

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

RFLP分析を用いた薬剤耐性結核菌の伝播に関する研究

分担研究者 高橋光良 財) 結核予防会結核研究所細菌学科科長

研究要旨 日本各地から分離された結核菌の RFLP 分析を行った結果、単剤耐性菌の多くは日本で優勢なクラスター型に分離された。中でも SM 単剤耐性菌は 2 型が 12.8%であった。また、単剤耐性菌の 33%は 4 つの優勢なクラスター型(1/2/3/4 型) に型別された。一方、薬剤 2,3,4 剤耐性菌の型はそれぞれユニークであり、1,2,3,4 型に加え 2 つの RFLP 型(5,6 型) の存在が示された。この 5,6 型には INH/SM/RFP 単剤耐性菌も多く含まれ 5 型には全薬剤耐性の 11%、6 型には 16.5%が型別された。

A:研究目的

これまで INH 高度耐性を獲得した菌での感染はないと信じられていたが、最近になって米国の多剤耐性菌による集団発生の報告や本邦においても薬剤結核菌による院内感染・家族内感染事例が報告され、薬剤耐性菌での感染が懸念されている。しかし薬剤耐性結核菌のサーベイランス、菌の亜分類に関する情報が少なく結核対策に利用できない。そこで我々は耐性結核菌の伝播の現状を評価するために DNA fingerprinting 法で大規模な結核菌分離株を用いて検討を行った。

B:研究方法

①臨床分離株は 1997 年度結核療養研究協議会（療研）の研究で集められた結核菌 2000 株、1992 年度結核療養研究協議会（941 株）および複十字病院結核菌分離株（561 株）につ

いても分析を行った。

② DNA の抽出と精製

結核菌は現地保健所および病院検査室で小川培地に増殖したのを用いた。DNA の抽出と精製は直接小川培地から菌を分取してベンジルクロライド法により調製する。

③ビオチン化プローブの精製

プローブとして IS6110 由来 245bp の PCR 産物および polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) を用いた。IS6110 由来 245bp のプローブはオリゴラベリング法を用いてビオチン化— dCTP の取込みでビオチン標識した。また、IS6110 の RFLP 分析でコピー数が 1～5 本の菌株をさらに疫学的な有効性を見るためにプローブとして PGRS を用いる。PGRS のプローブはビオチン dCTP を以下の 3 カ所に DNA 合成法を用いて 5'-ATC(B) GGCAACGGCGGC(B)

AACGGCGGCAACGGC(B) GG-3'の 32 mer にラベルして用いる。

④ DNA の検出法

DNA の検出は化学発光システムを用いて結核菌の RFLP 分析標準法で行った。精製結核菌 DNA を制限酵素 PvuII で消化後、0.8 %アガロース電気泳動、ナイロンフィルターへの転写、UV 固定を行った。次いで 65 °C、3 時間プレハイブリダイゼーション後、ビオチン化プローブ (IS6110 および PGRS) DNA を加え、65 °C 一夜でハイブリダイゼーションする。このフィルターを洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン液と室温で 15 分間反応後、化学発光物質を加え X 線ファルム上でバンドを検出する。

⑤ クラスター分析

分離された結核菌を IS6110 をプローブとした RFLP 分析パターンからクラスター解析する。クラスター解析は Bio-Image 社の Whole Band Analyzer Ver.3.2.1 に X 線ファルム上の結核菌のバンドと内部マーカである λ HindIII + ϕ X174 のバンドを取込み、最近隣法により評価する。

C&D:研究結果と考察

1997 年度結核菌臨床分離株約 2000 株の DNA 抽出はベンジルクロライド法を用いて終わり、現在分析中である。今回は 1992 年度療研株と複十字病院臨床分離株を用いて薬剤耐性結核菌の亜分類とクラスター解析を行ったので報告する。これまでの RFLP 分析から IS6110 コピー数は

1 から 19 本であり、結核蔓延国に見られる様なコピー数 1 本と 11 本にピークが検出される事を報告した。しかし、この現象は 1940 年代の既感染者が高齢になった要因が強く関与することも示唆してきた。また、IS6110 を用いた RFLP 分析から日本では 4 つの優勢なクラスター型 (1/2/3/4 型) の存在が示唆され、集団発生事例においてもこれらの型が優勢に検出されることも解ってきた。さらに、薬剤耐性菌での院内感染・家族内感染事例 3 つはユニークなパターンであり、日本の優勢な流行株であるクラスター群には属していなかった。この解析を基軸に薬剤耐性菌のクラスター解析をした結果、1992 年度療研 941 株では 109/941 株の 11.5 %が薬剤耐性菌でコピー数のピーク形成が 11 本に見られた (図 1)。また、薬剤耐性菌の内 INH+RFP+1,2 剤耐性株では 10 本と 13 本に見られた。さらに、23 株中 10 株が新しい 2 つのクラスター 5,6 型に属しており、上記の集団発生 2 事例株と相関を示した。残り 13 株中 9 株がそれぞれユニークなパターンであり、4 株が 1/2/4 型に属していた。また、初回 SM 単剤耐性菌では 14/109 (12.8%) が 2 型に属し、初回未治療では 11.9%であった。(表 1)。これは SM 耐性菌で伝播したことを意味している。さらに、単剤耐性株 36/109 (33%) が 4 つの優勢なクラスター型 (1/2/3/4 型) に分布していた。加えて、この 5,6 型には単剤耐性菌も多く 5 型は薬剤耐性の

