

[原 著]

1 大学病院における *Mycobacterium kansasii* 菌株の *hsp65*-PRA 法を用いた遺伝子型別と分離状況の検討

火石あゆみ¹⁾・田澤節子⁴⁾・新井祐司¹⁾・宇賀神和久⁵⁾・阿南晃子¹⁾・富樫真弓¹⁾
 中村久子¹⁾・矢澤直行¹⁾・土屋 裕²⁾・林 宗貴³⁾・丸茂健治⁴⁾

¹⁾ 昭和大学藤が丘病院 臨床検査部

²⁾ 同 呼吸器内科

³⁾ 同 救急医学科

⁴⁾ 同 臨床病理科

⁵⁾ 昭和大学病院 臨床検査部

(平成23年9月21日受付, 平成24年1月13日受理)

Mycobacterium kansasii は病原性の高い非結核性抗酸菌であるが, 大学病院や市中病院での報告は極めて少ない。今回, 当院における過去8年間(2003年1月~2010年2月)の *M. kansasii* 分離状況を調べた。*M. kansasii* は毎年1~2例, 10患者から分離された。塗抹所見は(-)~(2+), 培養は小川培地で1~>100集落であった。性差は女性よりも男性が4倍高く, 70歳代が多かった。*hsp65*-PRA (PCR-restriction enzyme pattern analysis using mycobacterial heat shock protein 65-kDa gene) 法で, *hsp65*-type I が8株, *hsp65*-type II と III が各1株であった。*M. kansasii* に対する治療は *hsp65*-type I が分離された8例中4例で行われていた。半定量 catalase 試験では *hsp65*-type I と II が高 catalase 産生であった。HIV 患者から分離されることがある *hsp65*-type II が分離された患者は, 間質性肺炎で全身状態が悪い症例で, 本菌に対する治療は行われなかった。この型の PCR 産物は従来のものと1塩基異なった (Genbank accession no. JF836805)。環境からの分離が多い *hsp65*-type III が分離された患者は, 肺がんが疑われた症例で汚染菌の可能性が高かった。今後症例数を集めるなかで, *hsp65*-PRA 法による *M. kansasii* 型別を診断のための補助的手段として明らかにしていきたい。

Key words: *Mycobacterium kansasii*, *hsp65*-PRA 法, 半定量 catalase 試験。

序 文

非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria: NTM) は結核菌群以外の培養可能な抗酸菌を指し, 土壌や水中などの環境に広く生息する。NTM の多くは非病原菌であるが, *M. kansasii* は病原性があることで知られている¹⁾。また, NTM の同定法には遺伝子検査法が有効であるが, このうち, heat shock protein 65kDa gene の菌種特異塩基配列による解析法 (*hsp65*-

PRA) は菌種同定に加え, 型別も可能である。*M. kansasii* は I~VII 型に分類され, この型別によって, ヒトと環境に生息する型に分かれる傾向があると報告されている^{2~4)}。

一方, 本邦での市中病院における NTM 分離背景に関する報告例は少なく, 病原性が問題となる *M. kansasii* に関しても同様である。当院は結核病床を設置していないが, 患者検体からしばしば *M. kansasii* が分離されることから, その分離背景を臨床検査の立場から調査してきた⁵⁾。今回, 保存中の *M. kansasii* を *hsp65*-PRA 法で型別し, 同様にこの菌の分離背景を調べた。

材料と方法

1. 材料

2003年1月から2010年2月までに当院の臨床検体が

著者連絡先: (〒227-8501) 神奈川県横浜市青葉区藤が丘1-30
 昭和大学藤が丘病院 臨床検査部
 火石あゆみ
 TEL: 045-974-6332
 FAX: 045-973-1019
 E-mail: hiishi0225@cmed.showa-u.ac.jp

ら分離された *M. kansasii* 10株を使用した。なお、対照株として *hsp65*-type I *M. kansasii* PI株と *hsp65*-type VI *M. kansasii* FM18株を使用した⁶⁾。

