

結核菌の分子疫学解析における Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法の検討

浅井 紀夫 杉浦 伸明 真田 正稔 和田宗之* 長谷篤*

Examination of VNTR Method on Epidemiology of *Mycobacterium Tuberculosis* by Molecular Techniques

Norio ASAI Nobuaki SUGIURA Masatoshi SANADA Muneyuki WADA* Atushi HASE*

大阪市立環境科学研究所の協力を得て、京都府保健環境研究所における行政検査として結核 JATA (12)-VNTR を実施するための検査プロトコルについて検討した。検体の種類をはじめ、抽出条件、PCR 条件、菌株の保存状態が解析に及ぼす影響について詳細に試験し、以下のプロトコルが最も優れた手法であると結論した。小川培地保存株上のコロニーを検体とし、遺伝子用滅菌蒸留水中で浮遊させ、ヒートブロックで 98°C 15 分熱処理後、氷冷により DNA を抽出した後、20 µL の反応スケールで、熱処理 94°C 5 分の後、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 63°C 30 秒、伸長 72°C 3 分の増幅反応を 35 サイクル繰り返し、72°C 3 分の最終伸長の条件で PCR 反応を行う。この方法を用いて、京都府内で分離された菌株について JATA (12)-VNTR のパターン解析を行い、結核感染源の同一性の特定に優れた方法であることを再確認した。また、長期保存株や死菌からも簡便に解析を行えることから疫学調査に有用な方法であると考察した。

キーワード：結核菌、縦列反復配列多型 (VNTR)、PCR、分子疫学、制限酵素断片長多型 (RFLP)
key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Variable numbers of tandem repeats, Polymerase Chain Reaction, Molecular Epidemiology, Restriction Fragment Length Polymorphism

はじめに

結核菌感染症における分子疫学調査方法としては Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法が広く行われている¹⁾。しかし、この解析法は 1 µg 以上の精製された高分子 DNA を用いるため、大量の結核菌が必要となる。生菌を扱うことによる検査担当者への感染危険性は高く、増殖速度が遅い結核菌の大量培養には長期間 (通常 1 か月以上) を要し、感染源の特定など緊急を要する疫学調査に利用できない。また、電気泳動条件等の差違が、検出バンドのパターン、膜への転写・固定およびハイブリダイゼーションへ与える影響は大きく、その上、画像による診断のため、同時に検査を行わなかった株間の比較は困難である。このような問題点から、京都府では RFLP 解析を必要に応じて結核検査専門機関である (公財) 結核予防会結核研究所へ依頼している。しかし、依頼料は高価で、事例が発生してから結果を得るまでに 2、3 か月程度必要とすることから、RFLP 法による迅速な疫学調査を行うことは困難な状態となっている。

Supply ら²⁾ は *Mycobacterial interspersed repetitive units* と呼ばれる部位での配列の繰り返し数を測定することから結核菌の分類方法を開発した。PCR を用いる分子疫学手法であり、少量の未精製 DNA を検体として用い、

死菌からの解析も可能であるため、安全面でも優れた方法である。さらに結果を数値化できるため、データの保存・蓄積、施設間での比較・検討にも有利である。この方法は世界規模で収集された菌株の分類では優れた解析能力を有するが、各地域内で分離される近縁株の型別分類には限界がある。「北京型ファミリー」と呼ばれる結核菌系統群が 80% を占める日本の分離菌株を解析すると、大きなクラスターが残り、さらに細分した分類をしないと疫学手法としては使用できない³⁾。

そこで、前田ら⁴⁾ は日本で分離される菌株に有用な分類ができる遺伝子部位を検討し、Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) 12-VNTR (以下「VNTR」という) 法を確立した。これは結核菌の JATA1~JATA12 と呼ばれる 12 か所の領域での配列の繰り返し数を測定することによる分類法である。平成 19 年から近畿各府県において VNTR 法の実用化が検討されてきた。VNTR 法の解析結果は検体の状態や使用する機器、試薬の種類に影響を受けやすいため⁵⁾、施設毎の詳細なプロトコルを作成する必要がある。

