

- 症としての結核対策確立のための研究(主任研究者 森 亨)平成 14 年度分担研究報告 . 2003 ; 49 : 213 .
- 15) Behr MA, Warren SA, Salamon H, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear negative for acid fast bacilli. Lancet 1999 ; 353 : 444 9.
- 16) Verver S, Warren RM, Munch Z, et al. Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high incidence area. Lancet 2004 ; 363 : 212 4.
- 17) Borgdorff MW, Nagelkerke NJD, van Soolingen D, et al. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993 1995 using DNA fingerprinting. Am J Epidemiol 1998 ; 147 : 187 95.
- 18) Borgdorff MW, Behr MA, Nagelkerke NJD, et al. Transmission of tuberculosis in San Francisco and its association with immigration and ethnicity. Int J Tuberc Lung Dis 2000 ; 4 : 287 94.
- 19) 内村和広・高橋光良・大角晃弘ほか . 沖縄県 RFLP 分析をもとにした性・年齢階級・居住地別 Transmission Index の推定 . 結核 2005 ; 80 : 278 .
- 20) 高橋光良 . 結核菌 DNA の RFLP 分析を用いた結核分子疫学の研究と実践 . 結核 2003 ; 78 : 641 51 .
- 21) Dubroniewski FA, Gibson A, Ruddy M, et al. Evaluation and Utilization as a Public Health Tool of a National Molecular Epidemiological Tuberculosis Outbreak Database within the United Kingdom from 1997 to 2001. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 1861 8.
- 22) Yates MD, Dubroniewski FA, Wilson SM. Evaluation of a rapid PCR based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis* . J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 712 4.
- 23) Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. N Engl J Med 2003 ; 349 : 1149 56.
- 24) 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 71.

総 説

結核と *M. avium* 感染症の分子疫学の新たな展開

結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンスセンター 高橋光良

1992 年よりわが国でも結核感染の疫学に分離結核菌の RFLP 分析が導入されるようになり、感染源の特定がより確実に行えるようになった¹⁾。一般細菌と同様に結核菌の分子疫学は遺伝子工学に基づいた幾つかの手法の結集で

ある。結核菌の RFLP 分析では、トランスポゾンである転位因子 (Insertion sequence IS 6110) のタイピングが最も早くから普及し、多く使用されている。その他にも多くの方法が開発され、さまざまな使われ方をしている。そ

してその結果の意味づけについてもかなりの進歩がみられている。本稿は IS 6110 を用いる方法と並行して行われる方法として、最近特に重要性を増しているスポリゴタイピング、およびその一つの応用分野である *M. bovis* の同定について検討し、次いで *M. avium* のタイピングに関する近年の知見をレビューするものである。

1. スポリゴタイピング

1.1 IS 6110 の安定性

筆者は IS 6110 の変異と安定性について、結核予防会複十字病院の 96 人の結核患者から少なくとも同じ患者から 2 回以上分離された 188 株について、その前後のパターン変化の発生について検討した¹⁾。その結果平均 90 日間で 24 組 (25%) が 1 本以上の変異を示した。このことは患者同士の疫学調査上接触関係が判明すれば、それらの患者から分離された菌株の間にバンド 1 本程度の違いがあっても同一菌と考えるのが妥当であることを意味している。米国の臨床株でも 90 日間で 29% の変異が確認されている²⁾。IS 6110 のバンドの指数残存分析を用いたオランダの研究では、IS 6110 のバンド変化の半減期は 3.2 年であることが示された³⁾。このことは半数の菌株が 3~4 年で一つのバンドに変化がみられるということを示している。この 3~4 年という時間は、疫学的に関係のある菌株と異なる菌株を区別するのに十分であり、IS 6110 を用いた DNA 指紋法の結核伝播の疫学研究における有用性を支持するものである。しかし、IS 6110 でコピー数が 5 個以下のような株は非常に安定しており、同じパターンが持続することが知られており、株の鑑別には異なる molecular clock となる標識を用いた二次分析が必要とされる。

IS 6110 による結核菌群の DNA 指紋法は最も広く行われている手法であるが、他のタイピ

ング法と比較して幾つかの不都合な点が存在する。例えば、RFLP 解析を行うには 2 µg の DNA が必要である。これだけの量の DNA は臨床材料から増殖させた大量の菌からでなくては得られない。このことは数週間の培養による遅れを意味し、また生菌を必要とする。また RFLP を行うための高度な技術、コストも欠点である。さらに IS 6110 RFLP パターンの正確な分析のためには高度の電算機システムが必要である⁶⁶⁾。

1.2 スポリゴタイピングの技術

近年 PCR を利用したタイピング法が幾つも見出されている⁴⁾⁻¹⁹⁾。その方法の利点は、原則としてより少ない菌量で済まされることである。これらの PCR 法は実施が簡単である。幾つかの PCR 法は、mixed linker PCR 法のように¹⁰⁾¹⁶⁾、鑑別能も再現性も IS 6110 を用いた RFLP に十分匹敵する。しかしながら、簡単であるということから結核菌群の解析にはスポリゴタイピングが最も多用されている²⁰⁾⁻²⁴⁾。スポリゴタイピングは IS 6110 の RFLP においてコピー数が 5 以下の菌株に対する追加的検査にも用いられる²⁰⁾²¹⁾²⁴⁾。スポリゴタイピングの原理は、結核菌群菌株のゲノム DR 領域に複数存在する 36 bp からなる direct repeats (DR) に挟まれたスペーサー配列を可視化するものである⁵⁾。DR 領域に含まれる DR の数は菌株間で異なり、その間にあるスペーサー配列も菌株間で異なる。*M. tuberculosis* の H 37 Rv 株および *M. bovis* BCG P 3 株の DR 領域の解析結果に基づいて、43 の合成オリゴヌクレオチドが DNA メンブレンの上に一列に配置される。未知の結核菌株の DR 領域におけるこれら 43 のスペーサーの存在を調べるためには、この菌株の DR 領域全体を PCR で増幅する。これは DR に対し相補的で互いに逆方向に向いた二つのプライマーを使用して行う。このようなプライマーを用いることにより、隣接する DR との

