

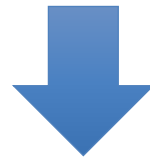
結核菌VNTR分析に関する 外部精度評価について

公益財団法人 結核予防会結核研究所
村瀬 良朗、細谷真紀子、御手洗 聡

厚生労働省 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」

背景

- 「結核に関する特定感染症予防指針」では、VNTR分析を用いた分子疫学調査の実施が推奨されており、多くの自治体で実施されている。
- 2016年より検査精度保証に関する取り組みが制度化されている。



「結核菌VNTR解析の外部精度評価」に関する研究を
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」(主任研究者 宮崎義継)の
一部として実施

2021年度VNTR分析外部精度評価の概要

- 2021.9.30に結核レファレンス委員より地方衛生研究所へ開催の案内
- 2021.11.15までに61施設より参加の回答（2020年度 [n=56]）
- 2021.11.16に検体DNAを参加施設へ送付
- 報告期限(2022.1.31)までに58施設から報告、その後、2施設から報告あり
- 個別成績、全体成績をまとめた報告書を参加施設へ報告 (2022.3.29)

2021年度外部精度評価の分析結果

各施設で用いられていたDNA分子量の測定法 (2021年度, 60施設)



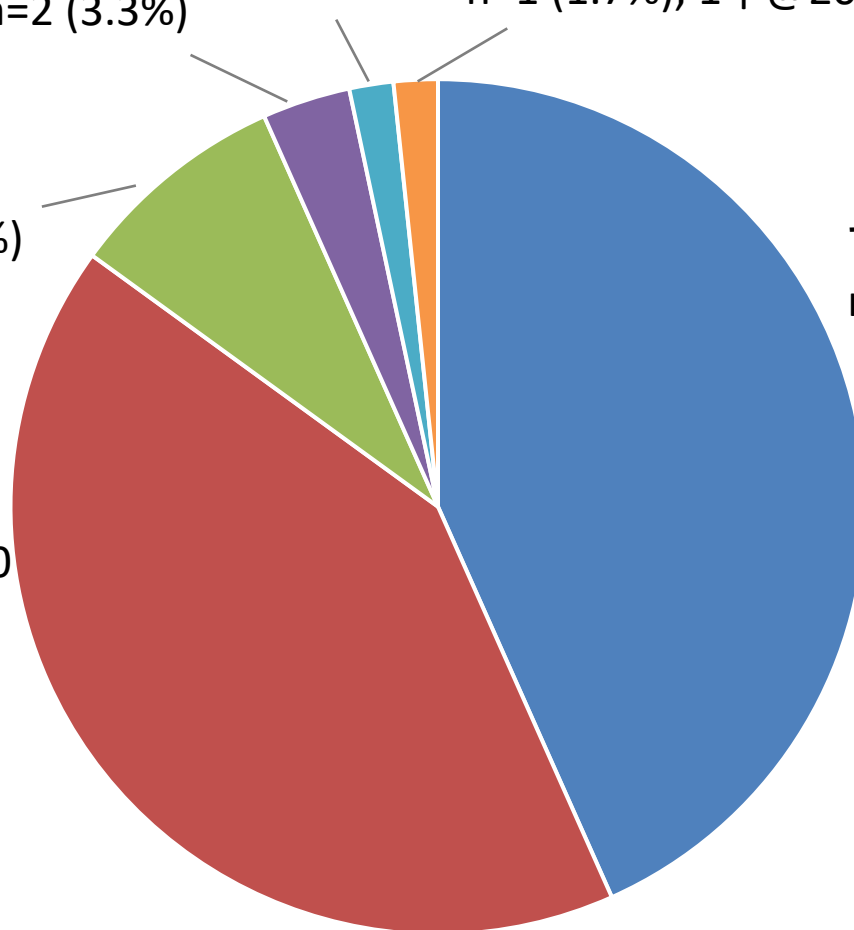
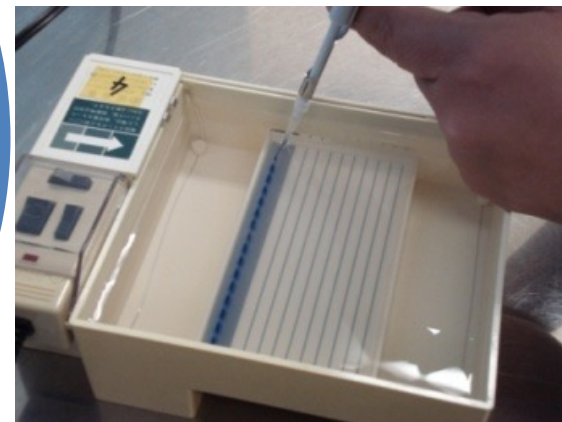
QIAxcel, n=2 (3.3%)
LabChip, n=1 (1.7%)
TapeStation, n=1 (1.7%), 1↑@2020



