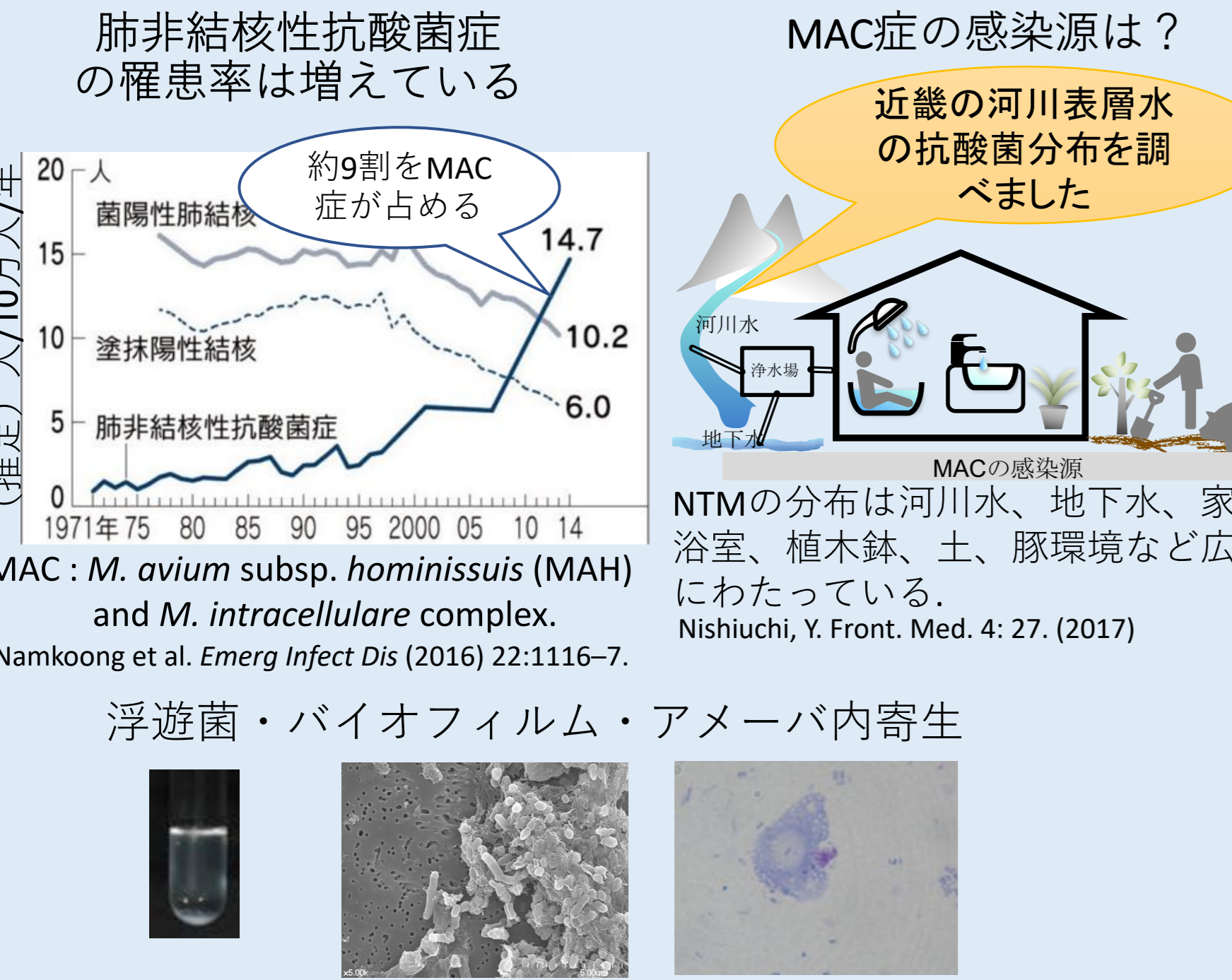


# 河川水の自由生活性アメーバ内の非結核性抗酸菌を分離して共生関係の実態を解明する

西内 由紀子 (大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所)

## 目的と背景

肺非結核性抗酸菌感染症は世界中で増加しており、特に日本における増加は著しい。環境から感染することが知られている抗酸菌感染症が世界中で増えている事実は、環境中で抗酸菌が生存域を拡大している事を示唆している。環境中では、浮遊菌、バイオフィーム、アメーバ内寄生していると考えられているが、その実態は不明である。本研究では河川表層水中の浮遊菌と自由生活性アメーバ内の抗酸菌について、培養法と抗酸菌現存量、および菌叢を比較解析して共生関係の実態を調べた。



