

臨床由来 *Mycobacterium avium* における Variable Numbers of Tandem Repeats 型別解析法の有用性の検討

^{1,2}森山 誠 ²小川 賢二 ⁴西森 敬 ¹打矢 恵一
³伊藤 哲也 ⁵八木 哲也 ⁵中島 一光 ²中川 拓
²垂水 修 ¹二改 俊章

要旨：〔目的〕 *M. avium* に対する VNTR 型別解析法と IS1245-RFLP 型別解析法の菌株鑑別能力比較、および治療による菌株の VNTR データ変化を検討した。〔対象および方法〕患者喀痰から分離培養された *M. avium* 24 株を HGDI を用いて 2 種の方法における菌株鑑別能力比較を行った。また、1 名の *M. avium* 感染患者において、治療経過中に分離された菌株の変化を VNTR 型別解析法により検討した。〔結果〕HGDI により算定した菌株鑑別能力は、IS1245-RFLP 型別解析法が 0.866、VNTR 型別解析法が 0.975 であり、VNTR 型別解析法のほうが優れていた。治療経過を追って検討した症例では、分離した 40 コロニーを検討した結果、ポリクローナルな *M. avium* が感染しており、治療時期によって検出されるクローンの割合が大きく変化していた。〔結論〕*M. avium* の鑑別に VNTR を用いることは菌株鑑別能力と簡便性において大変有用であると考えられた。また、治療による変化については今後症例を集積することにより *M. avium* 感染症の治療法に有用な情報が得られると考えられた。

キーワード：VNTR 型別解析、鳥型結核菌、IS1245、RFLP 型別解析、複合感染

はじめに

非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria, NTM) は土壌、水中、塵埃などの環境中に広く分布している環境常在菌であり、なかでも *Mycobacterium avium* (鳥型結核菌, *M. avium*) による感染症は、NTM 症の 5 割を占めており、特に重要な菌種である。結核菌と異なり、ヒト-ヒト感染は確認されていないが、近年では、治療成果が思わしくない患者が累積し、日常臨床の場においては抗酸菌陽性患者の半数を NTM 症患者が占めてしまうほど患者が増加している¹⁾。症状が悪化し、死亡してしまうケースもあるが、その原因が菌側にあるのか、宿主側にあるのか、または治療法にあるのかははっきりしていない。長期間の排菌を継続することがあり、こうした症例は複数の *M. avium* による感染、いわゆるポリクローナル感染が原因ではないかと考えられてきた。

M. avium は *M. intracellulare* と合わせて 28 種の血清型に

分けられ、MAC として臨床現場で扱われてきた²⁾。分子遺伝学的な研究の進展により、それまで血清型が 1～3 に分類されていた *M. avium* は *M. avium* subsp. *avium* とされ、牛などの反芻獣にヨーネ病を起こす *M. paratuberculosis* と分類学的な位置が決定していなかった“wood pigeon mycobacteria” (モリバト菌) が、それぞれ *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) および *M. avium* subsp. *silvaticum* として *M. avium* 種に分類された³⁾。他にもヒトなどの哺乳類から分離される *M. avium* subsp. *hominissuis* が提案されている⁴⁾。このように分類学的に肥大化した *M. avium* の疫学的なマーカーとして血清型別解析が用いられてきたが、コロニーが Rough 型となる菌株には簡易な方法を用いることができないなどの問題もあった。このため、遺伝子を用いた新たな方法が開発、検討され、ヨーネ菌が特異的に保有している挿入配列 IS900 をプローブとした IS900-RFLP 型別解析法⁵⁾や、より広範囲の *M. avium* 種に利用可能な挿入配列 IS1245 をプローブとした

¹名城大学大学院薬学研究科、²独立行政法人国立病院機構東名古屋病院臨床研究部/呼吸器科、³臨床検査科、⁴独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所、⁵国立長寿医療センター病院呼吸器科

連絡先：小川賢二、独立行政法人国立病院機構東名古屋病院臨床研究部/呼吸器科、〒465-8620 愛知県名古屋市中東区梅森坂5-101 (E-mail: ogawak@toumei.hosp.go.jp)

(Received 11 May 2006/Accepted 15 Jun. 2006)

