

# 皮膚から分離された *Mycobacterium shinshuense* の細菌学的解析

<sup>1</sup>鹿住 祐子   <sup>1</sup>大友 幸二   <sup>1</sup>高橋 光良   <sup>1</sup>御手洗 聡  
<sup>1</sup>菅原 勇   <sup>2</sup>和泉 純子   <sup>2</sup>安藤 昭子   <sup>3</sup>長谷川秀浩

**要旨：**〔目的〕同定困難であった *Mycobacterium shinshuense* の細菌学的解析を行った。〔対象と方法〕37歳女性，右下肢皮膚潰瘍より分離された抗酸菌（被検株753）と *M. marinum* (ATCC 927)，*M. ulcerans* (ATCC 19423)，*M. shinshuense* (ATCC 33728) を DDH，16S rRNA 法，*rpoB* 法，薬剤感受性試験，生化学的・生物学的検査を用いて比較した。〔結果〕DDH法によって上記の4株は *M. marinum* として判定されたが，遺伝子配列の検索方法（16S rRNA 法・*rpoB* 法）ではこの被検株（753）が3菌種のうち，いずれであるかを決定できなかった。しかし，16S rRNA 法の中の Portaels<sup>4)</sup>らの方法によってこの3菌種を分類することが可能であった。この方法によって被検株（753）は *M. shinshuense* と同定された。薬剤感受性試験と生化学的・生物学的性状検査においても被検株は *M. shinshuense* と同定された。〔考察〕DDHにて *M. marinum* と同定された抗酸菌で，発育条件が28℃培養で2週間かかり，暗所培養にて黄色のコロニーを形成する Scotochromogen であった場合，塩基配列レベルの検査と従来法の実施が必要である。

**キーワード：** *Mycobacterium shinshuense*, Skin ulcer, DDH, 16S rRNA 法, *rpoB* 遺伝子

## はじめに

*Mycobacterium shinshuense* は1982年に御子柴・東村らによって *Mycobacterium ulcerans* 類似菌として発表された暗発色の抗酸菌である<sup>1)</sup>。細菌学的・臨床的な研究は，東村・御子柴によって計数分類・DNA homology analysis が行われ，信大株は現在，ATCC 33728として保存されている<sup>2)</sup>。病変が類似している *M. ulcerans* は，アフリカ諸国にて重篤な皮膚潰瘍を引き起こす細菌として知られている<sup>3)</sup>。*M. shinshuense* も皮膚に潰瘍を形成する。*M. shinshuense* と *M. ulcerans* を分けるために，東村はDNAハイブリダイゼーションでは分類できないが，ミコール酸組成によって分類できると報告した。しかし，今回，われわれは Portaels<sup>4)</sup>らの16S rRNA法を用い，1248, 1289, 1450から1452番目に位置する塩基を検査し，同時に，確認として従来法を用いた。

今回，著者らは，新潟県長岡中央総合病院皮膚科患者

37歳女性の皮下潰瘍組織から分離された抗酸菌の同定を試み，本邦2例目の *M. shinshuense* と同定しえたので報告する。

## 材料と方法

### 材 料

37歳女性，右下肢皮膚潰瘍より分離された菌（被検株753）と *M. marinum* (ATCC 927)，*M. ulcerans* (ATCC 19423)，*M. shinshuense* (ATCC 33728) を用いて比較した。

### DNA-DNAハイブリダイゼーション法

日本では抗酸菌の同定法としてDNA-DNAハイブリダイゼーション法：DDHマイコバクテリア極東（極東製薬）<sup>5)</sup>が広く使われている。キットに添付している使用説明書に従い，上記の対象株について同定を実施した。このキットで同定可能な菌種は *M. tuberculosis* complex, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum*, *M. goodii*, *M. szulgai*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gastri*,

<sup>1</sup>結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター，<sup>2</sup>新潟県厚生連長岡中央総合病院，<sup>3</sup>新潟県厚生連病理センター

