# 当センターにおける Mycobacterium gordonae の 分子疫学的解析

1吉田志緒美 1鈴木 克洋 4岩本 朋忠 1露口 一成

2冨田 元久 1岡田 全司 3坂谷 光則

要旨:〔目的〕臨床検体ならびに院内汚染環境から分離された Mycobacterium gordnae の分子疫学的解析。〔対象〕NHO近畿中央胸部疾患センターを受診した患者から分離された46株と,院内環境から分離された3株。〔方法〕パルスフィールド電気泳動法(PFGE),hsp65PRA解析と16S rRNA遺伝子シークエンス解析から多型性を調べた。〔結果〕hsp65PRAでは13種類の遺伝子型が認められ,16S rRNA遺伝子解析の結果から M. gordonae 症由来株は環境由来株とは一致しなかった。さらに PFGE の結果から M. gordonae 症の複数菌感染が示唆されたが,院内におけるアウトブレイクは認められなかった。〔考察〕院内の環境汚染に対する監視を継続し,必要時に M. gordonae に対する徹底した疫学的環境調査を実施できる体制を構築することが重要である。

キーワーズ: Mycobacterium gordonae, 16S rRNA遺伝子シークエンス, hsp65PRA, PFGE, 複数菌感染

### はじめに

Mycobacterium gordonae は土壌や水系に広く分布している暗発色性の遅発育菌である。雑菌性の抗酸菌とされているが、時にヒトに対して病原性が認められる。肺疾患既往歴のあるヒトや免疫低下の患者への感染症<sup>1)2)</sup>のみならず、健常者における感染症も報告されている<sup>3)4)</sup>。

本菌種に対する分子遺伝学的解析から、168 rRNA 遺 伝子に菌種内変異(sequevar, sqv)が認められ $^5$ )、またrpoB遺伝子 $^6$ やhsp65PRAの領域 $^7$ の塩基配列に多型性が認められている。そこで、今回われわれは当センターから分離された患者由来株と院内環境から分離された株について遺伝子型の特定を行い、院内アウトブレイクならびに臨床的意義との関係について検討した。

## 材料と方法

臨床分離株:2007年1月1日~12月31日の期間,当 センターに受診された38患者から分離され,アキュプローブマイコバクテリアゴルドネ研究用(極東製薬工業)を用いた検査によりM.gordonaeと同定された38株 を使用した。また、多剤耐性結核(MDR-TB)患者病棟に入院中のMDR-TB患者2名から2008年10月2日と12月11日にM.gordonaeが各1回ずつ分離された。何らかの迷入もしくは院内環境からの疑似アウトブレイクの可能性を疑い、これら2株に加え、2008年10月1日~12月31日の期間中、他の入院患者6名から分離されたM.gordonae6株を合わせて46株を解析対象とした。今回、肺非結核性抗酸菌症の診断基準®を満たした患者は6名であり、1名のみ初発時(2007年3月)と再発時(2008年10月)に排菌していた。したがって菌の異同の確認のため、この患者のみ初発時と再発時の1株ずつを対象とした。45名の年齢構成は25~86歳(平均67.7歳)、性別は男性33名、女性12名であった。

環境分離株:院内から採取されたサンプル水は臨床分離株と同様に集菌、スプータメントゾル処理を施し、得られた100μl沈渣を用いて培養を試みた。2007年12月に実施した院内環境調査では、外来に設置されている採痰室の手洗い水道水とネブライザー由来の水から M. gordonae が各1株分離された。さらに2009年1月実施の院内環境調査の結果、MDR-TB患者病棟内に設置され

<sup>1</sup>独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター, <sup>2</sup>同臨床検査科, <sup>3</sup>同内科(現:精華町国民健康保険病院), <sup>4</sup>神戸市環境保健研究所

