

## 職場における浮遊微生物濃度の測定と細菌叢の解析

石松維世<sup>1</sup>, 安部太喜<sup>2</sup>, 福田和正<sup>3</sup>, 石田尾徹<sup>1</sup>, 谷口初美<sup>2</sup>, 保利 一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>産業医科大学産業保健学部第1環境管理学, <sup>2</sup>黒崎播磨株式会社, <sup>3</sup>産業医科大学医学部微生物学

**抄録:** 職場における浮遊微生物濃度の測定と細菌叢の解析: 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—シックビルディング症候群 (SBS) やアレルギーの原因と考えられる浮遊微生物の検出方法は培養法によるものが多く, 浮遊微生物濃度や構成微生物の把握などに限界がある. 本研究では, ろ過捕集法-蛍光二重染色法によって職場の室内浮遊微生物濃度測定を継続的に行い, 総菌数濃度とエステラーゼ活性を持つ生理活性保有菌数の割合について調べた. 常時温湿度調整されている実験室では, 総菌数濃度と湿度には関連はなかったが, 使用頻度が低く空調機の運転頻度も低い会議室では, 捕集時期により総菌数濃度の変動が見られた. また, 生理活性保有菌割合の変動と測定前における降雨の有無には, 有意に関連があった ( $n = 15$ ,  $p < 0.05$ , Mann-Whitney 検定). 本方法により生理活性保有菌を含めた浮遊菌数濃度の測定が可能であったことから, この方法は室内浮遊微生物のリスク評価の一助になると考えられた. 一方, 捕集した浮遊微生物中の細菌類について, 16S rDNA の塩基配列に基づいた同定を行って気中細菌種の構成を調べたが, 測定した実験室, 会議室では門レベルでの構成細菌叢にはほとんど差が見られず, またヒトに対して強い病原性を持つ菌種は見出されなかった. (産衛誌 2007; 49: 39-44)

**キーワード:** Bioaerosols, Sick building syndrome (SBS), Air sampling, Viability, Identification of bacteria, 16S rDNA

### I. はじめに

「建築物衛生法 (ビル管理法) 関連政省令」や「事務所衛生基準規則」の改正によって空気中病原微生物の対策に関する項目が追加された後においても, 職場にお

ける室内浮遊微生物濃度の測定はほとんど行われていない. この理由のひとつとして, 室内空気中の微生物の存在状況と疾病との定量的な関係が必ずしも明確ではなく, 測定結果についての判断が難しいことが挙げられる. しかし, シックビルディング症候群 (SBS) は VOC 等の揮発性有機化合物と換気量, および微生物などとの複合的要因によると言われており<sup>1)</sup>, いくつかの真菌類はアレルギーの原因とされている<sup>2)</sup>.

NIOSH のバイオエアロゾル捕集マニュアル<sup>3)</sup> には, 気中微生物の捕集方法として衝突法やろ過捕集法が, 検出方法として培養法やアクリジンオレンジを用いた DNA 染色法が示されているが, 我が国で市販されている多くのバイオエアロゾル捕集機器は衝突法と培養法との組み合わせによるものである. 衝突法の機器は取り扱いが簡便であるが, 空気中の浮遊微生物濃度や微生物種を把握するには制限のある方法と考えられ, 測定に際し次のような点が問題になると思われる. 1. 使用した培地との適合性 (栄養要求性など) により, 検出されない微生物が生ずること, 2. ABNC (Active but non-culturable) や VNC (Viable but non-culturable) 状態にある微生物や死んだものは, コロニーを作ることができないため検出できないこと<sup>4)</sup>, などである.

このような問題点を考慮して, 我々は比較的長い時間定量的な捕集ができるろ過捕集方法と, 培養によらず臭化エチジウム (EtBr) で DNA を染色し総菌数濃度を測定する方法を検討してきている<sup>5)</sup>. この方法においては, DNA 染色時に Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) で同時に染色することにより, エステラーゼ活性を保有する微生物を検出することができると考えられる. これらふたつの染色法を組み合わせることにより, 培養を行わずに総菌数を把握でき, かつ酵素活性を有する微生物を検出することができることから, 室内空気における微生物汚染のリスクを評価するための方法として有望であると考えられる.

