

第40回 衛生微生物技術協議会 熊本 2019年7月10日

# レファレンスセンター報告

## 結核

# 討議事項

- 2018年度に実施した結核菌VNTR型別法の外部精度評価結果に関する協議（結核研究所・村瀬）
- 結核菌分子疫学調査におけるゲノム解析の利用に関するアンケート調査報告（山形衛研・瀬戸）
- 本年度の活動内容

# VNTR分析に関する外部精度評価の方法

- レファレンス委員を介して、EQA実施プロトコールの配布・参加募集
- 参加希望のあった衛生研究所を対象
- 結果既知の結核菌3株のDNAを送付
- 内部精度管理用結核菌DNAの配布
- 各施設でのVNTR分析結果を結核研究所にて標準結果と比較解析

# 外部精度評価で用いたVNTR分析結果報告シートの概要

施設名

PCR産物の測定方法

分析結果シート

分析施設 担当者)  
**XX研究所 (X)**

分析方法  
**キャピラリー電気泳動 (ロスモアイ)**

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
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						
H37Rvの コピー数	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	5	2	3	4	3	2						
Strain A(QC-DNA 1)	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	8	11	4	1	11	4	2	2	5	2	3	4
Strain B(QC-DNA 2)	2	5	2	1	2	3	1	2	3	13	8	4	7	N	3	6	8	4	3	2	1	4	1	4
Strain C(QC-DNA 3)	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	14	9	3	3	2	4	3	5

JATA(12/15)

HV

Supply(15)

国内で推奨される共通の分析対象

超可変領域、  
高識別能  
(オプション)

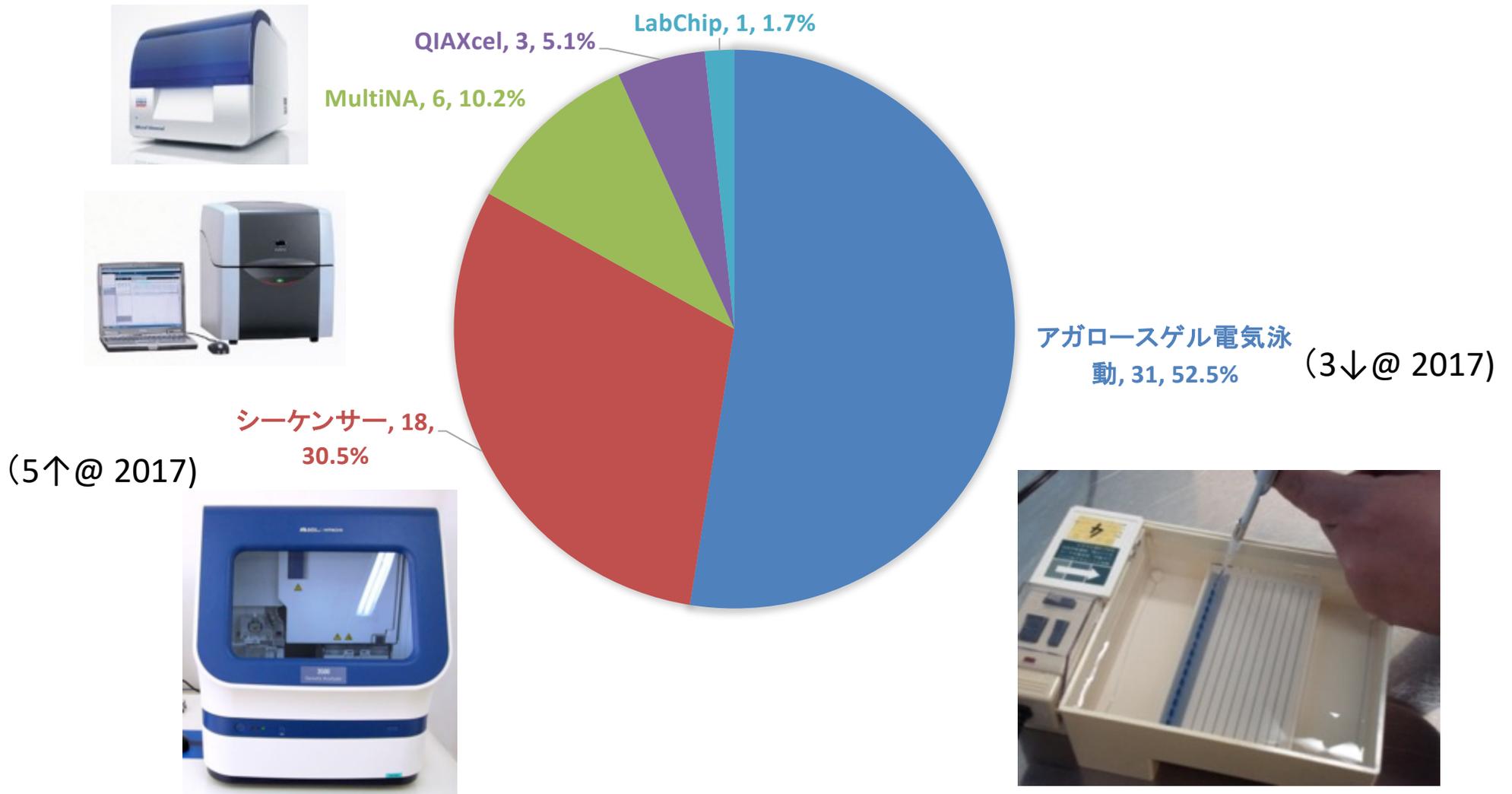
国際比較  
(オプション)

