

E. coli および *Candida* に対する 抗生物質と天然系抗菌剤の三剤併用効果

田中 昂希, 谷田 育宏, 大澤 敏

金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所, 〒924-0838 石川県白山市八束穂 3-1

Three drugs combined effect of antibiotics and natural antimicrobial agents against *E. coli* and *Candida*

Koki Tanaka, Ikuhiro Tanida, Satoshi Osawa

Genomu Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology,
Yatsukaho, Hakusan, Ishikawa, 924-0838

E-mail : b6900980@planet.kanazawa-it.ac.jp

Abstract

The three drugs combined effects of various antibiotics and natural antimicrobial substances, Benzyl isothiocyanate (BITC), Cinnamaldehyde (CAL) have been investigated against *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*). Antimicrobial activities were determined by minimum inhibitory concentration (MIC) using micro-dilution method. The combination effect was judged by the fractional inhibitory concentration (FIC) index using the checkerboard method. Microencapsulation was performed by a submerged curing coating method in which a mixture of sodium alginate and an antibiotic or antibacterial agent was reacted with calcium chloride to form capsules by ionic cross-linking. The results showed that the combination of Polymyxin B and BITC, CAL had combined effect against *E. coli*. The combination of Amphotericin B, BITC and CAL showed combined effects on *C. parapsilosis*. MIC value of three drugs combination is much lower than that of two drugs combination, leading to reduction of antibiotic usage. Furthermore, sustained release of antimicrobial agents from microcapsules was conformed *in vitro* experiment.

Keywords : Antibiotics, Natural antimicrobial agent, Combined effect, Microcapsule

Received February 6, 2021; accepted March 1, 2021

1 緒言

2019年における全世界の主な死因は、虚血性心疾患や脳卒中、肺疾患などの非感染症であるが、低所得国の死因TOP10のうち、6つは感染症である¹⁾。また、近年では、薬剤耐性菌の患者数も増加傾向にあり、対策が求められている。薬剤耐性菌に対して、世界的な対応が行われなければ、2050年には世界で、年間約1000万人が死亡するとの試算が発表されている²⁾。これらの感染症には、抗生物質を用いた治療が行われるが、抗生物質は様々な副作用を引き起こすことが知られている^{3,4)}。特に、真菌感染症において、高頻度で発生するカンジダ症⁵⁾の治療に中心的な役割を果たしているAmphotericin Bは、抗真菌スペクトルは広いものの、腎毒性が強く、低カリウム血症等を引き起こすことが知られている^{6,7)}。また、新規抗生物質の開発は、新規ターゲット分子の探索が困難であり、開発コスト、収益性といった観点から、停滞傾向にある⁸⁾。そのため、既存の抗生物質を使用して、副作用を軽減させる治療法が必要である。

本研究では、抗生物質と、抗生物質とは異なる作用機構を有する天然系抗菌剤であるBenzyl isothiocyanate (BITC)、およびCinnamaldehyde (CAL)との三剤併用による抗生物質の使用量削減を試みた。WHOが新規抗菌薬として緊急に必要な細菌に選定したものの中から⁹⁾、腸内細菌である*E. coli*、また、*Candida* spp.の中でも、*Candida albicans*に次ぐ死亡率を示す*Candida parapsilosis*¹⁰⁾に対する効果を調べた。これまでに、二剤併用効果を示す報告は多くなされている^{6, 11, 12)}が、二剤の併用では抗生物質の使用量削減には限度がある。そのため、三剤併用により、さらなる抗生物質の使用量削減を検討した。

さらに、薬剤の副作用を軽減させるアプローチとして、薬剤のマイクロカプセル (MC)化を検討した。MC化により、薬剤が徐放能を示すことが知られており、また、材料、濃度、製法

等の様々な条件設定により、薬剤の徐放が異なる挙動を示すことも知られている。そこで、三剤併用効果を示した抗真菌薬、BITC、CALをMC化させ、その薬剤の溶出挙動を検討した。

