厚生労働行政推進調査事業費補助金
健康安全･危機管理対策総合研究事業

地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究

― 令和 6-7 年度　総括･分担研究報告書　－

研究代表者

貞升　健志

東京都健康安全研究センター

令和 8（2026）年 3 月

目次

Ⅰ．総括研究報告書
地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究・・・

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）

地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究（令和６-７年度 総括研究報告書）

研究代表者	貞升　健志	東京都健康安全研究センター 参事研究員
研究分担者	岩本　朋忠	神戸市健康科学研究所　所長
	長島　真美	東京都健康安全研究センター 健康危機管理情報課長
	塚越　博之	群馬県衛生環境研究所　保健科学係長
	野本　竜平	神戸市健康科学研究所　副部長
	久保田寛顕	東京都健康安全研究センター　統括課長代理
研究協力者	瀬戸　順次	山形県衛生研究所　研究専門員
	和田　崇之	大阪公立大学大学院生活科学研究科　教授
	江原　勇登	埼玉県衛生研究所　ウイルス担当
	浅倉　弘幸	東京都健康安全研究センター　主任研究員

研究要旨

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）では、次世代シークエンサー（遺伝子検査機器：NGS）を用いてゲノム解析を行うことにより、全国の地方衛生研究所（地衛研）等での地域の変異株の発生状況を把握し対策に役立ててきた。一方で、地方衛生研究所における業務は多岐にわたり、COVID-19 以外の NGS を用いた解析は棚上げ状態にあった。そこで、本研究班は 2025～2026 年度にかけて実施し、全国規模で地衛研における NGS 解析技術・知識の均てん化を推進すること、ブロック拠点を中心に、地衛研独自でできるだけゲノム解析を実施可能な体制を整えることを目標とし、①ゲノム解析に関する調査、②ゲノム解析ブロック拠点の設置および研修、③基礎的研修の実施（Web 研修等）、④NGS 検査マニュアルの作成、⑤PFGE に代替しうる NGS 解析法の検討を行い、最終的な目標であるゲノム検査における人材育成ガイドラインを作成した。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症では、次世代シークエンサー（遺伝子検査機器：NGS）を用いてゲノム解析を行うことにより、全国の地方衛生研究所（地衛研）等での地域の変異株の発生状況を把握し対策に役立ててきた。この方法は、国立感染症研究所（感染研）のマニュアルに基づき臨床サンプルの遺伝子増幅を行い、感染研の解析 Web サイト（COG-JP/ PathoGenS）で解析することにより実施してきた。

次世代シークエンサーはあらゆる病原体の遺伝子解析が可能であるものの、ウイルス遺伝子の塩基配列が 1 万～20 万塩基であるのに対し、細菌は 200 万～600 万塩基と 10 倍以上長く、異なる手法を用いる必要がある。また、原因不明疾患の病原体解析は、臨床サンプル中に病原体のゲノムの含有率を見る方法であり、既知の病原体の解析手法とは異なり、ヒトゲノム情報の除去、病原体の検索が必要である。

今までは、感染研の Web サイトを利用して解析方法であったが、既に利用できないといった課題があった。そもそも、地衛研における病原体検査は、感染研の病原体検出マニュアルに基づいて行われるが、NGS を用いた病原体に対するゲノム検査法（手法、

解析法）に関するマニュアルはほとんど存在していない。

さらに、数年単位で人事異動が発生する地衛研も多く、地域レベルでの検査・解析技術が維持できず、次の感染症危機時に、次世代シークエンサーを用いた検査・解析ができないことが懸念されていた。

以上のような課題解決のため、平時から次世代シークエンサーを活用した検査技術の維持や、検査を実施できる人材を継続的に育成するための方策や検査体制を維持するための人員体制について検討し、全国規模で技術・知識の均てん化を推進する必要があった。

本研究班では、次の項目を主な達成目標として検討を行うこととする。

①全国の地衛研のゲノム検査に係る人員体制や技能維持の現状について調査を実施する。

②地方衛生研究所全国協議会の各ブロック（北海道・東北・新潟地区等の６ブロック）に解析用 PC を設置し、主として細菌分野の無料解析ソフトのインストールから解析までを研修することで、ブロック拠点を作る（ブロック拠点は可能な限り広げていく）。

③地衛研等を対象とした微生物分野の基礎的な知識を学ぶ Web 研修を行う。

④次世代シークエンサーに関わる検査マニュアルを地方衛生研究所全国協議会と連携し作成する。

⑤PFGE に代替しうる NGS 解析法を検討する。

⑥全国の地方衛生研究所のゲノム検査における人材育成法についてガイドラインを作成する。

B. 研究方法

本研究班では、それぞれの研究分担者または研究協力者がそれぞれの研究目的（各課題）に沿って研究を実施する（図１、２）。

1. 全国の地方衛生研究所のゲノム検査に係る調査の実施（瀬戸、和田）

84 地衛研を対象にインターネット環境に関するアンケート調査を実施する。コマンドラインを用いたゲノムデータ解析には外部のインターネットに接続可能な環境が必要となるため、全国地衛研の状況を把握するために実施することとする。

2. 地方衛生研究所の各ブロック拠点で PC を用いた解析拠点の整備（瀬戸、和田、野本）

地衛研において、コマンドラインを用いたゲノムデータ解析を自律的に実施可能な状況にすることを目的として、全国 6 ブロックでの拠点の選定とパソコンの設置および現地研修会（2025 年度は 3 ブロック、2026 年度は 4 ブロック）を実施する。

3. 原因不明疾患におけるゲノム解析法の構築（長島、浅倉、江原）

原因不明疾患等における次世代シーケンサー（NGS）の利用は、近年、重要視されており、年々増加傾向にある。一方で、解析法についてはこれといった標準法はなく、地方衛生研究所（地衛研）独自での解析方法の確立が急務である。今回、不明疾患解析検体およびアンプリコン NGS 解析を行う解析ソフト PaHuM ならびに MTAAP の評価およびこれらに関する Web セミナーを実施する。

4. 地衛研等を対象とした微生物分野の基礎的な研修の実施（塚越）

地衛研における検査や研究の基礎を学ぶことで地衛研職員全体の底上げを目的として、Web 研修または集合型研修を通じて、人材育成研修を行う。

5. 次世代シークエンサーに関わる検査マニュアルの作成（岩本）

地衛研におけるゲノム解析の普及を目的として、ゲノム解析ワーキンググループを構成し、ゲノム解析の１次処理にあたるウェットラボ操作に関するマニュアル作成に取り組む。

6. 疫学調査における NGS 解析の利用に関する研究（野本、久保田）

集団食中毒をはじめ病原性細菌に起因す

る集団感染が発生した場合、地衛研ではパルスフィールド電気泳動（PFGE）による系統解析を行い、その結果をもって保健所等と連携し、事例究明と収束に向けた対応に当たってきた。今後、PFGE 機器の販売は終了し,サポートも 2023 年末で終了が予定されている。そのため、NGS を用いた菌の比較を地衛研として考えることに取り組む。

7. 全国の地方衛生研究所におけるゲノム解析に関する人材育成法についてのガイドライン作成

本研究班での最終目標である、ゲノム解析に関する人材育成法についてのガイドラインを作成する目的で、分担研究の結果を鑑みて、ガイドラインを作成する。

（倫理面への配慮）

本研究班で実施する事項については、東京都健康安全研究センター倫理委員会で承認されている（6 健研健第 906 号）。

C. 研究結果

1. 全国の地方衛生研究所のゲノム検査に係る調査の実施（瀬戸、和田）

1 年目にインターネット環境に関するアンケートを実施したところ、84 地衛研中 29 地衛研（34.5%）において、現時点ではコマンドラインによるゲノムデータ解析を実施できない、もしくはできない可能性があるという調査結果となった。

また、通信インフラ未整備によりゲノムデータ解析を自施設で実施できない致命的な問題点も潜んでおり、これらを解決していくために必要な支援について、本研究班で検討していくことが明らかになった。

2. 地方衛生研究所の各ブロック拠点での PC を用いた解析拠点の整備（瀬戸、和田、野本）

研修会は、2025 年 1～12 月に 7 回開催した。全国 86 地衛研のうち 68 施設 171 人が研修会に参加した。研修内容は、基礎編、細菌編、ウイルス編に分け、初学者向けの構成とした。研修会は 2～3 日開催し、大半をパソコンでの実習に割いた。誰一人として取り残さないことを念頭に、質問しやすい雰囲気を作ることを意識した結果、総質問数は 7 会場で 500 回以上となった。参加者の 83%が 20～40 歳台と若く、各会場とも非常に活気のある中で研修会が開催された。研修の総合評価は、91%が最高評価の「非常に良かった」であった。

最終のアンケートでは、参加者のゲノムデータ解析に対する自信度（10 段階評価）の中央値が、研修前の 2 から研修後は 7 へと有意に増加した。研修参加前にコマンドラインを使っていなかったが研修後に使うようになった者が 3 割おり、研修の成果が認められた。今後も同様の研修の機会を望むかの設問では、全員が研修会の継続を希望していた。今後の研修内容としては、初級編の研修会の継続と、細菌・ウイルス特化型の中級編の新規研修という 2 種類が望まれていた。

研修会終了後には、全資料に作業動画を追加しつつ再編成したものを作成したことで、e ラーニングの機会を創出した。

本研究における全国地衛研を対象としたゲノムデータ解析現地研修会の満足度は非常に高く、次年度以降の研修の継続が要望されていた。今回の初級編に加え、今後、中級編・上級編の研修会を進めていくことで、全国地衛研でのゲノムデータ解析に長けた人材の育成が可能になる。

3. 原因不明疾患におけるゲノム解析法の構築（長島、浅倉、江原）

原因不明疾患等における次世代シーケンサー（NGS）の利用は、近年、重要視されており、年々増加傾向にある。しかしながら、解析法についてはこれといった標準法はなく、地衛研独自での解析方法の確立が急務である。今回、不明疾患解析検体およびアンプリコン NGS 解析を行う解析ソフト PaHuM ならびに MTAAP の評価を行った。結果として、どちらの解析ソフトも機能的に市販ソフトと同等以上であることが示され、十分に地衛研の NGS 解析に役立つことが示された。また、臨床検体からの直接の NGS 解析は、個人のゲノムデータも一緒にデータ化してしまう懸念があり、倫理的な問題点の解決策を指摘される場合も想定さ

れる。そこで、全国の地衛研の担当者を対象に、原因不明疾患における NGS 利用について、2025 年 9 月 2 日～9 月 24 日に計 11 問のアンケート調査を実施した。その結果、回答率は 90.7%であった。次世代シーケンサー（NGS）は、85.9%の地衛研が所有し、不明疾患での NGS 使用は「研究として必要」が 62.7%と最も多く、「通常検査のオプション」が 46.3%、「検査法として必要」は 29.9%であった。倫理的な問題については、「各所で倫理委員会を通しておくべき」が、52.2%と最も多かった。また、以上の結果を含めて、地衛研の職員を対象とした Web 研修会を実施した。

網羅的ゲノム解析ツールである MePIC、PaHuM、CZ ID を比較し、PaHuM および CZ ID が MePIC の後継解析ツールとなり得るか検討した。MePIC により病原ウイルスゲノムが検出された 3 検体の NGS データを用いて、PaHuM および CZ ID による追加解析を実施し、各解析ツールで検出されたウイルスゲノムのリード数を比較した。その結果、3 検体中 2 検体では、3 つの解析ツールすべてで同等のリード数が得られた。残りの 1 検体ではリード数に若干の差異がみられたものの、いずれのツールでも目的とする病原ウイルスを検出できた。さらに、国立感染症研究所が新たに開発した PATHDET と、PaHuM および CZ ID を、C 型インフルエンザウイルスをスパイクインした検体を用いて比較したところ、リード数には多少の違いがあったものの、いずれのツールも目的とする病原ウイルスを検出した。以上より、これらの解析ツールはいずれもメタゲノム解析ツールとして高い相互信頼性を有すると考えられた。

4. 地衛研等を対象とした微生物分野の基礎的な研修の実施（塚越）

地方衛生研究所（地衛研）では、高度化する検査に対応可能な専門職人材が不足している現状がある。そこで、本研究では、基礎的な知識と技術の習得による人材育成をすることで地衛研の職員全体の底上げを目的として、基礎的な研修を行い、その必要性について検討を行った。Web 研修では、地衛研職員として検査の基礎を学ぶための講義を行った。対面型の研修では、リアルタイム PCR 法などを通して基本的な手技や考え方について講習した。アンケート調査の結果からいずれの研修会も満足度は高く、継続を望む声が強かった。また、対面型の研修後のアンケートでは、所内への伝達方法が所内供覧のみであった自治体も多く今後の課題であると考えられた。本研究で取り組んだ基礎的な研修をとおして、正確な検査・研究につなげていくことで感染症発生事案において“頼りになる地衛研”となっていく必要がある。

5. 次世代シークエンサーに関わる検査マニュアルの作成（岩本）

地衛研でのゲノム解析の普及を促すため、地衛研全国 6 支部をカバーするゲノムワーキンググループメンバー（グループ長　岩本）を組織して、ゲノム解析のウェットラボ操作に関するマニュアル作成に取り組んだ。令和 6 年度は「地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編」を作成し、地方衛生研究所全国協議会ホームページ上に掲載した。令和 7 年度は、本マニュアルの普及に向けた研修の実施、さらには、エンテロウイルスゲノムを 2 セットの PCR 増幅でカバーできゲノム解析プロトコルを作成した。A, B, D 種のエンテロウイルスに対応するものである。

6. 疫学調査における NGS 解析の利用に関する研究（野本、久野田）

集団食中毒をはじめ病原性細菌に起因する集団感染が発生した場合、地方衛生研究所ではパルスフィールド電気泳動（PFGE）による系統解析を行い、その結果をもって保健所等と連携し、事例究明と収束に向けた対応に当たってきた。今後、PFGE に代わり、一塩基単位の解像度で全ゲノム比較を行うことが可能な次世代シークエンサー（NGS）を用いた菌の比較が求められる。本研究課題では NGS を用いた数値化の方法として一塩基多型（SNP）解析を行うことを前提とした。その際、検出される一塩基変異（SNV）は解析方法によって変化しうることから、特に影響を与える要因を特定したところ、リファレンスの選定や、遠縁株

を含むか否かという条件によって検出される SNV の数が影響されることを確認した。検討結果を踏まえ、最終的に SNP 解析精度管理用マニュアルの草案を作成した。本マニュアルでは最初に粗く SNP 解析をすることで遠縁株を判断し、近縁株のみで再度 SNP 解析を行う二段階のワークフローを採用した。各地衛研が同等の解析を行うための精度保証として、リードデータ品質の基準の統一ならびに SNP 解析の方法の指定を盛り込んだ。今後は本マニュアルの完成版をウェブ上で公開するとともに、地衛研ネットワークの中で研修を実施するなどし、全国地衛研への浸透を図っていく。

7. 全国の地方衛生研究所におけるゲノム解析に関する人材育成法についてのガイドライン作成（貞升）

地衛研は都道府県、政令指定都市及び中核市等に設置されている公的試験研究機関である。2023 年、地衛研は地域における科学的かつ技術的拠点となる機関として法制化された。

我が国における総人口は、2004 年をピークに急激に減少し、出生率は 2024 年に 1.15 と過去最低となった。このような状況下で、新たな若い人材が全国の地衛研に配属され続けるような楽観的な状況はもはや期待できない。一方で、健康危機対応に待ったはなく、地域における有事対応は突然やってくる。

地衛研が地域の健康危機管理の技術的拠点として的確に対応していくためには、日々の人材育成が重要な要素となる。特に、病原体ゲノム解析等の新たな知識・技術に関する分野での進歩は著しく、一つの地衛研だけで解決できない側面もあり、全国の地衛研が一体となって考えていくべきである。そこで、ゲノム解析に関する人材育成法についてのガイドライン（日本語。、英語）を作成した。

本ガイドラインは、「地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究班（24LA2003）」において実践した内容を軸とし、地衛研における微生物分野の人材育成マニュアル等の作成時に、利用または考慮すべき事項を要点としてまとめ、地方衛生研究所全国協議会のホームページ上にアップロードした（https://www.chieiken.gr.jp/koseirodo/LocalPHL_GenomicsTraining_KeyPoints.pdf）。

ガイドラインの内容は下記の通りである。

1. 遠隔地 OJT を利用した人材育成
2. 研修・検査等の手法の見える化（開発を含めて）
3. E-learning による個別最適な学びの手助け
4. 目指すべき NGS 関連スキル
5. 関連スキルに対する熟達化
6. ブロックを拠点とした人材育成
7. ゲノム解析におけるブロック拠点の選定要素
8. 学びのサイクル化
9. NGS の実戦での活用。

D. 考察

本研究班の研究では、ウイルス感染症や細菌感染症の両面から、ブロック拠点の設置、NGS に関する基礎的な方法の開発、研修、それらを含めたガイドライン作成に取り組んだ。

ブロック拠点では、PC を設置し、Web 環境や解析環境が悪い地衛研でもブロック拠点での解析を可能にした。

研修会では、Web セミナーや対面の研修を取り入れ、NGS に関する障壁もできるだけ取り除けるような観点で研修を実施した。また、Web セミナーではアーカイブ化を図り、地衛研職員の誰もがいつでも参照することが可能にした。

ガイドラインは、本研究班で検討した全ての要素を含め、いつまでの参照できるように、地衛研のホームページ上にも掲載した。

本研究班は終了するが、今後も継続して実施することで、NGS 解析のみならず、地衛研における人材育成が継続的に可能になると思われる。

それぞれの成果の詳細は各分担研究報告を参照していただきたい。

E. 結論

本研究班では、全国規模で技術・知識の均てん化を推進すること、地衛研独自でできるだけ実施できることを行うこととし、①ゲノム解析に関する調査、②ゲノム解析ブロック拠点の設置、③基礎的研修の実施、④NGS 検査マニュアルの作成、⑤PFGE に代替しうる NGS 解析法の検討を行い、最終的な目標である、ゲノム検査における人材育成ガイドラインの作成を作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

１．論文発表

1) 貞升健志：地方衛生研究所における次世代シークエンサーの利用と課題、東京健安研セ年報, 75, 77-81, 2024

2) 長島真美，藤原卓士，村田ゆかり，他：東京健安研セ年報、75, 27-40, 2024

3) Seto J, Inoue S, Abe S, Terashita K, Endo Y, Fujii S, et al. A case of endogenous and collateral reactivation caused by two *Mycobacterium tuberculosis* subclones. J Infect Chemother. 2025;31:102795.

4) Komabayashi K, Chikaoka S, Awano H, Abe A, Sendo D, Furuyama M, et al. Parechovirus A3 infections, including myalgia, in Yamagata, Japan between 2022 and 2023 and their next-generation sequencing analyses. Jpn J Infect Dis (in press).

5) Kawashima A, Tsuchiya K, Kuroki K, Nagashima M, Koizumi Y, Nakamoto T, Mizushima D, Aoki T, Sadamasu K, Teruya K, Yoshimura K, Gatanaga H. : Prolonged severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection and intrahost viral evolution in a severely immunocompromised patient with human immunodeficiency virus infection: A whole-genome sequencing study., Int J Infect Dis. 2026 Apr;165:108453. doi: 10.1016/j.ijid.2026.108453.

6) Uriu K, Okumura K, Uwamino Y, Chen L, Tolentino JE, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Ito J, Sato K; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium.: Virological characteristics of the SARS-CoV-2 NB.1.8.1 variant., Lancet Infect Dis. 2025 Aug;25(8):e443. doi: 10.1016/S1473-3099(25)00356-1.

7) Ishitsuka T, Sugiyama M, Kubota H, Takai S, Kakuda T, Suzuki Y. Isolation of Rhodococcus equi bacteriophage ReT1 and investigation of its bactericidal effect. Microb Pathog. 207:107868. 2025.

8) Aoki W, Uwamino Y, Niida N, Kubota H, Kamoshita Y, Inose R, Nagata M, Ishihara O, Uno S, Yoshifuji A, Namkoong H, Hasegawa N, Matsushita H. Cefiderocol susceptibility of Stenotrophomonas maltophilia species complex and carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from blood cultures at a university hospital in Tokyo, Japan. J Glob Antimicrob Resist. 44:251-255. 2025.

9) Aoki W, Uwamino Y, Kubota H, Kamoshita Y, Inose R, Nagata M, Namkoong H, Matsushita H. Evaluation of in vitro efficacy of aztreonam-nacubactam and cefepime-nacubactam against clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia. Antimicrob Agents Chemother. 69:e0075525. 2025.

10) Kobayashi K, Kubota H, Ariyoshi T, Suzuki Y, Mori K, Suzuki J, Ochiai Y, Sadamasu K, Chiba T. Differential Copy Number of Chromosomal blaCTX-M-14 in Escherichia coli Sequence Type ST38 from Companion Dogs and Cats. Curr Microbiol. 83:189. 2026.

11) 安中めぐみ, 長谷川乃映瑠, 久保田寛顕, 吉田勲, 鈴木淳, 貞升健志. 結核菌検査におけるゲノム解析法に関する検討. 東京健安研セ年報. 75. 115-118. 2024.

12) 安中めぐみ, 久保田寛顕, 長谷川乃映瑠, 伊藤仁, 小林甲斐, 森功次, 貞升健志, 千葉

隆司．結核菌における薬剤耐性遺伝子変異検出の有用性の検討．東京健安研セ年報．76．57-61．2025.

13) Tanimoto Y, Ohyama M, Ito E, Akiyoshi K, Onishi Y, Mori A, Nomoto R. Whole genome-based surveillance for human adenovirus-related diseases in Kobe City, Japan, 2018-2022. BMC Res Notes. 2025;18:170.

14) Komatsu S, Nomoto R, Nakanishi N. Stability of a bla_{GES-5}-carrying plasmid in a *Serratia marcescens* nosocomial outbreak. J Infect Chemother. 2025;31:102742.

15) Hiratsuka T, Nakanishi N, Akita H, Masuda K, Komatsu S, Nomoto R, Amemura-Maekawa J. A large outbreak investigation of Legionnaires' disease associated with a public bath facility in Hiroshima, Japan, using PFGE, SBT, MLVA, and whole-genome sequencing. Int J Med Microbiol. 2025 ;321:151680.

16) Izuta K, Nishikubo M, Nomoto R, Sumitomo S, Matsuoka Y, Seo R, Nishioka H, Ariyoshi K, Sando E. Systemic lupus erythematosus mimicking Japanese spotted fever due to *Rickettsia japonica* detection in an eschar: a case report. BMC Infect Dis. 2026. Epub ahead of print.

17) 久保萌加, 濱畑啓悟, 森愛, 野本竜平, 磯目賢一, 川崎悠, 岩田あや, 松原康策．エコーウイルス 11 髄膜炎の小児例:神戸市 2 施設の後方視的観察研究 2023~2024．小児感染免疫. 37. 165-175. 2025

18) 平良由貴, 楫理恵子, 須賀知子, 伏屋智明, 谷本佳彦, 谷本佳彦, 森愛, 野本竜平. 2024 年 8 月に神戸市で検出された麻疹ウイルス遺伝子の分子疫学解析．IASR. 46. 63-64. 2025

19) 中西典子, 藤永千波, 小松頌子, 田中忍, 向井健悟, 野本竜平, 塩谷紀代, 森本るみ, 潮見千賀, 菅澄子, 宗田由紀, 楠信也．神戸市における *Streptococcus pyogenes* $M1_{UK}$ 系統株の発生動向と分子疫学解析 感染症学雑誌. 99. 301-309. 2025

20) 貞升健志：地方衛生研究所における次世代シーケンサー解析から検査導入までの育成段階、東京健安研セ年報, 76, 25-31, 2025

２．学会発表

1) 江原 勇登、小暮　栞、遠藤 昇里、今泉 晴喜、黒沢 博基、濱本 紀子、猪野 翔一朗、大阪　由香、貞升　健志、富岡　恭子、尾関 由姫恵、岸本　剛、本多　麻夫「原因不明疾患検査における次世代シーケンサー解析法の比較検討」第 37 回日本臨床微生物学会総会・学術集会、千葉、2026.2.13－15

H．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

地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究（24LA2003）

2024年度から2か年

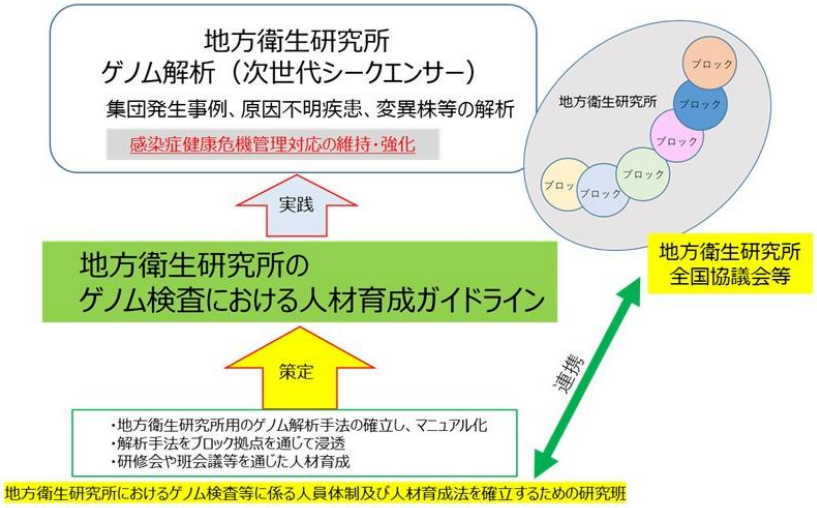


図１　研究班の目的・概要

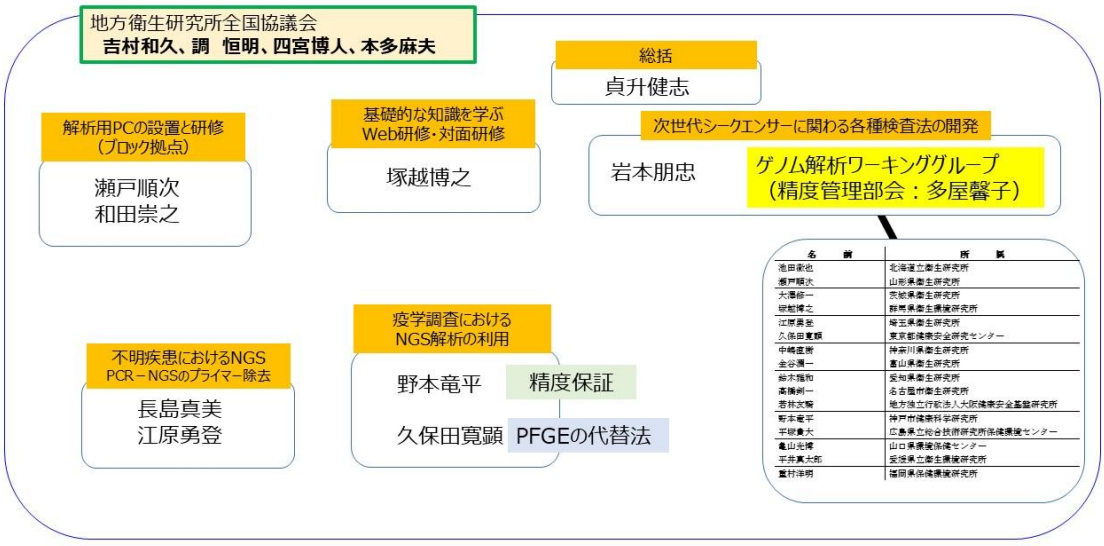


図２．研究班の人員体制

地方衛生研究所の病原体ゲノム解析における人材育成のための要点



令和 7 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究（研究代表者　貞升健志）

2026 年 3 月

表紙の画像は、ゲノム、サイクル、人材育成等をキーワードとし、
生成 AI（Image Creator）で作成したものです。

はじめに

地方衛生研究所（地衛研）は都道府県、政令指定都市及び中核市等に設置されている公的試験研究機関である。2023 年、地衛研は地域における科学的かつ技術的拠点となる機関として法制化された。

我が国における総人口は、2004 年をピークに急激に減少し、出生率は 2024 年に 1.15 と過去最低となった。このような状況下で、新たな若い人材が全国の地方衛生研究所に配属され続けるような楽観的な状況はもはや期待できない。一方で、健康危機対応に待ったはなく、地域における有事対応は突然やってくる。

地衛研が地域の健康危機管理の技術的拠点として的確に対応していくためには、日々の人材育成が重要な要素となる。特に、病原体ゲノム解析等の新たな知識・技術に関する分野での進歩は著しく、一つの地衛研だけで解決できない側面もあり、全国の地衛研が一体となって考えていくべきである。

本ガイドラインは、「地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究班（24LA2003）」において実践した内容を軸とし、地衛研における微生物分野の人材育成マニュアル等の作成時に、利用または考慮すべき事項を要点としてまとめたものである。

1. 遠隔地 OJT を利用した人材育成

多くの地方衛生研究所（地衛研）では、これまで、日々の業務を通じて知識や技能を身につける OJT（職場内研修） を中心に、必要に応じて 外部研修（Off-JT） を組み合わせる形で人材育成が行われてきた。こうした継続的な人材育成は、職員一人ひとりの成長を促すとともに、人が人を育てる文化を組織に根付かせ、地衛研全体の能力向上に不可欠である。

一方で、次世代シーケンサー（NGS）を用いた病原体ゲノム解析 の分野では、従来の OJT が十分に機能しない場合がある。これは、技術が高度かつ専門的であるため、各地衛研に OJT を担える指導人材がまだ存在しない可能性があるためである。

また、Off-JT についても、地理的制約や社会的な研修ニーズ、予算、講義内容との適合などの課題があり、必ずしも効果的に実施できるとは限らない。加えて、ゲノム解析に必要な機器やデジタル環境など、ハード面の課題も少なくない。このため、地衛研共通で利用できる解析プラットフォームや、人材育成・評価に関する方針やマニュアルの整備が求められる。

さらに、学ぶ側の視点に立つと、自ら学ぶ姿勢（自助） や 同僚から学ぶ仕組み（共助）が重要となる。その実現には、遠隔地でも実施可能な OJT の推進が不可欠であり、対応可能な地衛研が教育支援や人材派遣などの形で協力していくことが重要である。

［メモ］地方衛生研究所全国協議会（地全協）は、健康危機管理の技術的拠点である地衛研の集合体であり、6 ブロック 86 機関が所属している。共に支え合う関係であると同時に、切磋琢磨していくことで、地衛研の技術等の質的向上が期待できる。

２．研修・検査等の手法の見える化（開発を含めて）

一般的な人材育成の現場では、多くの研修用資料が整備されており、比較的容易に入手することができる。一方で、ゲノム解析に関する技術や知識を扱った研修資料は限られているのが現状である。さらに、国から公定法や解析用プラットフォームが迅速に示されない場合も多く、研修を実施するための基盤が十分に整っていないことも少なくない。

このような状況では、ゲノム解析関連の研修を担当する者（研修実施者）は、自ら最適な手法や資料を選定、あるいは新たに作成し、研修教材として活用していく必要がある。また、作成・活用された研修手法や資料については、全国で共有し活用できるよう標準化を進めることが重要であり、関係機関が連携して取り組んでいくことが求められる。

［メモ］従来から各地衛研では、JIHS 国立感染症研究所から研修等を通じて示されたマニュアル等を標準操作手順書に落し込み、検査等で活用してきた。しかしながら、緊急時等にマニュアルそのものがなかったり、タイムリーな人材育成研修が受けられない場合が想定される。特に、人事異動が定期的に実施される職場では、このような状況が多い傾向が認められる。

３．E-learning による個別最適な学びの手助け

標準的な手法や研修資料が整備されていれば、個人レベルでの知識習得が可能となり、学習はより容易になる。自ら学ぶ機会を支援する手段としては、基礎から応用までを網羅した定期的な講演会の開催と、その内容のアーカイブ化が有効である。

地衛研に勤務する職員は、それぞれ専門的なバックグラウンドが異なり、研修の進捗も個人差があることから、短期間で一律に習得することは難しい。しかし、Web 研修などのツールを活用し、講演内容をアーカイブ化することで、時間や場所に制約されることなく、誰もが何度でも学習できる環境（E-learning 化）を整えることができる。

そのため、定期的に実施する講演会等については、内容の充実や更新を継続しながら、計画的にアーカイブ化していくことが必要である。

［メモ］従来から、論文を読み、論文を基にトライ＆エラーを繰り返し実施し、学んできたが、映像のアップロードや聴講が容易となった現在では、学びの手助けとして、これらの資料を活用しない手はないと言える。

４．目指すべき NGS 関連スキル

地衛研には、感染症や食中毒、それらの原因となる病原体について、試験検査、調査、研究を行い、関連情報を収集・分析・公表する業務を、着実かつ創意工夫をもって遂行できる人材が求められる。

これらの業務の一環として、積極的疫学調査などにおいてエビデンスを得る目的で、NGS による病原体ゲノム解析を実施する場合がある。その際に必要とされるスキルは多岐にわたり、どの水準まで求めるかについては、各地衛研がそれぞれの役割や体制に応じて個別に設定する必要がある。

以下に、ゲノム解析において求められるスキルの例を示す。

1）健康危機管理において、目的に応じた病原体ゲノム検査を適切に選択できること
2）健康危機管理事例に関する病原体ゲノム解析を実施できること
3）上記 1）および 2）について、知識や技術を深化させ、創造的に活用できる段階を目指すこと
4）そのほかの事項については、「地方衛生研究所の微生物分野における人材育成マニュアル作成のための要点」を参照されたい

５．関連スキルに対する熟達化

人が経験を積みながら実践的な知識や技能を身につけ、初心者から熟達者へと成長していく長期的な学習過程を熟達化という。熟達化は、表に示すとおり、

・手続き的熟達化（業務歴 1～2 年目）
・定型的熟達化（業務歴 3～5 年目）
・適応的熟達化（業務歴およそ 6～10 年目）
・創造的熟達化（業務歴およそ 11 年目以降）

の各段階に分けることができる。

各地衛研においては、こうした熟達化が進んだ職員をより多く育成・確保することが理想である。そのためには、職員一人ひとりの熟達化の進み具合や、その深さを客観的に把握し、組織として熟達化を計画的に推進していくことが重要である。

［メモ］最終的に、全ての地衛研で多くの分野に対する多くの熟達者を抱えることが目標である。

表　熟達化の段階

1 手続き的熟達化（業務歴１～2年目） **業務に関する経験の無い者は「初心者」と呼ばれ、熟達化はほとんど進んでいない。**
2 定型的熟達化（業務歴3～5年目） **定型的な業務であれば速く正確に行うことができるようになる。**
3 適応的熟達化（業務歴およそ6～10年目） **状況に応じて類推しながら業務を進められる状態。俗にいう「中堅者」で、経験からの知識や想像力を発揮して非定型的な業務を進めることができる。**
4 創造的熟達化（業務歴およそ11年目以降） **高いレベルのパフォーマンスを効率よく正確に発揮できている状態をいう。この域に達したものを「熟達者」という。状況に応じた新たな手順やルール、技術を編み出すことができる。**

「眞﨑大輔監修：人材育成ハンドブック，ダイヤモンド社，2019」より引用改変

６．ブロックを拠点とした人材育成

全国の地衛研は、地域ごとに地理的に近い研究所同士がブロック単位でまとめられている。ブロック単位で考えれば、NGS を用いた解析に精通した OJT 人材が全く存在しない状況は、個々の地衛研で考える場合に比べて大幅に少なくなると考えられる。

同一ブロック内の地衛研は、日常的に顔を合わせる機会も多く、相互に連携しやすい関係にあることから、OJT を実施しやすい土壌がすでに整っている。特に、NGS 解析に必要な高性能な解析用 PC の貸与や共同利用は、研修を進める上での初期段階として重要な要素となり得る。

そこで、ブロックごとに研修の基盤となる拠点（ブロック拠点）を整備し、この拠点を中心とした包括的な研修を定期的に実施することで、ブロック内の連携強化や、地衛研全体の技術力および人材育成水準の底上げが期待できる（図）。

さらに、同じ研修を受講した職員や研修を実施した職員同士のつながりは、協働的な学びを促進する「共助」につながり、その後の知識や技術の継続的な蓄積、さらには長期的な協力関係の構築にも寄与する。

［メモ］地全協は全国で６つのブロックに分割される。全国一律のみでなく、ブロックを拠点とした人材育成研修は、協働的な学び（共助）において効果的である。

７．ゲノム解析におけるブロック拠点の選定要素

ゲノム解析におけるブロック拠点の選定要件としては、以下のような点が考えられる。中でも、ブロック拠点として主体的に活動する意思を持つ職員の存在と選定は、極めて重要な要素である。

1）解析用 PC の性能

NGS 解析を円滑に実施できる十分な処理能力を有していること

2）良好なインターネット環境

大容量データの送受信や、オンライン研修・遠隔支援に支障がない通信環境が整っていること

3）人材と意識（熱意）

ゲノム解析や人材育成に意欲を持ち、継続的に取り組む人材が確保されていること

4）定期的な研修会の実施体制

ブロック内外の職員を対象とした研修を、計画的かつ継続的に実施できる体制があること

5）各地衛研からの移動距離・時間

ブロック内の地衛研から無理なく移動でき、対面研修が実施しやすい立地であること

8．学びのサイクル化

前述したさまざまな研修を受けた職員が、研修で得た知識や技術を所属先に持ち帰り、実際の業務で実践・振り返り（復習）を行うことで、学びは定着していく。

さらに、所内での伝達講習などを通じて知識を共有するだけでなく、他の地衛研における研修会で講師を務めることにより、理解は一層深まり、学びの熟達化と固定化が加速される。

［メモ］研修を受けた職員が次なる研修の実施者として行動することができると、学びの熟達化、固定化が加速される。新たな研修を始める場合には、新たな人材を発掘するのも人材育成的に良い。

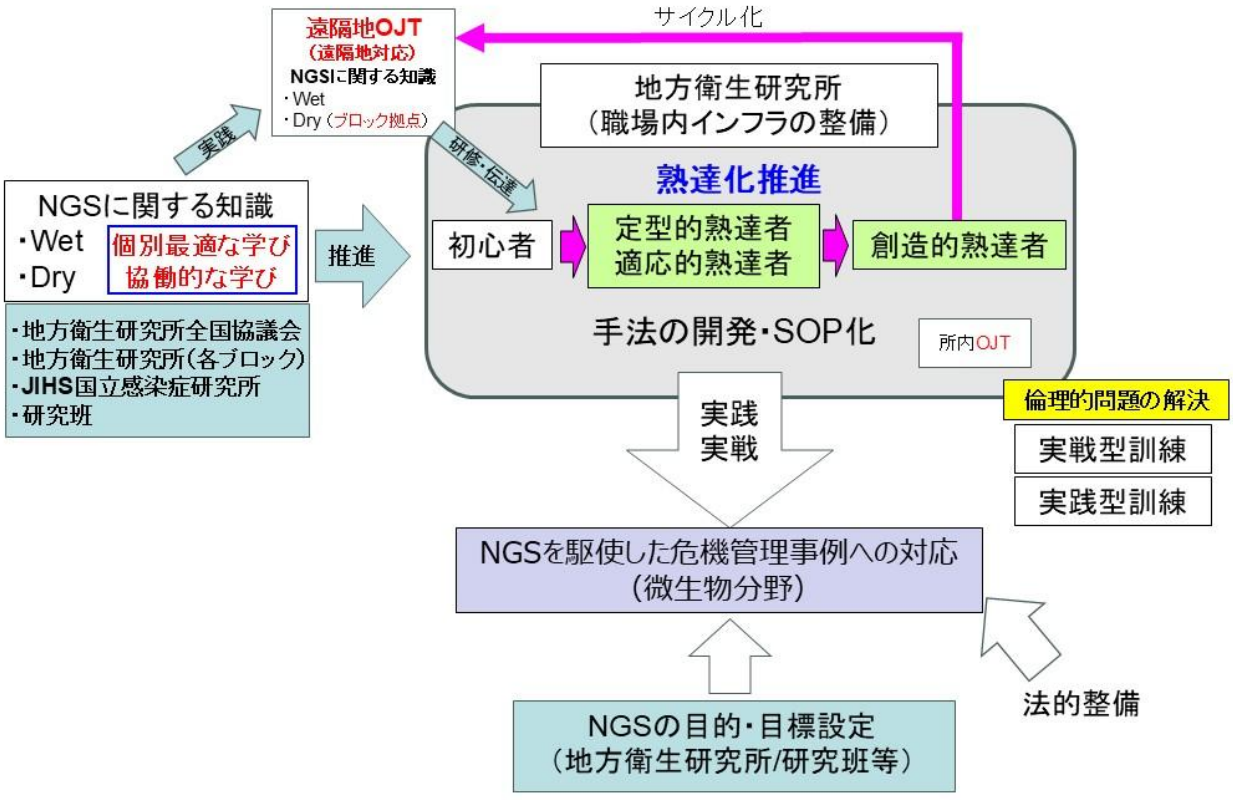


図　地方衛生研究所NGS分野における危機管理対応（微生物分野）に向けた体制図

９．NGS の実戦での活用

NGS 解析技術については、単なる研究目的にとどめるのではなく、行政検査への実践的な活用を検討していかなければならない。しかし、行政検査への導入については、新型コロナウイルス感染症のように国から通知等が示されない限り、各自治体や各地衛研の判断に委ねられる。そのため、検査責任者など管理職の判断・決断が極めて重要である。その決断を支えるためにも、全国の地衛研において行政検査での NGS 活用事例を着実に積み重ね、実績として共有・蓄積していくことが重要である。

［メモ］最終的な研修成果の目標は、地衛研に求められる感染症危機管理への実践的な活用である。その実現にあたっては、検査責任者などの管理職が、研修で得た知識や技術を実戦に投入するかどうかを判断することが重要な要素と言える。

おわりに

新型コロナウイルス感染症への対応を業務として経験した地衛研職員は、地域における健康危機管理の技術的拠点を担う重要な存在である。そのため、緊急時への対応力の維持・向上に加え、平時から新たな知識や技術を継続的に習得していくことが重要な課題となっている。

こうした人材育成においては、JIHS 国立感染症研究所等や企業が提供する研修機会の活用に加え、全国あるいはブロック内の地衛研が相互に協力する体制を基盤とした研修体系を構築することが重要である。このような体系のもとで、各地衛研において職務を着実に遂行できる人材を、循環的かつ計画的に育成し、活用していくことには大きな意義がある。

本ガイドラインは、現時点において地衛研の微生物分野における人材育成班に参画いただいている諸先生方の知見を集約したものである。本書が、地衛研における病原体ゲノム解析分野の人材育成の一助となることを期待する。

参考文献

1）地方衛生研究所の微生物分野における人材育成マニュアル作成のための要点、https://www.chieiken.gr.jp/koseirodo/guideline20230630.pdf

2）貞升健志、地方衛生研究所における次世代シークエンサーの利用と課題、東京健安研セ年報, 75, 77-81, 2024

3）貞升健志、地方衛生研究所における次世代シーケンサー解析から検査導入までの育成段階，76，2025

4）眞﨑大輔監修：人材育成ハンドブック，ダイヤモンド社，2019.

令和 7 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究班」

「地方衛生研究所の病原体ゲノム解析における人材育成のための要点」

研究代表者　貞升健志　　東京都健康安全研究センター
研究分担者　岩本朋忠　　神戸市健康科学研究所
塚越博之　　群馬県衛生環境研究所
長島真美　　東京都健康安全研究センター
野本竜平　　神戸市健康科学研究所
久保田寛顕　東京都健康安全研究センター
研究協力者　瀬戸順次　　山形県衛生研究所
和田崇之　　公立大学法人大阪　大阪公立大学
江原勇登　　埼玉県衛生研究所
浅倉弘幸　　東京都健康安全研究センター
淀谷雄亮　　川崎市健康安全研究所
安井善宏　　愛知県衛生研究所
川瀬　遵　　島根県保健環境科学研究所
成田　翼　　宮崎県衛生環境研究所
坂上亜希恵　宮城県保健環境センター
蕪木康郎　　さいたま市健康科学研究センター
重村洋明　　福岡県保健環境研究所
平井真太郎　愛媛県立衛生環境研究所
貞升友紀　　東京都健康安全研究センター

Key Points for Human Resource Development in Pathogen Genome Analysis at Japanese Public Health Institutes



FY2025 Ministry of Health, Labour and Welfare Administrative
Promotion Research Project Subsidy
(Comprehensive Research Project on Health, Safety and Crisis Management Measures)

Research to establish personnel systems and human resource development methods for genome testing at local public health laboratories

Principal Investigator: Kenji Sadamasu

March 2026

The cover image was generated using generative AI (Image Creator), based on keywords including genome, cycle, and human resource development.

Introduction

Prefectural and municipal public health institutes (PHIs) are public research and testing organizations located in prefectures, designated cities, and core cities across Japan. In 2023, PHIs were officially recognized as regional hubs for science and technology.

Japan's population has been steadily declining since it peaked in 2004, and in 2024, the birth rate hit a record low of 1.15. Given these trends, it is unlikely that there will be a sufficient influx of young talent to fill positions at PHIs nationwide. At the same time, the need for effective responses to health crises is urgent, and local emergency situations can arise unexpectedly.

Ongoing human resource development is essential for PHIs to effectively serve as technical hubs in regional health crisis management. Notably, there have been significant advancements in areas such as pathogen genome analysis. Some challenges cannot be solved by a single PHI alone; therefore, collaboration between PHIs nationwide is necessary.

This guideline is based on the findings of the "Study Group for Establishing Personnel Systems and Human Resource Development Methods for Genomic Testing at Prefectural and Local Public Health Laboratories (24LA2003)." It highlights key considerations for creating a personnel development manual for microbiology at PHIs.

1. Human Resource Development Using Remote OJT

Many prefectural and municipal public health institutes (PHIs) have traditionally focused on on-the-job training (OJT), where employees learn skills and knowledge through their daily work, with external training (Off-JT) used as needed. This approach to continuous human resource development helps each employee grow, fosters a culture of mentoring within the organization, and is essential for enhancing the overall capabilities of PHIs.

However, in the specialized field of pathogen genome analysis using next-generation sequencing (NGS), traditional OJT may not be effective. The technology is highly specialized, and PHIs may lack the necessary instructors to provide adequate training.

Additionally, Off-JT may not always be practical due to various challenges such as geographic limitations, societal training needs, budgets, and alignment with course content. There are also numerous technical obstacles, such as the specialized equipment and digital infrastructure required for genome analysis. As a result, there is a need for a common analysis platform that can be used by all PHIs, along with clear policies and manuals for human resource development and evaluation.

From the learner's perspective, self-motivation and a system for collaborative learning with colleagues (mutual help) are essential. To address these needs, it is critical to promote remote OJT programs that can be implemented even in distant locations. PHIs that are capable of offering such support should cooperate by providing educational assistance and personnel dispatch.

【Note】 Japan Association of Public Health Institutes (JAPHI) is an organization consisting of 86 PHIs across six regions, serving as technical hubs for health crisis management. By working together and supporting each other, we can expect improvements in the quality of technologies across PHIs.

2. Visualizing Training and Testing Methods (Including Development)

In typical human resource development settings, a wide range of training materials is readily available and easy to access. However, training resources related to genome analysis technology and knowledge are currently limited. Additionally, the government often does not provide official methods or analytical platforms in a timely manner, leaving the infrastructure for training underdeveloped.

Given these challenges, those responsible for genome analysis training (trainers) must independently select or create the most suitable methods and materials to use in their training programs. It is also crucial to standardize the training methods and materials developed and implemented across the country. Relevant organizations must collaborate to address this issue.

【Note】Traditionally, local public health institutes have incorporated manuals from the JIHS National Institute of Infectious Diseases (NIID) into their standard operating procedures and used them in testing. However, during emergencies, these manuals may not be available, or timely human resource development training may not be feasible. This issue is particularly common in workplaces with frequent personnel turnover.

2. Facilitating Individualized Learning through E-learning

Having standardized methods and training materials in place makes it easier for individuals to acquire knowledge. Regular lectures covering topics from basic to advanced levels, along with archiving the content, can be an effective way to support self-learning.

Since PHI staff members come from different professional backgrounds and progress at different rates, it can be difficult to ensure uniform knowledge acquisition in a short period of time. However, by leveraging tools like online training and archived lecture content, we can create an e-learning environment where anyone can learn as many times as they wish, regardless of time or location.

For this reason, it is important to systematically archive regularly scheduled lectures and other events, while continually improving and updating the content to keep it relevant.

【Note】 Traditionally, learning has involved reading papers and practicing through trial and error. However, with the ease of uploading and watching videos, there is no reason not to take advantage of these materials to enhance the learning process.

3. NGS-Related Skills to Be Acquired

PHIs require personnel who can reliably and creatively carry out work related to infectious diseases, foodborne illnesses, and their causative pathogens. This includes testing, investigations, and research, as well as the collection, analysis, and dissemination of relevant information.

