

報告書

研究課題：D7 の抗菌・抗真菌活性の検討

研究期間：令和2年10月1日～令和2年10月23日

実験場所：崇城大学薬学部微生物学研究室

崇城大学薬学部微生物学研究室 准教授
方 軍

抗真菌活性の検討

〒860-0082 熊本県熊本市西区池田4-2-2-1

Tel: 096-326-4137

Fax: 096-326-5048

Email: fangjun@ph.sojo-u.ac.jp

2020年10月23日

1. 緑膿菌の増殖とバイオフィルム形成に対する D7 の抑制効果と他の消毒剤との比較

方法：

(1) 96-well Plate①の各ウェルに種々の濃度の被検物質を含む緑膿菌懸濁液 180 μ l を入れる。96-peg Lid を被せてインキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C で培養する（ペグ上にバイオフィルムが形成される）。

(2) 96-well Plate②、96-well Plate③の各ウェルに滅菌生理食塩水 200 μ l を、96-well Plate④の各ウェルに Crystal Violet Solution 200 μ l を入れる。

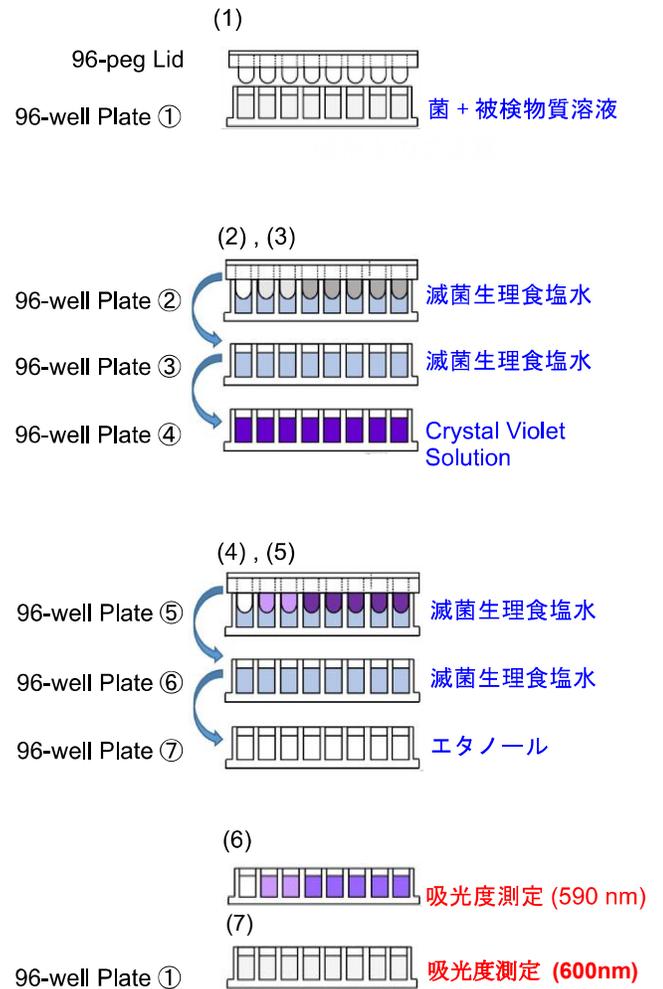
(3) 96-well Plate②、96-well Plate③に手順(1)の 96-peg Lid を順次浸して洗浄する。続けて 96-well Plate④に 96-peg Lid を被せて室温で 30 分静置する。

(4) 96-well Plate⑤、96-well Plate⑥の各ウェルに滅菌生理食塩水 200 μ l を、96-well Plate⑦の各ウェルにエタノール 200 μ l を入れる。

(5) 96-well Plate⑤、96-well Plate⑥に手順(3)の 96-peg Lid を順次浸して洗浄する※。続けて 96-well Plate⑦に 96-peg Lid を被せて室温で 15 分静置する。

