

宮城県内の環境中における非結核性抗酸菌の動態について

Environmental survey of nontuberculous mycobacteria in Miyagi

木村 葉子 渡邊 節 有田 富和 山口 友美 畠山 敬

Yoko KIMURA, Setsu WATANABE, Tomikazu ARITA, Yumi YAMAGUCHI,
Takashi HATAKEYAMA

ヒトの生活環境に近い公衆浴場水や水たまり、下水等の環境水を対象に非結核性抗酸菌（NTM）の遺伝子を検索し、その分布状況を調査した結果、NTM は県内の環境中に広く分布していることが確認された。特に公衆浴場水では、ヒトに対して病原性の高い NTM である *M.avium* が高率に検出された。さらに、公衆浴場水において原水の種類による比較をしたところ、水道水を原水としている公衆浴場水で NTM 遺伝子陽性割合が高かった。また、宮城県食肉衛生検査所で分離した豚 NTM 症由来の *M.avium* について VNTR 型別解析を実施した結果では、系統樹上で大きく 3 つのクラスターに分かれ、多くの株はそれぞれの農場毎にクラスターを形成していたが、複数農場から広く検出されるクラスターも存在した。

キーワード：非結核性抗酸菌；環境水；*M.avium*；豚；VNTR

Key words : nontuberculous mycobacteria ; environmental water ; *M.avium* ; pig ; VNTR

1 はじめに

非結核性抗酸菌（nontuberculous mycobacteria : NTM）とは、抗酸菌（Mycobacterium 属菌）の中で結核菌群とらい菌を除いた培養可能な菌群の総称で、土壌や粉じん、水系、動物の体内等に広く存在する環境常在菌である。この菌を原因とする非結核性抗酸菌症（NTM 症）は、そのほとんどが肺に感染する肺 NTM 症で、難治性の慢性進行性呼吸器感染症である。現在約 150 種類存在するとされている NTM の中でヒトに病原性を有するのは約 50 種類程度¹⁾であるが、中でも *M.avium* と *M.intracellulare* を含む MAC (*M.avium* complex) を原因菌とするものが全体の約 8 割を占め罹患率が高い。NTM は、結核菌と異なりヒトからヒトへの感染はないとされているが、近年罹患患者数が急増している。しかし、感染経路が不明瞭であり、また有効な治療薬が開発されていないため、長期間の治療が必要で完治が難しい。また、NTM 症は感染症法に指定される発生動向調査の対象とはなっておらず、詳しい実態は明らかになっていないのが現状である。

加えて、MAC は豚の NTM 症の主要な原因菌でもある。これまで豚が直接の感染源となったヒト感染事例は確認されていないものの、動物における NTM 症の実態は不明な点が多い。

そこで、本研究ではヒトの周辺環境中における NTM の動態を把握するため、宮城県内の公衆浴場水や水たまり、下水等の環境水を対象に、NTM 遺伝子の検索を行った。また、豚由来の NTM 株について、分子疫学的解析を実施したので報告する。

2 対象および検査方法

2.1 対象

2.1.1 環境中における NTM 遺伝子の検索

平成 26 年度から平成 28 年度に宮城県内で採水した公衆浴場水 264 検体、アスファルト道路上の水たまり 76 検体および平成 28 年度に採取した県内下水処理場の流入下水 50 検体の計 390 検体を対象とした。

2.2.2 豚由来 NTM 株の分子疫学的解析

平成 29 年度に宮城県食肉衛生検査所で分離した豚 NTM 症由来の分離株 29 株を対象とした。

2.2 方法

2.2.1 環境中における NTM 遺伝子の検索

1) 検体の前処理

公衆浴場水および水たまりについては、フィルターろ過により濃縮液を作製した。流入下水については、ポリエチレングリコールおよび NaCl を加え、4℃で 1 晩攪拌した後、冷却遠心した。上清を除き、沈渣を滅菌蒸留水で懸濁させ下水濃縮液とした。

2) 2 段階 PCR 法による遺伝子検出

1)の各濃縮液から、アルカリ熱抽出法により DNA を抽出し、OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEARCH) を用いて遺伝子増幅を阻害する環境由来物を除去した。

遺伝子検出は楠ら²⁾の方法に従い、初めに前段で処理した DNA 抽出液をテンプレートとして NTM 遺伝子のスクリーニングを行った (1st-step PCR)。次に、NTM 遺伝子陽性となった PCR 産物の一部をテンプレートとして *M.avium*, *M.intracellulare* および *M.kansasii* の主要 3 菌種についての遺伝子検出を行った (2nd-step PCR)。

