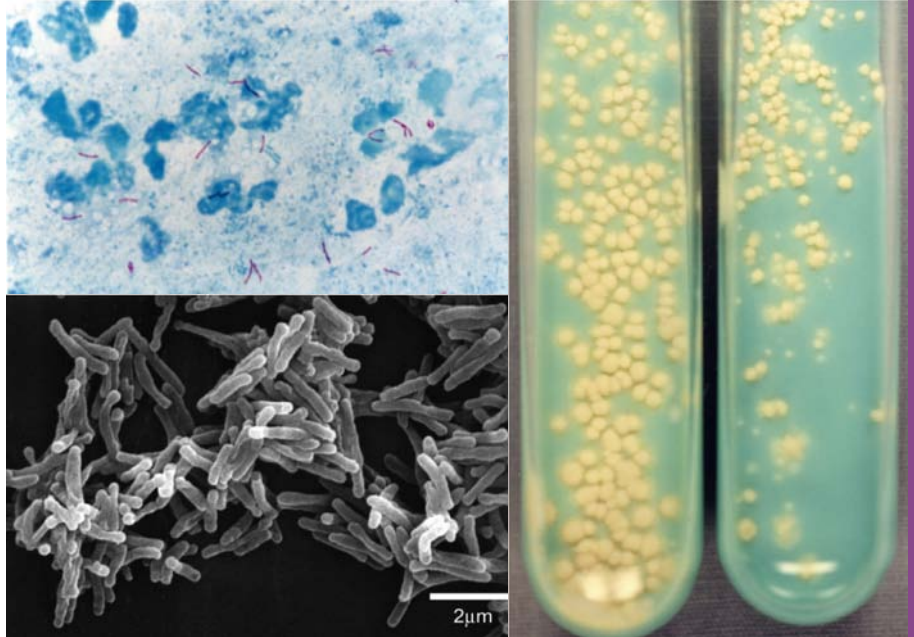


Application Note

島津アプリケーションノート No.19 (ライフサイエンス)



Lifescience

反復配列多型(VNTR)分析を利用した結核菌の型別 — MultiNA の活用 —

前田 伸司*¹
S. MAEDA

曾我部 有司*²
Y. SOGABE

1. はじめに

結核とは結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による感染症です。そのうち8割以上は肺結核です。結核菌は感染者から発せられたせきやくしゃみなどに含まれて空気中に拡散し、それを周囲の人が吸い込むことにより広がります。これを空気感染といいます。結核は年齢に関係なく人から人へ感染します。

世界では総人口の約3分の1が結核に感染しているといわれています。毎年約940万人が新たに発病し、約180万人が命を落としています¹⁾。

結核菌に感染しても発症するのは1割程度で、健康な人であれば免疫機構により結核菌は撃退されてしまいます。しかし、体の抵抗力が低下している人や乳幼児などでは結核菌が体内で猛威をふるい発病してしまいます。

結核 (肺結核) を発病してしまった場合、初期症状は

微熱が出る程度で自覚症状は少なく、その後、咳・痰・倦怠感・発熱など風邪と同じような症状が出ます。症状が軽いため、数週間放置してしまうこともあり、結核の発見を遅らせる原因となっています。さらに病状が進むと結核菌は肺を浸食して組織を破壊することで、宿主の呼吸機能を低下させます。

現在では結核に対する治療薬 (抗結核薬) があります。しかし、結核は早期診断・治療が重要となります。治療が遅れた場合、呼吸機能障害など後遺症が残ることがあります。また、適切な治療を受けなければ、薬剤耐性菌を生み出すことになり、治療はさらに困難となります。

集団感染や院内感染などが疑われる場合、分離された結核菌株の型別を行うことは、感染源の追跡調査や感染防止策を検討する上で非常に重要な情報となります。

*1 公益財団法人 結核予防会 結核研究所 抗酸菌 レファレンス部 結核菌情報科

*2 (株)島津製作所 分析計測事業部 応用技術部 京都ADC

2. 結核菌の型別解析

1993年に報告されたIS6110 (*1) 制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析法²⁾ (*2) を用いた結核菌の型別により、結核の集団発生や院内感染疑い例の確認や否定および感染源や伝播様式の推定が検査結果に基づき可能となりました。(図1)。

