

DDHマイコバクテリアにて *Mycolicibacterium fortuitum* と同定された非発色性迅速発育抗酸菌のクラリスロマイシンに対する誘導耐性能と *erm* 遺伝子との関連性

¹吉田志緒美 ¹露口 一成 ²木原 実香 ²富田 元久
¹井上 義一 ³林 清二 ³鈴木 克洋

要旨：〔目的〕 DDHマイコバクテリアにて *Mycolicibacterium fortuitum* と同定された非発色性迅速発育抗酸菌 (NPRGM) のクラリスロマイシン (CAM) に対する感受性と誘導耐性遺伝子の解明。〔対象〕 肺非結核性抗酸菌症患者から分離培養され、*M. fortuitum* と同定された14株。〔方法〕 対象株のCAMに対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、複数の遺伝子領域での菌種同定と *erm* 遺伝子の検証。〔結果〕 対象株はシーケンス解析にて5種類のNPRGMに同定され、半数は *M. fortuitum* であった。14株のうち9株 (64.3%) は3日目のMIC判定で耐性となったが、残りの5株中4株は14日目でMICの上昇を示し、1株は感受性を維持した。13株は *erm* consensus 領域に陽性であったが、*M. fortuitum* 1株は欠損していた。7株に *erm* (39), 3株に *erm* (40) の保有が認められた。〔考察〕 肺 NPRGM 症由来株における *erm* 遺伝子と CAM 誘導耐性能の多様性が明らかとなったが、NPRGMの正確な同定法と誘導耐性能の適切な評価法の確立が課題に挙げられた。

キーワード： *Mycolicibacterium fortuitum*, 非発色性迅速発育抗酸菌, クラリスロマイシン, 誘導耐性, *erm* 遺伝子, DDHマイコバクテリア

はじめに

わが国の非結核性抗酸菌 (non-tuberculosis mycobacteria: NTM) 症の症例数は近年増加しており、2014年度には推定罹患率が14.7/10万人に達し、結核の罹患率 (12.9/10万人) を上回ったことが報告されている¹⁾。NTMは2018年7月時点で190を超える菌種多様性をもつことから、NTM症の治療経過も複雑かつ多彩である。また、菌種分類技術の進歩により菌種は細分化される傾向にあり、2010年以降に国際原核生物命名規約に基づき新たに登録された49菌種のうち、迅速発育抗酸菌 (Rapidly Growing Mycobacterium: RGM) の割合は26種 (53%) に達し、今後も新しいRGMの登録が見込まれる²⁾。従来、遅発育抗酸菌症に比べ病原性が低いとされてきたRGM症であったが、近年では肺 *Mycobacteroides abscessus* complex 症

のマクロライド系薬剤を中心とした多剤併用療法における治療奏効性が報告されており³⁾⁴⁾、RGMの同定技術の更新とそれに伴う診断および治療レジメンの確立が求められている。

RGMは菌種ごとに多様な感受性を有することから、RGM症治療における適正な抗菌薬の使用においては正確な菌種同定が必要である。わが国における臨床検査室でのNTMの同定検査には遺伝子をターゲットとした抗酸菌核酸遺伝子確認キットが汎用されており、RGMの同定にはDNA-DNAのハイブリダイゼーションを応用したDDHマイコバクテリア (極東製薬工業, 東京) が利用されている。同キットは18種のNTM種の同定が可能であるが多様なNTMに対する特異度が低いために誤判定を招く可能性が報告されており⁵⁾⁶⁾、*M. abscessus* complex の亜種鑑別や *M. fortuitum* とその近縁菌の判別は困難で

国立病院機構近畿中央呼吸器センター (旧称: 近畿中央胸部疾患センター)¹臨床研究センター, ²臨床検査科, ³内科

連絡先: 吉田志緒美, 国立病院機構近畿中央呼吸器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: yoshida.shiomi.vg@mail.hosp.go.jp)
 (Received 8 Jul. 2018/Accepted 29 Aug. 2018)

