

[原 著]

Mycobacterium intracellulare の遺伝子型とクラリスロマイシン感受性の検討

吉田志緒美¹⁾・富田元久²⁾

¹⁾ 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター

²⁾ 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床検査科

(平成 25 年 5 月 20 日受付, 平成 25 年 7 月 29 日受理)

本研究は *Mycobacterium intracellulare* 呼吸器臨床分離株の菌遺伝子型並びにクラリスロマイシン感受性について評価することを目的とした。独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離された 80 株を対象に 16S rRNA 遺伝子及び 16S-23S ITS 領域のシーケンスによる遺伝子型の分類を行い、並びに微量液体希釈測定法にて感受性を決定した。MIC が 8 mg/L 以上を示した株について 23S rRNA 上の耐性遺伝子の有無を確認した。同時期に分離された *M. avium* 179 株についても感受性と耐性遺伝子の有無について検討を行った。遺伝子型解析の結果、*M. intracellulare* は 8 種類の遺伝子型に分類され、そのうち Min-A が 66 株と最も多かった。肺非結核性抗酸菌症の診断基準を満たしていた肺 *M. intracellulare* 症例は 73 症例であった。細分化された *M. intracellulare* 遺伝子型は地域ごとに異なる優位性をもつ傾向が示唆され、*M. intracellulare* 症の発症頻度はその菌遺伝子型に依存している可能性があると考えられた。また、*M. intracellulare* と *M. avium* の MIC 分布は共に 2 峰性であり、MIC₅₀、MIC₉₀ は 2 ないし 8 と同程度であった。MIC 32 mg/L 以上の耐性 *M. avium* 株は 8 株存在したのに対し、*M. intracellulare* は 5 株であり、すべて Min-A であった。MIC が 8 および 16 mg/L の株に耐性遺伝子変異は認められなかったが、耐性株は *M. avium* の 2 株を除いて、すべて変異を有していた。遺伝子型と耐性株の関係を明らかにするには今後、耐性株の蓄積が必要である。

Key words: *M. intracellulare*, ITS sequence, genetic distribution, pulmonary infection disease, clarithromycin

序 文

MAC (*Mycobacterium avium* complex) 菌とは *M. avium* と *M. intracellulare* の 2 菌種を主とする非光発色性の遅発育菌の総称である。近年、起炎菌として MAC 菌が分離される MAC 症の増加が、罹患率の上昇から確認されている (カナダでは 1997 年: 5.6/10 万, 2003 年: 7.7/10 万, アメリカでは 1993-1996 年:

1.1/10 万, 2005-2006 年: 4.7/10 万)^{1)~3)}。わが国では、2001 年と 2007 年の症例を対象に罹患率の変動を調査した報告が⁴⁾、非結核性抗酸菌症研究協議会から発表されている⁴⁾。それによると、非結核性抗酸菌症の増加とともに MAC 症 (*M. avium* 症, *M. intracellulare* 症に区別されている) の罹患率は上昇している [*M. avium* 症 2001 年: 3.42/10 万, 2007 年: 3.71/10 万, *M. intracellulare* 症 2001 年: 1.48/10 万, 2007 年: 1.52/10 万]⁴⁾。しかし、MAC 症の罹患率は地域によって差が見られヨーロッパでは低い傾向がある (フランス, 2000-2002 年: 0.2/10 万, 南西アイルランド, 1987-2000 年: 0.3/10 万)⁵⁾。

MAC 症を引き起こす MAC 菌の分離株数も近年増加傾向である⁶⁾⁷⁾。しかし、分離株を *M. avium* と *M. intracellulare* に区別した場合、両菌種の変動に地域差

著者連絡先: (〒591-8555) 大阪府堺市北区長曾根町 1180
独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター
吉田志緒美
TEL: 072-252-3021
FAX: 072-251-1372
E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp

が見られる⁸⁾⁹⁾。オランダの報告では、2000年から2006年の期間中、結核菌群を含めた全抗酸菌株数に占める *M. avium* 分離株の割合は13%から28%と増加しているのに反して *M. intracellulare* の分離株の割合は5%から7%とほとんど変動がないという⁸⁾。しかし、オーストラリアの報告では *M. avium* 株の分離頻度は1999年:1/10万、2005年:1.55/10万、*M. intracellulare* 株の分離頻度は1999年:2.2/10万、2005年:5.3/10万という結果となり、*M. intracellulare* の方が *M. avium* より分離株数の増加傾向が顕著であった⁹⁾。また、両菌種の疾患との関連性についても地域間で違いが見られるようである。米国の報告では *M. avium* の方が *M. intracellulare* よりも疾患関連性が高いのではないかとしている¹⁰⁾。一方、韓国では *M. intracellulare* の方が *M. avium* より病原性が高いという¹¹⁾。しかし、わが国では、分離株数の変動や疾患関連性についての検討がなされておらず、経年的にMAC菌の分離株数を全国調査された報告は見当たらない。

