

# 微生物を用いた鹿革からの溶出ホルムアルデヒド抑制

井上ゆみ子<sup>\*1)</sup>

## Lessening of Eluted Formaldehyde from Deer Skin by Using Microorganisms

INOUE Yumiko<sup>\*1)</sup>

奈良県の特産品である鹿革の用途拡大を目指し、その阻害要因である溶出ホルムアルデヒド量を微生物により抑制する技術を検討した。ホルムアルデヒドを使用するなめし工場の排水サンプルからホルムアルデヒドに対する耐性および分解能をもつ微生物株を分離同定し、鹿革に当該微生物が増殖した培養液中への浸漬処理を施したところ、良好なホルムアルデヒド溶出量抑制効果を確認することが出来た。

### 1. 緒言

皮革の利用は人類の歴史とともに発達し、環境・資源・用途に応じた様々な加工及び利用技術が培われてきた。我が国においては、牛革や鹿革などを主な皮革材料として、衣料、容器、はきもの、武具および楽器などが作られてきた<sup>1)</sup>。奈良県には武道具および印伝材料となる鹿革なめし産業が存在する。これらの鹿革の加工技術は、近代化の過程で伝統的脳漿鞣しからホルムアルデヒドを主とする化学薬品を用いる方法へと移り変わり、高品質の鹿白革を生産することが出来るようになった<sup>2) 3)</sup>。しかしながら、溶出ホルムアルデヒド濃度が業界基準値<sup>4)</sup>よりも高く衣料材料としては不向きであり、鹿革の用途拡大を阻んできた。そこで本研究では、微生物の力を利用して鹿革の溶出ホルムアルデヒド量を抑制する技術について検討したので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 ホルムアルデヒド耐性微生物のスクリーニング

微生物の力を利用するために、鹿革の溶出ホルムアルデヒド濃度で生存および増殖可能な微生物を獲得する必要がある。また、ホルムアルデヒドを多用する鹿革なめし工場の排水路等には、環境に適応してホルムアルデヒドへの耐性を獲得した微生物が存在することが予測される。そこで、県内の鹿革なめし工場3箇所（A工場、B工場およびC工場）の排水を試料として採取し、微生物スクリーニングに供した。実験は、試験管中に調整した液体標準培地および

普通培地（表1）5mlに試料を0.5ml添加し、35℃で3日から2週間培養し、微生物の増殖による濁りが確認されたものをより高いホルムアルデヒド濃度の培地へ接種する継代培養を繰り返して行った。なお、培地に添加するホルムアルデヒドは、パラホルムアルデヒド溶液16%（和光純薬工業）を希釈して用いた。増殖を認めた最高濃度の培養液を平板寒天培地に塗布して35℃のインキュベータに静置し、形成された単コロニーから標的微生物を単離し微生物株とした。微生物種の同定は、日本薬局方準拠の「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」に従い実施した。標的領域は、細菌では16S rRNA可変領域、真菌では18S rRNAと5.8SrRNA間のスペーサー領域（ITS1）とし、BLAST相同性検索により菌種を同定した。

#### 2.2 ホルムアルデヒド分解能の確認

濃度約500 $\mu$ g/mlのホルムアルデヒドを含む標準培地試験管に接種し、35℃のインキュベータ内で培養し、菌の増殖に伴うホルムアルデヒド濃度の経時変化を測定した。対照には微生物を接種しない培地を用意し、ホルムアルデヒド濃度の測定はアセチルアセトン法を用いた。また、分離した微生物のうち、それぞれの性状を比較して以後の試験に使用する試験菌株を選定した。

#### 2.3 微生物による処理と溶出ホルムアルデヒドの測定

微生物による鹿革のホルムアルデヒド抑制効果を検討するため、次の実験を行った。ホルムアルデヒドでなめされた鹿革をおよそ8cm四方に切り取り、試料とし、フラスコ内で試験菌の培養液100ml中への浸漬処理を施した。実験は、(イ)微生物を接種しない培地への浸漬（対照）、(ロ)微生物を増殖させた培地液に革を浸漬、および(ハ)培地に革を浸漬したのち試験菌を接種後に培養、の3パターンで実施した。いずれも試料革を浸漬したフラスコを2時間シェーカーで振とうしたのち、35℃のインキュベータ内に3日間置いてから水洗いを2回行った。そして十分に乾燥

