

検体の遺伝子学的解析で診断しえた *Mycobacterium lentiflavum* 肺感染症の 1 例

²開 陽子 ¹大河内康実 ¹徳田 均

要旨：63歳女性。1998年（51歳）、左上葉に空洞性病変が出現し、気管支洗浄液の抗酸菌塗抹検査およびPCR検査より *Mycobacterium avium* 症と診断し、11カ月の内服加療を行い空洞は消失し菌も陰性化した。2001年1月に舌区の陰影が増悪し、喀痰の抗酸菌培養検査は陰性であったが経過より再燃と診断、6カ月間の内服治療を行ったが陰影の改善が得られず、同年7月頃より抗酸菌培養は陽性が続き、2005年頃から陰影は左肺全体に拡大した。喀痰検査を繰り返したが、いずれの検体でも抗酸菌塗抹検査および培養にて抗酸菌が検出されるも、PCR検査、DDH法では菌種の同定には至らなかった。その後も緩慢に肺の破壊が進行した。2010年1月の気管支洗浄液および2008年の喀痰分離培養株について遺伝子学的解析を行い、*M. lentiflavum* 肺感染症と診断した。非結核性抗酸菌症の菌同定にはDDH法が広く使われているが、このキットでは同定できる菌種に限りがある。*M. lentiflavum* などのDDH法で同定できない菌種は、遺伝子学的解析により同定し確定診断を得ることができる。

キーワード：肺非結核性抗酸菌症、*Mycobacterium lentiflavum*、*Mycobacterium avium*、遺伝子学的解析

はじめに

Mycobacterium lentiflavum は1996年に分離発見された¹⁾、Runyon II群に属する非結核性抗酸菌であり、世界各国で、また国内でも分離同定の報告が相次いでいる^{2)~7)}。しかし臨床検査の場で抗酸菌同定に繁用されているDNA-DNA hybridization法（以下DDH法）で同定できる菌種ではないため、その同定には遺伝子学的解析が必要となる。

今回われわれは遺伝子学的解析により *M. lentiflavum* 肺感染症と診断しえた1例を経験したので報告する。

症 例

症 例：63歳、女性。

主 訴：発熱、膿性痰。

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

喫煙歴：5本/日×4年（18歳から22歳）。

現病歴：1998年に偶然発見された左肺上葉の空洞病変（Fig. 1 a-c）について精査が行われ、気管支洗浄液の抗酸菌塗抹・固形培地培養が陽性、*M. avium*-PCR検査が陽性で、肺 *M. avium* 症と診断し、リファンピシン（RFP）、クラリスロマイシン（CAM）、エタンブトール（EB）、スパルフロキサシン（SPFX）にて11カ月間の内服加療を行った。これにより抗酸菌培養検査は陰性化し空洞病変も縮小したが、舌区の気管支拡張は残存した。2001年1月に胸部単純X線写真上、左肺に散在する浸潤影が出現し（Fig. 2）、喀痰抗酸菌塗抹陰性、*M. avium*-PCR検査で陰性ではあったが、経過より *M. avium* 症の再燃と診断し、胃腸障害のためRFPを除いた、CAM、EB、SPFXにて6カ月間加療した。しかし陰影の改善は得られず、また6カ月ごとに繰り返した喀痰抗酸菌検査では、いずれも固形培地培養は陽性であったが、DDH法による菌の同定は不可能であった。この間に呼吸機能は徐々に悪化し、2006年の時点で肺活量2230 ml、%肺活量89.2%、動脈血液ガス分析で、PaO₂ 94.3 Torr., PaCO₂ 40.7 Torr. と

¹社会保険中央総合病院内科、²自治医科大学附属病院呼吸器内科

連絡先：開 陽子，自治医科大学内科学講座呼吸器内科学部門，〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1
(E-mail: yokoh@jichi.ac.jp)
(Received 10 Feb. 2012/Accepted 4 Jun. 2012)

