

厚生労働科学研究費補助金
健康科学総合研究事業

居住環境に基づく感染性疾患と その管理に関する研究

(H16-健康-048)

平成14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 河野 茂
(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

平成17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

居住環境に基づく感染性疾患とその予防に関する研究： (主任研究者 河野 茂)	-----	1
---	-------	---

資料

(1) 居住空間における細菌性疾患とその予防に関する研究 (分担研究者 山口恵三)	-----	13
(2) 人畜共通感染症に関する研究—建築物衛生の観点から (分担研究者 池田耕一)	-----	24
(3) インフルエンザなどウイルス感染症についての実態調査・研究 (分担研究者 鈴木 宏)	-----	32
(4) 居住環境に基づく抗酸菌感染症の予防に関する研究 (分担研究者 御手洗聡、高橋光良、阿部千代治)	-----	39
(5) ダニアレルギー患者の居住環境等の背景因子に関する検討 (分担研究者 秋山一男)	-----	45
(6) 黒色真菌 <i>Stachybotrys chartarum</i> の病原性に関する研究 (分担研究者 亀井克彦)	-----	51
(7) 居住環境中の真菌による疾患についての実態調査・研究 (分担研究者 高鳥浩介)	-----	57
(8) 室内空気環境における微生物挙動のシミュレーション (分担研究者 藤井修二)	-----	63
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	77

I. 總 合 研 究 報 告

主任研究者：河 野 茂

居住環境に基づく感染性疾患とその管理に関する研究

主任研究者 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
感染分子病態学講座 病態生理制御学分野 河野 茂

研究要旨：

居住環境中に存在する病原微生物等の実態の把握、それによる疾病の予防を目的とした居住環境の維持管理の在り方について研究を行ない、以下の知見を得た。

- 1) 文献レビューを行った結果、居住環境における微生物に基づく疾患の発症、あるいは公共交通機関のような移動性閉鎖性空間における感染性疾患の伝播についての検討はほとんどなされていなかった。
- 2) 従って、国内における居住環境と感染性・アレルギー性疾患についての実態把握のための疫学調査や、温度・湿度や空調と感染性疾患の発症との関連性の調査、防御法に関する基礎的・臨床的研究が必須と考えられた。
- 3) ヒト常在性の高い細菌は保菌者の行動に基づいて周辺環境を汚染すると考えられた。
- 4) 室内空気中の細菌の多くがVNC (viable but not cultivable) の状態にあることが明らかとなり、その意義や測定法について検討が必要と考えられた。
- 5) 居住環境中へのメチシリン耐性コアグラールゼ陰性ブドウ球菌(MRCNS)などの耐性菌の拡散が示唆された。
- 6) 人畜共通感染症の原因となるパストレラ属菌を保有することが確認されたペットを飼育している住宅の環境からは同菌は検出されなかったが、ペットのイヌおよびネコから同菌が高率に分離された。
- 7) 角柱状酸化チタン光触媒空気浄化機は内視鏡保管庫内における細菌数を短時間の稼働で有意に減少させた。
- 8) 居住環境の約30%の箇所から非結核性抗酸菌が検出され、ヒトに病原性を示すものが含まれていた。
- 9) 環境因子として結核の感染予防上現実的に対処可能なのは「換気」であり、二次的な感染の拡大が懸念される高齢者施設、病院、刑務所、学校、社会福祉施設等では換気システムに配慮が必要と思われる。
- 10) インフルエンザの流行は交通網に沿って拡散する伝播様式が明らかとなり、人口密度と交通網発達の間接的関係の重要性が示唆された。
- 11) インフルエンザの流行と冬季の平均気温との関連は示されなかった。
- 12) 居住環境中の真菌は環境により種類が異なり、特に水系環境では独特の分布を示した。また簡便な方法で生細胞と死細胞との鑑別や形態の観察が可能となった。
- 13) 生活環境からの除塵ならびに除真菌法として、掃除機、粘着クリーナー、拭き・掃き掃除、空気清浄機と比較したところ、掃除機ならびに空気清浄機で除真菌効果が高かった。生活環境の素材では、タタミやジュタン・カーペットに比べフローリングで除真菌効果が高かった。
- 14) 特発性乳児肺ヘモジデロシス (AIPH) の原因真菌と考えられている *Stachybotrys chartarum* が種々の強い生物活性を有していることが明らかとなった。
- 15) *S. chartarum* をマウスへ経気道的に投与し、肺の間質を中心とした炎症性病変や肺動脈壁の肥厚など様々な病変を形成することが明らかとなった。
- 16) 建築物の解体作業中には屋外、室内共に粉塵量が増加する傾向が認められたが浮遊

微生物数と粉塵量とは有意な相関は認められなかった。

- 17) ダニアレルゲンの簡易なサンプリング法が開発され、皮膚表面を含む種々の環境表面からのサンプリングが可能となり室内空気中のアレルゲン濃度とも相関した。
- 18) 温湿度管理だけではダニの増殖を制御することのできないわが国の室内環境においては、カーペットや布製家具の除去、こまめな掃除、洗濯といったごく一般的な室内環境整備策が、ダニによる室内環境汚染の低減化に重要である。
- 19) イヌを飼育している家庭では有意にイヌアレルゲンその他のアレルゲン量が多かった。ネコを飼育している家庭では飼育するネコ数が多いほど、床堆積塵中および空中アレルゲン量が多くなり、空中ネコアレルゲン濃度に $5\mu\text{m}$ 以上の浮遊粒子が関与していることが判明した。
- 20) Computational Fluid Dynamics (CFD) やサブドメイン法により室内空気環境中の微生物挙動のシミュレーションが可能となり、疾患の予防のための居住環境のあり方を考える上で有用と思われた。
- 21) 数値シミュレーション技術の適用により、微生物の拡散・輸送段階においては室内気流や換気状況が大きく関与し、また建材表面での微生物育成環境に関しては建材選定方法や水分環境の制御が重要であることが明らかとなった。

分担研究者

<平成14年度～16年度>

山口恵三（東邦大学医学部・微生物学教室教授）、池田耕一（国立保健医療科学院・建築衛生部部長）、秋山一男（国立相模原病院・臨床研究センター部長）、亀井克彦（千葉大学真菌医学研究センター・系統・科学分野教授）、高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部長）、

<平成15年度～16年度>

鈴木 宏（新潟大学大学院医歯薬学総合研究科・国際感染症学教授）、藤井修二（東京工業大学大学院・情報理工学研究科教授）、
<平成16年度>御手洗 聡（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科長）

<平成15年度>

高橋光良（結核予防会結核研究所・レファレンスセンター結核情報科長）

<平成14年度>

岩本愛吉（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター感染症分野教授）、阿部千代治（結核予防会結核研究所・基礎研究部長）

A. 研究目的

空調システムや循環式浴槽を介したレジオネラ属菌の集団感染、空調の不備に基づく結核の集団感染、冬季に乾性条件で好発するインフルエンザの集団感染、加湿器で繁殖した細菌による肺炎や、居住環境に存在する真菌による過敏性肺臓炎の発症、湿性環境下で繁殖するダニによるアレルギーの誘発など、建築物や住居の構造、設備の

維持管理、使用条件などは、病原微生物等の繁殖やそれに基づく感染性疾患・アレルギー性疾患をはじめとする種々の疾患に大きく関与している。加えて、公共交通機関などの移動手段としての閉鎖空間も居住環境とともに感染性疾患の伝播に重要と考えられる。さらに本研究班発足後に SARS が世界的な問題となり、その感染経路の一部に居住環境が関与している可能性も指摘されている。病院環境では、院内感染対策の立場から広範にこのような調査報告が行われているものの、一般の居住環境に焦点をあてた研究はほとんど行なわれておらず、予防医学的な観点からはこのような研究は不可欠であると考えられる。

そこで、居住環境中に存在する病原微生物等の実態の把握、それによる疾病の予防を目的とした居住環境の維持管理の在り方や、交通機関での疾患の伝播予防法について研究を行なう。

B. 研究方法と内容

初年度（平成14年度）は現状の把握と問題点を明らかにするためにこの分野における国内外の文献のレビューを中心に行った。すなわち、PubMed による National Library of Medicine をはじめとする各種文献データベースを利用して、以下の研究に関する文献レビューを行った。