連絡先:吉田志緒美,独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部 疾患センター臨床研究センター,〒591-8555 大阪府堺市北区 長曽根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp) (Received 21 Dec. 2009/Accepted 16 Feb. 2010)

hsp65PRA type IIIV VI Χ NP3 NP13 NP22 New pattern 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 sqv I 0 sqv II 3\*\* 0 0 0 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 sqv III 0 0 0 0 0 0 2 0 4 (1) 0 0 0 0 0 16S rRNA gene sqv IV 1(1) 0 0 2 (1)\* 0 0 0 0 1 (1) 1 (1)\* 0 0 0 6 sqv V 0 0 3 (1) 4 2 0 3 2 3 2 0 0 1 new sqv 0 1 (1) 0 0 0

Table 1 M. gordonae strains which had concordant results by both hsp65PRA method and 16S rRNA gene sequencing

strains number in parentheses causes pulmonary infection

ている手洗い場水道水から1株が分離された。ちなみに 上記2回の環境調査の結果、細菌検査室の備品、試薬から M. gordonae は分離されなかった。

16S rRNA遺伝子解析:PCR 反応は岩本らの方法<sup>9</sup>に 準じて行った。抽出した DNA をテンプレートとし Takara Ex Taq (タカラバイオ) を用いて、94℃ 30秒、 55℃ 30秒、72℃ 1分を35サイクル行った。16S rRNA 遺伝子の超可変部 Aと Bを含む領域をプライマー 285F [5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'] と 264R [5' -TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3'] を用いて PCR 増幅産物を得た。PCR産物を精製した後 BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan)を用いて16S rRNA遺伝子の部分配列を 得た。得られた塩基配列は、Ribosomal Differentiation of Microorganisms: RIDOMを用いて相同性検索を行い、菌 種決定をした。

Hsp65PRA解析:Telentiらの方法 $^{n}$ に準じて行った。 Tb11 [5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'] と Tb12 [5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'] のプライマーを用い,95 $^{\circ}$ 1分の熱変性の後,96 $^{\circ}$ 40秒,60 $^{\circ}$ 50秒,72 $^{\circ}$ 1分を45サイクル行い,最後に72 $^{\circ}$ 7分間伸張した。得られた PCR 増幅産物の BstEII 切断断片長(60 $^{\circ}$ 0分処理)および HaeIII 切断断片長(37 $^{\circ}$ 0、60分)を制限酵素失活処理後マイクロキャピラリー電気泳動装置 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies社)を用いて解析した。

PFGE解析: 抗酸菌の集団感染の解析において PFGE は有用である。今回吉田らの方法<sup>10</sup>に準拠して制限酵素 *Dra* I を用いて実施し、得られた泳動像を Phoretix 1D Pro (Nonlinear Dynamics社)を用いてゲルイメージ解析処理し、Phoretix 1D Database (Nonlinear Dynamics社)にて系統樹を作成した。得られた結果は Tenoverらの PFGE 電気泳動パターンの評価基準<sup>11)</sup>を用いて疫学的評価を行った。

#### 結 果

16S rRNA遺伝子:供試された49株のうち6株の塩基 配列は M. gordonae DSM44160 基準株と 100% 一致し sqv Iに分類された。5株は M. gordonae DSM43212株と100 %一致しsqv Ⅱと分類され、そのうち3株は環境分離株 であった。sqv Ⅲに分類された6株のうち5株は M. gordonae Borste 11340/99と1塩基の違いが見られた。さら に11株がsqv IVに分類され、この中には解析期間中に再 発した M. gordonae 症患者からの初発時と再発時の株が 含まれていた。この患者からの初発時の株はM.gordonae Borste 10681/99と100% 一致したが、1年7カ月後 に再発した時の分離株では1塩基の違いが見られた。20 株は M. gordonae Borste 9411/99と 100% 一致し sqv V に 分類された。1 株は sqv V と 5 塩基違いを認め、new sqv とした。また M. gordonae 症由来 7 株の内訳は sqv Ⅱ 1 株 (1塩基違い), sqv IV 4株 (1株のみ1塩基違い), sqv V 1 株, new sqv 1 株となった。