そこで、VNTR 法の実践的な検査法について検討を行い、作成したプロトコルを用いて実サンプルの疫学的解析を試みたので報告する。

材料と方法

1. 検体

京都府で 2000 年 1 月から 2012 年 3 月に分離され小川培地に保存された 35 株、および 2011 年 3 月から 2012 年

(平成 24 年 7 月 31 日受理)

* 大阪市立環境科学研究所

* Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

3月に分離されMIGIT培地に保存された6株、の合計41株を用いて検討した。MISIT培地については、検体が保健所から搬入された後、10日以内に試験に供した。

2. 実験方法

2-1. Template DNA の調製

小川培地の検体については以下の2方法を用いてTemplate DNAを調製した。①培地試験管をオートクレーブMSS-325 (TOMY製)で121℃15分あるいは30分加熱処理した後、水冷し、試験管内に残存する凝固水と菌塊を回収し、11,000rpmで1分間遠心した上清をTemplate DNAとした。②1μLプラスチックエーゼで小川培地上の生菌コロニーを掻き取り、遺伝子用蒸留水50μLに十分懸濁し、オートクレーブ121℃ないしはヒートブロックDTU-2B (TAITEC製)98℃で、15分ないしは30分加熱処理後、冷却し、11,000rpmで1分間遠心した上清をTemplate DNAとした。

MIGIT培地の検体については、①50μLを1.5mLエッペンドルフチューブに分注したもの、あるいは②これを11,000rpmで1分間遠心した沈渣をTE buffer (日本ジーン製)50μLで再浮遊し、再度、遠心・再浮遊を繰り返した(以下「洗浄処理」という。)ものをそれぞれヒートブロックにより98℃15分加熱処理後、水冷し、11,000rpmで1分間遠心した上清をTemplate DNAとした。

2-2. 使用プライマー

感染微生物技術協議会から表1に示した塩基配列のプライマー(50μM)の提供を受け、希釈せずに使用した。

2-3. PCR

反応試薬は前田ら⁵⁾の方法を参考に以下の割合で調製した。25.0μLの2×GC buffer I (TAKARA製)、5.0μLのdNTPs (TAKARA製)、0.25μLのEX Taq HSver. (TAKARA製)および0.5μLの各プライマーを混合し、遺伝子用蒸留水で47.5μLにメスアップしたものにTemplate DNAを2.5μL加えた後、35μLのミネラルオイル (Sigma製)を重層した(以下「50μLスケール」という。)。また、ミネラルオイルを除く全ての試薬等を2/5倍量とし、ミネラルオイルを26μL重層したもの(以下「20μLスケール」という。))およびミネラルオイルを除く試薬等を1/5倍量とし、ミネラルオイルを19μL加えたもの(以下「10μLスケール」という。))の3タイプを調製した。それぞれをTAKARA PCR Thermal cycler 480 (TAKARA製)を用い、熱処理94℃5分の後、熱変性94℃30秒、アニーリング63℃30秒、伸長72℃3分の増幅反応を35サイクル行い、最終伸長72℃3分の条件でPCRを行った。

