

## [原 著]

## ノカルジア属細菌の分子生物学的同定法と抗菌薬感受性に関する検討

渋谷理恵<sup>1)</sup>・館田一博<sup>1), 2)</sup>・木村聡一郎<sup>1)</sup>・石井良和<sup>1)</sup>・村上日奈子<sup>2)</sup>・島津玲子<sup>1)</sup>

檜谷総子<sup>1)</sup>・岩田守弘<sup>2)</sup>・松本哲哉<sup>3)</sup>・木村一博<sup>4)</sup>・内田 耕<sup>4)</sup>・中田紘一郎<sup>4)</sup>

久保勢津子<sup>5)</sup>・三上 襄<sup>5)</sup>・山口恵三<sup>1), 2)</sup>

<sup>1)</sup> 東邦大学医学部微生物・感染症学

<sup>2)</sup> 東邦大学医療センター大森病院臨床検査部

<sup>3)</sup> 東京医科大学微生物学

<sup>4)</sup> 東邦大学医学部呼吸器内科

<sup>5)</sup> 千葉大学真菌医学研究センター

(平成 18 年 2 月 8 日受付, 平成 18 年 4 月 19 日受理)

*Nocardia* 属細菌は日和見感染症の原因菌として重要であるが、その培養同定はしばしば困難であり、臨床の現場において見逃されている症例も多数存在するものと考えられる。また本菌感染症に対する抗菌薬療法は、通常、数カ月にわたって実施されることから、その抗菌薬感受性成績は重要である。本研究では、臨床分離 *Nocardia* 属細菌 26 株を対象に従来の生化学的同定法と分子生物学的方法の同定結果を比較するとともに、菌種別に見た抗菌薬感受性を検討した。臨床分離された 26 株は従来の生化学的同定法（生化学的検査、発育性、細胞壁成分の分析など）により *N. asteroides* 12 株、*N. nova* 8 株、*N. farcinica* 6 株と同定された。分子生物学的方法としては、近年報告されている 16S rDNA を用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) を用いて検討したところ、生化学的同定法で *N. asteroides* と同定された 12 株のうち 4 株が *N. asteroides*, 4 株が *N. farcinica*, 4 株が *N. transvalensis* という結果になった。一方、従来の生化学的同定法により *N. nova* と同定された 8 株のうち 2 株が *N. nova*, 1 株が *N. farcinica*, 残りの 5 株は同定不能となった。生化学的同定法で *N. farcinica* と同定された 6 株は分子生物学的方法においてもすべて *N. farcinica* と判定された。これら *Nocardia* 属細菌の抗菌薬感受性を検討したところ、菌種により感受性分布に若干差が見られるものの、ミノサイクリン、イミペネム、アミカシン、アルベカシン、ST 合剤、リネゾリドでおおむね強い抗菌活性が観察された。本研究から、*Nocardia* 属細菌の 16S rDNA を用いた RFLP 同定法の有用性が示唆された。

**Key words:** *Nocardia*, RFLP, conventional identification, antimicrobial susceptibility testing

## 序 文

*Nocardia* 属細菌はグラム陽性好気性放線菌の一つであり、水や土壌など自然界に広く存在している。本菌による感染症は主に免疫不全宿主に見られ、特に呼

吸器・皮膚・神経系感染症の原因菌として重要である<sup>1), 2)</sup>。*Nocardia* 属細菌は血液寒天培地などの日常の培養検査で使用される培地にも発育するが、その増殖は遅く、見逃されている症例も多数存在するものと考えられる。また、*Nocardia* 属細菌が培養されてきても一般検査室での菌種の同定は困難であり、これが本菌感染症に対する対応の難しさの一つとなっている。最近になって、16S rDNA を用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) など遺伝子レベルでの *Nocardia* 属細菌の同定法がいくつか報告されている<sup>3)~7)</sup>。Conville らは、制限酵素 *Hin*P1I, *Dpn*II,

著者連絡先: (〒143-8540) 東京都大田区大森西

5-21-16

東邦大学医学部微生物・感染症学講座

館田一博

TEL: 03-3762-4151

FAX: 03-5493-5415

E-mail: kazu@med.toho-u.ac.jp

*SphI*, *BstEII* を用いた *Nocardia* 属細菌の RFLP 結果から、臨床上重要な *N. asteroides*, *N. nova*, *N. farcinica*, *N. transvalensis* などを鑑別できることを報告しており、本菌感染症の診断への応用が期待されている<sup>8)</sup>。特に、*Nocardia* 属細菌の中で *N. farcinica* は転移性の脳膿瘍を形成する頻度の高い病原体として知られており、本菌種を正確に同定することは臨床上重要である。また、*Nocardia* 感染症に対しては、長期の抗菌薬投与が必須であることから、原因菌の正確な同定に基づく適切な抗菌薬療法の実施が必須となる。

