

先天性 IL-12/IFN- γ 経路異常の患者から長期にわたって分離された *Mycobacterium porcinum* の細菌学的性状

¹鹿住 祐子 ¹前田 伸司 ¹宇田川 忠 ¹菅原 勇
²神谷 齊

要旨:〔目的〕IL-12/IFN- γ 経路に先天性に異常のある患者から長期にわたって分離された迅速発育抗酸菌の菌種同定を行うこと。*M. porcinum*と同定されたこれら分離株の細菌学的性状を *M. porcinum* および類縁菌種の基準株と比較すること。〔対象および方法〕IL-12/IFN- γ 経路に先天性に異常のある1人の患者から1996年から2007年の間に7回にわたって頸部・腋窩・鼠径部・腕部のリンパ節と腫瘍部分から分離された迅速発育抗酸菌7株、内視鏡洗浄液から分離された *M. porcinum*, *M. porcinum* 基準株 ATCC33776, *M. fortuitum* 基準株 ATCC6841 について、従来の同定法による細菌学的性状の比較と薬剤に対する感受性試験を行った。さらに、分離菌7株と *M. porcinum* および類縁菌種の基準株13株について、*rpoB*, *dnaJ*, *hsp65* 遺伝子の塩基配列の相同性を比較した。〔結果〕被検分離菌7株の3遺伝子の塩基配列はすべて100%一致し、薬剤感受性にも菌株間に大きな差はみられなかった。しかし、分離の過程において42℃における菌の発育は陽性から陰性に、コロニーはS型からR型へと変化し、発育速度は3日から7日と遅くなり、マンニト分解能は陽性から陰性になった。

キーワード: *Mycobacterium porcinum*, *M. fortuitum*, IFN- γ 受容体2遺伝子異常, Mendelian susceptibility to mycobacterial disease

はじめに

非結核性抗酸菌は自然界にも広く分布しているが、なかでも *Mycobacterium fortuitum* は人に対する起病性を有することが知られている²⁾³⁾。*M. fortuitum* と類縁の菌群には *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. mageritense*, *M. houstonense*, *M. boenickei*, *M. neworleansense*, *M. brisbanense*, *M. porcinum* などが含まれている⁴⁾⁵⁾。

ところで *M. fortuitum* に近縁の *M. porcinum* は、1983年に東村ら⁶⁾がブタの結核類似性リンパ節炎から分離、報告した。*M. fortuitum* とは異なる独立した迅速発育抗酸菌種で、従来法あるいは DDH 法、16S rRNA 遺伝子塩基配列による方法⁷⁾では同定することが困難であった。

今回、われわれは IFN- γ 受容体2遺伝子異常のある患者から長期にわたって分離された迅速発育抗酸菌を

M. porcinum と同定し、その細菌学的性状、遺伝子塩基配列ならびにモルモットに対する病原性について検討したので以下に報告する。

対象と方法

(1) 症例

1988年生まれの男性。本患者の免疫学的背景と *M. avium* 感染については、先に豊田ら⁸⁾が報告している。それによると、生後1歳3カ月から咳嗽、高熱が持続し、肺膿瘍・肝脾腫・全身リンパ節腫脹のため入院。胃液および肺門リンパ節と肺の生検から *M. avium* が分離され、以来2000年まではkanamycin (KM), isoniazid (INH), rifampicin (RFP) などの抗結核薬を中心とした治療を受け、いったんは病状の改善をみたが、治療中止で再燃したため、治療を再開し、2000年以降はsparfloxacin (SPFX), levofloxacin (LVFX), clarithromycin (CAM),

¹結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部, ²独立行政法人国立病院機構三重病院

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部結核菌情報科, 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: kazumi@jata.or.jp)

(Received 12 Jun. 2008/ Accepted 5 Sep. 2008)

imipenem (IPM), arbekacin (ABK) などの投与を受けた。11歳からは IFN- γ の皮下注射を受けている。これらの治療によって *M. avium* は検出されなくなった。なお、1990年には BCG 接種を受けたが、特別の副反応はみられなかった。

