

# 岡山県で分離された *Mycobacterium kansasii* 株ゲノムのパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による解析

—分離年代によって PFGE パターンが異なるクラスターを形成する—

三村 公洋

**要旨:** [目的] 岡山県で発見された *M. kansasii* 症における疫学調査, および分離株における分子生物学的検討と感染様式の考察。[対象と方法] 1977年から1994年の間に分離・保存していた *M. kansasii* 22株について, 制限酵素 *Vsp I* を用いてゲノム DNA のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行った。また水島工業地帯の5会社から水道水を採取し抗酸菌培養を行った。[結果] PFGE解析の結果から年代ごとの菌株がそれぞれ1つのクラスターを形成することが見出された。水道水培養の結果は, いずれの検体からも *M. kansasii* は検出されなかった。[結論] 岡山県では分離年代ごとの菌株が1つのクラスターを形成していることから, 共通の環境や地域に生息する *M. kansasii* が感染源となっている可能性が考えられた。

**キーワード:** *M. kansasii* 症, 非結核性抗酸菌症, 岡山県, 水島工業地帯, パルスフィールドゲル電気泳動, Tap water

## はじめに

近年わが国では肺結核の減少とは逆に肺非結核性抗酸菌症が増加しており, 特に肺 *M. kansasii* 感染症においては, 1970年代前半までは関東およびその周辺地域に限られていた発症地域が, その後は症例数の増加とともに, 全国的な広がりを見せ始めた<sup>1)</sup>。岡山県では第1例目の *M. kansasii* 症が1976年に倉敷市の水島工業地帯で発見されて以後, Matsushimaの調査<sup>2)</sup>によると本症が同地域を中心として, 同心円状の分布で患者数の増加と発症地域の広がりを見せ始めたと報告されている。また2002年に著者が Matsushimaの報告と同じ方法で岡山県内の主要な医療施設, 32病院を対象に *M. kansasii* 症の現状を再調査したところ, 今なお水島工業地帯を中心とした同心円状の分布で患者が分布していることが分かった<sup>3)</sup>。しかし症例数の増加は1995年までで, その後のさらなる増加は見られなかった。当時の岡山県における *M. kansasii* 症患者の分布と1976年以後の年ごとの症例数を Fig. 1および Fig. 2に示す。本研究では, これらの調

査の過程で得られた *M. kansasii* 22株について, 制限酵素 *Vsp I* を用いてパルスフィールドゲル電気泳動を行い, 各分離菌株のゲノムの相同性を調べ, 系統樹を作成した。その結果, 年代ごとに菌株がクラスターを形成していることが明らかになり, 本感染症の疫学を考えるうえで重要なデータが得られた。また水島工業地帯を中心として増加する本症の感染源を調査するために, 水島工業地帯にある任意の5会社で, 工場内で社員が頻繁に利用する水道とその蛇口から検体を採取して抗酸菌培養を行った結果もあわせて報告する。

## 方 法

### パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

1977年から1994年の間で Matsushimaが保存した川崎病院で分離した *M. kansasii* 11株 (K1~11) と, 1989年から1993年の間に国立南岡山病院で分離した11株 (M1~11) に対して, 制限酵素 *Vsp I* を用いて PFGE解析を行った。菌株は患者1人につき1株である。

