

結核菌の分子疫学解析

はじめに

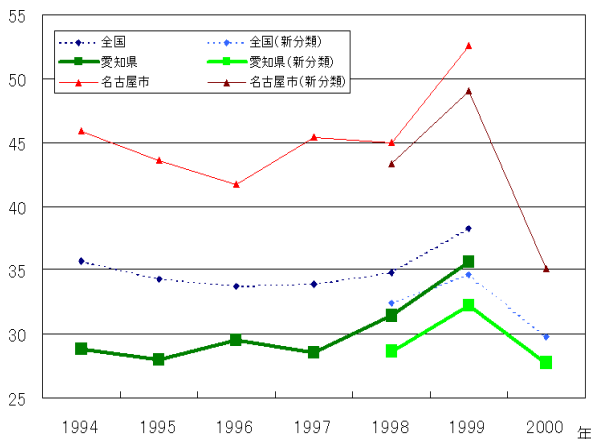
1999年7月、厚生省は「結核緊急事態宣言」を発表した。全国的な結核罹患率^{*1}の上昇、多剤耐性結核菌の出現等、抗結核薬登場以前の状態に逆戻りしかねないとさへ危惧されている。今回筆者（微生物部 鈴木）は大阪府立公衆衛生研究所において結核菌の遺伝子解析に関する研修を受けたので、結核菌群^{*2}に特異的な塩基配列であるIS6110^{*3}を利用した分子疫学的手法としてのRestriction fragment length polymorphism (RFLP)解析を紹介する。

*1 罹患率：人口10万人あたりの新規登録患者の数。

*2 結核菌群：Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microtiの総称。このうち日本において患者から分離されるのはM. tuberculosisおよびM. bovisである。

*3 IS6110：結核菌群に特異的な転移性遺伝子で、長さは1361bp。結核菌群の染色体上に0～25コピーがランダムに存在する。

図1 罹患率の年次推移(人口10万人対)



結核の現状⁽¹⁾

図1はここ7年間における結核罹患率の推移である。全国の統計では1997年まで一貫して低下してきた罹患率が97年以降増加に転じたことがわかる。愛知県および名古屋市においてもほぼ同様の傾向が見られ、96～97年頃から増加傾向にある。特に西日本の大都市で結核の罹患率は非常に高く、大阪市で約110、神戸市で約60、名古屋市でも約50と、愛知県全体の罹患率(約30)の約1.6倍となっている。2000年については確定数ではないものの、12月までの概算では1999年を下回っている。

近年の結核罹患率上昇の原因として高齢人口の増加があげられる。図2は年齢階層別に見た全国における結核新規登録患者数^{*5}の推移である。70歳以上の高齢者の患者数が他の年齢層と比較し、際だって増加しており、患者数の増加に伴い塗抹陽性患者数^{*6}も増加している。

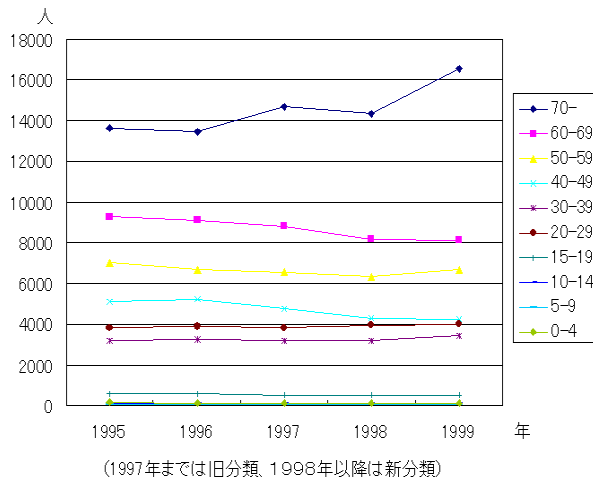
こういった高齢者が感染源となり、周囲の中年、若年の未感染者が感染、発病しているものと考えられ、中年、若年層の罹患率も若干上昇傾向にある。

*4 新分類と旧分類：旧分類では非定型抗酸菌症患者も含まれ、実際の結核患者数より大きな数字となっていたが、1998年以降は非定型抗酸菌症患者が除かれた新分類が使用されている。

*5 新規登録患者数：新たに結核と診断され登録された患者の人数。

*6 塗抹陽性患者：新規登録患者のうち痰の中に菌を排出している患者。感染性が高い。

図2 年齢層別新規登録患者数



結核菌の挿入断片 IS6110 を用いた Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析による型別分類

集団発生、あるいは散発事例において原因菌株の相互関係を明らかにするための方法として、従来は薬剤耐性パターンおよびフェージ型別分類等が利用されてきたが、近年では遺伝子型別分類を行なうことが多い。

