

16S rRNA 遺伝子および ITS-1 領域をターゲットとした Invader 法による 23 菌種の抗酸菌の同定

—臨床分離株を用いた DDH 法との比較検討—

¹長野 誠 ²市村 禎宏 ¹伊藤 伸子 ²富井 貴之
³鹿住 祐子 ²武井 勝明 ^{4,5}阿部千代治 ³菅原 勇

要旨：〔目的〕われわれは、16S rRNA 遺伝子あるいは 16S-23S rRNA 遺伝子 internal transcribed spacer (ITS-1) 領域の菌種特異的塩基配列にプローブを設定することにより 23 菌種の抗酸菌を同定できる Invader 法を開発した。今回、多数の臨床分離株を用い Invader 法と DNA-DNA hybridization (DDH) 法の同定結果を比較検討した。〔方法〕2005 年 11 月～12 月の間に DDH 法による菌種同定を受託した小川培地培養菌 636 株を評価に用いた。Invader 法では 13 種類のプローブセットを用い、高温蛍光マイクロプレートリーダーで蛍光を計測することにより菌種を同定した。DDH 法、アンプリコア PCR 法、アキュプローブ法による測定はキットの添付文書に従った。同定不一致株については 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し菌種を決定した。〔結果〕今回調べた 636 株中 615 株 (96.7%) は Invader 法で同定可能であった。DDH 法で同定対象になっていない *M. lentiflavum* が 14 株、*M. parascrofulaceum* が 3 株、*M. intermedium* が 1 株 Invader 法で同定された。一方、DDH 法では、1 回目の測定で 636 株中 511 株 (80.3%)、2 回測定を繰り返すことにより 580 株 (91.2%) の同定が可能であった。Invader 法で複数菌種陽性となった 8 株を除いた 628 株のうち 551 株 (87.7%) の結果は Invader 法と DDH 法で一致した。両法の結果の不一致例は、主に *M. gordonae*, *M. avium*, *M. lentiflavum* あるいは *M. intracellulare* で認められた。同定不一致株について、16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析などにより Invader 法の結果が正しいことを確認した。〔結語〕臨床重要な 23 菌種の抗酸菌の同定を目的とした Invader 法により、DDH 法に比べてより正確に抗酸菌種を分類および同定できることがわかった。また、臨床分離株のおよそ 97% がこの方法で同定可能であった。

キーワード：抗酸菌の同定, Invader 法, 16S rRNA 遺伝子, ITS-1 領域, DDH 法

はじめに

非結核性抗酸菌による感染症は年々増加傾向にある¹⁾²⁾。現在、約 110 種類以上の抗酸菌菌種が知られており、それらは環境に広く分布している。その多くはヒトに対する病原性をもたないが、3 分の 1 程度の菌種はヒトに対して病原性がある。*M. avium* と *M. intracellulare* はヒトの日和見感染症の起因菌であり、わが国では非結核性抗酸菌症の 70% を占める。また、*M. kansasii* も非結核性抗酸菌症の起因菌であり全体の約 20% である。非結

核性抗酸菌症は、臨床症状や病理組織学的所見だけでは結核との鑑別が困難な場合があり、また菌種により薬剤感受性が異なることから、適切な診断や治療のためには迅速な菌種の同定が要求される^{3)~5)}。

近年、遺伝子解析に基づいた様々な抗酸菌同定法が開発されている⁶⁾⁷⁾。16S rRNA 遺伝子⁸⁾⁹⁾、16S-23S rRNA 遺伝子 internal transcribed spacer (ITS-1) 領域¹⁰⁾、*hsp65* (65 kDa heat shock protein) 遺伝子¹¹⁾あるいは *rpoB* (DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ β サブユニット) 遺伝子¹²⁾の塩基配列を解析し、相同性を調べる方法などが報告されて

¹株式会社ビー・エム・エル臨床ゲノム部、²同安全性試験部、³結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター、⁴株式会社ビー・エム・エル、⁵日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

連絡先：長野 誠，株式会社ビー・エム・エル臨床ゲノム部，〒350-1101 埼玉県川越市の場 1361-1
(E-mail: nagano-m@bml.co.jp)
(Received 9 Jan. 2008 / Accepted 17 Mar. 2008)

いる。日本では、主に以下の2種類のキットが広く使用されている。アキュプローブ法は16S rRNAの可変領域をターゲットとし、菌種特異的なDNAプローブを用いて、RNA-DNAのハイブリダイゼーション法により同定を行う方法である^{13)~15)}。同定可能菌種は、結核菌群 (*M. tuberculosis* complex), *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii*, *M. gordonae*である。全染色体DNAをターゲットとしたDNA-DNAハイブリダイゼーション法のDDHマイコバクテリア‘極東’ (以下DDH法とする)は、マイクロプレートに固定した基準株DNAと被検菌DNAの全塩基配列の類似度を測定することにより菌種を同定する方法である^{16) 17)}。同定可能菌種は、結核菌群, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. gastri*, *M. xenopi*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. peregrinum*の計18菌種である。

われわれは、核酸を増幅することなく一塩基配列の違いを特異的に検出できるInvader法^{18) 19)}を抗酸菌同定に応用し、16S rRNA遺伝子とITS-1領域の菌種特異的配列を検出するInvader法による抗酸菌17菌種同定法を開発した²⁰⁾。今回、検出プローブを追加し、同定可能菌種数を23菌種としたInvader法の特徴をより詳細に検討するために、DDH法との結果を比較検討した。

