

結核集団感染事例における分子疫学的解析法としての

Variable Numbers of Tandem Repeats法の活用

向川 純, 山本 宣和, 三宅 啓文, 貞升 健志, 甲斐 明美

Practical Use of VNTR Method as a Molecular Epidemiological Tool for Outbreak of Tuberculosis

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

結核集団感染事例における分子疫学的解析法としての

Variable Numbers of Tandem Repeats 法の活用

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

ストレプトマイシン耐性で同一RFLPパターンを持つ結核菌株が、都内各地よりほぼ毎年のように分離され、当センターでRFLP解析した結核菌株660株のうち5%を占めている。これらの株はすべてストレプトマイシンに高度耐性で、VNTR法で遺伝子型を詳細に解析するとほぼ同一のアリルプロファイルを示したが、部分的に異なる領域も存在した。これらの株が分離された事例間の疫学上の関連性は認められなかったが、RFLP法に変わる分子疫学解析法として、VNTR法の有用性が示唆された。

キーワード : RFLP法, VNTR法, ストレプトマイシン耐性株

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¹⁻³⁾。今回は、ストレプトマイシン (SM) 耐性で、同一のRFLPパターンを有する株が、当センターで解析した660株中、約5%の32株を占めていることから、これらの株をさらにVNTR法で詳細に解析し、合わせて、薬剤感受性、分離場所、感染事例の発生時期、発生状況、事例間の関連について調査したので報告する。

実験方法

1. 材料

平成12年度から21年度の10年間に、都内で分離された結核菌660株のRFLPパターンを解析し、その中から事例A~MのSM耐性で、かつ同一RFLPパターンを示した結核菌32株を用いた。

2. 薬剤感受性試験

液体培地に接種した菌を、McFarland No.1の濃度まで培養し、ブロスミックMTB-I法(極東製薬)を用いて最小発育阻止濃度(MIC値)を調査した。

3. 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°Cで20分間加熱殺菌後、プロテナーゼK・SDS・フェノール・クロロフォルム法でDNAを抽出した。

4. RFLP分析

RFLP法は、高橋ら⁴⁾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、ピ

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。

5. 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7領域(10, 16, 23, 26, 31, 39, 40)⁵⁾、ETRの2領域(A, C)⁶⁾、QUBの9領域(11a, 11b, 15, 18, 26, 1895, 3232, 3336, 4156)⁷⁾、Mtubの7領域(04, 16, 21, 24, 30, 38, 39)⁸⁾、そしてVNTR2372, VNTR3820, VNTR4120⁹⁾の計28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. SM耐性で同一RFLPパターンを示した株の分離状況

SM耐性で、同一RFLPパターンを示す株が平成12年から17年にかけて19株分離²⁾、平成17年から21年には新たに13株分離された。

図1に示したように、これらの株の推定感染地は、都内各地並びに神奈川県北部に広がっていた。分離された年度も様々であり、我々がRFLP解析を開始した平成12年度よりほぼ毎年のように検出されている。

感染事例及び推定感染地は、病院(事例A, 事例C)、集合住宅(事例B)、学校(事例G, 事例H)、遊戯店(事例D)、会社(事例E, K)、24時間営業の飲食店(事例F)、飲食店(事例J)、地域(事例I, 事例L, 事例M)と様々で、各事例間の関連は認められなかった。また事例Gは神奈川県北部地域の居住者並びにその親戚関連の感染事例であった。事例Mでは1~2年のあいだに近接した地域から9株の結核菌が分離されたが、各患者の接点は不明で集団感染事例