間のDNAおよびより遠隔のDNAを増幅する⁵⁾。増幅したスペーサー配列をメンブレン上に固相化した43の合成オリゴヌクレオチドの列と逆方向になるように載せる。一方のDRプライマーはあらかじめストレプトアビジンペルオキシダーゼ複合体および基質を用いてビオチンラベルされているので、合成オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションは化学発光で検出することができる。

1.3 スポリゴタイピングの特色

培養菌に対して用いるスポリゴタイピングは、簡単で確実、再現性も高い手法である。さらにその結果を視覚的なイメージでなく数値的に表現でき、さらにワープロ上でコード化できる。しかしながら、IS 6110をRFLPの代用とすることが適切かどうかは疑わしい^{23 25 26)}。IS 6110のパターンで明らかに分離できる*M. tuberculosis*の菌株が、同一のスポリゴタイピングを示すことがある^{16 18)}。同様にスポリゴタイピングの鑑別能は、*M. bovis*の分離株についてもPGRSやDRによるRFLPよりも低い²⁷⁾⁻³³⁾。しかしながらスポリゴタイピングはふるい分けには有用であろう。スポリゴタイピングのパターンが異なっている結核菌株は例外なくIS 6110のパターンも異なる^{24 26)}。ligation mediated PCR^{13 14)}を用いればさらに大規模にふるい分けをスポリゴタイピングそのものよりも効果的に行えると言われている³⁴⁾。

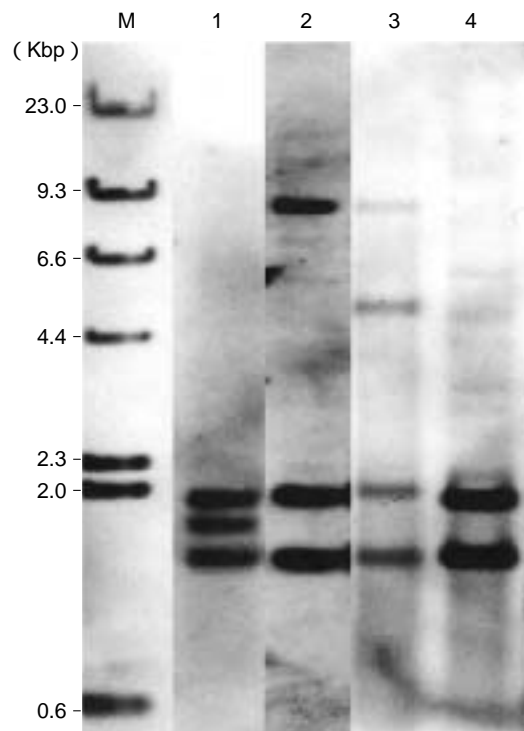
H 37 RvとBCG以外の株から見いだされたスペーサー配列を加えて解析することにより、スポリゴタイピングの鑑別能が向上するのではないかと期待された⁵⁾。しかしながらそうはいかなかった。43のセットにさらに51種のスペーサー配列を追加して検討した最近の研究では、それほど鑑別能は向上しなかった³⁵⁾。

スポリゴタイピングはIS 6110等に比べてより安定な遺伝子情報を解析しているため、結核菌群の菌種やその亜種分類に有効である。例

えばすべての「北京遺伝子型株」の*M. tuberculosis*はスポリゴタイピングの43のスペーサー中、最後の九つにのみ反応する³⁶⁾。さらに大部分の*M. bovis*では、39~43番目のスペーサーが欠落している^{5 20 27 28 37)}。そして大部分の*M. bovis*(すべての*M. bovis* BCGを含む)ではそのほか3, 9, 16番目のスペーサーが欠落している^{5 20)}。*M. microti*もスポリゴタイピングのパターンによりvole typeとlama typeに分けられる。

スポリゴタイピングがIS 6110 RFLPと比べて明らかに有用な点は、原則として一度のアッセイで結核菌群の検出とタイピングが同時

図1 *M. bovis* BCG菌株類似のRFLPパターン。レーンMは分子量マーカ、レーン1, 2はBCG Tokyo株の変異と思われる株(1はBCG膀胱注入療法患者から得られたもの, 2は乳幼児BCG接種後の皮膚病変から分離されたもの), 3は結核患者の喀痰から分離した*M. tuberculosis*, 4は通常のBCG Tokyo株



に行える点である³⁸⁾。さらにスポリゴタイピングは死菌でも実施可能で³⁹⁾、チール・ネールゼン染色に用いたスライドガラスやパラフィン包埋材料を用いても実施できる⁴⁰⁾⁴¹⁾。

