

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 AP-PCR 法及び VNTR 法の比較検討

向川 純*, 柳川 義勢*, 山田 澄夫**

Comparison of AP-PCR and VNTR method as a Molecular Epidemiological Tool for Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis*

Jun MUKAIGAWA*, Yoshitoki YANAGAWA* and Sumio YAMADA**

Keywords : 結核集団感染 outbreak of *Mycobacterium tuberculosis*, IS6110-RFLP 法 IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism method, AP-PCR 法 Arbitrarily Primed PCR method, VNTR 法 Variable Number Tandem Repeats method

はじめに

結核集団感染疑い事例解明のための分子疫学的方法として、結核菌特異的な挿入配列である IS6110 を用いた Restriction Fragment Length Polymorphism (IS6110-RFLP) 法 (以下 RFLP 法と略す) が広く用いられているが、 μg 単位のゲノム DNA を必要とし、結果がでるまでに一カ月以上を要することもあり、蔓延実態の迅速な解明が困難になっている。近年、PCR 法を用いた新しい迅速な結核菌型別法として、Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) 法や、Variable Number Tandem Repeats (VNTR) 法が報告されている。本報告では、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 AP-PCR 法や VNTR 法の有用性について、東京都内で発生した結核集団感染が疑われる事例より分離された菌株の、RFLP 法での解析結果と AP-PCR 法並びに VNTR 法との結果を比較し、それぞれの検査法の特性を検討した。

実験方法

1. 材料

平成 12 年度より 17 年度の 6 年間に、東京都内で発生した結核集団感染を疑われる 19 事例より分離された結核菌 69 株を用いた。

2. DNA の抽出

結核菌を小川培地より回収し、80°C で 20 分加熱殺菌後、プロテナーゼ K・SDS・フェノール・クロロホルム法で DNA を抽出した。

3. RFLP 分析

RFLP 法は、高橋¹⁾らの方法に従い、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た。次いで、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. Polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) 法

Ross²⁾らの方法に従い、DNA の切断を *SmaI* で行い、ビオチン化 PGRS プローブ (5'-ATC GGC AAC GGC GGC AAC GGC GGC AAC GGC-3') でハイブリダイゼーションを行った。

5. AP-PCR 法

松井³⁾らの方法に従って行った。20 ng の結核菌 DNA を鋳型に用い、IS6110 中の塩基配列を元にしたプライマーセットである 1903F (5'-CGC CAG AGA CCA GCC GCC-3') と、92R (5'-CCG CAC CGC CCG CTC ACG CA-3') を用い、denaturation 94°C 1 分、annealing 58°C 6 分、extension 72°C 6 分のサイクルを 40 回行った。サイクラーは Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600-R (ロッシュ・ダイアグノステック社) を用い、増幅した PCR 産物を、3.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジンプロマイドで染色し観察した⁴⁾。

6. VNTR 法

松本⁵⁾らの方法に従って、MIRU⁶⁾ 12 領域、ETR⁷⁾ 4 領域、計 16 領域を検査し、反復配列数 (アシルプロファイル) をもとめた。MIRU は、2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40, ETR は A, B, C, F の各領域をそれぞれのプライマーで増幅し、PCR 産物の DNA サイズから、反復配列数を測定した。

* 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

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

** 東京都健康安全研究センター微生物部

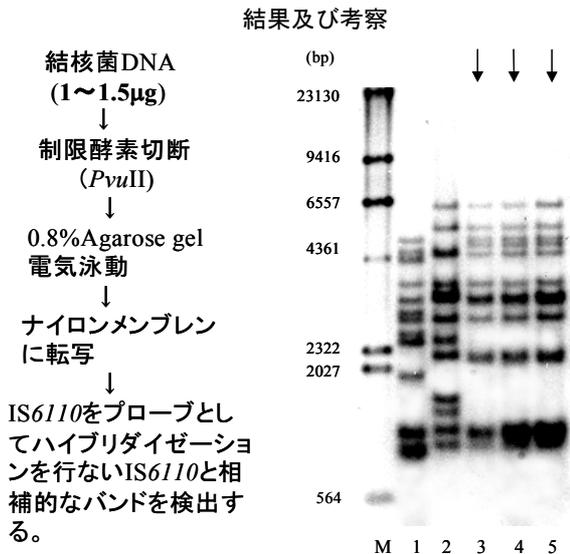


図1. RFLP法

1. RFLP 法と AP-PCR 法の結果の比較

図1に RFLP 法の方法を示した。図のように、5 株中、3, 4, 5 が同じパターンを示しており、同一感染源による感染であることが推定された。このように RFLP 法は、株間の差がわかりやすく、結果が明瞭であり、そのパターンの類似度から、クラスター分析をおこなうことができる¹⁾。しかしながら、結核菌の DNA を μg 単位で必要とするため、結果を得るためには一月以上を要する場合もあり、その感染事例の疫学的解析情報の提供が遅れることも多い。

