

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)

結核菌 VNTR ハンドブック追補版 目次

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

7. VNTR 型別における反復数傾向	P2-4
8. VNTR 型別における異同判定の考え方	P5-7
9. サイジングの際のトラブル	P8-14

7. VNTR 型別における反復数傾向

【要旨】

一般的に反復配列領域の繰り返し数は、塩基配列の突然変異とは異なって可逆的に変化するため、単純に遺伝系統の分子マーカーとして利用することはできない。しかしながら、結核菌株（特に北京型結核菌）においては一定の傾向が認められ、かなりの精度で個々の VNTR 型別から菌株の系統を推定することができる。こうした情報を個々の菌株データに当てはめることにより、より正確かつ詳細な異同判定が可能となるだろう。

・日本国内における結核菌系統について

国内で分離される結核菌株は、地域に関わらず約 7~8 割が「北京型結核菌」に属する。日本の北京型結核菌は MLST 型別 (Multi-locus sequence typing: 菌株の SNPs によって分類する型別/系統解析手法) に基づくと 8 種類の ST 型が分類される。これらは各型の出現頻度から、5 つの系統群に分類できる。

- ・ ST11/26 群 ┌
- ・ STK 群 |
- ・ ST3 群 | … 祖先型 (Ancient 型)
- ・ ST25/19 群 └

- ・ ST10, ST22, ST8 群 … 新興型 (Modern 型)

ST 分類に関する参考論文は以下の通り。

Filliol I et al. (2006) Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol.* 188(2):759-72.

Nakanishi N et al. (2013) Evolutionary robust SNPs reveal the misclassification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains into sublineages. *Infect Genet Evol.* 16:174-7.

和田崇之、前田伸司. (2011) ゲノム配列にもとづく結核菌群の発生と進化の理解. *化学療法領域.* 27(8): 25-31.

・各系統に特徴的な VNTR 型について

これまでの型別データ蓄積から、上記の北京型 5 系統には全国的に共通した VNTR 傾向があることがわかってきた。こうした型別傾向を把握することは、VNTR 型から菌株の異同を判断する上で有効である。

※VNTR は一定頻度で変異するため、数か所程度のずれは頻繁に起こる点を考慮しつつ、あくまでも傾向として捉えるべきものである。

※ST 系統分類は点変異に基づいて定義され、VNTR 型別によるものではないことにも注意する。VNTR 型別の変異は可逆的であるため、特定の系統を支持できない。本稿において呈示された VNTR 型別と系統分類の相関性は、国内株の共通傾向として考えること。

VNTR 領域	ST11/26	STK	ST3	ST25/19	Modern (ST10, ST22, ST8)	北京株の 頻出型	多様度	H37Rv
<i>t04 (J01)</i>						4	低	2
<i>M10 (J02)</i>			1			3	低	3
<i>t21 (J03)</i>					4	3	低	1
<i>t24 (J04)</i>			2			2~4	中	4
<i>Q11b (J05)</i>		2~3				5~8	高	5
<i>2372 (J06)</i>						3~4	低	2
<i>M26 (J07)</i>		一部 2				7	中	3
<i>Q15 (J08)</i>	2					4	低	4
<i>M31 (J09)</i>						5	中	3
<i>3336 (J10)</i>						7	中	8
<i>Q26 (J11)</i>				一部 2		8~10	高	5
<i>4156 (J12)</i>	4	4	5	5	3	3~5	低	3

表 1 JATA(12)-VNTR 型別における各領域の反復配列と北京型結核菌の系統群の関係性.

表 1 に北京型結核菌において系統の指標となりうる反復数を纏めた。各系統の指標反復数以外は他系統と同等の傾向を示すため、これらの情報を合わせることによって 12 領域全体の傾向から北京株であることを判定できる。J05 は多様性が高く、STK 群を除いて 2~9 と様々な値をとる。J12 は系統指標に役立つが、各系統群内での移動度は低い。

多様度は、各系統内での変動度を示した。各系統内では中~高の領域で株ごとにバリエーションが見られることが多い。

VNTR 反復数と北京型結核菌の系統に関する参考論文は以下の通り。

Wada T & Iwamoto T. (2009) Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family. *Infect Genet Evol.* 9 (5): 921-926.

・ 北京型結核菌に特徴的なVNTR型について

JATA(12)-VNTR で用いられる 12 領域は、国内の北京型結核菌で特に分解能が高まる設計のため、単独で北京型株の特徴となる領域は含まれていない。上述の傾向を踏まえながら、追加領域（特に国際標準領域）において頻出型に近いパターンを示す株は北京株と考えるよい。

※VNTR は一定頻度で変異するため、数か所程度のずれは頻繁に起こる点を考慮しつつ、あくまでも傾向として捉えること。

VNTR 領域		ST11/26	STK	ST3	ST25/19	Modern (ST10, ST22, ST8)	北京株の 頻出型	多様度	H37Rv
Supply's international	M04						2	低	3*
	M16				一部4		3	低	2
	M40						3	低	1
	ETR A*						4	低	3
	ETR C						4	低	4
	t30		2				2 or 4	低	2
	t39						3	低	5
Additional loci	Q11a*						5~9	高	2
	Q3232						—	高	4
	3820						—	高	3
	4120						—	高	2
	Q18*						8~10	中	5

表 2 追加領域 (12 か所) VNTR 型別における各領域の反復配列と北京型結核菌の系統群の関係性.