遺伝子型別分類法として、多くの微生物でパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) が利用されている。しかし結核菌では、独特の細胞壁構造のため手順が複雑となり、また再現性に乏しいのに加え、PFGE で得られるパターンの数も少ないことから、PFGE はほとんど用いられていない。そこで結核菌の遺伝子型別分類では、その遺伝子中に挿入されている特異的な塩基配列である IS6110 の RFLP 分析⁽²⁾ が疫学調査の有効な手法として世界中で利用されている。IS6110 の RFLP 分析とは、結核菌群の持つ IS6110 のコピー数と制限酵素 “PvuII” による切断部位の多様性を利用して遺伝子型別分類を行なう方法である。

IS6110 は *M. tuberculosis* には 0~25 コピーが、*M. bovis* には 1~6 コピーが含まれている。また *M. bovis* BCG 株のうち pasteur、Glaxo、Sweden、Copenhagen、Tice 株では 1 コピー、Moreau、Russian、Tokyo 株では 2 コピーが含まれている。IS6110 は染色体上にランダムに挿入されており、その位置は菌株によって異なる。

RFLP 分析においては、まず結核菌から染色体 DNA を抽出し、IS6110 を 1 カ所で切断する制限酵

素 “PvuII” を用いて染色体 DNA を切断する。切断された断片はおよそ 0.5~2.5kb のサイズとなる。電気泳動によって分けられた断片をそのままナイロン膜に写し取り、この膜を IS6110 だけに付着するジゴキシゲニン標識プローブでハイブリダイゼーションを行なう。アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体で処理し酵素反応を利用して可視化すると、図 3 のような RFLP パターンが現れる。

IS6110 のプローブは二つに分けられた断片の片方だけに付着するように設計してあるため、バンドの数は IS6110 のコピー数と等しく、また IS6110 の挿入位置の違いは RFLP パターンのバンド位置の違いとなる。IS6110 は結核菌の様々な部位に、また様々な数が組み込まれているので、その両者の組み合わせは非常に多数となり、それぞれの結核菌株が持つ RFLP パターンは特徴的なものとなり、その他の菌株と明確に識別可能なものとなる。従って、複数の患者から検出された結核菌株の RFLP パターンが一致した場合、それらの菌株は同一の感染源に由来すると考えられる。

RFLP の操作の概要

1. DNA 抽出

①小川培地の斜面上の菌を多めに掻き取り、500 μ l の TE*バッファーに浮遊させる。供試菌としては、培養 1、2 カ月以内の新鮮培養菌を使う。採取した菌を 85°C で 30~40 分加熱し、死滅させた後に使用する。

*TE バッファー: 10mM Tris-HCl buffer, 1mM EDTA pH 8.0

②Lysozyme (50mg/ml) を 10 μ l 加え、37°C 一晚反応。この操作が DNA 収量を左右する。

③10%SDS 70 μ l と Protinase K (10mg/ml) 5 μ l を加え、65°C で 15 分静置する。

④ヒートブロック (65°C) 上で 5M NaCl 100 μ l、CTAB/NaCl solution* 100 μ l の順に加えた後、激しくボルテックスで混和した後、65°C で 15 分間反応させる。CTAB は低温、低塩濃度で DNA と結合し、収量が下がるので注意が必要。

*CTAB/NaCl solution: 4.1g の NaCl を 80 ml の蒸留水に溶かし、10g の N-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide をかき混ぜながら加える。蒸留水で 100ml とする。

⑤通常のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を行ない、イソプロピルアルコールで沈殿させる。70%エタノールで洗浄後、乾燥させる。

⑥RNase を 10 μ g/ml 加えた TE バッファーを 10~15 μ l 加え 4℃一晩（急ぐときは 37℃ 2時間）放置。加える液量は析出した DNA 量で決める。

⑦DNA 量を測定する。

⑧DNA 量が 1mg/ml 程度になるように TE で濃度を調節して、4℃で保存。

2. 制限酵素処理と電気泳動

①サンプル DNA 2 μ l (2 μ g) に *Pvu*II 10~40U を加え、37℃ 2~6 時間反応させる。切断された DNA 断片のサイズは 0.5~2.5kbp となる。

②15x15cm の 0.8% アガロースゲルを用いる。サンプル DNA を各レーンで等量となるようにゲルにセットし、TBE バッファー* で 3.2 V/cm 10 分、0.8 V/cm 24 時間泳動する。

*TBE バッファー: Tris Base 12.11g、ホウ酸 6.18g、Na₂EDTA·2H₂O 0.74g を蒸留水にとかし 1000ml とする。

3. サザンブロッティング

①泳動の終了したゲルを 0.2N HCl に 10 分間浸漬する。

②蒸留水で 3 回洗浄

③Denaturation Solution (NaCl 35.5g、NaOH 8.2g、蒸留水 405ml) に 15 分ずつ 2 回浸漬。

④Neutralization Buffer (NaCl 87.8g、Tris 30.3g を蒸留水にとかし塩酸で pH 8.0~8.5 とし、500ml とする) に 30 分浸漬

