

キャピラリー電気泳動シーケンサーを用いた結核菌 VNTR 解析法の検討

Investigation of *Mycobacterium tuberculosis* VNTR analysis method using capillary electrophoresis sequencer.

目黒 響子 福田 千恵美 関 和美 岩下 陽子
Kyoko MEGURO Chiemi FUKUDA Kazumi SEKI Yoko IWASHITA

要 旨

当センターでは、平成31年4月1日より施行された香川県結核菌分子疫学的調査実施要領に基づき、患者より分離された結核菌に対して反復配列多型(VNTR)解析を実施している。従来はJATA(12)-VNTRでPCRを行い、アガロースゲル電気泳動法を用いてその増幅産物の反復数の算出を行っていたが、今回24領域でキャピラリー電気泳動シーケンサーを用いた手法について検討を行った。キャピラリー電気泳動シーケンサーではPCR増幅産物のDNAサイズの測定値と理論値に差が生じるという報告があり、当センターでも実測値と理論値に差が生じたため、既知株を用いてbinの値を補正した。補正後に別の既知株を用いて確認を行ったところ、正しいbinに入ることを確認した。

従来のアガロースゲル電気泳動法ではDNAサイズの判別が難しかった領域やスタッターピークが多く出現する領域での判別能向上が期待できる。

Abstract

In Kagawa Prefecture, repeat sequence polymorphism (VNTR) analysis is being conducted on *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in accordance with the Kagawa Prefecture Tuberculosis Molecular Epidemiological Surveillance Implementation Guidelines, which came into effect on April 1, 2019. In the past, PCR was performed using JATA(12)-VNTR, and the number of repeats of the amplified product was calculated using agarose gel electrophoresis. It has been reported that capillary electrophoresis sequencers show a difference between the measured and theoretical values of DNA size of PCR amplified products, and since there was a difference between the measured and theoretical values at our center, we corrected the Bin value using a known strain. After correction, another known strain was used for confirmation, and it was confirmed that the correct Bin was entered.

The conventional agarose gel electrophoresis method is expected to improve discrimination in regions where it is difficult to discriminate DNA size, or where many stutter peaks appear.

キーワード：結核菌 VNTR 解析 キャピラリー電気泳動シーケンサー

I はじめに

結核は結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex ただし *Mycobacterium bovis* BCG を除く) による感染症であり、感染症法における届出対象疾患の二類に分類され、診断後直ちに届出なければならない全数報告の疾患である¹⁾。

当センターでは、平成31年4月1日より施行された香川県結核菌分子疫学的調査事業実施要領²⁾に基づき、感染源・感染経路等の究明と、結核の発生予防並びに感染拡大防止対策の資料とすることを目的とし、結核患者から

分離された結核菌について反復配列多型 (Variable Number of Tandem Repeat : VNTR) 解析を実施している。当センターの従来の解析方法では、DNAの鋳型を抽出し、PCRで目的の領域を増幅した後、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リピート数の算出を行っていた。しかし、アガロースゲル電気泳動では、目視でDNAサイズを判別するため検査員の間で差が生じる可能性があるほか、24領域解析する場合に1検体につきPCRと泳動を24反応分行う必要があり、多くの操作手順を必要とした。今回作業の効率化と判別能向上を目的

