

住宅内水周りに発生するピンクスライム形成菌の特性と精油による抑制効果

著者	井原 望
発行年	2015-03-31
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416甲第574号
URL	http://doi.org/10.32286/00000144

課程博士

「平成 27 年 3 月期 関西大学審査学位論文」

住宅内水周りに発生するピンクスライム

形成菌の特性と精油による抑制効果

理工学研究科 総合理工学専攻

食品領域

12D6016 井原 望

要 旨

《概要》

本研究では、水廻りにおいてピンク色汚染問題を引き起こし、原因微生物の実態や有効な対策法の検討が進んでいないピンクスライム汚染に対する有効な制御法を提案するため、ピンクスライムの特性と精油に着目した抑制効果の評価を行った。

まず、実際の一般家庭における水周りに発生しているピンクスライムの実態を調査することで、制御標的とすべきピンクスライム形成菌の主要菌種の特定を試みた。その結果、制御標的とすべき主要なピンクスライム形成微生物は、*Methylobacterium* と *Rhodotorula* であることが分かった。次に、精油の利用が水周り環境適応型のピンクスライム対策法であるとみなし、精油蒸気によるピンクスライム形成菌に対する抗菌性評価を行った。その結果、ローズマリー、ティートリー、ペパーミントの3種の精油蒸気が、*Methylobacterium* と *Rhodotorula* に対して高い抗菌効果を示すことを明らかにした。さらに、最も高い抗菌効果を示したペパーミントを用い、*Methylobacterium* と *Rhodotorula* に対する殺菌性評価を行った。その結果、ペパーミント蒸気により顕著な殺菌効果が認められる一方、*Methylobacterium* と *Rhodotorula* の両菌種が比較対照微生物よりも抵抗性を示す傾向が明らかとなった。そこで、抵抗性の要因を調査するため、殺菌効果におけるピルビン酸ナトリウムの添加効果やヨウ化プロピジウム染色法による膜透過性変化を評価した結果、活性酸素がペパーミント蒸気の殺菌効果に寄与していること、そして *Methylobacterium* と *Rhodotorula* は抗酸化剤であるカロテノイドを保有しているためにカロテノイド非保有菌よりも抵抗性を示すことが示唆された。以上の結果より、ペパーミントに代表される精油蒸気の利用が浴室や洗面所などの住宅内水周りにおいて発生するピンクスライム形成菌の有効な制御法として期待できることが分かった。

《各章の要旨》

序論では、本研究の背景となっている住宅内に発生する微生物汚染の現状と対策、今後のライフスタイルの変化に対応した微生物汚染対策のあり方について述べている。そして、最も微生物汚染が激しい水周りでの現状と対策、それらの重要性について具体的に言及し、本研究で取り扱った精油の利用の有用性について提案している。

第1章では、実際の一般家庭における水周りに発生しているピンクスライムの実態を調査することで、制御標的とすべきピンクスライム形成菌の主要菌種の特定を試みている。住宅内水周りに発生するピンク色汚染の原因微生物を調査するため、31家庭の水周りからピンクスライムを31サンプル採取し、それぞれの形成微生物の分離培養および同定を行っ

た。細菌類の分離培養条件は標準寒天培地/25℃/1週間、真菌類の分離培養条件はポテトデキストロース寒天培地/25℃/3～5日間とした。その結果、細菌類はいずれも *Methylobacterium* と同定され、その検出率は 54.8% (17/31) であった。酵母はいずれも *Rhodotorula* と同定され、その検出率は 41.9% (13/41) であった。糸状菌は *Fusarium* と同定され、その検出率は 3.2% (1/31) であった。以上の結果から、制御標的とすべき重要なピンクスライム形成微生物は、*Methylobacterium* と *Rhodotorula* の両微生物であることが示唆された。

第 2 章では、精油の利用が水周り環境適応型のピンクスライム対策法であるとみなし、精油によるピンクスライム形成菌に対する抗菌性評価とその要因についての検討を行っている。ピンクスライム形成微生物の *Methylobacterium mesophilicum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Fusarium oxysporum* に対するローズマリー、ティートリー、ペパーミント蒸気の抗菌性を評価した。対照微生物として *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*、試験法として寒天蒸気法を採用した。抗細菌性の評価は標準寒天培地 (pH 7.0) で 25℃の条件、抗真菌性の評価はポテトデキストロース寒天培地 (pH 5.6) で 25℃の条件で行った。精油 20 μ l への曝露を 1 日間 (24 時間) とした場合の阻止円は、いずれの精油においても *E. coli* および *S. aureus* に対して認められなかったが、*M. mesophilicum* に対して 80mm 以上となった。*C. albicans*, *R. mucilaginosa* および *F. oxysporum* に対する阻止円はいずれの精油においても認められなかったものの、ペパーミントにおける *R. mucilaginosa* と *F. oxysporum* のコロニーの色は白色となった。精油 20 μ l への曝露を 5 日間とした場合の阻止円は、いずれの精油においても *C. albicans* に対して認められなかったが、ペパーミントでは *R. mucilaginosa* に対して 80mm 以上となった。以上の結果より、*M. mesophilicum* に対してはいずれの精油も高い抗細菌効果、*R. mucilaginosa* に対してはペパーミントが高い抗真菌効果を示すことが明らかとなった。

第 3 章では、精油による殺菌性評価を行うと共に、抗菌性と殺菌性の両結果の関連性やピンクスライム制御法への応用可能性について考察した。*M. mesophilicum* と *R. mucilaginosa* に対するペパーミント蒸気の殺菌効果を寒天蒸気法により評価した。寒天表面に塗抹した供試菌に対し、シャーレ内でペパーミント蒸気に曝露させた後、回収液へ移行させることで評価した。60 μ l のペパーミントをペーパーディスクに含浸させた場合、*M. mesophilicum* に対して 48 時間後、*R. mucilaginosa* に対して 168 時間後に顕著な殺菌効果が認められたが、両菌種は各々の対照菌である *Escherichia coli* と *Candida albicans* よりも抵抗性を示した。寒天に対して過酸化水素の消去剤であるピルビン酸ナトリウムを 0.03% 添加した場合、*M. mesophilicum* と *R. mucilaginosa* に対する殺菌効果はほとんど変化しなかったが、*E. coli* と *C. albicans* に対する効果は減少した。過酸化水素水

(0.2-1.0mM) による処理では *E. coli* と *C. albicans* よりも *M. mesophilicum* と *R. mucilaginosa* が抵抗性を示し、ペパーミント蒸気による殺菌効果と同様の傾向となった。

以上より、活性酸素がペパーミント蒸気の殺菌効果に寄与していること、そしてピンクスライム形成菌は抗酸化剤であるカロテノイドを保有しているために非保有菌よりも抵抗性を示すことが示唆された。一方で、ペパーミント蒸気は活性酸素を介しない直接的な殺菌効果を持つことも示された。従って、浴室や洗面所などの住宅内水周りにおいて発生するピンクスライム形成菌は、一般的な細菌や酵母よりもやや抵抗性であるものの、これら形成菌に対してペパーミント蒸気の利用が有効な制御法として期待できることが判明した。

以上

目 次

序論	・・・6
第1章 住宅内水周りに発生するピンクスライム形成菌の特定	
1-1 緒言	・・・13
1-2 実験材料および方法	・・・14
1-2-1 ピンクスライム形成菌の分離場所と分離培養条件	
1-2-2 細菌分離株の同定	
1-2-3 真菌分離株の同定	
1-3 結果	・・・15
1-4 考察	・・・15
第2章 ピンクスライム形成菌に対する精油蒸気の抗菌作用特性	
2-1 緒言	・・・18
2-2 実験材料および方法	・・・19
2-2-1 試験菌株と前培養条件	
2-2-2 精油	
2-2-3 抗細菌効果の評価	
2-2-4 抗真菌効果の評価	
2-3 結果	・・・23
2-3-1 抗細菌効果	
2-3-2 抗真菌効果	
2-4 考察	・・・28
2-4-1 抗菌作用特性	
2-4-2 各種処理条件が抗菌効果に及ぼす影響	
2-4-3 抗菌作用機構の推定	
第3章 ピンクスライム形成菌に対する精油蒸気の殺菌作用特性	
3-1 緒言	・・・31
3-2 実験材料および方法	・・・32
3-2-1 試験菌株と前培養条件	
3-2-2 精油	

3-2-3	殺細菌および殺酵母効果の評価	
3-2-4	過酸化水素による殺細菌および殺酵母効果の評価	
3-2-5	殺細菌効果における膜透過性変化の評価	
3-2-6	殺細菌効果における精油の主要活性成分の評価	
3-3	結果	・・・35
3-3-1	殺細菌および殺酵母効果	
3-3-2	過酸化水素による殺細菌および殺酵母効果	
3-3-3	殺細菌処理における膜透過性変化	
3-3-4	殺細菌効果における精油の主要活性成分	
3-4	考察	・・・50
3-4-1	殺菌作用特性と作用機構	
3-4-2	殺菌効果と抗菌効果がピンクスライム形成菌と対照菌との間で異なる要因	
3-4-3	殺細菌効果における精油の主要活性成分	
3-4-4	ピンクスライム制御法としての実用化の可能性	
	総括と結論	・・・54
	参考文献	・・・56
	本論文に関する報告	・・・60
	謝辞	・・・61

序論

微生物の繁殖が原因となる様々な問題は、食品、医療、農業、排水処理、文化財保存など多岐に渡る分野において生じている。そのため、従来から、食品分野では日持ち剤の活用による食品腐敗防止や食品製造工場における衛生管理、医療分野では医療用具などの効率的な滅菌手法や医薬品製造工場での衛生管理、農業分野では農作物の収量確保などを目的として、問題を引き起こす汚染微生物の制御に関する研究や技術開発が行われてきた。同様に上記他の分野においても、問題となる汚染微生物の制御に関する研究や技術開発が行われている。

これらの分野に加えて近年では、我々の生活基盤として重要である住宅内分野での微生物汚染問題と対策が一層注目されるようになってきた。住宅内で微生物汚染が発生することにより、それぞれの状況によって生活者は3種類の被害を受ける可能性がある。1つ目は建材や部材などの外観汚染である。例として、浴室などの水周りや壁紙に発生する黒色系統のカビ、便器内に発生する細菌などが挙げられる。これらは建材や部材の強度低下やシミ、見た目の不衛生感を引き起こす。2つ目は悪臭や不快臭である。浴室や台所の排水口での細菌や酵母の増殖に伴う下水臭、室内や収納部の結露により発生するカビに伴うカビ臭などが代表例である。3つ目は喘息などのアレルギー症や喉などの炎症である。室内で発生するハウスダストに付着している耐乾性の細菌やカビを生活者が体内に吸引することにより発生すると考えられる。

これら微生物汚染が引き起こす被害に対する対策が注目されるようになった理由としては3つ考えられる。1つ目の理由は、清潔衛生志向の高まりである。インターネットや携帯端末などによる情報の伝達技術が進化することで、食品偽装問題やバイオテロ、感染症拡大などについてのニュースが迅速に伝わるようになった。このことが我々の清潔意識や汚染に対する懸念意識をより助長させ、微生物対策をより重要視するようになったと考えられる。2つ目の理由は、誰でも手軽で簡単に微生物対策が可能になったことである。除菌スプレーや抗菌マスクなどの微生物汚染対策グッズがドラッグストアやコンビニエンスストアなどに多く並ぶようになった。また、空気清浄機や微生物対策機能を付与した除湿機、掃除機、洗濯機などの家電製品が家電量販店に多く販売されるようになった。3つ目の理由は、住宅の高気密化に伴う室内環境の温度湿度環境の変動が少なくなったことである。微生物の繁殖には、温度、湿度、栄養、酸素などが必要であり、これらの条件が好適な範囲に一定期間以上保持されることで発生が促進される。住宅の高気密化に伴って温度変動が少なくなることで、生活者にとって快適な環境が実現される一方、微生物の繁殖が促進されるようになったことが指摘されている。

さらに近年の社会環境や地球環境の変化により、住宅内環境や生活者の微生物汚染対策に関する行動様式は変化している。従来から行われてきた住宅内に発生する微生物汚染対策の代表例として、微生物の棲家となる室内ハウスダストや水廻りに対する定期的な掃除や換気乾燥が挙げられる。しかしながら、近年の社会成熟化に伴う核家族化や単身化、高齢化、夫婦共働き世帯などが増加することで、定期的な掃除に必要な時間確保や身体的負担の許容が困難になりつつあると考えられる。また、PM2.5や黄砂などの大気汚染範囲の拡大、発生予測が困難な暴風暴雨などの異常気象が頻発するようになったことから、外気を住宅内へ積極的に取り込んで換気乾燥することへの懸念が高まりつつある。以上のような背景から、今後も我々が快適で健康な暮らしを継続していくために、住宅内に発生する微生物対策は重要な課題として認識され、より有効な方法が開発されることが期待されている。

住宅内における微生物汚染の発生場所と微生物種について Table 1 にまとめた¹⁻³⁾。居間や寝室などの居室空間では生活行動に伴ってハウスダストが発生し、生活者が吸引することによって喉の炎症や咳などを誘発する。ハウスダストには *Staphylococcus* や *Bacillus* などの耐乾燥性の細菌やカビが付着している。ハウスダストを効率的に除去するためには、掃除機がけや床拭きなどによる定期的な清掃が有効である。最近では粘着シートやハウスダストを捕捉しやすくした細い繊維を利用したものが各メーカーから発売されており、これを利用することで簡単に効率的な清掃が可能になった。あるいは空気清浄機を使うことでハウスダストの自動除去も可能である。また、室内温度や湿度の変動が原因となって発生する壁紙への結露によってカビが発生する。対策として、防カビ剤が添加された壁紙を用いることや日常的な換気乾燥が有効である。湿気が滞留し易い床下、押入れ、下駄箱などの収納部においても結露が発生しやすいため、カビの発生が認められやすい。対策として、除湿剤の設置や定期的な換気乾燥が有効である。普及が進んでいる家電製品にも微生物汚染の発生が多い。エアコン内部においては、冷房運転終了後に発生する内部結露が原因となり、*Aspergillus* や *Penicillium* などの好乾性のカビが繁殖する⁴⁾。エアコンの再運転時にこれらのカビが空間中へ排出され、生活者の吸引による喉の炎症や咳などやカビ臭の発生を誘発する。対策として、結露が発生したエアコン内部を効率的に乾燥させる送風運転を行うこと⁵⁾、あるいは専門業者によるエアコン内部の定期的な掃除が有効である。掃除機能を持つロボットを搭載したエアコンを利用することで自動掃除が可能である。また、エアコンフィルターにはハウスダストが蓄積しやすく、多量のカビや耐乾燥性の細菌が存在するため、フィルターに抗菌・防カビ加工を施すことの有効性も報告されている⁶⁾。洗濯機内部では *Cladosporium* や *Exophiala* などのカビや赤色酵母が発生する⁷⁾。対策として、市販のカビ取り剤や温水洗浄などによる定期的な掃除が有効である。微生物汚染が最

も顕著な場所としては、微生物の発生に必須な要素のひとつである水が常に伴う環境である便器、洗面所、台所のシンク、浴室などの水周りが挙げられる。便器では *Staphylococcus* などの細菌の繁殖によるアンモニア臭気発生問題がある⁸⁾。対策として、便器使用後の洗浄液として電解水を活用したり、トイレ用の消臭剤を用いることが有効である。台所のシンクと洗面所では水滴が残り易いために *Methylobacterium* などのピンクスライムや一般細菌による汚染が激しい⁹⁾。そして水周りの中において最も微生物汚染が顕著であり、裸で入浴やシャワーをする場所であるために生活者にとって強く懸念される場所が浴室である。そこで以下、浴室における微生物汚染の現状に焦点を絞って詳述する。

Table 1 住宅内における微生物汚染の発生箇所、汚染微生物種、汚染度合い

場所	細菌	酵母	カビ	
居室	居間	△	×	△
	寝室	△	×	○
	押入れ	△	×	○
	和室畳	△	×	○
	窓サッシ	△	×	○
	壁紙	×	×	○
収納	下駄箱	△	×	○
	床下収納	△	×	△
家電製品	洗濯槽	○	◎	◎
	エアコン内部	○	△	◎
	冷蔵庫内	○	○	○
	掃除機	△	×	△
水周り	浴室	◎	◎	◎
	台所シンク	◎	○	◎
	便器	◎	△	◎
	洗面所	◎	○	◎