①居住環境に由来する一般細菌、結核菌、

重症急性呼吸器症候群(SARS)を含むウイルスによる感染症に関する研究、②真菌と健康被害に関する研究、③ *Stachybotrys chartarum* と特発性乳児肺ヘモジデロシス (AIPH) の関連性についての研究、④空調システムと感染症に関する研究、⑤ダニアレルゲンと気管支喘息発症・増悪についての研究

さらにダニによる室内環境汚染の評価方法の確立及びその応用という視点から、居住環境中のダニの人体への健康影響を検討した。

平成 15 年度および平成 16 年度は以下の研究を行った。

(1) 一般細菌と居住環境に関する研究
(河野 茂、山口恵三、池田耕一)

- 1) 特定の病原微生物(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌[MRSA]、非結核性抗酸菌)による患者周辺環境の汚染状況の調査を行い、その拡散能力について検討を行った。
- 2) 医学部学生を対象にした咽頭および鼻腔における病原細菌および耐性菌の保菌調査についての結果の解析を行った。
- 3) 保育園を対象とし、エアースンプラーを用いて保育室内の空気中の一般細菌を採取し、総菌量や生菌、死菌の割合、生きてはいるが培養不能な VNC (viable but not cultivable) 状態の有無について調査を行った。
- 4) 保育園で分離されたメチシリン耐性コアグラゼ陰性ブドウ球菌(MRCNS)に着目し、医療従事者を父母に持つ保育園児保育室空気中で MRCNS が検出された原因について、大学病院 ICU の環境から分離された MRCNS について遺伝子タイピングの検討を行った。
- 5) ペットを介した居住環境内での人畜共通感染症に着目し、イヌおよびネコを飼育している家庭におけるペットのパスツレラ属菌の保有率の調査を行った。
- 6) 角柱状酸化チタン光触媒を用いた空気浄化機の実用性の評価を行った。

(2) 結核および非結核性抗酸菌と居住環境に関する研究 (高橋光良、御手洗 聡、河野 茂)

- 1) 近年家族内あるいは集団感染とも思われる事例の報告もある非結核性抗酸菌に関して、居住環境中の分布に関する調査を実施した。
- 2) 平成 16 年度には前 2 年間の結果を受けてさらに感染の状況を解析するための文献調査と、集団内での伝搬様式解析のための刑務所での分子疫学調査解析を実施し、具体的対策について考察した。
- 3) カラオケスナックでの結核集団感染例を経験し、分子疫学調査と発症要因の解析を行った。

(3) インフルエンザ流行と居住環境に関する研究 (鈴木 宏)

感染症情報を基にした地理情報システム (geographic information system、GIS) を用い、インフルエンザの流行、伝播状況について以下の解析を行った。

- 1) 厚生労働省感染症サーベイランス情報のインフルエンザ患者発生情報を基にした GIS による感染症の疫学的分析。
- 2) 新潟県の小中学校のインフルエンザによる学校・学級閉鎖情報からの GIS による感染症の疫学的分析。
- 3) 気象情報とインフルエンザ流行についての分析。

(4) 真菌と居住環境に関する研究

(亀井克彦、高鳥浩介、河野 茂)

- 1) 居住環境中の日和見感染性真菌の真菌量や分布の調査を行った。
- 2) 二重蛍光染色法及び市販ファンギフローラ Y による蛍光測定の一つの方法で迅速かつ簡易な居住環境からの真菌の検出法の有用性についての評価を行った。
- 3) 生活環境からの除塵ならびに除真菌法として、掃除機、粘着クリーナー、拭き・掃き掃除、空気清浄機で比較した。
- 4) 特発性乳児肺ヘモジデロシス (AIPH) の原因真菌と考えられている *Stachybotrys chartarum* の病原性について in vitro におけるマクロファージや好中球に対する細胞障害性について検討した。
- 5) *S. chartarum* をマウス気管内に単回あるいは複数回投与し検討を行い、AIPH 再現の可能性も含めて諸臓器における病理組織

学的変化を検討した。

6) 老朽化した建築物の解体・建設工事における、粉塵の増加と飛散する微生物を定量的に測定し、工事とアスペルギルス属の胞子飛散の関係について検討した。

(5) ダニアレルゲンと居住環境に関する研究 (秋山一男、池田耕一)

1) アトピー型気管支喘息の主要な原因であるダニアレルゲンに関連して、ダニによる室内環境汚染調査用に簡易モニタリング法の開発の検討を行った。

2) 室内ダニアレルゲン量のモニタリング、室内温湿度の測定、住宅構造と生活様式に関するアンケート調査を実施して、それらのデータの解析から、ダニの増殖に関わる主要な室内環境要因の解明を試みた。

3) イヌおよびネコを飼育している家庭における、イヌおよびネコアレルゲンを中心としたアレルゲン濃度と室内空気環境の調査を行った。

(6) シミュレーションによる室内空気環境における微生物の挙動についての研究

(藤井修二)

1) 室内空気環境における微生物の挙動について Computational Fluid Dynamics (CFD) によるシミュレーション解析を行い、さらに新たなシミュレーション手法について検討した。

2) 数値シミュレーション技術を適用し、咳による微生物粒子の放出・拡散・輸送過程の把握、変動風吹き出しによる室内換気性能の向上と微生物排除性能向上の検討を試みた。さらに微生物育成条件に大きく関連する建材表面での水分挙動について実験的検討を行った。

(倫理面への配慮)

住宅、公共施設などにおける環境調査および被験者・ペットからの検体採取に際しては、予め当研究の目的と期待される成果などについて十分に説明し、主旨を理解していただき協力をお願いした。発表に際しては当該研究者以外には被験者、住宅、公共施設が特定できないように配慮した。

C. 研究結果

(1) 文献レビュー

一般細菌に関しては、国際論文と国内論文について、「環境と感染」で検索した場合のヒット数がそれぞれ 18371 と 2316 件、「環境と結核」で 1539 件と 165 件、「環境とインフルエンザ」で 2016 件と 169 件、「環境と緑膿菌・セラチア・セパシア」では 51167 件と 57 件であった。国内でのこの分野の研究は非常に遅れをとっており、検索結果の内容も会議録がほとんどで、表面的な検討結果や科学的エビデンスに乏しいものが多かった。また大部分が病院環境を主体としたものであったが、オフィスビルの居住者に生じるインフルエンザ様の呼吸器症状、だるさ、疲労感などの全身症状が、グラム陰性菌のエンドトキシンによって生じている可能性などについての報告があった。一方、実験的には、大気中に散布された一般細菌はコレラ菌などと同様に、環境中で生きてはいるが培養不能の状態 (VNC; viable but non-cultivable) になることが明らかとなった。

結核に関しては海外では飛行機のような公共交通機関内で結核が周囲の乗客に伝播したことを示唆する研究成績が報告されている。国内でも、通勤バス内、潜水艦、事業所内での結核感染についての調査報告があったが、一般の居住環境を焦点にした国内での研究は非常に少なかった。一方で、結核感染の疫学調査に分離結核菌の RFLP 分析が導入されるようになり、感染源の特定がより確実になった。病院や老齢健康施設など易感染性宿主が入っている施設における結核の集団感染が多発している。また拘留所・刑務所やホームレスシェルターなど限られたスペース内での集団生活、事業所や学校など一定の場所に机を置いている場合、遊興施設への高頻度の出入り、あるいは交通機関内での集団感染が報告されている。結核感染の宿主要因として、高齢者など易感染性宿主、若年者など結核菌未感染者の増加があげられる。環境要因として、結核の感染は 100% 空気感染と考えられており、アルミサッシなどによる居住環境の機密化、冷暖房の際における室内空気の循環などが考えられる。狭いスペース内での集団居住や結核の診断の遅れがこれら要因からみ感染の広がりを大きくしている。