追加領域の選択はここに挙げた 12 領域以外にも存在し、それらが菌株の型別分解に寄与する可能性は常にある。Supply's international 領域は北京株において変動が少なく、菌株の分解能に寄与することは少ないが、逆に北京型か否かの判断基準として利用することが可能である。

(長崎大学熱帯医学研究所国際保健学分野 和田 崇之)

8. VNTR 型別における異同判定の考え方

・集団事例解析(実地疫学が前提)とサーベイランス(実地疫学情報無し)における違い

VNTR 型別に使用する領域の選別により、国内臨床分離株の異同判定は高い精度で実現可能になってきた。しかしながら、VNTR 型別の分解能には限界があり、同一株でも 1~複数の VNTR 領域が変化する場合もあれば、逆に異なる株が型別一致となるケースもある。患者間の疫学的リンクを前提とした場合、遺伝型別による異同判定は精度の高い結果をもたらす。しかし、疫学情報が得られない場合、特に結核分子疫学サーベイランスの場合には、その解釈に特に注意を要すると考えるべきである。

右図は結核菌株の型別一致における両目的での考え方の違いを模式的に示したものである。複数の患者に何らかの疫学的リンクがあり、集団事例疑われた場合においては、分離株の型別一致は共通感染源の可能性を強く支持すると考えてよい。こうした場合は、用いる遺伝型別の分解能・精度が低くても十分な根拠として活用できる (A)。一方、サーベイランスの場合には実地疫学による事前情報が無いため、遺伝型別一致のみが菌株の異同判定を行う根拠となってしまう (B)。このような時は、分解能を可能な限り高めて異同判定を厳しく見積もり、調査の対象を絞る必要があるだろう。

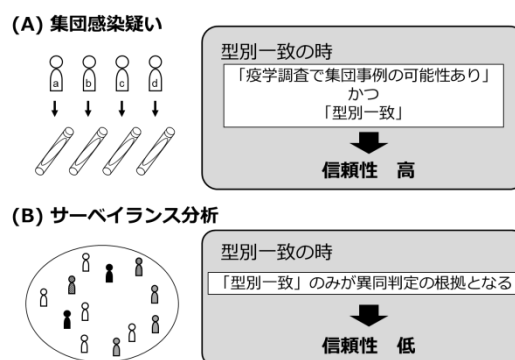


図. 結核分子疫学における実地疫学情報の有無と遺伝型別の考え方。

このように時は、分解能を可能な限り高めて異同判定を厳しく見積もり、調査の対象を絞る必要があるだろう。

以上の考察に沿ってVNTR型別を用いる場合、①疫学的リンクがある患者間の感染源調査の場合は、JATA(12)-VNTR型別のみでの十分な議論ができることが多い (注)。田丸ら (2013) の報告によると、12 領域のうち 11 領域の違いを感染源一致と考えることにより、ほとんどの事例において正しい結果が得られている。一方、②サーベイランス調査におけるJATA(12)-VNTR型別では、非常に多くの患者から同一型別株が分離され、それらに同一感染源の可能性を仮定することは困難である (和田ら、2013)。こうした場合には、より分解能が高いVNTR領域を追加解析し、厳しく異同判定を行うべきである。罹患率が低下し、分析対象数が少なくなった場合には、追加領域解析を含めた型別一致から未知の伝播経路を推定し、実地疫学調査にフィードバックさせる試みも可能になると期待される (瀬戸ら、2013)。

(注) ただし、地域的に高頻度に出現するVNTR型別には、なお注意を払うべきかもしれな

い。そのような型別が存在するか否かについては、あらかじめサーベイランス分析によって確認する必要がある。したがって、より高精度な感染源調査にはサーベイランス分析によるデータが重要な役割を担うこととなる。

集団事例解析における VNTR 型別に関する参考論文は、以下の通り。

田丸亜貴、他. (2013) 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(4): 399-403.

サーベイランスにおける VNTR 型別に関する参考論文は、以下の通り。

和田崇之, 他. (2013) 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基盤構築— JATA(12)-VNTR 型別に基づくクラスター形成とその傾向—, **結核**. 88(4): 393-398.

瀬戸順次, 他. (2013) 結核低蔓延地域における網羅的な結核菌反復配列多型 (VNTR) 分析の有用性. **結核**. 88(6): 535-542.

(長崎大学熱帯医学研究所国際保健学分野 和田 崇之)

[補足] 電気泳動に用いる機器について

アガロースゲル電気泳動は予想される PCR フラグメントサイズに応じて濃度を調節できるため、追加領域を含めた分析においても高精度な分析ができる。しかし、ゲルの作成や電気泳動に時間がかかるため、特に分析数が多い場合など、自動化によって作業コストを下げるのが期待される。

現在購入可能な電気泳動環境は、アガロースゲル電気泳動の他には、キャピラリー装置による電気泳動と DNA シーケンサーによるフラグメント解析が挙げられる。後者は解析精度が極めて高く、導入時の設定が困難であることを除けば、問題なく利用できる。これについては本ハンドブックの他章を参照されたい。

キャピラリー電気泳動は、ほとんどの機種において700 bp以上の分解能と再現性に問題を残すが、JATA(12)-VNTR の 12 領域においては、ある程度利用可能な状況となっている。以下、各機種に関する情報を挙げる。

・アジレントテクノロジー バイオアナライザ

<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=50>

・キアゲン QIAxcel

<http://www.qiagen.com/JP/AN-QX-VNTR1>

<http://www.qiagen.com/JP/AN-QX-VNTR2>

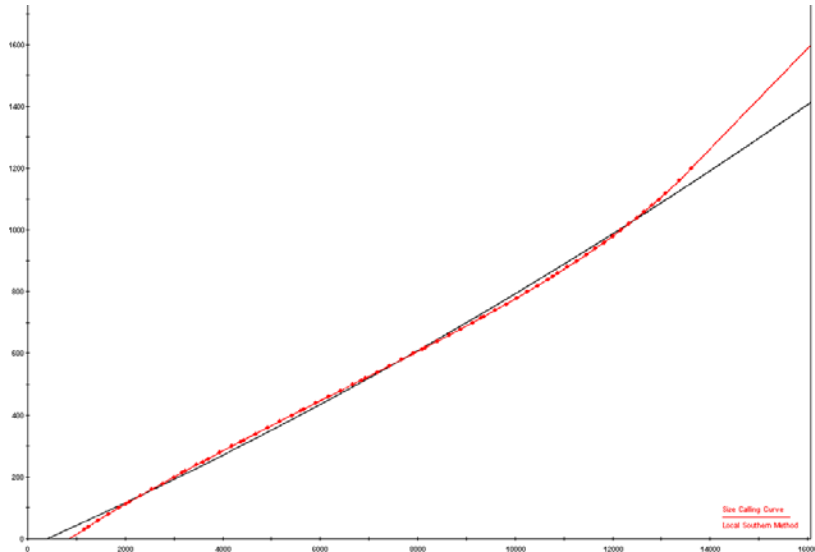
・島津製作所 MultiNA (マルチナ)

