

Mycobacterium avium の新規 Variable Number Tandem Repeat 領域の有用性の検討

1,3 黒河 和広 3 打矢 恵一 4 八木 哲也 1,6 高橋 弘泰
 1,3 新美 政樹 1,5 市川 和哉 1,3,7 稲垣 孝行 1,3,8 森山 誠
 3 二改 俊章 2 林 悠太 1,2 中川 拓 1,2 小川 賢二

要旨：〔緒言〕 *Mycobacterium avium* に用いられる Variable Number Tandem Repeat (VNTR) 型別解析法をより簡便で迅速な解析方法に発展させ、検査の効率性をさらに高める。〔方法〕肺 *Mycobacterium avium* complex 症由来臨床分離株から抽出した DNA を Genome sequencer FLX system (Roche Diagnostic System) にてシーケンス解析を行った。得られたシーケンスデータからこれまでに報告されていない新規 VNTR 領域を同定し、*M. avium* 臨床分離株 71 検体を用いて多様性指数を算出した。さらに MATR-VNTR 型別解析法の VNTR 領域と本研究で同定した新規 VNTR 領域から多様性の高かった 7 領域と 16 領域を選んで解析を実施した。また、各解析法での菌株鑑別能力を算定し MATR-VNTR 型別解析法による菌株鑑別能力と比較検討を行った。〔結果〕シーケンスデータ解析より 6 領域の新規 VNTR 領域が同定され、そのうち 5 領域が多様性を示した。各解析での菌株鑑別能力は多様性の高い 7 領域では 0.980, 16 領域では 0.995, MATR-VNTR 型別解析法では 0.992 であった。〔考察〕相対的に多様性指数の高い VNTR 領域のみを用いることにより、MATR-VNTR 型別解析法よりもさらに有用性が高まり、臨床の場で求められる簡便で速やかな解析に応用できるとともに、より詳細な解析が可能であることが考えられた。

キーワード： *Mycobacterium avium*, Variable Number Tandem Repeat (VNTR), 分子疫学的解析法, 最適化, ゲノム解析

緒 言

Mycobacterium avium の分子疫学的解析法は、1995 年に Guerrero ら¹⁾が報告した Insertion Sequence 1245 Restriction Fragment Length Polymorphism (IS1245-RFLP) 型別解析法、2007 年に Thibault ら²⁾が報告した Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR) 型別解析法、および西森ら³⁾が報告した *Mycobacterium avium* Tandem Repeat-VNTR (MATR-VNTR) 型別解析法などが主な解析法として知られている。これら 3 つの分子疫学的解析法の有用性の検討を Inagaki ら⁴⁾が行い、MATR-VNTR 型別解析法が簡便かつ最も菌株鑑別能力が優れていることを報告している。さ

らに Inagaki ら⁴⁾は MATR-VNTR 型別解析法のみでは識別できない菌株も存在すること、この問題点は IS1245-RFLP 型別解析法を組み合わせることで解決できることを報告している。しかしながら、IS1245-RFLP 型別解析法は解析に時間がかかり、手技が難澁すること、コピー数が増えるほど再現性が低くなること⁵⁾、コピー数が少ないほど解像度が低くなること⁶⁾が報告されており、不安定な解析であることが知られている。また MATR-VNTR 型別解析法は、多様性の低い VNTR 領域の存在が報告されている⁴⁾。したがって、多様性の低い VNTR 領域を解析から除外し、多様性の高い VNTR 領域を新たに組み合わせることで菌株鑑別能力が高まり、より効率的な解析を行うことが可能であることから、有用性の向上

¹⁾国立病院機構名古屋病院臨床研究部, ²⁾同呼吸器科, ³⁾名城大学薬学部微生物学研究室, ⁴⁾名古屋大学医学部附属病院中央感染制御部, ⁵⁾同薬剤部, ⁶⁾愛知県厚生連海南病院薬剤科, ⁷⁾高山赤十字病院薬剤部, ⁸⁾国立病院機構名古屋医療センター薬剤科

連絡先：打矢恵一, 名城大学薬学部微生物学研究室, 〒468-8503 愛知県名古屋市天白区八事山150 (E-mail: kuchiya@meijo-u.ac.jp) (Received 4 Nov. 2011/Accepted 13 Feb. 2012)

の余地が残っている。

そこで本研究は *M. avium* の有用性の高い、新たな VNTR 領域を同定するために *M. avium* 臨床分離株 (HN135 株) のゲノムを次世代シーケンサーにてシーケンス解析を行い、得られたシーケンスデータを基に新規の VNTR 領域を同定し、*M. avium* 臨床分離株 71 検体を用いて多様性指数を算出した。さらに MATR-VNTR 型別解析法の VNTR 領域と同定した VNTR 領域の中から多様性指数の高かった VNTR 領域を選び、VNTR 型別解析法の最適化を行った。また、MATR-VNTR 型別解析法と最適化した VNTR 型別解析法の有用性を比較するため、*M. avium* 臨床分離株 71 検体を使用して両解析法の菌株鑑別能力を算出し比較検討を行った。