たプライマーセットで PCR を行うが、その際、アニーリングの温度を少し低く、時間を長くして、塩基配列の似通った部位にも対合するようにし、多数の共通バンドを出現させ、その中の数本の異なるバンドを検出するため、判定には慎重を要するが、結核菌 DNA が 10 ng 以上あれば検査でき、プライマーも一組で検査できるため、簡便で迅速な結果が得られる長所がある。

表1. 結核感染疑い19事例でのRFLP法とAP-PCR法の結果の比較

		RFLP法		計
		同一パターン	異なるパターン	
AP-PCR法	同一パターン	10	1	11
	異なるパターン	0	8	8
計		10	9	19

表1は、結核感染疑い19事例での RFLP 法と、AP-PCR 法の結果を比較したものである。RFLP 法による解析で同一パターン10事例、異なるパターン9事例であることが判明した。ほとんどの事例で両法による結果は一致したが、RFLP 法で異なるパターンで、AP-PCR 法で同じパターンになった1事例について、図3に示した。

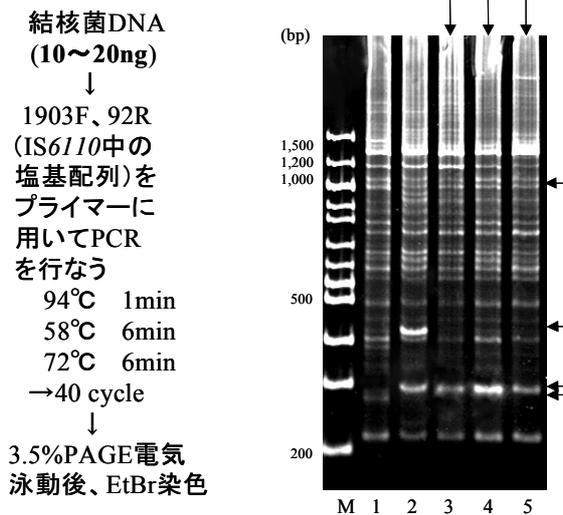


図2. AP-PCR法

図2に、前述の RFLP 法と同じ菌株を用いて AP-PCR 法で検査した結果を示した。RFLP 法と同様に、検体3, 4, 5 が同じパターンを示し、1, 2 と異なるパターンであることが判別できる。異なるバンドの位置は、図右の矢印で示した。AP-PCR 法は、IS6110 中の塩基配列を元にし

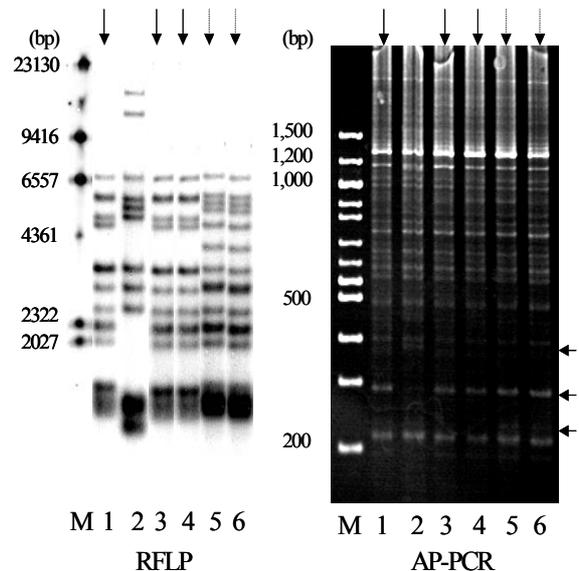


図3. RFLP法 AP-PCR法による結核菌の型別検査

(RFLP法で分別でき、AP-PCR法で一分別できなかった事例)

この事例から検出された6株の解析結果は、図の左の RFLP 法で1, 3, 4と、5, 6がそれぞれ同じパターンで、2がそれらと異なり、3つのパターンに分かれた。図の右の AP-PCR 法では、2は他と異なることが判定できるが、

1, 3, 4 と 5, 6 は明瞭な分別ができなかった. この事例のように, RFLP 法で数本の違いのある場合でも, AP-PCR 法では十分分別できない場合があることが判明した.

