

最小阻止濃度 (MIC) の簡易測定法

近畿職業能力開発大学校 登 成 健之介

Convenient Method for Measurement of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Kennosuke TONARI

要約 各種食品保存料関連物の最小阻止濃度 (MIC) とペーパーディスク法による阻止円の大きさを調べた結果、両者には強い相関関係があることが判った。(相関係数 (r): *B. subtilis* に対して $r = -0.938$ 、*E. coli* に対して $r = -0.943$) また、この回帰式から試験物質の阻止円の大きさが判れば、試験物質の MIC が予測でき、その近辺濃度の試験物質を含む培地を作成して、植菌、培養後、菌が生育できる最小濃度培地を調べることにより、効率的に試験物質の MIC が得られることが予想される。

緒言

最小阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) は抗菌作用を有する物質の評価にしばしば用いられる。これまでの方法は試験物質 (検体) の特定菌種 (例えば大腸菌) に対するおおよその阻止濃度を想定し、その濃度を中心とした周辺濃度の培地を作り、菌の生育を阻止する最小濃度を求めるものである。⁽¹⁾

例えば、最小阻止濃度 1,000ppm と想定した場合、2,000、1,500、1,000、500、250ppm といった検体濃度の培地を作り、植菌、37℃、24h 培養後、生育状況を判定し、例えば 1,000ppm 以上では生育が認められず、500ppm 以下では認められた場合、さらに 1,000ppm ~ 500ppm の間を調べる方法である。この方法では阻止濃度の想定を誤ると無駄が多く、多数の検体測定では非効率的であり時間がかかる。そこで、ペーパーディスク法を用いて、各種物質の阻止円の大きさとその MIC を予め測り、両者の関係 (回帰式) をまず求める。次に、ペーパーディスクによる試験物質の阻止円の大きさを測定し、この値を得られた回帰式に代入することによりおおよその試験物質の MIC が予測でき、その濃度近辺の試験物質を含む培地を作成し、植菌、培養後、菌が生育できる最小濃度を調べれば、その試験物質の MIC が効率的に得られると考えられる。

実験

1 ペーパーディスク法による阻止円の測定

1 - 1) 試料

12種類の食品保存料関連物質 (キシダ化学 (製) 特級試薬: ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、安息香酸、安息香酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸、パラオキシ安息香酸エチル、デヒドロ酢酸、サルチル酸、オルトクレゾール、ケイ皮アルデヒド、ケイ皮酸、チモール) およびパラクレゾール、ブチレイテッドアニソール (BHA)、ベンザルアセトン をサンプルとしてとりあげた。

1 - 2) 阻止円測定方法⁽¹⁾⁽²⁾

- 1) 各サンプルの 3% アセトン溶液を作成し、その 30 μ l を厚手ペーパーディスク (8mm 径) に吸着、風乾する。ただし、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウムは 3% 水溶液とする。
- 2) 日水製薬 (製) 標準寒天培地 (蒸留水で 2.4% 濃度に調整) をオートクレーブ (120℃、15分) 滅菌後、市販滅菌済みプラスチックシャーレ (9cm 径) に流し込み固化させる。
- 3) *Bacillus subtilis* (IFO3009)、*Escherichia coli* (IFO3301) の保存液 100 μ l を培地表面に均一に塗布

後、1)で調整したディスクを2)のシャーレ1/4円部の中央に置き、なじませた後、36~37、24時間培養する。次に培養後の阻止円の大きさを測定する。結果をTable 1に示した。

2 最小阻止濃度(MIC)の測定⁽¹⁾⁽²⁾

食品添加物関連物の阻止濃度を1,000ppmとみなし、各検体100、500、1,000、1,500、2,000ppm含む標準寒天培地を作成し、菌の生育状況を調べた。

2-1) 粗阻止濃度(MIC-1)の測定方法

1) 5本の試験管に標準寒天培地0.24gと純水10ml

を加え滅菌する。

2) 各検体2%アセトン溶液(塩類は水溶液)を作成し、0.05、0.25、0.50、0.75、1mlを上記試験管に加え、よく混合後、スラント状に固化させる。(対10g培地:100,500,1,000,1,500,2,000ppm)

