

## *Mycobacterium avium* タイピングにおける Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法と Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法の有用性の比較

<sup>1</sup>鹿住 祐子    <sup>1</sup>宇田川 忠    <sup>1</sup>前田 伸司    <sup>1</sup>村瀬 良朗  
<sup>1</sup>菅原 勇    <sup>2</sup>奥村 昌夫    <sup>3</sup>東 由桂    <sup>4</sup>後藤美江子  
<sup>5</sup>常松 範子

**要旨:**〔目的〕*M. avium* タイピングにおける VNTR と RFLP の有用性を比較する。〔対象および方法〕喀痰・気管支洗浄液分離の 36 例 (55 株) と HIV・血液から分離された 12 例 (29 株) を用い、西森らの *M. avium* 用 VNTR と IS1245 を用いた RFLP を行った。〔結果〕16 例から複数回採取された検体は 12 例が VNTR と RFLP が一致した。1 例 (8 株) に多クローン感染 (2 株) と *M. intracellulare* の複合感染 (1 株) が認められ、VNTR は 2 種類であったが、RFLP は 5 種類確認された。そして HIV 感染者血液の 1 例 (6 株) の VNTR は 6 株とも同じパターンであったが、RFLP は 3 パターン得られた。用いた 84 株のうち多クローン感染が 6 株あり、それらは喀痰・気管支洗浄液から 5 株 (13.9%)、HIV 感染者血液から 1 株 (8.3%) であった。そして *M. avium* と共に他の菌種の複合感染が 3 例 (6.3%) あった。VNTR において、接触歴のない株で VNTR が一致した例が、全 48 例 89 株中で 4 組 9 例 (18.8%) あったが、これらの株は RFLP で区別可能であった。〔結論〕今回の 84 株の *M. avium* 分析例では RFLP の分析能は VNTR より高かったが、同一例から採取した検体から VNTR は同じであったが RFLP パターンが異なるものがあり、1 症例から複数回の検体採取を行う必要性が示唆された。

**キーワード:** *Mycobacterium avium*, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR 法), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP 法), 多クローン感染

### はじめに

*Mycobacterium avium* は 1901 年に Chester によってトリに病原性のある抗酸菌として報告され<sup>1)</sup>、近年、HIV 感染者に播種性感染を引き起こすことで注目されている。日本における *Mycobacterium avium intracellulare* complex (通称 MAC: マック) は疫学に地域的分布差<sup>2)</sup>があり、近畿以東の北海道・東北・関東・東海および近畿では *M. avium*、以西である中国・四国・九州では *M. intracellulare* が比較的多い。そしてこの菌種は非病原性菌として自然界にも多く存在し、斉藤ら<sup>3)</sup>は 24 時間風呂において *M. avium* が浴水では少なかったものの、フィルターや濾材から高率に検出されたと報告している。さらにトリやヒ

トだけでなく、他の動物における *M. avium* 症報告は多く、佐藤らの報告<sup>4)</sup>でもブタに病原性が認められている。

この *M. avium* のタイピングは血清型別が用いられてきたが、特殊な機材と技術的熟練性を要するため、現在では挿入配列 (Insertion Sequence: IS) 型別によるタイピングが広く行われている。この方法は IS900, IS1331 など<sup>5)</sup>を用いて制限酵素断片長多型 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法の研究が行われてきたが、現在は 1414 bp の長さをもつ IS1245 が発見され<sup>6)</sup>、これが広く RFLP に用いられるようになった。そして近年、結核菌のタイピングに使われている Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法<sup>7)</sup>が *M. avium* においても応用されつつあり、今回われわれは *M. avium* タイピングに

<sup>1</sup>結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター、<sup>2</sup>結核予防会複十字病院呼吸器科、<sup>3</sup>同検査課、<sup>4</sup>東京大学医学部附属病院感染制御部微生物検査、<sup>5</sup>東京都立大塚病院検査科

連絡先: 鹿住祐子, 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター病理検査科, 〒204-8533 東京都清瀬市松山 3-1-24 (E-mail: kazumi@jata.or.jp)

(Received 14 Jun. 2007 / Accepted 25 Jul. 2007)

