

特集：人間科学

# マイクロバイオーーム解析を用いた 列車内の環境衛生評価のための基礎研究

吉江 幸子\* 池畑 政輝\* 川崎 たまみ\*  
京谷 隆\* 潮木 知良\*

Basic Research for Evaluation of Environmental Hygiene in Railway Vehicles Using Microbiome Analysis

Sachiko YOSHIE Masateru IKEHATA Tamami KAWASAKI  
Takashi KYOTANI Tomoyoshi USHIOGI

To evaluate environmental hygiene, microbiome analysis that comprehensively and qualitatively grasps the types and proportions of microbial genes on surfaces and airborne samples in railway vehicles was introduced. We monitored commuter vehicles using this analysis technology and confirmed that it was possible to grasp the difference in microbiome according to the difference in equipment. As a result, the microbial diversity of each equipment suggests that a floor has a different microbiome from others, and that the equipment which passengers directly touch, such as handrails and grips, have similar microbiome. The result of estimation analysis of origin of microorganisms indicates that the proportion of human-derived microbiome tends to be high in handrails and grips.

キーワード：環境衛生，マイクロバイオーーム，車内設備，遺伝子，モニタリング

## 1. はじめに

鉄道は不特定多数が利用する公共交通機関であることから、その環境衛生を維持・向上することは、利用者および鉄道従事者の安全・安心、更には快適性を確保するために重要である。具体的な鉄道の車両や駅における快適を含む環境衛生の要因としては、温湿度、振動、照度、化学物質（臭気成分等）、微生物等が挙げられるが、このうち、温湿度、振動、化学物質については、既に、鉄道における「見える化」に向けた測定・評価技術の開発が進められ<sup>1)</sup>、環境衛生の向上に貢献している。一方、微生物については、その知見は少ないのが現状である。

特に昨今では、2019年末から始まった新型コロナウイルス感染症拡大を契機とし、社会全体で生活様式が大きく変化するとともに、感染防止を含めた環境衛生への意識が高まっており、公共交通の環境衛生のあり方も問われるようになってきた。また、2017年には運輸安全管理マネジメント制度のガイドライン<sup>2)</sup>の改訂に伴い、運輸事業者期待される安全管理の取組における経営トップの責務として、「社会的要請が高まっている自然災害、テロ、感染症等への対応などの課題に対して的確に対応することが重要であることを認識する。」という文言が追記された。このように、感染症等の環境衛生上の課題に対しても鉄道事業者が一定の役割を果たすことが求められ始めている。さらに、将来的な鉄道を取り巻く変化

においては、インバウンド増加や地球温暖化に伴う環境衛生の変化が想定されるほか、少子高齢化に伴う労働力不足を想定した環境衛生維持のためのメンテナンスの効率化も必須である。

これに対し、本研究では鉄道環境の微生物に関する詳細な情報を得ることで微生物を「見える化」し、清掃・消毒や抗菌・抗ウイルス素材等の効果的、効率的な導入や、環境衛生に関わる将来的な変化への対応を可能とすることを目的とした。

この微生物の「見える化」においては、近年解析技術が大きく発展し、遺伝子配列に基づく評価を簡便かつ安価に行うことが可能となってきた。目に見えないため過剰な不安要素ともなり得る微生物の状態を把握し、鉄道の環境衛生の向上策の効果を示すことは、ひいては鉄道利用者や従事者の安心にもつながると考える。

本報告では、微生物を「見える化」するために、遺伝子に基づき、その場に存在する細菌や真菌等の微生物全体像（マイクロバイオーーム<sup>3)</sup>と呼ぶ。ここではウイルスは対象としない。）を把握する技術である「マイクロバイオーーム解析」による鉄道の環境衛生モニタリングの手順の整理、および実車での基礎的なモニタリングにより得られた知見について報告する。

\* 人間科学研究部 生物工学研究室

## 2. 環境衛生モニタリングのための微生物検出技術

鉄道の微生物に対する環境衛生上の具体的な対応策として、薬剤等を用いた清掃・消毒や、抗菌材料をはじめとする素材による対策、また換気等が主に考えられる。それらの対応策の導入に際しては、具体的な根拠として、対策の対象とする車両や駅の空間・設備における、微生物の種類、その特徴や分布、それらの季節や利用時間帯等に応じた変化を予め把握できるよう見える化し、さらに対策効果として、対策の前後での変化を評価できることが望ましい。ここで述べる「環境衛生モニタリング」とは、現場に存在する微生物を明らかにし、その状況を捉えることにより、環境衛生の向上に必要な情報を得るための手段である。

