

Mycobacterium kansasii 株における分子疫学的解明

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ³岩本 朋忠
¹岡田 全司 ²坂谷 光則

要旨：〔目的〕 *M. kansasii* 株に対する各種遺伝子型別法を用いた分子疫学的解明。〔対象と方法〕 2002年6月1日から2005年8月31日の期間、近畿中央胸部疾患センターにおいて臨床検体から分離、同定された *M. kansasii* 174株を対象として、*hsp* 65-PRA, ITS シークエンス, PFGE, IS1652-RFLP ならびに MPTR-RFLP を行った。また *hsp* 65-PRA と ITS シークエンスの結果に乖離があった株に対しては *hsp* 65 シークエンスを行った。〔結果〕 *hsp* 65-PRA の結果、174株中 I 型が170株 (97.7%) を占め、II 型は2株、II b 型は1株、VI 型は1株に認められた。ITS シークエンスでは I 型、II 型、VI 型の *M. kansasii* が *hsp* 65-PRA と同じ型を認め、II b 型は ITS sequevar type II と判定された。IS1652-RFLP と MPTR-RFLP の結果、I 型の170株は同一のバンドパターンを示し、I 型以外の型 (II 型、II b 型、VI 型) を示した4株に多型性が認められた。PFGE では、159株 (91.4%) がクラスターを形成し、残り15株に多型性を認めた。〔結論〕今回各種遺伝子型別法を用いて遺伝子型別を試みた結果、世界的に蔓延している I 型が当センター周辺地域においても高い割合で分布している状況が認められ、I 型の高いクローナリティーが示唆された。また PFGE により I 型に亜分類が存在する可能性が考えられた。

キーワード： *Mycobacterium kansasii*, *hsp* 65-PRA, 16S-23S ITS シークエンス, PFGE, RFLP

はじめに

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) は非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria, NTM) の I 群菌に分類される遅発性の光発色菌である。わが国では NTM 症の原因菌の約25%を占め、*Mycobacterium avium* complex (MAC) の次に多く症例報告されている菌種である¹⁾。またヒトに対する強い起病性をもち、主にヒトの肺結核類似症を引き起こす。現在 *M. kansasii* は DNA プローブを用いたハイブリダイゼーション²⁾³⁾ やシークエンス⁴⁾、制限酵素 (restriction enzyme) 処理による DNA 断片の多型解析⁵⁾ などの解析手法を用いて I～VII の遺伝子型に分類されているが⁶⁾、各種遺伝子型別法を同時に用いた詳細な解析の報告は少ない⁷⁾。今回われわれは、当センターにおいて分離、同定された *M. kansasii* 株を対象として、heat shock protein (*hsp*) 65-polymerase chain reaction (PCR)-restriction analysis (PRA) による遺伝子型別、16S-23S

internal transcribed spacer (ITS) シークエンス, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による高分子 DNA 解析, IS1652 ならびに major polymorphic tandem repeat (MPTR) の DNA プローブを用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) を用い、同菌の感染状況の解明を試みた。

方 法

〔対象〕

2002年6月1日から2005年8月31日の期間、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにおいて、臨床検体から分離、同定された *M. kansasii* 174株。すべての菌株の同定は、アキュプローブ マイコバクテリウム カンサシ研究用 (極東製薬) で行った。今回これらの菌由来患者174名は結核病学会の診断基準⁸⁾により *M. kansasii* 症と診断され、HIV 感染は認められなかった。

hsp 65-PRA

Telenti らの方法⁹⁾に準じて行った。小川培地発育菌か

¹独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター、²内科、³神戸市環境保健研究所

連絡先：吉田志緒美，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター，〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
 (Received 3 Aug. 2006 / Accepted 18 Oct. 2006)

ら白金耳で径2~3 mmのコロニー2個分の菌量を採取し、1.5 mlマイクロチューブに分注したインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) 200 μ lに懸濁した。56℃, 15~30分処理後10秒間 vortex し、正確に100℃, 8分間処理した後直ちに氷水中に急冷した。10秒間 vortex し、12000 rpm, 3分遠心した上清をPCRに用いた。PCR増幅のために、次のプライマーを使用した; Tb11 [5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'] と Tb12 [5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3']。PCR条件は95℃ 1分の熱変性の後、96℃ 40秒, 60℃ 50秒, 72℃ 1分を45サイクル行い、最後に72℃ 7分間伸張した。得られたPCR増幅産物の *Bst*E II 切断断片長 (60℃, 60分処理) および *Hae* III 切断断片長 (37℃, 60分) を制限酵素失活処理後マイクロキャピラリー電気泳動装置 Cosmo eye SV1201 (カイノス) を用いて解析した。

