

[原 著]

Pyrosequencing 法を用いた臨床分離抗酸菌株に対する同定法の精度評価

吉田志緒美<sup>1)</sup>・富田元久<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター

<sup>2)</sup> 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床検査科

(平成 26 年 5 月 13 日受付, 平成 26 年 9 月 8 日受理)

臨床分離された抗酸菌に対し, pyrosequencing 法を用いた同定法の精度評価を行った。対象は NHO 近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離された抗酸菌 100 株とした。日常検査にて市販キットとコロニー性状から得られた判定結果と, pyrosequencing 法, 従来のサンガーシーケンス法による結果を比較検討した。その結果, 93 株の pyrosequencing 法並びにサンガーシーケンス法の結果は日常検査の結果と一致した。不一致となった 7 株のうち 3 株はサンガーシーケンス法と日常検査の同定結果は一致したが (*M. avium* complex 1 株, *M. parascrofulaceum* 2 株), pyrosequencing 法とは異なった。また, 1 株は日常検査では *M. peregrinum* と同定されたが, pyrosequencing 法とサンガーシーケンス法では *M. mageritense* と同定された。残り 3 株は日常検査で Runyon 分類でのみ判定されたが, pyrosequencing 法, サンガーシーケンス法の結果では異なる分類に属する菌種が同定された (IV 群菌は *Tsukamurella* sp, III 群菌は *M. szulgai* もしくは *M. angelicum*, II 群菌は *M. colombiense* もしくは *M. bouchedurhonense*)。Pyrosequencing 法は日常検査で同定できない株に対しても菌種同定が可能であったが, いくつかの株で複数の菌種を同定することがあり, 結果の解釈には注意が必要であった。臨床現場では日常検査と並行して pyrosequencing 法を実施することにより正確な抗酸菌同定が可能となると考えられた。

**Key words:** Pyrosequencing 法, 抗酸菌, 同定, 16S rRNA 遺伝子

序 文

臨床の現場で結核の迅速診断に核酸増幅法が用いられるようになって久しい。核酸増幅法は結核菌のような増殖の遅い菌の検出には特に有用であり, 高い感度と特異度を有した核酸増幅キットが数多く市販されている。一方, 本来環境中に分布している抗酸菌には多くの菌種が存在するため, 対象菌種が限定されている従来の市販キットでは同定されない菌種に遭遇する頻度が高い。当センターでは, 市販キットを用いたにも

かかわらず判定不能とされた菌の割合は 2001 年の 0.94% から 2011 年の 3.35% と増加している。また, この 20 年間ほどで 100 を超える抗酸菌種が新種として登録されている現状から, 抗酸菌の同定にはより一層の正確性が求められる。

昨今の技術革新により, シークエンサーによる DNA 塩基配列に基づく菌種同定が数時間でできるようになった。従来の 16S rRNA gene をターゲットとしたサンガーシーケンス法は微生物の同定に信頼性が高い方法であるが, 実験工程の煩雑さから臨床の現場で日常的に汎用していくには適していない。一方, pyrosequencing 法は PCR 増幅産物を精製せずに測定ができるため, 簡便性に優れた微生物同定法の一つとして有用である<sup>1)~3)</sup>。同法はサンガーシーケンス法とは原理を異とする次世代シーケンサーを用い, DNA 合成時に産生される ATP と蛍光色素 (ルシフェラーゼ) との発光反応によって合成されたルシフェリ

著者連絡先: (〒591-8555) 大阪府堺市北区長曾根町 1180  
独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター  
吉田志緒美  
TEL: 072-252-3021  
FAX: 072-251-1372  
E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp

ンの発光パターンをリアルタイムに配列解読する。また、多数の PCR 増幅後のサンプルを約 1 時間で解析可能であり、DNA 抽出過程を加えた所要時間は約 4 時間である。同法の抗酸菌に対する同定精度の検討はすでにいくつかの論文で報告されているが<sup>3)~4)</sup>、わが国では、標準菌株を用いた報告があるのみで、臨床分離株に対して論じた報告は未だ無い<sup>5)</sup>。本研究では臨床にて分離された抗酸菌の同定法としての pyrosequencing 法の精度を評価した。