一方, 微生物の増殖は温湿度に関連すると考えられるが, 湿度が高くなるだけでなくそれが維持されることで, 微生物は成長し始める<sup>6)</sup>. すなわち, 湿度条件が整うことで生理活性が上昇すると考えられ, これは湿度が浮遊

2006年8月28日受付; 2006年12月7日受理

連絡先: 石松維世 〒807-8555 福岡県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)

微生物のリスクを上昇させたと捉えることもできる。

本研究では、職場である実験室、会議室および屋外の浮遊総菌数濃度および生理活性を有する菌数濃度をこれまでに行ってきたろ過捕集法で測定し、本方法が生理活性保有菌濃度を把握できるか、またバイオエアロゾルのリスクを評価できる方法であるかを検討した。

また、SBSでは微生物も複合的な原因のひとつとして挙げられているが、具体的な菌種等の情報は少ないため構成微生物叢の解析も重要と考えられることから、細菌類の16S rDNAの遺伝子配列から系統分類解析を行うことにより、対象職場の空气中細菌叢の解析を行った。

## II. 対象と方法

### 1. バイオエアロゾル捕集

2005年3月から12月まで、某大学の細菌を日常的に取り扱う実験室、実験室とは異なる建屋の会議室および屋外において気中微生物の捕集を行った。実験室は築28年を経過した8階建て建物の最上階にあり、3~5名程度がほぼ毎日実験を行っている。1年を通じて独立した空調機が稼働しているが、夜間は停止している。会議室は築9年を経た7階建て建物の6階にあり、常時在室している者はいない。また、会議室使用時以外には空調機は稼働しておらず、春期と秋期には建物の空調システム自体の運転がなされていない。屋外の捕集地点は、会議室のある建物の1階ポーチ部分である。

捕集には0.8 $\mu$ m孔径ニトロセルロース混合メンブレンフィルター(47mm $\phi$ , ADVANTEC)を装着したオープンフェイスサンプラーを用い、各測定場所において2サンプルを同時捕集した。吸引流量は15l/min、捕集時間は実験室48時間、会議室24~48時間、屋外6時間とした。

### 2. 二重染色法および培養法によるバイオエアロゾル濃度測定

捕集したメンブレンフィルターの1枚を4分割し、リン酸バッファー(PBS)20ml中で2分間激しく攪拌して捕集された微生物を回収した。この回収液の一定量を0.2 $\mu$ m孔径黒色ポリカーボネートフィルター(ADVANTEC)でろ過したのち、前報<sup>5)</sup>に示した染色用バッファー3mlを入れ、20mg/ml CFDA(和光純薬)溶液22.5 $\mu$ l(最終濃度150 $\mu$ g/ml)、2mg/ml EtBr(和光純薬)溶液150 $\mu$ l(最終濃度100 $\mu$ g/ml)を加え10分染色した。CFDA染色法は、CFDAが細胞質のエステラーゼと反応し発色することから、エステラーゼ活性を有している微生物(生理活性保有菌, Cells with esterase activities)を検出できる方法である<sup>7)</sup>。

1サンプルにつき3枚の試料を作製し、落射型蛍光顕微鏡(BX50, オリンパス)によりそれぞれの試料につ

いて、染色ごとに100視野検鏡し真菌と細菌とを分けて数えた。また、EtBr染色による総菌数とCFDA染色による生理活性保有菌数は、数えた細菌数と真菌数から求め、気中濃度を算出した。

残りの回収液は、普通寒天培地と麦芽寒天培地各2枚にそれぞれ0.1mlずつ接種し、普通寒天培地は37 $^{\circ}$ C、麦芽寒天培地は28 $^{\circ}$ Cでそれぞれ4日間培養したのち、生育したコロニー数を数えた。

### 3. 遺伝子増幅および遺伝子解析による系統分類

捕集したもう1枚のメンブレンフィルターについて、前報<sup>5)</sup>に示した方法により細菌DNAの抽出と精製を行った。すなわち、6分割したメンブレンフィルターに100mM Tris-HClバッファー(pH 8.0)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回収液8mlを0.2 $\mu$ 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。これに100mM Tris-HClバッファー0.9mlを加え、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。この回収微生物に、リゾチーム溶液(最終濃度4.0mg/ml)とSDS溶液(最終濃度1.8%)をそれぞれ加え、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回繰り返し、合計約3mlのDNA抽出液を得た。

この抽出液をPCI溶液により除タンパク処理した後濃縮し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用いて精製DNA試料を得た。

