2症例から細菌学的に同定された *Mycobacterium heckeshornense* について

[1]鹿住 祐子 [1]菅原 勇 [2]和田 雅子 [3]木村 清延
[4]糸納 秀司

要旨：〔目的〕51歳女性（症例1）と72歳男性（症例2）の喀痰から検出された抗酸菌を同定する。〔対象および方法〕症例1の患者は1986年から1990年の間に喀痰の塗抹（抗酸性染色）陽性培養陰性が16回あり培養陽性が4回あった。このうち2株が従来法にて *M. xenopi*-like と同定され，−80℃にて保存された。症例2の患者はじん肺患者で，2003年に定期検査の喀痰から抗酸菌が分離され当研究所に同定依頼があった。これら2症例2株において同定試験として16S rRNA遺伝子・*rpoB*遺伝子のシークエンスと従来法が行われた。〔結果・考察〕2株とも遺伝子検査によって *M. heckeshornense* と同定され，従来法にて確認された。発育に4週間かかる遅発育菌で，コロニーは暗所培養にて黄色に着色する Scotochromogen であった。*M. heckeshornense* を遺伝子学的に類似している *M. xenopi* から分けるために16S rRNA遺伝子と *rpoB* 遺伝子のシークエンス，そしてアリルスルファターゼ法が有用であった。ヒトへの病原性は不明であるが，症例1は排菌期間が長いため患者への影響は否定できない。塗抹陽性培養陰性の結果が得られたときは検体処理方法の改善が望まれる。

キーワーズ：*Mycobacterium heckeshornense*, *M. xenopi*, 16S rRNA シークエンス，*rpoB* 遺伝子，塗抹陽性培養陰性

はじめに

Mycobacterium heckeshornense の最初の分離は，ヨーロッパで1993年に右肺上葉に空洞のある30歳の白人女性の喀痰からである。分離時は従来からの生化学的性状によって *Mycobacterium xenopi*-like と同定されたが，その後，2000年に High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) を用いたミコール酸パターンの解析や16S rRNA塩基配列の決定などにより *M. heckeshornense* として発表された[1)2)]。また，van Hest ら[3)]は免疫機能の正常な男性の肺組織から本菌を検出し分析した結果，病原性が認められたとしている。この *M. heckeshornense* に類似[4)]の生化学的性状をもつ *M. xenopi* は1957年にアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）の皮膚の傷から初めて分離され，ヒトに対しても肺結核類似病変を引き起こすことが知られている。この菌は病院の水道水などからも検出され[5)6)]，日本でもまれに患者から分離される[7)]病原性の抗酸菌である。今回，著者らは，結核予防会複十字病院の症例1と北海道岩見沢労災病院の症例2の喀痰から分離された抗酸菌の同定を試み，*M. heckeshornense* と同定しえたので報告する。

材料と方法

（1）使用菌株

以下に示す症例1から分離された被検株 No. 50 と症例2から分離された被検株 No. 759，そして対照として *M. heckeshornense*（DSMZ44428/Type strain）と *M. xenopi*（ATCC19250/Type strain）を用いた。

症例1（被検株 No.50）は51歳の女性であり，1986年に他病院にて悸肋部痛・胆石と診断，喀痰の抗酸性染色陽性のため結核予防会複十字病院を受診した。以前に結核の治療を3年間受けた既往歴がある。1986年から

[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]研究部，[3]岩見沢労災病院内科，[4]検査科

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病理検査科，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24
(E-mail: kazumi@jata.or.jp)
(Received 5 Apr. 2006/Accepted 23 Jun. 2006)

1990年の間に喀痰検査が定期的に行われ，この間に塗抹陽性培養陰性（ガフキー 1号2回，2号3回，3号4回，4号5回，5号1回，6号1回）が16回，塗抹陽性培養陽性が2回，塗抹陰性培養陽性が2回あった。なお塗抹標本は直接塗抹法で作製し，チール・ネールゼン染色した。培養は喀痰を水酸化ナトリウム（NaOH法）で前処理後，2%小川培地とピルビン酸ナトリウム加小川培地に直接接種する方法で行われた。培養は8週間以上行われ，培養陽性4回のうち1988年と1990年に分離された2株は結核研究所で*M. xenopi*-likeと同定された。*M. xenopi*-likeとした理由は主な生化学的・生物学的性状は*M. xenopi*と一致したが，アリルスルファターゼ試験で*M. xenopi*が陽性であったのに対して被検株No. 50が陰性を示したためである。1991年2月に喀痰培養で*Aspergillus fumigatus*が培養され，RA Test陽性，末梢血液学的には異常を認められなかった。レントゲン所見は，両肺尖部に硬化性陰影があり，中肺野にわずかに散布陰影がみられた。自覚症状として頻回の喀血があった。治療はkanamycin（KM），ethambutol（EB），rifampicin（RFP）を断続的に数年間治療したが，2000年に慢性呼吸器不全にて死亡した。

