

皮膚から分離された *Mycobacterium shinshuense* の細菌学的解析

¹鹿住 祐子 ¹大友 幸二 ¹高橋 光良 ¹御手洗 聡
¹菅原 勇 ²和泉 純子 ²安藤 昭子 ³長谷川秀浩

要旨：〔目的〕同定困難であった *Mycobacterium shinshuense* の細菌学的解析を行った。〔対象と方法〕37歳女性，右下肢皮膚潰瘍より分離された抗酸菌（被検株753）と *M. marinum* (ATCC 927), *M. ulcerans* (ATCC 19423), *M. shinshuense* (ATCC 33728) を DDH, 16S rRNA 法, *rpoB* 法, 薬剤感受性試験, 生化学的・生物学的検査を用いて比較した。〔結果〕DDH 法によって上記の4株は *M. marinum* として判定されたが, 遺伝子配列の検索方法 (16S rRNA 法・*rpoB* 法) ではこの被検株 (753) が3菌種のうち, いずれであるかを決定できなかった。しかし, 16S rRNA 法の中の Portaels⁴⁾らの方法によってこの3菌種を分類することが可能であった。この方法によって被検株 (753) は *M. shinshuense* と同定された。薬剤感受性試験と生化学的・生物学的性状検査においても被検株は *M. shinshuense* と同定された。〔考察〕DDH にて *M. marinum* と同定された抗酸菌で, 発育条件が28℃培養で2週間かかり, 暗所培養にて黄色のコロニーを形成する Scotochromogen であった場合, 塩基配列レベルの検査と従来法の実施が必要である。

キーワード：*Mycobacterium shinshuense*, Skin ulcer, DDH, 16S rRNA 法, *rpoB* 遺伝子

はじめに

Mycobacterium shinshuense は1982年に御子柴・東村らによって *Mycobacterium ulcerans* 類似菌として発表された暗発色の抗酸菌である¹⁾。細菌学的・臨床的な研究は, 東村・御子柴によって計数分類・DNA homology analysis が行われ, 信大株は現在, ATCC 33728 として保存されている²⁾。病変が類似している *M. ulcerans* は, アフリカ諸国にて重篤な皮膚潰瘍を引き起こす細菌として知られている³⁾。*M. shinshuense* も皮膚に潰瘍を形成する。*M. shinshuense* と *M. ulcerans* を分けるために, 東村は DNA ハイブリダイゼーションでは分類できないが, ミコール酸組成によって分類できると報告した。しかし, 今回, われわれは Portaels⁴⁾らの16S rRNA 法を用い, 1248, 1289, 1450 から1452番目に位置する塩基を検査し, 同時に, 確認として従来法を用いた。

今回, 著者らは, 新潟県長岡中央総合病院皮膚科患者

37歳女性の皮下潰瘍組織から分離された抗酸菌の同定を試み, 本邦2例目の *M. shinshuense* と同定しえたので報告する。

材料と方法

材 料

37歳女性, 右下腿皮膚潰瘍より分離された菌 (被検株753) と *M. marinum* (ATCC 927), *M. ulcerans* (ATCC 19423), *M. shinshuense* (ATCC 33728) を用いて比較した。

DNA-DNA ハイブリダイゼーション法

日本では抗酸菌の同定法として DNA-DNA ハイブリダイゼーション法: DDH マイコバクテリア極東 (極東製薬)⁵⁾ が広く使われている。キットに添付している使用説明書に従い, 上記の対象株について同定を実施した。このキットで同定可能な菌種は *M. tuberculosis* complex, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gastri*,

¹結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター, ²新潟県厚生連長岡中央総合病院, ³新潟県厚生連病理センター

連絡先: 鹿住祐子, 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科, 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: kazumi@jata.or.jp)

(Received 26 Apr. 2004 / Accepted 27 May 2004)

M. xenopi, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. peregrinum* の全 18 菌種である。判定には 630 nm での吸光度で測定し、感度 1.9 倍以上、相対類似度 70% 以下のものを同定結果とした。