IS1245-RFLP型別解析法が広く用いられている。しかし、これらのRFLP型別解析法は結核菌におけるRFLP型別解析法と同様、手技が煩雑であることや、発育の遅い*M. avium*を大量に培養する必要があるなどの問題があった。近年、2成分制御系の遺伝子発現の研究から、Mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU) と呼ばれる結核菌に存在する縦列反復数可変領域 (Variable Numbers of Tandem Repeats, VNTR) が発見され、これを比較するVNTR型別解析法が報告された⁶⁾。抗酸菌におけるVNTRは、現在ではゲノム配列のデータベースから新規領域が次々と発見されている。また、結核菌で報告されたゲノムデータベースをコンピュータープログラムで検索することにより、ETR⁷⁾やQUB⁸⁾と呼ばれるVNTRが報告され、現在では全ゲノム配列のデータベースから任意の塩基対数、任意の相同性をもったVNTRが検索可能となっている。また、VNTRを利用した型別解析は、MLVA (Multi-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis) とも呼ばれている⁹⁾。西森らはヨーネ菌のVNTR型別解析を行うために、先行公開されていた全ゲノム決定過程のBLAST検索によって17カ所の有用なVNTRを検出し、この手法の有用性を獣医学領域において検討段階であるが、2003年に17種類のプライマーと検討中の解析法を先行公開した¹⁰⁾。また、この手法の有用性は現在獣医学領域で検討段階であり、臨床由来の*M. avium*におけるVNTR型別解析法の有用性は十分確認されていない。臨床場で簡便に詳細な型別解析ができれば、増悪を起こす菌株を特定しこれをターゲットとした治療法を確立する一助になると考え本研究を行った。

材料と方法

被検菌株はCOBAS AMPLICOR (Roche) を用いて同定した臨床由来の*M. avium*の24株を用いた。

VNTR型別解析法：使用菌株は*M. avium*陽性が確認されたMGIT (日本ベクトン・ディッキンソン) に保存されていた菌陽性溶液をMyco Broth (極東製薬工業) で増菌培養し、吸光度 (530 nm) 2.0になるまで培養を行った。培養菌液100 μ lをINSTAGENE MATRIX (Bio-Rad Laboratories) を用いてDNAを抽出した。PCRはReady-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences) を用い、温度条件およびサイクル数は、西森ら¹⁰⁾の方法に従った。増幅が得られない場合は、酵素をTaq GOLD (Applied Biosystems) に変更し、蒸留水35.5 μ l, 10x buffer 5 μ l, dNTP mix 5 μ l, Taq GOLD 0.5 μ l, 25 μ Mのプライマーを各1 μ l, テンプレートDNA溶液2 μ lを混和し、全量50 μ lとして増幅を試みた。その際の温度条件は95℃ 10分のプレヒーティング後、98℃ 10秒, 68℃ 30秒, 72℃ 1分の増幅サイクルを42回実行した。PCR産物はE-Gel 電気泳

動システム (Invitrogen) の2%アガロースのカセットにアプライし、TrackIt 50 bp DNA Ladder (Invitrogen) のサイズマーカーとともに電気泳動した。対照として各VNTR領域の反復回数が判明しているヨーネ菌ATCC 19698由来の増幅産物を用いた。電気泳動後のゲルはGel-Doc (Bio-Rad Laboratories) で撮影し、解析ソフトQuantity-One (Bio-Rad Laboratories) を用いて対象VNTR領域の塩基対数を推定した。先行公開マニュアル¹⁰⁾に記載の換算表にて各VNTR領域の反復回数を求め、これをアリルプロファイルとした。得られたアリルプロファイルを基に、Microsoft Excelマクロプログラムにより距離行列を求め、系統樹をフリーソフトウェアPHILIP (<http://evolution.gs.washington.edu/>) を用いてFitch-Margoliash法にて推定し、Tree View (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>) により系統樹を描画した。