#### ①菌の調整

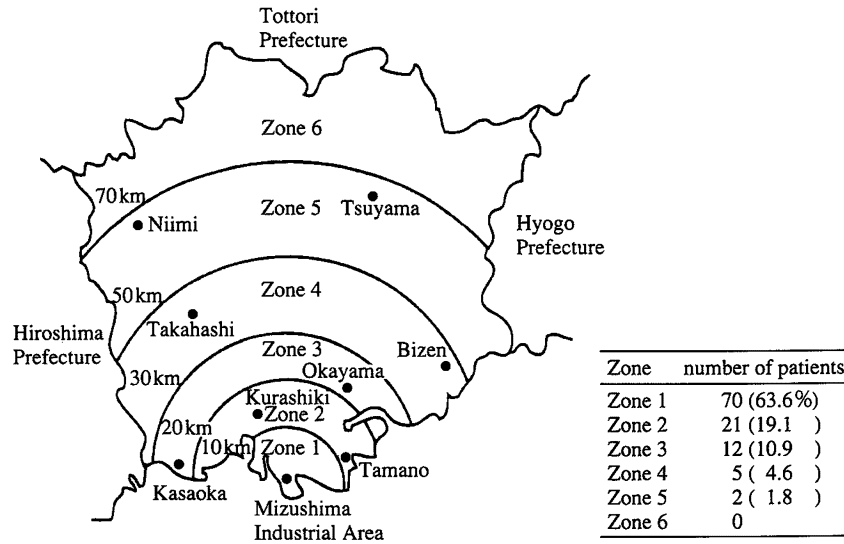


Fig. 1 The zonal distribution of the patients with *M. kansasii* infection in Okayama between 1994 and 2000

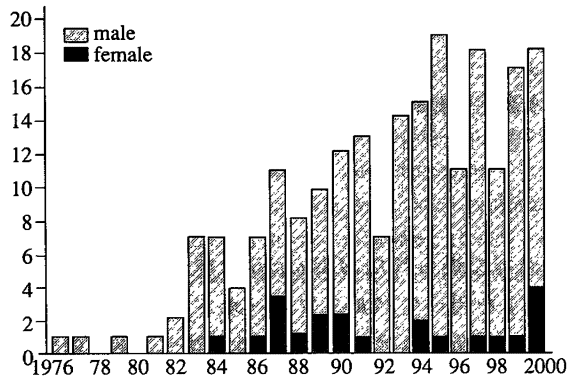


Fig. 2 The annual number of patients with *M. kansasii* infection in Okayama Prefecture

小川培地上で増菌した *M. kansasii* を一白金耳とり、0.5 M sucrose および 0.05% Tween 80 入りのセプティチェック AFB ボトル (BBL) で 37℃、14 日間培養し、D cycloserine を 1 mg/ml 加えてさらに 18 時間培養した。菌液を 3000 rpm、20 分、4℃ で遠心し沈渣を TS 溶液 [1M tris HCl (PH8.0) 50 mM, Sucrose 0.5M/100ml] 400 μl に再浮遊したものをいったん -40℃ で凍結し、水中にて再融解 (Freeze and Sawing) したものを使用した。

② プラグの作成

菌液の上澄み 100 μl をエッペンドルフチューブに取り、1.5% 低融点アガロース (BIO-RAD) 100 μl を加え、そのうち 100 μl をインサートモールドに入れて 4℃ で 15 分間固相化する。

③ 溶菌・除タンパク

リゾチーム 5mg/ml 入りの Lysis 溶液 [1M Tris-HCl (PH8.0) 50 mM, 0.5M EDTA 50mM/100ml] 500 μl に固相

化したプラグを入れて 37℃ で 48 時間処理する。ProteinaseK (Qiagen, Japan) 1.0 mg/ml 入りの ES 溶液 900 μl を調整し 50℃ で 48 時間処理する。

Pefabloc (Roche, Germany) 1.5 mM/ml の TE 溶液 [1M Tris-HCl (PH 8.0) 10 mM, 0.5 M EDTA (PH 8.0) 1mM/1000 ml] 500 μl を調整して室温で 2 時間 ProteinaseK を不活化し、Pefabloc は TE 溶液で 3 回洗浄して除去する。

④ 制限酵素処理

制限酵素反応に適した希釈済み buffer 50 μl を入れ、プラグを 37℃ 10 分間 preincubation してから buffer を吸引除去する。制限酵素 *Vsp I* (Promega, Madison, WI, USA) 10U 入り buffer を 50 μl 入れ 37℃ で 8 時間反応させる。

