

令和元年6月13日現在

機関番号：84412

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09120

研究課題名(和文) 地域特異性を示す病原性抗酸菌の感染源及び感染様式の実態解明

研究課題名(英文) Epidemiological analyses and determination of risk factors for pathogenic non-tuberculosis mycobacterium species in Japan.

研究代表者

吉田 志緒美 (Yoshida, Shiomi)

独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター・その他部局等・感染症研究部 流動研究員

研究者番号：40260806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、河川から*M. avium*、*M. intracellulare*を含む、ヒトへの病原性が認められている抗酸菌を多種分離できた。一方、動物由来抗酸菌症は当初想定されていたよりも少なく、病原体として動物宿主に定着しえた菌種は、結核菌群や*M. marinum*、その近縁種を除くと主流ではないと考えられた。また、国内飼育ボルネオゾウから結核菌群の亜種である*M. caprae* (ヤギ結核菌)を分離し、アジア地域を中心に問題となっているゾウ結核症に関する新しい知見を得た。魚類、爬虫類、両生類の*M. marinum*症からは、臨床株のショートリードを用いた比較解析を行い、多様な点変異性を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、培養が困難なNTMのDNAを効率よく抽出できる濾過法により、従来NTMの実態が不明な河川における多様な抗酸菌属の分布が明らかとなり、基礎的な環境中の菌の現存量データを得ることができた。これらのデータは、将来的な感染拡大防止対策や水資源の保護へ繋がる有効な方法を検討・提案することを可能とする。また、併行して動物由来のNTM分離を行い、得られた菌のゲノム配列から、異なる宿主間における抗酸菌の多様性と定着性の違いを明らかにした。さらに、MAHによる過敏性肺臓炎患者の浴室環境株と臨床分離株間において同一の遺伝子型の存在を認め、ヒト-動物 環境内における抗酸菌の実態を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Non-tuberculosis mycobacteria (NTM) is one of emerging pathogens for human and animals. Despite increasing infectious incidence in worldwide, little is known about the genetic relationship and resources behind the population evolution of NTM. To elucidate the local adaptation on human, wild or breeding animals, and environments, we assessed the genetic structure and different genomic characterization. We describe mycobacterial infection in an elephant that was caused by a relatively uncommon species of MTBC. *M. caprae* infection, a species of the MTBC, was diagnosed in a captive Borneo elephant (*Elephas maximus borneensis*) that was brought directly from Borneo island after being orphaned. Whole-genome sequencing has shown that single-nucleotide polymorphism (SNP) microevolution occurs in MTBC strains in animals for the adapted host. In addition, we determined the genetic variation in pathogenicity from alligator lizard, frogs and fishes infected with different strains of *M. marinum*.

研究分野：分子疫学

キーワード：抗酸菌 環境調査 菌種同定 人獣共通抗酸菌感染症 結核 分子疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国の肺非結核性抗酸菌 (NTM) 症は増加傾向にあり、肺 *M. kansasii* 症は肺 MAC 症に次いで 2 番目に多い疾患である。肺結核とよく似た症状と画像所見を呈するが、ヒト-ヒト感染の可能性は想定されていない。NTM は広く環境に存在するが、感染源・感染経路ともに不明である。肺 MAC 症が全国で発生しているのに対し、肺 *M. kansasii* 症の発生数は地域間格差が大きいのが特徴である。考えられる要因としては、それぞれの地域に分布する菌の浸潤度もしくは感染経路の違いが肺 *M. kansasii* 症発症の地域特異性として表れていることが挙げられるが、他の NTM に比べて環境からの菌分離が困難であるため、感染源、感染経路は不明とされている。しかし近年、NTM の主な生育環境である自然河川環境由来の試料中の NTM に対する採材方法や汚染除去法の最適化の検討がなされている。また申請者と分担研究者は、環境由来の *M. kansasii* を含めた NTM 検出の改良法の検討において、河川水中の抗酸菌の現存量と多様性の把握を目的とした、河川環境調査に関する共同研究を H27 年から実施していた¹⁾。そこで申請者は、改良法の確立とともに、*M. kansasii* を含む環境由来の NTM 株とヒト臨床分離株の分布状況をゲノムレベルで比較解析することにより、「*M. kansasii* を含む NTM の地理的特異性の解明」が可能であると考えた。