(6) 96-peg Lid を取り外し、マイクロプレートリーダーで 590 nm の吸光度を測定し、バイオフィルムの形成量を計算する。

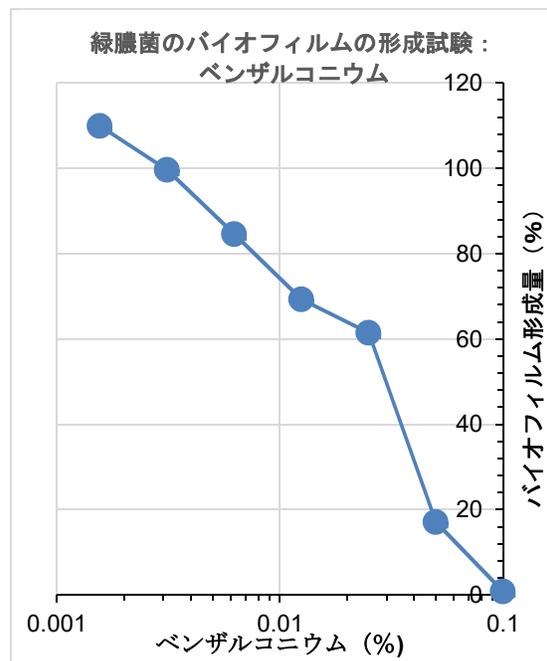
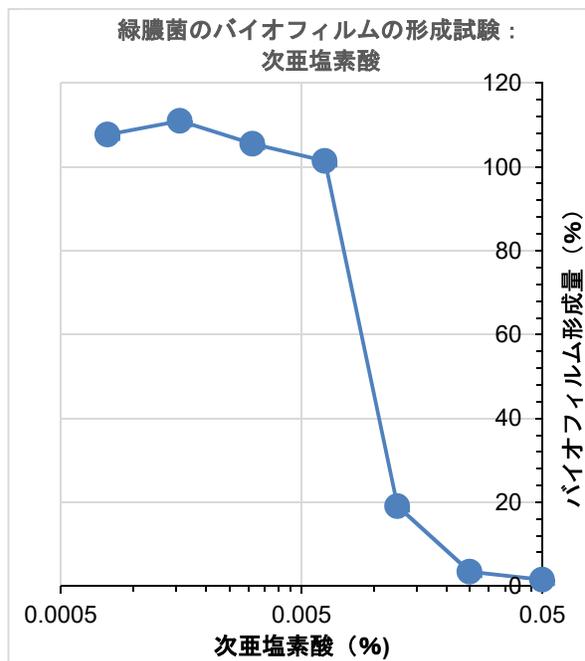
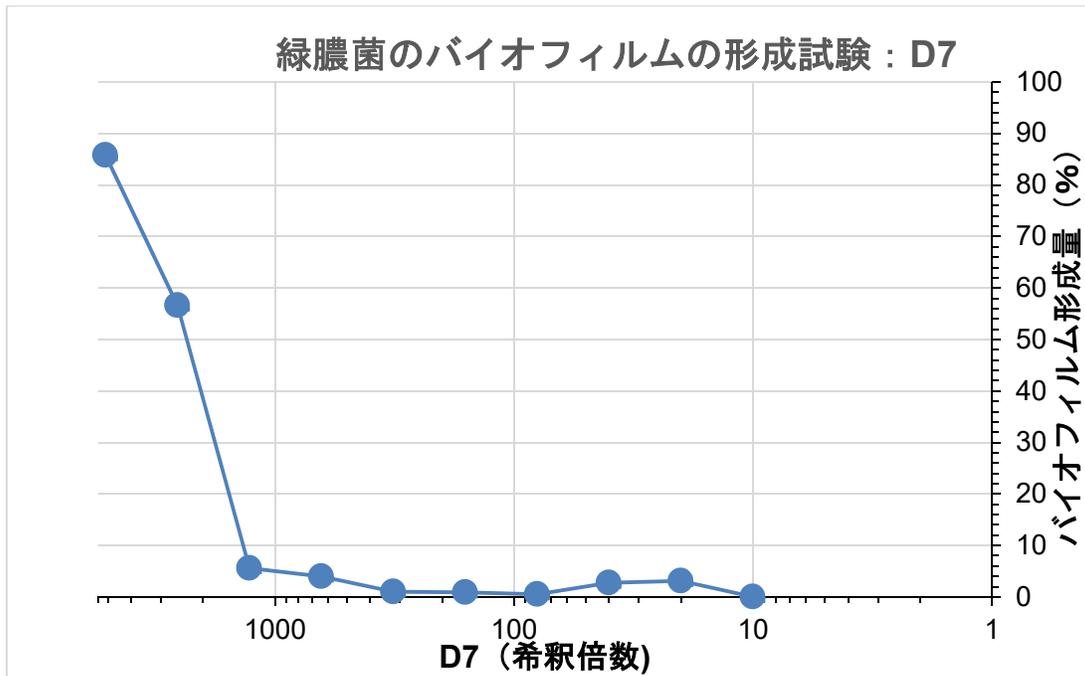
(7) 96-peg Lid を取り外した 96-well Plate①は、マイクロプレートリーダーで