表1 外部精度評価にて分与された株のVNTR型

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	HV					Supply				
	Mtub04	MIRU10	Mtub21	Mtub24	QUB11b	V2372	MIRU26	QUB15	MIRU31	QUB3336	QUB26	QUB4156	QUB18	QUB11a	ETR-A	QUB3232	VNTR3820	VNTR4120	Mtub39	MIRU40	MIRU04	Mtub30	MIRU16	ETR-C	
H37Rv	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	2	3	4	3	2	5	1	3	2	2	4	2	4	
2022年度																									
内部精度管理株A	4	5	3	2	4	10	4	5	10	8	5	10	9	4	9	5	6	3	3	2	2	4	2	4	
内部精度管理株B	2	2	0	3	4	2	5	4	3	20	8	3	0	5	2	15	3	3	1	2	4	2	3	3	
外部精度管理株1	3	3	3	4	7	3	8	5	5	8	2	5	9	8	4	10	12	10	3	3	2	4	4	4	
外部精度管理株2	4	3	4	3	5	4	7	4	5	5	6	3	9	5	4	12	14	10	3	3	2	4	3	4	
外部精度管理株3	1	4	8	3	7	1	2	4	4	5	7	2	10	11	4	1	9	4	2	2	5	2	3	4	
2021年度																									
内部精度管理株A	2	2	0	3	ND	2	5	4	3	8	7	3	3	>20	3	9	5	4	2	3	2	1	3	3	
内部精度管理株B	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	8	9	4	1	11	4	2	2	5	2	3	4	
外部精度管理株1	3	3	3	4	3	3	7	5	5	7	2	5	10	10	4	9	12	11	3	3	2	4	4	4	
外部精度管理株2	2	3	1	3	4	2	5	4	4	14	2	3	5	2	3	5	2	7	1	2	2	2	3	4	
外部精度管理株3	2	3	4	3	6	3	7	5	5	7	6	3	9	8	4	14	14	3	3	3	2	2	3	4	
2020年度																									
内部精度管理株A	1	3	2	3	5	3	5	4	5	7	9	3	7	5	4	14	14	10	3	1	2	3	3	4	
内部精度管理株B	2	2	2	2	3	2	4	4	3	7	8	3	5	>20	3	15	3	4	2	3	2	2	3	4	

にキャピラリー電気泳動シーケンサーを用いた VNTR 解析方法を検討した。

II 方法

1 試供検体

結核菌遺伝子型別外部精度評価にて分与された検体のうち、2022年度の6検体、2021年度のH37Rvを除く5検体、2020年度の2検体の計13検体をVNTR既知株として使用した(表1)。

2 検査方法

DNA 鋳型の調整は結核菌遺伝子型別外部精度評価にて配布された案内に従い、精製水を用いて1 ng/μLに調整した。

PCR 反応は結核予防会結核研究所のキャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法の標準作業手順書³⁾に準じて実施した。使用したプライマーと配列と Subset の組み合わせは表2の通りである。PCR 試薬は、2×GC Buffer I (タカラバイオ) 5 μL、Ex Taq Hot Start Version(タカラバイオ) 0.05 μL、dNTP Mixture 0.8 μL、精製水 0.15 μL にプライマー 2.4 μL、サンプル 1.6 μL を混合し計 10 μL とした。サーマルサイクラーを用いて 94°C1 分の後、94°C1 分、60°C1 分、72°C1 分を 30 サイクルしたのち、72°C3 分の条件で PCR 反応を行った。

PCR 増幅産物の subset *-1、*-2(*にはそれぞれ A~F が入る)を各 1 μL ずつ 23 μL の精製水と混合して 25 倍希釈混合液(A~F)を作成し、HiDi Formamide(Thermo Fisher Scientific) 8.6 μL と Gene Scan 1200LIZ 0.4 μL と希釈混合液 1 μL を混合し、95°C2 分間加熱処理後急冷した。

キャピラリー電気泳動シーケンサーは、SeqStudio Genetic Analyzer(Thermo Fisher Scientific)を用い、専用カートリッジ(キャピラリー長は 28 cm で、ポリマーは POP-1)を使用した。泳動後結果の解析は Gene Mapper 6.0(Thermo Fisher Scientific)を使用した。

