

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：32613

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14349

研究課題名(和文)共存状態でのカビ生育特性に及ぼす競争原理の影響の解明

研究課題名(英文)The Influence of Mycotoxin to Other Fungus Growth Characteristics Based on Competition Principle

研究代表者

柳 宇(YANAGI, U)

工学院大学・建築学部(公私立大学の部局等)・教授

研究者番号：50370945

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究では, *Penicillium*属から産生されるPatulin, *Fusarium*属から産生されるT-2 Toxin, *Aspergillus*属から産生されるSterigmatocystinの3種類のマイコトキシンが, 住環境で優先的に検出される9種の真菌に対する抑制実験を行い, 主として以下の結果が得られた。Sterigmatocystinにより抑制できる菌種ならばSterigmatocystinが最も成長を抑制できる。また, T-2 Toxinは多くの菌種の増殖を抑制できた。さらに, *Rhodotorula mucilaginosa*はもっとも生き残りの強い菌であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで筆者らが行ってきた住環境における床の堆積カビ, 浸水後の床下空間表面のカビに関する調査結果では, カビ汚染が顕著になっても分離されるカビの種類が多くないという傾向が確認されている。これらの結果から, 微生物の世界でも競争原理が起きているのではないかと考えられる。なお, 現状ではカビ共存状態での競争原理に関する研究例は世界的に見ても皆無であり, 先行研究はない。本研究では, 住環境におけるカビ汚染特性をこれまでにない手法で解析できたことから, 競争原理で優位に立ったカビに対応した殺菌方法や温湿度環境の制御等による制御方法等において重要な知見が示された。

研究成果の概要(英文): In this study, the experiments on controlling the fungus growth by mycotoxin were carried out. 9 species fungi which referentially detected from living environment were used in this study. Three kinds of mycotoxin, Patulin (produced by genus *Penicillium*), T-2 Toxin (produced by genus *Fusarium*), and Sterigmatocystin (produced by genus *Aspergillus*), were applied. The following results were mainly obtained. Since the appearance ratio of a colony falls remarkably compared with two kinds of other mycotoxin, if species by which growth was controlled by Sterigmatocystin is species which can be controlled by Sterigmatocystin, it will be considered that Sterigmatocystin controls growth most. Moreover, although Sterigmatocystin was strong about the degree of growth suppression, T-2 Toxin has controlled multiplication of many species. Furthermore, *Rhodotorula mucilaginosa* is considered to be the strong bacillus of survival in all species in the mycotoxin used in this experiment.

研究分野: 建築環境工学

キーワード: カビ 競争原理 マイコトキシン MVOC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、気候変動により、集中豪雨やゲリラ豪雨などによる浸水被害が増大している。また、洋の東西を問わず、ダンプネスに代表される住環境のカビ汚染の問題に注目が集まっている。世の中には 10 万種ものカビが存在するといわれているが、これまで筆者らが行ってきた住環境における床の堆積カビ、浸水後の床下空間表面のカビに関する調査結果では、カビ汚染が顕著になって分分離されるカビの種類が多くないという傾向が確認されている。これは“生き延びた”カビが自らの二次代謝産物であるイコトキシンでほかのカビの生育を抑制する作用をしていると考えられ、申請者らの予備的な研究でその可能性を確認している。また、現在、300 種類以上のマイコトキシンが報告されており、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属の 3 属により生産されるものがほとんどである。

2. 研究の目的

本研究は「共存状態でのカビ生育特性に及ぼす競争原理の影響の解明」を題目とする。“競争原理”は経済学用語の一つで、個人や集団に必要とするものが存在し、その数が限定されているならば、それを獲得するために大多数は競争を行い、競争に勝った者のみがそれを獲得できるようにするという概念である。また、場合によっては、相手を攻撃して獲得する。微生物の世界でも競争原理が起きているのではないかと考えられる。本研究では、カビの生育特性に及ぼす競争原理の影響について、カビ自から生産する二次代謝物質であるマイコトキシンによるほかのカビの生育に対する抑制特性を、カビの生育速度の変化との視点から評価を行い、その特性を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

3.1 基材含水率とカビ増殖関係に関する実験

(1) 含水率条件

既往の研究結果を踏まえて、本研究では、含水率を 21% と、18% および 24% の 3 つの条件に設定して行った。また、実際の測定結果では、含水率はそれぞれ 20.9%、17.8%、23.5% になっており、ほぼ設定条件を満たした。