RFLP型別解析法：ジゴキシゲニン標識IS1245プローブはvan Soolingenらによって提唱されている標準法¹¹⁾に従ってPCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて作成した。標準法では、テンプレートとして基準株またはプラスミドの使用が推奨されているが、今回は臨床由来の東名古屋病院保存株Toumei 006株のDNAを用いた。この菌株はPCR法により事前にIS1245の強い増幅を確認し、さらに増幅産物を電気泳動により標準法とほぼ同じ増幅産物の塩基対数であることを確認した。DNA抽出はISOPLANT II (NIPPON GENE) を使用し、TE Buffer (pH 8.0) を用いてDNA濃度を40 μ g/mlに調整し、制限酵素Pvu II (タカラバイオ) で消化した各試料を1%アガロースゲルを用いて定電圧80V, 3時間の電気泳動後、0.25 M塩酸でDNAを加水分解処理後、変性液 (1.5 M NaCl 含有0.5 M NaOH) に15分間浸漬、洗浄後Hybond N+ (Invitrogen) に転写した。熱変性させたジゴキシゲニン標識IS1245プローブを加えたハイブリダイゼーション溶液 (Amersham Biosciences K.K) を調整し、65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。プローブと結合したバンドはDIG Luminescent Detection Kit (Roche) を用いて化学発光を利用し、X線フィルムに現像することで検出した。さらに、IS1245のバンドが得られなかった菌株は、IS1245プローブ作成時に用いたプライマーでPCRを行い、IS1245保有の有無を確認した。

現像したフィルムを8 bit-TIFF形式のデジタル画像にし、Finger Printing II (Bio-Rad Laboratories) で解析した。異なるゲル間でバンドを比較するためのマーカーによる標準化を行った後、IS1245のバンドを自動検出した。自動検出されないものや、コンピューターが誤って検出したものは目視によりバンドを確認し、修正した。系統樹作成にはDice係数、またはDifferent Bandsを用い、UPGMA法で行った。また、Toleranceは1.0%で計算した。

原理の異なる型別方法の菌株鑑別能力を比較するため、HunterとGaston¹²⁾の指数 (Hunter Gaston Discriminatory Index, HGDI) を用いた。

ポリクローナル感染の解析：国立長寿医療センター病院の病型 bII2 の *M. avium* 感染症慢性排菌患者より、異なる時期に塗抹陽性喀痰を4回採取した。採取した喀痰はアルカリ処理後希釈して7H11C寒天培地に接種し、5%CO₂存在下で37℃、2～4週間培養した。このとき1プレート上のコロニー数が100～200コロニーとなるように希釈し、生じたコロニーから無作為に10コロニーを選択し、Myco Brothに接種し保存した。この菌陽性溶液500 μlをMyco Brothにて吸光度 (530 nm) 2.0になるまで増菌培養し、VNTR型別解析を行った。喀痰は1名の患者から4回、時期をずらして採痰されたもので、1つの喀痰から10コロニーを分離し、合計で40コロニーをVNTR型別解析した。解析に用いた喀痰は、2004年12月の入院前の喀痰、2005年3月の治療開始直前の喀痰、治療開始後4月、5月の4回であった。この患者の治療履歴をTable 1に示した。

結 果

RFLP型別解析法：IS1245-RFLP型別解析では0から11バンドが見られ、高い多様性を示した。結核菌におけるIS6110-RFLP型別解析の計算方法は、得られたバンドが類似となる割合を計算するDice係数がよく用いられている¹³⁾¹⁴⁾。このため今回の調査でもDice係数による計算を試みたが、IS1245のバンドを示さない菌株が多く (24株中9株)、これらの株では類似度を計算できず、その類似度は0%であった。

これに対し、バンドのの違いの割合で系統樹を計算する方法 (Different bands) では、IS1245のバンドが得られなかった菌株の類似度は100%であった。

単一バンドのみ示した2株 (Toumei 009, 012株) はどちらの計算方法でも100%類似となった。この2株をCluster R1とし、IS1245を保有していなかった9株をCluster R2とした。IS1245-RFLP型別解析法の系統樹をFig. Aに示した。

VNTR型別解析法：臨床由来株では、西森ら¹⁰⁾が報告した*M. avium*のVNTR領域 (MATR領域) のうちMATR-1～MATR-9, MATR-11～MATR-16の増幅が得られ、この15領域について検討した。MATR-0とMATR-10は増幅が得られなかったため、今回の検討からは省いた。

VNTR型別解析法ではFig. Bに示す系統樹となった。また、系統樹計算のもととなったアリルプロファイルをTable 2に示した。Toumei 023株とToumei 005株のアリルプロファイルが一致し、これをCluster V1とした。長寿医療センター病院保存株のChouju 4-6株と東名古屋