表2 プライマー配列と Subset の組み合わせ

Subset名	領域	蛍光色素	プライマー名	配列
A-1	3232	FAM	FAM_3232_F	CCCCAGCCTTACGACTGA*
	(QUB3232)		3232_R	GTCCGGCTTGGTGAAGG
	4156	PET	PET_4156_F	CGTCCGAGCGACATCAC*
A-2	(QUB4156)		4156_R	AGGATCGAGCGGTCCAG
	0424		Mtub04_F	CTTGGCGGGCATCAAGCGCATTATT
	(Mtub04)	VIC	VIC_Mtub04_R	GGCAGCAGAGCCCGGGATTCCTC*
B-1	1955	NED	NED_1955_F	AGACGTCAGATCCAGTT*
	(Mtub21)		1955_R	ACCCGACAACAAGCCCA
	3820	VIC	VIC_3820_F	ACCTTCATCCCTGGCGAC*
B-2	(VNTR3820)		3820_R	TGCGCGGTGAATGAGACG
	2074	PET	PET_2074_F	TGTGTACCTGACGATTCCAAGG*
	(Mtub24)		2074_R	TGGCCGGCAAATAATGGATGC
C-1	2372	NED	NED_2372_F	AGGTGAGGATCGGGTTGG*
	(VNTR2372)		2372_R	ACCACGGTTCAAGAACCAG
	3155	FAM	FAM_3155_F	GCCAGCCGTAACCCGACCCAG*
C-2	(QUB11b)		3155_R	GGCCCGAAATTCGACGTGG
	3336	FAM	FAM_3336_F	CCACCGGATCCAGGAAT*
	(QUB3336)		3336_R	CGGGATTCACCCAGTCTC
D-1	0960		MIRU10_F	GTTCTTGACCACTGCAGTCGTCC
	(MIRU10)	NED	NED_MIRU10_R	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT*
	2996		MIRU26_F	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC
D-2	(MIRU26)	PET	PET_MIRU26_R	CATAGGCGACCCAGCGAATAG*
	3192		MIRU31_F	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA
	(MIRU31)	VIC	VIC_MIRU31_R	GTGCCGACGTGGCTTTGAT*
E-1	2163a	FAM	FAM_11a_F	CGTGATGTTGATCGGGATGT*
	(QUB11a)		11a_R	ACCCTGGAGTCTGGGCATC
	4120	NED	NED_4120_F	GTTCAACCGAGCCAAACC*
E-2	(VNTR4120)		4120_R	GAGGTGGTTTCGTGTGTCG
	2163b	VIC	VIC_11b_F	CCGATGATAGCCCGTGAAGA*
	(QUB11b)		11b_R	AGGGTCTGATTGGCTACTCA
F-1	4052	PET	PET_4052_F	GAGGTATCAACGGGCTTGT*
	(QUB26)		4052_R	GAGCCAAATCAGGTCCGG
	1982	VIC	VIC_Q18_F	ATCGTCAGCTGCGGAATAGT*
F-2	(QUB18)		Q18_R	AATACCGGGGATATCGGTTTC
	0580	FAM	FAM_MIRU04_F	GCGGAGAGCCCAACTGC*
	(MIRU04)		MIRU04_R	GCCGACGAGAAACGTGACG
F-2	0802	NED	NED_MIRU40_F	GGGTGCTGGATGACAACTGT*
	(MIRU40)		MIRU40_R	GGGTGATCTCGGCAATCAGATA
	1644	PET	PET_MIRU16_F	TCGGTATCGGGTCCAGTCCAAGTA
F-2	(MIRU16)		MIRU16_R	CCCGTGTGCAGCCCTGGTAC*
	0577	NED	NED_ETR_C_F	GTGAGTCGCTGCAACAACCTGCAG*
	(ETR_C)		ETR_C_R	GGCGTCTTGACCTCCACGAGT
F-2	2165	FAM	FAM_ETR_A_F	AAATCGGTCCCATCAGCTTCTTAT*
	(ETR_A)		ETR_A_R	CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
	2401	VIC	VIC_Mtub30_F	CTTGAAGCCCGGTCTCATCTGT*
F-2	(Mtub30)		Mtub30_R	ACTTGAACCCCAACGCCATTAGTA
	3690	PET	PET_Mtub39_F	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC*
	(Mtub39)		Mtub39_R	TAGAGCCGACGGGGAAAGCTTAG