ITS シークエンス

ITS シークエンスは Richter らの方法¹⁰⁾に準じて行った。ITS 1 [5'-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC-3'] と ITS 2 [5'-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC-3'] を用いて ITS 全長を含む領域の PCR 増幅産物を得た。PCR 条件は95℃ 9分の熱変性の後、94℃ 45秒, 55℃ 60秒, 72℃ 90秒を30サイクル行い、最後に72℃ 7分間伸張した。BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (ABI) を用いて、ITS 全長の塩基配列を決定した。

PFGE

Iinuma らの方法¹¹⁾に準じて行った。

1. 菌液調整, サンプルブロックの作成

ミドルブルック 7H9 培地 (BBL) を用いて、*M. kansasii* 株を37℃, 7~14日間培養し、McFarland No.2~3の濁度に調整した後、D-cycloserine を1 mg/ml 加え、12~18時間培養を続けた。次いで培養液を遠心し、TS 溶液 [50 mM Tris HCl (pH8.0), 0.5 M Sucrose/100 ml] に再浮遊して、-40℃で凍結、その後直ちに氷水中で融解した (Freeze and Sawing)。菌液70 μ l に対し、1.5% 低融点アガロース (BIO-RAD) 70 μ l を混合し、その混合液120 μ l を速やかに PFGE 用インサートモールドに挿入し固相化した。

2. 溶菌, 除タンパク, 制限酵素処理

リゾチーム4 mg/ml 加 Lysis 溶液500 μ l にサンプルブロックを入れ、溶菌処理 (37℃, 18時間) 後、Proteinase K (1.0 mg/ml) 加 ES 溶液900 μ l にゲルを移し変えて除タンパク処理 (50℃, 18時間) を行った。次いで Proteinase K の不活化処理のため、Pefabloc 1.5 mM/ml 加 TE 溶液を500 μ l 入れたチューブに、サンプルブロックを0.5 mm 幅にスライスしたサンプルプラグを入れ、室温で2時間振盪した。TE 溶液で30分、3回の洗浄処理を行い、2回の pre-incubation の後、*Dra* I (100U) による制限酵素

処理 (37℃, 18時間) を行った。

3. 電気泳動

0.5% TBE 溶液に溶かした1% アガロースゲルにサンプルプラグを挿入した。14℃に冷却した0.5% TBE 溶液2000 ml を泳動槽に循環させ、PFGE 泳動装置 CHEF DR III (BIO-RAD) を用いて19.5時間の電気泳動を行った。

4. 染色, 撮影, 画像処理, 系統樹作成

ゲルを ethidium bromide (EtBr) 溶液に30分振盪して染色を行い、撮影した。Phoretix 1D Pro (Nonlinear Dynamics 社) を用いてゲルイメージ解析処理を行い、Phoretix 1D Database (Nonlinear Dynamics 社) を使用してデータベース化し系統樹を作成した。

IS1652-RFLP

IS1652 配列は *M. kansasii* に特異的な947 bp の長さを保有した配列であるが、DNA プローブの pMK1-9¹²⁾ に陰性の *M. kansasii* にのみ認めるとされている²⁾。今回われわれは Yang らの方法¹²⁾に準じて行った。IS1652 プロブは IS 1 [5'-TCC TCC GTG CGC GCT GGA GC-3'] と IS 2 [5'-CGG ACC TGC CCA TCA GCG TC-3'] を用いて作成し、各種制限酵素 *Alu* I, *Eco*R I, *Pvu* II, *Sma* I についてそれぞれのパターンの比較から多型性の検討を行った。

MPTR-RFLP

10 bp の繰り返し配列で、5 bp の間隔をもつ MPTR 配列は *M. kansasii* 以外に結核菌群、*M. gordonae*, *M. asiaticum*, *M. gastri*, *M. szulgai* にも存在する³⁾¹³⁾。結核菌の染色体上には100以上のコピー数をもつ多型性を示すが、*M. kansasii* に対しては高い分離能が認められている¹³⁾。今回 Hermans らの方法¹³⁾に準じて、IS1652-RFLP と同様、制限酵素 *Bst*E II, *Sma* I を用いて多型性の検討を行った。

