

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

「結核菌の臨床分離株を用いた RFLP 分析に関する研究」

分担研究者 水口康雄 千葉県衛生研究所 所長  
共同研究者 岸田一則 千葉県衛生研究所 細菌研究室

千葉県下で発生が認められた結核事例について薬剤感受性試験と分子遺伝学的解析を行った。その成績が県内で発生した多剤耐性菌による感染事例のサーベイランスに果たした貢献について報告する。

A. 研究目的

結核菌の型別は、流行状況把握や感染源追求等の疫学調査のために重要であるが、従来使用されてきた薬剤感受性試験成績、ファージ型別では、実施困難であった。近年これらの生物学的性状による型別に代わり、遺伝子を分析する分子疫学的分類が利用されるようになった。なかでも、結核菌特有の挿入配列 IS6110 を指標とした Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析の有用性が多数報告されるようになった。本法を用いて患者から分離された菌株を分析することにより集団感染、再感染の確認が可能といわれている。

われわれは千葉県内で発生した多剤耐性菌による複数患者発生例について微量液体希釈法による薬剤感受性試験と RFLP 分析を実施し、興味ある知見を得たので報告する。

また近年、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) がレジオネラ等病原細菌の分子疫学的

解析に応用されるようになった。結核菌疫学調査への有用性を検討するため臨床分離された結核菌の RFLP 解析成績と比較検討したので併せて報告する。

B. 研究方法

菌株：1997年から1999年にかけて千葉県内の結核患者から分離された結核菌 27 株について検査した。DNA の抽出と精製：工藤 PD 培地に増殖した結核菌をベンジルクロライド法とフェノール/クロロホルム法を併用して抽出、精製した。

IS プローブ：IS6110 由来の 245bp の PCR 産物をオリゴラベリング法によりジゴキシゲニン標識したものをプローブとした。

RFLP パターンの検出：結核菌 DNA 1  $\mu$ g を制限酵素 Pvu II で消化後に 0.8%アガロースで 150V、4 時間電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーした。UVクロスリンクングにより DNA をメンブレンに固定後

ISプローブで65℃一晩ハイブリダイゼーションした。フィルターは洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシンゲン Fab フラグメントと10分間反応後に化学発光基質を加えた。RFLPパターンは、暗箱内にメンブレンを設置し、デジタルカメラを使用して検出した。

AFLP (Amplified Frgmennt Length Polymorphism) の解析：結核菌 DNA 0.01 μg を EcoR I と Mse I で切断しアダプターをライゲーション後に Preselective Amplificationn により両端に EcoR I と Mse I の両方の切断サイトを有する DNA 断片のみを増幅する。次に Selective Amplification により EcoR I -A/Mse I -C プライマー (PE Applied Biosystems) によって特定の配列を有する DNA 断片のみを増幅する。得られた増幅産物はキャピラリーシーケンサーによりフラグメント解析した。

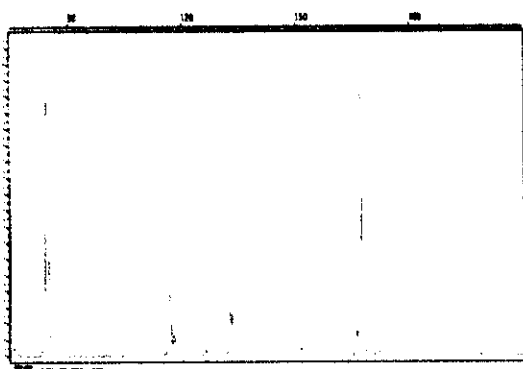


図1. 結核菌 AFLP パターン例  
縦軸：蛍光強度 横軸：分子量

AFLPパターンは図1. に示したピークの検出状況で解析する。結核菌は表1. に示した AFLP 1~14 のピーク

検出の有無で解析した。

ピーク	分子量 (bp ± 0.50)
AFLP1	55.82
AFLP2	61.08
AFLP3	63.87
AFLP4	69.8
AFLP5	75.62
AFLP6	84.35
AFLP7	116.58
AFLP8	117.66
AFLP9	126.39
AFLP10	132.7
AFLP11	151.13
AFLP12	166.99
AFLP13	171.6
AFLP14	222.93

表1. AFLP で検出したピークとその分子量

薬剤感受性試験：Broth MIC MTB I (極東) を使用した微量液体希釈法により Streptomycin (SM), Ethambutol (EB), Kanamycin (KM), Isoniazid (INH), Rifampicin (RFP), Levofloxacin (LVFX), Sparfloxacin (SPFX), Ciprofloxacin (CPFX) の MIC を測定した。

### C. 研究結果

#### (多剤耐性菌感染事例の検討)

千葉県下で認められた多剤耐性菌感染事例での臨床分離株の RFLP 分析成績と薬剤感受性試験について得られた成績を報告する。

ある精神病院において 55 歳男性入院患者 A1 が結核を発症した。その約 8 ヶ月後に 58 歳男性患者 A2, 47 歳女性患者 A3 の発症が認められた。分離された菌株は多剤耐性の傾向があるとの報告があり、当所において薬剤

数値はMIC値 ( $\mu\text{g/ml}$ )

	SM	EB	KM	INH	RFP	LVFX	SPFX	CPFX
A1	>128	2	2	16	>32	0.5	0.25	0.5
A2	>128	1	2	16	<0.03	0.25	0.125	0.25
A3	>128	1	2	16	<0.03	0.25	0.125	0.5

