—Note—

Circadian Rhythm of Air-borne Bacteria and Dust Particles in a Mice Breeding Room

Toru OBARA, Nobutaka FUKUYAMA,
Korefumi MINAKAMI, Tomoyuki UEDA
and Chuhei YAMAUCHI

*Institute of Laboratory Animal Science, Faculty of Medicine,
Kagoshima University 1208-1, Usuki-cho,
Kagoshima 890, Japan.*

(Received 10 December 1985/Accepted 12 March 1986)

The circadian rhythm of air-borne bacteria and dust particles in a mice breeding room was studied at 1-hour intervals on the first, third and fifth day after accommodation of the animals. The numbers of air-borne bacteria in the room increased day by day after accommodation, and showed a circadian rhythm which went down at about noon and rose with three peaks at about 20:00, 1:00 and 8:00. The numbers of dust particles tended to decrease from day to day, and they showed almost the same circadian rhythm as the air-borne bacteria. Correlations between air-borne bacteria and dust particles were not significant for each particle level on the first day, but were significant for all the particle levels of 0.3, 1, 2, and 5 μm at the third day, and were also significant at particles levels of 0.5 μm or more on the fifth day.

マウス飼育室の空中細菌及び粉塵の日内変動

小原 徹・福山伸隆・水上惟文・
上田智之・山内忠平

鹿児島大学医学部附属動物実験施設

空気中の細菌は一般に粉塵に付着して浮遊しているといわれ、また空中細菌と粉塵とは密接な関係があるともいわれる [2]。しかし、空中細菌と粉塵との相関関係については明らかにされていない。一方、実験動物施設では、空気清浄度の評価あるいは監視のために空中細菌数の測定がしばしば行われ [3, 4, 6, 9, 10]、また実験動物施設の落下細菌数の基準値 [12] も示されている。しかし、動物室の空中細菌には多くの変動要

因があるので [1, 7]、いまだ十分な解析は行われず、その測定方法についても疑問な点が多い。そこで、われわれは各種環境要因をできるだけ少なくした条件下でマウス搬入後における飼育室の空中細菌数と粉塵数の日内変動を遠隔測定し、かつ空中細菌数と粉塵数との相関関係について検索したので報告する。

実験には、空調の給気系に高性能フィルターを組み込んだ飼育室 (3,200×2,900×2,370 mm) を用い、環境

条件は温度 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数10回、照明時間12時間（午前7時点灯、午後7時消灯）に設定した。なお、飼育室は使用前に床及び壁等を清掃後、中性洗剤を用いてブラシで充分に洗浄した。その後、次亜塩素酸ナトリウム（ビューラックス、オーヤラックス社製）と両性界面活性剤（テゴー51、日本商事社製）を用いて1週間消毒し、十分な清浄度を維持していることを確認したのちに使用した。すなわち、動物搬入前の室内の空中細菌数は $0 \sim 1$ 個、粉塵数は $5\mu\text{m}$ レベルで0個、 $2\mu\text{m}$ で8個、 $1\mu\text{m}$ で98個、 $0.5\mu\text{m}$ で608個、 $0.3\mu\text{m}$ で7,201個ときわめて高い清浄度が維持されていた。動物は8～10週齢のSPFのddyマウス雌400匹を使用し、オートクレーブ滅菌した床敷約40gをいれたプラスチックケージに、それぞれ5匹ずつを収容した。

空中細菌と粉塵の測定にあたっては、ヒトの出入りによる影響を除くために、餌と水は1週間にわたって自由に摂取できるように準備し、実験期間中飼育室内に1回も入室することなく、室外から測定した。空中浮遊細菌の捕集は、山崎ら[11]の方法に準じてPinhole Samplerを用い、それを少々改変して実施した。すな

わち、ガス滅菌した直径20mm、長さ2mのゴムホースを飼育室の壁に設けた直径25mmの孔から出してピンホールサンプラー（三基社製）につなぎ、2分間に53ℓの空気を吸引して、トリプトソイ寒天培地（栄研）を入れた内径90mmのシャーレに吹き付けた。捕集後は好氣的に、 37°C で48時間培養した後形成されたコロニー数を数えた。なお、空中細菌の捕集場所は飼育室中央の床上1mとし、サンプリングはマウス搬入後1, 3, 5日目に1時間間隔で24時間連続測定した。一回の測定で3回のサンプリングを行い、その平均を各時間ごとの空中細菌数とした。空中粉塵は光散乱式パーティクルカウンターとデジタルプリンター（リオン社製）を用いて測定した。すなわち、空中細菌の捕集と同様に、直径10mm、長さ2mのビニールホースを、飼育室の壁に設けた孔から出してパーティクルカウンターに接続し、飼育室中央、床上1mの空気を2分間に1ℓ吸入し、0.3, 0.5, 1, 2及び $5\mu\text{m}$ の粒子径別の粉塵数を、搬入後1, 3および5日目に1時間ごとに24時間連続測定した。データは3点移動平均法により、時刻別の変動を経目的にもとめ、また空中細菌と粉塵との相関係数を求めた。

