

## 畳における抗菌剤の評価方法

吉田直人\*・黒木明香\*\*・児玉秀文\*\*・佐竹且弘\*\*・小川喜八郎\*

### Procedure of Evaluation of the Antimicrobial Agent in Tatami

Naoto YOSHIDA\*, Asuka KUROKI\*\*, Hidehumi KODAMA\*\*,  
Katsuhiro SATAKE\*\* and Kihachiro OGAWA\*

(平成11年5月11日 受理)

#### Summary

*Aspergillus* sp. was isolated from the Tatami. This fungal spore suspension 100  $\mu$ l was inoculated on to the potato dextrose agar. As for the antimicrobial agent used for the test, a precision amount was sprayed on the Tatami cut off in all directions of 4.5 cm. After Tatami was dried, it was put in center of the culture medium, and then cultured in 28 °C. Fungal growth was observed everyday, and the days (Y) until the inhibition zone formed around the Tatami disappears, the days (Z) until mycelium covered whole surface of the Tatami were sought. When the amount of the antimicrobial agent was decided with X(ml), the titer of antimicrobial agent was designed as (Y+Z)/X.

**Key words:** *Aspergillus* sp., Tatami, Antimicrobial agent

#### 緒 言

微生物災害 (biodeterioration)<sup>1)</sup>は、微生物の諸活動によって物質の諸形態に対して引き起こされる有害な変換事情をいうが、広く微生物の災害を考えると、微生物の一部のものは人をはじめ動植物の疾病の原因となる<sup>2,3)</sup>。日常生活では最も問題になるのは食品の腐敗<sup>4,5)</sup>であるが、そのほか、生活必需品、一般工業製品をはじめ、精密機器や貴重品に及ぶすべての物品は微生物の発育に適した状態になれば、微生物によって侵害される<sup>6)</sup>。微生物の侵害を受けると、商品価値を失うか、変色、変質、腐食などにより本来の機能に障害を生じ、甚だしいときは、火災や不測の事故<sup>7)</sup>を起こすこともある。

南九州は降雨量が多く、高温多湿であるので、微生物の発育には好条件がそろっており、一般工業製品の微生物災害が起こりやすい環境である。特に近年、宮崎県および鹿児島県においては、畳にカビが生じるといふ苦情がもちあがっている。我々は畳の微生物汚染防除をめざして抗菌剤を開発中であるが、畳における抗菌剤の効力をどのようにして測定し、比較するのかわいまだ確定的な方法が確立されていない。これまでは民間の試験研究機関が行った方法がある。それは畳表上にカビの胞子を植えつけず、そのままの状態、抗菌剤を噴霧し、温度28 °C、湿度98 %中に一定期間放置し、試料に付着していたカビの菌糸の発育の有無を調べるといふものであったが、試料上に胞子が付着していなければ抗菌力を見ることはできない。また胞子が

\* 生物機能工学講座

\*\* ケイ・ビー株式会社 (〒880-0841 宮崎市吉村町大町甲1993-1)

付着していても1種類とは限らず、多種の胞子が異なる試料に付着していれば、実験条件がそろっていないことになるので、正しい抗菌力測定とはなりにくい。したがって抗菌剤を開発する上で、抗菌力を正しく反映し、かつ簡便な方法が必要となる。そこで本研究において適切な抗菌剤の評価方法を検討した。

## 材料および方法

### 1 畳からの菌の分離

宮崎県の民家の畳において、カビの生じた部分にサブロー寒天培地が保持されたフードスタンプ（日水製薬）を押し付けて胞子を付着させ、28℃で5日間培養した。以後菌の培養には、ポテトデキストロース寒天培地（日水製薬）を使用した。