参加施設から電子メール等で報告シートを回収し、集計・分析を実施

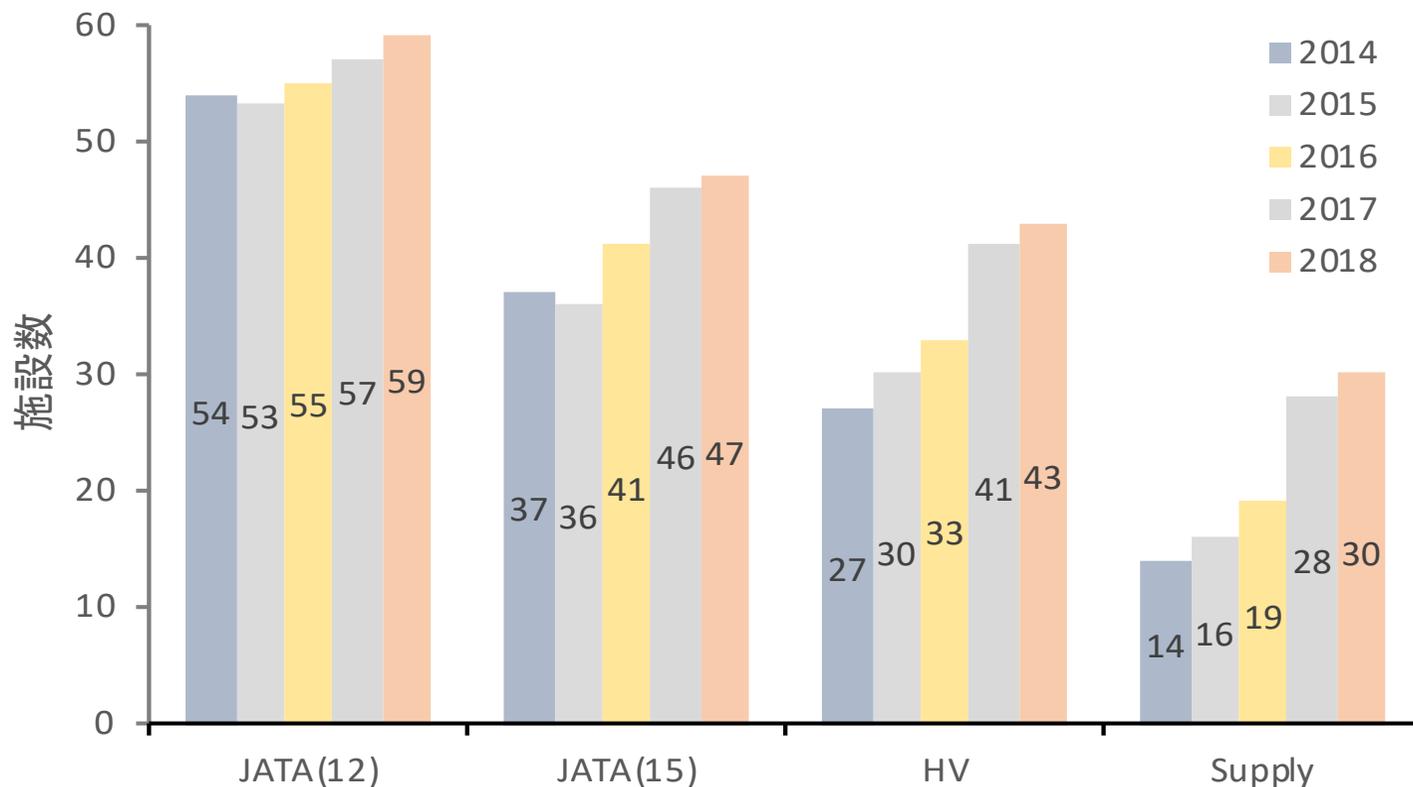
# 2018年度VNTR分析外部精度評価

- 59施設の参加（2017年度 [n=57]）
- 内部精度管理用検体、外部精度評価用検体の発送（2018.11.19）
- 59施設より分析結果を報告（～2019.1.12）

