

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04822

研究課題名(和文) 浮遊細菌数とエンドトキシン量に基づく室内のグラム陰性細菌曝露リスクの把握

研究課題名(英文) Assessing the risk of exposure to Gram-negative bacteria in indoor environments based on the endotoxin levels of airborne bacteria

研究代表者

石松 維世 (Ishimatsu, Sumiyo)

産業医科大学・産業保健学部・教授

研究者番号：40289591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性細菌の曝露リスクを検討するため、2つの室内と屋外で総粉じん中とPM2.5中の細菌数濃度とエンドトキシン(ET)濃度を経時的に測定し、次の成果を得た。室内のグラム陰性細菌の主要な発生源は屋外であり、黄砂飛来時でも室内ET濃度はDECOSのTLV-TWAを十分下回り、曝露による健康リスクは低かった。屋外の細菌数濃度とET濃度には、粒子サイズに関わらず正の相関性があり、ETを有するグラム陰性細菌の割合はほぼ一定と考えられた。室内では両者の相関性は低くなったが、ET濃度がグラム陰性細菌の変動を示すと考えると、グラム陰性細菌の曝露指標として活用できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、グラム陰性細菌が持つエンドトキシン(ET)をもとにして、細菌種に関係なくグラム陰性細菌集団としての健康リスク評価指標の可能性を探ったものである。屋外では浮遊細菌数濃度とET濃度に正の相関性が認められたことから、ETは浮遊細菌曝露の健康リスク指標になりうると考えられた。室内では両者の相関性は低くなったが、ET濃度はグラム陰性細菌以外には関係しないため、ET濃度はグラム陰性細菌への曝露リスク指標となると考える。

研究成果の概要(英文)：To assess the exposure risk of Gram-negative bacteria, I conducted temporal measurements of bacterial concentration and endotoxin (ET) concentration in total particulate matter and PM2.5 in two indoor and outdoor environments, and obtained the following results. The primary source of Gram-negative bacteria indoors is from the outdoors, and even during the occurrence of yellow sand, the indoor ET concentration remained well below the DECOS TLV-TWA, indicating a low health risk associated with exposure. There was a positive correlation between outdoor bacterial concentration and ET concentration, regardless of particle size, suggesting that the proportion of Gram-negative bacteria with ET remained relatively constant. While the correlation between the two decreased indoors, considering that the ET concentration reflects the fluctuations of Gram-negative bacteria, it is believed that the ET concentration can be utilized as an exposure indicator for Gram-negative bacteria.

研究分野：作業環境管理学

キーワード：エンドトキシン濃度 浮遊細菌数濃度 PM2.5 総粉じん

### 1. 研究開始当初の背景

室内環境中の浮遊微生物の健康リスクでは、気中濃度、含まれる微生物種、その構成比が重要と考えられる。これらは、別個にとらえるのではなく、複合的に考えていくことが重要である(図1)。よって菌数濃度だけではヒトへの健康リスク評価としては不十分であり、浮遊細菌叢の構成や存在比率も重要であることから、浮遊細菌のDNA断片塩基配列を解析し、菌数濃度( $\text{cells}/\text{m}^3$ )データ

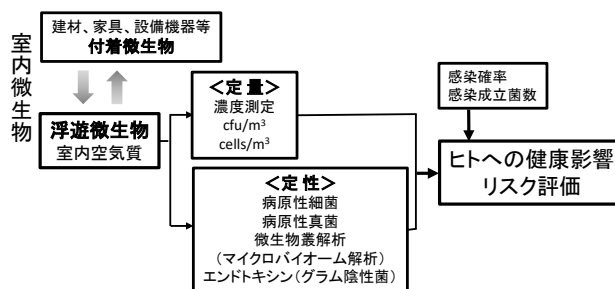


図1 室内浮遊微生物に対する健康リスク評価に必要な因子

と組み合わせることで健康リスク評価を試みた[1, 2]。しかし、検出された細菌種の多くに病原性はなく、病原性細菌のほとんどに感染成立菌数や発症菌数などの情報がなく、グラム染色性についても情報が偏っていた。