当所のサーマルサイクラーはミネラルオイル添加型の50μLチューブを使用する型式であり、ミネラルオイル無添加型の20μLチューブを使用するサーマルサイクラー

表1.VNTR解析に使用したプライマーの塩基配列

JATA1-F (JATA1 領域)	5'-CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT-3'
JATA1-R (JATA1 領域)	5'-GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC-3'
JATA2-F (JATA2 領域)	5'-GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC-3'
JATA2-R (JATA2 領域)	5'-GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT-3'
JATA3-F (JATA3 領域)	5'-AGACGTCAGATCCCAGTT-3'
JATA3-R (JATA3 領域)	5'-ACCCGACAACAAGCCCA-3'
JATA4-F (JATA4 領域)	5'-TGTGTACCTGACGATTTCAAGG-3'
JATA4-R (JATA4 領域)	5'-TGGCCGGCAAATAATGGATGC-3'
JATA5-F (JATA5 領域)	5'-CCGATGTAGCCCGTGAAGA-3'
JATA5-R (JATA5 領域)	5'-AGGGTCTGATTGGCTACTCA-3'
JATA6-F (JATA6 領域)	5'-ACCTCCGTTCCGATAATCCG-3'
JATA6-R (JATA6 領域)	5'-CAGCTTTCAGCCTCCACAAT-3'
JATA7-F (JATA7 領域)	5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC-3'
JATA7-R (JATA7 領域)	5'-CATAGGCGACCAGGCGAATAG-3'
JATA8-F (JATA8 領域)	5'-GCCAGCCGTAACCCGACCAG-3'
JATA8-R (JATA8 領域)	5'-GGGCCGGAATTCGAGTGG-3'
JATA9-F (JATA9 領域)	5'-ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA-3'
JATA9-R (JATA9 領域)	5'-GTGCCGACGTGGTCTTGAT-3'
JATA10-F (JATA10 領域)	5'-ATCCCCGCGGTACCCATC-3'
JATA10-R (JATA10 領域)	5'-GCCAGCGGTGTCGACTATCC-3'
JATA11-F (JATA11 領域)	5'-GTGCCGCGCCAGGTCTTCC-3'
JATA11-R (JATA11 領域)	5'-CACCGCGTGTGGACCCGAAC-3'
JATA12-F (JATA12 領域)	5'-ACCGCAAGGCTGATGATCC-3'
JATA12-R (JATA12 領域)	5'-GTGCATCTCGTCTGACTTCC-3'

に比較して反応開始までに要する時間が長いため、非特異反応防止の点から⁶⁾TaqポリメラーゼはHot start versionを用いた。

2-4. 電気泳動

増幅産物を2.0%アガロースゲル (Nusieve 3:1 Agarose-1, Lonza製)で電気泳動(50V, 120分)し、エチジウムブロマイド染色後、UV照射下でそれぞれのJATA領域におけるバンドの分子量を算出し、前田ら⁵⁾の示した表を用いて繰り返し数を算出した。JATA1~JATA12までの全ての領域で、バンドが確認されかつ前田らの示した表によ

る算出ができた場合を「VNTR 解析に成功した」と呼び、それ以外を「VNTR 解析に失敗した」と呼ぶ。「VNTR 解析に成功した」例を図1に、「VNTR 解析に失敗した」例を図2に示す。

2-5. 菌の死滅確認

加熱検体の一白金耳を小川培地（日水製薬製）および Middlebrook7H9 培地（Becton Dickinson 製）に接種し、小川培地は 37℃ 8 週間培養しコロニー生成を確認した。Middlebrook7H9 培地は 37℃ 8 週間培養した後、小川培地へ一白金耳接種し、さらに、37℃で8週間培養し、コロニー生成を確認した。いずれの方法においても、小川培地上にコロニー生成を確認できなかった場合に加熱処理された検体の菌は死滅していたと判定した。

結果と考察

1. 培地、抽出条件および PCR 条件に関する検討

小川培地株については培地上にコロニー隆起が確認できる分離株を5本選定し、加熱検体の種類、加熱方法、加熱時間および PCR 反応スケールの解析への影響について検討した。

MIGIT 培地株については6株を用い、菌株の TE buffer による洗浄効果の有無を検討した。試験 No. と検討条件および結果を表2に示す。結果は「VNTR 解析に成功した検体数 / 試験に供した検体数」で示す。

1-1. 小川培地の検体を用いた検討

1-1-1. DNA 抽出における熱処理方法の検討

結核菌は特定4種病原体に指定されている*1。試験管の状態オートクレーブ処理した検体の解析が可能であれば、検査担当者の感染危険性は格段に低下し、その上、検査機関、病院あるいは保健所での検体の保管、輸送等の取り扱いが容易となり、検体収集の点からも有利である。前田ら⁵⁾の方法でも試験管を直接オートクレーブ処理している。

小川培地分離株について、培地試験管を直接オートクレーブ処理した試験 No.1 および試験 No.2 では、加熱時間にかかわらず VNTR 解析に失敗した検体があった。30分オートクレーブ処理した試験 No.2 では5本全ての検体で VNTR 解析に失敗した。本試験には安全実験室内のオートクレーブを使用した。当該オートクレーブは冷却速度が遅く、検体は加熱終了後、長時間高温状態であったため、抽出された DNA が損傷したと推測される。試験管を直接オートクレーブで加熱処理する方法は、オートクレーブの温度や試験管内に加わる熱等の詳細な条件検討が必要であると考察し、以下コロニーを遺伝子用蒸留水中で浮遊させたコロニー浮遊液から DNA 熱抽出した。