DNA Sequence 法

• 16S rRNA 法

次に塩基配列検索法として世界的に使われている 16S rRNA 法⁶⁾を行った。対象となる各菌株について、卵培地発育菌 1 エーゼ (3 mm のエーゼにて 1 loopful) を滅菌蒸留水 500 μ l に浮遊させ、95°C にて 10 分間加温した。10,000 rpm にて 10 分間遠心後、上清のゲノム DNA 2.5 μ l を用いて PCR の反応を行った。PCR 反応には 10 倍 Buffer 5 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, 滅菌蒸留水 38 μ l, Ampli taq Gold (Roche diagnostics, 東京) 0.5 μ l (2.5 units), プライマー 2 μ l を混和して反応溶液とした。増幅にはプライマー 264 (5'-TGACACAGGCCACAAGGA-3') およびプライマー 285 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') を各々 3.2 pmole 使用した。PCR 反応条件は、denaturation は 94°C 30 秒, annealing 温度は 60°C 30 秒間, extension 72°C を 1 分 30 秒間, 40 サイクル行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて確認後、精製はスピンカラム (SUPREC TM-02, TAKARA, TAKARA SHUZO Co., LTD) を用いた。ダイレクトシーケンスはプライマー 285 と Big Dye terminator (ABI 4303153 Big Dye Terminator cycle Fs Ready Reaction Kit 1000) を用いて ABI 310 にて実施し、得られた塩基配列データは Ribosomal Differentiation of Microorganisms: RIDOM⁷⁾ で塩基配列の相同性を検索し、98% 以上の塩基配列一致をもって菌種を決定した。

さらに同じ 16S rRNA 法にて *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. shinshuense* を分けるため Portaels⁴⁾ の方法を用い、別の領域を検査した。PCR のプライマーは 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 5'-AGGAATTCTGGGTTTGCATGCACAGGA-3' で行い、シーケンスは 5'-TCATGTTGCCAGCACGTAATGGT-3', 5'-ATCGCAGATCAGCAACGC-3', 5'-GATTACTAGCGACTCCGA-3' の 3 種類を使用した。

• *rpoB* 法⁸⁾⁹⁾

塩基配列をさらに詳しく調べるために韓国の Kim らの提案した *rpoB* 法 (*rpoB* は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼをコードしている遺伝子であり、菌種によって遺伝子学的多型性を持っていることが報告されている) を行った。ゲノム DNA の作製と PCR 反応溶液は 16S rRNA に準じた。*rpoB* の増幅にはプライマー P1 (5'-CGACCACTTCGGCAACCG-3') およびプライマー P2 (5'-TCGATCGGGCACATCCGG-3') を各々 3.2 pmole 使用した。

PCR 反応条件は、denaturation は 1 分, annealing 温度は 66°C で 1 分間, extension 72°C を 1 分間, 40 サイクル行った。PCR 産物を確認後、精製はスピンカラムを用い、ダイレクトシーケンスはプライマー P1 と P2 それぞれと Big Dye terminator を用いて ABI 310 にて実施した。*rpoB* については ATCC 標準株を用いて当研究所で作成した *rpoB* のデータベースと GENETYX-PDB Ver.4.1 (Software development 社) を使用して相同性を検索し、99% 以上の塩基配列一致をもって菌種を決定した。

• *rpoB* Myco-ID¹⁰⁾

7H9 培地で培養、集菌した抗酸菌を、95°C 15 分 boil した。遠心分離後、上清 5 μ l を用いて、プライマー, thermal cycler を用いて、*rpoB* 遺伝子増幅産物 (360 bp) を得た。この産物を制限酵素 *Msp* I と *Hae* III で切断した後、15% ポリアクリルアミド電気泳動を行って、遺伝子断片の大きさを比較検討した。

• 従来法による生化学的・生物学的検査法

最終確認は生化学的・生物学的方法²⁾¹¹⁾にて行った。コロニーの形態は培地上の色調とスムーズおよびラフ型により分類し、発育速度と発育温度域は直径 3 mm のエーゼを用い、半エーゼのコロニーを滅菌蒸留水に浮遊させ 100 倍希釈し、その 0.1 ml を 1% 小川培地に接種し、28°C・37°C・42°C にて培養した。培養温度別に、3 日・5 日・7 日・10 日・2 週間・3 週間・4 週間・6 週間ごとにコロニーの形成を観察し、5 日以内を迅速菌とし、7 日は中間型、10 日以上を遅発菌とした。

光発色試験は被検菌を 1% 小川培地 2 本に接種し、遮光して十分発育した後、1 本に光を当て (60 ワット 1 時間)、再度 1 晩 37°C にて培養した。翌日、暗所培養のコロニーとの比較により色素を確認した。

薬剤感受性試験は各薬剤の濃度を 1% 小川培地に含有させ、菌浮遊液はマクファーランド 0.1 を滅菌蒸留水にて 100 倍希釈し、対照培地と薬剤含有培地に接種・28°C で培養した。Urease 水解試験、ナイアシンテスト、アリルスルファターゼ試験は東村の方法に従った。

病原性試験

Hartley 雌モルモットに被検株 2×10^6 CFU を皮下接種した。7 週間後、解剖して病理標本を作製し、病変の有無を調べた。

結 果

1% 小川培地発育菌を用いて行われた DDH は 4 株ともに *M. marinum* と判定された。これは東村も *M. ulcerans* と *M. shinshuense* は DNA homology 分析で分けることはできないとしている²⁾¹²⁾。

