

【原著論文】

剣道防具「面」の細菌叢の基礎的研究： 細菌の抗真菌効果について

田中和幸¹⁾, 奈良真孝¹⁾, 加藤 希¹⁾, 柴田紘三郎²⁾, 井川正治³⁾

¹⁾ 日本体育大学自然科学研究室, ²⁾ 日本体育大学運動方法 (ラグビー) 研究室, ³⁾ 日本体育大学健康管理学研究室

Studies on the bacteria produce the antibacterial substances on the Mens of Kendo

Kazuyuki TANAKA, Masataka NARA, Nozomi KATO, Kozaburo SHIBATA and Shoji IGAWA

Abstract: We have previously shown that it important for safe practice in sports to isolate bacteria from sports institutions and sporting equipment and take appropriate measures for the prevention of epidemics when necessary. On the Mens of Kendo, when the count of bacteria increased, the count of fungi decreased, and *vice versa* (mirror image phenomenon was repeated). These results showed a negative correlation between proliferation of fungi and bacteria on the Mens, as observed with Wrestling Mats and Judo Mats. In this study, antimicrobial activities of culture supernatants of bacteria isolated from the Mens were examined by the paper disc method. The culture supernatant of a bacterium showed growth inhibition against several kinds of fungi and, also bacteria. This strain remarkably inhibited the growth of *Penicillium chrysogenum* and *Micrococcus luteus* on potato-glucose agar medium. The strain was identified as *Paenibacillus* sp. using the method of the 16S rDNA analysis. Based on the above findings, the bacterium may be useful for disinfection of Kendo equipments in the future.

(Received: July 29, 2010 Accepted: August 17, 2010)

Key words: antifungal activity, Men (a protector of Kendo), flora

キーワード: 抗真菌効果, 剣道防具「面」, 細菌叢

1. 緒 言

先に, われわれはスポーツ競技施設柔道場の畳およびレスリング場のマットにおける細菌と真菌との個数の増減が, ミラーイメージを示すことを報告した^{1,2)}。奈良ら³⁾は柔道場畳から真菌を分離同定し, 抗菌様物質を産生する真菌をみいだした。また, 加藤⁴⁾は柔道場畳から分離された真菌が産生する抗菌様物質の殺菌効果を超微形態学的に確かめ, 真菌と細菌との個数が, 年間を通してミラーイメージを示す主な原因である可能性を明らかにしている。1990年, 辻ら⁵⁾は, 細菌が真菌に対して強い生育阻害作用を示すことを報告している。更に, 辻ら⁶⁾は抗菌活性物質の性状について検討し, 当物質の分離, 精製を試み, 得られた標品が *Helminthosporium oryzae* および *Pyricularia oryzae* の増殖を抑制することを見いだしている。今回, 剣道防具「面」から細菌および真菌について年間を通して継続的に採取し, 「面」における細菌と真菌の個数の増減が,

他のスポーツ競技施設^{1,2)}と同様に, ミラーイメージを示すことを明らかにした。このような現象が起こる原因には, 奈良ら, 加藤らがスポーツ競技施設で見いだした抗菌様物質を産生する真菌, 辻らにより発見された細菌による抗菌活性物質の関与が考えられる。われわれは「面」から新たに抗菌効果を示す特異的な細菌を分離同定し, 当細菌が「面」の殺菌に有用である可能性が示唆されたので報告する。

2. 方 法

1) 細菌, 真菌の採取

N 体育大学の剣道防具「面」から毎月無作為に5個を選び, 1年間継続的に採取した。「面」の内側側頸部領域より, カウントタクトおよびカウントタクトアプリケーター (Sysmex) を用いて圧力 500 g, 10 秒間の条件で採取し, 培養した。カウントタクトには普通寒天培地およびサブロー寒天培地を用いた。培養後, カ