<http://www.an.shimadzu.co.jp/bio/mce/multina/index.htm>

9. サイジングの際のトラブル

1. internal control の影響

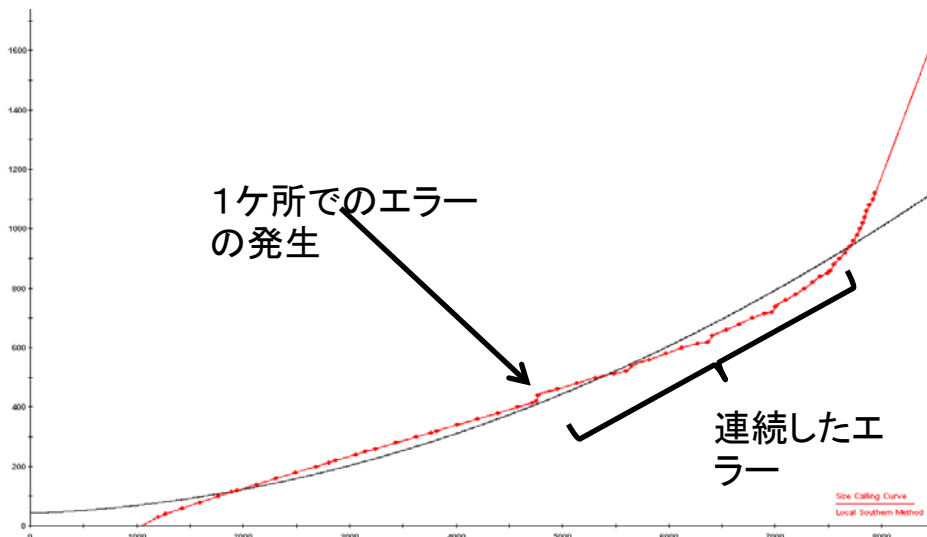
CESではinternal control に基づいてサンプルのサイジングが行われるので、なんらかの原因でinternal control が上手く機能しないと正確なサイジングが行えません。正確なassignが行われたinternal control のsize calling curveは以下の図のように高分子量領域の一部を除いて直線性が保たれています。



ABI Genetic analyzer 3130を使用

internal control のassignにエラーがある場合、通常は「SQ」値が低くなるためにエラーに気がつくことが可能ですが、size calling curve上のエラーの数が少ない場合は「SQ」がpassになってしまうことがあります。

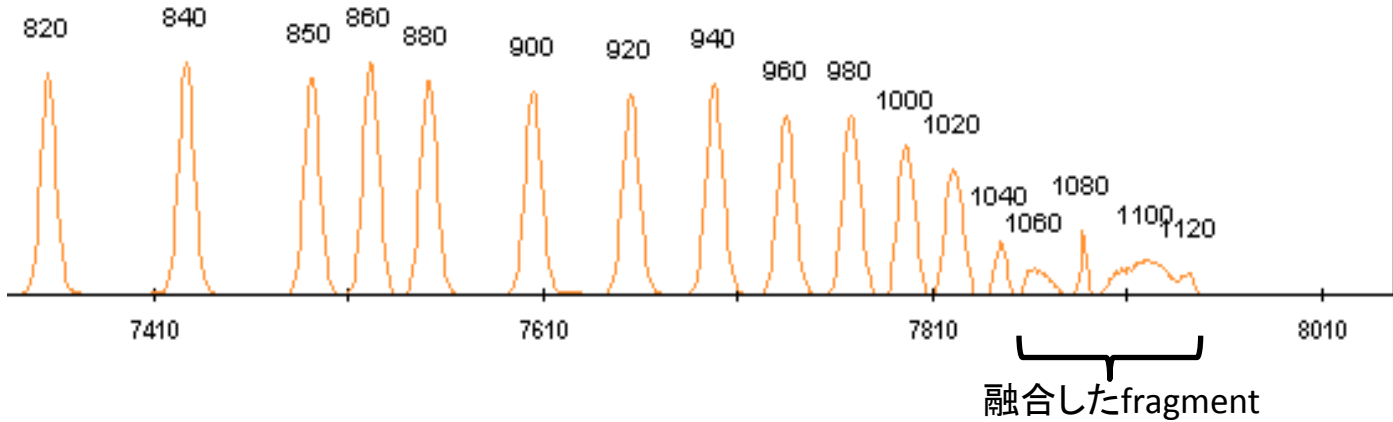
assignが上手く行われなかった場合のsize calling curveは以下の図のように直線性が損なわれます。CESのinternal control の特徴として、1ヶ所でエラーが起こると連続してエラーが発生するため、サンプルのサイジングが正確に行えません。



このような場合、size match editorを起動して、手動でinternal control のassignを修正する必要があります。

internal control の assign のエラーが起きる原因の一つに、以下の図のように internal control が古くなって高分子量の fragment が融合してしまうことがあります。