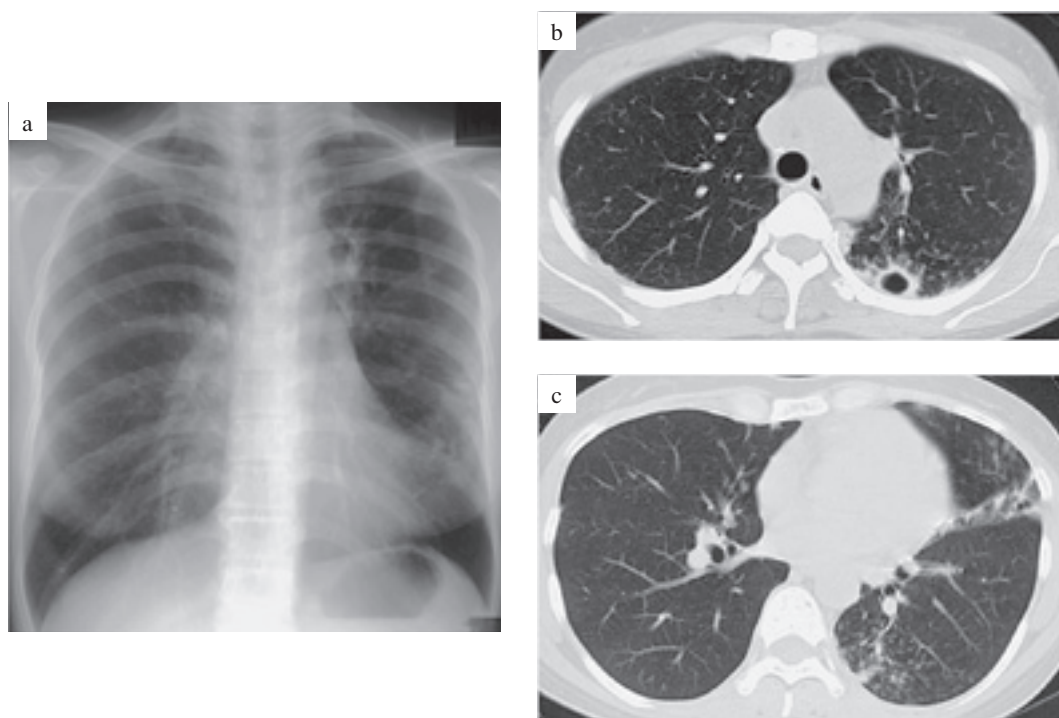


Fig. 1 Chest radiograph and CT scan in 1998. a) Chest X ray shows a cavitary lesion in the left upper lung field. b) Chest CT scan shows a cavitary lesion in the left lower lobe S⁶. c) Bronchiectasis in lingular segment and disseminated nodules in the left lower lobe.



Fig. 2 Chest radiograph in 2001, taken three years later, shows widespread, patchy infiltrations and shrinking of the entire left lung.

呼吸状態は良好であったものが、2008年には肺活量は1940 ml, %肺活量は79.5%, 動脈血液ガス分析では, PaO₂ 71.0 Torr., PaCO₂ 34.7 Torr.に悪化した。2009年12月末にA型インフルエンザウイルス感染を契機に咳嗽, 喀痰が増加し, 胸部単純X線写真上肺炎の合併が疑われたため, 2010年1月13日に入院した。

入院時現症: 身長156 cm, 体重50 kg, 体温38.6度,

脈拍60回/分, 整, 血圧130/80 mmHg, 表在リンパ節触知せず, 前胸部でrhonchi, 左肺野でfine cracklesを聴取。

検査所見 (Table): 入院時検査所見では末梢血で好中球優位の白血球数増多, CRP値上昇, 動脈血液ガス分析で低酸素血症を認めた。呼吸機能検査では, 肺活量1530 ml, %肺活量64.0%と2008年に比し拘束性障害の進行を認めた。喀痰の一般菌検査では有意な所見はなく, 抗酸菌塗抹1+, 培養は5週で陽性 (20コロニー)であった。

