

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18526

研究課題名(和文)ニオイ物質オンサイト多点計測に基づく次世代文化財カビ汚染制御法の確立

研究課題名(英文)Development of the next-generation fungal pollution control system for cultural properties based on the smell substance on-site multi-point measurement

研究代表者

竹内 孝江(Takeuchi, Takae)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：80201606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：カビは孢子形成を介して空中に拡散し文化財表面に付着して増殖する。従来法はカビの発生を確認してからの対処法でありカビ増殖抑制の制御は難しい。本研究では、見えないところでカビが発生してもニオイであれば早期発見が可能であるとの考えから、ニオイの定点観測によりカビ生育の初期段階で揮発性有機化合物(VOC)をモニタリングすることによって文化財カビ汚染を早期に制御する方法を開発した。小型可搬型IMSを用いて環境中のVOCのIMSドリフトグラムを取得し、2012年に我々が開発したカビ種同定ソフトウェア"MVOCFinder"を用いて解析することにより、文化財環境のカビ種およびその生育段階を迅速に特定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

文化財環境において、カビは孢子形成を介して空中に拡散し文化財表面に付着して増殖する。従来法はカビの発生を確認してからの対処法でありカビ増殖抑制の制御は難しい。本研究では、見えないところでカビが発生してもニオイであれば早期発見が可能であるとの考えから、ニオイの定点観測によりカビ生育の初期段階で揮発性有機化合物(VOC)をモニタリングし、文化財カビ汚染を早期に制御する方法を開発した。小型可搬型IMSと2012年に我々が開発したカビ種同定ソフトウェア"MVOCFinder"を用いて文化財環境のVOCを解析することによりカビ種およびその生育段階を迅速に特定できた。さらにカビの二次代謝経路も報告した。

研究成果の概要(英文)：Microbial contamination often makes serious damage to cultural properties. It is imperative to develop the instrument which can detect the activation of fungi at an invisible stage before damage occurs. Software, named MVOC Finder, which was created by our group (JP2012-238876 DYNACOM Co., Ltd.; Nara Women's University), was used for fungal species identification based on multivariate statistical analysis of IMS and GC-MS spectral data of MVOC. The function of the software is to detect and identify fungal species using atmospheric samples in order to quicken the detection process. The structure of the data analysis includes partial least squares regression (PLS) analysis, evaluation of collision cross sections and validation of the analysis. The function of the software is to detect and identify fungal species using atmospheric samples, and to quicken the detection process.

研究分野：化学質量分析学 文化財環境科学

キーワード：微生物由来揮発性有機化合物 真菌 イオン移動度スペクトロメトリー MVOC カビ代謝物質 多変量解析 PLS回帰 GCMS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 文化財が微生物により損傷を受ける例が多数報告されている。キトラ古墳では、*Penicillium*属、*Fusarium*属などが発生したため、壁面に損傷を与えた[①]。カビによる損傷をできるだけ少なくするためにはカビの発生を迅速に検出する手法の開発が必要である。

(2) カビは、初期の成長段階から揮発性代謝物(MVOC)、いわゆるカビ臭を放出している。そこで、MVOCに着目し、カビのニオイ計測によりカビの種類・成長段階を予測すること、大気中で動作可能なIMS装置(Ion Mobility Spectrometer)を開発し、土壌由来カビの生活史と MVOC の関係について学術的新分野を開拓する必要があることを提案した[②]。カビ臭のイオンモビリティスペクトル(IMS)およびGCMSデータベースを構築し、カビ種同定ソフトウェアを開発した[③]。

2. 研究の目的

(1) 見えないところでカビが発生してもニオイであれば早期発見が可能であるとの考えから、ニオイの定点観測によりカビ生育の初期段階で揮発性有機化合物 (VOC) をモニタリングすることによって文化財カビ汚染を早期に制御する方法を開発することを目的とした。

(2) 小型可搬型IMSを用いて環境中のVOCのIMSドリフトグラムを取得し、2012年に我々が開発したカビ種同定ソフトウェア"MVOCFinder"[③、④]を用いて解析することにより、文化財環境のカビ種およびその生育段階を迅速に特定するシステムを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化学成分が既知の合成培地変形型Czapek-Dox寒天培地を用い、代表的な土壌由来のカビである *Penicillium paneum*、*Fusarium solani*、*Aspergillus fumigatus*および遺伝子が既知の*Aspergillus nidulans*をバイアル瓶中で培養した。培養温度は*A. fumigatus*菌株と*A. nidulans*菌株は37℃、その他の菌株は28℃、培養日数は1～10日とした。所定の培養時間が経過した後、24時間に発生したMVOCをサンプリングし、固相マイクロ抽出ヘッドスペースGCMS法によってMVOCの同定と定量を行い、カビ種、成長段階、生育環境とMVOCの関係を明らかにした。

