

汚染調査によって、応急仮設住宅では一般的な住宅と比較して真菌汚染レベルが非常に高いことが顕在化した。この状況を改善するためには、真菌発育の要因を理解し、この傾向が、いずれの要因によって生じているものなのかを、明らかにする必要がある。そのためのアプローチのひとつとして、仮設住宅で実際に使用されている内装材等の建材と危害性真菌との親和性を把握することを目的として、複数建材を用いた真菌の接種実験を行い、発育程度についての検討を行った。

B. 研究方法

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。

平成 25 年度の検討では、試験接種菌として JIS Z 2911:2010 かび（真菌）抵抗性試験方法「6.一般工業製品の試験」に準拠した 5 菌種を用いた；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。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。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木材天井パネル、および一部の仮設住宅で使用されている化粧石膏ボード製パネルを含む。平成 26

年度には、試験接種菌として、本課題の他分担研究の成果から明らかとなった仮設住宅から高頻度で検出される 4 菌種に加え、医学分野で高アレルギー性菌種であることが知られる 2 菌種を供試した。建材は、平成 25 年度に使用したものと同一商品の、仮設住宅で使用される天井パネル 2 種類、および仮設住宅で使用される床材 2 種類、計 4 種類を使用した。

上記接種菌を適した寒天平板培地に接種し、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。それぞれ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（スルホはく酸ジオクチルナトリウム 50mg/l）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、温度 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 95%以上の条件で培養した。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で観察し結果を判定した。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

JIS かび抵抗性試験方法に準拠した 5 菌種を用いた検討の結果、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化粧石膏ボード製天井パネルと、仮設住宅で一般的に使用されている木材合板製天井パネル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、目視、顕微鏡ともに明確な差が認められ、化粧石膏ボードタイプは、高湿度条件下に長期間置いた場合では、一般的な真菌と親和性が高く、真菌が発育し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。

また、仮設住宅での検出頻度が高い真菌または高アレルギー性真菌を用いた検討の結果、

D. 考察

H24・25 年度に調査を行った仮設団地のうち団地 A 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、当該団地は、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団地 B 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、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。

上述のとおり、団地 A 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、団地 A 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。本研究の成果から、化粧石膏ボード製パネルは、木材合板パネルよりも高湿度条件で真菌が発育しやすいことが明らかとなった。また、団地 A では、真菌発育が著しい場所は、断熱の欠損等が発生しパネル表面温度が周囲より低く、局所的に結露発生または水分含有量が高くなる状態にあることが確認された¹⁾。団地 A の天井パネルは、化粧石膏ボード製であり、局所的に水分含有量が高くなった場所で、真菌の発育が促進され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、または逆に実験的に断熱欠損を生じさせた場合に真菌が自然発育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

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・高湿度条件で真菌が発育しやすく、特に高アレルギー性の菌種が高い発育性を示すため、注意が必要であることが明らかとなった。しかし、この建材を使用しない仮設団地でも高濃度真菌汚染は発生していることから、この建材の使用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) 長谷川兼一, 渡辺麻衣子, 石山 智, 木村悟隆. 仮設住宅建材におけるカビ発育性の検討-建材の含水状況の数値解析による分析-. 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会, 2014.9.

G. 研究発表

1. 誌上発表
特に無し

2. 学会発表

山崎朗子, 小沼ルミ, 長谷川兼一, 石山智, 木村悟隆, 瓦田研介, 工藤由起子, 鎌田洋一, 寺嶋淳, 渡辺麻衣子. 仮設住宅室内天井パネルにおけるカビ発育性の検討. 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会, 2014.9.

長谷川兼一, 渡辺麻衣子, 石山 智, 木村悟隆. 仮設住宅建材におけるカビ発育性の検討-建材の含水状況の数値解析による分析-. 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会, 2014.9.

- H. 知的財産権の出願・登録状況
特に無し。

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

分担研究報告書

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

研究分担者	渡辺 麻衣子	(国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者	鎌田 洋一	(岩手大学 農学部獣医学科)
	大波 純一	(独立行政法人科学技術振興機構 バイオデータベースセンター)
	小林 直樹	(東京工業大学大学院 生命理工学研究科)
	木村 悟隆	(長岡技術科学大学 工学部生物系)
	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 allele は、既存の登録配列とは異なる新規の allele であった。アミノ酸配列のアライメントから、配列の変異は報告されたエピトープを形成する配列部分にも入っており、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。さらに、菌株の系統解析を行ったところ、各系統においては明確な allele の偏りが認められ、Asp_v_13 の allele の出現と系統には相関関係があることが示された。当該菌の血清学的検査の妥当性を向上させるためには、同一菌種内の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

被災地の住環境における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。本課題の他分担研究の成果から、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いこと、*Aspergillus* 属菌のうちでは *A. versicolor* 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。*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。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* はアレルギー産生遺伝子 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。これらのことから、*A. versicolor* は種内においても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、アミノ酸シーケ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。菌体からの DNA 抽出の後、Asp-v-13 遺伝子、および供試菌株のゲノム全体の遺伝的多様性を検討するため β チューブリン(β -tub)遺伝子の PCR 反応およびシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。得られた Asp-v-13 遺伝子塩基配列は、アミノ酸配列に翻訳し、マルチプルアライメントを行った。アミノ酸配列におけるエピトープ部位は、過去の研究結果を参照して特定した。 β -tub 遺伝子は、系統解析の指標として用い、近隣結合法による供試菌株の系統樹を構築した。

