

肺 *Mycobacterium avium* 症の家族内発症例に対する IS1245 をプローブとした分子疫学的検討

¹桑原 克弘 ²渡辺 靖 ¹和田 光一 ¹土屋 俊晶

要旨：〔目的〕肺 *M. avium* 症は増加傾向にある非結核性抗酸菌症であるが感染様式は未だ明確ではない。家族内で *M. avium* に感染した3家族を経験し、その感染菌株が同一株であるか否かを検討した。〔方法〕3家族9例（うち肺 *M. avium* 症6例）に対し *M. avium* の DNA 多型マーカーである IS1245 をプローブとした RFLP 分析を用いて分子疫学的検討を行った。〔結果〕家族内発症の9例は、同じ家族内でも症例それぞれで異なる菌株であった。一部の症例では複数菌株が混在、再感染が起きていると考えられた。また陰影のない未発症の患者家族からも *M. avium* は分離され、家庭環境によっては曝露が日常的に起きている可能性が示唆された。〔考察〕家族内発症は菌の毒力の要因よりは遺伝的抗酸菌免疫力、局所の抵抗力の減弱、環境の要因が大きいと推察される。

キーワード：アビウム菌、家族内肺感染症、制限酵素断片長多型、挿入断片 1245

はじめに

結核症においては結核菌ゲノム中の遺伝子挿入配列 IS6110 をプローブとした制限酵素断片長多型 (RFLP: restriction fragment length polymorphism) 分析が一般化され集団感染、家族内感染などにおいて感染経路の推定や感染範囲の特定といった疫学分析に応用されている。

一方、近年増加傾向にある MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex) 症ではヒトからヒトへの感染はないとされ、環境が主たる感染源であると考えられているが詳細な感染様式はいまだ不明である。近年 *M. avium* では DNA 多型マーカーとして IS1245 が報告され RFLP 分析により疫学的分析が可能となっている¹⁾。IS1245 は結核菌における IS6110 と同じような遺伝子挿入断片で *M. avium* のそれぞれの菌株のゲノム上にランダムに挿入されており、*M. intracellulare* には存在しないという特徴を有している。

われわれは既に肺 *M. avium* 症において多クローン性感染がしばしばあることを報告しており、一部の肺 *M. avium* 症では環境から頻りに曝露、再定着していると考えている²⁾。

今回、接触歴の濃厚な *M. avium* 症の同時発症家族例を3組経験しており、従来ヒトからヒトへの感染はほとんどないとされている *M. avium* 症において菌株が同一か否かを検討するため IS1245 を用いた RFLP 分析を行った。

対象と方法

対象は独立行政法人国立病院機構西新潟中央病院で経験した肺 *M. avium* 症の家族例3組9例。

家族1 (症例1, 2)

症例1は84歳女性で、1998年より左上葉に空洞を伴う浸潤影を認め、複数回 *M. avium* を検出している。症例2は52歳女性で症例1の実娘で日常的に接触がある。1998年の検診で中葉、舌区中心に粒状影、斑状影を認め複数回 *M. avium* を分離している。

家族2 (症例3, 4)

症例3は71歳女性で、肺結核後遺症に伴う *M. avium* 症と診断され気管支拡張症で呼吸不全となっている。症例4は73歳女性で症例3の姉で20年以上同居しており、同じく結核後遺症に伴う *M. avium* 症で気管支拡張症、呼吸不全と診断されている。両者とも喀痰で反復して *M. avium* を検出している。

独立行政法人国立病院機構西新潟中央病院¹呼吸器科、²検査科

連絡先：桑原克弘，独立行政法人国立病院機構西新潟中央病院呼吸器科，〒950-2085 新潟県新潟市真砂1-14-1

(E-mail: kuwabara@masa.go.jp)

(Received 5 Jul. 2004/Accepted 9 Aug. 2004)

家族3 (症例5, 6, 7, 8, 9)

症例5は79歳女性。両側に空洞を伴う陰影あり、多量排菌。症例6は症例5の夫で85歳男性、血縁関係はない。肺結核後遺症に伴う気管支拡張症型で2回の排菌有り。

症例7, 8, 9は同居している孫で7歳女兒, 8歳女兒, 12歳男児である。この3例は当初結核の家族内発症を疑われ検診した際に胃液を採取し、すべて *M. avium* 陽性であったがその後の画像検査では陰影は認めていない。

RFLP分析は Soolingen らによって標準法として提唱された方法をもとに行った³⁾。DNA抽出後、*Pvu* IIで切断しアガロースゲル電気泳動を行いナイロンフィルターに転写、固定した。IS1245プローブはPCR法で作成しサザンハイブリダイゼーションを行いECL labeling and detection kit (Amersham)を用いた化学発光で多型バンドを検出し比較した。