結 果

*hsp*65-PRA, ITS シークエンス

M. kansasii 174 株中170株 (97.7%) が *hsp*65-PRA, ITS シークエンスとともに I 型と認められた。残り4株のうち、2株は両手法で II 型に、1株は VI 型と認められたが、*hsp*65-PRA パターンによる型別と ITS シークエンスによる型別での食い違いを示す株が1株認められた (Table 1)。この株の PRA パターンは Iwamoto and Saito¹⁴⁾ の定義した II b 型のパターンを示し、ITS シークエンスは II 型の配列であった。II b 型の PRA パターンを示した株については、*hsp*65 gene の PCR 産物のシークエンスを決定し、Iwamoto and Saito¹⁴⁾ の報告した atypical type II と一致することを確認した。

PFGE

PFGE により *M. kansasii* 174 株は、バンドパターンの

類似した大きなグループを形成する159株とユニークなパターンを示す15株に大別された。159株は *hsp65*-PRA および ITS シークエンスですべて I 型に型別された。一方、ユニークなパターンの15株には II 型、II b 型、VI 型を示した4株と I 型の11株が含まれていた。そこで今回の PFGE 結果を PFGE 電気泳動パターンの評価基準¹⁵⁾に基づいて、A, B, C の3つに分類した。グループ A はバンドの変化がない同一クローナリティーと2~3バンドの違いをもつ株からなり、*hsp65* PRA および ITS シークエンスで I 型に型別された170株のうちの159株(91.4%)が分類された。グループ B は4~6バンドの違いをもつ株からなり、I 型2株と VI 型1株が分類さ

れた。グループ C は7バンド以上の違いを認める株からなり、I 型9株と II 型2株および II b 型1株が分類された (Fig. 1)。

IS1652-RFLPならびに MPTR-RFLP

IS1652-RFLPでは I 型と I 型以外の4株 (II 型, II b 型, VI 型) 間で多型性を示したが、I 型の170株はすべて共通したバンドパターンを示し、多型性は認められなかった。

MPTR-RFLPでも同様に、タイプ間では多型性を示したが、I 型は多型性を認めなかった (Fig. 2)。また異なる制限酵素処理による多型性分類の比較では、いずれの RFLP においても変化は認められなかった。

Table 1 Distribution of *Mycobacterium kansasii* isolates according to subtype in NHO Kinki-chuo Chest Medical Center (n=174)

Type	<i>hsp65</i> -PRA	Sequencing	RFLP		Subtypes by PFGE		
		ITS	IS1652	MPTR	A Pattern	B Pattern	C Pattern
I	170	170	170	170	159	2	9
II	2	3	3	3	0	0	2
II b	1*	0	0	0	0	0	1*
VI	1	1	1	1	0	1	0
Total	174	174	174	174	159	3	12