C. 研究結果

Asp_v_13 遺伝子のアミノ酸配列を株間で比較した。31 株の *A. versicolor* の Asp_v_13 遺伝子アミノ酸配列には、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、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 遺伝子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。

β -tub 遺伝子塩基配列を指標として構築した系統樹を参照し、供試菌株をグルーピングしたところ、6 系統に分類された。各系統における allele 出現頻度を比較したところ、各系統と allele は完全に 1 対 1 の対応にはなら

なかったが、各系統においては明確な allele の偏りが認められ、Asp_v_13 の allele の出現と系統には相関関係があることが示された。

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* はアレルギー性の程度に違いを発揮する可能性が示唆された。同一菌種内でも複数の明確に分かれた系統が存在し、これと関連して各系統にはアレルギー性の程度に違いがある可能性が示された。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た。当該菌の血清学的検査の妥当性を向上させるためには、同一菌種内の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。

E. 結論

国内に分布する *A. versicolor* のアレルギー遺伝子において、アミノ酸配列の多様性が確認され、同一菌種内でも複数の明確に分かれた系統が存在し、これと関連して各系統にはアレルギー性の程度に違いがある可能性が示された。当該菌の血清学的検査の妥当性を向上させるためには、同一菌種内の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。

F. 研究発表

1. 誌上発表

特に無し

2. 学会発表

小沼ルミ, 渡辺麻衣子, 瓦田研介, 高鳥浩介, 小西良子, 鎌田洋一. *Aspergillus fumigatus* アレルゲン遺伝子の変異と菌分離由来の影響. 日本防菌防黴学会第 39 回年次大会, 2012.09.

鎌田洋一, 小沼ルミ, 渡辺麻衣子, 瓦田研介, 高鳥浩介, 小西良子. *Aspergillus fumigatus* アレルゲン遺伝子の変異と分離源との関連とエピトープへの影響. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2012.11.

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, 2014.3.

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とその活用. 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会, 2014.9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

無し

2. 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
渡辺麻衣子	室内環境のカビ毒汚染	かびと生活	6巻1号	24-29	2013
C. Oshikata, N. Tsurikisawa, A. Saito, M. Watanabe, Y. Kamata, M. Tanaka, T. Tsuburai, H. Mitomi, K. Takatori, H. Yasueda, K. Akiyama	Fatal pneumonia caused by <i>Penicillium</i> <i>digitatum</i> : a case report.	BMC Pulmonary Medicine	13巻	16	2013
渡辺麻衣子	東日本大震災被災地仮 設住宅におけるカビ発 生影響とその対策	都市有害生物 管理学会誌	印刷中	—	2015

特集

室内環境のカビ毒汚染

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第三室 室長

渡辺麻衣子

1. 住・労働環境のカビ

近年の住宅や労働施設は、気密性の高い建築様式を持ち、室内の温湿度管理が飛躍的に進んでいるという特徴を持ちます。このような環境はカビの増殖にも最適で、室内のカビ汚染は著しく増加しています。室内空気環境から検出されるカビの種類は、地域や季節などによって左右され、温度・湿度に依存して様々な様相を示すことが知られています。

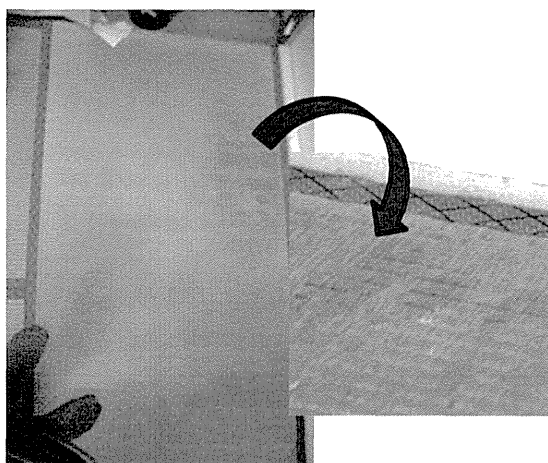
室内環境のカビ汚染がもたらすヒトへの健康危害としては、大きく分けて、感染症、アレルギー、二次代謝産物中毒の三つが挙げられます。これらのうち、感染症やアレルギーについては、患者数が多く、健康被害と原因の因果関係が比較的容易に認識できるために早い時期から注目され、研究が進んできました。二次代謝産物中毒については、近年、急激に新たな発見が増えてきました。微量分析技術の発達によって室内空気やハウスダスト中の化学物質の分析が盛んに行われるようになり、健康被害が起こった住環境や労働環境の空気やハウスダストから、カビの産生する二次代謝産物である微生物揮発性有機化合物 (MVOC) やカビ毒検出の報告¹⁾が急増しています。カビの孢子や菌糸といった菌体だけでなく、これらを吸引摂取することによるリスクについても知っておく必要があります。