# 各施設で用いられているDNA分子量の測定法 (2018年度, 59施設)



# 参加施設で採用されているVNTR分析システム



JATA-12は基本的に全施設実施。識別能を上げるためにJATA-15、HV、Supplyを追加分析する施設数が年々増加

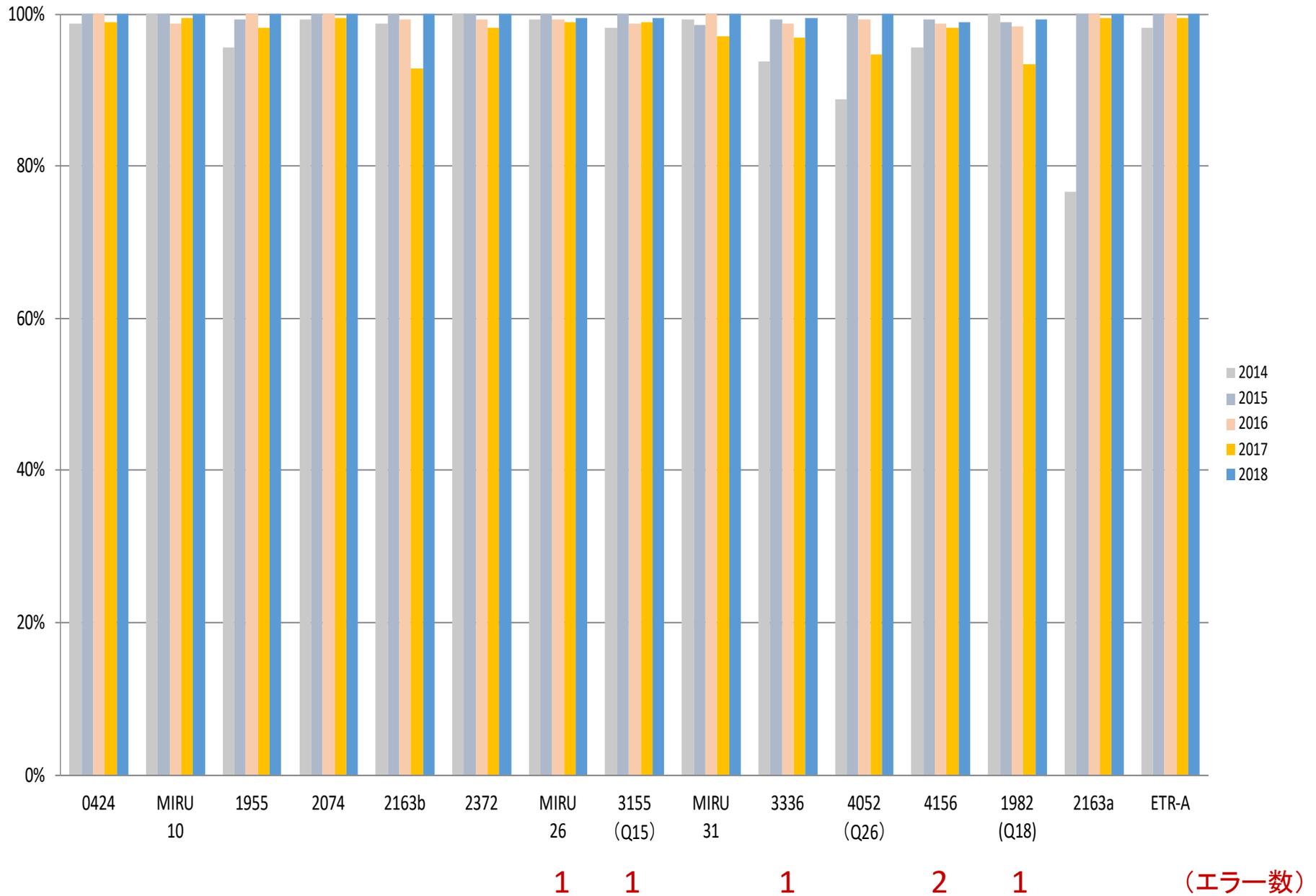
# 2018年度 外部精度評価の結果

## 結核菌3株をJATA-12 VNTR法で分析した場合の正答施設数

	2014 (54施設)	2015 (53施設)	2016 (55施設)	2017 (57施設)	2018 (59施設)
完全一致 (n, [%])	36 (67%)	49 (92%)	48 (87%)	40 (70%)	<b>55 (93%)</b>
1 locus違い (n, [%])	7 (13%)	1 (2%)	5 (9%)	12 (21%)	3 (5%)
2 loci以上の違い (n, [%])	11 (20%)	3 (6%)	2 (4%)	5 (9%)	1 (2%)

