

[短 報]

川崎市立井田病院における非結核性抗酸菌の分離頻度と時系列変化

関根由貴¹⁾・菊池 眸¹⁾・佐々木健太¹⁾・小嶋修平¹⁾・御手洗聡²⁾・西尾和三³⁾

¹⁾ 川崎市立井田病院検査科

²⁾ 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

³⁾ 川崎市立井田病院呼吸器内科

(令和4年12月14日受付, 令和5年2月7日受理)

背景:マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer: MALDI-TOF MS)を用いた同定法の利用により詳細な細菌同定が可能となり, 同定可能な抗酸菌種が増加している。

目的:川崎市立井田病院における2012年から2021年までの非結核性抗酸菌(Non-tuberculosis mycobacteria: NTM)検出状況について調査を行い, 抗酸菌の検出状況と推移を明らかにする。

結果:調査期間中に854株のNTMが臨床検体から分離されていた。*Mycobacterium avium*/intracellular complex (MAC)としては528株が分離され, 全体の61.8%を占めた。*Mycobacterium gordonae* 118株(13.8%)と*Mycobacterium abscessus* species 40株(4.7%), *Mycobacterium kansasii* 40株(4.7%)がこれに続いた。経年変化については, 同定法がDNA-DNAハイブリダイゼーション(DNA-DNA hybridization: DDH)法からMALDI-TOF MSへ変更となり, 同定される菌種が増加し, *Mycobacterium paragordoniae*, *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium mucogenicum*などの稀少菌種が同定されるようになった。

考察: MALDI-TOF MSの利用で稀少菌種が同定可能となり, 治療薬の選択など臨床的な対応に有用と思われた。

Key words: 非結核性抗酸菌, MALDI-TOF MS

序 文

近年, 非結核性抗酸菌(Non-tuberculosis mycobacteria: NTM)症が世界的に増加している¹⁾。NTMは水系あるいは土壌環境菌で, 現在約190種類が知られている²⁾。日本では2014年に肺NTM症の推定罹患率が14.7人/10万人年と推定され, 2007年の全国調査と比較して約2.6倍に増加していることがわかり大きな関心を集めた。日本においては一般的に*Mycobacterium avium*/intracellular complex (MAC)が検出菌の約90%を占め, 続いて*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus* speciesの順で検出されている³⁾。日本は世界的に見てもNTM症の有病率が高いことが報告されている¹⁾。

NTM症は菌種により治療に用いる薬剤や予後が異なるため, 菌種を同定することが重要である。菌種同定には従来DNA-DNAハイブリダイゼーション(DNA-DNA hybridization: DDH)法⁴⁾やアキュプロープ⁵⁾などが用いられてきたが, 同定できる菌種に限りがある。最近ではマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(matrix as-

sisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer: MALDI-TOF MS)を用いた同定法の利用により詳細な同定が可能となり, 同定可能な菌種が増加している⁶⁾。今回, われわれは当院における2012年から2021年までのNTM検出状況について調査を行い, その特徴について検討したので報告する。

材料と方法

データ収集方法

2012年1月から2021年12月までの10年間に抗酸菌培養検査で分離されたNTMを対象とした。同一患者から複数回NTMが分離されている場合は, 初回陽性検体を対象とし, 重複を避けて集計した。

検査方法

NTMが分離された検体は, 喀出痰763件(89.3%), 気管支洗浄液53件(6.2%), 気管支擦過5件(0.6%), Transtracheal aspiration (TTA)採痰4件(0.5%)であり, 呼吸器系検体が825件で全体の96.6%を占めた。その他の検体は胃液24件(2.8%), 膿(皮膚)2件(0.2%), 創部(腹膜透析カテーテル出口部)1件(0.1%), 胸水1件(0.1%), 便1件(0.1%)であった。無菌材料を除きN-アセチル-Lシステイン・水酸化ナトリウム(NALC-NaOH)法を用いて抗酸菌検査ガイド2020の方法に従って前処理を行った⁷⁾。培養検査はMGITを用い, BDバクテックMGIT960システム(日本ベクトン・ディッキンソン)にて6週間培養した。塗抹陽