As part of these activities, pathogen genome analysis using next-generation sequencing (NGS) may be conducted to obtain evidence for active epidemiological investigations and other response efforts. The skills required for such analysis are wide-ranging, and the appropriate proficiency level should be determined by each PHI according to its role and organizational structure.

Examples of skills required for genome analysis include:

・The ability to appropriately select pathogen genome testing methods suited to the objectives of health crisis management.

・The ability to perform pathogen genome analysis in cases related to health crisis management.

・The ability to further develop the knowledge and skills described above and apply them creatively in practice.

・For additional competencies, please refer to “Key Points for Creating a Human Resource Development Manual for Microbiology at PHIs.”

5. Proficiency in Related Skills

Proficiency refers to the long-term learning process through which individuals acquire practical knowledge and skills through experience, progressing from novice to expert. As shown in the Table, proficiency can be categorized into the following stages:

・Procedural Proficiency (1–2 years of work experience)
・Routine Proficiency (3–5 years of work experience)
・Adaptive Proficiency (approximately 6–10 years of work experience)
・Creative Proficiency (approximately 11 years or more of work experience)

Ideally, local public health institutes aim to develop and retain as many staff members at higher levels of proficiency as possible. To achieve this, it is essential to objectively assess each staff member's progress and depth of proficiency and to promote skill development systematically at the organizational level.

【Note】 Ultimately, the goal is for all PHIs to have a strong pool of proficiency experts.

Table Proficiency Stages

1	**Procedural Proficiency** (1–2 years of work experience) Individuals with no work-related experience are classified as "novices," and their expertise has scarcely
2	**Routine Proficiency** (3–5 years of work experience) In the case of routine tasks, individuals become capable of performing them quickly and accurately.
3	**Adaptive Proficiency** (approximately 6–10 years of work experience) This stage refers to the ability to proceed with tasks by reasoning through analogy depending on the situation. Commonly described as the "intermediate" level, individuals at this stage can manage non-routine
4	**Creative Proficiency** (approximately 11 years or more of work experience) This stage is characterized by the ability to deliver a high level of performance both efficiently and accurately. Individuals who attain this stage are described as "experts," and they are capable of developing

Adapted from Human Resource Development Handbook, supervised by D. Masaki, Diamond Publishing, 2019.

6. Human Resource Development Centered on Block Bases

PHIs across Japan are organized into regional blocks composed of geographically neighboring laboratories. When considered at the block level, situations in which no personnel have expertise in NGS analysis are expected to be far less common than when PHIs are considered individually.

In addition, PHIs within the same block interact frequently in their daily operations and already maintain collaborative relationships, creating a favorable environment for on-the-job training. In particular, the lending or shared use of high-performance analytical computers required for NGS analysis can play an important role in the early stages of training.

By establishing a training base for each block (a “block base”) and regularly conducting comprehensive training centered on these bases, collaboration within each block can be strengthened. This approach is expected to enhance overall technical capacity and improve human resource development standards across PHIs (see Figure).

Furthermore, connections formed among staff who participate in or conduct the same training programs will foster “mutual assistance” and collaborative learning. This, in turn, will support the continuous accumulation of knowledge and skills and help build long-term collaborative relationships.

【Note】 The JAPHI network is divided into six blocks. Block-based human resource development, rather than a fully national approach, is particularly effective in promoting collaborative learning and mutual support.

7. Factors for Selecting a Block Base for Genome Analysis

The following factors should be considered when selecting a block base for genome analysis. Among these, the presence of staff who are willing to take initiative and serve as leaders at the block base is particularly important.

・Analytical Computing Capacity
Sufficient computer processing power to perform NGS analysis smoothly and efficiently.
・Reliable Internet Connectivity
A communication environment that supports the rapid transfer of large datasets, as well as online training and remote technical support (remote OJT).
・Personnel and Commitment
A stable group of staff members who are highly motivated and dedicated to genome analysis and human resource development.
・Capacity to Conduct Regular Training Programs
An established system for planning and delivering systematic, continuous training seminars for staff both within and outside the block.
・Accessibility from Local Public Health Institutes
A location that is easily reachable from local public health research institutes within the block, enabling efficient travel and facilitating face-to-face training.

8. Learning Cycle

Employees who complete the training programs described above can apply the knowledge and skills they have acquired in their daily work at their home institutions, reinforcing and consolidating their learning through practice and reflection. In addition to sharing their expertise through OJT within the institute, they can also serve as instructors at training sessions hosted by other PHI research institutes. Teaching others further deepens their understanding and accelerates the mastery and retention of what they have learned.

【Note】 When trained staff members take on the role of instructors in subsequent training programs, the consolidation of their knowledge and skills is significantly accelerated. In addition, initiating new training programs provides opportunities to identify and nurture new talent.

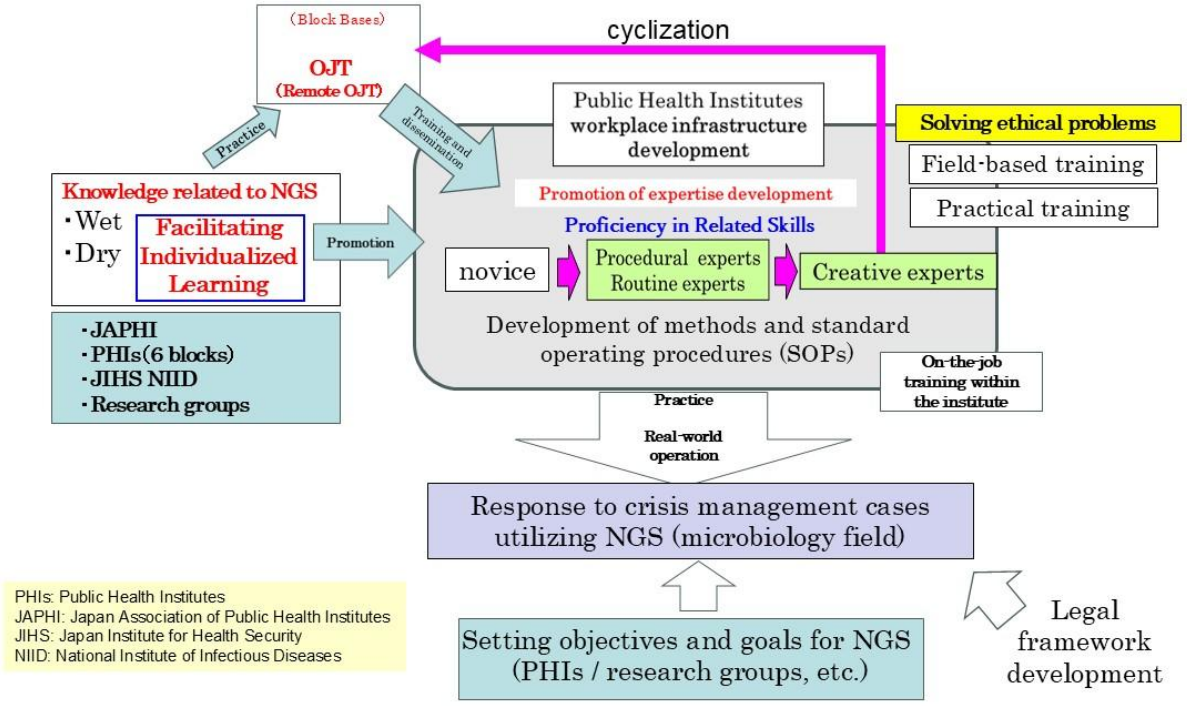


Figure Organizational framework for crisis management response using NGS in Public Health Institutes (microbiology field)

9. Practical Use of NGS

NGS analysis technology should not be limited to research applications; its use in routine administrative testing must also be considered. However, except in cases where national guidance is issued—such as during the COVID-19 pandemic—the decision to adopt NGS for administrative testing is left to individual local governments and public health institutes. As a result, the judgment and leadership of management personnel, including laboratory managers, play a critical role.

To support informed decision-making, it is important for PHIs nationwide to steadily accumulate examples of NGS applications in administrative testing and to share these experiences and outcomes across institutions.

【Note】The ultimate goal of training is the practical application of NGS in infectious disease crisis management, which is a core responsibility of PHIs. Achieving this goal requires management personnel, such as laboratory managers, to actively decide to implement the knowledge and skills acquired through training in real-world practice.

Conclusion

PHI personnel who played key roles in the response to COVID-19 are valuable assets and serve as technical pillars of regional health crisis management. In addition to maintaining and strengthening their emergency response capabilities, it is essential that they continue to acquire new knowledge and skills during non-emergency periods.

Effective human resource development requires making use of training opportunities offered by organizations such as the JIHS National Institute of Infectious Diseases and private companies, as well as establishing training systems based on mutual cooperation among PHIs at the regional and national levels. Within such systems, it is particularly important to develop and effectively utilize personnel who can reliably perform their duties at PHIs through a structured, cyclical, and planned approach to training.

This guideline brings together the collective knowledge of members currently involved in the PHIs' Microbiology Human Resource Development Team. We hope that it will serve as a useful reference for the development of human resources in pathogen genome analysis at PHIs.

References

1. Key Points for Developing a Human Resource Development Manual in the Field of Microbiology at Local Public Health Institutes. https://www.chieiken.gr.jp/koseirodo/guideline20230630.pdf
2. Sadamasu K.: Utilization and Challenges of Next-Generation Sequencing at Local Public Health Institutes. Annual Report of the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 75, 77–81, 2024.
3. Sadamasu K.: Stages of Human Resource Development from Next-Generation Sequencing Analysis to the Introduction of Testing at Local Public Health Institutes. Annual Report, 76, 2025.
4. Masaki, D. (Supervisor): Human Resource Development Handbook. Diamond, Inc., 2019.

FY 2025 Health, Labour and Welfare Policy Research Grants
(Comprehensive Research on Health Security and Crisis Management)

Research Group for Establishing Staffing Structures and Human Resource Development Methods for Genomic Testing at Local Public Health Institutes

Key Points for Human Resource Development in Pathogen Genome Analysis at Japan Public Health Institutes

Principal Investigator

Kenji Sadamasu
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

Co-Investigators

Tomotada Iwamoto, Ryohei Nomoto
Kobe Institute of Health
Hiroyuki Tsukagoshi
Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences
Mami Nagashima, Hiroaki Kubota
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

Collaborating Researchers

Junji Seto
Yamagata Prefectural Institute of Public Health
Takayuki Wada
Osaka Metropolitan University
Yuto Ehara
Saitama Institute of Public Health
Hiroyuki Asakura, Yuki Sadamasu
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
Yusuke Yodotani
Kawasaki City Institute for Health and Safety
Yoshihiro Yasui
Aichi Prefectural Institute of Public Health
Jun Kawase
Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science
Tsubasa Narita
Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment
Akie Sakagami
Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment
Kaburagi Yasuo
Saitama City Institute of Health and Science
Hiroaki Shigemura
Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences
Shintaro Hirai
Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

別紙３

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）
分担研究報告書

解析用パソコンの設置と研修に関する研究

研究協力者	瀬戸　順次	山形県衛生研究所	研究専門員
	和田　崇之	大阪公立大学大学院生活科学研究科	教授
	野本　竜平	神戸市健康科学研究所	副部長
	坂上亜希恵	宮城県保健環境センター	副主任研究員
	淀谷　雄亮	川崎市健康安全研究所	主任
	安井　善宏	愛知県衛生研究所	生物学部長
	川瀬　遵	島根県保健環境科学研究所	感染症疫学部長
	成田　翼	宮崎県衛生環境研究所	主任技師

研究要旨

全国の地方衛生研究所（地衛研）においてコマンドラインを用いたゲノムデータ解析を実施可能な人材を育成することを目的として、拠点の選定とパソコンの設置をおこない、現地研修会を開催した。

拠点は全国 6 か所に置き、配備した高性能なパソコンを用いて、研修会の事前準備にあたった。

研修会は、2025 年 1～12 月に 7 回開催した。全国 86 地衛研のうち 68 施設 171 人が研修会に参加した。研修内容は、基礎編、細菌編、ウイルス編に分け、初学者向けの構成とした。研修会は 2～3 日開催し、大半をパソコンでの実習に割いた。誰一人として取り残さないことを念頭に、質問しやすい雰囲気を作ることを意識した結果、総質問数は 7 会場で 500 回以上となった。参加者の 83%が 20～40 歳台と若く、各会場とも非常に活気のある中で研修会が開催された。研修の総合評価は、91%が最高評価の「非常に良かった」であった。

最終のアンケートでは、参加者のゲノムデータ解析に対する自信度（10 段階評価）の中央値が、研修前の 2 から研修後は 7 へと有意に増加した。研修参加前にコマンドラインを使っていなかったが研修後に使うようになった者が 3 割おり、研修の成果が認められた。今後も同様の研修の機会を望むかの設問では、全員が研修会の継続を希望していた。今後の研修内容としては、初級編の研修会の継続と、細菌・ウイルス特化型の中級編の新規研修という 2 種類が望まれていた。

研修会終了後には、全資料に作業動画を追加しつつ再編成したものを作成したことで、e ラーニングの機会を創出した。

本研究における全国地衛研を対象としたゲノムデータ解析現地研修会の満足度は非常に高く、次年度以降の研修の継続が要望されていた。今回の初級編に加え、今後、中級編・上級編の研修会を進めていくことで、全国地衛研でのゲノムデータ解析に長けた人材の育成が可能になる。

A. 研究目的

地方衛生研究所（以下、「地衛研」という。）に配備されている次世代シークエンサーから得られるゲノムデータは、主に高額な有償ソフトや JIHS 国立感染症研究所のプラットフォームにより解析されている。それらソフトは便利な反面、決められた解析しかできない、有償ソフトの利用更新が止まると解析できなくなる等の問題点がある。そこで、地衛研においてコマンドライン（パソコン上で文字を入力して解析の指示を出す方法）で操作する無償ソフトを用いたゲノムデータ解析が実施可能となることを目標とし、全国 6 地区の拠点にパソコンを配備のうえ、研修会を行うこととした。

B. 研究方法

1. 拠点の選定及びパソコンの設置

各地区における研修会のスムーズな開催及びその後の地区内の主導的立場になることを眼目とし、全国 6 地区に拠点を設置した。併せて、研修会の事前準備や解析の試行用いるためのパソコンを設置した。

2. 研修会の開催

山形県衛生研究所 瀬戸順次、大阪公立大学大学院生活科学研究科 和田崇之、神戸市健康科学研究所 野本竜平（以下、「講師」という。）の 3 人が研修会を開催した。研修会資料は、講師が作成した案を拠点の研究協力者（以下、「拠点担当者」という。）が試行し、改善したものを使用した。各研修会の最後に参加者からアンケート（以下、「研修会アンケート」という。）を取得した。

3. ソフトインストール環境の整備

研修会アンケートで要望の多かった解析手法について、講師がまとめたソフトインストール方法を拠点担当者がパソコンで試行し、改善しながら資料を整備した。

4. 最終アンケートの取得

研修の成果及び今後の研修に対する要望を把握することを目的として、2026 年 1 月に研修参加者を対象としたアンケート（以下、「最終アンケート」という。）を実施した。

5. 研修会アーカイブ資料の作成

全研修会終了後に、e ラーニングを可能とするためのアーカイブ資料を作成した。

（倫理面への配慮）

本研究では病原体ゲノムデータのみを用いており、患者情報は利用していない。

C. 研究結果

1. 拠点の選定及びパソコンの設置

拠点には以下の地衛研が選定された：

北海道・東北・新潟地区
　宮城県保健環境センター
関東・甲・信・静地区
　川崎市健康安全研究所
東海・北陸地区
　愛知県衛生研究所
近畿地区
　神戸市健康科学研究所
中国・四国地区
　島根県保健環境科学研究所
九州地区
　宮崎県衛生環境研究所

2025 年 8 月までに 6 拠点の他、山形県衛生研究所及び大阪公立大学大学院生活科学研究科にデスクトップパソコンが配備された。性能は、Windows 11 Pro 64 bit、メモリ 32～64 ギガバイト、CPU スレッド数 20 個、記憶媒体量 10 テラバイト、GPU（画像処理装置）搭載とした。

2. 研修会の開催

2025 年 1～12 月に全国 6 地区で 7 回の現地研修会を開催した（**表 1**）。関東・甲・信・静地区は対象となる地衛研が 29 か所と多かったため、2 回に分けた。近畿地区及び中国・四国地区は、交通アクセスを考慮して開催地を拠点から変更した。全国 86 施設の地衛研のうちの 68 施設 171 人が研修会に参加した。研修会には、事前配布したインストール資料（作業動画付き）を基にゲノムデータ解析を実施可能な環境を整備したパソコンを持参することを原則とした。また、基礎編資料（作業動画付き）を基に、基本的なコマンドライン操作は予習することを必須とした。

研修内容は、基礎編、細菌編、ウイルス編に分け、初学者向けの構成とした（**表 2**）。研修会は 2～3 日開催し、概ね 8 割をパソコンでの実習に割いた。講師は、専門用語を極力使わずに平易な表現で操作方法を説明するように努めた。また、エラーが起きた際に直ぐに対応できるように質問を促す声掛け

を徹底した。結果、講師が参加者から受けた質問は 7 会場で 500 回を優に超えた。

研修会アンケートは 171 人中 159 人（93%）から回答を得た。若い参加者が多く、20～40 歳台が 83%を占めた。研修の総合評価は、

「非常に良かった」145 人（91%）
「良かった」14 人（9%）
「どちらでもない」、「やや悪かった」、「非常に悪かった」各 0 人、であった。研修理解度は、

「とてもよく理解できた」47 人（30%）
「概ね理解できた」99 人（62%）
「どちらとも言えない」12 人（8%）
「あまり理解できなかった」1 人（1%）
「殆ど理解できなかった」0 人、であった。

研修全般の感想（自記式）では批判的・建設的意見を募るような聞き方とし、研修内容を随時改善していった。例えば、復習の機会が欲しいとの要望を受け、5 回目の九州地区以降では、研修会後に参加者に復習用課題を提供し、後日回答を配布した。

今後実践したい具体的な解析の設問（自記式）には 141 人が回答した。このうち 3 つ以上回答があった項目を図 1 に示す。最も要望が多かったのが不明病原体網羅解析であり、細菌ゲノム比較、薬剤耐性菌、結核菌と続いた。全般的には、細菌担当者は個別の病原体の解析に、ウイルス担当者は個別の病原体よりも網羅解析に興味を持っている傾向にあった。

3. ソフトインストール環境の整備

研修会アンケートで最も要望が多かった不明病原体網羅解析について、インターネット非接続状態で解析可能な無償ソフトである PATHDET のインストール資料を作成した。同時に、希望者に配布可能な網羅解析用シミュレーションデータを作成した。

4. 最終アンケートの取得

研修参加者 171 人に最終アンケートを依頼し、136 人（80%）から回答を得た。研修前後のゲノムデータ解析に対する自信度の中央値は、研修前の 2 から研修後には 7 へと有意に増加した（**図 2**；ウィルコクソンの符号順位検定 $p < 0.0001$）。個別の自信度の変化を見ると、自信度が変わらなかった者が 2 人、上昇した者が 134 人であり、上昇した自信度の中央値（四分位範囲）は 4（2–5）であった（**図 3**）。

研修後に自施設でコマンドラインの復習をしたものは 113 人（83%）に及んだ。さらに、研修参加前にコマンドラインを使っていなかった 107 人中 32 人（30%）が研修後にコマンドラインを検査や研究に使うようになっていた。実際、自由記載欄において「コマンドラインを全く使っていなかった状態から学会発表用のデータを作成できるようになった」という回答が含まれていた。また、今後も同様の研修の機会を望むかについて聞いたところ、136 人全員が研修会の継続を希望していた。

今後受講したい研修内容に関する設問（最大 3 項目まで選択可）の結果は、

細菌・ウイルスそれぞれの特化型研修	95
今回同様の基礎的な研修	75
中級編の研修	65
系統樹解析に関する研修	48
不明病原体網羅解析に関する研修	43
ロングリードのデータ解析研修	32
細菌ゲノムツール SNPcaster の研修	27
異動したため回答対象外	5
その他	1

となっていた。大別すると、初級編の研修会の継続と、細菌・ウイルス特化型の中級編の新規研修という 2 種類が望まれていた。

5. 研修会アーカイブ資料の作成

全 7 回の研修会を終えた後に、資料をインストール編・基礎編・細菌編・ウイルス編の 4 種類に再編成した。その際、細菌編、ウイルス編についても作業動画を追加した。総動画数は、64 本となった。これら e ラーニング教材及び不明病原体網羅解析ソフトのインストール資料は、2026 年 3 月に地方衛生研究所全国協議会ホームページに掲載された。

D. 考察

本研究では、全く白紙の状態から拠点の設置とパソコンの配備をおこない、全国での研修会を完遂した。全国地衛研の要望に応えながらの研修会の開催は難航を極めたが、参加者の 91%が最も高い満足度を得て

いた。その点を踏まえると、この度の初級編の現地研修会は成功したものと考えられた。

研修会成功の要因として、各地区で連携の土台があった点が考えられた。従前より、同一地区の地衛研職員は顔を合わせる機会が多く、地域内流行への対応等で連携体制を培ってきた経緯があった。そのこともあり、研修会開催決定後の拠点担当者と参加者の意思疎通はスムーズであった。そして何より、どの会場においても研修会の雰囲気が非常に和やかだったのは、顔の見える関係の研究者が集ったことによるものと感じられた。今回のゲノムデータ解析研修にとらわれず、全国地衛研における人材育成は、各地区において拠点を中心として進めていくことが有効と考えられた。

ゲノムデータ解析という特殊技術の研修会は、現地開催が望ましい。実際、参加者が行き詰った際に直ちに支援することで、研修から脱落する者を最小化することができた。研究班立ち上げ当初はウェブでの研修も検討されていたが、現地研修にしなければ、今回ほどの成果は得られなかったであろうことは容易に想像できる。

研修会アーカイブ資料の整備により、参加者に復習の機会を与えられるとともに、研修に参加できなかった者がゲノムデータ解析に触れる機会を作ることができると考えられる。研修会資料の e ラーニング化を進めていくことで、時間や場所に制約されることなく、誰もが何度でも自由に学習できる環境が整備される。さらに、本研究においては、資料に多数の動画を追加したため、e ラーニング受講者の理解度のさらなる向上が期待される。

研修会の開催により、講師も育成されることが実感された。具体的には、①講師 3 人で日々、解析技術の協議・共有をしたことで、解析の実力が向上した、②難解な解析技術を分かりやすく噛み砕いて説明する力が向上した、そして、③参加者の成長を間近で感じることが、以降の研修会運営の大いなるモチベーションとなることを知った。誰かに何かを理解してもらい喜びを感じることは人と人が接して初めて達成されると考えられる。研修会、特に対面型の研修会は、参加者だけでなく、講師も育成するものであると強く実感された。

初級編、中級編、上級編を組み合わせた研修会の継続により、参加者の人材育成のみならず、講師の人材育成も達成できると考えられる。最終アンケート結果では、参加者全員が研修の継続を望んでおり、中級の研修を求める声が最も多かった。ただし、この度の講師 3 人のみで今後の全ての研修会を運営することは事実上困難である。その点については、研修参加者の中から意欲のある者を募り、次回以降の講師となってもらうことで解決可能である（**図 4**）。各地衛研においてゲノムデータ解析技術を高めていくためには、学ぶ者以外に教える者も必要となってくる。現地研修の継続により参加者に加えて講師の人材も育成することは、将来的な各地区及び各地衛研の解析技術の向上に大きく寄与するものと期待される。

E. 結論

全国地衛研を対象としたゲノムデータ解析現地研修会の満足度は非常に高く、次年度以降の研修の継続が要望されていた。今回の初級編に加え、今後、中級編・上級編の研修会を進めていくことで、全国地衛研でのゲノムデータ解析に長けた人材の育成が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Seto J, Inoue S, Abe S, Terashita K, Endo Y, Fujii S, et al. A case of endogenous and collateral reactivation caused by two *Mycobacterium tuberculosis* subclones. J Infect Chemother. 2025;31:102795.

Komabayashi K, Chikaoka S, Awano H, Abe A, Sendo D, Furuyama M, et al. Parechovirus A3 infections, including myalgia, in Yamagata, Japan between 2022 and 2023 and their next-generation sequencing analyses. Jpn J Infect Dis. 2026;79:76-90.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 ゲノムデータ解析研修会概要

日時	日数	地区	場所	参加者数	開催地枠参加者数	研修補助者数	研修時間（時間）	インターネット環境
2025.1.30-31	2	近畿	大阪健康安全基盤研究所	15	25	6	12	有
2025.2.17-18	2	関東・甲・信・静	川崎市健康安全研究所	15	4	2	11.5	有
2025.2.20-21	2	東海・北陸	愛知県衛生研究所	14	9	3	10.5	なし
2025.5.26-27	2	関東・甲・信・静	川崎市健康安全研究所	17	2	2	11.5	有
2025.9.8-9	2	九州	宮崎県衛生環境研究所	15	7	1	12	有
2025.12.1-3	3	中国・四国	広島県立総合技術研究所保健環境センター	18	1	2	12.5	有
2025.12.15-16	2	北海道・東北・新潟	宮城県保健環境センター	16	13	0	12	有

表2 研修会の内容

分類		内容		コマンド/ソフト
基礎編		1.	場所の移動	cd, ls, pwd, mkdir
		2.	よく使う記号	*, >
		3.	実験室内作業の概要	zcat
	担当：瀬戸	4.	よく使うコマンド	mv, cp, cat
細菌編		1.	ショートリードの質評価	SeqKit
(腸管出血性大腸菌)		2.	トリミング	fastp
		3.	アセンブリ	SKESA
		4.	アセンブリ結果の評価	QUAST
		5.	病原因子検索	ABRicate
	担当：和田	6.	外部ツール紹介	CGE, DFAST (web)
ウイルス編		1.	細菌編1～4	
(アデノウイルス)		2.	一括処理方法	bash
		3.	ウイルス配列の検出	Blast (web)
		4.	アライメント（配列の整列）	MAFFT (web)
	担当：野本	5.	系統樹作成	iTOL (web)

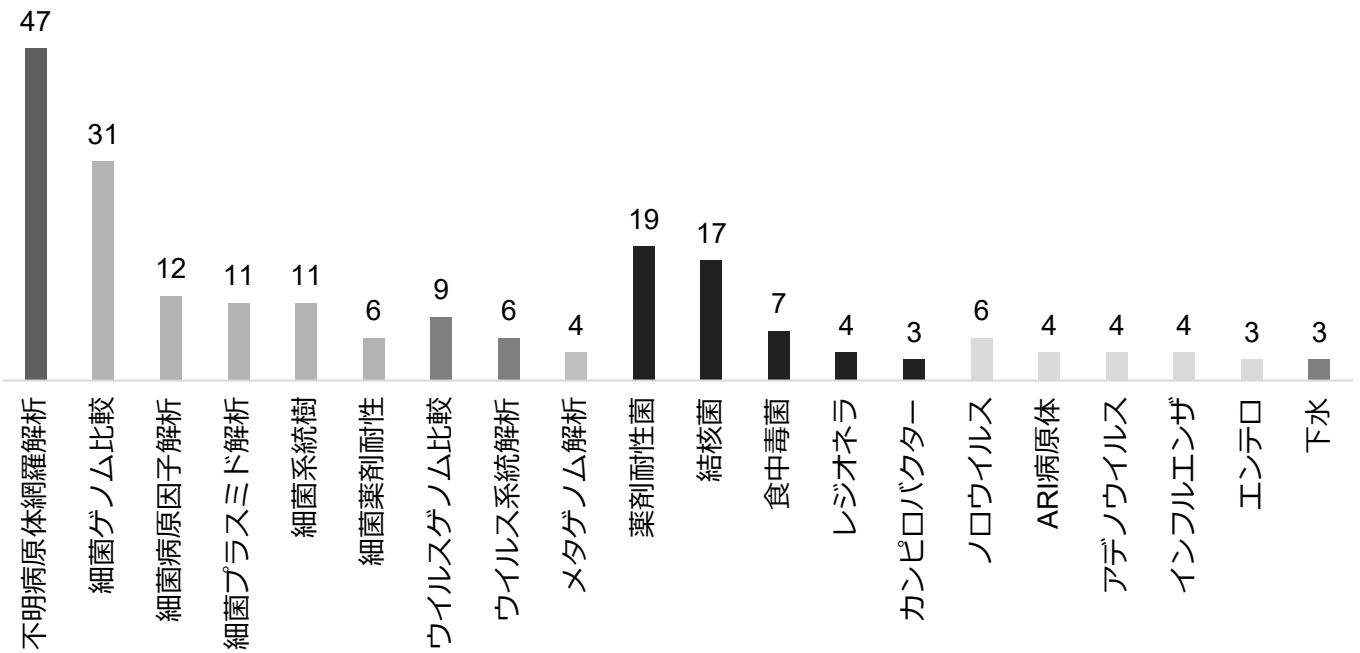


図1 今後実践したいゲノムデータ解析の内容・対象病原体

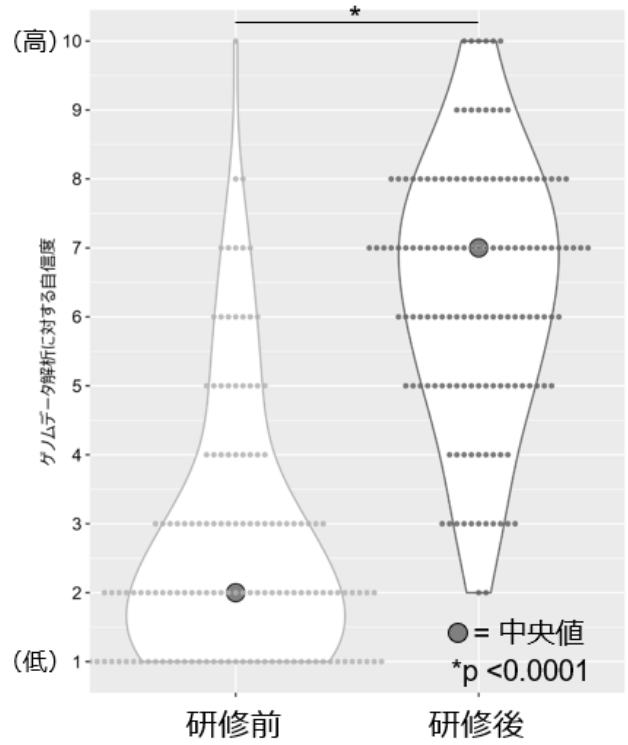


図2 研修前後の自信度の変化

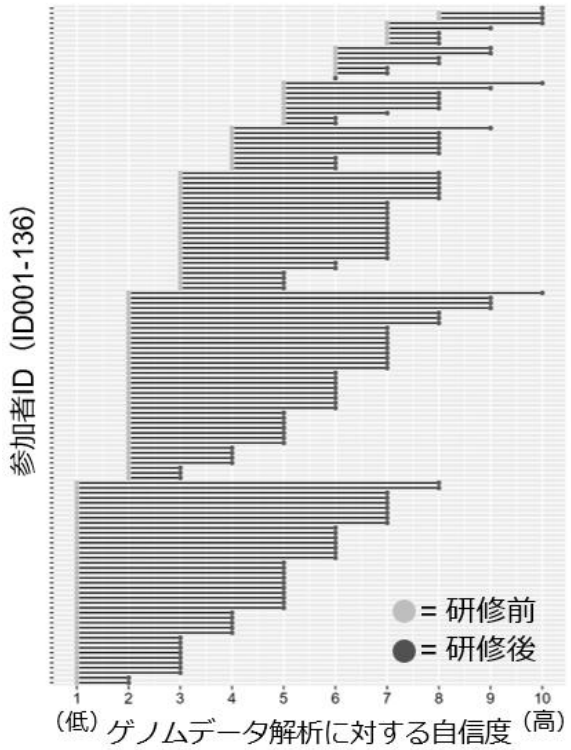


図3 研修前後の自信度の変化（個別回答）

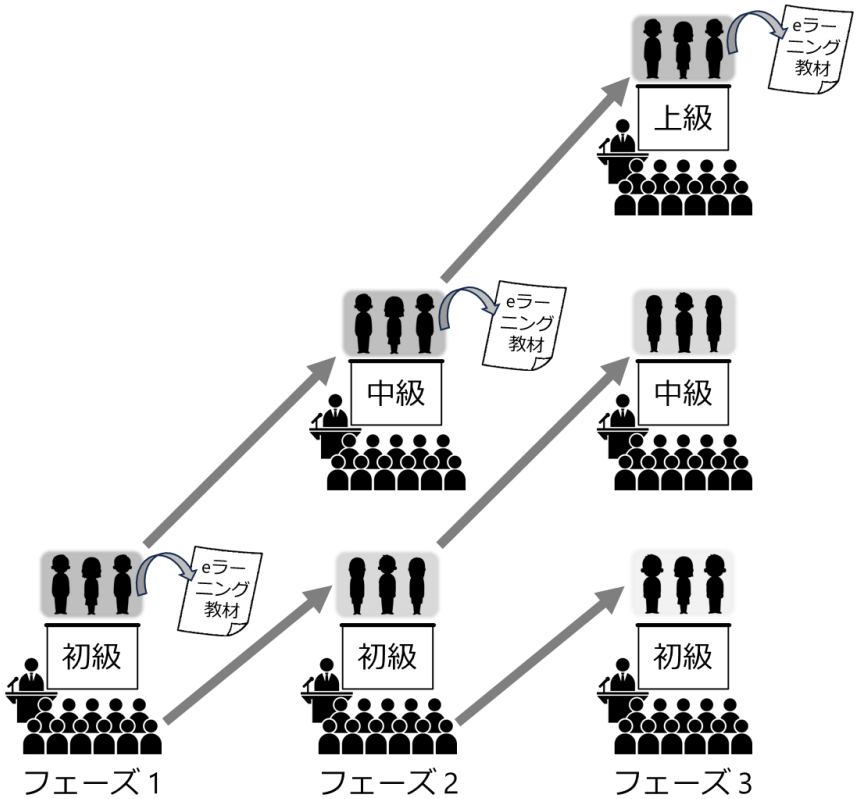


図4 ゲノムデータ解析に係る人材育成の成功循環モデル

フェーズ1 講師が初級編の研修会を企画・運営し、人材を育成する。研修後にeラーニング教材を作成する。

フェーズ2 講師は中級編の研修会を企画・運営し、eラーニング教材を作成する。初級編の講師はフェーズ1で教育を受けた人材の中から選出し、研修会の運営及びeラーニング教材の改善をおこなう。初級編の参加者はeラーニング教材で予習のうえ、研修に参加する。

フェーズ3 講師は上級編、フェーズ 2の初級編の講師は中級編の講師をそれぞれ担う。初級編はフェーズ 2で初級編を受講した者が講師を務める。各講師が各研修会の運営及びeラーニング教材の作成・改善をおこなう。各参加者は、それぞれの研修会のeラーニング教材で予習のうえ、研修に参加する。

以上により、全国の地方衛生研究所におけるゲノムデータ解析技術に長けた人材の育成が可能となる。併せて、講師の人材育成も可能となる。

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）
分担研究報告書（令和６-７年度）

原因不明疾患におけるゲノム解析法の構築

研究分担者　長島　真美　東京都健康安全研究センター
研究協力者　浅倉　弘幸　東京都健康安全研究センター
研究代表者　貞升　健志　東京都健康安全研究センター

研究要旨

原因不明疾患等における次世代シーケンサー（NGS）の利用は、近年、重要視されており、年々増加傾向にある。しかしながら、解析法についてはこれといった標準法はなく、地方衛生研究所（地衛研）独自での解析方法の確立が急務である。今回、不明疾患解析検体およびアンプリコン NGS 解析を行う解析ソフト PaHuM ならびに MTAAP の評価を行った。結果として、どちらの解析ソフトも機能的に市販ソフトと同等以上であることが示され、十分に地衛研の NGS 解析に役立つことが示された。また、臨床検体からの直接の NGS 解析は、個人のゲノムデータも一緒にデータ化してしまう懸念があり、倫理的な問題点の解決策を指摘される場合も想定される。そこで、全国の地方衛生研究所の担当者を対象に、原因不明疾患における NGS 利用について、9 月 2 日～9 月 24 日に計 11 問のアンケート調査を実施した（回答率 90.7%）。その結果、次世代シーケンサー（NGS）は、85.9%の地衛研が所有し、不明疾患での NGS 使用は「研究として必要」が 62.7%と最も多く、「通常検査のオプション」が 46.3%、「検査法として必要」は 29.9%であった。倫理的な問題については、「各所で倫理委員会を通しておくべき」が、52.2%と最も多かった。また、以上の結果を含めて、地衛研の職員を対象とした Web 研修会を実施した。

A. 研究目的

原因不明疾患における、次世代シーケンサー（NGS）の利用および解析は、従来より重要視されてきた。特に、茨城県衛生研究所が関与し、報告がなされたオズウイルス感染症の究明では、国立感染症研究所（感染研）の解析システムが使用された経緯がある。一方で、感染研の解析システムは、現在、地方衛生研究所（地衛研）の使用が不可能であり、地衛研独自での不明疾患検査体制の確立（解析方法の確立）が急務であった。

また、多数のプライマーを使用し、PCR を行った後に NGS 解析を行うアンプリコンベースの NGS 解析では、NGS 解析の感度・特異性向上で重要な要素であるが、最終的に使用したプライマーの除去が必須である。この手法は、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）解析で、全国で実施されてきた。この解析では、感染研の Web サイト: PathoGenS が利用されているが、SARS-CoV-2 以外の病原体解析には利用できない。

さらに、臨床検体からの直接の NGS 解析法は、個人のゲノムデータも一緒にデータ化してしまう懸念もあり、倫理的な問題点の解決策を指摘される場合も想定される。そこで、全国の地方衛生研究所の担当者を対象に、原因不明疾患の原因究明を目的とした次世代シーケンサー（NGS）の利用に関して、9 月 2 日～9 月 24 日に計 11 問のアンケート調査を実施した。

本分担研究では、原因不明疾患における網羅的解析やアンプリコン NGS 解析に適した解析ソフトの構築・導入、地衛研における原因不明疾患における NGS 解析に関しての意識調査および地衛研への研修を目的とした。

B. 研究方法

1.不明疾患解析検体の解析

東京都健康安全研究センターウイルス研究科に搬入され、ノロウイルスが検出された糞便検体 2 検体から抽出した RNA を供試し、NGS データをウイルス解析用パイプライン（PaHuM）（関塚産業有限会社）で解析を行い、検出したウイルスゲノムのリード数で解析ソフトの有用性を検討した。さらに、インフルエンザウイルスウイルスが検出された臨床検体より rRNA の除去の有無による解析データを検討した。

2.アンプリコン NGS 解析

東京都健康安全研究センターウイルス研究科に搬入された SARS-CoV-2 検体で、PCR 増幅後の産物を解析ソフト MTAAP（関塚産業有限会社）と従来法でのプライマー部分の除去、コンセンサス配列の取得を比較検討した。

3. アンケート調査

地方衛生研究所全国協議会のメールを用い、原因不明疾患の原因究明を目的とした次世代シーケンサー（NGS）の利用に関して、2025 年 9 月 2 日～9 月 24 日に計 11 問のアンケート調査を実施した。

4.Web 研修会

本研究班で検討した内容を地衛研セミナーとして、Web 研修を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究班で実施する事項については、東京都健康安全研究センター倫理委員会で承認されている（6 健研健第 906 号）。

C. 研究結果

1　不明疾患解析ソフトの使用

ウイルス解析用パイプライン（PaHuM）は（図 1）、臨床検体を用いた NGS 解析データ（メタゲノム）中に含まれるホスト（ヒト）ゲノムの除去、およびウイルスデーターベースを用いたウイルスリードの検索を行うソフトである。ノロウイルスが Ct 値 30 前後で検出された糞便検体 2 検体の解析で、それぞれ Contig の長さは異なるが、2 検体からノロウイルス GI が検出された（図 2）。

また、rRNA の除去効果を見る目的で、検討したところ、rRNA 除去した方が、各セグメントのリード長、カバレッジともに高い結果が得られた（図 3）。

2　アンプリコン NGS 解析

解析ソフト MTAAP は、アンプリコン内のプライマー配列を除去するのみではなく、コンセンサス配列の取得や、変異解析まで可能である（図 4）。

今回、SARS-CoV-2 の解析を本ソフトで実施したところ、従来、Ubuntu（プライマー除去）＋CLC Genomics Workbench（変異解析）の解析では 40 分程度かかっていたものが、MTAAP では 5 分程度であった（図 5）。また、MTAAP と CLC Genomics Workbench の解析結果はほぼ一致した。一部では、CLC で変異なしとされた部分が、MTAAP では Mix 塩基と判定されるなど、有用性が示された（図 6）。

3. アンケート調査

アンケート回答率は、90.7%であった。下記にそれぞれの問に関する結果を示す。

1）次世代シーケンサーの保有率

67 地衛研（85.9%）が次世代シーケンサーを保有と回答した（図 7）。

2）NGS 解析の対象（病原体）

2025 年度に実施している NGS 解析の対象病原体に関する問いでは、次世代シーケンサーを有する地衛研の 97%は新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の解析を行っていた（図 8）。

また、SARS-CoV-2 以外では、インフルエンザウイルス（10 施設）、ノロウイルス（8 施設）、CRE 等のプラスミド解析（13 施設）、結核菌（26 施設）、腸管出血性大腸菌（9 施設）、原因不明疾患（10 施設）、分離ウイルス（13 施設）であった（図 8）。

3）原因不明疾患における NGS 利用

原因不明疾患等の臨床検体を用いた次世代シーケンサー（ＮＧＳ）の検査利用に

ついて、現時点での必要性を聞いたところ、「研究として必要」が 62.7%と最も多く、「通常検査のオプション」が 46.3%、「検査法として必要」は 29.9%であった（図 9）。

4) 原因不明疾患（臨床検体）における NGS 解析の利用における倫理的な問題

原因不明疾患（臨床検体）における NGS 解析の利用における倫理的な問題を問うたところ、「各所で倫理委員会を通しておくべき」は、52.2%と最も多く（図 10）、「ヒトゲノムを削除した上で解析すれば良い」は 17.9％、「倫理的な問題は生じない」は 10.4%、「本庁とも調整、倫理上の心配なし」は 6.0%であった。

5）原因不明疾患（臨床検体）においての NGS 解析を実施の有無等

「過去に原因不明疾患（臨床検体）において、NGS 解析を実施したことがあるか？」の問いでは、14 か所（20.9%）があると回答した（図 11）。さらに、原因不明疾患（臨床検体）の NGS 解析において、使用した解析ソフトについて聞いたところ、国立感染症研究所（感染研）の Mepic/VirusTap が 9 か所であったのに対し、CLC Genomics Workbench と PaHum が 7 か所であり（図 12）、Mepic/VirusTap の代替も着実に進んでいることが明らかとなった。

原因不明疾患（臨床検体）の NGS 解析での倫理委員会での許可の有無について聞いたところ、11 か所は倫理委員会での許可を得ていた（図 13）。さらに、倫理委員会で必要とされた主な要件としては、「個人の同意」が 5 か所、「匿名化」は 6 か所であった（図 14）。

6）原因不明疾患（臨床検体）の NGS 解析を実施する上で必要と考えられるもの

継続的に原因不明疾患（臨床検体）の NGS 解析を実施する上で、必要と考えられるものとしては、消耗品予算、NGS 本体の更新、NGS 本体の点検費、解析ソフト・サーバー、人的資源、研修すべてで、多くの地衛研が必要と答えた（図 15）。

7）通知やマニュアルへの記載

原因不明疾患（臨床検体）における NGS の利用について、厚労省等からの通知や感染研の病原体検出マニュアルへの記載について聞いたところ、「厚生省の通知が是非必要」は 83.6%、「病原体検出マニュアルへの記載が必要」は 76.1%であった（図 16）。

最後に、原因不明疾患（臨床検体）における NGS 解析の利用についての統一的な検査マニュアルの必要性について聞いたところ、92.5%が「必要」と回答した（図 17）。

4.Web 研修会

2025～2026 年に原因不明疾患における NGS 利用等に関する Web 研修会を 3 回実施した。詳細は下記の通りである。

1）地衛研 Web セミナー第 4 回「Mini」

テーマ：不明疾患における NGS 解析法について考えてみる

https://www.youtube.com/watch?v=GSEGa7CWF_U

① 江原勇登（埼玉県衛生研究所）

「不明疾患における NGS 使用と解析について」

② 浅倉弘幸（東京都健康安全研究センター）

「糞便材料を使用した NGS 解析により判明したアストロウイルス」

③ 黒木絢士朗（東京都健康安全研究センター）

「海外のサイトを利用した NGS 解析（原因不明疾患）の比較と問題点」

④ 木村博一（群馬パース大学大学院保健科学研究科）

「メタゲノム解析・ウイルスゲノム解析用バイオインフォマティクスパイプラインプログラムの使用経験」

⑤ 関塚剛史（関塚産業有限会社）

「メタゲノム解析・ウイルスゲノム解析用バイオインフォマティクスパイプラインプログラム PaHuM のライセンス・仕様等について」

2）地衛研 Web セミナー第 5 回「Mini」

テーマ：不明疾患における NGS 解析ソフト PaHuM と PCR 増幅後の NGS 解析用ソフト MTAAP のご紹介

https://www.youtube.com/watch?v=gv8-hAcNpgk

①関塚剛史（関塚産業有限会社）

「メタゲノム解析・ウイルスゲノム解析用パイプライン PaHuM の使用方法の説明について」

②江原勇登（埼玉県衛生研究所）

「マルチプレックスタイリング PCR 増幅断片解析用　バイオインフォマティクスパイプラインプログラム MTAAP の使用経験（その１）
③浅倉弘幸（東京都健康安全研究センター）
「MTAAP の使用経験（その２）」
④関塚剛史（関塚産業有限会社）
「MTAAP の仕様等について」
3）地衛研 Web セミナー第 8 回「Mini」
「原因不明疾患における NGS のアプローチ」を行った。
https://www.youtube.com/watch?v=RH8mWs1CEuc&feature=youtu.be
①「NGS データを用いた解析をはじめる“とっかかり”」
福岡県保健環境研究所 重村 洋明
②「不明疾患における NGS 利用のアンケート調査結果について」
東京都健康安全研究センター 長島 真美
③「原因不明疾患における NGS 解析法について」
東京都健康安全研究センター 浅倉 弘幸
④「不明疾患における NGS 利用の特徴と注意点について」
埼玉県衛生研究所 江原 勇登
⑤「原因不明疾患に対応するゲノムサーベイランスに関する海外の動向と今後の課題」
JIHS 国立感染症研究所 堀場 千尋

D. 考察

今回、不明疾患解析検体およびアンプリコン NGS 解析を行う解析ソフト PaHuM ならびに MTAAP の評価を行った。不明疾患解析での NGS 利用は、オズウイルス感染症の報告から、地衛研の業務としての期待が大きい。一方で、解析を担ってきた感染研の Web 解析ソフトが使用できない現状あった。また、海外でも同様の Web 解析サイトはあり、同様の結果は得られるものの、ヒトゲノムを含む可能性もあり、躊躇する地衛研も多い。今回、新たに導入可能なソフトの有用性を示すことができ、今後の地衛研における使用拡大が期待される。特に、MTAAP については、解析ソフトの開発をこちらから持ち込み、共同開発を行った。

結果として、どちらの解析ソフトも機能的に市販ソフト以上であることが示された。

一般に、NGS 解析ソフトの値段は著しく高価であり、ライセンス更新が必要になる。今回、検討した解析ソフトは比較的安価であり、十分に地衛研の NGS 解析に使用可能であることが示された。

原因不明疾患解析での NGS 利用は、オズウイルス感染症の発見報告から、地衛研の業務としての期待が日々大きくなっている。一方で、臨床検体には個人のゲノム情報を含むことから、倫理的な問題を解決すべき議題とし、研究を実施した。昨年度は、NGS 解析系の構築を行い、今回は、原因不明疾患における倫理に着目し、アンケート調査を実施した。

今回のアンケート調査の結果から、倫理に関する点については、各地衛研で様々な見解があることが判明したが、倫理審査に関しては、「各所で倫理委員会を通しておくべき」52.2%であった。しかしながら、原因不明疾患における NGS の利用は、積極的疫学調査等の緊急の場合が多く、必ずしも倫理審査が間に合わない場合も想定され、現在のところ、包括的な視点で考えていくしか道がないと思われる。
真にこれを解決するためには、疾患ごとの厚労省等からの通知や JIHS 感染研の病原体検出マニュアルへの記載が必要と思われた。

E. 結論

不明疾患解析検体およびアンプリコン NGS 解析を行う解析ソフト PaHuM ならびに MTAAP は、地衛研における NGS 解析用ソフトとして、安価かつ高機能であり、利用可能である。

全国の地方衛生研究所の担当者を対象に、原因不明疾患における NGS 利用について、9 月 2 日～9 月 24 日に計 11 問のアンケート調査を実施した。その結果、回答率は 90.7%であった。次世代シーケンサー（NGS）は、85.9%の地衛研が所有し、不明疾患での NGS 使用は「研究として必要」が 62.7%と最も多く、「通常検査のオプション」が 46.3%、「検査法として必要」は 29.9%であった。倫理的な問題については、「各所で倫理委員会を通しておくべき」が、52.2%と最も多かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

１．論文発表

1) Kawashima A, Tsuchiya K, Kuroki K, Nagashima M, Koizumi Y, Nakamoto T, Mizushima D, Aoki T, Sadamasu K, Teruya K, Yoshimura K, Gatanaga H. : Prolonged severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection and intrahost viral evolution in a severely immunocompromised patient with human immunodeficiency virus infection: A whole-genome sequencing study., Int J Infect Dis. 2026 Apr;165:108453. doi: 10.1016/j.ijid.2026.108453.

