

システインの *Cladosporium cladosporioides* 増殖抑制効果

渡部俊彦,* 上野将明, 小笠原綾子, 三上 健, 松本達二

Growth-Inhibitory Activity of *Cladosporium cladosporioides* by CysteineToshihiko WATANABE,* Yukihiro UENO, Ayako OGASAWARA,
Takeshi MIKAMI, and Tatsuji MATSUMOTODepartment of Microbiology, Tohoku Pharmaceutical University,
4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received January 31, 2007; Accepted April 3, 2007)

When *Cladosporium cladosporioides* was cultured with cysteine, its growth was completely inhibited statically. The growth of *C. cladosporioides* cultured on potato-dextrose agar plates was also inhibited by the addition of cysteine. The production of ATP in *C. cladosporioides* was inhibited by cysteine. When a silicone block was incubated with *C. cladosporioides*, the surface of the block was coated with the biofilm of *C. cladosporioides*. However, the block containing cysteine was not covered with biofilm. These results indicate that cysteine is useful as a material to prevent the growth of *C. cladosporioides*.

Key words—*Cladosporium cladosporioides*; cystein; biofilm; silicone

緒 言

Cladosporium cladosporioides は、黒カビの一種であるが、ヒトに対して病原性を示すことはなく、稀に、アレルギーを誘発することが知られている真菌である。¹⁾ 本菌は、浴室や洗面所など湿気の多い所に発生し、黒く変色することから視覚的に認知され易く洗浄の対象とされている。この除菌には、主に市販の塩素系洗剤が使用されるが、塩素系洗剤はヒトに対して毒性があり、環境に対しても有害な物質である。²⁾ *C. cladosporioides* は自然界に広く分布し、胞子を飛散させて生息域を拡大していく性質があり、浴室などに発生した黒カビを除去しても、胞子が容易に屋内に侵入し、再び、壁などが汚染される。³⁾ このように根絶が困難な微生物による汚染に対し、塩素系洗剤のような有害物質を恒常的に使用し続けることは、保健・環境衛生的によいこととは言えない。

そこでわれわれは、人体や環境に対して無害で、*C. cladosporioides* の増殖を抑制できる物質の検索を行った。人体に対して無害という観点から、アミ

ノ酸類の *C. cladosporioides* の増殖抑制効果を検討したところ、システインに、本菌の増殖抑制効果のあることを見出したので報告する。

方 法

1. 菌株 *C. cladosporioides* NRBC4457 は、飼製品評価技術基盤機構より購入した。また、*C. cladosporioides* IFO52184, IFO40883, IFO41450, IFO41449 株は、千葉大学真菌医学研究センターより分与された。これら菌株は、ポテトデキストロース培地中 27°C で静置培養することで培養液表面にバイオフィームを形成する性質があり、胞子は、このバイオフィーム上に発生することから、培地表面を洗浄することで胞子の回収を行った。

2. アミノ酸による *C. cladosporioides* 増殖抑制効果 ナカライテスク株より購入したアミノ酸(リシン, フェニルアラニン, ロイシン, イソロイシン, メチオニン, バリン, スレオニン, トリプトファン, ヒスチジン, アルギニン, グルタミン, プロリン, グリシン, グルタミン酸, アスパラギン酸, システイン, チロシン, セリン, アラニン, アスパラギン) をポテトデキストロース培地(シグマ社)に溶解(10 mg/ml), これをろ過滅菌したもの

を実験に使用した。96 穴プラスチック製培養プレート (Nunc Delta Surface, Nunc 社製) に各アミノ酸溶液 100 μ l と *C. cladosporioides* NRBC4457 株胞子懸濁液 (最終濃度 4×10^5 cells/ml, ポテトデキストロース培地) 10 μ l を加え, 27°C で静置培養を行った。培養開始 1 又は 8 日目に, ImmunoMini NJ-2300 (Inter Med, USA) を用いて濁度 (OD620 nm) を測定し, その値を菌量として結果に示した。使用したアミノ酸のうち, チロシンは完全に溶解できなかったため, 飽和溶液として実験に使用した。