×：ほぼ発生なし △：少し発生する ○：発生する ◎：顕著に発生する

浴室においては細菌、酵母、カビのいずれも良く発生するが、特にカビによる汚染が深刻である。その代表的な理由のひとつとして、黒色や深緑色を呈するカビは生活者が認識しやすいことが挙げられる。まず細菌汚染に関しては、残水しやすい床や排水口において顕著である。*Pseudomonas* や *Methylobacterium* などが $10^5 \sim 10^8$ CFU/cm² 程度に繁殖し、ヌルつきなどの不衛感や下水臭などを引き起こす¹⁰⁾。対策として、塩素系あるいはアルカリ系のヌメリ除去剤の利用が挙げられる。入浴後に残る風呂湯にも細菌が繁殖しやすい。入浴後の翌日には 10^6 CFU/ml 位にまで繁殖している¹¹⁾。また、公共の入浴施設では *Legionella* による汚染が度々発生する¹²⁾。対策として、風呂湯における残留塩素濃度の確保や風呂湯の循環濾過設備の充実が行われている。黒変色を引き起こすカビと並んで、ピンク色変色の原因となる紅色細菌の *Methylobacterium*^{10) 13)} や赤色酵母の *Rhodotorula*²⁾ の繁殖も問題視されている。しかしながら、ピンクスライムの実態に関してはカビと比較して不明な部分が多い。対策として、*Methylobacterium* に対して 60°C での加熱やアルコール処理による殺菌効果¹⁰⁾ が認められているが、塩素¹⁰⁾、乾燥や界面活性剤¹³⁾ などの処理に対して抵抗性を示す。このような実用上の検討が行われてきたにも関わらず、有効対策についての研究や技術開発はあまり進展がみられない状況である。

浴室において最も深刻となるカビ汚染は、壁、天井、風呂蓋、目地、床などいずれの箇所にも発生する。発生するカビの種類や数に関しては数多く報告されており、*Cladosporium*、*Aureobasidium*、*Exophiala*、*Phoma* などの暗色系の種が多い^{14) 15)}。数が多い場所としては、壁や天井などの残水が少ない箇所では $10^2 \sim 4$ CFU/100 cm²、目地など残水し易い箇所では 10^6 CFU/100cm² とされている。対策に関する研究報告も数多くある。換気乾燥による防カビ処理^{16) 17)}、目地への防カビ剤添加処理¹⁸⁾、塩素系カビ取り剤による漂白と殺カビ処理¹⁹⁾ などが有効とされている。最近では、防カビ効果を付与させたミストを散布させる方法²⁰⁾ も開発されつつある。このように、黒変色を引き起こすカビ汚染の問題と対策法の研究開発が頻繁に取り上げられるのに対し、ピンク変色を引き起こすピンクスライムは問題としてはしばしば注目されるものの、原因微生物の実態や対策に関する研究はあまり進んでいない現状がある。

以上のように住宅内においては浴室に代表される水周りでの微生物汚染が顕著であること、汚染が発生する箇所に対しては、生活者による対策がそれぞれ行われていることが分かる。そこで、水周りで検討可能な微生物汚染対策法についての現状を整理し、それぞれの長所と短所を Table 2 に示した。物理的方法として、除去、加熱、乾燥、紫外線処理などがある。除去するための実際手段としては掃除することである²¹⁾。確実な効果が見込めるものの、時間的制約が多く、身体的負担が大きい。加熱を利用する場合、実際手段としては 40~60°C の湯を掛けることが考えられる。しかしながら、湯を作り出すためには相応

のエネルギーと電気代を必要とすることから、昨今の省エネルギー、省電気志向などの時代動向から望ましい方法とは言い難い。乾燥も効果があり、実際手段としては換気扇による自動乾燥、窓開けによる自然乾燥などが挙げられる¹⁷⁾。しかしながら、換気扇を稼動することで振動が引き起こされるなど、生活上の障害となる別の問題も発生しやすい。窓開けによる換気は自動車の排気ガスや近年のPM2.5等の大気汚染物質の発生問題が懸念されるため、外気を積極的に取り入れることに抵抗があり、防犯上の心配も予想される。また、近年の建築技術の進歩によって多く建設されるようになった高層マンションやホテルでは窓を開ける機会が大きく制限される。紫外線は短時間で高い効果が認められるが、住宅部材の変色や強度低下を促進する可能性があるし、生活者への危険性を及ぼす懸念もある。また、紫外線が当たらない箇所への効果はほとんど見込めない。

化学的方法としては、塩素剤、界面活性剤、アルコール、精油などを利用した方法がある。塩素剤および界面活性剤処理するためには、浴室用、トイレ用、台所用、排水口用など場所ごとに商品化された多種類の市販品があるため、簡単に実施することが可能である。高い殺菌効果や除菌効果があるものの、使用者の腕や手などへの付着や呼気による吸い込みなどの危険性が懸念されるし、排水後の環境負荷が高いなどの問題がある。アルコール処理は効果に即効性があり、残留性も少ないために環境負荷が低いが、同時に揮発性が高いために効果持続性に難点がある。

一方、精油は天然由来であるために安全性が高く、低環境負荷も低いと考えられている。抗菌効果や殺菌効果だけでなく家事やその他生活行動等に伴って発生する悪臭や不快臭の消臭効果、生活者の社会行動に伴って発生する各種心身のストレスを緩和するためのアロマ効果やリフレッシュ効果という付加効果を持ち合わせている²²⁾。すなわち精油は、住宅内の水周りにおいて従来から用いられてきた合成化学的・無機的な薬剤よりも好適な性能を持ち合わせている抗菌剤あるいは殺菌剤のひとつと考えられる。

Table 2 住宅内水周りで検討可能な微生物汚染対策法の長所と短所

制御原理	制御法	性 能				
		制御効果	安全性	環境負荷	簡便性	付加価値
物理的	掃除	◎	◎	◎	×	×
	加熱	○	△	×	△	△
	乾燥	○	◎	○	○	×
	紫外線	○	×	○	○	×
化学的	界面活性剤	○	△	×	○	△
	塩素	◎	×	×	○	×
	アルコール	◎	△	◎	○	△
	精油	○	○	○	○	◎

×：優れない △：あまり優れない ○：優れる ◎：特に優れる

以上の背景をもとに本研究では、住宅内で発生する微生物汚染の中でも最も深刻な水廻りにおいて、原因微生物の実態や有効な対策法の検討が進んでいないピンクスライム汚染に対する有用な制御法を提案するため、ピンクスライムの特性把握と精油に着目した抑制効果の評価を行った。まず第 1 章では、実際の一般家庭における水周りに発生しているピンクスライムの実態を調査することで、制御標的とすべきピンクスライム形成菌の主要菌種の特特定を試みた。第 2 章では、精油の利用が水周り環境適応型のピンクスライム対策法であるとみなし、精油によるピンクスライム形成菌の抗菌性評価とその要因についての検討を行った。続く第 3 章では、精油による殺菌性評価を行うと共に、抗菌性と殺菌性の両効果の結果を踏まえ、精油の利用によるピンクスライム制御法への応用可能性について考察した。

第1章 住宅内水周りに発生するピンクスライム形成菌の特定

要約

住宅内水周りに発生するピンク色汚染の原因微生物を調査するため、31 家庭の水周りからピンクスライムを31 サンプル採取し、それぞれの形成微生物の分離培養および同定を行った。細菌類の分離培養条件は標準寒天培地/25℃/1 週間、真菌類の分離培養条件はポテトデキストロース寒天培地/25℃/3～5 日間とした。その結果、細菌類はいずれも *Methylobacterium* と同定され、その検出率は 55% (17/31) であった。酵母はいずれも *Rhodotorula* と同定され、その検出率は 42% (13/41) であった。糸状菌は *Fusarium* と同定され、その検出率は 3.2% (1/31) であった。以上の結果から、制御標的とすべき重要なピンクスライム形成微生物は、*Methylobacterium* と *Rhodotorula* の両微生物であることが明らかとなった。

1-1 緒言

浴室や洗面所などの水周りは、住宅内において微生物汚染が最も顕著な場所である。これらの場所では黒色とピンク色の 2 種類の微生物汚染がよく発生する。黒色汚染の原因についての実態調査は幾つも行われており、*Cladosporium*、*Aureobasidium*、*Exophiala*、*Phoma* などの暗色系のカビが主要な原因カビ種であることが分かっている^{14) 15)}。優先原因カビ種を用い、住宅基材におけるカビ汚染機構の解明²³⁾ などの防カビ技術開発のための要素研究も進んでいる。これに留まらず、乾燥による発生予防法^{16) 17)}、日常的な掃除による発生予防法²¹⁾、塩素系薬剤によるカビ漂白効果¹⁹⁾ などの評価が行われてきており、ミストを利用した発生予防法²⁰⁾ など実用的かつ新たな防カビ技術開発も進んでいる。このことから、有効な微生物制御技術を確立するためには、制御標的とする微生物種を明らかにすることが第一歩であると考えられる。

一方、ピンク色汚染の原因微生物についてはグラム陰性細菌の *Methylobacterium*^{10) 13)} あるいは酵母の *Rhodotorula*²⁴⁾ が汚染原因菌であるとの報告があるが、どちらが主要な原因微生物であるかを示した知見は少ない。さらに両菌種の制御方法についても、加熱処理やアルコール処理により殺菌効果が認められるなどの報告^{10) 24)} にとどまっており、詳細な知見があまり見当たらない。このようにピンクスライム制御法の開発があまり進んでいない原因のひとつとして、標的微生物の種類の詳細が明らかになっていないことが挙げられ

る。そこで本章では、実際の一般家庭に発生しているピンクスライムを実態調査することで、主要なピンクスライム形成微生物の特定を行った。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 ピンクスライム形成菌の分離場所と分離培養条件

ピンク色汚染物の採取は、大阪府内の一般家庭 31 世帯の浴室や洗面所などの水周りを対象とし、2011 年の 6 月から 7 月の間に行った。採取方法は濱田らの報告²⁴⁾に従い、拭き取り綿棒と滅菌済み希釈液が一体となった拭き取り検査キット (Elmex, Pro-media ST-15) を用いた。ピンク色汚染物の発生面積約 $1 \times 10 \text{cm}^2$ を綿棒でゆっくりと一定の圧力で拭き取り後、綿棒を滅菌済み希釈液に浸漬し、原因微生物の分離培養に供試した。

細菌類の分離培養には、標準寒天培地 (日水製薬) を用いた。必要に応じて適宜希釈した滅菌済み希釈液 0.5ml を寒天培地に塗抹後、 25°C にて培養した。6-8 日間後に形成されるピンク色のコロニーを汚染原因細菌として分離した。真菌類の分離培養には、細菌類の増殖を抑制するためのクロラムフェニコール 50mg/L を添加したポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬) を用いた。細菌類と同様に、適宜希釈した滅菌済み希釈液 0.5ml を寒天培地に塗抹後、 25°C にて培養した。3~5 日間かけて形成される光沢性のあるピンク色のコロニーを汚染原因酵母として、また、菌糸を伴うピンク色あるいは赤色の綿状のコロニーを汚染原因糸状菌として分離した。

1-2-2 細菌分離株の同定

汚染原因細菌の分離株については、既往の報告²⁵⁾を参考にし、ブドウ糖発酵性、細胞形態の観察、グラム染色性、オキシダーゼおよびカタラーゼ活性、運動性についての性状試験を行った。詳細な手順は成書に従った²⁶⁾。

また、汚染原因細菌の全分離株から 1 株をランダムに選定し、16SrDNA の上流側 500 塩基対の解析による菌種推定を行った。寒天培地上のコロニーを滅菌蒸留水に懸濁後、 95°C で 10 分間加熱した。遠心分離により得られた上清を DNA 抽出液とし、Microseq 500 16SrDNA Bacterial Identification PCR Kit (Applied Biosystems) を用いて反応液を調製後、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) により PCR を行った。PCR 産物の精製は、Montage PCR Centifugal Filter (Millipore) による限外ろ過により行った。精製した PCR 産物を MicroSeq 500 16SrDNA Bacterial Identification Sequencing Kit (Applied Biosystems) によりシーケンス反応後、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決

定した。塩基配列の相同性検索 (basic local alignment search tool) を行い、97%以上で最も高い一致率を示したものを同定種とした。

1-2-3 真菌分離株の同定

汚染原因酵母の分離株については、細胞形態を観察した後、全分離株から 6 株をランダムに選定し、5.8SrDNA を挟む internal transcribed spacers-1 および 2 の解析による菌種推定を既報²⁷⁾ に従って行った。所定量のジルコニウムビーズおよび TE 緩衝液と共に、寒天培地上のコロニーをチューブに投入後、攪拌破砕した。加熱後に氷冷し、遠心分離により得られた上清を精製後、ITS-1 プライマーおよび ITS-4 プライマーを用いて所定の反応条件により PCR を行った。PCR 産物を精製したものをシーケンス反応後、塩基配列を決定した。塩基配列の相同性検索を行い、97%以上で最も高い一致率を示したものを同定種とした。汚染原因カビの分離株については、コロニーの形状および顕微鏡による形態的特徴によって属を同定した。

1-3 結果

各家庭から採取したピンク色汚染物 31 試料における同定された微生物種の発生頻度を Table 3 に示した。全ての試料において、汚染原因と思われる微生物が複数種検出されることはなく、検出されたのは細菌類のみあるいは酵母のみなど 1 種類であった。そこで各試料より、汚染原因と思われる微生物をそれぞれ 1 株ずつ、合計 31 株を分離した。31 株の内訳は *Methylobacterium* と推定された細菌が 17 株、*Rhodotorula* と推定された酵母が 13 株、*Fusarium* と推定された糸状菌が 1 株であった。17 株の細菌類の各種性状試験の結果、いずれもブドウ糖非発酵性のグラム陰性の桿菌、カタラーゼおよびオキシダーゼは陽性、運動性を有し、*Methylobacterium* 属の特性を示していた。また、16SrDNA 解析を行った代表的な 1 株は、*Methylobacterium mesophilicum* と同定 (相同率 99.5%) された。13 株の酵母はいずれも出芽型細胞が観察され、5.8SrDNA を挟む internal transcribed spacers-1 および 2 の解析を行った 6 株のうち 3 株は *R. mucilaginosa* (相同率はそれぞれ 100.0%, 100.0%, 99.7%)、他の 3 株は *R. minuta* (相同率はそれぞれ 100.0%, 99.8%, 99.5%) と同定された。1 株の糸状菌は、そのコロニー性状が綿状であり、三日月形的大型分生子が観察されたことから *Fusarium* 属と同定された。

1-4 考察

ピンク色汚染物から分離した細菌類 17 株については、分離培養時におけるコロニーの形

成期間や色調、性状試験および代表株の 16SrDNA 解析の結果から、いずれも *Methylobacterium* と推定された。酵母 13 株については、細菌類と同様に、分離培養時におけるコロニーの形成期間や色調、顕微鏡観察および代表株の 5.8SrDNA 解析の結果から、いずれも *Rhodotorula* と推定された。水周りに発生するピンク色汚染の原因微生物は、細菌の *Methylobacterium* あるいは酵母の *Rhodotorula* であることが既に明らかにされており、それぞれ個別に対する制御方法も幾つか検討されてきた。しかしながら、両菌種を制御対象として取り上げて検討された報告は調査した限り見当たらない。この理由のひとつとして、ピンク色汚染サンプルからの原因微生物の分離が *Methylobacterium* あるいは *Rhodotorula* のいずれかの培養条件に限定されてきたことが考えられる。以上を踏まえ、今回、両菌種を調査対象として分離培養を試みた結果、*Methylobacterium* の検出頻度は 17/31 (55%)、*Rhodotorula* の検出頻度は 13/31 (42%) と大きな差異は認められなかったことから、両菌種が主要な原因微生物であることが示唆された。

