

職場における微生物のリスク評価のための バイオエアロゾル捕集方法および検出方法

石松維世¹, 福田和正², 石田尾徹¹, 谷口初美², 保利 一¹

産業医科大学¹産業保健学部第1環境管理学,²医学部微生物学

抄録: 職場における微生物のリスク評価のためのバイオエアロゾル捕集方法および検出方法: 石松維世ほか. 産業医科大学産業保健学部第1環境管理学—微生物を含む生物由来の浮遊粒子状物質であるバイオエアロゾルについては, 労働環境において室内空気汚染物質としての認識がほとんどなかった. そこで, 微生物粒子濃度を迅速に把握し, シック・ビルディング・シンドローム (SBS) などについてリスク評価できる方法として, バイオエアロゾルをろ過捕集し臭化エチジウムによる DNA 染色後, 落射型蛍光顕微鏡で計測する方法を検討した. その結果, 従来法である培養法よりも短時間で測定結果が得られ, また培養では検出されなかった真菌分生子も観察された. さらに, ろ過捕集したバイオエアロゾル試料について PCR と DNA シークエンスにより遺伝学的解析を行ない, 細菌叢解析の有用性も検討した. 本方法により, 総菌数が問題となる SBS などについて迅速な対応ができるとともに, バイオエアロゾル構成細菌についても解析できる可能性が示された.

(産衛誌 2006; 48: 1-6)

キーワード: Bioaerosols, Microorganisms, Filter sampling, DNA staining, Direct counting, PCR, DNA sequence analysis

I. はじめに

結核に代表される空気感染症やインフルエンザの集団発生, 建築物の構造や給排気, 空調状態などに関係するシック・ビルディング・シンドローム (SBS), 特定の建物で発生するビル関連疾患 (BRI) など, 多くの人々が集まる場所における空気中の微生物に起因する健康影

響が問題となっている. 特に, 事務系職場は一部屋で多数の人間が執務する場合が多く, 一旦室内空気が汚染されれば多人数への健康影響が懸念される. 事務職場における室内空気汚染物質として広く認知されているものはホルムアルデヒドや VOC などの揮発性有機化合物であるが, 生物学的因子であるバイオエアロゾルも見逃せない要因である. バイオエアロゾルとは生物に由来する浮遊粒子状物質の総称であり, その中には真菌や細菌などの微生物, 花粉, 有機粉じんなどが含まれる. とりわけ, 細菌や真菌については感染症や SBS との関係もあり^{1, 2)}, 注目される場所である.

事務職場に限らず労働衛生分野では, 空気中の生物学的因子についてこれまでほとんど省みられることがなかったが, 2003年に改正された「建築物衛生法関連政省令 (通称: ビル管理法)」において, 室内空気が病原体によって汚染されることを防ぐこと, という条項が追加された. その翌年には「事務所衛生基準規則」が改正され, 「ビル管理法」と同様, 室内空気の微生物汚染防止対策を講じることが定められた. これらには, 室内空気汚染微生物として結核菌, レジオネラ属菌, インフルエンザウィルスの具体名が挙げられ, 多くの人々が集まる室内におけるこれらの微生物による空気汚染への懸念と, 集団感染が発生することへの危惧を示している. しかし, これらの法令には, 微生物による室内空気汚染防止対策として, 微生物が増殖しやすい冷却塔や加湿器およびそれらの水周り等の清掃について記してあるのみであり, 具体名が挙げられた微生物を含めた室内空気中の浮遊微生物粒子濃度測定や清掃前後の空気質の確認については述べられていない.