また一部の症例では分離時期を変え複数回採取し、継代、サブクローン化したうえで検討した。

結 果

家族1 (Fig. 1)

画像では症例1は空洞を伴う肺結核類似型を示し、症

例2は中葉舌区型で臨床病型が異なる。RFLP分析では症例1と2は明らかに異なる菌株で症例2はサブクローン化で異なる遺伝子型を有し多クローン性感染と判断される。

家族2 (Fig. 2)

画像では症例3, 4とも結核後遺症に伴う気管支拡張症型である。両者のRFLPパターンも明らかに異なり症例3では喀痰の採取時期でパターンが変化しており、感染クローンの交代が認められる。一方、症例4は時期を変えてもバンドが1本のパターンで変化を認めない。

家族3 (Fig. 3)

家族3の症例5, 6も同じく異なるパターンで同一菌による感染ではないと考えられる。症例7, 8, 9も症例5, 6とは異なるパターンである(症例9は多型バンドを持っていない)。この3例は未発症のコロナイズと考えられる。循環風呂などの高曝露環境は確認されなかったが家庭内で曝露、吸入機会が多いことが推測される。

考 察

MAC症の感染経路についてはヒトからヒトへの感染はなく環境、特に水回りや土壌がリザーバーとして重要

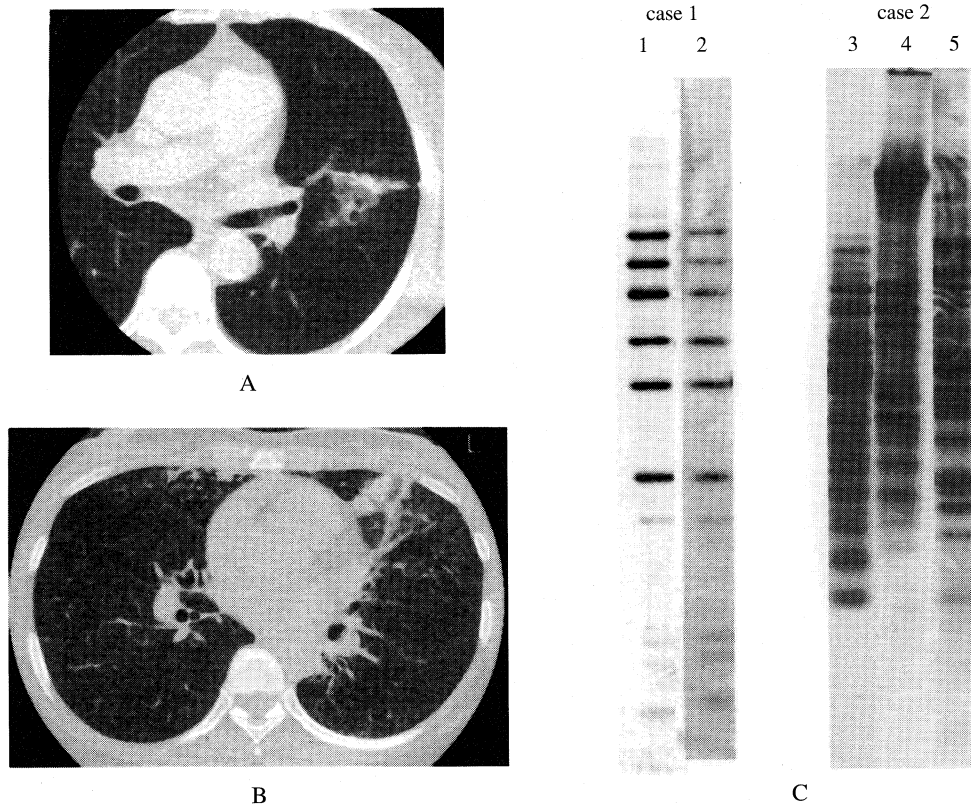


Fig. 1 (A) CT scan of case 1, (B) CT scan of case 2, (C) Lane 1, 2 RFLP patterns of subclones of isolate from case 1. Lane 3, 4, 5 RFLP patterns of subclones of isolate from case 2