表 2. 多剤耐性菌感染事例 A 由来株 (A1~3) の薬剤感受性試験成績

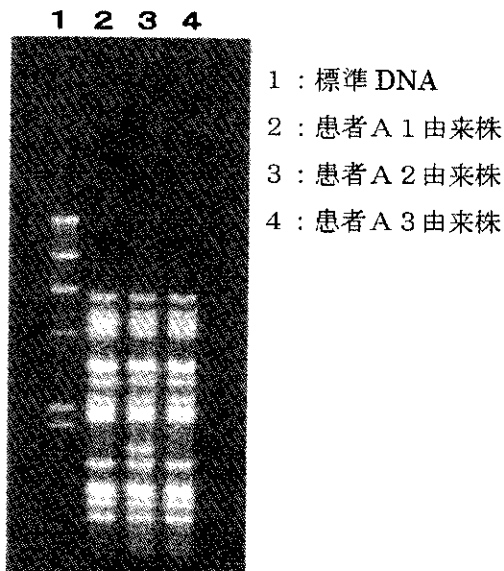


図 2. 多剤耐性菌感染事例 A 由来株の RFLP パターン

A1 の患者から分離された株は SM, INH, RFP の 3 剤に耐性であり, A2, A3 は SM, INH の 2 剤に耐性であった。RFLP パターン (図 2.) を解析したところ A1 と A3 は全て一致したが, A2 は同一のパターンのほかに 1 本のバンドの付加が認められた。

疫学的状況と RFLP パターンの類似性から同一感染源の存在が疑われ, 初発患者 A1 が感染源と考えられたが, 患者らからの正確な聞き取りは困難であり既往歴や過去の治療状況等まったく不明であった。

感受性試験を実施した。

薬剤感受性パターン (表 2.) は,

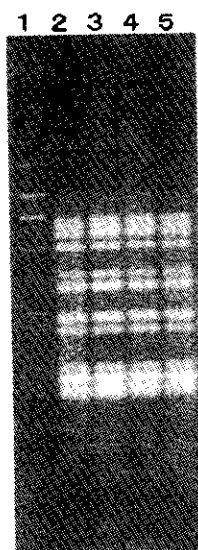
数値はMIC値 ( $\mu\text{g/ml}$ )

	SM	EB	KM	INH	RFP	LVFX	SPFX	CPFX
B1	>128	32	4	4	>32	4	2	8
B2	>128	4	1	2	32	0.25	0.125	0.25
B3	>128	4	1	2	32	0.25	0.125	0.25
B4	>128	128	2	>32	>32	0.25	0.125	0.25

表 3. 多剤耐性菌感染事例 B 由来株 (B1~4) の薬剤感受性試験成績

RFLP パターンが同一であった多剤耐性結核菌の集団感染例 B 由来結核菌の薬剤感受性を検査した。B 事例は, 昨年度の本報告書で RFLP 分析した服薬不十分な患者からの感染事例

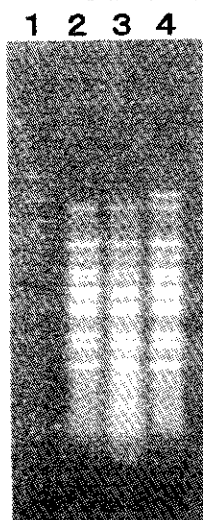
である。RFLP パターン (図 3.) はすべての株が同じであるが薬剤感受性パターン (表 3.) は異なっていた。B1, B2, B3 は INH に対し 4~2  $\mu\text{g/ml}$  の MIC 値を示したが, B4 は 32  $\mu\text{g/ml}$



- 1 : 標準 DNA
- 2 : 患者 B1 由来株
- 3 : 患者 B2 由来株
- 4 : 患者 B3 由来株
- 5 : 患者 B4 由来株

図 3. 多剤耐性菌による感染事例 B 由来株の RFLP パターン

以上であった。LVFX, SPFX, CPFIX に対して B1 は他の 3 株より高い MIC 値を示した。調査したところ患者は、それぞれ治療開始時期、治療方針等が異なり、B4 は INH を含めた治療を開始後に分離した株であり、他の患者は多剤耐性菌のため INH 不使用であった。また、B1 株だけが治療のため LVFX 使用開始後に分離された株であ



- 1: 標準 DNA
- 2: C 由来耐性株①
- 3: C 由来耐性株②
- ①と別コロニー
- 4: C 由来感受性株

図 4. 散発患者 C 由来感受性株と耐性株の RFLP パターン

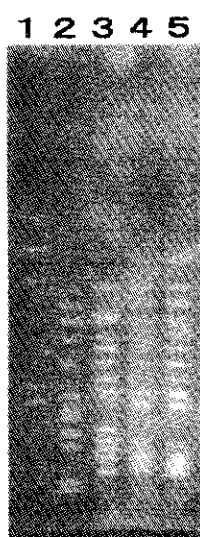
た。

散発患者 C から分離された結核菌の薬剤感受性試験を実施したところ、SM 1  $\mu$ g/ml, EB 2  $\mu$ g/ml, KM 2  $\mu$ g/ml, INH 0.125  $\mu$ g/ml, RFP < 0.03  $\mu$ g/ml, LVFX 0.5  $\mu$ g/ml, SPFX 0.25  $\mu$ g/ml, CPFIX 0.25  $\mu$ g/ml と判定された。ところが INH 16  $\mu$ g/ml の培地のみ菌発育が認められ、菌を分離し検査したところ INH > 32  $\mu$ g/ml の耐性菌であった。

C 由来株と耐性株の RFLP パターン (図 4.) を解析したところ、耐性株は感受性株と同パターンからバンド 1 本の消失を認めた。バンドの類似性から耐性株は感受性株から変異で発生したことが示唆された。

(RFLP 解析と AFLP 解析比較)