* 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

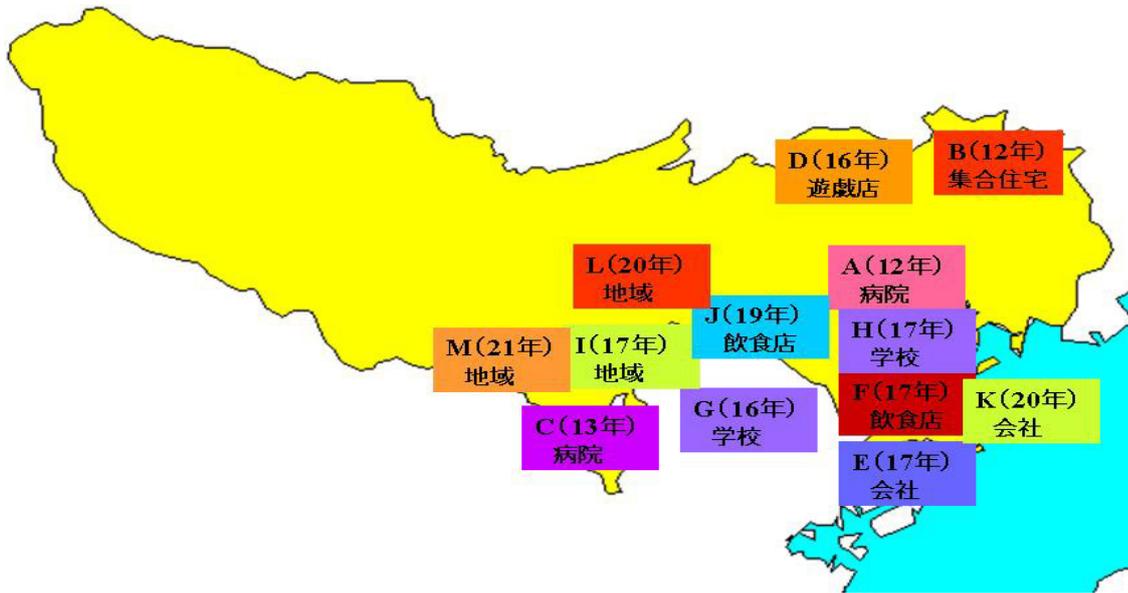
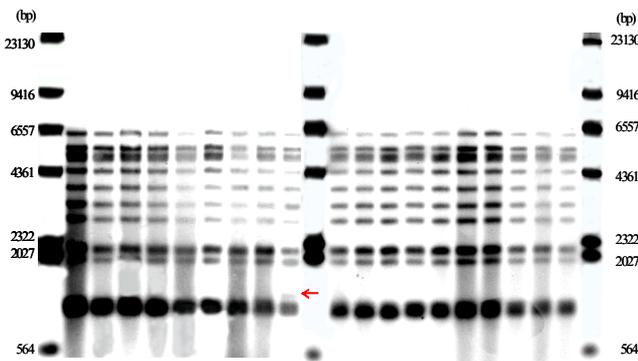


図1 分離場所と分離年度

かどうかは判定できなかった。

2. 薬剤感受性試験の結果

調査した32株はすべて SM 高度耐性で、MIC 値が128 µg/mL 以上であった。他の薬剤には感受性であったが、平成12年の事例 B は2株とも同時にイソニアジド (INH) にも耐性であった。事例 B 以外に SM 及び INH 耐性の株は分離されていない。

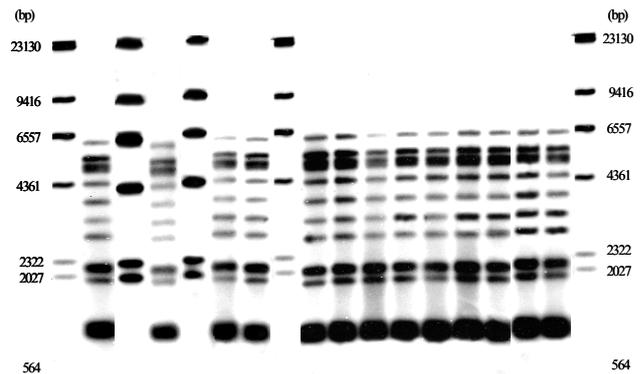


検体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
事例	A (12年)	B (12年)	Q (18年)	D (16年)	E (17年)	F (17年)	G (16年)	H (17年)											
場所	病院	集合住宅	病院	遊戯店	会社	飲食店	学校	学校											

図2. 平成12年から17年分離株のRFLPパターン

3. SM耐性株のRFLPパターン

図2に示したとおり、平成12年から17年に分離された株では、事例Eの矢印の部位に一本バンドが付加されている以外は、検体1から19まで同一のRFLPパターンであった。なお、検体1~3は同一患者で採取時期の異なる喀痰から分離された株である。



検体	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
事例	I (17年)	J (19年)	K (20年)	L (20年)	M (21年)								
場所	地域	飲食店	職場	地域	地域								

図3. 平成17年から21年分離株のRFLPパターン

図3に示したとおり、平成17年から21年にかけて分離された株もすべて同一 RFLP パターンであった。なお事例 E で見られたバンドは認められていない。

4. VNTR法による解析

表1、表2に示したとおり、VNTR 法で調査した28領域のほぼすべての領域で各株のアリルプロファイルの結果が一致し、株間での相違はあっても1領域で、複数の領域における相違はなかった。

事例内では事例 A、F を除いてアリルプロファイルはすべて一致したが、事例間では一部異なる成績を示した菌株が複数認められた。すなわち ETR-C の反復数が一ヶ所異なる株が3株（事例 G、神奈川県関連株）、QUB1895一ヶ所が

