

結核集団感染疑い事例における分子疫学的解析法としての
Variable Numbers of Tandem Repeats法の応用

向 川 純, 三 宅 啓 文, 吉 田 勲, 保 坂 三 継, 矢 野 一 好

結核集団感染疑い事例における分子疫学的解析法としての Variable Numbers of Tandem Repeats法の応用

向 川 純*, 三 宅 啓 文*, 吉 田 勲*, 保 坂 三 継*, 矢 野 一 好**

同一RFLPパターンを示した結核菌株を, VNTR法で解析した結果, 同一事例内の場合, ほとんどの事例でVNTR法の結果は一致したが, 一部不一致領域のある事例があった. 不一致を示した領域は, 多くは多様性の高い領域であったが, 一部に中程度の多様性の領域があった. 異なる事例間では, RFLPパターンは一致しても, VNTR法で複数の領域の不一致が観察される場合があった. VNTR法を結核集団感染事例の分子疫学的解析法として用いる場合, 用いる領域や検査する領域数を十分検討する必要があるが, RFLP法とVNTR法を併用することによって, 同一感染事例内及び異なる感染事例間のよりきめ細かい分子疫学的情報が提供できると考えられる.

キーワード: 結核集団感染, RFLP 法, VNTR 法

はじめに

我々は, 結核集団感染疑い事例の分子疫学的調査のため, RFLP法とVNTR法の比較検討を行ってきた^{1,2)}. 聞き取り調査で接触関係があり, RFLP法でパターンが一致し, 同一感染源由来と考えられる事例の中で, VNTR法で一部異なる領域のある事例があった. また, 感染事例は異なるが, RFLP法でパターンが一致し, なんらかの関連が疑われた事例があった²⁾. これら同一感染事例内及び異なる感染事例間での各株のRFLP法とVNTR法の結果を比較・検討したので報告する.

実験方法

1. 材料

平成12年度より19年度の8年間に, 都内で発生した結核集団感染を疑われる事例より分離された結核菌173株を用いた.

2. DNAの抽出

DNA抽出は, 既報¹⁾の通りに行った. すなわち, 結核菌を小川培地から回収し, 80℃で20分間加熱殺菌後, プロテナーゼK・SDS・フェノール・クロロフォルム法でDNAを抽出した.

3. RFLP分析

RFLP法は, 高橋ら³⁾の方法に従い, 1.5 µgのDNAを制限酵素PvuIIで切断後, 0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し, サザンブロット法でメンブレンに転写・固定後, ビオチン化IS6110プローブとハイブリダイゼーションを行い, アビジン化アルカリフォスファターゼとルミフォス530を反応させ, CCDカメラで映像を撮影し, バンドの検出を行った.

4. VNTR法

各菌株のゲノム遺伝子を鋳型に, 多重反復配列領域のうち, MIRUの12領域 (2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40⁴⁾, ETRの4領域(A, B, C, F)⁵⁾, QUBの9領域 (11a, 11b, 18, 26, 1451, 1895, 3232, 3336, 4156)⁶⁾, Mtubの9領域 (1, 4, 16, 21, 24, 29, 30, 38, 39)⁷⁾, そしてVNTR2372, VNTR3820, VNTR4120⁸⁾の計37領域について, それぞれのプライマーとTaq DNA polymeraseを用いたPCR法で領域を増幅し, PCR産物のDNAサイズから, 反復数を測定した. 各領域の多様性については, Hunter Gaston Diversity Index (HGDI値)⁹⁾で表記した.

5. 北京型, 非北京型結核菌の分別

Warren¹⁰⁾らの方法に従って, 北京型結核菌の遺伝子をプライマーセット1 (5'-TTC AAC CAT CGC CGC CTC TAC-3', と5'-CAC CCT CTA CTC TGC GCT TTG-3'), 非北京型結核菌の遺伝子をプライマーセット4 (5'-GGT GCG AGA TTG AGG TTC CC-3', と5'-TCT ACC TGC AGT CGC TTG TGC-3') を用いてPCR法で検出した.

結果及び考察

1. 同一感染事例内でのVNTR法の相違

聞き取り調査で接触関係があり, RFLP法でパターンが一致し, 同一感染源と考えられた38事例で, 調査したVNTR法37領域での一致・不一致を表1に示した.

37領域すべてが一致したのは26事例で, 1領域異なる事例が11事例あった. また一部の株でPCR陰性となった事例が1事例あった.

