

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：82602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18467

研究課題名(和文)高齢者居住環境における感染症予防と微生物汚染探索法としてエンドトキシン評価の提案

研究課題名(英文) Endotoxin measurement as an evaluation method for microbial pollution in the elderly residential environment

研究代表者

金 勲 (KIM, Hoon)

国立保健医療科学院・その他部局等・上席主任研究官

研究者番号：00454033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：細菌汚染評価におけるより迅速かつ再現性及び定量性が高い評価法として、エンドトキシン(ET)測定を提案する。その活用性と実用性を探索し、空気経由の感染症及び微生物汚染を定量的に評価し、感染症予防と環境改善に資することを目的とする。

1)室内空気中ET濃度と遺伝子分析：高齢者施設15件(60カ所)を対象に気中濃度を測定した。2)ET濃度と培養法の比較：チャンバー内で加湿器にカチオン系除菌剤を添加したものと水道水のみのもを用意し比較実験を行った。3)ハウスダスト中ET濃度：住宅92軒の寝室とリビングのハウスダストを採取しET濃度を分析すると共に住居・室内環境と居住者健康に関する設問を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養法が基本となっている細菌汚染評価法に対して、より迅速かつ再現性と定量性の高い評価法としてエンドトキシン(ET)測定の活用性と実用性の可能性を探索するため、ETの空気中濃度とPCRによる遺伝子解析及び培養法結果との比較、ハウスダスト中ET濃度と住居・生活環境及び居住者健康状況などを調べた。環境中ET濃度と他の測定法を網羅して比較研究しているのは国内で例のない貴重な研究である。

特に高齢者居住環境(施設、住宅)における感染症予防と微生物汚染探索法として従来の培養法の短所を克服するための測定法としてETの活用と実用性の可能性を示したことで高齢者のQOLと健康維持に資すると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have proposed the endotoxin (ET) measurement as a fast, highly reproducible and quantitative evaluation method for bacterial contamination. The research aim is to quantitatively evaluate microbial pollution and to explore its utility and practicality in order to contribute to the prevention of infectious diseases and indoor environmental improvement.

1) Indoor ET concentration and gene analysis : Air concentration was measured in 15 facilities (60 points) for the elderly. 2) Comparison of ET concentration and cultural procedure : The comparative experiments were carried out by preparing humidifiers with a cationic eradication agent of bacteria and a tap water only in the clean chamber. 3) ET concentration in house dust : We collected house dust at bedrooms and livings in 92 houses, determined ET in them, and had a questionnaire about the residential / indoor environment and health condition of residents.

研究分野：建築環境

キーワード：エンドトキシン 感染症 細菌 高齢者 PC 室内環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌が産生するエンドトキシン (ET) は乳幼児期の汚染因子 (非衛生的な環境) への曝露が成長・成人期における病気やアレルギー罹患に密接に関係するという衛生仮説 (1989、Strachan DP) ¹⁾でも注目されている物質である。また、多くの生物活性が発現し血液中に混入すると発熱、敗血症性ショックなどを引き起こすため医療・製薬・生理学では以前から重視されている。

研究代表者は衛生仮説に基づいたアレルギー罹患とハウスダスト中 ET 濃度に関する研究を行っており、ET 濃度の測定は時間、精度、再現性の面で優れていることが確認できた。微生物測定は培養が基本となり、結果導出までは時間を要し、捕集から培養・同定に至るまでの誤差も大きい。特に細菌は培地種類によって同定できる菌種が限定されることが多く、真菌よりも培養と同定が難しい。そこで、培養法ではなく ET 濃度を測定することで浮遊細菌濃度を代表させることを考え、空気捕集法の開発、フィルター選定試験、分析法の確立に加え、基礎的な調査として実際に高齢者施設及びオフィスビルを対象に現場測定を行ってきた ²⁾⁻⁶⁾。

