

## 結核菌 VNTR(Variable Numbers of Tandem Repeats)法の分子疫学解析

### 1. はじめに

結核は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による感染症であり、世界的に公衆衛生上の重要な問題となっている。日本における結核患者発生報告は近年減少傾向にあるものの、2019年には14,460人の新たな結核患者が報告されており、罹患率(人口10万対)は11.5と結核中蔓延国(罹患率10以上)に位置づけられている。結核菌に対する病原体サーベイランスとして、愛知県では2016年9月から「愛知県結核菌の遺伝子型別検査事業」においてJATA(Japan Anti Tuberculosis Association)12領域を対象としたVNTR(Variable Numbers of Tandem Repeats)法による解析を実施してきた。2020年10月からJATA12領域に、JATA15領域に含まれる3領域(QUB-18、QUB-11a、ETR A)、超多型領域3領域(QUB 3232、VNTR 3820、VNTR 4120)

及びSupply15領域に含まれる6領域の計12領域加えた24領域(表1)を解析対象としたので、分子疫学的手法としてのVNTR法及び一部領域で使用が推奨されているキャピラリーシーケンサー(CES)を用いたフラグメント解析を解説する。

### 2. VNTR法

VNTR法はPCRを基礎とした解析法であり、結核菌染色体上に多数存在する単一配列が繰り返し存在する領域について、その繰り返し数の違いを基に菌株を型別する方法である。VNTR法の中でもJATA12領域は国内で分離頻度の高い北京型において分解能が高いことから、現在、国内標準法となっている。ここでは、当所において実施しているJATA12 VNTR法の実際の作業工程を紹介する。

表1 VNTRセットで用いられるVNTR領域

Locus	424	960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156
領域名	Mtub04	MIRU 10	Mtub21	Mtub24	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	QUB 15	MIRU 31	QUB 3336	QUB 26	QUB 4156
JATA12	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
JATA15	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Supply15	○	○	○		○		○		○		○	○
超多型領域												

Locus	1982	2163	2165	3232	3820	4120	577	580	802	1644	2401	3690
領域名	QUB-18	QUB 11a	ETR A	QUB 3232	VNTR 3820	VNTR 4120	ETR C	MIRU 4	MIRU 40	MIRU 16	Mtub30	Mtub39
JATA12												
JATA15	○	○	○									
Supply15			○				○	○	○	○	○	○
超多型領域		○		○	○	○						

### (1) DNA 抽出 (テンプレート作製)

結核菌は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)において、バイオセーフティレベル (BSL) 3 に分類されているため、生菌を取り扱う際には BSL3 対応の実験室において、必ずガウン (白衣)、N95 マスク、ロング手袋などの個人防護具を装着する。また、作業前に、安全キャビネットの気流を安定させておくことや、適切な作業スペースの確保といった準備が重要となる。

菌株数と同数の 1.5 mL チューブを用意し、それぞれに蒸留水 200  $\mu$ L を分注する。小川培地などの固形培地からは、10  $\mu$ L ループを用いて結核菌を掻き取り、慎重に懸濁する。MGIT などの液体培地の場合は使い捨てピペットを用いて培地の底に沈殿した菌体を吸い取り、チューブへ移す。菌の懸濁工程や液体培地からチューブへの移行はエアロゾルの発生によって菌体が飛散する可能性があるため、注意を要する。菌懸濁後、1.5 mL チューブをヒートブロックにて 100°C、10 分間加熱し、13,000 rpm にて 3 分間遠心する。上清を PCR のテンプレートとして使用する。加熱により、チューブ内外の結核菌は死滅するので、以下の操作は通常の実験室にて実施する。

### (2) PCR

PCR 反応は用いる試薬やサーマルサイクラーの機種によって増幅効率が異なることが知られている。当所では、試薬は *TaKaRa ExTaq* Hot Start Version 及び *TaKaRa 2x GC buffer I* を、サーマルサイクラーは Applied Biosystems Veriti™ を使用している。2 mL チューブに表 2 に従い、100 反応分のマスターミックスを作製する。JATA12 VNTR 法を実施する際には 1 検体