おける VNTR と RFLP の有用性を比較した。

### 材料と方法

#### (1) 材料

被検株として主な抗酸菌 21 菌種 (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii*: ATCC12478, *M. marinum*: ATCC927, *M. scrofulaceum*: ATCC19981, *M. szulgai*: ATCC35799, *M. gordonae*: ATCC14470, *M. avium* subsp. *avium*: ATCC 25291, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: ATCC19698, *M. avium* subsp. "*suis*": ATCC19978, *M. avium* subsp. *silvaticum*: ATCC49884, *M. intracellulare*: ATCC13950, *M. gastri*: ATCC15754, *M. nonchromogenicum*: ATCC 19530, *M. terrae*: ATCC15755, *M. fortuitum*: ATCC6841, *M. fortuitum*: ATCC49403, *M. chelonae* subsp. *chelonae*: ATCC35752, *M. abscessus*: ATCC19977, *M. mucogenicum*: ATCC49650, *M. lentiflavum*: ATCC51985, *M. mageritense*: ATCC700351) と抗酸菌に近縁の *Rhodococcus equi*: ATCC 6939, *Nocardia asteroides*: ATCC19247 を加えた計 23 菌種と 16S rRNA シークエンス<sup>9)</sup>によって *M. avium* と同定した A から D の医療施設・48 例からの分離 84 株を用いた。この内訳は 16 例から複数回臨床材料を採取して得られた 52 株, 1 人 1 回の検体採取が 32 例 32 株であった。対象となった症例は病院の入院患者 (肺癌, HIV など), あるいは外来患者 (呼吸器疾患, リウマチなど) で, *M. avium* 症の有無は確認していない。

#### (2) DNA の抽出

2 週間培養した Middlebrook 7H9 液体培地発育菌 25 ml を 4,200 rpm 15 分間遠心沈殿し, 沈渣を ISOPLANT (ニッポン・ジーン) のマニュアルに従って抽出を行い, TE (pH 8.0) 200  $\mu$ l に浮遊させ DNA 抽出液とした。

#### (3) VNTR

PCR の温度条件とサイクル数は西森らの方法<sup>9)</sup>に従って 17 種類のプライマーセット (MATR) を使用した。PCR 産物を 1 $\times$ Tris-borate (TBE), 2.5% アガロースゲルにてサイズマーカー (100 bp DNA Ladder Marker) と共に電気泳動した。泳動後サイズマーカーより増幅産物のバンドのサイズを簡易的に計測して, 西森らの換算表に従って反復配列のコピー数を求め, アリルプロファイルを作成した。

このとき, 各 MATR で複数のバンドがみられたとき, *M. avium* が複数混在 (以下, 多クローン感染), また他の菌種の混入を疑い, 7H9 液体培地発育菌を 10<sup>6</sup> まで希釈し, その 0.1 ml を 7H10 寒天培地に接種・培養し, シングルコロニーを得てから再分析した。

#### (4) RFLP<sup>5) 10) 11)</sup>

RFLP は Soelingen<sup>9)</sup> の方法に従って実施した。DNA 抽出液をエタノール沈殿後, 制限酵素 *Pvu* II によって

DNA を切断した。電気泳動は 0.8% アガロースを用い, 22 mA $\cdot$ 30V で 16 時間行った。そしてアルカリ変性させ, DNA を 1 本鎖にし, トランスメンブランフィルターに 6 時間転写後 UV 固定を行った。さらにビオチン標識プローブ DNA; IS/245<sup>9) 11)</sup> を加えたハイブリダイゼーション液にてハイブリダイゼーションを行った。次にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Roche 社) を反応させ, アルカリドで ECL (GEヘルスケアバイオサイエンス) にて化学発光後に X 線フィルムに感光させて現像した。

### 結 果

(1) 主な抗酸菌 21 菌種と近縁 2 菌種による VNTR と RFLP の結果

主な抗酸菌 21 菌種と近縁 2 菌種の VNTR の結果は 23 菌種すべてに 1 から 16 の MATR において複数カ所にバンドの形成がみられた。Fig. 1 は西森らの *M. avium* 用のプライマー MATR を用いて PCR し電気泳動した *M. avium* subsp. *avium*: ATCC25291 (A) と *M. tuberculosis* H37Rv (B) である。4 種類の *M. avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. "*suis*", *M. avium* subsp. *silvaticum*) は 1 から 16 の MATR すべてにバンドの形成がみられた。一方, 他の菌種はバンドのない MATR が複数あった。MATR-0 (Fig. 1 右端) においてバンドがみられたのは *M. paratuberculosis* のみであった。