また, システインの有効濃度を確認するために, システイン溶液 (0.1, 1.0, 10.0 mg/ml) 100 μ l と *C. cladosporioides* NRBC4457 株胞子懸濁液 (4×10^5 cells/ml, ポテトデキストロース培地) 10 μ l を加え, 27°C で 3 日間静置培養を行い, 培養後, 前述の方法で, 濁度を測定した。

3. システインの *C. cladosporioides* 最小発育阻止濃度測定 システインのポテトデキストロース培地溶液 (20.00, 10.00, 5.00, 2.50, 1.25, 0.60, 0.30 mg/ml) 50 μ l に, 各種 *C. cladosporioides* 胞子懸濁液 (最終濃度 8×10^4 cells/ml, ポテトデキストロース培地) 50 μ l を加え, 96 穴プラスチック製培養プレート中で, 27°C, 6 日間培養を行い, 培養 0 日目と 6 日目の濁度を上記と同様の方法で測定した。菌の増殖が認められなくなったシステインの濃度を最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) とした。

4. システイン含有寒天培地上での *C. cladosporioides* 増殖性 システイン (1, 10 mg/ml) を配合したポテトデキストロース寒天培地を作成し, その表面に *C. cladosporioides* NRBC4457 胞子 (4×10^4 cells) を塗布し, 27°C で 3 又は 25 日間静置培養後, 増殖状態を観察した。

5. システイン処理 *C. cladosporioides* の ATP 産生能 *C. cladosporioides* NRBC4457 胞子懸濁液 (4×10^4 cells/ml) 90 μ l をルミチューブ (Kikkoman 社製) に加え, ここにシステイン溶液 (100, 10, 1 mg/ml) 10 μ l を加えたのち, 27°C で 2 時間静置培養した。培養後の菌体内 ATP 量は, ルシフェロール 250 プラス (Kikkoman 社) を用いて測定した。すなわち, 菌懸濁液に ATP 抽出試薬 100 μ l を加え, 20 秒間攪拌後, 発光試薬 100 μ l を加えたのち, 発光量を Minilumat Luminometer (Berthold

社, Germany) を用いて測定した。

C. cladosporioides NRBC4457 胞子は, 培養開始 4 時間目から発芽することを予備実験で観察しており, 培養 2 時間目ではシステイン添加群と未添加群で菌数に変化がないことを確認していることから, ATP 産生量の比較において, 一定菌数当たりの ATP 量に換算する処理は行わなかった。

6. システイン配合シリコーンでの *C. cladosporioides* 増殖性 シリコーン系充てん剤バスコク N (セメダイン株) に, システインを 50, 10, 1 % で配合し, 室温で 24 時間放置し乾固させた。このシステイン配合シリコーンを, 121°C, 20 分間の高圧蒸気滅菌で処理し, 実験に使用した。*C. cladosporioides* NRBC4457 胞子懸濁液 (4×10^4 cells/ml) 1 ml を 24 well プラスチックプレートに加え, この懸濁液中に各種システイン配合シリコーンを浸し, 27°C で 25 日間静置培養を行い, シリコーン表面のバイオフィーム形成状態を観察した。

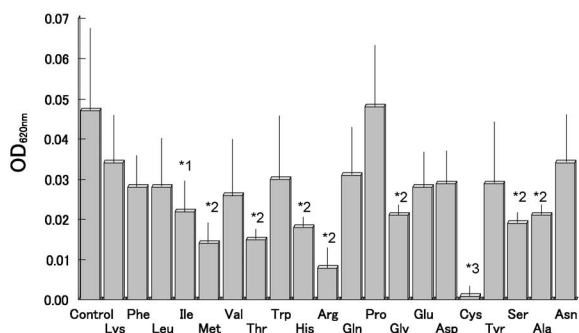
7. 統計処理 得られた実験結果は, Student's *t*-検定により統計処理を行った。

