Heat Resistance of *Cladosporium* Isolated from Laboratory Animal Facilities

Satoru KAWAI, Kosuke TAKATORI, and Tsuneo OHTAKI

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5
Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan

(Received 4 August 1989/Accepted 14 February 1990)

Heat resistance tests for the saprophyte, *Cladosporium*, isolated from laboratory animal facilities were carried out. In testing the effects of moderate and high temperature conditions, *C. sphaerospermum* (*C. s*) and *C. cladosporioides* (*C. c*) were found to grow on media in temperatures less than 32°C, but did not in temperature of 35°C and over. The colony diameter of *Cladosporium* became smaller as temperature increased. The death time of *C. s* treated with moist heat was within 12 min at 48°C and that of *C. c* was within 26 min at 43°C. Both *Cladosporium* species could not survive for more than 1 min at 55°C. On the other hand, *Cladosporium* treated with dry heat could not survive more than 69~12 min (*C. s*) and 39~9.5 min (*C. c*) at 70~100°C. From these results, it can be seen that *Cladosporium* was definitely sensitive to heat treatment, and the authors assume that heat is a means of prevention in laboratory animal facilities.

実験動物飼育施設から分離された *Cladosporium* の熱抵抗性

川合 寛・高鳥浩介・大滝恒夫

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

C. sphaerospermum, *C. cladosporioides* は自然界に広く分布する代表的な *Cladosporium* 属の腐生真菌である。これら腐生真菌は、食品加工環境下で本菌混入による品質低下や、建造物および居住環境の汚染を引き起こし、精密電子機器の劣化などあらゆる分野で悪影響を及ぼしている [2, 3, 10, 12]。また実験動物施設内における落下菌検査や、拭きとり検査でも本菌は多数分離され、時折バリア区域内からも検出されることがある。*C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides* は生体に対し、直接被害を及ぼすことは少ないとされるが、環境汚染腐朽菌やアレルギーになる可能性は十分に考えられ [4, 10, 16]、動物実験の場では、常時本菌の存在に注意を払う必要がある。

今回は実験動物飼育施設における防衛対策上の基礎データをを得る目的で、実験動物施設より頻繁に分離される *C. sphaerospermum* および *C. cladosporioides* に

ついて熱抵抗性試験を実施し、その成績を報告する。

材料および方法

1 供試 *Cladosporium* 株：今回実験に用いた菌株は、当センターの実験動物施設内において定期的に実施される空中落下菌検査に加え、動物体表拭き取り調査および施設内拭きとり検査の際に分離された *C. sphaerospermum* (以下 *C. s* と略) 10株, *C. cladosporioides* (以下 *C. c* と略) 10株である。またこれら2種と比較のため、ヒト病巣由来 *C. carrionii* (M # 1230-4株) 1株も用いた。

2 胞子浮遊液作製：各供試菌をポテト・デキストロース寒天斜面培地 (日本製薬) (以下 PDA) 上に接種し、25°C, 10日間培養後、0.1% Tween 80・生理食塩液を培地内に加え、常法 [5] に従って胞子浮遊液を作製し

た。孢子浮遊液は改良型ノイバウエル血球計算盤を用いて、孢子数 $5 \sim 10 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した。

3 熱抵抗性試験

恒温培養増殖性試験：上記で作製した孢子浮遊液を用い、恒温条件下で巨大培養を行った [11]。孢子浮遊液を接種した PDA 平板は 25, 32, 35, 37, 40, 45 および 50℃ の各温度に設定した恒温器内で 7 日間培養後、集落形成の有無および集落の直径を計測した。

湿熱抵抗性試験：本試験には先の試験で用いた 3 菌株 21 株のうち無作為に選抜した *C. s* 4 株 (No. 1~No. 4), *C. c* 5 株 (No. 1~No. 5) および *C. carrionii* 1 株の計 10 株を用いた。恒温水槽によって 37, 40, 45, 48, 50, 52, 55, および 60℃ に保った生理食塩液 1 ml 内に孢子浮遊液 0.1 ml を滴下した。1, 3, 5, 10, 30, 45, 60, 90 および 120 分間処理後、菌液を速やかに冷却し、その処理液の 0.1 ml を PDA 平板に接種、コンラージ棒で拡げ、25℃, 7 日間培養後に集落形成の有無を観察した。

