

# 植物抽出液の抗菌活性を評価するための 迅速なスクリーニング試験法の開発

## Development of The Screening Assay to Evaluate The Antimicrobial Activity of Plant Extracts

山田建太<sup>1)</sup>、宮代悠希<sup>1)</sup>、佐藤真<sup>2)</sup>、柏木敏<sup>2)</sup>、高田勝己<sup>3)</sup>、村上篤司<sup>4)</sup>

YAMADA Kenta, MIYASHIRO Yuki, SATO Makoto, KASHIWAGI Satoshi,  
TAKADA Katsumi, MURAKAMI Atsushi

### 1. 背景

持続的発展が可能な循環型社会の構築を目指すうえで、廃棄物の減量は重要な課題の一つに位置付けられている<sup>[1]</sup>。現在、我が国では年間1700万トンの食品由来廃棄物が排出されており、このうち事業系廃棄物が3分の1を占めている<sup>[2]</sup>。これら事業系の食品由来廃棄物のほとんどは、焼却・埋め立てられており、循環利用されずに廃棄されている。一部の廃棄物については、飼料・肥料化<sup>1)</sup>、またはエネルギー化といった循環利用がされているが、その他の利用方法が限られていることから、新たな再生利用方法が求められている。

静岡県富士市は、お茶や柑橘類の産地であることから、これらを加工する食品工場が多数あり、その加工工程で茶葉や柑橘類果皮等の食品残さが大量に廃棄されている。茶葉や柑橘類果皮には、抗菌活性を有する成分が含まれていることが知られているが<sup>[3-6]</sup>、食品由来廃棄物として排出された残さに含まれる抗菌活性を有する成分に注目した研究は少ない。この植物由来抽出液の抗菌作用を新たな製品に利用することが可能となれば、食品残さを肥料や飼料にするだけでなく、抗菌性成分として高付加価値を与えて再生利用することが可能となる。

細菌による食品汚染が社会的に注目されるようになった1990年代から、衛生的な生活環境の向上を目的とした、所謂ウェットティッシュのような生活用品の需要が増加した。それら生活用品は、身の回りの物や手などを清潔に保つことを目的に市販されており、抗菌剤や静菌剤等が含有されているものが多種市販されている。しかし、このような製品に利用できる合成抗菌剤の種類は限られているだけでなく、その価格も安価ではない。そこで、近年は植物に含まれている抗菌活性を有する天然成分が注目されている。植物から抗菌活性を有する成分を抽出し、これを製品に添加することで生活用品に抗菌性を

<sup>1)</sup> 常葉大学社会環境学部

<sup>2)</sup> 株式会社コーヨー化成ウェット事業部

<sup>3)</sup> タカダテクノコンサルタント

<sup>4)</sup> 環境科学研究所

付与する手法が試みられている。植物抽出液を抗菌性成分として利用するためには、多種検体の抗菌活性を何度も評価する必要があることから、その評価のために迅速で簡便かつ安価な抗菌活性の評価試験法が求められている。

植物抽出液や市販の抗菌剤が有する抗菌活性は、薬剤感受性試験によって評価されている。この試験の評価は、一般に日本化学療法学会<sup>[7]</sup>、や臨床検査標準委員会 (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI)<sup>[8]</sup>の指針に基づく、平板培地法によるコロニー形成や、試験管希釈法による濁度を目視で観測した結果が指標とされていることから、試験操作が煩雑だけでなく、培養や測定に時間を要する。試験操作を簡便にするために96穴マイクロプレートを用いた微量希釈法（以降、MP法と呼称する）を適応させた簡易試験法も開発されているが<sup>[9,10]</sup>、それら試験法では吸光度で濁度を測定した結果を指標としており、測定結果を得るためには20時間以上の培養時間を要する。そこで、近年ではテトラゾリウム塩を検出試薬とした、高感度な薬剤感受性試験法の開発が試みられている<sup>[11-13]</sup>。この検出試薬は、生細菌によってホルマザン色素へと代謝される。この色素の生成量は生菌数と比例することから、色素の吸光度を測定することで細菌の生存率や増殖率を評価することが可能である。Tukataniらは<sup>[11]</sup>、新たに合成された水溶性テトラゾリウム塩を検出試薬としたMP法を採用することで、高感度かつ迅速な試験法を開発したが、この試薬は高価であることから、抗菌性物質のスクリーニングといった多検体の測定・評価を行う場合に莫大な研究費を要する。