結核複数患者発生例 (D 事例, E 事例, F 事例, G 事例) 由来株についての RFLP 解析成績を図 5. ~ 図 9. に示す。



- 1 : 標準 DNA
- 2 : D1 由来株
- 3 : D2 由来株
- 4 : D3 由来株
- 5 : D4 由来株

図 5. 入院患者間に発生した複数患者発生例 D 由来株の RFLP パターン

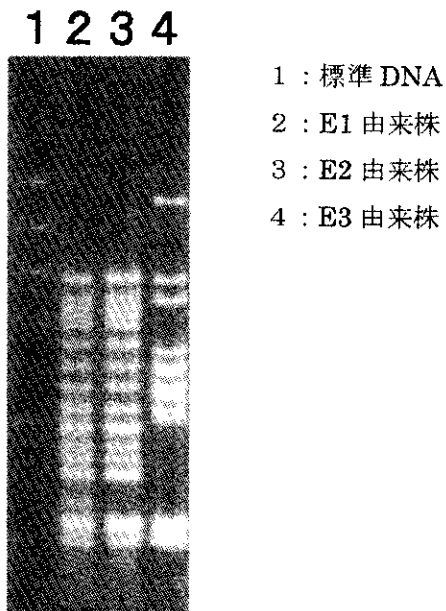


図 6. 入院患者間で発生した複数患者発生例 E 由来株の RFLP パターン

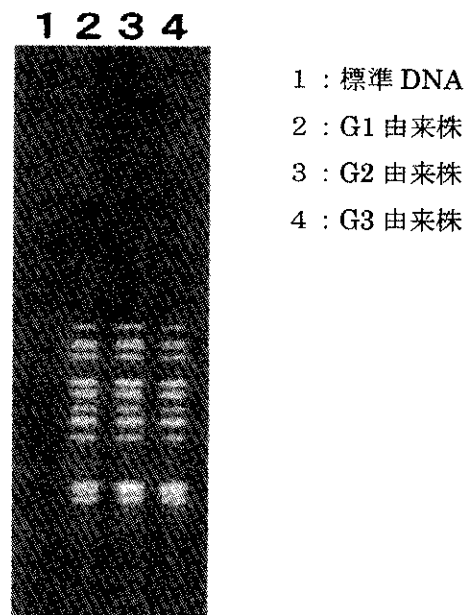


図 8. 職場で発生した複数患者発生例 G 由来株の RFLP パターン

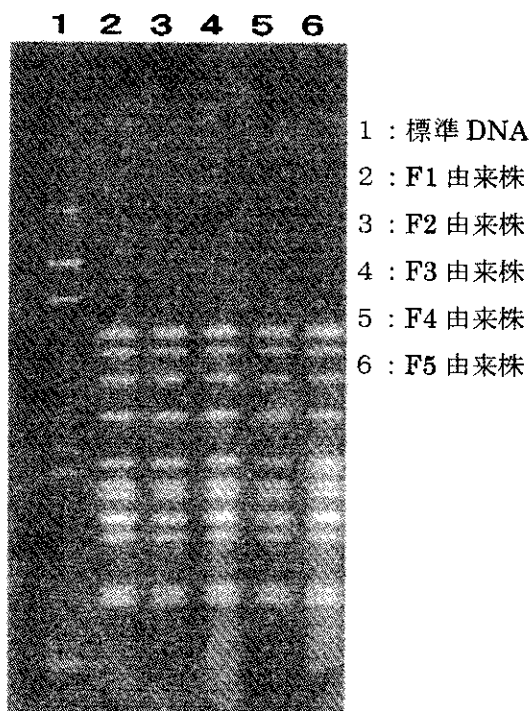


図 7. 老人養護施設で発生した複数患者発生例 F 由来株の RFLP パターン

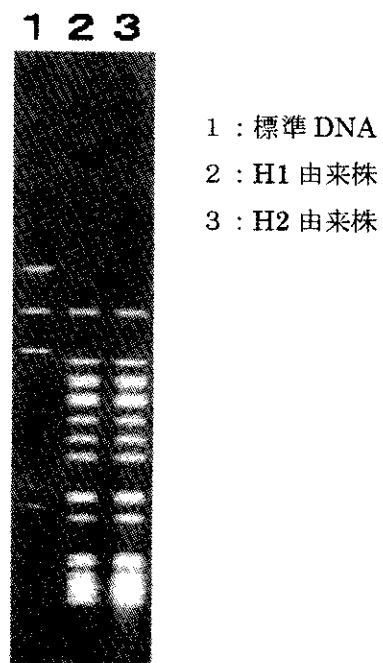


図 9. 入院患者間で発生した複数患者発生例 H 由来株の RFLP パターン

患者由来株の RFLP パターンと AFLP パターンを比較検討した。それぞれの事例で共通の RFLP パターンを示した E 事例の E1 と E2, F 事例の F1~F5, H 事例の H1 と H2 は, AFLP 解析においても共通のパターンを示した。一方, 異なる 6 タイプの RFLP パターンを示した菌株 (D1, D3, E1, F5, G1, H1) について AFLP パターンを比較したところ表 4. に示した AFLP 7 と AFLP11 ピークに多様性を認め, 3 つのグループに分類された。

	AFLP7	AFLP11
D1	+	+
D3	-	+
E1	-	+
F5	+	+
G1	-	+
H1	-	-

表 4. 異なる RFLP パターンを示した菌株の AFLP 7 と AFLP11 の検出状況

#### D. 考察

千葉県下で発生した多剤耐性菌による複数患者発生例 A, B 由来株について RFLP 解析を実施した。事例ごとに RFLP パターンは相同性が高く, それぞれ共通感染源の存在が疑われた。菌株の薬剤感受性は分離された患者の治療状況等により異なっていたため, 微量液体感受性試験による MIC 値が治療状況等耐性獲得の動向調査のため有効であった。

RFLP 解析により結核の詳細な疫

学調査が可能となったが, 解析に十分な量の DNA を得るためには, 菌の増殖が必要であり, 培養に数週間を要する。操作も自動化が困難である。判定の迅速化を目指して, 比較的微量の DNA と自動機器 (キャピラリーシーケンサー) で実施可能な AFLP 解析について検討した。その結果, AFLP パターンの多様性は少なく RFLP 分析に比べ詳細な検討は困難であった。本解析を結核菌に応用するには, 使用する制限酵素, プライマー等の条件検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

