

Mycobacterium kansasii の疫学と分子疫学的研究の現状

— (その2) 分子疫学的研究について —

¹吉田志緒美 ³斎藤 肇 ²鈴木 克洋

要旨: *Mycobacterium kansasii* においても各種遺伝子解析が可能となり, heat shock protein 65-polymerase chain reaction-restriction analysis (*hsp65*PRA) 解析から7種の遺伝子型が存在し, わが国では分離株の大部分がI型であり, その高いクローナリティーが明らかになっている。その他, ITS シークエンス解析やRFLP解析, PFGE解析などを用いた研究が世界的に盛んとなり, *M. kansasii* 症を引き起こすのに優位な遺伝子型 (I型) の存在が認められてきた。しかし感染経路, 環境ならびに臨床分離株における菌の多様性については今もって未知な面が多い。本総説では先の総説 (*M. kansasii* の疫学) に続いて分子疫学的研究の現状を解説し, 遺伝子型分類と分子疫学的見地から *M. kansasii* のより正確な解析の必要性を提唱したい。

キーワード: *Mycobacterium kansasii*, 分子疫学, 遺伝子型別, *hsp65*PRA, PFGE

M. kansasii の分子疫学

近年, *Mycobacterium kansasii* についても分子遺伝学的研究が進み, 主にDNAプローブを用いたハイブリダイゼーションやシークエンス解析, 制限酵素処理によるDNA断片の多型解析による遺伝子型分類がなされている。

pMK1-9は, Huangら¹⁾が報告した *M. kansasii* に対する最初のDNAプローブであり, *M. kansasii* のDNAと相補的にハイブリッドを形成するが, 他の非結核性抗酸菌種ともハイブリッドを形成し, また, このプローブは供試 *M. kansasii* 105株中85株 (I型) とのみ陽性反応を示したが, 他のI型以外の亜種20株では反応性は見られなかったという。Rossら²⁾は, *M. kansasii* の同定にpMK1-9プローブおよび *M. kansasii* のrRNA遺伝子と特異的にハイブリッド結合するDNAプローブGenProbe (AccuProbeの前身) を用いた検討により, pMK1-9プローブおよびGenProbeともすべての *M. kansasii* 株は検出できなかったといひ, pMK1-9プローブに陽性の *M. kansasii* は共通したバンドパターンを示すが, 陰性の *M. kansasii* では不均質であると述べている。Tortoliら³⁾は, AccuProbeは *M. kansasii*

に100%特異的であるが, 73%の菌株しか検出することができず, *M. kansasii* の遺伝的な多様性の存在を示唆した。また, Yangら⁴⁾は新たな *M. kansasii* に特異的なDNAハイブリッド形成プローブ (p6123) を臨床分離株から精製することに成功し, しかもpMK1-9に反応しなかった亜種を含むすべての株に対してもハイブリッド結合させることができた。一方, Böddinghausら⁵⁾はマイコバクテリアDNAに, 特異的にハイブリッド結合する16S rRNA遺伝子から精製分離したマイコバクテリア属特異的オリゴヌクレオチドを発見し, またRogallら⁶⁾は, 16S rRNA遺伝子の一部をPCR増幅し, それに続く直接の配列決定により多様なマイコバクテリア種を識別しえたが, *M. kansasii* と *M. gastri* とは表現型では異なるが, 16S rRNA遺伝子配列は全く同一であるため, この方法では両菌種を識別することができなかったという。

シークエンス解析では, Picardeauら (フランス)⁷⁾が *M. kansasii* の臨床分離の39株と水道水由来の24株について heat shock protein 65-polymerase chain reaction-restriction analysis (*hsp65*PRA) 解析を行い, 供試菌をI型~V型の5遺伝子型に分類し, I型菌は39.7%, II型菌は31.7%で両者はほぼ同程度の割合を示したといひ, またTaillard

¹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, ²同内科, ³財団法人広島県環境保健協会

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 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
(Received 14 Jan. 2011/Accepted 15 Feb. 2011)

ら (スイス)⁸⁾は、さらにVIおよびVII型菌を追加した7つの型 (I型~VII型) に分類し、I型は67%、II型は21%であったという。一方、Chimaraら (サンパウロ)⁹⁾は、182株中180株 (98.9%)、本邦ではIwamoto & Saito¹⁰⁾による解析で臨床分離菌198株中184株 (92.9%)が、またNHO近畿中央胸部疾患センター (以下、当センター) の検討¹¹⁾では臨床分離菌174株中170株 (97.7%)がI型に分類され、同遺伝子型をもつ亜種の優位性が認められている。