そこで、本研究では培養に96穴マイクロプレートを用いることで操作を簡便にすることと、検出試薬として安価で入手が容易なテトラゾリウム塩を用いることで、迅速かつ簡便だけでなく、安価に抗菌活性を評価できるスクリーニング試験法を開発することを目的とした。また、本試験を用いて実際の食品由来廃棄物から茶葉廃棄物と柑橘類のダイダイ果皮廃棄物を選択し、それら廃棄物から抽出した茶葉抽出液とダイダイ精油の抗菌活性を評価した。

## 2. 実験方法

### 2-1. 試薬

細菌の培養にはミューラーヒントン (MH, 関東化学株式会社製の) 培地を用いた。本試験では、安価で入手が容易な3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, 株式会社同仁化学研究所製)を検出試薬として用いた。MTTは精製水で0.1 mg/mL溶液となるよう調整し、0.20  $\mu$  mの加圧式フィルターでろ過滅菌した後、試験に用いた。本研究では、抗菌剤として使用されている、benzalkonium chloride (BZC, 鹿1級, 関東化学株式会社製)、cetylpyridinium chloride (CPC, 鹿1級, 和光純薬工業株式会社製)、chloramphenicol (CF, 生化学用, 和光純薬工業株式会社製)、oxacillin sodium monohydrate (OX, 生化学用和光純薬工業株式会社製)、ciprofloxacin (CFX, purity >98.0%, 東京化成工業株式会社製)の5種の化合物の抗菌活性を評価した。表1は今回試験に用いた抗菌剤を一覧にし示したものである。また被検試料の調整にエタノール (残留農薬試験用 300, 関東化学株式会社製)を用いた。生成したホルマザン色素を溶解するために、sodium dodecyl sulfate (SDS, 1級, 和光純薬工業株式会社製)を用いた。

表 1. 本試験で抗菌活性を評価した抗菌剤の一覧

| Compounds (abbreviation)          | CAS No.    | M.W.                | Chemical Formula  | Classification           | Type of activity |
|-----------------------------------|------------|---------------------|---|--------------------------|------------------|
| benzalkonium chloride (BZC)       | 3001-54-5  | 353.5 <sup>a)</sup> | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup><br>(R=C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ~C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> ) | quaternary ammonium salt | bactericidal     |
| chloramphenicol (CP)              | 56-75-7    | 323.13              | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> C <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>   | chloramphenicol          | bacteriostatic   |
| cetylpyridinium chloride (CPC)    | 123-03-5   | 358.00              | (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NC <sub>16</sub> H <sub>33</sub> )Cl · H <sub>2</sub> O  | quaternary ammonium salt | bactericidal     |
| ciprofloxacin (CFX)               | 85721-33-1 | 331.35              | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>  | fluoroquinolone          | bactericidal     |
| oxacillin sodium monohydrate (OX) | 7240-38-2  | 423.42              | C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S   | β-Lactam                 | bactericidal     |

a) 本研究では BZC のアルキル側鎖を C<sub>13</sub> として分子量を計算した

## 2-2. 菌種

本研究では、独立行政法人製品評価技術基盤機構より分譲された大腸菌 *Escherichia coli* (NBRC 3972) を評価試験菌として用いた。この菌は、MH 培地で 20 時間培養し、その培養液を滅菌リン酸緩衝生理食塩水で希釈して波長 550 nm の吸光度が 0.125 になるよう調整した。この操作によって試験に用いる菌液の菌数は約  $1 \times 10^6$  CFU/mL に調整した。また、試験操作においてマイクロプレート上で  $5 \times 10^5$  CFU/mL に希釈した。

