

【原著論文】

金管楽器内で生育するカビの金属耐性

浜田 信夫^{1*}, 阿部仁一郎², 佐久間大輔¹

Metal Tolerance of Fungi Growing in Brass Instruments

Nobuo HAMADA^{1*}, Niichiro ABE², and Daisuke SAKUMA¹¹Osaka Museum of Natural History, 1-23 Nagai Park, Higashi-Sumiyoshi, Osaka 546-0034, Japan²Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji, Osaka 543-0026, Japan

In brass instruments, the fungi *Purpureocillium* and *Fusarium* are considered predominant, whereas *Penicillium*, *Cladosporium*, and *Aureobasidium*, found often in the indoor environment, are uncommon. Environmental factors controlling the fungal flora in brass instruments, apart from indoor factors, were studied. The contamination of instruments by *Purpureocillium* and *Fusarium* species increased with instrument usage time more markedly than contamination by *Phoma* and *Exophiala* species. Because copper rust is often found in old brass instruments, it was suggested that metal ions could affect fungal growth. Thus, the metal tolerance of six predominant strains (including *Purpureocillium lilacinus*) isolated from brass instruments and five strains of common fungi isolated from the indoor environment was compared. We found that *P. lilacinus* and *F. oxysporum* were especially more tolerant to copper and zinc ions than common indoor fungi. Moreover, silver ions inhibited the growth of all fungal species more than the other metal ions examined, and fungi from brass instruments were more tolerant to silver ions than common indoor fungi. In contrast, iron (III) and aluminum ions inhibited fungal growth regardless of whether the species originated from brass instruments or the indoor environment. The predominant fungi in brass instruments were generally tolerant to copper, zinc, and silver ions, with *P. lilacinus* being the most tolerant. (Accepted 6 February 2019)

Key words : Brass (真ちゅう)/Fungal contamination (カビ汚染)/Metal toxicity (金属毒性)/*Purpureocillium*/Wind instruments (吹奏楽器).

はじめに

既報で¹⁾, ホルン, トロンボーン, トランペット, チューバ, ユーフォニウムなどの金管楽器に著しいカビ汚染が見られることを報告した。木管楽器に比べて, 金管楽器は長い, 細く曲がった管からなる。ゆえに, 演奏中に唾や湿った息などの水分が内部に溜まり, その水分が外部に排水されにくい特徴があることが分かった。また, 汚染カビの優占属は *Purpureocillium* (*Paecilomyces*) や *Fusarium* であり, *Phoma* や *Exophiala* などがそれらに続いた。*Phoma* や *Exophiala* は住宅の水回りや, 浴室やシンクの排水口によく見られるが²⁾, 金管楽器のカビの菌相は, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* が多い飲料水や室内環境の菌相とも異なる^{3, 4)}。例えば, *Purpureocillium lilacinus* が金管楽器の優占種であるのに対して, 食品や室内環境で多く見られる *Paecilomyces variotii* は見られなかった⁵⁾。また, *Aspergillus restrictus* などの好乾性カビもほとんど検出されなかった。

一方, 大きい楽器の方が, 小さい楽器よりカビ数が多

い傾向はあるが, 楽器の種類に関係なく, 汚染カビの菌相に違いは見られなかった⁶⁾。本研究では, 金管楽器に多く見られるカビの種を同定するとともに, それらのカビの生育を制御する要因の解明を試みた。

微生物に対して有害な銅のサビである緑青 (ロクショウ)⁷⁾ は, 銅と亜鉛の合金である真ちゅうが主な材料である金管楽器が古くなると, その表面にしばしば見られる¹⁾。環境汚染に配慮して今日では行われていないが, 湿った環境で使用される木材は, カビ汚染を予防するために, 銅やクロムやヒ素の溶液にあらかじめ浸すことが欧米などで行われてきた⁸⁾。また, カビ汚染を抑制するために有効なことが知られている銀イオンは⁹⁾, 金管楽器の表面のメッキにしばしば使われている。それ故, 銅や亜鉛や銀などの金属イオンが, とりわけ古い金管楽器のカビの菌相に影響を与える可能性が考えられた。

前報で⁶⁾, カビ汚染は, 新しい金管楽器より古い金管楽器に多いことが明らかになった。これは, 特定のカビの金属耐性が, 古い金管楽器での繁殖に寄与している可能性を示唆している。本研究では, 金管楽器から分離・

¹大阪市立自然史博物館 〒546-0034 大阪市東住吉区长居公園1-23 ☎06-6697-6221

²大阪健康安全基盤研究所 〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34 ☎06-6771-8331

