

201330031A

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

東日本大震災にみる災害時居住環境を汚染する真菌の
アレルギーリスク評価及び予防衛生管理に関する研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 渡辺 麻衣子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成26(2014)年3月

目次

総括研究報告

東日本大震災にみる災害時居住環境を汚染する真菌のアレルギーリスク評価
及び予防衛生管理に関する研究

協力研究報告書

仮設住宅内空気の真菌叢とその発育性の評価に関する研究・・・・・・・・・・1

協力研究報告書

室内環境を汚染する真菌のアレルゲンの多様性に関する研究・・・・・・・・・・9

図表

・・・・・・・・・・13

総括研究報告書

東日本大震災にみる災害時居住環境を汚染する真菌のアレルギーリスク評価
及び予防衛生管理に関する研究

協力研究報告書

応急仮設住宅内空気の真菌叢とその生育性の評価に関する研究

研究代表者	渡辺 麻衣子	(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
研究協力者	小沼 ルミ	(東京都立産業技術研究センター)
	山崎 朗子	(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
	長 純一	(石巻市立病院開成仮診療所)
	矢内 勝	(石巻赤十字病院 呼吸器内科)
	小林 誠一	(石巻赤十字病院 呼吸器内科)
	石田 雅嗣	(石巻赤十字病院 呼吸器内科)
	釣木澤 尚実	(国立病院機構相模原病院 アレルギー科)
	押方 智也子	(国立病院機構相模原病院 呼吸器科)
	斎藤 明美	(国立病院機構相模原病院 臨床研究センター)

研究要旨

H24・25年度に宮城県石巻市で行った仮設住宅室内空気サンプルからの分離真菌株の同定および空気汚染真菌数の解析を行った。また、仮設住宅に居住する真菌性アレルギー患者宅の経時的に採取した室内空気サンプルを入手したので、ここからも同様の実験および解析を行った。さらに、培養条件によるアレルギーリスク増減の評価の基礎データとするため、JIS Z 2911:2010 かび抵抗性試験方法に準拠した方法で、被災地住宅に実際に使われている建材上での培養実験による真菌生育性評価を行った。その結果、仮設住宅室内空気は、年間を通じて非常に高い濃度の真菌に汚染されており、津波浸水した賃貸住宅仮設住宅と同程度、冬季はそれ以上の真菌数を示したことが確認された。また、石巻市内の仮設住宅間でも、冬季には汚染程度には差が見られた。採取された室内空気からは、*Aspergillus* 属菌が通常見られる割合よりも多く検出される傾向にあった。本菌はアレルゲン性が高い真菌として知られ、注意が必要である。なお、真菌アレルギー患者宅室内空気真菌叢の推移を確認したところ、6月に

は、非被災世帯住宅室内と比較して、*Aspergillus* と *Eurotium* 属菌の異常な菌数増加が見られたが、6月のサンプリング後、医師の指導によって寝室で使用していた畳を廃棄した後、菌数の上昇する秋季になっても真菌数の増加は見られず、良好な真菌数を保っていた。

さらに、被災地住宅建材上での真菌培養試験を行った結果、被災地住宅の建設に使用されている建材、特に石膏天井パネルと畳は、室温・高湿度条件でカビが生えやすく、注意が必要であると考えられた。

A. 研究目的

室内空気環境中には、通常、浮遊真菌が常在しており、真菌は住環境においては普遍的な微生物であるが、真菌の発育を促進するような条件が室内に整った場合、室内で特異的に真菌の異常発育が見られることがある。災害時には、住環境の温度・湿度がコントロール不能に陥る、または清掃が行き届かない等住環境衛生に問題が生じやすいことから、真菌の異常発育の状態に陥りやすい。

2011年3月、東日本大震災が発生し、本震災に係る応急仮設住宅（仮設住宅）が、7県、岩手県、宮城県、福島県、茨城県、栃木県、千葉県、長野県に、約5.3万戸建設された。入居者数は2014年9月現在でもなお約10.4万人にのぼる¹⁾。また、被災地における恒久住宅の整備になお時間を要する状況にあることから、仮設住宅の供与期間は3年間に延長され、さらに仮設住宅の全ての居住者が転出するまでには7年間に要する見込みであるという。仮設住宅では、2011年から、住人の間で室内でのカビの発生が大きな問題となっており、行政や自治会への苦情、対策の実行への要望が多く寄せられていた。本研究代表者は、H24年度にのべ31世帯のプレハブ仮設住宅の真菌調査を行い、一般住宅と比較して室

内空気真菌数が非常に高い傾向にあることを示した²⁾。

プレハブ仮設住宅が真菌汚染を受けやすい住宅である傾向が示されてきたが、この状況を改善するためには、この傾向が、団地毎の建築構造的または地理的な理由によるものか、住人の個々の住まい方による影響が大きいのか、またはこれら複数の要因が同時に影響して生じているものなのかを、明らかにする必要がある。さらに、仮設住宅室内真菌叢の詳細を解析し、菌量および検出菌種の観点から、仮設住宅室内に生じている真菌叢の健康リスクを評価する必要がある。