ウントタクト上に増殖した細菌および真菌のコロニーを観察し、個数の計測と分離培養を行った。

2) 抗真菌効果を示す細菌の同定

細菌はPCR法を用いて16S rDNA領域を増幅した。次に、得られたPCR産物を精製した後、16S rDNAの全長の塩基配列をシーケンスし、国際塩基配列データベースによる相同性検索、系統解析により同定を行った。

3) 走査型電子顕微鏡観察

同定された*Paenibacillus*は24時間液体培養し、2.5%グルタルアルデヒドで2時間、4℃で固定し、エタノール系列で脱水後、酢酸イソアミルに置換した。その後、臨界点乾燥を行い、白金をコーティングした。試料は走査型電子顕微鏡(JSM-6460LV, JEOL)により加速電圧10KVで観察、撮影した。

4) ペーパーディスク法

分離された真菌はサブローデキストロースブロスで28℃、120–168時間振盪（1分間110ストローク）培養し、細菌は普通ブイヨンで35℃、24時間振盪培養した。*Paenibacillus*はポテトデキストロースブロスで37℃、24–192時間振盪培養したものをペーパーディスク法に用いた⁵⁾。ポテトデキストロース寒天培地（日水製薬）上に、表1に示した各種供試真菌液を混釈した同寒天培地8mlを重層した。同様に各種供試細菌にはミュラーヒントン寒天培地（日水製薬）を用いた。その後、*Paenibacillus*培養液を遠心し、その上清を115℃、

表1 *Paenibacillus* の抗真菌、抗細菌効果

Organisms	Activity
Fungi	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	++
<i>Aspergillus niger</i>	+
Fungi (Isolated from the Mens of Kendo)	
No. 1	+
No. 2	+++
No. 3	+
No. 4	+
No. 5	++
No. 6	++
No. 7	+++
No. 8	+++
No. 9	+++
No. 10	+
No. 11	+
No. 12	+
No. 13	+++
Yeasts	
<i>Candida albicans</i>	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+
<i>Candida tropicalis</i>	+
<i>Candida glabrata</i>	—
<i>Candida krusei</i>	—
Bacteria	
<i>Micrococcus luteus</i>	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+
<i>Bacillus sphaericus</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+

Paenibacillus の培養液（方法を参照）による真菌、細菌に対する阻害効果を示す。各真菌、細菌の周囲に形成された阻止円の直径を11mm未満を(–)、11–15mm(+), 16–20mm(++), 21mm以上を(+++)で表している。

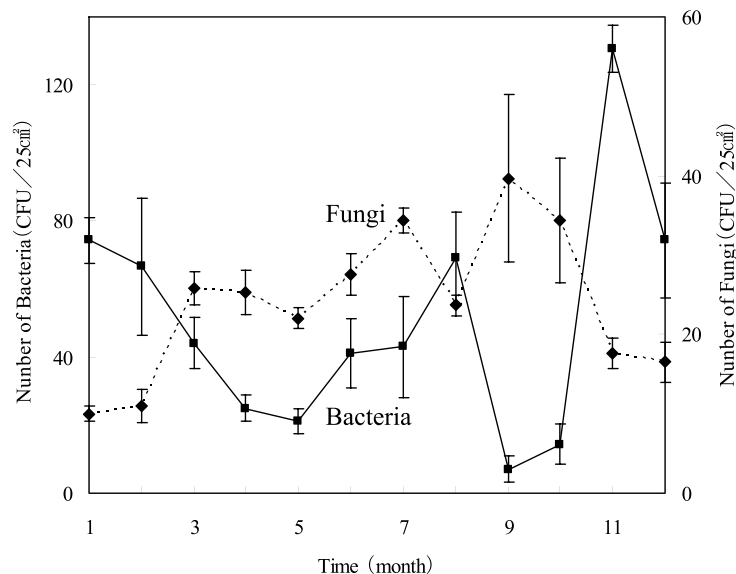


図1 年間における「面」の細菌および真菌の個数の動態

N 体育大学の剣道防具「面」の細菌、真菌の個数について1年間の継続的な調査を行ったものである。すなわち、細菌の個数が減少すると、真菌の個数に増加がみられる。このような現象が年間を通して繰り返される。いわゆる、細菌と真菌の個数がミラーイメージを示す現象を見いだした。(—■— 細菌, ---◆--- 真菌)

