



Title	脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用に関する研究
Author(s)	加藤, 信行
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1585
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用
に関する研究

1976年

加藤 信 行

目 次

緒 論	1
第1章 脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用力 の比較	10
第1節 緒言	10
第2節 供試薬剤	10
第3節 実験方法	12
第4節 実験結果	14
第5節 考察	24
第6節 要約	29
第2章 脂肪酸およびそのエステルのグラム陰性 細菌に対する加熱併用効果	30
第1節 緒言	30
第2節 実験方法	31
第3節 濁度法による殺菌効果の検討	33
第4節 脂肪酸およびそのエステルの加熱併用 効果の比較	35
第5節 加熱併用効果に対する諸影響因子	35
第6節 考察	41
第7節 要約	44

第3章	脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用に 対する種々の薬剤の影響	46
第1節	緒言	46
第2節	実験方法	46
第3節	諸種薬剤の添加効果	48
第4節	薬剤併用効果に対する諸影響因子	53
第5節	各種薬剤に対するクエン酸の添加効果	57
第6節	考察	59
第7節	要約	64
第4章	薬剤併用効果の作用機構	66
第1節	緒言	66
第2節	実験方法	66
第3節	実験結果	69
第4節	考察	77
第5節	要約	82
総括		83
文献		86

緒 論

食品をはじめ医薬、医療、化粧品、農薬関係はもちろんのこと、一般工業材料の分野においても防菌防黴の目的に利用される化学薬剤は、近年その有効性より安全性について注目され、種々再検討が加えられつつある。しかしながらこれは防菌防黴の分野における化学薬剤の占めるウェイトが軽くなってきたことを示すものではなく、むしろより有効で、より安全な化学薬剤の開発が強く要望されるものである。

本研究は脂肪酸およびその簡単な誘導体の抗菌作用と安全性に着目して、その中からすぐれた抗菌物質を見出し、より有効な利用方法の基礎となる知見を得る目的をもって実施したものである。

脂肪酸はそれ自身でも天然に広く存在しているが、多くはグリセロールとのエステル、すなわちグリセライドとして動植物油脂の主成分をなしている。油脂を構成する脂肪酸は通常直鎖状、偶数炭素数、一塩基性の飽和および不飽和脂肪酸で、主成分はパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸であるが、パーム核油、ヤシ油の様にラウリン酸を多量に含むものもある。また酵母は貯蔵物質としての脂肪を細胞内に持っている。

リン脂質は動植物、微生物にわたって広く存在し、そのほとんどは細胞膜の成分として、タンパク質と複雑に結合

した生命現象の重要な担い手のひとつであって、多方面から研究が行なわれている。その構成脂肪酸としては炭素数 14, 16, 18 の直鎖状の飽和および不飽和脂肪酸が主体であるが、その他の偶数炭素数あるいは奇数炭素数の脂肪酸、さらには環式酸も含まれている。

またグラム陰性細菌の表層に分布し、抗原性と毒性を有するリポ多糖類はリピッド A と多糖類より成っている。リピッド A の構成脂肪酸としてはラウリン酸, ミリスチン酸, パルミチン酸, 3-ヒドロキシミリスチン酸等が主体を成している。

その他脂質にはスフィンゴリピド, 糖脂質, ロウ, ステロイド, テルペン, 脂溶性ビタミン等があり, 生命維持におけるそれぞれの役目を果たしている。

このように脂質は生体にとって必須のものであるが, これに化学的処理を加え種々有用な物質を得ることも古くから検討され, 工業的にも多くのものが利用されている。代表的なものはセッケンであり, これは脂肪酸のナトリウムあるいはカリウム塩である。利用されている脂肪酸は通常ラウリン酸, ミリスチン酸, パルミチン酸, ステアリン酸, オレイン酸である。また脂肪酸のアルミニウム, カルシウム, マグネシウム等との金属塩は金属セッケンといわれ, 諸工業に広く利用されている。脂肪酸低級アルコールエステルは有機合成中間体, 医薬品, 可塑剤, 化粧品, 香料などの広い用途をもっている。

また脂肪酸の多価アルコールとのエステルは非イオン性界面活性剤として広く用いられている。ポリエチレングリコールエステルは乳化剤として用いられ、ソルビタンエステル、ポリオキシエチレンソルビタンエステルはそれぞれ Span, Tween に代表される乳化剤として、医薬品、化粧品を主体に、その他にも金属工業乳化脱脂剤、農薬噴霧油、アイスクリーム用乳化剤として用いられている。グリセロールエステル、蔗糖エステルは無害な乳化剤として食品工業、化粧品、医薬品工業に広く利用されている他、食品関係洗浄剤としても用いられる。

このような脂肪酸およびその誘導体の広範囲の利用に対して、微生物との関連においては、微生物菌体成分としての研究と共に、種々の微生物に対する抗菌作用についても多くの報告がなされているし、ギ酸、酢酸、二酢酸ソーダ、プロピオン酸、ソルビン酸、カプリル酸などの如く食品をはじめとする各分野における防腐剤としても広く利用されている。

細菌に対する脂肪酸の抗菌作用については、1911年に *Pneumococci* に対するオレイン酸、リノール酸、リノレン酸の抗菌作用が見出されて以来研究の対象となり、特に1940年以降主にグラム陽性細菌に対する検討が進められてきた。1952年までの研究の推移は Nieman¹⁾ の総説にくわしく述べられている。1例として Hassinen, Durbin および Bernhart²⁾ は炭素数4から18の偶数炭素数の飽和脂肪

酸およびオレイン酸の乳酸菌，グラム陰性細菌に対する抗菌作用を検討し，乳酸菌に対してはラウリン酸，ミリスチン酸が強い抗菌作用を示すが，グラム陰性細菌に対してはいずれの脂肪酸も作用力は微弱であったと報告している。

その後の研究について主なものを挙げていくと，Camien および Dunn³⁾ は乳酸菌に対する炭素数7から24の飽和脂肪酸の抗菌作用を検討し，ミリスチン酸，パルミチン酸，ステアリン酸がほぼ同程度の強い作用を示すことを報告している。Willett および Morse⁴⁾ は合成培地中 *Streptococcus agalactiae* に対してミリスチン酸，パルミチン酸，オレイン酸，リノール酸，リノレン酸が強い抗菌作用を示すことを認めている。Shen および Freese⁵⁾ は炭素数2, 4, 6, 8, 10の飽和脂肪酸およびリノール酸の *Bacillus subtilis* に対する増殖阻害を，Freese, Shen および Galliers⁶⁾, Shen ら⁷⁾ は同様の脂肪酸に加えて安息香酸類およびパラヒドロキシ安息香酸エステルについて *B. subtilis*, *Escherichia coli* に対する増殖阻害作用を検討しているが，用いた脂肪酸の中では *B. subtilis* に対してはカプリン酸，リノール酸が強い抗菌作用を示すが，*E. coli* に対しては酢酸，酪酸，カプロン酸，カプリル酸が *B. subtilis* の場合と同等の抗菌作用を示すのに反して，カプリン酸，リノール酸では *B. subtilis* に対する抗菌作用に比較して弱いことを認めている。Eisler および Metz⁸⁾ は *Pasteurella pestis* に対するラウリン酸，ミリスチン酸の強い抗菌作用を示し，Kato および Arima⁹⁾ は *E. coli*

に対する炭素数10から18の飽和脂肪酸およびオレイン酸、リノール酸、リノレン酸の抗菌作用を合成培地中で検討し、ラウリン酸が最も抗菌作用力が強いことを認めている。また Khan および Katamay¹⁰⁾ は *Salmonella* 菌3種について各種脂肪酸の抗菌作用力を比較し、酪酸、吉草酸、カプロン酸に強い作用力のあることを報告している。Salanitra および Wegener¹¹⁾ は *E. coli* に対し合成培地中、炭素数7, 8, 9の脂肪酸に強い抗菌作用力を認め、Fay および Farias¹²⁾ は *E. coli* に対して炭素数9, 10の脂肪酸に強い抗菌作用のあることを示した。また Woolford¹³⁾ は飼料用添加剤としての脂肪酸の抗菌作用を炭素数1から12の脂肪酸を用いて検討し、pH6においてはグラム陽性細菌については炭素数の増加と共に抗菌作用力も増大するが、グラム陰性細菌については炭素数3, 6, 7の脂肪酸が有効で、炭素数が8以上になると抗菌作用力は低下すること、pH5においてはグラム陽性細菌に対してはpH6の場合と同様であるが、グラム陰性細菌については炭素数5, 6の脂肪酸が他の脂肪酸に比較して若干抗菌作用力が強いことを示している。

Shen および Freese¹⁴⁾ は *E. coli* をエチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)で処理するとカプロリン酸、リノール酸の抗菌作用が増大することを認めている。Galbraith¹⁵⁾, Galbraith および Miller¹⁶⁾ はカプロリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸が *B. megaterium*, *Micrococcus lysodeiketicus*

その他のグラム陽性細菌に対し強い殺菌作用を示すこと、これらの殺菌作用はある種の金属イオン、コレステロール等で阻害される事、および殺菌作用に及ぼす pH の影響等について報告している。

かびについては 1945 年 脂肪酸の抗かび作用¹⁷⁾が報告されて以来いくつかの研究があるが、最近の報告では Lindeberg および Lindeberg¹⁸⁾ が炭素数 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 の飽和脂肪酸について検討し、*Boletus variegatus* に対してはプロピオン酸、酪酸が特異的に強い増殖阻害作用を示すが、*Marasmius foetidus* に対しては炭素数が増すにつれて増殖阻害作用が強くなるとしている。また Teh¹⁹⁾ は *Cladosporium resinae* に対して炭素数 5 から 12 の飽和脂肪酸は増殖阻害するが、炭素数 13 から 18 の飽和脂肪酸は基質として利用されると報告している。

酵母に対する抗菌作用については Huppert²⁰⁾ が炭素数 3 から 20 の飽和脂肪酸の *Candida albicans* に対する作用を検討し、炭素数 7, 8, 9 の脂肪酸が最も抗菌作用力が強く、炭素数 6, 10, 11 の脂肪酸、炭素数 3, 4, 5 の脂肪酸の順に抗菌作用力が低下することを認めたが、他の脂肪酸は無効であったと述べている。

一方脂肪酸誘導体については Kabara ら²¹⁾、Conley および Kabara²²⁾ はグリセライド、蔗糖エステルなどの抗菌作用(静菌作用)を遊離の脂肪酸と比較し、種々のグラム陽性細菌に対しモノグリセライドはその構成脂肪酸に比べはるか

に強い抗菌作用を示すが、ジグリセライド、トリグリセライドは無効であること、モノグリセライドの中ではモノラウリンが強い作用を示しモノカプリン、モノミリスチンがこれにつぐこと、モノオレインおよびその他のモノグリセライドの抗菌作用は弱いこと、蔗糖エステルは一部のグラム陽性細菌に抗菌作用を示すことを報告している。しかしこれらの脂肪酸および脂肪酸エステルはグラム陰性細菌に対してはほとんど無効であることも認めている。Kato および Arima⁹⁾ は蔗糖モノラウレートが合成培地中において *E. coli* の増殖をラウリン酸に比べ顕著に阻害することを認めている。谷、柳 および 石田²³⁾ は火落菌に対してラウリン酸は抗菌作用を示すが、蔗糖モノラウレートは無効であったと述べている。古賀 および 渡辺²⁴⁾ はモノグリセライドの *Aspergillus oryzae*, *B. subtilis*, しょう油産膜酵母に対する抗菌作用を検討し、炭素数 3, 4, 6, 8 の飽和脂肪酸のモノグリセライドはいずれの菌についても構成脂肪酸の抗菌作用力とほぼ一致し、炭素数が増すにつれて作用力も増大することを認めている。さらにしょう油産膜酵母に対するモノカプリン、モノカプリンの抗菌作用についての報告がある。^{25~27)}

本研究は脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用特性をさらに明確にして、抗菌剤としての利用のための基礎を確立することを目的にしたものであり、炭素数 6 から 18 の飽和脂肪酸およびそれぞれのモノグリセライド、蔗糖エステル

を供試して、代表的な微生物に対する抗菌作用力を検討すると共に、熱あるいは薬剤併用によりさらに広い抗菌スペクトルを見出し、その作用機構について詳細な検討を行った。本研究で得られた成果は次の様である。

第1章においては検討した28種類の飽和脂肪酸、グリセライド、蔗糖エステルのうち、かび、酵母に対してはカプリン酸、モノカプリン、モノラウリンが、グラム陽性細菌に対しては蔗糖ジカプリレート、モノカプリン、モノラウリンが強い抗菌作用を示し、これらの作用は汎用されている抗菌剤に比べて何ら遜色のないことを明らかにした。さらにモノカプリン、モノラウリンが *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* に対して強い殺菌、溶菌作用を有することを見出した。しかしグラム陰性細菌に対してはいずれも従来からの知見と同様抗菌作用力は微弱であった。

第2章においてはグラム陰性細菌に対し抗菌作用力の微弱な脂肪酸およびそのエステルのうち、モノカプリン、ラウリン酸、モノラウリンは *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* その他のグラム陰性細菌に対しそれ自体では殺菌効果の少ない温和な加熱処理（例えば50℃, 5分間の処理）により顕著な死滅促進効果のあることを見出した。

第3章においてはモノグリセライド、蔗糖エステルが EDTA, クエン酸, ポリリン酸などの添加により *E. coli* に対して顕著な殺菌作用を示すことを見出した。そのうちモノラウリンの場合には無菌水中30℃, 60分の処理によって

10^{-6} の生菌数低下がみられた。そしてこの殺菌作用は処理温度、pHの影響を強く受けることを認めた。モノグリセライドとクエン酸あるいはポリリン酸の組合せによる殺菌作用は *E. coli* に対して最も強く、*Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* がこれにつき、*Ps. aeruginosa* は薬剤併用による殺菌作用に対し最も抵抗性が強かった。

また *E. coli* に対するクエン酸の添加効果はエリスロマイシン、タイロシンに対しても顕著に認められると共に、さらにまたラウリル硫酸ナトリウム(SLS)、ドデシルジアミノエチルグリシン(テゴー51)に対しても見出された。

第4章においてはこのようなクエン酸の添加効果は現象的にはEDTAのそれと類似するところが多く、モノラウリンの細胞内移行性が増進されたものと予想されたが、これはクエン酸の添加によりモノラウリンの *E. coli* 菌体内取りこみ(あるいは吸着)の増大すること、モノラウリンはそれ自身では *E. coli* 菌体へのアミノ酸取りこみ阻害効果はないがクエン酸との併用によりこれを顕著に阻害すること、ならびに *E. coli* をクエン酸処理すると薬剤透過の障壁と考えられているリポ多糖類が漏洩することより立証された。

第1章 脂肪酸およびそのエステルの特菌作用力の比較

第1節 緒言

本研究開始にあたり、供試薬剂(脂肪酸およびそのエステル)の特菌作用力を比較する目的で代表的な微生物(かび、酵母、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌)に対する作用力を検討した。これらの薬剂はグラム陰性細菌に対しては特菌作用力微弱であったが、その他の微生物に対してはかなり強い作用を示したので、代表的な薬剂についてグラム陰性細菌以外の微生物に対する特菌剂としての利用のための基礎的な検討を行った。

第2節 供試薬剂

Table 1. Fatty acids and their esters.