このような状況の中で、本研究では臨床分離された *Nocardia* 属細菌 26 株を対象に従来の生化学的同定法と分子生物学的方法の同定結果を比較するとともに、微量液体希釈法を用いて菌種別の抗菌薬感受性を測定した。また、今回の検討の中で脳膿瘍原因菌として分離されていた *Nocardia* 属細菌（生化学的同定法では *N. asteroides*）が分子生物学的方法により *N. farcinica* と判定された症例を経験したので、本症例の簡単な経過を含めて報告する。

## 材料と方法

### 1. *Nocardia* 標準株および臨床分離株

本研究では *Nocardia* 属細菌千葉大標準株 6 株 (IFM 0290 *N. nova*, IFM 0284 *N. farcinica*, IFM 0319 *N. asteroides*, IFM 0239 *N. otitidiscaviarum*, IFM 0236 *N. brasiliensis*, IFM 0333 *N. transvalensis*) および臨床分離株 26 株（千葉大学および東邦大学保存株：1998～2002 年に分離）を対象とした。

### 2. 生化学的同定法による同定

グラム染色・チールネルゼン染色に加え、ミコール酸およびβ-ラクタマーゼ産生性により他の好気性放線菌との鑑別を行い、合わせてジアミノピメリン酸やメナキノン分析によって *Nocardia* 属細菌であることを確認した。さらに、糖からの酸産生能（アドニトール、アラビノース、エリスリトール、ガラクトース、グルコース、イノシトール、マルトース、マンノース、ラムノース、ソルビトール）や、有機物の分解能（アデニン、カゼイン、ヒポキサンチン、チロシン、キサンチン、尿素）、45℃における発育性、クエン酸利用能を検討した。上記に加え、イミベネム (IPM)、トブラマイシン (TOB)、カナマイシン (KM)、5-フルオロウラシル (5-FU) に対する感受性結果を参考に既報に従い菌種の同定を行った<sup>9), 10)</sup>。

### 3. PCR 法

#### 1) 核酸の調整

血液寒天培地で 48～72 時間培養した菌を、Catri-

mox-14 Solution (TaKaRa) 100 μl に懸濁した。室温で 10 分以上静置後、12,000 rpm で 5 分間室温にて遠心した。上清を除き、沈殿に滅菌超純水 300 μl 加え、チューブを転倒混和した後、12,000 rpm で 2 分間遠心し上清を除いた。沈殿に滅菌水を 10 μl 入れ、攪拌、スピンドウン後の上清を鋳型 DNA 溶液として使用した。

#### 2) PCR 反応

鋳型 DNA 溶液 0.5 μl と PCR 反応液 50 μl (dNTP Mixture 12.5 nmol, Taq polymerase 2.5 U, 10 × Buffer および primer sets) を混和した。Primer は Conville らの報告に従い、primer Upstream [5'-CGA-ACG-CTG-GCG-GCG-TGC-TTA-AC-3'] 50 pmol, Downstream 1 [5'-CCT-GTA-CAC-CGA-CCA-CAA-GGG-GG-3'] 50 pmol, Downstream 2 [5'-ACC-TGT-ACA-CCA-ACC-ACA-AGG-GGG-3'] 50 pmol を用いた<sup>8)</sup>。94℃で 5 分間反応させたのち、94℃ 1 分、65℃ 45 秒、72℃ 1 分を 40 サイクル、72℃ 10 分の条件で PCR を実施した。その後、1% アガロースゲル、1 kb DNA marker (BioLabs) を用いて電気泳動を行い、終了後、エチジウムブロマイド染色にて PCR 産物の有無を確認した。

#### 3) RFLP

各 PCR 産物は、制限酵素 (*HinPII*, *DpnII*, *SphI*, *BstEII*) (BioLabs) にて消化したのち、NuSieve 3:1 agarose 2%ゲル (FMC Corporation) を用いて電気泳動を行い増幅産物のバンドパターンを比較した。

### 4. 薬剤感受性試験

抗菌薬は、アルベカシン (ABK)、ミノサイクリン (MINO)、イミベネム (IPM)、スパフロキサシン (SPFX)、レボフロキサシン (LVFX)、セフトジジム (CAZ)、アミカシン (AMK)、リネゾリド (LZD)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム (ST) の計 9 種類を使用した。薬剤感受性試験は米国臨床検査標準委員会 (NCCLS) の推奨する標準法に準じ、ミューラー・ヒントン液体培地 (Difco) を用い微量液体希釈法にて MIC を測定した<sup>11)</sup>。被検菌を 35℃で 3 日培養し、10<sup>7</sup> cfu/ml の菌液をプレートの各ウェルに 5 μl 接種し、48 時間および 72 時間後に MIC を判定した。精度管理用標準株としては *S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) を使用し、規定の薬剤においては、その結果が基準値内にあることを確認した。

