大学における用途の異なる室内の浮遊真菌および細菌濃度の長期変動と発生源

石松維世*, 樋上光雄, 保利 一

産業医科大学 産業保健学部 作業環境計測制御学 〒807-8555 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

The study of seasonal changes and sources of airborne microorganisms in different rooms of the usage in a university during two and a half years

Sumiyo ISHIMATSU*, Mitsuo HINOUE and Hajime HORI

Department of Environmental Management, School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan
1-1 Iseigaoka, Yahata-nishi ku, Kitakyushu, Fukuoka, 807-8555, Japan

要 旨

大学の講座会議室、実習室、研究室と屋外において、2年半にわたり浮遊真菌・細菌濃度を測定し、季節変動、室内外濃度比(I/O比)、グラム陽性球菌の同定、疑われる真菌の発生源調査等をもとにして、大学室内の浮遊微生物の影響について多角的に捉え明らかにすることを目的とした。測定は、衝突法-培養法とろ過捕集法-DNA染色法で行い、毎月1回、定期に行った。室内の真菌生菌数濃度(cfu/m³)は、毎年、外気濃度の上昇に伴い夏季から秋季にかけて日本建築学会維持管理規準(事務所: 50 cfu/m³以下)を超過し、空気調和設備を介した屋外真菌の流入が示唆された。また、2012年7月の実習室の濃度上昇では室内に発生源はなく、外気または空気調和設備に起因する一時的なものと推察された。一方、細菌の生菌数濃度は、2年半の間、日本建築学会維持管理規準(事務所: 500 cfu/m³以下)を満足していたが、菌数濃度は生菌数濃度より2桁ほど高かった。使用頻度の高い講座会議室と研究室では生菌数の室内外濃度比(I/O比)が1を超える頻度が高かったが、細菌の菌数濃度(cells/m³)から求めたI/O比は、ほとんど1を超えなかった。このことは、室内には屋外より培養可能な新鮮な細菌や培地に適合した細菌が多いことを示し、衝突法-培養法は、発生から数日程度の比較的新しい細菌による影響の把握に有効と考えられた。衝突法-培養法で得られた細菌のグラム染色性に基づく構成比は、室内は屋外より単純な傾向にあり、使用頻度の高い部屋では*Staphylococcus epidermidis*や*S. hominis*を含む*Staphylococcus*属や*Micrococcus*属などのグラム陽性球菌が多く、発生源が在室者であることが強く示唆された。

Abstract

To explain influences of airborne microorganisms in a university rooms, we studied the seasonal changes of concentration (cfu/m³ and cells/m³), I/O ratio (In/Out ratio), identification of Gram-positive cocci and sources of airborne fungi and bacteria.

The concentrations of airborne bacteria and fungi, in the three rooms, that is a conference room, a practice room, and a laboratory, and outdoor of a university, were measured by the impaction method and the filtration method once a month during two and a half years. Viable fungi concentration (cfu/m³) in the rooms exceeded the standard value of Architectural Institute of Japan (AIJES-A0002-2013, Office: 50 cfu/m³≥) from summer to autumn every year, suggesting that the fungi were inflowing from outside air through the air conditioning system. A high value of viable fungi concentration was observed in Jul. 2012, but such high concentration was not recognized after that and no generation sources were recognized in this room. On the other hand, viable bacteria concentrations were almost satisfied AIJES-A0002-2013 (Office: 500 cfu/m³≥) during the same period. But, in the laboratory and the conference room that were frequently used, I/O ratios of viable bacteria often exceeded over 1, suggesting that the source of fresh bacteria was in the room. Moreover, most of I/O ratios of bacteria obtained from total cell concentration (cells/m³) were not greater than 1. Therefore, measurement of airborne bacteria by the impaction method was considered to be suitable for understanding relatively recent influences.

Based on Gram staining, composition of bacteria detected in the room was simple compared to outdoor, and there were many Gram-positive cocci, such as *Staphylococcus spp* including *S. epidermidis* and *S. hominis*, and genus *Micrococcus* by api test, from the frequently used rooms. Accordingly, it was strongly suggested that sources of those bacteria were occupants.

Key words: 浮遊真菌 (Airborne fungi), 浮遊細菌 (Airborne bacteria), 生菌数濃度 (Viable microbe concentration), 菌数濃度 (Cell concentration), 大学 (University), 長期間測定 (Sampling for long period), 発生源 (Sources of microbe)

*Corresponding author (責任著者) Email: sumiyois@med.uoeh-u.ac.jp, Tel: 093-603-1611(内4789)

受付: 2016年9月28日 (Received: 28 September 2016)

受理: 2016年11月8日 (Accepted: 8 November 2016)

1. はじめに

大学には、用途や築年数が異なる多くの建物が存在する。それらの多くは空調設備を有し、学生利用が主体の講義室や実習室、教職員と学生が使用する研究室や居室、多用途の講座会議室など、多様な部屋がひとつの建物内に混在している。また研究室の中には個別にエアコンを設置し、空調設備運転時間外に稼働させているところも多い。一方、実習室の使用頻度は週に1~2回程度と講義室より低く、時期によってはほとんど使用されないこともある。このように、大学は同じ建物内でも部屋の使われ方が大きく異なり、部屋の使用目的によって空調設備の仕様が変更されている場合もある。

