

rpoB 遺伝子と 16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み

鹿住 祐子 前田 伸司 菅原 勇

要旨：〔目的〕抗酸菌の同定に *rpoB* 遺伝子シーケンスを利用できるか評価を行うために 16S rRNA シークエンス (RIDOM) と比較し、さらにこの 2 つの方法を使い分けて DDH 法にて菌種不明であった 38 臨床分離株を同定した。〔対象および方法〕ATCC 標準菌株を中心とした抗酸菌 (106 株) と *Nocardia* 属, *Rhodococcus* 属, *Gordona* 属合わせて計 112 株を用いて, *rpoB* 遺伝子シーケンスと 16S rRNA シークエンスを行った。そして DDH 法不明菌 38 臨床分離株のシーケンス結果を 2 つの方法のデータベースで相同性を調べ、菌種を決定した。〔結果・考察〕研究対象となった 112 株のうち 16S rRNA シークエンス (RIDOM) では 69.6%, *rpoB* 遺伝子シーケンスでは 89.3% が同定可能であった。16S rRNA シークエンス (RIDOM) では同定できない *M. kansasii* など 11 菌種を *rpoB* 遺伝子データベースでは分けることが可能であったが、2 つのシーケンスを用いても *M. tuberculosis* など 12 菌種を分けることができなかった。DDH 法不明菌種の 38 株は *M. heckeshornense*, *M. branderi* など 21 菌種として同定され、両方の方法を組み合わせることによって 97.4% が同定可能であった。

キーワード：抗酸菌の同定, 16S rRNA, シークエンス, RIDOM, *rpoB* 遺伝子, DDH 法判定不能菌

はじめに

抗酸菌の同定は従来の生化学的・生物学的な方法 (以下、従来法) だけでは困難になってきている。近年、遺伝子を用いた方法が抗酸菌の研究に取り入れられるようになり¹⁾、抗酸菌は現在 100 種類以上同定でき、その威力を発揮している。同定方法として 16S rRNA の塩基配列の相同性を調べる方法²⁾、ミコール酸を分析する高速液体クロマトグラフィ (HPLC)³⁾、PCR 産物を制限酵素で切断して電気泳動する *hsp 65* (65-kDa heat shock protein) パターン解析⁴⁾、日本の一般の病院検査室や検査センターなどでは 16S リボソーム RNA の塩基配列の違いを利用した AccuProbe 法⁵⁾、基準株の DNA と被検株の DNA をハイブリダイゼーションし、相対類似度によって菌種を決定する DDH マイコバクテリア極東⁶⁾ (以下 DDH 法とする)、目的とする菌種 (例えば結核菌群) の DNA を PCR 後に同定するアンプリコアマイコバクテリウム⁷⁾、被検株の RNA を逆転写酵素で DNA にして同定する *Mycobacterium tuberculosis* Direct test (MTD)⁸⁾ などの遺

伝子検査、培養菌が得られれば結核菌群であるかどうかの判定が 15 分でできる免疫クロマトグラフィ法のキャピリア TB⁹⁾ などが行われている。それぞれの方法には特徴があり、時間も従来法よりはるかに短縮されるようになった。しかしながら、抗酸菌にはこれらの方法を用いても同定できない菌種がなお多く存在する。今回われわれは一般的に広く使われている 16S rRNA シークエンスの RIDOM データベースによる解析と DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子¹⁰⁾⁻¹⁴⁾ のデータベースの利点を生かし、より精度の高い抗酸菌の同定を試みた。

材料と方法

使用菌株：American Type Culture Collection (ATCC) 96 菌種 104 株, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) 2 菌種 4 株, *Mycobacterium gordonae* グループ別臨床分離株 3 株, *M. leprae* 1 株, 計 112 株 (標準菌株：Type strain は 99 株) を 1% 小川培地に発育させて研究材料とした。ただし、1% 小川培地に発

Table 1 Mycobacteria and other organisms used for the 16S rRNA and *rpoB* sequence database in this study

