

原著

VNTR法を用いた結核菌の分子疫学解析(2007-2009)

永井佑樹, 岩出義人, 中野 学*, 坂井 隆*, 田沼正路**,
片山正彦

Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR analysis (2007-2009)

Yuhki NAGAI, Yoshito IWANE, Manabu NAKANO, Takashi SAKAI,
Masamichi TANUMA, and Masahiko KATAYAMA

三重県内で分離された結核菌 145 株を対象に JATA12-VNTR 解析を実施した。その結果 12 の VNTR クラスターが確認されクラスター形成率は 21.7%であった。また県内分離株の 69.0%が北京型に分類され、北京型、非北京型のクラスター形成率はそれぞれ 28.3%, 7.1%となった。各領域ごとに多様性を比較したところ、分離株全体では QUB15 が最も低く、北京型では Mtub 21, QUB3336 での多様性が低い結果となった。

今回実施した JATA12-VNTR 解析は、各領域ともコピー数の判定がしやすく、データベース化へ向けた共通領域として有用であると考えられる。ただし北京型株での集団感染など、高い識別能を要する場合には、これらの領域に加え、さらに追加領域が必要となる。どの領域を追加するかについては今後の研究課題であるが、各領域の多様性は地域により異なるため、今後も県内分離株での VNTR データを蓄積し、地域に応じた VNTR 領域を選択していくことにより、VNTR 解析がより強力な分子疫学ツールになるものと思われる。

キーワード:結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*), 遺伝子型別, VNTR

はじめに

結核は現在でも集団発生や多剤耐性結核菌の拡大など公衆衛生上重要な問題であり、地域における発生状況や集団感染時の発生源、感染経路等を明らかにすることは、感染の拡大を防止するうえで最も重要である。

結核患者が発生した時の感染源の追求や感染経路の解明には、患者と感染源(排菌患者)との接触調査が実施されるが、個々の患者から結核菌が分離された場合、それぞれの菌の同一性が重要な問題となる。同一の菌による感染かどうかを判定するには遺伝子型別が実施されるが、結核菌では近年、結核菌の遺伝子中に存在する反復配列の数を株同士で比較するVNTR(Variable numbers of Tandem Repeats)法が利用されるようになってきた。このVNTR法はPCRにより実施がで

るため簡便で迅速に結果が得られ、非常に有用な方法として期待されているが、どの領域をPCRで増幅するかにより識別能が変化するため、領域の選択が非常に重要となる。特に日本に多いとされる北京型結核菌はゲノム上の多様性が低いため型別が難しく、世界的に実施されているMIRU-VNTR法などでは十分な識別能が得られないことが分かっている¹⁾。

そこで日本国内の株を型別するのに有用な方法として、(Japan Anti-Tuberculosis Association) JATA12-VNTR法が標準法として提唱されており²⁾、全国的な普及が期待されている。本研究では、三重県内で分離された結核菌を対象にJATA12-VNTR法による遺伝子型別を実施し、その有用性について検証したので報告する。

方 法

*独立行政法人国立病院機構三重中央医療センター

**三重県健康福祉部

Table1. Allelic diversity of *M.tuberculosis* isolates from Mie prefecture (2007–2009)

JATA No	Alias	Locus	Copy number of tandem repeat unit(s)														Allelic diversity	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
J 01	Mtub 04	424		7	37	24	71	2	1									0.66
J 02	MIRU 10	960		23	12	81	14	8			4			1				0.64
J 03	Mtub 21	1955	2	16	20	79	15	1		1	2	1		1				0.63
J 04	Mtub 24	2074		8	37	80	17	1										0.61
J 05	QUB 11b	2163			18	29	12	10	41	25	5	1		1				0.82
J 06	VNTR 2372	2372		13	22	75	28	4	1									0.66
J 07	MIRU 26	2996		7	5		10	24	19	70	5	3						0.71
J 08	QUB 15	3155			17	5	105	13					1			1	1	0.44
J 09	MIRU 31	3192			9	33	31	63	4	2								0.70
J 10	QUB 3336	3336				1	4	2	8	80	5	2	19	4	13	4	1	0.66
J 11	QUB 26	4052			16	6	9	6	5	27	65	7	1					0.74
J 12	QUB 4156	4156		2	11	45	39	45										0.72