2 実験方法

抗生物質として、Ampicillin (ABPC；富士フィルム和光純薬(株)製)、Fradiomycin sulfate (FRM；東京化成工業(株)製)、Polymyxin B sulfate (PL-B；富士フィルム和光純薬(株)製)、Amphotericin B (AMPH-B；富士フィルム和光純薬(株)製)、Itraconazole (ITCZ；東京化成工業(株)製)、5-Fluorocytosine (5-FC；東京化成工業(株)製)を使用した。併用物質として選定した天然系抗菌剤には、Fig. 1に示したBenzyl isothiocyanate (BITC；東京化成工業(株)製)、Cinnamaldehyde (CAL；富士フィルム和光純薬(株)製)を用いた。

供試菌株には、*Escherichia coli* JM109 (*E. coli* JM109；タカラバイオ(株))、カンジダ属の中から、*Candida parapsilosis* NBRC1396 (*C. parapsilosis* NBRC1396；独立行政法人製品評価技術基盤機構)を選定し、本研究での試験対象とした。吸光度の測定に使用した分光光度計は、(株)日立製作所製 Spectrophotometer UV-Vis U-3310にて測定した。

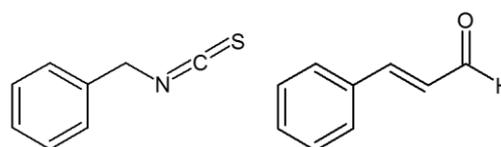


Fig. 1 Chemical structures of BITC (left) and CAL (right)

2.2 最小発育阻止濃度測定試験

本研究の抗菌性評価は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)および日本化学療法学会の試験法を参考に、併用試験のプロトコルを考案し、微量液体希釈法により、最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration : MIC)を

測定した^{13,14)}.

2.2.1 培地

E. coli JM109 では、滅菌済み Mueller-Hinton Broth に、ろ過滅菌した 25 mg/L の Mg^{2+} および 50 mg/L の Ca^{2+} を添加し、2 mol/L の NaOH 水溶液で pH 7.3 に調整した Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) 培地を使用した。

C. parapsilosis NBRC1396 に対しては、L-glutamine 添加 RPMI 1640 培地 (ナカライテスク (株) 製) に、3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS ; ナカライテスク (株) 製) を 0.165 mol/L となるように加えたものを、2 mol/L の NaOH 水溶液で pH 7.0 に調整し、ろ過滅菌したものをを用いた。

2.2.2 接種薬剤の調製

薬剤の力価も考慮したうえで秤量し、水溶性の抗生物質は蒸留水、非水溶性の抗生物質および BITC, CAL は DMSO (富士フィルム和光純薬 (株) 製) を、それぞれ目的濃度となるように加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌、溶解させた後、ろ過滅菌したものをを使用した。その後、調製した培地を用いて、薬剤の 2 倍希釈系列を作製し、VIORAMO 製丸底 96 well plate の各ウェルに、全量が 100 μ L となるように接種した。なお、本実験の濃度では、薬剤を混合した際の薬剤の析出は確認されなかった。

2.2.3 接種菌液の調製および培養時間

E. coli JM109 はニュートリエント寒天培地、*C. parapsilosis* NBRC1396 は、ポテトデキストロース寒天培地上において、35°C、24 h の条件で前培養した。前培養した菌体を 0.85 % 生理食塩水中に懸濁させ、ボルテックスミキサーを用いて菌体を生理食塩水中に分散させた。その後、懸濁液を McFarland 0.5 に調整後、最終接種菌数が *E. coli* JM109 : 約 5.0×10^4 cells/well, *C. parapsilosis* NBRC1396 : 約 $5 \times 10^1 \sim 2.5 \times 10^2$ cells/well となるように調整した。その後、96 well plate に菌液を

