

キャピラリー電気泳動による結核菌VNTR型別24領域解析法の検討

氏家絢子 矢儀田優佳 浅野由紀子 青木紀子 阪東成純 四宮博人

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, variable numbers of tandem repeat, capillary electrophoresis

当科では、結核菌分子疫学調査事業実施要領に基づき、県内患者から分離された結核菌株について縦列反復配列多型 (variable numbers of tandem repeat, VNTR) 分析を実施している。従来は18領域を対象として polymerase chain reaction (PCR)産物のアガロースゲル電気泳動による分析を行っていたが、今回、24領域を対象としたキャピラリー電気泳動による分析手法を検討した。PCR産物をキャピラリー電気泳動により分析すると、増幅産物のDNAサイズ(測定値)と理論値の間に差が確認されたが、両者に正の線形の相関性があることが示された。相関式を基に測定値からリピート数を算出すると、従来法と改良法での分析結果は一致し、さらに、6領域を追加したことによるVNTR型別分解能の向上が認められた。改良法を用いることにより、菌株のより詳細な分子疫学情報を保健所や行政担当課へ迅速に提供できるため、疫学調査や感染予防対策の推進への貢献が期待できる。

はじめに

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) によって引き起こされる感染症である。日本における2020年の結核新規登録患者数は1万2739人で、結核罹患率は10.1 (人口10万人対)となっており¹⁾、世界保健機構 (World Health Organization, WHO) が定義する結核の低まん延国の水準である10未満²⁾には至っていない。本県の2020年の結核新規登録患者数は122人、罹患率は9.1である¹⁾が、過去5年間の平均罹患率を地域別にみると、八幡浜保健所管内は15.8、宇和島保健所管内は15.1で、南予地域で高い傾向を示している³⁾。本県では、平成25年度に結核菌分子疫学調査事業を開始し、県内の結核患者から分離された菌株の縦列反復配列多型 (variable numbers of tandem repeat, VNTR) 分析を実施して、保健所や行政担当課に対し、感染源や感染経路の究明に資する科学的根拠を提示している。

VNTR型別分析とは、ゲノム内の数10 bpの反復配列のリピート数を算出し、菌株間で比較して相同性を調べる手法で⁴⁾、結果が数値化できることから、データ管理や検査施設間での比較が容易となる。当科では従来、JATA15領域^{5, 6)} (Mtub04, MIRU10, Mtub21, Mtub24, QUB11b,

V2372, MIRU26, QUB15, MIRU31, QUB3336, QUB26, QUB4156, QUB18, QUB11a, ETR-A) 及び超多変 (hypervariable, HV) 領域⁷⁾の3領域 (QUB3232, VNTR3820, VNTR4120) の合計18領域を対象として polymerase chain reaction (PCR)を行い、その増幅産物の大きさをアガロースゲル電気泳動で判別して、反復配列のリピート数を算出していた⁸⁾。しかし、この従来法は操作が煩雑で、分析結果判明までに時間がかかり、人為的誤差を生じやすいことが問題となっていた。そこで、今回、検査の効率性、正確性及びVNTR型別分解能の向上を目的として、Supply's 15-MIRU⁹⁾に含まれる6領域 (Mtub39, MIRU40, MIRU04, Mtub30, MIRU16, ETR-C) を追加した24領域を分析対象とするキャピラリー電気泳動による分析手法を検討した。また、改良法を用いて結核菌分子疫学事業で収集した菌株について再分析を行い、従来法と比較したので報告する。

材料と方法

1 検査材料

衛生微生物協議会結核レファレンス委員会が実施している2016～2020年度の外部精度評価事業において分与されたDNA 9検体(H37Rv及び内部精度管理株8検体) (表1)を24領域VNTR型別既知菌株由来DNA (以下、既

