

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

「抗酸菌の omnilog による測定法の確立に関する研究
- 結核菌分子疫学解析法の簡便化を目指して」に関する研究

研究分担者 松本 智成 （大阪府結核予防会大阪病院）

研究要旨.

結核菌株の遺伝子型別は、感染源の追跡調査や感染防止策を検討する上で重要である。現在では、VNTR 法が広く利用されるようになった。結核菌の VNTR 型別判定を正確に行なうには、正確に PCR 産物サイズを測定し、そのサイズから推定される。しかしながら PCR 産物サイズが大きくなるにつれ、分離能が低下し、正確なサイズ測定が困難になるなど注意すべき点がある。今回、より簡便に結核菌の VNTR 法による型判別を行なう目的で、キャピラリー電気泳動装置を使用して特定の VNTR loci において、今まで検出できた全ての反復数における DNA 断片を 1 つにプールした VNTR ラダーマーカーを作成し検討を行った。本 VNTR ラダーマーカーを用いた同定方法は熟練を要さずより正確な結核菌の型判別が行なえることを明らかにした。

A. 研究目的

結核菌株の遺伝子型別は、感染源の追跡調査や感染防止策を検討する上で重要である。現在では、VNTR 法が広く利用されるようになった。結核菌の VNTR 型別判定を正確に行なうには、正確に PCR 産物サイズを測定し、そのサイズから推定される VNTR 内の反復数を算出する必要がある。通常、アガロースゲル電気泳動が多く用いられているが、PCR 産物のサイズ測定は、泳動ごとに手作業にて分子量マーカーと比較しなければならないが、PCR 産物サイズが大きくなるにつれ、分離能が低下し、正確なサイズ測定が困難になるなど注意すべき点がある。今回、より簡便に結核菌の VNTR 法による型判別を行なう目的で、キャピラリー電気泳動装置を使用して特定の VNTR loci において、今まで検出できた全ての反復数における DNA 断片を 1 つにプールした VNTR ラダーマーカーを作成し検討を行った。

B. 研究方法

Supply 's 15-MIRU において、反復数が同定済みの結核菌ゲノム DNA は反復数を再確認後、各反復数の PCR 産物を混合して Supply 's 15-MIRU の領域ごとの VNTR ラダーマーカーを作成し、QIAxcel Advanced System 付属の ScreenGel Software に登録した。130 株の結核菌分離株 DNA の各領域における PCR 産物を QIAxcel Advanced System で測定し、VNTR ラダーマーカーと直接比較を行ない、各結核菌株の VNTR 反復数を決定した。また、現在使用している i-chip SV1210(日立化成株式会社)より検出された遺伝子型別を QIAxcel Advanced System で得られた遺伝子型別と比較した。

倫理面への配慮 既に同意が得られている患者から得られた結核菌 DNA を使用し名前は匿名化されているので倫理面では問題がない。

C. 研究結果

QIAxcel Advanced System で同定された各領域の反復数は、i-chip SV1210 で得られたそれらと比較検討した結果、高い相関を示した。また、QIAxcel Advanced System を用いた VNTR の反復数の同定は、従来の分子量マーカーを用いて PCR 産物の鎖長の推定を行なう方法と同等またはそれ以上の精度を持つことがわかった。

D. 考察

IS6110 RFLP 解析と比較して VNTR 解析は、迅速で、再現性があり、デジタルデータなので他のデータと比較がしやすく広域データベース構築に向いている。

結核菌の VNTR 型別判定を正確に行なうには、正確に PCR 産物サイズを測定し、そのサイズから推定される VNTR 内の反復数を算出する必要がある。通常、アガロースゲル電気泳動が多く用いられているが、PCR 産物のサイズ測定は、泳動ごとに手作業にて分子量マーカーと比較しなければならないが、PCR 産物サイズが大きくなるにつれ、分離能が低下し、正確なサイズ測定が困難になるなど注意すべき点があった。誰でも正確に測定出来るという事は広域データベース構築に重要である。

本 VNTR ラダーマーカーを用いた同定方法は熟練を要さずより正確な結核菌の型判別が行なえることを明らかにした。

E. 結論

判別マーカーとしての本 VNTR ラダーマーカーを用いた同定方法は、熟練を要さずより正確な結核菌の型判別が行なえる。簡便かつ迅速な本同定法により、ヒューマンエラーを最小限度に抑えることのみならず、検査手法としての標準化も容易になる。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1). Tomoshige Matsumoto, Yukio Hirayama, Yuka Hisamitsu, Megumi Fukumura, Akemi Hirata, Kumi Tanaka, Masashi Kurokawa, Yoshitaka Tamura, Hisakko Yoshida, Koichi Suzuki,

Takayuki Nagai, Ichiro Kawase, Yoshihiko Hoshino Simultaneous and Longitudinal Comparison of Interferon Gamma Release Assays Among Health Care Workers in Japan Mycobacterial Diseases in press.

(2). Tomoshige Matsumoto, Yuriko Koshii, Kazu Sakane, Tomomi Murakawa, Yukio Hirayama, Hisako Yoshida, Masashi Kurokawa, Yoshitaka Tamura, Takayuki Nagai, Ichiro Kawase

A novel approach to automated genotyping of Mycobacterium tuberculosis using a panel of 15 MIRU VNTRs. Journal of microbiological methods 04/2013

(3). Tomoshige Matsumoto, Hideo Ogata, Emiko Toyota, Katsuhiro Suzuki, Takefumi Saito, Akira Fujita, Toshinori Suetake, Kinuyo Chikamatsu, Kazue Mizuno, Satoshi Mitarai Clinical evaluation of a line probe assay kit for the identification of mycobacterium species and detection of drug-resistant mycobacterium tuberculosis Kekkaku: [Tuberculosis] 03/2013; 88(3):291-296.

2. 学会発表

1)松本智成、永井崇之、田村嘉孝、黒川雅史、川瀬一郎、藤井隆、相良憲幸 QIAxcel™ Advanced Systemを使用した結核菌 Supply 's 15-MIRU VNTR解析 第89回日本結核病学会総会