培養法で検出される室内浮遊細菌の多くはグラム陽性菌であるが、遺伝子解析ではそれ以外にも多く、室内空気中にはグラム陰性菌は少なくないと考えた。そこで、黄砂や $\text{PM}_{2.5}$ とともに存在すると肺の炎症を増悪させるという[3]グラム陰性菌細胞壁が持つリポ多糖類(LPS)であるエンドトキシン(ET)濃度( $\text{EU}/\text{m}^3$ )が、浮遊細菌の菌数濃度( $\text{cells}/\text{m}^3$ )との間に関連がある場合が多いことを見出した[4]ため、ETはグラム陰性細菌によるヒトへの健康影響評価指標になりうると考えた。

### 2. 研究の目的

浮遊細菌に着目した室内空気質の評価では、次世代シーケンサーによる遺伝子解析で検出される菌種が多様であることや、培養困難な細菌ではグラム染色性が不明という問題がある。そこで、細菌をグループ化できる指標としてETに注目した。室内外には $\text{PM}_{2.5}$ や $\text{SPM}_{10}$ も存在し、これらの粒子にも細菌およびETが含まれていた[4]ことから、 $\text{PM}_{2.5}$ や $\text{SPM}_{10}$ などの吸入性粒子を吸入すれば細菌やETも肺胞域に侵入し、肺の炎症や呼吸器系疾患のリスクになると考えられる。したがって細菌濃度とET濃度をペアで調べることにより、感染症とは別の視点から室内空気質を捉えられると考えた。

本研究では、室内および屋外の $\text{PM}_{2.5}$ と総粉じん中の細菌数濃度とET濃度を測定し、これらの関連性や黄砂の影響などを含め、室内のグラム陰性細菌がもたらす健康影響へのリスクを把握することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、2つの段階に分けて行った。まず、 $\text{PM}_{2.5}$ 用慣性衝突式サンプラーと新規開発の直進型サイクロン式サンプラーとの比較を行った。その結果をもとに $\text{PM}_{2.5}$ サンプラーを決定し、総粉じんと $\text{PM}_{2.5}$ を室内2箇所と屋外で定期的に捕集しデータを求めた。

#### (1) $\text{PM}_{2.5}$ サンプラーの検討

衝突型 $\text{SPM}_{10/2.5}$ サンプラー(NWPS-35H, 柴田科学、以後衝突型サンプラー、吸引流量 $2.5 \text{ L}/\text{min}$ )と直進型サイクロン式 $\text{PM}_{2.5}$ サンプラー(特許第6392112号, 産業医科大学、以後直進型サイクロン式サンプラー、吸引流量 $3.0 \text{ L}/\text{min}$ )を比較するため2020年7月~11月に屋外で8時間の併行測定を実施( $n=9$ )し、細菌数濃度とET濃度との相関性を調べ、適したサンプラーを決定した。捕集にはセルロース混合エステルメンブランフィルター( $0.8 \mu\text{m}$ 孔径, ADVANTEC、以下MFとする)を用い、捕集後、それぞれのMFからリン酸緩衝生理食塩水(PBS)  $5 \text{ mL}$ 中に微生物を回収した。回収菌液  $4 \text{ mL}$ を黒色ポリカーボネートフィルター( $0.2 \mu\text{m}$ 孔径, 直径  $25 \text{ mm}$ , ADVANTEC)ろ過し、臭化エチジウムでDNA染色した。これらを検鏡し、200視野中の細菌数から気中菌数濃度( $\text{cells}/\text{m}^3$ )を求めた。ET濃度は、同じ回収液  $200 \mu\text{L}$ からLAL法(比濁法)によりET濃度( $\text{EU}/\text{mL}$ )を求めた。このET濃度と回収液量、吸引空気量から、気中ET濃度( $\text{EU}/\text{m}^3$ )を算出した。