表1 外部精度評価事業で分与された DNA 検体の VNTR 型別

標準	領域	内部精度管理株								
		H37Rv	2020年度A	2019年度A	2019年度B	2018年度A	2018年度B	2017年度A	2017年度B	2016年度B
JATA	1 Mtub04	2	1	4	2	4	4	3	1	4
	2 MIRU10	3	3	3	2	3	8	3	4	1
	3 Mtub21	1	2	3	1	4	3	3	10	3
	4 Mtub24	4	3	3	3	3	2	3,4	3	2
	5 QUB11b	5	5	7	3	8	7	7	7	7
	6 V2372	2	3	3	2	3	3	3	2	4
	7 MIRU26	3	5	7	5	7	7	7	2	7
	8 QUB15	4	4	3	4	4	4	5	4	4
	9 MIRU31	3	5	5	3	5	4	5	3	5
	10 QUB3336	8	7	7	13	7	10	7	7	7
	11 QUB26	5	9	7	5	8	8	2	7	8
	12 QUB4156	3	3	5	3	3	2	5	2	5
	13 QUB18	5	7	10	5	8	5	10	11	10
	14 QUB11a	2	5	8	2	8	9	8	11	9
	15 ETR-A	3	4	4	3	4	5	4	4	4
HV	1 QUB3232	4	14	14	5	14	11	12	1	12
	2 VNTR3820	3	14	7	5	14	9	12	11	11
	3 VNTR4120	2	10	8	2	9	3	11	4	12
Supply's-15 MIRU	Mtub39	5	3	3	5	3	1	3	2	3
	MIRU40	1	1	3	1	3	3	3	2	3
	MIRU04	3* *	2	2	2	2	2	2	5	2
	Mtub30	2	3	4	2	4	2	4	2	4
	MIRU16	2	3	3	3	3	2	4	3	3
	ETR-C	4	4	4	4	4	4	4	4	4

* 領域 MIRU04 は、H37Rv では 77 bp を単位とした反復配列になっているが、多くの臨床株では 77 bp を単位とした反復配列に加えて 3'末端に 53 bp の単位が一つ加わっている⁴⁾。そのため H37Rv のリピート数は"3'"と表し、他の株のリピート数と区別した。

知株DNA)として使用した。

臨床菌株は、2020年度の愛媛県結核菌分子疫学調査事業に基づいて収集された結核菌株26株を使用した。

2 鋳型DNAの調製

臨床菌株は、滅菌蒸留水に懸濁し、95℃、10分間加熱して、13000 rpm、10分間遠心した上清を鋳型DNAとした。

3 PCR反応

24領域を対象としたマルチプレックスPCRは結核研究所のプロトコール¹⁰⁾に準じて実施した。すなわち、48種類の蛍光標識プライマー等を表2のとおり組み合わせ、12種類のプライマー混合液A-1～F-1を作成した。

PCR反応液は、10 μL中に、GC buffer I (タカラバイオ株)、0.2 mM dNTP、0.4 μM プライマー、0.25 U TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ株)、鋳型DNA 1.6 μLを含むように調整した。

サーマルサイクラーは S1000 (バイオラッド株)を使用し、94℃、1分間の後、94℃ 60秒、60℃ 60秒、72℃ 60秒を30サイクルとし、72℃、3分間で伸長反応を行った。

4 キャピラリー電気泳動

PCRの増幅産物を表2のとおりに等量混合し、さらにヌクレアーゼフリー水で400倍程度に希釈して、増幅産物混合液A～Fを調整した。その増幅産物混合液 1 μLに、

HiDi formamide (Thermo Fisher Scientific K. K.) 8.7 μL及びGene Scan 1200 LIZ (Thermo Fisher Scientific K. K.) 0.3 μLを混合し、95℃、2分間加熱した。

キャピラリー電気泳動は、Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific K. K.) を用いて、50 cmのキャピラリー及びポリマーにPOP7 (Thermo Fisher Scientific K. K.) を使用して、電圧8.5 kV、泳動時間5800 秒/列で実施した。泳動結果は、Gene Mapper 6.0 (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて分析し、増幅産物の大きさからリピート数を算出した。

結果

既知株DNA (H37Rv, 内部精度管理株 (2016年度, 2017年度, 2020年度)) 5検体について、24領域を対象としてキャピラリー電気泳動により分析した。

H37RvのSupply's-15 MIRU領域QUB15の泳動結果を図1に示した。repeat 4に本来の増幅産物を示す蛍光強度の一番大きいピークが見られ、さらにその前後に一定間隔で小さいピーク (stutter peak) が確認された。

表3には、H37Rvの24領域における既知のリピート数から計算されるDNAサイズ(以下、理論値)及びキャピラリー電気泳動から得られたDNAサイズ(以下、測定値) (平均

