

今村賞受賞記念講演

肺 *Mycobacterium avium* 感染症における病勢と菌遺伝子型との関連

菊地 利明

要旨：非結核性抗酸菌症は、致死的な慢性呼吸器感染症へと進展しうる疾患である。また、本症には病状が比較的長期間安定している症例もあり、その病勢を予測する指標は十分確立されていない。そこで、2005年から2006年にかけて東北大学病院呼吸器内科を受診し、気道検体から *M. avium* 菌が分離培養された全37症例を対象に、菌の多型縦列反復配列 (VNTR) と臨床経過との関連を後ろ向きに解析した。細菌学的診断後1年以内に抗菌剤療法が開始となっていた15症例を増悪型、診断後2年以上抗菌剤療法が開始されていなかった9症例を安定型と定義した。そして、菌のVNTR遺伝子型をクラスター解析したところ、増悪型症例の菌と安定型症例の菌では、集積するクラスターは異なっていた。さらに、多重ロジスティック回帰分析によって、菌のVNTR遺伝子型からその非結核性抗酸菌症の病勢を有意に予測できるモデルが構築可能であった。非結核性抗酸菌のVNTR遺伝子型を調べることによって、非結核性抗酸菌症の病状が進行性であるか否かを予測できることが示唆された。

キーワード：非結核性抗酸菌症，医療基準，ミニサテライト反復，計算生物学，クラスター解析

はじめに

非結核性抗酸菌 (NTM) 症は、結核菌群とライ菌を除いた抗酸菌による肉芽腫性感染症であり、治癒の確実に見込める化学療法が確立されていないことから、致死的な慢性呼吸器感染症へと進展しうる^{1)~3)}。しかし、NTM症の進行具合は様々で、病状が比較的急速に進行する症例もあれば、逆に数十年間安定している症例もある^{1)~3)}。その理由はわかっておらず、NTM症の病勢を予測する指標もない。このため、本症の診療ガイドラインにおいては、「診断すなわち治療ではなく、診断後どのような症例に治療を始めるべきかは不明」とされている^{3)~5)}。

そこで当該研究では、NTM症の病状が進行する危険性を予測して治療適応の指針とすることを目標に、NTM症の病原菌として最も頻度の多い *Mycobacterium avium* 菌を取り上げ、菌遺伝子型とそのNTM症患者の臨床経過との関連をレトロスペクティブに解析した⁶⁾。

対象と方法

2005年1月から2006年12月までに東北大学病院呼吸器内科で *M. avium* 菌が培養された全症例37名を対象とした。そのうち26名は臨床経過と胸部画像より肺NTM症と診断されたが、11名は肺NTM症ではなく一過性の感染と考えられた (Table)。肺NTM症患者26名のうち、併発した肺癌関連死のために肺NTM症の経過が追跡できなかった1名と過敏性肺炎型の1名を除き、*M. avium* 菌が検出されてから抗菌療法が開始されるまでの期間が10カ月以内だった15名を増悪型、*M. avium* 菌が検出されてから2年以上抗菌療法が開始されなかった9名を安定型と定義した。

M. avium 菌の遺伝子型は、variable numbers of tandem repeats (VNTR) 型別法 (Fig. 1) を用いて、ゲノム上に存在するミニサテライト領域の中から選択した16カ所における、縦列反復配列の反復数で決定した^{7)~13)}。菌遺伝子型間の相違度はマンハッタン距離で算出し、これを近

Table Demographic and clinical characteristics of subjects

	<i>M. avium</i> lung disease (N=26)	No <i>M. avium</i> lung disease (N=11)	<i>M. avium</i> lung disease (N=24)	
			Progressive disease (N=15)	Stable disease (N=9)
Mean age (male/female)	58 (7/19)	63 (7/4)	58 (5/10)	54 (0/9)
Fibrocavitary lung disease	3		3	0
Nodular bronchiectatic lung disease	22		12	9
Hypersensitivity-like lung disease	1			

