

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K02087

研究課題名（和文）鉄道公共設備における感染症対策のための模擬ウイルス飛散・再付着挙動の基盤研究

研究課題名（英文）Basic research on dispersion and readhesion dynamics of bacteriophage for infectious disease control in public railway facilities

研究代表者

川崎 たまみ（Kawasaki, Tamami）

公益財団法人鉄道総合技術研究所・人間科学研究部・主任研究員

研究者番号：60426145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：感染症拡大時、病院の床面に落下したウイルスが、人の移動により空間に浮遊する可能性を示唆する報告があるが、医療機関とは利用形態や環境等が大きく異なる公共設備における、床面からの飛散等に関する報告例は少ない。そこで、一般的に使用される床材に対し、SARS-CoV-2、ファージ、及び細菌を塗布後、活性力や遺伝子を指標とした回収率を測定した結果、床材の種類により回収率が異なる知見を得た。また、ファージを塗布した床材に人の歩行のタイミングで錘を接触後、空間・壁面へ飛散及び床面に残存したファージを測定する試験系を構築し、試験を行った結果、微生物の回収率が低い床材にて、活性力が低い傾向がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

空間内ウイルスの伝播についてシミュレーションする際、床面から飛散したウイルスの濃度や活性力が影響を与えるとの認識はあるものの、現状では飛散率や飛散後の活性力等に関する報告例が少ないため、試算に含まれていない報告例がみられた。そのため、本研究により、弾性・硬性床材を対象とした、SARS-CoV-2、ファージ、細菌の活性力や遺伝子を指標として、床材からの飛散を考慮する上で重要となる微生物の回収率を実測できたことは意義深いと考える。加えて、床面からファージが飛散する試験系も構築したことにより、他のファージの飛散量や飛散後の活性力に影響を与える環境要因の探索が可能となった。

研究成果の概要（英文）： There are reports suggesting that during infectious disease outbreak, viruses that drop on hospital floors can be transmitted through the air as people move around. However, there are few reports regarding virus suspension from floors in public facilities whose usage patterns and environments are different from those of medical institutions. Therefore, recovery rates were measured using viability and gene dosage as indicators, after applying SARS-CoV-2, phage, and bacteria on surfaces of commonly used flooring materials. As a result, these recovery rates were different according to the type of flooring materials. Moreover, a test system was created to measure suspension in a space and adhesion of a wall in a test space of phage applied on flooring materials, after dropping a weight on flooring materials where phage was applied at the same time as a person walks. As a result, it was found that microbial viability of flooring materials showing low recovery rates tended to be lower.

研究分野：環境衛生

キーワード：環境衛生 感染症対策 ウイルス動態 床材 室内環境 空気質 ファージ 鉄道等の公共設備

1．研究開発当初の背景

感染症拡大時においては、各環境の実状を踏まえた上で、清掃等の対応方法を予め準備しておくことが、2次的感染を防ぐ上でも重要である。病院内にてウイルス飛沫が床面に落下後、人の移動に伴い床面からウイルスが再度空間中に浮遊する可能性を示唆する報告がある¹⁾。一方、医療機関とは利用形態や衛生環境等が大きく異なる公共設備については、床面からの再飛散等に関する知見は乏しく、対策の必要性、効果的・効率的な対策案について検討するためにはエビデンスの蓄積が望まれていた。

2．研究の目的

本研究では、鉄道をはじめとした公共設備等の床を対象とし、人の利用等を想定した動きに伴う床面からの模擬ウイルスの空間中への飛散、壁面への再付着、及び異なる床材に対する模擬ウイルスの残存等に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

3．研究の方法

3.1 床材の選定

公共設備等で一般的に使用されている床材の整理を行い、弾性床材としては、試験片 A、B(ともに抗菌、抗ウイルス加工有)、C(抗菌加工有)、硬性床材としては、花崗岩と試験片 D、E を本試験に使用する床材として選定した。試験片のサイズは、微生物回収試験では 5 cm 角、微生物飛散試験では 10 cm 角とした。なお、対照にはポリスチレン製シャーレを利用した。

3.2 本試験で使用した微生物

ウイルスには、新型コロナウイルス感染症の起因ウイルスである SARS-CoV-2 を選定した。本研究課題の計画に着手し始めた 2020 年に、バクテリオファージ φ6(以下、ファージ φ6)が SARS-CoV-2 の代替として使用された報告²⁾があったことから、ファージ φ6 を本研究における模擬ウイルス候補の一つとして検討することとした。また、環境中の床面には細菌も付着していると考えられることから、細菌にも着目し、一般環境から検出された報告がある *Acinetobacter* 属細菌を選定した³⁾。

3.3 床材試験片からの微生物回収試験(図 1)