千葉県下で分離された結核菌について RFLP 解析を行い, その有用性を再確認したが, ケースによってはバンドの一部に違いが認められた。

また薬剤耐性菌複数感染例において分離菌株ごとに異なる薬剤耐性の傾向を, RFLP 分析のみでは検討不可能であった。

以上から, 結核感染の疫学調査には, RFLP 解析と従来からの聞き取り等の疫学調査や薬剤感受性試験等の性状検査にも重点を置いた幅広い検討が必要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

(1)岸田一則, 水口康雄: 千葉県内の患者から分離された結核菌の RFLP 解析. 第 48 回日本感染症学会東日本地方総会, 1999 年 10 月, 東京

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

平成11年度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  
分子疫学による薬剤耐性結核菌の解析

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

共同研究者 平野和重、和田雅子、阿部千代治（財）結核予防会結核研究所

【研究要旨】我々は本邦における薬剤耐性結核の現状のモニタリングと遺伝子型の分布を明らかにするために IS6110 DNA fingerprinting および spoligotyping を用いて分析を行った。結核菌株は 1997 年度結核療法研究協議会で全国より集められた株のうち 244 株の臨床分離株を用いた。このうち、IS6110 は 130 株の分析が終了し、spoligotyping は 232 株を解析した。その結果、これまでの IS6110 の分析からは多剤耐性結核菌での伝播は無かったが、SM 単剤耐性に 5 名、INH 単剤耐性に 2 名の同一パターンが検出された。一方、外国株との比較において spoligotyping (spt)-1, 2, 3 および 4 型が存在しており、中でも spt-1 は日本 (64.9%)、韓国 (63.6%) に多く southeast Asia 地区に蔓延している Beijing family であった。さらに、SM 単剤耐性菌では 66 株中 44 株 (66.7%) が Beijing family に属していた。これらのことは日本株も共通の genotype を持つことを意味している。

#### A. 研究目的

世界的に薬剤耐性結核菌による集団感染や院内感染事例や保健婦への感染例が報告されている。これまでに本邦においても薬剤耐性結核菌による院内感染・家族内感染事例が報告され、耐性菌での感染が懸念されている。近年、結核菌の伝播を科学的に証明する手段として分子疫学的手法が確立され population を基にした感染源追跡が実施されている。そこで薬剤耐性結核菌の伝播をモニタリングするために IS6110 DNA fingerprinting 法で日本と東南アジア各国で分離された薬剤耐性結核菌

分離株を用いて検討を行った。さらに、IS タイピングで低コピー数の株の二次的分別および遺伝子型を評価するために spoligotyping 法で分析した。これらの結果より同一パターンが検出された患者間の接触状況について疫学的な検討を加える。

#### B. 研究方法

1) 日本の臨床分離株は 1997 年度結核療法研究協議会（療研）で分離された結核菌 2144 株のうち薬剤耐性が確認された 244 株を用いた。また spoligotyping の遺伝子型を比較するために外国株として韓国、インド、

インドネシア、ネパール、タイ、イエメン、ボリビア株を用いた。

## 2) DNA の抽出と精製

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した。

## 3) ビオチン化プローブの精製

プローブとして結核菌 IS6110 由来 245bp の PCR 産物をオリゴラベリング法のビオチン化-dCTP の取込みで標識した。また、 $\lambda$  HindIII と  $\phi$  174HaeIII の内部マーカーは 4ng/lane を入れて電気泳動後、Digoxigenin-dCTP 標識  $\lambda$  HindIII と  $\phi$  174HaeIII のプローブを用いて分析標準法にて分析した。

## 4) DNA の検出とクラスター解析

精製結核菌 DNA を制限酵素 *Pvu*II で消化後、電気泳動、ナイロンフィルターへの転写および UV 固定を行った。次いで 65°C でサザンハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、ビオチン化プローブ IS6110 はアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン液を添加後、化学発光物質を加え X 線ファルム上でバンドを検出した。さらに確認のために 2 回分析を行った。一方、Digoxigenin 標識 DNA は抗-Digoxigenin ペルオキシダーゼ (POD) を用いて Enhanced Chemiluminescence (ECL; Amersham pharmaceutical biotech) の化学発光にて検出し、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ーである  $\lambda$  HindIII +  $\phi$  X174HaeIII の

バンドを取込みクラスター解析を行った。

## 5) Spoligotyping 法による分析

Biodyne C (日本ポール) ナイロンメンブレンを 16% EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide) で活性化し、mini-blotter (immunetics) に置いて 43 個の合成 spacer の各 0.3  $\mu$ M を 0.5M NaHCO<sub>3</sub> に溶解し、spacer/lane に 1 分間固定する。固定後 0.1M NaOH で不活化して 2xSSPE pH7.2, 0.1% SDS で 60°C にて 5 分間洗浄する。そのメンブレンを 90°C 回転させた後、5'末端 ビオチン primer 5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3' と 5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3' primer で PCR (96°C : 3 分、96°C : 1 分 - 56°C : 1 分 - 72°C : 30 秒) にて 30 回増幅した産物をハイブリダイゼーションしてビオチン-アビジン-POD の系を用いて ECL 化学発光で検出し spacer の有無にて判定した。

## C&D. 結果と考察

多くの国で IS6110 を用いた RFLP 分析が評価され結核菌の伝播に関する研究がなされている。これまでの IS6110 を用いた RFLP 分析から本邦では 4 つの優勢な遺伝子型であるクラスター型 (1/2/3/4 型) の存在が示唆され、集団発生事例に際してこれらの遺伝子型が優勢に検出されることも解ってきた。これは 1940 年代の既感染者が高齢になり発病する事で結核蔓延当時の株が影響してい