結 果

1. アミノ酸による *C. cladosporioides* 増殖抑制効果 各種アミノ酸溶液 (最終濃度 10 mg/ml) に, *C. cladosporioides* NRBC4457 胞子懸濁液を加え, 本菌の増殖に及ぼすアミノ酸の影響を検討した。その結果, 培養開始後 1 日目では, 20 種類のアミノ酸中 9 種類のアミノ酸で, *C. cladosporioides* の増殖速度が有意に抑制される傾向が認められた (Fig. 1(A))。しかし, これら 9 種類のアミノ酸のうちシステインを除く 8 種類のアミノ酸添加群では, 培養開始 8 日目の濁度が Control 群と同じ値を示しており (Fig. 1(B)), これらアミノ酸の *C. cladosporioides* 増殖抑制効果は極めて弱いことが明らかになった。一方, システイン添加群では, 培養開始 8 日目でも濁度の増加が認められず, また, 顕微鏡下での観察でも, *C. cladosporioides* は胞子の状態で存在し, 発芽・菌糸分裂している菌は観察されなかった (Data not shown)。これらの結果から, システイン添加群では, *C. cladosporioides* の増殖が完全に抑制されていることが明らかになった。

また, 培養液中のシステインを遠心洗浄により除

A) 1 day after incubation



B) 8 days after incubation

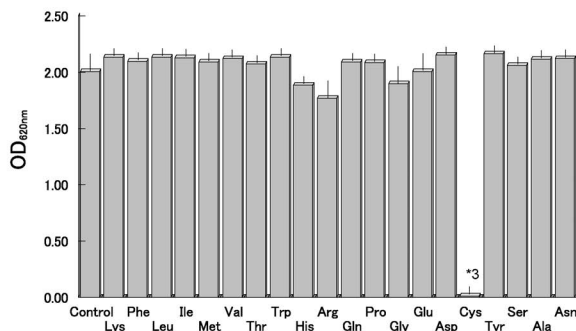


Fig. 1. Effects of Amino Acids on Growth of *C. cladosporioides* NRBC4457

The spore suspension of *C. cladosporioides* NRBC4457 (4×10^4 cells/ml) was mixed with each amino acid (final 10 mg/ml), and incubated at 27 °C for 1 or 8 days. After the incubation, the growth of *C. cladosporioides* was measured as described in Materials and Methods. These results were shown as mean \pm S.E. ($n=4$). *1 $p < 0.05$ vs Control, *2 $p < 0.01$ vs Control, *3 $p < 0.001$ vs Control.

去し、ポテトデキストロース培地にこの菌を再懸濁させると、*C. cladosporioides* 増殖が再開されることから (Data not shown), システインの *C. cladosporioides* 増殖抑制効果は殺菌的ではなく静菌的であることが明らかになった。

C. cladosporioides NRBC4457 以外の株に対する、システインの増殖抑制効果検討を目的に、*C. cladosporioides* IFO52184, IFO40883, IFO41450, IFO41449 株に対するシステインの MIC を測定した。その結果、Table 1 で示したように、使用した菌株すべての増殖がシステインにより抑制された。

2. システイン含有寒天培地上での *C. cladosporioides* 増殖性 *C. cladosporioides* は、浴室の目地に注入されるシリコンやゴムパッキンなどの固相表面に付着し、増殖することが多い。そこで、固相表面で増殖する *C. cladosporioides* の増殖がシステインによって抑制可能か否かの検討を行った。1 mg/ml システイン含有ポテトデキストロース培地

Table 1. Effect of Cysteine on Growth of Several *C. cladosporioides* Strains

	MIC (mg/ml)
<i>C. cladosporioides</i>	
NRBC4457	5.00
IFO52184	2.50
IFO40883	0.63
IFO41450	5.00
IFO41449	5.00

