

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500988

研究課題名（和文） 真菌の分泌物質を大気中で検出するための可搬型イオンモビリティ分析法の開発

研究課題名（英文） Development of methods for analyzing fungal metabolites by using a portable ion mobility spectrometer under atmospheric pressure

研究代表者

竹内 孝江（TAKEUCHI TAKAE）

奈良女子大学・理学部・准教授

研究者番号：80201606

研究成果の概要（和文）：文化財保存等においてカビによる損傷が問題となっている。本研究では、イオンモビリティスペクトロメトリーによるポータブルで簡易なカビ臭検出システムを開発するため、(1)固相マイクロ抽出法を応用したカビ臭（MVOC）のサンプリングと濃縮システムを試作し、カビ臭検出に必要な濃度の試料濃縮が可能にした。さらに(2)カビ種に特有のカビ臭物質を同定し、これを利用して IMS ソフトウェアを作成し、90%以上の正答率でカビ種を同定できた。

研究成果の概要（英文）：Fungal odor analysis in early growth stages is important for the conservation of cultural properties. The analytical methods for detecting fungal species and the stage of growth were developed using a distinctive fungal odor [Takeuchi et al, Surf. Interface Anal., 44(6), 694-698 (2012)]. Microbial volatile organic compounds were extracted by solid space microextraction, followed by GC/MS analysis. While the fungi were growing, the amount of alcohols, ketones and aldehydes as MVOCs emitted increased. The detection of sesquiterpenes was useful for determining fungal species. The prototype of solid-phase microextraction inlet system available in an ion mobility spectrometer (IMS) was manufactured. Software programs were also made for identifying fungal species by IMS spectra analysis of the odor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学質量分析学

科研費の分科・細目：文化財科学・文化財科学

キーワード：カビ臭、固相マイクロ抽出、GCMS、文化財、環境保全技術、

イオンモビリティスペクトロメトリー、MVOC、微生物由来揮発性有機化合物

1. 研究開始当初の背景

文化財がカビ（真菌）によって損傷を受ける報告が多数行われている。高松塚古墳やキトラ古墳など、土壌由来真菌による損傷だけ

でなく、博物館などにおいて収蔵品がカビによる損傷を受ける場合もある。キトラ古墳では、*Penicillium* 属、*Fusarium* 属などが発生したため、壁画に損傷を与えている[1]~[4]。

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。

カビは、まず孢子が発芽し、菌子体が成長、成熟して、孢子を形成するまでが生活史である。このうち通常、菌子体は無色あるいは白色で目視での確認は困難であることが多い。目視で確認できるのは孢子後であり、発芽後、5日程度以上経過している。

損傷を受ける前に検出する方法はないか、と考え、カビ臭による検出を目指して、分析手法、解析ソフトウェアの開発を行った。

カビの成長に伴い、代謝や分解酵素により排出される揮発性有機化合物は、微生物由来揮発性有機化合物 (MVOC) と呼ばれ、真菌類を検出する指標として研究が行われている [5]。MVOC は、拡散しやすいため、空気環境測定で検出が可能であり、目に見えない箇所での発生を感知することが期待できる [6]。また、発芽後 2 日程度でも MVOC を発散するため、早期発見が期待できる。

一般にカビ臭として認識されているものとして、上水道における 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 及びジェオスミンが挙げられる。また穀物取引における真菌汚染の問題があり、これらの検出では人の嗅覚による検出が実施されている [7]、[8]。ニオイ物質は非常に希薄であり、ppb あるいは ppt レベルでの評価が必要であるため、官能試験が採用されている。ppm レベルでの評価で十分である大気汚染 (SOx や NOx) の評価には半導体検出器によるセンサーなどを利用できたが、ニオイ物質ははるかに希薄で、ppb あるいは ppt レベルから濃縮する前処理が必要である。MVOC を濃縮・抽出する手法としては、多孔質ポリマー (Tenax GC or Chromosorb 102) に吸着させ、有機溶媒や加熱により分離させる手法などがある。また、ヘッドスペース固相マイクロ抽出法 (HS-SPME 法) による MVOC の濃縮・抽出法が利用されている [9]。ニホンコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) など、有用な真菌については種々の研究が行われゲノム解析も行われている。しかし、文化財に影響を与える真菌は土壌由来であって、有用性に乏しく、研究例は少ない。

- [1] 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 (2008).
- [2] 木川りか, 佐野千絵, 喜友名朝彦, 立里臨, 杉山純多, 高島浩介, 久米田裕子, 森井順之, 早川典子, 川野辺渉, 保存科学 49, 253 (2010).
- [3] 木川りか, 佐野千絵, 間淵創, 三浦定俊, 保存科学 44, 165 (2005).
- [4] 木川りか, 間淵創, 佐野千絵, 三浦定俊, 保存科学 45, 93 (2006).