ある。近年では、煩雑な工程が少なくランニングコストが安価なマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析器（質量分析装置）による非発色性迅速発育抗酸菌（Non-photochromogenic RGM: NPRGM）の迅速同定が盛んであるが、抗酸菌データベースの充実が課題とされている。

一方、NPRGM症では化学療法による治療奏効が見込まれる菌種の場合に臨床検体から得られた分離株を用いた薬剤感受性検査の実施が求められる⁷⁾⁸⁾。遺伝子解析により遺伝子変異と薬剤耐性との関係についても明らかにされ、CLSI M24-A2（2011）ではヒトに病原性が高い非発色性RGM（NPRGM）の薬剤感受性検査として微量液体希釈法を用いた最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration: MIC）値の測定の実施を推奨しており、特にマクロライド系薬剤に対するMICの上昇と誘導耐性遺伝子（erythromycin ribosomal resistance methylase: *erm* gene）の関係性から、*erm* (41) が関与する*M. abscessus* complex に対するクラリスロマイシン（clarithromycin: CAM）の誘導耐性能の判定として、検査開始から3日目の判定で感受性（8 μg/ml 以下）であった場合に14日目のMIC値を確認することとしている⁷⁾。ATS/IDSAのNTM症診断・治療ガイドラインでは*M. abscessus*症に加えて、*M. fortuitum*症治療において*erm* (39)の存在による薬剤感受性検査のデータの取り扱いに注意を促すコメントを記している⁸⁾。一方、同じNPRGMである*Mycolicibacterium mucogenicum*や*Mycolicibacterium peregrinum*, *Mycolicibacterium senegalense*, *Mycobacteroides chelonae*, *Mycobacteroides immunogenum*は*erm*遺伝子を欠損しているとされており⁹⁾、NPRGM症における適切な薬剤の選択には正確な菌種同定の実施と、MIC値測定および*erm*の確認が欠かせないと考えられる。しかし、これら菌種の臨床分離株の*erm*の保有やCAMに対する誘導耐性能についての検討は少ない。今回われわれは、単一施設での解析ではあるがDDHマイコバクテリアにて*M. fortuitum*とされたNPRGMの遺伝的多様性の確認並びにCAMに対するMIC値と*erm*遺伝子との関係性について後方視的に検討し、肺NPRGM症の起炎菌の実態解明を行った。

方 法

対象

2016年1月～2017年12月の期間中に当センターを受診し肺非結核性抗酸症診断ガイドライン¹⁰⁾に基づき肺NTM症と診断された患者からの喀痰を検体として、BACTEC MGIT 960システム（日本ベクトン・ディッキンソン、福島）と小川KY培地（セロテック、札幌）を用いた培養検査でいずれも陽性となり、DDHマイコバクテリアで*M. fortuitum*と同定されたNPRGM 14株を対象

とした。これらはタックマン・マイコバクテリウムツベルクローシス並びにアビウム、イントラセルラーレ（すべてロシュ・ダイアグノスティックス、東京）による同定検査でいずれも陰性であり、マイコバクテリウム抗原キットであるBDミジットTBc ID（日本ベクトン・ディッキンソン、福島）で結核菌群陰性となった。また、PNBA（*p*-nitrobenzoic acid 加7H11 agar）上の発育と小川培地上のコロニー性状から複数菌種の混在は否定された。

DNAの抽出

小川培養で陽性となり、DDHマイコバクテリアにて*M. fortuitum*と同定されたNPRGM株をMGITで継代し培養陽性となった菌液を1.5 mLマイクロチューブに1 mL採取し12,000 rpmで15分間遠心後、上清を除去した。残った沈渣に滅菌蒸留水100 μLを添加し、95℃で15分間処理を施した。急冷後vortexを行い、12,000 rpmで1分間遠心後、上清を別のチューブに移し替えて、サンガーシーケンスと*erm*解析のDNAテンプレートとして用いた。

