

今村賞受賞記念講演

MAC の 遺 伝 子 研 究

小川 賢二

要旨：*Mycobacterium avium* complex (MAC) に関する4つの遺伝子研究を行った。(1) *M. avium* 遺伝子タイピング法について：肺MAC症患者からの臨床分離株70株を用いてMATR-VNTR法で菌株鑑別解析を行った。この際IS/245-RFLP法とMIRU-VNTR法を併せて行い、その菌株鑑別能力を比較した。その結果、鑑別能力を比較できるHGDIを算出したところ、IS/245-RFLP法が0.960、MIRU-VNTR法が0.949、MATR-VNTR法が0.990となり、MATR-VNTR法が最も優れた遺伝子タイピング法であることが証明された。(2) *M. avium* の遺伝子的特徴について：わが国の臨床分離*M. avium* 株がもつ遺伝子挿入配列 (IS) の検討を行った。まずHeat shock protein 65を用いて81株の解析を行ったところ*M. avium* の亜種分類はすべて*M. avium* subsp. *hominissuis* と同定された。さらにIS901の保有の有無を調べたところ約70%の株が保有していた。なおIS901は鳥に感染する亜種*M. avium* subsp. *avium* と亜種*M. avium* subsp. *silvaticum* が保有するとされ、さらに欧米ではヒト由来の分離株はIS901をほとんど保有していないことが報告されており、このことはわが国の臨床分離*M. avium* の大きな特徴であると考えられた。さらにこのIS901を詳細に解析したところ*M. avium* subsp. *avium* が保有するIS901と比較し臨床分離株は塩基配列の60カ所に共通な変異があることが分かった。この新規挿入配列はISMav6と命名された。(3) MACのCAM耐性遺伝子について：CAMの薬剤感受性試験と薬剤耐性に関与する遺伝子の変異 (DNAのシーケンス解析により23S-rRNAのドメインV領域にある2058番目と2059番目の変異を検出) との相関性について検討した。さらに遺伝子変異の検出法の一つであるARMS-PCR法を用いて迅速にCAM耐性化の有無を検出するシステムを開発し、その有用性の検討を行った。薬剤感受性試験の結果より、臨床分離株253株中、感受性菌群 (227株) と耐性菌群 (26株) の2群に分かれた。シーケンス解析の結果から、無作為に選んだ感受性菌28株はすべて野生型であった。一方、耐性菌では26株中24株が変異型であった。2株は感受性菌と混在していたため、耐性菌のみを分離培養した後に変異型が確認された。これらの結果から薬剤感受性試験と薬剤耐性遺伝子の変異には相関性が認められた。また、ARMS-PCR法を使用した場合の遺伝子変異検出感度は84.6% (22/26)、特異度は100% (28/28)であった。感度が低下した原因は4株すべてが野生型と変異型の混在であったためと考えられた。以上の結果、ARMS-PCR法を用いることにより、薬剤感受性試験より早期に薬剤耐性の有無が分かるだけでなく、感受性菌と耐性菌の混在している検体も迅速に検出できることが示唆された。(4) *M. intracellulare* に対するVNTR分析法の開発について：バイオインフォマティクス解析により*M. intracellulare* のVNTR法を開発しその有用性を検討した。まず、TR領域の検索は2007年12月に公開された*M. intracellulare* ATCC13950の遺伝子ゲノム情報を基にTandem Repeat Finder (TRF) ソフトウェアを用いて行った。この方法により16のTR領域を見出した。この16領域を用いて肺MAC症由来菌株74株のVNTR分析を行った。その結果HGDIは0.988と非常に優れた菌株鑑別能力のあることが示された。また、長期排菌患者由来株を用いたVNTR領域の安定性の検討では、14症例において最長4年間16のVNTR領域は変化せず安定であった。以上より本法は*M. intracellulare* の遺伝子タイピング法として有用であり、さらに各VNTR領域が安定であったことから、再燃時にその原因が残存した菌

