

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02277

研究課題名(和文) 環境マイクロバイオームの動態計測に基づく集団感染機構の解明と制御

研究課題名(英文) Elucidation and control of outbreak mechanism based on dynamic microbiome measurement

研究代表者

加藤 信介 (Kato, Shinsuke)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：00142240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、集団内での病原物質のミクロな伝搬機構を明らかにし、建築公衆衛生の観点から、その伝搬を制御し感染防止に役立てることを目的としている。そのため、室内環境並びに人由来の微生物叢(Micro-Biome、マイクロバイオーム)の全遺伝子を直接解析し、病原物質の不活化の過程も考慮してその伝搬を解析し、人の行動観察により、人の接触による病原物質の伝搬可能性を解析し、人の行動シミュレーションにより具体的に病原物質の伝搬を予測する手法を開発する。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify micro propagation mechanism of pathogenic substances within a group and control its propagation from the viewpoint of building public health and use it for prevention of infection. For that reason, we analyzed the propagation by directly analyzing all genes of the microbial flora (Micro-Biome, microbiome), indoor environment and human origin, analyzing its propagation considering the process of inactivation of pathogenic substances, Analyze the possibility of propagation of pathogenic substances by human contact, and (3) develop a method to predict the propagation of pathogenic substances specifically by human behavior simulation.

研究分野：建築環境工学

キーワード：建築環境・設備 空気環境 建築公衆衛生 マイクロバイオーム 集団感染 遺伝子解析 行動観察 エージェントシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

人々の活動範囲がグローバル化するとともに、密度の高い都市居住が加速することで、インフルエンザなど、様々な感染症が都市の中で急速に拡大する事態、パンデミックが懸念されている。

(1) 建物環境下での感染原因病原体観察は困難： 感染原因物質である環境中のウイルスや細菌を個別に時間差なく観察することは難しい。細菌であれば採取したサンプルを培養し、形成されたコロニーから菌種や菌数が解析されるが、培養が難しいためにこうした手法が取れない細菌もある。またウイルスは培養できないため、ウイルスに感染させた細胞培養の変化から解析する等、より間接的な同定手法となり、速やかな解析は難しい。培養に頼らずリアルタイムで病原菌やウイルスの種類と量が解析できれば、環境中で感染症拡大のリアルタイムのモニタリングが可能となり、感染防止対策が一変されるものとなる。

(2) 感染経路観察には人の挙動調査が不可欠： 病原物質の伝播は、病原物質を含むエアロゾルの伝播で生じる空気感染や飛沫感染より、人の手掌とドアノブなど室内の建具や家具表面などとの接触を介する接触感染が多いと言う。このような接触感染を具体的に評価するには、人が建物の中でどのように行動するかを知る必要がある。接触感染の防止のためには手洗いが励行されているが、工学的には手洗いによるリスク低減効果が具体的に数値で評価されることが望まれる。飛沫感染に関しては、口と鼻を覆うマスクが感染防止策として期待されるが、その効果については定性的な評価に留まり、個別の感染者側、非感染者側のそれぞれでの伝播確率の低減効果が、定量的に調査、整理された例は少ない。人の行動シミュレーションが、人の移動だけでなく、接触に関しても検討することができれば、感染伝播の可能性を建物や用途の個別性を考慮して、具体的に評価することが可能になる。行動シミュレーションの基礎となる人の行動観察記録を整理し、感染伝播の可能性を具体的に評価する技術が求められている。

2. 研究の目的

本研究は、個別性の高い建築に適用可能なシミュレーションに基づく感染リスクの評価システム開発の基礎となることを目的とする。

(1) 感染原因物質をマイクロバイーム解析から直接評価： 感染は、病原性を持つ細菌やウイルスなどにより引き起こされるが、このような病原物質を細菌やウイルス単位で特定しなくとも、その細菌やウイルスの標識とその量（強度）を特定できれば、原因物質の伝播経路を探るには十分役立つ。この有力な標識候補は、その遺伝子である。病原性を持つものも含め、環境中の微生物は様々な種が互に関係性を持つ微生物叢（マイクロバイーム）をなして

