

循環式浴槽水からの *Mycobacterium avium* の検出 ならびに分離株の RFLP 解析の試み

下 島 優香子*, 矢 野 一 好**, 村 田 以和夫*, 諸 角 聖***

Isolation of *Mycobacterium avium* from Bath Water and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for the isolates

Yukako SHIMOJIMA*, Kazuyoshi YANO**, Iwao MURATA* and Satoshi MOROZUMI***

Keywords: トリ型菌 *Mycobacterium avium*, トリ型菌群 *Mycobacterium avium* complex, レジオネラ属菌 *Legionella* species, 浴槽水 bath water, RFLP 解析 restriction fragment length polymorphism analysis, 挿入配列 IS1245 insertion sequence IS1245

緒 言

国内で発生する非結核性抗酸菌症の60%から70%は、非結核性抗酸菌の中でもトリ型菌群, すなわち *Mycobacterium avium* complex (MAC) によるものである¹⁾. このMACという名称は、生化学的性状の類似性によりかつては鑑別同定が困難であった *Mycobacterium avium* (*M. avium*) と *M. intracellulare* の2菌種の総称である. MACは土壌, 水系などの自然界に広く分布しており, 公衆浴場水, 一般家庭浴槽水などからの分離例も報告されている^{2, 3)}.

MAC症はAIDS患者を除き, ほとんどが肺感染症であるが, *M. avium* については皮膚の感染例も報告されている⁴⁾. 本菌による皮膚感染症としては, 1998年及び1999年に家庭用の循環式浴槽水(いわゆる24時間風呂)の関与が考えられる家族内発生が相次いで報告され, 注目を集めた⁵⁻⁸⁾. 同時期に行われた調査においても家庭用24時間風呂から高率に *M. avium* が検出され, さらに *M. avium* は *M. intracellulare* よりも加熱に対する抵抗性があることが報告された⁹⁾.

一方, 近年細菌感染症の感染源や感染経路の推定に, 分子生物学的な疫学マーカーが用いられるようになり, *M. avium* 感染症についても, 本菌に特異的な挿入配列 (Insertion sequence; IS) であるIS1245をプローブとした Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析法が試みられている^{10, 11)}.

そこで循環式浴槽水から抗酸菌の検出を試みると同時に, 塩素処理の効果を調べる目的で, 浴槽水中の遊離残留塩素濃度と, 塩素処理がその汚染防止に有効であることが明らかにされているレジオネラについても併せて検査を行った. また, 今回分離された *M. avium* およびヒトの喀痰から分離された *M. avium* 保存株について, IS1245をプローブ

としたRFLP解析を行い, 本法の疫学マーカーとしての有用性についても検討した.

材料と方法

1. 試料水

2000年8月から10月の間に採取された循環式浴槽水39試料を供試した. 試料水の湯温及び遊離残留塩素濃度は, 採水現場において測定した.

2. 試料水の濃縮

上水試験方法に記載されているレジオネラ試験法(フィルター法)¹²⁾に従って, 試料水1Lを孔径0.22µmの滅菌メンブランフィルターでろ過し, フィルター上の捕捉物を滅菌精製水5mLで洗い出し濃縮被検液とした. 被検液を二分してそれぞれ抗酸菌及びレジオネラ試験に供した.

3. 抗酸菌の検出

濃縮した試料水を3,500 rpmで15分間遠心し, 沈渣を1mLの滅菌リン酸緩衝液(PBS, pH6.8)に浮遊させ, 倍量の2%NaOH-0.05Mクエン酸ナトリウムを添加し, 時々振とう, 攪拌しながら15分間処理した. その後, PBSで希釈し, 3,500 rpmで15分遠心した沈渣を1mLのPBSに浮遊させた. その一部を塗抹標本とし, チール・ネルゼン染色を行って鏡検した. 残りの約0.2mLを抗酸菌用分離培地である2%小川変法培地(極東製薬工業)に接種し, 37℃で最長8週間培養した. 集落の形成が観察されたものについてはチール・ネルゼン染色で抗酸菌であることを確認し, さらにDDHマイコバクテリア「極東」(極東製薬工業)を用いてマイクロプレートハイブリダイゼーション法により同定した. 抗酸染色陽性菌株のうち, 本法で同定不能であった菌株については *Mycobacterium* spp. とした.

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 環境保健部水質研究科

*** 微生物部

4. レジオネラの検出

濃縮した試料水に等量の0.2 M HCl-KCl溶液 (pH2.2) を加え室温で3分間酸処理した後, その処理液0.5 mlをレジオネラ選択培地であるWYO 寒天培地 (栄研化学) に接種し36 ℃で培養した. 一週間後, 青みを帯びた灰白色の潤滑集落を計数した. レジオネラの同定は, ラテックス凝集反応 (Legionella Latex Test Kit, OXOID) 及び診断用免疫血清 (デンカ生研) を用いた凝集反応によって行った.