わが国では *M. avium* 症の高い罹患率の原因解明に菌の遺伝子型解析が行われており、特有の遺伝子型を持つ *M. avium* の存在が近年のわが国での肺 *M. avium* 症増加の一因になっているのではないかという報告がある¹²⁾。また、*M. avium* の臨床分離株の遺伝子型には日欧間で地域差があるという報告がなされている¹³⁾。したがって、*M. intracellulare* の遺伝子型が *M. avium* と同様に地域間で異なっているのならば、*M. intracellulare* の全抗酸菌分離株に占める割合の変動や疾患関連性が諸外国と異なる可能性が考えられる。しかし、わが国では *M. intracellulare* の遺伝子型について検討された報告がない。そのため、われわれは *M. intracellulare* 株の遺伝子型を解析するのに必要な疫学データとして、過去11年間に臨床分離された *M. avium* と *M. intracellulare* の株数の変動と疾患関連性について分析した。次に、ITS領域を用いて *sequence* に分類する De Smet らの方法¹⁴⁾を基に菌の遺伝子型を決定し、同菌の遺伝的特徴について諸外国のデータと比較検討を行った。また、菌遺伝子型ごとにATS/IDSAステートメント及び日本結核病学会の肺非結核性抗酸菌症の診断基準²⁾¹⁵⁾を満たす症例の比率を算出し、疾患との関連性について比較した。

肺MAC症において、クラリスロマイシン (CAM) だけが治療効果を期待できる唯一の薬剤であり、他の薬剤はCAMとの併用効果でその活性は期待できるが単剤での臨床効果は乏しいことから、肺MAC症の治療効果を推測できる薬剤感受性検査はCAMに対してのみである¹⁵⁾。韓国の報告によると、*M. intracellulare*

は *M. avium* より病原性が高いため、治療する必要性があるとされ¹¹⁾、臨床的な比較検討から *M. avium* よりも難治性であるとされている¹⁶⁾。そのため、治療の難治化を引き起こしやすいCAM耐性株を決定し、その遺伝子型と疾患の関連性を見ることは重要であると考へた。本研究では *M. intracellulare* の遺伝子型解析に加えて、CAMの薬剤感受性検査で得られた耐性株と耐性ではないが高いMICを持つ株(判定保留株と感受性で最も高いMICを持つ株)に対して23S rRNAのdomain Vにおける耐性遺伝子変異の有無を検討し、耐性株の遺伝子型と耐性遺伝子変異の関連性を明らかにすることとした。さらに、同時期に肺 *M. avium* 症患者から分離された *M. avium* 株についても同様に解析することで、両菌種のCAM感受性の違いを比べた。

材料と方法

対象

2007年1月～12月の期間中に、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターに新規入院した患者80名から分離された *M. intracellulare* 80株を対象とした。同時期に新規入院した179名の患者から分離された *M. avium* 179株を、*M. intracellulare* 分離株と疾患との関連の検討及びCAM感受性のMIC比較のための対照とした。また、2001～2011年の期間に分離された全抗酸菌分離株数と、*M. avium* および *M. intracellulare* の分離株数を抽出し分離状況の推移を確認した。これらのデータは細菌検査室のデータベースから抽出した。対象とした排菌患者のうちATS/IDSA及び日本結核病学会の肺非結核性抗酸菌症の診断基準²⁾¹⁵⁾を満たした症例を *M. intracellulare* 症及び *M. avium* 症と定義し、*M. intracellulare* のみ遺伝子型と疾患との関連性について検討した。

M. intracellulare を排菌した80患者の内、*M. intracellulare* 症と診断されたのは73患者であり、新規診断例は44症例、再発例は29症例であった。一方、*M. avium* 排菌179患者の内、*M. avium* 症と診断されたのは172症例であり、新規診断例は91症例、再発例は81症例であった。すべての患者はHIV検査陰性であった。

対象株はすべて、BACTEC MGIT960システム(日本ベクトン・ディッキンソン)、小川KY培地(セロテック)を用いた培養検査で両方もしくはいずれかの培地で陽性となることを確認した。同定にはコバスアンプリコアマイコバクテリウムイントラセラー(ロシユ・ダイアグノスティクス)、アキュプロ

ブ マイコバクテリウム アビウムコンプレックス (アキュプローブ MAC 法: 極東製薬工業) を用いた。また、複数菌種の混在否定は、PNBA (*p*-nitrobenzoic acid 加 7H11 寒天培地) 上の発育と継代した小川培地上のコロニー性状から確認した。

DNA の抽出

小川培地発育菌から白金耳で径 2~3 mm のコロニー 2 個分の菌量を 1 サンプル分として採取し、1.5 ml マイクロチューブに分注したインスタジーン DNA 精製マトリックス (BIO-RAD) 200 μ l に懸濁した。56°C、15~30 分処理後 10 秒間 vortex し、正確に 100°C、8 分間処理した後直ちに氷水中で急冷した。10 秒間 vortex し、12000 rpm、3 分遠心した上清をシーケンス解析に用いた。

シーケンス解析

PCR 反応は Takara Ex Taq (タカラバイオ) を用いて、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクル行った。16S rRNA 遺伝子の超可変部 A と B を含む領域をプライマー 285F [5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'] と 264R [5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3'] を用いて PCR 増幅産物を得た。ITS 領域全長の増幅には ITS1 [5'-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC-3'] と ITS2 [5'-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC-3'] を用いた。PCR 産物を精製した後 BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan) を用いて 16S rRNA 遺伝子の部分配列と ITS 全長の塩基配列を得た。得られた塩基配列は、Ribosomal Differentiation of Microorganisms (RIDOM) を用いて相同性検索を行い、99% 以上の塩基配列一致を持って同一菌種と決定した。遺伝子型分類は ITS 領域のシーケンス解析結果を用いた De Smet らの分類 (11 種類の sequevar)¹⁴⁾ に基づいて決定した。