## 2-3. 吸光度測定

吸光度の測定に、コロナ電気株式会社製マイクロプレートリーダー SH-1000Lab を用いた。測定波長は 530 nm に設定した。

## 2-4. 植物由来試料

本研究では、チャノキ (英名: Tea plant, 学名: *Camellia sinensis*) から採取し、茶葉へと加工される過程で排出される粉末状の廃棄物から抽出した茶葉抽出液と、搾汁残さとして廃棄されたダイダイ (英名: Bitter orange, 学名: *Citrus aurantium*) の果皮から抽出したダイダイ精油を試料として選択した。

茶葉抽出液は以下の方法で調整した。粉末状の茶葉 2 g から、温度 78°C で 5 分間の条件でエタノールを抽出溶媒としたソックスレー法により得られた 40 mL の抽出液を茶葉抽出液とした。この抽出液には色素類が多く含まれており、本試験における測定を妨害することが予測されたことから、色素類を固相カートリッジ ENVI-Carb LC/NH<sub>2</sub> (Supelco 社製) によって除外したものを被検試料とし、その 50 μL を試験に用いた。

ダイダイ精油は以下の方法によって調整した。ダイダイ果皮 3 kg に水を加えて粉碎した後、減圧下で 50°C の条件で水蒸気蒸留法によって 42 g のダイダイ精油を得た。この精油の 0.5 mg をエタノールに 1 g となるよう溶解したものを被検試料とし、そのうち 50 μL を試験に用いた。茶葉抽出液とダイダイ精油は、試験に用いる直前に、0.2 μm の加圧式フィルターでろ過滅菌した。

## 2-5. 大腸菌の増殖試験

大腸菌の増殖試験は既報を参考に行った<sup>[11]</sup>。初期菌数が約  $5 \times 10^6 \sim 10^2$  CFU/mL になるようマイクロプレート上で 10 段階希釈し、37°C で 0、1、2、3、4、5、6、7、8 時間の設定で培養した。設定した各培養時間で培養した後、MTT を添加し、1 時間反応した後の吸光度を測定することで、培養時間

による吸光度の経時変化を観測した。

また、増殖試験から得られた吸光度のデータを用いて、吸光度が0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0に達するまでの培養時間と初期菌数をプロットし回帰式を求めた。

## 2-6. スクリーニング試験による抗菌活性評価

本研究で開発したスクリーニング試験によって抗菌剤や植物抽出液の抗菌活性を評価した。MTTは、生細菌によって約530 nmに吸収を有するホルマザン色素へと代謝されることから、生成される色素量は生菌の代謝活性に比例する。つまり、被検物質を含んだ液体培地中で菌を培養した後、MTTを添加することで生じるホルマザン色素の吸光度を測定し、その増減を観測することで、被検物質による菌の発育阻止率を評価することが可能である。

スクリーニング試験は、既報を参考に行った<sup>[11-13]</sup>。本研究で行ったスクリーニング試験の手順を以下に記す。まず、96穴マイクロプレートの全ウェルにMH培地を50 μL分注した。次に、被検試料50 μLをA列に添加し、かく拌した後、A列から50 μL採り、それをB列に添加した。この操作をH列まで行うことで段階希釈した。マイクロプレートを攪拌した後、菌数を約1 × 10<sup>6</sup> CFU/mLに調整した菌液を、全てのウェルに50 μL添加し、37°Cで4時間培養した。培養後、MTT溶液を全ウェルに50 μL添加し、37°Cで1時間反応させた。反応後、10%SDS溶液を50 μL添加しホルマザン色素を溶解し、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

また、陰性コントロール（以降、N.C.と略記する。最も吸光度が高くなる）として、被検物質の代わりにエタノールを添加した。さらに、菌液と被検物質を添加しないブランク（以降、BLと略記する。最も吸光度が低くなる）を設定した。細菌の発育阻害率は、式(1)により算出した。被検試料濃度の増加に依存した阻害率の増加、つまり用量-反応曲線が観測され、かつ阻害率が50%を超えた検体について、本試験では抗菌作用を有すると判断した。なお、これら阻害率は全て2回の試験により得られた値の平均値とした。