⑤ ゲル板の作成・パルスフィールド電気泳動

ゲル板および電気泳動用 buffer、泳動用アガロース、泳動用バッファーは PFGE ゲルキット (BIO-RAD) を使用し、電気泳動 (電圧 6.0V/cm, スイッチタイム Initial 1.0 秒 Final 23.0 秒, 泳動時間 18.5 時間) を行った。エチジウムブロマイドで 45 分間染色を行った後、蒸留水内で 1 時間脱色を行った。泳動結果の解析には Fingerprinting II (BIO-RAD) を使用した。

水道水培養

水島工業地帯に属する任意の 5 会社に依頼して、社員が頻りに利用する水道蛇口から、水道水 1000 ml をフラスコに採取し、またそれぞれの蛇口を綿棒で擦過し、生理食塩水に再浮遊したものを検体として抗酸菌培養を行った。集菌効率を上げるために、水道水 1000 ml を 0.22 μm ベンチトップフィルターを用いて濾過し、培地は

1%小川培地とセプティチェック AFB (BBL) を使用して37°Cで培養した。

①検体の採取

蛇口から流れる水道水1000 mlを滅菌したフラスコに直接採取し、また同じ蛇口を滅菌した綿棒で擦過して、その綿棒を生理食塩水1 mlの中で攪拌し、再浮遊したものを検体とした。検体は、当日中に研究室に持ち帰り処理を行った。

②前処理

1000 mlの水道水を0.22 μmベンチトップフィルターを用いて濾過する。そしてフィルターの2分の1を生理食塩水1 ml内に投入してよく攪拌し、1% NaOH 1 mlで雑菌処理を行い、0.1 mlを1%小川培地に接種した。残りのフィルター2分の1を、セプティチェック AFB ボトル (BBL) 付属のサプリメント1 mlを加えた後に液体培地内に投入して攪拌し、取扱説明書に従ってセプティチェック AFB スライドを装着した。また蛇口を擦過した綿棒を攪拌し、再浮遊した1 mlの生理食塩水も、1% NaOH 1 mlで雑菌処理を行い、0.1 mlを1%小川培地に接種した。

③培養

小川培地、セプティチェック AFB は、それぞれ37°Cで培養した。

結 果

1977～1994年に岡山市の川崎病院で分離した *M. kansasii* 11株 (K1～11) および1989～1993年に南岡山

病院で分離した *M. kansasii* 11株 (M1～11) についての PFGE 結果を Fig. 3 (A) に示した。これを基にプログラムを用いて作成した系統樹解析結果を Fig. 3 (B) に示す。*M. kansasii* 22株の PFGE 解析結果による系統樹には4つあるいは5つのクラスターが見られる。それぞれのクラスターをクラスター1 (K6, 7, 8), クラスター2-1 (M1, 2, 5, 10, 11), クラスター2-2 (M3, 4, K11) クラスター3 (K1, 2, 3, 4, 5), クラスター4 (M6, 7, 8, 9, K9, 10)とした。クラスター1は川崎病院株 (K株)のみ、クラスター2は1例を除いて南岡山病院株 (M株), クラスター3はK株のみで、クラスター4はM株が中心と、それぞれのクラスターはほぼK株またはM株のどちらかによって構成されている。そしてクラスター1および3はK8株以外が1977～84年にかけて検出された古いK株で構成されている。クラスター2および4は1988～94年にかけて検出されたM株と、K株では検出年の新しいK9, 10, 11株を含む。つまり年代ごとの菌株が各クラスターを構成していると考えられる。各菌株の単離年は Table に示す。この PFGE 解析結果の各クラスターを、南岡山病院の河原が測定した22株の薬剤感受性結果と合わせて検討してみたが、松島の報告<sup>4)</sup>と同じく薬剤感受性から菌の特異性を証明することはできなかった (Table)。

水島工業地帯における任意の5会社の水道水および水道蛇口の抗酸菌培養の結果は、小川培地とセプティチェック AFB ボトル、すべての検体で培養10～14日目に光発色性 (-), S型, 黄色～橙色のコロニーの発育を