3) コロニー状に生育させた保存菌(*B. subtilis*, *E. coli*)を白金耳でスラントに画線し、36~37、24時間培養する。結果をTable 2に示した。

2-2) 細阻止濃度(MIC-2)の測定方法

MIC-1の阻止範囲を絞り込むために、Table 3に示したMIC-2の濃度範囲のスラントを調整し、植

Table 1. Inhibitory Zone Sizes of the Compounds against *B. subtilis* and *E. coli*

	<i>B. subtilis</i> (IFO3009)				<i>E. coli</i> (IFO3301)			
	1	2	3	Aver (mm)	1	2	3	Aver (mm)
Sorbic acid	12	10	14	12.0	13	13	12	12.7
K-sorbate	8	8	8	8.0	8	8	8	8.0
Benzoic acid	16	13	17	15.3	15	15	13	14.3
Na-benzoate	8	8	8	8.0	8	8	8	8.0
p-Oxybenzoic acid	16	12	13	13.7	15	11	15	13.7
Ethyl p-oxybenzoate	11	9	10	10.0	14	10	11	11.7
Dehydroacetic acid	13	13	14	13.3	15	12	16	14.3
Salicylic acid	18	13	15	15.3	17	15	15	15.7
o-Cresol	8	8	8	8.0	8	8	8	8.0
Cinnamic aldehyde	17	15	16	16.0	17	17	16	16.7
Cinnamic acid	11	10	11	10.7	9	10	10	9.7
Thymol	18	20	20	19.3	18	20	19	19.0

30μl of 3% acetone solution of the compounds were absorbed in 8 mm-thick paper disks. (K-sorbate and Na-benzoate were used as 3% water solutions.) After drying briefly, disks were placed in quadrant of the plate and incubated for 24hrs. at 36~37. Inhibitory Zones of the compounds in diameter were measured in mm.

Table 2. Briefly Measured MIC (MIC-1) and Determined MIC (MIC-2) of the Compounds against *B. subtilis* and *E. coli*

	MIC 1 (ppm)		MIC 2 (ppm)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Sorbic acid	100 - 500	100 - 500	600	500
K-sorbate	1,500 - 2,000	1,500 - 2,000	1,800	2,000
Benzoic acid	500 - 1,000	500 - 1,000	500	500
Na-benzoate	1,500 - 2,000	1,500 - 2,000	1,700	1,800
p-Oxybenzoic acid	500 - 1,000	500 - 1,000	700	800
Ethyl p-oxybenzoate	500 - 1,000	500 - 1,000	1,000	800
Dehydroacetic acid	100 - 500	100 - 500	500	400
Salicylic acid	100 - 500	100 - 500	400	400
o-Cresol	1,500 - 2,000	1,500 - 2,000	2,000	2,000
Cinnamic aldehyde	100 - 500	100 - 500	500	400
Cinnamic acid	500 - 1,000	500 - 1,000	700	900
Thymol	100 - 500	100 - 500	300	300

MIC-1 was measured at the range of 100~2,000ppm

MIC-2 was measured at various ranges according to the result of MIC-1 (cf. Table 3)

Table 3 Preparation for Determined MIC (MIC 2) derived from MIC 1

MIC 1	MIC 2	Addition Quantity for MIC 2 *
100 ~ 600ppm	50 ,100 ~ 600ppm	1 %soln .:0 .05 ρ .1 ρ 2 ρ 3 ρ 4 ρ 5 ρ 6ml
500 ~ 1 ,000ppm	400 ~ 1 ,200ppm	2 %soln .:0 2 ρ 25 ρ 3 ρ35 ρ 4 ρ 45 ρ 5 ρ 55 ρ 6ml
1 ,000 ~ 1 ,500ppm	800 ~ 1 ,600ppm	2 %soln .:0 4 ρ 45 ρ 5 ρ 55 ρ 6 ρ 65 ρ 7 ρ 75 ρ 8ml
1 ,500 ~ 2 ,000ppm	1 ,400 ~ 2 ,200ppm	4 %soln .:0 35 ρ 38 ρ 4 ρ 43 ρ 47 ρ 5 ρ 53 ρ 55ml

* 100ppm gradations in concentrations of the compounds were incorporated. Acetone solutions of the compounds were added to each agar broth in the order described the colum of Addition Quantity for MIC 2 .

