


図1 増殖曲線と初発胞子数(黒カビ)

同様に、図2に青カビの増殖曲線を示した。その結果、初発胞子数300cfu/mL(60cfu/0.2mL)が定量限界付近だった。30cfu/mLでは増殖するときと、しないときがあった。

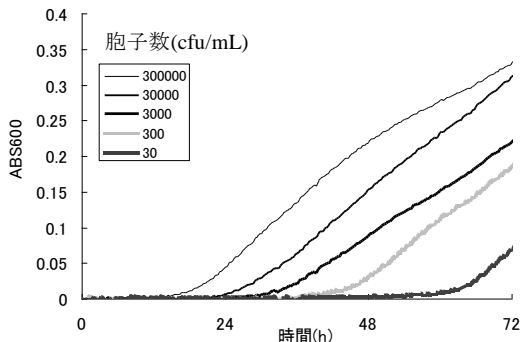


図2 増殖曲線と初発胞子数(青カビ)

以上のことから、本法における定量下限値を概ね200cfu/mL(40cfu/0.2mL)前後と設定して以降の試験を行った。

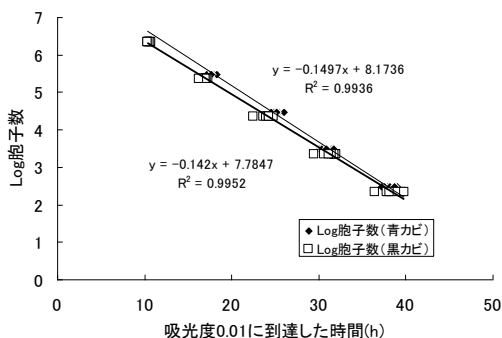


図3 初発胞子数と吸光度上昇時間

図3に増殖曲線と初発胞子数の測定を8回行ったときの結果を示した。縦軸は初発胞子数の対数

を示し、横軸は増殖曲線の吸光度が0.01に到達するのに要した時間をプロットし、最小二乗法で一次式と決定係数 (R^2) を求めた。その結果、どちらのカビ胞子も決定係数0.995前後を得た。また、寒天培地では100時間前後要していた培養時間を40時間以内で終了できる可能性が示された。

表1は増殖曲線の吸光度を0.01以外に設定して決定係数を比較した値を示した。各々図3に示した方法で決定係数を求めた。その結果、吸光度0.02のとき、最も相関関係が高かったことから、以降の試験では吸光度0.02に到達した時間を用いた。初発胞子数を逆算する方法については既報¹⁾に記載した方法を用いた。

表1 決定係数

吸光度	0.01	0.02	0.04	0.1
黒カビ	0.9952	0.9966	0.9944	0.8652
青カビ	0.9936	0.9945	0.9824	0.9502

3.2 抗カビ試験

3.2.1 MIC試験

まず、塩化ベンザルコニウムを用いてMIC試験を実施した。500ppmの抗カビ剤(サブロー液体培地により希釈)を1/2ずつ同培地で希釈していき、抗カビ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様の結果を得た。ただし、青カビで実施した一部で、MICで40回中8回、MBCで同じく4回従来法と異なる値となった。

表2 MIC及びMBC試験結果

		単位:ppm	
	試験	本法(n=40)	従来法(n=4)
黒カビ	MIC	7.8	7.8
	MBC	15.6	15.6
青カビ	MIC	3.9(一部7.8)	3.9
	MBC	15.6(一部31.3)	15.6

次に、製造工程の変更や、製造ロットによる性能の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抗カビ剤を使用し、濃度を等間隔にした希釈列で抗カビ試験を行った。予め予備試験を実施して、おおよそのMIC濃度を把握し

てから、1.0%～6.0%を0.5%刻みで抗カビ剤希釈列(11段階)を調製し試験を行った。

その結果、表3に示されたとおり従来法と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たものの、ほぼ同一のMICを示した。また、抗カビ剤を1/2ずつ希釈する倍数希釈法では把握できなかった製造工程20時間反応と24時間反応の抗カビ力の差や製造ロットごとの抗カビ能の違いも把握することができた。

表3 MIC及びMBC試験結果

単位:w/w%

製造ロット	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	2.0 (2.5)	1.5 (2.5)	2.0 (2.5)	1.5 (2.5)
91107	2.0 (2.5)	1.5 (2.5)	2.0 (2.5)	1.5 (2.5)
91110	2.5 (2.5)	2.0 (2.5)	2.5 (2.5)	1.5 (2.5)
91111	2.0 (2.5)	1.5 (2.5)	2.5 (2.5)	1.5 (2.5)

()内は、倍数希釈法で実施した結果
供試株：青カビ

3.2.2 D値試験

抗カビ剤として塩化ベンザルコニウムを使用した。本報では黒カビの試験結果を示した。

図4は縦軸に生存孢子数、横軸に抗カビ剤との接触時間を示した。まず、従来法及びマイクロプレートリーダー法を使用した方法で比較した結果を示した。抗カビ剤の濃度は50ppmとした。(MBC : 15.6ppm)