実験材料および方法

(1) 使用検体

COBAS AMPLICOR *Mycobacterium* Test (Roche Diagnostic Systems) を用いて *M. avium* と同定された臨床分離株 71 検体を使用した。臨床分離株は、独立行政法人国立病院機構東名古屋病院にて肺 MAC 症と確定診断された HIV 陰性患者の喀痰より分離培養して得られた。患者 1 人につき 1 株を使用した。基準株は *M. avium* 104 株 (Gen Bank accession number NC008595), *M. avium* subsp. *avium* GTC00603 株, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ATCC19698 株, *M. avium* subsp. *hominissuis* ATCC19978 株, *M. avium* subsp. *silvaticum* ATCC49884 株を用いた。

(2) シーケンス解析

① シーケンス解析用 DNA 抽出

独立行政法人国立病院機構東名古屋病院にて、肺 MAC 症と確定診断された患者の喀痰由来株 71 検体のうちの 1 検体 (HN135 株) を用いて Bannantine ら⁷⁾ の方法に従い DNA の抽出を行った。菌株の培養は抗酸菌培養用液体培地の MGIT 液体培地 (バクトン・ディッキンソン) を用い、MGIT 液体培地から Myco Broth (極東製薬) に継代培養し 37°C で OD₅₃₀ 値 0.2 になるまで培養を行った後、QIAGEN Genomic-tip 100/G (株式会社キアゲン) を用いてマニュアルに従い、DNA を抽出した。

② シーケンス解析

HN135 株から抽出した DNA を、次世代シーケンサーの Genome sequencer FLX system (Roche Diagnostic System) を用いてシーケンス解析を行った。次世代シーケンサーより得られたシーケンス情報を、アセンブリプログラムソフト Velvet⁸⁾ を用いて de novo アセンブルを行い、塩基配列断片を作成した。

(3) VNTR 領域の同定

HN135 株のシーケンスデータを Tandem Repeat Finder (<http://tandem.bu.edu>) を用いて VNTR 領域を検索した。

検索条件は、①アガロース電気泳動を行った際に解析しやすいように最小繰り返しサイズを 50 bp 以上 70 bp 以下、②Tandem repeat 間の相同性を 90% 以上、③コピー数が 2 以上、に設定した。

(4) プライマーの設計

各 VNTR 領域のプライマーは、西森ら³⁾の MATR-VNTR 型別解析法の PCR 条件で増幅ができるように Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を用いて、T_m 値をすべて 68±3°C に設定し、各 Tandem Repeat 領域の flanking region に対して作成した。また設計したプライマーが他の抗酸菌と相同性がないことを BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて検索を行った。

(5) VNTR 型別解析

① VNTR 型別解析用 DNA 抽出

菌株の培養は抗酸菌培養用液体培地の MGIT 液体培地を用い、MGIT 液体培地から Myco Broth に継代培養し 37°C で OD₅₃₀ 値 0.2 になるまで培養を行った後、InstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いてマニュアルに従い DNA を抽出した。

② PCR

PCR 反応は、AmpliTaq GOLD DNA Polymerase (Applied Biosystems Japan Ltd) を用いて行った。10x PCR buffer 2.5 μL, 2mM dNTPmix 2.5 μL, AmpliTaq GOLD DNA Polymerase 0.25 μL, 25 μM の各プライマー 0.5 μL, テンプレート DNA 1 μL を加え、全量 25 μL になるように滅菌精製水で調製した。西森ら³⁾の方法と同じく 95°C 10 分のプレヒーティング後、98°C 10 秒, 68°C 30 秒, 72°C 1 分の増幅サイクルを 36 サイクル繰り返し、最後に 72°C 7 分間の伸張反応を行った。

③ アガロース電気泳動

2% E-gel (invitrogen) に 15 μL の蒸留水と 5 μL の PCR 産物をいれ、30 分間電気泳動を行った。塩基対数測定には TrackIt™ 50bp DNA Ladder (invitrogen) を用いた。

④ 塩基対数の解析

ゲルを Gel-Doc (Bio-Rad) にて画像撮影し、解析ソフト Quantity-One (Bio-Rad) を用いて VNTR の塩基対数を測定した。

⑤ 各 VNTR 領域のシーケンス解析および *in silico* 解析

M. avium 104 株と *M. avium* subsp. *avium* GTC 00603 株の同定した各 VNTR 領域から得られた PCR 産物を Gen Elute™ PCR Purification Kit (Sigma-Aldrich) で精製し、PCR で使用したプライマーを用いてダイレクトシーケンスを行った。得られたシーケンスデータを全ゲノム情報が公開されているゲノム基準株 *M. avium* 104 株のシーケンスデータと比較し同一領域の増幅の確認を行った。シーケンスのアライメントには CLC Sequence Viewer 4.6.2