材料と方法

(1) 使用菌株

2005年11月から12月までに株式会社ビー・エム・エル総合研究所にDDH法による同定依頼のあった、2%小川培地 (極東製薬工業) に発育した臨床分離636株を対象とした。また、American Type Culture Collection

(ATCC) の18菌種19株と、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) の1菌種1株も2%小川培地に発育させた後、検討に使用した。

(2) Invader法

Invader法に用いたDNAは、DDH法でフェノール抽出後の水層残渣200 μ lからMagneSil (プロメガ) を使用して調製した。Invader法は以下の要領で行った。抽出したDNAを、384-wellプレートの所定のウェルに3 μ lずつ、1検体当たり26ウェル (13種 $\times$ 二重測定) に分注した後、ミネラルオイル (シグマ) を6 μ l重層した。95℃で10分間処理しDNAを熱変性させた後、13種類のプローブ溶液それぞれ3 μ l (Signal probe/Invader oligonucleotide/FRET probe溶液2.6 μ lとCleavase酵素0.4 μ lの混合溶液) を所定のウェルに分注した (Table 1)。高温蛍光マイクロプレートリーダー (FluoDia T70, 大塚電子) にセット。64℃に保温し15分間隔で4時間蛍光を計測した。蛍光強度は、蛍光色素FAMは486 nm/530 nm (励起波長/蛍光波長) で、また蛍光色素Redmond REDは560 nm/620 nmで測定した。各検体につき、Broad-range bacteriaプローブの反応がプラトーに達した時間におけるGenus *Mycobacterium*あるいは菌種特異的プローブの蛍光強度からfold-over-zero (FOZ)¹⁹⁾の値を算出し、FOZ値が2以上の場合を陽性とした。なお、Broad-range bacteriaとGenus *Mycobacterium*のプローブのみ陽性であった場合を抗酸菌属細菌と、またBroad-range bacteriaプローブのみ陽性であった場合を抗酸菌属以外の細菌と判定した。

(3) DDH法

DDHマイコバクテリア‘極東’ (極東製薬工業) による菌種の同定はキットの添付書類に従い行った。1回目の測定で判定基準を満たさなかった被検菌株について

Table 1 Probe sets used for the Invader assay

Set no.	FAM dye	Redmond RED dye
1	<i>M. tuberculosis</i> complex	None
2	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i>
3	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chelonae</i> (ITS-1)
4	<i>M. abscessus</i> / <i>M. chelonae</i>	Genus <i>Mycobacterium</i>
5	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. gordonae</i>
6	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. farcinogenes</i> complex ^a
7	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. septicum</i>	<i>M. porcinum</i> complex ^b
8	<i>M. terrae</i>	<i>M. nonchromogenicum</i> group ^c
9	<i>M. xenopi</i>	<i>M. intermedium</i>
10	<i>M. simiae</i> (ITS-1)	<i>M. lentiflavum</i>
11	<i>M. triviale</i>	<i>M. szulgai</i>
12	<i>M. gastri</i> (ITS-1)	<i>M. marinum</i> / <i>M. ulcerance</i>
13	Broad-range bacteria	<i>M. scrofulaceum</i> / <i>M. parascrofulaceum</i> (ITS-1)

^a*M. farcinogenes*, *M. senegalense* and *M. houstonense*

^b*M. porcinum*, *M. boenickei* and *M. neworleansense*

^c*M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. hiberniae* and *M. arupense*

は、再度測定を行い、2回目の測定においても判定基準を満たさなかったものを「同定不能」とした。

(4) アンプリコア™マイコバクテリウム アビウム、イントラセラーおよびアキュプロープ マイコバクテリウム アビウム コンプレックス

アンプリコア PCR 法は、Invader法で使った DNA を用いて、アンプリコア™マイコバクテリウム アビウムおよびイントラセラー (ロシュ・ダイアグノスティックス) の添付書類に従って測定した。また、アキュプロープ法は、小川培地菌株を用いて、アキュプロープ マイコバクテリウム アビウム コンプレックスキットおよびゴールドネ (ジェンプロープ) の添付書類に従って測定した。

(5) 16S rRNA 遺伝子 Top500 シークエンス解析

Invader法と DDH法で結果が一致しなかった株のうち、アンプリコア PCR 法あるいはアキュプロープ法で確認できない菌種について、16S rRNA 遺伝子約 1,500 塩基のうちの 5' 側およそ 500 塩基 (Top500) の配列を解析した。Invader法で使った DNA 溶液 1.0 μ l を用いて以下の条件で PCR 反応を行った。PCR 反応には、10 $\times$ Buffer 5 μ l, 8mM dNTP 1 μ l, プライマー 2 μ l, 滅菌蒸留水 40.5 μ l, AmpliTaq Gold (アプライドバイオシステムズ) 0.5 μ l を混和し反応溶液とした。プライマーは、Forward: 5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' と Reverse: 5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3' をそれぞれ 0.4 nmol 使用した。反応は、GeneAmp PCR System 9700 サーマルサイクラー (アプライドバイオシステムズ) を用い、95 $^{\circ}$ C 8 分間の後、94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 45 秒を 35 サイクル行うことによって、16S rRNA 遺伝子の 5' 側のおよそ 500 塩基を増幅した。PCR 産物を 3% アガロース電気泳動で確認した後、AMPure Kit (アジェンコート) を用いて DNA の精製を行った。サイクルシーケンスは、Big Dye terminator v1.1 cycle sequencing kit (アプライドバイオシステムズ) を用いて行った。CleanSEQ Kit (アジェンコート) を用いて精製した後、3130 ジェネティックアナライザー (アプライドバイオシステムズ) より得られた塩基配列データを Ribosomal Differentiation of Microorganisms²¹⁾ (RIDOM; <http://www.ridom-rdna.de/>) にて相同性を調べ、基準株と 98.5% 以上一致した菌種で相同性最上位をその菌種として同定した²²⁾。なお、RIDOM データベースで検索した結果、基準株と 98.5% 以上一致する菌種が存在しなかった株、あるいは RIDOM データベースに登録されていない菌種が疑われた株については、Genbank (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて検索し、基準株と 98.5% 以上一致した菌種で相同性最上位をその菌種として同定した。

