

VNTR法の解析により確認された*Mycobacterium avium*と *Mycobacterium intracellulare*との複合感染の1例

¹常松 範子 ³後藤美江子 ¹斉木由美子 ²馬場美智子
⁴宇田川 忠 ⁴鹿住 祐子

要旨：〔目的〕*M. avium*, *M. intracellulare* 複合感染の確認のため、VNTR法を実施し、電気泳動パターンの解析を行った。〔対象および方法〕症例：57歳女性、*M. avium*長期排菌者の2004年分離菌と2006年喀痰沈渣および分離菌から孤立コロニーを作製し、それぞれのコロニーを16S rRNA法にて菌種同定後、VNTR法を実施した。〔結果〕①2004年分離菌は単独の*M. avium*であった。②2006年喀痰沈渣と分離菌はVNTR法により複数の抗酸菌の存在が示唆された。③2006年喀痰沈渣と分離菌は16S rRNA遺伝子解析により*M. avium*と*M. intracellulare*に同定した。④2004年と2006年の*M. avium*は同一の電気泳動パターンを示した。⑤患者宅の風呂場からは、*M. avium*は検出されず、感染源は特定できなかった。〔考察〕VNTR法の解析により、本症例は治療中に*M. avium*と*M. intracellulare*の複合感染に推移したと考えられ、本症例のような複合感染の場合は、特にVNTR法の解析が有用と思われる。
キーワード：*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, 複合感染例, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR法), 非結核性抗酸菌 (NTM)

はじめに

結核菌の亜型分類は、IS6110を用いた制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism: 以下、RFLP) が主に使われている¹⁾。一方、*M. avium*の亜型分類では、IS901 RFLP²⁾, IS1245 RFLP³⁾などによって解析が行われているが、このRFLP手法は工程が煩雑で、日数を要する。これらの欠点を補う手法としてVNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats: 縦列反復多型) が普及し、結核菌群においてはSupplyら⁴⁾⁶⁾, Frothinghamら⁵⁾によりVNTR領域が報告された。今回、われわれは西森ら⁷⁾の方法に準拠し、複合感染を疑う患者の喀痰および分離した抗酸菌を用いて、VNTR法による解析を行い、*M. avium*と*M. intracellulare*を検出した症例について報告する。

症 例

患 者：57歳女性，主婦。

現病歴：2003年1月住民健診により胸部異常陰影を指摘され、同月当院内科を受診した。

1月17日の喀痰は抗酸菌集菌塗抹、液体培養検査共に陰性であった。しかし、1月28日の気管支洗浄液（左上舌区，左B⁶⁾）はマイコバクテリウム アビウム・イントラセルラー核酸同定精密検査（以下、MAC-PCR）⁸⁾実施により*M. avium* (+)，抗酸菌集菌塗抹土（ガフキー1号相当），液体培養検査は2週目に発育陽性となった。2月6日よりエタンブトール (ethambutol, EB)，リファンピシン (rifampicin, RFP)，イソニアジド (isoniazid, INH)，およびクラリスロマイシン (Clarithromycin, CAM) による治療を開始したが、白血球減少のため抗結核薬の服用を約1年半中断し、2004年7月からエリスロマイシン (erythromycin, EM) 1剤に変更した。2004年11月5日の喀痰は、抗酸菌集菌塗抹1+（ガフキー2号相当），液体培養検査で8日目発育陽性，同定検査により*M. avium*と確定した。

断続的な治療中断があり、2006年1月30日の喀痰は、

¹東京都立大塚病院検査科，²同内科，³東京大学医学部附属病院感染制御部微生物検査部門，⁴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

連絡先：常松範子，東京都立大塚病院検査科，〒170-8476 東京都豊島区南大塚2-8-1
(E-mail: noriko-o@ohtsuka-hospital.toshima.tokyo.jp)
(Received 26 Mar. 2008 / Accepted 8 Jul. 2008)

MAC-PCRにて *M. avium* (+), *M. intracellulare* (+), 抗酸菌集菌塗抹土 (ガフキー 1号相当), 液体培養検査は8日目発育陽性となった。現在はRFP, EB, CAM3剤による通院治療を継続している。

