

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18928

研究課題名（和文）家庭内真菌叢の網羅的な同定かつ定量化手法の開発

研究課題名（英文）Development of method for determining indoor fungal concentration using genetic analysis

研究代表者

長谷川 兼一（Hasegawa, Kenichi）

秋田県立大学・システム科学技術学部・教授

研究者番号：50293494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ダンプネスの室内環境を解明することを目指し、メタゲノム解析による真菌叢の評価手法を示した。遺伝子塩基配列に基づいた真菌の網羅的な解析には、真菌種のデータベースの確かさが指摘されるなど課題はあるものの、ダンプネスを代表する主要な真菌種が明確になれば、その室内環境の一端が解明されるものと期待できる。現段階では、解析結果の妥当性を十分に検証するには至っていないが、研究グループが提案しているダンプネスの評価において、ダンプネスによる室内環境汚染が重篤である群では、真菌汚染に寄与する種の生存比率が高いことが示された意義は大きい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家庭内真菌はアレルギー性疾患誘発の要因の一つとされるが、住宅を対象とした臨床調査により得られた結果では、真菌濃度と症状に明確な関連は見られず、エビデンスの蓄積が滞っている。家庭内真菌の評価法が構築されれば、健康リスクに対する建築的防除技術の開発に貢献できるとともに、アレルギー治療の現場において患者の曝露環境を理解する手がかりにもなる。例えば、疾患の原因究明と合理的な治療法の判断に繋がることや、公衆衛生分野への新たな知見に対する学術的貢献、建築技術分野への健康リスク低減のための技術開発の促進、医療分野へのアレルギー治療の現場での有益な情報提示などが期待され、異分野への波及効果は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：The indoor dampness was associated with allergic symptoms among children, however the causal mechanisms was not be revealed yet. This study focused on the quantitative estimation of indoor dampness using dampness index proposed by authors and measured results such as indoor temperature, humidity and microorganisms. The microorganisms were genetically analyzed to evaluate the population diversity of microbial species through the DNA analyzed technologies. The fungal species of which the detection rate was increasing with ranks 1 to 4 of indoor dampness index were considered to be associated with indoor environmental problems of dampness. The results of this study presents the association between indoor dampness and fungal species of *Walleimia sebi* and *Rhodotorula glutinis*.

研究分野：建築環境工学

キーワード：家庭内真菌 DNA解析 同定 定量化 評価手法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

空中浮遊微生物である菌類は生物的特徴により真菌(カビ)と細菌に分類され、真菌は粒径が 5 ~ 100 μ m の孢子を有する。建築空間内での真菌は呼吸時に体内に吸い込まれ、アレルギー疾患を誘発するが、真菌濃度と症状との関連性は明確でない¹⁾。これは、従来の測定法では健康リスクの観点から見た「用量」を適切に定量できないことが原因である。

建築空間の真菌の測定法にはいくつかの種類があるが、基本的には空気を一定量捕集し、その空気に含まれる孢子を培養した後に、コロニー数を数えて浮遊真菌濃度として定量する。一般には、平板培地を用いた衝突法²⁾を用い、捕集空気中に含まれる培養可能な孢子数を定量することになる。衝突法では、得られた真菌濃度が対象空間の衛生性を評価しているが、アレルギーとして作用する不活性真菌を定量することができないため、健康リスク評価における用量 - 反応関係を導き出すことは不可能である。

室内真菌による健康影響を適切に評価するためには、経口暴露量を定量化することが不可欠である。米国では、床ダストに含まれる真菌を DNA 解析し Moldiness Index という指標が提案³⁾され評価法の開発が進んでいる、日本では、建築空間における健康リスクの観点から見た真菌濃度の測定法の提案はされていない。

2. 研究の目的

本研究では、健康リスク要因としての家庭内真菌の実態解明に迫るため、DNA 解析技術を用いた測定手法を開発することを目的とする。解析により、従来の培養法では不可能である網羅的な同定や真菌アレルギーの定量の可能性に期待できるため、住環境における健康リスクの防除策やアレルギー治療に向けた曝露環境の室内空気清浄度を適切に評価することができる。

