

極低濃度二酸化塩素ガスによる真菌 *Alternaria alternata* の菌糸成長抑制

森野博文,* 松原あかね, 福田俊昭, 柴田 高

Inhibition of Hyphal Growth of the Fungus *Alternaria alternata* by Chlorine Dioxide Gas at Very Low ConcentrationsHirofumi MORINO,* Akane MATSUBARA, Toshiaki FUKUDA, and Takashi SHIBATA
Taiko Pharmaceutical Co., Ltd., 3-34-14 Uchihonmachi, Suita City 564-0032, Japan

(Received October 10, 2006; Accepted January 6, 2007)

The efficacy of chlorine dioxide (ClO_2) gas at very low concentrations for hyphal growth of *Alternaria alternata* related to fungal allergy was evaluated using a fungus detector. The fungus detector is a plastic sheet with a drop of spore-suspending medium, and it makes possible clear observations of hyphal growth with a light microscope. ClO_2 gas (average 0.075 ppm, 0.21 $\mu\text{g}/\text{l}$) inhibited hyphal growth of the fungus, but not germination of fungal spores. The hyphal length was more than 1780 μm under air conditions (control) and $49 \pm 17 \mu\text{m}$ under ClO_2 gas conditions for 72 h. According to the international chemical safety card, threshold limit values for ClO_2 gas are 0.1 ppm as an 8-h time-weight average and 0.3 ppm as a 15 min short-term exposure limit. From these data, we propose that treatment with ClO_2 gas at very low concentrations in space is a useful tool for the growth inhibition of fungi in the fields of food, medicine, etc. without adverse effects.

Key words—chlorine dioxide; gas; fungus; mold; hypha; mycelium

緒 言

近年の空調設備の発達には快適な空間を提供する一方で、微生物である真菌類に対しても非常に好都合な環境を生み出している。多くの真菌類が気管支喘息、アレルギー性鼻炎に代表される真菌アレルギー症を引き起こすことで知られており、¹⁾ また食品、医薬品など製品への真菌類の混入は企業にとって致命的となる恐れがある。これら多くの問題があるにも係わらず、小さな空調機器でさえその内部は真菌類の温床となっていることが珍しくない。²⁾ まして空港、工場、病院などの大型施設にもなればその空調設備は大型となり、しかも多くの場合長大で複雑なダクト構造を持つためより深刻となり易い。³⁾ このような大型施設の空調設備には通常の液状消毒剤や防かび剤での対応には限界があり、新しい有効な対応策が必要である。

二酸化塩素 (ClO_2 , CAS No: 10049-04-4) は常温で黄色の気体として存在し、水溶性の強力な酸化剤

である。⁴⁾ 欧米においては発ガン物質のトリハロメタンを生成し難いことから次亜塩素酸ナトリウムの代わりに水道水の消毒に用いられている。⁵⁾ 水道水への利用は溶液状の二酸化塩素の研究を促し、既に多くの知見が報告されている。⁶⁻⁸⁾ 一方ガス状の二酸化塩素の知見はラットに対する毒性試験、作業環境中での許容濃度の知見 (0.1 ppm as an 8-h time-weight average, 0.3 ppm as a 15-min short-term exposure limit) など安全性に関する知見が多く、⁷⁾ 有効性に関する知見は非常に限られたものであった。最近クラドスポリウム、ペニシリウムなどの真菌類あるいはサルモネラ、病原性大腸菌などの細菌類に対する二酸化塩素ガスの有効性が報告されている。⁹⁻¹²⁾ しかしながら、これらの報告は閉鎖空間内を想定した燻蒸、あるいは野菜や果物の消毒のモデル実験であるため、ガスに対するヒトへの安全性は考慮されておらず、100—3500 ppm の非常に高濃度なガスが使われている。現在のところ真菌類に対して極低濃度な二酸化塩素ガスの有効性を検討した報告は見当たらない。無害と考えられる濃度域での真菌類に対する有効性が分かれば真菌アレルギー症対