Abbreviation	Drug	Abbreviation	Drug
C ₆	Caproic acid	SMC ₁₂	Sucrose monolaurate
MC ₆	Glycerol monocaproate	SDC ₁₂	Sucrose dilaurate
SMC ₆	Sucrose monocaproate	C ₁₄	Myristic acid
SDC ₆	Sucrose dicaproate	MC ₁₄	Glycerol monomyristate
C ₈	Caprylic acid	SMC ₁₄	Sucrose monomyristate
MC ₈	Glycerol monocaprylate	SDC ₁₄	Sucrose dimyristate
SMC ₈	Sucrose monocaprylate	C ₁₆	Palmitic acid
SDC ₈	Sucrose dicaprylate	MC ₁₆	Glycerol monopalmitate
C ₁₀	Capric acid	SMC ₁₆	Sucrose monopalmitate
MC ₁₀	Glycerol monocaprato	SDC ₁₆	Sucrose dipalmitate
SMC ₁₀	Sucrose monocaprato	C ₁₈	Stearic acid
SDC ₁₀	Sucrose dicaprato	MC ₁₈	Glycerol monostearate
C ₁₂	Lauric acid	SMC ₁₈	Sucrose monostearate
MC ₁₂	Glycerol monolaurate	SDC ₁₈	Sucrose distearate

本研究で用いた脂肪酸およびそれぞれのエステルを Table 1 に示した。

脂肪酸はいずれも半井化学の試薬特級品（純度 99% 以上）であり，脂肪酸モノグリセライドは理研ビタミン油株式会社より提供されたものである（グリセロールモノカプロレート 95.4%，その他はいずれも 99% 以上の純度のものである）。

蔗糖エステルは Osipow らの方法²⁸⁾によって合成したもの（蔗糖カプロレート，カプリレート，カプレート，ラウレート）および第一工業製薬株式会社より提供されたもの（蔗糖ミリステート，パルミテート，ステアレート）を大竹および玉手の方法²⁹⁾によりモノエステルとジエステルに分離精製して用いた。

これらの合成は蔗糖と脂肪酸メチルエステルをジメチルホルムアミドに溶解させ，触媒として炭酸カリウムを添加し，減圧下で 90~95℃，9~10 時間反応させると，脂肪酸蔗糖エステルの混合物が得られる。ジメチルホルムアミド除去後，アセトンを用いてエステルを抽出する。

精製法はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い，展開，溶出溶媒としてクロロホルム，メタノール-クロロホルム（5:95，8:92，20:80），ジメチルホルムアミドを用いた。蔗糖ジエステルはメタノール-クロロホルム（8:92）で溶出され，蔗糖モノエステルはメタノール-クロロホルム（20:80）で溶出されることが報告されているので，これと同様

の手法でモノエステル，ジエステル区分を得た。

なお精製品の純度判定は木下³⁰⁾の薄層クロマトグラフィー法を採用し，展開溶媒としてクロロホルム-メタノール-酢酸-水(80:10:8:2)を用い，硫酸で発色させた。この方法に従うと蔗糖モノエステルは R_f 0.1，ジエステルは R_f 0.2～0.4であると報告されているが，カラムクロマトグラフィーで分離したモノエステル，ジエステルの薄層クロマトグラフィーでの R_f が上記文献値と一致したのでそれ以上の同定のための試験は行なわなかった。

蔗糖エステルはモノ体，ジ体ともに数種の異性体の混合物の可能性があるが，異性体の分離は行なわずに抗菌試験に供した。しかし蔗糖ジカプリレートのみカラムクロマトグラフィーで上記溶媒を用い再分画し，薄層クロマトグラフィーで判定した結果3種の異性体(R_f 0.4, 0.25, 0.2)を分離し， R_f の大きい順にSDC₈-1, SDC₈-2, SDC₈-3として抗菌試験に供した。これらの異性体がジエステルであることは R_f 値より明らかであるが，エステルの位置についての同定は行っていない。

その他の試薬はいずれも市販品を用いた。

第3節 実験方法

抗菌作用力は常法による希釈法(寒天あるいは液体培地を用いた)によって測定した。供試菌は *Asp. niger* ATCC 1015, *Penicillium citrinum* 2125, *Can. utilis* 6020, *Saccharomyces*

Ceriseis 7180, *B. subtilis* var. *niger* 4380, *B. cereus* 8361, *M. lysodeikticus* 8338, *Staph. aureus* 209P, *E. coli* K-12, *Ps. aeruginosa* 8135 であるが、これらはすべて教室保存菌株である。

前培養および作用力検定培地としては、細菌に対しては肉エキス 0.5%, ペプトン 1%, 食塩 0.5% 培地 (pH 7.0) を、かび、酵母に対しては Czapek-Dox 培地に酵母エキス、ペプトンをそれぞれ 0.25% 添加した培地 (pH 5.6) を用いた。

寒天培地での希釈法では寒天斜面培地上でかび、酵母は 30°C, 48 時間、細菌は 37°C, 24 時間前培養し、これより 2~3 白金耳の細胞を所定量の無菌水に浮遊させ (650 nm での吸光度 (OD) 0.1~0.2), この 1 白金耳を試験薬剤を含む寒天培地に劃線した後、かび、酵母は 30°C, 48 時間、細菌では 37°C, 24 時間後の発育の有無より最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

液体培地での希釈法では、所定量の薬剤を含む培地 (L 字管) に、24 時間前培養 (振盪培養) した菌を一定量接種し (約 10^6 細胞/ml), 適温, 24 時間振盪培養した後の OD より MIC を求めた。

無菌水中での殺菌作用力の測定では、*Staph. aureus* の 24 時間培養後の細胞を用い、この細胞の無菌水懸濁液 (650 nm での OD 0.12) に所定量の薬剤を添加し 30°C, 60 分間処理した。処理後の生菌数は常法による平板培養法 (肉エキス-ペプトン寒天培地 (pH 7.0), 37°C, 24 時間培養後のコロニー

数測定)により求めた。

また栄養培地中での殺菌(溶菌)作用はL字管中で発育している菌に薬剤を所定量添加し、OD(650nm)の測定により検討した。

第4節 実験結果

a) 脂肪酸およびそのエステルの静菌作用力の比較

先ず供試脂肪酸およびエステルの抗菌作用力を比較する目的で、かび(2菌種)、酵母(2菌種)、グラム陽性細菌(4菌種)、グラム陰性細菌(2菌種)について、寒天および液体培地を用いた希釈法により検討を加えた。

Table 2 はかび、酵母に対する結果である。寒天培地ではカプリル酸、カプリン酸、グリセロールモノカプレート(モノカプリン)、グリセロールモノラウレート(モノラウリン)に強い抗菌作用が認められた。また液体培地における抗菌作用力と比較すると、カプリル酸、カプリン酸およびこれらのエステルはほぼ同等の抗菌作用を示したが、ラウリン酸、モノラウリンは液体培地中の方が寒天培地より強い作用を示した。

Table 2. Comparison of antifungal activities of fatty acids and their esters.

Drug	MIC (mM)				
	By agar method			By broth method	
	<i>A.niger</i>	<i>P.citrinum</i>	<i>C.utilis</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.utilis</i>
C ₆	> 2		> 2	> 2	
MC ₆	> 2		> 2	> 2	
SMC ₆	> 2		> 2	> 2	
SDC ₆	> 2		> 2	> 2	
C ₈	> 2	2	2	1	2
MC ₈	> 2	2	> 2	> 2	> 2
SMC ₈	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
SDC ₈	> 2	2	> 2	> 2	> 2
C ₁₀	1	1	1	0.5	1
MC ₁₀	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
SMC ₁₀	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
SDC ₁₀	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
C ₁₂	> 2	> 2	> 2	> 2	1
MC ₁₂	0.5	0.5	0.25	0.5	0.063
SMC ₁₂	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
SDC ₁₂	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
C ₁₄	> 2		> 2	> 2	
MC ₁₄	> 2		> 2	> 2	
SMC ₁₄	> 2		> 2	> 2	
SDC ₁₄	> 2		> 2	> 2	
C ₁₆	> 2		> 2	> 2	
MC ₁₆	> 2		> 2	> 2	
SMC ₁₆	> 2		> 2	> 2	
SDC ₁₆	> 2		> 2	> 2	
C ₁₈	> 2		> 2	> 2	
MC ₁₈	> 2		> 2	> 2	
SMC ₁₈	> 2		> 2	> 2	
SDC ₁₈	> 2		> 2	> 2	

MIC: Minimum inhibitory concentration

Table 3は細菌に対する結果を示したものである。

Table 3. Comparison of antibacterial activities of fatty acids and their esters.

Drug	MIC (mM)				
	By agar method				By broth method
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>M. lysodeikticus</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
C ₆	> 2	> 2		> 2	
MC ₆	> 2	> 2		> 2	
SMC ₆	> 2	> 2		> 2	
SDC ₆	> 2	> 2		> 2	
C ₈	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
MC ₈	2	2	1	2	2
SMC ₈	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
SDC ₈	0.125	0.125	0.125	0.125	0.5
C ₁₀	2	2	2	> 2	> 2
MC ₁₀	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
SMC ₁₀	> 2	> 2	1	> 2	> 2
SDC ₁₀	> 2	0.5	0.125	> 2	> 2
C ₁₂	> 2	> 2	> 2	> 2	0.5
MC ₁₂	0.063	0.063	0.063	0.063	0.063
SMC ₁₂	2	2	0.5	> 2	> 2
SDC ₁₂	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
C ₁₄	> 2	> 2		> 2	
MC ₁₄	0.5	0.5		> 2	
SMC ₁₄	> 2	> 2		> 2	
SDC ₁₄	> 2	> 2		> 2	
C ₁₆	> 2	> 2		> 2	
MC ₁₆	> 2	> 2		> 2	
SMC ₁₆	> 2	> 2		> 2	
SDC ₁₆	> 2	> 2		> 2	
C ₁₈	> 2	> 2		> 2	
MC ₁₈	> 2	> 2		> 2	
SMC ₁₈	> 2	> 2		> 2	
SDC ₁₈	> 2	> 2		> 2	

寒天培地ではグリセロールモノカプリレート(モノカプリリン), カプリン酸, 蔗糖ジカプリレート, 蔗糖モノラウレート, グリセロールモノミリステート(モノミリスチン)に弱い抗菌作用がみられ, 蔗糖ジカプリレート, モノカプリリン, モノラウリンにはかなり強い抗菌作用が認められた。この場合液体培地中での結果とほとんど一致するが, 蔗糖ジカプリレートは寒天培地の方が強い抗菌作用力を示し, ラウリン酸はこれと逆の結果が得られた。

グラム陰性細菌(*E. coli*, *Ps. aeruginosa*)に対しても同一条件で検討を加えたが, 2 mM 濃度でほとんど阻害効果は認められなかった。

なお細菌に対してかなり強い抗菌作用力を示した蔗糖ジカプリレートについては, 3種の異性体を分離し(薄層クロマトグラフィーでのR_f値の大きいものから順にSDC₈-1, SDC₈-2, SDC₈-3とした), Table 3に示した4種の試験細菌に対する抗菌作用力を比較したのがTable 4である。

Table 4. Comparison of antibacterial activities of SDC₈ isomers.

Drug	MIC (mM)*			
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>M. lysodeikticus</i>	<i>Staph. aureus</i>
SDC ₈ (mixture)	0.125	0.125	0.125	0.125
SDC ₈ -1	0.25	0.125	0.125	0.125
SDC ₈ -2	0.125	0.125	0.25	0.125
SDC ₈ -3	0.125	0.125	0.125	0.125

* by agar method

各異性体の抗菌作用力は混合物のそれと大差なく、エステル
 の位置による抗菌作用力の差はほとんどないものと考え
 られる。

以上の試験結果より抗菌作用力の強いもの2,3種を選び、
 食品防腐剤として、さらにまた化粧品その他の分野におい
 ても広く利用されているパラオキシ安息香酸ブチル(BpHB)、
 デヒドロ酢酸(DHA)、ソルビン酸(SA)等の抗菌剤と希釈
 法(寒天培地)により抗菌作用力を比較した結果がTable
 5,6である。モノカプリン, モノラウリンはすべての供試
 菌に対して, BpHBなどの一般抗菌剤と同等ないしはそれ以
 上の抗菌作用力を示し, 蔗糖ジカプリレートもグラム陽性細
 菌に対してはこれらに匹敵するMICを示すことが明らかと
 なった。

Table 5. Comparison of antifungal activities of fatty acid
 esters with some commonly used preservatives.

Drug	MIC (mM)*		
	<i>A. niger</i>	<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
MC ₁₀	0.5 (123)**	0.5	0.5
MC ₁₂	0.5 (137)	0.25	0.5
BpHB	1.0 (200)	1.0	1.0
SLS	0.35 (100)	1.4	0.35
SA	8.9(1,000)	8.9	8.9
DHA	0.6 (100)	1.2	1.2

BpHB: butyl p-hydroxybenzoate, SLS: sodium lauryl sulphate,
 SA: sorbic acid, DHA: dehydroacetic acid

* by agar method

** µg/ml

Table 6. Comparison of antibacterial activities of fatty acid esters with some commonly used preservatives.

Drug	MIC (mM)*		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Staph. aureus</i>
SDC ₈	0.125 (74)**	0.125	0.25
MC ₁₀	0.5 (123)	0.5	0.5
MC ₁₂	0.063 (17)	0.063	0.063
BpHB	2.0 (400)	1.0	1.0
SLS	0.35 (100)	0.35	0.18
SA	35.7 (4,000)	35.7	35.7

* by agar method

** µg/ml

これらの結果よりモノラウリン, モノカプリン, 蔗糖ジカプリレートは抗かび剤あるいは抗細菌剤としてすぐれた薬剤ということができる。

b) 脂肪酸およびそのエステルの静菌作用に対する影響因子

これら脂肪酸エステルの実用にあたっては, 色々の作用環境条件の影響を検討しておく必要がある。そこで C₁₂化合物について *B. subtilis* を試験菌として抗菌作用に対する pH の影響を検討した結果が Table 7 である。

ラウリン酸では従来からいわれているように pH の影響が顕著であって, pH 7 の場合に比べて, pH 6 で 4 倍, pH 5 では 30 倍も抗菌力が増強されたが, モノラウリンや蔗糖モノラウレートでは pH 6, 7, 8 の範囲においていずれも同程度の抗菌作用力を示した。しかし pH 5 では両者とも作用力の増大

することが認められた。

Table 7. Effect of pH on antibacterial activities of C₁₂ compounds towards *B. subtilis*.

pH	MIC (mM)*		
	C ₁₂	MC ₁₂	SMC ₁₂
5	0.016	0.032	0.25
6	0.125	0.063	>2
7	0.5	0.063	>2
8	>1.0	0.063	>2

* by broth method

次に蔗糖ジカプロレート, モノカプリン, モノラウリンのグラム陽性細菌に対する抗菌作用に対する食品成分などの共存の影響を検討した結果が Table 8, 9, 10 である。

Table 8. Effect of food constituents on antibacterial activity of SDC₈.

Additive	MIC (mM)*		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Staph. aureus</i>
Control	0.125	0.125	0.125
1% corn starch	0.125	0.125	0.125
1% wheat flour	0.25	0.25	0.25
1% gelatine	0.125	0.125	0.125
1% albumin	0.5	0.5	0.5
0.1% Tween 20	1	1	1
0.1% MC ₁₈	1	0.25	>1

* by agar method

蔗糖ジカプロレートでは, でん粉, 小麦粉, ゼラチンの影響はほとんどないが, アルブミン, モノパルミチン, Tween 20の存在により抗菌作用力がかなり低下することが見出された。

Table 9. Effect of food constituents on antibacterial activities of MC₁₀.

Additive	MIC (mM)*		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Staph. aureus</i>
Control	0.5	0.5	0.5
1% corn starch	1	>1	1
1% wheat flour	1	>1	1
1% gelatine	0.5	0.5	0.5
1% albumin	1	>1	1
0.1% Tween 20	1	1	1
0.1% MC ₁₆	0.5	1	0.5

* by agar method

Table 10. Effect of food constituents on antibacterial activities of MC₁₂.

Additive	MIC (mM)*		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Staph. aureus</i>
Control	0.063	0.063	0.063
1% corn starch	1	1	1
1% wheat flour	1	1	1
1% gelatine	0.125	0.125	0.125
1% albumin	1	1	1
0.1% Tween 20	0.5	0.5	0.5
0.1% MC ₁₆	1	>1	1

* by agar method

モノカフ⁰リンではゼラチン，モノパルミチンの影響は少ないが，その他のものは抗菌作用力を低下させ，モノラウリンではゼラチン以外のものはすべて作用力を低下させることが明らかとなった。これらの結果より共存物質の影響は蔗糖エステルに比べてモノグリセライドの方が大きく，実用上相当問題になるものと予想される。

またモノラウリンの作用力がモノパルミチンの共存によ

り大きく低下することはモノラウリンの純度が問題となることを示唆している。事実ここで使用しているモノラウリンは純度99%以上のものであるが、市販の試薬1級品（純度40~50%）の作用力を測定するときモノラウリン含有量から考えられる以上に低下していることが認められた。（例えば *B. subtilis* に対する抗菌作用において高純度のものの MIC 0.063 mM に対し低純度のもののそれは 0.25 mM であった。）以上の結果より、モノグリセライド製剤の実用に当っては純度と共に不純物の影響について十分考慮しておく必要がある。

また蔗糖ジカプリレートがでん粉、小麦粉、ゼラチン共存の影響が少ないことは実用上好ましく、すぐれた抗菌剤ということができよう。

C) 脂肪酸およびそのエステルの殺菌作用

以上脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用特性を明らかにするために、静菌作用力の比較を行ったが、次にこれらの化合物のうち作用力の強いものを選び、*Staph. aureus* に対する殺菌作用力を検討し、得られた結果を Table II に示した。

モノカプリン、モノラウリンは MIC においても相当強い殺菌作用を示し、30°C、60分処理で、前者で 10^{-5} 以下、後者で 10^{-3} の生菌数低下が認められた。しかし同じ作用条件下でラウリン酸、蔗糖ジカプリレートでは殺菌効果は微弱であ

た。

Table 11. Comparison of bactericidal activities of four fatty acid derivatives toward *Staph. aureus*.