ウイルスに関しては、呼吸器感染ウイルスに関しては、rhinovirus と influenza

virus の研究例が多く、消化器感染ウイルスに関しては、rotavirus と SRSV の研究例が多かった。一方、influenza virus の生存に対する湿度の影響などいまだに 30~40 年前のデータが引用されているものもあった。SARS ウイルスは乾燥したプラスチック表面上で 48 時間生存可能とされた。これは、一般の coronavirus の環境表面での生存時間として報告のある 3 時間よりはるかに長い。また、糞便中の SARS ウイルスは少なくとも 2 日間、さらに下痢便中では高い pH のために安定化して 4 日間の生存が可能とされている。このような環境中での長い生存時間が、Amoy Gardens でのアウトブレイクの背景となっている。感染経路に関しては、飛沫感染と患者分泌物を介する接触感染が中心と考えられている。飛行機内での空気感染事例も今のところ報告されていない。しかし、現時点では空気感染の可能性も完全には否定されていない。

真菌に関しては、キーワードとして居住環境、真菌、アレルギー、感染の組み合わせで検索したところ計 343 件あり、うち感染、アレルギーとに関する文献が 38-127 件であった。これら文献を 1966 年から 5 年単位で見ると明らかに 1996 年以降での報告数が多くなっている。また、さらに居住環境の真菌と健康被害因子をキーワードとして分類したところ、空気質、ハウスダストおよび生活環境に普遍的な真菌が関与していた。

Stachybotrys chartarum が特発性乳児肺ヘモジデローシス (AIPH) の原因となっている可能性が米国で指摘されており、文献的検討の結果、本菌と AIPH との関連性については、米国では多数の症例が報告されているものの、疫学的結論は得られておらず、生物学的にも直接発生機序に結びつくほどの情報は得られていないことなどが確認された。

空調システムと感染症に関しては、「Air conditioning system and infection」というキーワードで PubMed による National Library of Medicine のデータベースを検索した結果、対象文献は 44 編があった。しかし、いわゆる一般居住環境に関するものは僅か 2 編で、しかも何れも空調システムと感染症との関連に関する証拠を示すものではなかった。

ダニアレルゲンと気管支喘息発症・増悪についての研究では、アトピー型気管支喘

息の原因アレルゲンとしてのダニアレルゲンの重要性の程度は、国・地域や生活程度等により異なることが明らかになってきた。

(2) 一般細菌と居住環境に関する研究

MRSA をマーカーとした場合、汚染状況は保菌者の活動状況により変化し、その他の微生物においても保菌者・キャリアの活動状況により居住環境の汚染の程度は大きく異なることが予想された。シーツ交換などの一般家庭で行われる行為により、病原微生物が空中に浮遊し、通常とは異なる経路で感染を起こす可能性が示唆された。非結核性抗酸菌は保菌者からの飛沫到達可能な距離においても環境汚染は見られず、室内空気からも検出されなかった。結核菌と異なり飛沫核として放出されにくい可能性が示唆された。

医学部学生の調査では急激にメチシリン耐性コアグラエゼ陰性ブドウ球菌 (MRCNS) を鼻腔に保菌する学生が増加したが、その後の明らかな増加傾向は見られなかった。その一方で、この数年でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) などの耐性菌検出例が見られるようになり、一般環境における薬剤耐性菌の増加が疑われた。

2 つの大学病院附属保育園、および 3 つの一般保育園の計 5 施設で空気中の細菌について調査を行った結果、保育園の空気内の総菌数は概ね 1,000 リットルあたり 100 万前後であった。しかし、総菌数および生菌数の数に比べ、培養された菌数は 100 分の 1 から 1000 分の 1 と少なく、この差の中にある菌は、VNC (viable but not cultivable) の状態にあることが疑われた。ある保育園では 3 つの保育室のうち 2 室からメチシリン耐性コアグラエゼ陰性ブドウ球菌 (MRCNS) が優勢に分離された。父母に医療従事者が見られない保育園では MRCNS は分離されなかった。

大学病院旧 ICU 各サンプリング部位の空気から高頻度に MRCNS が分離された。また大学新病院の稼動前の ICU 各サンプリング部位の空気からはブドウ球菌そのものが検出されなかったが、稼動 1 ヶ月後には高頻度に MRCNS が分離された。一方旧 ICU 空気から分離された MRCNS と菌種が一致する保育園園児室空気からの分離株の間には、調べた限り遺伝的に同一の菌株は見出せな

った。大学病院近辺および保育園近辺の一般公園の空気中からは MRCNS はまったく検出されなかった。所属する大学病院の病室が高度に MRCNS で汚染されている場合、その汚染が大学病院に勤務する親から保育児を介して保育園の環境を汚染する可能性が示唆された。

イヌまたはネコをペットとして飼育している調査対象住宅の何れにおいても空気中と堆積塵からはパストレラ属菌は検出されなかったが、全てのイヌから *Pasteurella canis* または *P. dagmatis* が検出され、イヌの口腔内にパストレラ菌が高い率に常在していることが確認され、調査対象の 11 匹のネコのうち、9 匹の口腔から *P. multocida* が検出され、ネコの口腔内にもパストレラ属菌が高い率に常在していることが確認された。

角柱状酸化チタン光触媒空気浄化機は内視鏡保管庫内における細菌数を短時間の稼働で有意に減少させた。

(3) 結核菌および非結核性抗酸菌と居住環境についての研究

居住環境における非結核性抗酸菌の分布を調査した結果、全 80 検体中水系を中心に 30% に抗酸菌が検出されており、それらは *M. gordonae*、*M. fortuitum*、*M. abscessus*、*M. neoaurum*、*M. mucogenicum*、*M. mageritense*、*M. vaccae*、*M. obuense* 他 3 菌種の同定困難な抗酸菌種であった。*M. fortuitum*、*M. abscessus* 及び *M. mucogenicum* はヒトに対する病原性が報告されており、他の非結核性抗酸菌についても免疫不全や免疫機能の低下した宿主に対しては十分病原性をもつと考えられる。一方、この時の検体では空中浮遊抗酸菌の同定は培地汚染がひどく、培地の発育選択性を向上する必要があることが明らかとなった。

平成 16 年度は特に一般の環境とは異なる環境あるいは状況について研究を行った結果、一般個人と免疫不全者について見た場合、宿主側の因子は主に発病に関するものであり、感染そのものはどのような個人でも機会は同じと考えられた。しかしながら、生体内環境という意味では、局所的あるいは全身的に免疫低下を伴う特殊な病態が存在する場合には通常的环境に存在する MAC 等の菌も感染因子として重要と思われ、

そうした状況では非結核性抗酸菌についても環境因子としての重要性を認識し、消毒等の処置をとる必要があると思われた。

感染を惹起する菌側の因子としては、現状で広く流行している株が感染性の点で危険と考えられる。アジア地域では Beijing Family と呼ばれる一群の結核菌が多く認められている。これは薬剤耐性や宿主環境への適応能力により効率良く拡がったものと考えられるが、このような「流行性」の株が蔓延している地域は「環境」として危険であると考えられた。結核感染におけるいわゆる 22 high-burden countries のうち 8 か国は東一東南アジア地域に集中しており、これらの地域への訪問は、それ自体が結核感染のリスクであると考えられた。国内でも大阪市では 2003 年の統計で人口 10 万対 68.1 (同年の全国平均は 24.8) と極めて高く、途上国を上回る結核罹患率が認められている。

結核が発生した場合に二次感染・集団感染が起こりやすい特殊な環境として、高齢者施設、福祉施設、刑務所 (監獄)、学校、病院等が考えられる。実際にそれらの施設での集団感染事例は多く報告されていた。これらに共通する因子としては、その集団性に加えて診断の遅れによる感染源との接触の長期化がある場合が多かった。

結核の集団発生が確認されたカラオケスナックは 1 辺が 2.7m の正方形の小さな店舗で、6 席のカウンター席のみであった。出入り口は 1 ヶ所で換気扇以外に窓は無かった。1999 年 5 月より 2000 年 4 月の間に発症した 4 名の排菌性結核患者間に面識があることが判明し、全員がこのカラオケスナックの利用者であり、それ以外の接点は無かった。4 名の患者から分離された結核菌株の遺伝子パターンを Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 解析したところ、全て同一株であることが証明された。同店の従業員や他の利用者に感染はなく、発症した 4 名の患者は共通して常習飲酒、喫煙が認められ、1 名が肝障害、別の 1 名は肝障害と糖尿病を基礎疾患として有していた。