胸部X線写真では主に左肺野に広範な斑状浸潤影を認め, また左肺の容積減少が認められた (Fig. 3-a)。胸部CTでは左上葉の気管支拡張を伴うconsolidationと空洞形成, および一部左下葉, 右中葉に及ぶ散在性粒状影を認めた (Fig. 3b, c)。気管支内視鏡検査では, 左主気管支内腔には白色ないし黄色の粘稠痰が大量にみられた。舌区支から採取した気管支洗浄液の検査では, 一般細菌, 抗酸菌ともに塗抹, 培養とも陰性であった。

2001年以降抗酸菌検査を繰り返し, 培養陽性にもかかわらず以前検出された*M. avium*が検出されないため, *M. avium*をはじめDDH法で同定できる菌種以外の菌種を疑い, 岐阜大学大学院医学系研究科病原制御学分野に遺伝子学的解析を依頼した。検体は, 2008年6月の喀痰培養陽性株, 今回入院時喀痰培養株, 気管支洗浄液の3検体を提出した。各検体でPCR法とシーケンス解析により*M. lentiflavum*のみを検出し (Fig. 4), 他には一般

細菌も含めて病原微生物は検出されなかったため、同菌の感染症と診断した。

入院当初は一般細菌の感染を考えセフトラジジム (CAZ) を投与していたが、*M. lentiflavum* 検出後からエリスロマイシン (EM) を投与し、炎症所見の悪化がみられたため、モキシフロキサシン (MFLX) に変更、続いてCAMも追加し、臨床検査値、症状ともに改善した。その後の11カ月間同2剤の内服を継続し咳嗽、喀痰ともに減少した。しかし、12カ月目から発熱が出現し、MFLXをシタフロキサシン (STFX) に変更した。その後10カ月以上外来で治療を継続しているが、症状、検査所見ともに安定している。

考 察

M. lentiflavum は1996年にSpringerら¹⁾によって初めて報告されたRunyon II群に属する非結核性抗酸菌である。黄色く平滑で比較的小さいコロニーを形成し、22℃から37℃の環境下で3～4週かけて発育する遅発育菌である。遺伝子学的な近属菌としては*M. simiae*や*M. genavense*が挙げられる。

当初は小児の頸部リンパ節から分離された報告が多くみられていたが^{2) 3)}、肺をはじめとして、肝臓、血液などリンパ節以外の部位から分離される例も各国で報告が相次いでいる^{1) 4) ~ 11)}。同定に遺伝子学的解析が必要なこ

Table Laboratory data on admission

Hematology		Biochemistry		BGA	
WBC	11870 / μ l	TP	7.2 g/dl	pH	7.484
Seg	86 %	Alb	3.8 g/dl	PaCO ₂	32.9 mmHg
Mo	4 %	BUN	13 mg/dl	PaO ₂	73.6 mmHg
Lym	9 %	Cre	0.8 mg/dl	HCO ₃	24.2 mmol/l
RBC	487 / μ l	AST	17 U/l	BE	1.4 mmol/l
Hb	14.1 g/dl	ALT	16 U/l		
Ht	42.9 %	LDH	259 U/l		
Plt	33.4 $\times 10^4$ / μ l	Na	138 mEq/l		
ESR	36	K	4.3 mEq/l		
Serology		Cl	101 mEq/l		
CRP	4.0 mg/dl	Glu	82 mg/dl		
IgG	1156 mg/dl				