2187-431X/2019/0710-0265 \$02.00/0© 2019 Soc. Antibact. Antifung. Agents, Jpn

Table 1. Fungal flora in brass instruments according to various periods of usage

Periods of usage (years)	0-3.0			>3.0		
Sample number	31			69		
Genus	Avg	± S.E. (log)	Avg CFU/cm ²	Avg	± S.E. (log)	Avg CFU/cm ²
<i>Acremonium</i>	1.07	± 0.07	11.8	1.04	± 0.04	10.9
<i>Aspergillus</i>	1.00	± 0.00	N.D.	1.00	± 0.00	N.D.
<i>Aureobasidium</i>	1.00	± 0.00	N.D.	1.06	± 0.04	11.4
<i>Cladosporium</i>	1.01	± 0.01	10.2	1.00	± 0.00	10.1
<i>Exophiala</i>	1.06	± 0.04	11.6	1.20	± 0.08	15.9
<i>Fusarium</i>	1.59	± 0.19	38.6	1.99	± 0.17	97.0*
<i>Purpureocillium</i>	1.63	± 0.18	42.9	2.29	± 0.16	194.1*
<i>Penicillium</i>	1.01	± 0.01	10.2	1.00	± 0.00	N.D.
<i>Phoma</i>	1.31	± 0.15	20.3	1.34	± 0.09	22.1
<i>Trichoderma</i>	1.00	± 0.00	N.D.	1.00	± 0.00	10.1
Other	1.02	± 0.02	10.4	1.04	± 0.03	11.1
unknown	1.01	± 0.01	10.2	1.02	± 0.02	10.5
Total fungal number	2.45	± 0.21	281.3	3.23	± 0.14	1710.6*

Fungal flora in 100 brass instruments was examined in the previous paper (Hamada and Abe 2017).

The average fungal number belonging to each genus was calculated in logarithmic scale with standard error (S.E.), and converted into Avg CFU/cm². N.D indicates the fungus was not detected.

The asterisk indicates a significantly elevated value.

培養された6株のカビについて、銅、亜鉛、銀の各金属イオンを添加した培地上で成長を調べた。そして、一般環境中に多く見られる第二鉄やアルミニウムのイオンの培地上で、成長を比較した。さらに、スマートフォンやエアコンなどの室内環境から分離された一般的な5種のカビについても、前述の5種類の金属イオン存在下で成長を調べ、金管楽器由来のカビとの比較を行った。

材料と方法

1. 金管楽器から分離されたカビの同定

前報 (2016) では⁶⁾、金管楽器内部に生育するカビを、ふき取りキット (Promedia ST-25PBS) を用いて採取し、楽器のカビ汚染に影響を与える水分などの様々な環境要因を研究した。使用期間が3年を上回る楽器のカビ数 (cfu/cm²) は、使用期間が3年以下の場合に比べて、5倍以上だった。本報では、前報のこれらのデータを用いて、使用期間とともにカビ汚染が増加した原因を解明するために、調査した100台の金管楽器から検出された各属のカビの平均コロニー数を計算した (Table 1)。

金管楽器で優占しているカビの5属の6株と、室内環境中で多くみられるカビの5属の5株を、実験材料として選択した (Table 2)。これらの11株は浜田 (NH) によって分離培養され、大阪市立自然史博物館に保管されている。

本研究で用いた株については、まず光学顕微鏡で検鏡して、属や種の同定を試みた。さらに、種の同定を確認するために、1/4 Potato Dextrose agar (PDA) の斜面培地で2週間以上単離培養した後、遺伝子解析を行った¹⁰⁾。各株からDNAを抽出し、PCR法により

internal transcribed spacer (ITS) 領域を、また、ITS領域が増幅できない場合は translation elongation factor 1 alpha (*tef1*) 領域を増幅した。その後、増幅産物のシーケンスを解読し、EMBL-FASTA Nucleotide Similarity Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>) によりシーケンスの相同性を比較した。分離株からのDNA抽出法、使用したプライマーペア、電気泳動後のPCR産物の精製ならびにシーケンス操作法は既報に従った¹⁰⁾。本報で得られたシーケンスは、International Nucleotide Sequence Database (INSD, GenBank/DDBJ/EMBL) で閲覧でき、そのアクセッション番号は LC375362-LC375372である。

実験に用いる11株を単離培養した後、単孢子由来のコロニーを含む寒天片 (5 × 5 mm) を滅菌針で採取し、100mlの滅菌水の入った三角フラスコに加えた。そして、約30秒間ミキサー (TM-101; Iwaki Glass Co.) で混和し、均質な孢子の懸濁液とした。