*Atypical type II by *hsp65* sequence

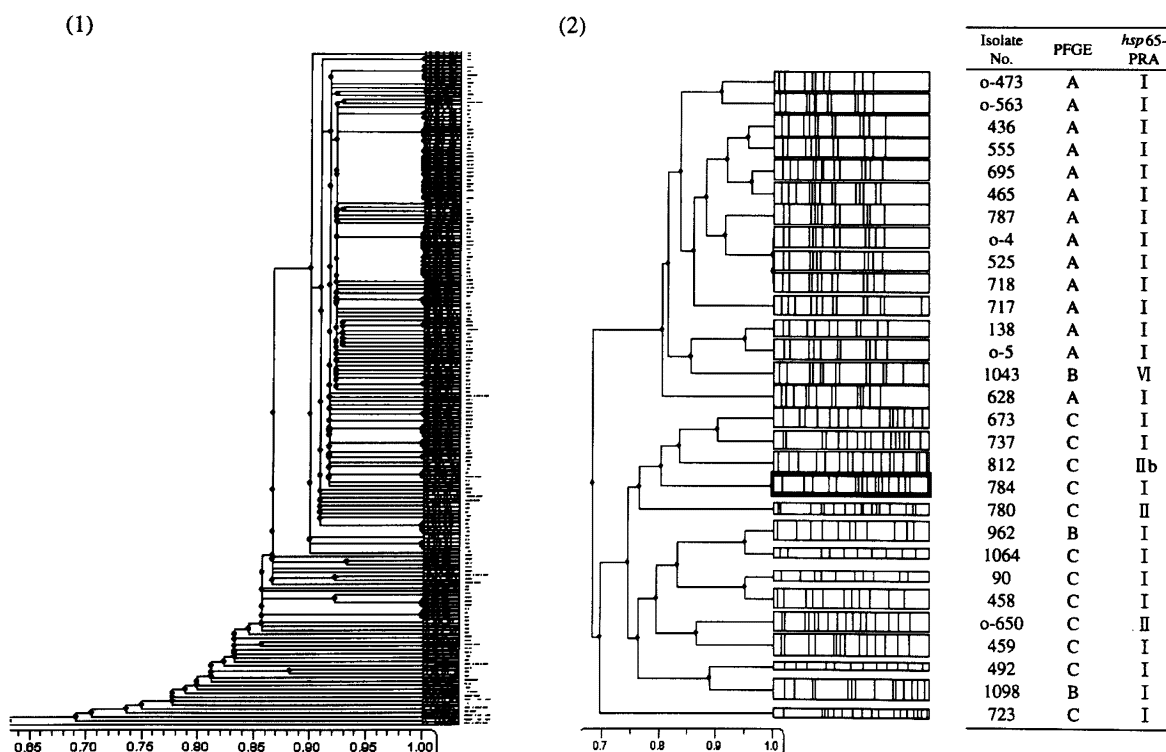
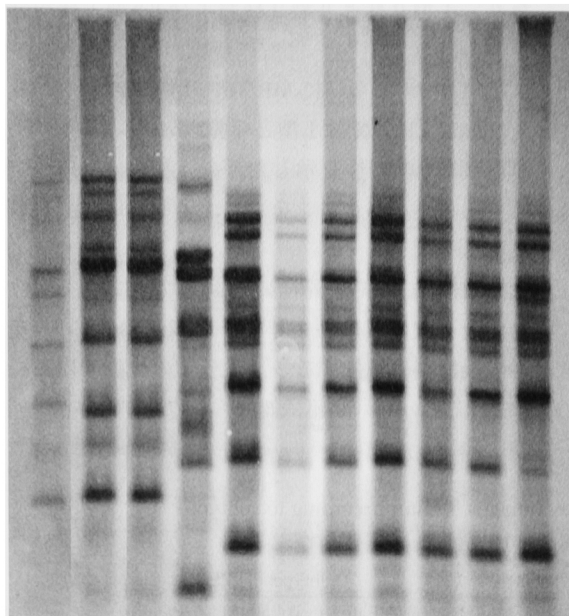


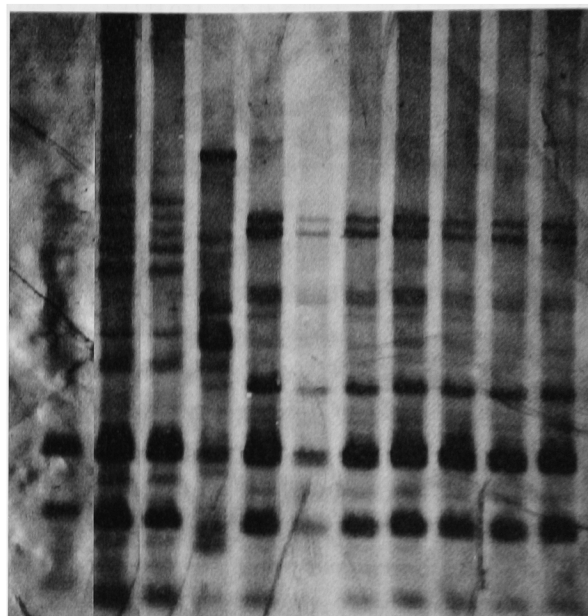
Fig. 1 Phylogenetic tree for single linkage of 174 *Mycobacterium kansasii* isolates (1) and polymorphic analysis of isolates consist of the representative pattern A, and all patterns of B and C (2) by PFGE. The pattern A showed the indistinguishable common pattern, and the pattern B and C showed polymorphous pattern by PFGE.

(1) IS1652



Isolate No.	812	o-650	780	1043	90	1098	673	784	1064	962	459
Type	IIb	II	II	VI				I			

(2) MPTR



	812	o-650	780	1043	90	1098	673	784	1064	962	459
	IIb	II	II	VI				I			

Fig. 2 RFLP analysis of IS1652 and major polymorphic tandem repeat (MPTR) in relation to the *Mycobacterium kansasii* genotype, according *hsp* 65-PRA.

