

結核菌の制限酵素多型分類：第二報；分析結果報告

川合 常明 廣地 敬 赤石 尚一 大谷 倫子 藤田 晃三
高瀬 愛子^{*1} 品川 雅明^{*2} 松本 英伸^{*3}

要 旨

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 129 株について制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism : RFLP) 分析を行った。

検出されたバンド数は 0~16 本であり、平均 10.3 本であった。共通性のある RFLP パターンは 11 種類に大別され 1 パターンあたり 2~11 株あり合計 40 株あったが、その他の株には共通性がほとんどみられず多型性のパターンが認められた。

集団感染が疑われた事例においては RFLP パターンが一致し、同一感染源であることが裏付けられた。

1. 緒言

近年、遺伝子配列の出現状況が菌株固有のものであることがわかり、結核菌においても菌由来の挿入配列 IS6110 をプローブとした制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism : RFLP) が疫学的解析および診断のための手段に利用できていることが知られている^{1,2)}。

衛生研究所、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、結核予防対策の一環として「結核菌遺伝子分析事業」を平成 11 年 3 月から開始した。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の疫学調査及び接触者検診の充実を図り、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、RFLP の検査方法の検討結果を第 1 報として既に報告した³⁾が、今回、RFLP により得られた遺伝子配列の解析結果について報告する。

2. 方法

2-1 供試菌株

市内の医療機関 2 施設より患者の同意のもとに提供された結核菌分離菌株 129 株を用いた。

2-2 プローブ調製

プローブはプライマー-INS²⁾を用いて PCR により結核菌 IS6110 由来 245bp の増幅産物を精製し、ジゴキシゲニン-dUTP を用いたランダムプライム標識法によりジゴキシゲニン標識した。

2-3 RFLP^{4,5)}

小川培地上に発育した結核菌コロニーを白金耳 (1 μ L) で山盛り採り、塩化ベンジル法 (ISOPLANT, NIPPON GENE) により DNA を抽出した。次にこの DNA に制限酵素 *Pvu* を加えて 37 $^{\circ}$ C 2 時間反応させた後、フェノールを用いて制限酵素反応を停止させ、1.0% アガロース (I.D.NA Agarose, TaKaRa) で 12V, 16 時間通電し電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースから DNA をメンブランフィルターに転写し

1. 札幌市保健所

2. 国立療養所札幌南病院

3. 北海道社会保険中央病院

120 ・20 分間加熱して DNA の固定を行った。次に、メンブランフィルターをハイブリダイゼーション溶液に浸し 42 °C で 30 分間加熱後、ジゴキシゲニン標識したプローブを加えて 42 °C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。次にメンブランフィルターをアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液に浸し室温で 30 分間反応させた後、蛍光基質 HNPP に浸し室温で 4 時間反応させ、UV ランプをメンブランフィルター上に照射してバンドの蛍光を検出した。

3. 結果及び考察

3-1 バンドパターンの共通性及び疫学的な関連性について

バンドパターンについて共通性のあるものを分類すると 11 種類に大別され、1 つのパターンあたり 2~11 株あり合計 40 株 (31%) であった (図 1)。

また、別にバンド数が 1~3 本の違いで類似したパターンを示したものは 17 株 (約 13%) あった (図 2) が、残りの 72 株 (約 56%) は全く一致しなかった。