労働環境におけるバイオエアロゾルの捕集方法や検出方法については, NIOSH³⁾ がマニュアルを示している. ここには, 細菌や真菌の捕集のために複数の捕集器具があげられ, 検出方法についても培養法や染色法などいくつかの方法が提示されており, 目的や状況に応じて測定者が適切な方法を組み合わせて選ぶようになっている. これは, バイオエアロゾルの中でも細菌や真菌など微生

2005年7月14日受付; 2005年10月6日受理

連絡先: 石松維世 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘
1-1 産業医科大学産業保健学部第1環境管理学
(e-mail: sumiyois@med.uoeh-u.ac.jp)

物の捕集方法や検出方法は、対象として考える微生物種や目的によって方法が異なるためと思われる。たとえば、感染症の集団発生対策のためであれば微生物種の同定が必要であるが、SBSでは微生物の存在そのものが問題となるため微生物総数が重要であり微生物種の同定は必ずしも必要ではない。したがって、SBSのリスク評価を行う場合には、微生物の生死よりも迅速に総菌数を把握できる方法が有効と考えられる。

これまで、微生物の検出方法としてさまざまな分野で培養法が多く用いられてきているが、水圏や土壌などの環境に棲息する細菌では、培養によって得られる菌数はDNA染色を行って得られる総菌数の1%未満と大きく下回ることが知られており⁴⁾、培養法による検出の限界が示されてきている。さらに、菌種によって適切な培地を選定せねばならず、またコロニー検出までに時間を要する培養法は、非常に制約された検出方法であるといえる。

我々はこのような点を考慮し、バイオエアロゾルを総量としてろ過捕集し、臭化エチジウム染色によって迅速に評価する方法を従来法である培養法と比較して検討した。また、ろ過捕集したバイオエアロゾル微生物叢の構成を明らかにするため、細菌類の16S rDNAをPCRによって増幅し、得られた塩基配列について遺伝学的な系統解析も行った。

II. 対象と方法

1. DNA染色法によるバイオエアロゾル濃度測定

1) ろ過捕集

2004年9月から2005年1月にかけて、某大学の微生物を日常的に取り扱っている実験室において、直径47mmのニトロセルロース混合メンブレンフィルター(0.8 μ m孔径, ADVANTEC)を装着したオープンフェイスホルダー(ADVANTEC)によりろ過捕集を行った。捕集場所は、室内の壁際1.5mの高さとした。吸引流量は15L/min, 最大48時間の捕集を行った。捕集中の室内温度および湿度は、アスマン通風乾湿計(柴田科学)によって測定した。なお、午前8時半頃から午後9時頃までエアコンが稼動していた。

2) バイオエアロゾルの回収

捕集後のメンブレンフィルターは、滅菌したはさみで4分割したのち50mL用滅菌ふた付きチューブに入れ、ろ過滅菌したリン酸バッファー(PBS)20mLを加えた。そのフィルターを2分間激しく攪拌し、捕集された微生物を回収した。

3) 臭化エチジウム染色

微生物回収液を2mL分取し、黒色ポリカーボネートフィルター(0.2 μ m孔径, ADVANTEC)で吸引ろ過したのち、邑瀬ら⁵⁾の方法を改変して微生物のDNA染色を行った。すなわち、微生物をろ過したポリカーボネ

ートフィルターをろ過器に装着したまま染色用バッファー(0.1 M Na₂HPO₄, 5% NaCl, 0.5mM EDTA \cdot 2Na混合)3mLを入れ、2mg/mL臭化エチジウム溶液150 μ Lを加えた後(最終濃度100 μ g/mL)、10分間静置してDNAの染色を行った。その後バッファーと染色液を吸引ろ過して除き、ろ過滅菌した蒸留水3mLでフィルターを吸引ろ過して洗浄した。

4) バイオエアロゾル計測

染色後のフィルターを無蛍光顕微鏡用オイル(オリンパス)で封入したのち落射型蛍光顕微鏡システム(BX50, オリンパス)によって1,000倍で観察し、真菌数と細菌数を数えた。1試料につき3サンプル(フィルター)を作成し、計数する視野数は1フィルターにつき100視野とした。対照として、ろ過滅菌したPBS 2mLのみをろ過したフィルターを同様に染色し、検鏡した。フィルター有効面積と視野面積、計測した視野数および液量から、メンブレンフィルターに捕集された菌数を算出し、バイオエアロゾル総菌数濃度(cells/m³)と真菌数濃度(cells/m³)とを算出した。手順をFig. 1に示す。