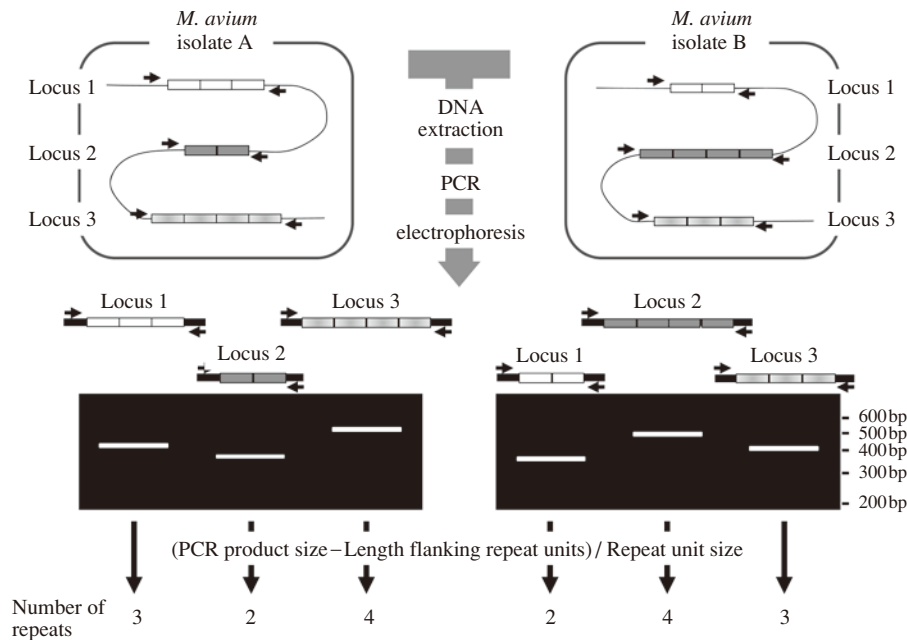


Fig. 1 The polymerase chain reaction (PCR)-based method to profile variable numbers of tandem repeats (VNTR). Using the DNA extracted from *M. avium* isolates, mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU) loci were amplified by PCR. The PCR products were run on an agarose gel to determine the size of each amplicon. From the size of the PCR product, the number of repeat units was calculated.

隣結合法で解析することにより樹形図を作成した¹⁴⁾¹⁵⁾。さらに多重ロジスティック回帰分析を用いて、*M. avium* 菌の遺伝子型から肺NTM症の増悪危険率を予測するモデルを構築した。

結 果

全症例37名から培養された*M. avium* 菌の遺伝子型はFig. 2に示すとおりである。3症例(2・13・22)からは、遺伝子型の異なる株がそれぞれ2株ずつ得られた。この*M. avium* 菌全40株の遺伝子型を樹形図解析したところ、3つのクラスター(クラスターA・B・Cと命名)に分類された(Fig. 3)。クラスターAには安定型肺NTM症患者から得られた菌株が有意に集積し($p=0.02$)、クラスターCには増悪型肺NTM症患者から得られた菌株が

有意に集積した($p=0.01$)。

そこで、*M. avium* 菌の遺伝子型から肺NTM症の増悪危険率を予測するモデルを作成するために、多重ロジスティック回帰分析を行った。Ma-31から各菌株へのマンハッタン距離を用いることによって、最も有意な予測モデルが構築された(年齢補正オッズ比, 1.95; 95%信頼区間, 1.16-3.30; $p=0.01$)。このモデルを、2007年に東北大学病院呼吸器内科で肺NTM症と診断された症例も含めた増悪型肺NTM症19症例と安定型肺NTM症13症例で検証したところ、増悪型群と安定型群の増悪危険率はそれぞれ平均0.77と0.30で増悪型群が有意に高く($p=0.003$, マン-ホイットニーノンパラメトリック検定), 感度(増悪型で[増悪危険率>0.5]の割合)は79%, 特異度(安定型で[増悪危険率<0.5]の割合)は

<i>M. avium</i> Isolate	MIRU Locus															
	MATR -1	MATR -2	MATR -3	MATR -4	MATR -5	MATR -6	MATR -7	MATR -8	MATR -9	MATR -10	MATR -11	MATR -12	MATR -13	MATR -14	MATR -15	MATR -16
Ma-1	2	0	1	2	2	1	2	2	3	2	2	3	2	2	2	3
Ma-2a	1	1	2	3	2	2	2	1	4	3	1	3	0	3	2	2
Ma-2b	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-3	1	1	5	1	2	1	1	2	3	2	1	3	0	2	2	3
Ma-4	2	2	2	0	3	3	3	2	2	0	4	3	2	4	3	2
Ma-5	2	2	1	0	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3
Ma-6	2	0	1	1	2	1	6	2	3	2	2	3	2	2	2	3
Ma-7	2	0	1	2	2	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3
Ma-8	2	1	5	2	2	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3
Ma-9	2	1	1	1	2	1	6	2	2	2	2	3	0	2	2	3
Ma-10	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-11	1	0	4	1	2	1	2	2	2	2	2	3	0	3	2	3
Ma-12	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-13a	1	1	5	1	2	1	1	2	3	2	1	3	0	2	2	3
Ma-13b	1	0	5	1	2	1	6	2	3	2	2	3	2	2	2	3
Ma-14	1	1	2	1	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-15	2	0	1	1	2	1	2	2	2	2	2	3	0	2	2	3
Ma-16	2	2	1	2	2	1	3	2	2	0	2	3	0	3	2	1
Ma-17	2	2	5	2	2	1	4	1	2	2	4	3	1	2	4	2
Ma-18	1	1	1	2	2	1	1	2	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-19	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-20	2	2	2	0	3	1	3	4	2	1	3	3	2	5	4	3
Ma-21	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-22a	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	2	2	2
Ma-22b	2	2	2	3	3	1	2	1	3	3	1	3	0	2	2	2
Ma-23	2	0	5	1	2	1	6	2	2	3	2	3	0	3	2	3
Ma-24	1	0	5	1	2	1	6	2	3	2	2	3	2	2	2	3
Ma-25	2	1	2	2	2	1	1	2	3	3	1	3	0	3	4	1
Ma-26	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-27	2	0	1	1	2	1	1	2	3	2	2	3	2	2	2	3
Ma-28	1	1	2	1	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-29	1	0	5	1	2	1	2	2	2	3	2	3	0	2	2	3
Ma-30	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-31	2	0	1	1	2	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3
Ma-32	2	1	1	1	2	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	3
Ma-33	1	1	2	1	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-34	1	1	5	1	2	1	1	2	3	2	1	3	0	2	2	3
Ma-35	1	0	1	1	2	1	1	2	3	2	2	3	2	2	2	3
Ma-36	1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	3	0	3	2	2
Ma-37	2	0	1	2	2	1	2	2	2	3	2	3	0	2	2	3

