

大学施設内のマイクロバイームの実態に関する調査研究
 (第2報) 便所・エレベータ内および研究室内細菌叢の実態調査
Research on Actual State of Microbiome in University Facilities
(Part 2) Survey on Microbiome in Toilet, Elevator and Laboratory

○福ヶ野 拓也 (大阪大学) 山中 俊夫 (大阪大学)
 小林 知広 (大阪大学) 崔 ナレ (大阪大学)
 Takuya FUKUGANO*¹ Toshio YAMANAKA*¹ Tomohiro KOBAYASHI*¹ Narae CHOI*¹
 *¹ Osaka University

In facilities where many people gather, such as schools, hospitals and public facilities, air infection and contact infection are problematic. In this research, by analyzing microbiomes existing in the air and the surfaces of fittings in the building space at the DNA level, we will clarify the characteristics of the bacteria in the building space and their propagation pathways. In this report, we report the results of investigation of microbiome in the toilet, elevator, and laboratory in a certain building in Osaka University in both summer and winter.

はじめに

学校や病院、高齢者施設などの多くの人々が集まる施設において、空気感染や接触感染などのヒト-環境-ヒト間での感染により多くの人々が健康被害を受けたという報告が絶えない。直近でも、秋田県大仙市内の某特別養護老人ホーム内で職員と入所者など合わせて計26人がインフルエンザA型に集団感染し、2019年1月5日に入所者の女性が1人死亡したという報告がなされている。

本研究は建築空間内において空気中および建具などの表面に存在するマイクロバイーム(微生物叢)をDNAレベルで解析することで、それぞれの対象空間中に存在する細菌の特徴およびそれらの伝搬経路について考察することを目的とし、本報では2017年12月(冬期)の大阪大学構内の某建物での調査結果に加え、2018年7月(夏期)の同建物での調査結果も併せて報告する。

1. 測定概要

測定は大阪大学構内の某建物内とし、冬期の測定では7階および8階男子便所とエレベータを対象とし、夏期の測定では8階男子便所とエレベータ、そして研究室を対象とした。Fig.1にこれら諸室を含む平面図(サンプル採取箇所も記載)を示す。まずは冬期の測定について説明を行う。Fig.2に測定スケジュールを示す。2017年12月4日の19:00にサンプル表面をアルコール除菌し、そこから1週間放置した後の2017年12月11日18:00~22:00にサンプル採取を行った。そこから8階男子便所にて1週間次亜塩素酸水を噴霧し、7階男子便所では1週間放置し、2017年12月18日18:00~20:00に便所のみでサンプル採取を行った。噴霧の方法については既報¹⁾を参照されたい。既報¹⁾でDNA解析では除菌効果の確認ができないことが分かったため、本報では除菌に

Table.1 Equipment used by each measurement

temperature, relative humidity, CO ₂ concentration	
measuring equipment	thermo-hygrometer (T&D RTR-53A, T&D RTR-576)
floating bacteria	
measuring equipment	air pump (Shibata Science LTD. MP-Σ500N II), PTFE 0.3 Filter
adhered bacteria	
measuring equipment	swab