す。

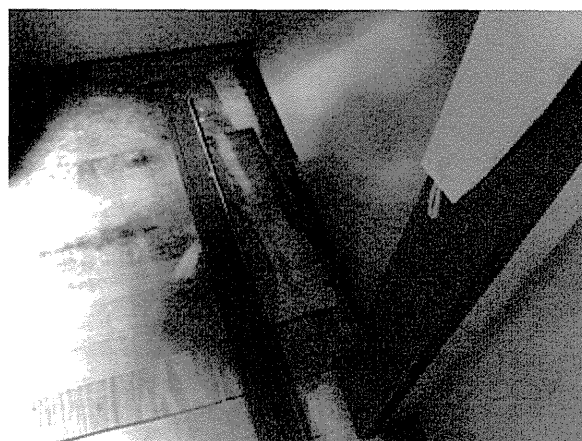
現在、最も注目されている室内環境のカビ汚染問題のひとつとして、東日本大震災被災地での仮設住宅の深刻なカビ汚染が挙げられます。仮設住宅は本来長期間の居住を想定しておらず、短期間にローコストで住宅を供給することが大きな目的であることから、一般住宅と比較して、断熱や換気性能は低く、また、使用している建材の特徴から、結露が非常に生じやすい建築構造になっています。さらに、居住者ひとりあたりの床面積が少なく、収納が少ない上に物が多いという状況に陥りやすく、カビ発生が起こりやすい環境にあります。著者の昨年度の調査からも、天井、畳上、畳下、布団下、押し入れ内、家具周辺等でのカビ発生(図1)が多数確認され、室内空気のカビ数が非被災地の一般住宅の約150倍以上もの値となった世帯がありました。同様の状況が各地の仮設住宅室内で報告されています。このような場合、室内環境を汚染するカビが及ぼす住人の方々への健康被害が懸念されますが、感染症やアレルギーだけでなく、カビ毒やMVOCによる健康被害も想定する必要があります。

2. ヒトの健康被害に関わるカビ毒

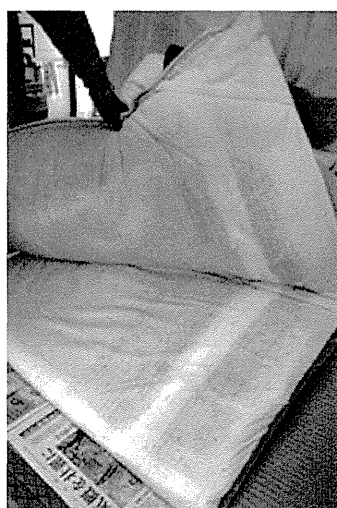
本稿では、室内環境を汚染することの多いカ



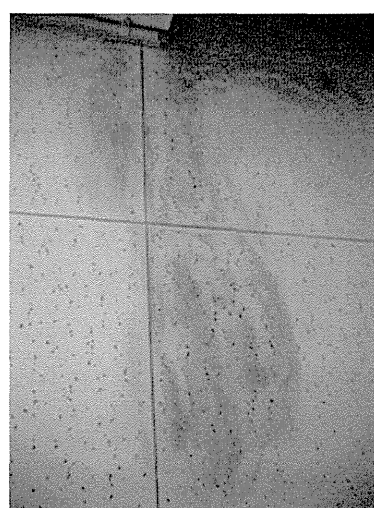
畳表面のカビ汚染



畳下のカビ汚染



敷布団のカビ汚染



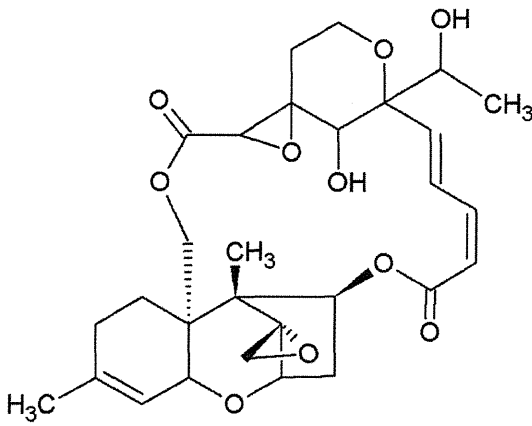
天井のカビ汚染

図 1. 仮設住宅のカビ汚染状況

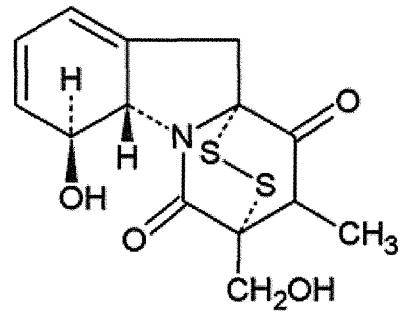
び産生二次代謝産物のうち、毒性が強いカビ毒について注目します。室内環境におけるカビ毒のヒト体内への吸収経路としては、目などの粘膜や皮膚からの浸潤、および呼吸器からの吸入の二つの経路が挙げられます。カビ毒による中毒症といえば食中毒が有名です。カビに汚染された食料中に蓄積されたカビ毒の摂食による大規模な食中毒事件が世界的に数多く発生し²⁾、早くから解明が進んでいます。これに対して、カビ毒の粘膜や皮膚からの浸潤や呼吸器からの

吸入がおよぼすヒトへの危害性については、関連研究が少なく、未知の点が多く残されています。しかしながら、室内環境をカビ毒が汚染すると、浸潤や吸入によってヒトが暴露される機会が多いことから、これらの吸収経路は健康に与える影響が大きいと考えられ、これらの経路でカビ毒を摂取した場合の危害の程度を明らかにすることは、重要な課題であると言えます。