この患者の T リンパ球は、IL-12 刺激による増殖反応および IFN- γ 産生能および PHA 刺激による細胞表面 IL-12R β 1 および IL-12R β 2 の発現が低下しており、さらに IL-12 刺激による STAT4 の核内転位はほとんど認められなかった。IL-12R β 1 および IL-12R β 2 の遺伝子には変異は認められなかった。豊田らの論文発表後に、IFN- γ 受容体 2 遺伝子の変異が認められている。

1996年から2007年にかけて頸部、腋窩、鼠頸部、腕部のリンパ節、ならびに数年前から治療中であるが、皮膚扁平上皮癌部位からも近似した迅速発育抗酸菌が分離された。

(2) 供試菌株

1996年から2007年の間に患者から分離された抗酸菌7株 (A株からG株)、*M. porcinum* 基準株 ATCC33776、*M. porcinum* 参照株として結核予防会複十字病院内視鏡定期点検の際の洗浄水から分離された2株 (H株、I株)、*M. fortuitum* 基準株 ATCC6841 のほかに遺伝子塩基配列の比較にはさらに類縁菌種の ATCC 基準株 11種類を供試した (Table 1)。

Table 1 Mycobacteria used in this study

A. Strains isolated from the patient		
Strain	Date of isolation	Region of isolation
A	June, 1996	Right cervical lymph node
B	January, 1999	Left axillary lymph nodes
C	August, 2000	Right axillary lymph nodes
D	April, 2001	Right inguinal lymph node
E	August, 2003	Right brachial lymph node
F	January, 2005	Left inguinal lymph node
G	February, 2007	Site of a skin-tumor
B. ATCC strains		
<i>M. porcinum</i>		ATCC33776
<i>M. fortuitum</i>		ATCC6841
<i>M. peregrinum</i>		ATCC14467
<i>M. mageritense</i>		ATCC700351
<i>M. mucogenicum</i>		ATCC49650
<i>M. senegalense</i>		ATCC35796
<i>M. septicum</i>		ATCC700731
<i>M. houstonense</i>		ATCC49403
<i>M. boenickei</i>		ATCC49935
<i>M. neworleansense</i>		ATCC49404
<i>M. brisbanense</i>		ATCC49938
<i>M. acetamidolyticum</i>		ATCC35931
<i>M. farcinogenes</i>		ATCC35753
C. Reference strain of <i>M. porcinum</i>		
Strain H	Washings of an endoscope	
I	Washings of an endoscope	

(3) 培養学的・生化学的性状試験⁹⁾¹⁰⁾

発育速度と発育温度の検討は、プロスミック 7H9 液体培地中 37°C 3日間培養した菌液を 10,000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 で培養して行った。コロニーの観察はプロスミック 7H10 寒天培地に被検菌 10,000倍から 1,000,000倍希釈液の 0.1 ml を接種し、37°C で培養した。生化学的性状として硝酸塩還元試験、クエン酸利用能、イノシット分解能、マンニット分解能を調べた。

(4) 遺伝子塩基配列

1% 小川培地 37°C 5日培養菌からの DNA の抽出は、1 白金耳の菌を ISOPLANT (ニッポンジーン) I 液に浮遊させ、95°C 10分間加熱後、ISOPLANT のプロトコールに従い、TE (pH 8.0) 100 μ l に浮遊させ、被検液とした。

遺伝子検査として、*rpoB*¹¹⁾、*hsp65*¹²⁾、*dnaJ*¹³⁾ の塩基配列を決定し、被検株と基準株との間の相同性を検討した。*rpoB* 遺伝子は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードし、このうちの 342 bp をプライマー 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') によって増幅し、分析にはプライマーを含まない 306 bp を用いた。*hsp65* 遺伝子の増幅には Tb11: 5'-ACCAACGATGGTGG TGTGTCCAT, Tb12: 5'-CTTGTGCAACCCGCATACCCT を用いて position 398 から 836 の 439 bp を増幅し、分析にはこのうちのプライマー部分を含まない 401 bp を用いた。*dnaJ* は結核菌の *dnaJ* 遺伝子の position 10 から 376 に相当する部分を J10F: CGIGARTGGGTYGARAATG, J335R: ARICCCGGAALARRTCICC で増幅し、解析にはプライマーを含まない 326 bp を用いた。

