

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

健康被害をもたらす有害生物の制御・処理技術に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究者 高鳥 浩介

分担研究者名

- | | |
|-------------------------|------|
| (1) 国立相模原病院 臨床研究センター | 安枝 浩 |
| (2) 東京農工大学 農学部 | 林谷秀樹 |
| (3) 埼玉県衛生研究所 | 高岡正敏 |
| (4) (財)食品薬品安全センター | 高橋淳子 |
| (5) (株)大裕商事 衛生微生物研究センター | 李 憲俊 |
| (6) (株)エヌ・エム・ジー | 徳田美幸 |

要旨

健康被害を及ぼす有害生物の生態系での調査をまとめ、その生物の持つ特性を検討した。対象生物は、細菌、真菌、ダニ、水生生物であり、さらにその生物の持つ有害性を特に病原性、毒性、アレルギー性の観点から有害生物の生理特性について基礎研究を実施した。

1. 研究目的

住環境には、ヒトの健康を害する生物が存在している。特にアレルギーや感染症などと深く関わる生物が分布していることが今までの研究から明らかになりつつある。しかし、これら有害生物の生態研究は単独で研究されており、それぞれの生物間での拮抗、共存といった生物の生態は不明であった。また健康被害のひとつとしてアレルギーが重視されるが有害生物のうちダニを除く有害因子の検索はほとんど解明されていないのが現状である。その意味で本研究が総合的に調査研究されることにより、有害生物および有害因子の特定ができ、健康被害の予防に大きく貢献できるものと期待される。

そこで、初年度は有害生物の生活環境での生態を中心にして次の7課題について研究を実施した。

2. 研究方法

1) 環境真菌の発生要因および制御技術の研究

(1) 住環境にみる真菌動態調査

初年度の研究は住環境全般にわたり真菌の動態を検討することとした。対象住宅は関東地方 81 世帯を対象として実施した。

住宅：関東地方の1戸建て78世帯 集合住宅3世帯、計81世帯を対象とした。

調査場所：洗面所、台所、浴室、トイレ、玄関、リビングなどの室内環境を対象とした。

サンプリング・培養法：各家庭の約80ヵ所から試料採取し真菌培養を行った。

(2) 小型分級サンプラーによる空気中の真菌細胞数測定法

小型分級サンプラー(PM₁₀、PM_{10-2.5}、PM_{2.5})を用いて屋内空気中の真菌測定を行なった。測定は2001年9月～2002年1月までの6ヶ月間。調査地点は神奈川県内の住宅(約12m²)で実施。通気量は、3L/分、24時間で各月の連続する約7日間実施した。実施後速やかに各分級のフィルターを取りだし、真菌培養を行なった。

2) 健康被害をもたらすアレルギーの制御技術に関する研究

(1) ELISAによるダニアレルギーの測定：ELISAはモノクローナル抗体(以下mAb)とビオチン/ストレプトアビジンの系を用いる sandwich 法で行った。

(2) Der p 1 と Der f 1 に対する mAb の反応性の検討：マイクロプレートにコートした Der p 1、あるいは Der f 1 に対してビオチン化した各 mAb、100 ng/0.1 ml を反応させた。

(3)Der 1 ELISA の開発 : Der p 1 に対する mAb、11 種類と Der f 1 に対する mAb、11 種類の中から適切な mAb を組み合わせて、Der p 1 と Der f 1 がバランスよく反応する測定系を組み立てた。

(4)Der 1 ELISA における測定値の信頼性、再現性の評価 : 室内塵エキスについて Der 1 ELISA でそれぞれの Der 1 量を測定し、従来の Der p 1 と Der f 1 を ELISA で測定して合計値との相関性を評価した。

(5)Der 1 ELISA による気管支喘息患者寝具中ダニアレルゲン量の測定 : アトピー型気管支喘息患者と健康対照者の寝具から塵を採集し、アレルゲン量を Der 1 ELISA で測定して両群の汚染のレベルを比較した。

3) 住環境に存在する病原細菌の熱抵抗性の検討

供試菌株として *E. rhusiopathiae* ATCC 19414 のそれぞれ性質の異なる A~I 株の計 9 株を用いた。熱抵抗性試験では、定常期に達した菌液を、シリンジバイアルに分注し密封した。菌液の入ったシリンジバイアルを 52℃ 恒温槽の温水中に入れ、菌液の温度が 52℃ に達した時点、ならびにそれ以後一定時間ごとに取り出し、氷水中で冷却した。菌液中の温度は温度測定用センサーをつけた生理食塩水が入ったシリンジバイアルを、菌液の入ったシリンジバイアルと同時に温水中に入れて測定し、データコレクタを用いて管理した。熱処理後、後培養し D 値を算出した。