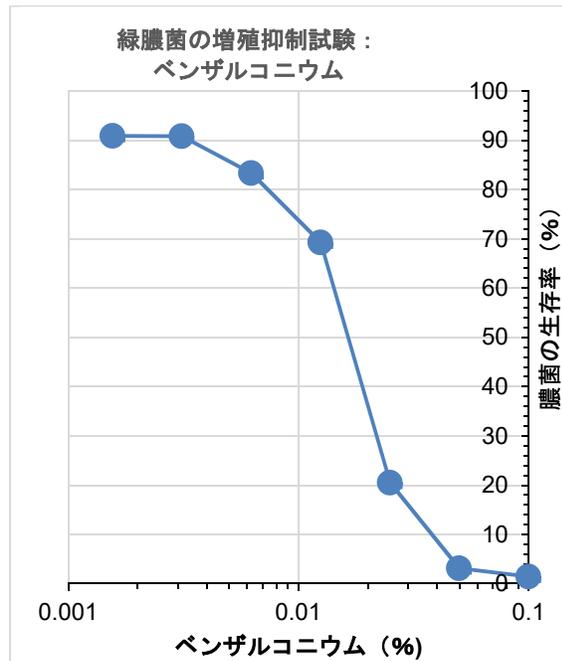
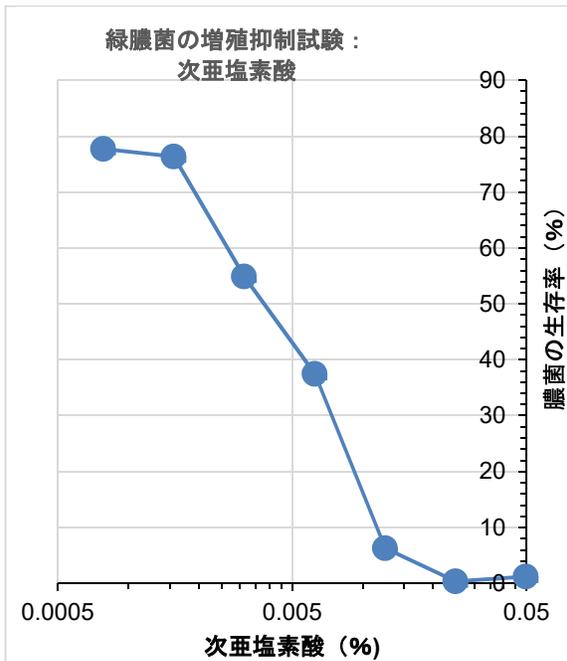
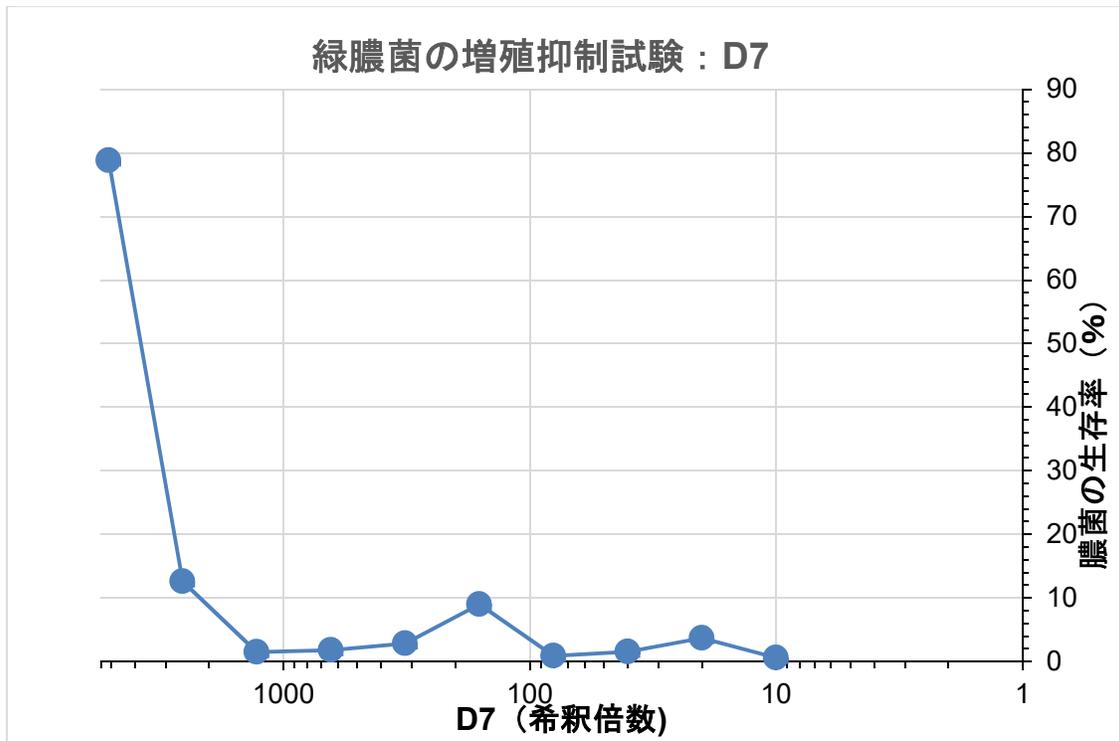
600 nm の吸光度を測定し、緑膿菌の増殖（生存率）を計算する。