- [5] Schwadorf, K., Muller, H-M., *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **72**, 457 (1989).
- [6] Moularat, S., Robine, E., Ramalho, O., Oturan, A. M., *Chemosphere*, **72**, 224 (2008).
- [7] Smith, E. A., Chambers, E., Colley, S., *Foods World*, **39**, 495 (1994).
- [8] Borjesson, T., Eklov, T., Jonsson, A., Sundgren, H., Schnurer, J., *Cereal Chem.*, **73**, 457 (1996).
- [9] Walinder, R., Ernstgard, L., Johanson, G., Norbak, D., Venge, P., Vieslandea, G., *Environ. Health Perspect*, **113**, 12, 1775, (2005).

2. 研究の目的

古墳など、一般環境中にある文化財は、カビの繁殖による損傷などのおそれがある。遺跡にある文化財の損傷を防ぐためには、カビが繁殖すると直ちに対策を講じる必要がある。本課題研究においては、カビが発生するニオイ物質に着目した。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り、有効であると考えている。

本研究の最終目標は、ニオイの定点観測を行い、検出されたニオイからカビ発生 of 診断を行い、発生したカビの予測と警報を発するシステムの構築である。このようなシステムはいまだに開発されていない。

3. 研究の方法

(1) カビの培養方法

真菌の MVOC は培養条件に依存する。成分が既知であり、古墳などの土壌と類似した貧栄養培地である変形型 Czapek-Dox 寒天培地を用いた。この培地は一般的に用いられている Czapek-Dox 寒天培地 ([10],[11]) とは異なり、クエン酸ナトリウムが添加され、スクロースに変えてグルコースを用いていた。

培養したカビは、*Penicillium paneum* (KT138 株)、*Fusarium solani* (NBRC31093 株)、*Aspergillus fumigatus* (KT176 株、IFM40822 株) および *Aspergillus nidulans* (FGSC4 株) である。培養のための容器は 20 mL スクリューキャップ付きバイアル瓶を用いた。これに変形型 Czapek-Dox 寒天培地 2 mL を流しいれ、孢子の数を調整した孢子懸濁液を 2 μ L ずつ、中央部に接種した。調整した試料は、ゴミが入らないように、また、成長に必要な酸素が拡散により供給できるよう、アルミホイルで蓋をして培養した。培養温度は、*A. fumigatus* 菌株と *A. nidulans* 菌株は 37°C、その他の菌株は 28°C とした。培養日数は 1 日から 10 日とした。

バイアル瓶には、培養中に発生した MVOC が充満しているため、所定の培養時間が経過したのち、バイアル瓶の空気を入れ替えてか

らスクリーキャップを閉じ、その後 24 時間に発生した MVOC をサンプリングした。バイアル瓶は測定の前日に 65°C で 15 分間加熱し殺菌した。コントロール用にカビを接種しない培地だけのバイアル瓶も用意し、VOC をサンプリングして比較対象とした。培養日数が 1 日目から 10 日目まで揃えて測定を行った。

(2) MVOC の分析方法 (極微量の分析技術)

培養したカビサンプルからニオイ物質を分析するために、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) を用いた。装置としては島津製作所製 QP-2010 を用いた。GC/MS においては、気体のニオイ物質を濃縮するための前処理として固相マイクロ抽出法 (solid-phase microextraction, SPME) を利用した。SPME 法[12]は、固相または液相を塗布した細い針 (SPME ファイバー) に試料の化学物質を吸着させ、その後、針を GC の注入口に挿入して化学物質の加熱脱着により抽出する方法である。これにより希薄な MVOC を濃縮することができる。カビを培養して MVOC を充満させたバイアル瓶の中に SPME ファイバーを挿入し、上部気相 (ヘッドスペース) の MVOC を吸着させて濃縮を行った。SPME ファイバーとしては、Sigma-Aldrich 社 SUPELCO 製 divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (膜厚 50/30 μm)、PDMS/DVB (膜厚 65 μm)、Carboxen/PDMS (膜厚 75 μm) を用いた。

バイアル瓶を 80°C で 10 分間加熱し、バイアル瓶の中で MVOC を拡散させた。そのバイアル瓶に SPME ファイバーを挿入し 80°C で 15 分間保持することにより MVOC を濃縮した。SPME ファイバーをバイアル瓶から引き抜き、GC の注入口に挿入し、GC/MS 測定を行った。