例えば、感染症対策の1つである、清掃・消毒は、環境中の病原体を不活化または低減させることを目的として実施する。これらを効率的かつ的確に行うためには、例えば鉄道車両であれば、まず設備ごとの微生物を見える化し、微生物の分布等を踏まえ、重点的に対策すべき箇所を絞り込むことが有効である。その上で、効果的な方法を検討するため、対策前後の微生物の量的な変化を捉える必要がある。

このため、鉄道総研では微生物の遺伝子に基づいた定性・定量的検出技術を組み合わせた鉄道の環境衛生モニタリングに向けた研究を進めている（図1）。本報告ではこのうち、車両を対象とした定性的検出技術（マイクロバイーム解析）の適用方法と結果について報告する。

## 3. 鉄道環境におけるマイクロバイーム解析手順の検討

マイクロバイーム解析の手順は大きく分けて、鉄道環境からの試料採取、採取した試料からのDNA抽出、そのDNAに含まれるマイクロバイーム解析に必要な遺伝子配列の解読、得られた遺伝子配列に基づく解析の4つとなる。本章ではこの4つの手順について整理する。

### 3.1 試料採取

試料採取は、環境衛生モニタリングの上で最も重要な作業となるが、営業車両での試料採取は、メンテナンス等の合間に限られるため、解析可能な試料を限られた時間内で採取する必要がある。そこで、数名の作業員により、表1に示す各設備から30分～1時間程度の作業時間でマイクロバイーム解析に十分な試料量を得るための採取手法を整理した。試料採取には、その性状により、①設備表面の付着物に対しては、スワブ（4N6FLO-QSwabs レギュラーサイズ（ドライチューブ入り））に

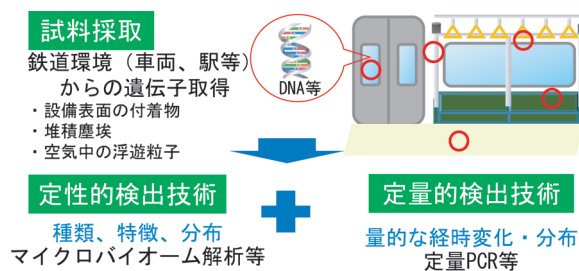


図1 鉄道の環境衛生維持・向上のための微生物の見える化

よる乾燥した状態でのふき取り採取、②座面上に堆積した塵埃に対しては掃除機による回収、③空調フィルタに捕集された塵埃に対しては滅菌ピンセット等によるかき集めの方法を用いた（図2）。スワブによるふき取りは、生理食塩水等に浸して採取する方が効率が良いものの、設備素材への影響の他、営業に復帰するまでの限られた時間内に残存する液体等の拭き取り、乾燥が困難な場合があるため、乾いたスワブを用いて、採取面積を大きく確保することとした。掃除機による採取は、採取後の試料回収を容易にするため、底部を切断した50ml滅菌チューブを紙パックに接続して吸込口に取り付け、チューブを介して塵埃を捕集することとした。

採取する面積の目安は、通勤車両に関しては、手すり、つり手、座面等の設備において1ロングシート（7席分）とした。

表1 通勤車両調査時の試料採取箇所の整理

本文番号	方法	試料採取箇所
①	スワブ	運転台、窓（乗降ドア等）、つり手、手すり棒（水平、垂直）、床
②	掃除機	座面塵埃
③	かき集め	空調フィルタ塵埃

### 3.2 DNA抽出

DNA抽出には、DNeasy PowerSoil Pro Kit（QIAGEN）を用いた。DNA抽出工程では、周辺環境から持ち込まれる土に含まれる腐植物質等が、DNA合成酵素の働きを利用して遺伝子断片を増幅するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅を阻害することが考えられるため、このような阻害物質を除去する工程を含む抽出方法を選定した。

### 3.3 遺伝子の増幅および配列解読

マイクロバイーム解析では、抽出したDNAから細菌や真菌の系統学的分類に用いられるrRNA遺伝子等の一部領域をPCRにより増幅して解析することで、細



図2 試料採取の方法

菌や真菌等の種類を同定することができる。本報告では、真正細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子の特定の領域を PCR にて増幅させるため、DNA を複製する起点となる DNA 断片であるプライマーとして、341F<sup>4)</sup>、805R<sup>5)</sup> の配列を用い、文献 6 のプロトコールをもとに PCR による DNA 断片の増幅および精製を実施した。精製後の試料は、次世代シーケンサー Miseq (Illumina) にて遺伝子配列を解読した。