各カビの株の孢子の懸濁液 (0.5ml) を1:10、あるいは1:100に希釈して、様々な金属イオンを添加した1/4 PDA培地の入ったシャーレ2枚ずつに接種した。金属イオンを添加していない1/4 PDA培地の希釈率の異なるシャーレのうち、一枚当たりの平均コロニー数が概ね20-100になるシャーレを、各カビのコントロールとした。インキュベータ (NK System Biotron; LH-100-RD) で、25°C ± 1.0°Cで、8-10日間培養して、発生したコロニー数をカウントした。

2. カビの金属耐性実験

5種類の金属イオンに対する耐性を調べるために、硫酸銅 CuSO₄、硫酸亜鉛 ZnSO₄、硝酸銀 AgNO₃、硫酸

Table 2. List of fungi used in this study

Strain no. (NH)	Species	Colony color	Origin	Region	Identity
692	<i>Exophiala equina</i>	dark	trumpet	ITS	100%, <i>Exophiala equina</i> (KJ481252)
1723	<i>Fusarium oxysporum</i>	purple	euphonium	ITS	100%, <i>Fusarium oxysporum</i> (LN828164)
1452	<i>Fusarium</i> sp.	pale yellow	alto sax	ITS	94.1%, <i>Fusarium violacea</i> (KM231824)
582	<i>Purpureocillium lilacinus</i>	pale pink	trombone	tefl	99.8%, <i>Purpureocillium (Paecilomyces) lilacinus</i> (AX109711)
632	<i>Purpureocillium lilacinus</i>	pink	trumpet	tefl	99.8%, <i>Purpureocillium (Paecilomyces) lilacinus</i> (AX109711)
1152	<i>Phoma glomerata</i>	dark	alto sax	ITS	99.6%, <i>Phoma (Didymella) glomerata</i> (KT387236)
424	<i>Aureobasidium pullulans</i>	partially dark	smart-phone	ITS	100%, <i>Aureobasidium pullulans</i> (KPI31643)
1426	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	dark	bathroom	ITS	100%, <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (AB572903)
581	<i>Paecilomyces variotii</i>	pale brown	air conditioner	ITS	99.1%, <i>Paecilomyces variotii</i> (AF033395)
504	<i>Penicillium chrysogenum</i>	pale blue	pottery	ITS	99.8%, <i>Penicillium chrysogenum</i> (GU723449)
881	<i>Verticillium fusisporum</i>	white	air conditioner	ITS	99.1%, <i>Verticillium (Lecanicillium) fusisporum</i> (JN850976)

第二鉄 $Fe_2(SO_4)_3$ 、硫酸アルミニウム $Al_2(SO_4)_3$ の溶液を用いた。各々の溶液は、0.5, 2.0, 8.0g/100ml の3種類の濃度に調整した。そして、各シャーレに25ml ずつの1/4 PDA 培地を入れ、それが固まった後、培地中の金属濃度が0.01%, 0.04% and 0.16% になるように、0.5ml の金属溶液を添加した。なお、実験に用いた $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$ 試薬 (和光純薬製) は51% の水分 (nH_2O) を含んでいたが、その濃度は原子吸光分光光度計 (Parking Elmer Co.: AAnalyst600) を用いて測定した。AgNO₃ を添加した培地では、他の4金属塩と同じ濃度の場合には、カビのコロニーが全く発生しなかった。そこで、AgNO₃ の添加量を各々1/64に減らして実験を行った。

各カビの成長阻害を調べるために、様々な金属塩を異なる濃度で添加した培地で、11株のカビを培養した。そして、各々の条件で発生したコロニー数について、コントロールとの比較を行った。様々な金属塩を添加した培地でのカビの成長は、コロニー数比やコロニーの大小として示した。表でのコロニー数比 (colony count) は、コントロールのコロニー数に対する様々な培養条件でのコロニー数の百分率 (%) で表現した。一方、コロニーの大きさの比較 (colony diameter) は、コントロールと同等を++で、より小さいものを+で示した。

カビの成長は酸性培地で阻害される可能性がある⁷⁾、主な培地についてのpH値を、Piccolo pHメーター (Hanna; HI1280) を用いて測定した。1/4 PDA のpH値は6.6; 1/4 PDA にそれぞれ0.16% のCuSO₄, ZnSO₄, Fe₂(SO₄)₃, Al₂(SO₄)₃ を添加した培地は3.37, 4.35, 2.28, 3.02; 1/4 PDA に0.0025% のAgNO₃ を添加した培地は5.44だった。