Species	Strain	Species	Strain
1. <i>M. abscessus</i>	ATCC19977	57. <i>M. komossense</i>	ATCC33013
2. <i>M. acapulcensis</i>	ATCC14473	58. <i>M. kubicae</i>	ATCC700732
3. <i>M. africanum</i>	ATCC25420	59. <i>M. lactis</i>	ATCC27356
4. <i>M. agri</i>	ATCC27406	60. <i>M. lentiflavum</i>	ATCC51985
5. <i>M. aichiense</i>	ATCC27280	61. <i>M. leprae</i>	Thai53*
6. <i>M. alvei</i>	ATCC51304	62. <i>M. madagascariense</i>	ATCC49865
7. <i>M. asiaticum</i>	ATCC25276	63. <i>M. mageritense</i>	ATCC700351
8. <i>M. aurum</i>	ATCC23366	64. <i>M. malmoense</i>	ATCC29571
9. <i>M. austroafricanum</i>	ATCC33464	65. <i>M. marinum</i>	ATCC927
10. <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC25291	66. <i>M. microti</i>	ATCC19422
11. <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC19698	67. <i>M. montefiorensis</i>	ATCCBAA-256
12. <i>M. avium</i> subsp. " <i>suis</i> "	ATCC19978*	68. <i>M. moriokaense</i>	ATCC43059
13. <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	ATCC49884	69. <i>M. mucogenicum</i>	ATCC49650
14. <i>M. botniense</i>	ATCC700701	70. <i>M. neoaurum</i>	ATCC25795
15. <i>M. bovis</i>	ATCC19210	71. <i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC19530
16. <i>M. branderi</i>	ATCC51789	72. <i>M. novium</i>	ATCC19619*
17. <i>M. brumae</i>	ATCC51384	73. <i>M. obuense</i>	ATCC27023
18. <i>M. celatum</i>	ATCC51131	74. <i>M. paraffinicum</i>	ATCC12670*
19. <i>M. celatum</i> II	ATCC51130*	75. <i>M. parafortuitum</i>	ATCC19686
20. <i>M. chelonae</i> chemovar <i>niacinogenes</i>	ATCC35750*	76. <i>M. peregrinum</i>	ATCC14467
21. <i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	ATCC35752	77. <i>M. petroleophilum</i>	ATCC21497
22. <i>M. chitae</i>	ATCC19627	78. <i>M. phlei</i>	ATCC11758
23. <i>M. chlorophenolicum</i>	ATCC49826	79. <i>M. porcinum</i>	ATCC33776
24. <i>M. chubuense</i>	ATCC27278	80. <i>M. poriferae</i>	ATCC35087
25. <i>M. confluentis</i>	ATCC49920	81. <i>M. pulveris</i>	ATCC35154
26. <i>M. conspicuum</i>	ATCC700090	82. <i>M. rhodesiae</i>	ATCC27024
27. <i>M. cookii</i>	ATCC49103	83. <i>M. scrofulaceum</i>	ATCC19981
28. <i>M. diernhoferi</i>	ATCC19340	84. <i>M. senegalense</i>	ATCC35796
29. <i>M. duvalii</i>	ATCC43910	85. <i>M. septicum</i>	ATCC700731
30. <i>M. engbaekii</i>	ATCC27353	86. <i>M. shimoidei</i>	ATCC27962
31. <i>M. fallax</i>	ATCC35219	87. <i>M. shinshuense</i>	ATCC33728
32. <i>M. farcinogenes</i>	ATCC35753	88. <i>M. simiae</i>	ATCC25275
33. <i>M. flavescens</i>	ATCC14474	89. <i>M. smegmatis</i>	ATCC19420
34. <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	ATCC35931	90. <i>M. smegmatis</i>	ATCC700084*
35. <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	ATCC6841	91. <i>M. sphagni</i>	ATCC33027
36. <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	ATCC49403	92. <i>M. szulgai</i>	ATCC35799
37. <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	ATCC49404	93. <i>M. terrae</i>	ATCC15755
38. <i>M. gadium</i>	ATCC27726	94. <i>M. terrae</i>	DSM43540*
39. <i>M. gallinarum</i>	ATCC19710*	95. <i>M. terrae</i>	DSM43541*
40. <i>M. gastri</i>	ATCC15754	96. <i>M. terrae</i>	DSM43542*
41. <i>M. genavense</i>	ATCC51233	97. <i>M. thermoresistibile</i>	ATCC19527
42. <i>M. gilvum</i>	ATCC43909	98. <i>M. tokaiense</i>	ATCC27282
43. <i>M. goodii</i>	ATCC700504	99. <i>M. triplex</i>	ATCC700071
44. <i>M. gordonae</i>	ATCC14470	100. <i>M. triviale</i>	ATCC23292
45. <i>M. gordonae</i> group B**	KK33-08*	101. <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC27294
46. <i>M. gordonae</i> group C**	KK33-53*	102. <i>M. ulcerans</i>	ATCC19423
47. <i>M. gordonae</i> group D**	KK33-46*	103. <i>M. vaccae</i>	ATCC15483
48. <i>M. haemophilum</i>	ATCC29548	104. <i>M. valentiae</i>	ATCC29356
49. <i>M. hassiacum</i>	ATCC700660	105. <i>M. wolinskyi</i>	ATCC700010
50. <i>M. heckeshornense</i>	DSM44428	106. <i>M. xenopi</i>	ATCC19250
51. <i>M. heidelbergense</i>	ATCC51253	107. <i>Nocardia asteroides</i>	ATCC19247
52. <i>M. hiberniae</i>	ATCC49874	108. <i>Rhodococcus equi</i>	ATCC6939
53. <i>M. interjectum</i>	ATCC51457	109. <i>Gordona aichiensis</i>	ATCC33611
54. <i>M. intermedium</i>	ATCC51848	110. <i>Gordona aurantiaca</i>	ATCC25938
55. <i>M. intracellulare</i>	ATCC13950	111. <i>Gordona bronchialis</i>	ATCC25592
56. <i>M. kansasii</i>	ATCC12478	112. <i>Gordona terrae</i>	ATCC25594

*These are not type strains.

