

(様式 6 - 1)

学籍番号 : 1631D01

氏 名 : 大崎 千尋

論文題名 : 新規な土壌由来細菌 TM-I-3 株を含む微生物資材の非接触抗真菌作用の評価及びメカニズムの解明

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 1. 緒言

近年では、微生物の力を有効活用することで、自然と共生し環境を保全しながら産業活動を行おうとする観点から、微生物資材に国内外で関心が集まっている。微生物資材は特定の微生物を高濃度に含有させた粉末状あるいは液体物質であり、国内では農業分野を中心に多様な用途で使用されている。しかしながら、現段階では微生物資材に関する法的規制がなく、十分な効能効果や安全性のエビデンスがなく作用機構が未解明なまま、製品が先行し出回ってしまう傾向にある。筆者は以上の現状を受け、微生物資材の特性を生かし居住空間の微生物制御に寄与できる可能性に着目した。微生物資材の居住空間における適応と人体への真菌曝露の予防を最終目標に設定し、新規な微生物の探索、新規な菌株を含有した微生物資材の評価方法の検討及び非接触抗真菌作用のメカニズムの解明を目的とした。

### 2. 研究方法

長崎県内の土壌から微生物資材として利用できる菌株として、耐久性に優れる新規の *Bacillus* 菌株の探索を行った。スクリーニングした中から単離・同定した *Bacillus* 属である TM-I-3 株の 16S rDNA 塩基配列・分子系統解析、形態学的解析、生理学・生化学的解析より TM-I-3 株の微生物学的性状を明らかにした。さらに溶血試験や急性経口毒性試験を行い TM-I-3 株の安全性の確認を行った。

次に TM-I-3 株の接触抗真菌作用の有無の確認を寒天拡散法に準じて行った。さらに TM-I-3 株の非接触抗真菌作用が有効な真菌の探索および同属の *B. subtilis* 株との比較を行うことにより、本菌の非接触抗真菌作用の評価を行った。

その後、TM-I-3 株の非接触抗菌作用のメカニズムを明らかにするため、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株の揮散する成分をそれぞれ捕集し Gas chromatography/mass spectrometry (以下、GC/MS) 及び Gas chromatography (以下、GC) を用いて定性分析及び定量分析を行い、揮散性成分を比較した。加えて、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株の揮散する成分の嗅覚官能試験を行い、分析結果と官能評価の相関性の有無を検討した。また、定性分析より明らかになった TM-I-3 株から揮散する成分の標準物質を用いて抗真菌試験を寒天氣体法に準じて行うことにより非接触抗真菌作用に寄与している成分を検討した。

最後に TM-I-3 株が真菌の菌糸成長を抑制するステージを検討するために、Logistic 解析を用い真菌の

(様式 6 - 1)

増殖曲線の作製および形態観察を行った。その後、TM-I-3 株を共存させた場合の真菌の菌糸成長やコローニー形成に対する影響について検討を行った。

### 3. 結果・考察

TM-I-3 株の遺伝子解析および安全性の確認を行い、TM-I-3 株が *B. sporothemodurans* に最も近縁な *Bacillus* 属の新規の菌株であることが推定された。安全性試験に関しても遺伝子解析の結果より、バイオセーフティレベルが 1 で、ヒトや動物に病気を起こす可能性はほとんどない菌種と推定された。さらに溶血性試験は陰性、急性経口毒性試験結果を含めて毒性は低いと判定された。

TM-I-3 株の抗菌能力の結果より、TM-I-3 株は接触した条件での抗真菌効果はほとんど無いことが明らかになった。一方、9.5 L の密閉箱を用いた非接触抗真菌作用の試験においては、TM-I-3 株は、*A. fumigatus*、*C. cladosporioides*、*P. expansum*、*T. cutaneum* の真菌増殖に対して著しい抑制を示した。同属の *B. subtilis* 株は *A. fumigatus*、*C. cladosporioides*、*P. expansum* に対して真菌増殖抑制は示さず、*T. cutaneum* に対してのみ若干の抑制を示した。続いて 125 L の密閉箱を用いた非接触抗真菌作用の試験を行い、TM-I-3 株は、*A. fumigatus*、*C. cladosporioides* の真菌増殖に対して著しい抑制を示した。これより、実空間に適応した場合でも TM-I-3 株が非接触抗真菌作用を発揮し真菌の増殖防止に繋がる可能性がある事が推定された。

次に *B. subtilis* 株を陰性対照とし、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株が揮散する成分を GC/MS にて定性分析を行ったところ、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株は共通の揮発性成分を産生していた。TM-I-3 株と *B. subtilis* 株の間で揮発性成分に関して明確な差が見られなかったため、続いて GC/MS および GC を用いて TM-I-3 株と *B. subtilis* 株の揮発性成分の定量を行った。定量分析において、次の 2 つの特徴が明らかになった。第一に陰性対照の *B. subtilis* 株と比べて、TM-I-3 株はイソ吉草酸やイソ酪酸などの強い臭気の成分量の揮散が極めて少なかった。嗅覚官能評価においても TM-I-3 株の産生するにおいの臭気強度と快・不快度は *B. subtilis* 株の産生するにおいと比較し有意に小さいという定量結果に相関した結果がでた。第二に陰性対照の *B. subtilis* 株と比べて、TM-I-3 株はベンズアルデヒドと安息香酸の芳香族化合物の揮散量が多かった。アルデヒド系の化合物はアロマセラピーにおいては、フェノール系の化合物と同等に強い抗真菌効果があることが知られている。これらの物質の揮散量の違いが、*B. subtilis* 株との非接触抗真菌作用の差を生み出しているのではないかと筆者は考察した。

最後に、TM-I-3 株の非接触抗菌作用の真菌成長阻害の経時的なメカニズムを検証するために、代表の被験真菌 *A. fumigatus* および *C. cladosporioides* の増殖挙動をシグモイド曲線に表し、また経時的な形態観察を行った。続いて、密閉箱を用いた TM-I-3 株の被験真菌の増殖挙動に対する阻害時期の検証実験を行った。その結果、TM-I-3 株は各被験真菌の増殖曲線における誘導期、形態観察の写真では孢子から菌糸が発芽するまでのステージを阻害することが明らかになった。これらの結果より、TM-I-3 株の非接触抗菌作用は静菌的・予防的な作用を期待することができるが、殺菌作用や滅菌作用の効果は弱いという結論となった。