

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

広域・複雑化する食中毒に対応する調査手法の開発に関する研究

分担研究報告書

IS-printing system のマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA）への適応

研究分担者 岡部 信彦 川崎市健康安全研究所 所長

研究協力者 窪村 亜希子 川崎市健康安全研究所 消化器・食品細菌検査室

本間 幸子 川崎市健康安全研究所 消化器・食品細菌検査室

松尾 千秋 川崎市健康安全研究所 微生物課長

研究要旨

【目的】

O157 の分子疫学解析に用いられる IS-printing 法（IS 法）について、PCR 法による遺伝子増幅後に通常行っているアガロースゲル電気泳動の代替として、迅速性の高い遺伝子解析装置であるマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA）を用いてよりの確に解析を行うための検討を行う。

【方法】

川崎市内で分離された O157 菌株のうち IS 法の結果が既に確認されている 5 株を供試株とした。

IS 法の各 primer sample の適切な結果判定法については、解析に用いる ladder の違いによる検出遺伝子サイズの違いや、異なるチップで測定することによる遺伝子サイズ誤差を確認し各 set の primer sample 及び positive control との比較がよりの確に行える方法の検討を行った。

また定法により調整を行ったサンプルについて、MultiNA で測定し得られた信号強度は低く、PCR 後の増幅遺伝子濃度が低いことが示唆されたことから、PCR 反応液全体量を変えるまたは、作成する template やサンプルへの添加量を変えることにより遺伝子濃度を高くする検討を行った。また同じサンプルのうち最も高濃度であった遺伝子増幅産物の各希釈サンプルと低濃度であった遺伝子増幅産物の原液サンプルの測定結果を比較することにより適切な希釈倍率について検討を行った。

【結果及び考察】

解析法の検討においては、importladder に比べサンプル測定時に同時測定を行った ladder を用いる場合の方が 1st set primer sample と ladder との誤差が少なく良好な結果が得られた。異なるチップによる測定結果についてはチップが同じまたは異なった場合で誤差に大きな違いは認められなかった。

PCR 後の増幅遺伝子濃度の検討においては、いずれも定法に比べ高い信号強度を得ることが可能となったが、PCR 反応液全体量を変更するのみでは遺伝子濃度の著増は認められなかった。希釈倍率の検討については、低濃度サンプルを原液測定を行った場合に比べ高濃度サンプルを希釈し測定した場合の方がゲルイメージにおいて positive control とのズレが少なく、また誤判定の原因となりうるプライマーダイマーについても低減されることが確認された。

A. 研究目的

IS-printing System (IS 法) は、腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子の中に存在する複数の異なる IS(insertion sequence) を 1st 及び 2nd の 2 セットの multiplexPCR 法により、それぞれ最大 18 バンド、合計 36 バンドの有無によりタイピングを行う分子疫学解析法である。

また IS 法はその迅速性や、サンプルと positive control (PC) の比較によりバンド検出有りを「1」、無しを「0」とすることで、結果の数値化が可能になることから現在多くの地方衛生研究所において食中毒や感染症等の発生の際に用いられている。

通常 IS 法は、PCR 法による遺伝子増幅後に 3.0%のアガロースゲルにサンプル 5.0µl と 6×LoadingDye 1µl を添加し、100V においては約 90 分程度の電気泳動を行い、EtBr にて染色後に洗浄を行い (合計約 15~30 分程度)、撮影装置により結果の確認を行う。

しかし PCR 後の遺伝子の検出について、マイクロチップ電気泳動装置

(MultiNA) を用いると 1 分析あたり約 4 分 30 秒程度と通常のゲル電気泳動に比べ時間の短縮が可能となり、サンプル数が多い場合には検出に用いるマイクロチップを最大 4 枚用いることで約 80 秒ごとに順次分析結果を得ることが可能となるなど迅速性に優れている。

またマイクロチップでは、PCR 増幅産物から得られる信号強度 (mV) を波形 (エレクトロフェログラム) として検出するが、サンプルに自動添加される 2 つのマーカー (LM と UM) をもとに通常のゲル電気泳動後のバンド画像に似せたゲルイメージに自動変換されることから、結果の確認も容易となる。

今回 IS 法の測定のうち、ゲル電気泳動および染色・洗浄部分の代替として、MultiNA を用いた測定を行い、そこから得られるゲルイメージにおいて IS 法の解析が的確に行えるよう検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

B-1. 供試菌株

2013 年に当所で分離し保管され、ゲル電気泳動により IS 法の結果が既に確認されている腸管出血性大腸菌 O157 菌株 5 株 (EH1~EH5) を供試菌株とした (表 1)。

B-2. MultiNA による IS 法測定に用いる試薬の調整と機器の設定

IS 法測定のために MultiNA で使用される試薬については SHIMADZU のアプリケーションで示される方法に準拠し、分離バッファについては蛍光色素 GelSTAR を 4000 倍希釈になるように DNA-1000 に添加したものをを用い、マーカー溶液については LM 及び UM として DNA Quantitation Standard 100bp fragment (Genesure Laboratories, Inc 社製) を終濃度 2.25ng/µl 及び Nolimit 1200bp DNA Fragment (Fermentas 社製) を終濃度 0.75ng/µl になるよう TBE に添加したものをを用いた。

Ladder は IS 法の 1st set positive control (1stPC) を用いるため、1st set positive control template の PCR 増幅産物を DNA-1000 キットにより通常通り測定後、MultiNA 取扱説明書に準じて ladder として登録を行った。

さらに IS 法測定に用いるため、新たにプロジェクトを登録する際の条件設定においては、ladder は既に登録を行った 1stPC を選択し、色素は GelStar に設定した。

B-3. 1st 及び 2nd set primer sample の測定結果の解析法の検討

B-3-1. 1st set primer sample の解析に適した ladder の検討

MultiNA 測定後の自動解析により表示されるサンプルの検出遺伝子サイズ (bp) は、通常のシングルプライマーによる PCR の測定を行う場合においては問題にはならない程度ではあるが誤差が生じることが知られている。

しかしゲルイメージ画像により IS 法のサンプルと PC の結果を的確に判定するためにはその誤差を低減させる必要がある。

通常、測定を行ったサンプルの遺伝子サイズ (bp) は併せて測定された ladder の結果をもとに自動解析され、結果を得ることが可能であるが、IS 法の場合は ladder の解析に重要な LM が機器により自動認識されないことから、まず ladder の結果を得るために、測定後に検出される ladder の各ピークから手動で LM を選択し設定する必要がある。しかしサンプルと同時に ladder の測定を行わず、事前に登録された ladder (importladder) を再解析ボタンにより選択する場合は LM の設定が不要となる。

今回、供試株 EH1~3 の 1st primer sample (1st sample) について、サンプル測定時に併せて ladder の測定も行い手動で ladder の LM の設定し解析を行う場合と、ladder の測定は行わずに importladder を用いて解析を行った場合のサンプルの検出遺伝子サイズ(bp)を比較することで、いずれの解析法がより誤差の低減が可能か検討を行った。

B - 3 - 2. 2nd set primer sample 及び positive control との比較のためのチップ間の検出サイズ誤差の検討

MultiNA の測定に用いるマイクロチップは最大 4 枚まで使用可能であるが、測定に用いるチップが異なると、同じサンプルを測定する場合でも検出遺伝子サイズは異なる。

IS 法測定において 1stPC を ladder とした場合、2nd set positive control

(2ndPC) についてはサンプルと同様に測定を行う必要があり、サンプルとして 18 の増幅遺伝子の検出が必要となる。

今回 2ndPC 及び EH1~5 の 2nd set primer sample (2nd sample) をそれぞれ異なる 4 枚のチップ (チップ A~D) を用いて測定を行い、各チップによる検出遺伝子サイズ (bp) や、2ndPC と 2nd sample の検出遺伝子サイズの差について比較検

討を行い、チップの違いにより生じる検出遺伝子サイズ誤差がゲルイメージで 2ndPC とサンプルを比較する際に影響するか検討を行った。

B-4. ゲルイメージによる結果解析に適したサンプル濃度の検討

B-4-1. 事前検討 (定法に準拠した方法による検討)

各サンプル濃度及び希釈倍率の検討を行うにあたり、EH1~3 株を用いて事前検討として付属の取扱説明書に準拠し PCR 法により増幅された遺伝子の濃度を確認することとした。

菌株からの template 作成は「(1) 推奨法: アルカリ溶解法」に準拠し、25mM NaOH 水溶液に 1 mm 程度の菌体コロニーを懸濁し、95°C で 5 分加熱後、4µl の 1M Tris-HCl を加えて中和、12,000rpm で 5 分遠心し、上清 1µl を template として使用した。PCR 反応液は「4. PCR 反応液の調製」に準拠し、1st または 2nd set Primer Mix を 5µl、2×IS-P Master Mix を 25µl、template DNA、1st または 2nd set template Mix を 1µl に滅菌蒸留水 19µl を加え全体量を 50µl とした。PCR を行った後に各サンプル及び PC について MultiNA で測定を行った結果、いずれのサンプルも信号強度が低く、希釈せず原液を用いた測定を行った場合においても、ゲルイメージで各バンドが非常に薄く表示された (図 1)。

