

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 03 月 31 日現在

機関番号：84406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500750

研究課題名（和文） 浴室で繁殖するカビのルーツを解明する

研究課題名（英文） Study on the origin of fungi growing in bathrooms

研究代表者

濱田 信夫（HAMADA NOBUO）

大阪市立環境科学研究所・研究副主幹

研究者番号：40270764

研究成果の概要（和文）：日本でもヨーロッパでも、いずれの浴室のカビも遺伝子的に非常に近縁であったが、野外から採取されたいずれの種の株とも異なっていた。一方、野外から採取された株について、界面活性剤の培地で培養を試みた。その結果、野外から採取した株の中に、その培地で生育するものが見つかった。野外の界面活性剤を利用できる特性を元来持っていた株が、浴室などの洗剤を使う水回りという新しい環境を得て繁殖しているのが、浴室のカビと言えよう。

研究成果の概要（英文）：*Scolecobasidium*, isolated from bathrooms and washing machines, because of their exposure to detergents, might be genetically and biologically distinct from outdoor isolates. *Scolecobasidium* from leaves were classified into 2 groups that grow using surfactant or not using. The isolates from bathrooms were identified as *S. humicola*, and *S. humicola* can use surfactants as their nutrition. A further implication is that the genetic variation found in the *S. humicola* isolates from detergent-rich indoor environments can occur as a result of having adapted itself to such an environment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・生活科学一般

キーワード：住環境

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで住環境中のカビについて、そ

の生態の解明に取り組んできた。居住者のアレルギー疾患の原因になる室内塵やエアロ

ンの真菌相、さらに、結露したサッシ窓、洗濯機や浴室の真菌相を明らかにした。水分要因、即ち住宅の立地、構造、さらに生活様式とカビ汚染の関係や、住宅や生活様式の歴史の変遷とカビ汚染の関係も究明してきた。

一方で、住環境中の各部分で生育するカビの生理的特性について研究してきた。住宅の中では、エアコンについて、室内に浮遊している一般の *Cladosporium* 等のカビが、冷えたフィルター部分などで発生した結露水を利用して生育することを明らかにした。冬の結露によるカビ汚染が見られるサッシ窓では、*Pseudotaeniolina* などの温度差の著しい過酷な環境中で見られる珍しいカビを見つけた。

(2) 本プロジェクトの一つである浴室のカビ汚染を研究する上で、洗濯機におけるカビ汚染の研究が役立った。石鹼を使用している洗濯機と、合成洗剤を使用している洗濯機とでは、カビ相に大きな違いが見られた。*Scolecobasidium* は合成洗剤の場合により多く、*Exophiala* は石鹼の場合により多かった。*Exophiala* や *Scolecobasidium* は一般に生長が遅く、野外環境中ではごく稀である。このような洗濯機のカビ相を決定している要因はカビの栄養になる洗剤、とりわけ、洗剤の成分中の AE (アルキルエーテル) などの非イオン界面活性剤が主な栄養源だと考えた。理由として、*Scolecobasidium* は、AE を高濃度で添加した培地の方が生育のよいことが挙げられる。

(3) それまでの浴室の調査によって、生長の遅い暗色の珍しいカビが多く見つかった。浴室の壁や床では、*Exophiala*、*Phoma*、*Scolecobasidium*、*Cladophialophora* が多く見つかった。これらは、いずれも石鹼やシャ

ンプー成分を栄養にし、洗濯機でしばしば見つかるカビだった。なお、予備調査では、台所からも同様にカビが認められた。このように、住環境中に生育するカビには、界面活性剤を栄養にしたり、次亜塩素酸耐性だったり、人の生活様式に適応したカビの繁殖が認められた。このカビのルーツはどこにあるか、生物学的にも興味深いと考えられた。