2) Uriu K, Okumura K, Uwamino Y, Chen L, Tolentino JE, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Ito J, Sato K; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium.: Virological characteristics of the SARS-CoV-2 NB.1.8.1 variant., Lancet Infect Dis. 2025 Aug;25(8):e443. doi: 10.1016/S1473-3099(25)00356-1.

3) Kaku Y, Okumura K, Kawakubo S, Uriu K, Chen L, Kosugi Y, Uwamino Y, Begum MM, Leong S, Ikeda T, Sadamasu K, Asakura H, Nagashima M, Yoshimura K; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Ito J, Sato K.: Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XEC variant., Lancet Infect Dis. 2024 Dec;24(12):e736. doi: 10.1016/S1473-3099(24)00731-X. Epub 2024 Nov 6.

4) Kumagai R, Kawakami M, Kasuya F, Yamada K, Takahashi A, Murayama K, Morita K, Kaneyasu T, Tamai N, Hasegawa M, Harada S, Amano A, Fujiwara T, Miyake H, Nagashima M, Sadamasu K.: Sewage surveillance of SARS-CoV-2 in Tokyo (May 2020-June 2022): method using high-throughput, fully-automated platform., Virusdisease. 2024 Sep;35(3):520-524. doi: 10.1007/s13337-024-00880-z. Epub 2024 Jul 2.

5) 黒木 絢士郎：ノロウイルス遺伝子型別における RNA-Seq NGS 解析サイトの活用、東京都微生物検査情報、45, 6-8, 2024

２．学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

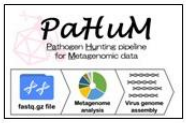
なし

２．実用新案登録

なし

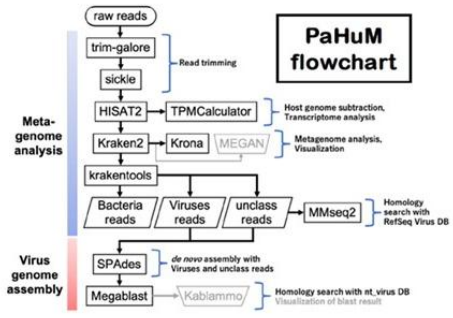
３．その他

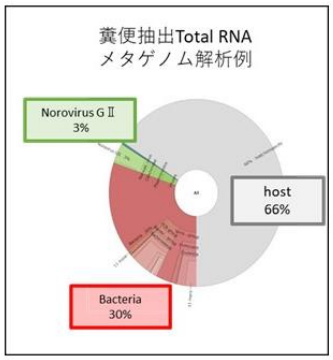
なし



メタゲノム解析・ウイルスゲノム解析用パイプライン

- メタゲノム中に含まれるホスト（ヒト）ゲノム除去
- ウイルスデーターベースを用いたウイルスリードの検索





Kraken2 detected virus name	MMseqs2 detected virus name with Kraken2 unclass reads	Num. virus sequence
Norwalk virus (295); Primate norovirus (7)	Norwalk virus (400)	4

Contig length	Coverage read depth	Subject sequence id	Hit seq title
6727	11.0	MK956174.1	Norovirus GI isolate G19-002 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; VP1 (ORF2) gene, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds

図１．ウイルス解析用パイプライン（PaHuM）について

ライブラリ調製試薬：　SEQuoia Express Stranded RNA Library Prep Kit
rRNA除去（ヒト）：　SEQuoia RiboDepletion Kit
次世代シークエンサー：iseq 150bp×2 PE
解析：PaHuM

Sample：1
Virus：Norovirus GI
RNA：糞便乳剤
Ct：30.0

Kraken2 detected virus name	MMseqs2 detected virus name with Kraken2 unclass reads	Num. virus sequence
Norwalk virus (295); Primate norovirus (7)	Norwalk virus (400)	4

Contig length	Coverage read depth	Subject sequence id	Hit seq title
6727	11.0	MK956174.1	Norovirus GI isolate G19-002 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; VP1 (ORF2) gene, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds
550	3.8	MK956175.1	Norovirus GI isolate G19-003 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; VP1 (ORF2) gene, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds
434	1.8	MH638229.1	Norovirus GI isolate BA81265 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) and VP2 (ORF3) genes, complete cds
257	0.8	PQ894187.1	Norovirus GII isolate IC_285 nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds

Sample：2
Virus：Norovirus GI
RNA：糞便乳剤
Ct：29.8

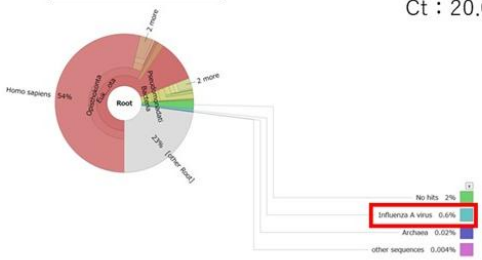
Kraken2 detected virus name	MMseqs2 detected virus name with Kraken2 unclass reads	Num. virus sequence
Norwalk virus (60); Primate norovirus (44); Shallot latent virus (1); Tobacco mild green mosaic virus (1)	Norwalk virus (110); Primate norovirus (51); Shallot latent virus (2)	10

Contig length	Coverage read depth	Subject sequence id	Hit seq title
826	7.0	PQ683217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
1906	6.3	MN922742.1	Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW108/2019/TWN nonstructural polyprotein, RdRp region, (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds
372	5.2	PQ683217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
710	4.2	PQ683217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
1498	3.9	PQ683217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
842	3.3	PQ683217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
915	3.0	PQ683217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
291	0.8	MK956174.1	Norovirus GI isolate G19-002 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; VP1 (ORF2) gene, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds

図2．PaHuMを用いたノロウイルス解析例

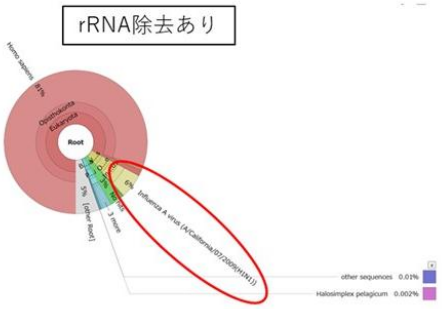
Influenza A virus
咽頭ぬぐい液
Ct：20.0

rRNA除去なし



	Contig length	Coverage read depth
segment 1	397	2.8
segment 2	290	5.0
segment 3	964	3.0
segment 4	892	4.7
segment 5	363	6.6
segment 6	355	3.7
segment 7	657	4.1
segment 8	266	1.3
Total contig length	4,184	

rRNA除去あり

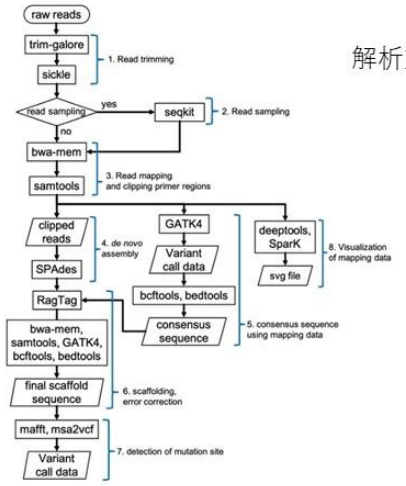


	Contig length	Coverage read depth
segment 1	2400	15.8
segment 2	2380	21.9
segment 3	2319	15.3
segment 4	1865	23.4
segment 5	1618	18.2
segment 6	1527	20.8
segment 7	1070	22.9
segment 8	1002	17.0
Total contig length	14,181	

図3．rRNA除去の有無によるインフルエンザウイルス解析例

MTAAP
Multiplex Tiling Amplicon-seq Analysis Pipeline

マルチプレックスPCR 増幅断片解析用パイプライン



解析対象ウイルスゲノムをマルチプレックスPCRで増幅

↓

増幅産物のプライマー部分を除去し、
コンセンサス配列を取得

↓

変異解析

ウイルス特異的な変異の検出
- 大きな欠損
- 混合感染
- ミックスアレル

図4．ウイルス解析用パイプライン（MTAAP）について

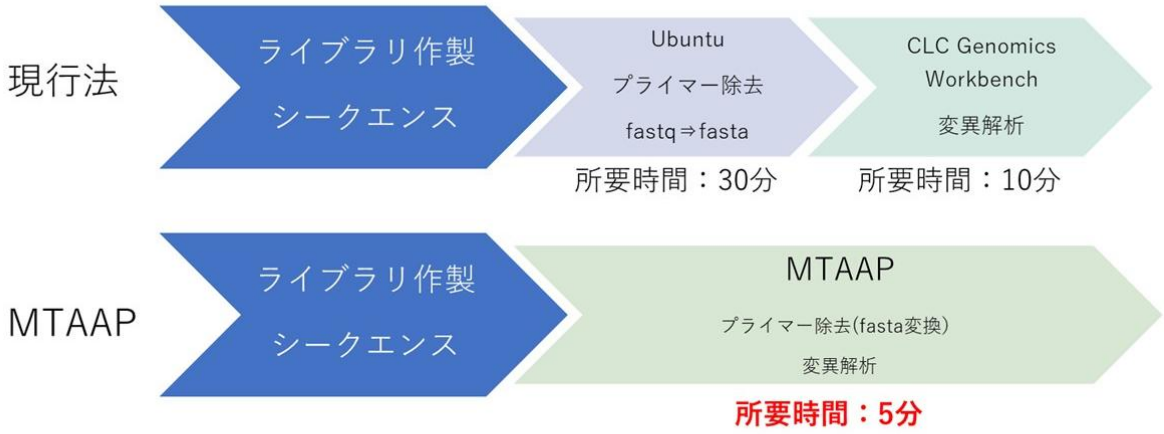


図5.MTAAPを使った新型コロナウイルス解析①

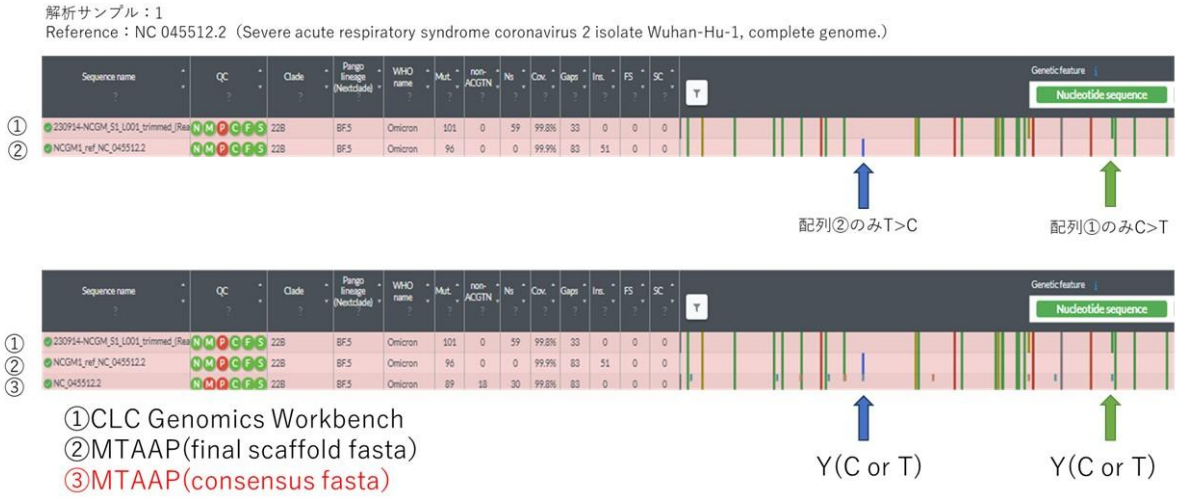


図6.　MTAAPを使った新型コロナウイルス解析②

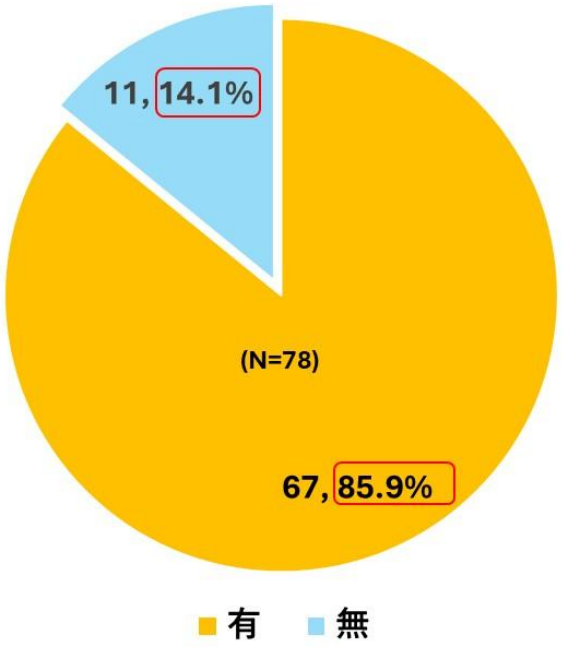


図7　次世代シーケンサーの保有状況

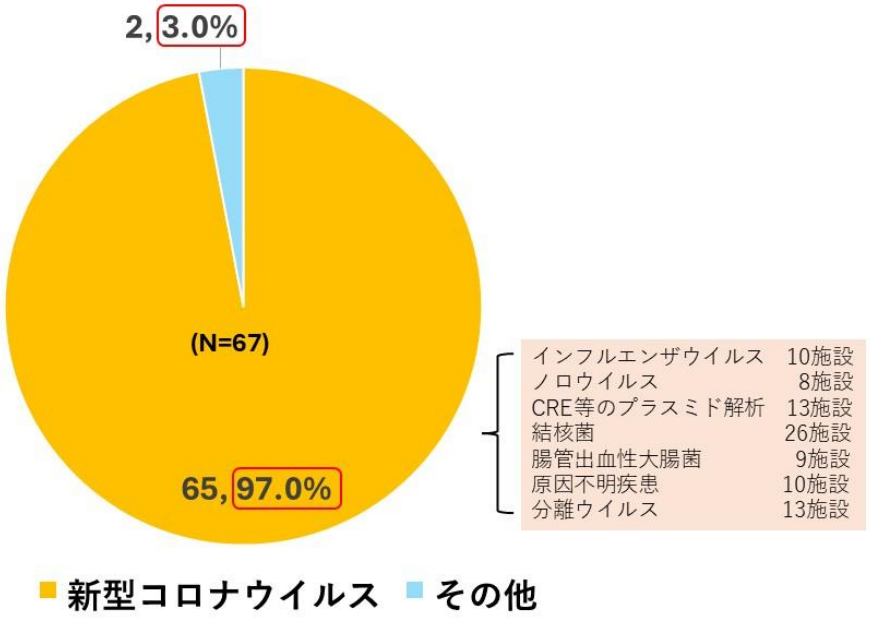


図8　2025年度に実施しているNGS解析の対象（病原体）（予定も含む。複数回答可）。

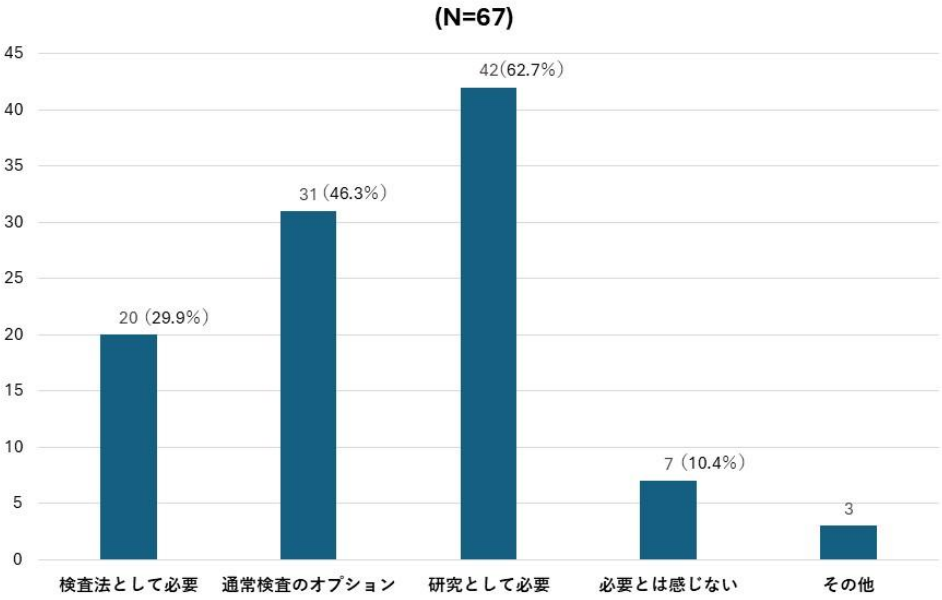


図9　原因不明疾患等の臨床検体を用いた次世代シーケンサー（ＮＧＳ）の検査利用について、貴所としての現時点での必要性を教えてください。（複数回答可）

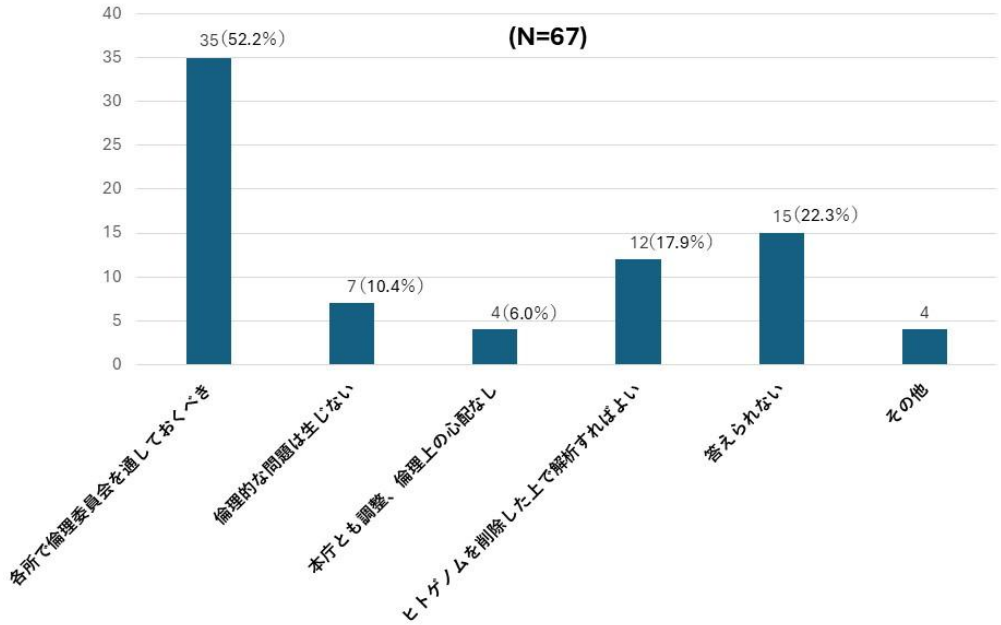


図10　原因不明疾患（臨床検体）におけるNGS解析の利用における倫理的な問題

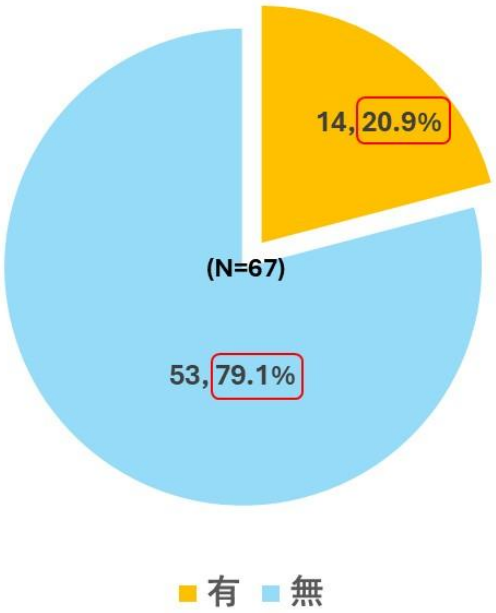


図11　過去に原因不明疾患（臨床検体）において、NGS解析を実施したことがあるか？

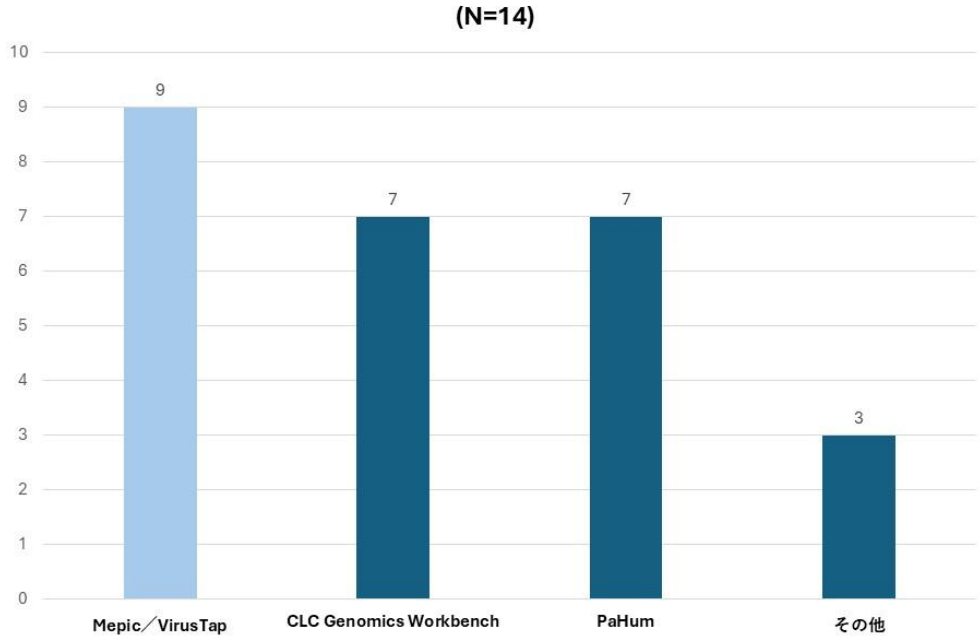


図12　原因不明疾患（臨床検体）のNGS解析において、使用した解析ソフト（または解析プラットフォーム）（複数回答可）

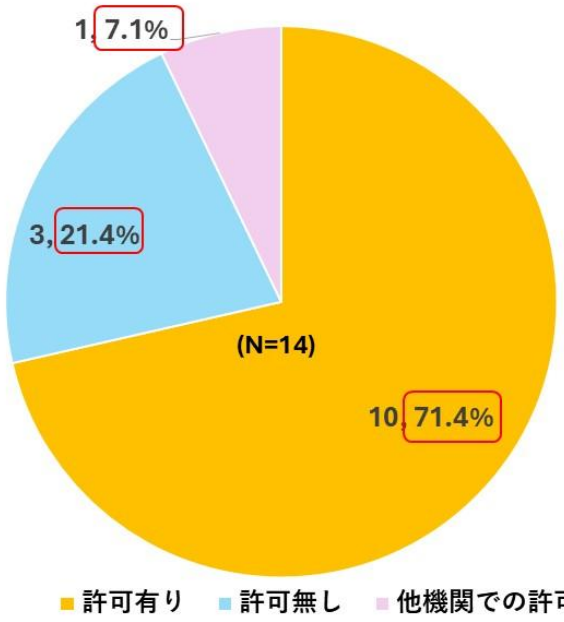


図13　貴所において、原因不明疾患（臨床検体）のNGS解析で、倫理委員会での許可の有無について教えてください。

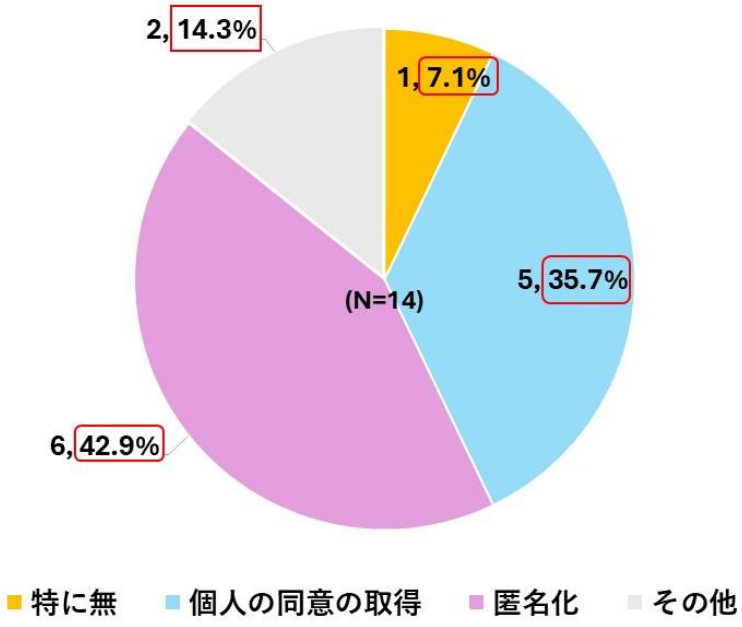


図14　倫理委員会で必要とされた主な要件（複数回答可）

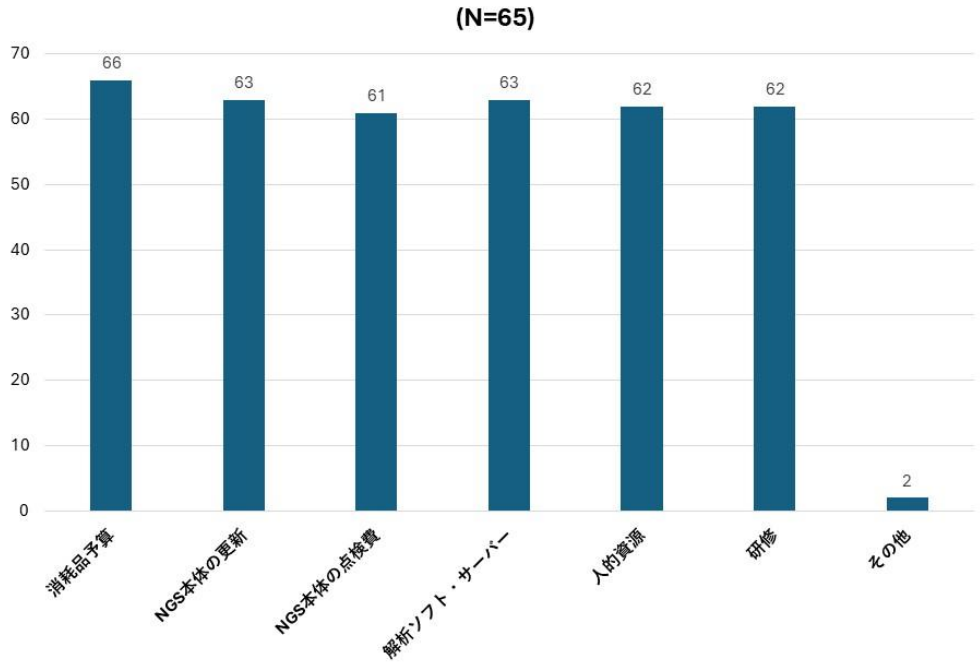


図15　継続的に原因不明疾患（臨床検体）のNGS解析を実施する上で、必要と考えられるもの（複数回答可）

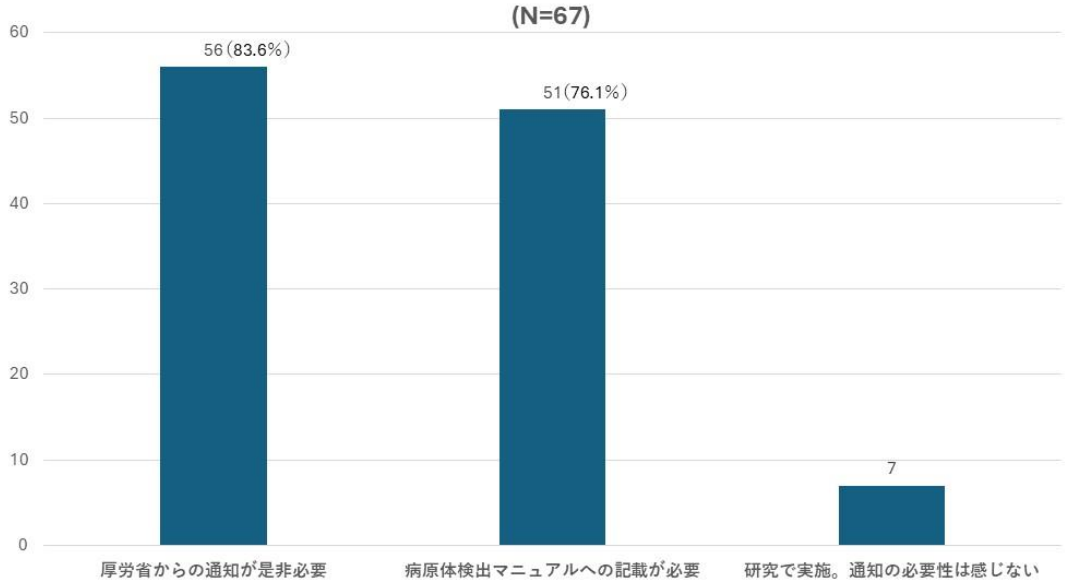


図16　原因不明疾患（臨床検体）におけるNGSの利用について、厚労省等からの通知や病原体検出マニュアルへの記載（複数回答可）

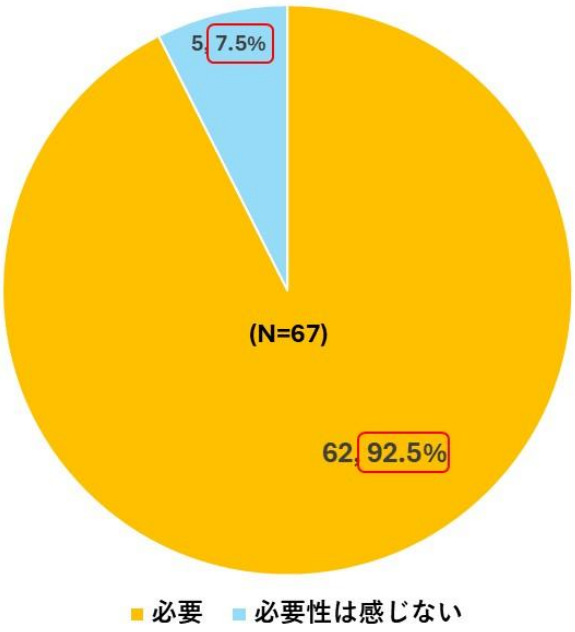


図17　原因不明疾患（臨床検体）におけるNGS解析の利用について、統一的な検査マニュアルの必要性について

別紙３

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）
分担研究報告書

原因不明疾患におけるゲノム解析法の構築に関する研究

研究協力者　江原　勇登　埼玉県衛生研究所　ウイルス担当

研究要旨
網羅的ゲノム解析ツールである MePIC、PaHuM、CZ ID を比較し、PaHuM および CZ ID が MePIC の後継解析ツールとなり得るか検討した。MePIC により病原ウイルスゲノムが検出された 3 検体の NGS データを用いて、PaHuM および CZ ID による追加解析を実施し、各解析ツールで検出されたウイルスゲノムのリード数を比較した。その結果、3 検体中 2 検体では、3 つの解析ツールすべてで同等のリード数が得られた。残りの 1 検体ではリード数に若干の差異がみられたものの、いずれのツールでも目的とする病原ウイルスを検出できた。さらに、JIHS 国立感染症研究所が新たに開発した PATHDET と、PaHuM および CZ ID を、C 型インフルエンザウイルスをスパイク添加した検体を用いて比較したところ、リード数には多少の違いがあったものの、いずれのツールも目的とする病原ウイルスを検出した。以上より、これらの解析ツールはいずれもメタゲノム解析ツールとして高い相互信頼性を有すると考えられた。

A. 研究目的

次世代シーケンサー(以下NGSという。)を用いた原因不明疾患における網羅的解析は、健康危機管理を担う公的検査機関として非常に重要である。これまで国立感染症研究所ゲノム解析研究センターが開発した網羅的ゲノム解析ツールであるMePICにより解析を実施していたが、その解析システムは2023年に廃止になったことから、後継となる解析ソフトウェアが必要となっていた。そこで、MePICの開発者が独立後に新規に開発した PaHuMと、国立感染症研究所や地方衛生研究所で解析実績のある海外の解析プラットフォームの１つであるCZ ID、さらにJIHS国立感染症研究所で新たに開発したPATHDET と解析結果を比較し、比較検討した。

B. 研究方法

研究１　不明ウイルス感染症等 3 検体における解析ツール(MePIC, PaHuM, CZ ID)の比較

2023 年に、埼玉県の感染症重大事案対策事業として当所に搬入された 15 歳以下の急性脳炎・脳症、無菌性髄膜炎及び不明ウイルス感染症等 6 症例 23 検体のうち、NGS データを MePIC により解析し、病原ウイルスゲノムを検出した 3 検体（検体1～3）の NGS データを用いた。3 検体の NGS データを、PaHuM 及び CZ ID で追加の解析を行い、検出したウイルスゲノムのリード数をそれぞれの解析ツール間で比較した。

なお、NGS 検査におけるライブラリーキットは、SMARTer Stranded RNA-Seq Kit HT(タカラバイオ)を使用し,AMPureXP（BeckmanCoulter）で精製後，MiSeq Reagent Kit v3 150bp（Illumina）でシングルエンドシーケンスを行った。なお、PATHDET は現在ペアエ

ンドシーケンスのみ対応のため、解析していない。

研究２　C 型インフルエンザをスパイク添加した検体における解析ツール(PATHDET,PaHuM,CZ ID)の比較

健康な検査担当者の鼻腔ぬぐい液を検体とし、ここに C 型インフルエンザのウイルス培養液を添加した。核酸抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を使用し、得られた RNA は SMART-Seq Total RNA Mid Input（タカラバイオ）でライブラリー調整し、iSeq 100（Illumina）を用いてペアエンドシーケンスを実施した。得られた NGS データを PATHDET、PaHuM、CZ ID の 3 ツールで解析し、ウイルス分類、検出リード数、フィルタリング工程の挙動、ホスト配列除去性能など複数の観点から比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は、埼玉県感染症重大事案対策事業の一環として実施した。データの学術的利用については埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の審査を受け、許可を得た（承認日：2018 年 8 月 29 日）。

D.　　研究結果

研究１　不明ウイルス感染症等 3 検体における解析ツール(MePIC, PaHuM, CZ ID)の比較

①　検体 1

MePIC では全ウイルス 47 リードのうち 4 リード（9%）からムンプスウイルスを検出、PaHuM では全ウイルス 132 リードのうち 4 リード(3%)ムンプスウイルスを検出、CZ ID では全ウイルスリード数はカウントされないが、ムンプスウイルスが 4 リード検出した。MePIC、PaHuM、CZ ID の全ての解析ツールでムンプスウイルスを 4 リード検出した（表 1）。

②　検体 2

MePIC では全ウイルス 8,937 リードのうち 9 リード（0.1%）からパラインフルエンザ 3 型を検出、PaHuM では全ウイルス 6,055 リードのうち 9 リード(0.1%)パラインフルエンザ 3 型を検出、CZ ID では全ウイルスリード数はカウントされないが、ラインフルエンザ 3 型を 9 リード検出した。MePIC、PaHuM、CZ ID の全ての解析ツールでパラインフルエンザ 3 型を 9 リード検出した（表 2）。

表2 各ゲノム解析ツールによるリード数の比較（検体2）

解析ツール	全リード数	全ウイルス	パラインフルエンザ3型ウイルス	その他のウイルス
MePIC	2,926,738	8,937	9	8,928
PaHuM	2,926,738	6,055	9	6,046
CZ ID	2,926,738		9	

③　検体 3

MePIC では全ウイルス 1,136 リードのうちヒトヘルペスウイルス 6 が 57 リード(5%)、ヒトヘルペスウイルス 6B が 1,048 リード（92%）を検出、PaHuM では全ウイルス 1,142 リードのうちヒトヘルペスウイルス 6A を 12 リード(1%)、ヒトヘルペスウイルス 6B を 1,098 リード(96%)検出、CZ ID では全ウイルスリード数はカウントされないが、ヒトヘルペスウイルス 6 を含む突発性発疹ウイルス(Roseolovirus)が 1,063 リード検出した。リード数は異なるものの、MePIC、PaHuM、CZ ID の全ての解析ツールでヒトヘルペスウイルス 6A 及びヒトヘルペスウイルス 6B を含むヒトヘルペスウイルス 6 を検出した。

表3 各ゲノム解析ツールによるリード数の比較（検体3）

解析ツール	全リード数	全ウイルス	ヒトヘルペスウイルス6	ヒトヘルペスウイルス6A	ヒトヘルペスウイルス6B	突発性発疹ウイルス	その他のウイルス
MePIC	5,426,312	1,136	57		1,048		31
PaHuM	5,426,312	1,142		12	1,098		32
CZ ID	5,426,312					1,063	

研究２　C 型インフルエンザをスパイク添加した検体における解析ツール(PATHDET,PaHuM,CZ ID)の比較

①　PATHDET

PATHDET では、総リード数 927,638、フィルタリング後リード数 857,844、ホスト除去後リード数 490,482 であ

表1 各ゲノム解析ツールによるリード数の比較（検体1）

解析ツール	全リード数	全ウイルス	ムンプスウイルス	その他のウイルス
MePIC	711,316	47	4	43
PaHuM	711,316	132	4	128
CZ ID	711,316		4	

た。その内、3,497 リードをウイルス配列と判定し、C 型インフルエンザ由来の配列を 8 リード(全ウイルスリード数の 0.23%)検出した。

② PaHuM

PaHuM では、総リード 927,638、フィルタリング後リード数 915,470、ホストゲノム除去後リード数 564,938 であった。その内、126 リードをウイルス配列と判定し、C 型インフルエンザ由来の配列を 9 リード（全ウイルスリード数の 7.1%）検出した。

③ CZ ID

CZ ID では、総リード 927,638、フィルタリング後リード数 823,690、ホルトゲノム除去後リード数 414,178 であった。ウイルス由来配列の総数は不明だったものの、C 型インフルエンザを 16 リード検出した(表 4)。

表 4　各工程の検出リード数の比較

項目	PATHDET	PaHuM	CZ ID
総リード数	927,638	927,638	927,638
フィルタリング後リード数	857,844	915,470	823,690
ホスト除去後リード数	460,482	564,938	414,106
ウイルス総リード数	3,497	126	–
C 型インフルエンザリード数	8	9	16

D. 考察

研究 1 では MePIC と PaHuM で比較すると、全ウイルスリード数に違いが見られたことから、解析リードの真核生物、細菌、ウイルスへの分類能には差が見られると考えられた。病原ウイルスのリード数については、検体 1 ではムンプスウイルス、検体 2 ではパラインフルエンザウイルス 3 型がそれぞれ同じリード数検出したが、検体 3 ではヒトヘルペスウイルス 6 を検出したものの、リード数やウイルス名の表記名は異なっていた。このことからリード数が増えると解析ツールによる誤差が見られることが示唆されたものの、大きな差はなく、全ての解析ツールで目的とする病原ウイルスを同様な信頼性で検出できると思われた。

研究 2 も同様で、3 ツールすべてで目的のウイルスを検出できたことから、いずれも病原体検出ツールとして一定の信頼性を有していると考えられた。一方で、フィルタリング後のリード数やホスト配列の除去性能などに違いが見られ、解析ツールの選択が結果に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究は研究 1 及び研究 2 を合わせても 4 検体のみを対象としており、複数病原体混在や微量病原体検出、実際の臨床検体の解析といった実運用で想定される状況を十分に再現できていない。今後、より複雑な検体を用いた多面的な検証が必要であると考えられた。

E. 結論

本研究により、PATHDET、PaHuM、CZ ID の 3 ツールは、いずれも病原体検出能力を有することが確認された。特に行政的観点からは、解析の透明性やツールの持続的な利用可能性を考慮した上で、PATHDET を中心に活用しつつ、複数ツールを組み合わせる形で解析体制を強化することが望ましい。今後は、より多様な検体条件で解析を実施し、健康危機管理に必要な迅速・高精度な網羅的解析体制の構築に向けてデータの蓄積・共有を進めていくことが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

江原 勇登、小暮　栞、遠藤 昇里、今泉

晴喜、黒沢 博基、濱本 紀子、猪野 翔一朗、大阪　由香、貞升　健志、富岡 恭子、尾関　由姫恵、岸本　剛、本多 麻夫「原因不明疾患検査における次世代シーケンサー解析法の比較検討」第 37 回日本臨床微生物学会総会・学術

集会、千葉、2026.2.13－15

H. 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

別紙３

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
令和 6 年度～令和 7 年度 総合研究報告書 分担研究報告書
微生物分野の基礎的な研修に関する研究

研究分担者　塚越　博之　群馬県衛生環境研究所

研究協力者　猿木　信裕　群馬県衛生環境研究所
貞升　健志　東京都健康安全研究センター

研究要旨

地方衛生研究所（地衛研）では、高度化する検査に対応可能な専門職人材が不足している現状がある。そこで、本研究では、基礎的な知識と技術の習得による人材育成をすることで地衛研の職員全体の底上げを目的として、基礎的な研修を行い、その必要性について検討を行った。Web 研修では、地衛研職員として検査の基礎を学ぶための講義を行った。対面型の研修では、リアルタイム PCR 法などをとおして基本的な手技や考え方について学んだ。アンケート調査の結果からいずれの研修会も満足度は高く、継続を望む声が強かった。また、対面型の研修後のアンケートでは、所内への伝達方法が所内供覧のみであった自治体も多く今後の課題であると考えられた。本研究で取り組んだ基礎的な研修をとおして、正確な検査・研究につなげていくことで感染症発生事案において“頼りになる地衛研”となっていく必要がある。

目的

地方衛生研究所（地衛研）は、衛生行政において調査研究、試験検査、研修指導及び公衆衛生情報等の収集・解析・提供等を行うの科学的、技術的中核機関である。特に、感染症や食中毒などの健康被害が生じた際には高精度な検査により原因究明を行う機関である。地衛研における病原体検査では、高精度の検査が求められており、新興感染症などの検査にも迅速に対応することが求められている。しかしながら、地方自治体においては財政面の不足に加えて、頻繁な人事異動等により、専門性の高い人材が不足しているのが現状である。そこで、本研究では、基礎的な知識と技術の習得による人材育成をすることで地衛研の職員全体の底上げを目的として、基礎的な研修を行い、その必要性について検討を行った。

B. 研究方法

令和 6 年度および 7 年度において、Web 研修を 2 回、対面型（ハイブリッド方式を含む）を 3 回実施した。Web 研修では、地衛研職員として必要な基礎知識を中心に研修を行った。また、対面型研修では、リアルタイム PCR 法の研修を 2 回、ウイルス分に関する研修を 1 回実施した。

C. 研究結果

地方衛生研究所等を対象とした Web 研修には、多くの施設が参加したことから関心が高く、アンケート結果からも満足度も高い研修となった（表１）。また、人材育成において困っていることに関する設問では、所属において人事異動が多いこと、人材育成をするための人材が不足していることも明らかになった。

表1　WEB研修の参加状況と満足度

	参加機関数	参加人数	満足度（平均）＊
令和6年度	47	280	86.5
令和7年度	74	304	92.4

*各講義において、5段階評価で4以上の回答をした割合

対面型研修では、3 回の研修を実施した（表 2）。研修後のアンケート調査から、い

ずれの研修においても高い満足度が得られた。また、対面型研修では、研修後も継続を望む声が強かった。一方、研修内容の所属への伝達方法に関する設問では、“所内供覧のみ”がと最も多く，次いで”口頭での伝達”や “実習書のみの伝達”であった（表 1）。また、研修後に新しく取り組んだことがあるかどうかに関しては、およそ 7 割の研修生が新しいものに取り組んだと回答し、内容としてはマイクロピペットの使い方など基礎的な内容が多かった。

表2　対面型研修の参加状況

内容		参加人数	満足度（平均）*
令和6年度	リアルタイムPCR（ウイルス分野）	50	92.0
令和7年度	リアルタイムPCR（細菌分野）	24	91.6
	ウイルス分離	6	100

*各講義において、5段階評価で4以上の回答をした割合

D. 考察

Web 研修および対面での研修を実施したところ、満足度も高く研修の継続を望む声が多かった。対面型の研修内容を職場へ還元する際には書面のみなどとなっていることからさらなる工夫が必要であると考えられる。また、研修後に取り組んだこととしてピペット操作など基礎的な内容を挙げていることから、継続して研修を行い定着させていくことも必要であると考えられる。多くの地衛研では、人事異動が頻繁に行われ、業務に関する事務的な引継ぎのみで検査に対応している可能性もあることからも継続が必要であると考えられる。さらに、アンケート結果から職場内で OJT による人材育成も困難である状況も見えてきていることから、今後も基礎的な研修を継続する意味は大きいと考えられる。研修では、地衛研の実務に直結する研修が求められており、そのための予算等の整備が必要である。

E. 結論

地方自治体において、感染症などの健康危機発生時に地衛研は高い専門性を活かして原因を究明する機関であるにも関わらず、人材面で困難な状況にあると考えられる。頻繁な人事異動や職場での OJT 不足等により、機能低下を起こさないためにも“基礎からしっかりと学ぶ研修”を行う意味は大きい。検査内容は高度になり、検査項目も増加している状況ではあるが基礎を学ぶことで様々な検査に対応できる能力を身に付けていくことが重要である。本研修活動をとおして、基礎を学び、応用力を高めて、正確な検査・研究につなげていくことで感染症発生事案において“頼りになる地衛研”となっていく必要がある。

謝辞

研修会に多大なご協力をいただきました JIHS 国立感染症研究所　齋藤智也先生、平井晋一郎先生、サーモフィッシャーサイエンティフィック　澤口穣先生、栄研化学株式会社　下條誉幸先生、山形県衛生研究所　水田克巳先生、池田辰也先生、瀬戸順次先生、髙橋智子先生、的場洋平先生、小川直美先生、鈴木麻友先生、川崎市健康科学研究所　岡部信彦先生、清水英明先生、池田史郎先生、タカラバイオ株式会社　梅田直先生、西川聖子先生、篠崎香菜先生、井上英和先生、栃木県保健環境センター　齋藤明日美先生、埼玉県衛生研究所　江原勇登先生、千葉県衛生研究所　蜂巣友嗣先生、花田裕司先生、さいたま市健康科学研究センター　菊地孝司先生、蕪木康郎先生、大阪健康安全基盤研究所　左近直美先生、東京都健康安全研究センター　吉村和久先生、長島真美先生、浅倉弘幸先生、神門幸大先生、市川めぐみ先生、また、事務局としてご協力いただきました一般財団法人日本公衆衛生協会　若井友美様、松原未貴様に感謝申し上げます。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1．論文発表

無し

2．学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

別紙３

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）
（総合）分担研究報告書

次世代シークエンサーに関わる各種検査法の開発

研究分担者　　岩本　朋忠　　神戸市健康科学研究所

研究協力者　　地方衛生研究所ゲノム解析ワーキンググループ

研究要旨
地衛研でのゲノム解析の普及を促すため、地衛研全国 6 支部をカバーするゲノムワーキンググループメンバー（グループ長　岩本）を組織して、ゲノム解析のウェットラボ操作に関するマニュアル作成に取り組んだ。令和 6 年度は「地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編」を作成し、地方衛生研究所全国協議会ホームページ上に掲載した。令和 7 年度は、本マニュアルの普及に向けた研修の実施、さらには、エンテロウイルスゲノムを 2 セットの PCR 増幅でカバーできゲノム解析プロトコルを作成した。A, B, D 種のエンテロウイルスに対応するものである。

A. 研究目的

ゲノム解析の１次処理にあたるウェットラボ操作に関するマニュアル、プロトコルを作成し、全国の地方衛生研究所（地衛研）への普及を通じて、地衛研におけるゲノム解析能力の向上に寄与する。