5 μ L 接種し、恒温槽にて 35°C、24 h の条件で培養後、各ウェル中のなかで、菌の発育が認められない最小濃度を MIC とした。

2.4 併用効果の判定

併用効果を測定した MIC 値を用いて、併用効果の有無を判定する FIC index を算出した¹⁵⁾。下記に示す計算式により、算出値が ≤ 0.5 を相乗作用、 $0.5 < \sim \leq 1.0$ を相加作用、 $1.0 < \sim \leq 2.0$ を不関、 > 2.0 を拮抗作用とした。なお、相乗作用および相加作用となる FIC index 1.0 以下を示したものを併用効果有りとした。

2.5 マイクロカプセルの作製

Table 1 の組成に従い、薬剤添加 1.0 wt % アルギン酸ナトリウム水溶液 (Na-Alg ; ナカライテスク (株) 製) をシリンジにいれ、注射針 (内径 0.70 mm; テルモ (株)) を通じて、液面からの高さ 5 cm より、スターラー攪拌下にある 1.0 wt % または 5.0 wt % 塩化カルシウム (富士フィルム和光純薬 (株) 製) 水溶液中へ滴下させ、アルギン酸カルシウム (Ca-Alg) ゲルとする粒径約 2 mm の各薬剤を添加した MC をそれぞれ作製した。MC 形成後、ガラスフィルターを用いて、塩化カルシウムと MC を分離し、MC を回収した。

Table 1 Composition of antimicrobial agents encapsulated Na-Alg aq

	Amount (g)
AMPH-B, 5-FC	0.1
ITCZ	0.02
BITC, CAL	1.0
5 wt% Na-Alg aq	3.0
DMSO	2.5
Distilled water	9.5



Fig. 2 Photograph of the prepared microcapsules

2.6 マイクロカプセルの薬剤溶出試験

内包する薬剤の特徴的な吸収波長、すなわち AMPH-B, ITCZ, 5-FC (385, 262, 234 nm), BITC, CAL (243, 292 nm)における吸光度を、アセトニトリル(MeCN; 富士フィルム和光純薬(株)製)-0.9%生理食塩水 (Saline) [6:4, v/v]に溶解させて測定し、検量線を作成した。作製した薬剤内包 MC 1.0 g を、50 mM のクエン酸三ナトリウム(富士フィルム和光純薬(株)製)を溶解させた 0.9 % 生理食塩水 50 mL 中に浮遊・懸濁させ、37°C, 140 rpm, 30 min の条件で振とうし、MC を完全に溶解させた。この溶液をシリンジフィルターでろ過した後、吸光度を測定し、検量線の値から MC の薬剤内包量を算出した。

溶出試験は、生理食塩水 50 mL を加えた 100 mL エルレンマイヤーフラスコに、MC 1.0 g を浮遊させ、37°C, 100 rpm の条件で振とうした。1 h 毎に溶出液のみを 500 μ L 分取し、その都度、新しい生理食塩水を 500 μ L 加える操作を、振とう開始から 6 h 経過まで、経時的に繰り返した。分取した溶出液を MeCN-Saline [6:4, v/v] に溶解させて吸光度を測定し、内包量をもとに、MC の薬剤溶出率を算出した。

3 実験結果および考察

3.1 併用物質の抗菌性および抗真菌性評価

Table 2 に、BITC, CAL 単剤の *E. coli* JM109 および *C. parapsilosis* NBRC1396 に対する MIC 測定試験結果を示す。供試菌株に対して、Table 2 の濃度で抗菌性を示すことが確認された。また、Table 2 より、CAL の *C. parapsilosis* に対する抗真菌性は特に強いことが確認された。