結核菌は細胞壁に多量の脂質、ろう質を保持する⁷⁾ため腸管出血性大腸菌などと比較すると、熱に対する抵抗性が強く 100℃ 10 分程度の熱処理で完全に殺菌される保証はなく、安全面からも DNA 抽出にはオートクレーブの使用がすすめられている。また、結核菌は安全実験室内

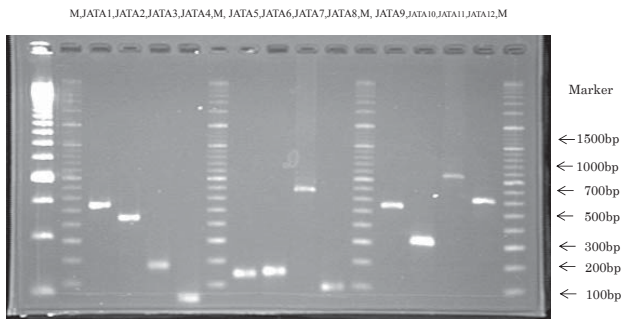


図1 VNTR 解析に成功した例の電気泳動パターン (M:Marker)

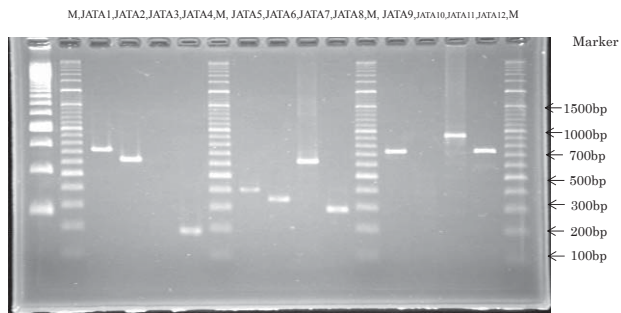


図2 VNTR 解析に失敗した例の電気泳動パターン (M:Marker)

表 2. 検査条件の解析への影響

試験 No	培地	加熱検体	加熱方法	加熱時間	冷却方法	反応スケール	結果 (VNTR 解析に成功した検体数 / 試験に供した検体数)
1	小川培地	試験管	オートクレーブ	15	氷冷	50 μL	2/5
2	小川培地	試験管	オートクレーブ	30	氷冷	50 μL	0/5
3	小川培地	コロニー浮遊液	オートクレーブ	15	氷冷	50 μL	5/5
4	小川培地	コロニー浮遊液	オートクレーブ	30	氷冷	50 μL	2/5
5	小川培地	コロニー浮遊液	ブロックヒーター	15	氷冷	50 μL	5/5
6	小川培地	コロニー浮遊液	ブロックヒーター	30	氷冷	50 μL	5/5
7	小川培地	コロニー浮遊液	ブロックヒーター	15	氷冷	20 μL	5/5
8	小川培地	コロニー浮遊液	ブロックヒーター	15	氷冷	10 μL	0/5
9	MIGIT	無処理	ブロックヒーター	15	氷冷	20 μL	0/6
10	MIGIT	TE buffer で洗浄処理	ブロックヒーター	15	氷冷	20 μL	2/6

* 1 法律第 114 号 平成 10 年 10 月 2 日

で調整するため、常設のオートクレーブの使用が可能であればより実用的である。一方、DNAは熱分解しやすく、細菌のDNA熱抽出では100℃以下10分程度の加熱による処理が一般的である。

オートクレーブで15分加熱処理した試験No.3では全ての検体でVNTR解析に成功したが、30分加熱した試験No.4では失敗した検体があった。オートクレーブは熱処理終了後、圧力を下げ、突沸等が起こらない温度まで冷却する必要があり、機器の種類による冷却等の程度が様々であるので、現段階ではプロトコルとしてオートクレーブの使用は適切でないと判断した。

ヒートブロックを用いた試験No.5および試験No.6の場合では、加熱時間にかかわらず5検体全てでVNTR解析に成功した。ヒートブロック98℃15分処理においてはいずれの加熱検体も菌は死滅しており取扱時の危険性はないと判断した。一方、30分処理においてはエクストラバンドが確認されDNA熱分解が疑われたため、15分の加熱処理を適切なDNA抽出条件とした。

