

平成15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

目 次

課題番号		
文献NO 20030933A KH61061	医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究	森川 馨 …… 1
KH61062 954A	生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究	土屋利江 …… 20
KH61063 955A	標的指向型DDS製剤を用いた腎疾患治療方法の開発	名取泰博 …… 29
KH61064 956A	新規体外循環システムの創製と評価技術の開発	渋谷統寿 …… 32
KH61065 957A	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	高鳥浩介 …… 36
KH62080 958A	ヒト肝特異的有機アニオントランスポーター遺伝子LST-1およびLST-2導入肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓組織の開発	松野正紀 …… 44
KH62083 959A	活性タンパク利用技術としての新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発研究	五十嵐理慧 …… 47

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

研究要旨 健康被害を及ぼす有害生物の生態系での調査をまとめ、測定技術、疫学、生物活性、細胞機能に関する研究を行った。対象生物は、住環境にみる細菌、真菌、ダニ、水生生物であり、その生物の持つ有害性を特にアレルギーとしての観点から多面的に検討した。それぞれの生物の持つ特性及び活性機能を解析することができた。

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) 宮崎大学農学部 後藤 義孝
- (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) 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
- (7) 旭電化工業株式会社 東海林 義和

A. 研究目的

住環境には、健康影響を及ぼす有害生物が分布生息している。特にアレルギーや感染症などと深く関わる生物が潜在的に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から制御に関する研究は個々に実施されていることが多く、それぞれの生物間での拮抗、共存する生物生態は不明であった。健康被害として重視されるアレルギーは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。したがって、本研究が総合的に調査研究することにより、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。

さらに、快適な住環境から健康維持できる環境を作り出すための技術開発が必要となる。この研究を通して生活環境にみる有害生物の生態・生物学的特性を解明する。その結果に基づいて有害生物に起因するアレルギーや感染症といった健康被害を防御するための技術をそれぞれの分野から共同研究することにより、快適な生活環境作りに寄与できる成果が得られることを目的とする。

15年度は生活環境での有害生物の生態・危害

性・生物特性および環境適応性を中心に次の8課題について研究を実施した。

B. 研究方法

1) 空中飛散真菌の粒径測定に関する研究

室内環境の空中より分離した真菌 *Aspergillus niger* 2株, *Penicillium* spp. 2株を前培養した後、胞子を0.05% Tween80液で単一胞子状になるように調整した。

作製した真菌胞子の粒径をリアルタイム粒子計測法を応用した TSI Incorporated 社(米国) APS33B system, Model 3310, Aerodynamic Particle Sizerにて、測定器入口吸引流量5L/mins, 入口部流速1.1m/s, 質量1の条件で測定した。使用した菌株の胞子サイズについては光学顕微鏡のマイクロメーターを用いて粒径の測定を行った。

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

敷きフツンの上面に大きさ6x7cmのテープを貼付して試料を採取した。敷きフツンの片面から吸引採取したものを寝具塵とした。また、各家庭で日常的に使われている掃除機の紙パック中の塵を採取して室内塵とした。空気試料は、被験者の寝室において、2.5 L/minの流速でガラス繊維濾紙上に24時間吸引捕集した。

高感度蛍光ELISAによるDer p 1/Der f 1の測定を検討した。ELISA用緩衝液で段階希釈したDer p 1/Der f 1標準品または試料の希釈液0.1mlをインキュベートし、正常ウサギγグロブリン(1mg/ml)を含むELISA用緩衝液に溶解した2次抗体(アフィニティー精製ウサギ抗Der p 1, 抗Der f 1抗体のビオチン標識体)5ng/0.1mlを加えた。

ELISA 用緩衝液で希釈したストレプトアビジン- β -D-ガラクトシダーゼ結合物(ロシユダイアグノスティックス) 0.1 ml をインキュベートし、基質溶液 (0.1 mM 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド) 0.1 ml を加え酵素反応を行った。反応停止液 (0.1 M glycine-NaOH, pH 10.4) 0.1 ml を加え、蛍光プレートリーダーを用いて励起波長 360 nm, 測定波長 465 nm にて蛍光強度を測定した。標準品の段階希釈液の蛍光強度から標準曲線を描き、その標準曲線から試料中の Der p 1, あるいは Der f 1 の濃度を求めた。この測定における検出下限は、Der p 1, Der f 1 ともに 1 pg/ml であった。