11%が含まれ、その内の既治療では10%であった。6型は薬剤耐性の16.5%が含まれ、既治療では8.3%であった。

一方、複十字病院で分離された結核菌で検討をした結果、薬剤2,3,4剤耐性菌は上記の療研での解析に見られた新しい2つのRFLP型(5,6型)と相関していた。この事は遺伝学的に類似した結核菌による感染あるいは旧流行株の治療脱落の菌によるものと考えられ、今後の分析を展開する上で興味深いことである。また、耐性菌による持続排菌例でIS6110の転移頻度が高いことが見出された。この事はトランスポゾンの転移活性が突然変異遺伝子に關与するRecA遺伝子あるいはシグマ70を活性化し薬剤耐性をコードしている遺伝子の変異活性を高めているとも考えられ、現在検討中である。また、4つの優勢なクラスター型(1/2/3/4型)ではIS6110の転移頻度が有意に低かった。これは結核菌流行株地域差に起因すると考えられ事から、今後耐性菌の標本を増やし年齢・治療歴などを検討し、同一パターンでの菌株の疫学調査を行う予定である。

E:結論

薬剤耐性結核菌のRFLP分析の結果、SM単剤耐性菌は4つの優勢なクラスター型(1/2/3/4型)の2型に属していた。一方、2,3,4剤耐性菌は型に属さないユニークなパターンが優性であったが、新たに2つのRFLP型(5,6型)の存在が示された。

図1. 結核菌941株中のIS6110コピー数の分布

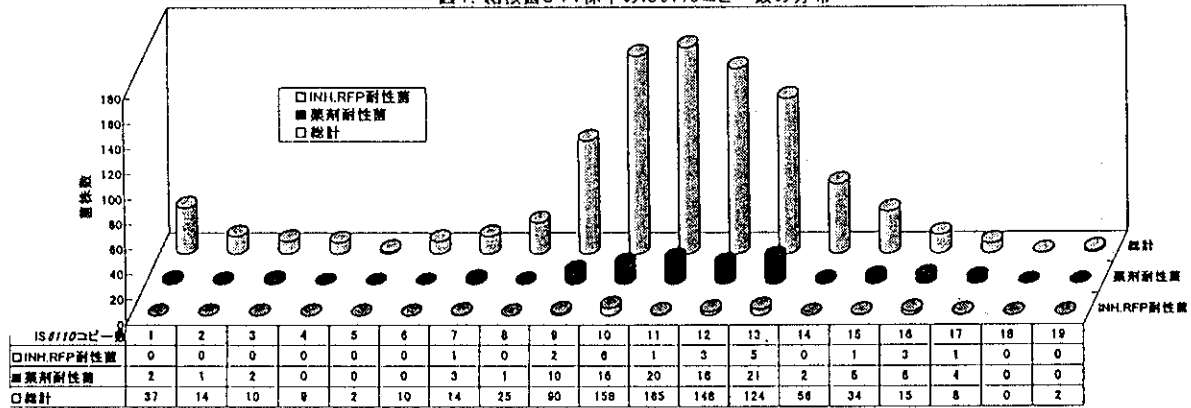


表1. 1992年度療研941株の薬剤耐性結核菌のRFLP型の分布

RFLP型	薬剤完全耐性菌							
	INH		SM		RFP		2剤以上	
	未治療	既治療	未治療	既治療	未治療	既治療	未治療	既治療
1			3	2		1	1	4
2		4	13	1		2		3
3	1	3				1	1	
4			2	1	2			3
5		2	1	4		1		4
6	1	3	4	1		1	4	4
Unique	1	7	5	7		1	4	6
Subtotal	3	19	28	16	2	7	10	24
Total								109

SM(20 μ g/ml に耐性) ; INH(1 μ g/ml に耐性); RFP(50 μ g/ml に耐性) ;
KM(100 μ g/ml に耐性)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌のカナマイシン耐性の分子遺伝学的解析

分担研究者 谷口初美 産業医科大学・医学部・微生物学教室・助教授

研究要旨： 16S rRNA のタンパク合成の A site に変異を有しない、臨床分離のカナマイシン耐性結核菌の変異部位を明らかにすることを目的とした。その結果、16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T が G に、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T が C に変異していることを見いだした。

A. 研究目的

これまで我々は、臨床分離の結核菌のカナマイシン耐性変異について遺伝学的に調べるために、カナマイシン・バイオマイシン耐性スメグマ菌を用いて、その耐性変異の遺伝学的解析を行ってきた。その結果、カナマイシン耐性は 16S rRNA 遺伝子のタンパク合成の A site に変異が起きていること、同じ A site の変異であっても部位によってはバイオマイシンと交叉耐性を示すこと、また臨床分離株のカナマイシン耐性結核菌の約 70% がこの部位に変異が起きていることを明らかにした (Fig. 1)。しかし、残り 30% のカナマイシン耐性結核菌の変異部位については未解明のままである。そこで今回はこの残り 30% のカナマイシン耐性結核菌の変異部位を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

臨床分離の多剤耐性結核菌で、ス

トレプトマイシン及びカナマイシン耐性の strain no. 33, no. 36, no. 114 の 3 株を用いた。これら 3 株のカナマイシン耐性度はカナマイシン 100 μ g/ml 含有小川培地上で 3+, 1+, 3+であった (Table 1)。

これら 3 株の 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定した。16S rRNA 遺伝子については 10 種類の合成プライマーを、23S rRNA 遺伝子については 18 種類の合成プライマーを用いて、PCR 反応を行い、その産物について direct sequencing を行った。Sequencing 反応は ABI 社の Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit を、解析は ABI 社の 373S DNA sequencer を用いた。

C. 研究結果 (Table 1)

1) no. 33 株 は、16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T が G に、513 番目の A が C に変異していた。23S rRNA 遺伝子では、236 番目の T が

C に変異していた。

2) no. 36 株 は、16S rRNA 遺伝子にも、23S rRNA 遺伝子にも変異は起きていなかった。

3) no. 114 株 は、no. 33 株と同様、16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T が G に、513 番目の A が C に、また、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T が C に変異していた。

D. 考察

16S rRNA 遺伝子の 513 番目の A から C への変異はストレプトマイシン耐性の変異であることが既に報告されている。そこで 16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T から G への変異と、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T から C への変異がカナマイシン耐性の変異である可能性が高い。しかし、これらの変異は、no. 33、no. 114 の両株に認められたが、no. 36 株には認められなかった。