(6) *M. gordonae* の *rpoB* 遺伝子の PCR 制限酵素解析

Invader法で *M. gordonae* と同定された菌株について、伊藤らの方法²³⁾に準じて *rpoB* の遺伝子型を決定した。PCR 増幅産物を制限酵素 *Hae*III で消化した後、3% アガロース電気泳動のフラグメントパターンにより A・B・C・D あるいはその他のクラスターに分類した。

結 果

(1) Invader法と DDH法の結果の比較

DDH法では、1 回目の測定で 636 株中 511 株 (80.3%) の同定が、また、2 回目の測定を実施することにより 580 株 (91.2%) まで同定が可能であった。しかしながら、同定菌種と培地上の集落の性状あるいは着色が一致しない株も存在した。一方、Invader法では 636 株中 615 株 (96.7%) が同定可能であった。Invader法で複数菌種陽性となった 8 株を除いた 628 株において、両同定法の結果の一致率は 87.7% (551/628) であった (Table 2)。

(2) Invader法と DDH法の同定結果の乖離について

Invader法で *M. avium* あるいは *M. intracellulare* と同定された 400 株のうち、DDH法で結果が一致しなかったものが 15 株存在した (Table 2)。これらの株のアンプリコア PCR 法およびアキュプロープ法の結果は、Invader法の結果とすべて一致した (Table 3)。

Invader法で *M. gordonae* と同定された 68 株のうち、DDH法で *M. gordonae* と同定されたのは 34 株 (50.0%) のみであり、29 株は同定不能、5 株は *M. gordonae* 以外の菌種に同定された (Table 2)。これら 68 株の *rpoB* 遺伝子について RFLP 解析を行ったところ、クラスター A が 9 株、クラスター B が 12 株、クラスター C が 16 株、クラスター D が 26 株認められ、その他のパターンを示したものが 5 株 (パターン E 4 株、パターン F 1 株) 確認された (Table 4)。クラスター A の 9 株はすべて DDH法で *M. gordonae* と同定されたが、他のクラスターあるいは他のパターンに分類された株の同定には共通性が認められなかった。一方、*M. gordonae* の標準菌株である ATCC14470^T と ATCC35756 はともに DDH法で *M. gordonae* と同定され、*rpoB* の遺伝子型はクラスター A であった。

M. lentiflavum は、636 株中 14 株 (2.2%) に検出された (Table 2)。この 14 株のうち 7 株は、DDH法で *M. simiae*, *M. intracellulare* あるいは *M. fortuitum* に同定された。なお、この 7 株はすべて、16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析で *M. lentiflavum* と同定された (Table 3)。

DDH法で *M. scrofulaceum* と同定された 5 株のうち 3 株は、Invader法で *M. parascrofulaceum* と同定され、16S rRNA 遺伝子 Top500 の配列は、BLAST 検索により *M. parascrofulaceum* の基準菌株 ATCCBAA-614^T の配列 (Accession No. AY337273) と完全に一致した (Table 3)。

Table 2 Comparison of the identification results obtained by Invader assay and DDH method

Mycobacteria identified by Invader assay	Testing by DDH method		
	No. of strains with agreed results	No. of strains with discrepant results	Identified as
<i>M. avium</i>	266	13	<i>M. intracellulare</i> (4), <i>M. terrae</i> (1), Unidentified (8)
<i>M. intracellulare</i>	119	2	<i>M. avium</i> (2)
<i>M. gordonae</i>	34	34	<i>M. gastri</i> (3), <i>M. szulgai</i> (1), <i>M. xenopi</i> (1), Unidentified (29)
<i>M. kansasii</i>	51	0	
<i>M. fortuitum</i>	19	0	
<i>M. lentiflavum</i>	7 ^a	7	<i>M. simiae</i> (3), <i>M. intracellulare</i> (3), <i>M. fortuitum</i> (1)
<i>M. abscessus</i>	11	0	
<i>M. tuberculosis</i> complex	9	0	
<i>M. chelonae</i>	8	0	
<i>M. nonchromogenicum</i> group	3 ^b	5	<i>M. terrae</i> (1), Unidentified (4)
<i>M. peregrinum</i> / <i>M. septicum</i>	3 ^c	1	<i>M. gordonae</i> (1)
<i>M. szulgai</i>	3	0	
<i>M. terrae</i>	3	0	
<i>M. parascrofulaceum</i>	0	3	<i>M. scrofulaceum</i> (3)
<i>M. scrofulaceum</i>	2	0	
<i>M. porcinum</i> complex	0	2	<i>M. fortuitum</i> (2)
<i>M. xenopi</i>	1	0	
<i>M. intermedium</i>	1 ^a	0	
<i>M. simiae</i>	0	0	
<i>M. marinum</i> / <i>M. ulcerance</i>	0	0	
<i>M. gastri</i>	0	0	
<i>M. triviale</i>	0	0	
<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	0	5	<i>M. avium</i> (2), <i>M. intracellulare</i> (2), <i>M. abscessus</i> (1)
<i>M. avium</i> and <i>M. gordonae</i>	0	2	<i>M. avium</i> (2)
<i>M. avium</i> and <i>M. chelonae</i>	0	1	<i>M. chelonae</i> (1)
<i>Mycobacterium</i> sp.	7 ^a	8	<i>M. intracellulare</i> (2), <i>M. gordonae</i> (1), <i>M. szulgai</i> (1), <i>M. terrae</i> (1), <i>M. scrofulaceum</i> (1), <i>M. gastri</i> (1), <i>M. triviale</i> (1)
Other bacteria	4 ^a	2	<i>M. intracellulare</i> (1), <i>M. xenopi</i> (1)