連絡先：鹿住祐子，結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: kazumi@jata.or.jp)

(Received 26 Apr. 2004/Accepted 27 May 2004)

*M. xenopi*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. peregrinum* の全18菌種である。判定には630 nmでの吸光度で測定し、感度1.9倍以上、相対類似度70%以下のものを同定結果とした。

#### DNA Sequence 法

##### • 16S rRNA 法

次に塩基配列検索法として世界的に使われている16S rRNA法<sup>6)</sup>を行った。対象となる各菌株について、卵培地発育菌1エーゼ(3 mmのエーゼにて1 loopful)を滅菌蒸留水500  $\mu$ lに浮遊させ、95℃にて10分間加温した。10,000 rpmにて10分間遠心後、上清のゲノムDNA 2.5  $\mu$ lを用いてPCRの反応を行った。PCR反応には10倍 Buffer 5  $\mu$ l, 10 mM dNTP 2  $\mu$ l, 滅菌蒸留水38  $\mu$ l, Ampli taq Gold (Roche diagnostics, 東京) 0.5  $\mu$ l (2.5 units), プライマー2  $\mu$ lを混和して反応溶液とした。増幅にはプライマー264 (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3')およびプライマー285 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')を各々3.2 pmole使用した。PCR反応条件は、denaturationは94℃ 30秒, annealing温度は60℃ 30秒間, extension 72℃を1分30秒間, 40サイクル行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動にて確認後、精製はスピンカラム (SUPREC TM-02, TAKARA, TAKARA SHUZO Co., LTD)を用いた。ダイレクトシーケンスはプライマー285とBig Dye terminator (ABI 4303153 Big Dye Terminator cycle Fs Ready Reaction Kit 1000)を用いてABI 310にて実施し、得られた塩基配列データはRibosomal Differentiation of Microorganisms: RIDOM<sup>7)</sup>で塩基配列の相同性を検索し、98%以上の塩基配列一致をもって菌種を決定した。

さらに同じ16S rRNA法にて*M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. shinshuense*を分けるためPortaels<sup>8)</sup>らの方法を用い、別の領域を検査した。PCRのプライマーは5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 5'-AGGAATTCCTGGGTTTGCATGCACAGGA-3'で行い、シーケンスは5'-TCATGTTGCCAGCACGTAATGGT-3', 5'-ATCGCAGATCAGCAACGC-3', 5'-GATTACTAGCGACTCCGA-3'の3種類を使用した。

##### • rpoB 法<sup>9)</sup>

塩基配列をさらに詳しく調べるために韓国のKimらの提案した*rpoB*法(*rpoB*はDNA依存性RNAポリメラーゼをコードしている遺伝子であり、菌種によって遺伝子学的多型性を持っていることが報告されている)を行った。ゲノムDNAの作製とPCR反応溶液は16S rRNAに準じた。*rpoB*の増幅にはプライマーP1 (5'-CGACCACTTCGGCAACCG-3')およびプライマーP2 (5'-TCGATCGGGCACATCCGG-3')を各々3.2 pmole使用した。

PCR反応条件は、denaturationは1分。annealing温度は66℃で1分間, extension 72℃を1分間, 40サイクル行った。PCR産物を確認後、精製はスピンカラムを用い、ダイレクトシーケンスはプライマーP1とP2それぞれとBig Dye terminatorを用いてABI 310にて実施した。*rpoB*についてはATCC標準株を用いて当研究所で作成した*rpoB*のデータベースとGENETYX-PDB Ver.4.1 (Software development社)を使用して相同性を検索し、99%以上の塩基配列一致をもって菌種を決定した。