基礎的研究 ²⁾⁻⁶⁾から得られた結果から、ET と細菌濃度に相関が得られる可能性がある、高齢者施設がオフィスより有意に高い濃度を呈す、高齢者施設に明らかに汚染されている部屋が複数存在することや、オフィスでも冬期の加湿器使用で濃度が高くなることを確認している。また、明確な相関性と指標としての提案段階には至っておらず、より綿密な実測調査が必要である。また、分担研究者 (柳宇) は培養法のみならず DNA 分析ができる環境になったため、グラム陰性菌だけを分離した同定も可能になり、より厳密な相関調査ができるようになった。

2. 研究の目的

微生物評価には培地を用いる培養法が従来から使われているが、結果導出までは時間を要し、捕集から培養・同定に至るまでの誤差も大きいことは短所とされている。近年は PCR 法を用いる DNA 分析法も導入されつつあるが、費用と現場適用の課題が残っている。

本研究は、培養法が基本となっている細菌汚染評価法に対して、より迅速かつ再現性及び定量性が高い評価法として、真正細菌の殆どを占めるグラム陰性菌が産生するエンドトキシンを測定することを提案し、その活用性と実用性を探索することで空気経由の感染症及び微生物汚染を定量的に評価し、感染症予防と環境改善に資することを目的とする。

3. 研究の方法

以下内容について研究を遂行した。

(1) 室内空気中 ET 濃度と遺伝子分析

特別養護老人ホームを対象に北海道 4 施設、仙台 5 施設を選定し、2018 年 11 月 (北海道 4 件) 2019 年 3 月 (仙台 5 件、北海道 3 件)、2019 年 8 月 (仙台 5 件、北海道 3 件) に室内 60 箇所と外気 20 箇所の濃度測定を行った。測定項目は ET、浮遊真菌・細菌、DNA 解析、測定箇所は居室 (寝室) 2 室、共用空間 1 カ所、外気である。

空気試料は MCE フィルター (Mixed Cellulose Ester Membrane Filter) に 100L (3.3L/min) を吸引・捕集、カイネティック比濁法 (Toxinometer ET-5000) により濃度を定量した。

r-PCR を用いた遺伝子分析は、室内と屋外の浮遊菌についてエアポンプ (Air Check、XR5000) と PTFE (Polytetrafluoroethylene)、表面付着菌についてスワブ (DUO-V Swab) を用いて採取した。その後、DNA の抽出・精製・PCR による増幅・ラベリングを行った後、商用ラボに依頼し次世代シーケンサー (NGS) による解析を行った。

(2) 空気中 ET 濃度と培養法の比較

クリーンチャンバー内で比較実験を行った。加湿器にカチオン系除菌剤を添加したものと水道水のみのもを用意し、MCE フィルター及び SCD 培地に加湿空気を 1 週間に渡り 24 時間間隔で捕集した。また、最初日に受けた水道水を滅菌試験管に室温保存した水の培養と ET 濃度測定を行った。

(3) ハウスダスト中 ET 濃度の実態とアレルギー症

調査は住居形態を問わず住宅の寝室とリビングを対象に、ハウスダストを採取しダスト中 ET 濃度を分析した。2018 年は寝室とリビングの各 1 箇所ずつ、2019 年は寝室 1 箇所、リビングは中央部 1 箇所、隅 1 箇所の計 3 箇所採取した。

同時に住居・室内環境と居住者健康に関するアンケートを実施した。アンケート調査では、居住環境、家族構成、アレルギー罹患の有無、換気・掃除、結露有無、生活用品の使用状況などに関する設問を実施した。

2018 年 56 軒、2019 年 36 軒、合計 92 軒で調査を実施した。その中で高齢者のいる住宅は 11 軒だった。

4. 研究成果

(1) 室内空気中 ET 濃度と遺伝子分析

空調されているオフィスは 1EU/m³ 以下が多く見られるが、高齢者施設でも多くの部屋で 1~2EU/m³ 以下の濃度が見られた。しかし、施設によっては 10EU/m³ を超えるところも観察され、1 施設では寝室、共用部共に 16.9~48.4EU の非常に高い濃度で 1/0 比 (外気濃度と対する室内濃度の比) も 14.6~41.7 と非常に高かった。施設全体に影響している汚染源があると考えられる。