いる。環境中のマイクロバイームを採取し、その特性を遺伝子分析などで解析できれば、病原菌やウイルスを分離しなくともその病原性、感染リスクは評価可能である。

本研究では、集団内での感染症拡大に着目し、その原因物質の伝搬性状をマイクロバイーム解析を利用して分析し、建物内での感染リスクを評価し、これを制御することを目的とする。

(2) マイクロバイームを利用する人から室内環境に放散される病原物質のトレース： 本研究では、空気感染や接触感染による病原物質の伝播の性状を、被験者となる人や室内環境中のマイクロバイームの解析より行う。

(3) 人の行動観察： 人は室内で様々な行動する。接触感染、空気感染に関連する行動をどの様な頻度でどのように行うかを観察する。例えば接触感染に着目した検討の場合は、建具や家具などへの接触行動に関して、その発生頻度、発生間隔、継続時間などを記録し、統計的に整理する。

(4) 人の行動シミュレーションによる病原物質伝播の予測： コンピューターを用いて、人の行動を再現するシミュレーション手法により、人から放散される病原物質の室内での伝播性状を解析する。行動シミュレーションの基礎となる人の振る舞いの基本データは、人の行動観察より得る。

3. 研究の方法

研究は、①室内環境や人体に存在する微生物叢（マイクロバイーム）の信頼性を確保した解析手順を確立し、②特定の個人スペースにおいて、被験者の口腔中や手掌表面のマイクロバイームと、被験者周辺空气中、スペース内の家具や取手等の表面のマイクロバイームの相関から、被験者から放散伝播される微生物叢が周辺に与える影響および伝搬性状を調べ、③接触感染につながる被験者の単位時間内の行動を統計的に安定となる程度、観察、集計し、④既存の人流シミュレーション手法に、人の行動観察データ、人のマイクロバイームの周辺への伝播性状の統計値を反映し、感染拡大のシミュレーションを可能にし、⑤このシミュレーションの信頼性を観測データに基づき検証し、⑥実際の建築でのデモを行う。

4. 研究成果(文献1,2参照)

(1) 環境マイクロバイームの評価

1) サンプル採取対象

大学研究室所属の男子学生12名の手、口腔内、作業デスク及び作業空間の空気サンプル、出入り口のドアノブ（2箇所）についてサンプリングを行った。被験者のサンプリングについては、日ごとのサンプル採取時間、場所の偏りをなくするためにサンプリングの順番はランダムに行った。

拭取りの採取時間については食事の影響を

考慮して14時から採取を開始した。空気サンプルは1日の平均的な性状を把握するため執務時間である9時～17時の8時間、SKC社のAir Sampling Pump Air-Check:XR5000を使用し、5 L/minの体積流量にてサンプリングを行った。

拭取りサンプルに使用したスワブはB社、空気サンプルについてはPTFE 0.3 Filterを使用した。2) サンプル採取数、濃度確認

サンプル数は159サンプルで、すべてのサンプルについて解析を行う。DNA抽出法はこれまでと同様で、抽出したDNAについて次世代シーケンサーによる解析が可能かどうか判断するためQubit®3.0フルオロメーターによるDNA濃度測定を行った。その結果、多くのサンプルについてサンプル濃度がLow（検出限界以下）となり、現状のサンプル濃度では解析が難しいことが分かった。よってサンプルの混合を行いエタノール沈殿後DNAフリー水にて溶解しDNA濃度を高める操作を試みた。

3) エタノール沈殿によるサンプル濃度の確保

サンプルの濃度が低いものについてエタノール沈殿を行ったため、室温での放置を1日と長時間放置した。また、濃度を高めるため最後のペレットを溶解する際にはDNAフリー水を30 µl加えた。これによりDNA濃度が上昇したかどうかの確認を行うため再度QubitによるDNA濃度の解析を行った。その結果エタノール沈殿後のDNA濃度は変化がない、または減少してしまった。DNA濃度が低いサンプルはエタノール沈殿が困難であったため十分量の濃度が確保できなかった。よって解析を行うためにPCRのサイクル数を増やしDNAを増幅させた。

4) PCR条件

サンプル混合後の36サンプルについてNested PCRによりDNAの増幅を行った。

5) 解析結果

i) 菌組成比

使用した菌叢解析用パイプライン : QIIME (ver 1.9.0) は現状属レベルまでの解析に限

界であるため、属レベルまでの解析結果を図1に示す。この中で各サンプルに高い割合で検出されたものは6種類であった。(サンプルIDについて ; ○-△, ○=被験者ナンバー、△=1:手, 2:机, 3:口腔)