スポリゴタイピングを行ううえでの問題点は臨床材料を直接用いた場合、PCR 反応を阻害する物質が存在するために、一致したスポリゴのパターンを得ることが難しいことである。現在スポリゴタイピングに対する臨床材料の前処理法の改善が研究されている。

1.4 *M. bovis* BCG と結核菌の鑑別

これまで結核予防、膀胱がん免疫療法で使用される BCG ワクチンの BCG Tokyo 株は、IS 6110 による RFLP 分析で他の BCG ワクチン株である Pasteur, Glaxo, Tice あるいはウシ型菌 *M. bovis* 野生株と異なり、特徴のある 2 本バンドを示す⁴²⁾。このため BCG と結核菌の鑑別は IS 6110 のみで行われ、なんら不都合は生じなかったが、近年 IS 6110 パターンに関して BCG Tokyo 株に酷似した結核菌株や、BCG Tokyo 株の IS の変異株が確認されるようになった。図 1 において、レーン 1, 2 は BCG 変異株、レーン 3 は結核菌、レーン 4 は通常の BCG 株の IS 6110 パターンである。

このような問題に対処する方法の一つとして MPTR 法⁴³⁾がある。この方法により結核菌群の MPTR 領域内 PCR 産物の長さや変異を示す Sequevar の LONG, MED G, MED C および SHORT と呼ばれる四つのタイプに分別でき、特に LONG (PCR 産物 343 bp) は結核菌と *M. bovis* にみられ、MED G (PCR 産物 328 bp) は結核菌と *M. bovis* の 765 番目の塩基が G であるのに対し、MED C (PCR 産物 328 bp) では *M. bovis* BCG のみで 765 番目が C に置換している。また SHORT (PCR 産物 313 bp) は *M. africanum* で検出される。

結核菌と *M. bovis* BCG を鑑別するためのより確実な方法は塩基配列決定により解析を行う

ことであろう。一方、スポリゴタイピングは *M. bovis* と BCG のみが 39/43 のスパーサーを欠落していることを確認する⁵⁾。BCG と結核菌、ウシ型菌野生株などとの鑑別はこれらの併用によって行うべきである。

1.5 その他のタイピング法

① RAPET 法⁴⁴⁾⁴⁵⁾: RAPET 法は英国で開発された方法で、IS 6110 の逆繰り返し配列部分内の (5' GAGTCTCCGGACTCACCGG 3') を PCR 法により増幅し、0.8% アガロースゲル電気泳動後のエチディウムプロマイド染色で可視化して判定する。さらに詳細に検討する場合は、PCR 産物を *Hae* III で切断して判定する。英国では集団発生等のスクリーニングに、この迅速診断法である RAPET を利用している。本法は再現性に優れており、集団発生時の鑑別能は IS 6110 と同等であると報告されている。

② MIRU VNTR 法⁴⁶⁾⁴⁷⁾: 初めは VNTR⁴⁸⁾を含む exact tandem repeat (ETR) A, ETR B, ETR C, ETR D, ETR E の各遺伝子座を PCR により増幅し、0.8% アガロースゲル電気泳動後、53 bp の tandem copies の数を数値化して鑑別する、しかし、IS 6110 と比較すると鑑別能が低いことから疫学研究には向かなかった。最近になり、ヒトミニサテライト様の構造が結核菌ゲノム上に見いだされた⁴⁹⁾。MIRU と命名された 40-100 bp からなる tandem repeat は結核菌群中に 12 の遺伝子座があることが示された。この 12 遺伝子座と ETR A, ETR B, ETR C の 15 遺伝子座の組み合わせにより IS 6110 と同等の鑑別能があることが示された。MIRU VNTR の変異の比は、スポリゴタイピングと IS 6110 の中間型である。本法は迅速診断が可能であり、安定性があり⁵⁰⁾、株間を比較するための数値化が容易であることが報告されている。さらに、MAC 用のプライマーを使用することにより *M. avium*,

M. intracellulare および *M. paratuberculosis* を分別することができる⁵¹⁾。

③ Mixed linker PCR 法⁹⁾¹⁶⁾ : PCR を基にしたタイピングの間では VNTR タイピング, mixed linker PCR およびスポリゴタイピング法において高い再現性がみられた。IS 6110 RFLP タイピングと mixed linker PCR 法が最も良い亜分類法であった。Mixed linker PCR 法は DNA 指紋型パターンの自動検出が最適化された有望な方法である。Mixed linker PCR は最近タイピングが微量の菌でも 6 5 時間内で行える fast ligation mediated PCR (FliP) に発展した。FliP 法⁵²⁾ は mixed linker PCR と同じ鑑別能力と再現性を示した。

④ PGRS 法⁵³⁾ : 結核菌の PGRS はスポリゴタイピングと同様に二次的マーカーとして最も一般的である。重要な制限となるのは RFLP 分析を行ううえで培養が必要であるということであり, それに費す時間の遅れゆえに対策上の有用性は小さくなる。そこで新たに増幅を基礎としたタイピング手法が望まれ, 徐々に普及しつつある。スポリゴタイピング, Mixed linker PCR および VNTR 法等々である。

2 . *M. avium* の型別

M. avium complex (MAC) に は *M. avium* と *M. intracellulare* が含まれ, 元来 *M. avium* はトりに, *M. intracellulare* はヒトに肺結核類似症を引き起こすとされていたが, その後これら両菌種のいずれかを古典的な方法では区別できない菌株が自然環境からも分離され, MAC あるいは *M. avium intracellulare* complex (MAIC) と総括的に呼ばれることが多い⁵⁴⁾⁵⁵⁾。ただ *M. avium* はエイズ患者に, そして *M. intracellulare* は正常免疫の者に比較的多いとされる。