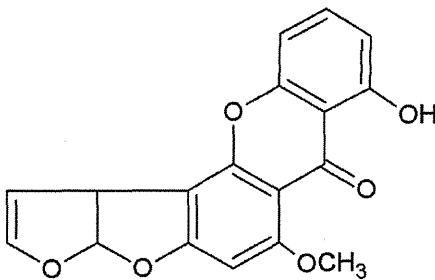
3. 室内環境を汚染するカビ毒



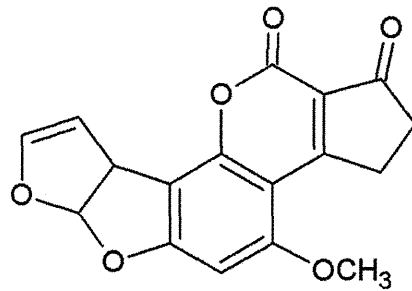
サトラトキシシン G



グリオトキシシン



ステリグマトシスチン



アフラトキシシン B₁

図 2. カビ毒の化学構造式

本稿では、室内環境を汚染するカビ毒およびその産生カビについて述べ、それらがどのようなヒトへの健康危害を引き起こす可能性があるのかについて解説しつつ、環境分野におけるカビ毒の重要性について考えていきたいと思います。

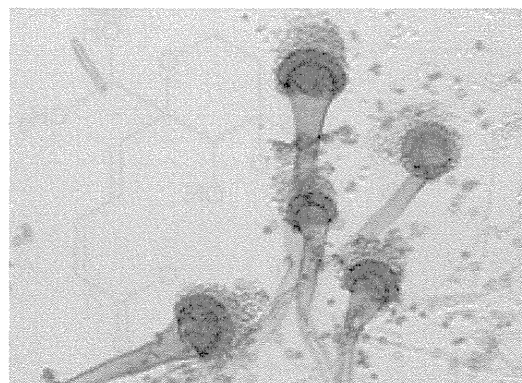
3-1. スタキボトリス・チャタラム *Stachybotrys chartarum* (以下 *S. chartarum*) が産生するサトラトキシシン

サトラトキシシンが関係する可能性があるヒトの健康危害が過去にアメリカで発生したことから、室内空気環境を汚染するカビ毒の中で研究報告が最も多いカビ毒です (図 3)。 *S. chartarum* (図 2) は土壌や空気中から通常検出されるカビ

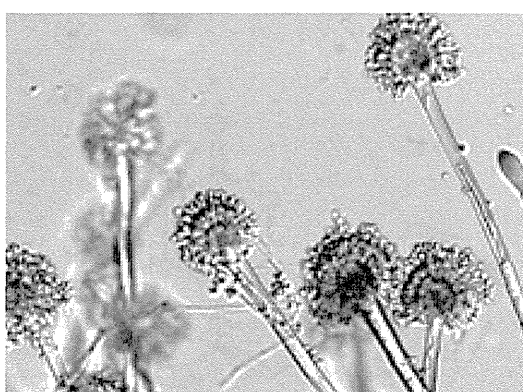
ですが、洪水や漏水などの水害を受けた高湿度の環境下では壁紙や建材に付着して旺盛に発育することが知られ、国内をはじめ世界各地で、水漏れ事故や水害時の浸水を受けた室内での異常発育が報告されています。1993 から 1994 年に発生したアメリカの洪水では、被災した建物の室内の多くで *S. chartarum* が大量に検出され、そこに居住する乳幼児の間で重篤な呼吸不全・肺出血を伴う肺症状が複数件発生し、死亡例も報告されました。この患者宅から分離された *S. chartarum* がサトラトキシシンを産生すること、室内からは最大で 1,400 pg/m³ ものサトラトキシシンが検出されたことから、 *S. chartarum* が産生するサトラトキシシンと肺症状との間の因果



スタキボトリス・チャタラム



アスペルギルス・フミガタス



アスペルギルス・バージカラー



アスペルギルス・フラブス

図3. カビ毒産生菌の顕微鏡像

関係が考えられています。サトラトキシン産生 *S. chartatum* 株の胞子をマウスに反復吸入させると、肺出血が引き起こされたという研究報告³⁾もあります。

さらに、最近の研究により、サトラトキシンをはじめとするカビ毒は、ヒト嗅覚細胞や神経系細胞にアポトーシスを過剰に引き起こすことが明らかとなり⁴⁾、嗅覚障害、嘔吐、頭痛、倦怠感などの症状を引き起こしてシックハウス症候群の原因となっているという説が有力視されています。

3-2. アスペルギルス・フミガタス *Aspergillus fumigatus* (以下 *A. fumigatus*) が産生するグリオトキシン

A. fumigatus (図2) は、胞子を吸入することによって肺に感染し、アスペルギルス症の原因菌となることで、非常によく知られた医真菌です。このカビが産生するグリオトキシン (図3) をマウスに投与すると、免疫担当細胞による病原体食作用の抑制が見られ、ヒトでは、気道障害などの毒性を持つことから、微生物への易感染性に関与するカビ毒であることが明らかにされました。遺伝子操作によって作製した、グリオトキシン産生抑制 *A. fumigatus* をマウスに感染させる実験では、肺胞中のグリオトキシン濃度レベルの低下と *A. fumigatus* 病原性の低下との関連性が報告され、肺胞内のグリオトキシンがアスペルギルス症での感染成立に果たす役割が大

きいことが示されました⁵⁾。これらのことから、*A. fumigatus* がヒトの気道内に定着したのち産生されたグリオトキシンが、マクロファージなど免疫担当細胞の病原体食作用を回避させて定着を速やかに進める役割をしていることが考えられています²⁾。

3-3. アスペルギルス・バージカラー *Aspergillus versicolor* (以下 *A. versicolor*) が産生するステリグマトシスチン

