

短 報

VNTR法を利用した結核菌の 遺伝子型別

高橋智恵子¹, 富岡敏昭², 綿貫祐司²,
西森 敬³, 岡崎則男¹

Molecular Typing for *Mycobacterium tuberculosis* by Variable Numbers of Tandem Repeats Analysis

Chieko TAKAHASHI¹, Toshiaki TOMIOKA²,
Yuji WATANUKI²,
Kei NISHIMORI³ and Norio OKAZAKI¹

はじめに

結核の集団発生時には、感染経路・感染源を解明し、感染の拡大および再発の防止を図ることが重要である。このための分子疫学的手法として、主にRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法による結核菌分離株の遺伝子型別が、国際標準法として実施されてきた^{1,2)}。しかし、この方法は、制限酵素処理、電気泳動、サザンブロッティングおよびDNAハイブリダイゼーション等の複雑な工程と機器および高度の技術を必要とする。また、所要日数も1週間以上であり、結果が画像であるため、施設間のデータを比較することが困難である。これらの難点を解消する方法として最近Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法が検討されている^{3,4)}。VNTR法は、DNA上に存在する縦列反復塩基配列 (20~100bp) の反復数が、菌株により異なることを利用して型別をする方法で、PCRと電気泳動を基礎技術としているため迅速かつ簡便である。さらに、結果を数値化することにより、施設間のデータ比較が容易であり、広域データベースの構築も可能とされる。これらの利点から、結核の分子疫学的手法として現在有望視されている^{5,6)}。しかし、VNTR法は、いまだに確立されたものではなく、結核菌DNA

の抽出、DNA上の解析領域、PCR条件およびPCR産物の解析等の基礎的部分においても検討課題が残されているのが現状である。

本報では、VNTR法による結核菌の遺伝子型別を実施する際のDNA調製法、PCR反応液および電気泳動用アガロースゲルの種類と濃度等について検討したのち、臨床材料より分離された50株のVNTR解析を行った結果、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

結核予防会結核研究所より分与された結核菌*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra株 (弱毒標準株) を用いて基礎的検討を行った。さらに、1996~2004年に県内医療機関で患者より分離された結核菌50株を用いてクラスター解析を実施した。分離株中には同一患者由来株 (3名より2株ずつ: 6株)、検査室交差汚染の疑い株 (3株) および家族内由来株 (2株) が含まれていた。

2. 結核菌DNAの調製

2%小川培地 (極東製薬) に発育した結核菌集落2~3個を鈎菌し、以下に記述する5種類の方法でPCR用テンプレートDNAの調製を行った。①精製水抽出法⁷⁾ および②TE緩衝液抽出法⁸⁾ は、それぞれの液に浮遊後100℃20分加熱抽出したもの、③精製水抽出後フェノール/クロロホルム抽出したもの⁹⁾、④アイソプラント (ニッポンジーン) で抽出したもの¹⁰⁾ および⑤インスタジーンDNA精製マトリックス (以下インスタジーン、バイオラッド) で抽出したもの¹¹⁾ である。④、⑤は試薬添付の説明書に従って操作した。また、③、④、⑤の抽出液については、Ultrospec 3100 pro (アマシャムバイオサイエンス) によりDNA濃度を定量した。PCR用テンプレートDNAとして用いる際に①および②は、100倍希釈し、③、④および⑤は、DNA濃度を2μg/mlに調製した。希釈には、精製水を使用した。

3. PCR反応液・標的増幅領域・PCR条件

PCR反応液は、Premix Taq (以下Premix, タカラバイ

表1 VNTR法で使用した解析領域

TBTR 1	ETR-A	TBTR 9	MIRU-16
2	ETR-B	10	MIRU-20
3	ETR-C	11	MIRU-23
4	ETR-D	12	MIRU-24
5	ETR-E	13	MIRU-26
6	ETR-F	14	MIRU-27
7	MTRU-2	15	MIRU-39
8	MIRU-10	16	MIRU-40

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
chieko.vvme@pref.kanagawa.jp

2 神奈川県立循環器呼吸器病センター

3 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

オ) およびpuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (以下Ready,アマシャムバイオサイエンス)の2種類を使用した。増幅領域およびプライマーは、西森らの報告¹¹⁾に従った。ETR領域³⁾ およびMIRU領域⁴⁾ から選択された16箇所の解析領域を表1に示したが、西森らはこれらをTBTR 1~16として記載しており、本報ではその記載に従った。なお、TBTR 10,12,13および14の4領域を増幅するためのプライマーは、西森ら¹¹⁾ が独自に設定したものである。PCR条件は、95℃5分のプレヒーティング後、94℃10秒、68℃30秒、72℃60秒の増幅サイクルを36回実施した。