- 完全一致施設の割合 これまでで最も高い
  - 2 loci以上の違いがあった施設の割合 これまでで最も少ない
- } これまでで最も正答率が高い

# 各locusにおける正答率(%)



# 各分析法におけるローカセットの正答率

結核菌3株をJATA-12 VNTR法で分析した場合の正答との一致率

	JATA-12		JATA-15		HV		Supply	
	n	正当%	n	正当%	n	正当%	n	正当%
Agarose	31	99.7	24	100	21	96.3	10	100
Sequencer	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	-	-
Labchip	1	100	-	-	-	-	1	100
	59		47		43		30	

# 外部精度評価まとめ

- 2018年度は59施設に対して外部精度評価を実施(5回目)
- 2018年度の結果では、3株のEQA用検体をJATA 12で分析した場合の正答施設が55施設(93%)
- 自動化と分析精度に優れるシーケンサーの採用施設が増加傾向(13→18施設)
  - ▶ 研修、マニュアル、Bin setの配布等で支援する必要
- 今後も外部精度評価や研修を通じて、分析精度の維持と向上を図る必要がある。
- プライマー設定の共通化を図る。

# VNTR研修の実施

- 2019年5月30-31日に本年度1回目の研修を実施
- 研修精度を考慮し、一回当たり5名程度まで
- 一般的な結核菌の取扱からフラグメント解析によるVNTRの実習まで実施
- 来年度も実施するため、9月中にアナウンスする。

# 結核菌ゲノム解析に関するアンケート調査結果概要

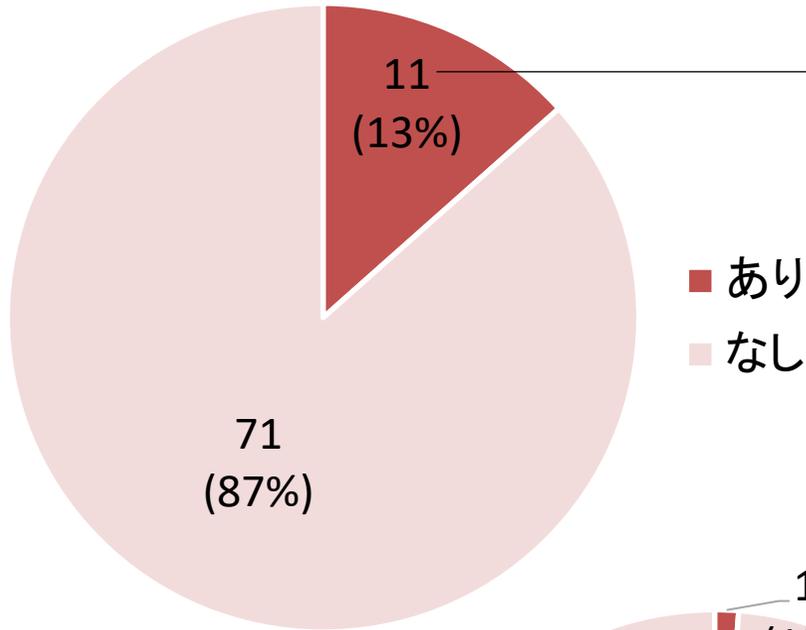
## 目的

- 第94回日本結核病学会総会シンポジウムにおける 地衛研の現状紹介（2019.6.8 済）
- AMED結核研究所研究班において、現場に即した結核菌ゲノム解析のあり方を考えるための基礎データとすること

# 調査の概要

アンケート実施期間	平成31年2月15日～3月6日
回答施設数	82施設
回答率	100%
回答条件	機器設置・解析実施状況は、平成30年12月31日現在の状況を回答