### 3.4 遺伝子の解析

真正細菌・古細菌の種類を同定し、試料ごとの種の割合等を算出するため、Miseq によって得られた遺伝子配列データを、マイクロバイオーム解析用ソフトウェア QIIME2-2019.07<sup>7)8)</sup> を用いて解析した。なお、一部季節では、植物由来等の遺伝子が検出されたことから、これらの遺伝子配列を除去する工程を追加し、全体の解析を行う手順とした。真正細菌・古細菌のうち、鉄道環境から検出されるのは、ほとんどが真正細菌であるが、本報告では、以下これらを合わせて「微生物」と表記する。

## 4. 通勤車両におけるモニタリング調査

### 4.1 方法

#### 4.1.1 調査対象

対象とする通勤車両は、同一路線を走行し、運用形態が同じで、年式や設備の一部が異なる 2 形式（以下、車種 A、B とする）とした。車種 B では、手すりの表面加工が異なるほか、つり手に抗菌素材が使用され、空気清浄機が搭載されている等の違いがあった。

#### 4.1.2 調査方法

試料採取は、2018 年 10 月、2019 年 10 月に実施した。採取は、通勤車両が営業走行し、車両基地に入庫した後、清掃前の留置された状態で実施した。それぞれの時期に各車種の任意の一編成の同一号車を対象として採取した。採取した試料解析の手順は 3 章に示した通りとした。

#### 4.1.3 多様性解析

得られた塩基配列から、解析過程で生じたエラーを含む配列を除去した amplicon sequence variant (ASV) に基づき、微生物の多様性を解析した。試料内の多様性を

示す  $\alpha$  多様性については、種数と種均等度（ここでは ASV 数とその均等度）の指標である Shannon 指数<sup>9)</sup> を算出した。試料間の多様性を示す  $\beta$  多様性については、微生物の系統学的距離およびその割合に基づき算出された weighted unifrac 距離を用いて主座標分析を行った。統計的検定は、Shannon 指数については Kruskal-Wallis 検定、weighted unifrac 距離については PERMANOVA によって行った。Benjamini-Hochberg FDR による調整済み  $p$  値 ( $q$  値) が 0.05 未満の場合、統計的有意差があるとみなした。

#### 4.1.4 微生物種の同定

微生物種の同定は、得られた ASV から、データベース Greengenes<sup>10)</sup> に基づき行った。

#### 4.1.5 微生物の由来の推定

検出された数百種類以上の微生物に対して既往文献等からその由来を調査するのは困難であるため、様々な環境中から検出され、既に報告されているマイクロバイオームデータをもとに、鉄道環境試料内の由来の内訳を推定した。本報告では、Earth Microbiome Project (EMP)<sup>11)12)</sup> に登録されたマイクロバイオームデータを参照し、EMP ホームページで公開されている試料リスト（今回は代表的な 2000 データ）から、人由来の試料（皮膚、口腔、鼻腔、糞便）および環境由来の試料（水、土壌、大気）を由来として設定し、解析には SourceTracker2<sup>13)</sup> を用いた。

## 4.2 結果および考察

### 4.2.1 車種の違いによる多様性の比較<sup>14)</sup>

車種 A および車種 B に関して、客室内全体の違いについて検討した。車種 A、B について、試料内の多様性（ $\alpha$  多様性のうち shannon 指数）を図 3 に示す。この結果、車種 A と B では違いがみられないことがわかった。

また、試料間の多様性（ $\beta$  多様性）について、車種 A に対する weighted unifrac 距離として図 4 に示す。 $\alpha$  多様性と同様に、車種間の統計的有意差は見られなかった。このことから、同じ路線を走行し、同様な運用形態である車種 A、B において、微生物の多様性に大きな違いはみられないことが確認された。今回対象とした車種 B については、つり手に抗菌仕様がなされていたが、つ

り手のみを対象として比較しても、車種 A と B との間で微生物の多様性に有意な差は見られなかった。ただし、この多様性の評価は、微生物の種類とその割合に基づき解析したものであり、量的な議論はできない。今後、環境衛生向上につながる知見として、抗菌・抗ウイルスや汚れが付着しにくい等、機能の異なる素材間の比較を行うため、多様性だけでなく量的な分布や経時的な変化等も含めて、検討する必要があると考える。