結果：

バイオフィルムの形成量



緑膿菌の増殖 (生存率)



2. 緑膿菌の増殖とバイオフィーム形成に対する D7 の抑制効果と他の消毒剤との比較

方法：

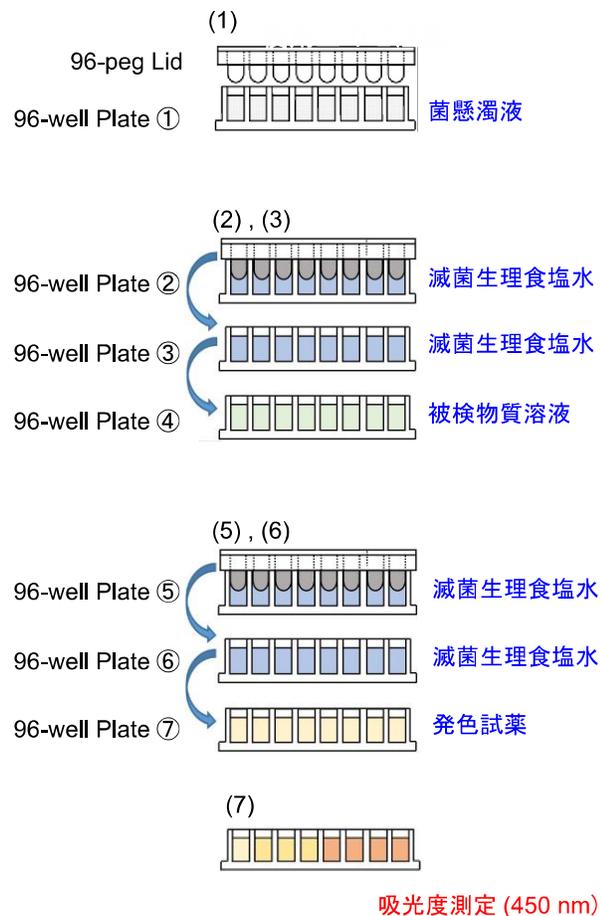
(1) 96-well Plate 1 の各ウェルに緑膿菌懸濁液 180 μ l を入れ、96-peg Lid を被せてインキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C で培養する(ペグ上にバイオフィームが形成される)。

(2) (2) 96-well Plate 2、96-well Plate 3 の各ウェルに滅菌生理食塩水 200 μ l を、96-well Plate 4 の各ウェルに被検物質 (D7, 次亜塩素酸、ベンザルコニウム) を含む培地 200 μ l を入れる。

