

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19267

研究課題名(和文)非結核性抗酸菌(NTM)の新規検出方法の開発

研究課題名(英文)A novel treatment method for selective cultivation of non-tuberculous mycobacteria

研究代表者

平井 一行(Hirai, Kazuyuki)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：10580847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、非結核性抗酸菌(NTM)に対して、病院・家庭内水系の培養法による迅速発育型と遅発育型が分離検出可能な選択的かつ定量的な検出方法の開発が最大の目的である。開発した新規検出方法は、家庭・病院の水系試料からNTMを検出することが可能であった。

NTMの汚染状況を把握することが可能となったことから、病院・家庭内水系での免疫抵抗減弱者のNTM感染対策を講じることができ、健康な社会づくりに貢献できることを期待している。

研究成果の概要(英文)：Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are opportunistic pathogens. Patients infected with NTM are increasing year after year. A main niche of NTM is aquatic environments including municipal water supplies. However, the treatment methods for cultivation of M. tuberculosis cause decrease of viable NTM significantly. It is difficult in culture to detect NTM quantitatively. Therefore, we develop a novel treatment method for selective cultivation of NTM.

On the basis of our results, a novel treatment method is useful for the semi-quantitative detection of NTM in culture

研究分野：細菌学

キーワード：非結核性抗酸菌 検出法 培養

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌 (NTM) は病原性が弱い、主に日和見感染である。NTM は自然界に広く存在しており、ヒト-ヒト感染する結核菌とは異なり、環境から感染する。医療の高度化、並びに高齢化による免疫抵抗減弱者の増加に伴い、NTM の感染者数は世界的に増加傾向にあり (Thorax et al., 2007)、日本でも同様に増加しており問題となっている。治療は抗生剤の投与となるが、効果は小さく除菌が出来ずに難治化する例が多い。

このような背景から、感染原因である汚染源の調査が盛んに行われるようになった。調査から、病院内では、上水道、無菌水作製装置の蛇口、内視鏡洗浄機などが NTM に汚染されている実態がわかってきた (Gillespie et al., 2000)。また、NTM 患者の株と家庭内の水道水や浴室から分離された株とに遺伝子的相関性があった報告もある (S. Tichenor et al., 2012)。

これらの調査では NTM の菌種の確定 (定性的検出) までであり、汚染度 (定量的検出) は把握されておらず、感染経路は推定に留まり、多くの場合は原因が不明に終わるのが現状である。これは、NTM の選択的・定量的検出方法が確立されていないからである。

NTM はコロニー形成に 1 週間以上を要することから、選択的培養を行うには 1-2 日でコロニー形成する一般細菌を殺滅する必要がある。そこで、同じ抗酸菌である結核菌を検出する処理法を代用している。しかし、結核菌よりも酸やアルカリに弱い NTM の生残菌数は処理後に大きく低下する。また、処理濃度を一定にしていることから、迅速発育型 NTM が多数のコロニーを形成した場合は、遅発育型 NTM のコロニーは形成されず検出不能になっていることが推測される。このことから、迅速発育型と遅発育型を区別し、選択的な汚染度の把握 (定量的検出) は、現状では困難である。

また、汚染源の早期確定の為に、迅速性の高い核酸を標的とする市販のキットも使用されている。しかし、定量的検出が可能なキットはまだ無い。

2. 研究の目的

迅速性、迅速発育型と遅発育型が分離検出可能な選択性、汚染度 把握可能な定量性を併せ持つ、病院内水系試料の NTM 検出系の開発が望まれており、本研究によりその新規な検出法を確立したい。

病院内水系においては一般細菌と NTM (迅速・遅発) とが混在することから、長期培養を必要とする NTM を無処理で選択的・定量的に分離把握することは上記に述べたとおり不可能である。申請者は、高い頻度で代用されている NaOH 法、NALC-NaOH 法、シュウ酸法 (結核菌検査法指針 2000. 27-42) を臨床での分離率が高い遅発育型 NTM の *Mycobacterium avium* に適用して、生菌数が

約 1%以下になることを確かめた (図)。その他の NTM でも同様の傾向が考えられ、3 種の処理法が定量的把握の目的には使用出来ないことが推測された。

しかし、予備実験ではシュウ酸法の処理濃度を原法の 5%より下げることにより、NTM の生菌数は大きく上昇するのに対して、一般細菌 (表皮ブドウ球菌、大腸菌、緑膿菌) はいずれも 0.05%以上での処理ですべて死滅することがわかった (原液; 109 CFU/mL)。

また、迅速発育型の *M. fortuitum* は無処理 (109 CFU/mL) と比べ、シュウ酸 0.05% 処理ではほぼ同じ生菌数が得られ、0.1% 処理では約 50% の生菌数となり、0.5% 処理では約 10% に減少した。遅発育型の *M. goodnae* では 0.5% 処理で無処理とほぼ同じ菌数が得られた。臨床分離株を用いたところ、低濃度 (0.1% と 0.5%) による改良シュウ酸法で、選択的かつ定量的な NTM 検出が可能である結果を得つつある。

上記結果から、シュウ酸法を改良することで、一般細菌と NTM (迅速・遅発) とが混在する病院・家庭内水系から NTM 選択的に迅速発育型と遅発育型分離培養できる可能性が示唆されている。そこで、NTM の選択的、定量的検出法の開発を行う事にした。

また、培養法による NTM 検出には最短の培養でも一カ月の時間を要する。しかし、免疫抵抗減弱者の多い病院では、早急に汚染状況を把握し対策を講じたい。そこで、高い定量性と再現性を併せ持つ qPCR 法による迅速検出を考えた。