rpoB 領域、*hsp 65* 領域、16S-23S ITS 領域のサンガーシーケンス解析

hsp 65 と *rpoB* 領域の塩基配列の決定にはDevulderらの報告¹¹⁾に準じ、プライマーセットは順にHSP_Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) と HSP_Tb12 (5'-CTTGT CGAACCGCATACCCT), GrpOB1 (5'-ATCGACCACTTC GGCAACCGCC) と GrpOB2 (5'-GGTACGCGTCTCGAG AASCCG)を用いた。16S-23S ITS 領域はRothらの方法¹²⁾に準じ、16S-1420F (5'-TGGGCTTTGAGACAACAGG) と 23S-23r (5'-TCGCCAAGGCATCCACC)を用いた。増幅されたPCR産物はGenetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)を用いて解析し、得られたデータはBLAST解析により登録データベースと比較し検討した。

erm 遺伝子解析

Estebanら¹³⁾とNashら¹⁴⁾¹⁵⁾の方法に準じて、各種*erm*遺伝子の確認を行った。*erm* (38)と*erm* (39)の増幅には94℃ 30秒、65℃ 30秒、72℃ 30秒のサイクルを35回を行い、各種*erm*遺伝子の共通領域である*erm* consensus領域と*erm* (40)には94℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒のサイクルを25回行った。増幅されたPCR産物はMupid-ex（ミュージッド、東京）を用いたアガロースゲル電気泳動を行い、バンドの確認を行った。今回の検討では*erm*遺伝子のinactivationを伴うような塩基配列の変異や挿入、欠損の存在を確認していない。

CAM感受性検査

CAM感受性検査はCLSI M24-A2⁷⁾に準じ、微量液体希釈法で測定した。菌液調製方法は検出菌をマイコプロス（極東製薬工業、東京）で前培養後、滅菌蒸留水でマクファーランドNo.0.5に調整し、陽イオン調整ミューラー

ヒントンブイヨン (栄研化学, 東京) 12 mL に調整菌液 60 μ L を添加した。ドライプレート「オリジナルプレート」(栄研化学, 東京) の各ウェルに調整菌液の 100 μ L を接種し大気培養の後, 3 日目, 14 日目の MIC 値を測定した。MIC 値が 2 μ g/ml 以下の株は感受性 (Susceptible: S), 4 μ g/ml は判定不可 (Indeterminate: I), 8 μ g/ml 以上の場合耐性 (Resistant: R) と判定した。

結 果

今回 *M. fortuitum* と同定された NPRGM14 株中, 7 株 (50%) は *M. fortuitum* であり, そのうち 6 株は *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, 1 株は *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* であった。残りの 7 株は 4 種類の異なる菌種 [*Mycobacterium mageritense* (3), *Mycobacterium septicum* (2), *Mycobacterium porcinum* (1), *Mycobacterium neworleansense* (1)] と同定された (Table 1)。これら 14 株中 13 株は *erm* consensus に陽性を示したが, *erm* (38) はすべての対象株で陰性であった。*erm* (39) は 7 株 [*M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (4), *M. porcinum* (1), *M. mageritense* (2)], *erm* (40) は 3 株 [*M. mageritense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*] で陽性を示した。*M. fortuitum* 7 株中 4 株はこれら 4 つの *erm* 遺伝子のうち *erm* consensus と *erm* (39) に陽性を示したが, 2 株 (No. 439, 639) は *erm* consensus 以外は陰性を示し, 残り 1 株 (No. 677) はすべての *erm* に対して陰性であった。*M. mageritense* 3 株のうち, No. 163 は *erm* (40) 陽性, *erm* (38) と *erm* (39) 陰性であったが, No. 352 と 463 は *erm* (39) 陽性, *erm* (38), *erm* (40) 陰性であった (Table 1)。*erm* を欠損しているとされる *M. mucogenicum* や *M. peregrinum*, *M. senegalense*, *M. chelonae*, *M. immunogenum* は今回分離されなかった。

CAM に対する 3 日目の MIC 値は 14 株中 9 株で 8 μ g/ml 以上となり耐性と判定された。14 日目の判定で感受性と判定された 5 株のうち 4 株は MIC の上昇を示し, 誘導耐性ありと判定された。残り 1 株 (No. 677) は 3 日目で 0.25 μ g/ml, 14 日目でも同じ値を示し, 感受性を維持した (Table 2)。