Table 3 ピンクスライム形成菌の原因菌種、採取場所、発生頻度

属	分離培地	採取場所	サンプル回収数 (%)
<i>Methylobacterium</i>	標準寒天培地	浴室	14
		洗面所	0
		台所シンク	3
		(小計)	17 (55)
<i>Rhodotorula</i>	ポテトデキストロース 寒天培地	浴室	6
		洗面所	6
		台所シンク	1
		(小計)	13 (42)
<i>Fusarium</i>	ポテトデキストロース 寒天培地	浴室	1
		洗面所	0
		台所シンク	0
		(小計)	1 (3.2)
		(総計)	31 (100)

第2章 ピンクスライム形成菌に対する精油蒸気の抗菌作用特性

要約

ピンクスライム形成微生物の *Methylobacterium mesophilicum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Fusarium oxysporum* に対するローズマリー、ティートリー、ペパーミント蒸気の抗菌性を評価した。対照微生物として *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*、試験法として寒天蒸気法を採用した。抗細菌性の評価は標準寒天培地 (pH 7.0) で 25°C の条件、抗真菌性の評価はポテトデキストロース寒天培地 (pH 5.6) で 25°C の条件で行った。精油 20 μ l への曝露を 1 日間 (24 時間) とした場合の阻止円は、いずれの精油においても *E. coli* および *S. aureus* に対して認められなかったが、*M. mesophilicum* に対して 80mm 以上となった。*C. albicans*、*R. mucilaginosa* および *F. oxysporum* に対する阻止円はいずれの精油においても認められなかったものの、ペパーミントにおける *R. mucilaginosa* と *F. oxysporum* のコロニーの色は白色となった。精油 20 μ l への曝露を 5 日間とした場合の阻止円は、いずれの精油においても *C. albicans* に対して認められなかったが、ペパーミントでは *R. mucilaginosa* に対して 80mm 以上となった。以上の結果より、*M. mesophilicum* に対してはいずれの精油も高い抗細菌効果、*R. mucilaginosa* に対してはペパーミントが高い抗真菌効果を示すことが明らかとなった。浴室や洗面所などの水周りに発生するピンクスライムへの対策法として、精油の利用が有効であると推察された。

2-1 緒言

第1章で行った住宅内水周りに発生するピンクスライム形成菌の実態調査の結果、グラム陰性細菌の *Methylobacterium* および酵母の *Rhodotorula* の 2 菌種が主要な形成微生物であることが示唆された。この結果より、ピンクスライム制御法を検討する場合はどちらか一方の菌種だけではなく、両菌種に対する有効性を評価する必要があると考えられた。個別の菌種の制御方法については幾つの検討報告がある。*Methylobacterium* に対しては 60°C での加熱処理や 60% アルコール処理により殺菌効果¹⁰⁾ が認められるものの、塩素¹⁰⁾、乾燥や界面活性剤¹³⁾ など様々な処理に対して抵抗性を示すことが報告されている。*Rhodotorula* については 41°C での加熱処理や 80% アルコール処理により殺真菌効果が認められる²⁴⁾ などの報告にとどまっており、詳細な知見があまり見当たらない。

一方、住宅内で実施される微生物汚染制御法には、生活者の健康や周辺環境を保護するために安全性が高く、低環境負荷なものが望まれる。この条件を満足するもののひとつとして、天然系の抗菌・防カビ剤の利用が考えられる。天然系の抗菌・防カビ剤は化学合成系のものと比較して環境調和性や安全性が高いとされている。中でも精油は揮発する蒸気によって抑制効果だけでなく悪臭抑制やアロマセラピーなどの付加価値が認められる。精油による微生物への抑制効果の代表的なものとして、微生物の増殖を抑制する抗菌効果と微生物細胞を殺す殺菌効果の 2 つが挙げられる。精油による抗菌効果と殺菌効果に関する既往研究は、精油を緩衝液や滅菌水などに混在させた状態で評価する液系で行われたものが多い^{28) 29)}。精油蒸気そのものによる抗菌効果についても幾つかの報告があるが、評価の対象としてきた微生物種は *Escherichia* や *Staphylococcus* などの細菌類³⁰⁻³²⁾、*Candida* や *Trichophyton* などの真菌類³³⁻³⁵⁾ であり、いずれも日和見感染の原因や食品衛生管理上で重要となる微生物に対するものが主である。そこで、精油蒸気がピンクスライム形成微生物に対しても抗菌効果を示す可能性があると考えた。本章では、精油の中でもローズマリー、ティーツリー、ペパーミントを取り上げ、ピンクスライム形成菌を標的とした抗菌性の評価を行い、有効な対策として応用し得る可能性を検討した。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 試験菌株と前培養条件

第 1 章でピンクスライム優占微生物として同定された菌種について製品評価技術基盤機構 (NBRC) より標準菌株を入手し、用いた。*Methylobacterium mesophilicum* NBRC 15688 株は標準寒天培地に塗抹し、25°C で 7 日間前培養して供試した。*Rhodotorula mucilaginosa* NBRC 0001 株および *Fusarium oxysporum* NBRC 31982 株はポテトデキストロース寒天培地に塗抹し、25°C で 5 日間前培養して供試した。比較対照の細菌として *Escherichia coli* NBRC 3972 株および *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 株を採用し、標準寒天培地に塗抹後、37°C で 1 日間 (24 時間) 前培養して供試した。比較対照の酵母として *Candida albicans* NBRC 1594 株を採用し、ポテトデキストロース寒天培地に塗抹後、25°C で 5 日間前培養して供試した。

2-2-2 精油

精油としてローズマリー、ティーツリー、ペパーミント (GAIA NP Corp., Organic Essential Oil) の 3 種を採用した。供試する精油は、次の 3 条件を満足するものを選定した。第 1 の条件として、抗菌効果や殺菌効果について既往研究が複数ある精油であること

である。これは抗菌効果や殺菌効果に関する既往知見と本研究で得られた結果についての整合性や妥当性の検証や考察が可能になるためである。第 2 の条件として、精油の中でも中程度の抗菌効果や殺菌効果を持つことである。精油の静菌効果については、その化学構造により 7 グループに分類³⁶⁾され、最も高い抗菌効果を持つフェノール/キノングループにはオレガノなどの精油、最も低い抗菌効果である炭化水素グループにはジンジャーなどが属している。これらの精油を用いた評価において、結果の過剰評価や過少評価につながる可能性を排除するためである。ローズマリーはオキシドグループ、ティートリーとペパーミントはアルコールグループに属し、精油の中でも中程度の抗菌効果や殺菌効果を示す。第 3 の条件として、すでに身の回りで良く用いられ、安全性の高さが経験的に確認されている精油である。ローズマリーの植物体は臭い消しとして pasta などと一緒に供される。ティートリーは香水、ペパーミントはペパーミントガムやはっか飴の成分として用いられている。それぞれの主要な要構成成分および含有率を Table 4 に示した。

Table 4 供試精油と主要構成成分

精油	主要構成成分と含有率*
ローズマリー	α -Pinene (27.94%) , 1,8-cineole (27.74%) , camphor (7.00%)
ティートリー	Terpinene-4-ol (36.67%) , γ -terpinene (20.08%) , α -terpinen (9.39%)
ペパーミント	Menthol (36.46%) , menthone plus isomenthone (24.87%) , menthofuran (10.07%)

* 主要構成成分と含有率は 37) より引用

2-2-3 抗細菌効果の評価

抗細菌性の評価は、寒天平板に接種した供試菌を密閉シャーレ内で精油蒸気に曝露させる寒天蒸気法によった³³⁾。寒天蒸気法の模式図を Fig. 1 と 2 に示した。前培養した *E. coli* NBRC 3972 株、*S. aureus* NBRC 12732 株、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株をそれぞれ白金耳で採取して滅菌蒸留水に懸濁し、適宜希釈して約 10^9 CFU/ml に調整した。この内の 0.1ml を前培養で用いた寒天培地に塗抹後、シャーレの上蓋内側中央に滅菌済みペーパーディスク (Advantec, 厚手, ϕ 8mm) を設置し、各精油をそれぞれ 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 μ l 滴下した。各供試菌液を塗抹した寒天平板のシャーレ本体を裏返して上蓋の上に置き、両者の接合部をパラフィルムで密封することで精油への曝露処理を開始した。

精油への曝露条件が抗細菌性に及ぼす影響を検討するため、2つの曝露条件を設定した。1つは各供試菌の増殖速度の差を考慮して同じ増殖相で比較するため、非曝露区の培養が定常期に到達する条件である。*E. coli* NBRC 3972 株、*S. aureus* NBRC 12732 株については37℃で1日間（24時間）、*M. mesophilicum* 15688 株については25℃で7日間とした。もう1つは精油が実際に使用される住宅内環境の想定条件で同一の曝露期間である。全供試菌について25℃で1日間（24時間）とした。*M. mesophilicum* 15688 株への曝露を25℃で1日間（24時間）とする場合、次のように操作した。25℃で1日間（24時間）曝露後、精油を滴下したペーパーディスクを除去し、シャーレの蓋をせずにクリーンベンチ内で10分間風乾させて精油蒸気を除去した。その後、蓋をして6日間培養して計7日間とした。曝露を25℃で7日間とする場合、ペーパーディスクは除去せずにそのまま7日間曝露した。対照として、供試精油量と同量の滅菌済み蒸留水を添加して同様に操作した。保持後に形成される阻止円径を抗菌効果の指標とした。供試菌の生育が全く認められない場合、阻止円径はシャーレの内径相当の80mm以上とした。実験は各水準3回行い、得られた結果の平均値を算出した。

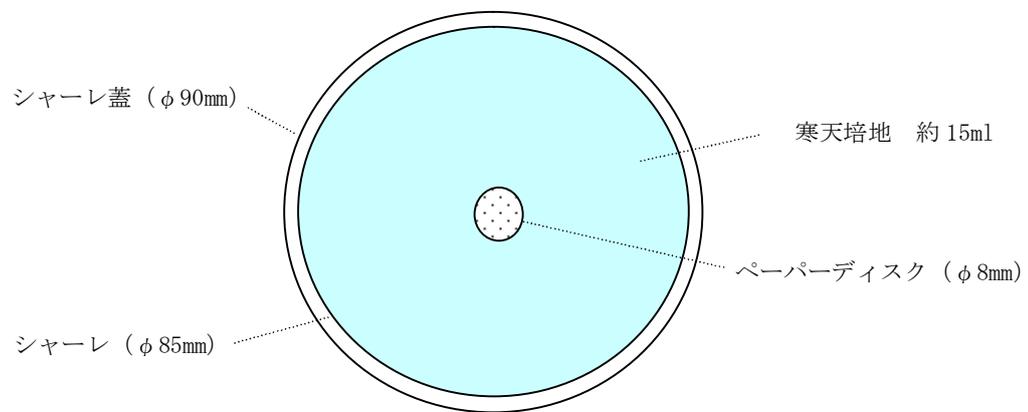


Fig. 1 寒天蒸気法の模式図 (上面図)

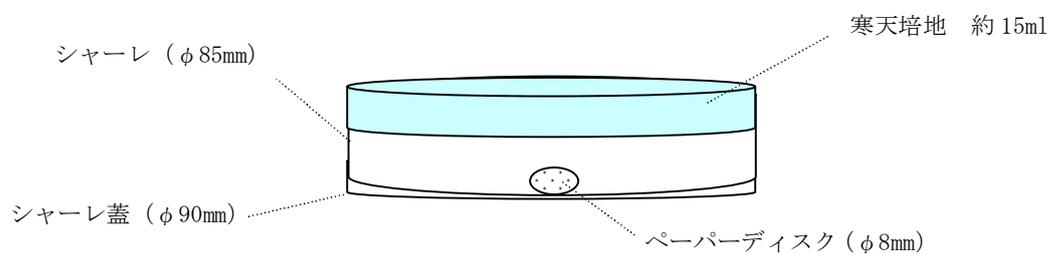


Fig. 2 寒天蒸気法の模式図 (側面図)

2-2-4 抗真菌効果の評価

抗真菌性についても前項に示した寒天蒸気法によって評価した。前培養した *C. albicans* NBRC 1594 株、*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株、*F. oxysporum* NBRC 31982 株をそれぞれ白金耳で採取して滅菌蒸留水に懸濁し、適宜希釈して約 10^8 CFU/ml に調整した。前項と同様に、供試菌の精油への曝露を行った。なお、各精油量はそれぞれ 20, 40 μ l 滴下した。

抗細菌性の評価と同様に、非曝露区の培養が定常期に到達する条件と住宅内環境を想定した同一曝露期間条件の 2 つの曝露条件を設定した。前者の条件は全供試菌について 25°C で 5 日間とし、後者の条件は全供試菌について 25°C で 1 日間 (24 時間) とした。曝露を 1 日間 (24 時間) とする場合、前項と同様に処理後、ペーパーディスクを除去し、4 日間培養して計 5 日間とした。曝露を 5 日間とする場合、ペーパーディスクは除去せずにそのまま 5 日間曝露した。対照として、供試精油量と同量の滅菌済み蒸留水を添加して同様に操作した。保持後に形成される阻止円径とコロニーの色変化を抗真菌効果の指標とし、得られた結果の処理と取扱いは前項と同様に行った。

2-3 結果

2-3-1 抗細菌効果

精油量および曝露温度と曝露期間の違いが抗細菌性に及ぼす影響について検討し、結果を Table 5 に示した。*M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対し、20 μ l のペパーミントで 1 日間 (24 時間) 曝露後、精油処理を解除して 6 日間培養させた平板上での発育の様相を Fig. 3 (a, b) に示した。*M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対する曝露 1 日間 (24 時間) の水準において、阻止円が形成される最小精油量は 2 μ l であり、精油種はペパーミント、阻止円径は 35mm であった。精油量 10 μ l ではいずれの精油においても、阻止円径は 80mm 以上となり、顕著な効果が観測された。曝露 7 日間の水準においても阻止円が形成される最小精油量は 2 μ l、精油種はティートリーとペパーミント、阻止円径はそれぞれ 35mm と 80mm 以上であった。精油量 5 μ l 以上では、いずれの精油でも阻止円径が 80mm 以上となった。対照菌である *E. coli* NBRC 3972 株については、曝露温度や精油供試量によらずいずれの精油でも阻止円は形成されなかった。もう 1 つの対照菌である *S. aureus* NBRC 12732 株については、25°C 曝露では精油供試量によらずいずれの精油でも阻止円は形成されなかったが、37°C 曝露においては、10 μ l のティートリーによる阻止円径が 15mm、ペパーミントによる阻止円径が 18mm となった。同様に、20 μ l のティートリーによる阻止円径が 20mm、ペパーミントによる阻止円径が 30mm となった。

Table 5 精油による抗細菌性評価の結果

菌種	温度 (°C)	処理時間 (日)	精油量 (μ l)	阻止円径 (平均値±標準偏差, mm)		
				ローズマリー	ティートリー	ペパーミント
<i>E. coli</i> NBRC 3972 株	37	1	0.5	0	0	0
			1	0	0	0
			2	0	0	0
			5	0	0	0
			10	0	0	0
			20	0	0	0
<i>S. aureus</i> NBRC 12732 株	37	1	0.5	0	0	0
			1	0	0	0
			2	0	0	0
			5	0	0	0
			10	0	15±2.0	18±1.7
			20	0	20±1.0	30±2.6
<i>M. mesophilicum</i> NBRC 15688 株	25	1	0.5	0	0	0
			1	0	0	0
			2	0	0	0
			5	0	0	0
			10	0	0	0
			20	0	0	0
<i>M. mesophilicum</i> NBRC 15688 株	25	7	0.5	0	0	0
			1	0	0	0
			2	0	35±2.0	>80
			5	>80	>80	>80
			10	>80	>80	>80
			20	>80	>80	>80
<i>M. mesophilicum</i> NBRC 15688 株	25	1	0.5	0	0	0
			1	0	0	0
			2	0	0	35±3.0
			5	0	>80	>80
			10	>80	>80	>80
			20	>80	>80	>80