Drug	Concentration (mM)	Viable counts/ml
—	—	1.6×10^8
SDC ₈	1	3.9×10^7
	0.5*	6.8×10^7
MC ₁₀	1	$10^3 >$
	0.5*	$10^3 >$
	0.25	2.4×10^8
C ₁₂	1	3.2×10^7
	0.5*	7.5×10^7
MC ₁₂	0.5	1.0×10^4
	0.25	2.3×10^4
	0.125*	1.6×10^5
	0.063	1.3×10^7

The cells were treated in distilled water at 30°C for 60 min and platecounted.

* MIC of drug by broth method

Table 11の結果は単純な系での休止細胞についての殺菌効果を比較したものであるが、増殖可能な栄養培地中での経過を *B. subtilis* について OD の測定によって検討した結果のうち、モノラウリンの場合を示したのが Fig. 1 である。

OD 0.01, 0.1, 0.6, 1.0, >1.0 の各時点で MIC (0.063 mM) あるいはその倍濃度のモノラウリンを添加した場合、速かな溶菌現象が観察されたが、薬剤感受性は培養経過の進行と共に低下した。この場合、薬剤添加後 1 時間での生菌数は 10^{-2} ないし 10^{-3} 低下していることを確認した。

このような溶菌現象はモノラウリンに限らず、ラウリン酸 (0.5 mM)、モノカプリン (0.5 mM)、蔗糖ジカプリレート (0.5 mM) においても Fig. 1 の No. 6 と同様の経過を示すことを認

めた。

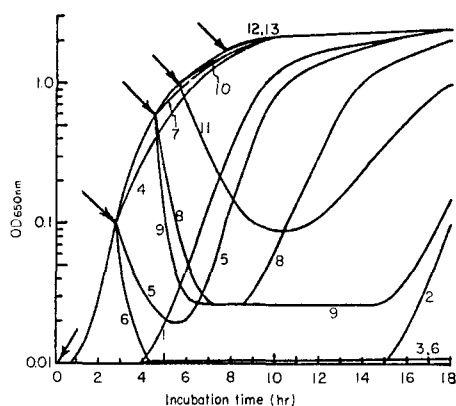


Fig. 1. Effect of MC_{12} added at different growth phases of *B. subtilis*. The OD was measured with an automatic growth recording apparatus (Bio Scanner OT-BS-12, Otake). The time of addition (indicated by the arrows) and the concentration of MC_{12} are as follows:

No of curve	OD of the time of addition	Conc. (mM)
1	0.01	0.032
2	0.01	0.048
3	0.01	0.063
4	0.1	0.032
5	0.1	0.048
6	0.1	0.063
7	0.6	0.063
8	0.6	0.094
9	0.6	0.125
10	1.0	0.094
11	1.0	0.125
12	>1.0	0.125
13	—	—
(control)		

第5節 考 察

この章では、抗菌性と安全性の点より抗菌剤としての実用化が期待されている脂肪酸誘導体の抗菌作用特性を詳細に検討するに当り、この系列の多数の化合物のうちより作

用力の強いものを選択することを目的に行った。

一般に飽和脂肪酸ではかび，酵母に対しては炭素数8ないし10のもの，グラム陽性細菌に対しては炭素数10ないし12のものが最高の抗菌力を有するといわれている。

本研究においても供試菌に対して同様の傾向のあることを認めるとともに，一般にエステルの方がもとの酸よりも抗菌作用力が強く，モノカプリンがかび，酵母に対して最も強く，モノラウリンもこれに劣らない作用力をもっていることを見出した。

グラム陽性細菌に対してはモノラウリンが最も強く，モノカプリンに比べて蔗糖ジカプリレートがかなり強い作用力をもっていることを見出した。グリセライドについては，Kabaraら²¹⁾，ConleyおよびKabara²²⁾の報告と一致する点が多いが，蔗糖エステルについては，特にそれぞれモノ体とジ体とに分離して検討すると共に，作用力の強い蔗糖ジカプリレートについては，さらに3つの異性体を分離して検討を加えた。その結果，蔗糖エステルの抗菌作用力は，脂肪酸の炭素数に依存してモノ体の方が強いもの，逆にジ体の方が強い作用力をもつもののあることを認め，さらに蔗糖カプリレートではジ体の異性体ではほとんど作用力に相違のないことを明らかにした。

このような蔗糖エステルの抗菌作用と構造との関係，あるいは脂肪酸エステルがもとの脂肪酸より作用力が強いことについての理由は明らかにされていないが，物理化学的

な要因により決まる菌体への吸着あるいは取り込みの相違によるものと予想される。例えば脂肪酸に比べてそのモノグリセライドが抗菌作用力が強く、ジグリセライド、トリグリセライドにその作用がないのは、モノグリセライドが菌体への作用に適した親水・親油性バランスを持っているためであると予想されるが、その詳細は明らかでない。

蔗糖ジカプリレート、ラウリン酸、モノラウリンについて寒天培地と液体培地での抗菌作用力にかなりの差があることが認められ興味を持たれるが、その理由は明らかでなく（菌の接種量、寒天の影響、酸素の影響等が考えられるが、薬剤の種類により抗菌力の強くなる培地が変ることの適切な説明にはならない）今後検討の要がある。

Table 5, 6 に示したように脂肪酸エステルは広く抗菌剤として利用されているパラオキシ安息香酸ブチル、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、ラウリル硫酸ソーダと同等ないしはそれ以上の抗菌作用力をもっていることを明らかにした。しかし実用的見地よりみて種々予想される共存成分の影響を検討しておく必要がある。食品成分などの共存によって作用力の低下することは一般の抗菌剤にみられる現象であるが、モノグリセライドの抗菌作用力がでん粉、蛋白質によって拮抗されることは注目すべき問題であるし、またモノパルミチン添加によってモノラウリンの作用力の低下する事実はモノグリセライドの純度と抗菌力との関連において注目すべき問題である。

脂肪酸エステルは現在低毒性食品防腐剤として広範囲に適用研究が試みられているが、未だ実用の域に到達していない。その原因のひとつとして考えられるのが本実験で示した共存物の影響を受けやすい点であって、そのために十分適用範囲を選択する必要があるだろう。例えば比較的単純な系で共存物の影響が少ないと予想される分野への適用が期待されている。

また一方化粧品品の防菌防黴問題は食品の場合以上に重要な問題であり、低毒性防腐剤としてパラオキシ安息香酸エステル、ソルビン酸等が用いられているが、より安全で、より有効なものの開発が望まれている。本研究で検討した脂肪酸エステルはその抗菌作用力、毒性その他の物性の点からみて十分適用試験を行なう価値がある。

Galbraithら¹⁵⁾は脂肪酸類の*B. megaterium* などに對する殺菌作用について検討し、例えば*B. megaterium* に対してラウリン酸 0.5~1.0 mM でかなり強い殺菌効果を認めているが、供試菌種により作用力が変動することも示している。

本研究では *Staph. aureus* を供試してラウリン酸を対照としてモノカプリン、モノラウリン、蔗糖ジカプリレート
の殺菌力を比較した。その結果、モノグリセライドのみ MIC 附近の濃度においても強い殺菌効果を示すことを見出し、また増殖培地中でも相当の殺菌、溶菌効果のあることを認めた。これらの知見は今後作用機構を検討する上に有力な情報となるものと考えられる。

さらにまたその殺菌作用力は実用面で多くの利用が考えられ、脂肪酸エステルが元来持っている界面活性剤としての作用と合わせて、野菜、果実、肉、魚等の洗浄殺菌剤として、あるいは食品工場における環境衛生用殺菌剤、医療関係においては医療器具消毒、患部洗浄、手指の消毒、消毒用軟こう、家庭における食器洗浄、手指、皮膚の消毒が考えられる。

脂肪酸およびそのエステルはその他農業用殺菌剤、木材、繊維、塗料への適用も過去の研究および本章で得た知見を基にすれば十分応用研究する価値ある抗菌剤ということができる。

グラム陰性細菌は加熱、放射線、紫外線に対しては感受性が大であるが、化学薬剤に対しては抵抗性の高いものが大部分である。しかし実際に防菌防黴の立場よりグラム陰性細菌はきわめて重要な対象であり、防菌防黴の目的に利用される薬剤はこれらに対しても強力な抗菌作用をもつことが望ましい。しかし現在有効で低毒性の薬剤はほとんど見当たらない。本研究で用いた脂肪酸およびそのエステルも従来からいわれているようにほとんどみるべき抗菌作用を示さない。しかし何らかの方法を併用して抗菌作用力が発現できれば防菌防黴剤として、より広範囲への利用が期待できよう。

第6節 要約

脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用力を比較して、これらのものの抗菌剤としての有用性を見出す目的で、炭素数6より18の飽和脂肪酸、それぞれのモノグリセライド、蔗糖エステル28種類を用いて抗菌作用力を比較検討した。

その結果、かび、酵母に対してはカプリン酸、モノカプリン、モノラウリンが、グラム陽性細菌に対しては蔗糖ジカプリレート、モノカプリン、モノラウリンが強い抗菌作用力を有していることを認めた。しかもこれらの作用力は汎用されている抗菌剤に比べて何ら遜色のないことを明らかにした。エステル類の抗菌作用力は環境pHによって変動は少なかったが、でん粉、アルブミン、Tween 20、モノパルミチンによって拮抗されることを認めた。

供試薬剤はグラム陰性細菌に対してはいずれも抗菌作用は微弱であった。

静菌作用力の最も強いモノカプリン、モノラウリン、蔗糖ジカプリレート、ラウリン酸については、*Staph. aureus*、*B. subtilis* を用いて殺菌作用を検討し、モノカプリン、モノラウリンが強い殺菌、溶菌作用力を有することを見出した。

第2章 脂肪酸およびそのエステルのグラム陰性細菌に対する加熱併用効果

第1節 緒言

グラム陰性細菌は食品，医療，化粧品などをはじめ多くの分野で問題となっている有害菌であって，加熱，放射線，紫外線に対し他の微生物に比べて感受性が高いことを利用した殺菌防腐法がある。しかしこれらの利用できない分野，ことに二次汚染の防止のためには化学薬剤による方法が最も好ましい。現在この目的に利用できる低毒性の薬剤は見当らない。

脂肪酸およびそのエステルのグラム陰性細菌に対する抗菌作用については過去に若干検討されている。栄養培地においてはカプロン酸までの短鎖の脂肪酸は鎖長が長くなるにつれて抗菌作用力を増すが，炭素数8以上の中鎖ないし長鎖の脂肪酸では作用力は微弱であるとされている。^{14, 21)}

しかしグラム陰性細菌のうち *Pasteurella pestis* はラウリン酸，ミリスチン酸に対して感受性が高いことが報告されている。⁸⁾

合成培地中においては *E. coli* に対する中鎖(炭素数7, 8, 9, 10, 12)の脂肪酸が強い抗菌作用を示すことが認められているが，^{9, 11, 12)} 最大の抗菌力を示す脂肪酸の炭素数は報告により若干異っている。なお合成培地中 *E. coli* に対する蔗糖モノラウレートの高い抗菌作用も報告されている。⁹⁾ しかし一

般に各種グラム陰性細菌に対して脂肪酸およびそのエステルは栄養培地中でほとんど抗菌作用を示さないといえる。

本章においてはかび，酵母，グラム陽性細菌に対して強力な抗菌作用力を示す脂肪酸およびそのエステルについて，加熱併用によるグラム陰性細菌に対する抗菌作用を検討し，第3章においては薬剤併用による影響について検討した。

加熱による殺菌法はきわめて有効な手段であり広く利用されているが，熱感受性材質など加熱処理をきらう場合，二次汚染の恐れのある場合などにおいては他の手段との併用あるいは全く他手段にたよらざるをえない。このような場合を考慮し，加熱と他の殺菌，防腐手段の併用研究がひろく行なわれてきた。

本章では脂肪酸およびそのエステルの実用上問題となる可能性のある代表的な各種グラム陰性細菌に対する加熱併用効果を検討し，実用面への適用のための基礎資料を得ることを目的として行った。

第2節 実験方法

a) 供試薬剤

供試した薬剤は Table 1 の脂肪酸およびそのエステルの内の15種である。

b) 加熱処理

供試菌として教室保存の *E. coli* K-12, *Ps. aeruginosa* 8135, *Ser. marcescens* 8260, *Pr. vulgaris* 8102, *Sal. typhimurium*

DB21 (MIT) を用いた。

肉エキス 0.5%, ペプトン 1%, 食塩 0.5% 寒天培地 (pH 7.0) で 37°C, 24 時間培養した細胞を適当量の無菌水中に懸濁し (650nm での OD 0.1 ~ 0.15, 生菌数約 10^8 cells/ml), こゝに薬剤を加えて, 主として 50°C, 5 分加熱処理した。

この処理液を肉エキス・ペプトン培地に 2% となるように植菌し, 37°C で微生物自動発育記録装置 (Bio Scanner OT-BS-12 型, 大岳製作所) を用いて発育経過 (650nm での OD の上昇) を記録した。その模式図を Fig. 2 に示す。

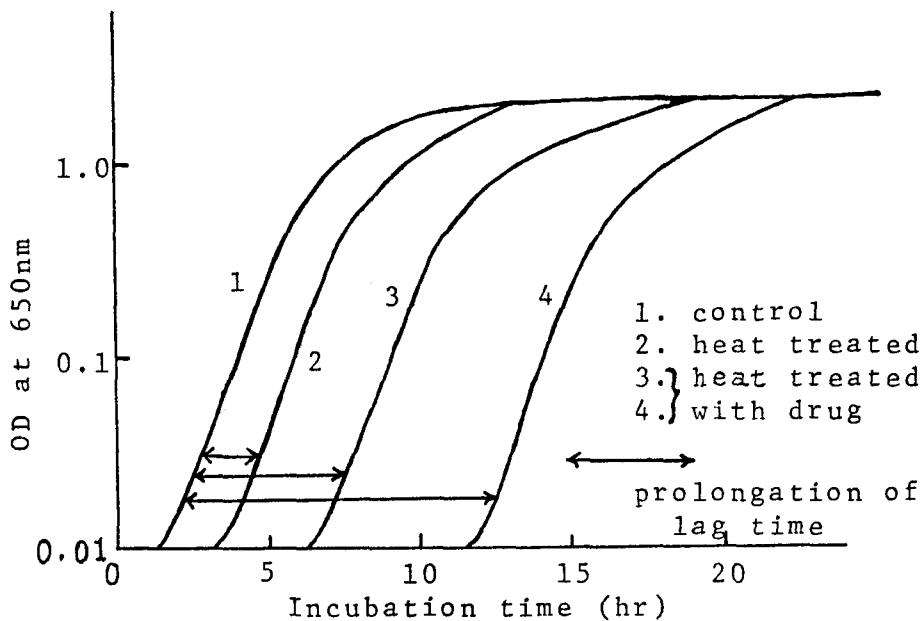


Fig. 2. Typical growth curve of *E. coli* in nutrient broth obtained by the automatic growth recording apparatus (Bio Scanner OT-BS-12).

加熱単独処理あるいは薬剤，加熱併用処理を行った細胞を新しい培地に2% 植菌し培養すると，無処理の細胞に比べて発育遅延がみられるが，発育速度は全く同様であった。従って Fig. 2 に示した様に処理（加熱あるいは薬剤単独および両者の併用）細胞の無処理細胞に対する発育の遅れを lag time の延長時間（prolongation of lag time）と定義し，この値をもって薬剤の抗菌作用力とした。

また同じ処理細胞について常法による平板培養法による生菌数の測定も行った。

第3節 濁度法による殺菌効果の検討

種々の生菌数レベルの細胞浮遊液を肉エキス・ペプトン培

Table 12. Relationship between prolongation of lag time and viable counts of *E. coli*.