症例2（被検株No.759）は72歳男性であり，じん肺管理4の患者で2003年10月に定期検査にて喀痰塗抹抗酸菌陽性となった症例である。レントゲン所見で1996年頃から右上肺野に空洞陰影が見られたが，菌が検出された2003年当時，抗酸菌症を思わせる所見はなかった。喀痰をNALC-NaOH法による前処理後に遠心集菌し，沈渣を塗抹し蛍光法により観察したところ2003年10月から11月にかけての3週間で9回抗酸菌陽性となった。内訳は，ガフキー 1号1回，2号1回，5号4回，8号1回，9号2回であった。さらにこの沈渣の培養は小川培地とMGIT液体培地で行われ，塗抹陽性9回のうち8回が培養陽性となった。ガフキー 1号の喀痰による培養のみ陰性であった。患者はCRP正常・自覚症状なしのため治療が行われなかった。その後，塗抹・培養が陰性となった。

（2）生化学的・生物学的性状検査[8)9)]

発育速度と発育温度域は1/2白金耳量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℃・37℃・42℃にて培養しコロニーの性状を観察した。生化学的性状として硝酸塩還元試験，Urease試験，Tween 80水解試験，テルライト還元試験，アリルスルファターゼ試験3日法を行った。主要4抗結核薬に対する感受性はバクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ（MGIT法：日本ベクトン・ディッキンソン）を用い検査した。

（3）遺伝子検査[10)]

遺伝子検査として一般的に使われている16S rRNA[11)12)]とKimらの提案した*rpoB*遺伝子[13)14)]の塩基配列を決定し，標準株との間で相同性を比較した。卵培地発育菌の1白金耳を滅菌蒸留水500 μlに浮遊させ，95℃にて10分間加温した。10,000 rpmにて10分間遠心後，上清の2.5 μlを用いてPCR反応を行った。16S rRNAの増幅にはプライマー264（5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3'）およびプライマー285（5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'），*rpoB*遺伝子の増幅にはプライマーP1（5'-CGA CCA CTT CGG CAA CCG-3'）およびプライマーP2（5'-TCG ATC GGG CAC ATC CGG-3'）を使用した。PCR反応は，16S rRNAについては94℃ 30秒間，60℃ 30秒間，72℃ 1分30秒間で40サイクル行った。また*rpoB*遺伝子については94℃ 1分間，66℃ 1分間，72℃ 1分間で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.）で行った塩基配列の決定はBig Dye Terminator 1.1（ABI）を用いてABI310にて実施した。得られた16S rRNAの結果はRibosomal Differentiation of Microorganisms: RIDOMを用い，98%以上の塩基配列一致をもって，同一菌種と決定した。*rpoB*遺伝子については当研究所にて作成した*rpoB*遺伝子データベースを使用して相同性を調べ，99%以上の塩基配列一致をもって菌種を決定した。

（4）病原性試験

試験には4株が使用され，Hartley雌モルモットを用い，被検菌の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

標準株として用いた*M. xenopi*（ATCC 19250）および*M. heckeshornese*（DSMZ 44428）と被検株2株の生物学的・生化学的性状の検査結果をTable 1に示した。被検2株とも42℃の発育が認められ発育速度は42℃にて4週間であった。コロニーの性状は被検2株とも標準株*M. heckeshornense*と同様であり，スムース型であった。これに対し標準株*M. xenopi*はラフ型に近いスムース型であった。光発色試験の結果，4株とも暗発色であり黄色の着色が見られた。硝酸塩還元試験，Tween 80水解試験，Urease試験，テルライト還元試験はすべて陰性であった。しかし，アリルスルファターゼ試験3日判定では被検2株と*M. heckeshornense*は陰性であったが*M. xenopi*は陽性であった。これらの結果は，被検2株の生物学的・生化学的性状は*M. xenopi*より*M. heckeshornense*に近いことを示している。isoniazid（INH）は4株とも耐性，RFPとstreptomycin（SM）の2薬剤については4株とも感受性であった。EBについては*M. xenopi*と被検株50は