Hsp65PRA解析: M. gordonae における hsp65PRAパタ ーンは PRANET (http://app.chuv.ch/pls/pranet) と従来の 報告<sup>7) 12)~16)</sup>から決定した。今回, hsp65PRAのタイプⅡ に属する菌株は検出されなかったが、従来報告されてい ないタイプ (new pattern) を含む13種類のタイプに分類 された。M. gordonae 症由来 7 株の hsp65PRA タイプはタ イプⅢが2株,タイプⅥ,タイプNP3,タイプNP13, タイプ NP22, new patternが各1株という結果となり, 再発患者からの初発時分離株はタイプⅢ, 再発時分離株 は new pattern と分類された。Hsp65PRAのタイプと16S rRNAの sqv との比較では、sqv Iの6株は DSM44160と 同一の hsp65RPA タイプ I と分類された。sqv II の臨床 分離株 2 株は hsp65PRA タイプ new pattern となり,一方 環境分離株3株はhsp65PRAタイプIと分類された。 Sqv Ⅲの6株はタイプ V とタイプ W に分類され, sqv IV, sqv Vは順に5種類と8種類のPRAタイプを示し、多型 性が見られた(Table 1)。

PFGE解析:供試菌49株から得られたPFGEパターン

<sup>\*</sup>strains from a patient with policional infection of M. gordonae

<sup>\*\*</sup>three strains from hospital environments

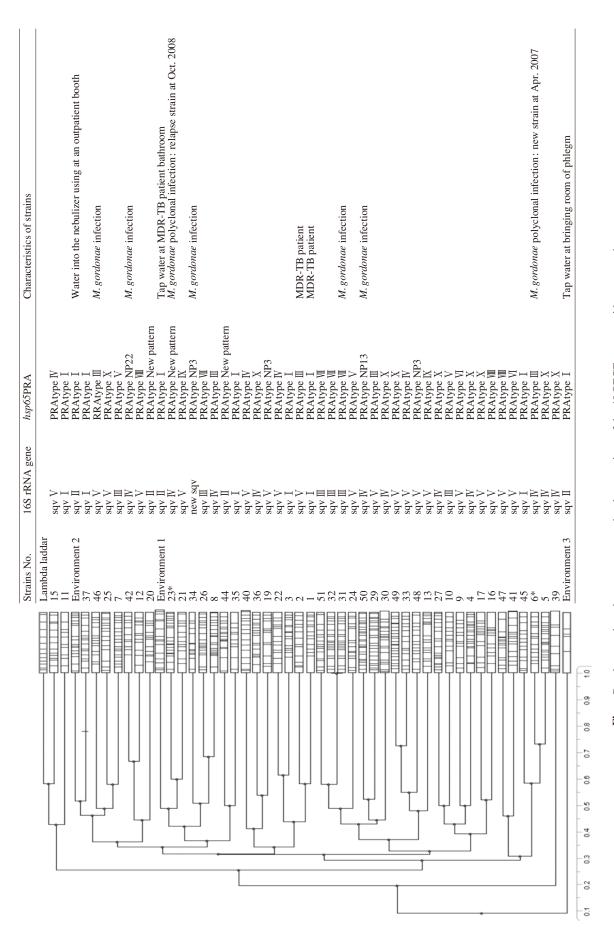


Fig. Dendrogram based on computer-assisted comparison of the 49 PFGE pattern with genotype in 16S rRNA and *hsp65PRA*. The positions of Lambda laddar size marker are indicated on the top. \*strains from a patient with polyclonal infection of *M. gordonae* 

のうち sqv III, hsp65PRA タイプ VIII である臨床分離株 2 株 (No.31 & No.32) のパターンが一致した。そのほかに,同じ M.gordonae 症患者から分離された 2 株を含む 47 株 間で一致するパターンは認められなかった(Fig.)。

## 考 察

非結核性抗酸菌は自然界のみならず医療施設の環境に も広範囲に分布している17/18)。M. gordonaeの院内におけ る環境汚染の報告では、患者と接触する機会の多い気管 支鏡19)や、水道水20)、冷却水槽21)に汚染源が見つかって いる。したがって感染対策上、初歩的な衛生管理の不手 際による院内感染で易感染性患者が犠牲にならないよう に, 院内感染対策活動での監視を強化し継続することは 最も重要である。また院内において非結核性抗酸菌の汚 染と思われる事例が発生した場合, 疑似アウトブレイク の可能性を考慮し, 汚染源から分離された菌と臨床検体 からの分離株との遺伝子型の異同を検証することが求め られる。今回 M. gordonae 3 株が院内の水回り環境に存 在することが認められたが、これらの環境分離株は臨床 分離株とは異なった PFGEパターンを有していた (Fig)。 また院内では患者に対して採痰時に水道水を用いたうが いの指導は行っていないため、あらゆる環境に生息して いるであろう M. gordonae を起因とする検体採取時の検 体への混入も考えにくい。したがって院内における疑似 アウトブレイクの可能性は低いと考えられた。