(CLC bio, Japan) を用いた。

⑥各 VNTR 領域での多様性指数 (allelic diversity) の検討

VNTR 領域は個々の領域において多様性の度合いが異なり、それを数値で表したものが多様性指数である。多様性指数が大きいほど菌をより詳細に分類することが可能となり、VNTR 領域の有用性が高いと判断できる。同定した VNTR 領域と MATR-VNTR 領域の多様性指数を Selander ら⁹⁾の方法に従い算出した。

⑦系統樹作成

得られた塩基対数から、各 VNTR 領域の反復回数を求め、アリルプロファイルを作成した。アリルプロファイルからマンハッタン距離を算出し、系統樹を Fitch-Margoliash 法にて推定し、系統樹作成ソフト Fig tree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) を用いて作成した。

⑧菌株鑑別能力 (HGDI) の検討

菌株鑑別能力とは、個々の分子疫学的解析法における分類の程度を数値化したものであり、この値が大きいほど菌がより詳細に分類することが可能な解析法であることがわかる。理論的には多様性指数の高い VNTR 領域を多数組み合わせることで菌株鑑別能力が高まる。菌株鑑別能力の計算式は、Hunter と Gaston¹⁰⁾の方法に従い、Hunter and Gaston discriminatory index (HGDI) を算出した。

結 果

(1) 塩基配列決定

HIV 陰性肺 MAC 症患者由来株である HN135 株を用いてシーケンス解析を行い Velvet⁸⁾を用いて de novo アセンブルした結果、塩基配列断片が 106 本得られ、全長は、5503585 bp であった。しかし、得られた塩基配列断片の連結は不完全であり、完全な塩基配列の決定には至っていない。

(2) VNTR 領域の同定

HN135 株のシーケンスデータより VNTR 領域の検索を行った結果、12 領域が同定された。同定された 12 領域を *M. avium* 104 株のシーケンスデータを用いて調べたところ、12 領域中 6 領域が今までに報告されている VNTR 領域^{2)11)~13)}と同一であったため解析から除外し、残りの 6 領域を Higashi Nagoya Tandem Repeat (HNTR) 領域と命名した。この 6 領域について、設計したプライマーを用いて、*M. avium* 臨床分離株 71 検体と *M. avium* 104 株で VNTR 解析を行ったところ、HNTR-4 領域において PCR 産物が得られなかったため解析から除外し、残りの 5 領域を用いた。

(3) VNTR 型別解析

①各 VNTR 領域のシーケンス解析および in silico 解析

各 HNTR 領域の in silico 解析の結果を Table 1 に示した。*M. avium* 104 株と GTC00603 株の HNTR 各領域から得られた PCR 産物をダイレクトシーケンスし、得られたシーケンスデータを *M. avium* 104 株の全ゲノムシーケンスデータと比較したところ、各 HNTR 領域のリピートシーケンスが一致し、同一領域が増幅されていることが確認された。

Table 1 Primer sequences, tandem repeat motif, conservation, size, and copy number of 6 HNTR loci in *M. avium* strain HN135 and TR position in *M. avium* strain 104

Locus name	PCR primer sequences (5'-3')	TR* motif	Conservation (%)	Estimated size range (bp)	Repeat × copy no.	Tandem repeat position in <i>M. avium</i> strain 104
HNTR-1	F: CGCAGCTGACGGCACACCTC R: GTGGCAGGTCAGCGGCACAA	GGCGCGCCGCCATTAAGGTCAGCG GCGGTCGCCAGCGCGGCGAAAGC CGGGCGCAGCG (58bp)	97	453	(57 bp × 2) + 12 bp	1037565–1037960
HNTR-2	F: AGCCGAGCAGCACCACGACA R: GGAACCGCCGGTCGTTGCTA	GCTCAGCGGCGATCGCCAGCTCCG GCAGAGCCGGGGCGCAGCGGGTC GCCGCCGTCGT (58bp)	97	316	(58 bp × 2) + 43 bp	526032–526405
HNTR-3	F: ACCAGCAGCCGCAGCCGTAG R: GCGGCCGATCCAACATCGTC	AGCCAATGGTCGCGACCCGCCGCG CCCGGCTTCACCGCGCTTGCGATC GCTCCT (54bp)	98	323	(54 bp × 3) + 3 bp	298307–298521
HNTR-4	F: GCTGACCGGCTCCACCGAAG R: TTACACGCCGCGAGCAGACG	CCACTGAAGACGAGCGGCGTCAGC CGCGAGGAGGAAGTGGAACCGAC GGCTTGAG (55bp)	98	226	(55 bp × 2) + 7 bp	4810555–4810835
HNTR-5	F: CCAGGCGCGACGATTCTGCT R: TTGTCCACACCGGGCAGCAC	TGAAACTCGCCGGCGACGATGCAG AGCGTAGCGATGAGGAGGAGCGGC GCCGA (53bp)	92	308	(53 bp × 2) + 15 bp	3973476–3973730
HNTR-6	F: GACGCGATCGCCGAACATGA R: ATCAGCGCCGGGGTCAACAG	TGGCCCCTGACGATCGCGAGGGCG GCGCAGCCGGACGAAGCGGGTCTGT CACCAT (54bp)	100	478	(54 bp × 2) + 13 bp	2337232–2337655

