

称号及び氏名 博士（工学） 堀切 茂俊

学位授与の日付 2020年3月31日

論文名 「真菌胞子の物理的殺菌プロセスにおける損傷の解析と動態評価」

論文審査委員 主査 古田 雅一

副査 松浦 寛人

副査 谷口 良一

副査 田中 良晴

## 論文要旨

糸状菌は、住宅環境や食品衛生分野などで品質劣化や環境悪化のリスク要因となり、中毒やアレルギー疾患などの深刻な健康被害を引き起こすため、防除対策が求められている。真核生物である糸状菌は、単純分裂増殖細胞である細菌とは異なり、胞子や菌糸などの複数の細胞形態をとるため、その生長過程が複雑である。胞子は、細胞壁構造を有し、細胞内にトレハロースなどを貯蔵しており、乾燥などの環境変化に対して耐性を示す。また、菌糸は胞子から発芽によって出現し、活性の高い先端部分から伸長することによって生長する。さらに菌糸が成熟すると、胞子を形成して、これを拡散させることによって環境中に生育範囲を拡大させる。このような糸状菌の発育や生長を抑制し、殺菌するためには、生育過程における細胞形態の対象を定め、これに対して有効性と安全性が担保された適切な処理を行う必要がある。

殺菌処理方法には、物理的処理や化学的処理など様々な手法が知られており、殺菌効果や品質劣化などの様々な側面を勘案して、適切な方法が選択される。物理的殺菌処理は、古来より用いられてきた手法であり、加熱処理や紫外線処理などのほか、ガンマ線照射処理などの電離放射線が用いられている。近年、主に食品衛生分野において、食品の品質劣化を防ぐ目的で、殺菌処理のミニマムプロセッシングが進んでいる。そのため、検体中に亜致死的（sub-lethal）な損傷菌（injured cells）が発生する可能性が示唆されており、対策が求められている。損傷菌は、通常の平板培養法では検出されないか、遅れて検出されるために生菌数の過小評価につながる。しかし、このような損傷菌の性質や検出方法、処

理方法など関連する研究の進展や情報の整備はあまり進んでいない。特に糸状菌に関する損傷菌研究の事例は殆ど知られていない現状にある。そのため、微生物の損傷化やそこからの回復に至る現象を考慮し、これらを抑制できる低負荷な殺菌処理技術の構築が求められる。そのような課題に対し、本研究では、①損傷菌を検出する手法の構築、②損傷菌の発生を抑制できる低負荷な殺菌処理制御の向上、が必要であると考え、環境中の糸状菌である *Cladosporium cladosporioides* と *Aspergillus niger* を対象とし、物理的殺菌手法である加熱殺菌とガンマ線照射殺菌に関する損傷菌の生成とその機序を解明することを目的とし、以下の研究を行った。

第2章では、糸状菌の損傷菌解析法の構築を行った。糸状菌の低負荷殺菌において、亜致死損傷を受けたものは生長の遅延現象として現れることを見出し、これに着目して生長曲線における遅延時間から逆算して試料中の生残菌数を求める発育遅延解析法を活用し、二重培養法による損傷菌解析法を確立した。この遅延現象を速度論的に解析すると、生長までの遅延時間に基づく  $\lambda$  損傷と、生長速度低下に基づく  $\mu$  損傷の2つの損傷モードからなることが明らかとなり、これらを個別のパラメータとして設定するとともに、それぞれ定量化するための解析理論を構築した。この方法を低負荷の加熱処理に適用したところ、 $\lambda$  損傷と  $\mu$  損傷を個別に算出し、かつ加熱時間に応じた生成過程を知ることができた。このとき、従来の包括的な損傷菌解析法による損傷菌数（overall 損傷）に対してバラつきが大幅に小さくなり、2つの損傷モードはそれぞれ有意に求められることを確認した。