A. versicolor (図2) は、湿気による被害を受けているビルの室内から高頻度で検出されるカビで、しばしば室内空気が孢子に高濃度で汚染されることがあります。このカビが産生するステリグマトシスチン(図3)は、肝臓で酸化を受けると活性化され、発癌性物質に変化することが知られています。また、マウスにある一定濃度以上の *A. versicolor* 孢子を吸引させると、肺での炎症反応を促進し肉芽腫を形成します。マウスにステリグマトシスチンを吸入させると、肺や気管支の細胞で、炎症反応を促進させる免疫系活性物質の産生が確認された⁶⁾ ことから、肺での肉芽腫形成とステリグマトシスチンの存在との関連性が疑われています。また、*A. versicolor* の産生するカビ毒が気管に対して強い繊毛運動抑制作用を持つこと⁷⁾ が報告されており、ステリグマトシスチンが吸入によって気管支細胞に作用すれば、ヒト疾患に関連する可能性があると言えます。

3-4. アスペルギルス・フラブス *Aspergillus flavus* (以下 *A. flavus*) の産生するアフラトキシン

アフラトキシン(図3)は、自然毒において最強の発ガン性物質のひとつとして非常によく知られています。代表的な産生菌として知られる *A. flavus* (図2) は、日本をはじめ世界中の土壌から普遍的に検出されるカビです。アフラトキシンは、主に亜熱帯および熱帯地域からの輸

入作物、特に穀類や豆類を中心に、幅広い農作物から検出されています。アフラトキシンが原因の大規模な食中毒事例は世界中で複数回発生し、死亡者も多数出ています²⁾。経口摂取による健康危害について最も注意しなくてはならないカビ毒です。

このように、経口摂取による毒性が非常に強いために、吸入摂取した場合の危害性についても注目され、研究が進行しています。例えば、穀類や豆類の加工工場の室内では、原料で大量に発育したアフラトキシン産生菌とこれが産生したアフラトキシンが含まれる多量の粉塵が飛散しているため、そこで働く労働者のアフラトキシンの吸引によるリスクが高いことが報告されており⁸⁾、このような室内環境では注意が必要です。また、ヒト気管支の細胞へアフラトキシンを作用させると、アフラトキシンは代謝によって発ガン性物質となるため、アフラトキシンの吸入によって肺ガンのリスクが高まるとする研究報告もあります²¹⁾。

おわりに

カビは、環境中に普遍的に生息しており簡単に対象物に付着し、条件さえ満たされれば旺盛に発育を開始します。室内を汚染することの多い *A. fumigatus* や *A. versicolor* といったカビを建材に接種して培養した場合にカビ毒の生成が確認されることから、室内空気環境のカビ毒汚染に目を向け、汚染原因となるカビの発生源に対して対策を講じることが必要です。また、環境中からカビ毒の暴露を受けた患者の尿や唾液など体液および血清、組織等からそれらカビ毒が検出されたという報告もあることから⁹⁾、空気環境から摂取したカビ毒は体内に入り、健康被害を引き起こすことが容易に想像されます。今後、食品からの経口摂取と同様に、空気環境か

らのカビ毒の摂取についてモニタリングし、ヒト疾患との関連性を明確にしていく必要があると言えます。

参考文献

- 1) Y. Wang, T. Chai, *et al.* (2008) Simultaneous detection of airborne aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environ. Res.*, 107, 139-144.
- 2) 小西良子 (2009) 医食住にかかわるカビ毒、モダンメディア、55、18-29.
- 3) 高鳥美奈子、信太 隆夫ら (1994) 最近 10 年間の相模原地区における空中飛散真菌、アレルギー、43、1-8.
- 4) E. Karunasena, M. D. Larranaga, *et al.* (2010) Building-associated neurological damage modeled in human cells: a mechanism of neurotoxic effects by exposure to mycotoxins in the indoor environment. *Mycopathologia*, 170, 377-390.
- 5) J. W. Bok, S. A. Balajee, *et al.* (2005) LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot. Cell*, 4, 1574-1582.
- 6) J. D. Miller, M. Sun, *et al.* (2010) Inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs induced by low molecular weight compounds from fungi from the built environment. *Chem. Biol. Interact.*, 183, 113-124.
- 7) E. Pieckova and Z. Jesenska (1998) Molds on house walls and the effect of their chloroform-extractable metabolites on the respiratory cilia movement of one-day-old chicks *in vitro*. *Folia Microbiol.*, 43, 672-678.
- 8) A. Traverso, V. Bassoli, *et al.* (2010) Assessment of aflatoxin exposure of laboratory worker during food contamination analyses. Assessment of the procedures adopted by an A.R.P.A.L. laboratory (Liguria Region Environmental Protection Agency). *Med. Lav.*, 101, 375-380.
- 9) D. G. Hooper, V. E. Bolton, *et al.* (2009) Mycotoxin detection in human samples from patients exposed to environmental molds. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 1465-1475.

CASE REPORT

Open Access

Fatal pneumonia caused by *Penicillium digitatum*: a case report

Chiyako Oshikata¹, Naomi Tsurikisawa^{1*}, Akemi Saito¹, Maiko Watanabe², Yoichi Kamata², Maki Tanaka³, Takahiro Tsuburai¹, Hiroyuki Mitomi¹, Kosuke Takatori³, Hiroshi Yasueda¹ and Kazuo Akiyama¹

Abstract

Background: *Penicillium* species are among the most common fungi present in the environment and are usually considered non-pathogenic to humans. However, in immunocompromised hosts they can be virulent pathogens and can cause death. *Penicillium digitatum* is a plant pathogen that commonly causes a postharvest fungal disease of citrus called green mould; it very rarely causes systemic mycosis in humans. Here, we report a case of fatal pneumonia due to *P. digitatum* infection, as confirmed by repeated examination of cultured sputum.