試料中のダニアレルゲンの測定を寝具表面、皮膚表面から試料を採取したテープ、および空気試料を用いて Der p 1/Der f 1 の高感度蛍光 ELISA で測定した。Der p 1 と Der f 1 の合計量を Der 1 量として、測定値はテープ法の場合には 1 平方メートルあたりの Der 1 量 (ng/m²) で、空気試料の場合には空気 1 立方メートルあたりの Der 1 量 (pg/m³) で表した。

3) 住環境にみる動物由来有害微生物の制御に関する研究

住環境における微生物の生残性を *S. aureus*, *S. intermedius*, 大腸菌群, *Pseudomonas* spp., *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula* spp. の保存菌株を用いて調べた。前培養した供試菌を滅菌水に浮遊させ、細菌はマックファーランド濁度 2, 真菌は 1.0×10⁶/ml の菌液を作製した。各菌液を滅菌ペーパーディスクに滴下し、室温乾燥環境 (25°C, RH30%)、高温乾燥環境 (37°C, RH30%)、室温高湿度環境 (25°C, RH99%) の各条件下に静置した。一定期間ごとに、ディスクを培地に接種し、菌の発育の有無を確認した。なお、これらの試験は紫外線の影響を考慮して暗室内で行った。

ハウスダスト中の微生物消長をハウスダスト (HD) における細菌および真菌数 (CFU) の経時的変化を調べた。

4) 廃材より再生された炭の住居内設置による住環境改善とダニの制御に関する研究

調査対象は、出雲市内の一般家庭を対象に、炭処理を行った家庭 3 家屋及び対照家庭として 3 家屋の計 6 家屋について調査を行った。

調査時期は、H15 年 4 月から 11 月までとし、炭の設置は 7 月末日とした。ダニの調査場所は、処理家庭及び対照家庭ともに、床 3 カ所及び布団から塵を採集し検査を行った。

一方、環境評価として、2 年度に開発されたダニ培養装置を用いてチリダニ (Dp, Df) 数の増殖を調べた。

5) 水系生物の生態および活性に関する研究

調査対象とした試料は、39 施設の冷却塔水および 10 施設の自己水源の水道水とした。一般細菌数、大腸菌群、大腸菌、 β -グルカン、エンドトキシン、SLP (Silkworm larvae plasma), *Legionella pneumophila* 血清群 I 型および真菌とレジオネラ属菌の生菌数さらに同定を行った。

試験方法は、真菌の測定については発育を糸状菌と酵母に分け観察し同定を行った。また、 β -グルカン、エンドトキシン、SLP およびレジオネラ属菌の測定は、 β -グルカンテストワコー、エンドトキシン-シングルワコー、SLP シングル試薬セットおよびレジオネラ検出キットを使用した。

6) 有害微生物の制御処理技術に関する研究

供試カビとして当センターで分離保存されている *Phoma* sp. HMC1098 を用いた。供試試料は、市販の業務用シリコンシーラントを充填、乾燥後切り取って四角柱 (10×5×50mm) を作製した。24 時間毎、精製水を交換しながら、120rpm にて 1 週間攪拌した。攪拌後、121°C, 15 分間高圧蒸気滅菌したものを供試試料とした。孢子液を接種した後 5°C にて培養した。培養後、試験試料をスライスし、顕微鏡にて観察した。

7) 有害環境真菌の検出技術および産生物質の評価に関する研究

バイオリアクター (攪拌型培養槽) による培養検討を行った。攪拌型培養装置としてファーマンタを使用して温度、攪拌回転数、通気量、制御による回分培養を行い O. D. 値, D. O. 値, pH 挙動をモニタリングした。また、原料シュエクロース、産生物質のオリゴ糖、高分子多糖類の消長を HPLC にて検出した。使用菌株は ADK34 株とした。HPLC 装置は東ソー社製 (SD-5000 型) を、分離カラムはゲルろ過用カラム KS-804 (昭和電工社製)、RI 検出器を使用した。培養液中の多糖量はフェノール硫酸 (マイクロアッセイ) 法により行った。

8) 有害生物の制御処理技術に関する研究

イミダゾール系抗菌剤のチアベンダゾール (TBZ) と、ピリジン系抗菌剤のジンクピリチオン (ZPT) を用いた。単独抗菌剤ならびに 2 種抗菌剤の配合条件で実施した。供試した抗菌剤を Glucose Peptone broth (GP broth) で、系列希釈を作製し、孢子数を加えた。この試験管を培養し液体培地内での真菌の増殖の有無を確認し、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

2 種抗菌剤の配合条件による試験法は Checker board 方式によって測定した。抗菌剤について GP broth で希釈した。それぞれの濃度に希釈した抗菌剤を分量し、これに孢子液を加えた。この試験管を 27°C, 7 日間培養し、液体培地内での真菌の