大幸薬品㈱

*e-mail: morino@seiorgan.co.jp

策として、またカビの増殖が有害となるような食品、医療分野を筆頭に空調設備を持つあらゆる分野において、安全性の高い真菌類の増殖抑制手段として応用できる可能性がある。

カビの成長に対する極低濃度なガス状物質の抑制効果を評価するには、菌糸の成長が感度よく明瞭に判定でき、また得られた結果からカビの発育環境そのものを評価できることが望ましい。従来から知られているカビの抵抗性試験はコーティング剤を含む工業製品、工業材料のカビに対する抵抗性の試験方法であって、試験ガスを含む環境自体の評価方法ではない。¹³⁾ これに対してカビの発育環境それ自体の評価方法が報告されている。¹⁴⁻¹⁶⁾ この評価方法で用いられているカビセンサーは迅速で感度がよく、しかも定量的な測定が可能である。今回、われわれは真菌アレルギー症の原因菌として知られているアルテルナリアのカビセンサーを用いたカビの発育環境モデルを構築して、0.1 ppm 以下の極めて低濃度な二酸化塩素ガスの有効性を検討したので報告する。

材料及び方法

1. カビセンサー 室内環境評価用の小型カビセンサー (13 mm×20 mm, *Alternaria alternata* S-78) を環境生物学研究所より入手した。このカビセンサーは透明なプラスチックの板にカビの胞子と少量の栄養源がスポットされており、センサーに用いられている評価菌は発芽率が高く、菌糸伸長速度が速く、顕微鏡下で菌糸が明瞭にみえる特徴を持つ。¹⁴⁾

2. ClO₂ ガス濃度の測定 二酸化塩素ガス濃度は二酸化塩素ガス測定器 (0-1000 ppb, Model 4330-SP, Interscan corporation) を用いて測定した。標準二酸化塩素ガスが市販されていないため、測定器の検定は以下の方法で行った。

理論上の二酸化塩素ガス濃度が 0.2 ppm になるように、遮光された 5 l のテドラーバック (Tedlar polyvinyl fluoride film, DuPont) に必要量の二酸化塩素水溶液を注入し、25°C で 30 分間気化させた。次に二酸化塩素ガス測定器を用いて、テドラーバック内のガス濃度を測定した。このときの実測値は 0.16 ppm であり、理論値 0.2 ppm に対して 80% であった。理論上必要な二酸化塩素水溶液の量は、ガス濃度 1 ppm = 2.8 μg/l, ClO₂ 分子量 = 67.45, ε = 1130 M⁻¹ cm⁻¹ ¹⁷⁾ から求めた。

3. 湿度調節用寒天ゲルの準備 カビの成長には高湿度環境が欠かせないため、カビセンサー近傍の湿度調節用として、カビセンサーを入れるための穴を持つ寒天ゲルを準備した。湿度センサーを用いて湿度調節用寒天ゲルの穴の中を測定し、相対湿度が 90% 以上であることを確かめた。

4. モデル環境 (Fig. 1) 25°C に保たれた暗室に 100 l のテドラーバックを設置し、この中に湿度調節用寒天ゲルとその寒天に設けられた穴底にカビセンサーを置いた。モデル環境内はマグネチックスターラーを用いてガラス製フラットシャーレ (外径 70 mm×高さ 17 mm) 上に置かれたクロス十字回転子 (外径 60 mm×高さ 20 mm) によりかく拌 (350 rpm) した。モデル環境内の二酸化塩素ガス濃度を 0.1 ppm 以下に保つために、上述したガス測定器の検定と同様な方法で二酸化塩素ガスを発生させ、経時的に環境内のガス濃度を測定した。時間経過により二酸化塩素ガス濃度は低下してくるため適宜二酸化塩素水溶液の追加操作を行った。また二酸化塩素水溶液の代わりに蒸留水を注入したものをコントロールとした。

