

ベンズイミダゾール系薬剤に耐性を持った Penicillium spp . 防除に関する - 考察

富樫 巖

宜寿次盛生^{*1}

原田 陽^{*1}

Observation of Disinfecting Benzimidazole - tolerant Penicillium spp . with Fungicides

I wao TOGASHI

Seiki GISUSI

Akira HARADA

The antifungal activities of benomyl (BEN) , thiabendazole (TBZ) , chlorhexidine digluconate (CHG) and glutaraldehyde (GLA) were tested against five strains of Penicillium spp , including two strains (96201 Pe and 97203 Pe) isolated from two mushroom factories in which benzimidazole (BEN and / or TBZ) was used to disinfect the cultivation environment . BEN and TBZ were not very inhibitory to the growth of 96201Pe and 97203Pe . The minimum inhibitory concentration (MIC) of TBZ against the two strains was 10^2 - 10^4 fold of those against the others , so that it was considered that the two strains had gained tolerance to benzimidazole . On the other hand , CHG and GLA showed potent antifungal activity against the five strains of Penicillium spp . tested . The MIC values of CHG and GLA were 0.0016 - 0.0031 and 0.25 % (W/V) , respectively . Therefore , it is thought that CHG and GLA are useful to disinfect benzimidazole - tolerant Penicillium spp .

Keywords : Penicillium spp . , minimum inhibitory concentration, benzimidazole , chlorhexidine digluconate , glutaraldehyde
ペニシリウム属菌 , 最小発育阻止濃度 (MIC) , ベンズイミダゾール , グルコン酸クロルヘキシジン , グルタルアルデヒド

栽培施設内の消毒 (環境殺菌) にベンズイミダゾール系薬剤を使用している食用キノコの栽培施設から分離した2菌株 (96201Peと97203Pe) を含む5菌株のペニシリウム属菌に対するベノミル (BEN) , チアベンダゾール (TBZ) , グルコン酸クロルヘキシジン (CHG) およびグルタルアルデヒド (GLA) の生育阻害効果を観察した。その結果, 96201Peと97203Peでは, BENとTBZの同効果はかなり小さく, TBZの最小発育阻止濃度 (MIC) は他の3菌株に比べて 10^2 ~ 10^4 倍高い値となり, ベンズイミダゾール系薬剤に対する耐性が発現していることが分かった。しかし, CHGとGLAの生育阻害効果はいずれの菌株に対してもほぼ等しく, 両薬剤のMICは, それぞれ0.0016 - 0.0031と0.25% (W/V) であった。以上の結果から, ベンズイミダゾール系薬剤に耐性を持ったペニシリウム属菌の環境殺菌に用いる薬剤として, CHGとGLAが期待できることが分かった。

1. 緒 言

食用キノコの栽培施設において, Penicillium spp . (以下, ペニシリウム属菌と記す) は検出率の高い空中落下菌である¹⁻⁴⁾。そのために, おが粉培地冷却時,

種菌の接種作業時, および培養初期から中期にペニシリウム属菌がおが粉培地へ混入し, おが粉培地へのキノコ菌糸の蔓延を阻害もしくは遅延させ, 子実体生産にマイナスの影響を及ぼす事例が報告されて

いる⁵⁻⁸⁾。したがって、安定した子実体生産をはかるためには、ペニシリウム属菌をはじめとする栽培施設を汚染する微生物密度の低減等、栽培環境の保全に努めることが不可欠となる。

栽培施設に浮遊するペニシリウム属菌等の糸状菌を防除するために、一般的にベノミル (BEN) やチアベンダゾール (TBZ) を有効成分とするベンズイミダゾール系薬剤が用いられる^{5,6,9,10)}。一方、同薬剤は耐性菌が発現しやすいことが指摘されており^{11, 12)}、その取り扱いには慎重な配慮が必要となる。本研究では、ベンズイミダゾール系薬剤を環境殺菌に使用している、ナメコ (*Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito et Imai in Imai) とエノキタケ (*Flammulina velutipes* (Curt. :Fr.) Sing.) 栽培施設から分離した2菌株、およびホルムアルデヒドと塩化ペンザルコニウムを環境殺菌に使用しているエノキタケ栽培施設から分離した1菌株を含む5菌株のペニシリウム属菌についてベンズイミダゾール系薬剤に対する耐性を観察するとともに、ペニシリウム属菌防除に用いる殺菌剤の選択肢を増やすことを目的にグルコン酸クロルヘキシジン (CHG) とグルタルアルデヒド (GLA) の利用可能性を検討した。