Prolongation of lag time (hr)	Viable counts/ml
0	1.2×10^8
3.0	1.2×10^6
5.8	1.2×10^4
8.7	1.2×10^2

地に2% となるように植菌し，その後の発育経過より lag time を求めると，Table 12 のように生菌数と lag time

の延長時間との間に密接な相関関係が見出される。すなわち本実験条件下では生菌数の 10^{-2} 低下は lag time の大凡3時間の延長に相当することになる。

薬剤と加熱併用処理を行った細胞について Table 12 に示した生菌数を lag time の延長時間で代用するためには Fig. 2 に示した発育経過を OD で測定した結果が一致すること以

外に、新しい培地へ植菌直後の生残菌(傷害菌を含む)の発育速度が無処理の場合と一致する必要がある。これについてはモノラウリンを用いた加熱併用処理において発育初期の菌数の増加を平板培養法で求め、無処理の細胞、モノラウリンの加熱併用処理を行った細胞、加熱単独処理を行った細胞いずれも植菌後30分以内に発育が開始し、しかも発育速度はいずれもほぼ同様であるという実験事実より確かめられた。従ってモノラウリンの加熱併用処理による lag time の延長はほぼ Table 12 の相関関係を持った生菌数の低下(すなわち殺菌作用)によると言える。

なお Table 20 において他の薬剤についても lag time の延長が生菌数の低下により起ることを示しているが、その他にも lag time の延長時間と生菌数を同時に測定し、両者に Table 12 で示した相関関係がほぼあてはまることを認めている。

この事は薬剤と加熱の影響が生か死として現われてくるのか、あるいは生残菌中の損傷細胞はその程度にかかわらず回復が栄養培地中で速かに起っているためと考えられる。

この様に脂肪酸およびそのエステルの加熱併用処理においては、lag time の延長は菌の死滅によって起る発育遅延と見做して差支えない。従って薬剤処理による殺菌作用力の比較の目的には二のような lag time の延長時間を利用することが極めて有効なことが明らかである。またこの様な方法は *Ps. aeruginosa* の場合にも適用することが出来る。

第4節 脂肪酸およびそのエステルの加熱併用効果の比較

脂肪酸およびそのエステルは *E. coli* や *Ps. aeruginosa* のようなグラム陰性細菌に対してはほとんど抗菌作用を示さないが，これら薬剤を 50°C，5分という比較的温和な加熱処理と併用した場合，著しい死滅促進効果が認められた。

すなわち Table 13 に示したように，加熱単独では 15 時間の lag time の延長を示すような条件において，モノカプリン，ラウリン酸，モノラウリンが顕著に，モノカプリリン，カプリン酸，ミリスチン酸，モノミリスチンに僅かであるが死滅促進作用が見出され，蔗糖エステル類では無効ないしは少し保護的に働くことが明らかとなった。

Table 13. Enhancing effect of fatty acids and their esters on thermal destruction of *E. coli*.

Drug	Prolongation of lag time (hr)	Drug	Prolongation of lag time (hr)
—	1.5	C ₁₂	>20
C ₈	1.3	MC ₁₂	9.5
MC ₈	2.6	SMC ₁₂	1.5
SMC ₈	1.5	C ₁₄	5.7
SDC ₈	1.5	MC ₁₄	2.4
C ₁₀	3.7	SMC ₁₄	0.9
MC ₁₀	>20	SMC ₁₆	0.7
SMC ₁₀	1.3	SMC ₁₈	0.9

The cells were treated in distilled water with each drug (0.5 mM) at 50°C for 5 min and treated cells were inoculated into nutrient broth at a rate of 2% and incubated at 37°C. Lag time was calculated from the recorded growth curve.

第5節 加熱併用効果に対する諸影響因子

前節で示したように数種の供試薬剤は顕著な加熱併用効果を示すことを見出したので，以下ラウリン酸，モノカプ

リン, モノラウリンを用いて併用効果に対する種々の影響因子について検討を加えた。

a) 濃度

Table 14は薬剤濃度の影響を調べた結果である。

Table 14. Effect of concentration on enhancing effect of three drugs towards *E. coli*.

Concentration (mM)	Prolongation of lag time (hr)		
	MC ₁₀	C ₁₂	MC ₁₂
0.5	>20	>20	9.5
0.25	7.7	9.5	9.5
0.1	2	3	9
0.05	—	—	8.3
0.025	—	—	4.3
0	1.2	—	—

The cells were treated in distilled water with various concentration of each drug at 50°C for 5 min. The culture test was performed as shown in Table 13.

モノカプリン, ラウリン酸では濃度効果が著しく, 0.1mMより0.25, 0.5mMと上昇するにつれて大きく lag time の延長が認められた。モノラウリンでは0.05mM以上ではそれ程濃度効果は認められなかったが, 0.1mM以下の低濃度においても数時間の lag time の延長 ($10^{-3} \sim 10^{-6}$ の強い死滅促進効果に相当) が見出された。

b) 温度

Table 15は加熱処理温度の影響を検討した結果である。

Table 15. Effect of temperature on enhancing effect of three drugs towards *E. coli*.

Drug (mM)	Temperature (°C)	Prolongation of lag time (hr)			
		37	47	50	53
—		0	0	1.2	4.3
MC ₁₀ (0.25)		0	2.3	7	>20
C ₁₂ (0.25)		0	3.8	6.7	>20
MC ₁₂ (0.1)		0	5.6	9.8	13.7

The cells were treated in distilled water at various temperatures for 5 min.

37°C, 5分処理ではすべての薬剤は無効であったが, 温度上昇と共に死滅促進効果は増大した。この場合にもモノカプリン, ラウリン酸では温度上昇効果が大きく, 47°C, 50°C, 53°Cと lag time 延長時間が著しく増加したが, モノラウリンでは延長時間の増加は少なかった。しかし後者では 47°C, 5分処理でも 5.6 時間の lag time の延長すなわち 10^{-4} 程度の死滅効果が認められた。

C) 菌の発育相 (菌齢)

Table 16 は増殖中の *E. coli* を各発育段階で採取し, 一定菌濃度 (OD 0.10) になるように肉エキス・ペプトン培地で調製し, モノラウリン (0.25 mM) と 50°C, 5分加熱処理した結果で, 未加熱 (薬剤添加なし) を基準に lag time の延長時間で示している。菌の発育相が進むにつれて死滅促進効果の減少することが明らかになった。なお表には示していないが, モノラウリン (0.25 mM) 単独処理 (室温) ではいずれの発育相の

菌に対しても無効であった。

Table 16. Effect of culture age of *E. coli* on enhancing effect of MC₁₂.

Culture age (OD at 650 nm)	Prolongation of lag time (hr)	
	—	MC ₁₂ *
0.10	0.2	10
0.30	0.3	8
0.80	0.2	4.5

Each sample was treated in nutrient broth at 50°C for 5 min. Cell concentration during heating was adjusted to 0.1 of OD in all cases.

* 0.25 mM.

d) 細胞浮遊液組成

Table 17はモノラウリンの加熱併用効果に対する塩類の影響を検討した結果である。

Table 17. Effect of metal salts on enhancing effect of monolaurin towards *E. coli*.

Metal salt		Prolongation of lag time (hr)
K-Phosphate	0.16 M	> 20
	0.08	> 20
	0.04	10.2
Na-Phosphate	0.16	8.5
KCl	0.16	> 20
	0.08	8.5
NaCl	0.16	8.0
K-Phosphate*	0.16	> 20
—		8.3

The cells were treated with MC₁₂ (0.25 mM) at 50°C for 5 min at pH 7.0 in distilled water with or without metal salt.

* treated in nutrient broth

モノラウリン(0.25 mM)共存下で 50°C, 5分の加熱処理をリン酸カリウム(pH 7.0)中で行なうと, 死滅促進効果は非常に増大し, さらに塩化カリウム(pH 7.0)中に行っても同様な結果が認められた。しかしリン酸ナトリウム(pH 7.0), 塩化ナトリウム(pH 7.0)中ではこのような死滅促進効果は無菌水中と同程度であったことより, カリウムイオンがモノラウリンの加熱併用効果に対し共同的に働いているということが出来る。

次に本研究では加熱処理を多くの場合無菌水中で行ったが, これを肉エキス・ペプトン培地中に行ってもほとんど同程度の死滅促進効果のあることを認めた(Table 14においてモノラウリン 0.25 mMで8時間の lag timeの延長がみられた)。またリン酸カリウムによるモノラウリンの加熱併用の増進効果は肉エキス・ペプトン培地中でも認められた(Table 17)。

e) 各種グラム陰性細菌に対する加熱併用効果

以上のような脂肪酸およびそのエステルの加熱併用効果は *Ps. aeruginosa* を対象とした場合にも認められた。Table 18に示したように, モノカプリン, ラウリン酸, モノラウリンいずれも有効であり, 0.5 mMの薬剤濃度で8時間程度の lag timeの延長が認められ, 平板培養法による生菌数測定においても 10^{-5} の生菌数低下がみられた。

Table 18. Enhancing effect of three drugs on thermal destruction of *Ps. aeruginosa*.

Concentration (mM)	Prolongation of lag time (hr)		
	MC ₁₀	C ₁₂	MC ₁₂
0.5	8	8.9	8
0.25	5.5	6.2	7.5
0.1	—	—	6.8
0	3.5	—	—

The cells were treated in distilled water at 50°C for 5 min and treated cells were inoculated into nutrient broth at a rate of 2% and incubated at 37°C.

その他のグラム陰性細菌についても同様の条件で検討した。その結果 Table 19 に示した様に *Sal. typhimurium* では効果は少ないが, *Pr. vulgaris*, *Ser. marcescens* においては強い加熱併用効果が見出された。またこれらの菌についても lag time の延長が生菌数低下によるものであることを確かめている。

Table 19. Enhancing effect of monolaurin on thermal destruction of Gram-negative bacteria.

Organism	Prolongation of lag time (hr)	
	without MC ₁₂	with MC ₁₂
<i>Ser. marcescens</i>	3.6	7.6
<i>Pr. vulgaris</i>	4.3	> 19
<i>Sal. typhimurium</i>	0.3	1.0
<i>E. coli</i>	1.3	8.0

The cells were treated in distilled water at 50°C for 5 min.

MC₁₂: 0.25 mM

第6節 考 察

温和な加熱処理による損傷機構の研究は、グラム陽性細菌に始まり³¹⁾、グラム陰性細菌についても、*Sal. typhimurium*³²⁾、*E. coli*³³⁾、*vibrio marinus*³⁴⁾、*Ps. fluorescens*³⁵⁾ が取り上げられている。

微生物の熱死滅は色々の因子によって左右されるが、加熱培地中の諸成分の影響は顕著である。これら諸成分は微生物の熱死滅に対して保護的に働く場合がある一方、逆に促進する場合もあり、この点に関しては多数の研究がある^{36,37)}。

薬剤の併用による死滅促進効果については、古くは抗生物質(サブチリン、ナイシン、タイロシン)について検討されたが、その他有機酸、第4級アンモニウム塩および両性界面活性剤、グルタルアルデヒド、食塩、各種キレート化剤等について加熱併用効果が認められている。

その中ソルビン酸、タイロシン、テゴーについて加熱併用における作用メカニズムを検討したものとして、荒崎および飯田³⁸⁾、Shibasaki および Tsuchida³⁹⁾、土戸ら³⁹⁻⁴¹⁾の報告がある。

すなわちソルビン酸は加熱併用により数種の酵母に対して顕著な死滅促進効果のあることを示し、*C. utilis* に対するソルビン酸の作用を詳細に検討した結果、この薬剤は加熱処理時より加熱後の菌の加熱損傷修復期に強く働くことを立証している。またその作用は加熱損傷菌の修復に必要な蛋白質合成、呼吸の阻害をしていることを見出している。

また *E. coli* に対する タイロシンの加熱併用効果は加熱損傷回復後の細胞の発育に対して働いていることを認めている。次に両性界面活性剤である テゴールの *B. subtilis* 孢子への顕著な加熱併用効果について示し、テゴールが加熱時孢子表面に強く作用していることを見出している。

脂肪酸系列の化合物について、このような分野の研究として 2,3 の報告があるが、^{42,43)} 断片的なもので、詳細に検討した研究報告はない。

本研究は脂肪酸およびそのエステル of 抗菌作用特性の研究の一環として行ったものであるが、これらの化合物に抵抗性の強い *E. coli*, *Ps. aeruginosa* に対して、モノカプリン、ラウリン酸、モノラウリンが温和な加熱処理との併用により低濃度で著しい死滅促進効果を示すことを見出した。

本研究では自動発育記録装置を用いた OD による発育経過の測定結果より無処理細胞に対する lag time の延長時間を求め、多数の供試薬剤の加熱併用効果を比較検討した。

Table 12 を基準にして Table 13 以下のデータより死滅促進効果を推定して述べてきたが、Table 20 には *E. coli*, *Ps. aeruginosa* について lag time 延長時間に対応した生菌数の実測値の例を示した。これから明らかなように、50°C、5分という温和な加熱処理とモノラウリンを 0.1 mM (約 30 $\mu\text{g/ml}$) という低濃度で併用することにより 10^5 以下の死滅率が期待できることは注目し得る結果ということが出来る。

しかもこのような効果は単純な水溶液の系ばかりではな

く、肉エキス・ペプトン培地中でも認められることは実用的にも有利な特性ということが出来る。

Table 20. Relationship between prolongation of lag time and viable counts determined with same sample.

a) *E. coli* Initial viable count 1.4×10^8 /ml

Drug (concentration)	Prolongation of lag time (hr)	Viable counts per ml
---	1.1	3.5×10^7
MC ₁₀ (0.25 mM)	7.0	8.0×10^4
C ₁₂ (0.25 mM)	9.2	3.0×10^2
MC ₁₂ (0.1 mM)	10.0	1.0×10^2

b) *Ps. aeruginosa* Initial viable counts 1.8×10^8 /ml

Drug (concentration)	Prolongation of lag time (hr)	Viable counts per ml
---	4.3	6.7×10^6
MC ₁₀ (0.5 mM)	9.7	3.0×10^3
C ₁₂ (0.5 mM)	12.0	1.0×10^2
MC ₁₂ (0.1 mM)	7.5	7.0×10^3

The test conditions were same as that shown in Table 12 and 13.

本研究で用いた脂肪酸およびそのエステルの加熱併用処理による lag time の延長は生菌数低下に基づくことを見出したが、このことよりこれらの薬剤の作用は上記テゴ型に属すると考えることが出来る。そしてソルビン酸型、タイロシン型の作用を示す薬剤では lag time の延長と生菌数の間には相関関係はないと考えられる。従って本研究で用いた lag time の延長時間で殺菌作用力を比較する方法はすべての薬剤に適用することは出来ない。

また *B. subtilis*, *Staph. aureus* の様なグラム陽性細菌に対してはモノラウリン単独処理で lag time の延長と生菌数低下が認められた。しかしその lag time の延長時間は生菌数の低下より算出した lag time の延長時間よりはるかに大きく、グラム陽性細菌については殺菌効果を lag time の延長時間で表示することは出来ない。なお最近 Shida, Komagata および Mitougi⁴⁴⁾ は本実験と同様な手法で Biophotometer を用い、植菌量と lag time の延長時間の相関性を詳細に検討し、グラム陰性細菌では両者は完全に対応しているが、グラム陽性細菌については対応性がみられないことを認めている。

これら薬剤の有効性は供試菌の細胞に対し損傷を与えはじめる程度の加熱条件が必要なこと、菌齢によって効果が変わることより、*E. coli*, *Ps. aeruginosa* などの脂肪酸およびそのエステルに対する透過性障壁が加熱によって傷害を受け、脂肪酸およびそのエステルの細胞内への透過をうながすものと推定することができる。

以上のように推論される脂肪酸およびそのエステルの作用機構の詳細な検討の進展は種々の要因による細菌細胞膜損傷の解明にも貢献すると期待される。

第7節 要約

グラム陰性細菌に対し常温では全く殺菌作用のない脂肪酸およびそのエステルを、無菌水あるいは肉エキス・ペプト

ン培地に加えて比較的低温で短時間処理するとき、*E. coli*,
Ps. aeruginosa に対し顕著な死滅促進効果を示すことを見出
した。さらにまた *Ser. marcescens*, *Pr. vulgaris* など"におい
てもモノラウリンの加熱併用効果がみられた。

加熱処理細胞の発育過程における lag time の延長が細胞
の死滅による発育遅延と考えて差支えない結果を得たので、
以上のような死滅促進効果は lag time の延長時間の比較に
よって判定した。

加熱併用により顕著な死滅促進効果を認めたのは、15種
の供試薬剤のうち、モノカプリン、ラウリン酸、モノラウリン
であり、これらについて濃度、温度、菌齡、加熱培地成分
の影響について検討した。その結果、モノラウリンが 0.1
mM という低濃度においても著しい死滅促進効果のあるこ
とを明らかにした。

第3章 脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用に 対する種々の薬剤の影響

第1節 緒言

グラム陰性細菌の有害性は各分野で大きな問題となっているが、一般に薬剤感受性が低く、適切な抗菌剤は少ない。

第2章で単独ではグラム陰性細菌に対して抗菌作用力の微弱な脂肪酸およびそのエステルの加熱併用による顕著な殺菌作用を示したが、それ以外に他の低毒性物質との併用によりグラム陰性細菌に対し抗菌作用を示すことが発見できれば更に広い分野（加熱処理のできない材料の殺菌、食品工業の装置、医療関係、化粧品、食品の殺菌洗浄等）への利用を期待することができる。

以上の見地から脂肪酸およびそのエステルについて広い抗菌スペクトルと作用力の増強を目的にして種々の薬剤の組合せ効果について検討を行った。その結果、有機酸、ポリリン酸などを添加するとき脂肪酸エステルは *E. coli* その他のグラム陰性細菌に対して強い殺菌効果を示すことを見出した。