日本では約10年前から、このような菌の型別が公衆衛生の現場で利用されています。基準となる結核菌の型別法は、現在のところIS6110 RFLP分析法です。しかし、この方法では生きた菌からのDNAを精製しなければならないので、菌の培養が必要です。そのため結果を得るのに時

間がかかります。また、バンドの差異 (アナログデータ) の判定は肉眼によるため、電気泳動の条件による結果の変動が大きく、多施設間でのデータの比較や共有が困難です。一方、結核菌のゲノム解析から明らかになったミニサテライト (*3) DNAを解析する反復配列多型 (Variable Number of Tandem Repeats: VNTR) 分析法は、PCR法 (*4) を利用した型別法なので、迅速に型別結果が得られます。また、菌株同士の異同判別が容易でRFLP法の欠点を補う方法であるため、公衆衛生の現場で急速に普及が進んでいます。

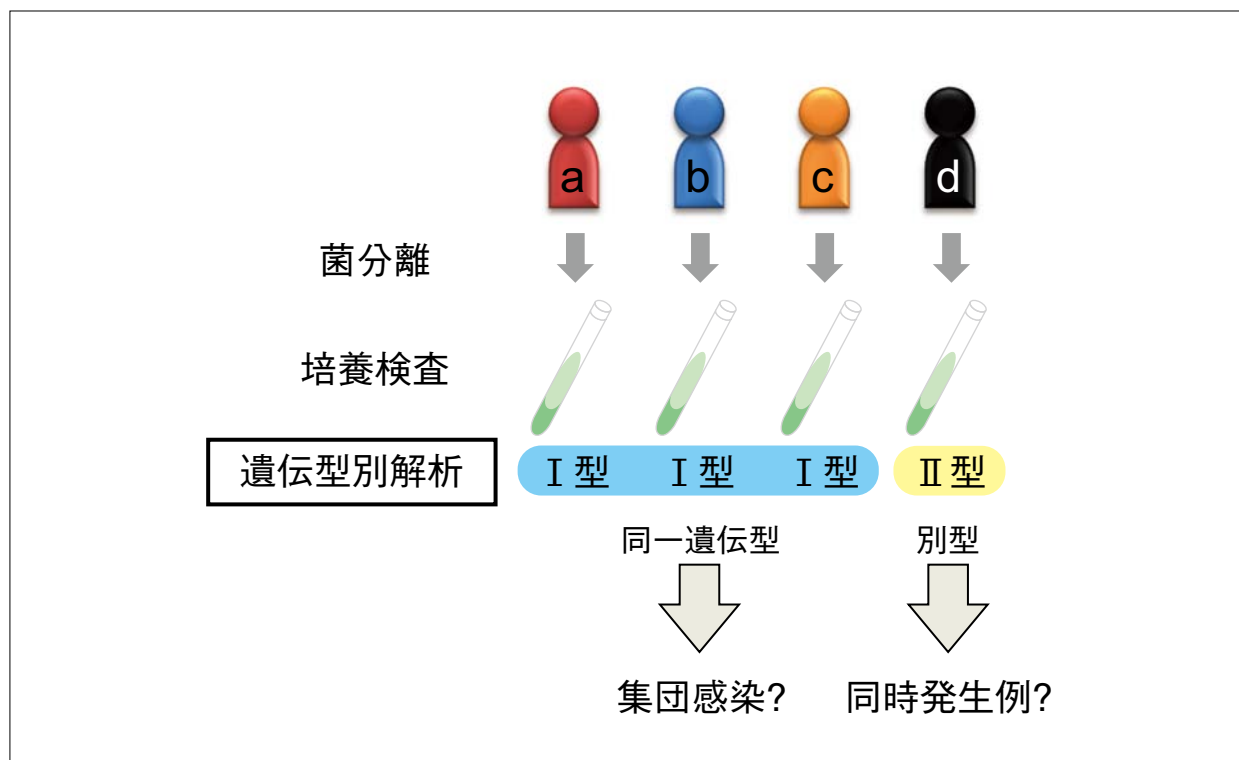


図1 特定の地域内で分離された結核菌の型別例

(*1) IS6110 :