ると推測された。また、1992 年度結核菌臨床分離株の薬剤耐性結核菌を解析した結果、SM 単剤耐性菌は4つの優勢な遺伝子型であるクラスター型(1/2/3/4 型)の2型に属していた。一方、INH/RFP+1,2,3 剤耐性菌は型に属さないユニークなパターンで、新たに2つの RFLP 型(5,6 型)の存在が示された事を報告した。今回我々は薬剤耐性結核菌の伝播の現状を解析するために 1997 年度療研 2144 株中の薬剤耐性結核菌を用いて IS6110 DNA fingerprinting と spoligotyping 法を用いて検討した。その結果、2144 株中 232 株(10.8%)の薬剤耐性菌 DNA を選別して 130 株の IS タイピングと 232 株の spoligotyping が終わった。130 株の IS6110 コピー数の分布は 1 から 21 本に見られた。このコピー数分布はこれまでに分析したピークを

形成する解析と一致していた。また、INH/RFP+1,2,3 剤耐性菌中で同一パターンを示す株はこれまでに存在しなかった。しかし、SM 単剤耐性株中 5 株と 2 株が優勢な遺伝子型であるクラスター型(1/2/3/4 型)の2型に属する菌によりそれぞれ同一パターンを示した(図1)。また、5 株中 3 株は同一地域由来株で残る 2 株は共に別地区由来株であった。さらに、類似性の高い株も存在していた。この知見は 1992 療研のデータと関連している。さらに、INH(0.2/1.0)単剤耐性株中 2 株が同一パターンで同一地区由来株であった(図2)。

図1. SM 単剤耐性菌 5 株による同一パターン

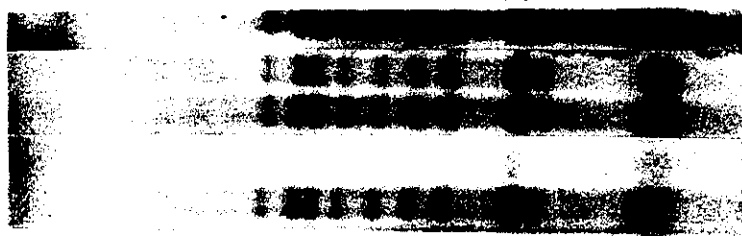


図2. INH 単剤耐性菌 2 株による同一パターン



上記結果は疫学調査を検討中である。

前回、全薬剤耐性株も日本に特徴のある優勢な遺伝子型であるクラス

ター型(1/2/3/4 型)に 36/109(33%)が属していた事を報告した。近年、spoligotyping 法が考案され低コピ

一数の株の二次的分別と地理学的に類似性のあるファミリーの遺伝子型に分別されることが報告されている。本法を用いた日本株の解析から Beijing family に属していることが判った。この事は共通の祖先から派生していることを示している。これまでも東南アジアを中心とした結核菌分離株を用いた IS タイピングから国別に特徴のあるパターンが存在することから外国の菌株での亜分類に有効であることを述べてきた。しかし、クラスター型(1/2 型)を示さない株も Beijing family に属しており、地理学的な分別において IS タイピングのみでは不十分であることが示された。本法を用いた外国株での評価の結果、spoligotype(Spt)の Spt-1 は Qian らが報告した Beijing family に属する結核菌株が多く存在しており、日本は 232 株中 149 株(64.2%)、韓国は 11 株中 7 株(63.6%)、インドは 9 株中 1 株(11.1%)、インドネシアは 9 株中 3 株(33.3%)、タイは 26 株中 3 株(11.5%)、イエメンは 19 株中 1 株(5.3%)、ポリビアは 16 株中 0 株(0%)であった(表 1)。さらに、Spt-2 (ポリビア、イエメン、インドネシア)、Spt-3 (ネパール、インド、イエメン)、Spt-4 (ネパール、タイ)に特徴的な spt が存在していた(図 3,4)。このことは地球レベルの結核菌伝播のモニタリングに利用可能であると考えられる。1997

年度療研株の薬剤耐性菌 232 株中 Beijing family を示す Spt-1 が 149 株(64.2%)、Spt-2 が 37 株(16.0%)、Spt-3 が 0 株(0%)、Spt-4 が 4 株(17.2%)存在していた(表 2)。この両者のタイピングから韓国、日本は共通の結核菌の祖先を持っているが、IS6110 の特異的パターンで分別可能であることが判った。この知見は Park らの韓国株での分析結果と一致している。さらに、Quan らの中国株の分析結果とも一致することから中国、韓国、日本の結核菌の祖先が共通であることが示唆された。興味あることに、先に示した多剤耐性菌の新しい 2 つのクラスター 5,6 型は IS タイピングでは特徴のあるパターンであったが、spoligotype は Beijing family に属していた。一方、先に報告した多剤耐性菌での院内感染・家族内感染事例 2 つはユニークなパターンであり日本の優勢な遺伝子型であるクラスター群に属さず、spoligotype は Beijing family に属していなかった。このことは外国株由来の可能性も考えられ、更なる詳細な検討が必要であると思われる。今後、残された株の解析と疫学調査を検討すると共に *KatG463/gyrA95* の塩基の点突然変異および *danA-dnaN* 部分への IS6110 の挿入箇所による遺伝子型の分類で近隣諸国より分離された結核菌の分別を行い伝播における現状を探りたい。

図 3. Spoligotyping による種々国々のタイピング



表 1. 種々国々より分離された結核菌に見られる Beijing family の分布

Origin	No. of strains Investigated	No. of strains of the Beijing family	% of strains of the Beijing family
日本	232	149	64.2
韓国	11	7	63.6
インド	9	1	11.1
インドネシア	9	3	33.3
タイ	26	3	11.5
イエメン	19	1	5.3
ボリビア	16	0	0