結 果

1. 金管楽器に多いカビの同定

金管楽器から分離されたカビの菌相について、使用期

間が3年間以下のものと、3年より長いものとを比較した (Table 1)。平均カビ数の多い順序に各属を並べると、新しい楽器と古い楽器ではほぼ同じだった。使用年数に関係なく、最も優占している属は *Purpureocillium (Paecilomyces)* で、*Fusarium*, *Phoma*, *Acremonium*, *Exophiala* がそれに続いた。しかしながら、各属の平均カビ数は、古い楽器と新しい楽器では、数倍の差が見られた。例えば、*Purpureocillium* の平均カビ数は、新しい楽器では42.9 CFU/cm² に対して、古い楽器では約4.5倍の194.1 CFU/cm² で、有意の違いが認められた。また、*Fusarium* 属の平均カビ数も有意に増加し、新しい楽器では38.6 CFU/cm² に対して、古い楽器では約2.5倍の97.0 CFU/cm² だった。それに対して、*Phoma*, *Acremonium*, *Exophiala* の平均カビ数の比は、それぞれ約1.1倍, 0.9倍, 1.4倍と、ほとんど違いが見られなかった。このように、*Purpureocillium* が使用年数に伴って最も顕著に増加した。

金管楽器から検出された *Purpureocillium* 属のカビは、コロニーの形状や胞子の検鏡の結果、すべてが *P. lilacinus* と同定された。また、公表されている遺伝子解析によるシーケンスのデータも、これらのカビが *P. lilacinus* であることを支持していた (Table 2)。また、大部分の *Fusarium* のコロニーは *F. oxysporum* あるいは *Fusarium* sp. と同定され、他に多いカビとして、*Phoma glomerata* や *Exophiala equina* が同定された。*Fusarium* sp. は三日月型の特徴的な胞子を持ち、そのコロニーは淡黄色からオレンジ色のスライム状で、成長速度は遅かった。

金管楽器で特定のカビが使用年数とともに増加することに影響する要因を解明するために、様々なカビの成長に対する金属イオンの効果を調べた。

2. カビの金属耐性

2種のカビ *P. lilacinus* と *P. variotii* では、0.01%, 0.04%, 0.16% のCuSO₄ をそれぞれ添加した1/4 PDA

培地で、コロニーの成長に明確な違いが見られた (Fig. 1)。 *P. lilacinus* のコロニーは、0.04%や0.01%の CuSO_4 を添加した培地に比べて、0.16%の CuSO_4 の培地では

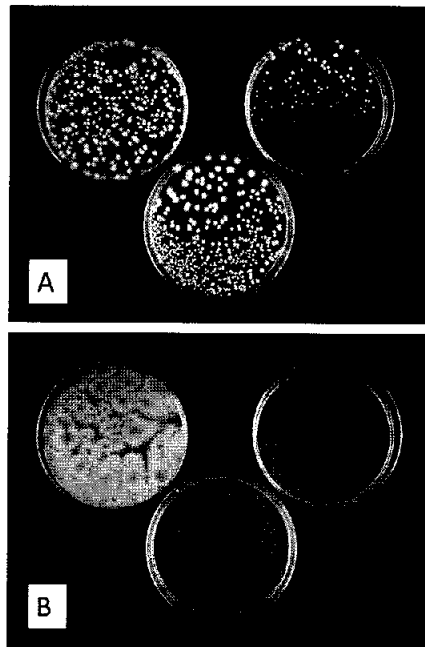


Fig. 1. Effect of copper ions (CuSO_4) on two fungi cultured for 10 days

A : *Purpureocillium* (*Paecilomyces*) *lilacinus* (Strain no. NH582) ; B : *Paecilomyces variotii* (Strain no. NH581)
Left, 0.01% CuSO_4 ; Center : 0.04% CuSO_4 ; Right, 0.16% CuSO_4

より小さかったが、3種類の濃度のいずれの培地でも検出された (Fig. 1A)。一方、*P. variotii* のコロニーは0.01%の CuSO_4 の培地だけで認められた (Fig. 1B)。

金管楽器由来及び室内環境由来のすべてのカビが、0.01%の CuSO_4 を添加した培地で、種類に関係なくよく成長した (Table 3)。さらに、発生したコロニーの数や大きさもコントロール (1/4 PDA だけの培地) に比べてほぼ同じであった。次に、0.04%の CuSO_4 の培地では、*P. variotii* の場合を除いて、他の株ではいずれもコロニーが検出された。しかし、ほとんどの株のコロニー数やその大きさは共に、コントロールより小さかった。さらに、0.16%の CuSO_4 の培地では、*P. lilacinus* の2株、および *F. oxysporum*, *P. glomerata* の金管楽器から分離した計4株のコロニーが検出された。とりわけ *P. lilacinus* のいずれのコロニー数比も、*F. oxysporum* や *P. glomerata* のコロニー数比より高かった。

