Mycobacterium shinshuense と *Mycobacterium leprae* の分子生物学的診断法の有用性

中永和枝*¹⁾、鈴木幸一¹⁾、谷川和也¹⁾、岩本朋忠²⁾、
後藤正道³⁾、斎藤 肇⁴⁾、石井則久¹⁾

1) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

2) 神戸市環境保健研究所微生物部

3) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科人体がん病理学

4) 広島県環境保健協会

〔受付・掲載決定：2007 年 6 月 29 日〕

キーワード：遺伝子診断、*Mycobacterium leprae*、*Mycobacterium shinshuense*、PCR、16S rDNA

ハンセン病とブルーリ潰瘍

ハンセン病の原因菌 *Mycobacterium leprae* は培養不能であることから、ハンセン病の診断には PCR 法を応用した *M. leprae* の遺伝子診断が重要である^{1, 2)}。他方 *M. shinshuense* は、ブルーリ潰瘍の原因菌である *M. ulcerans* と近縁（両者間の異同性についてはまだ明らかでない）の抗酸菌で、1982 年に束村、御子柴らによって初めて報告され^{3, 4)}、2004 年鹿住らにより本邦 2 例目が報告された⁵⁾。本菌は *M. ulcerans* と同様、分離培養に長期間を要するため、*M. leprae* と同じく PCR 法を応用した迅速な遺伝子診断が重要と考えられる。

わが国の皮膚科領域における主要な抗酸菌感染症は *M. marinum* によるものであり、*M. leprae* と *M. shinshuense* は稀であるが、それらによる感染症は治療や予後の点から、早期診断が極めて重

要である。本稿では最新の分子生物学的な抗酸菌同定法の有用性について両者を例にとりあげて以下に述べる。

皮膚科領域における抗酸菌検査

皮膚科領域では、皮膚組織や病巣の浸出液などを主な検査材料として、一般の抗酸菌検査法に準じて塗抹、培養検査が行われる。皮膚科領域の抗酸菌には、30℃前後を至適発育温度とするものもあり、菌の分離培養にあたっては 37℃に加えて 30℃（あるいは室温）をも試みるべきである。抗酸菌分離が出来たらその同定や薬剤感受性試験を行う⁶⁾。他方、未だ管内培養が不能な *M. leprae* や、培養に長期間を要する *M. ulcerans* / *M. shinshuense* による感染症の診断には遺伝子検査が有用である。すでに検体が病理組織学的検査のためパラフィンブロックや凍結包埋ブロック標本とされている場合でも PCR 検査が可能である。図 1 には、皮膚科領域における抗酸菌検査の主な流れと PCR 及び 16S rDNA シークエンス解析の位置づけを示した。

* Corresponding author:

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部
〒189-0002 東京都東村山市青葉町 4-2-1
TEL: 042-391-8211 FAX: 042-394-9092
E-mail: nakanaga@nih.go.jp

図1 抗酸菌検査の主な流れ

パラフィン切片を利用した PCR (short target)

ホルマリン固定パラフィン包埋標本では、DNAが断片化しているため、長鎖の増幅はできないが、200 bp 以下の短い標的サイズが設定された PCR では比較的良好に検出可能である。新たな皮膚生検を施行する必要が無く、検体の輸送や保存が容

易であることから、当センターで受託するハンセン病の行政検査では、パラフィン切片を材料とした PCR 検査も受け付けている。PCR の方法としては、まず試料から DNA 抽出が確実にに行われているかを確認するため、ヒトゲノム DNA の β -globin 領域の増幅を確認する。図2ではレーン4、5、6がそれに該当する。レーン5の被験検体からは205 bp のヒト β -globin 標的バンドが検出されているので、この PCR 検査は正常に機能していることが判る。次に目的とするらい菌検出はレーン1、2、3で確認する。被験検体(レーン2)ではらい菌 *dnaK* を標的とした157 bp のバンドがみられ、*M. leprae* 陽性と判定できた。なお、陰性コントロールであるレーン1、4ではバンドがみられず、陽性コントロールであるレーン3、6ではそれぞれ157 bp、205 bp のバンドがみられる⁷⁾。