Case presentation: A cavity was found in the left upper lung on routine chest X-ray in a 78-year-old undernourished male who had been diagnosed at age 66 with bronchial asthma and pulmonary emphysema. No increased sputum production was present. The presence of antigen-specific precipitating antibodies to *Aspergillus flavus* and *P. digitatum* was confirmed in the patient's serum and also later pleural fluid by using Ouchterlony double immunodiffusion testing with *A. flavus* and *P. digitatum* antigens. The patient was treated over a period of months with itraconazole, micafungin, voriconazole, amphotericin B, and antibacterials. However, the cavity enlarged, the pleural effusion increased, and the patient began producing purulent sputum. He died from progressive renal failure. From sputum culture only one fungus was isolated repeatedly on potato-dextrose agar in large quantities. This fungus was confirmed to be *P. digitatum* by molecular identification. Partial sequences of the beta-tubulin gene were determined by using the primers Bt2a and Bt2b for PCR amplification and sequencing and underwent a BLAST search at the National Centre for Biotechnology Information, these results confirmed that the isolated fungus was *P. digitatum*.

Conclusion: To our knowledge, this is the first report of pulmonary infection with *P. digitatum*. Our patient had pulmonary emphysema and was elderly, and undernourished. These factors might have facilitated the infection. In his case, antimycotics were ineffective in treating the lung involvement. Although human infection with *P. digitatum* is considered rare, it appears that this organism can be very virulent and resistant to antimycotics.

Keywords: *Penicillium digitatum*, *Penicillium* species, Infection, Immunocompromised host, Pulmonary emphysema, Pneumonia

Background

Penicillium species are among the most common fungi in the environment and are usually considered non-pathogenic to humans [1]. However, in immunocompromised hosts they can be virulent pathogens that can cause death [2]. *Penicillium digitatum* is a plant pathogen that commonly

causes a postharvest fungal disease of citrus called green mould [1]; it very rarely causes systemic mycosis in humans [3]. Here, we report a case of fatal pneumonia due to *P. digitatum* infection, as confirmed by repeated examination of cultured sputum.

Case presentation

A 78-year-old male presented at our hospital in April 2005 with a history of bronchial asthma and pulmonary emphysema first diagnosed at age 66 years. He had been an office worker for 40 years and had never been involved in agriculture. He had therefore had no obvious

* Correspondence: n-tsurikisawa@sagamihara-hosp.gr.jp

¹Clinical Research Centre for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization, Sagamihara Hospital, 18-1 Sakuradai, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-0392, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

opportunity for exposure to the citrus pathogen in his work environment or in and around his house. His asthma was of the non-atopic type and moderate, as defined by the Global Initiative for Asthma Guidelines 2002. The patient was an ex-smoker with a Brinkman Index of 1590. He was being treated with inhaled corticosteroids and theophylline. On first presentation in April 2005 to our hospital, he did not have asthma exacerbation or increased sputum production, but his dyspnoea on effort was graded 2 on the Hugh-Jones scale. In April 2005, when the patient was 78 years old, an abnormal shadow representing a cavity was found in the left upper lung on chest X ray at his yearly medical check-up. At the time the patient did not have increased sputum production, but chest computed tomography (CT) revealed a thin-walled cavity about 4 cm across and containing a fungus ball in the left upper lobe (S1 + 2); a CT scan taken 2 years previously had revealed only a small cavity indicative of emphysematous change (Figures 1a, 1b). There were no inflammatory changes in the peripheral blood (leukocyte count, 7950 cells/ μ L; C-reactive protein, 0.23 mg/dL; erythrocyte sedimentation rate, 10 mm/h; *Aspergillus* antigen, negative; β -D glucan, negative), but antigen-specific precipitating antibodies to *Aspergillus flavus* and *P. digitatum* were confirmed in the patient's serum and pleural fluid by Ouchterlony double immunodiffusion testing [4]. No *A. flavus* or *P. digitatum* and no bacteria or tubercle bacilli were detected in cultures of sputum or bronchial lavage fluids. We diagnosed the patient with lung aspergilloma and treated with itraconazole (100 mg/day

for 3 months. However, the cavity became larger and thicker-walled (Figure 1c, July 2005), and the patient developed back pain. He was admitted to our hospital on 25 July 2005 and was treated for 3 months with an increased dose of itraconazole (200 mg/day) with added micafungin (300 mg/day). The patient's vital capacity (VC) of 2.64 L, percentage VC of 85.7%, forced expiratory volume in 1 s (FEV1) of 1.09 L, and percentage FEV1 of 50.9% in August 2005 was lower than his VC of 3.01 L, %VC of 95.6%, FEV1 of 1.12 L, %FEV1 of 49.6% in 2003. The patient was unable to undergo further lung function tests because of his progressive respiratory failure.