#### (2) 室内外における細菌数濃度とET濃度

某大学内の会議室(第2種機械換気)と実験室(第1種機械換気、ドラフトチャンバー2基あり)と屋外において、総粉じんと $\text{PM}_{2.5}$ 中の細菌数濃度とET濃度を測定し、両者の関連性を踏まえて室内空気質を評価した。2021年3月~12月と2022年3月~11月に、総粉じんと $\text{PM}_{2.5}$ を捕集した。総粉じんはオープンフェイス、 $\text{PM}_{2.5}$ は衝突型サンプラーを用い、8時間捕集した。吸引流量は、総粉じんは $20 \text{ L}/\text{min}$ 、衝突型サンプラーは $2.5 \text{ L}/\text{min}$ である。捕集後、PBSを総粉じんMFには $10 \text{ mL}$ 、 $\text{PM}_{2.5}$ のMFには $5 \text{ mL}$ 加え微生物を回収した。回収菌液のうち総粉じんは $2 \text{ mL}$ 、 $\text{PM}_{2.5}$ は $4 \text{ mL}$ を用い、(1)と同様にして菌数濃度とET濃度を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PM<sub>2.5</sub> サンプラーの検討

浮遊細菌数濃度と ET 濃度は、同じ微生物回収液を用いているため、両濃度ともにサンプラー間の相関性と近似式の傾きは同様になると予想した。

浮遊細菌数濃度 (図 2) は、両サンプラー間の相関性は高く、回帰式の傾きは 1.013 で相関係数も  $R=0.980$  であった。一方、ET 濃度は、全データ ( $n=9$ ) による回帰式の傾きは 0.477 (相関係数  $R=0.838$ ) となり、衝突型サンプラーより直進型サイクロン式サンプラーの方が低かった。また両サンプラー間に相関性はあるが、捕集時期により一次回帰式の傾きに差異が認められた (図 3)。

細菌数濃度と ET 濃度の結果に差があったことは、PM<sub>2.5</sub> 中の細菌数が同等であっても ET が付着する粒子の大きさや凝集度合い等に違いがあったこと、慣性力と遠心力という分級方法の違いが、捕集された ET 量に差をさえ生じたこと、捕集時期により細菌叢構成が異なっていたことなどが考えられたが、現時点では確認できず今後の課題となった。

よって、本結果から、以降の PM<sub>2.5</sub> の捕集には、従来使用していた衝突型サンプラーを引き続き使用することとした。

##### (2) 室内外における細菌数濃度と ET 濃度

解析に使用したデータのうち、2022 年 10 月第 1 回目の測定では会議室に細菌の塊が多く桁違いのデータが得られたため、菌数濃度と ET 濃度が常態ではないと判断し、解析から除外した。

##### ① 屋外と室内の細菌数濃度

総粉じん中と PM<sub>2.5</sub> 中の細菌数濃度について、屋外と室内との関連性を図 4 と 5 に示す。2021 年は、会議室・実験室ともに屋外との間に正の相関傾向が見られたが、2022 年は、総粉じん・PM<sub>2.5</sub> ともに相関性はなかった。この違いには黄砂の影響が考えられる。2021 年 3 月の測定日には黄砂が飛来し、そのため屋外と両室内の細菌数濃度は総粉じん・PM<sub>2.5</sub> ともに著しく高くなった。特に PM<sub>2.5</sub> 中の濃度が高かったが、飛来日である 3 月のデータを除外して解析すると、相関係数が低くなった。黄砂中には多くの細菌が付着し移動していることが認められている[5]が、本結果から、黄砂飛来時には総粉じん中だけでなく黄砂の平均粒径 (約 4 μm) より小さい PM<sub>2.5</sub> 中にも多くの細菌が含まれ、機械換気装置を介して室内に侵入していることが示された。一方、2022 年では黄砂飛来時の測定日がなく、黄砂の影響はなかった。しかし、2022 年 10 月~11 月では、特に会議室の PM<sub>2.5</sub> 中に細菌の塊が散見され、細菌数濃度を押し上げた。2022 年の結果で屋外と室内の関連性が低い傾向であったのは、室内濃度に影響するグラム陽性細菌発生源が室内にあったことが推察され、室内の大きな発生源の一つである在室者の影響が示唆された。