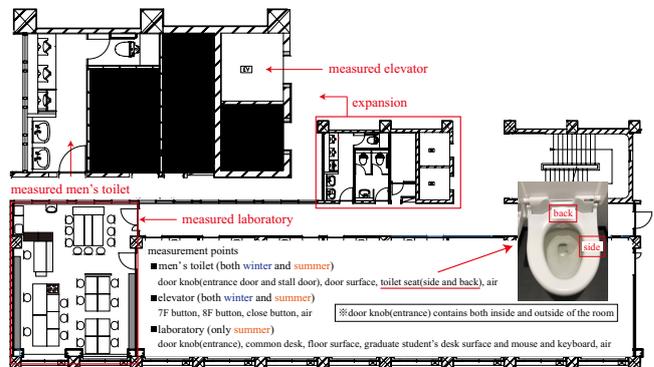


Fig.1 8th floor plan & measurement points

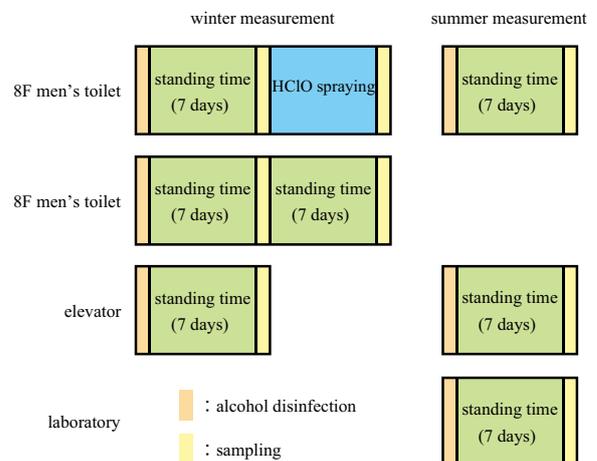


Fig.2 Measurement schedule

についての考察は行っていない。続いて夏期の測定について、2018年7月23日23:00にサンプル表面をアルコール除菌し、そこから1週間放置した後の2018年7月30日17:00～22:30にサンプル採取を行った。Table.1に測定項目と用いた機器を示す。冬期夏期の両測定において、温湿度とCO₂濃度をアルコール除菌時からサンプル採取までの期間継続的に計測をした。浮遊微生物および付着微生物の拭き取りサンプリングの手法は既往論文²⁾に従った。採取したサンプルは、工学院大学へ冷凍輸送し、DNAの抽出以降の全行程を委託した。

2. 測定結果

2.1 環境測定結果

バックグラウンドの温湿度データの平均値をTable.2に示す。便所やエレベータは非空調室であるため、夏は高温多湿で冬は低温低湿となっていた。研究室内は学生が在室している間は空調されているため、温湿度は高くなりすぎたはいなかった。

2.2 獲得データ量

Fig.3およびFig.4にそれぞれ冬、夏の各サンプル採取箇所でのリード数を示す。リード数とはDNA断片の塩

基配列の単位で、獲得データ量を表す。PCRによる増幅が同時に行われなかったサンプルどうしはリード数の比較ができないため、Fig.3とFig.4間でリード数の比較はできないことに注意されたい。Fig.3の冬期の結果では7階便所および8階便所のサンプルを取り扱っているが、便所の同じ箇所でも階が異なればリード数に大きく差が生じており、階によって使う人の性質や使われ方の違いなどにより菌数や菌叢に差が生じることが示唆される。またFig.4では研究室でのサンプルも含まれており、リード数を見れば研究室内のサンプルのリード数は相対的に小さく、不特定多数の人が使用する便所やエレベータ内のサンプル(空気を除く)のリード数は相対的に大きいことが分かる。多くの人に利用される(触れられる)箇所では細菌の付着が促進される可能性が考えられる。また冬期でも夏期でも便座(後ろ)のリード数が比較的高いことが分かる。前報¹⁾でも述べたように、この箇所では人の糞便に多量に含まれる腸内に生息する

Table.2 Average temperature, humidity and CO₂ concentration

		8F toilet		7F toilet		elevator		laboratory	
		winter	summer	winter	summer	winter	summer	winter	summer
average	temperature (°C)	15.8	31.2	15.1		15.8	32.0		27.0
	humidity (%RH)	37.3	59.0	35.2		29.0	54.4		65.3
	CO ₂ (ppm)	521	391	485		×	×		745