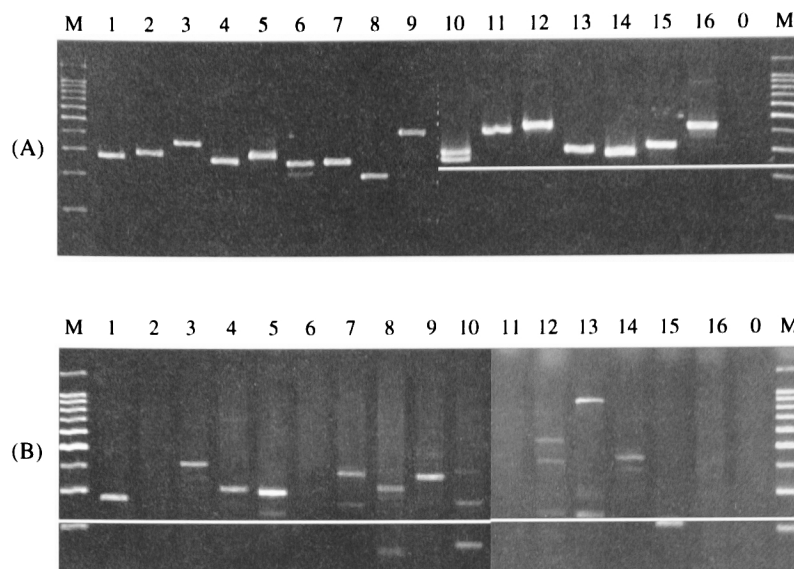
RFLP では, 4 種類の *M. avium* 以外からバンドの形成はみられなかった。

(2) 16 例から複数回採取した臨床材料分離の *M. avium* による検討

16 例から複数回採取した臨床材料から分離された *M. avium* 52 株について VNTR と RFLP を行った (Table 1)。症例番号 1 から 11, 16 は検体の種類が喀痰あるいは気管支洗浄液, 12 から 15 は HIV 感染者の血液である。

(a) 症例番号 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 14, 15 では VNTR と RFLP がそれぞれの症例内で同じパターンとなり, 症例番号 9 の KK41-377 と KK41-378 は VNTR が同じであったが, RFLP は 1 本バンド違いであった。

(b) 症例番号 7 では 2003 年 3 月から 2004 年 1 月までの間に 8 回検体が採取され, 6 回は喀痰, 2 回が気管支洗浄液であった。検体番号 KK41-366 は VNTR にて 3 カ所 (MATR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 12) にダブルバンドがみられ, コロニーをシングル化した後, それぞれのコロニーを 16S rRNA 法によって同定した結果, *M. avium* と *M. intracellulare* の複合感染であった。このシングルコロニーから得られた *M. avium* を液体培地で増菌培養し, 再度, VNTR を行い, そして RFLP を行った。KK41-368 (気管支洗浄液) は VNTR の MATR 番号 3 と 4 に 2 本バンドがみられ, 寒



**Fig. 1** (A) VNTR analysis pattern of *M. avium* subsp. *avium* (ATCC25291). (B) VNTR pattern of *M. tuberculosis* (H37Rv).

The primer sets reported previously<sup>9)</sup> were used. M: 100 bp ladder marker; 1 to 16 were sequentially in number of locus in Nishimori's primer sets. 0 was used for *M. avium* subsp. *paratuberculosis* detection.

**Table 1** Comparison of VNTR and IS/245 RFLP analyses in the cases that specimens were collected from identical patients several time. (16 cases, 52 strains)

No. of case	strains	No. of strains	Results of VNTR	Results of RFLP
1.	KK41-300, 300-1	2	Same	Same
2.	KK41-347, 348	2	Same	Same
3.	KK41-352, 353, 354, 396	4	Same	Same
4.	KK41-355, 356	2	Same	Same
5.	KK41-357, 358, 359	3	Same	Same
6.	KK41-360, 361	2	Same	Same
7.	KK41-366 ~ 373	8	Polyclone and superinfection of the other <i>Mycobacteria</i>	Difference
8.	KK41-375, 376	2	Same	Same
9.	KK41-377, 378	2	Same	One band difference
10.	KK41-379, 380	2	Same	Difference
11.	KK41-392, 393, 394	3	Same	Same
12.	KK41-398 ~ 403	6	Same	Difference
13.	KK41-404 ~ 406	3	Same	Same
14.	KK41-411 ~ 413	3	Same	Same
15.	KK41-415 ~ 420	6	Same	Same
16.	KK41-438, 440	2	Superinfection of the other <i>Mycobacteria</i>	Same

天培地でシングルコロニーを作り、再度 VNTR にて確認したところ、2 種類の *M. avium* が混在した多クローン感染であった。KK41-371 は分譲された元株（小川培地発育菌）にて行った VNTR で多クローン感染が確認されたが液体培養で発育せず、死菌と考えられた。このため分析に必要な DNA 量が得られず、RFLP は実施できなかった。この 8 検体の結果は VNTR において多クローン感染であったため KK41-368 は 2 つ（コロニー番号 1