##### • rpoB Myco-ID<sup>10)</sup>

7H9培地で培養、集菌した抗酸菌を、95℃ 15分ボイルした。遠心分離後、上清5  $\mu$ lを用いて、プライマー、thermal cyclerを用いて、*rpoB*遺伝子増幅産物(360 bp)を得た。この産物を制限酵素*Msp*Iと*Hae*IIIで切断した後、15%ポリアクリルアミド電気泳動を行って、遺伝子断片の大きさを比較検討した。

##### • 従来法による生化学的・生物学的検査法

最終確認は生化学的・生物学的方法<sup>3)11)</sup>にて行った。コロニーの形態は培地上の色調とスムーズおよびラフ型により分類し、発育速度と発育温度域は直径3 mmのエーゼを用い、半エーゼのコロニーを滅菌蒸留水に浮遊させ100倍希釈し、その0.1 mlを1%小川培地に接種し、28℃・37℃・42℃にて培養した。培養温度別に、3日・5日・7日・10日・2週間・3週間・4週間・6週間ごとにコロニーの形成を観察し、5日以内を迅速菌とし、7日は中間型、10日以上を遅発菌とした。

光発色試験は被検菌を1%小川培地2本に接種し、遮光して十分発育した後、1本に光を当て(60ワット1時間)、再度1晩37℃にて培養した。翌日、暗所培養のコロニーとの比較により色素を確認した。

薬剤感受性試験は各薬剤の濃度を1%小川培地に含有させ、菌浮遊液はマクファーランド0.1を滅菌蒸留水にて100倍希釈し、対照培地と薬剤含有培地に接種・28℃で培養した。Urease水解試験、ナイアシンテスト、アリルスルファターゼ試験は東村の方法に従った。

##### 病原性試験

Hartley雌モルモットに被検株 $2 \times 10^6$  CFUを皮下接種した。7週間後、解剖して病理標本を作製し、病変の有無を調べた。

## 結 果

1%小川培地発育菌を用いて行われたDDHは4株ともに*M. marinum*と判定された。これは東村も*M. ulcerans*と*M. shinshuense*はDNA homology分析で分けることはできないとしている<sup>3)12)</sup>。

シーケンスの結果、16S rRNA法によって被検株753は*M. marinum*: ATCC 927, *M. ulcerans*: ATCC 19423, *M.*

Table Characteristics of our clinical isolate and reference strains

	<i>M. marinum</i> ATCC927	<i>M. ulcerans</i> ATCC19423	<i>M. shinshuense</i> ATCC33728	Clinical isolate 753
Growth Rate	5 days	6 weeks	2 weeks	2 weeks
Growth at 37°C	+	—	—	—
Growth at 28°C	+	+	+	+
Rough colonies	Smooth	Rough	Smooth	Smooth
Photochromogen	Photochromogen	Nonphotochromogen	Scotochromogen	Scotochromogen
Colour of colony	Yellowish	Grayish white	Yellowish	Yellowish
Resistance to ethambutol, 5 µg/ml	S	S	R	R
Resistance to rifampicin, 25 µg/ml	S	S	S	S
Resistance to isoniazid, 10 µg/ml	S	R	S	S
DNA-DNA Hybridization (DDH)	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>
Urease	+	—	—	—
Niacin test (28°C)	+	—	—	—
Arylsulfatase 3 days	+	—	—	—
Arylsulfatase 14 days	+	—	—	—

S: Sensitive R: Resistance

*shinshuense*: ATCC 33728 と 98.51% の一致でこれらの 3 菌種と同種であると判定された。

同じ 16S rRNA 法であるが Portaels らの方法では塩基配列の 1248 の position に *M. marinum* は A (adenine), *M. ulcerans* は G (guanine), *M. shinshuense* は G, 被検株は G であった。1289 の position において *M. marinum* は A, *M. ulcerans* は C (cytosine), *M. shinshuense* は G, 被検株は G であった。この方法によって被検株は *M. shinshuense* と同定された。