1. 検体および DNA 抽出

結核菌検査を実施している県内の病院から提供された臨床分離株を、2% ビット培地で培養後、高橋ら³⁾の方法に従い ISOPLANT (NIPPON GENE) を用いて DNA 抽出を行い検体とした。

2. VNTR 解析

各菌株のゲノム DNA を template に、多重反復配列領域のうち、JATA12-VNTR 法で用いられている 12 領域 (Mtub 04, MIRU 10, Mtub 21, Mtub 24, QUB 11b, VNTR 2372, MIRU 26, QUB 15, MIRU 31, QUB 3336, QUB 26, QUB 4156) について、それぞれのプライマーと Ex Taq HS version (Takara) を用いた PCR 法で増幅を行い、PCR 産物の増幅サイズから、コピー数を測定した。各領域の多様性については、Hunter Gaston Discrimination Index (HGDI 値) で表記し³⁾、全 12 領域でコピー数が完全に一致したものは同一クラスターと判定した。

3. 北京型、非北京型の分類

Warren らの方法⁴⁾に従い、PCR により北京型および非北京型の分類を実施した。

結果および考察

供試した 145 株 (2007-2009 年) のうち産物の得られた 142 株について、多型反復配列 12 領域のコピー数を測定し、各領域の多様性を調査した (Table1)。その結果、QUB 11b の HGDI 値が 0.82 と最も高く、続いて QUB 26, QUB 4156, MIRU 26, MIRU 31 の領域で 0.7 以上の値を示し多様性が高い結果となった。その一方、QUB 15 の領域では、コピー数 4 の株が大半を占め (HGDI 値 0.44) かなり多様性の低い結果となった。

また、今回三重県内で分離される結核菌の感染動向を調査するため北京型かどうかの分類を実施し、それぞれの領域の多様性を比較した (Figure1)。その結果、県内分離株の 69.0% (98/142) が北京型株と判定され、これまでの報告と同様に県内でも北京型が優勢であることが明らかになった。また各領域での多様性の比較では、Mtub 21 で北京型の HGDI 値が 0.39 に対し非北京型が 0.76, QUB 3336 で北京型 0.45 に対し非北京型が 0.85 となり、この 2 領域に関しては、北京型の多様性が非北京型に比してかなり低い結果となった。

さらに今回の VNTR 解析の結果から、

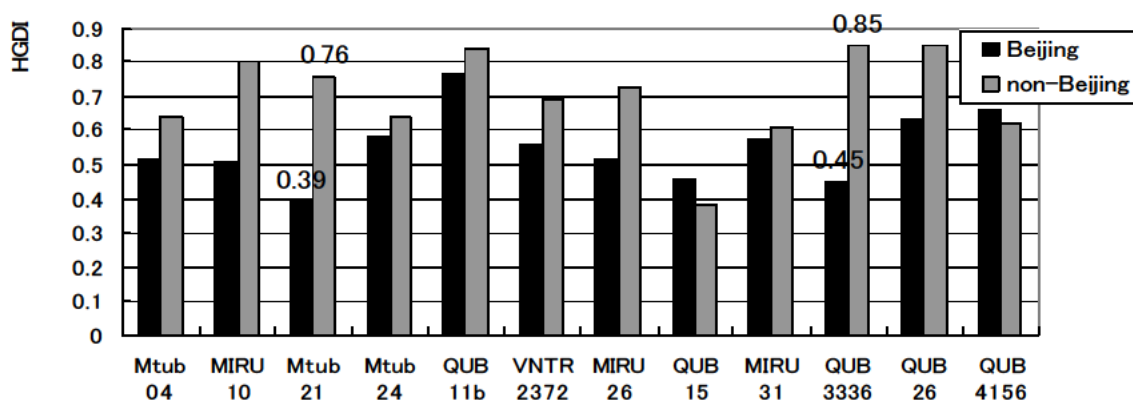


Figure1. Comparison of allelic diversity in Beijing and non-Beijing lineage

12 の VNTR クラスタが確認された。その内訳として 5 株で構成されたものが 1 つ (cluster), 4 株で構成されたものが 2 つ (cluster), 2 株で構成されたものが 9 つ含まれ、全体のクラスタ形成率は 21.7% となり前田ら³⁾により報告されているものよりやや高い結果となった。また北京型、非北京型のクラスタ形成率はそれぞれ 28.3%、7.1% であった。