GC の注入口の温度は 200°C に設定した。

(3) 極微量のニオイ分子捕集技術開発

数 ppb~ppt オーダーのカビ臭分子 MVOC を IMS で検出するための、固相マイクロ抽出カビ臭濃縮部を製作し、その性能を検討した。分子量が 60 から 200 程度の MVOC に対しては、固相吸着物質としてはポリジメチルシロキサン (PDMS) が適する。そこで、128 mm の塗布部分をもつタングステンフィラメントに、ヘキササンに溶かした PDMS (モメンティブ社、TSE200) を塗布後、X 線 (Cu ターゲット封入管、15kV、15mA、フィルター無し、試料との距離 30cm、照射時間 30 分) を照射、重合して、SPME カビ臭濃縮ファイバーを製作した。製作した SPME 濃縮ファイバーは、1.2W の直流通電により、200°C まで加熱可能で、繰り返し使用可能であった。

(4) カビ臭のデータベース作成

4 種のカビ (*Aspergillus fumigatus* KT176 株、*Aspergillus nidulans* FGSC4 株、*Fusarium solani* MBRC31093 株、*Penicillium paneum* KT138 株) の MVOC の IMS および GC/MS データベースを構築した。

(5) IMS のソフトウェアプログラムの作成

上述の 4 種のカビの MVOC の GC/MS および IMS スペクトルデータからカビ種を特定するためのアルゴリズムを検討した。

[10] Czapek, *Beitr. Chem. Physiol. Pathol.*, 1, 40, 1902-1903.

[11] Dox, *U. S. Dept. Agr. Bur. Anim. Ind. Bull.*, 120, 70 (1910).

[12] Arthur, C. L., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* 62, 2145, (1990).

4. 研究成果[13]

培養日数 1 日目から 10 日目までの *F. solani* の MVOC について、測定された全イオン電流クロマトグラム (TIC) を比較した。また、8 種の化合物が MVOC として測定された。アルコール、アルデヒド、ケトン、セスキテルペン、エステル、芳香族化合物など、23 種の MVOC がこれらの 4 種 5 株のカビ (*A. fumigatus*, *A. nidulans*, *F. solani* および *P. paneum*) から検出された。このなかで、アルコール、アルデヒド、ケトンに属する化合物は、ほとんどすべてのカビ種に検出され、真菌に普遍的な MVOC であると言える。これに対して、セスキテルペンは、カビ種に依存した代謝が見られる。すなわち、 β -cis-Bergamotene と β -Bisabolene は *A. fumigatus* から代謝され、 α -Farnesene は *A. nidulans* から代謝されることがわかった。さらに β -Caryophyllene は *P. paneum* から代謝されることがわかった[13]。したがって、セスキテルペンの種類によってカビ種の特定を行える可能性がある。

試料の MVOC は、質量分析計のイオン化室でイオン化して分解し、フラグメントイオンとなって検出される。各 MVOC から得られる特徴的フラグメントイオンの量と、培養時間との関係を検討した。

A. nidulans の代謝物である 1-Octen-3-ol (アルコール) から生成されるフラグメントイオンのうち最も強度が大きく基準ピークとして観測された m/z 57 イオンは、培養時間が 100 時間程度まではほとんど検出されていないが 150 時間程度から増え始め、200 時間を超えるとかなり増大することがわかった。*P. paneum* の代謝物である Benzaldehyde (アルデヒド) から生成される分子イオン (m/z 106) の検出量および *P. paneum* の代謝物である 2-Undecanone (ケトン) から生成されるフラグメントイオンのうち基準ピークとして観測された m/z 58 イオンの検出量

は共に成長初期段階から徐々に代謝され単調に増加していることがわかった。MVOCとして同定されたこれら以外のアルコール、アルデヒド、ケトンも同様に、培養時間の増加とともに代謝量が増えることがわかった。これらのMVOCは培養時間の増加および孢子の量の増加とともに代謝量が増えることがわかった[13]。

A. nidulans の代謝物である α -Farnesene から生成されるフラグメントイオンのうち特徴的な m/z 123 イオンの検出量、*A. fumigatus* の代謝物である β -Bergamotene から生成されるフラグメントイオンのうち基準ピークとして観測された m/z 119 イオンの検出量、および、*P. paneum* の代謝物である β -Caryophyllene から生成されるフラグメントイオンのうち特徴的な m/z 133 イオンの検出量が培養時間とともにどのように変化するか検討した。その結果、これらのセスキテルペン類の生成は培養時間に対してピークを持っていた。この培養時間のピークは孢子形成時期と一致していた。したがって孢子形成に関連する代謝に関連していると考えることができ、セスキテルペンがカビ種の特定に利用できることと合わせ、カビの生態にとって重要な働きをしていると考えられた[13]。

