

2019 年度

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

長崎国際大学大学院

薬学研究科

医療薬学専攻

博士（薬学）学位論文

大崎 千尋

## 目次

緒言 .....	1
<b>第 1 章 TM-I-3 株の性状及び安全性.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 材料及び方法 .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 土壌試料とスクリーニングの方法.....	6
1.1.2 培地及び培養条件 .....	8
1.1.3 遺伝的解析 .....	9
1.1.4 形態学的観察 .....	10
1.1.5 生理学・生化学的解析 .....	10
1.1.6 溶血性試験 .....	11
1.1.7 急性経口毒性試験 .....	11
<b>1.2 結果 .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 遺伝的特徴 .....	13
1.2.2 形態学的・生理学的・生化学的特徴 .....	14
1.2.3 安全性 .....	14
<b>1.3 考察 .....</b>	<b>25</b>
<b>第 2 章 TM-I-3 株含有微生物資材の抗真菌作用 .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 材料及び方法 .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 供試験資材及び被験真菌 .....	27
2.1.2 培地及び孢子懸濁液の作製.....	28
2.1.3 接触抗真菌試験（寒天拡散法）.....	29
2.1.4 9.5 L の密閉箱を使用した非接触抗真菌試験.....	30
2.1.5 125 L の密閉箱を使用した非接触抗真菌試験 .....	31
<b>2.2 結果 .....</b>	<b>34</b>
2.2.1 TM-I-3 株の接触抗真菌作用 .....	34
2.2.2 9.5 L の密閉箱を使用した TM-I-3 株の非接触抗真菌作用 .....	34
2.2.3 125 L の密閉箱を使用した TM-I-3 株の非接触抗真菌作用 .....	35
<b>2.3 考察 .....</b>	<b>44</b>

## 第3章 TM-I-3株含有微生物資材の非接触抗真菌作用の解析.....47

### 3.1 材料及び方法 .....47

3.1.1 供試験資材及び被験真菌 ..... 47

3.1.2 培地及び孢子懸濁液の作製 ..... 48

3.1.3 ガスクロマトグラフィー／質量分析 (GC/MS) による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の揮発性成分の定性分析 ..... 49

3.1.4 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の有機酸類の定量分析 51

3.1.5 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の芳香族化合物の定量分析及び経時的な量的変化の評価 ..... 53

3.1.6 SD (Semantic differential)法 を用いた TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株から発生するにおいの嗅覚官能評価 ..... 55

3.1.7 同定した揮発性成分の標準物質を用いた抗真菌試験 (寒天気体法) . 57

### 3.2 結果 .....59

3.2.1 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の揮発性成分の定性分析 ..... 59

3.2.2 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の有機酸類と芳香族化合物の定量分析並びに両菌株の嗅覚官能評価 ..... 62

3.2.3 TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の芳香族化合物の経時的な量的変化の評価 ..... 67

3.2.4 同定した揮発性成分の標準品を用いた抗真菌試験 (寒天気体法) ... 69

### 3.3 考察 .....71

## 第4章 TM-I-3株による真菌成長過程の阻害ステージの解明.....73

### 4.1 材料及び方法 .....73

4.1.1 供試験資材及び被験真菌 ..... 73

4.1.2 培地及び孢子懸濁液の作製 ..... 73

4.1.3 菌糸成長の観察と真菌増殖曲線の作製 ..... 74

4.1.4 TM-I-3 株の被験真菌の増殖挙動に対する阻害ステージの検証 ..... 76

### 4.2 結果 .....78

4.2.1 菌糸成長観察の結果 ..... 78

4.2.2 被験真菌の増殖曲線 ..... 78

4.2.3 TM-I-3 株の被験真菌の増殖挙動に対する阻害ステージの検証 ..... 79

4.3 考察 .....	85
総括 .....	87
参考文献・引用文献 .....	91
謝辞 .....	101
付記 .....	104

## 略語表

本論文内では、以下の略語を用いた。

略記	英語表記	日本語表記
ADH	Arginine dihydrolase	アルギニンジヒドロラーゼ
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	アスペルギルス・フミガタス
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	バチルス・セレウス
BLAST	Blast Local Alignment Search Tool	ブラスト
<i>B. sporothermodurans</i>	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	バチルス・スポローサーモデュランズ
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	バチルス・サブチリス
<i>C. cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	クラドスポリウム・クラドスポリオイデス
CIT	Citric acid	クエン酸回路の利用性
GC	Gas chromatography	ガスクロマトグラフィー分析
GEL	Gelatinase	ゼラチナーゼ
GS/MS	Gas chromatography/mass spectrometry	ガスクロマトグラフィー質量分析
H <sub>2</sub> S	Hydrogen sulfide	硫化水素
IND	Indole	インドール
LD50	Lethal dose, 50%	半数致死量
LDC	Lysine decarboxylase	リシンデカルボキシラーゼ
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization	マトリックス支援レーザー脱離イオン化法

NBRC	NITE Biological Resource Center	独立行政法人 製品評価技術基盤機構
NIT	Nitrate	硝酸塩還元
ODC	Ornithine decarboxylase	オルニチンカルボキシラーゼ
ONGP	$\beta$ -Galactosidases	$\beta$ -ガラクトシダーゼ
PD	Potato dextrose	ポテトデキストロース
PDA	Potato dextrose agar	ポテトデキストロース寒天
PDMS	Polydimethylsiloxane	ポリジメチルシロキサン
PTFE	Polytetrafluoroethylene	ポリテトラフルオロエチレン
<i>P. expansum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	ペニシリウム・エクスペンサム
SA	Standard agar	標準寒天
SD	Semantic differential	セマンティック・ディファレンシャル法
SDGs	Sustainable development goals	持続可能な開発目標
SDS	Sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SIM	Selected-ion monitoring	選択イオンモニタリング
SPME	Solid-phase microextraction	固相マイクロ抽出
<i>T. cutaneum</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>	トリコスポロン・クタネウム
TDA	Tryptophan deaminase	トリプトファンデアミナーゼ
TIC	Total ion chromatogram	全イオンクロマトグラム
URE	Urease	ウレアーゼ
VP	Voges-Proskauer	フォーゲスプロスカウエル

## 緒言

微生物資材と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状物質であり、すでに多様な用途に対して多くの製品が製造・販売されている。主に有機物の分解促進や連作障害の防止、土壌改善といった農業用目的で微生物資材は使用されていることが知られているが、その他にも水質の改善や汚染土壌の浄化、脱臭目的で一部使用されている。以上の事例のように、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、微生物資材に近年国内で関心が集まっている [1, 2]。海外の動向としても、微生物資材は化学製品に代わるものとして、その市場はまだ全体に占める割合は小さいものの徐々に多くの国で販売されるようになってきている [3]。その理由としては、世界中で環境問題に対する意識が高まっていく中、21世紀においてヒトの産業活動を地球環境と調和させる新たな方法及び生物と環境が調和する戦略として「共生」の積極的な利用が不可欠になってきていることが考えられる [4]。2015年9月の国連総会においてはSDGs（持続可能な開発目標）が採択され、ますます持続可能な手段を用いた環境や資源保全に対する関心が高まっていることも要因として挙げられる [5, 6]。環境問題について、未だかつてない程の議論が沸き起こっている最中、環境負荷の少ない循環型の生物資源として微生物資材は最も適した持続可能な手段として捉えられている [2, 7, 8]。

しかしながら、微生物資材の関心が高まる中、全ての製品が期待通りの効果を示すものでもなく、肥料や農薬として規制を受けない製品として、効能効果や安全性の十分な試験や検証がされないまま販売されている場合もあると報告されている [1, 9, 10]。具体的な国内の例として、1985年から1995年の間に微生物資材関連の報告は70件以上あるが、その効果が認められたものは半数で、さらに含有微生物による効果か、その他の含有有効成分によるものか明確でないものが多く認められるとの報告があった [9]。また海外の調査では、販売されてい

る十数種類の微生物資材の開示されている情報収集を行ったところ、含有されている微生物の具体的な種・属や作用機序、具体的なエビデンスがほとんど、または全く入手できなかつたと報告されている[11]。

このような現状の中、*Bacillus* 属の細菌は土壌改良や植物健全育成を目的に微生物資材に含まれている菌種の一つとして数十年前から使用されている[7, 12, 13]。*Bacillus* 属細菌は好気性から通性嫌気性のグラム陽性桿菌で、土壌や水圏など自然界に広く分布している。本菌は乾燥、高温、放射線といった環境ストレスに対して抵抗性を有する長時間生存できる耐熱性の芽胞を形成し、環境中に普遍的に存在している。*Bacillus* 属には 50 菌種ほどあり、*Bacillus cereus* (以下、*B. cereus*) や *Bacillus subtilis* (以下、*B. subtilis*) といった幾つかの菌種グループに分類され、多くは非病原性を示す。医学上の病原微生物に分類される *Bacillus anthracis* (炭疽菌) と *B. cereus* (セレウス菌) は *B. cereus* の菌種グループに含まれる[14, 15]。身近な *Bacillus* 属の非病原性の有用細菌としては、古くから日本人の食生活と密接に関わってきた納豆菌 (*Bacillus subtilis var. natto*) が最もよく知られている[16]。

これまで、いくつかの先行研究において、*Bacillus* 属の菌は抗菌効果や抗真菌効果があることが報告されてきた[17-19]。これら全ての研究に共通することは、*Bacillus* 属の菌が産生する代謝物や *Bacillus* 属の産生する物質の抽出液が対象の細菌や真菌と直接接触することにより増殖抑制を発揮することを示している点である。これはいわゆる Alexander Fleming がアオカビ (*Penicillium notatum*) から、penicillin を見出した出来事と同様の仕組みであり[20]、*Bacillus* 属が真菌に対する抗菌物質を産生していることが推測される。

一方、筆者は、*Bacillus* 属を含むいくつかの菌が特定の菌や真菌に対して増殖抑制作用を示す揮発性物質を産生する報告に注目した

[21, 22]。精油の揮発性物質による抗菌作用は一般的にも良く知られているが[23, 24]、対象に触れることなく抗菌作用や抗真菌作用を発揮する現象を本報ではそれぞれ「非接触抗菌作用」、「非接触抗真菌作用」と呼ぶこととする。これらの作用の利点は、従来の抗菌物質のよ

うな接触部位のみの限定的な抗菌作用ではなく、一定の室内空間を想定した接触面に捉われない四方八方からの細菌・真菌の抑制が可能であることである。この利点は簡便な細菌や真菌の増殖防止の提供に繋がる可能性がある [25, 26]。

簡便な細菌や真菌の増殖防止が必要とされる身近な場所の一つは居住空間や生活空間であろう。居住空間内の真菌は特に鼻腔や肺や皮膚の疾患の原因になることが知られている [27, 28]。年間 160 万人以上の人々が肺・呼吸器を中心にしたアスペルギルス症、カンジダ症、クリプトコッカス症、ニューモチスシス症といった真菌症を原因として命を落としており、10 億人もの人々がここ数年で足白癬や爪白癬、口腔内カンジダ症といった難治性の真菌症に罹患していることが報告されている [29, 30]。特に免疫機構の完成していない新生児や日和見感染を起こしやすい高齢者、免疫不全や免疫疾患を抱える患者や間質性肺炎といった重度の肺疾患に罹患している患者にとっては真菌症の罹患は状態をさらに悪化させる要因になる。肺アスペルギルス症や肺カンジダ症といった深在性真菌症の罹患率は免疫不全患者の中で増加傾向にあり、肺カンジダ症に関しては Fluconazole (FLCZ) の登場や抗菌薬不応性の患者の血清  $\beta$ -グルカンの陽性や喀痰、尿、便など複数個所におけるカンジダコロナイゼーションが確認された場合、確定診断前に抗生物質を投与するエンピリックセラピーを開始することにより予後は大幅に改善しつつある。一方、肺アスペルギルス症に関しては Amphotericin B (AMPH) 以外は抗真菌活性が乏しいため、重症からの回復が見込めない例も報告されている [31-33]。また近年では薬剤耐性をもつ深在性真菌症の報告例もあるため、抗真菌薬の治療のみに依存することができない現状がある [34, 35]。

一方、一部の真菌が家庭内で人体に曝露し、アレルギーの原因になることも知られている。屋内で検出される真菌の代表に *Cladosporium* 属や *Penicillium* 属、*Aspergillus* 属が含まれており [36, 37]、先行研究の結果、喘息や鼻炎の発症や喘息の重症化の強い危険因子として報告されている [38-40]。米国で行われたいくつかのバースコホート研

究では *Penicillium* 属と *Aspergillus* 属の曝露が将来の喘息や喘鳴の発症の危険因子であることが示されている [36, 41]。

真菌症は、重篤化する前の早期治療や罹患する前の予防対策、曝露防止対策が非常に重要である。真菌症は予防段階を心がけることにより、深刻な症状を回避できる可能性のある疾患の一つでもあるとも言える [42]。

先ほども筆者が言及した非接触抗真菌作用を持つ菌株を居住空間に応用することで、居住環境汚染の防止や真菌症の予防、アレルギー予防に適応できる可能性があるものの、これまで微生物制御の分野において、詳細な非接触抗真菌作用を持つ菌株の性状や抗菌メカニズム、抑制機構を解析した例は極めて少ない。その理由としては、前述した通り、医薬品類と異なり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のないまま製品が先行して出回ってしまう傾向にあることが考えられる [1, 9, 10]。加えて、微生物資材の多くは微生物群、つまり複数の細菌や酵母が混合した状態で市場に出回っているものが多く、現在の技術的レベルでは接種されている微生物の検出や追跡、複合的な作用の解析は困難であり、エビデンスを出すことが極めて難しいことが考えられる [43]。しかしながら、その機能が未解明、未開発な分野であるため、微生物資材の今後の飛躍や発展性が十分に見込める分野であることが予想される。

このような背景を受けて、筆者は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、微生物資材の含有菌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今回の研究の目的とした。

本論文は次の 4 章より成る。

第 1 章では、長崎県内の土壌から微生物資材の含有微生物として利用できる菌株のスクリーニングをし、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* 属に属する TM-I-3 株が非接触状態において一部の真菌に対して抗真菌作用を示すことを見出した。筆者はこの 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。

第 2 章では、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。

第 3 章では、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) を用いて定性分析及び定量分析を行い、揮発性成分を比較した。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に相関性があるか否かを検討した。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単体の抗真菌試験を寒天気体法に準じて行うことにより、どの成分が非接触抗真菌作用に寄与しているかを検討した。

第 4 章では、TM-I-3 株が真菌の菌糸成長のどのステージを抑制するかを検討するために、真菌の菌糸成長に関して Logistic 解析を用い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ニー形成に対する影響について検討を行った。

## 第1章 TM-I-3株の性状及び安全性

*Bacillus* 属の細菌はグラム陽性桿菌であり、芽胞形成菌のため耐久性に優れ、高温で乾燥した環境下や栄養が不足しがちな厳しい状況下でも長期的に生存可能であることが知られている [14]。

本研究においては、*Bacillus* 属の耐久性に着目し、研究対象となる有用かつ新規な *Bacillus* 属の細菌の探索を開始した。そして、スクリーニングにより見出した *Bacillus* 属に属する TM-I-3 株を供試験株とし、遺伝的解析、形態学的観察、生理学・生化学的解析を行うことにより本菌株の性状を明らかにすることとした。また遺伝的解析、溶血性試験および急性経口毒性試験を行うことにより菌株の安全性の検討を試みた。なお、1章の一部については、共同研究先である有限会社 T.M エンタープライズのデータが含まれる。

### 1.1 材料及び方法

#### 1.1.1 土壌試料とスクリーニングの方法

九州各地、特に長崎県内を中心に畑や公園、庭、森、川辺、牛舎、ゴルフ場などを含む広範囲の土壌を200箇所以上採集した。

1次スクリーニングとして、この土壌サンプルを少量取り出し、100 mL耐熱プラスチック容器に入れ、0.02 Mリン酸緩衝溶液20 mLと十分に混合した。芽胞を持つ*Bacillus*属を得るために、この後にオートクレーブを用いて80°Cにて10~30分間加熱した。この土壌混合溶液0.1 mLを普通寒天培地 (Nissui Co., Ltd., Tokyo, Japan) (Table 1-1) の上に広げ、24時間から48時間かけて50°Cの温度で培養した。培養後、普通寒天培地上に形成された各々のシングルコロニーを採取し、土壌分離株を1000株以上得た。

2次スクリーニングとして、これらの分離株をグラム染色し、グラム陽性かグラム陰性かを判定した。その後、グラム陽性になった菌株

のみをそれぞれヒツジ血液寒天培地 (Becton Dickinson and Company, Tokyo, Japan) (Table 1-2) に塗り広げ、溶血性の有無を確認した。これにより溶血性を持たないと推定された芽胞形成菌を複数得た。

共同研究先の有限会社T.Mエンタープライズは、これらの菌株を以下の手順でMatrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) 微生物同定解析を実施した。菌株をターゲットスライドに塗布し、VITEK MS-CHCA matrix試薬 (bioMérieux, Lyon, France) を1 µL滴下した。試料が乾燥したのち、ターゲットスライドをセットし、VITEK MS™ plus (bioMérieux) にて分析を行った。分析結果をVITEK MS™ Knowledge Base V2.0およびSARAMIS™ Knowledge Base (bioMérieux) の自動解析ソフトより解析を実施し、*B. cereus*株などの有害な菌でないことが判明した株の一つをTM-I-3株とし、本研究の供試験株とした。1次スクリーニングと2次スクリーニングは全て無菌操作で行った。

Table 1-1 Nutrient agar (Nissui)

<b>Ingredients</b>	<b>g/L</b>
Meat extract	5.0
Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0

pH 7.0±

Table 1-2 TSA II 5% sheep blood agar M (Becton, Dickson and Company)

<b>Ingredients</b>	<b>g/L</b>
Pancreatic digest of casein	14.5
Papanic digest of soybean meal	5.0
Sodium chloride	5.0
Growth factors	1.5
Defibrinated sheep blood	5%
Agar	15.0

pH 7.3

#### 1.1.2 培地及び培養条件

培地は、普通液体培地 (Oxoid, Hampshire, UK) (Table 1-3) を用いた。供試験株は-80 °C 凍結保存ストック内の TM-I-3 株の菌液を用いて 30 °C で 48 時間好氣的条件下の培養を行い、その後実験に使用した。また 1.1.6 及び 1.1.7 においては同条件で BD™ Tryptic Soy Broth (Becton, Dickson and Company, Maryland, USA) (Table 1-4) で振盪培養 (150 rpm) した培養液を用いた。

Table 1-3 Nutrient agar (Oxoid)

<b>Ingredients</b>	<b>g/L</b>
'Lab-Lemco' powder	1.0
Yeast extract	2.0
Peptone	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0

pH 7.4±0.2 at 25 °C

Table 1-4 BD™ Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson and Company)

<b>Ingredients</b>	<b>g/L</b>
Bacto™ tryptone	17.0
Bacto soytone	3.0
Glucose	2.5
Sodium chloride	5.0
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5
pH 7.3±0.2	

### 1.1.3 遺伝的解析

有限会社 T.M エンタープライズは、TM-I-3 株菌の同定のため 16S rDNA 塩基配列・分子系統解析を各プロトコールに基づき行った。DNA は achromopeptidase (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan) により抽出し、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて PCR により増幅した。この際、使用したプライマーは 9F と 1510R であった。精製された DNA を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を用いてサイクルシーケンシング法を行った。この際、使用したプライマーは、9F、785F、1099F、536R、802R、1510R であった。DNA 断片を ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) によって電気泳動し ChromasPro 1.7 sequencing software (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia) により配列を決定した。この塩基配列を、最も近縁な微生物の 16S rRNA 遺伝子配列の代表と比較し、TM-I-3 株の簡易分子系統樹を微生物同定用 DNA データベース DB-BA 10.0 (Techno Suruga Laboratory, Shizuoka, Japan) と国際塩基配列データベース (DDBJ/GenBank/EMBL) から近隣結合法を用いて得た。TM-I-3 株とその近縁な微生物の 16S rRNA 遺伝子の相同率は配列の対比較によって計算した。

#### 1.1.4 形態学的観察

TM-I-3 株の形態学的な特徴を決定するため、グラム染色 (Nissui Co., Ltd.) を行い光学顕微鏡 BX50F4 (Olympus, Tokyo, Japan) より形態観察を行った。

#### 1.1.5 生理学・生化学的解析

生理学的解析をするため Barrow らの方法 [44] に基づき、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生、ブドウ糖の酸化/発酵 (O/F) の試験を行った。

生化学的性状を解析するため以下の手順で API 50 CHB kit (bioMérieux) 及び API 20 E kit (bioMérieux) を用いた。普通寒天培地にて TM-I-3 株を 30 °C で 18 時間培養し、コロニーを数個釣菌した。それぞれ API 50 CHB の液体培地のアンプル及び 0.85% 滅菌生理食塩水のアンプルに懸濁し、マクファーランド濁度 2 になるように菌液を調製した。調製した菌液をプレートのチューブ部分に接種し、30 °C で 24 時間及び 48 時間培養した。API 50 CHB においては酸化により培地のフェノールレッド指示薬が黄色に変化しているものを陽性反応、未変化のものを陰性反応と判定した。またエスクリン反応においては赤色から黒色に変化した場合を陽性反応、未変化のものを陰性と判定した。また API 20 E においては各添加試薬を読み取り時に添加した [45]。化学的性状の検査項目については Table 1-6 および Table 1-7 に結果と共に示した。追加試験として、嫌気条件下での生育、20 °C 及び 50 °C 条件での生育、5% NaCl 条件での生育、カゼインの加水分解能およびでんぷんの加水分解能を調べた。

### 1.1.6 溶血性試験

溶血性を持つ微生物が血液中に感染し、溶血素という病原因子を産生することにより赤血球の細胞膜に損傷を与え、いくつかの疾患を引き起こすことが知られている [46]。代表的な症状としては、溶血性貧血や溶連菌感染症、溶連菌感染症に続発する急性糸球体腎炎やリウマチ熱があげられ、*Clostridium perfringens* や *Streptococcus pyogenes*、尿路病原性の *Escherichia coli* 等の細菌が溶血性関連疾患を引き起こすと報告されている [47-49]。溶血性を示す細菌が全て疾患を起こすとは限らないが安全性を確認するという点では検査すべき項目の一つと言えるため、TM-I-3 株に対する溶血性試験を以下の方法で実施した。

1.1.2 に記した TM-I-3 株の培養液を白金耳でヒツジ血液寒天培地 (Becton Dickinson and Company) へ画線した。この寒天培地を 30 °C で 72 時間培養し、コロニー周囲の溶血環の有無を確認した。溶血環の有無が分かりやすいようにヒツジ血液寒天培地をライトビューアーの上に置き、下から発光させたデジタル画像を撮影した。陽性対照として、*Bacillus* 属の BS-T2 株、陰性対照として *Bacillus* 属の TM-N5 株を同様に画線した [50]。

### 1.1.7 急性経口毒性試験

#### ① 検体

検体を 1.1.2 に記した TM-I-3 株の約  $1.0 \times 10^8$  個/mL に調製した菌培養液とし、ブランクとして TM-I-3 株のっていない滅菌済みの培養液を用いた。

#### ② 試験動物

毒性試験や薬理的試験に広く用いられており毒性物質に感受性の高い時期である 5 週齢の ICR 系雌マウス (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) を購入した。約 1 週間の予備飼育を行って一般状態に異常のな

いことを確認した後、試験に使用した。試験動物はポリカーボネート製ゲージに各 5 匹収容し、室温 23 °C ± 3 °C、照明時間 12 時間／日とした飼育室において飼育した。飼料（Nosan Corporation, Yokohama, Japan）および飲料水（水道水）は自由摂取させた。

### ③ 試験方法

OECD Guideline for Testing of Chemicals 420 [51] に準拠し、投与容量として 20 mL/kg を投与する試験群及び対照品を投与する対照群を設定し、各群につき雌マウス 5 匹を用いた。投与前に約 4 時間試験動物を絶食させた。体重を測定した後、試験群には TM-I-3 株の培養液、対象群には菌の入っていない培養液をそれぞれ 20 mL/kg の投与容量で胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した。観察期間は 14 日間とし、投与日は頻回、翌日から 1 日 1 回の観察を行った。投与後 7 及び 14 日に体重を測定し、Levene 検定を行った。分散に差がみられなかったため、Student の t-検定により群間の比較を行った。有意水準は 5%とした。観察期間終了時に動物すべてを剖検した。

## 1.2 結果

### 1.2.1 遺伝的特徴

Fig. 1-1 で示すように、微生物同定用 DNA データベース DB-BA 10.0 と Blast Local Alignment Search Tool (BLAST) 相同性検索の結果、TM-I-3 株の 16S rDNA 塩基配列は *Bacillus* 属の 16S rDNA 塩基配列に対し高い相同性を示した。