4) ダニの生態発生要因制御技術の研究

各家庭の寝具、床面を中心に室内塵採取した。ダニの分離及び Der 1, Der 2 の検査は、定法通りに測定した。

5) 水系生物の微生物的・化学的研究

水道水、地下水、工業用水、クーリングタワー水、湖沼水およびミネラルウォーターなどの微生物試験として、一般細菌数、大腸菌群、大腸菌、エンドトキシン、SLP、*Legionella pneumophila* 血清群 I 型および真菌の生菌数と同定を行った。さらに真菌の測定においては、β-グルカンを検出することにより迅速な真菌の存在を検出した。

化学的試験は、pH 値、電気伝導率、過マンガン酸カリウム消費量(COD)、総硬度、塩素イオン、アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、硫酸イオン、蒸発残留物、金属、2-メチルイソボルネオール、ジオスミン、色度および濁度を測定した。

6) 有害微生物の制御処理技術に関する基礎研究

Cladosporium sphaerospermum HMC2102 前培養後、スライドガラスに接種し、経時的に発芽率、菌糸成長速度および形態学的な特徴を調べた。

7) 有害生物の制御処理技術に関する基礎研究

難水溶性有機溶媒の DMSO、アセトンを用い真菌に対する有機溶媒による真菌への影響を検討した。

3. 研究成果

1) 環境真菌の発生要因および制御技術の研究

(1) 住環境にみる真菌動態調査

洗面所、台所(キッチン)、浴室、トイレ、玄関、リビング、和室、寝室、押入、北側洋室、クローゼットなどの室内環境を対象として真菌調査を行った。*Cladosporium* が最も多く、家庭環境での検出頻度の高いことがわかった。ついで、酵母が多く 19.6% であり、さらに *Rhodotorula* は 13.0% であった。糸状菌である *Penicillium* は 8.9%、*Alternaria* は 8.4% であった。これら真菌をみると明らかに高湿性とする真菌と低湿性とする真菌に分かれ、高湿性の酵母、赤色酵母、*Aureobasidium*、*Phoma* と低湿性とされる *Aspergillus*、*Penicillium* の分布がそれぞれの環境でどのように認められるかさらに確認した。

洗面所 : *Cladosporium* が最も多く 48%。台所 : *Cladosporium*、酵母が 30% 台であり、*Rhodotorula* を含めて高湿性真菌。浴室 : *Cladosporium* が 48% と圧倒的に多く、*Rhodotorula*、酵母が 20% 台。トイレ : *Cladosporium* が 40% 台。玄関 : *Cladosporium* が著しく多く 60% 台。リビング : 検出頻度は高くないが *Cladosporium* が最も多く 30%。リビングの真菌は多様。和室 : *Cladosporium* が 60% 台と著しく多い。寝室 : *Cladosporium* が 30% 程度、酵母が 20%。押入れ : *Cladosporium* が 20% 台。

(2) 小型分級サンプラーによる屋内空気中の真菌数測定成績

小型分級サンプラー(3L/分)を用いて真菌数を測定し、CFU 推移をみた。大気中にみる分級(1層 : PM₁₀、2層 : PM_{10-2.5}、3層 : PM_{2.5})での真菌数を検討したところ PM_{10-2.5} で最も多く捕集された。次いで PM₁₀ であった。3層の PM_{2.5} では著しく真菌数は少なかった。小型分級サンプラーの各分級にみる主要真菌をみると PM₁₀ と PM_{10-2.5} では *Cladosporium*、*Penicillium* に加え、酵母、*Eurotium* が多く、一方 PM_{2.5} では、著しく CFU は少

なく、確認された真菌をみても多くはないが *Penicillium* であった。

各分級での真菌細胞の粒径を鏡検による直接法で確認できた。1、2層に真菌細胞を多く確認することができ、真菌細胞の大きさと各粒径との比較を行ったところ、1層フィルターでの捕集は10 μ m前後に幅広く確認でき、比較的大型の菌糸または孢子細胞を認めた。2層フィルターでの多くは2.5-7.5 μ mの細胞を捕集し、フィルターと真菌細胞が一致した。さらに3層のPM_{2.5}では、真菌細胞の大きさ3 μ m以下の小さな細胞が確認できた。この結果は、各層での粒径とほぼ一致するものであった。