考 察

NPRGM はマクロライドに対する誘導耐性能が認められており, その誘導耐性に関連する各種 *erm* は広範囲に NPRGM に分布している^{13)~15)}。Nash らによると, *erm* 遺伝子領域のタンパク質アミノ酸配列による系統樹で近縁菌とされる *Mycobacterium smegmatis* と *Mycobacterium goodii* には *erm* (38), *M. fortuitum*, *Mycobacterium boeniclei*, *Mycobacterium houstonense*, *M. neworleansense*, *M. porcinum* には *erm* (39), *M. mageritense*, *Mycobacterium wolinskyi* には *erm* (40) が存在するという¹⁴⁾。今回, *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* の 1 株 (No. 677) は 4 種類の *erm* 遺伝子が陰性となり, 14 日目の MIC 値の上昇が認められなかった。Nash らの臨床分離 NTM 株に対する *erm* の検討によると, *M. fortuitum* 32 株すべての *erm* (39) が陽性, *erm* (38) が陰性であり, *M. mageritense* 13 株はすべて *erm* (38), *erm* (39) 共に陰性であったという¹⁵⁾。今回の検討は数少ない臨床分離株を対象としているが, Nash らの結果との間に乖離がみられた (Table 1)。Nash らの株¹⁵⁾ は *erm* (40) について検討されておらず, すべての *erm* の保有状況について比較することはできないが, 環境中に流行する NTM 分布には地域特異性があることから, 異なる地域から分離された株間の遺伝的多様性が今回の *erm* 保有の違いという結果に関連している可能性が考え

Table 1 Species identification and *erm* genes determination of clinical NPRGM isolates

Isolate No.	Genetic identification		<i>erm</i> genes determination				DST results*	
	DDH mycobacteria	Multiple sequencing used <i>hsp65</i> , <i>rpoB</i> , and 16S–23S ITS regions	<i>erm</i> consensus	<i>erm</i> (38)	<i>erm</i> (39)	<i>erm</i> (40)	Day 3	Day 14
129	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>	positive	negative	positive	negative	S	R
162	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. septicum</i>	positive	negative	negative	positive	R	R
163	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	positive	negative	negative	positive	R	R
406	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	positive	negative	positive	negative	S	R
593	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	positive	negative	positive	negative	R	R
652	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. neworleansense</i>	positive	negative	negative	positive	R	R
47	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	positive	negative	positive	negative	R	R
307	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	positive	negative	positive	negative	S	R
352	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	positive	negative	positive	negative	R	R
439	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	positive	negative	negative	negative	R	R
463	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mageritense</i>	positive	negative	positive	negative	R	R
526	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. septicum</i>	positive	negative	negative	negative	S	R
639	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	positive	negative	negative	negative	R	R
677	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	negative	negative	negative	negative	S	S

NPRGM: Non-photochromogenic rapidly growing mycobacterium

DST: Drug susceptible testing, S: Susceptible, R: Resistance

*: Microdilution methods for clarithromycin

Table 2 *In-vitro* clarithromycin-susceptibility of clinical NPRGM isolates

Identification by multiple sequencing of <i>hsp65</i> , <i>rpoB</i> , and 16S–23S ITS regions	Incubation time	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
		0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	> 64
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (6)	3 days			1*			2			2	1		
	14 days			1*						1		1	3
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> (1)	3 days											1	
	14 days												1
<i>M. mageritense</i> (3)	3 days										1	2	
	14 days												3
<i>M. neworleansense</i> (1)	3 days										1		
	14 days												1
<i>M. porcinum</i> (1)	3 days						1						
	14 days											1	
<i>M. septicum</i> (2)	3 days						1				1		
	14 days												2