第2節 実験方法

a) 供試薬剤

有機酸（クエン酸，リンゴ酸，乳酸，シュウ酸，マロン酸，コハク酸，フマル酸等），アミノ酸（グリシン，グル

タミニ酸, セリン, リジン), グリシルグリシン, リン酸, EDTA等は市販の試薬特級品を用いた。これらのうち酸はすべて処理時, 苛性ソーダあるいは苛性カリ水溶液で pH 7.0 に調整した。ポリリン酸も市販品であるが, これはトリポリリン酸とテトラポリリン酸を主体とした混合物である。

b) 抗菌作用力の測定

供試菌としては教室保存の *E. coli* K-12, *Ser. marcescens* 8260, *Pr. vulgaris* 8102, *Sal. typhimurium* DB 21 (MIT) および *Ps. aeruginosa* 8135 を用いた。

肉エキス・ペプトン寒天培地で培養した細胞を無菌水に浮遊させ (650 nm での OD 0.1~0.15, 生菌数約 10^8 cells/ml), これに適当量の薬剤を添加し (pH 7.0), 30°C で 60 分処理した。

この処理細胞液を新しい肉エキス・ペプトン培地に 2% となるように植菌し, 微生物自動発育記録装置を用いて 37°C での発育経過を記録した。薬剤併用処理を行った細胞についても, 加熱併用処理の場合と全く同様に, 無処理の細胞に比べて発育遅延がみられるが, 発育速度は全く同様であった。従って加熱併用処理の場合と同様に薬剤処理細胞の無処理細胞に対する発育の遅れを lag time の延長と定義した (Fig. 2 参照)。

これと併行的に常法による平板培養法により生菌数 (生残菌数) を求めた。

第3節 諸種薬剤の添加効果

a) 脂肪酸およびそのエステルに対するクエン酸の影響

第2章で薬剤加熱併用処理細胞の lag time 延長と生菌数との間に相関関係が認められたので、供試薬剤の効果は lag time の延長時間で比較した。

本章における $20\sim 40^{\circ}\text{C}$ での薬剤併用処理の場合においても同様な関係が見出されたので（モノラウリンとクエン酸併用処理を行ない生菌数 10^{-4} 低下した細胞の培養初期の発育速度が無処理のそれとほとんど変らなかったこと、Table 30 にみられる様に lag time の延長時間と生菌数に密接な相関関係がみられること）、この方式を採用した。なお *E. coli* については Table 12 に示したように3時間の lag time の延長が生菌数 10^{-2} 低下に相当している。

予備実験においてモノラウリンに EDTA を添加して *E. coli* 細胞浮遊液を 30°C , 60分処理するとき、顕著な死滅効果 ($10^{-4}\sim 10^{-5}$) が認められたので、一般にキレート生成能を有し、しかも毒性の低い諸物質について検討を加えた結果、クエン酸やポリリン酸の添加によって強い併用効果のあることを見出した。すなわち Table 21 に示したように、単独では *E. coli* に対してほとんど殺菌作用のないモノラウリンにクエン酸あるいはポリリン酸を組み合わせることにより、著しい lag time の延長が認められた。しかもこの場合、カリウム塩の方がナトリウム塩より強い併用効果のあることが明らかとなった。

Table 21. Effect of citric acid, polyphosphoric acid and ethylenediamine tetraacetic acid on the antibacterial activity of monolaurin against *Escherichia coli*.

Drug (concentration)	Prolongation of lag time (hr)
Citric acid (CA) (1%)	
sodium salt	6.2
potassium salt	8.3
Polyphosphoric acid (PP) (1%)	
sodium salt	7.3
potassium salt	>12.0
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (0.01 M)	
sodium salt	8.3
—	0.3

The cells of *E. coli* were treated with a drug combination in distilled water (pH 7.0) at 30°C for 60 min. The drugs added were neutralized to pH 7.0 by NaOH or KOH aq. solution.

The treated cells were inoculated to nutrient broth in a tube of the automatic growth recording apparatus (Bio Scanner, type OT-BS-12, Otake) at a rate of 2% and incubated at 37°C.

Lag time was calculated from a recorded growth curve.

Concentration of MC₁₂: 0.25 mM

EDTA, クエン酸 (Na 塩およびK塩) あるいはポリリン酸 (Na 塩) のそれぞれ単独処理では薬剤無処理と全く同様の発育経過を示し、ポリリン酸 (K塩) 単独処理では0.5時間の lag time の延長はあるが発育速度は無処理と全く同様であった。

ここで用いたクエン酸の濃度は1%であって、これは約0.05Mに相当するが、0.01M

のEDTAとほぼ同程度の lag time の延長効果を示し、ポリリン酸1% (リン酸として0.1Mに相当) はそれ以上の効果をもっていることが認められた。

さらにモノラウリンとリン酸カリウム (0.1M), リン酸ナトリウム (0.1M), 塩化カリウム (0.16M), 塩化ナトリウム (0.16M) などとの組合せについても同様の条件で検討し、若干の併用効果のあることを認めたが (2~3時間の lag time 延長), Table 21 の結果と比較するとき、金属イオン (Na^+ , K^+)

単独による併用効果はそれほど強くはないといえることができる。

次に各種脂肪酸およびそのエステルに対するクエン酸の添加効果を比較した結果を Table 22 に示した。

Table 22. Effect of citric acid on the antibacterial activity of fatty acids and their esters against *E. coli*.

Drug	Prolongation of lag time (hr)
C ₈	0
MC ₈	0.2
SMC ₈	0
SDC ₈	4.5
C ₁₀	0
MC ₁₀	>12
SMC ₁₀	0
C ₁₂	0.6
MC ₁₂	8.9
SMC ₁₂	5.4
C ₁₄	0
MC ₁₄	1.0
SMC ₁₄	1.7
SMC ₁₆	0.1
SMC ₁₈	0

The test condition was the same as that shown in Table 21.
Concentration of fatty acid derivatives: 1 mM
Conc. of CA (Na salt): 1 %

強い併用効果の認められたものは、蔗糖ジカプリレート、モノカプリン、モノラウリン、蔗糖モノラウレートであり、加熱との併用効果の顕著であったラウリン酸はほとんど効果は認められなかった。

さらにラウリン酸は 0.01M の EDTA との組合せにおいても効果が少なかったが (0.5 時間の lag time の延長), 1%

ポリリン酸カリウムとの併用により約 6 時間の lag time の延長が認められた。また 1% ポリリン酸カリウムは蔗糖モノラウレートに対しても有効であった (約 7 時間の lag time の延長)。

クエン酸の添加によって強い殺菌作用力を見出したモノカプリン、モノラウリンについて、それらの濃度の影響を

検討した結果を Table 23 に示した。

Table 23. Effect of citric acid at various concentration of monoglycerides.

Concentration of monoglyceride (mM)	Prolongation of lag time (hr)	
	MC10	MC12
1	> 12	9.7
0.5	> 12	8.5
0.25	0.3	7.7
0.125	0.1	6.0
0.063	--	4.0

Concentration of CA(Na salt): 1% Test organism: *E. coli*.
The test condition was the same as that shown in Table 21.

モノカプリンは0.5, 1mM ではきわめて有効であって、いずれも12時間以上のlag timeの延長を示したが、0.25mM 以下ではほとんど無効となった。しかしモノラウ

リンでは濃度の影響は少く、0.063mM という低濃度においてもかなりの併用効果があった。

以上のように *E. coli* に対して脂肪酸エステルはクエン酸あるいはポリリン酸などとの組合せにより強い殺菌作用を示すことを見出したが、他のグラム陰性細菌に対する作用を検討したのが Table 24 である。ここでみられる lag time の延長が生菌数低下によることは平板培養法で確かめてある。

これらの薬剤の併用による殺菌作用に対して *E. coli* は最も感受性が高く、*Ser. marcescens*, *Pr. vulgaris*, *Sal. typhimurium* がこれにつき、*Ps. aeruginosa* は最も抵抗性が強いという結果が得られた。またいずれの菌についても適用濃度ではモノカプリン(1mM)の方がモノラウリン(0.25mM)より作用力が強く、ポリリン酸(1%)の方がクエン酸(1%)より強い併用効果を持っていた。以後の検討は低濃度でも有効なモノラウリンを用い、*E. coli* について行った。

Table 24. Effect of citric acid and polyphosphoric acid on the antibacterial activities of monoglycerides against Gram negative bacteria.

Organism	Prolongation of lag time (hr)								
	-			MC ₁₀			MC ₁₂		
	-	CA	PP	-	CA	PP	-	CA	PP
<i>E. coli</i>	0	0	0.5	0.8*	>12*	>12*	0.3	8.8	>12
<i>Ser. marcescens</i>	0	0.5	0.7	0.7	8.9	11.4	0	3.2	6.8
<i>Pr. vulgaris</i>	0	0	1.2	2.0	4.0	4.6	0.2	1.5	2.8
<i>Sal. typhimurium</i>	0	0	0.1	1.2	11.6	>12	0.1	0.5	2.5
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	0	0	0.5	0.9	3.0	0	0	0

The test condition was the same as that shown in Table 21.
 Concentration of drugs ... CA (Na salt): 1 %, PP (K salt): 1 %,
 MC₁₀: 1 mM (* 0.5 mM), MC₁₂: 0.25 mM

b) モノラウリンの作用に対する諸物質の影響

Table 25. Effect of amino acids and organic acids on the antibacterial activity of monolaurin against *E. coli*.

Drug	Prolongation of lag time (hr)
-	0.1
Glycine	0.1
Glycylglycine	0
Glutamic acid	1.1
Serine	0
Lysine	0.4
Citric acid	8.0
Malic acid	4.9
Lactic acid*	>12.0
Oxalic acid	3.0
Malonic acid	0.5
Succinic acid	0.6
Fumalic acid	0.4

The test condition was the same as that shown in Table 21.
 Concentration of drug: MC₁₂.....0.25 mM Amino acid and
 organic acids (Na salt).....1 %

*pH5.5

Table 25にはモノラウリン(0.25mM)に対する各種アミノ酸および有機酸の添加効果を示した。供試アミノ酸はすべて併用効果はなく、有機酸ではクエン酸の他にリンゴ酸、乳酸、シュウ酸で併用効果が認められた。しかし乳酸の場合この実

験条件下では加熱処理によって pH が低下しており、併用効果に対する pH の影響を考慮しなければならない。

さらにまた酢酸、プロピオン酸、フィチン酸、エタノール、グリセリンなどについても検討を加えたが、何れも効果は微弱かあるいはほとんど無効であった。

第4節 薬剤併用効果に対する諸影響因子

以上のようにモノラウリンなどに対してクエン酸、ポリリン酸が強い併用効果を示したので、併用効果に対する諸因子の影響についてモノラウリンを対象として検討を加えた。

a) 濃度

Table 26. Effect of concentration of added chemicals on the antibacterial activity of monolaurin.

Added drug		Prolongation of lag time (hr)
Citric acid (Na salt)	1.0 %	0.1 10.1
	0.5 %	8.5
	0.1 %	4.0
Malic acid (Na salt)	1.0 %	6.2
	0.1 %	0.2
Polyphosphoric acid (K salt)	1.0 %	>12.0
	0.1 %	8.7

The test condition was the same as that shown in Table 21.
MC12.....0.25 mM Test organism: *E. coli*.

Table 26 に示したようにクエン酸、ポリリン酸の場合は、添加濃度が 0.1% の場合においてもかなりの併用効果を認めたが、リンゴ酸 0.1% ではほとんど無効であった。

b) 時間

以上の実験ではすべて 30°C, 60分という一定の処理条件での結果であるが, Table 27 には処理時間をかえた場合の効果をクリックエン酸とポリリン酸とについて比較した結果を示した。

Table 27. Combined effect of citric acid, polyphosphoric acid and EDTA on the antibacterial activity of monolaurin.

Time (min)	Prolongation of lag time (hr)		
	CA	PP	EDTA
2	—	2.1	—
5	—	5.7	—
10	3.3	7.0	4.5
30	5.7	>12.0	—
60	7.9	>12.0	—

The test condition was the same as that shown in Table 21.

Concentration of drug:

MC₁₂.....0.25 mM CA (Na salt).....1%

PP (K salt).....1% EDTA (Na salt).....0.01M

Test organism: *E. coli*.

モノラウリンに対するポリリン酸の添加効果は短時間処理でもかなり強く, 10分間処理で7時間のlag timeの延長を示した。クエン酸の場合はこれと同等の効果を得るためには60

分程度の処理が必要であった。

c) 温度

Table 28. Effect of test conditions on the combined effect of monolaurin and citric acid against *E. coli*.

Combination of drug	Prolongation of lag time in the following conditions		
	40°C, 10 min	30°C, 60 min	20°C, 60 min
MC ₁₂ (0.25 mM)+CA	9.1	6.7	3.1
MC ₁₂ (0.125 mM)+CA	8.2	5.9	2.5
MC ₁₂ (0.063 mM)+CA	3.7	—	—
MC ₁₂ (0.25 mM)	0.6	0.2	—
CA	0.3	0	—

The test condition was the same as that shown in Table 21.

Concentration of CA (Na salt): 1%

次にモノラウリンに対してクエン酸を併用する場合の処理温度の影響を調べた結果が Table 28 である。処理温度の上昇と共に併用効果も増大する傾向を示した

が、とくに 30℃ より 40℃ への上昇効果は顕著であった。

d) pH

Table 29 は肉エキス・ペプトン培地中でのモノラウリンに対する有機酸の併用効果に対する pH の影響を調べた結果である。

Table 29. Effect of pH on the combined effect of mono-laurin and organic acids.

Drug	Prolongation of lag time (hr)			
	pH	5.5	7.0	8.0
Citric acid (CA)	0	0	0	
Lactic acid (LA)	0.4	0	0	
MC ₁₂	2.5	0.4	0.6	
MC ₁₂ + CA	5.2	4.3	8.4	
MC ₁₂ + LA	5.4	1.7	0.1	

The cells were treated in nutrient broth of various pH at 30 °C for 60 min. Other test condition was the same as that shown in Table 21.

Concentration of drug: MC₁₂...0.25 mM CA, LA (Na salt)...1 %

Test organism: *E. coli*.

モノラウリン単独でも pH 5.5 では 2.5 時間の lag time の延長が認められたが(平板培養による生菌数測定によって殺菌に起因する結果であることは確かめている)。

クエン酸、乳酸単独では低 pH でも殺菌作用を示さないが、これらとモノラウリンとの組合せによる殺菌効果は、クエン酸の場合は中性より酸性あるいはアルカリ性で作用は強く、乳酸の場合には pH の上昇とともに急激な作用の低下が認められた。

e) 菌齢(薬剤の添加時期)

第 1 章において *Staph. aureus*, *B. subtilis* に対し、モノラウリン、ラウリン酸、モノカプリン、蔗糖ジカプリレートが顕著な殺菌ないし溶菌作用のあることを示したが、同

様な方法で、種々の発育相において、モノラウリンにクエン酸を加えた場合のODの経過を測定した結果がFig. 3である。

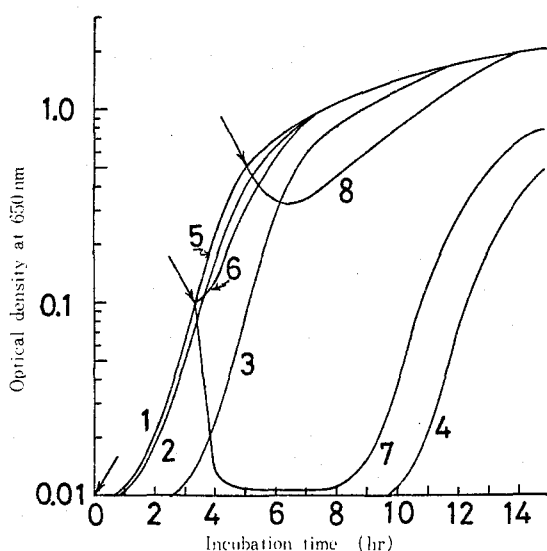


Fig. 3. Combined effect of monolaurin and citric acid added at different growth phase of *E. coli*.

The automatic growth recording apparatus (Bio Scanner OT-BS-12) was used in the culture test. The arrows indicate the time of addition of monolaurin and citric acid (Na salt).

