

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249007

研究課題名（和文） 環境疾患—環境変化にともなう感染症出現機構の解明—

研究課題名（英文） Environmental disease: environmental alteration and infectious disease

研究代表者

那須 正夫（NASU MASAO）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：90218040

研究成果の概要（和文）：非結核性抗酸菌症は患者報告数が1990年代以降先進国を中心に増加し、水環境からの暴露が感染の要因と考えられているものの、いまだその感染経路は明らかとなっていない。そこで本研究では、微生物学と疫学、バイオインフォマティクスを総合し、非結核性抗酸菌症の出現機構の解明を目指した。その結果、ヒトへの暴露という観点から浴室環境が *M. avium* のリザーバーとなる可能性を確認した。また、日米間の比較により、水道水中の残留塩素が *M. avium* の生残に影響を与えている可能性を示した。すなわち、「水道の整備に伴う塩素消毒→塩素耐性をもつ非結核性マイコバクテリウムの生残→感染症の出現」というつながりが考えられた。

研究成果の概要（英文）：The incidence of nontuberculous mycobacteria (NTM) diseases has increased gradually in most industrialized countries since 1990's. Aquatic environments are thought to be sources of infection of NTM, but the infectious routes remain unknown. The goal of this study was revealing the occurrence mechanism of NTM disease from the comprehensive viewpoint of microbiology, epidemiology and bioinformatics. Our results showed that bathroom environment is supposed as the reservoir of *Mycobacterium avium* which is a clinically important NTM species. The results also suggested that the concentration of residual chlorine should affect the survival of *M. avium*. In conclusion, the linkage of "chlorine disinfection - survival of NTM with chlorine resistance - occurrence of NTM disease" was suggested as the occurrence mechanism of NTM disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2009年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
2010年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
年度			
年度			
総計	35,900,000	10,770,000	46,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境変化、感染症、非結核性抗酸菌、水環境、分子疫学

1. 研究開始当初の背景

人類は災害から身を守り、また安全・安心

で快適な生活を求めて、環境を改変してきた。一般社会において、環境・生態系に関する関

心が深まるにしたがい、環境改変はネガティブな印象を持たれることがある。しかし、環境や生態系のかく乱が起こらなければ、これらの環境の改変が新たな「文化・文明」の礎になることは歴史的な事実である。

一方で、上記のかく乱が生じた場合には感染症の拡大を招く恐れがある。また現在、水環境の改変が新たな感染症を引き起こしつつあることが認識されてきており、なかでも非結核性抗酸菌症は近年急速に感染者数が増えつつある。本感染症の特徴として、集団発生がなく、水環境、特に住環境の水回りにおける曝露が大きな要因とされているものの、感染源や感染経路が不明であることが挙げられる。また、家族内での感染者間で遺伝子型が異なる場合があり、環境内動態が不明である。

2. 研究の目的

非結核性抗酸菌をモデルとし、環境改変による感染症出現（環境疾患）の機構について解明し、環境改変と安全・安心な社会生活を両立させるための基盤となる「環境改変—感染症の発生—我々の生活の変化」の「環」（図1）に関する知見の蓄積と、環境疾患防止のための考察を目的とした。