表2 本研究に用いたプライマー配列

標準	領域名	プライマー名	配列	蛍光標識	プライマー 混合液	増幅産物 混合液
HV1	QUB3232	FAM_3232_F 3232_R	CCCCAGCCTTACGACTGA GTCGGGCTTGGTGAAGG	FAM -	A-1	A
JATA12	QUB4156	PET_4156_F 4156_R	CGTCCGAGCGACATCAC AGGATCGAGCGGTCCAG	PET -		
JATA01	Mtub04	VIC_Mtub04_R Mtub04_F	GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT	VIC -	A-2	
JATA03	Mtub21	NED_1955_F 1955_R	AGACGTCAGATCCCAGTT ACCCGACAACAAGCCCA	NED -		
HV2	VNTR3820	VIC_3820_F 3820_R	ACCTTCATCCTTGGCGAC TGCGCGGTGAATGAGACG	VIC -	B-1	
JATA04	Mtub24	PET_2074_F 2074_R	TGTGTCACCTGACGATTTCAAGG TGGCCGGCAAATAATGGATGC	PET -	B-2	B
JATA06	V2372	NED_2372_F 2372_R	AGGTGAGGATCGGGTTGG ACCACGCTTCAAGAACCAG	NED -		
JATA08	QUB15	FAM_3155_F 3155_R	GCCAGCCGTAACCCGACCAG GGGCCGGAAATTCGCAGTGG	FAM -	C-1	
JATA10	QUB3336	FAM_3336_F 3336_R	CCACCGCGATCCAGGAAT CGGGATTACCACGATCTC	FAM -		
JATA02	MIRU10	NED_MIRU10_R MIRU10_F	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	NED -	C-2	C
JATA07	MIRU26	PET_MIRU26_R MIRU26_F	CATAGGCGACCAGGCGAATAG TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	PET -		
JATA09	MIRU31	VIC_MIRU31_R MIRU31_F	GTGCCGACGTGGTCTTGAT ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	VIC -	D-1	
JATA14	QUB11a	FAM_11a_F 11a_R	CGTGATGTTGATCGGGATGT ACCCTGGAGTCTGGCATC	FAM -		
HV3	VNTR4120	NED_4120_F 4120_R	GTTCACCGGAGCCAACC GAGGTGGTTTCGTGGTTCG	NED -	D-2	D
JATA05	QUB11b	VIC_11b_F 11b_R	CCGATGTAGCCCGTGAAGA AGGGTCTGATTGGCTACTCA	VIC -		
JATA11	QUB26	PET_4052_F 4052_R	GAGGTATCAACGGGCTTGT GAGCCAAATCAGGTCCGG	PET -	E-1	
JATA13	QUB18	VIC_Q18_F Q18_R	ATCGTCAGCTGCGGAATAGT AATACCGGGGATATCGGTTC	VIC -		
Supply's-15	MIRU04	FAM_MIRU04_F MIRU04_R	GCGCGAGAGCCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAGC	FAM -	E-2	E
Supply's-15	MIRU40	NED_MIRU40_F MIRU40_R	GGGTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	NED -		
Supply's-15	MIRU16	PET_MIRU16_R MIRU16_F	CCCCTCGTGCAGCCCTGGTAC TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	PET -	F-1	
Supply's-15	ETR-C	NED_ETR C_F ETR C_R	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG	NED -		
JATA15	ETR-A	FAM_ETR A_F ETR A_R	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCCGCGATTT	FAM -	F-2	F
Supply's-15	Mtub30	VIC_Mtub30_F Mtub30_R	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA	VIC -		
Supply's-15	Mtub39	PET_Mtub39_F Mtub39_R	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGAAAGCTTAG	PET -		

値 ± 標準誤差 (n = 4) を示した。H37Rvにおける理論値と測定値の差が最も大きかった領域 Mtub39では、理論値は562 bp、測定値は496.7 bpで、65.3 bpの差が生じた。このDNAサイズの差は各領域によって異なり、0.6～65.3 bpの差が生じた。この差はstutter peakについても生じ、