薬剤感受性検査

CLSI2011 M24-A2¹⁷⁾ に準拠し、CA-Mueller-Hinton プロス (pH 7.4) を用いた微量液体希釈測定法にて CAM の感受性を判定した。シングルコロニーを継代後、3 株同時に測定した平均値をもって MIC とし、また測定値の変動監視のため、異なる日時による測定を 3 回行った。CAM 感受性の判定基準は MIC 8 mg/L 以下で感受性、16 mg/L を判定保留、32 mg/L 以上を耐性とした。

耐性遺伝子変異領域のシーケンス解析

結核菌には MIC による RFP 感受性検査で感受性と判定されたにもかかわらず、耐性遺伝子変異を有する低濃度耐性菌が存在する¹⁸⁾。同様に、今回対象とした

株に低濃度耐性菌が存在するかどうかを確認するために、CAM の MIC が 8 mg/L 以上を示した株について、耐性遺伝子変異の解析を行った。Inagaki らの方法¹⁹⁾ に準拠し、マクロライド系抗菌薬耐性に関与する 23S rRNA の domain V 領域を PCR により増幅した後、PCR 産物 (445 bp) のダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を比較した。

統計学的検定

統計学的検定には χ^2 検定をおこない、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

当センターにおける過去 11 年間の *M. avium*、*M. intracellulare* 分離状況の推移

Figure 1 に、当センターにおける各年の全抗酸菌株数 (結核菌群を含む) と *M. intracellulare* 並びに *M. avium* 株の分離株の割合、肺 *M. avium* 並びに *M. intracellulare* 症例数を示した。期間中、収容可能な病床数の計が変更しているため、年次ごとの結核病床数/合計病床数を添付した。当センターで分離された結核菌群を含むすべての抗酸菌株に占める *M. intracellulare* の分離株の割合は 2001 年の 7.2% (69/957 株) から 2011 年の 15.8% (113/716 株) に倍増していた。*M. avium* の割合は 2001 年の 17.6% (168/957 株) から 25.3% (181/716 株) に増加していた。一方、*M. avium* 株、*M. intracellulare* 株を排菌した患者のうち、診断基準を満たした症例の割合 (肺 *M. avium* もしくは *M. intracellulare* 症患者数/*M. avium* もしくは *M. intracellulare* 菌陽性者数) は、2001 年から 2011 年の間に大きな変化がなかった [*M. avium*: 最小 93.1% (162/174 株)-最大 97.8% (177/181 株), *M. intracellulare*: 最小 89.9% (62/69 株)-最大 93.8% (105/112 株)]。

M. intracellulare 遺伝子型分類と疾患との関連性

対象株は 16S rRNA 遺伝子シーケンス解析により、すべて *M. intracellulare* と判定され、ITS シーケンス解析によって 8 種類の遺伝子型 (sequevar) に分類された。今回の検討では、同一サンプル内に異なる遺伝子型が含まれる複数菌クローンは存在せず、すべて単一クローンであった。Min-A 株は *M. intracellulare* 基準株 DSM 43223 (ATCC 13950) と同じ遺伝子型を示し、66 株 (82.5%) と最も分離頻度が高かった (Table 1)。Min-A 66 株のうち、*M. intracellulare* 症と診断された患者は 63 名 (95.5%) であった。

Min-A 以外の残り 14 株の内訳は、Min-B が 1 株、MAC-A と MAC-C が各 4 株存在し、MAC-D は 2 株、

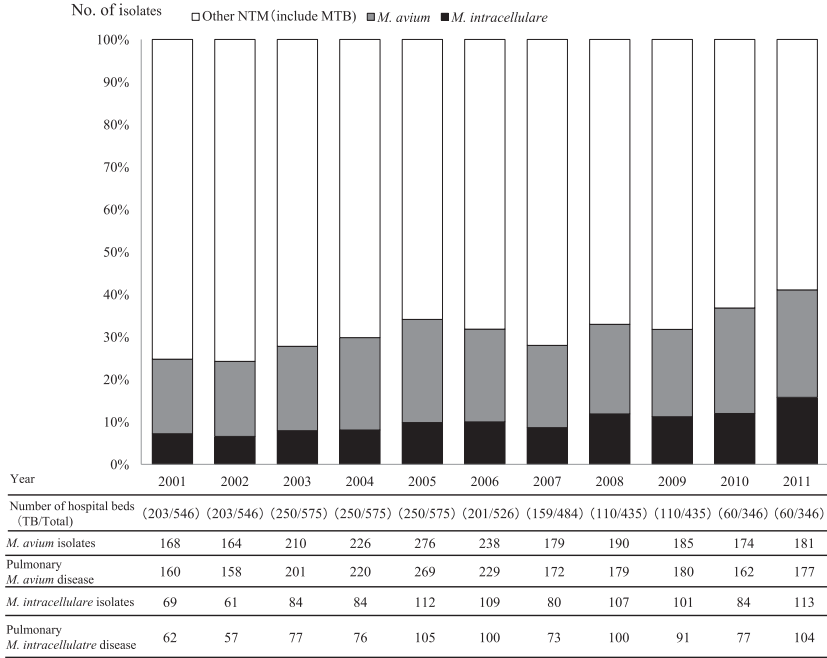


Figure 1. Trends of isolation of *M. intracellulare* and *M. avium* added these proportions among all NTM and the number of hospital beds at NHO Kinki-chuo Chest Medical Center from 2001 to 2011