表1 液体培地の組成（1L中）

標準培地		普通培地	
酵母エキス	2.5g	肉エキス	5.0g
ペプトン	5.0g	ペプトン	10.0g
ブドウ糖	1.0g	塩化ナトリウム	5.0g

\*1) ライフマテリアルグループ

させた鹿革からの溶出ホルムアルデヒド量を測定した。測定方法はJIS L1041「樹脂加工織物及び編物の試験方法」の遊離ホルムアルデヒド試験B法に準じ、試験直後および5ヶ月後の2回行った。

## 2.4 紫外線による除菌効果の検討

皮革に微生物が生きたまま残留することは製品化を目指す上で好ましくない。鹿革の製造過程では天日干や陰干しが行われているため、紫外線による除菌効果を検討した。シャーレに平板寒天培地を作成し、適当な濃度に希釈した試験菌培養液  $100\mu\text{l}$  を塗布したのち、10分間の紫外線暴露を施して  $35^\circ\text{C}$  で24時間培養した。生成したコロニー計数を行い、紫外線の効果を評価した。紫外源は、15型殺菌灯、太陽光（直射）および太陽光（日陰）の3種で、それぞれ培地2枚を実験に使用した。対照試料として紫外線を暴露しないものを用意した。

## 3. 結果

### 3.1 ホルムアルデヒド耐性微生物の分離同定

試料を採取したA工場、B工場およびC工場のうち、A工場から1種(A株)、C工場から2種(C-1株およびC-2株)のホルムアルデヒド耐性微生物を分離することが出来た。これら3種の微生物は、すべて標準培地で良好に増殖するものであったので、以降の実験は標準培地を用いて実施した。遺伝子解析および相同性検索の結果から、A株：*Pseudomonas aeruginosa*、C-1株：*Pseudomonas* sp.およびC-2株：*Paecilomyces* sp.と同定した。それぞれ増殖できる最高ホルムアルデヒド濃度は、A株が  $800\sim 1000\mu\text{g/ml}$ 、C-1株が  $650\sim 800\mu\text{g/ml}$  およびC-2株が  $1600\sim 2000\mu\text{g/ml}$  であった。

### 3.2 分離株のホルムアルデヒド分解能

試験の結果、いずれの株もホルムアルデヒドを分解することが判明した（図1）。分解の早さは、A株がもっとも早く、C-1株およびC-2株は同程度であった。

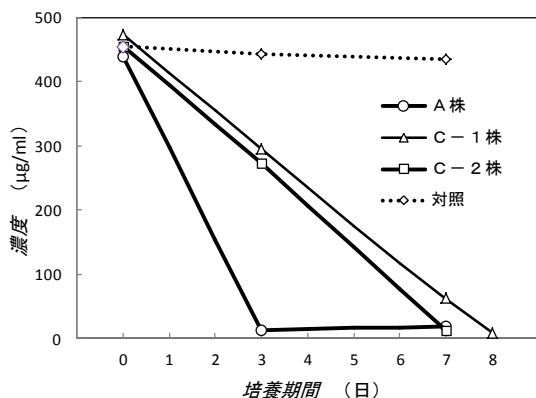


図1 培地中のホルムアルデヒド濃度変化

表2 微生物株間の相対的性状比較

増殖早さ	C-2 << C-1 ≒ A
耐ホルムアルデヒド能	C-1 < A << C-2
ホルムアルデヒド分解早さ	C-1 ≒ C-2 << A
その他の性質	A: 病原性あり C-1およびC-2: 不明