による内因性再燃か、別の菌による再感染かの判別に有用であると考えられた。

キーワード：MAC, VNTR, HGDI, IS901, ISMav6, Clarithromycin耐性遺伝子, ARMS-PCR法, MLVA法

はじめに

Mycobacterium avium complex (MAC) の遺伝子研究を開始するきっかけになった理由を述べる。平成4年頃より診療する肺MAC症患者が増加し、その中には病状が進行し呼吸不全となり50歳代で死亡するというケースも経験するようになってきた。当時肺MAC症は肺結核後遺症という位置づけであったが、実際には明らかな先行疾患のない中高年女性患者が多く、決定的な治療薬のない難治性感染症という印象を強くもった。そのため本疾患に対し現状での治療法に関する研究を行い、平成17年に多剤併用療法の臨床効果の検討を本学会誌に発表した¹⁾。しかし同時に現状治療の限界を感じるに至った。そのころには宿主因子の研究やヒト遺伝子研究も行われていたが、臨床応用できる研究成果は得られていなかった。正確な疫学データはないが、最近20年間でわが国における肺MAC症は急激に増加しているという印象が強く、日本に生息するMAC菌にヒト感染に関する何らかの菌側因子が存在するのではないかと疑うようになってきたVNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別解析法を臨床分離 *M. avium* に応用し、当時の標準法である IS1245-RFLP (Insertion Sequence1245-Restriction fragment length polymorphism) 解析法と比較しながら菌のタイプと臨床的病態に関する相関性の検討を開始するに至った。

Mycobacterium avium の遺伝子タイピング法

Mycobacterium avium のタイピングは、1995年に Guerrero ら²⁾によって報告された IS1245-RFLP 型別解析法が標準法³⁾として用いられてきた。しかしこの解析法は IS1245 を保有していない菌株が存在することや、結核菌と同様にコピー数が増えるほど再現性が低くまた解像度も低下⁴⁾するため不安定な方法であり、データを比較する多施設

共同研究には不向きであった。これに対しわが国では2003年に西森ら⁵⁾が *Mycobacterium avium* tandem repeat (MATR) 領域を用いた VNTR 型別解析法を発表しすでに獣医学領域で利用していた。そこで森山ら⁶⁾や鹿住ら⁷⁾が MATR を用いてヒト臨床分離株に応用したところ良好な結果が得られた。また2007年には Thibault ら⁸⁾が *Mycobacterium* Interspersed Repetitive Units (MIRU)-VNTR 型別解析法を発表し、その有用性が報告された。そこでわれわれは3つの型別解析法を比較し、どの方法が今後の研究に有用なのかを検討した。なお VNTR とは、染色体上に散在する10~100 bp のミニサテライトの塩基配列を構成単位とし、その構成単位が反復して現れる遺伝子領域である。この方法の長所としてはPCR法を主体としているため簡便であること、少量の菌株で行えるため発育の遅い抗酸菌でも容易に解析が可能であること、さらにデジタルデータとして扱えるため、施設間の比較も容易であることなどが挙げられる。また、MIRU-VNTR は Tandem Repeat Finder Program による網羅的検索により8カ所の VNTR 領域が特定されたのに対し、MATR-VNTR は結核菌の Tandem Repeat との相同性検索により16カ所の VNTR 領域が特定されたもので、VNTR 解析法の原理は変わらないが、VNTR 領域の検索方法が大きく異なっている。臨床分離 *M. avium* 70株に対しこれら3つの方法に IS1245-RFLP と MATR-VNTR を組み合わせた4つのパターンにおける解析を行い、Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) を用いて菌株鑑別能の比較を行った。その結果 Table 1 に示すとおり3つの型別解析法の中では MATR-VNTR が HGDI=0.990 と最も優れていた。またこれに IS1245-RFLP を組み合わせると HGDI=0.999 となりきわめて鑑別能力の上昇が確認されたが、現状では MATR-VNTR で十分有用であると考えられた⁹⁾。

Table 1 Discriminatory index of VNTR and IS1245-RFLP typing of *M. avium* clinical isolates

Typing method	IS1245-RFLP	MATR-VNTR	MIRU-VNTR	IS1245-RFLP plus MATR-VNTR
No. of different patterns	53	56	27	68
No. of clusters	4	8	16	2
No. of clustered isolates	21	22	59	4
No. of unique isolates	49	48	11	66
HGDI	0.960	0.990	0.949	0.999