*TR: tandem repeat

Table 2 VNTR typing of MATR allelic distribution in *M. avium* clinical isolates

Locus	No. of isolates with specified TR allele ^b									Allelic diversity (<i>h</i>) ^a	
	0	1	2	3	4	5	6	7	Total		
MATR-1	1	31	38			1				71	0.516
MATR-2	29	36	4	2						71	0.566
MATR-3		42	11	1	3	14				71	0.579
MATR-4		2	66	3						71	0.121
MATR-5		1	67	3						71	0.095
MATR-6	1	50	20							71	0.416
MATR-7		21	27	3		5	14	1		71	0.718
MATR-8		14	54		3					71	0.372
MATR-9		1	49	21						71	0.428
MATR-11		22	48			1				71	0.439
MATR-12				71						71	
MATR-13	39	3	29							71	0.523
MATR-14		1	45	23	2					71	0.485
MATR-15			68		2	1				71	0.069
MATR-16		5	14	52						71	0.411

^aCalculated as described by Selander et al.⁹⁾^bThere was a total of 71 clinical isolates tested.**Table 3** VNTR typing of HNTR allelic distribution in *M. avium* clinical isolates

Locus	No. of isolates with specified TR allele ^c									Allelic diversity (<i>h</i>) ^b	
	0	1	2	3	4	5	6	7	NP ^a		Total
HNTR-1	4	37	30							71	0.540
HNTR-2		47	22	2						71	0.457
HNTR-3		18	20	33						71	0.635
HNTR-4									71	71	
HNTR-5		38	33							71	0.490
HNTR-6	46	1	24							71	0.458

^aNP, no PCR product^bCalculated as described by Selander et al.⁹⁾^cThere was a total of 71 clinical isolates tested.

②多様性指数の検討

多様性指数を算定するため、*M. avium* 臨床分離株 71 検体を用いて解析を行った。MATR 領域と HNTR 領域の多様性指数をそれぞれ Table 2 と Table 3 に示した。すべての HNTR 領域は、多様性が確認された。また、MATR 領域と HNTR 領域、合計 20 領域を多様性指数値で順位付けし、その値に応じて任意に 3 段階に区分し (High: 0.5 以上の 7 領域, Moderate: 0.3 以上 0.5 未満の 9 領域, Low: 0.3 未満の 4 領域) Table 4 に示した。

③系統樹作成

HNTR 領域の有用性を検討するため、以下の 5 パターンにおいて系統樹作成を行った。i) MATR 領域 (15 領域), ii) HNTR 領域 (5 領域), iii) Table 4 にて High に属した 7 領域, iv) Table 4 にて Moderate 以上に属した 16 領域, v) MATR 領域と HNTR 領域を合わせた 20 領域。このうち, iii) と iv) の系統樹をそれぞれ Fig. 1 と Fig. 2 に示した。なお, アリルプロファイルが同一であった検体は図中, 黒枠をつけて表した。また, iv) と v) の系統樹は同じであった。

Table 4 Allelic diversity ranking of each locus

Locus	Allelic diversity (<i>h</i>) ^a	Polymorphism
MATR-7	0.718	High
HNTR-3	0.635	
MATR-3	0.579	
MATR-2	0.566	
HNTR-1	0.540	
MATR-13	0.523	
MATR-1	0.516	
HNTR-5	0.490	Moderate
MATR-14	0.485	
MATR-9	0.428	
HNTR-6	0.458	
HNTR-2	0.457	
MATR-11	0.439	
MATR-6	0.416	Low
MATR-16	0.411	
MATR-8	0.372	
MATR-4	0.121	
MATR-5	0.095	
MATR-15	0.069	
MATR-12	0.000	