## アメーバ含有分画

表 1. アメーバの分離

河川表層水53試料から651株の抗酸菌を分離し7種のアメーバを同定した

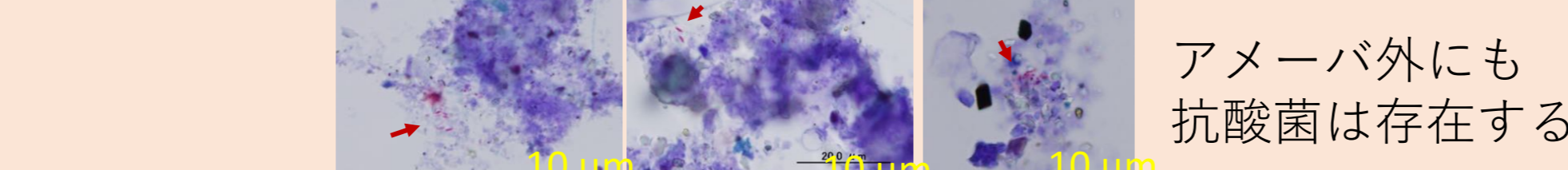
Amoebae species	淀川						猪名川						石川					
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	I1	I2	I3	I4	I5	I6	S1	S2	S3			
<i>Vermamoeba vermiformishominissuis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
<i>Vannella simplex</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
<i>Naegleria neojejuensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0			
<i>Naegleria koreanum</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
<i>Naegleria sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Stenamoeba limacina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
<i>Amoebosoa sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

青字は冬季、赤字は夏季試料から分離した

図 1. アメーバ内の抗酸性染色陽性菌



アメーバ分画を直接塗抹、抗酸性染色



アメーバ外にも抗酸菌は存在する

アメーバ内の抗酸性染色陽性菌の分離

分離できなかった

## 浮遊菌含有分画

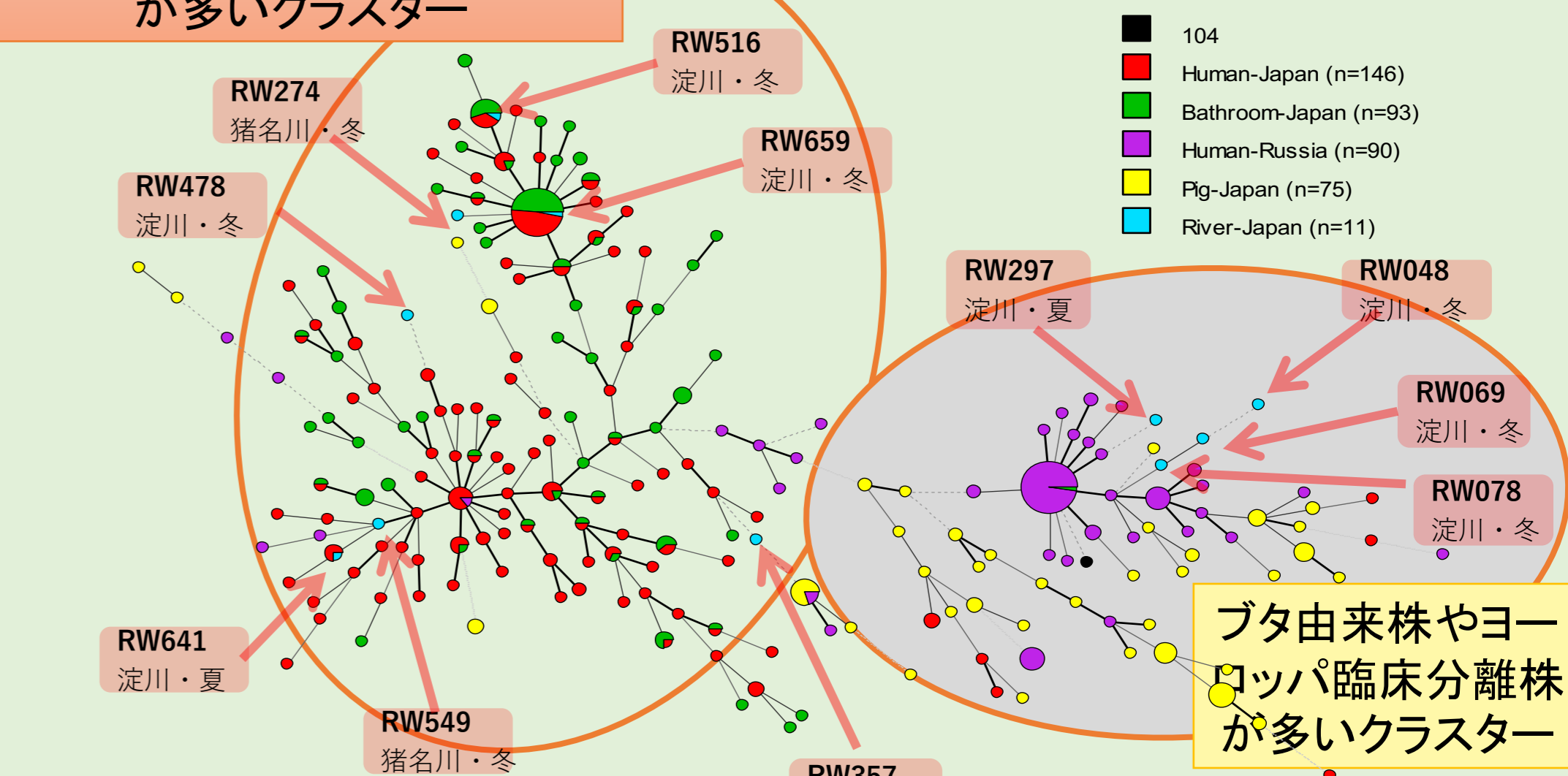
表 2. 河川表層水53試料から651株の抗酸菌を分離し29種の抗酸菌を同定した