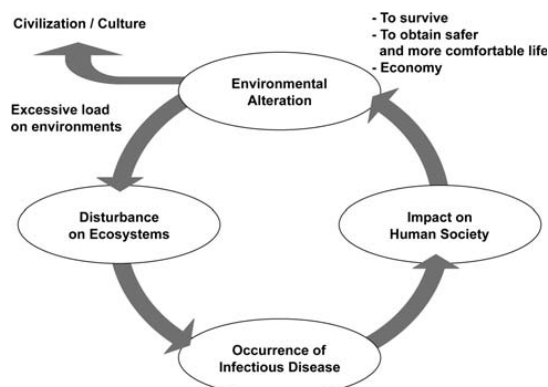


図1. 「環境改変—感染症の発生—我々の生活の変化」の「環」（Yamaguchi et al., *Ecol. Res.*, in press）

3. 研究の方法

本研究においては、rRNA 遺伝子を標的として非結核性抗酸菌の種レベルでの現存量測定と、新たに開発した蛍光染色法で生理活性をもつ抗酸菌の検出を行い、住環境における非結核性抗酸菌の分布を明らかにした。また、非結核性抗酸菌の臨床分離株・環境分離株・家畜由来株に対して分子集団遺伝学的アプローチを用いてその多様性ならびに集団構造を比較解析することにより、非結核性抗酸菌の宿主（ヒト、生息環境）への適応・定

着に関する考察を行った。

住環境内の非結核性抗酸菌の分布を解明するにあたり、ヒトと接触頻度が高く、エアロゾルを発生しやすい場所として、台所シンクの排水口、浴室の排水口、浴槽の追い炊き口、シャワーヘッドを選択し、それぞれの地点から滅菌したポリエステル製綿棒を用いて、バイオフィルムを採取した。各地点に存在する非結核性抗酸菌の現存量測定には、rRNA 遺伝子を標的とした定量的PCR法を用いた。本研究において最適化した条件、プライマーセットを使用し、臨床上重要な *M. avium*、*M. intracellulare* を種レベルで定量した。また、生理活性（呼吸活性）をもつ抗酸菌のシングルセルレベルでの検出には、本研究において開発した、蛍光二重染色法（Auramine O-CTC[5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride]二重染色法）を使用した（図2）。本方法は、呼吸活性をもつ抗酸菌を迅速に検出できるという利点がある。

非結核性抗酸菌のうち、臨床上重要な *M. avium* の環境内分布を評価するにあたって、臨床分離株 114 株、環境（患者浴室）分離株 38 株、家畜（ブタ）由来株 70 株を試料とした。新規遺伝型別解析法である VNTR（反復配列多型分析）により、各分離株の遺伝的多様性解析およびクラスター解析、我が国の臨床分離株特有の挿入配列保有株の分離頻度測定を行い、臨床分離株（ヒト）、環境由来株、家畜由来株（ブタ）の遺伝学的特徴の相関性と相違性を明らかにした。

4. 研究成果

平成 20 年度の成果は以下の通りである。

(1) 非結核性抗酸菌の環境内動態を解明するにあたり、本菌の生理活性を評価する手法の検討を行った。

その結果、

① 抗酸菌を特異的に染色する Auramine O、呼吸活性を指標とする CTC を併用し、最適化することで、生理活性をもつマイコバクテリウムをシングルセルレベルで 90 分以内に検出することを可能とした。

② *gyrB* 遺伝子を標的とする逆転写 PCR-DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）を検討した結果、細菌群集内で増殖している細菌を本方法により選択的に同定することができることを示した。

(2) 結核菌をモデルとして集団遺伝学的解析のための実験系の確立と解析手法の検討を行った。

その結果、

① 菌株識別能力に優れた遺伝子型別解析法である縦列反復配列数多型解析法

(Variable Number of Tandem Repeat : VNTR) を確立し、データ処理方法として、最小展開木 (Minimum Spanning Tree : MST) を用いたクラスター解析の有用性を、疫学的情報と進化系統的情報を加味して検証した。

② 今回確立した遺伝学的集団構造解析法を多剤耐性結核菌に適用し、薬剤耐性化獲得能力に優れた結核菌遺伝系統群の存在を示すデータを得た。

平成 21 年度の成果は以下の通りである。

(1) 非結核性抗酸菌の環境内動態を解明するにあたり、環境中における本菌の現存量、また生理活性を評価する手法の検討を進めた。

① 水環境および生活環境における非結核性抗酸菌の現存量を種レベルで測定するために、定量的 PCR 用プライマー等を検討し、rRNA 遺伝子が有用であることを見出した。