HGDI: Hunter-Gaston discriminatory index

MATR-VNTR型別解析法臨床応用の現状

肺 *M. avium* 感染症は経気道感染であり、HIVに伴う播種性 *M. avium* 感染症は経腸感染が主と考えられている。またブタの場合も HIV の場合と同様に経腸感染であることが分かっている。そこで肺 *M. avium* 感染症患者由来株、HIV 患者由来株およびブタ由来株について VNTR 解析を行った。その結果、感染様式の異なる肺 *M. avium* 感染症患者由来株とブタ由来株は異なるクラスターを形成した。また、HIV 患者由来株の一部はブタ由来株と同じクラスター内に入り相同性を示した。以上のことから感染様式により菌の類似性が高いことが示唆された。しかしながら当院における肺 *M. avium* 感染症 104 症例を対象とした臨床分離株と臨床データおよび臨床経過のレトロスペクティブな研究では、いまだ有意な知見は得られていない。以上については第 47 回日本呼吸器学会学術講演会および第 84 回日本結核病学会総会において発表した。菌の病原性の強さや治療反応性などを見出すためにはさらにいろいろな角度からの検討が必要であると考えられた。

肺 MAC 症患者から臨床分離した *Mycobacterium avium* の遺伝子的特徴

M. avium は現在 4 つの亜種に分類され、鳥に感染するタイプは *M. avium* subsp. *avium* および *M. avium* subsp. *silvaticum*、牛や羊に感染するタイプは *M. avium* subsp. *paratuberculosis*、ヒトやブタに感染するタイプは *M. avium* subsp. *hominissuis* である。亜種決定方法は Heat shock protein 65 gene のシーケンス解析¹⁰⁾ (以下 *hsp65* 解析) ならびに細菌のゲノム上に存在し、菌の進化や薬剤耐性、病原性に関与すると報告されている遺伝子挿入配列 (以下 IS 解析) などを用いてなされる^{11)~17)}。そこで肺 MAC 症患者喀痰から分離された *M. avium* 81 株、HIV 陽性患者の血液から分離された *M. avium* 33 株、ブタ由来 *M. avium* 23 株について *hsp65* 解析および IS 解析を行った。まず *hsp65* 解析ではすべての株が subsp. *hominissuis* であった。次に PCR 法を用いた IS 解析を行ったところ、鳥感染タイプの亜種しか保有しないとされていた IS901 が肺 MAC 症患者由来株の 75%、HIV 由来株の 45% に検出された。海外の研究^{14) 18)}を見ると欧米では 0~8% など、ほとんど保有しないことが報告されている。すなわち日本で分離された subsp. *hominissuis* 株は欧米の株にはない特徴をもっていると考えられた。IS901 の検出は PCR 法を用いて行ったため、近似配列の増幅を懸念し、塩基配列の詳細を検討するためシーケンス解析を加えた。その結果、鳥に感染するタイプの IS901 と比べ、60 カ所の塩基変異を認め塩基配列相同性は 95% であった。これにより鳥感

染タイプの IS901 とは別の IS と判定し、新規 IS としての登録を行ったところ、ISMav6 と命名された¹⁹⁾。IS901 は鳥に対する病原性に関与しているとの報告¹⁸⁾もあるため、ISMav6 がヒトに対する病原性に関連する可能性もあると考え挿入位置を検討したところ、菌が生体に感染した際、ヒト免疫細胞のインターフェロン γ を強誘導するタンパクをコードする遺伝子 *cfp29* の Shine-Dalgarno 配列に挿入されていることが分かった²⁰⁾。すなわち、本遺伝子の転写開始部位に挿入されることにより遺伝子の発現を抑制する可能性があり、ヒトの免疫細胞からの攻撃を受けにくくなる可能性が考えられた。これらの機序や働きに関しては引き続き *in vivo* および *in vitro* での検討を行っている。