2-3-2 抗真菌効果

精油量および曝露期間の違いが抗真菌性に及ぼす影響について検討し、結果を Table 6 に示した。*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株および *F. oxysporum* NBRC 31982 株に対し、 $20\ \mu\text{l}$ のペパーミントで 1 日間 (24 時間) 曝露後、精油処理を解除して 4 日間培養した平板上での発育の様相を Fig. 3 (それぞれ c, d および e, f) に示した。*C. albicans* NBRC 1594 株については、曝露期間によらずいずれの精油でも阻止円は形成されなかった。*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株については、曝露 1 日間 (24 時間) ではいずれの精油でも阻止円は形成されなかったが、コロニーの色は $40\ \mu\text{l}$ のティートリー、 $20\ \mu\text{l}$ および $40\ \mu\text{l}$ のペパーミントでは白色にとどまっていた。曝露 5 日間では、 $20\ \mu\text{l}$ のローズマリーでは 8mm、 $40\ \mu\text{l}$ のローズマリーでは 10mm、 $20\ \mu\text{l}$ のティートリーでは 20mm、 $40\ \mu\text{l}$ のティートリーでは阻止円の大きさが 38mm となった。 $20\ \mu\text{l}$ および $40\ \mu\text{l}$ のペパーミントでは阻止円径が 80mm 以上となり、顕著な効果が観測された。*F. oxysporum* NBRC 31982 株については、曝露期間によらずいずれの精油でも阻止円は形成されなかったが、コロニーの色は、曝露 1 日間 (24 時間) では $20\ \mu\text{l}$ および $40\ \mu\text{l}$ のペパーミント、 $40\ \mu\text{l}$ のローズマリーおよびティートリー、さらに曝露 5 日間では $20\ \mu\text{l}$ のローズマリー以外の全ての水準において白色にとどまっていた。

Table 6 精油による抗真菌性評価の結果

菌種	温度 (°C)	処理時間 (日)	精油量 (μ l)	阻止円径 (平均値±標準偏差, mm、コロニー色)			
				ローズマリー	ティートリー	ペパーミント	
<i>C. albicans</i>	25	5	20	0 (White) †	0 (White)	0 (White)	
			40	0 (White)	0 (White)	0 (White)	
			NBRC 1594 株	20	0 (White)	0 (White)	0 (White)
				40	0 (White)	0 (White)	0 (White)
<i>R. mucilaginosa</i>	25	1	20	8±1.0 (Light pink)	20±2.6 (White)	>80 (-)	
			40	10±1.7 (Light pink)	38±2.6 (White)	>80 (-)	
			NBRC 0001 株	20	0 (Light pink)	0 (Light pink)	0 (White)
				40	0 (Light pink)	0 (White)	0 (White)
<i>F. oxysporum</i>	25	5	20	0 (Red)	0 (White)	0 (White)	
			40	0 (White)	0 (White)	0 (White)	
			NBRC 31982 株	20	0 (Red)	0 (Light red)	0 (White)
				40	0 (White)	0 (White)	0 (White)

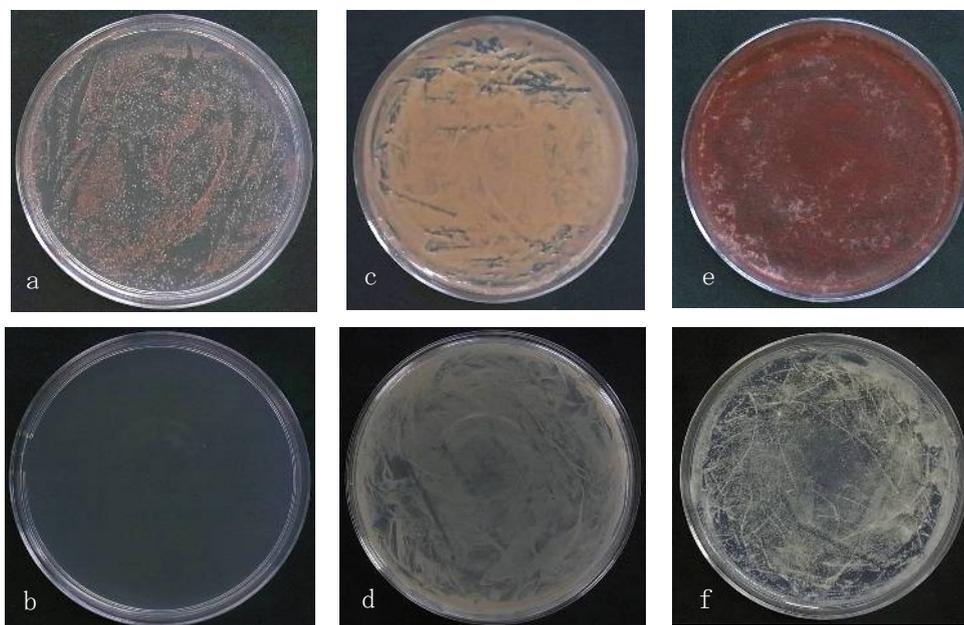


Fig. 3 ペパーミントで1日間（24時間）曝露処理後、
再培養した供試菌の生育の様子と色調

M. mesophilicum NBRC 15688 株 : a ペパーミントなし、b ペパーミント 20 μ l

R. mucilaginosus NBRC 0001 株 : c ペパーミントなし、d ペパーミント 20 μ l

F. oxysporum NBRC 31982 株 : e ペパーミントなし、f ペパーミント 20 μ l

2-4 考察

2-4-1 抗菌作用特性

抗菌性の評価における焦点は、ピンク色原因微生物が対照微生物よりも精油に感受性かどうかである。細菌類を対象とした場合、37°Cで1日間(24時間)曝露において *E. coli* NBRC 3972 株への顕著な静菌効果が認められない一方で、*S. aureus* NBRC 12732 株への効果が認められたことから、グラム陰性とグラム陽性細菌の表層の違いによって抵抗性の差異が生じたと考えられる。*E. coli* NBRC 3972 株や *S. aureus* NBRC 12732 株に対する精油蒸気の抗菌効果については多くの報告がある³⁰⁻³²⁾。いずれも *E. coli* NBRC 3972 株と比較して *S. aureus* NBRC 12732 株に対する効果が高く認められ、本結果と同様の傾向を示している。この原因としてグラム陰性菌の外膜に存在する親水性のリポ多糖体が疎水性の精油の浸透を阻害するためと考えられている³⁸⁾。また、精油の抗菌効果の強さは、抗菌活性成分の官能基に基づいて分類され、オキシド類であるローズマリーはアルコール類であるティートリーよりも効果が弱いとされている³⁶⁾。*S. aureus* NBRC 12732 株への効果はこの序列を反映した傾向となったため、本結果の妥当性が支持されたと思われる。そして本研究の制御標的でグラム陰性細菌である *M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対しては、いずれの精油においても顕著な効果が認められることが判明し、興味深い結果が得られた。これまで *M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対する精油の抗菌効果については調査した限り見当たらない。

一方、精油の抗真菌効果については、25°Cで5日間曝露において、対照酵母の *C. albicans* NBRC 1594 株よりもピンク色汚染酵母の *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株への効果が高かった。*Rhodotorula* への精油の抗真菌効果については幾つかの報告がある。寒天拡散法を用いて、オキシド類であるローズマリーによる抗真菌性を評価した結果、*R. gluninis* に対する阻止円は 0mm となったが、ペパーミントと同じアルコール類であるコリアンダーによる阻止円は、*R. gluninis* に対して 87mm と高い効果を示した³⁴⁾。また、液体培地を用いた最小発育阻止濃度 (MIC) 法による結果ではあるが、チモールやカルバクロールを主成分とする *Echinophra platyloba* (ペルシャ語で *Khosharizeh*) DC による MIC 値は、*C. albicans* に対して 448 μ g/mL、*R. mucilaginosa* に対して 224 μ g/mL となっており、*R. mucilaginosa* への効果が高く観測されている³⁵⁾。いずれも本結果と同様の傾向が認められているが、その理由に関しては詳しく検討されていない。また、*S. aureus* NBRC 12732 株の結果と同様、精油種の違いによる *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株への効果は、精油の抗菌活性成分の官能基に基づいたオキシド類とアルコール類の違いを反映しており、この傾向は本結果とも一致する。

2-4-2 各種処理条件が抗菌効果に及ぼす影響

抗菌性の評価は供試微生物が定常期にまで増殖する条件で行われるのが一般的であり、精油による評価においても同様である。異なる菌種に対する効果を比較する場合、必然的に菌種ごとに曝露温度や曝露期間などの試験条件が異なる。これらの違いが精油の拡散や揮発速度、供試微生物への曝露量などの違いを引き起こした場合、異なる菌種に対する公平な評価が困難になると考えられる。例えば、定常期にまで増殖する期間が1日間（24時間）以内である *E. coli* NBRC 3972 株は、7日間である *M. mesophilicum* NBRC 15688 株よりも精油への曝露期間が必然的に短くなるため、*E. coli* NBRC 3972 株は *M. mesophilicum* NBRC 15688 株と比較して抗菌効果が低く見積もられることが推測される。そこで、精油が実際に使用される住宅内環境の想定として 25°C で1日間（24時間）を曝露条件に採用し、この統一条件下での抗菌効果を比較した。

25°C で曝露1日間（24時間）による *M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対する抗菌効果は *E. coli* NBRC 3972 株および *S. aureus* NBRC 12732 株と比較して顕著に高く、25°C で曝露7日間による効果よりも若干低くなったことから、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株への効果は即効的と考えられる。また、*S. aureus* NBRC 12732 株への効果が曝露温度 25°C よりも 37°C において高く観測された理由として、曝露温度が 25°C の場合では、37°C の場合よりも精油の蒸散量が低下したこと、*S. aureus* NBRC 12732 株の代謝活性が低下して細胞内部への精油の浸透速度が低下したことの2点が考えられる。一方、25°C で曝露1日間（24時間）による *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株への抗真菌効果は、*C. albicans* NBRC 1594 株と同様に認められなかったが、ペパーミントにおいてはコロニーが白色にとどまる現象が観測された。これはピンク色の原因物質であるカロテノイド³⁹⁾の形成が不十分となったためと考えられる。しかしながら、25°C で曝露5日間において、特にペパーミントでは *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株への効果が高かったことから、即効的ではないものの遅効的な効果としては高いものと思われる。

以上の結果より、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対しては曝露条件によらずいずれの精油も高い抗細菌効果、*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株に対しては曝露が5日間と比較的長い場合には、ペパーミントが高い抗真菌効果を示すと判断できる。

2-4-3 抗菌作用機構の推定

細菌の *Methylobacterium* は、放射線や紫外線⁴⁰⁾、洗剤成分¹³⁾、乾燥¹³⁾⁴⁰⁾、過酸化水素⁴⁰⁾などのストレスに抵抗性を示す。この要因として、各種ストレスを受けることで細胞内に発生する活性酸素に対して、その特有成分のスピリロキサンチンやカロテン酸を主体とするカロテノイド⁴¹⁾が抗酸化機能を発揮するためと考えられている⁴²⁾。同様に、酵母の

Rhodotorula もトルラドジン、 β -カロテン、トルレンなどのカロテノイドを保有し、これらが紫外線³⁹⁾ や酸化環境⁴³⁾ のストレス時に発生する活性酸素の消去機能を担っている。他のカロテノイド保有菌についても同様の報告がある。*Deinococcus radiodurans* が放射線のほかに紫外線、乾燥、過酸化水素に抵抗性を示す機構として、保有するデイノキサントンを主体とするカロテノイドが活性酸素の抗酸化機能を持つためであることが明らかとなっている⁴⁴⁾。また、好塩菌の *Halobacterium salinarium* が放射線や紫外線、過酸化水素に抵抗性を示す機構として、細胞内部の塩化カリウムおよびカロテノイドのバクテリオルベリンが活性酸素の抗酸化機能を持つためとされている⁴⁵⁾。

一方、カタラーゼやグルタチオンなどの抗酸化酵素の添加により、オレガノやコリアンダーなどの *Saccharomyces cerevisiae* に対する殺酵母効果が低減することから、精油処理によって発生する活性酸素が殺酵母効果に寄与していると考えられている⁴⁶⁾。*M. mesophilicum* NBRC 15688 株は、活性酸素への抗酸化機能を持つカロテノイドを保有し、かつ精油に対して抵抗性を示す *E. coli* NBRC 3972 株や *Pseudomonas fluorescens* と同様のグラム陰性細菌であるにも関わらず、精油に対して感受性を示す点は興味深い。この要因については、筆者は以下のように別の機構が優先的に機能したためと推察している。本来、精油は親油性であるために、脂質成分を多く保有する微生物に対して高い抗菌効果を示す。このことを示す例として、寒天蒸気法を用いたティートリーによる阻止円は、*S. aureus* に対して 0mm であるが、脂質成分を多く保有する抗酸菌の *Mycobacterium avium* に対しては 69mm、同様にペパーミントによる阻止円は *S. aureus* に対して 8mm であるが、*M. avium* に対しては 90mm と高い抗菌効果が認められた報告がある⁴⁷⁾。一方、カロテノイドは脂質成分として細胞膜の構造維持や代謝調節に重要な働きをしている⁴⁸⁾。

これらのことから、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株が保有するカロテノイドに精油蒸気が吸着して細胞膜構造の損傷を引き起こし、抗菌効果をもたらした可能性が考えられる。また、直径 12 cm のシャーレで作成した YM 寒天培地上で培養させた *Candida* の細胞内脂質の生産量は、培地 1 枚当たり 15~27mg であるのに対し、*Rhodotorula* は約 2 倍の 30~60mg とされ⁴⁹⁾、油脂酵母と言われるほど脂質生産性が高い。従って *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株の場合は、脂質成分やカロテノイドに精油蒸気が吸着して細胞膜構造の損傷を引き起こし、抗真菌効果をもたらした可能性が考えられる。このような機構が実際に機能するかどうかは不明であるが、今後、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株への抗菌効果の機構を明らかにするためには、抗菌効果とカロテノイド量や脂質成分量との因果関係を中心に、精油処理時に発生する活性酸素の影響を検証する研究の進展が待たれる。

第3章 ピンクスライム形成菌に対する精油蒸気の殺菌作用特性

要約

M. mesophilicum と *R. mucilaginosa* に対するペパーミント蒸気の殺菌効果を寒天蒸気法により評価した。素寒天表面に塗抹した供試菌に対し、シャーレ内でペパーミント蒸気に曝露させた後、回収液へ移行させ、その中の生存数変化を評価した。60 μ l のペパーミントをペーパーディスクに含浸させた場合、*M. mesophilicum* に対して 48 時間後、*R. mucilaginosa* に対して 168 時間後に顕著な殺菌効果が認められたが、両菌種は各々の対照菌である *Escherichia coli* と *Candida albicans* よりも抵抗性を示した。寒天に対して過酸化水素の消去剤であるピルビン酸ナトリウムを 0.03% 添加した場合、*M. mesophilicum* と *R. mucilaginosa* に対する殺菌効果はほとんど変化しなかったが、*E. coli* と *C. albicans* に対する効果は減少した。過酸化水素水 (0.2-1.0mM) による処理では *E. coli* と *C. albicans* よりも *M. mesophilicum* と *R. mucilaginosa* が抵抗性を示し、ペパーミント蒸気による殺菌効果と同様の傾向となった。以上の結果から、ペパーミント蒸気の殺菌効果の一部には活性酸素が寄与していること、そしてピンクスライム形成菌は抗酸化剤であるカロテノイドを保有しているために非保有菌よりも抵抗性を示すことが示唆された。一方で、ペパーミント蒸気は活性酸素を介しない直接的な殺菌効果を持つことも示された。従って、浴室や洗面所などの住宅内水周りにおいて発生するピンクスライム形成菌は、一般的な細菌や酵母よりもやや抵抗性であるものの、これら形成菌に対してペパーミント蒸気の利用が有効な制御法として期待できることが判明した。