III 結果

1 理論値との比較

初めに結核菌遺伝子型別外部精度評価にて 2022 年度に分与された6検体と2020年度に分与された2検体をキャピラリー電気泳動シーケンサーを用いて分析した。結核予防会結核研究所より配布された Bin セットを使用し Gene Mapper 6.0にて解析したが、設定されている bin に入らない領域が複数あった。そこでリポート数を x 軸、測定した増幅産物のサイズを y 軸に散布図を作成し近似直線を求めた。次に、求めた近似直線を検量線として各領域の DNA サイズ

を計算し、bin の値を補正した。なお、理論値の DNA サイズと検量線より求めた実測値のサイズは表 3 の通りである。1200 bp を超えるサイズについてはマーカーの範囲外のため bin の設定は不可能であった。近似直線の作成に用いていない 2021 年度に外部精度評価にて分与された、H37Rv を除く 5 検体を解析したところ、内部精度管理株 A の QUB11a を除くすべての領域で既知のリピート数と一致した。また、内部精度管理株 A の QUB11b の領域は設定した bin 中に大きなピークが見られないことを確認した(図 1)。QUB11a 領域については、リピート数 >20 となっているが、キャピラリー電気泳動シーケンサーによる解析では明らかなピークが確認できなかった。

2 アガロースゲル電気泳動との比較

アガロースゲル電気泳動による解析では、1 検体の場合 PCR に約 2 時間、泳動時間は 45 分～1.5 時間、染色と脱色に約 1 時間であった。キャピラリー電気泳動シーケンサーを用いた解析では、1 検体の場合 PCR に約 2 時間、泳動に約 4 時間であった。

アガロースゲル電気泳動でスタッターピークが確認される領域が複数あったが、キャピラリー電気泳動シーケンサーでの解析においても複数領域でスタッターピークが確認された(図 2)。

IV 考察

結核菌の VNTR 解析における PCR 産物のサイズ測定の方法は、アガロースゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動シーケンサー、マイクロチップ電気泳動装置などがある。キャピラリー電気泳動シーケンサーは高い分析精度と再現性から、結核菌遺伝子型別外部精度評価に参加した施設において 2022 年度の調査ではシーケンサーを使用する施設がアガロースゲル電気泳動よりも多い結果となる⁴⁾等、多くの施設で導入が進められている。当センターでも試薬等を準備し解析を行ったが、氏家ら⁵⁾や前田ら⁶⁾の報告にあるように、既知株の実測値と理論値では、差がみられる領域が多かった。特に超可変領域である QUB3232、VNTR3820、VNTR4120 においては繰り返し単位の塩基数が理論値に比べて差が大きく、最も差が大きかった QUB3232 領域では約 14 bp の差となった。bin は理論値のサイズ±10 bp で設定されており、理論値における Bin セットを使用するとリピート数が多くなるほど理論値から大きく外れていき、正しい bin に入らなくな

ることが予想された。また、キャピラリー電気泳動シーケンサーによる泳動では測定に使用する機器の種類やリマー、バッファー、キャピラリーの劣化状況などにより PCR 産物の測定結果が変動することがわかっている³⁾。そのため、今回のような導入時のみでなく、カートリッジやバッファーの交換時にはポジティブコントロールとして既知株を用いて確認をする必要があるほか、bin の設定値とずれが生じる場合、その都度既知株を用いて bin の設定値を補正する必要があると考えられた。

アガロースゲル電気泳動では、スタッターピークの多く出現する QUB18 領域において、以前最も濃いバンドを目視で判定するのに苦慮したことがあった。キャピラリー電気泳動シーケンサーでは、Height として数値で判別できるため、スタッターピークと真のピークの判別がより正確に可能となった。また、1000 bp を超えるサイズにおいても数値化して判定できるため、アガロースゲル電気泳動よりも精度の高い分析結果を得られた。しかし、今回確認に用いた 2021 年内部精度管理株 A のようにある領域で欠損している場合や 1200 bp を超える可能性が考えられる場合は、キャピラリー電気泳動シーケンサーだけでは判別ができないため、アガロースゲル電気泳動を併用することが必要であると考えられた。

