

遺伝子タイピングによる県内の結核菌の動態

A Molecular Approach to Studying the Transmission of Tuberculosis in Miyagi prefecture

畠山 敬 矢崎 知子

Takashi HATAKEYAMA, Tomoko YAZAKI

過去に県内から収集された結核菌に、RFLP法とVNTR法を用いた遺伝子解析を行った結果、同じ遺伝子パターンを持つ26組(67株)のクラスターと167株のユニークパターンが得られた。これにより、県内における結核菌の蔓延状況を調べたところ、特定の株が近隣の地区ばかりでなく広域に拡散している実態が明らかとなった。

キーワード：結核；分子疫学；RFLP；VNTR

Key words : tuberculosis ; molecular epidemiology ; restriction fragment length polymorphism (RFLP) ; variable numbers of tandem repeat (VNTR)

1 はじめに

古典的な結核疫学は、患者の発症までの経過や行動、関連する人たちとの接触歴などの情報を基礎とした分析であった。しかし、最近の遺伝子解析技術の進歩に伴い、結核菌遺伝子中に存在する特定箇所の遺伝子配列の変化の比較により菌の亜分類が可能となった。これにより、結核疫学は患者側からの情報に加え、原因菌からの遺伝子情報という科学的根拠を基に正確性の高い疫学対応を行うことが可能となった。現在では global standard としての RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素断片長多型) 法¹⁾と、新しい解析方法である VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeat) 法^{2,3)}が主流となっている。

RFLP法は、結核菌群遺伝子特有のトランスポゾン (*IS6110*) をサザンハイブリダイゼーションで検出する方法であるのに対し、VNTR法は、菌に存在する一連の遺伝子群が移動や欠損した時に残る数十塩基の DNA の繰り返し配列 (Tandem Repeat: 以下, TR) 数を測定する方法である。変化に富む複数の遺伝子座を標的として PCR を行い、そのアレルプロファイルの違いから菌の区別を行うものである。この方法は喀痰からの直接解析も可能で、複数の有効なプライマーの組み合わせにより RFLP に匹敵する解析力を示すとされている。

宮城県でも平成11年から RFLP法を結核菌遺伝子解析手法として導入しており、院内感染や家族内蔓延の解明など、遺伝子解析により様々な疫学問題の処理を行った。

しかし、RFLP法は、菌の培養から結果を得るまでに長時間を必要とし、加えて手技の複雑さというルーチンを困難とさせる2つの大きな問題を持っている。

そこで、本研究では、簡便で迅速な VNTR法を用いて結核菌遺伝子の比較を行い RFLP法との相関を明らかにすること、および両方法によって得られた結果から、様々な角度で県内の結核菌の発生と蔓延状況を解析することを研究の目的とした。

2 材料および方法

2.1 材料

結核・感染症菌発生动向調査事業により、各保健所が集めた結核菌234株を使用した。

2.2 方法

2.2.1 RFLP 解析

RFLPは Takahashi⁵⁾らの方法で実施した(図1)。

培養で十分量に達した結核菌から、Isoplant (ニッポンジーン社)で遺伝子を抽出し、制限酵素 *Pvu* II (TaKaRa社)で切断して電気泳動を行った。遺伝子断片をハイブリダイゼーション膜 (Hybond N+: アマシャムバイオサイエンス社)に転写した後に、Biotin Luminescent Detection Kit (Roche社)で化学発光を行い、X線フィルムで検出を行った。

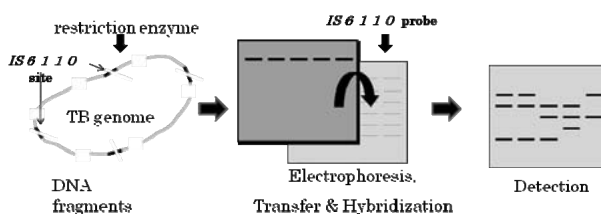


図1 RFLP法の概要

2.2.2 VNTR 解析

VNTRは Sola²⁾, Frothingham⁶⁾, Skuce⁷⁾らの方法に従った。すなわち、MIRU (12組: 2・4・10・16・20・23・24・26・27・31・39・40), ETR (4組: A・B・C・F), QUB (4組: Q5・Q11a・Q11b・Q18)の各領域を標的とする合計20組のプライマーを選び、TaKaRa Ex Taq custom ver.1 (2×GC buffer)を使用して各温度条件でPCRを実施した。それぞれの文献に記載されている算出方法に従ってTRのコピー数を決定し、一連の連続データ(アレルプロファイル)として遺伝子情報を表示した(図2)。