2. バイオエアロゾルの細菌叢解析

1) ろ過捕集

バイオエアロゾル細菌叢の解析には、濃度測定と同じ場所と方法でエアロゾルを捕集し、採集日の異なる2サンプルを使用した。

2) 試料DNAの抽出と精製

捕集後のメンブレンフィルターを6分割し15mL滅菌ふた付きチューブに入れ、100mM Tris-HClバッファー(pH 8.0, 0.25M EDTA, 100mM NaCl)10mLを加え30秒間激しく攪拌した後超音波洗浄機(35kHz)で2分間処理し微生物を回収した。フィルターを除いた後、2mLをろ過し臭化エチジウム染色を行なって菌数を計数した。

残りの回収液8mLを0.2 μ m孔径ポリカーボネートフィルターで吸引ろ過し、フィルターを2.5mL滅菌ふた付きチューブに入れた。100mM Tris-HClバッファーを0.9mL加え、30秒の攪拌と2分間の超音波処理により再度微生物を回収した。これに、リゾチーム溶液を最終濃度4.0mg/mL, SDS溶液を最終濃度1.8%になるようそれぞれ加えた後、ローテーターで約1時間緩やかに振とうした。その後12,000rpmで3分の遠心分離を行い、DNA抽出液である上清を分取した。同様の抽出操作をさらに2回行い、合計約3mLのDNA抽出液を得た。最終抽出残渣は臭化エチジウム染色を行い計数し、抽出操作における菌体破壊率を算出した。

抽出液にPCI溶液(フェノール25:クロロホルム24:イソアミルアルコール1)により除タンパク処理した後濃縮し、さらにQIAEX II Gel Extraction Kit

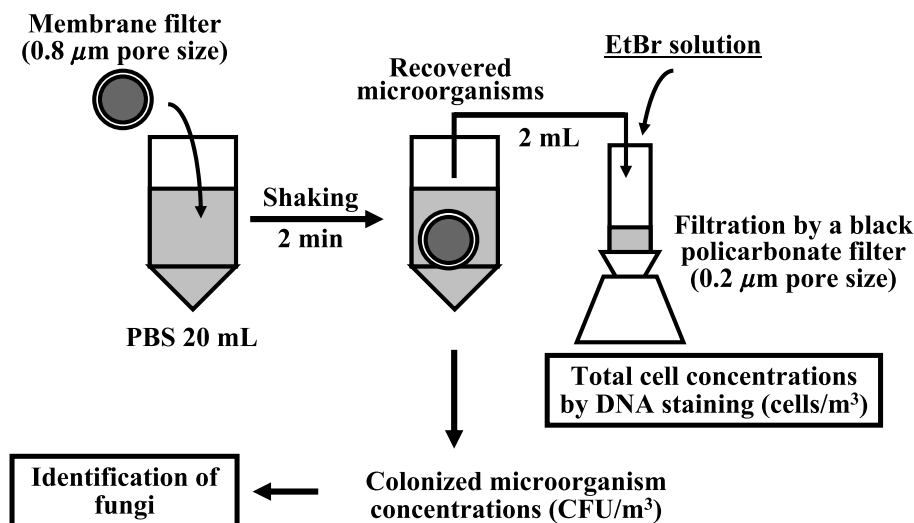


Fig. 1. Protocol for determination of bioaerosol concentrations.