NPRGM: Non-photochromogenic rapidly growing mycobacterium

MIC, minimum inhibitory concentration

*: MIC value of isolate No. 677

られた。

本研究では、NPRGM 14株のうち9株 (64.3%) は3日目の判定でCAM耐性となった。Estebanらの報告によると、*M. fortuitum*の28.1% (89株中25株)、*M. mageritense*の20% (5株中1株)がCAM耐性 (3日目)であった¹³⁾。Nashらの報告では*M. mageritense*株 [961635]と*M. houstonense*株 [2014]は恒常的にマクロライドに耐性であったとされ¹⁴⁾、Wallaceらも*M. mageritense* ATCC700351株を含む*M. mageritense* 5株は高いMIC値 (8~>64 $\mu\text{g/ml}$)を示したと報告している¹⁶⁾。Huthらの報告では*M. mageritense*の臨床分離23株のCAMに対する3日目のMIC値は1~64以上を示し、S/I株の占める割合は4%であったという¹⁷⁾。したがって、CLSI M24-A2が提唱する薬剤感受性検査ではNPRGMの耐性誘導能を十分に評価できないことが示唆された。NPRGM症例はそれほど多くはないが重症例もあり、臨床上也 *erm*の検証や使用薬剤の感受性検査の実施は重要であると考えられる。したがって、今後NPRGMに対するCAM誘導耐性能の評価が可能な感受性検査の再検討が求められる。

今回の検討では、3日目で感受性を示した5株のうち1株を除いた4株でMICの上昇が示され、これら4株は*M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (2)、*M. porcinum* (1)、*M. septicum* (1)と同定された。*M. septicum*は1999年に中心静脈カテーテルの留置による2歳児の敗血症の起炎菌として初めて報告され¹⁸⁾、翌年に菌種登録されたNPRGMである。同菌における各種 *erm*の保有状況とCAM誘導耐性能を検討した報告はなく、Estebanらから *erm* consensus陽性の臨床分離株1株だけが報告されている¹³⁾。今回われわれが分離した*M. septicum* 2株は共に *erm* consensus陽性である一方、*erm* (38)および *erm* (39)は陰性であった。し

かし、*erm* (40)の保有に違いがみられ、*erm* (40)陽性を示したNo.162はCAMにおける3日目の判定の時にはすでに8 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高いMIC値を示していたことから誘導耐性の確認はできなかったが、*erm* (40)陰性のNo.526は14日目にMIC上昇がみられ、*erm* (40)以外の誘導耐性遺伝子の可能性が示唆された。わが国では、小林らが*M. septicum* 1株に対しCAMのMICは14日目でも上昇を示さなかったとしている (*erm*は未検討)¹⁹⁾。

NTM症の起炎菌同定は薬剤感受性検査を行ううえで必須の検査であり、適切な感染症診療や感染制御において最も重要な要素の一つと考えられている。ATS/IDSAのNTM症診療・治療ガイドラインでは、適正な抗菌薬使用の際に必要な菌種同定の手段として species levelまでの同定を推奨している⁸⁾。CLSI 2011 M24-A2でも species levelでの同定を提唱し、どうしてもできない場合の代替えとして*M. fortuitum* groupと*M. chelonae-abscessus* groupの区別による決定を認めている⁷⁾。したがって、*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. abscessus*および*M. chelonae*のNPRGMを同定できるDDHマイコバクテリアではCLSIの代替的同定をかりうじてクリアできる。しかし、DDHマイコバクテリアは誘導耐性が認められない*M. peregrinum*や*M. mucogenicum*を*M. fortuitum*と同定してしまう²⁰⁾。したがって、同定検査に同キットを用いる場合、CAM誘導耐性能を欠失しているNPRGMも薬剤感受性検査を実施する対象菌種として判断してしまうおそれがある。また本来なら、遺伝子のシーケンス解析による同定が施行されるべきであるが、相同性の高いこれらの菌種では16S rRNA遺伝子の解析だけでは区別がつかないため、さらに*hsp65*, *rpoB*, ITSといったハウスキーピング遺伝子の解析が必要である。しかし、species levelまでの同定を