2. 研究の目的

浴室などの住環境は野外と多くの点で異なる環境であることは知られているが、生育するカビも野外は全く異なる生理的特性を持ち、その遺伝的特性も異なっているように見える。住環境中のカビは、その生理的特性も、そのルーツと考えられる多様な野生種のカビの中から、特殊な環境に適応した少数の株が室内で繁栄するようになったとの仮説を立てた。この住宅内でのカビの野生から栽培化への過程を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 住宅内で繁殖しているカビについて、多くの株を収集した。採取場所として、浴室、洗濯機、居間の窓目地、台所などの住宅について、ふき取りなどによりカビのサンプルを採取した。なお、住宅ごとの遺伝的特性の違いが見られる場合があるので、調査時に確認した。野外については、研究所近くの公園、また、市内の神社の森、さらには、原植生の残る吉野などで、落下菌中心のカビ採取を行った。なお、*A. fumigatus* は、これまで室内塵中にあると思われてきた。しかし、応募者の予備調査では、浴室でも検出された。まず、住宅内の分布とその生理的性質の関係をみた。

(2) 生理的性質については、温度耐性、

アルカリ耐性、乾燥耐性をまず調べた。浴室のセメント部分はアルカリ性で、いくつかの *Exophiala* が pH9.2 で生育できることが指摘されている。カビは一般的に酸性域で生育するものが多く、これは注目すべき形質といえよう。また、このアルカリ耐性が石鹼を栄養とするという特性とどのように関連しているかについても吟味した。

(3) カビの種の同定は、単離培養後にカビの生育状況を観察するとともに、顕微鏡観察を行い、形態的特徴について文献検索を行いつつ、これまで確認してきた。真菌にも形態学的に鑑別できない種類が存在しており、その厳密な鑑別のために遺伝子検査を応用した。

遺伝子レベルでは、分離株のリボソーム DNA の ITS 領域を増幅する V9D (5'-TTA AGT CCC TGC CCT TTG TA -3') と ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') のプライマーペアを用いて、分離株の同領域を PCR 法により増幅し、DDBJ が提供する FASTA プログラムにより、そのシーケンスの相同性を検索した。DNA の抽出、精製、PCR 反応ならびに増幅産物の精製からシーケンス反応の操作については、定法で行った。

4. 研究成果

(1) 解析に供した全分離株と3つのリファレンス株 (*S. humicola*, NBRC32054 ; *S. constricta*, NBRC9375 ; *S. gallopava*, CBS. 437. 64) から、各遺伝子領域の部分シーケンス (1710-bp、18SrDNA ; 1650-bp、28SrDNA ; 1160-bp、tef1 ; 685-bp、rpb2) が得られ、18SrDNA では 1000-bp、28SrDNA では 580-bp、tef1 では 480-bp、rpb2 では 630-bp を分子系統学的解析に用いた。国際 DNA データバンクに登録されていた *Scolecobasidium*

spp. は種ごとに明確に区別された。洗剤に含む室内環境から分離された 11 株のうち石鹼工場から分離された NH503 を除く 10 株は野外の葉から分離されたリファレンス株である *S. humicola* (NBRC32054) と最も近縁であった。また、それら 10 株中 7 株 (NH182、NH468、NH676、NH9105、NH8071、NH1841、NH1843) と 3 株 (NH792、NH539、NH279) は解析した 4 遺伝子座でさらに 2 系統に区別された。一方、石鹼工場の壁から分離された NH503 は、他の 10 分離株および解析に供した *Scolecobasidium* spp. と 4 遺伝子座において明確に区別された。

(2) 全ての分離株の胞子はいずれも 2 つの細胞区画で構成されており、楕円形または円筒状の形態でその長径は約 7~8 μ m であった。しかし、胞子表面の小棘 (denticle) の形態は NH503 と他の 10 株とで顕著に異なっていた。すなわち、NH503 の小棘は明視野観察においてもその存在が明らかであり、他の 10 株のそれは不明瞭であった。この相違は SEM 観察においてより明瞭に確認された。

培養実験に供した全分離株は sodium oleate (オレイン酸 Na) のみならず polyoxyethylene-(9)-lauryl ether を含む培地で発育した。しかし、14 のリファレンス株においては、株によってその発育程度に差異を認めた。すなわち、*S. terreum*、*S. tricladiatum*、*S. variabile*、*S. verruculosum*、*S. cateniphorum*、*S. gallopava* の 10 株は polyoxyethylene-(9)-lauryl ether を含む培地では発育しなかったが、*S. constricta* と *S. humicola* の 2 株は両界面活性剤を含む培地で発育が認められた。