CT所見: 2004年6月30日, 右肺S¹に約1cmの空洞があり, 周囲に散布巣を認め, 中葉や右肺下葉S⁸に小粒状影が散在。また, 左肺上葉S¹⁺²にも小粒状影が散在し, 左肺下葉S⁶にはtree-in-bud appearanceがあり, 舌区にはair bronchogramを伴う楔状の浸潤影を認めた。2006年1月23日, 右S^{3a}領域を中心に結核病巣酷似の壁の比較的厚い空洞性病変と小葉中心性の散在性病変を認めた。右S⁵領域にも散布性病変, さらに左舌区を中心に気管支拡張症を伴うconsolidationを認めた。また, 左S⁶領域には気道散布性病変も認めた。2006年3月1日, 右S^{3a}領域の空洞性病変周辺に浸潤像を認め, 明らかな悪化傾向があった。これら病変は, 画像所見上では活動性の結核病巣の可能性を否定できなかった。

臨床経過: Fig. 1に示す。

対 象

2004年と2006年の喀痰は前処理を集菌法にて行い, 2%小川培地とBBL MGIT (Mycobacterium Growth Indi-

cator Tube) 抗酸菌システム (以下, MIGIT)¹⁰⁾へ接種した。抗酸菌の確認はZiehl-Neelsen染色にて行い, 検出菌の一部は抗酸菌群核酸同定精密検査 (以下, DDH法)⁹⁾により菌種を同定した。

また, 感染源や感染経路を特定するため, 患者自宅浴室の排水口, シャワーヘッドから抗酸菌分離を試みた。排水口, シャワーヘッドを綿棒で拭い精製水で抽出し, その沈渣を用いて抗酸菌分離培養を行った。

方 法

(1) 被検菌および材料

①2004年11月5日の喀痰からの2%小川培地分離菌で, DDH法により同定した *M. avium* 株 (KK41-440)。②MAC-PCRにより *M. avium* と *M. intracellulare* の同時陽性となった2006年1月30日の喀痰凍結保存沈渣 (KK41-439) と2%小川培地分離菌 (KK41-438)。③患者宅浴室 (排水口, シャワーヘッド) から培養し, Ziehl-Neelsen染色により抗酸菌と確認した排水口MGIT発育菌 (KK41-442) およびシャワーヘッドMGIT発育菌 (KK41-444) を材料とした。