ゲルイメージとして表示される画像や信号強度 (mV) は遺伝子濃度に比例するため、IS 法サンプルは MultiNA で測定するには遺伝子濃度が低いことが示唆されたことから、初めにより高い濃度の遺伝子増幅産物を得る方法について検討を行い、次に適切な希釈倍率について検討することとした。

B-4-2. 高濃度の遺伝子増幅産物を得るための検討

1. PCR 反応液全体量の違いによる比較検討

取扱説明書「(1) 推奨法：アルカリ溶解法」に準拠するが、PCR 反応液の全体量を 25 μ l または 12.5 μ l に変更することにより増幅遺伝子濃度を高くすることが可能か検討を行った。

全体量が 25 μ l 及び 12.5 μ l の PCR 反応液の調整については、各 Primer Mix と 2 \times IS-P Master Mix をそれぞれ 1/2 量及び 1/4 量とし、template はいずれも 1.0 μ l 添加、滅菌蒸留水の添加量を調整することで全体量をそれぞれ 25 μ l、12.5 μ l とし、PCR 後に超純水により 10 倍希釈した増幅遺伝子を測定し、得られたエレクトロフェログラムや信号強度(mV)について比較検討を行った。

2. template 添加量及び調整法の違いによる比較検討

PCR 反応液全体量は定法と同じ 50 μ l とするが、添加する template の量を増やす、または template 作成の際に供試するコロニー数を増やすことにより高濃度の template を作成し、さらに PCR 反応液へ添加する量も増やすことで PCR 後の増幅遺伝子濃度を高くすることが可能か検討を行った。

具体的な調整法については、template 添加量を増やす場合は、定法に従い作成した template を PCR 反応液に 2.5 μ l または 5.0 μ l 添加することとし、高濃度 template については 2~3 コロニー (1mm 以上のコロニーの場合は 2 コロニー、1 mm 以下のコロニーのみの場合は 3 コロニーとした)を sweep した菌体から作成した template を PCR 反応液に 1.0 μ l、2.5 μ l または 5.0 μ l 添加し、いずれも各 Primer Mix と 2 \times IS-P Master Mix の添加量は変えずに、滅菌蒸留水の量を調整することで全量を 50 μ l とした。ただし、各 PC の添加量は常に 1.0 μ l とした。

各 PCR 増幅産物については、超純水により 10 倍希釈したものを測定し、得られたエレクトロフェログラムの信号強度 (mV)について比較検討を行った。

B-4-3. 測定サンプルの希釈倍率の検討

B-4-2 の結果から 10 倍希釈後の測定で十分な信号強度を示したサンプルについて超純水で 5 倍、10 倍、20 倍希釈を行い測定結果を比較することで適切な希釈倍率を検討した。

さらに B-4-2 の結果から 10 倍希釈後の測定で低い信号強度を示したサンプルについては原液で測定を行い、上記の各希釈サンプルと比較することでいずれの測定方法がよりゲルイメージによる結果解析に適しているかについても検討を行った。

C. 研究結果

C-1. 1st 及び 2nd set primer sample の測定結果の解析法の検討

C-1-1. 1st set primer sample 解析に適した ladder の検討

各 ladder の解析による検出遺伝子サイズ(bp)を表 2 に示した。

いずれの解析法においても検出遺伝子サイズの誤差は増幅サイズ(bp)に比例して大きくなる傾向がみられた。

しかし、個々のピークの比較により測定時に併せて測定を行った ladder (以下、測定時 ladder)の方が importladder による解析を行った場合に比べ多くの検出遺伝子で規定の増幅サイズに近い値を得ることが可能であった。さらに、ゲルイメージとして表示された場合においても同様に測定時 ladder により解析を行った場合の方が PC とのズレも少ない傾向が認められた (図 2)

C-1-2. 2nd set primer sample 及び positive control との比較のためのチップ間の検出サイズ誤差の検討

4 枚のチップ A~D のそれぞれで 2ndPC 及び EH1~5 の 2nd sample について測定し、解析は C-1-1 の結果から測定時 ladder を用いて解析を行った各検出遺伝子サイズ (bp) の結果を表 3 に示した。2ndPC 及び sample の検出遺伝

子サイズはいずれも規定値よりも小さい値で検出され、その誤差は *stx1* (151bp) から 2-04 (710bp) までのバンドについては、バンドの遺伝子サイズが大きくなるのと比例してその誤差も大きくなる傾向が認められた。

さらに、チップ A で測定した 2ndPC と 2nd sample の検出遺伝子サイズの差 (2ndPC-2nd sample) うちチップ A 及びチップ A 以外 (チップ B~D) の平均値 (表 4) について比較を行ったが大きな違いは認められず、チップ B~D で同じ比較をした場合においてもチップ A と同様の結果となった。

さらに表 4 のうち EH2 の 2-01 バンドは規定値との誤差や、EH3 の 2-02 バンドにおいては他のチップとの誤差においては特に大きくなったが、ゲルイメージとして表示した場合 (図 3)、遺伝子サイズの大きい部分の方が表示間隔が狭まることなどから、数値ほどのズレは認められなかった。

C-2. ゲルイメージによる結果解析に適したサンプル調整及び濃度の検討

C-1 の結果から C-2 の検討においては測定時 ladder によりサンプルの解析を行った。

C-2-1. PCR 反応液全体量の違いによる比較検討

Template 1.0 μ l に対し全体量を 1/2 または 1/4 にし調整した PCR 反応液の遺伝子増幅産物を 10 倍希釈し測定した結果 (表 5)、多くのサンプルにおいて全体量が少ない場合でより高い信号強度を得たが、著増は認められなかった。しかし、10 倍希釈時において EH3 の様にバンドが明瞭な場合と EH1 の様に不明瞭な場合があるなど、株によりばらつきが認められた (図 4)。

C-2-2. template 添加量及び調整法の違いによる比較検討

定法に準拠し作成した template を PCR 反応液に 2.5 μ l または 5.0 μ l 添加し

たサンプル (以下 1-2.5、1-5.0)、及び複数コロニーの sweep から作成した高濃度 template を PCR 反応液に 1.0 μ l、2.5 μ l、5.0 μ l 添加したサンプル (以下 S-1.0、S-2.5、S-5.0) の遺伝子増幅産物を 10 倍希釈し測定した結果 (表 6)、いずれも定法に比べ高い信号強度を示し、特に S-5.0 サンプルは高い信号強度を得ることが可能となった。

また EH2 1st set の S-1.0 の 1-06 バンド部分、EH3 1st set の S-1.0 の *ae*, *hlyA* バンド部分、EH1 株の 2nd set の 1-2.5、S-1.0 サンプルの 2-09 バンド部分などにおいては極端に信号強度が低いものの、S-2.5 や S-5.0 サンプルの同バンドにおいては、信号強度が高まり、ゲルイメージとしても確認しやすい状態として表示された (図 5)。

C-2-3. 測定サンプルの希釈倍率の検討

C-2-1 の結果から十分な信号強度が得られた S-5.0 について 5 倍、10 倍、20 倍希釈を行ったサンプル、及びある程度の信号強度が得られた S-1.0 について原液で測定を行った結果 (図 6)、S-1.0 については全てのバンドで信号強度を高くすることが可能であったものの、10 倍希釈時において極端に信号強度が低かった EH2 1st set の 1-06 バンド部分、EH3 1st の *ae*, *hlyA* バンド部分、EH1 2nd の 2-09 バンド部分などについては、同サンプルの他のバンドに比べ薄く表示された。

また図 6 のゲルイメージにおいて、多くのサンプルでゲルイメージ上における PC とのバンドのズレは、S-5.0 希釈サンプルに比べ S-1.0 原液測定サンプルの方が大きく、S-5.0 サンプルのうち 10 倍または 20 倍希釈サンプルで最も小さい傾向が認められた。

さらに図 6 のエレクトロフェログラムから LM の前に検出されるプライマーダイマー (点線部分) について、希釈を行った場合の方が信号強度が低くなることも確認された。

D. 考察

サンプルの解析に必要となる ladder については、サンプル測定時に併せて測定を行った ladder を用いる場合、ladder 測定自体にかかる時間や、測定後に手動による LM の設定が必要になるなど、importladder を用いる場合に比べ全サンプルの結果解析終了までに必要となる時間が長くなる。しかし、C-1 の結果から importladder をサンプルの結果解析に用いる場合はバンドの表示位置のズレが大きくなることから、サンプル測定時に併せて測定を行った ladder を用いることが誤判定の低減につながるものと考えられた。