- ① Staphylococcus (ブドウ球菌属)
- ② Streptococcus (レンサ球菌属)
- ③ Corynebacterium (コリネバクテリウム属)
- ④ Lactobacillus (ラクトバチルス属)
- ⑤ Enhydrobacter (エンヒドロバクター属)
- ⑥ Propionibacterium (プロピオニバクテリウム属)

これらの菌はヒト由来のもので、環境マイクロバイオームの主な構成であることが確かめられた。その他に検出された菌の由来を被験者ID 2のデスクを例に推測する。作業デスクに付着していた菌の属数は65種で、その中でID 2の手、口から検出された共通の菌は47種、手のみ検出されたものは1種、口のみ検出されたものは7種、どちらからも検出されなかったものは10種であった。この10種について、作業デスクの被験者由来ではないと考えられ、他の検体からどの程度検出されたのかを表1に示す。10種の菌の内、多くは土壌、ヒト腸内から検出されるものであり、他の被験者の手から多く検出されていることから、これらの菌を保有する被験者がID 2のデスクに触れ、菌が伝搬していることが推測される。

表1 作業デスクへの菌伝搬予測

<i>Actinobaculum</i>	3	3	1	7	不明
<i>Prevotella</i>	6	5	7	13	歯
<i>Rubrobacter</i>	4	1	1	6	温泉、汚染水
<i>Williamsia</i>	0	1	0	1	不明
<i>Lachnospira</i>	6	2	2	10	ヒト腸内
<i>Brevundimonas</i>	8	6	5	19	淡水、土壌
[<i>Ruminococcus</i>]	2	2	0	4	ヒト腸内
<i>Pantoea</i>	7	8	5	20	腸内、土壌
<i>Campylobacter</i>	2	3	4	9	家禽類腸内、ヒト口腔
<i>Hydrogenophaga</i>	0	1	0	1	汚水、土壌
合計	38	27	25	90	

