

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656338

研究課題名(和文)健康リスク評価の観点から見た室内浮遊真菌のDNA解析による濃度定量法の開発

研究課題名(英文)Development of method for determining indoor fungal concentration using genetic analysis from the viewpoint of occupants' health risk assessment

研究代表者

長谷川 兼一(Kenichi, Hasegawa)

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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：室内の浮遊真菌を捕集するために液体捕集法(インピンジャ法)の適用可能性を検討した。吸引量、吸引時間を測定パラメータとして、浮遊真菌捕集に最適な条件を探したが、インピンジャー法では捕集効率を十分に確保することが難しいことがわかった。従って、フィルタ法に絞って捕集法を構築する必要がある。

浮遊真菌濃度の定量では、DNA量が多い場合であれば検量線が十分に引けることを確認した。DNA量が少ない場合でも検量線が引けるためには増幅効率が良いプライマーの設計が必要である。今後、DNA量を十分に得られるダスト捕集による真菌を解析対象とし、本研究にて試みたDNA解析手法を適用するなど、研究展開が可能である。

研究成果の概要(英文)：In order to collect airborne fungi in indoor, the application possibility of methodology using an impinger was tested. Optimum conditions for collection of airborne fungi such as air sampling rate, sampling time and so on were examined. It was revealed that it was not easy to keep the collection efficiency stable during a measurement period. Therefore it is necessary to develop the methodology sampling by filtration in future.

In determining indoor fungal concentration using genetic analysis, it was found that the more samples of microbial species were collected, the higher analysis precision was. It is important to design a primer for improvement of amplification efficiency of DNA.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：建築学・建築環境・設備

キーワード：室内浮遊真菌 健康リスク DNA解析 捕集法 濃度定量法

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の胞子を有する。浮遊真菌は呼吸時に体内に吸い込まれ、アレルギー性疾患を誘発する。

建築空間の浮遊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胞子を培養した後、コロニー数を数えて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(以下、衝突法)を用い、捕集空気中に含まれる培養可能な胞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、アレルゲン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。

浮遊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[Vesper, S. et.al.: Development of an Environmental Relative Moldiness Index for US Homes. JOEM 49(8), August 2007: 829-833.]され評価法の開発が進んでいるが、浮遊ダストを対象としていない。日本では、建築室内環境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、以下の2点を明らかにする。

- 1) 従来の衝突法では数分間の空気捕集により測定するため、時間変動が大きい浮遊真菌濃度の代表値を得られるか疑問である。従って、長時間サンプリングが可能な液体捕集法(インピンジャ法)に着目し、衝突法との差異ならびに有効性を明らかにする。
- 2) DNA解析技術を用いて、浮遊真菌を菌種毎に定量化する手法を確立するとともに、カビアレルゲン量の定量化の可能性を提示する。

3. 研究の方法

(1)インピンジャ法による真菌濃度測定法に関する検討

インピンジャ法による浮遊真菌濃度の測定として図1に示す測定システム(インピンジャはSKC社製のBiosamp)を用いた。実験の対象とした建物は、秋田県立大学構内に位置する屋外実験家屋の1階東側居室と床下である。実験ではインピンジャ法により、真菌を8時間連続捕集すると同時に、エアサンプラー(ミドリ安全製、Bioサンプラー)を用いて、1時間間隔で衝突法による捕集を行った。衝突法ではDG-18培地を用い、BIOサンプラーにて毎回100Lの空気を1分間捕集する。インピンジャ法では捕集溶液(以下

ViaTrap)を用い、12.5L/minの流量にて8時間連続捕集を行う。捕集後の培地は、インキュベーターで25℃、96時間培養後、コロニー数を計測した。また、同時に室内の温湿度を計測するとともに、在室者の人数や空調使用の有無、窓の開閉状況を記録した。

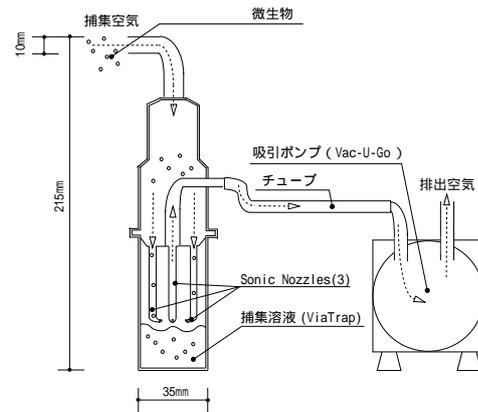


図1 実験に用いた測定システム

(2)DNA解析技術を用いた真菌濃度の定量化手法の検討

測定対象の真菌

本研究ではアレルギー性疾患を引き起こす真菌に焦点を当てる。文献(秋山一男:室内環境におけるアレルギー疾患の現状-真菌アレルギーを中心に-室内環境,10 pp.11-16,2007年)を参考に、本研究においてDNA解析を行う真菌を決定した。

DNA解析を行う真菌は

Alternaria alternata (NBRC107930)
Aspergillus versicolor (NBRC33027)
Aspergillus fumigatus (NBRC 33022)

