

**IS6110が1コピーの株による結核感染事例の  
Variable Numbers of Tandem Repeats法を用いた分子疫学的解析**

向川 純, 三宅 啓文, 山本 宣和, 貞升 健志, 甲斐 明美

**Molecular Epidemiological Analysis of Tuberculosis Patients Infected with  
Single-IS6110-Copy Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Using the VNTR Method**

Jun MUKAIGAWA, Hirofumi MIYAKE, Nobukazu YAMAMOTO, Kenji SADAMASU and Akemi KAI

## IS6110が1コピーの株による結核感染事例の

### Variable Numbers of Tandem Repeats法を用いた分子疫学的解析

向川 純\*, 三宅 啓文\*, 山本 宣和\*, 貞升 健志\*, 甲斐 明美\*\*

結核感染事例のうち、IS6110が1コピーの株による事例について、VNTR法等で型別試験を実施し、型別性能を比較検討した。10事例より分離された14株は、RFLP法では約5 kbpに一本バンドを示し、各株ともほぼ同じ分子量で、事例内、事例間の区別ができなかった。従来より1コピー株の解析に用いてきたPGRS法では、事例ごとにパターンが異なり、事例間の区別をすることができた。VNTR法を用い多重反復配列37領域の検査を実施したところ、PGRS法と同等の区別をすることができた。VNTR法は、PGRS法に比べ手技が簡単で、結果が迅速に得られ、データベース化も容易であり、1コピーの株の解析にも有用であることから、今後の結核菌型別試験の標準法となることが予想される。

キーワード：RFLP法、IS6110、1コピー、PGRS法、VNTR法

#### はじめに

結核菌遺伝子タイピングの方法として、IS6110を用いた Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)法はその安定性と精度の高さから、世界的標準法とされ、結核集団感染の分子疫学的解析に応用されてきた。しかし、IS6110が5コピー以下の株については、RFLP法は鑑別能力が不十分であると言われ、Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence (PGRS)法、スポリゴタイピング等での型別試験が行われている。数年来より、結核菌の新しい型別法として Variable Numbers of Tandem repeats (VNTR)法が開発され、菌株識別能の高さ、データベース化の容易さが報告されている。我々もVNTR法について検討してきたが<sup>1-3)</sup>、今回は都内において結核集団感染事例より分離された、IS6110が1コピーの株について、VNTR法で型別試験を行いその解析能を検討したので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 材料

平成12年度より20年度の9年間に、都内で発生した結核感染10事例より分離された、IS6110が1コピーの結核菌株14株を用いた。

##### 2. DNA抽出

DNA抽出は、既報<sup>1)</sup>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°Cで20分間加熱殺菌後、プロテナーゼK・SDS・フェノール・クロロフォルムでDNAを抽出した。

##### 3. 遺伝子解析

##### 1) RFLP法

RFLP法は、高橋ら<sup>4)</sup>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ノフォス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。

##### 2) PGRS法

Cousinsらの方法で実施した<sup>5)</sup>。制限酵素はSmaI、ハイブリダイゼーションにはビオチン化PGRSプローブ(5'-ATC GGC AAC GGC GGC AAC GGC GGC AAC GGC GG-3')を使用した。

##### 3) VNTR法

各結核菌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, 40)<sup>6)</sup>、ETRの4領域(A, B, C, F)<sup>7)</sup>、QUBの9領域(11a, 11b, 18, 26, 1451, 1895, 3232, 3336, 4156)<sup>8)</sup>、Mtbの9領域(01, 04, 16, 21, 24, 29, 30, 38, 39)<sup>9)</sup>、そしてVNTR2372, VNTR3820, VNTR4120<sup>10)</sup>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。

#### 結果及び考察

##### 1. RFLP法による解析

図1に示したとおり、平成12年から20年度までの9年間に、東京都内において集団感染あるいは小規模感染を疑われた10事例より分離された、IS6110が1コピーの結核菌株14株のRFLPパターンを示した。すべての株で、約5 kbp前後のほぼ同じ大きさの一本鎖バンドが観察され、RFLP法では事例