さらに他の既知株DNA 4検体(内部精度管理株(2016年度、2017年度、2020年度))でも同様に確認された。

そこで、既知株DNA 5検体(H37Rv、内部精度管理株(2016年度、2017年度、2020年度))について、理論値と測定値の相関グラフを作成したところ、線形の正の相関性が

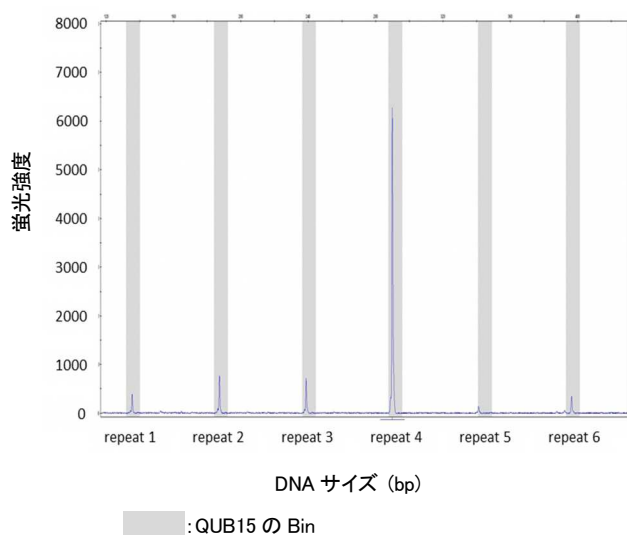


図1 H37Rv の領域 QUB15 のキャピラリー電気泳動像

表3 H37Rv の 24 領域のキャピラリー電気泳動による理論値と測定値

標準	領域	リピート数	理論値 (bp)	測定値* (bp)	DNAサイズの差 (bp)
JATA	1 Mtub04	2	639	636.1 ± 0.42	2.9
	2 MIRU10	3	643	633.5 ± 0.45	9.5
	3 Mtub21	1	267	267.6 ± 0.29	-0.6
	4 Mtub24	4	238	238.9 ± 0.49	-0.9
	5 QUB11b	5	547	547.7 ± 0.04	-0.7
	6 V2372	2	360	343.0 ± 0.79	17
	7 MIRU26	3	438	439.2 ± 0.15	-1.2
	8 QUB15	4	287	291.7 ± 0.59	-4.7
	9 MIRU31	3	651	643.5 ± 0.41	7.5
	10 QUB3336	8	666	617.4 ± 1.30	48.6
	11 QUB26	5	879	857.0 ± 0.88	22
	12 QUB4156	3	367	361.2 ± 0.62	5.8
	13 QUB18	5	621	623.5 ± 0.23	-2.5
	14 QUB11a	2	309	310.1 ± 0.11	-1.1
	15 ETR-A	3	420	424.7 ± 0.12	-4.7
HV	1 QUB3232	4	406	349.3 ± 1.40	56.7
	2 VNTR3820	3	444	399.5 ± 1.00	44.5
	3 VNTR4120	2	447	427.3 ± 0.60	19.7
Supply's-15 MIRU	Mtub39	5	562	496.7 ± 1.40	65.3
	MIRU40	1	408	405.1 ± 0.23	2.9
	MIRU04	3	352	350.1 ± 0.29	1.9
	Mtub30	2	363	366.7 ± 0.17	-3.7
	MIRU16	2	671	665.6 ± 0.54	5.4
ETR-C	4	276	262.9 ± 0.41	13.1	

* 平均値 ± 標準誤差 (n = 4)

見られた(図2). これらの相関グラフから相関式を求め、解析ソフトGene mapper 6.0におけるBin(各リピート数の増幅産物の大きさの範囲)の設定を補正し、相関式作成に用いていない既知株DNA(内部精度管理株(2018年度, 2019年度))4検体について分析したところ、結果は24領域全て既知のリピート数と一致した。

次に、従来法により18領域のVNTR型別分析済みの臨床菌株DNAについて、改良法で再分析を行い、24領域

のVNTR型別を行った(表4). 改良法による再分析で得られた18領域のリピート数は、従来法での分析結果とすべて一致し、改良法により新たに追加した6領域(Mtub39, MIRU40, MIRU04, Mtub30, MIRU16, ETR-C)の型別が明らかになった。