^aCalculated as described by Selander et al.⁹⁾

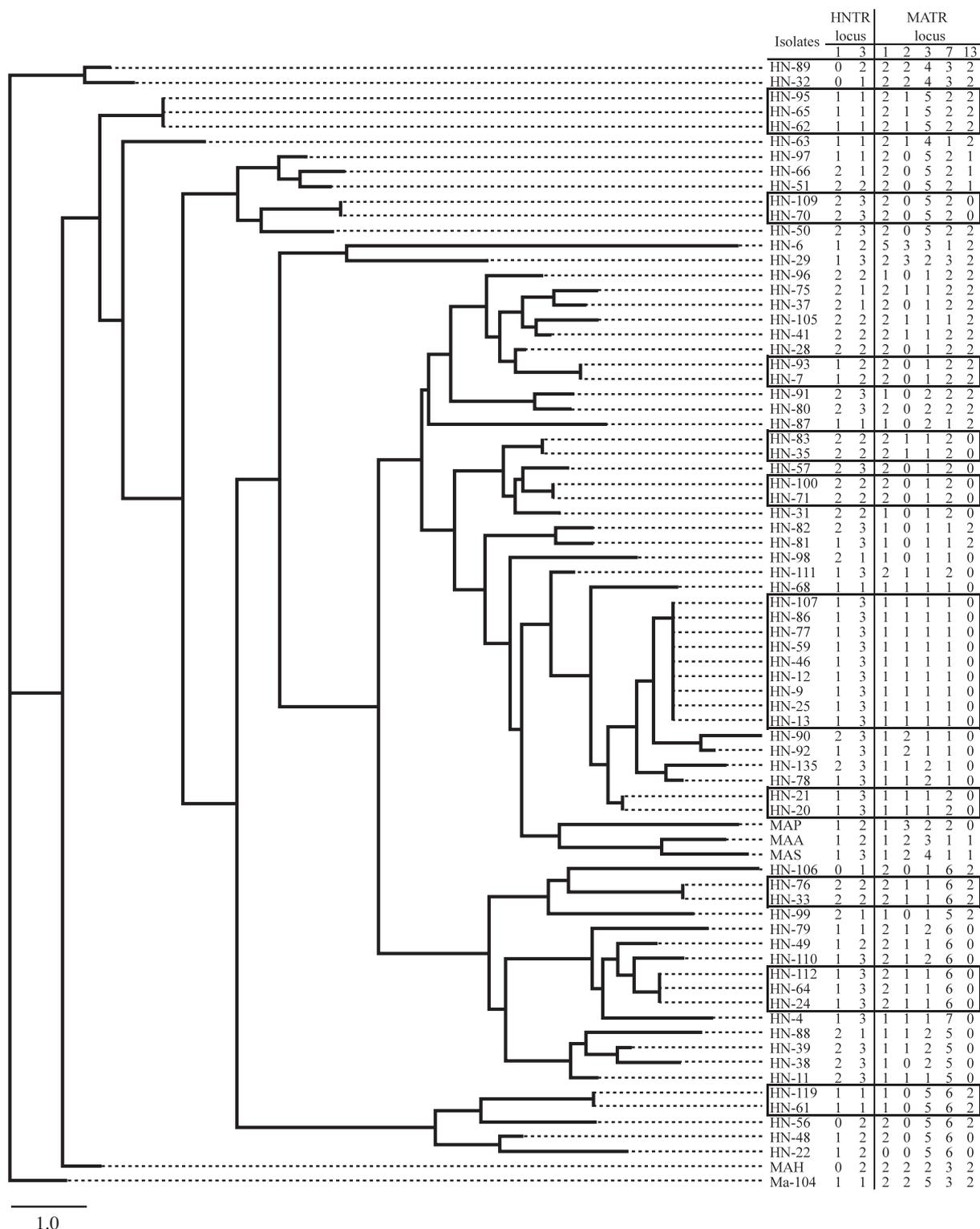


Fig. 1 Dendrogram and allele profiles constructed from 7 loci-VNTR typing results for *M. avium* isolates, including 71 clinical strains and reference strains. The dendrogram was created from distance matrix files by Fitch-Margoliash analysis according to 7 loci-VNTR markers. Allele profiles analyzed using 7 VNTR loci from isolates showing 100% similarity are boxed. The Manhattan distance is indicated at the bottom. MAA (*M. avium* subsp. *avium*), GTC00603; MAH (*M. avium* subsp. *hominissuis*), ATCC19978; MAS (*M. avium* subsp. *silvaticum*), ATCC49884; MAP (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*), ATCC19698; Ma-104 (*M. avium* subsp. *hominissuis*), *M. avium* strain 104.

