

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18903

研究課題名(和文)非結核性抗酸菌分布の地域特異性を共存微生物との関係から解明する

研究課題名(英文)Understanding the regional specificity of non-tuberculous Mycobacterium distribution in relation to coexisting microorganisms.

研究代表者

藤吉 奏 (Fujiyoshi, So)

広島大学・学術・社会連携室・助教

研究者番号：20805808

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)：日本全国の浴室環境からシャワー水、シャワーヘッド中バイオフィーム試料を収集し微生物群集構造を解析したところ、シャワー水には地域差がなく抗酸菌の割合もヨーロッパやアメリカと比べると低かった。シャワーヘッド中バイオフィームについても抗酸菌の割合はシャワー水同様に低かった。得られた微生物群集構造を用いてネットワーク解析をしたところ、日和見感染菌を含む属と負の相互作用をする細菌を見出すことができた。しかしこれらは難培養性であったことから、現在理化学研究所と共同で培養方法を検討している。試料から微生物の分離培養をしたところ、現在までにMycobacterium属を含む55株を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、浴室ならびに浄水環境における微生物群集を評価した国内初のデータである。また、同じ浴室で採取したシャワーヘッドからの水とその内部のバイオフィームの微生物群集を比較することで、水とバイオフィームの微生物の類似性と相違性が明確に示された。各家庭において独自のバイオフィーム微生物群集が構築されていたことから、公衆衛生においては各家庭における衛生対策が重要であり、そのためには現場での迅速かつ容易な微生物群集の同定が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Samples from bathroom environments in Japan were collected and microbial community structure in showerhead biofilm and showerhead feed water was analyzed. The percentage of Mycobacterium in showerhead biofilms was low, as was that in shower water. Network analysis revealed some bacterial genus that interacted negatively with opportunistic pathogenic genus. However, these bacteria were difficult to culture, and we are currently working on a culture method in collaboration with RIKEN. We have isolated and cultured microorganisms from our samples and have so far obtained 55 strains, including Mycobacterium spp.

研究分野：環境遺伝生態学

キーワード：住環境 細菌群集 微生物生態学 相互作用 ホームプロバイオティクス 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

近年、日本を含む先進国において一部の非結核性抗酸菌 (Non-Tuberculosis Mycobacteria, NTM) を原因とする肺疾患が急増している^[1]。2014 年の報告では肺 NTM 症の罹患率は人口 10 万人に対して 14.7 と推定されており、7 年前と比較して 2.6 倍と急激な勢いで上昇し公衆衛生上重要な感染症となっている^[2]。NTM は水や土などの環境中に存在する菌で 150 種類以上が発見され、そのうち MAH (*Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*) をはじめとした 20 種類程度が病原菌として知られている^[3]。NTM 症はヒトからヒトへの感染はなく、主な感染経路はヒト周辺環境に存在する NTM への曝露と考えられているが、感染経路は未だ不明である。これまでに、浴室や台所の水/バイオフィーム試料のうち特にシャワーヘッドや浴槽に病原性の NTM が存在し浴室内でこれらの菌に曝露されることが NTM 症の原因である可能性が示唆されている^[1,4]。最近実施された全国規模での調査では、罹患率や臨床現場で分離される NTM 症起因菌種の組成が国内の地域間で大きく異なっていること^[5]、MAH の検出率も地域間で異なることが報告された^[2]。一方で、抗酸菌染色と qPCR を用いた検査では、全国的に約半数の家庭の浴室から NTM が検出されている^[6]。

これまで住環境の微生物は、「ヒト」「建物」「周辺環境」「水」が由来となり形成されることが知られている^[7]。また、微生物群集構造に影響を及ぼす物理化学的環境因子として温度や湿度、上水道の消毒に使用されている塩素などが関与していることが知られている^[7]。それならば、「周辺環境」と「水」の由来に近い地域では微生物群集構造が類似するはずである。しかし、申請者が独自に全国 22 都市、全 12 都道府県からカラン水、シャワー水およびシャワーヘッド中バイオフィームを収集し、それらの微生物群集構造および群集に占める NTM の割合を調べたところ、地域での類似性はなく、試料ごとに異なっていた。病原性の抗酸菌は地域間で差があるにも関わらず、NTM の分布には地域性が見られていないこと、住環境中の微生物群集構造においても地域性が認められないことから、申請者は住環境に存在する病原菌の分布や割合は、上述の物理化学的環境因子だけでなく、それらと共存する他の微生物種との相互作用のような生物学的的因子にも影響を受けているのでは」という問いを持った。