しかし測定毎に複数のピークからの的確に LM を選択する必要があることから、人為的ミスも考えられるため、ある程度の熟練が必要であるとも考えられる。

チップ間の誤差については 2ndPC と 2nd sample の比較において重要であると考えられるが、本調査においてはチップが同じまたは異なる場合で大きな違いは認められず、ゲルイメージにおいても表示されるバンドのズレは、チップに係らず一様であり 2ndPC と 2nd sample の結果の比較はいずれのチップで測定を行っても変わらないものであった。しかしながら、チップによる誤差はチップ自体の使用回数や状態によっても左右されるため、極端に使用回数が異なるチップによる測定結果の比較は避けるべきであると考ええる。

また、MultiNA のゲルイメージで表示されるバンドのうち遺伝子サイズが大きい部分ではその表示間隔が狭くなる特性上、

増幅遺伝子サイズ (bp) が近い 2-02 (861bp) と 2-03 (801bp) のバンド間隔はさらに近く表示されることから、IS 法のサンプルを測定する場合においては、ある程度状態の良いチップを使用することや、併せてエレクトロフェログラムの確認を行うことも重要であると考ええる。

PCR 後の増幅遺伝子濃度の検討については表 5 及び表 6 からいずれの検討にお

いても効果が認められた。特に表 6 の S-5.0 では高い信号強度を示したことについて、表 6 の結果のうち template 添加量が同じである定法と S-1.0 サンプルの信号強度の比較において S-1.0 の方が高い信号強度を示したことや、同じ template であっても添加量の異なるサンプルの信号強度の比較においては添加量が多い方が高い信号強度を示す傾向が認められるなど、高濃度 template と添加量を増やすことのいずれも効果が認められたことによるものと考えられた。

また定法による測定を行った場合において、株が異なる場合や、株が同じであっても表 5 (50 μ l 測定結果) 及び表 6 (定法) において信号強度にばらつきが認められたことについては、template 作成にあたり 1 コロニーを釣菌する際、均一な大きさのコロニーが釣菌されなかったことにより template 濃度が異なっていたことが示唆された。

今回、1-2.5 及び S-1.0 で一部ゲルイメージにおいて薄く表示されたバンドが S-2.5、S-5.0 では確認しやすい画像を得られた (図 5)。IS 法のように複数のバンドを検出する場合、極端に信号強度が異なるとゲルイメージのコントラストに影響を及ぼし信号強度が低いバンドは極端に薄く表示される可能性がある。そのため希釈倍率を変えるなど全体の信号強度を高くした場合に信号強度のばらつきが同様であれば、薄いバンドは薄いままである可能性もある。しかし、図 5 のエレクトロフェログラムの比較から、各バンドの信号強度が高くなったと同時に、サンプル内でのばらつきが低減されている可能性が示唆された。

また、図 6 エレクトロフェログラムにおいて高倍率希釈の方がプライマーダイマーが低減されていたことについては、原液による測定を行った図 1 のエレクトロフェログラムのプライマーダイマー部分についても高値を示していることから、作成する template の濃度などに係らず、PCR 後のプライマーダイマーの濃度はあ

る程度一定であることが示唆され、希釈することで低減されたものと考えられた。

プライマーダイマーは、IS法測定結果においてLMに極めて近い位置に検出されるため、信号強度の高い場合はLMに酷似した波形として認められ、**ladder**のLMを手動で設定をする際の人為的ミスや、機器がサンプルのLMを自動認識する場合に誤判定を起こす原因となり、ゲルイメージ画像に重大なズレを生じさせる。そのため、プライマーダイマーの信号強度はより低いことが望ましいと考えられ、本調査結果からIS法をMultiNAで測定する場合は高濃度サンプルを希釈して測定をする方が適していると考えられた。

またエキストラバンドについても、その検出位置によっては同様に機器が誤判定を起こす原因となる。本調査を行うにあたり検出されたエキストラバンドは、添加する**template**量に比例して信号強度が増す場合と**template**量に係らず一定の場合が認められたが、後者の場合、図6のエレクトロフェログラムのEH2及びEH3の1st setのUM後に認められるエキストラバンドのように、サンプルの希釈により低減されることも分かった。

エキストラバンドや遺伝子濃度のばらつきなどにより生じる薄いバンドについては、ゲル電気泳動を行った場合においても結果を判定する際の誤判定の要因となっており検査室間の結果不一致を招いているなど大きな課題となっているが、ゲル電気泳動に適した希釈倍率の検討を行う必要があるものの、同様の方法によりある程度改善される可能性も示唆された。

希釈倍率の検討については、本調査では最も高濃度であったS-5.0を用いて希釈を行い、10または20倍希釈で最も誤差が低減されるなど良好な結果を得ることが出来たが、PCR反応液を通常1/2や1/4量で実施している場合においては、信号強度が高くなる可能性があるため**template**量を下げるとともに、希釈倍率を上げるなどの調整が必要であると考えら

れる。また、MultiNAで安定した測定結果を得るためには、遺伝子増幅産物を希釈する際に十分なピペッティングを行うなど基本的なことも重要であった。

PCの希釈倍率については今回十分な検討を行えなかったが、サンプルのコントラストに影響を与えない程度の信号強度にする必要があり、本調査においては10倍希釈または20倍希釈で良好な結果を得られることが多かった。しかし調整したPCによってはPCR後にバンドの一部で極端に高い信号強度を示す場合が見受けられ、希釈倍率の検討を行うとともに均一な信号強度を得るための検討も必要であると考えられる。

E. 結論

MultiNAでIS法の解析を行うことは通常のアガロースゲル電気泳動に比べ大幅な時間短縮が可能となり、測定結果についてもデジタルデータとして保存されることから、データ管理や以前測定した株との比較、画像による結果の共有がより容易になるなど多くのメリットがある。

本調査により、バンドの有無の確認が必要となるIS法の判定をよりの確に行うためには、解析はサンプルと併せて測定を行った**ladder**を用いて行うべきであると考えられた。また2nd setのうち、2-02 (861bp)、2-03 (801bp)においてはバンド間が狭いため、両ピークが分離可能である状態の良いチップを用いるべきであると考えられた。

さらに、定法のうち推奨法のアルカリ溶解法に準拠し調整されたPCR反応液から得られる増幅産物の遺伝子濃度はMultiNAで測定する場合においては薄いことから、PCR後に高濃度の遺伝子増幅産物を得る必要があると考えられ、本調査において**template**の添加量を増やすまたは、供試するコロニー数を増やすなどにより高濃度**template**を作成し添加することで効果が得られることが確認された。

さらに測定を行う際、低濃度の遺伝子増幅産物を原液で測定する場合に比べ、

高濃度の遺伝子増幅産物を希釈し測定した場合の方が、プライマーダイマーは低減され、かつ各バンドの遺伝子濃度のばらつきが低減されることも示唆されるなど、誤判定の低減にもつながると考えられた。

しかしながら、**ladder** の **LM** を手動により設定を行う際に人為的ミスが起こる可能性やエキストラバンドの発生により機器が **UM** や **LM** の誤判定を起こすことや、本来のバンドの波形に影響を与える可能性があるなど、今後も株数を増やし検討を続ける必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. 供試株の IS パターン

primer set	1st set															2nd set																					
	primer no.	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eee	16	hlyA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx1	stx2
	size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
EH1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	
EH2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
EH3	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0		
EH4	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1		
EH5	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		

図 1. 事前検討結果 (ゲルイメージとエレクトロフェログラム)

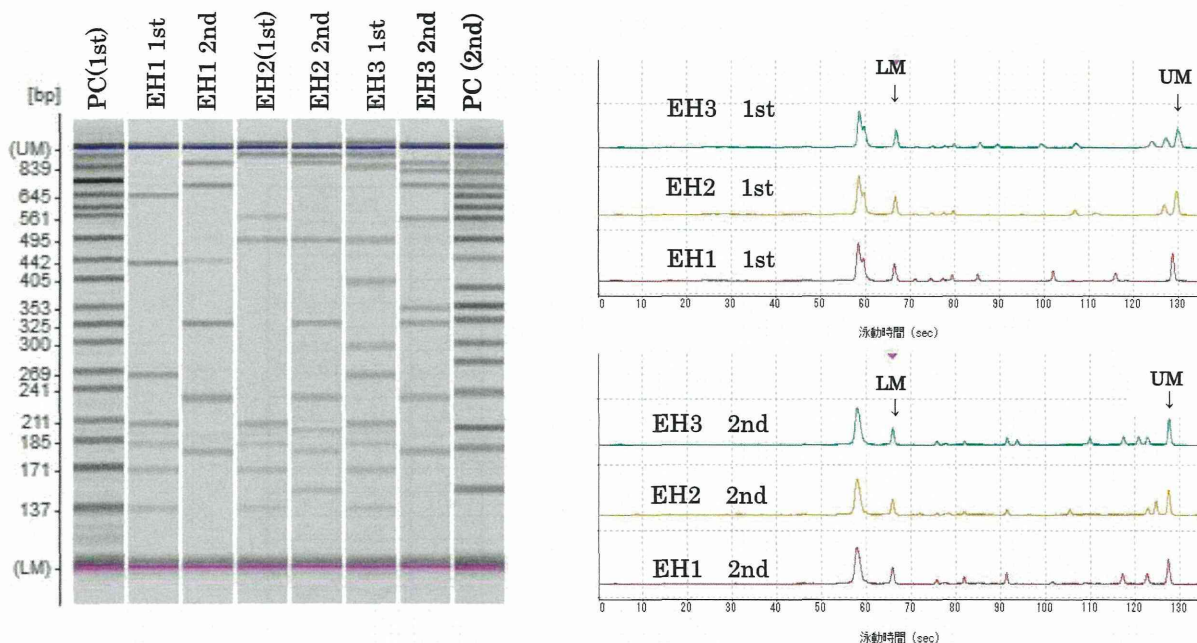


表 2. Ladder の違いによる検出遺伝子サイズ(bp)