B. 研究方法

地衛研全国 6 支部をカバーするゲノムワーキンググループ（GWG）を構成し、合議制で地衛研の体制に即した検査マニュアル・プロトコルの作成を進めた。ワーキンググループメンバー構成は、令和 6 年度は 16 施設から 16 名、令和 7 年度は 15 施設から 17 名であった。令和 6 年度、7 年度ともに、ワーキンググループ会議を各 4 回 web で開催し、アンケート調査なども併用して活動した。

令和 6 年度は、DNA ライブラリ作製マニュアルを作成することにした。マニュアルの作成にあたっては、ゲノム DNA 断片化温度と反応時間の断片化への影響とライブラリーサイズセレクション方法の違いによるリードデータへの影響について検証した。

令和 7 年度は、DNA ライブラリ作製マニュアル普及のための研修実施とエンテロウイルスゲノム解析プロトコルの作成に取り組んだ。反応条件を最適化したプロトコルについて、エンテロウイルス A 種、B 種、D 種から、それぞれ、6、12、1 種類のウイルス型を選定し、各ウイルス型から３株以上を抽出、合計 128 株を用いて検証実験を行った。

（倫理面への配慮）
検査手法の標準化とマニュアル化についての研究であり、個人情報など倫理面での配慮を必要とする情報や行為は一切伴わない。

C. 研究結果

I. 地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編の作成（令和 6 年度成果物）

１）マニュアル作成における課題の抽出
マニュアル作成にあたっては、ライブラリのサイズセレクションの方法、各ライブラリの混合比率を均質化するためのノーマ

ライゼーションのタイミング、ライブラリの濃度測定方法について意思統一が必要であることが分かった。ワーキンググループメンバー間での web 会議を繰り返し、サイズセレクションの方法については、ゲル切り出しによる方法とビーズ法の両方の手法を併記し、それぞれの特徴を記載することとした。ノーマライゼーションは、ライブラリ調整に使用する DNA 濃度を均一化 (20 ng/uL)することとした。濃度測定法は、Qubit Fluorometer を用いた方法に統一し、定量的 PCR 法をトラブルシューティングのための方法として記載することとした。

2）ゲノム DNA のフラグメンテーション処理時間と Lid 温度の影響

断片化は反応時間 3 分で十分進行することが確認できた。地衛研では様々な機種のサーマルサイクラーが使用されおり、リッド(ふた)の温度調節が出来ない機種への対応が求められる。本研究での検証実験の結果、リッド温度を調節可能なサーマルサイクラーの場合は 80℃、調節できないサーマルサイクラーの場合は、32℃での断片化処理反応中、リッドを開放して、65℃のステップになってからリッドを閉めるという操作を推奨することとした。

3）ライブラリサイズセレクション方法の違いによるリードデータへの影響

リードデータの品質とデータ量確保に大きく影響するライブラリのサイズセレクションについては、磁性ビーズによる方法とゲル切り出しによる方法を比較した。その結果、ビーズ精製は簡便な手法ではあるが、170 サイクル付近からのクオリティが大きく低下することが分かった。その原因として、インサートサイズが短いライブラリが多く混入することによるものと考えられた。一方、ゲル切り出しの場合は、手間のかかる方法ではあるが、ライブラリーサイズはほぼ均質化しており、インサートサイズも想定通りの物が得られることから、リードデータとして無駄になる部分が少なく、ビーズ精製に比べてより多くのデータ量を確保できることを確認した。この検証結果をもとにして、マニュアル中では、両者の比較データを appendix として提示し、フラグメント解析が可能な施設においてはビーズ精製も可能ではあるが、それ以外の施設はゲル切り出しによる方法を推奨すると明記することにした。

II. 地衛研ゲノム DNA ライブラリ作成マニュアル普及のための研修

マニュアル内容説明会を、地衛研 Web セミナーとして行った (2025 年 4 月 24 日開催。参加者 150 名程度)。Web セミナーについては、後日、地全協ホームページに動画を掲載し公開した。

地域保健総合推進事業中国・四国ブロック地域専門家会議において、技術研修を対面で行った (2025 年 10 月 16, 17 日)。中国・四国ブロックに属する 10 施設から合計 12 名が参加した。研修 1 日目は座学と大腸菌 ATCC25922 株の DNA 抽出を行った。2 日目はゲル切り出し練習を含めて、ライブラリ作製とイルミナシーケンサーのランまでを実際に行った。

III. エンテロウイルスの全ゲノム解析プロトコルの作成（令和 7 年度成果物）

Mrie-Line Joffret 等が報告した手法 (Front Microbiol . 2018 Sep28:9:2339.) を改良し、多施設共同検証実験を経て、エンテロウイルスの全ゲノム解析プロトコル初版を作成した。本プロトコルの特徴は、2 セットの PCR プライマーでエンテロウイルスのゲノム配列の全長を増幅できる点にある。また、試薬の組み合わせを検討したことから、非特異増幅を抑えることに成功した。さらに、A 種、B 種、D 種のエンテロウイルスに対応したプライマーセットを提示することで、幅広い型のエンテロウイルスを対応可能にした。

プロトコルの有用性を検証するために、エンテロウイルス A 種、B 種、D 種から、それぞれ、6、12、1 種類のウイルス型を選定し、合計 128 株を用いて、PCR 増幅の有無を確認した。検証作業は、GWG メンバー8 施設で行った。フラグメント 1 はいずれの施設でも増幅が良好であり、128 株中 122 株

(95.3%) で良好な増幅が認められた。一方、フラグメント 2 では、増幅不良が散見され良好な増幅が認められたのは、128 株中 88 株 (68.8%) であった。特に、施設 A では 12 検体中 11 件、施設 F では 21 検体中 11 件が増幅不良であり、増幅不良が特に顕著であった。

D. 考察

地衛研全国 6 支部をカバーする検査実務者によるゲノム解析ワーキンググループを組織することで、各地衛研の実情に即したマニュアル (地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編) とプロトコル (エンテロウイルスの全ゲノム解析プロトコル) が作成できた。地衛研内でのゲノム解析手法の標準化に大きく寄与するものである。定期的な会議とアンケートの実施を通じて、ワーキンググループ間での情報共有、意見交換を活発に行い課題に取り組んだ成果と言える。また、web セミナーや実地での技術研修を企画・実行し、今後の地衛研連携や人材育成の在り方を示すモデルケースにもなった。

マニュアル、プロトコルの作成においては、可能な限り、記載内容の妥当性を実験的に確認した。検証結果を appendix として提示したり、解析成功のための注釈を加えるなど、内容の充実と記載内容の信頼性を示す工夫をした。特に、GWG メンバー複数施設で検証作業を実施できた利点は大きい。施設による保有機種の違いに対する選択肢の提示にもつながり、全国に 80 か所以上存在する地衛研のニーズに即したマニュアル、プロトコル作成が実現した大きな要因である。

一方で、GWG メンバー間での役割分担は必ずしも均質ではなく、特定の施設への過度な負担につながったことは、今後の課題である。今回、2 年間の活動においては、具体的な目標を定めずに、まず GWG を組織し、メンバー間での議論駆動型で課題を見出し、マニュアル・プロトコルつくりを遂行するというプロセスを経たために、メンバー間での役割分担が後付けで決定したことを考えると役割分担の不均質は、やむおえない結果ではある。今後、同様のワーキンググループを立ち上げる場合には、まず、課題を明確化したうえで、グループメンバーの選定を行うことで、よりスムーズなプロジェクトの遂行が可能になるものと思われる。

E. 結論

生物種にかかわらず、ゲノム解析の基盤プラットフォームとなるマニュアル「地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル QIAseq FX DNA Library kit 編」を令和 6 年度に作成した。さらに、令和 7 年度には、エンテロウイルス A 種、B 種、D 種の幅広いウイルス型の全ゲノム解析を可能とするプロトコル「エンテロウイルスの全ゲノム解析プロトコル初版」を作成した。地衛研全国 6 支部をカバーする検査実務者によるゲノム解析ワーキンググループメンバーで取り組んだ成果であり、施設による保有機種の違いも考慮した、地衛研のニーズに即したマニュアルとプロトコルである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1．特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

・地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル　QIAseq FX DNA Library kit 編
・エンテロウイルスゲノム解析プロトコル初版 (Ver.05)。

地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル

QIAseq FX DNA Library kit 編

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

＊本マニュアルの内容に関する質問、問い合わせは、下記のゲノム解析ワーキンググループメーリングリスト宛にお願いします。

genome_working_group-ml-bounces￥chieiken.gr.jp

（￥を@に変更してください）

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

変更履歴

・初版作成（2025 年 3 月 19 日）

ゲノム DNA ライブラリ作製手順の概要

Fragmentation
（ゲノム DNA の断片化処理）

↓

Adapter ligation
（各サンプルへのインデックスとアダプターの付与）

↓

Clean up and Elution
（ライゲーション後の溶液の精製）

↓

Library amplification
（ライブラリの PCR 増幅）

↓

Library size selection
本マニュアルでは、磁性ビーズによる方法とアガロースゲル電気泳動ゲル切り出しによる方法を併記した。

↓

ライブラリの定量、モル濃度計算

↓

ライブラリ変性、イルミナシーケンサーのラン

１．試薬・装置

試薬等 消耗品

- DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN)等　同等品
- QIAseq FX DNA Library Kit 各種 （QIAGEN：180475 等）
- Qubit dsDNA HS Assay Kit （ThermoFisher：Q32854 等）
- Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）同等品
- Illumina 社 シーケンシングキット （300-cycle 以上可能なものを推奨 ）
- QIAGEN 社 Buffer EB
- 80%エタノール溶液（用時調整）
- 低吸着性エッペンチューブ（1.5 ml）
- 100 mg/mL RNase A （ニッポンジーン）　同等品
- アガロース S （ニッポンジーン）等　同等品
- ×10,000 GelRed（ニッポンジーン）等　同等品
- 100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）等　同等品
- × 1　TAE buffer：用時調製
- FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）
- QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）等　同等品
- 3M 酢酸ナトリウム水溶液（pH5.0）
- イソプロパノール

器具・機器等

- Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher)
- Illumina 社シーケンサー
- PCR Thermal Cycler 各種（ヒートリッドの温度制御可能なものが望ましい）
- AMPure XP 精製用磁石スタンド（Fast Gene Magna Stand 等）
- 卓上ミニ遠心機・プレート遠心機（スピンダウン用）
- 8 連チューブ用あるいは 96well プレート用アルミブロック
- 電気泳動装置：MupidR-exU（株式会社ミュービッド）あるいは同等品
- LED トランスイルミネーター：FAS-V （日本ジェネティクス） あるいは同等品
- その他基本的な実験器具類

２．ゲノム DNA 抽出

2-1.　ゲノム DNA 抽出（細菌）

菌種に応じた適切な培養条件で培養した菌体についてゲノム DNA を抽出する。一例として、DNeasy Blood and Tissue kit （QIAGEN）を使用した方法を紹介する。

1. 純培養した菌体を回収し 180μL の Buffer ATL でペレットを再懸濁する（グラム陽性菌の場合は前処理で菌体溶解のために追加のステップが必要となる。詳細はキットのマニュアルを参照)。
2. Proteinase K 20 μl を添加後、ボルテックス操作して混和し、組織が完全に溶解するまで 56℃でインキュベートする（1 時間～一晩)。
3. 4 μL の RNase A（100 mg/ml）を添加しボルテックス操作で混和、室温（15 ～ 25℃）で 2 分 間インキュベートする。
4. 15 秒間ボルテックス混和する。200 μl の Buffer AL を添加し、ボルテックス操作で十分に混和する。200 μL のエタノール（96 ～ 100%）をサンプルに添加し、再びボルテックス操作で十分に混和する。
5. 混合液（形成した沈殿物を含む）を、キットに添付されている新しい 2 mL コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column に移す。6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
6. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、 500 μL の Buffer AW1 を添加後、6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心分離する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
7. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、 500μL の Buffer AW2 を添加後、20,000 x g （14,000 rpm）で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させる。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
8. DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し、50～100 μL の Buffer EB を DNeasy メンブレン上に添加する。室温（15～25℃）で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心分離し、ゲノム DNA を溶出する。

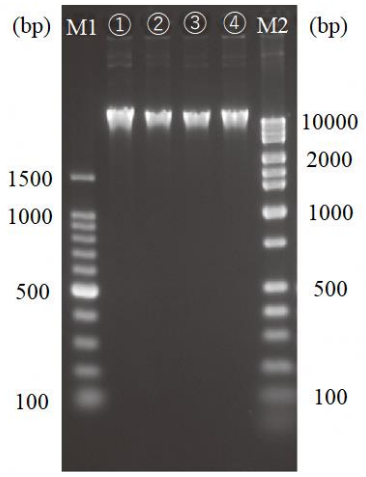
【ゲノム DNA の品質評価】

・アガロースゲル電気泳動で主に 10 kbp 以上の高分子DNA が観察されること（下図参照）

オプション

NanoDrop 等の分光光度計での吸光度測定が可能であれば、A260/A280 が 1.7 以上であることを確認するとよい。ただし、A260 から換算した DNA 濃度は後述の Qubit による測定結果とは一致しないことが多い。DNA 濃度調製は、Qubit 等の蛍光色素を用いて二本鎖 DNA 濃度を正確に定量可能な機器の測定結果を元にすること。ただし、本マニュアルは Qubit を使用した検討結果に基づいており、Qubit 以外の蛍光試薬を用いる場合は濃度設定について事前に検討することを推奨する。

（参考図　大腸菌 ATCC25922 株 DNA のアガロースゲル電気泳動例）



泳動条件：100V、30 分
泳動装置：Mupid-exU（タカラバイオ）
泳動 Buffer：×0.5 TBE
染色方法：Gel-Red
アガロース濃度：2%
M1：100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）
①～④：大腸菌 ATCC25922 株
M2：Wide-range DNA Ladder（タカラバイオ）

2-2.　DNA 濃度測定

Qubit 試薬を用い、製品取扱説明書に従って濃度測定を行う。Qubit での測定範囲外（Out of range）となった場合は適宜希釈して再測定する。ゲノム DNA は、Buffer EB（QIAGEN）で 20 ng/μL に希釈し、ライブラリ作製に用いる。

【注釈】メーカー使用説明書では、Qubit 試薬は 6 ヶ月間安定と記載されている。

操作例：

【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit　（Thermo Fisher Scientific）

Qubit Assay Tube　（Thermo Fisher Scientific）

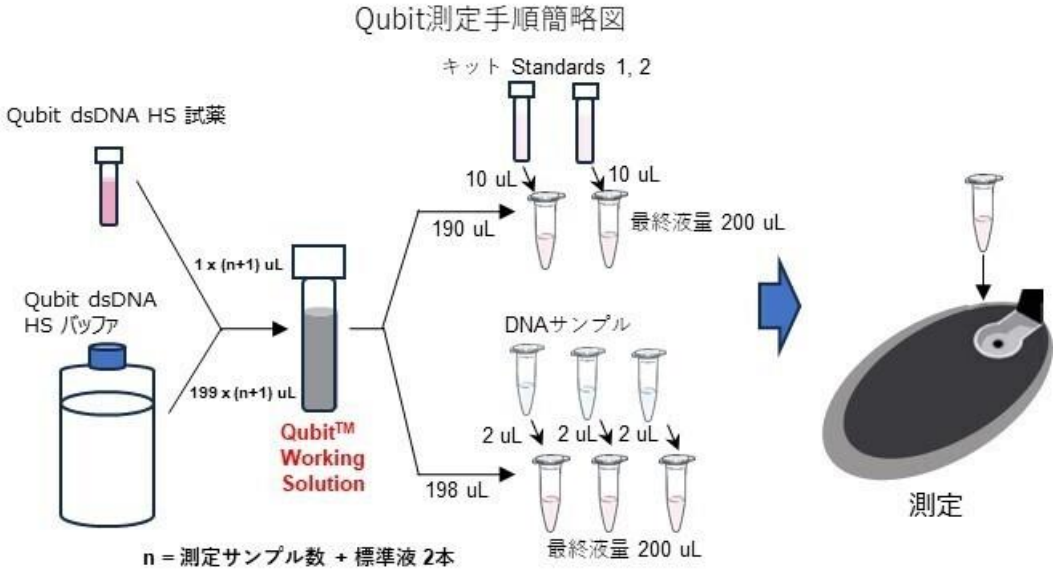
【手順】

・　下図（Qubit 測定手順間略図）を参考に、標準液 (standard #1, standard #2)と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。検体数を n として、Qubit Reagent n+2 μL、Quant-IT Bufer 199×(n+2) μL を混合する。

・ Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 μL を分注する。

・　Qubit DNA HS Standard #1、#2 10 μL を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。

・　DNA サンプル 2 μL に Qubit working solution 198 μL を加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。



（サーモフィッシャー社 Qubit 2.0 Fluorometer カタログを参考に作図）

３．ライブラリ作製

QIAseq FX DNA Library Kit （QIAGEN）

*本マニュアルでは、キットのプロトコルの 1/2 スケールで実施する。

* Clean up and Elution を除く全ての作業を氷上のアルミブロック上で実施する。

※検体数が多い場合は全ての作業について、各マスターミックスや AMPure Beads を 8 連チューブに必要量分注しておき、8 連ピペットを用いて反応チューブに分注・ピペッティングするとサンプル間の時間差や試薬の入れ忘れ、コンタミネーションのリスクが軽減できる。

注意点

本製品は各アダプターが使いきりであり、アルミプレートシールで封をされた 96well プレートに入っている。本プロトコルは 1/2 スケールで実施する関係上、アダプター全量を使用しないため、一度解凍して 8 連チューブなど別の容器に移して再凍結保存（-20℃以下）しておき、必要分だけ取り出して使用することを推奨する。ただし、飛沫によるアダプター同士の交差汚染を防ぐため 96well プレートの遠心操作は必須であり、また、アルミプレートを剥がす場合は交差汚染の防止に細心の注意を払うこと。

3-1. Fragmentation（ゲノム DNA の断片化処理）

・サンプル分の 0.2 mL PCR チューブ もしくは 96 well PCR プレートを用意

・下記の Fragmentation マスターミックスをサンプル数+α 反応分となるように調製する。

試薬	容量（1 検体あたり）
Nucleotide Free Water	15.0 μL
Fx Buffer, x10	2.5 μL
Fx Enzyme Mix	5.0 μL
Total	22.5 μL

※調製後のマスターミックスはボルテックス厳禁

・マスターミックスを 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する。

・20 ng/μL に調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え、8 連ピペットの目盛りを 10 μL に設定して 10 回以上ピペッティングする

・スピンダウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

4℃	1 min
32℃	3 min
65℃	30 min
4℃	1 min

※ ヒートリッド温度が変更可能な機種であれば 80℃に設定する（注釈参照）
※ 試薬調整前にプログラムを開始し、4 ℃ で pause しておくとよい

・反応終了後、すぐに PCR チューブをスピンダウンし氷上のアルミブロック上に置く。

注釈

QIAGEN のマニュアルではヒートリッド温度は 70℃と記載されている。これはヒートリッドが高温の場合、32℃の Fragmentation の工程に影響が出るためであるが、本プロトコルでは SARS-CoV-2 のゲノム解析マニュアルの記載に倣い 80℃とした。リッド温度が変更できない機種の場合は、32℃反応中、リッド(蓋)を開放して、65℃のステップになってからリッドを閉めることを推奨する。また、リッド温度を 70℃～105℃設定で反応させた場合の断片化の経時的変化を巻末に参考データとして記載している（Appendix 図 1、2）。

3-2. Adapter Ligation（各サンプルへのインデックスとアダプターの付与）

試薬	容量（1 検体あたり）
Nucleotide Free Water	7.5 μL
DNA Ligation Buffer, x5	10.0 μL
DNA Ligase	5.0 μL
Total	22.5 μL

- 上記 Ligation マスターミックスをサンプル数+α反応分となるよう調製し、新しい 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する
- 対応するアダプターを 2.5 μL 加え、数回ピペッティング
- Fragmentation 後の DNA を全量（25 μL）加え、ピペッティング（20 回以上）で十分混和する。

・　スピンダウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

20℃	15 min

※ヒートリッドは 20℃、もしくは開放する

※試薬調整前にプログラムを開始し、20℃ で pause しておくとよい

・　反応中に Agencourt AMPure XP beads を冷蔵庫から室温に出しておく

注意点

DNA Ligation Buffer は非常に粘性が高い液体のため、以下の手順で十分に Mixture を混合することを推奨する。これらの混合が不十分の場合はライブラリの質が低下する。

・Nucleotide Free Water と DNA Ligation Buffer, x5 を混合後、ボルテックスで十分混合した後、Ligase を加えてタッピングあるいはピペッティングで混合し Ligation マスターミックスとして使用する。

3-3. Clean up and Elution （磁性ビーズ精製２回による、未反応アダプター等の除去）

（用意するもの）

Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）

80%エタノール（用時調製）

0.2 mL チューブ用マグネットスタンド（日本ジェネティクス社など）

・AMPure Beads を室温に戻しておく。

＜１回目の精製＞

・AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和し、底部に沈んでいる磁気ビーズを均一化させる。

・AMPure Beads を 40 μL （0.8 倍量）ずつ加え、ピペッティングで混和する。

・室温で 5 分間静置する。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間程度（上清がクリアになるまで）静置する。

・ビーズに触れないように上清を取り除く。

・チューブをスタンドに設置したまま、200 μL の 80%エタノールを加える。

・30 秒間静置後、上清を取り除く。

・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回)。

・上清を除き、マグネット上で 3 分間程度静置し、ビーズを乾燥させる(乾燥させすぎ注意)。

・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、25 μL の buffer EB を加える。

・ピペッティング後、スピンダウンする。

※ここの過程のビーズは固まりやすく、分散しづらいのでよくピペッティングすること。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。

＜２回目の精製＞

・AMPure Beads をボルテックスで十分混和する。

・AMPure Beads を 27.5 μL （1.1 倍量）ずつ、回収した上清に加え、混和する。

・室温で 5 分間静置する。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間程度（上清がクリアになるまで）静置する。

・ビーズに触れないように上清を取り除く。

・チューブをスタンドに設置したまま、200 μL の 80%エタノールを加える。

・30 秒間静置後、上清を取り除く。

・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回)。

・上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。

・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、13 μL の buffer EB を加える。

・ピペッティング後、スピンダウンする。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を 11.75 μL 回収する。

3-4. Library Amplification（ライブラリの PCR 増幅）

試薬	容量（1 検体あたり）
Primer Mix （10 μM each）	0.75 μL
Hi-Fi PCR マスターミックス, x2	12.5 μL
Total	13.25 μL

・上記 PCR マスターミックスをサンプル数＋α反応分調製し、転倒混和後スピンダウン。
・13.25 μl を Clean up and Elution で溶出したサンプル(11.75 μL)に添加しピペッティングで混和する。
・スピンダウン後サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う。

98℃	2 min
6 cycles of	
98℃	20 sec
60℃	30 sec
72℃	30 sec
↓	
72℃	1 min

【注釈】この工程を終えた検体について、-20℃保存可能である。

４．ライブラリサイズセレクション

ライブラリの精製およびサイズセレクションはその後の Run の結果に大きく影響する。本マニュアルではアガロースゲル電気泳動後のゲル切り出しによる精製方法と、キットの公式プロトコルに準じた磁性ビーズによる精製方法を記載する。

なお、本工程では既に Index による各サンプルの標識が完了しているので、複数サンプルをプールして実行しても良い。ただし、その際は各個別サンプルの濃度やクオリティについては検証不可となるので注意が必要である。

注釈

それぞれの精製方法によって得られたリードデータの質や、注意点などについては巻末の Appendix で解説しているのでどちらの手法を採用するかの参考にしていただきたい。ただし、磁性ビーズを使用した精製方法では Bioanalyzer や MultiNA、TapeStation 等の、キャピラリー電気泳動装置のスメア解析機能によるライブラリサイズの把握が必要となるため、それらの装置を保有していない施設ではゲル切り出しによる精製方法を選択することを推奨する。

4-1. 電気泳動によるゲル切り出し（**4-2 ビーズ精製を選択する場合は不要**）

（用意するもの）

- ゲル切り出し用トランスイルミネーター：BLooK LED Transilluminator（GeneDireX）等同等品（DNA 損傷の観点から UV イルミネーターは非推奨）
- アガロース S （ニッポンジーン）等　同等品
- ×10,000 GelRed（ニッポンジーン）等　同等品
- 100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）等　同等品
- × 1　TAE buffer：用時調製
- FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）
- QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）等　同等品
- イソプロパノール

（ゲルの作成方法）

＊状況によっては泳動する溶液量が多いため、厚めのゲルを作製するとよい。ゲルが厚いと後染めでは染まりにくいので、染色方法は先染めを推奨する。

・×1 TAE buffer と 1%重量のアガロースを混合する。
・電子レンジで溶解する。
・50℃の恒温水槽で保温する。
・1/10,000 量の×10,000 Gel Red を混合する。
・コームを立てたゲルメーカーに流し、固まるまで待つ。
・冷蔵庫で十分冷却して、ゲルを完全に固化させる。
・コームを外し、保湿して保存する。　※用事調製する。

（PCR 産物の泳動）

- PCR 反応後の各サンプル（25μL）に×6 Loading Buffer を 5μL 加える。
- 各ウェルにアプライする。
- 両サイドのマーカーレーンに 100bp DNA Ladder を 15μL アプライする。
- 100 V、30 分間程度泳動する。
- ブルーライトのイルミネーター上で泳動像を確認する。
- 500-600bp のサイズを切り出し、2 mL マイクロチューブに回収する。
  （FastGene アガロース ゲルバンドカッターを用いるとよい）

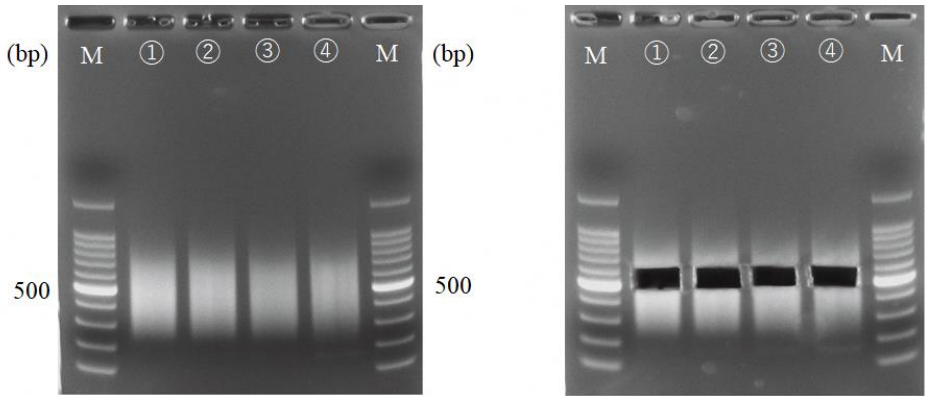
注釈

※複数サンプルをプールする場合は、例えば全量を 36μL となるようにし、×10 Loading Buffer を 4μL 加えてから各ウェルにアプライすること。

（QIAquick Gel Extraction Kit を用いたゲルからの DNA 抽出）

- 切り出したゲルスライスの重量を測定する。
- 測定した重量の mg を μL と見立て、3 倍量の Buffer QG を加えてボルテックスする。
- 50℃のヒートブロック上で時折ボルテックスしながら 10 分間溶解する。
- 溶液の色がオレンジ色、あるいは紫色となった場合は 3M 酢酸ナトリウム水溶液を 10μL 加えてボルテックスする。
- ゲル重量と同量のイソプロパノールを加えてボルテックスする。
- QIAquick カラムに溶解したサンプルを入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- Buffer QG を 500μL 入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- Buffer PE を 750μL 入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- カラムに何も入れないまま遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、1.5mL のマイクロチューブを取り付ける。
- メンブレンの中央に 30μL の Buffer EB を添加し、1 分間静置する。
- 遠心してマイクロチューブ内に溶出された DNA を回収する。
- 完成したライブラリーは、-30℃で 1 ケ月程度保存可能

（参考図　大腸菌 ATCC25922 株における切り出し前後のゲル画像例）



左：切り出し前　右：切り出し後
ライブラリ調製キット：QIAseq FX DNA Library UDI-A Kit
泳動条件：100V、30 分　　泳動装置：Mupid-exU（タカラバイオ）
泳動 Buffer：×1 TAE　　アガロース濃度：1%　#Gel-Red 先染め
切り出し用トランスイルミネーター：BLooK LED Transilluminator（GeneDireX）
ゲルカッター：FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）

M：100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）
①～④：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

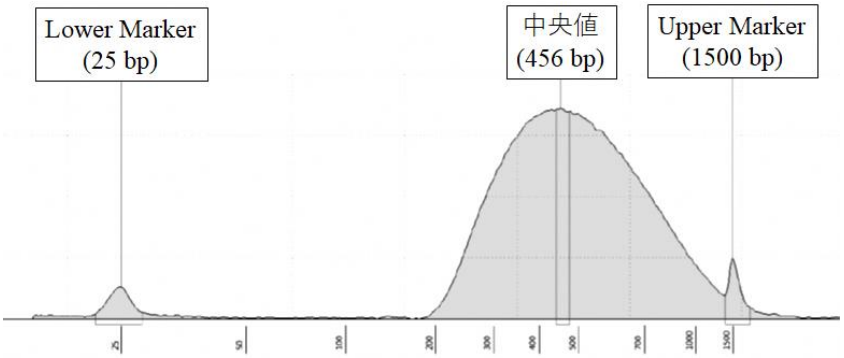
4-2. ビーズ精製**（4-1. 電気泳動によるゲル切り出しを選択した場合は不要）**

Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）等　同等品
80%エタノール（用時調製）
0.2 ml チューブ用マグネットスタンド（日本ジェネティクス社など）

・AMPure Beads を室温に戻しておく。
・AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和する。
・AMPure Beads を 30 µL（1.1 倍量）ずつ加え、ピペッティングで混和する。
・室温で 5 分間静置する。
・マグネットスタンドに設置し上清が清澄化するまで 2 分間程度静置する。
・ビーズに触れないように上清を取り除く。
・チューブをスタンドに設置したまま、200 µL の 80%エタノールを加える。
・30 秒間静置後、上清を取り除く。
・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回）。
・上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。
・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、30 μL の buffer EB を加える。
・ピペッティング後、スピンダウンする。
・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。
・Bioanalyzer や MultiNA 等のキャピラリー電気泳動装置のスメア解析機能によりライブラリサイズの分布を確認し、中央値を控えておく。
・完成したライブラリーは、-30℃で 1 ケ月程度保存可能

（参考図　ビーズ精製後のスメア解析例）



使用機種：Agilent 2200 TapeStation（アジレント・テクノロジー）
使用キット：High Sensitivity D1000
分析サンプル：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

５．ライブラリ定量

5-1.　Qubit によるライブラリ DNA 濃度測定

【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit （Thermo Fisher Scientific）

Qubit Assay Tube （Thermo Fisher Scientific）

【手順】

・　本マニュアル 7 ページの Qubit 測定手順間略図を参考に、標準液 (standard #1, standard #2)と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。

・　Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 µL を加える。

・　Qubit DNA HS Standard #1、#2 10 µL を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。

・　精製後の DNA ライブラリ 2 µL に Qubit working solution を 198 µL 加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。

・　後述「ライブラリのモル濃度計算式」を用いてライブラリモル濃度を算出する。

・　Buffer EB（QIAGEN）で 4 nM となるように希釈する。

ライブラリのモル濃度計算式

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{ライブラリの平均サイズ（bp）×660}

例１：500-600bp の範囲でゲル切り出しを行った場合

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{550（bp）×660}

例２：ビーズ精製後、スメア解析の中央値が 400bp だった場合

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{400（bp）×660}

注釈

算出されたライブラリモル濃度が 4nM に満たない場合は、2nM になるように Buffer EB で希釈し、「６．ライブラリ変性等 Run 関係：MiSeq での Run 時の変性・希釈作業」において 2nM を初期値とした手順に移ることが可能である。ただし、その場合は、同時に Run する全ての検体を 2nM に希釈する必要がある。

5-2. qPCR 法による定量（通常は行わない）

注釈

Qubit での定量値で想定通りのデータが得られなかった場合、より精度の高い定量法である qPCR 法での定量を行い、原因を推定する。qPCR 法としては、イルミナシーケンサーで用いられている P5、P7 配列をターゲットとした市販のキットが複数販売されている。本マニュアルでは、Itokawa らの qPCR 法によるライブラリ定量法を掲載する（5-2 参照）。

https://www.protocols.io/view/illumina-truseq-library-quantification-with-qpcr-p-6qpvrddpzgmk/v1

UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution　Thermo Fisher #15632011

PhiX Control v3　Illumina, Inc. #FC-110-3001

PrimeTime® Gene Expression マスターミックス Integrated DNA Technologies #1055770

・Salmon sperm DNA を 5 ng/μL に調整する。

試薬	容量 （μL）
Nucleotide Free Water	9,889
1 M Tris-HCl, pH 8.0	100
0.5 M EDTA	10
UltraPure DNA Solution 10 mg/ml	5
Total	10 mL

・上記 Salmon sperm DNA（5 ng/μL）を使用し、PhiX コントロールの希釈系列を作成する。

50 pM	100 μL
5 pM	100 μL
0.5 pM	100 μL
0.05 pM	100 μL

・Primer ＆ Probe Mix （20x）を調製する。

Probe	5 nM
P5 primer	5 nM
P7 primer	5 nM

Double-quenched probe （IDT）:

/56-FAM/ACACTCTTT/ZEN/CCCTACACGACGCTCTTC/3IABkFQ/

P5 primer: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

P7 primer: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3’

・ライブラリを Buffer EB で 100 倍または 1,000 倍に希釈しておく。

・qPCR

試薬	容量（μL；1 検体あたり）
Prime Time PCR マスターミックス	10
20x primer & probe mix	1
Nucleotide Free Water	8
希釈ライブラリ or 希釈 PhiX コントロール	1
Total	20 μl

95℃	2 min
30 cycles of	
97℃	5 sec
62℃	10 sec
68℃	15 sec

・得られた結果からライブラリのモル濃度（nM）を算出する。

６．ライブラリ変性等 Run 関係

MiSeq のカートリッジは V2 と V3 で推奨のアプライ濃度が異なる。iSeq 100 も含めた各カートリッジの推奨濃度は下記の通りである。

- MiSeq Reagent kit V2： 10 pM からはじめ、クラスター密度を 1000-1200 K/mm2 になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- MiSeq Reagent kit V3： 12 pM からはじめて、1200-1400 K/mm2 になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- iSeq 100 il Reagent v2： 50～100 pM（変性作業無し）で occupancy が 80～90%を目指して最適化を行ってゆくのが良い。

MiSeq での Run 時の変性・希釈作業

・ 氷を用意しておき、HT1 バッファーとアルミブロックを冷やしておく。
・ ４本の 1.5 ml チューブを用意、それぞれ以下の用途に使用する。

各ライブラリを 4 nM に希釈した場合（推奨）

- チューブ[N]： 0.2 N NaOH 調製用（Nuclease-Free Water 800 µL と 1N NaOH 200 µL を混合）
- チューブ①：１次希釈用
- チューブ②：２次希釈用 （HT1 バッファー990 µL を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）
- チューブ③: ３次希釈用 （HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）

・ チューブ①に ライブラリ溶液を 5 µL 入れておく。
・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 5 µL を チューブ① に加える。
・ Vortex でよく混ぜる（5 秒）。
・ スピンダウンする。
・ 室温で 5 分間インキュベーション（変性）後すぐに 2 次希釈へ進める。
・ １次希釈後のライブラリ溶液（チューブ①） 全量 10 µL を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
・ Vortex でよく混ぜ（10 秒）、3 次希釈へ進める。
・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
・ Vortex でよく混ぜる （5 秒）。
・ チューブ③から 630 µL を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。

上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/200 まで希釈される（4 nM→20 pM）。
チューブ③が計 1000 µL となるように Run したい最終濃度に希釈する（最終を 15pM としたいのであれば、②:750 µL + HT1: 250 µL）。

各ライブラリを 2 nM に希釈した場合

- チューブ[N]： 0.2 N NaOH 調製用（Nuclease-Free Water 800 µL と 1N NaOH 200 µL を混合）
- チューブ①： 1 次希釈用
- チューブ②：2 次希釈用 （HT1 バッファー980 µL を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）
- チューブ③: 3 次希釈用 （HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）

・ チューブ①に ライブラリ溶液を 10 µL 入れておく。
・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 10 µL を チューブ① に加える。
・ Vortex でよく混ぜる（5 秒）。
・ スピンダウンする。
・ 室温で 5 分間インキュベーション（変性）後すぐに 2 次希釈へ進める。
・ 1 次希釈後のライブラリ溶液（チューブ①） 全量 20 µL を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
・ Vortex でよく混ぜ（10 秒）、3 次希釈へ進める。
・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
・ Vortex でよく混ぜる （5 秒）。
・ チューブ③から 630 µL を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。

上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/100 まで希釈される（2 nM→20 pM）。チューブ③が計 1000 µL となるように Run したい最終濃度に希釈する（最終を 15pM としたいのであれば、②:750 µL + HT1: 250 µL）。

注釈

サンプル濃度が高すぎるとオーバークラスターにより、リードデータが得られない場合がある。不慣れな施設は、まずは、やや低めの最終濃度で試すほうが安全である。
また、2 nM よりも低い濃度に希釈することは、2 次希釈液への NaOH の持ち込みが多くなる理由でメーカーから推奨されていない。

QIAseq FX DNA Library UDI キットを使用した際のサンプルシートの作成方法について

2025 年 3 月現在、QIAseq FX DNA Library には CDI アダプター付属の製品と Unique Dual Index（UDI）アダプター付属の製品が販売されている。このうち CDI アダプターはイルミナ純正の TruSeq キットと同一のインデックス配列であるため、イルミナ NGS に付属の Local Run Manager (LRM)の初期状態でインデックスの指定が可能である。一方で、UDI アダプターキットのインデックス配列は QIAGEN 独自の配列であるため、LRM には配列が登録されておらずサンプルシートの作成が困難である。そこで、LRM に UDI アダプターキットのインデックス配列を登録するための手法を掲載する。

- 別添の 4 種類のテキストファイルを USB メモリ等の外付けドライブに保存し、イルミナ NGS（iSeq または MiSeq）に接続する。
- LRM を立ち上げ、TOOLS→Library Prep kit を選択する
- Add Library Prep Kit を押し、目的のテキストファイルを選択する（使用するキットによって必要に応じて A～D まで 4 回繰り返す）＊通常 A キットしか使用しないという施設は A のみ登録すると間違いがなくて良い。
- サンプルシート作成画面に行き、QIAseq の UDI キットが選択できるようになっていれば成功（ウェルポジション指定で自動的に R1 と R2 のインデックス配列が入力される）

ゲノム解析ワーキンググループメンバ

池田徹也　　北海道立衛生研究所
瀬戸順次　　山形県衛生研究所
大澤修一　　茨城県衛生研究所
塚越博之　　群馬県衛生環境研究所
江原勇登　　埼玉県衛生研究所
久保田寛顕　　東京都健康安全研究センター
中嶋直樹　　神奈川県衛生研究所
金谷潤一　　富山県衛生研究所
鈴木雅和　　愛知県衛生研究所
髙橋剣一　　名古屋市衛生研究所
若林友騎　　地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
野本竜平　　神戸市健康科学研究所
平塚貴大　　広島県立総合技術研究所保健環境センター
亀山光博　　山口県環境保健センター
平井真太郎　　愛媛県立衛生環境研究所
重村洋明　　福岡県保健環境研究所
グループ長：地全協　精度管理部会員　神戸市健康科学研究所　岩本　朋忠

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。
厚生労働行政推進調査事業費補助金　健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升　健志）

Appendix

1. Fragmentation における Lid 温度および反応時間の影響について

本マニュアル 3. ライブラリ作製の Fragmentation については、公式マニュアルでは input DNA 量の違いにより 2〜30 分という記載になっている。本マニュアルでは input DNA 量を 50 ng に固定しているため、反応時間が断片化に与える影響は大きい。そのため、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、反応時間による断片化の進行具合を検証した。なお、検討は以下の試薬および機器を使用し、本マニュアルの作業手順に従って実施した。

DNA 抽出試薬：DNeasy Blood and Tissue kit （QIAGEN）

サーマルサイクラー：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch TP350 (タカラバイオ)

キャピラリー電気泳動：Agilent 2100 Bioanalyzer (アジレント・テクノロジー)

Agilent High Sensitivity DNA キット(アジレント・テクノロジー)

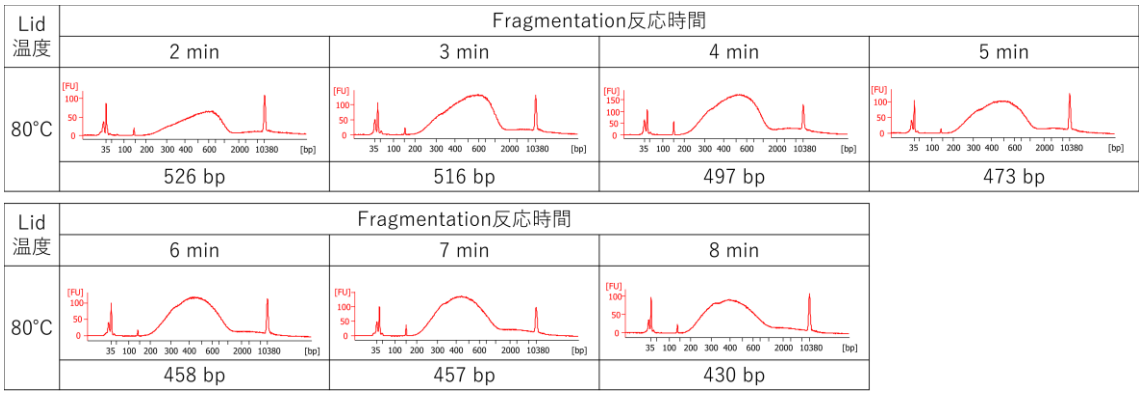


図 1. Fragmentation の反応時間における断片化の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

断片化は反応時間 3 分でも十分進行しており、ライブラリ作製に適していると考えられた。MiSeq を使用してリードデータを取得する場合、片側 250 または 300 bp となるペアエンドリードを想定するケースが多いため、少し長めの断片を残存させる条件で反応時間を設定することを推奨する。

続いて、Lid 温度が断片化に与える影響について検証した。同様に大腸菌 ATCC25922 株を用いて Lid 温度を 70℃、80℃、105℃に設定し反応を行った。105℃については Fragmentation 反応中に Lid を開放した状態と閉めた状態の 2 条件で検証を行った。その結果を図 2 に示す。70℃、80℃、105℃（開放）では断片化の進行に大きな違いは見られなかったが、105℃で閉めた場合は若干断片化の進行が早くなる傾向が認められた。しかし、その影響は軽微であり、Lid を開放した条件では他と差がないため、Lid 温度を調節可能なサーマルサイクラーを所持しない施設は参考にしていただきたい。

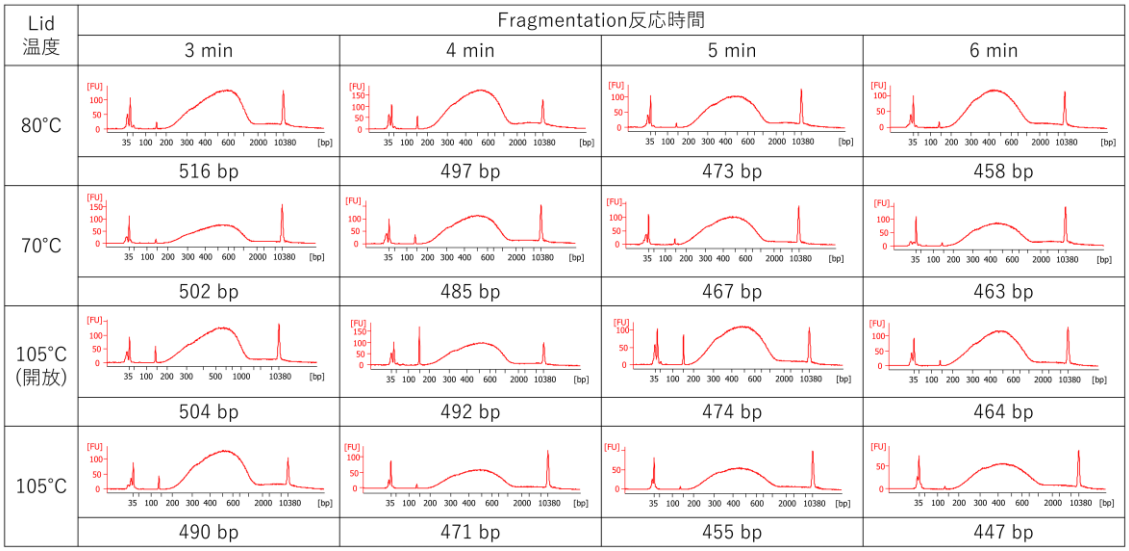


図 2. Lid 温度の違いによる Fragmentation 反応の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

2. ライブラリ精製方法の違いによるリードデータへの影響について

本マニュアル 4. ライブラリのサイズセレクションの項でも述べたように、ライブラリの精製やサイズセレクションはその後の解析に影響を与える重要な工程である。キットの公式マニュアルでは磁性ビーズによる精製手法が記載されている。この手法は簡便であるが、ライブラリサイズの推定が難しい点や、ライブラリサイズがブロードに広がってしまうという難点がある。このことは、想定を大幅に逸脱したサイズのフラグメントが混ざることで、クラスターの形成不全や、解析サイクルの後半部分でのリードのクオリティ低下を招くことにつながってしまう。一方で、電気泳動によるゲル抽出での精製方法は、工程としては煩雑になるものの、目的のサイズのライブラリのみを収集できるため、ライブラリサイズの推定が容易で質の良いリードデータを再現性良く取得することが可能となる。

本マニュアル作成に際し、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、ビーズ精製とゲル抽出の違いによるライブラリの状態と取得したリードデータの違いについて検証したので参考にしていただきたい。

両手法によるライブラリサイズの分布の解析結果を図 3 に示す。ゲル抽出精製が 550bp 付近で比較的シャープな山を形成しているのに対し、ビーズ精製ではアダプターダイマーやプライマーダイマーなどは見られなかったものの、山がブロードで 1000 bp を超えるサイズのフラグメントも残存しているのがわかる。

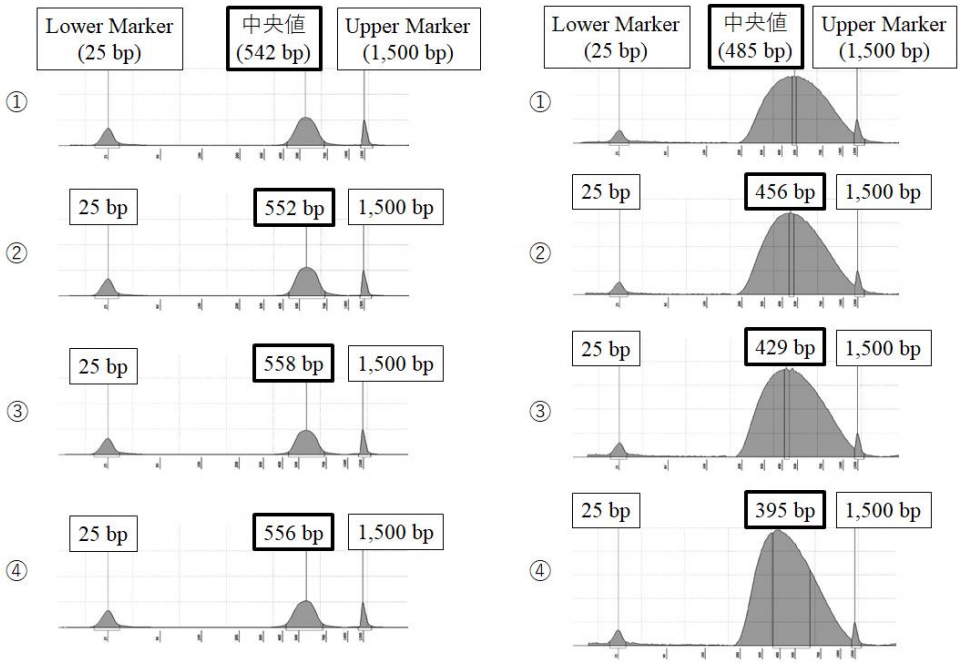


図 3. ライブラリサイズの分布。ゲル抽出（左）とビーズ精製（右）を TapeStation により解析した

1000 bp を超えるフラグメントは MiSeq のクラスター形成過程において Bridge PCR がうまくいかずクラスター形成不全を引き起こす。そのため、想定したライブラリの DNA 濃度