^aThe result obtained by DDH method was unidentified.

^bThe result obtained by DDH method was *M. nonchromogenicum*.

^cThe result obtained by DDH method was *M. peregrinum*.

なお, RIDOMで検索した場合は, 16S rRNA遺伝子の超可変B領域を含まずに解析するため, *M. simiae* (ATCC 15080株と100%, ATCC14470^T株と99.3%一致)と同定された。

M. nonchromogenicum groupは, 636株中8株(1.3%)に検出された(Table 2)。DDH法で同定不能と判定された4株の16S rRNA遺伝子Top500の配列を調べた結果, No.187株はBLAST検索により*M. arupense*の基準株AR30097^Tの配列(Accession No. DQ157760)と完全に一致し, No.626株は1塩基の違いであった(Table 3)。一方, No.619とNo.625菌株はともにRIDOMでは*M. terrae*のS281株(sqvIII)と完全に一致し, BLAST検索では*M. arupense*の基準株と4塩基異なるのが相同性上位であった。DDH法で, *M. terrae*と同定された菌株(No.318)もNo.619およびNo.625菌株と同じ配列を有していた。

Invader法で*M. porcinum* complexと同定された2株(No.511とNo.518)は, ともにDDH法で*M. fortuitum*と同定された(Table 2)。No.518株の16S rRNA遺伝子

Top500の配列は, *M. porcinum*の基準菌株ATCC39693^Tあるいは*M. neworleansense*の基準菌株ATCC49404^Tの配列と100%一致しており, 一方, No.511株は99.8%の一致であった(Table 3)。なお, No.511株はRIDOMでは, *M. fortuitum*のS358株(sqvIV)と100%一致していた。また, Invader法で*M. peregrinum*/*M. septicum*, DDH法で*M. gordonae*と同定されたNo.543株の16S rRNA遺伝子の配列は, *M. peregrinum*基準菌株ATCC700731^Tあるいは*M. septicum*基準菌株ATCC14467^Tの配列と100%一致していた。

Invader法では, 636株中8株(1.3%)で複数菌種陽性となった(Table 2)。No.75の株を除き, DDH法では, Invader法で同定された2菌種のうちのいずれかの菌種で同定された。*M. avium*と*M. intracellulare*の両方が陽性となった5株はすべてアンプリコアPCR法で*M. avium*と*M. intracellulare*の両者が陽性であった(Table 3)。

(3) Invader法で抗酸菌属細菌あるいは抗酸菌属以外の細菌と分別された菌株

Table 3 Discrepant results in identification of *Mycobacterium* species except *M. gordonae* between Invader assay and DDH method

Strain	Invader assay	DDH method	Amplicor or AccuProbe ^{a, b}	16S rRNA sequencing ^a (%)
48	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	NT
230	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	NT
171	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	NT
217	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	NT
551	<i>M. avium</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. avium</i>	NT
15	<i>M. avium</i>	Unidentified	MAC	NT
145	<i>M. avium</i>	Unidentified	MAC	NT
282	<i>M. avium</i>	Unidentified	MAC	NT
324	<i>M. avium</i>	Unidentified	MAC	NT
363	<i>M. avium</i>	Unidentified	MAC	NT
476	<i>M. avium</i>	Unidentified	MAC	NT
481	<i>M. avium</i>	Unidentified	MAC	NT
489	<i>M. avium</i>	Unidentified	MAC	NT
567	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	NT
614	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	NT
111	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. simiae</i>	NT	<i>M. lentiflavum</i> (100)
345	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. simiae</i>	NT	<i>M. lentiflavum</i> (100)
135	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. simiae</i>	NT	<i>M. lentiflavum</i> (99.8)
70	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. intracellulare</i>	Negative	<i>M. lentiflavum</i> (100)
396	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. intracellulare</i>	Negative	<i>M. lentiflavum</i> (99.8)
544	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. intracellulare</i>	Negative	<i>M. lentiflavum</i> (100)
39	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. fortuitum</i>	NT	<i>M. lentiflavum</i> (100)
318	<i>M. nonchromogenicum</i> group	<i>M. terrae</i>	NT	<i>M. arupense</i> (99.1)
187	<i>M. nonchromogenicum</i> group	Unidentified	NT	<i>M. arupense</i> (100)
626	<i>M. nonchromogenicum</i> group	Unidentified	NT	<i>M. arupense</i> (99.8)
619	<i>M. nonchromogenicum</i> group	Unidentified	NT	<i>M. arupense</i> (99.1)
625	<i>M. nonchromogenicum</i> group	Unidentified	NT	<i>M. arupense</i> (99.1)
543	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. septicum</i>	<i>M. gordonae</i>	Negative	<i>M. peregrinum</i> (100), <i>M. septicum</i> (100)
265	<i>M. parascrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	NT	<i>M. parascrofulaceum</i> (100)
580	<i>M. parascrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	NT	<i>M. parascrofulaceum</i> (100)
33	<i>M. parascrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	NT	<i>M. parascrofulaceum</i> (100)
511	<i>M. porcinum</i> complex	<i>M. fortuitum</i>	NT	<i>M. porcinum</i> (99.8), <i>M. neworleansense</i> (99.8)
518	<i>M. porcinum</i> complex	<i>M. fortuitum</i>	NT	<i>M. porcinum</i> (100), <i>M. neworleansense</i> (100)
183	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	NT
369	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	NT
127	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	NT
581	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	NT
75	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. avium</i> and <i>M. intracellulare</i>	NT
3	<i>M. avium</i> and <i>M. gordonae</i>	<i>M. avium</i>	MAC and <i>M. gordonae</i>	NT
449	<i>M. avium</i> and <i>M. gordonae</i>	<i>M. avium</i>	MAC and <i>M. gordonae</i>	NT
541	<i>M. avium</i> and <i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	MAC	NT