ところで, 非結核性抗酸菌の亜型分類のために従来からの血清型別法に加えて, パルス

フィールドゲル電気泳動法 pulse field gel electrophoresis (PFGE), IS 型別による菌の亜型分類法などが行われている。*M. avium* については IS 900 ファミリーの RFLP 研究が盛んに行われたが, その後 IS 256 ファミリーに属する 1414 bp の長さをもつ IS 1245 が発見され⁵⁶⁾, この IS は *M. avium* の分子疫学に広く用いられている。ここではこれによる型別, IS 1245 の転位頻度 (安定性), その他最近得られた知見について述べる。

2.1 *M. avium* の培養と DNA の抽出⁴²⁾⁵⁷⁾

Middlebrook 7H9 液体培地に *M. avium* を接種して 2~3 週間 37 °C で培養する。または送付された小川培地上のコロニーを集菌して用いてもよい。死菌であってもコロニーが 1 エーゼ集菌できれば分析可能である。また, 小川培地上で劣性発育をする菌は, 液体培地で増菌してから分析すると効率的である。菌からの DNA の抽出は, Isoplant, 和光純薬 : Code No. 314-02731⁵⁸⁾ を用いて, 菌の約 0.03 g を小川培地から集菌する。電気泳動は 1xTris Acetate (TAE) 電気泳動溶液 (50 xTAE 電気泳動溶液 : Tris base 242 g, Glacial acetic acid 57.1 ml, 0.5 M EDTA, pH 8.0 100 ml, DW で全量を 1000 ml にして 121 °C で 15 分間オートクレーブする) にて 1 ウエル当たり 5 mA, 100 V で 3.5 時間電気泳動し, Bromophenol blue が 10.5 cm になるまで行う。終了後, サザンブロッティングをしてハイブリダイゼーションする。化学発光による検出法⁵⁹⁾ にてバンドを検出する。終わった後に内部マーカーの検出のためのリプロービング (蒸留水で 2 分間洗浄 0.2 M NaOH 0.1% SDS で 5 分間 2 回洗浄 2 xSSC で 5 分間洗浄) し, メンブレンを乾燥する。内部マーカーのプローブは Lambda Hind III Fragment と Phix 174 RF DNA HaeIII Fragment の各 25 ng/μl を標識してハイブリダイゼーションに用いる。検体のマッチングは

肉眼あるいはコンピュータで行う。

2.2 *M. avium* の分子疫学に用いられる亜型分類法

従来 *M. avium* の疫学的な分類は血清型別により決定していた^{60,61)}。しかし近年になって、遺伝子を用いた型別法が開発され、血清型と遺伝子型が必ずしも一致しないことから、従来の血清型別は菌の型別法としては不相当であることが明らかにされた。遺伝子を用いる亜型分類法は以下の方法が知られている。

① パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE): *M. avium* のゲノム DNA を制限酵素で消化し、パルスにより電流の方向性を変化させて高分子の DNA 断片をアガロース内で分子ふるいして、その電気泳動パターンからタイピングする方法である⁶²⁾。しかし、数種類の制限酵素を使うこと、数 µg 単位の全 DNA を使用することに加え、高度のテクニックを必要とする。

② IS 1110⁶³⁾: *M. avium* のゲノム内に存在する 1468 bp の IS 900 ファミリーの IS であり、0~15 本が検出される。この IS は逆繰り返し配列を欠落しており、*M. avium* 以外の抗酸菌には存在しないが、一般的には転位頻度が高いことから亜型分類や疫学的なマーカーとしては使用されない。

③ IS 901 と IS 902⁶⁴⁾: *M. avium* のゲノムから分離された IS で 1472 bp の長さを保有する。両 IS は DNA レベルでの相同性が 98 % と高いことから、通常は IS 901 が型別に用いられる。検出される IS コピー数は 2~8 本あるが、型の種類は非常に限られている。

④ Oligonucleotide GTGGTGGTGGTGGTG; (GTG)₆⁶⁵⁾: 初め結核菌で使用された。結核菌の 80 座に存在する主多型縦列反復 MPTR は RFLP 分析としては適切な方法ではなかった。その後、PGRS や直接反復配列 DR 構造は IS 6110 の低コピー数株の二次的分別に有効であ

ることが分かった。同様に結核菌群のゲノムドメインの繰り返し構造を認識する (GTG)₆ 配列もまた PGRS と同程度の亜分類が可能であり、疫学的なマーカーとして有効であることが示されている。一方、(GTG)₆ 配列は *M. avium* や *M. intracellulare* および Runyon I 群、II 群、III 群、IV 群に属する他の菌種とも相同性があることが分かり、主要な抗酸菌の疫学マーカーとして利用できる。

⑤ ribotyping (リボタイピング) 法⁶⁶⁾: リボタイピング法とは、細菌 DNA を制限酵素で切断後に電気泳動を行い、分離された断片の中からリボゾーム RNA をコードする遺伝子を含む断片を検出してそのパターン (リボタイプ) を分析する方法で、分子疫学に利用されている。*M. avium* と *M. intracellulare* を分別する方法としては抽出 DNA を *SacI* と *ClaI* で消化後、16S rRNA 遺伝子をプローブとして分析する。