一般に室内の浮遊細菌の濃度や細菌種は在室者の影響が強く、大学講義室において在室人数と浮遊細菌濃度に正の相関関係があることや¹⁾、落下菌数は朝より午後のほうが多いことが報告されている^{2,3)}。また、空調設備がある部屋の浮遊細菌濃度は、窓のみしかない部屋よりも低いこと⁴⁾や在室者数が多くても空調設備が設置されている方が浮遊細菌の濃度が低いこと⁵⁾も報告されている。真菌については、住宅ではあるがrRNA遺伝子解析により室内の真菌叢は外気の影響を受け、室内外ともに季節の影響を受けるという報告⁶⁾や、空調設備そのもので微生物の増殖が起こること⁷⁾、使用されているフィルターが真菌に汚染されている事例⁸⁾もある。これらから、室内の浮遊微生物汚染は、使用頻度による浮遊細菌濃度の違いや、空調設備のフィルター性能によっては室内の浮遊真菌濃度が外気濃度によって変動すること、あるいは空調設備そのものの汚染による影響などが考えられる。しかし、多人数が長時間滞在する講義室以外の部屋について浮遊微生物濃度を調べた例はほとんどなく、大学の実習室や研究室の実態やこれらの部屋の空気質を管理するための基礎的データは少ない。それに加え、長期間にわたり同一の室内を継続して調べた報告は少ないため、室内および屋外の浮遊微生物濃度の季節的変動などについての情報も少ない。

浮遊微生物濃度測定は培養法で行われることが多く、日本建築学会規準値⁹⁾も培養法に基づいて定められている。しかし、測定に使用する培地と微生物との適合性や、VNC(Viable but non-culturable)状態の細菌の存在¹⁰⁾など、培養法では検出できない場合があることも知られている。一方DNA染色法では、

培養法で検出されない微生物も検出できる利点があるが、これだけでは増殖能を持つ菌やグラム染色性などの把握はできない。しかし、これら2種類の方法を併用すれば、得られた情報を総合して室内空気質のよりよい評価を行うことができると考えられる。

本研究では、某大学内の用途と使用頻度が異なる部屋として、講座所有の会議室(以下、講座会議室)、工学系実習室(以下、実習室)、研究室の3部屋と屋外において、細菌と真菌の生菌数濃度と菌数濃度を2年半にわたって測定した。これらについて、濃度の季節変動、室内外濃度比、衝突法-培養法で得られた細菌のグラム染色性と形状の差異、グラム陽性球菌の同定、測定期間中に高い真菌濃度を示した室内の発生源調査さらに濃度測定法の違いを踏まえ、大学室内の浮遊微生物の影響について多角的に捉え明らかにすることを目的とした。

2. 対象と方法

2.1 測定時期および測定場所

福岡県北九州市内にある某大学の建物2棟の室内計3箇所(講座会議室、実習室、研究室)および屋外において、浮遊細菌および真菌の濃度測定を行った。測定は2011年10月~2014年3月の2年半にわたって行い、毎月1回、9時から14時の間に実施した。各部屋の概略と空調設備の運転状況とをTable 1に、部屋の平面図をFig. 1~3に示す。建物A(1997年竣工、7階建て)では6階にある講座会議室(Fig. 1)および4階の実習室(Fig. 2)、建物B(1978年竣工、8階建て)では8階にある研究室(Fig. 3)を測定対象とした。

建物Aは各階ごとに外気を空調設備(AHU)に取り入れ、平日の8時から18時まで加湿温調して各階に供給している。AHUには粒子の平均捕集効率82%(質量法)のフィルターが設置されており、加えて4階のAHUには全熱交換器が付随しているが、6階にはない。4階の実習室は、空気の供給に連動して排気がなされているが、6階の講座会議室の排気は換気扇に依っており運転は使用者の判断に任されていた。冷暖房は天井に設けられたファンコイルユニット(FCU)により、AHUの稼働時間帯に任意に行うことができ、冷房期間は例年7月1日~9月30日、暖房期間は11月1日~3月31日であった。しかし、講座会議室と実習室では使用時にのみFCUの運転がなされ、通常は停止していた。講座会議室は、使用されていないときには常時ドアが解放されていたが、

実習室は使用時以外にはドアは施錠されており、実習時にもドアは閉められていた。部屋の使用頻度は、講座会議室では数名から15名前後が週3～4日、1回につき数時間使用していたが、実習室は週1～2回、15～20名が午後に3～5時間使用し、いずれの年も8月、9月、2月、3月には実習は行われなかった。

建物Bの研究室は研究に影響を与えないために給気口は閉じられており、冷暖房は個別エアコンを使

用し運転は実験者に任されていた。また、この部屋では、4～5月と9～10月を除きほぼ毎日個別エアコンが運転されていた。研究室のドアは、昼間は解放されており夜間は施錠されていた。また、毎日数名が実験のために8時頃から21時頃まで使用していた。

屋外の測定は、風雨を避け建物Aの南側の屋根のあるピロティで行った。

Table 1 Outlines of three examined rooms in a university.