Mycobacterial species	Case reports in Japan	淀川						猪名川									
		Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter										
<i>M. avium</i> (MAC)	有り	0	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>M. intracellulare</i>	有り	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>M. colombiense</i>	有り	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>M. arupense</i>	有り	0	1	0	2	0	1	0	3	2	1	2	0	1	1	1	1
<i>M. asiaticum</i>	有り	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. goodii</i>	有り	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. gordanae</i>	有り	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
<i>M. intermedium</i>	有り	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. lentilavum</i>	有り	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. nonchromogenicum</i>	有り	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. paratuberculosis</i>	有り	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>M. peregrinum</i>	有り	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. shigaense</i>	有り	0	2	1	1	2	1	0	1	1	2	2	0	1	0	1	0
<i>M. szulgai</i>	有り	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. triplex</i>	有り	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. arosiense</i>	-	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. bohemicum</i>	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>M. europaeum</i>	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>M. interjectum</i>	-	0	0	1	2	2	0	1	1	1	1	2	0	2	1	0	1
<i>M. nebraskense</i>	-	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	2
<i>M. parascrofulaceum</i>	-	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. paraseoulense</i>	-	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>M. senense</i>	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. seoulense</i>	-	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. virginense</i>	-	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	2
<i>M. yongonense</i>	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. algericum</i>	非病原性	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. cookii</i>	非病原性	0	1	1	2	1	0	2	2	3	1	3	0	1	2	1	0
<i>M. paragordanae</i>	不明	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. spp.</i>	不明	0	1	2	2	0	2	3	3	3	3	3	0	0	2	1	2