(4) インフルエンザ流行と居住環境についての研究

感染症サーベイランス情報と全国の小中学校のインフルエンザによる学校・学級閉

鎖情報から、インフルエンザ流行のピークは毎年東北・北海道からではなく西日本からゆっくりないしは急速に北上し、特にA/H3N2型が変異した際には大きな流行となり、日本全体に短期間に伝播する事が示唆され、流行とウイルス抗原変異との関与が再確認された。

気象との関連を検討し、日本では1987年1999年まで1回のラニーニャと4回のエルニーニョがあるが、これらの5回の場合と流行との関連性はなかった。また流行の大小は特に冬季の気温との関連は無かった。

インフルエンザの流行開始は、相対湿度ではなく10℃以下の気温と10g/m³以下の絶対湿度が必要条件と思われたが、更なる検討が必要である。

インフルエンザ流行は全国地域の山脈に遮られつつ、近隣相互地域の交通の頻度によって伝播して行く傾向が見られた。

インフルエンザによる県内小中学校の学校・学級閉鎖情報から、流行は近県から入り、都市部に入ると爆発的に近郊の市町村に交通網に沿って拡散する伝播様式が明示され、約10万以上の都市がこの傾向を示唆した。

インフルエンザによる県内小中学校の学校・学級閉鎖措置として学校、学年、クラス閉鎖、午後のクラス閉鎖、クラブ活動中止など様々な措置があり、学校閉鎖などの強い措置は少なかった。再措置は学校、学年閉鎖群では、他と比較し少なく、措置は患者発生早期に行うべきであることも示唆された。

(5) 真菌と居住環境についての研究

居住環境の中でも湿性な環境である水系環境は特異な真菌生態を有していることがわかった。水系環境器材では、浴室、洗面所、トイレ、台所ともに主要真菌のほとんどは、*Cladosporium*, *Rhodotorula* 及びその他の酵母が多くを占めていた。特に *Cladosporium* はほとんどの箇所でも40%前後と高く汚染しているものといえた。また好湿性真菌、耐乾性真菌、好乾性真菌としてまとめたところ、環境とその環境に占める真菌とは相関した。居住環境中の真菌量や分布の測定法は従来から培養によって実施されてきた。今回新たに、真菌の迅速かつ簡易な手法の評価を二重蛍光染色法及び市販ファンギフローラ Y による蛍光測定の一

つの方法で検証した結果、良好な結果が得られた。

生活環境にみられる真菌の具体的除去対策を、タタミ、ジュタン・カーペット、フローリングおよび空中環境を対象にして行った。今までの研究結果からみて、生活環境での主要真菌は、*Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Wallemia* であり、これら真菌の除去効果が高いほど有効な対策になるものと考えられた。除塵ならびに除真菌法として、掃除機、粘着クリーナー、拭き・掃き掃除、空気清浄器と比較したところ、いずれもその効果を認めた。特に除真菌効果の高い掃除方法は、掃除機ならびに空気清浄機の使用であった。粘着クリーナー、拭き・掃き掃除法では、除真菌効果はあるものの、その有効性には一定の限界があり、その使用法をよく理解する必要があると考えられた。生活環境の素材と真菌の関係をみたところタタミ、ジュタン・カーペットに比べフローリングの方が、除真菌効果が高かった。

S. chartarum の培養上清、および本菌胞子洗浄液中にさまざまな生物学的活性が見られ、マクロファージや好中球に対して細胞障害性を有することが明らかとなった。細胞障害性の程度は菌株により差が見られた。また好中球1個あたりが貪食する胞子数 (phagocytic index) では、*S. chartarum* が *Aspergillus fumigatus* よりも低値を示し、さらに本菌胞子はその殺菌能に対し抵抗性を有することが判明した。さらに、マウスに *S. chartarum* の胞子を経気道的に投与し、諸臓器における病理組織学的変化を検討した結果、肺胞出血像は軽微にとどまったが、肺胞内を中心に好中球を主体とする炎症を生じ、反復投与では好酸球による著明な血管周囲間質の炎症と共に、血管壁の肥厚による肺動脈内腔の著しい狭窄を生じた。本菌は肺で発芽することなく排除されていた。このように、本菌がヒトに吸入された場合、感染は成立しないものの、肺の間質を中心とした炎症性病変や肺動脈壁の肥厚など様々な病変を形成する可能性が示唆された。居住環境内における本菌研究の重要性が示された。

病院改築に伴う工事期間中は、隣接する病院環境で屋外、室内共に粉塵量が増加する傾向が認められたが浮遊微生物の状況は真菌あるいは一般細菌のいずれにおいても粉塵量とは有意な相関は認められなかった。

窓のある一般病室では工事期間中は低菌室の前室と比較して有意に多くの糸状菌が分離されることが判明し、通常の病室では侵襲性肺アスペルギルス症 (invasive pulmonary aspergillosis) の発症リスクが増加する可能性が示唆された。

(6) ダニアレルゲンと居住環境についての研究

室内塵、寝具塵中のダニアレルゲン量を、major allergenである Der p 1 と Der f 1 の合計である Der 1 量として ELISA により測定することで、これまでの虫体数測定法に代わる免疫法を考案し、空中アレルゲンの動態における新知見が得られた。すなわち、ダニアレルゲンは何らかの人為的な動作、たとえば布団の上げ下ろしや睡眠中の寝返り等がなければ空中に浮遊することが少ないこと、同じ浮遊条件であれば発生源のダニアレルゲン量の多寡が空中ダニアレルゲン量に影響を与えること、等が明らかになった。

さらにダニによる室内環境の汚染の実態を明らかにするための室内環境調査に有用な簡易モニタリング手法を開発した。医療用粘着テープで寝具表面、皮膚表面から試料を採取する方法 (テープ法) は、サンプリングが簡便であり、寝具表面、ヒトの皮膚表面のダニアレルゲン量を直接評価することが可能になった。テープ法で採取されるアレルゲン量は超微量であるため、高感度の測定法が必須になる。Der p 1/Der f 1 は検出感度が 1 pg/ml の高感度蛍光 ELISA を確立しているため、ほとんどの検体から検出下限値以上のダニアレルゲンを検出することができた。さらに、その測定値は室内空気中アレルゲン濃度と有意に相関した。また、わが国のごく一般的な家庭の室内の温湿度を通年的に測定したところ、月平均の相対湿度が 50% を下回ることはほとんどなく、開放型暖房器具を使っていれば、通年的に 60% 以上で推移していた。このような温湿度管理だけではダニの増殖を制御することのできないわが国の室内環境においては、一般的な室内環境整備策を効率よく組み合わせることでそれを励行することにより汚染の低減化を図ることが重要であると考えられた。

ペットを飼っていない住宅内ではダニアレルゲン Der 1 とイヌアレルゲン Can f 1 が

殆ど検出されなかったのに対して、イヌを飼っている住宅ではいずれのアレルゲンも検出され、特に Can f 1 は Der 1 の 10-100 倍多く検出された。イヌを飼っている住宅では、 $1\mu\text{m}$ 以上の浮遊粒子濃度が高い傾向にある。また、浮遊真菌数と $5\mu\text{m}$ 以上の浮遊粒子濃度の間に有意な相関関係が認められ、1000 個の浮遊粒子中に 4~5 個の真菌が含まれると推定された。今回の調査の結果からは、窓を 2 分弱開ければ、室内の空気を外気と 1 回入れ替えられ、換気による室内汚染物質の対策が有効であることが確認された。また、ネコを飼育している家庭では、床堆積塵中のネコアレルゲン量は $100\sim 5000[\mu\text{g}/\text{g}]$ の範囲にあった。7 匹のネコを飼育している住宅のネコアレルゲン量は今まで国内における測定の結果に比べ顕著に高かった。この住宅の空中に浮遊するネコアレルゲン濃度は他の住宅の約 10 倍であった。空中浮遊アレルゲン濃度と床堆積塵中のアレルゲン量、 $5\mu\text{m}$ 以上の浮遊粒子濃度との間に有意な相関関係が認められた。空中ネコアレルゲン濃度にも $5\mu\text{m}$ 以上の浮遊粒子が関与していることから、従来の粗大粒子に対する清浄化技術がペットアレルゲン粒子の除去に対しても有効であることが示唆された。