1) 2015 年度公益財団法人クワタ水環境科学助成「河川における非結核性抗酸菌の実態調査と対策方法の提案」

2. 研究の目的

ヒト肺 NTM 症は NTM が起因となって引き起こす慢性の感染症であり、その中でも *Mycobacterium kansasii* 症は国内で 2 番目に多い抗酸菌感染症であるが、感染源・感染経路ともに不明である。本研究では、1) 蔓延度の異なる地域由来の *M. kansasii* をふくめた NTM 臨床分離株の比較調査、2) 環境 (自然河川、患者住環境)、動物における *M. kansasii* をはじめとした NTM 株の分布調査を実施し、病原性抗酸菌の地理的特異性の解明とヒト 動物 環境を取り巻く抗酸菌感染様式の実態解明を図る。本研究は NTM 症の発症にかかわる基盤研究であり、得られた成果を通して、病原性抗酸菌のリスク評価や発症予防に寄与することを最終目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、*M. kansasii* をはじめとする NTM の遺伝的多様性を遺伝子レベルで比較解析することにより、病原性抗酸菌症の感染様式の地域差を反映した系統地理学的分布の違いを解明するとともに、ヒトに適応した感染様式を引き起こす菌株の遺伝的特徴を明らかにすることを目的とし、異なる分離頻度をもつ環境地域から抗酸菌分離株を収集、地域固有株間の遺伝型別解析と最適な検出法の確立を目指した。また、河川調査から思うように菌分離が進まない場合を想定し、近隣住居以外の水域を対象として地域内の網羅性を高め、抗酸菌感染症以外の関連疾患を有する患者の住環境と動物由来感染症の調査を実施した。したがって、*M. kansasii* 以外の NTM 症も対象とする幅広い NTM の分布状況調査を行った。

4. 研究成果

A. 河川水からの NTM 分離に適した処理と培養法の確立

1、河川中に存在する NTM を検出・同定するため、吸引濾過により表層水 500 mL を 0.2 μm ポアサイズメンブレンでトラップした。このフィルタリング済みメンブレンをアルカリ処理し、抗酸菌以外の発育を抑制する PANTA (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) 入りの 7H11 寒天培地上に静置し、36℃ で 3 週間培養することで、雑菌を抑制し、且つ河川由来 NTM を単離することに成功した。今回、一般的な環境サンプルの処理として採用されているメンブレンを物理的に破砕したのち抽出用試薬を用いて NTM を回収する方法とは異なり、ろ過後のメンブレンを直接処理し培地上に静置する方法を採用した事により、試料のロスを最小限に抑えつつ、試料中の NTM を効率よく捕捉することができた。今後、環境水の NTM 調査における標準法として、広く普及するものと期待される。

2、河川水に棲息するNTMの菌種分布:石川採水を年2回(夏季、冬季)実施し、採水3地点からのDNA現存量を検討した。培養が困難なNTMを含むすべてのNTMのDNA量(atpE遺伝子コピー数)を捕捉するためにステリベックスを用いたDNA抽出法を検討したところ、2段階濾過法を用いなくてもDNAを回収することができた。したがって、DNA現存量の検討にプレろ過を省略することで、より実態を反映したDNA現存量を明らかにできると考える。また、研究2年目には、これらのサンプルから計192株のNTMを検出しrpoB遺伝子配列を決定、BLAST検索により菌種同定を行った。192株の内、昨年度検出されなかった肺MAC症の起炎菌の一つである*M. avium* subsp. *hominissuis*が分離された。また、*M. intracellulare* や *M. arupense* については初年度と同様に検出されたが、今年度は *M. shigaense* や *M. yongonense*も検出された。*M. shigaense*は琵琶湖周辺に居住地を持つ皮膚肉芽腫症の患者の病変部から分離された比較的新しい抗酸菌種であるが、琵琶湖を源泉とする大阪北摂地域の淀川河川水サンプルから高頻度に分離されており、今回大阪南部に位置する大和川を源泉とした石川河川水から分離されたことはNTMの環境浸淫状況を推察する上で示唆に富む結果である。