さらに*M.kansasii*の16S-23S internal transcribed spacer (ITS) 領域内の塩基配列を解析することによって塩基上に相違を認める5遺伝子型に分類することも可能となり、当センターで検討した174株中173株が*hsp65*PRAとITSシーケンスで同じ遺伝子型をもつことが明らかにされた¹¹⁾が、例外的に1株のみが*hsp65*PRAでIIb型、ITSシーケンスでII型を示し、これはIwamoto & SaitoのいうI型とII型の中間型 (atypical type II) に相当するものであった¹⁰⁾。このようにII型からI型への分化を示唆する株の存在が稀ながらみられたことは*M.kansasii*の進化過程を考えるうえで興味深い。

*M.kansasii*はGC-richな複数反復配列をもつことから、RFLPによる分子疫学解析が盛んに行われてきた。Gaafarら¹²⁾はAmplified-Fragment Length Polymorphism (AFLP)による遺伝子型分類を行い、SingleとMultipleの2つのpatternに分類した。またYangら¹³⁾により、*M.kansasii*に特異的な947bpの長さを保有したIS1652配列はDNAプローブのpMK1-9陰性の*M.kansasii*にのみ認められ、1から11本のバンド間で多型性を示すとされている。Picardeauら⁷⁾は*hsp65*PRAのII型とIII型にはIS1652配列が存在する一方、I型、IV型、V型には存在しなかったとしているが、当センターの解析¹¹⁾ではI型、IIb型、IV型にもIS1652の存在が認められている。すべての型にIS1652配列が存在するか否かは現時点では不明であるが、今後さらに菌株を蓄積、検討することにより解明されるであろうと考えている。

また、10bpの繰り返し配列で5bpの間隔をもつMPTR配列は*M.kansasii*以外に結核菌群、*M.gordonae*、*M.asiaticum*、*M.gastri*、*M.szulgai*にも存在し、結核菌の染色体上では100以上のコピー数をもつ多型性を示すが、*M.kansasii*では約80の遺伝子領域に存在し、その高い分解能が認められている¹⁴⁾。Arendら¹⁵⁾は22株の*M.kansasii*を対象としてITSシーケンスをターゲットとしたキットであるINNO-LiPA Mycobacteria DNA probe test (Inno-genetics)で分類したうえでMPTR-RFLPを行い、3分類されたグループごとに各々に共通したパターンが存在したが、いずれの株においても疫学的関連性は認められなかったという。当センターの検討¹¹⁾でもIS1652-RFLPと

同様に各型間に多型性が認められたが、供試174株由来の患者の居住地域や職場環境といった生活圏は広範囲に及んでいたため、疫学的関連性は乏しいと考えられた。

Picardeauら⁷⁾は、高い分離能をもつ分子疫学的手法の一つである制限酵素*Dra* Iを用いたPFGE解析で大きなクラスターを形成したグループをパターンIと定義したが、これは*hsp65*PRAでI型に相当したとしている。また、パターンIは4つの亜型に分類され、そのうち最も多く見られたのはIaであったという。Zhangら¹⁶⁾は、*M.kansasii*症患者69名からの初回分離株と2種類の標準菌株 (ATCC12478, ATCC35775)の合計71株中、彼らというDa型 (制限酵素*Dra* I処理) とIinumaら¹⁷⁾のいうM型 (制限酵素*Vsp* I処理) は上記のパターンIaと共通するパターンを有していたとし、Da型の31株と1~3のバンドを異にした33株、4~6のバンドの異なる4株の合計68株 (95.8%)にクローナリティーを認めたという。また、上記69患者から分離されたすべての臨床分離株 (81株)について*hsp65*PRA解析を行ったところ、78株 (96.3%)はI型であったという。当センターで得られた臨床分離174株中170株はPFGE解析 (制限酵素*Dra* I処理)でバンドの変化がない同一クローナリティーと2~3バンドの違いを認めたパターンA (159株)と、4~6バンドの違いをもったパターンB (2株)、7バンド以上の違いを認めたパターンC (9株)に分類された。目視比較によりパターンAはZhangらのDa型 (IinumaらのM型)に属するものと判断でき、I型の中でも特にクローナリティーの高いグループと考えられた¹¹⁾。また当センターの成績は一医療施設での臨床分離株を対象としたものであるが、全国の臨床分離株を対象としたIinumaらの成績¹⁷⁾と同様、PFGE解析により、他の手法では識別できなかったI型の一部を亜分類でき、わが国における*M.kansasii*の感染状況を知るうえで重要な知見が得られるものと考えられた。なお、上記した当センターでの174株の遺伝子型分類¹¹⁾は一括してTableに示した。