である。

真菌の採集はメンブランフィルターを使用した。46×68×32(cm)の簡易な捕集箱の中に真菌を培養したシャーレを設置し、流量15L/minで12時間の空気吸入を行った。捕集後のフィルターは15mlふた付きチューブに入れ、100mM Tris-HCL buffer 5mlを加えて、攪拌と超音波洗浄を繰り返して真菌を回収した。処理後は2mlチューブに入れて-20℃で保存した。

DNA抽出

MO BIO社のPower Soil DNA Isolation Kitを用いてDNAを抽出した。抽出を行った溶液は2mlチューブに分注して-20℃で保存した。

プライマー設計及びRealTime-PCR

RealTime-PCR(以下Rt-PCR)を行うためのプライマー設計を行った。NBRCの配列情報またはEPAの情報から各真菌の保存性の比較的低いITS領域の配列を用いてプライマーを設計した(表1)。

Rt-PCRの実験はLightCycler® Nanoにて行った。サーマルサイクル条件は95℃10分でProbes Masterを活性化させた後に95

20 秒で DNA を 1 本鎖に分離させ、52 ~ 62 30 秒でアニーリングした。サイクル数は最大 45 回とした。

表 1 設計したプライマーとプローブ

	<i>Al. alternata</i>	<i>As. versicolor</i>	<i>As. fumigatus</i>
Forward Primer	ATATGAAGGC GGGCTGGAAC	CGGCGGGAAG CCCT	CGCGTCCGGT CCTCG
Reverse Primer	ATATGAAGGC GGGCTGGAAC	CCATGTGTGAA AGTTTTGACTG ATTTTA	TTAGAAAAATA AAGTTGGGTGT CGG
Probe	CTCTCGGGGT ACAGCCTTGCT GA	AGACTGCATC ACTCTCAGGC ATGAAAGTTCAG	TGTCACCTGCT CTGTAGGCC G

検量線作成のために、PCR 産物を PCR clean-up Gel extraction を使用して DNA を精製し、50 倍希釈して分光光度計で 260nm の吸光度を測定して以下の計算式で DNA のコピー数を求めた。

$$C \left(\frac{pmol}{\mu l} \right) = \frac{A_{260} \times 100 \times 50}{(1.5 \times N_A + 0.71 \times N_C + 1.2 \times N_G + 0.84 \times N_T)}$$

$$\text{コピー数} \left(\frac{copies}{\mu l} \right) = C \times 10^{-12} \times 6.02 \times 10^{23}$$

N_A, N_C, N_G, N_T : DNA の塩基数
 C : 濃度, A_{260} : A_{260} の吸光度

コピー数を求めた後に数段希釈を行い、検量線作成のための溶液を作製した。

4. 研究成果

(1) インピンジャ法による真菌濃度測定法に関する検討

実験期間中の室内状況を図 2(a)、真菌濃度の測定値を図 2(b)、室内温湿度変動を図 2(c)、外気温湿度変動を図 2(d)に示す。

測定期間中 9:50 と 11:50 からの 10 分間アースチューブを運転した後に測定を行った。その際 1 時間前の値と比べると、DG-18 培地では 10cfu/m³ 増加、DG-18 培地では 700 cfu/m³ 増加しており、真菌濃度が増加傾向にあることに加え、相対湿度も高くなっている。つまり、アースチューブを運転することにより室内へカビ胞子が侵入し、カビにとって適湿に近づくとと言える。

また、インピンジャ法による真菌濃度の平均値をこの測定期間(8時間)の代表値とし、衝突法による平均値と比較する。インピンジャ法が 204 cfu/m³ となり、衝突法による DG-18 培地が 414 cfu/m³ となり真菌濃度に差が見られた。原因として考えられることの一つに、インピンジャの捕集効率の変動が挙げられる。測定期間中に吸引ポンプの流量が変動している可能性がありこのことが、安定した真菌捕集の妨げになったと考えられる。

