

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K04826

研究課題名（和文）インフルエンザウイルスの室内環境における伝播動態の解明に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental research on transmission dynamics of influenza virus in indoor environment

研究代表者

嶋崎 典子（Shimasaki, Noriko）

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：80466193

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）：本研究は、呼吸器系ウイルスの室内感染伝播動態の解明に向けた基盤研究である。影響因子として居住者の保有抗体価を1年間モニターしながら、ブレイクスルー感染の実態把握を行ったところ、COVID-19では流行株に対するワクチン抗体価が減弱し、25%の人にブレイクスルー感染が発生し、感染推定場所は自宅、同居家族からというケースが多かった。一方、インフルエンザは流行株に対してワクチン抗体価がほぼ減弱せず、ブレイクスルー感染は起こらなかった。模擬実験により、温湿度の室内環境因子によるウイルス感染価の変化を検証し、ウイルスモデル粒子のエアロゾル作出実験を行い、チャンパー内拡散動態を調べられる実験系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回100人規模の調査で、マスクや手指衛生への重要視など個人意識に関係なく、宿主の抗体価低減がCOVID-19の室内伝播感染を起こす一因であることが示唆され、ブレイクスルー感染に関する実態把握ができたことは意義深い。一方で、感染場所や経路が不明なケースも多かったことから、室内における感染源伝播動態を解明することは引き続いての課題であり、本研究で構築したウイルスモデル粒子のエアロゾル実験系によって、様々な建築材料で囲まれた空間内における、感染源の浮遊特性や付着特性が評価できるようになった。ウイルス感染性に影響を与える室内環境因子も評価できた。

研究成果の概要（英文）：We conducted fundamental research to elucidate the dynamics of indoor transmission of respiratory viruses. We had monitored for a year the antibody titers of participants as an influencing factor to understand the actual situation of breakthrough infection. We found that 25% of people had breakthrough infections with COVID-19, in which the antibody titers induced by the vaccine were weakened against the epidemic strain, and in many cases it was suspected that the infection occurred at home and from the family members. On the other hand, influenza vaccine antibody titers reacted against the epidemic strain, and no breakthrough infections occurred with influenza. We verified the change of viral infectivity by indoor environmental factors such as temperature and humidity through simulated experiments and performed an aerosol experiment of generating virus model particles to investigate the diffusion dynamics of the model particles in the chamber.

研究分野：感染制御

キーワード：インフルエンザ COVID-19 ウイルス変異 中和抗体 ウイルス伝播 エアロゾル

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、毎年約 1200 万人が感染する国内最大の感染症であり、病院や介護施設など公共建築物内での集団発生も毎年報告されている。病院や介護施設では、感染対策として、ワクチン接種や手洗いなどの手指衛生を実施するものの、施設内感染を防ぐことが出来ていない。インフルエンザ感染は、接触感染・飛沫感染・空気感染と多様な状態で起こるが、共通機序は、インフルエンザ罹患者の呼吸器から発生するインフルエンザウイルスが、室内環境下を様々な状態で伝播して、各人の免疫抗体を超えた感染閾値量で人体内に入ることである。従って、感染対策として、各人の免疫に基づく閾値量を超えない程度にウイルス曝露量を低減するために、室内環境におけるウイルスの伝播動態について理解を深めることは重要である。

2. 研究の目的

当初はインフルエンザウイルスを研究対象としていたが、2020 年から世界的に新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が大流行し、一方でインフルエンザが殆ど流行しない状況になってしまったため、新型コロナウイルスも研究の対象に含めることにした。

本研究は、病室等の室内環境における、インフルエンザや新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のウイルス伝播動態の解明に向けた基盤研究を行うことを目的とする。

COVID-19 については、2021 年 10 月の時点で国民の約 8 割が 2 回目ワクチン接種を終え、中和抗体を持つと思われる人が多数を占める環境であったが、遺伝子変異による抗原性が変化した株（デルタ株やオミクロン株）の出現により、ワクチン効果の減弱が懸念されるようになった。ワクチンを接種した者が感染することをブレイクスルー感染というが、変異ウイルスの影響はインフルエンザでも絶えず問題になっており、ワクチンで誘導された抗体の変異ウイルスに対する中和能が不足となることで、ウイルス感染を阻止できなくなると考えられている。そこで、ウイルスの感染伝播に影響を与えそうな因子として宿主の保有抗体量に着目し、本研究では、国内複数施設のワクチン接種した健常成人について、ワクチン株と変異株に対する中和抗体価をモニターしながら、ブレイクスルー感染の有無を調べ、実態把握を試みた。