5. ClO₂ ガスの有効性の評価 モデル環境内に置かれたカビセンサーは 1 日毎に取り出され、位相差顕微鏡下 (IMT-2, OLYMPUS) で写真を撮り、胞子から伸びた菌糸の長さを測定することにより評価した。

6. 菌糸長の測定 菌糸長はカビセンサーを空

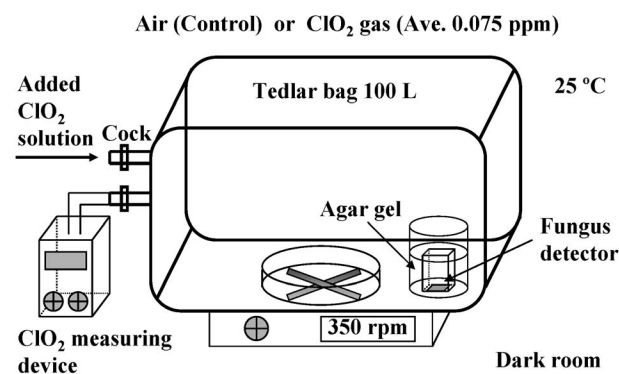


Fig. 1. Illustration of a Model Space Made Using a 100 l Tedlar Bag

The experiments were performed in the dark to prevent photo inactivation of ClO₂ gas. The ClO₂ gas was produced from to add a ClO₂ solution into the bag. The gas in the model space was stirred by a magnetic stirrer during the evaluation. The concentration of ClO₂ gas in the model space was measured by a ClO₂ measuring device. A fungus detector was placed on the bottom in a hole made in the agar gel.

気環境下と二酸化塩素ガス環境下で 0, 24, 48, 72 時間置いた後に、位相差顕微鏡下で撮影された写真より測定した。胞子から菌糸が長く伸びた場合は複雑に絡み合うため測定が困難となる、よって以下の定義を設けて測定した。

菌糸が栄養源のスポット内の場合；胞子と伸びた菌糸の先端との直線距離を菌糸長とする。菌糸が栄養源のスポット外の場合；栄養源のスポットの外周（スポット外に伸びた菌糸との交点）と伸びた菌糸の先端との直線距離を菌糸長とする。

結 果

モデル空間内における二酸化塩素ガス濃度の経時変化を Fig. 2 に示した。二酸化塩素ガス濃度の最大値は 0.099 ppm, 最小値は 0.054 ppm であり平均値は 0.075 ppm であった。

カビセンサーを用いたアルテルナリアの菌糸成長に対する極低濃度な二酸化塩素ガスの効果を Fig. 3 に示した。モデル空間内に空気だけを導入したコントロール実験において、実験開始時ではカビセンサー上の胞子に発芽管及び菌糸の形成はほとんど認められないが、時間経過に伴って菌糸が成長し複雑に入り組んだ状態が観察された (Fig. 3. left side of A, B)。一方 Ave. 0.075 ppm の二酸化塩素ガスを導入した場合、試験開始後 72 時間に渡って菌糸の著しい成長は観察されなかった (Fig. 3. right side of A, B)。しかしながら、多くの胞子で発芽管の形成が観察された。菌糸長の測定結果を Table 1 に示した。試験開始後 72 時間における菌糸長は、コント

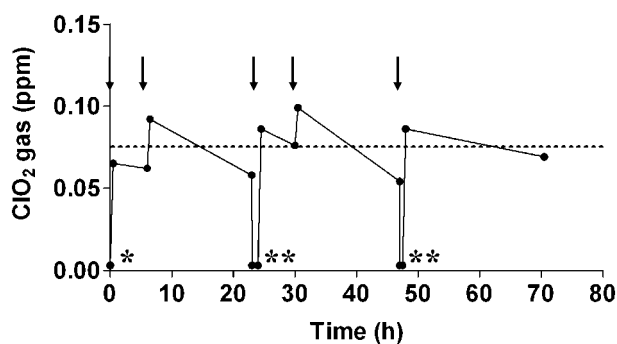


Fig. 2. Time Course of Changes in Concentration of ClO_2 Gas in the Model Space

*The background level of ClO_2 gas was about 0.003 ppm. **To take pictures, the fungus detector was placed outside the model space. (↓) A ClO_2 solution was added into the bag. (---) An average value of concentration of ClO_2 gas in the model space was 0.075 ppm except for * and **.

