

*Mycobacterium lentiflavum*の菌種内塩基配列変異に関する研究

¹岩本 朋忠 ²中永 和枝 ²石井 則久 ³吉田志緒美
⁴斎藤 肇

要旨：〔目的〕 *Mycobacterium lentiflavum*の菌種内塩基配列変異を明らかにし、優位に存在する遺伝子型を特定する。〔材料と方法〕肺疾患患者16名より分離された16株を用いて各菌株の16S rDNA (1471 bp)、ITS (282 bp)、*rpoB*遺伝子 (306 bp)、および *hsp65* 遺伝子 (401 bp) の塩基配列を解析し、各領域における塩基配列の多型性を調べた。〔結果と考察〕16S rDNA、ITS、*rpoB* 遺伝子各々で2種類の塩基配列型、*hsp65* 遺伝子では3種類の塩基配列型が認められた。4領域を組み合わせた解析 (multilocus sequence typing, MLST) により、供試16菌株は3つの遺伝子型、すなわち、MLST2 (12株)、MLST3 (3株)、MLST4 (1株) に分類され、MLST2が優位な遺伝子型であった。遺伝子型と薬剤感受性との間には相関は認められなかった。

キーワード： *Mycobacterium lentiflavum*, 塩基配列型, 遺伝子型, Multilocus sequence typing, 16S rDNA, 16S-23S ITS, *rpoB* 遺伝子, *hsp65* 遺伝子

はじめに

*Mycobacterium lentiflavum*はSpringerら(1996年)によりヒトの脊椎椎間板炎病巣や諸種臨床検体から分離された、それまで記載をみない1抗酸菌種である¹⁾。その後、本菌によるリンパ節炎^{2)~7)}、中高年齢者での肺感染症が世界各地より相次いで報告され^{7)~9)}、易感染状態の人のみならず健常者における感染症もみられている。その分離頻度は近年増加傾向にあり、飲料水供給システムが感染源の一つと考えられている¹⁰⁾。わが国でも、岩本ら¹¹⁾により本菌による慢性肺疾患患者の1症例が報告された。本菌は生化学的性状や市販の遺伝子プローブを用いた方法では同定不能であり、その確定診断には16S rDNAなどの塩基配列の解析が必要である¹⁾。

本菌種に対する分子遺伝学的解析結果から、*M. lentiflavum*には16S rDNAと16S-23S ITS (internal transcribed spacer) の塩基配列に菌種内変異 (sequevar, sqv.) のあることが認められている¹²⁾。したがって、*M. lentiflavum*の各種遺伝子領域における菌種内変異を明らかにすること

で、その遺伝子型別分類が可能となり、本菌の遺伝子型と臨床的意義・地域特異性との関連性の解明に寄与するものと思われる。そこで本研究では、わが国の肺疾患患者16名より分離された *M. lentiflavum* の16S rDNA、ITS、*rpoB* 遺伝子、*hsp65* 遺伝子の菌種内変異ならびに優位に存在する遺伝子型について検討した。なお、分離菌の臨床ならびに細菌学的方面については別途、本誌へ投稿準備中である。

材料と方法

供試菌：わが国の肺疾患患者16名の喀痰から分離され、16S rDNAの塩基配列により *M. lentiflavum* と同定された16菌株を使用した。

DNA抽出・PCR：小川培地上発育菌の1白金耳よりISOPLANT (日本ジーン) で抽出精製したDNA 1 ngをPCR反応に使用した。PCR反応はTakara Ex Taq (タカラバイオ) を用いて、94℃ 30秒 (denaturation)、55℃ 30秒 (annealing)、72℃ 1分 (extension) を35サイクル行った。16S rDNAのほぼ全長 (約1500 bp) の塩基配列分析

¹神戸市環境保健研究所, ²国立感染症研究所ハンセン病研究センター, ³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, ⁴広島県環境保健協会

連絡先: 岩本朋忠, 神戸市環境保健研究所, 〒650-0046 兵庫県神戸市中央区港島中町4-6
(E-mail: kx2t-iwmt@asahi-net.or.jp)
(Received 19 Oct. 2007 / Accepted 7 Jan. 2008)