また、本研究では、環境工学的な視点から、室内環境因子によるウイルスの感染性変化の影響を検証した。また、呼吸器ウイルスの室内環境下における伝播動態をトレースするモデル粒子を作出し、実環境でのインフルエンザウイルスの伝播事例を実験的にシミュレーションし、模擬的にウイルス動態を調べることが可能な実験系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) ブレイクスルー感染に関する実態把握¹⁾

国内 3 施設に勤務する健常成人で、COVID-19 ワクチンを 2 回以上またはインフルエンザワクチンを 1 回以上接種した、任意の研究参加者約 100 人を対象とした。2022 年 3 月～2023 年 3 月に、ブレイクスルー感染した参加者から、任意で状況報告して頂き、任意で提供された唾液、鼻水、血清の検体について、次世代シーケンサーによるウイルスゲノム解析やバリエーションに対する中和抗体価測定を行った。研究期間中は、参加者の血清を約 4 ヶ月おきに収集し、ワクチン株と流行株に対する抗体価をモニターした。但しワクチン接種時期は個人によって異なる。COVID-19 抗体価は、VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた中和法によって、インフルエンザ抗体価は SIAT 細胞と抗 NP 抗体を用いた中和 ELISA 法で測定した。また、参加者の感染対策行動を推定するために、感染対策に関する意識調査アンケートを実施した。なお、インフルエンザについては、研究期間中にブレイクスルー感染が起らなかったため、過去に発生したブレイクスルー感染の検体等を分析した。検体の採取や解析を進めるにあたっては、所属機関のヒト倫理審査の承認を得て実施した。

(2) 模擬実験で使用したウイルスと感染価測定および遺伝子量測定

インフルエンザウイルスは、A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株を発育鶏卵に接種して培養し、実験に用いた。PR8 株の感染価測定は、あらかじめ培養した MDCK 細胞シートへ接種し、34°C 4 日間培養後、TCID₅₀法で感染価を求めた。PR8 株の遺伝子量測定は、RNA を抽出し、A 型 M1 遺伝子を標的とした real-time RT-PCR で定量した。

SARS-CoV-2 は、JPN/TY/WK-521 (WK) 株を Vero E6/TMPRSS2 細胞に接種して培養し実験に用いた。WK 株の感染価測定は、Vero E6/TMPRSS2 細胞懸濁液へ接種し、37°C 3 日間培養後、TCID₅₀法で感染価を求めた。WK 株の遺伝子量測定は、RNA を抽出し、N 遺伝子を標的とした real-time RT-PCR で定量した²⁾。

(3) ウイルス粒子の大きさと液中粒度分布の測定

ウイルス粒子の大きさについて、ネガティブ染色をしたウイルス粒子を透過電子顕微鏡 (TEM) で観察し、また、ウイルス粒子の液中粒度分布は動的光散乱法 (DLS) で測定した³⁾。

4. 研究成果

(1) ブレイクスルー感染に関する実態把握

呼吸器ウイルスの室内感染伝播に影響しそうな因子の1つとして、ワクチン接種者の抗体価をモニターしながら、ブレイクスルー感染の有無を調べた。その結果、参加者の、COVID-19に対するワクチン株（武漢株）で誘導された血清中の中和抗体価は、流行株であるオミクロン株に対して1/5～1/10に減弱していた（図1）。また、その中和抗体価は、経時的に低下し約9ヶ月後は接種約1ヶ月後の1/10未満となっていた（図2）。研究期間中にCOVID-19の国内最大の流行が発生し、本研究参加者の25%にブレイクスルー感染が発生した。この割合は、国内全人口の8割であるワクチン接種者数に対する、研究期間中の国内新規感染者数の割合28%と同程度であり、市中と似たブレイクスルー状況になっていると推察した。ブレイクスルー感染者から任意で得られた鼻水や唾液検体から、その時期に流行⁴⁾していたオミクロン株 BA. 5. 2. 20、BA. 2. 3. 1 等が確認された。ブレイクスルー事例の感染推定場所は自宅で、同居家族からというケースが多かったが、経路不明も多かった。ブレイクスルー感染した人から任意で提供された唾液・鼻水検体中のウイルス量をPCRで定量したところ、発熱レベルとは相関性は見られないため（図3）、自宅療養中の同居者の感染対策は、発熱を目安にすることなく、一定の対策が必要であることが示唆された。