以上より、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、そのためには、極微量のMVOCを測定するため、濃縮プロセスが必要であることがわかった。また、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。これらの知見に基づき、GC/MSにより測定されたMVOCのマススペクトルから、多変量解析を用いてカビ種の同定を行うソフトウェアの開発を行った。また、大気圧での測定が可能であるイオンモビリティスペクトル分析法のスペクトルからもカビ種の同定が行えるよう、データベース化・ソフトウェア開発を行った。これに関しては、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】ソフトウェア開発タイプ（平成21～23年度）（チームリーダー奈良女子大学竹内孝江）と連携して行った。参画機関である株式会社ダイナコム、東邦大学 菅井俊樹准教授、名古屋大学 紅朋浩助教の連携協力に感謝する。

IMS装置は、元々テロ対策として開発され、常温常圧下で利用出来るガス分析装置であるため小型化でき、またガスの検出感度が高い特徴を持っているが、テロなどの目的で利用される場合はサンプル中に含まれる成分の数は一つであることが多く、事実、製品では、得られた単一ピークの成分の可能性を示すソフトウェアが付属されている程度である。カビのMVOCでは、多成分のガスを検出、

同定することが必要である。市販のIMS-MINI(ドイツIUT社製)を用いて、洞窟や文化財などで多く発生する4種のカビから放出されたMVOCのIMS計測データからカビ種を同定する方法を開発した。その結果、90%以上の正答率でカビ種を同定できた。

カビの生活史におけるMVOCの働きの解明にも取り組んでおり、文化財保全へ貢献できるよう努力しているところである。

[13] Takeuchi, T., Kimura, T., Tanaka, H., Kaneko, S., Ichii, S., Kiuchi, M., Suzuki, T., *Surf. Interface Anal.*, **44**, 694-698, (2012).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Takae Takeuchi, Tomoko Kimura, Haruna Tanaka, Sachiyo Kaneko, Shoko Ichii, Masato Kiuchi and Takahito Suzuki, "Analysis of volatile metabolites emitted by soil-derived fungi using head space solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry: I. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani* and *Penicillium paneum*", 査読有, *Surf. Interface Anal.* **44**(6), 694-698 (2012), DOI 10.1002/sia.4870
- ② T. Takeuchi, M. Kiuchi and T. Suzuki, "Fungal Odor Analysis for Conservation of Cultural Properties", 査読無, *J. Japan Association on Odor Environment*, **43**(3), 2012.
- ③ J. Ohshita, Y. Hatanaka, S. Matsui, T. Mizumo, Y. Kunugi, Y. Honsho, A.i Saeki, S. Seki, J. Tibbelin, H. Ottosson and T. Takeuchi, "Effects of the silicon core structures on the hole mobility of star-shaped oligothiophenes", 査読有, *Dalton Transactions.*, **39**, 9314-9320 (2010), DOI: 10.1039/C0DT00224K.
- ④ M. Tajiri, T. Takeuchi and Y. Wada, "Distinct features of matrix-assisted 6 μ m infrared laser desorption/ionization mass spectrometry in biomolecular analysis", 査読有, *Anal. Chem.*, **81**(16), 6750-6755 (2009), DOI: 10.1021/ac900695q.

[学会発表] (計14件)

- ① Takae Takeuchi, Tomoko Kimura, Shoko Ichii, Masato Kiuchi, Sachiyo Kaneko and Takahito Suzuki, "The Effect of Incubation Temperature on Microbial Volatile Organic Compounds Emitted by *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium paneum*", 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Vancouver (Canada), 2012

