

## 大腸菌を用いた香りの抗菌活性試験における非阻止円部での菌数の挙動

木更津工業高等専門学校 学生会員 ○金澤真里子 山口菜摘

正 会 員 大久保努 上村繁樹 吉井文子

## 1. はじめに

精油をはじめとする香り物質が、優れた抗菌活性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、シナモンなどは真菌に対して強い抗菌活性を有している。またティートリーは歯周病、傷、火傷など、菌が原因とされる疾患の消毒や殺菌を目的として広く用いられている<sup>1),2)</sup>。

我々は、精油を構成する香り分子の気体状態での抗菌活性を、寒天気体法を用いて求めている<sup>3)</sup>。本法は、ガラス製ペトリ皿に香り物質を入れたガラスカップを設置し、その上方に大腸菌などの検定菌を植種した寒天培地を置くことにより、気体状の香り物質による菌の増殖阻害を評価する簡便な評価方法である。香り物質に抗菌性がある場合、寒天の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。これは、概ね円形を呈することから阻止円と称し、一般的には、この直径を測定することにより、香り物質の抗菌活性を定量している<sup>3)</sup>。

しかしながら、我々は、寒天気体法を用いて測定を続ける中で、明らかに阻止円の外周にあたる検定菌の増殖部においても、香り物質を添加しないで増殖させたコントロール系に比べて大きく菌数が低下する現象を確認した。そこで本報では、さらに阻止円の外側の部分（非阻止円部）における菌数低下に関わる評価方法について検討した結果を報告する。

## 2. 材料と方法

## 2.1 抗菌活性の測定

円筒ガラスカップについては、内径 25mm、深さ 7mm の特注品を作成し、ガラス製ペトリ皿については内径 90mm、深さ 20mm のものを用いた。

ガラスカップに任意の量の香り分子を投入し、ペトリ皿の上皿に設置した。次いで、寒天培地をペトリ皿の下皿で固定させ、大腸菌 *Escherichia coli* IFO 3972 (ATCC 8739) を植種後、37℃で 24 時間培養した。さらに揮発した気体状の香り分子の拡散が、周囲の温度の影響を受け、増殖阻害部の形状や再現性等に影響を及ぼす可能性を考え、実験室の温度を 25℃に一定に保ち操作を行い、操作後はすぐにインキュベーターのペトリ皿を移動させた。また阻止円の面積は、LIA for Win 32<sup>3)</sup>を用いて測定した。さらに、香り分子を設置せずに検定菌を完全に増殖させたペトリ皿（有菌コントロール）、検定菌を植種せずにクリアな寒天の状態を維持したペトリ皿（無菌コントロール）、および香り分子の寒天への付着の様子を観察するために、香り分子を投入し評価菌を植種しないペトリ皿の 3 種をコントロールとして同時に用意することで、阻止円および非阻止円の濃淡等を比較、評価した。大腸菌を塗布する寒天培地としてデゾキシコレート寒天培地を使用した。

## 3. 結果と考察

リナロールの測定時に、寒天中心部の阻止円はクリアであったものの、非阻止円部において有菌コントロールと比べて色が薄くなることが確認された（写真 1）。そこで、非阻止円部においても大腸菌の増殖がある程度阻害を受けているものと考え、以下のような評価方法を提案した（図 1）。

すなわち、阻止円およびその外周部の寒天を、内径 6mm の滅菌済みガラス管でくり抜き、くり抜いた培地を希釈液に加え、150 秒間攪拌し、寒天から菌体を剥離させた。この攪拌時間は、別途有菌コントロールを用いて、攪拌時間と剥離した大腸菌数の相関を得て決定した（結果は省略）。

その後、適宜希釈して、再度デゾキシコレート寒

キーワード かおり、抗菌、寒天気体法、くり抜き菌数測定

連絡先 〒292-0041 千葉県木更津市清見台東 2-11-1 木更津工業高等専門学校

E-mail : uemura@wangan. c. kisarazu. ac. jp

天培地により大腸菌数を計数した. 同様の操作を有菌コントロールでも行い, 比較対象とした (以下, くり抜き菌数測定と呼ぶ). 以上の操作により, 寒天上に増殖した大腸菌数を単位面積 (cm<sup>2</sup>) 当たりで計測できるようになった.

図 2 にリナロールの添加量 10 μL の場合の, 寒天の中心から水平方向にかけてのくり抜き菌数測定の結果を示す. 阻止円の内部においては, 大腸菌の増殖はほぼ見られず, 完全に抗菌性が発揮されることがわかった.

