

## 臨床由来病原性 *Nocardia* 属菌の分類と系統解析

影 山 亜紀子<sup>1</sup> 三 上 襄<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北里大学北里生命科学研究所生物機能研究室

<sup>2</sup>千葉大学真菌医学研究センター

### 要 旨

近年、医療技術の進歩に伴い臓器移植患者等の易感染者が増加し、これまで稀であった *Nocardia* による日和見感染症が増加している。感染源菌種として *Nocardia asteroides* グループが多くを占めているが、*Nocardia* の種の同定は主に形態学的性状・生化学性状に基づき行われてきたため、*N. asteroides* は種の定義が曖昧であるという問題を抱えていた。その上、臨床領域からは既存の菌種に性質の当てはまらない菌株は *N. asteroides* であるとされていた。そのため臨床・分類学両面に混乱が生じ、再分類の必要性が痛感されていた。そこでこれまで *N. asteroides* であると同定されていたものの特異な性質を持つ菌株について、系統的位置付けを明らかにすることを試みた。

1965年から2001年の間に臨床材料より分離された *N. asteroides*-like 分離株22株について16S rDNA 塩基配列による系統樹を作成し、更に詳細な性状を調べた結果9新種の存在が明らかとなり、それぞれ新種として提唱した。その他にも8新種を提唱し、計17新種を報告した。

一方、これまでに臨床分離例の無い *Nocardia* 菌種、また国外でのみ臨床分離例のあった菌種についても、国内での臨床例を報告した。1992年から2001年の間に日本の医療機関で分離された *Nocardia* 属菌株303株について同定を行った結果、*Nocardia beijingensis*, *Nocardia transvalensis*, *Nocardia pseudobrasiliensis* の3種が日本で初めての臨床分離例であることが明らかとなった。

**Key words:** ノカルジア症 (nocardial infection), *Nocardia asteroides*-like 株 (*Nocardia asteroides*-like strain), 16S rDNA 塩基配列解析 (16S rDNA sequence analysis), 日本初臨床分離 (first isolation in Japan)

### はじめに

千葉大学真菌医学研究センターでは数多くの医療機関より菌株同定の依頼を受けており、その数は年間200例近くに達している。その中で、これまで病原性放線菌が半数以上を占め、特に *Nocardia* 菌株が多数収集保存されている。

*Nocardia* 属に属する菌種はノカルジア症の原因菌として知られている<sup>1)</sup>。多くの *Nocardia* 種は人や動物に対して感染を引き起こすが、既往歴により状態が異なることや治療薬が特異的でないなどの問題から治療が難しいと考えられている<sup>2-4)</sup>。このようなことから、臨床領域において効果的な治療を行うためには *Nocardia* 種の同定が必要であると考えられている<sup>3-7)</sup>。ノカルジア症はこれまでは稀な病気であると考えられていたが、近年では増加傾向にある<sup>5)</sup>。その感染源菌種として *N. asteroides sensu stricto*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova* を含む *N. asteroides* グループが多くを占め<sup>6-9)</sup>、その他 *Nocardia brasiliensis*, *N. pseudobrasiliensis*, *Nocardia otitidiscaviarum*,

*N. transvalensis* についても報告されている。

*Nocardia* 属の基準種である *N. asteroides* はノカルジア症原因菌の大部分を占めるが分類学的には非常に定義が曖昧である<sup>10, 11)</sup>。臨床領域からは既存の菌種に性質の当てはまらない菌株がかなり分離され、これら菌株の大部分は *N. asteroides* であるとされてきたため、臨床・分類学両面に混乱が生じ、再分類の必要性が痛感されていた。

そこで本研究ではこれまで *N. asteroides* であると同定されていたものの特異な性質を持つ菌株について、生理生化学性状と共に分子生物学的手法を用いて系統学的位置付けを明らかにすることを試みた。一方、これまでに臨床分離例の無い *Nocardia* 菌種、また国外でのみ臨床分離例のあった菌種についてもセンター保存 *Nocardia* 株に存在していることを明らかにした。