## 材料と方法

### 対象

2011 年 1 月~12 月の期間中に、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターに新規入院した患者のうち 100 名から分離された抗酸菌 100 株を対象とした。対象株はすべて、BACTEC MGIT960 システム (日本ベクトン・ディッキンソン)、小川 KY 培地 (セロテック) を用いた培養検査で両方もしくはいずれかの培地で陽性となることを確認した。また、複数菌種の混在否定は、0.5 mg/ml PNBA (*p*-nitrobenzoic acid 加 7H11 寒天培地) 上の発育と継代した小川培地上のコロニー性状から確認した。今回抗酸菌に対する同定結果の比較に重点をおいたため、菌種ごとに分離頻度が異なる状況を考慮して結核菌群の菌株数を絞り、各種市販キットを用いても菌種同定できなかった 24 株を含めた。今回、これら同定不能株は、Runyon 分類による菌群と、pyrosequencing 法とサンガーシーケンス法で同定された菌種が属する菌群が一致する場合に、同定一致とし菌種判定を行った。

今回の対象菌株が日常検査によって同定された菌種もしくは Runyon 分類と菌株数は以下の通りである。

*M. tuberculosis* complex (10), *M. avium* (10), *M. intracellulare* (10), *M. kansasii* (10), *M. abscessus* (10), *M. chelonae* (5), *M. fortuitum* (4), *M. goodii* (3), *M. szulgai* (3), *M. xenopi* (2), *M. terrae* (2), *M. scrofulaceum* (2), *M. marinum* (1), *M. avium* complex (1), *M. peregrinum* (2), 同定不能 24 株 [Runyon 分類 II 群菌 (18), III 群菌 (3), IV 群菌 (3)]。

### 市販キット

当センターにおいて日常検査に使用している市販キットは以下の通りである。結核菌群の同定にはコバス アンプリコア マイコバクテリウム ツベルクローシス (ロシュ・ダイアグノスティックス) と結核菌群同定試薬キャピリア TB (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた。*M. avium* と *M. intracellulare*

の同定にはコバス アンプリコア マイコバクテリウム アビウムとコバス アンプリコア マイコバクテリウム イントラセラー (共にロシュ・ダイアグノスティックス), *M. avium* complex の同定にはアキュプローブ マイコバクテリウム アビウム コンプレックス (極東製薬工業) を用いた。*M. kansasii* および *M. goodii* の同定には、研究用試薬であるアキュプローブ マイコバクテリウム カンサシとアキュプローブ マイコバクテリウム ゴルドネ (共に極東製薬工業) を用いた。上記以外の菌種の同定には DDH マイコバクテリア '極東' (DDH 法: 極東製薬工業) を用いた。すべての方法は添付の取扱説明書に準拠して行った。

### DNA の抽出

小川培地培養菌から白金耳で径 2~3 mm のコロニー菌量を採取し、1.5 mL マイクロチューブに分注した Tris-EDTA buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0: TE 溶液) 500 µL に懸濁した。95°C で 10 分間処理の後、急冷し 10 秒間 vortex を行った。12,000 rpm で 5 分間遠心後の上清を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し替え、pyrosequencing 法ならびにサンガーシーケンス法に用いた。MGIT 培養菌の場合、1.5 mL マイクロチューブに培養液を 1 mL 採取し 12,000 rpm で 15 分間遠心後、上清を除去した。残った沈渣に TE 溶液 100 µL を添加し、95°C で 30 分間処理を施した。急冷後 vortex を行い、12,000 rpm で 1 分間遠心後、上清を別のチューブに移し替えて同様に用いた。

### サンガーシーケンス法領域の設定とプライマー

サンガーシーケンス法の PCR 反応は岩本らの方法<sup>6)</sup>に準じ、Takara Ex Taq (タカラバイオ) を用いて、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 35 回行った。16S rRNA 遺伝子の超可変部 A と B を含む領域をプライマー 285F [5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'] と 259R [5'-TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA-3'] を用いて PCR 増幅産物を得た。PCR 増幅産物を精製した後 BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan) を用いて 16S rRNA 遺伝子の部分配列を得た後 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 検索を行った。99% 以上の塩基配列一致を持って同一菌種と判定した。

### Pyrosequencing 法

DNA 抽出物を pyrosequencing 法のテンプレートとして使用するために、PyroMark PCR (キアゲン) のピオチン修飾プライマー (MOTT 16S Primers for

Table 1. Clinical isolates identified by pyrosequencing correlating to conventional 16S rRNA gene sequencing and phenotypic identification (N=100)