	Conference room	Practice room	Laboratory
Building	A		B
Year of completion	1997		1978
Frequency of usage	3-4 days/week	1-2 days/week except summer and spring	5-6 days/week
Number of occupants	7-15	15-20	3-5
Take in outdoor air	AHU	AHU Total heat exchanger	Close of air inlet
Air filter of AHU	82% of dust collection efficiency by Weight method		
Air conditioning system	FCU		Personal air conditioner
Driving time of air conditioner	Only usage of room		Anytime
Air from AHU	Temperature & RH	25°C・60%	—
	Time	8:00 - 18:00	—
Period of air conditioning	Cooling	1st Jul. - 30th Sep.	—
	Warming	1st Nov. - 31th Mar.	—

Fig. 1 A floor plan of a conference room.

Fig. 2 A floor plan of a practice room.

Fig. 3 A floor plan of a laboratory.

2.2 測定方法

毎月の浮遊微生物測定は、Fig. 1～Fig. 3に示すように室内の給排気口を避けて行い、研究室では実験者の動線を避けた。測定前日夕方より在室者を制限し、測定中の講座会議室と実習室はドア・窓ともに閉め、在室者を制限した。研究室では在室者の制限はしなかったが、測定時には窓と測定点寄りのドアを閉めて行い、可能な限り影響を少なくした。

2.2.1 菌数濃度測定

浮遊微生物の菌数濃度(cells/m³)測定は、ろ過捕集法-DNA蛍光染色法で行った。セルロース混合エステルメンブレンフィルター(0.8 μm孔径, 47 φ mm, ADVANTEC)を装着したオープンフェースホルダを高さ約1.5 mに設置し、吸引流量20 L/minで午前中に3時間の捕集を行った。捕集後のフィルターは、リン酸生理食塩水10 mLを加え2分間激しく攪拌して微生物を回収した。この微生物回収液8 mLを黒色ニュークリポアフィルター(0.2 μm孔径, 25 φ mm, ADVANTEC)でろ過したのち、染色用バッファー(0.1 M phosphate buffer [pH 8.5], 5% NaCl, 0.5 mM EDTA・2Na) 3 mLと臭化エチジウム溶液を加え(最終濃度100 μg/mL)、10分間静置してDNA染色を行った。染色後、蒸留水3 mLで洗浄し、フィルターを無蛍光オイルで封入して落射型蛍光顕微鏡(BX-50, オリンパス)にて1000倍で検鏡した。1試料につきランダムに選んだ100視野中の細菌と真菌を、大きさと細胞壁および核の有無をもとに分けて計数し、それぞれの菌数濃度を算出した。またブランクとして、滅菌した未使用のセルロース混合エ

テルメンブレンフィルターを同様に処理し、回収液を染色して検鏡した。

2.2.2 生菌数濃度測定

生菌数濃度(cfu/m³)測定は衝突法-培養法で行い、BIO SAMP(MBS-1000, ミドリ安全)を用いてろ過捕集の間に、高さ約0.75 mにおいて吸引流量100 L/minで1分間捕集した。細菌用はソイビーンカゼインダイジェスト寒天培地(SCD培地)、真菌用はジクロラングリセロール寒天培地(DG-18培地)各2枚を用い、日本建築学会規準に従いSCD培地は2012年2月までは捕集後37℃、2012年3月以降は32℃で48時間培養、DG-18培地は25℃で5日間以上培養し、それぞれ2枚のコロニー数を平均して生菌数濃度を算出した。また、測定の際には各培地のトラベルブランクでサンプラー準備時の培地汚染を確認し、コロニーが出た場合は測定値を補正した。

2.3 捕集細菌のグループ分けと同定方法

2012年4月から2013年3月の測定において、衝突捕集後のSCD培地から得た細菌コロニーを植え継ぎ、グラム染色後1000倍で検鏡して、グラム染色性と形状により以下の5つのグループに分けた。①グラム陽性と判断される球状の菌、②グラム陰性と判断される球状の菌、③グラム陽性と判断される桿状の菌、④グラム陰性と判断される桿状の菌、⑤グラム染色性によらず形状が判定できない菌である。芽胞を形成していた細菌については、植え継ぎ操作により栄養菌体を確認した。また、植え継ぎ操作ができた細菌は-80℃で凍結保存した。グラム陽性と判断された球状の菌は、凍結保存菌を用いて一般細菌同定キット(グラム陽性球菌用)であるAPI STAPHまたはID32 staph api(ともに、シスメックス・バイオメリュー)で同定を試みた。判定はapi同定キットの反応パターンをapi webデータベース(シスメックス・バイオメリュー)と照合し、属名または種名の同定結果が「Acceptable」、「Good」、「Very good」または「Excellent」となったものを信頼できるものと判断した。