前報<sup>5)</sup>と同じく、5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'および5'-CCGTCAATTCCTTT(A/G)AGTTT-3'の塩基配列を持つプライマーを用い、精製DNAのPCRを行った。試料25 $\mu$ l(精製DNA 1 $\mu$ l、各プライマー0.1 $\mu$ M、10倍希釈PCRバッファー2.5 $\mu$ l、Amplitaq-Gold DNAポリメラーゼ(PERKIN ELMER)1.25U、dNTPs 0.2 $\mu$ M、滅菌蒸留水)に対し、96 $^{\circ}$ C・30秒、55 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・60秒の増幅サイクルを35回繰り返して約560bpの増幅産物を得、ひとつの捕集サンプルにつき、同定に供する遺伝子断片を約200クローン得た。これらの遺伝子断片で形質転換し増殖させた大腸菌1 $\mu$ lをテンプレートとし、M13プライマーセットを用いて同条件でPCRを行い、約700bp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ない、ジェネティックアナライザー(3130xl, Applied Biosystems)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) を行い、捕集した細菌類の階層分類を行った。「相同性あり」と判定した条件は、オーバーラップする長さが400 bp以上でマッチング率80%以上のものとし、この条件を満たさないものは「同定不能」とした。

### Ⅲ. 結 果

総菌数濃度 (cells/m<sup>3</sup>)、およびそれに対する生理活性保有菌 (Cells with esterase activities) と真菌それぞれの割合 (%), 培養による細菌と真菌の生菌数濃度 (CFU/m<sup>3</sup>) を Table 1 に示す。実験室の総菌数濃度は期間中大きな変動はなく、生理活性保有菌割合とともに捕集時の室温または湿度との間には相関が見られなかった。会議室では、総菌数濃度、生理活性保有菌割合および真菌の生菌数濃度は、測定時期により変動が見られた。一方、全測定場所のデータ (n = 15) において、生理活性保有菌の割合が40~50%である測定日とそれより低い日があった。気象庁のHP<sup>8)</sup> より、本測定場所近傍観測点の気象統計データに示された降雨量と生理活性保有菌割合との関連性を調べたところ、測定開始2日以内に1 mm以上の降雨があった場合、生理活性保有菌の割合が有意に高いことが認められた ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney 検定)。しかし、降雨の有無と細菌および真菌

の生菌数濃度との間には有意差がなかった。

遺伝子解析により同定された細菌叢の内訳を Fig. 1 に示す。PCR法によってDNAの増幅ができたサンプル数は、実験室11サンプル中4サンプル (36.4%), 会議室3サンプル中2サンプル (66.6%), 屋外1サンプル (100%) であった。

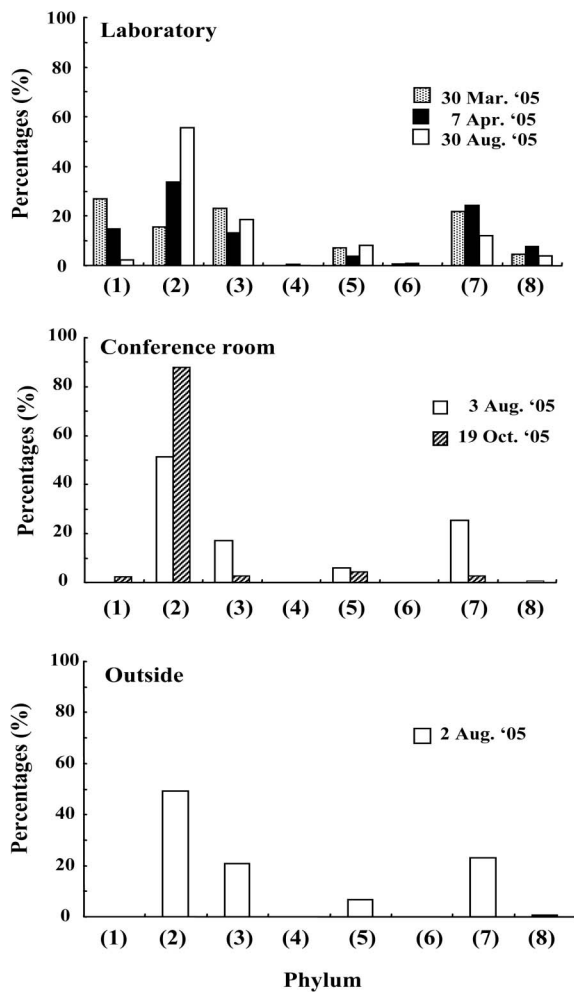
BLAST 相同性検索によって同定された細菌叢は、実験室では、Cyanobacteria 門, Proteobacteria 門, Firmicutes 門, Bacteroides 門, Actinobacteria 門の5つのグループが測定時期に関係なく共通して検出された。しかし、時期により構成グループの比率は異なっていた。ヒトの出入りが多い実験室からは、ヒト由来と考えられる Firmicutes 門の *Streptococcus* 属や Actinobacteria 門の *Propionibacterium* 属が多く検出された。会議室と屋外では、Cyanobacteria 門以外の4グループが実験室と共通しており、両場所での構成比率は似かよっていた。8月の測定 (白抜きバー) では、3箇所とも構成比率が似かよっており、なかでも Proteobacteria 門の比率が高かった。