株名	1stPC	EH1 1st		EH2 1st		EH3 1st	
	規定値	測定時 ladder	import ladder	測定時 ladder	import ladder	測定時 ladder	import ladder
1-01	974			1113	1141	1076	1136
1-02	839					851	857
1-03	742						
1-04	645	643	662				
1-05	595						
1-06	561			560	573		
1-07	495			496	504	494	502
1-08	442	437	447				
1-09	405					404	409
1-10	353						
1-11	325						
1-12	300					299	302
1-13	269	266	268			268	268
1-14	241						
1-15	211	209	214	210	213	211	214
eee	185	184	191	185	190	185	190
1-16	171	171	173	171	173	171	173
hlyA	137	137	140	137	140	138	140

図 2. サンプルと同時測定した ladder による解析 (A) と import ladder による解析 (B) によるゲルイメージ

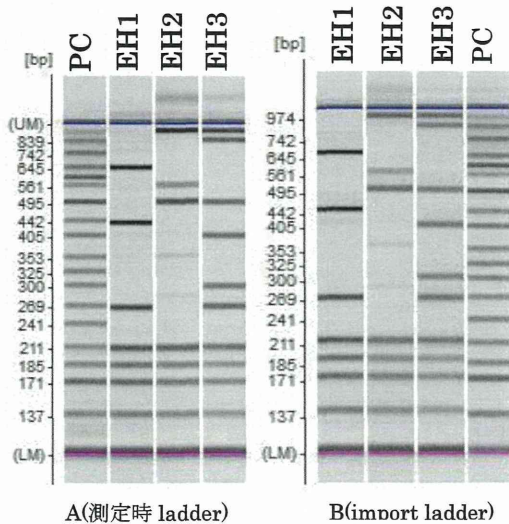


表 5. PCR 反応液全体量の違いによる比較 (信号強度 (mV))

株名	1st set															2nd set																			
	EH1			EH2			EH3			EH4			EH5			サンプル	EH1			EH2			EH3			EH4			EH5						
バンド	size(bp)	50μl	25μl	12.5μl	50μl	25μl	12.5μl	50μl	25μl	12.5μl	50μl	25μl	12.5μl	50μl	25μl	12.5μl	バンド	size(bp)	50μl	25μl	12.5μl	50μl	25μl	12.5μl	50μl	25μl	12.5μl	50μl	25μl	12.5μl	50μl	25μl	12.5μl		
1-01	974				28	44	127	77	97	106	3	7	10	26	10	62	2-01	987				68	80	83				5	10	34					
1-02	839							51	64	79	4	9	11	35	13	76	2-02	861	5	7	16	30	38	32	37	10	25	2	3	8	5	10	32		
1-03	742										3	8	11				2-03	801							47	20	60	1	5	12					
1-04	645	1	4	10													2-04	710	5	7	16				44	18	56	1	4	11	9	15	45		
1-05	595																2-05	642																	
1-06	581				4	6	17							24	12	66	2-06	599																	
1-07	495				22	36	111	35	47	66	3	9	12	29	16	78	2-07	555							35	18	55	1	4	12	10	17	49		
1-08	442	1	4	11							4	11	15				2-08	499				36	44	66											
1-09	405							29	40	60	3	8	12	27	18	75	2-09	449	1	1	6														
1-10	353										3	8	12				2-10	394											1	5	11				
1-11	325																2-11	358							26	25	62	2	6	12	8	20	47		
1-12	300							24	35	50	2	7	11	20	17	56	2-12	331	4	6	13	44	53	85	38	27	80	2	6	13	6	13	33		
1-13	269	1	3	8				30	44	62	3	8	14	16	16	44	2-13	301											1	4	9	3	13	31	
1-14	241																2-14	278																	
1-15	211	1	3	8	24	38	92	24	37	52	3	7	12	12	14	36	2-15	240	3	4	10	23	33	31	23	16	59	0	3	9	1	8	21		
eee	185	0.4	1	4	7	11	25	9	18	38	1	4	6	2	7	31	2-16	211				22	26	47											
1-16	171	1	2	5	13	22	52	11	18	28	2	5	8	10	14	32	stx2	181	3	3	8	22	26	52	24	27	68	1	5	9	4	14	32		
hlyA	137	0.4	1	3	5	9	19	6	13	34	1	3	5	1	4	17	stx1	151				18	22	45				1	4	7					

図 4. PCR 反応液全体量の違いによる比較 (ゲルイメージ)

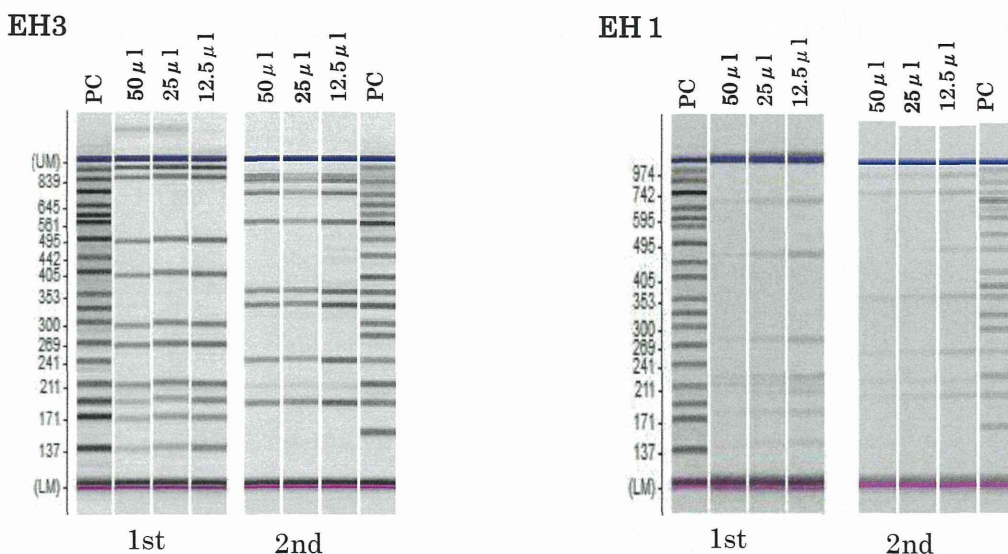
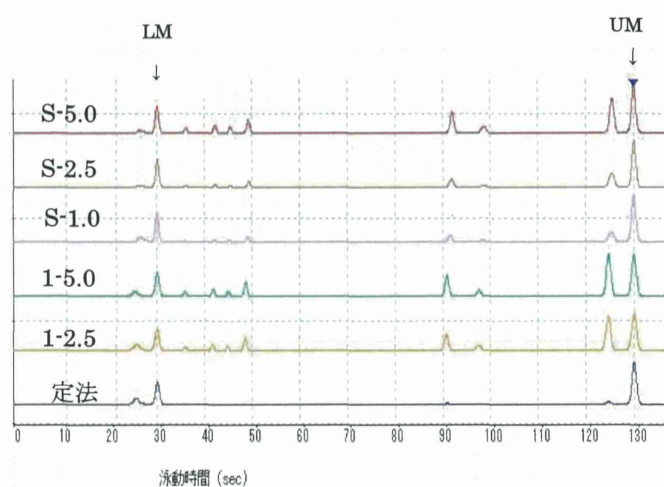
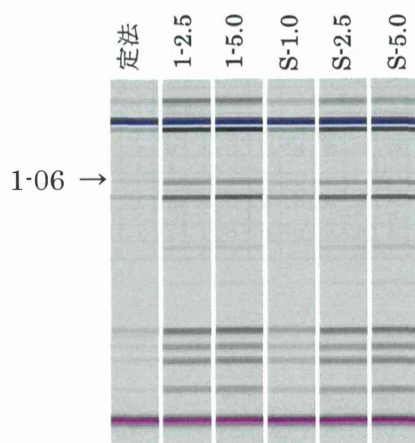