1993年、スウェーデンの Telenti らにより遺伝子内の抗酸菌特異的部位を PRA法で分別し遺伝子内の多様性の違いから同定する方法が報告され、5種類の M.gordonae の菌種内変異が分別可能となった $^{70}$ 。彼らは 1992年に収集した臨床分離株の 38% が hsp65PRA タイプ I で

あったと報告している7%。以降,多数の研究データが蓄 積され、1996年にはアメリカの Taylor らによって13株 中11株(84.6%)がタイプIであったとする結果が報告 され<sup>12)</sup>, 2001年にはイタリアの Brunello らにより *M. gor*donaeのタイプⅡが50%と最も多く分布していたと報告 された13)。同時期ブラジルから2つの報告があり、 Suffys らはタイプ I が 17.6%, タイプ II が 35.2%<sup>14)</sup>とし, Chimara らはタイプ I が4.5%, タイプ II が43.2%, 他に 4 種類の新しいタイプ (X, NP3, NP13, NP22) が認め られたという<sup>15)</sup>。続いて2002年, da Silva Rocha らはブ ラジルの16州から臨床分離株を集め大規模な解析を実 施したところ,19株中タイプ I が 4株 (21.1%),タイ プⅢが5株(26.3%) 認められ、8株(42.1%) が新しい 3種類のタイプとして認められたとしている1%。わが国 では Itohらが、1988~2001年に集められた34株のうち タイプⅣが26.4%と最も多く存在し次にタイプⅢ (23.5 %)が続いたとしている%。今回われわれの結果から、 最も多かったタイプはタイプ I とタイプ X (各18.4%) であり、次にⅢ (10.2%)、タイプⅣとⅢがそれぞれ8.2% と続いた。残り36.6%は新しいタイプを含む8種類のタ イプに分類され、hsp65PRAタイプの高い多様性が認め られた (Table 2)。これらの結果は、M. gordonae の地域 的分布の差を反映しているのか、もしくは1990年代か ら2000年代後半にかけての M. gordonae の時間的な変動 (ダイナミクス) を表しているのか、今後、臨床分離株・ 環境分離株での遺伝子型別に関するデータが蓄積される ことで、その臨床的意義・地域特異性などとの関連性が 明確になることが期待される。

M. gordonae 症分離株は16S rRNA遺伝子解析によってsqv Ⅲ, Ⅳ, V, New sqv に分類され,多様な菌種内変異

 Table 2
 Frequency of hsp65PRA types in M. gordonae strains from different geographic regions

hsp65PRA type	% PRA typing in geographic region							
	Sweden (1992) <sup>7)</sup>	United States (1996) <sup>12)</sup>	Italy (2001) <sup>13)</sup>	Brazil (2001) <sup>14)</sup>	Brazil (2001) <sup>15)</sup>	Brazil (2002) <sup>16)</sup>	Japan (1998–2001) <sup>6)</sup>	Japan (2007–2009)
	(n=24)	(n=13)	(n=18)	(n=17)	(n=44)	(n=19)	(n=34)	(n=49)
I	38	84.6	27.8	17.6	4.5	21.1	17.6	$18.4^{a}$
II	17		50	5.9		5.3	5.9	
III	12		11.1	35.2	43.2	26.3	23.5	10.2
IV	21	7.7	11.1		4.6		26.4	8.2
V	12				2.3		11.8	6.1
VI		7.7						4.1
VII				5.9	6.8	5.3		8.2
VIII					6.8			6.1
IX								4.1
X					25			18.4
NP3					2.3			6.1
NP13					2.3			2
NP22					2.3			2
New Pattern				35.2		42.1	14.7	6.1

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> three of nine strains were isolated from hospital environments.

