

結核菌の制限酵素多型分類：第一報；方法の検討

川合 常明，廣地 敬，赤石 尚一，大谷 倫子，藤田 晃三
品川 雅明*¹，伊達 義昭*²

要 旨

私たちは、結核菌の RFLP (Restriction fragment length polymorphism；制限酵素断片長多型) 分析法の改良を試みた。

PCR によるプローブについては 245bp 増幅産物をアガロースゲルから切り出してジゴキシゲニン標識した後、検出反応を行ったところ発色強度及び感度とも良好であった。RFLP については DNA を制限酵素消化後にフェノールを用いて制限酵素を完全に失活することにより蛍光シグナルが増強した。また、酵素標識した DNA 断片の検出に、アルカリホスファターゼ活性検出用蛍光基質 3-Hydroxy-N-2'-biphenyl-2-naphthalenecarboxamide phosphate ester (HNPP) を用いることにより、良好な蛍光発色が得られ、簡便に DNA 断片を検出することができた。

札幌市内の医療機関 2 施設より提供された結核患者からの分離菌株について、この方法で RFLP 分析したところ、数本のバンドを有する多型性が認められ、蛍光基質 HNPP の有用性が確認された。

1. 緒言

感染症の集団発生事例において、分離された菌株の型別を行うことは感染源の追跡調査あるいは感染防止対策の一手段として重要である。

従来、結核菌の解析においては薬剤感受性パターン及びファージ型別等が用いられてきたが、菌株の鑑別には不十分であった¹⁾。

近年、DNA 塩基配列の出現状況が菌株固有のものであることがわかってきており、結核菌においても同様であるとの知見が得られている^{1,2)}。Hermans らは結核菌由来の挿入配列 IS6110 をプローブとした RFLP (Restriction fragment length polymorphism) を結核菌の疫学的解析や診断のための手段に利用できることを報告している²⁾。

平成 11 年 3 月から結核予防対策の一環として新たに衛研，保健衛生部，保健所および市内の医

療機関 2 施設が共同で「結核菌遺伝子分析事業」を開始した。本事業は、RFLP により結核菌の遺伝子分析を行うことにより、集団発生時における同一感染源の特定など疫学調査及び接触者健診の充実を図り、本市における今後の結核予防対策に役立てるものである。

私たちは、本事業における RFLP の検査方法の検討を行うとともに、患者の同意のもとに提供された結核菌の RFLP 分析データを蓄積することで市内に存在する結核菌の種類及び広がり状態を把握する目的で、調査研究を行っている。

今回、本事業を開始するにあたり、RFLP の検査方法について検討したので概要を報告する。

2. 方法

2-1 供試菌株

1 国立療養所札幌南病院

2 北海道社会保険中央病院

市内の医療機関 2 施設より提供された結核患者からの分離菌株 77 株のうち一部を用いた。

2-2 PCR による結核菌 IS6110 由来のプローブ DNA 調製およびプローブのジゴキシゲニン標識

(1)PCR 反応液：プライマーとして INS-1²⁾ (CGTGAGGGCATCGAGGTGGC) 最終濃度 0.2 μ M/ μ l 及び INS-2²⁾ (GCGTAGGCGTCGGTGACA AA) 最終濃度 0.2 μ M/ μ l dNTP 最終濃度 0.2mM, MgSO₄ 最終濃度 0.5mM, 1 \times PCR 反応液, PCR 用酵素として KOD-Plus-DNA Polymerase (TOYOBO) 1.0unit/PCR 反応液 50 μ l, テンプレートとして結核菌 DNA 100ng を用いた。

(2)PCR 反応条件：PCR Thermal Cycler MP (TaKaRa) を用いて, PCR の温度, 反応時間及び反応回数は 94 2min 1cycle; 94 30sec, 65 30sec, 72 1min, 30cycles; 72 3min 1cycle の条件で行った。次に, PCR 増幅産物を 3% NuSieve 3:1 Agarose (FMC) を用いて電気泳動後, アガロースゲルを Ethidium Bromide (0.5 μ g/ml) で染色して写真撮影した。さらにアガロースゲルから 245bp 増幅産物を切り出し QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) により DNA 精製を行った。