階層分類により同定された菌種には、どの場所においてもヒトへの強い病原性を示すものは見出されなかった。

**Table 1.** Concentrations of microorganisms from air

Date	Temperature (°C)	Humidity (%)	DNA staining			Colonized cell concentrations	
			Total cell concentrations (cells/m <sup>3</sup> )	Cells with esterase activities/Total cells (%)	Fungi/Total cells (%)	Bacteria (CFU/m <sup>3</sup> )	Fungi (CFU/m <sup>3</sup> )
Laboratory							
30 Mar. '05	25.3	39	7.2 × 10 <sup>3</sup>	44	56	46	25
7 Apr. '05	24.4	32	4.2 × 10 <sup>3</sup>	47	48	16	25
12 May '05	27.5	34	4.6 × 10 <sup>3</sup>	29	39	12	63
9 Jun. '05	26.4	50	5.3 × 10 <sup>3</sup>	31	39	20	22
23 Jun. '05	26.5	56	4.9 × 10 <sup>3</sup>	29	40	29	12
30 Jun. '05	25.5	49	4.4 × 10 <sup>3</sup>	44	39	15	14
7 Jul. '05	25.8	55	7.2 × 10 <sup>3</sup>	46	39	8	106
27 Jul. '05	25.7	48	3.9 × 10 <sup>3</sup>	38	43	41	39
29 Aug. '05	27.9	55	6.1 × 10 <sup>3</sup>	21	52	27	19
20 Oct. '05	26.3	37	3.0 × 10 <sup>3</sup>	25	50	111	146
24 Nov. '05	23.0	30	2.7 × 10 <sup>3</sup>	19	24	19	12
Conference room							
3 Aug. '05	27.5	66	11.8 × 10 <sup>3</sup>	47	79	—	265
19 Oct. '05	26.8	41	4.6 × 10 <sup>3</sup>	43	77	64	83
12 Dec. '05	18.0	35	2.7 × 10 <sup>3</sup>	16	31	30	28
Outside							
2 Aug. '05	30.0	69	17.1 × 10 <sup>3</sup>	52	59	148	333

—: No data because of too much fungi colonies  
CFU: Colony Forming Unit



**Fig. 1.** Percentages of airborne bacteria classified by DNA sequence analysis. (1) Cyanobacteria, (2) Proteobacteria, (3) Firmicutes, (4) Deinococcus-Thermus, (5) Bacteroidetes, (6) Gemmatimonadetes, (7) Actinobacteria, (8) Unclassified.

#### IV. 考 察

室内空気中の微生物濃度は、温湿度に加えその部屋の使われ方や築年数、使用者の有無や人数、窓を含む出入り口の開閉状況、外気の流入などによって異なると考えられ、その構成細菌叢も同様にこれらの影響を受けると思われる。また、微生物は、相対湿度の条件が好転しそれが維持されると成長することも報告されており<sup>6)</sup>、このことは湿度の変化によって微生物の生理活性が上がることを意味する。室内の相対湿度の上昇は、降雨や加湿装置の運転、あるいは温度の低下などによるが、外気条件との間に相関が高いことが示されている<sup>9)</sup>。しかし、空調機の運転により温湿度がコントロールされている場合には、室内の相対湿度の変動は外気の影響を受けにくいと考えられる。

本測定結果より、実験室では総菌数濃度および生菌数濃度と、測定時に観測した湿度に相関は認められなかった。独立した空調機が長時間稼動する実験室では、気温や湿度の変動が小さいため室内の微生物濃度がほぼ一定に保たれていると推測され、そのことが総菌数濃度の変化が小さい原因と考えられた。一方、会議室は実験室に比較すると総菌数濃度の変動が大きかったが、この部屋の使用頻度が低いため空調機の運転がほとんど行われていなかったことから、外気の影響を受けやすかったためと考えられた。