⑥ IS 900⁶⁷⁾: *M. avium* subsp. *paratuberculosis* のゲノム内に発見された 1451 bp の長さの挿入断片であり、IS 901 / IS 902, IS 1110 および *Streptomyces clavuligerus* の IS 116 と高い相同性をもち、*M. avium* subsp. *paratuberculosis* は 15~20 本のコピー数が検出される。しかし、*M. avium* と *M. intracellulare* のタイピングにはパターンが限定されており、亜型分類には向かない⁶⁸⁾。

⑦ IS 1311⁶⁹⁾: この IS は *M. avium* と *M. avium* subsp. *paratuberculosis* の両者に存在しており 1259 bp の長さの IS で、ゲノム内に 7~10 コピー数が検出される。また、IS 1311 と IS 1245 は 85 % の高い相同性を保有している。最近、IS 1311 に反応し IS 1245 には反応しない特異的プライマーを使用して、*M. avium* subsp. *paratuberculosis* の亜型分類が可能になった⁷⁰⁾。

⑧ IS 1245^{56,71)}: *M. avium* のゲノム内に最近発見された新しい挿入断片で、ヒトや動物から

の分離株に1~27の高いコピー数を示す。このISはIS 256に属しPFGEと同程度の分別が可能である。また、IS 1311とDNAレベルで85%の相同性を保有している。IS 1245の安定性は、90日以内に1~2本が転位する程度であることが認められている。

2.3 IS 1245の安定性と標準化分析法

ゲノム内に存在するISをターゲットにする分子疫学的研究において、最も重要な点はISの安定性である。IS遺伝子はトランスポゾンであるため少なからず転位活性を保有する。このため転位頻度の低いISを利用することが望まれる。結核菌のIS 6110は約400代*in vitro*で継代しても転位活性は認められなかったのに対して、*M. avium*のIS 1245は1年間の培地継代で1~2本の転位が確認されている⁷²⁾。IS 1245はIS 1081のtransposase(トランスポゼース)をコードしている塩基配列と64%相同性があり、これはIS 1081も同一程度の転移活性を保有していることを示唆している⁵⁶⁾。実際、IS 1081は同一患者からの分離菌では90日で1本の転位が存在したのに対して、IS 1245は69日と88日で1および2本の転位が認められている。Pestel CaronとArbeit⁷³⁾もISの安定性について同一患者からの分離菌では8例(25%)で1~2本の転位が、5例(16%)で3本以上の転位が認められたが、*in vitro*の継代では安定していたと報告している。これらのことから*M. avium*のIS 1245は結核菌のIS 6110より安定性においては劣るが、感染源追跡のためのマーカーとしては有用であることを示しており、これを用いた標準分析法としてはオランダのvan Soolingenら⁷⁴⁾の提唱した方法が用いられている。

2.4 IS タイピングのこれまでの成績

BauerとAndersen⁷⁵⁾ら(デンマーク)はエイズ患者由来分離株(90株)、HIVに未感染患

者(91株)およびヒト以外の由来株(22株)の*M. avium*のIS 1245を用いて、感染伝播の追跡調査を2年間にわたって行っている。その結果、ヒト由来株ではIS 1245では多コピー数であったのに対して、非ヒト由来株では多コピーと低コピーの両グループが存在した。同一パターンを示した株は、エイズ患者由来株、HIV未感染患者分離株ともに地理学的に広範囲な分布を示し、土壌や家畜由来株の遺伝子型に属する*M. avium*株がヒトからも検出された、などの知見を得ている。Bono⁷⁶⁾らはヒト由来株と動物由来株を分析した結果、トリ由来株のISコピー数はヒトおよびブタ由来株に比べて低く、PFGEとIS 1245両者の多形性の程度も低かったと報告している。Komijinら⁷⁷⁾の8養豚場2,899グループ、総計158,763頭を対象にした検討によれば、154グループ856頭(0.5%)が感染し、そのうち141グループ(91.5%)の各5頭において下顎リンパ腺と腸管膜リンパ腺に病巣がみられた。そして、これらの材料から分離された91株の*M. avium*をIS 1245タイピングしたところ株間に59%の類似性が、また、96年に分離したヒト分離191株の*M. avium*のタイピングの類似性は61%であったが、ヒトとブタの解析では75%の類似性がみられたという。これはヒトとブタが土壌との接触で、*M. avium*に対して容易に曝露されることを意味しているのかもしれない。Pestel CaronとArbeitら⁷³⁾(米国)は、40人のHIV患者からの141臨床分離株と同じ水源から分離した18環境分離株の計159株を分析している。これによれば臨床分離株では141株中40株が型別され、これらの株のコピー数は10本以上25株(63%)、4~9本6株(15%)、1~3本9株(23%)で、ISの安定性については40株中8株(25%)に1~2本、5株(16%)に3本以上の転位が確認されたが、*in vitro*の継代では安定であったという。

わが国では斎藤らが「24時間風呂」の浴水、

スポンジフィルター、濾材より分離した *M. avium*⁷⁸ 26 株、24 時間風呂が感染源と考えられたヒトの皮膚病巣から分離された 9 株とそれらの患者使用の 24 時間風呂から分離された 5 株の血清型と IS 1245 の遺伝子型分析を行っている⁷⁹。24 時間風呂由来株はヒトの肺 *M. avium* 症由来株に比べてコロニーの粘稠性が高く、DNA 抽出時の酵素処理に抵抗性を示したことから DNA の回収率が極端に悪かった。IS 1245 をプローブとした RFLP 分析パターンは 24 時間風呂由来のコピー数は 3~28 本で、低コピー数 (10 本以下のバンド) の株は 26 株中 21 株 (80.8%) も存在し、数本の共通バンドを有した。