(7) シミュレーションによる室内空気環境における微生物の挙動についての研究

結核菌が $1\sim 4\mu\text{m}$ 、SARS-CoV が $0.08\sim 0.16\mu\text{m}$ 、Influenza virus が $0.08\sim 0.12\mu\text{m}$ であることより、粒子の条件は粒径 $0.1\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ とし Computational Fluid Dynamics (CFD) によるシミュレーション解析を行った。強制換気を有する居室内でも気流は均一ではなく、よどみ領域では空気齢が高くなり、十分な換気性能が確保できないため、発生した微粒子が室外に除去されにくい。粒径 $1\mu\text{m}$ 以下の粒子は気流により輸送されやすいが、室内の換気状況が十分でない場合には、かなりの数が室外に除去されず、残存する。解析したモデルでは発生開始 30 分経過後でも、粒子発生源の位置によっては、粒径によらず 90% の粒子が残存する場合も認められた。粒径 $1\mu\text{m}$ 以下の微粒子の場合には、粒子発生源近傍空気余命と粒子残存率とはよい相関を示し、換気性能の改善により残存率を低減できる可能性のあることがわかった。

咳により静止空気中に放出された粒径 10 μm 微粒子の挙動について数値シミュレーションを実施し、咳を開始してから 1 秒後には高濃度の微生物粒子を含む渦流が軸方向距離 1.5m、拡散幅 80cm に達することがわかった。咳により放出された微生物は、渦流の形成、輸送に伴って慣性力を失いながら拡散し、さらに室内気流によって広い範囲に輸送されるものと考えられる。また、吹き出し口の首振り、間欠吹き出しなどの変動風吹き出しによる換気性能向上の可能性を数値シミュレーションにより検討した結果、変動風吹き出しを適用した室内では、各部の濃度減衰速度に大きなばらつきがなく、換気性能を大幅に向上できることがわかった。部屋の隅やベッドの下など、日射が入らずよどみやすい領域では、微生物が育成しやすい環境と考えられ、変動風吹き出しによる換気性能向上が室内汚染質環境の改善にもつながるものと期待できる。

さらに、石膏ボードや木材などの建材を対象として、環境中の相対湿度と含水量、表面水分量、平衡相対湿度との関係について実験的評価を行った結果、いずれの建材も吸湿よりも放出に要する時間が長く、いったん吸湿すると建材内部に水分が保持されやすいこと、石膏ボードの場合に結露を生じると急速に水分が内部に浸透し、長時間にわたりこれが保持されて微生物育成に有利な状況を生じることなどがわかった。結露を生じるような場所に石膏ボードを使用することは望ましくないと判断できる。

D. 考察

初年度の文献レビューの結果、居住環境における感染性疾患についての国内での研究はほとんど行われておらず、その正確な実態について文献からのみ評価することは困難であり、基礎的検討や実地調査の必要性が考えられた。特に一般細菌についてはどのような細菌が居住環境に起因して感染性疾患を起こす可能性があるのか情報が少ない。

特定の病原細菌や耐性菌をマーカーとして環境汚染の指標とした。MRSA のような常在性の高い細菌では、保菌者の行動様式・範囲などに基づいて周辺環境が汚染され、多くのヒト常在性細菌が同様に拡散することが考えられた。また通常は接触により伝播するとされている MRSA も空中に浮遊す

る場合があり、特に一般家庭でも日常的に行われるシーツ交換時に浮遊量が増加し、これを吸入することで気道に定着する可能性も示唆された。

保菌状態が医療従事者と比較し一般健康人に近いと思われる医学部学生を対象に行った調査では、平成 8 年には極めて低率であった鼻腔の MRCNS 保菌率が平成 9 年に急激な上昇が見られた。その後は明らかな増減傾向は認めなかった。また MRSA が平成 14 年度から医学部学生の鼻腔から検出されており、MRCNS と同様に MRSA も一般環境に拡散している可能性もあり、今後の動向に注意が必要である。また、咽頭ぬぐい液においても、PRSP、耐性インフルエンザ菌などの薬剤耐性菌が低率ながら検出されていることは、これらの薬剤耐性菌が居住環境内で咳、くしゃみ等を介した飛沫感染により拡散する可能性が考えられる。

MRCNS は現在、大学病院などの ICU 室環境から高頻度に分離されていることが報告されており、今回の研究結果も大学病院病棟が MRCNS に高度に汚染されている実態を明らかにしたものと思える。ICU 稼動前にはブドウ球菌がまったく検出されなかったのに対し、稼動 1 ヶ月後には 1 箇所を除き、高率に MRCNS を含むコアグラゼ陰性ブドウ球菌株が多数検出された。特に MRCNS 株が検出されたことは、すでに医療従事者の皮膚に MRCNS が広く定着している可能性を示唆するものと思えた。その一方で一般公園空気中からは、ブドウ球菌はまったく分離されず、公園のような居住外環境の空気中にはブドウ球菌はほとんど分布していないことを示唆した。

結核の主要感染経路は飛沫（核）による空気を介した呼吸器感染である。従って感染源によって汚染された空気を共有しないことが感染防止の第一である。またこれに付随して感染源を早期に除去すること、発病に至りやすい個人・集団では感染源の侵入を阻止することが環境因子として重要である。汚染した空気を除去する唯一の方法は換気である。アメリカ Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) では感染源を隔離する際の換気基準として、部屋を陰圧として外部と 2.5Pa の差をあたえ、施設を新設する際には 12ACH 以上 (1ACH では 1 時間にその部屋の容積と等量の空気が流入する)、既存の施設でも 6ACH 以上の換気効率を要求し

ている。また、空気を還流する場合はHEPAフィルターあるいは紫外線灯による病原体の除去を必要とする。

非結核性抗酸菌についてはヒト-ヒト感染は起こらないとされている。居住環境の約30%から非結核性抗酸菌が分離されており、その中にはヒトに病原性を示す菌種も含まれており、これらが感染性疾患やアレルギー性疾患の原因となっている可能性が示唆された。特に非結核性抗酸菌に対して感染リスクの高い免疫不全患者、小児、高齢者については、その居住環境、特に台所や風呂などの清掃除菌の必要性が考えられる。肺非結核性抗酸菌患者の咳に伴う周辺環境および室内空気の汚染に関する調査では、いずれからも非結核性抗酸菌は分離されず、結核菌と比較して飛沫核として飛散しにくい可能性が考えられ、そうであれば非結核性抗酸菌でヒト-ヒト感染が起こらない要因とも考えられる。

パストツレラ症などのペットを介した人畜共通感染症の増加は現代社会における問題のひとつである。イヌおよびネコを飼育している家庭での調査を行ったところ、イヌおよびネコの口腔内に高率にパストツレラ属菌保有していることが確認された。しかし、空気中や堆積塵中の何れにおいてもパストツレラ属菌は検出されず、一般環境中において生存することが難しいのか、あるいは生存していてもその測定が難しいのかが不明であり、今後の課題となる。イヌを飼っている住宅内ではイヌアレルギーその他のアレルギー量が多いことが明らかとなり、ペットの飼育は感染症とアレルギー性疾患の両方の原因となりうることが示唆された。また、空中浮遊アレルギー濃度と床堆積塵中のアレルギー量、 $5\mu\text{m}$ 以上の浮遊粒子濃度との間に有意な相関関係が認められ、空中ネコアレルギー濃度に $5\mu\text{m}$ 以上の浮遊粒子が関与していることから、従来の粗大粒子に対する清浄化技術（例えば空気清浄機の使用など）がペットアレルギー粒子の除去に対しても有効であることが示唆された。

GISを用いたインフルエンザの流行に関する研究結果からは、その伝播形式は、近隣相互地域が互いに影響しあっており、それには人口密度や交通網発達の要因が考えられるが、今後のさらなる検討が必要と思われる。交通の発達した現在、昨年SARSコロナウイルスが香港のひとつのホテルで