ブルーリ潰瘍の診断においても、標的サイズを200 bp 以下に設定した *M. ulcerans* の insertion sequence (IS) 2404 を検出する PCR 法が応用されている⁸⁾。全長が1274 bp の IS 2404 はヒトに病原性のある抗酸菌のうちでは、*M. ulcerans*、*M. shinshuense* のみに認められる^{9, 10)}。しかし、*M. haemophilum* (ヘミンあるいはヘモグロビン要求性の皮膚潰瘍起炎菌) や *M. marinum* (I 群抗酸菌で、抗酸菌同定キット DDH マイコバクテリア極

図2. Detection of 157bp *M. leprae dnaK* gene fragment by PCR

レーン1-3: *M. leprae dnaK* gene fragment の増幅、レーン4-6: ヒト β -globin gene fragment の増幅。1.4: 陰性コントロール (H_2O)、レーンM: DNA サイズマーカー、2.5: 皮膚組織のパラフィン切片から抽出した DNA、3.6: 陽性コントロール (ハンセン病患者生検組織由来 DNA)

図3. Amplification of 154bp *M. ulcerans* IS 2404 fragment by PCR

増幅には10倍段階希釈した菌液より抽出した DNA を使用。レーン上の数字 10^4 - 10^0 は、検体の DNA 量に相当する *M. ulcerans* の CFU 値で、すべて陽性を示した。レーンM: DNA サイズマーカー

東では *M. ulcerans*, *M. shinshuense* と区別できない) には IS 2404 がみられないため、鑑別診断の一つとして応用できる。*M. ulcerans* 97-107 の培養菌液を希釈してそれぞれからの DNA を抽出し、IS 2404 を標的とした PCR を行って感度を調べたところ、わずか数 CFU の菌から抽出した DNA でも検出が可能であった (図 3)。設定された標的サイズは 154 bp と短く、パラフィン切片を材料とした PCR 検査でも検出可能である。

16S rDNA シークエンスによる菌の推定

培養によって菌が分離された場合、あるいは培養はできないものの、検査材料に多量の菌が存在する場合は、16S rDNA シークエンスを行い、RIDOM (<http://www.ridom-rdna.de/>) データベースを用いて菌の推定が可能である¹¹⁾。RIDOM は実用向きの簡便な相同性検索システムでインターネットを通して自由にアクセスできる。簡単な利用法として、シークエンスのテキストデータを入力すると相同性の高い順に菌株 10 例の表が画面上に現れる。対照となるシークエンスは抗酸菌の 16S rDNA のうちの超可変領域 A および B を含む約 500 bp (*E. coli* ポジション 54-510) である。表 1 には *M. shinshuense* 臨床分離株のシークエンスを入力した場合の結果を一部改変して示した。画面には抗酸菌株とともにシークエンスの違いが数値として表示される。*M. shinshuense* 臨床分離株のシークエンスは *M. shinshuense* (ATCC33728) に対して相同性 100% であるが、*M. marinum* と *M. ulcerans* に対しては 1 bp 違っているのみで、相同性は 99.77% であり、*M. tuberculosis* には 97.52%、*M. avium* には 97.06% であるが、*M. leprae* に対する相同性は低く (92.75%) 上位 10 例中の画面には表示されてこない。通常 99% 以上の相同性を示すものが同一の菌種と推定されるが、*M. shinshuense* はこの相同性の結果だけでは *M. marinum* や *M. ulcerans* と区別できない。そのほか、*M. kansasii* と *M. gastri*, *M. chelonae* と *M. abscessus* も互いに 100% の相同性があり、RIDOM の 16S rDNA 相同性検索結果のみでは同定困難で、他の方法との併用が必要である¹²⁾。