Conditions of culture test are as follows:

No. of curve	OD at the time of addition of drug	Concentration	
		CA (%)	MC12 (mM)
1	—	—	—
2	0.01	0.5	—
3	0.01	—	0.125
4	0.01	0.5	0.125
5	0.1	0.5	—
6	0.1	—	0.125
7	0.1	0.5	0.125
8	0.5	0.5	0.125

発育の進行と共にOD低下効果は減少したが、肉エキスをペプトン培地中において、クエン酸共存下でモノラウリン0.125 mMという低濃度でも顕著な発育阻害効果(殺菌ならびに溶菌に起因する)を認めた。

なおTable 22に示したように定常期の*E. coli*細胞に対してほとんど殺菌効果を示さないラウリン酸とクエン酸の組合せについてFig. 3と同様な実験を行なうと、

クエン酸共存下でラウリン酸 0.5mM でモノラウリンの場合とほぼ同様な経過を示すことを認めた。

f) 培地成分

Fig. 3 ならびに Table 29 の結果よりモノラウリンはクエン酸などを添加した場合、蒸留水のような単純な系ばかりでなく、肉エキス・ペプトン培地中でも殺菌効果を示すことが明らかとなった。しかしモノラウリン(0.25mM) + クエン酸(1%) (pH 7.0), 30°C, 60分間の処理条件で、蒸留水中で6.7時間、肉エキス・ペプトン培地中で4.3時間の lag time の延長を示し、後者ではかなりの効果の減少が認められた。

第5節 各種薬剤に対するクエン酸の添加効果

脂肪酸エステルのうち抗菌作用力の強いモノラウリン、モノカプリンに対しクエン酸を添加するとき *E. coli* などに対し顕著な抗菌作用の増強(特に殺菌作用)を認めたが、このようなクエン酸の添加が他の抗菌剤に対しても有効であるか否かを検討した。

薬剤として EDTA との併用効果が認められている抗生物質のうちエリスロマイシン、タイロシンを用いたが、その他ラウリル基を持った抗菌物質としてラウリル硫酸ソーダ、ドデシルジアミノエチルグリニン(テゴー 51)を用いた。

増殖培地にこれらの薬剤単独およびクエン酸と併用して

加え、*E. coli*の増殖経過をみたのが Fig. 4 である。

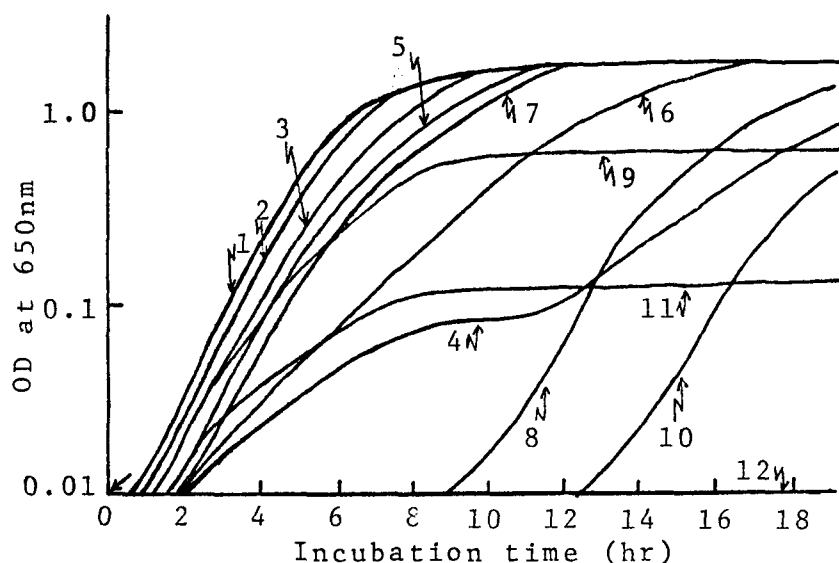


Fig. 4. Combined effect of citric acid and various drugs against *E. coli*.

Conditions of culture test are as follows:

No. of curve	Drug (concentration)
1	control
2	CA (Na salt, 0.5%)
3	SLS (100 μ g/ml)
4	SLS (")+CA (")
5	Tego 51 (5 μ g/ml)
6	Tego 51 (")+CA (")
7	MC ₁₂ (20 μ g/ml)
8	MC ₁₂ (")+CA (")
9	Tylosin (20 μ g/ml)
10	Tylosin (")+CA (")
11	Erythromycin (5 μ g/ml)
12	Erythromycin (")+CA (")

クエン酸の添加によりいずれの薬剤の作用(この結果からは薬剤の作用が静菌作用であるか殺菌作用なのか)区別出

来ない)も増強されることを認めたが、モノラウリン、エリスロマイシン、タイロシンに対して添加効果は特に強く現われた。

第6節 考 察

栄養培地中においてグラム陽性細菌に対して一般に飽和脂肪酸の鎖長が長くなるにつれて抗菌作用力を増し、カプロン酸ないしラウリン酸で最高になるが、グラム陰性細菌に対してはカプロン酸までの短鎖のものは同様の傾向が認められているが、中鎖ないし長鎖の飽和脂肪酸では作用力は微弱か、ないしは無効とされている。^{14, 21)}

しかし合成培地中においては炭素数7, 8, 9, 10, 12の脂肪酸が *E. coli* に対し短鎖の脂肪酸(炭素数1~6)に比べて強い抗菌作用を示すことが報告されている。^{9, 11, 12)} また脂肪酸グリセロールエステル、蔗糖エステルは栄養培地中グラム陰性細菌に対してほとんど無効であるが、^{21, 22)} 合成培地中において *E. coli* に対して蔗糖モノラウレートが強い抗菌作用を示すことが認められている。⁹⁾

一方グラム陰性細菌に対して抗菌作用の弱い薬剤がEDTAの共存あるいは前処理によって有効性の増大することは多く報告されている。Levine⁴⁵⁾ は *E. coli* に対して生菌数低下を示さない程度のEDTA処理がアクチノマイシンD感受性を大きく増大させることを報告している。

Muschel および Gustafson⁴⁶⁾ は *Sal. typhimurium* に対する

EDTA 処理がアクチノマイシン D 感受性を増大させるが、その他の抗生物質（ポリミキシン B，ペニシリン，ストレプトマイシン，カナマイシン，クロラムフェニコール，クロルテトラサイクリン，マイトマイシン C 等）への感受性はほとんど変わらないことを見出している。また EDTA 処理によりセチルピリジウムブロマイド，ミリスチル硫酸ナトリウムへの感受性増大も認めている。

Spicer および Spooner⁴⁷⁾ は *E. coli* に対する EDTA 処理によりアクチノマイシン D，セファロスポリン P₁，エリスロマイシン，バンコマイシンへの感受性は大きく増加し，バシトラシン，ノボビオシンへの感受性も若干増すが，ベンジルペニシリン，シクロセリン，リンコマイシン，ポリミキシン B への感受性はほとんど変わらないと述べている。

Tsuchido, Ozawa および Shibasaki⁴⁰⁾ は EDTA 処理した *E. coli* はタイロシンに対する感受性が増大することを認めている。

Voss⁴⁸⁾ は EDTA および 2-ハイドロキシ-3-(ジメチルヘキサデシルアンモニオ)プロパン-1-スルホネートの存在下でアルキルアミンあるいはセチルピリジウムクロライドその他の陽イオン界面活性剤の *E. coli* に対する抗菌作用力が増大することを認め、Hague および Russell⁴⁹⁾ は EDTA 処理により *E. coli*，*Enterobacter cloacae*，*Klebsiella aerogenes*，*Ps. aeruginosa* に対するセトリミド，クロルヘキシジン，ベンザルコニウムクロライドの抗菌作用は増大するが，カル

ベニシリンの抗菌作用はほとんど変わらないことを報告している。また Sheu および Freese¹⁴⁾ は EDTA 処理により *E. coli* の脂肪酸（カプリン酸，リノール酸）に対する感受性が増大することを認めている。

しかし EDTA はその毒性からみて実用面での利用はかなり限定される。従って EDTA と同様にグラム陰性細菌に対し薬剤の作用力を増大させる低毒性物質が見出されると、食品、化粧品その他の分野での利用が期待できる。

本研究では予備試験において脂肪酸エステルに対し EDTA を添加するとき顕著な殺菌作用力を発現することを見出したので、飽和脂肪酸およびそのエステルを用いて、*E. coli* に対する抗菌作用に対する種々の薬剤の併用効果を検討した。その結果、モノカプリン，モノラウリン，蔗糖ジカプリレート，蔗糖モノラウレートに対し，クエン酸，ポリリン酸などが EDTA に劣らない併用効果を有することを認めた。

この場合，第2章同様併用による殺菌効果は lag time の延長時間をもって比較したが，Table 30 には *E. coli* について lag time の延長時間に対応した生菌数の実測値の例を示した。

これから明らかなように低濃度の脂肪酸エステルとクエン酸あるいはポリリン酸の併用により *E. coli* に対して強い殺菌作用を示すことが見出された。しかもこのような併用効果は脂肪酸およびそのエステルのグラム陽性細菌に対

する抗菌力とほぼ対応している。

Table 30. Relationship between prolongation of lag time and viable counts determined with same sample (*E. coli*).

Drug (concentration)	Prolongation of lag time (hr)	Viable counts per ml
MC ₁₂ (0.25 mM) + CA (Na salt, 1 %)	7.7	9.0×10^2
MC ₁₂ (0.125 mM) + CA (")	6.0	7.1×10^3
MC ₁₂ (0.063 mM) + CA (")	4.0	4.5×10^5
MC ₁₀ (0.5 mM) + CA (")	>12	<10
MC ₁₀ (0.25 mM) + CA (")	0.3	9.0×10^7
MC ₁₂ (0.25 mM) + PP (K salt, 1 %)	>12	<10

The test condition was the same as that shown in Table 21.
Initial viable count: 1.2×10^8 /ml

脂肪酸エステルとクエン酸あるいはホリリン酸の組合せは *E. coli* に対し最も有効であり, *Ser. marcescens*, *Pr. vulgaris*, *Sal. typhimurium* がこれにつき, *Ps. aeruginosa* は最も抵抗性が強かった。この傾向はこれらのグラム陰性細菌の一般薬剤に対する感受性の差とほぼ一致していた。

また脂肪酸の抗菌作用について Shen および Freese⁽⁴⁾ は対数期 (600 nm での OD 0.5) まで増殖させ EDTA 処理した *E. coli* に対しカプリン酸, ミリスチン酸, オレイン酸, リノール酸が発育阻害や代謝機能障害を発現ないし増進することを報告している。本実験で用いた定常期 (24 時間前培養) の *E. coli* ではクエン酸とカプリン酸あるいはミリスチン酸の組合せによる殺菌作用は現われず, クエン酸あるいは EDTA とラウリン酸の併用により若干の殺菌効果が認められた。

しかし対数期(650nmでのOD 0.5)の *E. coli* にラウリン酸とクエン酸を同時に添加すると顕著な増殖の遅延および溶菌現象が認められ、菌の発育相による薬剤感受性の差は大きいと考えられる。

EDTAに比べてキレート生成能のはるかに弱いクエン酸(それぞれのマグネシウムキレートの安定化定数は8.7および3.2である)にグラム陰性細菌に対する薬剤の抗菌作用、特に殺菌作用を増大させる作用のあることはきわめて興味ある現象ということができる。

EDTAのグラム陰性細菌に対する作用と対比してクエン酸などもこれと同様なメカニズムにより脂肪酸エステルの抗菌作用力を増強しているものと考えられるが、キレート生成能の同等といえるアミノ酸(たとえばグリシンのマグネシウムキレートの安定化定数は4である)などは全く効果のないことより、別の機構による可能性もある。あるいはその増強作用力はキレーターとしての強さのみで決まるものではなく、菌体との相互作用において、作用点への到達あるいは作用が発現されるための更に別の因子の存在により影響されるとも予想される。

さらにグラム陰性細菌に対し膜損傷を起こす加熱との関連性についても考慮する必要がある。しかし加熱時に有効性を認めた遊離脂肪酸(C_{10} , C_{12} , C_{14})が薬剤併用による効果がないこと、逆に薬剤併用効果の認められた蔗糖エステル(SDC_8 , SMC_{12})に加熱併用効果がないことより、両者の併

併用効果の機構は異質なものとわざるを得ない。

またクエン酸の添加によりモノラウリンのみならず エリスロマイシンその他の抗菌物質のグラム陰性細菌に対する抗菌作用力が増強されることは非常に興味ある現象であり、生体に普遍的に存在しているクエン酸の生体への作用という基礎的な面と、実用面における抗菌剤の作用を増強させる低毒性物質として今後の研究が望まれる。

ポリリン酸、クエン酸、脂肪酸エステルは毒性は低く、ポリリン酸塩は結着剤として、クエン酸は酸味料として、脂肪酸エステルは乳化剤としてそれぞれ食品に添加されている。これらの組合せがグラム陰性細菌に殺菌作用を示すことはその低毒性から考えて非常に有利であり、グラム陰性細菌の有害性が問題となっている各分野へ抗菌剤として応用が期待できる。

第7節 要 約

飽和脂肪酸およびそのエステルは30℃では *E. coli* に対しほとんど殺菌作用を示さないが、モノグリセライドや蔗糖エステルはEDTA、クエン酸、ポリリン酸などの添加により顕著な殺菌作用を示すことを見出した。アミノ酸類はほとんど影響がなく、その他の有機酸塩や無機塩類では若干の併用効果が認められたが、クエン酸などと比較すると問題にならなかった。

クエン酸の添加により強い殺菌作用力を示したものは、

モノカプリン，モノラウリン，蔗糖モノラウレート，蔗糖ジカプリレートであった。その効果は顕著であって，これからエステル $0.063 \sim 1.0 \text{ mM}$ に対し，クエン酸を $0.1 \sim 1.0 \%$ 添加し， 30°C ，60分間作用させると， 10^2 ないし 10^{-6} の生菌数低下が認められた。ポリリン酸はクエン酸，EDTA に優る併用効果を示し，いずれもナトリウム塩よりカリウム塩の方が作用力は大きく，作用時の温度の上昇によってより短時間の処理で強い殺菌作用力を示した。

以上のようなクエン酸などの併用効果は栄養培地中에서도見出されたが，その pH や組成成分の影響をうけることも明らかとなった。

脂肪酸エステルとクエン酸あるいはポリリン酸の組合せによる殺菌作用は他のグラム陰性細菌についても見出されたが，その作用は *E. coli* に対して最も強く，*Ps. aeruginosa* は最も抵抗性が強かった。

また *E. coli* に対するエリスロマイシン，タイロシン，SLS，テゴー51の抗菌作用力はクエン酸との併用により著しく増強されることを見出した。

第4章 薬剤併用効果の作用機構

第1節 緒言

前章でモノラウリンとクエン酸あるいはポリリン酸の併用により *E. coli* などグラム陰性細菌に対して顕著な殺菌効果を発現することを示したが、本章ではその併用効果の機構を明らかにする目的で *E. coli* を供試して以下の検討を行った。

第2節 実験方法

a) 添加時期をかえた場合の効果

肉エキス・ペプトン寒天培地で 37°C , 24時間培養した *E. coli* K-12の細胞を適当量の無菌水中に懸濁し(650 nmでのOD 0.12, 生菌数約 10^8 cells/ml), これにモノラウリン(0.25 mM), クエン酸(0.05 M)をそれぞれ単独で加え(pH 7.0), 30°C , 60分処理した。この処理液をモノラウリン(0.25 mM)あるいはクエン酸(0.05 M)を含む肉エキス・ペプトン培地(pH 7.0)に2%となるように植菌し, 37°C で培養し, 無処理細胞に対する lag time の延長時間および培養開始1時間後の生菌数を平板培養法で求めた。

b) クエン酸, EDTA の前処理の影響

a)と同様に無菌水中に懸濁した *E. coli* の細胞にクエン酸(0.05 M)あるいはEDTA(0.01 M)をそれぞれ添加し, 30°C , 60

分処理した。この処理液を $3000\times g$, 10分間遠沈し, 2回水洗した後無菌水中に懸濁し(前処理と同じ菌濃度にする), モノラウリン単独 (0.125 mM), モノラウリンとクエン酸 (0.05 M), モノラウリンとEDTA (0.01 M) を添加し ($\text{pH } 7.0$), 30°C , 10分処理した。処理液を肉エキス・ペプトン培地に2%植菌し, 37°C で培養して lag time の延長時間を求めた。

c) 塩化マグネシウム, 塩化カルシウムの保護効果

a) と同様の懸濁液にモノラウリン (0.25 mM) とクエン酸 (ナトリウム塩, 0.005 M), ホリリン酸 (カリウム塩, リン酸としての濃度 0.01 M), EDTA (0.01 M) の併用処理を行うとき, 塩化マグネシウム (0.05 M), 塩化カルシウム (0.07 M) を添加して 30°C , 60分処理し, lag time の延長時間よりその効果をみた。またモノラウリン (0.25 mM) とクエン酸 (0.01 M) の併用処理 (30°C , 60分) 直後塩化マグネシウム (0.05 M) を添加して 30°C , 10分処理, あるいは培養培地中に塩化マグネシウム (0.05 M) を添加して薬剤併用処理による作用の回復を検討した。

d) *E. coli* K-12 によるモノラウリンの取りこみ

^3H -モノラウリン (モノラウリンをトリチウム置換し (日本シンロイヒ株式会社に依頼), その一部を薄層クロマトグラフィー (ベンゼン 95 : メタノール 5) で精製したもの) を用いて検討した。a) と同様に培養した *E. coli* の細胞を 650 nm での OD