\* 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

内での菌の同一性，事例間での関連の有無の識別をすることができなかった。

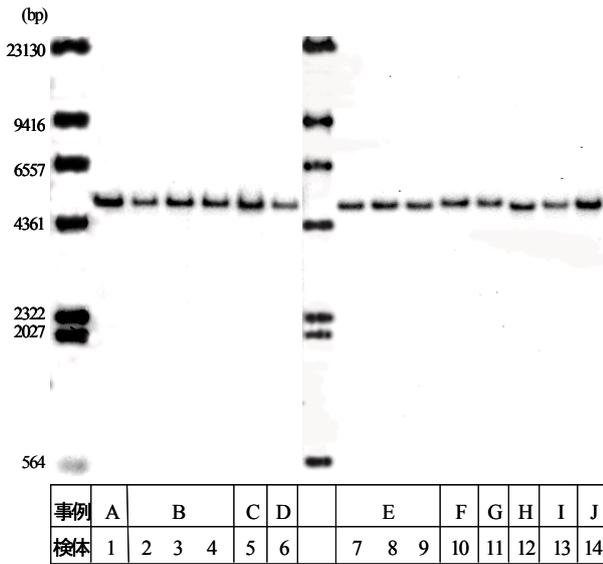


図1. RFLP法による解析

2. PGRS法による解析

図2にPGRS法による結果を示した。各株で，分子量4 kbp～10 kbpの間のバンドに多様性が観察され，事例Bでは，検体2～4が同一パターン，事例Eでは，検体7～9が同一パターンを示し，同一菌による感染が示唆された。また，他の事例では，事例ごとに異なるパターンを示し，各事例を区別することができた。一方，事例Aと事例Cの株は異なる事例由来であるが，類似したパターンを示した。

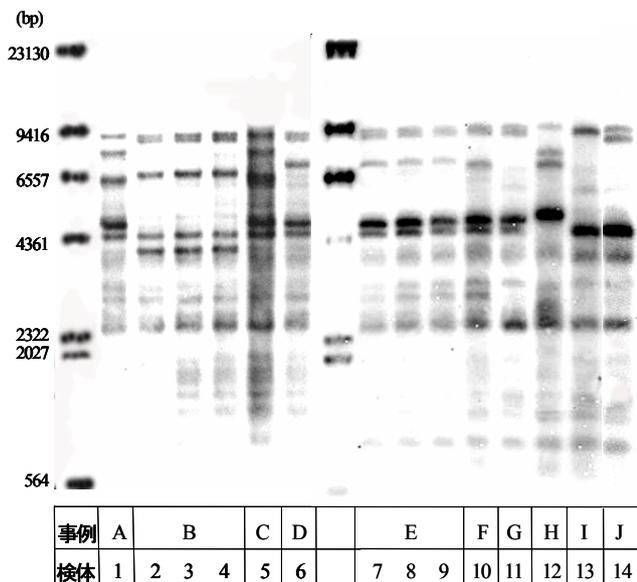


図2. PGRS法による解析

3. VNTR法による解析

表1にVNTR法による解析結果を示した。まず，松本ら<sup>11)</sup>によって提唱されたMIRU12領域と，ETR4領域の計16領域とPGRS法の結果を比較したところ，PGRS法では，事例Aと事例Bは異なるパターンを示したが，MIRU12領域と，

ETR4領域のVNTR法では事例A，B，Cは16領域が全く同じアレルプロファイルとなり，区別できなかった。また，事例G，I，Jも区別できなかった。QUBの9領域，Mtub9領域，その他領域3領域では，事例Aと事例Bでは，QUB18，QUB26，QUB3232，VNTR2372，VNTR4120の5領域が異なる反復数となり，事例G，I，Jでは，QUB26，Mtub04，Mtub16，Mtub 21，Mtub29，Mtub30，Mtub39，VNTR3820の8領域が異なる反復数を示した。

このようにMIRU12領域，ETR4領域にQUB，Mtubの領域を加え調査することで，各株，各事例を明瞭に区別できることが明らかとなった。また，事例B，事例Eでは事例内はすべて同じアレルプロファイルとなり，同一株による感染が示唆された。事例Eと事例Fは，PGRS法ではパターンが類似し区別が付きにくかったが，VNTR法では10箇所の相違があり，明瞭に区別できた。

一方，事例Aと事例Cの株は，PGRS法で同一パターン，VNTR法でもVNTR3820以外は，まったく同じアレルプロファイルとなった。VNTR3820は株間での変異が大きい領域で，同一菌による感染でもこの領域が異なる事例があることを我々は報告した<sup>3)</sup>。これらのことから事例AとCは異なる事例であるが，なんらかの関連があることが推定された。

表1. VNTR法による解析

MIRU2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
10	5	5	5	5	5	4	3	3	3	4	1	2	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
23	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1
27	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3
31	3	3	3	3	3	4	2	2	2	3	3	3	3	3
39	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
40	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ETR-A	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	1	3	3
B	2	2	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	4	4
F	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	3	2	2
QUB11a	6	6	6	6	6	7	7	7	7	9	7	5	7	7
11b	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	2	2
18	7	6	6	6	7	7	6	6	6	7	7	0	7	7
26	7	8	8	8	7	7	8	8	8	9	8	8	7	7
1451	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2
1895	4	4	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4	4	4
3232	5	4	4	4	5	5	3	3	3	4	4	6	4	4
3336	12	12	12	12	12	13	13	13	13	18	13	8	13	13
4156	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2
Mtub01	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	9	9
04	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	4	2	4
16	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2
21	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	3	3
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1
29	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4
30	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6
38	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	6	3	3	3
VNTR2372	1	3	3	3	1	3	3	3	3	4	3	2	3	3
VNTR3820	8	8	8	8	9	8	8	8	8	8	6	3	8	8
VNTR4120	4	3	3	3	4	5	4	4	4	3	4	4	4	4
事例	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J				
検体	1	2 3 4	5 6		7 8 9	10	11	12	13	14				