4. PCR産物の解析

PCR産物の電気泳動には、アガロースH14 (タカラバイオ) およびNuSieve 3:1アガロース (タカラバイオ) を2あるいは3%の濃度で使用した。泳動終了後のアガロースゲルをエチジウムプロマイド染色し、泳動像をパソコンに取り込み、DNAサイズマーカー (100bp DNA Ladder, タカラバイオ) を目安として、目視あるいは画像解析ソフトEDAS290FF (インビトロジェン) にて、16箇所の解析領域のDNAバンドのサイズを判読した。

5. 臨床分離株のクラスター解析

臨床分離株50株について、各DNAサイズから反復塩基配列の反復数を換算表¹¹⁾より求めた。この16の反復数の並びをVNTRパターンとし、解析用ソフト秀吉 (社会情報サービス) を用いて、ユークリッド距離 (ワード法) によるクラスター解析を行った。

結果および考察

1. VNTR条件の基礎的検討結果

結核菌H37Ra株を用い、PCR用テンプレートDNAの調製法を比較検討したところ、表2に示すように①~⑤の方法の内、⑤インスタジーンによる抽出が簡便性およびDNA回収量共に最も優れていた。①精製水あるいは②TE緩衝液での加熱抽出は、簡便ではあるもののタンパク質の混入量が多くDNA定量ができないため、菌株ごとのDNA濃度を一定にすることが困難であった。また、③精製水で加熱処理後にフェノール/クロロホルム抽出

表2 テンプレートDNA抽出法の比較

抽出法	操作	核酸濃度(μg/ml)
精製水	簡便	測定不能
TE緩衝液	簡便	測定不能
フェノール/クロロホルム	煩雑	51.8
アイソプラント	煩雑	44.4
インスタジーンマトリックス	簡便	137.8

あるいは④アイソプラントによる抽出は、DNA回収量において⑤の約3分の1量しか回収できず、さらに④は、操作が煩雑で時間を要した。これらの結果から、DNA抽出にはインスタジーンを使用することとした。

次に、PCR反応液としてPremixとReadyを比較すると、結核菌H37Ra株を用いた場合は両者においてPCR結果に優劣は認められなかった。しかし、臨床分離株では、Premixを使用した場合菌株により、16箇所の解析領域の中で増幅されない領域が認められたが、Readyの使用により増幅が確認された。VNTR法では、1菌株につき16箇所をPCRで増幅するため、まず、経費の面でより安価なPremixでPCRを実施し、良好な結果が得られなかった菌株については、Readyを用いて再試験をすることとした。

PCR産物の電気泳動に用いるアガロースH14とNuSieve 3:1アガロースを比較したところ、日常使用しているアガロースH14で十分使用可能であった。NuSieve 3:1アガロースでは、DNAバンドがよりクリアに観察されたが、この製品は高価であることから、アガロースH14による泳動においてDNAバンドが不明瞭でサイズの判読が不可能な場合にのみ使用することとした。ゲル濃度は、2および3%で泳動像に違いは認められなかったが、3%アガロースH14は硬く破損し易いため、2%での使用が有用と考えられた。以上の検討結果から、インスタジーンによるテンプレートDNAの調製後、Premixを用いてPCRを実施し、2%アガロースH14で泳動を100V 40分行うこととした。図1に、この条件で行った結核菌H37Ra株の泳動像とVNTRパターンを示した。

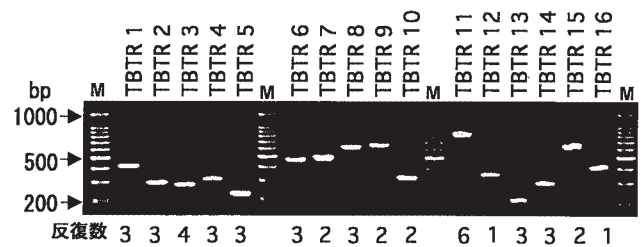


図1 Mycobacterium tuberculosis H37Ra 株のVNTR解析におけるPCR産物のアガロース電気泳動像およびVNTRパターン
M:100bp DNA ラダー

2. 臨床分離株のクラスター解析

供試した分離株50株中多くが上記の条件で解析が可能であったが、2株にDNAが増幅されない領域を認めたため、前述の通りTaqとアガロースを変更して良好な結果が得られた。こうして得られた50株のVNTRパターンは、ユークリッド距離によるクラスター解析を実施し、図2に示すようなデンドログラムを作成した。供試した