暴露を受けた人々を媒介として各国に広まったように、現在社会における重要な感染症の伝播様式と考えられる。また、地域によってはそれぞれの地域にある高い山脈によってその伝播が抑制される傾向も見られた。これらの大きな流行伝播の様式は、古くは江戸時代以前からのヒトの交流を示すものでもあり、インフルエンザウイルス感染伝播との関連を強く示唆する興味ある結果となった。新潟県内のインフルエンザによる学校・学級閉鎖状況からその措置の有効性を検討した結果からは、措置は患者発生早期に行うべきであることも示唆され、措置基準の見直しが急務と思われた。また、措置しない学校の近隣学校への影響も考えられ、地域全体での措置を行う必要性が示唆された。

真菌は居住環境に存在する微生物の中では比較的疾患との関連性が高い。従来から培養法で検査される場合が多いが、死菌であっても抗原性が保たれアレルギー性疾患の原因となりうる。今回の調査で、蛍光法を用いると簡便に生きた真菌と死菌を鑑別できることが明らかとなり、また形態の観察が容易になることが判明した。これらの方法で検討された居住環境中の真菌の分布調査では、環境の種類（湿性か否か）と生息する真菌の種類に相関が見られ、特に水系環境は独特の真菌生態を有していることが明らかとなった。生活環境には *Cladosporium*, *Penicillium* を主要とした真菌が生息し、こうした真菌について種々の清掃法の有効性について具体的な評価を行った。電気掃除機を用いた掃除では、フローリングが最も除真菌効果が高く、床材の表面が均一であり空隙が少ないため、塵埃が掃除により除塵されやすいためと思われた。粘着クリーナー、および濡れ雑巾と乾拭きによる拭き掃除の効果は掃除機に比べて弱かった。除塵前後での清掃により、特に汚染性の強い *Cladosporium*, *Penicillium* は生活環境のダストに主要であり、空中飛散性も強い。空気清浄機の作動により真菌数が減少し、必然的に主要真菌である *Cladosporium*, *Penicillium* も減少した。空気清浄機による除真菌効果を検討したところ明らかに除真菌が確認され、このことは空中の塵埃も減少させているものと思われ具体的な真菌除去に有効な方法と考えられた。また清浄機作動時間については詳しく検討していないことからより効率

のよい作動時間と空間について今後検証する必要がある。

*Stachybotrys chartarum*による乳児特発性肺胞出血その他の健康被害の実態はわが国では全く明らかとなっていない。しかし、本菌の存在は国内での居住環境においても稀でない。今回の研究により本菌が様々な強力な生物活性を有していることが明らかとなった。マウスモデルにおいて乳児特発性肺胞出血に相当するような著明な出血性病変は認められなかったものの、激しい肺胞性肺炎、好酸球をまじえた血管周囲の間質性肺炎、さらに肺動脈壁肥厚といった、これまでに報告のない病変の形成が確認された。いずれの病変においても本菌の定着は確認されておらず、これらに本菌による感染ではなく、本菌に含まれている活性物質により惹起された病態と考えられた。本菌の長期間反復投与では、一部のマウスで肺動脈内腔の狭窄や閉塞が確認されたことから、本菌に曝露され続けると肺高血圧症を生じる可能性が推測された。これまでに本菌の投与によってマウス肺組織中に肉芽腫を形成した例などはあるものの、ここで見られたような動脈内腔の狭窄や閉塞が惹起されたという報告はなく、貴重な知見であると考えられる。このような血管壁の変化がもたらされる機序としては血管内皮の障害などが考えられるが、このことについては明らかではない。一方、肺高血圧症は種々の原因で発症するものの、一部には原発性肺高血圧症のように全く原因が知られていないものもあり、これらは予防や治療法が明らかにされていないため大きな問題となっている。我々の研究により、本菌の吸入によって肺高血圧症が発生する可能性が示されたことは、ヒトにおける本疾患の研究に関して大きな意義をもつ可能性が考えられる。

ダニは国内のアトピー型気管支喘息の最大の原因アレルギーであり、患者の居住環境でのダニアレルゲンの調査がしばしば行われる。今回の研究ではこれまでの掃除機を用いた方法よりはるかに簡便で従来法との相関の高いテープ法が開発された。テープ法の開発により従来困難であったヒトの皮膚表面のダニアレルゲン量の評価が可能となった。さらにテープ法での測定値と室内空気中のダニアレルゲン濃度に有意な相関が見られたことから、煩雑なエアサンプリングを行わずに暴露レベルを推定できる

可能性がある。わが国は世界でも有数のダニ汚染地域であるが、その最大の要因は温暖湿潤な気候であると考えられている。1年を通して換気だけで室内の相対湿度を50%以下に維持することができる北欧やアルプス高地などでは、一般家庭室内のダニ汚染のレベルはきわめて低値である。一方、わが国の一般家庭では室内の相対湿度を通年的に50%以下に維持することはまず不可能であると考えられる。調査開始時点で汚染のレベルが非常に低かった家屋において、寝室をフローリングからカーペットに変更したとたんに床の汚染は急上昇して、それにもなって寝具の汚染も徐々に上昇している。このことは、温湿度の制御でダニの増殖を阻止することがまず不可能なわが国のような地域においては、可能な限り除湿を心がけることとともに、あるいはそれ以上に、カーペットや布製家具の除去、こまめな掃除、洗濯といったごく一般的な室内環境整備策が、ダニによる室内環境汚染の低減化に重要であるということを示している。

室内空気環境における微生物挙動のシミュレーションは、疾患の原因と疑われる微生物の大きさなどにより様々な解析が可能であり、本研究班で明らかとなった微生物などによる健康被害を予防するための重要なツールになると考えられる。数値シミュレーション技術を適用し、咳による微生物粒子の放出・拡散・輸送過程の把握、変動風吹き出しによる室内換気性能の向上と微生物排除性能向上の検討を試み、さらに微生物育成条件に大きく関連する建材表面での水分挙動について実験的検討を行った。一連の結果から、微生物の拡散・輸送段階においては室内気流や換気状況が大きく関与し、また建材表面での微生物育成環境に関しては建材選定方法や水分環境の制御が重要であることが明らかとなった。従来から、屋内環境の問題は省エネルギー化や快適性を中心に扱われてきたが、病院などの医療施設では、微生物汚染を制御する観点から設計が行われるべきであろう。建築の立場から微生物汚染の制御を目的として実施できる内容は、材料選定、レイアウト設計を含む空調換気設計など多岐にわたる。本研究により得られた研究成果は、今後の室内における微生物汚染制御を考える上で有効に活用できるものと考えられる。

E. 結論

初年度の文献調査からダニや一部の真菌を除いて、この分野の研究は不十分であり、居住環境と病原性微生物やダニの関連についての疫学調査や、温度・湿度や空調と感染性疾患の発症の関連性の調査、防御法に関する臨床的研究が必須であることが示唆された。

平成 15 年度には、一般細菌、人畜共通感染症の原因となるパスツレラ属菌、抗酸菌、真菌、インフルエンザウイルス、ダニについて疫学的あるいは実験的な調査も含めて、その居住環境中における実態などが具体的に明らかとなってきた。その中で新しい検出法の開発も行われた。さらに室内空気中における微生物挙動のシミュレーションが可能となった。

平成 16 年度には、薬剤耐性菌を中心とした一般細菌、パスツレラ属菌、真菌、インフルエンザウイルス、ダニについて、疫学的調査も含めて居住環境中における実態などがさらに具体的に明らかとなってきた。また、*S. chartarum* が乳児特発性肺胞出血以外の病態にも関与している可能性が示唆された。さらに数値シミュレーション技術による居住環境中の微生物の拡散様式の検討結果が、室内における微生物汚染制御に活用可能と考えられた。一部の細菌や居住環境中の真菌やダニなどの除去法についても具体的な結果が得られた。

今後さらにこのようなデータを蓄積し、居住環境における感染性・アレルギー性疾患の原因微生物やダニなどの実態をさらに明らかにし、疾患予防についての研究に発展させる必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
別紙一覧表を参照
2. 学会発表
該当するものなし

G 知的所有権の取得状況

該当するものなし

厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)
「居住環境に基づく感染症疾患とその管理に関する研究」
総合研究報告書

居住空間における細菌性疾患とその予防に関する研究

分担研究者 山口恵三 東邦大学医学部微生物教室教授
研究協力者 大野 章 東邦大学医学部微生物教室

研究要旨

平成 14 年度における文献調査等の成果により、居住空間における一般細菌調査の対象を保育園とし、平成 15 年度ではエアースンプラーで採取した保育室の空気 1000L 中の総細菌数、培養可能な細菌数を調べ、また培養された細菌の同定、抗菌薬感受性を自動細菌同定抗菌薬感受性機器を用いて行なった。