5. RFLP法による解析

浴槽水から分離された*M. avium*株, 1998年1月から2000年12月までに接触者検診などの目的で当所に搬入された人の喀痰から分離された*M. avium* 10株と*M. intracellulare* 1株 (表1), 及び*M. avium*標準株ATCC25291を供試した.

1) DNAの抽出 小川培地上の菌塊をTE bufferに均等浮遊させ80 ℃20分間の加熱により死滅させた後, リゾチーム, 10% SDS/プロテナーゼK mix, CTAB/NaCl, クロロホルム/イソアミルアルコールによる処理を行ってDNAを抽出した.

2) ピオチン化プローブの作成 プローブにはIS1245配列内の427 bpからなるPCR産物を用いた¹⁰⁾. すなわちプライマーP1 (5'-GCCGCCGAAACGATCTAC) とP2 (5'-AGGTGGCGTCGAGGAAGAC) で, 94 ℃1分, 65 ℃1分, 72 ℃1分を30サイクル, 72 ℃10分を1サイクルPCR反応を行い, そのPCR産物をRandom primed DNA labeling system (コスモバイオ社) を用いてピオチン標識し, プローブとした.

3) サザンブロットハイブリダイゼーション 抽出した*M. avium*のDNAを制限酵素Pvu IIで切断後, 0.8%アガロースゲルで電気泳動を行い, ナイロンメンブレンHybond-N+ (アマシャムファルマシアバイオテク) に転写した. そしてナイロンメンブレン上のDNAをUV固定し, ピオチン化プローブと65 ℃で15時間以上ハイブリダイゼーションさせた. その後メンブレンは5%リキッドブロック (アマシャムファルマシアバイオテク) を用いて65 ℃でブロッキングし, アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンと室温で15分反応させた. 結果の判定はルミホス530 (和光純薬) を用いて化学発光により行った.

表1. 供試した人喀痰由来MAC菌株

菌株NO.	菌種	分離年月	年齢	性別
H1	<i>M. avium</i>	1998年1月	82	男
H2	<i>M. avium</i>	1998年8月	56	男
H3	<i>M. avium</i>	1998年10月	77	男
H4	<i>M. avium</i>	1998年10月	49	女
H5	<i>M. avium</i>	1998年12月	47	女
H6	<i>M. avium</i>	1999年3月	80	男
H7	<i>M. avium</i>	1999年5月	73	男
H8	<i>M. avium</i>	1999年11月	64	男
H9	<i>M. avium</i>	2000年6月	75	男
H10	<i>M. avium</i>	2000年12月	66	女
H11	<i>M. intracellulare</i>	1999年11月	74	女

成 績

1. 抗酸菌の検出

試験に供した浴槽水39試料の塗抹標本をチール・ネルゼン染色後鏡検した結果, 5試料 (12.8%) から, 小川変法培地を用いた培養では, 10試料 (25.6%) から抗酸菌が検出された (表2). 菌種別では, *M. avium*が4試料 (10.3%), *Mycobacterium* spp. が7試料 (17.9%) から検出された.

また, 抗酸菌が検出された10試料の遊離残留塩素濃度は 0.3 mg/Lが4試料, 0.4-2.0 mg/Lが4試料, >2.0 mg/Lが1試料, 及び不明1試料であった (表3).

2. レジオネラの検出

浴槽水39試料のうちレジオネラが検出されたのは, 12試料 (30.8%) であった (表2). 検出された*Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) 血清群は1群が3株, 3群が1株, 5群及び6群がそれぞれ3株であり, 群別できなかった株が2株あった.

残留塩素濃度の判明している試料では, レジオネラが検出された10試料のうち9試料が残留塩素濃度0.3 mg/L以下であった (表3).

また, 浴槽水39試料のうち6試料は抗酸菌, レジオネラともに陽性, 4試料は抗酸菌陽性レジオネラ陰性で, 6試料は抗酸菌陰性レジオネラ陽性であった. 抗酸菌, レジオネラともに陰性であったものは23試料であった (表4).

3. *M. avium*のRFLP解析

IS1245をプローブとしたRFLP法による*M. avium*の解析の検出パターンを図1に, 検出されたバンドの本数を表5に示した. 浴槽水より分離された4株では, 検出されたバンド数は1, 3, 6および14本と全て異なった. また人の喀痰から分離された10株においては1本のものが3株認められ, その他3, 6, 11, 12, 13, 18, 及び19本のものが各1株であった. *M. intracellulare*では0本であり, 鶏由来標準株である*M. avium* ATCC25291では3本であった.