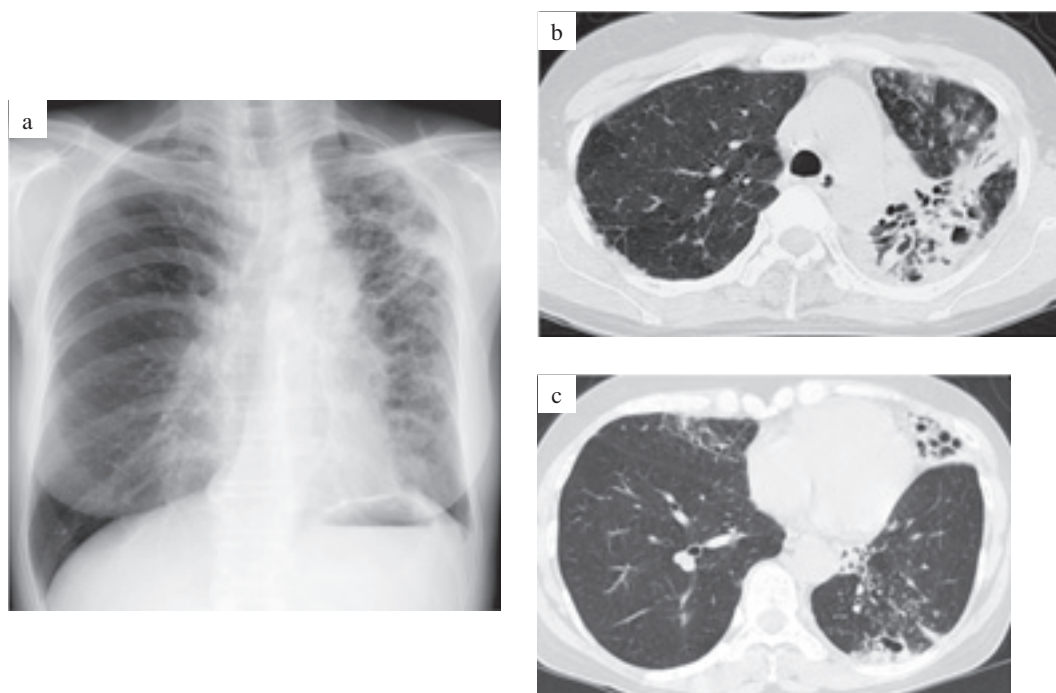


Fig. 3 Chest radiograph on admission in 2010 shows diffuse infiltration and progressive shrinking of the left lung. CT scan on admission shows consolidation, cavity lesions, bronchiectasis and disseminated nodules in the entire left lung.

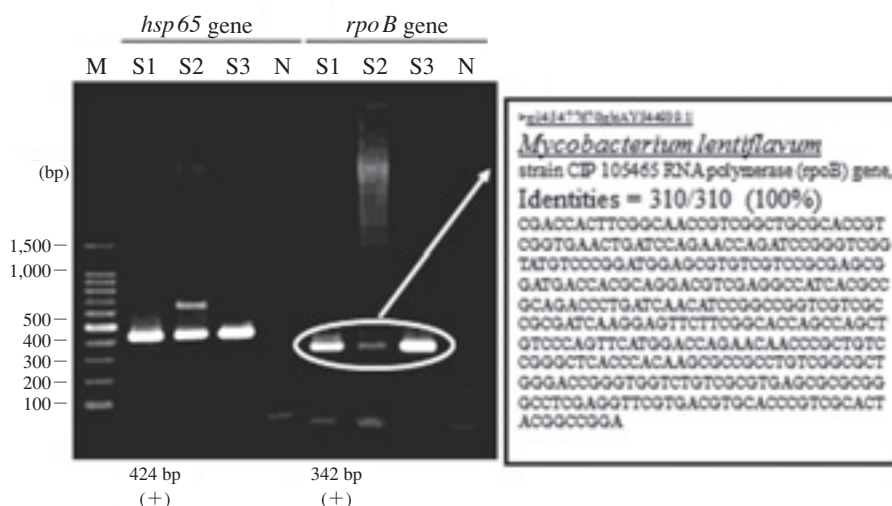


Fig. 4 Analysis of DNA sequence *hsp65* gene and *rpoB* gene

Lanes S1: DNA of sputum in 2010. S2: DNA of BALF in 2010. S3: DNA of culture in 2008. N: negative control. M: molecular size markers.

ともあり、本邦での臨床経過も合わせた肺での感染についての臨床文献報告はこれまでに2003年の岩本らの報告⁷⁾のみとなっている。同症例は、71歳の男性で40年以上前に肺結核の治療歴があり咳嗽と血痰で発症し、喀痰抗酸菌塗抹検査が陽性であった。イソニアジド (INH), RFP, EBおよびピラジナミド (PZA) の4剤、続いてCAMにて1年間治療を行ったものの抗酸菌塗抹検査は陽性が続き、胸部画像所見も徐々に悪化していた。抗酸菌感染後の荒蕪肺を背景に、治療に抵抗性で緩徐に進行した点が、われわれの症例と共通する。