(3) これまで海外では、*S. humicola* の室

内環境からの分離に関する報告はわずか一つあるのみであった (Lian and de Hoog, 2010)。しかし、*S. humicola* 株と *Scolecobasidium* spp.、あるいはそれら種または株間の遺伝学的、生物学的な相違は明らかではなかった。

本調査において顕微鏡観察により判明した分離株 10 株の胞子の形態学的特徴は、以前報告された *S. humicola* のそれと類似していた (de Hoog et al. 2000)。多遺伝子座の分子系統学的解析により、*Scolecobasidium* spp. 種間の各遺伝子座の遺伝的距離は、18SrDNA で 0.008、28SrDNA で 0.040、*tef1* で 0.039、*rpb2* で 0.175 であった。また、NH503 以外の 10 分離株とリファレンス株である *S. humicola* との遺伝的距離は前述した *Scolecobasidium* spp. 種間のそれらよりも低い値であった。各遺伝子座の遺伝的距離および胞子の形態学的所見から、洗濯機と浴室から分離された 10 株は *S. humicola* と同定された。NH468、NH1841、NH1843 の 3 株および最近海外で報告された株 (Lian and de Hoog, 2010) はいずれもヨーロッパの複数の地域の浴室から分離された株であることから、*S. humicola* は野外環境のみならず、浴室といった室内環境からも検出される菌種であることが明らかとなった。

(4) 石鹼工場の壁から分離された NH503 と遺伝的に最も近縁であった *Scolecobasidium* spp. との遺伝的距離は、18SrDNA では *S. humicola* と 0.011、*rpb2* では *S. terreum* と 0.181 であり、この値は前述した *Scolecobasidium* 種間の遺伝的距離よりも高い値であったが、28SrDNA では *S. terreum* と 0.038、*tef1* では NH792、NH539、NH279 と 0.019 であり *Scolecobasidium* 種間の遺伝的距離よりも低い値であった。形態学的には NH503 の

胞子表面の小棘は、今回の調査で *S. humicola* と同定された他 10 株および遺伝的に近縁であった *S. terreum* のそれらと明らかに異なっていたが (Abbott, 1927)、*S. constricta* のそれとは類似していた。しかし、解析した 4 遺伝子座における NH503 と *S. constricta* との遺伝的距離の値は *Scolecobasidium* 種間のそれらと比較した場合、明らかに高い値であった (18SrDNA では 0.021、28SrDNA では 0.132、*tef1* では 0.066、*rpb2* では 0.22)。このことから、石鹼工場の壁分離株 NH503 は遺伝学的、形態学的にユニークな株であり、おそらく新種と考えられた。

(5) 今回の調査において、ヨーロッパの浴室と洗濯機由来株を含む *S. humicola* 10 株は、遺伝学的に葉に由来する *S. humicola* のリファレンス株 (NBRC32054) と近縁であったが、解析した 4 遺伝子座の分子系統学的解析ではリファレンス株と異なる 2 つのグループに分類された。さらに、これら 10 株とリファレンス株の中では *S. constricta*、*S. humicola* のみが sodium oleate と polyoxyethylene-(9)-lauryl ether を添加した培地で発育し、他の *Scolecobasidium* spp. では sodium oleate を添加した培地のみで発育した。このことは、*S. constricta* と *S. humicola* の 2 種は、分離株の由来に関係なく界面活性剤を栄養素として利用できることを示唆しており、また、洗剤成分に富む環境由来 10 株に認められた遺伝学的変異は、そのような環境中での発育に適応した結果生じたのではないかと考えられた。あるいは、*S. humicola* の遺伝学的に変異したタイプが洗剤成分に富む室内環境での発育に適応している可能性もある。こうした推論の正当性を確認するためには、今後、室内外の様々な環境から分離された *S. humicola* の遺伝子レベ