## 結 果

## 1) 生化学的同定法による同定結果

臨床分離された26株の *Nocardia* 属細菌を生化学的同定法で同定したところ、12株が *N. asteroides*, 8株が *N. nova*, 6株が *N. farcinica* となった。

## 2) 臨床分離26株の16S rDNAの増幅結果

*Nocardia* 属細菌の標準株 (*N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis*) を用いて16S rDNAの増幅を行ったと

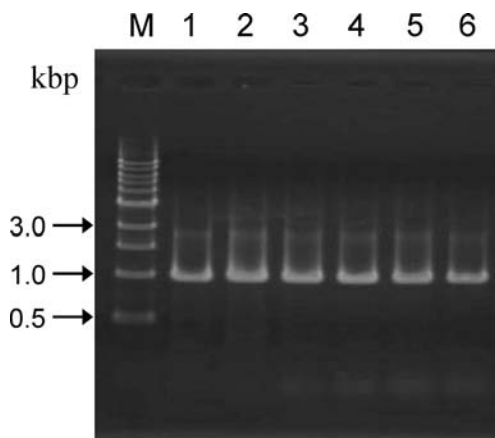


Fig. 1. PCRの泳動結果 (1 kb Ladder, 1%アガロースゲル)

M: 1 kb マーカー, Lane 1: *N. asteroides*, Lane 2: *N. brasiliensis*, Lane 3: *N. farcinica*, Lane 4: *N. nova*, Lane 5: *N. otitidiscaviarum*, Lane 6: *N. transvalensis*

ころ、既報と同様に約1 kbの位置に単一の増幅産物が確認された (Fig. 1). 次に臨床分離株26株を対象に同様の検討を実施したところ、いずれも約1 kbの位置に増幅産物が確認された (data not shown). この結果から、これら26株を *Nocardia* 属細菌としてその16S rDNAを制限酵素 *DpnII*, *HinP1I*, *SphI*, *BstEII* で処理するとともに、既報に従いRFLP解析を実施した。

## 3) 16S rDNA増幅産物を用いたRFLP解析

6種類の標準株の16S rDNAを *DpnII*, *HinP1I*, *BstEII*, *SphI* の4種類の制限酵素で処理したところ、Fig. 2に見られるようなRFLPパターンが観察された。Table 1に16S rDNA増幅産物の制限酵素切断断片のサイズをまとめて示した。生化学的同定法で *N. asteroides* と同定された12株のうち4株が *N. asteroides*, 4株が *N. farcinica*, 4株が *N. transvalensis* のRFLPパターンと一致した。一方、生化学的同定法により *N. nova* と同定された8株のうち2株が *N. nova*, 1株が *N. farcinica* のRFLPパターンと一致した。しかし、残りの5株においては、RFLPパターンはすべて同一であったものの、今回使用した標準株の中で一致するものは見られなかった。また、生化学的同定法で *N. farcinica* と同定されていた6株はRFLP解析においてもすべて標準株 *N. farcinica* と同一パターンを示した。Table 2に生化学的同定法における同定結果とRFLP解析による結果の相関を示した。

## 4) 抗菌薬感受性成績

Fig. 3にRFLP解析で同定された *N. asteroides* 4株, *N. farcinica* 11株, *N. transvalensis* 4株の抗菌薬