(3) (3) 96-well Plate 2、96-well Plate 3 に手順 (1) の 96-peg Lid を順次浸して洗浄する。続けて 96-well Plate 4 に 96-peg Lid を被せてインキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C で培養する。

(4) (4) 滅菌コニカルチューブ内で WST solution 990 μ l と Electron mediator reagent 110 μ l を混合し、Mueller-Hinton broth (MHB) 培地を 20.9 ml 加えて、発色試薬とする。

(5) (5) 96-well Plate 5、96-well Plate 6 の各ウェルに滅菌生理食塩水 200 μ l を、96-well Plate 7 の各ウェルに手順 (4) で調製した発色試薬 200 μ l を入



れる。

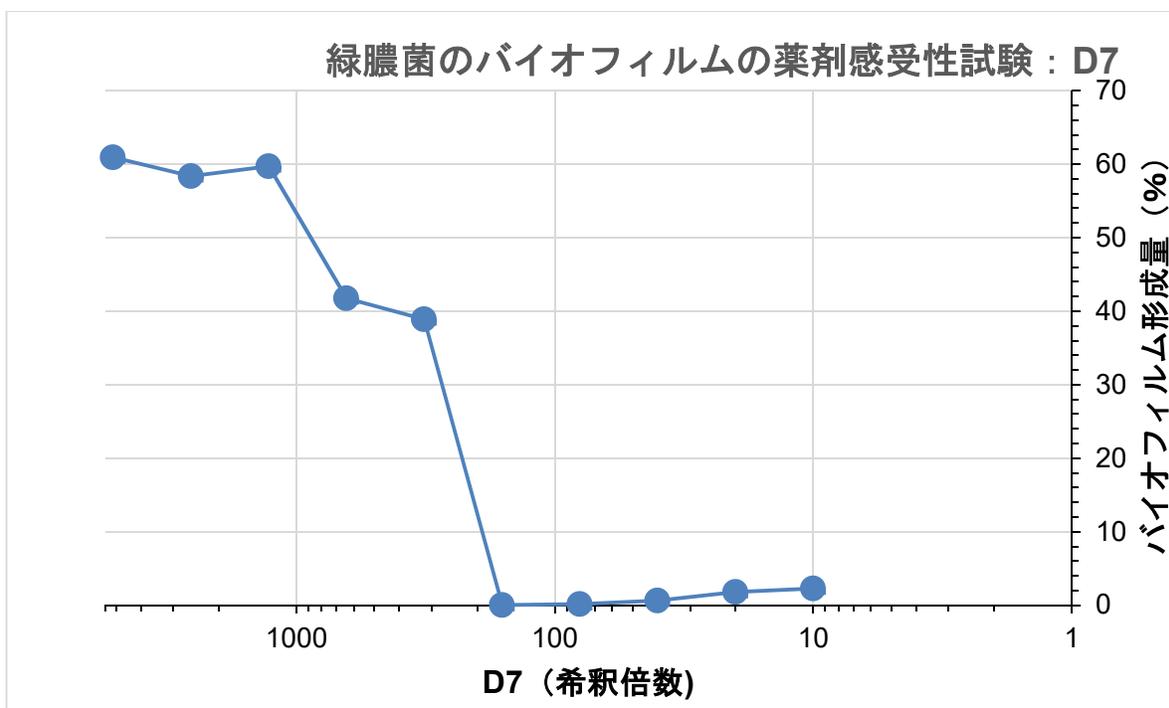
(6) (6) 96-well Plate 5、96-well Plate 6に手順 (3) の 96-peg Lid を順次浸して洗浄する。続けて 96-well Plate 7に 96-peg Lid を被せてインキュベーター内で 37 °C で培養する。