を行うため、下記の2組のプライマーセットを用いてPCR増幅産物を得た¹³⁾¹⁴⁾。プライマーセット1: 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG (9-30; *E. coli*の16S rDNAを基準とした位置、以下同様)、5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA (1046-1027)。プライマーセット2: 5'-TTG TCG CGT TGT TCG TGA AA (590-609), 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA (1542-1523)。16S-23S ITS領域全長の増幅には、16S rDNAの3'末端部分を標的としたITS1 (5'-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC)と23S rDNAの5'末端部分を標的としたITS2 (5'-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC)を用いた¹⁵⁾。*rpoB*遺伝子(348 bp)はKimらの設計したプライマーセット(MF, 5'-CGA CCA CTT CGG CAA CCG; MR, 5'-TCG ATC GGG CAC ATC CGG)を用いて増幅した¹⁶⁾。*hsp65*遺伝子(441 bp)の増幅には、Telentiらのプライマーセット(TB11, 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT; TB12, 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT)を用いた¹⁷⁾。

塩基配列解析・遺伝子型別分類: PCR産物をスピнкаラム(SUPREC-02, タカラバイオ)で精製しダイレクトシーケンスに用いた。ダイレクトシーケンスは、BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencingキット(Applied Biosystems Japan)を用いて、ABI 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems Japan)で行った。塩基配列の決定はプライマー標的領域とその近傍を除く領域、すなわち16S rDNA(1471 bp)、ITS全長(282 bp)、*rpoB*遺伝子(306 bp)、*hsp65*遺伝子(401 bp)を対象とした。これら4領域の塩基配列に基づき、供試16菌株を遺伝子型(multilocus sequence typing, MLST)に分類した。

薬剤感受性検査: Middlebrook 7H9液体培地を用いた微量液体希釈法によるBrothMIC NTM(極東製薬工業)を用いて、9薬剤(Table 3参照)の供試12菌株〔MLST2(9株)、MLST3(2株)、MLST4(1株)〕に対する最小発育阻止濃度(MIC)を求めた。菌液調整ならびに結果判定はキットの使用方法にしたがった。すなわち、小川培地で発育した4週間以内の新鮮な菌コロニーをMiddlebrook 7H9培地を用いて通常大気(37°C±1°C)にてMcFarland No.1に相当するまで培養した。得られた菌液をMcFarland 0.5に相当する濁度に調整し、調整した菌液110 µlを11 mlの滅菌蒸留水に加え希釈攪拌して接種菌液とし、薬剤乾燥固着マイクロプレートにて100 µlずつ分注、接種した。マイクロプレートをプレートシールで蓋をしたのち、密封容器にいれ通常大気(37°C±1°C)にて培養した。培養7日目に肉眼的に有意の菌発育が認められない最小薬剤濃度を供試菌に対するMICとした。

塩基配列アクセション番号: 本研究にて得られた、16S rDNA sqv. I, sqv. III, ITS sqv. Ib, *rpoB* sqv. II, *hsp65*

sqv. II, IIIの塩基配列はDDBJのアクセション番号AB362380からAB362385で登録した。

結 果

(1) 塩基配列分析

16S rDNA: *M. lentiflavum*の16S rDNAには異なる3つの塩基配列型が示されており¹⁾、その塩基配列の違いは抗酸菌の菌種同定に一般的に用いられている前半部分(500 bp)よりも、後半部分(900 bp以降)に多く認められている(Table 1)。したがって、本菌の16S rDNAの塩基配列型の決定には16S rDNAのほぼ全長を対象に塩基配列分析を行う必要がある。

供試16菌株のうちUN-107株を除く15株の16S rDNA塩基配列は、*M. lentiflavum* ATCC 51985^T基準株(アクセション番号X80769)と100%一致し、sqv. Iに分類された(Table 1)。UN-107株はATCC 51988株と100%一致し、sqv. IIIに分類された(Table 1)。UN-107株とその他の供試15株との塩基配列相同性は、Springerらの解析対象領域である1421 bpでは99.4%(8塩基の違い)、今回の解析領域1471 bpでは99.5%(8塩基の違い)であった。ATCC 51986株の塩基配列型であるsqv. IIに属する菌株は、検出されなかった。