床材試験片から空間への微生物の飛散挙動を把握するにあたり、各床材試験片の基本的な特性の一つとして、微生物に対する回収率の違いが、空間への飛散挙動へ影響を与えるのではないかと仮説を立てた。そこで、各床材試験片からの微生物の回収試験を行った。回収率については、対照(シャーレ)からの回収率の平均値を 100%とした換算値として算出した。また、各試験は 3 回ずつ繰り返し行った。

a) SARS-CoV-2 回収方法

試験は抗ウイルス試験法(ISO 21702, 2019)を改変して実施した。SARS-CoV-2 液 0.1mL を各試験片表面上に塗布し 4cm 角フィルムで覆った直後、試験片上からフィルムを取り除いた。そ

の後、スワブで試験片表面及びフィルム表面を拭き取った。拭き取り後のスワブは、培地の入ったチューブに回収し、SARS-CoV-2 回収液を得た。これらの SARS-CoV-2 回収液から 10 倍段階希釈液を作成し、宿主細胞 (Vero E6/TMPRSS2) へ接種し、37℃、3 日間培養後、50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID50) 法による感染価測定⁴⁾を行った。また、SARS-CoV-2 回収液から RNA を抽出し、SARS-CoV-2 の N 遺伝子に特異的なプライマーとプローブを用いて定量 PCR による SARS-CoV-2 粒子中 N 遺伝子量の測定を行った⁵⁾。

b) ファージ φ6 回収方法

ファージ φ6 についても a) SARS-CoV-2 回収方法に準じて、0.1 mL 塗布直後にスワブを用いた回収を行った。ただし、この試験では、塗布直後にフィルムで覆う工程は行わなかった。接種ファージ φ6 原液、及びファージ φ6 回収液について 10 倍段階希釈液を作成し、宿主細菌 (*Pseudomonas syringae*) と混合し、25 ± 1℃、24 時間培養後発生したプラーク数を数えて、それぞれ感染価を測定し、回収率を求めた。

