

主論文の要旨

**Molecular typing and genetic characterization of
Mycobacterium avium subsp. *hominissuis* isolates
from humans and swine in Japan**

〔 日本 *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* の
ヒト・ブタ由来株における分子タイピングと遺伝的特徴 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

足立 崇

【緒言】

肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症の原因菌の1つである *Mycobacterium avium* は4亜種に分類され、各亜種の宿主への特異性から、異なる病原性を示す。その1つである *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) は、主にヒトまたはブタを宿主として病気を引き起こし、これまで variable number of tandem repeats (VNTR) 型別解析や 16S-23S rDNA Internal transcribed spacer(ITS)解析等を用いてヒト株、環境株、ブタ株の欧米や東アジアの株における分子疫学的差異を示す研究結果が報告されてきている。しかしながら日本の肺 MAC 症患者由来株、AIDS 患者由来株、ブタ由来株のそれぞれの分子疫学的・遺伝的特徴は明らかではない。本論文では様々な分子疫学的・遺伝学的手法を用いて日本で分離された MAH 株の異なる宿主における遺伝的特徴を解析する。

【対象と方法】

ATS/IDSA2007 の診断基準に合致した肺 MAC 症患者の喀痰由来株 (pMAC 株) 69 株、HIV 感染患者の血液培養由来株 (HIV-MAC 株) 28 株、食用ブタのリンパ節由来株 (swine 株) 23 株の合計 120 株を解析対象とした。これらの菌株を用いて Heat shock protein65 (*hsp65*) 塩基配列解析によって亜種同定を行い、code 1-15 の遺伝子型に分類した。次に MATR-VNTR (*Mycobacterium avium* tandem-repeat variable-number tandem-repeat) 型別解析を市川ら (2009) の報告に従って行い、PCR 産物の電気泳動後のゲルを、解析ソフト(Quantity-One)を用いて対象の VNTR 領域の塩基対数を推定した。各 VNTR 領域の反復回数を求め、これをアシルプロファイルとした。各 VNTR 領域の得られたデータを基に基準株 (*M. avium*104) からのマンハッタン距離を計算し最小全域木解析 (MST : minimum spanning tree) で系統樹を作成した。16S-23S rDNA ITS 解析 (ITS 解析) は Novi ら(2000)の方法に従い、PCR 産物の塩基配列結果を NCBI サイトの BLAST による相同性解析によって、これまで報告されている Mav-A から Mav-G の遺伝型に分類し、VNTR による遺伝型と比較した。さらに新規挿入配列 *ISMav6* の保有率と clarithromycin (CLA) に対する感受性を解析した。*ISMav6* の保有状況について PCR 法を用いて Ichikawa ら(2009)の方法に従って解析した。CLA に対する薬剤感受性検査はブロスミック NTM (極東) を用いた微量液体希釈法で行った。判定は NCCLS/CLSI (米国臨床検査標準化協会) の基準に従い最小発育阻止濃度が 4 μ g/ml 以下を感受性、32 μ g/ml 以上を耐性と判定した。

【結果】

hsp65 塩基配列解析で 120 株の対象株全てを MAH と同定した。*hsp65* の遺伝型解析では、code 15 が pMAC 株 (57%; 39/69)、HIV-MAC 株 (46%; 13/28) で多く存在している一方、swine 株では code 1 (87%; 20/23) が多く存在し、code 2, 3, 15 は存在しなかった (Table 2)。VNTR 型別解析では、pMAC 株は HIV-MAC 株、swine 株よりも有意に基準株からのマンハッタン距離が大きかった ($p < 0.001$, Figure 1)。VNTR 型