あたり 12 反応分のマスターミックスが必要になること、ピペット操作による試薬の損失を補填する分量の試薬調整をする必要があるため、100 反応分のマスターミックスは 8 検体分に相当する。マスターミックスを 180  $\mu$ L ずつ 96well PCR プレートの端の列に分注し (図 1a)、A から H のウェルにテンプレートをそれぞれ 24  $\mu$ L 加え、ピペッティングする (図 1b)。8 連マルチチャンネルピペットを用いて、17  $\mu$ L ずつ分注し (図 1c)、対応するプライマーミックス (3  $\mu$ M each、反応液中最終濃度 0.45  $\mu$ M each) を 3  $\mu$ L ずつ加え (図 1d)、総容量 20  $\mu$ L で PCR を実行する。反応条件は 94°C 5 分 {94°C 30 秒 63°C 30 秒 72°C 1 分 30 秒} 35 サイクル 72°C 7 分で、JATA3 及び JATA5 はプライマーの融解温度が低いため、アニーリング温度を 63°C から 60°C へ変更して実施している。

### (3) 電気泳動

キャピラリー電気泳動装置 (QIAxcel Advanced System 等) やアガロースゲル電気泳動により、PCR 増幅産物の有無及び増幅産物のサイズを確認する。キャピラリー電気泳動装置は高感度なため、PCR 産物を適宜希釈して泳動を実施する。当所では QIAxcel DNA High Resolution Kit (アラインメントマーカー: QX Alignment Marker 15 bp/3 kb) を用い、泳動条件 OM1700 にて泳動後、QIAGEN 社から配布された陽性コントロールを基に、増幅産物サイズを決定している。得られた増幅産物サイズからリピート 0 のサイズを引き、リピートユニットサイズで除することで、リピート数としている。増幅産物が確認できなかった場合は、希釈により検出できなくなった可能性を考慮し、PCR からやり直している。

表 2 JATA12 VNTR 法 PCR 試薬の組成

各試薬名	$\mu$ L /反応	$\mu$ L /100反応	反応液中終濃度
TaKaRa 2xGC buffer I	10	1000	1x
dNTP混合液 (各2.5 mMを含む)	2	200	0.25 mM each
滅菌精製水	2.9	290	-
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ $\mu$ L)	0.1	10	0.5 U