本研究では、住環境を汚染する真菌のリスク評価および真菌アレルゲン汚染の改善と予防衛生管理を行うことを目的としている。今年度は、プレハブ仮設住宅の室内真菌叢と、同地域にある異なるタイプの被災住宅の室内真菌叢を継時的・空間的に比較解析し、また昨年度分離・保存した菌株の分類・同定を行って、仮設住宅の真菌汚染の現状把握と、原因についての知見を得た。さらに、実際に使用されている仮設住宅建材におけるカビ発育性の検討を行い、仮設住宅建材におけるカビとの親和性を実験的に検証した。

B. 研究方法

(1) 仮設住宅における室内真菌叢の解析

H24年から25年度にかけて、宮城県石巻市内のプレハブ製の応急仮設住宅として、津波による浸水を受けた地域に近接している開成第一・第二仮設団地（開成団地）、および浸水地域と離れた高所にある城内仮設団地（城内団地）を選択し（図1）、のべ46世帯で調査を行った。各世帯の寝室・リビング・台所、および同じ団地敷地内の外気を対象として真菌のサンプリングを行った。また、これらと比較するために、別の研究課題として本研究代表者によって同地域で行われた、津波被災床上浸水住宅に対する真菌汚染調査の結果と、比較解析を行った（表1）。床上浸水住宅として、賃貸住宅および一戸建ての持ち家を対象とした。さらに、石巻市内医療機関の研究協力者から、仮設住宅居住者から真菌性ぜんそく患者の発生の情報、および患者宅室内から経時的に採取した空気サンプルを得たので、真菌叢の解析を行った。

各世帯では、居住者の許可が得られるかぎり寝室、台所、居室の3地点（図2）でのサンプリングを行った。サンプリング手法としては、衝突法によるエアサンプラー（エアサンプラー エアーイデアル 3P™；シスメックス・ビオメリユ株式会社、東京）を用いて空気浮遊真菌を採取した。寒天平板培地として、好湿性真菌の分離に適するDRBC寒天培地（OXOID、アメリカ）、および好乾性真菌の分離に適するDG-18寒天培地（OXOID）を用いた（図3）。1部屋あたりで、これら2種類の培地それぞれ3～5枚に室内空気を採取した。1枚の培地に採取する空気量は、10～100Lと

した。空気採取後の培地を実験室内で4～7日間25℃で培養後、生じたコロニー数を計測し、空気1m³当りの総真菌数値を算出した。この値を、エアサンプラーに付属のMPN表を用いてMPN値に換算した。また、サンプリング時での気温および相対湿度を計測した。DRBCおよびDG-18寒天平板培地上に生じたコロニーについて、実体顕微鏡および光学顕微鏡で観察しておおまかに分類し、その部屋において優占種となっている菌種のコロニーを釣菌して分離した。分離株は、ポテト・デキストロース寒天平板培地（PDA；栄研化学、東京）に接種し、10から14日間25℃で培養の後、目視によるコロニー性状の観察、および顕微鏡によるプレパラート観察を行い、形態学的性状に基づき同定した。

（倫理面への配慮）

被災地でサンプリングを行うにあたり、個人の住宅を訪問する必要があるため、不利益・危険性の排除等についてのインフォームド・コンセントを十分に行った。また、患者宅真菌叢の調査にあたっては、国立医薬品食品衛生研究所倫理審査委員会の承認を得た。

(2) 仮設住宅建材におけるカビ発育性の検討

仮設住宅建材を入手してカビ接種実験を行い、それら建材におけるカビの親和性を実験的に検証した。建材は、実際に仮設住宅建設に使用されているメーカーの建材を含む6品目（天井パネル用石膏ボード、天井パネル用木材ボード、畳、発泡スチロール、クッションフロアシート、タイルカーペット）合計16種類の商品を供試した（表2）。なお、実際に石巻市内仮設住宅で最も汎用的に使用されて

いる天井パネルは、表 2 におけるサンプル 8 (メーカー C 木材天井パネル 1)、一部の仮設住宅で使用されている天井パネルは、表 2 におけるサンプル 1 または 3 (石膏ボードタイプ 1) である。