一方、ヒト皮膚感染病巣分離の 8 株、肺結核類似症例患者の喀痰から分離した 1 株およびその患者の自宅浴水から分離した 5 株の計 14 株は 10~28 のバンドを有し、また肺結核類似症例患者とその患者自宅の浴水からの分離株⁸⁰ではバンド数は各 12 本と 11 本で相互に 80% の類似性があった。この知見は、ヒトやブタに感染する菌株は高いコピー数を保有すると述べた Bauer と Andersen⁷⁵ や Bono⁷⁶ の知見と一致しており、また IS 1245 の安定性を考慮すると、39 と 40 は同一株と考えるのが妥当であろう。クラスター解析では 4 群に分かれ 1 群は血清型 1 (10/13; 76.9%) と 4 (3/13; 23%)、2 群は血清型 1 (9/14; 64.3%)、8 (2/14; 14.3%) および 9 (1/14; 7%)、3 群は血清型 1 のみ (3 株)、4 群は血清型 4 のみ (10 株) に分類された。

上述したようにオランダでのヒト由来株とブタ由来株のクラスター解析では 75% と高い類似性を示した⁷⁷が、わが国の 24 時間風呂由来分離株とヒト皮膚感染病巣分離株間の類似性指数は 40% 前後と低かった。上記の *in vitro* の継代では IS 1245 の転位は検出されていないこと⁷⁵を考えると、環境中由来菌には複数の型の菌が存在していることも考えられ、単一口

コニーについて分析検討することが必要なのかもしれない。一方、感染したヒトや動物の体内で転位頻度が高くなる可能性もある。

70 年代初めに AccuProbe MAC で陽性を示した *M. avium* 菌株全 28 は血清型 (肺 MAC 症には 28 種類の血清型があることが報告されている。それぞれの血清型で病態が異なる可能性があり、血清型を迅速に測定できる) で 3 群に分けられ、1 群は毒力型 (播種性)、2 群は中間毒力型 (接種部位の病巣、軟組織損傷)、3 群は弱毒型であったことが記載されている⁸¹。トリに毒力が認められた 1 群は血清型 1~3 で PCR タイプ IS 901⁺, IS 1311⁺, IS 1245⁺ であり、*M. avium* のプローブと反応するが、*M. intracellulare* のプローブとは反応しない。この特徴をもつ MAC 株はトリ、ブタ、環境中およびヒトから高頻度に分離される。トリに局所病変型を示す 2 群は血清型 4~6, 8~11 および 21 で PCR タイプ IS 901⁻, IS 1311⁺, IS 1245⁺ であり、*M. avium* のプローブと反応するが、*M. intracellulare* のプローブとは反応しない。これらの特徴を示す株はヒト、ブタおよび環境中から高頻度に分類される。弱毒の 3 群は血清型 7, 12~20, 22~28 で MAC と *M. intracellulare* のプローブに反応するが、*M. avium* のプローブに反応しない PCR タイプ IS 901⁻, IS 1311⁻, IS 1245⁻ の遺伝子型をもつ *M. avium* に分類される。これらの特徴をもつ株の多くは環境中から分離される。

血清型全 28 種類に属する MAC を 3 種類の IS で RFLP 分析した結果も上述の血清型分類の結果と同一であった⁸¹。IS 901 は 1 群のゲノム内にランダムに 4 コピー以上検出され、IS 1245 はトリ型 RFLP 型を意味する不変な 3 コピーのみが検出され、IS 1311 は IS 1245 と高い相同性を示すが、1 群では単一コピーとして検出された。また 2 群の RFLP 分析ではゲノム内にランダムに 3 コピー以上の IS 1245 と IS 1311 が検出されていることを記載している

が、同様に抗酸菌種のみに対応する *dnaJ*⁸²⁾ と IS 901, IS 1311, IS 1245 の PCR 型で分析した Dvorska⁸¹⁾らの報告によると、HIV 陰性患者 6 人の分離培養で各 1 人から 6 個のコロニーを分別し、計 36 株について試験した結果では、血清型、RFLP 型および薬剤感受性の間の相関はなく、むしろポリクローナル感染の存在を推測している。この知見は斎藤⁷⁸⁾らの 24 時間風呂由来分離株とヒト皮膚感染病巣分離株間の類似性指数は 40 % 前後と低かったことと相関があるのかもしれない。分子時計の異なる新たな挿入配列が発見されれば、変異の時間的相関が明確になるであろう。

IS 1245 をプローブとした RFLP 分析は、疫学的に優れたマーカーであり、MAC 症の感染の追跡、予防など臨床的にも公衆衛生上も寄与しうる有用な手段となるであろう。