Fig. 1 Circadian rhythm of air-borne bacteria in a mice breeding room

Table 1. Numbers of air-borne bacteria in a mice breeding room measured at hourly intervals on the first, third and fifth day after accommodation of animals

TIME (o'clock)	Days after accommodation		
	First	Third	Fifth
light period	7	15 a	20
	8	25	30
	9	4	9
	10	7	4
	11	3	4
	12	3	2
	13	1	1
	14	1	3
	15	3	3
	16	8	5
dark period	17	10	6
	18	12	8
	19	13	9
	20	19	22
	21	10	13
	22	10	14
	23	11	25
	24	19	17
	1	22	26
	2	8	17
	3	7	9
	4	8	8
	5	15	7
	6	22	19

a : Each number represents the average value from three samples per one measuring time, and represents the numbers of bacteria per 53 l of air removed by vacuum for 2 minutes.

空中細菌数：マウス搬入後，1，3および5日目における飼育室内の時刻別の空中細菌数は Table 1 に，また，3 点移動平均法による日内変動は Fig. 1 に示す。室内の空中細菌数はマウス搬入後1日目で1～25，3日目で1～30，5日目で7～83と経日的に増加し，とくに5日目では各測定時刻とも著しく増加した。このように経日的な菌の増加は，動物搬入後の室内における細菌の増加と関連したものであろう。すなわち，動物の糞尿由来の細菌が経日的にケージ内で増加し，動物の行動によって室内に飛散したものと考えられる。

また，日内の時刻別には，それぞれの測定日において朝8時前後，消灯後の20時前後および深夜の1時前後に増加する3峰性の変動を示した。この傾向は動物搬入後の1，3および5日目の空中浮遊細菌数について普遍的にみられた。1日目では13及び14時に最小値の1個を示し，8時に最大値の25個を示し，その間に25倍の差がみられた。同様な1日内の最小値と最大値との差は3日目では30倍，5日目では12倍であった。このように，マウス室内の空中細菌が，昼の12時前後にもっとも少なく，その後いくらかの変動はあるが，夕刻から朝にかけて3峰性に増加する現象は，夜行性であるマウスの自発行動および摂食行動と大きな関係があるものと考えられる。

これまでの報告によると，動物飼育室の空中細菌はラットでは夜間に増加する日内変動をみとめたとの報告もあるが，マウスでは日内変動をみとめなかったという報告[10]もある。本実験のマウス室での結果は，空中細菌が朝の点灯前後，夜の消灯直後及び深夜に増加する3峰性の日周リズムのあることを示し，前者の説を支持するものである。岡ら[8]は，マウスの自発運動量が暗期および明期の移行期および深夜に増加する2または3峰性の日周リズムのあることを報告しているが，本実験の結果もマウスの自発運動の日周リズムと緊密に関連したようなパターンを示していた。

空中粉塵：Fig. 2はマウス飼育室における動物搬入後1，3，5日目の粒子径別・粉塵数を3点移動平均法により示した。0.3，0.5，1 μm レベルの小さな粉塵数は3日目までは減少したが，5日目は僅かに増加する傾向がみられた。しかし，2，5 μm レベルの粉塵は3日目以後も減少の傾向を示した。このことは，初期には床敷が乾燥して居住性がよいために動物が好んで活動する傾向にあり，そのために飼育室の粉塵量も増加したものと思われる。しかし，その後，床敷が糞尿等で湿潤してくると比較的大きな粉塵は飛散し難くなるのではないかと考えられる。

粉塵の日内変動においては，おおまかにみて昼間の12時前後がもっとも少なく，夜の20時前後，深夜1時前後および朝の8時前後に増加する3峰性の変動を示した。この傾向は1日目では各粒子径の粉塵で顕著にみとめられたが，その変動パターンは日数の経過とともにやや小さくなる傾向を示した。このようにマウス室内の粉塵が昼間に少なく，夕刻，深夜および朝に増加するのは，前述の空中細菌と同様に動物の自発行動，摂食行動に係るものであろう。

Fig.2 Circadian rhythm of dust particles in a mice breeding room

空中細菌と粉塵との相関：Table 2は動物搬入後1，3および5日目における空中細菌と粒子径別粉塵数との相関係数およびその有意差の有無について示したものである。動物搬入1日目ではいずれの粒子径レベルでも有意な相関はみられなかった。この原因は床敷が乾燥して飛散する粉塵量が多いこと，滅菌した床敷，飼育器具を使用したためにまだ細菌の増殖が少なかったことに関係するものであろう。3日目では0.5 μm レベルを除くすべての粒子レベルで5%の危険率で有意な相関がみられた。これは粉塵の飛散量が1日目よりやや少なくなり，細菌の増殖数もやや多くなり，これらの両因子が同様な日内変動パターンを示していることに関係していると考えられる。5日目においては，2および5 μm レベルではきわめて高い相関がみとめられ，0.5および1 μm レベルでも5%危険率で有意な相関がみとめられた。しかし，0.3 μm レベルでは有意な相関はみ

Table 2. Correlation between numbers of air-borne bacteria and dust particles in a mice breeding room

particle size of dust (μm)	Days after accommodation		
	First	Third	Fifth
0.3	0.323 ns	0.422 *	0.169 ns
0.5	0.030 ns	0.283 ns	0.525 *
1	0.177 ns	0.529 *	0.703 *
2	0.315 ns	0.724 *	0.961 **
5	0.115 ns	0.755 *	0.928 **

ns: not significant. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

られなかった。これは，5日目に空中細菌数は著しく増加し，1 μm 以上の粉塵はやや減少し，ともに典型的日内変動をしていることに関連するものであろう。こ

のように、大きいレベルの粉塵と空中細菌との間に相関があるのは、空中細菌の粒子の大きさは $1\sim 28\mu\text{m}$ (平均 $12\mu\text{m}$)の範囲にあるといわれること[2], パーティクルカウンターで吸引測定した1, 2および $5\mu\text{m}$ の粉塵のなかには細菌も吸引して測定していることが関係しているかもしれない。著者ら[5]は、この実験とは別に動物施設洗浄室で使用ずみの汚染ケージ処理作業中の空中細菌と粉塵重量、粉塵の粒子径別の粉塵個数との相関について検索した。そこでは、空中細菌数と粉塵重量との間には相関はみとめられなかったが、空中細菌と2および $5\mu\text{m}$ レベルの粉塵個数との間には有意な相関がみとめられた。いずれにしても、 $1\sim 5\mu\text{m}$ レベルの粉塵と空中細菌とが動物搬入後3日以降において有意な相関があることは注目すべきであろう。

S P F動物施設では、飼育環境の微生物的清浄度の監視のために、空中細菌の測定が広く行われているが、本実験の結果では、動物搬入後の日数、測定時刻が空中細菌数と大きな関係のあることを示している。また、これらのほかに、空中細菌は動物の収容密度、温度、湿度、換気回数、ケージ交換後の日数と大きな関係のあることも知られている[1, 7]。したがって、空中細菌測定結果には、サンプリングの方法、暴露時間、培地の種類、培養時間などとともに、少なくとも温度、湿度、換気回数、収容密度、測定時刻等を示しておくことが必要である。一方、空中細菌と粉塵とは密接な関係のあることが明らかになったので、空中粉塵の測定も動物室の清浄度モニタリングの一指標になるものと考えられる。将来、上記の各種要因に重みづけした一定の関係式で表示する方法が開発されることによって、はじめて実用的な評価方法が確立されるものと考えられる。

要 約

マウス飼育室の空中細菌数と粒子径別の粉塵個数を、動物搬入後1, 3および5日目に1時間ごとに検索した。空中細菌は動物搬入後の日数とともに増加し、1日のなかでは正午前後がもっとも少なく、20時前後、深夜の1時前後および8時前後に増加する3峰性の日内変動を示した。粉塵は経日的に減少する傾向を示したが、空中細菌と同様の日内変動パターンを示した。空中細菌と粉塵との間には、動物搬入1日目では相関をみとめなかったが、3日目では、0.3, 1, 2および $5\mu\text{m}$ レベルの粉塵との間に、5日目では $0.5\mu\text{m}$ 以上の粉塵との間に有意な相関がみとめられた。

本実験は、文部省科学研究費 一般研究(B)課題番号60480486の一部として実施したものである。

文 献

- [1] Besch, E. L. (1980). *Laboratory Animal Science*, **30**, 385-389.
- [2] 早川一也・都築正和 (1974). 空気調和のための空気清浄, pp. 371-418. ソフトサイエンス社, 東京.
- [3] 本田登美夫 (1984). 実験動物技術, **19**, 48-52.
- [4] 松本恒弥 (1980). 実験動物技術, **15**, 1-17.
- [5] 水上雅文・小原 徹・山内忠平 (1986). 実験動物, **35**, 293-297.
- [6] 小原 徹・松山賢忠・藤田省吾・山内忠平 (1979). 実験動物, **28**, 79-83.
- [7] 小原 徹・今田中伸哉 (1984). 実験動物技術, **19**, 1-6.
- [8] 岡 基・斉藤 徹・高橋和明 (1984). 獣医医学と統計利用, No. 13-19.
- [9] 大西絹一・浜田佑二 (1981). 実験動物技術, **16**, 119-122.
- [10] 高垣善男・野口午郎 (1968). 実験動物, **17**, 109-117.
- [11] 山崎省二 (1975). ジャパンフードサイエンス, **14**, 36-43.
- [12] 実験動物施設基準研究会 (1983). ガイドライン——実験動物施設の建築および設備——昭和58年版, pp. 50-51, 清至書院, 東京.