16S-23S ITS領域: *M. lentiflavum*における16S-23S ITSの種内変異は、エイズ患者での播種性感染の原因菌として血液から分離された*M. lentiflavum* HL1株について報告されている¹²⁾。今回われわれの解析によれば、UN107株において266番目の塩基にTが挿入される新たな変異が認められ(Table 1)、その他の供試15株では、HL1株のITSと100%一致した。これら15株とHL1株の16S rDNA配列は*M. lentiflavum*の基準株と100%一致しているが、ITS全長では92.6%の一致にとどまっている。一方、UN-107株は基準株の16S rDNAとは8塩基の違いを認めるが、ITSでは1塩基挿入のみの違いである。通常、ITSの変異速度は16S rDNAに比べて速いことから16S rDNA配列の一致するものが、ITSによりさらに亜型に分類される。16S rDNAの塩基配列が基準株と一致するHL1株のITS塩基配列が基準株と大きく異なることから、16S rDNAで亜型に分類されるUN-107株では、そのITSはさらに大きく異なるのではないかと予想されたが、予想に反する結果であった。

***rpoB*遺伝子、*hsp65*遺伝子:** 16S rDNA、ITSにおいて複数の塩基配列型が確認されていることから、*M. lentiflavum*の*rpoB*遺伝子、*hsp65*遺伝子においても異なる塩基配列型の存在が予想される。しかしながら、現在までに遺伝子データベース上に登録されている塩基配列は*rpoB*遺伝子、*hsp65*遺伝子ともに、基準株であるCIP 105465株に関するデータのみであり¹⁸⁾、その多型性に関

する報告はいまだなされていない。

本研究により、*rpoB* および *hsp65* 両遺伝子においても異なる塩基配列型の存在が確認された (Table 1)。*rpoB* 遺伝子では、UN-107 を除く 15 株が基準株と 100% 一致したが UN-107 株では基準株と 6 塩基異なる配列を示した (sqv. II)。一方 *hsp65* 遺伝子では、供試 16 菌株は 3 つの塩基配列型に分類された。すなわち、基準株と 100% 一致した 3 株 (sqv. I; AS-4, UN-122, KKC-4)、1 塩基異なる 12 株 (sqv. II; UN-106, 127, 139, AS-10, MA-1, KKC1-3, 5-8)、9 塩基異なる 1 株 (sqv. III; UN-107) であった (Table 1)。

複数ローカス塩基配列タイピング：抗酸菌の系統発生的解析に基づく菌種同定や分子疫学的解析のための遺伝子型別分類において、複数ローカスを対象にした塩基配列の利用 (MLST) が有用である¹⁸⁾。わが国の臨床検体から分離された *M. lentiflavum* 16 株を 16S rDNA, ITS, *rpoB* 遺伝子, *hsp65* 遺伝子の 4 領域を対象に解析を行った結果、Table 2 に示すように、各塩基配列型が 16S rDNA (I) -ITS (II) -*rpoB* gene (I) -*hsp65* gene (II) のものが 12 株を占めた。*M. lentiflavum* 基準株の遺伝子型 I-I-I-I を MLST1, I-II-I-II を MLST2 に分類すると、MLST1 と MLST2 は 16S rDNA と *rpoB* 遺伝子の塩基配列が一致し、ITS の相同性は 92.6%, *hsp65* 遺伝子では 99.8% (401bp 中 1 塩基の違い) であった。さらに、その

他の遺伝子型として、I-II-I-I (MLST3, 3 株), III-Ib-II-III (MLST4, 1 株) が認められた。*M. lentiflavum* 基準株の遺伝子型である MLST1 は検出されなかった。

(2) 薬剤感受性検査

供試菌 12 株から得られた 3 つの遺伝子型 (MLST2, 3, 4) と薬剤感受性との相関性についてみると、Table 3 に示すように各菌株により MIC 値は多少のばらつきを示すものの、遺伝子型と薬剤感受性との間には一定の相関は認められなかった。供試菌 12 株すべてで、clarithromycin および levofloxacin の MIC 値は比較的低い値を示しており、*M. lentiflavum* に対する有効性が期待される。

考 察

Springer ら¹⁾ は多相分類学的解析により新種として記載した *M. lentiflavum* の 3 レファレンス株 (ATCC 51985^T, 51986, 51988) が、3 種の異なる 16S rDNA 塩基配列型 (sqv. I, II, III) を有することを報告した。その後、Niobe ら²⁾ は、播種性感染を起こしたエイズ患者の血液より分離された HL 1 株が、本菌基準株 ATCC 51985^T と同一の 16S rDNA 塩基配列をもつものの、その ITS 塩基配列は基準株と大きく異なることを報告している。16S rDNA および ITS での報告から、*M. lentiflavum* には他の遺伝子領域においても菌種内変異の存在が示唆されるが、これまでにその検討結果に関する報告はなされてい

Table 1 *M. lentiflavum* sequevar in 16S rDNA, ITS, *rpoB* gene, and *hsp65* gene