PCR 反応は、*rpoB* 遺伝子は 94°C 1分間、66°C 1分間、72°C 1分間を 40 サイクル、*hsp65* 遺伝子は 94°C 1分間、60°C 1分間、72°C 1分間を 45 サイクル、*dnaJ* 遺伝子は 95°C 30秒、55°C 30秒、72°C 1分間を 35 サイクル行った。

それぞれの PCR 産物を精製するためにスピнкаラム (SUPREC TM-02, TAKARA, TAKARA SHUZO Co., Ltd.) を用い、塩基配列の決定は ABI Big Dye terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用いて ABI 310 で実施した。今回の研究に使用した基準株のうち *dnaJ* 法による遺伝子配列を *M. farcinogenes* (AB456563)、*M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* (AB456562)、そして *M. brisbanense* の *hsp65* 法による配列は AB456564 として日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録した。

(5) 薬剤感受性検査

プロスミック NTM¹⁴⁾ (極東製薬工業; 東京) で試験し、プロスミック NTM のプロトコールに従って MIC を測定した。判定は 37°C 培養 3 日後に行った。

(6) モルモットに対する病原性

Hartley 雌モルモットそれぞれ 1 匹ずつに *M. porcinum* (ATCC33776), *M. fortuitum* (ATCC6841), 患者由来菌 A 株, G 株, 内視鏡由来菌 H 株の 2×10^6 CFU を皮下接種し, 7 週間後に剖検し, 病理組織標本を作製し, 病変の有無を調べた。

結 果

(1) 培養学的・生化学的性状

M. porcinum 基準株 ATCC33776, *M. fortuitum* 基準株 ATCC6841, 患者由来株 7 株ならびに, *M. porcinum* 参照

株 2 株の培養学的・生化学的性状を Table 2 に示した。

発育温度についてみると, 全供試菌株が 28°C と 37°C で発育し, さらに 42°C では *M. porcinum* ATCC33776, *M. fortuitum* ATCC6841, *M. porcinum* 参照株 (H 株, I 株) と被検株の A 株のコロニー数は 37°C より少なく, 発育速度も 1 週間かかったが発育した。しかし, 他の患者由来の 6 株 (B 株から G 株) は, 発育不能であった。発育速度は ATCC33776, ATCC6841, A 株は 3 日で発育したが, B 株, C 株, D 株, E 株は 5 日, F 株は 6 日, G 株は 7 日 (小さなコロニー) を要した (Fig.)。寒天培地上における A

Table 2 Cultural and biochemical characterization

Strain	Colony Morphology	Growth Rate	Growth at			Nitrate Reduction	Utilization of		
			28°C	37°C	42°C		Citrate	Inositol	Mannitol
<i>M. porcinum</i> (ATCC33776)	S ^a	3 days	+	+	+ ^c	-	+	+	+
<i>M. fortuitum</i> (ATCC6841)	S	3 days	+	+	+ ^b	+	-	-	-
A	S	3 days	+	+	+ ^c	-	-	+	+
B	S and R ^b	5 days	+	+	-	-	-	+	+
C	R	5 days	+	+	-	-	-	+	+
D	R	5 days	+	+	-	-	-	+	-
E	R	5 days	+	+	-	-	-	+	-
F	R	6 days	+	+	-	-	-	+	-
G	R	7 days	+	+	-	-	-	+	-
H	S	3 days	+	+	+ ^b	+	-	+	+
I	S	3 days	+	+	+ ^c	+	-	+	+