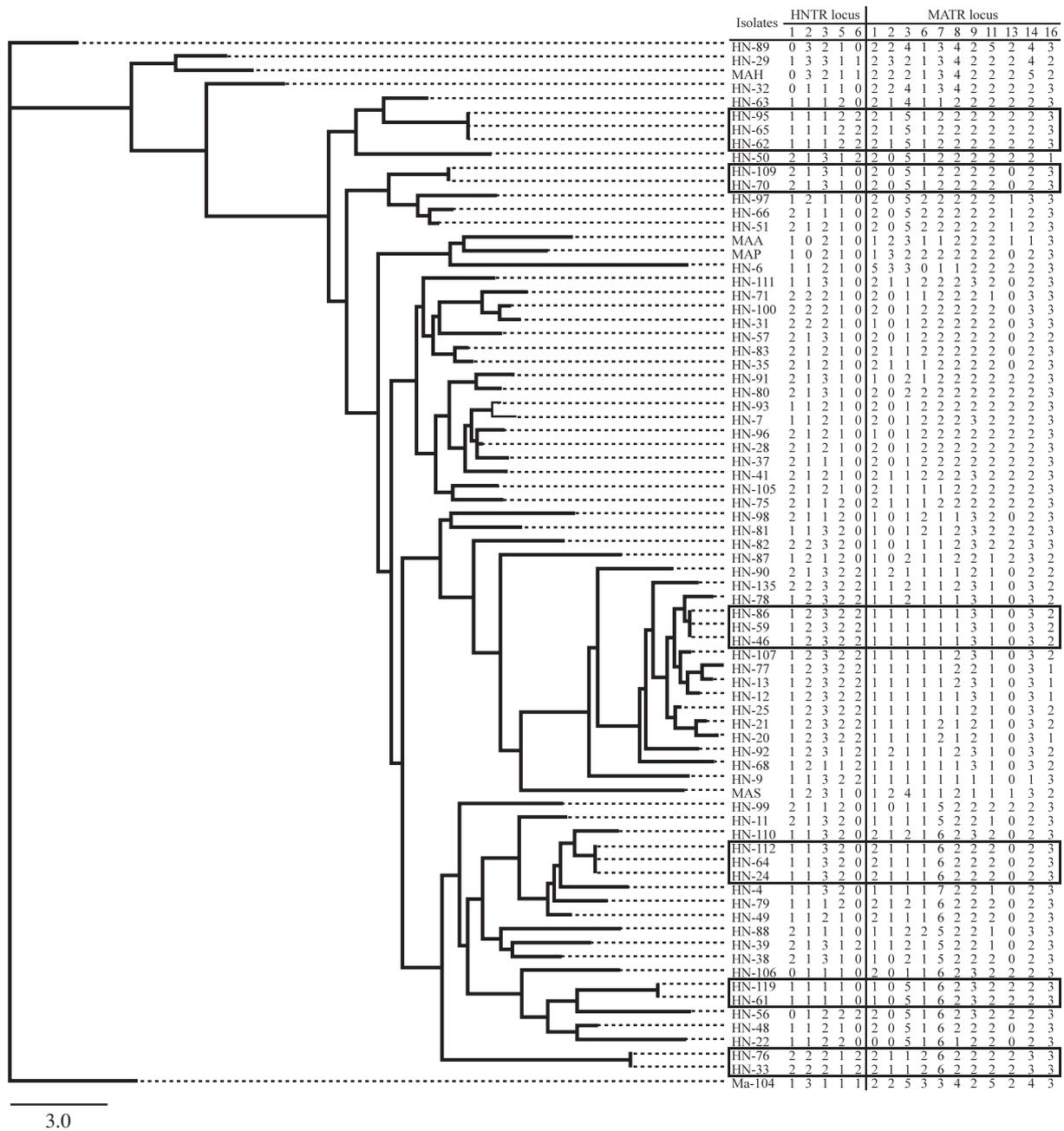


Fig. 2 Dendrogram and allele profiles constructed from 16 loci-VNTR typing results of *M. avium* isolates, including 71 clinical strains and reference strains. The dendrogram was created from distance matrix files by Fitch-Margoliash analysis according to 16 loci -VNTR markers. Allele profiles analyzed using 16 VNTR loci from isolates showing 100% similarity are boxed. The Manhattan distance is indicated at the bottom. MAA (*M. avium* subsp. *avium*), GTC00603; MAH (*M. avium* subsp. *hominissuis*), ATCC19978; MAS (*M. avium* subsp. *silvaticum*), ATCC49884; MAP (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*), ATCC19698; Ma-104 (*M. avium* subsp. *hominissuis*), *M. avium* strain 104.

④菌株鑑別能力 (HGDI) の検討

作成したアレルプロファイルより菌株鑑別能力を算定し、Table 5に示した。各領域を用いた解析法の菌株鑑別能力はiii)は0.980, iv)は0.995, v)は0.995であった。また、系統樹が同じであったiv)とv)は、菌株鑑別能力の値も同一であった。

考 察

本研究は、*M. avium*のゲノム解析を行い、得られたシーケンスデータから新規のVNTR領域を同定し、MATR-VNTR型別解析法のVNTR領域と組み合わせ、臨床分離*M. avium* 71検体を用いて、VNTR型別解析法をより簡便

Table 5 Discriminatory index of each VNTR typing of *M. avium* clinical isolates^b

Typing method	No. of different patterns	No. of clusters	No. of clustered isolates	No. of unique isolates	HGDI ^a
MATR-VNTR	56	8	22	49	0.992
HNTR-VNTR	28	12	57	14	0.953
7 loci-VNTR	52	10	29	42	0.980
16 loci-VNTR	62	6	15	56	0.995
MATR-VNTR plus HNTR-VNTR	62	6	15	56	0.995

^aCalculated as described by Hunter and Gaston¹⁰⁾

^bThere was a total of 71 clinical isolates tested.