著者連絡先: (〒211-0035) 神奈川県川崎市中原区井田2-27-1
川崎市立井田病院検査科
関根由貴
TEL: 044-766-2188
FAX: 044-788-0624
E-mail: sekine-y@city.kawasaki.jp

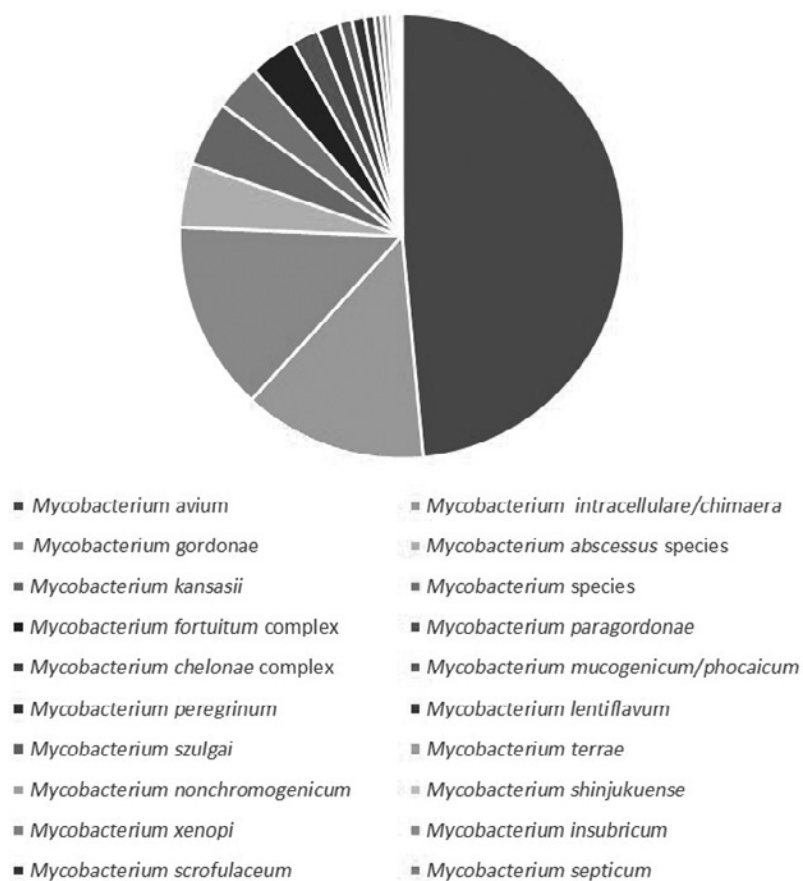


図1. 非結核性抗酸菌分離内訳

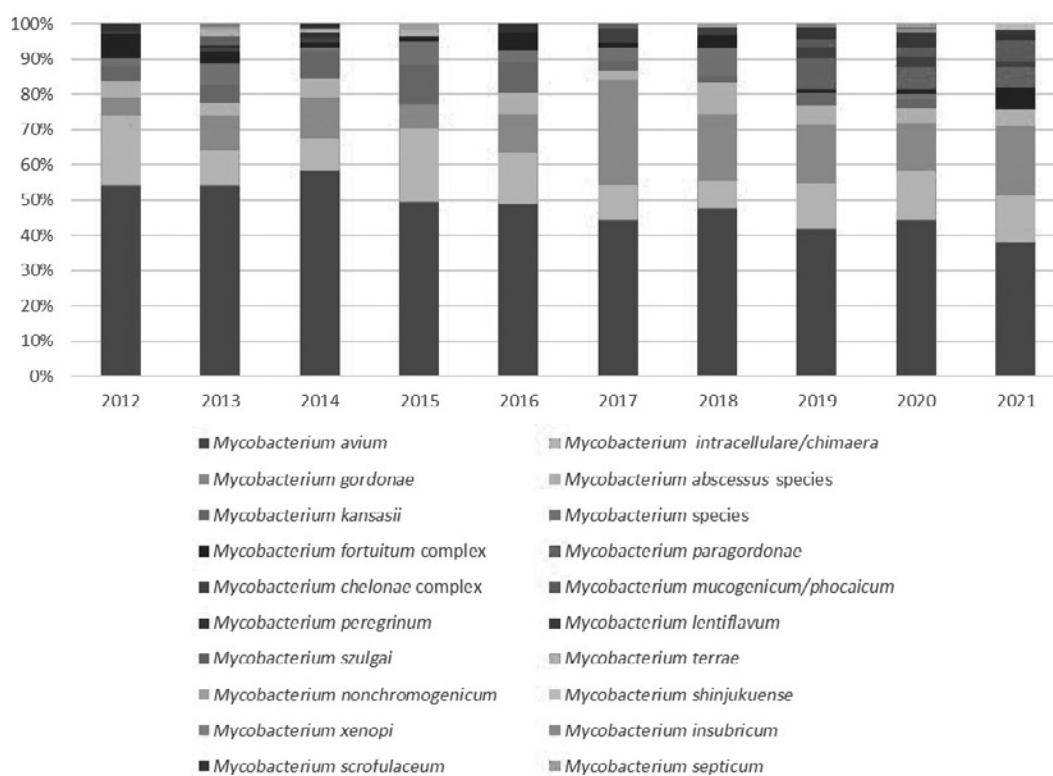


図2. 年次別非結核性抗酸菌分離割合

表 1. 年次別非結核性抗酸菌分離数

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	総計
<i>Mycobacterium avium</i>	60	62	45	30	40	33	48	38	33	25	414
<i>Mycobacterium intracellulare/chimaera</i>	22	12	7	13	12	8	8	12	11	9	114
<i>Mycobacterium gordonae</i>	6	11	9	4	9	22	19	15	10	13	118
<i>Mycobacterium abscessus</i> species	5	4	4	0	5	2	9	5	3	3	40
<i>Mycobacterium kansasii</i>	5	6	6	7	7	2	2	3	2	0	40
<i>Mycobacterium species</i>	2	7	1	4	3	3	8	0	1	0	29
<i>Mycobacterium fortuitum</i> complex	8	4	1	1	4	1	4	1	1	4	29
<i>Mycobacterium paragordoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	8	5	4	17
<i>Mycobacterium chelonae</i> complex	1	1	1	0	0	3	2	3	2	1	14
<i>Mycobacterium mucogenicum/phocaicum</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4	8
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	2	1	1	0	2	0	0	1	0	1	8
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	6
