

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	村瀬 良朗 有川 健太郎	公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部 神戸市環境保健研究所感染症部

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VNTR分析の外部精度評価(External Quality Assessment: EQA)では、一部に精度不十分な状況が認められ、さらなる分析精度向上の必要性が考えられた。そこで、2020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～2019年度に引き続いて7回目となる外部精度評価を実施することとした。

2020年度は、56施設が外部精度評価を希望し、全施設から分析結果を回収した。各施設で3株の外部精度評価用検体をJATA(12)で分析した場合、全株12ローサイ完全正答したのは49施設(88%, 49/56)であった。この成績は初年度(2014年度、67%)や特定ローサイの成績が低かった2017年度(70%)と比べると有意に高く( $p = 0.01$ ,  $p = 0.04$ )、2015年度(92%)、2016年度(87%)、2018年度(93%)、2019年度(90%)とは有意差は認められなかった( $p = 0.53$ ,  $p = 1.00$ ,  $p = 0.35$ ,  $p = 0.77$ )。VNTR型別解析法の検査精度は概ね一定に保たれているが、今後も検査精度の維持・向上を目的として、外部精度評価を始めとする精度保証活動を継続して実施すべきである。

#### 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つつあ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。ただし、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分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67%(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、2020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～2019年度に引き続いて7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)を規定している。今回それぞれの呼称・日本語訳として上記を用いている。

### 参加施設の募集

衛生微生物技術協議会結核レファレンス会議の各ブロックの代表を通して 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。

### 参加施設へ送付した検体:

- ① 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。
- ② 内部精度管理用結核菌 DNA (※)  
コピー数既知の結核臨床分離株 2 株および基準株である H37Rv 株の DNA を内部精度管理用 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。

(※)今回送付した菌株 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(Hypervariable Regions/超過変領域: 3232, 3820, 4120)の合計 24 ローサイ

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。

### 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・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. 内部精度管理用検体の提供と外部精度評価の実施

全国の地方衛生研究所 83 施設を対象に、内部精度管理用検体の配布及び外部精度評価参加についての希望を電子メールにて調査した(2020 年 11 月 12 日)。2020 年 11 月 24 日までに 56 施設より外部精度評価の参加希望があり、同年 11 月 27 日に内部精度管理用検体及び外部精度評価用検体を発送した。解析結果報告期限(2021 年 1 月 26 日)までに全ての参加施設から分析結果が送付された。解析結果の分析は結核研究所にて実施した。

### 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。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(表)。

2020 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 48、45、34 であり、2014 年度より

分析対象ローサイが年々増加する傾向にあった(図 1)。

### 3. 外部精度評価用検体を JATA (12) 分析した場合の正答施設数

各施設で 3 株の外部精度評価用検体を JATA (12) で分析した場合、全株 12 ローサイ完全正答したのは 49 施設(88%, 49/56)、1 ローカス違いは 3 施設(5.4%, 3/56)、2 箇所以上違いは 4 施設(7.1%, 4/56)であった(表 1)。2020 年度に全ローサイ完全一致した施設の割合は、初年度の 2014 年度(67%, 36/54)及び 2017 年度(70%, 40/57)と比べると有意に高く( $p=0.01$ ,  $p=0.04$ )、2015 年度(92%)、2016 年度(87%)、2018 年度(93%)、2019 年度(90%)とは有意差は認められなかった( $p=0.53$ ,  $p=1.00$ ,  $p=0.35$ ,  $p=0.77$ )。

### 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(Thermo Fisher)、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)などが各施設で採用されていた(表 2)。2020 年度の調査では過去 6 年間と同様に、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(45%, 25/56)。次いで自動シーケンサーを用いたフラグメント解析(アガロースゲル併用 4 施設含む)が 23 施設(41%, 23/56)、MultiNA(アガロースゲル併用 4 施設含む) 5 施設(8.9%, 5/56)、QIAxcel(アガロースゲル併用 1 施設含む) 2 施設(3.6%, 2/56)、LabChip (PE)が 1 施設(1.8%, 1/56)であった。

### 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、

JATA (12)、JATA (15)、HV、Supply における正答率をまとめた(表 3)。正答率は、各ローカスセットにおける 1 ローカスあたりの正答率として算出した。

JATA12 については、アガロースゲル電気泳動法 ( $n=25$ )、自動シーケンサー ( $n=23$ )、QIAxcel ( $n=2$ ) の正答率が高く(範囲:99.3-100%)、MultiNA ( $n=5$ )、LabChip ( $n=1$ )は両者とも 97.2%であった。

オプション評価対象とした JATA (15)、HV、Supply については、MultiNA で JATA (15) の正答率が 74.1%となったものの、その他の領域及び分析法については高い正答率であった(範囲:99.4-100%)。