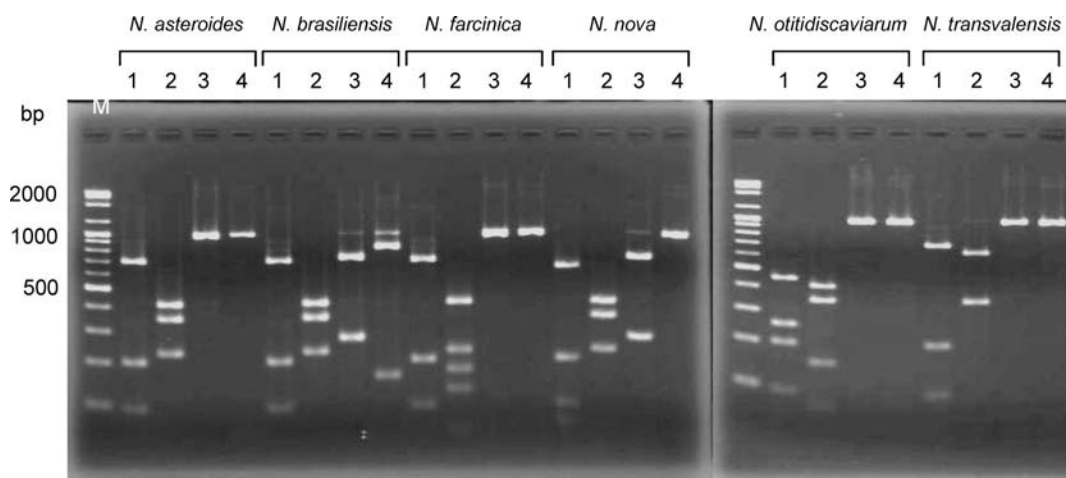


Fig. 2. 制限酵素作用後の泳動結果 (100 bp Ladder, 2% Nusieve ゲル)

1: *DpnII*, 2: *HinP1I*, 3: *BstEII*, 4: *SphI*

Table 1. 制限酵素作用による切断断片 RFLP パターン

Species	Restriction enzymes used			
	<i>DpnII</i>	<i>HinP1I</i>	<i>BstEII</i>	<i>SphI</i>
<i>N. asteroides</i> type strain	700, 200, 95	420, 350, 225	Uncut	Uncut
<i>N. brasiliensis</i>	700, 200, 95	420, 350, 225	730, 270	835, 165
<i>N. farcinica</i>	705, 200, 95	420, 225, 175, 125, 55		
<i>N. nova</i>	640, 200, 95, 60	420, 350, 225		
<i>N. nova</i> variant	700, 200, 95	420, 350, 225	730, 270	Uncut
<i>N. otitidiscaviarum</i>	455, 250, 200, 95	420, 350, 150, 75		
<i>N. transvalensis</i>	705, 200, 95	645, 350		
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	525, 200, 175, 95	420, 350, 225		
Unclassified	455, 250, 200, 95	420, 225, 175, 125, 55	Uncut	Uncut

Table 2. 従来の生化学的同定法と RFLP 法の同定結果の相関

Conventional identification	Identification from RFLP pattern				
	<i>N. farcinica</i> (11 strains)	<i>N. asteroides</i> (4 strains)	<i>N. nova</i> (2 strains)	<i>N. transvalensis</i> (4 strains)	Unclassified (5 strains)
<i>N. nova</i> (8 strains)	1		2*		5
<i>N. asteroides</i> (12 strains)	4	4*		4	
<i>N. farcinica</i> (6 strains)	6*				

\*生化学的同定法と RFLP 法での結果の一致

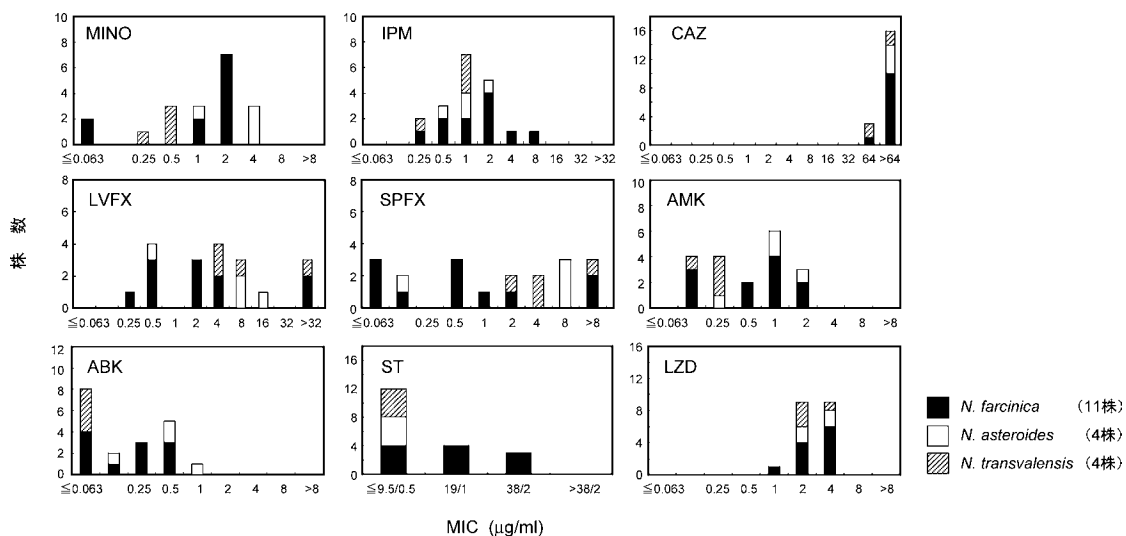


Fig. 3. *Nocardia* 属細菌 (*N. farcinica*, *N. asteroides*, *N. transvalensis*) の抗菌薬感受性分布

