

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19188

研究課題名(和文) 水害被災地における真菌アレルギー患者の免疫血清学的検査の妥当性向上に関する研究

研究課題名(英文) Development of immunoserological diagnostic methods for fungal-allergic patients in flood-damaged areas

研究代表者

渡辺 麻衣子 (MAIKO, WATANABE)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・室長

研究者番号：00432013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水害被災住宅汚染真菌に対する血中IgE抗体の高感度測定法として、真菌で最もアレルギー性の強いAspergillus属関連菌種を用いて、菌体からの抗原エキス精製および化学発光酵素免疫測定法(CLEIA法)の構築に成功した。さらに、住宅高検出菌種に対して、実際の被災者血清でCLEIA法による測定を行った結果、各菌種それぞれで7.0～15.1%の陽性者が存在することを示した。

また、住宅真菌汚染と関連性が強いヒョウヒダニ類のアレルゲンタンパク(Der\_f\_1およびDer\_p\_1)の定量系構築を目指しモノクローナル抗体の作出を行った。抗Der\_1またはDer\_f\_1モノクローナル抗体を得た。

研究成果の概要(英文)：We developed the Chemiluminescent Enzyme Immunoassay (CLEIA) method for the detection of anti-fungal allergen antibody(IgE) for fungal-allergic patients in flood-damaged areas, with Aspergillus species and their related species which are the most allergic fungi. Our results indicated that positive rates for several allergic fungi among the dwellers in flood-damaged areas were in the range of 7.0-15.1% by the CLEIA method.

Because the growth of mites in the housedust is well correlated with the growth of fungi, we acquired the anti-Der\_f\_1 and Der\_1 monoclonal antibody to construct the detection method for allergen of the genus Dermatophagoides in the future study.

研究分野：衛生微生物学

キーワード：水害被災住宅 室内真菌叢 抗原特異的IgE 化学発光酵素免疫測定法

## 1. 研究開始当初の背景

東日本大震災および関東・東北豪雨での鬼怒川流域水害等、近年大規模水害が頻発している。このような、我々はこれらの水害後、被災地における仮設住宅、浸水住宅等の室内真菌叢の調査を行い、非被災者地の一般住宅と比較して高濃度真菌汚染の傾向があること、中でも *Eurotium* 属菌、*Aspergillus section Restricti* (*A. restrictus*、*A. penicillioides* 等が含まれる)等の汚染濃度が高いことを示した。また、真菌発育と関連してダニ類が増殖することが知られており、真菌汚染が進行している環境では、同時にダニ類の汚染も高度に進行している可能性が高い。居住者はこれらのアレルゲンの高濃度曝露を受けており、呼吸器アレルギーを発症、または増悪させる懸念がある。

そこで、東日本大震災における被災者を対象として、過去に呼吸器集団検診を実施したところ、喘息有病率が全体の2割強におよぶことが明らかとなった。喘息の原因の一つとして環境中の真菌やダニのアレルゲンが考えられるため血中の抗原特異的IgE抗体を測定したり、住環境中のアレルゲン量を評価することがあるが、真菌については、これまで、上述の *Eurotium* 属および *Aspergillus* 属菌特異的IgE抗体測定に用いるための、菌体または培養物からの抗原精製方法が確立しておらず安定的な抗原の供給が難しい。また、陽性・陰性の境目レベルの反応を示す軽度の陽性者の把握も行う必要性があることから、広く行われている発色または蛍光ELISA法よりも高感度な手法で検出する必要がある。これらのことから、実際に住環境から分離した真菌株を用いての抗原エキスの精製法、および新たな高感度IgE測定系の構築が必要である。ダニ類については、室内環境の主要アレルゲンとなっているヤケヒョウヒダニおよびコナヒョウヒダニのアレルゲンタンパクに対する研究が進行し、Der\_f\_1 および Der\_p\_1 を始めとした抗原特異的IgEの正確な測定法が確立している。しかし一方で、住宅の汚染アレルゲン量の定量法については改良の余地が残されている。現在、ハウスダスト中のダニアレルゲン濃度の測定は市販された各種キットを用いて行うことが可能だが、感度がそれほど高くないことから、多量のハウスダストサンプルを必要とする。このことから、少量のサンプルからの定量を可能とする高感度検出法の構築が必要である。