Table 1 Characteristics of our clinical isolate and reference strains

	M. xenopi ATCC19250	*M. heckeshornense* DSMZ44428	Clinical isolate No.50	Clinical isolate No.759
Growth at 28℃	−	−	−	−
Growth at 37℃	+	+	+	+
Growth at 42℃	+	+	+	+
Growth Rate (at 42℃)	4 weeks	4 weeks	4 weeks	4 weeks
Pigmentation	Scotochromogen	Scotochromogen	Scotochromogen	Scotochromogen
Colonies (Rough/Smooth)	Rough/smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Colour of colony	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Urease	−	−	−	−
Tween Hydrolysis	−	−	−	−
3-day Arylsulfatase	+	−	−	−
Tellurite Reduction	−	−	−	−
Susceptibility test (MGIT)				
Isoniazid (0.1 μg/ml)	Resistance	Resistance	Resistance	Resistance
Rifampicin (1.0 μg/ml)	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Sensitive
Ethambutol (5.0 μg/ml)	Resistance	Sensitive	Resistance	Sensitive
Streptomycin (1.0 μg/ml)	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Sensitive

Table 2 Identification of two clinical isolates by 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing

Gene	Type strain	Similarity (%)	
		Strain No. 50	Strain No. 759
16S rRNA	*M. xenopi*	94.43	94.23
	M. heckeshornense	100	100
rpoB	*M. xenopi*	95.4	95.1
	M. heckeshornense	99.7	100

耐性であったが *M. heckeshornense* と被検株 No. 759 は感受性であった。

抗酸菌の分類や詳細な菌種の同定のために 16S rRNA など遺伝子の塩基配列の相同性を比較する方法が用いられている。この研究では 16S rRNA と *rpoB* 遺伝子を選び，塩基配列を比較した。Table 2 に示したように 16S rRNA の塩基配列でみると被検株 No. 50 は *M. heckeshornense* との相同性は 100%，*M. xenopi* とは 94.43% であった。*rpoB* 遺伝子の塩基配列でみるとそれぞれ 99.7% と 95.4% であった。被検株 No. 759 は *M. heckeshornense* との 16S rRNA の塩基配列による相同性は 100%，*M. xenopi* とは 94.23% であった。*rpoB* 遺伝子の塩基配列でみるとそれぞれ 100% と 95.1% であった。遺伝子検査の結果は，被検株 No. 50 と No. 759 は *M. heckeshornense* として同定されることを示している。

M. xenopi，*M. heckeshornense* の標準菌株と No. 50，No. 759 の病原性をモルモットに皮下接種し，7 週後に解剖して調べた。肉眼では，肺に肉芽腫病変が不著明だったが，4 株とも，肺組織に微小な肉芽腫が認められた (Fig.)。Fig. に典型的なリンパ球，類上皮細胞からなる肉芽腫が示されている。

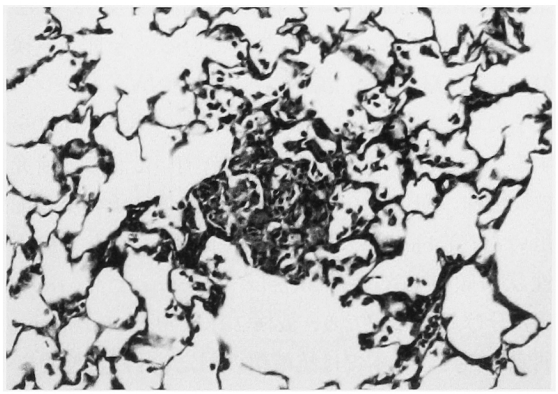

Fig. Pulmonary histopathology of the guinea pig. Hematoxylin & eosin stain. × 40.