考察

今回、結核菌のVNTR型別分析において、従来の18領域を対象としたアガロースゲル電気泳動による分析法を改良して、24領域を対象としたキャピラリー電気泳動による分析法を検討した。

従来法では、1検体につき18本の反応チューブによるPCR反応が必要であるが、改良法では蛍光標識により増幅産物を識別することが可能なため、対象が24領域であるものの、蛍光標識プライマー等を用いたマルチプレックスPCRにより、1検体あたり4領域ごとに組み合わせた6本の反応チューブで分析可能となった。また泳動時間は、従来法では対象領域や対象検体により、1検体当たり30分~3時間程度であったが、改良法では1検体当たり1.5時間程度となり、2倍以上の時間短縮と省力化が可能であった。さらに、データ分析については、従来法では、目視でバンドサイズを読み取るため、誤差が生じる可能性があるが、改良法では、解析ソフトウェアを用いてリピート数を算出するため、迅速性及び正確性が飛躍的に向上することが判明した。

今回は、改良法で活用する解析ソフトの正確性を向上させるため、複数の既知株DNA 9検体を用いて、解析ソフトのBin設定を行った。その結果、岩本ら¹¹⁾及び前田ら¹²⁾が報告しているように、当科においてもDNAサイズの理論値とキャピラリー電気泳動で得られる測定値に差が生じることを確認した。例えば、H37RvにおけるSupply's-15 MIRU領域Mtub39では、H37Rvのリピート数は5であるため、そのリピート数から計算されるDNAサイズは562 bpであるが、測定値は496.7 bpであった。この差は、キャピラリー電気泳動による分析において、PCR産物が加熱処理されて1本鎖になっていること、結核菌ゲノムはGC含量が高い¹³⁾ことから、PCR産物が立体構造をとりやすいことが要因と考えられる。さらに、今回のプライマーがtailedプライマーであったこともDNAサイズの差を生じさせる要因となった可能性がある。tailedプライマーは、プライマー末端に特定のテール配列が付加されたプライマーで、TaqポリメラーゼによるPCR反応の増幅産物末端へのアデニン付加を促進することで、増幅産物を安定させる効果が期待されている。しかしながら、そのアデニン付加により、増幅産物