(2) 孤立コロニーの作製

滅菌蒸留水4.5 mlを分注した試験管に小川培地分離菌

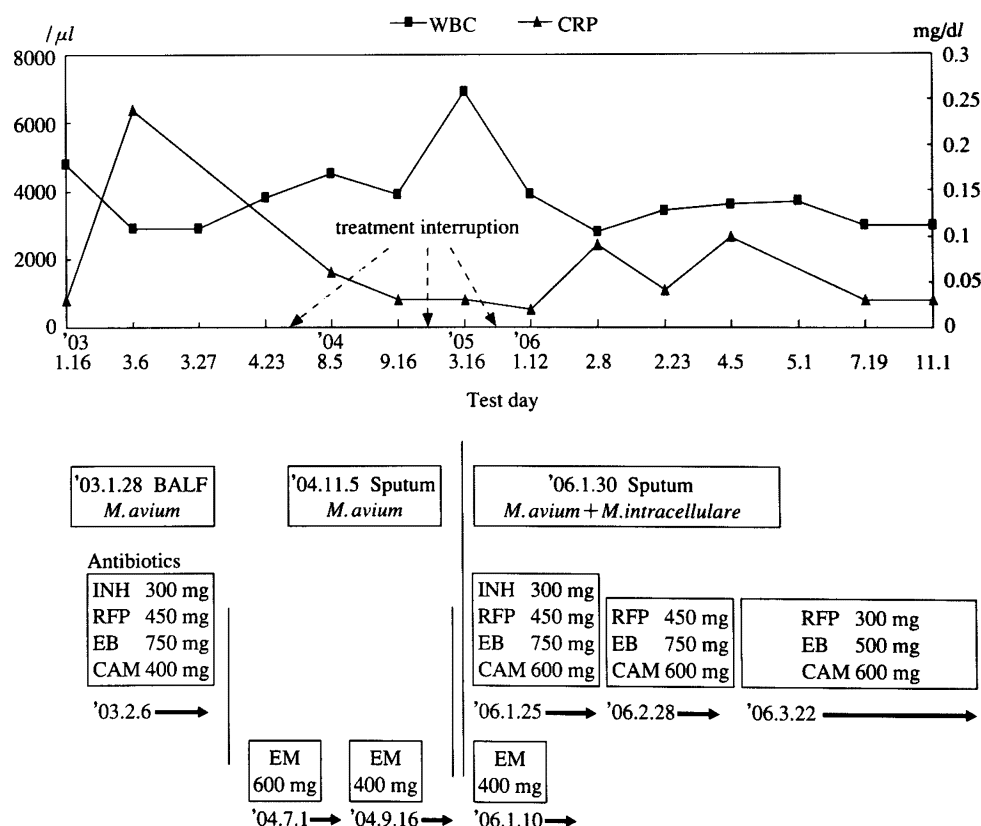


Fig. 1 Clinical course and laboratory data

を浮遊させ、よく混和後、菌の塊を取り除くため、ミリポアフィルター 1.2 μ で濾過し、菌液 0.5 ml に滅菌蒸留水 4.5 ml を混和して 10 倍希釈菌液とした。100 倍、1000 倍希釈菌液を作製し、各希釈液 100 μ l を Middlebrook 7H11 寒天培地（以下、7H11 培地）に接種、37 $^{\circ}$ C 2 週間培養した。喀痰沈渣はミリポアフィルターで濾過した原液を 7H11 培地で 37 $^{\circ}$ C 4 週間培養した。

（3）DNA 抽出¹¹⁾

7H11 培地からそれぞれ孤立コロニーを 10 個釣菌し、滅菌蒸留水 600 μ l と混和、95 $^{\circ}$ C 10 分間加温、12,000 rpm 10 分間遠心沈殿してその上清を用いた。

（4）菌種の同定

被検菌株の同定は孤立コロニーを増菌して、16S rRNA 遺伝子解析¹¹⁾により決定した。

（5）VNTR 法による解析

西森ら⁷⁾の方法に準拠し、16 種類のプライマーセット（1～16）を使用し、被検菌株の DNA 抽出液を PCR 増幅後、増幅産物 1 μ l を 1 $\times$ Tris-Acetate (TAE)、2.5% アガロースゲル（NIPPON GENE；Agarose 21）にて 100 bpDNA Ladder Marker（TOYOBO）と共に電気泳動（60～70 分間）し、エチジウムブロマイドにより DNA 染色した。さらに電気泳動パターンを写真撮影し、目視による解析を行った。

結 果

BDH により、*M. avium* と同定した 2004 年の喀痰の小

川培地分離菌は、VNTR 法においても単独の *M. avium*（Fig. 2A）と確認できた。2006 年の喀痰沈渣と小川培地分離菌は VNTR 法により複数の抗酸菌の存在が示唆された（Fig. 2B）。複数の菌の混在が確認された材料をシングル化し、これらの孤立コロニーを 16S rRNA 遺伝子解析により同定した結果、*M. intracellulare* と *M. avium* であった。VNTR 法の電気泳動パターンを目視により比較したところ、*M. intracellulare*（Fig. 2C）と *M. avium*（Fig. 2D）は異なったパターンを示し、鑑別可能であった。また、孤立コロニーから DNA 抽出した 2004 年と 2006 年の *M. avium* は VNTR 法の電気泳動で同一パターンを示した。

一方、患者宅の風呂場から検出された抗酸菌は 16S rRNA 遺伝子解析により、シャーワーヘッドから *M. fortuitum*、排水口から *M. mageritense* を確認できたが、*M. avium* や *M. intracellulare* は検出されなかった。

考 察

M. avium と *M. intracellulare* は細菌学的に類似するため *M. avium* complex（以下、MAC）と総称されている。MAC 感染症は呼吸器感染の起因菌の 70% 以上を占め、人畜共通感染症としても重要性が高い。非結核性抗酸菌（Non-tuberculous mycobacteria：NTM）は環境に広く分布し、結核菌とは異なり人から人への感染はなく、環境から感染すると考えられている。また、複数の菌種の非結核性抗酸菌を同時にまたは、時期を隔てて検出すること