一方、2022/23シーズンのインフルエンザは、国内でA/H3N2ウイルスの小規模流行が起こったが、本研究参加者にブレイクスルー感染は発生しなかった。H3N2ワクチン株で誘導された抗体は、H3N2流行株とも概ね反応し（図1）、抗体価の経時変化は、COVID-19ワクチンより緩やかであった（図2）。

なお、参加者への意識アンケートによると、感染対策において手指衛生、マスク、ワクチンのどれを重要視するかについて、臨床従事者と非臨床従事者の間に違いが認められたが（図4）、ブレイクスルー感染の発生率に有意差はなかった。

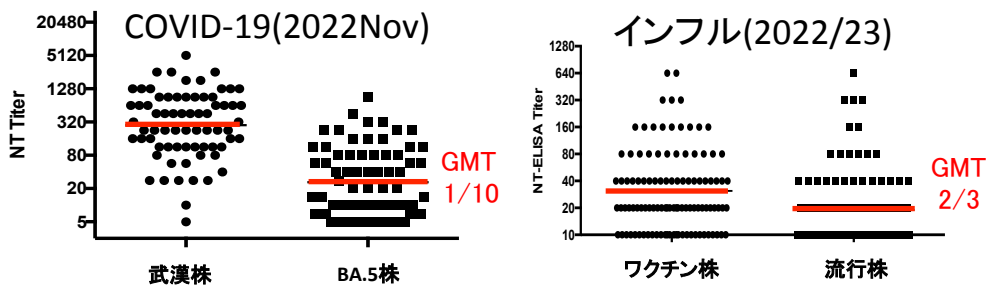


図1. 中和抗体の比較（ワクチン株 vs 流行株）

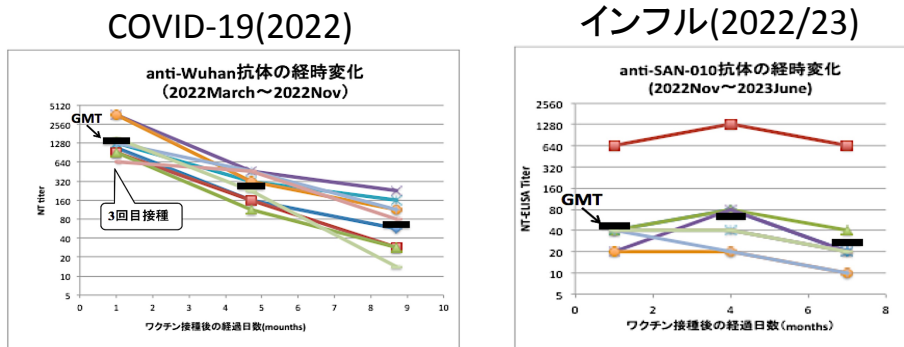


図2. ワクチン株中和抗体の経時変化

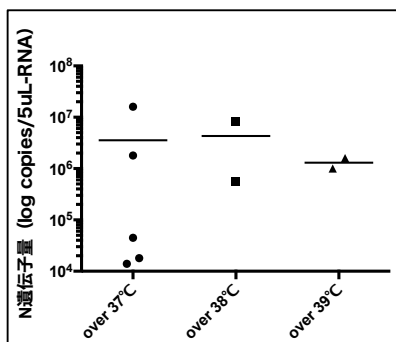


図3. 自宅療養者の唾液中のウイルス量

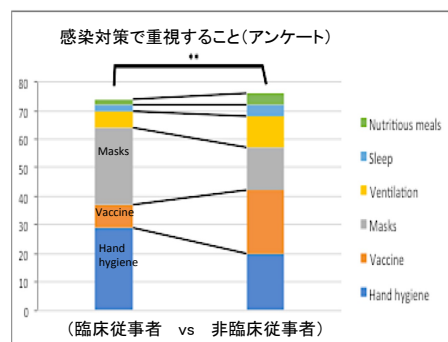


図4. 感染対策に関する意識調査

インフルエンザでは、研究期間中にブレイクスルー感染が起こらなかったため、過去に発生したブレイクスルー感染事例について、罹患者の鼻水検体や血清の抗体価を分析したところ、検体から当時主流行だったB型山形系統ウイルスが分離され、ワクチン接種による抗体上昇が少なかったことが判明した。なお、本事例は、無風の部屋で、感染疑いの人が2時間作業する中で、後半1時間同席した人に感染伝播が起こったと推定されている。