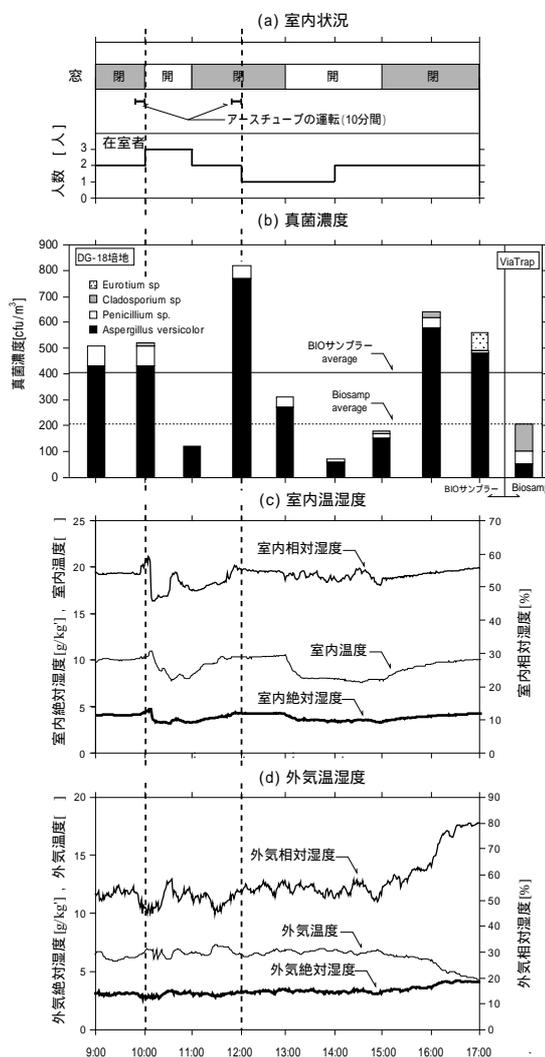


図 2 測定結果

本研究では、インピンジャ法に着目し、浮遊真菌濃度の代表値の算出を試みた。しかしながら、捕集効率の安定化や液体捕集という現場での作業性を考えると、汎用性のある手法とするには検討課題が多いといえる。

(2) DNA 解析技術を用いた真菌濃度の定量化手法の検討

設計プライマーの PCR 条件の最適化

3 つの真菌を同時に測定するためにアニーリング温度の検討を行った。反応条件として 95 を 5 分間行った後に 95 を 30 秒、表 2 に示した 52 ~ 62 の範囲でアニーリング温度を変えて 30 秒、72 を 15 秒のサイクルを 35 回行い、サイクル後に 72 を 5 分にし、その後は 4 で保冷した。

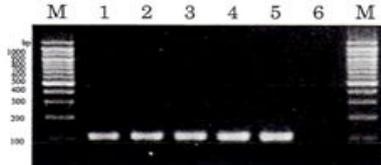
その結果、*Al. alternata* と *As. versicolor* についてはどの温度でも良く反応することが確認できたが、*As. fumigatus* については 59.7 が最もよく反応が見られた(図 3, Lane No. は表 2 に対応)。

以上より、RealTime-PCR でアニーリング温度を 60 とした。

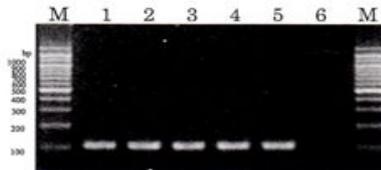
表2 アニーリング条件

Lane	sample	
1	PCR product	
2		anneal Tm 52.0
3		anneal Tm 54.7
4		anneal Tm 58.1
5		anneal Tm 59.7
6		anneal Tm 62.0
M	Negative control	
	100bp Ladder(HSS)	

No.1 Alternaria alternate



No.2 Aspergillus versicolor



No.3 Aspergillus fumigatus

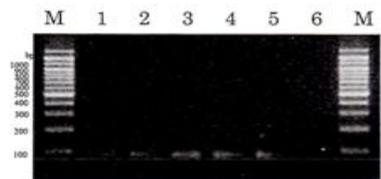


図3 アニーリング温度の検討結果

RealTime-PCR の解析

先に作製した検量線作成用の精製 PCR 産物希釈液およびメンブレンフィルターによって捕集した真菌サンプルについて、先に決定した測定条件で Rt-PCR を行った。

その結果, *Al.alternata*, *As.versicolor*, *As.fumigatus* 全てから検出結果が得られ, 図4 に示した検量線も得ることができた。しかしながら, 捕集した真菌サンプルについても検出はされたものの, Ct 値がそれぞれ 31.6, 38.6, 28.1 と立ち上がり遅いため, 検量線上に Ct 値をプロットすることができず, 定量には至らなかった。この原因として, 捕集真菌から抽出した DNA 量が少ないことが考えられ, 浮遊真菌の捕集による解析手法では定量化には限界があることが指摘できる。

今後の展開として, ダスト捕集による真菌を解析対象とすれば, 本研究にて提案した DNA 解析手法により定量化が十分に可能であるという知見が得られた。

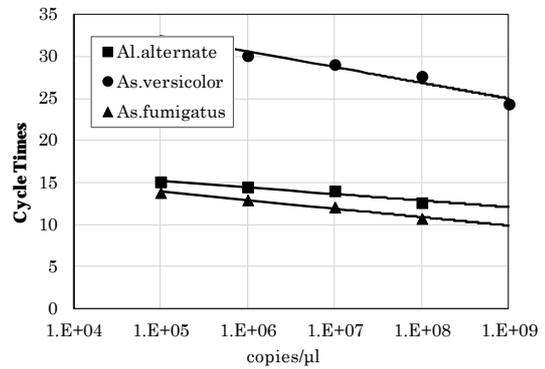


図4 各真菌の検量線

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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

なし

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

金澤 伸浩 (KANAZAWA, Nobuhiro)

秋田県立大学・システム科学技術学部・准教授

研究者番号: 40315619

(3)連携研究者

()

研究者番号: