

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

東京都健康安全研究センター微生物部

向川 純 下島優香子 村田以和夫
遠藤美代子 柳川 義勢 諸角 聖

(平成 15 年 6 月 28 日受付)

(平成 15 年 8 月 18 日受理)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, restriction fragment length polymorphism (RFLP)
arbitrarily primed PCR (AP-PCR) IS6110

要 旨

我々は、結核集団感染疑い事例の分子疫学的調査のため、IS6110 を用いた RFLP 法による結核菌型別検査を行っている。今回は、都内で発生した事例を対象に、より迅速に型別可能な AP-PCR 法による解析を同時に実施し、両法の性能を比較し、分子疫学的解析における本法の有用性について検討した。

1999 ~ 2002 年の 4 年間に、東京都内で発生し結核の集団感染が疑われた 5 事例由来の分離菌株について、RFLP 法ならびに AP-PCR 法で型別検査を行い、両者のパターン解析結果を比較した。このうち、2 事例は病院での事例、その他は事業所の新入社員研修施設、公民館での社会活動、家庭内での家族と友人関係が疑われる事例が 1 事例ずつである。このうち 4 事例で RFLP 法と AP-PCR 法で事例毎にパターンが一致し、それぞれ集団感染であることが確認された。残る 1 事例では両法ともすべての菌株が異なるパターンであった。これらの結果から両法とも型別検査に有用であることが確認された。RFLP 法では、パターンの違いが明瞭に判定できるのに対して、AP-PCR 法では多数の共通バンドの中に何本の異なるバンドがあるか慎重に判別する必要がある。一方、RFLP 法では μg 単位の DNA が必要であるのに対して、AP-PCR 法では ng 単位で検査できるため、培養の早い時期でも解析が可能であり、迅速に結果が得られる利点がある。両法を検査の必要性に応じて使い分けることが考えられた。

[感染症誌 77 : 1040 ~ 1048, 2003]

序 文

結核菌の疫学的解析には、結核菌由来のマーカー遺伝子である insertion sequence 6110 (IS 6110) や direct repeat (DR) 配列、polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) などの解析が有用であることが報告されている¹⁾⁻¹¹⁾。我々も、

結核集団発生が疑われる事例について、IS6110 および PGRS を用いた Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 解析を行い、その分子疫学的有用性について報告してきた¹²⁾。

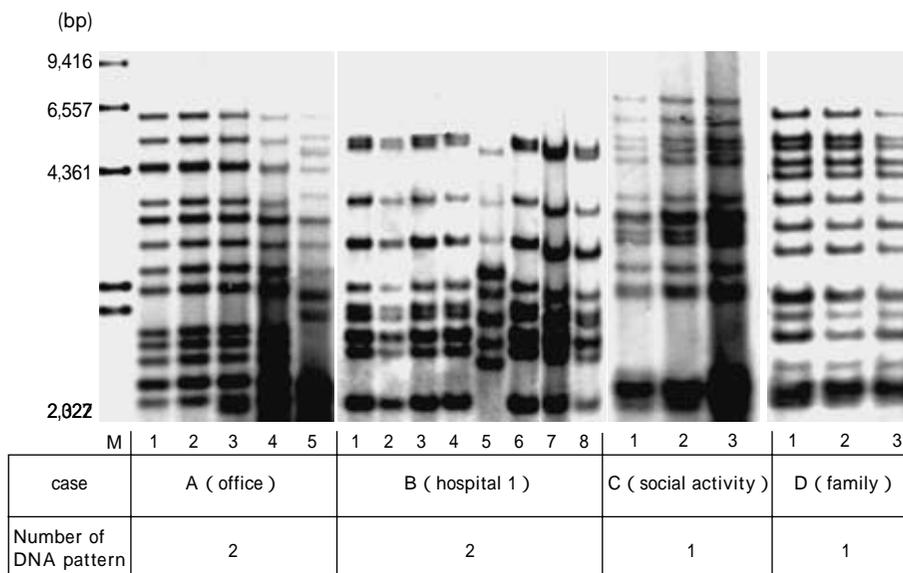
IS6110 を用いた RFLP 法は、現在最も有効な方法として結核の疫学的調査に応用されているが、その手技が煩雑であり、結核菌の DNA を μg 単位必要とするため、解析を行なうまでに長時間の培養が必要などの短所がある。近年、新しい細菌の遺伝子タイピング法として PCR を応用した Ar-

別刷請求先 : (〒169 0073) 東京都新宿区百人町 3
24 1

東京都健康安全研究センター微生物部
向川 純

Table 1 Information of each cases suspected as a outbreak of *Mycobacterium tuberculosis*

Case	Number of patients	Place	Time at infection	Frequency of contact	Number of Strains tested	Number of strains having same DNA pattern
A	9	Office	Same time	1 time	5	4
B	8	Hospital 1	For 6 months	everyday	8	7
C	4	Social activity	For a few months	1-2/a week	3	3
D	5	Family	For a few months	everyday	3	3
E	10	Hospital 2	For 2 years	Almost no time	8	0

Fig. 1 DNA finger printing of *Mycobacterium tuberculosis* by IS6110-RFLP method-1

bitrarily Primed PCR (AP-PCR) 法が開発され、結核菌についても実施されてきている¹³⁾⁻¹⁵⁾。今回我々は、RFLP 法ならびに AP-PCR 法の両法によって、東京都内で起こった結核菌集団感染と考えられる事例について、分子疫学的解析を行い、その成績について比較検討したので報告する。

材料および方法

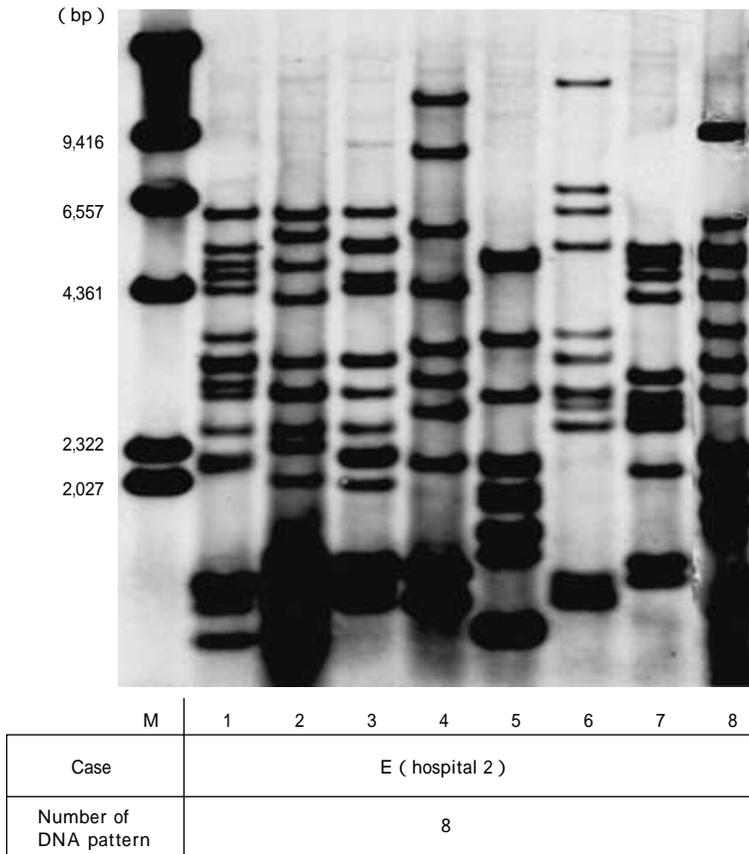
1. 供試菌株

1999～2002年に、東京都内で発生した5集団27人の患者材料から分離された結核菌27株を対象として検討した。これらの分離株は、P3施設内で前処理を行ったのち、アンプリコマイコバクテリア法(ロッシュダイアグノスティック社)およびDDHマイコバクテリア法(極東製薬)を用い結

核菌群であることを同定し、P3施設内で硝酸塩還元試験を行い、結核菌であることを確認した。

2. RFLP 解析

P3施設内のセイフティーキャビネット内で、小川培地上の新鮮発育コロニーを10mM Tris-HCl (pH8)、1mM EDTA バッファーに懸濁させ、8020分間熱処理した後、P2施設においてSDS-proteinase K 処理後、フェノール・クロロホルムで除タンパクし、イソプロパノールでDNAを沈殿・回収した。1.5μgのDNAを制限酵素PvuIIで切断後、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し、サザンプロット法でメンブレンに転写・固定した。その後、ビオチン化IS6110プローブとハイブリダイゼーションを行い、アビジン化アルカリ

Fig. 2 DNA finger printing of *Mycobacterium tuberculosis* by IS6110-RFLP method-2

フォスファターゼとルミホス 530(和光純薬)を反応させ、フィルムに感光後、現像し IS6110 に相補的なバンドの検出を行った。

3. AP-PCR 解析

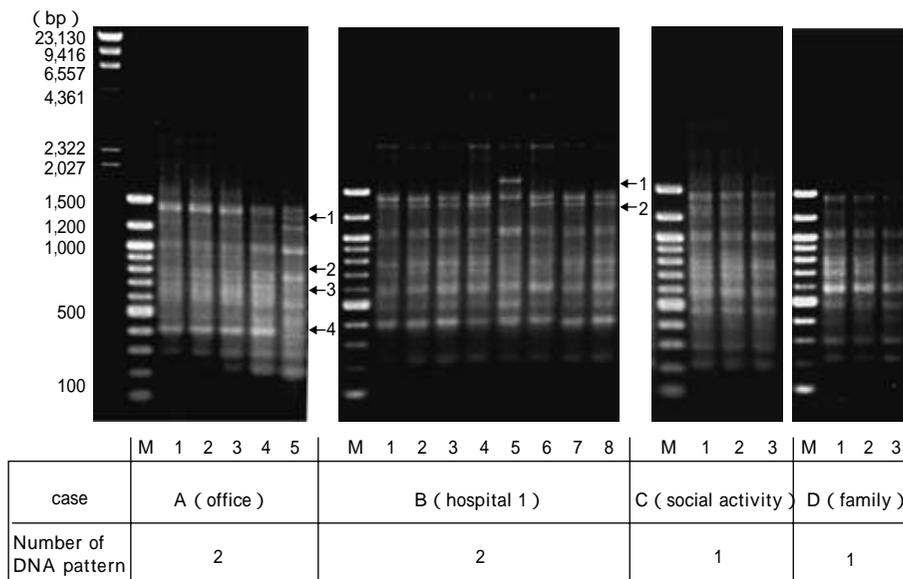
松井ら¹³⁾の方法を参考にして行った。DNA の抽出は RFLP と同じ方法を用い、その 20ng を PCR 反応緩衝液 (1x TaKaRa Ex Taq Buffer, 200 μ M dNTPs, 1.5 μ M primers, 1.25 Unit TaKaRa Ex Taq) と混合し、全量を 25 μ l とした。プライマーは 1309F (CGCCAGAGACCAGCCGCC), 92R (CCGCACCGCCGCTCAGCA) を用いた。反応は denaturing 94 1分, annealing 58 6分, extension 72 6分, サイクル数は 40 回行った。サイクラーは Perkin Elmer Gene Amp PCR System

9600-R(ロッシュ・ダイアグノスティック社)を用い、増幅した PCR 産物を、電気泳動後、エチジンプロマイドで染色し観察した。電気泳動に用いたゲルは、松井ら¹³⁾の方法にしたがい 1.75% アガロースゲルと、中村ら¹⁶⁾がセラチア菌の AP-PCR 法による分子疫学的解析に用いたポリアクリルアミドゲルを参考に、3.5% ポリアクリルアミドゲルの両ゲルを用いた。

成 績

今回調査対象とした事例の概要を Table 1 に示した。結核集団感染疑い 5 事例における感染場所としては、事業所の新入社員研修施設(A)、公民館での社会活動(C)、家庭内での家族と友人関係(D)が疑われる事例が各 1 例と、病院で感染した

Fig. 3 DNA finger printing of *Mycobacterium tuberculosis* by AP-PCR method-1 (1.75% Agarose)



と疑われる事例が2例(B, E)である。各事例由来菌株のRFLP法でのDNAの電気泳動像をFig. 1, 2で、AP-PCR法によるDNAの電気泳動像を、Fig. 3 A(アガロースゲル電気泳動法)、Fig. 5 B(ポリアクリルアミド電気泳動法)で示した。Aでは5株中4株(1から4)、Bでは8株中7株(B5を除く残りの株)、C, Dではそれぞれ供試した株がすべて同じパターンを示し、不一致の菌株を除き同一菌による集団感染事例と判定された。一方、事例Eでは供試した8株のパターンはいずれの方法でも異なっており(Fig. 2 A, B)、散発事例が同一場所に集まったものと判断された。今回供試した5事例、27株について、そのRFLPから得られたIS6110のバンド数を調べると、13本が最も多く、ついで10と14本で平均は12本であった。

AP-PCR法の解析結果を、Fig. 3 A(アガロース電気泳動法)並びにFig. 5 B(ポリアクリルアミド電気泳動法)に示した。電気泳動図の右側に示した矢印は、他の株と異なるバンドの位置を示している。A5では5本のバンドが他の菌株とは異なっており、B5では2本のバンドが他と異なっていた。Eでは各菌株で合計13本の異なったバンド

が存在していた。一方、C, Dの事例ではそれぞれ供試菌株に異なるバンドはなかった。

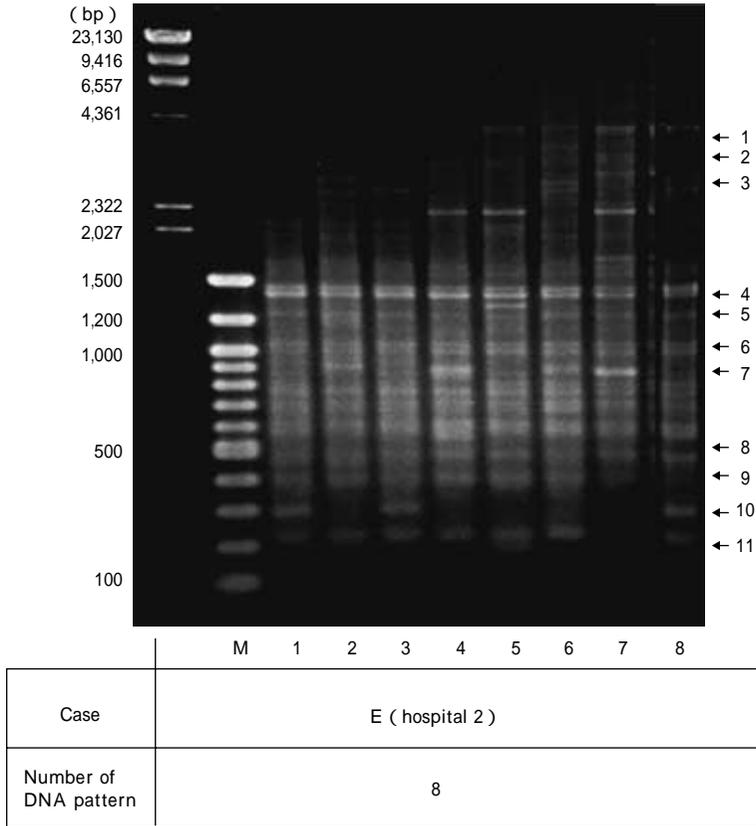
アガロース電気泳動法では高分子(約2,000から4,000bp)のDNAのバンドの違いが判別しやすく、一方ポリアクリルアミド電気泳動法では低分子(約2,000bp以下)の違いが判別しやすかった。バンドの明瞭さではポリアクリルアミド電気泳動法の方がアガロース電気泳動法より優れていた。

考 察

結核菌のゲノムにランダムに存在する挿入断片(IS6110)が発見され、疫学的な指標として有効であることが立証されて以来、この断片を用いたRFLP法による分子疫学的調査に活用されている¹⁾²⁾³⁾¹²⁾。IS6110は抗結核薬による治療や長期継代培養をしても、そのRFLPパターンは安定して、分子疫学的解析法として信頼の高い方法であることが示されている¹⁾⁻³⁾¹²⁾¹⁹⁾²⁰⁾。

今回は、AP-PCR法の有用性を検討するために、集団感染が疑われた5事例について、RFLP法に加えてAP-PCR法による解析を試みた。その結果、聞き取り調査とあわせて、4事例の結核集団感染事例と散発事例の集合した1事例を確認した。

Fig. 4 DNA finger printing of *Mycobacterium tuberculosis* by AP-PCR method-2 (1.75% Agarose)

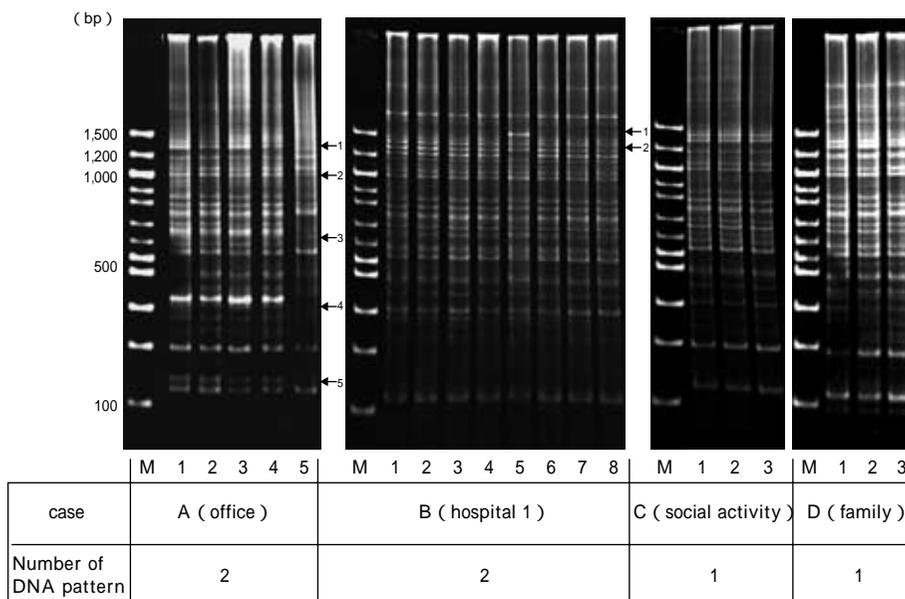


事例 A は、某事業所の平成 11 年の新入社員間で結核患者が 9 名も発生した事例である。入手できた菌株 5 株中 4 株が両方法とも同一パターンを示した。社員は新規採用時の研修で同席したのみで、勤務先はすべて異なっており、研修終了後の接触はほとんどなかった。また研修に参加した社員以外からの発症者はなく、これらのことから新人研修施設で集団感染したものと推察された。事例 B は、同じ病棟の入院患者と病院職員の中で結核が半年間に多数発生したものであるが、1 人の分離株以外は初発患者 (B1) とパターンが一致しており、集団感染であることが示唆された。事例 C は、週 1~2 回程度の公民館における成人の趣味の同好会での集団感染事例である。発症者 4 人、感染者 21 名が確認されており、発症者 3 名の菌株の RFLP 法及び AP-PCR 法のパターンを解析す

ると、初発者 (C1) と同じパターンであった。

最近、若年集団での結核の集団感染として学校、家庭・友人関係、アルバイトを中心とした職場での事例が報告されている⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾。今回我々は、事例 D で十代後半の患者およびその家族 1 人 (D1)、患者と同年齢の友人 2 人 (D2、D3)、および患者のアルバイト先の職員での集団感染を明らかにした。残念ながら初発者の菌株は入手できなかったが、供試された菌株はいずれも両法で同じパターンを示した。

事例 E は病院での事例であるが、結核に罹患した病院職員由来株 (E8) は、その病院で過去 2 年間に分離された患者由来の結核菌株 (E1~7) とは RFLP 法および AP-PCR 法でパターンが一致しなかったことから、過去の患者とは無関係で、異なった状況での感染であることが明らかにされ

Fig. 5 DNA finger printing of *Mycobacterium tuberculosis* by AP-PCR method-1 (3.5% PAGE)

た。

我々は1999年度より、東京都多摩地域にあるF病院で分離された結核菌株のRFLPパターンを解析しているが、数百株の菌株を解析しても、類似したパターンを示すものはあるものの、同一患者由来の菌株を除くと、同一パターンを示すものは皆無であった。東京のような大都市でも、結核散発例由来菌株間でRFLP法のパターンが完全に一致することはほとんどないと考えられ、その一致は同一菌株による感染を強く示唆するものとする。

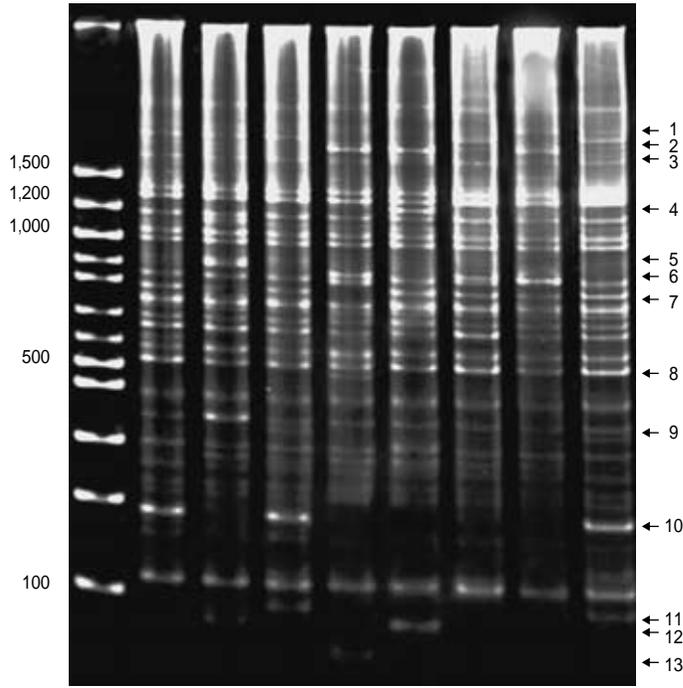
今回RFLP法とともにAP-PCR法を行い、パターンの比較を行ったが、両法の結果を比較すると、RFLP法のパターンが一致する事例(A, B, C, D)ではAP-PCR法も一致し(Fig. 1, 3, 5)、RFLP法でそれぞれ異なるパターンを示すもの(E)はAP-PCRでも一致しなかった(Fig. 2, 4, 6)。またRFLP法で一致はしないが類似したパターンを示す株は、AP-PCRでも類似したパターンを示した(E1, E2, E3)。RFLP法でバンドが1本のみ異なり、残りのバンド(13本)がすべて共通の株

は、AP-PCR法ではパターンの区別ができなかった(A1とA3)。しかしこれまでの経験では、RFLP法でバンドが2から3本異なるとき、AP-PCR法でも異なるバンドが検出されている。通常、RFLP法で1本異なるバンドがあり、残りがすべて共通の株は、同じ由来の菌株とみなし^{19, 20)}、2本以上異なるバンドがあるときは、異なった菌株と判定されている。AP-PCR法でバンドに差がないときは同じ由来菌株としても問題ないと判断でき、AP-PCR法も結核集団感染疑い事例の分子疫学的な解析方法として、有用であると考えられた。

AP-PCR法の問題点として、その再現性があげられている。しかしながら、今回行ったように結核菌のDNAをSDS・proteinase K・フェノール・クロロフォルム法で抽出し、イソプロパノール沈殿させた純度の高いDNAを用いることで、松井らの報告¹³⁾と同様、高い再現性が認められた。一方、RFLP法が明瞭にパターンの違いを判定できるのに対して、AP-PCR法は、多数の共通バンドが存在している中から数本の異なったバンドを確認し判別する必要がある。これはAP-PCR法が、

Fig. 6 DNA finger printing of *Mycobacterium tuberculosis* by AP-PCR method-2 (3.5% PAGE)

(bp)



	M	1	2	3	4	5	6	7	8
Case		E (hospital 2)							
Number of DNA pattern		8							

IS6110 の内部に特異的なプライマーを用いて PCR を行っているが、アニーリング温度を低く設定することで、このプライマーが IS6110 以外の塩基配列が似通った部位にも対合して、多数の共通バンドが増幅されるためと考えられ、判定には慎重を要する。アガロースゲルを用いた DNA の解析では低分子側のバンドが不明瞭であったが、中村ら¹⁶⁾がセラチア菌の AP-PCR 法の DNA 解析に用いたポリアクリルアミド電気泳動を採用することで、低分子側でかなり明瞭に異なるバンドを判別することができた。AP-PCR 法は、RFLP 法に比べ手技が簡単で、ng 単位の DNA 量で十分解析可能であり、菌の発育が不完全な場合でも実施で

きる。さらに、PCR 産物の解析にポリアクリルアミド電気泳動法を用いることで、明瞭な泳動像を得ることができ、結核集団感染事例における菌株の迅速な型別法として有用であると考えられた。さらに事例による解析の検討を重ねていきたい。

本論文の要旨は第 77 回日本感染症学会(2003 年 4 月、福岡)にて報告した。

文 献

- 1) 阿部千代治：IS タイピング法：抗酸菌のくり返し配列と RFLP 分析。日細菌誌 1994；49：823-8。
- 2) 高橋光良，鹿住祐子，平野和重，深澤 豊，安部千代治：RFLP 分析による結核感染の疫学。結核 1995；70：553-9。