トランスポゾン (一定な塩基配列を持ち染色体上を移動するDNA断片) が持つ挿入配列 (Insertion sequence: IS) の一種で、IS6110は結核菌群が持つ1,358塩基からなるDNA断片。

(*2) 制限酵素断片長多型 (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) :

個体あるいは種によりDNA中の制限酵素認識部位の塩基配列には個体差があります。このような性質を利用して、あるDNAを制限酵素によって断片化を行い、その切断パターンから個体や種を同定する方法。

(*3) ミニサテライト DNA :

DNA配列の中にある、およそ5から30塩基対 (bp: base pair) の配列が何度も繰り返されている部分。

(*4) PCR (Polymerase Chain Reaction) 法 :

試料となるDNAを鋳型として、DNAのある一部分だけを選択的に増幅させる方法。増幅したい領域の両端と配列特異的な短い1本鎖DNA (プライマー) とDNA合成酵素 (DNAポリメラーゼ) を用いて、サイクル反応 (DNA二本鎖の解離→プライマーの結合→DNA合成反応) を行うことにより任意のDNA領域を増幅する方法。原理的にはDNAが1分子でもあれば反応サイクルの乗数だけDNAが増えます。プライマーを挟む領域の増幅の有無を利用して目的物の有無が判断できます。

3. 分析ローカスの重要性

生物のゲノム上に存在する一定のDNA単位が連続して並ぶ領域（ミニサテライト）において、繰り返しDNA単位が何個存在するかを調べる方法がVNTR分析です。この分析法は、法医学の分野で親子鑑定や個人特定のためのDNA鑑定に利用されている手法です。結核菌のゲノムDNA上にも、同様なミニサテライト（VNTR領域）が存在します。

結核菌ゲノム上にある調べたいローカス（*5）の反復配列外側の定常領域にプライマーを設計します。このプライマーを用いてPCRを行い、そのPCR産物のDNAサイズ（bp）を電気泳動法により測定してコピー数（反復配列数）を算出します（図2(a)）。PCR法を利用して核酸を増幅するため、少量のDNAを検体として使うことが可能で、ゲノムDNAの精製及び菌の培養は不要です。そのため、RFLP分析法より迅速に結果が得られる有望な型別法といえます。複数箇所のVNTRを調べることで、それぞれ

の株はコピー数の羅列（デジタルデータ）として表すことが可能です。この数字を比較することで株同士の異同を容易に判別することができます（図2(b)）。

微生物反復配列データベース³⁾では、結核菌H37Rvゲノム上には79箇所、CDC1551では、78箇所のミニサテライトが存在することが示されています。それぞれのミニサテライトは、そのローカスによって反復配列変化の頻度（塩基配列や繰返しの数）が異なります。非常に変化しやすい（不安定な）ローカスを選択すれば識別能は上がりますが、家族内感染で同一感染源と考えられる場合でも異なる結核菌と判定される可能性が生じます。また、逆に変化の頻度が低い（安定な）ローカスを選択すると、すべて同じ型の結核菌と判定される可能性があります。このように、VNTR分析による型別能は選択したローカスに依存し、それらの組合せが極めて重要です。