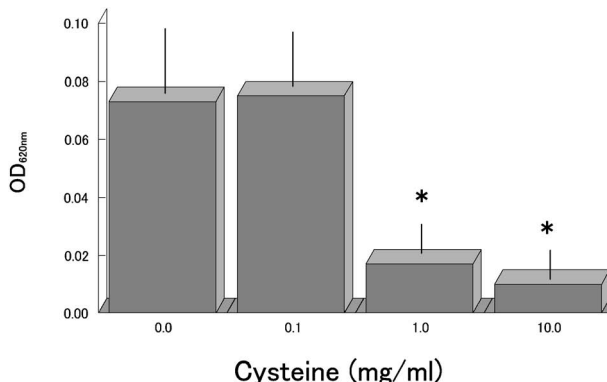


Fig. 2. Effects of Cysteine on Growth of *C. cladosporioides* NRBC4457

The spore suspension of *C. cladosporioides* NRBC4457 (4×10^4 cells/ml) was mixed with cysteine (final 0.1, 1.0, 10.0 mg/ml), and incubated at 27 °C for 3 days. After the incubation, the growth of *C. cladosporioides* was measured as described in Materials and Methods. These results were shown as mean \pm S.E. ($n=4$). * $p < 0.001$ vs Control.

で *C. cladosporioides* NRBC4457 を培養した場合、培養 3 日目では、その増殖は著しく抑制されていた (Fig. 2)。一方、1 mg/ml システイン含有ポテトデキストロース寒天培地表面に *C. cladosporioides* 胞子を塗布して培養した場合、培養 3 日目で培地表面全体に黒色の集落が形成されていた (Fig. 3)。この結果から、固相表面上で増殖する *C. cladosporioides* に対するシステインの抗菌効果は、液体培地中での抗菌効果より低いことが明らかになった。また、10 mg/ml システイン含有ポテトデキストロース寒天培地表面では、培養開始 3 日目でも黒色集落は観察されなかったが、培養 25 日目の観察では、黒色集落が増加している様子が観察されたことから、システインが *C. cladosporioides* に対し静菌的に作用していることが示唆された。

3. システイン処理 *C. cladosporioides* の ATP 産生能 システインが *C. cladosporioides* ATP 産生経路に障害を引き起こしているか否かを明らかにするために、システイン処理後の菌体内 ATP 量

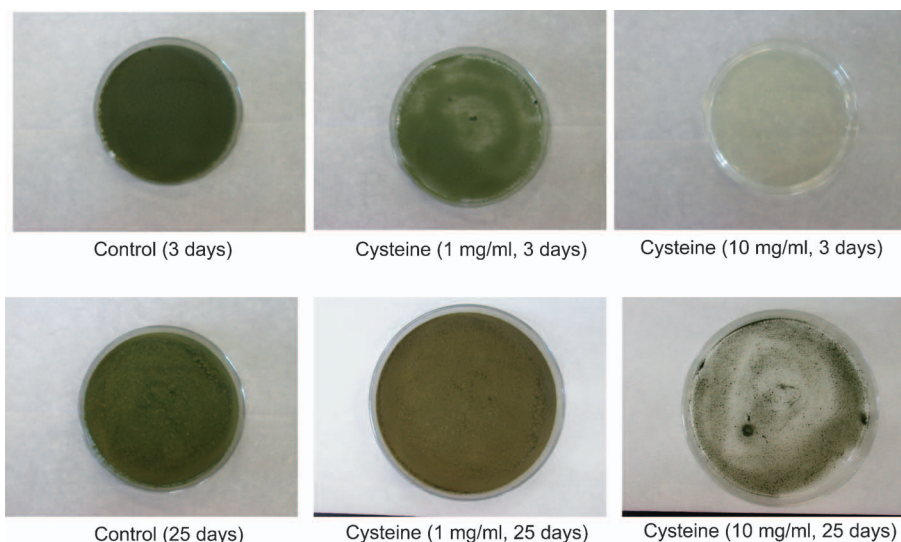


Fig. 3. Growth of *C. cladosporioides* NRBC4457 Cultured on Potato-Dextrose Agar Containing Cysteine

The spore suspension of *C. cladosporioides* NRBC4457 (4×10^4 cells/ml) was plated on potato-dextrose agar containing cysteine and incubated at 27°C for 3 or 25 days. After the incubation, the growth of *C. cladosporioides* was examined.

