
総説 シンポジウム**病院待合室における細菌叢の実態**

柳 宇 加藤 信介 永野 秀明 藤井 結那 光岡 眞知子

工学院大学 建築学部

Microbiome in a Japanese Hospital Waiting Rooms

U Yanagi, Shinsuke Kato, Hideaki Nagano, Yuina Fujii, Machiko Mitsuoka

School of Architecture, Kogakuin University

要約

細胞核の中にある遺伝情報 (genetic information) の本体である DNA の二重らせん構造が解明されたのは1953年であった。その後、1977年にイギリス人 Sanger が DNA 塩基配列決定するためのサンガー法を開発し、1985年にアメリカ人 Mullis が PCR 法と呼ばれる遺伝子配列増幅方法を開発した。PCR 法の開発によって、関連研究がさらに急ピッチで進んできている。1995年に細菌ゲノムの完全配列が決定された。また、2010年に次世代シーケンサーが開発された契機に、近年微生物ゲノム解析関連の研究が急に進み、これまで知られていない細菌に関する膨大な情報を得ることができるようになった。

本報では、微生物 DNA 解析の略史、DNA 解析の原理と現状を紹介したうえで、筆者らが実施した病院待合室環境中の細菌叢に関する調査の結果について述べる。次世代シーケンス解析により、不特定多数の人が集まる場所である病院の待合室に多くの病原性細菌が存在している可能性が明らかになった。また、待合室から検出されている菌のうち、まだ病原性についてわかっていない細菌も多く含まれており、今後病原性の解明により、より多くの詳細な情報が得られる。(臨床環境 25 : 82-87, 2016)

《キーワード》 病院待合室、マイクロバイオーーム、実態

Abstract

The double helix structure of DNA (Deoxypentose Nucleic Acids) which is the main part of genetic information in a nucleus was clarified in 1953. Then, the Sanger method to make a DNA base sequence decision was developed by British Sanger in 1977. American Mullis developed the genome sequence amplification method called the PCR (polymerase chain reaction, polymerase chain reaction) method in 1985. By development of the PCR method, related research increased notably. The full arrangement of

受付：平成28年9月18日、採用：平成28年9月19日

別刷請求宛先：柳 宇

工学院大学建築学部

〒163-8577 新宿区西新宿1-24-2

a bacteria genome is determined in 1995. Moreover, by using the next-generation sequencer developed in 2010, the research on bacterial genome analysis can increase suddenly in recent years, and the huge information about the bacteria which are not known until now can be acquired now.

This paper describes the results obtained by the investigations about Microbiome in hospital waiting-room, after introducing the history of microbe DNA analysis and the principle and the present condition of DNA analysis. A possibility that many pathogenic bacteria existed in the waiting room of the hospital which is the place in which many and unspecified persons gather in became clear by the next-generation sequence analysis. Moreover, many bacteria which are not known about pathogenicity yet among the bacilli detected from the waiting room are also contained, and many detailed information is acquired more by elucidation pathogenic from now on.

(Jpn J Clin Ecol 25 : 82 – 87, 2016)

《Key words》

I. 微生物DNA解析の略史

微生物の存在が人間によって初めて確認されたのは17世紀に入ってからである。記録によれば1673年にオランダ人 Leeuwenhoek が自ら制作した顕微鏡で“小動物”(微生物)を観察したという。約200年後の1860年にフランス人 Pasteur が肉汁ブイヨンを用いて、空気中の微生物の存在を証明し、1881年にドイツ人 Koch がジャガイモを主成分とする固形培地を用いて空気中から微生物の分離に成功した¹⁾。1884年にデンマーク人 Gram がグラム染色法を開発し、細菌をグラム陰性菌とグラム陽性菌に分類した。1889年にオランダ人 Beijerinck がウイルスの概念を提唱した。微生物構造の解明はその64年後であった。

1953年にイギリス人 Watson と Crick の2ページの論文が Nature 誌に掲載された²⁾。その論文の内容は細胞核の中にある遺伝情報 (genetic information) の本体である DNA (Deoxyribose Nucleic Acids、デオキシリボ核酸) の二重らせん構造の解明であった(図1)。この発見は後に20世紀最大の発見といわれている。なお、二人は9年後の1962年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。DNA 構造の解明を契機に関連研究が活発的に行われるようになった。1977年にイギリス人 Sanger が DNA 塩基配列決定のためのサンガー法を開発し、1980年にノーベル化学賞を受賞した。DNA 配列を決定するためには、ある程度のDNA量を確保する必要があり、その役割を担うのは

1985年にアメリカ人 Mullis によって開発された PCR (polymerase chain reaction、ポリメラーゼ連鎖反応) 法と呼ばれる遺伝子配列増幅方法である。Mullis は9年後の1994年にノーベル化学賞を受賞した。Mullis はドライブ中に PCR 法を閃き、その場でメモをとったと伝えられている。