金管楽器から分離されたカビでは、*P. glomerata* のコロニー数比は他の株に比べて低かったが、すべての株が0.16%の ZnSO_4 の培地で成長した (Table 3)。0.16%の ZnSO_4 培地では、*P. lilacinus* や *Fusarium* sp. のコロニー数や大きさはコントロールとほぼ同じであった。対照的に、室内環境由来の株の成長は、調べた株ごとに様々だった。例えば、*A. pullulans* と *P. variotii* は共に0.04%や0.16%の ZnSO_4 培地で生育しなかったが、*Verticillium fusisporum* のコロニー数は、0.16%の

Table 3. Growth inhibition by copper, zinc or silver ion against fungi collected from brass instruments and the indoor environment

Strain no. (NH)	Species	Control	CuSO_4 (%)			ZnSO_4 (%)			AgNO_3 (%)		
			0.01	0.04	0.16	0.01	0.04	0.16	0.000156	0.000625	0.0025
692	<i>Exophiala equina</i>	100	94	69	0	98	100	58	94	2	0
		++	++	-		++	++	+	-	+	
1723	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	84	51	9	108	97	89	101	44	0
		++	++	+	+	++	++	+	+	+	
1452	<i>Fusarium</i> sp.	100	96	37	0	87	104	84	63	36	0
		++	++	+		+	++	+-	++	+	
582	<i>Purpureocillium lilacinus</i>	100	99	95	48	96	85	90	96	54	0
		++	++	++	+	+-	+-	++	++	+	
632	<i>Purpureocillium lilacinus</i>	100	96	97	38	89	97	90	86	21	0
		++	++	+	+	++	++	++	++	+	
1152	<i>Phoma glomerata</i>	100	102	73	12	105	114	6	85	11	0
		++	++	+	+	++	+	+	+	+	
424	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	81	27	0	47	0	0	42	0	0
		++	++	+		++			++		
1426	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	100	99	56	0	96	67	36	43	14	0
		++	++	+		++	++	+	++	+	
581	<i>Paecilomyces variotii</i>	100	95	0	0	81	0	0	47	11	0
		++	++			+			++	+	
504	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	102	45	0	109	109	18	79	15	0
		++	++	+		++	+	+	++	+	
881	<i>Verticillium fusisporum</i>	100	101	42	0	105	104	89	86	0	0
		++	++	+		++	++	+	++		

The number and diameter of fungal colonics found on 1/4 PDA medium after 8-10 d incubation were designated as the control. Percentage of the colony number per the control is shown for each concentration of metal in the medium.

The diameter of fungal colonies was compared with that of the control, and a similar size is ++ ; smaller +.

Table 4. Growth inhibition by iron or aluminum ion against fungi collected from brass instruments and the indoor environment

Strain no. (NH)	Species	Control	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (%)			Al ₂ (SO ₄) ₃ (%)		
			0.01	0.04	0.16	0.01	0.04	0.16
692	<i>Exophiala equina</i>	100	82	37	0	93	85	59
		++	++	+		++	++	+
1723	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99	31	0	101	102	83
		++	++	+		++	-	+
1452	<i>Fusarium</i> sp.	100	85	1	0	78	47	0
		++	++	+		++	+	
582	<i>Purpureocillium lilacinus</i>	100	73	10	0	99	101	100
		++	++	+		++	++	++
632	<i>Purpureocillium lilacinus</i>	100	79	7	0	96	99	89
		++	+	+		++	++	+
1152	<i>Phoma glomerata</i>	100	77	13	0	101	31	0
		++	+	+		++	+	
424	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	87	69	0	92	62	37
		++	++	++		+	++	++
1426	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	100	99	4	0	99	91	22
		++	++	+		++	++	+
581	<i>Paecilomyces variotii</i>	100	68	31	0	70	66	72
		++	++	++		++	++	++
504	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	75	39	0	90	85	85
		++	++	+		++	++	++
881	<i>Verticillium fusicarpum</i>	100	101	5	0	102	103	105
		++	++	+		++	++	+

The number and diameter of fungal colony found on 1/4 PDA medium after 8-10 d incubation was designated as the control.

Percentage of the colony number per the control is shown for each concentration of metal in the medium.

The diameter of fungal colonies was compared with that of the control, and a similar size is ++; smaller +.