### 6. 各ローカスの正答率の比較

JATA (12)、JATA (15)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)の正答率(範囲:77.6-95.7%)が低く、また、2017 年度は 3 つのローサイ(2163b、4052 [QUB26]、1982 [QUB18])の正答率(範囲:92.9-94.7%)が若干低かったが、2020 年度の調査ではいずれのローカスでも 97.6-100%であった。

### D. 考察

2020 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~2019 年度に引き続いて 7 回目となる外部精度評価を実施した。

主要な分子量測定法は従来と同様にアガロースゲル電気泳動法( $n=25$ )と自動シーケンサー( $n=23$ )であり、続いて MultiNA ( $n=5$ )、QIAxcel( $n=2$ )、LabChip (PE) ( $n=1$ )であった。調査対象期間における傾向としてはアガロースゲル電気泳動法の採用施設数が減少(37 [2014] vs 25 [2020])し、自動シーケンサーの

採用施設数が増加(7 [2014] vs 23 [2020])していた。

外部精度評価株 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 88% (49/56)であった。この成績は初年度(2014 年度、67%)や特定ローサイの成績が低かった 2017 年度(70%)と比べると有意に高く( $p = 0.01, p = 0.04$ )、2015 年度(92%)、2016 年度(87%)、2018 年度(93%)、2019 年度(90%)とは有意差は認められなかった( $p = 0.53, p = 1.00, p = 0.35, p = 0.77$ )。

2014 年度に分析精度が低かった 5 ローサイでは、2019 年度も分析精度の改善が維持されていた(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、2016 年度から 2019 年度は VNTR プロファイル既知の菌株 DNA を内部精度管理用検体として配布している。内部精度管理用検体の配布と継続的な外部精度評価の実施が、分析精度の維持と向上に寄与していると考えられる。

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 48、45、34 であり、これまでで最も多くなった(図 1)。JATA (12)は分析難易度が低く、集団発生疑い事例の鑑別等に有用である。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(サーベイランス調査)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。

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。本邦でも自動シーケンサーの導入を支援する必要があると考えられ、結核研究所では 2019 年度に計 10 施設を対象に 2 日間の技術研修を 2 回実施した。2020 年度については COVID-19 の影響で技術研修の開催を取りやめた。こうした背景もあり、結核研究所では自動シーケンサー分析系を用いた結核菌 VNTR 分析に関する標準作業手順書を作成し、近日中に結核研究所 HP ([www.jata.or.jp](http://www.jata.or.jp))にて公開する予定としている。

QIAxcel を採用している一部の施設では、例年、全体的に正答率が低い傾向にあったが、2020 年度は検査精度が向上していた(表 3)。外部精度評価の主要な目的は、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。低精度となった施設においては、内部精度管理や教育訓練を通じて、検査精度が改善されることが期待される。

今後の精度保証については、評価株数を増やすことに加え、日常分析業務で遭遇しうるイレギュラーな検体(一部ローカセット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を検討する必要がある。一部の施設においては、結核菌の全ゲノム配列比較法が実施されており、こうした新しい手法に対応していくことも必要である。

2014 年度～2020 年度の外部精度評価により、本邦における VNTR 分析精度の現況を調査した。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。また、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。そのため、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る。

## E. 結論

2020年度は、56施設を対象にVNTR分析に関する外部精度評価を実施した。各施設で3株の外部精度評価用検体をJATA(12)で分析した場合、全株12ローサイ完全正答したのは49施設(88%, 49/56)であり、4施設では2箇所以上の違いが認められた。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精度保証が重要であり、分析精度の維持と向上を支援する継続的な活動が必要と考えられた。

#### 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

村瀬良朗, 御手洗聡. ゲノム革命がもたらす結核対策の将来展望. 公衆衛生 2020; 84(4):

256-261.

##### 学会発表

1. 村瀬良朗, 細谷真紀子, 下村佳子, 森重雄太, 近松絹代, 青野昭男, 五十嵐ゆり子, 山田博之, 高木明子, 御手洗聡. 本邦における結核菌遺伝子型別検査の外部精度評価成績(2014-2019). 第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会 1月29日-3月31日, 2021年, WEB開催.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