図 2. 縦列反復配列多型解析

今回分離した河川由来 *M. avium* は遺伝子型別で多様性を示した

患者由来株と浴室環境由来株が多いクラスター

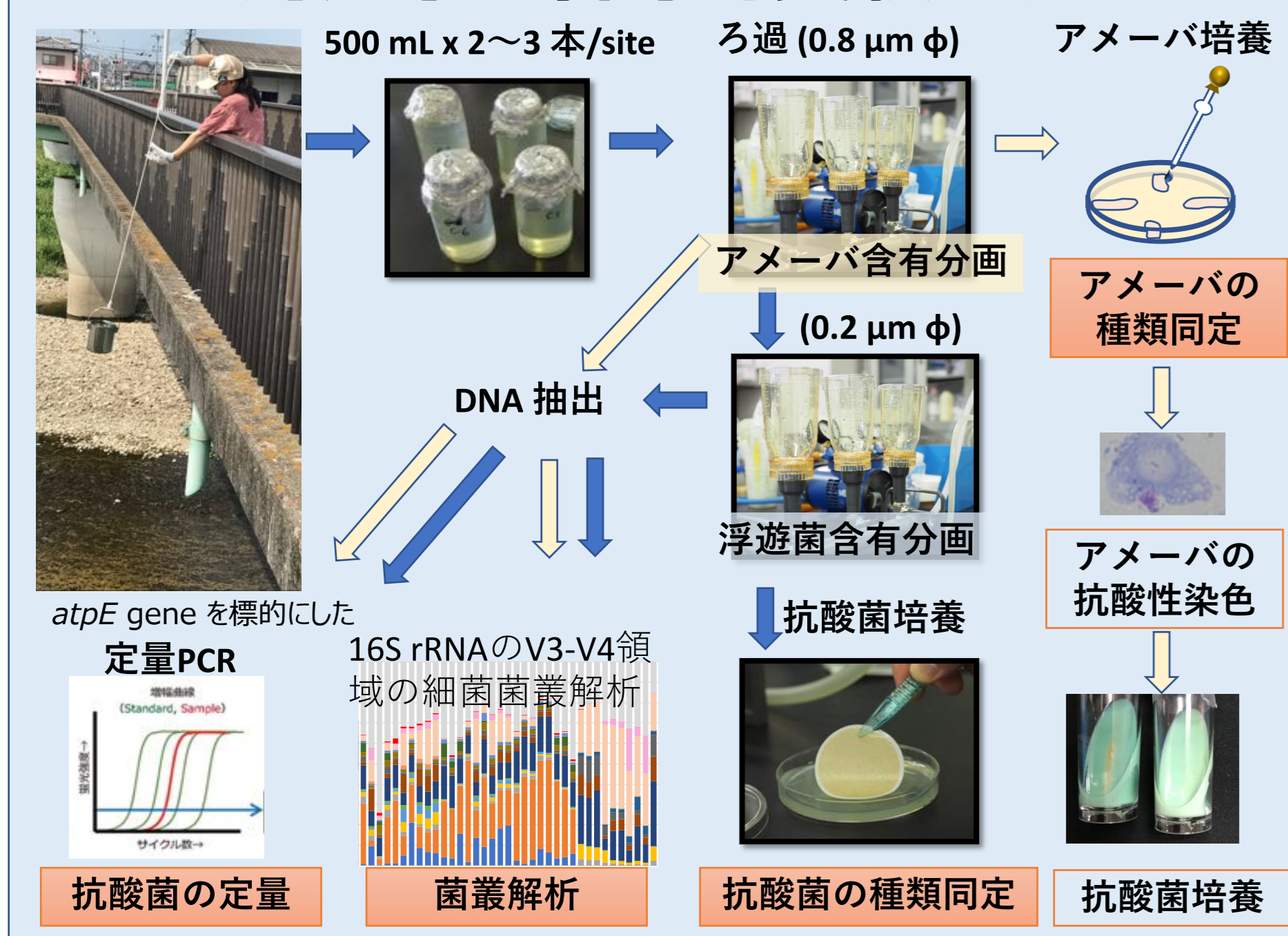


河川表層水の浮遊菌分画のMAHは多様で、偏りのない分布を示した。このことから、自然界において多様なMAHが存在し、感染源(浴室)では宿主による選択圧がかかっていることが示唆された。

## 結果と考察

- 河川表層水からアメーバ含有分画 (> 0.8 μm φ) と浮遊菌含有分画 (< 0.2 μm φ) に分けて、培養法、抗酸菌現存量、および菌叢を比較解析してアメーバと抗酸菌の共生関係の実態を調べた。
- 河川表層水アメーバ含有分画から7種のアメーバを分離同定した(表 1)。
- アメーバ内には抗酸性染色陽性に染まる菌が見られたが、菌の分離はできなかった(図 1)。
- 一方、河川表層水の浮遊菌分画からは29種の多様な抗酸菌を分離した(表 2)。
- 河川水9試料から分離した11株の *M. avium* について縦列反復配列多型解析を実施したところ、患者由来株と感染源である浴室由来株が多いクラスターと、豚由来株やヨーロッパ臨床分離株が多いクラスターの両方にまたがる偏りのない分布を示した(図 2)。自然界において多様な *M. avium* が存在し、感染源(浴室)では宿主による選択圧がかかっていることが示唆された。
- 抗酸菌の現存量は検出限界以下から40万コピー/500 ml 河川水の抗酸菌が得られた(図 3)。
- 菌叢解析では試料の違いや採水季節によりクラスターが形成された(図 4-6)。
- Mycobacterium* 属の結果について試料別に比較すると、アメーバ含有飼料の方が *Mycobacterium* の占める割合が高かった(図 7)。
- 培養法で分離アメーバの種類や頻度も少なくアメーバから抗酸菌を分離できなかったことから、河川表層水はアメーバの主な生息場所ではないかもしれない。
- アメーバが少ないにも関わらず、定量法と菌叢解析から抗酸菌の存在が認められたことから、アメーバ細胞内だけでなくその他の原生動物やプランクトンに付着して存在している可能性が示唆された。事実、アメーバ含有試料を直接塗抹した試料にも抗酸性染色陽性菌が認められた(図 1)。
- 抗酸菌は細胞内に寄生するだけでなく、ヒト赤血球に付着して細胞外増殖する能力を有していることを見出した(in preparation)。環境においても同様な増殖形態をとっているのかもしれない。この観点から本研究を進展させ、環境中における抗酸菌の生息実態を明らかにしたい。