図 4. Spoligotyping 法により解析された特異的パターン

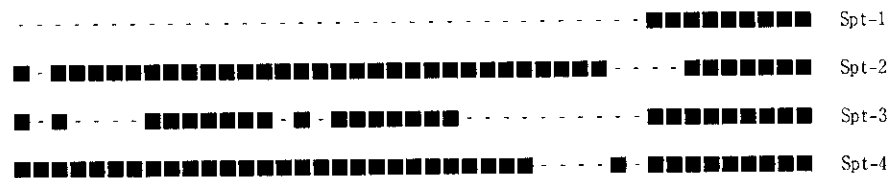


表 2. 薬剤耐性結核菌と spoligotype の分布

Antitibi c	Spoligotype					Total
	Spt-1	Spt-2	Spt-3	Spt-4	other	
H	3	5	-	2	3	13
HH	16	5	-	-	6	27
R	3	1	-	-	1	5
S	44	6	-	2	14	66
K	5	2	-	-	2	13
HR	5	1	-	-	1	7
HS	7	-	-	-	-	7
HE	1	-	-	-	-	1
HK	-	1	-	-	-	1
HHR	7	1	-	-	2	10
HHS	14	2	-	-	2	18
HHE	-	-	-	-	1	1
RS	2	-	-	-	-	2
RE	1	-	-	-	-	1
SK	6	4	-	-	2	12
HRS	2	-	-	-	-	2
HRE	3	-	-	-	-	3
HSK	1	-	-	-	1	2
HHRS	3	-	-	-	-	3
HHRE	1	-	-	-	3	4
HHSE	2	-	-	-	-	2
HHSK	1	-	-	-	-	1
RSE	-	-	-	-	1	1
HRSE	1	-	-	-	2	3
HHRSE	6	-	-	-	1	7
HHSEK	-	1	-	-	-	1
HHREK	1	2	-	-	-	3
HHRSK	4	-	-	-	2	6
RSEK	2	-	-	-	-	2
HHRSEK	5	2	-	-	-	7
Total (%)	149 (64.2 %)	37 (16.0%)	0 (0%)	4 (1.7%)	42 (18.1%)	232

Spt-1: Beijing family(Korea, Japan), Spt-2: (Bolivia, Yemen, Indonesia) , Spt-3: (Nepal, India, Yemen), Spt-4: (Nepal, Thailand). H;isoniazid(0.2  $\mu$  g/ml),

HH;isoniazid(0.2 $\mu$ g/ml , 1 $\mu$ g/ml) R;Rifampin(40 $\mu$ g/ml), E;Etambutol (2.5 $\mu$ g/ml) , S;Streptomycin (10 $\mu$ g/ml) , K;Kanamycin (20 $\mu$ g/ml) .

#### E. 結論

IS6110 DNA fingerprinting を用いた分析は 232 株中 130 株の薬剤耐性結核菌が解析され、現状では多剤耐性結核菌による伝播は発見されていない。一方、SM および INH 単剤耐性菌中に同一パターンを示す菌が検出され、現在疫学調査中である。Spoligotyping による評価では spt-1、2、3、4 が検出された。このうち spt-1 は日本と韓国に多く検出され、Quanらが報告した Beijing family であることが示された。このことは韓国や中国の株と共通の祖先を持つことを意味している。これら両分析法は結核菌伝播のモニタリングに適当な手段であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hirano, K., Abe, C., and Takahashi, M. 1999. Mutation in the *rpoB* gene of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated

mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J. Clin. Microbiol. 37:2663-2666.

伊藤邦彦、高橋光良、吉山 崇、和田雅子、中園智昭、尾形英雄、水谷清二、杉田博宣. 1999. 病院検査室における結核培養の Cross-contamination. Kekkaku. 74:777-788.

##### 2. 学会発表

深澤豊、鹿住裕子、平野和重、高橋光良、阿部千代治. 1999. *M. xenopi* の 16SrRNA gene 配列変異菌株について. 実研結核研. 69:supplement.

平野和重、阿部千代治、高橋光良. 1999. アジア諸国で分離されたりファンピシン耐性株の *rpoB* 遺伝子の変異と line probe 法によるその迅速検出. Kekkaku. supplement.

#### G. 知的所有権の取得状況 なし

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・教授

研究要旨：カナマイシン耐性結核菌の 16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T->G 変異、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T->C 変異、*vicA* 変異及び putative multidrug resistant efflux pump protein をコードする *tap* 遺伝子の変異について調べ、カナマイシン耐性株の約 19% が *tap* 遺伝子に guanine の挿入変異を有し、約 8% が 23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T->C 変異を有する事を見いだした。

#### A. 研究目的

これまで我々は、結核菌のカナマイシン耐性変異について遺伝学的な解析を行ってきた。その結果、臨床分離株のカナマイシン耐性結核菌の約 70% が 16S rRNA 遺伝子の 3' 末端近傍の amino acyltransferase 結合部位、タンパク合成の A site に変異を有することを明らかにした。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。そこでこの残り 30% について変異部位を明らかにするために解析を行い、前回までに 16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T->G 変異、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T->C 変異が、カナマイシン耐性と関連している可能性が高いと報告した。今回はこれら 2 つの変異と、23S rRNA 遺

伝子の *vicA* 変異及び putative multidrug resistant efflux pump protein をコードする *tap* 遺伝子の変異について調べた。

#### B. 研究方法

臨床分離のカナマイシン耐性結核菌 25 株を用いた。16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T->G 変異及び A site の変異、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T->C 変異、*vicA* 変異については、これらの変異部位を含む primer を合成し、その PCR product について dye terminator 法で塩基配列を決定した。16S rRNA 遺伝子の A site に変異を有しない 11 株及び、コントロールとして BCG の *tap* 遺伝子 1260bp の全塩基配列を、6 種類の primer を合成して dye terminator 法で決定し、比較した。Primer は *M. tuberculosis* の