増殖の有無を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は、人や環境に対して安全性を脅かす恐れのない実験施設でプロトコールどおりに研究が実施されていることから、倫理面での問題はないものと判断した。

C. 研究結果

1) 空中飛散真菌の粒径測定に関する研究

Aspergillus niger 2 株はあらかじめ測定した胞子の粒径は 3.5~5.1 μm および 2.9~4.0 μm であった。リアルタイム粒子計測法を応用した APS33B system を用いた結果は 3.52~5.05 μm および 3.05~5.42 μm の範囲にあり、ほぼ近似の結果が得られた。すなわち顕微鏡計測による粒径と今回使用した APS33B system での計測は真菌で十分計測できた。

また *Penicillium* spp. 2 株は顕微鏡測定値 2.5~4.7 μm および 2.5~4.7 μm であった。同様にリアルタイム粒子計測法による APS33B system を用いて実施したところ 2.46~4.07 μm , 2.64~4.37 μm に分布する測定値が得られた。この比較においてもほとんど近似であることがわかった。

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

寝具表面ダニアレルゲン量と就寝者の皮膚表面ダニアレルゲン量との関係を検討した。昨年度は、テープ法による寝具表面 Der 1 量と従来の掃除機法による寝具塵中の Der 1 量との関係を求めたが、今年度は、テープ法による寝具表面 Der 1 量と就寝者の皮膚表面 Der 1 量との関係について検討し両者の間には $r = 0.72$, $p < 0.001$ という極めて高い相関関係がみられた。

寝具表面、皮膚表面ダニアレルゲン量と寝室内空気中ダニアレルゲン濃度との関係を検討した。寝室内で 24 時間エアサンプリングを行い、1 日平均の室内空気中 Der 1 濃度を求めて、その濃度と寝具表面、および就寝者の皮膚表面 Der 1 量との関係を検討した。テープ法で採取した寝具表面、および就寝者の皮膚表面ダニアレルゲン量はいずれも、寝室内空気中のダニアレルゲン濃度と有意に相関した。

3) 動物由来有害微生物の制御に関する研究

住環境における微生物の生残性を検討した。各菌種の生残性は、菌種や菌株によって大きな差がみられたが、いずれの菌種でも 37 $^{\circ}\text{C}$ よりも室温環境、乾燥より高湿環境下において生残日数が大幅に延長することが明らかとなった。

ハウスダスト中の細菌の生菌数は室温・乾燥環

境下に静置することで 4 ヶ月目までに大きな変動はみられなかったが、静置期間が長引くとともにグラム陽性球菌 (*Staphylococcus* など) からグラム陽性桿菌 (*Bacillus* など) に優占菌が移行した。一方、総真菌数は 2 ヶ月目以降にピークを迎えたサンプルが多く、その後低下する傾向がみられた。菌属別にみると、試験開始当初 HD の優占菌であった *Cladosporium* や *Penicillium* の菌数は減少していったが、反対に *Aspergillus restrictus*, *Eurotium*, *Wallemia* などの好稠性菌類は徐々に増加し、2 ヶ月目以降に菌数が最大となった。

4) ダニの生態発生要因制御技術の研究

炭設置によるダニの増殖への影響を見るために、炭処理設置家庭 3 家屋と対照 3 家屋におけるダニへの影響を検討した。寝具と床でダニの生息状況に違いがあるため、効果判定は、寝具のダニ数と床のダニ数に分けて評価を行った。評価は、炭設置を行った 7 月末の時期より前の 4 月から 7 月までの 4 ヶ月間と炭設置後の 8 月から 11 月の 4 ヶ月間のダニ相及びダニ数の変動について、処理群 3 家屋と対照群 3 家屋の比較を行うことによって、炭処理のダニへの影響を評価した。

その結果、対照家庭の 3 家屋の床及び寝具ともに、総ダニ、チリダニ、チリダニ以外のダニは、処理前の 4 ヶ月の平均ダニ数に比べて、処理後の 4 月のそれは増加した。これに対して処理群では、床のチリダニ数が 3 家屋中 2 家屋で処理後に減少した。また、寝具では、3 家屋中 1 家屋で処理後に減少したにとどまった。しかし、チリダニ以外のダニは 3 家屋の床及び寝具ともに、対照群同様処理後に増加した。