Identified results of routine laboratory tests*	N	Pyrosequencing (16S rRNA gene)	Conventional 16S rRNA gene sequencing (BLAST results)
<i>M. tuberculosis</i> complex	10	10 <i>M. tuberculosis</i> complex	10 <i>M. tuberculosis</i> complex
<i>M. avium</i>	10	10 <i>M. avium</i>	10 <i>M. avium</i>
<i>M. intracellulare</i>	10	10 <i>M. intracellulare</i>	10 <i>M. intracellulare</i>
<i>M. kansasii</i>	10	10 <i>M. conspicuum</i> / <i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> (Primer 1), <i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> (Primer 2)	10 <i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i>
<i>M. abscessus</i>	10	10 <i>M. abscessus</i> / <i>M. massiliense</i> / <i>M. bolletii</i> / <i>M. chelonae</i>	10 <i>M. abscessus</i> / <i>M. massiliense</i> / <i>M. bolletii</i> / <i>M. chelonae</i>
<i>M. chelonae</i>	5	5 <i>M. abscessus</i> / <i>M. massiliense</i> / <i>M. bolletii</i> / <i>M. chelonae</i>	5 <i>M. abscessus</i> / <i>M. massiliense</i> / <i>M. bolletii</i> / <i>M. chelonae</i>
<i>M. fortuitum</i>	4	4 <i>M. fortuitum</i>	4 <i>M. fortuitum</i>
<i>M. gordonae</i>	3	3 <i>M. gordonae</i>	3 <i>M. gordonae</i>
<i>M. szulgai</i>	3	3 <i>M. szulgai</i> / <i>M. angelicum</i>	3 <i>M. szulgai</i> / <i>M. angelicum</i>
<i>M. xenopi</i>	3	3 <i>M. xenopi</i> / <i>M. heckeshornense</i>	3 <i>M. xenopi</i> / <i>M. heckeshornense</i>
<i>M. terrae</i>	2	2 <i>M. terrae</i> / <i>M. kumanmotoense</i>	2 <i>M. terrae</i> / <i>M. kumanmotoense</i>
<i>M. scrofulaceum</i> **	2	2 <i>M. scrofulaceum</i> / <i>M. conspicuum</i> / <i>M. parascrofulaceum</i> / <i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i>	2 <i>M. parascrofulaceum</i>
<i>M. marinum</i>	1	1 <i>M. marinum</i>	1 <i>M. marinum</i>
<i>M. avium</i> complex**	1	1 <i>M. colombiense</i> / <i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i>	1 <i>M. avium</i> complex
<i>M. peregrinum</i>	1	1 <i>M. peregrinum</i>	1 <i>M. peregrinum</i>
<i>M. peregrinum</i> **	1	1 <i>M. peregrinum</i> / <i>M. mageritense</i> / <i>M. poriferae</i>	1 <i>M. mageritense</i>
Unidentified isolates***	24	24 identified (included 3 discrepancies)	24 identified (included 3 discrepancies)
Total	100	93/100 (7 discrepancies)	93/100 (7 discrepancies)

\*: Identified species by routine laboratory tests with commercial kits, pigmentation and growth rate.

\*\* : Discrepancies of isolate between phenotypic identification by routine laboratory tests and both sequencing results.

\*\*\*: See table 2 for the detailed explanation.

PCR) を用いて DNA を増幅し、ビオチン化した PCR 増幅産物 (192 bp) を得た。

PCR 増幅産物は PyroMarkQ24 システム (キアゲン) 付属のバキュームワークステーションのバキュームプレップツール (ツール) を用いて捕集させた。まず、ツールにストレプトアビジンをコーティングした Sepharose ビーズと PCR 増幅産物を吸着固定させ、70% エタノールとアルカリ性 Denaturation 溶液に通して変性させた。続いてツールを Wash buffer 中にて洗浄し 1 本鎖にし、シークエンスプライマーを含んだ Annealing buffer をあらかじめ添加した PyroMarkQ24 プレート内に上記ツールを入れ、ツールの先端に吸着しているビーズを振り落しアニーリングさせた。全菌株の同定には MOTT 16S Primer 1 For Sequencing (キアゲン) を用い、日常検査で *M. kansasii* と同定された株に対しては、MOTT 16S Primer 2 For Sequencing (キアゲン) のプライマーセットを追加して *M. kansasii* と近縁菌種の鑑別を試みた。この反