**Refer to ref.16).

育困難な菌株は Middlebrook 7H9 液体培地にて培養し、*M. leprae* は DNA 抽出液を供与されたためこれを用いた。Table 1 に用いた菌種の内訳を示した。

(1) DNA の抽出

1.5 ml 用のビーズ入りプラスチックチューブに、10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 600 μ l を入れ、小川培地発育菌の1白金耳を加え、液体培地発育菌は遠心沈殿した後の沈渣を加え、95 $^{\circ}$ C、10分間加温した。これに600 μ l のフェノール・クロロホルム等量混合液を加え、80秒間攪拌した。さらに4,200 rpm 5分間遠心沈殿。上清500 μ l をとって別の容器に移し、クロロホルム500 μ l 加えて混和、3,000 rpm 5分間遠心沈殿。上清を360 μ l 別の容器に移し、クロロホルム360 μ l 加え、10,000 rpm 10分間遠心沈殿。上清250 μ l にエタノール500 μ l 加え、-80 $^{\circ}$ Cにて20分間静置。10,000 rpm 10分間遠心沈殿。エタノールを捨て、風乾し、TE 100 μ l に浮遊させて DNA 抽出液として使用した。

(2) 16S rRNA シークエンス・RIDOM データベース解析¹⁹⁾

16S rRNA 遺伝子は染色体 DNA の 1/1,000 程度で、全長が約 1,500 bp ほどあり、今回シークエンスを調査したのはこのうちの 446 bp である。

DNA 抽出液のゲノム DNA 2.5 μ l を用いて PCR の反応を行った。PCR 反応には 10 倍 Buffer 5 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, 滅菌蒸留水 38 μ l, Ampli Taq Gold (Roche Diagnostics, 東京) 0.5 μ l (2.5 units), プライマー 2 μ l を混和して反応溶液とした。増幅にはプライマー 264 (5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA -3') およびプライマー 285 (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') を各々 0.1 nmol 使用した⁴⁾。PCR 反応条件は、94 $^{\circ}$ C 30秒間、60 $^{\circ}$ C 30秒間、72 $^{\circ}$ C 1分30秒間を 40 サイクル行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて確認後、精製はスピンカラム (SUPREC TM-02, TAKARA, TAKARA SHUZO Co., LTD) を用いた。ダイレクトシークエンスは Big Dye terminator (ABI 4303153 Big Dye Terminator cycle Fs Ready Reaction Kit 1,000) 4 μ l, 3.2 pmol プライマー 285 を 2 μ l, 5 \times Buffer 2 μ l, 滅菌蒸留水 11 μ l, 精製された PCR 産物 1 μ l を混和し、添付のプロトコールどおりに行い、ABI 310 にて実施し、得られた塩基配列データは Ribosomal Differentiation of Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom-rdna.de/>) にて相同性を調べ、98% 以上の一致をもって、その菌種として同定した。

(3) *rpoB* 遺伝子シークエンス・*rpoB* 遺伝子データベース解析

M. tuberculosis の *rpoB* 遺伝子は全長が 3,519 bp あり、RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードしている。この多型性を抗酸菌の同定に利用した。Kim らの報告^{13) 14)}

による *rpoB* 遺伝子上のアミノ酸で 444 から 454 番目 (大腸菌での番号) の Highly conserved regions (HCR) 5 領域内にプライマー P1, 547 から 577 番目の HCR 6 領域内にプライマー P2 を設計し、306 bp のシークエンスの決定を行った。

PCR 反応溶液は 16S rRNA シークエンスの方法に準じた。*rpoB* の増幅¹³⁾にはプライマー P1 (5'-CGA CCA CTT CGG CAA CCG-3') およびプライマー P2 (5'-TCG ATC GGG CAC ATC CGG-3') を各々 3.2 pmol 使用した。PCR 反応条件は、94 $^{\circ}$ C 1分間、66 $^{\circ}$ C 1分間、72 $^{\circ}$ C 1分間を 40 サイクル行った。PCR 産物を確認後、精製はスピンカラムを用い、ダイレクトシークエンスはプライマー P1 と P2 それぞれを Big Dye terminator を用いて ABI 310 にて実施した。*rpoB* 遺伝子シークエンスについては GENETYX-WIN Ver.5.2 (Software Development 社) にて当研究所にて作成した *rpoB* 遺伝子データベースを使用し、GENETYX-PDB Ver.4.1 (Software Development 社) で相同性を調べ、99% 以上の塩基配列の一致をもって菌種を同定した。

(4) DDH 法⁸⁾

市販キットの使用説明書 (DDH マイコバクテリア '極東': 極東製薬) に従って行った。フェノール・クロロホルム試薬キットによって DNA を抽出し、ビオチンで標識、1本鎖にした後、これを予めマイクロプレートに固定されている以下の 18 菌種の基準株と 2 時間ハイブリダイゼーションを行った。固定されている菌種は、*M. tuberculosis* complex (結核菌群: BCG), *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum*, *M. goodii*, *M. szulgai*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gastri*, *M. xenopi*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. peregrinum* である。洗浄を繰り返し、発色試薬を加え、630 nm で吸光度を測定した。1番強く発色したウエルと 2番目に強く発色したウエルの吸光度の相対類似度が 70% 以下であるとき、1番強く発色したウエルの基準株と被検株が同じ菌種であると判定し、18 菌種のうちの 1 つの菌名に決定した。なお、このとき、1番強く発色したウエルの吸光度と対照ウエル (大腸菌の DNA) の吸光度の差が 1.9 倍なければならない。技術的誤りがなく、以上 2 つの条件を満たさない場合、DDH 法判定不能菌と判定した。