2) 健康被害をもたらすアレルゲンの制御技術に関する研究

(1) Der p 1 と Der f 1 に対する各 mAb の反応性の比較 : Der p 1 に対する mAb を 11 種類と Der f 1 に対する mAb を 11 種類、合計 22 種類の mAb を作製し、Der p 1 と Der f 1 に対して、ウェルにコートした Der p 1 / Der f 1 に対するビオチン化 mAb の direct binding で評価した。大半の抗体は Der p 1 と Der f 1 の間で全く交差反応せずに免疫原に対して特異的に反応するか、もしくは Der p 1 と Der f 1 の間で弱く交差反応するのみであった。しかし、Der p 1 に対する mAb の P1A09 は Der p 1 と Der f 1 の両方に対してほぼ等しく反応した。

(2) Der 1 ELISA の開発 : ビオチン化二次抗体として用いる Der p 1 に対する mAb、5 種類と、Der f 1 に対する mAb、2 種類の至適な組み合わせについて検討した。P1A04 と F1A11 の組み合わせでは Der f 1 よりも Der p 1 の方が強く反応し、逆に P1A01 と F1A03 の組み合わせでは Der f 1 の方が強く反応したが、P1A06 と F1A11 の組み合わせでは Der p 1 による吸光度と Der f 1 による吸光度がほぼ等しかった。

(3) Der 1 ELISA の性能評価 : Der 1 ELISA による測定値と従来法による測定値との間には非常に高い相関関係が認められた。検体の中には Der p 1 と Der f 1 の割合が異なるさまざまな試料があるが、Der p 1 が 90% 以上である試料、逆に Der f 1 が 90% 以上である試料、あるいは Der p 1 と Der f 1 がほぼ 1 : 1 である試料のいずれでも Der 1 ELISA の測定値は従来法とよく一致した。また Der 1 ELISA の測定内での再現性と測定間での再現性の結果をみたところ、いずれの場合にも測定値の変動係数 (CV%) は 10% 以下であり良好な再現性を示した。また、添加回収試験においても回収率は 90.6~114% の範囲に収まっており、Der 1 ELISA の測定値の正確度は満足すべきものであった。

(4) Der 1 ELISA で評価した成人アトピー型気管支喘息患者寝具の汚染のレベル : Der 1 ELISA で測定した寝具塵中の Der 1 量の幾何平均値は、喘息患者群が 17.7 μ g/g dust、対照群が 24.3 μ g/g dust であり、両群間に有意差はなく、感作の閾値とされる 2 μ g/g dust、喘息発作誘発の閾値とされる 10 μ g/g dust よりもはるかに高値であった。

3) 住環境に存在する病原細菌の熱抵抗性の検討

(1) 各培養温度における菌数と吸光度

各菌株は所定の時間培養後、吸光度を確認したものを加熱試験の供試菌液とした。なお、加熱試験に際し、すべての供試菌株の D 値が測定できる温度を検討した結果、52 $^{\circ}$ C で熱抵抗性実験を行なうことが最も適当であったので、この温度で熱抵抗性試験を行うこととした。

(2) *Erysipelothrix* 属菌株の 52 $^{\circ}$ C における D 値

25 $^{\circ}$ C で培養した A~D 株を 52 $^{\circ}$ C で処理した時の D 値は、1.06~2.56 であった。一方、37 $^{\circ}$ C で培養した菌を 52 $^{\circ}$ C で処理した時の D 値は 1.25~2.34 で、いずれの菌株とも 25 $^{\circ}$ C で培養した時の D 値に比べて有意な差は認められなかった。25 $^{\circ}$ C で培養した E~I 株を 52 $^{\circ}$ C で熱処理した D 値は、0.58~3.94 であった。一方、37 $^{\circ}$ C で培養した D 値は 1.15~9.64 で、いずれの菌株とも 25 $^{\circ}$ C で培養した時の D 値に比べ有意に高かった ($P < 0.05$)。

4) ダニの生態発生要因制御技術の研究

(1) 検出されたダニ類 : 室内塵中のダニ相及びダニ数の調査結果から、採集塵より検出されたダニ類は、チリダニ類が極めて優位であった。チリダニ科に属するダニはヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、シワチリダニ、イエチリダニの 4 種を認め、どの調査時期でも 50% 以上を占めた。

