

●症 例

16S rRNA 解析で診断した肺 *Mycobacterium xenopi* 症の 1 例

荒野 直子^a 関谷 充晃^a 鈴木 健司^b
植草 利公^c 菊池 賢^d 高橋 和久^a

要旨：症例は 47 歳の女性。201X 年 5 月の健診で左上肺野の結節影を指摘され、他院で精査したが診断確定せず。当院を紹介され 201X+1 年 2 月に胸腔鏡下左肺上葉部分切除を施行し、切除検体の抗酸菌塗抹検査が陽性で抗酸菌感染症が疑われた。しかし、培養陰性で確定診断に至らず、切除検体を用いた 16S rRNA 遺伝子診断を施行し、肺 *Mycobacterium xenopi* 症と診断確定した。肺 *M. xenopi* 症は、我が国では比較的まれな疾患であり報告する。

キーワード：*Mycobacterium xenopi*, 肺非結核性抗酸菌症

Mycobacterium xenopi, Pulmonary nontuberculous mycobacteriosis

緒 言

Mycobacterium avium complex (MAC) 症以外の肺非結核性抗酸菌症 (nontuberculous mycobacteriosis: NTM) は、通常 DNA-DNA hybridization (DDH) 法により菌種を同定する。同法は分離された菌株を用いる検査であり、抗酸菌の培養陽性が原則である。今回我々は、塗抹検査で多数の抗酸菌がみられるも培養陰性となり、16S rRNA 遺伝子診断により肺 *Mycobacterium xenopi* 症と診断した 1 例を経験した。肺 *M. xenopi* 症は比較的まれな疾患で、かつ培養結果の解釈に注意を要する菌種であり報告する。

症 例

症例：47 歳，女性，銀行員。

主訴：なし。

既往歴：特記事項なし。

家族歴：父 くも膜下出血。

生活歴：喫煙歴・海外渡航歴なし。

アレルギー：なし。

現病歴：201X 年 5 月の健診で左上肺野の結節影を指摘され前医を受診した。同年 7 月上旬の CT ガイド下生検の結果、抗酸菌塗抹検査が陽性であり、凝固壊死を伴う類上皮細胞肉芽腫を認めた。しかし、結核菌、*Mycobacterium avium* および *Mycobacterium intracellulare* のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、6 週間の抗酸菌培養も陰性となり、確定診断に至らなかった。外科切除を勧められたが、当院での精査加療を希望して、同年 11 月下旬に当院紹介となった。

初診時現症：身長 162 cm，体重 47 kg，体温 36.6°C，血圧 104/74 mmHg，脈拍 74 回/min，整。経皮的動脈血酸素飽和度 (SpO₂) 97% (室内気)。意識清明。胸部聴診上，心雑音，肺副雑音は聴取せず。表在リンパ節は触知せず。

検査所見 (表 1)：特記すべき異常所見はなし。

胸部画像所見：胸部 X 線写真 (図 1a) では、左肺尖部に 22 mm 大の結節影を認める。胸部単純 CT (図 1b) では左上葉 S¹⁺²a に、周囲に娘結節を伴う辺縁不整な結節を認める。5ヶ月前の前医の胸部 X 線写真 (図 1c)，胸部単純 CT (図 1d) と比較し結節は増大傾向を示していた。

初診後の経過：201X+1 年 2 月，胸腔鏡下左肺上葉部分切除を施行した。切除検体での抗酸菌塗抹検査は蛍光法 3+，Ziehl-Neelsen 法 1+ と陽性だったが，結核菌，*M. avium*，および *M. intracellulare* の PCR は陰性だった。病理所見では hematoxylin-eosin (HE) 染色で乾酪壊死を囲むように Langhans 型の多核巨細胞が混在した類上皮細胞肉芽腫を認めた (図 2a)。膠原線維染色では壊死内に肺胞を構成する既存の弾性線維は保たれていた (図 2b)。抗酸菌染色では、抗酸菌の塊状の集簇を数ヶ所

連絡先：荒野 直子

〒113-8421 東京都文京区本郷 3-1-3

^a 順天堂大学医学部呼吸器内科

^b 同 呼吸器外科

^c 関東労災病院病理診断科

^d 東京女子医科大学感染症科

(E-mail: narano@juntendo.ac.jp)

(Received 3 Apr 2016/Accepted 14 Nov 2016)