### *Nocardia asteroides*-like 分離株の再分類

1965年から2001年の間に千葉大学真菌医学研究センターに菌株同定の依頼株として送られて来た臨床由来 *Nocardia* 菌株のうち、形態学的性状・生化学性状に基づいた同定では *N. asteroides*-like 株とされた22株について16S rDNA 塩基配列による系統樹を作成し、更に詳細な

別刷請求先：三上 襄

〒260-8673 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1  
千葉大学真菌医学研究センター

Table 1. Isolated strains

Strain	Year	Source
IFM 0245	1985	sputum of a 41-year-old female patient with nocardiosis, Japan
IFM 0263	1986	granuloma from a 68-year-old male patient with nocardiosis, Japan
IFM 0425	1994	trans-tracheal aspirate, Thailand
IFM 0731	1997	sputum, Thailand
IFM 0860	1999	sputum, Thailand
IFM 0092	1965*	patient, Mexico
IFM 0260	1986	63-year-old male treated with corticosteroids
IFM 0265	1987	skin abscess from 30-year-old female patient, Japan
IFM 0330	1990	skin abscess from 30-year-old male with systemic lupus erythematoses treated with corticosteroids, Japan
IFM 0636	1996	skin abscess from 53-year-old male with systemic lupus erythematoses treated with corticosteroids, Japan
IFM 0833	1998	skin abscess from 68-year-old male, Japan
IFM 0575	1995	sputum as well as bronchoalveolar lavage of 75-year-old male patient with non-tuberculous mycobacterial infection, Japan
IFM 0784	1997	sputum of 69-year-old male patient with a history of lung cancer, diabetes, emphysema and radiation pneumonitis, Japan
IFM 10035	2001	sputum of 65-year-old male patient with rheumatoid arthritis and lung nocardiosis, Japan
IFM 0937	1999	sputum of 81-year-old male patient with nontuberculous mycobacterial infection, Japan
IFM 10088	2001	sputum of 31-year-old male patient with acute myeloid leukemia, Japan
IFM 0137	1975	patient, Japan
IFM 0372	1992	patient, Japan
IFM 0496	1994	patient, Japan
IFM 0556	1995	70-year-old male patient, Japan
IFM 0952	2000	81-year-old male patient, Japan
IFM 0323	1989	73-year-old male patient with a history of autoimmune hemolytic anemia and steroid therapy, Japan

\*IFM 0092 was an isolate that has been in the laboratory since 1965.

性状を調べた。22株に関する菌株情報を Table 1 にまとめて示した。22株は肺がん、腎不全、糖尿病、白血病、HIVなどの既往歴、ステロイド治療歴を有する人の臨床材料より分離されたもので年齢、性別、既往歴、治療歴など様々である。今回糖分解性、酵素活性、窒素還元性、生育温度、イミペネム、トブラマイシン、カナマイシン、5-フルオロウラシルに対する感受性など詳細に検討し、最終的には DNA-DNA 相同性試験を行った結果、22株は *Nocardia* 属の9新種であることが明らかとなり、それぞれ *Nocardia anaemiae*<sup>12)</sup>, *Nocardia aobensis*<sup>13)</sup>, *Nocardia araoensis*<sup>14)</sup>, *Nocardia arthritidis*<sup>15)</sup>, *Nocardia asiatica*<sup>16)</sup>, *Nocardia inohanensis*<sup>17)</sup>, *Nocardia niigatensis*<sup>17)</sup>, *Nocardia pneumoniae*<sup>14)</sup>, *Nocardia yamanashiensis*<sup>17)</sup> として提唱した。

*N. asteroides*-like 臨床由来株以外で千葉大学真菌医学研究センターに依頼のあった分離株等から更に *Nocardia concava*<sup>18)</sup>, *Nocardia exalbida*<sup>19)</sup>, *Nocardia higoensis*<sup>20)</sup>, *Nocardia shimofusensis*<sup>20)</sup>, *Nocardia sienata*<sup>21)</sup>, *Nocardia testacea*<sup>21)</sup>, *Nocardia thailandica*<sup>22)</sup>, *Nocardia vermiculata*<sup>22)</sup> を新種として提唱し、計17新種を報告した。