The cavity continued to enlarge further. Its fluid content increased, and consolidation appeared around it (Figure 1d, October 2005). The patient's medication regimen was changed to voriconazole (400 mg/day), amphotericin B (10 mg/day), and fluconazole (400 mg/day), in addition to itraconazole (200 mg/day) and antibacterials. Treatment with this broad range of antimycotics and antibiotics did not slow the growth of the cavity: its fluid content continued to increase, and invasive consolidation and pleural effusion developed (Figure 1e, December 2005; 1f, January 2006). The pleural effusion increased, and the patient began producing purulent sputum. He died in February 2006 from progressive renal failure. Sputum samples yielded a single fungus, which was isolated repeatedly on potato-dextrose agar in large quantities. It was identified as *P. digitatum* and had the form of a spreading organism with a mealy, grey-green colour that turned olive green in culture. The abundance of the organism's elliptical spores was greater in the patient's sputum culture (Figure 2) than

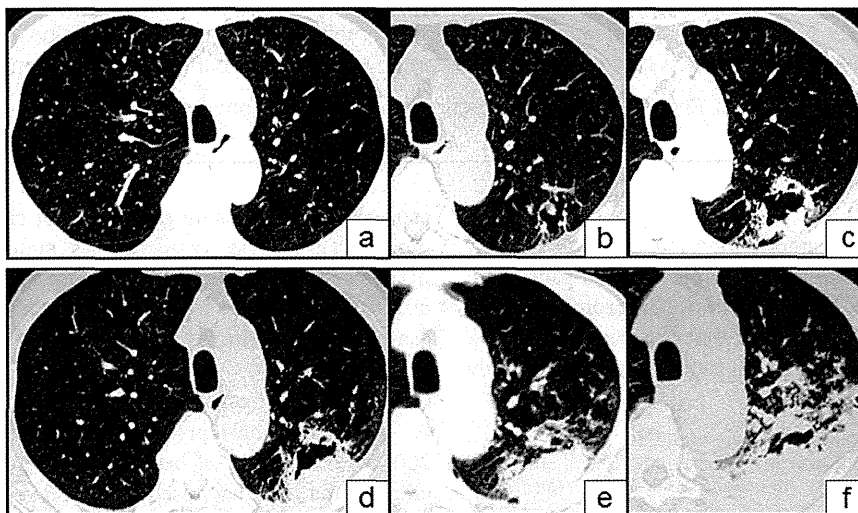


Figure 1 Computed tomographic imaging of the chest at the level of the aortic arch in 2003, two years before dyspnea onset, showed a small cavity in the left upper lobe due to emphysematous change (a). Computed tomography 2 years after initial presentation (April 2005) showed that the cavity was increasing in size and contained a fungus ball (b). The cavity then continued to increase in size, developing a thick wall and infiltration of the surrounding areas, with increased pulmonary effusion (c: July 2005; d: October 2005; e: December 2005; f: January 2006).

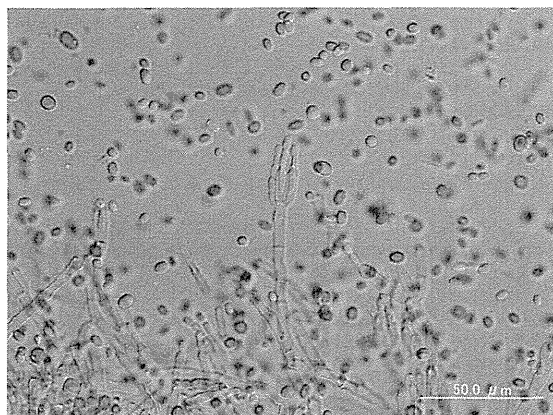


Figure 2 The fruiting structures (penicilli) of *Penicillium* from this patient have a brush-like appearance; the spores of *Penicillium digitatum* are typically elliptical under the microscope.

in cultured reference colonies [1]. This fungus was confirmed to be *P. digitatum* by molecular identification. Partial sequences of the β -tubulin gene determined by using the primers Bt2a and Bt2b [5] underwent BLAST analysis at the National Centre for Biotechnology Information.

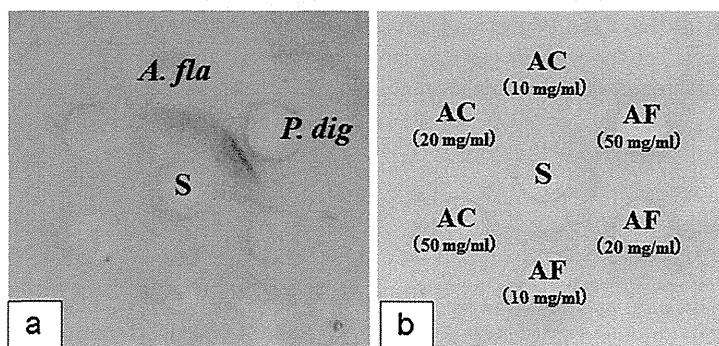
We found antigen-specific precipitating antibodies to *A. flavus* and *P. digitatum* in the patient's serum (Figure 3a) at April 2005, and pleural effusion at November 2005 by using Ouchterlony double immunodiffusion testing [4] with *A. flavus* and *P. digitatum* antigens (HollisterStier, Spokane, WA, USA). We confirmed the

presence of antigen-specific precipitating antibodies to *P. digitatum* by using antigen derived from the patient's sputum culture fluid or extracted directly from his sputum (Figure 3b).

To extract the antigen from the sputum culture, we added 1.5 mL of Glass Beads (Biospec Product, OK, USA) to the patient's sputum and crushed the mixture with a Mini-Beadbeater (Biospec Product, OK, USA). It was then incubated with 0.125 mol of NH_4CO_3 overnight at 4°C and the antigen extracted after freeze-drying of the filtrate. We diagnosed invasive pulmonary penicilliosis due to *P. digitatum*.