(2) ウイルス感染価へ温湿度が与える影響に関する模擬実験

室内環境因子として、まず温湿度がウイルス感染価に与える影響は大きいと考えられたので、以下の実験を行った。

① 温度と SARS-CoV-2 の感染価低下の関係

実験室で培養された WK 株を用いて、チューブに入れ、温度 4℃、34℃、37℃で1日、3日と静置したところ、4℃では感染価がほぼ変わらなかったのに対し、34℃、37℃と温度上昇につれて、感染価低下が加速し、37℃は3日で感染性が失活した。室温では1日後ほぼ変わらなかった。

更に、ヒト唾液の不活化影響を調べるため、別途、市販のヒト由来唾液に WK 株を添加して4℃保管したところ3日後も感染性が残っていた。

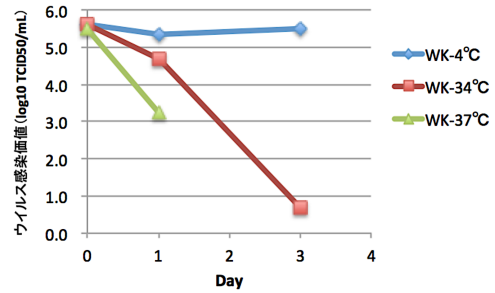


図 5. SARS-CoV-2 の温度の影響

② 温度負荷形態の違い

室内環境の物体表面残存を模擬するため、前述の WK 株を用いて、φ60mm シャーレにウイルス液を 0.4mL 滴下して 4cm 角の PE 製被覆フィルムを被せ、温度 4℃、37℃で1日静置した（湿度 100%RH）。フィルム除去後、培地でシャーレ表面及びフィルム表面を洗い出し、SARS-CoV-2 回収液を得た。この液の回収率を N 遺伝子量で確認したところ、滴下量ほぼ全量が回収できていたが、シャーレ上で温度負荷したウイルス液はチューブ内に比べて感染価低下が大きかった。

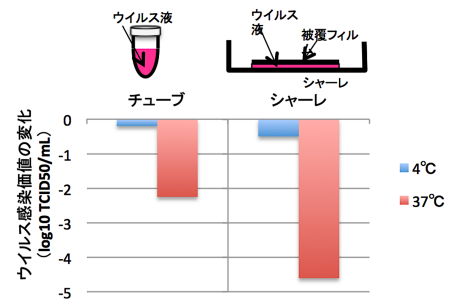


図 6. 温度負荷形態の違い

③ 臨床分離 B 型インフルエンザウイルス株の環境生残性

ヒトから出た飛沫の感染性ウイルスの冬季の環境生残性を模擬するために、B 型山形系統インフルエンザのブレイクスルー感染者由来の臨床分離ウイルス株を用いて、φ60mm シャーレにウイルス液 0.1mL を微小液滴 (2μL) にして付着させ、25℃28~35%RH で 2 時間静置した。その後、培地を加えて洗い出し、ウイルス回収液を得た。ウイルス感染価を測定したところ、2 時間静置では感染価はほぼ変わらなかった。感染源となる可能性が示唆された。

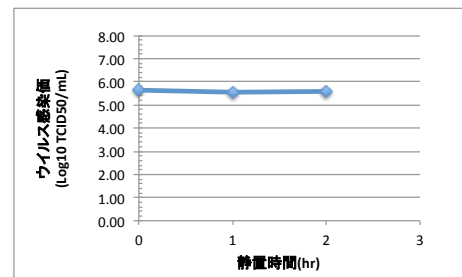


図 7. B 型インフルエンザ臨床株の環境生残性

(3) ウイルスモデル粒子を用いた人工エアロゾル噴霧実験

① ウイルス伝播動態をトレースするためのモデル粒子の作製

別の研究で、室内機材表面からウイルスを回収する際に、ウイルスの種類によって異なる挙動を示すことが判明したことから⁵⁾、伝播動態をトレースする微生物としては、呼吸器ウイルスの特性を反映させるため、インフルエンザウイルス PR8 株を用いた。PR8 株を大量培養し、ショ糖密度勾配超遠心法で精製した後、感染性を無くすため不活化処理を行った。