現在規定されている 4 種の亜種分類において、ヒトやブタに感染する *M. avium* subsp. *hominissuis* が本当に同じ分類でよいのかという疑問がある。肺 MAC 症は経気道感染、ブタは消化管感染であり感染経路が異なる。2008 年に Turenne らによる *hsp65* を含めた 10 種のハウスキーピング遺伝子を用いた Multilocus sequence typing (MLST) での *M. avium* 亜種の系統樹解析の報告²¹⁾をみると、4 つの亜種のうち subsp. *hominissuis* だけが広範囲な分布を示している。Fig. に示すごとく全ゲノム解析された HIV 感染基準株である *M. avium* 104 とわれわれが解析した肺 MAC 症株である *M. avium* HN135 を加えると 2 つの株は両サイドに近い位置にあることが分かる。この 2 株における全ゲノム解析の一致率は 98.9% (未発表データ) であり、この点からも同じ亜種とは言い難いと考えられる。また MATR-VNTR 法における樹形図上の位置関係をみてもこの 2 株は最も離れた位置にあることが確認され、さらに消化管感染するブタからの分離株と *M. avium* 104 は同じクラスター上にあることが分かり、これらのことから subsp. *hominissuis* は経気道感染するタイプと消化管感染するタイプとでは別の亜種と考えたほうが妥当ではないかと考えられた。

MAC の Clarithromycin (CAM) 耐性遺伝子迅速検出法の検討

肺 MAC 症における基本的治療は Clarithromycin (CAM) を含む多剤併用療法であり、その中で CAM は唯一 MIC データが信頼できるキードラッグ²²⁾である。CAM 耐性は肺 MAC 症の臨床的な悪化を予測する予後因子として重要であり、耐性の有無を早期に検出することは臨床的に有用である²³⁾。そこで肺 MAC 症からの臨床分離 MAC 株に対し、CAM 耐性に関与するとされる 23S-rRNA ドメイン V 領域の遺伝子変異をシーケンス解析し、プロシミック NTM を用いた CAM 薬剤感受性試験との相関について検討すると共に、CAM 耐性化の有無を迅速に検出

する方法である Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR 法を用いた検討を行った。まず CAM に対する薬剤感受性試験は、HIV 陽性ヒト由来 *M. avium* 臨床分離株 33 株、HIV 陰性肺 MAC 症由来 *M. avium* 臨床分離株 134 株、HIV 陰性肺 MAC 症由来 *M. intracellulare* 臨床分離株 86 株の計 253 株に対して施行した。その結果 MIC 8 $\mu\text{g/mL}$ 未満の感受性株が 227 株、MIC 8 $\mu\text{g/mL}$ 以上の耐性株が 26 株であった。次に 23S-rRNA ドメイン V 領域のシーケンス解析および ARMS-PCR 法解析は CAM 耐性株 26 株と CAM 感受性株 227 株の中から無作為に抽出した 28 株の計 54 株に対して施行した。その結果を Table 2 に

示す。シーケンス解析での CAM 耐性検出感度は 24/26 で 92.3%，また野生型と変異型が混在するケースを変異型とカウントすると 25/26 で 96.2% に上昇する。なお特異度は 28/28 で 100%，ARMS-PCR 法解析での CAM 耐性検出感度は 22/26 で 84.6%，混在ケースを変異型とすると 25/26 で 96.2% とシーケンス解析の場合と比較し同等となった。なお特異度は 28/28 で 100% であった。これらの結果から、肺 MAC 症由来の臨床分離 MAC 株における CAM の薬剤感受性と CAM 耐性遺伝子の変異には強い相関性があり、ほとんどの CAM 耐性 MAC 菌の耐性機序はこの遺伝子変異により説明可能であると考えられた。