本試験では、被検試料の抗菌力の評価に、50%阻害濃度（50% inhibitory concentration: IC<sub>50</sub>）と、最少発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration; MIC）を用いた。本研究におけるIC<sub>50</sub>の定義は、被検試料濃度と阻害率との間で単回帰式を求め、得られた回帰式から50%阻害率になる濃度を外挿して算出された値とした。また、MICの定義は、菌の発育を90%以上阻害する最少濃度とした。

$$\text{阻害率} [\%] = \left\{ 1 - \frac{(\text{検体の吸光度} - \text{BLの吸光度})}{(\text{N.C.の吸光度} - \text{BLの吸光度})} \right\} \times 100 \quad \dots (1)$$

## 3. 結果と考察

### 3-1. 培養時間の検討と定量性の評価

図1は大腸菌の増殖試験を行った結果を示したものである。初期菌数を5 × 10<sup>6</sup> CFU/mLとした場合では、培養時間が0、1時間の時吸光度は変化せず、2時間以降から増加し、4時間培養で吸光度は約1.20まで達し、さらに長時間の培養をしても吸光度はほぼ一定となる増殖曲線が得られた。また、初期

菌数を少なくすると、吸光度が増加するまでに必要な培養時間が長くなった。これは大腸菌の増殖に伴い検出試薬として添加した MTT から生成されたホルマザン色素の量も増加したことを示唆しており、MTT を用いることで、大腸菌の増殖を吸光度によって十分評価できると考えられた。

図 2 は、このデータを用いて吸光度が 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 に達するまでの培養時間と初期菌数をプロットし回帰式を求め、その直線性を示す決定係数 ( $r^2$ ) を算出した結果を示したものである。これより、吸光度 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 において  $r^2$  が 0.9 以上であり培養時間と菌数の高い相関が得られた。つまり、本条件で評価試験を行う場合、吸光度が 0.1 から 0.8 に到達する培養時間で、定量的な測定が可能と言える。この結果から、抗菌活性のスクリーニング試験法の条件として、初期菌数は  $5 \times 10^5$  CFU/mL とし、培養時間は 4 時間に設定することで、可能な限り短時間でかつ定量的な測定が可能であると考えられた。

また、吸光度が 0.8 に達するまでの培養時間に対する初期菌数をプロットして得られた回帰式は  $y = -0.38\ln(x) + 7.284$  であり、この式から約 8 時間の培養で 1 個の大腸菌を検出できることが示唆された。この結果は、新規の検出試薬を使用した既報の試験方法とほぼ同じであった<sup>[8]</sup>。Tukatani らは<sup>[11]</sup>、近年高感度で迅速に生菌の検出が可能な試薬として水溶性テトラゾリウム塩を使用しているが、この試薬を使用するとプレート 1 枚あたり約 10,000 円のコストを要する。一方、本法では 10%SDS 溶液を添加してテトラゾリウム塩を溶解させる操作が加わるが、安価な検出試薬である MTT を使用していることから、プレート 1 枚あたり約 1,000 円と、10 分の 1 のコストで試験が可能である。従って、本試験方法を用いることで、高価な検出試薬を使用しなくても高感度で大腸菌を検出することが可能であり、本試験法は多検体の抗菌活性評価に有益と言える。

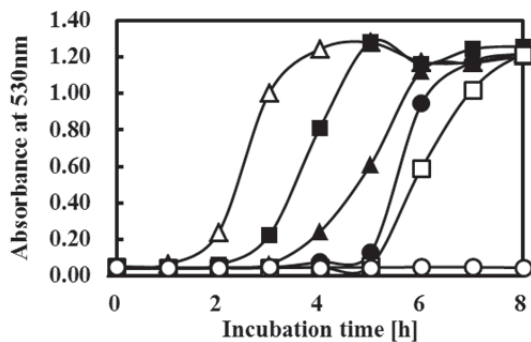


図 1. 大腸菌の増殖試験

初期菌数 [CFU/mL]

- ( $\Delta$ )  $5 \times 10^6$
- ( $\blacksquare$ )  $5 \times 10^5$
- ( $\blacktriangle$ )  $5 \times 10^4$
- ( $\bullet$ )  $5 \times 10^3$
- ( $\square$ )  $5 \times 10^2$
- ( $\circ$ ) 0