近年、遺伝子解析技術が分類に応用されるようになったことにより *Nocardia* 属の分類は飛躍的に進み、1998

年以降 *Nocardia* 属の新種が多く提唱され、それまで10数種しか存在しなかった種が2006年の11月現在、その数は60種以上に上っている。Fig. 1 に *Nocardia* 属全体の16S rDNA 塩基配列による系統樹を示した。実に *Nocardia* の菌種の約1/4以上が我々の提案した菌種となっている。

#### 日本国内で初めての臨床分離例の報告

これまで臨床分離例の無い *Nocardia* 菌種、また国外でのみ臨床分離例のあった菌種が千葉大学真菌医学研究センターの保存菌株に存在していることを明らかにした。

1992年から2001年の間に日本の医療機関で分離された *Nocardia* 菌株303株について同定を行った。303株は細胞壁のジアミノ酸に *meso*-DAP を持つこと、主なメナキノンとして MK-8H<sub>4</sub> (cycl.) を持つこと、ミコール酸の大きさなどから *Nocardia* 属であることを確認した。更に生理生化学性状を調べることにより種の同定を行った結果、*N. asteroides* が 72 株、*N. farcinica* が 81 株、*N. nova* が 33 株、*Nocardia cyriacigeorgica* が 31 株、*N. brasiliensis* が 66 株、*N. otitidiscaviarum* が 14 株、*N. beijingensis* が 2 株、*N. transvalensis* が 3 株、*N. pseudobrasiliensis* が 1 株であることが明らかとなった。これまでノカルジア症の原因菌