考　察

喀痰の検査で塗抹陽性培養陰性 (Smear-positive and Culture-negative：SPCN) の結果が得られた場合，原因[15)16)]として，①ガラス面の傷や他の細菌を顕微鏡で見誤った，②喀痰を培地に接種する前の雑菌処理が強すぎて抗酸菌も処理されたなどの技術的問題，③栄養素の変化した低活性菌，④化学療法による死菌，などが考えられる。症例 1 の検査では喀痰の消化・雑菌処理のために

NaOH法が用いられていた。非結核性抗酸菌の中にはアルカリの影響が強すぎて，塗抹陽性であったにもかかわらず培養陰性あるいは生菌数を減らすことがある。NALC-NaOH法と集菌法を採用している症例2ではほとんどの塗抹陽性が培養陽性になっており，検査技術の進歩が大きく影響していると考えられる。

この他にSPCNの原因としてその菌の発育温度域がある。著者は以前*Mycobacterium shinshuense*[16]の培養を経験したことがあり，この*M. shinshuense*は28℃において2週間で発育可能であったが，37℃における培養は陰性（あるいは非常に困難）であった。非結核性抗酸菌の場合，必ずしも37℃における培養が優性とは限らず，*M. marinum*，*M. chelonae*，*M. shinshuense*などのように低め，逆に*M. xenopi*，*M. heckeshornense*のように37℃より高い温度のほうが優性ということがある。今回の*M. heckeshornense*について，症例1ではSPCNが頻回見られ，菌の発育は37℃より42℃のほうが優性で，28℃では陰性であった。SPCNの結果が得られた時，発育温度域が37℃より高めあるいは，低めである可能性がある。

これまで抗酸菌の菌種鑑別・同定のために培養法と生化学的性状試験が用いられてきたが，臨床分離株の中には典型的でない性状を示す株もある。その上これまでに報告されている菌種は100種以上もあることから従来法での鑑別・同定は容易でない。Bergey's Manual of Systematic Bacteriologyによれば細菌の分類は染色体DNAの相同性に基づくべきとしている。今日，被検菌株の16S rRNA，*ropB*，*dnaJ*，HSP65，DNAジャイレース遺伝子の塩基配列を決定し，標準株との間で相同性を比較する方法が菌種の同定に用いられている。この研究では被検菌株の同定に16S rRNAと*rpoB*遺伝子の塩基配列を用いた。Table 2に示したように遺伝子検査で生化学的性状が類似している*M. heckeshornense*と*M. xenopi*を明確に分けることができ，被検2株を*M. heckershornense*と同定できた。日本では抗酸菌の同定に1回の検査で18菌種もの抗酸菌の中から1菌種を決定できるDDH法[18]が広く用いられているが，*M. heckeshornense*は対象になっておらず，同定不明あるいは*M. xenopi*と判定されることがある。DDH法で*M. xenopi*が疑われたとき，アリルスルファターゼ試験3日法は両者を分けるうえで有用と考える。

症例1については過去に結核の既往があり，塗抹検査では陽性が続いたにもかかわらず培養が陰性だったため診断できなかった。その後，アスペルギルス症を併発したため*M. heckeshornense*が原因菌かどうか不明である。しかし，排菌していた期間が長いためこの影響を否定することはできない。症例2は日本結核病学会の肺非結核性抗酸菌症の診断基準の細菌学的基準を満足する症例であるが，CRP正常・自覚症状なしのため治療が行われず，その後，塗抹・培養が陰性となった。モルモットの病原性試験の結果から*M. heckeshornense*の病原性は低いと推察されるが，宿主の免疫機能が低下すると病変が悪化すると考えられる。今後，*M. heckeshornense*の宿主に対する反応を，詳細に調べる必要がある。

ま と め

抗酸菌は現在100種以上あり，従来からの培養・生化学的性状による非結核性抗酸菌の同定は困難になってきている。以前に従来法で*M. xenopi*-likeと鑑別・同定した菌株を16S rRNAと*rpoB*遺伝子の塩基配列決定により*M. heckeshornense*と同定しえた。

なお，本論文の趣旨は第149回日本結核病学会関東支部会・第168回日本呼吸器学会関東地方会合同学会（2006年2月，東京）で発表した。

謝 辞

MGITによる薬剤感受性検査をしていただいた結核予防会複十字病院細菌検査科の東由香女史と，論文を作成するにあたりご高閲頂いた前結核予防会結核研究所基礎研究部長 阿部千代治先生に深謝致します。

文 献

1）Roth A: *Mycobacterium heckeshornense* sp. nov., A new pathogenic slowly growing *Mycobacterium* sp. Causing cavitary lung disease in an immunocompetent patient. J Clin Microbiol. 2000 ; 38 : 4102–4107.