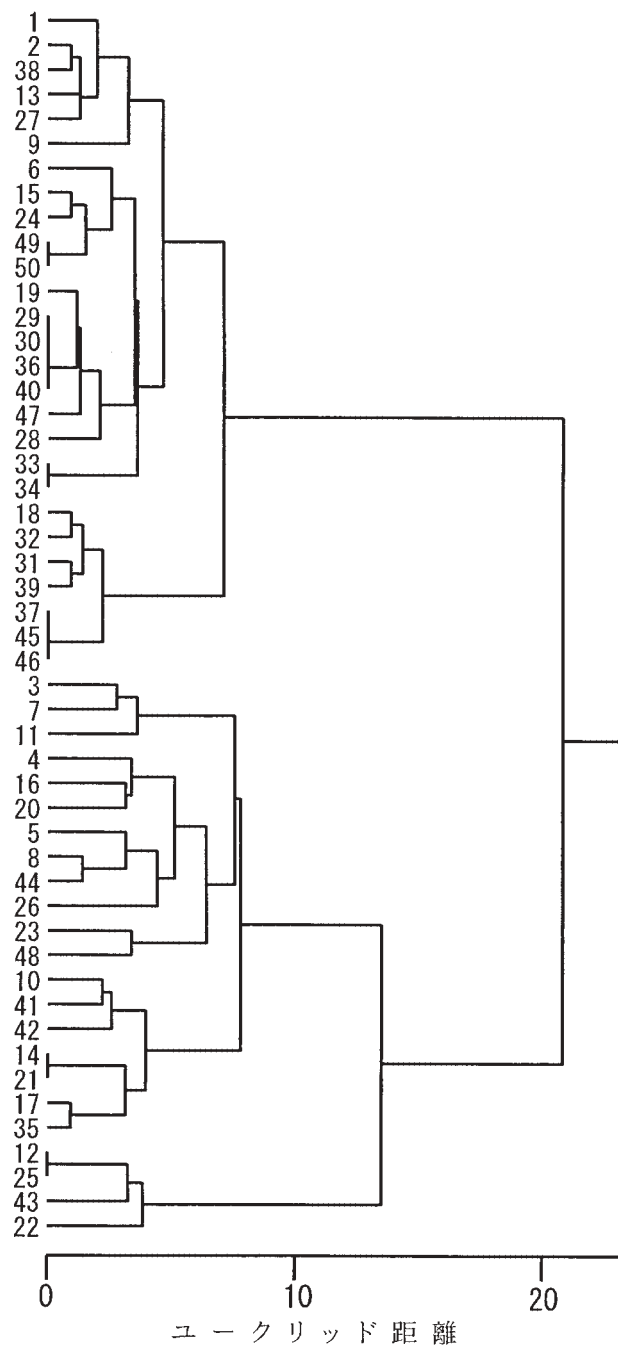


図2 結核菌分離株50株のVNTR解析によるデンドログラム

分離株50株は、41型に型別され、6組15株がクラスターを形成し、最大クラスターは4株が1組、3株が1組、2株が4組であった。クラスターを形成した菌株のVNTRパターンを表3に示した。菌株No.29, 30の2株および33, 34の2株はそれぞれ同一患者由来で、これらは初発時の菌が体内に残存し、数年後に再発した再燃例であると推定された。一方、同一患者由来の2菌株でも、VNTRパターンが一致しなかった例（菌株No.31と32）があり、これらは外来性の再感染と推察された。結核再発が内因性再燃か外因性再感染かは、治療薬剤の選択において重

表3 クラスターを形成した6組15株のVNTRパターン

菌株No.	TBTR領域															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
29	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
30	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
36	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
40	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3
37	4	2	4	2	5	3	2	1	2	2	5	1	7	3	3	3
45	4	2	4	2	5	3	2	1	2	2	5	1	7	3	3	3
46	4	2	4	2	5	3	2	1	2	2	5	1	7	3	3	3
33	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	3	7	3	3	3
34	4	2	4	2	5	3	2	3	3	2	5	3	7	3	3	3
14	3	2	4	2	4	3	2	4	3	2	6	1	5	3	1	1
21	3	2	4	2	4	3	2	4	3	2	6	1	5	3	1	1
12	4	6	4	5	3	3	2	4	3	2	6	2	2	3	3	2
25	4	6	4	5	3	3	2	4	3	2	6	2	2	3	3	2
49	4	2	4	2	4	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	2
50	4	2	4	2	4	3	2	3	3	2	5	1	7	3	3	2