融合した fragment を元に戻すことは出来ませんので、このような場合には internal control の 買い換えが必要です。

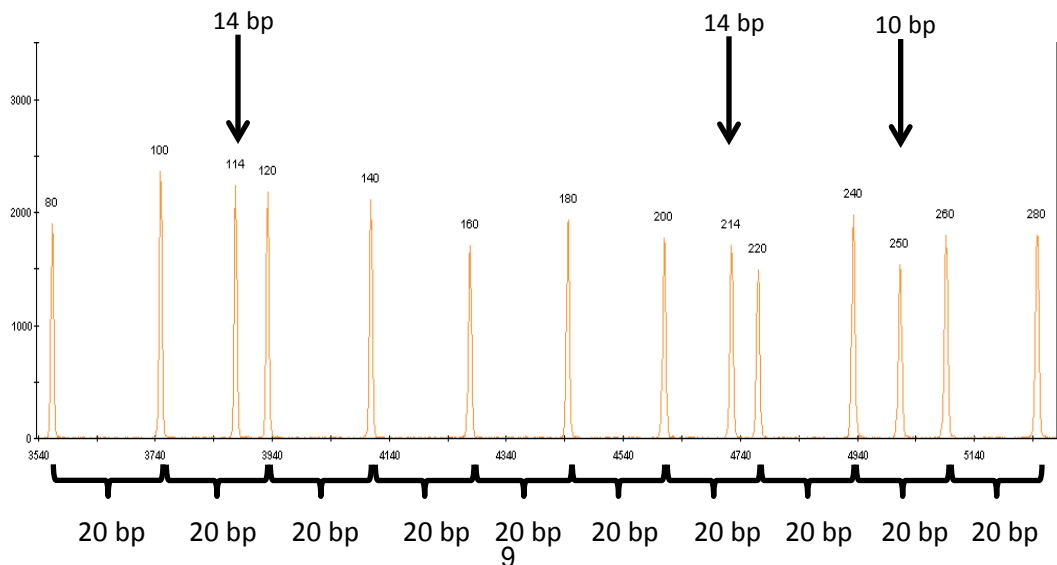


internal control の assign が正確に行われているかどうかをチェックするポイントとしては、

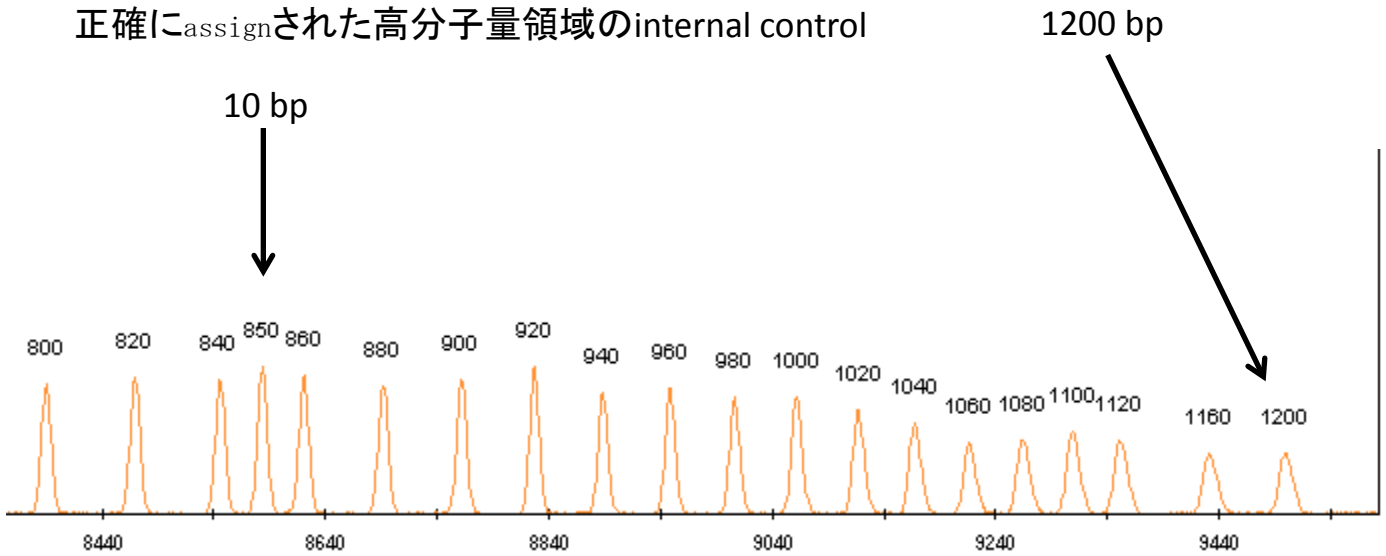
- ① 基本的に20 bpのladder になっているが、10 bpのladder が部分的に存在するので、その部分の assign が正確かどうかをチェックする。
- ② 100～800 bpまでは14 bpのfragmentが存在するので、その部分の assign が正確かどうかをチェックする。
- ③ 一番大きなfragmentが1200 bpに assign されているかどうかをチェックする。