考 察

近年、分子遺伝学の発展によって、NTMの分子疫学解析に各種遺伝子型別法を応用した多くの疫学的解明の研究が進み、*M. kansasii*においてもいくつかの分子疫学的解析がなされている^{6) 7) 14) 16)}。先人の報告から *M. kansasii* が世界的に分布している状況がうかがえるが、国あるいは地域に発症頻度の分布差が見受けられる。英国ウェールズ地方では最も多いNTMであり¹⁷⁾、チェコの Karvina 地方¹⁸⁾ や南アフリカの鉱山¹⁹⁾ でも多数報告されているが、オーストラリアではあまり分離されていない²⁰⁾。わが国¹⁾ および米国²¹⁾ ではMACに次いで多く分離されているが、米国内でも地理的に中南部に多い傾向があり^{22) 23)}、サンフランシスコの統計では5年間で269名の *M. kansasii* 症の患者が報告されている²⁴⁾。わが国においても症例数の増加に伴い全国的な広がりを見せているが、米国同様に流行の地域性が見られ、特に近畿圏地域は他の地域に比べて最も多い¹⁴⁾。しかも近畿圏内に位置する当センターでは年間60から70例の新規 *M. kansasii* 症患者が受診している。そこで感染経路の推測ならびに疫学的解明に有用な遺伝子型別解析を同菌株に対して実施することは治療戦略を図るうえでも非常に重要である。

同菌に対する代表的な解析法のひとつである *hsp* 65-

PRAはTelentiら⁹⁾が開発したPCR-based *hsp* 65 gene内の制限酵素切断部位の多様性からNTMを分別するPCR-restriction analysis (PRA)である。Picardeauら(フランス)⁷⁾は *M. kansasii*の臨床分離菌39株と水道水からの分離菌24株を対象として *hsp* 65-PRAを行い、I型～V型の5つのタイプに分類した。また臨床分離菌191株を対象としたTaillardら(スイス)⁶⁾はさらにVII型までの7つのタイプに分類している。Picardeauら⁷⁾の結果ではI型は39.7%、II型は31.7%と同程度の割合を示し、Taillardら⁶⁾によるとI型は67%、II型は21%を占めていた。一方Chimaraら¹⁶⁾が臨床分離菌184株について検討したサンパウロでの報告では182株(98.9%)がI型と認められ、Iwamoto and Saito¹⁴⁾のわが国での報告においても、臨床分離菌198株中184株(92.9%)がI型に分類されている。今回われわれの検討ではI型が高い割合(97.7%)で認められた。

そこで今回の解析を含めたI型が多数を占めた報告^{14) 16)}と、Picardeauら⁷⁾やAlcaideら⁴⁾のII型が比較的多い欧米の報告との間に違いが表れる理由について考察してみると、まず対象とするサンプリングの違いが考えられる。I型が多数認められた報告^{14) 16)}は臨床検体のみを対象としており、一方環境由来検体を含めた場合^{4) 7)}にはII型が多く認められている。また *M. kansasii* は自然界からの分離は稀で、同一地域の水道水から繰り返し分離される

と報告されている²¹⁾。したがって、諸国間で異なる地理的環境の影響下におけるサンプリングの違いから、*M. kansasii*の感染状況の相違が生じたと考えられた。また、環境宿主側のリスクファクターの違いも関係していると思われる。Picardeauら⁷⁾の報告では臨床分離菌13株(33.3%)にHIV感染を認め、そのうち8株がⅡ型に属していた。Taillardら⁹⁾は、HIV感染が認められる39株(20.4%)のうち15株がⅡ型であると報告している。またAlcaideら⁹⁾は彼らの考察の中で、Tortoliら²⁹⁾が検討した69株のうちHIV感染を認めた株は20株(29.0%)含まれ、そのうちのアキュブローブ法で陰性を示した12株がおそらくⅡ型に相当すると述べている。そこでTaillardら⁹⁾や、Chimaraら¹⁶⁾は宿主の免疫状態がⅠ型以外の型の感染による*M. kansasii*症と関連していると考察している。したがって、今回のHIV感染陰性の*M. kansasii*症患者由来菌株を対象とした検討から、全身性の重篤な免疫不全をもたない患者群での*M. kansasii*症はⅠ型が大部分を占めるであろう可能性を支持した。

Tortoliの論説²⁹⁾でⅠ型はヒトから、Ⅱ型はヒトもしくは環境から、Ⅲ型からⅤ型は環境から多く分離されるため、Ⅲ～Ⅴ型が分離された場合はcolonizationの可能性があるとされているが、その後新たに報告されたⅥ型、Ⅶ型に関してはその臨床的意義は未だ不明である。今回われわれが分離したⅥ型による*M. kansasii*症患者は日本結核病学会の診断基準⁹⁾を満たしていることからcolonizationの可能性は低いと考えられる。Ⅵ型についての報告例が限られており、今後のデータ蓄積が必要ではあるが、今回のわれわれの結果はⅥ型のヒトへの感染は臨床的に意義があることを強く示唆するものである。