(2) ダニ数の分布と季節消長 : 検出されたダニ数は、調査家庭及び場所によって差が見られ、多い場所で総ダニ数が 28000 個体/g (673.3 個体/m²)、少ない家庭で 5.2 個体/g (0.4 個体/m²) の範囲にあった。

ダニ数の季節消長をみると、チリダニ及びチリダニ以外のダニ類ともに 8 月に極めて多く検出され、次に 10 月が多く、1 月には最低値を示した。これらを場所別に比較すると、各素材の違いによってダニ数に

差が認められ、特にカーペット、寝具においてダニ数が多い傾向を示した。

(3)室内塵中のダニアレルゲン量とダニ数比較:各家庭の室内塵中のダニアレルゲン量は、多いものでDer 1量 134.03 $\mu\text{g/g}$ (61653.80ng/m²)、またDer2量 108.38 $\mu\text{g/g}$ (33290.20ng/m²)であったが、少ないものでは検出限界以下と大きな差がみられた。各調査時期におけるDer 1量とDer 2量は高い相関を示し、またそれぞれの抗原量とチリダニ数も相関した。

また、各調査時期におけるダニアレルゲンの季節消長はダニ数のピーク同様夏季にもっとも高い値を示し、Der 1量がDer 2量に比べて高かった。

5)水系生物の微生物的・化学的研究

真菌数と β -グルカンの関連性は、真菌数が20/L以下の試料では β -グルカン20pg/mL以下、真菌数が200/L以下の試料では β -グルカン100pg/mL以下という相関があった。また、 β -グルカンテストワコーおよびファンギテックGテストMKの2種類の測定方法による一致率は、20pg/mLを基準値として比較した場合には、94.7%と高かった。一方、細菌の検出率の高い試料は、真菌も同様に高い検出が認められた。

真菌の検出が高いほど2-メチルイソボルネオールとジオスミンの検出濃度が高かった。2-メチルイソボルネオールおよびジオスミン以外にもアルコール類等の化学物質も検出された。過マンガン酸カリウム消費量、アンモニア性窒素、電気伝導率、色度および濁度の各項目値が高い試料では、細菌および真菌の検出が高かった。さらに、鉄、アルミニウムおよび銅などの金属が高濃度で検出された試料も、細菌および真菌の検出が高いことがわかった。

6)有害微生物の制御処理技術に関する基礎研究

低栄養環境での*C. sphaerospermum*の発育過程は、発芽、発芽管形成、菌糸成長、発育停止あるいは発育後の異常形態形成であった。厚膜胞子が確認された。

1次分岐までの菌糸成長速度を測定した。栄養無添加のスライドガラス表面での菌糸はlag phaseからlog phaseに入る直前に発育が停止した。停止までの菌糸伸長速度は5~13 $\mu\text{m/h}$ であった。

7)有害生物の制御処理技術に関する基礎研究

DMSOでは、48時間後の殺菌濃度は50%以上であった。アセトンは菌種により差が認められ、48時間後における殺菌濃度は20~50%であった。

4. 考察

1)環境真菌の発生要因および制御技術の研究

(1)住環境にみる真菌動態調査

生活環境にあってヒトに対して何らかの影響を及ぼす可能性の高い真菌は多い。環境真菌の住環境での生態は部分的に調査されているに過ぎない。本研究は、日本の典型的な一戸建て住宅について、住宅内各所に分布する真菌を把握することから着手した。この研究はヒトに対して有害とされる真菌の生態を知ることにより、その弊害であるヒトへの健康被害や建物の劣化汚損を防止するための技術を確立することにある。

本年度は、環境真菌の分布を一戸建て住宅で調査した。全体を通して、住宅に多い真菌は*Cladosporium*であった。*Cladosporium*は、中温性、好湿性であり乾燥には弱い真菌である。生態系での分布をみると土壌に多く、主要空中真菌であり、住環境でも広範な分布をとる。そのため、住環境の比較的湿った場所に付着し、汚染しやすい。汚染すると著しく抵抗性が強くなるが、孢子単体では極めて弱い真菌である。