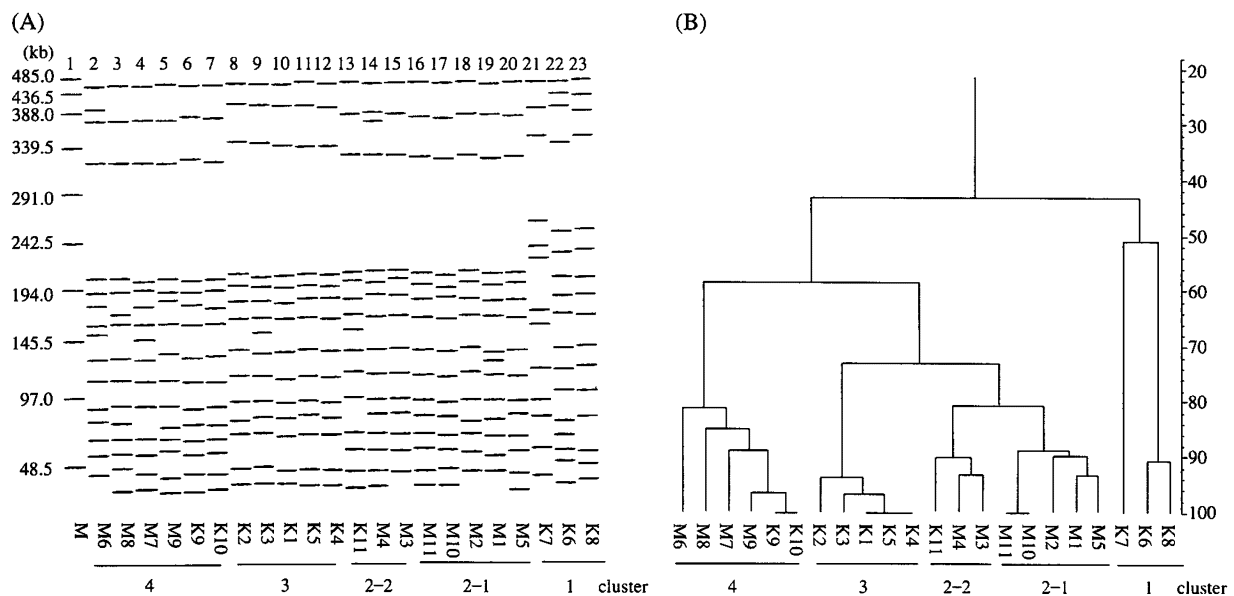


Fig. 3 (A) Schematic representation of PFGE patterns with *Vsp I* digestion. Lane 1, lambda DNA standards; lane 2 through 23, clinical *M. kansasii* isolates in Okayama Prefecture. (B) Dendrogram based on computer-assisted of 22 isolates of *M. kansasii* in Okayama Prefecture.

Table Antimicrobial activity of antimycobacterial drugs against *M. kansasii* isolates in Okayama Prefecture