(QIAGEN) を用いて精製 DNA 試料を得た。

3) PCR による遺伝子増幅と塩基配列の決定

精製 DNA をテンプレートとし、大腸菌の塩基配列 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' および全生物共通塩基配列 5'-CCGTC AATTCCTTT (A/G) AGTTT-3' をプライマーとして PCR を行った。PCR 条件は、試料 25 μ L (精製 DNA 1 μ L, 各プライマー 0.1 μ M, 10 倍希釈 PCR バッファー 2.5 μ L, Amplitaq-Gold DNA ポリメラーゼ (PERKIN ELMER) 1.25 U, dNTPs 0.2 μ M, 滅菌蒸留水) に対し、96 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒, 55 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒, 72 $^{\circ}$ C \cdot 60 秒の増幅サイクルを 35 回繰り返した。これにより約 560 bp の増幅産物を得た。この PCR 産物を精製濃縮した後、大腸菌プラスミドに埋め込み形質転換させ増殖させた。

この形質転換大腸菌 1 μ L をテンプレートとし、M13 プライマーセットを用いて上記と同条件で PCR を行い、約 700 bp の増幅産物を得た。この PCR 産物に対し、M13 フォワードプライマーおよび BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いてシーケンスを行った。

4) 16S rDNA 塩基配列に基づく細菌叢解析

シーケンス後、ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems 3130xl, アプライドバイオシステムズ) で塩基配列を決定した。

決定した塩基配列のうちエアロゾル中の細菌類と考えられる配列のみを用いて、細菌基準株の 16S rDNA データベースに対する相同性検索 (BLAST) を行った。これにより、オーバーラップする長さが 400 bp 以上でマッチング率 80% 以上のものを既知菌種との「相同性あり」とした。また、上記検索条件を満たさないものは「同定不能」とした。

3. 培養法による計測

臭化エチジウム染色に用いた微生物回収液 0.1 mL を普通寒天培地に接種し、37 $^{\circ}$ C で 3 日間培養したのち一般細菌数の検出を行い、生育したコロニー数からバイオエアロゾル生菌数濃度 (CFU/ m^3) を算出した。また、普通寒天培地に生育した真菌については、ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) および麦芽寒天培地を用いて分離培養し、巨大コロニーの色や形態および顕微鏡による形態的な同定を試みた。

III. 結 果

1. バイオエアロゾル濃度

測定時期と温湿度、および染色による総菌数濃度と培養による生菌数濃度とを Table 1 に示す。測定した実験室における定常的な総菌数濃度は 10^4 cells/ m^3 前後であり、時期による大きな変動は見られず、総菌数濃度と温度や湿度との間には相関する傾向は見られなかった。また、総菌数に占める真菌数の割合は、15~35% 程度で変動していた。同じ微生物回収液を培養して得られた生菌数濃度は、 10^2 CFU/ m^3 前後であった。

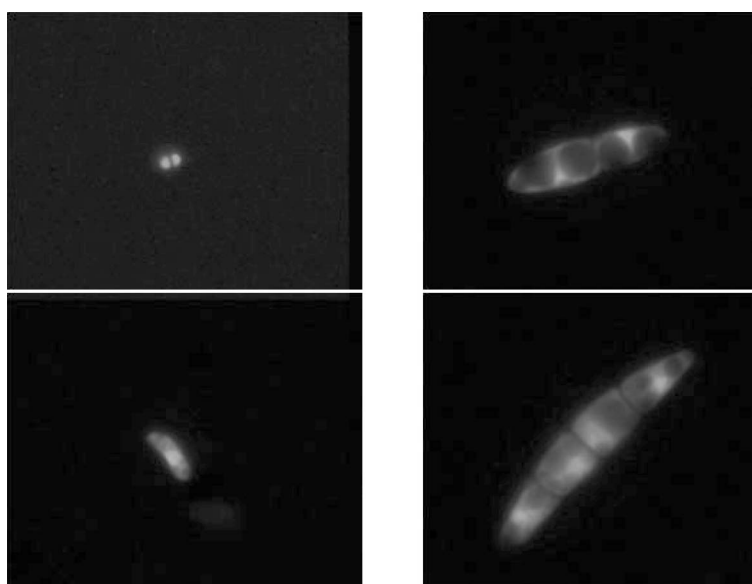
落射型蛍光顕微鏡によって観察されたバイオエアロゾルの例を Fig. 2 に示す。どの時期においても、双球菌や桿菌、あるいは芽胞を形成している *Bacillus* 属などが観察された。また真菌では、隔壁を持った大分生子が期間を通じて観察されたが、培養では出現しなかった。分離培養によって得られた真菌類は、*Cladosporium* 属、*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属と思われるグループが多かったが、特定の菌種が増殖しているということはない。