## 2(1) NGS据え置き機の設置



## 2(2) 設置機種

MiSeq 1台: 10施設

iSeq 2台: 1施設

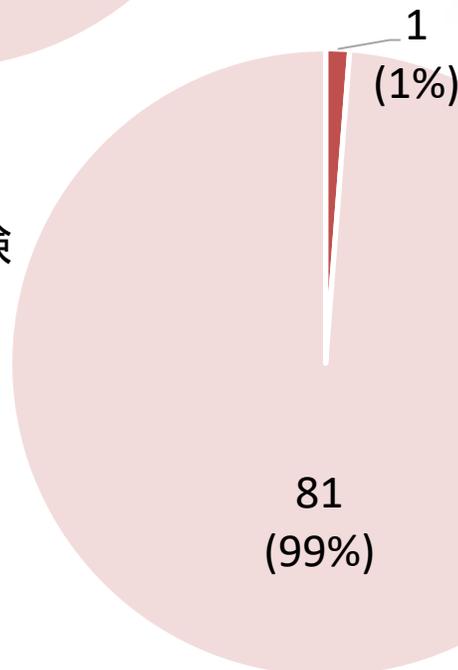


MiSeq, 1700万  
*Mtb* 40株/run



iSeq 100, 400万  
*Mtb* 4株/run

## 2(3) モバイル型NGS使い捨て機を用いた病原体ゲノム解析の経験



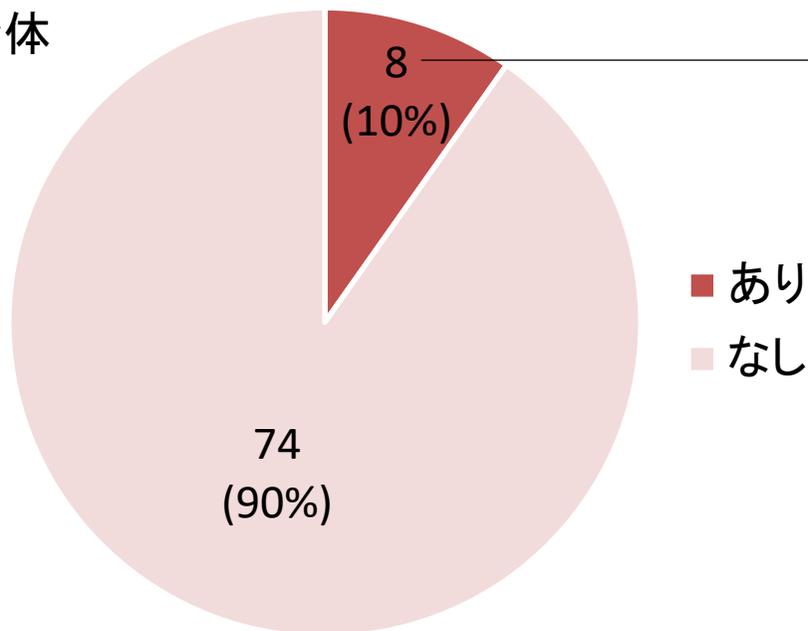