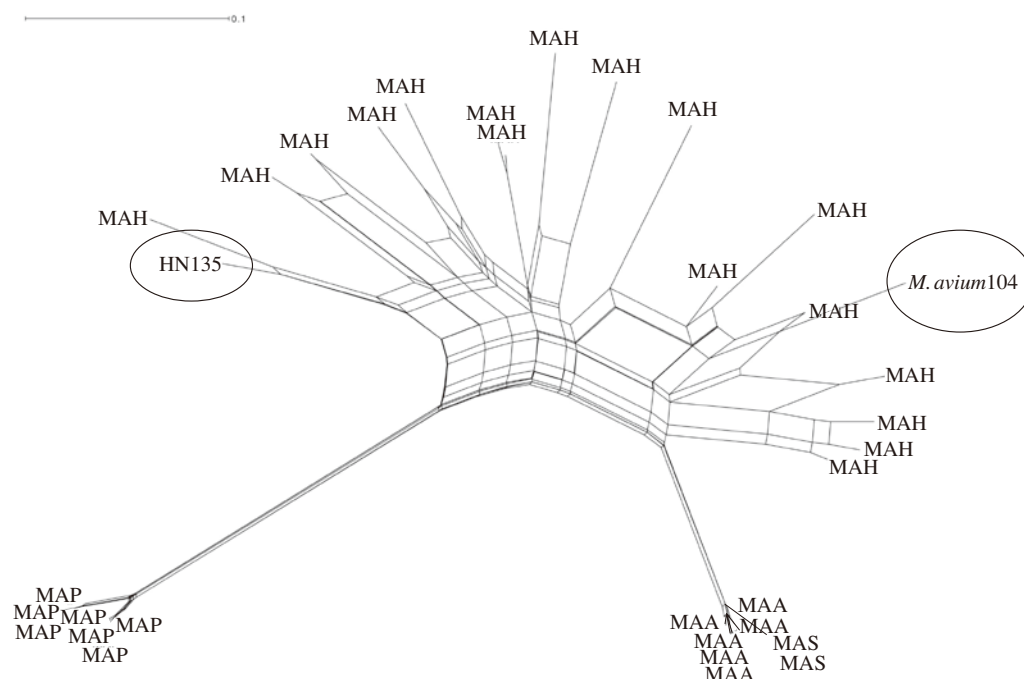


Fig. Splits graph of the phylogenetic relationship among the *M. avium* subspecies genotypes. The vertices are labeled with each subspecies. The graph was generated from the concatenated sequences of the ten gene loci (8064 bp). The scale bar represents a 10% difference in nucleotide sequences.

MAP: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

MAA: *M. avium* subsp. *avium*

MAS: *M. avium* subsp. *silvaticum*

MAH: *M. avium* subsp. *hominissuis*

HN135: isolated from HIV negative patient with pulmonary infection

M. avium 104: isolated from HIV positive patient with disseminated infection

Table 2 Comparison of the results from sequence analysis and ARMS-PCR with an *in vitro* susceptibility test

<i>in vitro</i> susceptibility test		CAM-sensitive n=28	CAM-resistant n=26
Sequence analysis	WT	28	1
	MT	0	24
	WT+MT	0	1
ARMS-PCR method	WT	28	1
	MT	0	22
	WT+MT	0	3

CAM: Clarithromycin WT: CAM wild type MT: CAM mutant type

さらに、薬剤感受性試験では検出しにくい感受性菌と耐性菌の混合型検体に関し薬剤耐性遺伝子を用いて解析することにより容易に検出できる可能性が示唆された。本研究によりシーケンス解析よりも ARMS-PCR 法を用いることでさらに多くの混在型を検出できることが可能であると考えられた。なお混在菌の MATR-VNTR 解析では同一菌であることが確認された²⁴⁾。

Mycobacterium intracellulare における Multi Locus VNTR Analysis (MLVA 法) の開発とその有用性の検討

Mycobacterium intracellulare は肺 MAC 症の起因菌の一つであるが、*M. avium* に比べ分子疫学解析はほとんどなされていなかった²⁵⁾。そこで *M. intracellulare* の VNTR 型別解析法をバイオインフォマティクス解析により開発し、その有用性の検討を行った。まず VNTR 領域の検索であるが、2007 年 12 月に公開された *M. intracellulare* ATCC 13950 の遺伝子ゲノム情報を基に Tandem Repeat Finder (TRF) ソフトウェアを用いて行った。検索条件は、①2 回以上の繰り返し配列をもつ、②VNTR 領域の多様性をアガロース電気泳動で解析しやすいように最小繰り返しサイズを 50~65 bp とする、③Tandem repeat 間の相同性を 90% 以上とする、とした。その結果、解析が不能であった領域と増幅が得られなかった領域を除外し Table 3 に示す 16 領域を選択した。次に肺 MAC 症患者由来菌株 74 株を用い、今回選択した 16 領域による菌株鑑別能力を検討した。その結果、系統樹解析では 74 株が 17 個のクラスターを含む 49 個の遺伝子タイプに分離され、HGDI による菌株鑑別能力は 0.988 と優れたものであった。なお従来行われていた Heat shock protein 65-PCR Restriction