* 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部

表1. 同一感染事例内でのVNTR法の相違事例数

VNTR法の結果		
VNTR37領域すべて一致		一部異なる領域が存在
RFLP法で同一パターンを示した事例	26事例	1 領域異なる：11事例
		一部PCR陰性：1事例

2. 異なる事例間でRFLP法のパターンが一致した事例でのVNTRの結果

感染事例は異なるが、RFLP法でパターンが一致し、なんらかの関連が疑われた事例についてVNTR法で解析した（表2）。異なる感染事例間で、調査したVNTR法の37領域が一致したのは3事例間、1領域異なる領域があったのは7事例間で、異なる領域数は1領域から7領域までさまざまであった。

37領域が一致した3事例は、昨年報告した事例B（平成12年、病院）、事例C（平成12年、集合住宅）、事例I（平成17年、学校）の感染事例である²⁾。これらの事例から分離された株は、SM耐性で同一RFLPパターンを持ち、事例間の関係は不明であるが、都内各地に昔から蔓延していると考えられる株である。

表2. 異なる事例間でRFLP法のパターンが一致した事例でのVNTR法の相違

VNTR法の結果		
VNTR37領域すべて一致		一部異なる領域が存在
RFLP法で同一パターンを示した事例	3事例	1領域異なる：7事例
		2領域異なる：1事例
		5領域異なる：2事例
		7領域異なる：1事例

3. 北京型結核菌株による感染事例でのRFLP法とVNTR法の相違

昨年報告したように²⁾、日本で蔓延している結核菌株は、約80%が北京型、約20%が非北京型であり、北京型結核菌株と非北京型結核菌株では、VNTR法の各領域の多様性が異なっているため、これらの感染事例を、北京型結核菌株による感染事例と非北京型感染事例に分けて、VNTR法の不一致領域を示した。VNTR各領域のHGDI値は、昨年度報告した値を用いた²⁾。

北京型結核菌株による感染事例で、RFLP法でパターンが一致し、同一感染源によると考えられる事例で、VNTR法で不一致を示した領域は、MIRU31、Mtub21、QUB3232、VNTR3820、VNTR4120の5領域で、MIRU31、Mtub21以外は、HGDI値が、それぞれ0.9、0.9、0.89と株間での多様性が高く、QUB3232では同一人物の時期をずらせて分離さ

れた株間でも不一致があった²⁾。また、一部の株が、ETR-A、QUB11a、QUB11bでPCR陰性を示す事例があった（表3）。

異なる感染事例間で、RFLP法のパターンが一致し、関連が疑われた株間でのVNTR法の不一致は、VNTR4120、QUB26、QUB11b、QUB1895など、比較的HGDI値の高い領域が多いが、昨年報告した事例Hでは、ETR-Cのように0.03ときわめて低いHGDI値を示す領域が他の事例と不一致であった²⁾。この領域の相違はかなり大きな遺伝学的相違と考えられ、この事例は他の事例とは関連が薄いことが示唆された。

表3. 北京型結核菌株による感染事例でのVNTR法の相違領域

領域	HGDI値	同一事例内(PCR陰性)	異なる事例間
1 QUB3232	0.9	3	
2 VNTR3820	0.9	3	
3 VNTR4120	0.89	2	1
4 QUB26	0.77		2
5 QUB11b	0.71	(1)	1
6 Mtub24	0.66		
7 QUB18	0.62		
8 QUB1895	0.62		1
9 QUB4156	0.6		
10 Mtub4	0.57		
11 QUB3336	0.56		
12 MIRU10	0.51		
13 QUB11a	0.51	(1)	
14 MIRU16	0.46		
15 Mtub21	0.44	1	
16 ETR-F	0.38		
17 VNTR2372	0.37		
18 MIRU23	0.31		
19 MIRU31	0.27	1	
20 Mtub30	0.27		
21 MIRU40	0.22		
22 MIRU26	0.19		
23 MIRU39	0.19		
24 ETR-A	0.13	(1)	
25 Mtub39	0.1		
26 MIRU4	0.07		
27 ETR-B	0.07		
28 Mtub38	0.07		
29 MIRU20	0.03		
30 MIRU24	0.03		
31 ETR-C	0.03		1
32 Mtub16	0.03		
33 Mtub29	0.03		
34 MIRU2	0		
35 MIRU27	0		
36 QUB1451	0		
37 Mtub1	0		

4. 非北京型結核菌株による感染事例でのRFLP法とVNTR法の相違

非北京型結核菌株による感染事例で、RFLP法でパターンが一致し、同一感染源によると考えられた事例で、VNTR法で不一致を示した事例は1事例あり、不一致領域はMtub39であった（表4）。図1並びに表5の事例Aがその事例で、検体7が他の株と不一致であった。

