

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560708

研究課題名(和文) 浮遊微生物の濃度と菌叢解析による室内環境リスク評価の試み

研究課題名(英文) A conation of the indoor air risk evaluation by both airborne bacterial concentrations and bacterial flora analyses

研究代表者

石松 維世 (ISHIMATSU, Sumiyo)

産業医科大学・産業保健学部・講師

研究者番号：40289591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：室内空气中に浮遊する細菌のヒトへの健康影響リスクを検討するために、空气中的浮遊細菌濃度とともに細菌の種類と構成比率を分子生物学的方法により調べた。その結果、浮遊細菌の構成比率は場所および季節によって大きく異なり、在室者の多い部屋では皮膚常在細菌が常に複数検出されたことが特徴的であった。一方、感染事例報告のある細菌種の検出数は解析した細菌全体の1割程度であり、これらの室内での浮遊細菌からの感染リスクは低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to consider the health effects of the airborne bacteria, the bacterial concentrations and the bacterial flora in rooms and outdoor air were investigated. I analyzed the airborne bacterial communities based on the 16S rDNA sequence, and I made the classifications of airborne bacterial flora in three places (Conference room, Laboratory and Outdoor). The airborne bacterial compositions were different from each season and each place, but Staphylococcus was commonly detected in Laboratory where some people worked every day. However, the clones of species that were reported infectious case were detected less than 10% in all analyzed clones, and it was considered that there was low risk for the health effect by the airborne bacteria in these rooms.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：建築学・建築環境・設備

キーワード：空気環境 浮遊微生物濃度 浮遊細菌叢解析 季節変動

1. 研究開始当初の背景

- (1) 浮遊微生物による室内空気汚染の評価は、生菌数濃度 (CFU/m³) によって行われているが、結核菌やレジオネラ属菌のように、通常の培養法で検出困難なものはモニタリング的な捕集では見逃される可能性が高い。
- (2) 研究代表者らは DNA 染色による菌数濃度と培養法による生菌数濃度の比較から、浮遊微生物のうちの一部のみが培養法で検出されるにすぎないことを示してきた。一方、化学物質においてその種類と個々の濃度が重要であるように、浮遊微生物においても感染症や健康へのリスクを考える場合には、細菌と真菌という集団の濃度だけでなくその構成種とその比率を考える必要がある。
- (3) しかし複数の培地を用いた生化学的な同定法や、培養後のコロニーから得られた遺伝子の分子生物学的同定法では、増殖能を有し使用した培地に適合した菌種や培養条件に適合した微生物のみを対象としているという問題がある。
- (4) したがって、浮遊微生物に関する室内環境評価には、培養法による濃度や菌種の評価だけでは現実の室内の空気質とは異なった評価を行う可能性もあり、培養できない微生物を含めた浮遊微生物の健康影響への具体的な提言や評価方法が必要になると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 化学物質等のリスクはハザードと気中濃度あるいは曝露濃度との積で表されるが、浮遊微生物における感染のリスクは確率的影響と考えられており気中濃度の低減あるいは曝露の機会を減らすことが感染リスクの低減となる。
- (2) 現在、浮遊微生物は培養法に基づいた濃度測定や菌種の同定が行われているが、この方法では培養できない微生物は検出できないため、検出された微生物のみでは室内環境を俯瞰したデータとは言い難い。また、濃度データに比べ微生物集団を構成する菌種および構成比に関するデータはかなり不足している。
- (3) 現在の浮遊微生物濃度測定 (CFU/m³) は、モニタリングに重点が置かれているため、一般的な細菌や真菌が生育する培地を使用することが多い。しかし、レジオネラ属菌や結核菌などは、これらの培地では生育できないため、たとえこれらの細菌が存在していたとしても曝露の危険性を見逃してしまう。
- (4) また、浮遊微生物の多くは培養できない状態にあり、特に細菌では室内外で存在する浮遊細菌種や生理状態が異なる可能性が高い。したがって、室内空気質について微生物学的な健康影響を考える場合、浮遊細菌の

構成を念頭に置かねば、環境の状態を過小評価する可能性もある。

- (5) 本研究課題では、室内外の浮遊微生物を培養法と DNA 蛍光染色法によって測定するとともに、培養法で得られた浮遊細菌を染色性と形状でグループ分けし、グラム陽性球菌を生化学的検査キットで同定した。さらに、ろ過捕集により捕集された細菌に対し培養を介さない分子生物学的手法により網羅的細菌叢解析を行い浮遊細菌の構成種とその比率を求め、濃度および培養法による細菌種構成とあわせて総合的に浮遊細菌についてのリスク評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象