## 河川水の採水と実験方法



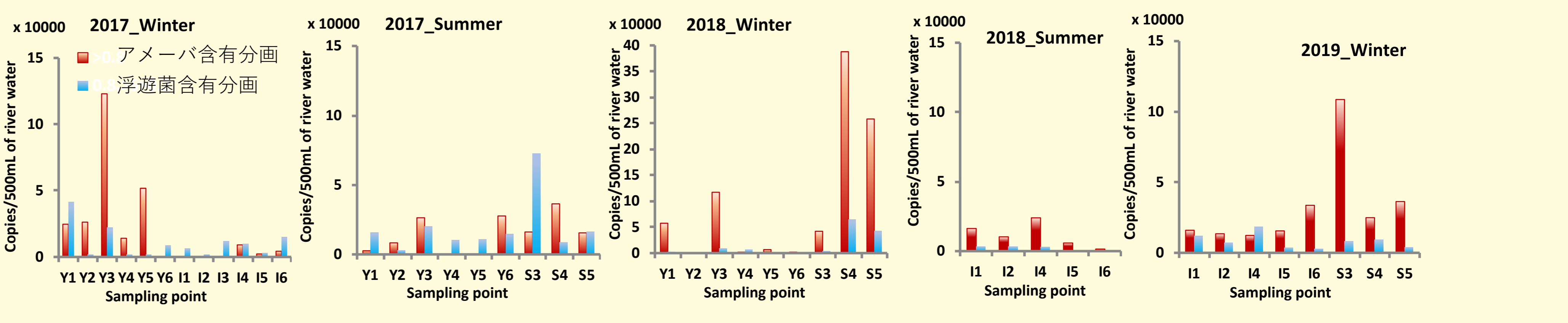
### 試料採取場所



採水は大阪健康安全基盤研究所生活環境課の皆様にご協力いただきました。深謝いたします。

## アメーバ含有分画 & 浮遊菌含有分画

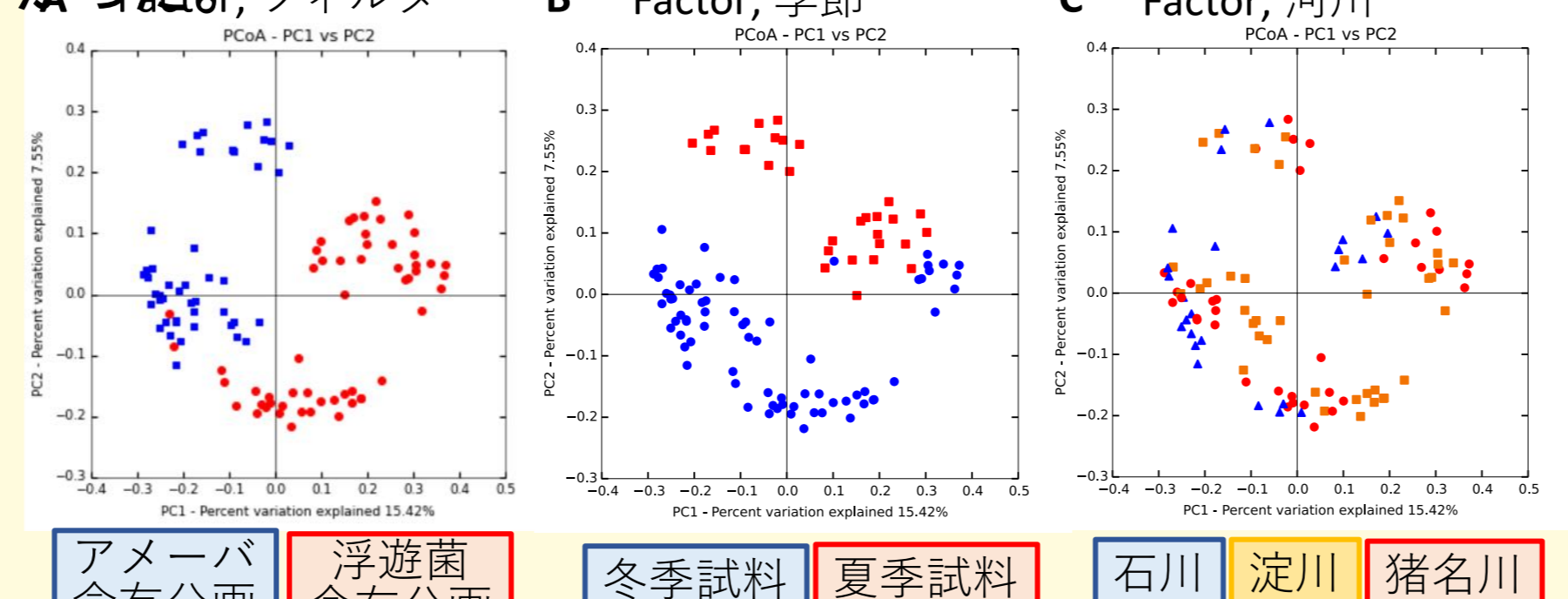
図 3. 抗酸菌定量解析; アメーバ含有分画、浮遊菌分画のいずれからも抗酸菌の存在が認められた。比較した43ポイント中27ポイントで、アメーバ画分の方がmycobacteria 菌量が多かった。