別解析を基に作成した MST では、pMAC 株と swine 株は明らかに異なるクラスターを形成し、一方で HIV-MAC 株では両クラスターにわたり広く分布し特徴的なクラスターを形成しなかった (Figure 2)。ITS 解析では主に Mav-A, B, F の 3 つの遺伝型に分かれた。さらに本研究で 3 つの新しい遺伝型が見出され、Mav-Q, R, S と名付けられた (Table 1)。pMAC 株の多くは Mav-A (51%; 35/69) と Mav-F (36%; 25/69) であったが、swine 株は Mav-B (65%; 15/23) が多く、Mav-F は存在しなかった。一方、HIV-MAC 株では Mav-A, B, F の遺伝型はほぼ同様の割合で存在していた (Table 3)。VNTR 解析に基づく MST に ITS の遺伝型を配置したところ Mav-A, F と、Mav-B において VNTR 型別解析の分布と類似した遺伝的配置を示していた (Figure 3)。ISMav6 は pMAC 株 (70%; 48/69) と HIV-MAC 株 (46%; 13/28) で高率に保有するが、swine 株には存在しなかった。新しい遺伝型である Mav-Q, R, S は pMAC 株で 5 株存在し、その多くが ISMav6 (80%; 4/5) を保有していた。ヒト由来株では、Mav-F と Mav-Q,R,S は Mav-A, B と比較し ISMav6 保有率が高かった。CLA 耐性株は 15 株で全てヒト由来株であり、ブタ株には存在しなかった (Figure 4)。ITS の遺伝型では、Mav-A と Mav-F でそれぞれ 10%, 24% に CLA 耐性株がみられたが、Mav-B には CLA 耐性株は存在しなかった (Table 3)。

【考察】

pMAC 株と swine 株は VNTR 型別解析法において、それぞれ特徴的な分子疫学的クラスターを形成し、この結果はこれまでの他の研究報告と一致していた。さらに、本研究では ITS 遺伝型を MST 上に配置し、ヒト由来株で優位な Mav-A, F と swine 株で優位な Mav-B は異なるクラスターを形成していることを明らかにした。一方、米国のヒト由来株では Mav-A, B が多く Mav-F は稀であるが高い ISMav6 保有率と CLA 耐性率を持つ、と報告されている。この報告と本研究結果では、pMAC 株における ITS の遺伝型分布が異なっており、米国と日本では pMAC 株の遺伝的背景が異なる可能性がある。この違いが地理的条件のみでなく病原性に関連した遺伝学的背景や感染経路に由来するかはさらなる研究が必要だろう。

これまでに IS1245-RFLP 分析法を用いた研究で AIDS 患者は遺伝的により多様な MAH に感染すると報告されており、本研究の VNTR 型別解析や ITS 解析でも同様に、HIV-MAC 株が pMAC 株、swine 株と比較し、菌株の遺伝的多様性が大きいことを示していた。これまでの ITS 解析の報告で、播種性 MAC 症の AIDS 患者由来株には Mav-B が多いことが報告されていたように、本研究でも swine 株のクラスター上に HIV-MAC 株が 36% 存在し、その多くが Mav-B であったことから (Figure 2)、Mav-B はブタのみでなく AIDS 患者等の免疫不全者に対しても疾患を引き起こしやすい可能性があると考えられた。

CLA 耐性率はヒト由来株で高く、MAC 感染の治療のみでなく他の感染症治療や免疫調節作用を期待した CLA 投与による臨床的曝露によって耐性率が高められていると考えられた。また、ISMav6 保有率は pMAC 株で高く、この挿入配列は MAH のモキ

シフロキサシン耐性に関係することが報告されており，MAH の環境適応手段の 1 つであることが推察されている。pMAC 株の CLA 耐性率や IS*Mav6* 保有率の高さは，これらが swine 株と異なる特徴的な遺伝的進化をしている可能性を示唆している。

本研究の制限（limitations）として，HIV-MAC 株と swine 株のサンプル数が十分でなく，対象菌株が全て日本の株のみであることが挙げられる。今後，MAH の遺伝学的背景を確定していくにはより多くのサンプル数と日本と海外の両菌株を用いた疫学研究が必要となるだろう。

【結論】

本研究では分子疫学的解析と遺伝的解析により，日本の MAH ではヒトの肺病変由来の pMAC 株とブタ由来の swine 株では遺伝的・進化的特徴が大きく異なることが明らかになった。