- ① 某大学内にある A 講座の会議室 (講座会議室)、工学系実習室 (実習室)、B 講座研究実験室 (研究室) および屋外を対象とし、2011 年 10 月から 2014 年 3 月まで毎月 1 回継続して浮遊微生物測定を行った。
- ② 講座会議室の使用頻度は週に数日であり、数名~10 名程度が数時間程度使用していた。温調設備は使用時のみ運転し、それ以外は基本的に停止していた。また、使用時以外にはドアはほぼ開放されていた。実習室は、週に 1 回 4 時間程度の実習で使用される以外は人の出入りはほとんどなく、温調設備も使用時以外は停止していた。研究室は、平日はほぼ毎日複数の在室者がおり、ドアも開放されていたが窓は常時閉じられていた。空調設備は個別空調機を独自に設置しており、時間外でも運転されているときが多かった。また、土曜日にも在室者がいることがあった。

(2) 菌数濃度測定法

- ① 菌数濃度測定はろ過捕集法で行い、セルロースエステル混合メンブランフィルター (0.8 μm 孔径、ADVANTEC) を用いた。吸引流量 20 L/min で 3 時間捕集後、フィルターをろ過滅菌したりん酸緩衝生理食塩水 (PBS) 10 mL 中で激しく攪拌し、微生物を回収した。
- ② その回収液 8 mL を黒色ニュークリポアフィルター (0.2 μm 孔径、ADVANTEC) でろ過し、フィルター表面の微生物を臭化エチジウムで染色した。その後、1000 倍で 100 視野中の微生物を計数し、細菌と真菌の浮遊菌数濃度 (cells/m³) を算出した。

(3) 生菌数濃度測定法

- ① 生菌数濃度測定は衝突法で行い、BIO SAMP (MBS-1000、ミドリ安全) を用いた。捕集用培地は、細菌用にはソイビーンカゼインダイジェスト寒天培地 (SCD 培地)、真菌用には CP 添加ポテトデキストロース寒天培地 (PDA 培地) およびジクロラングリセロール寒天培地 (DG-18 培地、2013 年度のみ) を使用し、ろ過捕集中に 100 L/min で 1 分間捕集

を行った。

② 捕集後、SCD 培地は 37°C・48 時間、PDA 培地および DG-18 培地は 25°C・5 日間または 25°C・7 日間培養し、コロニー数から細菌および真菌の浮遊生菌数濃度 (CFU/m³) を算出した。

(4) 浮遊細菌の生化学的同定

① 2012 年度において、衝突法による毎月のサンプリングにより SCD 培地で検出された細菌コロニーについて、グラム染色性と形状によるグループ分けを行い、各測定場所における細菌の構成比を求めた。

② グラム陽性と判定したブドウ状の球菌について、生化学的検査キットである api staph または ID32 staph api (シスメックス・バイオメリュー) を用いて *Staphylococcus* 属、*Micorococcus* 属および *Kocuria* 属に関する同定を行った。

(5) 浮遊細菌の分子生物学的細菌叢解析

① 2012 年 7 月、10 月、2013 年 1 月および 4 月において、講座会議室、研究室および屋外を対象とし、吸引流量 30 L/min でセルローズエステル混合メンブランフィルター (0.8 μm 孔径、ADVANTEC) を用い、浮遊微生物を 3~4 週間にわたって連続して過捕集した。捕集後、各測定場所のフィルターそれぞれからろ過滅菌 PBS 中に微生物を回収して黒色ニュークリポアフィルター (0.2 μm 孔径、ADVANTEC) でろ過し、場所ごとにまとめて滅菌水中に懸濁させた。

② この試料懸濁液中の菌体を超音波破碎機で 15 秒間処理し、この菌体破碎処理液 900 μL に 100 μL の 30% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を加え攪拌し、ガラスビーズ (大 0.3 g、小 0.2 g) と塩化ナトリウム 0.15 g を加え、ビーズ式細胞破碎装置 (MS100 Micro Smash、トミー精工) にて 4500 rpm で 5 分間の破碎処理を行った。処理後、15000 rpm で 3 分間遠心を行い、上清をチューブに移した。残渣に 900 μL の滅菌水と 100 μL の 30% SDS 溶液を加え、同様の抽出操作をさらに 2 回行った。