Strain	Cluster	yr	INH	RFP	EB	TH	CS	SM	KM	PAS	CPFX	OFLX	SPFX	LVFX	CAM	RXM
K6	1	1977	25	0.39	6.25	0.39	>100	50	100	>100	0.78	0.39	0.2	0.39	0.78	1.56
K7	1	1983	6.25	0.2	12.5	0.2	>100	100	>100	>100	1.56	1.56	0.2	0.78	0.78	1.56
K8	1	1994	1.56	0.1	3.13	0.1	>100	25	>100	>100	1.56	1.56	0.2	0.78	0.78	1.56
M1	2-1	1990	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	25	100	>100	0.39	0.39	0.1	0.2	0.2	0.78
M2	2-1	1991	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	50	>100	>100	1.56	0.78	0.2	0.39	0.78	1.56
M5	2-1	1989	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	50	>100	>100	1.56	0.78	0.2	0.39	0.78	1.56
M10	2-1	1992	6.25	0.2	3.13	0.2	>100	50	>100	>100	3.13	0.78	0.2	0.39	0.78	3.13
M11	2-1	1993	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	50	>100	>100	1.56	0.78	0.2	0.39	0.78	1.56
K11	2-2	1994	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	50	>100	>100	3.13	0.78	0.2	0.39	0.78	1.56
M3	2-2	1990	6.25	0.1	3.13	0.39	>100	25	>100	>100	1.56	0.39	0.1	0.2	0.2	0.78
M4	2-2	1989	3.13	0.1	3.13	0.2	>100	25	100	>100	0.39	0.39	0.1	0.2	0.2	0.78
K1	3	1984	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	25	100	>100	0.39	0.39	0.1	0.39	0.78	1.56
K2	3	1984	12.5	0.39	6.25	0.39	>100	100	>100	>100	0.39	0.39	0.1	0.39	0.78	1.56
K3	3	1983	12.5	0.39	>100	0.78	>100	>100	>100	>100	0.39	0.39	0.2	0.39	1.56	3.13
K4	3	1984	6.25	0.2	12.5	0.78	>100	>100	>100	>100	0.39	0.39	0.2	0.39	1.56	3.13
K5	3	1984	6.25	0.2	6.25	0.39	>100	25	>100	>100	0.39	0.78	0.2	0.2	0.78	1.56
K9	4	1988	6.25	0.2	3.13	0.39	>100	50	>100	>100	0.78	0.39	0.1	0.39	0.78	1.56
K10	4	1994	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	25	100	>100	0.78	0.78	0.1	0.39	0.2	0.78
M6	4	1991	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	25	100	>100	0.39	0.39	0.1	0.2	0.78	1.56
M7	4	1990	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	50	>100	>100	1.56	0.78	0.2	0.39	0.78	1.56
M8	4	1991	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	50	>100	>100	3.13	0.78	0.2	0.39	0.78	1.56
M9	4	1992	6.25	0.1	3.13	0.2	>100	50	>100	>100	3.13	0.78	0.2	0.39	0.78	1.56

認められた。菌種同定のために純培養を行い、それぞれ DDHを行った結果、すべて *M. gordonae* と同定され、*M. kansasii* を検出することはできなかった。

### 考 察

国内の肺 *M. kansasii* 症は1970年代から、患者数が増加し、当初は関東地区に限られていた発症地域が全国的な広がりを見せ始めた<sup>1)</sup>。岡山県では1976年に水島工業地帯で第1例目が発見されて以来、水島工業地帯を中心として同心円状に患者が分布している。岡山県で最大の人口を有する岡山市よりも水島工業地帯で圧倒的に患者数が多いことは、本症が単に人口の多い地域に多発しているわけではなく、地域性があることを示している。しかし、Matsushimaの調査当時<sup>2)</sup>と比べてみると、水島工業地帯のみといった地域限局性は薄らいできている。非結核性抗酸菌症はヒトからヒトへは感染しないとされているが、*M. kansasii* 感染症の感染源や感染経路については、いまだ明らかでない。2002年に行った著者の調査<sup>3)</sup>では、*M. kansasii* 症患者に鉄工所や建築業、石工など粉塵作業が多いことから、本症の発症と粉塵吸入との関連<sup>3)</sup>も考えられる。

*M. kansasii* は海外の報告では、水道水や給水システムから検出された報告もある<sup>6)7)</sup>。著者は水島工業地帯にある5つの工場内で作業員が頻繁に使用する水道施設から抗酸菌を検出したが、分離されたのはすべて *M. gordonae* であり、*M. kansasii* は検出されなかった。しか

し、今回の水道水培養は通常の臨床検体の培養方法と同じ手順で行っており、雑菌処理方法、集菌方法、および培地についても再検討する必要があるかもしれない。Engelら<sup>8)</sup>は、ロッテルダムの病院や工場水道水、その水源からも *M. kansasii* を検出しているが、菌の混入経路や感染経路については不明な点が多い。また菌の検出には季節性があり、さらに同一施設内であっても水道によって検出頻度に差があることなどから、頻回に多くの検体を集めて調査を行う必要もあると考える。地域性を持ちながら確実に増加を示す本症であるが感染源や感染経路については不明な点が多いため、水道水を含む環境水や土壌などについても、患者の発生状況に基づきながら、引き続き調査をしていく必要がある。