Table 1 Patients' data of polyclonal infection analysis

Date	Sputum	Antibiotics
2004/12	First collection	
2005/3/14	Second collection	
2005/3/17		SM
2005/4/6		SM, RFP, CAM
2005/4/21	Third collection	
2005/5/11		SM, RFP, CAM, EB
2005/5/27	Fourth collection	

病院保存株のToumei 024株のアリルプロファイルが一致し、これをCluster V2とした。

IS1245-RFLP型別解析で単一バンドを示し、Clusterを形成したCluster R1 (Toumei 009, 012株) は、VNTR型別解析では3つのMATR領域で異なる反復回数を示した。この2つの菌株はIS1245-RFLP型別解析では区別できず、VNTR型別解析法により区別できた。一方、VNTR型別解析でアリルプロファイルの一致したCluster V2 (Chouju 4-6, Toumei 024) はIS1245-RFLP型別解析法で区別された。IS1245-RFLP型別解析法でバンドが得られなかった菌株は、それぞれVNTR型別解析法により区別された。このように、VNTR型別解析法とIS1245-RFLP型別解析法では異なる結果を示した。

また、それぞれの型別解析法の菌株鑑別能 (HGDI) はIS1245-RFLP型別解析法が0.866であったのに対し、VNTR型別解析法が0.975であり、菌株鑑別能はVNTR型別解析法が優れていた (Table 3)。

ポリクローナル感染の解析：Table 4に示したようにポリクローナルな感染が示唆された。2004年12月 (入院前) の喀痰から分離されたコロニーはMATR-2, 3, 9, 13の反復回数がそれぞれ異なる3つのパターンに分かれた。ここではMATR-2, 3, 9, 13の反復回数がそれぞれ0, 5, 2, 2のものをパターンα, 0, 5, 3, 2のものをパターンβとし、1, 1, 2, 0のものをパターンδとした。2005年3月 (治療開始直前) の喀痰から分離されたコロニーも2004年12月と同じパターン (パターンα, β, δ) が得られた。しかし、MATR-9が増幅できないものもあり (NP)、パターンαまたはβが考えられるが、第4のパターンも考えられ、ここではパターンγとした (Table 4)。

4月の喀痰から分離されたコロニーからは1パターンのみが得られた (パターンδ)。5月の喀痰から分離されたコロニーは4月に単独で得られた1パターン (パターンδ) に加え、3月に得られたパターン (パターンα, γ) が再び現れた。さらに採痰の時期によって、ポリクローナルパターンの割合が大きく異なった。

