

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02317

研究課題名(和文) エンドトキシン測定による感染予防と微生物汚染対策に関する研究

研究課題名(英文) Research on Infection Prevention and Microbial Contamination Control by Determination of Endotoxin

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：2020年～2022年にかけてリビング、寝室におけるハウスダスト収集として住宅148軒、空気のサンプリング(50軒)を実施した。加えて、一部の住宅に対しては水回りにおけるハウスダストを一緒に収集した。また、居住形式、建築概要及び住環境、生活習慣、アレルギー症などに関するアンケートを実施し、ET濃度との相関について検討した。全体的にペット有り(11,438EU/g)が無し(9,567EU/g)よりET濃度が高く、秋冬季が夏季より平均濃度が高いことが確認された。また、高齢者施設の冬期と夏期の共用部の浮遊細菌叢の解析により細菌属の同定を行うと共に、多様性について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハウスダスト中ET濃度とアレルギーに関する調査は医学・生理学分野で行われているが、室内空間の環境評価としてETを用いる試みは未だになく、国内では我々が先駆けてETに着目した研究を行っている。世界的にも空気中ET濃度についての研究例は少ない上、本研究で計画している培養法及び遺伝子解析結果とET濃度を比較した研究例は皆無であり、世界的にも例のない先進的な取り組みである。培養法が基本となっている細菌汚染評価法に代わるより迅速かつ再現性及び定量性が高い評価手法としてET測定法を位置づける。空気中細菌濃度や汚染度の指標としてETの活用は、室内環境における汚染状況の把握や環境改善の面で大変有意義である。

研究成果の概要(英文)：House dust were collected in living and bedrooms in 148 homes and air sampling in 50 homes from 2020 to 2022. House dust in washing area were also collected in some houses. In addition, the questionnaire regarding the type of residence, housing outline, living environment, lifestyle, allergies, etc. was administered, and the correlation with ET concentrations were examined. Overall, ET concentrations were higher with pets (11,438 EU/g) than without pets (9,567 EU/g), and the mean concentration was higher in autumn and winter than in summer. The bacterial genera were identified by analyzing the suspended bacterial flora in the common area of the elderly facilities during winter and summer, and alpha diversity was also examined.

研究分野：建築環境

キーワード：エンドトキシン 室内空気 ハウスダスト 細菌 感染対策 建築

## 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) <sup>1)</sup>でも注目されている物質である。また、ET は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。

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・同定に至るまでの偏差も大きい。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。一方、ATP (アデノシン三リン酸) 法や個数濃度測定機なども紹介されているがまだ確立した方法とは言えず、最近リアルタイム PCR を用いた遺伝子解析などの先端技術も導入されつつあるが、費用や現場適用など一般利用にはまだ課題が残っている。

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住宅、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。筆者らの既往研究 <sup>2), 3)</sup>から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、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、細菌濃度を代表するほど明確な相関解明には至っておらず、より大規模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遺伝子分析ができる環境になったため、菌叢 (菌種) を区分した同定も可能になり、より綿密な相関調査が可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究では室内における感染症予防や空気衛生環境の改善に資するため、微生物が産生する ET 濃度に着目し、室内空気の汚染実態と細菌汚染の指標としてその活用可能性の根拠として従来の培養法及び遺伝子分析法との比較・分析を行い、室内環境中 ET 濃度と細菌汚染の関係を究明する。その成果に基づき、培養法が基本となっている細菌汚染評価法に代わるより迅速かつ再現性及び定量性が高い評価手法として ET 測定法を位置づける。

「空気中 ET 濃度の実態と浮遊細菌濃度 (培養法、遺伝子分析法) との相関」、「室内環境要素 (真菌、浮遊粒子状物質、温湿度、CO<sub>2</sub>、換気の計測と居住環境などの調査) と空気中 ET 濃度との関連性」、「ET 濃度による室内空気の細菌汚染度評価手法」について研究する。高齢者施設、児童施設、住宅、オフィスなどを対象に研究期間中の採取試料数 400~500 を目標とし、一部対象に対しては他の空気衛生環境要素を同時測定する。