<i>Mycobacterium szulgai</i>	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	4
<i>Mycobacterium terrae</i>	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	4
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	3
<i>Mycobacterium shinjukuense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Mycobacterium xenopi</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>Mycobacterium insubricum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Mycobacterium septicum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
総計	111	115	77	61	82	75	101	91	75	66	854

性、培養にて発育を認めなかった場合は、MGIT による培養を 8 週間まで延長した。

菌種同定法

同定検査はエスアールエルに外部委託した。2012 年 1 月から 2019 年 3 月までは、コバス TaqMan MAI (ロシュ・ダイアグノスティック) および DDH 法 (極東製薬工業) により同定を実施した。DDH 法では培養菌 (固形培地より白金耳半〜1 ループ分の菌) をガラスビーズ入り溶菌チューブに入れて分散させ、添付試薬を用いて DNA を抽出した。次に標識試薬を 100 μ L 加え 10 分間光照射し DNA を標識後、DNA 変性試薬を用いて DNA を一本鎖にした。更に基準株由来 DNA を固定したマイクロプレートに標識 DNA を加え、一定温度で 2 時間保温し DNA を結合させた後、余分な DNA を洗浄し、プレートに結合している DNA に発色酵素液を加えた。最後に保温、洗浄、発色基質液を加え室温で反応させた後、発色 (吸光度) を測定し、算出した相対類似度と合わせて菌種判定を行った。2019 年 4 月から 2021 年 12 月までは、TRCReady MAC (東ソー) と MALDI-TOF MS を併用した。MALDI-TOF MS は MALDI バイオタイパー (ライブラリー Ver. 5.0, プルカー・ダルトニクス) にて行った。