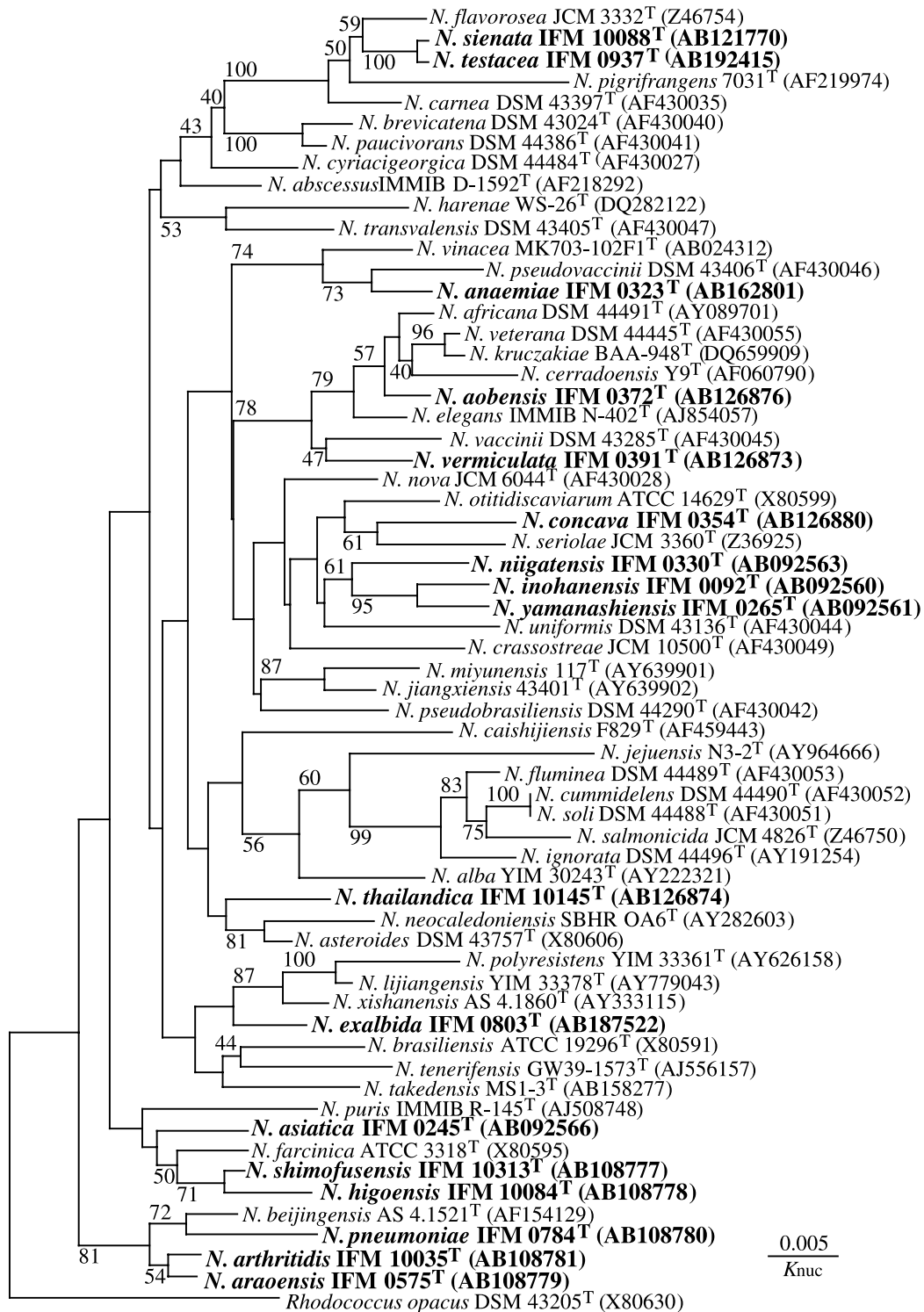


Fig. 1. Neighbour-joining tree of the genus *Nocardia* based on 16S rDNA gene sequences. Numbers at nodes indicate percentages of bootstrap support based on a neighbour-joining analysis of 1000 replications (only values greater than 40% are indicated).

として知られていた菌種以外にも近年新しく提唱された *N. beijingensis* や *N. cyriacigeorgica* も分離されることが明らかとなった。

ノカルジア感染 303 症例について年齢別にグラフで示した (Fig. 2)。10 歳以下でも 18 例あり, 11 歳から 20 歳で最も症例が少なかった。また 61 歳から 80 歳の年代での症例が多いことが明らかとなった。Fig. 3 にはノカル

ジア症の原因菌として知られている *Nocardia* 7 種について年ごとに分離株数の移り変わりを示した。10 年間で見ると増加傾向にあるが 1999 年以降はほぼプラトーに達していることが明らかである。

今回 303 株について同定を行った結果, 特に *N. beijingensis*, *N. transvalensis*, *N. pseudobrasiliensis* の 3 種は日本で初めての臨床分離例であることが明らかと