用いた 3 株のカナマイシン耐性度は、100 μ g/ml カナマイシンに対して、no. 33、no. 114 の両株は +3 と高いが、no. 36 株は +1 と他の株に比べて低く、no. 36 株の場合は、耐性度の低い population の混入が考えられた。no. 36 株に変異が認められなかったのは、この耐性度の低い population の影響によるものと考えられるので、no. 33、no. 114 の両株に認められる変異がカナマイシン耐性の可能性が高いと考えられる。

しかし、これら 2 つの変異が両方ともカナマイシン耐性に必要なもの

であるか否かは不明である。

今後、更に株数を増やして、また、人為的に変異を起こして、これら、16S rRNA 遺伝子及び 23S rRNA 遺伝子における変異と、カナマイシン耐性との関係を確認する実験を行う計画である。

E. 結論

16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T から G への変異と、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T から C への変異がカナマイシン耐性の変異である可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Taniguchi, B. Chang, C. Abe, Y. Nikaido, Y. Mizuguchi, & S. Yoshida. Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by the conjugation system. *J. Bacteriol.* 179:4795-4801, 1997.
2. Y. Suzuki, C. Katsukawa, A. Tamaki, C. Abe, M. Makino, Y. Mizuguchi, & H. Taniguchi. Detection of kanamycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by searching mutations on the 16S ribosomal RNA. *J. Clinical Microbiol.* 36:1220-1225, 1998.

2. 学会発表

1. 抗酸菌のカナマイシン、バイオマイシン耐性変異の遺伝学的解析

1997, 3 第70回日本細菌学会総会
栃木、宇都宮
谷口初美、二階堂義彦、水口康雄、
吉田真一 日本細菌学雑誌; 1997,
vol.52, no.1, p184

2. 抗酸菌のバイオマイシン・カプレオ
マイシン耐性変異(*vicA*)の遺伝学的
解析 1998, 4 第71回日本細菌学
会総会 長野、松本
谷口初美、常彬、水口康雄、
吉田真一 日本細菌学雑誌; 1998,
vol.53, no.1, p194

3. マイコバクテリアのカナマイシン・
バイオマイシン耐性の分子機構
1998, 4 第68回実験結核研究会
新潟
谷口初美、常彬、阿部千代治、水口
康雄、吉田真一

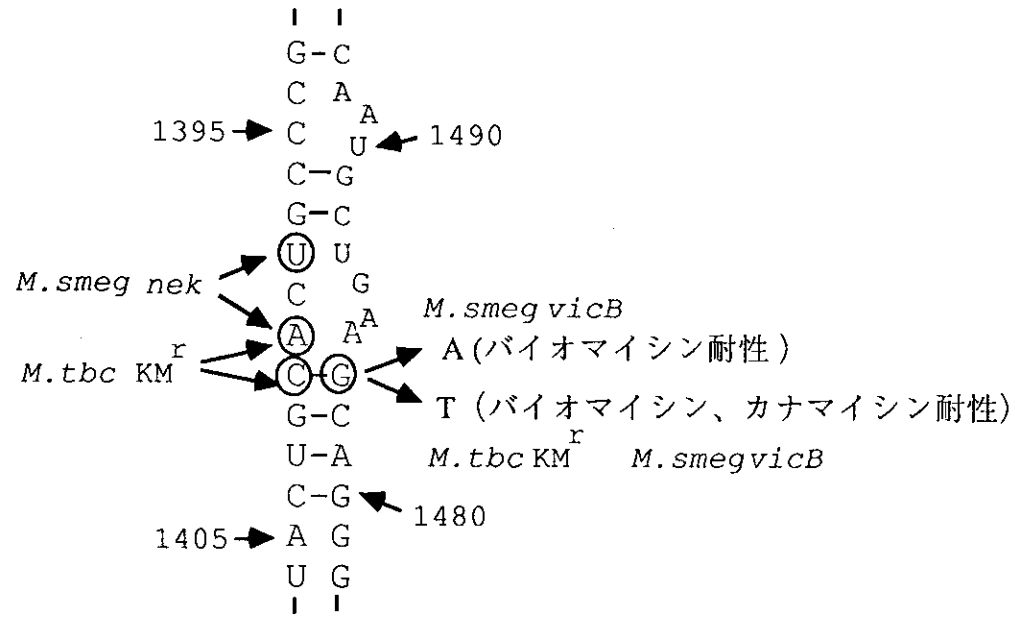


Fig.1 Mutation sites on the A site of the 16S rRNA gene

Table 1: Drug resistance and mutations on the 16S and 23S rRNA genes

strain no.	KM(100µg/ml)	SM	CPM	EVM	RIF	INH	EB	PAS	TH	CS	SM resistance	16S rRNA	23S rRNA
33	R (3+)	R	R	S	R	R	R	R	R	R	rrs513A/C	16T->G, 513A->C(SM)	236T->C
36	R (1+)	R	R	S	R	R	S	S	S	S	rpsL269A/G		
114	R (3+)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	rrs513A/C	16T->G, 513A->C(SM)	236T->C

DNAチップを用いた薬剤耐性結核菌迅速検出法の開発 に関する研究

分担研究者 鈴木 定彦 大阪府立公衆衛生研究所 主任研究員

研究要旨

本研究ではこれまでにモデル系として主要抗結核剤5剤の一つであるリファンピシンに対して耐性を有しているかどうかを迅速に鑑別できるDNAチップの開発を行ってきた。結核菌においてはRNAポリメラーゼの β サブユニットをコードする遺伝子である *rpob* 遺伝子の特定の領域の変異とリファンピシン耐性が高い相関性を示すことが明らかとなっている。そこで、*rpob* 遺伝子上の変異を検出するためのキャプチャーオリゴヌクレオチドの合成を行い、これをポリカルボジイミドをコートした基材に共有結合させたものをプロトタイプDNAチップ（全変異のうちの約80%が検出可能）として用いて実験を行った。これまでに *rpob* 遺伝子上に変異を持つ臨床分離結核菌より抽出したDNAを鋳型としたPCRによりビオチン化したプローブを用い検討を行った。その結果、試験した全ての分離株においてDNAチップによる検出が可能であることを確認できた。

A. 研究目的

DNAチップを用いた薬剤耐性結核菌迅速検出法の開発を本研究の目的としている。結核菌の薬剤耐性獲得機構に関してこれまでに様々な研究が行われてきており、数々の報告が成されてきている。それらを総合して考えると、結核菌の薬剤耐性獲得機構の特徴は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）あるいはバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）等におけるプラスミドあるいはトランスポゾンによる菌から菌への伝達とは全く異なり、突然変異とその選択の結果であると考えられる。つまり、結核菌の染色体DNA上の特定の遺伝子上の変異により薬剤耐性の形質を獲得した菌が、化学療法の過程で増殖するものと考えられる。遺伝子上の変異と耐性の関係については、リファンピシンとRNAポリメラーゼ β サブユニット遺伝子、ピラジナミド

とピラジナミダーゼ遺伝子、ストレプトマイシンと16SリボゾームRNA遺伝子およびリボゾーム蛋白S12遺伝子、イソニアジドとカララーゼ・ペルオキシダーゼ遺伝子、エタンブトールとアラビノシルトランスフェラーゼ遺伝子等が明らかとなっている。我々の研究グループもカナマイシン耐性に関与する突然変異が16SリボゾームRNA遺伝子上に存在することを見出し報告した。

これまでに薬剤耐性結核菌迅速検出法に関する研究も多種行われてきている。それらの中にはMIGIT、BACTEC等の培養法を発展させた方法、ラインプローブ、分子ビーコン等の遺伝子増幅を基盤とした方法がある。迅速さの点では遺伝子増幅を基盤とした方法が有利であるが、これらの方法に関しては現在の所、多種類の薬剤感受性を同時に判別することは可能となっていない。

本研究ではDNAを高密度に、しかも多種類、小面積上に固層化する（高度集積）技術を応用して遺伝子増幅により臨床検体より薬剤耐性に関与する遺伝子を増幅し（マルチプレックスPCR）、これをプローブとしてハイブリダイゼーションを行うことにより多種類の薬剤感受性を同時に判別するシステムを構築することを試みている。本年度はその第一段階として、RNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子をターゲットとしたプロトタイプDNAチップを作成し、検討を行った。

B. 研究方法

1) プロトタイプDNAチップの作成

RNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子上のリファンピシン耐性に関与する塩基置換に関する研究は世界規模で行われてきており、81塩基対の領域に狭められている。その中でも数カ所の高頻度部位がすでに同定されている。本研究ではその高頻度塩基置換を検出するためのプロトタイプDNAチップを作成した。用いたオリゴヌクレオチドはすべて15塩基よりなり、その5'末端には全てアミノ基を付加した。これはDNAチップ基盤上のポリカルボジイミドと共有結合をさせることを目的としている。これにより非常に高密度のキャプチャーオリゴヌクレオチドの固層化を可能にしている。

2) プローブの合成

ON99-002; gccgcgatcaaggagttc およびON99-003; ビオチン化-cacgtgacagaccgccggを用いてPCRを行った。鋳型としては結核菌標準菌株H37RvおよびRNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子上7種類の異なった塩基置換を有する臨床分離株より抽出したDNAを用いた。PCR反応には、宝酒

造社製のZ-Taq DNAポリメラーゼを用いた。反応液はポリメラーゼ添付されているものを用いた。これに、10ngの結核菌由来DNAを加え、PCRを行った。反応は98℃-5秒、55℃-5秒、72℃-15秒のサイクルを35回行った。

3) ハイブリダイゼーション

PCR反応により得られたビオチン化プローブ100ngをエタノール沈澱後50μlの10%デキストラン硫酸/5xSSC溶液に溶解した。沸騰水浴中で10分間過熱後、氷上にて急冷し、プローブを変性させた。このプローブを宝酒造社製ジーンフレームで囲んだところに注ぎ、カバーフィルムにて密閉した（図1）。27、32、37、42℃のいずれかの温度にて3時間のハイブリダイゼーションを行った後、2xSSC/0.1%SDSにて室温5分、2xSSC室温5分の洗浄し、ビオチン化プローブの検出を行った。検出にはペルオキシダーゼ標識ビオチニルチラミド（ニューイングランドバイオラボ社製）を用いた。2xSSCにて洗浄したDNAチップをさらにTBST緩衝液（1.0mMトリス、150mMNaCl、0.05%トリトンX-100、pH7.5）にて室温5分の洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと室温にて30分反応させた。TBST緩衝液室温5分の洗浄後、ビオチニルチラミドを加え室温にて30分反応、さらにTBST緩衝液室温5分の洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと室温にて30分反応させた。TBST緩衝液室温5分の洗浄後、ジアミノベンジジン溶液を加え室温にて30分反応させた。この操作によりビオチン化プローブがハイブリダイズしているDNAチップ上のスポットは焦茶色に発色する。