^aSmooth ^bRough ^ca few colonies

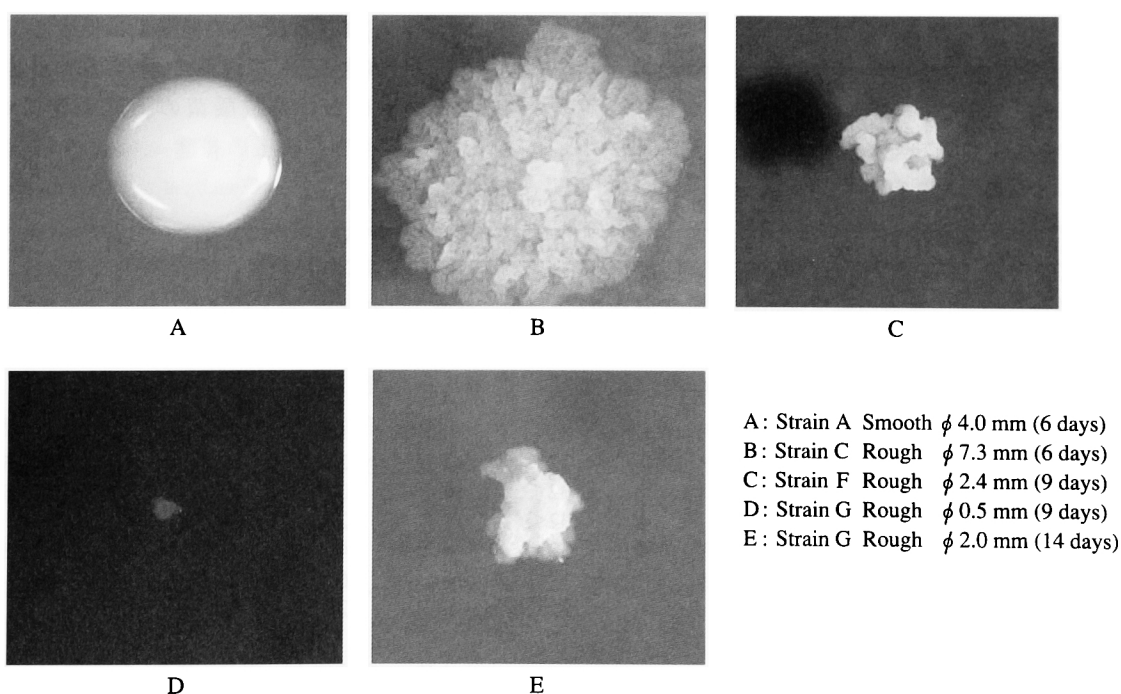


Fig. Colony morphology on the 7H10 agar

株のコロニーはS型であったが、B株はS型とR型コロニーが混在し、C株、D株、E株、F株、G株ではR型コロニーのみが得られた。硝酸塩還元試験はATCC33776と患者由来7株は陰性であったが、ATCC6814と参照株2株は陽性であった。クエン酸利用能はATCC33776は陽性であったが、他はすべて陰性であった。マンニット分解能は患者由来のうちA株、B株、C株は陽性であったが、D株、E株、F株、G株は陰性であった。

Table 3 Relatedness to the strain A (%)

Organism	<i>rpoB</i>	<i>dnaJ</i>	<i>hsp65</i>
<i>M. porcinum</i>	99.7	99.7	100*
<i>M. fortuitum</i>	94.1	93.9	96.9
<i>M. peregrinum</i>	97.1	96.5	99.0
<i>M. mageritense</i>	97.7	70.4	97.1
<i>M. mucogenicum</i>	92.8	71.1	94.0
<i>M. senegalense</i>	98.0	97.4	96.2
<i>M. septicum</i>	97.4	95.7	98.6
<i>M. houstonense</i>	93.5	95.7	97.4
<i>M. boenickei</i>	91.5	98.8	99.0
<i>M. neworleansense</i>	97.4	96.5	97.4
<i>M. brisbanense</i>	94.8	88.0	97.9
<i>M. acetamidolyticum</i>	94.1	93.7	96.9
<i>M. farcinogenes</i>	95.1	95.7	97.1
Patient strain			
B	100	100	100*
C	100	100	100*
D	100	100	100*
E	100	100	100*
F	100	100	100*
G	100	100	100*
Reference strain of <i>M. porcinum</i>			
H	99.3	100	99.5**
I	99.3	100	99.5**