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体

防御部では、石井則久を窓口として、抗酸菌感染が疑われる皮膚疾患について相談に応じ、依頼に基づき分離・同定検査を実施している。

抗酸菌の系統解析

RIDOM データベースには現在亜種を含め 102 種、186 株の抗酸菌 16S rDNA シークエンスデータが登録されているが、わが国で感染症として報告されたことのある菌種は 30 種ほどである。図 4 に日本で分離されたことのある主要な病原性抗酸菌 30 種の 16S rDNA シークエンスデータに基づいた系統解析結果を系統樹として示した。*M. leprae* は、*M. haemophilum* と比較的近縁であり、*M. shinshuense* は *M. ulcerans*, *M. marinum* と、さらに *M. tuberculosis* ととも比較的近縁であり、これらは迅速発育抗酸菌とは遠縁の関係にある。近年次々と新しい抗酸菌が報告されている¹³⁾ が、これは抗酸菌の分離培地として特に液体培地が広く用いられるようになり、菌の分離頻度が高くなってきた

図 4 日本の抗酸菌感染症

日本の抗酸菌感染症起炎菌 30 種について、16S rDNA 塩基配列 (*E. coli* positions 54-510) を用いて系統解析を行い、近隣結合 (neighbor joining) 系統樹を描いた。* は外群、a は accession number, T は Type strain, 数字はブートストラップ確率を示す。

表1 RIDOM を用いた相同性検索：*M. shinshuense* 分離株の 16S rDNA シークエンス入力結果

Strain		mismatches (bp) ^{a)}	overlap (bp) ^{b)}	identity ^{c)}
<i>M. shinshuense</i>	[ATCC 33728]	0	442	100.00%
<i>M. marinum</i>	[DSM 44344]	1	442	99.77%
<i>M. ulcerans</i>	[ATCC 19423]	1	442	99.77%
<i>M. asiaticum</i>	[DSM 44297]	9	442	97.96%
<i>M. tuberculosis</i>	[ATCC 27294]	11	444	97.52%
<i>M. caprae</i>	[CIP 105776]	11	444	97.52%
<i>M. bovis</i>	[ATCC 19210]	11	444	97.52%
<i>M. africanum</i>	[ATCC 25420]	11	444	97.52%
<i>M. microti</i>	[ATCC 19422]	11	444	97.52%
<i>M. avium</i> subsp. ^{d)}	[DSM 44133]	13	442	97.06%
<i>M. leprae</i>	[AH1104/96]	33	443	92.75%

a) *E. coli* positions 54-510 の範囲内で *M. shinshuense* 分離株のシークエンスと異なる塩基の数

b) *M. shinshuense* 分離株のシークエンスと一致する範囲内の塩基数

c) *M. shinshuense* 分離株を 100% としたときのシークエンスの一致率

d) *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

こと、さらにそれにも増して遺伝子検査による菌の同定法が進歩したことによるものであろう。また非結核性抗酸菌感染症患者も増加傾向にあり¹⁴⁾、今後それらの迅速な検査、診断の重要性はさらに増すものと思われる。

まとめ

皮膚科領域で扱われている抗酸菌感染症原因菌として重要な *M. shinshuense* と *M. leprae* を例にとり、それぞれの PCR 検査と RIDOM を用いた 16S rDNA シークエンス解析法について述べ、さらに菌の 16S rDNA シークエンスデータを基にした系統解析手法を用いて、本邦で分離された病原性抗酸菌の菌種間の近縁関係についても述べた。