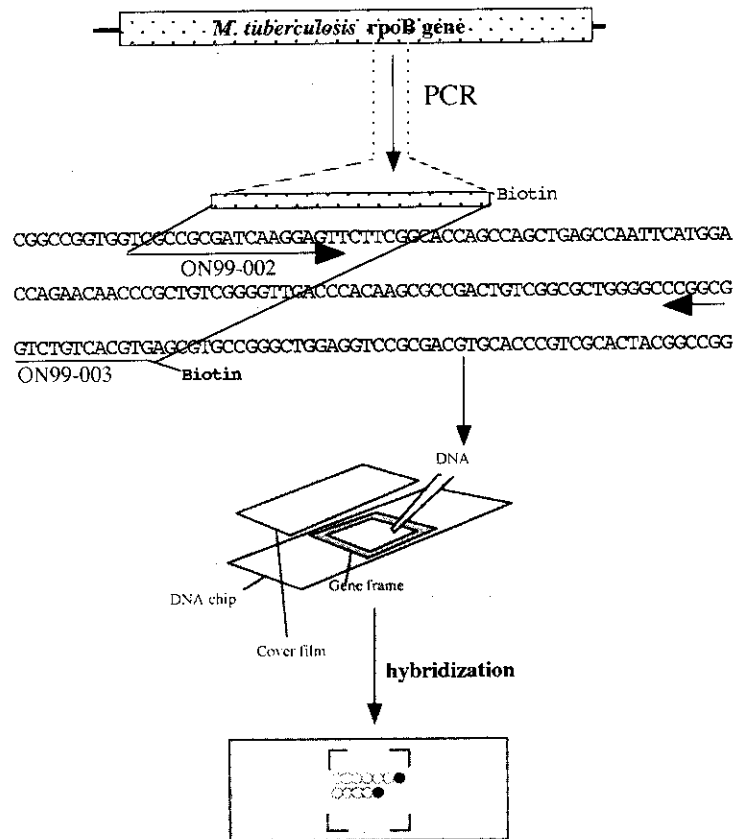


図1. DNAチップによるリファンピシン耐性結核菌の迅速鑑別の方法。PCRにより増幅させたビオチン化プローブをスライドガラス上に固着化したキャプチャーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。

C. 研究結果

1) プロトタイプDNAチップの作成

RNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子上のリファンピシン耐性に関与する塩基置換を検出するためのプロトタイプDNAチップの作成を試みた。本実験では耐性に関与する塩基置換の中でも特に高頻度に見られる置換にフォーカスを合わせて研究を進めた。図2に用いたキャプチャーオリゴヌクレオチドとDNAチップ上のそれらの配列を示す。本研究で用いたキャプチャーオリゴヌクレオチドは58、59、74番の塩基置換を検出するためにデザインしてある。つまり15塩基のキャプチャーオリゴヌクレオチドの7、8あるいは9番目の塩基が野生型（感受性型）とは異なるように合成

してある（図2B）。これらを図2Aに示すように野生型を右端に置き、それに対応する塩基置換型をその左に配置した。また、塩基置換型キャプチャーオリゴヌクレオチドは臨床分離株約500のデータ（文献よりのデータ約340および我々のデータ約160）を総合して、これまでに分離されているもののみを用いた。それゆえ、58、59塩基置換検出用キャプチャーオリゴヌクレオチドは6種類、74番塩基置換検出用キャプチャーオリゴヌクレオチドは4種類が必要であった。本研究で用いた塩基置換検出用キャプチャーオリゴヌクレオチドにより、約80%のリファンピシン耐性結核菌の検出が可能となる。

2) プローブの合成

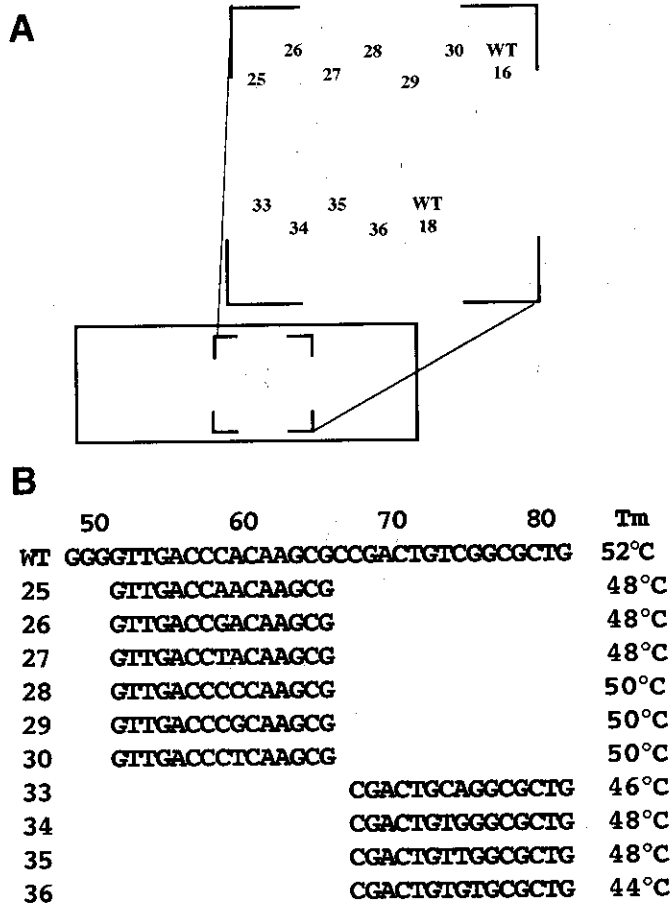


図2. キャプチャーオリゴヌクレオチドの固層化と用いた配列. (A) キャプチャーオリゴヌクレオチドの固層化はガラスプレート (スライドガラス) 上にコートしたポリカルボジイミド樹脂上に5'末端にアミノ基を付加したオリゴヌクレオチドを共有結合させた. (B) 用いたオリゴヌクレオチドの配列を示す. それぞれのT_mは野生型プローブに対する融点を表している.

ON99-002およびON99-003を用いてPCRを行った。鋳型としては結核菌標準菌株H37RvおよびRNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子上7種類の異なった塩基置換を有する臨床分離株より抽出したDNAを用いた。PCR反応には、宝酒造社製のZ-Taq DNAポリメラーゼを用いた。本プライマーペアにより用いた臨床分離株全てにおいて良好なDNA増幅が見られた。増幅されてくるDNA断片の長さは予想された様に約100塩基対であった。

3) ハイブリダイゼーション

結核菌標準菌株H37RvのDNAを鋳型としたPCR反応により得られたビオチン化プローブ100ngをエタノー

ル沈澱後10%デキストラン硫酸/5xSSC溶液に溶解した。プローブを変性させた後27、32、37、42°Cのいずれかの温度にて3時間のハイブリダイゼーションを行った。その後、2xSSC/0.1%SDSにて室温5分、2xSSC室温5分の洗浄し、ビオチン化プローブの検出を行った。その結果を図3Aに示す。この結果をエプソン社製フラットベットスキャナGT-9600によりコンピュータに取り込み、画像解析ソフトNIHイメージ1.59PPCにて解析を行った。その結果を図3Bに示す。縦軸に結合が予想されるキャプチャーオリゴヌクレオチドに対するその他のキャプチャーオリゴヌクレオチドへの結

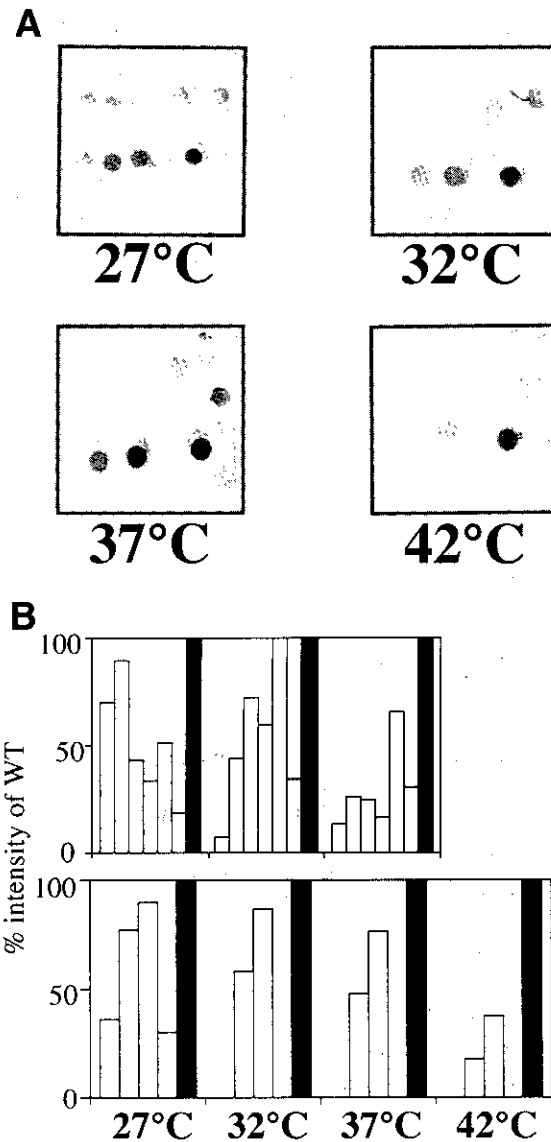


図3. 結核菌標準菌株H37Rvを鋳型として作成したプローブを用いたハイブリダイゼーションの条件検討。(A) 27、32、37、42℃におけるハイブリダイゼーション。(B) ハイブリダイゼーション結果の比較。黒棒は本来ハイブリダイズするべきスポット。白棒はそれぞれのキャプチャーオリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションの黒棒に対する相対強度。

合の相対強度を百分率で示した。上段に58、59塩基置換検出用キャプチャーオリゴヌクレオチドを、下段に74番塩基置換検出用キャプチャーオリゴヌクレオチドより得られた結果を示した。74番塩基置換検出用キャプチャーオリゴヌクレオチドでは42℃のハイブリダイゼーションがもっともバックグラウンドの低い結果が得られた。58、59塩基置換検出用キャプチャーオリゴヌクレオチ

ドでは42℃のハイブリダイゼーションにおいてどの位置にもハイブリダイゼーションが見られず、37℃のハイブリダイゼーションがもっともバックグラウンドの低い結果が得られた。この結果より、37℃のハイブリダイゼーション温度を用いて臨床分離株の試験を行った。

結核菌標準菌株H37RvのDNAを用いたのと同様のハイブリダイゼーションおよび洗浄を行った後、ビオチン化

ローブの検出を行った。その結果を図4に示す。それぞれのハイブリダイゼーションの結果の右横には予想されるハイブリダイゼーションの位置を●で示した。58番目の塩基置換を持った臨床分離株としては3株(TB93-027, 94-062, 93-031;それぞれC→A、C→G、C→Tの塩基置換)、59番目の塩基置換を持った臨床分離株としては2株(TB93-050, 92-004;それぞれA→G、A→Cの塩基置換)、74番目の塩基置換を持った臨床分離株としては2株(TB93-026, 93-005;それぞれC→G、C→Tの塩基置換)を用いた。用いた全ての株において予想される位置にハイブリダイゼーションが得られた。

A→Gの塩基置換)、74番目の塩基置換を持った臨床分離株としては2株(TB93-026, 93-005;それぞれC→G、C→Tの塩基置換)を用いた。用いた全ての株において予想される位置にハイブリダイゼーションが得られた。

D. 考察

本研究では薬剤耐性結核菌の迅速鑑別の法法として、DNAチップの構築を試

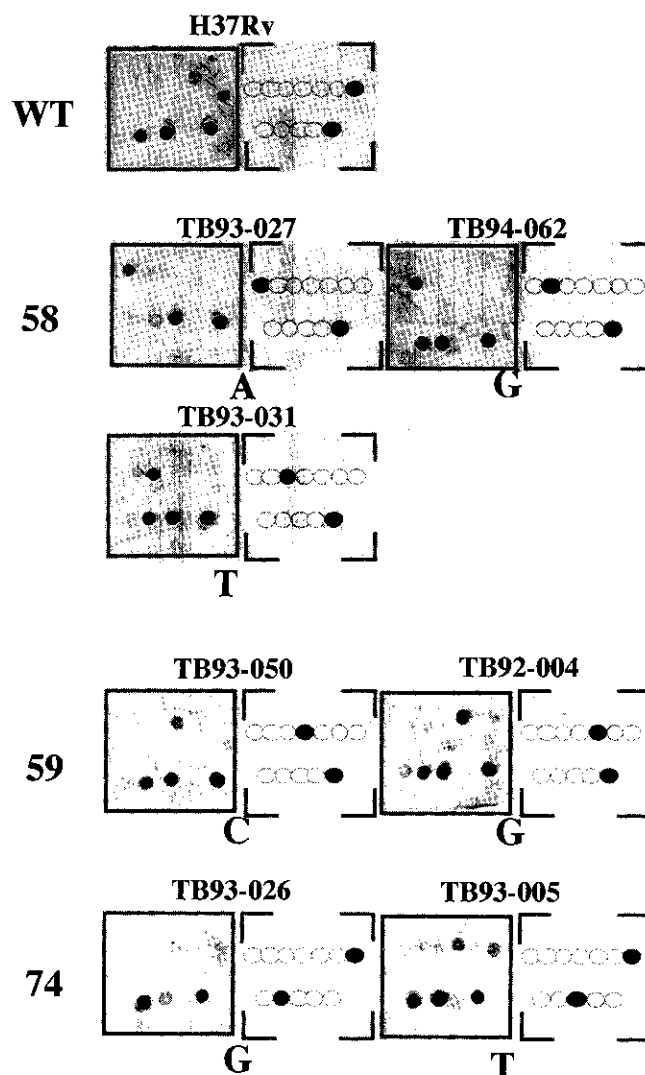


図4. 結核菌標準菌株H37Rvおよび臨床分離株のDNAを用いて作成したプローブのDNAチップへのハイブリダイゼーション。それぞれのハイブリダイゼーションの結果の右横には予想されるハイブリダイゼーションの位置を●で示した。左横の数字は塩基置換の場所、それぞれの図の上に示した文字は菌株名、下に示したアルファベットは置換の結果の塩基をそれぞれ示している。

みた。本年度はプロトタイプチップとしてリファンピシン耐性結核菌検出チップの作成と臨床分離株を用いた研究を行った。結果の項で示した様に用いた全ての耐性菌においてDNAチップによる検出が可能であることが証明できた。

E. 結論

本研究の結果は幅広い範囲でDNAチップによる薬剤菌の検出が可能であることを示すものである。今後、オールインワンチップ（一枚のDNAチップにより全ての薬剤に対する感受性が鑑別できる系）を最終目標として他の薬剤耐性の検出系の開発に取り組んでゆきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yasuhiko Suzuki, Chihiro Katsukawa, Aki Tamaru, Chiyoji Abe, Masanao Makino, Yasuo Mizuguchi and Hatsumi Taniguchi. Detection of kanamycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by searching mutations on the 16S ribosomal RNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 36:1220-1225 (1998)

鈴木定彦、田丸亜貴、Amin Ruhul、勝川千尋 結核菌の薬剤耐性検査；薬剤耐性に関与する遺伝子と迅速診断への応用の可能性。臨床と微生物 (1998)

Chihiro Katsukawa, Aki Tamaru, Yoshihito Miyata, Masanao Makino and Yasuhiko Suzuki

Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 83:634-640 (1997)

2. 学会発表

鈴木定彦、勝川千尋、田丸亜貴、阿倍千代治、水口康夫、牧野正直、谷口初美。結核菌における *rrs* 遺伝子上の点突然変異検とカナマイシン耐性。結核 73:152 (1998)

中曽根知恵、石田知恵子、高嶋哲也、田丸亜貴、鈴木定彦、勝川千尋。臨床分離株を用いた結核菌感受性PZA液体培地法の検討。結核 74:163 (1998)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

アジア諸国で分離されたリファンピシン耐性結核菌の *rpoB* 遺伝子の変異と Line probe 法による変異の検出

分担研究者 阿部千代治 結核予防会結核研究所基礎研究部長
研究協力者 平野 和重 結核予防会結核研究所基礎研究部

研究要旨：リファンピシン(RFP)は主要な抗結核薬の1つであり、耐性の分子機構が最初に解明された。主にアジア諸国で分離された RFP 耐性結核菌の 94.4%(85/90 株)は RNA ポリメラーゼのβサブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子の約 70 ベースからなるホットスポット領域に変異が見られた。しかし RFP 耐性株の 5.6%ではこの領域に変異が認められなかった。次にこのホットスポット領域をカバーする約 20 ベースからなる重複プローブを用いる Line probe 法で変異の検出を試みた。Line probe 法と塩基配列分析および感受性試験との一致率は 96.7%(87/90), 92.2%(83/90)であった。この結果は Line probe 法は RFP 耐性結核の迅速診断に有効であることを示している。

A.研究目的

わが国で複数の薬剤に耐性を獲得している結核菌による集団感染、小規模感染が頻発しており、迅速な診断法と感受性試験法の開発が急がれている。近年結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子が少しずつ明らかになってきた。リファンピシン(RFP)は主要な抗結核薬の1つであり、耐性の分子機構が最初に解明された。RFPの標的は RNA polymerase であり、耐性菌では RNA polymerase のβサブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子に変異が見られる。この研究では主にアジア諸国で分離された結核菌の *rpoB* 遺伝子の塩基配列の分析と line probe 法による変異の検出を試みた。

B.研究方法

(1)使用菌株

バングラデシュ、カナダ、インド、インドネシア、韓国、マレーシア、ミャンマー、ネパール、フィリピン、タイ、イエメンで分離された 116 株の結核菌を実験に用いた。

(2) *rpoB* の塩基配列測定

rpoB 遺伝子の塩基配列は Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction を用い、ABI の Prism 377 DNA Sequencer で測定した。プライマーはホットスポット領域を含む 305 bp 増幅のために設計された。

(4) Line probe 法による変異の検出

256 bp PCR 産物の増幅のために、5'末端をビオチンで標識した次のプライマーを用いた; IP-1: 5'-GGT CGG CAT GTC GCG GAT GG-3', IP-2: 5'-GCA CGT CGC GGA CCT CCA GC-3'。

rpoB 遺伝子のホットスポット領域をカバーする約 20 塩基からなる 5 種の部分的に重複する野生型プローブ (S1:nucleotide 番号 1524-1544, S2: 1540-1561, S3: 1555-1575, S4: 1570-1592, S5: 1585-1603) と変異頻度の高い 3 領域を検出するための 4 種の変異型プローブ (R2: Asp 516 Val, R4a: His 526 Tyr, R4b: His 526 Asp, R5: Ser 531 Leu) がニトロセルロースストリップにコートされている。Line probe 法による変異の検出は AUTO-LiPA (Innogenetics) で行った。