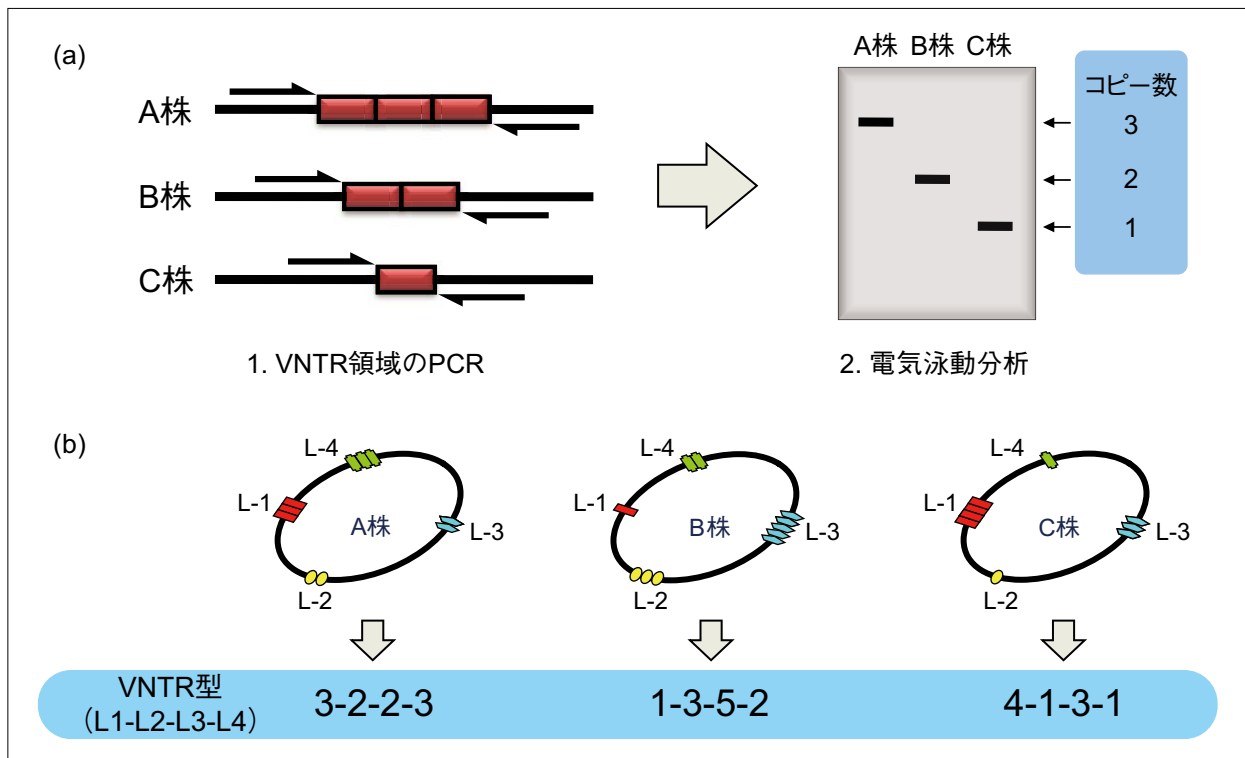


図2 反復配列多型（VNTR）分析による菌株の型別

- (a) VNTR領域のDNAをPCRで増幅し、PCR産物の分子量から繰り返し数を算出。
(b) 複数のVNTR領域を個別に解析し、反復数を算出。各分離株は数字の羅列として表されるので、容易に比較できます。

(*5) ローカス (locus) :
染色体やゲノムなど遺伝子の位置。遺伝子座ともいいます。

4.VNTR 分析システム

フランスパスツール研究所のSupplyらは、15-locus VNTR分析および24-locus VNTR分析を国際的な標準分析法として提唱しています⁴⁾ (表1)。現在、ヨーロッパ諸国ではこのSupply (15)-VNTR分析での型別結果を利用して結核菌遺伝子型データベース構築が進められています。しかし、このSupply (15)-VNTR法を用いて日本国内で分離された結核菌を分析すると、大きなクラスター (*6) が形成されると岩本らは報告⁵⁾ しており、結核研究所でも同様な分析結果が得られています。このようにSupply (15)-VNTR及びSupply (24)-VNTR分析の分解能は日本国内で