### 3. 研究の方法

ET 分析装置 (Toxinometer ET5000 / ET7000、和光純薬) 遺伝子分析装置 (リアルタイム PCR、BIO-RAD 社) 培養器及びクリーンチャンパー、パーティクルカウンタ (TSI-DRX8533、RION-KR12A) などを用いる。ET に対して、ハウスダストは掃除機の吸引口に不織布 + PET フィルターを装着して採取した。空気試料として MCE フィルター (φ47mm、Mixed Cellulose Ester Membrane Filter) に 100L (30min at 3.3L/min) を吸引・捕集した。捕集後は γ 線滅菌試験管に回収し冷暗所で保管する。分析時には蒸留水 (注射用水; ET フリー) を添加・攪拌した後、上澄み液を分注・分析した。分析は Toxinometer を用いて、リムルステスト (Limulus test) - カイネティック比濁法による定量計測を行った。検量線は、1.0、1/5、1/25、1/125 (=0.008) EU/mL の 4 段階の濃度標準を用いた。室内空気中 ET 濃度の実態を把握するとともに細菌濃度、空気環境測定、設問から得られた環境要素、室内環境因子のデータと細菌汚染度の相関分析 (SAS-JMP11) を行う。

以上の結果に基づき、空気中 ET 濃度と細菌汚染との相関を明確にし、室内空間における感染及び細菌汚染度の評価法として ET の活用性を示す。

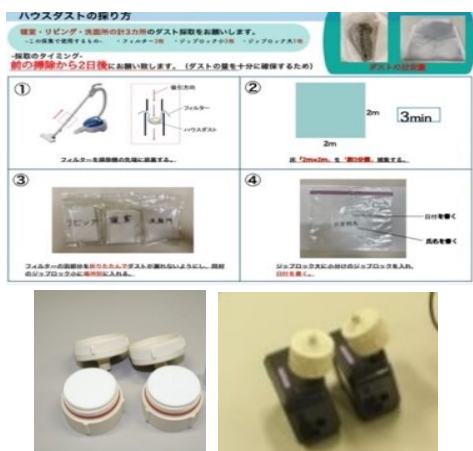


図1 ハウスダスト採取説明書 (左上)、空気サンプリング (左下)、検量線 (右)

#### 4. 研究成果

##### (1) 室内 ET 濃度

2020年～2022年にかけてリビング、寝室におけるハウスダスト収集として住宅148軒、空気のサンプリング(50軒)を実施した。加えて、一部の住宅に対しては水回りにおけるハウスダストと一緒に収集した。また、居住形式、建築概要及び住環境、生活習慣、アレルギー症などに関するアンケートを実施し、ET濃度との相関について検討した。

相関分析には148軒のほかに、2019年以前に収集している167軒分のデータも加えた。分析総数は315軒分である。各年度の測定結果に対する濃度集計は単年度報告にて報告している。

##### (a) 住環境と室内 ET 濃度

居住構造は木造、RC造、鉄骨造の順に多くそれぞれ回答は48%、30%、20%であった。機械換気設備は有り44%、無し56%であった。普段行う掃除頻度は週2～3回、週1回、毎日の順に多くそれぞれの回答は39%、36%、18%であった。ペット有無については飼っていない住宅が64%、飼っている住宅は犬17%、猫9%、その他10%であった。

室別ダスト中ET濃度を図2に、空気中濃度を図3に示す。ダスト中のET濃度では水回りの値が高く、他室との差は約2,000～10,000[EU/g]であった。全体的には冬、秋、夏順にETの平均濃度が高く季節による違いが確認された。

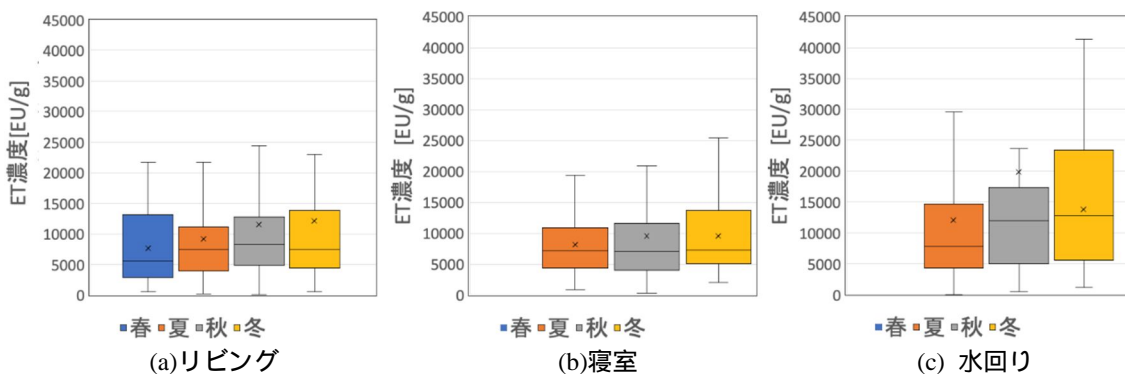


図2 ダスト中 ET 濃度 [EU/g]