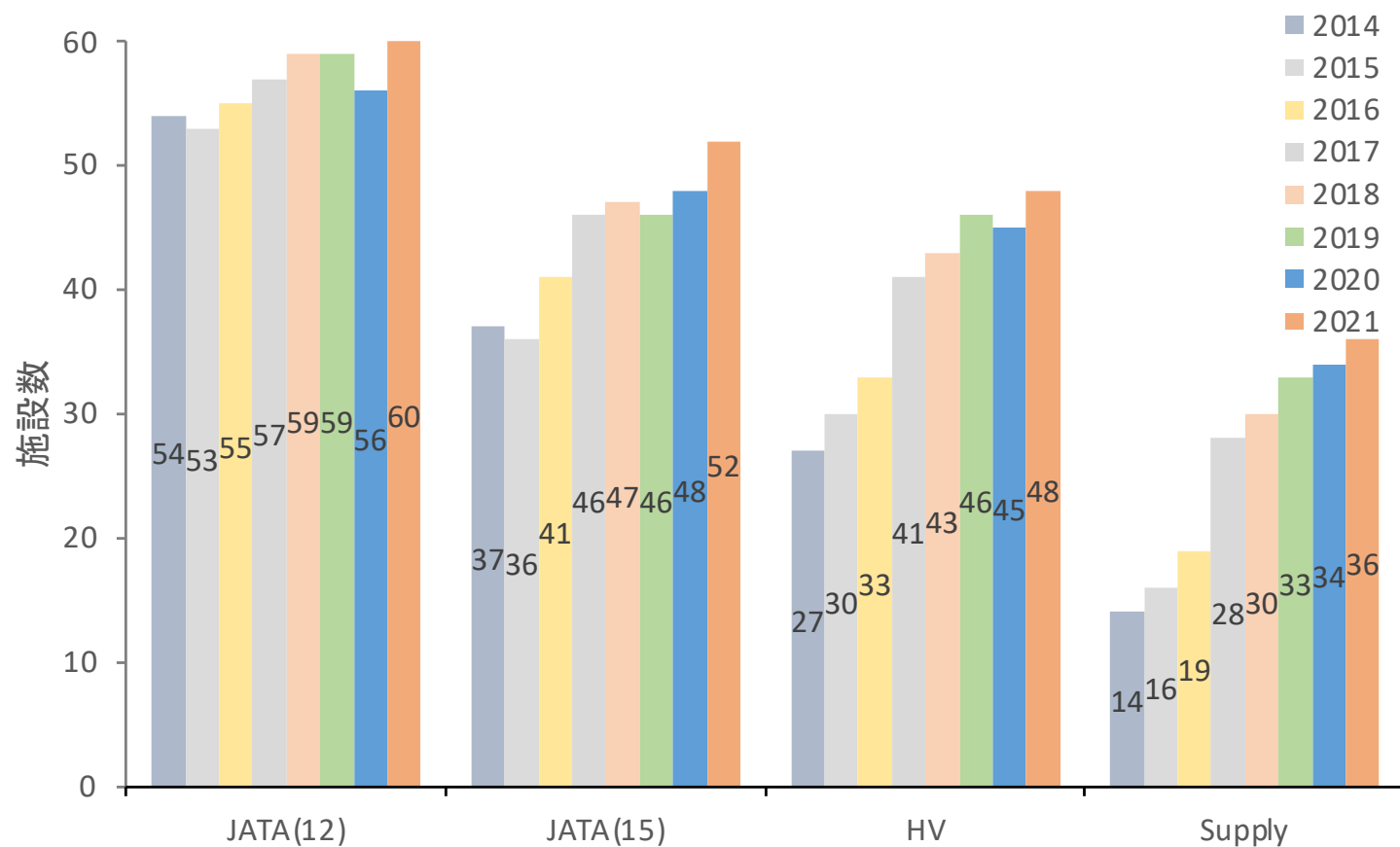
MultiNA, n=5 (8.3%)