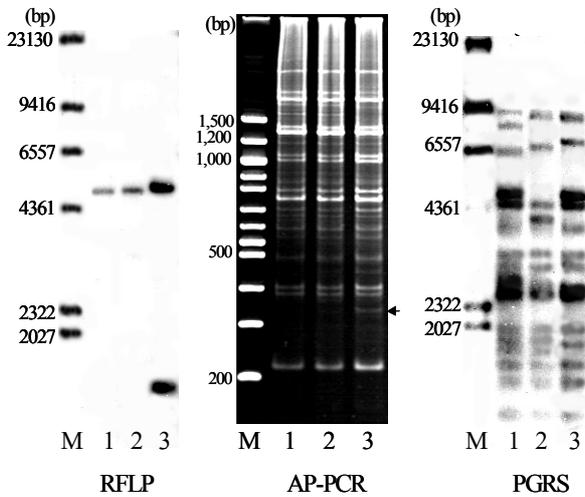


図4. RFLP法で一本あるいは二本バンドを示した株のAP-PCR, 及びPGRS法による型別検査

図4は, 図の左のように, RFLP 法で一本あるいは二本バンドを示した株を AP-PCR 法で解析したものである. 図の真中のように, AP-PCR 法では一本バンド株 2 株は差がなく, また一本と二本バンド株間も十分分別できなかつた. そこで, PGRS 法を用いると, 図の右のように一本バンド 2 株も, また一本バンド 2 株と二本バンド株も, それぞれ異なるパターンを示し, 明瞭に分別することができた. この結果から, AP-PCR 法は, RFLP 法で一本あるいは二本バンドの株の解析には不十分で, PGRS 法やスポリゴタイピング法⁸⁾での解析が必要であることが判明した.

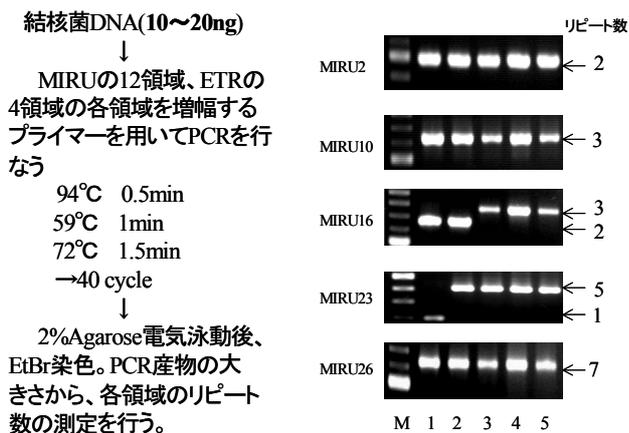


図5. VNTR法

2. RFLP 法と VNTR 法の結果の比較

図5にVNTR法の方法を示した. VNTR法はAP-PCR法と同様にPCRを用いた方法であるが, 標的遺伝子がIS-6110と異なり, 結核菌遺伝子中に複数箇所存在する9~110塩基対(bp)の直列に反復される塩基配列 (tandem repeats) の

存在する領域において, 反復数が株によって異なることを利用して型別する方法であり, 各領域を増幅するプライマーを用いて, PCR法によって遺伝子を増幅し, 増幅産物のサイズから反復数を求め, 各領域の反復数 (アレルプロファイル) を株間で比較する方法である.

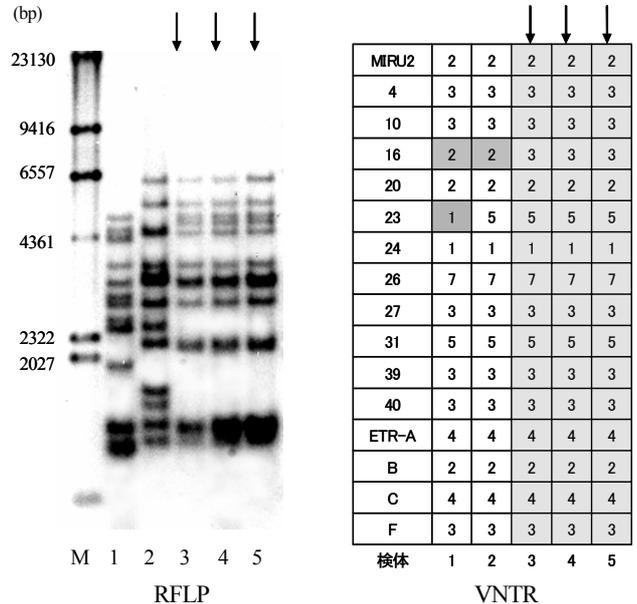


図6. RFLP及びVNTR法による結核菌の型別検査 (RFLP法とVNTR法で同じ結果となった事例)

図6にRFLP法とVNTR法の結果を比較した. VNTR法の数値は各領域の反復数を示している. この事例では3, 4, 5がRFLP法で同じパターンであるが, VNTR法でも各領域が同じ反復数を示し, 1, 2とはMIRU16や23の反復数が異なっていることがわかる.