この結果から、炭設置家庭の床におけるチリダニの増殖抑制効果が示唆されたが、チリダニ以外のダニには効果が認められなかった。

ダニ培養装置による住居環境評価をおこなった。昨年度開発したダニ培養装置について、上述した 6 家庭で実地調査を行ったところ、6 家庭のうち 5 家庭で、Dp, Df とともに 6 月から 8 月にダニ数が最も増加した。その後、Dp, Df とともに増殖数は減少し、顕著な季節消長パターンを示した。本装置による炭処理家庭と対象家庭のダニ数の増殖率については顕著な差は認められなかった。

5) 水系生物の生態及び活性に関する研究

冷却塔水の種類別における真菌の検出状況は、開放式冷却塔水と密閉型冷却塔水を比較すると、いずれも密閉型冷却塔水において真菌の検出率が高かった。開放式冷却塔水の角形と丸形を比べると、散水方向と空気の流れがカウンターフローになっている丸形の方が、真菌の検出率とその生菌数はいずれも高かった。開放式冷却塔水における

微生物的汚染を検索した結果、細菌の検出率が高い試料は、真菌についても同様に高い検出が認められ、汚染の高い丸形冷却塔水は細菌と真菌の相関性が $r=0.795$ であった。

Legionella pneumophila 血清群 I 型の測定では、全体の約 36% の施設から 10 CFU/100mL 以上の検出が認められた。簡易改良型検出キットは、従来の生菌数を測定する方法と比較し、10CFU/100mL の検出感度が得られた。レジオネラ属菌と β -グルカン、エンドトキシンおよび SLP については、正の相関関係が認められた。

6) 有害微生物の制御処理技術に関する研究

シリコンシーラントでの *Phoma* sp. の発育を観察した結果、25℃、培養 3 日目からシリコンの中に侵入する菌糸が確認された。また、培養 5 日～7 日目では、シリコンの表面に分生子殻の形成が確認された。しかし、これら分生子殻は、培地の場合、培地の方に付着するが、培地にシリコンを設置した場合は、シリコンの方に付着していることが確認された。

7) 有害環境真菌の検出技術および産生物質の評価に関する研究

バイオリアクター（攪拌型培養槽）による多糖類産生に関する検討を行った。昨年度の検討により多糖生産性が良かった Czapek-Dox 培地（CZ 培地）において多糖類の生産を指標として培養特性を検討した。初期条件は、CZ 培地 3L、培養温度 26℃、初期 pH6.0、攪拌回転数 250rpm、通気量 3.0L/min とした。菌体増殖は、試験管培養とほぼ同様であり、24～36hr. で最大に達した。培養とともに pH 低下が認められ、50hr で pH4.0 となった。培養産物の HPLC 分析の結果、多糖の産生以外にオリゴ糖の生成も認められた。原料糖のシュークロースは培養初期にグルコースとフラクトースに分解し、まずグルコースが消費、次いでフラクトースが消費されていくことが判った。フェノール硫酸測定の結果、経時的な多糖生成量の増加が確認された。

8) 有害生物の制御処理技術に関する研究

抗菌剤の真菌 6 種に対する単独の MIC 成績は TBZ では *Aspergillus terreus* や *Penicillium citrinum*, *P. funiculosum* に対して効果が認められ、0.08～10 ppm であった。しかし、*Cladosporium cladosporioides* ならびに *C. sphaerospermium*, *Alternaria alternata* については、効果が低下し、その MIC 値は 600～1000 ppm であった。一方、ZPT については、全供試菌の MIC 値が 0.4～60 ppm の範囲下だが、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属については TBZ に比して、MIC 値が高い傾向がみられた。

次に ZPT と TBZ の配合による抗真菌活性をまとめた。TBZ に抵抗性を認めた真菌を評価すると、*Cladosporium cladosporioides* は、ZPT を 40ppm 以上配合することによって、TBZ に対する MIC 値は 60ppm まで低下した。*C. sphaerospermium* や *Alternaria alternata* は、ZPT を 4ppm 以上配合することによって、TBZ に対する MIC 値は 40ppm まで低下した。*Alternaria alternata* については、ZPT を 4ppm 以上配合することによって、TBZ に対する MIC 値は 20ppm まで低下した。

ZPT に対して抵抗性を認めた真菌を評価すると、*Aspergillus* 属は 6～20ppm、*Penicillium* 属については 0.08～0.4ppm 以上 TBZ を添加することによって、ZPT の MIC 値は 10～20ppm まで低下した。

