

2005年に兵庫県で分離された結核菌のBeijing genotypeと薬剤感受性

辻 英高* 西海弘城 山岡政興

Characterization of *Mycobacterium Tuberculosis* according to Beijing Genotype and the Drug Susceptibility Isolated from the Patients in Hyogo Prefecture in 2005

Hidetaka TSUJI*, Hiroki NISHIUMI and Masaoki YAMAOKA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

Genotypic analysis according to the genotype of Beijing lineage was performed on 30 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from the patients in Hyogo prefecture in 2005. Among them, 24 strains were classified into Beijing genotype and also 21 strains were subdivided into ancient sublineage, and three strains belong to modern sublineage. The strains classified into the modern sublineage showed different IS6110 RFLP patterns. Two of them were drug-resistant strains, one strain showed the resistance to isoniazid and the other was multi-drug resistant strain which showed the resistance to all four primary anti-tuberculosis drugs.

I はじめに

結核の分子疫学解析法として結核菌のIS6110を遺伝子マーカーとしたRFLP分析法が標準化され¹⁾, 国内外において結核感染の疫学的な研究のための強力な手段となっている²⁻³⁾. また, 結核菌遺伝子のDR (direct repeat) 領域を標的とした Spoligotyping (spacer oligo nucleotide typing)法⁴⁻⁶⁾やプラスミド上の繰り返し配列を標的とした PGRS (polymorphic GC-rich repetitive sequence)法⁷⁾などがIS6110-RFLPによる分子疫学解析を補完するための分析法として用いられている⁸⁻⁹⁾. Soolingenら⁹⁾は東アジアから分離された結核

菌についてIS6110-RFLP, 及びSpoligotyping法を用いて解析した結果, 分離株は遺伝学的に類似性が高く, またSpoligotyping法で特徴的なパターンを示すことを明らかにし, これらの菌株についてBeijing familyと命名した. この遺伝子型に属する結核菌は全世界で分離されているが, 特に東アジアを中心に分布している⁹⁻¹⁰⁾ことが知られている. Beijing genotypeはSpoligotyping法によって他の結核菌と区別されるが, 方法が煩雑である. 最近, Mokrousovら¹⁰⁾はPCRに基づいたIS6110 inverse PCR法によってBeijing genotypeの型別が可能であると報告している.

我々は県内における結核菌のBeijing genotypeとの関係を知るために, 2005年に分離された30菌株について, Mokrousovらの行ったPCR法を用いてBeijing genotypeに関する型別を行った. あわせて一次抗結核薬に対する薬剤耐性を調べたので, 報告する.

感染症部

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
感染症部 辻 英高

II 材料と方法

1. 供試菌株

分析に使用した菌株は県内で2005年に分離され、患者の同意のもとに研究センターに搬入された30菌株である。

2. 菌株の遺伝子分析

供試菌株について、IS6110 inverse PCR法¹²⁾ および *dnaA-dnaN* 領域におけるIS6110の挿入の有無¹³⁾ をPCR法により調べ、分離株のBeijing genotypeの型別、およびancient sublineage と modern sublineageの亜型別を行った。また、Beijing genotype modern sublineage 株についてはさらに菌株間の関連性を調べるために、RFLP分析^{1, 14)} を行った。

3. 薬剤感受性

供試菌株について、結核菌検査指針¹⁵⁾ に従って、一次抗結核薬であるイソニアジド(INH)、リファンピシン(RFP)、ストレプトマイシン(SM)、エタンブトール(EB)の4薬剤を対象にして、1%小川培地を用いた比率法により試験した。

III 結果

1. 遺伝子分析

Mokrousovらの方法に準拠して行ったPCR法によるBeijing genotypeの検討結果はTable 1のとおりである。供試した30菌株のうち24菌株(80%)はIS6110 inverse PCRの結果、いずれの菌株も290bp、および470bpに増幅フラグメントが認められ、Beijing genotypeに分類された。このうち、3菌株は260bpにも増幅フラグメントバンドがみられたことから、さらにmodern sublineageに分類され、他の21菌株はancient sublineageに分類された。Beijing genotype分類されたこれらすべての株は*dnaA-dnaN*領域にIS6110を保有していた。また、modern sublineageに分類された3菌株のRFLPパターンはFig. 1のとおりである。NO. 1~3は類似したパターンを示したが、サイズに僅かな違いがみられた。また、約1.4Kb以上のサイズで、NO. 1に比べてNO. 2は3本、NO. 3は2本バンドが多かった。

2. 薬剤感受性と遺伝子型

供試した30菌株のうち28菌株は試験した4薬剤に対して感受性であった。薬剤耐性の2菌株はいずれも遺伝子分析によってBeijing genotype modern sublineageに属した。1株(Fig. 1 ; No. 1)はINH, RFP, SMおよびEBの4薬剤耐性であり、他の1株(Fig. 1 ; No. 2)はINHに耐性であった。