Fig. 2 VNTR profiles of 40 clinical *M. avium* isolates. The numbers of tandem repeat units at 16 MIRU loci are shown for each *M. avium* isolate. Two different *M. avium* isolates were cultured from respiratory samples of subjects 2, 13 and 22. They are referred to as Ma-2a/b, Ma-13a/b and Ma-22a/b, respectively.

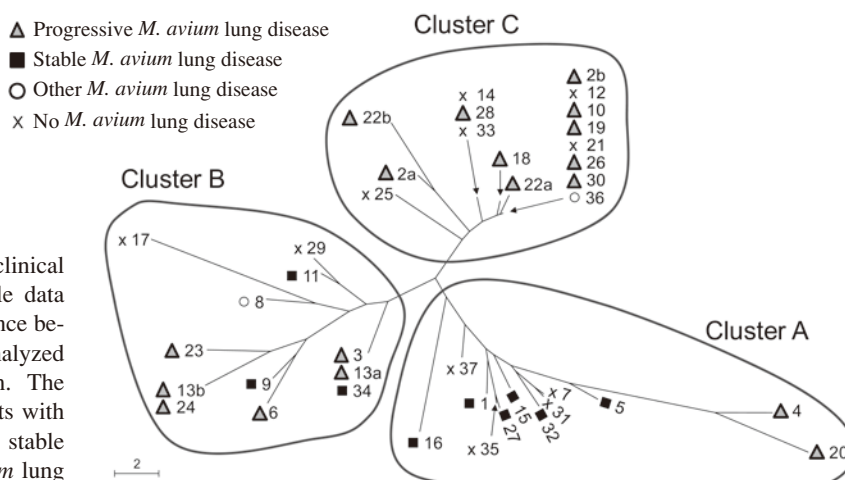


Fig. 3 Cluster analysis of *M. avium* clinical isolates. Based on the VNTR profile data shown in Fig. 2, the Manhattan distance between each pair was calculated and analyzed using a neighbor-joining algorithm. The distribution of *M. avium* from subjects with progressive *M. avium* lung disease, stable *M. avium* lung disease, other *M. avium* lung disease, and no *M. avium* lung disease, is shown as a radial dendrogram. The scale bar indicates genetic distance.

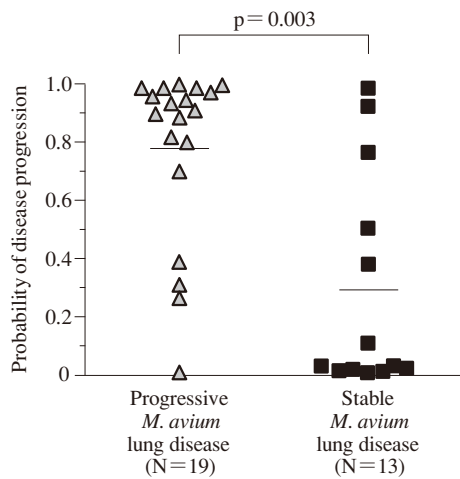


Fig. 4 Estimates of *M. avium* lung disease progression. The probabilities of disease progression were calculated from the logistic regression analysis according to the Manhattan distances of *M. avium* isolates from Ma-31. Results are shown for subjects with progressive or stable *M. avium* lung disease. Horizontal lines indicate mean values for the results.