2. 表現型検査

3%小川培地(日水製薬)および工藤PD培地“ニチビー”(日本ビーシー製造)で培養された集落はチールネルゼン染色で陽性を確認後、PCR法(CO-BAS AMPLICOR, ロシユ・ダイアグノスティックス)にて結核菌と *Mycobacterium avium* complex (MAC) を否定した。つづいて光発色試験陽性かつ硝酸塩還元試験(自家製試薬使用¹⁾)陽性であった場合、*M. kansasii* を疑い、以下の *hsp65*-PRA (PCR-restriction enzyme pattern analysis using mycobacterial heat shock protein 65-kDa gene) 法で詳細に同定した^{1,7)}。なお、小川培地からの集落が純培養されていることの確認は、Middlebrook 7H11寒天培地で再培養した集落を観察して行った。

3. 半定量 catalase 試験

小川培地の代わりにMiddlebrook 7H11寒天培地上培養菌の1白金耳を高層培地表面に接種し、37℃で2~3週間培養後の菌苔表面に試薬1 mlを加え、5分後の泡沫の高さを計測し、45 mm以上の泡沫を産生したNTMを高catalase菌、45 mm以下の泡沫を産生したNTMを低catalase菌とした¹⁾。

4. *hsp65*-PRA 法

Telentiらの方法に準じて行った⁷⁾。Primer pairはTb11 [5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3']とTb12 [5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3']を使用し、PCR条件は熱変性94℃(5分)後、熱変成94℃(1分)、アニーリング56℃(1分)および伸長72℃(2分)を45

回繰り返し、最後に伸長72℃(10分)を行った。得られた増幅産物は制限酵素 *Bst*P I (*Bst*E II) (60℃, 60分) および *Hae* III (37℃, 60分) で処理し、その断片をMetaphor agarose (3%) で電気泳動を行った。DNA分離バンドはethidium bromide染色し、写真撮影した。

5. Direct sequencing 法

hsp65-type II Mk3とtype III Mk9からの上記PCR増幅産物を、先のprimer pairを使いsequenceした。測定された塩基配列のsimilarity検索にはNCBI web site (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用した。

6. 統計学的解析

当院検査部細菌検査室データベースから *M. kansasii* 分離データを抽出し、各種分離背景を解析した。

7. 診断基準

M. kansasii 感染症診断の有無は肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針-2008年に基づいた⁸⁾。

結 果

hsp65-PRA 法による同定・型別

hsp65-PRA法で同定され、型別された成績をFig. 1A (*Bst*P I処理)と1B (*Hae* III処理)に示した。*Bst*P I処理 *hsp65*-type Iは、対照PI株(lane 11)のDNA断片パターンを示し、他型(type II~VII)と異なる(Fig. 1A)^{2,4)}。これより、Mk1(lane 1), Mk3~7(lane 3~7), Mk9(lane 9), Mk10(lane 10)のDNA断片パターンはtype Iに対応した。しかし、Mk2(lane 2)とMk8(lane 8)のDNA断片パターンはtype VIの対照Mk18(lane 12)に対応し、他型であった。*Hae* III処理 *hsp65*-type Iは、*Bst*P I処理type Iに対応した先の8