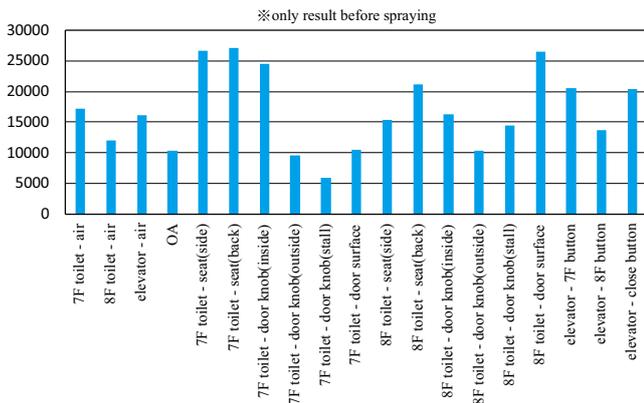


Fig.3 The number of lead (the number of bacteria) of each sample in winter

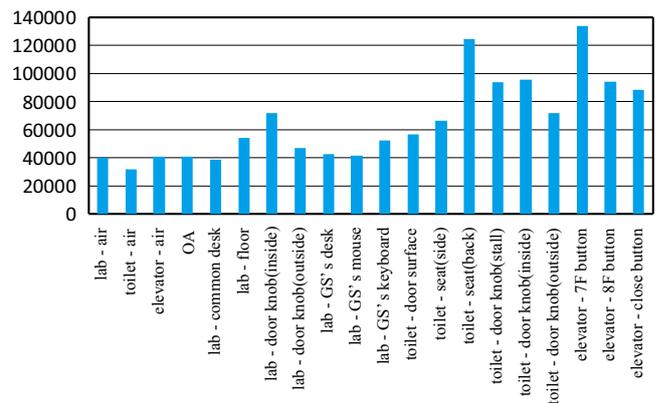


Fig.4 The number of lead (the number of bacteria) of each sample in summer

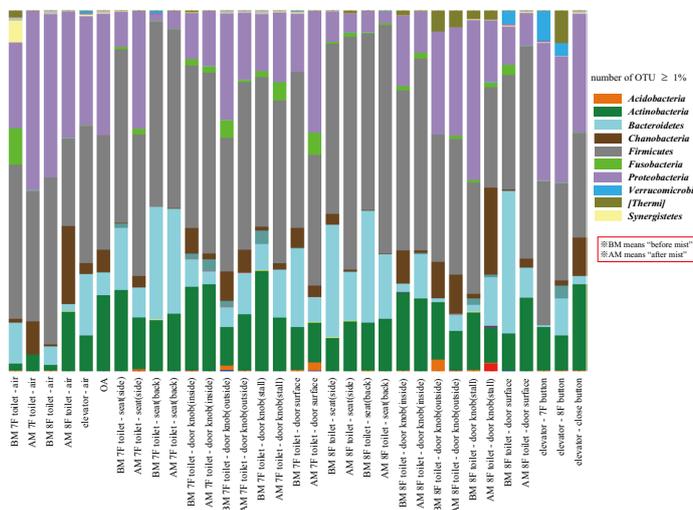


Fig.5 Composition ratio focusing on phylum of each sample in winter

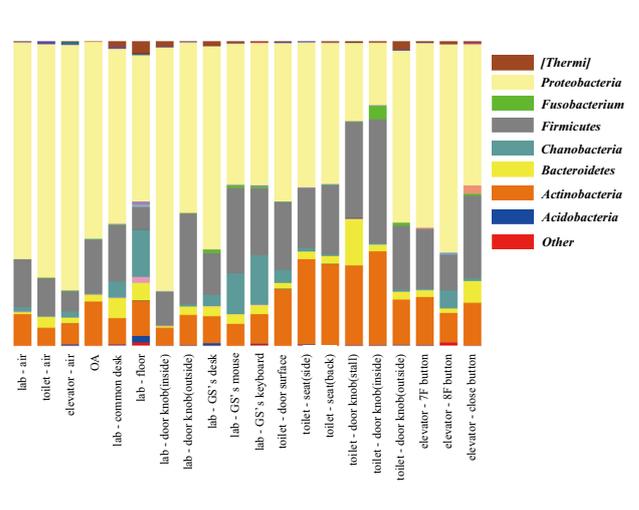
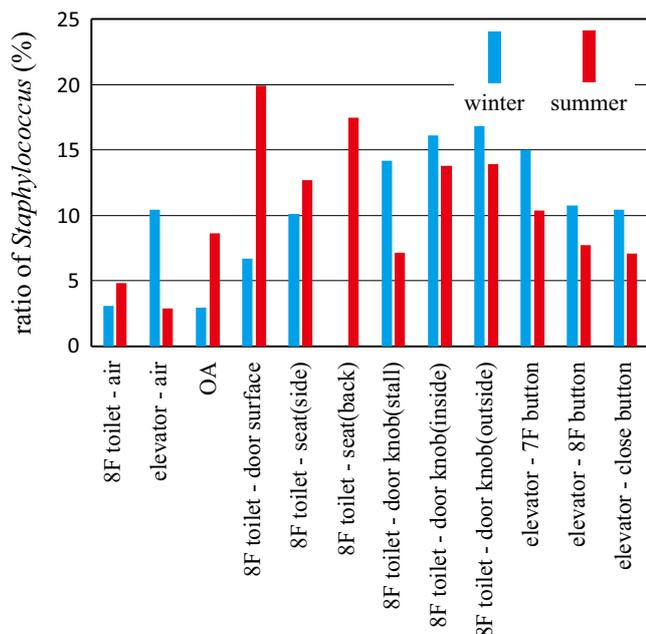