*rpoB* 法では被検株 753 は *M. marinum*: ATCC927 と 99.3%, *M. ulcerans*: ATCC 19423 と 99.3%, *M. shinshuense*: ATCC 33728 と 99.7% となり, 99.0% 以上の塩基配列の一致で同種と決定するこの方法では決定できなかった。

従来法による検査結果は Table のとおりである。発育速度は *M. marinum* は 5 日間, *M. ulcerans* は非常に発育が遅く 6 週間かかった。*M. shinshuense* と被検株は 2 週間であった。発育温度域は 4 株ともに 37°C では困難で, 28°C で旺盛な発育を示した。さらに光発色性は *M. marinum* は光を当てた時にコロニーが黄色に着色する Photochromogen, *M. ulcerans* は光に関係なく着色しない Non-photochromogen, *M. shinshuense* と被検株は暗所培養でもコロニーに着色が見られる Scotochromogen であった。生化学的性状では, *M. marinum* は Urease 水解試験陽性, ナイアシンテスト陽性 (28°C 培養菌使用), アリルスルファターゼ陽性で *M. ulcerans*, *M. shinshuense* から分けることができた。*M. ulcerans* は EB 5 µg/ml 感性, INH 10 µg/ml 耐性, *M. shinshuense* は EB 5 µg/ml 耐性, INH 10 µg/ml 感性であった。

*rpoB* Myco-ID では, 105, 70, 60, 45, 40 bp のバンドが *M. ulcerans*, *M. shinshuense* で認められた。被検株では制限酵素 *Msp* I で切断したとき, これら以外に 180 bp に

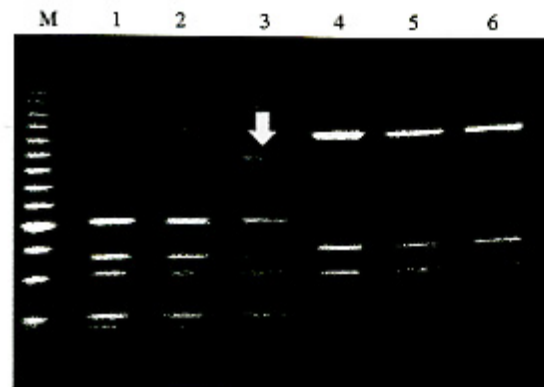


Fig. *rpoB* Myco-ID analysis of *M. ulcerans* (ATCC 19423), *M. shinshuense* (ATCC 33728) and clinical isolate 753.

Lane M: size marker, Lane 1, 4: *M. ulcerans* (ATCC19423), Lane 2, 5: *M. shinshuense* (ATCC 33728), Lane 3, 6: Clinical isolate (753), Lane 1, 2, 3: digestion with *Msp* I, Lane 4, 5, 6: digestion with *Hae* III

バンドが見られた (Fig. の矢印)。

被検株をモルモットに皮下投与したとき, 当該皮膚に浅い潰瘍を形成し, 肺, 脾などに肉芽腫は形成されなかった。

## 考 察

日本の臨床検査室では, 抗酸菌の同定には DDH が多く使われている。しかし, 今回の *M. shinshuense* のように *M. marinum* として判定される菌種がある。DDH によって *M. marinum* と判定され, 28°C 培養で 2 週間かかり, 暗所培養で黄色いコロニーを作る場合, 遺伝子配列 (シーケンス) と *rpoB* Myco-ID, さらに確認として薬剤感受性試験と生化学的・生物学的性状検査の実施が有用である。

興味あることに、被検株の *rpoB* Myco-IDによる検討で、180 bpのバンドが新たに見つかった。部分的に、配列の違いが示唆され、今後、さらに検討する必要がある。

*M. shinshuense*の病理性試験は、動物を用いて行われていなかった。今回、モルモットを使用して検討したところ、皮膚に浅い潰瘍を作るのみで、肺、脾、肝、リンパ節に肉芽腫が認められなかった。このことから、*M. shinshuense*の病原性は低いと推察される。今後、*M. shinshuense*の宿主に対する反応を、詳細に調べる必要がある。