## 2. 研究の目的

(1) 上述の、住宅で高濃度・高頻度で検出された菌種に着目して、これらを抗原とした特異的IgE抗体濃度を測定できる高感度ELISA法を構築する。また、この方法を用いて、実際の被災者の血中の真菌特異的IgE濃度測定を行い、アレルギー反応陽性率を明らかにする。

(2) 住環境中の簡便なダニアレルゲン測定方

法の構築のため、Der\_f\_1 および Der\_p\_1 に対するモノクローナル抗体の作出を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 被災地の室内環境から高濃度・高頻度で分離されたカビ菌種 *Aspergillus section Restricti* および *Eurotium* 属については抗原の市販が無く、抗原から精製する必要がある。抗原としては、カビにおいて最もアレルギー患者数が多く、強いアレルゲンとなることがよく知られる *A. fumigatus*、および上述した *A. restrictus*、*A. glaucus*、

*Eurotium amstelodami* の4菌種を用いた。*A. fumigatus* および *E. amstelodami* については、購入した真菌原材料 (Greer社) を用いた炭酸アンモニウム溶液による抽出物を十分にろ過して菌体を除去し、ろ液を凍結乾燥で粉末化後、PBSで溶解して抗原エキスとした。*A. restrictus* および *A. glaucus* については、当研究室でツアベック液体培地にて培養した培養液ろ過物をそれぞれ凍結乾燥後、PBSで溶解して抗原エキスとした。IgE検出法としてはELISA法を採用し、化学発光酵素免疫測定法 (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay:CLEIA)の構築を行った。得られた抽出抗原を96-well immune-microplateの各wellに固相化し、検体となるヒト血清を添加した後に、抗ヒトIgE-HRP抗体で標識し、化学発光基質 (SuperSignal™ ELISA Femto) を添加した。その後、抗原抗体複合体の検出を行った。抗原抗体複合体濃度の評価は、ルミノメーターTriStar LB941で425nmの発光強度を測定することにより推定した。アレルギー性疾患を持たない非被災者血清14検体を陰性検体と定義し、それらの測定値から平均値+3SDを算出し、これを陰性上限値として、この値以上を示した検体を特異的IgE抗体陽性と定義した。

また、構築したCLEIA法を適用しての実際の被災者血清中の真菌特異的IgE濃度の測定時には、平成26年度に実施した、宮城県石巻市における現または元仮設住宅住民を対象とした呼吸器アレルギー集団検診受検者の血清376名分を供試した。

(2) 抗ダニモノクローナル抗体の作出方法については、NCBIデータベースからダウンロードしたヤケヒョウヒダニ抗原タンパク遺伝子Der\_f\_1およびDer\_p\_1の塩基配列を参照して、人工遺伝子を作製し、大腸菌にクローニングし、組み換えタンパクの合成を行った。それぞれのタンパクで約1mg前後のタンパク量を得て、(株)医学生物学研究所へ受託し、マウスモノクローナル抗体作出を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 抽出真菌抗原を持ちいたCLEIA法構築

においては、最初に、*A. fumigatus* を抗原として、陽性コントロール検体を用いての検量線を作成するため、抽出抗原の希釈列を作製して希釈液それぞれのルミノメーター測定値を計測した。作成した検量線を図 1 に示した。