表2. 結核感染疑い19事例でのRFLP法とVNTR法の結果の比較

		RFLP法		計
		同一パターン	異なるパターン	
VNTR法	同アレル	7	0	7
	異なるアレル	3	9	12
計		10	9	19

表2は, 結核感染疑い19事例でのRFLP法と, VNTR法の結果を比較したものである. ほとんどの事例でRFLP法とVNTR法の結果は一致したが, RFLP法で同一パターンにもかかわらず, VNTR法で異なるアレルプロファイルを示した事例が3事例あった. RFLP法で異なるパターンを示した事例において, VNTR法で同じアレルプロファイルになった事例はなかった.

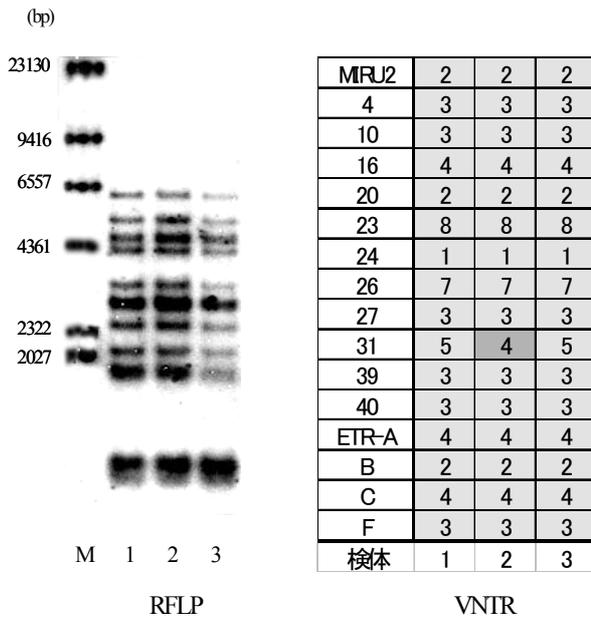


図7. RFLP及びVNTR法による結核菌の型別検査 (RFLP法とVNTR法で異なった結果となった事例)

図7にRFLP法とVNTR法で異なった結果となった事例の一つを示した。RFLP法で菌株1, 2, 3が同じパターンを示したが、VNTR法では菌株2はMIRU31が他の株と異なっていた。他の事例では、ETR-Fが1ヶ所異なっていた事例、MIRU23と31の2ヶ所が異なっていた事例があった。

ま と め

RFLP法は、株間のDNAパターンの違いが明瞭で、識別が容易であり、現在、結核菌型別検査の標準法となっている。しかし、検査に μg 単位のDNAを必要とし、菌の培養を含めると解析までに時間がかかる欠点がある。一方、AP-PCR法はng単位のDNAで解析可能であり、簡便で迅速な型別検査が行える。RFLP法で数本異なるバンドがあった株の一部で、AP-PCR法で同じパターンとなり、分別の難しい場合や、RFLP法で一本バンドや二本バンドの株は、十分分別できない短所もある。また、AP-PCR

法は多数の共通バンドの中に異なる数本のバンドを検出する必要があり、判定には慎重を要するが、RFLP法と同じIS6110を標的とするため、両法ではほぼ同じ結果を得ることができた。

VNTR法は、結果がアリルプロファイルという形で数値化でき、過去の株との比較、他の施設の株との比較が簡単である一方、多数の領域を検査する必要があり、IS6110とは異なる遺伝子を解析するため、異なる結果になることがある。今回用いたMIRU12領域、ETR4領域の他にも、QUB, Mtubといった領域が報告されており、集団感染疑い事例の解明にはどの領域を何ヶ所検査すべきか、またどの領域が異なっていれば異なる株と判定するかなど今後検討すべき課題が多い。そこで、現段階においてはAP-PCR法でスクリーニングを行い、異なるパターンのものは、散發事例と考え、同一パターンのものは同一感染源による感染の可能性が高いので、さらにRFLP法で確認する方法により、検査の効率化、迅速化が図れると考えられる。

謝 辞 北里大学医療衛生学部の栗原未来さんに協力いただいた。ここに感謝する。

文 献

- 1) 高橋光良, 安部千代治: 日細誌, **49** (5), 853-857, 1994.
- 2) Ross, B. C., Raios, K., Jackson, K., et al.: *J. Clin. Microbiol.* **30**, 942-946, 1992.
- 3) 松井則夫, 油納善久, 芳川信治, 喜多英二: 感染症誌, **72** (9), 890-896, 1998.
- 4) 向川 純, 下島優香子, 村田以和夫, 遠藤美代子, 柳川義勢, 諸角 聖: 感染症誌, **77** (12), 1040-1048, 2003.
- 5) 松本智成, 阿野裕美: 結核, **81** (3), 190, 2006.
- 6) Supply, P., Lesjean, S. and Savine, E. et al.: *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3563-3571, 2002.
- 7) Frothingham, R., and Meeker-O'Connell, W. A.: *Microbiology*, **144**, 1189-1196, 1998.
- 8) Sola, C., Filliol, I., Gutierrez, MC., et al.: *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 390-396, 2001.