Gene	Sequevar	Nucleotide positions and sequence variants ^a										Similarity to type strain (%)	Reference
16S rDNA ^b	I	137	220	947	950	957	960	1053	1057	1070	1077	100	1)
	II	G	C	C	C	G	G	G	C	C	G	99.9	1)
	II	T	T	T	T	A	A	A	T	G	C	99.4	1)
16S-23S ITS ^c	I	138	149	191-	218-	226-		232-		246-	266-	100	12)
	Ib	G	T	TT	G-T	ATT		TTGTGGTGAT		CCAT-ATAT	T-	99.6	Present
	II	A	C	C-	GAC	GAC		CTCGGGCTGC		TCGTCAAAA	T-	92.6	12)
<i>rpoB</i> gene ^d	I	1723	1762	1919	1949	1952	1958					100	18)
	II	A	T	G	G	A	T					98.0	Present
<i>hsp65</i> gene ^e	I	431	501	570	594	663	687	723	766	778	781	100	18)
	II	G	C	C	T	C	T	C	C	C	G	99.8	Present
	III	A	T	T	C	G	G	T	A	T	A	97.8	Present

^aThe positions indicated are corresponding to nucleotide sequence accession number X80769 for 16S rDNA, no. AF318174 for ITS, and reference 18) for *rpoB* and *hsp65* gene

^bUN-107 was classified as sqv. III and other 15 strains were as sqv. I

^cUN-107 was classified as sqv. Ib and other 15 strains were as sqv. II.

^dUN-107 was classified as sqv. II and other 15 strains were as sqv. I.

^eUN-122, AS-4, and KKC-4 were classified as sqv. I. UN-107 was classified as sqv. III. Other 12 strains were classified as sqv. II.

Table 2 Multilocus sequence typing of *M. lentiflavum*

<i>M. lentiflavum</i> strains	Sequevar				Sequence type
	16S rDNA	ITS	<i>rpoB</i>	<i>hsp65</i>	
ATCC51985 ^T /CIP 105465 ^T	I	I	I	I	MLST1
ATCC 51986	II	NA	NA	NA	NA
ATCC 51988	III	NA	NA	NA	NA
HL1	I	II	NA	NA	NA
UN-106	I	II	I	II	MLST2
UN-127	I	II	I	II	MLST2
UN-139	I	II	I	II	MLST2
AS-10	I	II	I	II	MLST2
MA-1	I	II	I	II	MLST2
KKC-1	I	II	I	II	MLST2
KKC-2	I	II	I	II	MLST2
KKC-3	I	II	I	II	MLST2
KKC-5	I	II	I	II	MLST2
KKC-6	I	II	I	II	MLST2
KKC-7	I	II	I	II	MLST2
KKC-8	I	II	I	II	MLST2
UN-122	I	II	I	I	MLST3
AS-4	I	II	I	I	MLST3
KKC-4	I	II	I	I	MLST3
UN-107	III	Ib	II	III	MLST4

NA, Sequence data are not available from public database

Table 3 Drug susceptibility testing

Strain	MLST	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
		SM	EB	KM	INH	RFP	LVFX	CAM	TH	AMK
UN-106	2	2	8	1	2	2	0.25	0.06	4	2
AS-10	2	1	128	2	32	0.5	0.25	0.125	16	2
KKC-1	2	0.5	4	1	1	0.5	0.125	0.03	2	1
KKC-2	2	4	8	0.25	1	0.25	0.5	0.06	1	2
KKC-3	2	2	4	0.5	1	0.25	0.5	0.03	0.5	2
KKC-5	2	1	4	2	1	0.25	0.25	0.03	0.5	1
KKC-6	2	1	2	2	1	0.06	0.125	0.03	0.5	1
KKC-7	2	1	64	0.5	1	0.125	0.125	0.03	8	1
KKC-8	2	4	8	2	1	0.5	0.5	0.06	2	2
UN-122	3	4	4	0.25	0.5	0.25	0.5	0.06	1	4
KKC-4	3	1	4	0.5	2	0.25	0.25	0.03	1	0.5
UN-107	4	2	128	2	32	0.25	0.25	0.125	16	1

*streptomycin (SM), ethambutol (EB), kanamycin (KM), isoniazid (INH), rifampicin (RFP), levofloxacin (LVFX), clarithromycin (CAM), ethionamide (TH), amikacin (AMK)

