

【特集】

結核集団感染事例における分子疫学的解析法としての Variable Numbers of Tandem Repeats 法の検討

Usefulness of Variable Numbers of Tandem Repeats Method as a Molecular
Epidemiological Tool for Outbreak of Tuberculosis

向川 純、三宅啓文、吉田 勲、保坂三継、矢野一好
東京都健康安全研究センター

Jun MUKAIGAWA, Hirofumi MIYAKE, Isao YOSHIDA,
Mitsugu HOSAKA, Kazuyoshi YANO
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

要旨：結核集団感染事例の感染経路などの解明のため、現在、結核菌特異的な挿入配列である IS6110 を用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法が広く用いられている。しかし、RFLP 法では μg 単位の結核菌 DNA を必要とするため、結果がでるまで一ヶ月以上を要することもあり、迅速な解明が困難になっている。我々は、PCR 法を用いた迅速な結核菌型別法として、arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法、variable numbers of tandem repeats (VNTR) 法を報告してきた。そのうちデータベース化が容易で、手技的に簡単な VNTR 法について、さらに多くの多重反復配列領域について菌株間での分解能などを検討した結果を基に、実際の集団感染事例より分離された菌株の解析結果を RFLP 法と比較検討したので報告する。

キーワード：結核集団感染、RFLP 法、VNTR 法

Abstract: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) method is now widely used as an epidemiological tool for outbreak of tuberculosis. But it needs at least one microgram of bacterial DNA for analysis, and it takes over one month for bacterial culture to get enough DNA, so it is hard to get quick results. We have been reporting arbitrarily primed PCR (AP-PCR) method, variable numbers of tandem repeats (VNTR) method, which are based on PCR method, to get rapid results for typing of *Mycobacterium tuberculosis*. Here we report about VNTR method, which is suitable for construction of genome database of *Mycobacterium tuberculosis*, and is a technically easy method, is compared to RFLP method about analyzing power. We examined discrimination power of each tandem repeat region using *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from outbreak cases of tuberculosis.

Keywords : outbreak of tuberculosis, IS6110-restriction fragment length polymorphism method, variable numbers of tandem repeats method

社会的意義：結核は、現在でも全世界で毎年700万人以上が発病し、単一感染症による死亡原因としてはHIV/AIDSについて第2位を占める重大な疾患である。

我が国においても、かつては国民病と呼ばれ広く蔓延し、死亡者も年間10万人を超えたが、戦後の国をあげての結核対策により、急速に患者数が減少した。しかし、現在でも毎年約2万人以上の新規患者が発生、年間約2,000人が死亡し、まだまだ撲滅にはほど遠いのが現状である。

一方、近年結核の集団感染事例が全国で多発している。これは、結核患者が減少し、社会的に活動の盛んな世代の大半が結核未感染となったため、未感染者集団内で感染が起こると容易に感染が広がること、また、ビルディング等の建築物の近代化で建物内の気密性が進み、換気が十分でない場合、感染が広がりやすいことなどが原因と考えられる。集団感染の発生場所も、学校、病院、事業所の他に簡易宿泊施設化した24時間営業の飲食店、特殊公衆浴場など、社会・風俗の変化に伴いさまざまな場所に広がっている。

ひとたび結核集団感染が発生すると、社会におよぼす影響は大きく、感染拡大防止のために、より広範囲な定期外検診の実施や、対策委員会の設置など、大がかりな感染拡大防止対策が必要となる。そこで同一菌による集団感染事例か、他の場所で感染し、たまたまその集団に集まった散発事例であるかの区別が重要である。

同一結核菌による感染かどうかの判定には、遺伝子型別試験が有効であり、現在、RFLP法が広く用いられている。一方、新しい結核菌型別試験法として、近年VNTR法が開発されつつある。VNTR法はPCR法を用いた方法で、RFLP法に比べ手技が簡単で、迅速な結果を得ることができる。データが数値化されるので、遺伝子型のデータベース化も容易で、遺伝子型のデータベースができれば、新しく分離された結核菌株の感染源検索が実施できる。検査するVNTRの領域を他施設と統一しておくことで、首都圏にまたがる広範囲な集団感染事例が発生した場合、他県との情報交換が容易となる。

我々は結核対策の現場に、結核拡大防止対策を有効に行うための、詳細な分子疫学的菌情報をより迅速に提供するため、新しい型別試験法であるVNTR法の性能について吟味し、従来法のRFLP法と比較検討した。