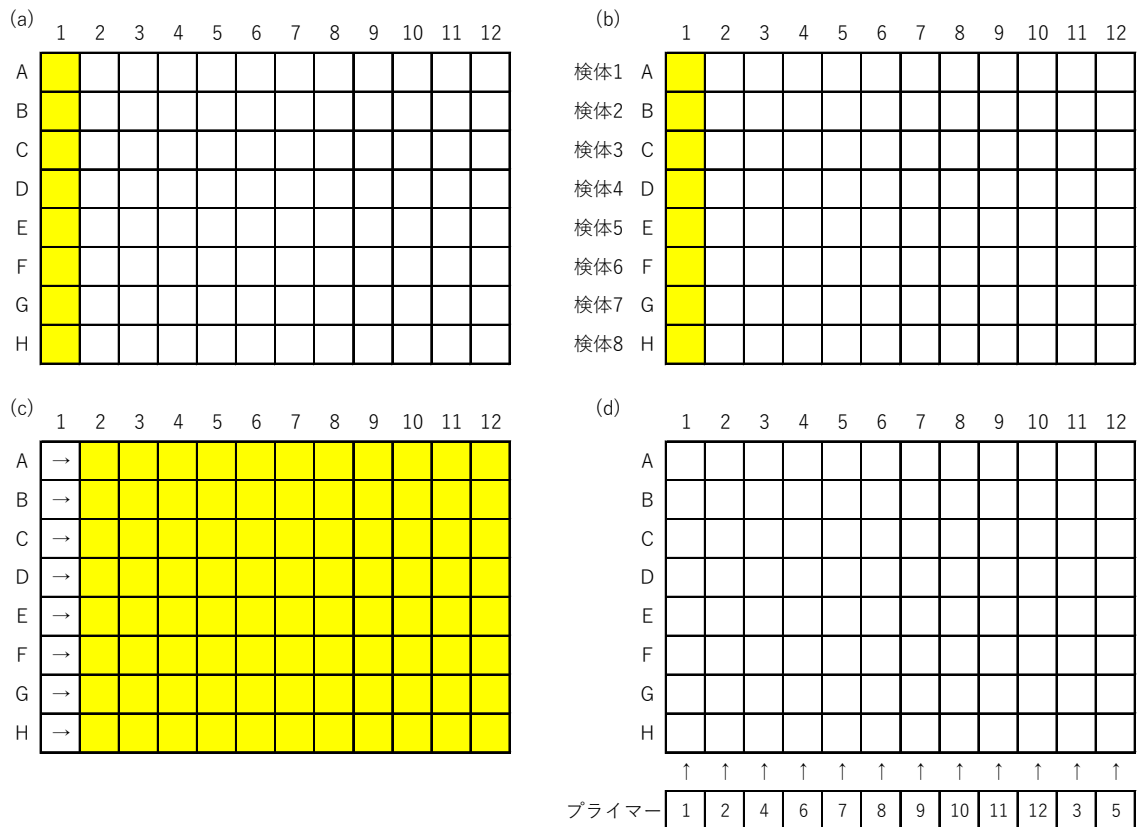


図1 JATA12 VNTR 法 PCR の方法概略図

(a)1列のウェルに  $180\mu\text{L}$  ずつマスターミックスを分注する。(b)A行からH行のウェルにテンプレートを各  $24\mu\text{L}$  添加し、ピペッティングする。図中では例示として、検体1から検体8としてある。(c)1列のウェルから2から12列のウェルへ、マスターミックスとテンプレートの混合物を  $17\mu\text{L}$  ずつ分注する。(d)12連チューブに分注したプライマーミックス ( $3\mu\text{M}$  each) をA行からH行のウェルに  $3\mu\text{L}$  ずつ添加し、遠心後サーマルサイクラーにセットする。プライマーの数字は JATA ナンバーであり、JATA3 及び JATA5 はアニーリング温度を変更するため、右端に配置してある。

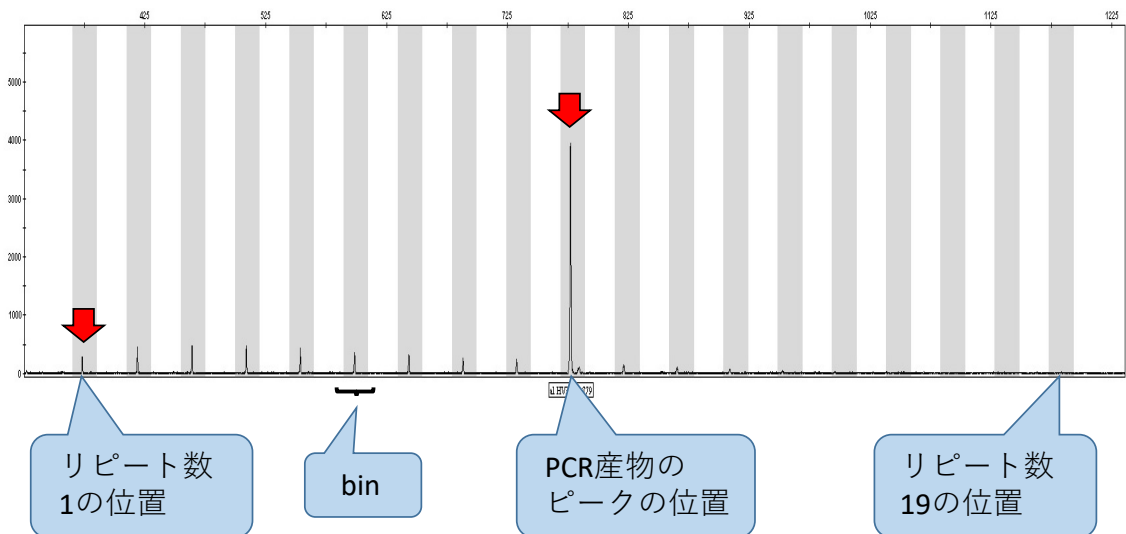


図2 bin set を用いたフラグメント解析実施例

グレーの部分が各リピート数の理論値のサイズ値 $\pm 10\text{ bp}$  (bin) となっている。一番左がリピート数1の bin、一番右がリピート数19の bin である。bin 中にピークがあれば、該当リピート数と判定する。図中、赤矢印はリピート数が10となる。