#### 文 献

- 1) 御子柴甫: *Mycobacterium ulcerans*類似菌による非定型抗酸菌の1例. 日本皮膚科学会雑誌. 1982; 92: 557-565.
- 2) 東村道雄: 日本人女性に皮膚潰瘍を作った *Mycobacterium ulcerans* 類似菌. 結核. 1989; 64: 691-697.
- 3) van der Werf TS, van der Graaf WT, Tappero JW, et al.: *Mycobacterium ulcerans* infection. Lancet. 1999; 354 (9183): 1013-1018. Review.
- 4) Portaels F, Fonteyne PA, de Beenhouwer H, et al.: Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. J Clin Microbiol. 1996; 34: 962-965.
- 5) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 1991; 29: 1596-1603.
- 6) Springer B, Stockman L, Teschner K, et al.: Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J Clin Microbiol. 1996; 34: 296-303.
- 7) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al.: Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3637-3648.
- 8) Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, et al.: Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 1999; 37: 1714-1720.
- 9) Kim BJ, Lee KH, Park BN, et al.: Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 2001; 39: 2102-2109.
- 10) Lee H, Park HJ, Cho SN, et al.: Species identification of *Mycobacterium* by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2966-2971.
- 11) Tsukamura M: A review of the methods of identification and differentiation of mycobacteria. Rev Infect Dis. 1981; 3: 841-861. Review.
- 12) 東村道雄: *Mycobacterium ulcerans* 及び *M. haemophilum* による感染症. 結核. 1988; 63: 433-439.

## Original Article

## MYCOBACTERIUM SHINSHUENSE ISOLATED FROM CUTANEOUS ULCER LESION OF RIGHT LOWER EXTREMITY IN A 37-YEAR-OLD WOMAN

<sup>1</sup>Yuko KAZUMI, <sup>1</sup>Koji OHTOMO, <sup>1</sup>Mitsuyoshi TAKAHASHI, <sup>1</sup>Satoshi MITARAI, <sup>1</sup>Isamu SUGAWARA, <sup>2</sup>Junko IZUMI, <sup>2</sup>Akiko ANDOH, and <sup>3</sup>Hidehiro HASEGAWA

**Abstract** [Purpose] Second clinical infection case of *Mycobacterium shinshuense* was presented, we tried the identification of *M. shinshuense* that is isolated from skin.

[Object] Mycobacteria species isolated from cutaneous ulcer lesion of right lower extremity in a 37-year-old woman.

[Method] Identification by DNA-DNA Hybridization, 16S rRNA and *rpoB* method as genomic level and conventional method.

[Result] It did not grow on 1% Ogawa's slant medium at both 37°C and 42°C, but grew at 28°C. It formed yellowish colonies in the dark. It was difficult to distinguish *M. shinshuense* from *M. ulcerans* and *M. marinum* by DNA-DNA hybridization (DDH) and DNA sequencing. To identify that it is *M. shinshuense*, growth rate, temperature range of mycobacterial growth, light coloration reaction, biochemical and biological tests, and drug susceptibility testing were further explored. Finally it was identified as *M. shinshuense* based on these results.

[Consideration] For Mycobacteria species which grow 2 weeks after inoculation at 28°C, and which is identified as *M. marinum* by DDH method, it is necessary to identify with sequence and conventional method.

**Key words:** *Mycobacterium shinshuense*, Skin ulcer, DDH, 16S rRNA method, *rpoB* gene

<sup>1</sup>Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis (RIT), Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), <sup>2</sup>Nagaoka General Central Hospital, JA Niigata-ken Kouseiren, <sup>3</sup>Pathology Center, JA Niigata-ken Kouseiren

Correspondence to: Yuko Kazumi, TB Information Division (Molecular Epidemiology & Genetic Identification), Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: kazumi@jata.or.jp)