乾熱抵抗性試験：滅菌ろ紙の中央部に孢子浮遊液 0.1 ml を滴下し、37℃, 30 分間乾燥した。乾燥終了後、各 1 枚のろ紙を 50, 70, 80, 90 および 100℃ に設定した恒温器内で、5, 10, 15, 30, 60, 90 および 120 分間処理した。所定時間毎にそのろ紙を取り出し、PDA 平板上に貼付、25℃, 7 日間培養後集落形成の有無を観察した。PDA 平板上に貼付したろ紙は培養開始 3 日目に剥がし、培養を継続した。

菌死滅の判定法：各熱抵抗性試験において所定の培養が終了した時点で、PDA 平板上に集落が全く認められなかったものを死滅と判定し、死滅に達するまでの熱処理時間を死滅時間とした。

成 績

1 恒温培養増殖性試験：培養温度を 25℃ に設定した場合は *C. s*, *C. c* 共に 10 株が発育し、30℃ では両種とも 8 株が発育、32℃ では *C. s* 4 株、*C. c* 3 株が発育した (Fig. 1)。35~37℃ の培養温度では、*C. carrionii* のみに発育が見られ、40℃ 以上の設定では、全ての菌株が発育しなかった。これら各供試温度で形成された集落の平均直径は Fig. 2 に示したとおりである。*C. s* は培養温度 25℃ の場合 $23.9 \pm 3.4\text{mm}$ 、30℃ では $16.4 \pm 5.2\text{mm}$ 、32℃ では $14.0 \pm 2.9\text{mm}$ であった。一方 *C. c* は培養温度 25℃ の場合 $34.2 \pm 6.3\text{mm}$ 、30℃ では $14.9 \pm 3.6\text{mm}$ 、32℃ では $8.5 \pm 0.7\text{mm}$ であった。従って *C. c*, *C. s* 両種は、培養温度の上昇に伴って集落の直径が減少する傾向を示し、特に *C. c* は顕著な減少傾向が認められ

Fig. 1. Fungal growth test at different temperature

Fig. 2. The colony diameter of *Cladosporium*

た。これら両種に対し、*C. carrionii* は、25~35℃ の範囲で集落の直径が増加傾向を示した。

2 湿熱抵抗性試験：湿熱処理による *C. s* の平均死滅時間は、45℃ では 82.5 分であったが、48℃ では 12 分と著しく短縮し、50℃ では 3 分、52℃ では 3 株が 1 分以内に死滅、そして 55℃ 以上では 1 分以内の処理で 4 株全て死滅した (Table 1)。一方 *C. c* は 43℃ 前後の処理で死滅時間の短縮が顕著となり、48℃ では約 2 分、52℃ では 4 株が 1 分以内に死滅、そして 55℃ 以上では 5 株全て 1 分以内の処理で死滅した (Table 1)。これら 2 種に対し、*C. carrionii* は 50℃ 以前に著明な死滅時間の短縮は認められず、52℃ で 15 分、55℃ で 3 分、60℃ 以上で 1 分以内に死滅した。すなわち今回、供試した菌の湿熱抵抗性には種差が認められ、*C. carrionii*, *C. s*, *C. c* の順で

Table 1. Fungal survival time in moist heat test (min)

Fungus	No.	Temperature (°C)								
		37	40	43	45	48	50	52	55	60
<i>C. s</i>	1	120<	120<	120<	90	3	1	<1	<1	<1
	2	120<	120<	120<	90	15	5	<1	<1	<1
	3	120<	120<	120<	90	15	5	<1	<1	<1
	4	120<	120<	120<	60	15	1	5	<1	<1
	$\bar{X}$	-----	-----	-----	82.5	12.0	3.0	-----	-----	-----
<i>C. c</i>	1	120<	90	ND	ND	5	5	5	<1	<1
	2	120<	90	30	10	3	1	<1	<1	<1
	3	120<	90	30	30	1	1	<1	<1	<1
	4	120<	90	15	5	1	1	<1	<1	<1
	5	120<	90	30	5	1	3	<1	<1	<1
	$\bar{X}$	-----	90	26.3	12.5	2.2	2.2	-----	-----	-----
<i>C. carrionii</i>		120<	120<	120<	120<	45	45	15	3	<1
<i>C. s</i> : <i>C. sphaerospermum</i> <i>C. c</i> : <i>C. cladosporioides</i>										

Table 2. Fungal survival time in dry heat test (min)