統計処理

菌種および分離数について 2018 年以前と 2019 年以降で比較を行った。カイ 2 乗検定を実施し、必要に応じて Yates の補正を行った。P<0.05 を以て有意差ありとした。

倫理的配慮

本研究は既存の資料を再解析したものであり、臨床情報を利用してないことから研究倫理審査の対象とならない。

結 果

抗酸菌分離菌数

2012 年から 2021 年までの 10 年間に 854 株の NTM が分離されていた。2012~2018 年 (7 年間) の分離数は 622 株であり、2019~2021 年 (3 年間) は 232 株であった。*Mycobacterium avium* が 414 株 (48.5%), *Mycobacterium intracellulare/chimaera* が 114 株 (13.3%) であった (図 1)。*Mycobacterium avium/intracellulare* complex (MAC) としては 528 株が分離され、全体の 61.8% を占めた。*Mycobacterium gordonae* 118 株 (13.8%) と *Mycobacterium abscessus* species 40 株 (4.7%), *Mycobacterium kansasii* 40 株 (4.7%) がこれに続いた。*M. avium* と *M. intracellulare/chimaera* の比率の年毎の平均値は 3.9 ± 1.3 であった。

抗酸菌種の経年変化

経年変化については、1 年間当たりの同定菌種が 2018 年以前は平均 8.6 菌種、2019 年以降は平均 11.7 菌種であり、DDH 法と比較して MALDI-TOF MS の利用により、同定される菌種に変動がみられた ($p=0.317$)。MAC 以外の菌種の割合について 2018 年以前と 2019 年以降を比較すると、平均 35.7% から平均 45.0% に増加していた ($p=0.018$) (図 2)。*Mycobacterium paragordoniae* は、2018 年以前は 0 株、2019 年以降は 17 株 ($p<0.0001$)、*Mycobacterium lentiflavum* は、2018 年以前は 0 株、2019 年以降は 6 株であり、分離数が増加した ($p<0.0001$) (表 1)。同定不能であった *Mycobacterium species* は、2018 年以前は 28 株、2019 年以降は 1 株であり、同定不明数が有意に減少した ($p=0.007$)。

呼吸器系検体と肺外検体の差異

膿 (皮膚) 2 件より *M. abscessus* species, 創部 (腹膜透析カテーテル出口部) 1 件より *Mycobacterium fortuitum* complex が検出されていた。呼吸器系検体では MAC が優位

(61.8%)を占めたが、膿や創部からは迅速発育抗酸菌が検出されていた(100%)。

考 察

本研究では当院における10年間のNTM分離状況を調べた。日本国内でのNTM分離頻度の報告は、MACが約90%と最も多く、続いて*M. kansasii*、*M. abscessus* speciesの順で検出されている³⁾。それに対して当院のNTM分離頻度は、MACが約60%を占め、次に*M. gordonae*が多く、続いて*M. abscessus* speciesと*M. kansasii*が検出されていた。MACが優位を占める傾向に違いはなかったが、約60%と低い割合となった。他の報告ではMACの分離頻度は約65~90%となっており^{8)~10)}、当院のMAC分離頻度の低さが目立った。原因は不明であるが、他の菌種が相対的に多いことが理由の一つとして考えられた。九州や東南アジアではMACの分離頻度が低く、*M. abscessus* speciesの分離頻度が高いとする報告もあり¹¹⁾¹²⁾、地域的な類似性や温暖化の影響などが考えられ、今後の日本全体のNTM感染症の流行状況を先取りしている可能性が考えられた。