3. 研究の方法

(1) 真菌を対象としたメタゲノム解析手法の構築

室内真菌を網羅的に解析する手法の構築を目指し、DNA 解析手法の一つであるメタゲノム解析に着目した。メタゲノム解析は主に、難培養の細菌を中心に活用されている。近年、次世代シーケンサ(NGS)の開発により、微生物の培養をせずとも大量の DNA 配列情報が高速・高精度で処理され、種の同定が可能となった。細菌に対しては、サンプル中のそれぞれの細菌が持つ 16S リボゾーム RNA 遺伝子の一部を PCR で増幅し、PCR 産物(アンプリコン)を NGS でシーケンスし、高い精度で細菌同定が可能となっている。一方、真菌については、リボゾームの図 1 に示す ITS 領域や D1/D2 領域の遺伝子情報を使用して真菌情報を得る場合が多いが、参照する塩基配列データベースとの相同性の点で課題が残るようである。本研究では、ITS2 領域の遺伝子情報⁴⁾に基づいて、真菌種を同定する。

(2) 室内真菌叢を評価するための実測調査

本調査では、小学生以下の子どもがいる東北地方 6 県と新潟県、富山県の戸建住宅 120 件を対象としてアンケート調査と実測調査を実施した。アンケート調査では、冬期の室内環境に着目し、暖房・換気設備の種類や使用状況、加湿・除湿の状況、室内環境として結露・カビの発生や窓ガラスの結露の程度・頻度などについて尋ねた。また、医師の診断に基づくアレルギー疾患の有無とともに、皮膚・粘膜刺激症状、精神・神経症状を調査することが可能な MM 調査票(翻訳版)²⁾を用いてシックハウス症候群の自覚症状の有無を尋ねた。アンケート調査は実測調査と同時にを行い、60 件ずつに分けて冬期の連続する 5 日間を対象に実施した。

実測調査では、居間と寝室の室内湿度、床ダスト内に含まれる真菌叢を測定した。ダスト中の真菌は DNA 解析によって同定した。各調査項目に対応する測定キットを対象住宅に送付し、居住者に温湿度計の設置と所有している掃除機を用いた床ダストの採取を依頼した。床ダストの採取では、紙パックを掃除機の先端に取り付け、各部屋の床面全体のダストを吸引することを指示した。

4. 研究成果

(1) 床ダストに含まれる室内真菌叢を評価する測定手法の開発

図 2 にメタゲノム解析のワークフローの概要を示す。

床ダストのサンプリング方法

解析対象には床ダストを用いることとし、掃除機の先端にゴミ取り袋(住化エンバイロメンタルサイエンス株式会

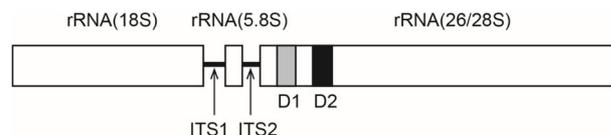


図 1 リボゾーム遺伝子の構造

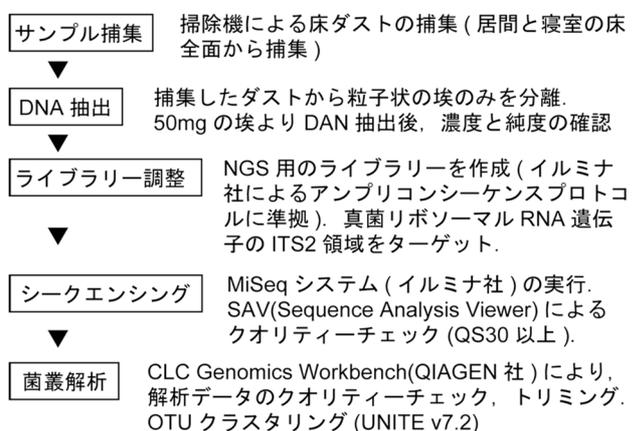


図 2 メタゲノム解析のワークフローの概要

社)を装着し、居間や寝室の床全面のダストを捕集する。現段階では、解析用のダストを多く得るために捕集面積・時間を規定していないが、標準化を図るにはサンプリング条件の統一の有無が課題である。