から推定したライブラリの想定クラスター密度と実際の密度の乖離が大きくなってしまう可能性がある。

続いて、作製したライブラリから MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてリードデータを取得し、fastp v0.23 によるトリミングを実施した。その結果、リード数の残存率はトリミングの前後でどちらの手法も 98%となり大きな違いはなかったが、残存した総リード長はゲル抽出が約 94%であるのに対し、ビーズ精製は約 74%しか残存せず、大きく差がついた（Table 1）。これはビーズ精製ではリードの後半部分のクオリティが急激に落ちることが原因と考えられる。

Table 1. トリミング前後でのリード数と総リード長の残存率

	残存リード数割合（%）	残存総リード長割合（%）
ビーズ精製	98.4	73.5
ゲル抽出精製	98.1	93.7

図 4 に示す通り、170 サイクル付近からビーズ精製のリードはクオリティの低下が確認される。これは insert size が短いリードでは反応サイクルの後半でアダプター領域以降を解析してしまうためであり、ライブラリ精製過程で短いフラグメントが残存してしまうことに起因する。

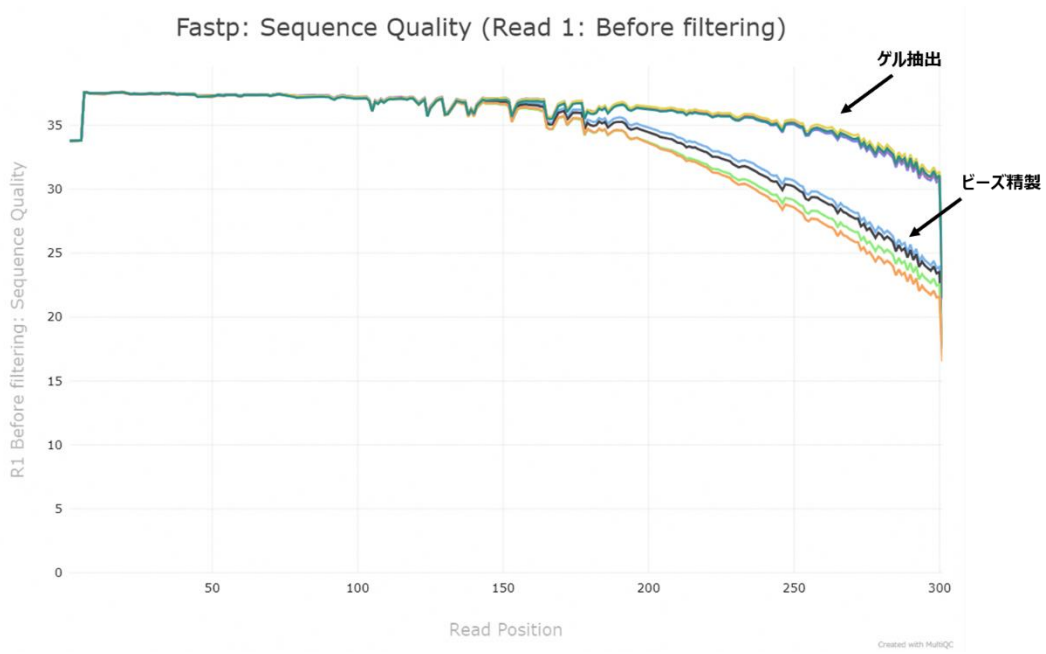


図 4. トリミング前のリードクオリティの推移。X 軸の数字は反応サイクル数と同義

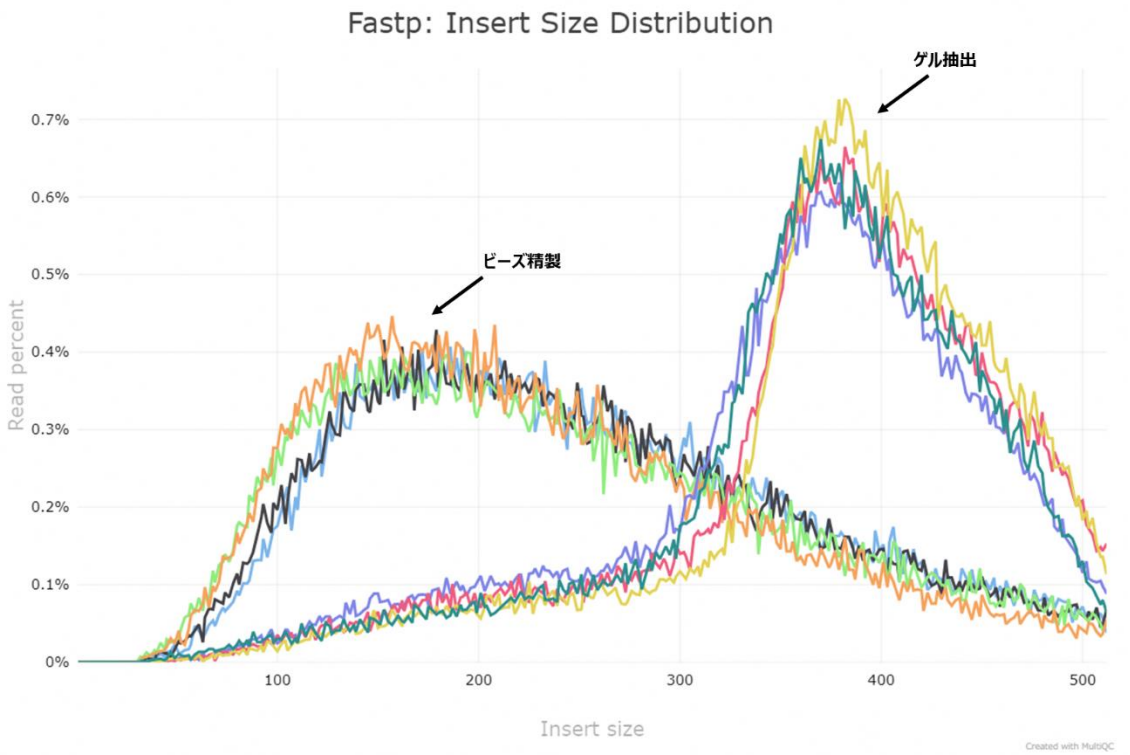


図 5. リードの Insert size の分布

またそれぞれのリードデータの Insert size の分布を図 5 に示した。ゲル抽出のピークは 380 bp 付近であるのに対し、ビーズ精製では 160 bp 付近がピークとなった。500 サイクルや 600 サイクルの Reagent kit で解析する際は短い Insert size では無駄になる部分が多いため得られたデータ量に対し、解析に使用できるデータ量の割合が少ないという問題が生じてしまう。

一方で、今回のリードデータを用いて大腸菌 ATCC25922 株の完全長配列（Accession no. CP009072）をレファレンスとして SNVs 解析を実施したところ、取得した 8 検体間では SNV は検出されず、レファレンス配列に対しては 8 検体とも 2 SNVs が検出された。これは株の継代の際に蓄積された SNV であると考えられる。また、Assembly 結果もビーズ精製の方が若干コンティグ数が多くなる傾向があるが、概ねデータの差異は認められなかった。従って、ビーズ精製とゲル抽出ではインサートサイズなどの違いはあるが、SNVs 解析などでは同様の結果が得られるであろう。ビーズ精製の方がデータのロスが大きくなるため、目標とする解析に合わせて精製方法を選択するよう参考にしていただきたい。

地衛研　エンテロウイルスゲノム解析プロトコル

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

1. 概要

本プロトコルは、以下の参考文献を改変したPCRと次世代シークエンサー(NGS)を用いてエンテロウイルスのゲノム解析を行うことを目的としたものである。

参考文献:Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing:Application for Viral Mixtures. Marie-Line Joffret, et al. Frontiers in Microbiology.September 2018 | Volume 9 | Article 2339

本プロトコルでは、図1のとおりエンテロウイルスゲノムをRT-PCRで5´末端側のFragment 1と3´末端側のFragment 2に分けて増幅し、それぞれの増幅産物を合わせてNGSを用いてゲノムデータを取得する。本プロトコルは、検出感度を得るために参考文献の方法を表1のとおり改変している。また、本プロトコルで用いる試薬を表2のとおり例示する。

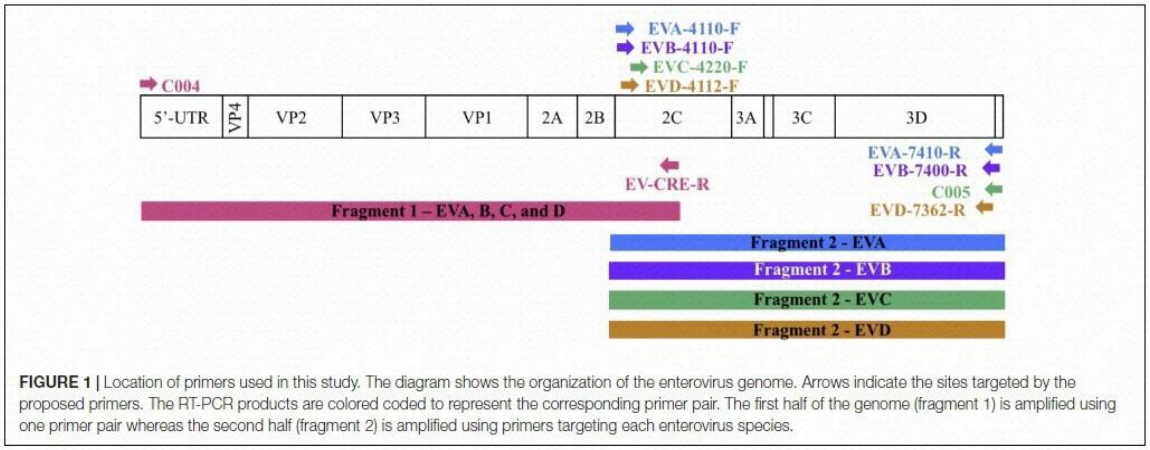


FIGURE 1 | Location of primers used in this study. The diagram shows the organization of the enterovirus genome. Arrows indicate the sites targeted by the proposed primers. The RT-PCR products are colored coded to represent the corresponding primer pair. The first half of the genome (fragment 1) is amplified using one primer pair whereas the second half (fragment 2) is amplified using primers targeting each enterovirus species.

図1　参考文献　Figure 1より抜粋

表1　参考文献の方法からの主な改変箇所

	参考文献	本プロトコル
逆転写反応	One-Step-RT-PCR	RT-PCR
PCR	Multiplex	single 2種類
Fragment 1 の Forward primer	C004	EVP2
Anneling 温度	55℃	一部 45℃

表2 使用試薬リスト（例示）

試薬の種類	品名	メーカー	コードNo	容量
逆転写反応試薬	SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scinetific	18090050	50反応
逆転写反応試薬	Random Hexamers (50 μM)	Thermo Fisher Scinetific	N8080127	5nmol
逆転写反応試薬	dNTP mix (10mM each)	Thermo Fisher Scinetific	18427013	100μl
逆転写反応試薬	RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scinetific	10777019	5000 unit
PCR	EmeraldAmp PCR Master Mix	Takara Bio	RR300A	160回用

1. Random hexamer primer、dNTP、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は例示と異なるメーカーのものを使用しても問題ない。
2. Random hexamer primer ではなく Oligo (dT) primer を用いることもできるが、Random hexamer primer と比較して Fragment 1 の検出感度が下がり、Fragment 2 の検出感度が上がる傾向がある。ウイルス株によっては、Fragment 1 の感度低下が大きく、EV-D68の一部のウイルス株で検出できなくなる例がみられた。
3. 例示されたPCR試薬以外を使用することもできるが、特に Fragment 1 で非特異的増幅がみられるので留意すること。またOne-Step-PCR 試薬を使用し逆転写反応とPCR反応を同時に行うことも可能であるが、こちらも非特異的増幅がみられるので留意すること。
4. EmeraldAmp PCR Master Mix は、過度な凍結融解の繰り返しにより活性が低下する場合がある為、使用頻度が高い場合、いったん融解したものは 4℃保存を推奨する。

2. 対象試料

培養細胞により分離されたエンテロウイルス株を用いる。本プロトコルの検出感度では臨床検体を解析するのは困難である。本プロトコルで増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型は表3のとおり。増幅産物の確認は、ゲノムワーキンググループ各施設が保有している遺伝子型のエンテロウイルス分離3株ずつ（施設BのEV-A71のみ5株）を用いて本プロトコルを実施し、標的とするバンドが検出されることで行った。

表3　増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型

		SPECIES A						SPECIES D
		CV-A2	CV-A4	CV-A6	CV-A10	CV-A16	EV-A71	EV-D68
施設A	Fragment 1		○ ○ ○				○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2		× × ×				× × ○	× × ×
施設B	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ × ○ ○	
	Fragment 2		○ ○ ○	○ ○ ×	× × ○	○ × ×	○ × × × ○	
施設C	Fragment 1					○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2					○ ○ ○	○ ○ ○	
施設D	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設E	Fragment 1	○ ○ ○						
	Fragment 2	○ ○ ○						
施設F	Fragment 1	○ ○ ○	○ ○ ○	× × ×	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2	× ○ ○	○ × ○	× × ×	○ × ×	× × ×	○ ○ ×	
施設G	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設H	Fragment 1						○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2						○ ○ ○	○ ○ ○

		SPECIES B										
		CV-A9	CV-B2	CV-B3	CV-B4	CV-B5	E-3	E-6	E-7	E-11	E-18	E-25	E-30
施設A	Fragment 1									× ○ ○			
	Fragment 2									× × ×			
施設B	Fragment 1												
	Fragment 2												
施設C	Fragment 1					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
	Fragment 2					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
施設D	Fragment 1	○ ○ ○					○ ○ ○	○ ○ ○			○ ○ ○		○ ○ ○
	Fragment 2	× ○ ○					× ○ ○	× × ×			○ ○ ○		○ ○ ×
施設E	Fragment 1								○ ○ ○			○ ○ ○	
	Fragment 2								○ ○ ○			○ ○ ○	
施設F	Fragment 1	○ ○ ○											
	Fragment 2	○ ○ ○											
施設G	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	× × ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
施設H	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	○ × ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			

標的とするバンドが検出されたものを ○ とした

3. RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)等のRNA抽出キットを用いてエンテロウイルスRNAを対象試料から抽出する。Carrier RNAについては、添加していても問題ない。

4. 逆転写反応

本プロトコルでは、SuperScript Ⅳ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) (以下SS4)でRandom hexamer primer を用いる方法を表4－1に示す[注1)]。SS4には Random hexamer primer、dNTP mix (10mM each)、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は付属していないので別途用意が必要となる。

表4-1のとおり反応調製液を作成し、表4－2のとおり 65℃ 5分 反応させた後、少なくても 1分 氷上でインキュベートし、annealed RNA 13μlを作成する。

表4－1

Component	Volume
50 μ M Random hexamer primer	1 μl
dNTP mix (10mM each)	1 μl
Template RNA	11 μl
Total	13 μl

表4－2

temperature	Reaction time
65℃	5 min

表5－1のとおり反応調製液を作成し、annealed RNA 13 μ l と混合する。表5-2の条件で反応させ cDNA を作成する。

表5－1

Component	Volume
5×SSIV Buffer	4 μl
100 mM DTT	1 μl
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 μl
SuperScirpt IV Reverse Transcriptase (200U/μL)	1 μl
annealed RNA	13 μl
Total	20 μl

表5－2

temperature	Reaction time
23℃	10 min
55℃	10 min
80℃	10 min

5. PCR反応

得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行う。参考文献では、Fragment 1 と Fragment 2 の primer を混合してPCRをしているが、Fragment 1 と Fragment 2の検出感度が異なること、非特異的増幅がみられることがありバンドの切り出しを必要とする場合があることから、本プロトコルではFragment 1 と Fragment 2を分けてPCRを行う。本プロトコルでは、非特異的増幅が少なかったことからPCR試薬に EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio) を使用する。

5－1. Fragment 1 のPCR

Fragment 1 のPCRでは、検出感度が低いこと、ウイルス株によっては検出ができないことから、Forward primer を参考文献の C004 から EVP2 に変更している。EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されている primer である[注2)]。表6－1のとおり反応調製液を作成し、表6－2の条件で反応させる[注3)]。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い4060bp前後にバンドが認められるか確認する。用いる primer 配列は表10のとおり。

表6－1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 µl
10µM Forward primer EVP2 (Final conc 200nM)	0.5 µl
10µM Reverse primer EV-CRE-R (Final conc 200nM)	0.5 µl
Nucleotide Free Water	9.5 µl
cDNA	2 µl
Total	25 µl

表6－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
55℃	30 sec	×30 cycle
72℃	4 min 30 sec	

5－2. Fragment 2 のPCR

Fragment 2 のPCRは、エンテロウイルスの種（EV-A、EV-B、EV-C、EV-D）により用いる primer が異なる。また、EV-A と EV-D のPCRでは、アニーリング温度を参考文献の 55℃ では増幅がみられなかったことから 45℃ に変更している。EV-Cについては、ウイルス株を用いた検証を行っていない為、本プロトコルでは示さない。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い標的とするバンドの有無を確認する。得られる遺伝子増幅産物は、どのPCRでも3300bp 前後である。用いる primer 配列は表10のとおり。

5－2－1. Fragment 2 EV-A のPCR

表7－1のとおり反応調製液を作成し、表7－2の条件で反応させる。

表7－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVA-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVA-7410-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表7－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
45℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

5－2－2. Fragment 2 EV-B のPCR

表8－1のとおり反応調製液を作成し、表8－2の条件で反応させる。

表8－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVB-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVB-7400-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表8－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
55℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

5－2－3. Fragment 2 EV-D のPCR

表9－1のとおり反応調製液を作成し、表9－2の条件で反応させる。

表9－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVD-4112-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVD-7362-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表9－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
45℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

表10 各 primer の配列

PCR	Primer name	5´-3´ Sequence	Position
Fragment 1	EVP2	CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT	※1
	EV-CRE-R	CGGBRTTTGSWCTTGAACTG	※2
Fragment 2	EVA-4110-F	AARAARTTYAAYGAYATGGC	4110 - 4130※3
EV-A	EVA-7410-R	TTTGCTATTCTGGTTATAAC	7410 - 7390※3
Fragment 2	EVB-4110-F	GGCGNTGGCTYAARCRAARG	4110 - 4130※4
EV-B	EVB-7400-R	GCACCGAATGCGGAGAATTTAC	7400 - 7378※4
Fragment 2	EVD-4112R	GGCTAKCMCAAAAGATWGAC	4112 - 4132※5
EV-D	EVD-7362-R	CCAAKTRACCAAAATTTACC	7362 - 7342※5

※1 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 452 - 476
CV-B4 E2 (AF311939) : 450 - 474
EVD-68 Femon (AY426531) : 445 - 469

※2 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 4418 - 4437
CV-B4 E2 (AF311939) : 4375 - 4394
EVD-68 Femon (AY426531) : 4390 - 4409

※3 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065)

※4 CV-B4 E2 (AF311939)

※5 EVD-68 Femon (AY426531)

6. 遺伝子増幅産物の精製

Fragment 1 、Fragment 2 それぞれのPCRで得られた遺伝子増幅産物を電気泳動し、標的バンドが認められるか確認する。標的バンドが認められたら、QIAquick PCR Purification Kit等による精製、もしくは AMPure XP（Beckman Coulter）等による磁気ビーズ精製を行う。また、非特異的バンドが確認されず、明瞭な標的バンドが認められていれば、遺伝子増幅産物をNucleotide Free Water等で5倍程度希釈することで精製工程を省略することができる。明瞭な非特異的バンドが認められた場合、標的バンドの切り出しとQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)等を用いた精製を行うことで、標的遺伝子以外によるゲノムデータ圧迫を抑えることができる。

7. Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物の混合

精製した Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物を Qubit dsDNA HS Assay Kit 等でDNA濃度を測定する。Fragment 1 と Fragment 2 で同程度の濃度になるように調製して混合する。複数の検体を同時に解析する場合は、検体間で同程度の濃度に調製しておいた方がよい。

8. ライブラリ調製

新型コロナウイルスゲノム解析プロトコル（国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター）に記載されている NGSライブラリ調製（QIASeq FX）の手順に従いライブラリ調製を行う。

9. シーケンシング

Illumina NGS のマニュアルに従い、ライブラリを希釈し、カートリッジにロードする。

10. ゲノムデータ解析

得られた Fastq データを用いてゲノム解析を行う。

注記

1. 多くの施設で使用しているPrimeScript RT Reagent kit（Takara Bio）、LunaScript RT SuperMix Kit（NEB）の使用は避けた方が良い。
2. EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されているVP4-VP2-semi-nested RT-PCRの1st PCR で 使用されている。元の文献は以下のとおり。
   Rotbart, H. A. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol 28, 438-442, doi:10.1128/jcm.28.3.438-442.1990 (1990).
3. Fragment 1 と Fragment 2 で検出感度が異なる為、Fragment 1 PCRの primer 濃度、cycle 数、template 量を変更して検出感度を調整している。

Appendix

1．本プロトコルで Fragment 2 の PCR 増幅不良の場合における代替法の一例

ワーキンググループ内の検証において、本プロトコルに記載した試薬類を使用した際に Fragment 2 の増幅がみられない施設が散見された。こういったケースにおいて異なる試薬を使用した場合の PCR 増幅についての事例を紹介するので解析を実施する際の参考にされたい。なお、RNA 抽出までは 3．と同様の手順で実施し、使用したプライマー配列も同一のものである。また、検証は EV-B の特定の種においてのみ実施したものである。

1-1．使用試薬および機器

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara, #R026A)

1-2．Fragment 2　EV-Ｂ　のPCR

表S1-1のとおり反応調製液を作成し、表S1-2の条件で反応させる。

表S1-1

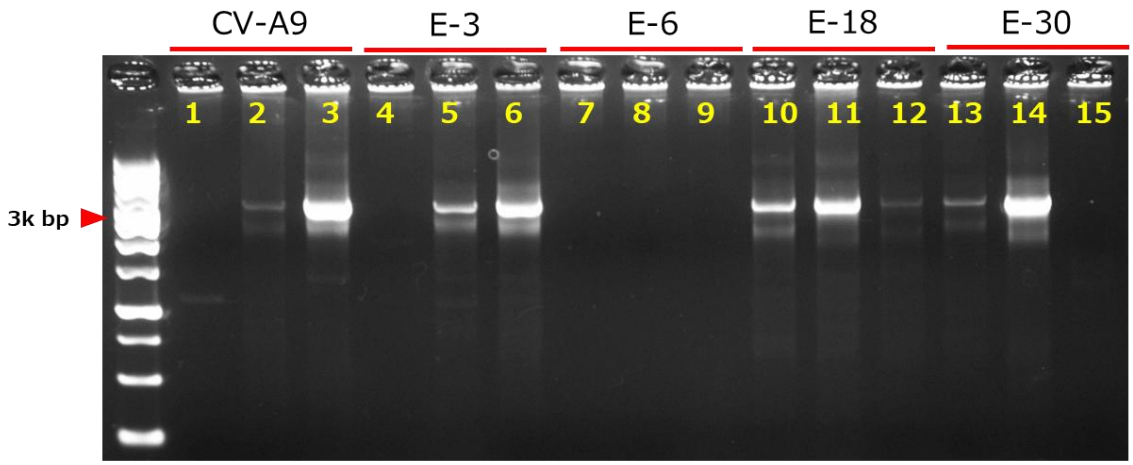
component		Volume
Nucleotide Free Water		3.0 µl
2 × 1 step High Fidelity Buffer		12.5 µl
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR		2.0 µl
PrimeScript II RT Enzyme Mix		0.5 µl
10µM Forward primer EVB-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVB-7400-R	(Final conc 400nM)	1 µl
RNA		5 µl
Total		25 µl

表S1-2

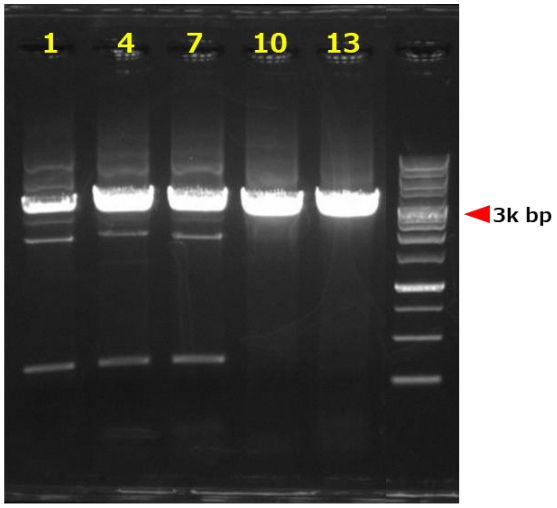
Temperature	Reaction time	
45℃	15 min	
94℃	2 min	
98℃	10 sec	
55℃	15 sec	×40 cycles
68℃	1 min	

1-3. PCR結果の比較

プロトコル本文の方法（以下、本法）で実施したFragment 2のPCR結果を図S1、PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（以下、検証法）を使用して実施したPCR結果を図S2に示す。なお、検証法は各遺伝子型から1検体ずつを選抜して実施した。泳動図の検体番号はそれぞれ同一検体である。この検証は 1 施設のみで実施したものであり、施設間誤差や使用する機器の違いは考慮されていない。



図S1．本プロトコルに従い実施したFragment 2の泳動図



図S2．PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kitを使用して実施したFragment 2の泳動図

本法で増幅不良であった検体番号1, 4, 7, 13について十分な増幅が確認された。一方で非特異増幅も複数確認された。また、図では示していないが、Fragment 1についても同じ試薬で検証したところ、増幅は確認されたものの、本法で実施した結果よりも非特異増幅が多かった。

地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル

QIAseq FX DNA Library kit 編

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

＊本マニュアルの内容に関する質問、問い合わせは、下記のゲノム解析ワーキンググループメーリングリスト宛にお願いします。

genome_working_group-ml-bounces￥chieiken.gr.jp

（￥を@に変更してください）

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

変更履歴

・初版作成（2025 年 3 月 19 日）

ゲノム DNA ライブラリ作製手順の概要

Fragmentation
（ゲノム DNA の断片化処理）

↓

Adapter ligation
（各サンプルへのインデックスとアダプターの付与）

↓

Clean up and Elution
（ライゲーション後の溶液の精製）

↓

Library amplification
（ライブラリの PCR 増幅）

↓

Library size selection
本マニュアルでは、磁性ビーズによる方法とアガロースゲル電気泳動ゲル切り出しによる方法を併記した。

↓

ライブラリの定量、モル濃度計算

↓

ライブラリ変性、イルミナシーケンサーのラン

１．試薬・装置

試薬等 消耗品

- DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN)等　同等品
- QIAseq FX DNA Library Kit 各種 （QIAGEN：180475 等）
- Qubit dsDNA HS Assay Kit （ThermoFisher：Q32854 等）
- Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）同等品
- Illumina 社 シーケンシングキット （300-cycle 以上可能なものを推奨 ）
- QIAGEN 社 Buffer EB
- 80%エタノール溶液（用時調整）
- 低吸着性エッペンチューブ（1.5 ml）
- 100 mg/mL RNase A （ニッポンジーン）　同等品
- アガロース S （ニッポンジーン）等　同等品
- ×10,000 GelRed（ニッポンジーン）等　同等品
- 100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）等　同等品
- × 1　TAE buffer：用時調製
- FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）
- QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）等　同等品
- 3M 酢酸ナトリウム水溶液（pH5.0）
- イソプロパノール

器具・機器等

- Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher)
- Illumina 社シーケンサー
- PCR Thermal Cycler 各種（ヒートリッドの温度制御可能なものが望ましい）
- AMPure XP 精製用磁石スタンド（Fast Gene Magna Stand 等）
- 卓上ミニ遠心機・プレート遠心機（スピンダウン用）
- 8 連チューブ用あるいは 96well プレート用アルミブロック
- 電気泳動装置：MupidR-exU（株式会社ミュービッド）あるいは同等品
- LED トランスイルミネーター：FAS-V （日本ジェネティクス） あるいは同等品
- その他基本的な実験器具類

２．ゲノム DNA 抽出

2-1.　ゲノム DNA 抽出（細菌）

菌種に応じた適切な培養条件で培養した菌体についてゲノム DNA を抽出する。一例として、DNeasy Blood and Tissue kit （QIAGEN）を使用した方法を紹介する。

1. 純培養した菌体を回収し 180μL の Buffer ATL でペレットを再懸濁する（グラム陽性菌の場合は前処理で菌体溶解のために追加のステップが必要となる。詳細はキットのマニュアルを参照)。
2. Proteinase K 20 μl を添加後、ボルテックス操作して混和し、組織が完全に溶解するまで 56℃でインキュベートする（1 時間～一晩)。
3. 4 μL の RNase A（100 mg/ml）を添加しボルテックス操作で混和、室温（15 ～ 25℃）で 2 分 間インキュベートする。
4. 15 秒間ボルテックス混和する。200 μl の Buffer AL を添加し、ボルテックス操作で十分に混和する。200 μL のエタノール（96 ～ 100%）をサンプルに添加し、再びボルテックス操作で十分に混和する。
5. 混合液（形成した沈殿物を含む）を、キットに添付されている新しい 2 mL コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column に移す。6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
6. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、 500 μL の Buffer AW1 を添加後、6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心分離する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
7. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、 500μL の Buffer AW2 を添加後、20,000 x g （14,000 rpm）で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させる。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
8. DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し、50～100 μL の Buffer EB を DNeasy メンブレン上に添加する。室温（15～25℃）で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心分離し、ゲノム DNA を溶出する。

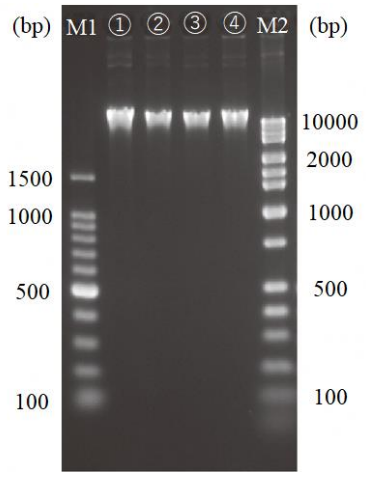
【ゲノム DNA の品質評価】

・アガロースゲル電気泳動で主に 10 kbp 以上の高分子DNA が観察されること（下図参照）

オプション

NanoDrop 等の分光光度計での吸光度測定が可能であれば、A260/A280 が 1.7 以上であることを確認するとよい。ただし、A260 から換算した DNA 濃度は後述の Qubit による測定結果とは一致しないことが多い。DNA 濃度調製は、Qubit 等の蛍光色素を用いて二本鎖 DNA 濃度を正確に定量可能な機器の測定結果を元にすること。ただし、本マニュアルは Qubit を使用した検討結果に基づいており、Qubit 以外の蛍光試薬を用いる場合は濃度設定について事前に検討することを推奨する。

（参考図　大腸菌 ATCC25922 株 DNA のアガロースゲル電気泳動例）



泳動条件：100V、30 分
泳動装置：Mupid-exU（タカラバイオ）
泳動 Buffer：×0.5 TBE
染色方法：Gel-Red
アガロース濃度：2%
M1：100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）
①～④：大腸菌 ATCC25922 株
M2：Wide-range DNA Ladder（タカラバイオ）

2-2.　DNA 濃度測定

Qubit 試薬を用い、製品取扱説明書に従って濃度測定を行う。Qubit での測定範囲外（Out of range）となった場合は適宜希釈して再測定する。ゲノム DNA は、Buffer EB（QIAGEN）で 20 ng/μL に希釈し、ライブラリ作製に用いる。

【注釈】メーカー使用説明書では、Qubit 試薬は 6 ヶ月間安定と記載されている。

操作例：

【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit　（Thermo Fisher Scientific）

Qubit Assay Tube　（Thermo Fisher Scientific）

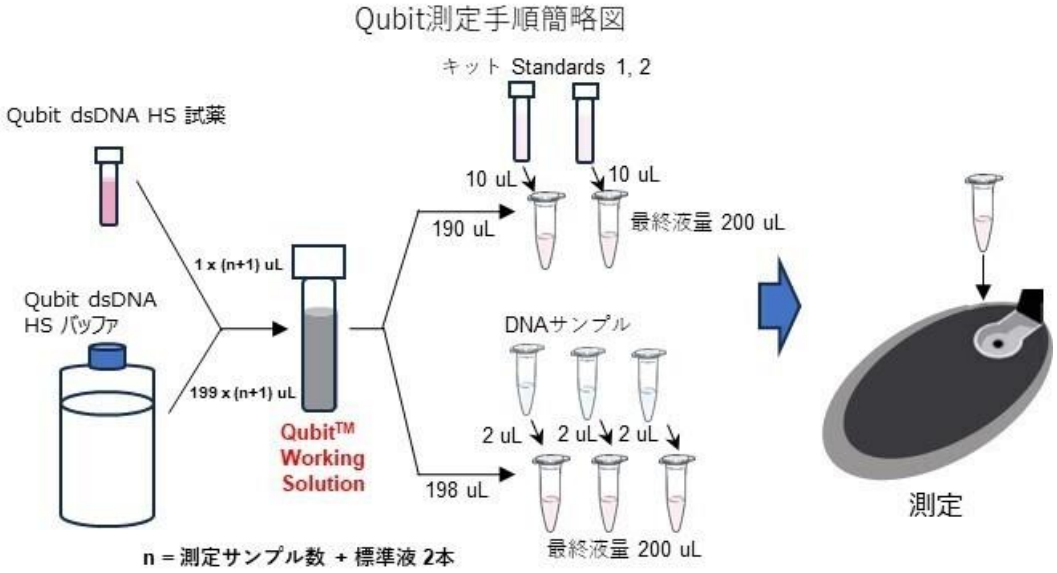
【手順】

・　下図（Qubit 測定手順間略図）を参考に、標準液 (standard #1, standard #2)と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。検体数を n として、Qubit Reagent n+2 μL、Quant-IT Bufer 199×(n+2) μL を混合する。

・ Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 μL を分注する。

・　Qubit DNA HS Standard #1、#2 10 μL を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。

・　DNA サンプル 2 μL に Qubit working solution 198 μL を加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。



（サーモフィッシャー社 Qubit 2.0 Fluorometer カタログを参考に作図）

３．ライブラリ作製

QIAseq FX DNA Library Kit （QIAGEN）

*本マニュアルでは、キットのプロトコルの 1/2 スケールで実施する。

* Clean up and Elution を除く全ての作業を氷上のアルミブロック上で実施する。

※検体数が多い場合は全ての作業について、各マスターミックスや AMPure Beads を 8 連チューブに必要量分注しておき、8 連ピペットを用いて反応チューブに分注・ピペッティングするとサンプル間の時間差や試薬の入れ忘れ、コンタミネーションのリスクが軽減できる。

注意点

本製品は各アダプターが使いきりであり、アルミプレートシールで封をされた 96well プレートに入っている。本プロトコルは 1/2 スケールで実施する関係上、アダプター全量を使用しないため、一度解凍して 8 連チューブなど別の容器に移して再凍結保存（-20℃以下）しておき、必要分だけ取り出して使用することを推奨する。ただし、飛沫によるアダプター同士の交差汚染を防ぐため 96well プレートの遠心操作は必須であり、また、アルミプレートを剥がす場合は交差汚染の防止に細心の注意を払うこと。

3-1. Fragmentation（ゲノム DNA の断片化処理）

・サンプル分の 0.2 mL PCR チューブ もしくは 96 well PCR プレートを用意

・下記の Fragmentation マスターミックスをサンプル数+α 反応分となるように調製する。

試薬	容量（1 検体あたり）
Nucleotide Free Water	15.0 μL
Fx Buffer, x10	2.5 μL
Fx Enzyme Mix	5.0 μL
Total	22.5 μL

※調製後のマスターミックスはボルテックス厳禁

・マスターミックスを 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する。

・20 ng/μL に調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え、8 連ピペットの目盛りを 10 μL に設定して 10 回以上ピペッティングする

・スピンダウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

4℃	1 min
32℃	3 min
65℃	30 min
4℃	1 min

※ ヒートリッド温度が変更可能な機種であれば 80℃に設定する（注釈参照）
※ 試薬調整前にプログラムを開始し、4 ℃ で pause しておくとよい

・反応終了後、すぐに PCR チューブをスピンダウンし氷上のアルミブロック上に置く。

注釈

QIAGEN のマニュアルではヒートリッド温度は 70℃と記載されている。これはヒートリッドが高温の場合、32℃の Fragmentation の工程に影響が出るためであるが、本プロトコルでは SARS-CoV-2 のゲノム解析マニュアルの記載に倣い 80℃とした。リッド温度が変更できない機種の場合は、32℃反応中、リッド(蓋)を開放して、65℃のステップになってからリッドを閉めることを推奨する。また、リッド温度を 70℃～105℃設定で反応させた場合の断片化の経時的変化を巻末に参考データとして記載している（Appendix 図 1、2）。

3-2. Adapter Ligation（各サンプルへのインデックスとアダプターの付与）

試薬	容量（1 検体あたり）
Nucleotide Free Water	7.5 μL
DNA Ligation Buffer, x5	10.0 μL
DNA Ligase	5.0 μL
Total	22.5 μL

- 上記 Ligation マスターミックスをサンプル数+α反応分となるよう調製し、新しい 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する
- 対応するアダプターを 2.5 μL 加え、数回ピペッティング
- Fragmentation 後の DNA を全量（25 μL）加え、ピペッティング（20 回以上）で十分混和する。

・　スピンダウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

20℃	15 min

※ヒートリッドは 20℃、もしくは開放する

※試薬調整前にプログラムを開始し、20℃ で pause しておくとよい

・　反応中に Agencourt AMPure XP beads を冷蔵庫から室温に出しておく

注意点

DNA Ligation Buffer は非常に粘性が高い液体のため、以下の手順で十分に Mixture を混合することを推奨する。これらの混合が不十分の場合はライブラリの質が低下する。

・Nucleotide Free Water と DNA Ligation Buffer, x5 を混合後、ボルテックスで十分混合した後、Ligase を加えてタッピングあるいはピペッティングで混合し Ligation マスターミックスとして使用する。

3-3. Clean up and Elution （磁性ビーズ精製２回による、未反応アダプター等の除去）

（用意するもの）

Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）

80%エタノール（用時調製）

0.2 mL チューブ用マグネットスタンド（日本ジェネティクス社など）

・AMPure Beads を室温に戻しておく。

＜１回目の精製＞

・AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和し、底部に沈んでいる磁気ビーズを均一化させる。

・AMPure Beads を 40 μL （0.8 倍量）ずつ加え、ピペッティングで混和する。

・室温で 5 分間静置する。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間程度（上清がクリアになるまで）静置する。

・ビーズに触れないように上清を取り除く。

・チューブをスタンドに設置したまま、200 μL の 80%エタノールを加える。

・30 秒間静置後、上清を取り除く。

・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回)。

・上清を除き、マグネット上で 3 分間程度静置し、ビーズを乾燥させる(乾燥させすぎ注意)。

・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、25 μL の buffer EB を加える。

・ピペッティング後、スピンダウンする。

※ここの過程のビーズは固まりやすく、分散しづらいのでよくピペッティングすること。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。

＜２回目の精製＞

・AMPure Beads をボルテックスで十分混和する。

・AMPure Beads を 27.5 μL （1.1 倍量）ずつ、回収した上清に加え、混和する。

・室温で 5 分間静置する。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間程度（上清がクリアになるまで）静置する。

・ビーズに触れないように上清を取り除く。

・チューブをスタンドに設置したまま、200 μL の 80%エタノールを加える。

・30 秒間静置後、上清を取り除く。

・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回)。

・上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。

・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、13 μL の buffer EB を加える。

・ピペッティング後、スピンダウンする。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を 11.75 μL 回収する。

3-4. Library Amplification（ライブラリの PCR 増幅）

試薬	容量（1 検体あたり）
Primer Mix （10 μM each）	0.75 μL
Hi-Fi PCR マスターミックス, x2	12.5 μL
Total	13.25 μL

・上記 PCR マスターミックスをサンプル数＋α反応分調製し、転倒混和後スピンダウン。
・13.25 μl を Clean up and Elution で溶出したサンプル(11.75 μL)に添加しピペッティングで混和する。
・スピンダウン後サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う。

98℃	2 min
6 cycles of	
98℃	20 sec
60℃	30 sec
72℃	30 sec
↓	
72℃	1 min

【注釈】この工程を終えた検体について、-20℃保存可能である。

４．ライブラリサイズセレクション

ライブラリの精製およびサイズセレクションはその後の Run の結果に大きく影響する。本マニュアルではアガロースゲル電気泳動後のゲル切り出しによる精製方法と、キットの公式プロトコルに準じた磁性ビーズによる精製方法を記載する。

なお、本工程では既に Index による各サンプルの標識が完了しているので、複数サンプルをプールして実行しても良い。ただし、その際は各個別サンプルの濃度やクオリティについては検証不可となるので注意が必要である。

注釈

それぞれの精製方法によって得られたリードデータの質や、注意点などについては巻末の Appendix で解説しているのでどちらの手法を採用するかの参考にしていただきたい。ただし、磁性ビーズを使用した精製方法では Bioanalyzer や MultiNA、TapeStation 等の、キャピラリー電気泳動装置のスメア解析機能によるライブラリサイズの把握が必要となるため、それらの装置を保有していない施設ではゲル切り出しによる精製方法を選択することを推奨する。

4-1. 電気泳動によるゲル切り出し（**4-2 ビーズ精製を選択する場合は不要**）

（用意するもの）

- ゲル切り出し用トランスイルミネーター：BLooK LED Transilluminator（GeneDireX）等同等品（DNA 損傷の観点から UV イルミネーターは非推奨）
- アガロース S （ニッポンジーン）等　同等品
- ×10,000 GelRed（ニッポンジーン）等　同等品
- 100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）等　同等品
- × 1　TAE buffer：用時調製
- FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）
- QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）等　同等品
- イソプロパノール

（ゲルの作成方法）

＊状況によっては泳動する溶液量が多いため、厚めのゲルを作製するとよい。ゲルが厚いと後染めでは染まりにくいので、染色方法は先染めを推奨する。

・×1 TAE buffer と 1%重量のアガロースを混合する。
・電子レンジで溶解する。
・50℃の恒温水槽で保温する。
・1/10,000 量の×10,000 Gel Red を混合する。
・コームを立てたゲルメーカーに流し、固まるまで待つ。
・冷蔵庫で十分冷却して、ゲルを完全に固化させる。
・コームを外し、保湿して保存する。　※用事調製する。

（PCR 産物の泳動）

- PCR 反応後の各サンプル（25μL）に×6 Loading Buffer を 5μL 加える。
- 各ウェルにアプライする。
- 両サイドのマーカーレーンに 100bp DNA Ladder を 15μL アプライする。
- 100 V、30 分間程度泳動する。
- ブルーライトのイルミネーター上で泳動像を確認する。
- 500-600bp のサイズを切り出し、2 mL マイクロチューブに回収する。
  （FastGene アガロース ゲルバンドカッターを用いるとよい）

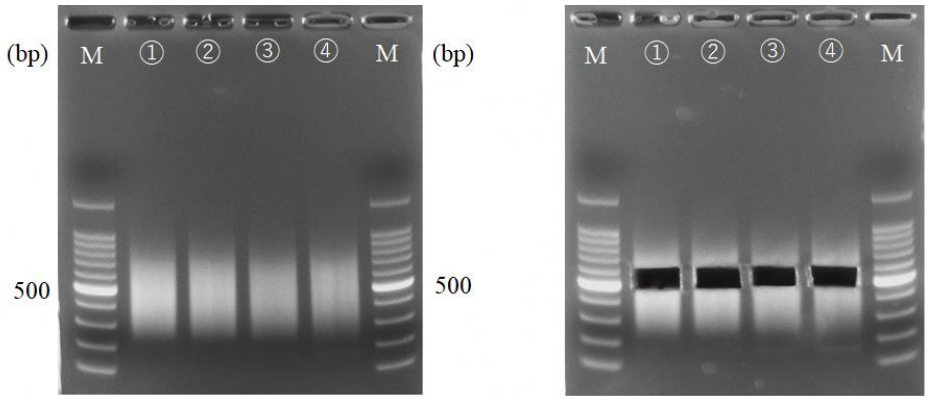
注釈

※複数サンプルをプールする場合は、例えば全量を 36μL となるようにし、×10 Loading Buffer を 4μL 加えてから各ウェルにアプライすること。

（QIAquick Gel Extraction Kit を用いたゲルからの DNA 抽出）

- 切り出したゲルスライスの重量を測定する。
- 測定した重量の mg を μL と見立て、3 倍量の Buffer QG を加えてボルテックスする。
- 50℃のヒートブロック上で時折ボルテックスしながら 10 分間溶解する。
- 溶液の色がオレンジ色、あるいは紫色となった場合は 3M 酢酸ナトリウム水溶液を 10μL 加えてボルテックスする。
- ゲル重量と同量のイソプロパノールを加えてボルテックスする。
- QIAquick カラムに溶解したサンプルを入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- Buffer QG を 500μL 入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- Buffer PE を 750μL 入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- カラムに何も入れないまま遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、1.5mL のマイクロチューブを取り付ける。
- メンブレンの中央に 30μL の Buffer EB を添加し、1 分間静置する。
- 遠心してマイクロチューブ内に溶出された DNA を回収する。
- 完成したライブラリーは、-30℃で 1 ケ月程度保存可能

（参考図　大腸菌 ATCC25922 株における切り出し前後のゲル画像例）



左：切り出し前　右：切り出し後
ライブラリ調製キット：QIAseq FX DNA Library UDI-A Kit
泳動条件：100V、30 分　　泳動装置：Mupid-exU（タカラバイオ）
泳動 Buffer：×1 TAE　　アガロース濃度：1%　#Gel-Red 先染め
切り出し用トランスイルミネーター：BLooK LED Transilluminator（GeneDireX）
ゲルカッター：FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）

M：100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）
①～④：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

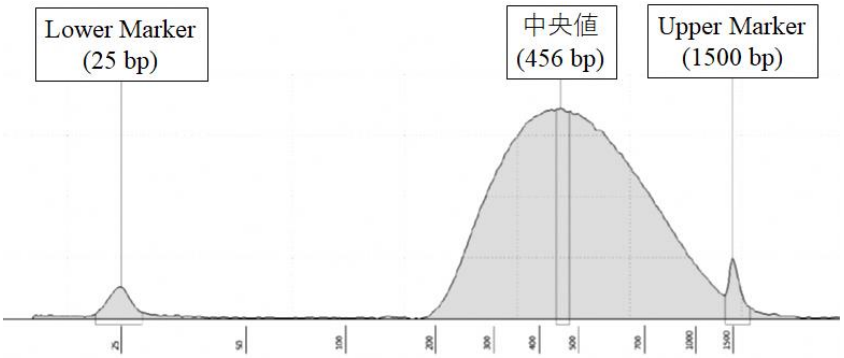
4-2. ビーズ精製**（4-1. 電気泳動によるゲル切り出しを選択した場合は不要）**

Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）等　同等品
80%エタノール（用時調製）
0.2 ml チューブ用マグネットスタンド（日本ジェネティクス社など）

・AMPure Beads を室温に戻しておく。
・AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和する。
・AMPure Beads を 30 µL（1.1 倍量）ずつ加え、ピペッティングで混和する。
・室温で 5 分間静置する。
・マグネットスタンドに設置し上清が清澄化するまで 2 分間程度静置する。
・ビーズに触れないように上清を取り除く。
・チューブをスタンドに設置したまま、200 µL の 80%エタノールを加える。
・30 秒間静置後、上清を取り除く。
・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回）。
・上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。
・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、30 μL の buffer EB を加える。
・ピペッティング後、スピンダウンする。
・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。
・Bioanalyzer や MultiNA 等のキャピラリー電気泳動装置のスメア解析機能によりライブラリサイズの分布を確認し、中央値を控えておく。
・完成したライブラリーは、-30℃で 1 ケ月程度保存可能

（参考図　ビーズ精製後のスメア解析例）



使用機種：Agilent 2200 TapeStation（アジレント・テクノロジー）
使用キット：High Sensitivity D1000
分析サンプル：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

５．ライブラリ定量

5-1.　Qubit によるライブラリ DNA 濃度測定

【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit （Thermo Fisher Scientific）

Qubit Assay Tube （Thermo Fisher Scientific）

【手順】

・　本マニュアル 7 ページの Qubit 測定手順間略図を参考に、標準液 (standard #1, standard #2)と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。

・　Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 µL を加える。

・　Qubit DNA HS Standard #1、#2 10 µL を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。

・　精製後の DNA ライブラリ 2 µL に Qubit working solution を 198 µL 加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。