Table 1. Comparative sequevars and distribution of *M. intracellulare* isolates according to the diagnostic criteria of non-tuberculous mycobacterial lung disease

ITS Sequevar	This study				Schweickert, et al. (Germany) ^a				Park, et al. (Korea) ^b			
	Mycobacterial species, sequevars, no.	Clinical follow up no.	Clinically relevant, no. (%)	Clinically not relevant, no. (%)	Mycobacterial species, sequevars, no.	Clinical follow up no.	Clinically relevant, no. (%)	Clinically not relevant, no. (%)	Mycobacterial species, sequevars, no.	Clinical follow up no.	Clinically relevant, no. (%)	Clinically not relevant, no. (%)
Min-A	66	66	63 (95.5)	3 (4.5)	17	3	3 (100)	0	88	88	75 (88.6)	13 (16.7)
Min-B	1	1	1 (100)	0								
Min-C					3	2	0	2 (100)				
MAC-A	4	4	3 (75)	1 (25)	143	90	3 (3.3)	82 (91.1)*	6	6	3 (50.0)	3 (50.0)
MAC-C	4	4	4 (100)	0	2	1	0	1 (100)				
MAC-D	2	2	1 (50)	1 (50)								
MAC-E					1	1	0	1 (100)				
MAC-T	1	1	0	1 (100)								
MAC-U	1	1	0	1 (100)								
FI-9336 (10bp mismatch)	1	1	1 (100)	0								
Total	80	80	73 (91.3)	7 (6.7)	166	97	6 (6.2)	86 (88.7)	94	94	78 (83.0)	16 (17.0)

*: A total of 5 *M. intracellulare*, sequevar MAC-A, isolates were associated with mycobacterial lung disease by the ATS criteria, but radiologic findings have been attributed to an underlying illness or an insufficient sample.

^a: The distribution of *M. intracellulare* by Schweickert, et al. (2008)²³

^b: The distribution of *M. intracellulare* by Park, et al. (2010)²²

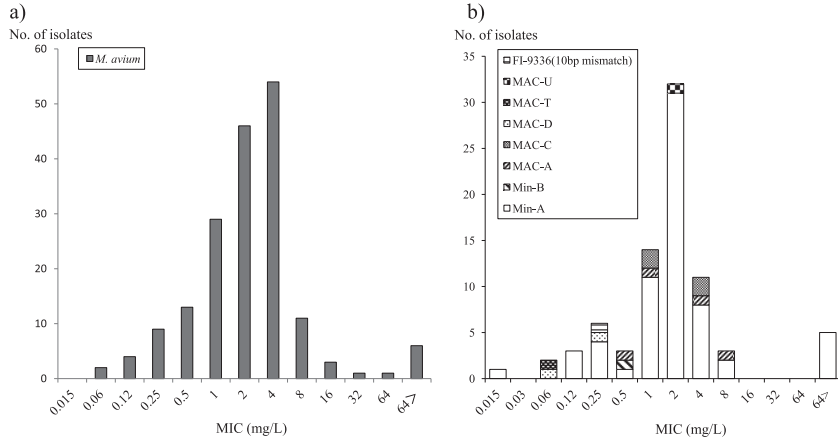


Figure 2. Distribution of MICs (mg/L) of clarithromycin for *M. intracellulare* and *M. avium* isolates, based on ITS sequevar type

- a) Distribution of MICs (mg/L) of *M. avium*
- b) Distribution of MICs (mg/L) of *M. intracellulare*

MAC-U と MAC-T が各 1 株, MAC FI-9336 株 と 10 bp 異なる相同性を示した未同定株が 1 株認められた。これらの株のうち Min-B と MAC-C, FI-9336 近縁菌株はすべて *M. intracellulare* 症と診断された患者からの株であった。次に *M. intracellulare* 症と関連性が高い遺伝子型は MAC-A の 75% (3/4 株), MAC-D の 50% (1/2 株) であり, MAC-T 及び MAC-U の各 1 株は *M. intracellulare* 症とされた患者から排菌されなかった。

CAM 感受性検査

M. intracellulare 80 株は感受性 75 株, CAM 耐性 5 株となり, 判定保留株は存在しなかった。これら *M. intracellulare* の耐性率は 6.3% (5/80) であった。同時期に分離された *M. avium* 179 株は感受性 161 株, 判定保留 3 株, 耐性 8 株であった。*M. avium* の耐性率は 4.5% (8/179) であり, *M. intracellulare* と *M. avium* の間で CAM 耐性率の差はなかった ($p > 0.05$)。Figure 2 に示したとおり, *M. intracellulare* と *M. avium* の MIC 分布は 2 峰性となった。*M. intracellulare* 耐性 5 株は Min-A 遺伝子型のみであった。