接種実験は、JIS Z 2911:2010 かび抵抗性試験方法「6. 一般工業製品の試験」に準拠した方法で行った。試験接種菌には以下の 5 菌種を供試した；① *Aspergillus niger* NBRC 105649、② *Penicillium citrinum* NBRC 6352、③ *Rhizopus oryzae* NBRC 31005、④ *Cladosporium cladosporioides* NBRC 6348、⑤ *Chaetomium globosum* NBRC 6347。上記接種菌を PDA 平板培地に接種し、25℃で 7 日間培養して、十分な生育を確認した後に、孢子懸濁液作成に供した。上記 5 種の試験菌について孢子を約 10^6 個/ml となるように湿潤剤添加滅菌水 (スルホコハク酸ジオクチルナトリウム 50mg/l) 10ml に懸濁させ、それぞれの単一孢子懸濁液を等容量ずつ混合してろ過したものを混合孢子懸濁液とした。滅菌シャーレ内に静置した試料に混合孢子懸濁液を一定量噴霧した後、加湿用水槽と共に密閉容器 (17L) に入れた。26℃に設定した恒温器 (三洋電機(株)製 MIR-254) に試験片を入れた密閉容器を設置し、培養後 28 日目および 80 日目で、試料を肉眼および実体顕微鏡約 20 倍で観察し結果を判定した。培養中の密閉容器内は温度 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 95%以上を保持することとした。生育性の判定基準としては、「0 : 試料又は試験片の接種した部分に菌糸の発育が認められない」、「1 : 試料又は試験片の接種した部分に認められる菌糸の発育部分の面積は、全面積の 1/3 を超えない」、「2 :

試料又は試験片の接種した部分に認められる菌糸の発育部分の面積は、全面積の 1/3 を超える」の 3 段階によるものとした。

C. 研究結果

(1) 仮設住宅における室内真菌叢の解析

H24 および 25 年度の調査で得た、仮設住宅室内空気 1 m^3 あたりの真菌汚染レベルの程度をより正確に把握するため、床上浸水した賃貸住宅および一戸建ての持ち家における調査結果 (データ未発表) との間で比較解析を行った (図 4)。DRBC を用いて計測した好湿性真菌および DB-18 を用いて計測した好乾性真菌の、両方のデータを用いた。その結果、好湿性真菌数と好乾性真菌数の増減は同様の傾向を示し、仮設住宅の室内空気は、年間を通じて、多くの世帯において、本研究での検出上限値である空気 1 m^3 あたりの真菌数 163,200 CFU を記録した。被災していない一般家屋の真菌汚染の基準値は、空気 1 m^3 あたりの孢子数 1,000 CFU とされており³⁾、この値をはるかに超える真菌数が多くの世帯で記録されたことから、仮設住宅では、被災していない一般家屋と比較して、真菌数は年間を通じて非常に高い傾向にあることが確認された。また、津波浸水家屋では、空気 1 m^3 あたりの真菌数は、持家では 16,880 CFU、賃貸住宅では 163,200 CFU であった (データ未発表)。賃貸住宅と仮設住宅では、一般的な家屋の真菌汚染の指標とされる 1,000 CFU を超える程度が著しく、特に仮設住宅では、真菌数は年間を通じて非常に高い傾向があり、津波浸水家屋にも見られない特徴があることが確認された。

また、真菌サンプリングを行った世帯での気温・相対湿度の推移について、部屋を区別せず集計し、仮設住宅では団地ごとにまとめ、津波浸水した賃貸住宅の値と比較した(図7)。その結果、城内団地でのみ年間を通じて高い値を示した。よって、冬季(3月)の湿度において、仮設住宅と津波浸水を受けた賃貸住宅間で差が有り、仮設住宅だけを比較しても団地間で差があることが示された。

さらに、検出真菌数を住宅タイプごとに部屋を区別せず集計し、各月の真菌数平均値の比較解析を行った。その結果を、DRBCを用いて計測した好湿性菌については図8に、好乾性菌については図9に示した。室内を汚染する菌数は、好乾性真菌数のほうが全体的に高い菌数を示す傾向が見られたものの、好湿性と好乾性真菌数の増減は、互いにおおむね同様の傾向を示した。特に8月および3月において、城内団地でのみ菌数の最大値が著しく大きく世帯間でばらつきが見られ、開成団地および津波浸水を受けた賃貸住宅ではこの傾向は比較的小さく、仮設住宅団地間でも、室内真菌汚染の傾向には顕著な差があることが示された。

また、H24 および H25 年度に分離した、室内空気から優占的に検出された真菌群の分離株の同定を行った(図5)。その結果、多くの世帯の室内空気からは、アレルギー性が最も強い真菌のひとつとして認識されている *Aspergillus* 属菌の検出頻度は、被災していない一般的な住宅室内の傾向よりも比較的高かった(図6)。*Aspergillus* 属菌のうち、*A. versicolor* および *Aspergillus* 属菌の有性世代である *Eurotium* 属菌の検出頻度・濃度が高

いレベルにあることが明らかとなった。

さらに、仮設住宅に居住する真菌性ぜんそく患者宅室内の真菌叢の解析を行い、その結果を図10に示した。6月の初回調査時の真菌叢は、好乾性真菌数において、検出上限値である163,200 CFUを記録し、そのうち優占的に検出されたのは *Eurotium* 属菌であった。*Aspergillus* 属菌も通常よりも多く検出され、上記 *A. versicolor* の割合も高かった。この調査の後に、医師の指導により寝室の畳を排除し、環境整備方法の指導を行ったところ、それ以降の調査では、総真菌数自体が著しく低下し、*Eurotium*、*Aspergillus* 属菌ともに割合の低下が見られた。