表1 検査所見

Hematology		Serology	
WBC	4,100/ μ l	CRP	0 mg/dl
Neut	66.2%	<i>Aspergillus</i> antigen	0.1
Lym	23.4%	<i>Cryptococcus</i> antigen	negative
Eos	2.2%	PR-3 ANCA	<10 EU
Hb	12.4 g/dl	MPO-ANCA	<10 EU
Plt	28.3×10^4 / μ l	CEA	0.9 ng/ml
Chemistry		CYFRA	1.7 ng/ml
AST	34 IU/L	ProGRP	29.3 pg/ml
ALT	33 IU/L	QFT-3G	negative
LDH	202 IU/L	Bacteriological examination	
TP	6.9 g/dl	Sputum	
BUN	14 mg/dl	Smear for AFB	negative
Cr	0.76 mg/dl	Culture for AFB	negative
Na	142 mEq/L	PCR for <i>M. tuberculosis</i>	negative
K	4.2 mEq/L	PCR for <i>M. avium</i>	negative
Cl	104 mEq/L	PCR for <i>M. intracellulare</i>	negative

AFB : acid-fast bacteria.



図1 胸部X線写真では、左肺尖部に22 mm大の結節影を認め (a)、胸部単純CTでは左S^{1+2a}に、周囲に娘結節を伴う辺縁不整な結節を認める (b)。5ヶ月前の前医での胸部X線写真 (c)、胸部単純CT (d)と比較して病変の増大を認めた。

に認めた (図2c, d)。しかし、Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 法を用いた抗酸菌培養は8週間まで延長したが陰性であり、菌種は同定できなかった。

病変は完全切除され、さらなる検体採取は不可能であり、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片 (formalin-fixed, paraffin-embedded : FFPE) からDNAを抽出し、16S

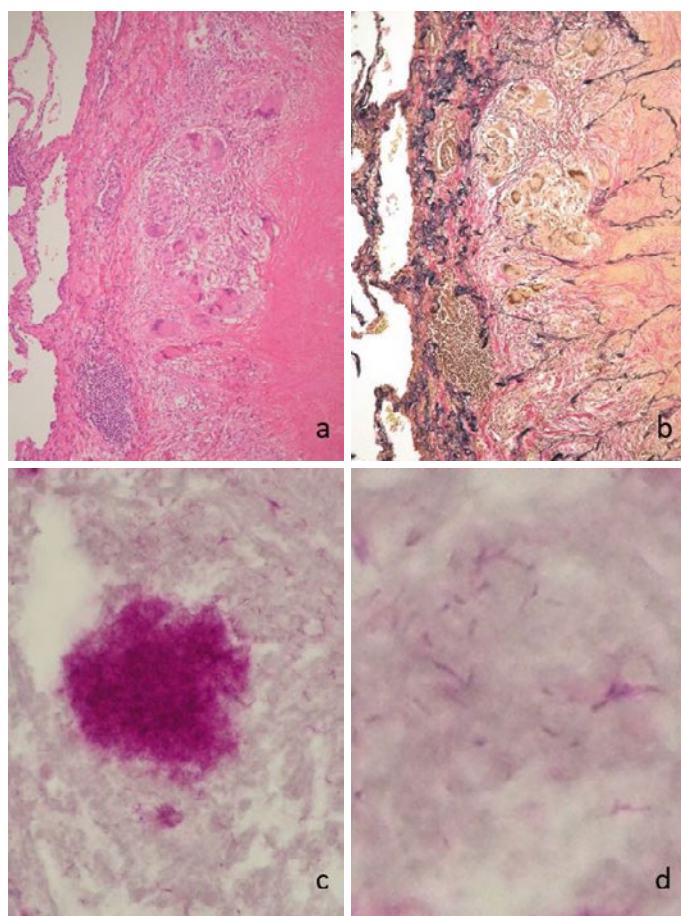


図2 切除検体の HE 染色で乾酪壊死を囲むように Langhans 型の多核巨細胞が混在した類上皮細胞肉芽腫を認めた (a). 膠原線維染色では壊死内に肺胞を構成する既存の弾性線維は保たれている (b). 抗酸菌染色で抗酸菌の塊状の集簇 (c, d) を認めた.