全体的には冬期濃度が夏期より高く、寝室より共用部の方が高い傾向を示す。また、以前から行っている追跡調査の結果からは突出して高濃度を示す施設や部屋はその傾向が持続的に現れることが確認された。例えば、北海道の Fac.H01 は居室・共用室ともに濃度が高く、夏期には一端低くなるが、翌冬にまた濃度が高くなることを繰り返しており、冬期に限った発生源が存在することが推察される。他にも夏期には改善され、翌冬になると再び上昇する傾向が見られる施設があった。

仙台施設 (Fac.S4) の共用部では 2019 年 8 月の共用部で 13.5EU/m³ の濃度が観察され、この施設は以前の研究 (2016 年 9 月・11 月) でも 70EU/m³ 以上の高濃度が観察されたことがある。

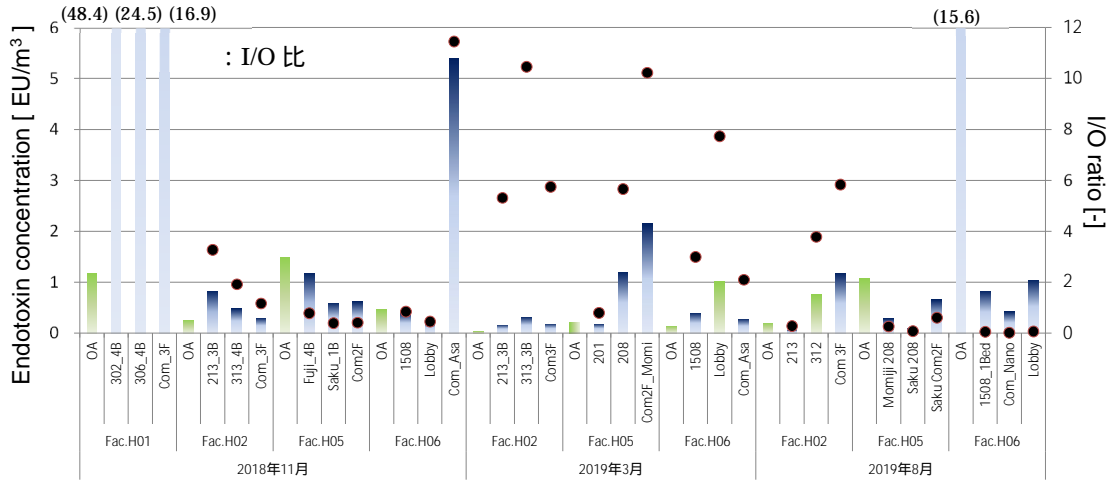


図 1 高齢者福祉施設における ET 測定結果 (北海道)