また、*M. gordonae*が高い割合で検出されていた。当院同様*M. gordonae*がMACに続いて高頻度に分離されている報告がある¹³⁾が、当院では、外来患者に採痰容器を渡し、自宅にて採取した喀出痰を提出する運用となっており、検体採取時の検体への混入が一因と考えられた。*M. gordonae*は自然界に広く存在するだけでなく、水道水や環境にも存在しており、今回の分離株の中にはこのような汚染菌として分離されたものが含まれるため、割合が高くなっていたと考えられた。ただし、入院患者における*M. gordonae*の分離頻度も外来患者と同様であり、院内環境での汚染も考えられた。病院内で*M. gordonae*の汚染を報告した論文もあるため、当院でも検討の必要性が考えられた。

非病原性と考えられる*M. gordonae*の分離が多くある一方、MALDI-TOF MSによって同定された稀少菌種について病原性の有無が問題となる。今回の検討で分離された稀少菌種の臨床的病原性は確認していないが、近年稀少菌種の感染を示した論文が多数報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。環境菌であるNTMの病原性は一概に決められないものの、稀少菌種でも明らかな起炎性を示す場合があり、病態も異なる。また、中にはMALDI-TOF MSで*Mycobacterium* spp.と判定され、詳細なゲノム解析の結果として新種と同定されたものもある。これらはMALDI-TOF MSによる同定の有用性を示す結果であり、稀少菌種については今後も情報の収集・蓄積が必要と思われた。

NTM分離の多くは呼吸器系検体であった。呼吸器系検体ではMACが優位を占めたが、肺外検体においては迅速発育抗酸菌が検出されており、分離される抗酸菌種に差がみられた。皮膚、軟部組織感染症の原因菌として、*M. abscessus* species、*M. chelonae*、*M. fortuitum* complex、*M. marinum*などが挙げられる¹⁶⁾。

NTMの菌種同定は、感染症としての病原性の判断や薬剤選択から迅速性が要求されている。菌種同定にはDDH法が使用されていたが、同定可能な菌種が18菌種であり、十分とは言えなかった。MALDI-TOF MSの利用により同定菌

種が大幅に拡大した(2022年時点で182菌種)。同定菌種には患者背景の変化の可能性もあり、一概にMALDI-TOF MSの効果と帰結することは難しいが、これまで単に抗酸菌として報告されていたものが減少していることから考えると、MALDI-TOF MSによる同定菌種増加の効果はあるものと考えられた。

MALDI-TOF MSに変更後、*M. lentiflavum*の分離数が増加した。*M. lentiflavum*が*M. intracellulare*に偽陽性を示すことが報告されている¹⁷⁾。MALDI-TOF MSの同定精度は遺伝子解析と比較しても良好であることが報告されている¹⁸⁾。臨床的に稀なNTMの確定には、MALDI-TOF MSによる同定が重要であると思われた。MALDI-TOF MSの利用により、これまでに同定されていない稀少菌種が増加していることから、臨床的に菌種情報を応用するため、薬剤感受性試験情報などの治療に有用な情報を蓄積するための基礎が構築されたと考えられた。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Morimoto, K, K Iwai, K Uchimura, et al. 2014. A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan. *Ann Am Thorac Soc* 11: 1-8.
- 2) LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.net/index.html>.
- 3) Namkoong, H, A Kurashima, K Morimoto, et al. 2016. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan. *Emerg Infect Dis* 22: 1116-1117.
- 4) Kusunoki, S, T Ezaki, M Tamesada, et al. 1991. Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* 29: 1596-1603.
- 5) 阿部千代治, 鹿住祐子, 深澤 豊, 他. 1991. ACCU PROBEによる抗酸菌の同定. *臨床と微生物* 18: 557-561.
- 6) 大楠清文. 2017. 質量分析法による菌種の迅速同定. *医学のあゆみ* 263 (13): 1211-1217.
- 7) 日本結核・非結核性抗酸菌症学会抗酸菌検査法検討委員会. 2020. 抗酸菌検査ガイド2020, 日本結核・非結核性抗酸菌症学会. 南江堂.
- 8) 新井裕司, 岩田香恵, 火石あゆみ, 他. 2012. 市中大学病院における過去30年間の抗酸菌分離状況: 微生物検査室からの報告. *日臨微誌* 22: 263-271.
- 9) 園田明子, 小原知美, 大竹暁子, 他. 2014. 当院における抗酸菌検出状況について. *医学検査* 63: 779-785.
- 10) 阿部水穂, 村松志保, 赤澤博美, 他. 2018. 当院検査室における抗酸菌検査動向調査. *医学検査* 67: 779-784.
- 11) Morimoto, K, N Hasegawa, K Izumi, et al. 2017. A Laboratory-based Analysis of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in Japan from 2012 to 2013. *Ann Am Thorac Soc* 14: 49-56.
- 12) Simons, S, J van Ingen, PR Hsueh, et al. 2011. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. *Emerg Infect Dis* 17: 343-349.