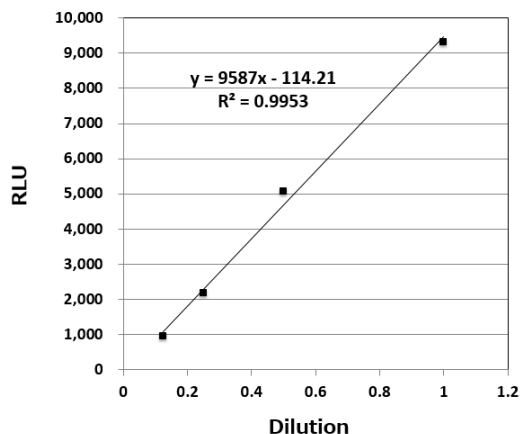


図 1. *Aspergillus fumigatus* 抗原に対する陽性コントロール検体における検量線

抽出抗原は良く反応しており、抗原抽出液の濃度は 1 ~ 5 倍希釈の幅で用いればよいことが示された。

次に、アレルギー性疾患を持たない宮城県外の被験者による血清 14 検体を陰性検体と定義し、抗原として供試した 4 抗原について測定を行い、陰性上限値をこれら 14 検体の Ave. + 3SD と設定できた。この陰性上限値と比較し、376 例の供試検体を測定した。4 抗原に対する代表的な陽性例を図 2 に示した。

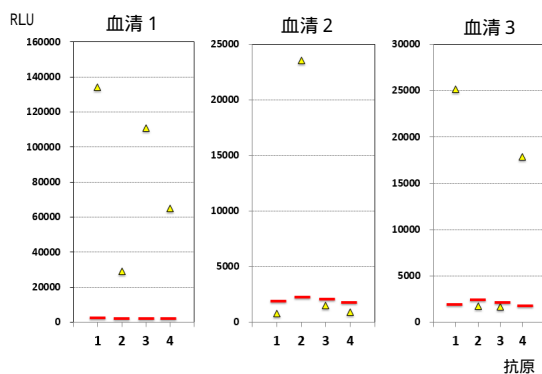


図 2. 代表的な測定結果例。

1. *Eurotium amstelodami*、2. *Aspergillus fumigatus*、3. *Aspergillus glaucus*、4. *Aspergillus restrictus*。

測定結果を集計した結果、*A. restrictus* の陽性率は 20.1% と最も高く、続いて *E. amstelodami* の陽性率は 15.1% であった。*A. glaucus* は 6.6% となり、*A. fumigatus* の陽性率は 3.6% と最も低かった。一方で検診において喘息有病例ではダニ特異的 IgE

抗体は有意に高値であった。よって、臨床の場では最もアレルゲン性が高く重要視されてきた *A. fumigatus* よりも、住宅汚染濃度の高い真菌種のほうが高率に抗原として働く可能性が示唆された。しかし、表 1 に示した通り、供試検体 376 例の医師による喘息の有病率と、これらの真菌の抗体陽性率との間には統計学的有意差を認めなかった。

表 1. 喘息有病群および非有病群におけるコナヒョウヒダニおよび *Aspergillus fumigatus* 抗原に対する陽性率の比較

	喘息	非喘息	P value
Der_f_1 陽性率	38%	24%	p<0.01
A fum igatus 陽性率	8%	2%	NS

一方で、コナヒョウヒダニに対する IgE 抗体陽性率は喘息有病率と相関があった。これらのことから、被災住宅を汚染する真菌は、直接的に喘息の原因となっているか否かについては明らかにできなかったが、高濃度に住宅を汚染している菌種ほど強くアレルギー感作を起こしている可能性があることが考えられた。また、ダニアレルゲンは、直接的に被災者の高率な喘息発症に関与していることが示唆されたが、真菌は一般的にダニの増殖を促進すると考えられていることから、間接的に居住者のアレルギー感作に影響する可能性があると考えられた。

以上の結果から、CLEIA 法を用いた本測定法は、特異的 IgE 抗体測定法として有用性のあることが示され、また、水害被災者の間で起こっているアレルギー被害状況を把握できた。