CHGとGLAの選択に当たっては、生育阻害を引き起こす作用点や作用機構がベンズイミダゾール系薬剤と異なること、医療現場の微生物制御に汎用される¹³⁾ ことに注目した。なお、本研究の一部は第29回日本木材学会北海道支部研究発表会 (1997年10月、旭川市) で発表するとともに木材学会誌¹⁴⁾ に掲載された。

2. 実験方法

2.1 供試菌株

ベノミル水和剤を環境殺菌に使用している栽培施設のナメコおが粉培地 (培養途中のもの) から分離した1菌株 (菌株番号: 96201Pe), 市販のロックフォールチーズ (デンマーク産) から分離した *P. roqueforti* Thom (同: 97201Pe), ホルマリンと塩化ペンザルコニウム液を環境殺菌に使用しているエノキタケ栽培施設の落下菌から分離した1菌株 (同: 97202Pe), ベノミル水和剤とチアベンダゾール水和剤を環境殺菌または培地に混和している栽培施設の

エノキタケおが粉培地 (培養途中のもの) から分離した1菌株 (同: 97203Pe), およびカビ抵抗性試験 (JIS Z2911) に用いられる *P. citrinum* Thom (同: ATCC 9849) の合計5菌株のペニシリウム属菌を用いた。

2.2 供試薬剤

BEN (ペンレート[®]水和剤, ベノミル50% (W/W), デュボン ジャパン リミテッド, 東京), TBZ (ピオガード[®]液剤, チアベンダゾール10% (W/V), 北興化学工業 (株), 東京), CHG (ヒピテンR, グルコン酸クロルヘキシジン5% (W/V), ゼネカ薬品 (株), 大阪), およびGLA (グルタルアルデヒド水溶液, 25% (W/V), ナカライテスク (株), 京都) を用いた。

2.3 ベンズイミダゾール系薬剤の生育阻害効果の観察

高圧蒸気殺菌後, 60 以下に冷却したポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地に, BENまたはTBZを添加して直径90mmの平板培地を作成した。その平板培地に, PDA平板培地を用いて温度25 で7日間前培養した供試菌株の菌体 (同培地ごと打ち抜いた直径5mmの円盤) を接種後, 温度25 , 照度200~350lxの環境下で7日間培養して菌叢の生育面積をコントロールと比較した。なお, BEN濃度は0.05% (W/V), TBZ濃度は0.1% (W/V) とし, 各試験区の平板培地の供試枚数は3とした。

2.4 TBZ, CHG, GLAの最小発育阻止濃度の測定

供試薬剤の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) を液体培地法で測定した。液体培地としてはグルコース・ペプトン液状培地 (GP培地: glucose: 20g, polypeptone: 5g, malt extract: 2g, KH₂PO₄: 1g, MgSO₄·7H₂O: 0.5g, distilled water: 1000 ml, pH: 5.7±0.1) を用いた¹⁵⁾。内径18mm・長さ180mmの試験管にGP培地で調製した供試薬剤の2倍希釈液5mlを取り, ペニシリウム属菌の胞子液 (胞子数: 4~6×10⁶/ml) 0.1mlを接種後, 2.3と同様の環境下で7日間培養して, ペニシリウム属菌の生育を阻害した有効成分の最小濃度をMICとした¹⁵⁾。繰り返し数は2とし, 同様の試験を3回行った。なお, 胞子液は供試菌株をPDA平板培地で7日間前培養し, 0.05% Tween80生理食塩水を用いて作成した。

3. 結果と考察

3.1 ベンズイミダゾール系薬剤の生育阻害効果

コントロール培地の菌叢面積^{きんそう}を100%とした場合のBENおよびTBZ添加PDA平板培地におけるペニシリウム属菌の生育状況を第1表に示した。BENの0.05% (W/V), およびTBZの0.1%(W/V)は, キノコ栽培施設の環境殺菌を目的に, それらの薬剤を水溶液として壁面, 床面, 天井等に噴霧する濃度⁹⁾に相当する。その結果, 96201Peと97203Peの2菌株については, BEN添加PDA平板培地では生育阻害を受けず, また, TBZ添加PDA平板培地でも菌株により菌叢の生育度合いに若干の影響はあるが生育阻害を受け難いことが分かった。一方, 97201Peと97202Peの2菌株については, BENおよびTBZ添加PDA平板培地において全く生育がみられず, ATCC 9849についてはわずかな生育が観察された。