77%であった (Fig. 4)。

ま と め

本研究によって、*M. avium* 菌による肺NTM症の病勢と菌遺伝子型とは関連があり、菌遺伝子型を調べることによって、その肺NTM症の増悪危険性を推測できることが示唆された。

これまで、NTM症の病勢と*M. avium* 菌の形質との関連はいくつかの論文で指摘されている。例えば、血清型1/4/8の菌は病原性が高いという報告、平滑で透明なコロニーは菌分裂能やサイトカイン産生刺激能に富むという報告、そして、血清型4の菌によるNTM症は予後不良という報告がある^{16)~18)}。今後これら既報告の*M. avium* 菌の血清型や性状と、今回われわれが用いた菌VNTR遺伝子型がどのように対応しているのかを調べていく必要がある。さらに、今回のわれわれの検討は少数例のレトロスペクティブ解析であり、多数例のプロスペクティブ解析によって、今回用いた病勢のパラメーターが臨床的に妥当かどうかを今後検討していく予定である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、渡辺彰教授（東北大学加齢医学研究所）と貫和敏博教授（東北大学大学院医学系研究科）をはじめ、多くの先生方からご指導とご助力を賜ったことに深謝いたします。

文 献

1) Field SK, Cowie RL : Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. *Chest*. 2006 ; 129 : 1653-1672.

2) Glassroth J : Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Chest*. 2008 ; 133 : 243-251.

3) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. : An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 ; 175 : 367-416.

4) 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会/日本呼吸器学会感染症・結核学術部会：肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針—2008年。結核。2008 ; 83 : 525-526.

5) 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会/日本呼吸器学会感染症・結核学術部会：肺非結核性抗酸菌症化学療法に関する見解—2008暫定。結核。2008 ; 83 : 731-733.

6) Kikuchi T, Watanabe A, Gomi K, et al. : Association between mycobacterial genotypes and disease progression in *Mycobacterium avium* pulmonary infection. *Thorax*. 2009 ; 64 : 901-907.

7) Bull TJ, Sidi-Boumedine K, McMinn EJ, et al. : Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes*. 2003 ; 17 : 157-164.

8) Mobius P, Luyven G, Hotzel H, et al. : High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing. *J Clin Microbiol*. 2008 ; 46 : 972-981.

9) Motiwala AS, Li L, Kapur V, et al. : Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect*. 2006 ; 8 : 1406-1418.

10) Overduin P, Schouls L, Roholl P, et al. : Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2004 ; 42 : 5022-5028.

11) Romano MI, Amadio A, Bigi F, et al. : Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol*. 2005 ; 110 : 221-237.

12) Thibault VC, Grayon M, Boschirolini ML, et al. : New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol*. 2007 ; 45 : 2404-2410.

13) Turenne CY, Wallace R Jr, Behr MA : *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin Microbiol Rev*. 2007 ; 20 : 205-229.

14) Felsenstein J : PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*. 1989 ; 5 : 164-166.

15) Saitou N, Nei M : The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*.

- 1987 ; 4 : 406–425.
- 16) Gangadharam PR, Perumal VK, Crawford JT, et al.: Association of plasmids and virulence of *Mycobacterium avium* complex. Am Rev Respir Dis. 1988 ; 137 : 212–214.
- 17) Shiratsuchi H, Toossi Z, Mettler MA, et al.: Colonial morphology as a determinant of cytokine expression by human monocytes infected with *Mycobacterium avium*. J Immunol. 1993 ; 150 : 2945–2954.
- 18) Maekura R, Okuda Y, Hirotsu A, et al.: Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. J Clin Microbiol. 2005 ; 43 : 3150–3158.

————— Meamorial Lecture by the Imamura Award Winner —————

DISEASE PROGRESSION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM*
PULMONARY INFECTION AND THE
MYCOBACTERIAL VARIABLE NUMBER TANDEM REPEAT (VNTR) TYPING

Toshiaki KIKUCHI

Abstract The disease progression of nontuberculous mycobacterial (NTM) pulmonary infection is variable, and it is sometimes difficult to distinguish between patients who require immediate therapy and those in whom such a decision can be withheld. Here we show that the progression of NTM lung disease due to *Mycobacterium avium* infection is significantly associated with the mycobacterial genotype. This suggests that genotyping of *M. avium* isolates may enable us to predict whether the lung disease will progress or not.

Key words: Nontuberculous mycobacteriosis, Treatment

standard, Minisatellite repeat, Computational biology, Cluster analysis

Department of Pulmonary Medicine, Tohoku University Hospital

Correspondence to : Toshiaki Kikuchi, Department of Pulmonary Medicine, Tohoku University Hospital, 1–1, Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980–8574 Japan.
(E-mail: kikuchi@idac.tohoku.ac.jp)