表. 2020 年度結核菌遺伝子型別検査 (VNTR 分析) 外部精度評価において分析対象としたローサイと標準正答

ID	JATA No.															HV			Supply					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	3232	3820	4120	3690 (Mtub 39)	MIRU 40	MIRU 04	2401 (Mtub 30)	MIRU 16	ETR-C
0424	MIRU 10	1955	2074	2163b	2372	MIRU 26	3155 (QUB 15)	MIRU 31	3336	4052 (QUB 6)	4156	1982 (QUB 18)	2163a	ETR-A	3232	3820	4120	3690 (Mtub 39)	MIRU 40	MIRU 04	2401 (Mtub 30)	MIRU 16	ETR-C	
入力	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	
H37Rv	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	5	2	3	4	3	2	5	1	3 <sup>a</sup> (353bp)	2	2	4
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
外部精度 評価株 1	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	12	10	3	3	2	4	3	4
外部精度 評価株 2	4	2	3	3	6	1	6	4	5	7	6	3	8	8	4	6	11	7	3	3	2	4	3	4
外部精度 評価株 3	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	8	9	4	1	7	4	2	2	5	2	3	4

図 1. 参加施設で採用されている VNTR 分析システム

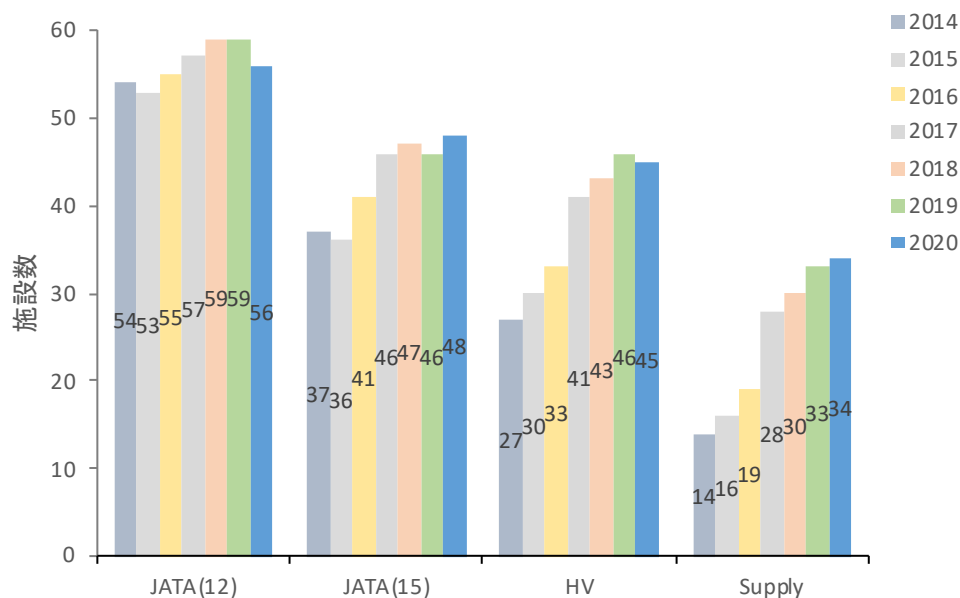


表 1. 3 株を JATA (12) で分析した場合の正答施設数

	2014 施設数(n=54), 割合	2015 施設数(n=53), 割合	2016 施設数(n=55), 割合	2017 施設数(n=57), 割合	2018 施設数(n=59), 割合	2019 施設数(n=59), 割合	2020 施設数(n=56), 割合
全ローサイ完全一致	36, 67%	49, 92%	48, 87%	40, 70%	55, 93%	53, 90%	49, 88%
1ローカス違い	7, 13%	1, 1.9%	5, 9.1%	12, 21%	3, 5.1%	2, 3.4%	3, 5.4%
2カ所以上違い	11, 20%	3, 5.7%	2, 3.6%	5, 8.7%	1, 1.7%	4, 6.8%	4, 7.1%

表 2. 各施設で用いられていた PCR 産物の分子量測定方法

分析方法	2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020	
	施設数	%	施設数	%	施設数	%	施設数	%	施設数	%	施設数	%	施設数	%
アガロースゲル	37	69	34	64	36	66	34	60	31	53	31	53	25	45
自動シーケンサー	7	13	10	19	10	18	13	23	18	31	20	34	23	41
MultiNA	4	7.4	4	7.5	5	9.1	6	11	6	10	4	6.8	5	8.9
QIAxcel	4	7.4	3	5.7	2	3.6	3	5.3	3	5.1	3	5.1	2	3.6
コスモアイ	2	3.7	2	3.8	1	1.8								
Agilent 2100 Bioanalyzer					1	1.8								
LabChip (PE)							1	1.8	1	1.7	1	1.7	1	1.8

