

QIAxcel™ Advanced System を使用した 結核菌 Supply's 15-MIRU VNTR 解析

松本 智成（一般財団法人 大阪府結核予防会 大阪病院 診断検査部）

はじめに

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な情報となります。この結核分子疫学解析は 1990 年代に IS6110 RFLP 法により大きく発展しましたが、試験手法がサザンブロットであるために多量の結核菌ゲノム DNA が必要であり、培養に月単位の日数を要すること、またバンドパターンの再現性や、施設間での情報の共有が難しいといった問題がありました。

現在では、結核菌ゲノム解析によりゲノム上の VNTR (Variable Number Tandem Repeat) 領域が明らかにされ、これらを指標にした VNTR 法が広く利用されるようになりました。VNTR は、結核菌ゲノム上に複数座上する縦列反復配列で、座位ごとにその反復単位長（数十から 100 塩基程度）は異なり、菌株ごとに多様な反復数を示します。この VNTR の多型性を利用して、複数の VNTR 領域での多型（反復数）を ID とした菌株の型別判定を行なうのが VNTR 法です（図 1）。▶

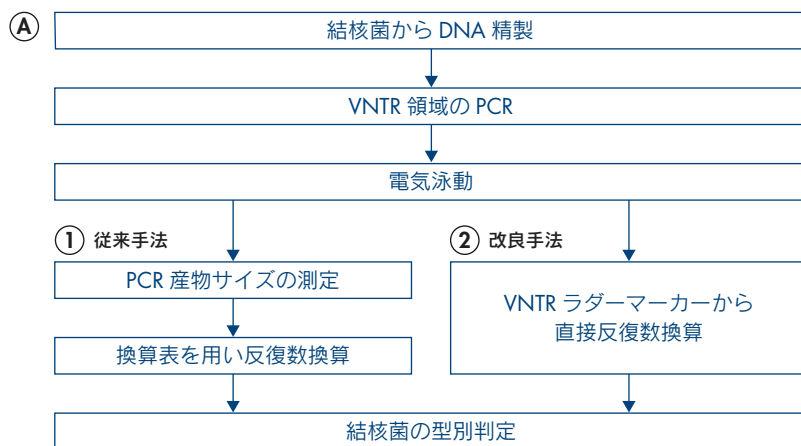


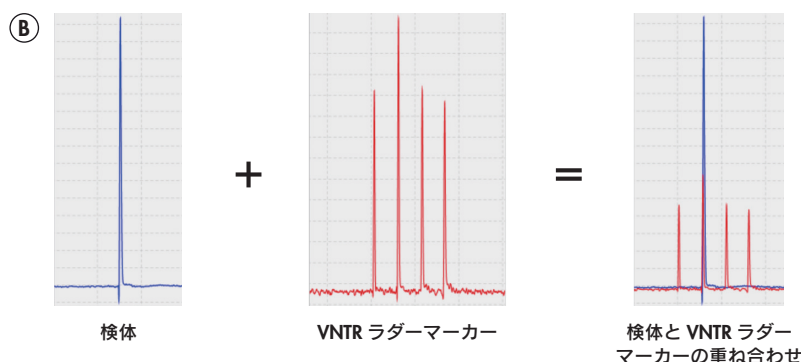
図 1. VNTR による結核菌の型別判定手順

① VNTR による結核菌の型別判定手順概要；結核菌株よりゲノム DNA を抽出した後、VNTR 領域を PCR 増幅する。PCR 産物は電気泳動により分子量ごとに分離させた後、菌株固有の VNTR 領域での多型を利用した型別判定を行なう。

① 従来手法：PCR 産物の鎖長を分子量マーカーで測後、換算表を用いて VNTR 座位ごとの反復数を算出する。

② 改良手法：PCR 産物と各 VNTR ラダーマーカーを比較し、反復数を直接決定する。この改良手法を用いることで PCR 産物の正確なサイズを算出する必要がなくなるため、簡便かつ明瞭な反復数の同定を可能にする利点がある。

③ VNTR ラダーマーカーを利用した型別判定；各 VNTR 領域で見られる様々な鎖長の PCR 産物をプールして VNTR ラダーマーカーを作成し、検体の PCR 産物と直接比較を行なう。各々のデータは QIAxcel Advanced System に付属の ScreenGel Software にて重ね合わせを行ない、反復数の検定・同定を行なう。