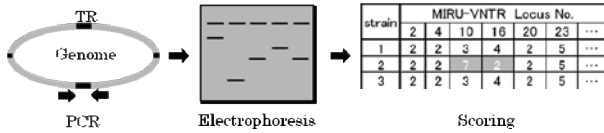


図2 VNTR法の概要

3 結果

3.1 VNTR法とRFLP法との比較

両解析方法による分別能力の違いを調べるため、VNTR法でアリルプロファイルが共通であった23組について、RFLP法でのクラスター解析を行った。その結果、アリルプロファイルが共通である株はRFLP解析においてもほぼ全て（22組）がVNTRの場合と同一のグループに含まれた。RFLPで明らかに異なるパターンを示した株は1組（No.9）2株のみであり、その一致率は95%以上であった（図3）。

また、VNTR法はRFLP法で直別困難な株の分別に適しており、県内各地に既に定着している株と流行株を詳細に区別することが可能であった（図4）。

3.2 共通な遺伝子タイプを持つ株の地域的蔓延状況

上記の二つの遺伝子解析方法で県内患者株、および患者関連株の分布との関連性を調査した。その結果、共通事例の一部は同一または近隣の保健所管内ばかりでなく県内各地に広がっており、他の自治体が関連する例も含め、患者間の広範囲な関連性を疑うべき例が存在することが確認された（図5）。

また、いずれかの患者株と共通パターンを持つ株の存在割合は67株（他自治体関連分2株含む）と全体の約3割であり、特に海岸沿いのA、B保健所管内と県北部のE保健所管内で多い傾向が認められた（表1）。

3.4 時系列による流行のモニタリング

また、同一の遺伝子タイプを持つ株の検出時期を時系列的に解析した場合、既に蔓延を停止していると考えられる株や、現在も活動し今後も患者発生の予想される株などの傾向を推察することが可能であった（図6）。