10 分間、高圧蒸気滅菌器で処理し、それをペーパーディスク（直径 10 mm, ADVANTEC）に 80 μ l 含ませ寒天培地上に置き、28°C で 72–120 時間培養後、形成された阻止円を観察した⁷⁾。

3. 結 果

図 1 は N 体育大学剣道防具「面」の年間における月毎に採取した細菌および真菌の個数の動態を表している。「面」から採取された細菌の個数は平均 5.1×10 CFU/25 cm^2 で、真菌は 2.4×10 CFU/25 cm^2 であった（図 1）。細菌の個数の減少は 3 月から 7 月、9 月から 10 月の間に認められ、一方、8 月と 11 月には、増加がみられた（図 1）。真菌の個数は 3 月から 7 月に増加し、8 月と 11 月に減少していることが分かる（図 1）。すなわち、細菌と真菌の個数の動態はミラーイメージを示している（図 1）。

被検細菌は、ポテトデキストロース寒天培地上でムコイド状のコロニーを形成するグラム陽性、通性嫌気性の芽胞形成桿菌⁸⁾であった。図 2 は、被検細菌の走査型電子顕微鏡像で、約 $0.7 \times 1.5 \sim 2.5 \mu\text{m}$ の桿状形態が観察される。当細菌は 16S rDNA 塩基配列の解析を行った結果、*Paenibacillus* 属の一種であることが分かった（図 3）。

図 4 は *Paenibacillus* の抗真菌効果を経時的に測定した結果である。*Paenibacillus* の培養液によるペーパーディスク法処理の結果、120 時間前後培養したものの阻止円の直径が最大となることが分かった（図 4）。

表 1 は、各種真菌および細菌について、*Paenibacillus* の抗真菌、抗細菌効果をペーパーディスク法で測定した結果である（表 1）。「面」より分離された真菌

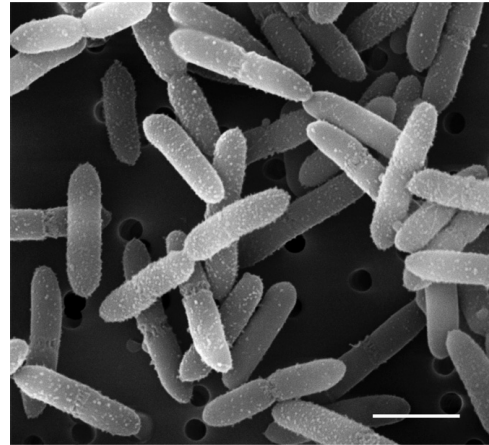


図 2 *Paenibacillus* の走査型電子顕微鏡像
スケールは 2 μm を示す。

13 菌種および *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* に、それぞれ阻止円の形成が認められ、細菌の *Micrococcus luteus* に対しては顕著な阻止円の形成が認められた（表 1）。図 5 は *Penicillium chrysogenum* に形成された阻止円を示している。

4. 考 察

真菌感染症の化学療法は細菌感染症に比べていまだ立ち遅れており、特に深在性真菌症の患者数は年々増加していると言われている⁹⁾。わが国における深在性真菌症の代表的なものはカンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコッカス症などである。これらは近年の広域細菌抗生物質、ステロイドホルモン、免疫抑制剤、制