ZnSO₄培地でもコントロールとほぼ同じであった。

1/4 PDA 培地へ AgNO₃を添加した場合には、他の金属イオンを添加した場合より、カビの成長を強く阻害した (Table 3)。例えば、AgNO₃による *P. lilacinus* に対する阻害効果は、CuSO₄に比べて64倍以上であった。0.0025%の AgNO₃培地では、金管楽器及び室内環境由来のいずれのカビも全く生育しなかった。しかし、0.000625% AgNO₃培地では、金管楽器由来のすべてのカビが生育したが、室内環境由来の *V. fusicarpum* や *A. pullulans* は生育しなかった。さらに、*P. lilacinus*、*F. oxysporum*、*Fusarium* sp. のコロニー数比は、調べた他のカビのコロニー数比より高かった。

一般環境中に多い第二鉄とアルミニウムのイオンの、本実験で用いた11の菌株に対する生育阻害効果を、金管楽器の材料やメッキに用いられる銅、亜鉛、銀イオンの効果と比較した (Table 4)。

金管楽器由来のカビも室内環境由来のカビも、0.16%の Fe₂(SO₄)₃を添加した培地では、コロニーは全く検出されなかった。ところが、0.04%の Fe₂(SO₄)₃を添加した培地ではすべての種類のカビのコロニーが検出された。しかし、カビの由来に関係なく、各カビのコロニー数比やその大きさは様々だった。例えば、*A. pullulans* のコロニー数比は、金管楽器由来のカビも含め、他のカビより高かった。一方、*Fusarium* sp. や *P. lilacinus* の

2株のコロニー数比は、調べたカビの中で、比較的lowかった。

0.04%や0.16%の Fe₂(SO₄)₃を添加した培地とは対照的に、0.04%や0.16%の Al₂(SO₄)₃を添加した培地では、ほとんどのカビが成長した。*Fusarium* sp. と *P. glomerata* を除いて、他のカビはいずれも0.16%の Al₂(SO₄)₃の培地で成長した。0.16%の Al₂(SO₄)₃培地で生育するカビのコロニー数比や大きさは、調べた株の間で大きな差異が見られた。この差異は、0.04%の Fe₂(SO₄)₃ 培地で観察されたのと同様に、金管楽器か室内環境かというカビの由来とは関連が見られなかった。

すなわち、金管楽器から分離されたカビはいずれも、銅、亜鉛、銀などの金管楽器の材料のイオンに対して、より強い耐性が認められた。しかし、金管楽器から分離されたカビは、室内環境から分離されたカビと同様に、第二鉄やアルミニウムのイオンに対する耐性に明確な傾向は見られなかった。

考 察

前報で⁶⁾、水分と栄養要因が金管楽器のカビ汚染に影響していることを明らかにした。使用頻度とともに増える楽器内の水分の蓄積は、内部のカビ汚染の増加をもたらす。しかし、楽器の使用頻度とともに汚染カビ数は増

えても、優占カビの構成比はカビ数に関係なく同様であった⁶⁾。トランペットやトロンボーン、ホルンなどの小型の金管楽器より、チューバやユーフォニウムといった大型の楽器で、より多くのカビ汚染が認められた¹⁾。大型楽器の方が小型楽器より掃除が困難であるため、唾などの水分要因に加えて、カビの栄養になりやすい食物のカスが、楽器の内部により多く溜まると考えられる。カビ汚染の程度と同様に、楽器の種類や大きさにも関係なく、カビの菌相は類似していた。*P. lilacinus* などの特定のカビが、使用年数とともに増加するので (Table 1)、本研究では水分や栄養要因以外の他の要因について調査した。

少量の重金属イオンはカビなどの微生物の生育にとって必須であるが、大量の場合には、重金属イオンが微生物の細胞に取り込まれた後、内部のたんぱく質分解物を変性させるために、微生物に生育阻害を及ぼす⁷⁾。この阻害の作用システムは銅と銀とで共通であり、金属がイオン化した場合のみに作用する¹¹⁾。金管楽器が古くなるにつれて、金属の表面の腐食 (サビ) が促進されて、金属イオンの濃度が次第に増加すると考えられる¹²⁾。例えば、銅のサビである緑青は、古い金管楽器でしばしば見られるが⁶⁾、このようなサビの発生は、楽器の管内部の湿った環境と、唾などに含まれる少量の NaCl によって助長される¹²⁾。

金管楽器が古くなるとともに増加する金属毒性は、金管楽器の材料である銅イオンと亜鉛イオンによるものである。しかし、金管楽器が古くなるにつれて、*P. lilacinus* や *Fusarium* spp. の成長は促進されるように見えるが (Table 1)、あくまで他のカビと比較して、成長が良好であると言ふべきであろう。金属イオンに対する微生物の耐性に関する文献は多い。例えば、*Penicillium* と *Aspergillus* 等のいくつか種は、菌細胞への金属イオンの浸透を阻止することによって、高濃度の銅溶液中でさえも生育できる¹³⁾。同様に、*Candida utilis* の場合には、銅イオンが高濃度で摂取されても、細胞内で沈殿ができて無害化されることが示唆される⁷⁾。なお、今のところ *P. lilacinus* の耐性のメカニズムは不明である。本報で調べた限り、*P. lilacinus* の2株が銅イオンにも亜鉛イオンにも最も耐性があり、*F. oxysporum* が続いた (Table 3)。真ちゅうには約65%の銅が含まれていることから、古い金管楽器のカビに対する生育阻害には、亜鉛イオンより銅イオンの方がより寄与していると考えられる。