アガロースゲル, n=26 (43%), 2↓@2020

シーケンサー, n=25 (42%), 4↑ @2020



参加施設で採用されているVNTR分析システム



- JATA-12は基本的に全施設で実施
- 任意の実施としたJATA-15、HV、Supplyの分析施設数が年々増加

2021年度 外部精度評価の結果

結核菌3株をJATA-12 VNTR法で分析した場合の正答施設数

	2014 (54施設)	2015 (53施設)	2016 (55施設)	2017 (57施設)	2018 (59施設)	2019 (59施設)	2020 (56施設)	2021 (60施設)
完全一致 (n, [%])	36 (67%)	49 (92%)	48 (87%)	40 (70%)	55 (93%)	53 (90%)	49 (88%)	54 (90%)
1 locus違い (n, [%])	7 (13%)	1 (2%)	5 (9%)	12 (21%)	3 (5%)	2 (3%)	3 (5%)	6 (10%)
2 loci以上の 違い (n, [%])	11 (20%)	3 (6%)	2 (4%)	5 (9%)	1 (2%)	4 (7%)	4 (7%)	0 (0%)

- 2021年度は90%の施設が完全一致、10%が1 locus違い、2 loci以上異なった施設は無かった
- 2021年度は良好な成績であったが、エラーのある施設もあるため、外部精度評価の必要性がある