DNA 抽出

掃除機で捕集した居間と寝室の床ダストから粉末状の埃を分離する。床ダストには綿状埃が含まれる場合が多いので、ポルテックスミキサーを用いて、粉末状の埃を分離することを繰り返し 50mg を得る。サンプル 50mg に対し、DNA すいすい-W(株式会社リーゾ)を用いて DNA を定法により抽出し、超純水 100 μ l に溶解して試料とする。分光光度計(NanoDrop)により DNA 濃度・純度を計測し、抽出状況を確認する。

ライブラリーの調製

メタゲノム解析におけるワークフローに従いNGS用のライブラリーを作成する。本研究では、イルミナ社によるアンプリコンシーケンスプロトコル⁵⁾に準じている。まず、各サンプル中の真菌リボソーム RNA 遺伝子の ITS2 領域に対して、ユニバーサルプライマー⁶⁾(ITS3:GCATCGATGAAGAACGCAGC, ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC)を使用し PCR 増幅(トレースサイズ 550bp)する。次に、NGS 用のインデックス付加のためのプライマー⁵⁾(フォワードプライマー: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG, リバースプライマー: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG)の配列をサンプル毎に PCR 増幅(トレースサイズ 630bp)により付加しライブラリーを構築する。

ライブラリーの検証・プール

サンプル毎のライブラリーを検証(Quality Check, QC)するため、定量試薬(PicoGreen, TECAN 製)を用いて蛍光光度測定とリアルタイム PCR にて DNA 濃度、バイオアナライザ電気泳動システムにより塩基長の分布(550bp 付近であることを確認)、を計測する。次に、各サンプルを等モル量で混合(ライブラリーのプール, 最大 96 サンプル)した後、各サンプルで行ったと同様に、DNA 濃度、塩基長の分布を計測する。

塩基配列のシーケンシング

プールしたライブラリーに対し、試薬 Reagent Kit v2(500 サイクル)を用いて次世代シーケンサ MiSeq(イルミナ社)により配列解析を行う。

菌叢解析

シーケンシングより得られた結果から QV(Quality Value)>30 の配列を選別し、それらを UCLUST(クラスタリング・ツール)で 97%以上の配列相同性でクラスタリングし、一つの OTU(Operational Taxonomy Unit)とした。OTU の代表配列について、UNITE v7.2 データベースに対する BLAST 検索により真菌種を同定する。また、それぞれの OTU に含まれる配列数により、その真菌種の比存在量を推定する。

(2)開発した測定手法を用いた住宅のダンプネスの評価

生物を階級分類する方法に習えば、Kingdom(界)分類で菌界、植物界などに分けられる。図 3 に調査対象の居間の床ダストに含まれる生物の生存比率を OTU の割合として示す。図では、ダンプネスのランク⁷⁾で分類し、菌界の割合が低い住宅からそれぞれ並べている。住宅によって菌界の生存比率には幅があるが、各ランクの中央値と比較すると、ランク 4 の群での OTU 割合が高い。しかしながら、図 6(a)に示す Kruskal-Wallis 検定によれば、両者には関連性は認められず、ダンプネスの程度が高い住宅ほど菌界の生存比率が高い訳ではない、ということが示される。