が確認された。また hsp65PRA 解析でも 6 タイプに分か れ多様性を示した。しかし、肺非結核性抗酸菌の診断基 準を満たさない臨床分離株が M. gordonae 症分離株と同 じ sqv, hsp65PRAタイプをもっていたため、M.gordonae の遺伝子型の違いによるヒトへの病原性の違いを明確に 説明することはできなかった。一方, 今回分離された環 境由来株の数は少ないが、すべて sqv II, hsp65PRA タ イプIと分類され、M.gordonae 症分離株を含む臨床分 離株とは異なった遺伝子型を示した。Prince らは環境中 に存在する非結核性抗酸菌60株を調査した結果, M. gordonae 21 株は数種類の遺伝子型に分類されたと報告 している22)。今後、より多くの環境分離株を集積し検 討することで、環境中の M. gordonae の分布多様性を明 らかにし、環境からヒトに感染する際に優位なM. gordonae菌が選択されるという仮説を証明できると考え ている。

非結核性抗酸菌が臨床検体から分離された場合でも検体への混入や気道への一時的な迷入を否定できない。肺非結核性抗酸菌症の診断基準では検体が喀痰の場合,稀な菌種や環境から高頻度に分離される菌種(M. gordonae, M. chelonae など)では,2回以上の異なった検体での培養陽性を満たす必要があると定義されている®。今回 M. gordonae 症と判定された患者 6 名(13.3%)以外の患者では細菌学的所見とともに画像上も M. gordonae 感染症を思わせる所見は認められなかった。今回の結果からも M. gordonae 症の診断には一層慎重な判断が必要であると考えられた。

PFGEパターンが一致した2株 (No.31, No.32) 由来の患者は入院時期が異なっており、患者背景、居住地にも違いが見られたことから患者間の接触歴は乏しいと思われた。1名 (No.32) は肺非結核性抗酸菌症の診断基準を満たしていなかったことから、環境から偶発的に遺伝子を同じくする菌株が迷入し1名 (No.31) のみ発症に至った可能性が考えられた。しかし、その後同じパターンをもつ株が見受けられないため特に同菌株がヒトに感染しやすい株とも言い難く、今後、同菌株を発端とする真のアウトブレイクが発生する危険性は否定的である。

今回6名の M. gordonae 症患者のうち、再発した1名の患者から分離された菌株の16S rRNA遺伝子の塩基配列と hsp65PRAのタイプは、初発時と再発時で相違を認めた。さらに PFGEパターンでは7本以上のバンドの違いが見られ、初発菌株(No.6)と再発菌株(No.23)は異なる遺伝子型であると分類された(Fig)。したがって、同一患者における複数菌感染もしくは治療終了後に起こった外来性再感染の可能性が考えられた。MAC症をはじめとした非結核性抗酸菌症の複数菌感染は免疫不全の患者はもちろん、免疫機能が正常なヒトでも決して稀

ではない。複数菌感染は非結核性抗酸菌症が難治である 理由の一つと考えられている。今回の結論をさらに支持 するため、現在、対象菌株を純化し得られたシングルコ ロニー間の遺伝子型を比較検討中である。

## 文 献

- Barber TW, Craven DE, Farber HW: Mycobacterium gordonae: a possible opportunistic respiratory tract pathogen in patients with advanced human immunodeficiency virus, type 1 infection. Chest. 1991; 100:716-720.
- Lessnau KD, Milanese S, Talavera W: Mycobacterium gordonae: a treatable disease in HIV-positive patients. Chest. 1993: 104:1779-1785.
- 3) 藤田結花,松本博之,藤兼俊明,他:健常成人女性に発症したMycobacterium gordonaeによる肺感染症の1例. 結核. 2000;75:369-374.
- 4 ) Weinberger M, Berg SL, Feuerstein IM, et al.: Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature. Clin Infect Dis. 1992; 14: 1229–1239.
- 5) Kirschner P, Böttger EC: Microheterogeneity within rRNA of *Mycobacterium gordonae*. J Clin Microbiol. 1992; 30: 1049–1050.
- 6 ) Itoh S, Kazumi Y, Abe C, et al.: Heterogeneity of RNA polymerase Gene (*rpoB*) sequences of *Mycobacterium gordonae* clinical isolates identified with a DNA probe kit and by conventional methods. J Clin Microbiol. 2003; 41: 1656–1663
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 他:*Mycobacterium kansasii* 株における分子疫学的解明. 結核. 2007; 82: 103-110.
- 11) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsedfield gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2233–2239.
- 12) Taylor TB, Patterson C, Hale Y, et al.: Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol. 1997; 35: 79–85.
- 13) Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, et al.: Identification of 54 Mycobacterial Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* Gene. J Clin Microbiol. 2001; 39: 2799–2806.