Table 2 MIC for BITC and CAL of microbial strains

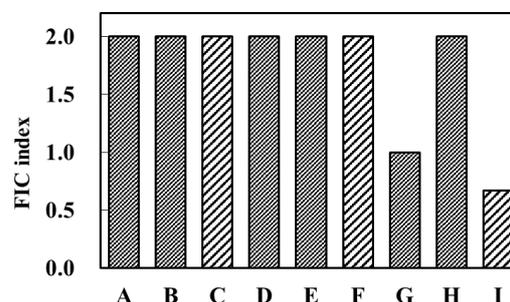
Microbial strain	MIC (μ g/mL)	
	BITC	CAL
<i>E. coli</i> JM109	200	400
<i>C. parapsilosis</i> NBRC1396	200	50

3.2 *E. coli* JM109 に対する併用試験

Table 3 に、*E. coli* JM109 に対する薬剤併用試験の結果を、Fig. 3 に併用試験での MIC 値をもとに算出した FIC index の結果を示す。Table 3 より、PL-B では三剤併用効果を示し、PL-B の MIC

値は、単剤 : 0.125 μ g/mL から、BITC との二剤併用 : 0.0625 μ g/mL, BITC と CAL との三剤併用 : 0.0313 μ g/mL へと低下し、PL-B の使用量は単剤と比較すると、三剤併用では 1/4 に抑えられた。また、Fig. 3 に示した FIC index の算出結果より、BITC との二剤併用、BITC と CAL との三剤併用では、相加効果 (FIC index \leq 1.0) を示すことが分かった。PL-B は、グラム陰性菌の細菌細胞膜に作用する薬剤である¹⁶⁾。また、BITC および CAL の詳細な抗菌メカニズムは明らかとされていないが、イソチオシアネート(ITC)類は、細菌の非特異的な酵素の不活化、呼吸系の作用障害に加え、タンパク質の改変による細菌細胞膜損傷等が報告されている^{17, 18)}。また、ITC 類の抗菌メカニズムは、 β -ラクタム系抗生物質よりペプチド系抗生物質である PL-B などに類似しているとの報告もある¹⁹⁾。CAL の抗菌メカニズムは、主に細菌細胞壁に損傷を与える²⁰⁾ため、BITC, CAL が *E. coli* の外膜構造等に損傷を与えたことにより、細菌細胞膜に作用点をもつ PL-B が作用しやすくなったことが要因となり、相加効果を示したと考えられる。

ABPC, FRM は二剤併用、三剤併用ともに併用効果は確認されなかった。ABPC は細胞壁ペプチドグリカンに作用するが、BITC と作用メカニズムが異なる¹⁹⁾ため、併用効果を示さなかったと考えられる。また、FRM などのアミノグリコシド系抗生物質は、カチオン性のアミノ基を多数有する構造である。そのため、細菌外膜のリポ多糖の Mg^{2+} を排除することで、自らリポ多糖と結合し、外膜構造を破壊することで、リボソームに到達して作用することで抗菌性を示す²¹⁾。しかし、FRM 単剤での MIC 値以下



A: ABPC+BITC B: ABPC+CAL C: ABPC+BITC+CAL
D: FRM+BITC E: FRM+CAL F: FRM+BITC+CAL
G: PL-B+BITC H: PL-B+CAL I: PL-B+BITC+CAL

Fig. 3 FIC indices of combinations consisting of antibiotics, natural antimicrobial agents in *E. coli* JM109

Table 3 MICs for single, double and triple combinations of antibiotics, BITC and CAL against *E. coli* JM109

Combinations of antibacterial agents		MIC (μg/mL)			Ratio [※]		
		Antibiotics	BITC	CAL	double	triple	
ABPC	Single	ABPC	0.5	-	-	-	
	Double	ABPC + BITC	0.5	200	-	1	-
		ABPC + CAL	0.5	-	400	1	-
	Triple	ABPC + BITC + CAL	0.5	200	400	-	1
FRM	Single	FRM	0.25	-	-	-	
	Double	FRM + BITC	0.25	200	-	1	-
		FRM + CAL	0.25	-	400	1	-
	Triple	FRM + BITC + CAL	0.25	200	400	-	1
PL-B	Single	PL-B	0.125	-	-	-	
	Double	PL-B + BITC	0.0625	100	-	1/2	-
		PL-B + CAL	0.125	-	400	1	-
	Triple	PL-B + BITC + CAL	0.0313	100	100	-	1/4