結核菌は通常1~19本のIS6110のコピー数を持ち、コピー数1と11の株が多いことが知られている<sup>4)</sup>。van Soolingenらがインドの南部で調査した株では、1コピー株は、ほとんどが1.5 kbpの同一の大きさを示した<sup>12)</sup>。高橋らの調査では、日本で分離された1コピー株は、約5 kbpの大きさを示すものが多く、1.5 kbの株は日本在住の外国人から分離されたものであった<sup>13)</sup>。今回、我々の調査でも、すべて約5 kbp前後の大きさの株であった。

都内で分離された1コピー株をRFLP法で遺伝子解析をした場合、このようにほとんど同じ大きさの単一バンドとなるため、同一菌由来の株か否か確認するために、PGRS法で検査を実施しているが、PGRS法は手技が難しく、多数のバンドが出現するため、明瞭なバンドを得るには熟練した手技を要する。また、スポリゴタイピングでは、マイクロプロッターなどの特別な器機が必要である<sup>14)</sup>。この点、VNTR法はサーマルサイクラーと、電気泳動装置があれば実施でき、結果も明瞭である。また、デジタルデータであるためデータベース化も容易で、他機関との情報交換に適している。一方、今回の結果からも判明したように、VNTR法は検査する領域の組み合わせによっては、異なる由来の菌でも同一菌と判定を誤る場合があり、集団感染かどうかの判定に大きな影響が生ずる恐れがある。

今後、VNTR法で用いるのに最適な領域の検討と、従来のRFLP法や他の遺伝子解析法との結果の比較検討が重要であろう。

### ま と め

我々は、これまでVNTR法を用いて、集団感染事例の解析をおこなってきた。今回、IS6110が1コピーの株について検討したところ、従来法であるPGRS法と同等の良好な結果を得た。一方、解析する領域の組み合わせによっては、

菌株識別能力が低下してくることも判明した。今後、VNTR法でもっとも菌株識別能力が高い領域の組み合わせについて検討し、実際の行政検体の検査に応用する必要がある。

### 文 献

- 1) 向川 純, 柳川義勢, 山田澄夫: 東京健安研七 年 報, **57**, 55-58, 2006.
- 2) 向川 純, 三宅啓文, 柳川義勢, 他: 東京健安研七 年 報, **58**, 57-61, 2007.
- 3) 向川 純, 三宅啓文, 吉田 勲, 他: 東京健安研七 年 報, **59**, 53-57, 2008.
- 4) 高橋光良, 安部千代治: 日細誌, **49**(5), 853-857, 1994
- 5) Cousins, D., Williams, S., Liebana, E., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3168-178, 1998.
- 6) Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3563-3571, 2001.
- 7) Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A.: *Microbiology.*, **144**, 3563-3571, 2002.
- 8) Roring, S., Scott, A., Brittain, D., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1189-1196, 2002.
- 9) Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F., et al.: *BMC Microbiology*, **2**, 37, 2002.
- 10) Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5034-5043, 2005.
- 11) 松本智成, 阿野裕美: 結核, **81**, 190, 2006.
- 12) van Soolingen, D., Hass, P., Hermans, M., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1987-1995, 1993.
- 13) 高橋光良: 資料と展望, **17**, 43-53, 1996.
- 14) Kammerbeek, J., Schouls, A., Kolk, M., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 907-914, 1997.

**Molecular Epidemiological Analysis of Tuberculosis Patients Infected with  
Single-IS6110-Copy Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Using the VNTR Method**

Jun MUKAIGAWA\*, Hirofumi MIYAKE\*, Nobukazu YAMAMOTO\*, Kenji SADAMASU\* and Akemi KAI\*

We performed molecular epidemiological analysis of tuberculosis patients infected with single-IS6110-copy strains of *Mycobacterium tuberculosis* using the VNTR method and examined the discriminative power of this method. Fourteen strains of *M. tuberculosis* isolated from 10 tuberculosis cases exhibited only one band by the RFLP method. The size of this band was almost 5 kbp, and it was difficult to distinguish individual strains and cases. Using the PGRS method, however, each strain and each case could be satisfactorily distinguished. Further, by analyzing 37 tandem repeat regions of the VNTR method, we could clearly distinguish each strain and each case. The VNTR method is technically easier than the PGRS method, and suitable for the construction of database for *M. tuberculosis*, yielding results faster than other methods. Furthermore, it is useful for the discrimination of single-IS6110-copy strains of *M. tuberculosis*. Consequently, it is anticipated this method will become a gold standard for the molecular typing of *M. tuberculosis*.

**Keywords:** restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, single-IS6110-copy strain, polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) method, variable numbers of tandem repeats (VNTR) method

---

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