D. 考察

1) 空中飛散真菌の粒径測定に関する研究

室内環境でのアレルゲンとして真菌があり、その真菌をどのように計測するかさまざまな試みがなされている。真菌はアレルゲンとしてみた場合、生死細胞すべてについて対象とする必要があり、従来の培養法によらない方法を検討する必要がある。そこでここでは大気中に分布する真菌細胞を電気的信号により粒子計測する方法を考え、さらに粒径を正確に計測できる装置の検討を行うこととした。リアルタイム粒子計測法として非生物粒子を対象として用いられていた APS33B system は質量を 1 と定め単位時間当たりの移動距離より粒径を算出するため対象の形、表面構造などに影響されることが考えられる。

今回の真菌胞子を APS33B system 測定値と顕微鏡測定値に大きな差が認められなかったことより、本測定器を用いても真菌細胞の粒径（直径）の測定とその分布を解析することが可能であると考えられる。今後さらに検討する必要があることは、真菌の形状である。単細胞で比較的球形である胞子では十分対応できるが、多形態をとる真菌細胞での応用を今後さらに進める必要もある。

2) 健康被害をもたらすアレルゲン制御技術に関する研究

ELISA によるアレルゲン量測定で室内環境の汚染のレベルを評価するという方法を大規模な疫学的調査で有効に機能させるためには、測定法そのものを簡易化して試料の処理能力を上げることとともに、サンプリングの方法を可能な限り簡略化することが必要である。従来の掃除機法では、掃除機を運転しての室内塵の採取や掃除機の搬送などの複雑な作業が必要である。一方、テープ法であれば、寝具からのサンプリングという作業そのものも従来法に比べてはるかに容易で簡単に行う

ことができるため、高い回収率を期待することもできる。

テープ法で測定した寝具表面のダニアレルゲン量と就寝者の皮膚表面のダニアレルゲンとの間には相関関係がみられ、しかもこれらの寝具表面、皮膚表面のアレルゲン量は、寝室内空气中ダニアレルゲンの1日平均濃度と有意に相関した。従来の掃除機法で集めた室内塵中のダニアレルゲン量と空气中濃度との間には明確な相関は見られず、室内塵中のダニアレルゲン量が、ヒトが実際に吸入するアレルゲン量、すなわち曝露量を直接反映するわけではない。テープ法での測定値が空气中濃度と有意に相関するという事実は、煩雑なエアサンプリングを行わなくても、非常に簡単なテープ法で測定した寝具表面、皮膚表面のダニアレルゲン量が曝露の指標として利用できる可能性がある。

3) 動物由来有害微生物の制御に関する研究

今回調査を行った家庭では、動物由来の一菌種が環境全体を汚染していく様子が観察された。アレルギー性皮膚炎を発症した犬を飼育し始めたところ *Staphylococcus intermedius* が、犬体表、同居猫体表、人体表、住環境のいずれからも大量に分離され、とくに猫体表と住環境から分離された菌株は、犬由来株と全く同じバンドパターンを示した。このケースでは、人や猫に健康被害は認められなかったが、*S. intermedius* の異常増殖は犬のアレルギー性皮膚炎やアトピー性皮膚炎でよくみられることから、昨今増えているこのような疾患をもつ動物の飼育管理には十分な注意が必要と考えられた。このように一つの菌株が、動物や人、住環境を互いに往き来し、家庭固有の微生物叢を形成することが推察された。

各種細菌および真菌の生残性であるが、最も生残期間の短かった *Malassezia* の高温・乾燥環境下でも1週間以上生残することが明らかとなったことから、人や動物の体表から脱落した微生物が、床面や被毛上に付着する形で生残し、間接的に他の個体に移動、定着していくものと考えられた。

乾燥環境が種々の微生物の生残性にマイナスに働くことが証明されたことから、住環境を乾燥状態に保つことが有害微生物制御のためにはある程度有効と思われた。人や動物の体表から脱落した微生物の多くがHD中に混在することを考えると、蓄積したHDはそれらの微生物の温床となり得ることから、住環境中の有害微生物制御の観点からはHDの除去が非常に重要なポイントであるといえる。

最も汎用されている消毒剤の一つであるGCHDの各種微生物に対する殺菌効果を確認した。GCHD

は各種細菌および真菌の発育を抑制するのに効果的であったが、*Staphylococcus* に対しては至適濃度が存在し、0.5%濃度では効果がみられなかった。従って、GCHDを使用する時には濃度の確認が必要であること、また本薬剤の特徴である有機物の混入による効果の減弱を考慮して使用することが必要と考えられた。

4) ダニの生態発生要因制御技術の研究

対照家庭に比べて炭設置家庭の床におけるチリダニの増殖抑制が示唆されたが、なぜチリダニだけが抑制されたのか、チリダニ以外のダニについては効果が認められないのか、理由は不明である。