全検体で施行することは時間的、経済的に負担が増える。質量分析装置による NPRGM の迅速な同定は可能であるが、臨床分離株を用いた検討では MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, 東京) では *M. goodii* を *M. wolinskyi* と判定し²¹⁾、反して *M. wolinskyi* は同定できないという報告²²⁾があり、Vitek MS PLUS (bioMérieux, 東京) では *erm* をもたない *M. peregrinum* を、*erm* (39) を有する *M. fortuitum* に誤判定した、という報告もある²¹⁾。けれども、2018年6月に質量分析による抗酸菌同定検査が保険収載されたことで、同法による同定依頼が増えている。したがって、質量分析装置に収載されるデータベースの充実と同定精度の向上が今後期待できる。一方、われわれの施設のように質量分析装置を導入できず未だ DDH マイコバクテリアによる同定検査を行っている医療施設は一定数存在すると思われるため、精度の高い NPRGM 同定法の開発も必要であると考えられる。

NPRGM の誘導耐性能を確認するには14日間の培養が必要である⁷⁾。Brown-Elliott らの報告によると、部分的 16S rRNA, *rpoB*, *hsp-PRA* 法を用いて菌種同定した199株の *M. mucogenicum* group (*M. mucogenicum*, *M. phocaicum*, *Mycolicibacterium aubagnense*) と157株の *M. immunogenum* の株では14日目での MIC 上昇は見られず、*erm* の存在も確認できなかったとしている⁹⁾。したがって彼らは、これらの菌種が同定された場合は14日目の判定を省略し、感受性検査の短縮が可能であると提言している⁹⁾。しかし臨床現場での抗酸菌検査には、得られた分離株はなるべく迅速に同定検査を行ったうえで薬剤感受性を検討し、早期の治療レジメン作成に有益な情報を提供するという目的がある。そのため、わが国の一般的な細菌検査室において薬剤感受性検査を行う前に複数のシーケンス解析による菌種確認を行うことは、時間的なロスが大きい。したがって、現状では14日目の MIC 判定省略は非常に困難であると考えられる。

結 語

DDH マイコバクテリアにて *M. fortuitum* と同定された NPRGM 株の半数は *M. fortuitum* であったが、残りは4種類の異なる近縁菌であった。また、NPRGM は複数の *erm* に陽性を示したにもかかわらず、半数以上の株で3日目の MIC 値が高く誘導耐性能の確認ができなかった。今後 NPRGM に対する、より適切な同定検査と薬剤感受性検査の確立が必要と思われる。

謝 辞

本論文の執筆に際して、国立病院機構近畿中央呼吸器センター臨床検査科 小池由紀子氏、江口富夫氏に深謝申し上げます。

利益相反：本論文の研究内容、結論、意義、あるいは意見について他者との利益相反 (conflict of interest) はありません。

文 献

- 1) Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, et al.: Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22: 1116-1117.
- 2) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html/> (2018年7月9日アクセス)
- 3) Harada T, Akiyama Y, Kurashima A, et al.: Clinical and microbiological differences between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* lung diseases. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 3556-3561.
- 4) Koh W-J, Jeong B-H, Kim S-Y, et al.: Mycobacterial characteristics and treatment outcomes in *Mycobacterium abscessus* lung disease. *Clin Infect Dis.* 2017; 64: 309-316.
- 5) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：結核菌検査指針2007. 財団法人結核予防会, 東京, 2007, 85-86.
- 6) 吉田志緒美, 富田元久：Pyrosequencing 法を用いた臨床分離抗酸菌株に対する同定法の精度評価. *日本臨床微生物学雑誌.* 2015; 25: 26-33.
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute: M24-A2 Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard Second-Edition. Wayne, Pa, USA. 2011, 31; 26-28.
- 8) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.: An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 367-416.
- 9) Brown-Elliott BA, Hanson K, Vasireddy S, et al.: Absence of a functional *erm* gene in isolates of *Mycobacterium immunogenum* and the *Mycobacterium mucogenicum* group, based on in vitro clarithromycin susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 875-878.
- 10) 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.
- 11) Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois JP: A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005; 55: 293-302.
- 12) Roth A, Fischer M, Hamid ME, et al.: Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 139-147.
- 13) Esteban J, Martín-de-Hijas NZ, García-Almeida D, et al.: Prevalence of *erm* methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15: 919-923.
- 14) Nash KA, Andini N, Zhang Y, et al.: Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob*