1977~94年に岡山県内で分離した *M. kansasii* 22株について制限酵素 *Vsp I* を用いて PFGE を行い、その成績に基づいて系統樹を作成すると、4~5つのクラスターとして捉えられ、各クラスターが、ほぼ年代別の菌株によって構成されていることがわかった。クラスターがほぼ年代別に構成される理由の1つとして、年代別の *M. kansasii* 株の遺伝子が時代と共に変化する環境に順応しながら、その塩基配列が変化していると考えられる。しかし K6 と K8 の分離年には17年の隔りがあるにもかかわらず、系統樹上はきわめて近縁であること、逆に K8 と K10 は同じ年に分離されたにもかかわらず、互いにきわめて遠縁であることを考えると、時代による遺伝子の変化では説明が難しい点もある。さらに、

Rossら<sup>8)</sup>は105株の *M. kansasii* を PFGE で解析したが11パターンしか得られなかったこと、Iinumaら<sup>9)</sup>は日本国内から集めた84株を PFGE で分析した結果、岡山県内で分離された *M. kansasii* の多くは国内で一般的に多く見られるタイプ (Type M) に属することなどを考え合わせると、PFGE で検出できる *M. kansasii* ゲノムのパターン (多形性) は限られており、PFGE パターンが時代とともに容易に変化するとは考え難い。年代別にクラスターを形成している傾向に加えて、K株群とM株群、すなわち分離病院によるクラスターを観察される。患者住所の正確なデータがないため、厳密な地域別クラスター形成を検証することは不可能であるが、病院によるクラスターを地域によるクラスターと考えるのは、それほど不合理なことではない。以上のことを考え合わせると、年代および地域によって分離菌が異なることは次のように解釈される。すなわち、ある環境 (あるいはある地域) に棲息する *M. kansasii* がある時に、よく増殖できる条件が成立して過大に増殖する。その結果、ヒトへの感染が成立しやすくなり、多くの患者が発生する。この場合、同一の (あるいは類似した) 感染源であるため、患者から分離される菌は同類のものとなる。また、別の年には別の環境 (地域) に棲息する菌がよく増殖できる環境が成立し、それが感染源となって患者が発生する。以上の解釈を証明するためには、環境からの菌の検出および患者発生状況との関連をさらに検討する必要がある。この場合、菌の棲息する環境というのがヒトの呼吸器内である可能性も存在する。次に、ヒト-ヒト感染の可能性について考察したい。Fig. 3 (B) に示したクラスター3に含まれるK1, 4, 5のPFGE解析結果は100%の一致を示しており、このうちK4と5は松島らの調査で、ほぼ同時期に同じ工場で働く2人から検出されたことが分かっている。以前から松島らは肺 *M. kansasii* のヒト-ヒト感染の可能性についても検討してきているが<sup>10)</sup>、PFGEは菌同士の一一致を証明するほど精密な検査ではないが、2人が同じ感染源に曝露された可能性もある。Zhang<sup>11)</sup>らはIinumaが分類したtype Mはすべて *M. kansasii* 5群のうち1群に含まれると報告しており、Tortoli<sup>12)</sup>によると1群は人体に対する病原性が強く、ヒトからのみ分離されると報告している。一方フランスのPicardeau<sup>13)</sup>はパリ周辺の病院で水道水から分離した *M. kansasii* が分子生物学的検査によって1群に分類されると報告している。いずれにしても水道水を含む環境水や給水システム、土壌や貯水池などの調査は興味深いものであり、近年著しい進歩を遂げる分析技術の発展によって、本症の感染様式や菌株同士の相互関係などが明らかになってくることが期待される。