考 察

MACによる肺感染症は, 国内外において近年増加傾向にある^{1, 13)}. 特に末期のAIDS患者は高率にMAC, そのほとんどは*M. avium*, による日和見感染を起こし, 全身播種性の症状を示して重症化し, 死に至ることも多い. そしてこのことがAIDS患者の生存率の低下を引き起こすことでも注目されている¹³⁾. 更に1998, 1999年に*M. avium*による皮膚感染症の家族内事例などが発生し, 感染源として家庭用24時間風呂が注目されたため, 循環式浴槽水の調査を試みた.

循環式浴槽水からの抗酸菌の検出率は25.6%, *M. avium*の検出率は10.3%であった. 公衆浴場水におけるSaitoらの報告²⁾では各々25.0%及び8.9%, 温泉水と公衆浴場水における宮本らの報告³⁾では35.0%及び10.0%であり, 検出率はほぼ同率であった.

一方, 今回の検査では*M. intracellulare*は検出されなかった. 41 ℃の培養で*M. avium*はよく発育したが, *M. intracellulare*

表2. 浴槽水の抗酸菌およびレジオネラ検査成績

試料 NO.	残留塩素 (mg/L)	湯温 ()	抗酸菌：		抗酸菌：培養成績		レジオネラ：培養成績	
			塗抹成績*	菌量**	菌種	菌量**	血清群***	
W1	0.3	41.0	2+	3	<i>Mycobacterium</i> .spp	24	1	
W2	1.0	41.4	2+	-		-		
W3	0.5	40.0	3+	約100	<i>Mycobacterium</i> .spp	-		
W4	0.5	40.2	3+	約100	<i>M. avium</i> , <i>Mycobacterium</i> .spp	-		
W5	0.7	42.0	-	-		-		
W6	0.1	42.0	-	-		160	1	
W7	3.0	40.8	-	-		-		
W8	痕跡	42.4	-	-		-		
W9	2.5	42.5	-	約20	<i>Mycobacterium</i> .spp	2	未同定	
W10	1.0	38.5	-	-		-		
W11	不明	42.6	-	1	<i>M. avium</i>	3200	5	
W12	>5.0	41.2	-	-		-		
W13	0.7	41.5	-	-		-		
W14	0.3	41.2	-	-		560	5	
W15	不明	不明	-	-		1200	5	
W16	0	51.0	-	-		-		
W17	0.2	42.0	-	1	<i>Mycobacterium</i> .spp	140	3	
W18	0.1	42.0	-	1	<i>M. avium</i>	64	6	
W19	0.1	41.5	-	-		2	1	
W20	1.5	39.0	-	1	<i>M. avium</i>	-		
W21	1.0	35.0	-	-		-		
W22	1.0	41.2	-	-		-		
W23	>5.0	42.0	-	-		-		
W24	0.7	39.5	-	1	<i>Mycobacterium</i> .spp	-		
W25	痕跡	41.0	-	-		-		
W26	0.1	41.0	±	2	<i>Mycobacterium</i> .spp	2	未同定	
W27	0	34.5	-	-		-		
W28	0.1	40.5	-	-		2	6	
W29	2.0	38.0	-	-		-		
W30	0.1	40.5	-	-		-		
W31	0	42.5	-	-		160	6	
W32	1.5	39.0	-	-		-		
W33	0.4	39.6	-	-		-		
W34	>2.0	40.4	-	-		-		
W35	>2.0	41.0	-	-		-		
W36	0.7	41.5	-	-		-		
W37	0.2	41.7	-	-		-		
W38	不明	不明	-	-		-		
W39	不明	不明	-	-		-		

* 1000倍で鏡検； - : 0/300視野，± : 1~2/300視野，1+ : 1~9/300視野，2+ : 10/100視野，3+ : 10/1視野

** CFU/100ml

*** *L. pneumophila*の血清群

は集落を形成しなかったという報告があり⁹⁾，通常の浴槽温度である40 前後において両菌種の発育能に差があるためと考えられる。

また，今回は調査しなかったが，家庭用24時間風呂においても，特に濾材からは高率に*M. avium*を中心とする抗酸菌が検出されるという報告があり^{3, 9)}，公衆浴場と家庭共