Table 1. Concentrations of microorganisms from air

Sampling date	Temperature (°C)	Humidity (%)	DNA staining		Plate culture
			Total cell concentrations (cells/m ³)	Fungi/Total cells (%)	Colonized cell concentrations (CFU/m ³)
13 Aug. '04	—	—	1.5 × 10 ⁴	—	—
9 Sep. '04	25.2	60	1.5 × 10 ⁴	—	—
11 Nov. '04	27.4	58	0.88 × 10 ⁴	34.9	1.9 × 10 ²
2 Dec. '04	25.0	33	0.95 × 10 ⁴	19.6	0.44 × 10 ²
9 Dec. '04	24.0	33	0.96 × 10 ⁴	13.8	0.76 × 10 ²
20 Jan. '05	25.5	30	0.35 × 10 ⁴	16.9	0.45 × 10 ²

—: No data

CFU: Colony forming unit

**Fig. 2.** Bacteria and fungi from a room air sample (EtBr staining, ×1,000).

2. バイオエアロゾルの細菌叢解析

DNA 抽出操作前後における 2 サンプルの臭化エチジウム染色結果から、本抽出方法による菌体破壊率は約 70% であった。

2 サンプルから得られた 16S rDNA 塩基配列を基にした細菌叢解析結果を Fig. 3 に示す。捕集日によって菌株数に差は見られるが、門レベルで Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria および Gemmatimonadetes の 6 グループが共通して検出された。これらのサンプルから高頻度に検出された菌種は、Actinobacteria 門では *Propionibacterium acnes*, Cyanobacteria 門では *Cylindrospermum* 属菌であった。また、両サンプルとも株数としては少なかったが、顕微鏡観察で見られた *Bacillus* 属が含まれていた。

IV. 考 察

職場でしばしば問題となる SBS では、建物内の換気

回数や VOC 濃度などとともに、微生物も関与しているということが示されており^{1, 2)}, EPA でも SBS の原因のひとつとして微生物をあげている⁶⁾。また、BRI ではレジオネラ属菌エアロゾルが原因菌として認められている⁷⁾。しかし、我が国の労働衛生分野では、結核の集団感染等を除き、空気中の微生物による健康影響についてはほとんど省みられていなかった。その原因として、空気中の微生物についての捕集方法や検出方法についての情報が少ないことがあげられよう。

微生物による室内空気汚染を調べる手段として現在用いられている測定機器は、ほとんどが培養法によって菌数および菌種を検出しており、培地の選択によっては汚染があっても微生物が検出されないという事態が生じる可能性がある。また、水圏や土壌など環境中の微生物は、人工培地で検出される菌数と実際に存在する菌数との間には大きな差があるということが知られてきており⁴⁾, 培養法による環境微生物の菌数評価やリスク評価には問