感受性分布を示した。MINO に対しては、*N. transvalensis* はすべて感受性を示したが、*N. asteroides* は 4 株中 3 株、*N. farcinica* は 11 株中 7 株が中等度耐性を示した。一方、IPM の抗菌活性は強く、今回検討した 26 株においては *N. farcinica* 1 株を除きすべてが

感受性であった。これに対し、第 3 世代セフェム系抗菌薬 CAZ はすべての株に対して 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の高い MIC 値を示した。今回検討したニューキノロン系抗菌薬の中では SPFX の抗菌活性が優れており、本剤のブレイクポイントは設定されていないものの、*N.*

*farcinica* 12 株中 8 株が  $1 \mu\text{g/ml}$  以下の MIC を示した。AMK に対してはすべて MIC  $2 \mu\text{g/ml}$  以下の感受性を示したが、ABK ではさらに強い抗菌活性が観察された。*Nocardia* 感染症に対して第一選択剤として使用されることが多い ST 合剤に対してはすべてが感受性を示した。また、近年、バンコマイシン耐性腸球菌、あるいはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌などのグラム陽性球菌感染症の治療の目的で開発された LZD の *Nocardia* 属細菌に対する MIC は  $1 \sim 4 \mu\text{g/ml}$  であり、臨床的有効性が十分に期待できる抗菌活性を有していることが明らかとなった。

#### 5) *N. farcinica* による脳膿瘍症例

以下に、今回の検討の中で脳膿瘍原因菌として分離されていた *Nocardia* 属細菌（生化学的同定法では *N. asteroides*）が RFLP 解析により *N. farcinica* と同定された症例の経過の概略を示す (Fig. 4)。

【症 例】42 歳 男性

【主 訴】嘔吐、歩行時のふらつき

【現病歴】2 月中旬より、 $38^\circ\text{C}$  台の発熱を認め食思不振、全身倦怠感を伴ったため、4 月 15 日近医を受診した。受診時、胸部 X 線・CT 上、左肺門部に浸潤影を指摘され翌日当院外来受診となった。この間、咳嗽、喀痰は認めなかった。胸部 CT 上、左縦隔に近接する不整形浸潤影を認めたため気管支鏡検査を施行するも、悪性腫瘍を含め確定診断は得られなかった。その後、頭痛と歩行時のふらつきが出現、6 月 4 日に突然

の嘔気、嘔吐出現したため救急外来受診、頭部 CT にて多発性の腫瘤影を認めたため精査・加療目的で当院に入院となった。

【既往歴】37 歳時より糖尿病（無治療）

【家族歴】特記すべきことなし

【嗜好品】喫煙歴：なし 飲酒歴：ビール 1 本/日

【アレルギー】薬物：なし 食物：なし

【入院後経過】

入院後、頭部 CT 検査にて脳膿瘍が疑われたため、開頭にて穿刺・排膿が実施された。穿刺液のグラム染色により特徴的な分岐するグラム陽性桿菌が観察され、また、培養検査により *Nocardia* 属細菌が培養されてきたことから、本菌による脳膿瘍と診断された。その後、ST 合剤および IPM などの抗菌薬療法により症状は軽快した。

#### 考 察

今日、一般細菌検査室における *Nocardia* 属細菌の正確な同定は困難であり、疑わしい細菌が分離された場合には菌株を研究施設へ送付し最終同定を依頼しているというのが状況である。一般検査室においては、菌糸状の発育を示す弱抗酸性の細菌が分離された場合に *Nocardia* 属細菌を疑うことになるが、それ以外の病原性放線菌である *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Rhodococcus*, *Gordonia* などとの鑑別はしばしば困難である。通常、ミコール酸の存在、 $\beta$ -ラクタマーゼ産生性