シーケンスの結果、16S rRNA 法によって被検株 753 は *M. marinum*: ATCC 927, *M. ulcerans*: ATCC 19423, *M.*

Table Characteristics of our clinical isolate and reference strains

	<i>M. marinum</i> ATCC927	<i>M. ulcerans</i> ATCC19423	<i>M. shinshuense</i> ATCC33728	Clinical isolate 753
Growth Rate	5 days	6 weeks	2 weeks	2 weeks
Growth at 37°C	+	—	—	—
Growth at 28°C	+	+	+	+
Rough colonies	Smooth	Rough	Smooth	Smooth
Photochromogen	Photochromogen	Nonphotochromogen	Scotochromogen	Scotochromogen
Colour of colony	Yellowish	Grayish white	Yellowish	Yellowish
Resistance to ethambutol, 5 µg/ml	S	S	R	R
Resistance to rifampicin, 25 µg/ml	S	S	S	S
Resistance to isoniazid, 10 µg/ml	S	R	S	S
DNA-DNA Hybridization (DDH)	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>
Urease	+	—	—	—
Niacin test (28°C)	+	—	—	—
Arylsulfatase 3 days	+	—	—	—
Arylsulfatase 14 days	+	—	—	—

S: Sensitive R: Resistance

shinshuense: ATCC 33728 と 98.51% の一致でこれらの 3 菌種と同種であると判定された。

同じ 16S rRNA 法であるが Portaels らの方法では塩基配列の 1248 の position に *M. marinum* は A (adenine), *M. ulcerans* は G (guanine), *M. shinshuense* は G, 被検株は G であった。1289 の position において *M. marinum* は A, *M. ulcerans* は C (cytosine), *M. shinshuense* は G, 被検株は G であった。この方法によって被検株は *M. shinshuense* と同定された。

rpoB 法では被検株 753 は *M. marinum*: ATCC927 と 99.3%, *M. ulcerans*: ATCC 19423 と 99.3%, *M. shinshuense*: ATCC 33728 と 99.7% となり, 99.0% 以上の塩基配列の一致で同種と決定するこの方法では決定できなかった。

従来法による検査結果は Table のとおりである。発育速度は *M. marinum* は 5 日間, *M. ulcerans* は非常に発育が遅く 6 週間かかった。*M. shinshuense* と被検株は 2 週間であった。発育温度域は 4 株ともに 37°C では困難で, 28°C で旺盛な発育を示した。さらに光発色性は *M. marinum* は光を当てた時にコロニーが黄色に着色する Photochromogen, *M. ulcerans* は光に関係なく着色しない Nonphotochromogen, *M. shinshuense* と被検株は暗所培養でもコロニーに着色が見られる Scotochromogen であった。生化学的性状では, *M. marinum* は Urease 水解試験陽性, ナイアシンテスト陽性 (28°C 培養菌使用), アリルスルファターゼ陽性で *M. ulcerans*, *M. shinshuense* から分けることができた。*M. ulcerans* は EB 5 µg/ml 感性, INH 10 µg/ml 耐性, *M. shinshuense* は EB 5 µg/ml 耐性, INH 10 µg/ml 感性であった。

rpoB Myco-ID では, 105, 70, 60, 45, 40 bp のバンドが *M. ulcerans*, *M. shinshuense* で認められた。被検株では制限酵素 *Msp* I で切断したとき, これら以外に 180 bp に

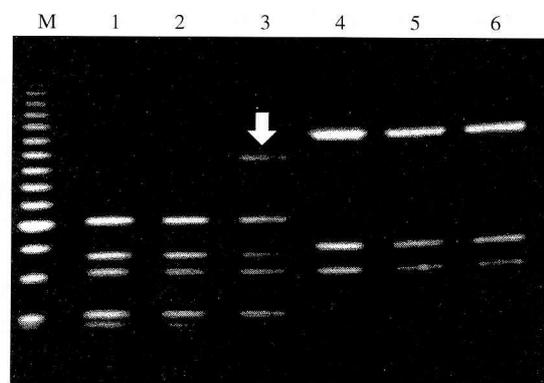


Fig. *rpoB* Myco-ID analysis of *M. ulcerans* (ATCC 19423), *M. shinshuense* (ATCC 33728) and clinical isolate 753.