3、計3年間の研究期間を通じて、最終的に58菌種のNTMを分離することができた。季節を問わず通年分離できた菌種は *M. terrae* および *M. arupense* であった。肺MAC症の起炎菌である *M. avium* subsp. *hominissuis*(MAH)と *M. intracellulare* を検出できたのに加え、医療機器の循環水内にバイオフィルムを形成することで感染を引き起こすと問題視されている *M. chimaera* を河川水から分離できた。院内で擬似アウトブレイクの起炎菌となった *M. chimaera* 事例については論文を執筆し、現在査読中である。一方、皮膚肉芽腫症の患者の病変部から分離されることが多い *M. shigaense* を河川から分離でき、稀な肺感染症患者からの臨床分離株のゲノム配列を比較解析している。さらに患者の浴室環境から同菌の検出を試み、環境ヒト感染関連の解明を進めることができた。これらの成果は、NTMの環境中の浸淫状況を推察し、ヒトへの感染・定着の動向を理解する上で非常に示唆に富むものである。

B、動物NTM症由来菌の解析

動物NTM症から分離されるNTMの遺伝子解析を実施し、新世界ザル由来の *M. kansasii*、野生捕獲された爬虫類由来の *M. marinum* や *M. virginensis*、野生下での捕獲爬虫類からの *M. marinum*、飼育ネコからの *Mycobacterium* sp. B10-07.09.0206 の分離に成功した。特に、ゾウ結核由来の *M. caprae* は、アジアで初めて検出された株であった。また、家畜以外の野生動物において、結核診断から治療成功に導いた世界初の貴重な症例となった。得られた *M. caprae* のゲノム配列は治療中に耐性を獲得した耐性株のデータと共に登録、公開し、動物抗酸菌感染症の診断における精度向上が期待されると同時に、感染拡大防止に活用されたいと考える。魚類、両生類、爬虫類といった多様な動物種由来の *M. marinum* 症から分離された *M. marinum* complex の分離に成功し、多様な点変異性を確認できた。また、学会、論文を通じて症例報告を行い、これらの活動全般は、獣医師、公衆衛生を専門とするエキスパート、呼吸器内科医をメンバーとしたコラボレーションを強固なものとし、アジアにおけるNTM症ネットワーク構築の進展に寄与した。

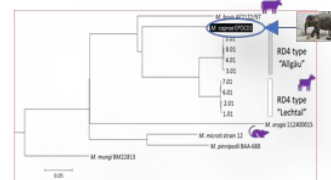


図. ボルネオゾウ由来 *M. caprae* のゲノム配列は他の家畜由来株とは異なる

C、ヒト由来NTM感染症及び関連疾患と環境内NTMとの関連性の検討

NTMによる過敏性肺臓炎(Hot tub disease:HTD)は稀な症例ではあるが、NTM症とは異なり、宿主の発症要因によるアレルギー疾患であるとされてきた。今回、われわれは、MAHによるHTDを経験し、患者の浴室環境に分布するMAHをエアサンプラーにより捕獲し、患者分離株と同じ遺伝子型であることを突き止めた。*M. abscessus* subsp. *massiliense* 症に併発したりポイド肺炎患者から、油脂の職業的・恒常的な暴露機会の多さが同症発症に寄与する可能性を報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携協力者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Rinko Katsuda, Shiomi Yoshida, Kazunari Tsuyuguchi, Tetsuji Kawamura. A case report of hot tub lung: identical strains of *Mycobacterium avium* from the patient and the bathroom air. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 22:350-352, 2018.
2. Hideki Kayanuma, Kikumi Ogihara, Shiomi Yoshida, Kaori Yamamoto, Takayuki Wada, Taro Yamamoto, Yuzo Tsuyuki, Hiroo Madarame. Disseminated nontuberculous mycobacterial disease in a cat caused by *Mycobacterium* sp. strain MFM001. Veterinary Microbiology, 230: 90-96, 2018.
3. Shiomi Yoshida, Tsubasa Araki, Tomohito Asai, Kazunari Tsuyuguchi, Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki, Kenji Ohya, Tokuma Yanai, Takayuki Wada, Taro Yamamoto. Phylogenetic uniqueness of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from an abnormal pulmonary bovine case. Infection, Genetics and Evolution, 62: 122-129, 2018.
4. Shiomi Yoshida, Satomi Suga, Satoshi Ishikawa, Yasuhiko Mukai, Kazunari Tsuyuguchi, Yoshikazu Inoue, Taro Yamamoto, Takayuki Wada. *Mycobacterium caprae* Infection in Captive Borneo Elephant, Japan. Emerging Infectious Diseases, 24: 1937-1940, 2018.
5. Takehiko Kobayashi, Kazunari Tsuyuguchi, Shiomi Yoshida, Yu Kurahara, Taisuke Tsuji, Keiko Nakao, Yumiko Sasaki, Seiji Hayashi, Yoshikazu Inoue, Katsuhiko Suzuki. A case of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* lung disease complicated by lipid pneumonia. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 21:124-126, 2017.
6. 和田崇之、吉田志緒美、柳井徳磨. ヒト、動物、環境を取り巻く非結核性抗酸菌の浸淫状況と宿主適応. 日本臨床部生物学雑誌, 27: 139-148, 2017.

