

生活環境にみる真菌アレルゲンとその測定

国立医薬品食品衛生研究所

高鳥 浩介

はじめに

アレルゲンとしての真菌は、生活環境のあらゆる場所に分布生息している。例えば、大気やハウスダストなどに分布し、真菌に適環境が得られると大量の発生から汚染へと進行する。特に生活環境に多い真菌としてカビである *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Alternaria*, *Wallemia* や酵母である *Rhodotorula* などを挙げる事ができる。これら真菌の生態を紹介し、大気での動態とその測定技術について述べてみたい。

1 生活環境にみる空中浮遊真菌の生態分布

室内にみる空中浮遊真菌は、主にアレルゲンとしての観点から調査研究されてきた。本邦に限らず諸外国の研究をみても真菌分布・頻度の結果はほぼ似た傾向を示している。すなわち主要真菌の多くは *Cladosporium* であり、次いで *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* などが占める。*Cladosporium* は、浮遊真菌として室内に限らず、野外でも比較的多く、この真菌の分布や検出頻度によって、汚染の程度を把握できる指標菌でもある。

2. 真菌の発生源

真菌の多くは本来土壌生息性が強く、土壌を介して植物に付着する。土壌での真菌は、1グラムあたり 10^4 ~ 10^6 であり、量的にも著しく多い。土壌が乾燥することにより、微粒子状となって大気中に飛散する。そのなかで *Cladosporium* の占める比率が高い。また、水中での分布も知られており、河川や湖沼などから大気中に飛散する真菌もある。しかし水生菌は、一般に陸生ではないため死滅しやすい。室内での真菌には野外から侵入する場合と、室内に長期にわたり生息する場合があり、前者には、*Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aureobasidium* 等、後者には *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium* 等が知られている。

3. アレルゲンとしての真菌とその測定

生活環境中であって大気中に分布するアレルゲンとして、ダニ、イヌ、ネコ、ハウスダスト以外に重視される生物として真菌がある。真菌の大きさは、一般に3 ~ 10 ミクロンが多く、大きい場合は100 ミクロンを超える。また真菌は大気中では孢子で浮遊しており、菌糸で浮遊することは少ないと考えられている。こうした細胞形態で大気中に分布することから、その測定には今日まで数多くの手法が工夫されてきた。その計測手法として落下法や吸引法があり、特に後者に関して多種類のサンプラーによる真菌測定が試みられてきた。多くは真菌数と菌種に焦点が当てられ、さらに生細胞を対象として調査が実施されてきた。ところが、真菌アレルゲンとしての観点からみると1) 総真菌量 2) 真菌分布 3) 経時的推移に加えて、4) 真菌細胞の粒径分布 5) 生細胞及び死細胞の動態把握を測定することが重要となるが、4) と 5) についてはほとんど調査研究されていないのが現状である。

そこで、はじめに生活環境大気中にみる真菌細胞の粒径分布測定手法について検討し、さらに真菌の生細胞と死細胞同時測定による測定手法の確立を目的として実施した成績についてまとめ、この測定手法が今後の技術展開にどのように評価されるか述べてみたい。

1) パーソナル・カスケード・インパクト (PCI) サンプラーによる室内大気中の真菌測定法

生活環境中でアレルゲンに最も暴露される環境は大気である。すなわち、大気中に分布する真菌は呼吸器系に吸引されることによりアレルゲンとして活性を示す。吸引される場合、アレルゲンの粒径が重要な因子になると考えられる。ところが、大気中に分布する真菌アレルゲンの粒径についてほとんど計測された知見がなく、病因学的、生物学的にも是非解明する必要がある。真菌のアレルゲン性に関する研究は、

まだ黎明期であり、今後の研究に期待するところが大きい。そのため、真菌に関してさまざまな分野からアレルゲンとの関わりを究明していく必要がある。その研究の一環として以下の研究による大気中での粒径分布並びに真菌種を把握することにより、少しでもアレルゲンとしての原因究明に結びつくことを期待している。そこで、従来からのサンプラーによる測定ではなく、粒径別で測定することを検討した。