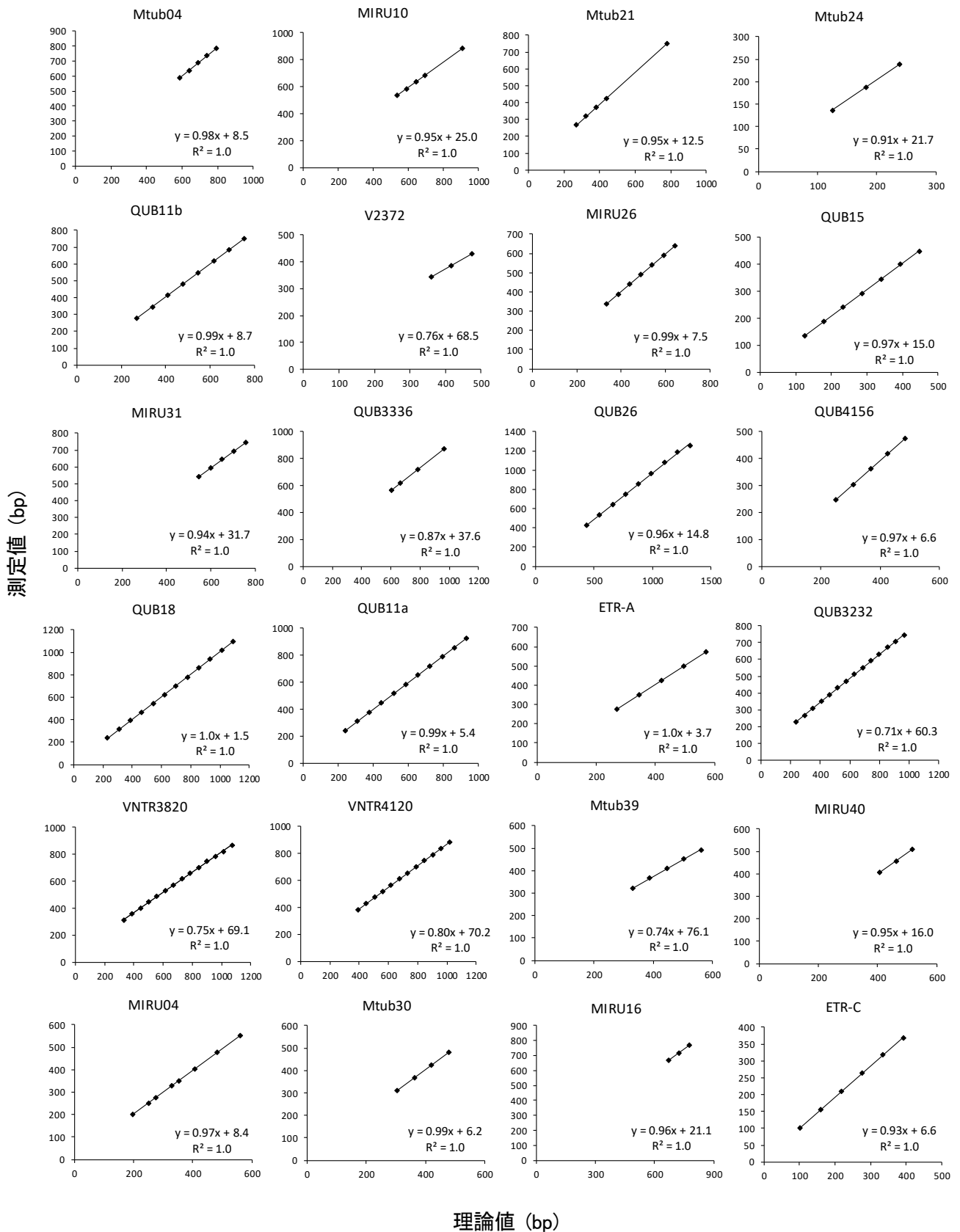


図2 24領域の測定値と理論値の相関グラフ

のサイズが理論値より数bp大きくなることが知られている。筆者らは、日常的に他菌種の分子疫学解析を実施しているが、腸管出血性大腸菌のMultilocus variable number

tandem repeat analysis (MLVA) 解析において、tailed プライマーを使用したことによりキャピラリー電気泳動結果が解析ソフトの標準的なBin設定から数bpずれ、MLVA型別

表4 県内患者から分離された臨床菌株由来 DNA の改良法による 24 領域の分析結果

標準	IATA																								HV			Supply's-15 MIRU					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	1	2	3	Mtub39	MIRU40	MIRU04	Mtub30	MIRU16	ETR-C									
領域	Mtub04	MIRU10	Mtub21	Mtub24	QUB11b	V2372	MIRU26	QUB15	MIRU31	QUB 3336	QUB26	QUB 4156	QUB18	QUB11a	ETR-A	QUB 3232	VNTR 3820	VNTR 4120	Mtub39	MIRU40	MIRU04	Mtub30	MIRU16	ETR-C									
20001	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	14	19	6	3	3	2	4	3	4									
20002	3	3	3	4	6	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	9	12	11	3	3	2	4	4	4									
20003	2	4	1	3	3	2	5	3	3	12	3	3	5	2	3	5	5	2	5	1	2	2	3	3									
20004	4	1	3	2	5	4	7	4	5	7	8	5	7	9	4	16	14	7	3	4	2	4	3	4									
20005	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	13	8	3	3	2	4	3	4									
20006	4	1	3	2	6	4	7	4	5	4	8	5	10	7	4	15	14	13	3	3	2	4	3	4									
20007	4	3	4	3	4	4	7	4	5	7	7	3	8	5	4	14	14	5	3	3	2	4	3	4									
20008	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	7	5	10	8	4	10	12	10	1	3	2	4	3	4									
20009	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	8	8	4	14	12	5	3	3	2	4	4	4									
20010	4	3	4	3	5	3	6	4	5	7	8	3	7	5	4	9	14	10	3	3	2	4	3	4									
20011	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	3	3	5	2	3	5	5	2	4	1	2	2	3	3									
20012	2	3	1	3	2	2	5	4	3	12	5	3	5	2	3	5	5	2	7	1	2	2	3	4									
20013	3	4	2	1	2	2	1	2	3	13	8	4	7	26	3	5	12	4	3	2	1	2	1	4									
20014	3	3	1	3	5	3	6	4	3	10	6	4	8	6	3	5	5	4	2	1	2	4	3	3									
20015	3	4	1	3	4	3	4	3	4	11	8	9	6	7	3	4	3	5	4	3	3'	4	3	3									
20016	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	10	8	4	4	18	12	3	3	4	2	3	4									
20017	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3	4	8	4	15	18	10	3	3	2	4	4	4									
20018	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	9	5	10	9	4	16	14	12	3	3	2	4	3	4									
20019	1	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	10	8	4	17	10	5	3	3	1	4	3	4									
20020	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	11	8	4	12	23	9	4	2	3	2	3	4									
20021	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	3	3	5	2	3	4	5	2	7	2	1	3	4	4									
20022	1	2	2	3	2	6	5	2	2	6	7	3	2	1	1	5	6	4	3	1	2	2	3	3									
20023	5	3	4	3	6	4	7	2	4	7	8	3	8	8	4	13	18	10	3	3	2	4	3	4									
20024	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	14	19	6	3	3	2	4	3	4									
20025	4	1	3	2	2	4	7	4	5	7	9	5	10	9	4	16	14	10	3	3	2	4	3	4									
20026	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	10	9	4	16	16	13	3	3	2	4	3	4									