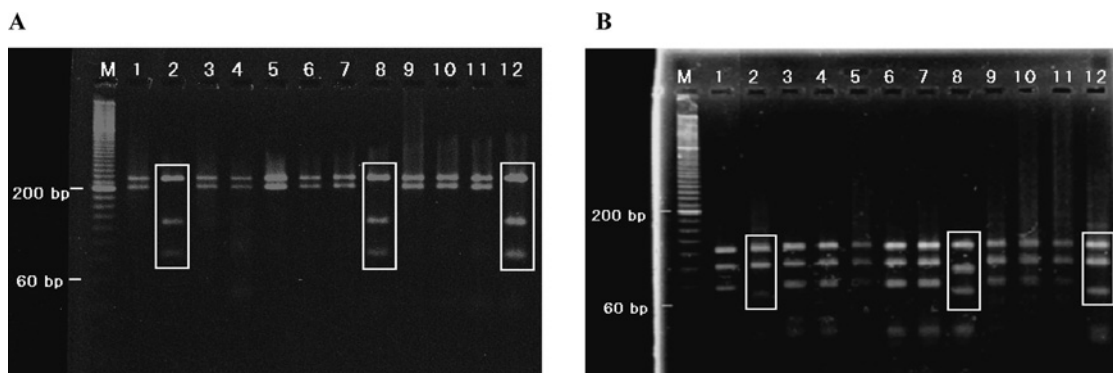


Fig. 1. *hsp65*-PRA status of 10 isolates and two reference strains
Panels A and B are *Bst*PI and *Hae*III digestions, respectively. Lanes in panels A and B: M, 20 bp ladder (molecular size marker); 1 to 10, isolates Mk1 to Mk10; 11 and 12, reference strains PI and FM18 containing *hsp65*-types I and VI, respectively. The blocks show digestion patterns differing from that of *hsp65*-type I.

Table 1. Summary of 10 *M. kansasii* isolates typed by hsp65-PRA

Case no.	Isolate no.	Collect yr.	Specimens	Acid-fast smear evaluation ^a	Colony no. grown on Ogawa egg medium	hsp65-Typing	Semi-quantitative catalase test ^c	Patient Gender/age	Medical treatment
1	Mk1	2003	Sputum	(1+)	>100	I	H	M/43 Inpatient	Unknown
2	Mk2	2004	Sputum	(-)	1 ^b	II	H	M/80 Inpatient	No
3	Mk3	2005	Sputum	(2+)	>100	I	H	M/78 Inpatient	Yes
4	Mk4	2006	Sputum	(2+)	>100	I	H	M/69 Inpatient	Yes
5	Mk5	2006	Sputum	(-)	1 ^b	I	H	M/57 Inpatient	No
6	Mk6	2008	Sputum	(-)	38	I	H	M/62 Inpatient	No
7	Mk7	2008	Sputum	(-)	40	I	H	M/42 Inpatient	No
8	Mk8	2009	Wash out	(-)	1 ^b	III	Unknown	F/73 Inpatient	No
9	Mk9	2009	Sputum	(-)	>100	I	H	F/70 Outpatient	Yes
10	Mk10	2010	Sputum	(-)	10	I	H	M/70 Outpatient	Yes

^a Ziehl-Neelsen stain

^b Kudo egg medium developed as modified Ogawa egg medium for culturing non-tuberculous mycobacteria. The three isolates were not all grown on Ogawa egg medium.

^c H and L, high and low catalase activities with more and less than 45 mm of bubbles, respectively. For Mk9, the height of bubbles was around 45 mm.

株のDNA断片パターンが対照PI株 (lane 11) とも対応した (Fig. 1B)。Hae III処理のDNA断片パターンは、他型 (type II~VII) 間で異なる^{2,4)}。Mk2 (lane 2) と Mk8 (lane 8) のDNA断片パターンは対照type VI Mk18 (lane 12) とも異なり、前者がtype II、後者がtype IIIに対応した。Mk2からの制限酵素処理前のPCR産物をdirect sequenceした421塩基 (GeneBank: JF836805) は、NCBI-similarity検索でtype IIに属したが、完全に一致するものはなかった。すなわち、Devulderらのものと1塩基異なり (GenBank: AY438086; 一致率99.8%; G299C)、次に、Iwamotoらのものと2塩基異なった (GenBank: AB232364; 一致率99.5%; G182AおよびG191C)⁴⁾。一方、Mk8からの421塩基の同様の検索では、Devulderらのものと完全に一致し、type IIIに属した (GenBank: AY438087)。

M. kansasii分離患者の内訳

*M. kansasii*が分離された患者背景をTable 1に示した。Case 1~8は外来患者で、case 9と10は入院患者であった。*M. kansasii*は2003年からの過去8年間に毎年1~2株分離され、患者の性別は、男性8例に対し女性2例と男性からの分離が3倍高かった。*M. kansasii*が分離された患者年齢は42~80歳で、特に70歳代からの分離が多く、その平均は64歳であった。塗抹検査は、10例中3例 (30%) が陽性となり (1+) が1例、(2+) が2例であった。検査材料はすべて呼吸器由来検体 (喀痰9件、肺洗浄液1件) であった。有意な基礎疾患としては心不全、慢性肝炎、食道がんが各1名で、合併症なしが6名であった。また、既存の肺疾患としては肺がん、間質性肺炎、肺気腫が各2名、

