

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：84505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10041

研究課題名(和文)浴室環境は非結核性抗酸菌感染のホットスポットなのか？

研究課題名(英文) Evidence of a bathroom environment as a hotspot for the infection of nontuberculous mycobacteria

研究代表者

岩本 朋忠 (Iwamoto, Tomotada)

神戸市環境保健研究所・感染症部・部長

研究者番号：70416402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：全国256家庭からシャワー水と給湯口バイオフィルムを収集し、抗酸菌の分離培養を行ったところ、73.6%の家庭から非結核性抗酸菌(NTM)が分離され、浴室環境はNTM曝露源であることを立証した。浴室環境から分離したMycobacterium avium subsp. hominissuis (MAH)を河川水、土壌、ブタ、およびヒト由来のMAHと比較したところ、我が国の自然環境中には遺伝的に多様なMAHが存在しており、特定の遺伝型に属するものが日本人患者と浴室環境には優占するという知見を得た。このことは、浴室環境がMAH感染のホットスポットの一つであることを強く支持するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我が国の浴室がNTM菌への日常的な曝露のホットスポットであることを明らかにした。とりわけ、肺NTM症の主要な起因菌であるMycobacterium avium subsp. hominissuis (MAH)は健康人家庭の浴室環境から高頻度に検出されるのみではなく、本研究における遺伝子解析により、臨床分離株との遺伝的関連性の高さが確認された。現在、有効な治療方法が確立されていないMAH肺感染症について感染源の一つが特定されたことで、その曝露リスクを低減させることでの感染予防策への道を拓く研究成果であり、学術的にも社会的にも意義の大きな研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterium avium subsp. hominissuis (MAH) is a typical inhabitant of the environment, especially bathrooms, which are considered as a potential source of infection. To corroborate this hypothesis, we determined the detection rate of MAH in bathrooms of healthy volunteers by an ordinary culture method and we analyzed the genetic relatedness of these isolates with those from patients and other sources such as river water and soil. A minimum spanning tree generated on the basis of the variable numbers of tandem repeats (VNTR) data indicated that isolates from the bathrooms of the healthy volunteers had a high degree of genetic relatedness with those from Japanese patients, bathrooms of patients, and river water, but not with those from Russian patients and Japanese pigs. These results showed that bathtub inlets in Japan provide an environmental niche for MAH and suggest that bathrooms are one of the important infection sources of MAH in Japan.

研究分野：抗酸菌分子疫学

キーワード：NTM Mycobacterium avium genetic relatedness VNTR genetic diversity bathroom environment minimum spanning tree

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

肺 NTM 症は近年先進諸国を中心に患者数が急増しており、国内の罹患率が世界一高いことから公衆衛生上の対策が急務である。ヒトからヒトへの感染はなく、本菌に対する公衆衛生対策のための第一歩は、環境中の感染源の特定である。

本研究開始当時、海外からはハウスダストや土壌を感染源とする報告が相次いだ。一方、我が国においては、浴室環境での感染について研究報告がなされており、エアロゾルを容易に発生する環境であることから「浴室環境感染源説」への関心が高まった。しかしながら、過去の研究では調査対象が NTM 症患者のいる家庭であることや調査対象地域が大阪に限局されていたため、患者からの菌の持ち込みによる影響と地域特性に関する問題を抱えていた。我が国における「浴室環境感染源説」を検証するために、全国の健常人家庭から浴室環境試料を収集し、NTM 菌の浴室環境内での定着の実態を全国規模で明らかにしようという本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「浴室環境が NTM 感染のホットスポットなのか？」という問いに対する解を与えることである。そのために、全国規模での浴室環境サンプリングを行い、非結核性抗酸菌の環境常在性と種の多様性および地域差を調査した。また、肺 NTM 症の主要な起因菌である *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) に着目して浴室分離株の遺伝的特徴を臨床分離株や河川水、土壌、海外分離株と比較することで、遺伝的多様性の観点からも感染源に関する考察を行った。