あり  
なし



MinION

### 3(3) 結核菌ゲノム解析の実施、もしくは結核菌ゲノムデータの取得の経験

全体



#### 4 データ取得詳細(複数回答)

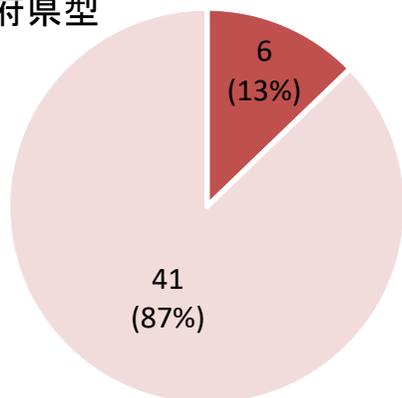
自施設NGS: 3施設

モバイル型NGS: 0施設

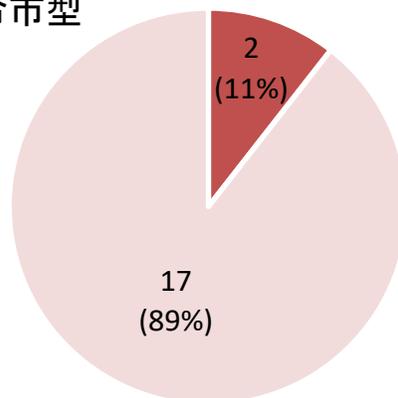
民間機関外注: 2施設

共同研究: 6施設