Fungus	No.	Temperature (°C)				
		50	70	80	90	100
<i>C. s</i>	1	120<	90	30	30	15
	2	120<	90	30	30	15
	3	120<	90	30	30	15
	4	120<	90	30	30	15
	5	120<	60	30	30	10
	6	120<	30	30	10	10
	7	120<	30	30	10	10
	8	120<	30	30	10	10
	9	120<	90	30	15	10
	10	120<	90	30	10	10
	$\bar{X}$	-----	69.0	30.0	20.5	12.0
<i>C. c</i>	1	120<	60	30	30	10
	2	120<	60	30	30	10
	3	120<	60	30	30	10
	4	120<	30	30	10	15
	5	120<	30	30	10	10
	6	120<	30	30	10	10
	7	120<	30	30	15	10
	8	120<	30	60	10	10
	9	120<	30	30	10	10
	10	120<	30	30	10	10
	$\bar{X}$	-----	39.0	33.0	16.5	10.5
<i>C. carrionii</i>		120<	60	30	15	10

C. s : *C. sphaerospermum* *C. c* : *C. cladosporioides*

湿熱抵抗性を示した。

3 乾熱抵抗性試験： *C. s* の場合、乾熱処理による平均死滅時間は、70℃で69.0分、80℃で30.0分、90℃で

22.5分、100℃で12.0分であった（Table 2）。一方 *C. c* は、70℃では39.0分、と他種に比較してもっとも高い乾熱感受性を示し、それ以降80℃で33.0分、90℃で16.5分、100℃で9.5分であった。また *C. carrionii* は70℃で60分、80℃で30分、90℃で15分、100℃で10分の死滅時間であった。このように乾熱抵抗性においても種差が認められ、70、90、100℃の各処理温度では供試した3菌種のうち *C. s* が最も高い乾熱抵抗性を示した。

考 察

バリア環境下の実験動物施設では、各種消毒薬を用いた化学的方法やエアフィルター、紫外線殺菌灯といった物理的方法により微生物コントロールが行なわれている。しかしながら *C. s*、*C. c* をはじめとする腐生真菌は、空中菌や土壌菌としての分布頻度も高く[1, 6, 17]、動物入荷時や使用器具への付着などにより、バリア区域内に持ち込まれる機会が多いことから、各殺菌法の特性を活かしたより効果的な実施が必要とされる。

一般に細菌、真菌は増殖最適温度により区分されるが、真菌では細菌ほど高温域で増殖するものは少ない傾向にある。真菌の場合、増殖最適温度が35～53℃のものを高温性菌、25～45℃のものを中温性菌、5～25℃のものを低温性菌と区分される[18]。今回の恒温増殖性試験では *C. s*、*C. c* 両種とも中温性菌の増殖温度域内にあたが、*C. c* は30℃以上になると発育が悪く、集落の小型化も明らかであることから、*C. c* が高温域での増殖性に欠け、*C. s* より最適増殖温度域の狭いことが推

察された。

芝崎 [8, 9] および高鳥 [13, 14, 15] は数種の腐生真菌を用いて熱抵抗性試験を実施している。そのなかで湿熱処理温度を52℃に設定した際、*C. c*は2分以内に死滅すると報告されている。今回の試験に用いた実験動物施設由来株でも *C. s*は48℃、*C. c*は43℃で湿熱抵抗性の減弱が顕著となり、52℃では両種ともほとんどの株で、1分以内の死滅が確認された。これは先の報告とはほぼ同様の効果であった。また他の中温性腐生真菌では湿熱処理温度を52℃に設定した場合、*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*については15分以上の処理で死滅、*Penicillium citrinum*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus stolonifer*について60分処理でも菌は生残することが、報告されている。これらのことから、今回供試した両種は、中温性菌のなかでも湿熱抵抗性の弱い種であり、特に *C. c*はより低い湿熱処理で容易に死滅することが示唆された。

乾熱による殺カビ効果は湿熱処理にくらべ著しく効果が弱く、その効果も種によりかなり異なることが知られている[13]。つまり、*Aspergillus fumigatus*, *Eurotium chevalieri*, *Absidia corymbifera*, *Mucor mucedo*においては100℃、90分の乾熱処理に抵抗するが、*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Trichoderma*, *Phoma*などの好湿性菌は、80℃程度の処理で比較的早期に死滅する。今回供試した *C. s*, *C. c*は、80℃処理で30分までは抵抗性を示したが、それ以降温度上昇に伴って、死滅時間の短縮が認められた。これらのことから両種は、他の腐生真菌と比較し乾熱抵抗性においても弱い種であり、特に *C. c*はその傾向が顕著であると考えられた。