3-1 緒言

第2章においてローズマリー、ティーツリー、ペパーミントによるピンクスライムに対する抗菌性の評価の結果、いずれの精油蒸気もが高い抗菌効果を示すことが明らかとなった。しかし、この抗菌性に殺菌効果が含まれているかどうかは明らかではない。精油蒸気による抗菌効果についての報告は多くあるが^{30) 32) 33)}、殺菌効果に関する報告は限定的である^{50) 51)}。また、評価の対象としてきた微生物種は、*Escherichia* や *Staphylococcus* などの細菌類、*Candida* などの真菌類であり、いずれも日和見感染の原因や食品衛生管理上で重要となる微生物に対するものが主である。ピンクスライム形成菌に対する精油蒸気による殺菌効果に関する報告は、調査した限りは見当たらない。そこでこの章では、最も高い抗菌効果を示したペパーミントに着目し、細菌の *M. mesophilicum* NBRC 15688 株と酵母の *R.*

mucilaginosa NBRC 0001 株に対する殺細菌・殺酵母効果を寒天蒸気法により評価した。さらに、有効なピンクスライム対策法としてのペパーミントを含めた精油の応用可能性の検討と作用機構解明のための殺菌効果要因の検証を合わせて行った。

3-2 実験材料および方法

3-2-1 試験菌株と前培養条件

第 2 章と同様、ピンクスライム優占微生物として同定された菌種について製品評価技術基盤機構 (NBRC) より標準菌株を入手し、用いた。ピンクスライム形成菌として *M. mesophilicum* NBRC 15688 株および *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株を用いた。比較対照の細菌として *E. coli* NBRC 3972 株、比較対照の酵母として *C. albicans* NBRC 1594 株を供試した。*M. mesophilicum* NBRC 15688 株は標準寒天培地に塗抹し、25°C で 7 日間前培養して供試した。*E. coli* NBRC 3972 株は標準寒天培地に塗抹後、37°C で 1 日間 (24 時間) 前培養して供試した。*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株および *C. albicans* NBRC 1594 株はポテトデキストロース寒天培地に塗抹し、25°C で 5 日間前培養して供試した。

3-2-2 精油

第 2 章での検討において最も高い抗菌効果を示したペパーミント (GAIA NP Corp., Organic Essential Oil) を採用した。

3-2-3 殺細菌および殺酵母効果の評価

抗菌性の評価と同様、評価は寒天平板に接種した供試菌を密閉シャーレ内で精油蒸気に曝露させる寒天蒸気法³³⁾を改変した方法によった。寒天蒸気法の模式図を Fig. 1 と 2 に示した。寒天蒸気法を精油蒸気による抗菌性評価で用いる場合は、曝露培地として栄養源を含む通常の培地が用いた。しかしながらここでは殺菌効果の評価するため、培地表面に塗抹した供試菌の増殖を防止できるように栄養源を含まない素寒天 (寒天濃度 1.5%) を使用した。

殺細菌効果の評価するために、前培養した *E. coli* NBRC 3972 株および *M. mesophilicum* NBRC 15688 株をそれぞれ白金耳で採取して滅菌蒸留水に懸濁し、適宜希釈して約 10^9 CFU/ml に調整した。この内の 0.1ml を前培養で用いた寒天培地に塗抹後、シャーレの上蓋内側中央に滅菌済みペーパーディスク (Advantec, 厚手, ϕ 8mm) を設置し、ペパーミントをそれぞれ 20, 40, 60 μ l 滴下した。各供試菌液を塗抹した寒天平板のシャーレ本体を裏返して上蓋の上に置き、両者の接合部をパラフィルムで密封することで精油への曝露処理を開始した。

殺酵母効果を評価するために、前培養した *C. albicans* NBRC 1594 株、*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株をそれぞれ白金耳で採取して滅菌蒸留水に懸濁し、適宜希釈して約 10^8 CFU/ml に調整した。殺細菌性評価と同様にして、供試菌の精油への曝露処理を開始した。*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株については 25°C/24, 48, 96, 196h、その他の供試菌については 25°C/24, 48h で保持した。それぞれ保持完了後、0.85%の生理食塩水と 0.1%のポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween80, MP Biomedical 製) を含む供試菌回収用溶液 3ml を寒天平板上に注入した。約 3 分間ピペッティングすることで寒天上の供試菌を回収後、それぞれ平板希釈法により生菌数を求めた。培養条件は、第 2 章と同様の条件とした。

既往の研究報告において、*S. cerevisiae* についてコリアンダーやシナモンで殺菌処理すると菌体内に活性酸素が発生し、これが殺酵母効果を促進に寄与していること、さらに、活性酸素消去剤としてカタラーゼなどの抗酸化酵素を添加することで殺酵母効果低減が認められることから、殺酵母効果における活性酸素の寄与を示唆しているものがある⁴⁶⁾。そこで本研究においても精油蒸気処理することで供試菌体内に活性酸素が発生し、殺菌効果に影響する可能性があると考えた。そこで、過酸化水素のスカベンジャーであるピルビン酸ナトリウム (和光純薬製) の添加が殺菌効果に及ぼす影響を調査するため、曝露寒天に対し、終濃度 0.03%になるように添加した素寒天を作成し、同様に精油曝露を行った。

3-2-4 過酸化水素による殺細菌および殺酵母効果の評価

殺細菌効果を評価するために、終濃度 0.2mM および 0.5mM の過酸化水素 (和光純薬製) を含む 9.9ml リン酸緩衝液 (タカラバイオ製) に対し、約 10^9 CFU/ml に調整した 0.1ml の細菌懸濁液を混合した。殺酵母効果を評価するために、終濃度 0.5mM および 1.0mM の過酸化水素を含む 9.9ml リン酸緩衝液に対し、約 10^8 CFU/ml に調整した 0.1ml の酵母懸濁液を混合した。それぞれ 25°C/30 分間、60 分間保持後、前項と同様にして平板希釈法により生菌数を求めた。

3-2-5 殺細菌効果における膜透過性変化の評価

既往報告において、液系に懸濁させたティートリーによる殺菌効果と細胞膜透過性の因果関係が示唆されている⁵²⁾。そこで、本研究においても同様の結果が得られる可能性があると考え、PI 染色による膜透過性変化を評価することで *E. coli* NBRC 3972 株および *M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対する殺細菌効果との関連性を検証した。

冷凍保存している 1mg/ml のヨウ化プロピジウム (PI、同二化学) を室温で 30 分解凍し、PI 溶液を調製し使用した。前項で行ったペパーミントによる殺菌処理後の細菌回収液を 1ml

サンプリングし、1 μ l の PI 溶液を加えて室温で 15 分間インキュベート後、蛍光強度を分光蛍光光度計（日立 F-2500 形）により測定した（励起波長 530nm、蛍光波長 615nm）。その後、位相差顕微鏡：（OLYMPUS BH-2 RFCA）および蛍光顕微鏡（OLYMPUS U-RFL-T）で細胞を 1000 倍で観察した。PI 染色率は、約 100 個の細胞を観察して求めた。

3-2-6 殺細菌効果における精油の主要活性成分の評価

一般に精油は多様な成分の混合物であり、ペパーミントも同様である。本研究で取り扱っているペパーミントの構成成分とそれぞれの含有率は、メントール 36.5%、メントン+イソメントン 24.9%、メントフラン 10.1%、リモネン 7.9%、酢酸メチル 4.8%、その他は含有率 4%未満となっている³⁷⁾。液系におけるペパーミントによる殺菌性評価⁵³⁾ およびペパーミント蒸気による静菌性³²⁾ に関する既往報告において、いずれもメントールとメントンが主要な殺細菌活性成分であるとされている。しかしながら、ペパーミント蒸気における主要な殺細菌活性成分は調べた限りでは見当たらないため、本研究で取り扱ったペパーミント構成成分について市販試薬を購入し、それぞれの殺細菌性を評価した。

供試菌として *E. coli* NBRC 3972 株、供試成分と供試量を Table 7 に示した。供試量はペパーミント量 60 μ l から各成分について計算したものである。試薬はいずれも和光純薬製を使用した。なお、イソメントンは非常に高価で入手困難な試薬であること、異性体であるためにメントンと構造的に類似していることから、メントンとほぼ同等物質とみなした。供試菌液の作成や曝露処理、保持条件などは前項と同様に行った。

Table 7 供試成分と供試量

供試成分	供試量 (μ l)
メントール	21.9
メントン	14.9
メントフラン	6.0
リモネン	4.7
酢酸メチル	2.9
メントール+メントン	36.8

3-3 結果

3-3-1 殺細菌および殺酵母効果

殺細菌効果の結果として、Fig. 4に *E. coli* NBRC 3972 株、Fig. 6に *M. mesophilicum* NBRC 15688 株の生存曲線を示した。両菌種共に、滴下ペパーミント量に応じて殺菌効果が高くなる傾向が認められ、 $60\ \mu\text{l} \cdot 48$ 時間で最大の殺菌効果を示した。この時のペパーミントなしと比較した生菌数の対数減少値(Log reduction)は、それぞれ *E. coli* NBRC 3972 株で 5.34、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株で 2.87 であった。過酸化水素のスキャベンジャーであるピルビン酸ナトリウムを寒天に 0.03%添加し、上記と同様に処理した場合の対数減少値は、それぞれ *E. coli* で 3.18 (Fig. 5)、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株で 2.88 (Fig. 7) であった。ピルビン酸ナトリウム添加によって *M. mesophilicum* NBRC 15688 株ではほとんど変化は無いが、*E. coli* NBRC 3972 株では 2.16 も向上した。

殺酵母効果の結果として、Fig. 8に *C. albicans* NBRC 1594 株、Fig. 10に *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株の生存曲線を示した。殺細菌効果と同様の結果となった。ペパーミント $60\ \mu\text{l} \cdot 48\text{h}$ で曝露処理した時の対数減少値は、*C. albicans* NBRC 1594 株で 4.77、*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株で 0.26 であった。同様に *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株に対して 168 時間処理した時の対数減少値は、4.94 に増加した。ピルビン酸ナトリウムを寒天に 0.03%添加し、上記と同様に処理した場合の対数減少値は、48 時間処理後の *C. albicans* NBRC 1594 株で 2.33 (Fig. 9)、168 時間処理後の *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株で 4.95 (Fig. 11) となった。殺細菌効果と同様、ピルビン酸ナトリウム添加によって *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株ではほとんど変化は無いが、*C. albicans* NBRC 1594 株では 2.44 ほど向上した。

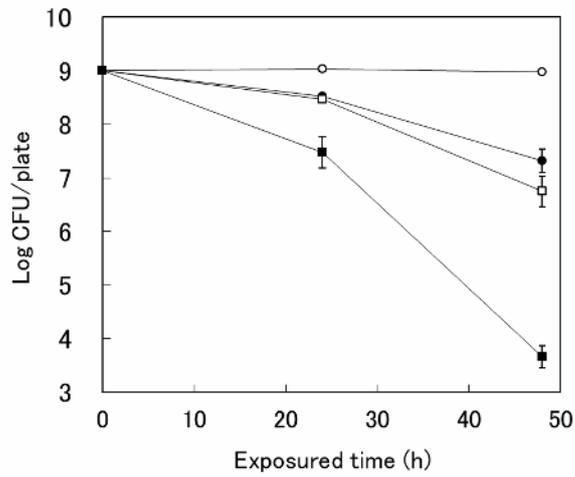


Fig. 4 *E. coli* NBRC 3972 株に対するペパーミントの殺菌効果
(ピルビン酸ナトリウム添加なし)

○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

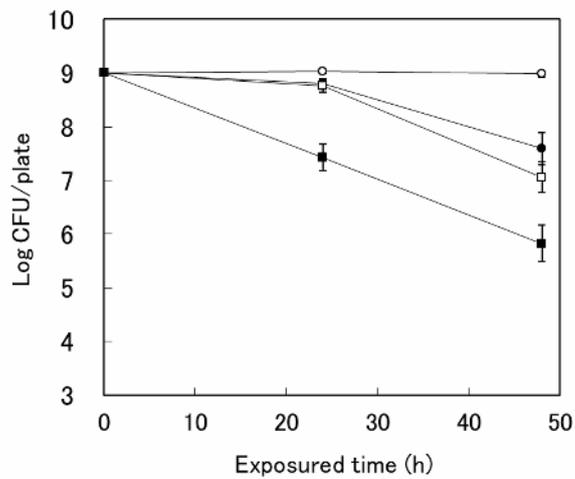


Fig. 5 *E. coli* NBRC 3972 株に対するペパーミントの殺菌効果
(0.03%ピルビン酸ナトリウム添加あり)

○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

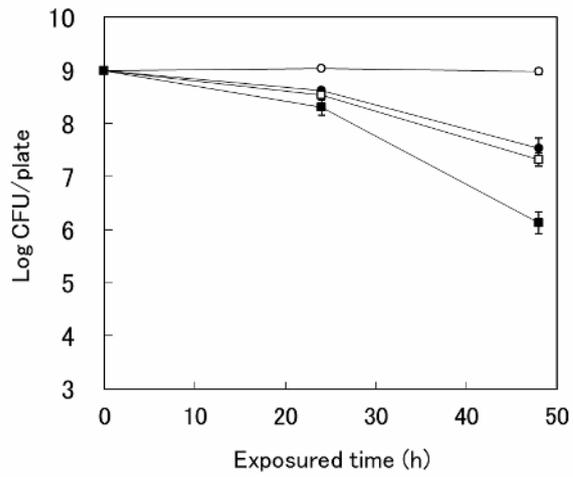


Fig. 6 *M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対するペパーミントの殺菌効果
(ピルビン酸ナトリウム添加なし)
○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

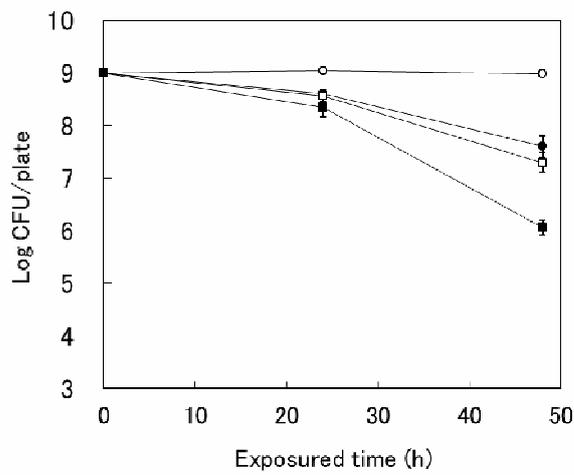


Fig. 7 *M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対するペパーミントの殺菌効果
(0.03%ピルビン酸ナトリウム添加あり)
○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

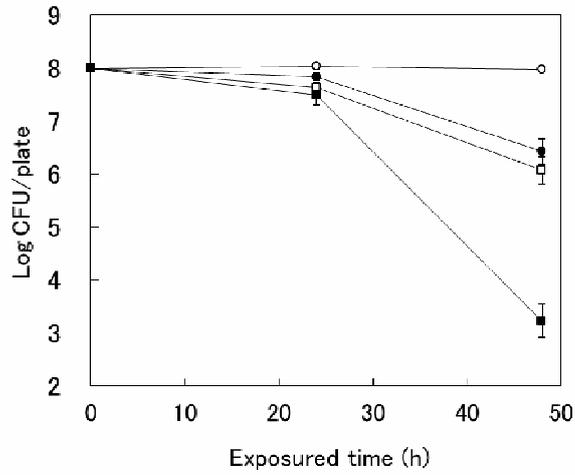


Fig. 8 *C. albicans* NBRC 1594 株に対するペパーミントの殺菌効果
(ピルビン酸ナトリウム添加なし)
○ : PM なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

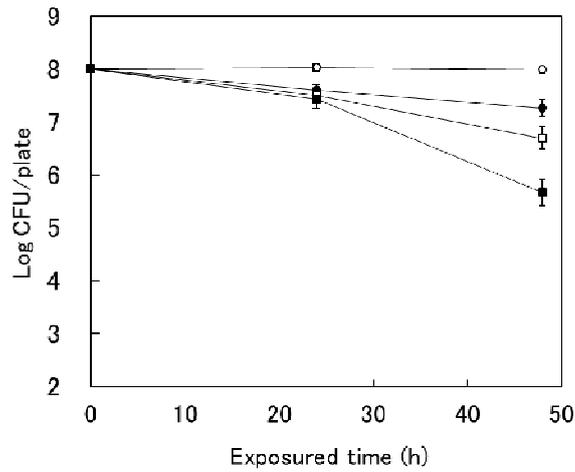


Fig. 9 *C. albicans* NBRC 1594 株に対するペパーミントの殺菌効果
(0.03%ピルビン酸ナトリウム添加あり)
○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