*Bacillus sporothermodurans* (*B. sporothermodurans*) M215 株は、全ゲノム配列中に 3 つの配列の異なる 16S rDNA 遺伝子領域を有することが報告されており、それぞれ Type1 (U49078)、Type2 (U49079)、Type3 (U49080) と分類されている [52]。ここで TM-I-3 株の 16S rDNA 塩基配列は *B. sporothermodurans* M215 株の 3 つのアクセッション番号 (U49078, U49079, U49080) に対し相同率 99.1%~99.3% の最も高い相同性を示した。国際塩基配列データベース (DDBJ/GenBank/EMBL) に対する相同性検索の結果についても TM-I-3 株は *Bacillus* 属の 16S rDNA 塩基配列に対して高い相同性を示し、基準株では *B. sporothermodurans* の M215 株の 3 つのアクセッション番号 (NR\_026010, NR\_118832, NR\_118833) に対し相同率 99.1%~99.3% の最も高い相同性を示した。

これより微生物同定用 DNA データベース DB-BA 10.0 に対する相同性検索で得られた上位 15 塩基配列を用いた 16S rDNA 塩基配列に基づく簡易分子系統解析を行った結果、TM-I-3 株は *Bacillus* 属で構成されるクラスターにおいて、*B. sporothermodurans* M215 株の 3 つのアクセッション番号 (U49078, U49079, U49080) で構成されるクラスターは含まれていたものの、いずれの配列とも異なる分子系統学的位置を示していた。Fig.1-2 に示す通り、*B. sporothermodurans* M215 株の 3 つのアクセッション番号 (U49078, U49079, U49080) の TM-I-3 株に対するシーケンスの主な相違点は共通して 250 bp 以下の領域 (超可変領域 V1~V2) に発現していることが明らかになった。また 900 bp~1100

bp の領域（超可変領域 V6~V7）にも相違点が確認された。

### 1.2.2 形態学的・生理学的・生化学的特徴

Fig. 1-3 と Table 1-5 が示すように、形態学的観察および生理学的解析より、TM-I-3 株は好気性条件で生育し、運動性を有するグラム陽性桿菌で、芽胞を形成し、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応はともに陽性を示した。これらの性状は、*Bacillus* 属の性状と一致する。

生理学的解析は Table 1-6 および Table 1-7 に示すように、TM-I-3 株は D-リボース、D-グルコースおよび D-フルクトースなどを酸化し、D-キシロース、L-キシロースおよび D-ガラクトースなどを酸化しなかった。また、TM-I-3 株はウレアーゼ活性を示さず、アセトインを産生せず、ゼラチンを加水分解し、硝酸塩を還元しなかった。追加試験の結果は Table 1-8 に示すように、検体は嫌気条件下では生育せず、20°C および 50°C で生育し、5% NaCl 環境下でも生育し、カゼインおよびでんぷんを加水分解しなかった。これらの性状は、16S rDNA 塩基配列解析において近縁性が示唆された *B. sporothermodurans* M215 株の性状と類似点が多く見られたが、相違点も確認された。特に D-グルコース、D-フルクトース、サリシンおよびセロビオースの 4 種類の糖を酸化する点やゼラチンを加水分解する点は *B. sporothermodurans* M215 株の性状と異った [53]。

### 1.2.3 安全性

遺伝的解析より得られた Fig. 1-1 の系統樹から TM-I-3 株の種レベルでの帰属分類が推定された。TM-I-3 株が *B. cereus* の菌種グループに含まれていないため本菌はバイオセーフティレベル 1 と推定された。これより、TM-I-3 株は「ヒトに疾病を起こし、或いは動物に獣医学的に重要な疾患を起こす可能性のないもの（日和見感染を含

む)」と推定された [54]。

またヒツジ寒天培地を用いた溶血性試験の結果は Fig. 1-4 に示すように、陽性対照の培地上のコロニー周辺には黄色に発色した溶血環が認められた。しかしながら、TM-I-3 株のコロニー周辺には溶血環は観察されなかった。これより、TM-I-3 株は溶血陰性と判定した。

急性経口毒性試験に関しては、いずれの投与群においても、観察期間中に死亡例や異常は認められなかった。また Table 1-9 に示すように、投与後 7 及び 14 日後の体重測定において、試験群は対照群と比べて体重値に差は見られなかった。なお、観察期間終了時の剖検では、全ての試験動物に異常は見られなかった。

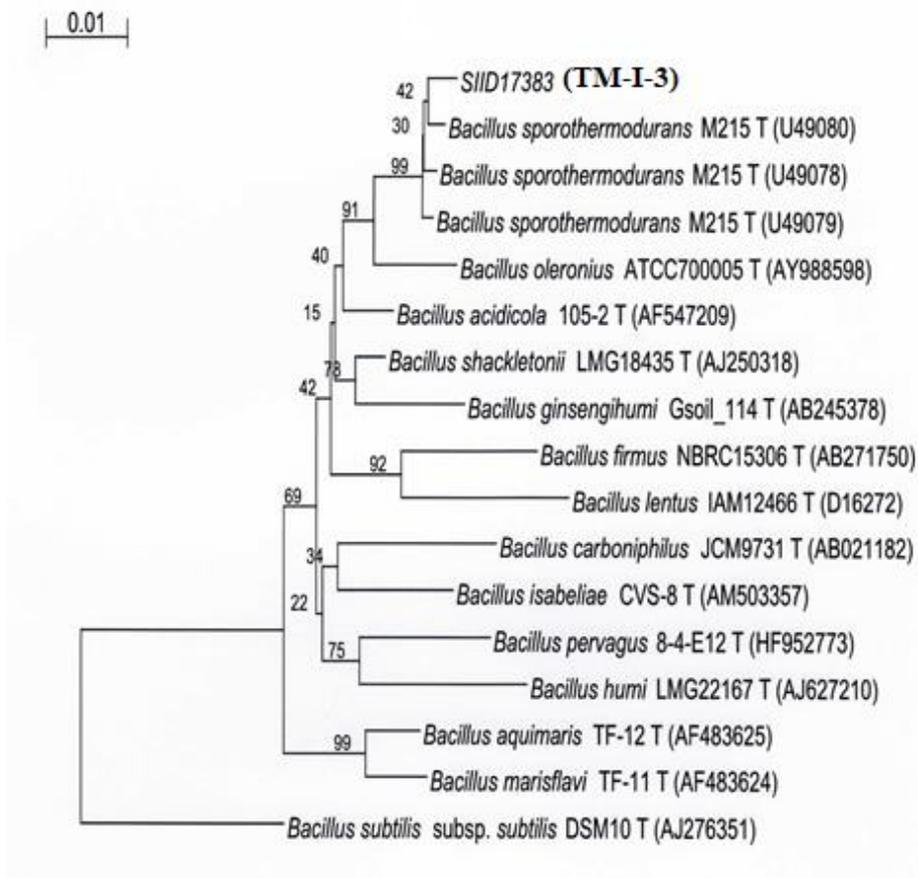


Fig. 1-1 Phylogenetic relationship of TM-I-3, which was isolated from soil in Nagasaki, Japan and analyzed by partial 16S rDNA gene sequences. Branches show bootstrap values and scale are genetic distance.

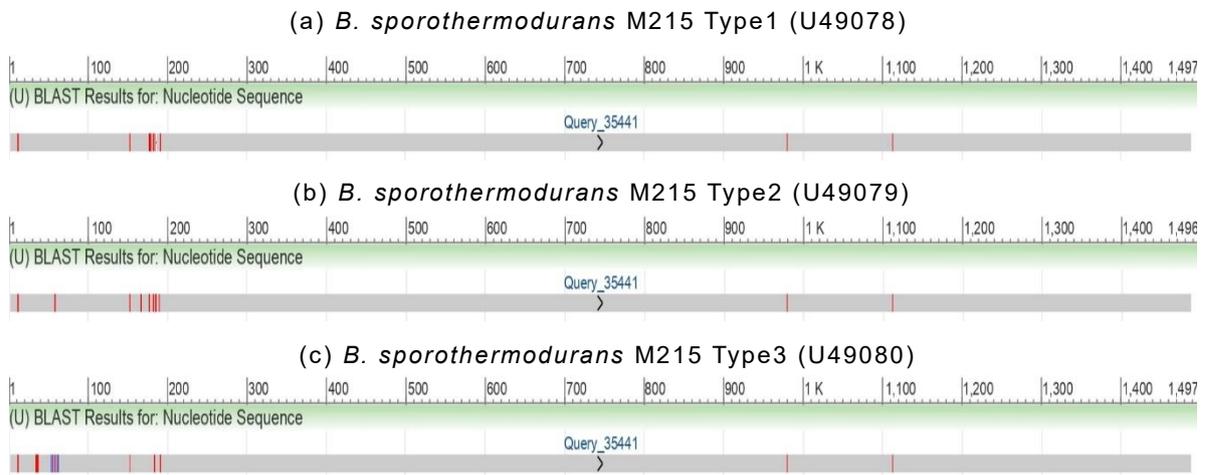


Fig. 1-2 Aligned sequences of three 16S rRNA gene types of *B. sporothermodurans* M215. The red lines and blue ones show the differences compared to aligned sequences of TM-I-3 and alignment scores;  $\geq 200$  and 40-50 respectively.

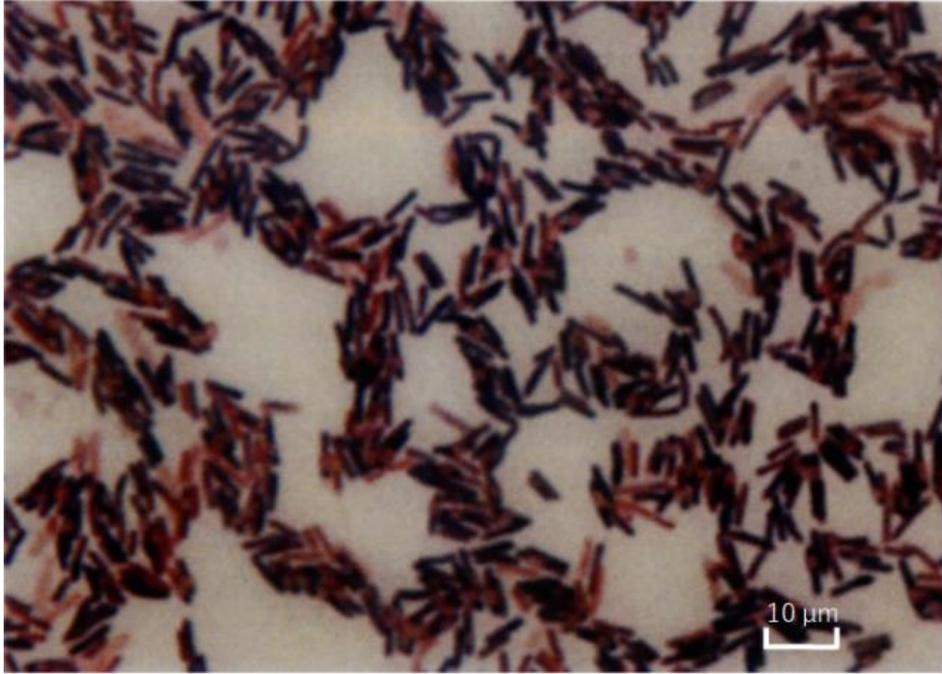


Fig. 1-3 Gram-stained optical microscope image of strain TM-I-3

Table 1-5 Bacteriological properties of TM-I-3

<b>Test</b>	<b>TM-I-3</b>	
Culture temperature	30 °C	
Morphotype	Rod-shaped (0.8-0.9×2.0-3.0 μm)	
Gram stainability	+	
Presence of spore	+	
Motility	+	
Colony	Medium	Nutrient agar
	Culture time	24 h
	Diameter	1.0-2.0 mm
	Color	Cream color
	Shape	Round
	Surface	Smooth
	Transparency	Opaque
	Viscosity	Buttery
Growth temperature	37 °C	+
	45 °C	+
Catalase reaction	+	
Oxidase reaction	+	
Acid and/or gas production from glucose test	-/-	
Oxidative-fermentation glucose test	-/-	

Table 1-6 Fermentation tests based on API 50 CHB tests

<b>Substrate</b>		<b>Substrate</b>		<b>Substrate</b>	
N-Acetylglucosamine	+	D-Galactose	-	Sorbose	-
Arbutin	+	Gluconate	-	Starch	-
Cellobiose	+	Glycerol	-	Trehalose	-
Esclin	+	Glycogen	-	D-Turanose	-
D-Fructose	+	Inositol	-	Xylitol	-
Gentiobiose	+	Inulin	-	D-Xylose	-
D-Glucose	+	2-Ketogluconate	-	L-Xylose	-
Maltose	+	5-Ketogluconate	-		
D-Ribose	+	Lactose	-		
Salicin	+	D-Lyxose	-		
D-Tagatose	+	Mannitol	-		
Adonitol	-	Mannose	-		
Amygdalin	-	Melezitose	-		
D-Arabinose	-	Melibiose	-		
L-Arabinose	-	$\alpha$ -Methyl-D-annoside	-		
D-Arabitol	-	$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-		
L-Arabitol	-	$\beta$ -Methyl-xylose	-		
Dulcitol	-	Raffinose	-		
Erythritol	-	Rhamnose	-		
D-Fucose	-	Saccharose	-		
L-Fucose	-	Sorbitol	-		

Table 1-7 Biochemical tests based on API 50 CHB tests

<b>Substrate</b>	
GEL**	+
ADH**	-
CIT**	-
H <sub>2</sub> S**	-
IND**	-
LDC**	-
NIT**	-
ODC**	-
ONPG**	-
TDA**	-
URE**	-
VP**	-

ADH: Arginine dihydrolase, CIT: Citric acid, GEL: Gelatinase,  
H<sub>2</sub>S: Hydrogen sulfide, IND: Indole, LDC: Lysine decarboxylase,  
NIT: Nitrate, ODC: Ornithine decarboxylase, ONPG: β-Galactosidases,  
TDA: Tryptophan deaminase, URE: Urease, VP: Voges–Proskauer

Table 1-8 Results of the additional physiological tests

<b>Test</b>	<b>TM-I-3</b>
Growth under anaerobic conditions	-
Growth on 5% NaCl	+
Growth temperature	
20 °C	+
50 °C	+
Hydrolysis of casein	-
Hydrolysis of starch	-

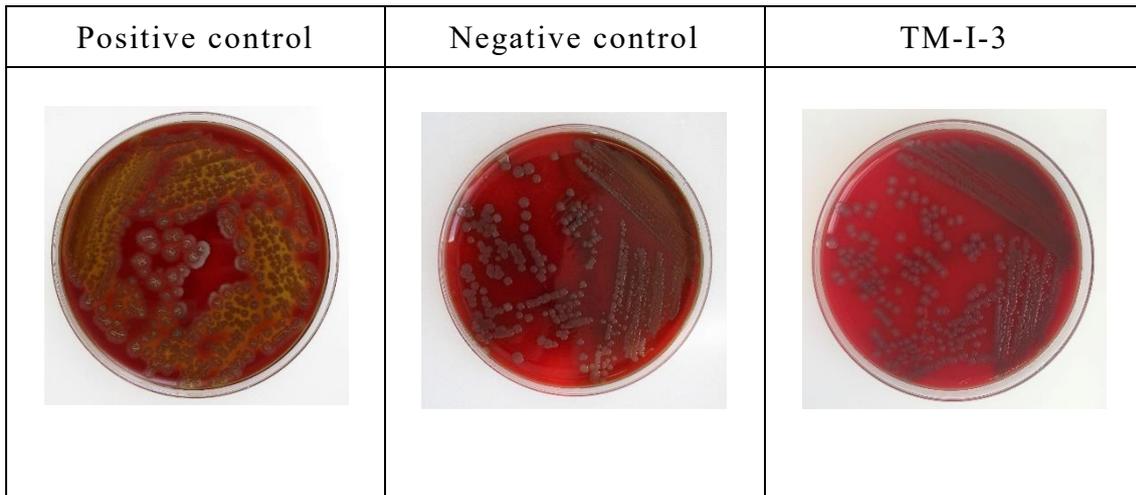


Fig. 1-4 The results of the hemolysis test using sheep blood agar. The yellow part around colonies indicated hemolysis.

Table 1-9 Mice body weight changes following oral administration with TM-I-3 broth or vehicle. The weight represented the mean  $\pm$  S.D. [g]. The number of mice was written in parenthesis.

Administered group	Before administration	After administration	
		7d	14d
Test group	28.0 $\pm$ 1.9 (5)	30.7 $\pm$ 2.1 (5)	33.0 $\pm$ 2.9 (5)
Control group	27.7 $\pm$ 1.9 (5)	31.3 $\pm$ 2.5 (5)	33.9 $\pm$ 2.9 (5)

### 1.3 考察

筆者は居住環境下において安全で有用な菌を探索することを目的に長崎県を中心とした土壌から新規な菌のスクリーニングを行った。スクリーニングで得られた菌類の中から最も有用で適すると考えられる *Bacillus* 菌 (TM-I-3 株) を採取し、性状や安全性を明らかにすることを目的として様々な方向からの解析を試みた。また、筆者は微生物資材のヒトや生物に対する安全性を担保する手段の確立に寄与することも含め、今回の試験内容を模索及び検討した。

その結果、遺伝子解析においては、16S rDNA 塩基配列解析から TM-I-3 株は *B. sporothermodurans* への近縁性が示唆されたものの、両者は完全には一致せず、また生理・生化学的試験においても両者の間には相違が認められた。これより、現段階では TM-I-3 株は *B. sporothermodurans* に帰属すると判断することは難しいと考え、*B. sporothermodurans* に近縁な *Bacillus* 属と推定された。すなわち TM-I-3 株は、新規の *Bacillus* 属に属する細菌である可能性が示唆された。

安全性に関しては、*Bacillus* 属の中には溶血試験陽性を示す菌株も多くあるが、TM-I-3 株は溶血試験陰性を示した。また急性経口毒性試験においてマウスは観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。この試験ではマウスを用いる単回経口投与において、検体の LD<sub>50</sub> 値は、雌では 20 mL/kg (約 2.0×10<sup>4</sup> mg/kg) を超えるものと評価された。一般的に嘔吐型食中毒を引き起こす菌として知られる *Bacillus* 属の *B. cereus* 株毒素の LD<sub>50</sub> は約 4.0×10<sup>-5</sup> mg/kg から約 8.0×10<sup>-5</sup> mg/kg とされている [55]。一方、非病原菌として報告されており豚・鶏用の飼料添加物として利用されている *Bacillus* 属の *B. subtilis* JA-ZK 株培養液の LD<sub>50</sub> は約 3.0×10<sup>3</sup> mg/kg である [56]。これらの文献値より TM-I-3 株の毒性が低いことが推定された。さらに TM-I-3 株が遺伝子解析においてバイオセーフティレベルが 1 であったことも加味すると、居住空間における使用に関して一定の安全性を担保することができたのではないかと考える。

しかしながら、長期的な使用や予期せぬ偶発的な状況を考慮し、慢性毒性や皮膚・角膜への有害性の有無をさらに検討する必要があると筆者は考える。また免疫系の未発達な乳幼児や免疫系が低下している高齢者への影響も検討すべき事項である。さらに、生体内への影響のみならず、環境や生態系に対する影響や負荷も考えていかなければならない。これより生態毒性試験等の実施も今後視野に入れる必要があると考える。

## 第2章 TM-I-3 株含有微生物資材の抗真菌作用

この章では、TM-I-3 株を含浸した微生物資材の抗真菌能力の性能を検討した。TM-I-3 株を微生物資材として取り扱った理由は、第一に居住空間への適応を念頭に研究を進めていくため、実空間でも取り扱いしやすい形態で実験を行った方がフィールド試験までの流れがスムーズに運ぶ可能性が高いためである。第二に *Bacillus* 属の耐久性の高さと長期保存性という特性を生かすためである。

居住空間内に見られる一般的なカビやアレルギー疾患や肺疾患といった感染症の原因となるカビの原因真菌を選出し、それらに対するTM-I-3 株の微生物資材の抗真菌作用の性能を接触条件と非接触条件に分けて判定した。

### 2.1 材料及び方法

#### 2.1.1 供試験資材及び被験真菌

TM-I-3 株を普通液体培地 (Table 2-1) にて 32°C で 24~48 時間振盪培養した微生物培地を作製し、滅菌済みのパーライト粉末に含浸させたものを供試験資材とした。また同属の *B. subtilis* 株を普通液体培地 (Table 2-1) にて 32°C で 24~48 時間振盪培養した微生物培地を作製し、滅菌済みのパーライト粉末に含浸させたものを陰性対照とした。

被験真菌として、*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*; NITE Biological Resource Center [NBRC] 33022)、*Cladosporium cladosporioides* (*C. cladosporioides*; NBRC 6348)、*Penicillium expansum* (*P. expansum*; NBRC 5453)、*Trichosporon cutaneum* (*T. cutaneum*; NBRC 5467) を用いた。

Table 2-1 Nutrient broth

Ingredients	g/L
Meat extract	5.0
Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0

pH 7.0±

### 2.1.2 培地及び孢子懸濁液の作製

培地は、供試験資材用として標準寒天培地（SA 培地）（Nissui Co., Ltd）（Table 2-2）、各被験真菌用としてポテトデキストロース寒天培地（PDA 培地）（Nissui Co., Ltd）（Table 2-3）を用いた。

孢子懸濁液の作製については、まず各被験真菌を PDA 培地にて 27°C で 1 週間～2 週間培養した。各被験真菌を培養した PDA 培地上に 15 mL の 0.01% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.）を含む滅菌生理食塩水を入れて 2 分間室温にて放置した。その後、コンラージ棒で真菌コロニーの表面をこすり孢子を浮遊させた。得られた真菌液を滅菌脱脂綿にて濾過し、 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$  /mL の濃度に調製し孢子懸濁液とした。

Table 2-2 Standard method agar (Nissui)

<b>Ingredients</b>	<b>g/L</b>
Yeast extract	2.5
Peptone	5.0
Glucose	1.0
Agar	15.0
pH 7.0±	

Table 2-3 Potato dextrose agar (Nissui)

<b>Ingredients</b>	<b>g/L</b>
Potato extract	3.9
Glucose	21.0
Agar	14.1
pH 5.6±0.2	

### 2.1.3 接触抗真菌試験（寒天拡散法）

4種類の被験真菌 100  $\mu$ L をそれぞれ塗り広げた PDA 培地の中央に滅菌済みのペーパーディスク（直径 13 mm）（GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK）を置いた。これらのペーパーディスクの上に数滴の滅菌水を垂らして湿らせた後、32°C で一晩恒温した供試験資材である TM-I-3 株含浸パーライト粉末 0.01 g を乗せた。陰性対照として 32°C で一晩恒温した *B. subtilis* 株含浸パーライト粉末 0.01 g を湿らせたペーパーディスクの上に乗せたシャーレ、ブランクとして滅菌済みパーライト粉末 0.01 g を湿らせたペーパーディスクの上に乗せたシャーレを用意した。これらのシャーレを 27°C で 7 日間した培養した。7 日後にそれぞれの被験真菌に対する阻止円の 3 連の直径を Foxit

Reader® (Foxit Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いて測定し、平均値と標準偏差を求めた。

#### 2.1.4 9.5 L の密閉箱を使用した非接触抗真菌試験

供試験資材である TM-I-3 株含浸パーライト粉末 1.5 g を SA 培地に乘せたシャーレを 32°C で一晚培養した。また 4 種類の被験真菌 100 µL をそれぞれ塗り広げた PDA 培地を用意した。プラスチック製の密閉箱（幅 18.0×奥行 27.0×高さ 20.0 cm; 9.5 L）の内側の底に Fig. 2-1 のように恒温した TM-I-3 株含浸パーライト粉末を乗せた SA 培地を設置し、密閉箱の天井の蓋の裏に用意した PDA 培地を逆さに強力両面テープで固定した。陰性対照として *B. subtilis* 株含浸パーライト粉末 1.5 g、ブランクとして滅菌済みパーライト粉末 1.5 g を SA 培地に乗せたシャーレを 32°C で一晚培養したものを使用し、同様の実験系を組み立てた。これらの密閉箱を 27°C で 7 日間培養した。7 日後にそれぞれの被験真菌の 3 連のコロニーの面積を Foxit Reader® (Foxit Japan, Inc.) を用いて測定し Levene 検定を行った。統計手順に従い [57]、*C. cladosporioides* を除く各被験真菌のコロニー面積は Dunnett 検定により多重比較を行った。また、*C. cladosporioides* のコロニー面積に関しては、Steel 検定より多重比較を行った。

さらに、3 連のコロニーの面積の平均値を用いて(1)の式から TM-I-3 株の各被験真菌の抑制率 (Inhibition ratio) を求めた。

$$\text{Inhibition ratio} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \cdots (1)$$

$A_0$  はブランクと共存させた各被験真菌のコロニー面積の平均値を示し、 $A$  は供試験資材または陰性対照と共存させた場合の各被験真菌のコロニー面積の平均値を示している。

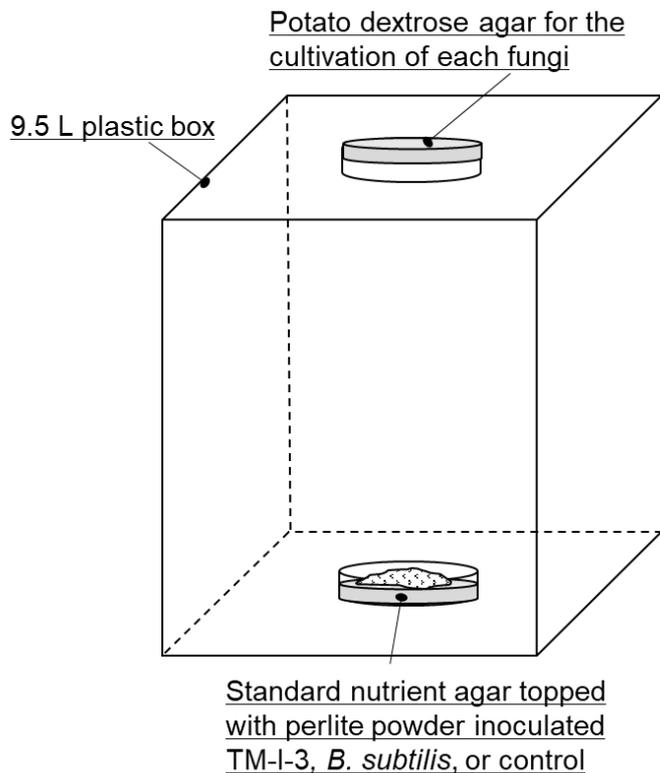


Fig. 2-1 Structure of the experimental equipment using 9.5 L plastic box, used to measure antifungal activity without direct contact with the subject.