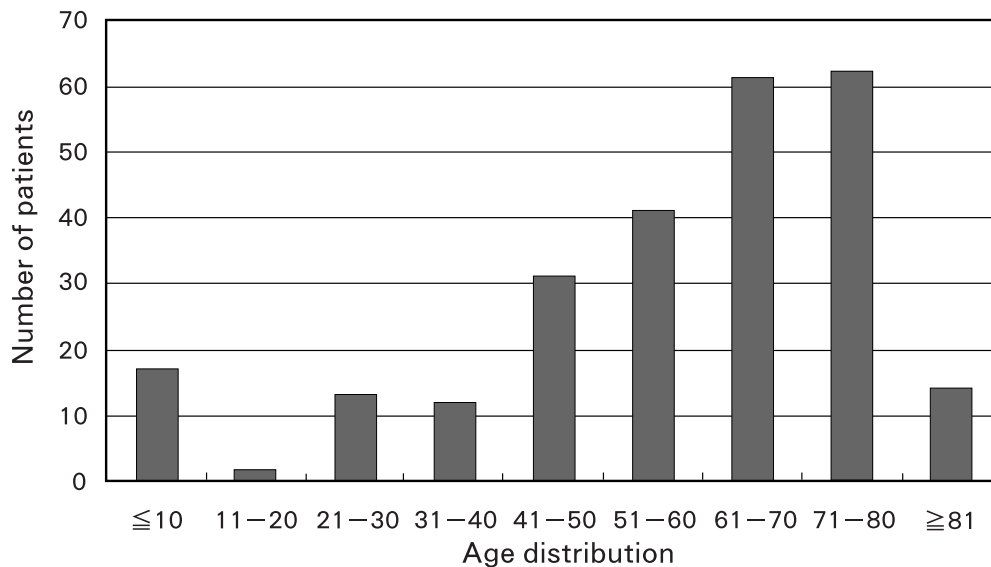


Fig. 2. Distribution by age of 303 cases of nocardial infections in Japan from 1992 to 2001.

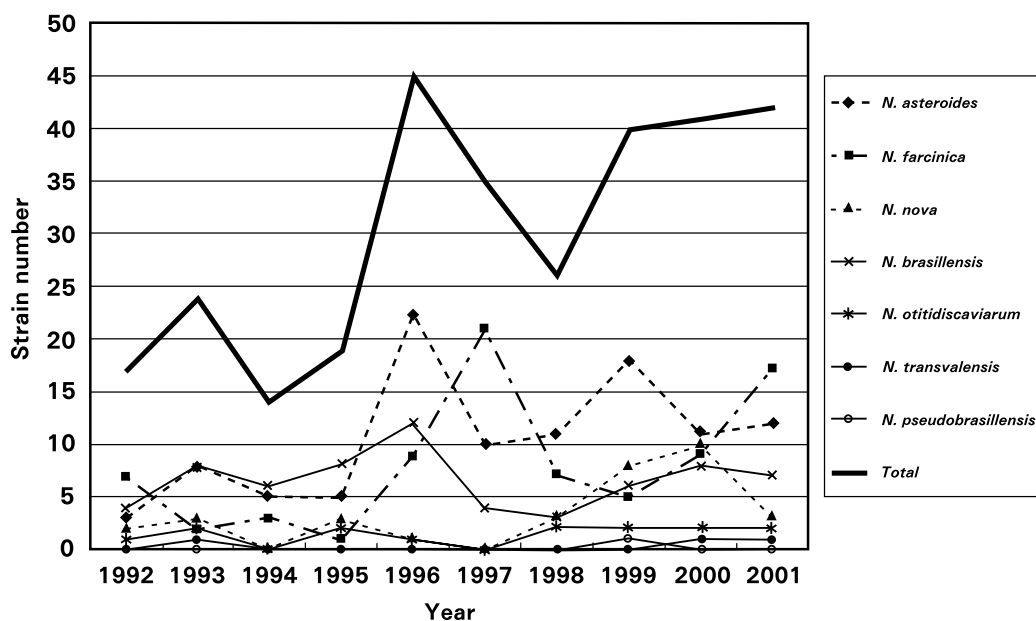


Fig. 3. Yearly incidence of 7 *Nocardia* species of infections in Japan from 1992 to 2001.

なった<sup>23-25</sup>). *N. beijingensis*は2001年に北京の汚水から分離され, *N. transvalensis*はオーストラリア, アフリカ, 北アメリカ, ヨーロッパでの感染が報告され, *N. pseudobrasiliensis*はアメリカやフランスなどの限られた地域で分離され, 最近ではブラジルのエイズ患者からも分離されているが, いずれも日本では報告例がなかった. *N. pseudobrasiliensis*は当初 *N. brasiliensis*と同定されていたが, 生理生化学性状試験, 16S rDNA塩基配列, RFLP解析の結果より *N. pseudobrasiliensis*であることを明らかとした.

その他 *Nocardia abscessus*<sup>26)</sup> と *Nocardia vinacea*<sup>12)</sup> についても日本で初めての臨床分離例として報告した.

#### おわりに

ノカルジア症の原因菌は *N. asteroides* が殆どであり, その他数種の限られた菌種のみと考えられていたが, 実際には *N. asteroides* と思われていた菌株のなかには多くの新種が存在していることが明らかとなった. ノカルジア症の治療には原因菌の同定が大切でその菌種の性質にあった治療が必須である. 今回, これまで *N. asteroides* とひとまとめに考えられていた菌株を整理整頓し, それぞれの種の詳細な性質を明らかにした. *Nocardia* の菌種はそれぞれ異なった薬剤感受性を示すことから, これらの種の同定は, 治療の際の薬剤の選択の一助になることが期待出来る.

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御指導を頂きました千葉大学真菌医学研究センター三上襄教授、西村和子教授に心より感謝致します。またノカルジアの生理生化学的な性状等の解析を行って下さった同高分子活性分野の矢沢勝清技官に心より感謝致します。発表論文に共著者として加わって頂きました多くの共同研究者の皆様と研究室の大学院生諸氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) McNeil MM, Brown JM: The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* **7**: 357-417, 1994.
- 2) Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Pang CHN: *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol* **24**: 54-63, 1974.
- 3) Goodfellow M: *Nocardia* and related genera. In Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th edn, Vol. 2, Systematic Bacteriology, pp.463-489, Edited by A. Balows and B.I. Duerden. London, Arnold, 1998.
- 4) Boiron P, Provost F, Chevrier G, Dupont B: Review of nocardial infections in France 1987 to 1990. *Eur J Clin Infect Dis* **11**: 709-714, 1992.
- 5) Beaman BL, Beaman L: *Nocardia* species: host-parasite relationship. *Clin Microbiol Rev* **7**: 213-264, 1994.
- 6) Poonwan N, Kusum M, Mikami Y, Yazawa K, Tanaka K, Gono T, Hasegawa T, Konyama K: Pathogenic *Nocardia* isolated from clinical specimens including those of AIDS patients in Thailand. *Eur J Epidemiol* **11**: 507-512, 1995.
- 7) Javalay K, Horowitz HW, Wormser GP: Nocardiosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Medicine (Baltimore)* **71**: 128-138, 1992.
- 8) Mirza SH, Campbell C: Mycetoma caused by *Nocardia transvalensis*. *J Clin Pathol* **47**: 85-86, 1994.
- 9) Schaal KP, Lee H-J: Actinomycete infections in humans- a review. *Gene* **115**: 201-211, 1992.
- 10) Schaal KP, Reuterberg H: Numerical taxonomy of *Nocardia asteroides*. *Zentbl Bakteriol Parasitol Infekt Hyg I Abt Suppl* **6**: 53-62, 1978.
- 11) Orchard VA, Goodfellow M: Numerical classification of some named strains of *Nocardia asteroides* and related isolates from soil. *J Gen Microbiol* **118**: 295-312, 1980.
- 12) Kageyama A, Yazawa K, Nishimura K, Mikami Y: *Nocardia anaemiae* sp. nov. isolated from an immunocompromised patient and the first isolation report of *Nocardia vinacea* from humans. *Jpn J Med Mycol* **46**: 21-26, 2005.
- 13) Kageyama A, Suzuki S, Yazawa K, Nishimura K, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia aobensis* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Microbiol Immunol* **48**: 817-822, 2004.
- 14) Kageyama A, Yazawa K, Mukai A, Kohara T, Nishimura K, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia araoensis* sp. nov. and *Nocardia pneumoniae* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2025-2029, 2004.
- 15) Kageyama A, Torikoe K, Iwamoto M, Masuyama J, Shibuya Y, Okazaki H, Yazawa K, Minota S, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia arthritidis* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. *J Clin Microbiol* **42**: 2366-2371, 2004.
- 16) Kageyama A, Poonwan N, Yazawa K, Mikami Y, Nishimura K: *Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 125-130, 2004.
- 17) Kageyama A, Yazawa K, Nishimura K, Mikami Y: *Nocardia inohanensis* sp. nov., *Nocardia yamanashiensis* sp. nov. and *Nocardia nigatensis* sp. nov., isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 563-569, 2004.
- 18) Kageyama A, Yazawa K, Taniguchi H, Chibana H, Nishimura K, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia concava* sp. nov., isolated from Japanese patients. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2081-2083, 2005.
- 19) Iida S, Kageyama A, Yazawa K, Uchiyama N, Toyohara T, Chohnabayashi N, Suzuki S, Nomura F, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia exalbida* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1193-1196, 2006.
- 20) Kageyama A, Yazawa K, Mukai A, Kinoshita M, Takata N, Nishimura K, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia shimofusaensis* sp. nov., isolated from soil and *Nocardia higoensis* sp. nov., isolated from a patient with lung nocardiosis in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1927-1931, 2004.
- 21) Kageyama A, Yazawa K, Nishimura K, Mikami Y: *Nocardia testaceus* sp. nov. and *Nocardia senatus* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Microbiol Immunol* **48**: 271-276, 2004.
- 22) Kageyama A, Poonwan N, Yazawa K, Suzuki S, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia vermiculata* sp. nov. and *Nocardia thailandica* sp. nov. isolated from clinical specimens. *Actinomycetologica* **18**: 27-33, 2004.
- 23) Kageyama A, Poonwan N, Yazawa K, Mikami Y, Nishimura K: *Nocardia beijingensis*, is a pathogenic bacterium to humans: The first infectious cases in Thailand and Japan. *Mycopathologia* **157**: 155-161, 2004.
- 24) Kageyama A, Yazawa K, Ishikawa J, Hotta K, Nishimura K, Mikami Y: Nocardial infections in Japan from 1992 to 2001, including the first report of infection by *Nocardia transvalensis*. *Eur J Epidemiol* **19**: 383-389, 2004.
- 25) Kageyama A, Sato H, Nagata M, Yazawa K, Katsu M, Mikami Y, Kamei K, Nishimura K: First human case of nocardiosis caused by *Nocardia pseudobrasiliensis* in Japan. *Mycopathologia* **156**: 187-192, 2002.
- 26) Kageyama A, Yazawa K, Kudo T, Taniguchi H, Nishimura K, Mikami Y: First isolates of *Nocardia abscessus* from humans and soil in Japan. *Jpn J Med Mycol* **45**: 17-21, 2004.