現在開発されている PCI サンプラー (PM₁₀, PM_{10-2.5}, PM_{2.5}の3分級フィルター) を用いて室内大気中の真菌測定を通年にわたり調査した。通気量 3L/分、測定時間は1~7日間実施し、各分級での真菌数を培養法で測定した。その成績の確証を得るため直接法により真菌細胞の大きさおよび形状の確認を行い、PCI サンプラーによる各分級での真菌細胞の評価を行った。

大気中にみる3分級(1層:PM₁₀、2層:PM_{10-2.5}、3層:PM_{2.5})での真菌細胞の真菌数と形状を検討した。真菌数では、2層PM_{10-2.5}で最も多く捕集され、ついで1層PM₁₀であった。3層PM_{2.5}では著しく真菌数は少なかった。また季節的な真菌数の傾向をみると秋季に多くなり、冬期に減少傾向を認めた。

PCI サンプラーの各分級にみる主要真菌をみると10 μ m以上と2.5-10 μ mでは *Cladosporium*, *Penicillium* に加え、酵母、*Eurotium* が多く、一方2.5 μ m以下では、少ないが *Penicillium* を認めた。

サンプラー各分級からの培養成績を確認するために各分級での真菌細胞の粒径を鏡検による直接法で確認したところ、各分級で真菌細胞が確認できた。すなわち1、2層に真菌細胞を確認することができ、真菌細胞の大きさと各粒径との比較を行ったところ、1層フィルターでの捕集は10 μ m前後に幅広く確認でき、細胞の大きさ4.8-72 μ m域にある比較的大型の菌糸または孢子細胞を認めた。2層フィルターでは2.5-7.5 μ mの細胞が多く捕集された。さらに3層では、大きさ2.5 μ m以下の細胞が確認できた。この結果から、各層での粒径は理論値にほぼ一致するものであり、PCI サンプラーによる真菌計測法への応用は十分期待できるものと判断された。

2) 真菌の生死細胞評価の解析

生活環境には数多くのアレルゲンが分布している。真菌もその一つであるが、従来の真菌とアレルゲンの考え方は、培養による結果が前面にでた生菌数による評価であった。しかし、アレルゲンの多くは蛋白であり、これは生菌に限らず死菌でもアレルゲンであることは否定できない。生活している場には著しい数の生物が存在しており、その多くはむしろ生細胞でない状態で自然界に存在している。真菌も同様で、その生物学的特性から、生活環境の大気中やハウスダストなどでも死細胞として存在している。生細胞に限らず死細胞を確認することもアレルゲン解明の一助になるものと考えられ以下の研究を行った。

大気中に多い真菌を対象として、真菌の生細胞と死細胞に対し蛍光色素 fluorescein diacetate (FDA) および propidium iodide (PI) の二重染色法による細胞の活性・不活性(生死)の解析を行った。

生細胞ではFDAと細胞内 esterase の反応から520nmで活性を確認できる。すなわち、生細胞は代謝による酵素活性を維持しており、基質と生体酵素との特異的な蛍光反応により緑色発光し明らかな細胞の活性を証明できた。一方、死細胞では特異的にDNAと反応するPIにより赤色発光を認めた。また、多細胞性孢子ではFDA、PIの双方に発色する細胞も存在し、複雑な活性を示した。

すなわち、環境に多い真菌の細胞活性・不活性を二重蛍光染色法により解析したところ、生細胞ではFDAが良好に反応し、また死細胞では細胞の一部および全体にPIによる発光を認め、明らかに生死細胞を判別できた。また、一部真菌にみられる多細胞性孢子ではFDA、PIの双方に発色する細胞も確認された。

生活環境中にみる真菌アレルゲンの測定法に関して、PCI サンプラーによる粒径分布および蛍光法による生死細胞測定を検討したところ、いずれも真菌アレルゲン計測法として十分活用され、かつ期待できるものと判断された。