

Short Report

健康リスク評価の観点から見た室内真菌の DNA 解析による濃度定量法の開発

長谷川兼一¹, 金澤伸浩², 藤晋一³, 福島淳⁴, 岡野桂樹⁴

¹ 秋田県立大学システム科学技術学部建築環境システム学科

² 秋田県立大学システム科学技術学部経営システム工学科

³ 秋田県立大学生物資源学部生物生産科学科

⁴ 秋田県立大学生物資源学部応用生物科学科

真菌は居住者のアレルギー性疾患を誘発することが指摘されているが、家庭内の浮遊真菌濃度と症状との関連性は明確でない。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大きな原因である。そこで、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。DNA 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ゲン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。本研究の新規性は、家庭内真菌の網羅的解析のために RISA 法に着目し、全ての真菌種の同定と定量が可能な技術開発にチャレンジすることである。RISA 法を適用する利点は、迅速かつ安価に解析できる点にある。本報では、その一環として、微生物に対する DNA 解析技術の適用可能性を検討した結果のうち、微生物群種を網羅的に解析する RISA 法の有効性の一端を示した。この測定法が構築されれば、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への有益な情報提示などが期待される。

キーワード：ダンプネス、健康影響、真菌汚染、ハウスダスト、DNA 解析

住宅のダンプネス（湿度が高い状態）と喘息やアレルギー症状などの健康影響との因果関係に着目した先行研究は多い。しかしながら、実際の住環境において、真菌などの具体的な暴露要因との因果関係を明示する知見は少なく、現段階では、ダンプネスという包括的に表現された指標との関連性が確認できるのみである。

ダンプネスから健康に連鎖する因果構造は、図 1 に示すように、室内環境の汚染が介在していると仮定できる。このような構造が明らかになれば、建築的な防除策の構築につながると期待できる。そこで、住宅の環境汚染の度合いを測る指標としてダンプネスの程度を提案（長谷川ら（2016））し、①ダンプネスの程度と子供の呼吸器系疾患とは有意な関連性があること、さらに、②ダンプネスの重篤度が増す

に従い、健康影響の発生割合が高くなるという用量-反応関係に類似した傾向があること、を提示した。しかしながら、筆者らが提案したダンプネスの評価

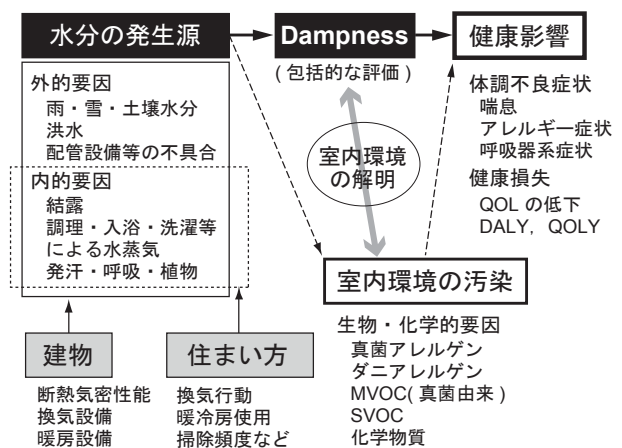


図 1 Dampness と健康への因果構造の例

法は回答者の主観に基づく判断により成り立つものであり、その客観性が十分に検証された訳ではない。

本研究は、ダンプネスによる室内環境汚染に関連が深い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。本報では、筆者らが開発している手法の一端を示す。

調査対象の選定とサンプリングの方法

調査概要

本研究では、2015 年 1 月に実施したインターネットを介したアンケート調査のうち、実測調査に協力できると回答した東日本の住宅 60 件を対象とした。アンケート調査では、冬期の室内環境に関する質問と子供の健康状態を尋ねた。実測調査は、30 件に分けて 2015 年 2 月上旬と下旬の連続する 5 日間に実施し、居間と寝室の室内温湿度、化学物質濃度、窓ガラスの結露量、床ダスト内に含まれる微生物量を測定した。床ダスト内に含まれる微生物は DNA 解析により真菌などを同定する。各項目に対応する測定キットを対象住宅に送付し、居住者に計測機器の設置や結露水・床ダストの採取を依頼した。

ダンプネスの程度の評価結果

筆者らは、包括的なダンプネスの評価を定量化することを意図して、表 1 のダンプネスの程度の評価法を提案している。これは、評価者が容易に観察可能な結露・カビの発生や、知覚が可能なカビ臭を評価項目としており、各評価項目の点数が大きいほどダンプネス問題の重篤度が大きいとした。