・　後述「ライブラリのモル濃度計算式」を用いてライブラリモル濃度を算出する。

・　Buffer EB（QIAGEN）で 4 nM となるように希釈する。

ライブラリのモル濃度計算式

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{ライブラリの平均サイズ（bp）×660}

例１：500-600bp の範囲でゲル切り出しを行った場合

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{550（bp）×660}

例２：ビーズ精製後、スメア解析の中央値が 400bp だった場合

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{400（bp）×660}

注釈

算出されたライブラリモル濃度が 4nM に満たない場合は、2nM になるように Buffer EB で希釈し、「６．ライブラリ変性等 Run 関係：MiSeq での Run 時の変性・希釈作業」において 2nM を初期値とした手順に移ることが可能である。ただし、その場合は、同時に Run する全ての検体を 2nM に希釈する必要がある。

5-2. qPCR 法による定量（通常は行わない）

注釈

Qubit での定量値で想定通りのデータが得られなかった場合、より精度の高い定量法である qPCR 法での定量を行い、原因を推定する。qPCR 法としては、イルミナシーケンサーで用いられている P5、P7 配列をターゲットとした市販のキットが複数販売されている。本マニュアルでは、Itokawa らの qPCR 法によるライブラリ定量法を掲載する（5-2 参照）。

https://www.protocols.io/view/illumina-truseq-library-quantification-with-qpcr-p-6qpvrddpzgmk/v1

UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution　Thermo Fisher #15632011

PhiX Control v3　Illumina, Inc. #FC-110-3001

PrimeTime® Gene Expression マスターミックス Integrated DNA Technologies #1055770

・Salmon sperm DNA を 5 ng/μL に調整する。

試薬	容量 （μL）
Nucleotide Free Water	9,889
1 M Tris-HCl, pH 8.0	100
0.5 M EDTA	10
UltraPure DNA Solution 10 mg/ml	5
Total	10 mL

・上記 Salmon sperm DNA（5 ng/μL）を使用し、PhiX コントロールの希釈系列を作成する。

50 pM	100 μL
5 pM	100 μL
0.5 pM	100 μL
0.05 pM	100 μL

・Primer ＆ Probe Mix （20x）を調製する。

Probe	5 nM
P5 primer	5 nM
P7 primer	5 nM

Double-quenched probe （IDT）:

/56-FAM/ACACTCTTT/ZEN/CCCTACACGACGCTCTTC/3IABkFQ/

P5 primer: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

P7 primer: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3’

・ライブラリを Buffer EB で 100 倍または 1,000 倍に希釈しておく。

・qPCR

試薬	容量（μL；1 検体あたり）
Prime Time PCR マスターミックス	10
20x primer & probe mix	1
Nucleotide Free Water	8
希釈ライブラリ or 希釈 PhiX コントロール	1
Total	20 μl

95℃	2 min
30 cycles of	
97℃	5 sec
62℃	10 sec
68℃	15 sec

・得られた結果からライブラリのモル濃度（nM）を算出する。

６．ライブラリ変性等 Run 関係

MiSeq のカートリッジは V2 と V3 で推奨のアプライ濃度が異なる。iSeq 100 も含めた各カートリッジの推奨濃度は下記の通りである。

- MiSeq Reagent kit V2： 10 pM からはじめ、クラスター密度を 1000-1200 K/mm2 になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- MiSeq Reagent kit V3： 12 pM からはじめて、1200-1400 K/mm2 になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- iSeq 100 il Reagent v2： 50～100 pM（変性作業無し）で occupancy が 80～90%を目指して最適化を行ってゆくのが良い。

MiSeq での Run 時の変性・希釈作業

・ 氷を用意しておき、HT1 バッファーとアルミブロックを冷やしておく。
・ ４本の 1.5 ml チューブを用意、それぞれ以下の用途に使用する。

各ライブラリを 4 nM に希釈した場合（推奨）

- チューブ[N]： 0.2 N NaOH 調製用（Nuclease-Free Water 800 µL と 1N NaOH 200 µL を混合）
- チューブ①：１次希釈用
- チューブ②：２次希釈用 （HT1 バッファー990 µL を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）
- チューブ③: ３次希釈用 （HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）

・ チューブ①に ライブラリ溶液を 5 µL 入れておく。
・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 5 µL を チューブ① に加える。
・ Vortex でよく混ぜる（5 秒）。
・ スピンダウンする。
・ 室温で 5 分間インキュベーション（変性）後すぐに 2 次希釈へ進める。
・ １次希釈後のライブラリ溶液（チューブ①） 全量 10 µL を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
・ Vortex でよく混ぜ（10 秒）、3 次希釈へ進める。
・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
・ Vortex でよく混ぜる （5 秒）。
・ チューブ③から 630 µL を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。

上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/200 まで希釈される（4 nM→20 pM）。
チューブ③が計 1000 µL となるように Run したい最終濃度に希釈する（最終を 15pM としたいのであれば、②:750 µL + HT1: 250 µL）。

各ライブラリを 2 nM に希釈した場合

- チューブ[N]： 0.2 N NaOH 調製用（Nuclease-Free Water 800 µL と 1N NaOH 200 µL を混合）
- チューブ①： 1 次希釈用
- チューブ②：2 次希釈用 （HT1 バッファー980 µL を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）
- チューブ③: 3 次希釈用 （HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）

・ チューブ①に ライブラリ溶液を 10 µL 入れておく。
・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 10 µL を チューブ① に加える。
・ Vortex でよく混ぜる（5 秒）。
・ スピンダウンする。
・ 室温で 5 分間インキュベーション（変性）後すぐに 2 次希釈へ進める。
・ 1 次希釈後のライブラリ溶液（チューブ①） 全量 20 µL を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
・ Vortex でよく混ぜ（10 秒）、3 次希釈へ進める。
・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
・ Vortex でよく混ぜる （5 秒）。
・ チューブ③から 630 µL を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。

上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/100 まで希釈される（2 nM→20 pM）。チューブ③が計 1000 µL となるように Run したい最終濃度に希釈する（最終を 15pM としたいのであれば、②:750 µL + HT1: 250 µL）。

注釈

サンプル濃度が高すぎるとオーバークラスターにより、リードデータが得られない場合がある。不慣れな施設は、まずは、やや低めの最終濃度で試すほうが安全である。
また、2 nM よりも低い濃度に希釈することは、2 次希釈液への NaOH の持ち込みが多くなる理由でメーカーから推奨されていない。

QIAseq FX DNA Library UDI キットを使用した際のサンプルシートの作成方法について

2025 年 3 月現在、QIAseq FX DNA Library には CDI アダプター付属の製品と Unique Dual Index（UDI）アダプター付属の製品が販売されている。このうち CDI アダプターはイルミナ純正の TruSeq キットと同一のインデックス配列であるため、イルミナ NGS に付属の Local Run Manager (LRM)の初期状態でインデックスの指定が可能である。一方で、UDI アダプターキットのインデックス配列は QIAGEN 独自の配列であるため、LRM には配列が登録されておらずサンプルシートの作成が困難である。そこで、LRM に UDI アダプターキットのインデックス配列を登録するための手法を掲載する。

- 別添の 4 種類のテキストファイルを USB メモリ等の外付けドライブに保存し、イルミナ NGS（iSeq または MiSeq）に接続する。
- LRM を立ち上げ、TOOLS→Library Prep kit を選択する
- Add Library Prep Kit を押し、目的のテキストファイルを選択する（使用するキットによって必要に応じて A～D まで 4 回繰り返す）＊通常 A キットしか使用しないという施設は A のみ登録すると間違いがなくて良い。
- サンプルシート作成画面に行き、QIAseq の UDI キットが選択できるようになっていれば成功（ウェルポジション指定で自動的に R1 と R2 のインデックス配列が入力される）

ゲノム解析ワーキンググループメンバ

池田徹也　　北海道立衛生研究所
瀬戸順次　　山形県衛生研究所
大澤修一　　茨城県衛生研究所
塚越博之　　群馬県衛生環境研究所
江原勇登　　埼玉県衛生研究所
久保田寛顕　　東京都健康安全研究センター
中嶋直樹　　神奈川県衛生研究所
金谷潤一　　富山県衛生研究所
鈴木雅和　　愛知県衛生研究所
髙橋剣一　　名古屋市衛生研究所
若林友騎　　地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
野本竜平　　神戸市健康科学研究所
平塚貴大　　広島県立総合技術研究所保健環境センター
亀山光博　　山口県環境保健センター
平井真太郎　　愛媛県立衛生環境研究所
重村洋明　　福岡県保健環境研究所
グループ長：地全協　精度管理部会員　神戸市健康科学研究所　岩本　朋忠

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。
厚生労働行政推進調査事業費補助金　健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升　健志）

Appendix

1. Fragmentation における Lid 温度および反応時間の影響について

本マニュアル 3. ライブラリ作製の Fragmentation については、公式マニュアルでは input DNA 量の違いにより 2～30 分という記載になっている。本マニュアルでは input DNA 量を 50 ng に固定しているため、反応時間が断片化に与える影響は大きい。そのため、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、反応時間による断片化の進行具合を検証した。なお、検討は以下の試薬および機器を使用し、本マニュアルの作業手順に従って実施した。

DNA 抽出試薬：DNeasy Blood and Tissue kit （QIAGEN）

サーマルサイクラー：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch TP350 (タカラバイオ)

キャピラリー電気泳動：Agilent 2100 Bioanalyzer (アジレント・テクノロジー)

Agilent High Sensitivity DNA キット(アジレント・テクノロジー)

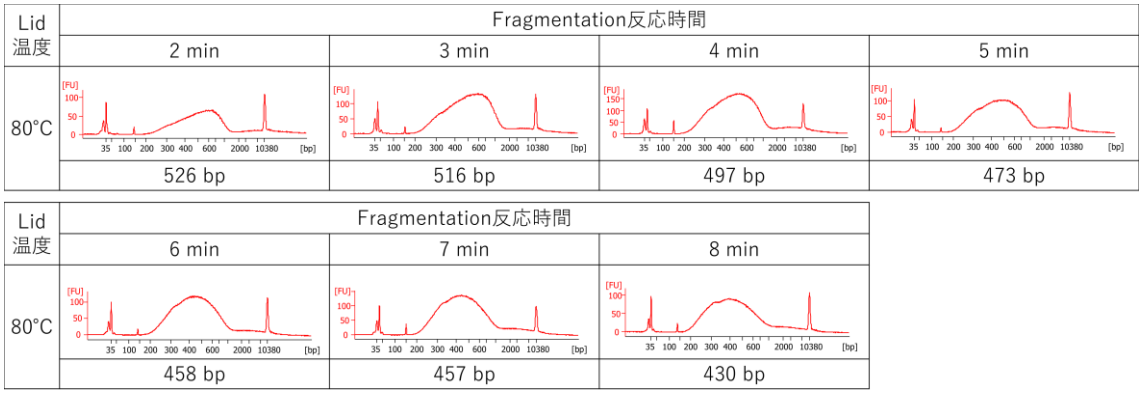


図 1. Fragmentation の反応時間における断片化の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

断片化は反応時間 3 分でも十分進行しており、ライブラリ作製に適していると考えられた。MiSeq を使用してリードデータを取得する場合、片側 250 または 300 bp となるペアエンドリードを想定するケースが多いため、少し長めの断片を残存させる条件で反応時間を設定することを推奨する。

続いて、Lid 温度が断片化に与える影響について検証した。同様に大腸菌 ATCC25922 株を用いて Lid 温度を 70℃、80℃、105℃に設定し反応を行った。105℃については Fragmentation 反応中に Lid を開放した状態と閉めた状態の 2 条件で検証を行った。その結果を図 2 に示す。70℃、80℃、105℃（開放）では断片化の進行に大きな違いは見られなかったが、105℃で閉めた場合は若干断片化の進行が早くなる傾向が認められた。しかし、その影響は軽微であり、Lid を開放した条件では他と差がないため、Lid 温度を調節可能なサーマルサイクラーを所持しない施設は参考にしていただきたい。

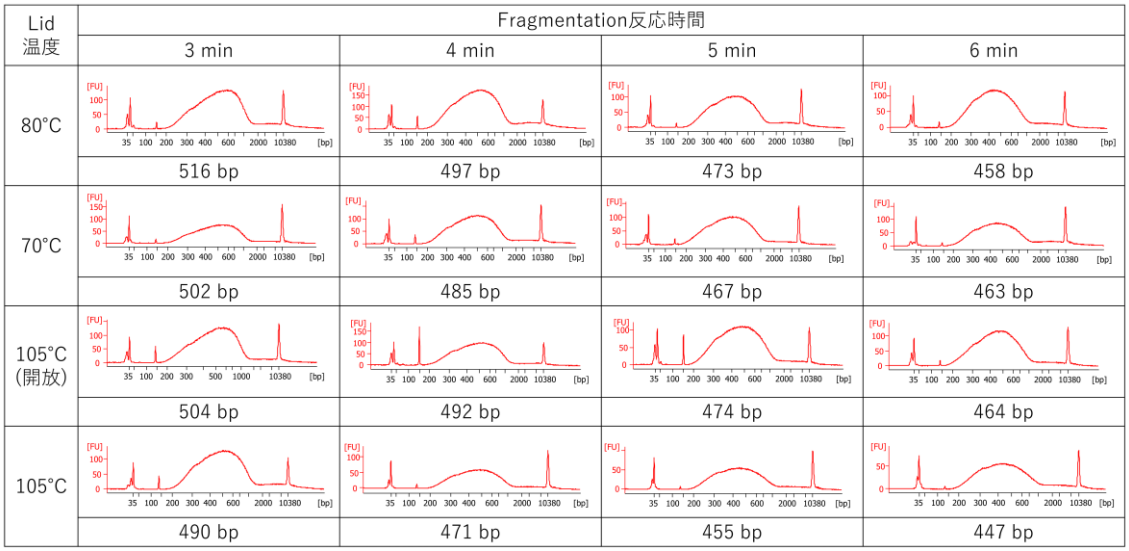


図 2. Lid 温度の違いによる Fragmentation 反応の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

2. ライブラリ精製方法の違いによるリードデータへの影響について

本マニュアル 4. ライブラリのサイズセレクションの項でも述べたように、ライブラリの精製やサイズセレクションはその後の解析に影響を与える重要な工程である。キットの公式マニュアルでは磁性ビーズによる精製手法が記載されている。この手法は簡便であるが、ライブラリサイズの推定が難しい点や、ライブラリサイズがブロードに広がってしまうという難点がある。このことは、想定を大幅に逸脱したサイズのフラグメントが混ざることで、クラスターの形成不全や、解析サイクルの後半部分でのリードのクオリティ低下を招くことにつながってしまう。一方で、電気泳動によるゲル抽出での精製方法は、工程としては煩雑になるものの、目的のサイズのライブラリのみを収集できるため、ライブラリサイズの推定が容易で質の良いリードデータを再現性良く取得することが可能となる。

本マニュアル作成に際し、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、ビーズ精製とゲル抽出の違いによるライブラリの状態と取得したリードデータの違いについて検証したので参考にしていただきたい。

両手法によるライブラリサイズの分布の解析結果を図 3 に示す。ゲル抽出精製が 550bp 付近で比較的シャープな山を形成しているのに対し、ビーズ精製ではアダプターダイマーやプライマーダイマーなどは見られなかったものの、山がブロードで 1000 bp を超えるサイズのフラグメントも残存しているのがわかる。

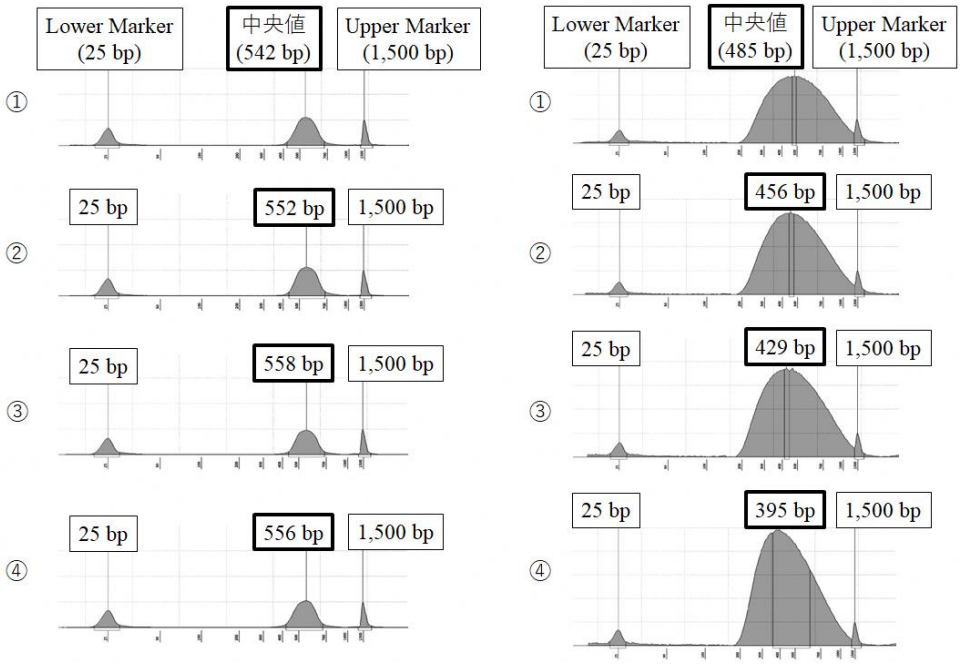


図 3. ライブラリサイズの分布。ゲル抽出（左）とビーズ精製（右）を TapeStation により解析した

1000 bp を超えるフラグメントは MiSeq のクラスター形成過程において Bridge PCR がうまくいかずクラスター形成不全を引き起こす。そのため、想定したライブラリの DNA 濃度

から推定したライブラリの想定クラスター密度と実際の密度の乖離が大きくなってしまう可能性がある。

続いて、作製したライブラリから MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてリードデータを取得し、fastp v0.23 によるトリミングを実施した。その結果、リード数の残存率はトリミングの前後でどちらの手法も 98%となり大きな違いはなかったが、残存した総リード長はゲル抽出が約 94%であるのに対し、ビーズ精製は約 74%しか残存せず、大きく差がついた（Table 1）。これはビーズ精製ではリードの後半部分のクオリティが急激に落ちることが原因と考えられる。

Table 1. トリミング前後でのリード数と総リード長の残存率

	残存リード数割合（%）	残存総リード長割合（%）
ビーズ精製	98.4	73.5
ゲル抽出精製	98.1	93.7

図 4 に示す通り、170 サイクル付近からビーズ精製のリードはクオリティの低下が確認される。これは insert size が短いリードでは反応サイクルの後半でアダプター領域以降を解析してしまうためであり、ライブラリ精製過程で短いフラグメントが残存してしまうことに起因する。

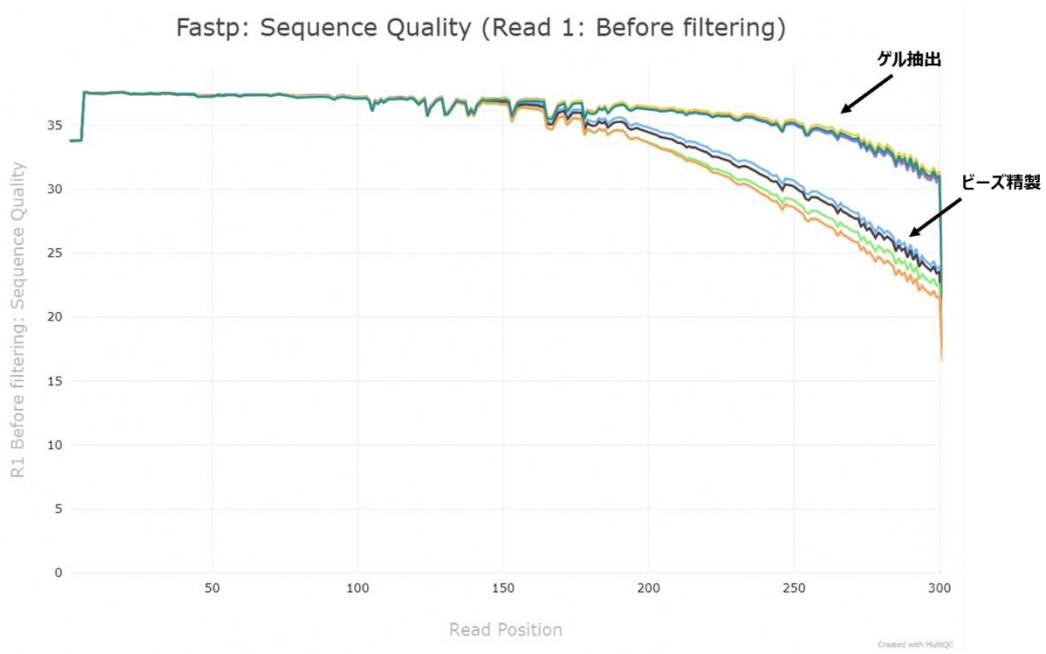


図 4. トリミング前のリードクオリティの推移。X 軸の数字は反応サイクル数と同義

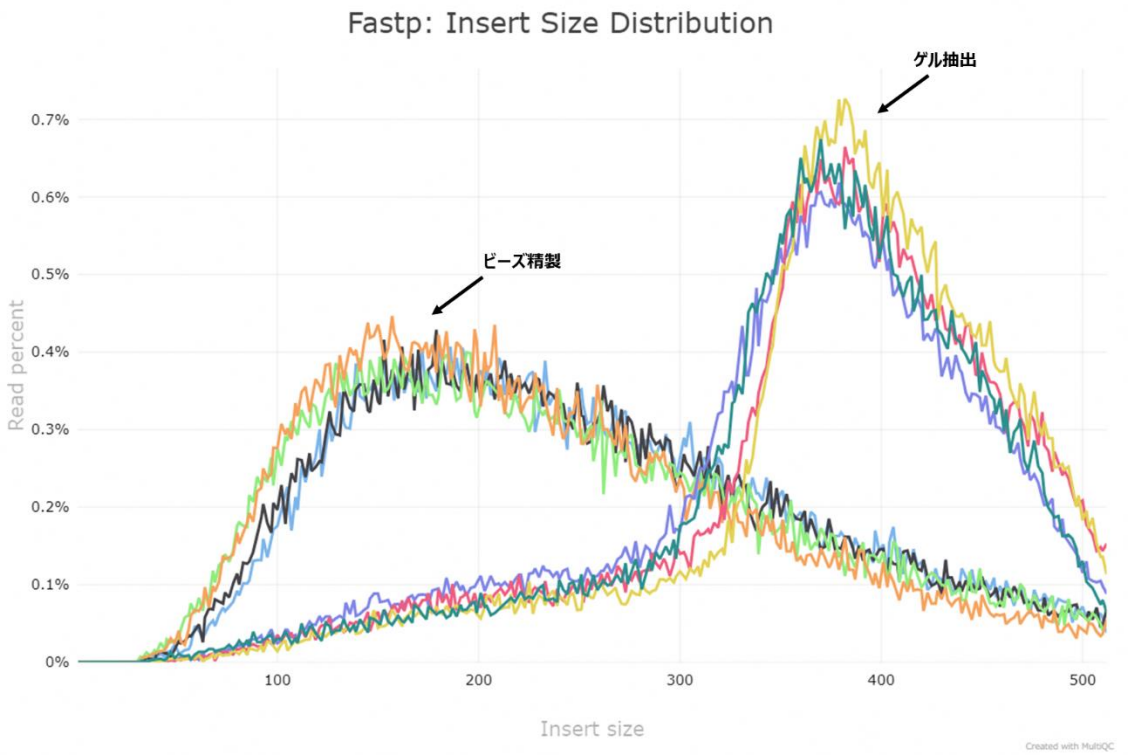


図 5. リードの Insert size の分布

またそれぞれのリードデータの Insert size の分布を図 5 に示した。ゲル抽出のピークは 380 bp 付近であるのに対し、ビーズ精製では 160 bp 付近がピークとなった。500 サイクルや 600 サイクルの Reagent kit で解析する際は短い Insert size では無駄になる部分が多いため得られたデータ量に対し、解析に使用できるデータ量の割合が少ないという問題が生じてしまう。

一方で、今回のリードデータを用いて大腸菌 ATCC25922 株の完全長配列（Accession no. CP009072）をレファレンスとして SNVs 解析を実施したところ、取得した 8 検体間では SNV は検出されず、レファレンス配列に対しては 8 検体とも 2 SNVs が検出された。これは株の継代の際に蓄積された SNV であると考えられる。また、Assembly 結果もビーズ精製の方が若干コンティグ数が多くなる傾向があるが、概ねデータの差異は認められなかった。従って、ビーズ精製とゲル抽出ではインサートサイズなどの違いはあるが、SNVs 解析などでは同様の結果が得られるであろう。ビーズ精製の方がデータのロスが大きくなるため、目標とする解析に合わせて精製方法を選択するよう参考にしていただきたい。

地衛研　エンテロウイルスゲノム解析プロトコル

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

1. 概要

本プロトコルは、以下の参考文献を改変したPCRと次世代シークエンサー(NGS)を用いてエンテロウイルスのゲノム解析を行うことを目的としたものである。

参考文献:Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing:Application for Viral Mixtures. Marie-Line Joffret, et al. Frontiers in Microbiology.September 2018 | Volume 9 | Article 2339

本プロトコルでは、図1のとおりエンテロウイルスゲノムをRT-PCRで5´末端側のFragment 1と3´末端側のFragment 2に分けて増幅し、それぞれの増幅産物を合わせてNGSを用いてゲノムデータを取得する。本プロトコルは、検出感度を得るために参考文献の方法を表1のとおり改変している。また、本プロトコルで用いる試薬を表2のとおり例示する。

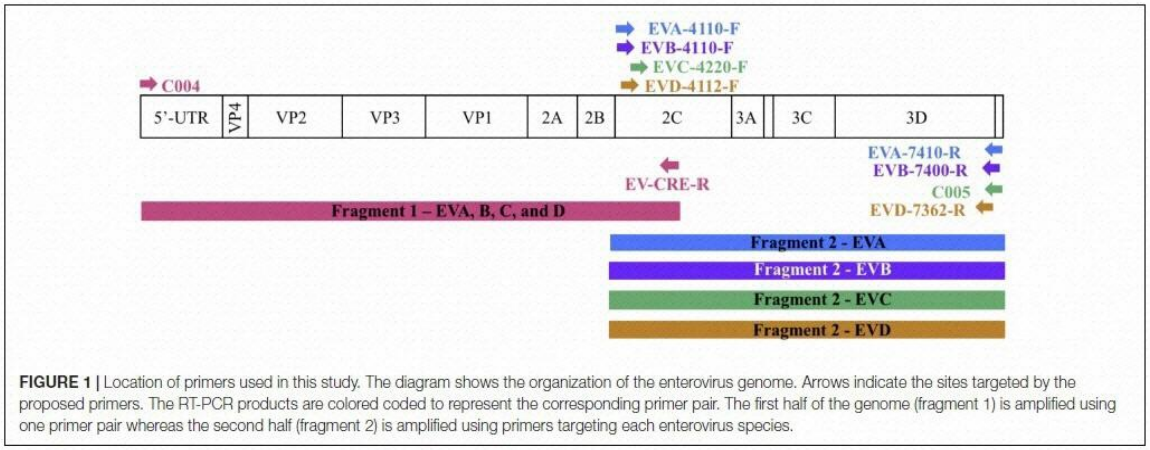


FIGURE 1 | Location of primers used in this study. The diagram shows the organization of the enterovirus genome. Arrows indicate the sites targeted by the proposed primers. The RT-PCR products are colored coded to represent the corresponding primer pair. The first half of the genome (fragment 1) is amplified using one primer pair whereas the second half (fragment 2) is amplified using primers targeting each enterovirus species.

図1　参考文献　Figure 1より抜粋

表1　参考文献の方法からの主な改変箇所

	参考文献	本プロトコル
逆転写反応	One-Step-RT-PCR	RT-PCR
PCR	Multiplex	single 2種類
Fragment 1 の Forward primer	C004	EVP2
Anneling 温度	55℃	一部 45℃

表2 使用試薬リスト（例示）

試薬の種類	品名	メーカー	コードNo	容量
逆転写反応試薬	SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scinetific	18090050	50反応
逆転写反応試薬	Random Hexamers (50 μM)	Thermo Fisher Scinetific	N8080127	5nmol
逆転写反応試薬	dNTP mix (10mM each)	Thermo Fisher Scinetific	18427013	100μl
逆転写反応試薬	RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scinetific	10777019	5000 unit
PCR	EmeraldAmp PCR Master Mix	Takara Bio	RR300A	160回用

1. Random hexamer primer、dNTP、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は例示と異なるメーカーのものを使用しても問題ない。
2. Random hexamer primer ではなく Oligo (dT) primer を用いることもできるが、Random hexamer primer と比較して Fragment 1 の検出感度が下がり、Fragment 2 の検出感度が上がる傾向がある。ウイルス株によっては、Fragment 1 の感度低下が大きく、EV-D68の一部のウイルス株で検出できなくなる例がみられた。
3. 例示されたPCR試薬以外を使用することもできるが、特に Fragment 1 で非特異的増幅がみられるので留意すること。またOne-Step-PCR 試薬を使用し逆転写反応とPCR反応を同時に行うことも可能であるが、こちらも非特異的増幅がみられるので留意すること。
4. EmeraldAmp PCR Master Mix は、過度な凍結融解の繰り返しにより活性が低下する場合がある為、使用頻度が高い場合、いったん融解したものは 4℃保存を推奨する。

2. 対象試料

培養細胞により分離されたエンテロウイルス株を用いる。本プロトコルの検出感度では臨床検体を解析するのは困難である。本プロトコルで増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型は表3のとおり。増幅産物の確認は、ゲノムワーキンググループ各施設が保有している遺伝子型のエンテロウイルス分離3株ずつ（施設BのEV-A71のみ5株）を用いて本プロトコルを実施し、標的とするバンドが検出されることで行った。

表3　増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型

		SPECIES A						SPECIES D
		CV-A2	CV-A4	CV-A6	CV-A10	CV-A16	EV-A71	EV-D68
施設A	Fragment 1		○ ○ ○				○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2		× × ×				× × ○	× × ×
施設B	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ × ○ ○	
	Fragment 2		○ ○ ○	○ ○ ×	× × ○	○ × ×	○ × × × ○	
施設C	Fragment 1					○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2					○ ○ ○	○ ○ ○	
施設D	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設E	Fragment 1	○ ○ ○						
	Fragment 2	○ ○ ○						
施設F	Fragment 1	○ ○ ○	○ ○ ○	× × ×	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2	× ○ ○	○ × ○	× × ×	○ × ×	× × ×	○ ○ ×	
施設G	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設H	Fragment 1						○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2						○ ○ ○	○ ○ ○

		SPECIES B										
		CV-A9	CV-B2	CV-B3	CV-B4	CV-B5	E-3	E-6	E-7	E-11	E-18	E-25	E-30
施設A	Fragment 1									× ○ ○			
	Fragment 2									× × ×			
施設B	Fragment 1												
	Fragment 2												
施設C	Fragment 1					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
	Fragment 2					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
施設D	Fragment 1	○ ○ ○					○ ○ ○	○ ○ ○			○ ○ ○		○ ○ ○
	Fragment 2	× ○ ○					× ○ ○	× × ×			○ ○ ○		○ ○ ×
施設E	Fragment 1								○ ○ ○			○ ○ ○	
	Fragment 2								○ ○ ○			○ ○ ○	
施設F	Fragment 1	○ ○ ○											
	Fragment 2	○ ○ ○											
施設G	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	× × ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
施設H	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	○ × ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			

標的とするバンドが検出されたものを ○ とした

3. RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)等のRNA抽出キットを用いてエンテロウイルスRNAを対象試料から抽出する。Carrier RNAについては、添加していても問題ない。

4. 逆転写反応

本プロトコルでは、SuperScript Ⅳ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) (以下SS4)でRandom hexamer primer を用いる方法を表4－1に示す[注1)]。SS4には Random hexamer primer、dNTP mix (10mM each)、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は付属していないので別途用意が必要となる。

表4-1のとおり反応調製液を作成し、表4－2のとおり 65℃ 5分 反応させた後、少なくても 1分 氷上でインキュベートし、annealed RNA 13μlを作成する。

表4－1

Component	Volume
50 μ M Random hexamer primer	1 μl
dNTP mix (10mM each)	1 μl
Template RNA	11 μl
Total	13 μl

表4－2

temperature	Reaction time
65℃	5 min

表5－1のとおり反応調製液を作成し、annealed RNA 13 μ l と混合する。表5-2の条件で反応させ cDNA を作成する。

表5－1

Component	Volume
5×SSIV Buffer	4 μl
100 mM DTT	1 μl
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 μl
SuperScirpt IV Reverse Transcriptase (200U/μL)	1 μl
annealed RNA	13 μl
Total	20 μl

表5－2

temperature	Reaction time
23℃	10 min
55℃	10 min
80℃	10 min

5. PCR反応

得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行う。参考文献では、Fragment 1 と Fragment 2 の primer を混合してPCRをしているが、Fragment 1 と Fragment 2の検出感度が異なること、非特異的増幅がみられることがありバンドの切り出しを必要とする場合があることから、本プロトコルではFragment 1 と Fragment 2を分けてPCRを行う。本プロトコルでは、非特異的増幅が少なかったことからPCR試薬に EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio) を使用する。

5－1. Fragment 1 のPCR

Fragment 1 のPCRでは、検出感度が低いこと、ウイルス株によっては検出ができないことから、Forward primer を参考文献の C004 から EVP2 に変更している。EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されている primer である[注2)]。表6－1のとおり反応調製液を作成し、表6－2の条件で反応させる[注3)]。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い4060bp前後にバンドが認められるか確認する。用いる primer 配列は表10のとおり。

表6－1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 µl
10µM Forward primer EVP2 (Final conc 200nM)	0.5 µl
10µM Reverse primer EV-CRE-R (Final conc 200nM)	0.5 µl
Nucleotide Free Water	9.5 µl
cDNA	2 µl
Total	25 µl

表6－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
55℃	30 sec	×30 cycle
72℃	4 min 30 sec	

5－2. Fragment 2 のPCR

Fragment 2 のPCRは、エンテロウイルスの種（EV-A、EV-B、EV-C、EV-D）により用いる primer が異なる。また、EV-A と EV-D のPCRでは、アニーリング温度を参考文献の 55℃ では増幅がみられなかったことから 45℃ に変更している。EV-Cについては、ウイルス株を用いた検証を行っていない為、本プロトコルでは示さない。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い標的とするバンドの有無を確認する。得られる遺伝子増幅産物は、どのPCRでも3300bp 前後である。用いる primer 配列は表10のとおり。

5－2－1. Fragment 2 EV-A のPCR

表7－1のとおり反応調製液を作成し、表7－2の条件で反応させる。

表7－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVA-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVA-7410-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表7－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
45℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

5－2－2. Fragment 2 EV-B のPCR

表8－1のとおり反応調製液を作成し、表8－2の条件で反応させる。

表8－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVB-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVB-7400-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表8－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
55℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

5－2－3. Fragment 2 EV-D のPCR

表9－1のとおり反応調製液を作成し、表9－2の条件で反応させる。

表9－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVD-4112-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVD-7362-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表9－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
45℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

表10 各 primer の配列

PCR	Primer name	5´-3´ Sequence	Position
Fragment 1	EVP2	CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT	※1
	EV-CRE-R	CGGBRTTTGSWCTTGAACTG	※2
Fragment 2	EVA-4110-F	AARAARTTYAAYGAYATGGC	4110 - 4130※3
EV-A	EVA-7410-R	TTTGCTATTCTGGTTATAAC	7410 - 7390※3
Fragment 2	EVB-4110-F	GGCGNTGGCTYAARCRAARG	4110 - 4130※4
EV-B	EVB-7400-R	GCACCGAATGCGGAGAATTTAC	7400 - 7378※4
Fragment 2	EVD-4112R	GGCTAKCMCAAAAGATWGAC	4112 - 4132※5
EV-D	EVD-7362-R	CCAAKTRACCAAAATTTACC	7362 - 7342※5

※1 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 452 - 476
CV-B4 E2 (AF311939) : 450 - 474
EVD-68 Femon (AY426531) : 445 - 469

※2 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 4418 - 4437
CV-B4 E2 (AF311939) : 4375 - 4394
EVD-68 Femon (AY426531) : 4390 - 4409

※3 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065)

※4 CV-B4 E2 (AF311939)

※5 EVD-68 Femon (AY426531)

6. 遺伝子増幅産物の精製

Fragment 1 、Fragment 2 それぞれのPCRで得られた遺伝子増幅産物を電気泳動し、標的バンドが認められるか確認する。標的バンドが認められたら、QIAquick PCR Purification Kit等による精製、もしくは AMPure XP（Beckman Coulter）等による磁気ビーズ精製を行う。また、非特異的バンドが確認されず、明瞭な標的バンドが認められていれば、遺伝子増幅産物をNucleotide Free Water等で5倍程度希釈することで精製工程を省略することができる。明瞭な非特異的バンドが認められた場合、標的バンドの切り出しとQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)等を用いた精製を行うことで、標的遺伝子以外によるゲノムデータ圧迫を抑えることができる。

7. Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物の混合

精製した Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物を Qubit dsDNA HS Assay Kit 等でDNA濃度を測定する。Fragment 1 と Fragment 2 で同程度の濃度になるように調製して混合する。複数の検体を同時に解析する場合は、検体間で同程度の濃度に調製しておいた方がよい。

8. ライブラリ調製

新型コロナウイルスゲノム解析プロトコル（国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター）に記載されている NGSライブラリ調製（QIASeq FX）の手順に従いライブラリ調製を行う。

9. シーケンシング

Illumina NGS のマニュアルに従い、ライブラリを希釈し、カートリッジにロードする。

10. ゲノムデータ解析

得られた Fastq データを用いてゲノム解析を行う。

注記

1. 多くの施設で使用しているPrimeScript RT Reagent kit（Takara Bio）、LunaScript RT SuperMix Kit（NEB）の使用は避けた方が良い。
2. EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されているVP4-VP2-semi-nested RT-PCRの1st PCR で 使用されている。元の文献は以下のとおり。
   Rotbart, H. A. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol 28, 438-442, doi:10.1128/jcm.28.3.438-442.1990 (1990).
3. Fragment 1 と Fragment 2 で検出感度が異なる為、Fragment 1 PCRの primer 濃度、cycle 数、template 量を変更して検出感度を調整している。

Appendix

1．本プロトコルで Fragment 2 の PCR 増幅不良の場合における代替法の一例

ワーキンググループ内の検証において、本プロトコルに記載した試薬類を使用した際に Fragment 2 の増幅がみられない施設が散見された。こういったケースにおいて異なる試薬を使用した場合の PCR 増幅についての事例を紹介するので解析を実施する際の参考にされたい。なお、RNA 抽出までは 3．と同様の手順で実施し、使用したプライマー配列も同一のものである。また、検証は EV-B の特定の種においてのみ実施したものである。

1-1．使用試薬および機器

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara, #R026A)

1-2．Fragment 2　EV-Ｂ　のPCR

表S1-1のとおり反応調製液を作成し、表S1-2の条件で反応させる。

表S1-1

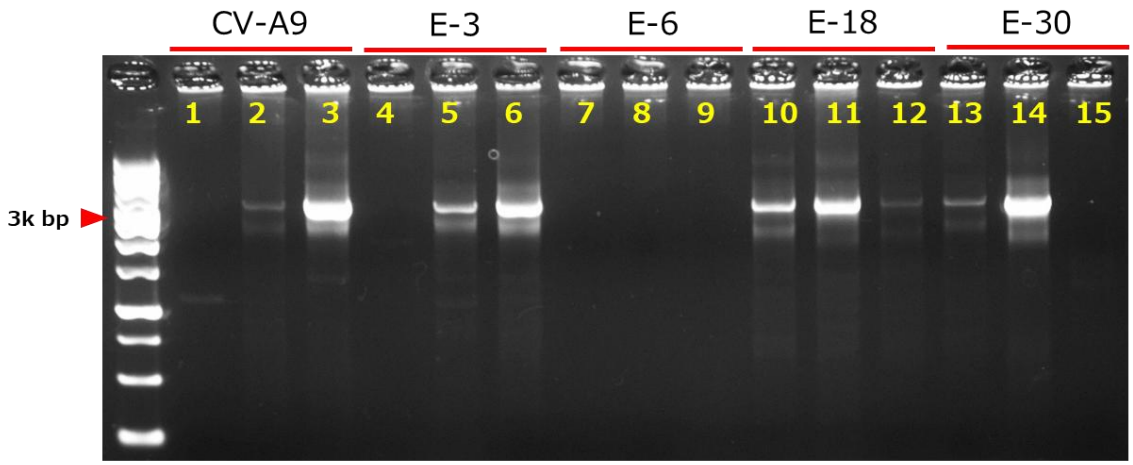
component		Volume
Nucleotide Free Water		3.0 µl
2 × 1 step High Fidelity Buffer		12.5 µl
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR		2.0 µl
PrimeScript II RT Enzyme Mix		0.5 µl
10µM Forward primer EVB-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVB-7400-R	(Final conc 400nM)	1 µl
RNA		5 µl
Total		25 µl

表S1-2

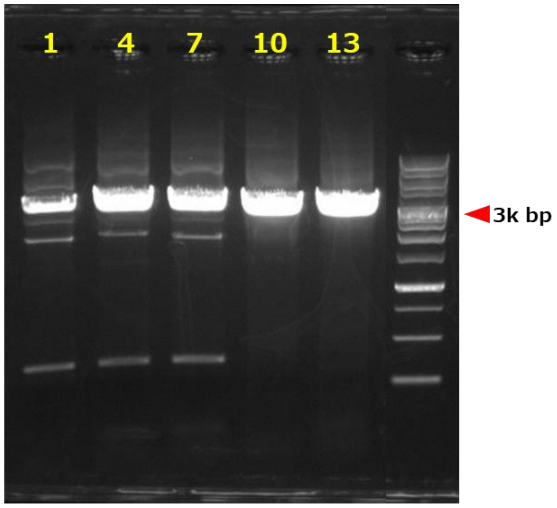
Temperature	Reaction time	
45℃	15 min	
94℃	2 min	
98℃	10 sec	
55℃	15 sec	×40 cycles
68℃	1 min	

1-3. PCR結果の比較

プロトコル本文の方法（以下、本法）で実施したFragment 2のPCR結果を図S1、PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（以下、検証法）を使用して実施したPCR結果を図S2に示す。なお、検証法は各遺伝子型から1検体ずつを選抜して実施した。泳動図の検体番号はそれぞれ同一検体である。この検証は 1 施設のみで実施したものであり、施設間誤差や使用する機器の違いは考慮されていない。



図S1．本プロトコルに従い実施したFragment 2の泳動図



図S2．PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kitを使用して実施したFragment 2の泳動図

本法で増幅不良であった検体番号1, 4, 7, 13について十分な増幅が確認された。一方で非特異増幅も複数確認された。また、図では示していないが、Fragment 1についても同じ試薬で検証したところ、増幅は確認されたものの、本法で実施した結果よりも非特異増幅が多かった。

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）
分担研究報告書

次世代シークエンサーに関わる各種検査マニュアルの作成：疫学調査における NGS 解析の利用に関する研究

研究分担者　久保田　寛顕　　東京都健康安全研究センター　統括課長代理
野本　竜平　　神戸市健康科学研究所　副部長

研究要旨

集団食中毒をはじめ病原性細菌に起因する集団感染が発生した場合、地方衛生研究所ではパルスフィールド電気泳動（PFGE）による系統解析を行い、その結果をもって保健所等と連携し、事例究明と収束に向けた対応に当たってきた。今後、PFGE に代わり、一塩基単位の解像度で全ゲノム比較を行うことが可能な次世代シークエンサー（NGS）を用いた菌の比較が求められる。

本研究課題では NGS を用いた数値化の方法として一塩基多型（SNP）解析を行うことを前提とした。その際、検出される一塩基変異（SNV）は解析方法によって変化しうることから、特に影響を与える要因を特定したところ、リファレンスの選定や、遠縁株を含むか否かという条件によって検出される SNV の数が影響されることを確認した。

検討結果を踏まえ、最終的に SNP 解析精度管理用マニュアルの草案を作成した。本マニュアルでは最初に粗く SNP 解析をすることで遠縁株を判断し、近縁株のみで再度 SNP 解析を行う二段階のワークフローを採用した。各地衛研が同等の解析を行うための精度保証として、リードデータ品質の基準の統一ならびに SNP 解析の方法の指定を盛り込んだ。今後は本マニュアルの完成版をウェブ上で公開するとともに、地衛研ネットワークの中で研修を実施するなどし、全国地衛研への浸透を図っていく。

A. 研究目的

集団食中毒をはじめとする病原体による集団感染が発生した際、全国の地方衛生研究所（以下、地衛研）では本庁、保健所等との連携のもと、事例の究明と収束に向けた対応にあたる。この際、地衛研では主としてヒトや環境サンプルなどの分析を行い、科学的データを与えることをもって疫学調査をより強固なものとする役割を担う。特に腸管出血性大腸菌など、細菌が原因となる集団感染が起きた際は、分離株の一致、不一致を見る方法として、これまでパルスフィールド電気泳動（PFGE）法がゴールドスタンダードとして用いられてきた。しかし、PFGE 法に用いる標準的な泳動装置が今後製造終了になり、使用不能となることが知られている。このため、集団感染を追跡する上で、PFGE 法に代わる方法の策定が喫緊の課題である。

そこで、本研究課題では PFGE の代替法として次世代シークエンサー（NGS）の活用を検討する。従来、菌型を比較する方法として PFGE は最も解像度の良い方法であったが、NGS の登場により一塩基単位での比較が可能となり、PFGE と同等か、それ以上の解像度で集団感染を追跡できるようになってきた。その一方で、NGS は機器から出力される膨大なデジタルデータをバイオインフォマティクスにより処理して結果としていく必要がある。また、疫学調査との比

較として一定の方法論（表 1）がコンセンサスを得ている PFGE に比べると、NGS では一塩基多型（SNP）解析によって得られる一塩基変異（SNV）を指標とした方法論がいまだ統一されていない状況にある。

表 1　PFGE における解釈
（Tenover et al., 1995. JCM）

相違バンド数	近縁関係	疫学的解釈
0 本	区別不能	集団感染
2 から 3 本	近縁	集団感染の可能性が高い
4 から 6 本	近縁の可能性	集団感染かもしれない
7 本以上	遠縁	非集団感染

そこで、NGS を実務的な集団感染対応へ活用するためにも解析手法の統一化やその精度を保証する仕方を整理するための検討を行っていく。なお、次世代シークエンサーにより生データを取得する工程、すなわちウェットの作業については地衛研ゲノム解析ワーキンググループにおける統一的マニュアルの作成と重複する。さらに、実際に行政依頼に対して保健所等に結果を発行する形式に関しては各自治体に適した形があると考えられる。したがって、本研究課題ではその間をつなぐデータ解析部分を対象とする（図 1）。

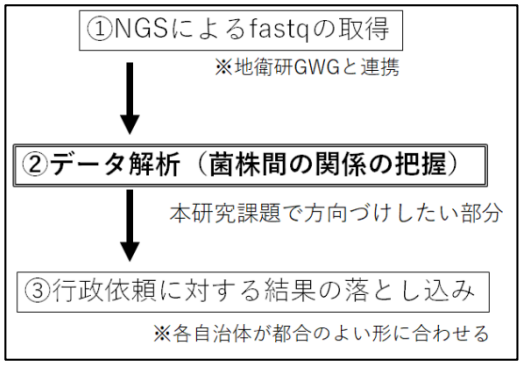


図 1　地衛研における NGS 対応

B. 研究方法

1. SNP 解析に影響を与える解析条件の特定

集団感染時には PFGE のバンド数の違いのように、SNV 数という数値化された菌株間の差異を判断材料とすることが想定される。そこで、SNP 解析のマニュアル化を行う上で重要と考えられる、解析結果に対して影響を与えうる要因を特定するために同一データに対して解析条件を変化させ、その結果を評価することとした。

まず、テストサンプルとして、過去に分離された *Acinetobacter baumannii* 14 株（うち、13 株は ST208 であり、残り 1 株は ST1316）について、SNPcaster（https://github.com/leech-rr/SNPcaster/）により SNV を検出し、リファレンス配列の違い等に起因する解析結果の変動について評価を行った。

2. 集団感染対応を目的とした精度管理マニュアルの作成

1．で特定された SNP 解析に与える解析条件を念頭に置き、地衛研が実際に集団感染に対応するにはどのような手順を踏むべきかについて、ワークフローを整えるとともに、SNPcaster の活用を前提とした検査マニュアルの作成を行った。SNPcaster のテストデータを用いて実際に SNP 解析を実施し、その結果を参考情報としてマニュアル内に記載した。また、これらのことについて、ゲノムデータ解析研修において一部の地衛研に対して情報共有を図った。