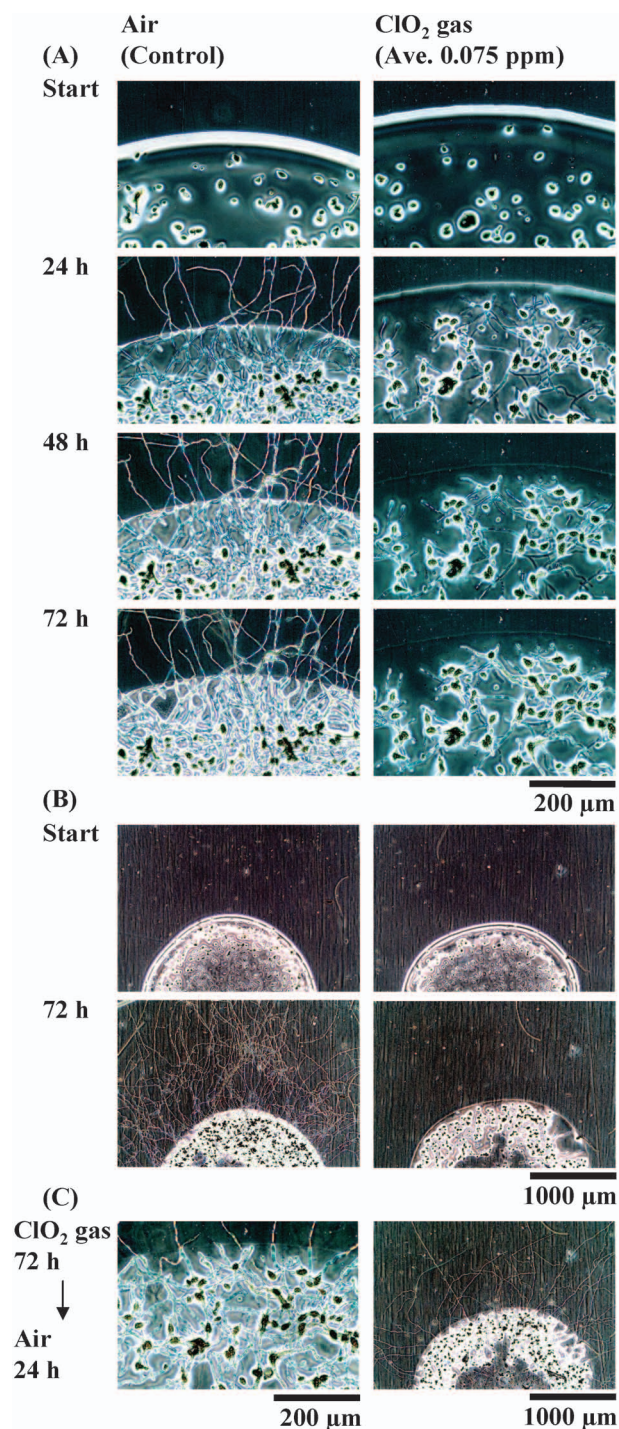


Fig. 3. Effect of ClO_2 Gas at Very Low Concentrations on Hyphal Growth of *Alternaria alternata* Using the Fungus Detector

The left side shows control experiments, the right side shows experiments of treatment with ClO_2 gas. (A) and (B) show pictures from the same fungus detector except for with a scale different. A half circle on the pictures shows a drop of spore-suspending medium (diameter, about 2 mm). Particles inside the half circle show fungal spores. (C) Effect of replacement of ClO_2 gas by air on the hyphal growth-inhibitory effect of ClO_2 gas at very low concentrations. After the fungus detector was exposed to ClO_2 gas at very low concentrations for 72 h, the ClO_2 gas in the model space was replaced by air, and it was exposed to air for 24 h.