(3)ジゴキシゲニン標識：調製したプローブ DNA をジゴキシゲニン-dUTP を用いたランダムプライム法 (DIG DNA Labeling Kit, Roche) によりジゴキシゲニン標識した。プローブ DNA を 100 の沸騰水中で 10 分間熱変性させ, 直ちに氷上冷却し, これに Hexanucleotide Mix 2 μ l, dNTP Labeling Mix (dNTP, DIG-dUTP を含む) 2 μ l, 滅菌蒸留水を加えて全量を 19 μ l にしてから Klenow enzyme 1 μ l, を加えて 37 で 60 分間反応させた後, 0.2M-EDTA (pH8.0) 2 μ l を加えて反応を停止させた。次に QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて, とりこまれなかった dNTP 及び DIG-dUTP を除去して標識済プローブ DNA の精製を行った。次に標識反応の良否の確認及びプローブ DNA 量を推測するために, 標識済プロ

ーブ DNA 及び DIG DNA Labeling Kit に添付の標識済コントロール DNA を用いて各々の希釈系列を調製し, ナイロンメンブレンフィルターにスポットした後, 直接検出して発色強度を比較した。

2-3 RFLP^{3, 4)}

(1)結核菌 DNA の抽出

小川培地上のコロニーを白金耳 (1 μ l) で山盛り採り DNA 抽出キット (ISOPLANT, NIPPON GENE) の Solution 加えて室温で一夜置き, 次に Solution を加えて 50, 30 分間加温, Solution を加え氷上に 15 分間置き, 遠心分離後, 水層をとりエタノール沈殿により DNA 抽出を行った。

(2)制限酵素 *Pvu* による DNA の消化および電気泳動

DNA の *Pvu* 消化：DNA 2 μ g, 10 \times M buffer 10 μ l, *Pvu* 10units/ μ l (TaKaRa), 及び滅菌蒸留水を加えて全量を 100 μ l に合わせ, 37, 2 時間反応させた。次に *Pvu* 消化済の反応液に等量のフェノールを加え遠心分離し, 上清をとりクロロホルムを等量加え遠心分離し, 上清をエタノール沈殿後, DNA を精製した。

電気泳動：*Pvu* 消化済 DNA 20 μ l に 6 \times Loading buffer 4 μ l を加えたものをサンプルとし, Marker は Digoxigenin-labeled Lambda Hind fragment (Roche) を用いた。1.0% I.D.NA Agarose (FMC) 及び 1 \times TAE buffer 用いて, 12V (1V/gel cm) で正確に 16 時間通電した。アガロースゲルを Ethidium Bromide (0.5 μ g/ml) で染色した後, 写真撮影した。

(3)メンブレンフィルターへの DNA の転写

アガロースゲルの前処理：電気泳動後のアガロースゲルを 0.25M-HCl に室温で 10 分間浸した後, アルカリ変性溶液 (0.2M-NaOH, 0.5M-NaCl) に室温で 30 分間浸し, さらに中和溶液 (0.5M-Tris-HCl, 3M-NaCl, pH7.5) に室温で 30 分間浸した。

DNA のメンブレンへの転写：20 \times SSC に浸した

ブロッディング装置のろ紙上に前処理済のアガロースゲルを置き、その上にナイロンメンブラン (Nylon Membranes, positively charged, Roche) を置き、さらにろ紙・ペーパータオルを順に重ね 500g 程度の重りをのせ 16 時間置いて、ナイロンメンブランにアガロースゲルの DNA を転写した。次に、120℃、20 分間加熱してナイロンメンブラン上の DNA を固定した。

(4)ハイブリダイゼーション

メンブランを予め 42℃ に加温したハイブリダイゼーション溶液 (DIG Easy Hyb, Roche) 約 20ml/100cm² に 30 分間浸した後、100℃ で熱変性した標識済プローブ DNA (25ng/ml) を加えたハイブリダイゼーション混合液 3.5ml/100 cm² に 42℃、16 時間浸した。