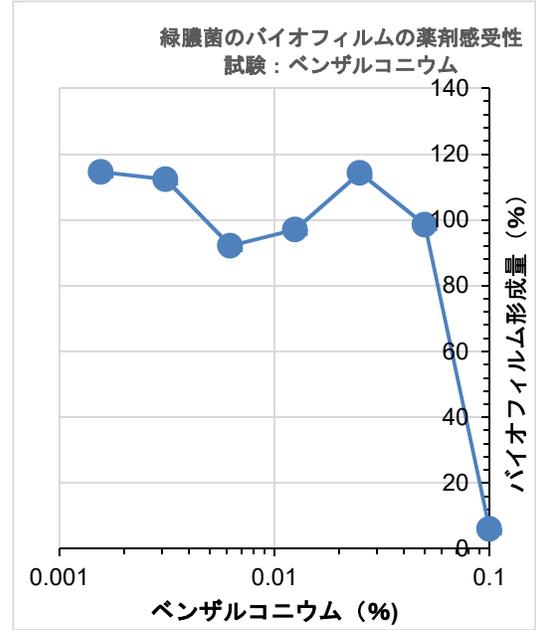
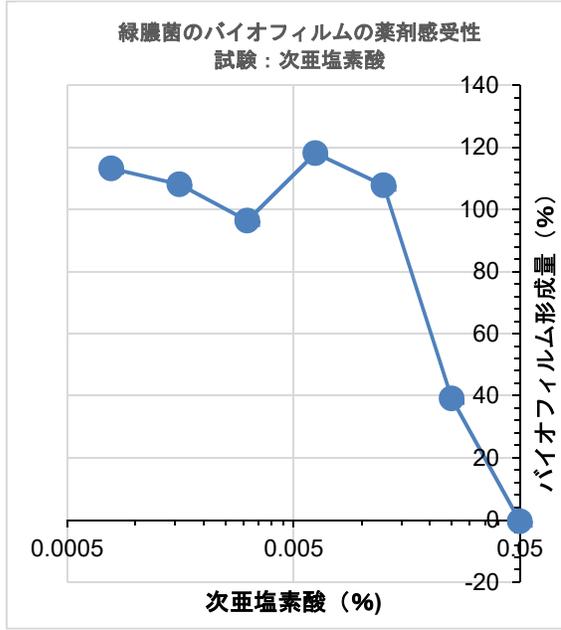
(7) 1h および 2h 後、(7) 96-peg Lid を取り外し、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定する。