(2) 仮設住宅建材におけるカビ発育性の検討

H24・25年度に調査を行った仮設団地のうち城内団地のみで、天井パネルでの著しいカビ発育が多く、世帯で観察された。また、本研究の今年度の研究成果から、当団地は、室内の真菌汚染レベルが高い津波浸水を受けた賃貸住宅および開成団地と比較しても、特に夏季と冬季で特に著しい真菌汚染がある世帯が多いということが明らかとなった。この二つの仮設住宅は、異なるタイプの建材の使用により建設されており、この真菌汚染レベルの違いが生じている原因の一つとして、天井パネルの材質の差異にある可能性を考えた。

そこで、培養条件によるアレルギーリスク増減の評価の基礎データとするため、被災地住宅に実際に使われている建材上での培養実験による真菌生育性評価を行った(表2)。実際に一部の石巻市内仮設住宅で天井パネルとして使用されている表2におけるサンプル1

または3（石膏ボードタイプ1）と、仮設住宅で一般的に天井パネルとして使用されている表2におけるサンプル8（メーカーC木材天井パネル1）における生育状況を比較した。その結果、培養28日目では、前者はサンプル1および3両方で目視でも生育が認められ、後者は目視では生育が認められなかった。培養80日目では（表2、図11）目視、顕微鏡ともに明確な差が認められ、サンプル1または3（石膏ボードタイプ1）は、高湿度条件下ではカビが生えやすい傾向にあることが示された。また、天井パネル以外の建材についても同様の検討を行った結果、複数の製品の畳において、高湿度条件下ではカビが生えやすい傾向にあることが示された。

D. 考察

(1) 仮設住宅における室内真菌叢の解析

仮設住宅室内空気を汚染する真菌数は、同地域の他の被災家屋よりも年間を通じて非常に高い数値を示したことが確認された。仮設団地間でも、特に冬季の真菌数に差が見られた。真菌数がより高かった城内団地では、冬季に比較的高い室内湿度を示しており、また、この団地の天井パネルでは、目視で著しいカビ生育が複数世帯で確認された。高い空気中の真菌数は、この天井パネルの真菌や室内の高湿度の状態と関係がある可能性が考えられた。

また、国内の被災していない一般的な室内空気からは、通常 *Penicillium* 属菌や *Cladosporium* 属菌のほうが高頻度に検出されることが知られている。本研究で調査された仮設住宅室内空気からは、*Aspergillus* 属

菌が通常よりも多く検出される傾向にあった。本菌はアレルギー性が高い真菌として知られ、注意が必要であることが示唆された。さらに、*Aspergillus* 属菌のうち、*A. versicolor* および *Aspergillus* 属菌の有性世代である *Eurotium* 属菌の汚染濃度が特に高い傾向が示されたことから、仮設住宅室内のアレルギーリスクを評価するためには、今後これらの菌種のアレルギー性について、十分に検討する必要があると考えられた。

(2) 仮設住宅建材におけるカビ発育性の検討

上述のとおり、城内団地では、特に天井において目視での真菌汚染が頻繁に確認された。これは、他の仮設団地では比較的に見られない現象であり、天井材がかびやすい材質である可能性等、城内団地特有の原因が存在する可能性が考えられた。建築資材においては、高吸湿性や、物理的な表面性状・化学的性状は、直接的に真菌の生育しやすさに影響を及ぼす。城内団地での3月の高い真菌数の原因としては、直接的には冬季の室内の高湿度が影響している可能性が非常に高い。この高湿度をもたらしている要因のひとつとして、冬季の結露が考えられる。カビ発育が著しい場所は、パネル表面温度が周囲より低く、結露発生がひどい傾向にあることが確認された（データ未発表）。

また、本研究の成果から、サンプル1または3のタイプの石膏ボードは、サンプル8のタイプの木材合板パネルよりも高湿度条件下でカビが生えやすいことが明らかとなった。城内団地の天井パネルは、サンプル1または3のタイプの石膏ボードである可能性が高く、

結露によって吸湿し、カビの生育を促した可能性が考えられた。今後、結露を防ぐための措置を行った場合に、天井パネルに生育する目視確認可能なカビが減少するか否かを確認するなど、天井パネルと天井の結露との組み合わせと室内汚染カビ数の関係性を十分に検討する必要があると考えられた。

しかしながら、仮設住宅の高濃度真菌汚染は、城内団地以外でも多くの団地で発生していることから、天井パネルの材質と結露の影響によるものと断定されたわけではなく、またこれだけが原因になっているとは考えにくい。今後も、住人の住まい方やその他の建築条件、気候や土地の地理学的条件など、多様な条件の影響について検討を続ける必要があると考えられた。