（倫理面への配慮）

本研究で用いた臨床分離株は、分離元とは連結不能な匿名化がされていることに加えて、本研究課題では一切の個人情報を用いず、個人が特定されることはない。また、東京都健康安全研究センター倫理審査委員会により、承認を受けているものである（審査番号：6 健研健第 906 号）

C. 研究結果

1. SNP 解析に影響を与える解析条件

NGS で標準株をリファレンスとした場合、リファレンスを標準株から ST208 株に変更した場合、ならびに解析対象から

ST1316 の一株を除いた場合に算出された SNV 数の変化を図 2 に示した。比較しやすいように、標準株と同じ SNV 数だった場合の理論直線を同時に示している。

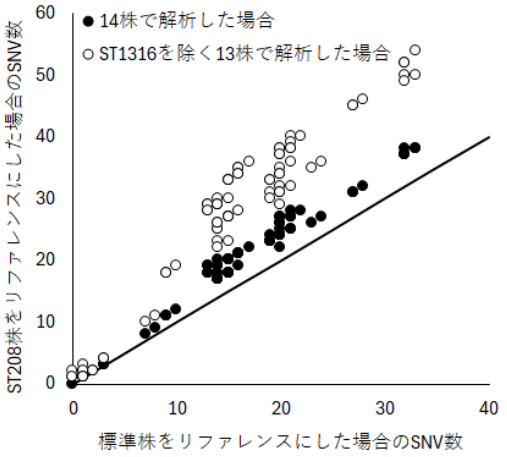


図 2　リファレンス、解析株数による変化

今回の解析でリファレンスやサンプルセットを変更した際のコアゲノム（全株に共通の領域）の変化を図 3 に、またそれぞれの解析での総 SNP 数と組換え領域内として除去された SNP 数を表 2 に示した。

図 3.　各解析によるコア領域の変化

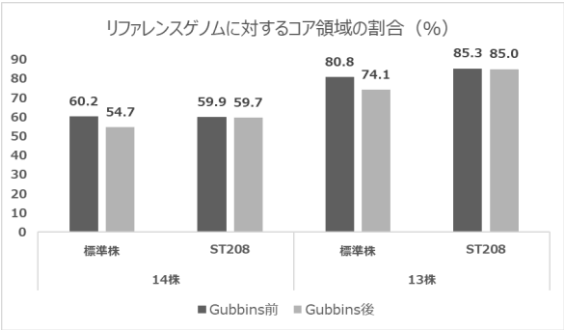
表 2　各解析における SNP 数

解析株数	14 株		13 株	
リファレンス	**標準株**	**ST208**	**標準株**	**ST208**
総 SNP 数 (Gubbins 前)	242,951	228,239	55,036	648
除去された SNP 数	23,950 (9.9%)	924 (0.4%)	17,392 (31.6%)	478 (73.8%)

リファレンスゲノムに対するコアゲノム領域の割合は 14 株で解析した場合は 60%前後であったのに対し、異なる ST の 1 株を除いた 13 株の解析では 80～85%となった。一方でリファレンスを変更した場合はコアゲノム領域の割合に与える影響は軽微であった。

また、各解析における総 SNP 数は 14 株で解析した場合はリファレンスに関わらず 20 万個を超える SNP が検出された一方で、13 株での解析では標準株をリファレンスにした場合は約 55,000 個、同一 ST をリファレンスにした場合は約 650 個の SNP となった。Gubbins による組換え領域除去を実施すると、14 株、13 株どちらの解析においても、リファレンスが標準株の場合は 17,000~23,000 個程度の SNP が除去され、リファレンスを ST208 にした場合は数百個の SNP のみが除去された。

算出される SNV 数がリファレンスとする配列や、解析に含む株によっても変動することが確認された一方で、コアゲノム領域については、リファレンス配列も含めた解析配列全体で判定されるため、今回の解析において異なる ST が混入していた 14 株の解析では大きくコアゲノム領域が減少することとなった。コアゲノム領域外にある SNP は解析には含まれないため、解析の分解能を向上させるためには遺伝系統的に離れた株は解析から排除することが望ましいと考えられる。また、組換え領域の除去に関してはリファレンスの影響が大きかった。これは Gubbins というソフトの仕様上、一株のみに検出される SNV では組換え領域



として判定されないという事が寄与している。今回の解析では遺伝系統的に離れた株は 1 株だったため、その株を除去するかどうかは組換え領域の解析ではあまり影響せず、リファレンスを変更することにより近接 SNV がどれだけ検出されるかどうかの方が影響が大きかったと考えられる。

2.　SNP 解析精度管理用マニュアル

前項において特定された要因を考慮することで、マニュアル化におけるワークフローには二段階の SNP 解析を採用すること

が望ましいと考えられた（図 3）。

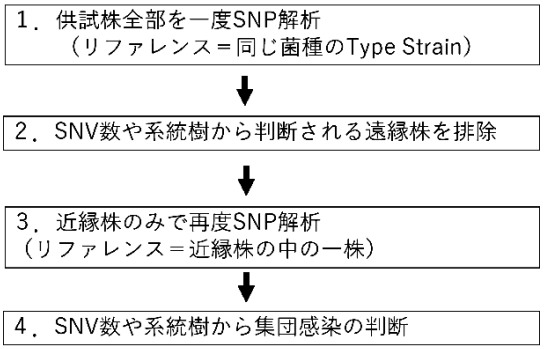


図３　集団感染対応時のワークフロー

集団感染はいつ何時、どのような菌種、系統の病原細菌によって引き起こされるかはわからず、データベース上から取得することを前提とした場合に常に理想的なリファレンスが準備できるとは限らない。そこで、あらゆる菌種に対応可能となるように、集団感染を構成するうちのひとつの分離株をSNP解析のリファレンスとして用いる形を考えた。その一方、全て菌種に対して菌種の一致、不一致を決める統一的な SNV の線引きを設定することは避けることとした。また、これらの内容についてゲノムデータ解析研修・中国四国地区研修会（2025 年 12 月実施）において説明し、同地区の地衛研との情報共有を行った。

最終的に、別添のとおり 2026 年 2 月末日の時点でのマニュアル草案である「地衛研　ゲノム解析精度管理マニュアル SNP 解析編（仮）」を作成した。本マニュアルは、SNPcaster の使用を前提とするほか、例え近縁であっても低品質のリードデータが含まれると、その株のみならず全体の解析結果に悪影響を及ぼす可能性があることから、最低限必要なデータ深度の確認やコンタミネーションの有無など、リードデータの品質評価を行ったうえでの SNP 解析の具体的手順について定めた。

また、本マニュアルは各地衛研の事情に応じて柔軟に解析手法を選択できるように、SNPcaster の使用を必須とするものではなく、オープンソース、あるいは市販のソフトウェアを用いて解析環境を整える場合に、SNPcaster のテストデータを使用して解析環境の検証を実施することを推奨した。そのため、データベースからのテストデータのダウンロード方法についても詳細に記述した。

テストデータを用いた解析では、1．で特定した解析条件を反映し、最初に異なる血清型も含む腸管出血性大腸菌の SNP 解析を実施し、続いて遠縁株を排除した解析、最後に集団事例中の 1 株をリファレンス株として用いる解析、という流れを結果を付けて記載した。

D. 考察

本研究課題において解析結果に強い影響を及ぼすと考えられた要素はリファレンスの選定と、遠縁株の含有であった。このことから、マニュアルでは二段階の SNP 解析を取り入れ、さらに一定の精度管理基準を設けた。統一的なマニュアルを提案することにより、複数の自治体間にまたがる大規模な集団感染事例が発生した場合にも地衛研間の解析結果をすり合わせ、広域的な連携をとることが可能となる。

この点において、NGS による集団感染の解析は単純に PFGE の代わりとなるだけでなく、PFGE を超える利点も生まれることが期待される。というのは、複数の自治体間にまたがる大規模な集団感染事例が発生した場合、PFGE ではひとつの地衛研に菌株を集め、同一手順によるプラグ作成から電気泳動を行う必要があった。NGS では分析済みの電子データの送付を行うだけで迅速に集約した解析が可能となる。

自治体間でのデータ共有は行政検査の秘匿性から容易ではないことも考えられるが、SNPcaster では生データを用いることなしに、途中まで解析したデータを共有することでその後の SNV 算出まで実施することができ、一定の秘匿性が担保される。こうした点においても菌株の共有に比べると、自治体間の連携に向けたハードルが低くなることが期待される。

E. 結論

集団感染を追跡するツールとして PFGE からNGSへと移行するにあたり、まずSNV 数による線引きを決めていくことに目が行きがちであるが、そうした基準ばかりが先行し、解析方法由来で SNV の検出数が変化してしまっては元も子もない。全国地衛研において同等の検査精度を確保するためには解析方法についても一定の道筋を指し示すことが重要である。本研究課題で作成した解析マニュアルの草案を元に、地方衛生研究所全国協議会と連携するなどし、迅速に全国地衛研との意識共有を進める。完成したマニュアルは、同協議会のホームページを活用して公開することを想定している。

さらに、地衛研間のネットワークを通じ、全国、あるいは地方ごとの集合研修または Web 研修によりマニュアルの浸透ならびに継続的なフォローアップを図っていくことが求められる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

１．論文発表

1) Mitobe M, Kubota H, Kobayashi K, Miyake H, Takano M, Mizushima D, Gatanaga H, Oka S, Suzuki J, Sadamasu K. Clustering of Polymorphic Membrane Protein E Clade in *Chlamydia trachomatis* Lineages from Men Who Have Sex with Men. Emerg Infect Dis. 30(10):2183-2187. 2024.

2) Uchitani Y, Okuno R, Ariyoshi T, Kubota H, Suzuki J, Sadamasu K. Genetic characteristics of invasive pneumococcal disease-derived *Streptococcus pneumoniae* of serogroup 24 isolated in Tokyo, Japan. J Infect Chemother. 202. 31(1):102484. 2025.

3) Ando N, Mizushima D, Takano M, Mitobe M, Kobayashi K, Kubota H, Miyake H, Suzuki J, Sadamasu K, Aoki T, Watanabe K, Oka S, Gatanaga H. Prolonged sitafloxacin and doxycycline combination regimen for treating infections by highly resistant *Mycoplasma genitalium*. J Antimicrob Chemother. 2025. 80(1):247-253. 2025.

4) Kubota H, Okuno R, Kenri T, Ucitani Y, Ariyoshi T, Yoshida I, Kobayashi, K, Mitobe M, Suzuki J, Sadamasu K. Multiplex Amplicon Sequencing for the Comprehensive Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiol. Spectr. 13:e0271924. 2025.

5) Ishitsuka T, Sugiyama M, Kubota H, Takai S, Kakuda T, Suzuki Y. Isolation of Rhodococcus equi bacteriophage ReT1 and investigation of its bactericidal effect. Microb Pathog. 207:107868. 2025.

6) Aoki W, Uwamino Y, Niida N, Kubota H, Kamoshita Y, Inose R, Nagata M, Ishihara O, Uno S, Yoshifuji A, Namkoong H, Hasegawa N, Matsushita H. Cefiderocol susceptibility of Stenotrophomonas maltophilia species complex and carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from blood cultures at a university hospital in Tokyo, Japan. J Glob Antimicrob Resist. 44:251-255. 2025.

7) Aoki W, Uwamino Y, Kubota H, Kamoshita Y, Inose R, Nagata M, Namkoong H, Matsushita H. Evaluation of in vitro efficacy of aztreonam-nacubactam and cefepime-nacubactam against clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia. Antimicrob Agents Chemother. 69:e0075525. 2025.

8) Kobayashi K, Kubota H, Ariyoshi T, Suzuki Y, Mori K, Suzuki J, Ochiai Y, Sadamasu K, Chiba T. Differential Copy Number of Chromosomal blaCTX-M-14 in Escherichia coli Sequence Type ST38 from Companion Dogs and Cats. Curr Microbiol. 83:189. 2026.

9) Nakamura K, Taniguchi I, Gotoh Y, Isobe J, Kimata K, Igawa Y, Kitahashi T, Takahashi Y, Nomoto R, Iwabuchi K,

Morimoto Y, Iyoda S, Hayashi T. Diversity of Shiga toxin transducing phages in Escherichia coli O145:H28 and the different Shiga toxin 2 production levels associated with short- or long-tailed phages. Front Microbiol. 15:1453887. 2024.

10) Nomoto R, Nakanishi N, Komatsu S, Matsui M, Suzuki S. Complete genome sequences of Escherichia coli KA0011 clinical isolate used as a quality control strain of carbapenem susceptibility testing in Japan. Microbiol Resour Announc. 13:e0015524. 2024.

11) Nomoto R, Osawa K, Kinoshita S, Kitagawa K, Nakanishi N, Sarassari R, Raharjo D, Fujisawa M, Kuntaman K, Shirakawa T. Metagenome and Resistome Analysis of Beta-Lactam-Resistant Bacteria Isolated from River Waters in Surabaya, Indonesia. Microorganisms. 12:199. 2024.

12) Tanimoto Y, Ohyama M, Ito E, Akiyoshi K, Onishi Y, Mori A, Nomoto R. Whole genome-based surveillance for human adenovirus-related diseases in Kobe City, Japan, 2018-2022. BMC Res Notes. 2025;18:170.

13) Komatsu S, Nomoto R, Nakanishi N. Stability of a blaGES-5-carrying plasmid in a Serratia marcescens nosocomial outbreak. J Infect Chemother. 2025;31:102742.

14) Hiratsuka T, Nakanishi N, Akita H, Masuda K, Komatsu S, Nomoto R, Amemura-Maekawa J. A large outbreak investigation of Legionnaires' disease associated with a public bath facility in Hiroshima, Japan, using PFGE, SBT, MLVA, and whole-genome sequencing. Int J Med Microbiol. 2025 ;321:151680.

15) Izuta K, Nishikubo M, Nomoto R, Sumitomo S, Matsuoka Y, Seo R, Nishioka H, Ariyoshi K, Sando E. Systemic lupus erythematosus mimicking Japanese spotted fever due to Rickettsia japonica detection in an eschar: a case report. BMC Infect Dis. 2026. Epub ahead of print.

16) 長島真美, 藤原卓士, 村田ゆかり, 長谷川乃映瑠, 有吉司, 上原さとみ, 小西典子, 門間千枝, 浅倉弘幸, 林真輝, 熊谷遼太, 原田幸子, 永野美由紀, 山崎貴子, 河上麻美代, 糟谷文, 矢尾板優, 黒木絢士郎, 天野有紗, 北村有里恵, 磯貝まや, 小杉知宏, 加來英美子, 鈴木薫, 南須原亮, 田部井由紀子, 小川麻萌, 中村三琴, 後藤千恵, 村内このみ, 古谷実, 原田順子, 川合由華, 小池浩二, 灘岡陽子, 中村貴恵子, 久保田寛顕, 安中めぐみ, 吉田勲, 小林甲斐, 水戸部森歌, 奥野ルミ, 内谷友美, 田淵優里, 森功次, 高橋由美, 村上昂, 和田紀乃, 河村真保, 赤瀬悟, 三関詞久, 中里彩乃, 小野明日香, 浅山睦子, 新井麻里, 鈴木愛, 岡田若葉, 古田菜摘, 齊木大, 前田雅子, 尾畑浩魅, 西野由香里, 井田美樹, 宗村佳子, 千葉隆司, 新開敬行, 横山敬子, 三宅啓文, 鈴木淳, 貞升健志. 健康危機管理に関連する微生物の分子疫学解析と検査法の開発に関する研究. 東京健安研セ年報. 75. 27-40. 2024.

17) 神田真軌, 小林甲斐, 西野由香里, 大場由実, 中島崇行, 栗田翔, 久保田寛顕, 有吉司, 神門幸大, 吉田勲, 安中めぐみ, 水戸部森歌, 長谷川乃映瑠, 尾畑浩魅, 畠山薫, 福井理恵, 市川めぐみ, 三橋華子, 黒田寿美代, 山崎華恵子, 井田美樹, 小林真紀子, 上原さとみ, 高橋由美, 高林晃子, 浅山睦子, 吉川聡一, 林洋, 松島陽子, 小池裕, 林もも香, 永野智恵子, 富澤早苗, 八巻ゆみこ, 上條恭子, 山本和興, 髙田朋美, 小鍛治好恵, 渡邊趣衣, 志良堂裕子, 大澤佳浩, 小山彩音, 野口舞子, 大貫文, 岡優香, 山崎貴子, 相原三菜子, 渡邊喜美代, 鈴木淳也, 小田智子, 鈴木淳, 横山敬子, 大塚健治, 横山知子, 新藤哲也, 中嶋順一, 木下輝昭, 貞升健志, 笹本剛生, 猪又明子. ワンヘルスアプローチに基づく抗微生物薬と薬剤耐性微生物の実態把握に関する研究. 東京健安研セ年報. 75. 41-57. 2024.

18) 安中めぐみ, 長谷川乃映瑠, 久保田寛顕, 吉田勲, 鈴木淳, 貞升健志. 結核菌検査におけるゲノム解析法に関する検討. 東

京健安研セ年報．75．115-118．2024.

19) 安中めぐみ, 久保田寛顕, 長谷川乃映瑠, 伊藤仁, 小林甲斐, 森功次, 貞升健志, 千葉隆司．結核菌における薬剤耐性遺伝子変異検出の有用性の検討．東京健安研セ年報．76．57-61．2025.

20) 久保萌加, 濱畑啓悟, 森愛, 野本竜平, 磯目賢一, 川崎悠, 岩田あや, 松原康策. エコーウイルス 11 髄膜炎の小児例:神戸市 2 施設の後方視的観察研究 2023~2024. 小児感染免疫．37．165-175. 2025

21) 平良由貴, 楫理恵子, 須賀知子, 伏屋智明, 谷本佳彦, 谷本佳彦, 森愛, 野本竜平. 2024 年 8 月に神戸市で検出された麻疹ウイルス遺伝子の分子疫学解析. IASR. 46. 63-64. 2025

22) 中西典子, 藤永千波, 小松頌子, 田中忍, 向井健悟, 野本竜平, 塩谷紀代, 森本るみ, 潮見千賀, 菅澄子, 宗田由紀, 楠信也．神戸市における Streptococcus pyogenes M1UK 系統株の発生動向と分子疫学解析 感染症学雑誌. 99. 301-309. 2025

２．学会発表

1) 小林甲斐, 久保田寛顕, 水戸部森歌, 有吉司, 鈴木淳, 貞升健志. 染色体上の *bla*$_{CTX-M-14}$ の増幅が認められたイヌおよびネコ由来基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌 sequence type 38 の分子疫学的性状. 第 36 回日本臨床微生物学会総会・学術総会. 2025.

2) 内谷友美, 奥野ルミ, 有吉司, 吉田勲, 久保田寛顕, 鈴木淳, 貞升健志. 侵襲性肺炎球菌感染症由来株の血清型と血清群 24 の分子疫学解析. 第 36 回日本臨床微生物学会総会・学術総会. 2025.

3) 有吉司, 内谷友美, 奥野ルミ, 吉田勲, 久保田寛顕, 鈴木淳, 貞升健志. 都内医療機関から分離された *bla*$_{NDM}$ 搭載 IncX3 プラスミド保有腸内細菌目細菌の分子疫学解析. 第 36 回日本臨床微生物学会総会・学術総会. 2025.

H. 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

地衛研　ゲノム解析精度管理マニュアル

細菌 SNP 解析編

Version 0.5

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

変更履歴

・初版作成（）

集団感染事例における細菌 SNP 解析（情報解析）精度管理の概要

本マニュアルは、単一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism、以下 SNP）解析ツールとして SNPcaster（https://github.com/leech-rr/SNPcaster）を使用することを念頭に置いて作成されている。リードデータの品質評価（Quality Check、以下 QC）および SNP 解析両方で使用できる。

リードデータの QC

リードデータのトリミング
（アダプター配列や低クオリティデータの除去）

⬇

データカバレッジの計算
（解析対象微生物ゲノムに対して何倍量のデータが取得できたかの確認）

⬇

ドラフトゲノム配列のアセンブリ
(生物種、Total ゲノムサイズ、コンティグ数などの確認)

⬇

CheckM による最終評価
(生物種、コンタミネーションの確認)

集団事例における SNP 解析

対象となる微生物の参照株を選定（通常は標準株で構わない）

⬇

集団事例関連株のトリミング済みリードを参照株のゲノム配列にマッピング
（SNP の検出）

⬇

コアゲノムサイズの確認、系統解析を実施
（コアゲノムサイズは十分確保できているか、系統的に離れた株が解析に混ざっていないかを確認）

⬇

系統的に離れた株があった場合、それらを除いて再度 SNP 解析を実施

⬇

コアゲノムサイズが小さい場合など必要に応じて参照株を変更
（集団事例の 1 株を選択してアセンブルデータを用意し、新たな参照株として用いる）

１．はじめに

COVID-19 のパンデミック以降、次世代シーケンサー（NGS）を導入する地方衛生研究所が急増した。また、民間企業の NGS の受託解析についても以前より安価なものが増加しており、病原体のリードデータ取得のハードルは下がっている。一方で、NGS から得られるデータ量は膨大であり、データ解析のためにはバイオインフォマティクスの知識が必要となる側面があり、このことが病原体ゲノム解析におけるソフト面での問題となっている。病原細菌の分野では、集団事例における菌株解析技術として、主にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) が用いられてきたが、当該機器のサポート終了に伴う代替法の導入が急務となっている。

本マニュアルでは、これまで PFGE が担ってきた菌株の同一性に関する解析手法の代替法として、全ゲノム SNP 解析について解説する。これから全ゲノム SNP 解析を導入する施設などで、自身が採用する手法やデータが妥当であるかどうかの参考になれば幸いである。対象はショートリード（Illumina 等）を用いた単離株解析を想定している。ただし、「SNP が何個以内であれば同一の株とみなすことができるのか」という基準については、病原体ごとに状況が異なるため、汎用的な答えを用意するのは困難である。そこで本マニュアルでは、SNP 解析に至るまでのリードデータの精度や、解析に用いられた手法そのものの妥当性を評価する方法について紹介する。

なお、本マニュアルでは JIHS 国立感染症研究所細菌第一部で開発された SNPcaster（https://github.com/leech-rr/SNPcaster）の使用を前提とした記載となっているが、SNPcaster のインストールや使用方法については詳細には記載しない。インストールや使用方法については https://github.com/leech-rr/SNPcaster/tree/main/doc/manual より日本語マニュアルが入手可能である他、マニュアルを学習させた ChatGPT (URL: https://chatgpt.com/g/g-69118b0d42f48191906ba605a540cba8-snpcaster-gpt) において対話形式での情報入手が可能（ただし無料ログインが必要）なので、それらを確認してほしい。

また、本マニュアルにはデータの準備や検証を行う際に一部 Linux を使用する箇所が存在するが、コマンドについての詳細な解説は省略する。Windows パソコン（PC）を用いた Linux コマンドでのゲノムデータ取り扱いについては、厚生労働行政推進調査事業費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升健志）により実施された、ゲノムデータ解析研修会の研修資料が地方衛生研究所全国協議会のホームページ（https://www.chieiken.gr.jp/）に掲載されているので、そのマニュアルにより操作法を身に付けていただきたい。

２．リードデータの QC（品質評価）

適用範囲

- 対象：単離された病原細菌株
- 入力データ：ペアエンド FASTQ ファイル
- 推奨 PC スペック：メモリ 16–128 GB（サンプル数・アセンブル方法に依存）、CPU 8 コア以上推奨

解析ツール

本マニュアルは SNPcaster(https://github.com/leech-rr/SNPcaster)での操作を前提としている。ただし、市販のソフトウェアであっても、同等の内容が担保されていれば本マニュアルの流れに沿った解析を実行可能である。あるいは、独自にオープンソースのプログラムを組み合わせて解析することも可能である。各地衛研におけるバイオインフォマティクスの習熟度や予算を考慮して選択されたい。

QC フロー

ここではショートリードデータの品質確認方法について、以下の 4 ステップを紹介する。SNPcaster では 1 度の操作で下記の一連の解析が実行されレポートファイルが出力される。

1. トリミング（fastp など）
2. カバレッジ（深度）確認（SeqKit など）
3. アセンブルによるゲノムサイズ確認（SPAdes, SKESA など）
4. CheckM（次ページ参照）による Completeness, Contamination 確認

カバレッジとはリードデータの厚みのことであり、下記の計算式により計算される。

カバレッジ ＝（R1 + R2 の総塩基長）/ 解析対象微生物のゲノムサイズ(bp)

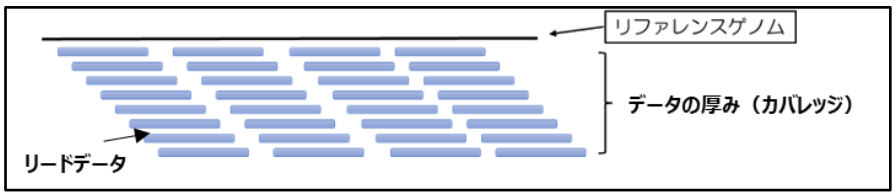


図 1. データカバレッジの概念図

信頼性のある SNP 解析を実施するうえで必要なカバレッジの目安は以下の通りである。

- ✓ 必要最低限：30x
- ✓ 推奨：50x 以上

カバレッジが 30x を下回るデータ量の検体を用いた解析では SNP の誤判定を生む可能性が高くなるため、このような検体は解析からは除外することを強く推奨する。
その他、1～4 まで考慮した QC のチェックリスト（目安）を以下に記載する。

- □ カバレッジ 30x 以上
- □ アセンブルゲノムサイズ(標準株の±10%)
- □ CheckM completeness(97%以上)
- □ CheckM contamination(3%以下)

メモ

CheckM の completeness（完全性） と contamination（汚染度） は、ゲノムアセンブリの品質を評価する上で重要な指標となる。CheckM は分類系統（門・綱・目…）ごとにそのグループが必ず持っている必須遺伝子セットが定義されたデータベースがあり、completeness はその必須遺伝子がどれだけ揃っているかを示す指標で、100%に近いほど欠落が少なく完全性が高いと判断される。contamination は本来 1 コピーのはずの必須遺伝子が複数コピー検出された場合に、多生物由来の配列が混ざっている可能性があるとして数値化される。

QC の実行（SNPcaster）

SNPcaster（Jupyter Lab 版）を使用する場合は、プロジェクト作成後にプロジェクトフォルダ内に「grape_qc_assembly.ipynb」という QC 解析用のノートブックが作成されているので、それを利用する。ノートブック内に詳細な解析手順についての記載があるので、それを確認しながら実行する。

なお「grape_qc_assembly.ipynb」で選択可能なアセンブラ（コンティグを作成するソフト）は SKESA と SPAdes との 2 種類があり、前者のほうが解析に要する時間が短い。 QC チェックリストさえクリアされれば、いずれのアセンブラを用いても問題ないが、集団事例中の株を参照配列に用いたい場合（3-4 で後述する）は SKESA の利用を推奨する。

QC を行う場合は、configuration.txt の作成を行う。まず、https://github.com/leech-rr/SNPcaster よりダウンロードした SNPcaster フォルダ内の app/notebook/sample_data/ehec 内に腸管出血性大腸菌用の「configuration.txt」ファイルがあるので、これを自身のプロジェクトフォルダにコピーする。初期値は右図の通りとなっているので、解析する菌種に応じて適宜編集すれば良い。

```
Genome size [Mbp]:  5.5
Coverage threshold:  40
Maximum number of contigs:  1000
Minimum genome size (Mbp):  4
Maximum genome size (Mbp):  6.5
Minimum completeness (%):  98
Maximum contamination (%):  2
```

解析が終了すると、プロジェクトフォルダ内に qc_assembly_[日付]_[時間]_[リスト名]のフォルダが作製される。解析フォルダ内に「qc_results.xlsx」というファイルが出力されているので、

qc のシートのデータを確認する。特に、coverage、total_length、completeness、contamination について確認し、その後の解析（SNP 解析等）に用いて良いかどうか判断する。

３．SNP 解析

本マニュアルでは、https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_datasetに記載されている、腸管出血性大腸菌の集団事例で解析されたリードデータ、を使用してSNPcasterで解析した例を示す。自施設にSNPcaster以外のツールを導入してSNP解析を試みる際も、このテストデータを使用して解析を実施し、SNPcasterの結果と比較して大きな齟齬が無いことを確認することを推奨する。

上記ページに記載のリードデータのアクセッション番号をもとに、データベースからダウンロードしても良いが作業が煩雑であるため、ここではLinux（Ubuntu）環境（WindowsのWSL2を含む）でコマンドを利用したデータの準備方法を紹介する。

なお、以下　　の網掛けでハイライトした部分はUbuntuターミナルで使用するコマンドを表す。

Ubuntuのターミナルを起動し、デスクトップなどの任意の場所に`cd`コマンドで移動して下記コマンドをタイプする

```
git clone https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_dataset.git
```

「WGS_benchmark_dataset」というフォルダがダウンロードされるので、そこに`cd`コマンドで移動する。次に、https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_datasetの「How to download short-read files」を参考にダウンロードする。「fasterq-dump_2023-05-30.sh」の利用には、SRA Toolkitのインストールが必要である。自身のPC環境に応じて、必要であればconda環境を作成してインストールする。

*SRA-Toolkitインストール参考コマンド

```
conda create -n sratools sra-tools
```

その後は、「fasterq-dump_2023-05-30.sh」と「list」ファイルがフォルダ内にあることを確認して下記コマンドでリードデータがダウンロードできる。`THREADS`は計算に使用するCPUのスレッド数なので、自身のPC環境に応じて任意の数字に入れ替える。

```
fasterq-dump_2023-05-30.sh list THREADS
```

各ファイルサイズを巻末の表に示すので、問題なくダウンロードできたかどうかを確認する際に参考にされたい。

3-1. SNP解析の実行

ダウンロードしたデータを用いてSNP解析を実行する。マニュアルとノートブック内に詳

細な解析手順についての記載があるので、それを確認しながら実行する。参照配列にはSNPcasterに付属しているSakai_BA000007.fastaを用いた。なお、SNPcasterは図2に示すフローで解析が進むパイプラインであり、BactSNP（SNP検出ソフト）にトリミングツールが付属しているため、解析にあたってはリードデータのトリミングの必要はない。

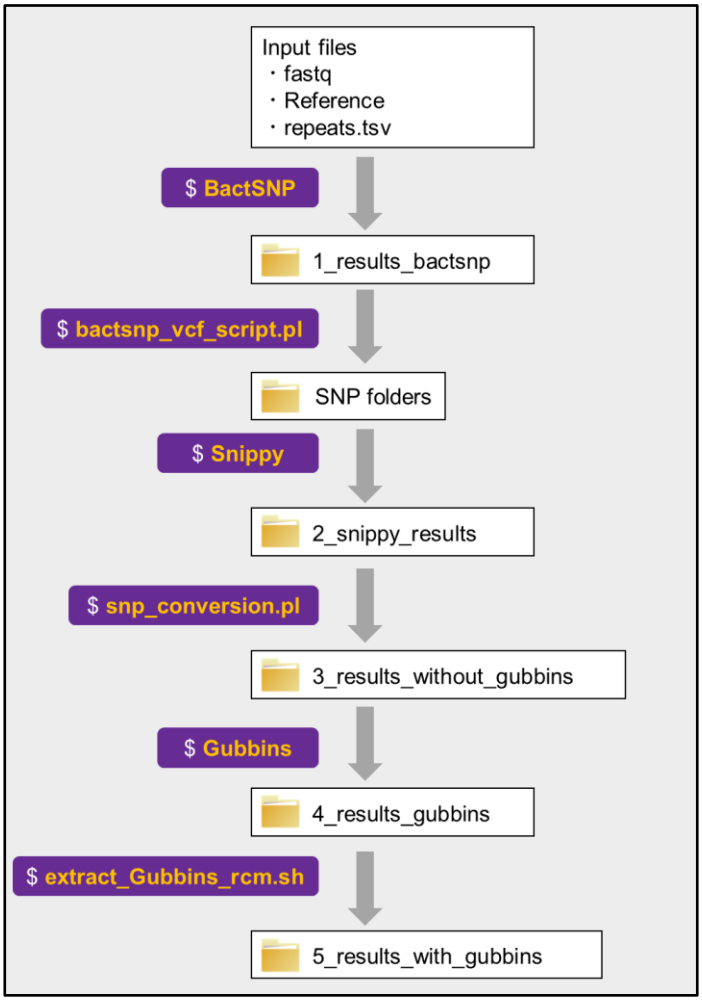


図2. SNPcasterの比較ゲノム解析フロー図

3-2. 全検体を用いたスクリーニング解析

本マニュアルでは、まず、ダウンロードした15検体（O157：10株、O121：5株）全てを用いて解析を実施した例を示す。これは、集団事例における分離株すべてを用いた解析に即した流れであると考えて良い。解析パラメータはほぼ基本値（変更なし）のままで、Gubbinsについては「実行する（１）」を選択した。解析が終了すると、プロジェクトフォルダ内に「snpcaster_[日付]_[時間]_[リスト名]」という名称のフォルダが作製され、出力ファイルが格納される。解析結果は「SNPcaster_report.txt」に集計されており、本解析では右記のようになった。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 4291372
After Gubbins : 4204425

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 74374
After Gubbins : 65665

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 74327
After Gubbins : 65627

Removed SNPs
Gubbins: 8709
```

コアゲノムサイズ（Core genome size）は参照配列の5.5Mに対して約4.3M（78%）であった。検出されたSNP数は組換え領域除去前で74,327個であり、多数のSNPsが検出されたことがわかる。それぞれの株間のSNP数をマトリックスで表示したファイルは、SNPcasterの出力フォルダ内の「3_results_without_gubbins」（組換え領域除去前）もしくは 「5_results_with_gubbins」（組換え領域除去後）に格納されている。図３は、そのうち組換え領域除去前のファイルを示したものである。このうち7万以上のSNPsが検出されている株を黄色でハイライトしているが、これらは血清型O121のグループである。

	REF	DRR14706	DRR14706	DRR14707	DRR14707	DRR14707	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969	DRR14974	DRR14975	DRR14976	DRR14976	DRR14977
REF	0	73759	73758	73759	73759	73760	138	137	136	137	137	981	980	982	982	980
DRR147067	73759	0	1	2	2	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147069	73758	1	0	1	1	2	73783	73782	73781	73782	73782	73844	73843	73845	73845	73843
DRR147072	73759	2	1	0	2	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147075	73759	2	1	2	0	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147079	73760	3	2	3	3	0	73785	73784	73783	73784	73784	73846	73845	73847	73847	73845
DRR149584	138	73784	73783	73784	73784	73785	0	3	2	3	3	1025	1024	1026	1026	1024
DRR149590	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	0	1	2	2	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149598	136	73782	73781	73782	73782	73783	2	1	0	1	1	1023	1022	1024	1024	1022
DRR149646	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	2	1	0	2	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149690	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	2	1	2	0	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149748	981	73845	73844	73845	73845	73846	1025	1024	1023	1024	1024	0	1	3	3	1
DRR149750	980	73844	73843	73844	73844	73845	1024	1023	1022	1023	1023	1	0	2	2	0
DRR149762	982	73846	73845	73846	73846	73847	1026	1025	1024	1025	1025	3	2	0	4	2
DRR149766	982	73846	73845	73846	73846	73847	1026	1025	1024	1025	1025	3	2	4	0	2
DRR149771	980	73844	73843	73844	73844	73845	1024	1023	1022	1023	1023	1	0	2	2	0

図3. dist_final_snp_matrix.tsv（全検体）の中身

3-3. 遠縁菌株の除外

集団事例におけるSNP解析では、異なる血清型やSequence Type（ST）の菌群は、解析群からは除外することが望ましい。3-2.のような例では、2つの血清型（O157とO121）が含まれており、ここでは血清型O121を除いた10検体を解析することとした。その結果の集約(SNPcaster_report.txt) は右記の通りである。コアゲノムサイズは4.9M（89%）まで上昇している一方で、総SNP数は組換え領域除去前で1,578個まで減少した。それぞれの株間のSNP数マトリックス表を図4に示す。血清型O157株間のSNP数は、図3および図4において緑色でハイライトされた部分に相当する。血清型O121を除外する前後のO157株間のSNP数を比較すると、SNP数が4桁を超える株間では、O121を除外した場合に検出SNP数が500個近く増加しているのがわかる。これは、遠縁菌株であるO121を除去したことによってコアゲノム領域が拡張され、検出対象となったSNPsが増加したことに起因する。一方で、このような場合でもSNP数が1桁の株間では大きな変化は認められなかったのは、ほとんどの検出SNPsが最初の解析の際に定義されたコア領域に含まれていたからである。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 4959266
After Gubbins : 4916717

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 1578
After Gubbins : 750

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 1521
After Gubbins : 701

Removed SNPs
Gubbins: 828
```

	REF	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969	DRR14974	DRR14975	DRR14976	DRR14976	DRR14977
REF	0	256	255	254	255	255	1372	1371	1373	1373	1371
DRR149584	256	0	3	2	3	3	1514	1513	1515	1515	1513
DRR149590	255	3	0	1	2	2	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149598	254	2	1	0	1	1	1512	1511	1513	1513	1511
DRR149646	255	3	2	1	0	2	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149690	255	3	2	1	2	0	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149748	1372	1514	1513	1512	1513	1513	0	1	3	3	1
DRR149750	1371	1513	1512	1511	1512	1512	1	0	2	2	0
DRR149762	1373	1515	1514	1513	1514	1514	3	2	0	4	2
DRR149766	1373	1515	1514	1513	1514	1514	3	2	4	0	2
DRR149771	1371	1513	1512	1511	1512	1512	1	0	2	2	0

図4. dist_final_snp_matrix.tsv（O121除外）の中身

3-4. 集団事例中の1株を参照株とした解析

3-3. で示したO157 Sakai株を参照配列とした解析では、解析対象株を血清型O157のみに限定することで十分なコア領域が確保され、近接な菌株は検出SNP数が1桁となった。このような明解なケースでは通常必要ないと考えられるが、本マニュアルでは更に集団事例のうちの1株を参照配列として解析する例を示す。

QCの実行（SNPcaster）の項目でアセンブルされたfastaファイルのうち、解析したい集団株から1株を選択し、SNPcaster.ipynbの「6. 参照配列をつなげて一つのFASTAファイルにする」を用いて、ドラフトゲノムのコンティグを連結してSNPcasterで使用可能な参照配列を作成する。その後は、作成された配列を参照配列としてSNPcasterを実行すれば良い。なお、この方法でド作成された配列を参照配列とする場合は、Gubbinsによる組換え領域の除去は実施できないので注意されたい。今回はDRR149598を参照株として、それとSNP数が1桁であった近縁の5株を解析した。その結果の集約 (SNPcaster_report.txt) は右記の通りである。コアゲノムサイズは5.2M（96%）となり、参照配列のほぼ全域がカバーされている一方で、検出SNP数は6個にまで減少した。それぞれの株間のSNP数マトリックス表を図5に示す。これまでの解析と比較して、わずかに検出SNP数の変化がみられる。これは、より近接な菌株ゲノムを参照配列としたことによってコア領域がさらに拡張され、SNP解析の解像度がさらに増加したことによるものである。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 5201544

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 6

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 6
```

	REF	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969
REF	0	2	1	0	1	2
DRR149584	2	0	3	2	3	4
DRR149590	1	3	0	1	2	3
DRR149598	0	2	1	0	1	2
DRR149646	1	3	2	1	0	3
DRR149690	2	4	3	2	3	0

図5. dist_final_snp_matrix.tsv（近接株のみ）の中身

3-2から3-4までで述べたように、コアゲノムSNPsの検出は「解析するサンプル群」や「参照配列」によって大きな影響を受ける。そのため、集団事例におけるコアゲノムSNP解析においては「近接な株同士を比較すること」が大前提となる。集団事例にNGS解析を適用する際はこのことを念頭に置き、解析しているサンプル群に遠縁の株が混ざっていないか、コアゲノム領域が十分に確保されているか（概ね75%以上を推奨）、について確認するよう努める必要がある。

冒頭でも述べたように、今後自施設において集団事例のSNP解析を導入する際には、本マニュアルに記載のデータを参考にして、自施設の解析環境が適切に機能するかどうかを確認してから解析を実行することを推奨する。

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。

厚生労働行政推進調査事業費補助金　健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升　健志）

別表．テストデータのファイルサイズ

DRR147067_R1.fastq.gz	105,783K
DRR147067_R2.fastq.gz	137,620K
DRR147069_R1.fastq.gz	112,819K
DRR147069_R2.fastq.gz	147,869K
DRR147072_R1.fastq.gz	110,675K
DRR147072_R2.fastq.gz	133,088K
DRR147075_R1.fastq.gz	95,208K
DRR147075_R2.fastq.gz	125,344K
DRR147079_R1.fastq.gz	104,785K
DRR147079_R2.fastq.gz	132,131K
DRR149584_R1.fastq.gz	144,066K
DRR149584_R2.fastq.gz	180,278K
DRR149590_R1.fastq.gz	116,620K
DRR149590_R2.fastq.gz	144,171K
DRR149598_R1.fastq.gz	154,462K
DRR149598_R2.fastq.gz	196,001K
DRR149646_R1.fastq.gz	103,696K
DRR149646_R2.fastq.gz	123,745K
DRR149690_R1.fastq.gz	146,901K
DRR149690_R2.fastq.gz	175,732K
DRR149748_R1.fastq.gz	183,890K
DRR149748_R2.fastq.gz	216,995K
DRR149750_R1.fastq.gz	163,170K
DRR149750_R2.fastq.gz	198,485K
DRR149762_R1.fastq.gz	187,530K
DRR149762_R2.fastq.gz	225,209K
DRR149766_R1.fastq.gz	160,643K
DRR149766_R2.fastq.gz	188,637K
DRR149771_R1.fastq.gz	89,887K
DRR149771_R2.fastq.gz	107,189K

地衛研　ゲノム解析精度管理マニュアル

細菌 SNP 解析編

Version 0.5

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

変更履歴

・初版作成（）

集団感染事例における細菌 SNP 解析（情報解析）精度管理の概要

本マニュアルは、単一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism、以下 SNP）解析ツールとして SNPcaster（https://github.com/leech-rr/SNPcaster）を使用することを念頭に置いて作成されている。リードデータの品質評価（Quality Check、以下 QC）および SNP 解析両方で使用できる。

リードデータの QC

リードデータのトリミング
（アダプター配列や低クオリティデータの除去）

⬇

データカバレッジの計算
（解析対象微生物ゲノムに対して何倍量のデータが取得できたかの確認）

⬇

ドラフトゲノム配列のアセンブリ
(生物種、Total ゲノムサイズ、コンティグ数などの確認)

⬇

CheckM による最終評価
(生物種、コンタミネーションの確認)

集団事例における SNP 解析

対象となる微生物の参照株を選定（通常は標準株で構わない）

⬇

集団事例関連株のトリミング済みリードを参照株のゲノム配列にマッピング
（SNP の検出）

⬇

コアゲノムサイズの確認、系統解析を実施
（コアゲノムサイズは十分確保できているか、系統的に離れた株が解析に混ざっていないかを確認）

⬇

系統的に離れた株があった場合、それらを除いて再度 SNP 解析を実施

⬇

コアゲノムサイズが小さい場合など必要に応じて参照株を変更
（集団事例の 1 株を選択してアセンブルデータを用意し、新たな参照株として用いる）

１．はじめに

COVID-19 のパンデミック以降、次世代シーケンサー（NGS）を導入する地方衛生研究所が急増した。また、民間企業の NGS の受託解析についても以前より安価なものが増加しており、病原体のリードデータ取得のハードルは下がっている。一方で、NGS から得られるデータ量は膨大であり、データ解析のためにはバイオインフォマティクスの知識が必要となる側面があり、このことが病原体ゲノム解析におけるソフト面での問題となっている。病原細菌の分野では、集団事例における菌株解析技術として、主にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) が用いられてきたが、当該機器のサポート終了に伴う代替法の導入が急務となっている。

本マニュアルでは、これまで PFGE が担ってきた菌株の同一性に関する解析手法の代替法として、全ゲノム SNP 解析について解説する。これから全ゲノム SNP 解析を導入する施設などで、自身が採用する手法やデータが妥当であるかどうかの参考になれば幸いである。対象はショートリード（Illumina 等）を用いた単離株解析を想定している。ただし、「SNP が何個以内であれば同一の株とみなすことができるのか」という基準については、病原体ごとに状況が異なるため、汎用的な答えを用意するのは困難である。そこで本マニュアルでは、SNP 解析に至るまでのリードデータの精度や、解析に用いられた手法そのものの妥当性を評価する方法について紹介する。

なお、本マニュアルでは JIHS 国立感染症研究所細菌第一部で開発された SNPcaster（https://github.com/leech-rr/SNPcaster）の使用を前提とした記載となっているが、SNPcaster のインストールや使用方法については詳細には記載しない。インストールや使用方法については https://github.com/leech-rr/SNPcaster/tree/main/doc/manual より日本語マニュアルが入手可能である他、マニュアルを学習させた ChatGPT (URL: https://chatgpt.com/g/g-69118b0d42f48191906ba605a540cba8-snpcaster-gpt) において対話形式での情報入手が可能（ただし無料ログインが必要）なので、それらを確認してほしい。

また、本マニュアルにはデータの準備や検証を行う際に一部 Linux を使用する箇所が存在するが、コマンドについての詳細な解説は省略する。Windows パソコン（PC）を用いた Linux コマンドでのゲノムデータ取り扱いについては、厚生労働行政推進調査事業費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升健志）により実施された、ゲノムデータ解析研修会の研修資料が地方衛生研究所全国協議会のホームページ（https://www.chieiken.gr.jp/）に掲載されているので、そのマニュアルにより操作法を身に付けていただきたい。

２．リードデータの QC（品質評価）

適用範囲

- 対象：単離された病原細菌株
- 入力データ：ペアエンド FASTQ ファイル
- 推奨 PC スペック：メモリ 16–128 GB（サンプル数・アセンブル方法に依存）、CPU 8 コア以上推奨

解析ツール

本マニュアルは SNPcaster(https://github.com/leech-rr/SNPcaster)での操作を前提としている。ただし、市販のソフトウェアであっても、同等の内容が担保されていれば本マニュアルの流れに沿った解析を実行可能である。あるいは、独自にオープンソースのプログラムを組み合わせて解析することも可能である。各地衛研におけるバイオインフォマティクスの習熟度や予算を考慮して選択されたい。

QC フロー

ここではショートリードデータの品質確認方法について、以下の 4 ステップを紹介する。SNPcaster では 1 度の操作で下記の一連の解析が実行されレポートファイルが出力される。

1. トリミング（fastp など）
2. カバレッジ（深度）確認（SeqKit など）
3. アセンブルによるゲノムサイズ確認（SPAdes, SKESA など）
4. CheckM（次ページ参照）による Completeness, Contamination 確認

カバレッジとはリードデータの厚みのことであり、下記の計算式により計算される。

カバレッジ ＝（R1 + R2 の総塩基長）/ 解析対象微生物のゲノムサイズ(bp)

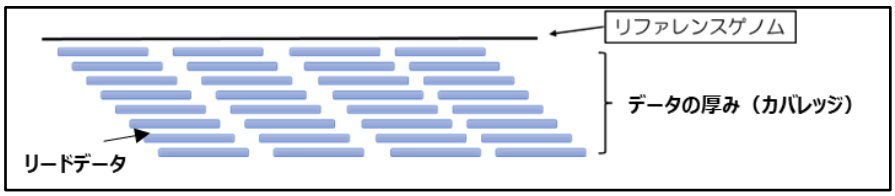


図 1. データカバレッジの概念図

信頼性のある SNP 解析を実施するうえで必要なカバレッジの目安は以下の通りである。

- ✓ 必要最低限：30x
- ✓ 推奨：50x 以上

カバレッジが 30x を下回るデータ量の検体を用いた解析では SNP の誤判定を生む可能性が高くなるため、このような検体は解析からは除外することを強く推奨する。
その他、1～4 まで考慮した QC のチェックリスト（目安）を以下に記載する。

- □ カバレッジ 30x 以上
- □ アセンブルゲノムサイズ(標準株の±10%)
- □ CheckM completeness(97%以上)
- □ CheckM contamination(3%以下)

メモ

CheckM の completeness（完全性） と contamination（汚染度） は、ゲノムアセンブリの品質を評価する上で重要な指標となる。CheckM は分類系統（門・綱・目…）ごとにそのグループが必ず持っている必須遺伝子セットが定義されたデータベースがあり、completeness はその必須遺伝子がどれだけ揃っているかを示す指標で、100%に近いほど欠落が少なく完全性が高いと判断される。contamination は本来 1 コピーのはずの必須遺伝子が複数コピー検出された場合に、多生物由来の配列が混ざっている可能性があるとして数値化される。

QC の実行（SNPcaster）

SNPcaster（Jupyter Lab 版）を使用する場合は、プロジェクト作成後にプロジェクトフォルダ内に「grape_qc_assembly.ipynb」という QC 解析用のノートブックが作成されているので、それを利用する。ノートブック内に詳細な解析手順についての記載があるので、それを確認しながら実行する。

なお「grape_qc_assembly.ipynb」で選択可能なアセンブラ（コンティグを作成するソフト）は SKESA と SPAdes との 2 種類があり、前者のほうが解析に要する時間が短い。 QC チェックリストさえクリアされれば、いずれのアセンブラを用いても問題ないが、集団事例中の株を参照配列に用いたい場合（3-4 で後述する）は SKESA の利用を推奨する。

QC を行う場合は、configuration.txt の作成を行う。まず、https://github.com/leech-rr/SNPcaster よりダウンロードした SNPcaster フォルダ内の app/notebook/sample_data/ehec 内に腸管出血性大腸菌用の「configuration.txt」ファイルがあるので、これを自身のプロジェクトフォルダにコピーする。初期値は右図の通りとなっているので、解析する菌種に応じて適宜編集すれば良い。