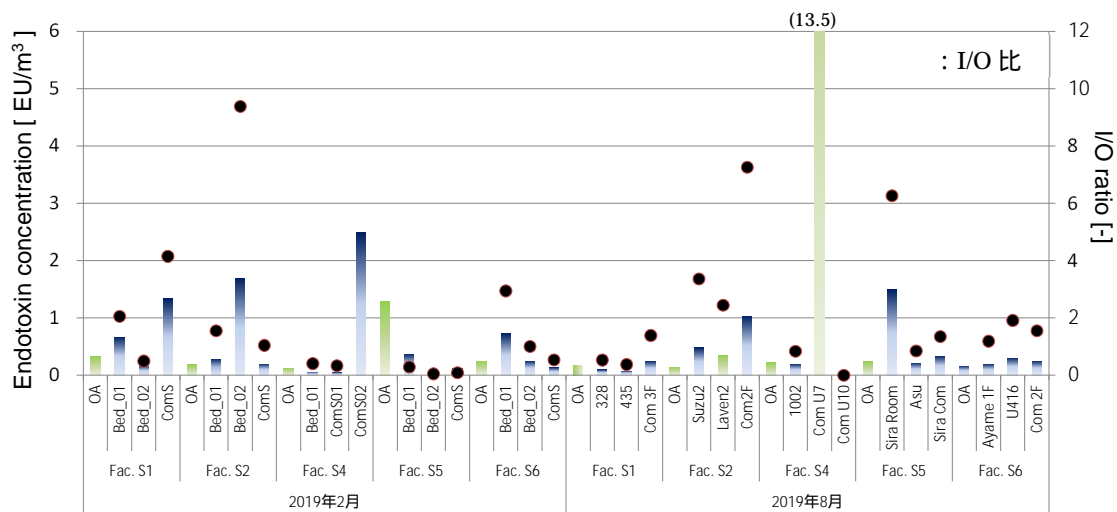


図 2 高齢者福祉施設における ET 測定結果 (宮城)

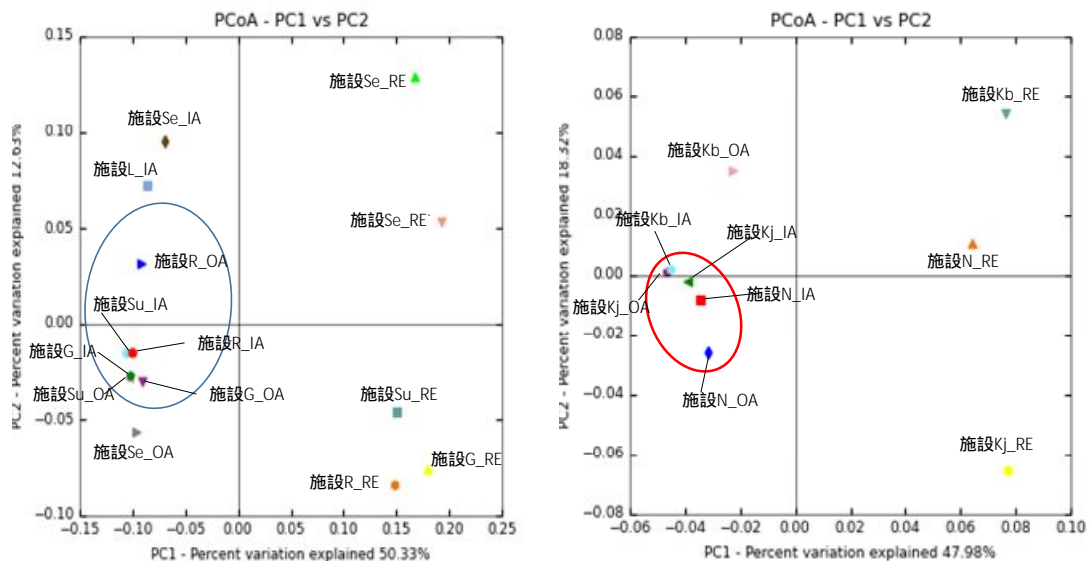


図 3 細菌叢の主座標分析例 (左: 宮城 - 冬期、右: 北海道 - 夏期)

PCR による遺伝子分析結果から、全ての測定箇所から高い割合で検出されたのは Acinetobacter 属、Staphylococcus 属、Streptococcus 属であった。Acinetobacter 属のほとんどの種は感染症を起す恐れのある日和見感染体である。とくに、中には多剤耐性菌種が含まれていることから近年注目されている細菌である。また、Staphylococcus 属に含まれる黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) は種々の病原因子を産生し、ヒトに多様な疾患を起こす強病原性細菌である。Streptococcus 属には S. pyogenes や S. agalactiae、S. dysgalactiae subsp. equisimilies が含まれておりヒトに感染症を引き起こす恐れのある日和見病原体である。各測定箇所の結果を用いて主座標分析を行った。主座標分析とは、多次元データのもつ情報をできるだけ損なわずに低次元空間に情報を縮約する方法である。多次元データを2次元・3次元データに縮約できれば、データ全体の雰囲気や視覚化することができる。視覚化により、データが持つ情報を解釈しやすくなる。ここではサンプルの距離感が近いほどデータの類似度が近い。仙台冬期の施設 Se、仙台夏期の施設 R、北海道夏期の施設 Kb を除いたすべての施設において、屋外と室内の細菌叢の距離が近いことから、どの施設においても屋外の空気がそのまま室内に影響していることが推察された。一方、各施設のリモコンの付着細菌叢は互い離れており、菌叢が異なっていた。これは使用する人に由来する菌叢が異なるためであると考えられる。