表 6. 添加する template の量及び濃度の違いによる比較 (信号強度(mV))

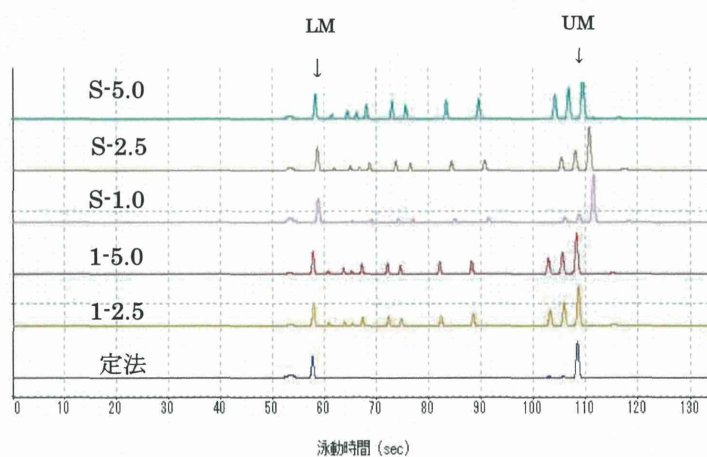
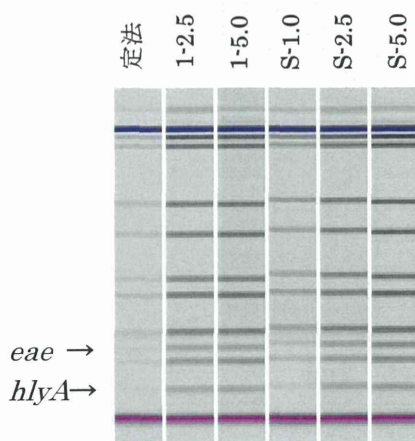
株名	1st set															2nd set																								
	規定値	EH1			EH2			EH3			EH4			EH5			規定値	EH1			EH2			EH3																
ladder	規定値	1-2.5	1-5.0	1-10	1-2.5	1-5.0	1-10	1-2.5	1-5.0	1-10	1-2.5	1-5.0	1-10	1-2.5	1-5.0	1-10	ladder	規定値	1-2.5	1-5.0	1-10	1-2.5	1-5.0	1-10	1-2.5	1-5.0	1-10	1-2.5	1-5.0	1-10	1-2.5	1-5.0	1-10							
1-01	974						14	169	202	46	68	168	10	125	118	43	107	165	2-01	987							13	98	111	200	189	188								
1-02	839												7	82	87	28	73	127	2-02	861	11	23	52	112	173	164	6	44	58	87	85	73	5	112	70	45	66	40		
1-03	742																		2-03	801																				
1-04	645	7	18	39	91	223	291												2-04	710	11	23	49	137	194	227														
1-05	595																		2-05	642																				
1-06	581							3	27	29	8	11	33						2-06	599																				
1-07	495							6	79	100	30	42	104	4	64	74	22	58	105	2-07	555																			
1-08	442	9	23	51	90	204	255												2-08	499							5	44	58	107	107	117								
1-09	405													4	58	73	18	52	98	2-09	449	2	4	13	5	54	51													
1-10	353																		2-10	394																				
1-11	325																		2-11	358																				
1-12	300													3	41	50	14	41	72	2-12	331	12	21	46	114	152	187	5	53	65	117	112	117	5	129	130	55	81	92	
1-13	269	6	14	32	55	125	157							4	56	66	20	51	90	2-13	301																			
1-14	241																		2-14	278																				
1-15	211	6	12	27	45	108	136	5	60	73	23	30	68	4	46	54	16	43	75	2-15	240	7	13	29	29	74	80	3	26	40	36	45	50	3	52	56	24	38	31	
eee	185	2	5	9	17	50	80	2	22	24	7	11	32	1	15	18	5	19	32	2-16	211							3	22	29	49	46	53							
1-16	171	3	6	13	26	72	98	2	30	40	11	16	41	2	24	31	7	21	40	stx2	181	5	8	18	105	136	160	2	22	30	50	51	63	4	92	102	51	75	89	
hlyA	137	2	4	8	10	35	60	1	19	22	6	9	27	1	14	16	3	15	25	stx1	151							1	26	35	70	67	75							

図5. 添加する template の量及び濃度の違いによる比較
(ゲルイメージとエレクトロフェログラム)

EH2(1st set)



EH3(1st set)



EH1(2nd set)

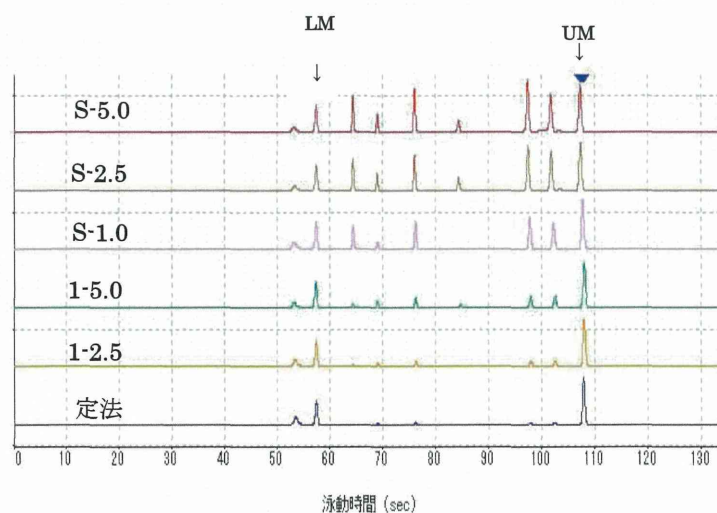
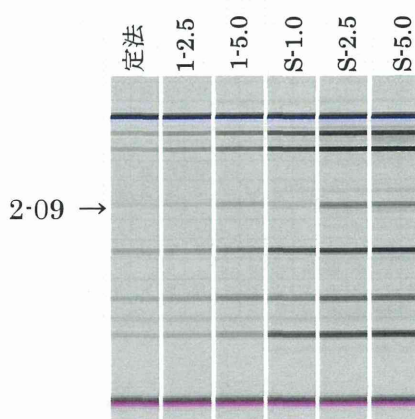
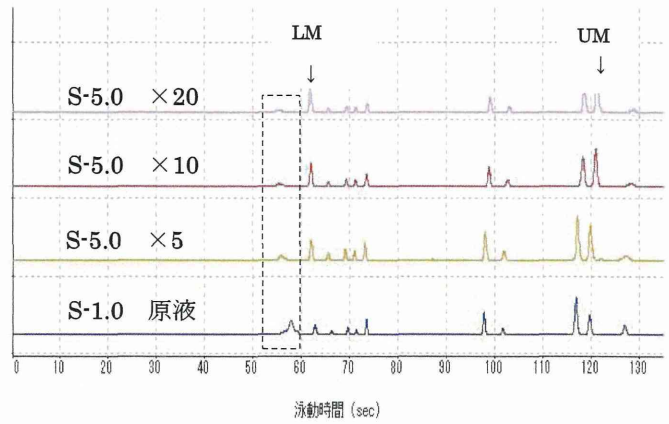
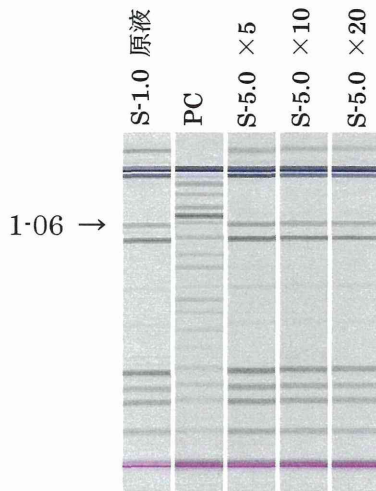
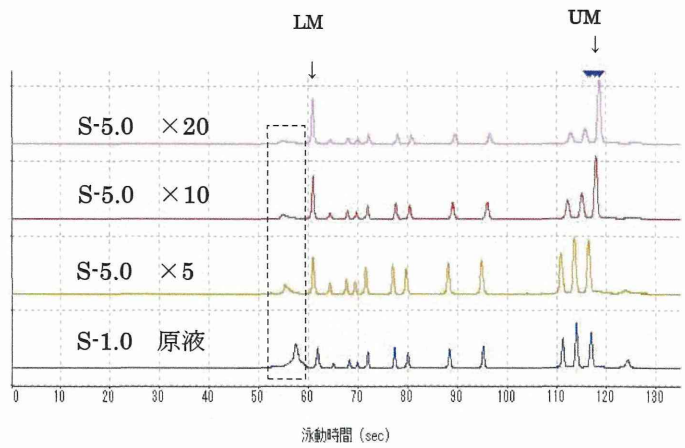
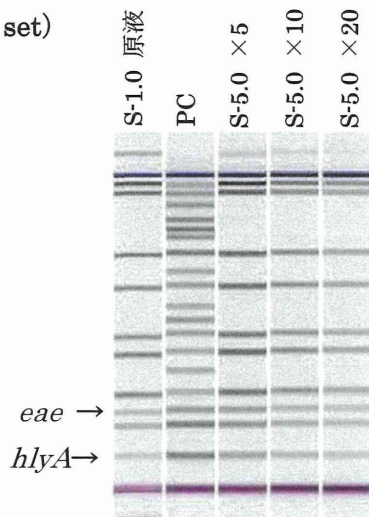