NTM の同定においては、16S rRNA 遺伝子配列だけでは、種レベルまでの同定が困難である。そこで、qPCR 法では、抗酸菌属として定量することで、汚染度を測定することにした。病院内水系においては一般細菌と NTM とが混在することから、プライマーの特異性が問題になるが、培養法を確立した上で PCR 法を比較検討すれば、特異性と定量性を検討することができる。

3. 研究の方法

(1) 結核菌検出法を用いた NTM 生残率の比較
NTM の検出に代用されている NaOH 法、NALC-NaOH 法、シュウ酸法では、NTM は生残率は低くなり、迅速発育型は上記処理では生残菌は極めて少ないとの報告はあるが、現在のところ正確に生残率を測定した報告はない。

そこで、迅速発育型、遅発育型の懸濁液を用いて、上記 3 種の方法で個々に処理した後、7H11 培地による培養で生残率を求め検出感度を明らかにする。

(2) 定量性を高める最適な検体処理条件の検討

選択的・定量的検出法の確立の為に、はじめに処理条件の検討を行う。臨床で分離率が高い *M. avium* を使用した予備実験から、

シュウ酸法の NTM 生残率が高いことを認めている。

そこで、シュウ酸法の原法について 4 項目について改良を行い、検体処理条件の検討をする。

(3) 選択性を向上させる為の固形培地に添加する抗生剤の検討

環境水を処理した予備実験から 0.05% シュウ酸処理では、メチロバクテリウムと少数の他のグラム陰性菌(菌種同定不能)のコロニーを認めた。また、真菌は 0.5% シュウ酸処理でも増殖することがあった。そこで、選択性向上の為に、7H11 培地への抗生剤添加を検討する。結核菌検出の場合には培地に、生存した細菌・真菌の増殖抑制を目的として、抗生剤混合剤 PANTA (成分: ポリミキシン B、アンホテリシン B、ナリジクス酸、トリメトプリム、アズロシリン) が添加されるので参考にした。

検討した検出方法を用いて、NTM 以外のコロニーを認めないように培地に添加する抗生剤、および抗生剤の濃度を検討する。模擬汚染水(一般細菌として表皮ブドウ菌、大腸菌、緑膿菌、メチロバクテリウムを、真菌としてカンジダ、アスペルギルス、および NTM を混合懸濁)を使用し、評価する。

PANTA は高価であるので、より廉価な検出法を開発する。候補としては、一定期間安定(1ヶ月)であり、NTM に対して抗菌性が無いもの、そして低価格を考慮し、一般細菌に対してはクロラムフェニコール、あるいはナリジクス酸を優先して検討する。抗真菌剤は、PANTA を参考にアンホテリシン B を検討することにした。

(4) NTM 汚染度(定量的)の迅速把握の為に qPCR 法との比較

抗酸菌属に特異的な遺伝子配列は既に報告されており、検出するプライマーの配列を利用することが来る。

そこで、病院内水系の汚染度の迅速把握為に抗酸菌属として qPCR の菌数と新規検出法の菌数を比較する。

(5) 確立した新規検出法の実試料(実際の環境水)測定への応用と評価

最適化した検出法について、病院内水系試料を使い有用性の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 結核菌検出法を用いた NTM 生残率の比較
2% NALC-NaOH, 4% NaOH, 5% シュウ酸と抗酸菌の残菌に優位な差は認められなかったが、シュウ酸法が僅かだが残菌率が高い傾向にあった(図 1)。

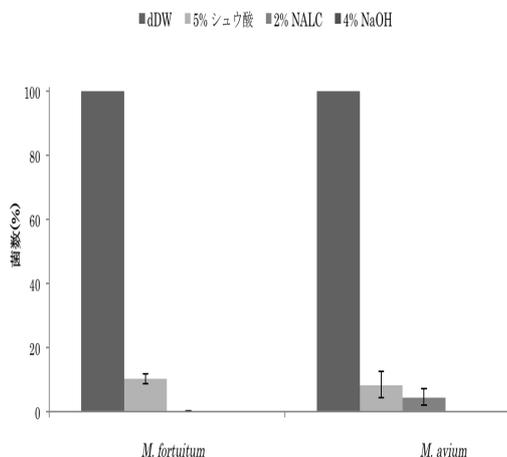


図 1. 結核菌検出法による NTM 生残率の比較

(2) 定量性を高める最適な検体処理条件の検討

改良した検出方法に対して、迅速発育型が 2 菌種、遅発育型を 4 菌種で検討した。シュウ酸濃度が 0.05% では全ての菌で 60% 以上の残菌率があった。また、0.1% では 50% 以上の残菌率であった。0.5% 以上となると、*M. chelonae* や *M. goodii* のように数% しか残菌しないものもあった。また、シュウ酸法原法の 5% では、残菌率が 1% 未満であった。

(3) 選択性を向上させる為の固形培地に添加する抗生剤の検討

PANTA を参考に、ナリジクス酸とアンホテリシン B を使用することで、雑菌の成長を抑制することが出来た。

(4) NTM 汚染度(定量的)の迅速把握の為に qPCR 法との比較

利用できる複数のプライマーと検出法による菌数の相関性を確認した。環境水での相関性を確認中である。

(5) 確立した新規検出法の実試料(実際の環境水)測定への応用と評価

家庭内、病院内の蛇口・浴槽より NTM を検出可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 平井一行、下村裕史、伊奈田宏康、出屋敷喜宏、平井義一
空中浮遊菌サンプラーを用いた非結核性抗酸菌の分離検出
第 89 回 日本細菌学会総会 2016.3.23-25
大阪国際交流センター(大阪)

(2) 平井一行、横田憲治、平井義一
エアロゾルサンプルからの非結核性抗酸菌
の分離検出
第 32 回 日本環境感染学会 2017.2.24-25
神戸国際会議場(神戸)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平井 一行 (Hirai Kazuyuki)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手
研究者番号：10580847