(2) 供試菌及び供試材

供試菌にクロカビ (*Cladosporium cladosporioides*, NBRC 6348, 8.0×10^4 spores/mL)、コウジカビ (*Aspergillus niger*, NBRC6342, 4.0×10^4 spores/mL)、アオカビ (*Penicillium pinophilum*, NBRC6345, 2.8×10^5 spores/mL) を使用した。供試材の木材にはスギの無垢材を $50 \times 50 \times 20$ (mm) に切ったものを用いた。

(3) 実験方法

実験には、含水率測定用、3 種類カビの増殖測定用の水槽計 4 個を用いた。また、供試材は含水率、含水率 23.5%・20.9%・17.8% の実験用それぞれ 3 個 (それぞれ 3 種類カビ増殖測定用) の計 12 個を使用した。含水率測定用の供試材に含水率計をセットして測定を行った。さらに、各水槽内に温湿度計を設置した (図 1)。

各水槽に供試材を 1.5 日間浸水させ、供試材の含水率が一律に 23% 以上となるようにした。その後、供試材の 50×50 mm の表面にサブ口液体培地を 500 μ l、 50×20 mm の木口部分にサブ口液体培地を 250 μ l 塗布した。なお、水槽内には飽和塩法を用いて飽和させた塩化カリウム水溶液を入れたピーカーを用意した。

また、供試材に孢子液を塗布後に孢子が異なる供試材に飛散しないよう、供試材と供試材の間に仕切りを設置した。含水率が 23.5% となった時点で、 50×50 mm の一辺の表面に 3 種類のカビ孢子液を 300 μ l、 50×20 mm の木口部分の表面に 150 μ l を塗布し、再び水槽内へと戻し密閉しインキュベーターで養生した。含水率が 20.9%、17.8% となった場合も同様に行った。

(4) 測定方法及び評価方法

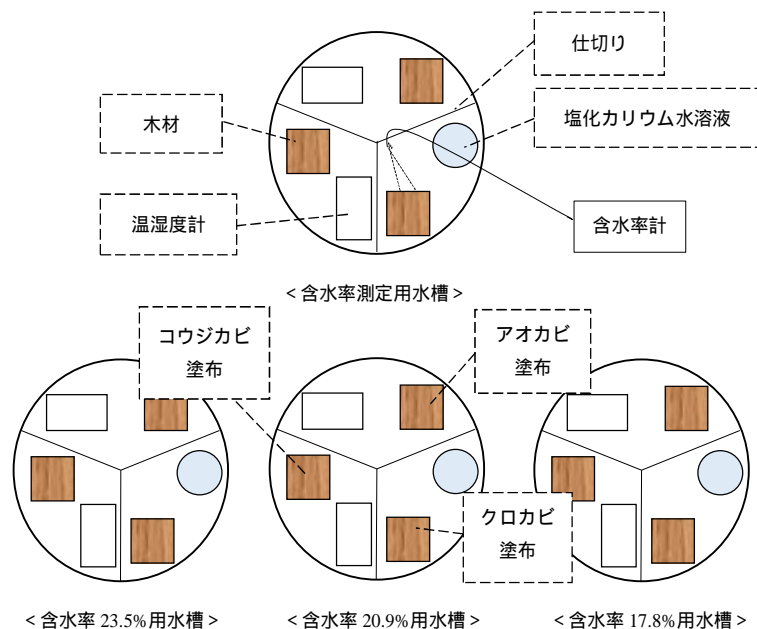


図 1 水槽内概略図

温湿度の測定は温湿度データロガー (TR-72Ui T&D 社製) を使用し, 含水率について木材含水率計 (KNS-GWS コーナー札幌社製) を用い 60 分間隔での連続測定を行った。測定に使用した含水率計は電気抵抗式であり, 木材の温度による影響を受けやすいためデータの補正を行い, 木材の種類別のデータ補正も同様に行った。カビの生育状態については, 水槽から供試材を取り出し目視及びデジタルカメラで外観を観察し, 実体顕微鏡によりカビを倍率 56 倍で撮影した。測定は 2 日間隔及び 7 日間隔 (実験の後半期間) で継続的に行った。