rRNA 遺伝子解析を試みた. DNA が寸断されていたため, 16S rRNA 遺伝子の全長 (27F-1492R) の PCR は陰性であった. そのため 27F-350R, 350F-520R, 520F-800R, 800F-1100R のプライマーの組み合わせを用い, 16S rRNA 遺伝子の 170~330 bp の断片を得る PCR を行ったところ, 27F-350R の PCR が陽性となった. この direct-sequence で得られた 330 bp の塩基配列を NJ 法 (近隣結合法) で系統樹解析した結果, DNA 配列は *M. xenopi* の標準株配列とのみ 100% 一致し (図 3), 本症例を肺 *M. xenopi* 症と診断した. 病変は完全切除され, 切除から診断確定までに約 4ヶ月経過していたことから, 術後は無治療で経過観察中である. 術後 18ヶ月経過した現在も再燃は認めていない.

考 察

M. xenopi は 1959 年に南アフリカのカエル (*Xenopus laevis*) から発見された遅発育性抗酸菌である. 英国やカナダ, 欧州においては MAC 症に次いで多いが, 我が国

ではまれである. 我が国では中年男性に多く, 肺結核や COPD, 間質性肺炎などを有する例に多い. また, AIDS やニューモシスチス肺炎の既往をもつ患者にも合併しやすいとされる¹⁾.

一般的に, MAC 以外の NTM 感染の診断は, 培養分離菌から抽出した DNA を用い, マイクロプレート内に固定した標準 DNA との間で定量的 DDH 法を行う. しかし本例は, 塗抹陽性にもかかわらず培養陰性となり, DDH 法が実施できなかった.

現在, 抗酸菌培養は多くの施設で全自動システム BACTEC MGIT 960[®] を用いた液体培地培養が行われる. MGIT 法は, 菌がチューブの培地中の酸素を消費すると, 紫外線照射により培地がオレンジ色の蛍光を発する. また, BACTEC 960[®] はコンピュータにより全自動で培養の有無を識別・記録するシステムである. これらを組み合わせたシステムである BACTEC MGIT 960[®] は, 6 週間にわたって 1 時間ごとに培養結果を蛍光輝度センサーで測定し判定・表示・記録する. そのため, 従来の小川

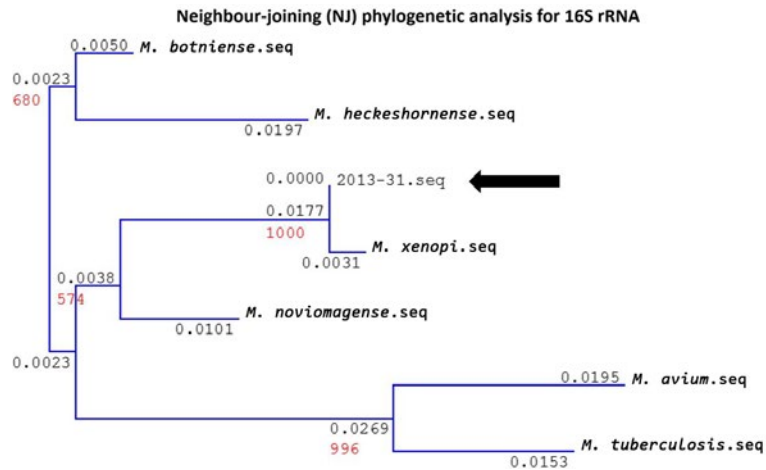


図3 系統樹解析では、切除検体の16S rRNA 遺伝子配列が *M. xenopi* と100%一致した。

法と比較し結核菌群、非結核性抗酸菌群の迅速な検出と高い検出率を示している²³⁾。

一方で肺 *M. xenopi* 症の診断において、BACTEC MGIT 960[®] で培養陰性と判定されることも少なくないことが報告されている。目視でコロニーを確認する小川法と違い、BACTEC MGIT 960[®] はコロニーを直接感知するわけではないため、コロニーが形成されていても培養陰性と判断されることがあり、その偽陰性率は50% (13/26)⁴⁾、61.1% (44/72)⁵⁾、70.5% (31/44)⁶⁾ と非常に高い。

BACTEC MGIT 960[®] が偽陰性を呈する機序は明らかでないが、菌量自体が少ないこと、代謝が亢進しておらず酸素消費が少ないことが原因と考えられている⁵⁾⁶⁾。酸素消費量は培養液に接している菌体全体の表面積に依存するため、粗大な顆粒が形成される *M. xenopi* では、無数の小さな顆粒が存在する場合に比べ表面積が小さくなり酸素消費量が少なかった可能性がある⁶⁾。