図6. 希釈倍率の違いによる比較 (エレクトロフェログラムとゲルイメージ)

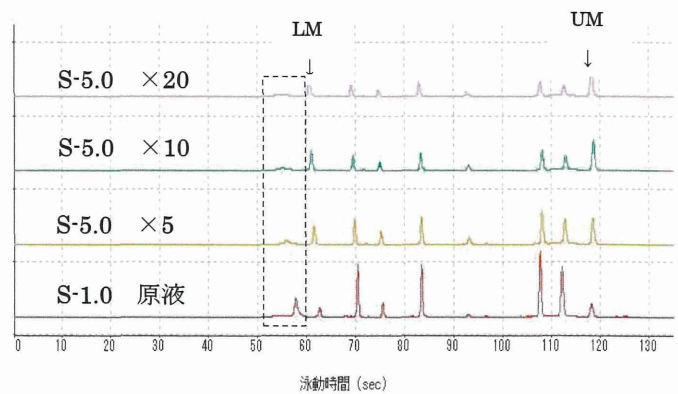
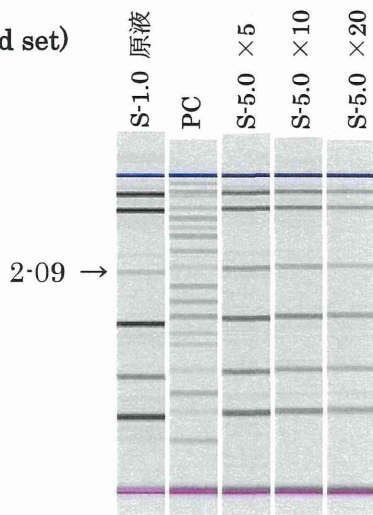
EH2(1st set)



EH3(1st set)



EH1(2nd set)



ウイルスを主とした広域事例調査手法の検討

研究分担者 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

食品媒介ウイルスによる散在型集団食中毒事例(diffuse outbreak)を早期に探知するためには、各事例の患者等から検出されたウイルスの塩基配列を比較して、株間の異同性を調べるのが有用である。株間の異同性の解析には系統樹解析が主に用いられているが、解析は必ずしも簡便ではない。そこで、迅速に株間の相同性を調べる手法として、ローカルBlast 検索を簡便に実行できるプログラムを開発した。開発したプログラムは、①塩基配列データを FASTA 形式とエクセル形式の相互に変換するプログラム、②検索したい株(問い合わせ株)と検索の対象となる株(参照株)のそれぞれをエクセルファイルで指定することにより、Blast 検索を実行し、問い合わせ株に対し類似性が最も高い株の類似度等に加え、遺伝子型等の情報を還元するプログラム、③塩基配列データをもつ2つのエクセルファイルを統合するプログラムから成る。これらのプログラムを用いることにより、国内で検出されているウイルスの遺伝学的相同性を迅速に解析することが可能になった。また、データの操作は基本的に表計算ソフト用ファイルを用いて行うことから、データ管理も簡便に行えるようになった。これらを実際の事例に適用することにより、迅速な散在型集団食中毒事例の探知に寄与できるものと考えられる。

研究協力者

北海道立衛生研究所	吉澄 志磨	長野県環境保全研究所	中沢 春幸
青森県環境保健センター	筒井 理華	長野県環境保全研究所	粕尾 しず子
岩手県環境保健研究センター	佐藤 直人	三重県保健環境研究所	楠原 一
岩手県環境保健研究センター	高橋 雅輝	滋賀県衛生科学センター	米谷 僚子
仙台市衛生研究所	関根 雅夫	大阪府立公衆衛生研究所	左近 直美
福島県衛生研究所	北川 和寛	大阪市立環境科学研究所	入谷 展弘
福島県衛生研究所	鈴木 理恵	大阪市立環境科学研究所	山元 誠司
福島県衛生研究所	金成 篤子	堺市衛生研究所	三好 龍也
千葉県衛生研究所	堀田 千恵美	島根県保健環境科学研究所	飯塚 節子
千葉市環境保健研究所	田中 俊光	島根県保健環境科学研究所	三田 哲朗
千葉市環境保健研究所	土井 妙子	広島市衛生研究所	藤井 慶樹
千葉市環境保健研究所	水村 綾乃	福岡県保健環境研究所	吉富 秀亮
東京都健康安全研究センター	森 功次	福岡県保健環境研究所	芦塚 由紀
東京都健康安全研究センター	宗村 佳子	福岡市保健環境研究所	宮代 守
東京都健康安全研究センター	永野 美由紀	福岡市保健環境研究所	古川 英臣
東京都健康安全研究センター	木本 佳那	福岡市保健環境研究所	松藤 貴久
新潟県保健環境科学研究所	田村 務	大分県衛生環境研究センター	加藤 聖紀
新潟市衛生環境研究所	山本 一成	沖縄県衛生環境研究所	喜屋武向子
新潟市衛生環境研究所	南波 裕太	沖縄県衛生環境研究所	加藤 峰史
富山県衛生研究所	滝澤 剛則	国立医薬品食品衛生研究所	上間 匡
富山県衛生研究所	稲崎 倫子	国立医薬品食品衛生研究所	三元 昌美
福井県衛生環境研究センター	小和田 和誠		(順不同)
山梨県衛生環境研究所	大沼 正行		

A. 研究目的

ノロウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス等の食品媒介性ウイルスによる感染症は毎年発生し、国民に多くの健康被害をもたらしている。特に近年は食品流通の大規模化や国際化に伴い、ウイルスに汚染された同一の食品による散在型集団食中毒事例(diffuse outbreak)の発生が危惧されている。2010年春季に全国各地で発生したA型肝炎事例には、同一の汚染食品による散在型集団食中毒事例が含まれていた可能性が示唆されている。

自治体間にわたる散在型集団食中毒事例を早期に探知し、共通の汚染食品や感染経路等を特定し、被害拡大防止対策を迅速に講じるためには、患者に関する疫学的な情報とともに患者から検出された病原体の遺伝子情報を自治体間で共有することが重要である。すなわち、患者から検出された株と同じ塩基配列を持つ株が他の地域や他の自治体で検出されているかどうかを迅速に把握し、同一の配列を持つ株が検出された患者について疫学的関連性を調べることで、早期の散在型集団食中毒事例を探知することができると思われる。

ウイルス株間の遺伝学的な相同性や近縁性を解析する手法として、ゲノムの塩基配列の系統樹解析やBLAST検索が実施されている。系統樹解析は主に遺伝子型別や分子進化の解析に用いられている。正確な遺伝学的近縁性を調べるができる一方、解析が煩雑で、時間がかかる欠点がある。一方、BLAST検索は、DDBJなどの遺伝子データベースに登録されている膨大な株の中から、類似株を検索することに主に利用されている。短時間で検索結果が得られる利点がある一方、ローカルデータベースを対象とした検索は一般的ではない。

そこで、今回、ウイルスによる散在型集団食中毒事例の早期探知等の広域事例調査の精度向上に寄与することを目的として、ローカルデータベースを対象に迅速簡便に実施できるBLAST検索システムの開発を試みた。

B. 研究方法と研究結果

(倫理面への配慮)

倫理面で配慮すべき事項はない。

1 システム開発のコンセプト

システムはWindows(64ビットパソコン)上で作動するシステムとした。システムの開発にあたっては、以下の点を考慮した。

1) 表計算ソフトに格納されたデータとFASTAデータを相互に変換できるものとする

一般に、ClustalW等による系統樹解析やBLAST検索等の遺伝子データの分析にはFASTA形式のデータが用いられている。このFASTA形式のデータは株名と塩基配列データから構成され、それら以外の情報を含むことができない。そのため、遺伝子型、検出年月日、その他の検体に関する情報等は、

株名、塩基配列情報とともに、表計算ソフトやデータベースソフトを用いて管理されることが多い。これらのことから、表計算ソフトで管理されているデータをFASTA形式に変換する機能およびFASTA形式のデータを表計算ソフト用のデータに変換する機能を持たせることとした。