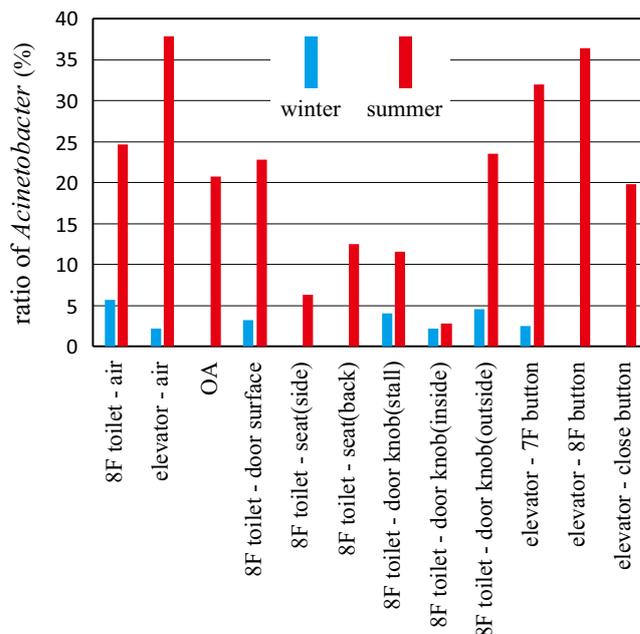
Fig.6 Composition ratio focusing on phylum of each sample in summer

Fig.7 Ratio of *Staphylococcus* of each sample in winter and summer

細菌が、検出された全ての細菌の中で 30%～40% と非常に高い割合を占めていた。

2.3 検出された細菌の組成比

Fig.5、Fig.6 にそれぞれ冬期および夏期に採取したそれぞれのサンプルで検出された細菌の「門」に着目した組成比を示す(細菌は「門」⇒「綱」⇒「目」⇒「科」⇒「属」⇒「種」と分類される)。冬期 (Fig.5) では *Firmicutes* 門の検出が最も高いことが分かった。この *Firmicutes* 門に分類される細菌の中では *Staphylococcus* 属(ブドウ球菌属: ヒトから分離されることが多い常在細菌であり、大部分は非病原性であるが、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、腐性ブドウ球菌の3種はヒトに対する病原性を持つ。)の検出割合が最も高かった。この *Staphylococcus* 属の両季節における各サンプルでの検出割合を Fig.7 に示す。夏期でも冬期と同様に比較的高い割合で検出されており季節による差異は特に見られなかった。また夏期 (Fig.6) では冬期とは異なり *Proteobacteria* 門の検出割合が最も高いことが分かった。この *Proteobacteria* 門に分類される細菌の中では *Acinetobacter* 属(アシネトバクター属: 土壌や川、人の皮膚などに広く存在する細菌であり、*A.baumannii* など健康な人にはほとんど影響はないが、入院患者など免疫が弱い人が感染すると肺炎などを起こし、重症化する恐れがある日和見感染症を引き起こす細菌も含まれている。)の検出割合が最も高かった。この *Acinetobacter* 属の両季節において各サンプルでの検出割合を Fig.8 に示す。夏期では非常に高い割合で検出されているにもかかわらず、冬期ではほとんど検出されていないことが分かる。香港で行われた研究³⁾でも *Acinetobacter* 属は冬期に比べて夏期に

Fig.8 Ratio of *Acinetobacter* of each sample in winter and summer

おいて高い割合が被検者の皮膚上で検出されていたことも併せて、*Acinetobacter* 属は季節による影響を受け、夏期の建築空間内で高い割合で検出される可能性が高いと考えられる。