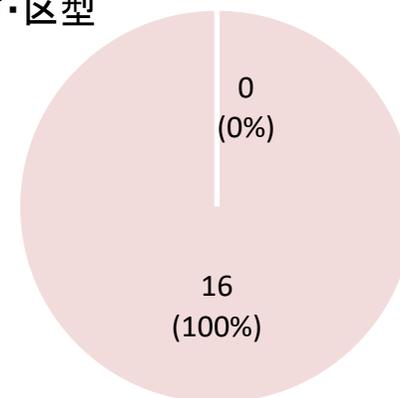
都道府県型



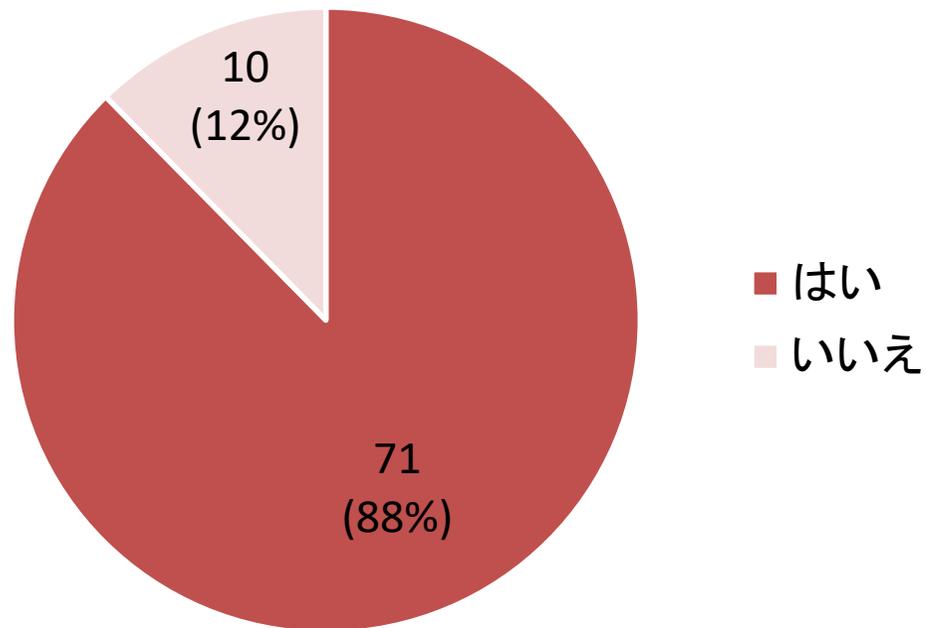
政令市型



中核市・区型

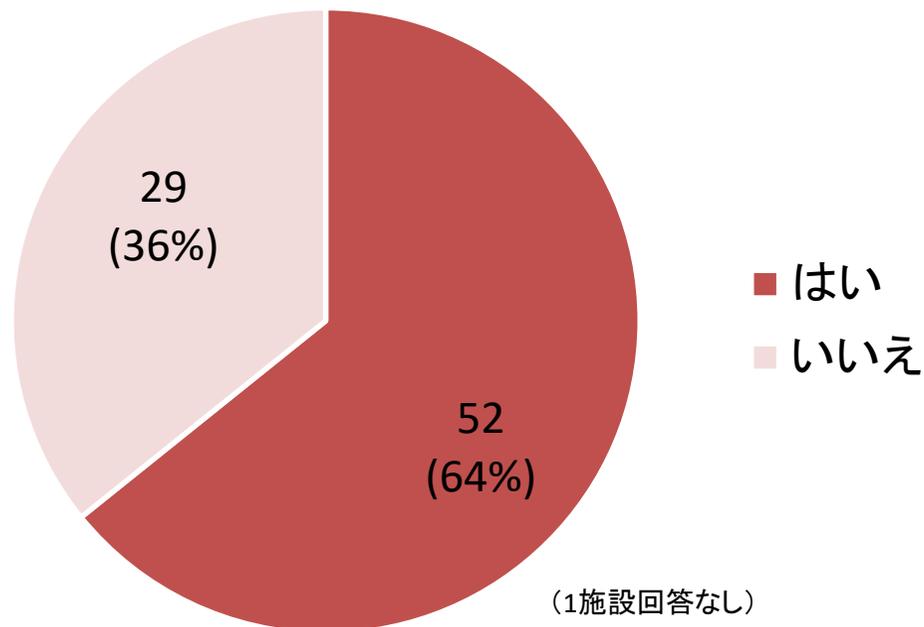


5(1)地衛研の業務遂行のために、  
NGSを用いた**病原体**ゲノム解析情報  
は有用か？



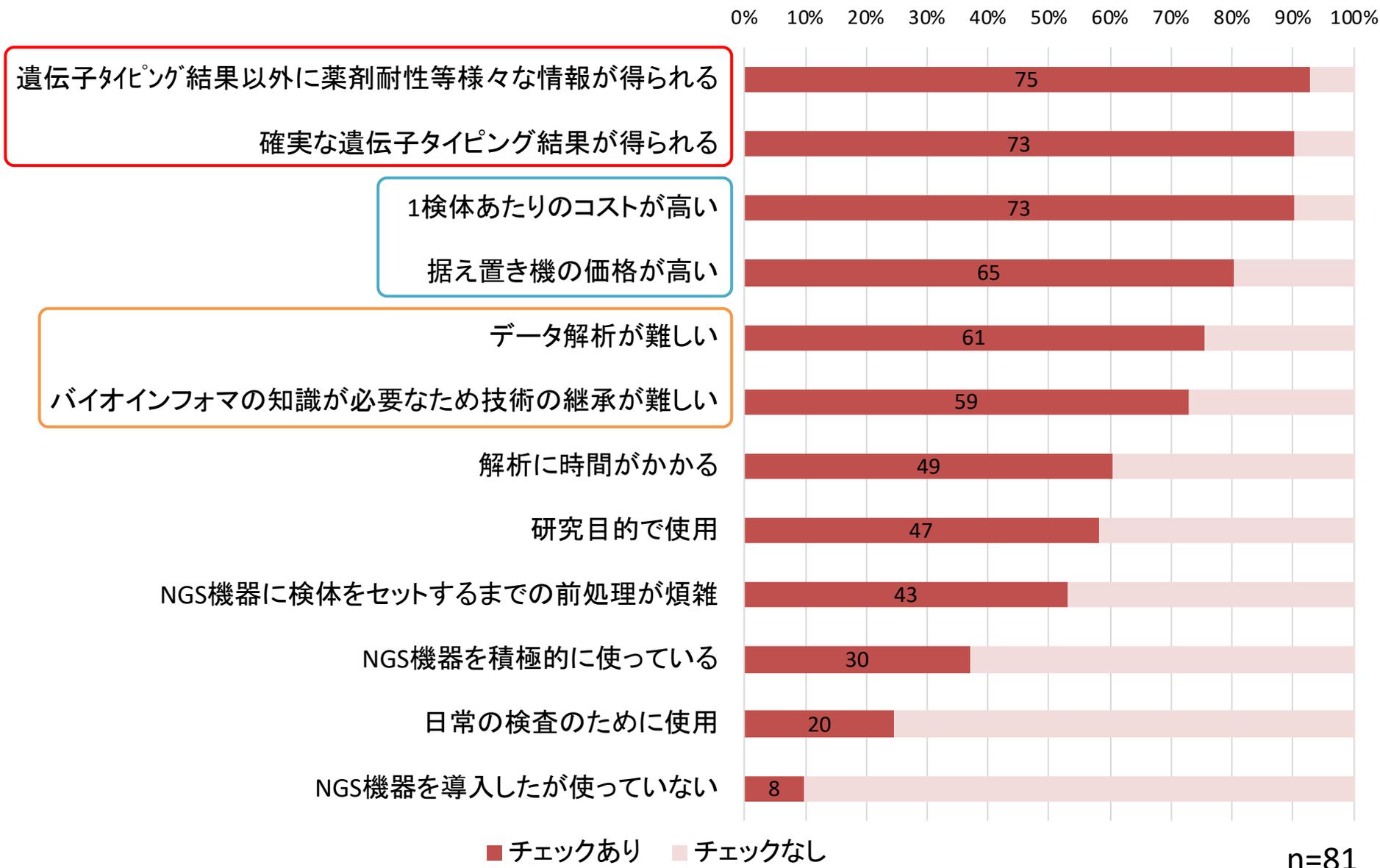
(1施設回答なし)