2.2.2 豚由来NTM株の分子疫学的解析

菌株を滅菌蒸留水に懸濁し、熱抽出法により DNA 抽出液を作成したのものについて、環境水検体と同様の方法で2段階 PCR による主要 3 菌種の遺伝子検出を行った。*M.avium* 遺伝子陽性となった株について、西森ら³⁾の方法に従い、MATR-1 から 16 まで 16 種類のプライマーセットを用いた VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別を実施し、アリルプロファイルの比較解析を行った。

3 結果

3.1 環境水からのNTM遺伝子検出状況

調査した 390 検体のうち、NTM 遺伝子陽性となったのは、公衆浴場水 264 検体中 79 検体 (29.9%)、水たまり 76 検体中 13 検体 (17.1%)、下水 50 検体中 30 検体 (60.0%) の計 122 検体 (31.3%) であり、今回対象とした 3 種類の水検体全てから NTM 遺伝子が検出された (表 1)。

NTM 遺伝子陽性となった検体について、*M.avium*、*M.intracellulare* および *M.kansasii* の遺伝子を検索した結果、公衆浴場水では *M.avium* 遺伝子が 29 検体と高率に検出された他、*M.kansasii* 遺伝子が 8 検体検出され、この 2 菌種で NTM 遺伝子陽性検体の半数近くを占めていた。また、*M.avium* と *M.kansasii* の 2 種類が陽性となった検体も 2 検体存在した。水たまりでは *M.kansasii* 遺伝子が 1 検体検出され、下水は全て 3 菌種以外の菌種であった (図 1)。なお、*M.intracellulare* については、今回調査したいずれの材料からも検出されなかった。

表 1 環境水からのNTM遺伝子検出結果

	検体数	NTM 遺伝子陽性数	陽性率
公衆浴場水	264	79	29.9%
水たまり	76	13	17.1%
下水	50	30	60.0%
計	390	122	31.3%

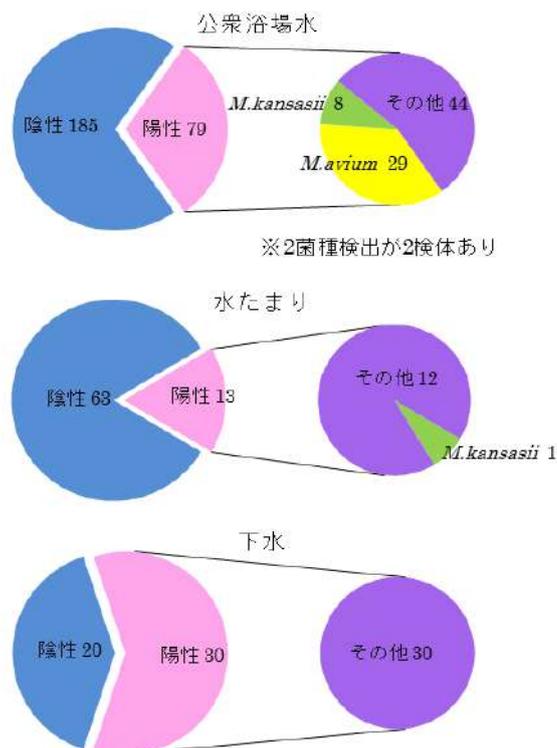


図 1 検体別主要 3 菌種遺伝子検出結果

3.2 公衆浴場水原水の種類による比較

公衆浴場水について、原水の種類による NTM 遺伝子の検出状況を比較した (図 2)。NTM 遺伝子陽性となったのは、水道水で 107 検体中 46 検体 (43.0%)、温泉 130 検体中 24 検体 (18.5%)、その他 27 検体中 9 検体 (33.3%) となり、特に水道水を原水としている公衆浴場水から多く検出されていた。また、*M.avium* 遺伝子陽性検体を比較すると、29 検体中水道水 23 検体、温泉 5 検体、その他 1 検体、*M.kansasii* 遺伝子陽性検体では、8 検体中水道水 7 検体、温泉 1 検体となり、いずれも水道水を原水としている公衆浴場水で高率に検出されていた。