一方, 阻止円の外周部では, 中心からの距離が近いほど増殖が抑制されており, 寒天の外縁においては約 10<sup>9</sup>/cm<sup>2</sup> と有菌コントロールと同程度見られた. このように, より色の濃淡が明確に視覚化できるデゾキシコレート寒天培地を使用したことにより, 阻止円とその周辺部で大腸菌の数に差が見られる発見につながったと言える.

現在のところ, リナロールにのみ, このような現象が見られたが, 今後, その他の香り分子についても検討を続けていく予定である. また外周部での大腸菌数の減少をどのように評価していくかという課題も同時に残された.

なお一般的には寒天気体法の大腸菌培養のための培地には比較的広範囲の細菌に適用できるニュートリエントアガー培地が用いられている. 本研究では, 阻止円の境界部をより鮮明に把握するために, デゾキシコレート寒天培地を使用して大腸菌の培養を行った<sup>3)</sup>. その結果, 非阻止円部での菌数低下の現象を把握することができたと考えられる.

#### 4. まとめ

以上, 本稿では, 寒天気体法を用いてリナロールの抗菌活性を測定した結果について報告した.

培地にデゾキシコレート寒天培地を用いたことにより, 阻止円の外周部が有菌コントロールに比べ色が薄くなることが判明した. そこで, 阻止円, 非阻止円部, 有菌コントロールの菌数を把握するための, くり抜き菌数測定を提案し, その結果, 外周部の菌数が明らかに有菌コントロールよりも減少することが分かった.

今後, 阻止円の面積だけではなく, 非阻止円部における大腸菌数を考慮した評価方法を確立する必要があると思われる.

#### 参考文献

- 1) 井上重治: 微生物と香り, フレグランスジャーナル社(2002)
- 2) 井上重治, 安部茂: 抗菌アロマセラピーへの招待, フレグランスジャーナル社(2011)
- 3) 山口菜摘他: かおり成分の抗菌性評価, 第 25 回におい・かおり環境学会講演要旨集, pp. 109-110 (2012)

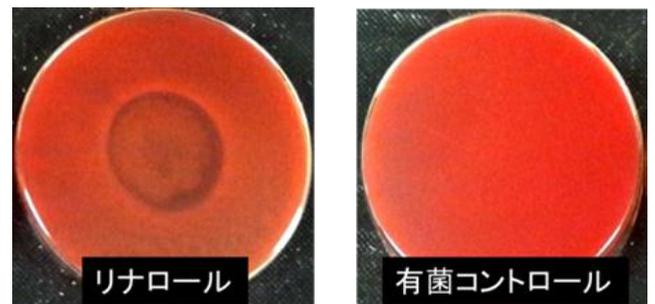


写真 1 培地の様子

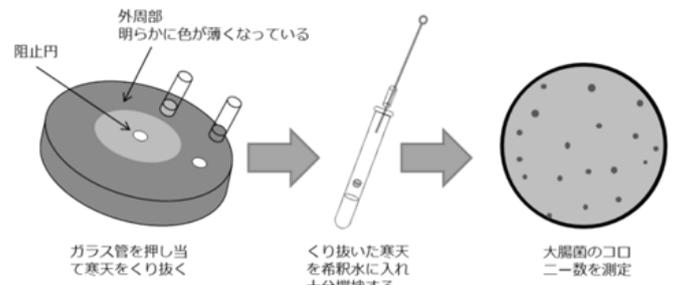


図 1 くり抜き菌数測定の概要

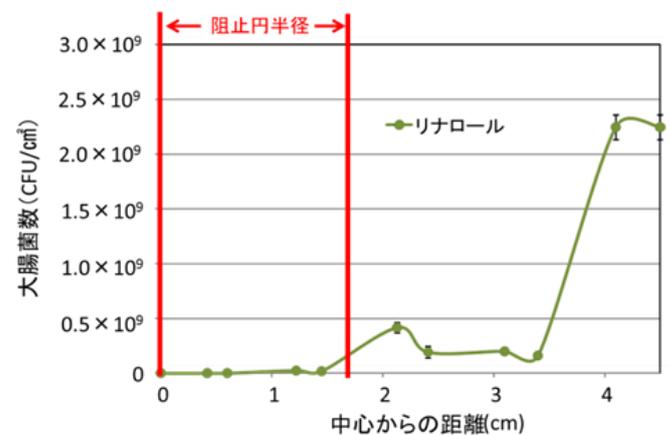


図 2 阻止円の中心からの距離と大腸菌数