(2) Der\_f\_1 および Der\_p\_1 それぞれを免疫源としてマウスモノクローナル抗体作製を試みた。その結果、Der\_p\_1 には反応せず Der\_f\_1 だけに特異的に反応する抗体を生成するクローン、および量抗原を区別できないが Der\_1 特異的に反応する抗体を生成するクローンを得ることができた。今後、これを用いてモノクローナル抗体の大量精製を行い、微量のハウスダスト検体からでも高感度にヒョウヒダニアレルゲンが検出可能な測定系の作出を試みる予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

渡辺麻衣子, 押方智也子, 齋藤明美, 石田雅嗣, 小林誠一, 矢内 勝, 鎌田洋一, 寺

嶋 淳, 釣木澤尚実 . 東日本大震災における  
応急仮設住宅住民を対象とした呼吸器ア  
レルギー集団検診 1・真菌叢調査 . 第 64 回  
日本アレルギー学会学術大会, 2015  
釣木澤尚実, 押方智也子, 石田雅嗣, 小林  
誠一, 矢内 勝, 齋藤明美, 鎌田洋一, 寺  
嶋 淳, 渡辺麻衣子 . 東日本大震災におけ  
る応急仮設住宅住民を対象とした呼吸器ア  
レルギー集団検診 2・疫学調査 . 第 64 回日  
本アレルギー学会学術大会, 2015  
齋藤明美, 釣木澤尚実 押方智也子, 石田  
雅嗣, 小林誠一, 矢内 勝, 鎌田洋一, 寺  
嶋 淳, 渡辺麻衣子 . 東日本大震災におけ  
る応急仮設住宅住民を対象とした呼吸器ア  
レルギー集団検診 4・血清学的調査 . 第 64  
回日本アレルギー学会学術大会, 2015  
渡辺麻衣子 . Relationship between  
Fungal contamination and health hazard  
in Temporary Houses after the Great  
East Japan Calamity . 第 9 回国際温熱環  
境・空調シンポジウム/第 3 回国際ビルエネ  
ルギー・環境カンファレンス 合同大会,  
2015  
渡辺麻衣子, 齋藤明美, 押方智也子, 小沼  
ルミ, 石田雅嗣, 小林誠一, 鎌田洋一, 寺  
嶋 淳, 矢内 勝, 釣木澤尚実 . 応急仮設  
住宅住民を対象とした呼吸器アレルギー集  
団検診 1・真菌叢調査 . 第 46 回日本職  
業・環境アレルギー学会総会・学術大会,  
2015  
大波純一, 小林直樹, 渡辺麻衣子, 山田修,  
水谷治, 高橋徹, 川上裕司, 橋本一浩, 清水  
公徳, 高橋治男, 知花博治, 鎌田洋一 . デー  
タベースから選出されたカビアレルギー候  
補遺伝子の *Aspergillus* 属内における配列  
比較とアレルギー性の検討 . 第 10 回日本ゲ  
ノム微生物学会年会, 2016  
久保文, 窪崎敦隆, 押方智也子, 齋藤明美,  
石田雅嗣, 小林誠一, 鎌田洋一, 山崎朗子,  
矢内勝, 寺嶋淳, 栗山進一, 釣木澤尚実,  
渡辺麻衣子 . 応急仮設住宅居住者における  
住宅汚染真菌特異的 IgE 濃度の測定 . 日本  
防菌防黴学会 第 44 回年次大会, 2017  
土田康之, 渡辺麻衣子, 高木拓也, 小沼ル  
ミ, 寺嶋淳, 木村悟隆 . 水害被災後の家屋  
の真菌叢の推移及び家屋の環境による真菌  
叢の相違 . 日本防菌防黴学会 第 44 回年次  
大会, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特に無し。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 麻衣子 (WATANABE, Maiko)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物  
部・室長

研究者番号: 00432013

(2)連携研究者

窪崎 敦隆 (KUBOSAKI, Atsutaka)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物  
部・主任研究官

研究者番号: 30425673

(3)研究協力者

鎌田 洋一 (KAMATA, Yoichi)

釣木澤 尚実 (TSURIKISAWA, Naomi)

押方 智也子 (OSHIKATA, Chiyako)

木村 悟隆 (KIMURA, Noritaka)