- Agents Chemother. 2006 ; 50 : 3476–3478.
- 15) Nash KA, Zhang Y, Brown-Elliott BA, et al.: Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. J Antimicrob Chemother. 2005 ; 55 : 170–177.
- 16) Wallace RJ Jr, Brown-Elliott B, Hall L, et al.: Clinical and laboratory features of *Mycobacterium mageritense*. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 2930–2935.
- 17) Huth RG, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr.: *Mycobacterium mageritense* pulmonary disease in patient with compromised immune system. Emerg Infect Dis. 2011 ; 17 : 557–558.
- 18) Schinsky MF, McNeil MM, Whitney AM, et al.: *Mycobacterium septicum* sp. nov., a new rapidly growing species associated with catheter-related bacteraemia. Int J Syst Evol Microbiol. 2000 ; 50 : 575–581.
- 19) 小林 治, 森田絹代, 鹿住祐子, 他: 希少菌種 *Mycobacterium septicum* を検出した市中肺炎の一例. 日本臨床微生物学雑誌. 2016 ; 26 : 124–130.
- 20) 吉田志緒美, 露口一成, 鈴木克洋, 他: *Mycobacterium fortuitum* を対象とした Ziehl-Neelsen 染色法と蛍光染色法における抗酸性の比較検討. 結核. 2013 ; 88 : 461–467.
- 21) Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, et al.: A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. PLOS ONE. 2015 ; 10 : e0144878.
- 22) 鈴木弘倫, 吉田 敦, 樽川友美, 他: 比較的まれな非結核性抗酸菌臨床株を対象としたMALDI-TOF MSによる同定性能の評価. 日本臨床微生物学雑誌. 2016 ; 26 : 105–111.

—————Original Article—————

CORRELATION BETWEEN GENOTYPIC *ERM* GENES AND PHENOTYPIC INDUCIBLE CLARITHROMYCIN RESISTANCE OF CLINICAL NON-PHOTOCHROMOGENIC RAPIDLY GROWING MYCOBACTERIUM ISOLATES WHICH WERE IDENTIFIED *MYCOLICIBACTERIUM FORTUITUM* BY DDH MYCOBACTERIA

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ²Mika KIHARA, ²Motohisa TOMITA, ¹Yoshikazu INOUE, ³Seiji HAYASHI, and ³Katsuhiro SUZUKI

Abstract [Objectives] The aim of this study was to identify the *erm* genes conferring the resistance variation in clinical non-photochromogenic rapidly growing mycobacterium (NPRGM) isolates identified *Mycolicibacterium fortuitum* by DDH mycobacteria kit.

[Material] All NPRGM isolates were collected from 14 consecutive bronchiectasis patients at the National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Osaka, Japan, between 1 January 2016 and 31 December 2017.

[Methods] All of isolates were confirmed using *rpoB*, *hsp 65*, and 16S–23S ITS region gene sequencing. Also, these isolates were evaluated the presence of *erm* genes and determined the minimum inhibitory concentration to clarithromycin according to CLSI 2011 M24–A2.

[Results] The presence of *erm* consensus regions among the 13 clinical isolates were determined, and heterogeneous *erm* genes including *erm* (39) and *erm* (40) presented in them which belonged to five species of NPRGM. However, the finding that the inducible resistance of NPRGM by *erm* methylases could not be confirmed by conventional susceptible

testing.

[Discussion] It therefore appears necessary to develop more proper inducible resistant evaluation to clarithromycin of NPRGM and accurate identification for selecting appropriate antimicrobial therapies.

Key words: *Mycolicibacterium fortuitum*, Non-photochromogenic rapidly growing mycobacterium, Clarithromycin, Inducible resistance, *erm* gene, DDH mycobacteria

¹Clinical Research Center, ²Department of Clinical Laboratory, ³Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

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: yoshida.shiomi.vg@mail.hosp.go.jp)