結 果

(1) 16S rRNA シークエンス・RIDOM データベース解析の結果

Table 1 の 112 株のうち RIDOM データベースでは *M. kansasii* と *M. gastri* のように 100% 一致するため分けられなかった株を Table 2 と Table 3 に示した。

Table 2 Comparison of homology by 16S rRNA and *rpoB* sequencing

16S rRNA sequencing (RIDOM)		<i>rpoB</i> sequencing
Homology		Homology
100% <i>M. kansasii</i> and <i>M. gastri</i>	→	100% <i>M. kansasii</i> vs 93.8% <i>M. gastri</i>
100% <i>M. abscessus</i> and <i>M. chelonae</i>	→	100% <i>M. abscessus</i> vs 97.1% <i>M. chelonae</i>
100% <i>M. fortuitum</i> ATCC49404 and <i>M. porcinum</i>	→	100% <i>M. fortuitum</i> ATCC49404 vs 96% > <i>M. porcinum</i>
100% <i>M. peregrinum</i> and <i>M. septicum</i>	→	100% <i>M. peregrinum</i> vs 97.4% <i>M. septicum</i>
100% <i>M. farcinogenes</i> , <i>M. senegalense</i> and <i>M. fortuitum</i> ATCC49403	→	100% <i>M. farcinogenes</i> vs 94% > <i>M. senegalense</i> 98% <i>M. fortuitum</i> ATCC49403

Table 3 List of unidentified strains by 16S rRNA and *rpoB* sequencing

100% same Homology
1. <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> and <i>M. microti</i>
2. <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> , <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> , <i>M. avium</i> subsp. " <i>suis</i> " and <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
3. <i>M. marinum</i> and <i>M. ulcerans</i>
4. <i>M. fortuitum</i> (ATCC6841) and <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>

Table 2はRIDOMデータベースによって解析できなかったが *rpoB* 遺伝子データベースにおいて菌種決定可能であった株で、Table 3はRIDOMデータベースと *rpoB* 遺伝子データベースの両方を用いても分けることのできない4つのグループである。Table 2と3のRIDOMの結果はTurenneら³⁾と同じであった。さらに *M. celatum* II (ATCC51130), *M. chelonae* chemovar *niacinogenes*, *M. montefiorensis*, *M. lactis*, *M. novium* はRIDOMデータベースに登録されていないためこれらを同定することはできなかった。*N. asteroides*, *R. equi*, *G. aichiensis*, *G. aurantiaca*, *G. bronchialis*, *G. terrae* は抗酸菌ではないためPCRでDNA産物が生成されなかった。

従ってTable 1の112株のうち、相同性が100%一致しているため分けられない23株 (Table 2と3) とRIDOMに登録されていない5株、そして抗酸菌ではない6株計34株が同定できなかったため、同定可能な株はTable 1に記載されている菌株の69.6%であった。

(2) *rpoB* 遺伝子シーケンス・*rpoB* 遺伝子データベース解析の結果

RIDOMデータベースでは同定できないTable 2の11株と抗酸菌ではない6株を *rpoB* 遺伝子データベースで分けることができた。しかしながら、Table 3の12株については分けることはできなかったため、Table 1の112株のうち *rpoB* 遺伝子データベースで分けることが可能であったのは89.3%であった。

(3) DDH法により判定不能であった臨床分離株の同定

これら2つのシーケンスを決定する方法を用いたDDH法判定不能の38臨床分離株の同定結果をTable 4に示した。Table 4のRIDOMデータベースの結果は相同性が98%以上、*rpoB* 遺伝子データベースにおいては99%

以上の菌種を示した。

以前、われわれは *rpoB* 遺伝子シーケンスを用いて *M. gordonae* を4つのグループに分けた¹⁶⁾。今回の *M. gordonae* 5株 (No. 60, 330, 353, 469, 528) はRIDOMデータベースで *M. gordonae* と同定したが、*rpoB* 遺伝子シーケンスを用いた方法ではATCC14470 (ATCC Type Strain) と一致せず、Bグループ1株、Cグループ2株、Dグループ2株であった。

No.728はRIDOMデータベースによって *M. malmoense* と *M. szulgai* が候補となったが、*rpoB* 遺伝子データベースでは99.7% *M. malmoense* で *M. szulgai* との相同性は90.5%となり *M. szulgai* は除外された。No.600はRIDOMデータベースでは *M. porcinum* (ATCC33776) と *M. fortuitum* (ATCC49404) の両方と99.76%の塩基配列が一致し、相同性が100%であったため決定できなかった。しかし、*rpoB* 遺伝子データベースにおいて *M. fortuitum* (ATCC 49404) との一致率は94.12%と低く、*M. fortuitum* は除かれた。

しかし、RIDOMデータベースによって同定可能であったが、*rpoB* 遺伝子データベースにおいて不明となった例があった。No. 660はRIDOMデータベースによって99.7% *M. terrae* と同定されたが、*rpoB* 遺伝子データベースではATCC15755 (ATCC Type Strain: *M. terrae*) とは96.1%であった。Table 5にNo. 660とATCC15755の塩基配列の比較を示した。No. 660 (上段) とATCC15755 (下段) には12カ所の塩基配列に違いがあり、306塩基のうち一致した数が294塩基 (96.1%) であったため不一致と判断した。そして他にもこの株と99%以上一致した菌種がなく、菌種不明となった。

RIDOMデータベースにおいて該当なしとなった1株 (No. 481)、抗酸菌ではなかったためPCRできなかった

Table 4 Candidate mycobacteria determined by DNA sequencing analyses of the 16S rRNA gene and *rpoB* in unidentified ones with DDH method.