③ 3 回分の上清約 3 mL にフェノール・クロロホルム溶液を等量加えて転倒混和し、室温で 3500 rpm・20 分間の遠心を行った。上清を Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Device (MILLIPORE 社.) で濃縮し、TE buffer (10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH 8.0) 500 μL で 2 回洗浄し、DNA を回収した。

④ この DNA に対してユニバーサルプライマー E341F および E907R を用い、細菌種の特徴を反映する 16S rDNA をターゲットとした PCR を行い、約 580 bp の PCR 産物を得た。この PCR 産物を、大腸菌にクローニングした後に回収し (解析クローン)、ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems 3130x、アプライドバイオシステムズ) で塩基配列を

決定した。

⑤ 解析クローンと細菌基準株の塩基配列について相同性検索 (BLAST 検索) を行い、450 bp 以上での一致率 80% 以上を既知菌種との相同性ありとして階層分類表を作成した。一致率が 80% に満たないものは「Unclassified」とした。

4. 研究成果

(1) 浮遊微生物濃度

細菌・真菌ともに菌数濃度 (cells/m³) は、生菌数濃度 (CFU/m³) に比べ常に 1~3 桁程度高く、特に屋外で顕著であった。一例として分子生物学的細菌叢解析時の浮遊細菌濃度の結果を表 1 に示す。ここでは細菌についての 3 カ月分を示したが、菌数濃度は生菌数濃度より 1~3 桁高い。他の時期の細菌や真菌濃度も同様であった。

表 1 細菌叢解析時の浮遊細菌濃度

	2012年 7月		2013年 1月		2013年 4月	
	菌数濃度 (cells/m ³)	生菌数濃度 (CFU/m ³)	菌数濃度 (cells/m ³)	生菌数濃度 (CFU/m ³)	菌数濃度 (cells/m ³)	生菌数濃度 (CFU/m ³)
講座会議室	3200	130	2800	50	320	10
実習室*	3100	10	1900	10	320	10
研究室	1700	40	1800	160	2700	30
屋外	24000	30	18000	10	17000	20

*: 細菌叢解析対象ではない

27 ヶ月間連続測定した結果、室内の浮遊細菌生菌数濃度は、日本建築学会の維持管理規準値 (事務所: 500 CFU/m³) を超えることはなく、細菌に関しては良好に維持されていた。一方、浮遊真菌濃度は毎年 5 月ごろから 11 月ごろまで、ほぼすべての部屋で維持管理規準値 (事務所: 50 CFU/m³) を超えた。この時期は屋外の浮遊真菌濃度も高く、各測定場所の変動の様子から屋外の影響を受けていると考えられたが、どの部屋も屋外との相関性は低く明確な影響の有無については確認できなかった。

(2) 培養法による細菌構成とグラム陽性球菌同定結果

① 2012 年度に衝突法によって得られた細菌を、グラム染色性と形状によりグループ分けした結果を図 1 に示す。使用頻度の低い実習室は検出コロニー数が少なく検出されないときもあったが、比較的使用されている講座会議室でも検出されないときがあった。しかし、検出された時は研究室と同様に検出細菌数も多く、グラム陽性球菌の比率が高かった。屋外の細菌構成は室内よりも多様な傾向にあり、グラム陽性球菌の比率は低い傾向であった。

② 各測定場所で得られたグラム陽性球菌について、細菌同定キットを用いて行った同定結果を図 2 に示す (2012 年 4 月~2013 年 1 月まで)。講座会議室および研究室では、多くが *Micrococcus* 属または *Staphylococcus*

属であることが認められた。

③ これらより、SCD 培地で検出される室内浮遊細菌の多くはヒト由来の皮膚常在細菌であることが推察され、在室者の多い場所ではヒトから発生して間もない増殖可能なグラム陽性球菌の浮遊量が多いと考えられた。したがって、SCD 培地を使用する衝突法一培養法は、室内空気質に対する在室者の影響を調べる方法として適していると考えられた。

