

VNTR法による結核菌の遺伝子型別について

山上隆也 柳本恵太 長久保由貴 内藤 亮 中澤美佳子 植松香星

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*
by Variable Numbers of Tandem Repeats(VNTR) Method

Takaya YAMAGAMI, Keita YANAGIMOTO, Yuki NAGAKUBO
Ryo NAITO, Mikako NAKAZAWA and Kosei UEMATSU

キーワード：結核菌、分子疫学解析、VNTR法

分子疫学解析とは、菌株の遺伝子型別に基づいて感染源や感染経路、感染の拡がりを明らかにすることであり、実地疫学調査を裏付ける科学的根拠を得る手段として活用されている¹⁾。結核菌の遺伝子型別検査法としては、制限酵素断片長多型法が国際標準分析法とされ、従来から実施されてきたが、検査工程が煩雑で迅速性に劣ることが課題である。しかし、近年開発された縦列反復配列数多型解析(Variable Numbers of Tandem Repeats, VNTR)法は、操作が簡便で迅速性に優れていることから、急速に普及してきている方法である。

VNTR法は、結核菌ゲノム上に存在するミニサテライトDNA中の繰り返し配列をPCRで増幅し、その分子量からリピート数を求めて型別する方法である。複数の領域を解析して数字のら列(プロファイル)とし、これを比較することで菌株の異同識別が可能である。結核研究所が開発したJATA(12)VNTR²⁾は、日本の流行株で高い型別分解能を有する12領域を解析対象としており、VNTRの国内標準法として提唱されている。

本県では、2017年度中に結核菌の分子疫学サーベイランス事業を開始することとしており、結核患者の菌株収集と、VNTRプロファイルのデータベース化を計画している。そこで今回、当所においてVNTRの検査体制を整備するため、臨床分離株を対象に検査法の検討を行った。併せて、外部精度評価に参加して検査精度の検証を行ったので、その結果を報告する。

対象と方法

1 供試菌株

(1) 臨床分離株

2015年から2017年に県内の医療機関で分離された結

地方独立行政法人山梨県立病院機構中央病院

核菌10株を対象とした。これらの菌株はそれぞれ異なる結核患者から分離されたものであるが、疫学的関連性は不明である。陽性対象としては結核研究所から分与された結核菌標準菌(H37Rv)株抽出DNAを用いた。

(2) 外部精度評価試料

衛生微生物技術協議会結核レファレンス委員会が実施した「結核菌遺伝子型別外部精度評価(2016年度)」³⁾に参加し、送付された内部精度評価用試料2検体、外部精度評価用試料3検体、計5検体の結核菌DNAを試料とした。

2 DNA抽出法

小川培地で培養した菌塊を一白金耳かき取り、滅菌蒸留水200 μ lに懸濁して95 \pm 10分間加熱した。放冷後、13000回転10分間遠心した上清をDNA粗抽出液とした⁴⁾。

3 VNTR法

JATA(12)VNTRに3領域を追加したJATA(15)VNTR⁵⁾と、超可変(HV)領域3領域⁶⁾をさらに加えた計18領域を解析対象とした。

PCR試薬はTaKaRa EX Taq HotStart Version(custom) ver.1(タカラバイオ)を使用し、添付の2 \times GC Buffer 10.0 μ l、2.5mM dNTPs mixture 1.6 μ l、ExTaq HS version 0.1 μ lに、10 μ Mプライマー(F,R)各0.8 μ l、滅菌蒸留水5.7 μ l、DNA粗抽出液1.0 μ lを加えて合計20.0 μ lとした。

PCRサイクルは初めに95 \pm 3分、次に95 \pm 30秒、60 \pm 30秒、72 \pm 1分30秒を35サイクル行い、最後に72 \pm 7分を追加した⁴⁾。

4 電気泳動

PCR増幅産物の電気泳動はアガロースゲル電気泳動とシーケンサーによるキャピラリー電気泳動を併せて実

施して結果を照合した。

(1) アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅産物 1.0 μl を 0.5×TBE 緩衝液、2%NuSieve 3:1 アガロースゲル(ロンザジャパン)でサブマリン電気泳動し、GelRed(和光純薬)染色で目的のバンドを検出した。同時に泳動した分子量マーカーとコントロール株(H37Rv 株)のバンドの位置から分子量を推定し、規定の換算式によって各領域のリピート数を求めた。分子量が 1500bp を超える場合には正確な分子量の推定が困難であるため、算定不能とした。

(2) キャピラリー電気泳動

PCR 増幅産物を滅菌蒸留水で 15~20 倍に希釈し、その 1 μl に Hi-Di Formamide(サーモフィッシャー) 12 μl、GeneScan1200 LIZ(サーモフィッシャー) 0.5 μl を加えて 95 °C 5 分加熱したものを試料とした⁷⁾。

シーケンサーには Genetic Analyzer 3500(サーモフィッシャー)、キャピラリーは 50cm キャピラリーレイ(サーモフィッシャー)、ポリマーは 3500 POP7-Polymer(サーモフィッシャー)を使用した。GeneMapper ソフトウェアで目的とするピークの大きさを算出し、目的ピークが検出されない場合は算定不能とした。リピート数の換算は Iwamoto ら⁶⁾の方法に準じ、スタッターピークの数に計測して求めた。