#### 4.2.2 設備の違いによる多様性および微生物種数の比較<sup>15)</sup>

次に設備ごとの違いを検討するため、車種 A と B を合わせて、設備の違いによるマイクロバイオームの比較を行った。

試料内の多様性として、客室内の各設備の  $\alpha$  多様性 (Shannon 指数) を図 5 に示す。この結果から、微生物の多様性は床が最も高く、他の設備と統計的有意差が見られた。これは、土等の鉄道外環境からの持ち込みが多いことが理由として考えられる。次いで  $\alpha$  多様性が高かったのは座面や空調埃であり、座面については手すり、

つり手、窓と有意差がみられたが、空調埃とは差がなかった。座面試料や空調埃試料は、それぞれ、堆積、浮遊した塵埃を捕集したものであるため、人の衣服に付着した微生物や空気中の微生物等が含まれると考えられ、 $\alpha$  多様性が高い傾向にあったと考えられる。また、手すり、つり手、窓においては有意差が見られなかった。

次に、設備ごとの  $\beta$  多様性について、主座標分析結果を図 6 に示す。この結果、設備ごとのプロットが集団を形成しており、それぞれの設備に応じてマイクロバイオームが形成されていることが示唆された。また、人が手で直接触れる頻度の高い手すり、つり手、窓において、プロット集団の重なりが大きく、各設備間に統計的有意差も見られなかったことから、マイクロバイオームが類似していると示唆される。人が直接触れる設備は、人由来の微生物が付着しやすいこと等から、マイクロバイオームが類似していることが考えられた。一方で、床はこれらとは別の集団を形成しており、その他の設備と比較して、統計的有意差が見られたことから、異なるマイクロバイオームが構成されていると考えられる。

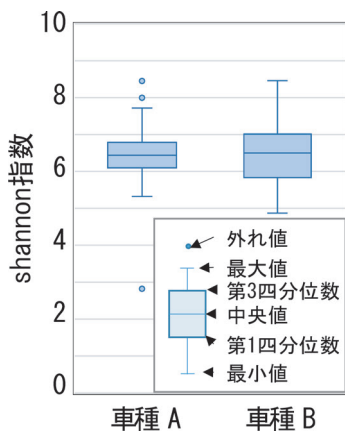


図3 車種の違いによる  $\alpha$  多様性

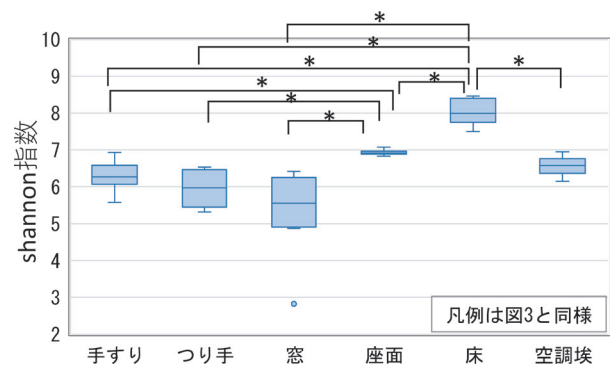


図5 設備の違いによる  $\alpha$  多様性 (\*  $q < 0.05$ )

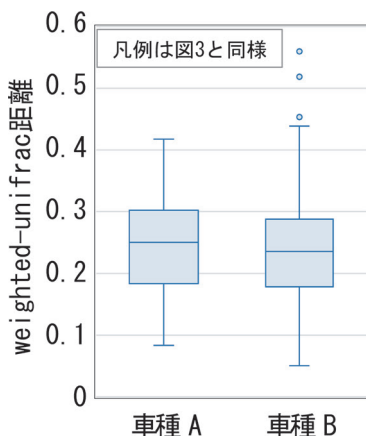


図4 車種の違いによる  $\beta$  多様性 (車種 A に対する weighted unifrac 距離)

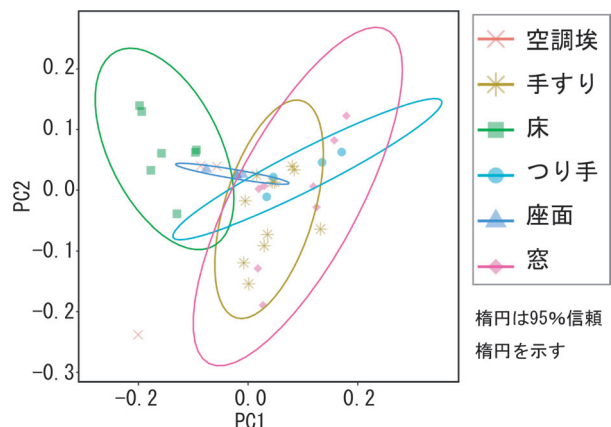


図6 設備の違いによる weighted unifrac 距離の主座標分析結果 (文献 15 図 2 を改変)