## ま と め

1977年から1994年の間に岡山県内で分離された22株の *M. kansasii* のゲノムDNAをパルスフィールドゲル電気泳動で解析した結果、年代別もしくは地域別のクラスターを形成することが分かった。これは、ある地域の特定の環境下で菌の広範な増殖が起り、それらの菌がそれぞれの年代の共通の感染源となっている可能性を強く示唆しており、本症の発症機序を考えるうえで重要である。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御鞭撻を賜りました川崎医科大学微生物学教授 大内正信先生、京都大学医学部付属病院検査部 飯沼由嗣先生、倉敷第一病院呼吸器センター 松島敏春先生に深謝いたします。

なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (13-406) の援助によって行われたことを付記し深謝いたします。

## 文 献

- 1) The Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals: Rapid increase of the incidence of lung disease due to *Mycobacterium kansasii* in Japan. *Chest*. 1983; 83: 890-892.
- 2) Matsushima T: Geographical and chronological spread of pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection in Okayama, Japan. *J Infect Chemother*. 1995; 1: 122-126.
- 3) 三村公洋: 岡山県における *M. kansasii* 症の現状. *結核*. 2002; 77: 665-669.
- 4) 松島敏春: 岡山県における *M. kansasii* 症の地理的、年代的拡がり. *結核*. 2003; 78: 591-595.
- 5) 下出久雄: 日本における *M. kansasii* 症. *結核*. 1977; 52: 577-585.
- 6) Engel HWB, Berwald LG, Havelaar AH: The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tap water. *Tubercle*. 1980; 61: 21-26.
- 7) Bailey RK, Wyles S, Dingley M, et al.: The isolation of high catalase *Mycobacterium kansasii* from tap water. *Am Rev Respir Dis*. 1970; 101: 430-431.
- 8) Ross BC, Jackson K, Yang M, et al.: Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 2930-2933.
- 9) Iinuma Y, Ichiyama S, Hasegawa Y, et al.: Large-Restriction-Fragment Analysis of *Mycobacterium kansasii* Genomic DNA and Its Application in Molecular Typing. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 596-599.
- 10) 松島敏春, 原 宏紀, 副島林造, 他: 岡山県における *M. kansasii* 肺感染症: 4症例発症の相互関係の推察. *結核*. 1983; 58: 299-305.
- 11) Zhang Y, Mann LB, Wilson RW, et al.: Molecular Analysis

- of *Mycobacterium kansasii* Isolates from the United States. J Clin Microbiol. 2004 ; 42 : 119-125.
- 12) Tortoli E: *Mycobacterium kansasii* species or complex? Biomolecular and epidemiological insights. 結核. 2003 ; 78 : 177-178.
- 13) Picardeau M, Prod'hom G, Raskine L, et al.: Genotypic Characterization of Five Subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 25-32.

---

Original Article

---

PFGE ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM KANSASII* ISOLATES  
IN OKAYAMA PREFECTURE

Kimihiko MIMURA

**Abstract** [Object] To investigate the epidemiology of *M. kansasii* infections in Okayama Prefecture and to consider the mode of infection of *M. kansasii* on the basis of the PFGE results.

[Materials and methods] 22 *M. kansasii* isolates of pulmonary infections from 22 patients treated between 1977 and 1993 in Okayama Prefecture were investigated by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) using restriction endonuclease *Vsp I*. In addition, the tap water from five companies in the Mizushima Industrial Area was cultured to investigate the source of infection of this disease.

[Results] These *M. kansasii* isolates were found to be clustered into four or five by PFGE during different. From the tap water, *M. kansasii* was not detected.

[Conclusions] From the result of the PFGE, it was considered that the infection source of *M. kansasii* in Okayama Prefecture was living in a common environment or a district.

**Key words:** *Mycobacterium kansasii*, Non-tuberculous mycobacteriosis, Okayama Prefecture, Mizushima Industrial Area, PFGE, Tap water

Division of Respiratory Diseases, Kawasaki Medical School

Correspondence to: Kimihiko Mimura, Division of Respiratory Diseases, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki-shi, Okayama 701-0192 Japan.  
(E-mail: resp@med.kawasaki-m.ac.jp)