応プレートで pyrosequencing 反応用の酵素、ヌクレオチド、基質を含む分注用カートリッジとともに PyroMarkQ24 にセットし、pyrosequencing 反応を開始した。得られた塩基配列 (40 bp) は FASTA 形式で保存され、Ribosomal Database Project under Favorites (<http://rdp.cme.msu.edu/>) にて相同性検索を行い Score 0.990~1.000 の塩基配列一致を持って同一菌種と判定した。

## 結 果

日常検査の結果と、pyrosequencing 法、サンガーシークエンス法の結果を比較したところ、日常検査で菌種同定された 76 株のうち 73 株は pyrosequencing 法とサンガーシークエンス法でも一致する菌種を同定できた。一方、pyrosequencing 法では、日常検査の同定菌種とともに、その近縁菌種に対しても高い相同性を示す菌株が認められた。日常検査で光発色試験陽性が確認された *M. kansasii* 10 株は pyrosequencing

Table 2. Sequence comparisons of 24 unidentified strains by commercial identification kits

No.	Identified results of routine laboratory tests	Pyrosequencing (16S rRNA gene)		Conventional 16S rRNA gene sequencing (BLAST results)	
		Identification	Score	Identification	Homology (%)
64*	IV	<i>Tsukamurella pulmonis</i> / <i>Tsukamurella spongiae</i>	1.000	<i>Tsukamurella pulmonis</i> / <i>Tsukamurella sp.</i> INBio 3020F	100
66*	III	<i>M. szulgai</i> / <i>M. angelicum</i>	1.000	<i>M. szulgai</i> / <i>M. angelicum</i> / <i>M. alsiensis</i> / <i>M. riyadhense</i>	100/100/ 99.43/99.24
98*	II	<i>M. colombiense</i> / <i>M. sp</i> LC6/ <i>M. intracellulare</i> / <i>M. bouchedurhonense</i>	1.000	<i>M. colombiense</i> CECT 3035/ <i>M. bouchedurhonense</i>	99.81/99.81
87	II	<i>M. scrofulaceum</i> / <i>M. conspicuum</i> / <i>M. paraffinicum</i> / <i>M. simiae</i>	1.000	<i>M. scrofulaceum</i>	100
62	IV	<i>M. mucogenicum</i> / <i>M. phocaicum</i>	1.000	<i>M. mucogenicum</i>	99.8
63	IV	<i>M. abscessus</i> / <i>M. massiliense</i> / <i>M. bolletii</i> / <i>M. chelonae</i>	1.000	<i>M. abscessus</i> / <i>M. massiliense</i> / <i>M. bolletii</i> / <i>M. chelonae</i>	100
91	II	<i>M. interjectum</i>	1.000	<i>M. interjectum</i>	99.8
67, 82	III (2 isolates)	<i>M. shimoidei</i> / <i>M. triviale</i>	1.000	<i>M. shimoidei</i> / <i>Mycobacterium sp.</i> 1777	99.81/99.81
80, 99	II (2 isolates)	<i>M. intermedium</i> / <i>M. sp.</i> Y2	1.000	<i>M. intermedium</i>	100
86-100	II (13 isolates)	<i>M. lentiflavum</i> / <i>M. sp</i>	1.000	<i>M. lentiflavum</i>	100

\*: Discrepancies between identification by routine laboratory and genetic identification by pyrosequencing and conventional sequencing.

法の MOTT 16S Primer 1 for Sequencing を用いた場合, *M. conspicuum*, *M. kansasii*, *M. gastri* の 3 菌種に同定され, MOTT 16S Primer 2 for Sequencing の場合, *M. kansasii* と *M. gastri* と同定された。*M. xenopi* 3 株は *M. xenopi* と *M. heckeshornense* に, *M. terrae* 2 株は *M. terrae* と *M. kumamotoense* に, それぞれ同定された。迅速発育菌の *M. abscessus* 10 株と *M. chelonae* 5 株は pyrosequencing 法, サンガーシーケンス法ともに *M. abscessus* complex の亜種 (*M. abscessus*/*M. massiliense*/*M. bolletii*/*M. chelonae*) で高い相同性が示された。同様に, 日常検査で Runyon 分類により判定された 24 株もすべて pyrosequencing 法, サンガーシーケンス法で菌種同定され, 100 株中 93 株の同定結果が一致した (Table 1)。Table 2 に, Runyon 分類により判定された 24 株の同定結果を記した。