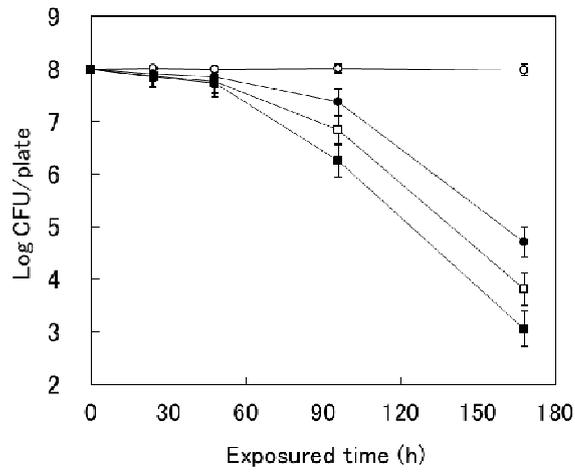


Fig. 10 *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株に対するペパーミントの殺菌効果
(ピルビン酸ナトリウム添加なし)
○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

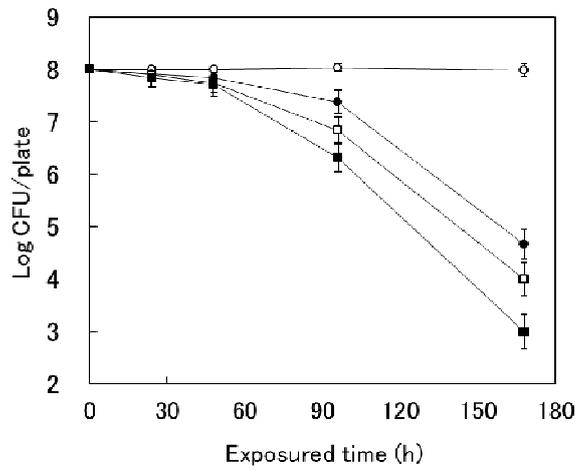


Fig. 11 *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株に対するペパーミントの殺菌効果
(0.03%ピルビン酸ナトリウム添加あり)
○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

3-3-2 過酸化水素による殺細菌および殺酵母効果

ピンクスライム形成菌と非形成菌における過酸化水素のスカベンジャーであるピルビン酸ナトリウムを0.03%添加した効果の違いが顕著に認められたため、過酸化水素水における直接的な殺菌効果を評価した。*E. coli* NBRC 3972 株と *M. mesophilicum* NBRC 15688 株の生存曲線をそれぞれ Fig. 12 と 13、*C. albicans* NBRC 1594 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株の生存曲線をそれぞれ Fig. 14 と 15 に示した。その殺菌効果の結果は、ペパーミント蒸気による殺菌効果と類似した傾向となった。ピンクスライム形成菌である *M. mesophilicum* NBRC 15688 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株では、それぞれの対照非形成菌である *E. coli* NBRC 3972 株と *C. albicans* NBRC 1594 株よりも抵抗性を示した。0.2mM で 60 分間および 0.5mM で 30 分間処理した時、*E. coli* NBRC 3972 株の生存数は検出限界以下 (10cfu/ml 未満) となった。一方、60 分間処理した後でさえも *M. mesophilicum* NBRC 15688 株の対数減少値は、0.2mM では 1.17、0.5mM では 1.57 となった。同様に、*C. albicans* NBRC 1594 株の対数減少値は、0.5mM では 2.08、1.0mM では 4.69、*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株の対数減少値は、0.5mM では 0.02、1.0mM では 0.27 となった。

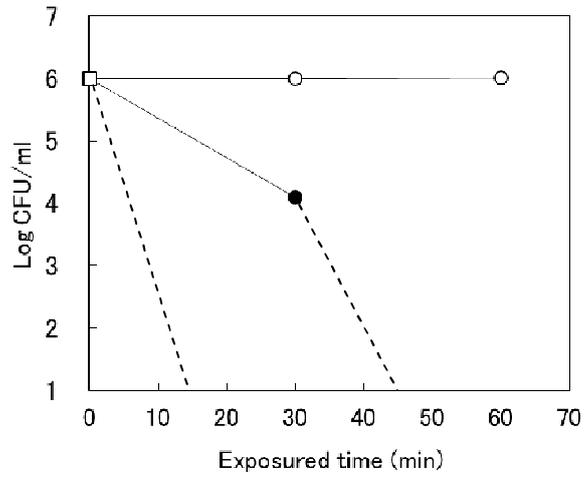


Fig. 12 *E. coli* NBRC 3972 株に対する過酸化水素の殺細菌効果

○ : なし ● : 0.2mM □ : 0.5mM

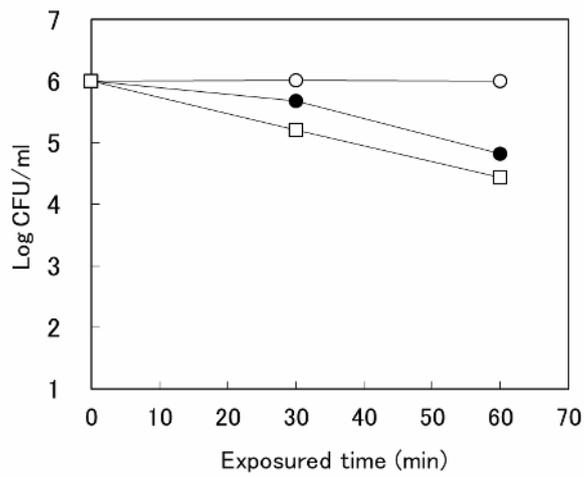


Fig. 13 *M. mesophilicum* NBRC 15688 株に対する過酸化水素の殺細菌効果

○ : なし ● : 0.2mM □ : 0.5mM

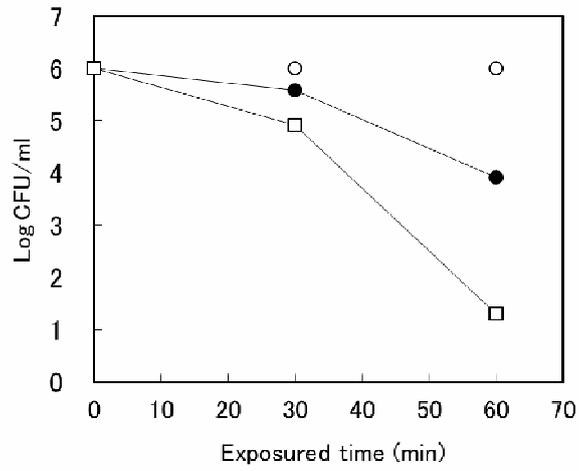


Fig. 14 *C. albicans* NBRC 1594 株に対する過酸化水素の殺酵母効果

○ : なし ● : 0.5mM □ : 1.0mM

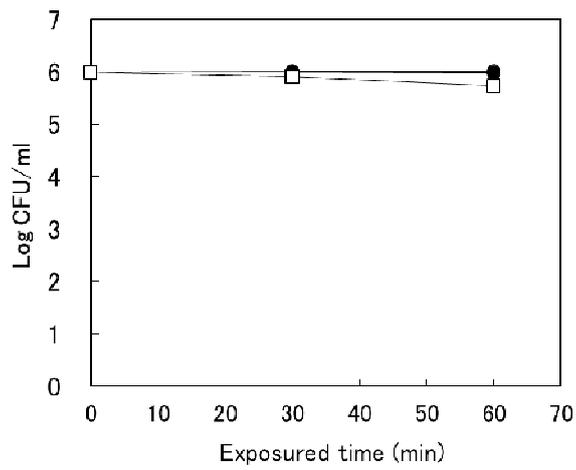


Fig. 15 *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株に対する過酸化水素の殺酵母効果

○ : なし ● : 0.5mM □ : 1.0mM

3-3-3 殺細菌処理における膜透過性変化

PI 染色率の結果を Fig. 16 および 17、ペパーミント 60 μ l で 48 処理後の位相差顕微鏡による観察と蛍光顕微鏡による PI 染色観察の様子を Fig. 18 および 19 に示した。*E. coli* NBRC 3972 株の PI 染色率は殺菌処理時間と共に増加し、殺菌処理 48 時間におけるペパーミント 20 μ l では 82%、ペパーミント 40 μ l および 60 μ l では 95%以上となり、高い値を示した。一方、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株の PI 染色率は、ペパーミント量と殺菌処理時間に依らずいずれも 5%未満の低い値となった。

蛍光強度の結果を Fig. 20 および 21 に示した。PI 染色率と同様、*E. coli* NBRC 3972 株の蛍光強度は殺菌処理時間と共に増加し、殺菌処理 48 時間におけるペパーミント 20 μ l では 2.9、40 μ l および 60 μ l では 5.5 以上となり、高い値を示した。*M. mesophilicum* NBRC 15688 株の蛍光強度は、ペパーミント量と殺細菌処理時間に依らずいずれも 1 未満の低い値となった。

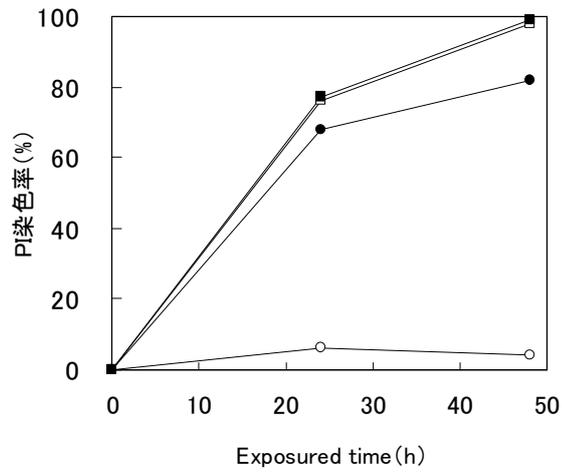


Fig. 16 ペパーミント蒸気殺菌処理に伴う *E. coli* NBRC 3972 株の PI 染色率

○ : なし ● : 20 μ l □ : 40 μ l ■ : 60 μ l

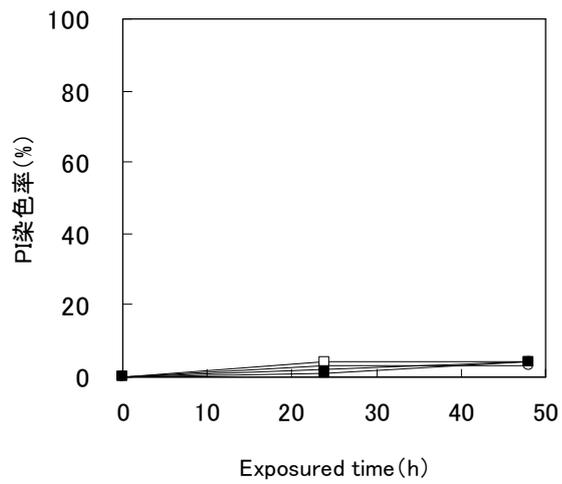


Fig. 17 ペパーミント蒸気殺菌処理に伴う *M. mesophilicum* NBRC 15688 株の PI 染色率

○ : なし ● : 20 μ l □ : 40 μ l ■ : 60 μ l

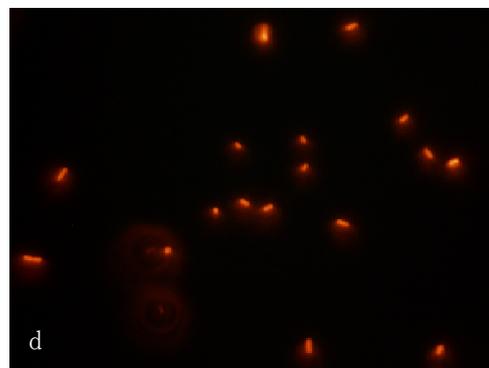
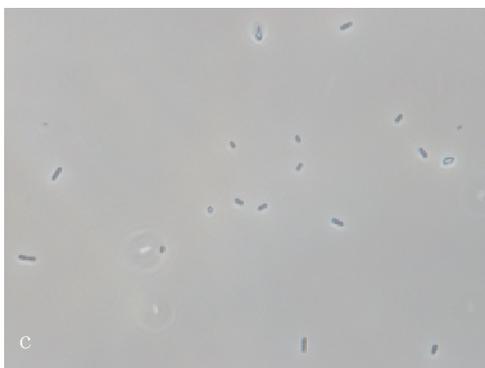
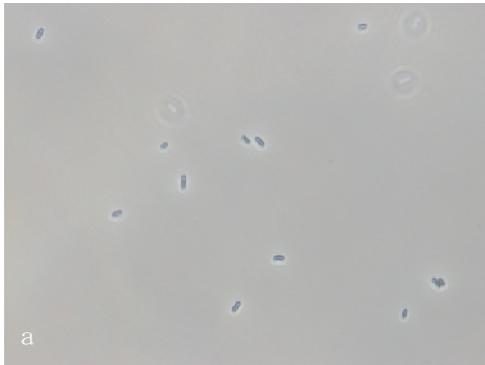


Fig. 18 ペパーメント蒸気殺菌処理に伴う *E. coli* NBRC 3972 株の PI 染色観察

- a : ペパーメントなし・48 時間後・位相差像
- b : ペパーメントなし・48 時間後・蛍光染色像
- c : ペパーメント 60 μ l・48 時間後・位相差像
- d : ペパーメント 60 μ l・48 時間後・蛍光染色像

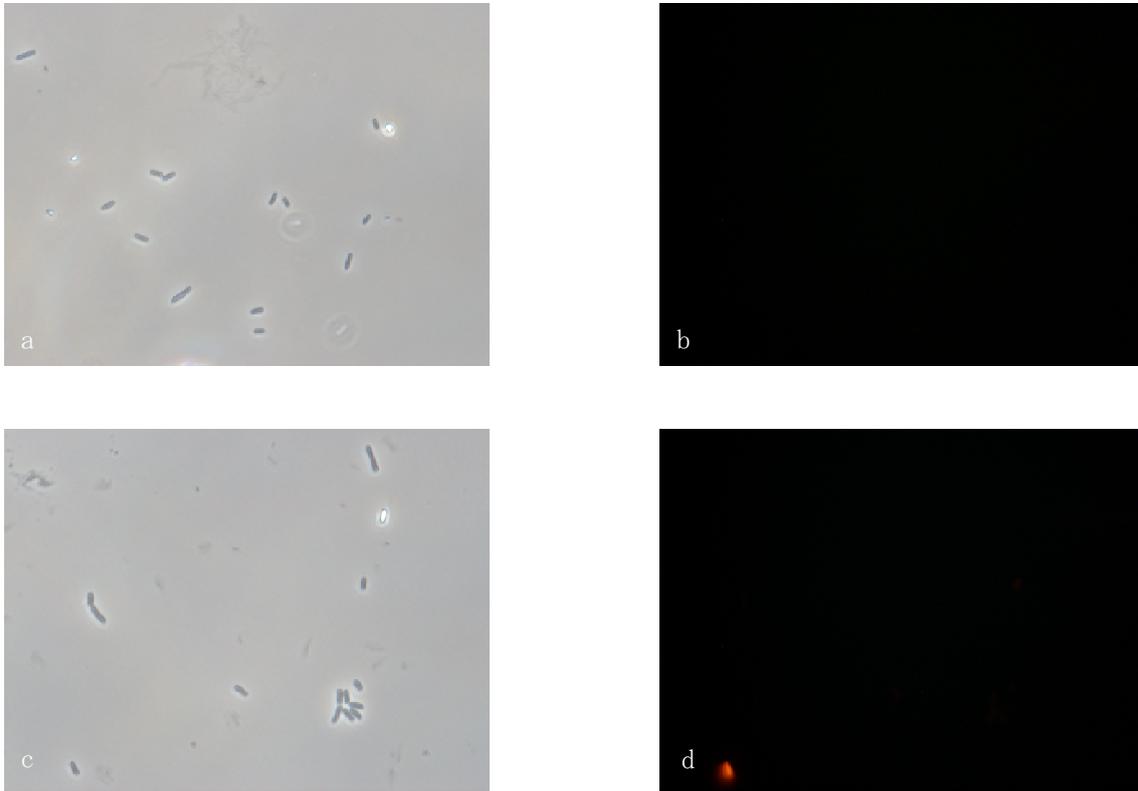


Fig. 19 ペパーメント蒸気殺菌処理に伴う *M. mesophilicum* NBRC 15688 株の PI 染色観察

- a : ペパーメントなし・48 時間後・位相差像
- b : ペパーメントなし・48 時間後・蛍光染色像
- c : ペパーメント 60 μ l・48 時間後・位相差像
- d : ペパーメント 60 μ l・48 時間後・蛍光染色像