3. 研究の方法

(1) 浴室環境試料

浴室環境中の NTM を調査するため、全国の健康者ボランティア 256 家庭の浴室からシャワー水 2L と給湯口のバイオフィーム試料を入手した。試料の採取は各ボランティアが実施し、匿名で返却した。

シャワー水試料を 0.2 μm ポアサイズメンブレンで吸引濾過し、メンブレンを 2% NaOH 水溶液で処理後洗浄し、メンブレンごと 7H11 培地上で培養した。PBS に懸濁されたバイオフィーム試料は遠心後に得られた沈殿物を 2% NaOH 処理後、段階希釈し、7H11 培地で培養した。3-4 週間培養後シングルコロニーを釣菌して培養し、16S rRNA 遺伝子あるいは *rpoB*、*hsp65* の部分配列の相同性検索にて菌種同定を行った。

(2) 分離菌株の遺伝型別解析

浴室試料から分離した抗酸菌のうち *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) と同定された 57 株について反復配列数多型解析を岩本らの方法 (引用文献 1) に従って行った。健常人浴室分離株に加えて、患者浴室分離株 (36 株)、国内ブタ由来株 (75 株)、国内河川水分離株 (17 株)、国内土壌分離株 (5 株)、MAH 肺感染症患者分離株 (日本 146 株、韓国 77 株、ロシア 90 株) の反復配列数多型解析データを得て、分離由来の異なる菌株間での遺伝的関連性を評価した。遺伝的関連性の評価は、全 503 株が

ら得られた反復配列数多型解析による遺伝型別パターンの比較に基づく minimum spanning tree (MST) を描写し clonal complex に分類することで行った。さらに、MAH の標準株である 104 株の反復配列数多型解析データを基準として全 503 株の遺伝距離を市川らの方法 (引用文献 2) に従って算出し、分離由来別の遺伝距離の違いについて Mann-Whitney *U* test により群間比較を行った。

4. 研究成果

(1) 健康者浴室サンプリングによる非結核性抗酸菌の検出率と菌種多様性

全国 256 家庭からシャワー水と給湯口からのバイオフィルムを収集し、抗酸菌の分離培養を行ったところ、73.6%

の家庭から非結核性抗酸菌が分離され、浴室環境は NTM 曝露のホットスポットであることを立証した (表 1)。地域別に検出率を見ると、北海道 (34.8%) や

表 1. 地域別 NTM および *M. avium* の分離頻度

サンプリング地域	NTM (%)	<i>M. avium</i> (%)	検体総数
北海道	9 (34.8)	2 (8.7)	23
東北地方 (青森、岩手、宮城、秋田、山形、福島)	16 (55.2)	4 (13.8)	29
関東地方 (茨城、栃木、群馬、埼玉、千葉、東京、神奈川)	33 (94.3)	10 (28.6)	35
中部地方 (愛知、岐阜、静岡、山梨、長野、新潟、石川、富山、福井)	11 (91.7)	2 (16.7)	12
近畿地方 (大阪、京都、兵庫、滋賀、奈良、和歌山、三重)	63 (70.8)	18 (21.7)	89
中国・四国地方 (鳥取、島根、岡山、広島、山口、香川、徳島、愛媛、高知)	37 (81.4)	6 (13.6)	44
九州・沖縄地方 (福岡、佐賀、長崎、熊本、大分、宮崎、鹿児島、沖縄)	15 (62.5)	2 (8.3)	24
全国総数	184 (71.9)	44 (17.2)	256