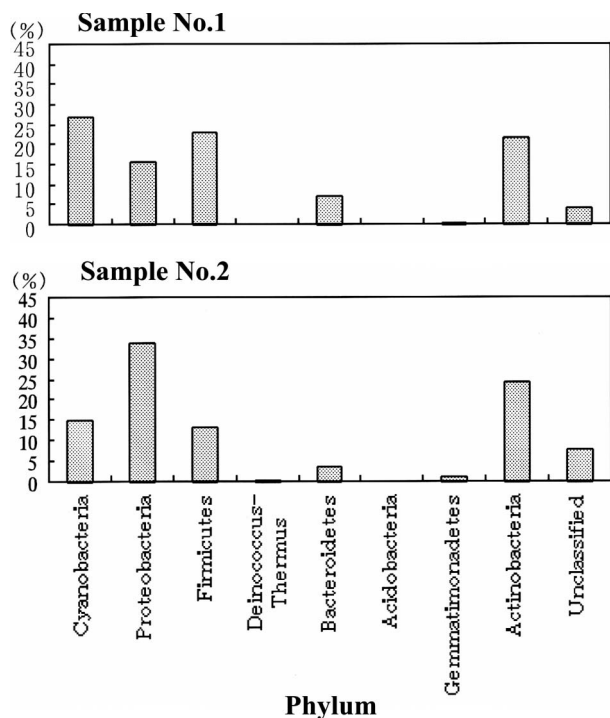


Fig. 3. Percentages of airborne bacteria classified by DNA sequence analysis.

題が残されている。

本研究においても、培養によって検出された生菌数濃度と染色による総菌数濃度との間には、2桁ほどの違いが見られた。また、比較的乾燥に強いと思われる真菌でも、検鏡で観察された菌種が培養では検出されなかった。この検出菌数濃度の違いには、捕集時の乾燥による影響を含めた微生物の生理状態の違いや、使用した培地への適合性などが関与していると考えられた。

しかし、DNA染色による微生物の検出は、培地の種類に依存することなく、また生死にかかわらず微生物総数を把握できる。さらに、菌数把握までに数日かかる培養法に比べ1日以内に結果が得られ、対策を講じやすいという利点がある。このような観点での検査法には、ダニアレルゲン検出によるダニ汚染の把握があり、染色による総菌数評価もダニ検査法同様、特定菌による感染症の予防というより、微生物の存在そのものが問題となるSBSやアレルギーなどのリスク評価に向いていると思われる。

バイオエアロゾルの多くは微生物単独での浮遊のほか、無機粉じんなど他の粒子に付着して浮遊していると考えられており、浮遊粉じん量とバイオエアロゾル量の間には高い相関が見られる⁸⁾。従って、多くの無機粒子と混在しているバイオエアロゾルにおいては、微生物のみを染色することが重要である。NIOSHマニュアルには、DNA染色に使用する蛍光色素としてアクリジント

レンジが記載されているが、臭化エチジウムは土壌において無機粒子と微生物とを区別できるという報告があり⁹⁾、本研究においても無機粒子はほとんど染色されておらず、この染色法はバイオエアロゾルに対しても十分適用可能であることが示された。また、本研究方法ではアレルギーの原因となることが多い真菌については、顕微鏡下で特徴ある分生子の形状や数を確認することもできるため、従来のように培養による結果(数日~数週間後)を待つことなく迅速な対応ができるという大きな利点がある。

一方、PCRによるバイオエアロゾル菌種の検出については、特定の菌種あるいは皮膚炎¹⁰⁾などの明らかな健康障害が問題となった場所や、結核患者の病室内など^{11, 12)}浮遊微生物濃度が高い場所についての報告はいくつかあるが、本研究で行ったような特に問題のない通常の室内については、細菌叢解析の報告はほとんどみられない。しかし、このような通常の室内におけるデータは、バイオエアロゾルのモニタリングに関する基礎データとして重要と思われる。本研究で行ったバイオエアロゾル細菌叢の遺伝学的系統解析からは、DNA染色により顕微鏡下で認められた*Bacillus*属も検出され、顕微鏡での観察との間にある程度の整合性が見られた。また、遺伝子解析からヒト由来と思われる細菌種*Propionibacterium acnes*も見出されたことから、室内バイオエアロゾルの細菌叢は屋外由来と思われる細菌ならびにヒトから発生する細菌を含めて構成されていることが示唆された。

V. 結 論

本研究において検討したろ過捕集法—DNA染色法は、SBSやアレルギーなど微生物の存在そのものによる健康障害のリスク評価および迅速な対応のために、有効な手段になると思われる。また、ろ過捕集したバイオエアロゾル細菌叢の遺伝子解析を行うことにより、健康影響を及ぼす可能性のある細菌種の検出を行える可能性が高い。従って、細菌叢解析はそれら細菌種に対するリスク判定などに関して有用な情報を提供する手段になり得ると考えられる。