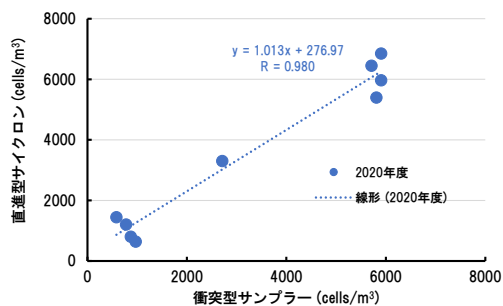


図 2 衝突型サンプラーと直進型サイクロン式サンプラーによる細菌数濃度の比較

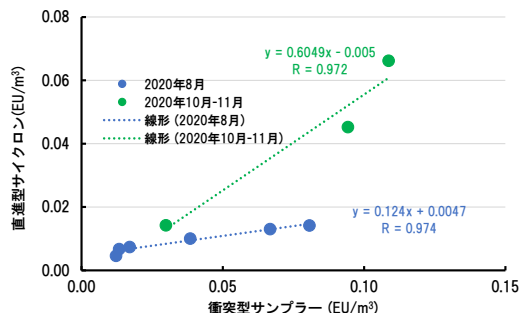


図 3 衝突型サンプラーと直進型サイクロン式サンプラーによる ET 濃度の比較

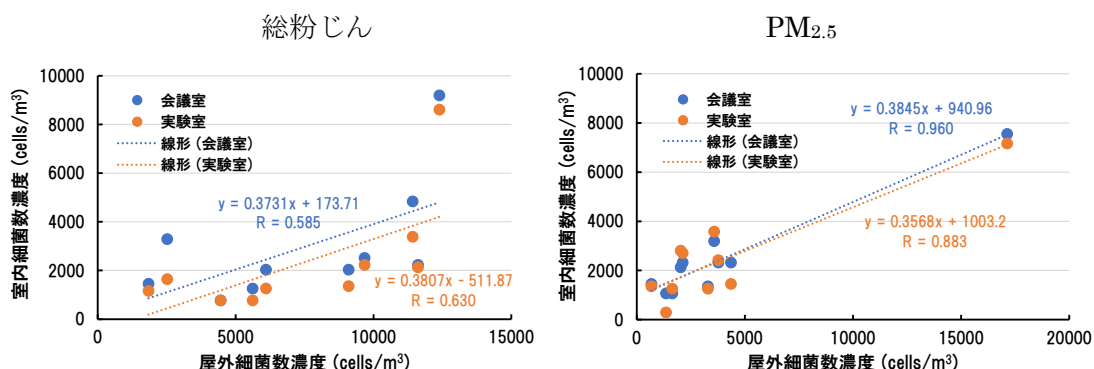


図 4 2021 年細菌数濃度の屋外と室内との関連性

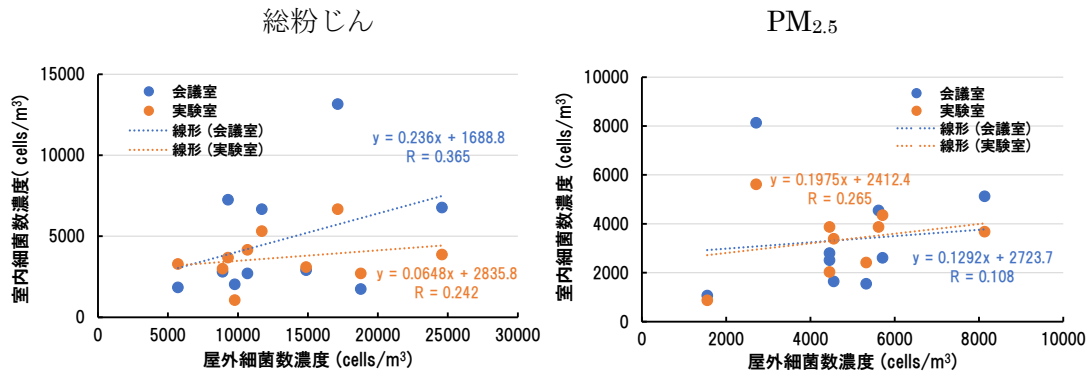


図5 2022年細菌数濃度の屋外と室内との関連性

② 屋外と室内のET濃度

総粉じん中とPM<sub>2.5</sub>中のET濃度について、屋外と室内との関連性を図6と7に示す。2021年と2022年のET濃度は、総粉じん・PM<sub>2.5</sub>ともに屋外と両室内との間に高い正の相関性が見られた。特筆すべきは、2021年の総粉じん中のET濃度の最高値である(図6)。この値は、屋外・両室内ともに2022年の総粉じん中ET濃度の最高値の2倍超であった。2021年総粉じん中ET濃度の最高値は、黄砂飛来日のデータであり、細菌数濃度と同様に黄砂の影響と推察された。しかし、黄砂飛来時の値を除外しても正の相関傾向が見られたため、両室内のET濃度は屋外の影響を受けていると考えられた。また、2021年の最高値は、DECOS (Dutch expert Committee on Occupational Safety) がアレルギー発生に基づくTLV-TWAとして定める90 EU/m<sup>3</sup>[6]を大きく下回っており、健康リスクは低いと考えられた。本結果から、室内のET濃度は細菌数濃度よりも屋外の影響を受けていることが明確であった。特に2022年のPM<sub>2.5</sub>中では両濃度の違いが明瞭であった(図5、7)。このことは、本建物の機械換気設備を通してグラム陰性細菌が侵入していることを示す。したがって、室内のグラム陰性細菌の主要な発生源は屋外であるが、菌数濃度に影響したと考えられる室内の発生源からは主にグラム陰性細菌以外が発生したと推察された。

