

課題番号3

キャピラリー電気泳動法を用いたフラグメント解析による結核菌VNTR解析の検討

微生物部

○保田和里 川原康彦 福留智子
内山浩子 吉野修司 杉本貴之

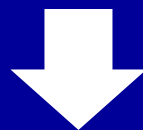
結核対策における 分子疫学調査の役割

1. 接触者健診における感染経路の証明
2. 疫学的に疑いがもたれなかった感染経路の発見
3. 再発と再感染の鑑別
4. 地域の感染状況の解明

結核菌分子疫学調査

【遺伝子型が一致した場合】

- ① 最近の患者間の感染
- ② 過去に同一流行株に感染した者が同時発病
- ③ VNTR解析の分解能の限界が原因で、本来異なる菌株が同一パターンを示すと判定される場合

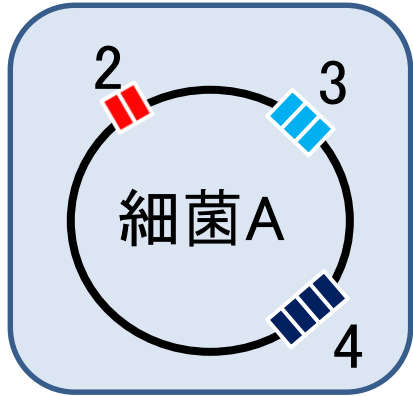


疫学情報と合わせた検証が必要

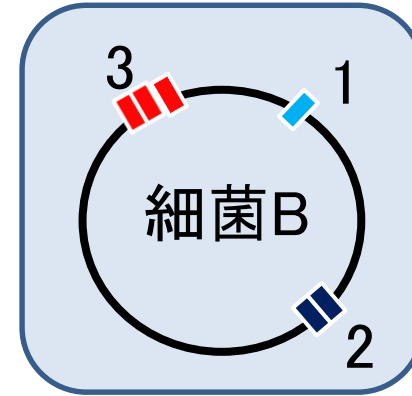
VNTR解析

【VNTR】（Variable Numbers of Tandem Repeats）

結核菌ゲノム上に存在する、50-100bpを単位として繰り返される反復配列の数を、菌株間で比較する遺伝子型別法



型別： 2-3-4



型別： 3-1-2

結核菌分子疫学解析

【JATA(12)-VNTR法】

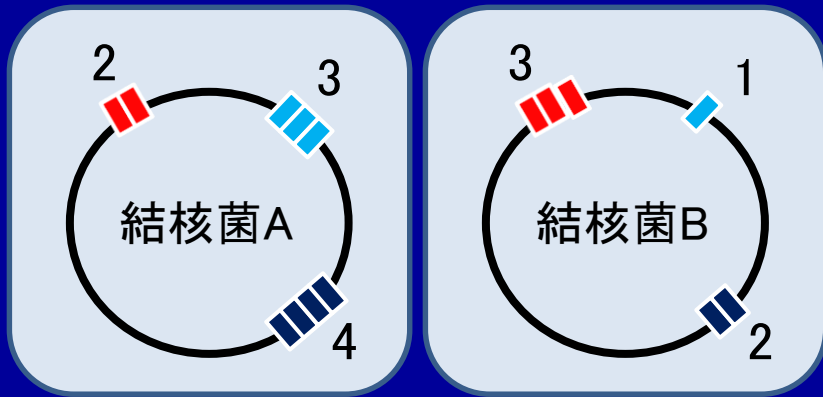
- 国内の標準法
- 12領域のVNTR型別を行う
- 東アジアに多い結核菌株「北京型ファミリー」の型別において分解能が高い