⑤メンブレンを 2x SSC* に 5 分浸す

*20x SSC (NaCl 175g、クエン酸ナトリウム 85g、蒸留水で 2000 ml とする) を保存液とし、10 倍に薄めて使う

⑥メンブレンとパッドを 20x SSC に 5 分浸す

⑦ブロッティング（吸引、キャピラリー法のどちらでも可）

⑧メンブレンを 2x SSC で洗浄

⑨UV で DNA を固定

4. ハイブリダイゼーションと発色

以下は BOEHRINGER MANNHEIM 社の DIG Nucleic Acid Detection Kit を使用したアルカリフォス

ファターゼによる発色法の一例である。他に蛍光色素やアイトープを用いる方法もある。

①Buffer 2 (Blocking stock solution*²を Buffer 1*¹で 10 倍にうすめる)、68℃で 15 分間プレハイブリダイゼーション

*1 Buffer 1 : マレイン酸 23.2g、NaCl 17.54g を蒸留水にとかし、水酸化ナトリウムの粒（又は高濃度水溶液）で pH 7.5 に調整し 2000 ml とする。

*2 Blocking stock solution (500 ml - 20℃保存) : 20x SSC 125 ml、N-lauroylsarcosine 0.5g、10% SDS 1 ml、blocking reagent 5g（キットに付属）、蒸留水 375 ml

②Buffer 2 (14ml) + ジゴキシゲニン標識プローブ (15 μ g/ml 30 μ l) で 68℃、一晩ハイブリダイゼーション。プローブはあらかじめ熱変成させておく。プローブは BOEHRINGER MANNHEIM 社の DIG DNA Labeling Kit にて作成。

③2x SSC 0.1% SDS 室温、5 分間を 2 回

④0.1x SSC 0.1% SDS 68℃、15 分間を 2 回

⑤Buffer 1 室温で 1 分間

⑥Buffer 2 室温で 30 分間

⑦Buffer 1 で洗浄

⑧アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (1:5000) 室温で 30 分間

⑨Buffer 1 室温で 15 分間を 2 回

⑩Buffer 3* 室温で 2 分間

*Buffer 3 : Tris 12.1g、NaCl 5.8 g、蒸留水で 1000 ml とする。使用前に Buffer 3 stock solution 50ml に 1M MgCl₂ solution 2.5 ml を加える

⑪Color substrate solution (Buffer3 8.574 ml に nitroblue tetrazolium 38.85 ml と 5-bromo-4-chloro -3- indolyl phosphate 30.18 ml を加える) 1 時間から一晩発色させる。

⑫蒸留水で洗浄、乾燥。

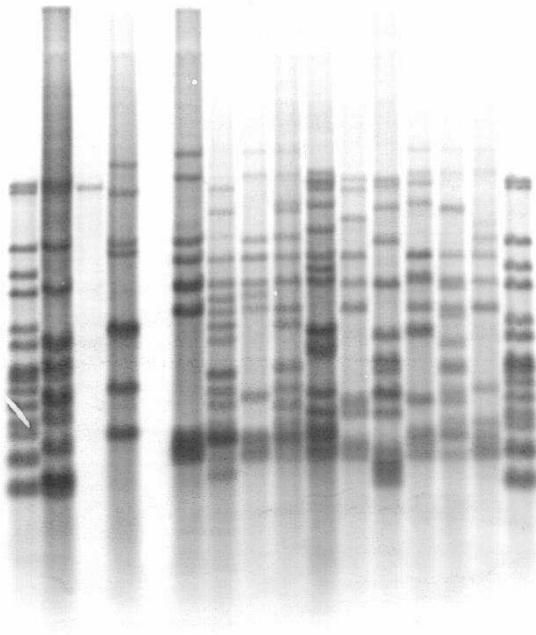


図3 結核菌の IS6110 による RFLP 分析画像
(大阪府立公衆衛生研究所 田丸重貴先生提供)

おわりに

IS6110 による結核菌の遺伝子型別分類は結果が安定しており再現性が高く、結核菌を継代してもほとんど変化しない。そのため時間間隔をおいて発生した患者間でも泳動パターンの比較が可能であり、同一の感染源に由来するか否かを特定できるとされている。

その一方で菌の分離後、RFLP 検査のために必要な菌量を得るために、さらに約1～2ヶ月の培養が必要であるため時間がかかる。また、しばしば見られる IS6110 を数コピーしか持たない株では十分な多様性が得られず判定が難しい場合があり(図3、左から第3レーン)、また、IS6110 を全く持たない株も存在することも報告されている

(3)(4)。さらに、薬剤感受性株と耐性株間で RFLP パターンに違いがない場合があることも示されている。

このような問題点も存在はするが、IS6110 による RFLP 分析は結核菌の疫学的解析において大変有効な方法であることから、一般的な方法として定着している。

謝辞

忙しい中、研修を担当して下さった大阪府立公衆衛生研究所の田丸重貴先生はじめ微生物課の先生方に感謝いたします。

参考文献

(1) 結核の統計 1999 厚生省保険医療局結核感染症課監修(財)結核予防会発行

(2) Hermans, P.W.M., van Soolingen, D., Dale, et al. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 28: 2051-2058.