次に, 両菌種の MIC₅₀, MIC₉₀ 並びに新規診断例と再発例の感受性率の比較を Table 2 に示した。両菌種の MIC₅₀, MIC₉₀ は 2 または 8 で差は認められなかった。肺 *M. intracellulare* 症由来の 73 株のうち, CAM 耐性株は 5 株であり, 耐性率は 6.8% (5/73 株) であった。一方, 肺 *M. avium* 症由来の 172 株のうち CAM 耐性株は 8 株であり, 耐性率は 4.7% (8/172 株) で

あった。これらの耐性率に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。新規診断例は *M. intracellulare* で 44 例, *M. avium* 症で 91 例, 再発例は *M. intracellulare* で 29 例, *M. avium* 症で 81 例であった。*M. intracellulare* の感受性 68 株を排菌した症例のうち, 新規診断例は 43 例, 再発例は 25 例であった。*M. avium* 感受性株 161 株を排菌した症例のうち, 新規診断例は 89 例, 再発例は 72 例であった。*M. intracellulare* の場合, CAM 耐性株を排菌した再発例は 4 例であり, 一方, *M. avium* の耐性株 8 株はすべて再発例によるものであった。

23S rRNA (Domain V) シークエンス解析結果

CAM 耐性 *M. intracellulare* の 5 株中 4 株はコドン 2058 のアラニンがグアニンに変異し, 残り 1 株はコドン 2059 に同じ変異を有していた (A2059G)。MIC が 8 mg/L を示した感受性 3 株に変異は認められなかった。一方, CAM 耐性 *M. avium* 8 株の内 6 株は耐性遺伝子変異 (A2058G) を認めたが, 2 株は変異を認めなかった。MIC が 8 mg/L を示した感受性 11 株と MIC が 16 mg/L の判定保留 3 株に変異は認められなかった。

考 察

当センターにおける過去 11 年間の *M. avium*, *M. intracellulare* 分離状況の推移

Figure 1 のとおり, 11 年間の間に全体の病床数及び結核病床数が減少しているのに反して *M. avium*,

Table 2. The MIC₅₀ and MIC₉₀ of clarithromycin determined for all *M. avium* or *M. intracellulare* isolates and clinical history of patients with pulmonary *M. avium* or *M. intracellulare* disease who were studied for their susceptibility of clarithromycin

	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
No. of isolates	179	80
MIC ₅₀	2	2
MIC ₉₀	8	8
Clinically relevant isolates [n]	172	73
Susceptible [n (%)]	161 (93.6)	68 (93.2)
New strain	89	43
Relapse	72	25
Intermediate [n (%)]	3 (1.7)	0 (0)
New strain	2	0
Relapse	1	0
Resistance [n (%)]	8 (4.7)	5 (6.8)
New strain	0	1
Relapse	8	4

M. intracellulare の分離株と症例数は共に増加していた。2001年から2007年に *M. avium*, *M. intracellulare* の罹患率が上昇していたという佐藤の罹患率の報告⁵⁾と同様の傾向が分離株数と症例数については示された。一方, *M. avium* や *M. intracellulare* 株を分離した患者が *M. avium* 症, *M. intracellulare* 症と診断される比率に大きな変動はなく, 高い値を維持していた (*M. avium* 症: 93.1–97.8%, *M. intracellulare* 症: 89.9–93.8%)。Maugeinらは *M. intracellulare* 症の比率 (47.2%) は *M. avium* 症の比率 (40.5%) とほぼ同等であったが, 約半数の症例は診断基準を満たさなかったとしている⁴⁾。Stoutらは *M. intracellulare* を排菌した患者のうち *M. intracellulare* 症と診断された比率は31.4%であり, *M. avium* の69.2%に比べて低かったとしている¹⁰⁾。今回の結果は彼らの報告に相反して *M. intracellulare* 症の比率が高いことが認められた。今回対象とした菌株は, すべて入院を必要とする患者から排菌されていたため, 診断基準を満たした症例の割合が高くなったのではないかと考えられる。一方, 比較対照とした海外の報告には患者情報としての入院の有無が記載されていないので⁴⁾¹⁰⁾, 診断時の患者がどのような状態であったのかは不明である。

このような菌の発症の違いについて, 宿主発病性と菌遺伝子型の違いが考えられる。MAC症の宿主に対する調査は少なく, 最近の報告では, Adjemianらの肺非結核性抗酸菌症の宿主側要因についての調査がある。彼らは, アメリカの非結核性抗酸菌症有病率がハ

ワイ州で最も高く, また, Asian/Pacific islander が白人より2倍以上高かったため, 人種間による有病率の違いがあるのではないかとしている²⁰⁾。このことが, わが国の肺非結核性抗酸菌症罹患率の増加の一つの理由となる可能性を示しているかもしれないが, 臨床で分離された非結核性抗酸菌を構成する菌種は地域によって様々であり²¹⁾, 地域ごとに分離される菌株が同じ菌である確認を行っていないため, MAC症の罹患率増加を解明するには難しい。したがって, 菌遺伝子型を比較することの方が菌の疾患関連性を明らかにできる可能性があると考えるが, 今回, 少ない菌株数しか収集できなかったため, 結果の解釈は限定的であることを考慮する必要がある。