また、炭処理による住居内環境への影響は、急激な変化ではなく、温和な影響と考えられ、ドラマチックな影響は期待できないため、さらに長期的な評価が必要であると考ええる。

ダニ増殖装置による住居環境評価については、今回の結果から、実際の住宅内においても、一定の評価が行えることがわかったが、装置の輸送方法、設置場所、評価期間等についてさらに検討する必要がある。

炭設置によりダニへの何らかの影響が認められるものの、今回の短期的な評価では顕著なダニ増殖抑制効果は認められず、さらに長期的な追跡評価が必要であると考えられる。

5) 水系生物の生態及び活性に関する研究

環境水中の真菌の迅速測定方法に、真菌細胞壁に共通して存在する構成成分であるβ-グルカン測定した結果、実際の真菌生菌数とβ-グルカン濃度との間に相関性 ($r=0.94$) があることが確認された。水の種類別に真菌数の基準値を設定した結果、水道水、地下水、井戸水および工業用水は、500mL中に真菌数が100CFU以下と規定した場合、β-グルカンの基準値は100pg/mL以下、食品および医療用製造水の場合には、500mL中に真菌数が10CFU以下と規定した場合、β-グルカンの基準値は、20pg/mL以下と設定することができた。

一方、環境水中で重要な問題となっているレジオネラ属菌の迅速測定方法については、水試料を改良メンブランフィルター法で20倍濃縮率を高めたことにより、レジオネラ検出キット法においても *Legionella pneumophila* 血清群I型を10CFU/100mLまで検出することが可能となり、浴槽水等の基準値(10CFU/100mL未満)を測定可能とした。さらに、レジオネラ属菌が検出される条件として、エンドトキシン濃度200EU/mL以上、SLP活性10pg/mL以上およびβ-グルカン濃度80pg/mL以上の場合に検出率が高いことが確認された。

平成16年4月から施行される水質基準に今回調査検討した自己水源の水道水は、すべて対応でき

ることが明らかとなった。しかし近年、浄化槽および下水道の高度処理普及率が低い我が国では、生理活性を有するヒトの排出する医薬品やヘルスケア関連物質が環境水中に流出したり、金属が土壌および環境水中を汚染することが報告されている。このようなことから「健康な水循環」を持続する必要性が今後の大きな課題である。

6) 有害微生物の制御処理技術に関する研究

前年度の研究からシリコン中での *Cladosporium* の孢子形成が初めて確認された。今年度の研究から、供試カビの *Phoma* sp. は、シリコン側に分生子殻の底部が付着することが判明された。分生子殻は分生子を産生、保護、放出する機能の菌要素であるため、シリコンに付着した分生子殻は、汚染源として重要な役割をするものと思われた。

7) 有害環境真菌の検出技術および産生物質の評価に関する研究

多糖生産は、糖質源としてシュエクロース、マルトース (2 糖類)、グルコース、マンノース、フラクトース (6 単糖)、5 単糖であるキシロースを用いて培養したところ、多糖類を生産し、その構成糖は唯一グルコースであることが判った。

生育 pH を比較したところ、酸性側では幅広く生育することが判った。多糖生産性と生育速度の相関関係も今後の課題であるが、比較的生育の遅い菌株が多糖生産性がよい傾向にある。

また、多糖の生産という観点で、バイオリアクターを用いた発酵条件の検討と発酵産物の解析では、温度 26℃ で良く増殖した。培養経過時間 36 ~ 48hr で培養液の増粘を認め、72hr 後には培養液の流動性がほぼなくなり、これら増粘は多糖生産によるものと推察された。pH は、培養開始から一貫して低下し培養開始 48hr で pH3.8 まで低下した。生成した酸について検討を進めたが、同定に至らなかった。

生産物の解析は、HPLC 分析で実施した。第 1 ピークは培養とともに増加し、生産されている多糖成分である。第 2 ピークは培養初期から終了時まで一定量が検出されず、第 3、第 4 ピークは分子量が 500 ~ 1000 であり、培養によって生成するピークであり、オリゴ糖と推察された。培養液から分離し、エタノール沈殿法にて精製した画分は、第 1 ピークに一致し、酵素処理とフェノール硫酸法により β グルカンであると確認された。No. 34 株の CZ 培地における多糖生産性は 14.4g/l であり、変換率は 48% と算出された。培養により pH が低下することから pH 調節による多糖生産効率の改良は今後検討する価値があると考えられる。