このモデル粒子を性状解析したところ、TEM では直径 120~130nm のウイルス粒子が多数観察され、DLS ではウイルス粒子が凝集せずに液中で均一分散していることが確認できた。

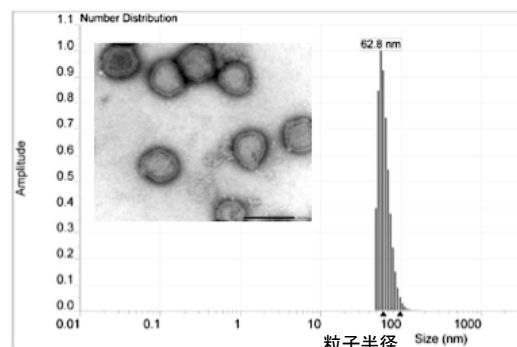


図 8. ウイルス粒子の大きさと液中粒度分布

②人工エアロゾルの性状解析

市販のヒト唾液に上記のモデル粒子を添加して、罹患者の唾液を模擬した液を調製した。過去に開発したネブライザ⁶⁾や市販のもの数種類を検討し、汎用性の点から市販ネブライザ(OMRON、NE-C28)を選び、前述の模擬唾液モデル粒子を噴霧し、エアロゾルの性状解析を行った。既報のインフルエンザ患者の呼気検出と同じように、50cmの近距離でパーティクルカウンターを用いて計測したところ、5 μ m以下にウイルス遺伝子を多く含むエアロゾルが作出できた(図9)。更に、エアロゾル感染対策の目安となる180cmの距離で、12段アンダーセンサンプラーでウイルスを回収して各ステージに捕集されたウイルス量をPCRで測定したところ、0.33~0.52 μ mにウイルス量のピークを持つエアロゾルとなっていた(図10)。

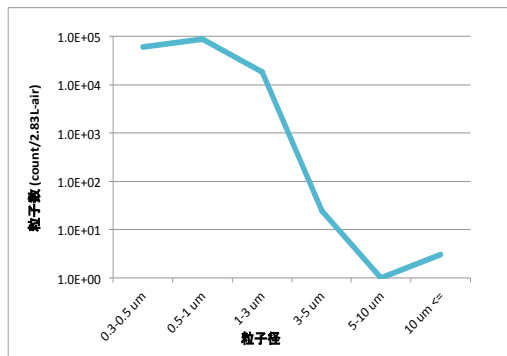


図9. エアロゾル性状解析:粒度

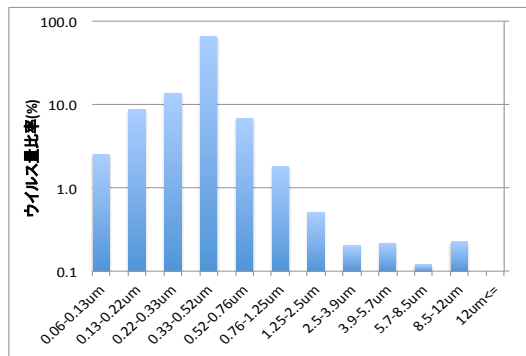


図10. エアロゾル性状解析:分級ウイルス量

③人工エアロゾル噴霧実験とチャンバー内の拡散動態

25°C40%RHの400Lチャンバー内に、インフルエンザ罹患者のくしゃみ量を模擬して、人工エアロゾルを局所的に発生させ、噴霧位置から6箇所への付着ウイルスと浮遊ウイルスを採取して、無風下でのチャンバー内の拡散動態を調べた。その結果、壁面方向は噴霧位置に近いほど付着ウイルス量は多かったが、底面方向は噴霧位置からの距離があまり影響しなかった(図11)。チャンバー内の全面積換算付着ウイルス量と全体積換算浮遊ウイルス量はほぼ同程度であり、接触感染曝露とエアロゾル感染曝露が同程度に起こりうる実験系が構築できた。