2) 解析に用いるデータは表計算ソフトのファイルデータとする

ある検出株について、他の事例や他の自治体で検出された株に対してBLAST検索を行う場合、検索で得られた相同性に関する情報とともに高い相同性を示した株に関する遺伝子型等の情報も得られることが望ましい。そのため、BLAST検索に用いるデータはFASTAファイルのものではなく、表計算ソフト用のファイルを用いることとした。

なお、本システムで使用する表計算ソフトは現在最も広く利用されているエクセルファイルとした。

2 開発したシステムの概要

1) エクセルファイルとFASTAファイルの変換プログラム

(1) FASTAファイルからエクセルファイルへの変換

FASTAファイルをプログラム(FastaConvert.exe)のアイコン上にドラッグ&ドロップすることにより、エクセルファイル(拡張子は「xls」)が作成される(図1)。FASTA形式のデータを持つファイルの拡張子は「txt」、「fas」、「fast」、「fasta」のいずれでも差し支えない。作成されるエクセルファイルは同じディレクトリに保存されているエクセルファイル(nihs.xls)と同じ列名を持つものが作成され、FASTA形式のシークエンスデータは、「株名」の列に「>」を除いた株名が、「シークエンス」の列にシークエンスデータが格納される。FASTAデータに、株名とシークエンスデータ以外のデータが含まれる場合は無視され、エクセルファイルには格納されない。また、シークエンスデータは、改行されていても問題なく、A、T、G、C以外にIUPACコードのアルファベットが含まれていても差し支えない。

(2) エクセルファイルからFASTAファイルへの変換

所定のフォーマット(株名が「株名」の列に、シークエンスデータが「シークエンス」の列に入力されている)を持つエクセルファイル(拡張子は「xls」または「xlsx」)をプログラム(FastaConvert.exe)のアイコン上にドラッグ&ドロップすることにより、FASTAファイル(拡張子は「fasta」)が作成される(図2)。

2) ローカルBLAST検索用プログラム

図3-Aに示すアイコン(Blast tool.exe)をクリックすると、図3-Bのwindowが開く。検索したい株(新たに報告された株など=

問い合わせ株)を含むエクセルファイル(図3-C)を「Query」のボックスに、検索対象となるデータ(これまで蓄積された株のデータ等=参照株)を含むエクセルファイル(図3-D)を「Reference」のボックスに、それぞれ「参照」をクリックし該当するファイルを選択するか、もしくは該当するファイルをそれぞれのボックスにドラッグ&ドロップすることにより指定する。実行ボタンをクリックするとプログラムが実行され、新たなエクセルファイル(図3-E)が作成される。

新たに作成されたエクセルファイルには、問い合わせ株に対して、BLAST検索の結果最も類似した株(E-valueとidentifyがカットオフ基準を超え、かつ、Scoreが最も高い株)について、株名が「類似株名(B1st)」に、参照株ファイルに遺伝子データベースのアクセションNoが入力されている場合は「アクセションNo」に、遺伝子型が入力されている場合は「遺伝子型(B)」に、また、BLAST検索の結果として「Score」, 「Expect」, 「Identities」, 「Strand」にそれぞれの返り値が入力される(図4)。最も類似した株が複数存在する場合には、BLAST検索の結果最初に表示された株の株名が入力され、同じスコアを示す株の件数(最大10)が件数の列に入力される。

BLAST検索の条件は、「Blast.ini」ファイルを編集することで変更することが可能(図5)で、その条件を満たす類似株が登録された参照株の中に存在しない場合には、類似株がなかったとして「該当なし」が返り値となる。

3) データの追加登録機能

既存の参照株のファイルに新たに解析された株を追加登録したい場合は、図6-AのWindowにおいて、ボタンを「BLAST」から「Merge」に変更し、「Reference」のボックスに既存の参照株のエクセルファイル(図6-B)を、「Query」のボックスに新たに追加登録したい株のエクセルファイル(図6-C)を指定し、「実行」することで、データを追加した新しいエクセルファイル(図6-D)が作成される。

C. 考察

共通の汚染食品や感染経路を特定し広域事例を早期に探知するためには、患者などから検出されたウイルスの塩基配列情報をできるだけ速やかに解析し、株間の異同性を調べることが重要である。現在、国内で検出された株について異同性を比較する場合、インターネット環境で利用できるClustalWやローカル環境で利用できるClustalX等を用いて、塩基配列のアライメントを行った後、近隣結合法(neighbor-joining method, NJ法)等でクラスタリングを行い、boot strap検定後に得られたphbファイルを基にMEGA等の系統樹描画ソフトを用いて系統樹を作成し判定することが一般的である(図7)。ClustalX等でアラ

イメントされた配列を視覚的に確認することにより株間の異同性を調べることは可能であるが、多くの株について実施することは手間がかかり現実的でない。

一方、散发性広域食中毒事例の探知には、調べたい検出株と同一の塩基配列を持つ株が他の地域や自治体で検出されている否かの情報が重要であり、遺伝的距離など分子進化的な詳細な分析は必ずしも必要としない。このような株間の同源性検索を迅速かつ簡単に実行できるプログラムとしてBLAST検索がある。BLAST検索は処理速度が速いことから、DDBJ等の遺伝子データベースに登録されている膨大なデータを検索対象とした同源性検索用のツールとして広く利用されている。ローカルのデータベースを対象としたBLAST検索を実施できるソフトもフリーで入手できるものもいくつか存在するが、使用法や得られたデータの分析の手間などを考えると、必ずしも簡便に実施できるとは言いがたい。

そこで、今回、我々は、ローカル環境で迅速簡便に実行できるBLAST検索のプログラムの開発を試みた。開発したプログラムは大きく3つの機能を持つ。一つ目は、シーケンスデータをFASTAファイルからエクセルファイルを、また、その逆にエクセルファイルからFASTAファイルをドラッグ&ドロップの操作で作成(データの変換)できる機能である。系統樹解析、BLAST検索をはじめ、塩基配列の分析にはFASTA形式が広く利用されている。一方、遺伝子型や検出株に関する疫学情報等についてはFASTAファイルでは管理することができないため、多くの研究機関では塩基配列データはその他の情報データとともに表計算ソフトやデータベースソフトで管理されているものと考えられる。そのため、塩基配列情報の解析や保管には、FASTAファイルから管理ファイルへ、管理ファイルからFASTAファイルへの変換操作は頻繁に行われている。その変換操作は一般的には「株名の「<」マークの付加や削除、塩基配列情報の改行(リターン)の削除を伴い、必ずしも容易ではない。本機能により、塩基配列情報のエクセルファイルとFASTAファイルの変換がドラッグ&ドロップの操作だけで実行可能となった。

二つ目の機能は、本プログラムの中心をなすBLAST検索の実行プログラムである。本プログラムの特徴の一つとしては、検索用および参照用のファイルとしてFASTAファイルではなく、エクセルファイルを用いることがあげられる。これにより、BLAST検索の結果最も類似性が高い株との同源性に関する情報だけでなく、エクセルファイルに記載されている、参照株のアクセションNo、遺伝子型なども得ることができる。また、得られた結果はデータ管理に適しているエクセルファイルとして得られるため、次に示すデータ結合機能を合わせることで、データ保管用ファイルに簡単にデータの追加登録を行うことができる。

三つ目の機能は、データ結合機能である。ウイルスの検出は日々行われるため、散发性広域事例の解析には、あたりに検出された株をそれまでに登録された株のデータベースに速やかに追加登録する必要がある。BLAST検索と同じWindowにおいて、それまで登録された株のエクセルファイルと新規登録したい株のエクセルファイルをそれぞれドラッグ&ドロップなどで指定することで、データの追加登録が可能となった。

また、BLAST検索において、「Reference」のボックスに遺伝子型別用の参照株のファイルを指定することにより、BLAST検索による簡便な遺伝子型別を実行することも可能である。ただし、この場合、あくまでBLAST検索の結果としての遺伝子型別であり、系統樹解析に基づく結果と一致しない可能性を否定できないので、その点については留意しておく必要がある。

以上のように、今回開発したエクセルファイルで管理されたローカルデータベースを対象としたBLAST検索システムは迅速、簡便にウイルスの株間の相同性を調べることができ(図7)、ウイルスによる散在型集団食中毒事例の早期探知等の広域事例調査の精度向上に寄与するものと考えられる。現在、開発したシステムを食中毒調査等の行政検査で患者等から検出されたシーケンスデータの分析に適用し、プログラムの不具合の検証を行うとともに、その有用性について検証中である。

D. 結論

国内で検出される食品媒介ウイルスについて、迅速に遺伝学的相同性を調べるためのシステムを開発した。

E. 研究発表

1. 論文発表

入谷展弘 山元誠司 改田 厚 阿部仁一郎 久保英幸 西尾孝之 伯井紀隆 大平真由 安井典子 榊田晴美 細井舞子 松本珠実 坂本徳裕 廣川秀徹 半羽宏之 野田 衛: 2014年9~11月に発生したノロウイルスによる胃腸炎集団事例について一大阪市, 病原微生物検出情報, 2014/12/26掲載(インターネット版)