1-1-2. PCR反応スケールの検討

反応スケールが小さければ少量のTemplate DNAでの解析が可能となり、低コストで実施できる利点が大きく、さらに菌培養期間もより短縮される。そこで反応スケールを20μLおよび10μLとして15分のヒートブロック加熱処理を行った。試験No.7の20μLスケールでは5検体全てVNTR解析に成功したが、試験No.8の10μLスケールでは5検体とも失敗した。2、3の領域ではバンド検出の見られる検体はあったが、JATA1～JATA12の全ての領域でバンドが検出された検体はなかった。

以上の結果から、小川培地上のコロニーを遺伝子用蒸留水で浮遊させた加熱検体を用い、ヒートブロックで98℃15分間加熱処理を行った後、氷冷し、20μLスケールでPCRする方法が最も良好であると判断し、以下、小川培地分離株を用いる試験にはこの方法を用いた。

1-2. MISIT 培地の検体を用いた検討

近年、喀痰等の培養にMIGIT培地を使用する医療機関が多い。液体培地であるため培養期間が十数日程度と短く、小川培地より高い精度での患者診断が可能とされる⁹⁾。VNTRは小川培地上のコロニーを対象としているため、解析には⁴⁾MIGIT培地から小川培地へ菌接種、分離培養しなければならない。必要な菌量を得るためには、最低2週間、通常1か月以上の培養期間を要する。

そこで、MIGIT培地を直接熱処理し、DNAを抽出したものについて検討を加えた。MISIT培地の結核菌量は少

ないため、50μLスケールで試験を行った(試験No.9)。6検体ともJATA1～JATA12の全ての領域においてバンドは検出されなかった。MIGIT培地は抗酸菌を迅速に検出する培地で蛍光色素等が添加されている⁸⁾。さらに前処理時で使用するタンパク質分解酵素セミアルカリプロテアーゼ、NALK、などが混入、喀痰などの組織成分も残留しており、これらがPCR反応に影響を及ぼしているおそれがある。そこで、MIGIT培地から採取した検体をTE bufferで洗浄処理したものを再度試験した(試験No.10)。2検体についてはVNTR解析に成功し、残り4検体についてもそれぞれ3本、3本、4本、5本のバンドが検出された。PCR反応は改善されたが、影響のある成分を完全に除去することは困難と推測した。一方、MIGIT培地に比べ、PCR反応への影響が少ないと予想されるMiddle Brook液体培地⁹⁾は数日間の培養で必要なDNA量を確保できることから、搬入されたMIGIT培地からMiddlebrook培地へ菌接種・培養しVNTR検査に供する方法は実用的であると期待される。平成24年度調査・研究課題として、液体培地やキアゲン等の菌抽出キットを用いた簡易・迅速DNA抽出方法について検討する。

2. 保存された小川培地上のコロニー形状および培地状態による解析への影響

過去に採取された菌株についても疫学解析上、重要な情報を保有している可能性がある。増殖速度の遅い結核菌感染事例では感染拡大が長期に及び、また多くの無症状保菌者の存在や再燃の可能性等¹⁰⁾の問題もあるため、解析結果は感染症対策として重要と考えられる。

VNTR法は死菌についても対応可能であるが、小川培地に長期間保存された菌株には、培地の腐敗やコロニーの培地への埋没等が見られるものもあり、これが解析に影響を及ぼすおそれがある。そこで、保存状態が解析に及ぼす影響について検討した。コロニー形状と培地状態に応じて①コロニーが完全に確認でき培地も良好②コロニーの隆起は十分に確認できず扁平であるが培地は良好③コロニーは確認できないが培地は良好④コロニーは確認できず培地は腐敗の4つに区分し、条件に適合する死菌検体を10本ずつ選択した。試験No.、コロニー形状、培地状態および結果を表3に示す。結果は「VNTR解析に成功した検体数/試験に供した検体数」で示す。

コロニーが確認された試験No.11および試験No.12はコロニーの隆起の有無にかかわらず全ての検体でVNTR解析に成功した。コロニーは確認できないが培地は良好の試験No.13でも3検体で成功したが、偶然に菌を釣菌した可能性があり手法としては好ましくないとした。培