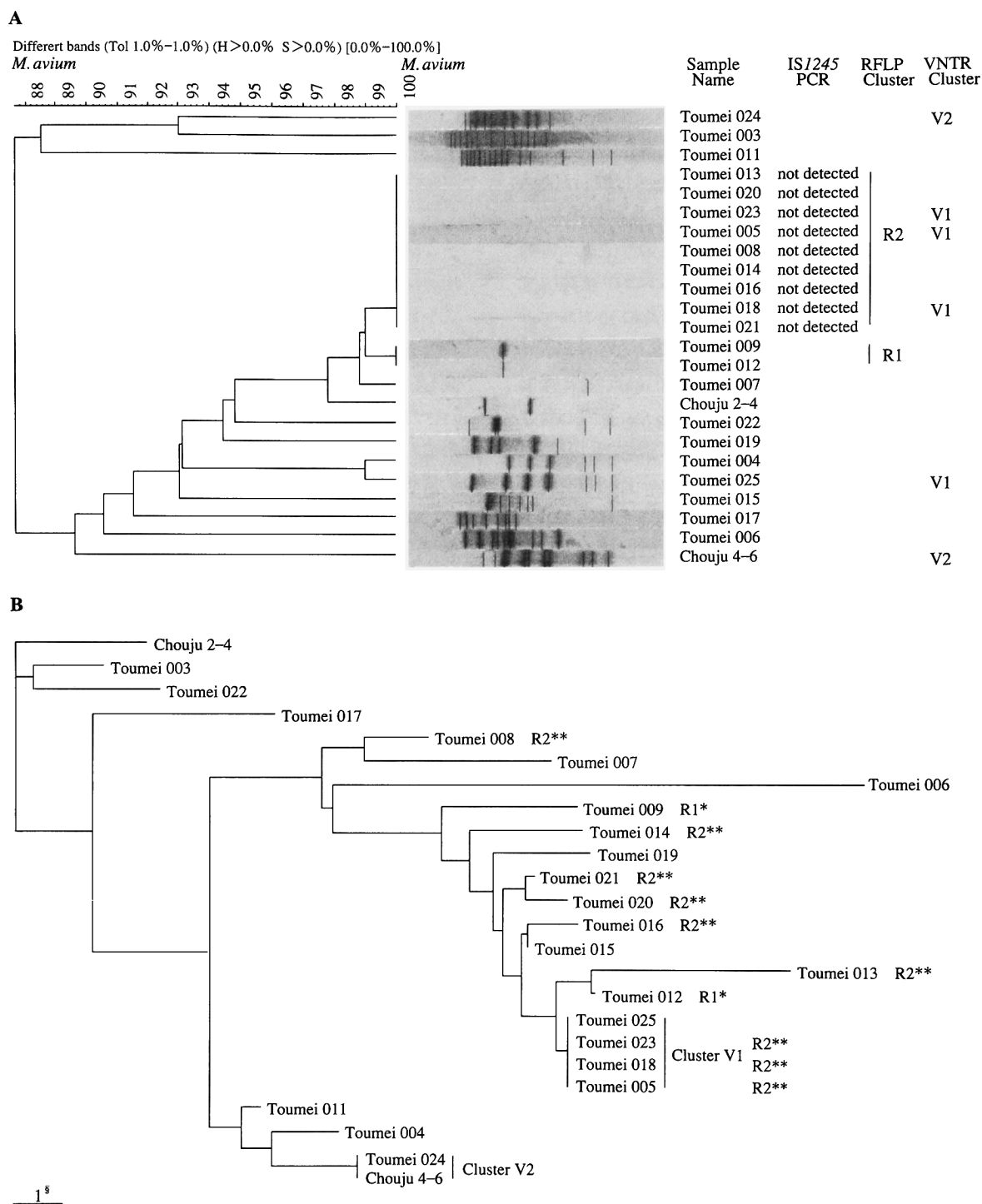


Fig. Dendrogram comparison of IS/245-RFLP typing (A) and VNTR typing (B)

*IS/245-RFLP Cluster R1. **IS/245-RFLP Cluster R2. [§]Basis of one repeat difference.

考 察

今回調査した臨床由来株では IS/245 を有していないものが多く、臨床由来株の鑑別には、IS/245-RFLP 型別解析法よりも VNTR 型別解析法のほうがよく鑑別できると考えられた。また、RFLP 型別解析はその方法に熟

練を要し、十分な DNA 量を得るための抗酸菌の培養、制限酵素による DNA の消化、プロッティングやハイブリダイゼーションのために約 1 週間ほどの時間が必要であった。このため、病院の検査科など、日常業務を多く抱えた施設では導入が非常に困難であると思われる。しかしながら、VNTR 型別解析法では鑑別できず、IS/245-

Table 2 Allele profile of 24 isolates of *M. avium*

Sample Name	MATR locus																Cluster
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16		
Chouju 2-4	2	0	5	2	2	1	6	2	2	2	3	2	2	2	3	V2	
Chouju 4-6	2	1	1	2	2	1	6	2	2	2	3	0	2	2	3		
Toumei 003	1	0	5	2	2	1	5	2	2	2	3	0	3	2	3		
Toumei 004	1	1	1	2	2	1	7	2	2	1	3	0	2	2	3	V1	
Toumei 005	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2		
Toumei 006	5	3	3	2	1	0	1	1	2	2	3	2	2	2	3		
Toumei 007	2	0	1	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	3	V1	
Toumei 008	1	0	1	2	2	2	2	2	2	2	3	0	3	2	3		
Toumei 009	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	3	0	1	2	3		
Toumei 011	1	1	1	2	2	1	5	2	2	1	3	0	2	2	3	V1	
Toumei 012	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	1		
Toumei 013	1	1	1	2	2	1	1	2	3	1	3	0	3	5	1		
Toumei 014	3	1	1	2	2	1	1	1	2	2	3	0	3	2	2	V1	
Toumei 015	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	3	0	3	2	2		
Toumei 016	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	3	0	3	2	2		
Toumei 017	2	0	5	2	2	1	2	2	2	2	3	2	2	2	1	V1	
Toumei 018	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2		
Toumei 019	1	2	1	2	2	1	2	1	3	1	3	0	2	2	2		
Toumei 020	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	3	0	3	2	1	V1	
Toumei 021	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	3	0	3	2	2		
Toumei 022	0	0	5	2	2	1	6	1	2	2	3	0	2	2	3		
Toumei 023	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2	V1	
Toumei 024	2	1	1	2	2	1	6	2	2	2	3	0	2	2	3	V2	
Toumei 025	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2	V1	