判定に苦慮した経験がある。キャピラリー電気泳動はバンドサイズを目視で判定するアガロースゲル電気泳動よりも精度が高く、数bpの差異を判定できるため、tailedプライマーにより増幅産物が数bp増加することが結果判定に大きく影響したと考えられる。キャピラリー電気泳動で分析を行う場合は、tailedプライマーの影響を考慮して、分析結果を補正する必要がある。

そこで、このDNAサイズの差を補正するために、複数の既知株DNAの結果から相関式を作成した。なお、この差は stutter peak でも確認された。VNTRのリピート数の正確な判定には、増幅産物のDNAサイズからの算出に加え、stutter peak を数えることも有用とされている¹⁴⁾ため、相関式の作成には本来の増幅産物のピークだけでなく stutter peak の分析結果も用いた。相関式(図2)を基に補正した設定により既知株DNAを分析すると、既知の24領域のリピート数が正しく示されることを確認した。さらに、VNTR型別分析済の臨床菌株の再分析を行ったところ、従来法と改良法では18領域のリピート数は全て一致し、補正したBin設定が正確であることが示された。

次に、再現性を確認するため、H37Rvについて複数回分析を実施したところ(表3, n=4)、増幅産物のサイズはいずれの領域でも誤差は1-2 bpの範囲内であり、再現性が高いことも確認された。

近年、全国の多くの地方衛生研究所で実施されているVNTR型別分析において、キャピラリー電気泳動を使用する施設が増加¹⁵⁾しており、2017年度は57施設中13施設(22.8%)、2018年度は59施設中18施設(30.5%)がキャピラリー電気泳動による分析を実施していた。さらに、増幅産物が700 bp以上になることが多いためVNTR型別分析がやや困難なHV領域において、外部精度管理の正解率は、QIAXcelを用いたキャピラリー電気泳動は77.8%、Multinaを用いたマイクロチップ電気泳動では92.6%、アガロース電気泳動では96.3%であるが、DNAシーケンサーを用いたキャピラリー電気泳動では100%であった¹⁵⁾。DNAシーケンサーを用いたキャピラリー電気泳動による本改良法を確立できたことで、当所におけるVNTR型別分析の正確性の向上が期待できる。

従来法では、国内標準のJATA12領域⁵⁾(Mtub04, MIRU10, Mtub21, Mtub24, QUB11b, V2372, MIRU26, QUB15, MIRU31, QUB3336, QUB26, QUB4156)、分解能の向上のためにJATA15として追加される3領域⁶⁾(QUB18, QUB11a, ETR-A)、東アジアで多い北京型結核菌での分解能の高いHV領域の3領域⁷⁾(QUB3232, VNTR3820, VNTR4120)の18領域を対象としていた。本

改良法では、上記18領域に加え、6領域(Mtub39, MIRU40, MIRU04, Mtub30, MIRU16, ETR-C)を追加することで、国際標準のSupply's 15-MIRU⁹⁾にも準拠することになった。また、解析領域が増加することでVNTR型別分解能が向上し、菌株間の相同性について、より有益な結果を保健所や行政担当課へ提供することが可能となった。