c) *Acinetobacter* 属細菌回収方法

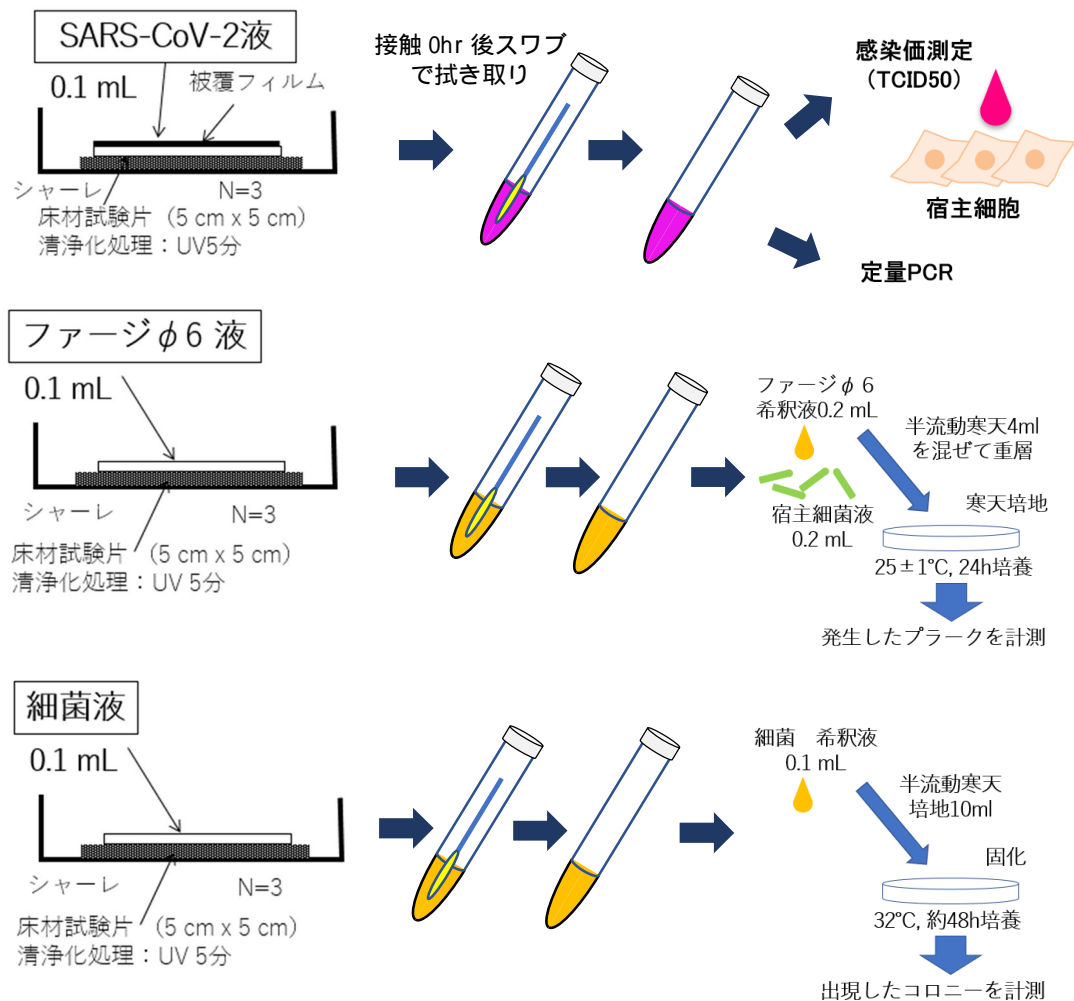


図1 SARS-CoV-2、ファージ φ6 及び細菌を用いた回収試験のフロー図

試験は抗菌性試験法 JIS Z2801 (2010) を改変して実施した。各試験片表面に *Acinetobacter* 属細菌液を 0.1 mL 塗布した直後、スワブを用いて表面を拭き取った。拭き取り後のスワブは培地の入ったチューブに入れ、細菌回収液とした。細菌回収液の 10 倍段階希釈液を作成し、希釈液 0.1 mL と標準寒天培地を混合後、 $32 \pm 5\%$ RH にて約 48 時間培養後、出現したコロニー数を計測し、接種細菌原液のコロニー数から、細菌生菌回収率を求めた。

3.4 ファージ $\phi 6$ の空間内飛散及び再付着試験系の構築 (図 2)

3.3 の試験結果 (4.1 参照) から、微生物の回収率が低かった弾性床材試験片 B と花崗岩、比較的回収率の高かった弾性床材試験片 C を、ファージ $\phi 6$ を用いた飛散試験に選定した。容器内に 10 cm 角の床材試験片を設置後、試験片上に円筒を設置した。床材試験片中央部に設けた 5 cm 角の領域内に、ファージ $\phi 6$ 液 0.4 mL をピペットを用いて均一に塗布した。塗布直後、円筒空間内にて床材試験片上に人の歩行を模擬したタイミングで錘を一定時間落下接触させ、壁面および空間へ飛散したファージ $\phi 6$ の感染価と遺伝子量の測定により、飛散・再付着挙動を評価する基礎的な試験系を構築した (図 2)。

a) 円筒内壁面へ再付着したファージ $\phi 6$ の回収方法

円筒内壁面の床材試験片表面からの高さ 0-10 cm、10-20 cm 位置に対し、試験片表面から飛散し壁面に付着したファージ液滴をスワブにて拭き取った後、培地の入ったチューブへ入れ、ファージ $\phi 6$ 回収液とした。各ファージ $\phi 6$ 回収液は、感染価測定及び遺伝子量測定に使用した。

b) 円筒内の空間に浮遊したファージ $\phi 6$ の回収方法

シリコンチューブを接続したホルダーにゼラチンフィルターをセットし、チューブ先端が試験片表面から 10 cm の高さ位置になるよう固定した。ホルダー上部にシリコンチューブを介して吸引ポンプへ接続し、試験時間内に円筒内の空気を吸引した。試験終了後、ゼラチンフィルターは、培養液の入ったシャーレに移し、 37°C で加温溶解後チューブへ移し、ファージ $\phi 6$ 回収液を得た。各ファージ $\phi 6$ 回収液は、感染価測定及び遺伝子量測定に使用した。

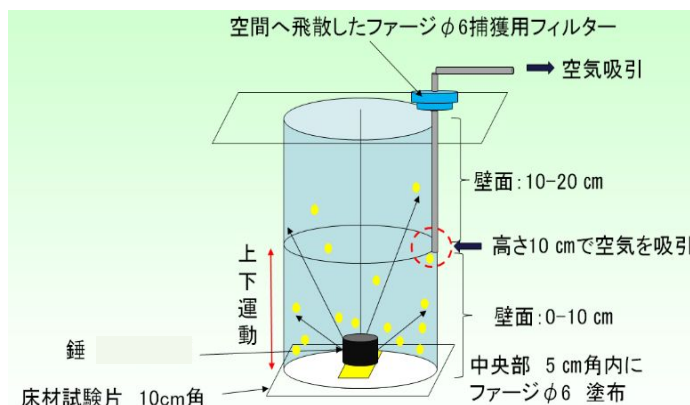


図 2 ファージ $\phi 6$ を用いた飛散試験のイメージ図

c) ファージ $\phi 6$ の感染価及び遺伝子量測定

ファージ $\phi 6$ 回収液に対し、宿主細菌に対するブランク数計測により感染価を測定した。一方、ファージ $\phi 6$ 回収液から RNA を抽出後、ファージ $\phi 6$ の *phi-6S_1* 遺伝子に特異的なプライマーとプロブを用いて、定量 PCR 法によりファージ $\phi 6$ 粒子中 *phi-6S_1* 遺伝子量⁶⁾の測定を行った。