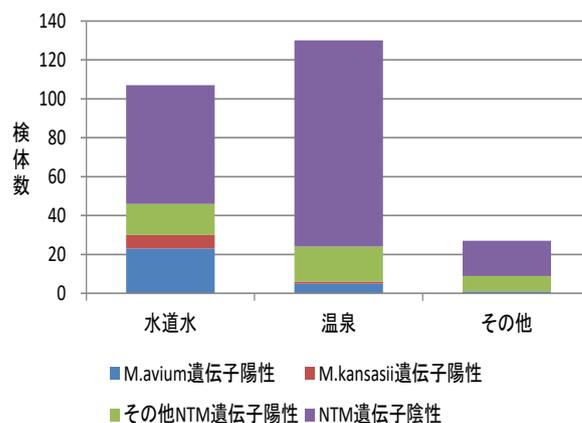


図 2 公衆浴場水原水の種類別検出結果

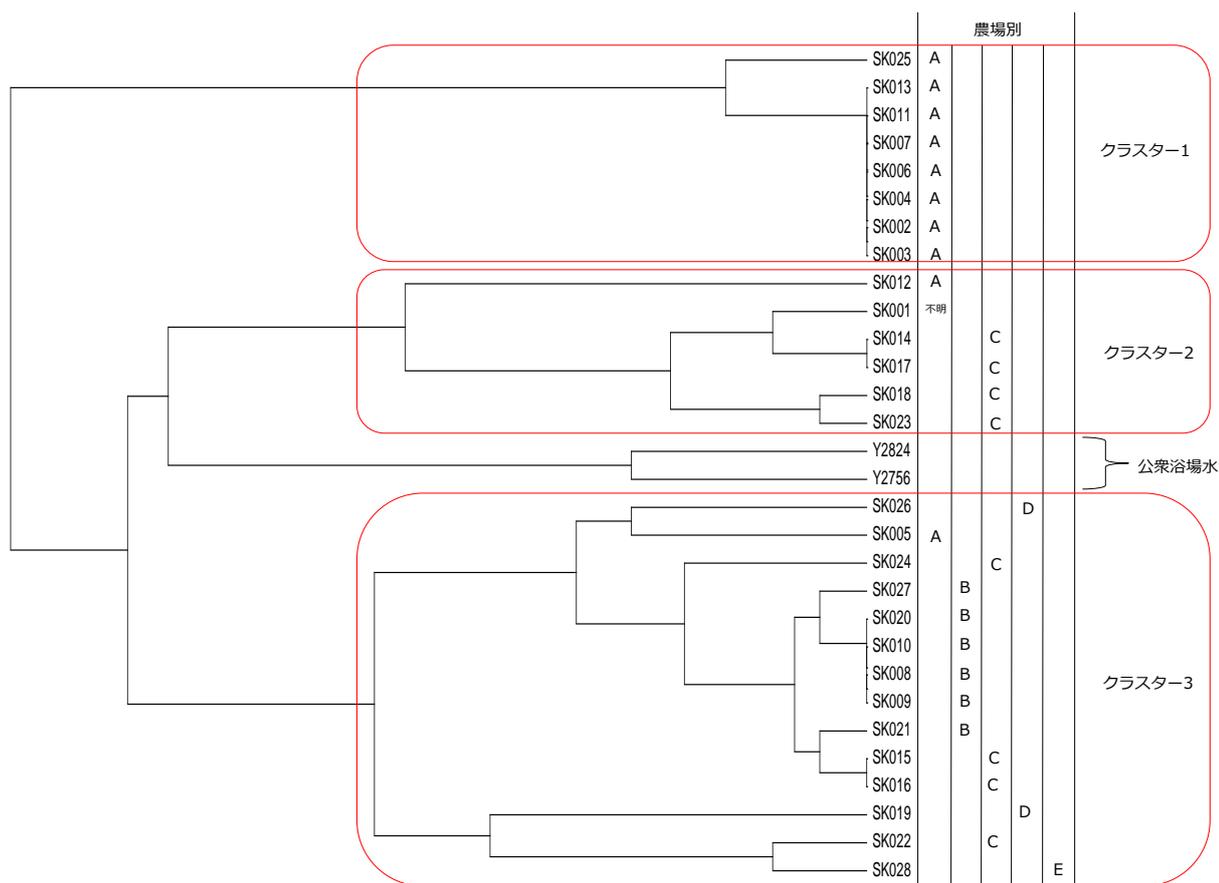


図3 *M. avium* VNT R型別解析結果

3.2 豚由来 *M. avium* のVNT R型別解析結果

調査した29株のNTMについては、不明の2株を除きAからEの5カ所の農場に由来する豚から分離されており、このうち28株が*M. avium*であった。残り1株については、今回調査した3菌種以外の菌種であった。

