

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究班
分担研究報告書

結核菌VNTR解析の外部精度評価

研究分担者 御手洗聡 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

研究協力者 瀧井猛将 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

研究要旨 地域あるいは集団における結核菌の感染動態を調査するため、多くの地方衛生研究所では結核菌のVNTR型別解析法が導入されている。2014年度に実施された最初のVNTR解析の外部精度評価（External Quality Assessment: EQA）では、一部施設及びVNTRローカスに精度不十分な状況が認められ、さらなる解析精度向上の必要が考えられた。そこで、各施設における内部精度管理の実施を支援するとともに、2014年度に引き続いて2015年度、2016年度にEQAを実施し、精度の向上を認めた。地方衛生研究所において定期的なEQAの有用性が認識され、継続の実施が要望されたことから、2017年度は第4回となるEQAを実施した。

2017年度はVNTR結果既知の結核菌3株のDNAをEQAに使用した。58施設がEQAに参加し、57施設（98.3%）から解析結果が送付された。各施設でJATA 12で分析した場合、3株/12ローサイで完全正答したのは40施設（70.2%、40/57）であった。2017年度の完全正答率は、2016年度（87.3%、48/55）と比べて低下した（ $p=0.0166$ ）。EQAの結果を受けた改善活動が必要と考えられた。

A．研究目的

近年、結核菌の疫学的感染動態を把握する上で、遺伝子型別技術が重要な役割を果たしていることはよく知られている。この遺伝子型別技術には様々なものがあるが、地方衛生研究所を中心に国内で実地疫学的によく利用されているのはVNTR（Variable Number of Tandem Repeat）である。VNTRは結果が数値（デジタル）であり、自治体間でデータを容易に共有・比較できることが大きな利点である。そのためには、解析精度の信頼性の確保（精度保証）が必要であり、実践的な観点からは外部精度評価の実施が有用である。2014年度、本邦で初めて実施された結核菌VNTR解析における外部精度評

価では、結核菌3株をJATA 12-VNTR法で分析した場合に全ローサイが完全一致した施設が66.7%（36/54）であり、分析精度改善の必要性が示されている。

そこで、2017年度は各施設における内部精度管理の実施を支援するとともに、2014年度、2015年度、2016年度に引き続いて4回目となる外部精度評価を実施することとした。

B．研究方法

用語の規定

精度保証（Quality Assurance: QA）は検査精度の永続的維持と改善を目的とした監視評価活動であるが、その因子として内部精

度管理(Internal Quality Control: IQC)と外部精度評価(External Quality Assessment: EQA)及びトレーニング(Training: TA)を有している。今回それぞれの呼称・日本語訳として上記を用いる。

参加施設の募集

衛生微生物技術協議会リファレンス委員会の各ブロックの代表を通して VNTR に関する IQC 用検体の配布及び EQA への参加希望を募った。

参加施設へ送付した検体：

EQA 用結核菌 DNA ()

精製した結核菌の DNA 3 検体(3 株)を EQA 用検体として使用した。

IQC 用結核菌 DNA ()

コピー数既知の結核臨床分離株 2 株の DNA を IQC 用 DNA として参加施設に配布した。これらを、コピー数を同定するための汎用コントロール検体とした。

今回送付する菌株 DNA は結核予防会結核研究所抗酸菌部及び神戸市環境保健研究所で実施した VNTR 分析において、一致した VNTR プロファイルを示した菌株であり、その一致した評価を基準として解析した。また、PCR 反応が良好であることを両機関で確認した。

試験領域(使用ローカス)：

JATA 12、JATA 15、Supply 15 に含まれるローサイ、および HV (Hyper Variable Regions/超過変領域: 3232, 3820, 4120)を評価対象とした。基本的に JATA 12 を最小実施単位とし、その他をオプションとした。その他に JATA 15 (JATA 12 に追加 3 ローサイ)、HV は 3 ローサイ、他に Supply らの 6

ローサイなどが分析対象ローサイとして想定されるため対応した報告様式を準備した。

外部精度評価の実施：

各施設は VNTR 分析結果報告シートを用い、施設名、PCR 産物の分析法、VNTR 分析結果を解析担当者(結核研究所・瀧井猛将)へ電子メールにて送付し、結核研究所内で集計・分析を実施した。