洗浄：メンブランを 2×SSC、0.1%SDS 混合液に 10 分間浸し、予め 65℃ に加温した 0.5×SSC、0.1%SDS 混合液に 30 分間浸し、洗浄を行った。

(5)検出反応

ブロッキング：メンブランを洗浄緩衝液 (DIG Wash and Block Buffer set, Roche) で洗浄後、Blocking solution (DIG Wash and Block Buffer set, Roche) に 30 分間浸した。

抗ジゴキシゲニン AP 標識抗体反応：Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche) を Blocking solution で 5000 倍希釈した溶液 30ml にメンブランを 30 分間浸した後、洗浄緩衝液で 30 分間洗浄を行った。

検出反応及び蛍光シグナルの検出：検出緩衝液 (DIG Wash and Block Buffer set, Roche) 30ml にメンブランを 5 分間浸した後、蛍光基質 3-Hydroxy-N-2'-biphenyl-2-naphthalenecarboxamide phosphate ester; HNPP-EU (アイシン・コスモス研究所) 5ml/100cm² で室温、2~4 時間反応させ、その後蒸留水に浸して反応を停止させた。次に、落射式蛍光読取装置 (Epi-Light UV FA1100, アイシン・コスモス研究所) により 310nm の UV ランプ

をメンブラン上に照射してバンドの蛍光を検出した。

3. 結果

3-1 PCR による結核菌 IS6110 由来のプローブ DNA 調製：

(1)PCR：非特異バンドが認められたので、アガロースゲルから 245bp 増幅産物を切り出し DNA 精製を行った (図 1)。

(2)ジゴキシゲニン標識：DIG DNA Labeling Kit を用いてジゴキシゲニン標識した後、標識反応の良否の確認及びプローブ DNA 量を推測したところ、標識済プローブ DNA は標識済コントロール DNA と同等の希釈濃度 (1.0 pg/μl) まで検出することができた (図 2)。

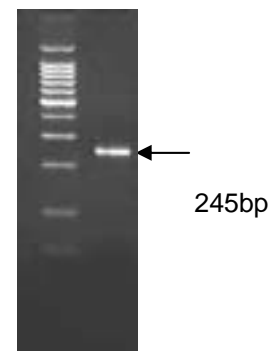


図 1 PCR によるプローブ調製

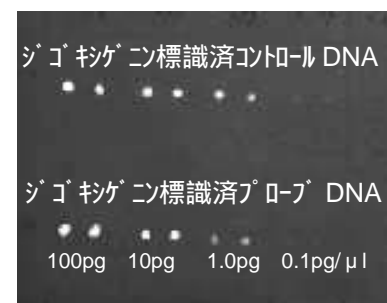


図 2 ジゴキシゲニン標識の検定

3-2 RFLP

医療機関からの分離菌株 17 株を用いて、RFLP を行ったところ 1 株（図 3 矢印のレーン）を除いて良好な結果が得られ、数本のバンドを有する多形性が認められた（図 3）。

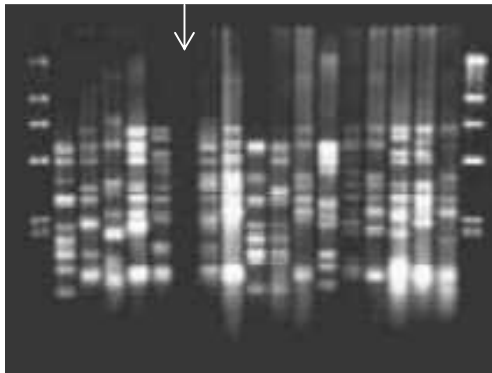


図 3 試供結核菌の RFLP 分析
レーンの両端は Lambda Hind fragment

4. 考察

4-1 PCR による結核菌 IS6110 由来のプロープ DNA 調製：PCR についてはプライマー濃度、 Mg^{+} 濃度、dNTP 濃度、PCR 用酵素濃度及び PCR の温度、時間など数項目について検討し、方法で述べたような条件に設定したが、非特異バンドが出現するため、さらに検討が必要である。電気泳動したアガロースゲルから 245bp 増幅産物を切り出した後、ジゴキシゲニン標識して標識効率を検定したところ良好な結果が得られた。