PCR 法の開発によって、関連研究がさらに急ピッチで進んできている。1995年に細菌ゲノムの完全配列が決定され、2003年3月に起きた集団感染の SARS の病原体である SARS Co-V の DNA 配列を決定するのに2か月も要しなかった。

II. DNA解析の原理と現状

図2にDNAの構造を示す。DNAはリン酸(P)、デオキシリボース(OH)、および4つの塩基(アデニンA、グアニンG、シトシンC、チミンT)から構成される。二重らせんDNAの2本鎖でかつAとT、CとGが対になるような配列をとる。AとT、CとGは互いに水素結合で結びついているため、高温(90℃以上)にするか、変性剤を加えると水素結合が切れて1本鎖のDNAになる。また、温度を70℃以下(プライマによって設定温度が異なる)に下げると、変性剤を除去すると、元の2本鎖DNAに戻る(図3)。これを1サイクルと呼ぶ。一般的にPCR処理をn回サイクル行くと、1つの2本鎖DNAから目的部分を2ⁿ倍に増幅する。長いDNAを増幅するには、ターゲットを決めて一部だけ増幅するか、すべて

細菌を採取した。

総合受付と待合室の表面付着微生物を滅菌緩衝リン酸液、室内と屋外の空中微生物をエアポンプ (Air Check、XR5000) と PTFE (Polytetrafluoroethylene) 0.3 Filter を用いて測定した。空気のサンプリング量を 180 ℓ (3 ℓ/min×60min) とした。

2. DNA 抽出方法

試料採取後、フィルタを安全キャビネット内で取り出し、ストマッカー-80 スタンダードボックスに入れた後、DNA フリー水 5 ml を加え、ストマッカーバイオマスターにかけ DNA を抽出した。その後袋から 1.5 ml の試験管に抽出液を入れ、遠心機 (KUBOTA5911) に 4℃×3,000回転×30分をかけ細菌を抽出した。

3. DNA の精製と増幅方法

DNA の精製には Nucleo Spin を使用し、ボルテックスで液を混合させ、昇温、エタノール添加、遠心分離など22の工程を経た。PCR を用いた DNA の増幅には、次に示すプロットコールで行った。

- ① 94℃×3分、② 94℃×45秒、③ 50℃×60秒
- ④ 72℃×90秒、⑤ 上記の②～④を35回繰り返す
- ⑥ 72℃×10分、⑦ 4℃で保持

4. 解析方法

Agilent 2200TapeStation を用いて、解析必要とされる核酸濃度および総量の検定を行った結果、品質条件を満たさない一部サンプルを除外した後、作成したシーケンスライブラリーを混合した。混合したライブラリーを品質向上のため、AMPureXP (ベックマ・コールター社製) を用いた。シーケンスの解析にイルミナー社次世代シクエンサー Miseq を用いて塩基配列を取得した。

16S rRNA の解析において、クラスタリング、相同性検索 (Blast 検索、DDBJ 16S ribosomal RNA データベース Ver.2016_01_12使用)、系統分類 (QIIME パイプライン使用)、系統樹データの作成 (QIIME パイプライン使用)、Rarefaction 解析 (QIIME パイプライン使用)、菌叢比較 (QIIME パイプライン使用) を行った。

5. 結果

(1) 検出された細菌叢

病院環境内から 9 門、19 綱、37 目、74 科、109 属の細菌が検出された。図 5 に検出された主な属菌を示す。

以下に病原性、生育特性、種類、発生源の視点から見た病院内の細菌の実態について述べる。

1) 病原性

病原菌を含む菌は *Actinomyces* 属、*Anaerococcus* 属、*Corynebacterium* 属、*Haemophilus* 属、*Halomonas* 属、*Lactobacillus* 属、*Neisseria* 属、*Sphingobacterium* 属、*Sphingomonas* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Yersinia* 属が検出された。

日和見感染菌を含む菌は *Acinetobacter* 属、*Actinomyces* 属、*Anaerococcus* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Corynebacterium* 属、*Leptotrichia* 属、*Novosphingobium* 属、*Pseudomonas* 属、*Psychrobacter* 属、*Ralstonia* 属、*Sphingomonas* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属が検出された。

また、呼吸器病原菌を含む *Ralstonia* 属、*Sphingomonas* 属検出された。

植物病原菌を含む *Pleomorphomonas* 属、*Pseudomonas* 属、*Ralstonia* 属、*Sphingomonas* 属、*Janthinobacterium* 属が検出された。

図 6 に室内空中、表面、外気中検出された主な病原菌を有する細菌属と日和見感染菌を有する属を示す。円の重なっている部分は共通の意味をしている。待合室内のみから検出されたのが 7 属、室内空中と外気中が共通しているのは 3 属、室内空中と表面が共通しているのは 1 属、室内表面のみから検出されたのは 1 属があった。したがって、室内に外気が影響を及ぼすものの、在室者からや室内表面からの影響も大きいことがわかる。