2.4 真菌発生源調査

実習室内での真菌発生源と疑われた実習用マットレス2枚について、2013年7月に付着真菌と内部から発生する真菌を調べた。マットレスはFig. 2に示すように、室内に保管されていた。マットレスを

Fig. 4に示すように表裏各8区画および両側面各4区画に分け、区画中央部においてスタンプ培地(ペタンチェック®25 CP加PDA培地, 栄研化学)で付着真菌を採取し、側面は空気抜き孔表面で採取した。さらにマットレスをポリエチレン袋に入れ、表裏それぞれ3箇所を10回ずつ叩いた後、ポリエチレン袋内の浮遊真菌を、DG-18寒天培地を装着したBIO SAMPにより吸引流量100 L/minで1分間捕集した。

Fig. 4 Sampling areas of stamp agar plates in a mattress.

Fig. 5 Temporal changes of fungi concentrations from Oct. 2011 to Mar. 2014.

[A]: Viable fungi concentration, [B]: Fungi cell concentration

また同時に室内の浮遊真菌濃度も測定した。さらに、2013年5月, 7月~9月, 10月および12月には実習室給気口の直下および実習室内において、浮遊真菌濃度を測定し、採取後の培地は、25℃で5日間以上培養したのちコロニー数を計数した。

3. 結果

3.1 浮遊微生物濃度

浮遊真菌および細菌について、2年半にわたる生菌数濃度(cfu/m³)および菌数濃度(cells/m³)の変動をFig. 5およびFig. 6に示す。Fig. 5は真菌, Fig. 6は細菌の結果である。生菌数濃度においてシンボルのない箇所は、コロニーが検出されなかったことを示す。また2013年8月の細菌の生菌数濃度は、培養温度に不備があったため欠測とした。真菌の屋外濃度は、生菌数も菌数も春から秋にかけて高く冬季は低い季節的変動を示し、室内濃度も連動する傾向が認められた。しかし、細菌の季節変動はいずれも明確ではなかった。

Fig. 6 Temporal changes of bacteria concentrations from Oct. 2011 to Mar. 2014.

[A]: Viable bacteria concentration, [B]: Bacteria cell concentration

測定した建物には空気調和設備が備わっていることから、生菌数濃度を日本建築学会が定める事務所の維持管理規準(細菌: 500 cfu/m³以下, 真菌: 50 cfu/m³以下)¹⁾と比較したところ、細菌はすべての部屋で規準を超えていなかった。一方、真菌はいずれの年も5月頃から11月頃までどの部屋も規準を超えていることが認められた。また、Fig. 5【A】に示すように2012年7月に実習室の真菌生菌数濃度が著しく高くなり、捕集した培地に*Cladosporium*属と思われるコロニーが非常に多く検出されたが、その後そのような高濃度になることはなかった。

菌数濃度は真菌、細菌ともに同時期の生菌数濃度の10倍から数100倍程度となり、その差は室内より屋外のほうが大きく、特に2013年3月の屋外の細菌では1500倍もの差が見られた。場所別では、実習室が他の2部屋より低い傾向にあり、その傾向は細菌の方が顕著であった。しかし、検鏡時に細菌が多数付着している土壌と思われる粒子が多く観察された2014年1月は、実習室の細菌菌数濃度が非常に高くなった。

細菌と真菌それぞれにおいて、生菌数濃度から算出した室内外濃度比(In/Out ratio: I/O比)と菌数濃

度から算出したI/O比をFig. 7に示す。真菌では、生菌数I/O比と菌数I/O比ともに1を超えることは少なかったが、2012年7月の実習室と2013年4月の研究室の生菌数I/O比が著しく高かった。一方、細菌の生菌数I/O比は、研究室や講座会議室では1を超えることが多かったが、実習室ではほとんど超えなかった。また、菌数I/O比は、細菌が多数付着した粒子が観察されたときを除き、どの部屋も概ね1を超えることなく推移していた。

3.2 グラム染色による細菌構成比

2012年4月から2013年3月にかけて、衝突法—培養法で捕集された細菌を、グラム染色性と形状によってグループ分けした結果をFig. 8に示す。屋外を含むどの場所からも、グラム陰性と判断される球菌は検出されなかった。一方、染色性と形状で分けることが困難で「その他」と分類したものが比較的多く認められた。

時期による違いはあったが、研究室や講座会議室では捕集菌数が多く、グラム陽性と判断された球菌がほぼ毎月検出された。実習室では、5月から9月にグラム陽性の球菌と判断されたものが検出されたが

Fig. 7 Temporal changes of In/Out ratios (I/O ratios) from Oct. 2011 to Mar. 2014.
[A]: Fungi colonies, [B]: Fungi cells, [C]: Bacteria colonies, [D]: Bacteria cells

Fig. 8 Composition of bacteria based on a gram stain from Apr. 2012 to Mar. 2013.