は低いことが分かっています。これらの型別システムの分解能が低い原因として、日本国内の結核菌の70-80 %が“Beijing”型と分類される結核菌であり、欧米諸国で広まっている結核菌と遺伝子型が異なることなどが考えられます。そのため、結核研究所では、12あるいは15ローカスを分析することにより、Supplyらの15-locus VNTR分析法より分解能が高いJATA (12)-VNTR分析法及びJATA (15)-VNTRシステムを構築しました^{6) - 8)}。この分析システムは日本国内における結核菌株の型別が効率良くできます。

表 1 各 VNTR 分析システムとローカス

No.	ローカス	別名	反復配列単位 (bp)	VNTR 分析システム			
				JATA(12)	JATA(15)	Supply(15)	Supply(24)
1	0424	Mtub 04	51	○	○	○	○
2	0960	MIRU 10	53	○	○	○	○
3	1955	Mtub 21	57	○	○	○	○
4	2074	Mtub 24	56	○	○		
5	2163b	QUB 11b	69	○	○	○	○
6	2372	VNTR 2372	57	○	○		
7	2996	MIRU 26	51	○	○	○	○
8	3155	QUB 15	54	○	○		
9	3192	MIRU 31	53	○	○	○	○
10	3336	QUB 3336	59	○	○		
11	4052	QUB 26	111	○	○	○	○
12	4156	QUB 4156	59	○	○	○	○
13	1982	QUB 18	78		○		
14	2163a	QUB 11a	69		○		
15	2165	ETR A	75		○	○	○
16	3690	Mtub 39	58			○	○
17	0802	MIRU 40	54			○	○
18	0580	MIRU 04	77			○	○
19	2401	Mtub 30	58			○	○
20	1644	MIRU 16	53			○	○
21	0577	ETR C	58			○	○
22	0154	MIRU 02	53				○
23	2531	MIRU 23	53				○
24	4348	MIRU 39	53				○
25	2059	MIRU 20	77				○
26	2687	MIRU 24	54				○
27	3007	MIRU 27	53				○
28	2347	Mtub 29	57				○
29	2461	ETR B	57				○
30	3171	Mtub 34	54				○

(* 6) クラスター：ゲノムDNA上において、同一の遺伝子コピーが多数集合している領域。ただし、ここでは同一遺伝子パターン（同じ型）株のグループの意味。

5. JATA(12)あるいはJATA(15)-VNTR法による結核菌型別法の実際

JATA(12)-あるいはJATA(15)-VNTR分析法では、それぞれ個別に12箇所、15箇所のローカスについてPCRを行います。その後、電気泳動でPCR産物のDNAサイズを測定してコピー数（反復配列数）に換算します。分析に用いる検体は、各社から販売されている細菌からDNAを抽出する試薬で精製したものあるいは、菌体を滅菌蒸留水に懸濁して熱処理した粗抽出DNA画分などが利用できます。この分析方法は、鋳型DNA、各ローカスのプライマー及び各試薬・酵素を混合してDNAの増幅を行う通常のPCRです。したがって、基本的にサーマルサイクラーと電気泳動装置があれば簡単に導入できるシステムです（図3）。しかし、各ローカスで得られたPCR産物をコピー数へ換算するためには、産物のDNAサイズをある程度正確に算出する必要があります。そのため、電気泳動分析にマイクロチップ電気泳動装置MCE-202 MultiNA（図5）を利用すると、標準試料の検量線から自動計算によってサンプルのDNAサイズの数値データが算出されるので、コピー数への換算が容易になります。

例えば、結核菌のVNTR-0424ローカスを分析すると菌株により約530 bpから790 bpまでの6種類のPCR産物が得られます（図4）。これらのPCR産物をコピー数に換算すると0から5までのコピー数に対応します。結核菌H37Rv株