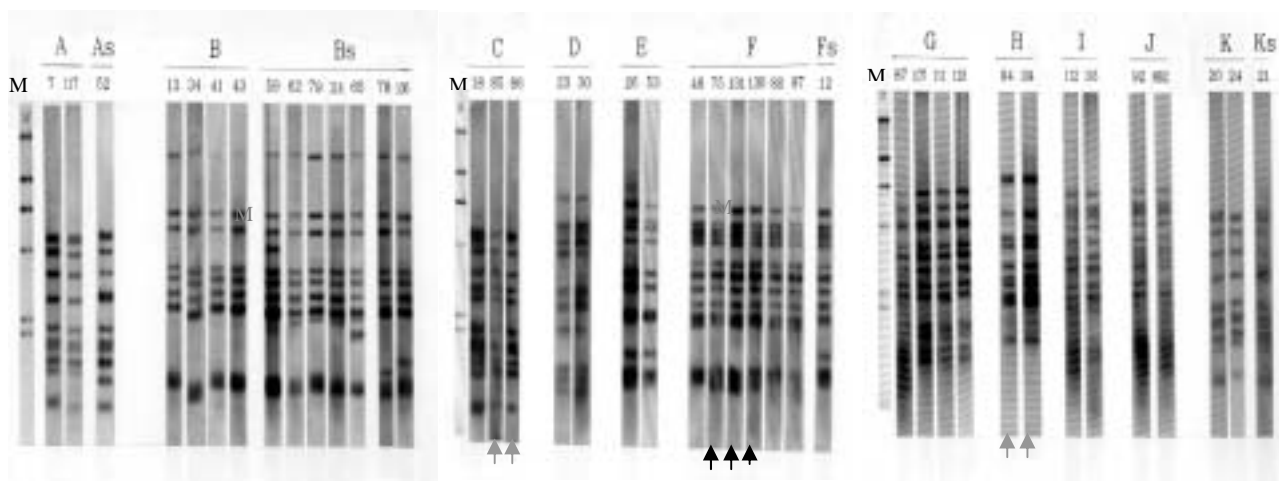


図 1 バンドパターンが一致した株

F グループ No.75, 130, 131, は集団感染が疑われた事例である。

C グループ No.85, 86 及び H グループ No.94, 104 は同居家族である。

M: マーカー *Hind*

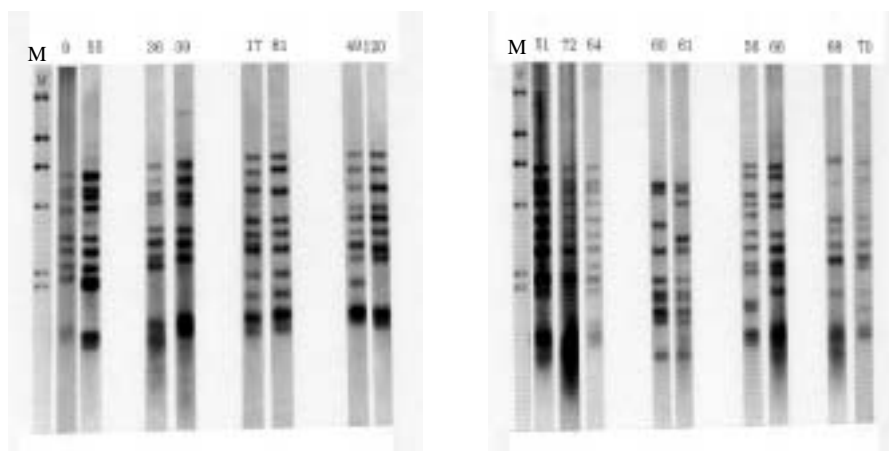


図 2 バンドパターンが類似した株

M: マーカー *Hind*

表1 バンドパターンが一致した患者の疫学調査結果

分類			性別	年齢	発病時期	既往歴	備考
A	A	7	男	51	H11.01		
		117	女	91	H12.10		
	As*	52	男	88	H11.08		
B	B	13	男	85	H11.03		
		34	男	78	H11.06		
		41	女	59	H11.09		
		43	男	90	H11.09		
	Bs*	59	女	68	H11.11		
		62	男	72	H11.11		
		65	女	33	H12.01		
		78	男	27	H12.04		
		79	男	23	H12.05		
		106	男	56	H12.10		
		114	男	67	H12.11		
C	C	18	女	75	H11.04		
		85	女	46	H12.03		86の妻
		86	男	45	H12.03		85の夫
D	D	23	男	76	H11.04		
		30	男	19	H11.07		
E	E	26	男	42	H11.06		
		53	男	43	H11.08		
F	F	48	男	53	H11.11		
		75	男	72	H12.02		(集団)
		80	男	35	H12.05		
		97	男	76	H12.09		
		130	男	75	H10.04		(集団)
	131	女	68	H10.11		(集団)	
Fs*	12	男	63	H11.03			
G	G	87	男	47	H12.03		
		107	女	46	H12.10		
		111	男	31	H12.10		
		123	男	50	H13.01		
H	H	94	男	62	H12.08		104と同居
		104	男	36	H12.09		94と同居
I	I	112	女	36	H11.07		
		116	男	50	H12.11		
J	J	92	女	50	H12.07		
K	K	20	男	68	H11.04		
		24	女	83	H11.05		
	Ks*	21	男	56	H11.04		

*s : 類似パターン, : 既往あり, : 健診等で指摘あり

バンドパターンが一致した患者の関連性について疫学調査結果をもとに検討したところ、集団感染が疑われた1事例では3株とも同一パターンを示し、同一感染源であることが裏付けられた。また別の2種類の同一パターンを示した株では2事例2株ずつ計4株が同居家族内の感染であることが認められた。しかし、その他の残りのパターンについて性別、年齢、発病時期等について関連性を検討したが、共通点は見出せなかった(表1)。