※ Ratio : Ratio of [MIC of antibiotics when Combined use of double or triple] to [MIC of antibiotics alone], that is, ratio of decrease in antibiotics usage.

$$\text{FIC index (2 drugs)} = \frac{\text{MIC of Antibiotics in combined}}{\text{MIC of Antibiotics alone}} + \frac{\text{MIC of (BITC / CAL) in combined}}{\text{MIC of (BITC / CAL) alone}}$$

$$\text{FIC index (3 drugs)} = \left(\frac{\text{MIC of Antibiotics in combined}}{\text{MIC of Antibiotics alone}} + \frac{\text{MIC of BITC in combined}}{\text{MIC of BITC alone}} + \frac{\text{MIC of CAL in combined}}{\text{MIC of CAL alone}} \right) / 1.5$$

では、リポ多糖の遊離作用が低かったことで、併用効果を示さなかったと考えられる。

3.3 *C. parapsilosis* NBRC1396 に対する併用試験

Table 4 に、*C. parapsilosis* NBRC1396 に対する三剤併用試験結果を、Fig. 4 に FIC index の算出結果を示す。選定した全ての抗生物質、すなわち AMPH-B, ITCZ, 5-FC と CAL の二剤併用では抗生物質の MIC 値が 1/4 ~ 1/2 に、さらに BITC を加えた三剤併用では、1/8 ~ 1/4 に減少し、抗生物質の使用量が二剤併用時よりも減少することが分かった。また、Fig. 4 に示す FIC index の値より、ITCZ, 5-FC と CAL との二剤併用においては、相加効果 (FIC index ≤ 1.0) を示し、さらに、三剤併用試験においては、全ての組み合わせで相加効果を示し、抗生物質だけではなく併

用物質である BITC, CAL の MIC 値も、三剤併用により低くなった。

C. parapsilosis に対する BITC および CAL の抗菌メカニズムに関しても、詳しくは解明されていないものの、BITC は真菌細胞壁に損傷を与え、代謝酵素を阻害することが知られている²²⁾。また、CAL は真菌細胞壁への損傷に加え、細胞壁合成酵素への阻害、真菌中のミトコンドリアおよび真菌細胞膜に損傷を与えるといった抗菌メカニズムが報告されている²³⁻²⁵⁾。また、本研究により、CAL の *C. parapsilosis* に対する MIC は、細菌である *E. coli* よりも低い傾向 (Table 2) にある。

本研究では真菌細胞膜に作用する AMPH-B, ITCZ, 真菌の核酸合成を阻害する 5-FC を選定した¹⁶⁾。これらの薬剤は、全て真菌細胞壁内部

Table 4 MICs for single, double and triple combinations of antibiotics, BITC and CAL against *C. parapsilosis* NBRC1396

Combinations of antifungal agents		MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Ratio [※]		
		Antibiotics	BITC	CAL	double	triple	
AMPH-B	Single	AMPH-B	0.5	-	-	-	
	Double	AMPH-B + BITC	0.5	200	-	1	-
		AMPH-B + CAL	0.125	-	50	1/4	-
	Triple	AMPH-B + BITC + CAL	0.0625	100	25	-	1/8
ITCZ	Single	ITCZ	0.5	-	-	-	
	Double	ITCZ + BITC	0.5	200	-	1	-
		ITCZ + CAL	0.25	-	25	1/2	-
	Triple	ITCZ + BITC + CAL	0.0625	100	25	-	1/8
5-FC	Single	5-FC	0.125	-	-	-	
	Double	5-FC + BITC	0.125	200	-	1	-
		5-FC + CAL	0.0625	-	25	1/2	-
	Triple	5-FC + BITC + CAL	0.0313	50	25	-	1/4

※ Ratio : See footnote to Table 3.