8) 有害生物の制御処理技術に関する研究

近年の住宅環境は気密性が高く、空調設備の向上によって、好乾性真菌の生息に適した環境となっている。その一方、外気との遮断によって結露が発生し、空中浮遊微生物の汚染を促進させ、住宅を取り巻く環境には至るところで真菌汚染が拡大し、ヒトの健康被害に影響を及ぼしている。単独抗菌剤による抗菌性について評価したところ、TBZ は *Cladosporium* 属や *Alternaria* 属、ZPT については *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属に対して抵抗性が認められた。各供試真菌の生態的動向を推定すると、*Cladosporium* 属や *Alternaria* 属は好湿性浮遊真菌としての検出頻度が高く、室内環境下では、結露発生箇所や水周り周辺で顕著な汚染を認めることが知られる。Cheacker board 法による抗菌性を評価すると、2 種抗菌剤の配合によって供試真菌の MIC 値が低濃度化する傾向が認められ、その併用効果が確認された。その結果、これら 2 種抗菌剤を配合することによって、室内汚染真菌に対して有効な制御能力を持つことが期待された。

E. 結論

1) 空中飛散真菌の粒径測定に関する研究

室内空気中のアレルゲンとしての真菌細胞計測の可能性を探ることを目的として、空中飛散する真菌細胞の粒径分布を電氣的に測定可能か検討するための研究を行った。真菌胞子をリアルタイム粒子計測法として用いられている APS33B system 応用による測定値と顕微鏡測定値に大きな差が認められなかったことから、本測定装置を用いて真菌細胞の粒径測定とその分布を解析することが可能であると考えられる。今後さらに検討する必要のあることは、真菌の形状であり多形態をとる真菌細胞での応用を今後さらに進め真菌アレルゲン計測法への可能性を検証する必要がある

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

室内環境中のアレルゲンによる汚染のレベルを評価するため試料の簡便なサンプリング方法としてテープ法を開発した。この方法は従来の掃除機法よりもはるかに容易に作業を行うことができ、また汚染の実態を反映する測定値を得ることができる。さらに、本法での測定値は室内空気中アレルゲン濃度との間に相関が見られ、ヒトが実際に吸入するアレルゲン量、すなわち曝露量を反映する指標として有用であることが示された。

3) 動物由来有害微生物の制御に関する研究

住環境に落下、付着した微生物は、乾燥によってより早く発育能を失わせることが可能と推察さ

れたが、乾燥環境下であってもHD内では菌の生残性が高まったり菌種によっては増殖さえ可能であることから、こまめな清掃によってHDを除去することが住環境の衛生管理の重要ポイントといえる。

本研究では、健康なペット動物が様々な起病性微生物の汚染源となる可能性が低いことを明らかにした。動物由来有害微生物による健康被害を防ぐためには、動物を健康に飼育することが重要といえる。動物飼育家庭における多様性に富んだ微生物叢が、様々な起病性菌種の定着を阻止している可能性もあることから、過剰な消毒は避け、人や動物、住環境それぞれにおける健全な微生物叢の再構築に務める。

4) ダニの生態発生要因制御技術の研究

廃材より再生された炭を吸放湿素材として利用し、住環境改善の効果及び評価指標として、ダニの増殖への影響を検討した。その結果、炭を敷き詰めた家屋では、3家屋のうち2家屋の床面で、処理前の4ヶ月間の平均チリダニ数に比べて、処理後の平均ダニ数が減少した。これに対して、対照群は3家屋ともにダニ数が増加した。しかし、ダニ数は採集場所によって大きな違いがあるため、統計学に有意な差は認めなかった。

5) 水系生物の生態及び活性研究

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。一方、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なり、エンドトキシン、SLPおよび β -グルカンがレジオネラ属菌の存在を推定する因子であることが明らかとなった。このことより、水系有害生物の汚染基準となる指標値を設定することが可能となり、今後の健全な水循環社会を構築する上で大きく貢献できた。

6) 有害微生物の制御処理技術に関する研究

住環境の主要汚染カビである *Phoma* sp. のシリコンでの発育について検討した結果、*Phoma* sp. はシリコンの中で菌糸および分生子殻底部を形成することが確認された。

7) 有害環境真菌の検出技術および産生物質の評価に関する研究

有害真菌として知られる黒酵母菌 (*Aureobasidium pullulans*) の産生物質として多糖類 (β グルカン) に着目し、バイオリアクター (攪拌型発酵槽) による発酵条件の検討を実施した。その結果、糖質化スペクトルが広く、D-ガラクトース、L-ソルボース、D-リボース、クエン酸塩、グルカル酸塩を糖質源としてよく生育した。生育速度は遅いが、糖質源としてシュークロース