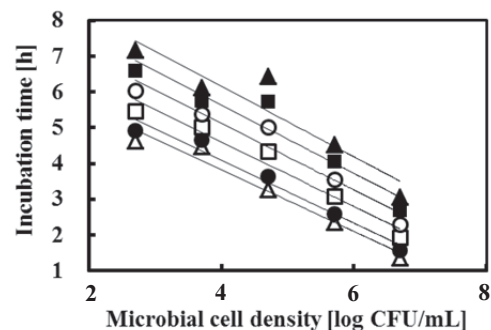


図 2. 目的の吸光度に達するまでに要した培養時間

- ( $\Delta$ ) 0.1;  $y = -0.41\ln(x) + 9.447$  ( $r^2=0.96$ )
- ( $\bullet$ ) 0.2;  $y = -0.40\ln(x) + 8.829$  ( $r^2=0.96$ )
- ( $\square$ ) 0.4;  $y = -0.39\ln(x) + 8.211$  ( $r^2=0.96$ )
- ( $\circ$ ) 0.6;  $y = -0.38\ln(x) + 7.593$  ( $r^2=0.95$ )
- ( $\blacksquare$ ) 0.8;  $y = -0.38\ln(x) + 7.284$  ( $r^2=0.92$ )
- ( $\blacktriangle$ ) 1.0;  $y = -0.37\ln(x) + 7.299$  ( $r^2=0.88$ )

### 3-2. スクリーニング試験による抗菌剤の抗菌活性評価

本研究で構築されたスクリーニング試験を用いて、5 種の抗菌剤の抗菌活性を評価した。図 3 はその結果得られた抗菌剤の用量 - 反応曲線を示したものである。この結果、高い精度で  $IC_{50}$  と MIC を評価するためには、さらに細かい濃度設定で試験をする必要があるが、全ての抗菌剤において、用量の増加によって阻害率の増加が認められた。今回試験に用いた抗菌剤は、全てグラム陰性菌に対する抗菌活性

を有することが知られており、本試験結果からも大腸菌に対する抗菌活性を有することが確認された。

一般に、抗菌剤の抗菌力を正確に評価するためには、日本化学療法学会や CLSI の指針に準拠した薬剤感受性試験によって測定された IC<sub>50</sub> や MIC 値を用いる必要がある。しかし、本試験法はスクリーニング試験であることから、IC<sub>50</sub> や MIC 値を測定することが目的ではなく、迅速に抗菌活性の有無を確認することと、相対的な抗菌力の比較を目的としている。従って、本研究では、図1の用量 - 反応曲線から算出された IC<sub>50</sub> と MIC の値から抗菌力を比較し、既報の簡易試験法から得られた値と比較しても差し支えないと判断した。表2に算出した5種の抗菌剤の IC<sub>50</sub> と MIC の値を示した。IC<sub>50</sub> の値から5種の抗菌剤の抗菌力を比較したところ、表2に示したように抗菌力の順位は、CFX > OX > CPC > CP > BZCであった。最も強い抗菌力が観測された CFX は、ニューキノロン系の抗菌剤であり、幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有することが知られている<sup>[14]</sup>。検出試薬に WST-8 を用いた Tukatani らの試験においても<sup>[11]</sup>、大腸菌に対して CFX の抗菌活性が最も強かったことが報告されている。

表3は本試験で測定された抗菌剤の MIC 値を他研究と比較したものである。これより、CP の MIC 値はほぼ同じであった。BZC と CPC の MIC については、他研究の結果よりも4~10倍程度抗菌力が強く検出された。BZC や CPC のような陽イオン界面活性剤は、エタノール等のアルコールと混合することで、抗菌活性に相乗的な効果が得られることが知られている<sup>[15]</sup>。本研究では、標準試薬の溶解にエタノールを使用したことが、BZC と CPC において他研究結果よりも強い抗菌活性が観測された要因の一つと考えられた。

試験に要する時間を他研究と比較すると、表3に示したように本研究では培養時間に4時間、発色試薬との反応に1時間と共に短時間であった。つまり、本試験法は数時間の実験操作によって、他研究結果と同程度に、抗菌活性を評価することが可能であり、スクリーニング試験法として十分使用できると言える。