その結果、D値を求める要素となる傾きについて、概ね一致した結果を得た。

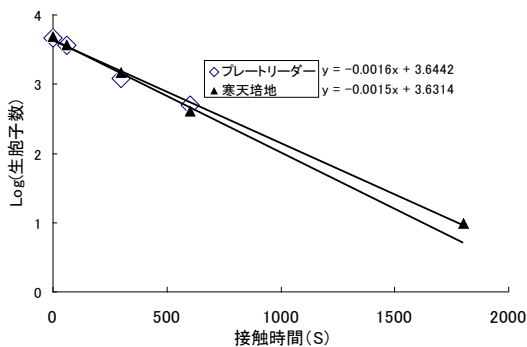


図4 係数法による生孢子数の比較

次に、抗カビ剤濃度を変化させて実施した場合の測定結果を図5に示した。ここでは、マイクロプレートリーダーの場合を示した。ただし、200cfu/mL以下は従来法に従って計数した値を使用した。

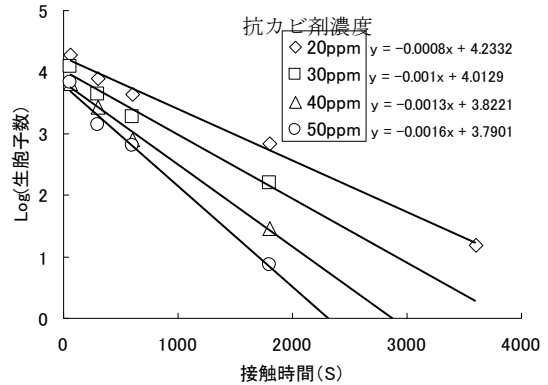


図5 抗カビ剤濃度と生孢子数の比較

図6は図5の傾きから求めたD値を濃度ごとにプロットしたもので、併せて従来法で実施した場合を併記し比較した。その結果、従来法と比較しても近似の結果を得ることができた。

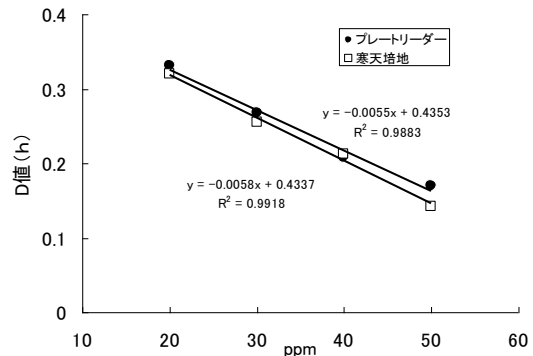


図6 D値と抗カビ剤濃度

また、抗菌(カビ)活性値等を推定するだけであれば、計数の必要はなく、段階的に希釈した菌(孢子)液と比較するだけなので、一層の迅速化が図れると考えられる。

3.3 迅速化の評価

試験を行った結果を、表4及び表5のとおり評価した。その結果、既報同様に経費削減と試験の短縮を図ることができた。

MIC及びMBCでは従来法に比べ一度に可能な検体数が大幅に増やせることが大きかった。特に、従来法で3か月程度必要な試験日数を10日に短縮することが可能であった。

D値試験では、試験の拘束時間に大きな差があった。従来法では1日の内10時間程度をかけて試験をしなければならなかったが、それが4時間程度に短縮された。また作業自体も従来法と比較して軽易なものだった。

表4 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	10日	80日	13

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

表5 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 シャーレ24枚	試験管84本 シャーレ240枚	15
培地量	0.1L(フアロー液体) 0.3L(フアロー寒天)	1L(フアロー液体) 3L(フアロー寒天)	10
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	5日	5日	100

比は従来法を100としたときの本法の割合

4 まとめ

(1) MIC 及び MBC 試験について

抗カビ剤の MIC、MBC についてマイクロプレートを用いた簡易法を試みた結果、従来法と同様の結果が得られ、測定時間も 1/8 程度に短縮された。

(2) 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。

ただし、定量下限値は従来法が勝ることから、200cfu/mL より下を計数したい場合は、従来法と組み合わせる必要があった。

また、この手法の応用例として、JISZ2801 等及び同等の抗菌（カビ）性試験を実施する前に、活性の高い試料を選抜するときに有効な方法だと考えられる。

(3) 迅速化の評価

抗カビ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。

参考文献

- 1) 細井永次, 鳴嶋善聡: 抗菌剤の簡易評価法の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **8**, (2010)
- 2) 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
- 3) (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
- 4) 芝崎勲: 新・食品殺菌工学, 光琳
- 5) 微生物研究法懇談会: 微生物学実験法, 講談社, (1975)153