(2) 空気中 ET 濃度と培養法の比較

除菌液添加の加湿空気の ET は7日間連続して検出限界以下、培地は6日目に4cfu/枚、7日目5cfu/枚となった。一方、水道水のみ加湿空気の ET 濃度は6日目までは10ET/m³前後で推移するが7日目は25EU/m³と上昇し、培地は6日目56cfu/枚、7日目300cfu/枚 超えと大幅に上昇する。水道水には綺麗な状態でも基本的に ET が含まれており、その濃度は季節や水の鮮度によって4~20EU/mL 程度であるとされている⁷⁾。

今回の実験データは少ないが、水道水のみ加湿条件の ET 濃度と培養法は $|r|=0.65$ と中程度の相関を示した。ET は水中濃度 (EU/mL) と空気中濃度 (EU/m³) に $|r|=0.86$ と強い相関性が見られた。これは、以前の研究で行った水道水のみ加湿実験でも同様の結果が出ている⁸⁾。

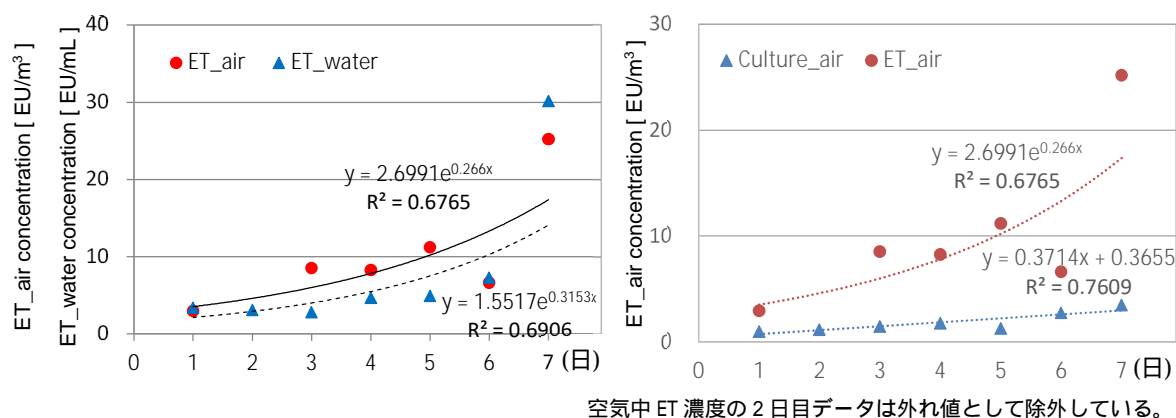


図4 加湿器実験による ET 濃度及び培養法の結果

(3) ハウスダスト中 ET 濃度の実態とアレルギー症

ET 濃度とアレルギー有症率の関係で相関は見られなかったが、アレルギー有症者のいる家庭に着目すると有症率が高いほど ET 濃度が低かった。居間・寝室間の ET 濃度には相関が見られなかった。また、全対象住宅では居間と寝室間に大きな ET 濃度の差は見られず、居間で105EU/g から80,349EU/g、寝室は263EU/g から108,324EU/g の範囲だった。居間、寝室共に平均値に対する標準偏差が多岐。全結果から平均値は約11,000 ET/g、中央値は約6000と8500 ET/gである。90パーセンタイル値は22,000 ET/g 程度だったが、図4から20,000ET/g を超える割合は2018年9%、2019年12%と少ない。