慢性壊死性肺アスペルギルス症、肺MAC症が各1名 (疾患の重複を含む) であった。胸部CT所見では小結節・気管支拡張型1名、孤立結節型1名、結核類似型7名であった。*M. kansasii*に対する治療はhsp65-type Iが分離された8例中4例で行われており、他4例、case 2は入院直後に他病院へ転院したため不明、case 6と7は、前者が肺がん疑いで他院へ転院、後者は入院3日後に死亡のため治療が行われず、case 8は詳細不明であった。今回、測定してhsp65-type IIとIIIになった2例 (共に1集落) のうち前者は感染の可能性があったが、間質性肺炎で全身状態が悪かったため抗結核薬の治療が行われず、後者は肺がんが疑われた症例で汚染菌の可能性が高かった⁸⁾。病原的意義で参考になる半定量catalase産生試験では、hsp65-types IとIIはすべて高catalase菌、hsp65-type IIIは泡沫45mm近辺にあり、判定不能であった。なお、対照のhsp65-type I PI株は高catalase菌、hsp65-type VI FM18株は低catalase菌であった。

考 察

*M. kansasii*はhsp65-typingでtype I~VIIまで知られている^{2~4)}。このうち、type Iは呼吸器疾患患者から多く分離され、type IIは環境ばかりでなくHIV患者からも分離されている。一方、type III~Vは環境から多く分離され、ヒトからの分離が少ないことから、病原性に乏しいと考えられている。さらに、type VIとVIIは分離頻度が低いため十分な知見がないが、前者は病原性を示唆する報告がある⁹⁾。今回、10件の*M. kansasii*分離株はすべて呼吸器系検査材料から得られ、

このうち type I が 8 株であったのに対し、type II と III が各 1 株と少なかったことは、前述の分離傾向と類似した。当院における過去 8 年間（2003 年 1 月～2010 年 2 月）の *M. kansasii* は合計 10 株、毎年 1～2 株分離され増減はなかった。他の報告と比較し、男女比 4 倍と男性が高かったことは同様であったが、平均年齢は 64 歳と高かった⁵⁾。*M. kansasii* は MAC に次いで多く分離される NTM であり、現在、全国的に分離されている¹⁰⁾。今後も、高齢者や免疫能低下患者からの *M. kansasii* 分離背景を *hsp65*-typting と関連させて注視したい。

hsp65-type II が分離された患者 1 名は、間質性肺炎による免疫能低下が考えられた。胸部 CT 所見では孤立結節型が認められたため、MAC 合併症を疑い、clarithromycin の投薬を開始した。提出された検体から本菌を 1 集落分離し、感染の可能性があるが、重篤な間質性肺炎で全身状態が悪く、抗結核薬の治療を行える状態ではなかった。本患者はその後呼吸不全で死亡した。

また、type III が分離された患者 1 名は肺がん疑いであり、呼吸器症状はなかった。胸部 CT 所見では小結節・気管支拡張型が認められており、本菌を 1 集落分離したが、その後は分離されなかったため、環境からの汚染菌の可能性が高かった。

一方、半定量 catalase 産生試験で、高 catalase 産生 *M. kansasii* は病原的意義があると報告されることから、本試験を試みた^{1,11)}。今回分離された type I および II は高 catalase 産生菌であり、type III は catalase 産生能が中間 (unknown) であった。ちなみに、対照 *hsp65*-type VI FM18 株は低 catalase 菌であったが、この type で病原性を指摘する報告がある⁹⁾。*hsp65*-typting と catalase 産生能とは異なる箇所を調べており、両者の関連性を本報告で明らかにすることは困難であった。しかし、両方法は *M. kansasii* 感染を総合的に判断するうえでの補助的検査法として有用となりうると考えられた。

hsp65-type II Mk2 株は、1 塩基ではあるが従来のもとの異なった silent mutant であった。Iwamoto らの報告では、この type II 内でもいくつかの variant が存在した⁴⁾。彼らは、ヒトから多く分離される *hsp65*-type I がヒトおよび環境から共に分離される *hsp65*-type II から intermediate type I を経た進化の過程で出現したことを考察している。今回の type II の発見は、この type が他 type よりも多型に富んでいる可能性を補足するものであった。