② 生理活性をもつ抗酸菌をシングルセルレベルで迅速に検出するために、平成 20 年度に作成した蛍光二重染色法 (Auramine O-CTC 二重染色法) の特異性を標準株により確認し、临床上重要な非結核性抗酸菌 (*M. avium* や *M. intracellulare* など) を特異的かつ迅速に検出可能であることを示した (図 2)。

③ *gyrB* 遺伝子の発現にもとづいた細菌の増殖活性評価法の有用性を大腸菌、緑濃菌を用いて評価した。その結果、*gyrB* 遺伝子の発現量を逆転写定量的 PCR 法で測定した値は、対数増殖期において他の増殖期と比較し有意に高く、本遺伝子が増殖活性の指標として有用であることを示した。

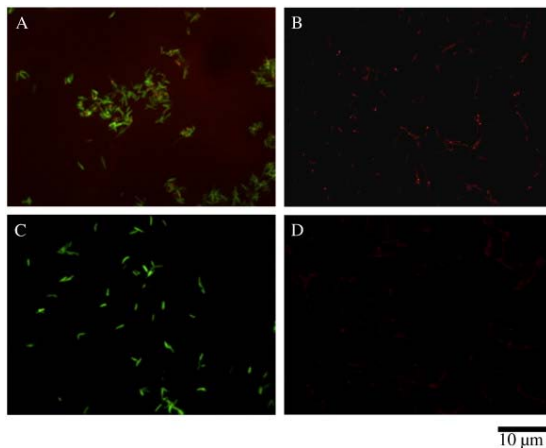


図 2. Auramine O-CTC 二重染色法による呼吸活性をもつ抗酸菌の特異的検出。(A)呼吸活性をもつ *M. intracellulare*、(B)呼吸活性をもつ大腸菌、(C)失活させた *M. intracellulare*、(D) 失活させた大腸菌 (Ichijo et al., *J. Microbiol. Methods*, 2010)

(2) 遺伝子データベース上に公開されている抗酸菌標準株の遺伝子情報を入力し、分子進化系統樹解析法を用いて解析した。その結果、病原性により系統樹が分岐する可能性を見出した。

(3) 結核菌をモデルとした集団遺伝学的解析を継続するとともに、国内の非結核性抗酸菌症の大部分を占める起原菌である *Mycobacterium avium* に対する集団遺伝学的解析実施のための検討を行った。

その結果、

① 結核菌においては、地域内での感染伝播が活発に認められる遺伝系統群の存在を明らかにした。

② *M. avium* についても結核菌と同様に VNTR-MST 解析の有用性を、ヒト臨床分離株を用いた検討で示した。さらに、*M. avium* ヒト臨床分離株について、16S-23S ITS 領域のシーケンス、*hsp65* 遺伝子のシーケンスならびに特定の挿入配列の存在において、本邦ヒト分離株が海外分離株とは異なる特徴を有することを明らかにした。

(4) 環境変化により発生する感染症 (レジオネラ症) の起原菌とされる *Legionella pneumophila* についての調査を行った。自然環境および水を循環使用する環境から分離した *Legionella pneumophila* の血清群を評価した結果、自然環境では多様な血清群が存在するのに対し、水を循環使用する環境では臨床においてレジオネラ症患者から高頻度で分離される血清群 1 に収束することを示した。今後、この要因を詳細に検討することにより、環境変化によるレジオネラ症の発生予防に貢献できると考える。

平成 22 年度の成果は以下の通りである。

(1) 水環境および生活環境における非結核性マイコバクテリウムの動態解析を行なうために、定量的 PCR の条件を最適化した。その結果、病原性非結核性マイコバクテリウムとして临床上重要とされる *Mycobacterium avium*、*M. intracellulare*、*M. kansasii* を種レベルで定量可能とした。