C . 研究結果

1. IQC 用検体の提供と EQA の実施

全国の 79 施設を対象に、IQC 用検体の配布及び EQA 参加についての希望を調査した(2017 年 11 月)。2017 年 12 月までに 58 施設より EQA への参加希望があった。2018 年 3 月 1 日までに 57 施設から分析結果が送付された。本報告書では、57 施設の分析結果に基づいて全体評価を実施した。

2. 各施設における VNTR 分析に利用しているローカセット

VNTR 分析システムには、JATA 12、JATA 15、HV 及びその他のローサイ(Supply 15 分析システムに含まれる)がある。今回の外部精度保証では最低限 JATA 12 での分析を依頼した。

2017 年度に各分析システムを利用していた施設数は、JATA 15、HV、Supply らのローサイがそれぞれ 46、41、28 であり、2016 年度の 41、33、19 と比べて追加領域での分析する施設が増えており、参加実施施設の半数(49%、28/57)が JATA 12、JATA 15、HV、Supply のローサイ全てを実施していた(図 1)。

3. EQA 用検体を JATA 12 分析した場合の正答施設数

各施設で3株のEQA用検体をJATA12で分析した場合、全株で12ローサイについて完全に正答したのは40施設(70.2%, 40/57)、1ローカス違いは12施設(21.1%, 12/57)、2ローサイ以上違いは5施設(8.8%, 5/57)だった(表1)。2017年度に全ローサイ完全一致した施設の割合は、2014年度とほぼ同様だった(70.2% vs. 66.7%, $p=0.691$)が、2016年度と比べると有意に低下していた(87.3% vs. 70.2%, $p=0.027$)。この成績低下の原因は、2016年度と比べて2017年度は、1ローカス違いの施設の割合が増えたためであった(9.1% vs. 21.1%)。

4. PCR産物のサイズ測定方法

PCR産物のサイズ測定のための方法として、アガロースゲル電気泳動、自動シーケンサーを用いたフラグメント解析、マイクロチップ電気泳動装置(MultiNA、島津製作所)、キャピラリー電気泳動装置QIAxcel(QIAGEN)などが各施設で使用されていた(表2)。2017年度の調査では2016年度と同様に、アガロースゲル電気泳動による分析を行っている施設が最も多かった(59.6%, 34/57)。自動シーケンサーを用いたフラグメント解析が13施設(22.8%, 13/57)、MultiNA6施設(10.5%, 6/57)、QIAxcel3施設(5.3%, 3/57)、パーキンエルマーLabChipが1施設(1.8%, 1/57)とアガロース電気泳動以外の方法が増加傾向にあり、6施設はアガロースゲル電気泳動と併用していた。

5. 各分析法におけるローカスセットの正答率

PCR産物の分子量分析法の違いごとに、JATA12、JATA15、HV、Supplyにおける正答率をまとめた(表3)。正答率は、各ロー

カセットにおける1ローカスあたりの正答率として算出した。

2017年度は2016年度と比べて全体的に若干低い正答率であった。また、一部の分析法で正答率が低下していた。全施設において共通の評価対象領域としたJATA12では、主要な分析法であるアガロースゲル電気泳動では2017年度は2016年度と比較して若干正答率が低下した(97.6% [2017] vs. 99.8% [2016])。自動シーケンサーでは2017年度と2016年度の正答率はほぼ同様であったが、6施設で用いられていたMultiNAでは正答率が低下していた(91.7% [2017] vs. 97.8% [2016])。

任意の評価対象としたJATA15、HV、Supplyでは、アガロースゲル電気泳動、自動シーケンサー、MultiNAともに高い正答率を示していた(97.6–100%)。一方、QIAxcel、パーキンエルマーLabChipについては、使用施設数が1施設と限られているものの、JATA15、HVについては、正答率が低い施設があった。

6. 各ローカスの正答率の比較

JATA12、JATA15における分析ローカスごとの正答率を年度別に比較した(図2)。2014年度は5つのローサイ(1955, 3336, 4052, 4156, 2163a)で正答率が低かった(77–96%)が、2016年度の調査ではいずれのローカスでも98–100%であり、高い正答率を示した。2017年度は、2016年度に比べて全体的には正答率が若干低下した。この要因としてJATA12では(2163b, 4052)、JATA15では(1982)の正答率(92.9%、94.7%、93.3%)が若干低かったことが挙げられる。