と 5）となったが、KK41-371 は増菌できなかったため最終的に 8 株を検査し、VNTR は A と B の 2 種類のパターンであったが、RFLP は①から⑤の 5 種類あった（Table 2）。

(c) 症例番号 10 の 2 株は VNTR が同じであったが RFLP は異なった。

(d) 症例番号 12 は 1 人の HIV 感染者から採取された血液で 1998 年 10 月から 1999 年 3 月までの間 6 回採取

Table 2 Typing pattern of isolates from case 7

Number of strain	VNTR	RFLP
KK41-366	<i>M. avium</i> pattern A and <i>M. intracellulare</i>	pattern ①
KK41-367	pattern A	pattern ②
KK41-368 (1)	pattern A	pattern ③
KK41-368 (5)	pattern B	pattern ④
KK41-369	pattern A	pattern ⑤
KK41-370	pattern A	pattern ⑤
KK41-371	Polyclone	Non
KK41-372	pattern A	pattern ①
KK41-373	pattern A	pattern ①

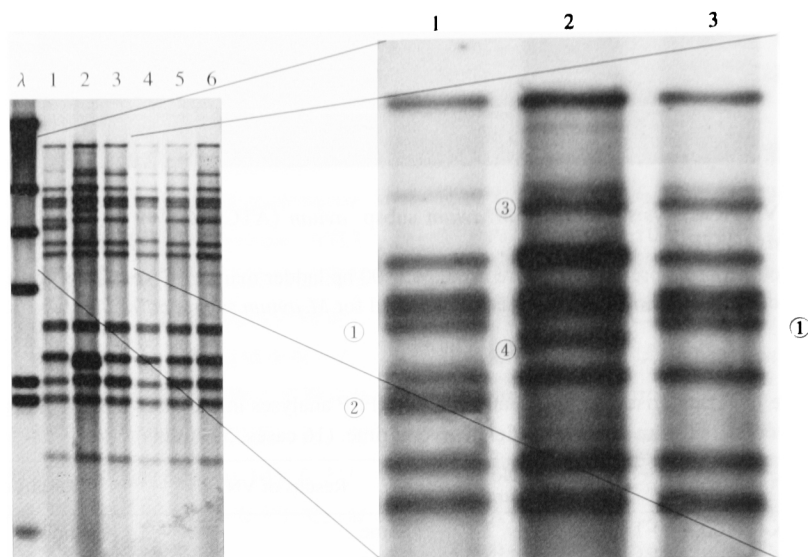


Fig. 2 RFLP pattern of *M. avium* isolated from blood specimens of HIV patient. M. Lambda *Hind* III digested DNA marker; 1: KK41-398 (1st sample), 2: KK41-399 (4 months later), 3: KK41-400, 4: KK41-401, 5: KK41-402, 6: KK41-403

し、VNTRは6株とも同じであったが、RFLPパターンはKK41-398（採取時期1998年10月26日株）とKK41-399（1999年2月19日株）はそれぞれ別パターンであった。さらにこれら2株は同一パターンであったKK41-400（1999年2月20日株）、KK41-401（1999年3月1日株）、KK41-402（1999年3月10日株）、KK41-403（1999年3月17日株）と異なった。従って症例12の6株からVNTRは1種類であったが、RFLPパターンは3種類得られた（Fig. 2）。

KK41-398、KK41-399とKK41-400の比較をFig. 2に示す。KK41-398とKK41-399を比較するとKK41-398の①と②がKK41-399では消失し、③と④が出現した。このKK41-399とKK41-400を比較した結果、④が消失し、①が出現した。

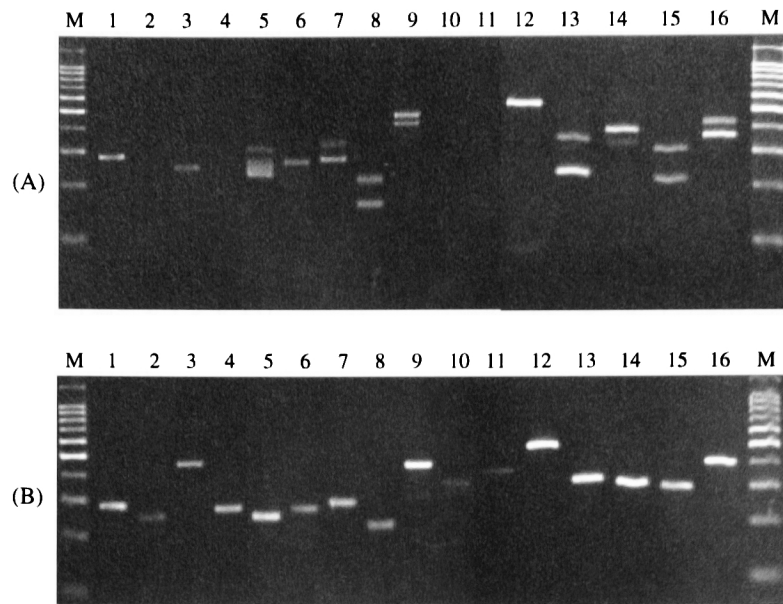
(e) 症例番号16の2検体のうちKK41-438（2006年1月採取）は複数のMATRに複数のバンドがみられたため寒天培地でシングル化し、その中の10個のシングルコロニーをとり、それぞれ16S rRNA シークエンスにて同