^aNT: Not tested, ^bMAC: *Mycobacterium avium* complex

Invader法で抗酸菌属細菌あるいは抗酸菌属以外の細菌と分別された検体は、636株中21株(3.3%)であった(Table 5)。21株のうち4株は、菌種特異的プローブあるいは Genus *Mycobacterium* プローブがハイブリダイズする塩基領域内に1塩基の置換を有していた。なお、

No.279株は、BLAST検索で *Mycobacterium* 属 IWGMT 90174株と100%一致したが、基準株との相同性が98.5%を超えるものはなく同定できなかった。一方、抗酸菌属以外の細菌と判定されたものが6株存在した。No. 559株は、DDH法で *M. intracellulare*, 16S rRNA 遺伝子

Table 4 The results in identification of *M. gordonae* between Invader assay and DDH method

Invader assay	DDH method	AccuProbe ^a	<i>rpoB</i> -RFLP	No. of strains
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	NT	A	9
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	NT	B	4
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	NT	C	7
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	NT	D	13
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	NT	Other (E)	1
<i>M. gordonae</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. gordonae</i>	B	1
<i>M. gordonae</i>	Unidentified	<i>M. gordonae</i>	B	7
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. gordonae</i>	C	1
<i>M. gordonae</i>	Unidentified	<i>M. gordonae</i>	C	8
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. gordonae</i>	D	2
<i>M. gordonae</i>	Unidentified	<i>M. gordonae</i>	D	11
<i>M. gordonae</i>	Unidentified	<i>M. gordonae</i>	Other (E)	3
<i>M. gordonae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. gordonae</i>	Other (F)	1

^aNT: Not tested**Table 5** The strains which were not identified by Invader assay (%)

Strain	Invader assay	DDH	AccuProbe ^{a, b}	16S rRNA sequencing ^a (%)
121	<i>Mycobacterium</i> sp. (Low signal for <i>M. gordonae</i>)	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> (99.3)
630	<i>Mycobacterium</i> sp. (Low signal for <i>M. gordonae</i>)	Unidentified	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> (99.3)
279	<i>Mycobacterium</i> sp. (Low signal for <i>M. avium</i>)	<i>M. scrofulaceum</i>	MAC	Unidentified
451	<i>Mycobacterium</i> sp. (Only <i>M. terrae</i> probe)	Unidentified	NT	NT
402	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. intracellulare</i>	MAC	<i>M. intracellulare</i> (98.8)
72	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. gastri</i>	NT	<i>M. neoaurum</i> (100)
118	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. terrae</i>	NT	<i>M. neoaurum</i> (99.8)
640	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. szulgai</i>	NT	<i>M. neoaurum</i> (100)
32	<i>Mycobacterium</i> sp.	Unidentified	NT	<i>M. celatum</i> [ATCC51130] (99.8)
378	<i>Mycobacterium</i> sp.	Unidentified	NT	<i>M. celatum</i> [ATCC51130] (99.8)
335	<i>Mycobacterium</i> sp.	Unidentified	NT	<i>M. mucogenicum</i> (99.1)
514	<i>Mycobacterium</i> sp.	Unidentified	NT	<i>M. mageritense</i> (100)
9	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. intracellulare</i>	Negative	<i>M. chlorophenolicum</i> (99.8)
553	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. triviale</i>	NT	<i>M. fortuitum</i> complex ^c (99.3)
588	<i>Mycobacterium</i> sp.	Unidentified	NT	<i>M. asiaticum</i> (99.1)
559	Other bacteria (Low signal for Genus <i>Mycobacterium</i>)	<i>M. intracellulare</i>	MAC	<i>M. chimaera</i> (99.3)
246	Other bacteria	<i>M. xenopi</i>	NT	<i>M. heckeshornense</i> (100)
331	Other bacteria	Unidentified	NT	<i>Gordonia sputi</i> (100)
450	Other bacteria	Unidentified	NT	<i>Corynebacterium jeikeium</i> (99.8)
507	Other bacteria	Unidentified	NT	<i>Gordonia otitidis</i> (100)
573	Other bacteria	Unidentified	NT	<i>Tsukamulla tyrosinosolvens</i> (99.8)