は、全ゲノムの塩基配列が解析され情報はデータベースに登録されています。このデータをもとに設計したプライマー6)を用いてPCRを行った場合、理論上のDNAサイズは639 bp（コピー数：2）のPCR産物が得られることになります。H37RvのDNAを使ってPCR後、実際にMCE-202 MultiNAでPCR産物を分析すると656 bp（4回測定した平均値）というDNAサイズが得られました。他のローカスでも同様に理論値と実測値のずれが生じる場合があります。しかし、詳しく検討した結果、この理論値と実測値のずれは再現性良く検出されました。おそらく、ローカスにより分子内において反復配列同士の相互作用などでDNAがある立体構造をとり、電気泳動における移動度が変化したためと推測されます。上記のような現象の対策として、あらかじめそれぞれのローカスの各コピー数に応じたPCR産物の実測値をデータとして取り、理論値と実測値のずれを把握しておくことで対応が可能です。

従来法であるアガロースゲル電気泳動を用いてもVNTR分析を用いた結核菌の型別は可能です。しかしながら、分析データを数値で得られるマイクロチップ電気泳動装置MCE-202 MultiNAを用いることでよりシステム化された実験系を構築することができます。

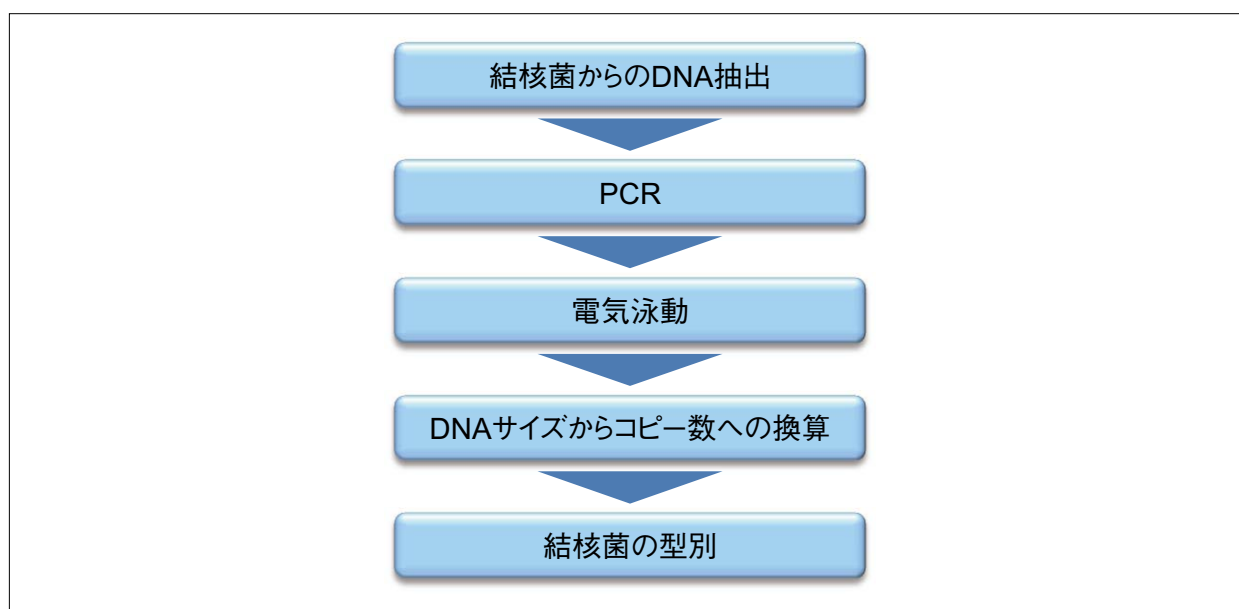
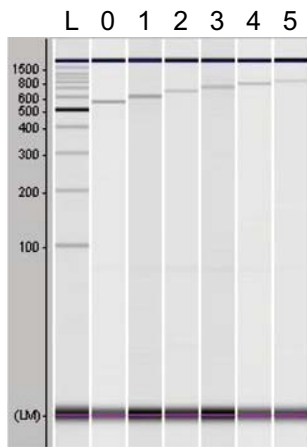
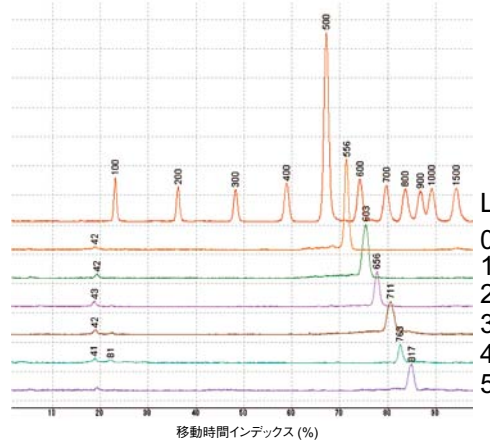