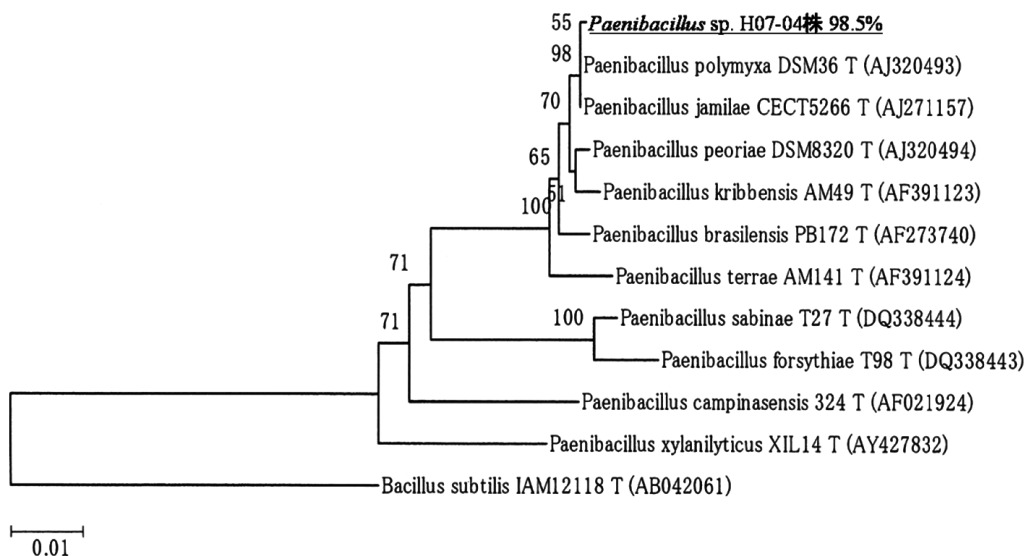


図 3 *Paenibacillus* の同定

細菌の 16S rDNA の全長の塩基配列から、国際塩基配列で検索同定を行ったものである（系統枝の分岐に位置する数値はブートストラップ値を示す）。

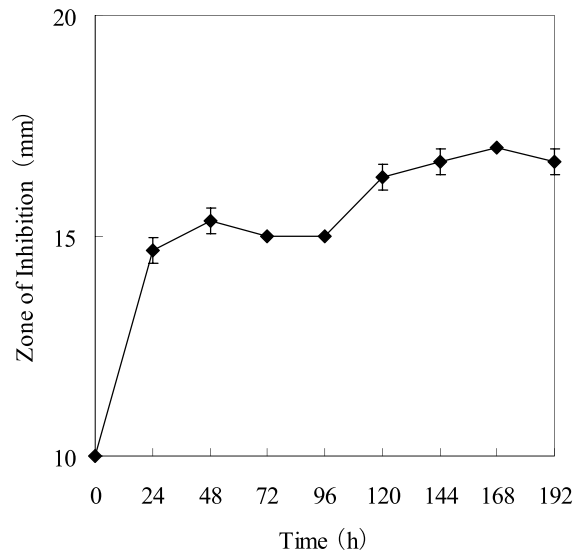


図4 *Paenibacillus* による抗真菌効果の測定
Paenibacillus 培養液を経時的に採取し、ペーパーディスク法を用いて、*Penicillium chrysogenum* の周囲に形成された阻止円の直径を測定したものである。

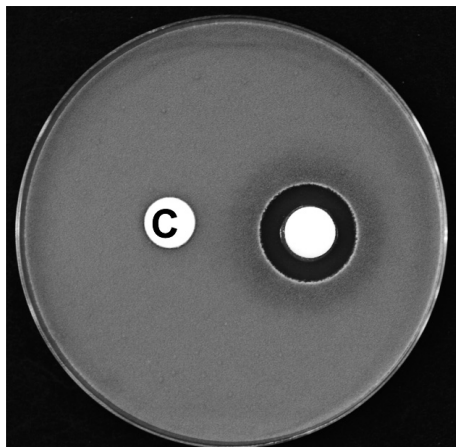


図5 *Paenibacillus* 培養液による *Penicillium chrysogenum* の阻止円形成
ディスク（右側）は *Paenibacillus* を培養し、その培養液を用いてペーパーディスク法により *Penicillium chrysogenum* について検定を行ったものである（方法を参照）。ディスクの周辺部に顕著な阻止円の形成が見られる。左ディスク C は対照を示す。