M. intracellulare 遺伝子型分類と疾患との関連性

MAC菌の遺伝子解析は, 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした場合, ほとんどの株を同定できるが, ハウスキーピング遺伝子 (*rpoB*, *hsp65* 等) などによるシーケンス解析を用いると, 16S rRNA 遺伝子解析で *M. intracellulare* と同定された株は幾つかの *sequevar* に分けることができる。ハウスキーピング遺伝子の一つである ITS 領域は 16S rRNA 遺伝子より進化が速いことから菌種間の多型性が高く特異性を高めることができるため, De Smetらは11種類の *sequevar* (Min-A から Min-D と MAC-A から MAC-I) での分類を提唱している¹⁴⁾。ここ数年, 複数の遺伝子領域をシーケンスし, これらの *sequevar* を新しい菌種として登録する報告が相次いでいるが(MAC-A :

M. chimaera, MAC-D: *M. marseillense*, MAC-K: *M. timonense*, MAC-Q: *M. vulneris*, MAC-X: *M. colombiense*), 抗酸菌分類に用いる遺伝子解析に gold standard が確立していない現状では、未だ流動的である。したがって、今回の sequevar 分類による遺伝子型分類は疫学解析にとって妥当であると考えた。

Park ら (韓国) の報告では Min-A は 93.6% であり²²⁾, わが国同様に高い優位性が示された。それらに対し Schweickert ら (ドイツ) の Min-A 比率は 10.2% と低かった²³⁾。Schweickert らの報告で最も優勢な遺伝子型は MAC-A であり, *M. intracellulare* の遺伝子型別分離頻度により地域による特異性が明らかになった²³⁾。また, 本研究で *M. intracellulare* 症と診断された患者 73 名の割合は 91.3% であり Park らの結果 (78 名; 83.0%) と同程度であったが²²⁾, 同上の Schweickert らの報告結果 (6 名; 6.2%) とは大きく異なっていた²³⁾。しかし, Min-A のみの疾患関連性に注目すると, 日独韓 3 か国の *M. intracellulare* 症の比率は同程度であった (順に 95.5%, 88.6%, 100%)。したがって, 8 種類の sequevar のうち Min-A 株は疾患との関連性が高いことが示唆された。一方, ドイツで *M. intracellulare* の臨床分離株全体に占める疾患関連性が低い理由として, MAC-A の頻度が高いことが関連していると思われる。他の欧米諸国からのデータは遺伝子型までは調べられていないが, *M. intracellulare* は疾患関連性が低いとされていることから (Ingen らは *M. intracellulare* 排菌患者のうち肺 *M. intracellulare* 症患者の割合は 12.5%²⁴⁾, Stout らは 30.4% と述べている¹⁰⁾), Schweickert らの報告と同様に MAC-A のような疾患関連性の低い遺伝子型が優位に構成されている地域が存在すると類推される。したがって, 本来環境菌である *M. intracellulare* は地域ごとに異なる遺伝子型で構成されている可能性が示唆された。

今回, MAC-A は 4 株認められ, *M. intracellulare* 症と診断されたのは 3 症例 (75.0%) であった。本データは Tortoli らの報告 [12 症例中 8 例 (66.7%)]²⁵⁾, Park らの報告 [6 症例中 3 例 (50.0%)]²²⁾ を追認できたが, Schweickert らの“MAC-A 株の病原性は低い”という結果とは相反した (3/90; 3.3%)²³⁾。一方, Ingen らは MAC-A 株間に存在する多様性を報告している²⁶⁾。MAC-A に関しては分離株数が少ないため単純な比較は難しいが, Ingen らの結果に基づくならば, MAC-A 遺伝子型菌が各報告で同一の菌種なのかどうか, もしくは地域ごとに多様性はないのか, それが疾患関連性の違いにどのように関係しているのかどうかを検討する必要があるだろう。また, Wallace らは, 患者

の生活環境調査をおこなった結果, *M. intracellulare* 症患者は Min-A が多いのに対し, 生活環境水からは Min-A ではなく MAC-A が優勢であったと報告している²⁷⁾。この Wallace らの報告に基づくならば, Schweickert らの疾患関連性が低かった MAC-A 株は環境に存在し, そこから患者の肺へ迷入 (colonization) が生じた可能性が考えられる。また, その他の遺伝子型である MAC-T 及び MAC-U 株は疾患との関連性が乏しい結果となり, すべての MAC-U が患者肺への colonization とした Lebrun らの報告結果²⁸⁾ と一致した。