図3 反復配列多型（VNTR）分析の手順

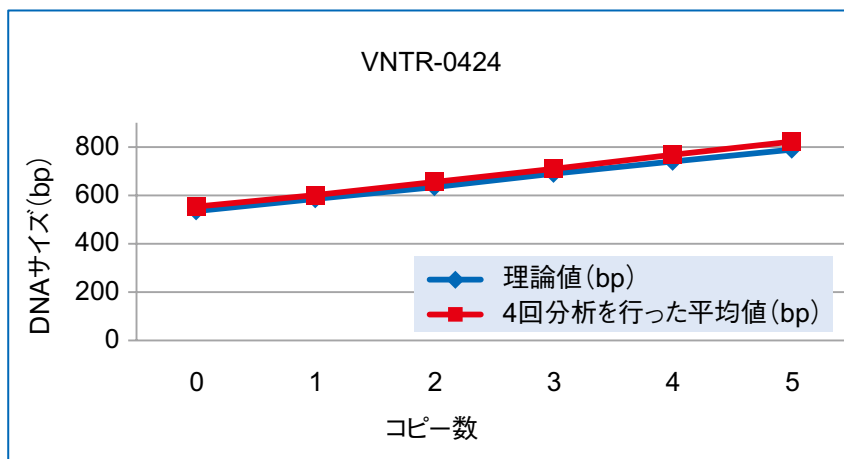


ゲルイメージ



エレクトロフェログラム

※0-5はコピー数
LはLadder Marker



理論値と測定値の比較



図4 マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA による VNTR-0424 の分析結果

6. まとめ

多剤耐性結核菌は、感染症法により三種病原体と規定されています。したがって、生菌の状態で検体を移動させることは困難です。しかし、VNTR法は死菌体でも分析できるので殺菌処理した後で分析施設に送付することができます。結核菌の型別法として、VNTR法を採用すると、

- 1) 分離された菌株の迅速な遺伝子型別が可能なので、集団発生疑い例では効率良い接触者調査ができる。

- 2) 全国規模の結核菌データベースの構築により、未知の流行パターンや伝播経路を察知できる。

など結核制圧のために極めて有益です。数値として得られた分析結果を容易に共有化できる新しいVNTR法が開発されたことにより、今後は型別結果が利用できる場面が多くなるものと考えられます。

※今回ご紹介した内容はMultiNAの自動分析機能を利用した分析の一例です。結核菌の型判別結果を保証するものではありません。サンプルによっては条件検討が必要となる場合があります。

7. マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”

アガロースゲル電気泳動法は試薬の調合、ゲルの作成、電気泳動、結果の画像取得、後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度、分離、再現性、定量性など客観性に乏しいものです。

マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 “MultiNA” はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。



図5 マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”