調査に選んだ保育園は、大学病院附属保育園 2 箇所 (A 大学病院、B 大学病院)、一般保育園 3 箇所の計 5 箇所とした。その結果、空気中には培養不能な細菌が多数存在し、コロニーが形成されるのはその一部であることが推測された。また 2 つの大学病院附属保育園のうち A 大学病院から、複数種のメチシリン耐性コアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (MRCNS) が高率に検出された。しかしもう一方の B 大学病院附属保育園からは特に高率には MRCNS は検出されなかった。一方 3 箇所の一般保育園のうち 2 箇所の一般保育園から、低率ながら MRCNS が検出された。MRCNS が検出された保育園園児の父母の一部は、医療関係従事者であった。父母に医療関係従事者が見られない保育園からは MRCNS は検出されなかった。以上の結果を受けて、平成 16 年度では医療従事者を父母に持つ保育園児保育室空气中で MRCNS が検出された原因について検討した。

最初に勤務先の医療機関環境が MRCNS で汚染されていて、医療従事者である父母から園児を介し、あるいは直接父母を介して保育園環境に持ち込まれた可能性を検討した。保育園児父母の医療従事者が勤務する A 大学病院 ICU 室空气中の細菌の培養と同定および感受性試験を行なった結果、各サンプリング部位の空気から高頻度に MRCNS が分離された。これら ICU 空気から分離された MRCNS と菌種が一致する保育園園児室空気からの分離株との遺伝的同一性を調べるため、パルスフィールドゲル電気泳動を行った。しかし両施設の分離株間に遺伝的同一性を示す菌株は見出せなかった。また 2004 年 6 月に開院した A 大学新病院の稼動前の新 ICU 室各サンプリング部位の空気からはブドウ球菌そのものが検出されなかったが、稼動 1 ヶ月後には高率に MRCNS が分離された。勤務する医療従事者の鼻腔や皮膚の培養はしていないが、新規稼動一ヵ月後に室内空气中から MRCNS を含むコアグラウゼ陰性菌が高率に分離されたことは、医療従事者の皮膚剥離菌による空気汚染が反映していることを示すものと思われた。

A 大学病院附属保育園で高頻度に MRCNS が検出された結果は、直接の証拠は得られていないものの、所属する大学病院等大規模病院の病室が高度に MRCNS で汚染されているような場合、その汚染が大学病院に勤務する親から保育児を介して保育園の環境を汚染する、そのような MRCNS の病院から市中への汚染経路がある可能性が本年度の研究結果から浮かび上がった。また MRSA の耐性遺伝子がコードされているインテグロン様 DNA である SSCmec がコアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) に由来する可能性も指摘されている。今回の結果は、MRCNS が市中居住空間を汚染する傾向が高く、それが病原性の面で CNS に比べ著しく病原性の高い黄色ブドウ球菌に SSCmec を伝播している役割を担う可能性も示唆しているかもしれない。今後は得られた分離 MRCNS 株の遺伝的解析を行い検討を進めて

いくことが重要と結論付けられた。

A. 研究目的

レジオネラあるいは抗酸菌などの特定の細菌を除いた、「居住環境に基づく細菌感染性疾患とその予防に関する研究」のテーマでは、通常の居住空間では一般細菌による感染事例は見られないので、研究そのものが困難と思われる。そこで平成14年度の文献調査などから、免疫能の十分成熟していない幼児が多数居住する保育園居住環境では、感染症発生の潜在的危険性を持つと推定され¹⁾、本研究は、保育園園児室内環境に焦点をあてた。調査対象としては空気を選択した。空気を調査対象とした理由は、ビルでの微生物などに原因する sick house syndrome の原因が、換気条件の要因に基づいていること²⁾、また空気ということで、一定の共通条件が得られ、施設間の比較がしやすいことによる。

以上の検討を平成15年度に行い、A大学病院附属保育園の園児室空気中より多数のメチシリン耐性ブドウ球菌(MRCNS)が分離される結果を得た。この結果に対し、比較の意味で複数の一般保育園および他大学病院附属保育園の園児室空気中細菌の検査を行なった。これらの結果、A大学病院附属保育園の園児室空気中に浮遊する MRCNS が、すでに MRCNS で環境が濃厚に汚染された病院病棟内に勤務する保育児の親である看護師など病院スタッフを介して保育児皮膚へ伝播したことに由来する可能性が考察された。またこの考察の一方、すでに市中環境がある程度 MRCNS で汚染されていて、その汚染が保育園園児室の空気にも反映している可能性なども合わせて考察され

た。平成16年度の研究目的はこれらの考察を基に、MRCNS が高頻度に分離された大学病院旧 ICU 室空気中の調査、新 ICU 室空気の稼動前と、稼動後の調査、市中環境としての一般公園空気の調査、そして旧 ICU 病棟内空気中から分離された MRCNS と、同大学附属保育園園児室空気から分離された MRCNS が遺伝的同一性を示すかどうかなどの調査研究を行うことで、それまでの考察の検証が行われた。

B. 研究方法

1. サンプリング

エアースンプラー(BIOSAMP;ミドリ安全株式会社)を用いて、保育室内の空気を1.5%寒天 20ml を加え固めたシャーレ上に、10min, 1000L の条件で吸引した。保育室は一つの保育園で3箇所とした。

寒天プレート上に衝突した微生物を PBS(pH7.4)10ml にて回収した。

2. 細菌数測定

生きてはいるが、コロニーを形成できない細菌の存在を明らかにするため、総細菌数、生細菌数、コロニー形成細菌数を測定し、空気中の細菌の生理状態を検討した。

1) 総細菌数、生細菌数の測定

細菌数は、BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes, Inc.Eugene)を用い測定した。本方法により生きている細菌細胞は緑色に染まり、死んでいる細胞は赤色に染色される³⁾。総細菌数は生きている細菌数と死んでいる細菌数の総和とした。

2) 培養可能細菌数の測定

羊血液寒天平板(ポアメディア;栄研化学)を用い、サンプル0.1ml を培地上に塗布し、

35℃で48時間培養し1ml中のコロニー形成細菌数を測定した。また培養されたコロニーについて、大きさ、形態、色調など酷似するものを同一菌種と推定し、それぞれのコロニー数を測定し、菌種ごとの菌数を算出した。

また特定の細菌群の検出を目的として羊血液加CNA寒天培地、DHL寒天培地、メチシリン耐性ブドウ球菌検出用培地、インフルエンザ菌検出用寒天培地を用いた。

3) 菌種の同定

代表的コロニーについて、それぞれ3から5コロニーを純培養し、グラム染色を行なった。グラム染色の結果に基づいて、自動細菌同定抗菌薬感受性機器 Phoenix 100(日本ベクトンディッキンソン株式会社)による菌種同定および抗菌薬感受性測定を行なった。

4) メチシリン耐性遺伝子の検出

Louie らの方法により、PCR を行い *nucA* および *mecA* の検出を行い、メチシリン耐性コアグラウゼ陰性ブドウ球菌であることを確認した⁴⁾。

5) A 大学付属保育園空気由来の MRCNS 株 および A 大学病院 ICU 室空気由来の MRCNS 株間のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による遺伝的同一性の確認

以下の菌株を PFGE の対象に用いた。

S.capitis ssp.capitis 4株(保育園由来1株、ICU由来3株)
S.hominis 5株(保育園由来3株、ICU由来2株)、
S.epidermidis 4株(保育園由来1株、ICU由来3株)、
S.saprophyticus (保育園由来4株、ICU由来1株)。

PFGE は Bio-Rad 研究所の試薬キット ジーンパスグループ1 を用いて行い、操作

はすべてインストラクションマニュアルに従って行った。

C. 結果および考察

1. 総菌数、生菌数、培養菌数

大学病院附属施設1の総菌数、生菌数、培養菌数の結果を図1に示した。

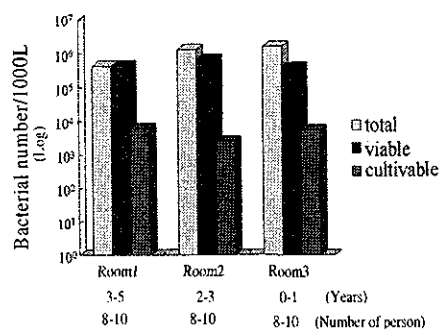


Fig.1 Total, viable and cultivable numbers of bacteria in 1000L of indoor air at each room in children attending day care centre