銀メッキは金管楽器の表面のカビ汚染を抑制していると思われる。AgNO₃のカビの生育阻害効果は、CuSO₄ や Fe₂(SO₄)₃ より桁違いに低濃度である 1/64 で認められた (Tables 3, 4)。例えば、細菌 *Escherichia coli* に対しては、銀イオンは銅イオンの約 1/50 の濃度で同等

の阻害効果が認められたとの報告がある¹⁴⁾。ゆえに、抗菌効果を銀イオンと銅イオンとで比較すると、カビに対する場合と細菌に対する場合とではほぼ同様であることが示唆される (Table 3)。

室内環境で一般的に見られる *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Penicillium* 属のカビが金管楽器では稀であるのは、主に銅イオンに対する感受性のためである可能性がある。理由は、必ずしも金管楽器に銀メッキが施されている訳ではないことによる (Table 3)。さらに、*P. lilacinus* は、第二鉄やアルミニウムのイオンの多い一般環境ではなく、銅、亜鉛、銀イオンの多い環境、すなわち金管楽器内に適応しているカビであると考えられる。緑青は、近年ヒトへの健康被害はほとんどないと言われるようになったが¹¹⁾、*P. lilacinus* が著しく汚染すると、目や鼻の疾患の原因になる可能性があると言われている¹⁵⁾。ゆえに、著しいカビ汚染がしばしば見られる古い金管楽器を使用する場合には、内部をよく手入れして使用することが推奨される。

本研究で用いた金属イオンの塩は、銀イオンの硝酸塩を除いて、銅、亜鉛、第二鉄、アルミニウムイオンはいずれも硫酸塩だった。AgNO₃は他の金属イオンよりカビに対して効果が見られたが、硝酸イオン濃度は、硫酸イオン濃度の 1/64 なので、硝酸イオン濃度の影響は無視することが出来るものと考えられる。また、pH 値が 2.28 と最も低い 0.16% の Fe₂(SO₄)₃ の場合は不明だが、次に低い pH 3.02 の 0.16% の Al₂(SO₄)₃ の培地では、多くのカビが成長した。また、ほとんどのカビは pH3 以上で生育でき、中には pH2 でも生育するカビもいると言われている¹⁶⁾。それゆえ、本実験のカビに対する塩の陰イオンの影響は、金属イオンに比してごく小さいと考えられる。

結 論

金管楽器に多くみられるカビは、とりわけ *P. lilacinus* は、一般に銅、亜鉛、銀イオンに耐性があることが分かった。金管楽器に多いカビは、楽器の管内部の環境に適応したカビであると考えられる。楽器の著しいカビ汚染は、健康被害の可能性もあるので注意が求められる。

謝 辞

大阪市環境科学研究センターの加田平賢二博士に、原子吸光分光光度計で、Fe₂(SO₄)₃ の水和物の金属濃度を測定していただいた。この場を借りて謝意を表したい。本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業・基盤研究 C (15K00774) の援助を受けて行った。

文 献

- 1) 浜田信夫, 阿部仁一郎 (2017) 管楽器におけるカビ汚染の現状. 日本防菌防黴学会誌 45, 345-351.
- 2) Hamada, N., and Abe, N. (2010) Comparison of fungi found in bathrooms and sinks. *Biocontrol Science* 15, 51-56.
- 3) 濱田信夫, 藤田忠雄 (2000) 食品におけるカビ汚染の特徴. 生活衛生 44, 205-210.
- 4) 濱田信夫 (2006) サッシ窓の結露とカビ汚染の現状. 生活衛生 50, 69-75.
- 5) Samson, R. A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., and Andersen, B. (2010) *Food and indoor fungi*. CBS-KNAW, Utrecht, Netherlands.
- 6) 浜田信夫 (2017) 管楽器におけるカビ汚染の対策. 日本防菌防黴学会誌 45, 385-391.
- 7) Gadd, G. M., and Griffiths, A. J. (1978) Microorganism and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology* 4, 303-317.
- 8) Sailer, M. F., and Homan, W. J. (2011) Protection of wood. In : Adan OCG, Samson RA (eds), *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living*. Wageningen Academic Publisher, Netherlands, pp. 435-462.
- 9) 飯盛杏子, 池水麦平, 吉川浩史, 濱田信夫 (2007) 培養したカビに対する銀イオンの除菌効果と栄養環境の影響. 防菌防黴 35, 415-422.
- 10) Abe, N., and Hamada, N. (2011) Molecular characterization and surfactant utilization of *Scolecobasidium* isolates from detergent-rich indoor environments. *Biocontrol Science* 16, 139-147.
- 11) 松村吉信 (2005) 銀イオンや銅イオンの抗菌性-作用メカニズムと微生物の適応戦略. 科学と教育 53, 288-291.
- 12) 増子 昇 (1997) さびのおはなし, 増補版. 日本規格協会, 東京.
- 13) Basu, S. N., Bose, R. G., and Bhattacharyya, J. P. (1955) Some physiological studies on a copper tolerant *Penicillium* species. *Journal of Scientific and Industrial Research* 14, 46-53.
- 14) Nies, D. II. (1999) Microbial heavy metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 730-750.
- 15) Larone, D. H. (2011) *Medically important fungi* (5th ed.). ASM Press, Washington D. C.
- 16) Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (2009) *Fungi and food spoilage* (3rd ed.). Springer, NY.