1株 (事例 C), QUB3232 一ヶ所が1株 (事例 A), Mtub21 一ヶ所が1株 (事例 F), VNTR3820一ヶ所が1株 (事例 F), VNTR4120一ヶ所が3株 (事例 E, K, L) であった. なお複数の領域で相違がある株はなかった. A, F 以外の事例では事例ごとに分離株のアリルプロファイルは一致し, それぞれの事例内における感染と考えられた. 一方で, 24時間営業の飲食店事例 F で分離された株では, 3株でそれぞれ異なる領域があり, 感染経路の解明にはさらなるデータの蓄積及び検討が必要である.

変異のあった領域のうち, ETR-C は多様性が低く, 我々がこれまで解析した株では, ほとんどが反復数4であり²⁾, この領域の相違は, 遺伝学的に大きな意味があると考えられる. 事例 G では ETR-C の反復数は5であり神奈川県北部で分離されたが, 都内では反復数5の株は検出されておらず, 感染者2名は神奈川県北部在住で, 残りの1名はそのうちの1名の親戚関連であったことから, この株がこの地域に昔から定着している可能性が示唆される.

一方, 他の領域は, 多様性が比較的高い領域で, 変異しやすい領域と考えられる. 特に QUB3232は, 事例 A で同一人物由来であるが異なる時期に分離された菌株間で18から14へと変異しており, この領域が非常に変異しやすいことを示している.

これらのことから, この同一の RFLP パターンを持つ株が, 以前から都内, 神奈川県北部の各地で感染を繰り返し,

その過程で VNTR の領域が部分的に変化してきたことが推定される.

今回我々の VNTR28領域を解析した結果から, SM 耐性株は株間で7領域の相違が観察された. すなわち, RFLP 法では同一と判定されているが, 我々の使用した28領域の VNTR では少なくとも, 11株になんらかの相違が認められることが示唆された. 一方, 結核研究所の提唱する JATA12 (MIRU10, MIRU16, MIRU31, QUB11b, QUB15, QUB26, QUB3336, QUB4156, Mtub04, Mtub21, Mtub24, VNTR2372 の12領域)あるいは JATA15 (JATA12に, ETR-A, QUB11a, QUB18の3領域を加えたもの)¹⁰⁾領域の解析では Mtub21が4 (3株)あるいは3 (1株)の違いだけで, 他の領域はすべて同一アリルプロファイルとなり, すべての事例が同一の菌株由来による集団感染と判断を誤る恐れがある. 海外では Supply¹¹⁾の15領域あるいはこれに地域特異的な領域を加えた方法が標準となりつつあり, 今後わが国においても, VNTR 法の解析領域数について統一化し, データの共有化・共同利用していく施策が必要になると思われる.

5. 北京型結核菌

32株はすべて, 北京型結核菌株¹²⁾であった. 北京型は東アジアに広く蔓延しているタイプの株で, 日本では約80%が北京株といわれており, 我々の報告でも都内で分離された株は約80%が北京型であった²⁾.

表1. 平成12年から17年に分離された株の VNTR アリルプロファイル

		検体No.																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
		A(12年)			B(12年)			C(13年)		D(16年)		E(17年)		F(17年)			G(16年)			H(17年)		
遺伝子座	通称名	病院			集合住宅			病院		遊戯店		会社		飲食店			学校			学校		
0960	MIRU10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
1644	MIRU16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
2531	MIRU23	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
2996	MIRU26	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7		
3192	MIRU31	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
4348	MIRU39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
0802	MIRU40	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
2165	ETR-A	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
0577	ETR-C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	4	4	4		
2163a	QUB11a	8	8	8	8	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
2163b	QUB11b	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
3155	QUB15	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
1982	QUB18	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
4052	QUB26	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
1895	QUB1895	4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
3232	QUB3232	18	14+18	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14		
3336	QUB3336	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7		
4156	QUB4156	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
0424	Mtub04	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
1442	Mtub16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
1955	Mtub21	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4		
2074	Mtub24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
2401	Mtub30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
3663	Mtub38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
3690	Mtub39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
2372	VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
3820	VNTR3820	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14+15?	14	14	14	14	14	14	14	14	14		
4120	VNTR4120	9	9	9	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9		

注: 14+18あるいは14+15は2種類の反復数を持つ株が混在していると考えられる株である.