からオリゴ糖 (2~5糖) や多糖 (β グルカン) を生産する特徴も見出すことができた。

8) 有害生物の制御処理技術に関する基礎研究

室内汚染真菌の防止対策の一環として、TBZ ならびに ZPT による抗菌剤の効果を検討した。TBZ は *Cladosporium* 属や *Alternaria* 属、ZPT については *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属に対して強い抵抗性を認めたが、これら2種抗菌剤を Checker board 法で評価したところ、いずれの真菌も MIC 値が低濃度化する傾向が認められ、その併用効果が期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高鳥浩介, 相原真紀: 住環境と真菌アレルギー 健康創造研究会誌 2(1): 27-34 (2003)
- 2) 高鳥浩介, 相原真紀: 家庭環境と防菌防黴防菌防黴 31: 663-667(2003)
- 3) 土肥友恵, 田中辰明, 李憲俊, 相原真紀, 高鳥浩介: 住環境由来真菌の建築資材等基質への付着および初期発育 防菌防黴 31(6): 319-322 (2003)
- 4) 高鳥浩介, 相原真紀: 病原性真菌の今日的意味 4. 真菌とアレルギー 化学療法の領域 20(3): 351-355 (2004)
- 5) Yasueda H, Saito A, Nishioka K, Kutsuwada K, Akiyama K: Measurement of Dermatophagoides mite allergens on bedding and human skin surfaces. Clin Exp Allergy 33: 1654-1658 (2003)
- 6) 安枝浩: 環境アレルギー量測定とその意義. アレルギーの臨床 23: 701-706 (2003)
- 7) 高橋淳子, 栗原綱義, 小井土重則, 大沢高温, 井上修, 阿部矩久, 進藤誠一郎, 高松輝雄, 曾根義一, 矢根五三美, 相川文彦, 井尻晴久, 高鳥浩介. 過去3年間における冷却塔水の衛生学的見地からの評価. ビルと環境, 101, 25-28 (2003)
- 8) 高鳥浩介, 松村芳多子, 高橋淳子. 居住環境と真菌. 空気調和・衛生工学会誌, 78, 47-52 (2004)
- 9) 椿 和文, 杉山 宏, 東海林義和 大麦 β グルカンとその生理機能性 アレルギーの臨床 Vol. 310 (No. 23-11月号), 41-45, 2003

2. 学会発表

- 1) 齋藤明美, 轡田和子, 安枝浩, 秋山一男, 岡田千春, 高橋清: テープ法による生活環境中アレルギー量の評価. 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003. 5. 12. 横浜.

- 2) 西岡謙二, 齋藤明美, 山田節, 齋藤博久, 秋山一男, 安枝浩: アトピー性皮膚炎乳幼児の皮膚表面ダニアレルゲン量. 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003. 10. 23. 岐阜.
- 3) 高橋淳子, 栗原綱義, 小井土重則, 大沢高温, 井上修, 阿部矩久, 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. 過去 3 年間における冷却塔水の衛生学的見地からの評価. 第 30 回建築物環境衛生管理全国大会, 2003. 1 (大会最優秀賞を受賞)
- 4) 高橋淳子, 範文平, 松木容彦, 井尻晴久, 高鳥浩介. 過去 3 年間における冷却塔水の衛生学的見地からの評価. 日本防菌防黴学会第 30 回年次大会, 2003. 5
- 5) 高橋淳子, 村山志帆, 松木容彦, 栗原綱義, 青木信道, 大沢高温, 井上修, 高松輝雄, 大曾根義一, 佐久間豊夫, 松本秀章, 矢根五三美, 相川文彦, 高鳥浩介. 専用水道 (自己水源) における新水質基準に対する対応について. 第 31 回建築物環境衛生管理全国大会, 2004.
- 6) 李憲俊, 相原真紀, 高鳥浩介 Growth of Cladosporium and Phoma in Silicon. Joint Meeting of IBBS & IBRG on Management & Control of Microbiology. Manchester, UK 大麦 β グルカンの抗体産生修飾作用の解析
- 7) 椿和文, 東海林義和, 池澤善郎 日本アレルギー学会春期臨床集会 (2003. 05. 12)
- 8) 椿和文, 相原真紀, 高鳥浩介, 東海林義和, 山崎正利, 他 黒酵母 (Aureobasidium pullulans) が発酵生産するグルカンの BRM 様活性 日本薬学会第 124 年会 (2004. 03. 29)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成15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16年9月30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