ない。

今回、わが国の肺疾患患者16名から分離された菌株の16S rDNA, ITS, *rpoB* 遺伝子, *hsp65* 遺伝子の塩基配列を解析したところ、16S rDNA, ITS, および *rpoB* 遺伝子ではそれぞれ2種類の塩基配列型が、また、*hsp65* 遺伝子では3種類の塩基配列型が認められ (Table 1)、4領域を組み合わせた解析により、MLST2 (12株)、MLST3 (3株)、MLST4 (1株) の3つの遺伝子型に分類された (Table 2)。今回の検討の限りでは、わが国における主要遺伝子型は MLST2 と推察される。

MLST2 および MLST3 は、播種性感染を起こしたエイズ患者より分離された HL1 株と 16S rDNA, ITS の塩基

配列が一致し、このタイプの *M. lentiflavum* はブラジルでも優位に存在している遺伝子型であると考えられている⁹⁾。これらの型に属する菌株の16S rDNA 塩基配列は ATCC 51985^T 基準株と完全に一致するにもかかわらず、ITS 領域での相同性がきわめて低い (92.6%) という特徴を有する。他方、基準株の16S rDNA との間で8塩基の違いが認められた UN-107 株 (MLST4) では、ITS 領域の相違は1塩基挿入のみであった。これらの結果は、通常の16S rDNA と ITS との変異速度の関係とは異っており、その変異頻度の食い違いには、時間的経過以外の何らかの要因が影響していることを示唆するもので興味深い。

Springerら¹¹⁾は、*M. lentiflavum*の基準株とした ATCC 51985^T株は脊椎椎間板炎病巣から分離され、その病原的意義を認めているが、同時に American Type Culture Collectionに保存された ATCC 51986株、ATCC 51987株、ATCC 51988株をはじめとしてその他の供試18株は検体から偶発的に、あるいは汚染された気管支鏡から繰り返し分離された病原的意義はないものであろうと述べている。Tortoliらによるレトロスペクティブな検討⁷⁾では、臨床材料からの本菌の検出例のうち臨床的な意義が確認されたのは約10%程度であったという。また、Tsitkoら¹⁰⁾は飲料水供給システム中のバイオフィームからの分離株と臨床分離株との比較では、環境由来株5株中4株は ATCC 51988株と同一の16S rDNA塩基配列を示したのに対して、病原的意義のあると思われる臨床分離株では6株すべてが ATCC 51985^T株と同一の16S rDNA塩基配列を示したという。今回われわれが供試した16菌株は、主治医によりその肺疾患との関連性が疑われたものであり、供試16株中15株が ATCC 51985^T株と同一の16S rDNA塩基配列を示した。これらの結果は、*M. lentiflavum*の遺伝子型の違いによるヒトへの病原性の違いを示唆するものであろう。今後、臨床分離株・環境分離株での遺伝子型別に関するデータが蓄積されることで、その臨床的意義・地域特異性などとの関連性が明確になることが期待される。

16S rDNAの前半約500 bpは抗酸菌の菌種同定において有用ではあるが、*M. lentiflavum*の16S rDNA sqv. IとIIを区別することはできない。このため、本菌の16S rDNA塩基配列型を決めるには、16S rDNAのほぼ全長を対象にした解析が必要である。また、16S rDNA sqv. IはITSにより亜型に分類されることが知られている¹²⁾。さらに、今回われわれが行った16株の臨床分離株による解析結果から、*rpoB*遺伝子と*hsp65*遺伝子においても異なる塩基配列型の存在が明らかとなった。これらのことから、今回解析対象とした4領域(16S rDNA全長、ITS全長、*rpoB*遺伝子部分配列、*hsp65*遺伝子部分配列)を利用した遺伝子型別分類は、*M. lentiflavum*の疫学的調査や地域的分布の特性、あるいは臨床的意義と遺伝子型別との関連性などの研究にとって有用であると思われる。また、同一菌種内での異なる塩基配列型に関する情報の蓄積は、今後開発が期待される遺伝子プローブによる本菌の迅速同定法の信頼性を高めるうえで重要な知見となるであろう。