表2. 平成17年から21年に分離された株の VNTR アリルプロファイル

遺伝子座	通称名	検体No.												
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	28	30	31	32
		I(17年)	J(19年)	K(20年)	L(20年)	M(21年)								
地域	飲食店	会社	地域	地域										
0960	MIRU10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
1644	MIRU16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2531	MIRU23	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2996	MIRU26	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
3192	MIRU31	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
4348	MIRU39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
0802	MIRU40	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2165	ETR-A	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
0577	ETR-C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2163a	QUB11a	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2163b	QUB11b	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
3155	QUB15	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1982	QUB18	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
4052	QUB26	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
1895	QUB1895	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3232	QUB3232	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
3336	QUB3336	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
4156	QUB4156	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
0424	Mtub04	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1442	Mtub16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1955	Mtub21	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2074	Mtub24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2401	Mtub30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3663	Mtub38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3690	Mtub39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2372	VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3820	VNTR3820	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
4120	VNTR4120	9	9	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9

6. VNTRとINH耐性化

我々は、RFLPパターンは同一でも、感染事例が異なる場合、詳しいVNTR解析で複数の領域が相違することがあり、異なった菌由来の感染事例であると判別できることを報告した³⁾。一方で、SM耐性で同一RFLPパターンを示す株は、各事例間でVNTR法による結果がほとんど同じアリルプロファイルを示し、異なっても一領域の相違であり、事例間の区別が困難であった。

平成12年に分離された事例Bの株は同時にINH耐性であったが、それ以降にINH耐性株は出現しておらず、耐性株が感受性株になる可能性は低いと考えられることから、RFLPパターン、VNTRのアリルプロファイルは同じでも、他の事例は事例Bで分離された株とは関連のない株による感染事例であると考えられる。同様に、岩本らは今回の32株と同一RFLPパターンを持つが、SM感受性であり、VNTR法でも類似したアリルプロファイルを持つ株の存在を報告している¹³⁾。RFLP法、VNTR法の結果のみならず薬剤感受性試験の結果もこれらの菌株の分別には必要な要素となると考えられる。

まとめ

今回の調査で、SM耐性32株のVNTR各領域の組み合わせが遺伝学的に安定で変化しにくい、あるいは、まだ未分化でこれから遺伝子が変化していく過程の途中である、という可能性が示唆される。これらの株を区別するには新たな他の遺伝子マーカーなどの調査も必要と思われる。

今回報告したSM耐性株は、東京のみならず、千葉県の一部からも分離され、いくつかの感染事例を起こしたとの報告がある(私信)。これらの株による感染拡大を防ぐためには、首都圏の他の衛生研究所、自治体の感染症担当者と連携して、これらの株についての疫学的情報、分子遺伝学的情報を集約する必要がある。

文献

- 1) 向川 純, 柳川義勢, 山田澄夫: 東京健安研七年报, **57**, 55-58, 2006.
- 2) 向川 純, 三宅啓文, 柳川義勢, 他: 東京健安研七年报, **58**, 57-61, 2007.
- 3) 向川 純, 三宅啓文, 吉田 勲, 他: 東京健安研七年报, **59**, 53-57, 2008.
- 4) 高橋光良, 安部千代治: 日細誌, **49**(5), 853-857, 1994
- 5) Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3563-3571, 2001.
- 6) Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A.: *Microbiology*, **144**, 3563-3571, 2002.
- 7) Roring, S., Scott, A., Brittain, D., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1189-1196, 2002.
- 8) Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F., et al.: *BMC Microbiology*, **2**, 37, 2002.
- 9) Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5034-5043, 2005.
- 10) 前田伸司, 村瀬良朗: 結核, **83**, 230, 2008.

- 11) Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4489-4510, 2006.
- 12) Warren, R. M., Victor, T. C., Streicher, E. M., *et al.*: *Am. J. Resir. Crit. Care. Med.*, **169**, 610-614, 2004.
- 13) 岩本朋忠, 藤山理世, 白井千香, 他: 結核, **85**, 411, 2010.

**Practical Use of VNTR Method as a Molecular Epidemiological Tool
for Outbreak of Tuberculosis**

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

Large numbers of *Mycobacterium tuberculosis* strains with the same IS6110 pattern and streptomycin-resistance have been isolated nearly every year in Tokyo, and reached 5% of 660 strains analyzed by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. We performed further analysis of these strains using the variable number tandem repeat (VNTR) method. These strains were highly resistant to streptomycin, and were highly conserved at 28 regions of tandem repeats analyzed, with 1 or no regions different from each other. Patient situation and geographic location of tuberculosis cases by these strains was discussed.

Keywords: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method, streptomycin-resistant strain, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) method

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