*tap* 遺伝子をコードする *orf Rv1258* の塩基配列から合成した。

塩基配列の決定は 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 373A DNA sequencer を用いた。

#### C. 研究結果 (別紙 Table)

1) 16S rRNA 遺伝子の 16 番目の T → G 変異は、25 株全株に見られなかった。

2) 16S rRNA 遺伝子の A site の変異は、25 株中 14 株に見られた。

3) 23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T → C 変異は 25 株中 8 株に見られた。このうち 3 株はこの変異のみを有していたが、5 株は同時に A site の変異も有していた。

4) 23S rRNA 遺伝子の *vicA* 変異は 25 株全株に見られなかった。

5) A site に変異を有しない 11 株について、*tap* 遺伝子の全塩基配列を決定した結果、7 株に 681 番目の guanine の挿入変異が認められた。そのうち 1 株は同時に 23S rRNA 遺伝子の 236 番目の T → C 変異を有していたが、残り 6 株には他の 4 箇所の変異は見られず、*tap* 遺伝子の変異のみであった。

#### D. 考察

16S rRNA 遺伝子の 16 番目の

T → G 変異、23S rRNA 遺伝子の *vicA* 変異は、カナマイシン耐性とは無関係であると考えられた。これに対し、

23S rRNA 遺伝子の 236 番目の

T → C 変異は 25 株中 8 株に見られ、このうち 3 株はこの変異のみで、その割合はカナマイシン耐性株全体の約 8 %であった。また、*tap* 遺伝子の変異を有する株は 7 株で、全体の 19% を占めていた。これらの変異が、カナマイシン耐性と関係あるか否か、これらの変異遺伝子を大腸菌・抗酸菌シャトルベクターにクローニングし、感受性株を形質転換して、カナマイシン及び他の薬剤に対する感受性試験をしなければならない。もしこれらの変異がカナマイシン耐性と関係あれば、16S rRNA 遺伝子の A site、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の変異、及び *tap* 遺伝子の、3 種類の変異で、カナマイシン耐性株の約 97% を検出出来ることになる。今後、これらの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予定である。

#### E. 結論

16S rRNA のタンパク合成の A site に変異を有しない、残り 30 %のカナマイシン耐性株について、23S rRNA 遺伝子の 236 番目の変異、及び *tap* 遺

伝子の挿入変異が 27 % の割合で見つかった。この変異とカナマイシン耐性との関係は、今後の確認実験を待たなければならない。

## F.研究発表

### 1.論文発表

1: S. Nabeshima, M. Nomoto, G. Matsuzaki, K. Kishihara, H. Taniguchi, S. Yoshida, K. Nomoto.

T-Cell hyporesponsiveness induced by activated macrophages through nitric oxide production in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1999; Jul; 67(7):3221-6.

2: 本田咲子・山元修・丸田耕司・末永義則・旭正一・谷口初美 皮膚非定型抗酸菌症の2例、西日本皮膚科 1999; vol.61, no.5, p626-629.

3: 河野公俊・谷口初美 多剤耐性遺伝子 The Lung—変貌する肺結核—、1999; vol.7, no.4, p71-75,

4: H. Taniguchi, Streptomycin, in *Encyclopedia of Molecular Biology* Ed. By T. E. Creighton, John Wiley & Sons, Inc. 1999; p2448-2450.

5: H. Taniguchi, Kanamycin, in *Encyclopedia of Molecular Biology* Ed.

by T. E. Creighton, John Wiley & Sons, Inc. 1999; p1339-1341.

6: H. Taniguchi, Rifampicin, in *Encyclopedia of Molecular Biology* Ed. by T. E. Creighton, John Wiley & Sons, Inc. 1999; p2208-2210.

### 2.学会発表

1: 常彬、鈴木定彦、後藤義孝、谷口初美、カナマイシン耐性結核菌の分子解析. 第 52 回日本細菌学会九州支部総会、福岡、1999 年 9 月. 日本細菌学雑誌 ; 1999, vol.54, no.4, p861

2: Hatsumi Taniguchi. Molecular mechanisms of drug resistance in mycobacteria. 5<sup>th</sup> International Conference on Emerging infectious diseases in the Pacific Rim, Chennai, India. 2000, Jan.

3: 野村和代、小川みどり、谷口初美、田辺忠夫、松本哲朗、ファイバースコープ自動洗浄機における抗酸菌汚染とその対策、第 15 回環境感染学会大分、2000 年 2 月



株数	16S rRNA		23S rRNA		Rv1258 (tap gene)
	16 番目	A site	236 番目	<i>vicA</i> site	
9	-	+	-	-	ND
5	-	+	+	-	ND
1	-	-	+	-	+
2	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-

ND: not determined

## DNAチップを用いた薬剤耐性結核菌迅速検出法の開発

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

本研究では昨年度の研究で主要抗結核剤5剤の一つであるリファンピシンに焦点をあててこれ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チップの開発をモデル系として行った。これは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を応用して、*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。これを用いて *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い、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。そこで本年度の研究ではまず *rpob* 遺伝子上のほぼ変異をカバーできるキャプチャーオリゴヌクレオチドを用いてDNAチップを作成し、様々な条件でハイブリダイゼーションおよび洗浄を試みこれらの条件の至適化を行った。さらに、ストレプトマイシン耐性を鑑別するための *rrs* および *rrsL* 遺伝子上の変異を検出できるキャプチャーオリゴヌクレオチド、イソニアジド耐性を鑑別するための *katG* および *inhA* 遺伝子上の変異を検出できるキャプチャーオリゴヌクレオチド、エタンブトール耐性を鑑別するための *embB* 遺伝子上の変異を検出できるキャプチャーオリゴヌクレオチド、およびカナマイシン耐性を鑑別するための *rrs* 遺伝子上の変異を検出できるキャプチャーオリゴヌクレオチドを用いて耐性の判明している臨床分離菌100菌株の判定を試みた。その結果、リファンピシン、ストレプトマイシン、イソニアジド、およびカナマイシン耐性の鑑別はほぼ満足の得られる結果が得られたが、エタンブトール耐性の鑑別に関しては更に検討の余地がある事が判明した。