^aNT: Not tested^bMAC: *Mycobacterium avium* complex^c*M. fortuitum* complex: *M. fortuitum*, *M. farcinogenes*, *M. senegalense*, *M. houstonense*, *M. porcinum*, *M. boenickei*, *M. neworleansense* and *M. mucogenicum*

Top500の配列はBLAST検索で *M. chimaera* の基準菌株 ATCC44623^T の配列と99.3%一致し、RIDOMでは、*M. intracellulare* の ATCC35770株 (sqvIII) と99.8%一致していた。

(4) DDH法による基準菌株の同定

臨床分離株を用いた検討から、DDH法で誤同定する可能性の考えられる菌種について、その基準菌株を用い

てDDH法を実施した結果をTable 6に示した。

考 察

今回、われわれの開発した16S rRNA遺伝子あるいはITS-1の菌種特異的塩基配列の検出により同定を行うInvader法と、全染色体DNAの相対類似度に基づき同定を行うDDH法との結果を比較検討した。その結果は、

Table 6 Testing of the type strains by DDH method

Species	Strain	Invader assay	DDH method
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC27294	<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> complex
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC25291	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
<i>M. intracellulare</i>	ATCC13950	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. fortuitum</i>	ATCC6841	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC19981	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. szulgai</i>	ATCC35799	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. xenopi</i>	ATCC19250	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>
<i>M. simiae</i>	ATCC25275	<i>M. simiae</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. lentiflavum</i>	ATCC51985	<i>M. lentiflavum</i>	Unidentified
<i>M. parascrofulaceum</i>	ATCCBAA-644	<i>M. parascrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. neoaurum</i>	ATCC25795	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. heckeshornense</i>	DSM44428	Other bacteria	<i>M. xenopi</i>
<i>M. chlorophenicum</i>	ATCC49826	<i>Mycobacterium</i> sp.	Unidentified
<i>M. farcinogenes</i>	ATCC35753	<i>M. farcinogenes</i> complex	Unidentified
<i>M. senegalense</i>	ATCC35796	<i>M. farcinogenes</i> complex	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. houstonense</i>	ATCC49403	<i>M. farcinogenes</i> complex	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. porcinum</i>	ATCC33776	<i>M. porcinum</i> complex	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. neworleansense</i>	ATCC49404	<i>M. porcinum</i> complex	Unidentified

両測定法の原理が強く反映されたものであった。

Invader 法は、プローブを設定した菌種特異的塩基配列に依存した反応であり、特にシグナルプローブが 100% マッチした菌株 DNA のみを検出するため、抗酸菌菌種同定において非常に高い特異性を有した方法であることが再確認された。DDH 法で同定可能な 18 菌種および臨床分離株から比較的高頻度に分離される菌種の検出プローブを組み合わせて設定することにより、臨床分離株の約 97% を同定することが可能であった。

DDH 法では、同定対象になっていないが臨床検体から比較的高頻度に分離される *M. lentiflavum*, *M. parascrofulaceum*, *M. neoaurum* などの菌種や、'*M. gordonae*-like' ²¹⁾ を他の菌種に同定してしまうケースが確認された。また、DDH 法では、*M. marinum* と遺伝学的に近縁な *M. ulcerans* と *M. shinshuense* を *M. marinum* と判定してしまう報告 ²⁴⁾ や *M. heckeshornense* を *M. xenopi* と判定してしまう報告がある。さらに、*M. scrofulaceum*, *M. nonchromogenicum* あるいは *M. fortuitum* などの菌種では生化学性状による同定法との相関が悪いことが知られている ^{25)~27)}。DDH 法は、「基準株に対して染色体 DNA の定量的 DNA/DNA ハイブリダイゼーション試験で 70% 以上の類似度があり、ハイブリッドの安定度 (ΔT_m) が 5 度以内に収まる菌株の集団を同一種とする定義 ²⁸⁾」に準拠した方法である。しかし、被検菌株が固相された菌種以外であってもこの判定基準を満たしてしまう例が散見されている。すなわち、DDH 法の判定基準は相対類似度に基づいて 18 菌種を識別する基準となっているが、近年非結核性抗酸菌の新菌種の提案は急増しており、判定基準設定時に含まれなかった類縁菌種を同定する場合には特に注意

が必要である。

われわれの開発した Invader 法による抗酸菌同定法も改善の余地はある。例えば、*M. nonchromogenicum* と *M. arupense*, *M. marinum* と *M. ulcerance* および *M. shinshuense* を区別することができない点である。このような場合は、種内で保存された菌種特異的な遺伝子配列を検索し、そこにプローブを設定することで分類が可能となる。なお、*M. arupense* は、2006 年に *M. nonchromogenicum* に近縁な臨床分離株から同定された菌種 ²⁹⁾ で、正木らが新菌種として報告していた *M. kumamotonense* ³⁰⁾ と同一菌種である。一方、データベースに登録されていない 16S rRNA 遺伝子配列を有する臨床分離株も稀ではあるが存在し、Invader 法で同定できないケースもあった。この場合、プローブを数種類ミックスすることにより同定が可能となり、実際、*M. gordonae* はシグナルプローブを追加することにより No.121 と No.630 の株の同定が可能となった。さらに、*Mycobacterium* sp. と判定された株の同定率を上げるために、16S rRNA 遺伝子の超可変 A 領域にプローブを設定することにより、データには示していないが、*M. neoaurum* ³¹⁾, *M. celatum* ³²⁾, *M. mucogenicum* ³³⁾ ³⁴⁾, *M. mageritense* ³⁵⁾ および *M. heckeshornense* ³⁶⁾ ³⁷⁾ の同定が可能であることを確認している。