異なる感染事例間で、RFLP法のパターンが一致し、関連が疑われた事例間での、VNTR法の相違は、表4に示すETR-A、Mtub21、Mtub39、QUB3232、QUB26、MIRU10、QUB3336の7領域であった。

非北京型結核菌株による感染事例内・事例間で、同一RFLPパターンを示した事例A、B、C（図1）でのVNTR法37領域の結果を示した（表5）。事例AとBでは6領域、事例AとCでは7領域、事例BとCではそれぞれ5領域の相違があ

った。これらの事例は、発生年度、発生場所が異なり、株間の関連性は不明で、それぞれの株は RFLPパターンは同一でも、遺伝学的にはかなり異なっていて、関連は薄いと考えられる。この同一RFLPパターンの株は、昔から都内各地に定着し、感染を繰り返していくうちに、VNTRの領域が少しずつ変化してきたことが推定される。

疫学的接触関係があり、RFLP法で同一パターンを示し、同一感染源による感染と考えられる事例で、VNTR法で不一致の領域がある場合、多くは HGDI値が0.8以上を示す多様性の高い領域であったが、中にはHGDI値が0.4以下の領域が不一致の事例もあり、この領域の不一致をどう解釈するかは、今後の検討課題である。

表4. 非北京型結核菌株による感染事例でのVNTR法の相違領域

領域	HGDI値	同一事例内	異なる事例間
1 QUB3336	0.91		1
2 MIRU10	0.86		1
3 QUB11a	0.85		
4 QUB26	0.83		1
5 VNTR3820	0.81		
6 MIRU40	0.79		
7 QUB3232	0.79		1
8 Mtub39	0.79	1	1
9 MIRU26	0.74		
10 QUB18	0.7		
11 QUB1895	0.69		
12 Mtub24	0.69		
13 VNTR4120	0.69		
14 VNTR2372	0.67		
15 QUB11b	0.64		
16 Mtub21	0.63		1
17 Mtub30	0.63		
18 ETR-F	0.6		
19 QUB1451	0.6		
20 MIRU4	0.58		
21 MIRU16	0.58		
22 ETR-A	0.58		1
23 MIRU39	0.56		
24 QUB4156	0.54		
25 Mtub1	0.53		
26 Mtub16	0.51		
27 Mtub4	0.5		
28 MIRU23	0.49		
29 Mtub38	0.44		
30 MIRU31	0.27		
31 ETR-B	0.26		
32 MIRU2	0.14		
33 ETR-C	0.14		
34 Mtub29	0.14		
35 MIRU20	0		
36 MIRU24	0		
37 MIRU27	0		

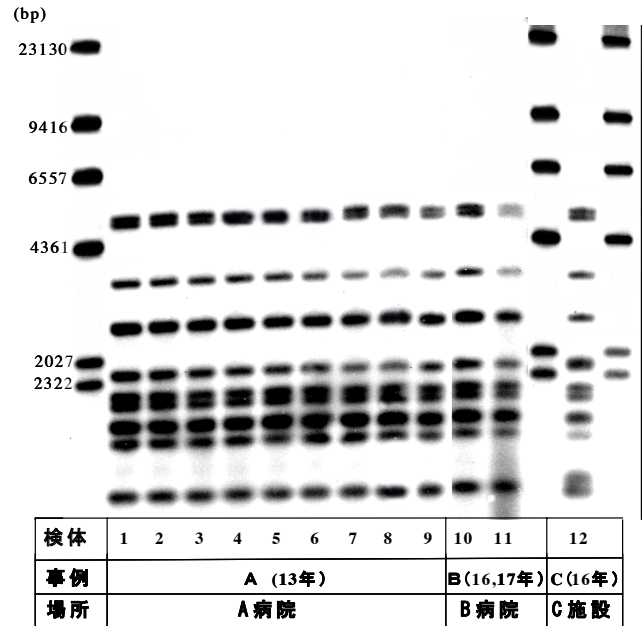


図1. 異なる事例 (A, B, C) 間で同じRFLPパターンを示した株のRFLP法の結果

表5. 事例A, B, C由来株のVNTR法の結果

MIRU2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
23	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
27	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
31	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ETR-A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
F	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
QUB11a	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
11b	3	3	3	3	3	3	3	3	2	4	4	5
18	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
26	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	2
1451	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1895	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3232	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5
3336	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	12
4156	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mtub01	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
29	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
30	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
38	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
39	7	7	7	7	7	7	5	7	7	5	5	8
VNTR2372	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
VNTR3820	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
VNTR4120	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
事例	A						B			C		
検体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