Alcaideら⁹⁾は*M. kansasii*の*hsp65*-PRAによって得られた5つの型がITSシーケンスによって塩基上に相違を認めると報告している。今回174株中173株の*hsp65*-PRAとITSシーケンスの型は一致したが、1株のみが*hsp65*-PRAでⅡb型、ITSシーケンスでⅡ型を示した。これはIwamoto and Saito¹⁴⁾の定義するⅠ型とⅡ型の中間型(atypical type Ⅱ)であり、Ⅱ型からⅠ型への分化を示唆する株の存在が今回の解析においても認められたのは興味深い。

IS1652-RFLPの結果、各型間で多型性が認められた。Yangら¹²⁾は1から11本のバンド間で多型性を示したとしている。またPicardeauら⁷⁾はⅡ型とⅢ型にIS1652配列は存在するが、Ⅰ型、Ⅳ型、Ⅴ型には存在しなかったとしている。しかし今回の検討でⅡ型以外のⅠ型、Ⅱb型、Ⅵ型の各型にもIS1652配列の存在が認められた。Ⅳ型、Ⅴ型、Ⅶ型の菌株が分離、同定されなかったため、すべての型にIS1652配列が存在するかどうかは現時点では不明だが、今後さらに菌株を蓄積してゆけば、この

点は解明されるものと考えられた。

MPTR-RFLPでRossら²⁷⁾はDNAプローブのpMK1-9に陽性の*M. kansasii*は共通したバンドパターンを有するが、陰性の*M. kansasii*は不均質であると報告している。しかしArendら²⁸⁾は22株の*M. kansasii*を対象としてITSシーケンスをターゲットとしたキットであるINNO-LiPA Mycobacteria DNA probe test (Innogenetics)で分類したうえでMPTR-RFLPを行った結果、3つに分類されたグループごとに各々の共通するパターンが存在したが、すべての株に疫学的関連性は認められなかったとしている。今回の検討でもIS1652-RFLPと同様に各型間の多型性が認められたが、174株由来の患者の居住地や職場環境といった生活圏は分散しており、疫学的関連性は乏しいと考えられた。

PFGEではPicardeauら⁷⁾が制限酵素*Dra*Iを用いたPFGEパターンから大きなクラスターを形成したグループをパターンⅠと定義し、そのパターンⅠは*hsp65*-PRAでⅠ型に相当したと報告している。またパターンⅠの中に4つの亜分類を認め、そのうち最も多く見られるパターンはⅠaであるとしている。Zhangら²⁹⁾によると、彼らが得たパターンDa(制限酵素*Dra*I処理)と、Iinumaら¹¹⁾が認めたM型(制限酵素*Vsp*I処理)は上記のパターンⅠaと共通するパターンを有したとしている。そしてZhangら²⁹⁾は供試した71株中、パターンDaの31株と1～3のバンドの違いをもつ33株、それに4～6のバンドの違いをもつ4株の合計68株(95.8%)にクローナリティーを認めたと報告し、また*hsp65*-PRAで81株中78株(96.3%)はⅠ型であったとしている。今回われわれの得たグループA(159株)は、目視比較によりZhangらのDa(IinumaらのM型)に属するものと判断でき、Ⅰ型の中でも特にクローナリティーの高いグループと考えられた。また今回の結果は1施設のみで得られた臨床検体を対象としたものであるが、全国規模の検体を対象としたIinumaら¹¹⁾の結果と同様にPFGEにより他の手法では識別できなかったⅠ型の一部を亜分類できた。したがって、今回の検討からわが国における*M. kansasii*の感染状況を知るうえで重要な知見が得られたと考えられ、同時に今回検討した各種遺伝子型別解析法の中ではPFGEが最も分離能の高い手法であることが示唆された(Table 2)。

われわれは、これまでの報告からNTMに対する有用性が認められている各種遺伝子型別解析法を用いて、*M. kansasii*症例の多い当センター周辺地域で集められた菌株の遺伝子型別特徴の解明を試みたが、大部分はⅠ型の遺伝子型に属しており、全国規模で集積された菌株との間に明確な違いを認めることができなかった。これらの高い分離能をもつ手法を用いても臨床分離株の大部分

Table 2 Comparison of results for *Mycobacterium kansasii* subspecies by different molecular typing methods