以上の結果から実験動物施設由来の *C. s*および *C. c*は他の腐生真菌に比較して熱抵抗性の弱い菌種であり、特に *C. c*は *C. s*より高温域での発育も悪く、湿熱および乾熱処理に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。従って、両菌種に対しては熱処理が非常に有効な防衛手段と考えられ、50℃以上15分の湿熱処理、または90℃以上、20分の乾熱処理が最も効果的であると示唆された。

要 約

実験動物飼育施設由来の腐生真菌 *Cladosporium* について熱抵抗性試験を実施した。恒温培養増殖性試験において、*C. sphaerospermum* (*C. c*) および *C. cladosporioides* (*C. c*) は、25~32℃では発育したが、35℃

以上では発育しなかった。両種とも集落の直径は、培養温度の上昇に伴って小さくなる傾向を示し、その程度は *C. s*に比較して *C. c*の方が顕著であった。湿熱抵抗性試験において、*C. s*は48℃、12分、*C. c*は43℃、約26分の処理で死滅し、55℃以上の処理では両種とも1分以内に死滅した。乾熱抵抗性試験では、70~100℃の処理において、*C. s*は69~12分、*C. c*は39~9.5分で死滅した。以上の結果から *C. s*および *C. c*は他の腐生真菌に比較して熱抵抗性の弱い菌種であり、特に *C. c*は *C. s*よりもその傾向が明らかであった。従って両種に対する熱処理は、実験動物施設内における有効的な防衛対策法であると示唆された。

文 献

- [1] George, L. B. (1986). *Cladosporium* Link. In The Genera of Hyphomycetes from Soil, pp 128-130, The Williams and Wilkins Company., Baltimore.
- [2] 井上富士男. (1987). 工場における微生物制御, 防菌・防黴, 1, 78-82.
- [3] 以上真由美. (1979). 建物のカビ. pp 9-36. 日本建築士会連合会, 東京.
- [4] Leventin, E. and Horowitz, L. (1978). A one year survey of the airborne molds of tulsas. *Oklahoma Animal of allergy*, 41, 21-27.
- [5] 日本工業規格. (1981). かび抵抗性試験法. pp 4, 日本規格協会, 東京.
- [6] Robert, A. S., Ellen, S. H., and Connie, A. N. (1981). *Cladosporium* Link ex Fr. In Introduction to Food-Borne Fungi, pp 175-182, Centraalbureau voor schimmelcultures., Netherland.
- [7] Barnett, H. L., Beneke, E. S., Emerson, R., Farr, M. L., Gray, W. D., Korf, R. P., and Simmons, E. G. (1974). Sampling airborne fungi. In Mycology Guide Book, pp. 379-383, Russell, B. S. (edit.), University of Washington Press Inc., Seattle and London.
- [8] 芝崎 勲 (1985). 微生物の制御とその基礎. 防菌・防黴, 13, 525-534.
- [9] 芝崎 勲 (1985). 微生物の制御とその基礎. 防菌・防黴, 13, 569-580.
- [10] 高鳥浩介 (1982). 畜産におけるカビ(4). 畜産の研究. 図附.
- [11] 高鳥浩介 (1983). 真菌の同定. 微生物同定法. pp 197-239. 衛生技術会編. 東京.
- [12] 高鳥浩介・石井喜一・鈴木文子・村山晶子・中尾美津男 (1983). 食品工場を汚染するカビの研究. 防菌・防黴, 11, 463-468.
- [13] 高鳥浩介 (1986). 食品環境における物理的処理における真菌制御, 特に温度処理による殺カビ性について. 伊藤記念財団・食肉に関する助成研究成果報告書, 4, 1-8.
- [14] 高鳥浩介 (1988). 微生物の各種抵抗性, 3, 真菌. 実験動物施設における滅菌・消毒マニュアル. pp 120. 前島一淑, 浦野 徹, 佐藤 浩, 八神健一編. ソフトサイエンス社, 東京.
- [15] 高鳥浩介 (1988). 防カビ試験と防カビ対策. 医薬ジャーナル, 1, 78-82.
- [16] 山内忠平 (1986). 実験動物の環境と管理 pp 122-123. 出版科学総合研究所, 東京.

- [17] 宇田川俊一・椿 啓介編（1978）．菌類図鑑・上．空中菌類．pp 51-63．講談社，東京．
- [18] 宇田川俊一（1983）．最新食品微生物制御システムデータ集．pp 113．春田三佐，宇田川俊一，横山理雄編．サイエンスフォーラム，東京．