1. 緒言

結核菌による感染事例が、同一菌による集団感染か、偶発的な散発事例であるかを調査する場合、結核菌は他の菌のような血清型やファージ型が乏しいので、菌株の型別には遺伝子解析が有効である。なかでもRFLP法による遺伝子解析が広くもちいられている。RFLP法は、結核菌遺伝子を制限酵素で切断後、電気泳動でDNA断片を分離し、結核菌特異的な挿入配列であるIS6110をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション法を実施し、IS6110に相補的なバンドを検出し、このパターンを比較するものである。RFLP法は精度と安定性、鑑別能力が高いことから、現在、結核菌型別試験の世界的標準法とされている。しかしながら、損傷が少なく、純度の高いDNAが1 μg以上必要で、菌数が少ない場合は、十分な量のDNAを得るために菌を培養する必要があり、結果を得るまでに、場合によっては1ヶ月以上の時間を要する。また、電気泳動に用いる器機、試薬（アガロースの種類や濃度、泳動緩衝液）、泳動方式（電圧や電流、環流式かどうか）によってパターンが若干変化する場合があります、異なる方式でRFLP検査を実施している機関同士の結果のデータ照合が容易でないという欠点がある。近年、菌株の型別解析手法として、結核菌遺伝子中の多重反復配列の反復数を株間で比較するVNTR法が開発されてきた。VNTR法はPCR法を応用した方法であるため、必要なDNA量がRFLP法の1/10以下でよく、培養初期の菌量の少ない時期でも、また排菌量が多いときは喀痰からでも検査が実施でき、結果が迅速に得られ、その菌情報を早期に提供できるという利点がある。また、死滅した菌からも検査が可能であり、データが数値化されるので、過去の株との比較や、他機関とのデータ照合が容易という利点もある。今回、このVNTR法の検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2-1. 材料

平成12年度より18年度の7年間に、都内で発生した結核集団感染を疑われる事例より分離された結核菌101株を用いた。

2-2. DNAの抽出

DNA抽出は、既報⁹⁾の通りに行った。すなわち、結核菌を小川培地より回収し、80°Cで20分間加熱殺菌後、プロテナーゼK・SDS・フェノール・クロロフォルム法でDNAを抽出した。

2-3. RFLP分析

RFLP法は、高橋ら⁸⁾の方法に従い、1.5 μg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、サザンブロット法でメンブレンに転写・固定後、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フォスファターゼとルミノフォス530を反応させ、CCDカメラで映像を撮影し、バンドの検出を行った。

2-4. VNTR法

各菌株のゲノム遺伝子を鋳型に、多重反復配列領域のうち、MIRUの12領域(2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40)⁶⁾、ETRの4領域(A, B, C, F)¹⁾、QUBの9領域(11a, 11b, 18, 26, 1451, 1895, 3232, 3336, 4156)⁴⁾、Mtubの9領域(1, 4, 16, 21, 24, 29, 30, 38, 39)³⁾、そしてVNTR2372、VNTR3820、VNTR4120⁵⁾の計37領域について、それぞれのプライマーとTaq DNA polymeraseを用いてPCR法により領域を増幅し、PCR産物のDNAサイズから、反復数を測定した。各領域の多様性については、Hunter Gaston diversity index (HGDI値)²⁾で表記した。

2-5. 北京型、非北京型結核菌の分別

Warren⁷⁾らの方法に従って、北京型結核菌の遺伝子をプライマーセット1(5'-TTC AAC CAT CGC CGC CTC TAC-3' と 5'-CAC CCT CTA CTC TGC GCT TTG-3')、非北京型結核菌の遺伝子

をプライマーセット4 (5'-GGT GCG AGA TTG AGG TTC CC-3' と 5'-TCT ACC TGC AGT CGC TTG TGC-3') を用いて PCR 法で検出した。

3. 結果及び考察

3-1. 都内で分離された結核菌の多重反復配列領域の多様性

供試した 101 株のうち RFLP 法でパターンの異なる 73 株について、多重反復配列 37 領域の反復数を調査した。表 1 に各領域での反復数の分布を示した。各領域により、菌株間で反復数の多様性に差が認められた。MIRU2、20、24、27、ETR-C、Mtub29 では、領域の多様性を示す HGDI 値が 0.1 以下であり、菌株間の多様性が極めて低い領域であることが判明した。一方、VNTR4120、QUB3232、VNTR3820、QUB26 等では、HGDI 値が 0.8 以上を示し、菌株間の多様性がきわめて高い領域であることが判明した。これらをまとめて HGDI 値の低い領域、高い領域を図 1 に示した。