に循環式浴槽水中に高率に*M. avium*が分布するものと考えられる。

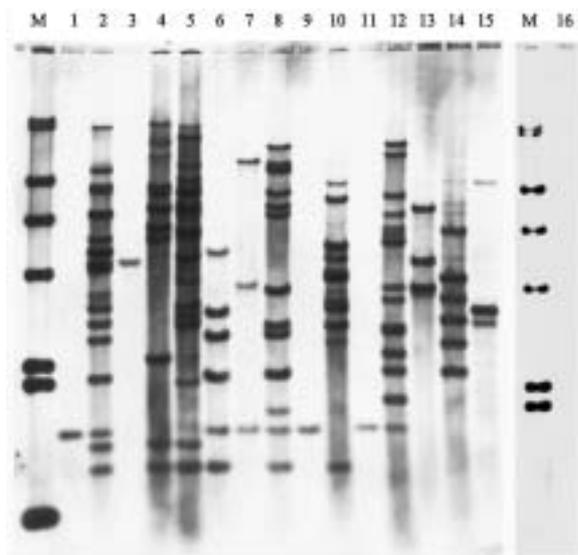
今回の調査では，抗酸菌とレジオネラの培養成績に一部相関が認められた。しかし，培養成績と遊離残留塩素濃度の関係を検討すると，レジオネラの陽性となった試料はいずれも塩素濃度の比較的低い試料であったが，*M. avium*を

表3. 浴槽水中の遊離残留塩素濃度と抗酸菌およびレジオネラの検出成績

塩素濃度 (mg/L)	試料数	抗酸菌 (<i>M.avium</i>) 陽性	レジオネラ 陽性
0	3	-	1
痕跡	2	-	-
0.1	6	2(1)	5
0.2	2	1(-)	1
0.3	2	1(-)	2
0.4	1	-	-
0.5	2	2(1)	-
0.7	4	1(-)	-
1.0	4	-	-
1.5	2	1(1)	-
2.0	1	-	-
>2.0	6	1(-)	1
不明	4	1(1)	2

表4. 浴槽水中の抗酸菌及びレジオネラ検出試料の相関性

	抗酸菌 (<i>M.avium</i>)陽性	抗酸菌陰性	計
レジオネラ陽性	6(2)	6	12
レジオネラ陰性	4(2)	23	27
計	10(4)	29	39

図1. IS1245をプローブとしたRFLP解析の検出パターン
M: DNA分子量マーカー HindIIIレーン1-10: *M.avium*; NO. H1-H10 (表1)レーン11-14: *M.avium*; NO. W4, W11, W18, W20より
分離された株 (表2)レーン15: *M.avium*; ATCC25291レーン16: *M.intracellulare*; NO. H11 (表1)

含む抗酸菌に塩素濃度との相関は認められなかった。このことから、低濃度の塩素処理では*M.avium*の増殖を防止できないものと推察された。

*M.avium*感染による皮膚炎の発症率は不明であるが、発

表5. *M.avium*のIS1245をプローブとしたRFLP解析成績

菌株NO.	由来	菌種	検出バンド数(本)
H1	人喀痰	<i>M.avium</i>	1
H2	人喀痰	<i>M.avium</i>	18
H3	人喀痰	<i>M.avium</i>	1
H4	人喀痰	<i>M.avium</i>	11
H5	人喀痰	<i>M.avium</i>	19
H6	人喀痰	<i>M.avium</i>	6
H7	人喀痰	<i>M.avium</i>	3
H8	人喀痰	<i>M.avium</i>	13
H9	人喀痰	<i>M.avium</i>	1
H10	人喀痰	<i>M.avium</i>	12
W4	浴槽水	<i>M.avium</i>	1
W11	浴槽水	<i>M.avium</i>	14
W18	浴槽水	<i>M.avium</i>	3
W20	浴槽水	<i>M.avium</i>	6
ATCC25291	鶏	<i>M.avium</i>	3
H11	人喀痰	<i>M.intracellulare</i>	0

症した場合は有痛性かつ難治性であることから⁴⁾、循環式浴槽水に生息する*M.avium*に対する汚染防止対策の必要性とともに、レジオネラと同様あるいはそれ以上の監視強化と注意喚起が必要である。

今回分離された抗酸菌の内、7株が同定不能な抗酸菌 (*Mycobacterium* spp.) であった。同定には、同定キットであるDDHマイコバクテリア「極東」(極東製薬工業)を用いたが、本同定キットで同定可能な菌種は、*Mycobacterium*属のうち人に臨床症状を起こすとされる*M.tuberculosis* complex, *M.avium*, *M.intracellulare*などの18菌種であり、それ以外の菌種は同定できない。更に、18菌種の中でも*M.scrofulaceum*, *M.gordonae*, *M.nonchromogenicum*, *M.fortuitum*, *M.chelonae*, には、同キットでは同定できない株があることが知られている¹⁴⁾。宮本らも、河川水等の自然環境水から分離された抗酸菌23株中11株は同キットで同定不能であったことを報告している³⁾。今後自然環境由来の抗酸菌を同定する方法を検討する必要がある。