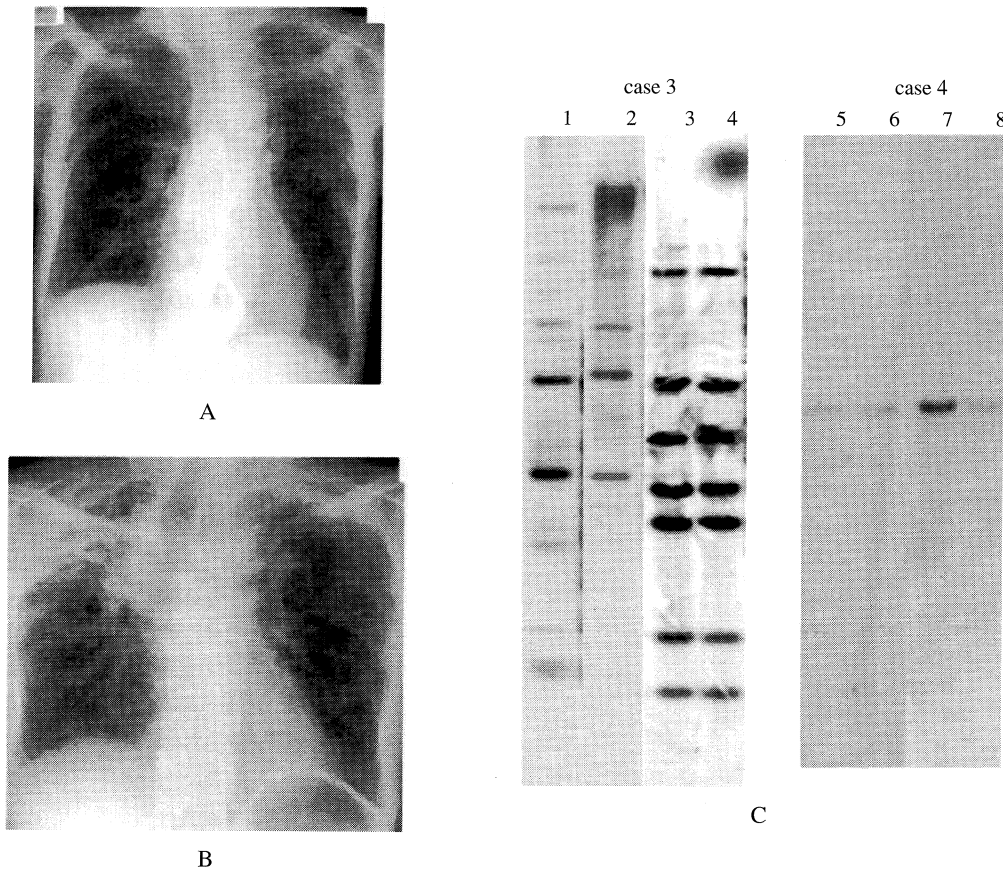


Fig. 2 (A) Chest radiogram of case 3, (B) Chest radiogram of case 4, (C) RFLP patterns of case 3, 4: lane 1, 2 subclones of isolate at 2000, lane 3, 4 subclones of isolate at 2001, lane 5, 6 subclones of isolate at 2000, lane 7, 8 subclones of isolate at 2001.

と考えられているが未だ明確ではない。感染経路の推定には分離菌を複数の型に分類し異同を推定する方法が以前よりなされている。従来 serotype を用いた分析が多かったが、IS1245 をプローブにした RFLP 分析は従来のパルスフィールド法などの他の RFLP 法と比較しても *M. avium* 症の疫学分析にきわめて有用であることを既に報告した。海外での IS1245 を用いた環境由来の *M. avium* 株での分析では豚からの分離株がヒトに類似している一方で、鳥類ではヒトではきわめて稀な 3 本の特有なパターンが多いことが知られている⁴⁾。従ってすべての環境菌がヒトにおけるリザーバーになるわけではなく環境のどこから生体内に定着するかは不明である。

今回、日常的に同居、接触している家族内で発症した 3 家族を経験し、同一菌株による家族内感染の可能性を検証するため RFLP 分析を行ったが、すべての家族内で異なる株による感染と考えられた。家族内発症の報告は稀で遺伝的免疫異常で播種型になった例の報告が散見される程度である。また家族例の DNA 多型マーカー分析の報告はパルスフィールド法により 2 家族 4 例で今回の検討と同じく異なる菌株を認めたという報告があるのみ

でほとんど検討されていない⁵⁾。

臨床像との関連では肺 *M. avium* 感染症について結核後遺症に伴う気管支拡張症型、中葉舌区型、結核類似型の 3 臨床病型でクローン構成に差異があり中葉舌区型ではしばしば同時多クローン性感染、経時的クローン交代が起きることを報告してきた²⁾。

今回の検討でも一部の症例では複数の菌株の混在、再感染が示された。気管支拡張症型や中葉舌区型では病変気管支局所の物理的排除能力、免疫力の減弱、あるいは抗酸菌特異免疫の障害があることが推察される。一般細菌と同様に MAC などの非結核性抗酸菌も吸入曝露を受ければ容易に定着、増殖する可能性が高く、日常的に曝露を受ければ複数のクローンが定着することは考えられる。同一菌株による発症がないという結果から MAC 症においては菌株の毒力の要素よりは宿主側の局所、全身免疫の低下といった要因の影響が強い可能性が示唆される。一方、一部の特に結核と鑑別を要するような空洞を伴う症例ではシングルクローンが感染、定着、増殖し病変を形成していると考えられ、病型として区別して考えるべきかもしれない。