文 献

- 1) 高橋光良．結核分子疫学の成果と展望．結核 2002 ; 77 : 741 52 .
- 2) Yeh RW, de Leon AP, Agasino CB, et al. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Genotypes. J Infect Dis 1998 ; 171 : 1504 13.
- 3) De Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, et al. Analysis of rate of change of IS 6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. J Infect Dis 1999 ; 180 : 1238 44.
- 4) Goulding JN, Stanley J, Saunders N, et al. Genome sequence based fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 1121 6.
- 5) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 907 14.
- 6) Friedman CR, Stoeckle MY, Kreiswirth BN, et al. Transmission of multidrug resistant tuberculosis in a large urban setting. Am J Respir Crit Care Med 1995 ; 152 : 355 9.
- 7) Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD Jr, et al. Double repetitive element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 1383 4.
- 8) 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 96.
- 9) Haas WH, Butler WR, Woodley CL, et al. Mixed linker polymerase chain reaction : a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex . J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 1293 8.
- 10) Otal I, Samper S, Asensio MP, et al. Use of a PCR method based on IS 6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 273 7.
- 11) Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A, et al. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction . J Infect Dis 1993 ; 167 : 975 8.
- 12) Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, et al. Rapid, amplification based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol 1993 ; 139 : 1537 42.
- 13) Prod'homme G, Guilhot C, Gutierrez MC, et al. Rapid discrimination of *Mycobacte-*

- rium tuberculosis* complex strains by ligation mediated PCR fingerprint analysis. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 3331 4.
- 14) Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 486 92.
- 15) Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, et al. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 2169 74.
- 16) Butler WR, Haas WH, Crawford JT. Automated DNA fingerprinting analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using fluorescent detection of PCR products. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 1801 3.
- 17) Kearns AM, Barrett A, Marshall C, et al. Epidemiology and molecular typing of an outbreak of tuberculosis in a hostel for homeless men. J Clin Pathol 2000 ; 53 : 122 4.
- 18) Patel S, Wall S, Saunders NA. Heminested inverse PCR for IS 6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 1686 90.
- 19) Sechi LA, Zanetti S, Dupre I, et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 128 32.
- 20) Bauer J, Andersen AB, Kremer K, et al. Usefulness of spoligotyping To discriminate IS 6110 low copy number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 2602 6.
- 21) Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS 6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 647 51.
- 22) Sola C, Horgen L, Maisetti J, et al. Spoligotyping followed by double repetitive element PCR as rapid alternative to IS 6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 1122 4.
- 23) Sola C, Devallois A, Horgen L, et al. Tuberculosis in the Caribbean : using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. Emerg Infect Dis 1999 ; 5 : 404 14.
- 24) Goguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G, et al. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 2210 4.
- 25) Wilson SM, Goss S, Drobniewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a Mycobacterium reference unit. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 3385 8.
- 26) Diaz R, Kremer K, de Haas PE, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994 June 1995 : utility of spoligotyping versus IS 6110 restriction fragment length polymorphism. Int J Tuberc Lung Dis 1998 ; 2 : 743 50.
- 27) Cousins DV, Skuce RA, Kazwala RR, et al. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. International Union against Tuberculosis

- culosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animals Subsection. Int J Tuberc Lung Dis 1998 ; 2 : 471 8.
- 28) Cousins D, Williams S, Liebana E, et al. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 168 78.
- 29) Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, et al. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS 6110 probes. Vet Microbiol 1998 ; 61 : 111 20.
- 30) Aranaz A, Liebana E, Mateos A, et al. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing : a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol 1998 ; 61 : 311 24.
- 31) Collins DM. DNA typing of *Mycobacterium bovis* strains from the Castlepoint area of the Wairarapa. New Zealand Vet J 1999 ; 47 : 207 9.
- 32) Costello E, O'Grady D, Flynn O, et al. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 3217 22.
- 33) Cousins DV, Williams SN, Dawson DJ. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population : DNA typing of isolates, 1970 1994. Int J Tuberc Lung Dis 1999 ; 3 : 722 31.
- 34) Bonora S, Gutierrez MC, Di Perri G, et al. Comparative evaluation of ligation mediated PCR and spoligotyping as screening methods for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 3118 23.
- 35) van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, et al. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. J Bacteriol 2000 ; 182 : 2393 401.
- 36) van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 3234 8.
- 37) Aranaz A, Liebana E, Mateos A, et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals : a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 2734 40.
- 38) Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, et al. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe : analysis by spoligotyping. Thorax 1998 ; 53 : 346 50.
- 39) Driscoll JR, McGarry MA, Taber HW. DNA typing of a nonviable culture of *Mycobacterium tuberculosis* in a homeless shelter outbreak. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 274 5. No abstract available.
- 40) van der Zanden AG, Hoentjen AH, Heilmann FG, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. Mol Pathol 1998 ; 51 : 209 14.
- 41) Qian L, Van Embden JD, Van Der Zanden AG, et al. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 471 4.

- 42) Takahashi M, Kazumi Y, Fukazawa Y, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol* 1993 ; 37 : 289 94.
- 43) Frothingham R. Differentiation of strains in *Mycobacterium tuberculosis* complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 840 4.
- 44) Yates MD, Drobniewski FA, Wilson SM. Evaluation of a rapid PCR based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 712 4.
- 45) Drobniewski FA, Gibson A, Ruddy M, et al. Evaluation and utilization as a public health tool of a national molecular epidemiological tuberculosis outbreak database within the United Kingdom from 1997 to 2001. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 1861 8.
- 46) Sola C, Filliol I, Legrand E, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs : association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 2003 ; 3 : 125 33 .
- 47) 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 71.
- 48) 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 96.
- 49) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al. Variable human minisatellite like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000 ; 36 : 762 71.
- 50) Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, et al. Stability of variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 4561 6.
- 51) 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 64.
- 52) Reising F, Kremer K, Amthor B, et al. Fast ligation mediated PCR typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Abstract of the project Meeting Molecular Epidemiology and Control of tuberculosis, Institute Pasteur, Paris, France, November, 1999.
- 53) Ross BC, Raios K, Jackson K, et al. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 942 6.
- 54) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1982 ; 27 : 994 7.
- 55) 豊田丈夫, 青柳昭雄, 齋藤肇. *Mycobacterium avium* complex 症の現況と将来. *M.avium* と *M. intracellulare* 症. *結核* 1993 ; 68 : 63 9.
- 56) Guerrero C, C Bernasconi, D Burki, et al.