(2) 本研究では、IMS装置としてはIUT社製IMS MINIを用いた。また、オンサイトの分析という利便性では及ばないが分子量情報や検出感度の高い分析が可能であるGCMSのデータも合わせて取得、蓄積することで、より利便性の高いデータベースを構築するように進めた。

(3) カビから放出された揮発性代謝物およびMVOC標準物質のIMS, GCMS, LCMSによる測定データ(測定条件、スペクトラム等)を代謝系遺伝子関連情報と共に、データベースに追加登録した。

4. 研究成果

(1) カビ臭のMVOC測定とデータベース構築

MVOCの種類と量の経時変化を調べた結果、カビは孢子形成時にのみカビ種に特有なセスキテルペンを発生することがわかった。また、低分子の有機酸、ケトン、アルデヒド、アルコール類のMVOC量はカビ菌株数とともに増加し、これらはどのカビ種にも共通に生成するMVOCであった[⑤]。すなわちセスキテルペンの種類によってカビ種の同定やカビの生育段階に関する情報を得る

ことができ、また3-オクタノンなどの発生量によってカビの孢子数を知ることが可能となった。文化財を守るためカビを早期に発見するには、アルコール、ケトン、アルデヒドのMVOCを検出すればよいこと、カビ種の特定にはセスキテルペンが利用できることがわかった。

(2) 解析・データベースソフトウェアの構成

開発したソフトウェアは以下の(3)~(5)の機能を持つ[③、④]。ユーザーはWEB経由ですべての機能を利用することができる。本研究において測定した多量のカビ臭データおよびカビ情報を学習させることにより、信頼性の高い文化財カビ種を特定方法を確立した。

(3) MVOCデータ (IMS、GCMS) の取込と管理用のWEBデータベース機能

MVOCデータに関しては、IMSやGCMSのクロマトグラフも登録、表示できる。また、各種VOCの標準物質の計測データも登録した。IMSのデータは、ピークを認識し、RIP (Reaction Ion Peak) を基準として相対値を求めて保存される。また、GCMSデータに関してもカラム情報を基に、リテンションタイムを標準化してデータを登録できる。未知の物質に関しては、標準物質のIMSおよびGCMSのデータを登録してあり、それらとの比較で、候補物質が表示される。

(4) IMSデータを対象にしたカビ種判定機能 (PLS回帰分析)

IMSデータからカビを判定する機能に関しては、RIPに対するMVOCの相対ドリフト時間を基に、回帰分析によって判定を行った。複数のMVOCが相関を持って変化している可能性があるため、重回帰分析では多重共線性の問題が発生する。IMSでは、装置から一定範囲のドリフト時間幅のデータが必ず計測されるため、回帰分析には多重共線性による問題を回避できるPLS (Partial Least Squares)回帰分析を用いた。GCMSによる同定についてもIMSデータでの同定方法を応用して、TIC (Total Ion Current) クロマトグラムを説明変数としたPLS解析を行った。

”MVOC Finder”を用いて、カビの未知試料のIMSデータを解析し、カビ種を推定した。判定性能の評価は、クロスバリデーションによって行い、ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) カーブを描き、AUC (Area Under the Curve) から性能を評価した。4種のカビの学習用データからPLSによる判定モデルを作り、クロスバリデーション法による評価を実施した。その結果、IMS, GCMSいずれの装置でも培養したカビの発生段階を含めて、90%の精度で判定が可能であるという結果を得ることができた。

”MVOC Finder”を使用して、未知のカビ試料のMVOCのIMSおよびGCMSデータを多変量解析したところ、90%以上の高い正答率でカビ種を特定することができた。共培養カビ種の同定については、「カビ種Aが存在するならば、Aに着目した存在判定のROC解析結果のAUCは有意な値(0.7以上)を示す」尤度評価の考え方を適用し、共培養IMSデータに対して構成カビ種と矛盾しない存在カビ種の判定結果を得た[⑧]。

(5) IMSの衝突断面積算出とIMSスペクトル理論予測機能

分子構造からIMSスペクトルを同定・予想するプログラムとアルゴリズムの開発を行った。イオン・分子間相互作用を取り入れない、剛体球近似での解析プログラムを用いて計算した結果、分子が小さくイオン・分子間相互作用が強く表れる場合、誤差が10%以上に拡大した[⑨]。そこでイオン・分子間相互作用を取り入れ、現在はトラジェクトリー (TM) 法を用いて衝突断面積を計算するように改良した。カビ代謝物データベースに統合するために、オープンソースプログラムを

用いてLinuxシステムに移植し、また、Windows用プログラムも作成した。

IMS測定は、大気中でIMS装置を使うため、水分子の影響や分子構造の完全な予測が困難であるが、構築した予測アルゴリズムを用いて、カビ代謝物の分子構造からIMSスペクトルを高精度で予測することが可能になった[⑧]。

(6) *Aspergillus nidulans*の揮発性代謝物質セスキテルペンの合成経路解明

真菌をMVOCから推定するためには、真菌の二次代謝経路の解明は重要である。一連の土壌由来真菌においてセスキテルペンが分生子生成時期にのみ検出されたことから、セスキテルペン類は、真菌増殖開始期の指標になる可能性があることを提案し、真菌*Aspergillus nidulans*のセスキテルペンの生合成経路を研究した[⑥~⑨]。土壌由来真菌のモデルである*A. nidulans*の遺伝子変異株を用いて、遺伝子発現効率がより高いと予想されるAN3280遺伝子発現誘導株を新規に作成しその代謝物質をGC/MS解析した。その結果、Farnesyl diphosphateから(+)-aristolocheneの生成過程に見られる4つの化合物を同定し、その生合成経路を解明した。

(7) IMSは大気中で測定可能であるという利便性の反面、湿度などの測定環境に測定されたIMSスペクトルが左右されるという欠点があったが、MVOC Finderを使うことによって、文化財環境のニオイ物質のIMSスペクトルからカビ種の特異性や発生量の予測が可能になった。