### 3. フラグメント解析

JATA12 領域は PCR 産物が高分子となる領域が少ないことから、「2. VNTR 法 (3) 電気泳動」で示したとおり、アガロースゲル電気泳動や QIAxcel (QIAGEN 社) や MultiNA (島津製作所) といったキャピラリー電気泳動装置を用いて、反復数を識別することが可能である。より高い分解能が要求される菌株については、多様度の高い領域 (QUB 18、QUB 3232、VNTR 3820、VNTR 4120) を追加して、菌株の異同を判定する必要がある。しかし、これらの領域では、PCR 産物が高分子となることから、JATA12 領域と同様の方法では反復数を決定することが難しいため、電気泳動の際にキャピラリーシーケンサー (CES) によるフラグメント解析を用いて反復数を決定することが推奨されている。フラグメント解析とは蛍光標識した PCR 産物及びサイズスタンダードを同時に CES で泳動し、サイズスタンダードから泳動時間とサイズ値の相関を示す検量線を引き、実際のサンプルのピーク位置を検量線で計算しサイズ値を求める方法である。得られたサイズ値からのリピート数決定方法は、bin set を用いた解析が一般的に使用され、各リピート数の理論値のサイズ値 $\pm$ 10 bp の幅を bin とすることで、この幅の間にピークが存在すれば、その幅を示すリピート数が該当リピート数となる (図 2)。しかし bin set を用いたフラグメント解析では、機器や試薬の状態によってサイズ長にずれが生じることがあり、リピート数を誤判定する可能性があるため、注意が必要である。

当所においては、誤判定の可能性を低くするために、回帰分析を用いたリピート数決定も行い、bin set を用いた解析結果との比較も実施している。回帰分析とは求めたい値を Y 軸、既知の値を X 軸におき、既知の Y 及び X から回帰直線式を作成後、X の値を代入することで Y の値を求めることである。結核の場合は、リピー

ト数既知株 4 検体を CES で同時に泳動することで回帰直線式を作成する。作成した回帰直線式にリピート数未知検体のサイズ値を X とし、代入することで、リピート数 Y を求めている。Microsoft Excel には回帰直線の傾きを求めることができる SLOPE 関数や回帰直線の切片を求めることができる INTERCEPT 関数、回帰分析を可能にする TREND 関数や FORECAST 関数の機能が搭載されているので、これらの機能を活用することで、回帰分析の実施が容易となる。

### 4. 終わりに

結核菌の分子疫学解析を実施することで、疫学調査から推定された感染経路の科学的根拠、集団感染事例の追跡、未知の感染経路の探知、散发事例であることの確認、接触者健診の範囲の確定等が可能になるため、公衆衛生上重要である。また、分子疫学解析を実施・運用する前提条件として検査の精度保証が重要となる。結核菌の分子疫学解析の現在の主流は VNTR 法であり、今後も外部精度評価に積極的に参加する等により、検査精度を維持していく必要がある。

### 5. 参考文献

- 1) 結核菌 VNTR ハンドブック 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編第一版 (2012 年 10 月編)
- 2) 結核菌 VNTR ハンドブック 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編追補版 (2014 年 3 月編)
- 3) 結核分子疫学調査の手引き 第一版 (2017 年 7 月)
- 4) 結核菌病原体サーベイランスの実践 第一版 (2017 年 7 月)
- 5) 抗酸菌検査ガイド 2020 日本結核・非結核性抗酸菌症学会 南江堂

(文責：生物学部 山田和弘)

---

愛知衛研技術情報 第45巻第1号 令和3年(2021)年 5 月 11 日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号

愛知県衛生研究所のホームページ【 <https://www.pref.aichi.jp/eiseiken/> 】

総務課 :	052-910-5618	生物学部	052-910-5654
企画情報部		ウイルス研究室 :	052-910-5674
健康科学情報室 :	052-910-5619	細菌研究室 :	052-910-5669
		医動物研究室 :	052-910-5654
		衛生化学部	052-910-5638
		医薬食品研究室 :	052-910-5639
		生活科学研究室 :	052-910-5643

代表電話 : 052-910-5618

代表 FAX : 052-913-3641

---