の3点があげられます。

正確に assign された低分子量領域の internal control



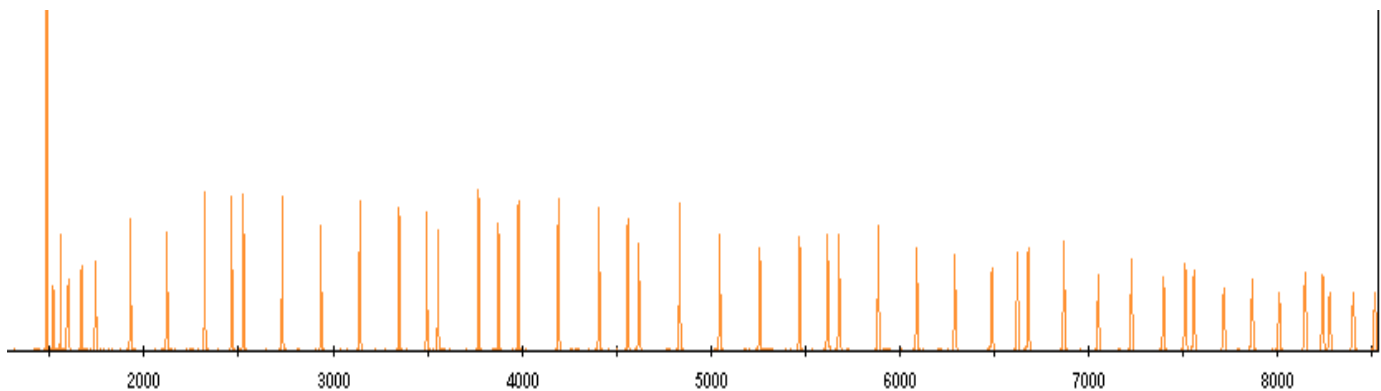
正確にassignされた高分子量領域のinternal control



internal control のassignが全く行われない場合があります。原因としては、

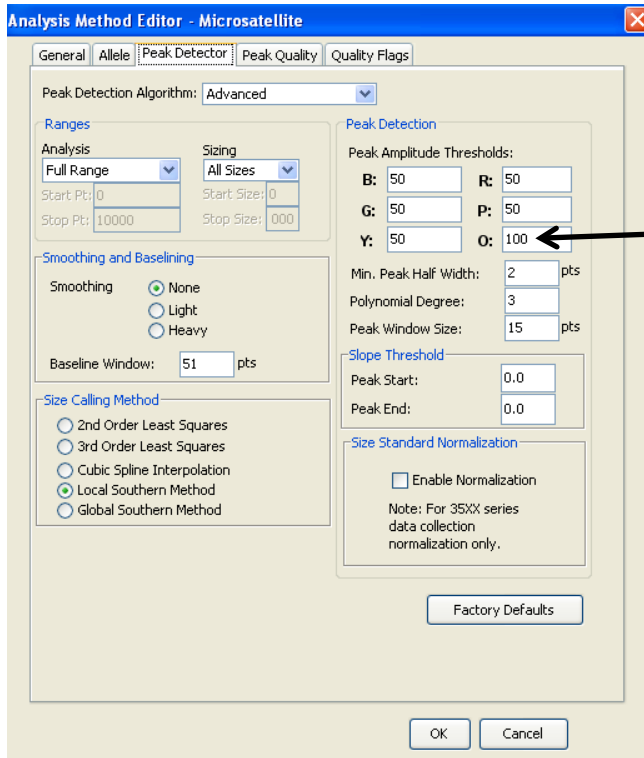
- ①internal control のpeak高が低すぎてcut offされてしまっている。
 - ②泳動時間が短すぎて全てのfragmentが泳動されていない。
- の2点が考えられます。

全てのfragmentが泳動されていないinternal control



対策

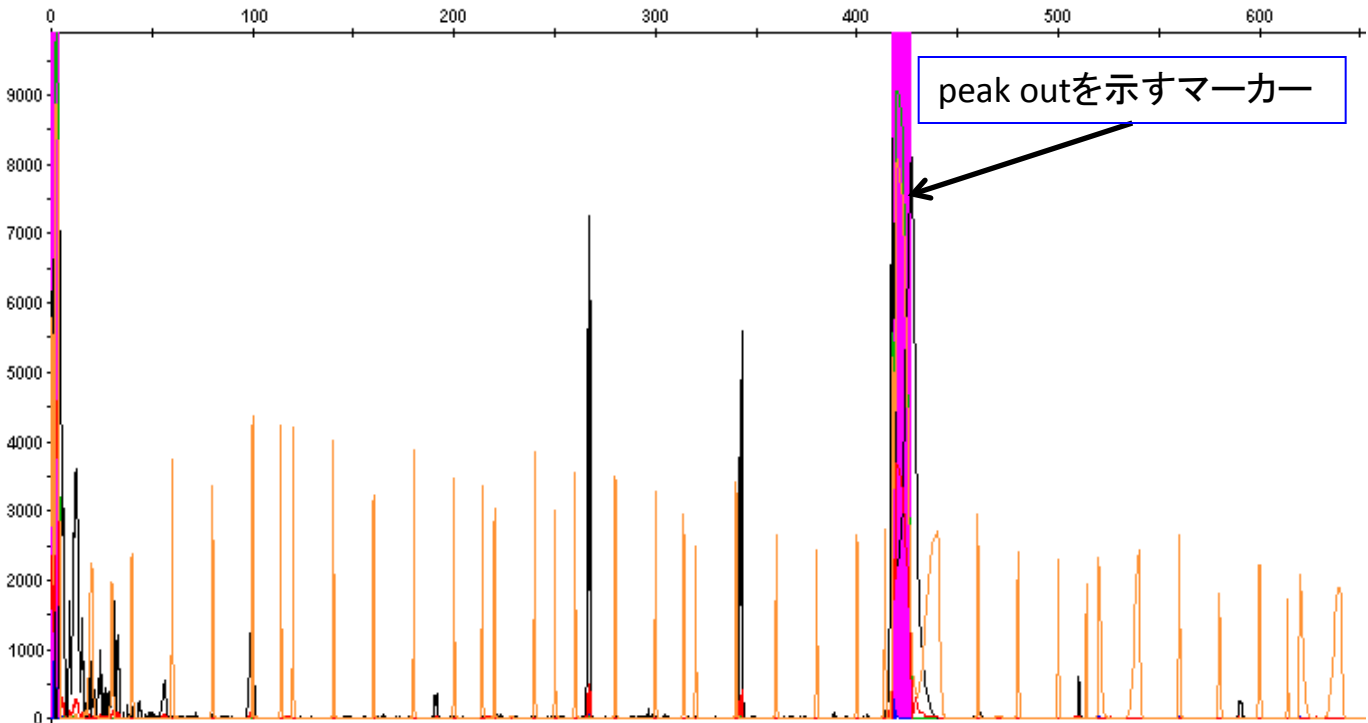
- ①internal control のpeak高が低すぎてcut offされてしまっている。
⇒method editorを起動し、internal controlである「Orange」のcut off値を小さくする。あまり小さくしすぎるとnoiseによるpeakを認識してしまい、assignのエラーが発生するので注意が必要です。
- ②泳動時間が短すぎて全てのfragmentが泳動されていない。
⇒size match editorを起動し、internal controlの一つ一つのfragmentに手動でsizeをassignする。