#### 2.1.5 125 L の密閉箱を使用した非接触抗真菌試験

供試験資材である TM-I-3 株含浸パーライト粉末 1.0 g を SA 培地に乗せたものを 1 つの箱に対して 2 つずつ用意し、32°C で一晩培養した。また 2.1.2 で作製した *A. fumigatus* と *C. cladosporioides* の 2 種類の被験真菌の孢子懸濁液をそれぞれ 200~300 CFU/mL の濃度に調製し、それら 100  $\mu$ L を塗り広げた PDA 培地を用意した。今回は実験装置の脆弱性の都合から、プラスチック製の密閉箱（幅 50×奥行 50×高さ 50 cm;125 L）の内側の底に Fig.2-2 のように培養した TM-I-3 株含浸パーライト粉末に乗せた 2 つの SA 培地と PDA 培地を配置し両面テープで固定した。ブランクとして、PDA 培地のみを設置した実験系を組み立てた。これらの密閉箱を 27°C で 5 日間培養した。5 日後にそれぞれの

被験真菌の 3 連のコロニーの面積を Foxit Reader® (Foxit Japan, Inc.) を用いて測定し Levene 検定を行った。各被験真菌のコロニー面積の分散に差がみられなかったため、Student の t 検定により群間の比較を行った。

さらに、3 連のコロニーの面積の平均値を用いて(1)の式から TM-I-3 株の各被験真菌の抑制率 (Inhibition ratio) を求めた。

$$\text{Inhibition ratio} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \cdots (1)$$

$A_0$  はブランクの各被験真菌のコロニー面積の平均値を示し、 $A$  は供試験資材と共存させた場合の各被験真菌のコロニー面積の平均値を示している。

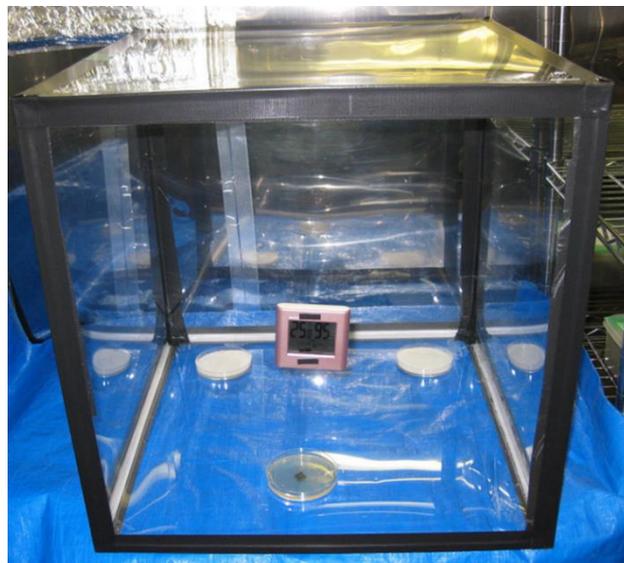
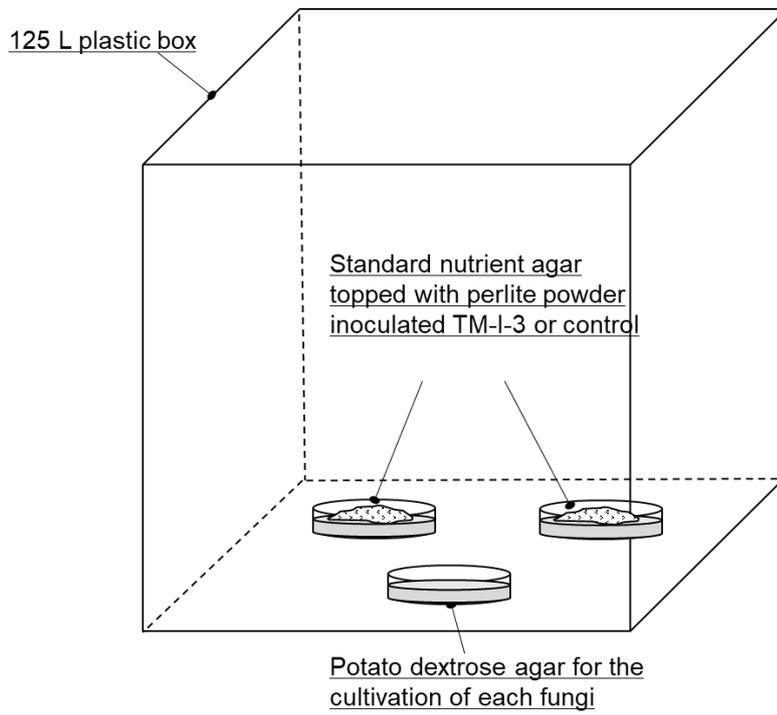


Fig. 2-2 Structure of the experimental equipment using 125 L plastic box, used to measure antifungal activity without direct contact with the subject.

## 2.2 結果

### 2.2.1 TM-I-3 株の接触抗真菌作用

寒天拡散法を参考にし、*A. fumigatus*、*C. cladosporioides*、*P. expansum*、*T. cutaneum* の 4 種類の被験真菌に対する TM-I-3 株の接触抗真菌作用の評価を行った。

Fig. 2-3 は接触抗真菌試験結果のデジタル写真、Table 2-4 は空白である未含浸パーライトと供試験資材である TM-I-3 株を含浸させたパーライト及び陰性対照である *B. subtilis* 株含浸パーライト粉末をそれぞれ共存させた PDA 培地上の各被験真菌に対する阻止円を比較した表である。

Fig. 2-3 のデジタル写真と Table 2-4 から各被験真菌は空白または供試験資材である TM-I-3 株と共存させた群に関しては、PDA 培地上にほぼ満遍なくコロニーが確認され、阻止円は観察されなかった。一方、陰性対照である *B. subtilis* 株含浸パーライト粉末を乗せた群は *A. fumigatus* を除く 3 種類の被験真菌に対してペーパーディスクの周囲に阻止円を示した。特に、*C. cladosporioides* と *T. cutaneum* に対して大きい阻止円を示した。

### 2.2.2 9.5 L の密閉箱を使用した TM-I-3 株の非接触抗真菌作用

9.5 L の密閉箱を使用し、TM-I-3 株の非接触抗真菌作用について検討した。

Fig. 2-4 は非接触抗真菌試験結果のデジタル写真、Fig. 2-5 は空白である未含浸パーライトと供試験資材である TM-I-3 株を含浸させたパーライト、そして陰性対照である *B. subtilis* 株を含浸させたパーライトをそれぞれ共存させた PDA 培地上の各被験真菌のコロニー面積を比較したグラフである。

Fig. 2-4 のデジタル写真から、空白と共存させた群では PDA 培

地上に全ての被験真菌のコロニーが満遍なく広がる様子が肉眼で確認できた。また *B. subtilis* 株を含浸させたパーライトを共存させた群においても *T. cutaneum* 以外は各被験真菌のコロニーが満遍なく広がる様子が肉眼で確認できた。*T. cutaneum* に関しては、微小なコロニーが PDA 培地上に広がっていた。TM-I-3 株と共存させた群では *A. fumigatus* 以外コロニーが確認できなかった、または微小なコロニーのみが観察された。*A. fumigatus* に関しては、複数の小さなコロニーが PDA 培地上の中心のみに観察された。

Fig. 2-5 (a)、(b)、(c) の各被験真菌のコロニー面積を比較したグラフが示すように、*A. fumigatus*、*C. cladosporioides*、*P. expansum* においてはブランクの群と TM-I-3 株の群で有意な差が見られた (d.f. = 2,  $p < 0.05$ )。一方、ブランクの群と *B. subtilis* 株の群で有意な差は見られなかった (d.f. = 2,  $p \geq 0.05$ )。*T. cutaneum* の結果においては、Fig. 2-5 (d) より、ブランクの群と TM-I-3 株の群およびブランクの群と *B. subtilis* 株の群で有意な差が見られた (d.f. = 2,  $p < 0.05$ )。

また、Table 2-5 より、TM-I-3 株の各被験真菌の抑制率は *A. fumigatus* を除き 90%以上であり、*A. fumigatus* に関しても抑制率 88.2%と比較的大きい数値であった。一方、*B. subtilis* 株の被験真菌の抑制率は *C. cladosporioides* および *P. expansum* に関しては、ほぼ抑制率が 0%に近かった。加えて *B. subtilis* 株の *A. fumigatus* に対する抑制率 13.8%であった。*T. cutaneum* に対してのみ *B. subtilis* 株の抑制率は 78.52%と比較的大きい数値を示したが、TM-I-3 株の *T. cutaneum* に対する抑制率の方が 13.34%の差をつけて大きいという結果であった。

### 2.2.3 125 L の密閉箱を使用した TM-I-3 株の非接触抗真菌作用

密閉箱の体積を 125 L に拡大し、さらに広い空間においても TM-I-3 株の非接触抗真菌作用の効果があるか、検討を行った。

Fig. 2-6 は実験結果のデジタル写真を示している。Fig. 2-7 はブランクである未含浸パーライトと供試験資材である TM-I-3 株をそれぞれ

共存させた PDA 培地上の各被験真菌のコロニー面積を比較したグラフである。また Fig. 2-8 は空白である未含浸パーライトと供試験資材である TM-I-3 株をそれぞれ共存させた PDA 培地上の各被験真菌のコロニー数を計測し比較したグラフである。

Fig. 2-6 の写真から各被験真菌は空白と共存させた群では PDA 培地上にコロニーが肉眼で確認できるが、TM-I-3 株と共存させた群ではコロニーが確認できなかった。

Fig. 2-7 (a) の *A. fumigatus* のコロニー面積を比較したグラフが示すように、*A. fumigatus* においては空白の群と TM-I-3 株の群で有意な差が見られた (d.f. = 2,  $p < 0.01$ )。一方、Fig. 2-7 (b) の *A. fumigatus* のコロニー面積を比較したグラフが示すように、*C. cladosporioides* においては空白の群と TM-I-3 株の群で有意な差が見られなかった (d.f. = 2,  $p \geq 0.05$ )ものの、 $p=0.073$  と有意傾向 ( $0.05 < p < 0.1$ ) は見られた。*C. cladosporioides* の被験真菌においてコロニー面積間の明確な有意差が得られなかったのは、培養時間が 5 日間と短くコロニーの広がり小さかったこと、*C. cladosporioides* のコロニー 1 個ずつが *A. fumigatus* と比較して小さなものであること並びにサンプル数が少なかったことが原因と考えられた。よって、次に各被験真菌のコロニー数を計測し比較を行った。その結果である Fig.2-8 (a) から *A. fumigatus* においては空白の群と TM-I-3 株の群で有意な差が見られた (d.f. = 2,  $p < 0.01$ )。また Fig. 2-8 (b) から *C. cladosporioides* においても、空白の群と TM-I-3 株の群で有意な差が見られた (d.f. = 2,  $p < 0.05$ )。TM-I-3 株の各被験真菌の抑制率は *A. fumigatus* と *C. cladosporioides* とともに 100%という結果だった。

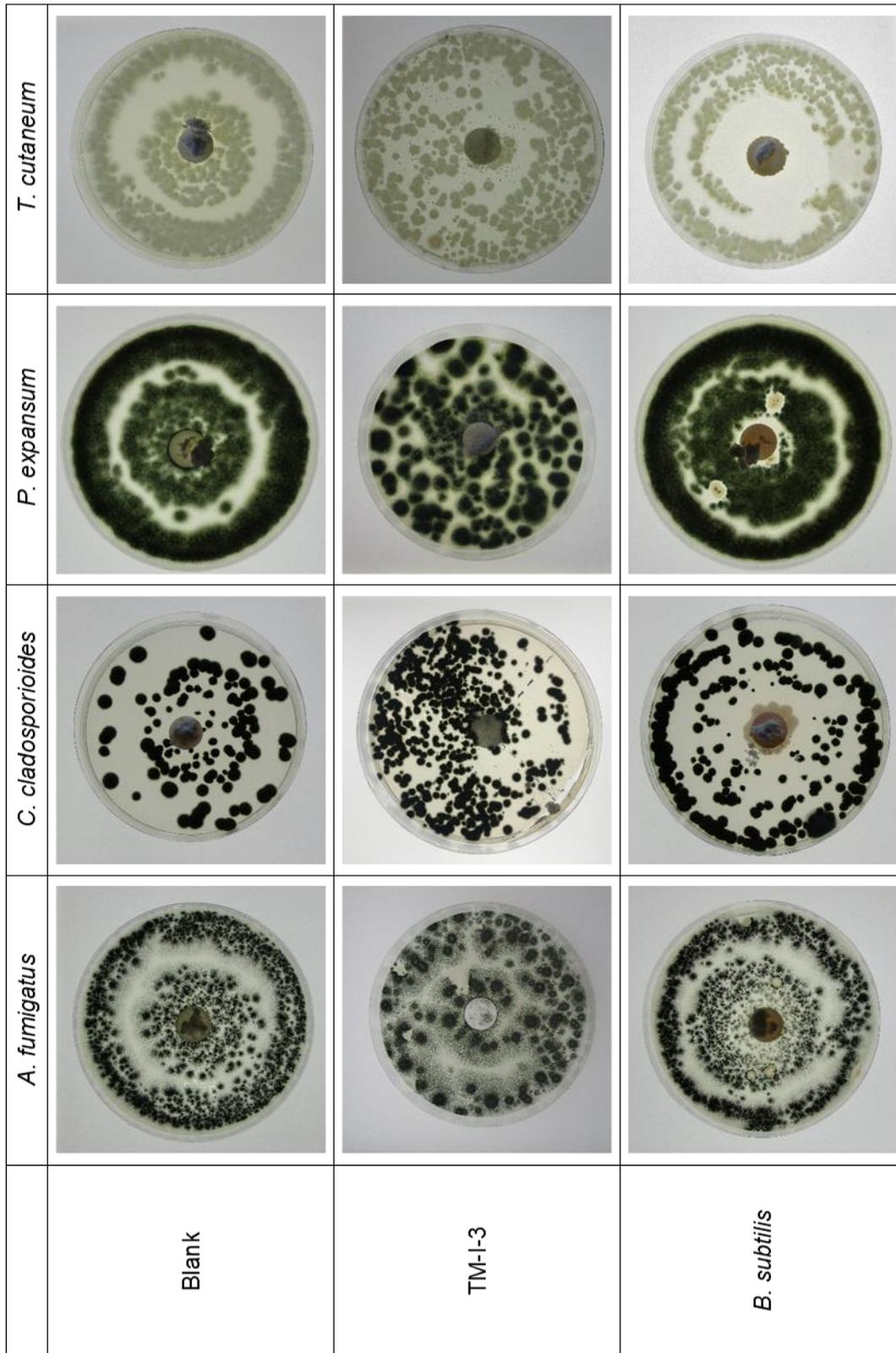


Fig. 2-3 Antifungal activity of strain TM-I-3 upon direct contact with four different fungal strains. “Blank” images are of the blank test groups, “TM-I-3” images are of the experimental groups, and “*B. subtilis*” images are of the negative control group. Plates show growth after 7 d at 27°C.

Table 2-4 Growth-inhibitory zone diameters of Blank, TM-I-3, and *B. subtilis* against *A. fumigatus*, *C. cladosporium*, *P. expansum*, and *T. cutaneum*. The inhibitory zone diameter is reported as the mean  $\pm$  SD (N = 3). The diameter in the agar diffusion included the diameter of the paper disc.

	Inhibitory diameter (cm)			
	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>P. expansum</i>	<i>T. cutaneum</i>
Blank	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
TM-I-3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
<i>B. subtilis</i>	0 $\pm$ 0	3.62 $\pm$ 0.735	1.45 $\pm$ 0.569	3.57 $\pm$ 0.362

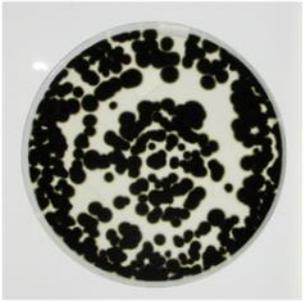
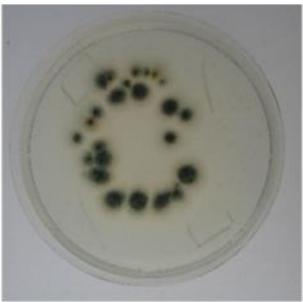
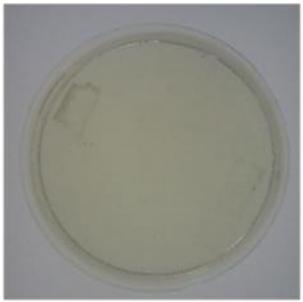
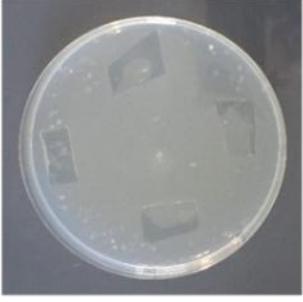
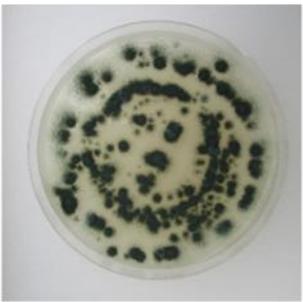
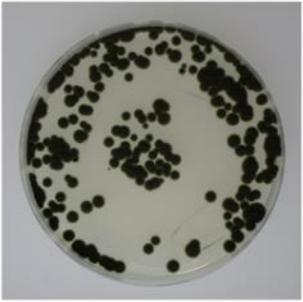
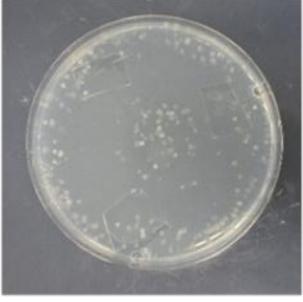
	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>P. expansum</i>	<i>T. cutaneum</i>
Blank				
TM-I-3				
<i>B. subtilis</i>				

Fig. 2-4 Antifungal activity of TM-I-3 without direct contact with four fungal strains in 9.5 L plastic box. “Blank” images are of the blank test groups, “TM-I-3” images are of the experimental groups, and “*B. subtilis*” images are of the negative control group. Plates show growth after 7 d at 27°C.

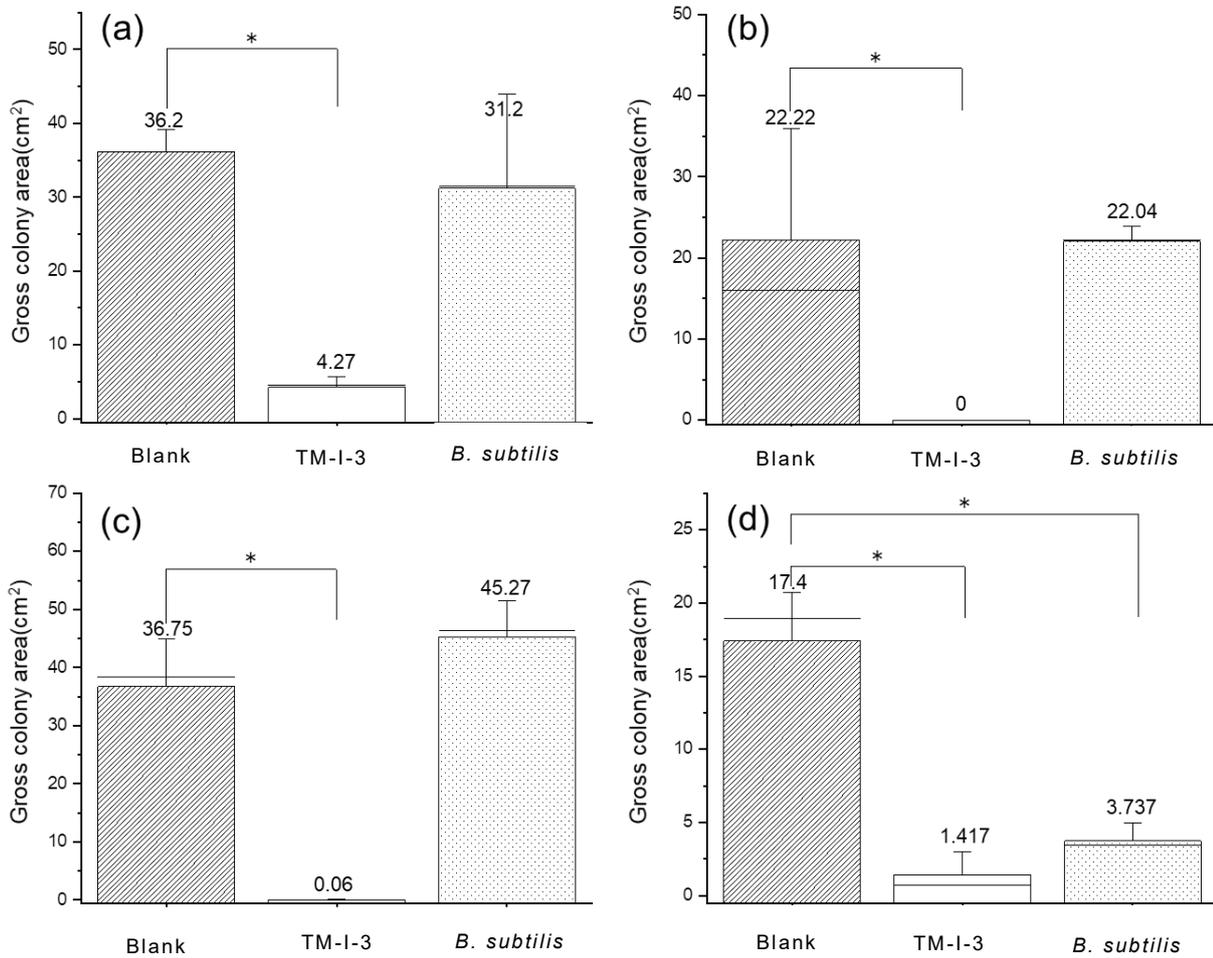


Fig. 2-5 Differences in the gross areas of colonies of each fungus, which were calculated from the images in Fig. 2-4 (N = 3). \*p<0.05, \*\*p<0.01. (a): *A. fumigatus*, (b): *C. cladosporium*, (c) :*P. expansum*, (d): *T. cutaneum*.

Table 2-5 Inhibition rate [%] of each tested fungus by TM-I-3 and *B.subtilis*.