E. 結論

仮設住宅室内空気は、真菌数は年間を通じて非常に高い数値を示したことが確認された。また、*Aspergillus* 属菌が通常よりも多く検出される傾向にあった。本菌はアレルギー性が高い真菌として知られ、注意が必要であることが示された。また、一部の被災地住宅の建設に使用されている建材には、室温・高湿度条件で特にカビが生えやすく、注意が必要であることが明らかとなった。しかし、この他の仮設団地でも高濃度真菌汚染は発生していることからこれだけが真菌の異常生育の原因とは考えにくく、多様な条件の影響について検討を続ける必要があると考えられた。

F. 参考文献

1. 復興庁, 東日本大震災からの復興の状況

に関する報告. 平成 24 年 11 月.
http://www.reconstruction.go.jp/topics/main-cat1/sub-cat1-1/20131112_kokkaihoukoku.pdf

2. 渡辺麻衣子, 東日本大震災にみる災害時居住環境を汚染する真菌のアレルギーリスク評価及び予防衛生管理に関する研究. 2013. 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業, 平成 24 年度 総括研究報告書.
3. 柳ら, 居住環境における健康維持増進に関する研究 その 9. 2009. 学術講演梗概集, D-1. p. 1001-1002. 日本建築学会.

G. 研究発表

1. 誌上发表

特に無し。

2. 学会発表

押方智也子, 釣木澤尚実, 斎藤明美, 渡辺麻衣子, 鎌田洋一, 斎藤博士, 粒来崇博, 前田裕二, 安枝 浩, 秋山一男. 環境改善が治療として奏功した *Penicillium* 属によるアレルギー性気管支肺真菌症の一例. 第 44 回日本職業・環境アレルギー学会総会学術大会, 相模原市, 2013. 07.

渡辺麻衣子, 山崎朗子, 小沼ルミ, 横瀬英里子, 園田 愛, 瓦田研介, 林健太郎, 武藤真祐, 鎌田洋一. 東日本大震災被災地における住宅タイプでみた空中浮遊真菌数の比較検討. 日本防菌防黴学会 第 40 回年次大会, 吹田, 2013. 09

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

I. 健康危害情報

宮城県石巻市内の応急仮設団地に居住する住民の中で、*Eurotium herbariorum* および *Aspergillus fumigatus* によるアレルギー性気管支肺真菌症が発生した。当該患者の主治医は石巻市立病院開成仮診療所長の長医師であり、石巻赤十字病院 石田医師および国立病院機構相模原病院 釣木澤医師の診断を受けた。両医師の診断によると、当該患者は、小児喘息の既往があり、震災後、応急仮設住宅に入居後に喘息発作が再発した。自宅環境から分離された真菌株から作製された抗原による各種抗原曝露試験および血清学的試験の実施によって、確定診断を受けたものである。上述の発症歴および自宅室内環境から当該原因菌は分離されていることから、自宅室内真菌叢からの影響である可能性が示唆されている。

総括研究報告書

東日本大震災にみる災害時居住環境を汚染する真菌のアレルギーリスク評価
及び予防衛生管理に関する研究

協力研究報告書

室内環境を汚染する真菌のアレルゲンの多様性に関する研究

研究代表者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
研究協力者 鎌田 洋一 (岩手大学 農学部獣医学科)
小沼 ルミ (東京都立産業技術研究センター)

研究要旨

石巻市内仮設住宅室内空気中から多く検出された *Aspergillus versicolor* の実際の分離株を用いて、アレルゲン遺伝子のアミノ酸配列の多様性について検討する目的で、複数の *A. versicolor* 分離株のアレルゲン遺伝子 Asp-v-13 のアミノ酸配列を決定し、比較解析を行った。その結果、*A. versicolor* の Asp_v_13 において、アミノ酸配列の多様性が確認され、10 の新たな allele が発見された。最もメジャーなアレルは、既存の登録配列とは異なる新規のアレルであった。エピトープの欠失および新規エピトープの出現が予想され、同一菌種内でもアレルゲン性の程度に違いがある可能性が示された。H26 年度の遺伝子発現解析および免疫学的実験の実施の際には、エピトープの多様性に考慮する必要があると考えられた。

A. 研究目的

このような室内空気環境中では真菌は増殖する一方で、真菌叢も通常時と比較して大きく変動し、真菌叢は少数の真菌で大部分を占められることが多い。これら高検出真菌はヒトへの暴露量が多く、特に危害性を検証する必要がある。

住環境の真菌汚染がもたらすヒトへの健康

被害の中でも、アレルギーは、あらゆる年齢層が罹患し、患者数も非常に多い疾患群である。本研究代表者の今年度の研究成果から、仮設住宅の多くの世帯の室内空気では、アレルギー性が最も強い真菌のひとつとして認識されている *Aspergillus* 属菌の検出頻度は、被災していない一般的な住宅室内の傾向よりも比較的高く (図6)、*Aspergillus* 属菌のう