で迅速な解析方法に発展させ、検査の効率性をさらに高める検討を行った。

*M. avium*の分子疫学的解析法は、MATR-VNTR型別解析法が最も優れている解析法であるとInagakiら⁴⁾によって報告されているが、MATR-VNTR型別解析法で鑑別できずIS1245-RFLP型別解析法によって鑑別できる菌株も存在するため、より詳細な解析を行う場合にはIS1245-RFLP型別解析法を併用する必要がある⁴⁾。さらに*M. avium*のMATR-VNTR型別解析法とMIRU-VNTR型別解析法を組み合わせることで菌株鑑別能力が向上したこともInagakiら⁴⁾は報告しており、*M. avium*の新たなVNTR領域が同定できれば、VNTR型別解析法のみでの解析が可能になることも述べられている。

結核菌のVNTR型別解析法は*M. avium*に比べ、より多くの研究がなされており、Frothingham¹⁴⁾、Goyal¹⁵⁾、Hermans¹⁶⁾、Namwat¹⁷⁾、Supply¹⁸⁾らの様々な報告がある。中でも国際標準法として使用されているのはSupplyら¹⁹⁾が報告したSupply's 15 (24)-MIRU-VNTR型別解析法であり、これまで国際標準法として使用されていたclassical MIRU-VNTR型別解析法²⁰⁾よりも菌株鑑別能力が向上し、必要に応じてより詳細な解析も可能となってきた。以上のように、結核菌でのVNTR型別解析法の最適化の経緯を鑑みると、*M. avium*のVNTR型別解析法においても、有用性が低い領域があると考えられ、解析に使用するVNTR領域を最適化する必要が示唆された。

本研究では、新たなVNTR領域が6領域（HNTR領域）同定され、そのうち5領域で多様性が確認された。また、これら5つのHNTR領域とMATR領域を組み合わせ、多様性指数値で順位付けした。数値が0.5以上をHigh、0.3~0.5をModerate、0.3未満をLowのように3段階に区分し、Highである7領域とModerate以上である16領域を使用して系統樹を作成するとともに菌株鑑別能力を算定した。分子疫学的解析法は、遺伝学的に関連のある菌株をタイピングする場合、菌株鑑別能力が0.95以上であれば使用できるとされており¹⁰⁾、Highである7領域での菌株鑑別能力は0.980であったので*M. avium*の鑑別に十分な解析法であると考えられた。また、MATR-VNTR型

別解析法は多様性の低い領域も含め15領域を使用するのに対し、本解析では半分以下の7領域で解析が行えるので、より簡便で迅速な方法である。したがって、労力や経費を極力抑えることが可能な解析方法であり、臨床にも導入しやすいことが考えられた。しかし、この7領域を用いた解析の問題点はMATR-VNTR型別解析法に比べ、わずかながら菌株鑑別能力が低いことである。この問題を解決するためにModerate以上に属した16領域の解析を行ったところ、その菌株鑑別能力は0.995であった。この値はMATR-VNTR型別解析法の菌株鑑別能力よりも高く、より有用性が高いことが示唆された。この結果から、迅速かつ簡便さを求める場合には7領域を用いた解析を行い、より詳細な解析を行う場合は16領域を使用することが望ましいと考えられた。

今回の解析において、多様性の特に低かった領域（MATR-4, 5, 12, 15）に関しては、HNTR領域とMATR領域の合計20領域を使用した解析での菌株鑑別能力が0.995であったこと、そして、これらの20領域からMATR領域の多様性指数が低い4領域（MATR-4, 5, 12, 15）を除外した16領域での菌株鑑別能力は同様に0.995であり、系統樹も同一であったことから、MATR-4, 5, 12, 15の4領域はHNTR領域よりも有用性が低く、VNTR型別解析を迅速かつ簡便に行う際には解析から除外できると考えられた。

*M. avium*のVNTR型別解析法については、Bull¹¹⁾、Overduin¹²⁾、Romano¹³⁾らにより新たなVNTR領域が報告されている。しかし、これらのVNTR型別解析法ではPCRの温度条件やサイクル数がMATR-VNTR型別解析法とは異なるという問題がある。この値が異なることで、各VNTR領域を組み合わせ、解像度の向上を図ろうとすると領域ごとにPCR条件を変更する必要があり、サーマルサイクラーを稼動する回数が増え、解析により多くの時間が必要となる。それに対し、本研究で同定したすべてのHNTR領域はPCRの温度条件、サイクル数が西森ら³⁾の方法と同一条件で増幅可能であるため、HNTR領域をMATR-VNTR型別解析法に組み込んでも、解析にかかる時間は余分にかからず高効率な解析が可能であることが考えら