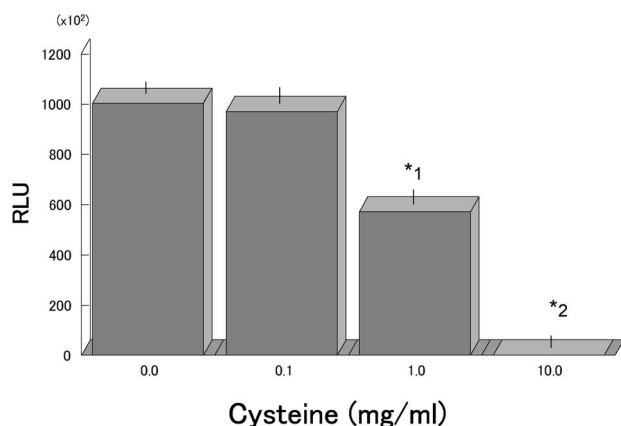


Fig. 4. Amount of ATP in *C. cladosporioides* NRBC4457 Treated with Cysteine

The spore suspension of *C. cladosporioides* NRBC4457 (4×10^4 cells/ml) was mixed with cysteine (final 0.1, 1.0, 10.0 mg/ml), and incubated at 27°C for 2 hours. After the incubation, the amount of ATP in *C. cladosporioides* was measured as described in Materials and Methods. These results were shown as mean \pm S.E. ($n=3$). *1 $p < 0.01$ vs Control, *2 $p < 0.001$ vs Control, RLU: Relative Light Unit.

を測定した。その結果、システイン処理した *C. cladosporioides* NRBC4457 の ATP 量は、処理したシステイン濃度に依存して低下し、システイン濃度 10 mg/ml では、ATP 産生が完全に抑制された (Fig. 4)。

4. システイン配合シリコンでの *C. cladosporioides* 増殖性 バイオフィームとは、真菌や細菌などの微生物が粘性のあるゲルを産生し、その中に菌が入り込んだ状態のことである。⁴⁾ *C. cladosporioides* もバイオフィームを形成する菌種

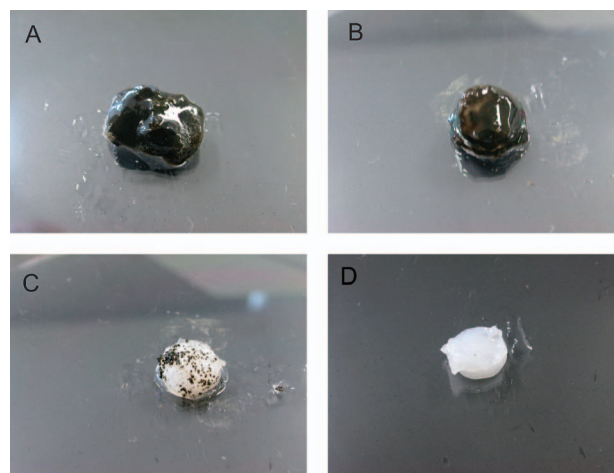


Fig. 5. Biofilm Formation of *C. cladosporioides* NRBC4457 on Surface of Silicone Containing Cysteine

The silicone containing cysteine was cultured in the suspension of *C. cladosporioides* NRBC4457 (4×10^4 cells/ml), and incubated at 27°C for 25 days. After the incubation, the biofilm formation was observed. A: Control, B: 1% of cysteine, C: 10% of cysteine, D: 50% of cysteine.

で、浴室壁面などのシリコン部分表面にバイオフィームを形成し増殖する。われわれは、システインをシリコンに配合することで、シリコン表面への *C. cladosporioides* バイオフィーム形成が抑制できるか否か検討を行った。異なる濃度でシステインを配合したシリコン塊を作製し、*C. cladosporioides* 懸濁液中で 25 日間培養後、シリコン表面のバイオフィーム形成状態を観察したところ、システイン濃度依存的に、シリコン表面でのバイオフィーム形成が抑制された (Fig. 5)。