2.4 サンプル採取箇所ごとの菌叢の関係性

Fig.9 に夏期サンプルの主座標解析の結果を示す。ユークリッド距離の代わりに類似度(相同性)を用いるため、相関性の高いものどうしが近く配置するようにプロットされる。Fig.9(A),(C) から院生のマウスと院生のキーボードの菌叢が他のサンプルとは類似度が低いことが分かる。研究室内の他のサンプルとは異なり、サンプルを採取したマウスとキーボードは基本的にそれを使用する1人の院生しか触れないため、個人によって掌に付着する菌叢に差があることが示唆される。個人個人の保有菌叢の違いは、生活習慣などによるものと考えられる。また、(B),(C) から研究室の床面も他のサンプルに比べ菌叢の類似度が低いことが分かる。今回のサンプルで唯一手で触れることはなく、足で踏まれる面であることが原因であると考える。床面からは唯一 *Rickettsiella* 属が検出された。この細菌はダニ等の節足動物に寄生し、病原性を持つ種も含まれている。床面のみで検出されたことはダニ等がハウスダストとなり床に堆積していたからであると考えられる。さらに(A),(B) から便所内にある什器のサンプルもまた他のサンプルに比べ菌叢の類似度が低いことが分かる。腸内細菌などの排泄に関わる細菌が検出されていることが原因と考えられる。唯一個室内のドアノブからは *Campylobacter* 属も検出され、これは夏期の食中毒菌として知られる *C.jejuni* や *C.coli* を含む。これらは糞便に含まれるため、排泄