(2) 平成 21 年度までに開発した蛍光二重染色法 (Auramine O-CTC 二重染色法)、および最適化した定量的 PCR 法を用いて、住環境中の非結核性マイコバクテリウムの動態を解明した。

その結果、

① 抗酸菌は浴室、台所の排水口に高い頻度で存在し、複数の地点においては生理活性をもった状態で存在していた。

② 米国では、水道水中の残留塩素濃度の基準が日本と比較して高濃度に設定されてお

り、*M. avium*はシャワーヘッドから検出されているのに対し、本研究では風呂釜と浴槽をつなぐパイプ中のみでしか検出されなかった。

(3) *M. avium*臨床分離株の遺伝学的特徴について、遺伝的多様性の観点から精査するとともに、家畜(ブタ)由来株ならびに環境由来株との遺伝的関連性の解明を目指した。

その結果、わが国では欧州諸国からの報告とは異なり、ヒト分離株とブタ分離株の遺伝的相性は低く、ブタ感染個体のヒト感染への影響は極めて限局的と考えられた。また、浴室環境分離株とヒト臨床分離株の遺伝的相性は高く、浴室環境での定着が確認された。

以上の成果より、ヒトへの暴露という観点から浴室環境が *M. avium* のリザーバーとなる可能性を確認した。また、日米間の比較により、水道水中の残留塩素が *M. avium* の生残に影響を与えている可能性が推察される。すなわち、「水道の整備に伴う塩素消毒→塩素耐性をもつ非結核性マイコバクテリウムが生残→感染症の出現」というつながりが考えられた。

我々は安全・安心で快適な生活を求めて、環境を改変し、文化や文明を創成してきた。その一方、微生物生態系を考慮せずに環境の改変を行った場合、感染症が生じるリスクが高まり、人間社会へ影響を与える。本研究により示した、「水道の整備に伴う塩素消毒→塩素耐性をもつ非結核性マイコバクテリウムが生残→感染症の出現」というつながりは、そのモデルとなるものである。すなわち、本研究において、環境改変にともなう環境疾患の発生を未然に防ぐためには、微生物生態系を十分に理解したうえで、適切に環境を改変することが重要となることを示した。

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8件)

- ① Nobuyasu Yamaguchi, Tomoaki Ichijo, Masao Nasu. Environmental disease: environmental alteration and infectious disease. ECOLOGICAL RESEARCH, in press. doi: 10.1007/s11284-010-0707-1 (査読有)
- ② Hajime Saito, Tomotada Iwamoto, Kiyofumi Ohkusu, Yoshihito Otsuka, Yasushi Akiyama, Shigeki Sato, Osamu Taguchi, Yoshiko Sueyasu, Yoshiko Kawabe, Hisao Fujimoto, Takayuki

Ezaki, Ray Butle. *Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, in press. doi:10.1099/ijs.0.025478-0 (査読有)

- ③ Tomoaki Ichijo, Yoko Izumi, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu. Rapid enumeration of respiratory active mycobacteria with fluorescent double staining. JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, 82(3):327-329 SEP 2010. (査読有)
- ④ Tomoaki Ichijo, Nobuyasu Yamaguchi, Katsuji Tani, Masao Nasu. Oligonucleotide probes for phylogenetic detection of waterborne bacteria. JOURNAL OF HEALTH SCIENCE, 56(3):321-325 JUN 2010 (査読有)
- ⑤ Tomotada Iwamoto, Riyo Fujiyama, Shiomi Yoshida, Takayuki Wada, Chika Shirai, Yasuto Kawakami. Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 47(10):3340-3343 OCT 2009 (査読有)
- ⑥ Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto. Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION, 9(5):921-926 SEP 2009 (査読有)
- ⑦ Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Shinji Maeda. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 291(1):35-43 FEB 2009 (査読有)
- ⑧ Tomotada Iwamoto, Shiomi Yoshida, Katsuhiko Suzuki, Takayuki Wada. Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. ANTIMICROBIAL

[学会発表] (計33件)