定した。その結果、1個を*M. avium*と同定し、9個が*M. intracellulare*であった。これによって得た*M. avium*（新たなKK41-438）を2004年に同じ症例から分離したKK41-440と比較した。このKK41-440のVNTRはそれぞれのMATRにおいてシングルバンドで、複合感染はなく、両者を比較した結果、VNTRとRFLPの結果は同じであった。

(3) 他の菌種との複合感染と*M. avium*の多クローン感染

(a) *M. avium*と他菌種の複合感染

48例84株のうち1株（HIV感染者・血液）からVNTRによって*M. tuberculosis*が*M. avium*と共に検出された。Fig. 3 (A) は分離株のVNTRの結果であり、複数のMATRに複数のバンドがみられた。このときのアンプリコマイコバクテリウム（Roche社）<sup>12)</sup>の結果は*M. tuberculosis* complex, *M. avium*共に陽性であった。このため*M. avium*と*M. tuberculosis*の混在を考え、寒天培地にて単一菌種のコロニー化を試みたが、*M. tuberculosis*と



**Fig. 3** VNTR pattern of KK41-408 (a combined case of *M. tuberculosis* and *M. avium*)  
This was a double infection case (A). *M. avium* and *M. tuberculosis* were detected by the Amplicore kit. So, bacilli were cultivated with INH for 2 weeks at 37°C. In analysis of Amplicore kit, MTB became negative and *M. avium* was positive. VNTR analysis was performed again (B).

*M. avium*のそれぞれ独立したコロニーを得ることができなかった。このためこれをMGIT（ベクトンディッキンソン社）・0.1 µg/ml INH含有液体培地にて2週間培養し、培養後に再度アンプリコアマイコバクテリウムを行い、*M. tuberculosis* complex陰性、*M. avium*陽性を確認し、VNTRを実施し*M. avium*の結果とした〔Fig. 3 (B)：写真は左から1～16のMATRを使用した結果である〕。他に2株（喀痰由来）が*M. avium*と*M. intracellulare*の複合感染で、この*M. tuberculosis*と合わせて他の抗酸菌が*M. avium*と共に検出されたのは48例84株中3株（6.3%）であった。

#### (b) 多クローン感染の株

48例84株から*M. avium*の多クローン感染であった6株がVNTRによって検出された。この内訳は喀痰と気管支鏡洗浄液の36例（55株）の中に5株（13.9%）、HIV感染者血液12例（29株）の中に1株（8.3%）のみであった。

#### (4) VNTRの結果をRFLPと比較

84株に加えて多クローン感染のためシングル化し、新たに6株が追加となったが、KK41-371が対象から削除され、計89株の比較を行った。

(a) 48例（89株）のVNTRの結果をRFLPと比較した。VNTRが同じパターンを示し、RFLPが異なった4組（9例）をTable 3に示した。グループ1、2は異なる施設の例で、3と4は同じ施設であった。同じ施設内の例は診療期間に違いがあるなど、これら4組にはそれぞれ接

**Table 3** The groups of the strains with identical VNTR profile and different RFLP pattern

Number of Group	Strains	Hospital
Group 1	KK41-254	A
	KK41-345	B
	KK41-354	C
Group 2	KK41-346	B
	KK41-430	D
Group 3	KK41-255	A
	KK41-271	A
Group 4	KK41-431	D
	KK41-434	D

点が認められなかった。

(b) この他に施設A（KK41-272-2）と施設C（KK41-375）はVNTRのパターンが同じで、RFLPの結果はバンドの位置が一致していたもののKK41-272-2が5本バンド、KK41-375は4本バンドでバンドが1本異なるパターンであった。