びEBの4薬剤耐性であり、他の1株(Fig. 1 ; No. 2)はINHに耐性であった。

Table 1 Classification of the 30 strains by the characterization according to the Beijing genotype isolated from the patients in 2005

Number of Strains	Size of flagment (bp)	IS6110 in <i>dnaA-dnaN</i>	Classification
21	290, 470	Yes* ¹	Beijing genotype ancient sublineage
3	260, 290, 470	Yes	Beijing genotype modern sublineage
6	Various sizes	No* ²	Non-Beijing strain

* 1 ; Expected size of amplicons which contained the amplification product of the IS6110 DNA (~1350bp) was ~2000 bp

* 2 ; Expected size of amplicons was 640 bp

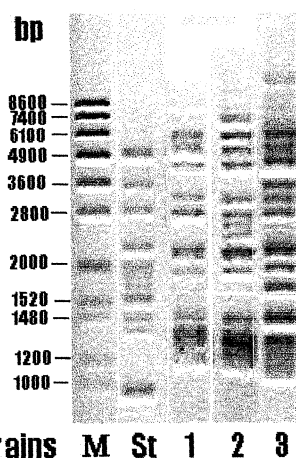


Fig. 1 IS6110-RFLP patterns of the three strains which were classified into the modern Beijing genotype : M; DNA molecular weight marker VII (Roche Diagnostics GmbH) , St ; *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Strains, No.1; showed the resistance to all four primary anti-tuberculosis drugs., No.2; resistant to INH., No.3; sensitive to all four primary anti-tuberculosis drugs.

IV 考察

結核菌の遺伝子型のなかでBeijing genotype^{9, 16)} と呼ばれる一群の結核菌がアジアに分布している。この遺伝子型の結核菌は全世界で分離されており、特に東アジアを中心に分布していることが知られている⁹⁻¹¹⁾。1990年代にアメリカで院内感染を引き起こした多剤耐性W株もBeijing genotypeに属しており、これらの菌株は感染伝播力が強く、また結核病態も重症であることが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。Beijing genotypeは結核菌DNAのDR領域でのスペーサ1~34の欠如⁵⁾、*dnaA-dnaN*領域やNTF領域におけるIS6110の挿入の有無などによって他の結核

菌と区別できる^{13,17)}ことが明らかにされている。Beijing genotypeはDR領域を標的とした分析法であるSpoligotyping法によって型別された方法であるが、これらの菌株を迅速に把握する必要性から、Insertion site mapping法などの迅速な分析法が報告されている^{17,20)}。Mokrousovら¹²⁾はPCRに基づいたIS6110 inverse PCR法によって結核菌の型別が可能である²¹⁾ことから、この方法を用いてBeijing genotypeの型別を行い、さらにBeijing genotypeをancient sublineageとmodern sublineageに区別した。我々はこの迅速法を用いて、県内の分離株30菌株についてBeijing genotypeに関する検討を行ったところ、分離株の24菌株(80%)がBeijing genotypeに該当し、他の6菌株(20%)はNon-Beijing strainsであった。さらに、Beijing genotype 24菌株のうち21菌株がancient sublineageに、3菌株がmodern sublineageに分類された。国内の他の研究においてもSpoligotyping法によって、分離株の70%程度がBeijing genotypeであると報告されており^{22,23)}、県内分離株のBeijing genotypeの分布は国内の分布と近似していた。また、分離株の薬剤感受性試験の結果、modern sublineageに分類された3菌株のうち2菌株は薬剤耐性株であり、これら3名の患者のうち2名はいずれも登録から2年以内に中国から来日された方であった。国別の結核菌株の解析で、その国に特異的なRFLPパターンが存在し、外国人結核患者株は在日5年以内のものではその国の特有なパターンを示すという報告²⁴⁾から、これら2名の患者は海外で感染し、発病した可能性が高い。また、他の1名の患者は海外渡航歴がなく、国内での感染の可能性が考えられた。県内や国内の分離株のほとんどの株がBeijing genotypeであることから、ancient sublineageは、県内や日本国内における固有の株と思われるが、modern sublineageは近隣の結核高まん延国での流行株²⁵⁾の可能性が考えられる。また、県内の分離株について行った薬剤感受性試験と遺伝子型別の結果から、Beijing genotypeのうち、modern sublineageに分類される菌株群には薬剤耐性株が多いことも考えられ、今後の分離動向について注意する必要があると思われる。

V 要 旨

兵庫県内の結核患者から分離された30菌株について、Beijing genotypeに関する型別を行った結果、24菌株はBeijing genotypeに該当した。さらに21菌株がancient sublineageに、3菌株がmodern sublineageに分類された。modern sublineageに分類された3菌株