4 考察

結核は、単一血清型原因菌による感染症としてはもっ

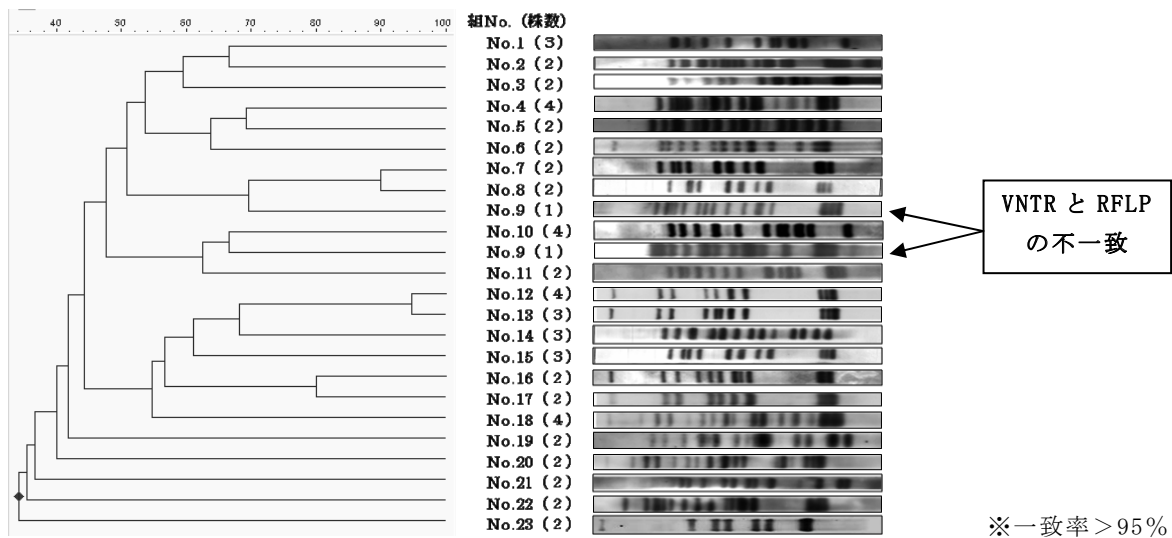


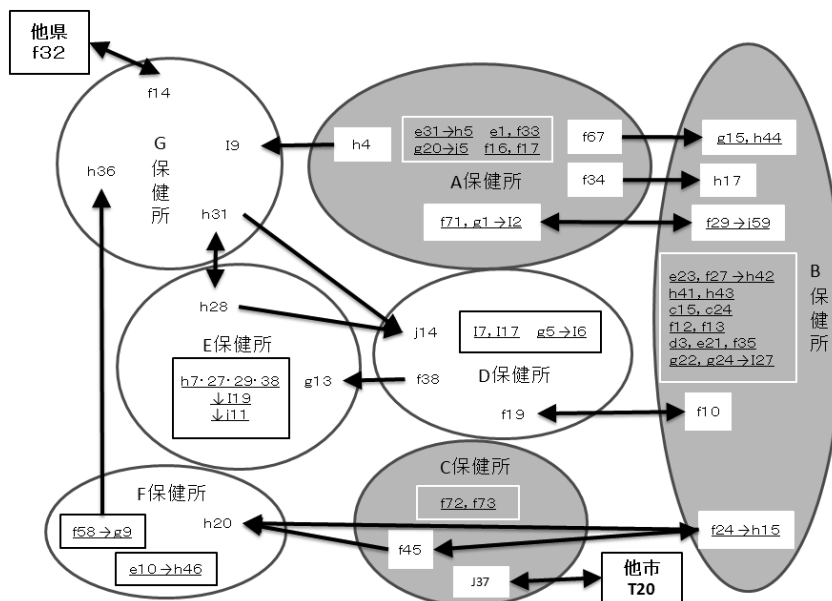
図3 アリルプロファイルが共通な株のRFLP法による再解析例

RFLP pattern	VNTR allele profile																			
	MIRU												ETR				QUB			
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C	F	5	11a	11b	18
[RFLP pattern]	2	2	1	3	2	5	1	7	3	5	3	3	3	2	4	3	4	11	7	11
[RFLP pattern]	2	2	1	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	3	4	11	7	11
[RFLP pattern]	2	2	1	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	3	4	11	7	11
[RFLP pattern]	2	2	1	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	3	4	9	6	11
[RFLP pattern]	2	2	1	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	3	4	11	11	11
[RFLP pattern]	2	2	1	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	3	4	11	8	11

※白抜き数字の部分は他と異なるコピー数であることを示す

図4 RFLP類似パターンにおけるVNTR法による詳細解析の例

※一致率 > 95%



注 1：アルファベットは患者の登録年度を示す（Kは平成20年度）
 注 2：矢印は患者間の関係を示す
 注 3：色塗りの保健所は海岸部の保健所を示す

図5 遺伝子タイプ共通事例の県内における蔓延状況

とも感染者が多く、世界では毎年2～300万人が死亡している。また、世界人口の1/3が結核菌に感染していると考えられており、この傾向が続けば、今後も20年間で2億人が結核を発症する危険があるとされる。

日本は先進国の中では最も罹患率が高く、結核に関しては後進国である。また、近年の長寿命化により既感染高齢者の発症が増えており、老人介護に関わる人たちが感染するケースが多く報告されている。さらに、最近で

は結核菌への抵抗力の少ない若年層での感染が多く見られるようになったことから、防疫対策は必須である。

国内で見ると、宮城県は毎年150人前後と恒常的な発生があるものの人口対10万人比は11.5（2007年）と低蔓延状態（10以下）に近く、このような状況下では接触者検診等による感染源の特定は極めて困難であり、むしろ分子疫学的解析が必要であると言わざるを得ない（図7）。

このような状況に対し、我々は平成10年度からRFLP法を行政検査に導入し、平成17年度にはVNTR法を導入した。RFLP法は結核菌株の代表的な比較方法として多くの地方衛生研究所で実施されており、その解析能力と有効性は高く評価されている⁹⁾。しかし、RFLPでは多量の結核菌を使用するため培養を必要とし、検出法も複雑であるという問題があった。これに対し、VNTR法はPCR法の応用であることから微量な菌からの検出も可能で、ガフキー陽性者の検体を直ちに試験に供することができるという特徴を持っている。また、遺伝子情報をデジタルデジタル化して提示することが可能なため、多くの施設間で菌株の情報をreal timeに交換し