Strains	16S rRNA (more than 98%)	<i>rpoB</i> (more than 99%)
808	<i>M. branderi</i> (99.53)	<i>M. branderi</i> (100)
481	None	<i>M. celatum</i> II (99.7)
374	<i>M. chelonae</i> and <i>M. abscessus</i> (100)	<i>M. chelonae</i> chemovar <i>niacinogenes</i> (100)
405	<i>M. chelonae</i> and <i>M. abscessus</i> (100)	<i>M. chelonae</i> chemovar <i>niacinogenes</i> (100)
211	<i>M. conspicuum</i> (100)/ <i>M. szulgai</i> (98.1)	<i>M. conspicuum</i> (100)
661	<i>M. conspicuum</i> (100)	<i>M. conspicuum</i> (100)
521	<i>M. engbaekii</i> , <i>M. hiberniae</i> and <i>M. lactis</i> (99.73)/ <i>M. terrae</i> (98.55)	<i>M. hiberniae</i> and <i>M. lactis</i> (99.3)/ <i>M. engbaekii</i> (99.0)
353	<i>M. gordonae</i> (99.77)	<i>M. gordonae</i> B-group (99.7)
469	<i>M. gordonae</i> (100)	<i>M. gordonae</i> C-group (99.7)
528	<i>M. gordonae</i> (100)	<i>M. gordonae</i> C-group (99.7)
60	<i>M. gordonae</i> (99.32)	<i>M. gordonae</i> D-group (99.7)
330	<i>M. gordonae</i> (100)	<i>M. gordonae</i> D-group (99.7)
50	<i>M. heckeshornense</i> (100)	<i>M. heckeshornense</i> (99.7)
759	<i>M. heckeshornense</i> (100)	<i>M. heckeshornense</i> (100)
727	<i>M. intermedium</i> (99.77)	<i>M. intermedium</i> (99.7)
718	<i>M. lentiflavum</i> (100)/ <i>M. simiae</i> (98.79)	<i>M. lentiflavum</i> (100)
739	<i>M. lentiflavum</i> (99.76)/ <i>M. simiae</i> (98.56)	<i>M. lentiflavum</i> (99.4)
902	<i>M. lentiflavum</i> (100)/ <i>M. simiae</i> (98.77)	<i>M. lentiflavum</i> (100)
667	<i>M. mageritense</i> (99.08)	<i>M. mageritense</i> (99.7)
686	<i>M. mageritense</i> (99.52)/ <i>M. wolinskyi</i> (98.07)	<i>M. mageritense</i> (100)
396	<i>M. malmoense</i> (98.64)	<i>M. malmoense</i> (100)
728	<i>M. malmoense</i> (99.47)/ <i>M. szulgai</i> (99.21)	<i>M. malmoense</i> (99.7)
242	<i>M. mucogenicum</i> (100)/ <i>M. farcinogenes</i> (99.52)	<i>M. mucogenicum</i> (99.3)
277	<i>M. mucogenicum</i> (99.03)/ <i>M. farcinogenes</i> (98.54)	<i>M. mucogenicum</i> (99.7)
298	<i>M. mucogenicum</i> (98.83)/ <i>M. farcinogenes</i> (98.36)	<i>M. mucogenicum</i> (99.0)
692	<i>M. mucogenicum</i> (99.73)/ <i>M. farcinogenes</i> (98.32)	<i>M. mucogenicum</i> (99.0)
221	<i>M. neoaurum</i> (100)/ <i>M. lacticola</i> (99.79)	<i>M. neoaurum</i> (99.3)
229	<i>M. neoaurum</i> (100)/ <i>M. lacticola</i> (99.79)	<i>M. neoaurum</i> (99.3)
55	<i>M. paraffinicum</i> (99.77)/ <i>M. scrofulaceum</i> (99.40)	<i>M. paraffinicum</i> (99.7)
600	<i>M. porcinum</i> and <i>M. fortuitum</i> (99.76)	<i>M. porcinum</i> (99.7)
85	None	<i>Gordona aichiensis</i> (99.7)
538	<i>M. shimoidei</i> (100)	<i>M. shimoidei</i> (100)
312	<i>M. szulgai</i> (98.90)	<i>M. szulgai</i> (99.7)
660	<i>M. terrae</i> (99.70)	None*
394	<i>M. triplex</i> (100)/ <i>M. genavense</i> (99.01)	<i>M. triplex</i> (99.7)
431	<i>M. triplex</i> (100)/ <i>M. genavense</i> (98.77)	<i>M. triplex</i> (99.7)
482	<i>M. triplex</i> (99.3)/ <i>M. genavense</i> (98.37)	<i>M. triplex</i> (99.3)
520	<i>M. wolinskyi</i> (100)	<i>M. wolinskyi</i> (99.3)