日常検査, pyrosequencing 法, サンガーシーケンス法のいずれかの同定結果が異なる株は 7 株認められた (Table 3)。3 つの方法のうち pyrosequencing 法の結果のみ異なっていた株は 1 株 (菌株 No.83) であった。同株は, 日常検査のコバス 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で陰性, アクエブローブ マイコバクテリウム アビウム コンプレックスで陽性となったことから *M. avium* complex と同定され, サンガーシーケン

ス法でも同様に *M. avium* complex と同定されたが, pyrosequencing 法で *M. colombiense*, *M. avium* もしくは *M. intracellulare* と同定された。

2 株 (菌株 No.74, No.75) は, 3 つの方法すべての同定結果が異なった。それらは, 日常検査では *M. scrofulaceum*, サンガーシーケンス法では *M. parascrofulaceum* と同定されたが, pyrosequencing 法では Runyon 分類の I 群菌に属する *M. kansasii*, *M. gastri* と II 群菌である 3 つの菌種 (*M. scrofulaceum*, *M. conspicuum*, *M. parascrofulaceum*) の 5 種類の菌種に対して Score1,000 を示したため, 完全一致とする菌種を判定できなかった。

菌株 No.85 は日常検査で *M. peregrinum* と同定されたが, pyrosequencing 法とサンガーシーケンス法では共に *M. mageritense* と同定された。

残り 3 株 (菌株 No.64, No.66, No.98) は日常検査で Runyon 分類により判定された結果と, pyrosequencing 法とサンガーシーケンス法で同定された菌種が属する Runyon 分類とが異なった。菌株 No.64 は迅速発育性の非発色コロニーをもつ IV 群菌と判定されていたが, *Tsukamurella sp* と, 菌株 No.66 は遅発育性の非発色性コロニーを持つ III 群菌と判定されていたが, II 群菌である *M. szulgai* もしくは *M. angelicum* と, 菌株 No.98 は遅発育性の暗発色性のコロニーから II 群菌と判定されていたが, III 群菌である

Table 3. Discrepant results for biochemical and genetic identification of unidentified mycobacterium isolates

Characteristic	Clinical isolates							
	81*	74*	75*	83*	64**	66**	98**	
Growth at								
25°C	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Colony morphology	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Pigmentation	Non-chromogen	Non-chromogen	Non-chromogen	Non-chromogen	Non-chromogen	Non-chromogen	Non-chromogen	Non-chromogen
P-nitrobenzonic acid (PNBA)	+	+	+	+	+	-	+	+
Runyon classification or identified species results	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. avium</i> complex	<i>M. avium</i> complex	III	II	II
Pyrosequencing	<i>M. peregrinum</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. poriferae</i>	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. parascrofulaceum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. gastri</i>	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. parascrofulaceum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. gastri</i>	<i>M. colombiense</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. avium</i>	<i>Tsukamurella pulmonis</i> <i>Tsukamurella spongiae</i>	<i>M. szulgai</i> <i>M. angelicum</i>	<i>M. colombiense</i> <i>M. sp</i> LC6 <i>M. intracellulare</i> <i>M. bouchetedurhonnense</i>	<i>M. colombiense</i> CECT 3035 <i>M. bouchetedurhonnense</i>
16S rRNA gene sequencing	<i>M. mageritense</i>	<i>M. parascrofulaceum</i>	<i>M. parascrofulaceum</i>	<i>M. avium</i> complex	<i>Tsukamurella pulmonis</i> INBio 3020F	<i>M. szulgai</i> <i>M. angelicum</i> <i>M. alsiensis</i> <i>M. riyadhense</i>	<i>M. colombiense</i> CECT 3035 <i>M. bouchetedurhonnense</i>	

\*: See table 1 for unidentified isolate by routine laboratory tests.

\*\*: See table 2 for unidentified isolate by routine laboratory tests.