M. porcinum* sqv1⁽¹⁾ *M. porcinum* sqv3⁽¹⁾

(2) 遺伝子塩基配列

Table 3に患者由来A株と他の患者由来株および諸種近縁基準株との*rpoB*, *dnaJ*, *hsp65*の塩基配列の相同性を示した。患者由来全7株の3遺伝子の塩基配列は100%一致し、*M. porcinum*の基準株ATCC33776と*rpoB*では99.7%, *dnaJ*では99.7%, *hsp65*では100%の相同性を示し、また*M. porcinum*参照株(H株、I株)と*rpoB*では99.3%, *dnaJ*では100%, *hsp65*では99.5%の相同性を示した。

(3) 薬剤感受性検査の結果

プロスミックNTMによるMICの測定結果はA株からG株まで大きな違いはなかった(Table 4)。ただし、この方法には迅速発育抗酸菌に対するブレイクポイントが設定されておらず、耐性・感性の判定ができなかった。

(4) モルモットに対する病原性

ATC33776, ATCC6841, A株, G株, H株を接種したモルモットでは、肺の病変に微小な肉芽腫が観察されたが、接種局所および所属リンパ節に病変はみられなかった。

考 察

今回、われわれが経験した*M. porcinum*感染症は1999年IL-12受容体欠損症と診断され、その後、豊田ら⁽⁹⁾によりIL-12/IFN- γ 経路におけるIL-12受容体発現低下、STAT4の核内転位の低下が明らかにされ、さらにその後IFN- γ 受容体2遺伝子異常が認められた患者における1例である。本症例のTリンパ球ではPHA刺激後のIL-12受容体 β 1および β 2の発現量は低下していたが、これら受容体遺伝子には変異は認められなかった。IFN- γ 経路異常における抗酸菌の易感染性については

Table 4 Drug susceptibility (MIC μ g/ml)

Organisms	SM	EB	KM	INH	RFP	LVFX	CAM	TH	AMK
<i>M. porcinum</i> (ATCC33776)	16	16	8	32<	16	0.5	1	8	0.5>
<i>M. fortuitum</i> (ATCC6841)	32	8	16	4	4	1.25	1	4	1
Patient strain									
A	8	16	8	32<	0.5	1	1	16<	1
B	16	16	1	32<	4	2	0.03	16<	0.5>
C	8	16	1	32<	16	0.5	0.06	16<	0.5>
D	8	16	8	32<	8	2	2	16<	1
E	16	16	4	32<	4	4	4	16<	0.5>
F	8	32	8	32<	16	16	2	16<	1
G	8	16	4	32<	8	2	8	16<	2
Reference strain of <i>M. porcinum</i>									
H	8	16	4	32<	2	0.5	1	16<	0.5>
I	8	16	4	32<	4	0.5	0.5	16<	1

streptomycin (SM) ethambutol (EB) kanamycin (KM) isoniazid (INH) rifampicin (RFP) levofloxacin (LVFX) clarithromycin (CAM) ethionamide (TH) amikacin (AMK)

Laurentら¹⁵⁾の優れた総説があり、多くの論文が引用・紹介されている。IFN- γ 経路の異常による抗酸菌易感染性を総称して Mendelian (単一遺伝子病) susceptibility to mycobacterial disease (MSMD) といい、わが国では、高田ら¹⁶⁾の IFN- γ /IL-12経路障害による免疫不全症についての全国667施設へのアンケート調査では、回収率68%のうち32名の患者にMSMDが認められた。この59%にBCG感染症、34%に非結核性抗酸菌感染症がみられたという。抗酸菌は細胞内寄生菌¹⁷⁾であり、抗酸菌感染に対する生体の防御免疫はIFN- γ によって活性化されたマクロファージに依存している。本症例のようにIL-12/IFN- γ のシグナルが障害を受けている場合、IL-12によるT細胞の活性化・IFN- γ 産生・IFN- γ によるマクロファージの活性化が適切に機能せず、抗酸菌に感染・発病しやすく、いったん発病したときは難治性になると考えられる。また戸井田らによってわが国におけるBCG接種後の副作用事例が総説されているが¹⁸⁾、IFN- γ 受容体1遺伝子異常の症例も含まれている。今回のわれわれの症例はIFN- γ 受容体2遺伝子の異常であるが、BCG接種後に異常はみられなかった。