2）Description of *Mycobacterium heckeshornense* sp. nov. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 3023–3024. Abstract not available.

3）van Hest R: *Mycobacterium heckeshornense* infection in an immunocompetent patient and identification by 16S rRNA sequence analysis of culture material and a histopathology tissue specimen. J Clin Microbiol. 2004 ; 42 : 4386–4389.

4）Tortori E: Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy : the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev. 2003 ; 16 : 319–354.

5）Wright EP, Collins CH, Yates MD: *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. J Hosp Infect. 1985 ; 6 : 175–178.

6）Slosarek M, Kubin M, Pokorny J: Water as a possible factor of transmission in mycobacterial infections. Cent Eur J Public Health. 1994 ; 2 : 103–105.

7）山崎泰宏，藤内 智，松本博之，他：*Mycobacterium xenopi*肺感染症の2例．日本呼吸器学会誌．2003 ; 41 : 556–560.

8）Tsukamura M: A review of the methods of identification and differentiation of mycobacteria. Rev Infect Dis. 1981 ; 3 : 841–861.

9) Public health mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Department of Health and Human services. Center for Disease Control, Atlanta GA 30333.
10) 鹿住祐子, 前田伸司, 菅原 勇：*rpoB* と16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み. 結核. 2006 ; 81 : 551-558.
11) 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.
12) 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.
13) 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.
14) 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.
15) 工藤祐是：喀痰における抗酸菌塗抹陽性培養陰性. 結核. 1981 ; 56 : 166-174.
16) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会：非定型抗酸菌症の治療に関する見解—1998年. 結核. 1998 ; 73 : 599-605.
17) 鹿住祐子, 大友幸二, 高橋光良, 他：皮膚から分離された *Mycobacterium shinshuense* の細菌学的解析. 結核. 2004 ; 79 : 437-441.
18) 江崎孝行：DNAを使った抗酸菌の迅速同定. 結核. 1992 ; 67 : 803-806.

Original Article

MICROBIOLOGICALLY IDENTIFIED ISOLATES OF *MYCOBACTERIUM HECKESHORNENSE* IN TWO PATIENTS

[1]Yuko KAZUMI, [1]Isamu SUGAWARA, [1]Masako WADA, [2]Kiyonobu KIMURA, and [2]Hideji ITONO

Abstract [Purpose] To identify mycobacteria isolated from sputa of a 51-year-old female and a 72-year-old male patient with pneumoconiosis.

[Object and method] Mycobacteria species were isolated from sputa of a 51-year-old female. The culture was always negative in spite of positive smears before the final isolation in 1988. A 72-year-old male patient suffered from pneumoconiosis and the acid-fast bacillus was isolated by routine sputum examination in 2003. These two strains of acid-fast bacilli were identified as *Mycobacterium heckeshornense* by partial sequencing of 16S rRNA and *rpoB* and conventional methods (biochemical and routine culture methods).

[Result] These two strains grew on 1% Ogawa's slant medium at 37℃ and 42℃, but not at 28℃. They formed yellowish colonies in the dark (Scotochromogen). They were classified as a slowly growing Mycobacteria. As it was difficult to distinguish *M. heckeshornense* from *M. xenopi* by conventional methods including growth rate, temperature range of mycobacterial growth, light coloration reaction, biochemical and biological tests, virulence using guinea pigs and drug susceptibility test were further explored. Finally two were identified as *M. heckeshornense* by summing of these results.

[Conclusion] Mycobacteria species that grow at 42℃ for four weeks, imply *M. xenopi* with a DDH method. It is essential to perform both sequencing of 16S rRNA and *rpoB* gene and a biochemical method for the purpose of distinguishing *M. heckeshornense* from *M. xenopi*.

Key words : *Mycobacterium heckeshornense*, *M. xenopi*, 16S rRNA sequence, *rpoB* gene, Smear-positive and culture-negative

[1]Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), [2]Iwamizawa Rosai Hospital

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