4 . 研究の成果

4.1 床材試験片からの SARS-CoV-2、ファージ $\phi 6$ 、細菌の回収率

弾性床材試験片に対する、SARS-CoV-2 の感染価を指標とした回収率（感染価回収率）及び遺伝子回収率は、試験片 B にて他の 2 試験片と比べて低かった。ファージ $\phi 6$ 活性回収率及び細菌生菌回収率も、試験片 B にて低い傾向が見られた。一方、硬性床材試験片に対する SARS-CoV-2 感染価回収率及び SARS-CoV-2 遺伝子回収率は、ともに花崗岩で低い傾向がみられた。これらの結果から、各微生物の回収率は試験片によって異なることが分かった。なお、6 種類の試験片に対する SARS-CoV-2 感染価回収率と SARS-CoV-2 遺伝子回収率では、高い相関が確認された。

4.2 ファージ $\phi 6$ を用いた飛散試験結果

3種類の床材試験片に対する試験の結果、飛散後、壁面へ付着及び床材試験片上へ残存したファージ $\phi 6$ の、(1) 遺伝子の検出傾向は、床材による顕著な違いは無く、(2) 感染価は、回収率が低い床材試験片にてより低い、又は不検出となる傾向がみられた。一方、全ての試験片において、空間からは、遺伝子は検出されたが感染価は不検出であった。これらのことから、本試験系条件下では、ファージ $\phi 6$ が試験片表面から空間へ飛散すると感染価が下がる傾向があることが考えられた。

本研究課題の遂行により、床材試験片からの微生物回収率が、微生物の飛散・再付着挙動を考察する際の重要な知見であることが分かった。今後、複数微生物の混在、異なる環境条件下にて、微生物の空間中の飛散、再付着に関する知見を収集する予定である。

（細菌・ファージ $\phi 6$ 試験担当：川崎、吉江、SARS-CoV-2 試験担当：嶋崎）

参考文献

- 1) Guo ZD, *et al.* Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul;26(7):1583-1591. doi: 10.3201/eid2607.200885. Epub 2020 Jun 21. PMID: 32275497; PMCID: PMC7323510.
- 2) Fedorenko A, *et al.* Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. *Sci Rep.* 2020 Dec 29;10(1):22419. doi: 10.1038/s41598-020-79625-z. PMID: 33376251; PMCID: PMC7772334.
- 3) Wu Z, *et al.* Comparative effects of environmental factors on bacterial communities in two types of indoor dust: Potential risks to university students. *Environ Res.* 2022 Jan;203:111869. doi: 10.1016/j.envres.2021.111869. Epub 2021 Aug 17. PMID: 34411549.
- 4) Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity. *Virolog Sin.* 2021 Feb;36(1):141-144. doi: 10.1007/s12250-020-00230-5. Epub 2020 May 26. PMID: 32458296; PMCID: PMC7973348.
- 5) Shirato K, *et al.* Development of Genetic Diagnostic Methods for Detection for Novel Coronavirus 2019(nCoV-2019) in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2020 Jul 22;73(4):304-307. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.061. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32074516.
- 6) Gendron L, *et al.* Evaluation of Filters for the Sampling and Quantification of RNA Phage Aerosols. *Aerosol Science and Technology*, 44 (10), 893–901, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川崎たまみ、吉江幸子、京谷隆、潮木知良、嶋崎典子
2. 発表標題 公共設備等で使用される硬性床材からの微生物の回収特性の基礎的検討
3. 学会等名 2022年室内環境学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎たまみ、吉江幸子、京谷隆、潮木知良、嶋崎典子
2. 発表標題 公共設備等で使用される床材からの細菌及びウイルスの回収特性の基礎的検討
3. 学会等名 第30回日本臨床環境医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎たまみ、吉江幸子、京谷隆、潮木知良、嶋崎典子
2. 発表標題 公共設備等で使用される弾性・硬性床材からのバクテリオファージ 6の回収特性
3. 学会等名 第31回日本臨床環境医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嶋崎典子、吉江幸子、川崎たまみ
2. 発表標題 公共設備等で使用される床材（弾性、硬性）からのウイルス回収特性
3. 学会等名 2023年室内環境学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	嶋崎 典子 (Shimasaki Noriko) (80466193)	国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官 (82603)	
研究 分担者	吉江 幸子 (Yoshie Sachiko) (20386626)	公益財団法人鉄道総合技術研究所・人間科学研究部・主任研究員 (82658)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	京谷 隆 (Kyotani Takashi)		
研究 協力者	潮木 知良 (Ushiogi Tomoyoshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------