近年、MACの遺伝子型別には、パルスフィールド電気泳動法¹⁵⁾、PCR¹⁶⁾及び様々な挿入配列をプローブとしたRFLP法^{10, 17)}等新しい方法が報告されている。その中でもIS1245をプローブとしたRFLP解析法は、*M.avium*に限定された方法であるが高い型別能力を有することから、標準法の提案もなされている¹⁸⁾。国内でも同解析法による*M.avium*の遺伝子型別が報告され始めたことから¹¹⁾、我々も今回分離された*M.avium*株及び保存株について同解析を試みた。15株についてRFLP法で検討したバンドの本数は1本から19本で菌株による多様性が認められた。*M.avium*感染症患者由来株は同方法で、13 - 23本¹¹⁾、3 - 27本¹⁰⁾、7本以上¹⁶⁾に分布したという報告もある。Guerreroらは、1本バンドを示したヒト由来株は16S rRNAのシーケンスでは*M.avium* subsp. *paratuberculosis*に近いが、特異的な挿入配列IS900を所有しない株であったと報告している¹⁰⁾。

今回我々の検討したヒト由来の*M. avium*株もまた、亜種が異なるか、患者の接触者検診などの目的で搬入された検体から分離された菌株であるため、*M. avium*感染症の患者由来株とは異なるパターンを示した可能性もあり、更なる検討が必要である。

近年の*M. avium*を含むMAC感染症の増加傾向、エイズ患者の増加傾向、及び24時間風呂における*M. avium*の汚染等により、*M. avium*に対しても感染原因の疫学的解析を目的とした分子生物学的な遺伝子型別が今後益々必要となる。今回検討したRFLP法は分離株から得られたバンドの本数からみて、集団感染、院内感染等発生時の分子疫学解析法として十分応用可能であることが示唆された。

ま と め

1. 抗酸菌は浴槽水39試料のうち、4試料が培養法、塗抹法両方陽性、6試料が培養法のみ陽性、1試料が塗抹法のみ陽性であった。*M. avium*は1試料が培養法、塗抹法両方陽性、3試料が培養法のみ陽性であった。

2. 遊離残留塩素濃度と抗酸菌(*M. avium*含む)検出には相関が認められなかった。

3. IS1245をプローブとしたRFLP解析法は、*M. avium*の遺伝子型別の方法として、集団感染、院内感染時の疫学マーカーとして有用であることが示唆された。

4. 循環式浴槽水の細菌汚染に関しては、レジオネラとともに*M. avium*の検出も重要である。

文 献

1) 坂谷光則：結核，74, 377-384, 1999 .
2) Saito, H. and Tsukamura, M. : *Japan. J. Microbiol.*, 20, 561-563, 1976 .

3) 宮本幹，山口義夫，笹津備規：環境感染，15, 127-132, 2000 .
4) 伊藤薫：日皮会誌，106, 1277-1281, 1996 .
5) 伊藤薫，伊藤雅章，尾崎京子，他：皮膚病診療，20, 703-706, 1998 .
6) 久保等：日皮会誌，108, 1321, 1998 .
7) 田畑伸子，加藤泰三，田上八朗：日皮会誌，108, 621, 1998 .
8) 楠原正洋，松尾圭三，森理，他：日皮会誌，109, 444, 1999 .
9) 藪内英子，坂井小枝佳，不破和美，他：環境感染，14, 181-188, 1999 .
10) Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 33, 304-307, 1995 .
11) 田丸亜貴，鈴木定彦，阿野裕美，他：結核，76, 328, 2001 .
12) 玉利祐三，吉田昌子，高木晋，他：分析化学，41, T77-T81, 1992 .
13) Horsburgh, C.R., Jr. : *N. Engl. J. Med.*, 324, 1332-1338, 1991 .
14) 山崎利雄，高橋宏，中村玲子：結核，68, 5-11, 1993 .
15) Mazurek, G.H., Hartman, S., Zhang, Y., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 31, 390-394, 1993 .
16) Picardeau, M. and Vincent, V. : *J. Clin. Microbiol.*, 34, 389-392, 1996 .
17) Bono, M., Jemmi, T., Bernasconi, C., *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 371-373, 1995 .
18) Van Soolingen, D., Bauer, J., Ritacco, C., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3051-3054, 1998 .