3.2 共存状態でのカビ生育に及ぼすマイコトキシンの影響に関する基礎実験

(1) 実験方法

1) 孢子液の調整方法

a) 使用菌種とマイコトキシン

使用菌種は筆者らの既往実験で用いた菌に加えて一般環境中で検出されることの多い好湿性から好乾性までの菌を対象とした。実験に用いた菌と培地の対応を表 1 に示す。実験に *Penicillium* 属から産生される Patulin と *Fusarium* 属から産生される T-2 Toxin に加えて主要マイコトキシンを産生する菌属である *Aspergillus* 属から産生される Sterigmatocystin を使用した。

b) 孢子液の作成

斜面培地に滅菌水(ST-25PBS)を入れ、綿棒の部分で斜面培地の菌の塊を崩した後、スパイラルプレーターに菌液、培地をセットし、塗布を行った。菌の培養に PDA と DG-18 培地を使用した。塗布後は密閉し、25℃に密閉したインキュベーターで 10 日間培養した。その後、それぞれの菌液を塗布して培養した培地に界面活性剤添加生理食塩液を入れ、コンラージ棒を用いてコロニーから孢子を採取する。界面活性剤添加生理食塩液は、Tween80 (0.5ml), 塩化ナトリウム (8.5g), 精製水 (1000ml) をオートクレーブにて滅菌し、作成したものを使用した。採取した孢子をボトルへと移し、パスツールピペットを用いて界面活性剤添加物生理食塩液を入れ、攪拌機を用いて孢子液を攪拌し、均一になるようにした。その後、パスツールピペットを用いてヘモサイトメーター (血球計算盤) に滴下し、顕微鏡を用いて孢子数を計測した。なお、孢子数が多すぎた場合は、界面活性剤添加生理食塩水で希釈して混合、均一にして再度、孢子数の計測を行った。

表 1 使用した菌種と培地、培養期間

NO	菌種名	培養期間	培地
NBRC 4460	<i>Cladosporium halotolerans</i>	10日	PDA
NBRC 9252	<i>Penicillium chrysogenum</i>	10日	PDA
NBRC 5453	<i>Penicillium expansum</i>	10日	PDA
NBRC 7101	<i>Aspergillus restrictus</i>	10日	DG18
NBRC 6813	<i>Acremonium fusidioides</i>	10日	PDA
NBRC 4439	<i>Wallemia sebi</i>	10日	DG18
NBRC 6347	<i>Chaetomium globosum</i>	10日	PCA
NBRC 33018	<i>Eurotium amstelodami</i>	10日	DG18
NBRC 0908	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10日	PDA

NBRC: National Institute of Technology Evaluation

2) マイコトキシン塗布時のコロニー数測定実験

本研究では Patulin (100µg/ml) と T-2 Toxin (100µg/ml) と Sterigmatocystin (50µg/ml) のマイコトキシンの溶液を使用した。実験はスパイラルプレーター法を用いて調整した孢子液をスパイラルプレーターにて 50µl を塗布したのち、その上にさらにマイコトキシン 50µl を 2 回の計 100µl 撒いた。更にマイコトキシンを 10 倍希釈した培地、100 倍希釈した培地と陰性コントロールの培地も用意した。水分が染み込むまで正の向きで約 30 分置いた後、逆さ向きに戻して培養を開始した。培養期間 3, 5, 7, 10 日目にインキュベーターから取り出し、濃度別の成長度合いを観察した。

4. 研究成果

4.1 基材含水率とカビ増殖速度の関係に関する実験

含水率の推移を図 2 に示す。実験開始時の含水率は 23.9% で、序盤は緩やかな減少が確認された。含水率 22% あたりから減少の傾きが大きくなり、16% 付近で横ばいとなった。また、顕微鏡観察結果から求めた 3 種類カビのカビ増殖指数 MMI¹⁾ を図 3 ~ 図 5 に示す。

筆者らの既往の研究では、木材の含水率が 21% 以上の条件では、*C. cladosporioides*, *A. niger*, *P. pinophilum* が MMI 最大の 7 まで増殖できることが確認されている²⁾。本研究では、3 種類のカビが 23.5% から開始した実験では 7 まで増殖するが、20.9% から開始した実験では 6 までしか増殖しない。さらに 17.8% から開始した実験ではその増殖が確認できなかった。試験期間中水槽内の相対湿度は最初の 12 日間ほぼ 100%, その後の 1 週間 90% 以上、その後 80% 以上に維持されていることを勘案すれば、カビの増殖において相対湿度よりも、基材 (木材) の含水率が最も重要な要素となることが明らかになった。

以上の実験より下記の事柄が明らかになった。

木材含水率およそ 21% 以上で木材表面に付着したクロカビ、コウジカビ、アオカビが増殖し、含水率が高いほど増殖速度が速くなることが確認された。一方、含水率 18% 以下では何れのカビにおいてその増殖が見られなかった。