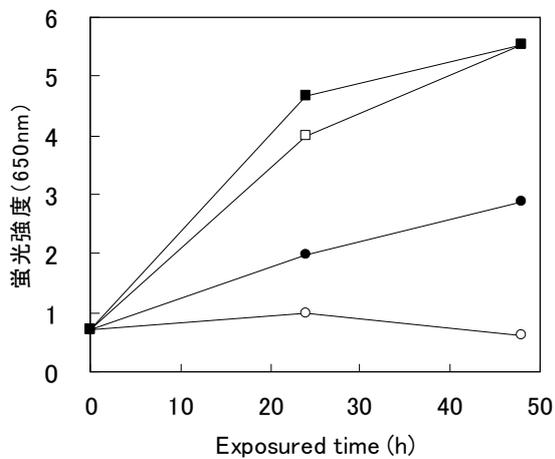


Fig. 20 ペパーメント蒸気殺菌処理に伴う *E. coli* NBRC 3972 株の PI 蛍光強度の変化

○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

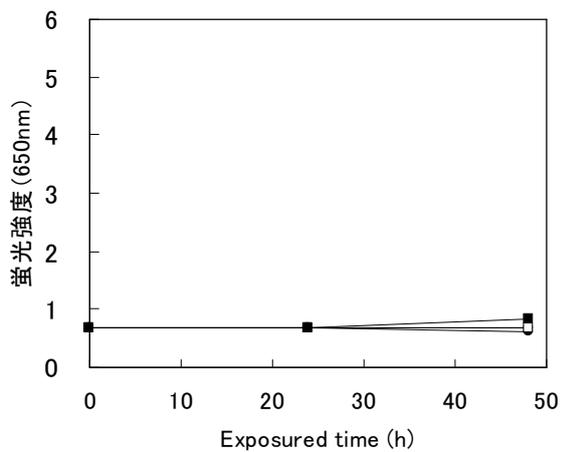


Fig. 21 ペパーメント蒸気殺菌処理に伴う *M. mesophilicum* NBRC 15688 株

の PI 蛍光強度の変化

○ : なし ● : 20 μl □ : 40 μl ■ : 60 μl

3-3-4 殺細菌効果における精油の主要活性成分

各成分における 48 時間までの殺菌効果の経時変化を Fig. 22 および 23 に示す。48 時間後におけるメントール 21.9 μ l の殺菌効果 (Log reduction) は 2.37 と最も高かったが、他の成分においてはいずれも 0.5 未満となり顕著な殺菌効果は認められなかった。供試した各成分の殺菌効果の合計は 3.13 にとどまり、ペパーミント 60 μ l の殺菌効果である 5.34 よりも低かった。しかしながら、メントールとメントンの混合体では 5.61 となり、ペパーミント 60 μ l と同等の殺菌効果を示した。

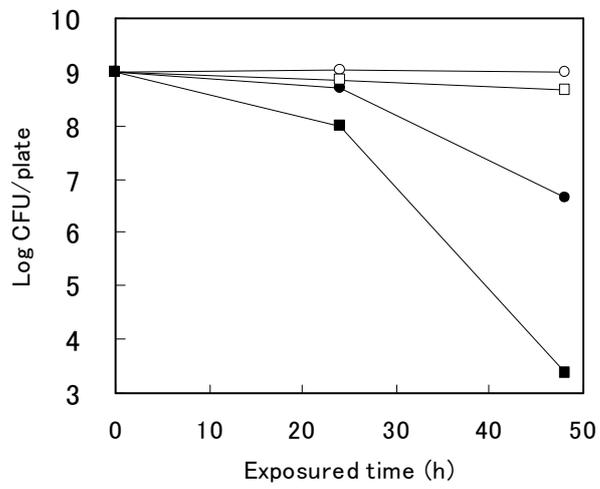


Fig. 22 ペパーミントの各主要構成成分の殺菌効果

○ : なし ● : メントール 21.9 μl □ : メントン 14.9 μl

■ : メントール 21.9 μl + メントン 14.9 μl

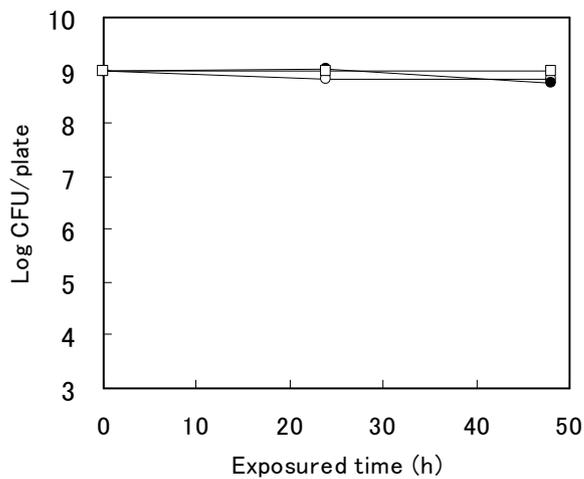


Fig. 23 ペパーミントの各主要構成成分の殺菌効果

○ : メントフラン 6.0 μl ● : 酢酸メチル 2.9 μl

□ : リモネン 4.7 μl

3-4 考察

3-4-1 殺菌作用特性と作用機構の推定

前述したように、精油による抗菌および殺菌効果に関する研究は多く報告^{28) 29)}されているが、多くは緩衝液などの液系での検討がほとんどであるし、精油蒸気の殺菌効果に関する報告も限定的である^{50) 51)}。そこで、ペパーミントに着目した殺菌性評価を行った。ペパーミント殺菌に関しても液系での報告⁵³⁾があるものの、ペパーミント蒸気での殺菌効果報告はあまり見当たらない。さらにピンクスライムに対する殺菌効果に関しては調査した限りは見当たらない。そのために、今回の結果はピンクスライム殺菌効果に関して斬新な知見を提供するものである。

過酸化水素のスカベンジャーであるピルビン酸ナトリウムの添加実験の結果より、ピンクスライム形成菌の殺菌効果には活性酸素の寄与は認められないが、非形成菌には認められることが示唆された。さらに、今回の結果で認められたピンクスライム形成菌の過酸化水素に対する抵抗性は、この示唆を裏づけている。またこのことから、ペパーミント蒸気によって引き起こされる細胞死には 2 つの形式があると考えられる。ひとつは活性酸素依存型であり、もうひとつは活性酸素非依存型である。

ピンクスライム形成菌は細胞内にカロテノイド色素を保有し、この色素が様々なストレスに対する抵抗性に重要な役割を担っている。既述したように、放射線や紫外線⁴⁰⁾、洗剤成分¹³⁾、乾燥^{13) 40)}、過酸化水素⁴⁰⁾など、*Rhodotorula* は活性酸素⁴³⁾に対して抵抗性を示す。*Methylobacterium* はスピロキサンチンやカロテン酸⁴¹⁾、*Rhodotorula* はトルラドジン、 β -カロテン、トルレンなど³⁹⁾のカロテノイドを保有している。それ故に、カロテノイドが抗酸化剤として機能することがカロテノイド生産微生物の高い抵抗性に寄与していると考えられる。*Deinococcus radiodurans* は放射線、紫外線、乾燥、過酸化水素に抵抗性を示す機構として、保有するデイノキサンチンを主体とするカロテノイドであることが考えられている⁴⁴⁾。また、好塩菌の *Halobacterium salinarium* が放射線や紫外線、過酸化水素に抵抗性を示す機構として、細胞内部の塩化カリウムおよびカロテノイドのバクテリオルビリンが活性酸素の抗酸化機能を持つためとされている⁴⁵⁾。さらに、オレガノやコリアンダーなどのカロテノイド非生産酵母である *S. cerevisiae* に対する殺菌効果は、カタラーゼやグルタチオンなどの抗酸化酵素の添加により低減することから、精油処理によって発生する活性酸素が殺菌効果に寄与していると考えられている⁴⁶⁾。これらの結果より、ペパーミント蒸気に対するピンクスライム形成菌が抵抗性を示す理由のひとつとして、細胞内カロテノイドの存在が考えられる。ピルビン酸ナトリウムを曝露寒天に添加した場合、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株への殺菌効果は変化せず *E. coli* NBRC 3972 株と *C. albicans* NBRC 1594 株への殺菌効果が減少すること、過酸

化水素に対してピンクスライム形成菌の 2 種が抵抗性であり、非形成菌の 2 種が感受性となったことから、上記した既往知見と類似する仮説が支持される。

本研究で得られた結果と既往報告を合わせて考慮すると、ペパーミント蒸気の殺菌効果に寄与するものとして、上記の 2 つの形式と他の精油蒸気でも認められる可能性が考えられる。ひとつはペパーミント蒸気による直接作用である。これは細胞膜を標的としたものと考えられる。もうひとつは、その結果として生じる細胞膜に存在する呼吸系への損傷であると考えられる。これによって電子伝達の機能障害が引き起こされ、活性酸素を生じた可能性がある。細胞内カロテノイドは、この間接的作用から細胞を保護していると考えられる。しかしながら、PI 染色率と蛍光強度の結果において、*E. coli* NBRC 3972 株に対しては処理時間と共にペパーミント蒸気分子の内膜通過が進行しているのに対し *M. mesophilicum* NBRC 15688 株では進行していない傾向が示されたことから、両者の膜透過性の変化が殺菌効果の違いに影響していることが示唆された。*Methylobacterium* が保有しているカロテノイドは外膜に局在していることが報告されている⁵⁴⁾。細胞内カロテノイドは抗酸化剤として知られる一方、脂肪族の油脂分としての性質を持っているため、親油性である精油を溶解できる可能性がある。これらのことから、上記の間接作用のひとつとして、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株の外膜に局在するカロテノイドを含む油脂分が、処理時間と共に外部から侵入してきたペパーミント蒸気を溶解することで細胞内への侵入をブロックしていることが示唆される。ピンクスライム形成菌を殺菌するためにペパーミント蒸気がどのように攻撃しているか、ピンクスライム形成菌と非形成菌の間において殺菌効果にどのような違いがあるのかを理解するためには、直接作用と間接作用の両形式に関する更なる研究が必要である。

本研究において、便宜上、曝露期間における精油蒸気量の適用を加えた精油液滴量の量として表現した。精油の蒸発は不均衡で不可逆的な過程であるために、シャーレ内の空間における精油蒸気の分布を決定するには、流体学的解析などの別側面からのアプローチが必要である。このようなペパーミント蒸気の反応特性と空間分布は今後解析していく必要がある。

3-4-2 殺菌効果と抗菌効果がピンクスライム形成菌と対照菌との間で異なる要因

本章で認められた *M. mesophilicum* NBRC 15688 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株の殺菌効果への抵抗性は、第 2 章で認められた生育阻止円の直径によって評価する寒天蒸気法による抗菌効果において感受性を示した結果と相反しているように見える。

この相反結果の理由のひとつとして、定常期に到達するまでの期間が *M. mesophilicum* NBRC 15688 株は 7 日間、*R. mucilaginosa* NBRC 0001 株では 5 日間要し、一方の対照菌の *E. coli* NBRC 3972 株は 1 日間、*C. albicans* NBRC 1594 株は 3 日間要するという生育速度の差が考えられる。ピンクスライム形成菌は生育速度が遅いため、ペパーミント蒸気濃度はピンクスライム形成菌が生育開始し始める以前に生育阻害可能な濃度に到達する。その後もペパーミント蒸気に曝露し続けられるため、生育とペパーミント蒸発において時間的差異が生じ、みかけ上の生育阻害の結果をもたらした可能性がある。そしてペパーミント蒸気から損傷を受けた細胞は十分な培養期間が与えられなかった。一方、殺菌性評価においては、ピンクスライム形成菌と非形成菌の両者ともに非増殖状態において処理開始から均等にペパーミント蒸気に曝露される。以上のことから、ピンクスライム形成菌は殺菌抵抗性を示したと考えられる。

3-4-3 殺細菌効果における精油の主要活性成分

今回の評価では各成分の供試量が異なるため、ペパーミント各構成成分における殺細菌効果の単純比較は難しいと思われる。しかしながら、殺細菌効果はメントールのみが顕著であり、メントールの約 2/3 の含有量であるメントンの殺細菌効果が顕著でないこと、そしてペパーミントの主要な殺菌活性成分はメントールおよびメントンであることが既往研究により明らかとなっていること、今回の結果からメントールとメントンの相互作用が主要な殺細菌効果となっている可能性が示唆されたことから、本研究で取り扱ったペパーミントの主要な殺細菌活性成分はメントールとメントンであると思われる。他の成分による相互作用は未検討であるため、今後、メントールとメントンを中心とした詳細な解析が必要である。

3-4-4 ピンクスライム制御法としての実用化の可能性

第 2 章および本章の結果を踏まえ、精油の利用による水周りに発生するピンク色汚染対策法として実用化するための主要な課題が 2 点考えられる。1 つ目の課題は、実用的な時間内において効果を実現することである。*M. mesophilicum* NBRC 15688 株を用いた一般的な抗菌性評価の期間は 7 日間⁵⁵⁾ であるが、実際の住宅内では 7 日間連続の精油処理が行われることは想定し難い。しかしながら、今回、精油蒸気への 1 日間 (24 時間) 曝露により

抗菌効果が認められたことから、実用的な時間内で抗菌処理が可能であることを明らかにできた。2つ目の課題は、実際の水周り空間での抗菌あるいは殺菌効果に必要な精油蒸気量をいかにして確保するかである。実際の水廻り空間は完全な密閉系ではなく、精油蒸気が流出する隙間が存在する。抗菌あるいは殺菌効果の発揮を維持するためには、必要な蒸気濃度を維持することが重要であるため、洗面所のような完全な解放系で精油蒸気による抗菌効果あるいは殺菌効果を発揮させることは難しいが、扉を閉めた浴室や蓋を閉めた便器内などの使用者が使用していない状態では効果が期待できる。実空間での効果に関しては、精油濃度を $5.0\text{mg}/\text{m}^3$ 確保することで菌数低減効果が認められる⁵⁶⁾ など幾つかの報告がある。また、浴室の場合に精油蒸気濃度をいち早く確保する手段として、ノズル噴霧によって水を微細化したミストを浴室内に散布させるミストサウナ機能⁵⁷⁾ を利用することが考えられる。ミストサウナ機能は、肌の美容や発汗促進などの効果があり、今後の需要が見込めるとされている。具体的には、浴室を使用しない時間帯に扉を閉め、ミストサウナ機能により精油を浴室内に均一分散させる。これにより精油の揮発を促進し、一定の精油蒸気濃度を確保することで抗菌効果が期待できる。今後、実際の水周りにおける精油の分散方法や精油蒸気濃度、および抗菌効果との関連性を検証する研究の進展が待たれる。

総括と結論

本研究では、水廻りにおいてピンク色汚染問題を引き起こし、原因微生物の実態や有効な対策法の検討が進んでいないピンクスライム汚染に対する有効な制御法を提案するため、ピンクスライムの特性と精油に着目した抑制効果の評価を行った。