これらの原因としては, ペニシリウム属菌の分離源である栽培施設で使用している薬剤と利用期間^{11,16)}が影響しているものと推察される。すなわち97202Peのエノキタケ栽培施設ではベンズイミダゾール系薬剤を全く使用していないのに対して, 96201Peのナメコ栽培施設ではベノミル水和剤のみを5年以上, 97203Peのエノキタケ栽培施設ではベノミル水和剤と

チアベンダゾール水和剤を2年以上の期間にわたって使用していた。このため, 96201Peと97203Peはベンズイミダゾール系薬剤に対する耐性を示したものと考えられる。

しかし, この2菌株がもともと供試薬剤に強い非感受性菌であり, 分離源である栽培施設における感受性菌数が低下したことで顕在化したのか, それとも薬剤との接触で耐性を獲得した耐性菌¹⁶⁾については今後の検討が必要となる。

96201PeがTBZと接触がないにもかかわらず, ある程度の生育阻害を受けながらもTBZ添加PDA平板培地で生育可能なのは, BENとTBZの化学構造や作用機構が似ていることにより生じる交叉抵抗性¹⁷⁾と考察される。また, 97201Peはチーズの製造, ATCC 9849はカビ抵抗性試験に用いられる菌株であり, ベンズイミダゾール系薬剤との接触は少ないと考えられる。

3.2 TBZ, CHG, GLAのMIC

供試菌株に対するTBZ, CHGおよびGLAのMICを第2表に示した。96201Peと97203Peの2菌株については, TBZのMICが0.63と2.5%(W/V), となり, 他の供試菌株と比較して $10^2 \sim 10^4$ 倍高い値が得られたことで, ベンズイミダゾール系薬剤に高い耐性を有する

第1表 BENまたはTBZを添加したPDA平板培地におけるペニシリウム属菌の生育状況^{a)}
Table 1. Effects of benzimidazole fungicides on the growth of *Penicillium* spp. on PDA plates^{a)}.

殺菌剤 ^{b)} Fungicide ^{b)}	濃度 Concentration (% (W/V))	供試したペニシリウム属菌 Strains of <i>Penicillium</i> spp.				
		96201Pe	97203Pe	97201Pe	97202Pe	ATCC9849
BEN	0.05	++++ ^{c)}	++++	-	-	+
TBZ	0.1	++	+++	-	-	+
コントロール Controls		++++	++++	++++	++++	++++

注: a): 供試菌は, 殺菌剤を添加して作成したポテトデキストロース寒天 (PDA) 平板培地および同薬剤を添加していないコントロール培地を用いて, 温度25℃・照度200-350 lxの環境下で7日間培養した。

各培養条件における平板培地の供試数は3枚とした。

b): BEN: ベノミル, TBZ: チアベンダゾール

c): +++++: コントロール培地における菌叢面積を100%とした場合, 90%以上の成育が観察された。

++++: 50-90%の成育, ++: 10-50%の成育, +: 10%以下の成育, -: 菌糸成長なし

Note: a): The fungi were incubated on PDA (potato-dextrose-agar) plates amended with the respective fungicides and PDA plates not amended as controls, at 25 °C in 200-350 lx for 7 days.

Three replicate cultures were used.

b): BEN: benomyl; TBZ: thiabendazole

c): +++++: estimated average zone of growth more than 90% of control;

++++: 50-90% growth; ++: 10-50% growth; +: less than 10% growth; -: no growth

第2表 GP培地を用いて測定した、ペニシリウム属菌に対するTBZ,CHG,およびGLAの最小発育阻止濃度(MIC)^{a)}

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of thiabendazole (TBZ), chlorhexidine digluconate (CHG), glutaraldehyde (GLA) against Penicillium spp. in GP liquid medium^{a)}.

単位: % (W/V)

殺菌剤 Fungicide	供試菌株 Strains				
	96201Pe	97203Pe	97201Pe	97202Pe	ATCC9849
TBZ	0.63	2.5	<0.0004	<0.0004	0.0016
CHG	0.0016	0.0031	0.0016	0.0016	0.0031
GLA	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

注: a) : 温度25・照度200-350 lx の環境下で7日間培養してMICを求めた。
繰り返し数を2とし,同様の試験を3回行った。

Note : a) : The fungi were incubated at 25 in 200-350 lx for 7 days to determine MIC .
The measurement of MIC was repeated three times with two replicates .