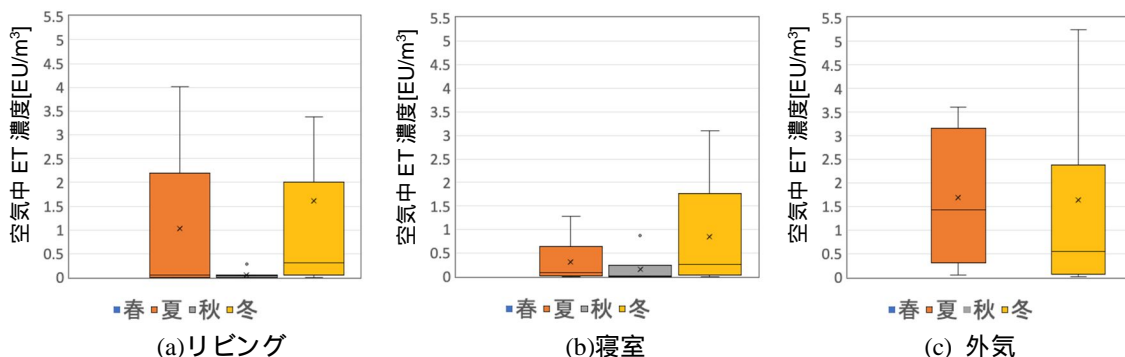


図3 空気中 ET 濃度 [EU/m³]

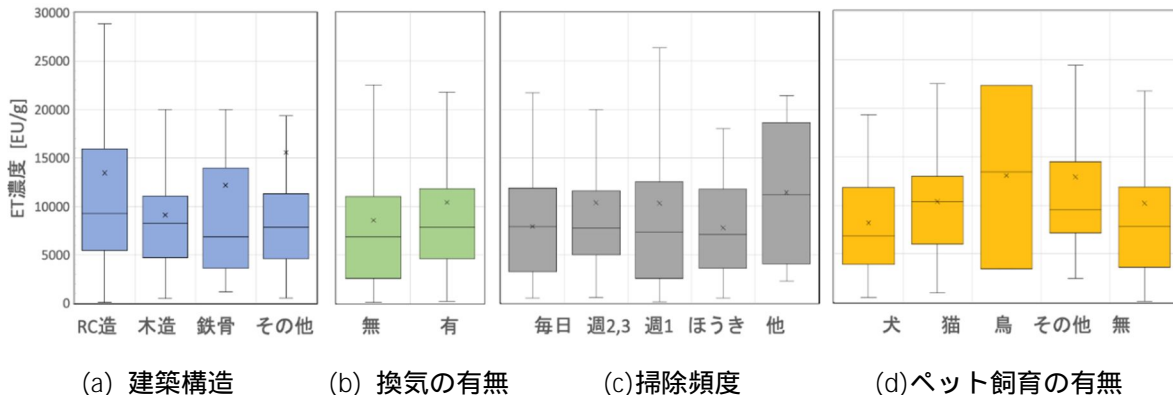


図4 住環境とダスト中 ET 濃度

既往研究<sup>2),3)</sup>から住宅やオフィスなど室内空気中のET濃度は1桁台が一般的であり1～2EU/m<sup>3</sup>前後が多く、オフィスより住宅が高い傾向を示す。本研究でも、外気が室内より高く、濃度変動も外気が大きかった。室内濃度では夏が冬よりやや高い傾向が見られたものの、寝室濃度では冬>夏となった。リビングは利用人数も多く外気の影響を受けやすいことより、寝室より高い傾向

を示している。

RC造と鉄骨造の方が木造よりET平均値が高く、換気設備有りが無しよりET濃度の平均値と中央値が約1,000EU/g高かった。ペット無しの住宅より、有りの住宅のET濃度が高く、ペットの種類では鳥>猫>犬の順に高かった。

(b) ペット有無とET濃度の相関分析

ET濃度の度数分布(図5)によると、ダストET濃度が10,000EU/mg以下においてはペット無し住宅の割合が高く、濃度16,000EU/g以上ではペット有り住宅の割合が高かった。平均値としてはペット有り11,438EU/g、ペット無し9,567EU/gであった。

有意差検定(t検定)結果、木造住宅では「ペット有り>無し」で有意差(p=0.0005)が認められたが、コンクリート造では認められなかった。戸建て住宅(p=0.051)集合住宅(p=0.92)でも有意差は認められなかった。