本例において、術前の胸部X線では左肺尖部の病変の増大を認め、死菌であった可能性は否定的である。生菌であれば通常は培養陽性になるはずであるが、BACTEC MGIT 960[®] のシステム側の問題で培養できなかった可能性も否定できない。*M. xenopi* の発育のための至適温度は43~45℃であり、MGIT システムの通常設定である37℃では適切に培養されなかった可能性がある。一方、*Mycobacterium marinum*、*Mycobacterium shinjukuense*、*Mycobacterium chelonae* などのように低温での培養が必要な菌種も存在する⁷⁾。抗酸菌塗抹陽性にもかかわらず培養陽性の場合、培養温度を変更して培養することも試みるべきである。

本例はBACTECシステムにより培養陰性と判断され、目視でコロニー形成を確認することなく、培地は破棄さ

れた。そのため、前述のように、培養システムの限界によって培養陽性が見逃されたのか、真に陰性であったかは不明である。しかし、*M. xenopi* 症では前者の可能性が十分にあるため、塗抹が明らかな陽性にもかかわらず培養陰性となるケースでは、培地を廃棄する前に目視でコロニーを確認することが重要である。

本例はFFPEからDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子解析を行い診断に至った。16S rRNA はすべての生物種に存在し、配列の保存性が高く、比較的長い塩基をもつため系統解析が可能である。PCRで得られた16S rRNA 遺伝子の増幅産物をクローニングして塩基配列を決定し、細菌基準株のデータベースと相同性検索を行って菌種を決定する。抗酸菌は16S rRNAのV2領域が各菌種に特異的であり、診断には遺伝子診断が有用⁸⁾との報告が見られる。菌株検査だけでなく生検や切除組織検体からも検査が可能であり、本例のようなケースでは16S rRNA 遺伝子解析を考慮してよい。

一方、抗酸菌同定のための標準法であるDDHは、結核菌、MACや *M. xenopi* を含めた18菌種の同定が可能とされるが、全染色体DNAの相同性が70%以上であれば同じ菌種とする細菌分類学の菌種同定基準を用いている。そのため *M. xenopi* の近縁種である *Mycobacterium heckeshornense*、*Mycobacterium botniense* は *M. xenopi* と診断され、*M. marinum*、*Mycobacterium ulcerans*、*M. shinjukuense* は *M. marinum* と誤って診断されてしまう⁹⁾。*M. xenopi* 症のみならず、DDHで同定困難な *M. heckeshornense*⁷⁾ や *Mycobacterium kyorinense*¹⁰⁾ などのまれな抗酸菌感染症であっても、16S rRNA 遺伝子解析により診断可能であることが報告され、同法の有用性が示されている。

M. xenopi の治療はリファンピシン (rifampicin :

RFP), エタンブトール (ethambutol : EB) を含む多剤併用療法が行われることが多いが, 標準治療は確立していない. 日本結核病学会は RFP, EB にストレプトマイシン (streptomycin) もしくはエチオナミド (ethionamide) の追加¹¹⁾, 英国胸部疾患学会 (BTS) では RFP, EB の2年間内服¹²⁾, 米国胸部学会・感染症学会 (ATS/IDSA) では RFP, EB, マクロライド系抗菌薬を菌陰性化後1年間の内服¹³⁾を推奨している.

一方肺 *M. xenopi* 症は, NTM のうちでは内科治療のみでは比較的予後不良であり, 難治例や再発例では外科切除も考慮される. その場合, 化学療法は術前3~6ヶ月程度, 術後は1年以上行うべきとされる¹⁴⁾. しかし, Lang-Lazdunski らの報告では, 肺 *M. xenopi* 症の完全切除例16例のうち, 術後化学療法は9例に施行され7例は未施行であったが, 化学療法の施行の有無にかかわらず全例で術後再発を認めなかった¹⁵⁾. また, 我が国の報告でも, 切除例10例において, 経過観察期間が6~103ヶ月 (中央値24ヶ月) とばらつきはあるものの術後の化学療法施行6例, 未施行4例のいずれもが再発を認めなかったとしている¹⁶⁾. これらは十分な症例数ではないが, 肺 *M. xenopi* 症の切除後に必ずしも化学療法の追加が必要でないことが示唆される. 一方で Parrot らは, 切除57例のうち12例 (21%) が5年の経過観察中に術後再発をきたしたと報告しており¹⁷⁾, 本症例も長期的な経過観察が必要であると考えられる. 現状では, 外科切除の有用性や術後の化学療法の必要性については明確なエビデンスはなく, 今後もさらなる症例の蓄積が必要である.

今回, 我々は肺 *M. xenopi* 症の1例を経験した. 抗酸菌塗抹が陽性でも培養陰性となった場合は, *M. xenopi* 症の可能性を考慮する必要がある. また, そのような場合には, ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片であっても診断確定のために16S rRNA 遺伝子解析を検討すべきである.

著者のCOI (conflicts of interest) 開示: 本論文発表内容に関して特に申告なし.

引用文献

- 1) Bluth MH, et al. *Mycobacterium xenopi*: Evidence for Increased Rate of Clinical Isolation. *Int J Biomed Sci* 2009; 5: 96-100.
- 2) 小倉 剛. 臨床からみた喀痰検査への BACTEC MGIT960 導入の利点. *日呼吸会誌* 2004; 42: 469-74.
- 3) 露口一成, 他. *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)* 法による臨床検体からの抗酸菌培養成績の検討—MGIT での菌量定量の可能性について—. *結核* 2003; 78: 389-93.
- 4) Pena JA, et al. Growth detection failures by the nonradiometric Bactec MGIT 960 mycobacterial culture system. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2092-5.
- 5) Idigoras P, et al. Comparison of the automated non-radiometric Bactec MGIT 960 system with Löwenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 350-4.
- 6) Piersimoni C, et al. Unreliable detection of *Mycobacterium xenopi* by the nonradiometric BACTEC MGIT 960 culture system. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 804-6.
- 7) 鹿住祐子, 他. 2症例から細菌学的に同定された *Mycobacterium heckeshornense* について. *結核* 2006; 81: 603-7.
- 8) Chakravorty S, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 330-9.
- 9) 吉田志緒美, 他. 迅速抗酸菌遺伝子増幅検査. *臨床病理* 2013; 61: 52-61.
- 10) Kobashi Y, et al. Pulmonary *Mycobacterium kyorinense* disease showed clinical improvement following combined therapy with clarithromycin and levofloxacin. *Intern Med* 2012; 51: 1923-6.
- 11) 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会. 非結核性抗酸菌症の治療に関する見解. *結核* 1998; 73: 599-605.
- 12) Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. *Thorax* 2000; 55: 210-8.
- 13) ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416.
- 14) 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会. 肺非結核性抗酸菌症に対する外科治療の指針. *結核* 2008; 83: 527-8.
- 15) Lang-Lazdunski L, et al. Pulmonary resection for *Mycobacterium xenopi* pulmonary infection. *Ann thorac Surg* 2001; 72: 1877-82.
- 16) 小松弘明, 他. *Mycobacterium xenopi* 肺感染症の2切除例. *日呼外会誌* 2015; 29: 745-50.
- 17) Parrot RG, et al. Post-surgical outcome of 57 patients with *Mycobacterium xenopi* pulmonary infection. *Tubercle* 1988; 69: 47-55.

Abstract

A case of pulmonary *Mycobacterium xenopi* infection diagnosed by 16S rRNA gene sequencing

Naoko Arano^a, Mitsuaki Sekiya^a, Kenji Suzuki^b,
Toshimasa Uekusa^c, Ken Kikuchi^d and Kazuhisa Takahashi^a

^aDepartment of Respiratory Medicine, Internal Medicine, Faculty of Medicine, Juntendo University

^bDepartment of General Thoracic Surgery, Faculty of Medicine, Juntendo University

^cDepartment of Diagnostic Pathology, Kanto-Rosai Hospital

^dDepartment of Infectious Diseases, Tokyo Medical Women's University

A 47-year-old woman was referred to our hospital because of a nodular lesion at the left upper lobe. She underwent a left upper partial lobectomy and positive findings of an acid-fast bacterium (AFB) smear test were detected, which suggested a pulmonary mycobacterium infection. However, polymerase chain reaction identification for *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex was negative. Culture for 8 weeks was also negative for AFB. We then performed a 16S rRNA gene sequence for using formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissue and finally diagnosed as a *Mycobacterium xenopi* infection.