のRFLPパターンはそれぞれ異なり、2菌株は薬剤耐性株であり、1菌株はINH耐性株、他の1菌株は4薬剤すべてに耐性の多剤耐性株であった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、調査にご協力いただいた兵庫県健康生活部健康局疾病対策課、及び健康福祉事務所の関係者の皆様方、ならびに菌株を提供いただいた医療機関の関係者の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R. and Shinnick, T. M. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 406-409 (1993)
- 2) van Soolingen, D., Hermans, P. W., de Haas, P. E., Soll, D. R. and van Embden, J. D. : Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : evaluation of an insertion sequence -dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2578-2586 (1991)
- 3) Takahashi, M., Kazumi, Y., Fukusawa, Y., Hirano, K., Mori, T., Dale, J. W. and Abe, C. : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 289-294 (1993)
- 4) Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., van Soolingen, D. and van Embden, J. D. : Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.*, **10**, 1057-1065 (1993)
- 5) Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. and van Embden, J. : Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and

- epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 907-914(1997)
- 6) van Embden, J. D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., B. A., van Der Zeijst, B. A. and Schouls, L. M. : Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.*, **182**, 2393-2401 (2000)
- 7) Ross, B. C., Raios, K., Jackson, K. and Dwyer, B. : Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.*, **30** : 942-946 (1992)
- 8) Bifani, P. J., Mathema, B., Liu, Z., Moghazeh, S. L., Shoptsin, B., Tempalski, B., Driscoll, J., Frothingham, R., Musser, J. M., Alcades, P. and Kreiswirth, B. N. : Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA*, **282**, 2321-2327 (1999)
- 9) van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. and van Embden, J. D. : Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 3234-3238 (1995)
- 10) Bifani, P. J., Mathema, B., Kurepina, N. E. and Kreiswirth, B. N. : Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.*, **10**, 45-52 (2002)
- 11) Glynn, J. R., Whiteley, J., Bifani, P. J., Kremer, K. and van Soolingen, D. : Worldwide occurrence of Beijing / W strains of *Mycobacterium tuberculosis* : a systematic review. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 843-849 (2002)
- 12) Mokrousov, I., Jiao, W. W., Valcheva, V., Vyazovaya, A., Otten, T., Ly, H. M., Lan, N. N., Limeschenko, E., Markova, N., Vyshnevskiy, B., Shen, A. D. and Narvskaya, O. : Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2851-2856 (2006)
- 13) Kurepina, N. E., Srevatsan, S., Plikaytis, B. B., Bifani, P. J., Connell, N. D., Donnelly, R. J., van Soolingen, D., Musser, J. M. and Kreiswirth, B. N. : Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis* : non-random integration in the dnaA-dnaN region. *Tuber. Lung Dis.*, **79**, 31-42 (1998)
- 14) 高橋光良, 阿部千代治 : 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. *日本細菌学雑誌*, **49**, 853-857 (1994)
- 15) 財団法人結核予防会 : 新結核菌検査指針2000, 東京 (2000)
- 16) Caminero, J. A., Pena, M. J., Campos-Herrero, M. I., Rodriguez, J. C., Garcia, I., Cabrera, P., Lafoz, C., Samper, S., Takiff, H., Afonso, O., Pavon, J. M., Torres, M. J., van Soolingen, D., Enarson, D. A. and Martin, C. : Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **164**, 1165-1170 (2001)
- 17) Plikaytis, B. B., Marden, J. L., Crawford, J., Woodley, C. L., Butler, W. R. and Shinnick, T. M. : Multiplex PCR assay specific for the multidrug resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1542-1546 (1994)
- 18) Moss, A. R., Alland, D., Telzak, E., Hewlett, Jr. D., Sharp, V., Chiliade, P., LaBombardi, V., Kabus, D., Hanna, B., Palumbo, L., Brudney, K., Weltman, A., Stoeckle, K., Chirgwin, K., Simberkoff, M., Moghazeh, S., Eisner, W., Lutfey, M. and Kreiswirth, B. : A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **1**, 115-121 (1997)
- 19) Zhang, M., Cong, J., Yang, Z., Samten, B. and Barnes, P. F. : Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J. Infect. Dis.*, **179**, 1213-1217 (1999).
- 20) Kurepina, N., Likhoshvay, E., Shashkina, E., Mathema, B., Kremer, K., van Soolingen, D., Bifani, P. and Kreiswirth, B. N. : Targeted hybridization of IS6110 fingerprints identifies the W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains

- among clinical isolates. J. Clin. Microbiol., **43**, 2148-2154 (2005)
- 21) Ross, B. C. and Dwyer, B. : Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., **31**, 329-334 (1993)
- 22) 高橋光良 : 結核菌DNAのRFLP分析を用いた結核分子疫学の研究と実践. 結核, **78**, 641-651 (2003)
- 23) 大畠律子, 多田敦彦 : 岡山地区で分離された結核菌におけるBeijing familyおよび他の遺伝子型. 結核, **79**, 47-53 (2004)
- 24) Jiao, W. W., Mokrousov, I., Sun, G. Z., Li, M., Liu, J. W. and Narvskaya, O. : Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. Chin. Med. J., **120**, 814-819 (2007)