入院時頭部CT



脳穿刺液グラム染色

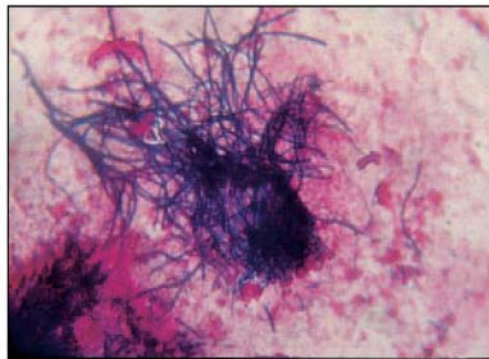


Fig. 4. *N. farcinica* による脳膿瘍症例の頭部 CT および脳穿刺液グラム染色所見



から *Nocardia* 属を推定し、そののちカゼイン・キサンチン・ヒポキサンチン分解能、アリルスルファターゼ産生、45°Cでの発育などの生理生化学的性状を参考に菌種を同定する。しかし、これら従来の生化学的同定法による同定には長時間を要することから、IPM, TOB, KM, 5-FU などの抗菌薬に対する感受性を参考とする迅速同定法が考案されている<sup>9), 10)</sup>。

抗菌薬感受性を菌種の同定に応用する場合の注意点として、経年的な抗菌薬感受性の変化、すなわち耐性菌の出現と増加が問題となる。*Nocardia* 属細菌はもともと抗菌薬に対する耐性化傾向が強く、現時点で新しい耐性菌が問題となっているという状況にはないが、中・長期的な視点から考えると抗菌薬感受性結果に頼らない、より安定な菌種の同定法を確立する必要がある。このような中で、近年、PCR法を用いて *Nocardia* 属細菌の DNA 断片を増幅し、制限酵素の切断パターンから菌種を同定する RFLP 法の有用性がいくつか報告されている<sup>3)~7)</sup>。Conville らは、28 株の臨床分離株を対象に生化学的同定法による同定と、16S rDNA を用いた RFLP 法を比較検討し、25 株で両方法の結果が一致、3 株で異なる結果となったことを報告している<sup>8)</sup>。この 3 株は従来の生化学的同定法で *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *Nocardia* 属細菌と同定されていたものであるが、RFLP 法ではそれぞれ *N. farcinica*, *N. asteroides*, 同定不能という結果になっていた。今回の筆者らの検討では、生化学的同定法による同定と RFLP 法の結果が一致した株は *N. asteroides* で 12 株中 4 株、*N. nova* で 8 株中 2 株、*N. farcinica* では 6 株中 6 株という結果であった。特に生化学的同定法で *N. nova* と同定された株における一致率が低く、そのほとんどが RFLP 法において同定不能に分類された。この点に関しては、これら同定不能株が *N. nova* variant である可能性も考えられることから、現在、16S rRNA の可変領域 (146~156) の塩基配列を決定し最終的な菌種の同定を行っている。

今回の検討では、生化学的同定法で *N. asteroides* と同定された 12 株のうち 4 株が *N. asteroides*, 4 株が *N. farcinica*, 4 株が *N. transvalensis* の RFLP パターンと一致した。これまでに報告してきたように、*N. asteroides* と *N. farcinica*, *N. transvalensis* の従来の生化学的同定には、前者では TOB 感受性およびクエン酸利用能、後者ではヒポキサンチン加水分解能および糖分解能を参考に判定した<sup>9), 10)</sup>。これら菌種において生化学的同定法と RFLP 法で乖離が見られた理由は不明であるが、菌種同定に抗菌薬感受性結果を用いることの難しさを示した成績とも考えられる。ま

た、*N. transvalensis* はアミノグリコシド耐性度が高く本菌感染症はわが国ではまれとされていたが、最近になって本菌が *N. asteroides* と誤同定されていた可能性を指摘する論文も報告されており注意する必要がある<sup>2), 12), 13)</sup>。

*Nocardia* 感染症に対する抗菌薬療法は、本症の多くが感染防御能の低下した宿主に見られることから、通常 3~6 カ月、ときには 1 年以上にわたって実施されることもある。本菌感染症に対しては ST 合剤が第一選択剤として使用されることが多いが、菌株・菌種ごとの抗菌薬感受性の違い、本剤による副作用発現などの点からも、分離菌を正しく同定し、その菌に対する抗菌薬感受性試験を実施することが望ましい。今回の検討では *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. transvalensis* を対象として、第一選択剤としての ST 合剤をはじめ、 $\beta$ -ラクタム系 (IPM, CAZ), テトラサイクリン系 (MINO), アミノグリコシド系 (AMK, ABK), フルオロキノロン系 (LVFX, SPFX), オキサゾリジノン系抗菌剤 (LZD) について抗菌薬感受性試験を実施した。今回検討した株においては NCCLS の判定基準で ST 合剤、IPM, AMK, MINO において耐性株は見られなかったが、CAZ の MIC においてはすべての株が 64  $\mu\text{g/ml}$  以上という高い値を示した。一方、フルオロキノロン系において LVFX に対して半数以上の株が耐性を示したのに対し (ciprofloxacin の耐性基準で MIC 4  $\mu\text{g/ml}$  以上)、SPFX においては 19 株中 9 株が MIC 1  $\mu\text{g/ml}$  以下の感受性を示していた。この成績とよく一致するように、*Nocardia* 感染症に対して SPFX が有効であった症例が筆者らの報告を含めいくつか散見される<sup>14), 15)</sup>。今回、抗 MRSA 薬、抗バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 薬としてそれぞれ認可されている ABK, LZD についても感受性試験を実施したが、ABK では 1  $\mu\text{g/ml}$ , LZD では 4  $\mu\text{g/ml}$  ですべての株の発育が阻止されており、これら薬剤の臨床的有用性が示唆された結果であった。LZD の *Nocardia* 属細菌 (140 株) および *N. brasiliensis* (25 株) に対する抗菌活性を検討した成績においても、MIC<sub>90</sub> がそれぞれ 1~4  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  と報告されており、筆者らの感受性結果はこれに近い成績であった<sup>16), 17)</sup>。