この結果から、総菌数および生菌数の数に比べ、培養された菌数は100分の1から1000分の1と少なく、この差の中にある菌は、生きてはいるが培養不能なVNC(Viable but not cultivable)の状態にあることが疑われた。結果には示さないが、他保育園においても、同様の成績が示されている。乾燥した状態の空気中では、細菌はVNC状態に移行しやすいとの研究結果もある⁵⁾。

一方VNC状態の証明は、熱や活性酸素スカベンジャー処理などにより培養能が復活することが一つの条件であるとされるが、今回は活性酸素スカベンジャーの一つカタラーゼ処理を行なったが、コロニー形成細胞数の有意な増加は認められなかった(成績未提示)。今後さらに検討する必要があるが、空気中の多数の菌がVNC状態にあるとすれば、今後の空気中細菌検査方法はその方法論も含め、再検討する必要があるだろう。

2. 菌種同定

1) A大学病院附属保育園保育室空気における菌種同定結果

同定結果を表1 a-c に示した。

Table 1-a Bacterial species isolated from room1 in A university-affiliated preschool

<i>Staphylococcus hominis</i>	} Methicillin-resistant Dominant
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
<i>Staphylococcus capitis</i> ssp. <i>capitis</i>	
<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	
<i>Staphylococcus kloosii</i>	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	

Kocuria rosea
Micrococcus luteus
Streptococcus salivarius ssp. *salivarius*
Gemella ssp.

Table 1-b Bacterial species isolated from room2 in A university-affiliated preschool

<i>Staphylococcus capitis</i> ssp. <i>ureolyticus</i>	} # Dominant
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	
<i>Staphylococcus hominis</i>	
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	

Leifsonia aquatica

Methicillin-resistant

Table 1-c Bacterial species isolated from room3 in A university-affiliated preschool

<i>Corynebacterium bovis</i>	} Dominant
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	} Methicillin-resistant
<i>Staphylococcus hominis</i>	
<i>Micrococcus luteus</i>	
<i>Streptococcus acidominimus</i>	
<i>Kocuria rosea</i>	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	

A 大学病院附属保育園においては、保育室1 および2 で MRCNS が優勢に分離された。また *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp. が分離されているが、これは人間の皮膚常在菌由来と考えられる。さらに保育室3 からは *Stenotrophomonas maltophilia* が分離されている。本菌は環境菌であるが、多くの抗菌薬に自然耐性を示す代表的な院内日和見感染原因菌の一つとして重要である。

保育室1 および2 から優勢に分離された MRCNS に対するオキサシリンの微量液体希釈法による MIC 値の結果、並びにメチシリン耐性が *mecA* 遺伝子によるものかどうか (*mecA* の存在)、同時にコアグラゼ陰性ブドウ球菌であるかどうか (*nucA* の非存在) を multiplex PCR により確認した (表2)。すべての株は *mecA* を保有し、また黄色ブドウ球菌に特有の *nucA* 遺伝子を保有せず CNS であることが確認された。さらに保育室2 における *S. epidermidis* の1 株を除いてオキサシリン高度耐性を示した。

Table 2 MIC determination of oxacillin by micro-broth dilution method to MRCNS isolates identified by Phoenix 100, and the detection of *mecA* and *nucA* by PCR method

Isolate	Oxacillin MIC (μ g/ml)	<i>mecA</i>	<i>nucA</i>
<i>S. hominis</i>	>256	+	-
Room1	<i>S. capitis</i> ssp. <i>capitis</i>	64	+
	<i>S. kloosii</i>	256	+
	<i>S. chromogenes</i>	128	+
	<i>S. epidermidis</i>	1	+
Room2	<i>S. saprophyticus</i>	128	+
	<i>S. saprophyticus</i>	128	+
	<i>S. saprophyticus</i>	256	+
	<i>S. saprophyticus</i>	256	+
	<i>S. haemolyticus</i>	256	+
	<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	256	+
	<i>S. hominis</i>	>256	+
Control	<i>S. epidermidis</i> ATCC29886	NT	-
	<i>S. aureus</i> ATCC29213	0.25	-
	MRSA 278 (clinical isolate)	>256	+

A 大学病院附属保育園において優勢に MRCNS が分離されたことは、今回の調査で得られた大きな特徴であった。そのため

本大学病院附属保育園における MRCNS の空気汚染が、大学病院附属保育園の多くに特有のものか、あるいはすでに市中環境において広く MRCNS が分布しているのかを知る必要が生じ、一般保育園および他大学病院附属保育園で同様の調査を行なった。

2) 一般保育園における保育室空気中における菌種同定結果

一般保育園 A の菌種同定結果を表 3 に、保育園 B の結果を表 4 に、さらに保育園 C の成績を表 5 に示した。

Table 3 Results in A general preschool

Room 1 For Infants aged one year 18 persons	Gram +	<i>Staphylococcus epidermidis</i> * MRCNS <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> - Dominant
	Gram -	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Pantoea agglomerans</i>
Room 2 For Infants aged two years 14 persons	Gram +	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Micrococcus luteus</i> - Dominant
	Gram -	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
Room 3 For Infants aged three years to four years 62 persons * parents of three children are nurse	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Micrococcus luteus</i> - Dominant <i>Alloicoccus otitidis</i> <i>Leifsonia aquatica</i>
	Gram -	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Mycoides odoratus/doratinimus</i> - Dominant <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>

Table 4 Results in B general preschool

Room 1 For Infants aged two year 16 persons	Gram +	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Staphylococcus capitis ssp capitis</i> <i>Micrococcus luteus</i> - Dominant <i>Corynebacterium amycolatum/striatum</i>
	Gram -	
Room 2 For Infants aged three year 16 persons	Gram +	<i>Micrococcus luteus</i> - Dominant
	Gram -	
Room 3 For Infants aged three year 15 persons	Gram +	<i>Micrococcus luteus</i> - Dominant <i>Brevibacterium species</i> <i>Corynebacterium urealyticum</i>
	Gram -	CDC group EQ-2 - Dominant

一般保育園での結果は、保育園児の父母に医療関係者がいる A および C 保育園で、A 大学病院附属保育園に比べ、低率ながらも MRCNS が分離された。

Table 5 Results in C general preschool

About 5 % of parents is medical personnel

Room 1 For Infants aged three year 13 persons	Gram +	<i>Staphylococcus equorum</i> - MRCNS <i>Micrococcus luteus</i> <i>Kocuria varians</i> <i>Leifsonia aquatica</i>
	Gram -	<i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Ralstonia pickettii</i>
Room 2 For Infants aged two year 15 persons	Gram +	<i>Staphylococcus epidermidis</i> - MRCNS <i>Kocuria varians</i> <i>Micrococcus luteus</i> - Dominant
	Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Ochrobacterium anthropi</i> <i>Rhizobium radiobacter</i>
Room 1 For Infants aged one year 22 persons	Gram +	<i>Staphylococcus capitis ssp. capitis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
	Gram -	<i>Pasteurella aerogenes</i> <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus complex</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>

しかし父母に医療関係者がいない B 保育園ではブドウ球菌は分離されているが、すべてメチシリン感性株であった。この結果は、A 大学病院附属保育園での結果が、医療従事者の親から保育児を介した、あるいは親から直接病院内の MRCNS が保育園環境に持ち込まれた可能性を示唆している⁶⁾⁷⁾。また成績には示さないが、分離された MRCNS はすべて *mecA* を保有していた。

そこで次に、別の大学病院附属保育園を調査した。

3) B 大学附属保育園での菌種同定結果

結果を表 6 に示した。結果に示したように、B 大学病院附属保育園保育室空気中からは MRCNS がほとんど分離されなかった。A 大学病院附属保育園保育室空気中から高頻度に MRCNS が分離されたこと、あるいは医療従事者の父母がいる一般保育園で