1.0 (生菌数約 10^9 cells/ml) になるよう無菌水中に懸濁し、これに 0.03 mM のモノラウリン ($6,200$ CPM/ml の ^3H -モノラウリンを含む)、あるいはクエン酸 (0.05M)、ホリリン酸 (0.05M)、EDTA (0.01M) を加え (pH 7.0), 30°C , 5分処理した後 0.03 mM のモノラウリンを加え, 30°C , 一定時間振盪培養した後 1ml の処理液を採取し, millipore filter (HA 0.45 μ) で口過, 1ml のモノラウリン水溶液 (1mM) で洗浄した。filter を乾燥後 2,5-ジフェニルオキサゾール (^6H) を含むトルエン 10 ml 中に移し, 液体シンチレーションカウンター (Beckmann LS-250) を用いて放射活性を測定し, これより *E. coli* に取りこまれた (あるいは吸着された) モノラウリンの量を算出した。

e) *Staph. aureus* および *E. coli* のアミノ酸取りこみに対する阻害効果

肉エキス・ペプトン培地中 37°C で一定レベルまで増殖させた *Staph. aureus* (650 nm での OD 0.3), *E. coli* (650 nm での OD 0.5) 培養液にクロラムフェニコール ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し, 所定量の薬剤を加え, ただちに ^{14}C -フェニルアラニン ($297 \text{ mCi}/\text{mmol}$) ($266,000$ CPM/ml) を加え, 37°C で引き続き培養し, 10分後 0.5 ml を採取, Millipore filter (HA 0.45 μ) で口過, 3ml の 0.1M リン酸緩衝液 (ナトリウム塩) で洗浄し, filter 上の放射活性を測定し, 薬剤無処理菌体との比較より取りこみ阻害率を算出した。

f) 細菌細胞壁成分の漏洩

肉エキス・ペプトン培地中24時間前培養した *E. coli* の培養液(400 ml)を $3000 \times g$, 10分間遠沈し, 2回水洗した後10 ml の無菌水に懸濁した (5.4×10^{10} cells/ml)。この懸濁液(2 ml)に所定量の EDTA, クエン酸, ポリリン酸(各2 ml)を加え(pH7.0), 30°C , 60分処理した。処理液を遠沈し($3000 \times g$, 10分間), 上澄液について Osborn らの方法⁵⁰⁾に従った酸加水分解($0.018N$ H_2SO_4 で 100°C , 20分間処理)を行った後, リポ多糖類に特異的に含有される 2-ケト, 3-デオキシオクツロン酸(KDO)を定量した。KDOの定量は Osborn⁵¹⁾により一部改良された Weissbach および Hurwitz の方法(チオバルビツール酸法)⁵²⁾ により行った。

第3節 実験結果

a) 添加時期をかえた場合の効果

モノラウリンとクエン酸の併用により *E. coli* に対して顕著な殺菌作用が認められたが, 実際に殺菌作用を示すのはどちらの薬剤であるか知る必要がある。そこで薬剤の処理順序を変えて検討を行った。

Table 31 に示したようにモノラウリンで処理した *E. coli* の細胞をクエン酸を含む培地で培養すると若干の lag time の延長ならびに生菌数の低下がみられた。しかしクエン酸処理した細胞をモノラウリンを含む培地で培養するとはるかに顕著な殺菌作用が認められた。

すなわちモノラウリンとクエン酸の処理順序が重要であり、クエン酸で処理した後、モノラウリンを作用させる方がその逆と比べてはるかに強い殺菌作用を示すといえる。

このことよりクエン酸処理により生菌数低下には直接つながらない傷害をうけるが、この傷害菌にモノラウリンが作用することにより強い殺菌効果が現われたと考えられる。

Table 31. Effect of successive treatment of monolaurin and citric acid on the antibacterial activity against *E. coli*.

Incubation ²⁾ Treatment ¹⁾	Prolongation of lag time (hr) (Viable counts after 1 hr incubation, cells/ml)			
	-	MC ₁₂	CA	MC ₁₂ + CA
-	0 (6.1×10^6) ³⁾	1.4 (6.8×10^5)	0.2	10.3 ($< 10^2$)
MC ₁₂	0.3		0.8 (8.0×10^5)	
CA	0 (7.0×10^6)	6.5 (2.0×10^2)		

Concentration of drug: MC₁₂... 0.25 mM, CA (Na salt) ... 0.05 M

- 1) The cells of *E. coli* were treated with a drug in distilled water (pH 7.0) at 30°C for 60 min.
- 2) The treated cells were inoculated to nutrient broth with or without drug at a rate of 2 % and incubated at 37°C.
- 3) initial viable count: 2.6×10^6

Table 31では培養中常に薬剤が共存していたが、次にクエン酸前処理、モノラウリンによる本処理をいずれも無菌水中で行ない、さらに本処理のときのクエン酸添加効果をみ

た。なお EDTA についても クエン酸と全く同様の実験を行った。

その結果は Table 32 に示すように クエン酸あるいは EDTA による前処理によりモノラウリンの作用は著しく増強され、本処理時にはクエン酸あるいは EDTA の併用効果はみられなかった。しかし例外としてクエン酸処理した細胞に対してモノラウリン単独よりモノラウリンと EDTA を併用させた方が作用力が強く現われた。

Table 32. Effect of pretreatment of citric acid and EDTA on the antibacterial activity of monolaurin against *E. coli*.

Pretreatment ¹⁾ \ Treatment ²⁾	Prolongation of lag time (hr)			
	-	MC ₁₂	MC ₁₂ + CA	MC ₁₂ + EDTA
-	0	0.1	2.9	3.3
CA	0	5.7	5.5	13.5
EDTA	0	7.3	5.5	7.2

Concentration of drug: MC₁₂... 0.125 mM, CA (Na salt) ... 0.05 M, EDTA ... 0.01 M

- 1) The cells of *E. coli* were pretreated with drug in distilled water (pH 7.0) at 30°C for 60 min.
- 2) After centrifugation and washing, the cells were treated with monolaurin in distilled water (pH 7.0) at 30°C for 10 min. The treated cells were inoculated to nutrient broth at a rate of 2 % and incubated at 37°C.

b) 塩化マグネシウム, 塩化カルシウムによる保護効果
一般に塩化マグネシウム, 塩化カルシウムはキレート剤の

生体への作用に対して保護的に働くと言われている。⁵³⁾ そこでモノラウリンとクエン酸等の併用による殺菌作用に対する塩化マグネシウム、塩化カルシウムの影響を検討した。

Table 33 に示したように塩化マグネシウム、塩化カルシウムはモノラウリンとクエン酸等の併用による殺菌作用を保護しているが、その作用は塩化マグネシウムの方が強く現われている。

Table 33. Effect of magnesium chloride and calcium chloride on the antibacterial activity of drug combination against *E. coli*.

Treatment	Prolongation of lag time (hr)		
	-	MgCl ₂	CaCl ₂
MC ₁₂ + CA	2.4	0.1	0.6
MC ₁₂ + PP	10.0	0.1	0.5
MC ₁₂ + EDTA	10.1	2.2	

The cells of *E. coli* were treated with drug combination in distilled water (pH 7.0) at 30°C for 60 min with or without MgCl₂ or CaCl₂.

Concentration of drug: MC₁₂ ... 0.25 mM, CA (Na salt) ... 0.005 M, PP (K salt) ... 0.01 M, EDTA ... 0.01 M, MgCl₂ ... 0.05 M, CaCl₂ ... 0.07 M

また薬剤併用処理直後の細胞に塩化マグネシウムを添加して 30°C, 10 分間処理したもの, あるいは培養培地中に塩化マグネシウムを共存させて培養したものいずれについても保護効果はみられず, 薬剤作用時に塩化マグネシウムが存在する必要があるといえる。

また Table 32 でクエン酸前処理した細胞にモノラウリンを作用させる時塩化マグネシウムを共存させるとモノラウリンの効果は失われた。

C) *E. coli* によるモノラウリンの取りこみ

クエン酸との併用によりモノラウリンの殺菌作用が増強されるのは蒸剤併用によりモノラウリンの細胞内移行が増大したためであると予想されたので、併用によるモノラウリンの取りこみの変化を検討した。

E. coli によるモノラウリンの取りこみは無処理あるいはクエン酸処理した細胞いずれについてもモノラウリン接触後ただちに最高量に達し、5分間はほぼ一定であったが、10, 15, 30分後には時間と共に減少の傾向を示した。そこでモノラウリン処理時間は3分間とし、その結果を Table 34 に示した。

モノラウリンの取りこみ（あるいは吸着）はモノラウリン単独処理に比べ、クエン酸、ホリリン酸、EDTA で処理すると約3倍に増加することが明らかとなった。

しかしこれらの放射活性は millipore filter 上一回の水洗でほとんど失われることが認められるので、モノラウリンは細胞内部に取りこまれるのではなく、細胞表層部に存在して抗菌作用を示していることになる。

Table 34. Uptake of monolaurin by *E. coli*.

Drug	Uptake (n mole/10 ⁹ cells)
MC ₁₂	1.3
MC ₁₂ + CA	3.9
MC ₁₂ + PP	3.7
MC ₁₂ + EDTA	4.1

The cells of *E. coli* (10⁹ cells/ml) were treated with CA, PP, EDTA in distilled water (pH 7.0) at 30°C for 5 min, and ³H-monolaurin was added. After 3 min incubation at 30°C, sample (1 ml) was filtered through millipore filter and washed with 1 ml of monolaurin solution (1 mM). And the radioactivity on the filter was counted.

Concentration of drug: MC₁₂... 0.03 mM (6,200 cpm/ml),
CA (Na salt) ... 0.05 M, PP (K salt) ... 0.05 M,
EDTA ... 0.01 M

d) アミノ酸の取り込み阻害

脂肪酸の抗菌作用の機構のひとつとしてアミノ酸の取り込みが阻害されると言われているが、^{7,14,54,55)} モノラウリンの作用機構に関しては報告がなく、モノラウリンも脂肪酸と同様アミノ酸取り込みを阻害するか否か、およびクエン酸併用による *E. coli* に対する作用についても検討した。

Table 35 に示したように *Staph. aureus* におけるアミノ酸の取り込みはラウリン酸 (MIC 0.5mM), モノラウリン (MIC 0.125mM) いずれについてもそれぞれの MIC で約 90% 阻害され、それ以下の濃度でもかなりの阻害効果がみられた。

E. coli におけるアミノ酸の取り込みはクエン酸あるいはモノラウリン単独では全く阻害されないが、両者を併用処

理することにより *Staph. aureus* の場合と全く同じように阻害された。すなわち増殖が完全に阻害される濃度(クエン酸 0.5% とモノラウリン 0.125 mMの併用)で約90%阻害されるが、それ以下の濃度では阻害率は低くなっていた。

Table 35. Effect of lauric acid and monolaurin on L-Phenylalanine uptake.

a) *Staph. aureus*

Drug		Inhibition of uptake (%)
C ₁₂	0.125 mM	20.0
	0.25	46.1
	0.5 *	86.3
MC ₁₂	0.032	20.6
	0.063	50.8
	0.125 *	90.2

b) *E. coli*

Drug		Inhibition of uptake (%)
MC ₁₂	0.125 mM	3.8
CA		0
MC ₁₂	0.032 + CA	10.9
	0.063 + CA	47.8
	0.125 + CA	88.3

Concentration of CA (Na salt): 0.5 %

* MIC of drug

The cells of *Staph. aureus* or *E. coli* were grown to an absorbancy at 650 nm of 0.3 (*Staph. aureus*) and 0.5 (*E. coli*) in nutrient broth at 37°C. Chloramphenicol (100 µg/ml) and drug were added to this suspension, and the uptake was started by the addition of ¹⁴C-phenylalanine (266,000 cpm/ml). After 10 min incubation at 37°C, sample (0.5 ml) was filtered through millipore filter and washed with 3 ml of phosphate buffer. The radioactivity on the filter was counted.

e) 細菌細胞壁成分の漏洩

グラム陰性細菌のEDTA処理による薬剤感受性の増大は、細胞壁に存在し薬剤透過の障壁となっているリポ多糖類がEDTA処理により一部取り除かれるためであるといわれている。^{53, 56~60)} クエン酸、ポリリン酸の *E. coli* に対する作用がEDTAのそれと類似しているため、これらによるリポ多糖類の漏洩を検討した。この場合漏洩したリポ多糖類はこれに特異的に含有されるKDOとして定量した。その結果をTable 36に示した。

Table 36. Effect of EDTA, citric acid and polyphosphoric acid on the leakage of lipopolysaccharide of *E. coli*

Drug	KDO (n mole/ 2.7×10^{10} cells)
-	2.6
EDTA	64.1
CA	41.0
PP	73.8

E. coli was grown in nutrient broth at 37°C. After 24 hr incubation, the cells of *E. coli* were harvested by centrifugation, washed twice with distilled water, and finally suspended in distilled water to a concentration of ca. 5.4×10^{10} cells/ml. The cell suspension (2.7×10^{10} cells/ml) with drug was treated at 30°C for 60 min. After centrifugation of cell suspension, the supernatant was hydrolysed and the amount of KDO was analyzed by thiobarbituric acid method.^{50~52)}

Concentration of drug: EDTA... 0.01 M, CA (Na salt)... 0.05 M, PP (K salt)... 0.1 M

クエン酸処理(0.05M), ポリリン酸処理(0.1M)によるリポ

多糖類の漏洩はEDTA処理(0.01M)に比較してそれぞれ64%, 115%であった。また薬剤無処理ではリポ多糖類の漏洩はほとんどみられなかった。すなわちクエン酸、ポリリン酸はEDTAと同様 *E. coli* の細胞壁に働き、その成分であるリポ多糖類を漏洩させることが明らかになった。

第4節 考 察

一般にグラム陰性細菌はグラム陽性細菌に比較して薬剤感受性が低い^{53, 56~60)}が、その理由はグラム陰性細菌の細胞壁特にその成分のひとつであるリポ多糖類が薬剤透過の障壁となっていると言われ、EDTA処理による薬剤感受性の増強はEDTAの作用によりその障壁がはずされるためと考えられている。

クエン酸についても現象的にはEDTAの作用と非常に類似している。モノラウリンの作用点がラウリン酸のような脂肪酸と同様に細胞膜であると仮定するならば、Table 32の結果よりクエン酸処理によりEDTA処理の場合と同様細胞壁に存在する薬剤透過の障壁がはずされたと予想できる。そして作用点におけるモノラウリンの作用に関してはクエン酸による増強作用はないと考えられる。

しかしクエン酸処理した細胞についてモノラウリン処理時、EDTAによる増強作用がみられた。この理由は明らかでないが、クエン酸処理による細胞壁の障害がEDTA処理の場合と量的あるいは質的に異なり、クエン酸により障害

を受けた細胞壁はEDTAによる二次的な障害を受けやすくなったため、モノラウリンの透過性が更に高まったためと予想される。

塩化マグネシウム、塩化カルシウムは薬剤併用による殺菌作用に保護的に働いているが、第3章で述べたように塩化ナトリウム、塩化カリウムはモノラウリンの殺菌作用を若干増強させているので、保護作用の本体はマグネシウムイオン、カルシウムイオンと考えることができる。

またクエン酸処理した *E. coli* にモノラウリンを作用させる時、マグネシウムイオンが存在するとモノラウリンの殺菌作用はなくなる。これについてはラウリン酸、リノール酸のグラム陽性細菌に対する殺菌作用がマグネシウムその他の金属イオンにより抑制され、その理由としてこれらの脂肪酸が金属イオンと結合して反応系外に除去されるためであるという報告¹⁵⁾がある。しかし本実験で用いたモノラウリンが金属イオンと結合するとは考えられず、マグネシウムイオンによるモノラウリンの作用の抑制は、これがモノラウリンに直接作用するのではなく、モノラウリンの細胞への作用を阻害しているものと考えられる。

そして薬剤併用処理後塩化マグネシウムで処理しても修復作用はみられなかったことより、薬剤処理により細胞は不可逆的な障害を受けたものと考えられる。

モノラウリンは単独でも *E. coli* に取り込まれ（あるいは吸着される）が、クエン酸等で処理するとその取り込み量は

約3倍になっており、明らかに薬剤併用による量的な増強作用がみられた。しかし殺菌作用のほとんどみられないモノラウリン単独処理でも取りこみはみられ、3倍の取りこみ量の増加が生菌数 10^{-5} ~ 10^{-6} の低下に一義的に結びつくとはいえないが、モノラウリン単独処理では主に細胞壁表面に吸着されるのに対して、クエン酸等と併用すると一部のモノラウリンは細胞壁を通過し細胞膜まで達し、膜に傷害を与えると考えれば説明できる。

そして一度取りこまれたモノラウリンは水洗により簡単に細胞外に取り除かれるという事実はモノラウリンが殺菌作用を示すためにはそれが細胞内にいつまでも存在する必要はなく、一度取りこまれると細胞にとって不可逆な傷害を与えると考えられる。