	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>P. expansum</i>	<i>T. cutaneum</i>
TM-I-3	88.2	100	99.8	91.9
<i>B. subtilis</i>	13.8	0.795	0	78.5

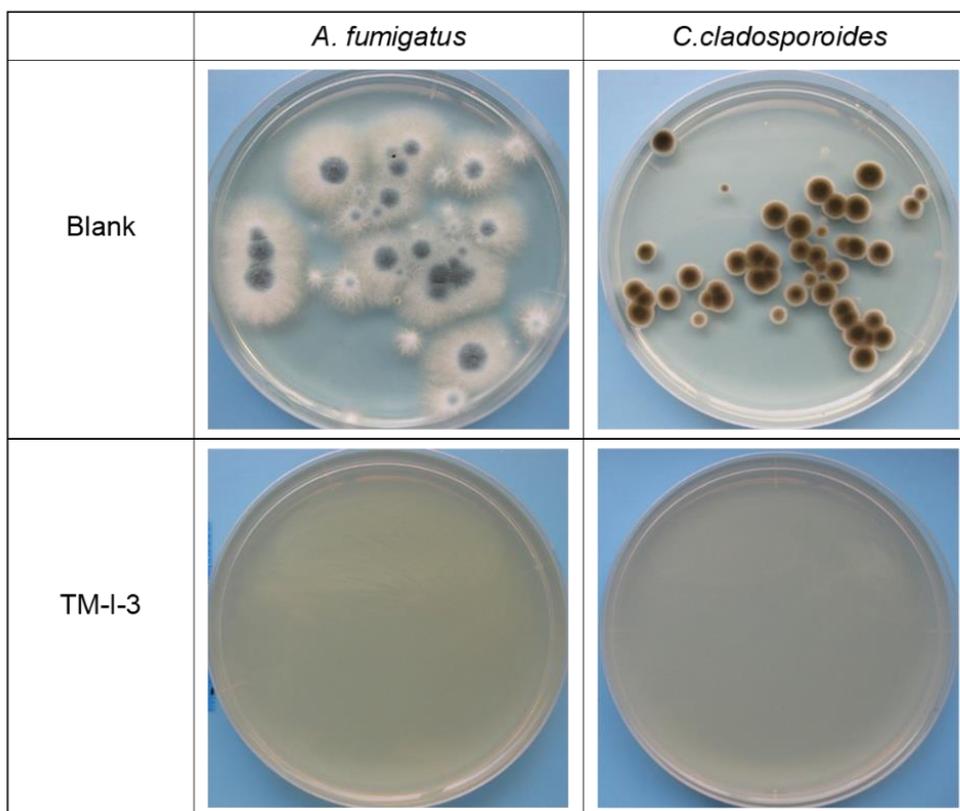


Fig. 2-6 Antifungal activity of TM-I-3 without direct contact with two fungal strains in 125 L plastic box. “Blank” images are of the blank test groups, “TM-I-3” images are of the experimental groups. Plates show growth after 5 d at 27°C.

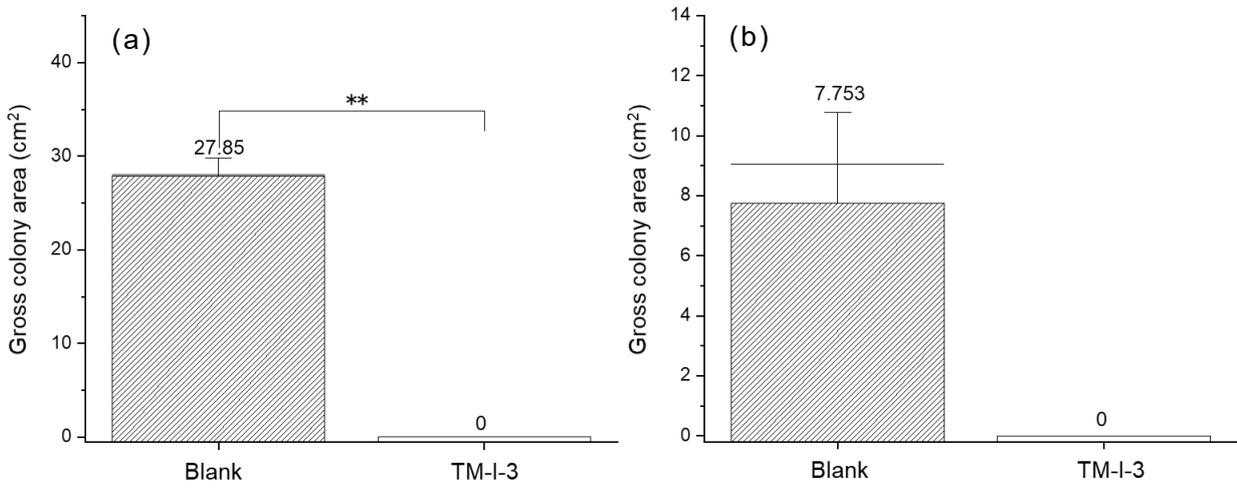


Fig. 2-7 Differences in the gross areas of colonies of each fungus, which were calculated from the images in Fig. 2-6 (N = 3) . Statistical significance was calculated by t-test. \*p<0.05, \*\*p<0.01. (a): *A. fumigatus*, (b): *C. cladosporium*.

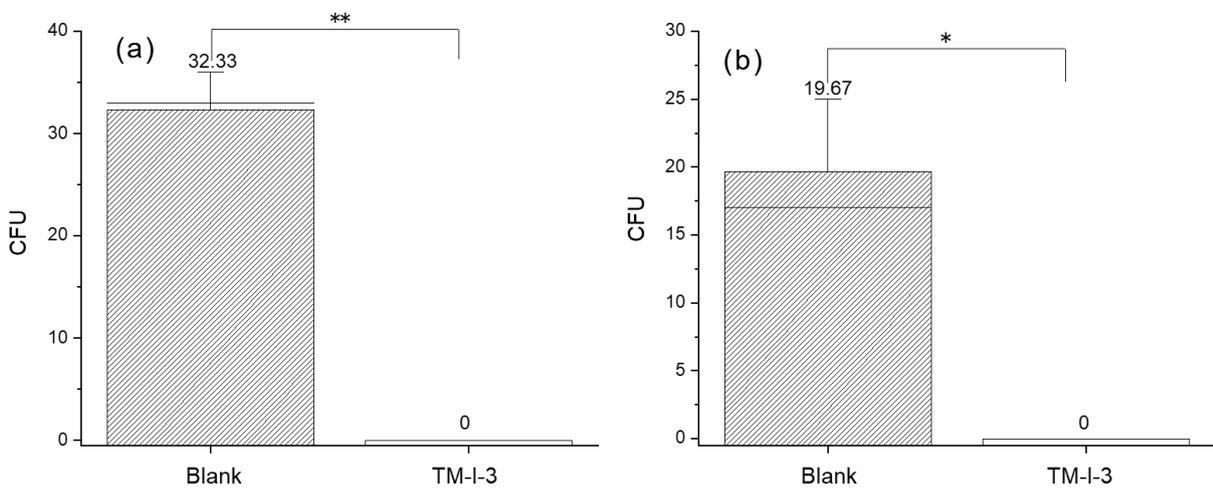


Fig. 2-8 Differences in colony-forming unit (CFU), which were measured from the images in Fig. 2-6 (N = 3). Statistical significance was calculated by t-test. \*p<0.05, \*\*p<0.01. (a): *A. fumigatus*, (b): *C. cladosporium*.

## 2.3 考察

この章では、TM-I-3 株の微生物資材としての作用を明らかにし、他の *Bacillus* 属と異なる特殊性を示すか検討するため、数種類の抗真菌試験を行った。

まず寒天拡散法を利用した接触試験において、TM-I-3 株は 4 種類全ての被験真菌の増殖を抑制することがなかった。このことは、TM-I-3 株が代謝を行い産出する液相成分には真菌増殖を抑制する効果がほとんどないということを示唆している。一方、陰性対照として用いた *B. subtilis* 株に関しては先行研究で報告があったように [17-19]、液相成分において抗真菌活性をもつ化合物を産生していることが明らかになった。

一方で、9.5 L プラスチックボックスを使用した非接触抗真菌試験において、同じバチルス属の *B. subtilis* 株を陰性対照とし、遠隔において被験真菌の増殖を防ぐことができるか検討し、その結果 TM-I-3 株は 4 種類の被験真菌に対して顕著な抑制を示した。一方、陰性対照の *B. subtilis* 株は、*T. cutaneum* を除く各々の被験真菌に対して増殖抑制の作用を示さなかった。また、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株の *T. cutaneum* の増殖抑制作用は TM-I-3 株の方が大きかった。これにより、TM-I-3 株が産出する気相の成分には真菌増殖を抑制する化合物が含まれていることが示唆された。

*C. cladosporioides* は代表的な屋内のカビ汚染を引き起こす黒カビであり [58]、主に喘息を症状とするアレルギー疾患の原因や増悪因子にもなると報告されている [59-61]。さらに、*C. cladosporioides* は気管支喘息の季節性増悪にも関わっていると言われている [58, 60]。TM-I-3 株の微生物資材を生活空間に設置することにより、家庭内の *C. cladosporioides* による汚染を防ぎ、アレルギー性の疾患の発病予防や増悪の防止に繋がる可能が考えられる。*P. expansum* は青から青緑色の真菌で餅やパン、果実や野菜の表面に生える事で知られている [61]。これより、TM-I-3 株の非接触抗真菌作用の特性を用いることで過剰な

防カビ剤を使用することなく、輸送される食品の食品汚染防止にも活用できる可能性がある。また、*P. expansum* と *A. fumigatus* は将来の喘息や喘鳴の発症因子であることも報告されている [60, 61]。さらに *A. fumigatus* は宿主の免疫の状態や肺の構造に応じて様々な感染症やアレルギー性疾患をおこすことが知られている [59]。特に、アレルギー性気管支肺真菌症や侵襲性肺アスペルギルス症の原因菌としても有名で、治療せずにいると気管支拡張症や肺線維症にまで続発する可能性があると言われている [59, 61]。そして *Trichosporon* 属は日本に多い夏型過敏性肺炎のアレルゲンとして知られている [60]。今回実験で用いた *T. cutaneum* も、数ある *Trichosporon* 属の一種でヒト病原性を持つ事が確認されている [61]。免疫性疾患や間質性肺炎、肺気腫といった肺関連の疾病にすでに罹患している人達にとっては、上述のような真菌性疾患に感染すると重症化し死に至る場合も報告されている [32]。このような患者の予防対策として、そして健常者にとっても未然に疾患に罹患することを防ぐ目的として、微生物資材の居住空間への導入も一つの手段として適用できるのではないかと筆者は考える。

筆者は生活空間の利用を想定し、更に大きな空間でも TM-I-3 株の非接触抗真菌作用が発揮されるか確認するために 125 L プラスチックボックスを作製し、9.5 L プラスチックボックスを用いた試験と同様の実験を行った。ただし実験装置の脆弱性の問題でプラスチックボックスの上部に PDA 培地を設置できず、下部で SA 培地と並列させる実験方法となった。PDA 培地を SA 培地と向かい合わせにして上部に設置した場合と、下部に SA 培地と並列に設置した場合では、抑制効果は同等か、または SA 培地と向かい合わせにして上部に設置した場合の方が高いことが予備実験で明らかになっている。よって SA 培地と並列した状態で抑制できたということは上部に向かい合わせで設置した場合も抑制効果が期待できる。室内空気 1 m<sup>3</sup> あたりには、カビが数個から数千個浮遊しており、室内カビ数の衛生基準はないものの、一般的に 100 個以下は少なく、1000 個以上であれば多いと言われている [62]。筆者は今回、室内空気 1 m<sup>3</sup> あたりに約 200~300 個の

カビが存在するという想定を行い、これを 125 L プラスチックボックスを用いて再現し実験を行った。今回の実験においては、9.5 L プラスチックボックスを用いた試験と比べて検体の量を 1.3 倍にしたが、2 種類の被験真菌の増殖を抑制率は 100% であった。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。*P. expansum* と *T. cutaneum* に関しては時間的制約のため 125 L プラスチックボックスを用いて実験を実施することができなかったが、実験を行った 2 種類の被験真菌と同様の結果が予想される。

本章では、TM-I-3 株の液相の代謝化合物と *B. subtilis* 株液相の代謝化合物の抗真菌作用に差があることが示され、一方 TM-I-3 株が病原真菌に対する強い非接触抗真菌作用を保持しており、産出する揮発性成分に抗真菌性を持つ化合物を持つことが示唆された。これらの特性の差がそれぞれの遺伝子配列の可変領域のどの部位に差として現れるか今後解析していくことが重要と考える。

また、この非接触抗真菌作用は 100 L 以上の大きな空間においても十分に効果があることが分かり、実空間への応用も期待できる結果となった。次章では、TM-I-3 株の非接触抗真菌作用のメカニズムをさらに明らかにするため、揮発性成分の分析的アプローチを行うこととした。

### 第3章 TM-I-3 株含有微生物資材の非接触抗真菌作用の解析

前章において、TM-I-3 株が一部の病原真菌に対して非接触抗真菌作用を持つことが示唆された。また、この非接触抗真菌作用は TM-I-3 株の揮発する成分が関連している可能性が高いことが示された。非接触抗真菌作用のメカニズムを解明するため、TM-I-3 株と陰性対照である *B. subtilis* 株が揮散する成分の定性および定量を行い、結果の比較を行った。加えて、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株が揮散する成分の定性・定量結果と嗅覚官能評価の関連性の有無を確認した。また、定性した TM-I-3 株の成分の標準物質における非接触抗真菌作用を検証することにより、寄与している成分を推定することとした。

#### 3.1 材料及び方法

##### 3.1.1 供試験資材及び被験真菌

TM-I-3 株を普通液体培地 (Table 2-1) にて 32°C で 24~48 時間振盪培養した微生物培地を作製し、滅菌済みのパーライト粉末に含浸させたものを供試験資材とした。また同属の *B. subtilis* 株を普通液体培地 (Table 2-1) にて 32°C で 24~48 時間振盪培養した微生物培地を作製し、滅菌済みのパーライト粉末に含浸させたものを陰性対照とした。

被験真菌として、*A. fumigatus* (NBRC 33022)、*C. cladosporioides* (NBRC 6348) を用いた。

### 3.1.2 培地及び孢子懸濁液の作製

培地は、各被験試験用として PDA 寒天培地 (Nissui Co., Ltd) (Table 2-3) を用いた。

孢子懸濁液は、各被験真菌を PDA 培地にて 27°C で 1 週間～2 週間培養した。各被験真菌を培養した PDA 培地上に 15 mL の 0.01% SDS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) 入り滅菌生理食塩水を入れて 2 分間放置した。その後、コンラージ棒で真菌コロニーの表面をこすり孢子を浮遊させた。その後、得られた真菌液を滅菌脱脂綿にて濾過し、セルカウンターと光学顕微鏡を用いて  $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$  /mL の濃度に孢子懸濁液を調製した。

### 3.1.3 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の揮発性成分の定性分析

2 mL のバイアルに供試験資材である TM-I-3 株含浸パーライト粉末 0.01 g を採取し、バイアルの入り口にシリコンセプタムを取り付け密封した。シリコンセプタムを通して、固相マイクロ抽出 (Solid-phase microextraction [SPME]) 装置に装着されたニードルを挿入後、ファイバーを気相中に押し出し供試験資材の揮発性成分の吸着を開始した。バイアルはブロックヒーターで 37°C、1 時間恒温した。その後、GC 注入口に注射針に内蔵されたファイバーを押し出して揮発性成分を加熱脱離し、GC/MS で測定した。GC/MS 条件を Table 3-1 に示す。なお、SPME 吸着材には、膜厚 75  $\mu\text{m}$  の Carboxen/ Polydimethylsiloxane (PDMS) Fused silica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた。ブランクとしては未含浸パーライト 0.01 g を、陰性対照としては *B. subtilis* 株を含浸したパーライト 0.01 g を採取し同様の条件で分析をした。GC/MS 測定ではスペクトルデータベースを用いてライブラリー検索を行い、候補物質を探し出した後、候補物質の標準物質を測定し保持時間とマススペクトルが試料成分と一致することをもって同定した。

Table 3-1 Experimental condition of GC/MS to analyze VOCs emitted from TM-I-3 and *B. subtilis*.

<b>GC system</b>	Agilent 6890 inert gas chromatography system (Agilent J&W Scientific, Santa Clara, CA, USA)
<b>Column</b>	DB-1 (60 m×0.32 mm i.d., 5.0 µm film thickness;100% dimethylpolysiloxane) (Agilent J&W Scientific)
<b>Constant flow of the helium carrier gas</b>	1.0 mL/min
<b>Injection</b>	Splitless
<b>The temperature of injection port</b>	250°C
<b>Oven temperature</b>	40°C hold for 1 min-10 °C/min to 280°C-280 °C hold for 20 mins.
<b>The detection method</b>	GC/MS-Full scan ( <i>m/z</i> 30-300)

### 3.1.4 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の有機酸類の定量分析

容量 180 mL のバイアルに供試験資材である TM-I-3 株含浸パーライト粉末 1.0 g を採取し、Polytetrafluoroethylene (PTFE) /シリコンセプタムを取り付けアルミシールで密封した。このバイアルは 50°C、2 時間恒温した。

その後、バイアルの入り口へニードルを刺し 100 mL/min の速度で窒素ガスを流し入れた。バイアルの出口から出てきた供試験資材の揮発性成分は、液体アルゴンで冷却した濃縮チューブ内の不活性化した石英ウールに 10 分間冷却濃縮した。濃縮チューブを液体アルゴンから外し、石英ウールに吸着した成分を 200°C で加熱して GC/MS 装置に導入した。ブランクとしては未含浸パーライト 1.0 g を、陰性対照としては *B. subtilis* 株を含浸したパーライト 1.0 g を採取し同様の条件で分析した。定量のために、それぞれ目的の標準物質 [酢酸、プロピオン酸、イソ吉草酸、n-酪酸、イソ酪酸] (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) を 0.01-10.0 mg/L の範囲で適宜濃度を調製し、selected-ion monitoring (SIM) 分析を行った。標準溶液のクロマトグラムのパーク面積値から検量線を作成し、絶対検量線法により目的物質を定量した。GC/MS 条件を Table 3-2 に示す。

Table 3-2 Experimental condition of GC/MS to analyze the quantity of organic acids emitted from TM-I-3 and *B. subtilis*.

<b>GC/MS system</b>	TRACE GC ULTRA& DSQ II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
<b>Column</b>	DB-WAX (30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness;100% polyethylene glycol) (Agilent J&W Scientific)
<b>Constant flow of the helium carrier gas</b>	1.0 mL/min
<b>Injection</b>	Splitless
<b>The temperature of injection port</b>	200°C
<b>Oven temperature</b>	40°C hold for 2 min-10 °C/min to 240°C-240 °C hold for 3 mins.
<b>The detection method</b>	GC/MS SIM scan ( <i>m/z</i> : acetic acid, 60; butyric acid, 73; isobutyric acid, 73; isovaleric acid, 74; propanoic acid, 60)

### 3.1.5 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の芳香族化合物の定量分析及び経時的な量的変化の評価

2 mL のバイアルに供試験資材である TM-I-3 株含浸パーライト粉末 0.02 g を採取し、バイアルの入り口にシリコンセプタムを取り付け密封した検体（0 時間後）と、同様にして作製したバイアルを 32°C の恒温器内に 24 時間いれて培養した検体（24 時間後）の 2 種類を用意した。これらのバイアルのシリコンセプタムを通して、SPME 装置に装着されたニードルを挿入後、ファイバーをバイアルの気相中に押し出し供試験資材の揮発性成分の吸着を開始した。バイアルはウォーターバス内で 50°C、1 時間恒温した。その後、GC 注入口にニードルに内蔵されたファイバーを押し出して揮発性成分を加熱脱離し GC/MS で測定した。GC/MS 分析条件を Table 3-3 に示す。なお、SPME 吸着材には、膜厚 75  $\mu\text{m}$  の Carboxen/PDMS Fused silica (Sigma-Aldrich) を用いた。ブランクとしては未含浸パーライト 0.02 g を、陰性対照としては *B. subtilis* 株を含浸したパーライト 0.02 g を採取し同様の条件で分析を行った。ベンズアルデヒド (NACALAI TESQUE, INC.) と安息香酸 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) の標準物質をメタノール (NACALAI TESQUE, INC.) で 100 ppm および 1000 ppm の濃度に調製し、同条件にて分析を行った。標準溶液のクロマトグラムのピーク面積値から検量線を作成し、絶対検量線法より目的物質を定量した。

Table 3-3 Experimental condition of GC/MS to analyze the quantity of benzaldehyde and benzoic acid emitted from TM-I-3 and *B. subtilis*.

<b>GC/MS system</b>	Shimadzu GCMS-QP2010 (SHIMADZU corp., Kyoto, Japan)
<b>Column</b>	DB-5ms [30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness; (5% phenyl)-methylpolysiloxane] (Agilent J&W Scientific)
<b>Constant flow of the helium carrier gas</b>	1.0 mL/min
<b>Split ratio</b>	10 : 1
<b>The temperature of injection port</b>	250°C
<b>Oven temperature</b>	40°C hold for 1 min-10 °C/min to 280°C-280 °C hold for 20 mins.
<b>The detection method</b>	GC/MS-Full scan ( <i>m/z</i> 30-300)

### 3.1.6 SD (Semantic differential) 法を用いた TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株から発生するにおいの嗅覚官能評価

3.1.3 - 3.1.5 における TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株の産生する揮発性物質の定量結果と各菌株の産生するにおいの官能評価の相関性の有無を確認するために SD 法を用いた実験を行った [63]。

20 mL のバイアルに供試験資材 0.02 g を採取し検体とした。検体 A には TM-I-3 株を含浸したパーライト粉末、検体 B には *B. subtilis* 株を含浸したパーライト粉末を封入した。においの主観評価を行うパネルとして正確な嗅覚を有すると認められた成人男女を合計 8 名選定した。

各検体を 1 回ずつバイアルの口に鼻を近づけにおいを嗅ぎ Table 3-4-1 と Table 3-4-2 に示したように、においの強さを表す臭気強度に関しては 6 段階尺度、においの質を表す快・不快度に関しては 9 段階尺度で評価を行った。また各においの質に関する記述も行わせた。評価者は検体 A と検体 B の中身の違いは一切情報を得ていない状態で評価を行った。

集計した評価値を用いて Mann-Whitney U 検定により群間の比較を行った。

Table 3-4-1 6-point odor intensity scale

Odor intensity	
0	Odorless
1	Very faint odor
2	Faint odor
3	Easily noticeable odor
4	Strong odor
5	Very strong odor

Table 3-4-2 9-point odor hedonics scale

odor hedonics	
4	Extremely pleasant
3	Very pleasant
2	Pleasant
1	Slightly pleasant
0	Neutral
-1	Slightly unpleasant
-2	Unpleasant
-3	Very unpleasant
-4	Extremely unpleasant

### 3.1.7 同定した揮発性成分の標準物質を用いた抗真菌試験（寒天氣体法）

定性した揮発性成分の標準物質[酢酸、プロピオン酸、イソ吉草酸、n-酪酸、イソ酪酸、ベンズアルデヒド]を、それぞれ滅菌水を用いて 1 ppm、10 ppm、100 ppm に希釈し濃度調製した。PDA 培地全体に調製した被験真菌の *A. fumigatus*、*C. cladosporioides* の孢子懸濁液を 100  $\mu$ L ずつ塗り広げた。

次に滅菌した直径 13 mm のペーパーディスク（GE Healthcare）を PDA 培地のシャーレの蓋の内側に設置し、その上に各濃度調製した標準溶液を 100  $\mu$ L 滴下した。ブランクとして滅菌水を 100  $\mu$ L 滴下した。寒天氣体法に準じて、Fig. 3-1 のように実験装置を組み立てた。このシャーレの蓋をビニールテープで密封し、27°C で 5 日間恒温した。

5 日後に培地で観察されたコロニー数をカウントし、3 連のコロニー数の平均値を用いて (2) の式から各濃度の標準品希釈液の各被験真菌の抑制率（Inhibition ratio）を求めた [64]。

$$\text{Inhibition ratio} = \frac{B_0 - B}{B_0} \times 100 \dots (2)$$

$B_0$  はブランクと共存させた各被験真菌のコロニー数の平均値を示し、 $B$  は標準溶液と共存させた場合の各被験真菌のコロニー数の平均値を示している。

(2) から求めた真菌成長の抑制率を用いて、各標準品希釈液の抑制の強さを Table 3-5 のようにスコア化し評価した [65]。

なお安息香酸については、標準物質が不揮発性のためこの試験を実施していない。

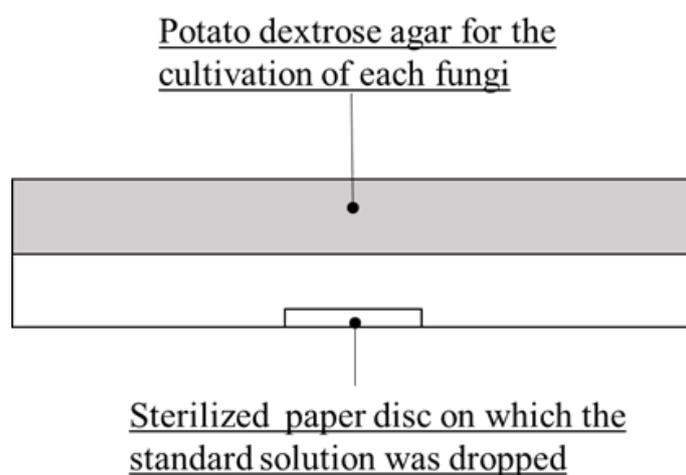


Fig. 3-1 Schematic presentation of the agar vapor assay [64]

Table 3-5 Classification of the antifungal effects of volatiles in every standard solution [65]

<b>Inhibition ratio (%)</b>	<b>Score</b>
100	4
75-99	3
50-74	2
25-49	1
0-24	0

## 3.2 結果

### 3.2.1 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の揮発性成分の定性分析

SPME 法を用いて GC/MS 分析を行い、結果を Table 3-6 と Fig. 3-2 に示した。TM-I-3 株および *B. subtilis* 株の揮発性物質は共に各保持時間 10.826 分から 10.846 分の間に酢酸、13.716 分から 13.775 分の間にプロピオン酸、15.693 分から 15.876 分の間にイソ吉草酸、16.386 分から 16.448 分の間に n-酪酸、18.014 分から 18.135 分の間にイソ酪酸、18.338 分から 18.468 分の間に 2-メチル酪酸等の有機酸が検出された。また、22.273 分から 22.394 分の間にベンズアルデヒド、25.744 分から 25.748 分の間に安息香酸といった芳香族化合物が検出された。TM-I-3 株および *B. subtilis* 株は上記の共通した化合物を揮発していることが明らかとなった。

また Fig. 3-2 より、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株の TIC には共通して 29.474 分から 29.487 分の間に未同定の揮発性物質が検出された。加えて、TM-I-3 株のみの TIC から保持時間 23.767 分と 25.130 分に未同定の揮発性物質が検出された。

Table 3-6 Volatile compounds released by TM-I-3 and *B. subtilis* identified by GC-MS.

