

資料

マルチプレックスPCR法を利用した 結核菌のVNTR解析の改良と性能評価

平塚 貴大

Improvement and performance evaluation of the VNTR analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using multiplex PCR

HIRATSUKA Takahiro

(Received: October 21, 2024)

マルチプレックスPCRを利用した結核菌のVNTR解析法を確立した。検討の結果、6種類のプライマーミックスと、PCR試薬のKOD-Multi & Epi (TOYOBO)を使用することで、最も効率の良い検査法を確立することができた。従来実施してきた検査法との比較の結果、一部結果が異なる場合があり、タンデムリピートのリピート数が多い場合にPCRの増幅が弱まることが原因と考えられた。確立した検査法は、判定が困難な場合、シングルPCRを併用することが必要であるが、PCRのマルチプレックス化による操作性の向上などの利点は大きく、VNTR解析において有用な方法である。

Key words : 結核菌, VNTR, マルチプレックスPCR, キャピラリーシーケンサー

結 言

国内における結核罹患率は徐々に減少しており、2021年に人口10万人あたり10人未満という、低蔓延国の基準を初めて下回った[1]。しかし、依然として他の先進国と比較すると高い水準にあり、今後も結核への対応は、感染症予防の中でも重要な項目のひとつである。

結核の感染防止対策において、感染経路を把握することは、感染の拡大防止につながる重要な要素である。分子疫学解析は、細菌のDNAを利用して感染経路を特定する手法であり、結核菌においては、Variable numbers of tandem repeats (VNTR) 解析が用いられている。VNTR解析では、タンデムリピートと呼ばれる特定の配列が繰り返している領域について、PCRを実施し、産物長からリピート数を算出し、これを菌株間で比較することで菌株の異同判定を行う。当センターでは、結核菌の解析において24領域のタンデムリピートについて解析を行っている。また、PCR産物の長さはキャピラリーシーケンサーを使用したフラグメント解析で測定し、これをもとにリピート数を算出し

ている。しかし、1株あたり24領域について個別にPCRを実施して解析することは容易ではなく、株数が増加することによる負担の増加量が多い。本研究では、先行する知見を基に[2-5]、従来24領域について個別に実施していたPCRについて、マルチプレックス化を行うために最適な試薬及び条件を検討し、検査法を確立した。また、確立した検査法の性能を把握するため、リピート数と、PCR産物の産生量について、従来実施している方法（以下、従来法）との比較を行った。

方 法

1 マルチプレックスPCRに用いるプライマーミックスの検討

使用するプライマーは、(一財)日本公衆衛生協会地域保健総合推進事業「地域における健康危機管理体制確保のための地方衛生研究所の連携協力の推進並びに検査精度の向上及び疫学情報機能の強化(保健情報疫学部会)」において実施された、平成28年度結核菌VNTR技術研究会において紹介されたものを使用した。これらのプライマーには、キャピラリーシーケンサーでフラグメント解析を行うために、24領域のタンデム

リピートに対応する各プライマーセットのうち、フォワード側のプライマーに4種類 (FAM, VIC, PET, NED) の蛍光色素のいずれかひとつが標識されている。これらのプライマーを利用して、最も効率的な組み合わせを検討した。

2 検討に使用したPCR試薬

FastStart High Fidelity PCR System (Roche), KOD -Multi & Epi- (TOYOBO), Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (TaKaRa), Multiplex PCR Master Mix 2× (biotechrabbit), QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (QIAGEN), Platinum SuperFi II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) の6種類のマルチプレックスPCR用試薬を用いて、各試薬で推奨される方法に従い、24領域のタンデムリピートについてPCRを実施した。

3 フラグメント解析

マルチプレックスPCRによって得られた各タンデムリピートのPCR産物を3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific) を使用してフラグメント解析を行った。フラグメント解析によって得られた産物長から、GeneMapper (ThermoFisher Scientific) を用いて各領域におけるタンデムリピート数を求めた。

4 従来法との比較検討

当センターに保管されていた53株の結核菌のDNAについて、マルチプレックスPCRによって得られた結果と従来法で実施した結果を比較するため、両方法で解析を行い、得られた各タンデムリピート領域におけるリピート数の比較を行った。また、PCR産物の産生量を比較するため、キャピラリーシーケンサーで解析を行った際に得られるピークの蛍光強度について比較した。

