



Title	IS6110 DNA fingerprinting analysis of individually separated colonies of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Author(s)	松本, 智成
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54152">https://hdl.handle.net/11094/54152</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【143】	
氏 名	松 本 智 成
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 23416 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 9 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	IS6110 DNA fingerprinting analysis of individually separated colonies of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (各々に分けられた結核菌コロニーのIS6110DNA指紋解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川瀬 一郎
	(副査) 教 授 奥村明之進 教 授 朝野 和典

#### 論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕 IS6110 RFLP解析は、結核菌の感染経路解析に有用な手法であり、その手法は、臨床検体由来からの結核菌株は、感染時の単一の結核菌株から増殖するという仮定に成り立っている。IS6110 DNA指紋パターンはゆっくりではあるが変化し、その半減期は3.2-3.7年と推定されている。喀痰中の各々のコロニーに分離された結核菌のIS6110 DNA指紋パターンおよびその変化を示した論文は無いので、我々は各々に分離された結核菌のIS6110 DNA指紋パターン解析ならびにセカンドタイピングとしてスパリゴタイピング解析を行った。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

2001年から大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターでは全ての結核菌株に対してIS6110 DNA指紋パターン解析を行っている。このうち病態と病歴が明らかで経時的に菌株が保存してあった4人由来の菌株(Cas

e 1-4)を用いた。結核菌株は-80°Cにて保存しており、その菌株を解凍し7H11寒天培地にて培養し、各々のコロニーを採取しおのの3mlの液体培地に3-4週間培養し、増殖した結核菌を小川培地に再培養した。培養した菌は、0.75mlの0.1mmガラスビーズ入りのバッファー(0.3M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 6mM EDTA)に溶解、ボルテックスし菌体を破碎した。5,000rpm, 5分間遠心し上清を回収、フェノールークロロフォルム法にてDNAを回収した。IS6110 DNA指紋パターン解析は、標準法で行った。IS6110 DNA指紋パターンが5本以下の場合にサブタイピングとしてスボリゴタイピングを行った。スボリゴタイピングは、製造者マニュアルに従った。

Case1は、RFP耐性菌株であり、初回加療終了の後、再発した。初回治療時再発時のIS6110 DNA指紋パターンに変化は認められなかった。しかしながら個々にコロニー分離したIS6110 DNA指紋パターンにおいて、全体には認められない少し異なるパターンをもつサブクローンが存在した。このIS6110 DNA指紋パターンが異なる菌株に対してスボリゴタイピングを行ったがパターンが同じ事より、パターンが異なる菌株は元の菌株と同一由来株であると判断した。

Case2は、多剤耐性結核(MDR-TB)症例であり、その経過中にrifampicinに対する感受性が低かったのが、高くなり再び低くなったり。喀痰から得られた結核菌をコロニー分離する事無しにIS6110 DNA指紋パターンを経時的に行つても変化は認められなかった。しかしながら、コロニー分離を行つてIS6110 DNA指紋パターン解析を行うと、元になるIS6110 DNA指紋パターンとは全く別のIS6110 DNA指紋パターンを有する結核菌を含む事が判った。さらにこの菌株をスボリゴタイピングを行つてもパターンが異なつてゐた。また薬剤感受性も元の結核菌はrifampicin耐性であるが、もう一方の結核菌はrifampicin感受性であったので別の菌の重複感染発病であると判断した。このことにより、全体としてIS6110 DNA指紋パターンが変化が無くとも、異なるIS6110 DNA指紋パターンを有する菌株が含まれる場合があることが明らかとなつた。しかしながら量が少ないので全体として反映されない。

Case3と4は結核菌は、各々、多剤耐性結核とSM耐性結核である。喀痰全体としてのIS6110 DNA指紋パターン解析では、経時的变化に伴い新たな付加バンドが出現し消失していった。これらの菌株に対して各々のコロニーに分離したIS6110 DNA指紋パターン解析を行うと、全菌株においてバンドが付加されるのではなく、新たな付加バンドを伴つた結核菌サブクローンが出現し、その比率が時間経過とともに増加することにより全体としてのバンドに反映し、そして再び減少し消失することにより全体としても消失した。