SeqStudio は 4 ウェル毎に泳動を行うため、1 検体に必要な 6 反応、つまり 6 ウェルでは泳動に 4 時間必要であった。泳動時間のみで比べると、アガロースゲル電気泳動より時間がかかる結果となった。しかし、PCR 反応や泳動に伴う操作においては、キャピラリー電気泳動シーケンサーでは PCR 反応が 12 反応分かつ泳動も 6 反応分で済み、それぞれ 24 反応分必要なアガロースゲル電気泳動に比べ非常に簡便になった。アガロースゲル電気泳動では一つの領域ごとに目視でサイズを測り、リピート数を決定していたため、リピート数の判定に時間もかかるうえ検査員によって差が生じる可能性があった。現在検査員間で判定したリピート数が違った場合は、より長時間泳動し再検を行っているが、キャピラリー電気泳動シーケンサーによる泳動ではリピート数の判定において検査員間で誤差が生じることがなく、判定にかかる時間が大幅に削減されることが期待される。

今後の課題として、今回は精度管理株のみでしか検討できていないため、臨床株を用いた検討を行う必要がある。

V まとめ

今回キャピラリー電気泳動シーケンサーによる VNTR 解析方法を検討した。既知株を用いて bin の値を補正することにより、ピークが正しい bin に入ることが確認され、分解能も向上した。しかし、遺伝子領域の欠損や 1200 bp を超えるサイズの遺伝子が考えられる場合はアガロースゲル電気泳動を併用する必要があると考えられた。実用に向けて今後は臨床株を用いて検討を行っていききたい。

文献

- 1) 結核予防会結核研究所:結核分子疫学調査の手引き 第一版 2017年7月, <http://www.jata.or.jp/law.php> (2023/7/3 閲覧)
- 2) 香川県薬務感染症対策課長通知:香川県結核菌分子疫学的調査事業実施要領の制定について, 30 薬感 第61533-3号(平成31年3月7日)
- 3) 結核予防会結核研究所:SOP(Standard Operating Procedure)キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌 VNTR の標準作業手順書 Version:no. 1.01 2021/Mar./22, https://jata.or.jp/dl/pdf/data/SOP_VNTR_v1.1_20230510.pdf (2023/7/3 閲覧)
- 4) 御手洗聡, 村瀬良朗, 有川健太郎:結核菌 VNTR 解析の外部評価に関する報告書(2022年度)
- 5) 氏家絢子, 他: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, 愛媛県立衛生環境研究所年報, 23, 11-19, (2022)
- 6) 前田詠里子, 他:Variable number of tandem repeat (VNTR)法を用いた結核菌の遺伝子型別-繰り返し回数算出における基礎検討-, 福岡県保健環境研究所年報, 40, 63-68, (2013)

表3 理論値および実測値のサイズ

番号	領域名	理論値	実測値
J01	Mtub04	537+51n	531.47+50.12n
J02	MIRU10	484+53n	478.32+51.018n
J03	Mtub21	210+57n	207.45+54.564n
J04	Mtub24	14+56n	25.822+52.701n
J05	QUB11b	202+69n	201.23+68.133n
J06	V2372	246+57n	251.79+46.35n
J07	MIRU26	285+51n	281.41+50.611n
J08	QUB15	71+54n	76.186+53.043n
J09	MIRU31	492+53n	488.1+51.079n
J10	QUB3336	194+59n	196.16+53.55n
J11	QUB26	324+111n	312.23+108.69n
J12	QUB4156	190+59n	185.91+57.418n
J13	QUB18	231+78n	226.41+78.884n
J14	QUB11a	171+69n	165.86+68.56n
J15	ETR-A	195+75n	191.13+75.6n
J16	QUB3232	182+56n	184.1+42.193n
J17	VNTR3820	273+57n	265.25+44.919n
J18	VNTR4120	333+57n	330.23+48.042n
J19	Mtub39	272+58n	270.88+46.372n
J20	MIRU40	354+54n	348.43+51.857n
J21	MIRU04	175+77n	172.17+74.972n
J22	Mtub30	247+58n	245.46+57.646n
J23	MIRU16	565+53n	558.69+51.311n
J24	ETR-C	44+58n	40.512+54.789n