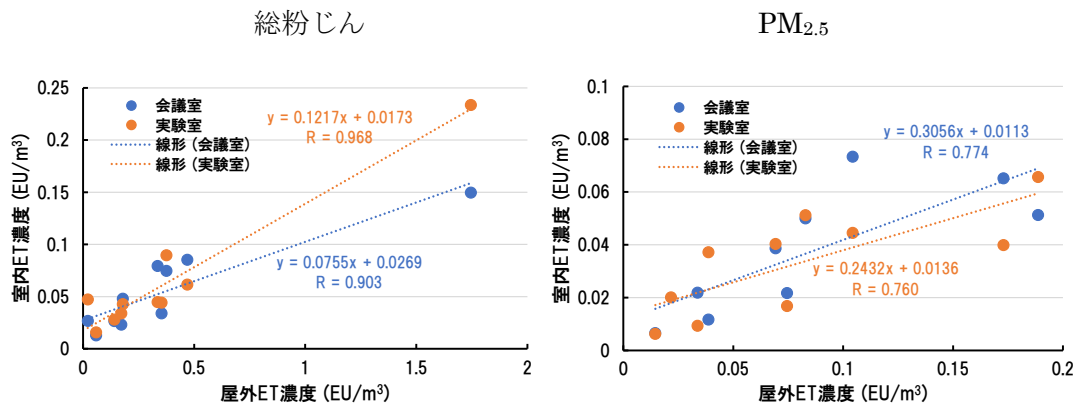


図6 2021年ET濃度の屋外と室内との関連性

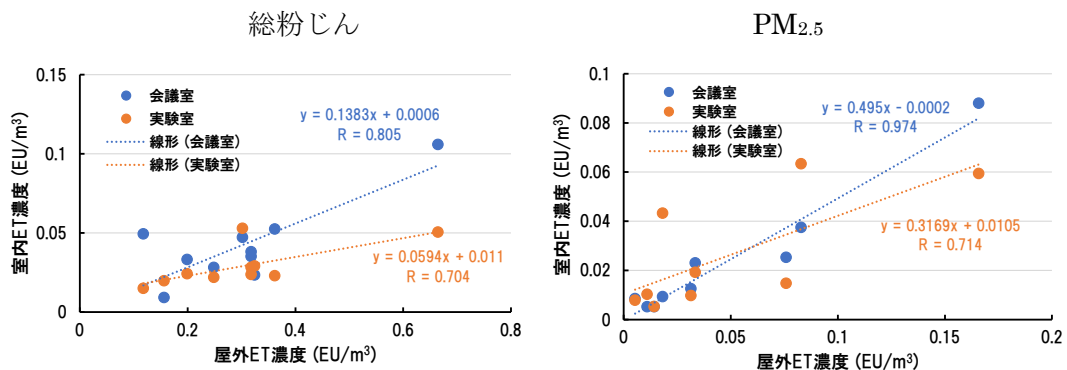


図7 2022年ET濃度の屋外と室内との関連性

### ③ 細菌数濃度と ET 濃度

2021 年と 2022 年の総粉じん中と PM<sub>2.5</sub> 中における細菌数濃度と ET 濃度との関連性について図 8 と 9 に示す。総粉じんでは、2021 年は屋外・室内ともに両濃度に正の相関性が見られたが、2022 年は屋外のみに見られた。PM<sub>2.5</sub> では 2021 年・2022 年ともに屋外では正の相関傾向が見られたが、両室内での相関性は低かった。

図 4~7 で示したように、黄砂飛来時は細菌数濃度・ET 濃度が高くなり相関性の有無に強く関わる。そのため、測定日に黄砂飛来がなかった 2022 年が常態に近いと考えられる。2022 年では、総粉じん・PM<sub>2.5</sub> ともに細菌数濃度と ET 濃度との間には屋外のみ明確な正の相関傾向が認められたことから、外気では粒子の大きさに関わらず、浮遊グラム陰性細菌の割合は概ね一定と推察された。一方、外気中の粒子とともに室内に浮遊細菌が侵入するが、本研究から、室内の細菌数濃度と ET 濃度との関連性は屋外よりも低くなる傾向にあった。しかし、ET 濃度は細菌数濃度よりもデータの安定性が高く、またグラム陰性細菌以外の影響を排除できる指標となるため、グラム陰性細菌の曝露指標として有効と考えられた。