cluster , の profile (J1-12) はそれぞれ 413264-745785, 333473-755725, 433323-643774 となり、cluster , の profile においては、和田ら⁶⁾により報告されている多発性大規模感染株候補型の profile と一致していた。近年各地で VNTR データが蓄積されるにつれ、いくつかの VNTR タイプが分離年度にかかわらず全国的にみられることが明らかになってきており、これらの株を多発性大規模感染株と定義するよう提案されている⁶⁾。現段階でこれらが同一株かどうかは分からないが、伝播力の強い菌株の存在を捉えている可能性も否定できないため、公衆衛生的にも継続的な監視が必要と考えられている。今後、各地域で VNTR データを蓄積していくことにより、多発性大規模感染株だけでなく各地域で限局して頻出するタイプの存在も予想される。そういったことから各地域で VNTR データを蓄積し、将来的には全国的なデータベースへと発展させていくことが今後の結核対策をより発展させるためにも非常に重要であると思われる。

さらに今回実施した JATA12-VNTR は増幅産物が 1kbp を超えるものも少ないため非常に判定がしやすく、全国的なデータベース化へ向けた共通領域としても有用であると考えられる。ただ北京型株での集団感染など、高い識別能を要する場合には、これらの領域に加え、さらに追加領域が必要となる。どの領域を追加するかについては今後の研究課題であるが、各領域の多様性は地域により異なってくる。このため⁷⁾、今後も県内で分離される株の VNTR データを蓄積し、県内分離株で多様性の高い領域を優先的に VNTR 領域に追加していくことにより、これまで以上に精度の高い菌株間の異同判定が可能となり、VNTR 解析がより強力な分子疫学ツールとして活用できるものと思われる。

まとめ

今回の研究により県内でも複数の VNTR クラスタの存在が明らかになった。VNTR 解析では異なる自治体間でのデータの比較ができるため広域的な結核の感染動向を把握することも可能となる。

また地域に応じた VNTR 型別を確立し、既存の実地疫学と組み合わせることにより、今までにない新しい結核対策を展開することが可能になるものと思われる。

文献

- 1) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al (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* strains predominated by the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett.* ; 270: 67-74
- 2) 前田伸司, 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.
- 3) 高橋光良 (1999): ISOPLANT による結核菌 DNA の簡易抽出. *WAKO BIO WINDOW* ; No19: 9.
- 4) Hunter P.R, and Gaston M.A, (1988): Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J clin Microbiol* ; 26: 2465-6.
- 5) Warren R M, Victor TC, Streicher EM, et al (2003): Patients with Active Tuberculosis often Have Different Strains in the Same Sputum Specimen. *Am J Respir Crit Care Med* ; 169 : 610-4.
- 6) 和田崇之, 長谷篤 (2010): 結核菌の縦列反復配列多型 (VNTR) 解析に基づく分子疫学とその展望. *結核* ;85: 845-852.
- 7) Comas I, Homolka S, Niemann S, et al (2009): Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLoS One*; 4: e7815

Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR analysis(2007-2009)

YuhkiNAGAI , YoshitoIWADE , ManabuNAKANO , TakashiSAKAI ,
Masamichi TANUMA , andMasahikoKATAYAMA

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis* , genotyping , VNTR(variable numbers of tandem repeats)

A total of 145 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mie prefecture were genotyped using JATA12-VNTR analysis. With JATA12-VNTR typing of all isolates, 12 VNTR clusters were found. The clusteringrateofJATA12-VNTRwas21.7% .

Beijing genotypes tuberculosis (TB) accounted for 69.0% (98/142) of the isolates, and clustering rates of Beijing and non-Beijing lineages were 28.3% and 7.1%, respectively. In comparison of the allelic diversity of each locus, the lowest allelic diversity among the all isolates was observed for QUB15 locus (0.44), and the allelic diversity of Mtub21 and QUB3336 loci (0.39 and 0.45, respectively) among the Beijinglineage were lower than those of other loci.

This JATA12-VNTR method is thought to be useful for shared VNTR loci, because it was generally easy to obtain the exact copy number using agarose gel electrophoresis in VNTR analysis. Several additional loci, however, should be added to obtain sufficient discriminatory power of Beijing genotype strains. Sinceallelic diversity of each locus differs according to area, accumulation of local findings of VNTR analysis and selection of optimal VNTR loci will establish this technology powerful tool for molecular epidemiology of *M.tuberculosis*.