<b>Compound</b>	<b>Retention time (min)</b>
Acetic acid	10.826-10.846
Propanoic acid	13.716-13.775
Isobutyric acid	15.693-15.876
Butyric acid	16.386-16.448
Isovaleric acid	18.014-18.135
2-Methylbutanoic acid	18.338-18.468
Benzaldehyde	22.273-22.394
Benzoic acid	25.744-25.748

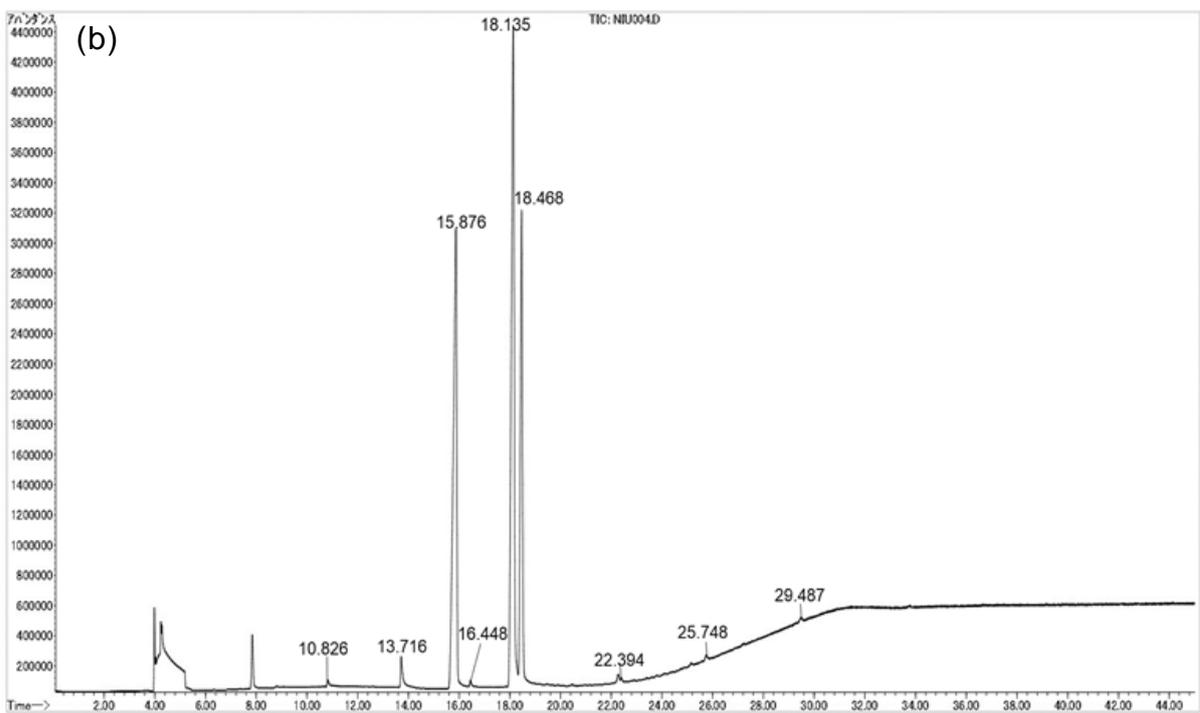
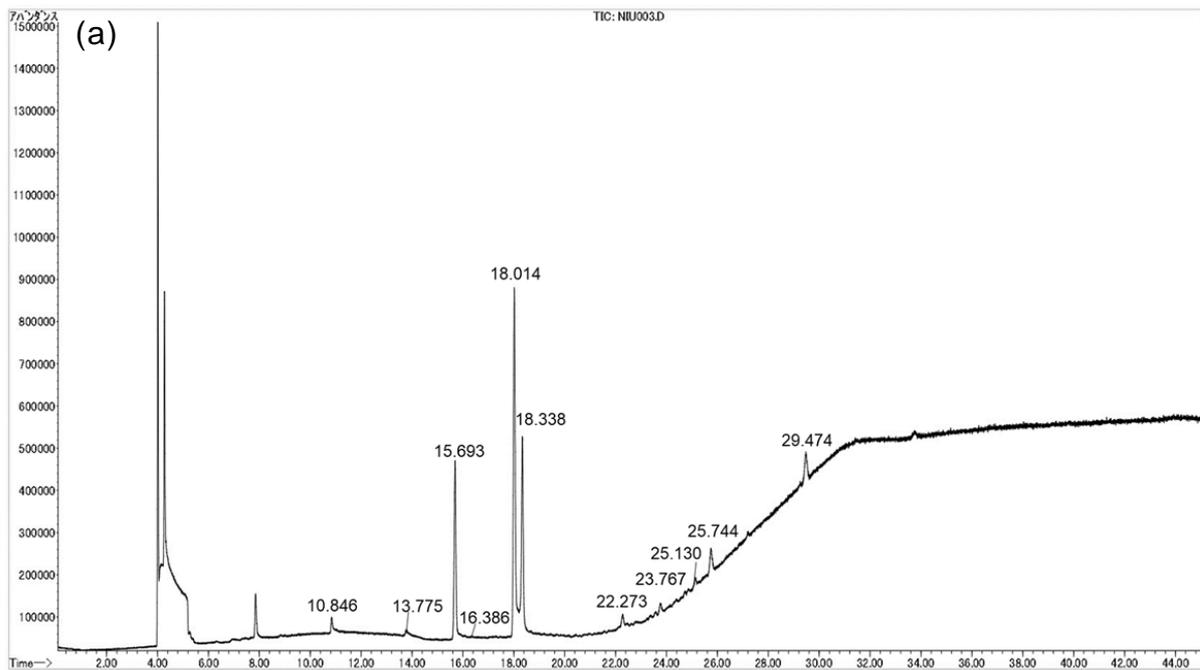


Fig. 3-2 GC/MS/TIC of the volatile compounds from emitted from (a) TM-I-3, and (b) *B. subtilis*.

### 3.2.2 GC/MS による TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の有機酸類と芳香族化合物の定量分析並びに両菌株の嗅覚官能評価

3.2.1 で同定した TM-I-3 株と *B. subtilis* 株が揮散する有機酸および芳香族化合物を選択し定量分析を行ったクロマトグラムを Fig. 3-3、Fig. 3-4 に示した。これらより算出した各有機酸の濃度を自然対数変換し比較した結果を Fig. 3-5 に示す。また各芳香族化合物の濃度を比較した結果を Fig. 3-6 に示す。*B. subtilis* 株はイソ吉草酸およびイソ酪酸において、TM-I-3 株に比べ約 90 倍～270 倍近い量を揮発していることが明らかになった。酢酸、酪酸およびプロピオン酸に関しては、若干ではあるが *B. subtilis* 株の揮散量が多かったものの、各濃度に大きな違いは見られなかった。ベンズアルデヒドの定量結果に関しては、TM-I-3 株は *B. subtilis* 株に比べ、約 8 倍以上の濃度を揮発することが示唆された。また安息香酸の定量結果に関しては、TM-I-3 株は *B. subtilis* 株に比べ、約 2.7 倍の濃度を揮発することが示された。

次に、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株が発する臭気を嗅覚官能評価して確認した結果を Fig. 3-7-1 と Fig. 3-7-2 に示した。TM-I-3 株の臭気強度は 1.9、*B. subtilis* 株の臭気強度は 3.6 となり、TM-I-3 株の臭気強度は *B. subtilis* 株の臭気強度に比べて有意に小さかった。これより TM-I-3 株のにおいの強さの方が *B. subtilis* 株のものより弱かったことが推定された。TM-I-3 株の快・不快感は -1.0、*B. subtilis* 株の快・不快感は -2.9 となり、TM-I-3 株の快・不快感は *B. subtilis* 株の快・不快感に比べて有意に大きかった。これより TM-I-3 株のにおいの不快度が *B. subtilis* 株のものより小さかったことが推定された。実際の評価者のにおいの質に関しては、TM-I-3 株は薄い吉草酸の匂い、微かな靴下の蒸れた匂い、黒糖ゼリーのような匂いという記述が見られた一方、*B. subtilis* 株は刺激臭、腐乱臭、吐き気を催す匂いという記述が見られた。

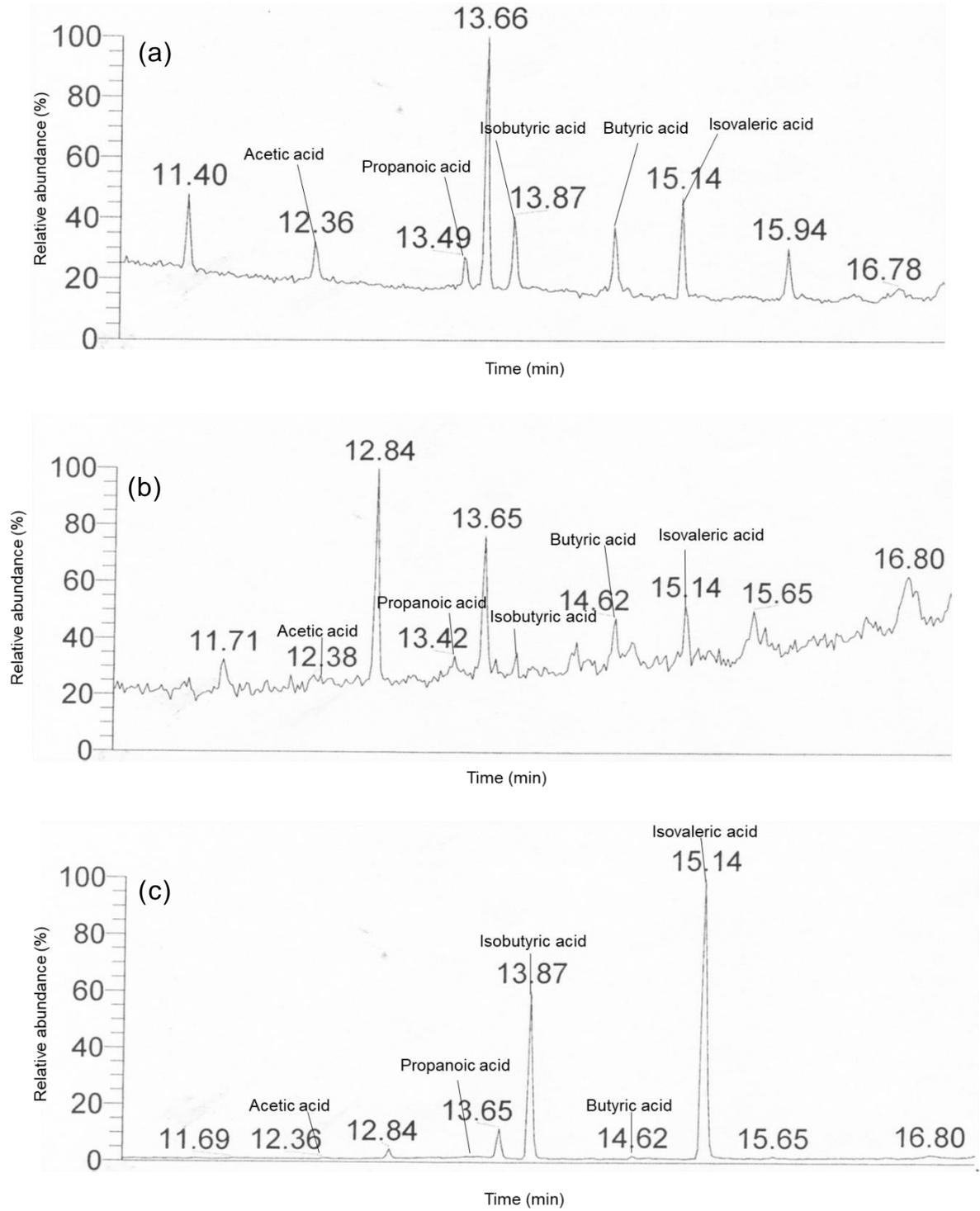


Fig. 3-3 GC/MS/TIC of the volatile acid compounds from emitted from (a) standards, (b) TM-I-3, and (c) *B. subtilis*.

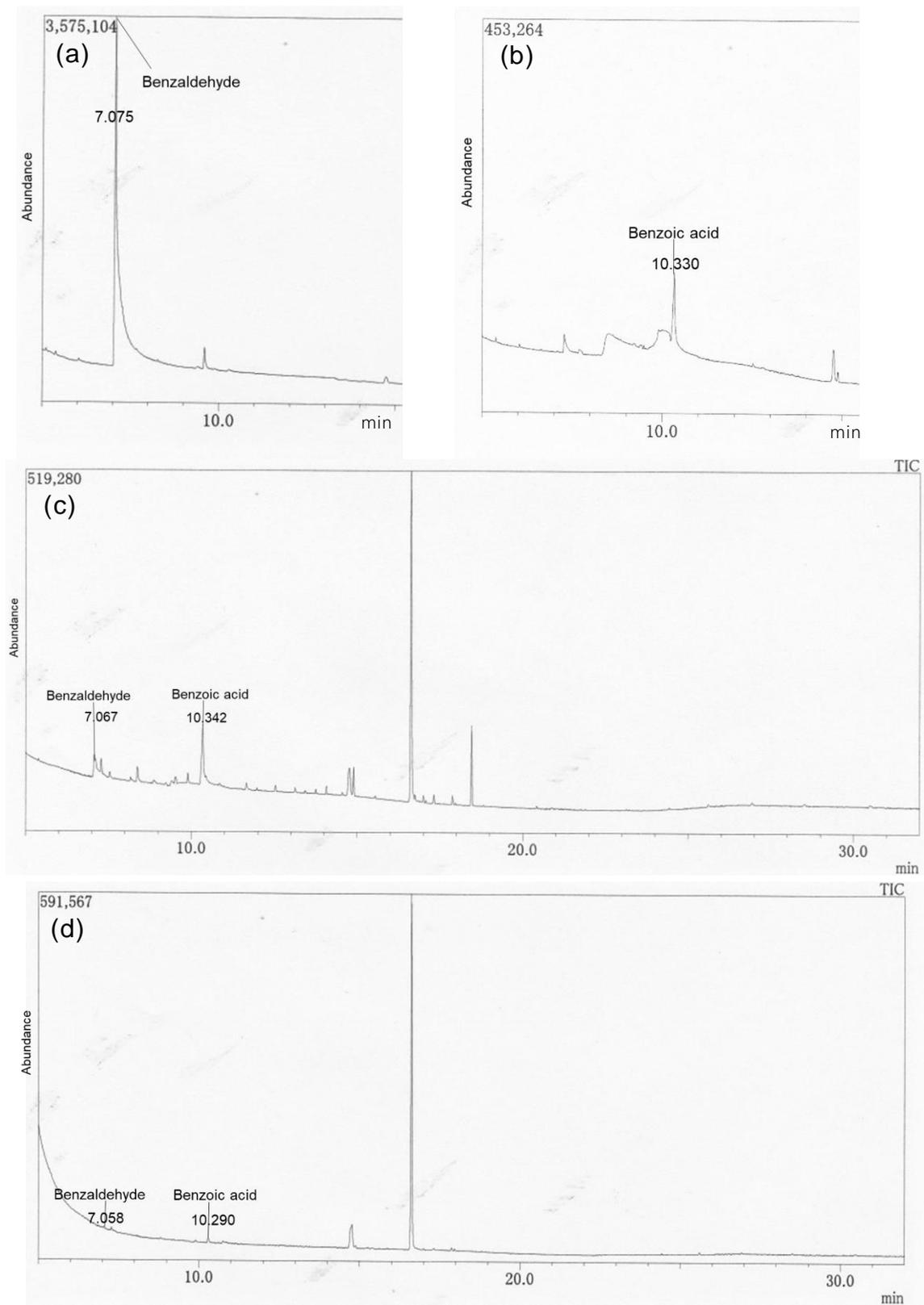


Fig. 3-4 GC/MS/TIC of the volatile aromatic compounds from emitted from (a) and (b) standards, (c) TM-I-3, and (d) *B. subtilis*.

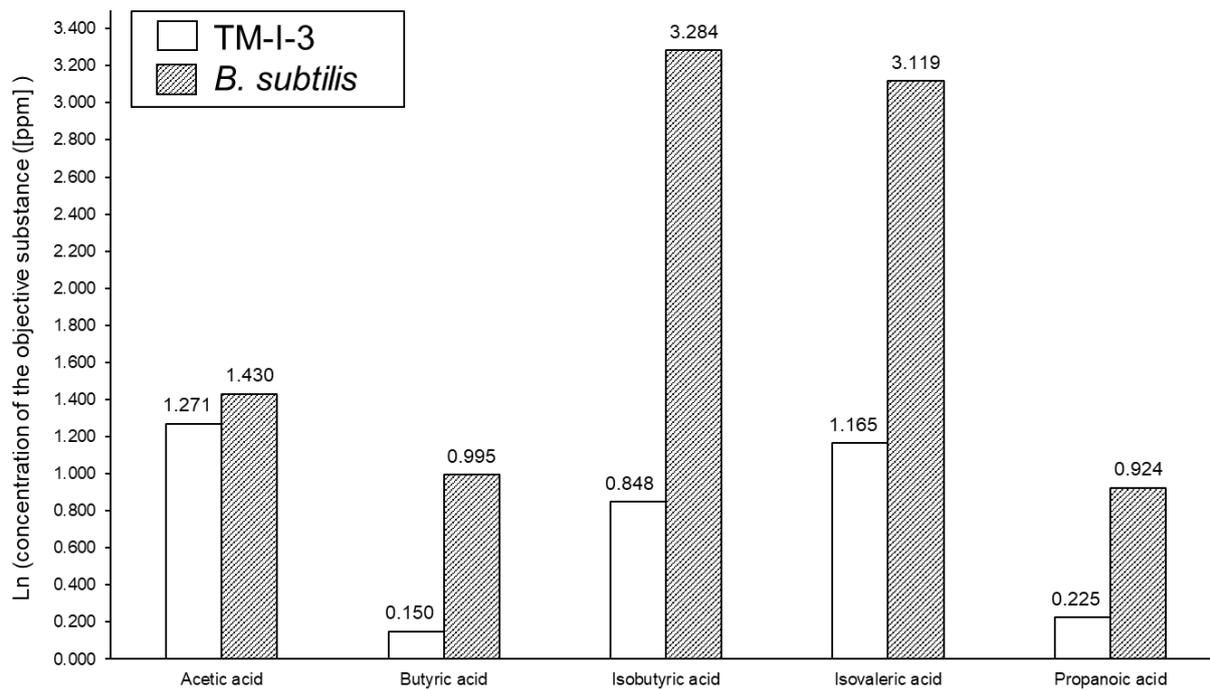


Fig. 3-5 Natural logarithm of concentrations of volatile acid organic compounds produced by TM-I-3 and *B. subtilis*.

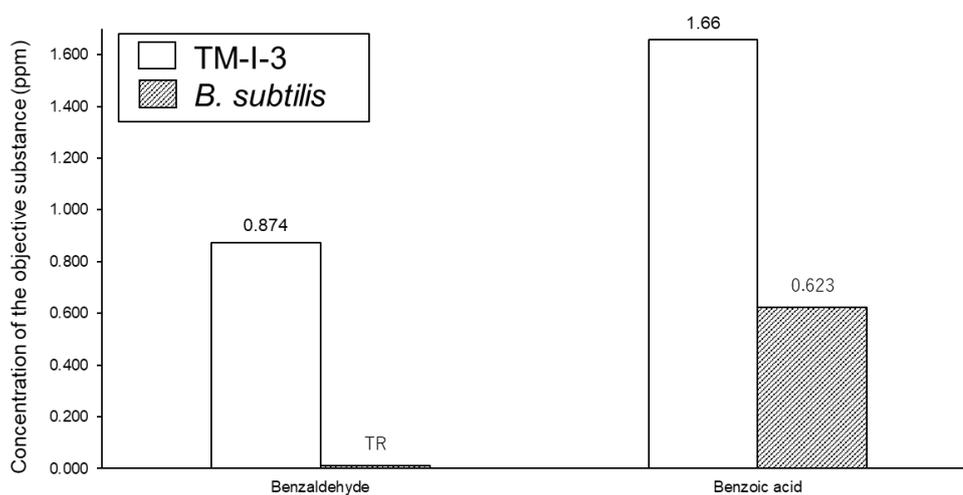


Fig. 3-6 Concentrations of volatile aromatic compounds produced by TM-I-3 and *B. subtilis*. \*TR: trace level

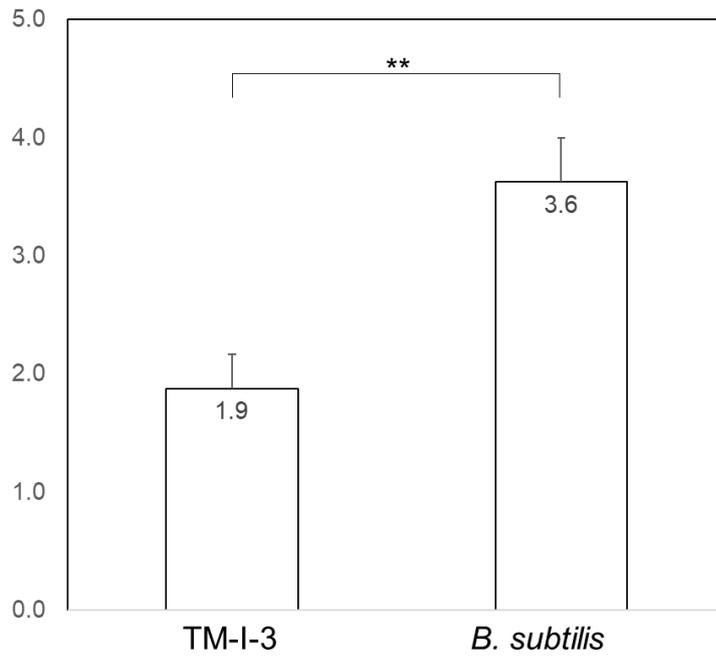


Fig. 3-7-1 Result of odor sensory measurement by intensity scale. Statistical significance was calculated by Mann-Whitney U test. \*\* $p < 0.01$ .