*M. colombiense*, *M. intracellulare*, もしくは *M. bouchedurhonense* と、それぞれ同定された。

菌株 No.66 に加えて、3つの方法の同定結果が一致し、*M. szulgai* とされた3株のコロニー性状を比較したところ、すべてスムーズ型で光発色性であった。また、PNBA における菌株 No.66 の発育は陰性であり、*M. szulgai* 3株は陽性2株、陰性1株という結果であった。

## 考 察

臨床分離抗酸菌株を対象とした pyrosequencing 法と日常検査の結果との間には、93% という高い一致率が示された。日常検査で同定されなかった24株はいずれも pyrosequencing 法で同定可能となり、サンガーシークエンス法の結果と大きく異なることはなかった。しかし、pyrosequencing 法の増幅領域が狭く、ターゲットとする塩基配列数も40bpと短く設計されていることに加え、抗酸菌種には16S rRNA gene で相同性が高い近縁菌が存在するため、pyrosequencing 法では、複数の菌種に対し高い相同性を示したために識別できない場合が見られた。また、pyrosequencing 法は、取り込まれた塩基数に比例したルシフェラーゼの発光量が検出されるため、連続した塩基配列が存在する場合、実測された波形のピークは高くなる。しかし、AAAA や TTTT といった同じ塩基が比較的長く連続した場合、その数を読み違いやすい傾向が見られた(データ未掲載)。そのため、1塩基分のピークの波形を1とする基準を目視にて設定してから、連続した塩基数を換算し配列を修正する必要がある。このように、これら pyrosequencing 法の特性を考慮して、結果の解釈には他の生化学的性状検査結果も参考にすることが求められる。

今回、日常検査にて Runyon 分類でのみ判定できた24株のうち3株(菌株 No.98, No.66, No.64)は、pyrosequencing 法とサンガーシークエンス法の結果では異なる分類の菌種に同定され、結果に乖離が見られた。菌株 No.98 (日常検査にて II 群菌) に対して、両シークエンス法で同定された菌種 *M. colombiense* と *M. bouchedurhonense* は、ともに非発色性のコロニー性状を持つが、*M. colombiense* は2週培養で暗発色性のコロニーが観察される特徴があることから同株は、*M. colombiense* である可能性が考えられた<sup>7,8)</sup>。また、菌株 No.66 (III 群菌) と *M. szulgai* 3株は、日常検査では非典型的な性状を示し、正確な同定は難しいと判断した。*M. angelicum* は *M. szulgai* に非常に近い塩基配列を持つ II 群菌であり、現時点ではジネ

ズミの1種である *Crocidura olivieri* に対する感染症例や<sup>9)</sup>、非常に稀であるがヒトへの感染症も報告されている<sup>10)</sup>。したがって今回の結果から、*M. angelicum* の可能性は否定できず、*M. szulgai* もしくはその近縁菌と同定するのが妥当であると考えられた。また、*M. szulgai* の近縁菌 (*M. angelicum*, *M. alsiensis*, *M. riyadhense*) は16S rRNA gene の配列で100%, 99.5%, 99.1% の高い相同性を持つため<sup>10)~12)</sup>、同菌種の詳細な同定には、進化の速いハウスキーピング遺伝子を解析するなどの方法が求められる。最後に、今回の検討で注目すべきは、抗酸菌ではない *Tsukamurella* 属菌を IV 群菌と同定していたことである(菌株 No.64)。*Tsukamurella* 属は、偏性好気性のグラム陽性桿菌で、無芽胞かつ弱抗酸性のミコール酸を有する放線菌である<sup>13)</sup>。同菌種が *M. fortuitum* と誤同定された報告もあり<sup>14)</sup>、コロニー性状だけで判別するのは困難である。抗酸菌感染症の治療薬剤の多くに耐性であるとも言われており、このような誤同定により不適切な治療を引き起こす危険性が大いにあると考えられる<sup>15)</sup>。したがって、抗酸菌のコロニー性状の判定には注意が必要であり、遺伝子解析結果を併用するといった慎重な対応が欠かせない。

今回、臨床分離抗酸菌株において pyrosequencing 法は、サンガーシークエンス法と同程度の高い精度が確認された。一方、pyrosequencing 法の同定結果と日常検査の Runyon 分類が異なる株も認められた。多彩な臨床検体を材料とする臨床現場では様々な性状の菌が分離されることは決して珍しくなく、今後も遭遇すると想定されるため、検査する医療従事者の熟練度が要求される。

**謝辞:** 本研究にあたり、当センター臨床研究センター 露口一成部長、並びにキアゲン(株) 嶋多涼子氏に深謝いたします。

**利益相反:** 本論文の研究内容、結論、意義、あるいは意見について他者との利益相反(conflict of interest)はありません。

## 文 献

- 1) Heller, L.C., M. Jones, R.H. Widen. 2008. Comparison of DNA pyrosequencing with alternative methods for identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2092-2094.
- 2) Cristia-Fernström, M., M. Olofsson, E. Chryssanthou, et al. 2007. Pyrosequencing of a short hypervariable 16S rDNA fragment for the identification of nontu-