結 果

1 プライマーミックスの検討

1検体あたりのPCR実施回数を可能な限り低減させるため、プライマーミックス数の削減を検討したが、同一色素で標識されたタンデムリピート領域は、キャピラリーシーケンサーによる解析でピークが重なる場合があり、同時に解析することが困難であった。このため、異なる蛍光色素で標識される4領域に対応したプライマーの組み合わせを1セットとして、6セットのプライマーミックスを組み合わせることが最適であった(表1)。各プライマーミックスについて、後述するPCR試薬の選定の後に、プライマーの濃度調整を行い、表1に示す最適な濃度配分を決定した。

表1 マルチプレックスPCRに使用したプライマーの組み合わせ

Primer Mix	Locus	Forward		Reverse		Final conc. (μmol/L)
		Fluorescent Dye	Sequence	Sequence	Sequence	
Mix 1	MIRU 04	Supply(15)	FAM	GTCAAACAGGTCACAACGAGAGGAA	CCTCCACAATCAACACACTGGTCAT	0.2
	MIRU 10	JATA02	VIC	ACCGTCTTATCGGACTGCACTATCAA	CACCTTGGTGATCAGCTACCTCGAT	0.2
	MIRU 16	Supply(15)	NED	CGGGTCCAGTCCAAGTACCTCAAT	GATCCTCTGATTGCCCTGACCTA	0.2
	MIRU 26	JATA07	PET	GCGGATAGGTCTACCGTCGAAATC	TCCGGGTCATACAGCATGATCA	0.3
Mix 2	MIRU 31	JATA09	FAM	CGTCGAAGAGAGCCTCATCAATCAT	AACCTGCTGACCGATGGCAATATC	0.1
	MIRU 40	Supply(15)	VIC	GATTCCAACAAGACGAGATCAAGA	TCAGGCTTTTCTCTCACGCTCTCG	0.1
	ETR-A	JATA15	NED	CGAAGCCTGGGGTCCCGCGATTT	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	0.1
	ETR-C	Supply(15)	PET	GTGAGTCGCTGCAGAACCCTGCAG	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG	0.3
Mix 3	Mtub 04	JATA01	FAM	GTCCAGGTTGCAAGAGATGG	GGCATCCTCAACAACGGTAG	0.2
	Mtub 21	JATA03	VIC	AGATCCCAGTGTGTCGTCGTC	CAACATCGCCTGGTTCTGTA	0.2
	Mtub 30	Supply(15)	NED	AGTCACCTTTCTACCCTCGTAAC	ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG	0.2
	Mtub 39	Supply(15)	PET	AATCACGGTAACTTGGGTTGTT	GATGCATGTTCCGACCCGTAG	0.2
Mix 4	QUB 11b	JATA05	FAM	CCGATGTAGCCCGTGAAGA	AGGGTCTGATTGGCTACTCA	0.3
	QUB 26	JATA11	VIC	GAGCCAAATCAGGTCGG	GAGGTATCAACGGGCTTGT	0.3
	QUB 4156	JATA12	NED	TGGTCGCTACGCATCGTGTGCGCCCGT	TACCACCCGGGCGAGTTTAC	0.2
	Mtub 24	JATA04	PET	CACTAGCTGCGTCACTGG	GCTGATTCGCCGACGAAAG	0.3
Mix 5	QUB 11a	JATA14	FAM	CGTGATGTTGATCGGGATGT	ACCCTGGAGTCTGGCATC	0.2
	QUB 15	JATA08	VIC	TACATTCGCGGCCAAAGG	AGGGGTTCTCGGTCACCC	0.1
	QUB 18	JATA13	NED	ATCGTCAGCTGCGGAATAGT	AATACCGGGGATATCGGTTT	0.3
	QUB 3232	HV*	PET	CAGACCCGGGTCATCAAC	CCAAGGGCGGCAATTGTGTT	0.3
Mix 6	QUB 3336	JATA10	FAM	ATCCCGCGGTACCCATC	GCCAGCGGTGTCGACTATCC	0.3
	VNTR 3820	HV	VIC	TGCGCGGTGAATGAGACG	ACCTTATCCTTGGCGAC	0.1
	VNTR 4120	HV	NED	GTTCACCGGAGCCAACC	GAGGTGGTTTCGTGGTCG	0.1
	VNTR 2372	JATA06	PET	ACCTCCGTTCCGATAATC	CAGCTTTCAGCTCCACA	0.2