2. 研究の目的

本申請研究では、国内の浴室カラン水、シャワー水およびシャワーヘッド中バイオフィームに存在する NTM と共起/排除関係にある微生物を明らかにすることを目的とする。NTM は培養に要する時間が長く、他菌種によるコンタミネーションの影響を受けやすい^[4]。しかし、病原性 NTM が日本の浴室内に存在することができている事実は、他の微生物との生存競争の中で抗酸菌がニッチを拡大している可能性が考えられる。病原菌も生物のため、単独ではなくそこに生息する他の微生物と相互作用しているはずである。本申請研究により NTM と共起/排除関係にあるような微生物が見つければ、それを利用した病原微生物の新たな予防・制御法を見出すことも可能である。

3. 研究の方法

(1) 試料採取とメタゲノム解析

シャワー水およびカラン水は、0.22 μm フィルターにろ過濃縮、シャワーヘッドバイオフィームはスワブを用いて採取した。採取した試料は日付と地点の郵便番号を記入し、保冷状態で輸送した。試料から、PowerBiofilm などのキットを用いて核酸を抽出した。

(2) 浴室 DNA 試料の 16SrDNA メタゲノム解析による微生物群集組成と NTM 菌種組成解析

抽出した核酸試料を用いて、次世代シーケンサー (Illumina 社 MiSeq および MiniSeq) による微生物群集構造解析を行い、試料中の NTM 菌種組成と微生物群集構造を決定した。NTM 菌種組成の解析には、hsp65 遺伝子を標的に設計した NTM に特異的なプライマーを^[8]、全真菌群集の解析には 18S rRNA 遺伝子^[9]、全細菌群集構造の解析には 16S rRNA 遺伝子^[10]の可変領域を増幅するユニバーサルプライマーを用いた。得られた塩基配列は種レベルまで解析可能なソフトフェア DADA2 (v. 1.10.1) と silva (v. 132 または v. 138) データベースを用いて遺伝学的な系統解析を行った。微生物群集構造のデータをもとに、さらに統計解析ソフト R (v. 3.3.1) を用いて相関解析やパターン解析、サンプリング地点間の類似性を多次元尺度法などにより評価した。これらのデータから、どの微生物が病原性 NTM と相互作用するか、地域間でクラスタリングパターンがあるかを検証した。

(3) 水道水の化学成分分析と NTM 培養

水道水試料について、0.22 μm フィルターにろ過後 7H11 培地を用いて NTM の分離培養をした。得られた菌株はサンガーシーケンサーを用いて 16S rRNA 遺伝子配列に基づき同定した。また、物理化学的因子と微生物群集組成との関係を明らかにするために水道水の化学成分 (塩素濃度、pH、濁度など) も測定した。

4. 研究成果

浴室試料の微生物群集構造を解析したところ、シャワーヘッド中バイオフィーム試料間の微生物群集の多様性は水に比べると高く、各家庭で異なる微生物群集構造が形成されていることが示された(図1)。シャワー水には地域差がなく全国どこの水も類似の群集構造であった。すなわち、浄水中の微生物群集構造は地域に依らず均質であることが示された。試料に占める抗酸菌の割合は水もバイオフィームも平均で0.3%とヨーロッパやアメリカと比べると低かった^[11]。

原水(井戸水や河川水)の微生物群集構造は地域や季節で異なることが知られている。実際に申請者が現代住宅と比較可能な古民家の井戸水に含まれる微生物群集を解析したところ、浄水中の微生物群集とは明らかに異なる微生物群集であった。このことから、浄水過程のどこで微生物群集は均質になるかを調べるため、広島県を含む合計5つの浄水処理施設において各工程の水試料採取・分析も追加で実施した。

水道水試料からNTMを含む微生物の分離培養を開始し、現在までに合計56株を取得している。そのうち22株は *Mycobacterium* 属であった(表1)。抗酸菌特異的な遺伝子配列を用いた解析と培養法を実施したところ、抗酸菌の出現割合は地域によって異なることも示唆された。得られた微生物群集構造を用いてネットワーク解析をしたところ、日和見感染菌を含む属と負の相互作用をする細菌を見出すことができた。しかしこれらは難培養性であったことから、現在理化学研究所と共同で培養方法を検討している。

<引用文献>

[1] Arikawa et al. (2019) Infect. Genetics Evolution. 74:103923, [2] Namkoong et al. (2016) Emerg. Infect. Dis. 22: 1116-1117, [3] Tortoli (2014) Clin Microbiol Rev. 27:727-52, [4] Nishiuchi et al. (2007) Clin. Infect Dis. 45: 347-51, [5] Morimoto et al. (2017) Ann. Am. Thorac. Soc. 14:49-56, [6] Ichijo et al. (2014) PLoS One 9:e110554, [7] Fujiyoshi et al. (2018) Front. Microbiol. 8:2336, [8] Kim et al. (2005) Int. J. Syst. Evol. Microbiol 55:1649-56, [9] Nishitani et al. (2012) Appl. Environ. Microbiol 78:813-21, [10] Klindworth et al. (2013) Nucleic Acids Res. 41:e1., [11] Gebert et al., (2018) mBio. 9:e01614-8.