- 13) 角田拓也, 橋本郷美, 真柴新一, 他. 2019. 非結核抗酸菌の検出状況と薬剤感受性の年次推移. 日臨微誌 29: 215-221.
- 14) Inagaki, K, M Mizutani, Y Nagahara, et al. 2016. Successful Treatment of Peritoneal Dialysis-related Peritonitis due to *Mycobacterium iranicum*. Intern Med 55 (14): 1929-1931.
- 15) 大村春孝, 加治木章, 池亀 聡, 他. 2012. 金属加工労働者から検出された *Mycobacterium immunogenum*. 結核 87: 341-344.
- 16) Koh, W-J. 2017. Nontuberculous mycobacteria-overview. p. 655-661, In: Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections, 7th ed. ASM Press.
- 17) 戸田宏文, 山口逸弘, 鹿住裕子, 他. 2013. 環境由来 *Mycobacterium lentiflavum* に対するコバス TaqMan MAI 偽陽性反応の検討. 感染症学雑誌 87: 215-217.
- 18) 鈴木弘倫, 吉田 敦, 樽川友美, 他. 2016. 比較的まれな非結核性抗酸菌臨床株を対象とした MALDI-TOF MS による同定性能の評価. 日臨微誌 26: 105-111.

Isolation frequency and chronological change of non-tuberculosis mycobacteria in Kawasaki Municipal Ida Hospital

Yuki Sekine¹⁾, Hitomi Kikuchi¹⁾, Kenta Sasaki¹⁾, Shuhei Kobanawa¹⁾, Satoshi Mitarai²⁾, Kazumi Nishio³⁾

¹⁾Department of Laboratory, Kawasaki Municipal Ida Hospital

²⁾Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

³⁾Department of Respiratory Medicine, Kawasaki Municipal Ida Hospital

Background: The use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) enables detailed identification of bacterial species, notably difficult to identify mycobacterial species. **Purpose:** To assess the detectability of non-tuberculosis mycobacteria (NTM) at Kawasaki Municipal Ida Hospital from 2012 to 2021, and clarify the detection status and transition of NTM. **Results:** Total 854 NTM isolates were isolated from clinical specimens during the study period, among which *Mycobacterium avium*/intracellulare complex (MAC, 528 isolates) accounted for 61.8% of the total isolates, followed by *Mycobacterium gordonae* (118 isolates, 13.8%), *Mycobacterium abscessus* species (40 isolates, 4.7%), and *Mycobacterium kansasii* (40 isolates, 4.7%). During the period of investigation, the identification method was changed from the DNA-DNA hybridization to MALDI-TOF MS, which increased the number of bacterial species identified, including the rare bacterial species such as *Mycobacterium paragordonae*, *Mycobacterium lentiflavum*, and *Mycobacterium mucogenicum*. **Discussion:** MALDI-TOF MS enables the identification of rare bacterial strains, and thus, can make important contributions in clinical settings, such as facilitating the selection of effective drugs.