本改良法の確立により、結核菌のVNTR型別について、より迅速かつ正確な分析を実施することが可能となった。しかしながら、結核の感染源や感染経路の解明には、患者の疫学情報が必須であり、今後も保健所担当者や情報共有を行う必要があると考えられる。さらに、当所既存菌株についても、本改良法を用いた再分析を進め、患者の疫学情報を含めた総合的な解析を行い、県内の結核流行の傾向を把握し、結核対策に寄与していく必要があると思われる。

まとめ

- 1 結核菌VNTR型別分析について、DNAシーケンサーを用いたキャピラリー電気泳動による24領域を対象とした手法を確立した。
- 2 理論値と測定値に差が生じたため、24領域型別既知株DNA9検体を用いてその差を補正した。
- 3 改良法を用いて臨床菌株DNAについて再分析を行ったところ、従来法で明らかにしていた18領域について、改良法の結果と100%一致した。また、追加した6領域については新たに型別が判明し、分解能の向上が認められた。
- 4 今後、本改良法を用いてVNTR型別分析を行うことで、保健所や行政担当課へ、正確な情報を迅速に提供することが可能となる。
- 5 改良法を用いて当所既存菌株の再分析を進め、患者の疫学情報と併せて、県内の結核の流行状況の傾向を明らかにすることで、疫学調査や感染予防対策への貢献が期待できる。

文献

- 1) 公益財団法人 結核予防会 結核研究所 疫学情報センター : 令和2年結核年報 <https://jata-ekigaku.jp/nenpou/>
- 2) World Health Organization : Global tuberculosis report 2021
- 3) 愛媛県感染症情報センター : 愛媛県感染症発生動向調査事業報告書 令和元年(2019年)

- 4) Supply P. et al. : Mol Microbiol 36, 762-771 (2000)
- 5) 前田伸司ほか : 結核 83, 673-678 (2008)
- 6) 前田伸司ほか : 結核 84, 784-786 (2009)
- 7) Allix-Béguet C. et al. : J Clin Microbiol 52, 164-172 (2014)
- 8) 仙波敬子ほか : 四国公衆衛生学会誌60, 67-75 (2015)
- 9) Supply P. et al. : J Clin Microbiol 44, 4498-4510 (2006)
- 10) 公益財団法人 結核予防会 結核研究所 : 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(2021年3月)
- 11) Iwamoto T. et al. : PLoS One 7, e49651 (2012)
- 12) 前田詠里子ほか : 福岡県保健環境研究所年報第40号, 63-68 (2013)
- 13) Cole S. T. : Nature 393, 537-544 (1998)
- 14) Iwamoto T. et al. : FEMS Microbiol Lett 270, 67-74 (2007)
- 15) 衛生微生物技術協議会第40回研究会 : レファレンスセンター等報告 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/8972-reference-report40.html>

Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by 24-locus based variable number tandem repeat (VNTR) analysis using capillary electrophoresis

Ayako UJIKE, Yuka YAGITA, Yukiko ASANO, Noriko AOKI, Naritoshi BANDO, Hiroto SHINOMIYA

In accordance with the guidelines for the implementation of the *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiological survey project in Ehime Prefecture, we have been conducting variable number of tandem repeat (VNTR) analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in the prefecture since 2013. In the past, we performed 18-locus based VNTR typing using agarose gel electrophoresis, but this method is time-consuming and sometimes error-prone. In this study, we investigated a capillary electrophoresis method for 24-locus VNTR analysis to improve the efficiency and accuracy of testing and the resolution of VNTR typing. Analysis of the PCR products by capillary electrophoresis showed a difference between the measured DNA size of the amplified product and the theoretical value, and there was a positive linear correlation between the two. When the number of repeats in each locus was calculated from the measured values based on the correlation equation, the analysis results of the conventional method and the improved method were in agreement, and furthermore, the VNTR typing resolution was improved by the addition of six loci. By using this 24-locus VNTR method, more detailed molecular epidemiological information on the strains can be rapidly provided to public health centers and administrative departments, which is expected to contribute to epidemiological surveys and promotion of infection prevention measures.