2. 学会発表

入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 野田衛: 2013/14シーズンに大阪市において集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスGII. 6株の分子疫学的解析, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10 (2014)
山本美和子, 伊藤文明, 野田衛: 広島市で検出されたA型肝炎ウイルスの分子疫学的解析, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10 (2014)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

FASTAファイル(*.txt, *.fas, *.fast, *.fasta)

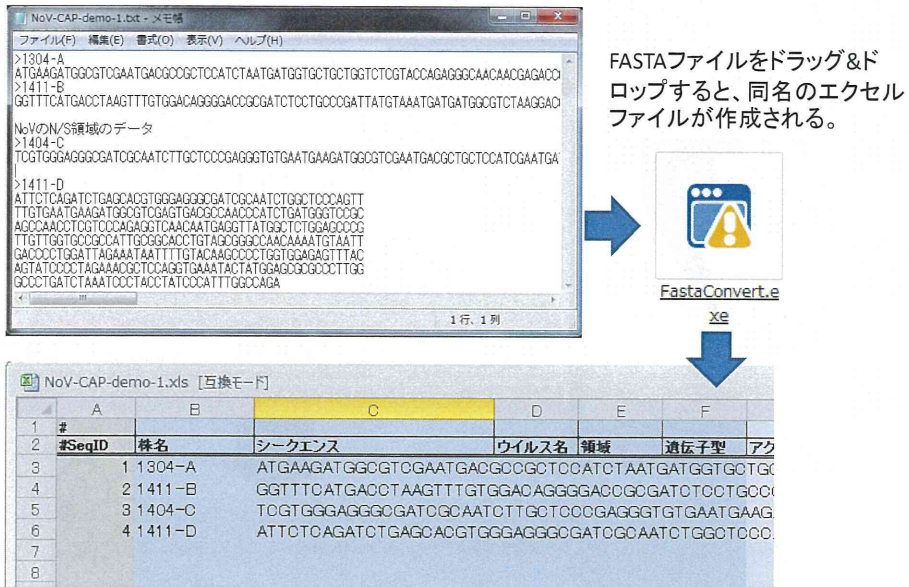


図1 エクセルデータとFASTデータを相互に変換するシステム (FASTAファイル⇒エクセルファイル)

エクセルファイル(*.xls, *.xlsx)

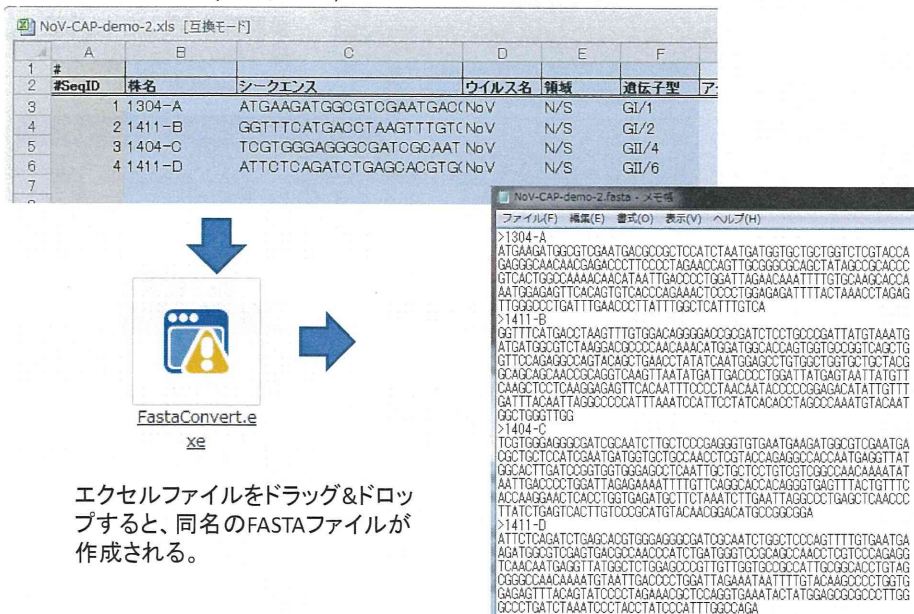


図2 エクセルデータとFASTAデータを相互に変換するシステム (エクセルファイル⇒FASTAファイル)

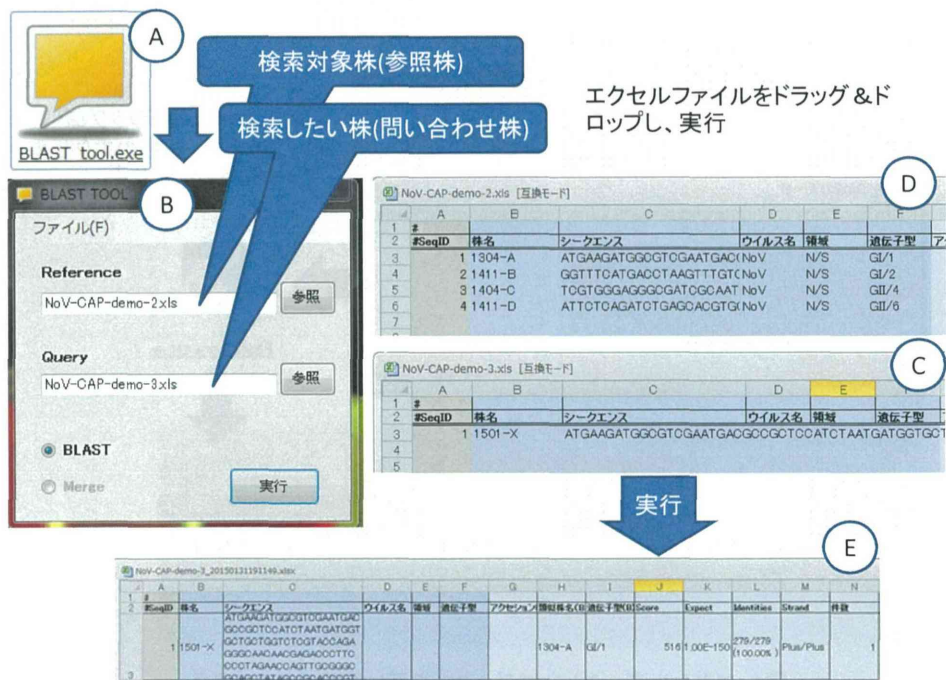


図3 ローカルBlast検索の実行

参照株のExcelファイル

#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	#SeqID	株名	シーケンス	ウイルス名	種属	遺伝子型	アクセシオン							
2	1	1304-A	ATGAAGATGGCGTGAATGAC	NoV	N/S	GI/1								
3	2	1411-B	GGTTTCATGACCTAAGTTGT	NoV	N/S	GI/2								
4	3	1404-C	TOGTGGGAGGGGATCGAAT	NoV	N/S	GI/4								
5	4	1411-D	ATTTCAGATGTGAGCAGGTG	NoV	N/S	GI/6								

作成されたExcelファイル

#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	#SeqID	株名	シーケンス	ウイルス名	種属	遺伝子型	アクセシオン	類似株名(B)	遺伝子型(B)	Score	Expect	Identities	Strand	件数
2	1	1501-X	ATGAAGATGGCGTGAATGAC					1304-A	GI/1	516	1.00E-150	279/279 (100.00%)	Plus/Plus	1

参照株のうち、もっとも近縁な株の遺伝子型、アクセシオンNoが代入

Blast検索結果

列名	値	備考	データソース
アクセシオンNo			データソース
類似株名(Blst)	1304-A	E-valueとidentityがカットオフ基準を超えた株において、Scoreが最も高い株	Excelファイル
遺伝子型(B)	GI/1		Blast検索
Score	516		
Expect	0.00E-150		
Identities	279/279(100%)		
Strand	Plus/Plus		
件数	1	Top Hitと同じScoreを持つ株の件数(最大10)	

図4 Blast検索の結果、作成されるExcelファイル



図5 Blast検索の条件指定

A 登録済の株 (データベース)

B 新規追加する株

C 新たに登録された株を含むエクセルファイルが作成される

D 追加された株

#	A	B	C	D	E	F
#SeqID	株名	シーケンス	ウイルス名	領域	遺伝子型	
1	1304-A	ATGAAGATGGGTCGAATGAC	NoV	N/S	GI/1	
2	1411-B	GGTTTCATGAOCTAAGTTTGT	NoV	N/S	GI/2	
3	1404-C	TOGTGGGAGGGOGATCGCAAT	NoV	N/S	GI/4	
4	1411-D	ATTCTCAGATCTGAGCACGTG	NoV	N/S	GI/6	
7	1501-X	ATGAAGATGGGTCGAATGAC	NoV	N/S	GI/1	

図6 データの追加登録機能