図 2 にダンプネスの程度の分布を示す。ダンプネスの程度は 2013 年度の全国調査の結果をもとに、ランク 1~4 の 4 段階に分類した。評点 13 付近以上の住宅をランク 4 とし、ダンプネスの程度が最も重篤であると判断している。図を見ると、評点 2~24 の広い範囲に分布している。

DNA 解析技術を用いた微生物の評価方法

概要

微生物の同定に DNA 塩基配列が研究や品質管理

等で利用されているが、リボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列に基づいて系統分類する研究が進展している（後藤（2009））。筆者らは、微生物群集から特定微生物を迅速に検出可能な解析技術の一つである RISA（Ribosomal Intergenic Spacer Analysis）法に注目している。RISA 法の利点として、解析サンプルに対して迅速・安価に病原性の高い菌種などのターゲットを検出することが挙げられる。よって、RISA 法を用いれば、室内に常在する微生物を網羅的に把握できるため、ダンプネスの程度に応じた真菌叢の特徴やそれらを定量化する評価法の開発に期待できる。

本報の調査では、協力世帯にダスト封入用袋を送付し、一定期間、保有の掃除機でダストを捕集した後、返送するよう依頼した。解析は、秋田県立大学バイオテクノロジーセンター（以降、BTC）の専門スタッフが担当した。

表 1 ダンプネスの程度の評価方法

- (1) 居間・寝室の結露箇所(6点)：「窓ガラス、窓枠、外気に面する扉等」とそれ以外での発生箇所の数により評価。
- (2) 居間・寝室の窓ガラスの結露の程度(6点)：「なし」～「水滴が流れる程度」までの程度により評価。
- (3) 居間・寝室の窓ガラスの結露の頻度(6点)：「なし」～「常に発生する」までの頻度により評価。
- (4) 浴室以外のカビの発生箇所(3点)：「なし」～「3箇所以上」までの発生居室の数により評価。
- (5) カビ臭の発生箇所(3点)：「台所・洗面所・浴室」とそれ以外での発生居室の数により評価。

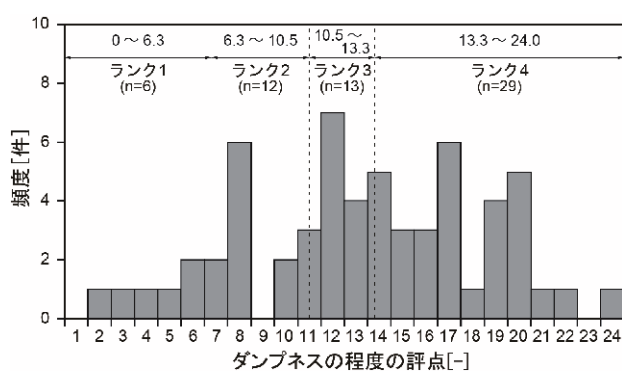


図 2 ダンプネスの程度の分布

RISA 法

RISA 法は、微生物の DNA 配列の一部であるリボゾーム RNA 遺伝子のうち、図 3 に示す ITS (Internal Transcribed Spacers) 領域あるいは、D1/D2 領域の長さに基づいて、微生物種の存在の有無を判別する手

法である。同一種であれば、ITS 領域の塩基配列の相同性が相当の確率で確認されている²⁾ため、ITS 領域の長さに対応した微生物の種を結びつけることができる。このような情報を予めデータベース化すれば、塩基配列を解析することなく、特定種の検出が迅速に行える。

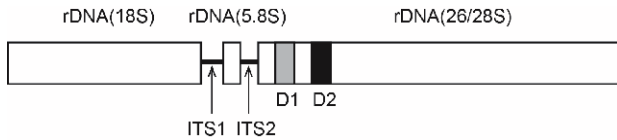


図3 ITS および D1/D2 領域

本研究では、RISA 法をダンプネスの評価に展開するため、ターゲットとすべき種の抽出、ならびにその種の ITS 領域の塩基配列を解析し、それらのデータベース化も図る。また、検出された微生物の定量化には、DNA を増幅する手法である PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いる。ターゲットとする種の ITS 領域の DNA に対して PCR を施し、増幅の程度に応じて多段的な定量化が可能と考えている。

次世代シーケンサーによる網羅的配列解析

RISA 法では、解析対象のダストに含まれる任意の微生物の種の存在を判別できるが、種を特定するためには ITS 領域の長さに対応する種の同定が必要である。現状では、ダンプネスの評価に必要な微生物の種の情報が整備されていないため、ITS 領域の長さに応じた DNA の塩基配列を解析する必要がある。