## Taxonomy and Phylogenetic Analysis of Infectious *Nocardia* Strains Isolated from Clinical Samples

Akiko Kageyama<sup>1</sup>, Yuzuru Mikami<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University,  
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

<sup>2</sup>Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University,  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

Following recent advances in medical technology, the increased number of immunocompromised patients such as those with organ transplants has led to an increase in opportunistic infections due to *Nocardia*. Although nocardiosis has been considered to be rare, recent reports indicate that the incidence of the infection is increasing. The *Nocardia asteroides* group is the principal source of infectious species, but the definition of species in *Nocardia* is problematic because species identification of *N. asteroides* has been based on mainly morphological and biochemical properties. Additionally, it was assumed that a clinical strain with properties that did not fully coincide with existing species was *N. asteroides* sensu lato. This caused problems in both clinical and taxonomical fields, and reclassification of *N. asteroides* sensu lato was necessary. Therefore, determination of the appropriate taxonomic position of *N. asteroides* sensu lato that is now classified as *N. asteroides* sensu stricto was conducted using a molecular phylogenetic method.

From 1965 to 2001, twenty-two strains of *N. asteroides* sensu lato were isolated from clinical samples. The phylogenetic tree using 16S rDNA sequences and detailed biochemical characters on the 22 isolates was determined. Results revealed that nine strains should be reclassified into species other than *N. asteroides* sensu stricto, and we proposed nine new species of the genus *Nocardia*. In addition, we proposed eight other new species of the genus *Nocardia* from other samples; hence seventeen new species were proposed in total. We also reported the first infectious cases due to *Nocardia beijingensis*, *Nocardia transvalensis* and *Nocardia pseudobrasiliensis* in Japan.

---

(平成18年度日本医真菌学会奨励賞受賞論文)