- 14) Suffys PN, da Silva Rocha A, de Oliveira M, et al.: Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level Using INNO-LiPA Mycobacteria, a Reverse Hybridization Assay. J Clin Microbiol. 2001; 39: 4477–4482.
- 15) Chimara E, Ferrazoli L, Misuka Ueky SY, et al.: Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restrictionenzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRAhsp65 patterns. BMC Microbiol. 2008; 8:48.
- 16) da Silva Rocha A, Werneck Barreto AM, Dias Campos CE, et al.: Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. J Clin Microbiol. 2002; 40:4191–4196.
- 17) Vaerewijck MJM, Huys G, Palomino JC, et al.: Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. FEMS Microbiol Rev. 2005; 29: 911-934.
- 18) 吉田志緒美, 冨田元久, 露口一成, 他:病院内に設置さ

- れた飲料水供給装置に起因するMycobacterium chelonae による疑似アウトブレイク. 環境感染誌. 2009 ; 24 : 109-112.
- 19) Gubler JG, Salfinger M, von Graevenitz A: Pseudoepidemic of nontuberculous mycobacteria due to a contaminated bronchoscope cleaning machine. Report of an outbreak and review of the literature. Chest. 1992; 101: 1245–1249.
- 20) Stine TM, Harris AA, Levin S, et al.: A pseudoepidemic due to atypical Mycobacteria in a hospital water supply. JAMA. 1987; 258: 809–811.
- Lalande V, Barbut F, Varnerot A, et al.: Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with water from refrig-erated fountains. J Hosp Infect. 2001; 48: 76–79.
- 22) Prince KA, Costa AR, Malaspina AC, et al.: Isolation of Mycobacterium gordonae from poultry slaughterhouse water in Sao Paulo State, Brazil. Rev Argent. Microbiol. 2005; 37:106–108.



# DETECTION OF MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF MYCOBACTERIUM GORDONAE ISOLATES

<sup>1</sup>Shiomi YOSHIDA, <sup>1</sup>Katsuhiro SUZUKI, <sup>4</sup>Tomotada IWAMOTO, <sup>1</sup>Kazunari TSUYUGUCHI, <sup>2</sup>Motohisa TOMITA, <sup>1</sup>Masaji OKADA, and <sup>3</sup>Mitsunori SAKATANI

**Abstract** [Objects] To analyze the molecular epidemiology of *Mycobacterium gordonae* strains from patients and environments in the hospital.

[Subjects] A total of 46 clinical strains were obtained from patients registered at the NHO Kinki-chuo Chest Medical Center and 3 strains from hospital environments.

[Methods] By using genetic data from the 16S rRNA gene and *hsp65*PRA, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) assessment of their intraspecies variability and epidemiology was carried out.

[Results] Strains from six patients and environmental cultures exhibited the different genotypes of 16S rRNA gene sequencing and the *hsp65*PRA type. The PFGE analysis suggested no pseudo-outbreak and showed a polyclonal infection in one patient.

[Conclusion] These findings suggest that we should maintain

effective surveillance of environments in the hospital and continuously perform molecular epidemiological investigations for infection control of *M. gordonae*.

**Key words**: *Mycobacterium gordonae*, 16S rRNA gene sequence, *hsp65*PRA, PFGE, Polyclonal infection

<sup>1</sup>Clinical Research Center, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, <sup>3</sup>Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center; <sup>4</sup>Department of Microbiology, Kobe Institute of Health

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591–8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)