表 1. VNTR 法による各領域の反復数別菌株数

反復数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	HGDI値	
MIRU2	1	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03
4	1	66	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.18
10	7	4	43	12	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.62
16	6	7	50	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
20	1	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03
23	2	0	0	1	58	6	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.36
24	72	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03
26	6	0	1	6	3	3	53	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.46
27	0	0	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	2	12	9	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.49
39	4	12	53	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.43
40	4	11	55	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41
ETR-A	0	3	12	56	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.39
B	4	69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.11
C	0	0	2	70	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08
F	2	15	53	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.43
QUB11a	0	0	5	1	1	5	1	3	39	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.61
11b	0	9	6	3	10	9	30	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.77
18	1	1	0	0	8	1	5	13	8	34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.74
26	0	14	0	5	1	5	11	25	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.81
1451	0	65	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2
1895	2	16	13	40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.62
3232	0	0	0	1	6	2	2	0	2	8	5	10	10	6	3	10	2	3	1	0	0	1	0	1	0	0	0.92
3336	0	0	0	3	2	1	40	6	3	9	0	1	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.68
4156	0	1	17	21	33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.67
Mtub1	0	0	0	0	0	0	0	0	65	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.19
4	1	3	20	27	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.72
16	9	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.27
21	5	9	43	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.62
24	6	25	31	5	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.69
29	0	1	1	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05
30	1	16	0	54	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41
38	55	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41
39	2	2	62	0	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.26
VNTR2372	3	6	52	11	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.47
VNTR3820	0	0	1	0	6	0	4	3	4	5	2	16	0	17	0	4	4	2	3	0	0	0	1	0	1	0	0.88
VNTR4120	0	4	4	9	6	1	1	8	11	9	3	8	2	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0.92

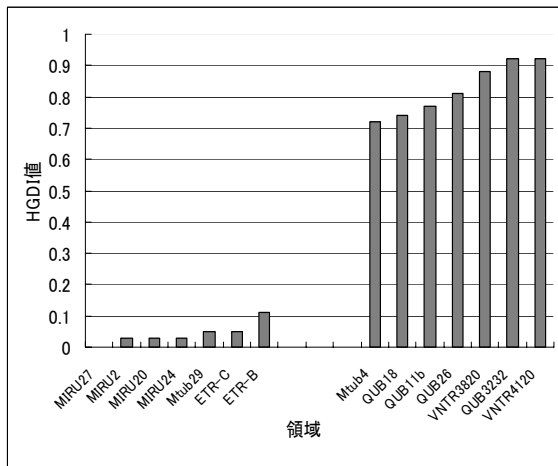


図 1. HGDI 値の低い領域と高い領域

3-2. 都内で分離された結核菌株の北京型並びに非北京型の分布と各領域の菌株の多様性

都内で分離された菌株を Warren⁷⁾らの方法により、北京型と非北京型に分類した。全菌株の77%が北京型、残りの23%が非北京型であり、従来の報告¹¹⁾と一致した。北京型と非北京型で、それぞれのVNTR法各領域の多様性を検討し、図2、図3に示した。MIRU、ETRの計16領域は、北京型ではMIRU10、16、ETR-Fを除き、いずれもきわめて低いHGDI値を示したが、非北京型では、MIRU10、16、23、26、39、40、ETR-A、Fは比較的高いHGDI値を示した。またQUB、Mtubその他の21領域では、北京型ではQUB1451、Mtub1、16、38、39のHGDI値はきわめて低かったが、非北京型では比較的高かった。このように北京型と非北京型では、同程度の多様性を持つ領域(QUB11b、18、26、1895、3232、4156、Mtub4、24、VNTR3820、4120等)がある一方、多様性の著しく異なる領域もあることが判明した。集団感染事例の解明には、菌株をまず北京型、非北京型に分け、それぞれの型で多様性が極端に低い領域を除いた10～15領域を選択し、各領域の反復数を比較することで、解析することが可能であると考えられる。