### 3.3 微生物の特徴と使用株の選定

得られた3種の微生物について、効率的な研究開発を進めるために、目的にもっとも適すると思われる株の選定を行った。

A株の *Pseudomonas aeruginosa* は緑膿菌として知られるグラム陽性桿菌で、土壌中や水中のいたるところに存在する。わずかな栄養物質があるだけで生存・増殖が可能で、薄緑色を呈する。免疫低下したヒトに対して日和見感染を起こす病原菌としても知られている。C-1株 *Pseudomonas* sp.はA株と同属であるが色調は白く、A株とは増殖パターンやホルムアルデヒド耐性能が異なることから別種であると判断した。種が不明なため詳しい性状は不明である。C-2株の *Paecilomyces* sp.は、いわゆるカビの仲間でも多くの種の存在が知られるが、やはり種が同定されていないため詳細は不明である。それぞれの相対的な特徴を比較検討した結果（表2）、A株が比較的高濃度のホルムアルデヒドにも耐性を持ち、増殖およびホルムアルデヒド分解が早く、種が判明して性状が把握しやすい、などの理由から今回の研究に使用する試験菌株として選定した。

### 3.4 鹿革のホルムアルデヒド溶出抑制法の検討

試験菌による処理を施した結果を表3に示す。

試験菌処理を施した試料ロおよびハは、いずれもホルムアルデヒド溶出量がエコレザー基準<sup>4)</sup>の  $300\mu\text{g/g}$ （成人皮膚非接触）を大幅に下回り、その効果は5ヶ月後も持続していた。一方、水だけで処理をした対照試料（イ）では、 $300\mu\text{g/g}$  を超えており、5ヶ月後も低下することはなかった。革の手触りは、微生物の有無にかかわらず全ての試料でややこわばる感じが増していた。また、試料（ロ）と（ハ）では、試験菌がもつ薄緑色の着色がわずかに認められた。

表3 鹿革のホルムアルデヒド溶出量 ( $\mu\text{g/g}$ )

試料	革処理直後	5ヶ月後
(イ)	357	352
(ロ)	175	111
(ハ)	147	118

### 3.5 紫外線による除菌効果の検討

試験菌が十分に増殖した培養液の菌数計測を行ったところ、 $10^{19}$ ~ $10^{21}$  (個/ml) 程度であることがわかった。そこで、 $10^{19}$  倍に希釈した試験菌培養液を各シャーレに塗布し、紫外線暴露および培養実験を行った。結果は、直射太陽光では試験菌がすべて死滅しており、殺菌灯と太陽光(日陰)では、暴露しない場合のおよそ 10 分の 1 に減少したと考えられた(表 4)。

表 4 紫外線暴露後のコロニー数

紫外線源	1枚目	2枚目	平均
暴露なし	10	21	16
殺菌灯	3	5	4
太陽光(直射)	0	0	0
太陽光(日陰)	3	2	3

## 4. 結言

鹿革の溶出ホルムアルデヒド抑制技術開発を目的として検討を行い、以下の結果を得た。

- (1)ホルムアルデヒド耐性微生物を 3 種分離し、いずれもホルムアルデヒド分解能を有することを確認した。
- (2) 試験菌株 *Pseudomonas aeruginosa* を用いた実験では、本菌を増殖させた培養液に鹿革を浸漬することで、溶出量をエコレザー基準の  $300 \mu\text{g/g}$  (成人皮膚非接触) よりも低く抑制することが明らかとなった。
- (3)上記の効果は、処理後 5 ヶ月経過後も維持されていた。
- (4)試験菌の持つ色素による着色が若干認められた。
- (5)紫外線暴露による除菌効果が確認された。

以上のことから、今回得た試験菌は、鹿革のホルムアルデヒド抑制に有効である可能性が示されたものと考えている。しかしながら、実用化には着色、風合い、および完全な除菌等の課題を検討する必要がある。

最後に、本研究の実施に当たりご協力いただきました奈良県毛皮革工場団地のみなさまに感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 西村三郎, 毛皮と人間の歴史, 紀伊國屋書店, 2003
- 2) 米田勝彦, 南田正紀, 澤島秀成, 皮革科学, 42, 188, 1996
- 3) 藤岡繁壽, 皮革科学, 44, 250, 1999
- 4) 一般社団法人日本皮革産業連合会, 日本エコレザー基準書, 2009