

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：34409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15490

研究課題名(和文)NTM症の予防に向けた環境中における非結核性抗酸菌のホットスポットの解明

研究課題名(英文)Understanding of NTM dynamics in environments

研究代表者

一條 知昭 (Ichijo, Tomoaki)

大阪樟蔭女子大学・健康栄養学部・准教授

研究者番号：20513899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：非結核性抗酸菌症の感染源として考えられている土壌環境における非結核性抗酸菌について、非結核性抗酸菌の群集構造解析、並びに他の細菌や真核生物も含めた解析を進めた。その結果、(1)土壌環境には多様な種のNTMが存在し、*M. avium*、*M. goodii*は今回対象とした土壌には普遍的に存在していること、(2)*M. avium*や*M. goodii*の存在割合と今回測定した物理化学的因子それぞれの間には関連は見られないこと、(3)*Mycobacterium*属菌の群集構造にはサンプリングサイトとの関係が示唆されることなどを見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた結果は、環境における非結核性抗酸菌の動態を理解するための基盤的知見となり、環境微生物学の観点から非結核性抗酸菌症の予防への貢献が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In order to prevent the nontuberculous mycobacterial diseases originated from environments, clarification of the dynamics of nontuberculous mycobacteria in the environment is indispensable. In this study, we focused on the soil considered as one of infectious sources, and clarified the mycobacterial abundance and community structure using gene-targeting methods. We found that there were various species of nontuberculous mycobacteria in the environment. Among these, focusing on *Mycobacterium avium*, it was found that it existed widely in the soil analyzed in this study, and it might dominate in the environment that repeats drying and wetting like flower pots. These results became the fundamental knowledge for understanding the dynamics of nontuberculous mycobacteria in the environment, and we can contribute to prevent the nontuberculous mycobacterial diseases from the viewpoint of environmental microbiology.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境微生物 環境疾患 非結核性抗酸菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌症は、1990年頃から米国を中心に患者報告者数が増加し、社会問題化している。日本では毎年新たに10,000名を超える患者が発生しているとされるが、実際の患者数はさらに多いと推測されている。本菌は結核菌に比べビルレンスは低いが、薬剤が効きにくく、慢性化しやすいため Quality of Life (QOL) が低下する。本感染症はヒトからヒトへの感染はなく、環境中の非結核性抗酸菌に暴露されることにより感染する。特に、生活環境中のエアロゾルの発生が感染と深く関わっていることが示唆されており、米国環境保護庁 (U.S. EPA) は水道水中のマイコバクテリアをゼロにするよう努力目標を設定している。しかし、本疾患の感染源や感染経路に関しては不明な点が多く残っており、治療法も未だ確立されていない。

感染源、感染経路の解明に向けては、世界的に研究が進められており、米国においては家庭内の水環境、特にシャワーヘッドを介した感染の可能性が示され、欧州においては T. Iwamoto やロシアの I. Mokrousov らの研究によりブタが介在している可能性を示している。しかしながら、非結核性抗酸菌の環境内動態は不明であり、環境因子と発症との関係が明らかでないため、予防対策を講じることが困難である。また本疾患の罹患者に対する生活指導のための基盤的な情報 (接触をさけるべき環境など) が不足している。

すなわち、本疾患においては治療法の確立とともに、予防が重要であり、環境内の非結核性抗酸菌の動態の解明が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では分子微生物生態学的手法を駆使し、非結核性抗酸菌 (NTM; non tuberculous mycobacteria) の環境内動態を解明し、環境因子とホットスポット (増殖の場) との関係を明らかにする。得られた知見を基盤とし、生活環境からホットスポットを取り除くことにより、非結核性抗酸菌症の予防に直接的に寄与する。

3. 研究の方法

本研究では、生活環境、特に土壌環境に着目し、非結核性抗酸菌症の動態を網羅的に解析し、本感染症のホットスポットの解明を目指した。研究は以下の通り進めた。

(1) 環境中の非結核性抗酸菌の網羅解析: 従来の培養に依存した手法では、環境中に存在する多種多様な非結核性抗酸菌の一部しか明らかとすることはできないため、本研究では培養に依存しない手法として、非結核性抗酸菌を種レベルで分類可能である *hsp65* 遺伝子を、高速シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンス法により網羅的に解析することにより、対象とする環境中に存在する非結核性抗酸菌の全体像を明らかとする。また、現存量測定にはリアルタイム PCR 法を用いた。

(2) *M. avium* の遺伝子型の解明: 土壌試料から *M. avium* を分離し、Variable number of tandem repeat (VNTR) 法により、遺伝子型を解明する。既に分離され、VNTR プロファイルの明らかになっている *M. avium* と今回の研究で分離した *M. avium* の遺伝子型と比較検討することにより、感染経路に関する考察を行う。