(3) Yuen, L.K.W., Ross, B.C., Jackson, K.M. and Dwyer, B. 1993. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 31:1615-1618.

(4) van Soolingen, D., de Haas P.E.W., et al. 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 31:1987-1995.

(微生物部 鈴木匡弘)

ホームページの作り方その2 (各種タグについて1)

前回の技術情報ではホームページは HTML (Hyper Text Markup Language) によって書かれていると説明しましたが、今回はその HTML の各種タグについて説明します。

1. HTML ファイルを作るために最低限知らなければいけない必須タグ

これから説明するタグは、HTML ファイルの特定のために不可欠なタグですが、ファイル内容の画面上での表示には影響を及ぼしません。しかし、

HTML 言語で書かれていることを宣言するためには必ず HTML ファイルに記述しなければいけません。

`<HTML>...</HTML>`

ファイルの内容を`<HTML>`と`</HTML>`で挟むことにより、このファイルが HTML ファイルであることを宣言します。

`<HEAD>...</HEAD>`

ページタイトルやサーバーなどが利用する情報を定義します。

`<TITLE>...</TITLE>`

ページタイトルを指定します。このタグで囲まれた文字列は画面上には表示されずにタイトルバーの部分に表示されます。またこのタグは必ず`<HEAD>`タグの間になければいけません。

`<BODY>...</BODY>`

ページとして表示される内容を定義します。

また、このタグには背景イメージや背景の色、文字の色、リンク色などを決める属性があります。またこの属性はページ全体に影響します。

`<BODY BACKGROUND="背景イメージの URL">...</BODY>`

ページの背景となるイメージを定義します。背景イメージの URL にはイメージファイルの URL 名及びファイル名を記入します。イメージファイルは JPEG 形式または GIF 形式のファイルを指定することができます。

`<BODY BGCOLOR="#RGB 値">...</BODY>`

ページの背景となる色を定義します。

RGB 値 RGB とは光の三原色で R: Red 赤、G: Green 緑、B: Blue 青の三色のことです。RGB 値はそれぞれ赤緑青の三色を 00 から FF までの 16 進数 (256 階級) で表し、赤、緑、青それぞれ 256 階級の組み合わせ (256 の 3 乗=16,777,216 とおり) で色を表現しています。

`<BODY TEXT="#RGB 値">...</BODY>`

ページで使うホットテキスト (リンクが指定されリンクスポットとしての働きを持っている文字列) 以外の本文の文字の色を指定します。

`<BODY LINK="#RGB 値">...</BODY>`

ページでのホットテキスト部の文字の色を指定し

ます。

これから説明するタグのほとんどすべてはこの`<BODY>`タグの間に記述することになります。

2. 文字を修飾するタグ

ここで説明するタグは、文字を修飾するに必要なタグです。太字にしたり、イタリックで表記したりするためのタグを説明します。テキストベースの文字だけのホームページを作るのならば、最低限これらのタグを知っていれば何とかなるでしょう。

`<H1>...</H1>` ~ `<H6>...</H6>`

見出し (ヘッダ) を指定します。見出しの大きさは H1 が一番大きく最上位、H6 が一番小さく最下位になっています。特別に何も設定していないときの見出し以外の文字の大きさは H4 の見出しの文字の大きさと同じになります。

`...`

このタグではさまれた文字列は太字 (ボールド) で表されます。

`<I>...</I>`

このタグではさまれた文字列は斜字 (イタリック) で表されます。

`<U>...</U>`

このタグではさまれた文字列には下線が追加されます。`<S>...</S>`

`^{...}`

このタグではさまれた文字列は上付文字で表されます。

`_{...}`

このタグではさまれた文字列は下付文字で表されます。 (企画情報部 山本 功)

次回はリンクやイメージを表すタグについて説明します。

~~~~~  
愛知衛研技術情報 第 24 巻 第 4 号

第 25 巻 第 1 号 合併号 平成 13 年 3 月 1 日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

電話: 052-911-3111

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6 号

FAX: 052-913-3641

愛知県衛生研究所のホームページ [【http://www.pref.aichi.jp/eiseiken】](http://www.pref.aichi.jp/eiseiken)