カビの増殖には相対湿度よりも、含水率が最も重要な要素となることが明らかになった。

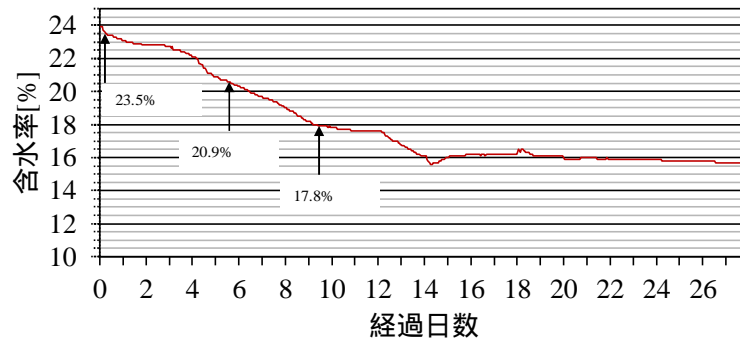


図2 含水率推移

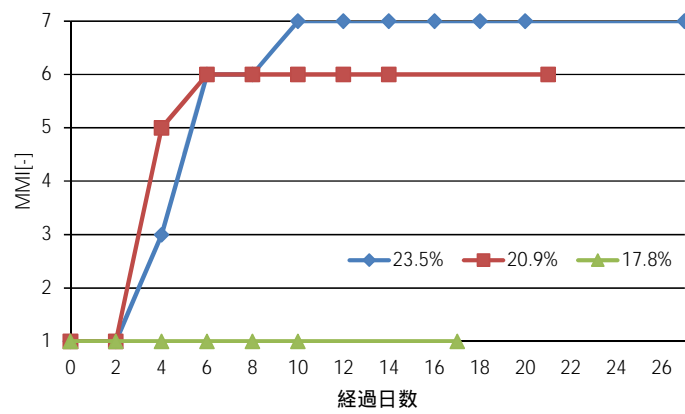


図3 木口におけるクロカビのカビ増殖指数 MMI

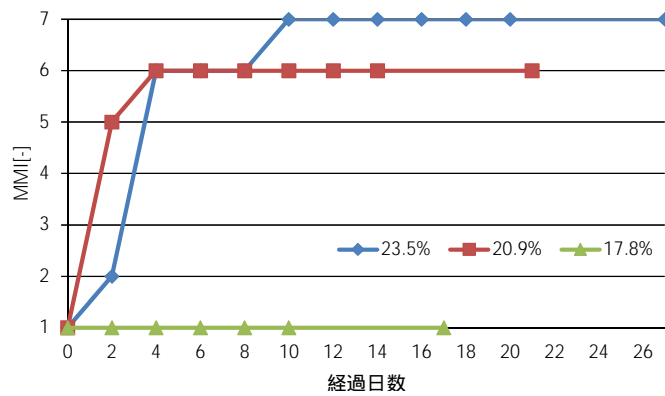


図4 木口におけるコウジカビのカビ増殖指数 MMI

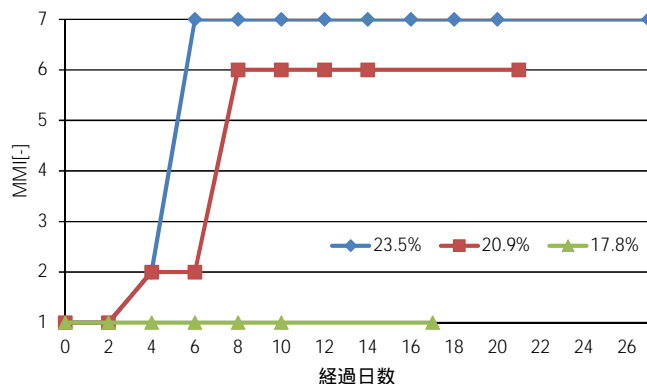


図5 木口におけるアオカビのカビ増殖指数 MMI

4.2 共存状態でのカビ生育に及ぼすマイコトキシンの影響に関する基礎実験

陰性コントロールの培地を基準にマイコトキシンの撒いた培地を比較した結果、3種のマイコトキシン溶液によって結果が異なった。その状態の一部を図6に、コロニー数と出現率を表2に示す。