Table 1. The Inhibitory Effect of ClO₂ Gas at Very Low Concentrations on Hyphal Growth of *Alternaria alternata*

Exposure period (h)	Hyphal length (μm)	
	Air (Control)	ClO ₂ gas (Ave. 0.075 ppm)
24	750 ± 169	28 ± 4
48	>1780	48 ± 18
72	>1780	49 ± 17

The hyphae were not observed at the initial time. Values represent mean ± S.D. (n=12–14).

ロール実験の場合 1780 μm 以上であったが、二酸化塩素ガスを導入した場合は 49 μm であった。

次に極低濃度な二酸化塩素ガスの菌糸成長抑制効果が菌の死滅に代表されるような永続的な効果があるのかを調べた。すなわちガスが存在するときだけ菌糸成長抑制効果があるのか、ガスがなくなると抑制効果が消失して菌糸の成長がみられるのかを検討した。試験開始から 72 時間後にモデル空間内の二酸化塩素ガスを空気に置換すると、その 24 時間後には菌糸の成長が観察された (Fig. 3(C))。

考 察

今回、われわれは Ave. 0.075 ppm の極めて低濃度な二酸化塩素ガスがアルテルナリアの菌糸成長抑制に極めて有効であることをみつけた。この濃度は人に対して悪影響がないと考えられている 0.1 ppm の値以下であるため、⁷⁾ 二酸化塩素ガスの応用範囲を広げる可能性があり有用な知見と考える。

カビセンサーを用いてカビの成長し易い環境か、あるいはそうでない環境かを定量的なカビ指数で表す報告がされている。^{14–16)} このカビ指数は環境がカビの成長に与える影響力を表しているため、二酸化塩素ガスの環境がカビの成長に与える影響力をみるには都合がよい。この方法論に従って Table 1 の結果からカビ指数を算出すると 72 時間の空気環境下では 122 以上となり、Ave. 0.075 ppm の二酸化塩素ガス環境下では 22 となった (値が大きいほどカビの生え易い環境を表し、台所シンクの内側でカビ指数 89 と報告されている)。¹⁴⁾ この結果は寒天ゲル付近の非常にカビの成長し易い環境が極低濃度な二酸化塩素ガスによりカビの成長し難い環境に変わったことを表している。

今回の実験において、極低濃度な二酸化塩素ガス

は菌糸の成長を抑制したが孢子からの発芽は抑制できなかった (Fig. 3. right side of A)。この結果はスタキボトリス、ペニシリウム、クラドスポリウムを用いた実験において、孢子からのコロニー形成を完全に不活化するには 500 ppm、24 時間の処置を要していることから、⁹⁾ その 1/5000 以下のガス濃度では発芽の抑制ができないのはむしろ当然かもしれない。またカビセンサーを二酸化塩素ガスに 72 時間暴露させたのち、二酸化塩素ガスを空気に置換すると、菌糸の成長が観察された (Fig. 3(C))。この結果は極低濃度な二酸化塩素ガスによる菌糸成長抑制効果は菌の死滅に代表されるような永続的な効果ではなく、ガス存在下のときだけに発揮される抑制効果であることを示唆する。多くの真菌類が増殖するためには孢子からの発芽後、菌糸の伸長、成熟菌糸の形成、孢子の形成という生活環を取るが、この生活環のどこかが阻害されると真菌類は増殖することができない。極低濃度な二酸化塩素ガスは孢子からの発芽を抑制できないが菌糸の成長を顕著に抑制している (Table 1)。つまり真菌類の生活環のうちで成熟菌糸の形成が阻害される結果となり、真菌類の増殖は困難となる。以上のことから、極低濃度な二酸化塩素ガスは滅菌効果を持つ薬剤としての期待はできないが、菌の増殖を抑制する防カビ剤としての役割は担えるものと考えられる。ガスの特性を生かした防カビ剤としての利用方法は、例えば大型施設の空調ダクト内に極低濃度な二酸化塩素ガスを常時、若しくは一定期間繰り返し流すことにより真菌類の増殖を大幅に抑制できる可能性がある。この場合においてダクト外へのガスの放出を避けたいときは、二酸化塩素ガスを吸収できる活性炭フィルターをダクト出口に取り付ければ対処可能であろう。