Ottehoffら¹⁹⁾の総説では *IFNGR2* 変異では *M. avium*, *M. fortuitum*, BCG, *M. abscessus* が主な感染菌として示されている。これらのいずれの抗酸菌もヒトに対する病原性は弱いが、起病能を有する可能性がある菌であり、*M. fortuitum* や *M. chelonae* の感染症についてはWallaceら²⁰⁾により多くの症例が報告されている。*M. porcinum* は動物に感染する可能性があり⁶⁾、Taddeiら²¹⁾は *M. avium* subsp. *paratuberculosis* の大がかりな調査の間に牛乳631から52株の迅速発育抗酸菌を分離し、そのうち6株が *M. porcinum* であったという。東村らはブタの結核様顎下リンパ節から *M. fortuitum* 類似の迅速発育菌を分離し *M. porcinum* と命名した。Wallace²²⁾らは、米国内で臨床材料から分離された *M. porcinum* 44株の中28株(63.6%)が外傷に関連し、呼吸器から8株(18.2%)、カテーテルあるいは血液に関連したものの7株(15.9%)であった。リンパ節に関連したものの1株(2.3%)のほかに自然界より2株、その他2株の計48株は、*hsp65* 遺伝子の塩基配列に基づく方法¹²⁾で *sqv* 1から *sqv* 5の5つのグループに分類でき、*sqv* 1にはATCC33775, ATCC33776が含まれ、*sqv* 3は創傷と軟水装置のような環境中からの分離株が含まれていたという。今回われわれがリンパ節より分離した7株は *sqv* 1に一致し、病院の院内感染対策として行っている内視鏡の定期点検時の洗浄水から分離した参照株(H株とI株)は *sqv* 3に一致した。

今回の症例では長期にわたる菌の分離経過中、薬剤に対する感受性や今回行った3種類の遺伝子塩基配列に変化はみられなかったが、培養学的・生化学的性状

に変化がみられた。寒天培地上におけるA株のコロニーはすべてS型であったが、B株ではR型菌が混在し、それ以降R型に傾き、F株、G株はR型菌のみであった。Catherinotら²³⁾の報告では、*M. abscessus* の type strain ATCC19977のS型コロニーは静脈注射後もマウスは生存したが、同一株から分離されたR型菌はマウスを短期間で高率に致死させたという。さらに薄層クロマトグラフィで、静止期と増殖期ともにS型菌はGlycopeptidolipids (GPLs) が認められたが、R型菌ではそれが認められなかったと述べている。今回の分離株については細胞壁構造や脂質の分析が行われていないが、供試株はコロニーの形状を変え、その大きさもFおよびG株は小さくなってきた。さらに発育速度は遅くなり、A株が3日で発育したにもかかわらず、F株とG株は6~7日を要し、発育温度域も42℃は発育不能となった。マンニト分解能も陽性から陰性に変化し、菌体内にて何らかの変化が生じているものと考えられる。工藤²⁴⁾は喀痰中の抗酸菌検査において塗抹陽性培養陰性例が治療中の患者に多くみられ、その要因の一つに菌の代謝活性の低下をあげ、菌株の変異によるものか、著しく発育の遅い株に遭遇する機会が少なくないと記載している。筆者の経験からもコロニーが非常に小さく、発育に時間を要する結核菌がある。今回、われわれの分離菌のモルモットに対する病原性はきわめて弱かったが、斎藤ら²⁵⁾²⁶⁾は *M. fortuitum*-*M. abscessus* のマウスに対する病原性について報告しており、興味ある知見を得ており、動物による感受性に差がある可能性があり、今後、マウスに対する病原性の検討が望まれる。

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²⁷⁾が広く用いられているが、*M. porcinum* は対象になっておらず、同定不明あるいは *M. fortuitum* と判定されることがある。今回の検討においても被検株のDDH法の結果は *M. fortuitum* と *M. peregrinum* にほぼ同程度に発色し、同定不能であった。DDH法で *M. fortuitum* が疑われるにもかかわらず同定不能の場合、*M. porcinum* は従来法では同定困難であり、また16S rRNA法⁶⁾では *M. neworleansense* と *M. porcinum*, *M. farcinogenes* と *M. senegalense* と *M. houstonense*, *M. peregrinum* と *M. septicum* と区別することができないが、今回検討した *rpoB* 法、*dnaJ* 法、*hsp65* 法で *M. porcinum* を他の迅速菌から分けることができ、*M. porcinum* の同定に有用な方法であると考えられる。

ま と め

細胞性免疫異常を示す患者から分離された *M. porcinum* の培養学的、生化学的性状を詳しく調べた。今回、薬剤に対するMICを比較するためにプロスミックNTM

を行ったが、この方法は微量液体希釈法の応用で、主に *M. avium* のような遅発育抗酸菌の MIC を測定するために開発された方法である。このため迅速発育菌に対するブレイクポイントが決められておらず、薬剤の効果が期待できるか否かを決定することができない。今後、同定を正確に行い、臨床データを重ね、基準法として使うことのできる薬剤感受性検査の開発、迅速発育抗酸菌に対して効果の期待できる新薬の開発が望まれる。

謝 辞

供試菌の提供に協力していただきました独立行政法人国立病院機構三重病院小児科 中野貴司先生と共に下野吉樹先生、そして論文を作成するにあたりご助言いただいた前 BCG 研究所所長 戸井田一郎先生に深謝する。

文 献

- 1) 斎藤 肇, 田坂博信, 武井直己: 非定型抗酸菌 Group IV Rapid growers に関する研究—主として自然界系白色発育抗酸菌の分類について—. 日本細菌学雑誌. 1968 ; 23 : 758-766.
- 2) 坂谷光則: 非定型抗酸菌症の疫学と臨床. 結核. 1994 ; 69 : 119-124.
- 3) 田澤節子, 丸茂健治, 樋口道生: 中心静脈カテーテル挿入部位の *Mycobacterium fortuitum* 皮下膿瘍が原因の血流感染の1例. 結核. 2006 ; 81 : 609-612.
- 4) Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr: Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2002 ; 15 : 716-746.
- 5) Schinsky MF, Morey RE, Steigerwalt AG, et al.: Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 2004 ; 54 : 1653-1667.
- 6) Tsukamura M, Nemoto H, Yugi H, et al.: *Mycobacterium porcinum* sp. nov., a Porcine pathogen. Int J Syst Bacteriol. 1983 ; 33 : 162-165.
- 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) Toyoda H, Ido M, Hayashi T, et al.: Impairment of IL-12-dependent STAT4 nuclear translocation in a patient with recurrent *Mycobacterium avium* infection. J Immunol. 2004 ; 172 : 3905-3912.
- 9) Tsukamura M: A review of the methods of identification and differentiation of mycobacteria. (Review). Rev Infect Dis. 1981 ; 3 : 841-861.
- 10) 斎藤 肇: 非定型および自然界系各抗酸菌の有機酸利用能および含水炭素分解能による分類の試み. 胸疾. 1962 ; 6 : 898-902.
- 11) 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.
- 12) Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al.: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 175-178.
- 13) Yamada-Noda M, Ohkusu K, Hata H, et al.: *Mycobacterium* species identification—A new approach via *dnaJ* gene sequencing. Syst Appl Microbiol. 2007 ; 30 : 453-462.
- 14) 河田典子, 河原 伸, 多田敦彦, 他: BrothMIC NTM を用いた非結核性抗酸菌の薬剤感受性についての検討. 結核. 2006 ; 81 : 329-335.
- 15) Laurent J: Genetic dissection of immunity to mycobacteria: The human model. Ann Rev Immunol. 2002 ; 20 : 581-620.
- 16) 高田英俊, 保科隆之, 佐々木由佳, 他: IFN- γ /IL-12 経路障害による免疫不全症の全国アンケート調査結果: BCG 副反応を中心に予防接種に関する文献集 (36) (研究報告) 110, 予防接種リサーチセンター, 2006.
- 17) 佐々木由佳, 楠原浩一, 原 寿郎: 細胞内寄生菌に対する易感染性を示す免疫不全症. 小児内科. 2002 ; 34 (増刊号) : 1226-1231.
- 18) 戸井田一郎, 中田志津子: 日本における BCG 接種による重大な有害事象. 結核. 2007 ; 82 : 809-824.
- 19) Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, et al.: Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. (Review). Nat Genet. 2002 ; 32 : 97-105. (Erratum in: Nat Genet 2002 ; 32 : 331)
- 20) Wallace RJ Jr, Swenson JM, Silcox VA, et al.: Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria (Review). Rev Infect Dis. 1983 ; 5 : 657-79.
- 21) Taddei R, Barbieri I, Pacciarini ML, et al.: *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. Vet Microbiol. 2008 ; 19. [Epub ahead of print]
- 22) Wallace RJ Jr, Brown-Elliott BA, Wilson RW, et al.: Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. J Clin Microbiol. 2004 ; 42 : 5689-5697.
- 23) Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, et al.: Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. Infect Immun. 2007 ; 75 : 1055-1058.
- 24) 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 : 291-299.
- 25) Emori M, Tomioka H, Saito H: Macrophage respiratory burst-inducing activity of *Mycobacterium fortuitum*: relationship with its virulence to mice: 結核. 1991 ; 66 : 421-424.
- 26) Saito H, Tasaka H: Comparison of the pathogenicity for mice of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus*.

