

かおりの抗菌評価試験（寒天気体法）の改良法の提案

木更津工業高等専門学校 学生会員 ○奈良本朱音 中山かのこ 山口菜摘 山田尊貴 松林未理
正会員 大久保勉 正会員 上村繁樹 吉井文子

1. はじめに

精油をはじめとするかおり物質が、優れた抗菌作用を有することはよく知られている。例えば、シナモン精油の蒸気はチフス菌を、ラベンダーの蒸気は結核菌を死滅させ、オレガノ、タイム、シナモンなどは強い真菌活性を有している^{1,2)}。かおり物質の抗菌作用を測定する方法としては、寒天拡散法、希釈法、密閉箱気体法などがある^{1,2)}。中でも、寒天氣体法は、図1に示すように、ガラス製のペトリ皿にかおり物質を入れたガラスカップを設置し、その上皿に大腸菌やカビなどを植種した寒天培地を置くことにより、かおり物質から揮発した成分による菌の増殖阻害を評価する簡便な評価方法として広く用いられている。かおり物質に抗菌作用がある場合、寒天表面に、菌が全く増殖しない、あるいは増殖していても発育が明らかに阻害されている部分が確認される。この増殖阻害部は概ね円形を呈することから「阻止円」と呼ばれている。一般的には、この阻止円の直径を測定することにより、かおり物質の抗菌作用を定量する試みがなされている。

我々は、“気体状態の匂い分子を組み合わせた抗菌活性と匂い活性の測定およびその構造活性の相関”について研究を行っているが、におい成分の抗菌活性を評価するにあたり、寒天氣体法を抗菌作用の判定に用いる試みを重ねている。しかしながら、寒天氣体法を用いた場合、物質によっては必ずしも阻止円が真円にならず、いびつな形で現れる現象に度々遭遇した（図2）。そのため、増殖阻害が生じた部分（増殖阻害部）の直径を測定することは不可能であった。そこで、本論では、阻止円の直径の評価に拘らず、増殖阻害部の面積を簡便な画像処理によって測定する簡易的な評価方法を提案した。

2. 実験方法と材料

かおり物質として表1に示す物質を選択した。か

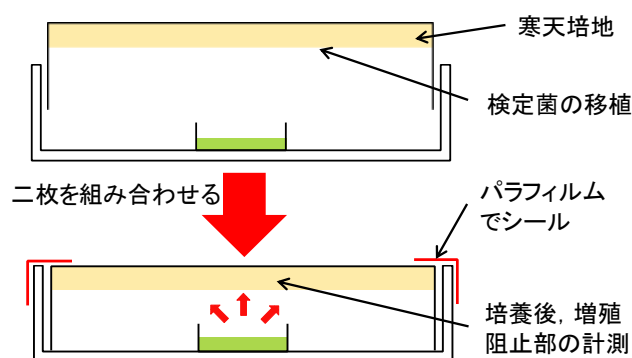


図1 かおりの抗菌評価試験（寒天氣体法）の概要



図2 増殖阻害部の形状の一例

おり物質を入れるガラスカップは、内径 25mm、高さ 7mm の特注品を用いた。各試料の投入量は 0.5mL とした。評価に用いた菌は *Escherichia coli* IFO 3972 (ATCC8739) (以下 *E. coli*) であり、Nutrient Agar 寒天培地 (Oxoid 社製) に植種後、37 度で 24 時間培養した。培養後、増殖阻害部を黒のマジックペンで着色し、入手容易なフリーソフト LIA for Win32 (<http://www.agr.nagoya-ac.jp/~hinkan/LIA32/index.htm>) を用いて面積を測定した。1 物質に対して最低 3 水準の実験を行い、増殖阻害部の面積を比較した。このとき、得られた増殖阻害部において、ほぼ真円 (X)、真円に近い (Y)、円形ではない (Z) の評価を行った。さらに、かおり物質を設置せずに評価菌を完全に増殖させたペトリ皿と、評価菌を植種せずにクリアな寒天の状態を維持したコントロール用のペトリ皿も同時に用意することで、以下のように増

殖障害部の濃淡を評価する基準を設定した。すなわち、寒天表面が全てクリアに増殖が阻害されている (A), 寒天の一部がクリアに増殖が阻害されている (B), 寒天の全面に阻害が見られるが薄く増殖している様子が見られる (C), 寒天の一部に増殖阻害があるが、薄く増殖している様子が見られる (D), 全く阻害が見られない (E), である。

3. 結果と考察

実験では、化合物から 18 種、精油から 4 種、身近な香り物質から 12 種、合計で 34 種の香り物質を試験したが、紙面の都合上、その結果の一部を表 1 にまとめる。表には、既報から、本研究と同様の試験菌と香り物質を用いた 3 例の阻止円の面積も合わせて表示した。

今実験で阻止円が認められたサンプルは総サンプル 34 種中 14 種サンプルであり、そのうち 8 種においては阻止円が円形とならなかった。既報では阻止円が真円であると仮定し、その直径から阻止円の面積を求めている。そのため円形とならなかった 8 種のサンプルにおいては既報の面積測定方法は適用できず、新たに画像解析ソフトを用いることにより精密な面積を算出した。

本実験結果から既報の値と三種の精油の値を比較してみたところ、真正ラベンダーは既報値 15.3 cm² ~ 35.0cm² に対し実験値 20.0cm²、ローズウッドは既

報値 1.54cm²~50.3cm² に対し実験値 10.8cm² と既報値の範囲以内に含まれたが、ティートリーについては、既報値が 1.13cm²~5.31cm² に対し実験値で 9.50cm² となり、若干我々の実験値のほうが大きくなった。一般に抗菌活性はローズウッド、真正ラベンダー、ティートリーの順で抗菌活性が高いとされており、今実験で得られた結果もこれと等しくなった。

4. まとめ

以上、本論では、簡易的な香り物質の揮発性成分の抗菌活性を測定する方法として従来からある寒天気体法に画像処理を組み合わせることを提案した。一般的に、グラム陰性菌である *E. coli* は、真菌類やウイルスに比べ、最も香り物質の阻害を受けにくいことが知られている。今後は、グラム陽性菌、真菌類などを用いて評価し、本法の有効性を確認する予定である。

参考文献

- 1) 井上重治 (2002) 微生物と香り, フレグランスジャーナル社
- 2) 井上重治, 安部茂 (2011) アロマセラピーへの招待, フレグランスジャーナル社
- 3) 野田信三他 (2001) アロマセラピー学雑誌, Vol.1, No.1, 16-21.

表 1 各物質の抗菌評価試験の結果 (一部抜粋)

物質	平均値 (cm ²)	標準 偏差	判定 (濃淡)	判定 (形状)	面積 (cm ²)	文献値 ³⁾ (cm ²)
酢酸エチル	-	-	A	-	-	-
酢酸ベンジル	11.4	3.50	D	Y	11.4	-
シナムアルデヒド	5.89	0.77	B	X	5.89	-
N-メチルアントラニル酸メチル	-	-	E	-	-	-
酢酸シクロヘキシル	-	-	C	-	-	-
チオカルバルデヒド	12.0	2.73	D	Y	12.0	-
真正ラベンダー	20	13.7	C,D	Z	20.0	15.3 - 35.0
ティートリー	9.5	2.70	A, B	Z	9.50	1.13 - 5.31
ローズウッド	10.8	3.36	A, B	Y	10.8	1.54 - 50.3
レモングラス	13.5	13.5	B	X	13.5	-