C. 研究結果

主にアジアの 11 カ国で分離された RFP 耐性結核菌の塩基配列を調べた。*rpoB* 遺伝子の 75 bp からなるホットスポット領域に 11 の変異が検出された (表 1)。そのうち 10 は点突然変異であり、1 は 3 塩基挿入 (コドン 514) であった。他に、欠失変異も別々のコドン 2 ヶ所の変異も見られなかった。しかし、RFP 耐性 90 株の中で 5 (5.6%) 株はホットスポット領域を含む 305 bp 領域に変異が認められなかった。

Ser-531 変異の頻度が最大であり、RFP 耐性菌 90 株中 48 (53.3%) に認められた。次いで His-526 (16.7%), Asp-516 (14.4%) の順であり、RFP 耐性結核菌の約 85% はこれら主要 3 コドンに変異が集中していることがわかった。

一方検査した RFP 感受性株では、26 株すべてが野生型配列であり、305

bp 領域に変異が認められなかった。

RFP 耐性結核菌 90 株と感受性株 26 株を用いて、Line probe による *rpoB* の変異の検出を試みた。野生型 S プローブとのハイブリダイゼーションパターンは塩基配列分析結果と 96.7% (87/90) 一致した。また変異型 R プローブにより 70 株が正しく同定された (表 2)。全体として、薬剤感受性試験との一致率は 92.2% (83/90) であった。不一致例には、3 塩基挿入のみられた 2 株と 75 bp からなるホットスポット領域に変異の見られなかった 4 株、S 型と R 型の混合を示した 1 株が含まれる。一方感受性株はすべて野生型のハイブリダイゼーションパターンを示した。

D. 考察

RFP 耐性の頻度はイソニアジド (INH) やストレプトマイシン (SM) 耐性の頻度より低い。しかし多くの場合 RFP 耐性は INH 耐性を伴う。それゆえ、迅速で信頼性が高い結核菌の検出法と薬剤感受性試験法の確立は患者の適切な治療と結核の対策にとって重要である。

この研究で主にアジア諸国で分離された結核菌の *rpoB* 遺伝子の塩基配列が分析された。RFP 耐性菌 90 株のうち 85 (94.5%) はこの遺伝子のホットスポット領域に変異を持っていた。この結果は、*rpoB* の塩基配列の測定は RFP 耐性菌の早期の検出に有効であることを示している。

高頻度に見られた変異は Ser 531

Leu であり、続いて Asp 516 Val, His 526 Tyr の順であった。変異の分布パターンには分離された国による差は認められなかった。このことは RFP 耐性菌による大きな感染の広がりが無いことを示している。主にヨーロッパとアフリカで分離された結核菌を分析した Telenti ら、アメリカで分離された株を分析した Williams ら、日本で分離された株を分析した Suzuki らの成績も同様である。

分析した中で 5 株(5.6%)は *rpoB* の 305 bp 領域に変異が認められなかった。他の研究者によっても同様の傾向が示された。このことは、*rpoB* の他の領域または *rpoB* 以外の他の分子機構がこれらの菌株では RFP の耐性に関与しているものと思われる。

Line probe 法は RFP 耐性を検出するためのキットである。RFP 耐性および感受性 116 株のうち 109 株は Line probe 法により正確に耐性と感受性を分離できた。しかしコドン 514 における TTC の挿入を検出できなかった。これはコドン 514 は S1 プロブの 3'末端に近接していることからきている。この変異の頻度は高くないが希ではない(この研究で 2.5%, ニューヨーク市分離株で 4%)。コドン 514 挿入変異を検出するプロブの改良は困難ではない。

結核の薬剤感受性試験では、薬剤の基準濃度における菌の集落数が薬剤を含まない対照培地の集落数の 1% 以上であれば耐性と判断している。この研究で、1 株は Line probe 法で

S 型と R 型の混合を示した。一方塩基配列の分析では変異が認められなかった。これらの矛盾は、塩基配列の自動分析では 2 つの混合培養の中でより優勢な集団の塩基配列が分析されることに起因している。パターンから変異の位置など詳細は分析不能であるが変異の検出は臨床上有効である。

Line probe 法は簡便であり、結果の判定も容易である。加えて、薬剤感受性試験の結果との一致率も 92.2%と高く RFP 耐性結核の迅速診断に有用である。

E. 結論

(1)アジア諸国で分離された RFP 耐性結核菌の 94.5%は *rpoB* 遺伝子の 75 bp からなるホットスポット領域に変異を示した。

(2)*rpoB* の変異は Ser-531, His-526, Asp-516 が高頻度であり、RFP 耐性株の 85%はこれらの 1 つに変異を持つことが明らかになった。

(3)RFP 耐性菌の検出のための line probe 法と塩基配列分析あるいは薬剤感受性試験の結果との一致率は 96.7%, 92.2%であり、RFP 耐性結核菌の迅速検出のために有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Hirano K, Abe C & Takahashi M: Mutaitons in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in mostly Asian

countries and their rapid detection by line probe assay (submitted to).

(2) Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, and Abe C: Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle Lung Dis* 1998;78:117-122.

2.学会発表

(1) Abe C, Hirano K, and Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of

rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Asian countries and their rapid detection by the line probe assay. IBC's International Conference on *Mycobacterium tuberculosis*, Dec 1998, McLean, VA, U.S.A.

(2) 平野和重, 阿部千代治, 高橋光良: アジア諸国で分離されたリファンピシン耐性株の *rpoB* の変異と Line probe 法による迅速検出. 第72回日本細菌学会総会, 1999年3月, 東京.