- 3) Thierry D, Cave DK, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, *et al.* : IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis complex*. Nucl Acids Res 1990 ; 18 : 188.
- 4) McAdam RA, Hermans PW, vanSoolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, van Embden JD, *et al.* : Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. Mol Microbiol 1990 ; 4 : 1607 - 13.
- 5) Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD : Insertion Element IS986 from *Mycobacterium bovis* BCG is Located in a Hot-spot Integration Region for Insertion Element in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. Infect Immun 1991 ; 59 : 2695 - 705.
- 6) Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer : Molecular Cloning of a Highly repeated DNA Element from *Mycobacterium tuberculosis* and its Use as an Epidemiological Tool. J Clin Microbiol 1992 ; 30 : 942 - 6.
- 7) Yang ZH, de Haas PE, van Soolingen D, van Embden JD, Andersen AB : Restriction Fragment Length Polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from Greenland during 1992 : Evidence of Tuberculosis Transmission between Greenland and Denmark. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 3018 - 25.
- 8) Ota I, Martin C, Vincent-Levy-Frebault V, Thierry D, Gicquel B : Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using IS6110 as an Epidemiological Marker in Tuberculosis. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 1252 - 4.
- 9) van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, *et al.* : Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting. Recommendation for a Standardized Methodology. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 406 - 9.
- 10) van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD : RFLP analysis of mycobacteria. P. 1 - 49. Protocols MMB, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands, 1993.
- 11) Cousins D, Williams S, Liebman E, Aranaz A, Banchoten A, van Embden J, *et al.* : Evaluation of Four DNA Typing Techniques in Epidemiological Investigations of Bovine Tuberculosis. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 168 - 78.
- 12) 山崎悦子, 下島優香子, 柴田 実, 村田以和夫, 諸角 聖 : 結核集団疑い事例における分子疫学的解析の有用性について . 日本臨床微生物誌 2001 ; 11 : 132 - 8.
- 13) 松井則夫, 油納善久, 芳川信治, 喜多英二, 坂谷光則 : 結核菌のフィンガープリンティングにおける AP-PCR 法の最適条件の設定及びその臨床応用 . 感染症誌 1998 ; 72 : 890 - 6.
- 14) Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A, Kunitomo D : DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J Infect Dis 1993 ; 167 : 975 - 8.
- 15) Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Eisenach KD, Cave MD, *et al.* : Rapid, amplification- based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol 1993 ; 139 : 1537 - 42.
- 16) 中村竜也, 柴田尚宏, 土井洋平, 奥田和之, 中田千代, 平城 均, 他 : 1991 年から 2000 年の間に血液培養により分離された *Serratia marcescens* における IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の解析 . 感染症誌 2002 ; 76 : 246 - 53.
- 17) 豊田 誠 : 高知県中学校における結核集団感染 . 第 77 回日本結核病学会総会 講演集/東京, 2002.
- 18) 小竹桃子, 大地まさ代, 土屋三紀, 大井 照 : 若年者のアルバイトを中心にしたファーストフード店で発生した集団感染の一例 . 第 77 回日本結核病学会総会 講演集/東京, 2002.
- 19) 高橋光良 : 結核分子疫学の成果と展望 . 第 77 回日本結核病学会総会 講演集/東京, 2002.
- 20) Yeh RW, Leon AP, Agasino CB, Hahn JA, Delay CL, Hopewell PC, Small PM : Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Genotypes. J Infect Dis 1998 ; 177 : 1107 - 11.

Usefulness of Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) Method
for DNA Fingerprinting Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB);
Comparison between DNA Restriction Fragment-Length Polymorphism
(RFLP) Method and AP-PCR Method

Jun MUKAIGAWA, Yukako SHIMOJIMA, Iwao MURATA, Miyoko ENDOU,
Yositoki YANAGAWA & Satoshi MOROZUMI
Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

We have been analyzing cases suspected as outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* in Tokyo using RFLP method. This time we analyzed 27 strains of MTB from 5 cases in two hospitals, a family, member of social activity and staff of a corporation using both RFLP and AP-PCR methods. At 4 cases, over 80% of strains were same pattern in each cases with RFLP and AP-PCR and were identified as a patient to patients transmission of MTB. At one case, in a hospital, each strains were completely different patterns at both methods, which showed it was not a outbreak case. Results of RFLP and AP-PCR were completely same, which indicates AP-PCR is also useful and rapid method for epidemiological analysis of MTB infection as well as RFLP.