ことが再確認された。一方, 97201Pe, 97202PeおよびATCC9849に対するTBZのMICは0.0004未満~0.0016% (W/V) であり, P. citrinumに対するTBZのMICの報告値(4~20ppm)¹⁵⁾とよく一致した。

GLAと比べて, CHGは低濃度でペニシリウム属菌の生育を阻止した。さらに, 両殺菌剤のMICはベンズイミダゾール感受性および非感受性菌株による差異が少なく, CHGのMICは0.0016~0.0031% (W/V), GLAのMICは0.25% (W/V)であった。これは, 供試薬剤の作用点や作用機構の違いが原因と推察される。ベンズイミダゾール系薬剤はDNA合成阻害により¹⁸⁾, CHGは細胞膜の破壊や損傷および核酸, 蛋白質等の変性により¹⁹⁾, GLAは細胞壁のNH₂, SH基との反応および蛋白合成阻害等により²⁰⁾阻害効果を発現するとされる。以上のことから, 特にベンズイミダゾール系薬剤に耐性を有するペニシリウム属菌が顕在化した栽培施設における環境殺菌を目的とした薬剤として, CHGやGLAが有効であると考察される。

キノコの菌床栽培が純粋栽培技術, および閉鎖的空間となる栽培施設を用いていることを考慮すると, 栽培環境における害菌防除は欠かせない。しかし, 栽培施設の微生物密度の低減に当たって薬剤処理のみに頼ることは短絡的であり, 本報告で示したように殺菌剤に耐性を持った微生物の顕在化を招く危険性がある。微生物密度の低減を図る主作業としては, 栽培施設内外の整理整頓や美化, 防鼠・防虫対策, 洗浄や念入りな清掃を心掛ける²¹⁾ことであり, 殺菌剤

の利用は従とすべきと考える。

文 献

- 1) 河野又四, 寺下隆夫: 日菌報, 23, 517-522 (1982) .
- 2) 吉田忠, 高尾彰一: 北海道大学農学部邦文紀要, 13 (2), 81-100 (1982) .
- 3) 米虫節夫 ほか4名: 防菌防黴, 16 (1), 3-8 (1988) .
- 4) 富樫巖 ほか3名: 木材学会誌, 42 (12), 1258-1263 (1996) .
- 5) 山中勝次 ほか3名: “新しいヒラタケ栽培”, 農村文化社, 1987, p.115-130 .
- 6) 山中勝次, 柿本陽一: “カラー版きのこ生育診断 ヒラタケ・エノキタケ篇”, 農村文化社, 1991, p. 24-86 .
- 7) 長野県: “菌床きのこ栽培障害事例集”, 長野県経済事業農業協同組合連合会, 1995, p.10-140 .
- 8) 古川久彦, 野淵 輝: “栽培きのこ害菌・害虫ハンドブック”, 全国林業改良普及協会, 1996, p. 224 - 229 .
- 9) 福井陸夫: “きのこの基礎科学と最新技術”, きのこ技術集談会編集委員会編, 農村文化社, 1991, p. 177 - 189 .
- 10) 山際 功: 特産情報, No. 83, 61-62 (1986) .
- 11) 有田郁夫: 菌蕈, 30 (5), 34-37 (1984) .
- 12) Nakata, A. et al.: Ann. Phytopath. Soc. Japan, 53 (12), 653-662 (1987) .
- 13) 青山平一 ほか4名: “第3版 院内における効果的

- 消毒法の実際”，薬業時報社，1996，p.43-109.
- 14) 富樫 巖，宜寿次盛生，原田 陽：木材学会誌，**44** (5)，375-379(1998).
- 15) 高鳥浩介，佐々木輝，太田利子：“一目でわかる 図解カビ検査・操作マニュアル”，テクノ システム，1991，p.59-355.
- 16) 本田 博 ほか3名：“新農薬学概論”，朝倉書店，1993，p.22-57.
- 17) 石崎 寛：“農薬科学”，養賢堂，1987，p.63-70.
- 18) J.W.ディーコン（山口英世，河合康雄訳）：“真菌学入門”，培風館，1982，p.218-223.
- 19) 芝崎 勲：防菌防黴，**14**(4)，p.201-210 (1988).
- 20) 牟岐和房：“消毒薬Q&A”，川名村治編，医薬ジャーナル社，1995，p.38-39.
- 21) 米虫節夫：科学と工業，**67**(7)，270-276 (1993).

—企画指導部 普及課—

—*1：きのこ部 生産技術科—

(原稿受理：99.2.23)