VNTR法による結核菌型別試験に用いる領域については、大阪府立呼吸器アレルギーセンター松本らの16領域

(MIRU2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40及びETR-A, B, C, F)¹¹⁾, Supplyらの15領域(MIRU4, 10, 16, 26, 31, 40, ETR-A, ETR-C, QUB-11b, 26, 4156, Mtub04, 21, 30, 39)¹²⁾, 結核研究所前田らの12領域(MIRU10, 26, 31, QUB-11b, 15, 26, 3336, 4156, Mtub04, 21, 24, VNTR2372)¹³⁾などが提唱されている。松本らの方法では、日本で蔓延している結核菌の約12%が同一アリルプロファイルになること、Supplyらの方法では、今回同一感染源と考えられる事例の中に、不一致領域があったこと(MIRU31, Mtub 21)、前田らの方法は、東京都心部で蔓延している菌株の分別には不十分であることが報告され現在見直しが検討されていることなど、VNTRのどの領域を用いるかについては、まだ十分な合意が得られていないのが現状である。結核集団感染事例の分子疫学的解析法として用いる場合、検査に用いる領域数とその組み合わせ、及び一部の領域が不一致の場合の解釈には、今後さらなる検討が必要であろう。

まとめ

我々は昨年の報告²⁾で、VNTR法の各領域は多様性に大きな差があり、北京型結核菌・非北京型結核菌では各領域の多様性は異なること、また、多様性の高い領域は、同一感染源による感染の場合でも、また同一患者内でも変異が生ずる場合があることを示した。今回の報告で、接触関係が不明で発生時期も異なり、異なる感染事例と考えられる場合は、RFLPのパターンは同一でも、VNTR法で複数の領域での不一致が観察される場合があった。

RFLP法とVNTR法の結果の相違は、IS6110とVNTR法の領域の進化速度が異なるためと考えられ、RFLP法とVNTR法を併用することによって、同一感染事例内及び異なる感

染事例間のよりきめ細かい情報が提供できると考えられる。

文 献

- 1) 向川 純, 柳川義勢, 山田澄夫: 東京健安研セ年報, **57**, 55-58, 2006.
- 2) 向川 純, 三宅啓文, 柳川義勢, 他: 東京健安研セ年報, **58**, 57-61, 2007.
- 3) 高橋光義, 安部千代治: 日細誌, **49**, 853-857, 1994.
- 4) Supply, P., Lesjean, S. and Savine, E. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3563-3571, 2001.
- 5) Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A.: *Microbiology.*, **144**, 1189-1196, 1998.
- 6) Roring, S., Scott, A., Brittain, D. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2126-2133, 2002.
- 7) Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F. et al.: *BMC Microbiology*, **2**, 1-12, 2002.
- 8) Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5034-5043, 2005.
- 9) Hunter, P. R. and Gaston, M. A.: *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 2465-2466, 2002.
- 10) Warren, R. M., Victor, T. C., Streicher, E. M. et al.: *Am. J. resir. Crit. Care. Med.*, **169**, 610-614, 2004.
- 11) 松本智成, 阿野裕美: 結核, **81**, 190, 2006.
- 12) Supply, P., Allix, C., Lesjean, S. et al: *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4498-4510, 2006.
- 13) 前田伸司, 村瀬良朗: 結核, **83**, 230, 2008. .

Application of the VNTR Method as a Molecular Epidemiological Tool for Outbreak of Tuberculosis

Jun MUKAIGAWA*, Hirofumi MIYAKE*, Isao YOSHIDA*, Mitsugu HOSAKA*, and Kazuyoshi YANO*

Strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from outbreak cases and showing the same RFLP pattern were analyzed by the VNTR method, and the results of VNTR analysis were nearly identical to those of RFLP. However, a disagreement in some regions of tandem repeats was observed in some cases. In different outbreak cases, even if the RFLP patterns were the same, several regions of tandem repeats did not correspond. If the VNTR method is applied to the epidemiological investigation of outbreak cases of tuberculosis, we need to more closely examine the regions of tandem repeats to be used. Through a combination of the RFLP and VNTR methods, we can provide more useful molecular epidemiological information to public health centers.

Keywords: outbreak of Tuberculosis, Restriction Fragment Length Polymorphism method (RFLP), Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) method

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan