

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591479

研究課題名(和文)全ゲノムシーケンスによるMAC菌分子疫学の確立と環境感染に関する病原遺伝子の探索

研究課題名(英文)Searching for pathogenic genes of MAC strains transmitted from environments

研究代表者

伊藤 穰(Yutaka, Ito)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80362482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺Mycobacterium avium complex (MAC)症患者および非感染者の約半数の自宅からMACを分離した。Variable numbers of tandem repeats (VNTR) 法による遺伝子型解析にて3クラスターにわけられたが、患者、土壌由来のMAC菌の分布に違いはなかった。高頻度土壌曝露のある肺MAC症患者で患者、土壌由来菌のVNTR遺伝子型は一致し、環境土壌はMACの感染源となりうる。VNTR解析により異なる遺伝子型を持つか他の抗酸菌菌種に交代した多クローン/複数抗酸菌感染では環境曝露が関連があり、抗菌治療後の再発例では高頻度土壌曝露が有意に多かった。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterium avium complex (MAC) strains were recovered from about half of residential soil samples of pulmonary MAC patients and non-infected control patients. Variable numbers of tandem repeats (VNTR) analysis revealed 3 clusters and did not include distinct major clusters for clinical or soil isolates. Clinical and corresponding soil isolate pairs with an identical VNTR genotype were recovered from patients with high soil exposure, suggesting that residential soils are a likely source of pulmonary MAC infection. Environmental exposure was associated with polyclonal and mixed mycobacterial MAC infection in pulmonary MAC disease. High soil exposure was independently associated with relapse after antimicrobial treatments.

研究分野：感染内科学

キーワード：VNTR 環境曝露

1. 研究開始当初の背景

肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者では、非感染対照者に比べて高頻度に土壌曝露を受けMAC症では生活環境から感染が示唆されることを報告した。しかし、患者由来株と土壌由来株の遺伝子型の違いは明らかにされていなかった。そこで、ある病原因子をもつ特定の菌株を曝露することで感染する、もしくは高頻度土壌曝露が病原菌感染の可能性を高め、発病をもたらしていると考えた。

2. 研究の目的

肺MAC症患者由来菌、患者居住土壌由来菌、非感染患者居住土壌由来菌の3群のMAC菌を用いて、variable numbers of tandem repeats (VNTR)解析法による遺伝子型別分類を行い、患者由来株と土壌由来株の遺伝子型プロファイルの違いを明らかにし、環境曝露との関連を検討する。

3. 研究の方法

肺MAC症患者100例 (*M. avium* 症67例、*M. intracellulare* 症26例、*M. avium* +*M. intracellulare* 症7例) とMAC感染のない気管支拡張症患者35例の自宅の農地、庭、鉢植えの土壌を回収、分離したMAC菌と患者由来のMAC菌からDNAを抽出した。*M. avium* は15か所、*M. intracellulare* は16か所のVNTR特異的プライマーを用いてPCRを行い、キャピラリー電気泳動にて各リピート数を決定した。この組み合わせをVNTRプロファイルとし、Phylip-3を用いて系統樹解析を行った。また、肺MAC症患者由来菌120例から異なる2回の臨床由来株に対して、VNTRプロファイルを決定し、異なるVNTR遺伝子型を有するまた、多クローン感染と同一の遺伝子型を有する単クローン感染とした。患者由来菌と土壌由来菌が一致した患者、多クローン感染患者、抗菌治療後

の再発患者における環境曝露との関連を検討した。

4. 研究成果

全体で48.9% (66/135検体)の土壌サンプルからMACを分離した。患者のMAC感染の有無や回収した土壌の種類に関わらずにMACは分離され (MAC症50%、非MAC気管支拡張症45.7%、 $p=0.66$; 農地71.4%、庭50.6%、鉢植え42.9%、 $p=0.33$) MACは自宅土壌に広く生息していることが示された。保存されていた患者由来株65株と土壌由来株66株のVNTRプロファイルの系統樹解析では、全体で大きく3クラスターにわけられたが、患者、土壌由来のMAC菌の分布にクラスター間の偏りはなく、患者、土壌由来株間のVNTR遺伝子型の違いは見つけれなかった。高頻度土壌曝露のある肺MAC症患者6人 (*M. avium*5例、*M. intracellulare*1例) から分離されたMAC菌がその患者の自宅土壌からのMAC菌とVNTR遺伝子型で一致し、環境土壌がMACの感染源となりうることを示した。(論文)

肺MAC症患者120例から採取した2回の喀痰培養由来のMAC菌のVNTR解析を行い、異なる遺伝子型を持つもしくは他の抗酸菌菌種に交代した多クローン/複数抗酸菌感染42例と同一の遺伝子型を持つ単クローン感染78例を比較したところ、気管支喘息の既往(16.7% vs. 1.3%, $P<0.01$)、高頻度土壌曝露(61.9% vs. 30.8%, $P<0.01$)、シャワー使用(90.5% vs. 70.5%, $P=0.013$)、プールでの水泳経験(16.7% vs. 1.3%, $P<0.01$)が多変量解析で有意であることを示し、水、土壌の環境曝露は肺MAC症患者でのMACを含む非結核性抗酸菌を再感染する危険因子となりうると思われた。(論文)

また、この120例の一部を含む72例に抗菌治療を行い、排菌停止して新たに菌が検出された再発例15例は高頻度土壌曝露が有意

に多く、環境からの再感染が示唆された。(論文)

無治療で排菌持続する例では、高頻度に土壌を曝露し、多クローン感染による再感染例も見られた。

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3件)

Ito Y, Hirai T, Fujita K, Kubo T, Maekawa K, Ichiyama S, Togashi K, Mishima M. The influence of environmental exposure on the response to antimicrobial treatment in pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. BMC Infect Dis. 査読有 2014;14:522.

doi:10.1186/1471-2334-14-522.

Fujita K, Ito Y, Hirai T, Kubo T, Maekawa K, Togashi K, Ichiyama S, Mishima M. Association between polyclonal and mixed mycobacterial *Mycobacterium avium* complex infection and environmental exposure. Ann Am Thorac Soc. 査読有 2014;11:45-53.

doi:10.1513/AnnalsATS.201309-297OC.

Fujita K, Ito Y, Hirai T, Maekawa K, Imai S, Tatsumi S, Niimi A, Iinuma Y, Ichiyama S, Mishima M. Genetic relatedness of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex isolates from patients with pulmonary MAC disease and their residential soils. Clin Microbiol Infect. 査読有 2013;19:537-41.

doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03929.x.

[学会発表](計6件)

Fujita K, Ito Y, Mishima M, et al. Association of polyclonal *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) infection with environmental exposure in patients with pulmonary MAC disease.

American Thoracic Society 2013

international conference. 2013.5.21,

Philadelphia (USA)

Ito Y, Mishima M, et al. Influence of environmental exposures on sputum culture conversion in untreated pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* complex disease. American Thoracic Society 2013 international conference. 2013.5.21, , Philadelphia (USA)

藤田浩平、伊藤 穰、平井豊博、前川晃一、久保 武、富樫かおり、一山 智、三嶋理晃 . 肺*Mycobacterium*

avium-intracellulare complex症におけるMAC多クローン菌感染環境曝露の関連 . 第53回日本呼吸器学会学術講演会 . 2013

年4月20日、東京国際フォーラム(東京都)

伊藤 穰、平井豊博、藤田浩平、前川晃一、久保武、富樫かおり、一山 智、三嶋理晃 . 肺*Mycobacterium avium*

complex(MAC)症治療の有効性に対する環境曝露の影響 . 第53回日本呼吸器学会学術講演会 . 2013年4月20日、東京国際フォーラム(東京都)

伊藤 穰、平井豊博、藤田浩平、前川晃一、久保武、富樫かおり、一山 智、三嶋理晃 . 無治療肺*Mycobacterium avium*

complex症患者における菌陰性化と環境曝露との関係. 第88回日本結核病学会総会 . 2013年3月28日、幕張メッセ(千葉県)

Ito Y, Mishima M, et al. Influence of environmental exposures on treatment outcomes in pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* complex disease.

IDWeek meeting 2012. 2012.10.20, San Deigo (USA)

[図書](計0件)
該当なし

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）
該当なし

取得状況（計0件）
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 穰 (ITO Yutaka)
京都大学・医学研究科・助教
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
(2014年より京都大学から異動)
研究者番号：80362482

(2) 研究分担者

三嶋 理晃 (MISHIMA Michiaki)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：60190625