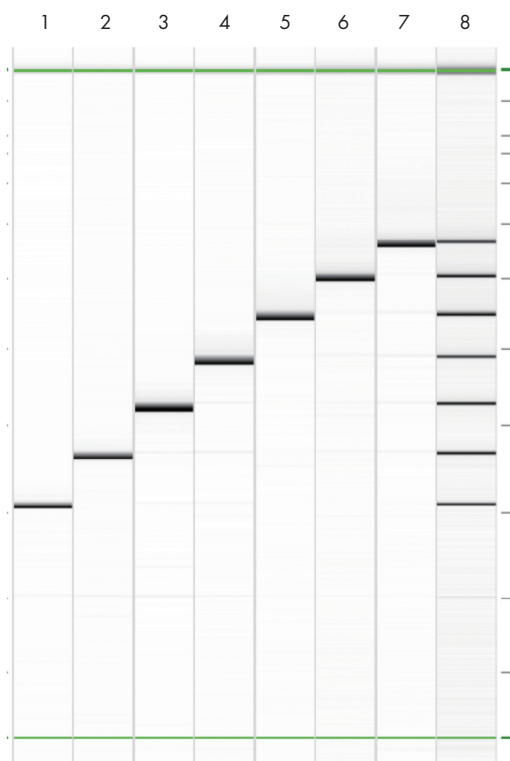


図 2. VNTR ラダーマーカー作成例

VNTR 座位 QUB4156c は、反復回数の単位を 59 bp とした多型を持つ。PCR のための特異的配列領域を共有し、反復単位長に依存した一定間隔でのサイズ多型を示すため、各多型の PCR 産物を混合することで、VNTR の反復数同定に用いる VNTR ラダーマーカーを作成した。ここでは 7 種類の反復回数を持つ菌株を集めて VNTR ラダーマーカーを作成した。

Lane 1: 反復数 1

Lane 2: 反復数 2

Lane 3: 反復数 3

Lane 4: 反復数 4

Lane 5: 反復数 5

Lane 6: 反復数 6

Lane 7: 反復数 7

Lane 8: 各反復数を混合した VNTR ラダーマーカー

さらに VNTR 法は PCR 法を利用するため、必要な DNA 量も少量でよく、死菌体からも分析することができます。また、得られた結果はデジタル化された数値として管理できるため、施設間でのデータ比較や長期間に及ぶ継続的なデータ蓄積が容易であるといった利点があります。

結核菌の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ります。結核菌型判別手法には、アガロースゲル電気泳動が多く用いられています。誰でも簡便に実施できる手法ですが、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いけません。これは泳動ごとゲルの濃度や泳動時間、電圧等の条件が異なるためです。また、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ります。

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、サイジング方法に工夫を凝らした高精度な VNTR の反復数の検出法を確立しましたのでここに紹介します。

一般に市販の分子量マーカーを用いたサイジングは、既知の分子量から推定を行なうために、各分子量マーカー間が十分に分離されていないと、目的の DNA 断片の推定される分子量は信頼性を損ないます。VNTR は座位ごとに反復単位の長さは異なりますが、分子量の推定時に仮に反復単位長以上の誤差が生じたらどうでしょうか。それは多型判定自身を読み誤ることになります。そこで特定の VNTR 座位において、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ました。このマーカーを使用すれば、目的の PCR 産物と同じ長さのラダーマーカーを見つけるだけで繰り返し回数を推定することができます。つまり、煩雑で不確定な市販の分子量マーカーからのサイズ推定作業を排除することができます。本研究では、自動電気泳動システム QIAxcel Advanced System を使用して、Supply's 15-MIRU VNTR 法で VNTR 解析を行ない、VNTR ラダーマーカーの有用性を検討したので以下に報告します（参考文献 1）。

材料および方法

1. 結核菌株、PCR 増幅、測定、解析

130 株の結核菌より菌株ごとの DNA を抽出して実験試料とした。PCR は、AmpliTaqGold® PCR Master Mix, GC enhancer (Life Technologies™ 社) を用いた。PCR の温度プロファイルは 94℃ / 5 分の変性を行なった後、94℃で 30 秒、60℃で 30 秒、72℃で 3 分の設定で 35 回サイクルの PCR 増幅を実施した。測定は QIAxcel Advanced System を使い、QIAxcel High Resolution Kit を使用し、OM2100 メソッドで測定を行なった。また解析は ScreenGel Software を使用した。