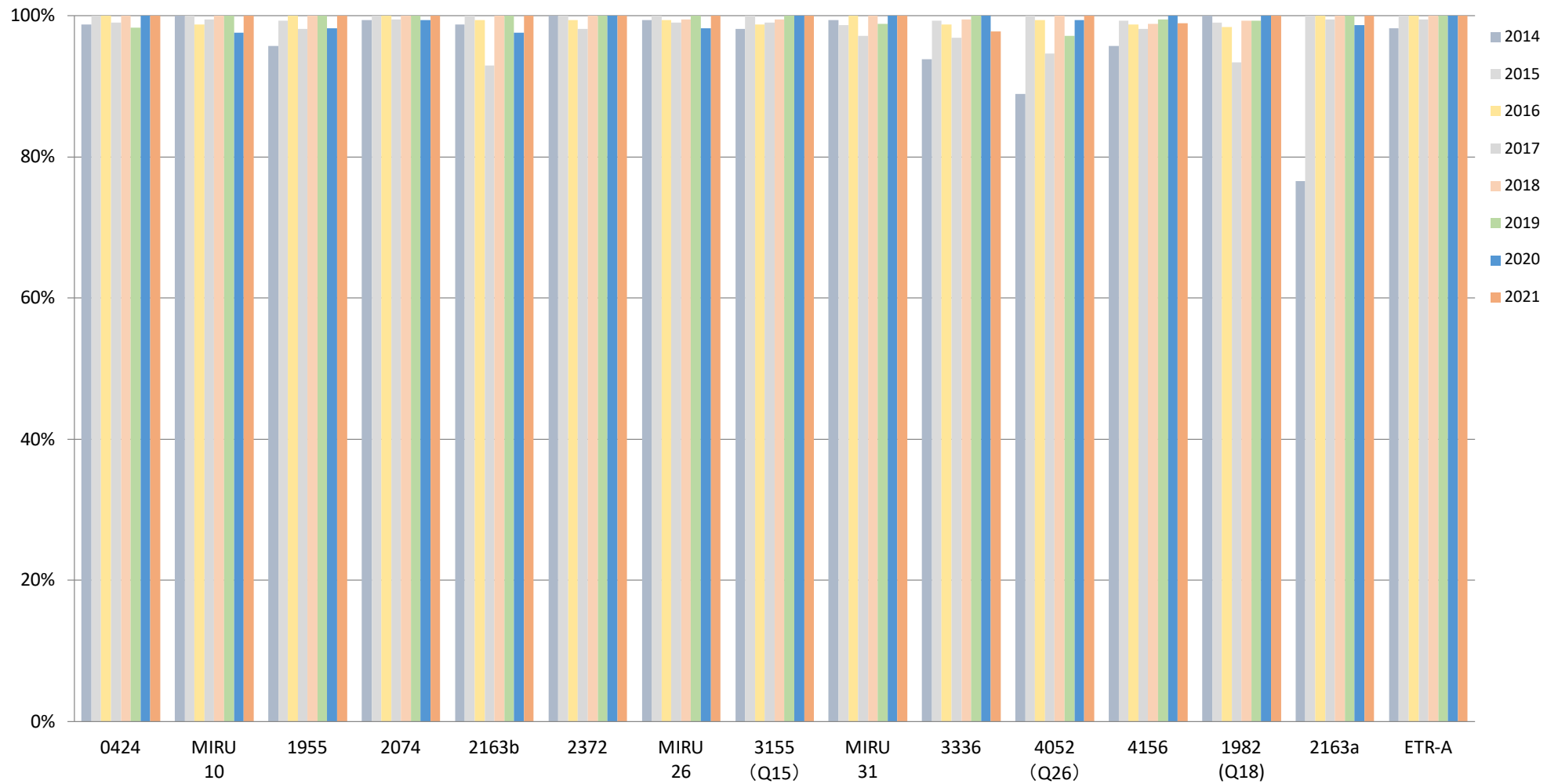
分子量測定法とローカスセットの正答率(2021)

結核菌3株をJATA-12 VNTR法で分析した場合の正答との一致率

	JATA 12		JATA 15		HV		Supply	
	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)
アガロースゲル電気泳動	26	99.6	18	100	17	100	7	100
自動シーケンサー	25	99.9	25	100	24	99.1	24	99.8
MultiNA	5	99.4	5	100	3	100	2	97.2
QIAxcel	2	100	2	100	2	100	1	100
LabChip(PE)	1	100	1	100	1	100	1	100
TapeStation	1	100	1	100	1	100	1	100

- 2021年度は、MultiNAのSupplyを除けば、すべての測定法、ローカスセットで正答率が高かった
- MultiNA、QIAxcel、LabChip では例年、正答率が低い施設が散見されたが、2021年度は改善していた（複数測定方法の併用による？）

各locusにおける正答率(%)



2021年度における1 locusあたりの正答率は97.8-100%であり、特定のlocusで正答率が低くなる現象は認められなかった

その他の活動

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.00 Date: of release 2020/Nov./xx Page: 1 of 15
--	---	--

1. 原理

本 SOP では、結核研究所抗酸菌部で実施している 24_{Beijing}-VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats ; 反復配列多型)の分析手順を示す(資料 1、2)。本分析では、PCR 反応によって VNTR 領域を増幅後、キャピラリー・シーケンサーを用いてその鎖長を分析(フラグメント解析)し、24ヶ所の VNTR 領域におけるコピー数を同定する。