れた。

以上の結果より、*M. avium*の新たに同定されたVNTR領域であるHNTR領域をMATR-VNTR型別解析法に組み合わせることで、より優れた菌株鑑別能力を示したことからHNTR領域の有用性が示されるとともに、多様性の低いMATR領域は解析から除外できると考えられた。さらに、迅速かつ簡便に解析を行う場合には多様性指数の高い7領域を、より詳細に解析を行う時には16領域を使用した解析を行うことで、より有用性の高いVNTR型別解析が可能となることが考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、野崎慎二先生をはじめとする独立行政法人国立病院機構東名古屋病院臨床検査科の皆様にご多大なご協力を頂きました。心より感謝いたします。

文 献

- 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.
- Thibault VC, Grayon M, Boschirola 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.
- 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及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.
- Inagaki T, Nishimori K, Yagi T, et al.: Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 2156–2164.
- Braden CR, Crawford JT, Schable BA: Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1210–1215.
- Bauer J, Andersen AB, Kremer K, et al.: Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 2602–2606.
- Bannantine JP, Baechler E, Zhang Q, et al.: Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1303–1310.
- Zerbino DR, Birney E: Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 2008; 18: 821–829.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, et al.: Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol.* 1986; 51: 873–884.
- Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 2465–2466.
- Bull TJ, Sidi-Boumedine K, McMinn EJ, et al.: Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes.* 2003; 17: 157–164.
- Overduin P, Schouls L, Roholl P, et al.: Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5022–5028.
- Romano MI, Amadio A, Bigi F, et al.: Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol.* 2005; 110: 221–237.
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998; 144: 1189–1196.
- Goyal M, Young D, Zhang Y, et al.: PCR amplification of variable sequence upstream of *katG* gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 3070–3071.
- Hermans PW, van Soolingen D, van Embden JD: 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.
- Namwat W, Luangsuk P, Palittapongpim P: The genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Thailand studied by amplification of DNA segments containing direct repetitive sequences. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 153–159.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000; 36: 762–771.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4498–4510.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, et al.: Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3563–3571.

Original Article

IDENTIFICATION OF NOVEL VARIABLE NUMBER TANDEM REPEAT (VNTR) LOCI IN *MYCOBACTERIUM AVIUM* AND DEVELOPMENT OF AN EFFECTIVE MEANS OF VNTR TYPING

^{1,3}Kazuhiro KUROKAWA, ³Kei-ichi UCHIYA, ⁴Tetsuya YAGI, ^{1,5}Hiroyasu TAKAHASHI, ^{1,3}Masaki NIIMI, ^{1,6}Kazuya ICHIKAWA, ^{1,3,7}Takayuki INAGAKI, ^{1,3,8}Makoto MORIYAMA, ³Toshiaki NIKAI, ²Yuta HAYASHI, ^{1,2}Taku NAKAGAWA, and ^{1,2}Kenji OGAWA

Abstract [Introduction] To make more effective use of variable number tandem repeat (VNTR) typing, we identified novel VNTR loci in *Mycobacterium avium* and used them for modified *M. avium* tandem repeat-VNTR (MATR-VNTR) typing.

[Method] Analysis of a DNA sample extracted from a clinical isolate (strain HN135) with the FLX system[®] genome sequencer (Roche Diagnostic System) led to discovery of several novel VNTR loci. The allelic diversity of the novel VNTR loci was evaluated for 71 clinical isolates and compared with the diversity of the MATR-VNTR loci. To improve efficacy of MATR-VNTR typing, we tested typing using 2 sets of loci selected from the newly identified loci and the MATR loci, i.e., one set containing 7 and another 16 loci. Hunter Gaston's discriminatory index (HGDI) was calculated for these sets.

[Results] Six VNTR loci were newly identified, of which 5 showed a high diversity. The HGDI was 0.980 for the improved new typing using a set of 7 loci, and 0.995 for another set of 16 loci, while it was 0.992 for the conventional MATR-VNTR typing.

[Discussion] VNTR typing with the set of the 7 loci enabled a rapid analysis, and another set of 16 loci enabled a precise analysis, as compared with conventional MATR-VNTR typing. A method that uses only VNTR loci with relatively high

allelic diversity is considered to be a useful tool for VNTR typing of MAC isolates.

Key words: *Mycobacterium avium*, Variable Number Tandem Repeat (VNTR), Molecular epidemiology, Optimization, Genome analysis

¹Department of Clinical Research, and ²Pulmonary Medicine, National Hospital Organization (NHO) Higashinagoya National Hospital, ³Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University, ⁴Department of Infectious Diseases, Center of National University Hospital for Infection Control, Nagoya University Hospital, ⁵Department of Pharmacy, Kainan Hospital Aichi Prefectural Welfare Federation of Agricultural Cooperatives, ⁶Department of Pharmacy, National University Hospital, Nagoya University Hospital, ⁷Department of Pharmacy, Japanese Red Cross Takayama Hospital, ⁸Department of Pharmacy, NHO Nagoya Medical Center

Correspondence to: Kei-ichi Uchiya, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya-shi, Aichi 468-8503 Japan. (E-mail : kuchiya@meijo-u.ac.jp)