上述した*M.kansasii*の詳細な亜分類および菌種内遺伝子変異の解明は、環境からヒトへと感染する本菌の進化過程を考えるうえできわめて貴重な知見である。ヒトから分離される遺伝子型 (I型)ならびに環境およびヒトから分離される遺伝子型 (II型)は、人類の文明が発達し都市化を伴ってヒトへの感染機会を大幅に増やしつつ現在に至ったものと思われ、環境からのみ分離される遺伝子型 (III型~VII型)は、稀にヒトに対して病原性を発揮するが、疫学的見地からも異なる感染源であると推測される。一方、疫学的にI型の臨床分離株が高い優位性を示すことと、環境からの菌の分離が非常に困難であることから、*M.kansasii*症の感染要因の解明や、特定の感染経路を探り、有効な感染予防対策を構築することは現

Table Distribution of subtype of *Mycobacterium kansasii* isolated in NHO Kinki-chuo Chest Medical Center¹⁾

Type	<i>hsp65</i> PRA	Sequencing	RFLP		Subtypes by PFGE		
		ITS	IS1652	MPTR	A pattern	B pattern	C pattern
I	170	170	170	170	159	2	9
II	2	3	3	3	0	0	2
IIb	1*	0	0	0	0	0	1*
VI	1	1	1	1	0	1	0
Total	174	174	174	174	159	3	12

*Atypical type II

時点では難しい。しかし、近年の一塩基多型 (SNPs, single nucleotide polymorphisms) 解析を用いた結核菌の系統発生的研究により、遺伝的多様性に富む環境中の抗酸菌の中からヒト体内に適応した結核菌群が進化してきたと推測されている¹⁸⁾¹⁹⁾ことから、今後ヒトに対してより発病を引き起こしやすい *M. kansasii* が明らかにされても不思議ではない。結核に類似の症状を引き起こし、自然界よりもヒトに近い環境に好んで棲息している *M. kansasii* だからこそ最重要視されるべきである。そのためにも最新の遺伝子学的手法を駆使して、非結核性抗酸菌の集団構造調査を含めた環境内の *M. kansasii* の多様性の解明を検討する必要がある。

M. kansasii 研究の将来展望

M. kansasii 研究の新しい分野の開拓は、遺伝系統ならびに感染経路の解明であり、最も有力視されているのは本菌のゲノム解読である。先行する結核菌のゲノム研究が現在の結核疫学および臨床面において大きなブレークスルーを導き出したのと同様に、*M. kansasii* の全ゲノム配列データの中から遺伝子変異の多型性解析を行うことで本菌の遺伝系統を明らかにし地域特異的な遺伝系統を浮き彫りにすることができるであろう。また、遺伝系統と臨床データを組み合わせることで、治療効果や各菌株における薬剤耐性化傾向について予測することや、難治化しやすい *M. kansasii* の存在を明らかにすることも可能となるであろう。そして *M. kansasii* の分子疫学解析の現状から、本菌が高いクローナリティーをもつという可能性を検証するためにも PFGE 解析に代わるより高い識別能力をもつ手法の開発は不可欠である。今後、本菌の病原性や発症メカニズムに関する知見を蓄積することで、*M. kansasii* 症の予防、診断、治療に大いに貢献できると思われる。

む す び

M. kansasii の集団遺伝学的解析は、特定地域における集団をその遺伝的特徴に基づき分類したものである。今

後、分離頻度の違う地域から分離された菌株の遺伝学的分類や、環境内の集団構造の解明にゲノムワイドな新たな手法を用いて網羅的に検討することで、病原性や発症メカニズムの違いに関する新しい知見が得られ、新たな治療や感染対策への道が拓かれるであろう。

