

氏名 (本籍)	正 木 孝 幸 (熊本県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	乙第 1416 号
学位授与日付	平成 18 年 12 月 20 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	<i>Mycobacterium kumamotonense</i> Sp. Nov. Recovered from Clinical Specimen and the First Isolation Report of <i>Mycobacterium arupense</i> in Japan: Novel Slowly Growing, Nonchromogenic Clinical Isolates Related to <i>Mycobacterium terrae</i> Complex
審査委員	(主査) 教授 江 崎 孝 行 (副査) 教授 出 口 隆 教授 渡 邊 邦 友

論文内容の要旨

近年、再興感染症として結核症のみならず、非結核性抗酸菌症の増加が問題となっている。非結核性抗酸菌症の臨床像には特異性がないため、診断には非結核性抗酸菌の分離培養と菌種同定が重要である。現在、*Mycobacterium* 属には 100 菌種以上が記載されているが、18 菌種の抗酸菌を鑑別する市販キット (DDH 法) を用いて同定しているのが実情である。われわれは、複数患者の臨床検体から分離された非結核性抗酸菌が DDH 法にて *M. terrae* および *M. nonchromogenicum* に対し弱い反応しか示さず同定に至らなかった菌種を得た。この 3 菌株に詳細な分子生物学的手法を実施し 2 種類の独立した菌種であることを明らかにした。新菌種として提案予定であった 1 株は米国の研究者により 2006 年 6 月記載された *Mycobacterium arupense* と同定され本邦初分離例となった。また、1 株は新菌種として位置付けられることを見出し、新菌種 *Mycobacterium kumamotonense* を提案した。

材料および方法

本研究では検診の精査で分離された CST 7247 および CST 7052 の 2 株、腱鞘炎患者由来 CST 0506 の 1 株計 3 株を使用した。ハウスキーピング遺伝子の塩基配列解析は 16S rDNA, *hsp65* および *rpoB* の 3 種の遺伝子を対象とした。PCR 法により増幅された各遺伝子の PCR 産物は dye-terminator 法により塩基配列を決定した。その塩基配列は DDBJ のデータベースに CLUSTAL W ソフトウェアを用いて近隣接合法により系統発生距離を算出し、TREE VIEW ソフトウェアを用いて遺伝子系統樹を得た。遺伝学的に近縁な菌種基準株を用い定量的 DNA-DNA 相同性試験を行い、最終的な種の異同を判別した。分離株の生理学的性状の決定と極東 NTM テストを使用した薬剤感受性試験を行った。ミコール酸分析は薄層クロマトグラフィー法および Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry 法を用い組成、構造および炭鎖長を決定した。

結果

16S rDNA 塩基配列類似度は CST 7247 と *M. terrae* では 98.6%, CST 7052 と *M. nonchromogenicum* および *M. hiberniae* は 99.1%, 98.9%, そして、CST 0506 と *M. nonchromogenicum* および *M. hiberniae* では 98.9%, 98.6%であった。*hsp65* 塩基配列類似度は CST 7247 と *M. terrae* は 98.3%, CST 7052 と *M. nonchromogenicum* および *M. hiberniae* では 94.1%,

95.0%, CST 0506 と *M. nonchromogenicum* および *M. hiberniae* は 94.1%, 95.1%であり, *rpoB* 塩基配列類似度は CST 7247 と *M. terrae* では 95.4%, CST 7052 と *M. nonchromogenicum* および *M. hiberniae* では 95.2%, 96.0%, CST 0506 と *M. nonchromogenicum* および *M. hiberniae* では 95.9%, 96.4%を示した。

CST 7247 は近縁基準株との定量的 DNA-DNA 相同性試験が 54.3%以下であったことから新菌種として, また, CST 7052 および CST0506 も近縁基準株との定量的 DNA-DNA 相同性試験が 47.5%以下であったことから新菌種として位置付けられた。

生理的性状試験は CST 7247 は 42°C培養での発育, β ガラクトシダーゼ活性がないことにより *M. terrae* と区別された。CST 7052 および CST 0506 は 42°C培養での未発育, 色素非産生性, 硝酸塩還元能, α および β グルコシダーゼ活性を欠如することで *M. nonchromogenicum* および *M. hiberniae* と区別された。薬剤感受性試験では 3 菌株ともイソニコチン酸ヒドラジドに耐性を示す *M. terrae complex* と同様の成績を示した。ミコール酸分析は 3 菌株とも α , ケトおよびジカルボキシミコール酸を有し *M. terrae complex* とほぼ同じ組成, 構造および炭鎖長であった。

しかし, CST 7052 および CST 0506 の遺伝子解析の結果, *M. arupense* との 16S rDNA および *hsp65* 塩基配列類似度は 99.8%~100%を示し, 生理学的性状試験結果も 2006 年 6 月に IJSEM 誌に記載された *M. arupense* と一致した。

結論

CST 7052 は新菌種として提案予定であったが米国の研究者によって 2006 年 6 月記載の *Mycobacterium arupense* と命名され, 本邦初の分離例であった。また, CST 7247 は分類学的に何れの菌種にも該当しないことが証明されたため新菌種 *Mycobacterium kumamotonense* sp. nov. として提案した。

論文審査の結果の要旨

申請者 正木孝幸は, 非結核性抗酸菌群の詳細な解析を通して, ヒト臨床材料にこれまで報告がない新しい菌群による感染症が発生していることをつきとめ, 分離株の分類学的解析を行なった。その結果, 新菌種を *Mycobacterium kumamotonense* sp. nov. と命名し, 分類学的に記載した。また, わが国では報告がなかった非結核性抗酸菌群感染症を記載し, 臨床細菌学に重要な貢献を行なった。これらの研究成果は, 細菌学に多大な貢献をしたものと認める。

[主論文公表誌]

Mycobacterium kumamotonense Sp. Nov. Recovered from Clinical Specimen and the First Isolation Report of *Mycobacterium arupense* in Japan: Novel Slowly Growing, Nonchromogenic Clinical Isolates Related to *Mycobacterium terrae* Complex
Microbiology and Immunology 50 (11), 889-897 (2006).