cut off値を低くするためには、この数字を小さくする

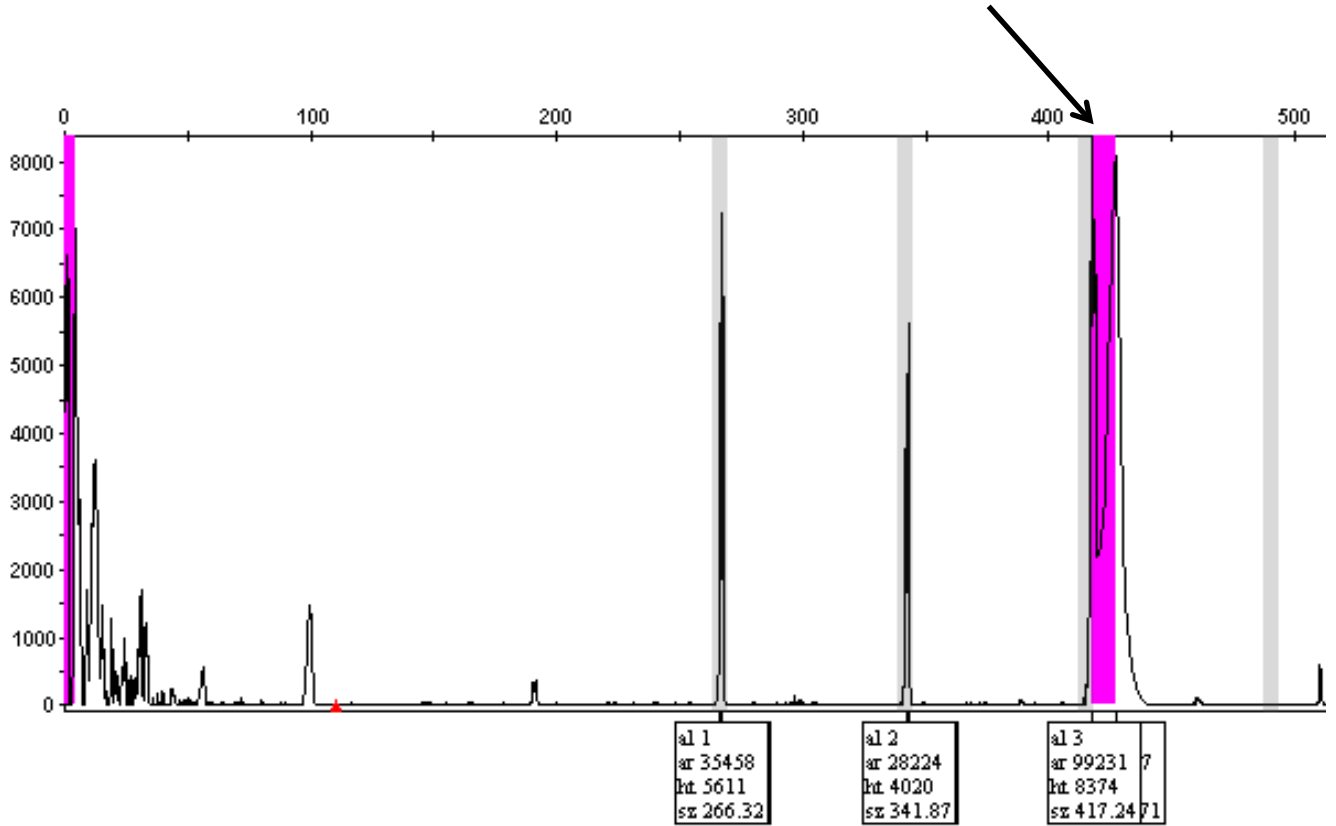
2. サンプルのpeak out の影響

CESではサンプルを適当に希釈して泳動しますが、希釈してもサンプル量が過剰な場合にはpeak outが発生します。peak out部分にはpeak outを示すピンク色のマーカーが表示されます。