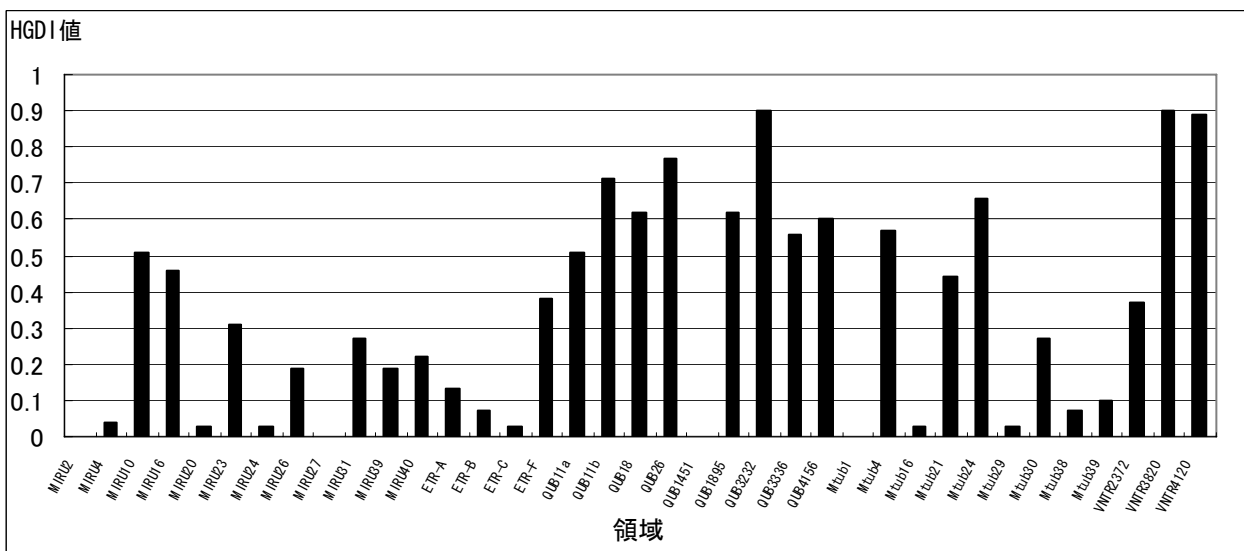


図 2. 北京型結核菌株における各領域の HGDI 値

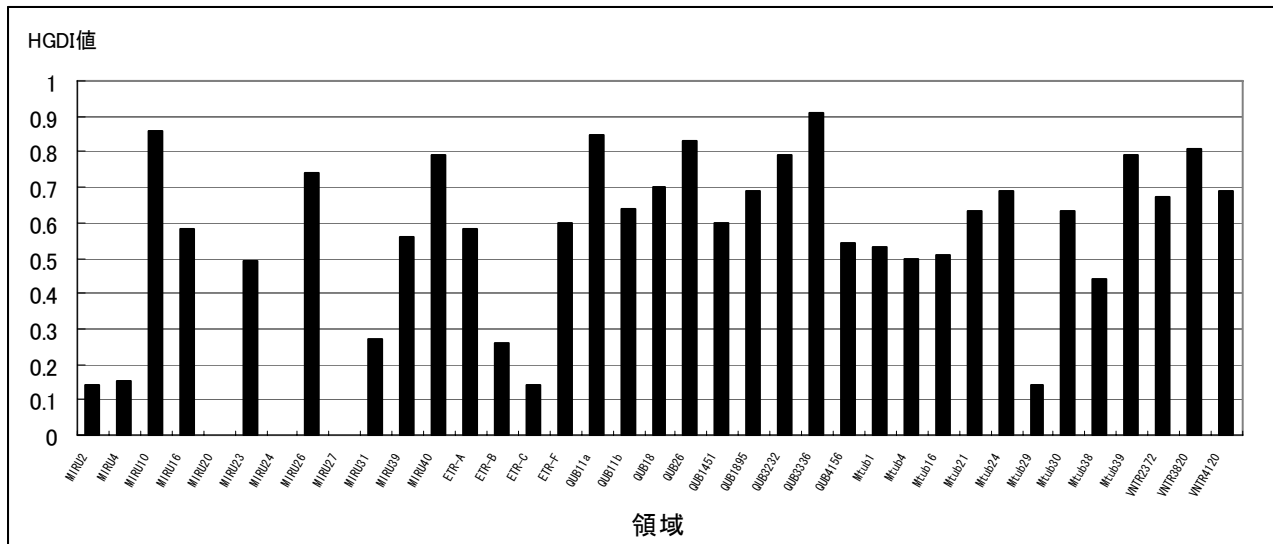


図3. 非北京型結核菌株における各領域のHGDI値

3-3. 短期間に発生した結核集団感染事例におけるVNTR法による遺伝子解析

平成17年に、都内の学校で、講師が結核を発症し、1年以内に生徒、同僚講師、父兄に多数の患者が発生した事例(A)があった。検査した菌株は図4に示すようにすべてRFLP法で同一パターンであり、表2に示すようにVNTR法でも調査した35領域すべてで同一アليلプロファイルを示した。これらの株は北京型であった。この事例のように、初発患者から短期間に直接的に伝播感染・発症した場合は、VNTR法での結果は同一であることがわかった。

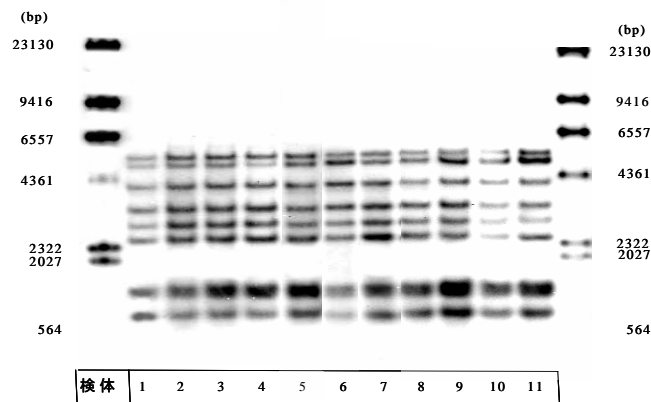


図4. 事例AのRFLP法による型別検査結果

3-4. 長期間に広い地域に発生した結核感染事例におけるVNTR法による遺伝子解析

この5年間に、RFLP法で同一パターンを示す株の分離された感染事例が8事例(B~I)あった。これらの事例は、平成12年から13年、16年、17年にかけて、都内ならびに神奈川県北部で発生したもので、患者は、病院の職員、集合住宅の住居者、病院の患者、遊戯店の常連客、会社社員、24時間営業の飲食店の店員と客、学校の生徒とその関係者とさまざまで、接触関係は不明であった。図5は、そのRFLP法による型別検査結果で、8事例、19株でRFLP法のパターンはすべて一致し、表3に示すように、VNTR法でもほとんどの領域が一致した。一方、各領域で異なる成績を示した菌株が認められた。ETR-Cが異なる株が3株(事例H, 神奈川関連株)、QUB1895が1株(事例D)、QUB3232が1株(事例B)、Mtub21が1株(事例G)、VNTR3820が1株(事例G)、VNTR4120が1株(事例F)であった。G以外の事例では事例ごとに分離株のアليلプロファイルは一致し、それ

それぞれの事例内における感染と考えられた。一方、24時間営業の飲食店事例で発生したGでは、3株でそれぞれ異なる領域があり、感染経路の解明には今後のさらなる検討が必要である。

表2. 事例AのVNTR法による型別検査結果

事例	A(17年)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
検体											
MIRU2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
23	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
27	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
31	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
40	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ETR-A	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
QUB11b	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
18	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
26	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
1451	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1895	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3232	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
4156	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mtub01	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
4	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
21	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
29	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
38	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3820	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
4120	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

変異のあった領域のうち、ETR-Cは多様性が低く、表1に示したように、我々がこれまで解析した株で、ほとんどが反復数4であり、この領域の相違は、遺伝学的に大きな変異であると示唆され、RFLPのパターンは同一でも、かなり異なる株であると考えられた。一方、他の領域は、菌株間で多様性が高い領域で、変異しやすい領域と考えられる。特にQUB3232は、同一人物由来で時期が異なって分離された菌株間で17から13へと変異していた。これらのことから、この同一のRFLPパターンを持つ株が、以前から都内、首都圏の各地で感染を繰り返し、その過程でVNTRの領域が部分的に変化してきたことが示唆された。