- A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS 1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 304 7.
- 57) 高橋光良 . RFLP 分析を用いた結核菌の分子疫学 . 日本細菌学雑誌 1998 ; 53 : 662 8 .
- 58) Jhingan AK. A novel technology for DNA isolation. Meth Mole Cellu Biol 1992 ; 3 : 15 22.
- 59) Pollard Knight D, Simmonds AC, Schaap AP, et al. Nonradioactive DNA detection on Southern blots by enzymatically triggered chemiluminescence. Anal Biochem 1990 ; 185 : 353 8.
- 60) Schaefer WB. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am Rev Respir Dis 1965 ; 92 : 85 93.
- 61) Saito H, Kubica GP. Serologic studies of avian Group III nonphoto chromogen complex by agglutination test. Am Rev Respir Dis 1967 ; 98 : 47 9.
- 62) Pestel Caron M, G Gabriel, B Gilles, et al. Molecular analysis of *Mycobacterium avium* isolates by using pulsed field gel electrophoresis and PCR. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 2450 5.
- 63) Hernandez MP, NG Fomukong, T Hellyer, et al. Characterization of IS 1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium* . Mol Microbiol 1994 ; 12 : 717 24.
- 64) Kunze ZM, S Wall, R Appelberg, et al. IS 901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium* . Mol Microbiol 1991 ; 5 : 2265 72.
- 65) Cilliers FJ, RM Warren, JH Hauman, et al. Oligonucleotide (GTG) as an epidemiology tool in the study of nontuberculous mycobacteria . J Clinical Microbiol 1997 ; 35 : 1545 9 .
- 66) Peillon R, EB Drouet, S Bruneau, et al. Discrimination of *Mycobacterium avium Mycobacterium intracellulare* strains by genomic DNA fingerprinting with a 16 S rRNA gene probe. FEMS Microbiol Letters 1994 ; 124 : 75 9.
- 67) Tim D, M Tizard, D Millar, et al. IS 900 targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hed* gene. Microbiology 1997 ; 143 : 547 52.
- 68) Butcher PD, NA Hutchinson, TJ Doran et al. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. J Appl Bacteriol 1996 ; 81 : 53 71.
- 69) Whittington RJ, AF Hope, DJ Marshall, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* : IS 900 restriction fragment length polymorphism and IS 1311 polymorphism analysis of isolates from animals and a human in Australia. J Clinical Microbiol 2000 ; 38 : 3240 8.
- 70) Marsh I, Whittington R, Cousins D. PCR restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS 1311 . Mol Cell Probes 1999 ; 13 : 115 26.
- 71) Garzelli C, N Lari, B Nguon, et al. Comparison of three restriction endonucleases in IS 1245 based RFLP typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* . J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 2450 5.

- bacterium avium*. J Med Microbiol 1997 ; 46 : 933 9.
- 72) Bauer J, AB Andersen. Stability of insertion sequence IS 1245, a marker for differentiation of *Mycobacterium avium* strains. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 442 4.
- 73) Pestel Caron M, RD Arbeit. Characterization of IS 1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 1859 63.
- 74) van Soolingen D, J Bauer, V Ritacco, et al. IS 1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates : proposal for standardization. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 3051 4.
- 75) Bauer J, AB Andersen, D Askgaard, et al. Typing of clinical *Mycobacterium avium* complex strains cultured during a 2 year period in Denmark by using IS 1245. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 600 5.
- 76) Bono M, T Jemmi, C Bernasconi, et al. Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. Appl Environ Microbiol 1995 ; 61 : 371 3.
- 77) Komijn RE, PEW de Haas, MME Scheider, et al. Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in the Netherlands and comparison of IS 1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 1254 9.
- 78) 斎藤肇, 村上和保, 石井則久, ほか. 「24時間風呂」からの *Mycobacterium avium* の検出. 結核 2000 ; 75 : 19 25.
- 79) Saito H, Takahashi M, Sato A. Serotyping and IS 1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolated from the “24 hour bath” in Japan. 101st General Meeting, ASM, U 12, May, 2001, Orlando.
- 80) Watando A, Toyota E, Mori N, et al. Pulmonary *Mycobacterium avium* infection in an immunocompetent young adult related to use of home bath with a circulating water system. Jpn J Dis 2001 ; 54 : 151 2.
- 81) Dvorska L, Bartos M, Ostadal O, et al. IS 1311 and IS 1245 restriction fragment length polymorphism analysis, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus negative patient. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 3712 9.
- 82) Nagai R, Tatewaki S, Wada A, et al. Development of rapid detection method for mycobacteria with PCR. J Med Technol 1990 ; 28 : 1247 52.