

平成28-30年度
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 結核予防会結核研究所抗酸菌部

研究協力者 村瀬良朗 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科
有川健太郎 神戸市環境保健研究所

研究要旨 精度保証は現在ではあらゆる検査の基本である。精度保証法自体には、内部精度管理、外部精度評価、トレーニングの三要素があるが、比較的大規模な精度保証にはパネルテスト等の外部精度評価が実施される。地方衛生研究所では結核菌の分子疫学解析を目的として Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)型別が一般に行われるが、全てのローカスの検査精度は同一ではない。施設間のデータ比較を正確化するため、地方衛生研究所を対象として2016～2018年の三年間連続して外部精度評価を実施した。総体としての検査精度そのものは年度毎に異なるが、施設ごとに検査者の交代や方法の違いなどがあり、各々の施設で継続的に外部精度評価を実施することで検査精度の継続的向上あるいは維持が可能となる。外部精度評価を始めとする精度保証活動は継続して実施されるべきである。

A．研究目的

日本国内における 2017 年 1 月 1 日～12 月 31 日間の結核罹患率（人口 10 万対の新規登録患者数）は 13.3 で、年々低下傾向である。患者年齢構成は、70 歳以上の高齢者が全結核患者の 59.0%を占めている。従来高齢者の結核は潜在結核感染症からの再燃例が多いと考えられていたが、近年の分子疫学解析により高齢者でも新規感染による結核の発病があることが示されている。一方若年者では外国出生結核患者の割合が年々増加しており、平成 29 年には結核患者全体の 9.1%に達した。これらの外国出生者は薬剤耐性結核を発病している確率が高く、感染の拡大は大きな社会的問題となる。結核の感染経路の解析については、従来の実地疫学解析が想定しない場合も多くなって

おり、実地疫学を支援する検査データとして遺伝子型別技術が利用され、集団感染の同定や Social Network Analysis の基礎情報として応用されている。

結核菌の型別分析は、診療・診断に直接結びつかないため保険点数もなく衛生検査所(検査センター)等では行われていない。病院検査室にも実施能力がなく、そのため、各都道府県・政令市の衛生研究所で分析することが期待され、環境も整いつつある。これまで、結核研究所では北京型結核菌を効率よく型別できる VNTR システムである Justified Analytical Tool Application (JATA) (12)を樹立して報告している。また、反復配列多型 (variable number of tandem repeat: VNTR)分析用のプライマーセット(18 loci)を希望する衛生研究所に送付している。

JATA (12)-VNTR システムは、北京型結核菌の識別能は若干低いが生型別結果は集団感染事例か否かの判断に利用可能である。また、本分析システムは、特別な装置は必要なく各 PCR 産物の分析にアガロースゲルを用いた電気泳動が利用できるという利点がある。

VNTR は結果が一連の数値（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。しかしながら、そのためには信頼性の確保が必要であり、全国的な精度保証の実施が必要である。

そこで本分担研究では地方衛生研究所を対象とした VNTR 型別法に関する外部精度評価を実施し、さらに各施設における内部精度管理の実施を支援する取り組みを行う。

B . 研究方法

1. 用語の定義

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。

2. 外部精度評価への参加施設募集

衛生微生物技術協議会時に実施内容を検討し、同協議会結核部会における各ブロックのリファレンス施設を通じて VNTR に関する内部精度管理用検体の配布及び外部精度評価への参加希望を募った。

3. 外部精度評価検体

外部精度評価用結核菌 DNA（ ）
精製した結核菌の DNA 3 検体（3 株）を

外部精度評価用検体として使用した。

内部精度管理用結核菌 DNA（ ）

コピー数既知の結核菌 4 株（臨床分離株 3 株+H37Rv 1 株）の DNA を内部精度管理用 DNA として希望施設に配布した。これら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。

（ ）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 解析において、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 増幅反応が良好であることを両機関で確認した。

4. 試験領域（対象ローカス）

JATA 12、JATA 15、Supply 15 に含まれるローサイ、および HV（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。

5. 外部精度評価結果解析

参加各施設は VNTR 分析結果報告シートを用い、施設名、PCR 産物の分析法、VNTR 分析結果を世話人（結核研究所抗酸菌部細菌科・村瀬良朗）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. 外部精度評価の実施

2016 年～2018 年の三年間で、それぞれ 56 施設、57 施設、59 施設に対して外部精度評価を実施した。

2. VNTR 解析に用いられるローカスセット
VNTR 分析システムには、JATA (12)、JATA

(15)、Hyper variable (HV)及びその他のローカスがある。外部精度評価では最低限 JATA (12)での分析を依頼した。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。

2016 年度は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 41、33、19 であり、2017 年度はそれぞれ 46、41、28 となった。2018 年度にはそれぞれ 47、43、30 であり年度毎に解析対象とするローカスが増加していた。

3. JATA (12)必須解析に関する精度

2016 年に全株 12 ローサイ完全正答したのは 48 施設 (87%, 48/55)、1 ローカス違いは 5 施設 (9.1%, 5/55)、2 箇所以上違いは 2 施設 (3.6%, 2/55)であった。翌 2017 年に全株で 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)であり、2018 年に全株 12 ローサイ完全正答したのは 55 施設 (93%, 55/59)、1 ローカス違いは 3 施設 (5.1%, 3/59)、2 箇所以上違いは 1 施設 (1.7%, 1/55)であった。

4. 増幅産物の解析法

2016 年の調査では 2015 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 (66%, 36/55)。次いで自動シークエンサーを用いたフラグメント解析が 10 施設 (18%, 10/55)、マルチナ 5 施設 (9%, 5/55)、QIAxcel 2 施設 (4%, 2/55)、コスモアイおよび Agilent 2100 Bioanalyzer が 1 施設 (2%, 1/55)であった。