ルの解析が必要である。

(6) 本調査では、9 分離株および *S. constricta* と *S. humicola* のリファレンス株は、市販の洗濯洗剤に含まれる非イオン界面活性剤の約 15 倍量に相当する 0.25% 濃度を含む培地上でも発育した。過去の報告によると、今回調査した NH8071 (今回 *S. humicola* と同定された) は、4 つのグループ (fatty acid esters、fatty acid amides、alkyl ethers、alkyl phenyl ethers) に分類される 16 種類の界面活性剤を栄養素として利用できることが示されている (Hamada and Nakamura, 2005)。このことから今回調査した他の *S. humicola* 9 分離株も NH8071 と同様に、複数種の界面活性剤を栄養素として利用できるものと推測される。

(7) 洗濯機から分離される *Exophiala alcalophila*、*E. moniliae* も今回の調査で用いた alkyl ether を含む培地で発育するが、野外から分離された *E. jeanselmei* は発育できない (Hamada, 2005)。界面活性剤を栄養素として利用する機構は明らかではないが、界面活性剤を利用する代謝機構を獲得した真菌が洗剤成分に富む環境中で発育できるものと考えられる。

Scolecobasidium 属真菌の種レベルの同定は、これまで主に胞子の明視野顕微鏡または走査型電子顕微鏡観察によりなされてきた (de Hoog, 2000)。しかし、同定のための形態学的アプローチは、形態学的に類似した種間の鑑別には利用できない。Horre et al. (1999) は核リボソーム RNA 遺伝子の PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法の有用性を、ヒトと他の脊椎動物および土壌や葉、水などの野外環境から分離された *Scolecobasidium* 株を用

いて検討しているが、*S. gallopava* を除く 5 種類の鑑別は成功していない。今回の調査では、*Scolecobasidium* 種間の鑑別と *S. humicola* 株間の相違を目的に多遺伝子座の分子系統学的解析を試み、その有用性を示した。今後、多様な環境から分離された *Scolecobasidium* 株を正確に同定するためには、こうした解析手法が必要と考えられる。

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 5 件)

- ① Abe N. and N. Hamada. Molecular characterization and surfactant utilization of *Scolecobasidium* isolates from detergent-rich indoor environments. *Biocontrol Science*. 査読有, 16, 2011, 139-147.
- ② 濱田信夫、阿部仁一郎. 壁紙の苦情品から分離されたカビの栄養特性. *防菌防黴* 査読有, 39, 2011, 463-472.
- ③ Hamada N and Abe N Growth characteristics of four fungal species in bathrooms. *Biocontrol Science*, 査読有, 15, 2010, 111-115.
- ④ Hamada N. and N. Abe .Comparison of fungi found in bathrooms and sinks. *Biocontrol Science* 査読有, 15, 2010, 51-56.
- ⑤ Hamada N and Abe N (2009) Physiological characteristics of 13 common fungal species in bathrooms. *Mycoscience*, 査読有, 50, 2009, 421-429.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 濱田 信夫、阿部 仁一郎. 汚染した壁紙から分離したカビの生理特性. 日本防菌防黴学会第 38 回大会. 豊中市. (2011.08.01-02)

- ② Hamada, N. and Abe, N. Characteristics and origin of common fungal species in bathrooms. 9th International Mycological Congress, Edinburgh UK (2010. 8. 1-6)

[図書] (計2件)

- ① 濱田信夫 (分担執筆), 住居医学 (V), 筏 義人、吉田 修編集、米田出版, 2011, 89-112,
- ② 濱田信夫 (分担執筆)、微生物孢子—制御と対策—渡部一仁、土戸哲明、坂上吉一編集、サイエンスフォーラム, 2010, 315-322、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 信夫 (HAMADA NOBUO)

大阪市立環境科学研究所・研究副主幹

研究者番号：40270764

(2) 研究分担者

阿部 仁一郎 (ABE NIICHIRO)

大阪市立環境科学研究所・研究主任

研究者番号：10321936