Table 3 Comparison of discriminatory power

Method	Number of Isolates	Number of Clusters	HGDI*
IS1245-RFLP	24	2	0.866
VNTR	24	2	0.975
IS1245-RFLP+VNTR	24	1	0.989

*Hunter Gaston Discriminatory Index

RFLP型別解析法により鑑別できた菌株もあり (Chouju 4-6, Toumei 024), 今回の研究では2つの型別解析法を組み合わせることで, さらに高い鑑別能力を得ることができることも分かった。一方 VNTR 型別解析法は非常に簡便であり, 必要な DNA 量も微量であり, その解析にも約1日ほどの時間があれば十分である。

全例で MATR-0 のプライマーでの産物が得られなかったが, この VNTR はヨーネ菌特異的な IS900 の配列を含んでいることから (第79回日本結核病学会口頭発表), 臨床由来株に IS900 あるいは類似配列をもった *M. avium* が含まれていなかったことが示唆された。MATR-10 は約 20 bp の差をもつ 2 つの PCR 産物を増幅し, 血清型参照株においても産物が得られないことがあり (第79回日本結核病学会口頭発表), MATR-10 を臨床由来株の解析に用いるにはプライマーを検討する必要がある。さらに INSTAGENE MATRIX により抽出されたテンプレート DNA は 500 bp を超える PCR のターゲットにおいて増幅効率が落ちることが報告されており¹⁵⁾,

MATR-9 において 4 以上繰り返す縦列反復配列を保有する株は予想される産物が 500 bp 以上であることから, 同一患者由来株の解析における NP の原因の 1 つであることが推測される。最近, 新規の VNTR 領域が発見されており¹⁶⁾, 新たな VNTR 領域を応用できれば VNTR 型別解析法の菌株鑑別能力はさらに上がるものと思われる。今回調査した株のうち, Toumei 005, 018, 023 株はどちらの型別解析法でも区別できないことから, その同一性が高く, 非常に関連性の高い菌株であると考えられた。何らかのコンタミネーションも考えられたが, 喀痰の処理された日付は Toumei 005 の喀痰が 2004/7/15, Toumei 018 の喀痰が 2005/1/19, Toumei 023 の喀痰が 2004/9/17 であった。採痰された患者の住所を確認したところ, Toumei 005 および Toumei 023 に感染していた患者の住所が非常に近いことがわかった。以上のことから, この患者は日常生活で共通の感染源に暴露されていた可能性があると思われる。