種によって違いはあるが、マイコトキシンによって成長の抑制されたものは出現率が50%台を下回る減少が見られた。中でもSterigmatocystinを撒いたものはそれで真菌の成長を抑制出筆者らの既往の研究³⁾では、*Cladosporium shpaerospermu*にPatulinを撒いたものは出現率25%となっており出現率が抑制されていたが、今回の実験では91%となり出現率がさほど抑制されていなかった。*Cladsporium*属に関しては筆者らの既往の研究で使用したのは*C. shpaerospermu*であり、前回と今回の実験においても同じ*Penicillium*属に同じマイコトキシンを撒いても出現率に差が見られたので同じ*Cladsporium*属であっても種が異なったために出現率に差が出てしまったのではないかと考えられる。また前回は2種のマイコトキシン今回も*Rhodotorula mucilaginosa*のみ3種類全てのマイコトキシンによって成長が抑制されな

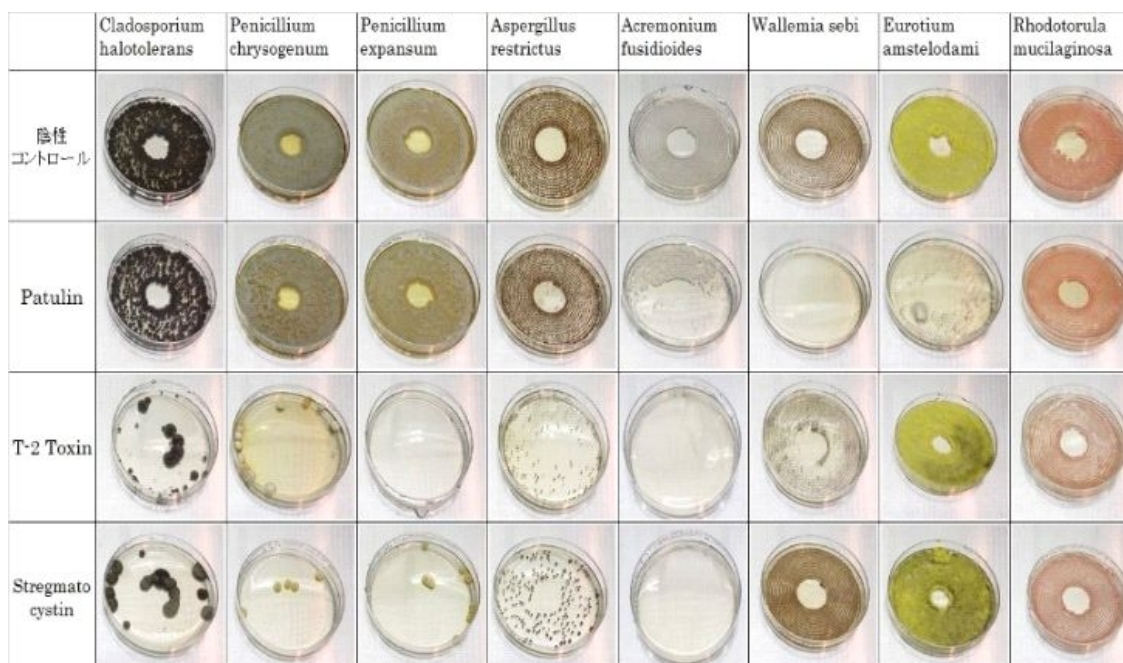


図6 マイコトキシンの成長抑制度合い(10日目)

表2 真菌のコロニー数と出現率(10日目)

コロニー数 生存率	C	P.c	P.e	As	Ac	W	E	R
陰性 コントロール	22000 100%	36000 100%	36000 100%	62000 100%	70800 100%	68400 100%	52000 100%	42560 100%
Patulin	20000 91%	22800 63%	28400 79%	59360 96%	13100 18%	0 0%	15600 30%	22960 54%
10-fold Patulin	20800 95%	27200 76%	30720 85%	60240 97%	40000 56%	49760 73%	34000 65%	39200 92%
100-fold Patulin	0 0%	27360 76%	31200 87%	61200 99%	56000 79%	60960 89%	51680 99%	0 0%
T-2 Toxin	5200 24%	280 1%	0 0%	7200 12%	0 0%	38200 56%	41200 79%	36000 85%
10-fold T-2 Toxin	22000 100%	26800 74%	27600 77%	61600 99%	58800 83%	50400 74%	40000 77%	23100 54%
100-fold T-2 Toxin	0 0%	28800 80%	26800 74%	62000 100%	59200 84%	58000 85%	50400 97%	41600 98%
Sterigmatocystin	500 2%	100 0%	180 1%	4480 7%	2400 3%	59200 87%	39200 75%	36800 86%
10-fold Sterigmatocystin	0 0%	24880 69%	26640 74%	58000 94%	53600 76%	49760 73%	38800 75%	40800 96%
100-fold Sterigmatocystin	0 0%	29600 82%	31600 88%	5800 95%	59360 84%	49760 82%	38800 81%	0 0%