Discussion

Penicillium digitatum is the most devastating pathogen of rotten citrus fruit and is responsible for 90% of production losses during post-harvest handling [6]. *Penicillium digitatum* is widely distributed in soils throughout the world. People are commonly exposed to the spores of this airborne pathogen every day. Upon Ouchterlony double immunodiffusion testing, the sera of five of 770 patients with pulmonary lung disease were confirmed to have low titres of antigen-specific precipitating antibodies to *P. digitatum* against antigen (obtained from Greer Laboratories, Lenoir, NC). However, none of these patients had antigen-specific precipitating antibodies to *P. digitatum* in tests of antigen extracted from patient's sputum culture fluid or sputum. In humans there is cross-reactivity to *Aspergillus* and *Penicillium*: most sera from patients with precipitins against *Penicillium* have precipitins against *Aspergillus* [7]. In April 2005, our



S; Serum of patient
 A. fla; Aspergillus flavus
 P. dig; Penicillium digitatum
 AC; Antigen derived from the culture filtrate
 AF; Antigen derived from fungus

Figure 3 Antigen-specific precipitating antibodies to *Aspergillus flavus* and *Penicillium digitatum* in the patient's serum (a) were found by Ouchterlony double immunodiffusion testing with *A. flavus* and *P. digitatum* antigens. We confirmed the presence of antigen-specific precipitating antibodies to *P. digitatum* by using antigen derived from the patient's sputum culture fluid or extracted from the fungus in his sputum (b).

patient had precipitins against both *P. digitatum* and *A. flavus*, but we did not find any *P. digitatum* or *A. flavus* in sputum cultures or in bronchoalveolar lavage fluids. This led to a delay in diagnosis.

Penicillium species can cause opportunistic infections [2]. Patients with *Penicillium* species infections have been treated successfully with itraconazole [8], amphotericin B [3,9], or fluconazole [3]. However, some patients with conditions caused by *Penicillium* species have died despite treatment with ketoconazole [2], amphotericin B [2], or itraconazole [10]. Pulmonary infections with fungi, including *Penicillium* species, are associated with much higher mortality rates in patients with nosocomial infections or infections complicating organ failure [11]. The minimal inhibitory concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, and voriconazole against *A. flavus* or *Aspergillus fumigatus* are lower than those against *Penicillium* spp. [12].

Conclusions

To our knowledge, this is the first report of pulmonary infection with *P. digitatum*. Our patient had pulmonary emphysema and was elderly, and undernourished. He had no known history of exposure to citrus fruit pathogens, but he was likely to have been immunocompromised. These factors might have facilitated the infection. In his case, antimycotics were ineffective in treating the lung involvement. Although human infections with *P. digitatum* are considered rare, it appears that this organism can be very virulent and resistant to antimycotics.

Consent

Written informed consent was obtained from the kin of the patient for publication of this Case Report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal form.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CO examined the patient and contributed to manuscript preparation. NT examined the patient, took part in discussions about the patient, and was involved in manuscript preparation and editing. AS performed the tests for antigen-specific precipitating antibodies to *A. flavus* and *P. digitatum* in the patient's serum. MW and YK confirmed the fungus as *P. digitatum* by molecular identification. KT and MT identified the fungus as *P. digitatum*, TT, HY, HM and KA contributed to discussions about the patient. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Katsuhiko Kamei (Chiba University) for his guidance and invaluable advice. We declare no financial support.

Author details

¹Clinical Research Centre for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization, Sagami Hospital, 18-1 Sakuradai, Minami-ku, Sagami, Kanagawa 252-0392, Japan. ²Division of Microbiology, National Institute of

Health Science, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan. ³Centre for Fungal Consultation, 5F 4-8-5, Chuo, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0051, Japan.

Received: 14 October 2012 Accepted: 14 March 2013

Published: 23 March 2013

References

1. Raper KB, Thom C: *Penicillium digitatum*. *A Manual of the Penicillia*. New York: Hafner Publ. Co; 1968:386–392.
2. Mok T, Koehler AP, Yu MY, Ellis DH, Johnson PJ, Wickham NW: Fatal *Penicillium citrinum* pneumonia with pericarditis in a patient with acute leukemia. *J Clin Microbiol* 1997, **35**:2654–2656.
3. Lyratzopoulos G, Ellis M, Nerringer R, Denning DW: Invasive infection due to *Penicillium* species other than *P. marneffe*. *J Infection* 2005, **45**:184–207.
4. Ouchterlony O: Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1949, **26**(4):507–515.
5. Glass NL, Donaldson GC: Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**:1323–1330.
6. Holmes LG, Eckert JW: Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 1999, **89**:716–721.
7. Brouwer J: Cross-reactivity between *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium*. *Int Arch Allergy Immunol* 1996, **110**:166–173.
8. D'Antonio D, Violante B, Farina C, Sacco R, Angelucci D, Masciulli M, Iacone A, Romano F: Necrotizing pneumonia caused by *Penicillium chrysogenum*. *J Clin Microbiol* 1997, **35**:3335–3337.
9. Gelfand MS, Cole FH, Baskin RC: Invasive pulmonary penicilliosis: successful therapy with amphotericin B. *South Med J* 1990, **83**:701–704.
10. Hsu JH, Lee MS, Dai ZK: Life-threatening airway obstruction caused by penicilliosis in a leukemic patient. *Ann Hematol* 2009, **88**:393–395.
11. Chen KY, Ko SC, Hsueh PR, Luh KT, Yang PC: Pulmonary fungal infection. Emphasis on microbiological spectra, patient outcome and prognostic factors. *Chest* 2001, **120**:177.
12. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, SENTRY Participants Group: Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates and *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY antimicrobial surveillance program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:1032–1037.

doi:10.1186/1471-2466-13-16

Cite this article as: Oshikata et al.: Fatal pneumonia caused by *Penicillium digitatum*: a case report. *BMC Pulmonary Medicine* 2013 **13**:16.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