enzyme analysis (PRA 法) による分類では 74 株すべてが *M. intracellulare* type I であり、全く菌株鑑別能力を認めなかった。さらに長期排菌患者 14 例由来株 33 株を用いこの 16 領域の安定性を調べた。その結果、14 症例において最長 4 年間 16 の VNTR 領域は変化せず安定であった。また 1 症例ではあるが、*M. intracellulare* 感染症例に対し治療を行い排菌が停止、その約 1 年後に再排菌した菌株の VNTR 解析を行ったところ、再排菌前後の株はすべて同一のものであることが確認された。以上 MLVA 法は 1 日で迅速に解析でき、再現性が高く、PRA 法に比べ菌株鑑別能力がきわめて優れていることが証明された。また各繰り返し領域が安定であったことから再燃時にその原因が残存した菌による内因性再燃か、別の菌による外来性再感染かの判定に有用であると考えられた²⁶⁾。

おわりに

菌遺伝子研究は肺 MAC 症由来 *M. avium* 株の全ゲノム解析により臨床応用に向けた研究が大きく進展すると考えられる。また国立病院機構病院全国研究にて ISMav6 in *cfp29* 保有株が臨床的な病態に関連していることを見出しつつあり、近い将来これらの知見が臨床応用される可能性があると考えている。最終的には菌側因子と宿主因子の双方の要因を結合させ、新しい治療法を開発することにより肺 MAC 症の克服を目指したい。

謝 辞

本研究は、西森敬先生、八木哲也先生、市川和哉先生、稲垣孝行先生、中川拓先生、森山誠先生、打矢恵一先生、二改俊章先生をはじめ、多くの共同研究者のお力添えにより得られた成果であり、この場をお借りし深謝申し上げます。

Table 3 VNTR allelic distribution in *M. intracellulare* clinical isolates

Locus	No. of isolates with the specified TR allele								Allelic diversity
	0	1	2	3	4	5	6	Total	
VNTR-1		5	52	14		3		74	0.46
VNTR-2	3	43	18	8	2			74	0.58
VNTR-3	7	62	5					74	0.27
VNTR-4		32	9	13	20			74	0.69
VNTR-5	14	2	55	3				74	0.40
VNTR-6		20	35	16	3			74	0.65
VNTR-7		20	38	15	1			74	0.62
VNTR-8	35		37	2				74	0.52
VNTR-9	2	1	71					74	0.07
VNTR-10	1	44	3	1	20	5		74	0.56
VNTR-11		1	34		36	2	1	74	0.54
VNTR-12			60	14				74	0.30
VNTR-13	3	1	33	37				74	0.54
VNTR-14		1	65	8				74	0.21
VNTR-15		38	31	5				74	0.55
VNTR-16		4	70					74	0.09