なおEDTAの前処理によるアクチノマイシンDの取りこみ量増加について検討した報告によると *E. coli*,⁵⁶⁾ *Sal. enteritidis*⁶⁰⁾ いずれについてもEDTA処理によりアクチノマイシンDの取りこみは無処理の場合と比較してかなり増大(4~10倍)しているが、アクチノマイシンD単独処理でもやはりその取りこみは若干起っている。

脂肪酸の作用機作として従来から報告されてきたのは
1) 酸化的リン酸化の阻害(ATP量の低下),^{5,7)} 2) 酸素取りこみ阻害,^{5,7,14)} 3) アミノ酸取りこみ阻害,^{7,14,54,55)} 4) 膜タンパクに対する影響⁵⁾ であるが、この場合糖の取りこみは阻害しないと言われている。⁵⁵⁾

またこれら個々の作用機作を総括して考え、脂肪酸が細胞膜のタンパク質に作用し、ATP合成の担体としてのタンパク質あるいは物質輸送のための担体であるタンパク質の作用を阻害するという考え方もある。⁵⁾

以上の報告を総合して脂肪酸の作用機作として最も可能性が強いのは脂肪酸が細胞膜に作用しその構造をみだし(これには膜タンパクとの結合あるいはその漏洩等を含む)、その結果ATPの生産あるいはアミノ酸の取りこみ等に必要とされる細胞膜の高エネルギー状態⁶⁾を保つことが出来なくなることであり、酸化リン酸化阻害、アミノ酸取りこみ阻害等は二次的、三次的なものであるという考え方である。

本実験では複雑な脂肪酸の作用のひとつであるアミノ酸取りこみ阻害を作用機作の一例として取りあげ、これについて検討を加えた。

その結果 *Staph. aureus* においてはラウリン酸がそのMICでアミノ酸取りこみを86%阻害しており、モノラウリンもまたMICで90%阻害していた。この事実だけからはモノラウリンがラウリン酸と同様に細胞膜に傷害を与え、その結果としてのアミノ酸の能動輸送の阻害とは断定できないが、その可能性は強い。

また *E. coli* における結果より、モノラウリン単独ではほとんど細胞膜まで到達出来ないため膜の損傷も少ないが、クエン酸の存在により細胞膜への直接作用が可能となり、その結果アミノ酸取りこみが阻害されたと考えられる。

また *E. coli* に対する クエン酸, ポリリン酸処理により EDTA 処理に匹敵する リポ多糖類の漏洩がみられたことは クエン酸, ポリリン酸の薬剤感受性増強作用の機構が EDTA のそれと非常に類似していることを強く示唆している。

なお *E. coli* においては一般にリポ多糖類は乾燥菌体の約 6% を占め, KDO はリポ多糖類中に約 3% 含まれると言われている。^{57,58,62)} これらの知見をもとに Table 36 の KDO 値よりリポ多糖類の漏洩率を算出すると EDTA 処理の場合 32% となる。Leine⁵⁷⁾ は *E. coli* の EDTA 処理により 30~50% のリポ多糖類が漏洩することを示し, Chipley⁶³⁾ は *Sal. enteritidis* の EDTA 処理により 36% のリポ多糖類が漏洩することを報告している。従って本実験の結果は EDTA 処理に関して従来の報告とほぼ一致しているといえることができる。

この様に *E. coli* に対し単独ではほとんど抗菌作用力のないモノラウリンがクエン酸との併用あるいは前処理で顕著な殺菌作用を示すのは, クエン酸処理により細胞壁に存在するリポ多糖類を中心とする薬剤透過の障壁がはずされ, 薬剤の細胞内の作用点(細胞膜と推定される)への到達が容易になったためと考えられる。そしてモノラウリンの *E. coli* 細胞に対する作用は *B. subtilis*, *Staph. aureus* のようなグラム陽性細菌における作用と変らず, 細胞膜の構造変化を起し, その結果二次的な酸化的リン酸化阻害, アミノ酸取りこみ阻害等が起り, 細胞は増殖出来なくなったと考えられる。

第5節 要 約

クエン酸とモノラウリンの併用によるグラム陰性細菌に対する顕著な殺菌作用について、その作用機構を検討した。

殺菌作用は薬剤を同時に作用させる時はもちろん、クエン酸処理を行った細胞にモノラウリンを作用させても現われ、この場合クエン酸を共存させても作用力の増強は認められなかった。またモノラウリンの作用は塩化マグネシウムの存在でほとんど失われた。

次に *E. coli* によるモノラウリンの取りこみ(吸着)は単独でも起るが、クエン酸、ポリリン酸、EDTA 処理を行なうと3倍に増大した。

またモノラウリンはラウリン酸と同様 MIC において *Staph. aureus* のアミノ酸取りこみを顕著に阻害し、クエン酸と併用すると *E. coli* のアミノ酸取りこみもほとんど完全に阻害した。

またクエン酸あるいはポリリン酸を *E. coli* に作用させるとリポ多糖類が漏洩することを見出した。

これらの事実よりクエン酸処理により *E. coli* の細胞壁に存在する薬剤透過の障壁がはずされ、モノラウリンは細胞壁を透過し、その作用点まで達して細胞にとって不可逆な傷害を与え、これによって細胞の再生能力を消失せしめるものと考えられる。

総 括

本研究は脂肪酸およびその多価アルコールとのエステル
の安全性と抗菌作用に着目し、その中から広い抗菌スペク
トルと強い作用を持つ物質を見出し、食品をはじめ各分野
において強く要望されている低毒性抗菌剤として利用する
ための基礎となる知見を得ることを目的として実施したも
のである。

検討した脂肪酸およびそのエステルは従来からの知見よ
り抗菌作用の期待される炭素数6より18の飽和脂肪酸(カ
プロン酸, カプリル酸, カプリン酸, ラウリン酸, ミリス
チン酸, パルミチン酸, ステアリン酸), それぞれのモノグ
リセライド, 蔗糖モノエステル, 蔗糖ジエステルの合計28
種類であり, 不飽和脂肪酸は取り扱われなかった。

第1章ではこれらの薬剤の抗菌スペクトルを検討した結
果, かび, 酵母に対してはカプリン酸, モノカプリン, モ
ノラウリンが, グラム陽性細菌に対しては蔗糖ジカプリレ
ート, モノカプリン, モノラウリンが強い抗菌作用を示し
たが, グラム陰性細菌に対してはいずれも抗菌作用力は微
弱であった。またモノカプリン, モノラウリンは *B. subtilis*,
Staph. aureus の様なグラム陽性細菌に対して強い殺菌作用
を示すことを認めた。

そしてグラム陽性細菌に対するこれらのエステルの抗菌
作用における環境因子の検討を行った結果, 作用力は環境

pHによって変動は少なかったが、でん粉、アルブミン、モノパルミチンにより拮抗された。このことはこれらの脂肪酸エステルの実際面での応用範囲が制限される可能性がある。

第2章では単独ではグラム陰性細菌に対し抗菌作用の微弱な脂肪酸およびそのエステルについて、その作用力を増強させる手法を検討した結果、モノカプリン、ラウリン酸、モノラウリンが *E. coli*, *Ps. aeruginosa* その他のグラム陰性細菌に対し温和な加熱処理により顕著な殺菌効果を示すことを認めた。

第3章では実用面におけるより広い応用をめざし、薬剤併用によるグラム陰性細菌への抗菌作用を検討した。この場合併用する薬剤として天然に広く存在し、毒性も問題とならない有機酸、アミノ酸、リン酸等に限って検討した。

その結果いくつかのモノグリセライド、蔗糖エステルがクエン酸、ポリリン酸などとの併用により *E. coli* に対して顕著な殺菌作用を示した。アミノ酸類はほとんど影響がなく、その他の有機酸や無機塩の併用もクエン酸に比較するとその効果は弱かった。

殺菌作用は処理温度、pH、菌齢の影響を強く受け、また増殖期の *E. coli* はモノラウリンとクエン酸の併用によりすみやかに溶菌することを認めた。またクエン酸の添加による薬剤の *E. coli* に対する抗菌力増強は脂肪酸エステル以外にもエリスロマイシン、タイロシン等にもみられ、クエン

酸の作用がかなり一般的なものであることが示された。また脂肪酸エステルとクエン酸あるいはポリリン酸の併用による殺菌作用はグラム陰性細菌に対して広く認められたが、その作用力は菌種によりかなり変動していた。

第4章ではクエン酸とモノラウリンの併用による *E. coli* に対する作用の機構を検討し、クエン酸前処理を行った細胞はモノラウリンによる殺菌作用を非常に受けやすくなることなど、クエン酸の添加効果はEDTAの作用と類似するところが多く、薬剤透過性の増強が予想されたが、モノラウリンの取りこみを測定した結果無処理に比べて約3倍増強されていた。また細胞内へのアミノ酸取りこみ阻害がモノラウリン単独では起らず、クエン酸との併用によって始めて現われてくることおよびクエン酸単独処理により薬剤透過の障壁と考えられているリポ多糖類が漏洩することより、モノラウリンの細胞内作用点への到達がクエン酸により増強されたと考えることができる。

以上脂肪酸およびそのエステルは単独でかび、酵母、グラム陽性細菌に対し強い抗菌作用を示すこと、温和な加熱処理あるいは薬剤併用処理によりグラム陰性細菌に対して顕著な殺菌作用を示すことを明らかにした。

本研究によって脂肪酸およびそのエステルを食品、化粧品その他の分野における広範囲の微生物に対して有効な低毒性防菌防黴剤として利用するための基礎が確立された。

文 献

- 1) Nieman, C. : *Bacteriol. Rev.*, 18, 147 (1954).
- 2) Hassinen, J. B., Durbin, G. T., Bernhart, F. W. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 31, 183 (1951).
- 3) Camien, M. N., Dunn, M. S. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 70, 327 (1957).
- 4) Willett, N. P., Morse, G. E. : *J. Bacteriol.*, 91, 2245 (1966).
- 5) Sheu, C. W., Freese, E. : *J. Bacteriol.*, 111, 516 (1972).
- 6) Freese, E., Sheu, C. W., Galliers, E. : *Nature*, 241, 321 (1973).
- 7) Sheu, C. W., Salomon, D., Simmons, J. L., Sreeravalson, T., Freese, E. : *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 1, 349 (1975).
- 8) Eisler, D. M., Metz, E. K. : *J. Bacteriol.*, 95, 1767 (1968).
- 9) Kato, A., Arima, K. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 596 (1971).
- 10) Khan, M., Katamay, M. : *Appl. Microbiol.*, 17, 402 (1969).
- 11) Salanitis, J. P., Wegener, W. S. : *J. Bacteriol.*, 108, 885 (1971).
- 12) Fay, J. P., Farias, R. N. : *J. Gen. Microbiol.*, 91, 233 (1975).
- 13) Woolford, M. K. : *J. Sci. Fd Agric.*, 26, 219 (1975).
- 14) Sheu, C. W., Freese, E. : *J. Bacteriol.*, 115, 869 (1973).
- 15) Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M., Thompson, J. K. : *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 803 (1971).

- 16) Galbraith, H., Miller, T. B. : J. Appl. Bacteriol., 36, 635 (1973).
- 17) Wyss, O., Ludwig, B. J., Joiner, R. R. : Arch. Biochem., 7, 415 (1945).
- 18) Lindeberg, G., Lindeberg, M. : Arch. Microbiol., 101, 109 (1974).
- 19) Teh, J. S. : Appl. Microbiol., 28, 840 (1974).
- 20) Huppert, M. : Antibiotics Chemother., 7, 29 (1957).
- 21) Kabara, J. J., Smieczkowski, D. M., Conley, A. J., Truant, J. P. : Antimicrob. Ag. Chemother., 2, 23 (1972).
- 22) Conley, A. J., Kabara, J. J. : Antimicrob. Ag. Chemother., 4, 501 (1973).
- 23) 谷, 柳, 石田 : 醗工, 39, 92 (1961).
- 24) 古賀, 渡辺 : 食品工誌, 15, 297, 310 (1968).
- 25) 上田, 徳永 : 調味科学, 13 (6), 1 (1967).
- 26) 渡辺 : 調味科学, 19 (3), 31 (1972).
- 27) 江口, 宮本, 沼上 : 調味科学, 19 (11), 43 (1972).
- 28) Osipow, L., Snell, F. D., York, W. C., Finchler, A. : Ind. Eng. Chem., 48, 1459 (1956).
- 29) 大竹, 玉手 : 工化, 67, 809, 1586 (1964).
- 30) 木下 : 工化, 66, 450 (1963).
- 31) Iandolo, J. J., Ordal, Z. J. : J. Bacteriol., 91, 134 (1966).
- 32) Tomlins, R. I., Ordal, Z. J. : J. Bacteriol., 105, 512 (1971).
- 33) Shibasaki, I., Tsuchido, T. : Acta Alimentaria, 2, 327

- (1973).
- 34) Griffiths, R. P., Haight, R. D. : *Can. J. Microbiol.*, 19, 557 (1973).
 - 35) Gray, R. J. H., Witter, L. D., Ordal, Z. J. : *Appl. Microbiol.*, 26, 78 (1973).
 - 36) 芝崎 : 食品殺菌工学 (3版), 22, 142, 光琳書院 (1975).
 - 37) 芝崎 : 加工食品と食品衛生 (河端, 菅野編), 153, 新思潮社 (1971).
 - 38) 芝崎, 飯田 : 食品工誌, 15, 447 (1968).
 - 39) 土戸, 岡崎, 芝崎 : 醗工, 50, 341 (1972).
 - 40) Tsuchido, T., Ozawa, O., Shibasaki, I. : *J. Ferment. Technol.*, 53, 363 (1975).
 - 41) Tsuchido, T., Kanda, K., Shibasaki, I. : *J. Ferment. Technol.*, 53, 862 (1975).
 - 42) Lategan, P. M., Vaughn, R. H. : *J. Food Sci.*, 29, 339 (1964).
 - 43) Michener, H. D., Thompson, P. A., Lewis, J. C. : *Appl. Microbiol.*, 7, 166 (1959).
 - 44) Shida, T., Komagata, K., Mitsugi, K. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 21, 75 (1975).
 - 45) Leine, L. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, 13 (1965).
 - 46) Muschel, L. H., Gustafson, L. : *J. Bacteriol.*, 95, 2010 (1968).
 - 47) Spicer, A. B., Spooner, D. F. : *J. gen. Microbiol.*, 80, 37 (1974).
 - 48) Voss, J. G. : *J. gen. Microbiol.*, 48, 391 (1967).
 - 49) Hague, H., Russell, A. D. : *Antimicrob. Ag. Chemother.*,

- 6, 200 (1974).
- 50) Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E., Carson, J. :
J. Biol. Chem., 247, 3962 (1972).
 - 51) Osborn, M. J. : Proc. N. A. S., 50, 499 (1963).
 - 52) Weissbach, A., Hurwitz, J. : J. Biol. Chem., 234, 705
(1959).
 - 53) Leine, L. : J. Biol. Chem., 243, 2373 (1968).
 - 54) Galbraith, H., Miller, T. B. : J. Appl. Bacteriol., 36, 659
(1973).
 - 55) Shou, C. W., Konings, W. N., Freese, E. : J. Bacteriol.,
111, 525 (1972).
 - 56) Leine, L. : Proc. N. A. S., 53, 745 (1965).
 - 57) Leine, L. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 21, 290 (1965).
 - 58) Tamaki, S., Sato, T., Matsushashi, M. : J. Bacteriol.,
105, 968 (1971).
 - 59) Tamaki, S., Matsushashi, M. : J. Bacteriol., 114, 453 (1973).
 - 60) Chipley, J. R., Edwards, Jr. M. M. : Can. J. Microbiol.,
18, 1803 (1972).
 - 61) Rosen, B. P., Adler, L. W. : Biochim. Biophys. Acta , 387,
23 (1975).
 - 62) Leine, L., Shoulin, V. K. : J. Biol. Chem., 243, 6384
(1968).
 - 63) Chipley, J. R. : Microbios , 10, 139 (1974).

謝 辞

この研究を行なうにあたり、終始御指導を賜った恩師
芝崎勲教授をはじめ、合葉修一教授、田口久治教授、大嶋
泰治教授、岡田弘輔教授、市川邦介教授、原田篤也教授、
高野光男助教授ならびに教室員の方々に深く感謝いたしま
す。

また研究の便宜をはかって頂きました理研ビタミン油株
式会社、第一工業製薬株式会社に深謝致します。

本論文に関係ある主な報告

脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用力の比較
醗酵工学雑誌 53巻 793 (1975)

脂肪酸およびそのエステルの *Escherichia coli* および
Pseudomonas aeruginosa に対する加熱併用効果
醗酵工学雑誌 53巻 802 (1975)

脂肪酸およびそのエステルの抗菌作用に対する種々の
薬剤の影響
防菌防黴誌 3巻 355 (1975)

クエン酸添加による脂肪酸エステルの抗菌作用力の
増強作用機構の解析
防菌防黴誌 (投稿予定)