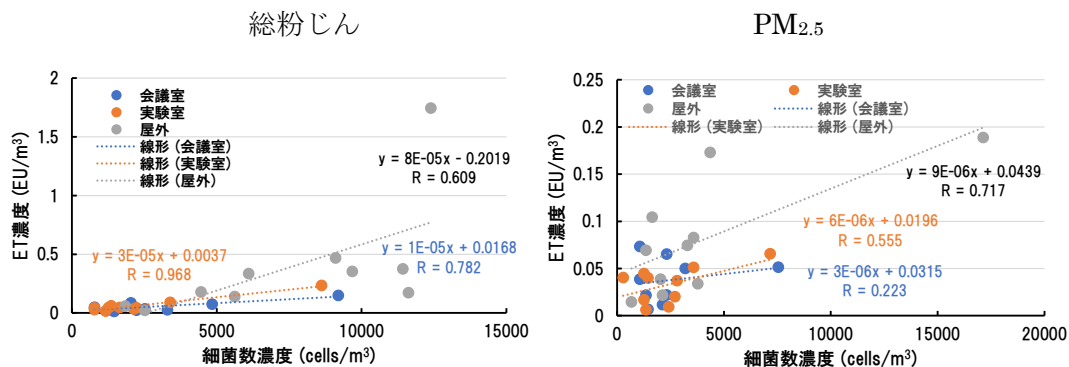


図 8 2021 年細菌数濃度と ET 濃度との関連性

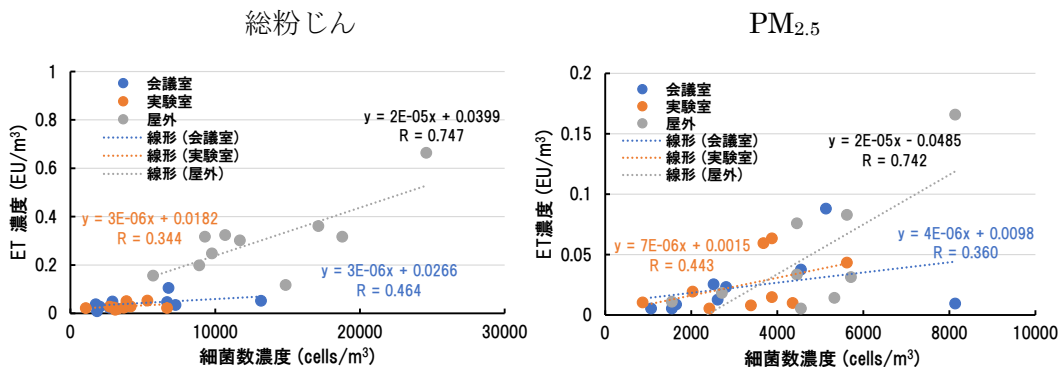


図 9 2022 年細菌数濃度と ET 濃度との関連性

### 5. まとめ

本研究により、室内のグラム陰性細菌の発生源は屋外であり、黄砂飛来時であっても室内の ET 濃度は DECOS の TLV-TWA を十分下回っており、曝露リスクは低いと考えられた。屋外の総粉じんと PM<sub>2.5</sub> 中の細菌数濃度と ET 濃度には正の相関性があり、ET を有するグラム陰性細菌の割合はほぼ一定と思われる。屋外のグラム陰性細菌は機械換気装置等を介して室内に侵入するが、ET 濃度はグラム陰性細菌以外には関係しないため、ET 濃度はグラム陰性細菌の曝露指標として有効と考えられた。

### 参考文献

1. 石松維世：H23 年度～25 年度 JSPS 科研費 23560708 報告書、2014
2. 石松維世：クリーンテクノロジー、28(11): 1-5, 2018
3. He M. et al: Inhalation Toxicology, 27(6), 287-299, 2015
4. 石松維世：H29 年度～R1 年度 JSPS 科研費 17K06688 報告書、2020
5. Yamaguchi N. et al: Scientific Reports, 525, 2012
6. DECOS : Endotoxins Health-based recommended occupational exposure limit, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石松維世・保利一
2. 発表標題 PM2.5中微生物濃度とエンドトキシン濃度のサンプラー間における比較
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾怜・石松維世
2. 発表標題 室内外の総粉じんおよびPM2.5中の浮遊微生物濃度変動
3. 学会等名 第39回産業医科大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井ノ口真至・石松維世
2. 発表標題 2種類のPM2.5サンプラーによる浮遊微生物濃度の比較
3. 学会等名 第38回産業医科大学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石松維世・保利一
2. 発表標題 室内外における総粉じんおよびPM2.5中のエンドトキシン濃度
3. 学会等名 第95回日本産業衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石松維世
2. 発表標題 室内外における総粉じん、PM2.5、SPM10中エンドトキシン濃度の測定
3. 学会等名 2022年度日本建築学会大会（北海道）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永ありさ・石松維世
2. 発表標題 総粉じん・PM2.5中浮遊微生物濃度 - 昨年度との比較 -
3. 学会等名 第40回産業医科大学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石松維世
2. 発表標題 室内における総粉じん、PM2.5中エンドトキシン濃度と換気設備
3. 学会等名 第96回日本産業衛生学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石松維世
2. 発表標題 室内外における総粉じんとPM2.5中細菌数濃度とエンドトキシン濃度の測定
3. 学会等名 2023年度日本建築学会大会（近畿）
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------