考 察

C. cladosporioides は、黒カビと呼ばれるカビの一種で、植物病原菌として自然界に広く分布しており、空気中に孢子を飛散させることによって、汚染範囲が拡大していくと考えられている。^{5,6)} また、この菌は、バイオフィルム形成能が高く、浴室の目地やゴムパッキンにバイオフィルムが形成されると、菌体を汚染箇所から剥離させることが非常に困難となる場合が多い。本菌は分布範囲が広く、飛散した孢子が容易に家屋に侵入するため、浴室の壁などに発生した黒カビを除菌しても、すぐに再発生し、洗浄や消毒だけで家屋内での本菌の発生を防止することは非常に困難である。そこで、われわれは、本菌の増殖を抑制する成分を配合した部材を開発することによって、本菌の発生を抑制する試みを行った。

C. cladosporioides は、浴室の壁や水筒で使用されるゴムパッキンなどヒトの生活環境に密接した場所に発生し易いことから、本菌の増殖抑制を目的に使用される成分は、ヒトに対して無害である必要がある。そこで、ヒトの身体を構成する 20 種類のアミノ酸が、*C. cladosporioides* 増殖抑制因子として使用できるか否か検討を行った。その結果、実験に使用した 20 種類のアミノ酸のうち、9 種類のアミノ酸で、*C. cladosporioides* NRBC4457 の増殖速度を抑制する効果のあることが明らかになった (Fig. 1)。しかし、これら 9 種類中 8 種類のアミノ酸では、菌の増殖は停止せず徐々に進行し、培養 8 日目では、アミノ酸未添加群と同程度まで菌が増殖したことから、これら 8 種類のアミノ酸は、*C. cladosporioides* の増殖抑制物質としては応用困難であると推察された。

これに対し、システイン添加群では *C. cladosporioides* NRBC4457 増殖が持続的に抑制されており、システインが *C. cladosporioides* 抑制因子として応用可能であることが示唆された (Fig. 1)。この実験で使用したシステインの濃度 (10 mg/ml) は、一般に使用される抗真菌剤や殺菌・消毒剤に比べて高いことから、この増殖抑制がシステイン特異的な作用ではなく、浸透圧、pH など非特異的な要因が原因である可能性が考えられた。しかし、分子量がシステインと同程度若しくはシステインより低いアミノ酸を用いた条件では増殖抑制が認められな

いことや、酸性又は塩基性アミノ酸の添加でも増殖が抑制されないことなどから、浸透圧や pH 等の培養環境の変化が原因による非特異的な増殖抑制効果ではないと考えられた。

システインによる増殖抑制効果が、他の *C. cladosporioides* でも認められるか否か、抗菌活性の評価を行ったところ、使用した 4 種の菌株に対しても、システインは増殖抑制効果を示した (Table 1)。この結果から、システインの抗菌活性は、*C. cladosporioides* 全般に有効であることが予想され、日常生活環境で発生する自然界由来の *C. cladosporioides* に対しても普遍的に抑制効果を示すことが予想された。

本研究では、家庭内に付着し増殖する *C. cladosporioides* の予防方法の確立が目的であり、シリコーンやゴムパッキンなど固相表面での *C. cladosporioides* 増殖を阻止する方法の開発が最重要項目である。そこで、システインの抗菌活性が、液相内にある菌体にだけでなく固相表面で増殖する菌体に対しても有効か否かの検討を行った。システインの有効濃度を検討する目的で、異なる濃度のシステインをポテトデキストロース培地に溶解し、この培地中での *C. cladosporioides* NRBC4457 増殖状態を濁度を指標に観察したところ、システイン濃度が 1 mg/ml 以上で、菌の増殖が著しく抑制された (Fig. 2)。そこで、システイン濃度が 1 又は 10 mg/ml のポテトデキストロース寒天培地を作製し、これら培地表面での *C. cladosporioides* 増殖状態を観察した。この培地は、*C. cladosporioides* にとって良好な培養環境であり、この寒天培地上で本菌を培養すると、培養開始 3 日目、寒天培地表面全体が黒色の集落で覆われた (Fig. 3)。この増殖は寒天培地へのシステイン添加で抑制することが可能であったが、液体培地とは異なり 1 mg/ml のシステイン濃度では、十分な抑制効果は得られず、システイン濃度が 10 mg/ml で、*C. cladosporioides* 増殖の著しい抑制が確認された。しかし、長期間培養を継続させたところ、培養 25 日目には、黒色集落が寒天培地表面に発生している様子が観察された。この結果は、システインが殺菌的に作用しているのではなく、菌に対して静菌的に作用していることを意味し、また、*C. cladosporioides* はシステインによる静菌状態が長期間持続しても、死滅しないことが明