MAC 症の colonization の比率には地域差が見られる⁴⁾⁷⁾。遺伝子型は調べられていないが, Maugein らの報告 (フランス) では MAC 菌を排菌した患者の 30% が混入 (contamination) もしくは colonization であるとしている⁴⁾。他方, Cheong ら (台湾) は MAC 症罹患率の増加にくらべて, 菌の患者肺への colonization の比率の増加が顕著であったという (MAC 症は 2000 年: 0.5/10 万, 2008 年: 2.1/10 万 に対し, 迷入率は 2000 年: 1.9/10 万, 2008 年: 12.3/10 万)⁷⁾。Simon らの報告からは, わが国の分離菌と疾患の関連性は高い傾向がうかがえる²¹⁾。われわれが今回対象とした臨床分離株は Wallace らの報告²⁷⁾ と同じく Min-A がほとんどであったが, 環境分離株は調査されていない。したがって, *M. intracellulare* の Min-A 以外の遺伝子型の疾患関連性を検証するには, 環境分離株と臨床分離株を比較し, colonization と遺伝子型の関係を検証することが必要であろう。

CAM 感受性検査と耐性遺伝子

CAM の作用機序はタンパク合成阻害で, 70S リボソームの 50S サブユニットを構成している 23S rRNA に結合しその作用を発揮する。23S rRNA は domain I ~ VI からなり, CAM 耐性のリボソーム変異点はドメイン V の A2058 位, A2059 位で見られる。このドメイン V のループはタンパク合成のときのペプチジル転移酵素活性を持つため, このループは RNA が酵素活性をもつ, いわゆるリボザイムの活性部位になっており, この部位に CAM が吸着するとペプチジル化ができなくなり CAM の抗菌力が発揮される。したがって, この部位に変異が生じると CAM が吸着できなくなり耐性化するとされている。

今回, Min-A の 5 株に A2058 または A2059 位の変異が認められた。いずれの株も CAM に対して高度に耐性化しており, 1 名のみ過去に MAC 治療の経歴を有していなかった。

肺 MAC 症における新規診断 CAM 耐性患者は稀で

あるといわれている。GriffithらはMICが32 mg/L以上のCAM耐性MAC症51例を検討し、これら耐性例のうち39/51(76%)がCAM単独またはquinoloneとの2剤併用療法を受けており、ATS推奨の併用療法では12/303(4%)にmacrolide耐性を生じたという²⁹⁾。今回、*M. intracellulare* 症の耐性率は6.8%(5/73株)、*M. avium* 症の耐性率は4.7%(8/172株)とGriffithらの報告と同程度であった。*M. intracellulare* 症の新規診断と再発患者間におけるCAM耐性の比率は有意な差は認められなかったが(3.0%/10.3%, $p > 0.05$)、*M. avium* 症には有意な違いが認められた(0%/8.6%, $p = 0.002$)。しかし、今回検討した株数が両菌種で約2倍(172株と80株)も異なることから、正確な耐性率の比較は困難である。また、耐性株がすべてMin-Aであったことから、Min-Aが他の遺伝子型に比べて耐性を獲得しやすいという可能性はあるものの、全体の中で圧倒的に優位な分離頻度を持つことから、今回のデータだけで結論付けることは不可能である。今後、CAM耐性株の蓄積が必要と考える。また、CAM耐性に関与する耐性遺伝子に変異が見られなかった耐性株には、今回の検討とは違うアプローチによる検討(排出ポンプや、薬剤のシナジー活性等)を行う必要がある。

本研究は、*M. intracellulare* の遺伝子型の多様性が地域ごとに存在し、遺伝子型の間で疾患関連性が異なる可能性を示した。結果は限定的ではあるが、*M. intracellulare* のヒトへの病原性を考える上で示唆に富む研究であると考えられた。抗酸菌と病原性との関連性は種/遺伝子型の違いで大きく異なるといわれていることから²⁶⁾、*M. intracellulare* の菌種/遺伝子型の正確な同定は臨床上重要であろう。

謝辞：本研究にあたり、当センター臨床研究センター 露口一成部長、並びに同研究検査科 小池由紀子氏、神戸市環境保健研究所 岩本朋忠博士に深謝いたします。

利益相反：本論文の研究内容、結論、意義、あるいは意見について他者との利益相反(conflict of interest)はありません。

文 献

- Marras, T.K., P. Chedore, A.M. Ying, et al. 2007. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. *Thorax* 62: 661-666.
- Griffith, D.E., T. Aksomit, B.A. Brown-Elliott, et al. on behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175: 367-416.
- Cassidy, P.M., K. Hedberg, A. Saulson, et al. 2009. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin. Infect. Dis.* 49: 124-129.
- Maugein, J., M. Dailloux, B. Carbonnelle, et al. 2005. Sentinel-site surveillance of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 26: 1092-1096.
- 佐藤滋樹. 2011. 非結核性抗酸菌症の地域差. 第85回総会ミニシンポジウム「非結核性抗酸菌症—何がどこまで判明したか」. *結核* 86: 114-116.
- Lai, C.-C., C.-K. Tan, C.-H. Chou, et al. 2010. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 294-296.
- Cheong, C.-U., C.-C. Lai, P.-R. Hsueh. 2012. Clinical significance of *Mycobacterium avium* complex isolates at a medical center in northern Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* 9: 1-2.
- van Ingen, J., W. Hoefsloot, P.N.R. Dekhuijzen, et al. 2010. The changing pattern of clinical *Mycobacterium avium* isolation in the Netherlands. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 14: 1176-1180.
- Thomson, R.M., on behalf of the NTM working group at the Queensland TB Control Centre and Queensland Mycobacterial Reference Laboratory. 2010. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 1576-1583.
- Stout, J.E., G.W. Hopkins, J.R. McDonald, et al. 2008. Association between 16S-23S internal transcribed spacer sequence groups of *Mycobacterium avium* complex and pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2790-2793.
- Han, X.Y., J.J. Tarrand, R. Infante, et al. 2005. Clinical significance and epidemiologic analyses of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* among patients without AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4407-4412.
- Ichikawa, K., T. Yagi, M. Moriyama, et al. 2009. Characterization of *Mycobacterium avium* clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, ISMav6. *J. Med. Microbiol.* 58: 945-950.
- Iwamoto, T., C. Nakajima, Y. Nishiuchi, et al. 2012. Ge-