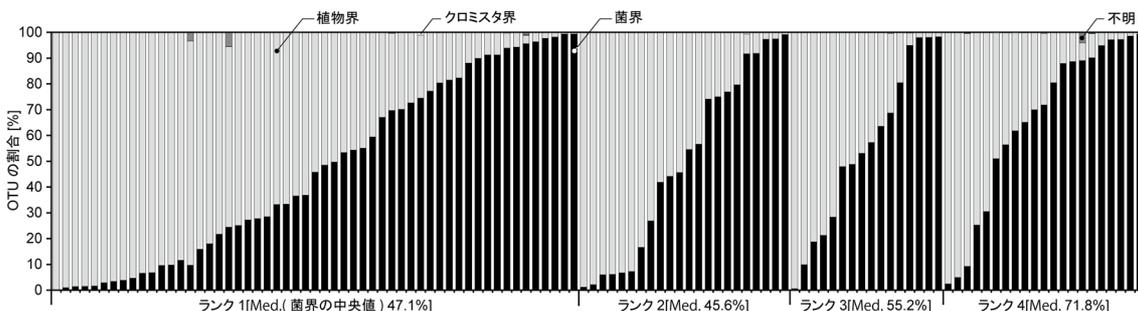


図 3 Kingdom(界)分類による OTU(Operational Taxonomic Unit) の割合

次に、Kingdom の下位の階級である Phylum(門)分類を図 4 に示す。真菌が含まれる子囊菌門の OTU の割合に従って、ダンプネスのランク内で昇順に並べている。子囊菌門についても、ダンプネスのランク 4 の中央値は他のランクと比べて大きい。図 3 の菌界と同様に統計的には有意差は確認できなかった。

本研究にて試行した DNA 解析手法では、1,522 種の真菌が検出され、各住宅においては約 200 種前後が同定されている。今後、住宅のダンプネスを特徴付ける真菌叢を追求する予定であるが、Vesper ら⁵⁾は、既に健康影響に疑いがある室内真菌を 35 種に特定し、それを元に ERMI(Environmental Relative Moldiness Index)というダンプネスによる真菌汚染を評価する指標を提案している。本研究では、それに習って床ダストに含まれるそれらの真菌種の存在比率

を求め、図 5 に結果を示す。ダンプネスのランク 4 では、特定の真菌種の OTU の割合が全体的に高く、ダンプネスのランク 4 の中央値は他のランクと比べて大きいことが確認できる。図 6(b)を見ると、ダンプネスのランクと OTU 割合とは有意な関連性が認められ、ランク 1 よりもランク 4 の OTU 割合が高いことが確認できる。筆者らの DNA 解析手法においても、ダンプネスによる真菌汚染が適切に評価できる可能性の一端が示されたといえる。