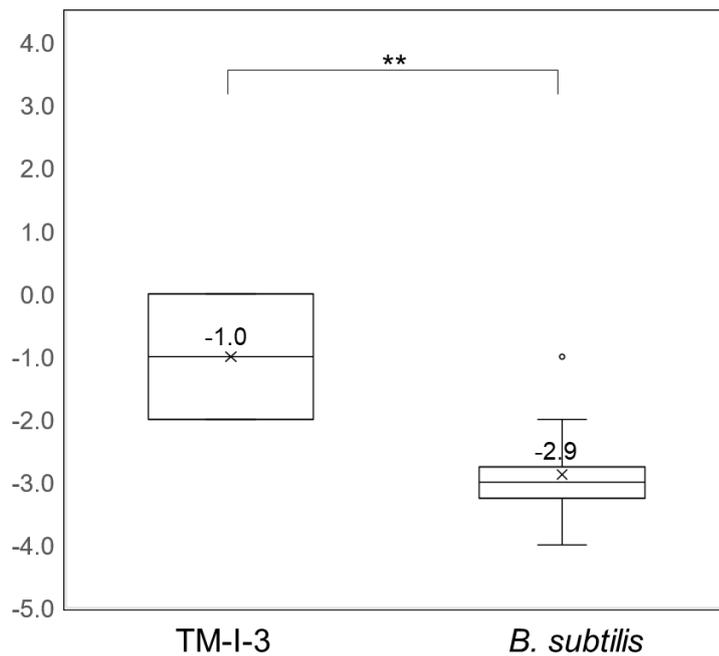


Fig. 3-7-2 Result of odor sensory measurement by odor hedonics scale. Statistical significance was calculated by Mann-Whitney U test. \*\* $p < 0.01$ .

### 3.2.3 TM-I-3 株及び *B. subtilis* 株産生の芳香族化合物の経時的な量的変化の評価

Fig. 3-8 のグラフより、TM-I-3 株の産生する揮発性物質において、バイアル内のベンズアルデヒドの濃度は 0 時間後から 24 時間後にかけて 0.874 ppm から 2.02 ppm へと約 2.3 倍、安息香酸の濃度は 1.66 ppm から 12.4 ppm へと約 7.4 倍ほど増加した。*B. subtilis* 株の産生する揮発性物質において、0 時間後と 24 時間後のバイアル内のベンズアルデヒドの濃度は双方とも検出はされるが濃度は測定できない痕跡程度であり、安息香酸の濃度は 0.623 ppm から 0.756 ppm へと 1.2 倍程度増加することが示された。

これらの結果から、TM-I-3 株のベンズアルデヒドや安息香酸の産生量は *B. subtilis* 株と比べて多いことが推定された。

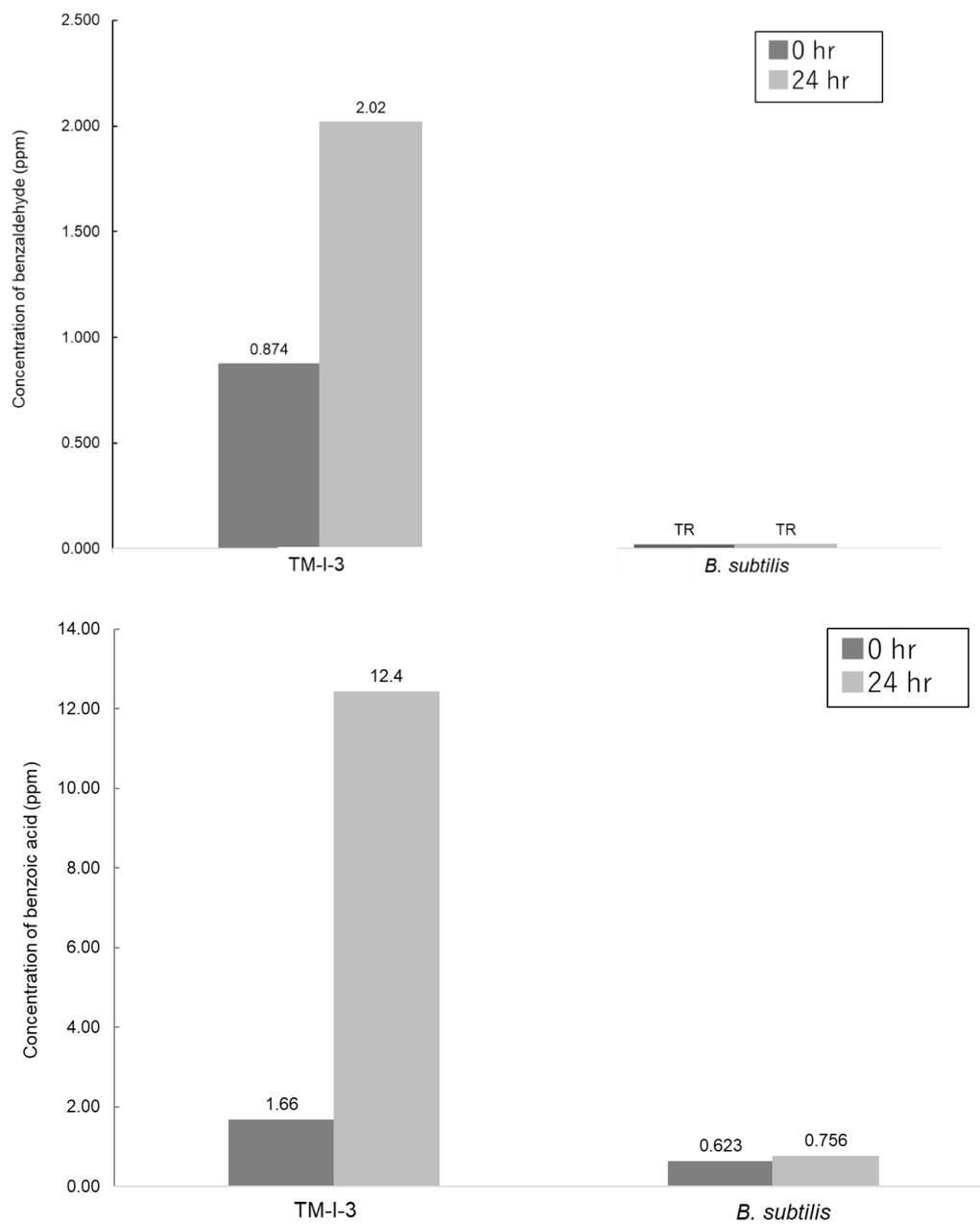


Fig. 3-8 Concentrations of volatile aromatic acid compounds produced by TM-I-3 and *B. subtilis* at 0 h and 24 h of incubation. \*TR: trace level

### 3.2.4 同定した揮発性成分の標準物質を用いた抗真菌試験（寒天氣体法）

100 ppm、10 ppm、1 ppm に希釈したそれぞれの標準溶液の寒天氣体法による抗真菌活性の評価は Fig. 3-9 に示した。

Fig. 3-9 (a) は各濃度の標準溶液の *A. fumigatus* に対する抑制率をスコア化して比較したものである。これより、100 ppm の濃度のベンズアルデヒドのスコアが 2 を唯一示しており、ベンズアルデヒド標準溶液のみが非接触状態で *A. fumigatus* を 50%～74% の間の抑制率で抑制する効果があることが示唆された。

Fig. 3-9 (b) は各濃度の標準溶液の *C. cladosporioides* に対する抑制率をスコア化して比較したものである。100 ppm のベンズアルデヒドのスコアは 4 を唯一示しており、ベンズアルデヒド標準品希釈液のみが非接触状態で *C. cladosporioides* のコロニー形成を 100% 抑制する効果があることが推定された。また 100 ppm のプロピオン酸のスコアは 2 を示しており、非接触状態で *C. cladosporioides* の増殖を 50%～74% の抑制率で抑制する効果があることが示された。そして 10 ppm、1 ppm のベンズアルデヒドのスコアは 1 を示しており、*C. cladosporioides* を 25%～49% の抑制率で抑制することが明らかになった。また、同様の効果が 100 ppm のイソ酪酸及び 10 ppm のプロピオン酸にもあることが認められた。

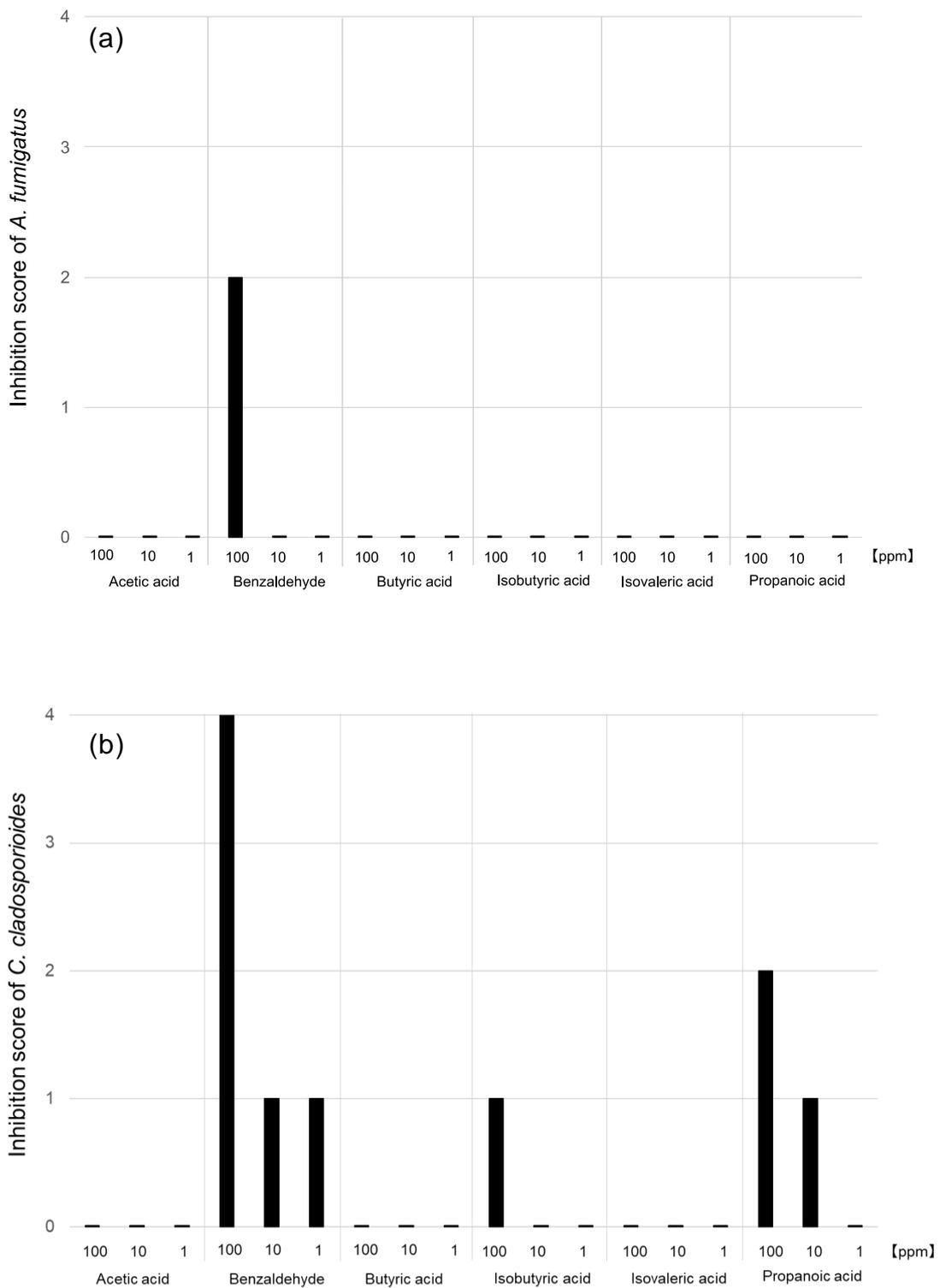


Fig. 3-9 Inhibition scores for standard solutions of each compound tested at the indicated concentrations against (a) *A. fumigatus* and (b) *C. cladosporioides*.

### 3.3 考察

TM-I-3 株の非接触抗真菌作用のメカニズム解明に着目して、第一のステップとして、直接の原因となる TM-I-3 株の揮発物質の分析を行った。そして陰性対照である *B. subtilis* 株の揮発性成分と比較することにより、起因する物質を特定しやすくした。

GC/MS を用いた定性分析においては、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株の比較では揮発性成分の種類に違いは認められず、第二のステップである定量分析を行い揮散性成分の濃度比較を行うこととした。

定量分析において、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。イソ吉草酸やイソ酪酸は一般的に悪臭に分類されている [66]。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差があったという定量試験結果と相関した結果が見られた。この特徴は、TM-I-3 株を居住空間に適用することを目的としている点においては非常に優れていることが言える。加えて、*B. subtilis* 株は納豆菌や足の裏に常在する菌として知られており、イソ吉草酸やイソ酪酸といった成分量の多さが臭気の原因の一つであることも今回の分析の結果より示唆された。

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揮散量が多かった。アルデヒド系はアロマセラピーにおいては、フェノール系と同等に最も強い抗真菌効果があることが知られている [23]。また、ベンズアルデヒドは梅干しの含有成分でも知られており、梅干しの防腐効果に寄与している物質として報告されている

[67]。先行研究の結果を裏付けるように、同定された揮発性成分の単体による抗真菌評価を標準品で行ったところ、同濃度においてベンズアルデヒドが最も強い抗真菌活性を被験真菌に示した。また、標準物質を用いた抗真菌試験を行えなかった安息香酸については、ベンズアルデヒド以上の抗菌・抗真菌作用にすぐれ食品保存料としても日常で使用され

ていることが報告されている [68]。また安息香酸の抗菌、抗真菌作用は酸性条件でのみ発揮されることが知られている [69]。これより、TM-I-3 株の非接触抗真菌メカニズムの一部は、放出される有機酸により酸性状態が作り出されベンズアルデヒドや安息香酸の抗真菌効果が発揮されることにより引き起こされるのではないかと筆者は考察した。またベンズアルデヒドは室温においても非常に酸化されやすいことも知られている。正確なベンズアルデヒドの室温における酸化速度はまだ報告されていないものの [70]、Sanker の報告によれば、80℃において 5 分以内にベンズアルデヒドは自動酸化し安息香酸に変わる [71]。Fig. 3-8 のグラフからでは質的な変化を知ることはできないが、TM-I-3 株から揮散されるベンズアルデヒドが大気中において自動酸化を受け安息香酸へと変化し、より抗真菌作用の強い安息香酸の増加に寄与している可能性もあると考えられる。

また *C. cladosporioides* に対してはイソ酪酸やプロピオン酸もある程度の成長抑制を示しているため、有機酸も抗真菌作用を一部担っている可能性も捨てることは出来ない。

以上から、この章では TM-I-3 株の産生する揮発性成分が単独で抗真菌作用を担っているというよりは、揮発性物質が複合的に作用し合い抗真菌作用を発揮している可能性が高いと結論づける。

## 第4章 TM-I-3株の真菌成長過程の阻害ステージの解明

前章において、TM-I-3株の非接触抗真菌作用のメカニズムを起因する揮発性成分内の化合物が推定されたため、筆者は次に経時的なメカニズムの解明をすることとした。具体的には、TM-I-3株が真菌成長のどのステージを阻害し、真菌のコロニー成長を抑制するかを確認することとした。今回は居住空間でよく観察される *A. fumigatus* 及び *C. cladosporioides* を代表の被験真菌とし、検証実験を行った。

### 4.1 材料及び方法

#### 4.1.1 供試験資材及び被験真菌

TM-I-3株を普通液体培地 (Table 2-1) にて 32°C で 24~48 時間振盪培養した微生物培地を作製し、滅菌済みのパーライト粉末に含浸させたものを供試験資材とした。

被験真菌として、*A. fumigatus* (NBRC 33022)、*C. cladosporioides* (NBRC 6348) を用いた。

#### 4.1.2 培地及び孢子懸濁液の作製

培地は、供試験資材用として SA 培地 (Nissui Co., Ltd.) (Table 2-2)、各被験試験用として PDA 培地 (Nissui Co., Ltd.) (Table 2-3) を用いた。

孢子懸濁液は、各被験真菌を PDA 培地にて 27°C で 1 週間~2 週間培養した。各被験真菌を培養した PDA 培地上に 15 mL の 0.01% SDS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) 入り滅菌生理食塩水を入れて 2 分間放置した。その後、コンラージ棒で真菌コロニーの表面をこすり孢子を浮遊させた。その後、得られた真菌液を滅菌脱脂綿にて濾過し、

セルカウンターと光学顕微鏡を用いて  $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$  /mL の濃度に孢子懸濁液を調製した。

#### 4.1.3 菌糸成長の観察と真菌増殖曲線の作製

6.12 g のポテトデキストロース粉末 (Becton, Dickinson and Company) を 300 mL の精製水に混合し高圧滅菌処理しポテトデキストロース液体培地 (PD 液体培地) とした。PD 液体培地と各試験菌の孢子懸濁液を 1 : 1 の割合で混合した。これより PDA 液体培地の濃度は 0.01 g/mL となり、この溶液を今回の被験真菌培養液とした。

PDA 培地を 1 cm 四方に切り取り、Fig. 4-1 のように、この培地片をプラスチックシャーレの底に 2 枚設置した。設置した培地片に各被験真菌培養液を 4 箇所それぞれ 10  $\mu$ L ずつ接種した。培地片に火炎滅菌したカバーガラスを置き、軽く押さえた。また、湿度を保持するために、もう一つ培地片を Fig. 4-1 のように設置した。プラスチックシャーレの蓋を閉め、ビニールテープで蓋の周囲を密閉し、27°C で 7 日間恒温した。

真菌の菌糸成長を観察するため、シャーレを逆さまにし、裏面から位相差顕微鏡 (Olympus BX63, Olympus corp.) を用いて 24 時間ごとにデジタル画像を撮影した [72]。デジタル画像から菌糸の長さを cellSens Dimension ver. 1.16 と image editing software (Olympus Corp.) を用いて測定した。平均化のために 48 時間以降の計測したサンプルの菌糸数は 100 本以上であった。これらのデータを Table 4-1 のパラメータに基づき、得られた測定値をもとに非線形最小二乗法を用いて推定を行った。推定したモデルパラメータを用いて各増殖モデルを実験結果に合わせてプロットし増殖曲線を作製した [73]。

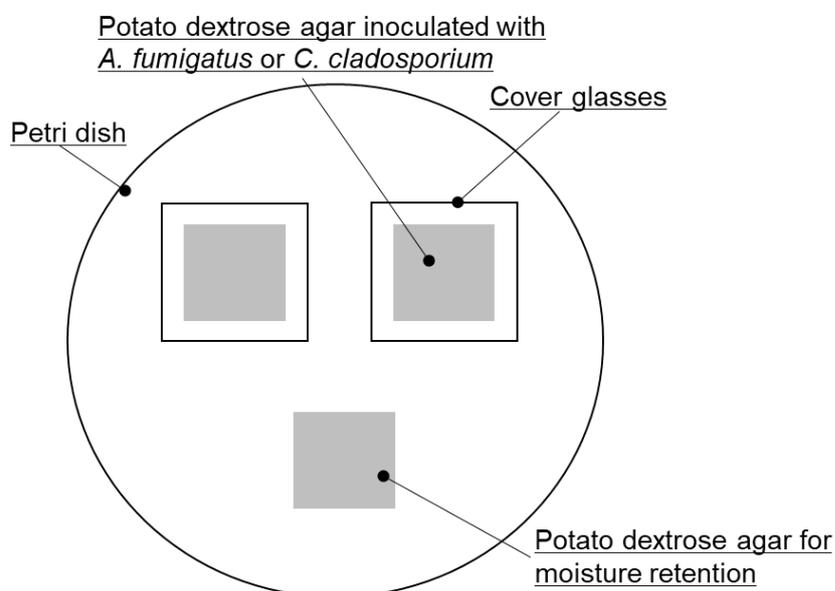


Fig. 4-1 Set-up of the slide culture for fungal growth monitoring following Fujihiro's method [72] .

Table 4-1 Sigmoid function of reproducing fungal growth [73]

---

[Logistic model]

---

$$\frac{dN}{dt} = rN \left[ 1 - \frac{N}{K} \right]$$

( $N(0)$ を  $t=0$  の場合の初期条件とした一般解)

$$N(t) = \frac{K}{1 + \left[ \frac{K}{N(0)} - 1 \right] e^{-rt}}$$


---

#### 4.1.4 TM-I-3 株の被験真菌の増殖挙動に対する阻害ステージの検証

プラスチック製の密閉箱（幅 20.7×奥行 30.0×高さ 9.5 cm; 5.6 L）を 8 個用意し、各密閉箱に No. 0 から No. 7 まで番号を付けた。100  $\mu$ L の各被験真菌の孢子懸濁液を満遍なく塗り広げた PDA 培地を全ての密閉箱の蓋の裏に Fig. 4-2 のように強力両面テープを用いて固定した。これらの密閉箱を 27°C で 1 週間培養した。Fig. 4-3 のタイムテーブルに従い、No. 0 の密閉箱には恒温器に入れた直後、No. 1 の密閉箱は恒温器に入れて 24 時間後、No. 2 の密閉箱は恒温器に入れて 48 時間後、No. 3 の密閉箱は恒温器に入れて 72 時間後、No. 4 の密閉箱は恒温器に入れて 96 時間後、No. 5 の密閉箱は恒温器に入れて 120 時間後、No. 6 の密閉箱は恒温器に入れて 144 時間後に、1.0 g の TM-I-3 株を含浸したパーライト粉末を乗せ一晚恒温した SA 培地をボックスの底に設置した。No. 7 の密閉箱のみ TM-I-3 株を置いた SA 培地は入れずに恒温を続け、これをブランクとした。7 日後の 8 つの密閉箱の PDA 培地上の被験真菌コロニーの面積を Foxit Reader® (FoxitJapan, Inc.) により計算した。

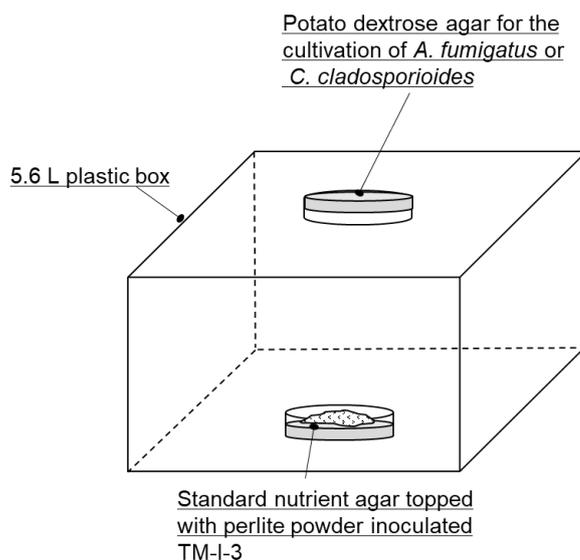


Fig. 4-2 Structure of the experimental equipment using 5.6 L plastic boxes, used to identify which stage of fungi growth TM-I-3 inhibits.

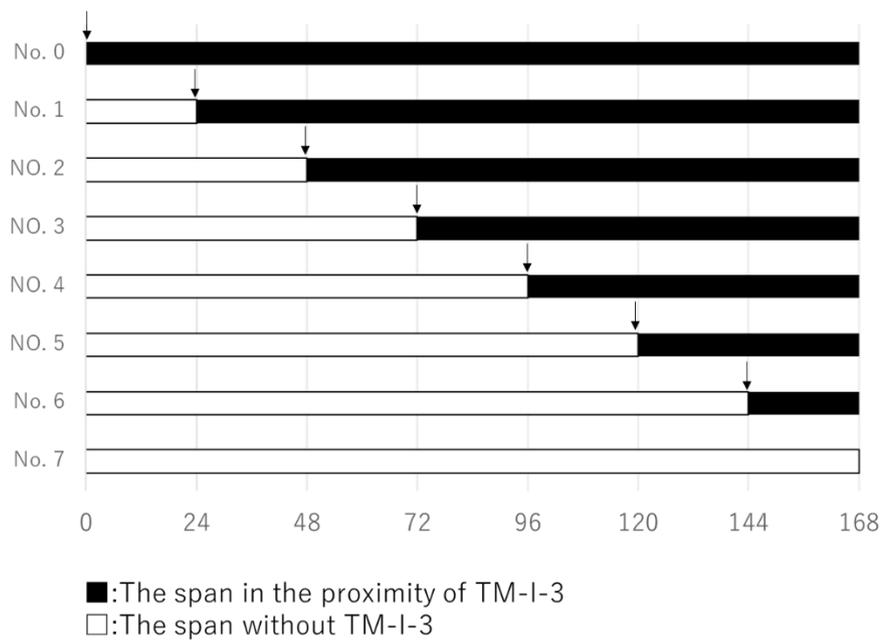


Fig. 4-3 Timeline of the experimental schedule. The black bar indicates the span in which the PDA was in the proximity of TM-I-3, while the white bar indicates the span in which the PDA was without TM-I-3.