アレルギー有症者のいる家庭は全体の72.6%であり、アレルギー有症者率は40.9%だった。花粉症、ダストアレルギー、アレルギー性鼻炎の回答が多かった。換気設備使用については、使用しない家庭は ET 濃度が比較的高く、また掃除頻度が低い家庭は頻度の高い家庭に比べて ET 濃度が高くなる傾向が見られた。今回の調査では高齢者のいる家庭と居ない家庭間の ET 濃度の差異は見られなかった。

(4) まとめ

加湿器を用いた ET 濃度と培養法の比較では中程度の相関が見られたが、ET 濃度は加湿器水の濃度 (EU/mL) と加湿空気の濃度 (EU/m³) に強い相関性が得られ、細菌濃度に対する ET 濃度の代表性と測定精度が示された。

室内における細菌濃度は建物及び設備に汚染が無い限り、人体が最も重要な発生源となり、全体的には複数の人が集まって活動する共用室で濃度が高くなる傾向がよく現れた。高齢者施設でも一般的な生活空間で見られる濃度レベルが多かったが、一部では突出して高い室が存在していることから室内に細菌の汚染源がある場合 ET 濃度として明確に反映されることが確認でき

た。マイクロバイーム解析（遺伝子分析）によって施設内の微生物の実態について窺うことができた。その結果、検出された細菌の多くが病原性を持っていることが分かった。更に、病原性のある細菌を含む属の中には日和見感染症の病原体や耐性菌が含まれており、高齢者施設には普通の居室用建物である以上に何らかの対策が必要なことが窺えた。

アレルギー有症率と住宅のハウスダスト中 ET 濃度と間に相関は見られなかったが、家庭の掃除頻度に負の相関が見られた。ハウスダスト中 ET 濃度から各家庭間の ET 濃度には大きな差があり、同じ住宅内でも居間と寝室間には濃度相関が見られなかった。

全体的には空気、ダスト共に ET 濃度は平均や中央値で判断するのではなく、90percentile 以上群と言った、より高リスク群を特定して問題解決に取り組む必要があると考えられる。

表 1 ハウスダスト中 ET 濃度の集計値
(計 92 軒、2018 年 56 軒 102 試料、2019 年 36 軒 108 試料)

Living	Mean	S.D.	Max	90%ile	Median	10%ile	Min
2018年	11,521	14,088	80,349	20,708	7,724	1,364	105
2019年	11,341	9,771	49,558	26,907	9,335	2,685	1,003
Whole	11,415	11,701	80,349	21,756	8,488	2,058	105
Bedroom	Mean	S.D.	Max	90%ile	Median	10%ile	Min
2018年	8,058	8,910	50,455	18,265	5,031	922	263
2019年	14,796	20,077	108,324	30,418	9,350	1,301	488
Whole	10,878	14,930	108,324	21,519	6,042	930	263

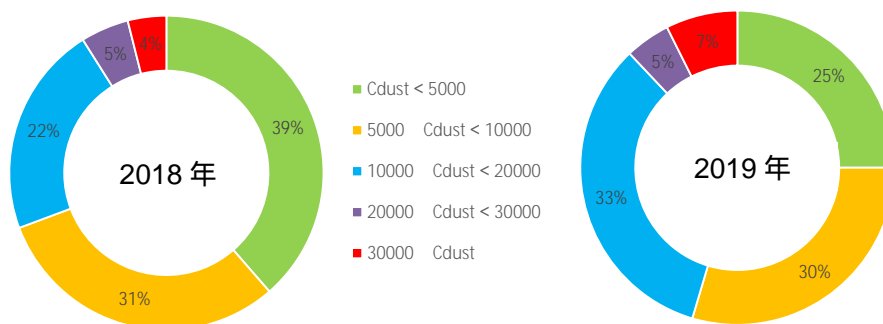


図 5 濃度区間別の割合

ET 測定では細菌による汚染状況を精度及び再現性よく定量できる上、時間や手間といった面で伝統的測定法である培養法より優れている。

一方、本研究では、SCD 培地ではグラム陰性菌の同定性能が高くない、グラム陰性と陽性菌を区分してカウントしていない、生菌と死菌の ET 産生量の違い、菌種による ET 産生度の違い、などがまだ明らかにできていない限界がある。引き続き、ET 濃度と細菌濃度の間の明確な相関性を判断するにはデータの拡充が必要である。