その一因としてRFLPの検査時期及び検査結果判定までに長時間を要したことから、RFLP結果判明後の再調査が困難であったためと考えられた。

今後、RFLPを有効に活用するためにはRFLP検査の早期実施とともに併行して初期調査を充実させることが必要と考えられる。

3-2 IS6110のバンド数の分布状況について

患者129名の年齢分布は18~104歳で71~80歳が30人と最も多く、次いで多いのは61~70歳の21人であった(図3)。

分離株129株のバンド数の分布は0~16本、平均10.3本であり、12本を持つ株が31株と最も多く、次いで9本が24株であった(図4)。また、年代別にバンド数の分布状況を比較したが、各年代ともほぼ同様な分布状況を示しバンド数の違いは認められなかった。

3-3 バンドパターンが認められなかった株について

129株中バンドが全く認められなかった1株について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。またバンドがスメア状で不明の2株については、DNA抽出方法に問題があるのか今後検討が必要であると考えられた。

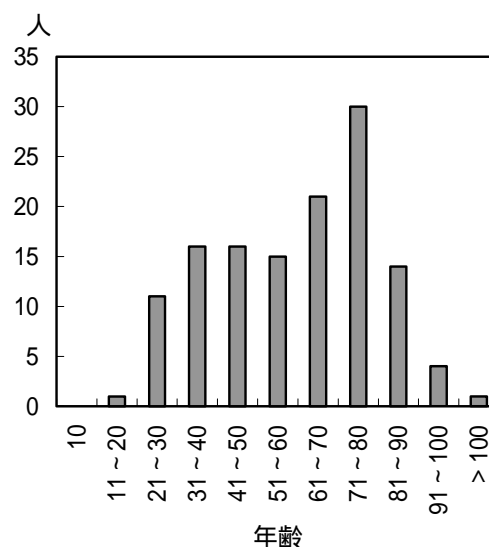


図3 年齢分布

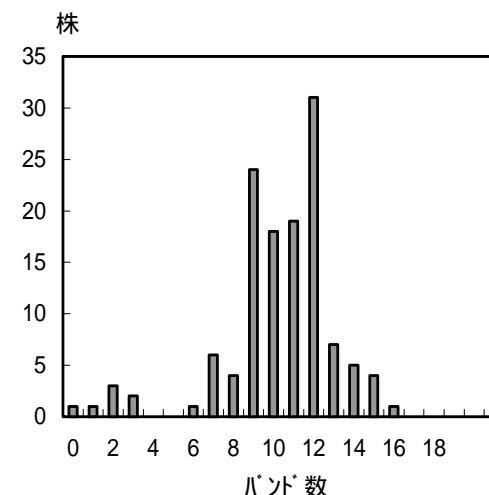


図4 バンド数分布図

4. 結語

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129株についてRFLP分析を行った。

IS6110のバンドが一致したパターンは11種類に分類され、各パターンあたり2~11株あり合計40株(31%)であった。

集団感染が疑われた事例においては RFLP パターンが一致し、同一感染源であることが裏付けられたことから、結核の疫学解析に有用であることがわかった。

今後、RFLP 分析データの蓄積を行うとともに、集団感染が疑われる事例の裏付けとして、また散発事例における関連性を調べる手段として役立てたい。

5.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)川合常明,廣地敬,赤石尚一他:結核菌の制限酵素多型分類,札幌市衛研年報, 27, 52-56, 2000.
- 4)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.
- 5)中山広樹,西方敬人: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, 1995.

Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on *Mycobacterium tuberculosis*: Report No.2;The Result of the Examination

Tsuneaki Kawai Takashi Hirochi Shoichi Akaishi Tomoko Otani Kozo Fujita
Aiko Takase^{*1} Masaaki Shinagawa^{*2} Hidenobu Matsumoto^{*3}

We carried out the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of 129 strains of *Mycobacterium tuberculosis* which were isolated at two hospitals in Sapporo city. The number of identified bands varied from 0 to 16 (mean, 10.3 bands). The identical banding pattern was classified into 11 types, and two to 11 strains (total of 40 strains) belonged to each identical RFLP pattern. However, there was the polymorphism among other 89 strains, which showed their respective nonidentical patterns.

RFLP pattern was identical in each group of isolates from patients with suspected clustering infection. This result indicated that each endemic was due to the same source of infection.

*1. Health Center of Sapporo City

*2. Sapporo South National Hospital

*3 Hokkaido Social Institute Central Hospital