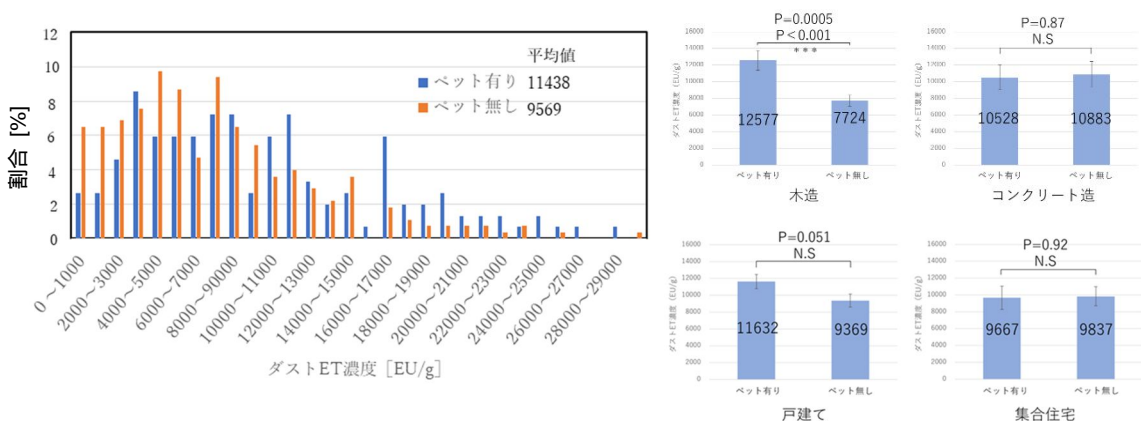


図5 ペット有り無しとET濃度

(2) 遺伝子分析

高齢者施設7件(北海道3施設、宮城県4施設)の冬期と夏期の共用部の浮遊細菌叢の解析を行った。測定対象施設は何れも特別養護老人ホームである。室内と屋外の浮遊細菌をエアポンプとPTFEを用いた同時並行での測定を行った。空気のスAMPLING方法、DNAの精製と増幅方法、マイクロバイオームの解析方法の詳細については「参考文献4)」を参照されたい。

(a) 細菌属

図6に検出された相対構成比1%以上の細菌属を示す。全体の相対構成比1%以上の細菌は以下に示す20属があった。ボルト体で示しているのは病原性のある菌種を含む属、青字で示しているのは口腔内常在菌である。また、(-)と(+)はグラム陰性菌と陽性菌を示している。20属のうち、病原性細菌種を含むのは11属、口腔内常在菌は5属、グラム陰性菌14属(70%)であった。

*Pseudomonas*(-), *Streptococcus*(+), *Acinetobacter*(-), *Staphylococcus*(+), *Neisseria*(-), *Enhydrobacter*(-), *Lactobacillus*(+), *Haemophilus*(-), *Rothia*(+), *Fusobacterium*(-), *Prevotella*(-), *Sphingomonas*(-), *Corynebacterium*(+), *Leptotrichia*(-), *Deinococcus*(-), *Veillonella*(-), *Methylobacterium*(-), *Brevundimonas*(-), *Paracoccus*(-), *Cutibacterium*(+).

仙台の冬期は*Pseudomonas*属が相対構成比で20~40%との高い占有率で検出された。この細菌属は住宅、住宅のエアコンのフィルターと内部から最も多く検出されていることから、住環境の優占細菌属であることが分かった。