なおこれらの19株はすべてストレプトマイシン耐性であり、北京型であった。

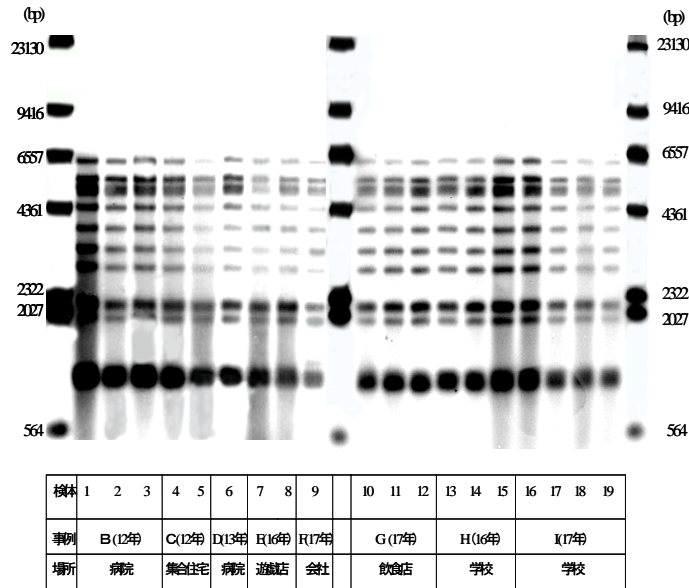


図5. 事例B~IのRFLP法による型別検査結果

表3. 事例B~IのVNTR法による型別検査結果

領域	事例 検体	B(12年)			C(12年)		D(13年)	E(16年)		F(17年)	G(17年)			H(16年)			I(17年)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
領域	MIRU2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	23	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	26	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	27	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	31	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	40	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	ETR-A	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	4	4
	F	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	QUB11a	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	11b	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	18	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
26	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
1451	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1895	4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
3232	17	13+17	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
4156	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Mtub01	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
21	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	
24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
29	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
38	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	
39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
3820	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14+15	14	14	14	14	14	14	14	14	
4120	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9	9	9	9	9	

4. 考察

VNTR法で、従来検査対象として Supply⁶⁾ や、Frothingham¹⁾ によって提唱されてきた MIRU, ETR の計 16 領域は、MIRU10、16、ETR-F を除くと、日本で蔓延している北京型遺伝子を持

つ結核菌株では、多様性は十分でないことが判明した。また、北京型と非北京型では領域によって、多様性に大きな差があることも判明した。結核集団感染事例で、短期間に感染が拡大した事例では VNTR 法の結果は一致したが、異なる事例で同一 RFLP パターンを示した株を、VNTR 法でも解析した結果、各事例内の株では同じ反復数を示したが、事例が異なると部分的に反復数の異なる領域があることが判明した。これは、感染が拡大するうちに、特定の領域が変化し、その株から新たな感染がおきたことを示している。このように、従来法の RFLP 法に加えて、VNTR 法を併用することで、集団感染事例の事例内、事例間の関連など、よりきめ細かい分子疫学的情報を保健行政の現場に提供できることが可能となった。現在、他の集団感染事例にも VNTR 法を応用し、RFLP 法の結果と比較し検討を行っている。

本報文は、東京都健康安全研究センター研究年第 58 号 (2007) に掲載された論文の内容の一部加筆・修正したものである。

参考資料：

1. Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats.: *Microbiology*, **144**, 1189-1196.
2. Hunter, P. R. and Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discrimination ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 2465-2466.
3. Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F. et al (2002). High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing.: *BMC Microbiology*, **2**, 1-12.
4. Roring, S., Scott, A., Brittain, D. et al (2002). Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2126-2133.
5. Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M. et al (2005). Polymorphism of variable tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*.: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5034-5043.
6. Supply, P., Lesjean, S. and Savine, E. et al (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacteria interspersed repetitive units.: *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3563-3571.
7. Warren, R. M., Victor, T. C., Streicher, E. M. et al (2004): *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **169**, 610-614.
8. 高橋光義, 安部千代治(1994). IS タイピング法 : IS6110 をプローブとした RFLP 分析による結核菌の亜分類. *日細誌*, **49** (5), 853-857.
9. 向川 純, 下島優香子, 村田以和夫, 他 (2003). 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. *感染症誌*, **77** (12), 1040-1048.
10. 向川 純, 柳川義勢, 山田澄夫(2006). 結核集団感染疑い事例における分子疫学的解析法としての AP-PCR 法及び VNTR 法の比較検討 : 東京健安研七年报, **57**, 55-58.
11. 横山栄二, 岸田一則, 一戸貞人(2007). 北京型結核菌における Supply らの VNTR 型別の有効性 : *結核*, **82** (4), 371.