ii) 主座標解析

Unifrac距離をもとに環境マイクロバイオームの菌叢について主座標解析を行い、ヒト

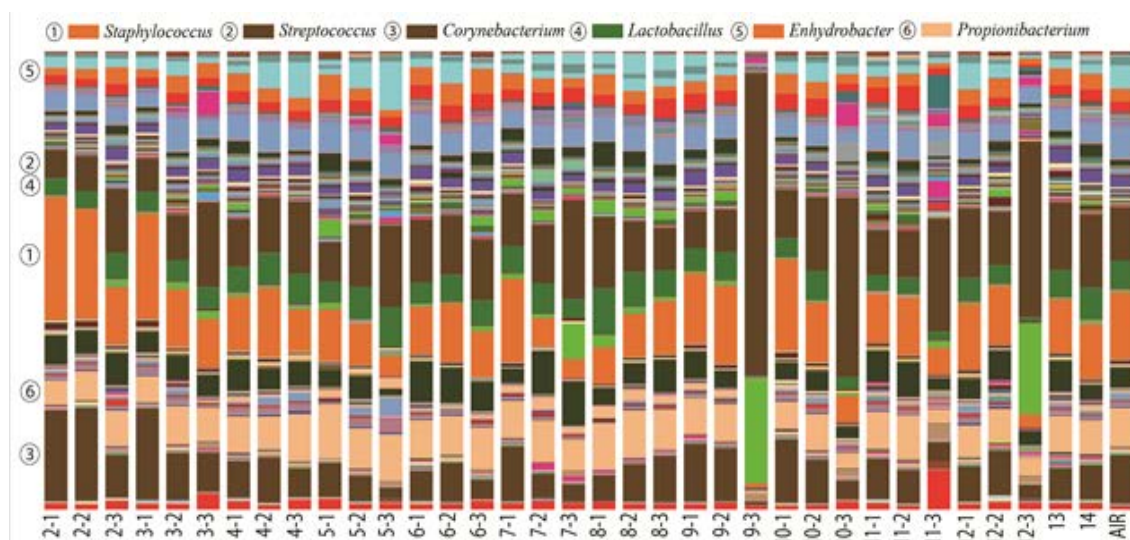


図1 環境マイクロバイオームの菌組成グラフ

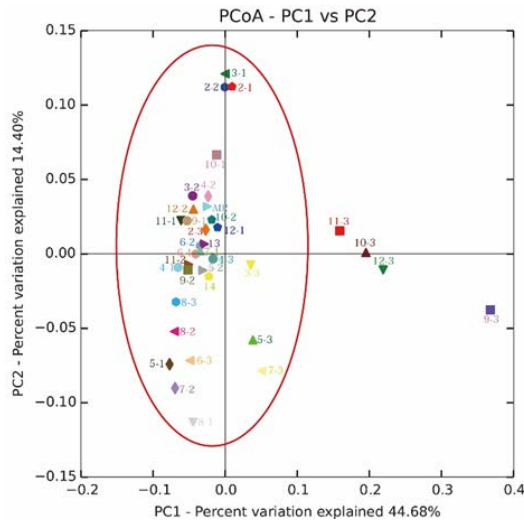


図2 主座標解析結果一例

と環境中の関係性について把握した。主座標解析の一例を図2に示す。

図2より、各被験者の手、作業デスクの菌組成及び菌種は高い類似性が認められ、中でもID2, 3, 6, 9, 10, 11, 12の計7名のサンプルが際立っている。これにより作業デスクに付着している菌はそのデスク作業者の手に由来していることが分かる。口腔内サンプルが離れた場所に位置していることから会話が少ない、あるいは会話などの日常行動による口腔内からの菌の飛散は少ないと考えられる。一方で飛散した菌がデスクに付着した後、衣類や手によって即座に除去されている可能性もある。

5) 環境マイクロバイーム解析のまとめ

環境マイクロバイームのサンプリング手法の検討及び遺伝子解析による菌組成、ヒトマイクロバイームとの関係を把握した。

サンプリング手法について、特定のスワブを用いてサンプリング箇所に対して3回のふき取りを行うことで80%程度の回収率が得られることが分かった。

環境マイクロバイームについて、その構成はヒト由来の常在菌が大半を占めており、作業デスクに対しての菌の伝搬は口腔内からよりも手からの伝搬が優位であり、ドアノブとサンプルの類似性が高いことから他者への菌が示唆された。また、検出された菌が土壌、ヒト腸内から分離されるものが多いことから手洗い不足が予想された。

(2) 手掌からの菌採取率

手掌から菌採取率、また手掌から他の物体表面への菌転写率の検討は、定量的評価が必要なため、環境由来のマイクロバイームを使用せず、実験は予め菌数を把握している乳酸菌の水溶液を用いて、検討している。

1) 実験手法

被験者に対し実験概要の説明及び同意を得た上で、成人学生10名(男性8名、女性2名)を対象に大学研究室実験室にて実験を

行った。その後、両手の手掌に100倍に希釈した乳酸菌飲料を片手につき $25\mu\text{l}$ を2滴合計 $100\mu\text{l}$ 滴下した後、両手をこすり合わせて万遍なく広げてもらい、クリーンチャンバー内で5分間乾燥させた。その後、サンプル採取用のスワブを用いて隙間なく手のひらをふき取った。実験は再現性の確認のために3セット行っている。

2) 実験結果

菌の採取率は、試料塗布後の乾燥時間により大きく異なり、塗布後1分での採取率は平均8%前後になるが、乾燥時間が長くなると、1%以下に落ちる。5分乾燥後の平均の菌取得率値は0.67%、変動係数は0.63であった。B、Cの採取率にばらつきが見られたが被験者間でのばらつき(CV: 0.61)の方が回数間でのばらつき(CV: 0.28)よりも大きかった。なお、被験者の手掌の面積が採取率に与える寄与率は少なく、ばらつきの主因は他にあるものと考察することが出来る。次に手掌表面の状態(水分量)が採取率に及ぼす影響について検証するためにラテックス手袋装着状態で湿潤状態と乾燥状態での採取率の検討を行った。乾燥時の採取率の平均値は、ラテックス手袋装着時(乾燥)のほうが素手よりも減少し個人差も小さくなること、ラテックス手袋装着時において乾燥状態と湿潤状態の平均採取菌数は200倍ほどの差が出る。これらの結果から、手掌表面の水分が採取率に大きく影響することが知れる。