2) 生育特性

好気性菌を含む *Acinetobacter* 属、*Azospirillum* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Corynebacterium* 属、*Haemophilus* 属、*Halomonas* 属、*Hydrogenophilus* 属、*Hymenobacter* 属、*Janthinobacterium* 属、*Micrococcus* 属、*Neisseria* 属、*Novosphingobium* 属、*Paracoccus* 属、*Petrobacter* 属、*Pleomorphomonas* 属、*Pseudomonas* 属、*Psychrobacter* 属、*Ralstonia* 属、*Sphingobacterium*

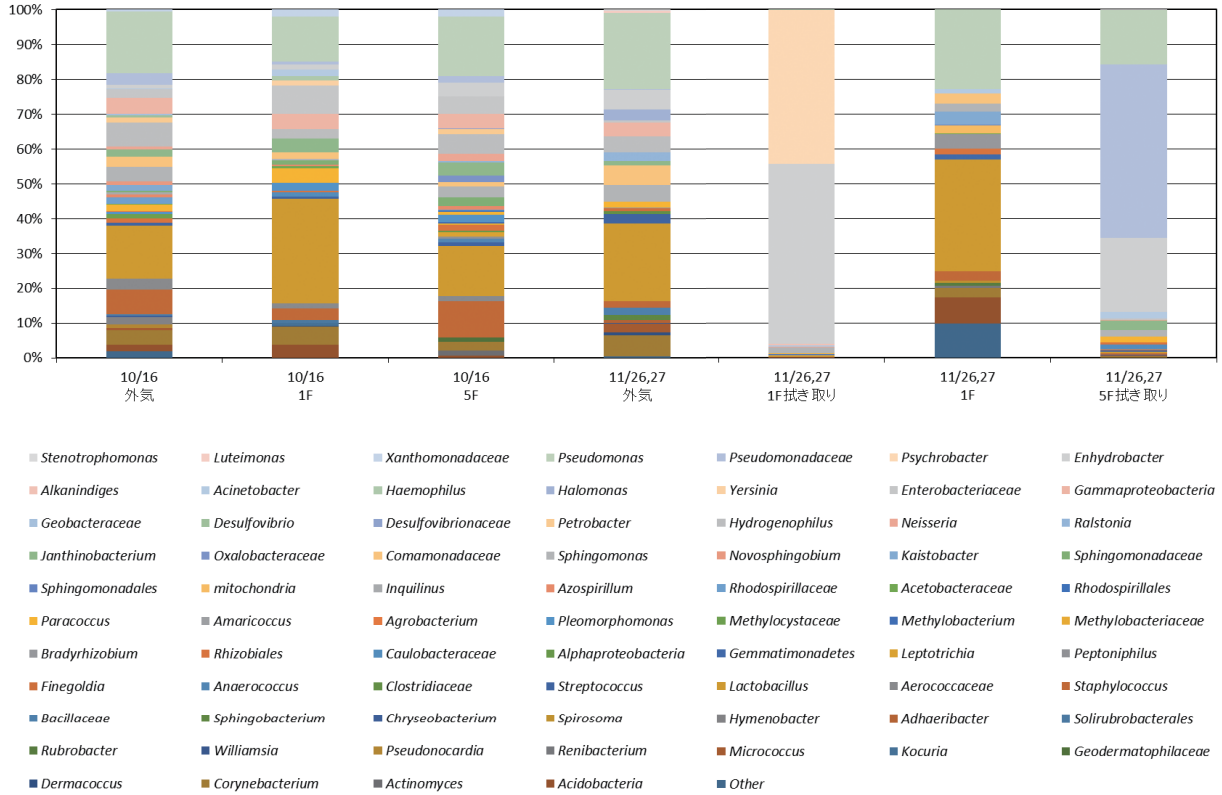


図5 病院の待合室内と屋外から検出された菌（属）

属、*Sphingomonas* 属が検出された。

嫌気性菌を含む *Actinomyces* 属、*Anaerococcus* 属、*Paracoccus* 属、*Pseudomonas* 属が検出された。

通性嫌気性菌を含む *Corynebacterium* 属、*Enhydrobacter* 属、*Haemophilus* 属、*Halomonas* 属、*Lactobacillus* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Yersinia* 属が検出された。

偏性嫌気性菌を含む *Leptotrichia* 属、*Streptococcus* 属が検出された。

3) 発生源

ヒト由来：*Acinetobacter* 属、*Actinomyces* 属、*Anaerococcus* 属、*Corynebacterium* 属、*Haemophilus* 属、*Lactobacillus* 属、*Leptotrichia* 属、*Micrococcus* 属、*Neisseria* 属、*Pseudomonas* 属、*Psychrobacter* 属、*Ralstonia* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属。