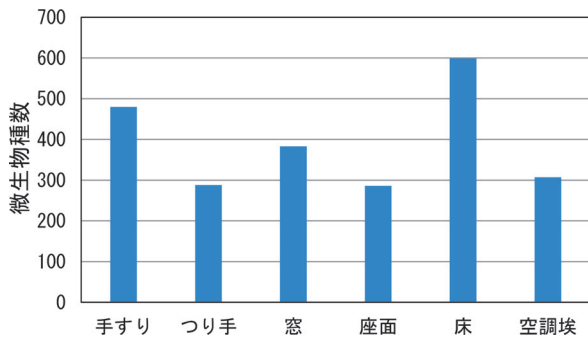


図7 同定された微生物種数

※データベースとの照合により、同定された種のみ

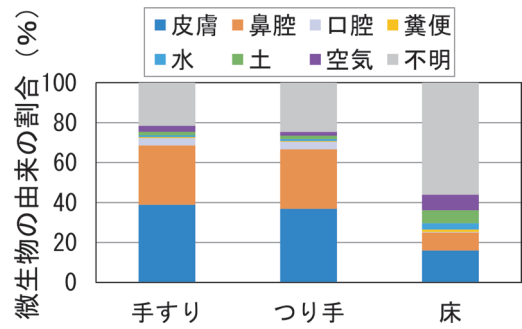


図8 由来の推定結果 (2018年10月試料)

各設備の試料から得られた遺伝子配列を、データベースと照合することにより微生物の同定を行うことで得られた、設備ごとの微生物種数を図7に示す。この結果、今回用いた試料から同定された微生物種の総数は、床が599種と最も多く、次いで手すりが480種と多いことがわかった。床において $\alpha$ 多様性が高かったのは、種数が多いことが1つの要因であることが示唆された。

今回は同じ季節(10月)に採取した試料について解析を行ったため、微生物の生育にも関わる温湿度の異なる季節による違いについては検討できていない。このため、今後、各設備について、同じ路線での変化の状況を把握するため、季節ごとに複数の試料を収集することで、その変化について検討する必要があると考える。

#### 4.2.3 微生物の由来の推定

4.2.2項において、設備ごとにマイクロバイームを構成する微生物の由来が異なることが考えられたため、2018年10月の試料に対して、人が触れる設備として手すりやつり手、 $\alpha$ 多様性や $\beta$ 多様性で違いが見られ、人が直接触れない設備として床を対象に、由来の推定を行った結果を図8に示す。この結果、手すりやつり手において人由来の微生物の割合が大きいことが示された。床については、手すりやつり手と比較して、土や空気等の環境由来の微生物の割合が高かった。本データでは、不明が多いが、今回はEMPデータベースから由来を設定したことが一因として考えられ、対象とした路線沿線環境のマイクロバイームを用いて由来を推定すれば、より周辺環境を考慮した解析ができる可能性がある。

なお、同じ通勤車両の試料を用いて、人が直接触れる設備(手すり、つり手、窓)に特徴的な微生物をLEFSe (Linear discriminant analysis effect size)<sup>16)</sup>にて解析したところ、人の皮膚常在微生物であるCutibacterium acnes等を含むActinobacteria門に属する微生物が主として抽出された<sup>17)</sup>。

## 5. まとめ

本報告では、鉄道車両の設備表面ふき取り試料や堆積・浮遊する塵埃試料中の遺伝子を検出・解析することで、その種類や大まかな割合を網羅的・定性的に把握するマイクロバイーム解析技術を導入し、鉄道環境中の微生物を「見える化」する調査手法を構築した。そのために、営業の合間に可能な採取箇所の選定と採取量、試料中の微生物遺伝子の検出・解析条件や手順、さらに、由来等の解析方法の導入を検討した。

次に、構築した手法を用いて通勤車両のモニタリングを行い、今回解析した試料における微生物種数は、床が最も多く、次いで手すりが多いこと、また、各設備の微生物の多様性については、床は他設備と異なり、手すりやつり手等の人が直接触れる設備は、類似していることがマイクロバイーム解析から示唆された。これらの設備に対し、微生物の由来の推定を行ったところ、手すりやつり手においては、人由来微生物の割合が多いことがわかった。