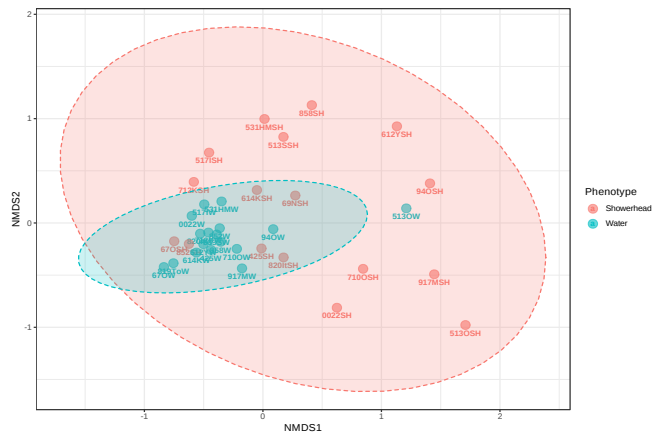


図 1. NMDS によるシャワー水とシャワーヘッド中バイオフィームの微生物群集の構成の相違(青がシャワー水、赤がバイオフィーム)

表 1. 浄水から分離培養した *Mycobacterium* 属一覧

| No. | 菌名 | 相同性 |
|-----|---|------|
| 1 | <i>Mycolicibacterium hodleri</i> | 98.7 |
| 2 | <i>Mycolicibacterium houstonense</i> | 97.7 |
| | <i>Mycolicibacterium senegalense</i> | 97.7 |
| 3 | <i>Mycolicibacterium hodleri</i> | 99.2 |
| 4 | <i>Mycobacterium paragordoniae</i> | 100 |
| 5 | <i>Mycobacterium lentiflavum</i> | 100 |
| 6 | <i>Mycobacterium lentiflavum</i> | 100 |
| 7 | <i>Mycobacterium triplex</i> | 99.6 |
| 8 | <i>Mycobacterium lentiflavum</i> | 100 |
| 9 | <i>Mycobacterium triplex</i> | 99.8 |
| 10 | <i>Mycolicibacterium neworleansense</i> | 100 |
| 11 | <i>Mycolicibacterium septicum</i> | 100 |
| | <i>Mycolicibacterium nivoides</i> | 100 |
| 12 | <i>Mycolicibacterium septicum</i> | 99.9 |
| 13 | <i>Mycobacterium colombiense</i> | 99.9 |
| 14 | <i>Mycobacterium colombiense</i> | 99.9 |
| 15 | <i>Mycobacterium colombiense</i> | 100 |
| 16 | <i>Mycobacterium colombiense</i> | 100 |
| 17 | <i>Mycobacterium colombiense</i> | 100 |
| 18 | <i>Mycobacterium colombiense</i> | 100 |
| 19 | <i>Mycobacterium lentiflavum</i> | 100 |
| 20 | <i>Mycobacterium paragordoniae</i> | 100 |
| 21 | <i>Mycobacterium paragordoniae</i> | 99.5 |
| 22 | <i>Mycobacterium lentiflavum</i> | 100 |