2017 年の調査では 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)、自動シークエンサーを用いたフラグメント解析が 13 施設 (22.8%, 13/57)、MultiNA 6 施設 (10.5%, 6/57)、QIAxcel 3 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。

2018 年度の調査では、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 (53%, 31/59)。次いで自動シークエンサーを用いたフラグメント解析 (アガロースゲル併用 2 施設含む)が 18 施設 (31%, 18/59)、MultiNA (アガロースゲル併用 4 施設含む)6 施設 (10%, 6/59)、QIAxcel 3 施設 (5.1%, 3/59)、LabChip (PE)が 1 施設 (1.7%, 1/59)であった。

5. 分析法別正答率

JATA (12)に関し、最も多く使用されているアガロースゲル電気泳動での正答率は、2016 年は 99.8%、2017 年は 97.6%、2018 年は 99.7%であった。JATA (12)以外のローカスセットでは、HV に関して QIAxcel の正答率が全体に低い傾向があった (66.7-77.8%)。自動シークエンサーの利用が年々増加しているが、正答率が必ずしも 100%ではなかった。

6. ローカス毎の正答率

JATA (12)及び(15)におけるローカス毎の正答率を年度別にみると、2016 年と 2018 年は何れのローカスでも 98%以上であったが、2017 年は 3 つのローサイ (2163b, 4052 [QUB26], 1982 [QUB18]) の正答率 (範囲: 92.9-94.7%) が低い傾向であった。

D．考察

2016～2018年にかけて結核菌遺伝子型別解析法としてのVNTRの外部精度評価を実施した。実施年によって複数のローカスで精度が上下しているものの、平均的には高い精度が保たれており、適切な検査精度が維持されているものと考えられた。

外部精度評価の実施に当たっては適切な検体を適切な数、適切に送付して適切な期間内で実施することが求められる。検体の適切性という観点では、一連の外部精度評価パネルテストでは既に抽出し精製したDNAを検体として使用している。これは検体の均質性と再現性、あるいは安定性を確保することが主な目的である。しかしながら実際の検査では結核菌から核酸を抽出して精製するプロセスが必須であり、このプロセスは検査精度に影響を与える。この点を考慮すると、外部精度評価に使用する検体は本来結核菌そのものであるべきであり、今後の外部精度評価パネル作成に当たっては、感染性を除去した結核菌を調製して送付することを考えるべきである。次に検体数としては毎回3検体送付しているが、最大24ローカスを解析する施設と12ローカスのみ実施する施設とでは物理的な作業量が2倍異なる。精度評価上も全ての施設が同じ領域を検査した方が母数が大きくなるため、対象領域は標準化した方が良いと考えられた。さらにこれまでの外部精度評価において常に安定して高精度な結果が得られるローカスと、不安定なローカスに関する知見が蓄積されてきており、特に安定しているローカスについては対象領域外とし、領域を少数に絞って検体数を増やした方が精度評価的には有効性が高いと思われる。今後は、全ての参加施設が同じ領域を検査し、相互比較が容易になるよう方法の変更

を考えたい。また現在の外部精度評価パネルは郵便により配布しているが、検体の安定性を考慮し、さらに不活化処理した結核菌そのものを使用することを考慮すると、低温状態による配布が望ましい。検体作成法の改良とともに注意すべき点と思われる。最後にパネルテストの実施期間（受領から結果報告までの時間：Turn Around Time/TAT）であるが、現在は11月～12月頃に検体を配布し、翌年1月末までの期間で実施している。ルーティーンのパフォーマンスを評価するのであれば、通常の検体を処理するのと同様のTATを設定すべきであり、1ヶ月以上という期間は実際的には長すぎるものと思われる。ただし各地衛研がどの程度のTATでVNTR情報を提供しているのかが不明であるため、次回外部精度評価を実施するに当たってはTAT情報を収集して適切に期間を設定したいと考える。

外部精度評価の主要な目的は、看過できないほどの低精度な状況を早期に検出し、これを改善することである。然るに、現在の外部精度評価活動では実施後の改善に関するフォローアップを行っておらず、外部精度評価でエラーが発生したローカスの精度が実際に改善されているかどうか不明である。今後は、エラーの発生したローカスに関しては各施設に再検と結果報告を求めたいと考える。

外部精度評価は、精度保証活動の一部に過ぎない。本質的には内部精度管理の補完であり、内部精度活動が円滑に実施できるよう標準手順書の整備や標準物質・基準結核菌株の分与等を進める必要がある。

E．結論

結核菌遺伝子型別法としてのVNTRに関して外部精度評価を連続して実施した。施

設あるいは使用している解析方法によって差異はあるものの、概ね適切な検査精度が維持されているものと考えられた。今後は検体の性状、数、対象領域数などに改良を加え、さらに評価後の改善の有無をフォローするところまで内容を拡大するべきと思われた。

F．健康危険情報

結核菌は感染症法の指定する特定病原体に相当するため、全ての結核菌の取扱（核酸検体の準備）は感染症法の基準を満たした BSL3 の実験室で実施した。バイオセーフティ上の問題点は報告されていない。

G．研究発表

論文発表

1. 御手洗聡. 病原体サーベイランスガイドラインの概要 特集 1 病原体サーベイランスの活用 保健師・看護師の結核展望 2017; 55(1): 2-7.
2. 御手洗聡. 結核菌サーベイランスの構築. 公衆衛生 2018; 82: 28-33.

学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

該当無し。