ち、*A. versicolor* および *Aspergillus* 属菌の有性世代である *Eurotium* 属菌の検出頻度・濃度が高いレベルにあることが明らかとなった。*Eurotium* 属菌は呼吸器アレルギー疾患の原因となった事例がある(私信)ものの、アレルギータンパクや遺伝子の特定には至っていない。*A. versicolor* は患者発生事例の報告があり、さらに患者血清中の抗体と結合性のあるアレルギータンパクの産生が確認され、ゲノム中にアレルギー産生遺伝子 Asp-v-13 の存在も報告されており、エピトープ部位の特定もなされている¹⁾。仮設住宅において本菌によるアレルギー被害が懸念される。一方で、*A. versicolor* と同定された株の中に、形態的特徴に差異が見られる株が存在し、種内で形態的多様性が認められた。また、本研究の研究代表者らの過去の研究から、*Aspergillus fumigatus* はアレルギー遺伝子 Asp-f-3 のアミノ酸配列に多様性を持ち、新たなエピトープの出現も確認された²⁾。これらのことから、*A. versicolor* は種内で遺伝的多様性が存在し、株間でのアレルギー性も多様性を持つ可能性が考えられる。

そこで本研究では、Asp-v-13 の多様性の有無を確認することを目的として、仮設住宅室内空気から本研究に成果によって数多く分離された *A. versicolor* 分離株を用いて、アミノ酸シークエンスの比較解析を行った。

B. 研究方法

本研究のH24および25年度の研究成果から得られた、石巻市内仮設住宅室内空気由来の *A. versicolor* 31株を供試した。過去の研究結果を参照し、真菌からのDNA抽出に適した菌体培養法および SDS 法²⁾を用いて、*A.*

versicolor 菌体からDNA抽出を行った。PCR反応およびシークエンス反応には、過去の研究¹⁾から引用したプライマーおよび反応条件を用いた。PCR反応は TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を、シークエンス反応は BigDye Terminators v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) をそれぞれ用いて行った。各反応は、添付の実験マニュアルに従って行った。シークエンス反応産物の電気泳動は Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた塩基配列は、GENETYX ver. 10 (ゼネティックス) を用いて編集した。塩基配列の翻訳およびアミノ酸配列のマルチプルアライメントは、Mega ver. 4.1³⁾を用いて行った。アミノ酸配列におけるエピトープ部位は、過去の研究結果¹⁾を参照して特定した。

C. 研究結果

Asp_v_13 のアミノ酸配列を株間で比較した結果を図12に示す。31株の *A. versicolor* の Asp_v_13 アミノ酸配列には、10個の異なる allele が検出され、*A. versicolor* 種内における Asp_v_13 の遺伝的多様性が示された。また、検出された allele を協力研究者らが開発した真菌アレルギーデータベース³⁾を用いて検索したところ、10 allele のアミノ酸配列は全てこれまで報告されている *A. versicolor* の配列と異なっており(表3)、新規の報告となった。さらに詳細に配列を検討した結果、Asp_v_13 のエピトープ領域においても、allele 間でアミノ酸が異なる位置が存在することが明らかとなった(図12)。

D. 考察

石巻市内仮設住宅から分離された *A. versicolor* が持つ Asp-v-13 は、これまで報告されている本遺伝子の allele と全て異なるタイプであることが明らかとなったことから、国内に分布する *A. versicolor* はアレルゲン性の程度に違いを發揮する可能性が示唆された。また、これまでに予想されているエピトープ領域外にも多数のアミノ酸置換が検出されており、新たなエピトープの出現の可能性も考えられる。次年度に計画している遺伝子発現解析および免疫学的実験の実施の際には、エピトープの多様性を考慮した解析を行う必要があると考えられた。

E. 結論

国内に分布する *A. versicolor* のアレルゲン遺伝子において、アミノ酸配列の多様性が確認され、同一菌種内でもアレルゲン性の程度に違いがある可能性が示された。次年度に計画している遺伝子発現解析および免疫学的実験の実施の際には、エピトープの多様性に考慮する必要がある。

F. 参考文献

1. Shi and Miller, Characterization of the 41 kDa allergen Asp v 13, a subtilisin-like serine protease from *Aspergillus versicolor*. 2011. *Molecular Immunology* 48:1827-1834.
2. Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., et al.: Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. 2010. *J. Food Prot.*, 73:1077-1084.
3. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar,

S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. 2007. *Mol. Biol. Evol.*, 24:1596-1599.