文 献

- 1) Sugita Y, Miyamoto M, Koseki M, Ishii N, Nakajima H: Diagnosis of leprosy by the practical application of the polymerase chain reaction. *Eur J Dermatol* 6:423-426, 1996.
- 2) Donoghue HD, Holton J, Spigelman M: PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol* 50:177-182, 2001.
- 3) Tsukamura M, Mikoshiba H: A new mycobacterium which caused skin infection. *Microbiol Immunol* 26:951-955, 1982.
- 4) 御子柴甫、進藤泰子、松本颯樹、望月正子、東村道雄：*Mycobacterium ulcerans* 類似菌による非定型抗酸菌症の 1 例。日皮会誌 92:557-565, 1982.
- 5) 鹿住祐子、大友幸二、高橋光良、御手洗聡、菅原勇、和泉純子、安藤昭子、長谷川秀浩：皮膚から分離された *Mycobacterium shinshuense* の細菌学的解析。結核 79: 437-441, 2004.
- 6) 石井則久、杉田泰之：抗酸菌症に関する検査、外来診療に必要な皮膚科検査マニュアル。MB *Derma*. 41:140-146, 2000.
- 7) 杉田泰之：ハンセン病と PCR。日ハンセン病会誌 70:3-13, 2001.
- 8) Phillips R, Horsfield C, Kuijper S, Lartey A, Tetteh I, Etuaful S, Nyamekye B, Awuah P, Nyarko KM, Osei-Sarpong F, Lucas S, Kolk AH, Wansbrough-Jones M: Sensitivity of PCR targeting the IS2404 insertion sequence of *Mycobacterium ulcerans* in an Assay using punch biopsy specimens for diagnosis of Buruli ulcer. *J Clin Microbiol* 43:3650-3656, 2005.
- 9) Stinear T, Ross BC, Davies JK, Marino L, Robins-Browne RM, Oppedisano F, Sievers A, Johnson PD: Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Myco-*

- bacterium ulcerans* by PCR. J Clin Microbiol 37:1018-1023, 1999.
- 10) Stinear T, Davies JK, Jenkin GA, Portaels F, Ross BC, Oppedisano F, Purcell M, Hayman JA, Johnson PD: A simple PCR method for rapid genotype analysis of *Mycobacterium ulcerans*. J Clin Microbiol 38:1482-1487, 2000.
 - 11) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A: Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying non-tuberculous *Mycobacterium* species. J. Clin Microbiol 39:3637-3648, 2001.
 - 12) 鹿住祐子、前田伸司、菅原勇：*rpoB* 遺伝子と 16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み. 結核 81: 551-558, 2006.
 - 13) 斎藤肇：抗酸菌の同定. 結核菌検査指針 2007（日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会編）出版予定. 結核予防会、東京、2007.
 - 14) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会：肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解－2003 年. 結核 78:569-572, 2003.

Mycobacterium shinshuense and *Mycobacterium leprae* infections: usefulness of genetical examinations

Kazue NAKANAGA^{*1)}, Koichi SUZUKI¹⁾, Kazunari TANIGAWA¹⁾,
Tomotada IWAMOTO²⁾, Masamichi GOTO³⁾, Hajime SAITO⁴⁾, Norihisa ISHII¹⁾

1) Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo

2) Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, Kobe

3) Department of Human Pathology, Field of Oncology, Kagoshima Univ. Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima

4) Hiroshima Environment and Health Association, Hiroshima

[Received & Accepted: 29 June, 2007]

Key words : genetic examination, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium shinshuense*, PCR,
16S rDNA sequence

Although *Mycobacterium shinshuense* and *M. leprae* infections are relatively rare in the fields of dermatology, an early diagnosis is one of the important prognostic factors of these infections. Applications of the genetical examinations such as PCR and 16S rDNA sequencing are helpful in early diagnosis with culture negative cases. Short target PCR tests are available to detect DNA of *M. shinshuense* or *M. leprae* from clinical specimens including formalin fixed-paraffin embedded samples. A partial 16s rDNA sequencing is functional with enough intact bacterial DNA. A similarity search based on the partial 16S rDNA sequences using RIDOM database is an easy and powerful tool to estimate the species of mycobacteria, however, it is not enough for the identification in some cases. For instance, a clinical isolate of *M. shinshuense* is clearly discriminated from *M. leprae* (92.75% sequence identity), however, difficult to be identified from *M. marinum* and *M. ulcerans* (99.77% sequence identity). The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences is illustrating that both *M. leprae* (closely related to *M. haemophilum*) and *M. shinshuense* (closely related to *M. marinum* and *M. ulcerans*, and also *M. tuberculosis*) are relatively related species and distantly related to rapidly growing species among 30 species of pathogenic mycobacteria which have been isolated in Japan.

*Corresponding author :

Department of Bioregulation, Leprosy Research Center,
National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aoba-cho,
Higashimurayama-shi, Tokyo 189-0002, Japan.
TEL : +81-42-391-8211 FAX : +81-42-394-9092
E-mail : nakanaga@nih.go.jp