遺伝子増幅が不明瞭であったMATR-10と16のプライマーを除く14組のプライマーセットによりVNTR解析を行い、UPGMA法により作成系統樹をした結果、豚由来*M. avium*は系統樹上で大きく3つのクラスターに分かれた。A農場由来株はほぼ全てがクラスター1に属し、C農場由来株はクラスター2および3、B農場由来株はクラスター3に属した。クラスター3にはB農場以外の4農場(A, C, D, E)の由来株も属しており、多くの農場にこのクラスターに属する株が広がっていた。

また、公衆浴場水で*M. avium* 遺伝子陽性であった検体のうち、VNTR型別が可能であった2検体(Y2824, Y2756)について豚由来株との相同性を確認したところ、豚由来*M. avium* クラスタ-2から分岐するものであったが相同性は低いものであった(図3)。

4 考察

NTMは環境常在菌であるとともにNTM症の原因菌である。NTM症は感染症法に指定される発生病動向調査の対象とはならないため、詳しい実態は不明である。し

かし、Namkoongら⁴⁾が2014年に実施した調査によると、日本における肺NTM症の推定罹患率は人口10万人に対して14.7人と算出しており、肺結核の罹患率をしのぐものであるとしている。また、2007年の全国調査と比較して約2.6倍に急増していることを報告しており、原因も含めた緊急な研究の必要性を論じている。そこで、本研究ではNTMの存在を調べるため、人に身近な環境物を対象に実態調査を行った結果、県内の環境中にはNTMが広く分布していることが明らかとなった。特に、公衆浴場水からは*M. avium*と*M. kansasii*の遺伝子が検出されており、中でも*M. avium*は約11%(29/264検体)と高率であった。この原因は定かではないが、温泉利用者による持ち込みの機会に加え、浴槽水が菌の生存に適した環境にある可能性などが要因の一つとして考えられる。人の生活に密接な公衆浴場水における*M. avium*等の汚染実態が明らかとなったことは、感染症発生対策の上で注目すべきことと思われる。

また、原水の種類によるNTM遺伝子検出状況を比較した結果、水道水を利用した公衆浴場水で陽性割合が高くなっており、*M. avium*および*M. kansasii*の遺伝子も非常に高い割合で検出されていた。この原因を解明するためには、施設の利用状況や採水時の状況等、関連情報を収集し分析することが必要であると考えられる。

一方、水たまりでは*M. kansasii*遺伝子陽性が1検体

のみで、下水からは主要 3 菌種は認められなかったが、水たまりの約 17%、下水の 60%にその他の NTM 遺伝子が存在した。NTM は現在約 150 種類存在することが知られており、水たまりおよび下水には、より自然環境に近い条件で生息する NTM が高率に存在するものと考えられた。今後は各調査材料に存在する種とその比率についても明らかにしていく必要があると思われる。

また、豚由来 *M.avium* の VNTR 型別解析の結果では、同一農場に由来する株の多くはそれぞれのクラスターを形成していたものの、複数農場から広く検出されるクラスターが存在した。このことは、それぞれの農場内で蔓延する型以外にも、人や家畜、飼料の移動など何らかの過程で外界からの侵入が起きていることを示しており、家畜衛生の観点からも、今後考慮すべきものと思われる。さらに、公衆浴場水と豚由来 *M. avium* の比較では、遺伝子型が異なっていた。しかし、本研究で解析に使用した公衆浴場水は 2 検体と少なく、人由来の NTM を比較対象に加えられなかったことなど、人・公衆浴場水・豚の関連性を評価するには並行的な解析を改めて行う必要があると考える。

NTM 症は、減少傾向にある結核とは対照的に急激な増加傾向にある。有効な治療方法の確立とともに発生源の解明が急務であり、その一助となるよう、今後も研究を進めていきたいと考える。

5 謝 辞

今回の調査を行うにあたり、菌株を提供していただきました宮城県食肉衛生検査所に感謝いたします。

本研究は平成 29 年度宮城県公衆衛生研究振興基金の研究助成により行われたものです。

参考文献

- 1) 病原微生物検出情報 38 : 245-247, 2017
- 2) 楠伸治, 村田豊, 南出和喜夫, 他 : 2 段階 PCR 法による喀痰中の *Mycobacterium avium*, *M.intracellulare* および *M.kansasii* の検出. 感染症学雑誌, 68: 42-49, 1994.
- 3) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 他 : VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. 動物衛生研究所研究報告書. 2003 ; 109 : 25_32.
- 4) Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, et al.: Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan (1). Emerg Infect Dis. 2016 ; 22 : 1116-1117.