本邦での *hsp65*-type I 以外の市中病院における *M.*

kansasii 分離背景に関する研究はほとんど行われていない。*M. kansasii* はヒトや環境に生息することから、高齢者や生体防御機構が低下した患者への感染が危惧される。このような患者が利用する医療施設では、感染制御を行ううえで *M. kansasii* も念頭に置くことが重要である。今後、症例数を増やすなかで、*hsp65*-typting の補助的検査法としての有用性を明らかにしたい。

利益相反について：利益相反はない。

引用文献

- 1) 齊藤 肇. 2007. 結核菌検査指針 2007・抗酸菌の同定. p. 51-78, 財団法人結核予防会 (日本結核病学会 抗酸菌検査検討委員会 編集 初版), 財団法人結核病学会 事業部出版調査課, 東京.
- 2) Alcaide, F, I. Richter, C. Bernasconi, et al. 1997. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: Implications for epidemiological and pathogenicity studies. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1959-1964.
- 3) Taillard, C., G. Greub, R. Weber, et al. 2002. Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss National Survey. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1240-1244.
- 4) Iwamoto, T, H. Saito. 2006. Comparative study of two typing methods, *hsp65* PRA and ITS sequencing, revealed a possible evolutionary link between *Mycobacterium kansasii* I and II isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 254: 129-133.
- 5) 田澤節子, 丸茂健治, 中村良子. 1999. 市中病院における *Mycobacterium kansasii* の分離状況: 微生物検査室からの報告. *結核* 74: 19-25.
- 6) Marumo, K., H. Nakamura, S. Tazawa, et al. 2010. Isolation of novel mycobacteria contaminating an aquarium fish tank in a Japanese university hospital. *J. Applied. Microbiol.* 109: 558-566.
- 7) Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, et al. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 175-178.
- 8) 倉島篤行, 鈴木克洋, 網島 優, 他. 2008. 肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針—2008年. *結核* 83: 525-526.
- 9) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 他. 2007. *Mycobacterium kansasii* 株における分子疫学的解明. *結核* 82: 103-110.

- 10) 山本正彦, 荒井秀夫, 河原 伸, 他. 1998. 非定型抗酸菌症の治療に関する見解—1998年. 結核 73: 599–605
- 11) Wayne, L. G. 1962. Two varieties of *Mycobacterium kansasii* with different clinical significance. Am. Rev. Respir. Dis. 86: 651–656.

Evaluation of Isolation of *Mycobacterium kansasii* Based on *hsp65*-Typing: A Report from a Clinical Laboratory in a Japanese University Hospital

Ayumi Hiishi,¹⁾ Setsuko Tazawa,⁴⁾ Yuji Arai,¹⁾ Kazuhisa Ugajin,⁵⁾ Akiko Anan,¹⁾ Mayumi Togashi,¹⁾
Hisako Nakamura,¹⁾ Naoyuki Yazawa,¹⁾ Yutaka Tsuchiya,²⁾ Munetaka Hayashi,³⁾ Kenji Marumo⁴⁾

¹⁾ Division of Clinical Laboratory, ²⁾ Department of Respiratory Medicine,

³⁾ Department of Emergency Center,

⁴⁾ Department of Clinical Pathology in Showa University Fujigaoka Hospital, and

⁵⁾ Division of Clinical Laboratory in Showa University

The isolation of *Mycobacterium kansasii* in a Japanese university hospital has not been evaluated in detail. We retrospectively investigated the isolation background of 10 *M. kansasii* strains determined by *hsp65*-typing in Showa University Fujigaoka Hospital in Japan during the eight years between 2003 and 2010. Of eight cases with type I, four were treated for pulmonary infection. Of the two cases without type I, one was a new type II containing one silent mutation (GenBank: accession no. JF836805), compared with sequences that have been reported until now, and another was type III, consistent with the known sequence (GenBank: accession no. AY438087). *M. kansasii* containing types I and II associated with pathogenicity showed high-catalase production with a semi-quantitative catalase test. Although the number of cases in this study was small, *hsp65*-typing possibly play an important role as a supportable test for evaluating the cause of *M. kansasii* infection.