らかになった。また、寒天培地表面での *C. cladosporioides* 増殖を抑制するためには液体培地より高い濃度のシステインが必要であることが明らかになったが、これは、*C. cladosporioides* 増殖を抑制するためには、菌体周辺に一定濃度以上のシステインの存在が必要であることを意味しており、流動性がない寒天培地では、菌体周辺のシステインが消費されて濃度が低下してしまうため、液体培地より高いシステイン濃度でなければ増殖抑制状態を維持することができないと考えられた。

また、結果には示していないが、*C. cladosporioides* は嫌氣的条件下では増殖できない性質であることから、本菌の増殖エネルギーは好氣的呼吸経路によって生成されていると考えられる。システイン存在下で *C. cladosporioides* を培養したときの ATP 産生量を測定したところ、システイン濃度依存的に、ATP 産生が抑制されたことから (Fig. 4)、システインが好氣的 ATP 産生経路の阻害を引き起こしている可能性が示唆された。10 mg/ml システインは、ATP 産生を抑制し、菌の増殖を停止させていたが、培地中からシステインを除去すると再び菌は増殖を開始することから、ATP 産生阻害は、システインによる不可逆的阻害ではなく、ATP 産生経路の中にシステインにより可逆的に不活性化される部位があると推測された。

システインに *C. cladosporioides* 抗菌性が認められたことから、シリコーンなどの建築材料にシステインが配合された状態でも、抗菌活性が発揮されるか検討を行った。市販のシリコーンは、粘性を保った状態でチューブ内に充填されており、空気中で数時間放置することでシリコーン塊を形成する。粘性状態のシリコーンにシステインを配合することでシリコーン塊の形成が阻害されることも予想されたが、シリコーンにシステインを加え十分かく拌後、空気中で放置すると、システインを配合していないシリコーンと同様に、数時間でシリコーン塊を形成した (Data not shown)。このことから、シリコーン

にシステインを配合してもシリコーン凝固には影響がなく、システインが充てん剤としてのシリコーンの性質を損なわないと考えられた。システイン配合シリコーンを、*C. cladosporioides* 懸濁液中に浸し、培養を行ったところ、Fig. 5 で示すように、システイン含有率が 10% 以上のシリコーン塊では、シリコーン表面へのバイオフィーム形成が著しく抑制されており、システインによる *C. cladosporioides* 増殖阻害効果が持続的に奏効していることが明らかになった。

本研究では、システインが *C. cladosporioides* の増殖抑制素材として応用可能であることを明らかにした。システインは、サプリメントとして服用されるほど、ヒトに対して安全性の高い物質であるので、建築部材や水筒・弁当箱のパッキンなどに配合しても、使用者に悪影響を与えることなく、長期に渡って *C. cladosporioides* の発生を抑制できることが予想された。

REFERENCES

- 1) Bouziane H., Latge J. P., Lelong M., *Allergol. Immunopathol.*, **34**, 64–69 (2006).
- 2) Forrester M. B., *Tex. Med.*, **102**, 52–57 (2006).
- 3) De Ana S. G., Torres-Rodriguez J. M., Ramirez E. A., Garcia S. M., Belmonte-Soler J., *Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, **16**, 357–363 (2006).
- 4) Mukherjee P. K., Mohamed S., Chandra J., Kuhn D., Liu S., Antar O. S., Munyon R., Mitchell A. P., Andes D., Chance M. R., Rouabhia M., Ghannoum M. A. *Infect. Immun.*, **74**, 3804–3816 (2006).
- 5) Richards G. M., Beuchat L. R., *Int. J. Food Microbiol.*, **103**, 1–10 (2005).
- 6) Hasnain S. M., Al-Frayh A. S., Al-Suwaine A., Gad-El-Rab M. O., Fatima K., Al-Sedairy S., *Mycopathologia*, **157**, 171–179 (2004).