#### (5) RFLPのバンド数について

RFLPを行った89株のうち17株（19.1%）はバンド数が3本以下であった。

## 考 察

結核菌のRFLPは結核感染の疫学調査や集団感染、あるいは小さなグループ（同じ事業所内・病院内・家族内

感染など)における感染拡大予防のために導入され、さらにこの感染経路解明<sup>10)</sup>だけでなく、検査技術の高度化による検査室内汚染<sup>13)</sup>の原因追求のためにも用いられている。結核菌型別には IS6110 を使った RFLP が使われ、*M. avium* の型別には IS1245 が用いられている。しかし、*M. avium* は自然界にも多く存在し、分裂時間・発育温度域・環境に適応する能力が結核と異なり、またヒトの体内における多クローン感染や他の菌種との複合感染などの頻度も高く、この研究を困難にしている。同一症例からはほとんどの場合、同じ VNTR・RFLP パターンであったが、Table 1 の症例番号 7 のように、同一症例から多クローンと *M. avium*、*M. intracellulare* の複合感染が確認されるなど判定の困難な症例もある。*M. avium* は通常一過性で、1 人の症例から 1 回検出されるだけのケースが多いが、症例 7 は基礎疾患にリウマチがあり、免疫と *M. avium* の多クローン感染・他の菌種との複合感染の関連について、今後、例数を増やして検討したい。

同一症例から複数回臨床材料を採取した検討では、16 例中 12 例に VNTR と RFLP にて同じ結果が得られたが、4 例は多クローン感染や他の菌種の混在、そして VNTR と RFLP の結果がくい違うなど、同じ症例でも、常に同じ結果ではなかった。このため家族内同一感染源が疑われる場合、必要に応じて複数回の臨床材料採取が望まれる。

HIV 症例の報告では Picardeau ら<sup>14)</sup>は 93 例から 89 RFLP パターン (95.7%) が得られ、フォローアップされた 39 例のうち 37 例が単クローン感染 (monoclonal) で、2 株は初めの RFLP パターンと異なった。今回のわれわれの研究でも HIV 患者の血液のフォローアップ 4 例 (Table 1 の症例番号 12 から 15) のうち 1 例 (症例番号 12) は RFLP が初めのパターンと異なった。Lari ら<sup>15)</sup>の報告では 52 の HIV 陽性例のうち、47 例が単クローン感染で、5 例が多クローン感染 (polyclonal) であった。そして今回のわれわれの研究でも HIV 感染者 12 例 1 株 (8.3%) に多クローン感染があったのみで、血液検体では喀痰などより単クローン感染が多いと考えられた。

桑原ら<sup>16) 17)</sup>は IS1245 にて *M. avium* の RFLP 法を行った場合、1 本バンドの変異は同一株とみなしており、今回、われわれもそのルールに従った。そして Bauer ら<sup>18)</sup>は 1 年間に 33 回液体培地による継代培養を繰り返したところ、*M. avium* 6 株のうち 4 株に 1 ないし 2 のバンドが変化したと報告した。Pestel-Caron<sup>19)</sup>は IS1245 の安定性について評価を行うため分離菌 32 株を分析した。その結果、8 例 (25%) で 1~2 本、5 例 (16%) で 3 本以上の違いが認められたと報告した。われわれの行った今回の HIV 感染者血液から分離された KK41-398 から KK41-403 までの 6 株は、VNTR 分析によって、すべて同一ブ

ロファイルで単クローン感染であると考えられたが、RFLP 分析において 3 種類のパターンが得られた (Fig. 2)。この変化がヒトの体内ですでに起こっていたのか、菌株の保存条件が原因なのか、継代培養も含めて実験中に生じたのか不明である。症例 7 と 12 は VNTR が同じにもかかわらず短期間の間に RFLP のパターンが変わった。これは VNTR におけるコピー数の変化より、RFLP 分析における IS1245 の変化のほうが生じやすい *M. avium* があることを示唆している。

Viedma ら<sup>20)</sup>は結核菌において MIRU-VNTR と RFLP を比較し、VNTR は同時に 2 種類の結核菌を検出でき、有用性が高いと報告した。*M. avium* においても RFLP では多クローン感染を見つけるためには数多くのコロニーを検査しなければならないが、VNTR では各 MATR にバンドが複数でき、その存在を容易に見つけることができる。それだけでなく、*M. avium* 以外の抗酸菌は IS1245 をもたないため IS1245 RFLP 分析を適応することはできないが<sup>6)</sup>、*M. avium* 用の VNTR を用いた場合、他の抗酸菌だけでなく、*Rhodococcus* sp. や *Nocardia* sp. も検出することができ、他の菌種が複合感染している場合も簡単に見つけることができるという利点がある。このため VNTR を行うにあたってあらかじめ *M. avium* と同定された株を用いる必要があるが、われわれは *M. avium* の分析においても同様に多クローン感染と、他の抗酸菌の同時検出において西森らの *M. avium* 用の MATR を用いた VNTR は有用であると考えた。