M. lentiflavum のリンパ節以外の部位への感染は、宿主が免疫不全状態にある場合とされている^{1) 4) ~ 7)}。今回報告した1例は、*M. avium* 感染後の荒蕪肺を基礎疾患にもち、肺局所の免疫能の低下が宿主要因となったと考えられる。

M. lentiflavum の肺感染症の治療に関しては他の稀な非結核性抗酸菌症と同様に、確立したものはない。これまでの報告では、AIDS患者の肺、血液から同菌が分離された1例において、リファブチン (RFB), EBおよびCAMの3剤を4カ月間投与したもののみが菌の陰性化に至っている⁵⁾。その他は、INH, RFP, EB, PZA, シプロフロキサシン (CPFX) など各種抗菌薬を投与しても、今回の症例のように一時的な改善しかみられなかったものがある^{6) 8)} 一方で、全く治療を行わずに病状が安定して推移しているものもみられた^{9) ~ 11)}。本感染症が直接死因となった例は報告されていない。治療レジメンとして、Runyon分類で同じ群に属する*M. szulgai* 症はRFP, INH, EBを菌の陰性化後1年間、*M. goodii* 症はRFP, EB, CAMが推奨されており、これらに準ずる治療が有用な可能性が考えられる¹²⁾。薬剤感受性試験においてはINHとRFPの

MIC値は非常に高値であり、MIC値が比較的低いのはCAMとレボフロキサシン (LVFX) であったとも報告されており⁶⁾、投与量、投与期間の調整により有効となる可能性が示唆される。しかし、非結核性抗酸菌症では、感受性検査で感受性が認められた抗菌薬であっても臨床的には治療効果を示さないことが多々みられており、治療は抗菌薬の選択から治療期間まで、試験的あるいは経験的に進めざるをえない。今後さらなる症例の蓄積と検討が必要である。本例は、*M. szulgai* 症や*M. goodii* 症で推奨される薬剤による治療には抵抗性を示した。現在投与中のSTFXとCAMを継続してまずは菌の陰性化を図り、その後の経過をみながらさらに1年間を目標に治療を継続する予定である。

本例では繰り返し抗酸菌を培養で検出しながらも菌種が同定できなかったため、DDH法で同定できないことと臨床経過を合わせて抗酸菌にターゲットを絞って検体の遺伝子学的解析¹³⁾を依頼し、診断することができた。当院では、通常の培養検査では同定できなかった肺アスペルギルス症も、遺伝子学的解析により診断し適切な治療に結びつけることができていた。このように、臨床的に疑わしい病原体が通常の検査法で検出できなかった場合、遺伝子学的解析が有用である。遺伝子検査による迅速診断の利点として、培養不可能または困難な病原体の検出、遅発性病原体の検出、病原因子や毒素の検出、耐性遺伝子の検出などが挙げられている。岩本らの報告¹⁴⁾をはじめ、分離同定技術の開発、遺伝子解析の研究が進行しており、より簡便な同定方法や遺伝子多様性が解明されつつある。作業性や解析時間の問題に関しても、全自動遺伝子解析装置の開発¹⁵⁾が行われている。現在のところ、病院検査室で解析ができるまでには至っていない

が、適切に症例を選択して適切な研究室に解析を依頼することで、今回のように診断、治療に結びつけることができる。今後、遺伝子解析がより簡便に臨床に応用され診断に活用できるようになること、また、新たな治療方法の開発に結びつくことが期待される。