[学会発表](計 25 件)

1. 向井康彦、菅里美、石川智史、吉田志緒美. ゾウの結核の症状、その診断と治療の難しさについて. 日本動物園水族館協会主催 第 28 回ゾウ会議. 2018.12.12. (京都)
2. Shiomi Yoshida, Satomi Suga, Satoshi Ishikawa, Yasuhiko Mukai, Kazunari Tsuyuguchi, Yoshikazu Inoue, Taro Yamamoto, Takayuki Wada. 11th International Meeting of Asian Society of Conservation Medicine. 2018.10.28-29.(インドネシア)
3. 石川智史、菅里美、吉田志緒美、向井康彦. ゾウの結核における迅速検査キットを用いた血清学的モニタリング. 第 24 回日本野生動物医学会大会. 2018.8.31-9.2. (大阪)
4. 菅里美、石川智史、吉田志緒美、向井康彦. イソニアジド過量投与により肝障害と風気疝を呈したゾウ結核症の一例. 第 24 回日本野生動物医学会大会. 2018.8.31-9.2. (大阪)
5. 吉田志緒美、露口一成、和田崇之、山本太郎、鈴木克洋. ヒト 動物 環境に浸淫する抗酸菌属の実態解明. 第 50 回非結核性抗酸菌症研究協議会. 2018.6.24. (大阪)
6. 有川健太郎、西内由紀子、田丸亜貴、吉田志緒美、岩本朋忠. 2015 年から 2017 年に実施した河川における非結核性抗酸菌の実態調査. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018.3.27-29.
7. 松原且季、吉田志緒美、須藤薫、本郷覚. パルカンヘビガタカゲ (*Ophisarus apodus*) の抗酸菌症の 2 例. エキゾチックペット研究会 2018 年度症例検討会. 2018.3.21. (東京)
8. 西内由紀子、有川健太郎、田丸亜貴、吉田志緒美、岩本朋忠. 近畿の河川表層水中の非結核性抗酸菌の分布実態. 第 70 回 日本細菌学会関西支部総会. 2017.11.25.(大阪)
9. Satoshi Ishikawa, Shiomi Yoshida, Takayuki Wada, Sarad Paudel, Satomi Suga, Yasuhiko Mukai.