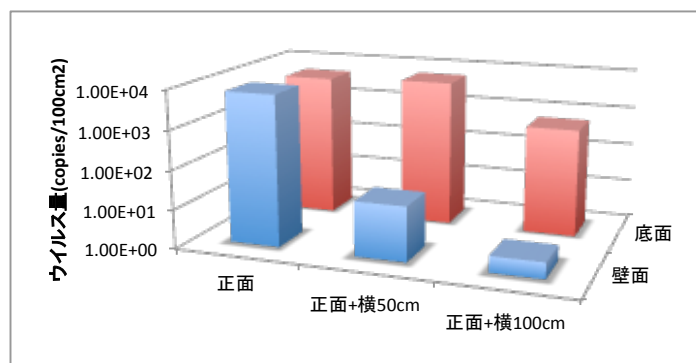


図11. 噴霧ウイルス粒子のチャンバー内における付着分布

<引用文献>

- 1) Shimasaki N, Ishii J, Kuwahara T, Nishijima H. A Brief Questionnaire on Healthcare Workers' Awareness toward the COVID-19 Vaccine and Antibody Tests. J. Disaster Res., 18(1), p21-26, 2023.
- 2) K Shirato, N Nao, HKatano, I Takayama, S Saito, F Kato, H Katoh, M Sakata, Y Nakatsu, Y Mori, T Kageyama, S Matsuyama, M Takeda, Development of Genetic Diagnostic Methods for Detection for Novel Coronavirus 2019(nCoV-2019) in Japan, Japanese Journal of Infectious Diseases, 2020, 73 (4), p. 304-307.
- 3) Shimasaki N, Okaue A, Kikuno R, Shinohara K. Comparison of the Filter Efficiency of Medical Nonwoven Fabrics against Three Different Microbe Aerosols. Biocontrol Science, 23(2), p61-69, 2018.
- 4) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10745-cepr-topics.html>
- 5) 嶋崎典子 他: A-29 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, 2023年室内環境学会学術大会要旨集, p274-275, 2023.
- 6) 嶋崎典子: ウイルス含有エアロゾルの発生・計測技術, 日本建築学会 環境工学委員会 第32回空気シンポジウム配布資料, p71-74, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Noriko Shimasaki, Junko Ishii, Tomoko Kuwahara, and Haruna Nishijima | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 A Brief Questionnaire on Healthcare Workers' Awareness toward the COVID-19 Vaccine and Antibody Tests | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Disaster Research | 6. 最初と最後の頁 21-26 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20965/jdr.2023.p0021 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Itsuki Hamamoto and Noriko Shimasaki | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 The Importance of Monitoring Viral Respiratory Infections During the COVID-19 Crisis. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Disaster Research | 6. 最初と最後の頁 73-81 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20965/jdr.2022.p0073 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 嶋崎典子 | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 室内でのウイルスや細菌に対する感染対策 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌 | 6. 最初と最後の頁 31-42 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 SHIMASAKI NORIKO | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Current circumstances and prospects on performance evaluation for infection control technologies of airborne viruses in indoor environments | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Microorganism Control | 6. 最初と最後の頁 177 ~ 186 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4265/jmc.28.4_177 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名 嶋崎典子、石井淳子 |
| 2. 発表標題 自宅療養期のCOVID-19患者から出る唾液中のウイルス調査 |
| 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 Noriko Shimasaki, Seiichiro Fujisaki, Shigeyuki Itamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Hideki Hasegawa, Makoto Takeda |
| 2. 発表標題 Analysis of SARS-CoV-2 derived from breakthrough infection cases |
| 3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 嶋崎典子 |
| 2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の基礎知識と感染対策：個人防護具・換気等の効果と適正使用 |
| 3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第48回年次大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 嶋崎典子 |
| 2. 発表標題 ウイルス感染対策における個人防護具・環境除菌の性能評価と適正使用 |
| 3. 学会等名 日本防菌防黴学会 令和2年度微生物汚染と対策に関する基礎講座（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名 嶋崎典子、石井淳子 |
| 2. 発表標題 インフルエンザ罹患事例におけるウイルス室内伝播動態解析の検討 |
| 3. 学会等名 第36回インフルエンザ研究者交流の会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 嶋崎典子 |
| 2. 発表標題 ウイルス含有エアロゾルの発生・計測技術 |
| 3. 学会等名 日本建築学会 環境工学委員会 第32回空気シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Noriko Shimasaki, Shigeyuki Itamura, Seiichiro Fujisaki, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Yuichi Harada, Hideki Hasegawa, Akihide Ryo, Junko Ishii. |
| 2. 発表標題 Analysis of human serum allowing the emergence of SARS-CoV-2 antigenic variant(s) from vaccinees and breakthrough infection |
| 3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会 |
| 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 | 石井 淳子 (Ishii Junko) (10704710) | 地方独立行政法人神戸市民病院機構神戸市立医療センター中央市民病院（第1診療部、第2診療部、第3診療部・中央市民病院・副医長 (84519) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|