表1 共通パターン株の保健所別存在割合

保健所名	A	B	C	D	E	F	G	他	計
供試株数	43	54	29	32	25	29	20	2	234
共通パターン株数	14	23	4	7	8	5	4	2	67
割合	0.33	0.43	0.14	0.22	0.32	0.17	0.20	1.00	0.29

※A～C：海岸部，D～F：県中央部・北部，G：県南部
 他：その他の自治体由来株

RFLP and VNTR information	~2005	2006	2007	...2008~
...	2 (cases)	-	-	終息株?
...	2	-	-	要観察株
...	3	-	-	
...	2	1	-	要注意株
...	1	1	-	
...	-	2	-	
...	1	4	-	要注意株
...	2	2	-	
...	1	-	1	要注意株
...	2	-	1	
...	2	1	1	

図6 特定株の蔓延規模と活動可能性の予測

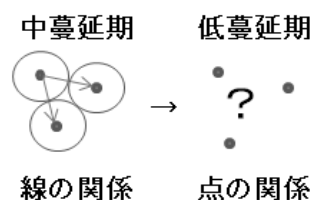


図7 結核蔓延パターンの推移

比較できるという利点を持つ (図 8)。

患者	VNTR(MIRU-ETR-QUB)	RFLP
父(初発)	223326133311-3243-4,4,5,6	
兄	223325173433-4243-4,10,7,9	
母	223326133311-3243-4,4,5,6	
弟	223326133311-3243-4,4,5,6	

図 8 家族内感染事例の VNTR による迅速解析結果

そこで本研究では、比較的古くから海外の研究者により研究されている MIRU, ETR, さらに QUB という 3 つの領域を併せて解析実験を行った。その結果, VNTR による分類と RFLP との一致率が約 95% まで上昇することが判明した。さらに, RFLP では判別不能な類似パターンを TR の相違から再評価することで菌株を詳細に分類することが可能であった。

これらの方法により, 県内の結核の動態を調べた結果, 共通症例は全体の約 3 割で, 地方の都市部 (規模の大きい漁港など) に共通症例が多いことが明らかとなった。さらに, 約 7 割の株には遺伝子の共通性がないことから, これら多くは既感染発病または県外地域からの蔓延である可能性が示された。

また, 院内感染や家族内感染など, 不特定多数株の感染の可能性が否定できる症例の証明は VNTR 単独の比較解析が有効であり, 初発患者が MDR (多剤耐性結核) 株の場合などでは, その迅速性から結果を直ちに関連患者の治療に応用することが可能であると考ええる。

このような有効性から, 今や結核菌遺伝子解析法は VNTR 法が主流となりつつある。現在は, 結核研究所と地方衛生研究所を中心とする研究グループが国内の株の特徴に合わせたプライマーの設計を行っており¹⁰⁾, 今後はこれらのプライマーによって結核菌遺伝子解析方法の全国統一化が図られるものと思われる。

参考文献

- 1) van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993 ; 31(2) : 406-9.
- 2) Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Loch C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the Mycobacterium

tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet Evol. 2003 Jul ; 3(2) : 125-33.

- 3) Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Loch C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol. 2001 Oct ; 39(10) : 3563-71.
- 4) Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Loch C. Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. Mol Microbiol. 2000 May ; 36(3) : 762-71.
- 5) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Hirano K, Mori T, Dale JW, Abe C. Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related Mycobacterium tuberculosis isolates. Microbiol Immunol. 1993 ; 37(4) : 289-94.
- 6) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiol. 1998 ; 144(Pt 5) : 1189-96.
- 7) Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG, Neill SD. Discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiol. 2002 Feb ; 148(Pt 2) : 519-28.
- 8) Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 ; 26(11) : 2465-6.
- 9) 大島律子 多田敦彦. 岡山県で分離された結核菌 DNA の IS6110-RFLP パターン分析. Kekkaku. 2002 ; vol77(10) : 629-637.
- 10) Maeda S, Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S. Rapid, simple genotyping method by the variable numbers of tandem repeats(VNTR) for Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan-analytical procedure of JATA(12)-VNTR. Kekkaku. 2008 ; 83(10) : 673-678.