C: *Cladosporium halotolerans* P.c: *Penicillium chrysogenum* P.e: *Penicillium expansum*
 As: *Aspergillus restrictus* Ac: *Acremonium fusidioides* W: *Wallemia sebi* C.g: *Chaetomium globosum*
 E: *Eurotium amstelodami* R: *Rhodotorula mucilaginosa* P: Patulin T: T-2 Toxin S: Sterigmatocystin

ったが、これは *R. mucilaginosa* が今回の実験で使用した真菌、マイコトキシンの中で一番強い優占種であるためにマイコトキシンに阻害されずに成長したと考えられる。

両方の実験において 10 倍希釈、100 倍希釈したものの成長度合いは真菌を培地に塗布しただけで他には何も撒いていないネガティブコントロール時と出現率に大きな差が出なかったことと日数が経つにつれてマイコトキシンの原液を撒いたものでも僅かながら真菌が成長している様子が確認できたことからマイコトキシンは薄まると成長抑制の度合いは弱まってしまうと考えられる。

以上の実験結果から下記の事柄が明らかになった。

Patulin, T-2 Toxin, Sterigmatocystin の 3 種類のマイコトキシンを塗布した結果、Sterigmatocystin によって成長が抑制された菌種は他の 2 種類のマイコトキシンに比べてコロニーの出現率が著しく低下することから、Sterigmatocystin により抑制できる菌種ならば Sterigmatocystin が最も成長を抑制すると考えられる。また成長抑制の度合いについては Sterigmatocystin の方が強いものの多くの菌種の増殖を抑制できたのは T-2 Toxin であった。このことから T-2 Toxin によって成長抑制される菌種が多いと考える。また *R. mucilaginosa* はこの実験で使用したマイコトキシン、菌種の中で生き残りの強い菌であると考えられる。

< 参考文献 >

- 1) 柳 宇, 鍵直樹, 大澤元毅: 木材表面におけるカビ増殖特性の評価方法, 日本建築学会環境系論文集 第 78 巻 第 689 号, pp.589-593, 2013
- 2) 柳 宇, 長谷川兼一, 鍵直樹, 東賢一, 大澤元毅: 浸水後の住宅におけるカビ増殖特性に関する実験的な研究, 空気調和・衛生工学会平成 27 年度大会, pp.93-96, 2015
- 3) 佐藤麻里奈, 柳宇, 鍵直樹: 共存状態における真菌増殖特性 に関する検討, 第 30 回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会予稿集, pp.59-61, 2013

5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

相川実穂, 鍵直樹, 柳 宇, 金 勲: 微生物から発生する揮発性有機化合物の実態と発生源調査, 第 36 回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会予稿集, pp.183-185, 2019

相川実穂, 鍵直樹, 柳 宇, 金 勲: 室内における微生物から発生する揮発性有機化合物の実態調査, 平成 30 年室内環境学会学術大会講演要旨集, YP-07, 2018

Mizuki Niimura, U Yanagi, Naoki Kagi: The Influence of Mycotoxin to Other Fungus Growth Characteristics Based on Competition Principle, the 8th International Conference on Energy and Environment of Residential Buildings, Paper No. E016, 2018

新村美月, 柳 宇, 鍵直樹: マイコトキシンと共存状態でのカビ生育に及ぼす競争原理の影響に関する基礎研究, 2018 年度日本建築学会大会学術講演梗概集, pp.899-900, 2018

新村美月, 柳 宇, 鍵直樹, 長谷川兼一, 東賢一, 金 勲, 大澤元毅: カビ増殖特性に与える木材の含水率の影響に関する検討, 日本建築学会 2017 年度大会, 2017

Yuriko Shimura, U Yanagi, Naoki Kagi, The Effect of Mycotoxin to other Fungus Growth Characteristics, Healthy Buildings 2017 Europe, Paper ID 0215 ISBN: 978-83-7947-232-1, 2017

6 . 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名: 鍵 直樹

ローマ字氏名: (KAGI NAOKI)

所属研究機関名: 東京工業大学

部局名: 環境・社会理工学院

職名: 准教授

研究者番号: 20345383