D. 考察

2017年度は各施設におけるIQCの実施を

支援するとともに、2014 年度、2015 年度、2016 年度に引き続いて 4 回目となる EQA を実施した。

各施設での分析法は、過去に実施した 3 回の結果とほぼ同様の内訳であった(表 2)。主要な分析法として、簡便な手法であるアガロースゲル電気泳動が 34 施設で用いられており、高い分析精度が期待される自動シーケンサーは 13 施設で使われていた。続いて MultiNA が 6 施設、QIAxcel 3 施設、パーキンエルマー-LabChip が 1 施設で採用されていた。自動シーケンサーは、分析系の導入に労力を要するものの、高い分析精度と自動化が期待できるため、欧米では幅広く用いられている。

EQA 用 3 株において JATA 12 全ローサイが完全一致した施設の割合は、2017 年度は 2016 年度と比べて低下していた(70.2% [2017] vs. 87.3% [2016], $p=0.0167$)。この成績低下の原因は、2017 年度は 2016 年度と比べて 1 ローカス違いの施設数が増えたためであった(15 施設 [2017] vs. 5 施設 [2016])。1 ローカス違いの施設における誤回答は特定のローサイに集中していた。今回の精度評価用に用いた試料には、高分子 DNA の解析を必要とするローサイを含んでいた。そのため、使用した装置の高分子 DNA の分解能や技術による影響が推察された。

2014 年度に EQA を実施して以来、2016 年度までの 3 回は分析精度の改善傾向が維持されていた。2017 年度は若干の減少が見られたが、上述のように分析対象の試料の影響もあることから、2016 年度同等の分析精度が維持されていると考えられた。

EQA の実施は、分析精度の向上と維持に有用であることが報告されている。また、最近改正された感染症法においても、病原体等検査の信頼性を確保することが求められ

ていることから、今後も EQA を継続的に実施していく必要があると考えられた。

2014 年度に分析精度が低かった 5 ローサイでは、2016 年度と同様に 2017 年度も分析精度が改善していた(図 2)。各施設における分析精度を改善するために、2015 年度はコピー数ラダーマーカー及び VNTR プロファイル既知の菌株 DNA を、2017 年度は VNTR プロファイル既知の菌株 DNA を IQC 用検体として配布した。IQC 用検体の配布が、分析精度の維持と向上に寄与していた可能性がある。

VNTR 分析に利用されていたローカセットの調査では、JATA 15、HV、Supply らの 6 ローサイを分析している施設数が、それぞれ 46、41、28 であり、過去 3 年間で最も多くなった(図 1)。JATA 12 は解析難易度が低く、集団発生疑い事例等の鑑別に有用である。一方、地域で発生した結核菌の網羅的解析から感染経路を推定する場合等では菌株識別能が不足することが分かっている。そのため、調査目的に応じて分析領域を追加する必要がある。地域分子疫学調査研究が普及してきたことにより、JATA 12 に加えてその他のローカセットを分析対象とする自治体が増えたと考えられる。

今後の精度保証について、評価株数を増やすことに加え、日常分析業務で遭遇するイレギュラーな検体(一部ローカスの欠損株や複数コピー数が検出される株など)を評価対象に加えることが有用であると考えられる。

本年度を含め 4 回の外部精度評価を実施したことにより、各地方衛生研究所において VNTR 分析系が導入されつつあることが確認された。結核分子疫学調査では、VNTR 情報を継続的に蓄積し、必要に応じて自治体間で情報共有する必要がある。そのため

には VNTR 分析の精度保証は必須であり、今後も分析精度の維持と向上を支援する活動が必要と考えられた。

E．結論

2017 年度は、57 施設を対象に VNTR 分析に関する EQA を実施した。3 株の EQA 用検体を JATA 12 で分析した場合、2016 年と比べて全株 12 ローサイ完全正答した施設数と割合は 48 施設 87.3% [2016]から 40 施設 70.2% [2017]と大幅に減少した。VNTR 情報の蓄積と他施設との情報共有を推進するためには QA が重要であり、分析精度の維持と向上を支援する継続的な活動が必要である。