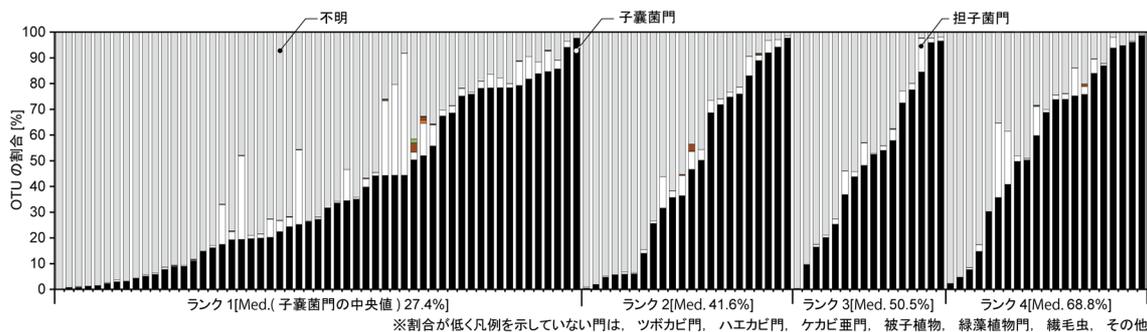


図 4 Phylum(門)分類による OTU(Operational Taxonomic Unit) の割合

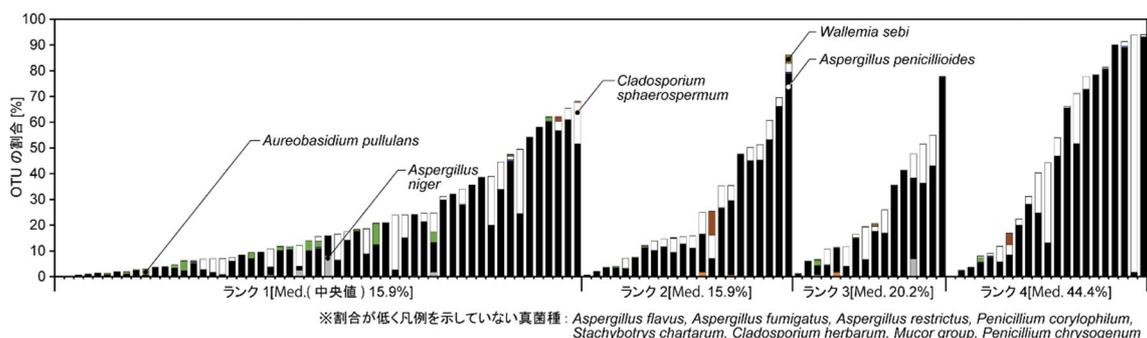


図 5 主な真菌種の OTU(Operational Taxonomic Unit) の割合

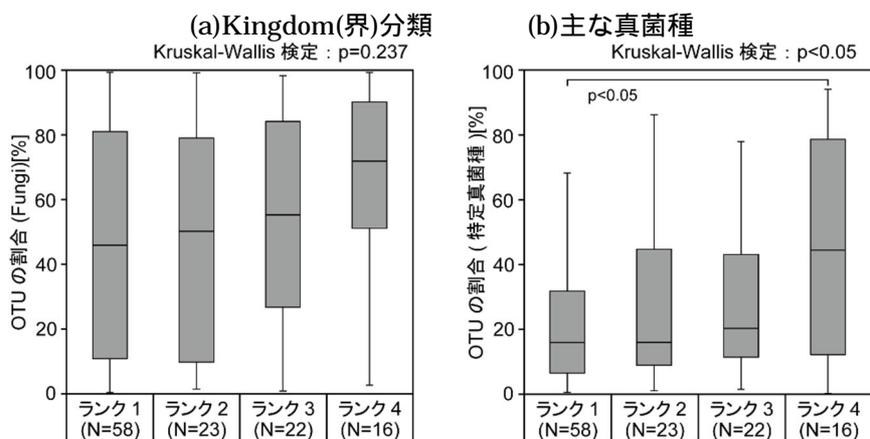


図 6 ダンプネスの程度と OTU の割合の関係

(5) 本研究の意義と成果と今後の展開

本研究では、ダンプネスの室内環境を解明することを目指し、メタゲノム解析による真菌叢の評価手法を示した。遺伝子塩基配列に基づいた真菌の網羅的な解析には、真菌種のデータベースの確からしさが指摘されるなど課題はあるものの、ダンプネスを代表する主要な真菌種が明確になれば、その室内環境の一端が解明されるものと期待できる。

そもそもダンプネスの定義は曖昧なままであるが、研究グループでは、居住者が住宅における室内環境に対する観察可能な項目を用いたダンプネスの評価法を提案し、評価結果を各種物理量と照合し、その妥当性を検証している。現段階では、解析結果の妥当性を十分に検証するには至っていないが、ダンプネスの程度が重篤である群では、真菌汚染に寄与する種の生存比率が高いことが示された意義は大きい。例えば、ダンプネスの程度が低いランク 1 の住宅群に比して、ダンプネスによる室内環境汚染が重篤なランク 4 の住宅群での検出割合が高い真菌種がダンプネスの特徴を表すと見なせば、*Wallemia* 属や *Rhodotorula glutinis* など、該当する真菌種が見ている。

一方、家庭内真菌はアレルギー性疾患誘発の要因の一つとされるが、住宅を対象とした臨床調査により得られた結果では、真菌濃度と症状に明確な関連は見られず、エビデンスの蓄積が滞っ

ている⁹⁾。本研究のような家庭内真菌の評価法が構築されれば、健康リスクに対する建築的防除技術の開発に大いに寄与するとともに、アレルギー治療の現場において患者の曝露環境を理解する手がかりともなり得る。例えば、疾患の原因究明とともに合理的な治療法の判断に繋がることや、公衆衛生分野への新たな知見に対する学術的貢献、建築技術分野への健康リスク低減のための技術開発の促進、医療分野へのアレルギー治療の現場での有益な情報提示などが期待され、異分野への波及効果は極めて大きい。