- berculous mycobacteria—a comparison with conventional 16S rDNA sequencing and phenotyping. AP-MIS 115: 1252-1259.
- 3) Tuohy, M.J., G.S. Hall, M. Sholtis, et al. 2005. Pyrosequencing as a tool for the identification of common isolates of *Mycobacterium* sp. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 51: 245-250.
  - 4) Bao, J.R., R.N. Master, D.A. Schwab, et al. 2010. Identification of acid-fast bacilli using pyrosequencing analysis. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 67: 234-238.
  - 5) 赤松紀彦, 松田淳一, 吉田麻衣子, 他. 2013. パイロシーケンス法を用いた迅速・簡便な新しい抗酸菌核酸同定法. *医学検査* 62: 246-251.
  - 6) 岩本朋忠, 中永和枝, 石井則久, 他. 2008. *Mycobacterium lentiflavum* の菌種内塩基配列変異に関する研究. *結核* 83: 417-422.
  - 7) Murcia, M.I., E. Tortoli, M.C. Menendez, et al. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2049-2054.
  - 8) Salah, I.B., C. Cayrou, D. Raoult, et al. 2009. *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium boucheduronense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2803-2808.
  - 9) Durnez, L., P. Suykerbuyk, V. Nicolas, et al. 2010. Terrestrial small mammals as reservoirs of *Mycobacterium ulcerans* in Benin. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 4574-4577.
  - 10) Davies, E., J. Wieboldt, T. Stanley, et al. 2012. Isolation and identification of '*Mycobacterium angelicum*' from a patient with type II respiratory failure: suggested reporting guidelines to molecular clinical laboratories. *J. Biomed. Sci.* 69: 134-136.
  - 11) Richter, E., E. Tortoli, A. Fischer, et al. 2007. *Mycobacterium alsienne*, a novel, slowly growing species isolated from two patients with pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3837-3839.
  - 12) van Ingen, J., S.A. Al-Hajoj, M. Boeree, et al. 2009. *Mycobacterium riyadhense* sp. nov., a non-tuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by a commercial line-probe assay. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1049-1053.
  - 13) Weon, H.Y., S.H. Yoo, R. Anandham, et al. 2010. *Tsukamurella soli* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1667-1671.
  - 14) Yassin, A.F., F.A. Rainey, H. Brzezinka, et al. 1996. *Tsukamurella pulmonis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 429-436.
  - 15) Perez, V.A., J. Swigris, S.J. Ruoss. 2008. Coexistence of primary adenocarcinoma of the lung and *Tsukamurella* infection: a case report and review of the literature. *J. Med. Case Reports* 2: 207.

## Novel identification of clinical mycobacterium isolates by pyrosequencing of 16S ribosomal RNA gene

Shiomi Yoshida<sup>1)</sup>, Motohisa Tomita<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Osaka, Japan

<sup>2)</sup>Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Osaka, Japan

Conventional methods for identification of mycobacterium isolates are often inexact and time consuming. Pyrosequencing of a short hypervariable 16S rRNA gene fragment is accurate, rapid and effective. We have retrospectively evaluated the discriminative power of pyrosequencing for mycobacterium identification, and compared with the results of the routine laboratory tests and conventional 16S rRNA gene sequencing (Sanger sequencing). A series of 100 clinical isolates were investigated, furthermore, growth rate and pigment production were annotated when species could not be resolved by pyrosequencing alone. 93 of the identified isolates by commercial kits and phenotypic characterization were unambiguously identified by both Sanger sequencing and pyrosequencing. An additional 3 isolates were directly identified to same species by Sanger sequencing and routine test, but the discrepancies with pyrosequencing (1 *M. avium* complex, 2 *M. parascrofulaceum*). By both sequencing methods, one isolate was identified as *M. mageritense*, however, identified as *M. peregrinum* by routine test. The remaining 3 isolates needed both sequencings because the discrepancies between Runyon classification (IV, III and II) and both sequencings were resulted (*Tsukamurella* sp, *M. szulgai* or *M. angelicum*, and *M. colombiense* or *M. bouchedurhonense*). We consider the pyrosequencing procedure to be a useful alternative for the identification of several mycobacterium species, and a versatile tool for the characterization of clinical mycobacterium isolates. At times it requires additional tests for definite species diagnosis and correct identification.