エアロゾルとなった細菌のいくつかでは、相対湿度 20~25%あるいは 40%程度の空気中に浮遊することによって急速にコロニーを形成しなくなったり分裂能が低下したりすることが報告されている<sup>10, 11)</sup>。このことから、微生物の生理活性、すなわちコロニー形成や分裂能の有無、酵素活性の有無などには、菌体の乾燥が大きく関与していると考えられる。しかし、浮遊 10 分後にコロニー形成能がほとんどみられなくなった細菌でもその 60%以上には分裂能が維持され、浮遊 4 時間後でもその割合にはほとんど変化がないことから、空気中に浮遊する微生物は VNC 状態であることが示唆されている<sup>11)</sup>。このような微生物は、条件を整えばコロニー形成を行う可能性もあり、一方、さらに長時間浮遊すれば、分裂能は示さないが呼吸活性や酵素活性などが維持された ABNC 状態に移行すると考えられる。

本結果では、空気中菌数濃度は「総菌数濃度 > 生理活性保有菌数濃度 ≧ 生菌数濃度」となっていた。ろ過捕集法では、フィルターに捕集された微生物は通過空気による乾燥の影響を受けると思われ、捕集されたフィルター上で様々な生理活性を失うことが懸念される。しかし、総菌数濃度と生菌数濃度の比は海洋や土壌などの環境中微生物の検出比率<sup>12)</sup>と同程度であった。また、生理活性保有の指標として用いたエステラーゼ活性は、本捕集方法でも維持され、捕集前の降雨により保有菌数割合が増加していた。これらのことから、本方法は、ろ過捕集による乾燥の影響があったとしても、分裂増殖する能力や酵素活性すなわち ABNC 状態も測定できる方法であることが示された。

今回捕集を行った結果から、降雨が微生物の生理活性の賦活化と維持を促す要因であることが示唆されたが、実験室のように、空調機器が長時間運転されている場合には、浮遊総菌数濃度の季節的変動は小さかった。したがって、空調機器の常時運転で室内環境を適切な条件に維持することは、バイオエアロゾル濃度の上昇を抑制するためには重要であることが認識された。

各測定場所から得られた浮遊細菌の 16S rDNA による系統分類の結果、室内の状態や築年数に係らず、細菌叢は共通する 4 つの門グループが大勢を占めていた。前報<sup>5)</sup>

で報告したグループのうち、今回の測定で検出頻度が低かった *Deinococcus-Thermus* 門と *Gemmatimonadetes* 門は、両室内および全測定時期に共通するグループではなく、場所や季節に関連したグループであると推測された。また、飛沫感染や空気感染を起こすと思われる菌種は見出されなかった。屋外で捕集した浮遊細菌について遺伝学的な菌叢解析を行った報告<sup>13)</sup>において、*Proteobacteria* 門や *Firmicutes* 門に属する *Bacillus* 属、*Lactobacillus* 属、*Streptococcus* 属などが多く検出されており、上記のグループで全解析クローン数の40%以上を占めていたことが記されている。地理的状況などの違いはあるが、本研究で屋外から捕集された細菌の優先グループはこの報告と似ており、屋外の微生物構成には共通性があるのではないかと考えられた。さらに Fig. 1 から、室内に浮遊する細菌類は屋外由来のものが多いと推察されるが、ヒトの出入りが多い実験室からヒト由来と考えられる *Streptococcus* 属や *Propionibacterium* 属が多く検出されたことから、ヒトも浮遊細菌の重要な発生源であることが示唆された。

職場を含め室内の浮遊微生物の測定とそのリスクの評価については、微生物濃度の測定方法や検出方法など検討すべき課題が多い。しかし、本方法によれば長時間の定量捕集ができるため、時間的変動が大きいといわれる微生物濃度を平均濃度として求めることができる。また、蛍光二重染色法によって総菌数濃度と生理活性保有菌濃度を把握できたことより、本方法はバイオエアロゾルのリスク評価の一助となることが示された。さらに、捕集方法を変更せずに細菌叢解析に用いる試料も得ることができるため、空气中微生物のモニタリングに適していると思われ、浮遊微生物濃度あるいは細菌叢に変化が生じた場合には迅速な対応ができると考えられた。

## V. 結 論

ろ過捕集法-蛍光二重染色法による室内の浮遊微生物濃度測定では、総菌数濃度とともに生理活性保有菌数を求めることができた。また、生理活性保有菌数割合の増減には降雨の影響が認められた。このことより、本方法は浮遊微生物の生理活性状態を考慮した浮遊微生物濃度測定が可能であり、浮遊微生物のモニタリングとリスク評価にも適用できると思われた。また、測定した3箇所では重大な病原性細菌は認められず、場所による細菌叢の構成グループにもほとんど差がなく、室内細菌は屋外および在室者由来であることが示唆された。