さらに RFLP には、① PCR などの核酸を増幅する作業がないため菌量が微量である場合、増菌 (2~3 週間) を行わなければならない、② DNA 抽出から判定まで検査過程が長い、③ バンド数の少ない場合、別の方法での確認が必要となる、などの問題がある。このバンド数の少ない株については森山ら<sup>21)</sup>も RFLP には IS1245 において単一バンドがあったため RFLP の菌株鑑別能が低かったと報告している。結核菌の RFLP 法において、バンド数 (コピー数) が少ない場合、タイピング能力が落ちる<sup>22)</sup>といわれ、他の方法で確認することが勧められているが、*M. avium* の場合、トリ由来株はバンド数が少ないという報告<sup>15)</sup>もあり (ATCC 標準菌株: *M. avium* subsp. *avium*: ATCC 25291 は 3 本バンド)、今後、バンド数の少ない例の検討が必要と思われる。

今後、① VNTR の感度、② 検体が喀痰である場合、喀痰の中の雑菌を処理し、均一にする前処理の生菌数に与える影響、③ 分離された菌の保存方法と継代培養の及ぼす影響、④ プレートから採取するコロニー数の問題、⑤ VNTR と RFLP の結果が異なった場合の解釈、などの課題が残った。

なお、今回の研究を通じて、主な抗酸菌 21 菌種と近

緑の2菌種と臨床分離84株の *M. avium* において西森らの MATR-0 によって PCR が可能であったのは *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: ATCC 19698 のみであった。クローン病の原因菌である *M. avium* subsp. *paratuberculosis* は核酸の塩基配列を解析する 16S rRNA 法や *rpoB* 遺伝子によって他の *M. avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. "suis", *M. avium* subsp. *silvaticum*) から分けることができないが<sup>8)</sup>, 西森らの *M. avium* 用 VNTR・MATR-0 は *M. avium* subsp. *paratuberculosis* をこれらから簡単に分けることが可能であると考えられる。

### まとめ

VNTR は、迅速であり、微量で検査可能、多クローン感染と他の菌種の混在を確認でき、RFLP でバンド数の少ない株の確認方法として使えるなど有用性が高い。しかし、VNTR は変化が RFLP より少なく、VNTR では接触のない症例同士が同じパターンとなった例があった。このためわれわれは VNTR を2段階と考え、まず被検株の多クローン感染と他の菌種の複合感染がないことを確認するために VNTR を行い、シングルコロニーを確保した後に再度、解析のために VNTR を行う。そして同じパターンが出たときは RFLP を行い、総合判断することによってより精度の高い分析ができると考えられる。また1症例から異なったパターンが得られる可能性を考え、複数回の臨床材料採取が望ましいと考えられる。

### 謝辞

貴重な臨床分離株を分与して頂きました東北大学医学部の芦野有悟先生に深謝致します。

### 文献

- 1) BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology, Volume 2. William & Wilkins, U.S.A., 1984, 1448-1449.
- 2) 豊田丈夫, 青柳昭雄, 齊藤 肇, : *M. avium* 症と *M. intracellulare* 症. 結核. 1993; 68: 63-69.
- 3) 齊藤 肇, 村上和保, 石井則久, 他: 「24時間風呂」からの *Mycobacterium avium* complex の検出. 結核. 2000; 75: 19-25.
- 4) 佐藤明正, 穴田勝進, 松尾秀輝, 他: ブタ抗酸菌症をひき起こす *Mycobacterium avium-M. intracellulare* の感染源. 結核. 1987; 62: 61-66.
- 5) Van Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, et al.: IS1245 restriction fragment length nich polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3051-3054.
- 6) Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, et al.: A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. J Clin Microbiol. 1995; 33: 304-307.
- 7) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Molecular Microbiology. 2000; 36: 762-771.
- 8) 鹿住祐子, 前田伸司, 菅原 勇: *rpoB* 遺伝子と 16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み. 結核. 2006; 81: 551-558.
- 9) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 他: VNTR (Variable Number 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.
- 10) 高橋光良: 結核と *M. avium* 感染症の分子疫学の新たな展開. 資料と展望. 2004; 51: 57-70.
- 11) Johansen TB, Djonje B, Jensen MR, et al.: Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. Clin Microbiol. 2005; 43: 2500-2502.
- 12) 阿部千代治, 齋藤由美子, 本山禎二, 他: アンプリコアマイコバクテリウムキットの評価に関する共同研究. 結核. 1997; 72: 181-186.
- 13) 伊藤邦彦, 高橋光良, 吉山 崇, 他: 病院検査室における結核菌培養の Cross-contamination. 結核. 1999; 74: 777-788.
- 14) Picardeau M, Varnerot A, Lecompte T, et al.: Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteremia. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2503-2510.
- 15) Lari N, Cavallini M, Rindi L, et al.: Typing of human *Mycobacterium avium* isolates in Italy by IS1245-based restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3694-3697)
- 16) 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.
- 17) 桑原克弘, 渡辺 靖, 和田光一, 他: 肺 *Mycobacterium avium* 症の家族内発症例に対する IS1245 をプローブとした分子疫学的検討. 結核. 2004; 79: 519-523.
- 18) Bauer J, Bengard A: Stability of Insertion Sequence IS1245, a Marker for Differentiation of *Mycobacterium avium* Strains. J of Clinical Microbiology. 1999; 37: 442-444.
- 19) Pestel-Caron M, Arbeir RD: Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1859-1863.
- 20) de Viedma GD, Roriguez AN, Andres S, et al.: Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5660-5664.
- 21) 森山 誠, 小川賢二, 西森 敬, 他: 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. 結核. 2006; 81: 559-566.
- 22) Bauer J, Bengard A, Kremer K, et al.: Usefulness of Spoligotyping To Discriminate IS6110 Low-Copy-Number

*Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Cultured in Denmark. Journal of Clinical Microbiology. 1999 ; 37 : 2602-2606.

Original Article

COMPARISON OF USEFULNESS BETWEEN  
VARIABLE NUMBERS OF TANDEM REPEATS (VNTR) ANALYSIS AND  
RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)  
IN THE GENOTYPING OF *MYCOBACTERIUM AVIUM*

<sup>1</sup>Yuko KAZUMI, <sup>1</sup>Tadashi UDAGAWA, <sup>1</sup>Shinji MAEDA, <sup>1</sup>Yoshiro MURASE,  
<sup>1</sup>Isamu SUGAWARA, <sup>2</sup>Masao OKUMURA, <sup>3</sup>Yuka AZUMA, <sup>4</sup>Mieko GOTO,  
and <sup>5</sup>Noriko TSUNEMATSU

**Abstract** [Objectives] Comparison of usefulness of IS1245 RFLP and VNTR in *M. avium* genotyping.

[Materials and methods] Thirty-six cases (55 strains) from sputum and BALF and twelve cases (29 strains) isolated from blood of HIV-infected patients were used. VNTR and RFLP using IS1245 were performed.

[Result] Multiple samples were taken from 16 patients and 52 clinical isolates were used for VNTR and RFLP for comparison. (1) VNTR and RFLP results were identical in 12 out of 16 cases whose samples were collected several times. (2) Eight isolates were obtained from one patient. In this eight isolates, there were the cases of *M. avium* polyclonal infection and of mixed infection with *M. intracellulare*. VNTR patterns were two types and RFLP were 5 kinds of different in this case. (3) VNTR patterns of six isolates from one HIV-infected patient were identical, but there were three variations in RFLP patterns.

There were three cases of mixed infections with *M. tuberculosis* or *M. intracellulare*, and six strains polyclonal infection of *M. avium* (7.1%) in 84 isolates. These 6 clinical isolates were derived from sputum or BALF (5 strains) and HIV-infected blood (one strain).

VNTR patterns were similar in four pairs (9 strains) who did not contact closely, but they were distinguished clearly by RFLP. Seventeen strains had three or less IS1245-related bands in RFLP analyses of 89 strains.

[Discussion] As there is a possibility of polyclonal infection with *M. avium* and mixed infection with other species, the single clonal infection should be confirmed first by VNTR. When single colony was obtained, VNTR and RFLP were performed for genotyping of *M. avium*. Furthermore, strains with less bands by RFLP should be carefully judged in terms of both VNTR and RFLP. It is recommended that the specimens should be collected from each patient several times.

**Key words:** *Mycobacterium avium*, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Polyclonal

<sup>1</sup>Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), <sup>2</sup>Respiratory Medicine, and <sup>3</sup>Medical Laboratory, Fukujiji Hospital, JATA, <sup>4</sup>Department of Infection Control and Prevention, The University of Tokyo Hospital, <sup>5</sup>Department of Clinical Laboratory, Tokyo Metropolitan Otsuka General Hospital

Correspondence to: Yuko Kazumi, TB Information Division (Molecular Epidemiology & Genetic Identification), Mycobacterium Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: kazumi@jata.or.jp)