*Nocardia* 属細菌による感染症としては呼吸器、皮膚軟部組織、中枢神経系感染症の頻度が高いことが知られている。特に致死的な感染症の原因となる脳膿瘍の原因としては *N. asteroides* complex (*N. asteroides sensu stricto* type VI, *N. farcinica*, *N. nova*, *N. abscessus*) や *N. farcinica* が重要であることが報告され

ている<sup>1), 12), 18)~20)</sup>. Kageyama らは 1992~2001 年に本邦において発症した *Nocardia* 感染症 303 症例をまとめて報告している<sup>2)</sup>. これによると, 全身性 *Nocardia* 症の中で中枢神経系に病変が見られたのは, *N. asteroides* が原因であった 10 症例中 7 例, *N. farcinica* 症例の 14 例中 9 例, *N. brasiliensis* 症例の 4 例中 4 例であったとしている. また最近になって, 比較的まれな病原体であると考えられていた *N. transvalensis* が, 脳膿瘍の原因としても重要であるという成績が報告されている<sup>21)</sup>. 筆者らの検討症例の中にも脳膿瘍症例が含まれており, その原因菌は従来の生化学的同定法では *N. asteroides* と同定されていたが, RFLP 法で *N. farcinica* であることが明らかになった. *Nocardia* 属細菌においては, *N. asteroides* や *N. farcinica* のように中枢神経系に高い親和性を示す菌種も知られていることから, RFLP 法などを用いた遺伝子レベルでの臨床分離株の正確な同定がますます重要になってくるものと思われる.

今回の検討から, *Nocardia* 属細菌の同定における 16S rDNA を用いた RFLP 解析の有用性が示された. 現在, *Nocardia* 属細菌としては *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. nova*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis* など 10 菌種以上がヒトに対して病原性を示すことが知られており, 免疫不全宿主の増加と相まって本菌感染症はますます重要になってくるものと思われる<sup>1), 2), 12)</sup>. 今後さらに本方法による *Nocardia* 属細菌同定の臨床的有用性, およびその一般臨床検査への応用の可能性などについて詳細に検討していく必要があると考えられた.

## 文 献

- 1) Beaman, B.L., L. Beaman, 1994. *Nocardia* species: host-parasite relationships. Clin. Microbiol. Rev. 7: 213-264.
- 2) Kageyama, A., K. Yazawa, J. Ishikawa, et al. 2004. Nocardial infections in Japan from 1992 to 2001, including the first report of infection by *Nocardia transvalensis*. Eur. J. Epidemiol. 19: 383-389.
- 3) Steingrube, V.A., B. A. Brown, J. L. Gibson, et al. 1995. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. J. Clin. Microbiol. 33: 3096-3101.
- 4) Steingrube, V. A., R. W. Wilson, B. A. Brown, et al. 1997. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. J. Clin. Microbiol. 35: 817-822.
- 5) Laurent, F. J., F. Provost, P. Boiron. 1999. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J. Clin. Microbiol. 37: 99-102.
- 6) Roth, A., S. Andrees, R. M. Kroppenstedt, et al. 2003. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxa. J. Clin. Microbiol. 41: 851-856.
- 7) Wilson R. W., V. A. Steingrube, B. A. Brown, et al. 1998. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. J. Clin. Microbiol. 36: 148-152.
- 8) Conville, P. S., S. H. Fischer, C. P. Cartwright, et al. 2000. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 38: 158-164.
- 9) 矢沢勝清, 三上 襄. 1995. ノカルジアの同定. 検査と技術 23: 877-884.
- 10) 矢沢勝清, 三上 襄. 2001. ノカルジアの検査法. 検査と技術 29: 111-119.
- 11) NCCLS. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes; approved standard, NCCLS document M24-A. NCCLS, Wayne, Pa.
- 12) Saubolle, M. A., D. Sussland. 2003. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. J. Clin. Microbiol. 41: 4497-4501.
- 13) Wilson, R. W., V. A. Steingrube, B. A. Brown, et al. 1997. Recognition of a *Nocardia transvalensis* complex by resistance to aminoglycosides, including amikacin, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 35: 2235-42.
- 14) 木村一博, 廣井真弓, 外山勝弘, 他. 2000. ST 合剤とスバフロキサシンの併用が著効した肺ノカルジア症の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌 38: 702-705.
- 15) 佐藤哲史, 大石和徳, 渡辺貴和雄, 他. 2002. 肺結核後の気管支拡張症に続発し, スバフロキサシンが著効した肺 *Nocardia asteroides* 症の 1 例. 感染症学雑誌 76: 212-215.
- 16) Brown-Elliott, B. A., S. C. Ward, C. J. Crist, et al. 2001. *In vitro* activities of linezolid against multiple *Nocardia* species. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1295-1297.
- 17) Vera-Cabrera, L., A. Gomez-Flores, W. G. Es-