DNA の塩基配列を読解する技術 (DNA シークエンシング) は著しく発展している。BTC では次世代シーケンサーと称する、当該分野の先端技術が反映されたシステムを保有している。本研究では、この次世代シーケンサーを用いて、解析対象に含まれる全ての微生物の塩基配列をゲノムショットガン解析により網羅的に読解し、RISA 法による評価が可

能なようにデータベース化を図っている。塩基配列がわかれば、DNA の相同性の基づいて種が同定され、病原性が高い微生物の存在を正確に把握することができる。また、ショットガン解析では、相同性が確認された塩基配列の数を知ることができ定量性が高いが、解析コストが高く手間もかかるため、汎用的にダンプネスの評価に用いることは現実的ではない。

DNA 解析結果と考察

RISA 解析

図 4 に、調査対象の 60 世帯から採取したダストに対する RISA 解析の結果を示す。図は、ダンプネスの程度のランク 1~3 とランク 4 とにグループを分けている。RISA 法では、ITS 領域の長さに対応する検出サイズにより有無は判別されるが、今回の対象では、サイズ小から大の順位に並べて約 500 種が検出された。両群の各サイズに反応した割合の差は、ダンプネスの程度が高い住宅の特徴の一端を示すと期待される。特に、ピークサイズが 740~75 付近では、ランク 4 の住宅群の方が反応する割合が高い箇所が散見され、749 は *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus* を示す可能性を別途検証している。今後、ショットガン解析を反映させ、多くの種を明らかにする予定である。

次世代シーケンサによるショットガン解析

表 2 に、子囊菌門に分類されるショットガン解析結果を示すが、同定された全ての種に対してダンプネスの程度のランクにて検出した割合を算出した。この割合は、各ランクにて検出されやすい種を示し、ダンプネスの程度に応じた真菌叢の特徴が明らかになることが期待される。例えば、*Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* といった *Aspergillus* 属の菌種に、ダンプネスの

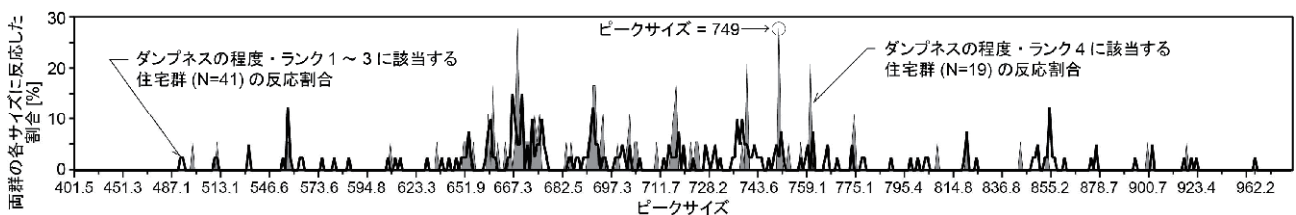


図4 RISA 解析の結果

Development of method for determining indoor fungal concentration using genetic analysis for health-risk assessments

Kenichi Hasegawa¹, Nobuhiro Kanazawa², Shin-ichi Fuji³, Jun Fukushima⁴, Keiju Okano⁴

¹ Department of Architecture and Environment System, Faculty of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University

² Department of Management Science and Engineering, Faculty of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University

³ Department of Bioresource Science, Faculty of Biological Production, Akita Prefectural University

⁴ Department of Bioresource Science, Faculty of Biotechnology, Akita Prefectural University

Authors have already proposed the estimation method for home dampness using occupants' self-reported answer to questions about visible vapor condensation, visible mold growth, and so on during the winter season. This dampness index ranges from 0 to 24, and its values were classified into four levels based on the quartiles from the national questionnaire surveyed results in approximately 5,000 residential buildings in Japan. Level 4 represents houses with the most serious problems related to indoor dampness. According to results from the survey, the prevalence of children diagnosed with asthma was approximately 8.0%. This dampness index of Rank 4 presented the house which had the most serious problems related to indoor dampness. In this paper, we have tried to collate the dampness index with microbial community included in sampling dust from the floor of each house. The microorganisms were analyzed using the ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) method, which is genetic-analysis method. The RISA method is able to provide rapid analyzed results with low cost and to encyclopedically analyze mold species in sampled dust. Through a comparison between the dampness index and mold contamination analyzed, the characteristics of dampness in residential buildings could be revealed. Houses with a dampness index of Rank 4 are likely to have several specific mould species.

Keywords: Home dampness, Adverse health effect, Mold contamination, House dust, Genetic analysis