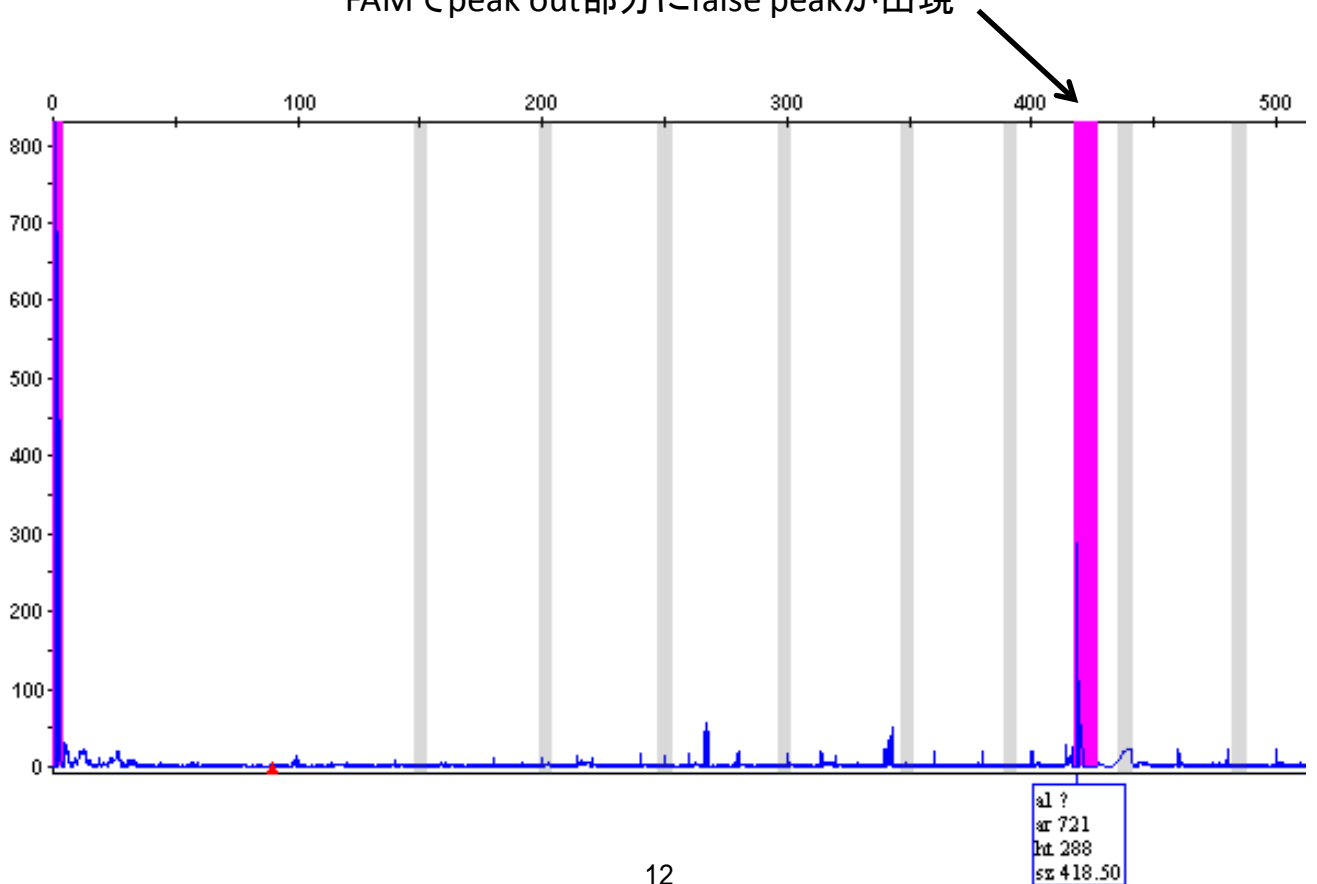


peak outが発生した場合、レーザーのcross overのために全てのdyeのデータにpeak out部分と同じ位置にfalse peakが出現することがあります。false peakをサンプルのpeakと間違えると、正しくサイジングが出来なくなります。