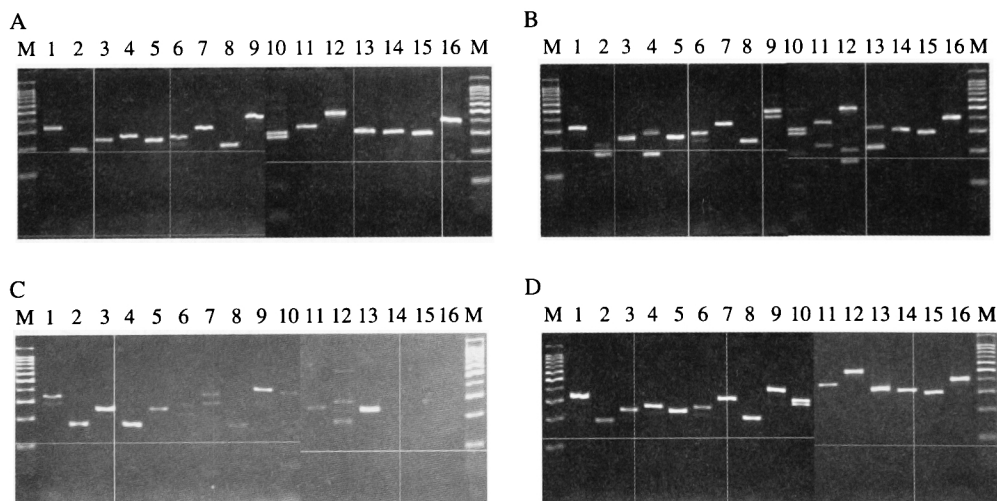


Fig. 2 VNTR pattern of MAC clinical isolates.

The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The lanes 1 to 16 are the number of each primer set. M: 100 bp DNA ladder marker.

A: *M. avium* (KK41-440, 2004)

B: complex infection of *M. avium* and *M. intracellulare* (KK41-438, 2006)

C: *M. intracellulare* (KK41-438, 2006)

D: *M. avium* (KK41-438, 2006)

もまれではなく、特に *M. avium* と *M. intracellulare* の混合排菌は時々見受けられる。本症例は、数度の治療中断があり、*M. avium* 単独から *M. intracellulare* との複合感染に推移した背景は確認できなかった。環境の抗酸菌分離から感染源や感染経路の特定も試みたが、MAC を分離できず、感染源および感染経路は特定できなかった。

今回用いた VNTR 法は反復塩基配列の存在する部位を PCR 法で増幅し、各部位における PCR 増幅産物の大きさから反復単位数（アリルプロファイル）を求め、さらに数値化することによりデータ比較が容易である。また、PCR を利用するため迅速かつ簡便で、再現性も高く、少量の抽出 DNA あるいはオートクレープ後の死菌でも分析が可能とされる。しかし、現状では *Mycobacterium tuberculosis* と *M. avium* のみ¹²⁾ VNTR 法による型別は可能であるが、*M. intracellulare* 型別は確立されていない。

本症例の *M. avium* は VNTR 法の型別により 2004 年と 2006 年株とも同一の電気泳動パターンを呈し、同じ *M. avium* が排菌されていたと思われる。しかし、加療時にはポリクロナル感染を考慮することも必要であり、また、集落形成の異なる 3 種の集落変異株（SmT, SmO, Rg）も考えられ、VNTR 法による型別が判断の指標になると考えられた。

一方、*M. intracellulare* の VNTR 法の型別はできなかったが、*M. avium* とは異なる電気泳動パターンを呈したため、両者の違いを判別することは可能であり、複数の抗酸菌感染が疑われる場合には、VNTR 法による解析は有用であると思われた。