*Rhodotorula*を含めた酵母は極めて高湿の環境に分布し、湿性になった環境で容易に発育しやすい。

一方、乾燥に強い*Penicillium*や*Aspergillus*は住環境でもリビング、寝室、タタミやハウスダストに主要な真菌とされ、一般に耐乾性である。前者は中温性、後者は高温性の種類が多い。*Penicillium*、*Aspergillus*ともに乾燥に強く、長期にわたり生残できる性質を有しており、そのため、季節により湿気や気温が高くなると発生しやすい真菌といえる。

このように住環境にみる真菌は、それぞれの適環境を作り出し、そこで活性を維持しながら生息を続ける。発育に適した条件になると細胞の活性が高まり、孢子であれば発芽をはじめようになる。さらに発芽から幼若菌糸形成を経て成熟化し、基質内に侵入した形態をとる。成熟菌糸となった場合、菌糸の耐久構造が認められ、この形態が著しく長期にわたり活性を有することとなる。今回の調査結果ではこうした現

象を確認していないが、さらに研究を進めていく上で継続して検索していく必要がある。

(2) 小型分級サンプラーによる屋内空気中の真菌細胞数測定

屋内空気中の真菌を小型分級サンプラー(3L/分)で作動時間 24 時間一定とし、真菌数を測定したところ、小型分級サンプラーは空気中真菌を各分級で測定できるものと判断され、今後のアレルゲン測定に応用されるものと推察された。また各分級での真菌数をみると、一般に PM_{10-2.5} で高い値を示し、次いで PM₁₀ が多かった。さらに真菌細胞の粒径と比較してみると、PM_{10-2.5} に最も真菌が多く、*Cladosporium*, *Penicillium*, *Aureobasidium*、酵母などであった。これは真菌細胞の粒径とほぼ一致するものである。すなわち真菌細胞の多くは、大きさが 4-10 μm にあり、その意味では一致した結果といえる。また PM₁₀ での捕集をみると、菌種にもよるがかなり一致した成績であった。一方、フィルター分級の PM_{2.5} では理論的に真菌を認めないはずであり、現実には著しく少数であった。このことから小型分級サンプラーでの真菌捕集分画は、それぞれの真菌細胞粒径とほぼ一致する傾向がうかがわれた。したがって、本サンプラーを用いての成果は、総真菌数に加え各分級での真菌数の推移まで反映できるものであり今後生物粒子としての真菌アレルゲンの意義を追求していく必要がある。

2) 健康被害をもたらすアレルゲンの制御技術に関する研究

アレルギー疾患、とくに気管支喘息の原因となる最も重要な室内環境アレルゲンは室内塵中に生息するチリダニ科、ヒョウヒダニ属の 2 種類のダニ、ヤケヒョウヒダニとコナヒョウヒダニである。とくにわが国は温暖、湿潤な気候から世界の中でも有数のダニ汚染地域の一つであるため、ダニ対策がアレルギー疾患制御のための最重要課題となる。

Der 1 量の測定には、mAb を用いる ELISA で Der p 1 と Der f 1 を別々に測定してそれを合計する方法が一般的であり、Der p 1 と Der f 1 の mAb-ELISA を開発してさまざまな室内塵試料中の Der 1 量を測定してきた。この方法は信頼性の高い測定法であるが、1つの試料に対して 2種類の ELISA で測定する必要がある。そこで 1つの ELISA の中で Der p 1 と Der f 1 をまとめて測定できるシステムの開発を試みた。

Der p 1 と Der f 1 はアミノ酸配列の相同性の高いタンパク質で、両者は非常に強く交差反応することが知られている。このような互いに強く交差反応する抗原を 1つの系の中でまとめて測定するための方法としてはいくつかの可能性が考えられるが、手持ちの mAb の Der p 1 と Der f 1 に対する反応性の特徴を考慮に入れて、所定の方式を採用した。すなわち、一次抗体に両者の共通するエピトープを認識する mAb を用いて Der p 1 と Der f 1 の両方を固相にトラップして、ビオチン化二次抗体には Der p 1 特異的 mAb、Der f 1 特異的 mAb の混合物を用いて両者を検出するという方法である。Der p 1 と Der f 1 に対する反応性のアンバランスを生じさせないために、ビオチン化二次抗体については十分に検討を加えて最適の組み合わせを選択した。その結果、Der p 1 が優位である住居から Der f 1 が優位である住居まで、Der p 1 と Der f 1 の存在割合にかかわらず両者の合計量を反映する測定値が得られた。