## 4.2 結果

### 4.2.1 菌糸成長観察の結果

位相差顕微鏡による顕微観察から得られた *A. fumigatus* および *C. cladosporioides* の 2 種類の被験真菌の菌糸成長の時系列写真を Fig. 4-4 に示す。

Fig. 4-4 (A) に示すように、*A. fumigatus* の胞子は 24 時間後には胞子の発芽が観察され、48 時間後には菌糸が伸長している様子が観察された。また 96 時間には新たな胞子が放出されている様子が観察され、120 時間後には菌糸の太さも大きくなっている。168 時間後には非常に複雑に絡み合い伸長した菌糸が観察された。

また Fig. 4-4 (B) に示すように、*C. cladosporioides* の胞子も同様に、24 時間後には胞子の発芽が観察され、48 時間後には菌糸が伸長している様子が観察された。また 96 時間には新たな胞子が飛散している様子が観察され、144 時間後から 168 時間後の間は菌糸の伸長が非常に大きく、菌糸の先端に更なる胞子を作り放出している様子が観察できた。

### 4.2.2 被験真菌の増殖曲線

真菌類を含む微生物の成長・増殖挙動は、一般に誘導期、対数増殖期、静止期、死滅期を有することが知られており、その様相はシグモイド曲線となることが多い [74]。各被験真菌の増殖現象を表現するため、デジタル画像から計測した真菌の菌糸の長さを平均化し、その値を利用して Logistic 型のモデルパラメータを同定し、Fig. 4-5 に各増殖曲線を示した。

Fig. 4-5 (a) より、*A. fumigatus* の菌糸成長は、胞子懸濁液を PDA 培地に塗布してすぐに誘導期に入り、24 時間後には対数増殖期に入ることが示されている。*A. fumigatus* の菌糸成長は 72 時間後を過ぎ

た頃に静止期に入り、典型的なシグモイド曲線を描くことが明らかになった。

Fig. 4-5 (b) から *C. cladosporioides* の菌糸成長は孢子懸濁液を PDA 培地に塗布して徐々に誘導期に入り、24 時間後過ぎた頃から対数増殖期に入るが、*A. fumigatus* の菌糸成長の対数増殖期と比べると比較的緩やかな速度で菌糸成長することが分かる。120 時間後を過ぎた頃に静止期に入り、おおよそシグモイド曲線を描くことが明らかになった。

#### 4.2.3 TM-I-3 株の被験真菌の増殖挙動に対する阻害ステージの検証

Fig. 4-6 (a) から *A. fumigatus* のコロニー面積は孢子を PDA 培地に塗布してすぐに TM-I-3 株と共存させた No. 0 の箱では 1 週間後のコロニー面積の平均値は  $3.215 \text{ cm}^2$  となっている。一方、PDA 培地に塗布して 24 時間後に TM-I-3 株と共存させた No. 1 の箱では 1 週間後のコロニー面積の平均値は  $5.575 \text{ cm}^2$  と No. 0 の箱に比べて 1.7 倍以上のコロニー成長をしている。さらに、PDA 培地に塗布して 48 時間後に TM-I-3 株と共存させた No. 2 の箱では 1 週間後のコロニー面積の平均値は  $10.68 \text{ cm}^2$  と No. 0 の箱に比べて 3.5 倍以上のコロニー成長をしている。これより、TM-I-3 株は *A. fumigatus* の孢子を PDA 培地に塗布しておよそ 24 時間の間の成長過程を最も阻害している可能性が高いことが示唆された。

Fig. 4-6 (b) から *C. cladosporioides* のコロニー面積は孢子を PDA 培地に塗布してすぐに TM-I-3 株と共存させた No. 0 の箱では 1 週間後のコロニー面積の平均値は  $1.648 \text{ cm}^2$  となっている。一方、PDA 培地に塗布して 24 時間後に TM-I-3 株と共存させた No. 1 の箱では 1 週間後のコロニー面積の平均値は  $8.285 \text{ cm}^2$  と No. 0 の箱に比べて 5 倍以上のコロニー成長をしている。さらに、PDA 培地に塗布して 48 時間後に TM-I-3 株と共存させた No. 2 の箱では 1 週間後のコロニー面積の平均値は  $16.72 \text{ cm}^2$  と No. 0 の箱に比べて 10 倍以上のコロニー成長

をしている。これより、TM-I-3 株は *C. cladosporioides* の胞子を PDA 培地に塗布して 24 時間の間の成長過程を最も阻害している可能性が高いことが示唆された。

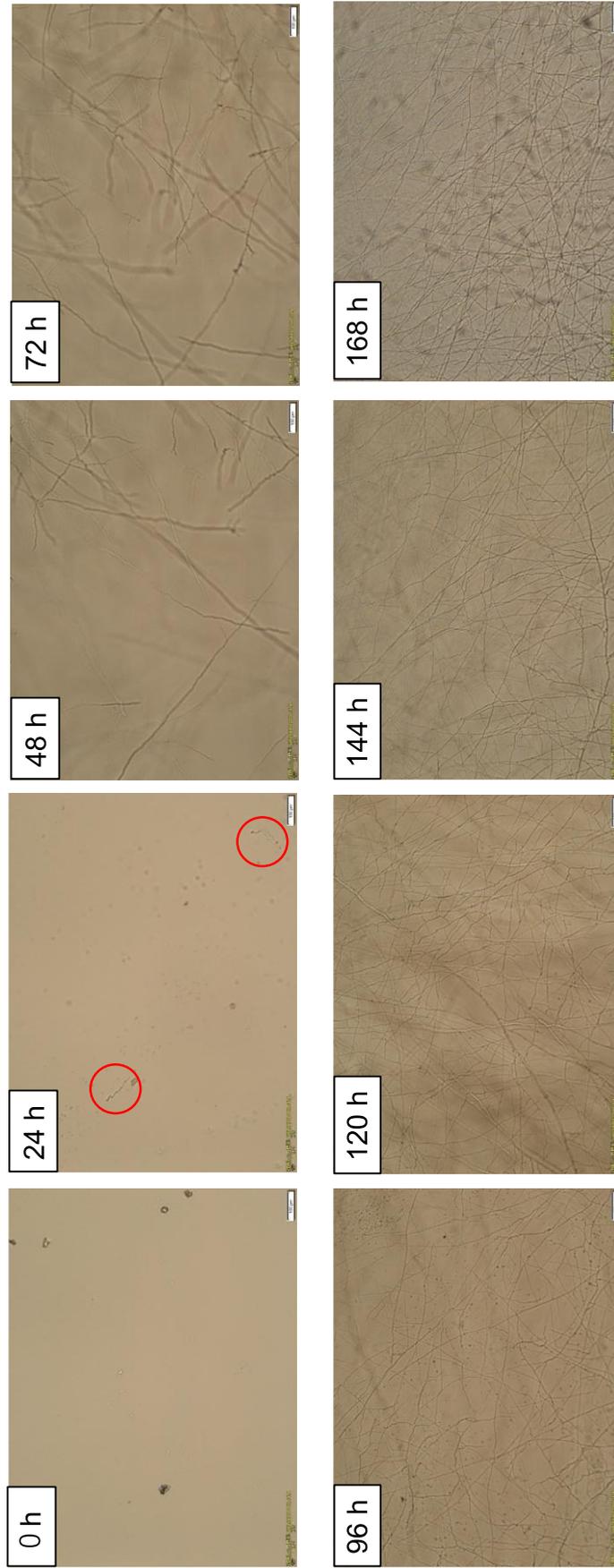


Fig. 4-4 (A) Temporal changes in the growth of fungi on slide cultures of *A. fumigatus*.

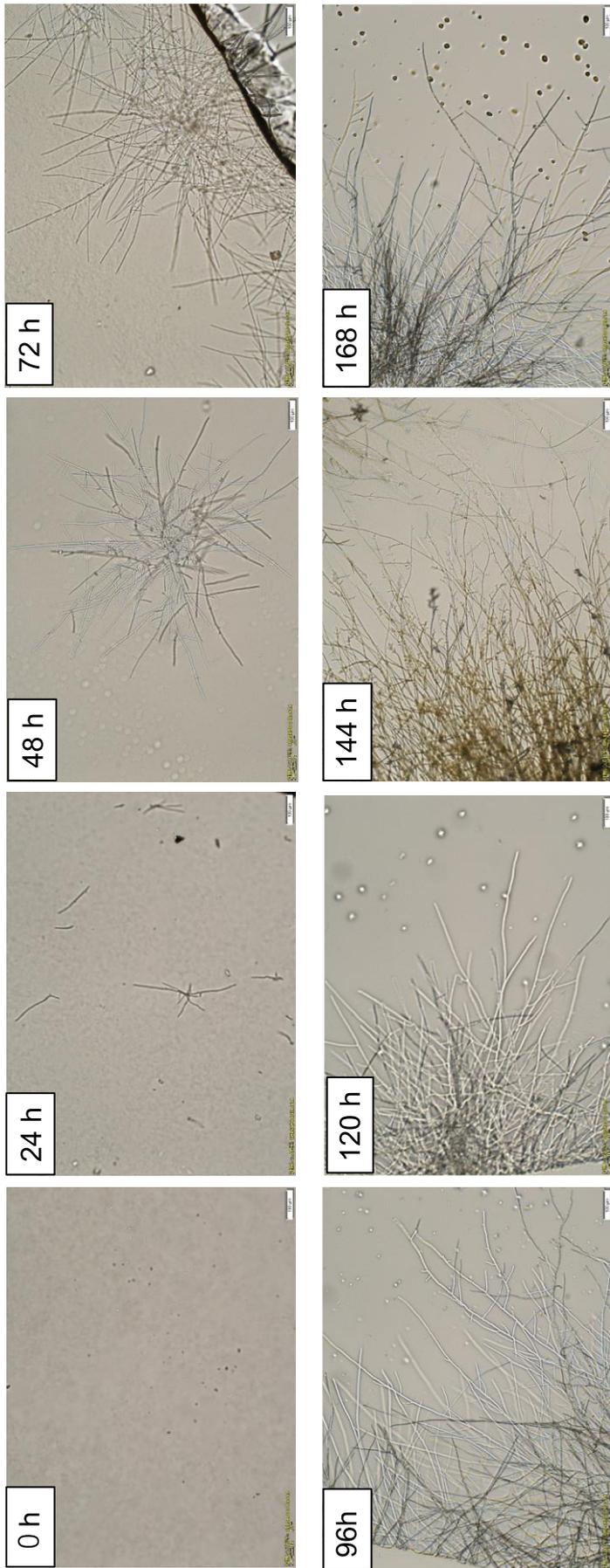
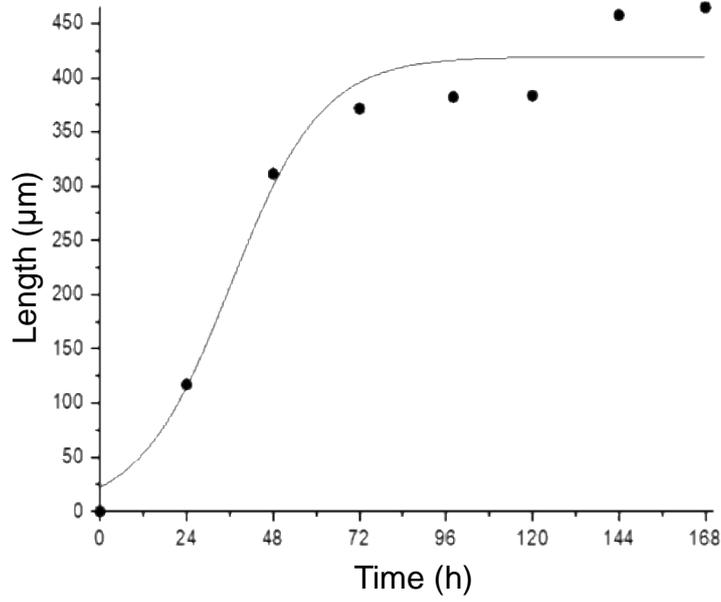
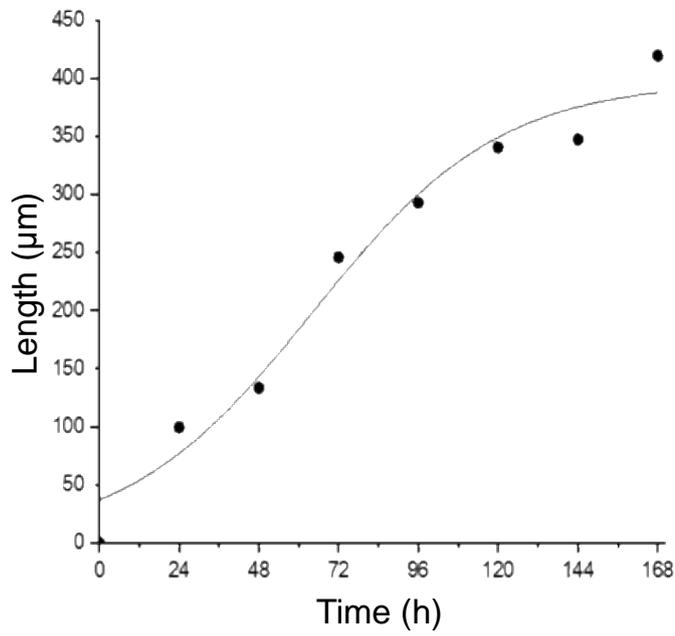


Fig. 4-4 (B) Temporal changes in the growth of fungi on slide cultures of *C. cladosporioides*.

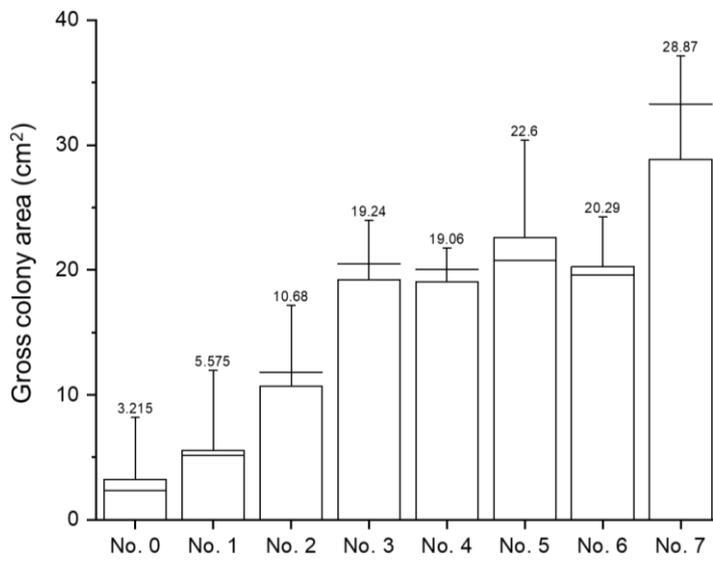


(a) *A. fumigatus*

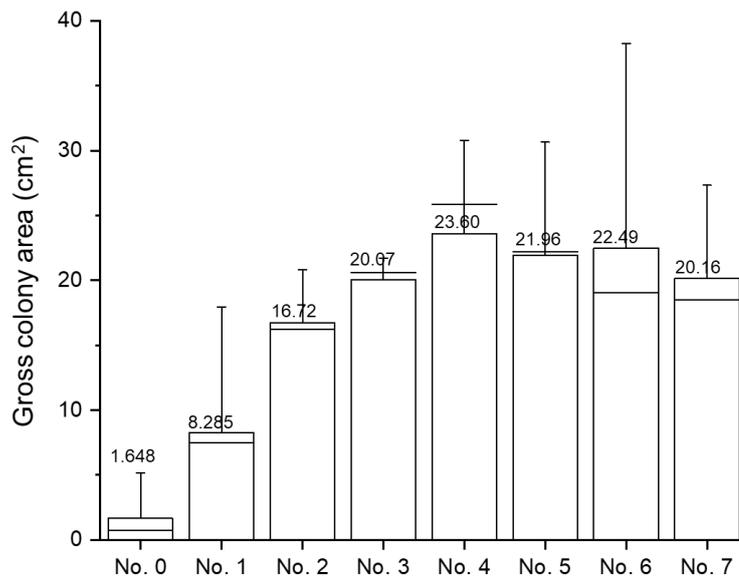


(b) *C. cladosporioides*

Fig. 4-5 Sigmoid curves of the studied fungi (a) *A. fumigatus* and (b) *C. cladosporioides*.



(a) *A. fumigatus*



(b) *C. cladosporioides*

Fig. 4-6 Gross colony area of box nos. 0 to 7; (a) *A. fumigatus* and (b) *C. cladosporioides*.

### 4.3 考察

この章では、TM-I-3 株の非接触抗真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、まず被験真菌の増殖曲線の作製と孢子から菌糸伸長までの顕微鏡観察をスライドカルチャーにて時系列で行った。さらに、非接触抗真菌試験を応用し TM-I-3 株の被験真菌の増殖挙動に対する阻害ステージの検証を行った。

これらの実験を総合的に解析すると、まず今回の被験真菌の *A. fumigatus* と *C. cladosporioides* の両方に共通する特徴が一点あげられる。それは、各孢子懸濁液を PDA 培地に接種して 24 時間以内の成長過程を TM-I-3 株は最も阻害していることが 4.1.4 の実験結果より推定された。各孢子懸濁液を PDA 培地に接種して 24 時間以内の成長過程というのはすなわち、Fig. 4-4 の顕微鏡観察画像から分かる情報では孢子が発芽する段階を示す。同様に、Fig. 4-5 のシグモイド型増殖曲線から分かる情報ではいわゆる誘導期の段階を示している。つまり、TM-I-3 株は孢子状態の真菌を非接触的に不活性化する能力があると予想される。また、No. 1 や No. 2 の密閉箱は No. 3 から No. 7 の密閉箱よりもコロニー面積の合計が小さい傾向にあるため、発芽後のある一定期間に TM-I-3 株と共存させることが菌糸成長を幾分か抑制する傾向にある可能性も否定できない。

しかし総合的に判断すると、TM-I-3 株は真菌の孢子が発芽し大きく伸長した場合や真菌の成長過程が対数増殖期に入った段階での成長はほとんど阻害できない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。

これまで微生物資材の抗真菌メカニズムに関して形態観察を含む真菌成長の経時的な面からのアプローチを試みた例はほとんど見られない。そのため、今回の実験プロセスおよび結果は、微生物資材の評価においても新たな発見であると考えられる。また、今後の TM-I-3 株のフィールドにおける活用の検討でも使用条件の決定に重要な情報と

なると言えるだろう。TM-I-3 株は室内環境の改善はもとより病原真菌の日和見感染やアレルギーの予防を目的にフィールドで利用されることが期待されているため、今回の結果も加味して最も効率良く効果を発揮する条件を検討していく必要がある。

## 総括

微生物資材は長い間、主に農業の分野を中心に流通をしていたが、微生物の特性を生かし居住空間の微生物制御に寄与し、特に真菌由来の疾患への予防効果が期待できる。微生物資材が流通し長い年月が経つにも関わらず、その効果を裏付けるエビデンスや具体的なメカニズムの解明はほとんど明確にされていない。今回の研究ではスクリーニングに成功した *Bacillus* 属の新規な土壌細菌 TM-I-3 株の解析を行い、性状や安全性の確認を行うと共に、非接触抗真菌作用の評価やメカニズムの解明に焦点を当てた。

本研究は、まず TM-I-3 株の遺伝子解析および安全性の確認を行うことから開始した。これより 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がほとんどない菌種と推定された。溶血性試験も陰性、急性経口毒性試験の結果も毒性が低いと判定された。

TM-I-3 株の性状と安全性が確認されたため、引き続き、TM-I-3 株の抗菌能力の性能評価を行うこととした。寒天拡散法を用いた試験の結果より、TM-I-3 株は接触した形式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。一方、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。*A. fumigatus*、*T. cutaneum* の被験真菌は特に深在性及び表在性真菌症の原因真菌で知られており、*C. cladosporioides*、*P. expansum* はアレルギーの原因真菌であり喘息等の増悪因子であることが報告されている。これまで不明瞭であった微生物資材の中の効能効果に対して、以上の事柄は微生物資材が病気の予防に繋がる可能性を示す明瞭なエビデンスを提示することができたと筆者は考える。

これらの結果を受け、*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 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。これより TM-I-3 株は *B. subtilis* 株が産生するベンズアルデヒドの約 8 倍以上、安息香酸の約 2.7 倍の濃度を産生しており、これらの物質が TM-I-3 株の非接触抗真菌作用のメカニズムに大きく関与している可能性が示唆された。また、TM-I-3 株と *B. subtilis* 株は共通した数種類の有機酸類を産生しており、これらも抗真菌作用を一部担っている可能性も捨てることは出来ない。全ての分析実験を通し、TM-I-3 株の非接触抗真菌作用は、単体の揮発性物質が抗真菌作用を担っているのではなく、揮発性物質が複合的に作用し合い抗真菌作用を発揮している可能性が高いと考察した。

次に、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い、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。これより、TM-I-3 株の非接触抗真菌作用は静菌的・予防的な用途に適していることが示唆され、一方で殺菌作用や滅菌作用、菌糸の除去効果は弱いことが推定された。

これまでの先行研究は [22, 75-77]、*Bacillus* 属の特性を植物の病原真菌に対して適応してきた例は多かったものの、ヒトや動物に対する病原真菌を評価した研究は非常に少ない。またシャーレや試験管内の非常に狭い空間における *in vitro* 実験が主であったため、実際の環境に対する適応に関しては、最後まで疑問が生じる研究が多くあった。本研究で、実環境を想定して大きな系の *in vitro* 実験を行い抗真菌評価出

来たことは、これまでの研究と一線を画する点であったと考える。

また、これまで *Bacillus* 属の揮発性成分に関する定性分析の報告はあるものの [76, 77]、定量分析を行い比較した例はほとんどなく、より *Bacillus* 属の非接触抗真菌効果のメカニズムを明確化できたと考える。また形態観察を行い時系列で真菌を観察することにより、非接触抗真菌効果の、より具体的な真菌の阻害機構を知ることができた。

今後は、TM-I-3 株を実際の居住空間に適応した場合、同様の効果を発揮できるかフィールド実験および長期間の追跡調査が必要になってくると考えられる。また今回同定できなかつた未知の揮発性物質の構造解析や定性した揮発性物質が別の種の真菌増殖を促進する可能性はないかの検証が求められる。また定性揮発性物質による相加・相乗効果についても検討の余地があるだろう。また近縁な *Bacillus* 属との遺伝的の解析や比較も今後非常に重要となるであろう。

近年でも農化学の分野では新種の *Bacillus* 属が発見され、抗真菌抗生剤の生産を行う菌株が報告されている。これらの菌株は植物の病気予防を目的に研究開発されているが、活性を保つには pH や温度といった一定の縛りがある傾向にある [78-80]。本研究の菌株を含む微生物製剤は人間や動物の住む居住区間へ適応する際に隔離して設置することを念頭に置いているため、pH や過度な温度変化を考慮する必要がない点は大きな利点であると考えられる。

これまで市場に出ている微生物資材を含む製品と本研究で使用した TM-I-3 株を比較すると、第一に、市場に出ている一部の微生物資材は細菌叢を含有したものが多く、多種多様な細菌類が混在するため未同定の菌種が多く、エビデンスの取得が非常に困難を極めている。さらに含有している微生物の一部に病原性細菌・真菌があるという指摘もされている。今回、筆者は単体の菌株を含有することで効果や安全のエビデンスの取得をより容易に、そしてより正確にすることができた。第二に、市場に出ている微生物資材は、謳われている効能効果とそれを裏付ける入手可能なエビデンスには不足している点や乖離している点、疑問を呈する点、詳細が不明な点が多く散見されている。特に論

文化されたエビデンスを持つ微生物資材はほとんど存在していない。第三に、すでに流通している微生物資材は家庭内の衛生環境を整えるものが主な目的であるが、本菌株のように疾患の予防を見据えてのエビデンスを取得したものは、ほとんど見られない。これらの事柄は、本菌株及び本菌株を含有する微生物資材のノベリティであると筆者は考察する。

微生物資材を含む製品は近い将来も成長が予想されている一方、前述した安全性やエビデンス不足の問題を抱えている [11]。本研究が一端となり、微生物資材の効能効果やメカニズムが更に明確化され、持続可能な手段として開発が進み、今後ヒトや動物の健康維持と環境保全の両立に繋がっていくことを信じている。