* HV: Hypervariable region

プライマーは、(一財)日本公衆衛生協会地域保健総合推進事業「地域における健康危機管理体制確保のための地方衛生研究所の連携協力の推進並びに検査精度の向上及び疫学情報機能の強化(保健情報疫学部会)」平成28年度結核菌VNTR技術研究会において紹介されたものを使用。

2 PCR試薬と反応条件の検討

6種類のPCR試薬を使用してマルチプレックスPCRを実施し、結果を比較したところ、KOD-Multi & Epi-及びPlatinum SuperFi II DNA Polymeraseで、すべての領域においてタンデムリピートが検出されており、安定して高い蛍光強度が得られていた。他の試薬については、一部の領域においてPCRの増幅効率が悪く、PCR産物が少ない、あるいは産生されない場合があった。1検体当たりの費用と調整方法の簡便さの観点から、本検査法ではKOD-Multi & Epi-を使用することとした。本試薬についてPCRの反応条件の検討を行った結果、94°C/2分で初期変性を行い、98°C/10秒、60°C/30秒、68°C/1分のサイクルを35回繰り返す、72°C/10分の後伸長を行うことで最も良好な結果を得られた。

3 従来法との比較検討

確立した検査法と従来法によって得られた、53株分の解析結果について比較を行ったところ、おおむねすべての検査結果が一致したものの、24領域のうち5領域(QUB26, QUB11a, QUB3232, VNTR3820, VNTR4120)においては、一部の結果が一致しなかった(図1)。これは、今回確立した検査法においてピークが確認できな

ったことが要因であり、当該箇所においてPCRによる増幅効率が悪かったことが考えられた。

各タンデムリピート領域におけるピークの蛍光強度について確認したところ、タンデムリピート領域ごとに、蛍光強度のばらつきの程度に違いがみられ、結果が一致しなかった領域の多くは、ばらつきの大きい領域であった。これらの領域においてはピークの蛍光強度が 1.0×10^3 を下回る場合があり、非特異な産物のピークとの区別が困難であった(図1)。

蛍光強度のばらつきに影響する要因について検討するため、タンデムリピート領域の中でばらつきが大きく、従来法との結果の一致率が低かったQUB3232, VNTR3820の2領域と、ばらつきが少なく、従来法との一致率が100%であったMtub30について、タンデムリピートのリピート数と蛍光強度の関係性について検証した(図2)。この結果、Mtub30はタンデムリピートのリピート数が1から4と少なく、多様性も低い一方で、QUB3232, VNTR3820はリピート数が多様であり、領域内のリピート数が多くなると蛍光強度が減少する傾向がみられた。また、従来法と一致しなかった結果は、高リピート数において生じる傾向にあった。