4. <http://fungusallergen.org/>

G. 学会発表

1. 誌上発表

特に無し

2. 学会発表

大波純一, 渡辺麻衣子, 山田 修, 水谷 治, 高橋 徹, 川上裕司, 橋本一浩, 清水公德, 高橋治男, 横山耕治, 鎌田洋一: カビアレルゲンデータベースの構築. 日本農芸化学会 2014 年度大会, 東京, 2014. 03.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

図 表

表 1. 調査対象世帯内訳

調査期間	調査世帯数*		
	仮設住宅	賃貸	持ち家
2012.07	7	5	7
2012.08	12	3	1
2012.10	14	3	0
2013.03	13	4	0
計	46	15	8

*複数期間で重複する調査世帯有り

表2. 被災地住宅建材上での真菌培養試験結果

サンプル		試験結果*	
会社名	商品	目視	実体顕微鏡
1 メーカーA	石膏ボードタイプ1	1	1
2 メーカーA	石膏ボードタイプ2	2	2
3 メーカーB	石膏ボードタイプ1	2	2
4 メーカーB	石膏ボードタイプ2	2	2
5 メーカーC	木材天井パネル1	0	0**
6 メーカーC	木材天井パネル2	1	1
7 メーカーC	木材天井パネル3	0	0**
8 メーカーD	木材天井パネル	1	1
9 メーカーE	樹脂製畳表	1	2
10 メーカーE	ウォッシュャブル畳	1	2
11 メーカーE	樹脂製置き畳	0	1
12 メーカーF	畳	2	2
13 不明	発砲スチロール	0	0
14 不明	クッションフロアシート1	0	0
15 不明	クッションフロアシート2	0	0
16 メーカーG	タイルカーペット	0	1

* 試験結果の表示:

- 0: 試料又は試験片の接種した部分に菌糸の発育が認められない。
- 1: 試料又は試験片の接種した部分に認められる菌糸発育部分の面積は、全面積の1/3を超えない。
- 2: 試料又は試験片の接種した部分に認められる菌糸発育部分の面積は、全面積の1/3を超える。

** 側面にカビの生育有り

表3. 発見されたAsp_v_13の新規アレルごとの株数

Allele名	株数
allele_1	9
allele_2	5
allele_3	5
allele_4	4
allele_5	3
allele_6	1
allele_7	1
allele_8	1
allele_9	1
allele_10	1
既存allele	0