5(2)地衛研の業務遂行の  
ために、NGSを用いた**病原体**  
ゲノム解析情報は必要か？



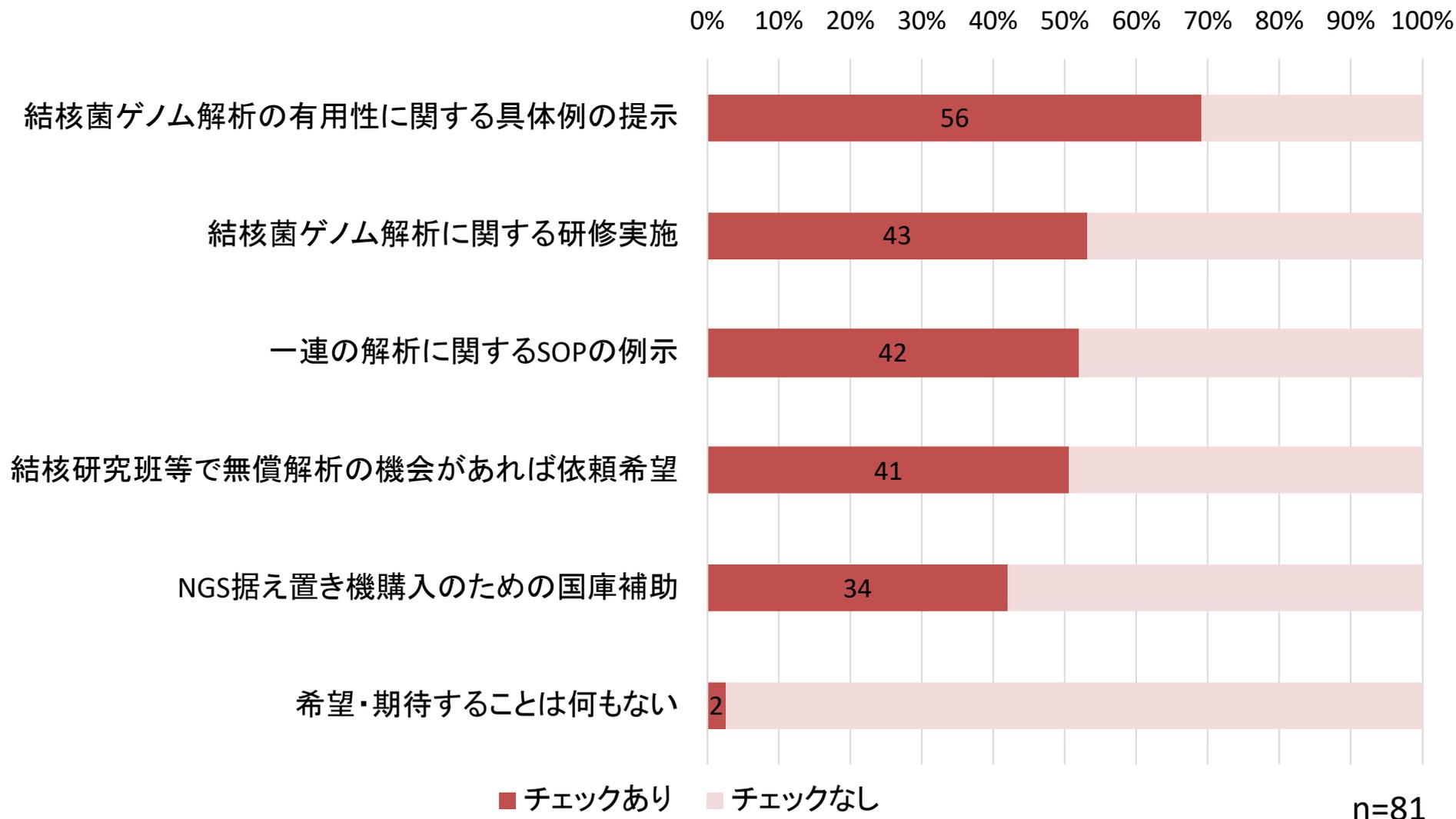
(1施設回答なし)

### 5(3) 病原体ゲノム解析に対する実感(NGS未実施の施設はイメージを回答)



(中核市・区型1施設回答なし、都道府県型、政令市型、中核市・区型の結果は次ページ<sup>18</sup>)

## 6 結核菌ゲノム解析普及のために希望・期待すること



# 2019年度の予定

1. 本年度の精度保証実施について
  1. 継続してVNTR外部精度評価を実施する。
2. 外部精度評価実施後のフィードバック(follow-up)
  1. 問題点の洗い出しと改善効果の評価のための調査を今年度から実施する。
  2. 今年度及び来年度結核菌の取扱とVNTRに関する研修を二回ずつ実施する(5月及び10月)。
3. 必要に応じてフラグメント解析の標準手順書をアップデートする。
4. ゲノム解析パイプライン解説書の試作

# 結核レファレンス委員会

## 委員

- 北海道東北新潟：山形県衛生研究所・瀬戸順次
- 関東甲信静：神奈川県衛生研究所・大屋日登美
- 東海北陸：富山県衛生研究所・磯部順子
- 近畿：大阪市立環境科学研究所・山本香織
- 中国四国：岡山県環境保健センター・河合央博
- 九州：大分県衛生環境研究センター・神田由子

## 世話人

- 結核予防会結核研究所抗酸菌部 御手洗聡, 村瀬良朗