### 2 畳における抗菌試験

畳からの分離菌を新たにポテトデキストロース寒天培地（PDA）に植え付け、28℃で5日間培養した後、白金耳を用いて、菌糸をかきとり、約5白金耳分を10mlの0.05%スルホンコハク酸ジオクチルナトリウム溶液に懸濁させた。その後トーマの血球計算盤を用いて胞子数を数え、 $10^6$ 個/mlになるように胞子数をそろえた。胞子懸濁液はPDAに100 $\mu$ l塗布し、コーンラージ棒を用いて広げた。畳表は国産八代一級品を使用し、4.5cm四方の正方形に切り取り、試料とした。試料にはスプレーにより抗菌剤を裏表計3mlを噴霧した。噴霧においてはビーカー中で行い、意図した量が正確に試料中に保持されるよう考慮した。その後試料を自然乾燥させ、直径8.5cmのプラスチックシャーレに調製したPDAの中心部に置き、28℃の恒温機に入れ、菌の生育度合を24時間毎観察した。実験に使用した抗菌剤は水分散系あるいは溶剤系の液体状のものでありA社、B社、C社、D社、E社の5種類を用いた。また滅菌蒸留水を噴霧したものを対照とした。

## 結果および考察

### 1 畳からの菌の分離

分離された菌は1種類で、カビであり、形態より *Aspergillus* sp. であると考えられた。以後本菌を実験に使用した。

### 2 畳における抗菌試験

Fig. 1においてControlは対照であり、畳表には抗菌剤をいっさい噴霧していないものである。培養1日目で試料以外の部分は菌糸で覆い尽くされ、早くも試料上も菌糸で薄く覆われ、*Aspergillus* sp.の旺盛な繁殖が認められた（写真では見えにくい）。

Fig. 1AはA社の抗菌剤を畳表に噴霧したものであるが、コントロールと同様に培養1日目ですでに菌糸は試料以外の箇所でも旺盛に生育していたが、畳表上での生育は見られなかった。しかし培養3日目には菌糸が畳表の全面を覆ったことが認められた。

Fig. 1BはB社の抗菌剤を噴霧した畳表で、培養3日目で畳表以外での生育は認められたが、畳表周辺に増殖阻止円が形成されているのが観察された。培養11日目には増殖阻止円は消失し、同時に畳表上での生育も認められた。本抗菌試験では、畳表周辺に増殖阻止円が形成されることがわかった。これは畳表に噴霧した抗菌剤がしみだし、ポテトデキストロース寒天培地中に広がることを示している。したがって増殖阻止円の部分まで抗菌剤が拡散していると思われる。

Fig. 1CはC社の抗菌剤を噴霧した畳表で、B社の抗菌剤と同様に培養3日目で畳表以外での生育は認められたが、畳表周辺に増殖阻止円が形成されているのが観察された。培養11日目には増殖阻止円は消失したが、畳表上での生育は認められなかった。培養14日目で畳表を薄く菌糸が覆うのが認められた。

Fig. 1DはD社の抗菌剤を噴霧した畳表で、B、C社の抗菌剤と同様に培養3日目で畳表以外での生育は認められたが、畳表周辺に増殖阻止円が形成されているのが観察された。培養14日目には増殖阻止円は消失し、同時に薄く畳表上を菌糸が覆うのが認められた。

Fig. 1EはE社の抗菌剤を噴霧した畳表で、コントロールと同様に培養1日目ですでに菌糸は畳表以外の箇所でも旺盛に生育していたが、畳表上での生育は見られなかった。しかし培養3日目には菌糸が畳表の全面を覆ったことが認められた。

以上の結果より

抗菌剤の噴霧量：X (ml)

畳表周辺に形成される増殖阻止円が消失するまでの日数：Y (day)

菌糸が畳表の全面を覆うまでの日数：Z (day)