Isolate no.	hsp 65-PRA	Sequencing	PFGE	RFLP***	
		ITS		IS1652	MPTR
1043	VI	type VI	B pattern	6	vi
962	I	type I	B	1	i
1098	I	type I	B	1	i
673	I	type I	C pattern	1	i
784	I	type I	C	1	i
737	I	type I	C	1	i
458	I	type I	C	1	i
459	I	type I	C	1	i
1064	I	type I	C	1	i
492	I	type I	C	1	i
90	I	type I	C	1	i
723	I	type I	C	1	i
o-650	II	type II	C	2	ii
812*	II b	type II	C	2	ii
780	II	type II	C	2	ii
Others**	I	type I	A pattern	1	i

*Atypical type II by hsp 65 sequence

**159 *Mycobacterium kansasii* isolates except for types that were defined on the basis of B, C patterns by PFGE.

***Classification of both RFLPs is based on each homogeneous cluster.

がI型に分類されたことから、*M. kansasii* I型は系統発生学的には比較的新しく分化した遺伝子型であると考えられた。したがって、その菌株間でのクローナリティーは高く維持されており、現在までに報告されている *M. kansasii* の遺伝子型別解析手法では同一クローン由来株の判別には限界があるものと思われる。*M. kansasii* の感染様式をより詳細に解明するためには、さらに高い解像度をもつ新たな手法を用いたアプローチが必要であろう。

一方、*M. kansasii* の感染様式の疫学的解明のためには、患者背景からの要因解明も重要である。発症の誘因として Marras ら¹⁷⁾ は粉塵曝露歴の関与を強く示唆する報告をしており、Alcaide ら³⁰⁾ はホームレスとの関連性を指摘している。よって、鉄工や造船関係の工場が多い当センター周辺の住環境の影響が菌の発症に大きく関係している可能性があると考えられた。また宿主側のリスクとして、HIV陽性患者や、AIDSではないが免疫抑制状態にある患者（腎移植や、長期ステロイド使用）が *M. kansasii* に感染している事例が多く報告されている^{31) 32)}。今回得られた遺伝子型別のデータを基にして HIV 感染以外の患者背景を加えた詳細なデータベース構築を現在検討中である。

ま と め

今回各種遺伝子型別法を応用して *M. kansasii* の分子疫学的解明を検討した結果、地域特性の解明には至らな

かったが、I型の蔓延した感染状況が推測された。IS 1652-RFLPではII型、III型以外の型（I型、IIb型、VI型）に IS1652 配列の存在が見出された。また PFGEにより、I型はクローナリティーの高い菌株で形成されていること、およびいくつかの亜分類の存在が示唆された。今後 *M. kansasii* のさらなる疫学的解明のために、より詳細な検討を行う必要があるものと思われた。

文 献

- 1) The Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals: Rapid increase of the incidence of lung disease due to *Mycobacterium kansasii* in Japan. Chest. 1983; 83: 890-892.
- 2) Yang M, Ross BC, Dwyer B: Isolation of a DNA probe for identification of *Mycobacterium kansasii*, including the genetic subgroup. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2769-2772.
- 3) Huang ZH, Ross BC, Dwyer B: Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA hybridization. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2125-2129.
- 4) Alcaide F, Richter I, Bernasconi C, et al.: Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1959-1964.
- 5) Devallois A, Goh KS, Rastogi N: Rapid identification of Mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp 65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 Mycobacterial species. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2969-2973.