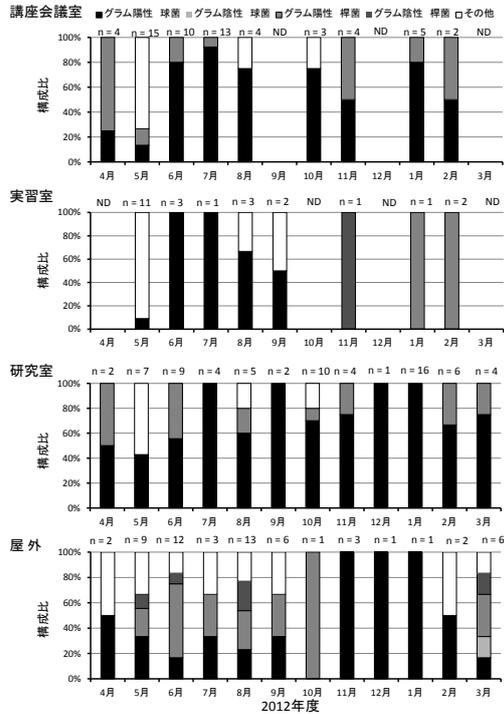


図 1 グラム染色による各測定場所の浮遊細菌構成

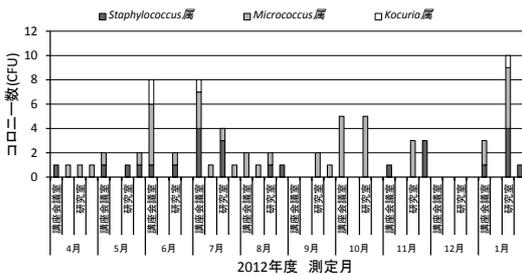


図 2 グラム陽性球菌同定結果

(4) 分子生物学的細菌叢解析

① 季節変化

季節ごとに計 4 回行った浮遊細菌叢解析のうち、2012 年 10 月は試料中に汚染が認められたため解析データから除き、2012 年 7 月(夏季)、2013 年 1 月(冬季) および 4 月(春季)の細菌叢解析結果を比較した。

測定場所ごとにまとめた門レベルでの解析結果を図 3 に示す。季節により違いはあるが、屋内外を問わず *Firmicutes* 門と

Proteobacteria 門の比率が高かった。解析を行った 3 か所のうち、研究室は他の 2 ヶ所に比べて門レベルでの季節変動が少ないことが認められ、どの時期も *Firmicutes* 門と *Proteobacteria* 門の比率の差は小さく、両者でほぼ 8 割を占めた。講座会議室では、7 月に「Unclassified」となった解析クローンが 56.8%と多かったが、これらのほとんどは真菌由来であった。

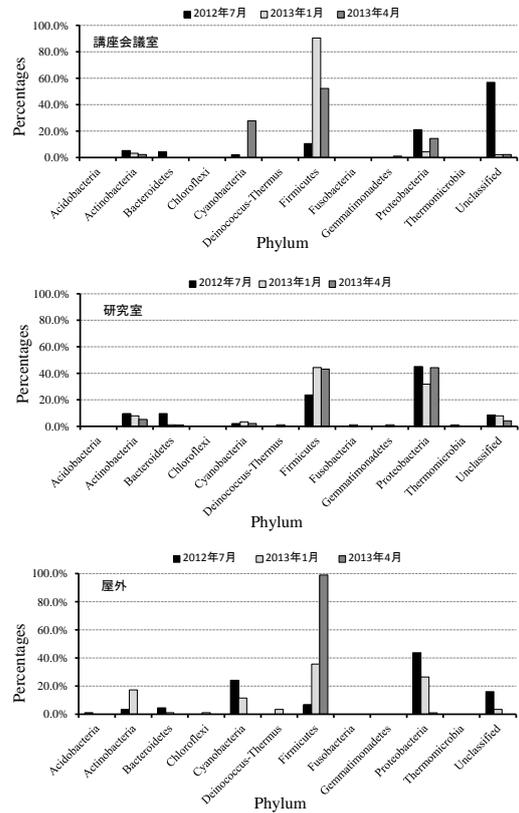


図 3 各測定場所における細菌叢解析結果 (門レベル)

Firmicutes 門には芽胞を形成する *Bacillus* 属や *Clostridium* 属、皮膚常在菌である *Staphylococcus* 属や口腔内細菌である *Streptococcus* 属などが含まれる。*Firmicutes* 門の中でも芽胞を形成する *Bacillus* 属や *Clostridium* 属は、いずれの場所でも冬季と春季に多くなっており、温湿度条件が厳しくなる季節には芽胞形成細菌の比率が上昇することが示唆された。さらに、春季の屋外では細菌叢は非常に単純になり、98.9%が *Firmicutes* 門でその構成細菌種は 4 種のみであった。このように細菌叢が単純化した理由として、冬季を経て棲息環境が厳しくなったことと黄砂の影響が考えられたが、この測定時期には黄砂の飛来はほとんどなく、黄砂が影響した可能性は低いと考えられた。