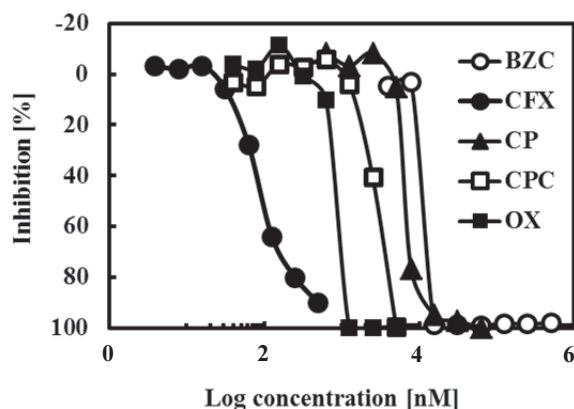


図3. スクリーニング試験から得られた抗菌剤の用量 - 反応曲線

表2. 本実験から得られた各種抗菌剤の IC<sub>50</sub> と MIC 値

| No. | Compounds | IC <sub>50</sub> [μM] | MIC [μM] | Concentration range [μM] |
|-----|-----------|-----------------------|----------|--------------------------|
| 1   | CFX       | 0.1                   | 0.5      | 0.004 - 0.5              |
| 2   | OX        | 0.8                   | 1.2      | 0.4 - 5.0                |
| 3   | CPC       | 3.0                   | 5        | 40 - 5000                |
| 4   | CP        | 8.6                   | 16       | 625 - 62500              |
| 5   | BZC       | 11                    | 16       | 4000 - 500000            |

表 3. 本実験と他試験で得られた MIC 値の比較

| Authors                               | Microbial<br><i>E. coli</i> | MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ] |      |     |       | Incubation<br>times [h] | Reaction<br>times [h] | Detection<br>reagents |
|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------|-----|-------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                       |                             | BZC                      | CPC  | CP  | CPX   |                         |                       |                       |
| This study                            | NBRC3972                    | 5.7                      | 1.8  | 5.7 | 0.16  | 4                       | 1                     | MTT                   |
| Tukatani <i>et al</i> <sup>[11]</sup> | NBRC3972                    | -                        | -    | 8   | 0.062 | 6                       | 2                     | WST-8                 |
| Miyano <i>et al</i> <sup>[9]</sup>    | IFO3972                     | 15.8                     | 15.8 | -   | -     | 24                      | 0                     | Not use               |
| Hosono <i>et al</i> <sup>[10]</sup>   | NBRC3972                    | 25                       | -    | 6.3 | -     | 24                      | 0                     | Not use               |

### 3-3. スクリーニング試験による茶葉抽出液とダイダイ精油の抗菌活性評価

スクリーニング試験により得られたダイダイ精油、茶葉抽出液の用量 - 反応曲線を図 4 に示した。植物抽出液中に含まれる抗菌活性を有する物質の濃度は不明であることから、今回は横軸を濃度ではなく希釈倍率として表した。これより、ダイダイ精油と茶葉抽出液から希釈倍率が低くなるに従い阻害率が増加することが確認された。つまり、ダイダイ精油と茶葉抽出液中に大腸菌の増殖に対する阻害活性を有する物質が含まれていることが示唆された。茶葉抽出液とダイダイ精油中には、今回の試験では、茶葉抽出液とダイダイ精油中に存在すると推察される抗菌活性物質の濃度は不明であることから、茶葉抽出液とダイダイ精油の抗菌力を数値として表し比較することはできない。しかし、本試験法を用いることで、植物から得られた抽出液の抗菌活性の有無を迅速に評価できることが確認されたことから、本試験法は、植物抽出液の抗菌活性スクリーニング試験として十分使用可能と言える。