今後、この技術を用いた環境衛生モニタリングの適用先の一つとして、清掃・消毒作業の効率化、抗菌・抗ウイルス機能を持つ設備導入の施策に関する具体的な根拠を提供できると考える。例えば、今回は人が直接触れる設備において、人由来微生物の割合が高いという推定結果が得られたが、この結果は、例えば感染機会の抑止のために重点的に対策すべき箇所の抽出に活用できる可能性がある。それは、感染症の病原体が、感染者から排出される際、通常生息している人由来の微生物とともに排出されることが想定されるため、人由来微生物を指標として分布や移動の実態把握を行うことは、病原体を含む飛沫や飛沫核を吸い込む(飛沫感染、空気感染等)、あるいは飛沫等が付着した設備を触り、体内に入る(接触感染)等の感染経路や機会に関する情報となり得ると考えるからである。

このような定性的な知見に加え、対象とする設備にお

ける微生物の量的な分布やその経時的な変化を把握することで適切なメンテナンスサイクルなどの提案も可能になるため、デジタル PCR 等による遺伝子定量技術による、指標として選定した微生物の定量技術の導入も進めている。

これらの取り組みを進めていくことで、将来的に想定される鉄道を取り巻く社会変化や環境の変化に伴う環境衛生状態の変化、あるいは新興・再興感染症等にいち早く対応し、利用者・従事者の安全・安心を確保できる鉄道環境の構築にも貢献できると考える。

## 文 献

- 1) 鈴木浩明, 中川千鶴: 鉄道利用者の快適性に関わる研究の現状と課題, 鉄道総研報告, Vol.34, No.1, pp.5-8, 2020
- 2) 国土交通省大臣官房運輸安全監理官: 運輸事業者における安全管理の進め方に関するガイドライン～輸送の安全性の更なる向上に向けて～, 2017
- 3) Berg, G. et al., "Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges," *Microbiome*, Vol. 8, No. 1, 103, 2020.
- 4) Hugerth, L.W. et al., "DegePrime, a Program for Degenerate Primer Design for Broad-Taxonomic-Range PCR in Microbial Ecology Studies," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 80, No.16, pp.5116-5123, 2014.
- 5) Herlemann, D. P. et al., "Transitions in Bacterial Communities along the 2000 km Salinity Gradient of the Baltic Sea," *The ISME J.*, Vol.5, No.10, pp.1571-1579, 2011.
- 6) 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System: [http://jp.support.illumina.com/downloads/16s\\_metagenomic\\_sequencing\\_library\\_preparation.html](http://jp.support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html) (参照日: 2021年10月11日)
- 7) Bolyen, E. et al., "Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science using QIIME 2," *Nature Biotechnology*, Vol.37, No.8, pp.852-857, 2019.
- 8) QIIME 2: <https://qiime2.org/> (参照日: 2021年10月11日)
- 9) Shannon, C. E., and W. Weaver, "The Mathematical Theory of Communication," University of Illinois Press, 1963.
- 10) DeSantis, T. Z. et al., "Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 72, No. 7, pp. 5069-5072, 2006.
- 11) Thompson, L. R. et al., "A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity," *Nature*, Vol. 551, pp.457-463, 2017.
- 12) Earth Microbiome Project: <https://earthmicrobiome.org/> (参照日: 2021年10月11日)
- 13) Knights, D., "Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking," *Nat. Methods*. Vol.8, No.9, pp.761-763, 2011.
- 14) 吉江幸子, 川崎たまみ, 京谷隆, 潮木知良, 池畑政輝: 通勤車両におけるマイクロバイオーーム解析, 2020年室内環境学会学術大会講演要旨集, p.65-66, 2020
- 15) 吉江幸子, 川崎たまみ, 京谷隆, 潮木知良, 池畑政輝: 通勤車両内の設備に存在する微生物の比較, 第27回鉄道技術連合シンポジウム(J-RAIL2020)講演論文集, S-4-2-5, 2020
- 16) Segata, N. et al., "Metagenomic biomarker discovery and explanation," *Genome Biol.*, Vol.12, No. 6, R60, 2011.
- 17) 吉江幸子, 川崎たまみ, 京谷隆, 潮木知良, 池畑政輝: マイクロバイオーーム解析による鉄道車両の環境衛生モニタリングの検討—設備の特徴の把握—, *交通医学*, Vol.75, p.45, 2021