### 細菌菌叢解析

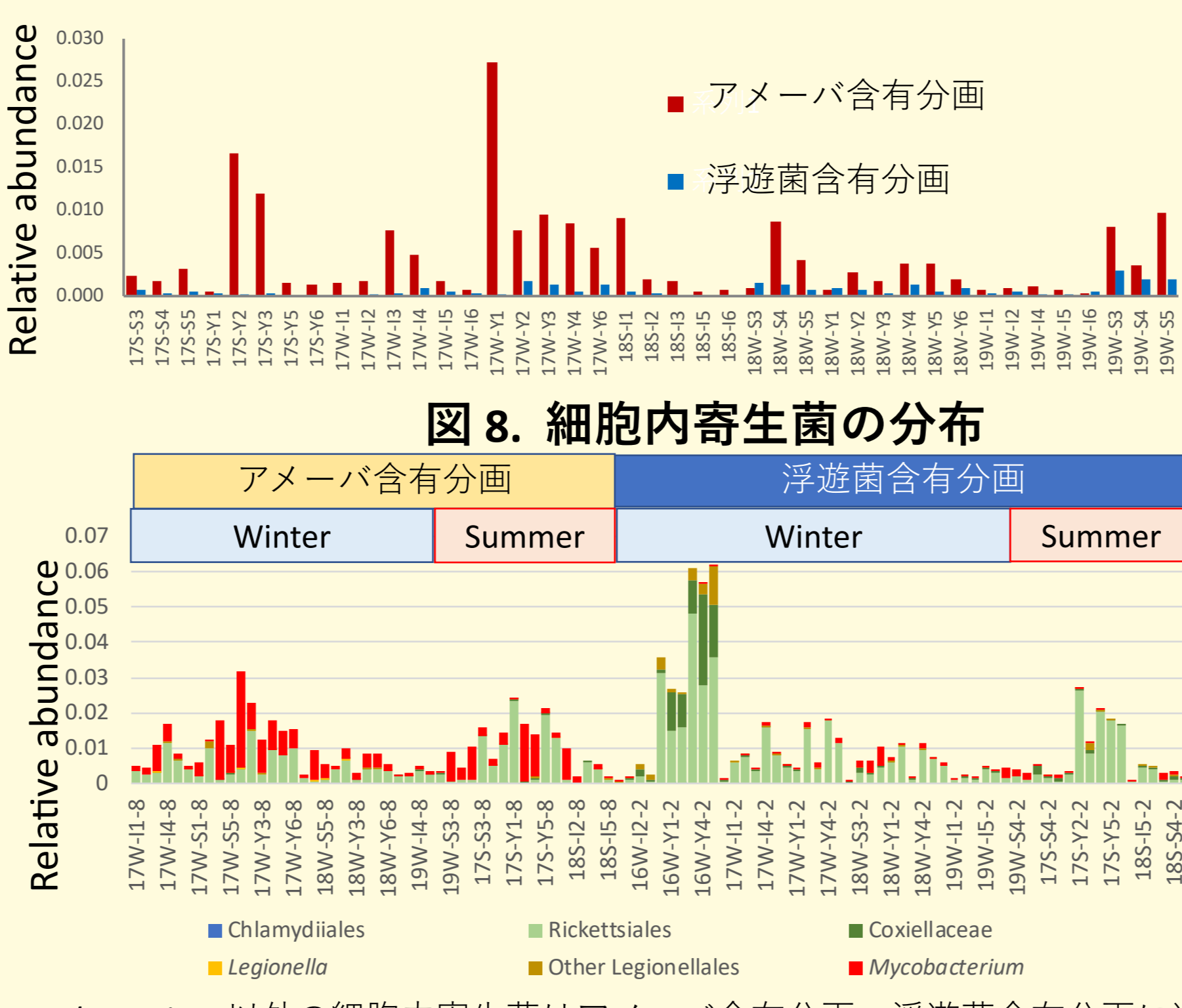
103 試料を解析し、1試料はPCR 増幅せず、1試料はread数が少なかった。計101 試料の解析結果を示す。