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Fujiyoshi So, Muto-Fujita Ai, Maruyama Fumito | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Evaluation of PCR conditions for characterizing bacterial communities with full-length 16S rRNA genes using a portable nanopore sequencer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-69450-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fujiyoshi So, Yarimizu Kyoko, Miyashita Yohei, Rilling Joaquin, Acuna Jacqueline J., Ueki Shoko, Gajardo Gonzalo, Espinoza-Gonzalez Oscar, Guzman Leonardo, Jorquera Milko A., Nagai Satoshi, Maruyama Fumito | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Suitcase Lab: new, portable, and deployable equipment for rapid detection of specific harmful algae in Chilean coastal waters | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research | 6. 最初と最後の頁 14144 ~ 14155 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11356-020-11567-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Yarimizu Kyoko, Fujiyoshi So, Kawai Mikihiro, et al. | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Protocols for Monitoring Harmful Algal Blooms for Sustainable Aquaculture and Coastal Fisheries in Chile | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health | 6. 最初と最後の頁 7642 ~ 7642 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph17207642 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Tanaka Daisuke, Fujiyoshi So, Maruyama Fumito, Goto Motoshi, Koyama Shinichi, Kanatani Jun-ichi, Isobe Junko, Watahiki Masanori, Sakatoku Akihiro, Kagaya Shigehiro, Nakamura Shogo | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Size resolved characteristics of urban and suburban bacterial bioaerosols in Japan as assessed by 16S rRNA amplicon sequencing | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68933-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Ruiz-Gil Tay, Acuna Jacqueline J., Fujiyoshi So, Tanaka Daisuke, Noda Jun, Maruyama Fumito, Jorquera Milko A. | 4. 巻 145 |
| 2. 論文標題 Airborne bacterial communities of outdoor environments and their associated influencing factors | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Environment International | 6. 最初と最後の頁 106156 ~ 106156 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envint.2020.106156 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Sakaguchi Riku, Fujiyoshi So, Wakai Satoshi, Yamanaka Masaru, Sambongi Yoshihiro | 4. 巻 85 |
| 2. 論文標題 Thermal destabilization mechanism of cytochrome c from psychrophilic <i>Shewanella violacea</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 1121 ~ 1127 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Fujiyoshi So, Nishiuchi Yukiko, Maruyama Fumito | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Structure of bacterial communities in Japanese-style bathrooms: Comparative sequencing of bacteria in shower water and showerhead biofilms using a portable nanopore sequencer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.07.14.452346 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kokubo Makoto, Fujiyoshi So, Ogura Daisuke, Nakajima Makiko, Fujieda Ayako, Noda Jun, Maruyama Fumito | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Relationship between the Microbiome and Indoor Temperature/Humidity in a Traditional Japanese House with a Thatched Roof in Kyoto, Japan | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Diversity | 6. 最初と最後の頁 475 ~ 475 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/d13100475 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 藤吉 奏 |
| 2. 発表標題 ハイブリッドアプローチによる環境ホロゲノム解析 |
| 3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 藤吉 奏 |
| 2. 発表標題 模擬古墳における環境計測と微生物群集特性 |
| 3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 河合幹彦, Andres Avila, Giovanni Larama, Raphael Verdugo, 藤吉 奏, Michel Abanto, 丸山史人, Enrique Ostria-Gallardo |
| 2. 発表標題 IT 万歳、教える側が楽：チリで夏期短期集中ゲノム情報解析講習会を主催して |
| 3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田中大祐、藤吉奏、丸山史人、後藤元志、小山慎一、金谷潤一、磯部順子、綿引正則、酒徳昭宏、加賀谷重浩、中村省吾 |
| 2. 発表標題 アンダーセンエアサンプラーとIllumina MiSeqを用いた富山市と横浜市における細菌バイオエアロゾルの特徴 |
| 3. 学会等名 第13回大気バイオエアロゾルシンポジウム |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小久保舞香、小椋大輔、伊庭千恵美、中嶋麻起子、藤枝絢子、丸山史人、藤吉 奏、能田 淳 |
| 2. 発表標題 住環境の微生物と物理化学的因子、住まいの関係ー美山の茅葺民家における微生物量と温湿度の関係についてー |
| 3. 学会等名 建築学会大会 2 0 2 1 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小久保舞香、小椋大輔、中嶋麻起子、藤枝絢子、丸山史人、藤吉 奏、能田 淳 |
| 2. 発表標題 住環境の微生物と物理化学的因子、住まいの関係ー伝統茅葺民家の微生物群集構造と、高断熱高気密住宅の室内温湿度環境と住まい方ー |
| 3. 学会等名 建築学会大会 2 0 2 2 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fujiyoshi S, Maruyama F |
| 2. 発表標題 Water supply provides bacteria for the shower head, but the environment selects. |
| 3. 学会等名 World Microbe Forum (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Maruyama F, Fujiyoshi S, Kokubo M, Nakajima M, Ogura D |
| 2. 発表標題 Microbiome and indoor temperature/humidity in a traditional Japanese house with a thatched roof |
| 3. 学会等名 ASM (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 So Fujiyoshi, Mateja Dovjak, Janja Vaupotic, Fumito Maruyama |
| 2. 発表標題 Understanding effects of ventilation on airborne microorganisms in build environments: A perspective. |
| 3. 学会等名 CLIMA2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|---------|-------------------------|------------------------|--|
| スロベニア | University of Ljubljana | Jozef Stefan Institute | |