東北地方 (55.2%) では低く、関東地方 (94.3%) や中部地方 (91.7%) で高かった。NTM 症の主要な起因菌である *M. avium* は全地域で検出され、特に関東地方 (28.6%) や近畿地方 (21.7%) で検出率が高かった。浴室内のサンプリングポイント別に分離菌の菌種と検出率を見ると、*M. lentiflavum* や *M. mucogenicum* はシャワー水から、*M. avium* と *M. gordonae* はシャワー水と給湯口のバイオフィルム両検体から頻度高く検出された。健康者家庭の浴室サンプルを用いた本結果は、患者浴室環境を対象とした先行研究での問題点、すなわち「患者による浴室環境内への菌の持ち込み」の影響を受けない結果であり、今後の衛生対策における貴重な基礎データとなり得る。

(2) 分離由来の異なる MAH 菌株の遺伝的関連性解析

肺 NTM 症の主要な起因菌である *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) に着目して浴室分離株の遺伝的多様性を臨床分離株や河川水、土壌、海外分離株と比較し、分離由来間の遺伝的関連性について検討した。全 503 株は 19 領

表 2 分離由来の異なる MAH の遺伝的多様性にもとづくクローナルコンプレックス分布

Origin of samples	Clonal complex No.				Total
	1	2	3	Others	
Human_Japan_P (%)	135 (92.5)	5 (3.4)	1 (0.7)	5 (3.4)	146 (100)
Bathroom_Japan_H (%)	53 (93)	0 (0)	1 (1.8)	3 (5.3)	57 (100)
Bathroom_Japan_P (%)	36 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	36 (100)
Human_Korea_P (%)	66 (85.7)	0 (0)	6 (7.8)	5 (6.5)	77 (100)
Human_Russia_P (%)	3 (3.3)	1 (1.1)	68 (75.6)	18 (20)	90 (100)
River_Japan (%)	11 (64.7)	0 (0)	2 (11.8)	4 (23.5)	17 (100)
Pig_Japan (%)	0 (0)	36 (48)	19 (25.3)	20 (26.7)	75 (100)
Soil_Japan (%)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	5 (100)
Total (%)	304 (60.4)	42 (8.3)	102 (20.3)	55 (10.9)	503 (100)

P: Patient, H: Healthy volunteer

域の VNTR 解析により 262 ジェノタイプに分類された。これらのジェノタイプは MST により、3 つのクローナルコンプレックスに大別できた。浴室分離株とヒト臨床分離株 (日本、韓国) の大部分はクローナルコンプレックス 1 に属した (表 2)。一方、ブタ由来株、ヒト臨床分離株 (ロシア)、土壌由来株はクローナルコンプレックス 2 と 3 に分類され、浴室分離株との遺伝的関連性が低いことが分かった。

次に、*M. avium* の参照株である *M. avium* 104 株を基準に、全 503 株のマンハッタン距離

を算出し、分離由来間での比較を行った。日本人臨床分離株とブタ由来株、土壌分離株、ロシア人臨床分離株の間に有意差を認められた。一方、日本人分離株と健常人浴室分離株、患者浴室分離株の間に有意差は認められず、遺伝的関連誌の高さが示された。サンプルサイズが小さいため明確な傾向は得られなかったが、河川水サンプルからは多様なVNTRパターンが得られ、遺伝距離のバリエーションも高かった。これらの結果は、我が国の自然環境中には遺伝的に多様なMAHが存在するものの、特定の遺伝型に属するものが患者と浴室環境に優占することを示しており、浴室環境分離株のヒトへのフィットネスの高さ、すなわち、浴室環境がMAH感染のホットスポットの一つであることを強く支持するものである。