(3) 菌転写率

1) 実験概要

三種類の素材(フロートガラス、すりガラス、メラミン化粧板)と手掌間の菌転写率を求める実験を行う。なお、これらの実験は全て本研究室実験室で行った。実験前に手洗い石鹸と希釈した逆性石鹸を用いて被験者の手掌と各素材の殺菌を行っている。

素材から手掌への転写率は、素材表面へ真空式スプレーで10倍希釈の乳酸菌を $100\mu\text{l}$ 散布、7分半の乾燥を行った後、0.5kgfで5秒間素材と手を接触させ、その後速やかにサンプル採取用スワブによりふき取りを行っている。手掌から素材への転写率は、手掌に10倍希釈の乳酸菌を同様に $100\mu\text{l}$ 滴下し、その後5分間乾燥させる。乾燥後、素材に0.5kgfで5秒間接触させ、その後素材を隙間なく縦横3回ずつ拭き取りを行った。

2) 実験結果

菌の転写率は素材によって異なる。フロートガラスとメラミン化粧板の表面はほぼ平滑であるが、転写率は、手掌から物体表面へ、物体表面から手掌へのいずれも10%程度であるが、表面に凹凸があるすりガラスでは、手掌から物体表面の場合で50%前後、物体表面から手掌でも30%前後に上昇する。転写率は表面凹凸の影響を大きく受ける可能性を示すとともに、表面が平滑な物体では、転写率がそれほど大きくならないことが示された。これは、実環境においても建具等の表面の凹凸によって感染リスクが異なることを示唆する

ものと考えられる。

(4) 人の行動観察

本研究では、まずはデスク作業における被験者の行動を観察した。単位時間内での、被験者の物質表面と手指、手指と顔面との接触回数を把握する。

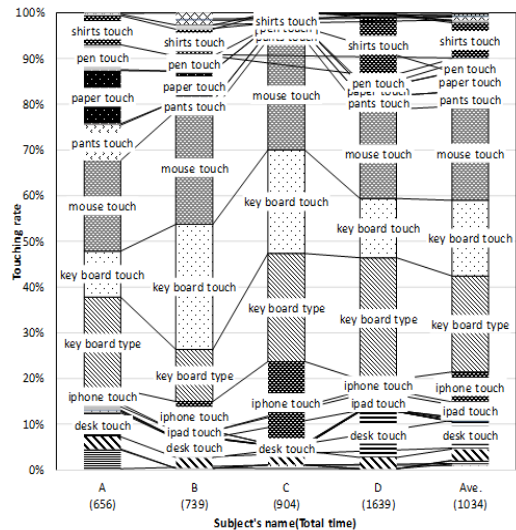


図3 被験者の単位時間接触回数

1) 実測概要

大学研究室における大学院生用のデスクで実測を行った。被験者は、日常研究室デスクを利用している学生4名(全て男性)とし、デスク横の仕切りの上設置したビデオカメラによりコアタイム(10:00~17:00)の間連続撮影を行う。なお、被験者には、普段通りの行動をとってもらった。その後ビデオデータを確認し、予め決めた項目に該当する時間と回数を集計した。

2) 実測結果

図3に接触対象別の接触行動の回数を示す。被験者名の下に数字は合計接触回数を示す。この結果から、被験者により若干のばらつきがあるものの事務所作業においては、回数割合で58.09%、時間割合で52.57%とキーボードとマウスへの接触割合が高い。

顔面接触行動に関しては粘膜部の中でも鼻への接触が多く、全顔面接触回数に対して平均約40%を占める。また、個人差はあるものの、被験者A以外の被験者は鼻、非粘膜、口の順で接触回数が多く、目への接触はあまり見られない。

(5) 接触感染シミュレーション

間接触感染シミュレーションの作成を行う。最小発症菌数を1とし、来院時に感染者が1、非感染者が0を保有していると設定する。各診察室の扉が感染媒体となり、エージェント-扉間の転写率は本研究で得られた3種類の素材の値とし、各転写率において診療時間内の消毒回数を変えたときのエージェントの保有菌数の変化を求める。