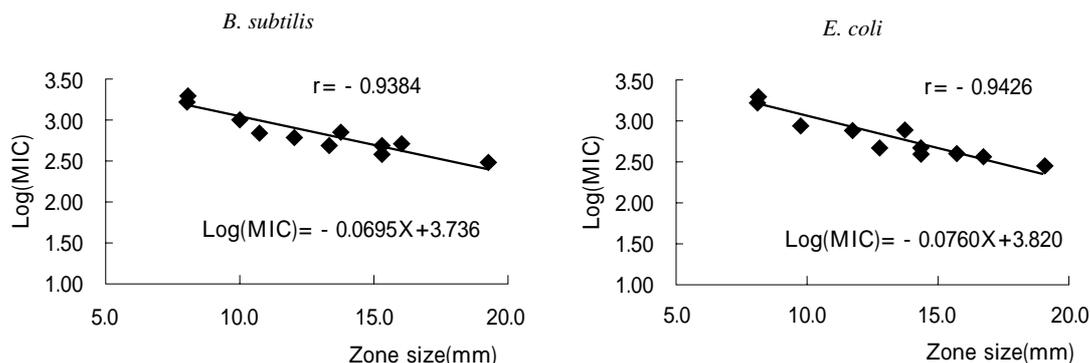


Fig .1 Relationship between Log(MIC) and Zone size of the Compounds against *B. subtilis* and *E. coli*

菌、培養後、2 - 1) 同様に判定する。
結果については Table 2 に同時表示した。

結果および考察

Table 1 および 2 より、阻止円の大きさと MIC の対数値の関係を Fig .1 に示した。

グラフより、各菌に対する、相関関係 (相関係数 (r) は *B. subtilis* : r = - 0 .938、*E. coli* : r = - 0 .943) が認められ、それぞれの回帰式は *B.subtilis* に対して $\log(MIC) = - 0 .0695X + 3 .736$ 、*E.coli* に対して $\log(MIC) = - 0 .0760X + 3 .820$ で、ペーパーディスク法による阻止円の大きさ (Xmm) が判れば、 $\log(MIC)$ が計算でき、MIC を推定できる。次に、この推定 MIC の近辺濃度培地を作成し、菌の生育可能な最小濃度を測定すれば化合物の MIC が効率よく得られることになる。

これを用いて、パラクレゾール、ブチレイテッドアニソール (BHA)、ベンザルアセトンの MIC を測定した結果を Table 4 に示した。

Table 4 より、計算による MIC 値とその観測値が近いことが判明した。尚、観測値の測定方法は 2 - 2) 法に準じて、BHA は 200 ~ 800ppm (1 %アセトン溶液で各培地を作成)、パラクレゾール、ベンザルアセトンは 600 ~ 1 ,200ppm (2 %アセトン溶液で各培地を作成)、で各系列については 100ppm づつの濃度変化を培地につけた。

総括

- 1 . ペーパーディスク法による阻止円の大きさと対象物 (サンプル) の阻止濃度 (MIC) の対数値は強い相関性がある。
- 2 . これらの回帰式を用いることにより、阻止円の大き

Table 4 Comparison of the Calculated MIC and Observed MIC

	Zone size (mm)		Calculated MIC*(ppm)		Observed MIC(ppm)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
p-Cresol	14 .6	13 .8	524	588	500	600
BHA	16 .0	15 .6	417	407	400	400
Benzalacetone	11 .0	10 .4	933	1 ,071	900	1 ,100

* calculated by the equations shown in Fig .1

きさから MIC が予測でき、予測値から効率的に試験物質の MIC が求まる。

謝辞

本研究の実施にあたりご協力を頂きました本校卒業生の竹中健二君、北村拓登君、松本尚之君に深謝いたします。

[参考文献]

- (1) Kennosuke TONARI、Antibacterial Activities of Hinokitiol and Related Compounds, *SeikatuEisei* , **42** (5), 187 - 189 (1998)
- (2) Kennosuke TONARI and Keiichiro Sameshima Antibacterial Activity of 3-Methylcyclopentanone Derivatives in Relation to Methylenomycins, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **49** (6), 585 - 590 (2000)