結果：

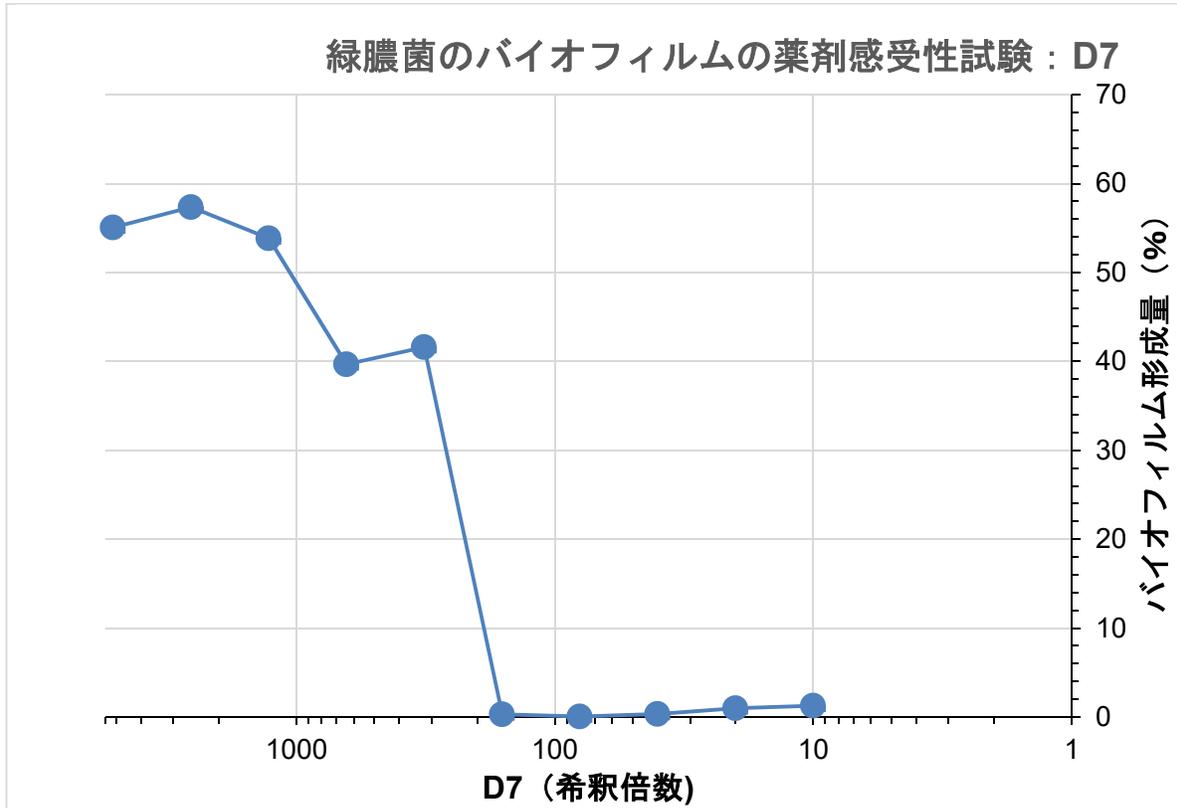
各消毒剤の緑膿菌バイオフィルムに対する殺菌効果

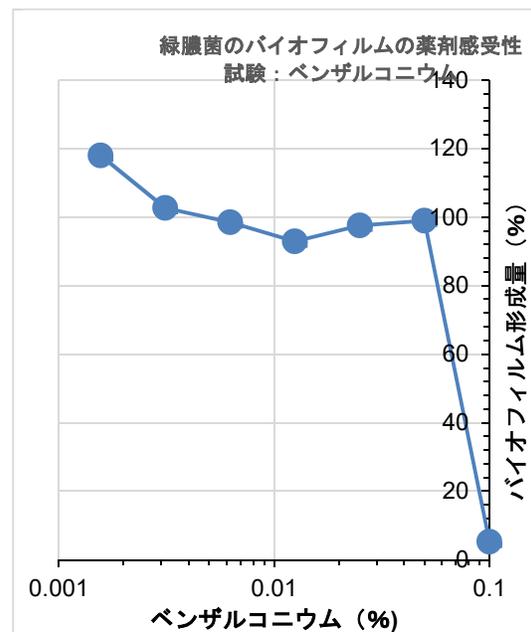
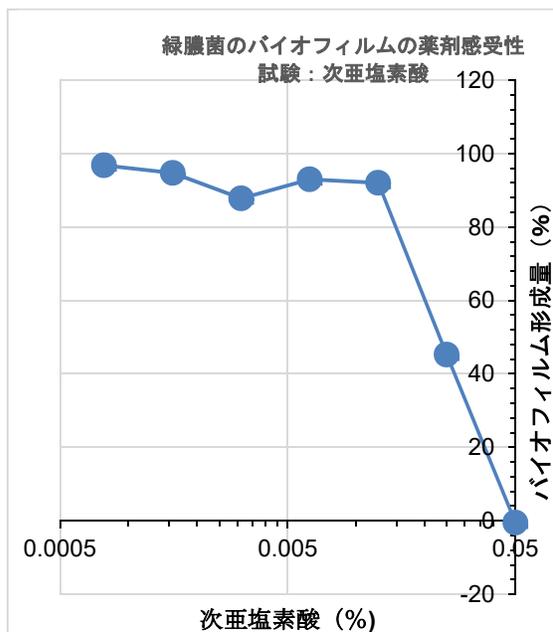
1) 発色 1 時間後





2) 発色 1 時間後





考察・結論

- ① 緑膿菌の増殖及びバイオフィルムの形成に対し、D7 が強い抑制作用を持つ。
1000 倍希釈液でも十分な抑制作用を示している。
- ② 推奨濃度の消毒剤（0.05%次亜塩素酸；0.1%ベンザルコニウム）は緑膿菌の増殖及びバイオフィルムの形成の抑制作用を示しているが、10 倍以上希釈されると、その作用が著しく減弱し、見られなくなる。
- ③ 形成した緑膿菌バイオフィルムに対して、D7 の 200 倍希釈液でも完全な殺菌効果を示した。次亜塩素酸とベンザルコニウムに関しては、推奨濃度で（0.05%次亜塩素酸；0.1%ベンザルコニウム）バイオフィルムの殺滅効果があるが、それ以下の濃度では殺菌効果がほとんど見られなかった。
- ④ これらの結果より、D7 は次亜塩素酸及びベンザルコニウムより強力な緑膿菌の増殖及びバイオフィルムの形成の抑制作用を持つ、さらに既存のバイオフィル

ムに対しても強力な殺滅効果がことが示唆される。