【JATA(15)+HV(超多変領域)】

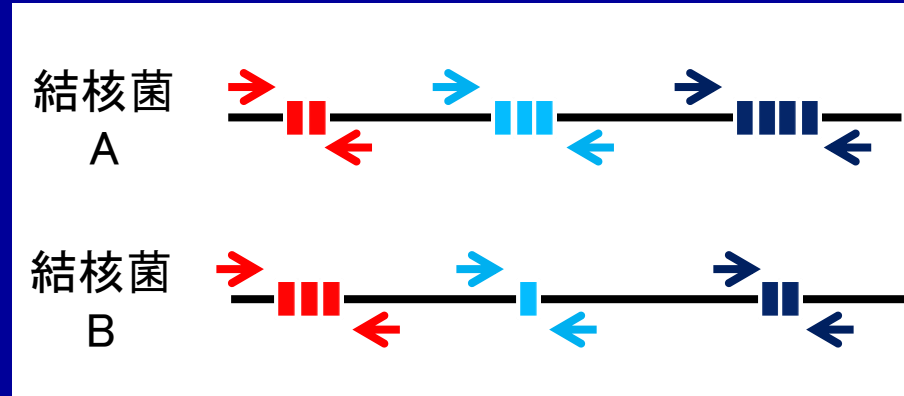
- 菌株識別力を高めるために追加解析する
- 12領域一致の場合に測定

方法

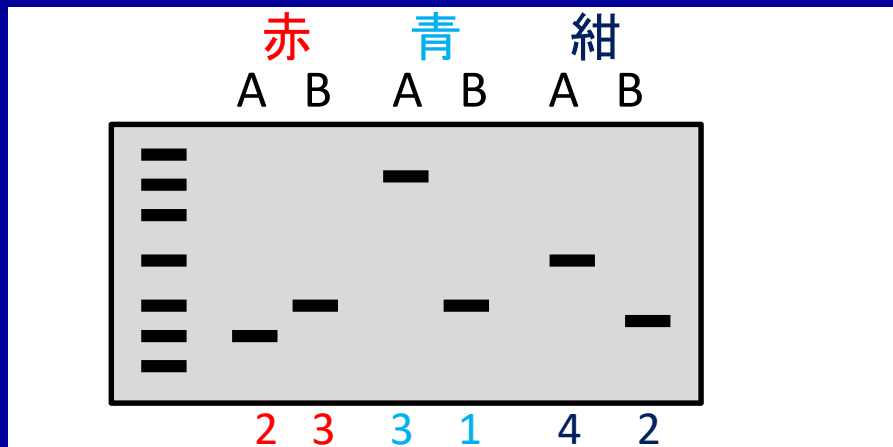
①結核菌からのDNA抽出



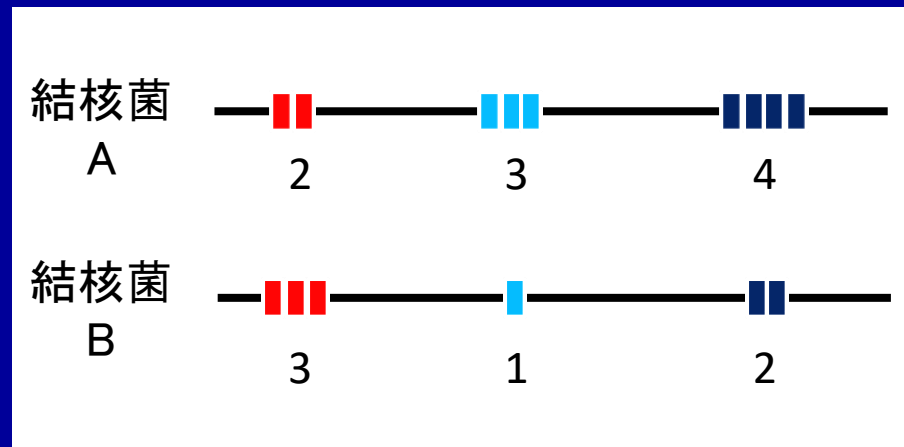
②VNTR領域のPCR



③PCR産物のサイズ測定 (アガロース電気泳動等)



④反復配列の数を算出



JATA(12)-VNTR法のVNTR換算表

JATA No.	Unit (bp)	反復数とPCR産物サイズ(bp)				
		0	1	2	3	4
1	51	535	586	637	688	739
2	53	483	536	589	642	695
3	57	208	265	322	379	436

PCR産物のサイズ測定に用いる 電気泳動の種類

- アガロースゲル電気泳動
- マイクロチップ電気泳動
MultiNA、コスモアイ、
Agilent 2100 Bioanalyzer、LabChip (PE)
- キャピラリー電気泳動
自動シーケンサー、QIAxcel

各施設で用いられている PCR産物のサイズ測定方法

分析方法	2014年	2015年	2016年	2017年	2018年
アガロースゲル	37	34	36	34	31
マイクロチップ					
MultiNA	4	4	5	6	6
コスモアイ	2	2	1		
Agilent 2100 Bioanalyzer			1		
LabChip (PE)				1	1
キャピラリー					
自動シーケンサー	7	10	10	13	18
QIAxcel	4	3	2	3	3

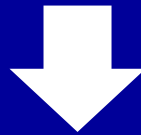
PCR産物のサイズ測定 長所・短所

	アガロース ゲル	マイクロチップ (MultiNA)	キャピラリー (シーケンサー)
分析工程	手作業	完全自動	完全自動
コスト	◎	○	△
再現性	△	○	◎
分解能 (700bp未満)	○	◎	◎
分解能 (700bp以上)	○	△	△
PCR産物の サイズ測定	目視	自動	自動
VNTR型別	目視	目視	自動

調査研究の目的

- 正確性、再現性の高いVNTR型別方法の検討

マイクロチップ電気泳動法
目視によるVNTRの算出



キャピラリー電気泳動法を用いたフラグメント解析

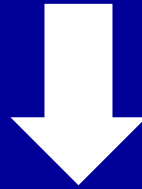
- PCR産物が700bpを超える場合の分解能と再現性の向上

実験計画

- ① キャピラリー電気泳動法を用いたフラグメント解析によるVNTR型別のプロトコール作成
- ② アガロースゲルやマイクロチップ電気泳動を用いた、過去の結核菌VNTR解析データと比較し、相同・異同をみる
- ③ マイクロチップ及びキャピラリー電気泳動の共通の問題点である、PCR産物が700bpを超える場合の分解能と再現性の向上

効果

キャピラリー電気泳動法の導入



- 検査の正確性、再現性が向上
- 正確なVNTR型別が可能
- 精度の高い分子疫学解析データの提供