第3章では、第2章で構築した解析法の評価を行うため、物理的殺菌手法として確立されている加熱処理を用いて、環境中に高頻度で検出される糸状菌である *Cladosporium* を低温域の加熱処理に供したときの亜致死損傷の生成を評価した。*Cladosporium* の熱感受性を評価するため熱死滅反応のアレニウスプロット解析を行った結果、47°Cを境に低温側では主に熱変性によらない特徴的な損傷機序であると考えられたため、45°Cを代表値とした低温域での加熱処理を、本解析法で評価することとした（対照：従来の致死的加熱条件として52°Cでの評価）。その結果、45°Cは加熱時間が長いほど  $\lambda$  損傷が顕著に増加し、 $\mu$  損傷は加熱時間の増加によってわずかではあるが有意に生成することを確認した。さらに、タイムラプス顕微画像解析によって、これらの  $\lambda$  損傷と  $\mu$  損傷に関与する生育特性値を検証した。その結果、45°Cの低温域による加熱では、 $\lambda$  損傷に関するものとして発芽膨潤開始のタイムラグ増加（1.8倍）と発芽胞子数増加率の低下（0.13倍）が影響し、 $\mu$  損傷に関するものとして分岐形成率の低下（0.60倍）が影響することを確認した。胞子の膨潤と発芽にかかる変化は、 $\lambda$  損傷の発生機序を示唆するとともに、制御手法の構築や、生理学的な解析へのアプローチにも一考を与えるものである。これらの結果より、本解析法が損傷菌の検出と定量化に有効であることが示された。

第4章では、構築した解析法を用いて、糸状菌である *Cladosporium* と *Aspergillus* のガンマ線照射による死滅過程の評価と損傷菌生成の検出と定量化を試みた。2種類の菌種は、いずれもガンマ線に対する感受性が認められ、 $D$  値となる照射線量は *Cladosporium* で 0.46kGy、*Aspergillus* で 0.28kGy であった。発育遅延解析法ではいずれの菌種でも  $\mu$  損傷が大きく、 $\lambda$  損傷は加熱に比べて大幅に小さくなった。ガンマ線の作用機序が DNA 損傷に

よるものであり、発芽過程よりも生長過程において影響したものと考えられる。*Aspergillus* の生長曲線では照射線量に応じた生長速度の低下が顕著に認められ、 $\mu$  損傷の増加を示した。一方、生長が一定のレベルに達すると生長速度は急激に変化して未処理に近いレベルに増加した。顕微画像解析でこの過程を検証すると、発芽胞子は、生長する集団と生長速度が低下して生長停止する集団が認められ、このような亜集団によって統合された生長曲線を示したものであった。ガンマ線照射は、加熱処理とは損傷菌の生成機序が異なり、本解析法ではそれらを個別に検知できることが示された。

第5章では、糸状菌の亜致死損傷過程を生理学的に解析するため、低い活性化エネルギーで細胞損傷と細胞死が引き起こされるメカニズムとして、液胞損傷と分解酵素の活性化の可能性について仮定し、蛍光染色を用いて検証した。細胞内の分解酵素としてプロテアーゼ活性に着目し、CMAC 誘導体による染色および比活性の測定を行ったところ、低温加熱による亜致死損傷過程では、作用量の増加に伴って活性の増加を確認した。さらに、細胞内の局在を観察したところ、未処理では液胞に局在したが、加熱後には細胞原形質内に分布がみられた。液胞局在性のプロテアーゼが細胞原形質に移行している可能性が示唆された。そこで、液胞局在性の酸性染料であるキナクリンを用いたところ、低温加熱によって胞子の原形質への染色が確認され、液胞膜の透過性の亢進と原形質の酸性化がおこったものと考えられた。液胞プロテアーゼも、加熱によって細胞原形質に漏出し、細胞内で障害を与えることで亜致死損傷が発生した可能性が示唆された。