<引用文献>

- ① (a) 木川りか, 佐野千絵, 間淵 創, 三浦定俊, 保存科学, **44**, 165-171 (2005); (b) 木川りか, 間淵 創, 佐野千絵, 三浦定俊, 保存科学, **47**, 129-134 (2008); (c) 佐野千絵, 犬塚将英, 間淵 創, 木川りか, 吉田直人, 森井順之, 加藤雅人, 降幡順子, 石崎武志, 三浦定俊, 保存科学, **47**, 135-171 (2008).
- ② 独立行政法人科学技術振興機構 産学イノベーション加速事業【先端計測分析技術・機器開発】ソフトウェア開発「IMSによる土壌由来カビ種検出データベースの構築」(2009-2012).
- ③ 「特定カビ種存在判定システム, 特定カビ種存在判定関数取得装置, 特定カビ種存在判定装置, 特定カビ種存在判定方法、及びプログラム」, 特願2012-238876 (2012年10月30日), 特開2014-87282 (2014年5月15日).
- ④ 「IMSドリフトタイム予測装置, IMSドリフトタイム予測方法およびプログラム」, 特願2012-254179 (2012年11月20日), 特開2014-10249 (2014年6月5日).
- ⑤ T. Takeuchi, T. Kimura, H. Tanaka, S. Kaneko, S. Ichii, M. Kiuchi and T. Suzuki, *Surf. Interface Anal.*, **44**, 694-698 (2012).
- ⑥ T. Takeuchi, S. Tsuru, T. Kimura, T. Suzuki, Y. Kiuchi, B. R. Oakley, T. Akashi, the 61st Annual Conference on Mass Spectrometry, Tsukuba, 3C-O3-1010 (2013).
- ⑦ 竹内孝江, 加太千晶, 紅朋浩, 第67回質量分析総合討論会(2019).
- ⑧ 竹内孝江, 「ニオイで菌を探る: 文化財環境における真菌検出システムの開発と学術展開」 センシング技術応用研究会 第213回研究例会(2020).
- ⑨ 服部真理子, 紅朋浩, 竹内孝江, 第69回質量分析総合討論会(2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Basher Abdulrahman H., Krstic Marjan, Takeuchi Takae, Isobe Michiro, Ito Tomoko, Kiuchi Masato, Karahashi Kazuhiro, Wenzel Wolfgang, Hamaguchi Satoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Stability of hexafluoroacetylacetone molecules on metallic and oxidized nickel surfaces in atomic-layer-etching processes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Vacuum Science & Technology A	6. 最初と最後の頁 022610 ~ 022610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1116/1.5127532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takae Takeuchi, Kana Nakamura, Abdulrahman H Basher, Tomoko Ito, Kazuhiro Karahashi, Satoshi Hamaguchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Quantum mechanical study on reaction mechanisms of gaseous pentane-2,4-dione and (Z)-4-hydroxypent-3-en-2-one on Ni surfaces and NiO surfaces	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the 12th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices 12	6. 最初と最後の頁 652-653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshimura Satoru, Sugimoto Satoshi, Takeuchi Takae, Murai Kensuke, Kiuchi Masato	4. 巻 685
2. 論文標題 Effects of injected ion energy on silicon carbide film formation by low-energy SiCH ₃ ⁺ beam irradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thin Solid Films	6. 最初と最後の頁 408 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tsf.2019.06.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takae Takeuchi, Yuri Tanaka, Tohru Yamagaki, and Motoshi Sakakura	4. 巻 11
2. 論文標題 Ambient Mass Spectrometry for Monitoring Microbial Volatile Metabolites from Soil-derived Fungi Using a DART Ion Source	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Proceedings of the 11th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '17	6. 最初と最後の頁 199-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoru Yoshimura, Satoshi Sugimoto, Takae Takeuchi, Kensuke Murai, Masato Kiuchi	4. 巻 430
2. 論文標題 Identification of fragment ions produced from hexamethyldisilazane and production of low-energy mass-selected fragment ion beam	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nimb.2018.05.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takae Takeuchi, A. James McQuillan, Alexander Shard, Andrea E. Russell, D. Brynn Hibbert	4. 巻 92
2. 論文標題 Glossary of methods and terms used in surface chemical analysis (IUPAC Recommendations 2020)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pure and Applied Chemistry	6. 最初と最後の頁 1781-1860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/pac-2019-0404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 竹内孝江
2. 発表標題 ニオイで菌を探る：文化財環境における真菌検出システムの開発と学術展開
3. 学会等名 センシング技術応用研究会第213回研究例会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部真理子, 紅朋浩, 竹内孝江
2. 発表標題 セスキテルペン合成経路解明のためのAspergillus nidulansの揮発性代謝物質の質量分析 VIII. AN3280 遺伝子発現誘導株：L08925株および L08910HA-pyrG2株
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大城明佳, 竹内孝江
2. 発表標題 微生物由来揮発性有機化合物 (MVOC) のイオン移動度およびGCMSデータの多変量解析による生育早期の土壌由来カビ種の同定I
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市村文, 竹内孝江
2. 発表標題 エレクトロスプレーイオン化、化学イオン化および電子イオン化質量分析法によるCo(acac) ₂ , Co(hfac) ₂ , Ni(acac) ₂ および Ni(hfac) ₂ からの気相イオンの生成
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村賀美, 竹内孝江
2. 発表標題 免疫グロブリンFc 領域糖ペプチドイオンの分子構造と衝突断面積に関する理論的研究1. 糖修飾、水酸基および電荷の効果の影響
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Motoyama, Keishi Kihara, Takae Takeuchi
2. 発表標題 Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Imaging (DESI-MSI) applied to the Research and Development
3. 学会等名 The 22nd International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takae Takeuchi, Yuki Kobayashi, Keishi Kihara, Akira Motoyama
2. 発表標題 Ab Initio Study of Reaction Mechanisms for E-Z Isomerization and H ₂ O Elimination in Urocanic Acids with Ion Mobility Mass Spectrometry
3. 学会等名 47th IUPAC World Chemistry Congress, Paris (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内孝江, 加太千晶, 紅朋浩
2. 発表標題 セスキテルベン生合成経路解明のためのAspergillus nidulans変異株の揮発性二次代謝物質の質量分析
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村賀美, 竹内孝江
2. 発表標題 Ab initio計算とイオン移動度質量分析法による糖ペプチドイオンの分子構造解析
3. 学会等名 第8回イオン移動度研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村賀美, 竹内孝江
2. 発表標題 Ab initio DFTとイオン移動度質量分析法による糖ペプチドイオンの分子構造解析
3. 学会等名 第8回イオン移動度研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠本 実里、山垣 亮、竹内 孝江
2. 発表標題 4'-Galloyl paeoniflorinのナトリウムイオン付加分子のフラグメンテーション反応経路に関する量子化学的研究
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会(2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村花菜, Abdulrahman H. Basher, 伊藤智子, 唐橋一浩, 浜口智志, 竹内孝江
2. 発表標題 アセチルアセトンとニッケル表面および酸化ニッケル表面との表面反応機構の研究
3. 学会等名 2018年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内孝江、小林優希、木原圭史、本山晃
2. 発表標題 イオンモビリティ質量分析計を用いたシス-トランス異性体の構造と異性化反応機構に関する量子化学的研究
3. 学会等名 第66回質量分析総合討論会(2018)/日本プロテオーム学会2018年大会(合同大会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://researchmap.jp/read0015361>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------