文 献

- 1) Springer B, Wu WK, Bodmer T, et al.: Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1100-1107.
- 2) Haase G, Kentrup H, Skopnik H, et al.: *Mycobacterium lentiflavum*: an etiologic agent of cervical lymphadenitis. Clin Infect Dis. 1997; 25: 1245-1246.
- 3) Tortoli E, Piersimoni C, Kirschner P, et al.: Characterization of mycobacterial isolates phylogenetically related to, but different from *Mycobacterium simiae*. J Clin Microbiol. 1997; 35: 697-702.
- 4) Uria MJ, Garcia J, Menendez JJ, et al.: *Mycobacterium lentiflavum* infection: case history and review of the medical literature. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21: 274-275.
- 5) Cabria F, Torres MV, Garcia-Cia JJ, et al.: Cervical lymphadenitis caused by *Mycobacterium lentiflavum*. Pediatr Infect Dis J. 2002; 21: 574-575.
- 6) Piersimoni C, Goteri G, Nista D, et al.: *Mycobacterium lentiflavum* as an emerging causative agent of cervical lymphadenitis. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3894-3897.
- 7) Tortoli E, Bartoloni A, Erba ML, et al.: Human infections due to *Mycobacterium lentiflavum*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 728-729.
- 8) Molteni C, Gazzola L, Cesari M, et al.: *Mycobacterium lentiflavum* infection in immunocompetent patient. Emerg Infect Dis. 2005; 11: 119-122.
- 9) Suffys P, Rocha Ada S, Brandao A, et al.: Detection of mixed infections with *Mycobacterium lentiflavum* and *Mycobacterium avium* by molecular genotyping methods. J Med Microbiol. 2006; 55: 127-131.
- 10) Tsitko I, Rahkila R, Priha O, et al.: Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. FEMS Microbiol Lett. 2006; 256: 236-243.
- 11) Iwamoto T, Sonobe S, Hayashi K, et al.: A chronic pulmonary disease caused by *Mycobacterium lentiflavum* in a patient with a history of pulmonary tuberculosis. Clin Microbiol Newsl. 2003; 25: 79.
- 12) Niobe SN, Bebear CM, Clerc M, et al.: Disseminated *Mycobacterium lentiflavum* infection in a human immunodeficiency virus-infected patient. J Clin Microbiol. 2001; 39: 2030-2032.
- 13) Edwards U, Rogall T, Blocker H, et al.: Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 1989; 17: 7843-7853.
- 14) Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al.: Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2882-2889.
- 15) Richter E, Niemann S, Rüscher-Gerdes S, et al.: Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (Accu-Probe) and molecular techniques. J Clin Microbiol. 1999; 37: 964-970.
- 16) Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, et al.: Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the

- RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 1999 ; 37 : 1714–1720.
- 17) 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.
- 18) Devulder G, Perouse de Montclos M, Flandrois JP : A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. Int J Syst Evol Microbiol. 2005 ; 55 : 293–302.

————— Original Article —————

INTRASPECIES DIVERGENCE OF 16S rDNA, ITS, *rpoB* GENE AND *hsp65* GENE SEQUENCE FOR *MYCOBACTERIUM LENTIFLAVUM*

¹Tomotada IWAMOTO, ²Kazue NAKANAGA, ²Norihisa ISHII, ³Shiomi YOSHIDA, and ⁴Hajime SAITO

Abstract [Objective] To clarify the genetic microheterogeneity of *Mycobacterium lentiflavum* and identify the predominant genotype.

[Materials and Methods] Clinical isolates of *M. lentiflavum* used in this study were obtained from sixteen patients of lung diseases. In order to assess their intraspecies variability, four gene fragments, from the 16S rDNA (1471 bp), 16S–23S ITS (282 bp), *rpoB* (306 bp), and *hsp65* (401 bp), were sequenced.

[Results] Intraspecies variabilities were found in all of the four targeting fragments. As multilocus sequence typing with these four targets, 16 clinical isolates were divided into 3 genotypes, i.e., MLST2, MLST3, and MLST4. Among them, MLST2 to which 12 clinical isolates belonged, was a predominant genotype. Three strains belonged to MLST3 and the remaining one strain belonged to MLST4. Drug susceptibility study indicated that there was no clear relation between sequence types and drug susceptibility.

[Conclusion] Multilocus sequence typing could aid in characterization and in better understanding of the epidemiology of *M. lentiflavum*.

Key words: *Mycobacterium lentiflavum*, Sequevar, Sequence type, Multilocus sequence typing, 16S rDNA, 16S–23S ITS, *rpoB* gene, *hsp65* gene

¹Kobe Institute of Health, ²Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, ³Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ⁴Hiroshima Environment and Health Association

Correspondence to : Tomotada Iwamoto, Kobe Institute of Health, 4–6, Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 650–0046 Japan.
(E-mail : kx2t-iwmt@asahi-net.or.jp)