最後に、今回の実験ではモデル環境内の二酸化塩素ガスの発生及びその濃度コントロールが手動で行われたために、結果として環境内のガス濃度の変動が大きくなった。この濃度コントロールを機械的に精度よくできれば安全性と有効性が確保できるようになり、実用面での応用範囲が非常に広がるであろう。また予備的な実験ではあるが、黒カビとして知られているクラドスポリウムあるいはユーロチウムに対しても極低濃度な二酸化塩素ガスによる菌糸成長抑制効果を確認しており (Data not shown)、他の菌種に対しても同様な効果を示す可能性がある。

特に後者のユーロチウムは好乾性の真菌類に属し、好湿性のアルテルナリアとは生育環境が異なるため興味深い結果である。以上のことから、極めて低濃度な二酸化塩素ガスは様々な分野において、真菌類の制御に対する新しい有効な対策手段となることが示唆された。

REFERENCES

- 1) Al-Doory Y., Domson J. F., "Mould Allergy," Lea & Febiger, Philadelphia, 1984.
- 2) Hamada N., Yamada A., *J. Antibact. Antifung. Agents*, **21**, 6-18 (1993).
- 3) Takatori K., *Environ. Building Services*, **110**, 385-389 (2005).
- 4) Budavari S., O'Neil M. J., Smith A., Heckelman P. E., Kinneary J. F., "The Merck Index—An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals," 13th ed. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, 2001.
- 5) Gates D., "The Chlorine Dioxide Handbook—Water Disinfection Series," American Water Works Association, Denver, 1998.
- 6) Takayama M., Sugimoto H., Mizutani S., Tanno K., *J. Antibact. Antifung. Agents*, **23**, 401-406 (1995).
- 7) Dobson S., Cary R., "Concise International Chemical Assessment Document 37—Chlorine Dioxide (Gas)," World Health Organization, Geneva, 2002.
- 8) Benarde M. A., Israel B. M., Olivieri V. P., Granstrom M. L., *Appl. Microbiol.*, **13**, 776-780 (1965).
- 9) Wilson S. C., Wu C., Andriychuk L. A., Martin J. M., Brasel T. L., Jumper C. A., Straus D. C., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5399-5403 (2005).
- 10) Sy K. V., McWatters K. H., Beuchat L. R., *J. Food Prot.*, **68**, 1165-1175 (2005).
- 11) Han Y., Selby T. L., Schultze K. K., Nelson P. E., Linton R. H., *J. Food Prot.*, **67**, 2450-2455 (2004).
- 12) Lee S. Y., Costello M., Kang D. H., *J. Food Prot.*, **67**, 1371-1376 (2004).
- 13) Hirakawa K., "Japanese Industrial Standard—Methods of Test for Fungus Resistance—JIS Z 2911: 2000," Japanese Standards Association, Tokyo, 2000.
- 14) Abe K., *Bokin Bobai*, **29**, 557-566 (2001).
- 15) Abe K., *J. Antibact. Antifung. Agents*, **21**, 557-565 (1993).
- 16) Abe K., Nagao Y., Nakada T., Sakuma S., *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 959-963 (1996).
- 17) Sjoestroem L., Tormund D., *Sven Papperstidn.*, **81**, 114-120 (1978).