3) 住環境に存在する病原細菌の熱抵抗性の検討

今回、*Erysipelothrix* 属菌 9 株の 52°C における D 値を調べたところ、特に熱抵抗性が高かった血清型 13 型に同定された菌株では 2.34~9.64 分であったが、それ以外のものでは 0.58~1.66 分であった。今までに *Erysipelothrix* 属菌の熱抵抗性を検討した報告はみられないが、同じグラム陽性菌である *Listeria monocytogenes* の 52°C における D 値について Casadei らは 9.9~20.1 分、Golden らは 38.8~64.1 分、Bunning らは 37.9 分と報告している。したがって、*Erysipelothrix* 属菌は食品媒介性感染症の原因菌である *L. monocytogenes* に比べると比較的熱に対する感受性が高いと考えられる。

細菌の培養温度が高いと熱抵抗性が高まる理由の一つに、細菌が熱感作を受けると菌体外に産生するタンパク、すなわちヒートショックプロテイン (Heat shocked protein, HSP) が関与している可能性が考えられる。細菌の HSP 産生は、細菌が熱感作を受けたときに自己を守るための防御機構のひとつであるが、このタンパクは熱以外の pH の変化や飢餓などのストレスを受けた時にも産生され、熱以外の他の外界からのストレスに対する耐性を高めることも知られている。HSP の分子量は 60~70 キロダルトンのものが多く、全ての細菌が HSP の産生に関わる遺伝子を持つといわれている。*Erysipelothrix* 属菌も 70 キロダルトンの HSP を産生することが知られている。しかし *Erysipelothrix* 属菌がどのような条件下で HSP を産生するかを詳細に検討した報告はなく、また本属菌が 37°C の培養温度でヒートショックを起こし HSP を産生するか否かも現時点では不明である。

本研究により、人の環境に広く分布する病原性細菌の一つであり、グラム陽性菌である *Erysipelothrix* 属菌の熱抵抗性は菌種ならびに血清型を決定する耐熱性抗原の有無によって異なるとともに、菌種や菌株によってはグラム陰性菌で指摘されているように、培養温度が高くなると熱抵抗性が高くなる現象が観察された。これらのことから、*Erysipelothrix* 属菌を加熱殺菌する場合には、その菌の発育温度により熱抵抗性が異なることを念頭において、殺菌温度や処理時間などを考える必要がある。また、他のグラム陽性の病原細菌についても、熱抵抗性と培養温度との間に *Erysipelothrix* 属菌のような現象がみられるか否かについて、今後検討していく必要がある。

4) ダニの生態発生要因制御技術の研究

室内塵中のダニ類の調査は各地で行われているが、今回行った西北地域における室内塵中のダニ類は、今までの結果とおおむね類似した。室内塵から検出されるダニ類の中で全国的に優位を占めるチリダニ科 *Pyroglyphidae* に属するダニ類が、高率に検出された。しかし、当地域の室内塵中より検出されたダニ数は、東京及び東京周辺の地域において検出されたダニ数に比べて少ない傾向を示し、地域特性を伺わせる結果となった。この要因として、当地は東京及びその周辺地域に比べて内陸地域に位置することによる気候の違いに起因することも考えられる。

5) 水系生物の微生物的・化学的研究

今回、 β -グルカンを測定することで、今まで 5~7 日間測定時間を必要としていた真菌を迅速に検出することができた。

冷却塔水における試験結果については、真菌数と β -グルカンの相関性は、水道水や環境水とは異なり、高い相関関係は見られなかった。これは、冷却塔水が水道水や環境水とは異なり、循環水であることから、 β -グルカンによる指標が過去の真菌汚染もあわせて測定された結果と考察された。

細菌および真菌の存在に関わると考えられる関連化学物質との相関関係については、化学的検討を行った結果、鉄、アルミニウムおよび銅などの金属が細菌および真菌の存在に大きく関わっていることが考えられた。また、水の汚染指標である項目についても高い相関性があることが確認された。

6) 有害微生物の制御処理技術に関する基礎研究

低栄養環境での *C. sphaerospermum* の発育過程は、発芽、発芽管形成、菌糸成長、発育停止あるいは発育後の異常形態形成であり、過酷な環境での生存性、拡散性に深く関与するものと考えられた。

C. sphaerospermum は、栄養の殆どない環境でも水分さえあれば菌糸状態まで発育し、さらにその環境で長く生存できる厚膜胞子を形成することが判明でき、このような発育は、*C. sphaerospermum* が生活環境および工業製品の主要汚染になる理由の一つであると考えられる。