- ① 一條知昭、住環境における非結核性抗酸菌の動態解明、日本薬学会第131年会、2011年3月29-31日、静岡
- ② 岩本朋忠、本邦*M. avium*のヒト・ブタ・環境由来株の遺伝的多様性とその関連性に関する考察、第41回結核・非定型抗酸菌症治療研究会、2010年12月4日、東京
- ③ 那須正夫、水環境における細菌の生態とヒトとのかかわり、第83回日本細菌学会総会、2010年3月27-29日、横浜
- ④ 那須正夫、都市文化に潜むレジオネラ感染症、第57回日本生態学会、2010年3月15-20日、東京
- ⑤ Tomotada Iwamoto, Study of the dynamics in population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Japan. US-Japan Cooperative Medical Sciences Program Forty-fourth tuberculosis and leprosy research conference, July 29-31, 2009, Fukuoka, Japan
- ⑥ Tomoaki Ichijo, Rapid Detection of Respiratory Active Mycobacteria by Auramine O-CTC Double Staining. 30th Annual Congress European Society of Mycobacteriology, JUL 5-7, 2009, Porto, Portugal (Best Poster Award 受賞)
- ⑦ Katsuji Tani, Expression of *gyrB* gene as indicator of bacterial growth activity. 109th American Society for Microbiology General Meeting, MAY 17-22, 2009, Philadelphia, USA
- ⑧ 岩本朋忠、わが国における非結核性抗酸菌の分布・多様性と病原的意義の検討、第82回日本細菌学会総会、2009年3月12-14日、名古屋
- ⑨ 山口進康、環境変化と感染症、第82回日本細菌学会総会、2009年3月12-14日、名古屋
- ⑩ 迫谷有希子、細菌の増殖活性評価指標としての *gyrB* 遺伝子、第24回日本微生物生態学会、2008年11月25-28日、札

幌 (ポスター賞受賞)

- ⑪ Tomotada Iwamoto, Population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. US-Japan Cooperative Medical Sciences Program Forty-third tuberculosis and leprosy research conference, July 8-10, 2008, Baltimore, USA
- ⑫ Masao Nasu, Environmental disease-environmental alteration and infectious disease-. International Symposium on Environmental Change, Pathogens, and Human Linkages, June 12-13, 2008, Kyoto, Japan

[その他]

(1) 研究会等の開催

那須正夫、川端善一郎：

2009年11月16-17日、総合地球環境学研究所(京都市)にて第27回「環境疾患」プロジェクト研究会「感染症が起きる生態系の変化を定量的に捉える試み」を開催。

那須正夫、山口進康：

2009年3月14日、第82回日本細菌学会総会(名古屋)において、ワークショップ「環境変化と感染症」をオーガナイズ。

(2) 受賞

一條知昭：

2009年7月7日、学会⑥において、Best poster of the 30th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology を受賞。

迫谷有希子：

2008年11月28日、学会⑩において、ポスター賞(優秀賞)を受賞。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 正夫 (NASU MASAO)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：90218040

(2) 研究分担者

高木 達也 (TAKAGI TATSUYA)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：80144517

谷 佳津治 (TANI KATSUJI)

大阪大谷大学・薬学部・准教授
研究者番号：50217113

岩本 朋忠 (IWAMOTO TOMOTADA)
神戸市環境保健研究所・微生物部・技術職員
研究者番号：70416402

山口 進康 (YAMAGUCHI NOBUYASU)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：20252702

馬場 貴志 (BABA TAKASHI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：20423121

(3)連携研究者

川端 善一郎 (KAWABATA ZENICHIRO)
総合地球環境学研究所・研究部・教授
研究者番号：80108456

一條 知昭 (ICHIJO TOMOAKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・研究員
研究者番号：20513899

小泉 義彦 (KOIZUMI YOSHIHIKO)
大阪府立公衆衛生研究所・環境水質課・研究員