また、今回の検討では、さまざまな非結核性抗酸菌が同定された。*M. lentiflavum* は 1996 年にヒトの脊椎椎間板炎病巣から分離された菌種で、喀痰、胃液、尿などからも分離例が報告されている ³⁸⁾。近年、分子遺伝学的同定法の進歩により、本邦での分離同定例も増加し、本検討でも臨床分離株の約 2% が *M. lentiflavum* であった。また、*M. parascrofulaceum* は 2004 年に Turenne らによって

*M. scrofulaceum*や*M. simiae*として同定されていた ATCC 株の中から新菌種として提案された菌種であり^{39) 40)}, *M. simiae*と相同性の高い16S rRNA遺伝子とITS-1を有するが、生化学性状は*M. scrofulaceum*に類似し、*M. scrofulaceum*には存在しない16S rRNA遺伝子の超可変B領域に存在する12塩基を有していることが特徴的である。この領域の12塩基配列は迅速発育菌と*M. simiae* complexの遅速発育菌での保有が確認されている。一方、ITS-1の領域は、*M. simiae*と*M. scrofulaceum*に非常に相同性の高い配列を有している。これまでに日本での*M. parascrofulaceum*の分離の報告はなく、本検討における分離例が初めてである。さらに、今回新たにプローブを設定した*M. farcinogenes*/*M. senegalense*/*M. houstonense*あるいは*M. porcinum*/*M. boenickei*/*M. neworleansense*の菌種と*M. peregrinum*と*M. septicum*などを加えたグループを「*M. fortuitum* complex」と称することがあるように、遺伝学的には非常に近縁な菌種である。*M. houstonense*, *M. boenickei*, *M. neworleansense*は、2004年に新菌種の提案がされる以前は、*M. fortuitum* third biovariant complexと分類されていた経緯がある⁴¹⁾。

近年、MGIT培地などの液体培地の導入や塩基配列解析などの遺伝子解析による同定方法の開発により、これまであまり同定されなかった菌種や新菌種が報告されるようになってきた。菌種の同定に基づき治療内容の選択が行われることから、正確にかつ臨床上重要な多くの菌種の同定が可能な測定系が望まれている。われわれの開発したInvader法による抗酸菌同定法は、これらの要求を満たした同定方法であり、臨床に広く使用されることを期待する。

謝 辞

本検討を実施するにあたり、多くのご助言を頂きました広島県環境保健協会の斎藤肇先生に深く感謝致します。また、本報告にあたり株式会社ビー・エム・エルの江頭徹氏、霜島正浩氏および山本英俊氏のご協力に感謝致します。

文 献

- 1) 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。
- 2) 坂谷光則：非定型抗酸菌症。結核。2005；80：25-30。
- 3) American Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association: Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med. 1997；156：1-25。
- 4) American Thoracic Society: An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of non-tuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007；175：367-416。
- 5) Ogata H: 非定型抗酸菌症の治療。日本医事新報。2002；4054：138-139。
- 6) Tortoli E, Bartoloni A, Bottger EC, et al.: Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. J Clin Microbiol. 2001；39：4058-4065。
- 7) Tortoli E: Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev. 2003；16：319-354。
- 8) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al.: Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species. J Clin Microbiol. 2001；39：3637-3648。
- 9) Springer B, Stockman L, Tescher K, et al.: Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J Clin Microbiol. 1996；34：296-330。
- 10) Roth A, Fisher M, Hamid ME, et al.: Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J Clin Microbiol. 1998；36：139-147。
- 11) Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, et al.: *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol. 1999；37：852-857。
- 12) 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。
- 13) Goto M, Oka S, Okuzumi K, et al.: Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol. 1991；29：2473-2476。
- 14) Reisner BS, Gaston AM, Woods GL: Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. J Clin Microbiol. 1994；32：2995-2998。
- 15) Tomioka H, Saito H, Sato K: Identification of *Mycobacterium avium* complex strains belonging to serovars 21-28 by three commercial DNA probe tests. Tuber Lung Dis. 1993；74：91-95。
- 16) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Applications of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid identification of 22 mycobacterium species. J Clin Microbiol. 1991；29：1596-1603。
- 17) 江崎孝之: DNAを用いた抗酸菌の迅速同定。結核。1992；67：803-806。
- 18) Fors L, Lieder KW, Vavra SH, et al.: Large-scale SNP scoring from unamplified genomic DNA. Pharmacogenomics. 2000；1：219-229。
- 19) Lyamichev V, Neri B: Invader assay for SNP genotyping. Methods Mol Biol. 2003；212：229-240。