修復に関わる因子として、トレハロースの消長を評価したところ、低温加熱による亜致死損傷を与えた後、発芽前に一過性のトレハロースの増加が起ることを確認した。これは修復過程において合成系が誘導された可能性が示唆され、遅延からの回復にはエネルギー生産能の回復が重要であるものと推測される。また、トレハロース濃度の変化による低温加熱および高温加熱による熱死滅速度への影響を評価したところ、高温加熱においてトレハロースによる熱抵抗化を確認したが、低温加熱は熱死滅速度への影響はみられなかった。これは、トレハロースの保護機能および各温度域の熱死滅機序を反映したものと考えられ、低温側では熱変性によらない損傷の影響が大きいことを示唆している。

第6章では、本論文の結論を述べ、本研究で得られた結果を総括し、今後の展望について述べた。本研究では、糸状菌の亜致死的な殺菌処理による損傷菌の検出方法の構築と、加熱殺菌とガンマ線照射殺菌による損傷化現象の解析を行ったが、今後、さらに詳細な生理学的解析の推進による機序の解明と定式化をすすめ、これを自動解析できる数学モデルの構築と、汎用機器のプログラム構築を目指す。これにより、市場における糸状菌の損傷菌研究促進と、殺菌工学の進展、ガンマ線照射処理の有効利用促進が期待される。

## 審査結果の要旨

糸状菌は、住宅環境や食品衛生分野などで品質劣化や環境悪化のリスク要因となり、中毒やアレルギー疾患などの深刻な健康被害を引き起こす。さらに食品衛生分野において進められている殺菌処理のミニマムプロセッシングにおいて、検体中に亜致死の(sub-lethal)な損傷菌(injured cells)が発生する恐れがあり、より高度な対策が求められている。本研究では、環境中の糸状菌である *Cladosporium cladosporioides* と *Aspergillus niger* を対象とし、物理的殺菌手法である加熱殺菌とガンマ線照射殺菌に関する損傷菌の生成とその機序を解明することを目的とし、以下の成果を得ている。

(1) 糸状菌の低負荷殺菌において、亜致死損傷を受けた菌体は生長の遅延現象として現れることを見出し、発育遅延解析法を基に二重培養法による損傷菌解析法を確立した。さらにこの遅延現象の速度論的解析により、生長までの遅延時間に基づく $\lambda$ 損傷と、生長速度低下に基づく $\mu$ 損傷の2つの損傷モードからなることを見だし、これらを個別のパラメータとして設定するとともに、それぞれ定量化するための解析理論を構築した。

(2) *C. cladosporioides* の熱感受性を評価するため熱死滅反応のアレニウスプロット解析及びタイムラプス顕微画像解析によって、45°Cにおいては加熱時間の増加に伴い $\lambda$ 損傷が顕著に増加し、発芽膨潤開始のタイムラグ増加と発芽胞子数増加率の低下が影響することを明らかにした。また $\mu$ 損傷は分岐形成率の低下が影響することを確認し、さらに液胞局在性の酸性染料であるキナクリンによる染色により、加熱による損傷菌発生には液胞の分解が強く関わっていることを示した。

(3) 構築した解析法が *A. niger* の<sup>60</sup>Coガンマ線照射による死滅過程の評価と損傷菌生成の検出と定量化に適用できることを示し、 $\mu$ 損傷が大きく、 $\lambda$ 損傷は加熱に比べて大幅に小さいことを見出した。さらに顕微画像解析により、 $\mu$ 損傷の増加は生長過程で成長停止する亜集団によることを見出し、ガンマ線による損傷菌の発生は加熱とは異なる機構であることを明らかにした。

以上の研究結果は糸状菌の殺菌及び損傷菌の検出に有効な解析法を提案しており、その機構について初めて有効な知見が得られたことは高く評価できる。これにより、市場における糸状菌の損傷菌研究促進と、ガンマ線照射を含む殺菌工学の進展が期待できる。これらの成果は申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。