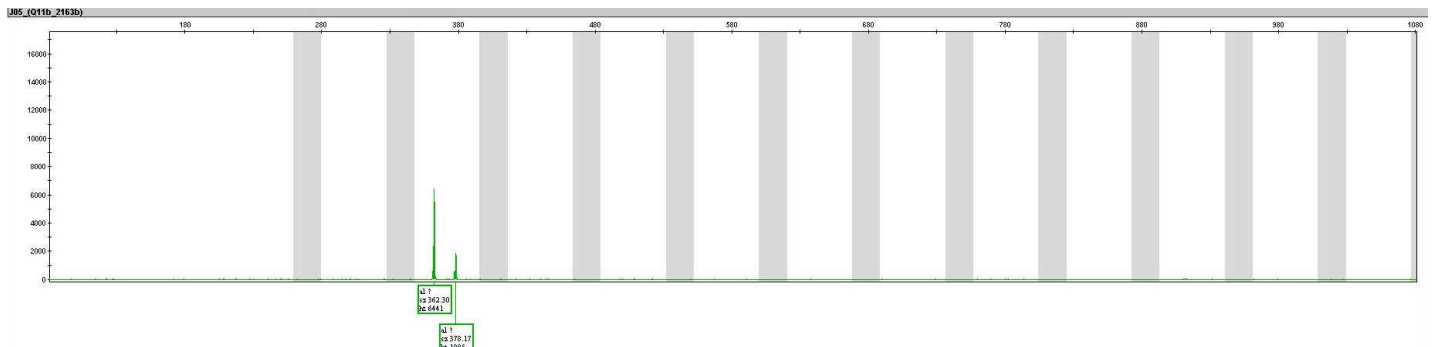


図1 2021年内部精度管理株AのQUB11b領域

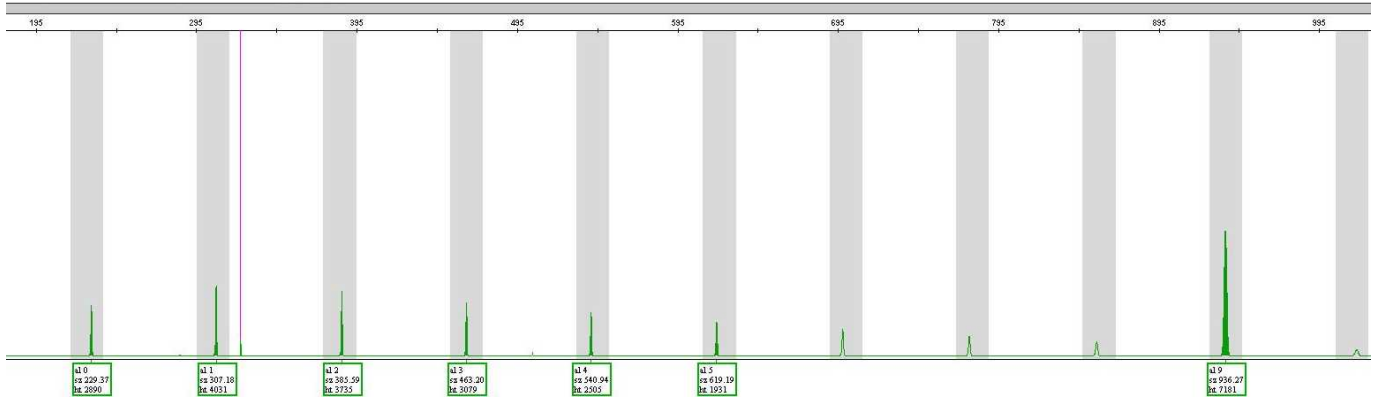


図2 スタッターピークが見られるQUB18領域