MultiNA特長

• わずか3ステップで分析

分析操作は非常にシンプル。分析スケジュールを作成したらあとは試薬とサンプルをセットしてスタートボタンをクリックするだけです。ゲルの作成は不要です。

• 最大120分析（108検体）まで自動分析

最大4枚セットすることができるマイクロチップで120分析（96+12検体）を自動分析します。

• 幅広い分野に活用

遺伝子研究用途をはじめ食品分析、ジェノタイプング、微生物分析、感染症分析、RNA分析など広い分野で活躍します。



図6 MultiNA 専用マイクロチップ

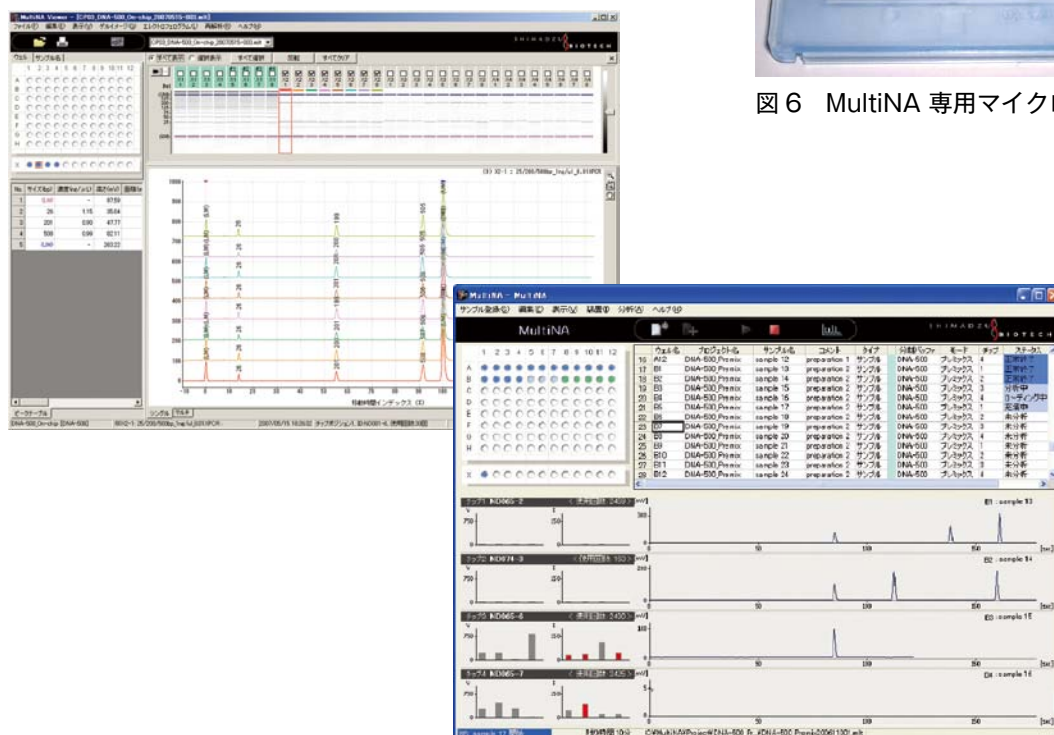


図7 MultiNA 操作画面

[参考文献]

- 1) 結核の常識2010,公益財団法人結核予防会
- 2) Van Embden, J. D. A., Crawford, J. T., Dale, J. W., Gicquel, B., Hermans, P., McAdam, R., Shinnick, T., and Small, P. M. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993; 31: 406-409.
- 3) GPMS : Genomes, Polymorphism and Minisatellites, <http://minisatellites.u-psud.fr>
- 4) Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. : Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 4498-4510.
- 5) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, Fujiyama R, Tanaka N, Kawakami Y, Ito M. : 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. 2007; 270: 67-74.
- 6) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原勇, 加藤誠也 : 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—JATA (12) -VNTR分析法の実際—. 結核. 2008; 83: 673-678.
- 7) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S, Maeda S. : Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2008; 57: 873-880.
- 8) 前田伸司, 村瀬良朗 : 結核菌の反復配列多型 (VNTR) 標準分析法の確立と型別情報データベースの構築, 第84回総会ミニシンポジウム II. 結核菌分子疫学の展望. 2009; 84: 784-786.

タイトル写真提供：公益財団法人 結核予防会 結核研究所
左上：抗酸菌染色，左下：結核菌の電子顕微鏡写真
右：小川培地上の結核菌集落

初版発行 2011年2月