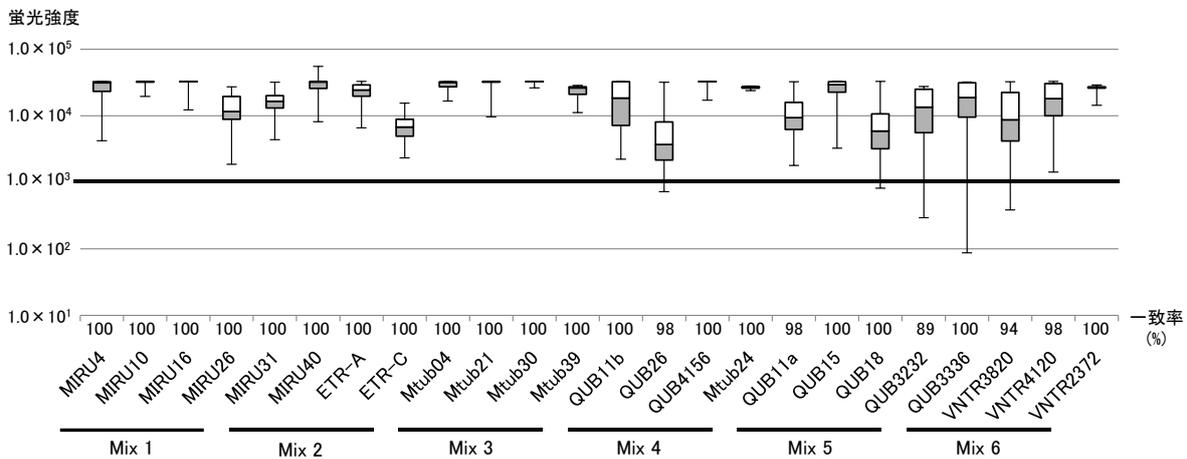


図1 各タンデムリピート領域の蛍光強度と従来法との結果の一致率

24領域のタンデムリピートにおけるピークの蛍光強度を、プライマーミックスの順(Mix 1~Mix 6)に箱ひげ図で示した。蛍光強度が太線で示した 1.0×10^3 を下回ると、リピート数の判定が困難であった。グラフの下部に、従来法と今回検討した検査法の結果の一致率をパーセンテージで示した。