がん剤などの使用による医原的誘因、あるいはエイズ、白血病、腎移植などの基礎疾患素因などにより免疫学的、生理学的に感染抵抗性の低下した患者、すなわち易感染性宿主が感染する日和見感染型真菌症であり、その発生率は著しく上昇しているといわれている^{10,11)}。一方で、わが国で深在性真菌症に使用されている抗真菌薬は、ポリエンマクロライド系抗生物質アムホテルリン B、フロロピリミジン系のフルシトシンおよびアゾール系のミコナゾール、フルコナゾール、イトラコナゾールなどが挙げられるが、それぞれ毒性が強

い、抗菌活性が低い、作用が静菌的であるなどの欠点があり、新しい抗真菌剤の開発が切望されている⁹⁻¹¹⁾。

本研究では、剣道防具「面」から細菌および真菌について年間を通して継続的に採取し、柔道場畳やレスリング場マットと同様に、細菌と真菌との個数の増減が、ミラーイメージを示す現象を確認した（図1）。剣道防具は一度購入すると使用不能になるまで長期間にわたって、ほとんど十分な洗浄をすることなく使用するのが一般的であるとされているため^{12,13)}、先に、田中ら^{14,15)}は、衛生学、公衆衛生学や疫学の見地から、自動細菌同定装置を応用し、初めて年間を通して剣道防具「面」の細菌叢を構成する17属46菌種の細菌を分離同定した。現在、「面」由来真菌についても28S rDNA塩基配列解析により分離同定を試みている。

次に、「面」から分離された細菌 *Paenibacillus* の抗真菌様物質産生の条件、抗真菌、抗細菌効果および *Paenibacillus* の性状について検討を行った。すなわち、「面」から採取された真菌をコロニーの色や形状および光学顕微鏡観察による形態学的な特徴¹⁶⁾によって分類し、そのようにして分離された真菌13菌種および *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Candida* 属5菌種と各種細菌に対する *Paenibacillus* 培養液の抗真菌、抗細菌効果をペーパーディスク法で調べた。その結果、「面」由来真菌13菌種および *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* などの糸状菌や *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* などの酵母様真菌、さらに、各種細菌に対して阻止円の形成が認められた（表1）。特に、「面」より分離された真菌13菌種中の7菌種および *Penicillium chrysogenum*、「面」の細菌叢で高頻度に分離される *Micrococcus luteus* には強力な増殖阻害効果を示した（表1）。本細菌は「面」に見られる真菌や細菌に対して強力な増殖阻害効果を示すことが判った（表1）。

今回、われわれは「面」由来の *Paenibacillus* が、真菌のみならず細菌に対しても増殖阻害効果を示すことを新たに見いだした（表1）。特に、「面」にみられる真菌や細菌には強い効果を示す傾向がみられた（表1）。このような細菌による抗真菌効果に関する研究は極めて限定されているが、*Bacillus* 属の細菌が産生する抗真菌抗生物質として Mycobacillin, Bacillomycin, Fusaricidin などが知られている^{17,18)}。従って、今回分離された *Paenibacillus* の産生する抗真菌様物質の分離精製、抗真菌や抗細菌作用機作の解明が今後の重要な研究課題であると思われる。

5. 結 語

剣道防具「面」の真菌と細菌との個数の増減がミラーイメージを示す現象を明らかにした。同時に、

「面」から分離同定した特異的な細菌による抗菌試験を試みた。すなわち、「面」から採取された細菌の培養液を、高圧蒸気滅菌器で処理した後、各種の真菌、細菌に対するペーパーディスク検定試験による抗菌効果の調査を行った。その結果、細菌には抗真菌効果と同様に抗細菌効果もみられることが新たに分かった。細菌の培養液による顕著な阻止円の形成は真菌 *Penicillium chrysogenum* と細菌 *Micrococcus luteus* とに認められた。抗菌効果を有する細菌は、16S rDNA 塩基配列を基に、*Paenibacillus* と同定された。*Paenibacillus* は今後、「面」の消毒などの衛生管理に有用な細菌である可能性が示唆される。