げます。

文 献

- 1) 多賀 収, 小川賢二, 中川 拓, 他: クラリスロマイシン, レボフロキサシン, およびストレプトマイシンを含む化学療法による *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 症の治療効果の検討. 結核. 2005 ; 80 : 1-7.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Christopher R, Barden JT, Crawford A, et al.: Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. Emerg Infect Dis. 2002 ; 8 : 1210-1215.
- 5) 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. 動物衛生研究所研究報告書. 2003 ; 109 : 25-32.
- 6) 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.
- 7) 鹿住祐子, 宇田川忠, 前田伸司, 他: *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. 結核. 2007 ; 82 : 741-748.
- 8) Thibault VC, Grayon M, Boschirol ML, et al.: New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. J Clin Microbiol. 2007 ; 45 : 2404-2410.
- 9) Inagaki T, Nishimori K, Yagi T, et al.: Comparison of a Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) Method for Typing *Mycobacterium avium* with *Mycobacterium* Interspersed Repetitive-Unit-VNTR and IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. J Clin Microbiol. 2009 ; 47 : 2156-2164.
- 10) Turenne C, Semret M, Cousins S, et al.: Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 433-440.
- 11) Bartos M, Hlozek P, Svastova P, et al.: Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. J Microbiol Methods. 2006 ; 64 : 333-345.
- 12) Dvorska L, Bull T, Bartos M, et al.: A standardized restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. J Microbiol Methods. 2003 ; 55 : 11-27.
- 13) Kunze M, Portaels F, Mcfadden J: Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 2366-2372.
- 14) Ritacco V, Kremer K, Van der Laan T, et al.: Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. Int J Tuberc Lung Dis. 1998 ; 2 : 242-251.
- 15) Mijs W, 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 *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*" for the human/porcine type of *M. avium*. Int J Syst Evol Microbiol. 2002 ; 52 : 1505-1518.
- 16) Chacon O, Bermudez L, Barletta G: Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. Annu Rev Microbiol. 2004 ; 58 : 329-363.
- 17) Harris N, Barletta R: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clin Microbiol Rev. 2001 ; 14 : 489-512.
- 18) Pavlik I, Svastova P, Bartl J, et al.: Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. Clin Diagn Lab Immunol. 2000 ; 7 : 212-217.
- 19) Ichikawa K, Yagi T, Moriyama M, et al.: Characterization of *Mycobacterium avium* clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, IS $Mav6$. J Med Microbiol. 2009 ; 58 : 945-950.
- 20) Rosenkrands I, Rasmussen P, Carnio M, et al.: Identification and Characterization of a 29-Kilodalton Protein from *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate Recognized by Mouse Memory Effect Cells. Infect Immun. 1998 ; 66 : 2728-2735.
- 21) Turenne C, Collins D, Alexander D, et al.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. J Bacteriol. 2008 ; 190 : 2479-2487.
- 22) Griffith D, Aksamit T, Brown-Elliott B, et al.: An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Resp Crit Care Med. 2007 ; 175 : 376-416.
- 23) Griffith D, Brown-Elliott B, Langsjoen B, et al.: Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex lung disease. Am J Resp Crit Care Med. 2006 ; 174 : 928-934.
- 24) Inagaki T, Yagi T, Ichikawa K, et al.: Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin-resistance genes in *Mycobacterium avium* complex isolates. J Antimicrob Chemother. (in press).
- 25) Turenne C, Wallace R, Behr M: *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. Clin Microbiol Rev. 2007 ; 20 : 205-229.

- 26) Ichikawa K, Yagi T, Inagaki T, et al.: Molecular typing of *Mycobacterium intracellulare* using multilocus variable-number of tandem-repeat analysis: identification of loci and

analysis of clinical isolates. Microbiology. 2010 ; 156 : 496–504.

Memorial Lecture by the Imamura Award Winner

GENETIC RESEARCH ABOUT *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX

Kenji OGAWA

Abstract A variable-number tandem-repeat (VNTR) typing method using the *Mycobacterium avium* tandem repeat (MATR) loci (MATR-VNTR) is employed in Japan for epidemiological studies using clinical isolates of *M. avium*. In this study, the usefulness of this MATR-VNTR typing method was compared with that of the IS1245-restriction fragment length polymorphism (IS1245-RFLP) typing method and a mycobacterial interspersed repetitive-unit (MIRU)-VNTR typing method reported previously (Boschirolì, C. Hubbans, P. Overduin, K. Stevenson, M.C. Gutierrez, P. Supply, and F. Biet, Clin Microbiol.) Seventy clinical isolates identified as *M. avium* from human immunodeficiency virus-negative patients with MAC infections were used. MATR-VNTR typing using 15 loci distinguished 56 patterns of different allele profiles, yielding a Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) of 0.990. However, IS1245-RFLP and MIRU-VNTR typing yielded HGDIs of 0.960 and 0.949, respectively, indicating that MATR-VNTR has an excellent discriminatory power compared with MIRU-VNTR and IS1245-RFLP typing. Moreover, concomitant use of the MATR-VNTR method and IS1245-RFLP typing increased the HGDI to 0.999. MATR-VNTR typing is inexpensive and easy to perform and could thus be useful in establishing a digital multifacility database that will greatly contribute to the clarification of the transmission route and pathophysiology of *M. avium* infections.