Lane M: size marker, Lane 1, 4: *M. ulcerans* (ATCC19423), Lane 2, 5: *M. shinshuense* (ATCC 33728), Lane 3, 6: Clinical isolate (753), Lane 1, 2, 3: digestion with *Msp* I, Lane 4, 5, 6: digestion with *Hae* III

バンドが見られた (Fig. の矢印)。

被検株をモルモットに皮下投与したとき, 当該皮膚に浅い潰瘍を形成し, 肺, 脾などに肉芽腫は形成されなかった。

考 察

日本の臨床検査室では, 抗酸菌の同定には DDH が多く使われている。しかし, 今回の *M. shinshuense* のように *M. marinum* として判定される菌種がある。DDH によって *M. marinum* と判定され, 28°C 培養で 2 週間かかり, 暗所培養で黄色いコロニーを作る場合, 遺伝子配列 (シーケンス) と *rpoB* Myco-ID, さらに確認として薬剤感受性試験と生化学的・生物学的性状検査の実施が有用である。

興味あることに、被検株の *rpoB* Myco-IDによる検討で、180 bpのバンドが新たに見つかった。部分的に、配列の違いが示唆され、今後、さらに検討する必要がある。

*M. shinshuense*の病理性試験は、動物を用いて行われていなかった。今回、モルモットを使用して検討したところ、皮膚に浅い潰瘍を作るのみで、肺、脾、肝、リンパ節に肉芽腫が認められなかった。このことから、*M. shinshuense*の病原性は低いと推察される。今後、*M. shinshuense*の宿主に対する反応を、詳細に調べる必要がある。

文 献

- 1) 御子柴甫： *Mycobacterium ulcerans*類似菌による非定型抗酸菌の1例。日本皮膚科学会雑誌。1982；92：557-565.
- 2) 東村道雄：日本人女性に皮膚潰瘍を作った *Mycobacterium ulcerans* 類似菌。結核。1989；64：691-697.
- 3) van der Werf TS, van der Graaf WT, Tappero JW, et al.: *Mycobacterium ulcerans* infection. Lancet. 1999；354(9183)：1013-1018. Review.
- 4) Portaels F, Fonteyne PA, de Beenhouwer H, et al.: Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. J Clin Microbiol. 1996；34：962-965.
- 5) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 1991；29：1596-1603.
- 6) Springer B, Stockman L, Teschner K, et al.: Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J Clin Microbiol. 1996；34：296-303.
- 7) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al.: Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 2001；39：3637-3648.
- 8) Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, et al.: Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 1999；37：1714-1720.
- 9) Kim BJ, Lee KH, Park BN, et al.: Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 2001；39：2102-2109.
- 10) Lee H, Park HJ, Cho SN, et al.: Species identification of *Mycobacterium* by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. J Clin Microbiol. 2000；38：2966-2971.
- 11) Tsukamura M: A review of the methods of identification and differentiation of mycobacteria. Rev Infect Dis. 1981；3：841-861. Review.
- 12) 東村道雄： *Mycobacterium ulcerans* 及び *M. haemophilum* による感染症。結核。1988；63：433-439.

MYCOBACTERIUM SHINSHUENSE ISOLATED FROM CUTANEOUS ULCER LESION OF RIGHT LOWER EXTREMITY IN A 37-YEAR-OLD WOMAN

¹Yuko KAZUMI, ¹Koji OHTOMO, ¹Mitsuyoshi TAKAHASHI, ¹Satoshi MITARAI, ¹Isamu SUGAWARA, ²Junko IZUMI, ²Akiko ANDOH, and ³Hidehiro HASEGAWA

Abstract [Purpose] Second clinical infection case of *Mycobacterium shinshuense* was presented, we tried the identification of *M. shinshuense* that is isolated from skin.

[Object] Mycobacteria species isolated from cutaneous ulcer lesion of right lower extremity in a 37-year-old woman.

[Method] Identification by DNA-DNA Hybridization, 16S rRNA and *rpoB* method as genomic level and conventional method.

[Result] It did not grow on 1% Ogawa's slant medium at both 37°C and 42°C, but grew at 28°C. It formed yellowish colonies in the dark. It was difficult to distinguish *M. shinshuense* from *M. ulcerans* and *M. marinum* by DNA-DNA hybridization (DDH) and DNA sequencing. To identify that it is *M. shinshuense*, growth rate, temperature range of mycobacterial growth, light coloration reaction, biochemical and biological tests, and drug susceptibility testing were further explored. Finally it was identified as *M. shinshuense* based on these results.

[Consideration] For Mycobacteria species which grow 2 weeks after inoculation at 28°C, and which is identified as *M. marinum* by DDH method, it is necessary to identify with sequence and conventional method.

Key words: *Mycobacterium shinshuense*, Skin ulcer, DDH, 16S rRNA method, *rpoB* gene

¹Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis (RIT), Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), ²Nagaoka General Central Hospital, JA Niigata-ken Kouseiren, ³Pathology Center, JA Niigata-ken Kouseiren

Correspondence to: Yuko Kazumi, TB Information Division (Molecular Epidemiology & Genetic Identification), Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: kazumi@jata.or.jp)