NEDでpeak outが発生

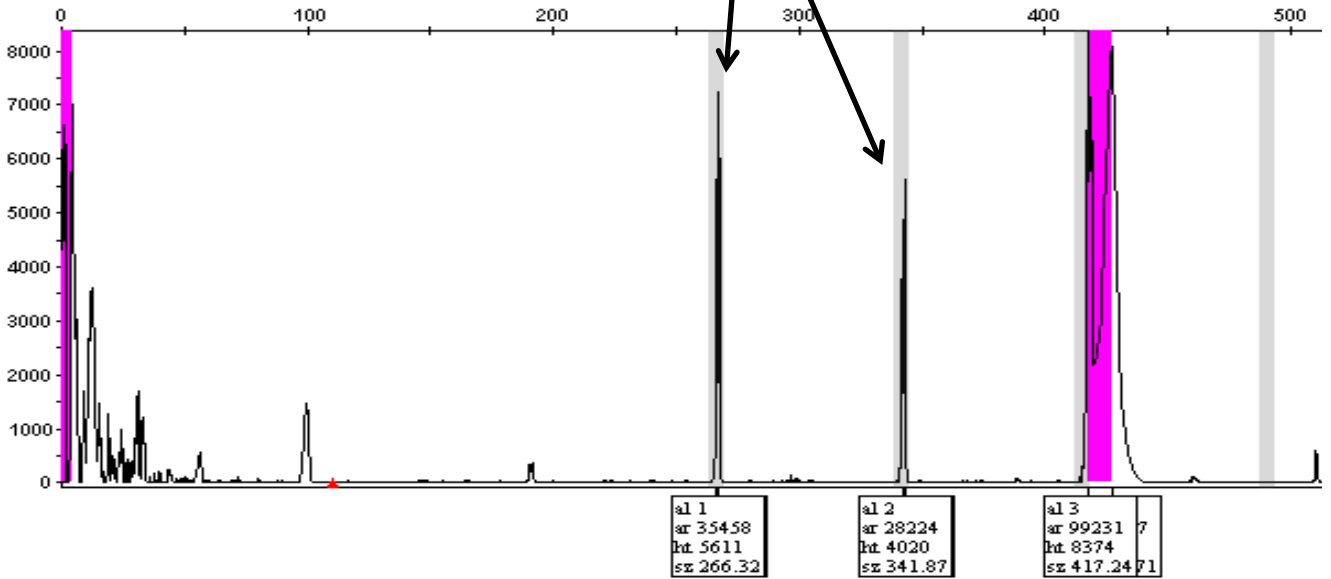


FAMでpeak out部分にfalse peakが出現

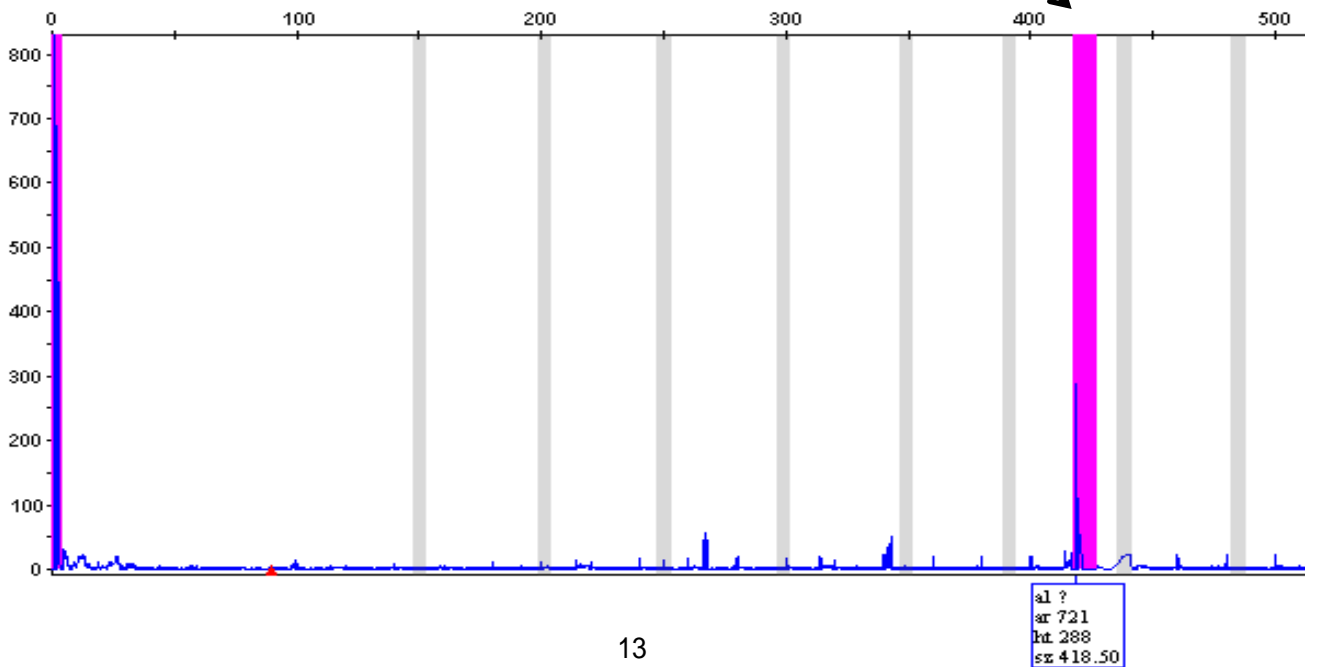


false peakを見分けるためにはstutter peakの有無を利用します。サンプルの本当のpeakはstutter peakが出現することが多いのに対し、false peakではそれ以外のpeakが出現しません。

stutter peak

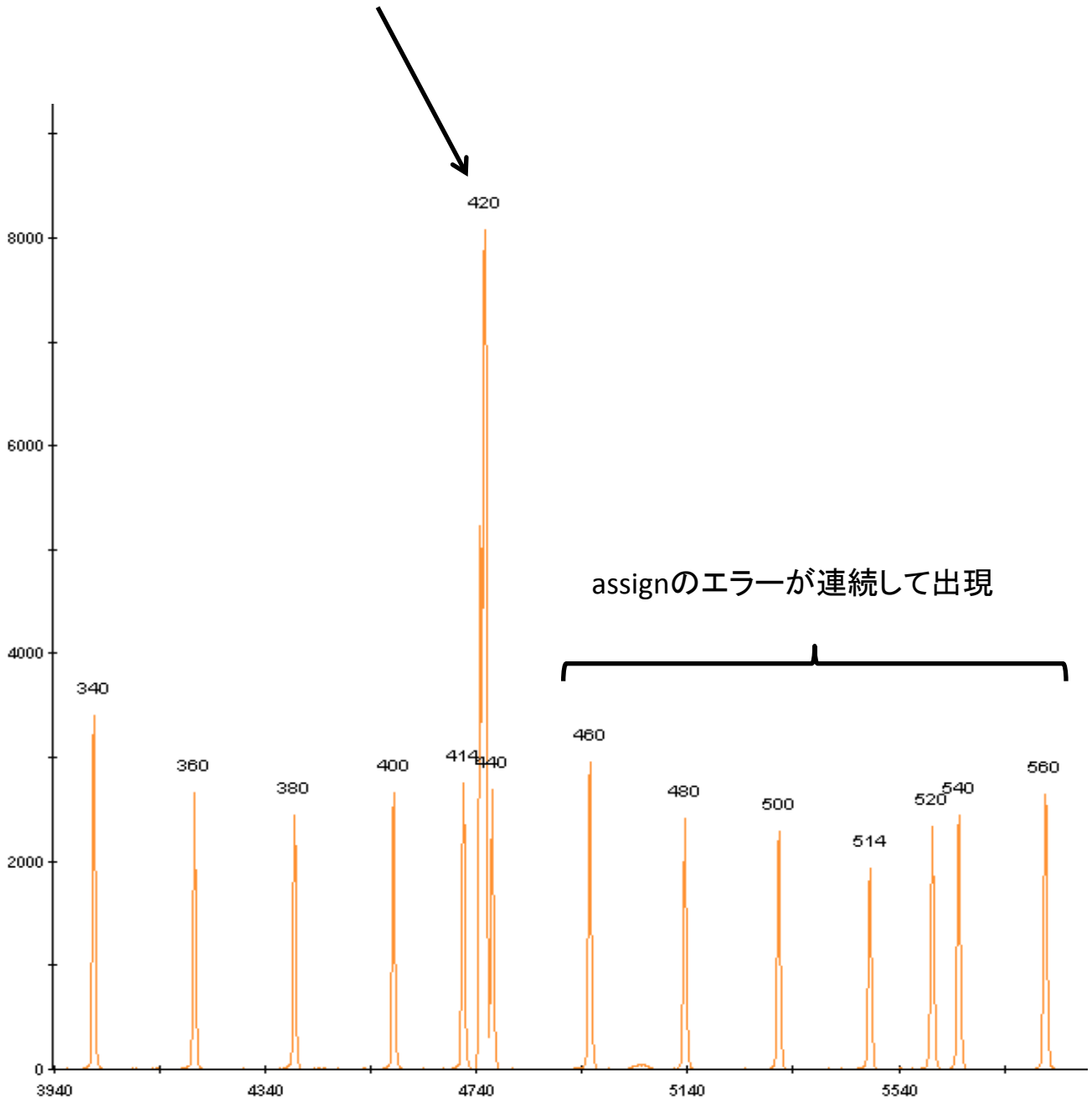


false peakのみ出現



peak outはinternal control にもfalse peakを出現させることがあります。
そのために、internal control のassignが正確に行われなくなることがあります。

peak outのため出現したfalse peakに誤ってassignされている



(千葉県衛生研究所 横山 栄二)

結核菌 VNTR ハンドブック

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

執筆者一覧

長崎大学熱帯医学研究所国際保健学分野 和田 崇之

7) VNTR 型別における反復数傾向

8) VNTR 型別における異動判別の考え方

千葉県衛生研究所 横山 栄二

9) サイジングの際のトラブル

地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会
マニュアル作成ワーキンググループ

宮城県保健環境センター 微生物部 畠山 敬

千葉県衛生研究所 細菌研究室 横山 栄二

長崎大学熱帯医学研究所国際保健学分野 和田 崇之

大阪市立環境科学研究所 調査研究課 長谷 篤

東京都健康安全研究センター 微生物部 貞升 健志、向川 純

東京都健康安全研究センター 健康危機管理情報課 神谷 信行

東京都健康安全研究センター 所長 住友 眞佐美