謝辞：本症例の遺伝子学的解析を施行いただいた、岐阜大学大学院医学系研究科病態制御学分野の大楠清文先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Springer B, Wu WK, Bodmer T, et al.: Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. J Clin Microbiol. 1996 ; 34 : 1100–7.
- 2) Cabria F, Torres MV, Garcia-Cia JJ, et al.: Cervical lymphadenitis caused by *Mycobacterium lentiflavum*. Pediatr Infect Dis. 2002 ; 21 : 574–5.
- 3) Haase G, Kentrup H, Skopnik H, et al.: *Mycobacterium lentiflavum*: an etiological agent of cervical lymphadenitis. Clin Infect Dis. 1997 ; 25 : 1245–6.
- 4) 長野 誠, 市村 慎宏, 伊藤 伸子, 他: 16S rRNA遺伝子およびITS-1領域をターゲットとしたInvader法による23菌種の抗酸菌の同定. 結核. 2008 ; 83 : 487–96.
- 5) Niobe SN, Bebear CM, Clerc M, et al.: Disseminated *Mycobacterium lentiflavum* infection in a human immunodeficiency virus-infected patient. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 2030–2.
- 6) Tortoli E: Clinical Features of Infections Caused by New Nontuberculous Mycobacteria, Part II. Clin Micro Newsl. 2004 ; 26 : 13 : 97–103.
- 7) Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K, et al.: A Chronic Pulmonary Disease Caused by *Mycobacterium lentiflavum* in a Patient with a History of Pulmonary Tuberculosis. Clin Micro Newsl. 2003 ; 10 : 79.
- 8) Molteni C, Gazzola L, Casari M, et al.: *Mycobacterium lentiflavum* Infection in Immunocompetent Patient. Emerg Infect Dis. 2005 ; 22 : 119–22.
- 9) Tortoli E, Bartoloni A, Erba ML, et al.: Human infection due to *Mycobacterium lentiflavum*. J Clin Micro. 2002 ; 40 : 728–9.
- 10) Galarraga C, Torreblanca A, Jimenez MS, et al.: Aislamiento de *Mycobacterium lentiflavum* en un caso sospechoso de cancer de pulmon. Enferm Infecc y Microbiol Clin. 2002 ; 20 : 93–94.
- 11) Tortoli E, Piersimoni C, Kirschner P, et al.: Characterization of mycobacterial isolates phylogenetically related to, but different from, *Mycobacterium simiae*. J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 697–702.
- 12) 倉島篤行: 比較的稀な菌種による肺非結核性抗酸菌症の治療. 結核. 2011 ; 86 : 923–932.
- 13) 大楠清文, 江崎孝行: 感染症診断における遺伝子解析技術の適応. 日本臨床微生物学. 2008 ; 18 : 163–75.
- 14) 岩本朋忠, 中永和枝, 石井則久, 他: *Mycobacterium lentiflavum*の菌種内塩基配列変異に関する研究. 結核. 2008 ; 83 : 417–422.
- 15) 曾家義博: 全自動遺伝子解析装置GENECUBE. JJCLA. 2011 ; 36 : 401–403.

Case Report

A CASE OF PULMONARY *MYCOBACTERIUM LENTIFLAVUM* INFECTION
DIAGNOSED BY MICROBIOLOGICAL ANALYSIS²Yoko HIRAKI, ¹Yasumi OKOUCHI, and ¹Hitoshi TOKUDA

Abstract In 1998, a 51-year-old woman was diagnosed with *Mycobacterium avium* infection on the basis of chest radiographic findings, positive smear test results, and positive results of polymerase chain reaction (PCR) specific for *Mycobacterium avium* DNA in bronchial lavage fluid. Antimycobacterial therapy was administered for 11 months, and the chest radiographic findings improved. In 2001, re-treatment was performed because radiographic findings indicated exacerbation of disease and poor response. After 2005, the patient remained both smear and culture positive for mycobacterium. However, the precise species could not be identified using PCR and DNA-DNA hybridization, and her left lung lesions gradually worsened. The culture isolate was subjected to DNA analysis with PCR amplification and sequence analysis; this ultimately revealed the presence of *Mycobacterium lentiflavum*. Combination antimicrobial therapy was administered for 10

months. The patient's symptoms were alleviated, and the radiographic appearance remained stable.

Key words : Pulmonary non-tuberculous mycobacteriosis, *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium avium*, Microbiological analysis

¹Department of Internal Medicine, Social Insurance Central General Hospital, ²Division of Pulmonary Medicine, Jichi Medical University

Correspondence to: Yoko Hiraki, Division of Pulmonary Medicine, Jichi Medical University, 3311-1, Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi, 329-0498 Japan.
(E-mail: yokoh@jichi.ac.jp)