VNTR 型別解析法を用いて今後多くの菌株を臨床的な

Table 4 Allele profile of polyclonal infection analysis

Sputum extraction date	Sample Name	MATR locus				Pattern	Pattern ratio $\alpha : \beta : \gamma : \delta$
		2	3	9	13		
2004/12	Chouju 1-1	0	5	2	2	α	3 : 4 : 0 : 3
	Chouju 1-2	0	5	3	2	β	
	Chouju 1-3	1	1	2	0	δ	
	Chouju 1-4	0	5	2	2	α	
	Chouju 1-5	1	1	2	0	δ	
	Chouju 1-6	0	5	2	2	α	
	Chouju 1-7	0	5	3	2	β	
	Chouju 1-8	0	5	3	2	β	
	Chouju 1-9	1	1	2	0	δ	
	Chouju 1-10	0	5	3	2	β	
2005/3/14	Chouju 2-1	0	5	3	2	β	4 : 2 : 1 : 3
	Chouju 2-2	0	5	2	2	α	
	Chouju 2-3	1	1	2	0	δ	
	Chouju 2-4	0	5	2	2	α	
	Chouju 2-5	0	5	2	2	α	
	Chouju 2-6	1	1	2	0	δ	
	Chouju 2-7	0	5	2	2	α	
	Chouju 2-8	1	1	2	0	δ	
	Chouju 2-9	0	5	3	2	β	
	Chouju 2-10	0	5	NP	2	γ	
2005/4/21	Chouju 3-1	1	1	2	0	δ	0 : 0 : 0 : 10
	Chouju 3-2	1	1	2	0	δ	
	Chouju 3-3	1	1	2	0	δ	
	Chouju 3-4	1	1	2	0	δ	
	Chouju 3-5	1	1	2	0	δ	
	Chouju 3-6	1	1	2	0	δ	
	Chouju 3-7	1	1	2	0	δ	
	Chouju 3-8	1	1	2	0	δ	
	Chouju 3-9	1	1	2	0	δ	
	Chouju 3-10	1	1	2	0	δ	
2005/5/27	Chouju 4-1	0	5	2	2	α	1 : 0 : 4 : 5
	Chouju 4-2	1	1	2	0	δ	
	Chouju 4-3	1	1	2	0	δ	
	Chouju 4-4	0	5	NP	2	γ	
	Chouju 4-5	1	1	2	0	δ	
	Chouju 4-6	1	1	2	0	δ	
	Chouju 4-7	0	5	NP	2	γ	
	Chouju 4-8	0	5	NP	2	γ	
	Chouju 4-9	1	1	2	0	δ	
	Chouju 4-10	0	5	NP	2	γ	

NP: No product

情報とともに検討していくことで、増悪を起こす菌株の特定とその解析が可能になると思われる。

ポリクローナル感染の解析：*M. avium*のポリクローナル感染はRFLP型別解析法による解析で病型との関連性が報告されたものもあり、病型としては中葉舌区型に多いことが示唆されている¹⁷⁾。また、ポリクローナル感染は、気管支拡張症で多く、空洞病変では少ないという報告もある¹⁸⁾。しかし、検討されているコロニー数は3～4コロニーと少ないものであった。VNTR型別解析法はRFLP型別解析法に比べて非常に簡便かつ、迅速に研究結果が得られ、比較的多くのコロニーを検討できた。また、今回の症例は、肺結核後遺症として空洞病変を有する症例であったが、今後、症例数を増やしていくことで、感染様式と病型の関連性がさらに明らかになるとと思われる。

感染源については、臨床由来株ということもあり、患者体内で変異がおこり、結果的にポリクローナル感染となった可能性もある。しかし、結核菌群においてはVNTR領域はきわめて安定な領域が多く、BCG株の比較では30年間で1領域のみ変化したことが知られている¹⁹⁾。このため、パターン α 、 β 、 γ は1領域のみの差であるため、患者に感染している間に変化した可能性もあるが、パターン δ は3～4領域が異なっており、感染後に患者体内で変化したのではなく、感染前から異なる系統に属していたものが感染したと考えられる。どのパターンをもつ*M. avium*が先に感染したのか、あるいは同時に感染したのかは不明である。

今回の症例では感染している株の割合が、治療経過によって大きく変化したことから、ポリクローナル感染を

研究する場合は、使用された薬剤、治療開始からの期間を十分考慮して研究しなければならないと思われる。

今後、菌株鑑別能力の優れている VNTR 型別解析と様々な臨床データを合わせることで、*M. avium* 感染症に対する治療法確立に貢献できることが期待される。