論文内容大意

表題：金管楽器内で生育するカビの金属耐性（原著論文）
著者：浜田信夫、佐久間大輔（大阪市立自然史博物館）、阿部仁一郎（大阪健康安全基盤研究所）
掲載：日本防菌防黴学会誌, Vol.47, No.7, pp.265-271 (2019)

金管楽器では、*Purpureocillium* や *Fusarium* が多く見られるが、室内環境でよく見られる *Penicillium* などは少ない。金管楽器中のカビ相を制御する環境要因について研究した。楽器を長期間使用すると、*Purpureocillium* などが顕著に増加することが分かった。緑青が古い金管楽器に見られることから、金属イオンがカビの成長に影響する可能性が示唆されたので、金管楽器で多い6株のカビと、住環境から分離された5株のカビについて、金属耐性を比較した。その結果、*P. lilacinus*, *F. oxysporum* が、室内環境の普通種より銅や亜鉛のイオンに対して耐性があった。また、金管楽器から分離したカビは、銀イオンに対しても耐性があった。一方、一般環境に多い第二鉄とアルミニウムのイオンは、金管楽器から分離したかどうかに関係なく、カビの成長を阻害した。金管楽器に多いカビは、銅、亜鉛、銀の各金属イオンの多い環境に適応していると考えられる。

Key words : Brass (真ちゅう)/Fungal contamination (カビ汚染)/Metal toxicity (金属毒性)/*Purpureocillium*/Wind instruments (吹奏楽器).

講座内容大意

表題：環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御¹³⁾
アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出
著者：井上浩章（アクアス株式会社 つくば総合研究所）、枝川亜希子（大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部）
掲載：日本防菌防黴学会誌, Vol.47, No.7, pp.273-277 (2019)

レジオネラは、環境中でアメーバに捕食され、そのアメーバを宿主として増殖する。近年、レジオネラとアメーバとの密接な関連を利用し、純培養のアメーバの中でレジオネラを増殖させてから検出するアメーバ共培養法を環境水試料に応用する試みが行われている。従来法に加えてアメーバ共培養法を行うことにより、より広範囲にレジオネラを検出することが可能となってきた。

本稿では、アメーバ共培養法を用いた冷却水、浴槽水、水景水からのレジオネラ検出について解説する。

Key words : Amoebic Co-Culture (アメーバ共培養法)/*Acanthamoeba* (アカントアメーバ)/*Legionella* spp. (レジオネラ属菌)/Environmental water (環境水).

表題：物理的微生物制御技術の今とこれから¹⁴⁾

放射線の利用—ガンマ線及び電子線による滅菌

著者：梅津 浩（日本照射サービス株式会社）

掲載：日本防菌防黴学会誌, Vol.47, No.7, pp.279-283 (2019)

放射線照射のうちガンマ線及び電子線による滅菌を取り上げ、利用されている分野や設備の特徴を交えながら照射法について紹介する。また、両法の線量分布のデータについて一例を示し、滅菌バリデーションや材質劣化についてもごく簡単に説明する。

放射線は、包装材を含む製品に対して多かれ少なかれ材質劣化を生じさせるが、最終梱包形態のまま滅菌できるメリットがある。また、滅菌バリデーションの考え方に従うことによって、都度の無菌試験を実施すること無くドジメトリックリリースが可能である。

そのような特徴を紹介することを通じて、放射線による滅菌に興味を持って頂くための一助としたい。

Key words : ガンマ線滅菌/電子線滅菌/滅菌バリデーション/材質劣化/ドジメトリックリリース.