- 20) Ichimura S, Nagano M, Ito N, et al.: Evaluation of the Invader assay with the BACTEC MGIT 960 system for prompt isolation and identification of Mycobacterial species from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 : 3316–3322.
- 21) Harmsen D: RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms Database. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30 : 416–417.
- 22) Janda JM and Abbott SL: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 : 2761–2764.
- 23) Itoh S, Kazumi Y, Takahashi M, et al.: Heterogeneity of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences of *Mycobacterium gordonae* clinical isolates identified with a DNA probe kit and by conventional methods. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 : 1656–1663.
- 24) 鹿住祐子, 大友幸二, 高橋光良, 他: 皮膚から分離された *Mycobacterium shinshuense* の細菌学的解析. *結核.* 2004; 79 : 437–441.
- 25) 長沢光章, 新井恵子, 森新真一, 他: DNA-DNA マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定 (DDH マイコバクテリア '極東') の基礎的検討. *臨検機器・試薬.* 1993; 16 : 141–145.
- 26) 山崎利雄, 高橋 宏, 中村玲子: マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定法の検討. *結核.* 1993; 68 : 5–11.
- 27) 斎藤 宏, 長友雅彦, 中島雅信, 他: DNA-DNA Hybridization 法を原理とする「DDH マイコバクテリア '極東」を用いた抗酸菌同定とその同定精度の検討. *JARMAN.* 1994; 6 : 23–28.
- 28) Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al.: International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* 1987; 37 : 463–464.
- 29) Cloud JL, Meyer JJ, Pounder JI, et al.: *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56 : 1413–1418.
- 30) Masaki T, Ohkusu K, Hata H, et al.: *Mycobacterium kumamotoense* sp. nov. recovered from clinical specimen and the first isolation report of *Mycobacterium arupense* in Japan: Novel slowly growing, nonchromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiol Immunol.* 2006; 50 : 889–897.
- 31) Tsukamura M: A new species of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, *Mycobacterium neoaurum* Tsukamura n. sp. (Japanese) *Med Biol.* 1972; 85 : 229–233.
- 32) Butler WR, O'Connor SP, Yakus MA, et al.: *Mycobacterium celatum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1993; 43 : 539–548.
- 33) Springer B, Böttger EC, Kirschner P, et al.: Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45 : 262–267.
- 34) Adékambi T, Foucault C, La Scola B, et al.: Report of two fatal cases of *Mycobacterium mucogenicum* central nervous system infection in immunocompetent patients. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 : 837–840.
- 35) Domenech P, Jimenez MS, Menendez MC, et al.: *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47 : 535–540.
- 36) Roth A, Reischl U, Schonfeld N, et al.: *Mycobacterium heckeshornense* sp. nov., a new pathogenic slowly growing *Mycobacterium* sp. causing cavitary lung disease in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 : 4102–4107.
- 37) 鹿住祐子, 菅原 勇, 和田雅子, 他: 2 症例から細菌学的に同定された *Mycobacterium heckeshornense* について. *結核.* 2006; 81 : 603–607.
- 38) 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.
- 39) Turenne CY, Cook VJ, Burdz TV, et al.: *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54 : 1543–1551.
- 40) Tortoli E, Chianura L, Fabbro L, et al.: Infections due to the newly described species *Mycobacterium parascrofulaceum*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 : 4286–4287.
- 41) Schinsky MF, Morey RE, Steigerwalt AG, et al.: Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54 : 1653–1667.

Original Article

IDENTIFICATION OF 23 MYCOBACTERIAL SPECIES BY INVADER ASSAY WITH TARGETING 16S rRNA GENE AND ITS-1 REGION — Comparison with DDH Method in Clinical Isolates —

¹Makoto NAGANO, ²Sadahiro ICHIMURA, ¹Nobuko ITO, ²Takayuki TOMII,
³Yuko KAZUMI, ²Katsuaki TAKEI, ^{4,5}Chiyoji ABE, and ¹Isamu SUGAWARA

Abstract [Purpose and Method] The Invader assay was developed to identify 23 mycobacterial species using probes derived from the species-specific region of the 16S rRNA gene and the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer 1 (ITS-1) region, with minor modifications of our previous study. In the present study, we compared the identification capability between the Invader assay and DNA-DNA hybridization (DDH) method. DDH is commonly used to identify non-tuberculosis mycobacterium in Japan and 636 clinical mycobacterial strains cultured on Ogawa slants were tested.

[Results] The Invader assay could identify 615 (96.7%) of the 636 strains. The results contained 14 *M. lentiflavum*, 3 *M. parascrofulaceum* and 1 *M. intermedium*, which were undetectable with DDH method. On the other hand, DDH method could identify 580 (91.2%) strains with duplicate assay. Of 628 strains except 8 strains identified as a few species by Invader assay, 551 (87.7%) strains were identified as the same species by two methods. Discordant results were mainly recognized for the identification of *M. gordonae*, *M.*

avium, *M. lentiflavum* and *M. intracellulare*. The results of other methods targeting 16S rRNA indicated correctness of the Invader assay.

[Conclusion] These results indicate that Invader assay could identify more correctly than DDH method and could identify about 97% of clinically important mycobacterium.

Key words: Identification of mycobacteria, Invader assay, 16S rRNA gene, ITS-1 region, DDH method

¹Development of Clinical Genomics, BML, Inc., ²Department of Microbiology, BML, Inc., ³Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, ⁴BML, Inc., ⁵Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.

Correspondence to: Makoto Nagano, Development of Clinical Genomics, BML, Inc., 1361-1, Matoba, Kawagoe-shi, Saitama 350-1101 Japan. (E-mail: nagano-m@bml.co.jp)