### A. 研究目的

低密度DNAアレーを用いて薬剤耐性結核菌を迅速に鑑別する方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リボソームRNA遺伝子およびリボソーム蛋白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リボソーム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、小面積上に固着化する（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) リファンピシン耐性結核菌検出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、非常に大量のデータが蓄積されてきている。本研究ではリファンピシン耐性と関係する結核菌 *rpoB* 遺伝子上の81塩基対の領域における塩基置換の大半を検出するためのDNAチップを作成した。それぞれの5'末には全てアミノ基を付加し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た。

### 2) プローブの合成

ON99-002; gccgcatcaaggagttc 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、10 ng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と検出

PCR反応により得られたビオチン化プローブをエタノール沈澱後50 μlの10%デキストラン硫酸/5xSSC溶液またはArraitt Unihyb溶液（BM機器社製）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）。

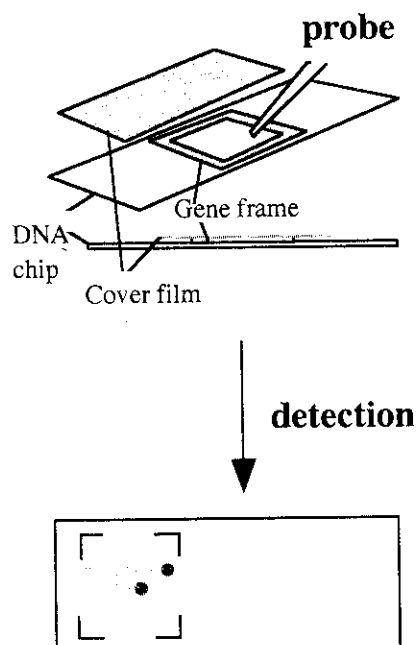


図1. DNAチップへのプローブのハイブリダイゼーションと検出

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あるいは3Mテトラメチルアンモニウムクロライド溶液にて室温5分洗浄し、引き続いて2xSSC室温5分の洗浄を行った。これをツイーン20含有トリスバッファードセライン（TBST; 10mMトリス、150mMNaCl、0.05%トリトンX-100、pH7.5）で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ビオチニルチラミドキット（ニューイングランドバイオラボ社製）、アビジン・ビオチン複合体（ABC）-ペルオキシダーゼキット（ベクタステイン社製）あるいはABC-アルカリフォスターゼキット（ベクタステイン社製）にてビオチン化プローブの検出を行った。ビオチニルチラミドキットによる検出はDNAチップを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、TB

ST緩衝液室温5分の洗浄後、ピ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、さらに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、ジアミノベンジン溶液を加え室温にて30分反応させた。この操作によりピ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を焦茶色に発色させた。ABC-ペルオキシダーゼキットによる検出はDNAチップをABC-ペルオキシダーゼ溶液と室温にて30分反応させ、TBST緩衝液室温5分間2回の洗浄後、TMB-メンブレン基質（キルケガード・ペリー社製）を加え室温にて30分反応させた。この操作によりピ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を青色に発色させた。ABC-アルカリフォスファターゼキットによる検出はDNAチップをABC-アルカリフォスファターゼ溶液と室温にて30分反応させ、TBST緩衝液室温5分間2回の洗浄後、NBT-BCIP混合液（ロシュ社製）を加え室温にて30分反応させた。この操作によりピ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を濃紺色に発色させた。反応終了後蒸留水にて洗浄し、乾燥後エプソンフラットベットスキャナGT-9600によりコンピュータに取込み、画像解析ソフトNIHイメージ1.59PPCにて解析を行った。

4) 他の薬剤に対する耐性検出のためのDNAチップの作成

リファンピシン耐性結核菌におけるrpoB遺伝子上の変異と同様にストレptomycin耐性と16SリボゾームRNA遺伝子およびリボゾーム蛋白S12遺伝子、イソニアジド耐性とカララーゼ・ペルオキシダーゼ遺伝子およびinhA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、カナマイシン耐性と16SリボゾームRNA遺伝子それぞれにおける特定の変異の関係が明かとされている。これらを検出するためのオリゴヌクレオチドをリファンピシン耐性結核菌検出DNAチップと同様に合成し、DNAチップ基盤上に結合させた。

5) 他の薬剤に対する耐性検出のためのプローブの合成

16SリボゾームRNA遺伝子およびリボゾーム蛋白S12遺伝子上のストレptomycin耐性に関係する領域、カララーゼ・ペルオキシダーゼ遺伝子およびinhA遺伝子上のイソニアジド耐性に関係する領域、アラビノシルトランスフェラーゼ遺伝子上のエタンブトール耐性に関係する領域、16SリボゾームRNA遺伝子上のカナマイシン耐性に関係する領域を増幅させるプライマーを合成し、これらを用いて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-TaqDNA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。

6) ハイブリダイゼーションと検出

リファンピシン耐性結核菌検出DNAチップの場合と同様に行った。プローブはそれぞれ別々のチューブでPCRを行った物を混合し、エタノール沈澱後用いた。ただし、リファンピシン耐性結核菌検出DNAチップの試験により最適条件が判明していたためそれを用いた（研究結果参照）。

## C. 研究結果

1) リファンピシン耐性結核菌検出DNAチップ

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。用いたオリゴヌクレオチドはその塩基配列を表1に示した。また、図2にはDNAチップ上のスポットの配列を示した。本研究で用いたキャプチャーオリゴヌクレオチドはこれまでに報告されている大半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。これらを図2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。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90%のリファンピシン耐性結核菌の検出が可能となることが予想された。