<引用文献>

- 1) WHO: WHO Guideline for Indoor Air Quality: Dampness and Mould, 2009.
- 2) 日本建築学会：浮遊微生物サンプリング法規準・同解説，日本建築学会環境基準，2013年。
- 3) Vesper, S. et.al.: Development of an Environmental Relative Moldiness Index for US Homes. JOEM 49(8), August 2007: 829-833.
- 4) R. Blaalid et. al: ITS1 versus ITS2 as DNA meta-barcodes for fungi, Molecular Ecology Resources, Vol.13(2), pp.218-224, 2013.3.
- 5) イルミナ株式会社：イルミナ MiSeq システム向け 16S リボソーム RNA 遺伝子アンプリコンの調製，文書番号 15044223 Rev.B JPN。
- 6) Michael A. Innis et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, pp.315-322, Academic Press, 1990.11.
- 7) 長谷川兼一，鍵直樹，坂口淳，篠原直秀，白石靖幸，三田村輝章：住宅のダンプネスのアンケートによる評価法の提案と子供のアレルギー疾患に及ぼす影響に関する全国調査，日本建築学会環境系論文集，第 723 号，pp.477-485, 2016.5。
- 8) Ali Kamal, Janet Burke, Stephen Vesper et al., Applicability of the Environmental Relative Moldiness Index for Quantification of Residential Mold Contamination in an Air Pollution Health Effects Study, Journal of Environmental and Public Health, Vol. 2014, Article ID 261357, 2014.11.
- 9) M. Mendell, R. Adams: The challenge for microbial measurements in buildings, Indoor Air 29, 523-526, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 長谷川兼一, 福島淳, 金澤伸浩, 藤晋一
2. 発表標題 居住環境と健康障害との関連性に関する調査 その14 住宅のダンプネスによる室内真菌叢に関する実態調査
3. 学会等名 日本建築学会 東北支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川兼一, 福島淳, 金澤伸浩, 藤晋一
2. 発表標題 住宅のダンプネスに関連する室内真菌汚染の実態 - 次世代シーケンサを用いた真菌叢の解析結果 -
3. 学会等名 空気調和・衛生工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Hasegawa, Naoki Kagi, Jun Sakaguchi, Naohide Shinohara, Yasuyuki Shiraishi, Teruaki Mitamura, Nobuhiro Kanazawa
2. 発表標題 Causal structures of association between home dampness during winter and allergic disease among children in cold climatic regions of Japan
3. 学会等名 Indoor Air 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川兼一, 福島淳, 金澤伸浩, 藤晋一
2. 発表標題 居住環境と健康障害との関連性に関する調査 その14 住宅のダンプネスによる室内真菌叢に関する実態調査
3. 学会等名 日本建築学会東北支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Hasegawa, Naoki Kagi, Jun Sakaguchi, Naohide Shinohara, Yasuyuki Shiraishi, Teruaki Mitamura, Nobuhiro Kanazawa
2. 発表標題 Causal structures of association between home dampness during winter and allergic disease among children in cold climatic regions of Japan
3. 学会等名 Indoor Air 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Hasegawa, Naoki Kagi, Nobuhiro Kanazawa, Jun Sakaguchi, Naohide Shinohara, Yasuyuki Shiraishi, Teruaki Mitamura, Jun Fukushima
2. 発表標題 Indoor environment and adverse health symptoms among children under home damp conditions
3. 学会等名 The 40th AIVC - 8th TightVent & 6th venticool Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川兼一, 福島淳
2. 発表標題 ダンプビルディングの室内環境と健康に関する研究 その14 DNA解析技術を用いた室内真菌叢の評価手法
3. 学会等名 日本建築学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川兼一, 福島淳, 金澤伸浩, 藤晋一
2. 発表標題 ダンプネスの汚染度が高い住宅における室内真菌叢のメタゲノム解析
3. 学会等名 日本防菌防黴学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福島 淳 (Jun Fukushima) (00181256)	秋田県立大学・生物資源科学部・教授 (21401)	
研究分担者	藤 晋一 (Fuji Shinichi) (40315601)	秋田県立大学・生物資源科学部・教授 (21401)	
研究分担者	金澤 伸浩 (Kanazawa Nobuhiro) (40315619)	秋田県立大学・システム科学技術学部・准教授 (21401)	