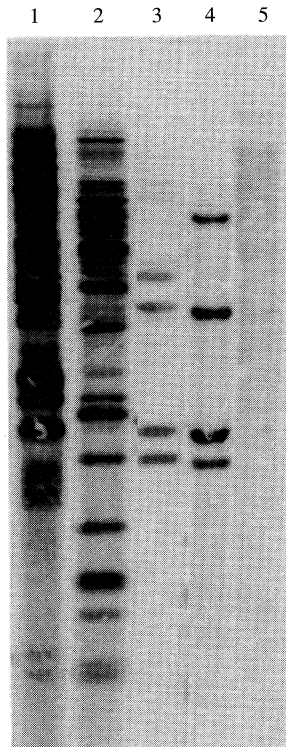


Fig. 3 RFLP patterns of family 3; lane 1 case 5, lane 2 case 6, lane 3 case 7, lane 4 case 8, lane 5 case 9.

また家族3で血縁のない夫婦，発病していない3例の患者家族小児で胃液から *M. avium* が分離されたことは曝露を受けやすい家庭環境（水回り，浴槽など）である可能性が考えられ興味深い。実際に循環風呂により家族内に皮膚感染が多発したという報告もあり⁶⁾，環境要因も大きいと考えられる。

一方，*M. avium* 症の直接的な発症の原因にはならなくとも反復する曝露のリザーバーとなり得ることは十分考

えられ，さらに検討が必要と考えられる。

ま と め

家族内発生例ではすべて菌株が異なっていた。家族内発生においては菌側の要因より宿主の気道の局所免疫，物理的排除能力の低下や遺伝的抗酸菌特異免疫の異常，曝露の多い生活環境といった要因が大きい可能性を示唆させる。

文 献

- 1) Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, et al.: A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. J Clin Microbiol. 1995; 33: 304-307.
- 2) 桑原克弘, 渡辺 靖, 和田光一, 他: IS1245を用いた肺 *Mycobacterium avium* 症の臨床病型と多クローン性感染の関連についての分子疫学的検討. 結核. 2004; 79: 39-46.
- 3) Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, et al.: IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: Proposal for standardization. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3051-3054.
- 4) Rittaco V, Kremer K, van der Laan J, et al.: Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. Int J Tubercle Lung Dis. 1998; 2: 242-251.
- 5) Tanaka K, Kimoto T, Matsumoto H, et al.: Familial Pulmonary *Mycobacterium avium* Complex Disease. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161: 1643-1647.
- 6) Sugita Y, Ishii N, Katsuno M, et al.: Familial cluster of coetaneous *Mycobacterium avium* infection resulting from use of a circulating, constantly heated bath water system. Br J Dermatol. 2000; 142: 789-793.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS BY IS1245
BASED RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM TYPING
ON CASES WITH PULMONARY *MYCOBACTERIUM AVIUM* DISEASE
OBSERVED IN THE SAME FAMILY

¹Katsuhiro KUWABARA, ²Yasushi WATANABE, ¹Koichi WADA, and ¹Toshiaki TSUCHIYA

Abstract [Introduction] *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) has become one of major human pathogens, however, its routes of transmission and environmental reservoirs causing human infection were not yet elucidated. We reported three families affected by pulmonary *Mycobacterium avium* (*M. avium*) disease. Previous reports on MAC diseases observed in the same family were very rare. The purposes of this study were to investigate whether the infected *M. avium* was the same strain among cases in the same family and to examine the possibility of human-to-human transmission, or infection from exposure to a common environmental reservoir.

[Methods] *M. avium* isolates from nine cases of three families were examined by DNA polymorphism based typing technique, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using insertion sequence IS1245 as a probe, to type the strains. Some isolates were subcultured to a single clone.

[Results] All strains isolated from cases in the same family showed different patterns by the RFLP analysis. And not only

simultaneous polyclonal infection but also repeated polyclonal infections were observed in some patients.

[Discussion] The results suggest importance of underlying anti-mycobacterial immunological impairment and defects of local defense rather than virulence of infected strains as the pathogenesis of pulmonary *M. avium* disease.

Key words: *Mycobacterium avium*, Familial pulmonary disease, RFLP, IS1245

¹Department of Respiratory Diseases, ²Clinical Laboratory Division, National Hospital Organization Nishi-Niigata Chuo National Hospital

Correspondence to: Katsuhiro Kuwabara, Department of Respiratory Diseases, National Hospital Organization Nishi-Niigata Chuo National Hospital, 1-14-1, Masago, Niigata-shi, Niigata 950-2085 Japan. (E-mail: kuwabara@masa.go.jp)