捕集菌数は少なく、また10月以降にグラム陽性球菌は認められなかった。屋外では、5月から9月の構成は室内に比べ多様であった。

3.3 細菌同定結果

衝突法—培養法で検出した細菌数と、グラム陽性の球菌と判断しapi同定キットで同定された細菌数

および割合をTable 2に、同定結果をFig. 9に示す。2012年4月から2013年3月の間に同定試験を行った菌株数は、講座会議室38株、実習室5株、研究室48株、屋外15株であり、使用頻度の高い講座会議室と研究室内の菌株数が多かった。これらの菌株のうちapi同定キットで同定されたものには*Micrococcus*属が多かったが、講座会議室と研究室からは

Table 2 The identified bacteria by api test from Apr. 2012 to Mar. 2013.

		Conference room			Practice room			Laboratory			Outdoor	
		Total bacteria (cfu)	Identified bacteria by api (cfu)	Identified bacteria (%)	Total bacteria (cfu)	Identified bacteria by api (cfu)	Identified bacteria (%)	Total bacteria (cfu)	Identified bacteria by api (cfu)	Identified bacteria (%)	Total bacteria (cfu)	Identified bacteria by api (cfu)
2012	Apr	4	1	25.0	0	0	-	2	1	50.0	2	1
	May	15	2	13.3	11	0	0.0	7	1	14.3	9	2
	Jun	10	8	80.0	3	0	0.0	9	2	22.2	12	0
	Jul	13	8	61.5	1	1	100.0	4	4	100.0	3	1
	Aug	4	2	50.0	3	1	33.3	5	2	40.0	13	1
	Sep	0	0	-	2	0	0.0	2	2	100.0	6	1
	Oct	8	5	62.5	0	0	-	10	5	50.0	1	0
	Nov	4	1	25.0	1	0	0.0	4	3	75.0	3	3
	Dec	0	0	-	0	0	-	1	0	0.0	1	0
	Jan	5	3	60.0	1	0	0.0	16	10	62.5	1	1
2013	Feb	2	0	0.0	2	0	0.0	6	3	50.0	0	0
	Mar	0	0	-	0	0	-	4	3	75.0	6	0
	Total	65	30	46.2	24	2	8.3	70	36	51.4	57	10

Fig. 9 Number of identified Gram-positive cocci by the api staph.

*Staphylococcus*属も比較的多く検出され、種名まで同定されたものの多くは、*Staphylococcus epidermidis*や*S. hominis*であった。また、*Micrococcus*属のほとんどは*Micrococcus luteus*であった。

3.4 真菌発生源調査

実習用マットレスに付着した真菌数と、マットレス内部から発生した真菌数をTable 3およびTable 4に示す。マットレス表面には真菌の付着が認められ

たが(ND~16 cfu/25 cm²)、マットレスを叩くことでポリエチレン袋中に浮遊した真菌は、100 Lあたりのコロニー数では室内や給気口よりも低かった。また、実習室の給気口と室内の浮遊真菌濃度との関係をFig. 10に示す。両者には正の相関傾向が認められた。

Table 3 Results of fungi colonies in two mattresses by stamp agar plates.

Sampling part of mattress	Sample No.	Mattress (cfu/25 cm ²)	
		A	B
Surface 1	1	ND	ND
	2	ND	ND
	3	1	ND
	4	5	ND
	5	7	1
	6	1	1
	7	1	ND
	8	3	ND
Side 1	9	3	2
	10	10	3
	11	3	3
	12	2	4
Side 2	13	ND	3
	14	1	1
	15	ND	1
	16	ND	2
Surface 2	17	1	1
	18	12	2
	19	5	1
	20	15	2
	21	16	1
	22	5	3
	23	11	1
	24	6	1

Table 4 Results of airborne fungi concentration from a mattress, room air and supply air in a practice room.

Sampling air	Fungi concentration (cfu/m ³)
Generation from a mattress (First time)	40
Generation from a mattress (Second time)	40
Room air	190
Supply air	240

Fig. 10 Correlation of viable fungi concentration between room air and supply air in a practice room.

4. 考察

継続した2年半の測定において、対象の3部屋における真菌生菌数濃度は、夏季から秋季にわたる約半年間は日本建築学会維持管理規準(事務所: 500 cfu/m³以下)を超過していることが認められた。しかし、これらの部屋の利用者に身体の不調を訴える者はいなかった。

測定した2つの建物に設けられた空気調和設備には、平均捕集効率82%(質量法)のフィルターが設置されているのみであり、中性能フィルターは設置されていない。そのため、真菌等がこの空気調和設備を通過する割合は比較的高いと考えられる。測定した3つの部屋では、屋外の真菌濃度が高くなる夏季から秋季には維持管理規準値を毎年超えていたため、このフィルターでは外気に含まれる真菌を十分に捕集除去できておらず、これらの建物は、現状では通年で規準値を満たすことは難しいと考えられた。