検査材料として、結核患者から分離培養された *M. tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*) から抽出したゲノム DNA を用いる。ゲノム DNA を鋳型とし、1つの反応溶液で複数の領域を同時に増幅する Multiplex PCR を組み合わせ、24ヶ所の VNTR 領域を 12 反応溶液で増幅する。この PCR 反応に蛍光標識プライマーを用いることで、VNTR 領域の増幅と同時に、フラグメント解析に必要な蛍光色素を PCR 産物に付加する。続くフラグメント解析では、キャピラリー・シーケンサーが5色の蛍光色素を同時に測定することで、1run あたり PCR 産物 4 色と内部分子量マーカー1 色を識別する。したがって、得られた PCR 反応溶液を 4VNTR 領域ずつ混合後、内部分子量マーカーと共にキャピラリー・シーケンサーで分析し、1 検体あたり 6 run で 24 VNTR 領域の分子量を測定する。得られた分子量をもとに、24VNTR 領域毎のコピー数と分子量の換算表に従い、GeneMapper ソフトウェア上で被験菌株の 24_{Beijing}-VNTR プロファイルと同定する。

2. 定義と略語

定義

- ・ **VNTR 法**
ゲノム DNA 上に複数存在するミニサテライト様の反復配列領域における反復数(コピー数)の多型を利用した遺伝子型別法であり、結核菌では 2000 年代から国際的に使用されている。VNTR 法を用いて十分な菌株識別能を得るためには、複数の反復配列領域を分析する必要がある。調査地域における結核菌流行株の違いや検査目的に応じ、複数の反復配列領域の組み合わせが提案されている(表 1)。
- ・ **JATA (Japan Anti-Tuberculosis Association) 12, JATA 15**
日本国内で分離される結核菌株を少ない解析領域で効率的に菌株識別するため、結核研究所から提案された 12 または 15ヶ所の VNTR 領域の組み合わせである(資料 3)。自治体間で VNTR 情報を共有・比較するため、JATA12 を共通解析領域として使用することが提案されている。患者同士の接触が疑われる事例(集団感染疑い等)において菌の同一性を鑑別する場合、JATA12、15 は十分な菌株識別能を有していると考えられている。一方、地域で発生した結核菌株を網羅的に分析し、VNTR 型の一致から帰納的に感染経路を推定する場合には、推定精度を高めるために、他の VNTR 領域を組み合わせる分析することが推奨される(24_{Beijing}-VNTR 等、後述)。
- ・ **Supply 15**
国際的な標準法として提唱された 15ヶ所の VNTR 領域の組み合わせである(資料 4)。Supply 15 の二次型別法として、9ヶ所を追加した Supply 24 も存在する。

標準作業手順書の公開

- ・ 自動シーケンサーを用いた結核菌VNTR法の SOPを結核研究所HPにて公開(2021.4)
- ・ DNA調製法、multiplex PCR法等の手順を記載

蛍光プライマーセットの小分けキット化

- ・ 自動シーケンサー分析系を導入する上で、蛍光プライマー一式の購入費用が課題
(24 loci: 2万円 x 24 ペア = 48万円)
- ・ 小分けキット化をThermoFisherに要望
- ・ 24 loci用プライマーセット一式の小分けキットが2022年5月より入手可能
- ・ 150反応分、77,000円
- ・ 発注番号:A54818JP

まとめと展望

- 2021年度は60施設に対して外部精度評価を実施中(8回目)
- 2021年度の結果では、3株のEQA用検体をJATA 12で分析した場合の正答施設が54施設(90%)
- 今後も外部精度評価等を通じて、VNTR分析の精度の維持と向上を図る必要がある。また、ゲノム解析に対応した外部精度評価を検討していく必要がある。

結核レファレンス委員会

委員

- 北海道東北新潟：山形県衛生研究所・瀬戸順次
- 関東甲信静：神奈川県衛生研究所・古川一郎
- 東海北陸：富山県衛生研究所・金谷潤一
- 近畿：大阪市立環境科学研究所・山本香織
- 中国四国：岡山県環境保健センター・河合央博
- 九州：大分県衛生環境研究センター・塚本伸哉

世話人

- 結核予防会結核研究所抗酸菌部 村瀬良朗，御手洗聡