4-2 RFLP

DNA の *Pvu* 消化：DNA を *Pvu* で消化した後、 $6\times$ Loading buffer を加えて電気泳動し、ハイブリダイゼーションしたところ、バンドの蛍光シグナルが弱く観察中に蛍光が認められなくなった。そこで DNA 量、制限酵素の量、標識プロープ量等を検討したところ、制限酵素の失活方法に問題があると考えられた。このためフェノール処理により制限酵素を完全に失活させたところ、バンドの蛍光シグナルが強くなり、良好な結果が得

られた。

RFLP では従来 DNA 断片を検出するために、ジゴキシゲニンまたはビオチンなどの酵素標識したプロープを用いた化学発光による方法を採用しているが、この検出方法は X 線フィルムを感光させてから、さらに現像処理行程が余計にかかることメンブラン上の DNA 断片を間接的に検出する方法であることなどの欠点があった。今回、検出方法として蛍光基質 HNPP を用いることにより簡便に行うことができた。

医療機関から提供された分離菌株 17 株を用いて RFLP 分析を行ったところ、16 株は数本のバンドを有する多形性が認められたが、残り 1 株はバンドが認められなかった。これは結核菌遺伝子中の挿入配列 IS6110 を持たない菌株であると考えられた。

5. 結語

今回、RFLP 検査方法について検討を加えた。

PCR によるプロープ DNA の調製については、さらに PCR 条件を検討しなければならないが、245bp 増幅産物をアガロースゲルから切り出してジゴキシゲニン標識した後、検出反応を行ったところ発色強度及び感度とも良好であった。

RFLP については DNA を制限酵素消化後にフェノールを用いて制限酵素を完全に失活することにより蛍光シグナルが増強した。また、蛍光基質 HNPP を用いることにより簡便に検出することができた。

今後、RFLP 分析データの蓄積を行い、市内の患者から分離される結核菌の種類とその広がり の状況を把握するとともに、集団発生時における疫学調査など、本市における今後の結核予防対策に役立てたい。

6. 文献

1) 高橋光良：呼吸器疾患・結核，資料と展望，No.

- 17 , 1996 .
- 2) Hermans PWM, Van Soolingen D, Dale JW et al :
Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis , J Clin Microbiol , 28 , 2051-2058 , 1990 .
- 3) 高橋光良 ,阿部千代治:IS タイピング法:IS6110 をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類 , 日細誌 , 49 , 853-857 , 1994 .
- 4) バイオ実験イラストレイテッド 遺伝子解析の基礎 , 秀潤社 .

Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on *Mycobacterium tuberculosis*: Report No.1; Modification of the Method

Tsuneaki Kawai, Takashi Hirochi, Shoich Akaishi, Tomoko Otani, Kozo Fujita
Masaaki Shinagawa*¹, Yoshiaki Date*²

We modified the method for restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis on *Mycobacterium tuberculosis* and applied it to some clinical isolates.

In probe preparation by PCR, a 245bp fragment of amplification was sliced out from the agarose gel, labeled with digoxigenin and utilized for detection. Both the color intensity and sensitivity were much improved by these processes. In RFLP analysis, fluorescence signal was intensified by phenol treatment for the complete inactivation of residual enzyme after DNA digestion with restriction enzyme. In the detection of DNA fragment labeled by digoxigenin, we used 3-Hydroxy-N-2'-biphenyl-2-naphthalenecarboxamide phosphate ester(HNPP), as a fluorescent substrate to detect alkaline phosphatase activity, and more intense fluorescence was obtained. The modified method was applied to some strains isolated from tuberculosis patients admitted to two medical facilities in Sapporo City. The resultant difference in the polymorphism with several distinct bands indicates usefulness of HNPP as a fluorescent substrate.

*1 Sapporo South National Hospital

*2 Hokkaido Social Insurance Central Hospital