② 測定場所の特徴

研究室では、他の2ヶ所ではほとんど検出されなかった *Staphylococcus* 属が季節にかかわらず常に6~10クローン検出された。これは定常的に複数の在室者がいる影響であると考えられた。一方、週に2~3回程度と研究室より使用頻度が低い講座会議室では *Staphylococcus* 属のクローンはほとんど検出されず、培養法による検出細菌とは構成が異なることが示された。

Staphylococcus 属以外には、各測定場所に特徴的な細菌種は認められず、室内外の細菌叢は、常に変化していると考えられた。

③ 病原性細菌

細菌叢解析結果から、ヒトへの感染事例報告がある細菌種についてまとめたものを表2に示す。検出された細菌の種類は夏季が最も多かったが、検出数はそれぞれ1クローンのみであった。

夏季に検出された特徴的な病原性細菌として、ふたつの室内からツツガムシ病の原因菌である *Orientia tsutsugamushi* のクローンが、研究室と屋外からはダニ寄生細菌でリケッチア症原因菌である *Rickettsia montanensis* のクローンが検出された。さらに研究室からはレジオネラ肺炎原因菌の *Legionella birminghamensis* のクローンも検出された。一方、冬季と春季には屋外では病

表2 ヒトへの感染事例報告がある細菌種

2012年7月			
測定場所	種名	n	
講座会議室	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1	
	<i>Staphylococcus xylosum</i>	1	
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	
	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	1	
	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	1	
研究室	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	1	
	<i>Kytococcus sedentarius</i>	1	
	<i>Micrococcus luteus</i>	1	
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	
	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	1	
	<i>Rickettsia montanensis</i>	1	
	<i>Legionella birminghamensis</i>	1	
	屋外	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1
		<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	1
		<i>Rickettsia montanensis</i>	1
		<i>Ralstonia pickettii</i>	1
2013年1月			
測定場所	種名	n	
講座会議室	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	1	
	<i>Clostridium glycolicum</i>	4	
	<i>Tissierella praecuta</i>	1	
研究室	<i>Brevibacterium casei</i>	1	
	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	2	
	<i>Clostridium glycolicum</i>	3	
	<i>Paracoccus yeei</i>	2	
2013年4月			
測定場所	種名	n	
講座会議室	<i>Rothia aeria</i>	1	
	<i>Turicibacter sanguinis</i>	3	
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	
研究室	<i>Actinomyces viscosus</i>	1	
	<i>Corynebacterium coyleae</i>	2	
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	
	<i>Clostridium lituseburense</i>	1	
	<i>Paracoccus yeei</i>	1	

原性細菌は検出されず、講座会議室と研究室ではひとつの種で複数検出されるものが認められた。

分子生物学的細菌叢解析法では、好気培養法では検出することができない偏性嫌気性菌である *Turicibacter sanguinis* や *Clostridium glycolicum*、さらに *O. tsutsugamushi*、*R. montanensis*、*L. birminghamensis* といった特異的培地や特殊な培養法を必要とする細胞内寄生菌のクローンも検出された。これらの多くは土壌や水等の環境中に生息する細菌であるが、現在行われているSCD培地を使用した好気培養でのモニタリング法では検出できない細菌種であり、本研究で実施した培養を介さない分子生物学的細菌叢解析法の有用性が認められた。

(5) 浮遊細菌の健康への影響

細菌叢解析を行った2012年7月、2013年1月および4月の菌数濃度データと、細菌叢解析によって得られた病原性細菌クローンの割合から、対象室内において想定される病原性細菌の浮遊菌数濃度を推算した。

2012年7月における両室内の総解析クローン数に対する病原性細菌の割合は、講座会議室は4.2%、研究室は8.6%であった。表1に示すように2012年7月の講座会議室の菌数濃度は3200 cells/m³であったことから、浮遊する病原性細菌濃度は134 cells/m³と推算される。同様にして両室内に浮遊すると考えられる病原性細菌菌数濃度を推算した結果を表3に示す。これより、両室内の浮遊病原性細菌菌数濃度は20~230 cells/m³程度であると考えられた。

表3 病原性細菌数濃度の推算

	2012年7月		2013年1月		2013年4月	
	菌数濃度 (cells/m ³)	病原性細菌菌数濃度 (cells/m ³)	菌数濃度 (cells/m ³)	病原性細菌菌数濃度 (cells/m ³)	菌数濃度 (cells/m ³)	病原性細菌菌数濃度 (cells/m ³)
講座会議室	3200	134	2800	179	320	21
研究室	1700	146	1800	164	2700	227