一方、室内の発生源を考える際にはI/O比が重要となり、I/O比が1を超えた場合は室内側に発生源があると推察される。本結果では、真菌の生菌数濃度および菌数濃度のI/O比は、どの部屋も1を下回ることがほとんどであったことから、各室内には基本的に真菌の発生源はないと考えられた。しかし、2012年7月の実習室と2013年4月の研究室では、菌数濃度から算出したI/O比はそれぞれ0.03と0.46であったにもかかわらず、生菌数濃度から算出したI/O比は高く、それぞれ8.9と7.7となった。2012年7月の実習室では、衝突法の培地上に*Cladosporium*属のコロニーが顕著に多く検出されI/O比が1を超えたことから、増殖できる真菌量の増大が懸念されたため、この時期に室内で真菌が発生する可能性のある出来事を調べ、実習室内に保管されたマットレスを使用する実習を疑った。しかし、翌2013年の同時期は実習室内の真菌生菌数濃度は外気を下回り、保管マットレスの表面と内部にも真菌の異常な増殖は認められず、むしろ実習室内や給気口の濃度のほうが高かった。また、この調査で空気調和設備からの空気を供給している実習室の給気口と室内の真菌生菌数濃度に正の相関傾向が認められたことから、給気口を介した真菌流入が室内濃度の上昇につながっていることが示唆された。したがって、2012年7月の真菌生菌数濃度の上昇は、外気あるいは空気調和設備から給気口までのダクト内に問題があったと考えられたが、その後は同様のことがなかったことから一時的なものと推察された。

また、2013年4月の研究室については、研究室内の濃度は前年と同程度であり、むしろ屋外濃度が低く測定されたことからI/O比が高くなったと考えられた。

本研究では、毎月1回の定期測定を行っていたが、2012年7月の実習室のように、1回のみ測定では室内の状態を正確に把握できない場合や、2013年4月の研究室のようにI/O比だけでは発生源の推定を誤る可能性があることが認められた。日本建築学会のサンプリング法規準(AIJES-A0008-2013)¹¹⁾では、未知の室内の場合には吸引空気量を変えて複数のサンプルを採取することを勧めているが、定期的なモニタリングにおいても予期せぬ濃度変動が見られたことから、再測定の実施など迅速な対応が求められる場合が生じることに注意する必要があると考えられる。また、定期的な測定は、異変が生じているか否かの判断にとって重要であることも認められた。

次に、浮遊細菌の生菌数濃度は、いずれも事務所の維持管理規準を満足しており、浮遊細菌に関する室内空気環境は良好と考えられた。しかし、その濃度は部屋によって異なり、研究室は比較的高く推移し実習室は低い傾向にあった。大学においては、在室者が多いあるいは使用頻度が高い室内では浮遊細菌の生菌数濃度が屋外より高く¹²⁾、在室者数と浮遊細菌濃度には正の相関性があるという報告¹⁾がある。これらの測定は培養法により在室者が存在する状況で行われており、在室者から発生して間もない細菌を捕えたと考えられ、室内の浮遊細菌の発生源が在室者であることを示している。一方、本測定では、基本的に測定時の在室者の影響を極力排除して測定しており、測定前12時間以上にわたり在室者がいない状態がほとんどであった。それにもかかわらず、Fig. 6【A】に示すように使用頻度がほぼ毎日あるいは週に3~4日という研究室と講座会議室や、実習期間中の実習室では生菌数濃度が高くなることが多く、衝突法-培養法で得られた細菌の生菌数濃度は使用頻度の高さを反映する傾向にあった。

一方、室内の細菌菌数濃度はFig. 6【B】に示すように年間60~10000 cells/m³の範囲で変動し、概ね1000 cells/m³前後であった。この変動範囲は、外気導入システムが異なる建物で測定した結果と同様であった¹³⁾。また、環境中の微生物は総菌数の1%程度しか培養できないという報告¹⁴⁾があるが、本測定でも室内の生菌数濃度範囲はND~230 cfu/m³と菌

菌数濃度との間に2桁程度の差が認められ、浮遊細菌の多くは培養法では検出されていなかった。この菌数濃度の変動の中で、2013年3月の研究室や2014年1月の実習室のように菌数濃度が一時的に高くなる場合が認められたが、この理由として、染色された細菌はすべて計数するというルールを設定していることがある。すなわち、細菌が多数付着した粒子が多い時には細菌菌数濃度は高くなり、特に黄砂が発生する2月頃から5月頃にこのような状況が起こりやすいことがこれまでの測定からわかっている。本測定では、室内においても染色したフィルター上に土壌粒子が多かったことから、細菌が複数付着した土壌粒子は空気調和設備のフィルターを通過しており、室内空気は外気の影響を受けていると考えられる。しかし、同時期の他の部屋では同じ様な結果にはなっていないこともあることから、同じ建物に取り入れられる外気の状態も、取り入れ階によって違いがある可能性が考えられた。