F．健康危険情報

結核菌株の取扱については、感染症法の

基準に適合した実験室内で実施した。

G．研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

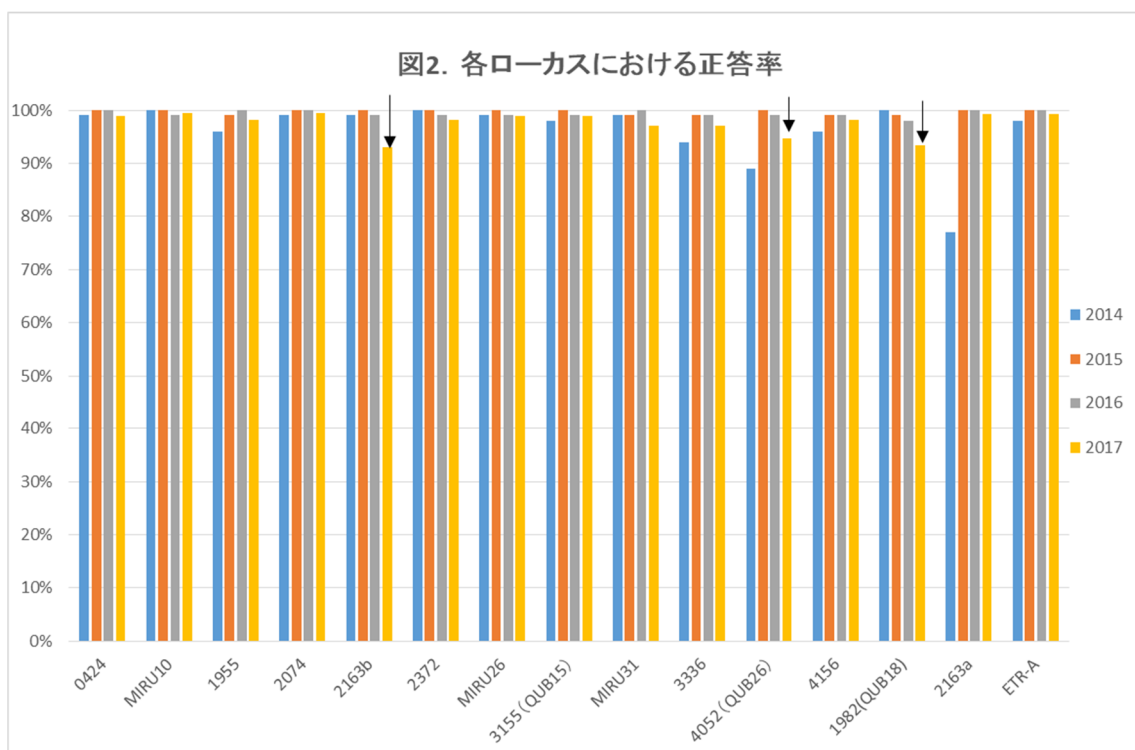
1．特許取得

2．実用新案登録

3．その他

表3. 各分析法におけるローカセットの正答率

	JATA(12)		JATA(15)		HV		Supply		
	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	
2014	アガロースゲル	37	98.5	22	94.4	15	94.8	5	96.7
	自動シーケンサー	7	97.6	7	92.1	7	92.1	7	95.2
	チップ電気泳動 (MultiNA)	4	96.5	2	83.3				
	QIAxcel	4	86.1	4	80.6	4	75	1	94.4
	コスモアイ	2	98.6	2	83.3	1	100	1	100
2015	アガロースゲル	34	99.7	22	100	16	94.2	5	100
	自動シーケンサー	10	100	9	100	10	100	9	100
	チップ電気泳動 (MultiNA)	4	100	2	100	2	100	1	100
	QIAxcel	3	99.1	2	94.4	2	66.7		
	コスモアイ	2	100	1	100			1	100
2016	アガロースゲル	36	99.8	27	99.6	20	97.8	8	100
	自動シーケンサー	10	98.9	9	100	9	98.8	9	100
	チップ電気泳動 (MultiNA)	5	97.8	3	100	2	100	1	100
	QIAxcel	2	97.2	1	88.9	1	66.7		
	コスモアイ	1	100	1	100	1	100	1	100
	Agilent 2100 Bioanalyzer	1	100						
2017	アガロースゲル (併用を除く)	34	97.6	27	97.9	23	98.6	12	100
	自動シーケンサー	13	98.5	13	99.1	13	98.3	13	100
	チップ電気泳動 (MultiNA)	6	91.7	4	100	3	100	2	100
	QIAxcel	3	97.2	1	88.9	1	66.7		
	パーキンエルマーLabChip	1	83.3	1	55.6	1	100	1	100



主要な分析法である JATA (12/15) 各ローカスにおける正答率を 2014 年度、2015 年度、2016 年度と比較した。2017 年度は、2016 年度に比べると、全体的に正答率の低下が見られ、特定のローカスに誤回答が集中した。矢印は、2017 年度の正答率が低かったローカスを示す。