ま と め

本症例のような MAC および *Mycobacterium kansasii* または *M. tuberculosis* との複合感染は、DDH 法や RFLP 法によって複数の菌種の混在を証明することは困難であるが、VNTR 法では簡便に行うことができる。さらに、VNTR 法では *M. avium* の型別が可能であり、本症例のように抗酸菌の複合感染を疑う症例や他の細菌由来の DNA による夾雑の影響が考えられる場合は、孤立コロニーの DNA 抽出液を用いた VNTR 法の解析は有用性が高いと思われた。

文 献

- 1) van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al.: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993; 31: 406-409.
- 2) Nishimori K, Eguchi M, Nakaoka Y, et al.: Distribution of IS901 in strains of *Mycobacterium avium* complex from swine by using IS901-detecting primers that discriminate between *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2102-2106.
- 3) 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.
- 4) Supply P, Magdalena J, Himpens S, et al.: Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol Microbiol. 1997; 26: 991-1003.
- 5) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 1998; 144: 1189-1196.
- 6) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol. 2000; 36: 762-771.
- 7) 西森 敬, 内田邦夫, 田中 聖, 他: VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. 動物衛生研究所研究報告. 2003; 109: 25-32.
- 8) 古賀宏延: 第6章 核酸増幅法. 「新結核菌検査指針 2000」, 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編, 結核予防会, 東京, 2000, 78-94.
- 9) 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.
- 10) 斎藤 肇: 第4章 分離培養法. 「新結核菌検査指針 2000」, 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編, 結核予防会, 東京, 2000, 27-42.
- 11) 鹿住祐子, 前田伸司, 菅原 勇: *rpoB* 遺伝子と 16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み. 結核. 2006; 81: 551-558.
- 12) 松本智成: 結核症の疫学解析ツール Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法について. 呼吸器科. 2007; 11: 86-90.

1) van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al.: Strain

Case Report

USEFULNESS OF THE VARIABLE NUMBERS OF TANDEM REPEATS (VNTR)
ANALYSIS FOR COMPLEX INFECTIONS OF
MYCOBACTERIUM AVIUM AND *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE*¹Noriko TSUNEMATSU, ³Mieko GOTO, ¹Yumiko SAIKI, ²Michiko BABA,
⁴Tadashi UDAGAWA, and ⁴Yuko KAZUMI

Abstract [Purpose] The bacilli which were isolated from a patient suspected of the mixed infections with *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*, were analyzed. The genotypes of *M. avium* in the sedimented fractions of treated sputum and in some colonies isolated from Ogawa medium were compared by the Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR).

[Object and method] Case: A woman, aged 57. Mycobacterial species isolated from some colonies by culture in 2004 and 2006 and from the treated sputum in 2006, were determined by DNA sequencing analysis of the 16S rRNA gene. Also, by using VNTR, the genotype of mycobacteria was analyzed.

[Results] (1) The colony isolated from Ogawa medium in 2004 was monoclonal *M. avium*. (2) By VNTR analyses of specimens in 2006, multiple acid-fast bacteria were found in the sputum sediment and in isolated bacteria from Ogawa medium. (3) By analyses of 16S rRNA DNA sequence, *M. avium* and *M. intracellulare* were found in the colonies isolated from the sputum sediment and the Ogawa medium in 2006. (4) The same VNTR patterns were obtained in *M. avium* in 2004 and 2006 when single colony was analyzed. (5) From the showerhead and culvert of the bathroom in the patient's

house, *M. avium* was not detected.

[Discussion] By VNTR analyses, it was considered that the mixed infections of *M. avium* and *M. intracellulare* had been generated during treatment in this case. Therefore, in the case of suspected complex infection, VNTR analysis would be a useful genotyping method in *M. avium* complex infection.

Key words : *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, Complex infection, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR), Non-tuberculous mycobacteria (NTM)

¹Department of Clinical Laboratory, and ⁴Internal Medicine, Tokyo Metropolitan Ohtsuka General Hospital, ³Department of Infection Control and Prevention, University of Tokyo Hospital Internal Medicine, ⁴Pathology Division, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis (RIT), Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to : Noriko Tsunematsu, Department of Clinical Laboratory, Tokyo Metropolitan Ohtsuka General Hospital, 2-8-1, Minamiohtsuka, Toshima-ku, Tokyo 170-8476 Japan.

(E-mail: noriko-o@ohtsuka-hospital.toshima.tokyo.jp)