謝辞 本研究を実施するにあたり貴重な御助言、御指導を戴きました自然科学研究室 長船哲齊教授に厚く御礼申し上げます。

6. 文 献

- 1) 仲村 洋：柔道場における細菌叢の動態。日体大卒業研究抄録 (2006).
- 2) Kiyohara, N., Nara, M., Miwa, Y., Koizumi, K., Fujimoto, H., Yamamoto, H., Shibata, K., Kibamoto, H., Ishii, T., Mizuno, M. and Osafue, T.: Correlation between bacteria and fungi on wrestling mats. *Med. biol.*, 152(10): 422-426 (2008).
- 3) 奈良真孝, 長船哲齊, 田中和幸, 清原伸彦, 柴田絃三郎, 宮武和孝: 柔道場より分離された細菌と真菌の相関性: 真菌の同定に関する研究 (Ⅱ). 日本体育学会第 60 回大会, 予稿集: 250 (2009).
- 4) 加藤 希: 柔道場畳の細菌と真菌との相関性: 顕微鏡による真菌培養液の殺菌に関する検討. 日体大紀要, 39(2): 137-141 (2010).
- 5) 辻 久生, 辻美保子, 上田博夫: *Bacillus* 属細菌培養液の抗菌活性と培地組成の検討. 日本農薬学会誌, 15: 1-6 (1990).
- 6) 辻 久生, 辻美保子, 出口 剛, 上田博夫: *Bacillus* 属細菌の産生する抗菌活性物質の性質ならびに分離・精製. 日本農薬学会誌, 15: 7-12 (1990).
- 7) 田中信夫, 仲村昭四郎: 抗生物質大要. 財団法人東京大学出版会: 東京, pp. 23-26 (1972).
- 8) 近藤雅臣, 渡部一仁: スポア実験マニュアル. 技報堂出版株式会社: 東京, pp. 3-162 (1995).
- 9) 金田 幸, 梶村芳雄: 新規抗真菌抗生物質 Bacillo-peptins 及び Fusaricidins について. 薬学雑誌, 122(9): 651-671 (2002).
- 10) Georgopapadakou, N. H. and Walsh, T. J.: Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science*, 264: 371-373 (1994).
- 11) Andriole, V. T.: The 1998 Garrod lecture. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.*, 44: 151-162 (1999).
- 12) 坪井三郎: 防具の衛生: 現代スポーツコーチ実践講 19 剣道. ぎょうせい: 東京, pp. 144-145 (1985).
- 13) 田淵俊彦: 剣道防具の衛生に関する研究—高校剣道部員の「面」顎部の細菌数について—: 武道学研究, 26: 41 (1996).
- 14) 石毛徹也, 柳かおり, 長船哲齊, 八木沢誠, 袴田大蔵, 志沢邦夫: 迅速自動細菌同定装置による剣道防具からの細菌の同定. 日本体育学会第 49 回大会, 予稿集: 579 (1998).
- 15) 田中和幸, 長船哲齊, 袴田大蔵, 志沢邦夫, 伊藤孝: 自動細菌同定装置を応用した剣道具の細菌叢の研究: 「面」に由来する細菌の同定. 武道学研究, 34(1): 23-33 (2001).
- 16) Larone, D. H.: 医真菌同定の手引き. シュブリンガー・フェアラーク東京株式会社: 東京, pp. 7-262 (1996).
- 17) Katz, E. and Demain, A. L.: The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, Biogenesis, and possible functions. *Bact. Rev.*, 41(2): 449-474 (1977).
- 18) Kajimura, Y. and Kaneda, M.: Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation, and biological activity. *J. Antibiot.*, 49: 129-135 (1996).

〈連絡先〉

著者名: 田中和幸

住 所: 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1221-1

所 属: 日本体育大学横浜健志台キャンパス電子顕微鏡室

E-mail アドレス: katanaka@nittai.ac.jp