- 年5月21日.
- ② 櫛彰子, 木村知子, 大岩さゆり, 鈴木孝仁, 木内葉子, 竹内孝江, 「イオンモビリティースペクトロメトリーと質量分析法による土壌由来カビ代謝物の分析」, 日本化学会第92春季年会, 横浜, 2012年3月26日.
- ③ 竹内孝江, 櫛彰子, 中村義隆, 紅朋浩, 菅井俊樹, 本城国明, 岩松雅子, 木内正人, 「簡易な検出器でカビ臭を解析 カビ種と生育状況を推測するソフトウェアを開発—IMSによる土壌由来カビ検出データベースの構築—」, 次世代ナノテクノロジーラム2012, 大阪, 2012年2月9日.
- ④ 竹内孝江, **招待講演** 「MS フラグメンテーションの基礎理論—準平衡理論(QET)—」, 第3回LC/MSワークショップ, 掛川, 2011年10月27日.
- ⑤ 竹内孝江, 本城国明, 岩松雅子, 櫛彰子, 「ポリジメチルシロキサンを用いたカビ臭物質濃縮のための固相マイクロ抽出プローブの開発—IMSによる文化財環境モニターへの適用—」, 第15回ケイ素化学協会シンポジウム, 須磨, 2011年10月21日.
- ⑥ 櫛彰子, 菅井俊樹, 木村知子, 田中春菜, 金子幸代, 木内正人, 鈴木孝仁, 竹内孝江, 「イオンモビリティースペクトロメトリーと質量分析法による土壌由来カビ *Aspergillus nidulans* の揮発性代謝物の同定」, 第59回質量分析総合討論会(2011), 大阪, 2011年9月15日.
- ⑦ Sachiyo Kaneko, Haruna Tanaka, Tomoko, Kimura, Takae Takeuchi, Masato Kiuchi, Shin-ichi Iwaguchi, Koji Yokoyama, Takahito Suzuki, “Physiological activity of microbial volatile organic compounds (MVOCs) as a growth regulator in the soil-derived fungal organisms”, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, 2011年9月9日.
- ⑧ 竹内孝江, **招待講演** 「微生物由来揮発性有機化合物の測定法」, JAIMA コンファレンス・室内環境学会主催講演会「諸環境の室内空気質とその測定法」, 幕張, 2011年9月8日.
- ⑨ T. Takeuchi, T. Kimura, H. Tanaka, S. Kaneko, S. Ichii, M. Kiuchi and T. Suzuki, “Analysis of Volatile Metabolites Emitted by Soil Fungi Using Head Space Solid-Phase Micro-extraction GC/MS and Ion Mobility Spectrometry”, 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver (USA), 2011年6月6日.
- ⑩ T. Takeuchi, H. Tanaka, T. Kimura, S. Ichii, M. Iwamatsu, S. Kaneko, M. Kiuchi and T. Suzuki, “Characterization of the Soil-Derived

Fungi Based on Mass Spectrometric Analysis of Their Microbial Volatile Organic Compounds”, 11th International Symposium on Atom Level Characterization for New Materials and Devices '11 (ALC'11), Seoul (Korea), 2011年5月23日.

- ⑪ 田中春菜, 木村知子, 金子幸代, 鈴木孝仁, 竹内孝江, 「微生物由来揮発性有機化合物の固相マイクロ抽出ガスクロマトグラフィー質量分析による真菌類のキャラクタリゼーション」, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月. ※地震のため講演はされなかったが, 主催者である(社)日本化学会は講演要旨集の発行をもって発表済みであると宣言した.
- ⑫ 金子幸代, 田中春菜, 竹内孝江, 木内正人, 岩口伸一, 鈴木孝仁, 「カビの他感作用物質としての2-pentadecanone」, 日本植物学会第74回大会, 愛知, 2010年9月9日.
- ⑬ 竹内孝江, **招待講演** 「マススペクトロメトリーにおける気相イオン化学と反応ダイナミクス」, 原子衝突研究協会第35回年会, 奈良, 2010年8月9日.
- ⑭ 竹内孝江, **招待講演** 「文化財環境モニターのための小型臭気センサーの開発」, 日本化学会第90春季年会, 大阪, 2010年3月29日.

[図書] (計1件)

- ① S. Kaneko, H. Tanaka, T. Kimura, T. Takeuchi, M. Kiuchi, S. Iwaguchi, K. Yokoyama and T. Suzuki, "Microbial volatile organic compounds (MVOCs) and their presumed physiological role for growth regulation in the soil-derived fungal organisms", *Proceedings of JSPS-IIAS Joint International Symposium on Conservation Technology for Cultural Heritage*, International Institute for Advanced Studies, Kyoto, pp.46-51(2009).

[その他]

ホームページ等
<http://koto10.nara-wu.ac.jp/Profiles/5/0000420/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 孝江 (TAKEUCHI TAKAE)
奈良女子大学・理学部・准教授
研究者番号: 80201606

(3) 連携研究者

木内 正人 (KIUCHI MASATO)
独立行政法人産業技術総合研究所・ユビキタスエネルギー研究部門・主任研究員
研究者番号: 50356862