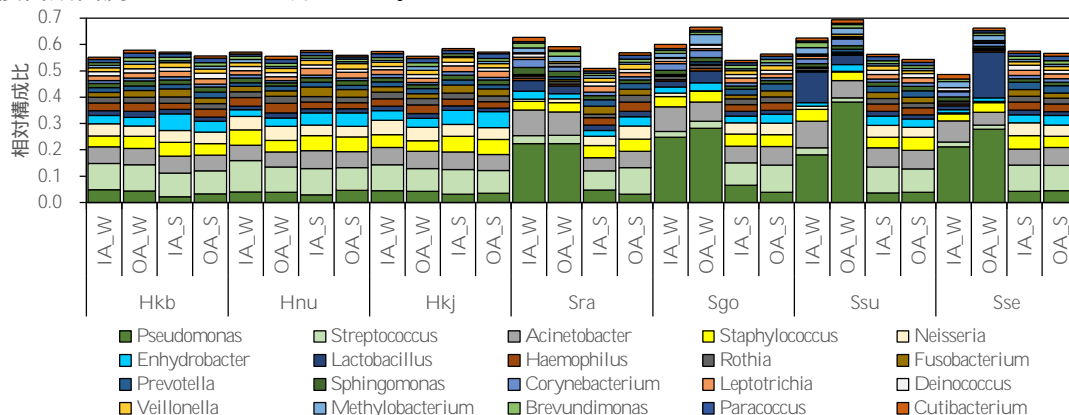


図6 相対構成比1%以上の細菌属

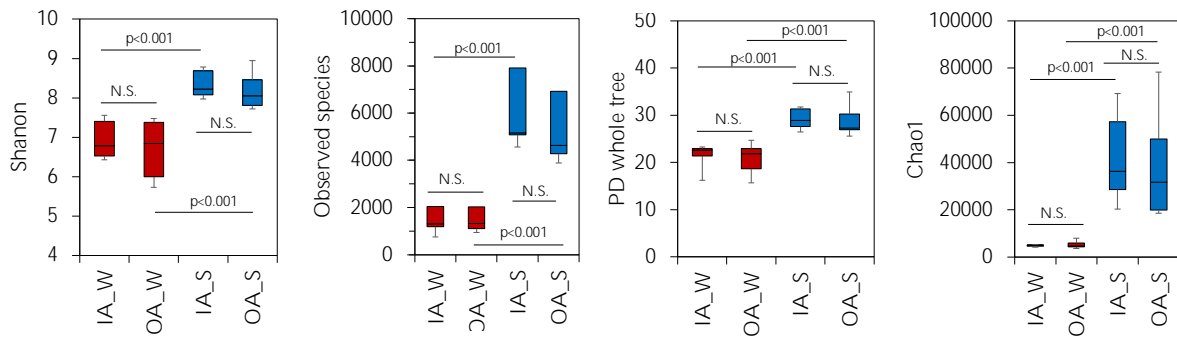


図7 多様性指数

( 図中の Hkb、Hnu、Hkj は北海道の施設、Sra、Sgo、Ssu、Sse は仙台の施設の ID。IA、OA、W、S はそれぞれ室内空気、屋外空気、冬期、夏期を示す )

### (b) 多様性

細菌叢を構成する細菌の豊かさや希少さを定量評価するには、Shannon、Observed species、PD whole tree、Chao1 などの指標がある。Shannon は菌種の豊かさに加え、均等度を考慮した指標である。菌種の数が多く、それぞれが均等に存在すると指標は高くなる。また、対数値を用いるため、希少な菌種にも重要視されている。Observed species は観測された菌種の豊かさを表す指標である。PD whole tree は菌種の系統距離を用いた細菌の豊さを推定する指標である。PD は phylogenetic diversity の略であり、系統的多様性を表す指標である。PD は生物群を系統樹上で結ぶ枝長さの総和として求められる。すなわち、系統樹上の位置に近い種（近縁種）が多ければ指数は小さくなり、離れている種（遠縁種）が多ければ指数は大きくなる。Chao1 は観測された菌種の豊かさに加え、その中でも希少な菌種も考慮した指標である。そのため、希少な菌種が多いほど指標が大きくなる。

図7に検出上記の4種α多様性の指数の四等分値を示す。SPSS Ver29を用いたマンホイットニーのU検定の結果、何れの指標においても、季節を問わず室内と屋外の間には有意な差が認められ、外気中の細菌種のα多様性が高かった。一方、冬期と夏期共に室内と屋外の間には有意な差が認められなかったことから、室内の細菌叢は屋外の細菌叢の影響を受けていることが推察される。これは自然換気と換気扇による機械換気によって外気中の細菌が室内に侵入していることが考えられる。

建築や居住環境と微生物環境は密接な関係にあると考えられることから、住環境及び生活習慣とET濃度、そしてET濃度とアレルギー症、感染症との関係について今後も調べてゆく必要がある。引き続き、遺伝子分析から細菌属、リード数とET濃度との相関について検討してゆく。

- 1) Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
- 2) 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（環境系）、pp.719-722、2016.8.
- 3) 金勲、柳宇、鍵直樹、東賢一、林基哉、大澤元毅、空气中エンドトキシン濃度と浮遊細菌濃度に関する基礎的研究、日本建築学会環境系論文集、Vol.83 No.749、2018.7；pp.581-588.
- 4) 柳宇、加藤信介:大学研究室におけるヒト由来細菌の分布特性、日本建築学会環境系論文集、2018；83(754):997-1004. doi:10.3130/aije.83.997

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	鍵 直樹  (Kagi Naoki)  (20345383)	東京工業大学・環境・社会理工学院・教授   (12608)	
研究分担者	小笠原 岳  (Ogasawara Takeshi)  (30516232)	明星大学・建築学部・准教授   (32685)	
研究分担者	林 基哉  (Hayashi Motoya)  (40320600)	北海道大学・工学研究院・教授   (10101)	
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)	
研究分担者	Lim Eunsu  (Lim Eunsu)  (50614624)	東洋大学・理工学部・教授   (32663)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------