J Bacteriol. 1969 ; 99 : 851–855.

1992 ; 67 : 803–806.

27) 江崎孝行：DNAを使った抗酸菌の迅速同定. 結核.

Original Article

MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF *M. PORCINUM* ISOLATED FROM A PATIENT WITH IMPAIRMENTS IN IL-12/IFN- γ PATHWAY¹Yuko KAZUMI, ¹Shinji MAEDA, ¹Tadashi UDAGAWA, ¹Isamu SUGAWARA, and ²Hitoshi KAMIYA

Abstract [Purpose] *Mycobacterium porcinum* has been successfully isolated from the patient with abnormal signal transduction pathway of IL12/IFN- γ . The properties of each bacterium were determined by conventional identification methods, DNA sequencing analysis and MIC assay.

[Materials and Methods] *M. porcinum* was isolated 7 times from 1996 to 2007 from cervical lymph node, axillary lymph nodes, inguinal lymph node, brachial lymph node and site of a tumor of the patient. In another occasion, mycobacteria were isolated from lavage fluid of the endoscope in routine inspection. Using these mycobacteria, *M. porcinum* (ATCC33776) and *M. fortuitum* (ATCC6841), the conventional identification method and MIC assay were carried out. For analyses of the DNA sequencing (*rpoB*, *dnaJ* and *hsp65*), the ATCC type strain of mycobacteria (11 strains) which are closely related to *M. porcinum* were also used.

[Results and Discussion] DNA sequencing analyses of the 7 samples isolated from the patient, were concurrently identical in 3 different genes. Drug susceptibility test showed that 7 isolates had no marked change. In conventional identification analyses, *M. porcinum* (ATCC33776), *M. fortuitum*

(ATCC6841), and *M. porcinum* that were isolated in 1996, were able to grow at 42°C. However, 6 isolates that were isolated after 1999, did not grow at 42°C. The colony detectable days of these 7 strains changed from 3 to 7. Over the time, the morphology of each colony changed from smooth to rough. Though the initial isolate had the ability to utilize mannitol, the later 4 isolates had no such ability.

Key words: *Mycobacterium porcinum*, *M. fortuitum*, IL-12/IFN- γ pathway, Mendelian susceptibility to mycobacterial disease

¹Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), ²National Hospital Organization Mie National 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)