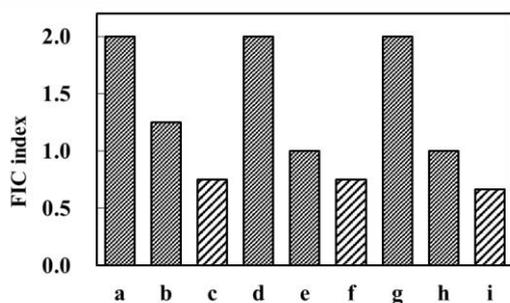


Fig. 4 FIC indices of combinations consisting of antibiotics, natural antimicrobial agents in *C. parapsilosis* NBRC1396

に作用点をもつため、二剤併用では、*C. parapsilosis* に対して、抗生物質と CAL の強力な抗真菌作用により、抗生物質の使用量が削減されたと考えられる。また、CAL との二剤に加え、さらに BITC を加えた三剤併用では、BITC および CAL が真菌細胞壁などの真菌外膜構造への損傷に加え、酵素阻害、ミトコンドリアに

対する機能阻害等の多様な抗菌メカニズムにより、*C. parapsilosis* に損傷を与えたことで、抗生物質が真菌細胞壁内部への取り込みが促進され、二剤併用時よりもさらに MIC 値が低くなったと考えられる。

3.4 マイクロカプセルの薬剤溶出試験

Fig. 5 に薬剤添加 MC の薬剤溶出挙動を示す。薬剤を MC 化することで、薬剤が徐放能を有することが明らかとなり、塩化カルシウム濃度が高いものほど、また、分子量が大きいものほど溶出速度が遅い傾向にあった。本研究では、Alg-Na と塩化カルシウム中の Ca^{2+} のイオン架橋により Ca-Alg ゲルとなる液中硬化被膜法により MC を作製した。Ca-Alg は、1 価金属塩水溶液中において、Ca-Alg ゲル中の Ca^{2+} と、1 価金属イオン間でのイオン交換反応により、Ca-Alg の一部が Na-Alg となることで、Ca-Alg の架橋密度が低下し、MC の弾性率を弱めることが知られている。そのため、1 価金属塩水溶液中では、MC の高分子網目内に多くの水を含んだ構造体となる²⁶⁾。以上の点から、Ca-Alg と溶出液間に