とすると抗菌剤の力価を

$$(Y+Z)/X \quad (1)$$

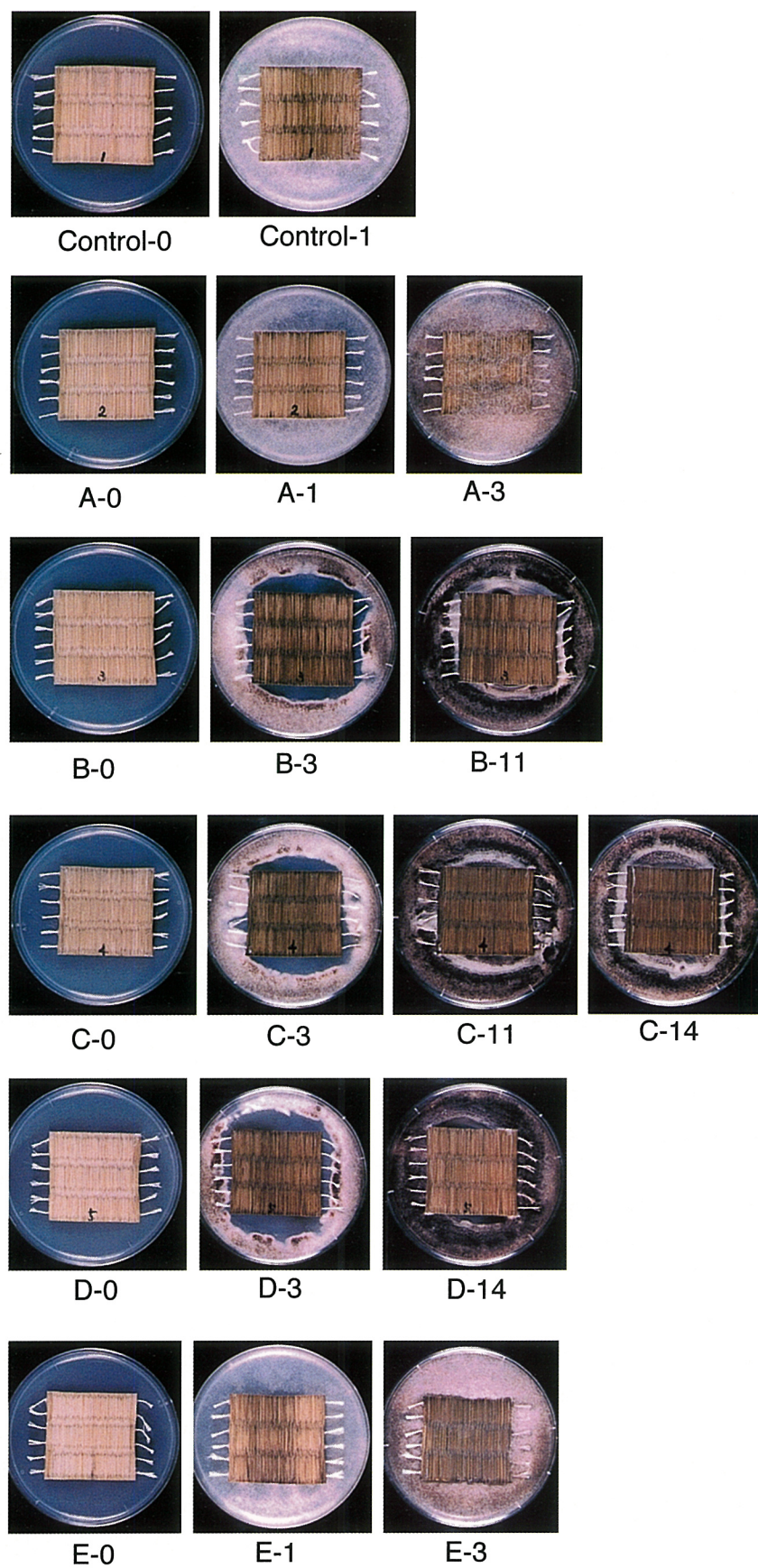


Fig. 1. The inhibition of *Aspergillus* sp. by the antimicrobial agent in Tatami. An alphabet shows the kinds of the antimicrobial agent, and a number shows cultivation days.