7) 有害生物の制御処理技術に関する基礎研究

DMSO は、高濃度でも真菌の生残性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。アセトンは、*Aspergillus*、*Penicillium* 属菌は高濃度でも生残性がみとめられている。室内環境に常在する好乾性真菌は、アセトンに対する抵抗性が極めて高いと思われ、難水溶性有機溶媒化学物質に対する住宅内汚染真菌は、その濃度が 10% 以下であれば生残性が認められることが明らかとなった。難水溶性有機溶媒物質は、住宅環境汚染真菌の発育を阻害せず、微生物汚染を助長していることが示唆された。

5. まとめ

1) 環境真菌の発生要因および制御技術の研究

(1) 住環境にみる真菌動態調査

住環境にみる真菌を調査した。住環境に最も多かった *Cladosporium* は約 40% の検出頻度であり、高率に認められた。次いで *Rhodotorula* を含めた酵母であり、さらに *Penicillium*、*Alternaria* などを検出した。

(2) 小型分級サンプラーによる空気中の真菌細胞数測定

大気中にみる真菌数および細胞粒径を 3 分級 (1 層 : PM_{10} 、2 層 : $PM_{10-2.5}$ 、3 層 : $PM_{2.5}$) で検討した。 $PM_{10-2.5}$ で最も多く捕集され、次いで PM_{10} であった。3 層の $PM_{2.5}$ では著しく真菌数は少なかった。

小型分級サンプラーの各分級にみる主要真菌をみると PM₁₀ と PM_{10-2.5} では *Cladosporium*, *Penicillium* が多く、PM_{2.5} では、CFU は少なかった。

各分級での真菌細胞の粒径を直接法で確認した。1、2 層に真菌細胞を多く確認でき、1 層フィルターでの捕集は 10 μm 前後に幅広く認め、大型の菌糸または胞子を認めた。2 層フィルターでは 2.5-7.5 μm の細胞を捕集し、フィルターと真菌細胞が一致した。さらに 3 層の PM_{2.5} では、真菌細胞の大きさ 3 μm 以下の小さな細胞が確認できた。この結果は、各層での粒径と一致した。

2) 健康被害をもたらすアレルゲンの制御技術に関する研究

本研究班において、室内環境がダニに汚染されているかの実態調査、汚染のレベルを低減化するための制御技術の評価を実施していく必要があり、それにもなって多くの室内塵試料中のダニアレルゲン量を測定しなければならない。そのときの測定に要する作業量を少しでも低減化するために、Der p 1 と Der f 1 をまとめて測定できる Der 1 ELISA を開発した。この Der 1 ELISA によって室内塵試料中の Der p 1 と Der f 1 の合計量を正しく反映する測定値が得られ、その再現性、正確度も満足できるものであった。このようなダニアレルゲンの簡易定量法は、大量の試料を処理する必要があるときに利用価値がある。

3) 住環境に存在する病原細菌の熱抵抗性の検討

住環境の病原菌の除去を行うための方策を確立するための基礎知見を得る目的で、それぞれ生理活性の異なる *Erysipelothrix* 属菌の計 9 株について、熱抵抗性を菌種ならびに培養温度により比較検討した。*Erysipelothrix* 属菌の熱抵抗性は菌種ならびに血清型を決定する耐熱性抗原の有無によって異なる可能性が示唆された。p

4) ダニの生態発生要因制御技術の研究

一般住宅のダニ数及びダニ相の調査を行った。ダニ調査のための室内塵採集は、我々自身が各対象家庭について、同一掃除機にて一定条件で採集した。チリダニが優位に検出され、次にホコリダニが多く、そのほかササラダニ類、コナダニ類、ニクダニ類、ツメダニ類、中気門類のダニなどが比較的多数検出された。各素材の違いによってダニ数に差が認められ、特にカーペット、寝具においてダニ数が多い傾向を示した。

また、各調査時期におけるダニアレルゲンでは Der 1 量が Der 2 量に比べて多かった。アレルゲン量の室内分布についても、ダニ数の分布とほぼ一致した。

5) 水系生物の微生物的・化学的研究

環境水中の真菌汚染については、β-グルカンを定量することにより、迅速で高感度に検出できる測定方法を構築することができた。また、レジオネラ属菌についても改良メンブランフィルター法を用いたレジオネラ検出キット法により、迅速で高感度に検出できることを可能とした。さらに、直接細菌あるいは真菌を測定せず、SLP を測定することにより水中の細菌あるいは真菌の存在を推定することが可能となった。