まず、実際の一般家庭における水周りに発生しているピンクスライムの実態を調査することで、制御標的とすべきピンクスライム形成菌の主要菌種の特定を試みた。その結果、制御標的とすべき主要なピンクスライム形成微生物は、*Methylobacterium* と *Rhodotorula* であることが分かった。次に、精油の利用が水周り環境適応型のピンクスライム対策法であるとみなし、精油蒸気によるピンクスライム形成菌の抗菌性の評価を行った。その結果、ローズマリー、ティートリー、ペパーミントの3種の精油蒸気が、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株に対して高い静菌効果を示すことを明らかにした。

さらに、最も高い抗菌効果を示したペパーミントを用い、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株に対する殺菌性評価を行った。その結果、ペパーミント蒸気により顕著な殺菌効果が認められる一方、*M. mesophilicum* NBRC 15688 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株の両菌種が比較対照微生物よりも抵抗性を示す傾向が明らかとなった。そこで、抵抗性の要因を調査するため、殺菌効果におけるピルビン酸ナトリウムの添加効果やPI染色法による膜透過性変化を評価した結果、活性酸素がペパーミント蒸気の殺菌効果に寄与していること、そして *M. mesophilicum* NBRC 15688 株と *R. mucilaginosa* NBRC 0001 株は抗酸化剤であるカロテノイドを保有しているためにカロテノイド非保有菌よりも抵抗性を示すことが示唆された。一方で、ペパーミント蒸気は活性酸素を介しない直接的な殺菌効果を持つことも示された。従って、浴室や洗面所などの住宅内水周りにおいて発生するピンクスライム形成菌は、一般的な細菌や酵母よりもやや抵抗性であるものの、これら形成菌に対してペパーミント蒸気の利用が有効な制御法として期待できることが判明した。

今後取り組むべき残された研究課題として以下の3点が挙げられる。1つ目の課題は、より直接的な評価方法を用いたピンクスライム形成菌の殺菌抵抗性の機構解明である。今回、殺菌効果におけるピルビン酸ナトリウムの添加効果やPI染色の結果などを通じて、ピンクスライムが保有するカロテノイドが殺菌抵抗性の原因となっていることを間接的に明らかにしたが、より直接的な評価方法による裏付けを行う必要がある。具体的方法としては、ピンクスライム形成菌のカロテノイド合成遺伝子破壊株を創出し、この株を用いてカロテノイドによる殺菌効果への寄与を直接的に評価することが考えられる。カロテノイドが抵抗性に寄与することを明確にできた次のステップとして、カロテノイド合成を効率的に阻

害するような環境制御や殺菌剤の開発に関する研究の進展が望まれる。2つ目の課題は、ピンクスライム制御法としての精油利用の実用化を目指した技術開発である。具体的な研究課題としては、コストパフォーマンスを改善させるための制御効果の向上が挙げられる。一般に、精油は時間や手間を掛けて植物体から抽出・精製されるため、数 ml で¥1000 前後と高価なものが多い。そのため、実用性のある技術として確立するためにはコスト低減が必要であると考えられる。そこで例として、より少量の精油で制御効果を実現するために、精油ミストの状態では浴室内へ散布する方法や薫煙方式などの効率的な精油散布法の検討、乾燥や加熱処理など他の制御方法との併用による抗菌や殺菌効率の向上検討などが挙げられる。3つ目の課題は、精油による制御効果の向上のためのピンクスライムの実態解析である。第1章で行ったピンクスライム実態調査では、全ての採取試料において、汚染原因と思われる微生物が複数種検出されることはなく、検出されたのは *Methylobacterium* のみあるいは *Rhodotorula* のみなど1種類であった。しかしながら、*Methylobacterium* とそれ以外の微生物との働きがより強固バイオフィーム形成に関与していることを示唆した報告もある⁵⁸⁾。この場合、*Methylobacterium* と *Rhodotorula* を中心としたバイオフィームを形成することで各々の単独状態よりも高い抵抗性を発揮している可能性がある。ピンクスライムバイオフィームの形成プロセスを解明することで、外乱に比較的弱い生育ステージなどが分かれば、精油を噴霧する量やタイミングなどを変えることで、より効率的なピンクスライム制御が実現できる可能性がある。これらの課題のクリアーを実現していくことで、精油蒸気の利用がピンクスライム形成菌の有効な制御法として確立されることを期待したい。

参考文献

- 1) 高鳥浩介, 相原真紀 (2003) 家庭環境と防菌防黴. 防菌防黴, **31**, 663-667.
- 2) 小島みゆき (2007) 住環境での衛生対策を科学する -真菌分布および生活者と浴室環境からみたカビ対策-. 防菌防黴, **35**, 745-753.
- 3) 井原望, 濱田信夫 (2010) 天然系抗菌・防カビ剤の利用の現状と将来. 生活衛生, **54**, 304-311.
- 4) 濱田信夫, 山田明男 (1993) エアコンのカビ汚染. 防菌防黴, **21**, 385-389.
- 5) 菅原作雄, 関辰夫, 阿部恵子 (2000) 空調機内のカビ抑制方法の検討. 室内環境学会講演集, 150-153.
- 6) 今井恵子, 栗山恵都子, 田中辰明, 李憲俊 (2003) 抗菌・抗カビ加工エアフィルタの評価. 空気調和・衛生工学会論文集, **90**, 113-118.
- 7) 濱田信夫 (2002) 洗濯機のカビ汚染の現状. 防菌防黴, **30**, 703-708.
- 8) 森山康司, 庄野信浩, 清原正勝, 木村太門 (2002) 電解水殺菌による小便器の防汚・防臭効果. 防菌防黴, **30**, 73-80.
- 9) 森山康司 (2011) 暮らしと微生物⑫ 台所 (キッチン). 防菌防黴, **39**, 509-514.
- 10) 古畑勝則 (1996) 浴室などの住環境に発生するスライム. 防菌防黴, **24**, 723-728.
- 11) 伊藤進, 武井章, 岡本暉公彦 (1984) 風呂水の微生物汚染とその清浄化. フレグランスジャーナル, **69**, 84-86.
- 12) 藪内英子 (1996) 家庭用 24 時間風呂浴槽水の *Legionella pneumophila* およびその他の細菌汚染. 日環感, **11**, 221-227.
- 13) Yano, T., Kubota, H., Hanai, J., Hitomi, J., and Tokuda, H. (2012) Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms. *Microbes Environ.*, **28**, 87-95.
- 14) 濱田信夫, 藤田藤樹夫 (1999) 浴室の真菌汚染 -菌相の特徴-. 防菌防黴, **27**, 351-358.
- 15) 高鳥浩介, 李憲俊 (2012) 暮らしと微生物⑬ 浴室. 防菌防黴, **40**, 161-171.
- 16) 相澤芳弘, 阿部恵子 (2003) 浴室内の換気・乾燥がカビ抑制に与える影響. 空気調和・衛生工学会学術講演会講演論文集, p. 1345-1348.
- 17) 井原望 (2011) カビ汚染対策法としての浴室乾燥の有効性評価. 防菌防黴, **39**, 285-290.
- 18) 中岡敬善, 池田孝之, 渋沢博之, 山口重行, 前田康成 (2004) 浴室かび抑制システム「カビシャット」, パナソニック 電工技報, **52**, 25-29.
- 19) 井原望, 石木茂, 濱田信夫 (2009) 浴室のシリコン内部に侵入したカビに対する次亜塩素酸の効果. 防菌防黴, **37**, 91-97.
- 20) 松下功, 小島未希, 荏開津孝男生, 濱田信夫 (2014) ミスト発生による浴室のカビ胞

- 子の発芽抑制効果. 防菌防黴, **42**, 233-238.
- 21) 濱田信夫 (2014) 掃除とカビ. 防菌防黴, **42**, 605-611.
- 22) 井上重治 (2007) 香りによる微生物のコントロール (第4章). (「微生物と香り」, フレグランスジャーナル社, 東京) 169-242.
- 23) 李憲俊、小菅旬子、相原真紀、高鳥浩介 (2005) シリコンシーラントにおける *Cladosporium* の侵入形態変化, 防菌防黴, **33**, 391-395.
- 24) 濱田信夫, 藤田藤樹夫 (2001) 浴室における真菌の生育速度. 防菌防黴, **29**, 77-84.
- 25) 古畑勝則, 小池和子 (1993) 飲料用タンク水から分離された *Methylobacterium* 属菌の性状と塩素抵抗性. 日本公衛誌, **40**, 1047-1053.
- 26) 渡部一仁 (2005) 日本薬学会編 衛生試験法・注解, p55-73, 金原出版, 東京.
- 27) Hamada, N., Murakami, T., and Abe, J. (2006) Characteristics of fungi growing on window sashes. *Seikatsu Eisei.*, **50**, 510-515.
- 28) Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and and Idaomar, M. (2008) Biological effects and of essential oils. A review. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 446-475.
- 29) Sara, B. (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 223-253.
- 30) Lopez, P., Sanchez, C., Battle, R., and Nerin, C. (2005) Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils : Susceptibility of selected foodbones bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6939-6946.
- 31) Frag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M., and El-baroty, G. S. A. (1989) Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.*, **52**, 665-667.
- 32) Inouye, S., Takizawa, T., and Yamaguchi, H. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.*, **47**, 565-573.
- 33) Inoue, S., Uchida, K., Maruyama, N., Yamaguchi, H., and Abe, S. (2006) A nobel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Jpn. J. Med. Mycol.*, **47**, 91-98.
- 34) Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., and Mount, J. R. (2001) Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Prot.*, **64**, 1019-1024.
- 35) Saei-Dehkordi, S. S., Aziz, A., Fallah, Saei-Dehkordi, S. S., and Kousha, S. (2012) Chemical composition and antioxidative activity of *Echinophora platyloba* DC. Essential oil, and its interaction with natural antimicrobials against food-borne

- pathogens and spoilage organisms. *J. Food Sci.*, **77**, 631-637.
- 36) 井上重治, 内田勝久, 安部茂(2006)植物精油 70 種の成分と抗菌活性の相関. *Aroma Res.*, **7**, 265-273.
- 37) GAIA NP Corporation, 成分分析表, Organic essential oil.
- 38) Mann, C. M., Cox, S. D., and Markham, J. L. (2000) The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**, 294-297.
- 39) Martin, M., Maria, R. F., Diengo, L., Maria, C. D., Maria, E. F. and Maria, B. (2010) Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 1145-1151.
- 40) Romanovskaya, V. A., Rokitko, P. V., Mikheev, A. N., Gushcha, N. I., Malashenko, Yu. R., and Chernaya, N. A. (2002) The effect of γ -radiation and desiccation on the viability of the soil bacteria isolated from the alienated zone around the chernobyl nuclear power plant. *Microbiology*, **71**, 608-613.
- 41) Saito, S., Takaichi, S., Shimada, K., and Nishimura, Y. (1995) Identification and subcellular distribution of carotenoids in the aerobic photosynthetic bacterium, *Pseudomonas radiora* strain MD-1. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 819-823.
- 42) 齋藤 剛 (2007) 極限環境微生物 ; 放射線耐性細菌の放射線耐性機構. *Viva Origino*, **35**, 85-92.
- 43) Sasaki, H., Nakanishi, T., Satonaka, K., Miki, W., Fujita, T., and Komemushi, S. (2000) Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 203-205.
- 44) Tian, B., Xu, Z., Sun, Z., Lin, J., and Hua, Y. (2007) Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1770**, 902-911.
- 45) Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., Saito, T., Ohyama, Y., Gekko, K., Yamamoto, O., and Ide, H. (1998) Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA - damaging agents. *J. Radiat. Res.*, **39**, 251-262.
- 46) Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., and Idaomar, M. (2005) Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **585**, 1-13.

- 47) Maruzzella, J. C., and Sicurella, N. A. (1960) Antibacterial activity of essential oil vapors. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **49**, 692-694.
- 48) 中谷陽一, Milon, A., Ourisson, G., and Ourisson, G. (1990) カロチノイドおよび類縁化合物とバクテリア細胞膜. *化学と生物*, **28**, 568-576.
- 49) Kaneko, H., Hosohara, M., Tanaka, M., and Itoh, T. (1976) Lipid composition of 30 species of yeast. *Lipids*, **11**, 837-844.
- 50) Johann, S., Gillian, F., and David, O. (2009) Effects of essential oils treatment, gas atmosphere, and storage temperature on *Listeria monocytogenes* in a model vegetable system. *J. Food Prot.*, **72**, 1209-1215.
- 51) Mohammad, M., O and Joseph, F., F (2009) Inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on sliced and whole tomatoes by allyl isothiocyanate, carvacrol, and cinnamaldehyde in vapor phase. *J. Food Prot.*, **72**, 315-324.
- 52) Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., and Wyllie, S. G. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 170-175.
- 53) Osawa, K., Saeki, T., Yasuda, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., and Arai, T. (1999) The antibacterial activities of pappermeint oil and green tea polyphenols, alone and in combination, against enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Biocontrol Sci.*, **4**, 1-7.
- 54) Hancock, B. I., and Williams, K. M. (1986) The Outer membrane of *Methylobacterium organophilum*. *J. Gene. Microbiol.*, **132**, 599-610.
- 55) 古畑勝則, 小池和子 (1990) 院内環境から分離された *Methylobacterium extorquens* の性状と薬剤感受性. *環境感染*, **5**, 47-51.
- 56) Sato, K., Krist, S. and Buchbauer, G. (2006) Antimicrobial effect of trans-cinnamaldehyde, (-)-perillaldehyde, (-)-citronella, citral, eugenol and carvacrol on airborne microbes using an airwasher. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2292-2294.
- 57) 上田和香 (2007) 家庭用ミストサウナの特徴と性能, *空気調和・衛生工学*, **81**, 1080-1083.
- 58) 大貫俊、徐芳芳、山口友香、王文昭、諸星知広、池田宰 (2013) 水回りに発生するピンクぬめり構成細菌が構成する複合バイオフィルムの解析. 第 65 回 日本生物工学会大会講演要旨集, 220.

本論文に関する報告

1. 研究論文

井原望, 濱田信夫, 土戸哲明 “住宅内水周りに発生するピンク汚染原因微生物に対する精油の抗菌・抗真菌効果” 防菌防黴, Vol. 42, No. 2, 2014

Nozomi Ihara, Jin Sakamoto, Munehiro Yoshida, Tetsuaki Tsuchido “Killing Effect of Peppermint Vapor against Pink Slime-Forming Microorganisms” *Biocontrol Sci.*

論文受理 掲載予定

2. 学会発表

井原望, 濱田信夫, 土戸哲明 “水周りに発生するピンク汚染の菌相解析と栄養環境の違いによる *Rhodotorula* のピンク度合いへの影響解明” 第 39 回日本防菌防黴学会年次大会, 2012. 9

井原望, 濱田信夫, 土戸哲明 “住宅内水周りに発生するピンク汚染原因菌に対する精油の抗菌効果” 第 40 回日本防菌防黴学会年次大会, 2013. 9

井原望, 柏木魁斗, 坂元仁, 土戸哲明 “ピンク色汚染菌に対するペパーミント蒸気の殺菌作用特性” 第 41 回日本防菌防黴学会年次大会, 2014. 9

3. 国際会議

Nozomi Ihara, Jin Sakamoto, Tetsuaki Tsuchido “Evaluation of Antimicrobial Activities of Essential Oils in Vapor Phase on Pink Slime-Forming Microorganisms” 14th International Union of Microbiological Societies 2014. 7

謝辞

本研究を行うにあたり懇切なるご指導、ご鞭撻を頂きました吉田宗弘教授、土戸哲明名誉教授に心より厚く御礼申し上げます。また、共に研究を進めて下さると共に、熱心なご指導を賜りました大阪市立自然史博物館の濱田信夫様、坂元仁特任助教に深く御礼申し上げます。お忙しい中、学位審査の副査として熱心なご指導を賜りました老川典夫教授、長谷川喜衛教授に深く御礼申し上げます。共に実験を進めて下さった元生物制御工学研究室4回生の志賀由希さん、柏木魁人さん、坂木弘幸さんに心から深く御礼申し上げます。研究室生活において多面に渡ってお世話になりました元生物制御工学研究室の皆様と富岡敏一特任教授に感謝申し上げます。最後に、長期間に渡る大学院生活を支えて下さり、暖かく見守って下さった両親と妻に心より感謝致します。

以上