- calante-Fuentes, et al. 2001. *In vitro* activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3629–3630.
- 18) Miksits, K., G. Stoltenburg, H. H. Neumayer, et al. 1991. Disseminated infection of the central nervous system caused by *Nocardia farcinica*. *Nephrol. Dial. Transplant.* 6: 209–214.
- 19) Peters, B. R., M. A. Saubolle, J. M. Costantino, 1996. Disseminated and cerebral infection due to *Nocardia farcinica*: Diagnosis by blood culture and cure with antibiotics alone. *Clin. Infect. Dis.* 23: 1165–1167.
- 20) Malincarne, L., M. Marroni, C. Farina, et al. 2002. Primary brain abscess with *Nocardia farcinica* in an immunocompetent patient. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 104: 132–135.
- 21) Yorke, R. F., E. Rouah, 2003. Nocardiosis with brain abscess due to an unusual species, *Nocardia transvalensis*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127: 224–226.

### Usefulness of RFLP Method for Identification of Recent Isolates of *Nocardia* spp. and Antimicrobial Susceptibility Testing

Rie Shibuya,<sup>1)</sup> Kazuhiro Tateda,<sup>1), 2), †</sup> Soichiro Kimura,<sup>1)</sup> Yoshikazu Ishii,<sup>1)</sup> Hinako Murakami,<sup>2)</sup> Reiko Shimatsu,<sup>1)</sup> Fusako Kashitani,<sup>1)</sup> Morihiro Iwata,<sup>2)</sup> Tetsuya Matsumoto,<sup>3)</sup> Kazuhiro Kimura,<sup>4)</sup> Koh Uchida,<sup>4)</sup> Koichiro Nakata,<sup>4)</sup> Setsuko Kubo,<sup>5)</sup> Yuzuru Mikami,<sup>5)</sup> Keizo Yamaguchi<sup>1), 2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine; † Corresponding author

<sup>2)</sup> Clinical Laboratory, Toho University Omori Medical Center

<sup>3)</sup> Department of Microbiology, Tokyo Medical University

<sup>4)</sup> Respiratory Medicine, Internal Medicine, Toho University School of Medicine

<sup>5)</sup> Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan.

In this study, we examined usefulness of RFLP method for identification of clinical isolates of *Nocardia* spp. (standard strains and clinical isolates), comparing to conventional biochemical assays. Twenty-six strains of clinical isolates were conventionally identified as *N. asteroides* ( $n=12$ ), *N. nova* ( $n=8$ ), *N. farcinica* ( $n=6$ ). In contrast, RFLP method using bacterial 16S rDNA demonstrated *N. asteroides* ( $n=4$ ), *N. farcinica* ( $n=4$ ), *N. transvalensis* ( $n=4$ ) in 12 strains of *N. asteroides* conventionally identified. Also RFLP results showed *N. nova* ( $n=2$ ), *N. farcinica* ( $n=1$ ), unclassified ( $n=5$ ) in 8 strains of *N. nova* conventionally identified, whereas all 6 strains *N. farcinica* indicated identical results. Antimicrobial susceptibility testing showed that the first-line antibiotics, such as minocycline, amikacin, imipenem and ST, in addition to newer antimicrobials (linezolid, arbekacin), were generally active against clinical isolates of *Nocardia* spp., although a small variation was observed among strains and species. These data suggest that RFLP method for identification of *Nocardia* organisms may be a useful technique in the clinical microbiological laboratory setting.