Mycobacterium avium (n=81) from patients with pulmonary infections who were HIV-negative and isolates (n=33) from HIV-positive patients were subjected to genetic analysis by PCR detection of three *M. avium*-specific insertion sequences (IS901, IS1245 and IS1311) and nucleotide sequencing of the heat-shock protein 65 (*hsp65*) gene. All clinical isolates were identified as '*M. avium* subspecies *hominissuis*' by sequence analysis of *hsp65*. Compared with clinical isolates of *M. avium* reported elsewhere, IS1245 was found less frequently in Japanese isolates (96/114 isolates, 84%) and IS901 was detected more frequently (76/114 isolates, 67%). One isolate was found to lack IS1311, which has not been reported previously for '*M. avium* subsp. *hominissuis*.' Nucleotide sequence analysis of the PCR products for IS901 revealed that all clinical isolates had the same new insertion sequence, designated ISMav6, which had 60 point mutation compared with the nucleotide sequence of the original IS901. These results suggest that '*M. avium* subsp. *hominissuis*' with ISMav6 is prevalent in

Japan. ISMav6 may have implications for the virulence of *M. avium* and contribute to an increase of *M. avium* infections in this country.

Clarithromycin (CAM) is the key drug in the various treatment regimens of *Mycobacterium avium* complex (MAC) diseases and the only drug for which drug susceptibility has been shown to correlate with a clinical response in these diseases. A point mutation at position 2058 or 2059 of the 23S rRNA gene has been reported to occur in high-level CAM-resistant isolates. This study examined a correlation between the results from a drug susceptibility test and the mutation of genes involved in drug resistance in MAC. Furthermore, we adapted a rapid detection method using amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR to identify a mutation in 23S rRNA gene in MAC isolates. Using MICs of CAM, drug susceptibility was tested for 253 clinically-isolated MAC strains. Of these, 28 CAM-sensitive strains and 26 CAM-resistant strains were analysed by sequence analysis and ARMS-PCR. The drug susceptibility test showed that a bimodal distribution was associated with 227 CAM-sensitive strains and 26 CAM-resistant strains. Sequence analysis revealed that all 28 CAM-sensitive strains tested were wild type, whereas 24 of the 26 CAM-resistant strains were mutant type. The sensitivity of the sequence and ARMS-PCR analyses were 92.3% and 84.6%, respectively, and specificity of both was 100%. We found a correlation between drug susceptibility testing and the mutation of drug-resistant genes in this study. ARMS-PCR allowed rapid determination of CAM resistance, even when samples consisted of the mixed type of CAM-sensitive and CAM-resistant strains.

MAC is divided into *Mycobacterium avium*, and the less-epidemiologically studied *Mycobacterium intracellulare*. Genetic typing for *M. intracellulare* using variable number of tandem repeats (VNTR) has not yet been developed. The aim of this study was to identify VNTR loci in the genome of *M. intracellulare* and apply them as an epidemiological tool to clinical isolates. Here, we identified 25 VNTR loci on the *M. intracellulare* genome, which 16 showed variations among clinical isolates in the number of tandem repeat motifs. Among the 74 *M. intracellulare* isolates, 49 genotypes were distinguished using the 16 VNTR loci, resulting in a Hunter-Gaston discriminatory index of 0.988. Moreover, all 16 VNTR loci were stable in different sets of isolates recovered within time

intervals ranging from 2 to 1551 days from 14 separate patients. These results indicate that for use as epidemiological markers of *M. intracellulare*, the loci in this VNTR assay highly discriminating and stable over time.

Key words: MAC, VNTR, HGDI, IS901, IS*Mav6*, Clarithromycin resistance gene, ARMS-PCR, MLVA

Department of Clinical Research, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital

Correspondence to: Kenji Ogawa, Department of Clinical Research, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital, 5-101, Umemorizaka, Meito-ku, Nagoya-shi, Aichi 465-8620 Japan.

(E-mail: ogawak@toumei.hosp.go.jp)