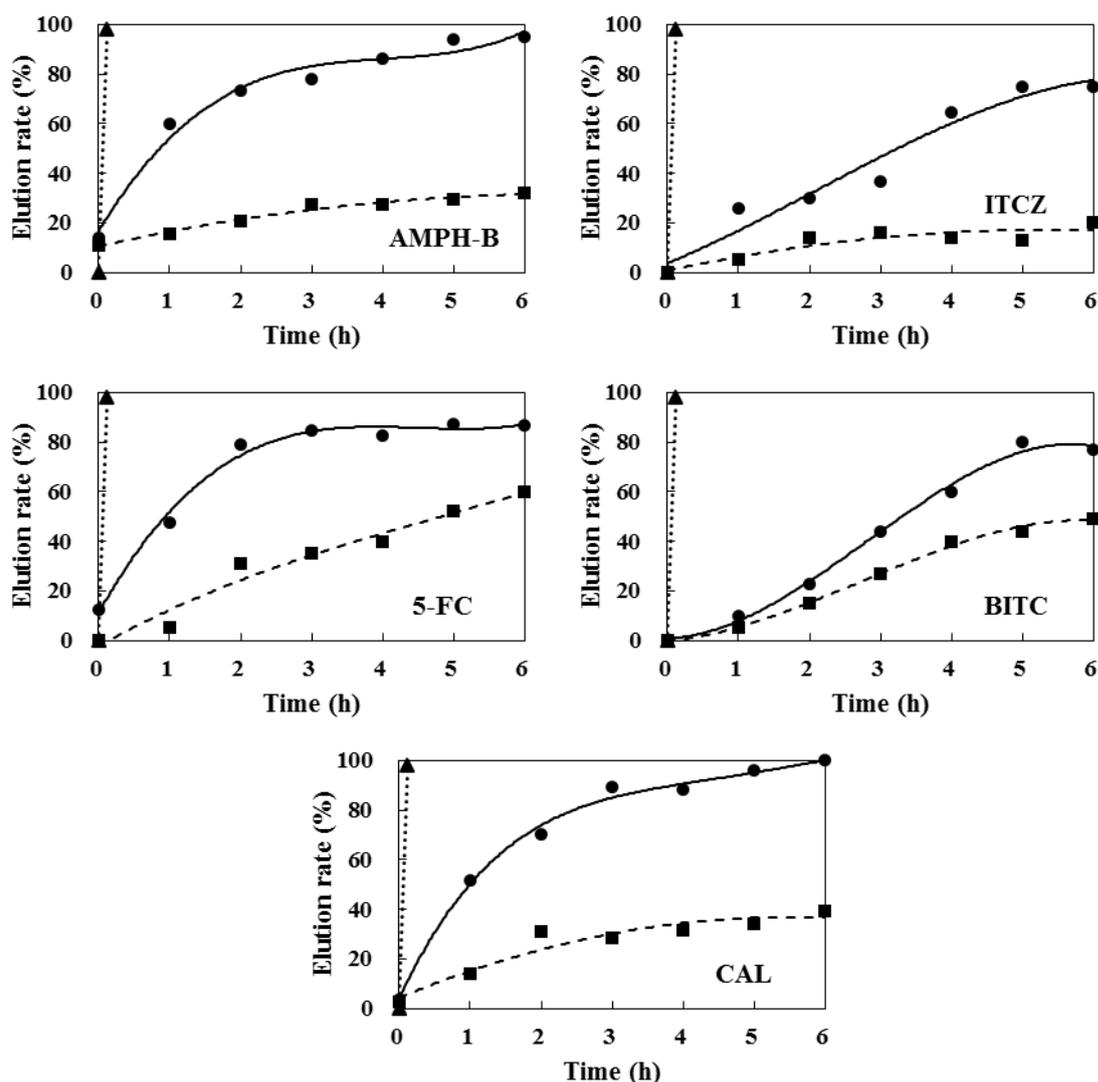


Fig. 5 Comparison of elution rates of MC containing various antimicrobial agents at 37°C in saline stirring at 100 rpm; microencapsulated with 1 wt % (●), 5 wt % (■) CaCl₂ aqueous solution, non-microencapsulation (▲)

において、薬剤の溶出が可能となり MC は徐放能を示し、また、5 wt %塩化カルシウム水溶液で作製した MC は、1 wt %で作製したものと比較すると、Ca-Alg の架橋密度がある程度維持されたことにより、徐放速度が 1 wt %のものより遅くなったと考えられる。

Ca-Alg の膜透過性には、溶質分子である薬剤の分子サイズが関係しており、分子量の大小だけではなく、分子構造が関係することも明らかとなっている²⁶⁾。そのため、分子量の大小、分子構造の違い、および Ca-Alg と各薬剤間との親和性の違い、分配係数などにより、薬剤の溶出挙動が異なることが示唆された。

4 結言

本研究では、臨床現場において使用される抗生物質と、植物由来の抗菌成分である BITC、CAL を併用させた三剤併用試験を行った。その結果、PL-B および AMPH-B、ITCZ、5-FC と BITC、CAL との三剤併用により、単剤、二剤併用時と比較して抗生物質の MIC 値が小さくなる傾向にあり、抗生物質の使用量がさらに削減できることが示された。また、薬剤内包 MC は、その架橋強度により薬剤徐放能を制御でき、三剤併用と合わせて抗生物質の使用量削減に有効であると結論した。