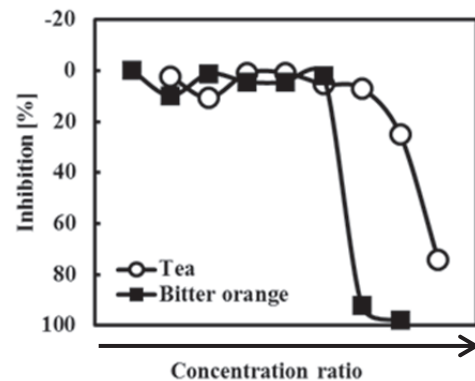


図 4. スクリーニング試験から得られた茶葉抽出液とダイダイ精油の用量 - 反応曲線

## 4. まとめ

本研究によって開発したスクリーニング試験法を用いることで、合成抗菌剤だけでなく、食品由来廃棄物である茶葉粉末から抽出した茶葉抽出液と、搾汁残さであるダイダイ果皮から抽出したダイダイ精油の抗菌活性を評価することが十分可能であることが確認された。この試験法は、良好な定量性が確認されただけでなく、平板培地法や検出試薬を用いない MP 法と比較して培養時間を短縮でき、生菌の検出感度も高かった。また、安価なテトラゾリウム塩を使用することで、研究コストを低く抑えることが可能であることから、多検体のスクリーニングにも適応可能である。つまり、本研究で開発したスクリーニング試験法を用いて、様々な食品由来廃棄物から得られた抽出液の抗菌活性を測定することで、新規な天然の抗菌性成分を見出すことが可能である。従って、本試験法は食品由来廃棄物に、抗菌活性の付加価値を与えて再生利用するためのスクリーニング試験法としての利用が期待できる。

## 引用文献

- [1] 環境省「平成25年版 環境・循環型社会・生物多様性白書」2013年 (<http://www.env.go.jp/policy/hakusho/h25/pdf.html>、2013年11月29日閲覧)。
- [2] 農林水産省「平成22年度食品廃棄物等の年間総発生量及び食品循環資源の再生利用等実施率について」2012年 (<http://www.maff.go.jp/j/press/shokusan/kankyoi/120831.html>、2013年11月29日閲覧)。
- [3] Toda M., Okubo S., Hiyoshi R., and Shimamura T. (1989) “The bactericidal activity of tea and coffee” *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 8, pp. 123-125
- [4] Kubo, I., Muroi, H. and Himejima, M. (1992) “Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 40, pp. 245-248.
- [5] Archana N. S., Vijay J., and B. Melkani. (2011) “Antimicrobial activity of six different parts of the plant citrus medica Linn” *Pharmacognosy Journal*, Vol. 3, No. 21, pp. 80-83
- [6] Yong-Wan Kim, Heung Jae Chun, In-Wook Kim, Hai-Bo Liu, Woong Shick Ahn. (2013) “Antimicrobial and antifungal effects of green tea extracts against microorganisms causing vaginitis”, *Food Science and Biotechnology*. Vol. 22 No. 3, pp. 713-719
- [7] 抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(2008)「寒天平板希釈法によるMIC測定法」『日本化学療法学会雑誌』Vol. 56, 1号, pp. 49～57
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006) “Methods for dilution microbial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – 7th edition M7-A7” Wayne, PA, USA.
- [9] 宮野直子 (2009)「界面活性剤の皮膚常在菌への影響」『大阪府立公衆衛生研究所報』47号、pp. 47-52
- [10] 細井永次, 鳴島善聡 (2010)「抗菌剤の簡易評価法の開発」『埼玉県産業技術総合センター研究報告』8巻
- [11] Tsukatani T, Higuchi T, Suenaga H, Akao T, Ishiyama M, Ezoe T, Matsumoto K. (2009) “Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances”, *Analytical Biochemistry*. Vol. 393, pp. 117-125
- [12] Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, Noguchi K, Ishiyama M, Ezoe T, Matsumoto K. (2012) “Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria” *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 90, pp. 160-166
- [13] Gerald Müller and Axel Kramer. (2008) “Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 61, pp. 1281-1287
- [14] Drago L., De Vecchi E., Mombelli B., Nicola L., Valli M., Gismondo M. R. (1986) “Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 48 (1), pp. 37-45
- [15] 都築正和 (1991)「カラー版 殺菌・消毒マニュアル」医歯薬出版株式会社