表4 分離株(50株)のTBTR領域(16箇所)における反復数の分布

反復数	TBTR領域															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1			1		1	1	3		8	1		43	2		9	8
2	2	45		44	1	5	50	4	7	49		5	5	1	15	13
3	14		2		13	42		26	40	1	1		2	3	48	26
4	33	1	47	2	9			11	2		3		5	1		3
5			1	3	26			1			38		8			
6	1	3									7		1			1
7											1		22			
8													4			

要視され、今回の結果は、VNTR法がこれに迅速に対応できることを示すものである。また、菌株No.37, 45, 46の3株は、検査室からの情報により検査室内における交差汚染が疑われたもので、これらがクラスターを形成したことで交差汚染であることが裏付けられた。この例では、交差汚染の原因が究明された後、検査方法が改善され、交差汚染の再発防止につながったことからVNTR法が結核菌検査の精度管理にも有用であることが示された。菌株No.49, 50は同一家族内の株で、家族内での感染あるいは感染源が同じであると推定された。このように、今回の臨床分離株におけるVNTR解析結果は、ある程度の疫学的背景を反映しており、VNTR法が結核の分子疫学的解析に有用であることを示すものと考えられる。

しかし、関連性が確認されていない菌株No.36と40, 14と21, 12と25であってもクラスターを形成した。これらは隠れた関連を持つ可能性があるものの、VNTR法の解析精度を向上させることにより型別され、クラスターを形成しなくなる可能性も否定できない。そこで、今回のVNTR法の解析精度の裏付けになると考えられる16箇所の各解析領域の反復数分布を調べた。その結果、表4に示すように、TBTR 2, 3, 7, 10および14の領域においては90%以上の菌株が特定の反復数に集中していることから、これらの領域は型別に寄与する可能性が低いことが判明した。

結核菌のVNTR法による遺伝子解析領域としては、今

回使用した領域の他にQUB領域およびMtub領域等が報告されている⁶⁾。これらの領域については本邦ではいまだ活用されていないが、今後他の領域を検討することにより解析精度の向上が可能と考える。上述したように、今回、臨床分離結核菌50株を供試した範囲では、有用とは思われない解析領域が存在したが、それらの領域の有用性を今回の成績のみで判断することは早計であろう。今後、多数の株についてVNTR解析を進めながら、新たな解析領域の利用を検討し、解析精度の向上を図る必要があると考えられた。

謝 辞

最後になりましたが御指導を頂きました微生物部新川部長ならびに尾上副部長に深謝いたします。

(平成18年7月20日受理)

文 献

- 1) Takahashi, M., Y. Kazumi, Y. Fukasawa, K. Hirano, T. Mori, W. Dale et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates, *Microbiol. Immunol.*, **37**, 289-294 (1993)
- 2) 向川 純, 下島優香子, 村田似和夫, 遠藤美代子, 柳川義勢, 諸角 聖: 結核集団感染の分子疫学的解析における Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) 法の有用性, *感染症誌*, **77**, 1040-1048 (2003)
- 3) Forthingham, R., and W.A. Meeker-O'Connell: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats, *Microbiology*, **144**, 1189-1196 (1998)
- 4) Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel and C. Loht: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome, *Mol. Microbiol.*, **36**, 762-771 (2000)
- 5) Kremer, K., C. Arnold, A. Cataldi, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, S. Panaiotov et al.: Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5628-5638 (2005)
- 6) Le Fleche, P., M. Fabre, F. Denoed, J. L. Koeck, and G. Vergnaud: High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing, *BMC Microbiol.*, **2**, 1-12 (2002)
- 7) Roring, S., A. Scott, D. Brittain, I. Walker, G. Hewinson, S. Neill et al.: Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2126-2133 (2002)
- 8) Skuce, R. A., T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain et al.: Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets, *Microbiology*, **148**, 519-528 (2002)
- 9) Easterbrook, P. J., A. Gibson, S. Murad, D. Lamprecht, N. Ives, A. Ferguson et al.: High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study, **42**, 4536-4544 (2004)
- 10) 川合常明, 廣地 敬, 赤石尚一, 大谷倫子, 藤田晃三, 品川雅明ほか: 結核菌の制限酵素多型分類: 第一報; 方法の検討, *札幌市衛研年報*, **27**, 52-56 (2000)
- 11) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 西森知子, 今井邦俊, 柏崎佳人ほか: VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル, *動衛研研究報告*, **109**, 25-32 (2003)