細菌の生菌数濃度と菌数濃度の変動から、測定した3つの部屋は在室者と屋外の影響を受けていると考えられたが、Fig. 7【C】、【D】に示すように、生菌数濃度および菌数濃度から求めた細菌のI/O比は、実習室より研究室や講座会議室のほうが高いことが多く、特に生菌数濃度では1を超える回数が多かった。

培養法では、検出される細菌類の栄養要求性が使用する培地に適合しているかということと、生理状態が培養可能な状態にあるかということにより検出できる菌数が決まる。すなわち、菌数濃度が高くてSCD培地に適合していない細菌やVNC状態のものが多ければ培養法では検出できない。

細菌は空気中ではVNC状態に陥ると考えられるが、本測定においては部屋の使用状況と測定までの時間経過から、少なくとも発生後12時間以上、場合によっては数日間を経ても、室内にSCD培地で培養可能な状態か培養中にVNC状態から復帰する状態にある細菌が浮遊していたと考えられる。また、Fig. 6に示すように屋外の菌数濃度は高いが生菌数濃度は室内と同程度であったことから、室内と屋外では総菌数に対しSCD培地で生育しやすい細菌の比率も異なっていたと考えられる。これらのことから、衝突法－培養法では発生から半日から数日を経過した比較的新鮮な細菌が検出され、検出される細菌の比率は屋外より室内のほうが高いと推察される。一

方、ろ過捕集法で得られた菌数濃度は、臭化エチジウムがDNAの二重らせんに入り込み発色するため、DNAの二重らせんが維持されていれば検出でき、生理状態も菌種も問わない。さらにろ過捕集の捕集時間は3時間と衝突法(1分間)より長く、濃度は時間平均値であることから、菌数濃度は測定場所の時間的・空間的変動を平均化した濃度と捉えることができる。

したがって、生菌数濃度と菌数濃度のI/O比の結果が必ずしも一致していない理由は、培養法が比較的新鮮な細菌に敏感な検出法であり、生菌数濃度に影響を与えるSCD培地に適合する細菌の割合が屋外より室内のほうが高いことと、菌数濃度は屋外のほうが高く、室内の生菌数濃度が上昇しても菌数濃度との2桁の差を凌駕するほどのものではないためと考えられる。このことは、他大学の建物において我々が測定した結果¹³⁾と同様であり、室内にSCD培地で培養可能な細菌が多くても、菌数濃度への影響は小さいということが改めて確認された。

以上の結果から、衝突法－培養法は半日から数日程度の室内空気汚染の影響を把握でき、ろ過捕集法－DNA染色法は時間的・空間的な変動を平均化した状況を把握できると考えられた。

2012年4月から2013年3月に衝突法－培養法で検出された細菌のグラム染色性に基づいた構成比は、どの室内も屋外より単純な傾向にあり、グラム陽性球菌の割合が高かった。大学の講義室において培養法により室内空気中の細菌を調べた報告では、ヒト常在菌を多く含むグラム陽性細菌の検出頻度が高いことが示されている^{12,15)}。これらの報告では、*Micrococcus*属、*Staphylococcus*属、*Bacillus*属というグラム陽性細菌が多く検出され、なかでも*Micrococcus*属と*Staphylococcus*属は在室者に由来するということが示されている。また教室の浮遊細菌について16S rRNA遺伝子を用いた解析を行ったところ、ヒト由来と考えられるグラム陽性球菌遺伝子の検出率が高いことが報告されている¹⁶⁾。本測定での対象室内は講義室ではないため在室人数は少ないが、やはり使用頻度の高い講座会議室と研究室で検出された生菌数は多く、Table 2に示すようにapi同定キットで同定された割合も高かった。なかでも*Micrococcus*属や*Staphylococcus*属の数が多く、これらには皮膚常在菌である*Staphylococcus epidermidis*や*S. hominis*が多く含まれていたことから、連日の

使用でなくとも使用頻度が高ければ、これらの細菌が多く検出されることが示された。

今回、細菌の同定に使用したapi同定キットは環境微生物用ではないが、浮遊細菌の同定に用いられた例もある^{17,18)}。本研究においてもグラム染色性と形状をふまえて使用すると、ヒト由来と考えられる *Micrococcus* 属や *Staphylococcus* 属を確認することができたことから、空気中のグラム陽性球菌の同定には簡便で有効な手段と考えられた。