謝辞：本研究は、平成16年度産業医科大学産業医学重点研究助成によって行われた。

文 献

- 1) Cooley JD, Wong WC, Jumper CA, Straus DC. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup Environ Med* 1998; 55: 579-584.
- 2) Bholah R, Subratty AH. Indoor biological contaminants and symptoms of sick building syndrome in office build-

- ing in Mauritius. *Int J Environ Health Res* 2002; 12: 93-98.
- 3) Jensen PA, Schafer MP. Sampling and characterization of bioaerosols. In: NIOSH Manual of Analytical Methods. Washington, DC: NIOSH, 1998: 84-112.
 - 4) Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic Identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995; 59: 143-169.
 - 5) 邑瀬章文, 内山知二, 山口進康, 那須正夫. 蛍光染色法による地下水中の細菌数評価. *防菌防黴* 1999; 27: 785-792.
 - 6) U.S. Environmental Protection Agency. Indoor air facts No.4 (revised): Sick Building Syndrome (SBS) Fact sheet. <http://www.epa.gov/iqa/pubs/sbs.html>. 1991, Feb. 2005.
 - 7) O'Mahony M, Lakhani A, Stephens A, Wallace JG, Youngs ER, Harper D. Legionnaires' disease and the sick-building syndrome. *Epidemiol Infect* 1989; 103: 259-292.
 - 8) 高橋泰子. 病院環境におけるエアロゾル—浮遊微生物の動態とその制御. *エアロゾル研究* 1992; 7: 106-112.
 - 9) Someya T. Three-dimensional observation of soil bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope. *Soil Microorganisms* 1995; 46: 61-69.
 - 10) Paez-Rubio T, Viau E, Romero-Hernandez S, Peccia J. Source bioaerosol concentration and rRNA gene-based identification of microorganisms aerosolized at a flood irrigation wastewater reuse site. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 804-810.
 - 11) Mastorides SM, Oehler RL, Greene JN, Sinnott JT, Kranik M, Sandin RL. The detection of airborne *Mycobacterium tuberculosis* using micropore membrane air sampling and polymerase chain reaction. *CHEST* 1999; 115: 19-25.
 - 12) Vadrot C, Bex V, Mouilleseaux A, Squinazi F, Darbord JC. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR in hospital air samples. *J Hospit Infec* 2004; 58: 262-267.

Sampling and Detection Methods of Bioaerosols for the Risk Assessment of Microorganisms in Work Environments

Sumiyo ISHIMATSU¹, Kazumasa FUKUDA², Toru ISHIDAO¹, Hatsumi TANIGUCHI² and Hajime HORI¹

¹Department of Environmental Management 1, School of Health Sciences and ²Department of Microbiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, Fukuoka 807-8555, Japan

Abstract: Bioaerosols including bacteria and fungi have been almost unrecognized as pollutants of work environments in Japan. The combination of filter sampling and DNA staining by ethidium bromide (EtBr) was examined for the detection and evaluation of total numbers of bioaerosols, including viable and dead microorganisms, for risk assessment in work environments. With direct counting of microorganisms by EtBr concentrations of total cells were obtained in a shorter time than plate culture, the traditional method for detection of microorganisms. Total cell concentrations (cells/m³) were about 100 times greater than colonized cell concentrations (CFU/m³)

in all samples. In some microscopic fields, macro conidia produced from some kinds of fungi were observed, but they were not detected by plate culture. Airborne bacterial 16S rDNA amplified by PCR were determined for their base sequences by DNA sequence analysis and classified by sequence-based homologies. Base sequences from 2 samples each contained 6 common groups of phylum. The combination of filter sampling and direct counting by EtBr staining was shown to be a better method for detecting and evaluating total cell concentrations in the risk assessment of sick building syndrome and allergy. (*San Ei Shi* 2006; 48: 1-6)