(%) Similarity

*See to Table 5

Table 5 Comparison of *rpoB* gene sequences between a clinical isolate and *M. terrae* type strain

```

Query: 1  TGC GCAC CCGT GGG C GAG CTG ATCC AGA ACC AGATCC GGG TCG GG C TGTCCC GGATGG AGC 60
Sbjct: 1  TGC GCAC CCGT GGG C GAG CTG ATCC AGA ACC AGATCC GGG TCG GG T TGTCCC GGATGG AGC 60
Query: 61  GCG TGG TCC GCG AGCG GATG ACC ACC CAG GAG C TCG AGG C CATC AC GCC C CAG ACC CTGA 120
Sbjct: 61  GCG TGG TCC GCG AGCG GATG ACC ACC CAG GAG C TCG AGG C CATC AC GCC C CAG ACC CTGA 120
Query: 121 TCA ACATCC GCCC GGTGG TCG CCG CGATCA AGG AGTTC TCG GC ACC AGCC AGCTCT CCG C 180
Sbjct: 121 TCA ACATCC GCCC GGTGG TCG CCG CGATCA AGG AGTTC TCG GC ACC AGCC AGCTCT CCG C 180
Query: 181 AGTTC ATGG ACCAGA ACA ACC CGCTGT CCG GTCTG ACC CACA AGC CGCC GCTGT CCG CGC 240
Sbjct: 181 AGTTC ATGG ACCAGA ACA ACC CGCTGT CCG GTCTG ACC CACA AGC CGCC GCTGT CCG CGC 240
Query: 241 TGG G CCG GG C GGTCTGT C CCG T GAG C GGG CCG GG CTG GAG GT CCG T GAC GTGC ACC CGT 300
Sbjct: 241 TGG G CCG GG C GGTCTGT C CCG T GAG C GGG CCG GG CTG GAG GT CCG T GAC GTGC ACC CGT 300
Query: 301 CCC ACT 306
Sbjct: 301 CCC ACT 306
    
```

Query: Clinical isolate: No.660

Sbjct: *M. terrae* ATCC15755

1株 (No.85), そして相同性が同じ候補が複数あった4株 (No.374, 405, 521, 600)を除き, 今回の DDH不明菌の38株中32株 (84.2%)が同定可能であった。また *rpoB* 遺伝子データベースでは38株から該当なしとなった1株 (No.660)と相同性が同じ候補が複数あったNo.521を除いた36株 (94.7%)が同定可能であった。そしてRIDOMデータベースと *rpoB* 遺伝子データベースの両方, またはいずれかで同定できたのは97.4%であった。

考 察

RIDOMデータベースで検索できる抗酸菌は154株 (109種類)と抗酸菌の多くを同定することができ, インターネットで誰でもアクセスできるため世界に広がっている。遺伝子検査の利点として, ①従来法による同定試験では数カ月を要した。しかし, シークエンスを決定することによって1日~2日で検査結果を得ることができる。②従来法には大量の菌量を必要とするが *M. malmoense* のように卵培地における発育の悪い株もあり, 必要な菌量が得られないことがある。遺伝子検査の中でも特にPCRなどを利用する場合, 微量で検査が可能である。③従来法は鑑別培地への接種する菌量・判定が難しいという欠点をもつが, 遺伝子検査法は手技がマニュアル化されている。などがあげられる。

しかしながら, 従来法^{19,20}を否定することはできない。RIDOMデータベースと *rpoB* 遺伝子データベースで同定できない菌が従来法で同定可能な場合がある。例えば, *M. shinshuense* は *M. marinum*・*M. ulcerans* とは1塩基違いで非常に近く, RIDOMデータベースと *rpoB* 遺伝子データベースを用いてもこれらから明確に分けることができないが, 光発色試験・発育速度・アシルスルファターゼ試験・薬剤に対する感受性パターンなどが大切な鍵となる²⁰。また, 16S rRNA シークエンスで分けることのできない *M. kansasii* と *M. gastri* も光発色試験と硝酸還元試験が大変参考となる。しかし, 遺伝子検査と従来法の結果が一致するとは限らず [*M. chelonae* chemovar *niacinogenes* (ATCC35750) はナイアシンテスト陽性であったが, Table 4の *M. chelonae* chemovar *niacinogenes* と同定されたNo.374と405は陰性であった], 特に検出種な菌種が得られたときはコロニー形態・生物学的性状・生化学的性状・薬剤感受性試験のパターンなどを標準菌株と比較しながら確認する必要がある。

rpoB 遺伝子データベースは, ①RIDOMデータベースでは分けることのできないTable 2の菌種を同定できる。②RIDOMデータベースで複数の候補があげられた *M. lentiflavum*などを1菌種にしぼることが可能である。③ *M. celatum* II (No.481)と *M. chelonae* chemovar *niacinogenes* (No.374, 405)と抗酸菌ではない *G. aichiensis* (No. 85)