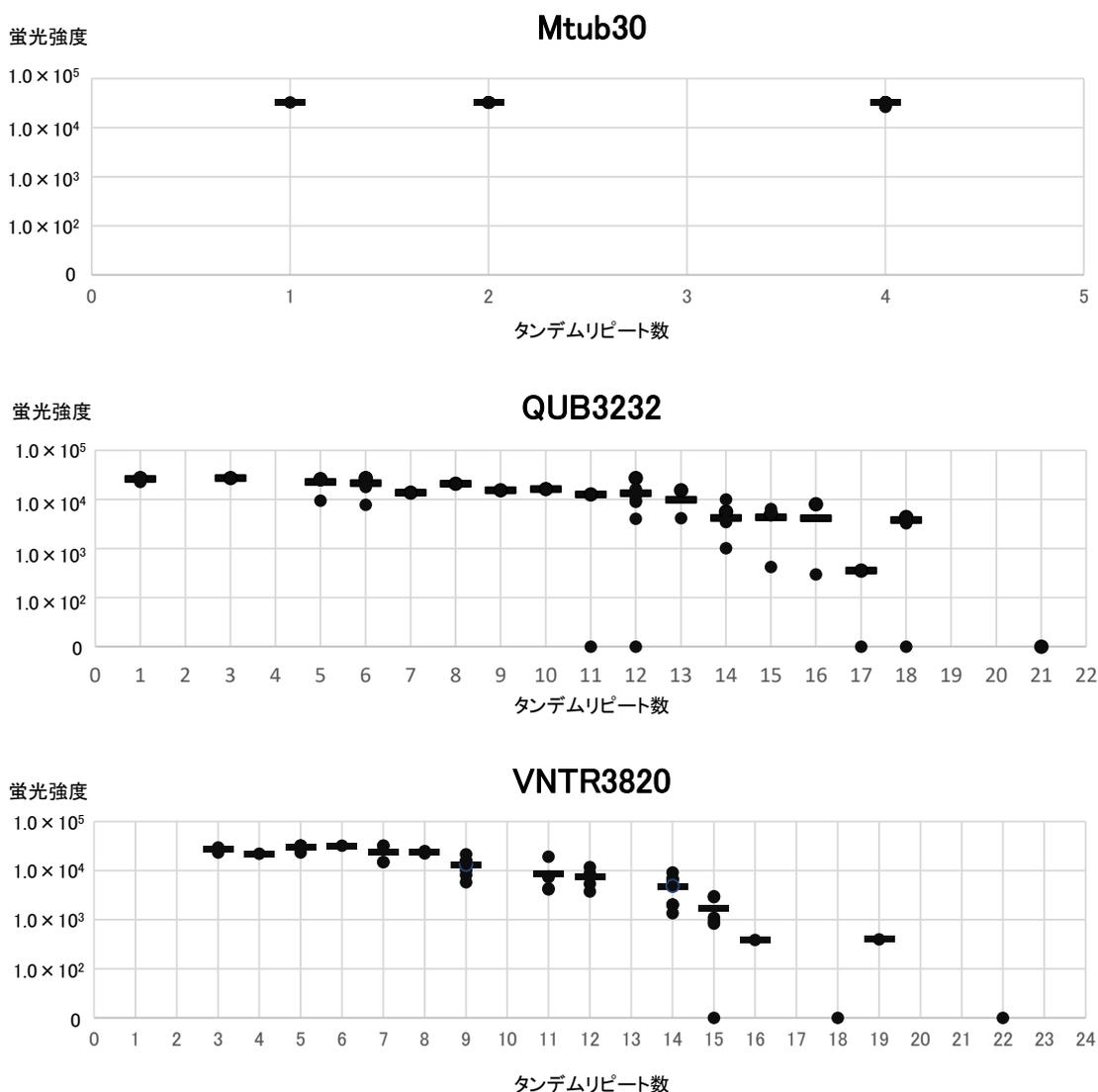


図2 マルチプレックスPCRによる蛍光強度とタンデムリピート数

53株におけるVNTR解析の結果のうち、Mtub30、QUB3232、VNTR3820の3領域について、タンデムリピート数とマルチプレックスPCRによって得られた蛍光強度を示した。実測値を点で、平均値を棒で示す。蛍光強度が0の点は、マルチプレックスPCRではピークが確認されなかった結果を示している。

考 察

従来法による結核菌のVNTR解析では、1検体につき24回のPCRを実施する必要があったが、今回確立した検査法においては、1検体につき6回のマルチプレックスPCRを実施することで検査の効率化ができた。従来法との比較の結果、ほぼすべての結果が一致しており、同等の性能があると考えられた。また、従来法においてはPCR産物を混合し、希釈してからキャピラリーシーケンサーで解析する必要があったが、今回確立した

検査法では、PCR産物の混合操作が不要となり、操作時間の短縮とミスの減少につながった。以上のことから、今回確立した検査法は十分に実用に耐えうる検査法であると考えられた。しかし、従来法とは結果が一致しない場合もあり、その要因として、タンデムリピートのリピート数が多い場合、PCRによる増幅効率が悪くなってしまい、結果としてピークの蛍光強度が落ち、解析不能となることが考えられた。また、PCRのマルチプレックス化により、QUB3232などの一部の領域においては微小な非特異反応がみられた。蛍光強

度が 1.0×10^3 程度の場合はレポート数の算出が困難であり、非特異反応との区別も難しくなることから、当センターにおいては、蛍光強度が 1.0×10^3 程度の場合は、該当する領域においてのみ、追加で従来法によるシングルPCRを実施することで、結果の正確性を担保することとした。追加で検査を行う必要がある可能性を考慮しても、マルチプレックスPCRを使用することによって、検査効率は向上したと考えている。今後、確立した検査法を利用することで、より多くの結核菌についてVNTR解析を実施することが可能であり、本検査法が結核の感染拡大防止に貢献することが期待される。

文 献

- [1] 厚生労働省. 2022年 結核登録者情報調査年報集計結果について.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00010.html, 参照 2024-10-1
- [2] 淀谷雄亮, 原俊吉, 他. 結核VNTR法におけるmultiplex PCRを用いた解析方法の検討. 平成30年度川崎市健康安全研究所年報第6号. 2018, 106-107.
- [3] 高橋洋平, 橋本恭奈, 他. キャピラリー電気泳動シーケンサー及びマルチプレックスPCRによる結核菌VNTR解析. 青森県環境保健センター年報. 2021, 32, 20-22.
- [4] 青木順子, 木村有紀, 他. VNTR解析による新潟県内の結核菌遺伝子型別結果について. 令和3年度新潟県保健環境科学研究所年報. 2022, 37, 56-60.
- [5] 公益財団法人 結核予防会 結核研究所. キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法の標準作業手順書.
https://jata.or.jp/dl/pdf/data/SOP_VNTR_v1.2_20240628.pdf, 参照 2024-10-1