文 献

- 1) 小川賢二, 垂水 修, 多賀 収: 第80回総会シンポジウムⅣ. 結核後遺症—現時点における総括— 5. 合併症とその対策(1) 肺真菌症および肺非結核性抗酸菌症に対する内科的介入. 結核. 2005; 80: 655-674.
- 2) Wolinsky E, Schaefer WB: Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination. Int J Syst Bacteriol. 1973; 23: 182-183.
- 3) Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV: Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria emended description of *Mycobacterium avium* and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1990; 40: 254-260.
- 4) Mijs W, de Haas P, Rossau R, et al.: Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52: 1505-1518.
- 5) Whipple D, Kapke P, Vary C: Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. J Clin Microbiol. 1990; 28: 2561-2564.
- 6) Supply P, Magdalena J, Himpens S, et al.: Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol Microbiol. 1997; 26: 991-1003.
- 7) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA.: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiol. 1998. 144: 1189-1196.
- 8) Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, et al.: Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiol. 2002. 148: 519-528.
- 9) Overduin P, Schouls L, Roholl P, et al.: Use of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5022-5028.
- 10) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 他: VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群および鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. 動衛研研究報告書. 2003; 109: 25-32.
- 11) van Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, et al.: IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Mycobacterium avium* Isolates: Proposal for Standardization. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3051-3054.
- 12) Hunter PR, Gaston MA: Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2465-2466.
- 13) 松本智成, 阿野裕美, 高嶋哲也, 他: 第79回総会シンポジウムⅢ. 抗酸菌検査法の臨床への応用 5. Molecular epidemiologic tools for tuberculosis: IS6110 RFLP, Spoligo-typing, and VNTR. 結核. 2005; 80: 95-111.
- 14) 岸田一則, 横山栄二, 内村眞佐子, 他: 千葉県で分離された結核菌の Restriction Fragment Length Polymorphism パターンのクラスター分析. 感染症学雑誌. 2005; 79: 672-679.
- 15) Nishimori K, Eguchi M, Nakaoka Y, et al.: Distribution of IS901 in strains of *Mycobacterium avium* complex from swine by using IS901-detecting primers that discriminate between *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2102-2106.
- 16) Romano MI, Amadio A, Bigi F, et al.: Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex and application to molecular epidemiology of isolates from South America. Vet Microbiol. 2005; 110: 221-237.
- 17) 桑原克弘, 渡辺 靖, 和田光一, 他: IS1245を用いた肺 *Mycobacterium avium* 症の臨床病型と多クローン性感染の関連についての分子疫学的検討. 結核. 2004; 79: 39-46.
- 18) Wallace RJ Jr., Zhang Y, Brown BA, et al.: Polyclonal *Mycobacterium avium* Complex Infections in Patients with Nodular Bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 1998; 158: 1235-1244.
- 19) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol. 2000; 36: 762-771.

Original Article

USEFULNESS OF VARIABLE NUMBERS OF TANDEM REPEATS TYPING
IN CLINICAL STRAINS OF *MYCOBACTERIUM AVIUM*

^{1,2}Makoto MORIYAMA, ²Kenji OGAWA, ³Kei NISHIMORI, ¹Keiichi UCHIYA,
²Tetsuya ITO, ⁴Tetsuya YAGI, ⁴Ikkou NAKASHIMA, ²Taku NAKAGAWA
²Osamu TARUMI, and ¹Toshiaki NIKAI

Abstract [Objectives] We evaluated the usefulness of Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) analysis, which was recently reported as a new typing method of *Mycobacterium avium* strains of animal origin, for strain differentiation of clinical isolates of *M. avium* in comparison with the standard IS1245-RFLP typing method. In addition, forty *M. avium* isolates recovered from sputum samples of same patient in different times were analyzed with VNTR typing method.

[Subjects and Methods] The subjects were twenty-four clinical isolates of *M. avium* stocked at Higashi Nagoya National Hospital and discriminatory power was evaluated with Hunter Gaston Discriminatory Index (HGDI). Furthermore, forty *M. avium* isolates recovered from sputum samples of one patient obtained at four different times were analyzed by using this VNTR typing method.

[Results] VNTR typing showed better discriminatory power for twenty-four clinical isolates than IS1245-RFLP method (HGDI: 0.975 vs 0.866). In the second study, polyclonal infection of four genotype strains with different allele profiles

were detected. The ratio of mixture of the four different genotype strains varied during clinical course.

[Conclusion] We considered that VNTR typing method was very useful for discriminatory examination of *M. avium*.

Key words: VNTR typing, *Mycobacterium avium*, IS1245, RFLP typing, polyclonal infection

¹Meijo University Graduate School Pharmaceutical Sciences Postgraduate Course, ²Department of Pulmonary Medicine, National Hospittal Organization (NHO) Higashinagoya National Hospital, ³National Institute of Animal Health, ⁴Department of Pulmonary Medicine, National Hospital for Geriatric Medicine

Correspondence to: Kenji Ogawa, Department of Pulmonary Medicine, NHO Higashinagoya National Hospital, 5-101, Umemorizaka, Nagoya-shi, Aichi 465-0065 Japan.
(E-mail: ogawak@toumei.hosp.go.jp)