- 6) Taillard C, Greub G, Weber R, et al.: Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss national survey. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 1240-1244.
- 7) Picardeau M, Prod'Hom G, Raskine L, et al.: Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 25-32.
- 8) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会: 肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解—2003年. 結核. 2003 ; 78 : 569-572.
- 9) Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al.: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 175-178.
- 10) Richter E, Niemann S, Rüsche-Gerdes S, et al.: Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol.* 1999 ; 37 : 964-970.
- 11) Iinuma Y, Ichiyama S, Hasegawa Y, et al.: Large-restriction-fragment analysis of *Mycobacterium kansasii* genomic DNA and its application in molecular typing. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 596-599.
- 12) Yang M, Ross BC, Dwyer B: Identification of an insertion sequence-like element in a subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 2074-2079.
- 13) Hermans PWM, van Soolingen D, van Embden JDA: Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J Bacteriol.* 1992 ; 174 : 4157-4165.
- 14) Iwamoto T, Saito H: Comparative study of two typing methods, *hsp65* PRA and ITS sequencing, revealed a possible evolutionary link between *Mycobacterium kansasii* typ I and II isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2006 ; 254 : 129-133.
- 15) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 ; 33 : 2233-2239.
- 16) Chimara E, Giampaglia CMS, Martins MC, et al.: Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the state of São Paulo between 1995-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 ; 99 : 739-743.
- 17) Marras TK, Daley CL: Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002 ; 23 : 553-567.
- 18) Kubín M, Svandová E, Medek B, et al.: *Mycobacterium kansasii* infection in an endemic area of Czechoslovakia. *Tubercle.* 1980 ; 61 : 107-112.
- 19) Corbett EL, Blumberg L, Churchyard GJ, et al.: Nontuberculous mycobacteria: defining disease in a prospective cohort of South African miners. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 ; 160 : 15-21.
- 20) Dawson DJ, Reznikov M, Blacklock ZM, et al.: Atypical mycobacteria isolated from clinical material in south-eastern Queensland. *Pathology.* 1974 ; 6 : 153-160.
- 21) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 ; 156 : S1-S25.
- 22) Good RC, Snider DE Jr: Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States 1980. *J Infect Dis.* 1982 ; 146 : 829-833.
- 23) Horsburgh CR Jr, Selik RM: The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am Rev Respir Dis.* 1989 ; 139 : 4-7.
- 24) Bloch KC, Zwerling L, Pletcher MJ, et al.: Incidence and clinical implications of isolation of *Mycobacterium kansasii*: results of a 5-year, population-based study. *Ann Intern Med.* 1998 ; 129 : 698-704.
- 25) Tortoli E, Simonetti MT, Lacchini C, et al.: Tentative evidence of AIDS-associated biotype of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 1994 ; 32 : 1779-1782.
- 26) Tortoli E: *Mycobacterium kansasii*, species or complex? biomolecular and epidemiological insights. *Kekkaku.* 2003 ; 78 : 705-709.
- 27) Ross BC, Jackson K, Yang M, et al.: Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 1992 ; 30 : 2930-2933.
- 28) Arend SM, Cerdá de Palou E, de Haas P, et al.: Pneumonia caused by *Mycobacterium kansasii* in a series of patients without recognised immune defect. *Clin Microbiol Infect.* 2004 ; 10 : 738-748.
- 29) Zhang Y, Mann LB, Wilson RW, et al.: Molecular analysis of *Mycobacterium kansasii* isolates from the United States. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 119-125.
- 30) Alcaide F, Benítez MA, Martín R: Epidemiology of *Mycobacterium kansasii*. *Ann Intern Med.* 1999 ; 131 : 310-311.
- 31) Witzig RS, Fazal BA, Mera RM, et al.: Clinical manifestations and implications of coinfection with *Mycobacterium kansasii* and human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect Dis.* 1995 ; 21 : 77-85.
- 32) Lichtenstein IH, MacGregor RR: Mycobacterial infections in renal transplant recipients: report of five cases and review of the literature. *Rev Infect Dis.* 1983 ; 5 : 216-226.

Original Article

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM KANSASII* ISOLATES¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ³Tomotada IWAMOTO,¹Masaji OKADA, and ²Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] To make molecular epidemiological analysis of *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*) isolates.

[Methods] We examined 174 *M. kansasii* isolates from clinical samples of patients at National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center from June 1, 2002 to August 31, 2005 by polymerase chain reaction (PCR) -restriction analysis (PRA) of the heat shock protein (*hsp*) 65 gene (*hsp*65-PRA), sequencing (ITS, 16S-23S internal transcribed spacer, and *hsp*65 for discrepant case between *hsp*65-PRA and ITS sequence), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and restriction fragment length polymorphism (RFLP) with the major polymorphic tandem repeat (MPTR) probe and the IS1652 probe of genomic DNA.

[Results] Of the 174 *M. kansasii* isolates, 170 strains were classified as *M. kansasii* type I using *hsp*65-PRA, while two isolates belonged to type II and one each isolate to type IIb and VI, respectively. Although the ITS sequence of these isolates also identified the same region of polymorphism by *hsp*65-PRA, only type IIb might be revealed atypical type II, a transitional type from typical type II to intermediate type I by *hsp*65 sequence. The polymorphic patterns by RFLPs with MPTR and IS1652 probe were shown specific for each

homogeneous cluster by *hsp*65-PRA. In addition, 159 isolates were recognized the same common pattern A by PFGE analysis. In contrast, the rest 15 isolates revealed significant polymorphism within 11 isolates of type I, and 4 isolates among type II, IIb, and VI.

[Discussion] We verified the *M. kansasii* genotype I was predominant, with the same pattern of major worldwide type regions, and reflected a very tight clonal structure. Type I was furthermore indicated recognition of subtypes by PFGE analysis.

Key words: *Mycobacterium kansasii*, *hsp*65-PRA, 16S-23S ITS sequencing, PFGE analysis, RFLP analysis

¹Clinical Research Center, ²Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ³Kobe Institute of Health

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)