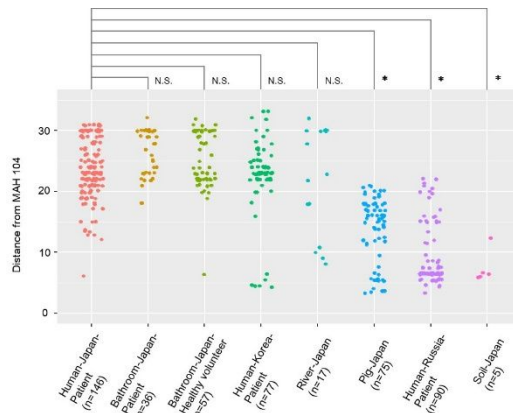


図. 分離由来の異なるMAHの遺伝距離の分布

< 参考文献 >

- Iwamoto T, Nakajima C, Nishiuchi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi N, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y, Nasu M. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect Genet Evol.* 2012 Jun;12(4):846-52. doi: 10.1016/j.meegid.2011.06.018. Epub 2011 Jul 2. PMID: 21745597.
- Ichikawa K, van Ingen J, Koh WJ, Wagner D, Salfinger M, Inagaki T, Uchiya KI, Nakagawa T, Ogawa K, Yamada K, Yagi T. Genetic diversity of clinical *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium intracellulare* isolates causing pulmonary diseases recovered from different geographical regions. *Infect Genet Evol.* 2015 Dec;36:250-255. doi: 10.1016/j.meegid.2015.09.029. Epub 2015 Oct 3. PMID: 26435330.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida Shiomi, Iwamoto Tomotada, Kobayashi Takehiko, Nomoto Ryohei, Inoue Yoshikazu, Tsuyuguchi Kazunari, Suzuki Katsuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Two New Cases of Pulmonary Infection by Mycobacterium shigaense, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 2728 ~ 2732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2611.200315	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 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
1. 著者名 Chikamatsu Kinuyo, Aono Akio, Kawai Akiko, Hata Hiroyuki, Iwamoto Tomotada, Igarashi Yuriko, Takaki Akiko, Yamada Hiroyuki, Mitarai Satoshi	4. 巻 163
2. 論文標題 Evaluation of Q Gene Mycobacteria: A novel and easy nucleic acid chromatography method for mycobacterial species identification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 105657 ~ 105657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2019.105657	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 -
1. 著者名 Starkova D. A., Iwamoto T., Vyazovaya A. A., Molchanov V. M., Zhuravlev V. Yu., Vishnevsky B. I., Narvskaya O. V.	4. 巻 55
2. 論文標題 Single Nucleotide Polymorphisms in hsp65 and MACPPE12 Genes of Mycobacterium avium subsp. hominissuis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Russian Journal of Genetics	6. 最初と最後の頁 544 ~ 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1134/S1022795419050120	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

1. 著者名 Yano Hirokazu, Suzuki Haruo, Maruyama Fumito, Iwamoto Tomotada	4. 巻 20
2. 論文標題 The recombination-cold region as an epidemiological marker of recombinogenic opportunistic pathogen <i>Mycobacterium avium</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 752 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-019-6078-2	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 Yoshida Shiori, Araki Tsubasa, Asai Tomohito, Tsuyuguchi Kazunari, Arikawa Kentaro, Iwamoto Tomotada, Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko, Ohya Kenji, Yanai Tokuma, Wada Takayuki, Yamamoto Taro	4. 巻 62
2. 論文標題 Phylogenetic uniqueness of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>hominissuis</i> isolated from an abnormal pulmonary bovine case	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 122 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2018.04.013	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岩本朋忠
2. 発表標題 結核・非結核性抗酸菌の分子疫学からみる抗酸菌とヒトとの関わり
3. 学会等名 第89回 実験結核研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有川健太郎、中島聡美、高杉義之、矢野大和、吉田志緒美、岩本朋忠
2. 発表標題 全国規模での健康者浴室サンプリングによる非結核性抗酸菌の検出率と菌種多様性
3. 学会等名 第46回 日本防菌防黴学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomotada Iwamoto
2. 発表標題 Genomics and local adaptation of Mycobacterium avium
3. 学会等名 2nd St. Petersburg Symposium on Tuberculosis and Mycobacteria: Molecular Approach (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本 朋忠
2. 発表標題 抗酸菌のONE Healthにおける立ち位置は？
3. 学会等名 第93回日本結核病学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018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