分子生物学的細菌叢解析法では菌体だけでなく遺伝子断片であっても検出されることと培養法で検出される環境中の細菌は1%程度であることを考えると、測定した室内における増殖可能な病原性細菌濃度は数 cells/m³程度と推察される。したがって、これらが呼吸によって在室者の体内に侵入し増殖する確率は非常に低いと考えられ、本研究で対象としたふたつの室内においては、浮遊細菌が在室者に与える健康への影響は低いと考えられた。

(6) 本研究の意義と今後の課題

① 本研究により、SCD培地と好気培養法では検出できない細菌種が室内外に浮遊していることが確認された。また、季節変動はあ

るが、病原性細菌種は常に存在していること、しかしその割合は低くヒトへの健康リスクは低いことが推察された。

② 一方、室内の浮遊微生物濃度は比較的 low、分子生物学的細菌叢解析を行うために必要な細菌数である $10^5 \sim 10^6$ cells を確保する効率的な捕集方法が求められる。本研究では、解析に必要な細菌数を得るために週単位の捕集時間を必要としたため、時間的な鋭敏さに欠けた。したがって、今後は低騒音で大容量の吸引ができるサンプラーの開発を含めた捕集方法の見直しを行い、より短期間の細菌叢の変化を調べることが課題となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 石松維世: 網羅的細菌叢解析法による浮遊細菌種の解析—浮遊細菌集団の“見える化”— クリーンテクノロジー、査読無、24 巻、2014、33-37

[学会発表] (計 11 件)

- ① 石松維世・樋上光雄・石田尾徹・笛田由紀子・谷口初美・保利 一: 捕集・解析方法の違いにより検出される室内浮遊細菌の特徴 第 87 回日本産業衛生学会、2014 年 5 月 14 日 (発表確定)、岡山
- ② 石松維世・樋上光雄・石田尾徹・笛田由紀子・谷口初美・保利 一: 冬季における室内外の浮遊細菌の構成 平成 25 年室内環境学会学術大会、2013 年 12 月 5-6 日、佐世保
- ③ 立野誠子・石松維世・樋上光雄・石田尾徹・笛田由紀子・柘野幸生・谷口初美・保利 一: 屋内外における浮遊微生物濃度測定と室内微生物汚染原因の解明 第 31 回産業医科大学学会、2013 年 10 月 26 日、北九州
- ④ 石松維世: 網羅的細菌叢解析による室内外の浮遊細菌の特徴 2013 年度日本建築学会大会 (北海道) 学術講演会、2013 年 9 月 1 日、札幌
- ⑤ 石松維世・樋上光雄・石田尾徹・笛田由紀子・谷口初美・保利 一: 室内空気における微生物学的リスク評価のための浮遊細菌叢の解析 第 86 回日本産業衛生学会、2013 年 5 月 15 日、松山
- ⑥ 石松維世・石田尾徹・笛田由紀子・樋上光雄・谷口初美・保利 一: 室内外の浮遊微生物濃度と細菌種についての検討 平成 24 年度室内環境学会学術大会、2012 年 12 月 16 日、東京
- ⑦ 三宅千尋・石松維世・樋上光雄・石田尾徹・

笛田由紀子・保利 一: 衝突法による浮遊微生物濃度の測定と細菌の同定 第 52 回日本労働衛生工学会、2012 年 11 月 16 日、福岡

- ⑧ 三宅千尋・石松維世・石田尾徹・笛田由紀子・柘野幸生・樋上光雄・谷口初美・保利 一: 衝突法による浮遊微生物濃度の測定とグラム染色による細菌構成比の算出 第 30 回産業医科大学学会、2012 年 10 月 20 日、北九州
- ⑨ 石松維世: 大学における浮遊微生物濃度と細菌構成 日本建築学会大会 (東海) 学術講演会、2012 年 9 月 13 日、名古屋
- ⑩ 石松維世・石田尾徹・笛田由紀子・樋上光雄・谷口初美・保利 一: 使用目的の異なる大学室内における浮遊微生物濃度 第 85 回日本産業衛生学会、2012 年 6 月 2 日、名古屋
- ⑪ 林田佳奈子・石松維世・石田尾徹・笛田由紀子・樋上光雄・柘野幸生・保利 一・谷口初美: 浮遊微生物捕集のためのろ過捕集フィルターの検討 第 29 回産業医科大学学会、2011 年 10 月 18 日、北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石松 維世 (ISHIMATSU, Sumiyo)
産業医科大学・産業保健学部・講師
研究者番号: 40289591