文 献

- 1) Huang ZH, Ross BC, Dwyer B: Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA hybridization. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2125–2129.
- 2) Ross BC, Jackson K, Yang M, et al.: Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2930–2933.
- 3) Tortoli E, Simonetti MT, Lacchini C, et al.: Evaluation of a commercial DNA probe assay for the identification of *Mycobacterium kansasii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994; 13: 264–267.
- 4) Yang M, Ross BC, Dwyer B: Isolation of a DNA probe for identification of *Mycobacterium kansasii*, including the genetic subgroup. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2769–2772.
- 5) Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, et al.: Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1751–1759.
- 6) Rogall T, Flohr T, Böttger EC: Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. J Gen Microbiol. 1990; 136: 1915–1920.
- 7) Picardeau M, Prod'Hom G, Raskine L, et al.: Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol. 1997; 35: 25–32.
- 8) Taillard C, Greub G, Weber R, et al.: Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity, Swiss national survey. J Clin Microbiol. 2003; 41: 1240–1244.
- 9) Chimara E, Giampaglia CMS, Martins MC, et al.: Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the state of São Paulo between 1995–1998. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99: 739–743.
- 10) Iwamoto T, Saito H: Comparative study of two typing methods, *hsp65* PRA and ITS sequencing, revealed a possible evolutionary link between *Mycobacterium kansasii* type I and II isolates. FEMS Microbiol Lett. 2006; 254:

- 129–133.
- 11) 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.
 - 12) Gaafar A, Unzaga MJ, Cisterna R, et al.: Evaluation of a modified single-enzyme amplified-fragment length polymorphism technique for fingerprinting and differentiating of *Mycobacterium kansasii* type I isolates. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3846–3850.
 - 13) Yang M, Ross BC, Dwyer B: Identification of an insertion sequence-like element in a subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2074–2079.
 - 14) Hermans PWM, van Soolingen D, van Embden JDA: Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. J Bacteriol. 1992; 174: 4157–4165.
 - 15) Arend SM, Cerdá de Palou E, de Haas P, et al.: Pneumonia caused by *Mycobacterium kansasii* in a series of patients without recognised immune defect. Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 738–748.
 - 16) Zhang Y, Mann LB, Wilson RW, et al.: Molecular analysis of *Mycobacterium kansasii* isolates from the United States. J Clin Microbiol. 2004; 42: 119–125.
 - 17) Iinuma Y, Ichiyama S, Hasegawa Y, et al.: Large-restriction-fragment analysis of *Mycobacterium kansasii* genomic DNA and its application in molecular typing. J Clin Microbiol. 1997; 35: 596–599.
 - 18) Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, et al.: Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2005; 1: e5.
 - 19) Crubézy E, Legal L, Fabas G, et al.: Pathogeny of archaic mycobacteria at the emergence of urban life in Egypt (3400 BC). Infect Genet Evol. 2006; 6: 13–21.

Review Article

PRESENT STATUS OF STUDIES ON EPIDEMIOLOGY
AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM KANSASII*,
IN SPECIAL REFERENCE TO ITS MOLECULAR EPIDEMIOLOGY

¹Shiomi YOSHIDA, ³Hajime SAITO, and ²Katsuhiko SUZUKI

Abstract There appears to be some genetic diversity among *Mycobacterium kansasii* (*M.kansasii*) isolates recovered throughout the world. Restriction analysis of heat shock protein 65-polymerase chain reaction-restriction analysis (*hsp65*PRA) showed that *M.kansasii* contains seven subspecies genetically distinct from *M.kansasii* isolates. *M.kansasii* genotype I is predominant in Japan and shows a very tight clonal structure. Different molecular typing methods including the 16S-23S rRNA spacer (ITS) region, RFLP, and PFGE analysis have been applied to isolates worldwide, and *M.kansasii* genotype I, as defined by *hsp65*PRA, appears to be highly clonal and the most common genotype associated with human disease. However, the identification of *M.kansasii* at the subtype level may possibly be more than just an interesting epidemiological tool; it may be relevant to determining the infectious pathway and clinical management of individual cases, as it allows the differentiation of potentially pathogenic subtypes from non-pathogenic subtypes. This review has been followed by the first review of the epidemiology of *M.kansasii*, and summarizes

the evidence of molecular epidemiology and establishes the validity and importance of studies of *M.kansasii*. Further, the more precise definition of various *M.kansasii* isolates herein should provide a significant contribution to the understanding of key aspects of its biology, genotype, and molecular epidemiology.

Key words: *Mycobacterium kansasii*, Molecular epidemiology, Genetic typing, *hsp65*PRA, PFGE

¹Clinical Research Center, ²Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ³Hiroshima Environment and Health Association

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