水由来：*Acinetobacter* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Enhydrobacter* 属、*Halomonas* 属、*Micrococcus* 属、*Novosphingobium* 属、*Paracoccus* 属、



図6 病原性・日和見感染菌

Pleomorphomonas 属、*Pseudomonas* 属、*Psychrobacter* 属、*Ralstonia* 属、*Sphingobacterium* 属、*Sphingomonas* 属。

土壌由来：*Acinetobacter* 属、*Azospirillum* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Hydrogenophilus* 属、*Hymenobacter* 属、*Janthinobacterium* 属、

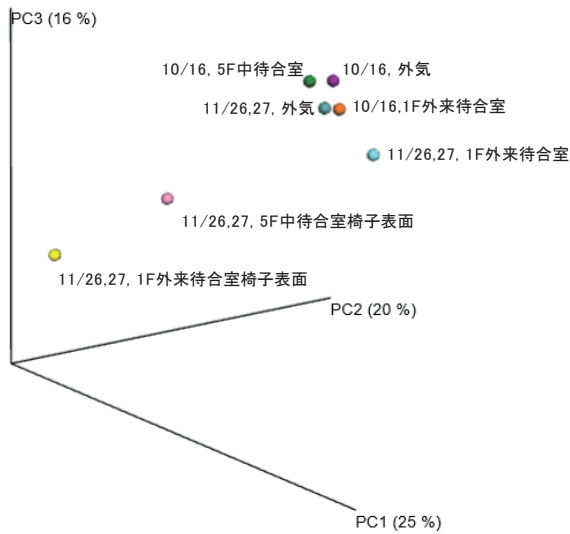


図7 主座標解析の結果

Micrococcus 属、*Novosphingobium* 属、*Paracoccus* 属、*Pleomorphomonas* 属、*Pseudomonas* 属、*Psychrobacter* 属、*Ralstonia* 属、*Sphingobacterium* 属、*Sphingomonas* 属。

(2) 主座標解析結果

図7に各サンプルから得られた菌の門・綱・目・科・属のデータを用いた3次元主座標分析(情報量を3成分に重みづけ)の結果を示す。主座標分析は主成分分析と異なり、多(高)次元のデータを2次元や3次元に落として視覚化するとき用いられる。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、相関の高いもの同士が近い配置になるようにプロットされる。従って、図7に示すプロット間の距離はマイクロバイオームの類似度が高い意味をしている。病院の待合室の表面と空中のマイクロバイオームが異なることがわかる。

IV. 結び

次世代シーケンス解析により、不特定多数の人が集まる場所である病院の待合室に多くの病原性細菌が存在している可能性が明らかになった。また、待合室から検出されている菌のうち、まだ病原性についてわかっていない細菌も多く含まれており、今後病原性の解明により、より多くの詳

細な情報が得られる。さらに、マイクロバイオームを解析することによって、微生物の発生源とその伝搬経路などを特定できる可能性が示唆された。

注

本報は、下記示す既発表の内容をもとに、加筆を加え再構築したものである。

- 1) 柳 宇：環境マイクロバイオーム、空気清浄、Vol.53、No.5、pp.1550-53、2016
- 2) 柳 宇、加藤信介、永野秀明、瀬島俊介、藤井結那、井沢圭、畑中未来、高橋雄大、松野重夫：諸環境におけるマイクロバイオームの比較、第33回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会予稿集、pp.145-148、2016
- 3) 柳 宇：環境マイクロバイオーム、第25回日本臨床環境医学会学術集会抄録集、p.16、2016
- 4) 藤井結那、柳 宇、永野秀明、井田寛、加藤信介：病院施設におけるマイクロバイオームに関する調査研究、第25回日本臨床環境医学会学術集会抄録集、p.68、2016
- 5) 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、日本建築学会大会学術講演梗概集、pp.715-718、2016
- 6) 光岡真知子、柳 宇、藤井結那、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1報・室内・屋外の細菌叢、日本建築学会大会学術講演梗概集、pp.743-744、2016
- 7) 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2報 細菌叢の解析結果、日本建築学会大会学術講演梗概集、pp.745-746、2016

謝辞

本研究は、科学研究費助成事業課題番号 15H02277 (研究代表者：加藤信介) による。

参考文献

- 1) 柳 宇：室内環境と微生物、空気清浄、第52巻、第1号、pp.45-54、2014
- 2) J.D.Watson, F.H.C.Crick：Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acids, *Nature*, Vol.171, pp.738-739, April 25, 1953
- 3) Shadi Shokralla, Jennifer L. Spall, Joel F. Gibson and Mehrdad Hajibabaei：Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research, *Molecular Ecology* 21, pp.1794-1805, 2012