6) 有害微生物の制御処理技術に関する基礎研究

栄養無添加表面での *C. sphaerospermum* の発育過程は、発芽から菌糸形成、発育停止、発育後の異常形態形成であった。lag phase から log phase に入る直前に発育が停止した。

7) 有害生物の制御処理技術に関する基礎研究

有機溶媒物質と真菌の生残性について検討した。DMSO は 50% 以上、アセトンについては 10~20% の殺菌濃度を示した。以上の結果から、住宅に用いる難水溶性有機溶媒は、真菌の生残性に強く影響を及ぼさないものと結論された。

6. 研究発表

- 1) 高鳥浩介 環境微生物の測定と評価(山崎省二編)第 3 章環境にみる真菌 pp. 29-56 第 3 章 真菌による生体影響 pp. 71-80 オーム社 2001
- 2) Aihara, Maki, Tanaka T. & K. Takatori *Cladosporium*, as the main contaminant of locations in dwelling environments. *Biocontrol Science* 6:49-52, 2001

- 3) Jong-C. Park、 Han D-W、 Park B-J Lee D-H、 K. Takatori & Hwal Suh Effective screening medium for the biodegradation of oleic acid by *Aspergillus niger*. *Biocontrol Science* 6:37-41 2001
- 4) Makimura K、 Hanazawa R、 Takatori K、 Tamura Y、 Fujisaki R、 Nishiyama Y、 Abe S、 Uchida K、 Kawamura Y、 Ezaki T、 Yamaguchi H: Fungal flora on board Mir-space station、 identification by morphological features and ribosomal DNA sequences. *Microbiology and Immunology* 45(5):357-363 2001.
- 5) Kosuke Takatori、 A Saito、 H. Yasueda & K. Akiyama The effect of house design and environment on fungal movement in homes of bronchial asthma patients' *Mycopathologia* 152(1): 41-49、 2001
- 6) 李憲俊、長峰英之、武井康裕、宮島千鶴、高鳥浩介 CO₂ 測定による抗カビ試験の評価 防菌防黴 29 :367-370 2001
- 7) Naoki Sugimoto、 J. Fukuda、 K. Takatori、 T. Yamada and T. Maitani Identification of principal constituents in enzymatically hydrolyzed coix extract *J. Food Hyg. Soc. Jpn* 42(5): 309-315 2001
- 8) 稲田知佳、工藤たか子、芳住邦雄、高鳥浩介、Alan Hedge 光照射による *Penicillium* 不活化の波長依存性 防菌防黴 29(12) : 757-762、 2001
- 9) 高鳥浩介 かび抵抗性試験方法 JIS Z 2911:2000 改正 防菌防黴 29(1) : 31-37、 2001
- 10) 高鳥浩介、相原真紀、村松芳多子 食品の真菌試験と培地評価 *Nissui Technomedia* 4 : 15-21、 2001
- 11) 高鳥浩介 真菌アレルギー 住環境にみる真菌とその生態 *真菌誌* 42 : 113-117、 2001
- 12) 高鳥浩介、相原真紀、太田利子 環境微生物概論 環境の真菌 *空気清浄* 39(3) : 178-181、 2001
- 13) 安枝浩 ダニアレルゲン測定法. *アレルギーの臨床* 21, 572-576 (2001).
- 14) 高橋淳子 21 世紀の水環境. *技術士*, 409, 3-5(2001)
- 15) 高橋淳子、岩上奈美子、松木容彦、栗原綱義、青島弘志、井尻晴久、高鳥浩介. 環境水にみる真菌とその化学的背景. 第 1 回環境技術研究協会年次大会, 2001. 6
- 16) 高橋淳子、岩上奈美子、松木容彦、青島弘志、井尻晴久、栗原綱義、高鳥浩介. 冷却塔水中における微生物汚染調査とその関連化学因子について. 平成 13 年度全国給水衛生検査協会全国水質検査研究発表会, 2001. 11
- 17) 高橋淳子、栗原綱義、小井土重則、大沢高温、井上修、阿部炬久、進藤誠一郎、高松輝雄、大曾根義一、矢根五三美、相川文彦、井尻晴久、高鳥浩介. 冷却塔水中の微生物汚染およびその関連化学因子. 第 29 回建築物環境衛生管理全国大会, 2002. 1

7. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社