参考文献・引用文献

- [1] 海見悦子, 高橋栄二, 橋口大介, 藤原和弘 (2006) 「微生物資材の産業活用 -その現状と将来展望-」, 『資源と素材』 vol. 122, no. 1, pp. 1-11.
- [2] Malusá, E., Sas-Paszt, L., and Ciesielska, J., (2012) Technologies for beneficial microorganisms inocula used as used as biofertilizers. *Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID: 491206.
- [3] Spök, A., and Klade, M. (2009) Environmental, health and legal aspects of cleaners containing living microbes as active ingredients”, results and conclusions of a study commissioned by the Austrian Federal Ministry of Agriculture, Forestry, Environment and Water Management.  
<http://www.tb-klade.at/wp-content/uploads/2015/06/IFZ-EWP-3-2010.pdf>
- [4] 「微生物共生系に基づく新しい資源利用開発 日本大学 21 世紀 COE プログラム」 (最終閲覧日: 2019 年 10 月 8 日)  
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~coe14/outline.html>.
- [5] 国立研究開発法人 科学技術振興機関 (2017) 「持続可能な開発目標 (SDGs) の達成に向けた産学官 NGO 等の取組事例」 (最終閲覧日: 2019 年 10 月 8 日)  
[https://www.jst.go.jp/sdgs/pdf/sdgs\\_book\\_jp\\_2018.pdf](https://www.jst.go.jp/sdgs/pdf/sdgs_book_jp_2018.pdf).
- [6] 環境省 (2017) 「平成 29 年度 環境白書・循環型社会白書・生物多様性白書」 (最終閲覧日: 2019 年 10 月 14 日)  
<https://www.env.go.jp/policy/hakusyo/h29/index.html>
- [7] 紀岡雄三, 赤澤貴徳, 増村弘明, 野口勝憲 (1999) 「*Bacillus* 属拮抗細菌の病害抑制効果」, 『土と微生物』 vol. 53, no. 2, pp. 103-109.
- [8] Nazaroff, W. W., and Weschler, J. C. (2004)

- Cleaning products and air fresheners: exposure to primary and secondary air pollutants. *Atmospheric environment*, vol. 38, no. 18, pp. 2841-2865.
- [9] 丸本卓哉 (1996) 「微生物資材に関する試験の現状と評価」, 『微生物を利用した農業資材の現状と将来』, 日本土壌肥料学会 (最終閲覧日: 2019年10月8日)  
[http://jssspn.jp/file/pdf5\\_sympo1996.pdf](http://jssspn.jp/file/pdf5_sympo1996.pdf).
- [10] 王一川 (2015) 「農業における微生物資材の市場現状と将来展望」, 『Techno Create Monthly Journal』 vol. 14, pp. 1-4.
- [11] Arvanitakis, G., Temmerman, R., and Spök, A. (2018) Development and use of microbial-based cleaning products (MBCPs): Current issues and knowledge gaps. *Food and Chemical Toxicology.*, vol. 116, pp. 3-9.
- [12] Sato, I., Yoshida, S., Iwamoto, Y., Aino, M., Hyakumachi, M., Shimizu, M., Takahashi, H., Ando, S., and Tsushima, S. (2014) Suppressive potential of *Paenibacillus* strains isolated from the tomato phyllosphere against *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Microbes and Environments*, vol. 29, pp. 168-177.
- [13] 野口勝憲 (1997) 「微生物資材開発の現状と課題」, 『土と微生物』 vol. 49, pp. 51-67.
- [14] 内藤茂三 「*Bacillus* 属細菌による食品の変敗と防止技術」, 財団法人食品分析開発センターSUNATEC (最終閲覧日: 2019年10月8日)  
<http://www.mac.or.jp/mail/090601/01.shtml>.
- [15] 東匡伸, 小熊恵二 「シンプル微生物学 改定第4版」, 南栄堂.
- [16] 木村啓太郎 (2015) 「納豆と微生物」, 『モダンメディア』 vol. 61, no. 11, pp. 338-344.
- [17] Cubeta, M. A., Hartman, G. L., and Sinclair, J. B. (1985) Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with

- soybean seeds. *Plant Disease*, vol. 69, no. 6, pp. 506-509.
- [18] Ferreira, J. H. S., Matthee, F. N., and Thomas, A. C. (1991) Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, vol. 81, pp. 283-287.
- [19] Todorova, S., and Kozhuharova, L. (2010) Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, pp. 1207-1216.
- [20] Cruickshank, R. (1955) Sir Alexander Fleaming, F. R. S. *Nature.*, vol. 175, pp. 663.
- [21] Howell, C. R., Beier, R. C., and Stipanovic, R. D. (1988) Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of Pythium preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology*, vol. 78, no.8, pp. 1075-1078.
- [22] Fiddaman, P. J., and Rossall, S. (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 74, no. 2, pp. 119-126.
- [23] 井上重治 (2001) 「香りの抗菌作用-アロマセラピーへの応用」, 『化学と生物』 vol. 39, no. 7, pp. 476-481.
- [24] Swamy, K. M., Akhtar, S. M., and Sinniah, R. U. (2016) Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, pp. e1-21.
- [25] Ács, K., Balázs, V., Kocsis, B., Bencsik, T., Böszörményi, A., and Horváth, G. (2018) Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement Alternative Medicine*, vol. 18, no.1, e227.

- [26] Inouye, S., Takizawa, T., and Yamaguchi, H. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 47, no. 5, pp. 565-573.
- [27] Thompson, R.G. III, and Patterson, F. T. (2012) Fungal disease of the nose and paranasal sinuses. *Journal Allergy and Clinical Immunology*. vol. 129, no. 2, pp. 321-326.
- [28] Hay, J. R., Johans, E.N., Williams, C.H., Bolliger, W.I., Dellavalle, P.R., Margolis, J.D., Marks, R., Naldi, L., Weinstock, A. M., Wulf, K. S., Michaud, C., C. Murray, L. J., and Naghavi, M. (2014) The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 134, no.6, pp. 1527-1534.
- [29] Almeida, F., Rodrigues, L. M., and Coelho, C. (2019) The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10.
- [30] Brown, D. G., Denning, W. D., Gow, A. R. N., Levitz, M. S., Netea, G. M., and White, C. T. (2012) Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*, vol. 4, issue 165, 165rv 13.
- [31] 有満征伸, 佐々英也, 内山耕作, 鈴川誠, 大柴薫、野村賢一, 野田直樹 (2016) 「集中治療室における侵襲性カンジダ感染症 チェックリストを用いた抗真菌薬の使用実態調査」, 『日本農村医学会雑誌』 vol. 64, no. 5, pp. 853-859.
- [32] 二木芳人, 吉田耕一郎, 玉田貞雄, 宮下修行, 橋口浩二, 小橋吉博, 岸本寿男, 中島正光, 松島敏春 (1995) 「早期診断を得たにもかかわらず救命し得なかった侵襲性肺アスペルギルス症の 1 症例」, 『感染症学雑誌』 vol. 69, no. 11, pp. 1307-1311.

- [33] Kousha, M., Tadi, R., and Soubani, O. A. (2011) Pulmonary aspergillosis: a clinical view. *European Respiratory Review*, vol. 20, no. 121, pp. 156–174.
- [34] Toyotome, T. (2019) Resistance in the environmental pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology Journal*, vol. 60, no. 3, pp. 61-63.
- [35] Gulshan, K., and Moye-Rowley, S. W. (2007) Multidrug resistance in fungi. *Eukaryotic Cell*, pp. 1933-1942.
- [36] Rosenbaum, F. P., Crawford A. J, Anagnost, E. S., Wang, J. C., Hunt, A., Anbar, D. R., Hargrave, M. T., Hall G. E., Liu C. C., and Abraham, L. J. (2010) Indoor airborne fungi and wheeze in the first year of life among a cohort of infants at risk for asthma. *Journal of the Exposure Science and Environmental Epidemiology*, vol. 20, no. 6, pp. 503–515.
- [37] Moriyama, Y., Nawata, N., Tsuda, T., and Nitta, M. (1992) Occurrence of moulds in Japanese bathroom, *Internatinal Biodeterioration and Biodegradation*. vol. 30, issue 1, pp. 45-55.
- [38] Zureik, M., Neukirch, C., Leynaert, B., Liard, R., Bousquet, J., Neukirch, F. (2002) Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ*, vol. 325, pp. 1-7.
- [39] Pulimood, B. T., Corden, M. J., Bryden, C., Sharples, L., and Nasser, M. S. (2007) Epidemic asthma and the role of the fungal mold *Alternaria alternate*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 120, no. 3, pp. 610–617.
- [40] 福富友馬 (2016) 「真菌とアレルギー疾患」, 『アレルギー』 vol. 65, no. 2, pp. 113-117.
- [41] Gent, J. F., Ren, P., Belanger, K. Triche, E., Bracken, M. B., Holford, R. T., and Leaderer, P. B. (2002) Levels of household mold

- associated with respiratory symptoms in the first year of life in a cohort at risk for asthma. *Environmental Health Perspectives*, vol. 110, no. 12, pp. A781-A786.
- [42] Ruiz-Camps, I., Aguado, M. J., Almirante, B., Bouza, E., Ferrer-Barbera, F. C., Len, O., Lopez-Cerero, L., Rodriguez-Tudela, L. J., Ruiz, M., Solé, A., Vallejo, C., Vazquez L., Zaragoza, R., and Cuenca-Estrella, M. (2011) Guidelines for the prevention of invasive mould diseases caused by filamentous fungi by the Spanish society of infectious diseases and clinical microbiology (SEIMC). *Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*, vol. 17, suppl. 2, pp. 1-24.
- [43] 金沢晋二郎 (1996) 「微生物資材検定法関の現状と展望」, 『微生物を利用した農業資材の現状と将来』, 日本土壌肥料学会 (最終閲覧日: 2019年10月8日).  
[http://jssspn.jp/file/pdf5\\_sympo1996.pdf](http://jssspn.jp/file/pdf5_sympo1996.pdf).
- [44] Barrow, G. I., and Feltham, R. K. A. (1993) *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- [45] 「<sup>®</sup>50 CHB/E Medium (アピ 50 CHB/E メディウム) 第4版」 bioMérieux (最終閲覧日: 2020年1月14日).  
<http://www.products.sysmex-biomerieux.net/product/pdf/50430F>
- [46] 太田敏子, 岡崎充宏, 金森政人, 古畑勝則, 松村充, 山本容正 「メディカルサイエンス 微生物検査学 第二版」, 近代出版.
- [47] 福原淳子, 甲田雅一, 本間請子, 門間千枝、柳川義勢 (2002) 「血管内溶血を起こし、短時間で死亡した劇症型 *Clostridium perfringens* 感染症の1例」, 『感染症学雑誌』 vol. 76, no. 7, pp. 562-565.
- [48] Ichikawa, M., Minami, M., Ohashi, M., Wakimoto, Y., Matsui, H., and Hasegawa, T. (2011) Clinical and microbiological analysis of

- beta hemolytic streptococci during 2006-2010 at Nagoya City University Hospital. *Nagoya Medical Journal*, vol. 51, pp. 175-189.
- [49] Ristow, C. L., and Welch, A. R. (2016) Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.1858, no. 3, pp. 538-545.
- [50] 「細菌性状試験報告書 SIID17383」(2015) 株式会社テクノスルガ・ラボ.
- [51] 経済協力開発機構 (2001) OECD Guideline for Testing of Chemicals 420 (最終閲覧日: 2019年10月8日).  
[https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced\\_gl420.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl420.pdf).
- [52] Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E., and Priest, G.D. (1996) *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 46, no. 3, pp. 759-764.
- [53] Heyndrickx, M., Coorevits, A., Scheldeman, P., Lebbe, L., Schumann, P., Rodríguez-díaz, M., Forsyth, G., Dinsdale, A., Heyrman, J., Logan, N. A., and Vos, P. D. (2012) Emended descriptions of *Bacillus sporothermodurans* and *Bacillus oleronius* with the inclusion of dairy farm isolates of both species. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, vol. 62, pp. 307-314.
- [54] 世界保健機関 (2004) Laboratory biosafety manual (最終閲覧日: 2019年12月24日).  
<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>
- [55] Shier, W. T., and Mebs, D. (1990) Handbook of Toxinology, *Science*.
- [56] 飼料添加物評価表 バチルス サブチルス JA-ZK 株 (2016)

食品安全委員会 肥料・飼料等専門調査委員会 (最終閲覧日: 2020年1月15日). [https://www.fsc.go.jp/iken-bosyu/iken-kekka/kekka.data/hisiryuu\\_bacillusubtilis\\_280518.pdf](https://www.fsc.go.jp/iken-bosyu/iken-kekka/kekka.data/hisiryuu_bacillusubtilis_280518.pdf)

- [57] 池田郁夫 (2013) 「統計検定を理解せずに使っている人のためにⅢ」, 『化学と生物』 vol. 51, no. 7, pp. 483-495.
- [58] Dales, E. R., Cakmak, S., Judek, S., Dann, T., Coates, F., Brook, R. J., and Burnett, T. R. (2003) The role of fungal spores in thunderstorm asthma. *CHEST*, vol. 123, no. 3, pp. 745-750.
- [59] Kousha, M., Tadi, R., and Soubani, O. A. (2011) Pulmonary aspergillosis: clinical view. *European Respiratory Review*, vol. 20, no. 121, pp. 156-174.
- [60] Shimazu, K., Ando, M., and Sakata, T., Yoshida, K., and Araki, S. (1984) Hypersensitive pneumonitis induced by *Trichosporon cutaneum*. *The American Review of Respiratory Disease*, vol. 130, no. 3, pp. 407-411.
- [61] 杉田隆 (2003) 「日和見感染症および夏型過敏性肺炎の原因菌種としての *Trichosporon asahii* の多様性解明」, 『真菌誌』 vol. 44, pp. 7-12.
- [62] 森川豊 「室内環境の微生物汚染について」, あいち産業科学技術センター (最終閲覧日: 2019年10月8日). [http://www.aichi-inst.jp/shokuhin/other/shokuhin\\_news/s\\_no20\\_02.pdf](http://www.aichi-inst.jp/shokuhin/other/shokuhin_news/s_no20_02.pdf)
- [63] 平間昭光, 澤田哲則, 朝倉靖弘, 佐藤義明、佐藤司、長谷川優、佐藤晃壽 (2005) 「木質建材の臭気評価」, 『林産試験場報』 vol. 19, no. 2, pp. 14-19.
- [64] Inouye, S., Uchida, K., Maruyama, N., Yamaguchi, H., and Abe, S. (2006) A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Japanese Journal of Medical Mycology*, vol. 47, no. 2, pp. 91-98.
- [65] 石島早苗, 江澤邦夫, 高橋美貴, 丸山奈保、安部茂 (2018)

- 「靴内部に残存する白癬菌等の汚染菌を抗菌する植物精油の選択と抗菌条件の検討」, 『日本防菌防黴学会誌』 vol. 46, no. 10, pp. 441-446.
- [66] 公益社団法人 におい・かおり環境協会「ハンドブック 悪臭防止法 六訂版」, ぎょうせい.
- [67] 岩崎啓子, 出口雄也, 長岡 (浜野) 恵, 長岡寛明、野村秀一 (2010)「高速液体クロマトグラフィーを用いた梅干し中の有機酸、アミダグリン及び安息香酸関連物質の一斉検出」, 『日本食品化学学会誌』 vol. 17, no. 1, pp. 65-68.
- [68] World Health Organization (2005) Concise International Chemical Assessment Document, No.26 (最終閲覧日: 2019年10月14日)
- [69] 小野寄菊夫、小嶋仲夫、永瀬久光「新しい衛生薬学 第7版」, 廣川書店.
- [70] M. J. O'Neil (2001) The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 13<sup>th</sup> ed. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ.
- [71] Sanker, M., Nowicka, E., Carter, E., Murphy, M. D., Knight, W. D. Bethellm D., and Hutchings, J. G. (2014) The benzaldehyde oxidation paradox explained by the interception of peroxy radical by benzyl alcohol. *Nature Communications*, vol. 5, no. 3332.  
[https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad26\\_rev\\_1.pdf](https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad26_rev_1.pdf)
- [72] Fujihira, M. (2013) Cultivation/slide-culture, *Medical Mycology Journal*, vol. 54, pp. 107–110.
- [73] Ito, K., Hayashi, T., Takigasaki, K., Yoshie, R. (2009) Numerical morphological analysis of fungal growth based on a reaction-diffusion model in indoor environment. *Journal of the Housing Research Foundation "Jusoken"*, vol. 36, pp. 281–292.
- [74] 角野猛 (2011)「微生物の発見と性質について (2)」, 『日本調理科学会誌』 vol. 44, No. 1, pp.88-93.
- [75] Wright, S. J. L. and Thompson, R. J. (1985) *Bacillus volatiles*

- antagonize cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 30, pp. 263–267.
- [76] Gao, H., Li, P., Xu, X., Zeng, Q., and Guan, W. (2018) Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, no. 456.
- [77] Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q. (2012) Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, no. 16, pp. 5942–5944.
- [78] Silo-suh, A. L., Lethbridge, J. B., Raffel, J. S., He, H., Clardy, J. and Handelsman, J. (1994) Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 6, pp. 2023–2030.
- [79] Joshi, S., Bharucha, C., and Desai, A. (2008) Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B, *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 4603–4608.
- [80] Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., and Gu, Y. (2010) Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components, *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 292–297.

## 謝辞

本研究は、長崎国際大学薬学部大学院薬学研究科佐藤博教授のご指導のもとに行われたものであり、多岐にわたるご指導及び本論文をまとめるに際して貴重なご助言を賜りましたことに深甚なる感謝の意を表します。本論文作成にあたり、審査委員として多くの助言をいただきました長崎国際大学薬学部薬学科小林秀光教授、大庭義史教授、小川由起子教授に深く感謝致します。また本研究に対して多岐に渡る助言をくださり温かく見守って下さいました長崎国際大学薬学部薬学科山口辰哉教授、相田美和講師に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、試料提供のご支援やご協力をいただきました有限会社 T.M エンタープライズ碓正男社長に深く感謝を申し上げます。また有限会社 T.M エンタープライズ研究開発代表担当浦川真二様からは研究に必要なデータの提供がございました。厚く御礼を申し上げます感謝する次第です。

また本研究の微生物実験を進めるにあたり、細やかな実験手技のご指導そして研究者としての心得を賜りました福岡大学薬学部薬学科中島幸彦助教に厚く御礼申し上げます。

本研究の分析実験を進めるにあたり、快く実験室に迎え入れ、分析方法のご指導とご協力を賜りました麻生大学獣医学部獣医学科高木敬彦教授、杉田和俊講師に心より感謝申し上げます。また分析機器の貸与にご協力いただきました長崎国際大学健康管理学部健康栄養学科の藤井俊輔講師にも心からお礼を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご助言を賜りました九州産業大学生命科学部生命科学科満生慎二教授に心より感謝申し上げます。

また、分析データのご提供をいただきました成蹊大学理工学部物質生命理工学科野口美由貴特別共同研究員、チューケン日本医薬中央研究所松原英隆所長、長崎窯業技術センター永石雅基次長に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究助成金を賜りました株式会社

onedum 代表取締役児玉憲亮様に深く感謝を申し上げます。

また、多岐に渡るご支援をいただきました馬場華奈子研究補助員にも心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、共同研究を申し入れていただきました九州大学生物資源環境化学府生命機能科学専攻微生物遺伝子資源学研究室下元仁美様にも厚く御礼申し上げます。

本研究の内容を一般の方々にも興味を持っていただくよう熱心に取材をしてくださいました朝日新聞佐世保支局長原口晋也様にも心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたりご支援をいただきました産業医科大学嵐谷奎一名誉教授にもここに深く感謝申し上げます。

私に大学院進学を勧め、研究活動の素晴らしさを教えてくださいました有限会社サンコーメディカル代表取締役山田高義様に深く感謝致します。

そして毎日真摯に実験に取り組んでくださった長崎国際大学薬学部薬学科環境毒性学研究室及び医療情報学研究室の卒業生・在校生の皆様にも心から御礼申し上げます。また、一緒に大学院生活を送り実験のサンプル提供に粘り強くご協力いただきました長崎国際大学薬学部薬学科の同窓生であり長崎国際大学薬学部薬学科倉岡卓也助手、山口恭士郎助手にも感謝申し上げます。

また研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここに名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後となりますが、いつも応援してくださる故郷・五島列島の父母、弟妹、祖父、祖母、親戚の皆様、特にご支援、応援を賜りました江頭直善・八代美夫妻にも心から感謝を申し上げます。そして、最後まで傍で見守り、揺るぎない支援と応援をくださった夫と夫のご家族にも心から感謝致します。

以上に記しました通り、到底一人ではやり遂げられなかった研究を完成させられたのは一重に沢山の方々のご理解、ご支援、ご協力のお

陰でございます。これからも一、研究者として日々精進し、皆様に御恩返しをしていきたいと考えている所存でございます。皆様方、長期間に渡るご支援を本当にありがとうございました。

## 付記

本論文内容は長崎国際大学と有限会社 T.M エンタープライズの共同研究の一部を含む。また、下記の学会誌及び学会、特許公報、報道にて発表したものをまとめたものである。

### 【論文】

本論文の 1 章・2 章は以下の論文により構成される。

Osaki, C., Yamaguchi, K., Urakawa, S., Nakashima, Y., Sugita, K., Nagaishi, M., Mitsuiki, S., Kuraoka, T., Ogawa, Y., Sato, H., The Bacteriological Properties of *Bacillus* Strain TM-I-3 and Analysis of the Volatile Antifungal Compounds Emitted by this Bacteria. *Biocontrol Science*, vol. 24, no. 3, pp. 129-136, 2019.

本論文の 3 章・4 章は以下の論文により構成される。

Osaki, U. C., Urakawa, S., Mitsuiki, S., Shimomoto H., Sugita, K., Sato, H., Analysis of the contact-independent antifungal activity of *Bacillus sporothermodurans* TM-I-3 against *Aspergillus fumigatus* and *Cladosporium cladosporioides*, *Biocontrol Science and Technology* (Under review on April 2020).

### 【学会発表】

臼井千尋、大浦皓紀、松本未来、相田美和、浦川真二、小川由起子、中島幸彦、満生慎二、松原英隆、永石雅基、佐藤博、TM-I-3 株による非接触状態でのカビ抑制の検討、室内環境学会学術大会 口頭発表 (講演要旨集 pp. 292-293) 2016

臼井千尋、大浦皓紀、松本未来、相田美和、浦川真二、中島幸彦、満生慎二、松原英隆、永石雅基、佐藤博、通常状態および苛酷条件下の TM-I-3 株が揮散する抗カビ物質の検討、平成 28 年度 第 33 回日本薬学会九州支部大会 口頭発表 (講演要旨集 pp. 89) 2016

Chihiro, U., Oura, K., Matsumoto, M., Ogawa, Y., Sohda, M., Nakashima, Y., Sugita, K., Noguchi, M., Urakawa, S., Matsubara, H., Sato, H., Identification of the antimicrobial ingredients emitted from strain TM-I-3 and study of the antimicrobial activity of TM-I-3 under spore state, 2017 Asia /CJK Symposium on Analytical Chemistry The 14<sup>th</sup> China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry ポスター発表 (講演要旨集 pp. 164-165) 2017

臼井千尋、大浦皓紀、松本未来、小川由起子、相田美和、中島幸彦、野口美由貴、杉田和俊、浦川真二、松原英隆、永石雅基、佐藤博、TM-I-3 株による非接触状態における抗菌活性物質の同定および芽胞状態での抗菌活性の探索、日本防菌防黴学会第 44 回年次大会 ポスター発表 (要旨集 pp. 260) 2017

大崎千尋、三宅更紗、坂井志穂、浦川真二、永石雅基、満生慎二、佐藤博、TM-I-3 株の *Aspergillus fumigatus* および *Cladosporium cladosporioides* の経時的菌糸成長における阻害機構の解明、室内環境学会学術大会 ポスター発表 (要旨集 YP-28) 2019

三宅更紗、大崎千尋、浦川真二、永石雅基、佐藤博、TM-I-3 株の揮発性物質の分析および非接触抗真菌作用のメカニズム解明、室内環境学会学術大会 ポスター発表 (要旨集 YP-16) 2019

**【学会発表賞】**

2017 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry  
Symposium Award 受賞

**【特許公報】**

碓正男、佐藤博、臼井千尋、特許公開 2017-070278、冷温下でも抗菌能力および消臭能力を持つ微生物、ならびにそれを用いた抗菌剤、消臭剤、抗菌方法、消臭方法

**【報道】**

「朝日新聞」2019年10月10日朝刊25面「防カビ・消臭 菌にお任せ」

「朝日新聞」2019年10月11日夕刊7面「防カビ細菌 大学院生が見つけた」

「朝日新聞」2019年11月1日ネット版 「『意識されず穏やかな菌』院生発見 カビ予防の立役者」

<https://www.asahi.com/articles/ASMBB4FL9MBBTOLB005.html>