しかしながら、このような限界性はあるものの、真正細菌の殆どをグラム陰性菌が占めることから ET 濃度は細菌汚染度合いを表すよい評価手法としてその活用可能性が期待できると考えている。

「参考文献」

- 1) Strachan DP. : Hay fever, hygiene, and household size. BMJ 1989;299:1259-60.
- 2) 金勲、柳宇、他 4 名： 室内環境中エンドトキシンに関する研究 その 1 空気中エンドトキシン濃度と培養法による浮遊細菌濃度との関係、日本建築学会大会学術講演梗概集、環境系、pp.613-14 . 2017.8.
- 3) 金勲、柳宇、他 5 名： エンドトキシンの室内環境濃度、日本建築学会大会学術講演梗概集、環境系、pp.719-22 . 2016.8. (選抜原稿)
- 4) 金勲： 空気中細菌とエンドトキシン、空気清浄、第 54 巻第 4 号、pp.20-24、2016.11.
- 5) Hoon KIM et al.: Endotoxin Concentration in House Dust and Indoor Air in Japan, Indoor Air 2016 Proceedings, Electronic file, 2016.07.
- 6) 金勲： 環境中細菌汚染とエンドトキシン、クリーンテクノロジー、第 27 巻第 5 号、日本工業出版、pp.1-5、2017.5. (総説)
- 7) 金勲、柳宇、鍵直樹、東賢一、Lim Eunsu、大澤元毅、林基哉： エンドトキシンの室内環境濃度、日本建築学会大会学術講演梗概集、pp.719-22、2016.8.
- 8) 金勲、柳宇、鍵直樹、東賢一、長谷川兼一、林基哉、大澤元毅、志摩輝治： 個別式加湿器による室内空気の微生物汚染に関する実験、空気調和・衛生工学会大会学術講演論文集、pp.1-4、2018.9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 柳 宇	4. 巻 29
2. 論文標題 特別養護老人ホームにおける室内マイクロバイオームの実態	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 クリーンテクノロジー	6. 最初と最後の頁 36-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 イムウンス, 金勲
2. 発表標題 生活習慣とハウスダスト中のエンドトキシン濃度との関係
3. 学会等名 室内環境学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新村美月, 柳宇, 小田切茜, 金勲, 加藤信介
2. 発表標題 高齢者福祉施設における室内マイクロバイオームの実態解明に関する研究（第3報）施設別・季節別の比較
3. 学会等名 室内環境学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田切茜, 柳宇, 新村美月, 金勲, 加藤信介
2. 発表標題 高齢者福祉施設における室内マイクロバイオームの実態解明に関する研究（第1報）北海道高齢者施設の実態調査
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 新村美月, 柳宇, 小田切茜, 金勲, 加藤信介
2. 発表標題 高齢者福祉施設における室内マイクロバイオームの実態解明に関する研究(第2報) 仙台市高齢者施設の実態調査
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 金勲
2. 発表標題 高齢者施設の空気環境
3. 学会等名 日本建築学会第27回空気シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金勲, 林基哉, 柳宇, 菊田弘輝, 本間義規
2. 発表標題 高齢者施設における室内環境の実態と課題 その3 寒冷地域の施設における室内エンドトキシン濃度
3. 学会等名 室内環境学会学術大会
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	柳宇 (Yanagi U) (50370945)	工学院大学・建築学部(公私立大学の部局等)・教授 (32613)	

6. 研究組織（つづき）

	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	Lim Eunsu (Lim Eunsu) (50614624)	東洋大学・理工学部・准教授 (32663)	
研究 分 担 者	林 基哉 (Hayashi Motoya) (40320600)	国立保健医療科学院・その他部局等・統括研究官 (82602)	