- Tuberculosis in a captive Asian elephant: the first treatment in Japan . 10th International Meeting of Asian Society of Conservation Medicine . 2017.10.21-22.(マレーシア)
10. Takayuki Wada, Shiomi Yoshida, Kaori Yamamoto, Taro Yamamoto, Satoshi Ishikawa, Satomi Suga, Yasuhiko Mukai. "Genomic monitoring of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from a captive Asian elephant" . 10th International Meeting of Asian Society of Conservation Medicine . 2017.10.21-22.(マレーシア)
 11. Shiomi Yoshida, Katsuki Matsubara, Atsushi Kojima, Takayuki Wada . *Mycobacterium marinum* infection in scheltopusiks (ophisaurus apodus) . 10th International Meeting of Asian Society of Conservation Medicine . 2017.10.21-22.(マレーシア)
 12. 有川健太郎、西内由紀子、田丸亜貴、吉田志緒美、岩本朋忠. 2015,2016 年度に実施した河川における非結核性抗酸菌の実態調査 . 日本防菌防黴学会第 44 回年次大会.2017.9.26-27 . (大阪)
 13. 和田崇之、吉田志緒美、柳井徳磨 . 抗酸菌属における病原性とその動物症例 . 環境微生物系学会合同大会 2017.2017.8.19-22.(埼玉)
 14. Tokuma Yanai, Mari Yamauchi, Misato Tanaka, Mohei Haridy, Hiroki Sakai, Shiomi Yoshida, Takayuki Wada. Spontaneous infections of *Mycobacterium marinum* in Japanese original amphibians. 66th Annual International Conference of the Wildlife Disease Association. 2017.7.23-28. (メキシコ)
 15. 和田崇之、吉田志緒美、山本香織、中島千絵、鈴木定彦、柳井徳磨、山本太郎. 様々な動物から分離された病原性抗酸菌種のゲノム解読. NG 現場の会 第5回研究会. 2017.5.22-24. (仙台)
 16. 柳井徳磨、吉田志緒美、和田崇之 . アジアにおける One Health に基づいた抗酸菌症のサーベイランスネットワークについて.第 90 回日本細菌学会総会 . 2017.3.19-21.(福岡)
 17. 田中海里、柳井徳磨、酒井洋樹、和田崇之、吉田志緒美、横田 伸一 . 日本産カエルにおける *Mycobacterium marinum* 感染の特徴およびサル類における感染実験 . 平成 28 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (石川) . 2017.2.24-26 . (石川)
 18. 吉田志緒美、木原実香、富田元久、佐藤雅美、笹田倫子 . 滅菌水供給装置の汚染が原因と考えられた *Mycobacterium chimaera* の擬似アウトブレイク . 第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 . 2017.1.20-22.(長崎)
 19. Takayuki Wada, Shiomi Yoshida, Tsubasa Araki, Tomotada Iwamoto, Kazunari Tsuyuguchi, Taro Yamamoto, Tokuma Yanai. Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolated from cattle with pulmonary infection. The 9th International Meeting of Asian Society of Conservation Medicine.2016.10.21-24 . (台湾)
 20. Shiomi Yoshida, Kazunari Tsuyuguchi, Lisa Nonaka, Masayuki Imajoh, Tokuma Yanai, Aki Tamaru, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki, Takayuki Wada, Taro Yamamoto. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from aqua cultured fish in South-western Japan. The 9th International Meeting of Asian Society of Conservation Medicine.2016.10.21-24 . (台湾)
 21. 田丸亜貴、和田崇之、吉田志緒美、中島千絵、鈴木定彦、坪田敏男 . 大阪府で発生したシカのウシ型結核集団発生と分離ウシ型結核菌株の遺伝子解析.2016.29-30.(沖縄)
 22. Shiomi Yoshida, Takayuki Wada, Taro Yamamoto. Evaluating virulence of *Mycobacterium kansasii* isolates adapted to human or animal, considering infectious examination using squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) . Infectious Diseases Research Seminar.2016 . 9.20.(長崎)
 23. 吉田志緒美、露口一成、鈴木克洋、田丸亜貴、西内由紀子、有川健太郎、岩本朋忠、辻本律、

和田崇之、井上義一、林清二.*Mycobacterium arupense* による腱滑膜炎症例と河川環境由来 NTM の分離状況調査. 第 48 回非結核性抗酸菌症研究協議会 2016.5.27.(石川)

24. 吉田志緒美、東桃代、露口一成、鈴木克洋、井上義一、和田崇之、山本太郎、林清二. 滅菌水供給装置の汚染が原因と考えられる *Mycobacterium chimaera* の疑似アウトブレイク. 第 91 回日本結核病学会総会. 2016.5.26-27. (石川)

25. 和田崇之、吉田志緒美、露口一成、山本太郎. 播種性病態を引き起こした新世界ザル由来 *Mycobacterium kansasii* 株の遺伝子解析及び病原性評価. 第 90 回日本感染症学会学術講演会. 2016.4.15-16(仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 露口 一成

ローマ字氏名: Kazunari Tsuyuguchi

所属研究機関名: 独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター

部局名: 臨床研究センター

職名: 感染症研究部長

研究者番号(8桁): 00359308

研究分担者氏名: 田丸 亜貴

ローマ字氏名: Aki Tamaru

所属研究機関名: 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

部局名: 微生物部

職名: 主幹研究員

研究者番号(8桁): 70270767

研究分担者氏名: 西内 由紀子

ローマ字氏名: Yukiko Nishiuchi

所属研究機関名: 大阪市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 00333526

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 岩本 朋忠

ローマ字氏名: Tomotada Iwamoto

研究協力者氏名: 有川 健太郎

ローマ字氏名: Kentaro Arikawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。