図 4. 主成分解析; アメーバ含有分画と浮遊菌含有分画、および試料採取季節によってクラスターが形成されたが、採水した河川、採水ポイントに差は見られなかった。

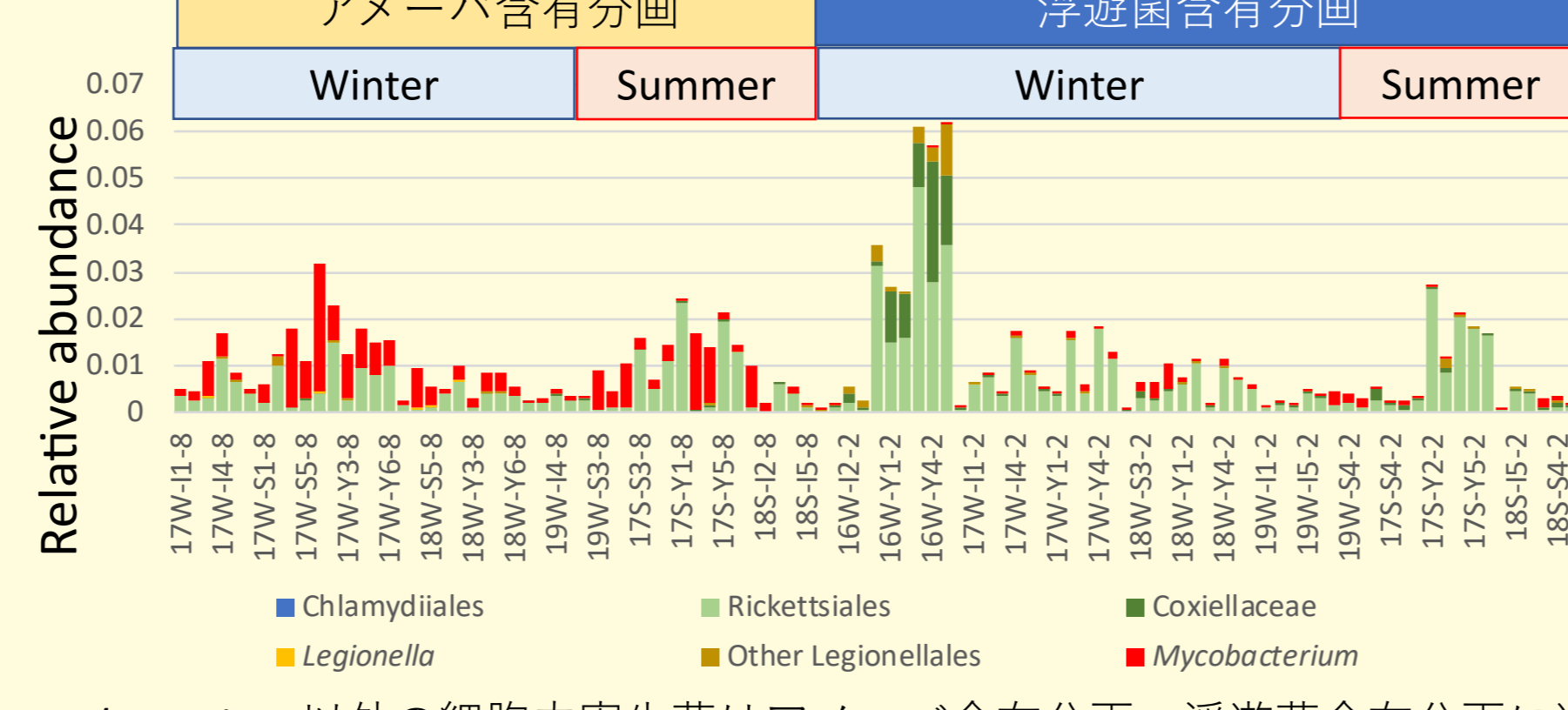


### 図 7. Mycobacterium 属の含有比率

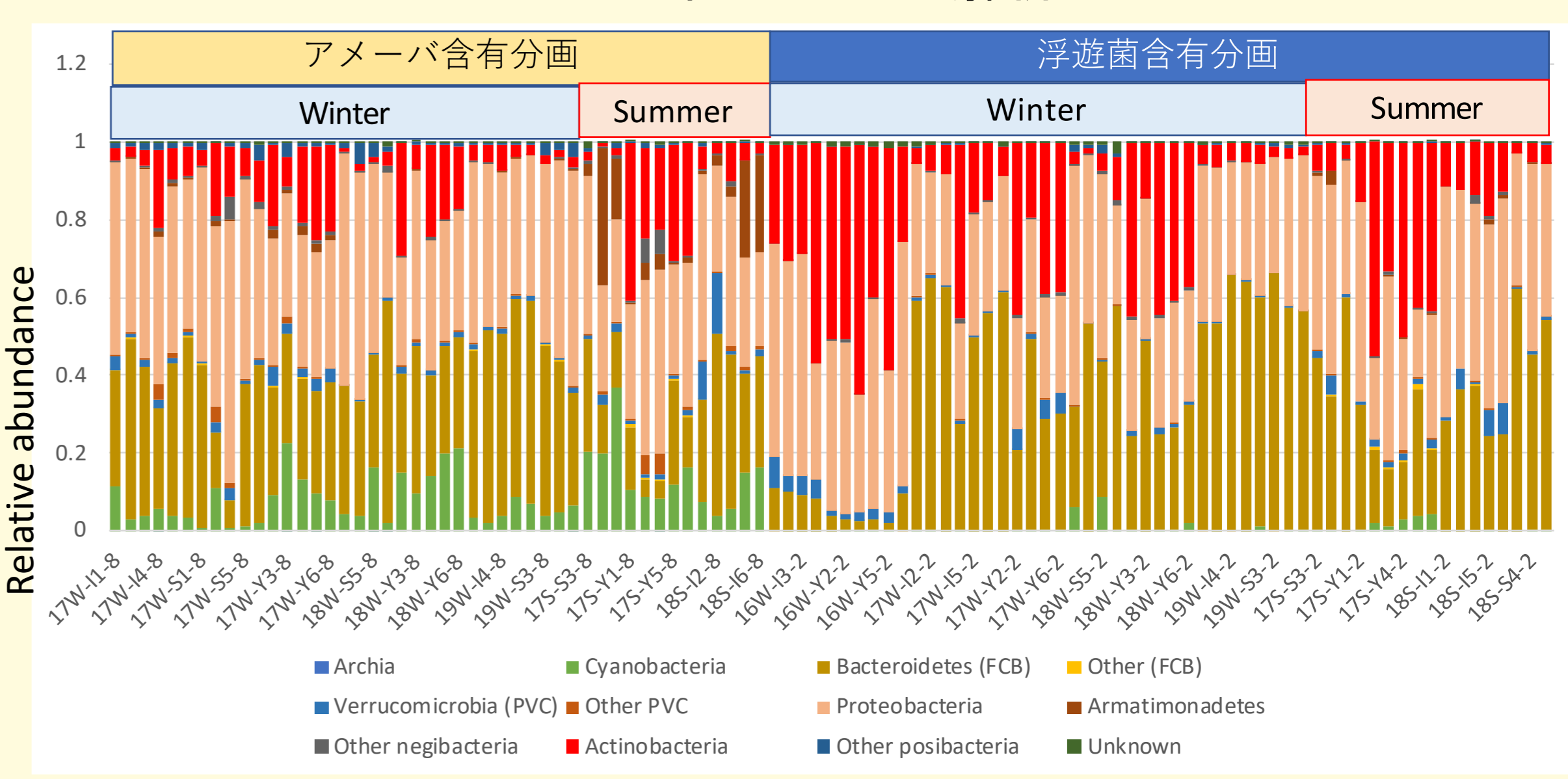
*Mycobacterium* はアメーバ含有分画で多く認められた。



### 図 8. 細胞内寄生菌の分布

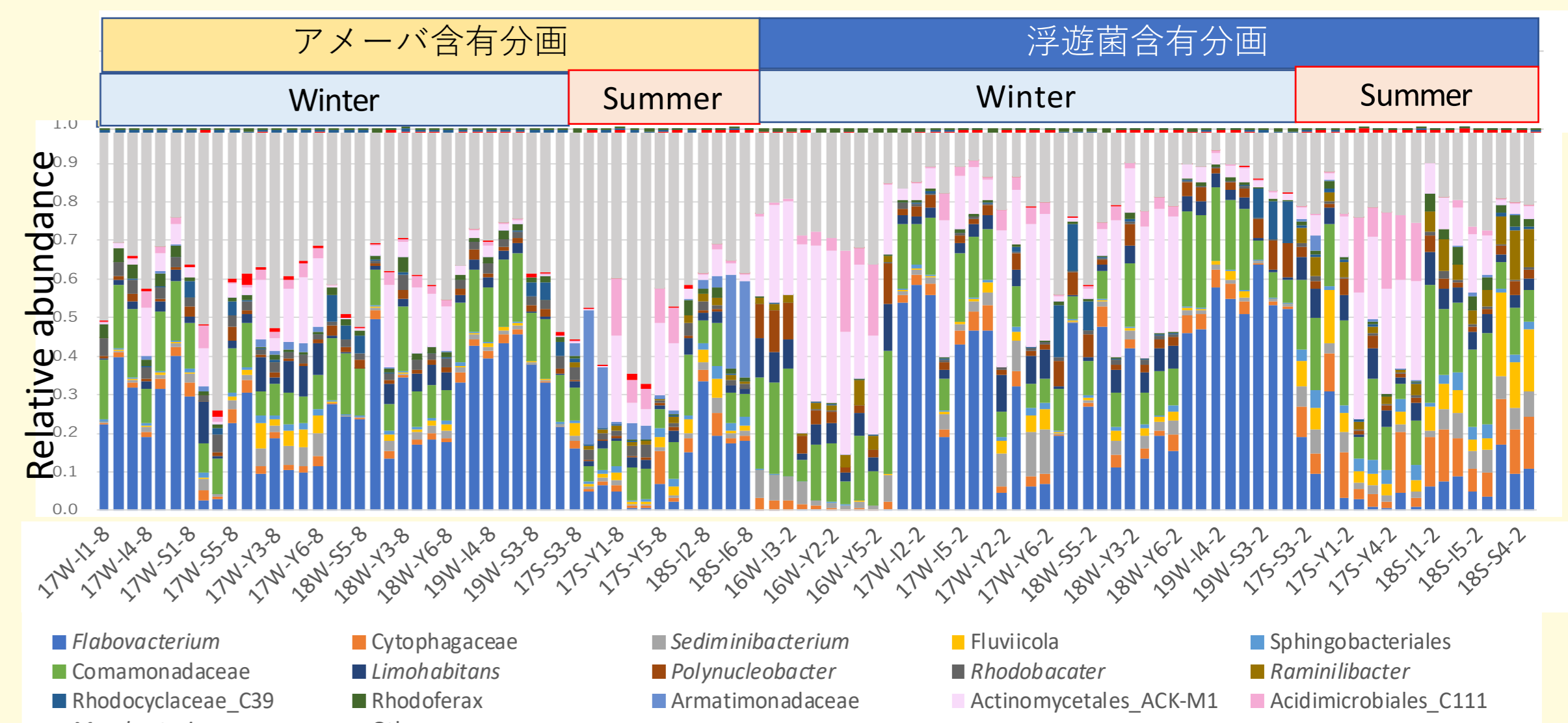


### 図 5. 門レベルの解析



アメーバ含有分画では Cyanobacteria が、浮遊菌含有分画では Actinobacteria が多く見られた。

### 図 6. 属レベルの解析



門レベルで平均17%見られた Actinobacteria は Actinomycetales\_ACK-M1, Acidimicrobiales\_C111 が主で、*Mycobacterium* は0.3%であった。冬季試料に *Flavobacterium* が多い傾向が見られた。

- ### 成果
- Arikawa et al., Genetic relatedness of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from bathrooms of healthy subjects, rivers, and soils in Japan with human clinical isolates from different geographical areas. *Infect.Genetics Evolut.* (in press)
  - Nishiuchi et al., *Mycobacteria* infect human erythrocytes as extracellular parasites. (in preparation)
  - 学会報告
  - 病原性抗酸菌は in vitro でヒト赤血球に感染する 西内由紀子ら、第91回日本細菌学会総会。(2018.3.27-29, 福岡)
  - 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 有川健太郎、西内由紀子、田丸亜貴、吉田志緒美、岩本朋忠第91回日本細菌学会総会。(2018.3.27-29, 福岡)
  - 近畿の河川表層水中の非結核性抗酸菌の分布実態 西内由紀子、有川健太郎、田丸亜貴、吉田志緒美、岩本朋忠.第 70 回日本細菌学会関西支部総会(2017.11.25., 大阪市)
  - 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 有川健太郎、西内由紀子、田丸亜貴、吉田志緒美、岩本朋忠 日本防衛防衛学会第44回年次大会。(2017.9.26-27, 豊中)
  - 河川における非結核性抗酸菌の実態調査 有川 健太郎、西内 由紀子、岩本 朋忠第90回日本細菌学会総会。(2017.3.19-21., 仙台)