5. まとめ

空気調和設備を備えた大学において、講座会議室、実習室、研究室および屋外における2年半の測定結果から、以下の知見が得られた。

- 1) 真菌の外気濃度が高くなる夏季から秋季の室内の浮遊真菌の生菌数濃度は、日本建築学会規準(事務所)の維持管理規準値を満たしておらず、室内の菌数濃度も外気濃度とともに変動していたため、この建物の空気調和設備に設置されているフィルター(平均捕集効率82%、質量法)は有効ではなかった。
- 2) 浮遊細菌の生菌数濃度は、測定期間中、日本建築学会の維持管理規準値(事務所)を満たしていたが、使用頻度の高い講座会議室と研究室は実習室の濃度より高かった。また、菌数濃度測定より、室内の細菌菌数濃度は外気の影響を受けていた。
- 3) 室内外の濃度比(I/O比)は、真菌では生菌数濃度、菌数濃度ともに1を超えることはほとんどなかったが、細菌では使用頻度の高い室内の生菌数I/O比は1を超えることが多かった反面、菌数I/O比は1を超えることはほとんどなく、室内には屋外より培養可能な細菌や培地に適合する細菌が多いと考えられた。
- 4) 使用頻度の高い講座会議室と研究室では、グラム陽性球菌の検出頻度が高く、その中には皮膚常在菌である *Staphylococcus epidermidis* や *S. hominis* が多く含まれていたことから、発生源は在室者であると推察される。
- 5) 衝突法一培養法による測定は、浮遊微生物による測定前数日程度の短期的な空気汚染の影響を把握でき、ろ過捕集法一DNA染色法は時間的空間的な変動を平均化した室内空気の状況を把握できると考えられる。

謝辞

本研究の実施にあたり、産業医科大学産業保健学部環境マネジメント学科卒業生である三宅千尋さん、立野誠子さんに多大なるご助力をいただきました。ここに深く感謝いたします。また、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究助成(課題番号23560708)により実施されました。ここに感謝いたします。

引用文献

- 1) Di Giulio M., Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Cellini L. (2010): Indoor air quality in university environments, *Environmental Monitoring and Assessment*, 170: 509-517
- 2) Stryjawska-Sekulska M., Piotraszevska-Pajak A., Szyszka A., Nowicki M., Filipiak M. (2007): Microbiological quality of indoor air in university rooms, *Polish J. of Environ. Stud.*, 16(4): 623-632
- 3) Soto T., Murcia R. M. G., Franco A., Vicente-Soler J., Cansado J., Gacto M. (2009): Indoor airborne microbial load in a Spanish university (University of Murcia, Spain), *Anales de Biologia*, 31: 109-115
- 4) Hwang S. H., Park D. U., Ha K. C., Cho H. W., Yoon C. S. (2011): Airborne bacteria concentrations and related factors at university laboratories, hospital diagnostic laboratories and a biowaste site, *J. Clinical Pathology*, 64: 261-264
- 5) Mirhoseini S. H., Nikaeen M., Satoh K., Makimura K. (2016): Assessment of airborne particles in indoor environments: Applicability of particle counting for prediction of bioaerosol concentrations, *Aerosol and Air Quality Research*, 16: 1903-1910
- 6) Adams R. I., Miletto M., Taylor J. W., Bruns T. D. (2013): Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances, *The ISME Journal*, 7: 1262-1273
- 7) Batterman S. A. and Burge H. (1995): HVAC system as emission sources affecting indoor air quality: A critical review, *HVAC & Research*, 1: 61-80
- 8) 柳宇・鍵直樹・池田耕一(2010): 空調システムにおける微生物汚染の実態と対策に関する研究 第4報 個別方式空調における「かび臭」原因究明のための調査, 日本建築学会環境系論

- 文集, 第75巻, 第654号, 721-726
- 9) 日本建築学会 (2013) : 微生物による室内空気汚染に関する設計・維持管理規準・同解説 (AIJES-A0002-2013), 日本建築学会, 丸善出版
 - 10) Colwell R. R., Brayton P. R., Grimes D. J., Roszak D. B., Hug S. A., Palmer L. M. (1985): Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms, *Bio/Technology*, 3: 817-820
 - 11) 日本建築学会 (2013) : 浮遊微生物サンプリング法規準・同解説 (AIJES-A0008-2013), 日本建築学会, 丸善出版
 - 12) Kalwasinska A., Burkowska A., Wilk I. (2012): Microbial air contamination in indoor environment of a university library, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(1): 25-29
 - 13) 石松維世・松鶴悟実・龍 有 二 (2012) : 地中熱利用ピットを有する建物における浮遊微生物の濃度変動と温湿度環境, 日本建築学会環境系論文集, 第77巻, 第676号, 491-498
 - 14) Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K-H (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews*, 59: 143-169
 - 15) Bartlett K. H., Kennedy S. M., Brauer M., van Netten C., Dill B. (2004): Evaluation an determinants of airborne bacterial concentrations in school classrooms, *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 1(10): 639-647
 - 16) Qian J., Hospodsky D., Yamamoto N., Nazaroff W.W., Peccia J. (2012): Size-resolved emission rates of airborne bacteria and fungi in an occupied classroom, *Indoor Air*, 22: 339-351
 - 17) Golofit-Szymerzak M. and Gorny R. L. (2010): Bacterial and fungal aerosols in air-conditioned office buildings in Warsaw, Poland -The winter season, *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*, 16(4): 465-476
 - 18) Manarte-Monteiro P., Carvalho A., Pina C., Oliveira H., Manso M. C. (2013): Air quality assessment during dental practice: Aerosols bacterial counts in an university clinic, *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentaria e Cirurgia Maxilofacial*, 54(1): 2-7