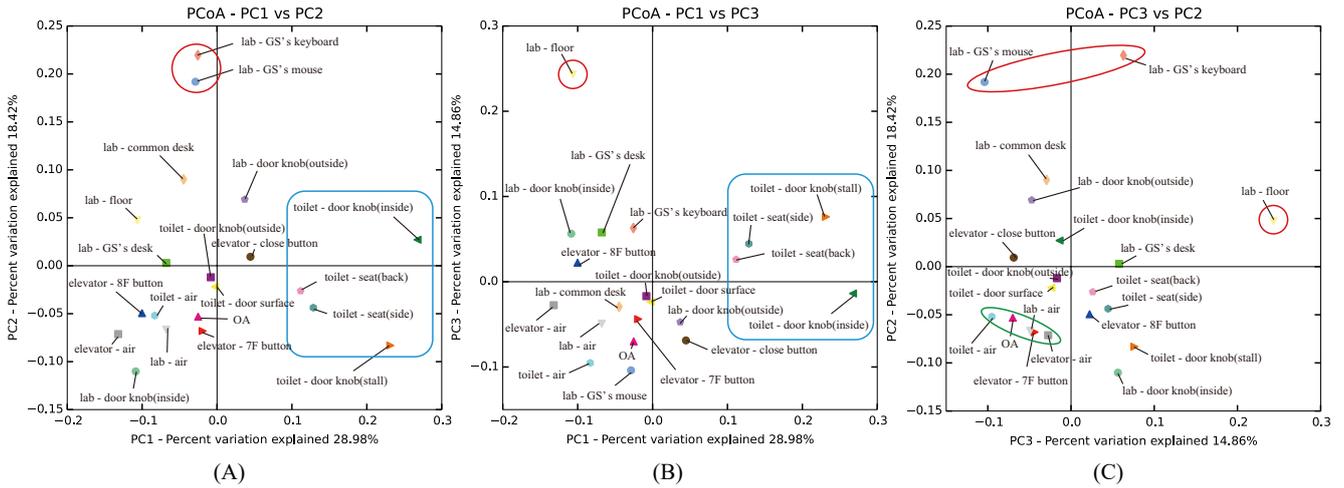


Fig.9 Principal coordinates analysis of each sample in summer

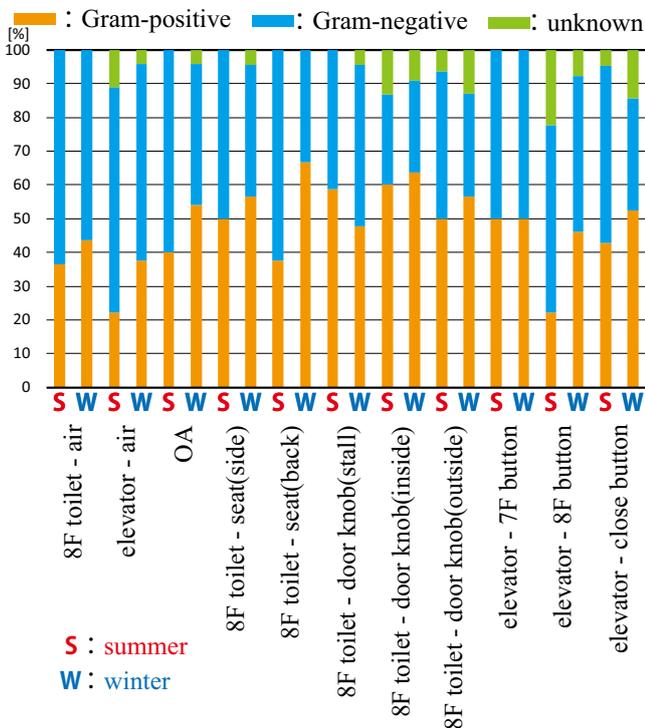


Fig.10 Gram staining of bacteria from each sample in winter and summer

により手に付着し、そのままドアノブに転移したと考えられる。最後に浮遊菌のサンプル（空気中のサンプル計4つ）どうしの類似度が非常に高いことが分かる。換気計画により、建物内の空気が諸室を経由して流れるからであると考えられる（例：外気→研究室→廊下→便所→排気）。

2.5 検出された細菌のグラム染色性

Fig.10 に両季節の各サンプルで検出された細菌のグラム染色性を示す。両季節の測定で共通するサンプルのみを抜粋しているため研究室での結果は含まれていない。グラム陰性菌は細胞壁にエンドトキシンを含み、微量でも体内に取り込んでしまうと発熱する恐れがあることで知られている。グラム陽性菌とグラム陰性菌は概ね同程度検出されているが、冬期

に比べ夏期の方がグラム陰性菌の検出割合が大きいことが分かる。これは夏期に最も高い割合で検出された *Proteobacteria* 門に分類される細菌がグラム陰性菌に分類されることが主な原因であると考えられる。

3. おわりに

本報では、本学構内にある建物内の男子便所、エレベータ、および研究室において、浮遊微生物と付着微生物を冬期と夏期の2回に分けてサンプルをして解析を行った。結果、各季節で検出された細菌には共通点や相違点が見られた。また、床からは *Rickettsiella* や便所個室ドアノブからは *Campylobacter* など、サンプル採取箇所の性質に起因すると考えられる細菌が検出された。今後は2018年7月に大阪市内の診療所で採取したサンプルのデータを分析し考察を行っていく。

謝辞

DNA抽出・精製と解析会社への送付については、工学院大学柳研究室の全面的なご協力を頂いた。またデータ整理に当たっては、同大学柳教授および瀬戸氏からご助言を頂いた。ここに記して感謝申し上げます。また実験に当たり、マイコム株式会社よりミスト噴霧器のご提供をいただいたことを深く感謝いたします。本研究は科学研究費助成事業挑戦的研究 JPH17828444 (開拓) (研究代表者：加藤信介) による。

参考文献

- 1) Takuya FUKUGANO, Toshio YAMANAKA: Research on Actual State of Microbiome in University Facilities (Part 1) Influence on Microbiome in Toilet and Elevator by Deodorant / Disinfectant sprayed, SHASE Convention Academic Lecture Outline A-39
- 2) U YANAGI, Shinsuke KATO, Miku HATANAKA: Establishing the monitoring method of respiratory system pathogen in built environment-Part 1 the study outline, sampling and DNA analysis method, AIJ Convention Academic Outline 41417
- 3) Y. W. CHU, C. M. LEUNG, E. T. S. HOUANG, K. C. NG, C. B. LEUNG, H. Y. LEUNG, AND A. F. B. CHENG: Skin Carriage of Acinetobacters in Hong Kong, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 1999, p. 2962-2967