4. 研究成果

(1) 環境中の非結核性抗酸菌の網羅解析

非結核性抗酸菌症の感染源のひとつとして考えられている土壌環境における非結核性抗酸菌について、存在する非結核性抗酸菌の網羅解析 (群集構造解析)、現存量測定を行った。試料は環境の異なる複数の土壌表面 (植木鉢、畑、樹木下、植生のある環境、植生のない環境) とし、西日本の2地点から合計30試料を採取した。アンプリコンシーケンスには非結核性抗酸菌を種レベルで分類可能である *hsp65* 遺伝子を、リアルタイム PCR 法による抗酸菌の現存量測定は *atpE* 遺伝子を標的とした。なお、*atpE* 遺伝子は1細胞あたり1コピー保有している。リアルタイム PCR 法で現存量を測定したところ、対象とした土壌において細菌、抗酸菌の現存量はそれぞれ $10^7 \sim 10^9$ cells/g、 $10^5 \sim 10^7$ cells/g であり、乾燥している試料を除き、抗酸菌は全細菌に対し0.1~10%の比率で存在していることがわかった (Fig. 1)。

また、群集構造解析により多様な種の非結核性抗酸菌が存在していることが明らかとなった。これらのうち、臨床重要な *Mycobacterium avium* に着目したところ、今回対象とした土壌には幅広く存在することを見出した。また、得られた非結核性抗酸菌の群集に関するデータを詳細に解析したところ、真核生物内での生残に必要とされる遺伝子を保有する種類の非結核性抗酸菌が、ある特定の環境において優占していた (Fig. 2)。このことは、環境中の非結核性抗酸菌の全体像を理解するためには、非結核性抗酸菌のみ標的とするのではなく、真核生物も含め解析する必

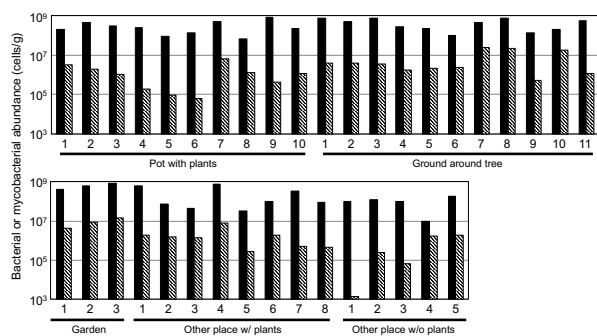


Fig.1. Bacterial and mycobacterial abundances in the soil samples determined with quantitative PCR. The closed bar and the striped bar indicate bacterial and mycobacterial abundance, respectively.

要性を提示するものである。

そこで、非結核性抗酸菌と真核生物や他の細菌との関係を考察すべく、再度同一の環境にて、16S rRNA 遺伝子を標的とした環境細菌叢解析、18S rRNA 遺伝子を標的とした真核生物の群衆構造解析を行った。その結果、①土壌環境には多様な種の NTM が存在し、*M. avium*、*M. goodii* は今回対象とした土壌には普遍的に存在していること (Fig. 3)、②*M. avium* や *M. goodii* の存在割合と今回測定した物理化学的因子それぞれとの間には関連は見られないこと、③*Mycobacterium* 属菌の群集構造と関連する細菌グループは見られなかったこと、④*Mycobacterium* 属菌の群集構造にはサンプリングサイトとの関係が示唆されること、⑤*M. avium* や *M. goodii* はある種の真核生物の存在と関係が示唆されること、を見出した。

(2) *M. avium* の遺伝子型の解明

複数の試料から *M. avium* subsp. *hominissuis* を分離した。VNTR 法を用いた遺伝子解析を行い、先行研究で報告されている肺炎患者宅土壌分離株、患者宅土壌分離株、居住環境分離株や河川分離株と VNTR プロファイルと比較したところ、今回分離された土壌分離株はこれらと異なるクラスターに存在することがわかった。このことから今回分離された土壌分離株は、これまでに日本の生活環境で分離された分離株の遺伝子型とは大きく異なっており、日本の土壌には多様な遺伝子型の *M. avium* subsp. *hominissuis* が存在していることを示唆している。

また、日本と欧州では、臨床で分離される *M. avium* subsp. *hominissuis* 株の遺伝子型に地域差が見られることが報告されている。そこで、これまでに日本と欧州で分離された株の VNTR プロファイルと、今回分離された土壌分離株の VNTR プロファイルをあわせてクラスター分類を行った。その結果、今回分離した土壌分離株は欧州の臨床分離株に多く見られる遺伝子型と非常に近く、日本の臨床分離株に多く見られる遺伝子型とは大きく異なることがわかった。