2. VNTR ラダーマーカーの調整、登録

Supply's 15-MIRUにおいて、反復数が同定済みの結核菌 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 (図 2)。

3. 測定、反復数の算出

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。

結果および考察

結核菌 130 株より抽出された DNA を、Supply's 15-MIRU 領域における VNTR の反復数の同定に用いました。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、高い相関を示しました (表 1)。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推察されました。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ため、簡便かつ迅速な本同定法は、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と考えます。そして結核菌同様に VNTR 領域を持つ生物種においても、応用が期待できます。 ▶

表 1. QIAxcel Advanced System と i-chip SV1210 との判定結果の一致率

領域	本研究で同定した VNTR 反復数	QIAxcel および i-chip との判定結果の一致率 (%)
ETR-A	1、2、3、4、5、6、7	100.0
ETR-C	2、3、4、5、6、7	97.6
ETR-D	1、2、3、3.5、4、5、6、7、10	100.0
ETR-E	2、3、4、5	99.2
MURU10	1、2、3、4、5、6、7、8、9、11	99.2
MURU16	1、2、3、4、5	98.4
MURU26	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12	100.0
MURU40	1、2、3、4、5、6、7	98.4
Qub11b	2、3、4、5、6、7、8、9	97.5
Qub26	2、3、4、5、6、7、8、9、10	98.0
QUB4156c	1、2、3、4、5、6、7	100.0
Mtub04	1、2、3、4、5、6	100.0
Mtub21	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10	100.0
Mtub30	1、2、3、4	100.0
Mtub39	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15	100.0

さらに、自動電気泳動装置である QIAxcel Advanced System を用いることで、解析の応用性を拡張することが可能となりました。1 つ目の利点としては、アガロース電気泳動ではできなかった異なる電気泳動の結果を比較することが可能になることです。複数の菌種や VNTR 領域を比較する場合、同一のアガロースゲル上で比較することが難しい場合もありますが、QIAxcel Advanced System では装置のソフトウェアである ScreenGel Software にデジタルデータとして蓄積されるため、過去に測定した検体との時間を越えた比較解析を可能にします。

2 つ目の利点として、VNTR ラダーマーカ―は、一度 QIAxcel Advanced System で測定・登録を行なうと、その後の他サンプル解析時に再利用可能である点が挙げられます。これは QIAxcel Advanced System が電圧や泳動時間等の泳動条件を管理しているためです。自動電気泳動装置一般に言えることですが、数 10 bp から 1,000 bp を超える DNA 断片を分離する場合、単一条件では分離が不十分で、サイズ推定において誤差が大きくなることがあります。結核菌の VNTR 領域である QUB26 は反復単位長が 111 塩基であるなど、反復数によっては 1,000 bp を超える PCR 産物となることも珍しくないですが、QIAxcel Advanced System を用いた解析においては、VNTR ラダーマーカ―を使用すれば、分子量サイズの推定を行わずとも、反復数を見出すことができるため、精度の高い結果を簡便に得られました。

最後に QIAxcel Advanced System は、12 連 PCR チューブや 96 PCR ウェルプレートを、そのまま測定に供することができるため、実験手順が簡素化でき、多検体処理にも適していると考えます。

参考文献

1. Matsumoto T, Koshii Y, Sakane K, Murakawa T, Hirayama Y, Yoshida H, Kurokawa M, Tamura Y, Nagai T, Kawase I. A novel approach to automated genotyping of Mycobacterium tuberculosis using a panel of 15 MIRU VNTRs. J Microbiol Methods. 2013 Jun; **93**(3): 239-41.

記載の製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.com の “Trademarks and Disclaimers” をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.com から入手可能です。

QIAxcel Advanced System は電気泳動アプリケーションを高速かつ高感度で行ないます。詳細は弊社ウェブサイト www.qiagen.com/QIAxcelAdvJP をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, QIAxcel™ (QIAGEN Group); AmpliTaqGold®, Life Technologies™ (Life Technologies).

製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。© 2016 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.com

株式会社 キアゲン | 〒104-0054 | 東京都中央区勝どき3-13-1 | Forefront Tower II
Tel:03-6890-7300 | Fax:03-5547-0818 | E-mail:techservice-jp@qiagen.com