のようにRIDOMデータベースに登録されていない菌種の同定に役立つ。④以前, われわれは *M. gordonae* を *rpoB* 遺伝子シークエンスによって4つのグループに分け *M. gordonae* には遺伝学的多型性があると考えた。そして *M. terrae* にも *M. gordonae* のような多型性の可能性があると考えられ, *M. terrae* の DSM43540, DSM43541と DSM43542はRIDOMデータベースによって ATCC15755 と分けることができなかったが, *rpoB* 遺伝子シークエンスではこの4株を分けることができた。*rpoB* 遺伝子シークエンスはこのような多型性の分類に役立つと思われる。

しかし, *rpoB* 遺伝子シークエンスデータベースはNo. 221, 229の候補となった *M. lacticola* のようにRIDOMデータベースに登録されていて, 当研究所の *rpoB* 遺伝子データベースにデータのない菌種はこれによって同定することができない。今後, さらなるデータ蓄積が望まれる。

非結核性抗酸菌の病原性については不明なものも多いが, 今回の研究で菌種の判明したTable 4の菌種については, 文献²²⁾によると *M. celatum* の初めての分離は2名のHIV患者からであったが, 日和見的に病原性があると書かれる。*M. conspicuum* も免疫不全者から分離され, *M. porcinum* という菌は1983年に東村によってブタに結核のようなリンパ節炎を起こしたとして発表された。発育の速い *M. wolinskyi* は骨折後の骨髓炎に関係し, *M. szulgai* は稀にヒトに肺結核類似症を引き起こす。そして肺疾患患者から分離された *M. shimoides* もヒトに対して病原性があると考えられている。コロニーが黄色く色のつく *M. lentiflavum* は1996年に脊椎椎間板炎病巣から検出され, さらに汚染された気管支鏡の使用が原因と考えられた臨床材料からも分離され, 胃液・喀痰・尿からも得られている。*M. triplex* は肝臓移植を受けた若い女性の心臓液と腹水から検出され, そして免疫機能正常な肺疾患患者からも分離されたことがある。さらに肺感染症の原因と考えられた *M. malmoense*²³⁾ と *M. intermedium*²³⁾, 右肺の空洞病変のある患者から分離されることがある *M. branderi*²⁴⁾, 1993年にヨーロッパで右上肺葉に空洞のある30歳の女性の喀痰から検出された *M. xenopi*-like は2000年に *M. heckeshornense*²⁵⁾ として発表され, この時, 病原性があったと考えられた²⁶⁾。*M. mucogenicum* については検査室内汚染²⁷⁾とも言われるが, 免疫機能に異常のない82歳と23歳の男性の髄液から検出され, 2症例とも入院後短期間で死亡したと報告された²⁸⁾。このように稀な非結核性抗酸菌の中にも病原性をもつものが少なくなく, 特に患者側の免疫機能低下によって原因菌ともなりうる。このようなことから非結核性抗酸菌の同定は重要性を増すものと考えられる。

ま と め

結核蔓延時代には結核菌と他の抗酸菌という分け方であったが、近年は枠を超えて結核菌だけでなく非結核性抗酸菌の同定も重要性を増してきている。現在までにわれわれの研究所で所有している *rpoB* 遺伝子データベースは ATCC・DSM の Type strain (Table 1) が主であるが、今後の課題として検出の稀な菌種とこれらの方法によってもまだ菌種不明とされた株のデータの蓄積を行い、不明菌の解析に努めたい。

医療機関の実験室・検査室でこれらの方法を用いて同定を行うとき、16S rRNA・*rpoB* 遺伝子のシーケンスの決定は微量の DNA から同定することができるため非常に有用であるが、PCR を使うため、実験室内汚染 (Cross contamination) を常に考慮しなければならない。さらに 1 本の培地上に抗酸菌が複数種類混在する可能性もあり、このため検体の種類と検出回数・コロニーの形態学的特徴・分離培養時の状況も重要な情報となる。

最後に RIDOM データベースに登録されている 154 株とわれわれの *rpoB* 遺伝子データベースに登録されている 112 株の菌の種類に違いがあり、この 2 つの方法の特徴を理解したうえで利点を使い分け、従来法にて確認することで分析能力を増すことができると考えられる。

謝 辞

この研究にあたって元国立療養所中部病院 東村道男先生に 23 株、元 BCG 研究所 故工藤祐是先生に H37Rv、国立感染症研究所ハンセン病研究センター 松岡正典先生に *M. leprae* を分与して頂き深謝致します。そしてこの論文を作成するにあたりご高覧頂いた前結核予防会結核研究所基礎研究部長 阿部千代治先生に深謝致します。

文 献

- 1) Tortoli E, Bartoloni A, Bottger EC, et al.: Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 4058-4065.
- 2) Tortoli E: Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 319-354.
- 3) 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.
- 4) Springer B, Stockman L, Teschner K, et al.: Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 296-303.
- 5) Butler WR, Guthertz LS: Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of

- Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 704-726.
- 6) Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E: Identification of 54 *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2799-2806.
- 7) 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.
- 8) 江崎孝行: DNA を使った抗酸菌の迅速同定. *結核.* 1992; 67: 803-806.
- 9) 阿部千代治, 齋藤由美子, 本山禎二, 他: アンブリコアマイコバクテリウムキットの評価に関する共同研究. *結核.* 1997; 72: 181-186.
- 10) 大角光彦, 豊田丈夫, 川城丈夫, 他: 核酸 (ribosomal RNA) 増幅を利用した結核菌検出の臨床的有用性に関する検討. *結核.* 1996; 71: 700-702.
- 11) Hasegawa N, Miura T, Ishii K, et al.: New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 908-912.
- 12) Boor KJ, Duncan ML, Price CW: Genetic and transcriptional organization of the region encoding the beta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J Biol Chem.* 1995; 270: 20329-20336.
- 13) 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.
- 14) Kim BJ, Lee KH, Park BN, et al.: Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2102-2109.
- 15) Harmsen D: RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 416-417.
- 16) Itoh S, Kazumi Y, Takahashi M: 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.
- 17) Tsukamura M: A review of the methods of identification and differentiation of mycobacteria. *Rev Infect Dis.* 1981; 3: 841-861. Review.
- 18) Public health mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control, Atlanta GA 30333.
- 19) Wayne LG, Good RC, Bottger EC: Semantide and chemotaxonomy-based analyses of some problematic phenotypic clusters of slowly growing mycobacteria, a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol.* 1996; 46: 280-297.

- 20) 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.
- 21) Barbara A. Brown-Elliott, Richard J. et al.: Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 716-746.
- 22) 熊本光孝, 西山秀樹, 鹿住祐子, 他: *Mycobacterium malmoeense* による肺感染症の1例. 日本呼吸器学会雑誌. 2005; 43: 454-458.
- 23) Ito A, Kishi F, Saito N, et al.: Pulmonary *Mycobacterium intermedium* disease in an elderly man with healed pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol. 2005; 43: 1473-1474.
- 24) Sugawara I, Kazumi Y, Otomo K, et al.: *Mycobacterium branderi* Isolated from Pus of a Right Pulmonary Cavitary lesion. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2005; 58: 187-188.
- 25) 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.
- 26) 鹿住祐子, 和田雅子, 菅原 勇, 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: ページ未定.
- 27) Adekambi T, Foucault C, La Scola B, et al.: Report of two fatal cases of *Mycobacterium neoaurum* central nervous system infection in immunocompetent patients. J Clin Microbiol. 2006; 44: 837-840.

Original Article

IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA BY SEQUENCING OF *rpoB* GENE AND 16S rRNA

Yuko KAZUMI, Shinji MAEDA, and Isamu SUGAWARA

Abstract [Purpose] To classify a specific *Mycobacterium* among various mycobacteria utilizing sequencing of *rpoB* gene. To classify mycobacteria not identified by DNA-DNA hybridization (DDH) using sequencing of *rpoB* and 16S rRNA gene.

[Objects and methods] Classification of 106 *Mycobacterium* strains, one *Nocardia* strain, one *Rhodococcus* strain, four *Gordona* strains was made by using partial sequencing of *rpoB* and 16S rRNA (RIDOM). Thereafter, 38 mycobacteria clinical strains not identified by DDH were classified utilizing the DNA sequencing data.

[Results] Pairs of *M. kansasii* and *M. gastri*, *M. abscessus* and *M. chelonae*, *M. fortuitum* (ATCC49404) and *M. polcinum*, *M. peregrinum* and *M. septicum*, *M. faruginogense* and *M. senegalense* and *M. fortuitum* (ATCC49403), *Rhodococcus*, *Nocardia* and *Gordona* strains were classified using sequencing of *rpoB* gene. Even though sequencing of *rpoB* and 16S rRNA gene was utilized, it was impossible to classify *M. tuberculosis* complex, *M. avium* family, *M. marinum* and *M. ulcerans*, and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* and *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticus*.

The 38 mycobacteria clinical strains not identified by DDH were successfully classified using sequencing of both *rpoB* and 16S rRNA. These sequencing analyses showed that *M. heckeshornense*, *M. branderi*, *M. intermedium*, *M. shimoidei*,

M. wolinskyi, *M. malmoeense* and *M. lentiflavum* could be identified. Thirty six clinical isolates (94.7%) and 32 clinical isolates (84.2%) were identified by *rpoB* sequencing and 16S rRNA sequencing (RIDOM), respectively.

[Conclusion] The classification ratio of mycobacteria including *Nocardia*, *Rhodococcus* and *Gordona* is 69.6% for sequencing of 16S rRNA and 89.3% for sequencing of *rpoB* gene. Sequencing of *rpoB* is useful for classification of mycobacteria due to its genetic diversity, but has some limitation in its application. In order to classify mycobacteria more accurately, it is important to combine sequencing of *rpoB* and 16S rRNA and biochemical/biological tests.

Key words: Identification of mycobacteria, 16S rRNA, Sequence, RIDOM, *rpoB* gene, Unidentified strain

Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Yuko Kazumi, TB Information Division (Molecular Epidemiology & Genetic Identification), Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: kazumi@jata.or.jp)