(3) 最後に

本研究では非結核性抗酸菌の環境中におけるホットスポットを明らかとし、非結核性抗酸菌症の予防を目指したものである。得られた知見を基盤として、ホットスポットを生み出さない環境づくりを行うことにより、非結核性抗酸菌症の予防に直接的に寄与しうる。本研究の成果は、日本をはじめ、経済発展の進んでいる多くの国々で今後大きな社会問題となりうる非結核性抗酸菌症の発生を予防するものであり、環境薬学が挙げる「ヒトと環境の関係を考え、健康な生活を保証する」という大きな使命を果たすものである。

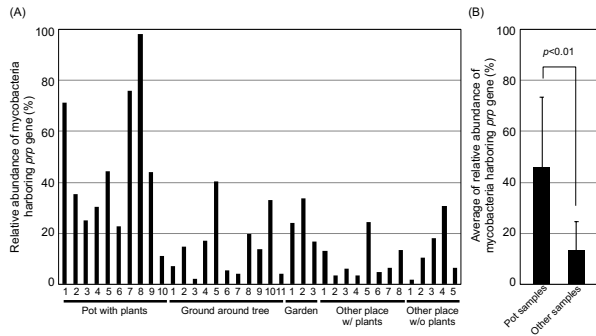


Fig. 2. Relative abundance of mycobacteria harboring *prp* gene against total mycobacterial community. (A) In each soil sample. (B) Average of relative abundance of mycobacteria with *prp* gene.

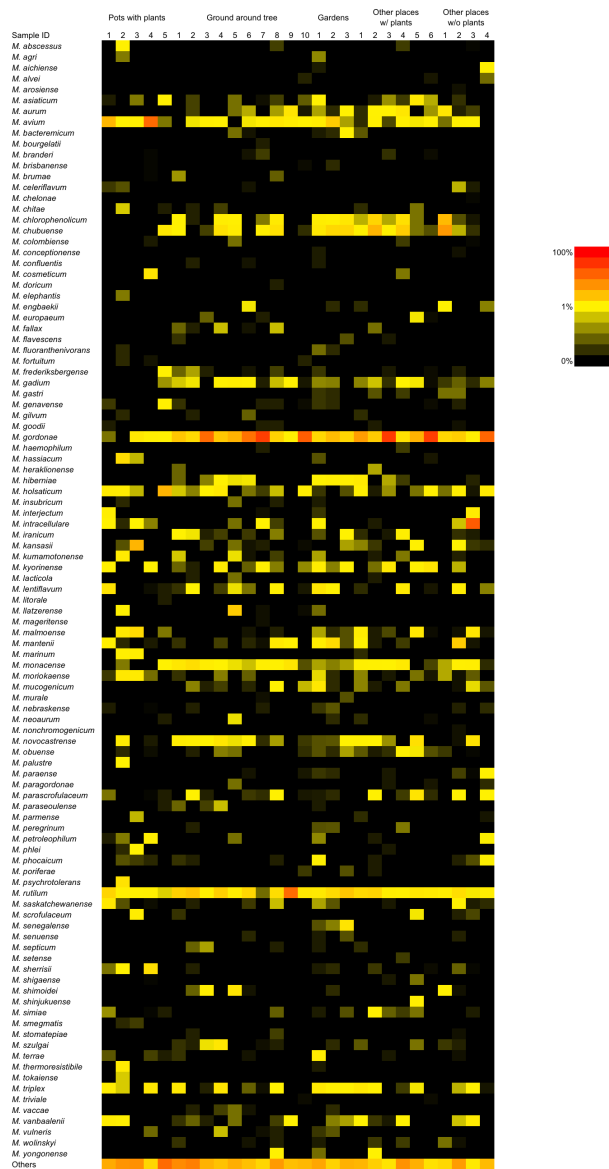


Fig. 3. Mycobacterial distribution at the species level and their relative abundance. Red, yellow and black in the heatmap represent 100%, 1% and 0%, respectively.

環境薬学が挙げる「ヒトと環境の関係を考え、健康な生活を保証する」という大きな使命を果たすものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arikawa Kentaro, Ichijo Tomoaki, Nakajima Satomi, Nishiuchi Yukiko, Yano Hirokazu, Tamaru Aki, Yoshida Shiomi, Maruyama Fumito, Ota Atsushi, Nasu Masao, Starkova Daria A., Mokrousov Igor, Narvskaya Olga V., Iwamoto Tomotada	4. 巻 74
2. 論文標題 Genetic relatedness of Mycobacterium avium subsp. hominissuis isolates from bathrooms of healthy volunteers, rivers, and soils in Japan with human clinical isolates from different geographical areas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 103923 ~ 103923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.meegid.2019.103923	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoaki Ichijo, Nobuyasu Yamaguchi, Masao NASU
2. 発表標題 Dynamics of nontuberculous mycobacteria in living environments
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Microbiology of the Built Environment (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 一條知昭
2. 発表標題 環境細菌の統合的理解に関する衛生微生物学的研究
3. 学会等名 フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----