- netic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect. Genet. Evol.* 12: 846-852.
- 14) De Smet, K.A.L., I.N. Brown, M. Yates, et al. 1995. Ribosomal internal transcribed spacer sequences are identical among *Mycobacterium avium-intracellulare* complex isolates from AIDS patients, but vary among isolates from elderly pulmonary disease patients. *Microbiology* 141: 2739-2747.
 - 15) The Nontuberculous mycobacteriosis control committee of the Japanese society for tuberculosis/the scientific assembly for infection and tuberculosis of the Japanese respiratory society. 2013. Guideline for chemotherapy of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease-2012 revised version. *Kekkaku* 88: 29-32.
 - 16) Koh, W.-J., B.-H. Jeong, K. Jeon, et al. 2012. Clinical significance of the differentiation between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in *M avium* Complex lung disease. *Chest* 142: 1482-1488.
 - 17) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard Second Edition, M24-A2, CLSI, Wayne, Pa, USA.
 - 18) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 他. 2008. 薬剤感受性検査で RFP 感受性, line probe assay で RFP 耐性となる結核菌の検討. *結核* 83: 577-583.
 - 19) Inagaki, T., T. Yagi, K. Ichikawa, et al. 2011. Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin resistance genes in *Mycobacterium avium* complex isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 722-729.
 - 20) Adjemian, J., K.N. Olivier, A.E. Seitz, et al. 2012. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185: 881-886.
 - 21) Simons, S., J. van Ingen, P.-R. Hsueh, et al. 2011. Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Tract Infections, Eastern Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 343-349.
 - 22) Park, J.-H., T.-S. Shim, S.-A. Lee, et al. 2010. Molecular characterization of *Mycobacterium intracellulare*-related strains based on the sequence analysis of *hsp65*, internal transcribed spacer and 16S rRNA genes. *J. Med. Microbiol.* 59: 1037-1043.
 - 23) Schweickert, B., O. Goldenberg, E. Richter, et al. 2008. Occurrence and clinical relevance of *Mycobacterium chimaera* sp. nov., Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1443-1446.
 - 24) van Ingen, J., S.A. Bendien, W.C.M. de Lange, et al. 2009. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax* 64: 502-506.
 - 25) Tortoli, E., L. Rindi, M.J. Garcia, et al. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1277-1285.
 - 26) van Ingen, J., W. Hoefsloot, P.C.A.M. Buijtel, et al. 2012. Characterization of a novel variant of *Mycobacterium chimaera*. *J. Med. Microbiol.* 61: 1234-1239.
 - 27) Wallace, R.J. Jr, E. Iakhiaeva, M.D. Williams, et al. 2013. Absence of *Mycobacterium intracellulare* and the presence of *Mycobacterium chimaera* in household water and biofilm samples of patients in the United States with *Mycobacterium avium* complex respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.* 51: 1747-1752.
 - 28) Lebrun, L., F.X. Weill, L. Lafendi, et al. 2005. Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2567-2574.
 - 29) Griffith, D.E., B.A. Brown-Elliott, B. Langsjoen, et al. 2006. Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174: 928-934.

Pathogenic characterization of *Mycobacterium intracellulare* sequevar
and susceptibility to clarithromycin

Shiomi Yoshida¹⁾, Motohisa Tomita²⁾

¹⁾Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Osaka, Japan

²⁾Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Osaka, Japan

Genotypic patterns in 80 *Mycobacterium intracellulare* isolates from NHO Kinki-chuo Chest Medical Center were subject to internal transcribed-spacer (ITS) sequencing and analyzed prevalence of disease as well as markers of clarithromycin resistance. We sequenced the partial 16S rRNA gene of each isolate and 16S-23S ITS region. Retrospective molecular genetic analysis of *M. intracellulare* isolates showed that 66 (82.5%) strains could be assigned to Min-A. Of 63 patients from whom Min-A was isolated, 95.5% caused pulmonary infections, whereas none of MAC-T or MAC-U isolates exhibited mycobacterial lung disease. The in vitro activity of clarithromycin against isolates was determined by the broth microdilution method. Clarithromycin resistant strains were analyzed by sequencing of the 23S rRNA. We also found that the patterns of clarithromycin susceptibility were variable, with no specific sequevar being fully resistant to the drug. Sequencing of the 23S rRNA of all 5 clarithromycin resistant isolates (100%) found the expected mutation in adenine 2058 or 2059. The genotypic diversity of *M. intracellulare* isolates and clinical cases implies a possible regional or local source of infection and route of transmission.