謝辞：本研究の一部は、平成17年度産業医科大学産業保健学部実践研究助成によって行われた。

## 文 献

- 1) U.S. Environmental Protection Agency. Indoor air facts No.4 (revised): Sick Building Syndrome (SBS) Fact Sheet. 1991. (online), available from <<http://www.epa.gov/iqa/pubs/sbs.html>>, (accessed 2005-02).
- 2) Fischer G, Dott W. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. Arch Microbiol 2003; 179: 75-82.
- 3) Jensen PA, Schafer MP. Sampling and characterization of bioaerosols. In: NIOSH Manual of Analytical Methods. Washington, DC: NIOSH, 1998: 84-112.
- 4) 山本啓之, 木暮一啓. Viable but non-culturable (VNC) の概念による細菌感染症へのアプローチ. 日本細菌学雑誌 1999; 54: 631-638.
- 5) 石松維世, 福田和正, 石田尾徹, 谷口初美, 保利 一. 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. 産衛誌 2006; 48: 1-6.
- 6) Viitanen H, Hanhijarvi A, Hukka A, Koskela K. Modeling mould growth and decay damages. Proceed Health Build 2000; 3: 341-346.
- 7) Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multi-nutrient starvation. FEMS Microbiol Ecol 1996; 20: 149-154.
- 8) 気象庁. 気象統計情報 2005年. (online), available from <<http://www.data.kishou.go.jp/etrn/index.html>>, (accessed 2006-07).
- 9) Green CF, Scarpino PV, Gibbs SG. Assessment and modeling of indoor fungal and bacterial bioaerosol concentrations. Aerobiologia 2003; 19: 159-169.
- 10) Marthi B, Fieland VP, Walter M, Seidler RJ. Survival of bacteria during aerosolization. Appl Environmental Microbiol 1990; 56: 3463-3467.
- 11) Heidelberg JF, Shahamat M, Levin M, Rahman I, Stelma G, Grim C, Colwell RR. Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. Appl Environmental Microbiol 1997; 63: 3585-3588.
- 12) Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 1995; 59: 143-169.
- 13) Radosevich JL, Wilson WJ, Shinn JH, DeSantis TZ, Andersen GL. Development of a high-volume aerosol collection system for the identification of air-borne microorganisms. Letters in Applied Microbiology 2002; 34: 162-167.

## Bioaerosol Concentrations and the Identification of Aerosolized Bacteria by 16S rDNA Analysis in Work Environments

Sumiyo ISHIMATSU<sup>1</sup>, Hiroki ABE<sup>2</sup>, Kazumasa FUKUDA<sup>3</sup>, Toru ISHIDAO<sup>1</sup>, Hatsumi TANIGUCHI<sup>3</sup> and Hajime HORI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Management 1, School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, Fukuoka 807-8555, Japan, <sup>2</sup>Kurosaki Harima Corporation and <sup>3</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan

**Abstract:** Bioaerosols cause sick building syndrome (SBS) and allergy. Many kinds of bioaerosol impactors are used for measurement of airborne microorganism concentrations in Japan. However, because the impactors are set on agar plates, some microorganisms cannot make colonies on the plates because of their lower viability or demands of nutrition. On the other hand, by double staining using ethidium bromide (EtBr) and carboxyfluorescein diacetate (CFDA), both total cells and cells with esterase activities can be detected without incubation. In this study, we calculated total cell concentrations and percentages of cells with esterase activities by the combination of filter sampling and double staining (EtBr and CFDA) from air of a laboratory, a conference room and outdoors. Temperature and humidity in the laboratory

were constantly kept by an air conditioner, but in the conference room, an air conditioner was only operated sometimes because of its low frequency of use. There were no significant differences between total cell concentrations and humidity in both rooms, but increase of the percentages of cells with esterase activities depended on rainfall before the samplings ( $n=15$ ,  $p<0.05$  by Mann-Whitney test). The increase of active microorganisms by rainfall should be considered when we evaluate the risk of bioaerosols in the workplace. There were few differences in classifications of aerosolized bacteria by 16S rDNA sequence-based homology between the laboratory and the conference room. In both rooms, few pathogenic bacteria were observed.

(*San Ei Shi* 2007; 49: 39-44)