表 3. 各分析法におけるローカセットの正答率

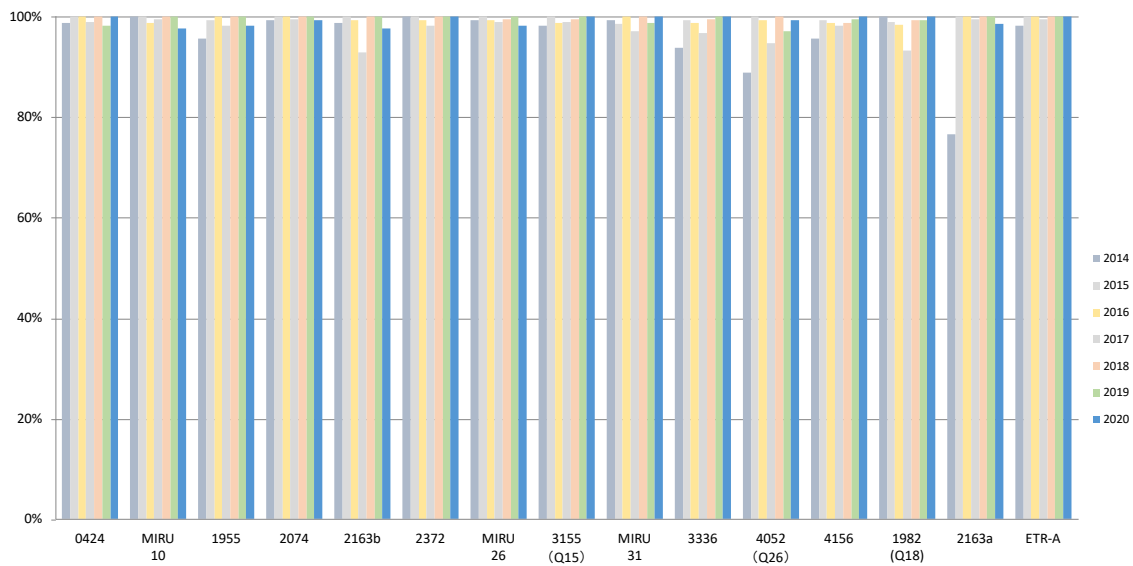
	JATA(12)		JATA(15)		HV		Supply		
	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	
2014	アガロースゲル	37	98.5	22	94.4	15	94.8	5	96.7
	自動シーケンサー	7	97.6	7	92.1	7	92.1	7	95.2
	MultiNA	4	96.5	2	83.3	0		0	
	QIAxcel	4	86.1	4	80.6	4	75	1	94.4
	コスモアイ	2	98.6	2	83.3	1	100	1	100
2015	アガロースゲル	34	99.7	22	100	16	97.2	5	100
	自動シーケンサー	10	100	9	100	10	100	9	100
	MultiNA	4	100	2	100	2	100	1	100
	QIAxcel	3	99.1	2	94.4	2	66.7	0	
	コスモアイ	2	100	1	100	0		1	100
2016	アガロースゲル	35	99.8	26	99.6	19	97.7	8	100
	自動シーケンサー	11	99	10	100	10	98.9	10	100
	MultiNA	5	97.8	3	100	2	100	2	100
	QIAxcel	2	97.2	1	88.9	1	66.7	0	
	コスモアイ	1	100	1	100	1	100	1	100
	Agilent 2100 Bioanalyzer	1	100	0		0		0	
2017	アガロースゲル	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
	MultiNA	6	91.7	4	100	3	100	2	100
	QIAxcel	3	97.2	1	88.9	1	66.7	0	
	LabChip (PE)	1	83.3	1	55.6	1	100	1	100
2018	アガロースゲル	31	99.7	24	100	21	96.3	10	100
	自動シーケンサー	18	99.8	18	100	18	100	18	99.7
	MultiNA	6	100	4	100	3	92.6	1	100
	QIAxcel	3	99.1	1	88.9	1	77.8	0	
	LabChip (PE)	1	100	0		0		1	100
2019	アガロースゲル	31	99.6	23	100	23	97.6	11	100
	自動シーケンサー	20	99.9	20	100	20	100	20	100
	MultiNA	4	98.6	2	100	2	88.9	1	100
	QIAxcel	3	97.2	1	88.9	1	44.4	0	
	LabChip (PE)	1	97.2	0		0		1	100
2020	アガロースゲル	25	99.6	21	100	19	100	10	99.4
	自動シーケンサー	23	99.3	22	100	22	100	21	100
	MultiNA	5	97.2	3	74.1	2	100	1	100
	QIAxcel	2	100	2	100	2	100	1	100
	LabChip (PE)	1	97.2	0		0		1	100

n: 各分析法による報告施設数

正答率 (%) : 各ローカセットにおける 1 ローカセット当たりの正答率 (%)



図 2. 各ローカスにおける正答率



主要な分析法である JATA (12/15) 各ローカスにおける年次的な正答率の推移を示した。2020 年度は全体的に高い正答率 (97.6–100%) であった。