**Table 1.** The comparison of the titer of each antimicrobial agent.

Antimicrobial agent	The amount of the antimicrobial agent (ml)	The days until inhibition zone disappears (day)	The days until the whole surface of the tatami is covered by mycelia (day)	Titer
Control	3 <sup>a)</sup>	1	1	0.67
A	3	1	3	1.33
B	3	11	11	7.33
C	3	11	14	8.33
D	3	14	14	9.33
E	3	1	3	1.33

<sup>a)</sup> distilled water

という式で表わすことを考案した。(1)式は値が大きいほど抗菌力が高いことを示すものである。菌糸が畳表の全面を覆うまでの日数は Fig. 1 Control-1 程度の菌糸が薄く畳表を覆うまでとする。また本試験は14日間に限定しているが、菌糸が畳表を覆わなければ、抗菌剤の量を減らして試験を行えばよい。

上記の方法にしたがってX, Y, Zの値を求め、(1)式に代入して抗菌剤の力価を求めると Table 1 のようになる。本実験では対照の値は0.67になる。したがって噴霧量を変えた場合は対照の値も変化することもあるので、常に対照を用意し、求められた抗菌剤の力価から対照の値を差し引いた値で示されなければならない。したがってTable 1よりA, B, C, D, E社抗菌剤の力価はそれぞれ、0.66, 6.66, 7.66, 8.66, 0.66ということになりD社抗菌剤が最も強力な抗菌力を持つといえる。

畳からの分離菌を供試菌にした利点であるが、自然界から分離したものや、タイプカルチャーから取り寄せた菌は本来畳上で生育しやすいのか、しにくいのかわからない。よって畳分離菌を用いる方がより有効的な抗菌剤の開発を見込めるであろう。PDAを用いる点であるが、PDAは栄養豊富であるので畳表以外の部分に確実に生育可能な環境を作りあげることができる。畳表上には生育しないが、そのほかでは旺盛に生育するので、判別が明確になるわけである。

本評価方法において注意すべき点はPDAに塗布する孢子数を正確に $10^6$ 個/mlにそろえることである。孢子濃度が10倍も100倍も濃いようでは生育速度が早く見えてしまうし、孢子濃度が薄いようであれば生育にむらが生じてしまうからである。

従来、抗菌剤の評価、抗菌能力を言葉による曖昧な表現や+といった記号で表わしていたが、抗菌能力を力価として数字で表わすことにより、目標がたてやすく、より明確な抗菌剤の評価が可能となると考えられる。

## 摘 要

畳より *Aspergillus* sp. を分離した。本菌の孢子懸濁液 $10^6$ 個/ml,  $100\mu\text{l}$ をポテトデキストロース寒天培地に塗布した。4.5 cm四方に切り取った畳表に供試する抗菌剤を正確量噴霧し、乾燥後、培地の中心部に置き28℃で培養した。1日毎菌の生育を観察し、畳表周辺に形成される増殖阻止円が消失するまでの日数(Y)、菌糸が畳表の全面を覆うまでの日数(Z)を求めた。抗菌剤の噴霧量をX(ml)とすると抗菌剤の力価を $(Y+Z)/X$ で表わすことを考案した。

キーワード：畳, 抗菌剤, *Aspergillus* sp.

## 引用文献

- 1) NEUJAHN, H. Y.: Yeasts in biodegradation and biodeterioration processes. *Bioprocess Technol.*, **5**, 321-348 (1990)
- 2) GIBOFSKY, A., KERWAR, S. and ZABRISKIE, J. B.: Rheumatic fever. The relationships between host, microbe, and genetics. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **24**, 237-259 (1998)
- 3) DORR, J., HUREK, T. and REINHOLD-HUREK, B.: Type IV pili are involved in plant-microbe and

- fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.*, **30**, 7-17 (1998)
- 4) MOLOKWU, C.N. and OKPOKWASILI, G.C.: Biodeterioration potentials of fungal isolates from vegetable oils. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **48**, 251-255 (1997)
- 5) DRYSDALE, A.D.: Prevention of biodeterioration of animal feeds using chemicals. *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 80 (1978)
- 6) NEU, T.R., VAN der MEI, H.C., BUSSCHER, H.J., DIJK, F. and VERKERKE, G.J.: Biodeterioration of medical-grade silicone rubber used for voice prostheses: a SEM study. *Biomaterials*, **14**, 459-464 (1993)
- 7) STREIFEL, A.J., LAUER, J.L., VESLEY, D., JUNI, B. and RHAME, F.S.: *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi generated by hospital building demolition. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 375-378 (1983)