本シミュレーションでは、消毒を1回行うと全ての扉に付着している菌が完全に殺菌される設定とした。この結果から、感染リ

スクは感染媒体となる物質の転写率に応じて大きく異なることが示された。また、感染媒体の消毒頻度の増加に比例して保有菌数の増加量が減少すること、すなわち接触感染リスクが減少することが示された。

<引用文献>

①高橋雄大、室内感染対策に資する環境マイクロバイオームの動態計測、東京大学大学院建築学専攻、2016年度 修士論文梗概集、2017

②長谷部花奈、遺伝子解析技術を用いた接触感染リスクの定量的評価手法に関する研究、東京大学大学院建築学専攻、2017年度 修士論文梗概集、2018

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

①柳宇、加藤信介、永野秀明、病院待合室における細菌叢の実態、Jpn J Clin. Ecol.、査読無、25巻、2016、82-87

②柳宇、環境マイクロバイオーム、空気清浄、査読無、Vol. 153、2016、pp. 1550-1553、

[学会発表] (計15件)

①柳宇、加藤信介、永野秀明、外気中の微生物による室内への影響 生菌からマイクロバイオームまで、日本建築学会大会、2016

②光岡真知子、柳宇、藤井結那、永野秀明、加藤信介、病院待合室におけるマイクロバイオームの実態に関する調査研究 第一報室内屋外の細菌叢、日本建築学会大会、2016

③藤井結那、柳宇、永野秀明、井田寛、加藤信介、病院待合室におけるマイクロバイオームの実態に関する調査研究 第二報細菌叢の解析結果、日本建築学会、2016

④井沢圭、柳宇、永野秀明、鍵直樹、大澤元毅、金勲、東堅一、加藤信介、オフィスビルにおけるマイクロバイオームの実態解明に関する研究 第二報室内・屋外細菌叢の比較、日本建築学会大会、2016

⑤畑中未来、柳宇、永野秀明、加藤信介、教室におけるマイクロバイオームの実態に関する調査研究 第一報秋季における大学教室の環境測定結果、日本建築学会大会、2016

⑥高橋雄大、加藤信介、柳宇、永野秀明、環境マイクロバイオーム性状及び日変動の把握、日本建築学会大会、2016

⑦加藤信介、柳宇、永野秀明、建築環境における呼吸器系病原体モニタリング法の確立に関する研究 その1、日本建築学会大会、2017

⑧柳宇、加藤信介、永野秀明、建築環境における呼吸器系病原体モニタリング法の確立に関する研究 その2、日本建築学会大会、2017

⑨長谷部花奈、加藤信介、柳宇、永野秀明、遺伝子解析技術を用いる接触感染リスクの定量的評価手法の開発 手のひらからの細菌採取率と手のひらと固体表面の接触による細菌伝搬率の検討、日本建築学会大会、2017

⑩瀬戸啓太、柳宇、他、オフィスビルにおけるマイクロバイオームの実態の解明に関する研究 第三報 冬季と夏季における細菌叢の比較、日本建築学会大会、2017

⑪高橋雄大、加藤信介、他、大学研究室における人と室内環境のマイクロバイオームの変動特性の検討、日本建築学会大会、2017年

⑫長谷部花奈、他、Establishing quantitative evaluation method of contact infection risk using qPCR method: Difference of bacteria collection rate depends on the moisture condition、空気調和・衛生工学会大会、2017

⑬畑中未来、他、学校環境におけるマイクロバイオームの実態に関する調査研究 第二報 秋季における細菌叢と室内環境の関連性、空気調和・衛生工学会大会、2017

⑭瀬戸啓太、他、オフィスビルにおけるマイクロバイオームの実態の解明に関する研究 第四報、2016年の調査における中央空調方式と個別空調方式の比較、空気調和・衛生工学会大会、2017

⑮光岡眞千子、他、医療施設におけるマイクロバイオームの実態の解明に関する研究 第二報 諸環境とのマイクロバイオームの比較、空気調和・衛生工学会大会、2017年

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://venus.iis.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤信介 (KATO, Shinsuke)

東京大学生産技術研究所・教授研究者

番号：00142240

(2) 研究分担者

柳宇 (YANAGI, U)

工学院大学建築学部・教授

研究者番号：50370945

永野秀明 (NAGANO, Hideaki)

東京都市大学工学部・講師

研究者番号：50610044

(3) 研究協力者 (0)