参考文献

- 1) WHO, <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, 2020.12.27 参照
- 2) J.O. Neill, *HM Government Wellcome Trust*, 1-20 (2014).
- 3) 堀誠治, *Yakugaku Zasshi*, **127**, 931-937 (2007).
- 4) 堀誠治, *Yakugaku Zasshi*, **131**, 1423-1428 (2011).
- 5) Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., Azeredo J., *FEMS Microbiol. Rev.*, **36**, 288-305 (2012).
- 6) 野崎阿季子, 高橋栄造, 岡本敬の介, 伊藤秀之, 波多野力, *Yakugaku Zasshi*, **130**, 895-902 (2010).
- 7) T.J. Walsh, R.W. Finberg, C. Arndt, J. Hiemenz, C. Schwartz, D. Bodensteiner, P. Pappas, N. Seibel, R.N. Greenberg, S. Dummer, M. Schuster, J.S. Holcenberg, *N. Engl. J. Med.*, **340**, 764-771 (1999).
- 8) 舘田一博, *日本内科学会雑誌*, **102**, 2908-2914 (2013).
- 9) WHO, <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>, 2020.11.20 参照
- 10) Puig-Asensio M., Pemán J., Zaragoza R., Garnacho-Montero J., Martín-Mazuelos E., Cuenca-Estrella M., Almirante B., *Crit. Care Med.*, **42**, 1423-1432 (2014).
- 11) Samonis G., Maraki S., Karageorgopoulos D.E., Vouloumanou E.K., Falagas M.E., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 695-701 (2012).
- 12) Rathod T., Padalia T., Chanda S., *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **6**, 579-589 (2017).
- 13) 日本化学療法学会, *Chemotherapy*, **38**, 102-105 (1990).
- 14) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, Third ed.*, CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, (2008).
- 15) 木場由美子, 猪川和朗, 小野寺一, 長岡里枝, 原稔典, 城市由美子, 横崎典哉, 大毛宏喜, 森川則文, *日本化学療法学会雑誌*, **60**, 469-477 (2012).
- 16) 西島正弘, 後藤直正, 増澤俊幸, 河村好章編, "薬学領域の病原微生物学・感染症学・化学療法学 [第2版]", 廣川書店, (2012).
- 17) 岸本憲明, 田野達男, 原田靖裕, 増田秀樹, *日本食品保蔵科学会誌*, **25**, 7-13 (1999).
- 18) Sofrata A., Santangelo E.M., Azeem M., Borg-Karlson A.K., Gustafsson A., Pütsep K., *PLoS One*, **6**, 1-10 (2011).
- 19) Lin C.M., Preston J.F. 3rd, Wei C.I., *J. Food Prot.*, **63**, 727-734 (2000).
- 20) Shen S., Zhang T., Yuan Y., Lin S., Xu J., Ye H., *Food Control*, **47**, 196-202 (2015).
- 21) 山口明人, 澤井哲夫, *ファルマシア*, **28**, 867-871 (1992).
- 22) Pereira C., Calado A.M., Sampaio A.C., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, (2020).
- 23) Y. Taguchi, Y. Hasumi, S. Abe, Y. Nishiyama, *Med. Mol. Morphol.*, **46**, 8-13 (2013).
- 24) Ka H., Park H.J., Jung H.J., Choi J.W., Cho K.S., Ha J., Lee K.T., *Cancer lett.*, **196**, 143-152 (2003).
- 25) Bang K.H., Lee D.W., Park H.M., Rhee Y.H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1061-1063 (2000).
- 26) 齋藤設雄, 根津尚史, 平雅之, 佐々木かおり, 荒木吉馬, *歯科材料・器械*, **26**, 311-316 (2007).