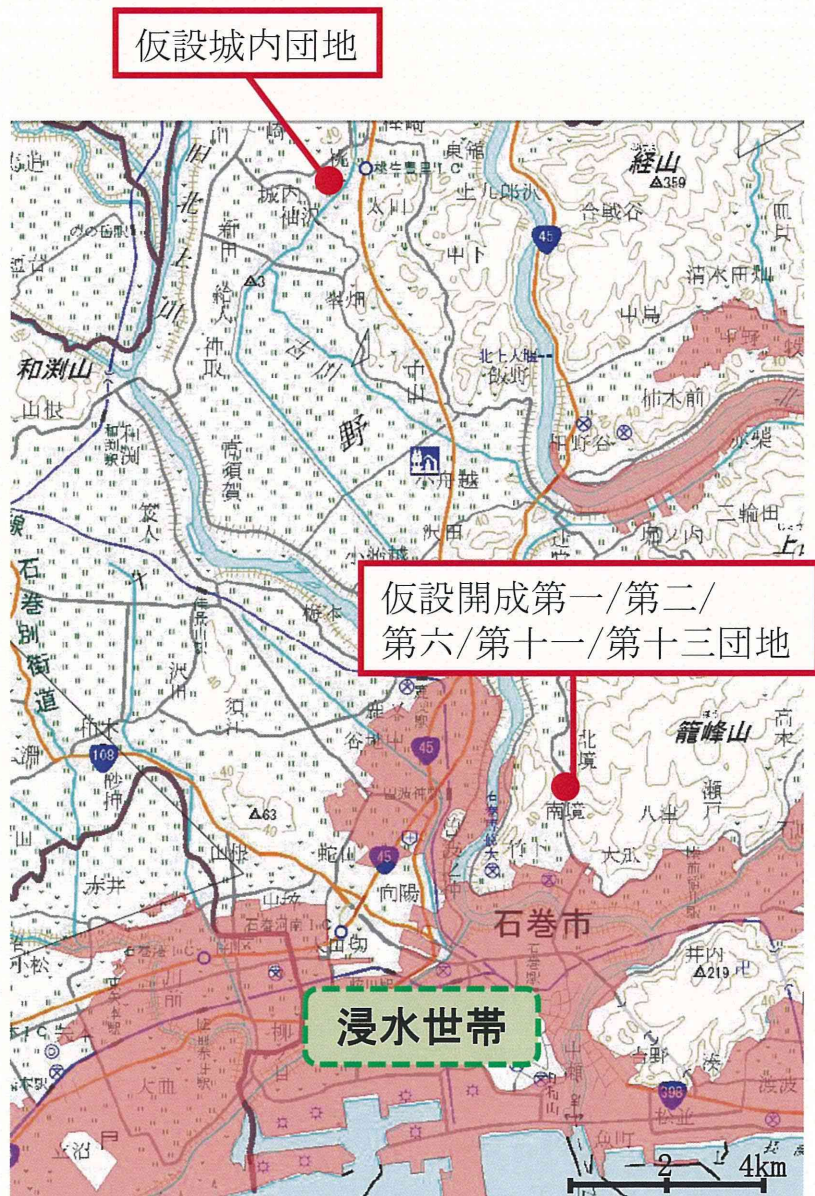
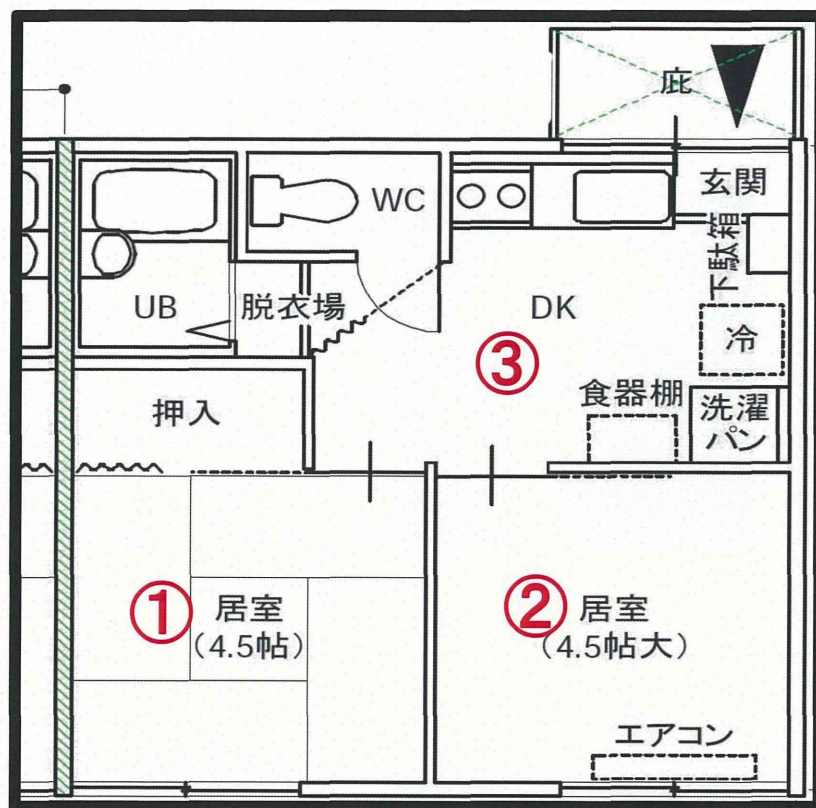


図1. 真菌サンプリングを行った団地位置
(宮城県石巻市内)

A



B

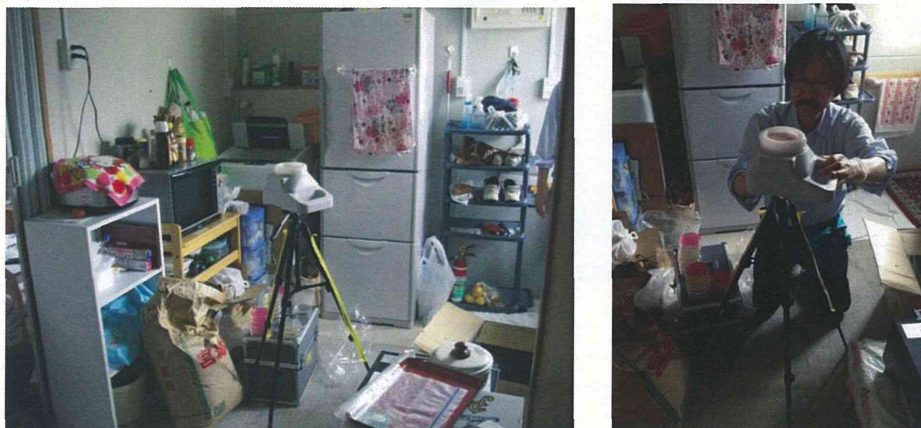


図 2. 応急仮設住宅における空気採取

(A) 応急仮設住宅の基本的な間取りおよび室内のサンプル採取地点。(B) 空気採取の様子。



	培地写真	代表的な培養真菌
DRBC (好湿性真菌に適する)		<i>Acremonium</i> spp. <i>Alternaria</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Clasdosporium</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. Yeast spp. Mycelia spp.
DG-18 (好乾性真菌に適する)		<i>Aspergillus</i> spp. <i>Aspergillus</i> <i>restrictus</i> <i>Clasdosporium</i> spp. <i>Eurotium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Wallemia</i> spp.

図 3. 培地上で培養された空気中の浮遊真菌サンプル
および当該培地で培養される代表的な菌種