### [ 総 括 ]

DNA指紋パターンは感染時のクローンに由来するはずであるが、個々に分離したIS6110 DNA指紋パターン解析によると、その経過中に新たな株が感染し同時に発病している場合もある事が明らかになった。また、喀痰からの結核菌株におけるIS6110 DNA指紋パターン解析のバンドの変化が起るときは、すべての菌株がいっせいにバンドが変化するのではなく、新たに変化したバンドをもつ結核菌が出現し、それが全体の中で数的優位を保つことにより全体としてのバンドに変化が見られる。この変化したバンドをもつ結核菌が数的優位を保てないときには全体としてのIS6110 DNA指紋パターンは変化が認められない。また、全体のIS6110 DNA指紋パターンは、その中に含まれる各々のIS6110 DNA指紋パターンの合成像である。したがって、その中にIS6110 DNA指紋パターンが異なる菌株が存在する場合は、測定試料に含まれる各々の菌群の比率により全体としてのIS6110 DNA指紋パターンが変化する。したがって、資料中の結核菌の中に各々異なる結核菌株が存在するとき、資料中の結核菌の割合が変化するので施設間の再現性の低下の要因となることが明らかになり、IS6110 DNA指紋パターン解析はその指紋パターンが資料中の菌のIS6110 DNA指紋パターンに依存するので広域データベース構築にその使用は適切ではないということをしめしたことから学位に値するものと認める。

異なる結核菌株が存在するとき、資料中の結核菌の割合が変化するので施設間の再現性の低下の要因となる。したがって、IS6110 DNA指紋パターン解析はその指紋パターンが資料中の菌のIS6110 DNA指紋パターンに依存するので広域データベース構築にその使用は適切ではない。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、各々に分離された結核菌のIS6110 DNA指紋パターン解析ならびにセカンドタイピングとしてスボリゴタイピング解析を行つたものである。

IS6110 RFLP解析は、結核菌の感染経路解析に有用な手法であり、その手法は、臨床検体由来からの結核菌株は、感染時の単一の結核菌株から増殖するという仮定に成り立つてゐる。IS6110 DNA指紋パターンはゆっくりではあるが変化するが、以前に喀痰中の各々のコロニーに分離された結核菌のIS6110 DNA指紋パターンおよびその経時的な変化を示した論文は無い。

本研究によりDNA指紋パターンは感染時のクローンに由来するはずであるが、個々に分離したIS6110 DNA指紋パターン解析によると、その経過中に新たな株が感染し同時に発病している場合もある事が明らかになった。また、喀痰からの結核菌株におけるIS6110 DNA指紋パターン解析のバンドの変化が起るときは、すべての菌株がいっせいにバンドが変化するのではなく、新たに変化したバンドをもつ結核菌が出現し、それが全体の中で数的優位を保つことにより全体としてのバンドに変化が見られる。この変化したバンドをもつ結核菌が数的優位を保てないときには全体としてのIS6110 DNA指紋パターンは変化が認められない。また、全体のIS6110 DNA指紋パターンは、その中に含まれる各々のIS6110 DNA指紋パターンの合成像である。したがって、その中にIS6110 DNA指紋パターンが異なる菌株が存在する場合は、測定試料に含まれる各々の菌群の比率により全体としてのIS6110 DNA指紋パターンが変化する。したがって、資料中の結核菌の中に各々異なる結核菌株が存在するとき、資料中の結核菌の割合が変化するので施設間の再現性の低下の要因となることが明らかになり、IS6110 DNA指紋パターン解析はその指紋パターンが資料中の菌のIS6110 DNA指紋パターンに依存するので広域データベース構築にその使用は適切ではないということをしめしたことから学位に値するものと認める。