表3. コロニー形状および培地状態の解析への影響

試験No	コロニー形状	培地状態	結果 (VNTR解析に成功した検体数/試験に供した検体数)
11	完全に確認できる	良好	10/10
12	隆起せず扁平	良好	10/10
13	確認できない	良好	3/10
14	確認できない	腐敗	0/10

地が腐敗した試験 No.14 については 10 検体とも VNTR 解析に失敗し、全ての検体においてバンドはまったく見られなかった。

以上の結果から、コロニーが確認され培地の腐敗が見られない長期保存株では VNTR 解析は可能であると判断した。

3. 京都府で分離された結核菌株の JATA (12) -VNTR による解析

京都府内で分離された 6 株 2 事例について、解析した結果をそれぞれの事例ごとに表 4 に示す。それぞれの領域の繰り返し数を JATA1 から順番に「,」で区切り列記して菌株の解析結果 (VNTR パターン) とした。

事例 1 では a と b の VNTR パターンが一致した。二人は同一施設内で勤務しており、同時期での発症であったため、施設内のアウトブレイクが疑われた。さらに a と b は同居家族であることがわかったため、施設調査に加えて家族調査を行ったところ、同一施設内に他の感染者はおらず、a の長男と b の母親に感染が確認され、家族内感染と判断された。

事例 2 については d、e、f は同じ病院で勤務する職員であった。それぞれ発生年が異なり長期的な院内感染の拡大が懸念されたが d、e、f のパターンは互いに一致せず散発例であることが判明した。しかし、接触者検診で無症状保菌者とされた c の VNTR パターンが患者 e と一致したことから、現在、管轄保健所で詳細な追跡調査を行っている。

今後、より簡便なプロトコルの作成を検討し、迅速な

表 4. 京都府で分離された結核菌株の事例ごとの VNTR 解析

事例 No	検体 No	分離年	解析結果 (VNTR パターン)
1	a	2011	3,3,4,3,5,3,6,4,5,10,8,3
	b	2011	3,3,4,3,5,3,6,4,5,10,8,3
2	c	2005	3,3,3,3,5,3,5,2,5,11,8,4
	d	2006	4,3,3,4,2,3,12,4,5,7,8,4
	e	2009	3,3,3,3,5,3,5,2,5,11,8,4
	f	2010	4,5,5,3,9,3,7,4,5,7,8,3

結核予防対策につながる事例検証を行い、近畿他府県での解析結果と比較・検討していきたい。

謝辞

本研究にあたり貴重な情報を御提供いただいた大阪府立公衆衛生研究所の田丸重貴氏、京都府丹後保健所の中村清康氏および京都府山城南保健所の十川美代子氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) 松本智成. 岩本朋忠. 2010. 第 84 回総会シンポジウム II 結核菌分子疫学の展望. 結核, 84, 783-794.
- 2) Supply P., Mazars E., Lesjean S. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. Mol Microbiol. 36:762-771.
- 3) Iwamoto T., Yoshida S., Suzuki K., Tomita M., Fujiyama R., Tanaka N., Kawakami Y., Ito M. 2007. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strain predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 270:67-74.
- 4) 前田信司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原勇, 加藤誠也. 2008. 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム. 結核 83, 673-678.
- 5) 前田信司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原勇, 加藤誠也. 2008. 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム. 結核 83, 674.
- 6) 中山広樹. 1996. バイオ実験イラストレイテッド③本当にふえる PCR. pp.97, 秀潤社, 東京.
- 7) 鹿住祐子. 1997. 抗酸菌について. 検査室から結核菌検査のはなし, pp.6, 財団法人結核予防会, 東京.
- 8) 日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会. 2007. 発育インジケータ付き液体培地. 結核菌検査指針 2007, pp.44-46, 財団法人結核予防会, 東京都.
- 9) 阿部千代治. 1993. 抗酸菌の検査, pp.25, 財団法人結核予防会, 東京都.
- 10) 豊田誠. 吉山崇. 2009. 第 83 回総会シンポジウム II 結核感染の実態に迫る. 結核, 84, 31-47.