結果と考察

分離菌株 10 株、精度評価試料 5 検体についての VNTR 型別結果(プロファイル)を表に示した。電気泳動の結果は、アガロースゲル電気泳動とキャピラリー電気泳動とで乖離は無く、すべて一致した。

臨床分離株 9 の HV(3820)領域と内部精度評価試料 A の QUB11a 領域はリピート数が算定不能であった。いずれもアガロース電気泳動では 1500bp よりも大きい分子量のバンドが確認されたが、キャピラリー電気泳動では目的ピークは検出されなかった。これは、今回使用したサイズスタンダードの測定範囲(40~1200bp)外であったことが要因と思われる。キャピラリー電気泳動で目的ピークが検出されない要因としては、この他にも PCR 増幅不良の場合や、菌遺伝子に変異が生じた場合などが想定される⁴⁾。これらを判別することは、正確なプロファイル情報を得る上で重要であることから、アガロースゲル電気泳動によって増幅産物の有無を確認することが必要と考えられた。

JATA(12)VNTR の結果では、臨床分離株 2 と 3、臨床分離株 6 と内部精度評価試料 B がそれぞれ同一プロファイルであった。しかし、JATA(15)VNTR、HV 領域の追加解析によって異なるプロファイルが得られ、いずれも異なる

表 VNTR 型別結果

試料	JATA(12)												JATA(15)			超可変領域		
	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	QUB18	QUB11a	ETR A	3232	3820	4120
H37Rv株	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	5	2	3	4	3	2
臨床分離株1	2	3	1	3	4	2	5	4	4	10	3	3	5	2	3	5	5	2
臨床分離株2 ¹	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	13
臨床分離株3 ¹	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	9	2	4	9	12	9
臨床分離株4	3	3	4	3	4	3	3	2	4	14	9	4	10	8	4	10	8	8
臨床分離株5	4	1	3	2	7	4	7	4	4	7	8	5	8	9	4	16	14	9
臨床分離株6 ²	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	15	12	14
臨床分離株7	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	10	9	4	16	14	12
臨床分離株8	4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	5	10	8	4	10	12	5
臨床分離株9	4	3	3	3	3	3	7	4	2	4	8	4	10	8	4	14	-	15
臨床分離株10	4	6	1	3	2	4	5	4	5	7	6	5	3	10	4	9	8	4
内部精度評価試料A	2	2	2	4	3	2	5	4	3	3	7	3	3	-	3	13	5	4
内部精度評価試料B ²	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	12	11	12
外部精度評価試料1	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	13	12	10
外部精度評価試料2	2	5	2	1	2	3	1	2	3	13	7	4	7	7	3	4	8	2
外部精度評価試料3	1	3	4	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	8	4	15	8	5

1,2 : JATA(12)VNTRプロファイルがそれぞれ一致 - : 算定不能

菌株であると判定された。JATA(12)VNTR は、集団発生疑い事例における菌株異同識別法として有用と報告されているが⁸⁾、実地疫学情報を加味できないサーベイランス解析では型別分解能は十分ではなく、異なる菌株が同一型として判定される可能性がある⁹⁾と指摘されている。今回の結果からもこのことが示唆され、VNTR プロファイルのデータベース化には、JATA(15)VNTR と HV 領域を追加解析することが必要と考えられた。

精度評価試料5検体のVNTR プロファイルは結核研究所が示した正答とすべて一致し、当所におけるVNTRの検査精度は良好と判定された。結核菌の分子疫学調査では、異なる自治体間でプロファイル情報を共有することが想定され、精度保証は必須である³⁾。今後も継続的に外部精度評価に参加して、分析精度を検証していくことが重要と考える。

まとめ

- 1 臨床分離株を対象に結核菌 VNTR 検査を試行した結果、18 領域についてプロファイル化が可能であった。
- 2 . キャピラリー電気泳動だけでは PCR 増幅の有無が確認できない場合があり、アガロースゲル電気泳動を併用することが必要と考えられた。
- 3 . サーベイランス解析には JATA(12)VNTR に加えて、JATA(15)VNTR や HV 領域の解析が必要と考えられた。
- 4 . 外部精度評価の結果、当所の検査精度は良好と判定された。

参考文献

- 1) 和田崇之,長谷篤:結核菌の縦列反復配列多型(VNTR)解析に基づく分子疫学とその展望,結核,85,845-852(2010)
- 2) 前田伸司ら: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,結核,83,673-678(2008)
- 3) 御手洗聡,村瀬良朗:結核菌 VNTR 解析の外部精度評価,厚生労働科学研究費補助金(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ポネットワークの強化に関する研究」平成 28 年度総括・分担研究報告書,54-60(2017)
- 4) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会:抗酸菌検査ガイド 2016,南江堂(2016)
- 5) 前田伸司,和田崇之,岩本朋忠:国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型(VNTR)分析法,日本細菌学雑誌,65,201(2010)
- 6) Iwamoto,T.et al.: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.,270,67-74(2007)
- 7) 地方衛生研究所全国協議会保健情報疫学部会:結核菌 VNTR ハンドブック第一版,2012
- 8) 田丸亜貴ら:JATA(12)-VNTR 型別による結核集団発生事例の菌株異同調査,結核,88,399-403(2013)
- 9) 和田崇之ら:複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基盤構築,結核,88,393-398(2013)