```
Genome size [Mbp]:  5.5
Coverage threshold:  40
Maximum number of contigs:  1000
Minimum genome size (Mbp):  4
Maximum genome size (Mbp):  6.5
Minimum completeness (%):  98
Maximum contamination (%):  2
```

解析が終了すると、プロジェクトフォルダ内に qc_assembly_[日付]_[時間]_[リスト名]のフォルダが作製される。解析フォルダ内に「qc_results.xlsx」というファイルが出力されているので、

qc のシートのデータを確認する。特に、coverage、total_length、completeness、contamination について確認し、その後の解析（SNP 解析等）に用いて良いかどうか判断する。

３．SNP 解析

本マニュアルでは、https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_datasetに記載されている、腸管出血性大腸菌の集団事例で解析されたリードデータ、を使用してSNPcasterで解析した例を示す。自施設にSNPcaster以外のツールを導入してSNP解析を試みる際も、このテストデータを使用して解析を実施し、SNPcasterの結果と比較して大きな齟齬が無いことを確認することを推奨する。

上記ページに記載のリードデータのアクセッション番号をもとに、データベースからダウンロードしても良いが作業が煩雑であるため、ここではLinux（Ubuntu）環境（WindowsのWSL2を含む）でコマンドを利用したデータの準備方法を紹介する。

なお、以下　　の網掛けでハイライトした部分はUbuntuターミナルで使用するコマンドを表す。

Ubuntuのターミナルを起動し、デスクトップなどの任意の場所に`cd`コマンドで移動して下記コマンドをタイプする

```
git clone https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_dataset.git
```

「WGS_benchmark_dataset」というフォルダがダウンロードされるので、そこに`cd`コマンドで移動する。次に、https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_datasetの「How to download short-read files」を参考にダウンロードする。「fasterq-dump_2023-05-30.sh」の利用には、SRA Toolkitのインストールが必要である。自身のPC環境に応じて、必要であればconda環境を作成してインストールする。

*SRA-Toolkitインストール参考コマンド

```
conda create -n sratools sra-tools
```

その後は、「fasterq-dump_2023-05-30.sh」と「list」ファイルがフォルダ内にあることを確認して下記コマンドでリードデータがダウンロードできる。`THREADS`は計算に使用するCPUのスレッド数なので、自身のPC環境に応じて任意の数字に入れ替える。

```
fasterq-dump_2023-05-30.sh list THREADS
```

各ファイルサイズを巻末の表に示すので、問題なくダウンロードできたかどうかを確認する際に参考にされたい。

3-1. SNP解析の実行

ダウンロードしたデータを用いてSNP解析を実行する。マニュアルとノートブック内に詳

細な解析手順についての記載があるので、それを確認しながら実行する。参照配列にはSNPcasterに付属しているSakai_BA000007.fastaを用いた。なお、SNPcasterは図2に示すフローで解析が進むパイプラインであり、BactSNP（SNP検出ソフト）にトリミングツールが付属しているため、解析にあたってはリードデータのトリミングの必要はない。

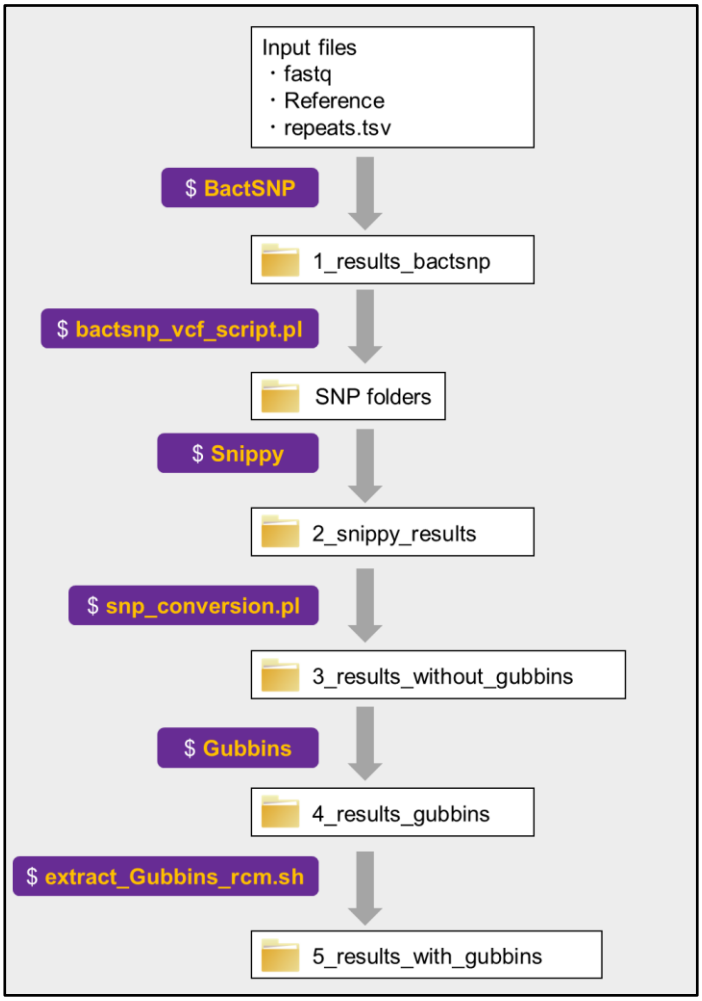


図2. SNPcasterの比較ゲノム解析フロー図

3-2. 全検体を用いたスクリーニング解析

本マニュアルでは、まず、ダウンロードした15検体（O157：10株、O121：5株）全てを用いて解析を実施した例を示す。これは、集団事例における分離株すべてを用いた解析に即した流れであると考えて良い。解析パラメータはほぼ基本値（変更なし）のままで、Gubbinsについては「実行する（１）」を選択した。解析が終了すると、プロジェクトフォルダ内に「snpcaster_[日付]_[時間]_[リスト名]」という名称のフォルダが作製され、出力ファイルが格納される。解析結果は「SNPcaster_report.txt」に集計されており、本解析では右記のようになった。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 4291372
After Gubbins : 4204425

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 74374
After Gubbins : 65665

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 74327
After Gubbins : 65627

Removed SNPs
Gubbins: 8709
```

コアゲノムサイズ（Core genome size）は参照配列の5.5Mに対して約4.3M（78%）であった。検出されたSNP数は組換え領域除去前で74,327個であり、多数のSNPsが検出されたことがわかる。それぞれの株間のSNP数をマトリックスで表示したファイルは、SNPcasterの出力フォルダ内の「3_results_without_gubbins」（組換え領域除去前）もしくは 「5_results_with_gubbins」（組換え領域除去後）に格納されている。図３は、そのうち組換え領域除去前のファイルを示したものである。このうち7万以上のSNPsが検出されている株を黄色でハイライトしているが、これらは血清型O121のグループである。

	REF	DRR14706	DRR14706	DRR14707	DRR14707	DRR14707	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969	DRR14974	DRR14975	DRR14976	DRR14976	DRR14977
REF	0	73759	73758	73759	73759	73760	138	137	136	137	137	981	980	982	982	980
DRR147067	73759	0	1	2	2	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147069	73758	1	0	1	1	2	73783	73782	73781	73782	73782	73844	73843	73845	73845	73843
DRR147072	73759	2	1	0	2	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147075	73759	2	1	2	0	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147079	73760	3	2	3	3	0	73785	73784	73783	73784	73784	73846	73845	73847	73847	73845
DRR149584	138	73784	73783	73784	73784	73785	0	3	2	3	3	1025	1024	1026	1026	1024
DRR149590	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	0	1	2	2	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149598	136	73782	73781	73782	73782	73783	2	1	0	1	1	1023	1022	1024	1024	1022
DRR149646	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	2	1	0	2	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149690	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	2	1	2	0	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149748	981	73845	73844	73845	73845	73846	1025	1024	1023	1024	1024	0	1	3	3	1
DRR149750	980	73844	73843	73844	73844	73845	1024	1023	1022	1023	1023	1	0	2	2	0
DRR149762	982	73846	73845	73846	73846	73847	1026	1025	1024	1025	1025	3	2	0	4	2
DRR149766	982	73846	73845	73846	73846	73847	1026	1025	1024	1025	1025	3	2	4	0	2
DRR149771	980	73844	73843	73844	73844	73845	1024	1023	1022	1023	1023	1	0	2	2	0

図3. dist_final_snp_matrix.tsv（全検体）の中身

3-3. 遠縁菌株の除外

集団事例におけるSNP解析では、異なる血清型やSequence Type（ST）の菌群は、解析群からは除外することが望ましい。3-2.のような例では、2つの血清型（O157とO121）が含まれており、ここでは血清型O121を除いた10検体を解析することとした。その結果の集約(SNPcaster_report.txt) は右記の通りである。コアゲノムサイズは4.9M（89%）まで上昇している一方で、総SNP数は組換え領域除去前で1,578個まで減少した。それぞれの株間のSNP数マトリックス表を図4に示す。血清型O157株間のSNP数は、図3および図4において緑色でハイライトされた部分に相当する。血清型O121を除外する前後のO157株間のSNP数を比較すると、SNP数が4桁を超える株間では、O121を除外した場合に検出SNP数が500個近く増加しているのがわかる。これは、遠縁菌株であるO121を除去したことによってコアゲノム領域が拡張され、検出対象となったSNPsが増加したことに起因する。一方で、このような場合でもSNP数が1桁の株間では大きな変化は認められなかったのは、ほとんどの検出SNPsが最初の解析の際に定義されたコア領域に含まれていたからである。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 4959266
After Gubbins : 4916717

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 1578
After Gubbins : 750

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 1521
After Gubbins : 701

Removed SNPs
Gubbins: 828
```

	REF	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969	DRR14974	DRR14975	DRR14976	DRR14976	DRR14977
REF	0	256	255	254	255	255	1372	1371	1373	1373	1371
DRR149584	256	0	3	2	3	3	1514	1513	1515	1515	1513
DRR149590	255	3	0	1	2	2	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149598	254	2	1	0	1	1	1512	1511	1513	1513	1511
DRR149646	255	3	2	1	0	2	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149690	255	3	2	1	2	0	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149748	1372	1514	1513	1512	1513	1513	0	1	3	3	1
DRR149750	1371	1513	1512	1511	1512	1512	1	0	2	2	0
DRR149762	1373	1515	1514	1513	1514	1514	3	2	0	4	2
DRR149766	1373	1515	1514	1513	1514	1514	3	2	4	0	2
DRR149771	1371	1513	1512	1511	1512	1512	1	0	2	2	0

図4. dist_final_snp_matrix.tsv（O121除外）の中身

3-4. 集団事例中の1株を参照株とした解析

3-3. で示したO157 Sakai株を参照配列とした解析では、解析対象株を血清型O157のみに限定することで十分なコア領域が確保され、近接な菌株は検出SNP数が1桁となった。このような明解なケースでは通常必要ないと考えられるが、本マニュアルでは更に集団事例のうちの1株を参照配列として解析する例を示す。

QCの実行（SNPcaster）の項目でアセンブルされたfastaファイルのうち、解析したい集団株から1株を選択し、SNPcaster.ipynbの「6. 参照配列をつなげて一つのFASTAファイルにする」を用いて、ドラフトゲノムのコンティグを連結してSNPcasterで使用可能な参照配列を作成する。その後は、作成された配列を参照配列としてSNPcasterを実行すれば良い。なお、この方法でド作成された配列を参照配列とする場合は、Gubbinsによる組換え領域の除去は実施できないので注意されたい。今回はDRR149598を参照株として、それとSNP数が1桁であった近縁の5株を解析した。その結果の集約 (SNPcaster_report.txt) は右記の通りである。コアゲノムサイズは5.2M（96%）となり、参照配列のほぼ全域がカバーされている一方で、検出SNP数は6個にまで減少した。それぞれの株間のSNP数マトリックス表を図5に示す。これまでの解析と比較して、わずかに検出SNP数の変化がみられる。これは、より近接な菌株ゲノムを参照配列としたことによってコア領域がさらに拡張され、SNP解析の解像度がさらに増加したことによるものである。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 5201544

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 6

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 6
```

	REF	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969
REF	0	2	1	0	1	2
DRR149584	2	0	3	2	3	4
DRR149590	1	3	0	1	2	3
DRR149598	0	2	1	0	1	2
DRR149646	1	3	2	1	0	3
DRR149690	2	4	3	2	3	0

図5. dist_final_snp_matrix.tsv（近接株のみ）の中身

3-2から3-4までで述べたように、コアゲノムSNPsの検出は「解析するサンプル群」や「参照配列」によって大きな影響を受ける。そのため、集団事例におけるコアゲノムSNP解析においては「近接な株同士を比較すること」が大前提となる。集団事例にNGS解析を適用する際はこのことを念頭に置き、解析しているサンプル群に遠縁の株が混ざっていないか、コアゲノム領域が十分に確保されているか（概ね75%以上を推奨）、について確認するよう努める必要がある。

冒頭でも述べたように、今後自施設において集団事例のSNP解析を導入する際には、本マニュアルに記載のデータを参考にして、自施設の解析環境が適切に機能するかどうかを確認してから解析を実行することを推奨する。

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。

厚生労働行政推進調査事業費補助金　健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升　健志）

別表．テストデータのファイルサイズ

DRR147067_R1.fastq.gz	105,783K
DRR147067_R2.fastq.gz	137,620K
DRR147069_R1.fastq.gz	112,819K
DRR147069_R2.fastq.gz	147,869K
DRR147072_R1.fastq.gz	110,675K
DRR147072_R2.fastq.gz	133,088K
DRR147075_R1.fastq.gz	95,208K
DRR147075_R2.fastq.gz	125,344K
DRR147079_R1.fastq.gz	104,785K
DRR147079_R2.fastq.gz	132,131K
DRR149584_R1.fastq.gz	144,066K
DRR149584_R2.fastq.gz	180,278K
DRR149590_R1.fastq.gz	116,620K
DRR149590_R2.fastq.gz	144,171K
DRR149598_R1.fastq.gz	154,462K
DRR149598_R2.fastq.gz	196,001K
DRR149646_R1.fastq.gz	103,696K
DRR149646_R2.fastq.gz	123,745K
DRR149690_R1.fastq.gz	146,901K
DRR149690_R2.fastq.gz	175,732K
DRR149748_R1.fastq.gz	183,890K
DRR149748_R2.fastq.gz	216,995K
DRR149750_R1.fastq.gz	163,170K
DRR149750_R2.fastq.gz	198,485K
DRR149762_R1.fastq.gz	187,530K
DRR149762_R2.fastq.gz	225,209K
DRR149766_R1.fastq.gz	160,643K
DRR149766_R2.fastq.gz	188,637K
DRR149771_R1.fastq.gz	89,887K
DRR149771_R2.fastq.gz	107,189K

別紙４

研究成果の刊行に関する一覧表

１０ポイント入力

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
黒木 絢士郎	ノロウイルス遺伝子型別における RNA-Seq NGS 解析サイトの活用	東京都健康安全研究センター微生物部	東京都微生物検査情報	東京都	東京都	2024	6-8

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
貞升健志	地方衛生研究所における次世代シークエンサーの利用と課題	東京健安研セ年報	75	77-81	2024
長島真美，藤原卓士，林り，他	健康危機管理に関連する微生物の分子疫学解析と検査法の開発に関する研究	東京健安研セ年報	75	27-40	2024
Kaku Y, Okumura K, Kawa S, et al	Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XEC variant.	Lancet Infect Dis.	Dec; 24(12)	e736. doi: 10.1016/S1473-3099(24)00731-X. Epub 2024 Nov 6.	2024
Kumagai R, Kawakami M Kasuya F, et al	Sewage surveillance of SARS-CoV-2 in Tokyo (May 2020-June 2022): method using high-throughput, fully-automated platform.,	Virusdisease	Sep; 35(3)	520-524	2024
Mitobe M, Kubota H, Kobayashi K, et al	Clustering of Polymorphic Membrane Protein E Clade in Chlamydia trachomatis Lineages from Men Who Have Sex with Men.	Emerg Infect Dis.	30(10)	2183-2187.	2024
Uchitani Y, Okuno R, Ariyoshi T, et al	Genetic characteristics of invasive pneumococcal disease-derived Streptococcus pneumoniae of serogroup 24 isolated	J Infect Chemother.	202	31(1): 102484.	2025

	in Tokyo, Japan.				
Ando N, Mizushima D, M, et al	Prolonged sitafloxacin and doxycycline combination regimen for treating infections by highly resistant Mycoplasma genitalium.	J Antimicrob Chemother.	80(1)	247-253	2025
Kubota H, Okuno R, Ke et al	Multiplex Amplicon Sequencing for the Comprehensive Genotyping of Mycoplasma pneumoniae.	Microbiol. Spectr.	In press		
Nakamura K, Taniguchi Gotoh Y, et al	Diversity of Shiga toxin transducing phages in Escherichia coli O145:H28 and the different Shiga toxin 2 production levels associated with short- or long-tailed phages.	Front Microbiol.	15	1453887	2024.
Nomoto R, Nakanishi N Komatsu S, et al	Complete genome sequences of Escherichia coli KA0011 clinical isolate used as a quality control strain of carbapenem susceptibility testing in Japan.	Microbiol Resour Announc.	13	e0015524	2024
Nomoto R, Osawa K, Ki S, et al	Metagenome and Resistome Analysis of Beta-Lactam-Resistant Bacteria Isolated from River Waters in Surabaya, Indonesia.	Microorganisms.	12	199	2024
神田真軌, 小林甲斐, 百里, 他	ワンヘルスアプローチに基づく抗微生物薬と薬剤耐性微生物の実態把握に関する研究.	東京健安研セ年報	75	41-57	2024
安中めぐみ, 長谷川乃明保田寛顕, 他	結核菌検査におけるゲノム解析法に関する検討	東京健安研セ年報	75	115-118	2024
Seto J, Inoue S, Abe S, Terashita K, Endo Y, Fujii S, et al.	A case of endogenous and collateral reactivation caused by two Mycobacterium tuberculosis subclones.	J Infect Chemother.	31	102795	2025
Komabayashi K, Chikaoka S, Awano H, Abe A, Sendo D, Furuyama M, et al.	Parechovirus A3 infections, including myalgia, in Yamagata, Japan between 2022 and	Jpn J Infect Dis (in press).			2026

	2023 and their next-generation sequencing analyses.				
Kawashima A, Tsuchiya K, Kuroki K, Nagashima M, Koizumi Y, Nakamoto T, Mizushima D, Aoki T, Sadamasu K, Teruya K, Yoshimura K, Gatanaga H.	Prolonged severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection and intrahost viral evolution in a severely immunocompromised patient with human immunodeficiency virus infection：A whole-genome sequencing study.	Int J Infect Dis.	Feb 3;165	108453. doi: 10.1016/j.ijid.2026.108453.	2026
Uriu K, Okumura K, Uwamino Y, Chen L, Tolentino JE, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Ito J, Sato K; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium.	Virological characteristics of the SARS-CoV-2 NB.1.8.1 variant	Lancet Infect Dis.	Aug;25 (8)	e443 doi: 10.1016/S1473-3099(25)00356-1	2025
Ishitsuka T, Sugiyama M, Kubota H, Takai S, Kakuda T, Suzuki Y.	Isolation of Rhodococcus equi bacteriophage ReT1 and investigation of its bactericidal effect.	Microb Pathog.	207	107868	2025
Aoki W, Uwamino Y, Niida N, Kubota H, Kamoshita Y, Inose R, Nagata M, Ishihara O, Uno S, Yoshifuji A, Namkoong H, Hasegawa N, Matsushita H.	Cefiderocol susceptibility of Stenotrophomonas maltophilia species complex and carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from blood cultures at a university hospital in Tokyo, Japan.	J Glob Antimicrob Resist.	44	251-255	2025
Aoki W, Uwamino Y, Kubota H, Kamoshita Y, Inose R, Nagata M, Namkoong H, Matsushita H.	Evaluation of in vitro efficacy of aztreonam-nacubactam and cefepime-nacubactam against clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia.	Antimicrob Agents Chemother.	69	E0075525	2025

Kobayashi K, Kubota H, Ariyoshi T, Suzuki Y, Mori K, Suzuki J, Ochiai Y, Sadamasu K, Chiba T.	Differential Copy Number of Chromosomal blaCTX-M-14 in Escherichia coli Sequence Type ST38 from Companion Dogs and Cats.	Curr Microbiol.	83	189	2026
安中めぐみ, 久保田寛顕, 長谷川乃映瑠, 伊藤仁, 小林甲斐, 森功次, 貞升健志, 千葉隆司	結核菌における薬剤耐性遺伝子変異検出の有用性の検討	東京健安研セ年報	76	57-61	2025
Tanimoto Y, Ohyama M, Ito E, Akiyoshi K, Onishi Y, Mori A, Nomoto R.	Whole genome-based surveillance for human adenovirus-related diseases in Kobe City, Japan, 2018-2022.	BMC Res Notes.	18	170	2025
Komatsu S, Nomoto R, Nakanishi N.	Stability of a blaGES-5-carrying plasmid in a Serratia marcescens nosocomial outbreak.	J Infect Chemother.	31	102742	2025
Hiratsuka T, Nakanishi N, Akita H, Masuda K, Komatsu S, Nomoto R, Amemura-Maekawa J.	large outbreak investigation of Legionnaires' disease associated with a public bath facility in Hiroshima, Japan, using PFGE, SBT, MLVA, and whole-genome sequencing.	Int J Med Microbiol.	321	151680	2025
Izuta K, Nishikubo M, Nomoto R, Sumitomo S, Matsuoka Y, Seo R, Nishioka H, Ariyoshi K, Sando E.	Systemic lupus erythematosus mimicking Japanese spotted fever due to Rickettsia japonica detection in an eschar: a case report.	BMC Infect Dis. Epub ahead of print.			2026
久保萌加, 濱畑啓悟, 森愛, 野本竜平, 磯目賢一, 川崎悠, 岩田あや, 松原康策	エコーウイルス 11 髄膜炎の小児例:神戸市 2 施設の後方視的観察研究 2023~2024.	小児感染免疫.	37	165-175	2025
平良由貴, 楫理恵子, 須賀知子, 伏屋智明, 谷本佳彦, 谷本佳彦, 森愛, 野本竜平	2024 年 8 月に神戸市で検出された麻疹ウイルス遺伝子の分子疫学解析.	IASR	46	63-64	2025
中西典子, 藤永千波, 小松頌子, 田中忍, 向井健悟, 野本竜平,	神戸市における Streptococcus pyogenes M1UK 系統株の発生動向と分	感染症学雑誌	99	301-309	2025

塩谷紀代，森本るみ，潮見千賀，菅澄子，宗田由紀，楠信也	子疫学解析				
貞升健志	地方衛生研究所における次世代シーケンサー解析から検査導入までの育成段階	東京健安研セ年報	76	25-31	2025

地方衛生研究所の病原体ゲノム解析における人材育成のための要点



令和 7 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究（研究代表者　貞升健志）

2026 年 3 月

表紙の画像は、ゲノム、サイクル、人材育成等をキーワードとし、
生成 AI（Image Creator）で作成したものです。

はじめに

地方衛生研究所（地衛研）は都道府県、政令指定都市及び中核市等に設置されている公的試験研究機関である。2023 年、地衛研は地域における科学的かつ技術的拠点となる機関として法制化された。

我が国における総人口は、2004 年をピークに急激に減少し、出生率は 2024 年に 1.15 と過去最低となった。このような状況下で、新たな若い人材が全国の地方衛生研究所に配属され続けるような楽観的な状況はもはや期待できない。一方で、健康危機対応に待ったはなく、地域における有事対応は突然やってくる。

地衛研が地域の健康危機管理の技術的拠点として的確に対応していくためには、日々の人材育成が重要な要素となる。特に、病原体ゲノム解析等の新たな知識・技術に関する分野での進歩は著しく、一つの地衛研だけで解決できない側面もあり、全国の地衛研が一体となって考えていくべきである。

本ガイドラインは、「地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究班（24LA2003）」において実践した内容を軸とし、地衛研における微生物分野の人材育成マニュアル等の作成時に、利用または考慮すべき事項を要点としてまとめたものである。

1. 遠隔地 OJT を利用した人材育成

多くの地方衛生研究所（地衛研）では、これまで、日々の業務を通じて知識や技能を身につける OJT（職場内研修） を中心に、必要に応じて 外部研修（Off-JT） を組み合わせる形で人材育成が行われてきた。こうした継続的な人材育成は、職員一人ひとりの成長を促すとともに、人が人を育てる文化を組織に根付かせ、地衛研全体の能力向上に不可欠である。

一方で、次世代シーケンサー（NGS）を用いた病原体ゲノム解析 の分野では、従来の OJT が十分に機能しない場合がある。これは、技術が高度かつ専門的であるため、各地衛研に OJT を担える指導人材がまだ存在しない可能性があるためである。

また、Off-JT についても、地理的制約や社会的な研修ニーズ、予算、講義内容との適合などの課題があり、必ずしも効果的に実施できるとは限らない。加えて、ゲノム解析に必要な機器やデジタル環境など、ハード面の課題も少なくない。このため、地衛研共通で利用できる解析プラットフォームや、人材育成・評価に関する方針やマニュアルの整備が求められる。

さらに、学ぶ側の視点に立つと、自ら学ぶ姿勢（自助） や 同僚から学ぶ仕組み（共助）が重要となる。その実現には、遠隔地でも実施可能な OJT の推進が不可欠であり、対応可能な地衛研が教育支援や人材派遣などの形で協力していくことが重要である。

［メモ］地方衛生研究所全国協議会（地全協）は、健康危機管理の技術的拠点である地衛研の集合体であり、6 ブロック 86 機関が所属している。共に支え合う関係であると同時に、切磋琢磨していくことで、地衛研の技術等の質的向上が期待できる。

２．研修・検査等の手法の見える化（開発を含めて）

一般的な人材育成の現場では、多くの研修用資料が整備されており、比較的容易に入手することができる。一方で、ゲノム解析に関する技術や知識を扱った研修資料は限られているのが現状である。さらに、国から公定法や解析用プラットフォームが迅速に示されない場合も多く、研修を実施するための基盤が十分に整っていないことも少なくない。

このような状況では、ゲノム解析関連の研修を担当する者（研修実施者）は、自ら最適な手法や資料を選定、あるいは新たに作成し、研修教材として活用していく必要がある。また、作成・活用された研修手法や資料については、全国で共有し活用できるよう標準化を進めることが重要であり、関係機関が連携して取り組んでいくことが求められる。

［メモ］従来から各地衛研では、JIHS 国立感染症研究所から研修等を通じて示されたマニュアル等を標準操作手順書に落し込み、検査等で活用してきた。しかしながら、緊急時等にマニュアルそのものがなかったり、タイムリーな人材育成研修が受けられない場合が想定される。特に、人事異動が定期的に実施される職場では、このような状況が多い傾向が認められる。

３．E-learning による個別最適な学びの手助け

標準的な手法や研修資料が整備されていれば、個人レベルでの知識習得が可能となり、学習はより容易になる。自ら学ぶ機会を支援する手段としては、基礎から応用までを網羅した定期的な講演会の開催と、その内容のアーカイブ化が有効である。

地衛研に勤務する職員は、それぞれ専門的なバックグラウンドが異なり、研修の進捗も個人差があることから、短期間で一律に習得することは難しい。しかし、Web 研修などのツールを活用し、講演内容をアーカイブ化することで、時間や場所に制約されることなく、誰もが何度でも学習できる環境（E-learning 化）を整えることができる。

そのため、定期的に実施する講演会等については、内容の充実や更新を継続しながら、計画的にアーカイブ化していくことが必要である。

［メモ］従来から、論文を読み、論文を基にトライ＆エラーを繰り返し実施し、学んできたが、映像のアップロードや聴講が容易となった現在では、学びの手助けとして、これらの資料を活用しない手はないと言える。

４．目指すべき NGS 関連スキル

地衛研には、感染症や食中毒、それらの原因となる病原体について、試験検査、調査、研究を行い、関連情報を収集・分析・公表する業務を、着実かつ創意工夫をもって遂行できる人材が求められる。

これらの業務の一環として、積極的疫学調査などにおいてエビデンスを得る目的で、NGS による病原体ゲノム解析を実施する場合がある。その際に必要とされるスキルは多岐にわたり、どの水準まで求めるかについては、各地衛研がそれぞれの役割や体制に応じて個別に設定する必要がある。

以下に、ゲノム解析において求められるスキルの例を示す。

1）健康危機管理において、目的に応じた病原体ゲノム検査を適切に選択できること
2）健康危機管理事例に関する病原体ゲノム解析を実施できること
3）上記 1）および 2）について、知識や技術を深化させ、創造的に活用できる段階を目指すこと
4）そのほかの事項については、「地方衛生研究所の微生物分野における人材育成マニュアル作成のための要点」を参照されたい

５．関連スキルに対する熟達化

人が経験を積みながら実践的な知識や技能を身につけ、初心者から熟達者へと成長していく長期的な学習過程を熟達化という。熟達化は、表に示すとおり、

・手続き的熟達化（業務歴 1～2 年目）
・定型的熟達化（業務歴 3～5 年目）
・適応的熟達化（業務歴およそ 6～10 年目）
・創造的熟達化（業務歴およそ 11 年目以降）

の各段階に分けることができる。

各地衛研においては、こうした熟達化が進んだ職員をより多く育成・確保することが理想である。そのためには、職員一人ひとりの熟達化の進み具合や、その深さを客観的に把握し、組織として熟達化を計画的に推進していくことが重要である。

［メモ］最終的に、全ての地衛研で多くの分野に対する多くの熟達者を抱えることが目標である。

表　熟達化の段階

1 手続き的熟達化（業務歴１～2年目） **業務に関する経験の無い者は「初心者」と呼ばれ、熟達化はほとんど進んでいない。**
2 定型的熟達化（業務歴3～5年目） **定型的な業務であれば速く正確に行うことができるようになる。**
3 適応的熟達化（業務歴およそ6～10年目） **状況に応じて類推しながら業務を進められる状態。俗にいう「中堅者」で、経験からの知識や想像力を発揮して非定型的な業務を進めることができる。**
4 創造的熟達化（業務歴およそ11年目以降） **高いレベルのパフォーマンスを効率よく正確に発揮できている状態をいう。この域に達したものを「熟達者」という。状況に応じた新たな手順やルール、技術を編み出すことができる。**

「眞﨑大輔監修：人材育成ハンドブック，ダイヤモンド社，2019」より引用改変

６．ブロックを拠点とした人材育成

全国の地衛研は、地域ごとに地理的に近い研究所同士がブロック単位でまとめられている。ブロック単位で考えれば、NGS を用いた解析に精通した OJT 人材が全く存在しない状況は、個々の地衛研で考える場合に比べて大幅に少なくなると考えられる。

同一ブロック内の地衛研は、日常的に顔を合わせる機会も多く、相互に連携しやすい関係にあることから、OJT を実施しやすい土壌がすでに整っている。特に、NGS 解析に必要な高性能な解析用 PC の貸与や共同利用は、研修を進める上での初期段階として重要な要素となり得る。

そこで、ブロックごとに研修の基盤となる拠点（ブロック拠点）を整備し、この拠点を中心とした包括的な研修を定期的に実施することで、ブロック内の連携強化や、地衛研全体の技術力および人材育成水準の底上げが期待できる（図）。

さらに、同じ研修を受講した職員や研修を実施した職員同士のつながりは、協働的な学びを促進する「共助」につながり、その後の知識や技術の継続的な蓄積、さらには長期的な協力関係の構築にも寄与する。

［メモ］地全協は全国で６つのブロックに分割される。全国一律のみでなく、ブロックを拠点とした人材育成研修は、協働的な学び（共助）において効果的である。

７．ゲノム解析におけるブロック拠点の選定要素

ゲノム解析におけるブロック拠点の選定要件としては、以下のような点が考えられる。中でも、ブロック拠点として主体的に活動する意思を持つ職員の存在と選定は、極めて重要な要素である。

1）解析用 PC の性能

NGS 解析を円滑に実施できる十分な処理能力を有していること

2）良好なインターネット環境

大容量データの送受信や、オンライン研修・遠隔支援に支障がない通信環境が整っていること

3）人材と意識（熱意）

ゲノム解析や人材育成に意欲を持ち、継続的に取り組む人材が確保されていること

4）定期的な研修会の実施体制

ブロック内外の職員を対象とした研修を、計画的かつ継続的に実施できる体制があること

5）各地衛研からの移動距離・時間

ブロック内の地衛研から無理なく移動でき、対面研修が実施しやすい立地であること

8．学びのサイクル化

前述したさまざまな研修を受けた職員が、研修で得た知識や技術を所属先に持ち帰り、実際の業務で実践・振り返り（復習）を行うことで、学びは定着していく。

さらに、所内での伝達講習などを通じて知識を共有するだけでなく、他の地衛研における研修会で講師を務めることにより、理解は一層深まり、学びの熟達化と固定化が加速される。

［メモ］研修を受けた職員が次なる研修の実施者として行動することができると、学びの熟達化、固定化が加速される。新たな研修を始める場合には、新たな人材を発掘するのも人材育成的に良い。

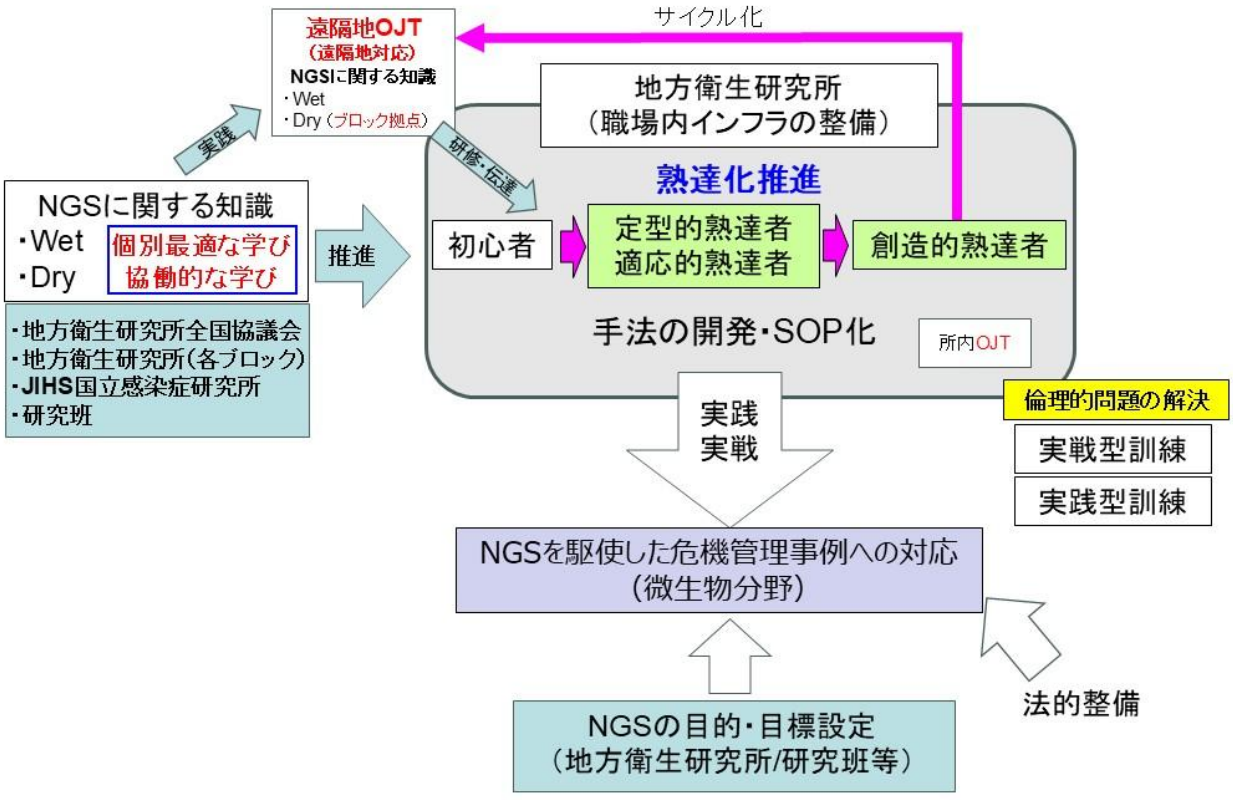


図　地方衛生研究所NGS分野における危機管理対応（微生物分野）に向けた体制図

９．NGS の実戦での活用

NGS 解析技術については、単なる研究目的にとどめるのではなく、行政検査への実践的な活用を検討していかなければならない。しかし、行政検査への導入については、新型コロナウイルス感染症のように国から通知等が示されない限り、各自治体や各地衛研の判断に委ねられる。そのため、検査責任者など管理職の判断・決断が極めて重要である。その決断を支えるためにも、全国の地衛研において行政検査での NGS 活用事例を着実に積み重ね、実績として共有・蓄積していくことが重要である。

［メモ］最終的な研修成果の目標は、地衛研に求められる感染症危機管理への実践的な活用である。その実現にあたっては、検査責任者などの管理職が、研修で得た知識や技術を実戦に投入するかどうかを判断することが重要な要素と言える。

おわりに

新型コロナウイルス感染症への対応を業務として経験した地衛研職員は、地域における健康危機管理の技術的拠点を担う重要な存在である。そのため、緊急時への対応力の維持・向上に加え、平時から新たな知識や技術を継続的に習得していくことが重要な課題となっている。

こうした人材育成においては、JIHS 国立感染症研究所等や企業が提供する研修機会の活用に加え、全国あるいはブロック内の地衛研が相互に協力する体制を基盤とした研修体系を構築することが重要である。このような体系のもとで、各地衛研において職務を着実に遂行できる人材を、循環的かつ計画的に育成し、活用していくことには大きな意義がある。

本ガイドラインは、現時点において地衛研の微生物分野における人材育成班に参画いただいている諸先生方の知見を集約したものである。本書が、地衛研における病原体ゲノム解析分野の人材育成の一助となることを期待する。

参考文献

1）地方衛生研究所の微生物分野における人材育成マニュアル作成のための要点、https://www.chieiken.gr.jp/koseirodo/guideline20230630.pdf

2）貞升健志、地方衛生研究所における次世代シークエンサーの利用と課題、東京健安研セ年報, 75, 77-81, 2024

3）貞升健志、地方衛生研究所における次世代シーケンサー解析から検査導入までの育成段階，76，2025

4）眞﨑大輔監修：人材育成ハンドブック，ダイヤモンド社，2019.

令和 7 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究班」

「地方衛生研究所の病原体ゲノム解析における人材育成のための要点」

研究代表者　貞升健志　　東京都健康安全研究センター
研究分担者　岩本朋忠　　神戸市健康科学研究所
塚越博之　　群馬県衛生環境研究所
長島真美　　東京都健康安全研究センター
野本竜平　　神戸市健康科学研究所
久保田寛顕　東京都健康安全研究センター
研究協力者　瀬戸順次　　山形県衛生研究所
和田崇之　　公立大学法人大阪　大阪公立大学
江原勇登　　埼玉県衛生研究所
浅倉弘幸　　東京都健康安全研究センター
淀谷雄亮　　川崎市健康安全研究所
安井善宏　　愛知県衛生研究所
川瀬　遵　　島根県保健環境科学研究所
成田　翼　　宮崎県衛生環境研究所
坂上亜希恵　宮城県保健環境センター
蕪木康郎　　さいたま市健康科学研究センター
重村洋明　　福岡県保健環境研究所
平井真太郎　愛媛県立衛生環境研究所
貞升友紀　　東京都健康安全研究センター

Key Points for Human Resource Development in Pathogen Genome Analysis at Japanese Public Health Institutes



FY2025 Ministry of Health, Labour and Welfare Administrative
Promotion Research Project Subsidy
(Comprehensive Research Project on Health, Safety and Crisis Management Measures)

Research to establish personnel systems and human resource development methods for genome testing at local public health laboratories

Principal Investigator: Kenji Sadamasu

March 2026

The cover image was generated using generative AI (Image Creator), based on keywords including genome, cycle, and human resource development.

Introduction

Prefectural and municipal public health institutes (PHIs) are public research and testing organizations located in prefectures, designated cities, and core cities across Japan. In 2023, PHIs were officially recognized as regional hubs for science and technology.

Japan's population has been steadily declining since it peaked in 2004, and in 2024, the birth rate hit a record low of 1.15. Given these trends, it is unlikely that there will be a sufficient influx of young talent to fill positions at PHIs nationwide. At the same time, the need for effective responses to health crises is urgent, and local emergency situations can arise unexpectedly.

Ongoing human resource development is essential for PHIs to effectively serve as technical hubs in regional health crisis management. Notably, there have been significant advancements in areas such as pathogen genome analysis. Some challenges cannot be solved by a single PHI alone; therefore, collaboration between PHIs nationwide is necessary.

This guideline is based on the findings of the "Study Group for Establishing Personnel Systems and Human Resource Development Methods for Genomic Testing at Prefectural and Local Public Health Laboratories (24LA2003)." It highlights key considerations for creating a personnel development manual for microbiology at PHIs.

1. Human Resource Development Using Remote OJT

Many prefectural and municipal public health institutes (PHIs) have traditionally focused on on-the-job training (OJT), where employees learn skills and knowledge through their daily work, with external training (Off-JT) used as needed. This approach to continuous human resource development helps each employee grow, fosters a culture of mentoring within the organization, and is essential for enhancing the overall capabilities of PHIs.

However, in the specialized field of pathogen genome analysis using next-generation sequencing (NGS), traditional OJT may not be effective. The technology is highly specialized, and PHIs may lack the necessary instructors to provide adequate training.

Additionally, Off-JT may not always be practical due to various challenges such as geographic limitations, societal training needs, budgets, and alignment with course content. There are also numerous technical obstacles, such as the specialized equipment and digital infrastructure required for genome analysis. As a result, there is a need for a common analysis platform that can be used by all PHIs, along with clear policies and manuals for human resource development and evaluation.

From the learner's perspective, self-motivation and a system for collaborative learning with colleagues (mutual help) are essential. To address these needs, it is critical to promote remote OJT programs that can be implemented even in distant locations. PHIs that are capable of offering such support should cooperate by providing educational assistance and personnel dispatch.

【Note】 Japan Association of Public Health Institutes (JAPHI) is an organization consisting of 86 PHIs across six regions, serving as technical hubs for health crisis management. By working together and supporting each other, we can expect improvements in the quality of technologies across PHIs.

2. Visualizing Training and Testing Methods (Including Development)

In typical human resource development settings, a wide range of training materials is readily available and easy to access. However, training resources related to genome analysis technology and knowledge are currently limited. Additionally, the government often does not provide official methods or analytical platforms in a timely manner, leaving the infrastructure for training underdeveloped.

Given these challenges, those responsible for genome analysis training (trainers) must independently select or create the most suitable methods and materials to use in their training programs. It is also crucial to standardize the training methods and materials developed and implemented across the country. Relevant organizations must collaborate to address this issue.

【Note】Traditionally, local public health institutes have incorporated manuals from the JIHS National Institute of Infectious Diseases (NIID) into their standard operating procedures and used them in testing. However, during emergencies, these manuals may not be available, or timely human resource development training may not be feasible. This issue is particularly common in workplaces with frequent personnel turnover.

2. Facilitating Individualized Learning through E-learning

Having standardized methods and training materials in place makes it easier for individuals to acquire knowledge. Regular lectures covering topics from basic to advanced levels, along with archiving the content, can be an effective way to support self-learning.

Since PHI staff members come from different professional backgrounds and progress at different rates, it can be difficult to ensure uniform knowledge acquisition in a short period of time. However, by leveraging tools like online training and archived lecture content, we can create an e-learning environment where anyone can learn as many times as they wish, regardless of time or location.

For this reason, it is important to systematically archive regularly scheduled lectures and other events, while continually improving and updating the content to keep it relevant.

【Note】 Traditionally, learning has involved reading papers and practicing through trial and error. However, with the ease of uploading and watching videos, there is no reason not to take advantage of these materials to enhance the learning process.

3. NGS-Related Skills to Be Acquired

PHIs require personnel who can reliably and creatively carry out work related to infectious diseases, foodborne illnesses, and their causative pathogens. This includes testing, investigations, and research, as well as the collection, analysis, and dissemination of relevant information.

As part of these activities, pathogen genome analysis using next-generation sequencing (NGS) may be conducted to obtain evidence for active epidemiological investigations and other response efforts. The skills required for such analysis are wide-ranging, and the appropriate proficiency level should be determined by each PHI according to its role and organizational structure.

Examples of skills required for genome analysis include:

・The ability to appropriately select pathogen genome testing methods suited to the objectives of health crisis management.

・The ability to perform pathogen genome analysis in cases related to health crisis management.

・The ability to further develop the knowledge and skills described above and apply them creatively in practice.

・For additional competencies, please refer to “Key Points for Creating a Human Resource Development Manual for Microbiology at PHIs.”

5. Proficiency in Related Skills

Proficiency refers to the long-term learning process through which individuals acquire practical knowledge and skills through experience, progressing from novice to expert. As shown in the Table, proficiency can be categorized into the following stages:

・Procedural Proficiency (1–2 years of work experience)
・Routine Proficiency (3–5 years of work experience)
・Adaptive Proficiency (approximately 6–10 years of work experience)
・Creative Proficiency (approximately 11 years or more of work experience)

Ideally, local public health institutes aim to develop and retain as many staff members at higher levels of proficiency as possible. To achieve this, it is essential to objectively assess each staff member's progress and depth of proficiency and to promote skill development systematically at the organizational level.

【Note】 Ultimately, the goal is for all PHIs to have a strong pool of proficiency experts.

Table Proficiency Stages

1	**Procedural Proficiency** (1–2 years of work experience) Individuals with no work-related experience are classified as "novices," and their expertise has scarcely
2	**Routine Proficiency** (3–5 years of work experience) In the case of routine tasks, individuals become capable of performing them quickly and accurately.
3	**Adaptive Proficiency** (approximately 6–10 years of work experience) This stage refers to the ability to proceed with tasks by reasoning through analogy depending on the situation. Commonly described as the "intermediate" level, individuals at this stage can manage non-routine
4	**Creative Proficiency** (approximately 11 years or more of work experience) This stage is characterized by the ability to deliver a high level of performance both efficiently and accurately. Individuals who attain this stage are described as "experts," and they are capable of developing

Adapted from Human Resource Development Handbook, supervised by D. Masaki, Diamond Publishing, 2019.

6. Human Resource Development Centered on Block Bases

PHIs across Japan are organized into regional blocks composed of geographically neighboring laboratories. When considered at the block level, situations in which no personnel have expertise in NGS analysis are expected to be far less common than when PHIs are considered individually.

In addition, PHIs within the same block interact frequently in their daily operations and already maintain collaborative relationships, creating a favorable environment for on-the-job training. In particular, the lending or shared use of high-performance analytical computers required for NGS analysis can play an important role in the early stages of training.

By establishing a training base for each block (a “block base”) and regularly conducting comprehensive training centered on these bases, collaboration within each block can be strengthened. This approach is expected to enhance overall technical capacity and improve human resource development standards across PHIs (see Figure).

Furthermore, connections formed among staff who participate in or conduct the same training programs will foster “mutual assistance” and collaborative learning. This, in turn, will support the continuous accumulation of knowledge and skills and help build long-term collaborative relationships.

【Note】 The JAPHI network is divided into six blocks. Block-based human resource development, rather than a fully national approach, is particularly effective in promoting collaborative learning and mutual support.

7. Factors for Selecting a Block Base for Genome Analysis

The following factors should be considered when selecting a block base for genome analysis. Among these, the presence of staff who are willing to take initiative and serve as leaders at the block base is particularly important.

・Analytical Computing Capacity
Sufficient computer processing power to perform NGS analysis smoothly and efficiently.
・Reliable Internet Connectivity
A communication environment that supports the rapid transfer of large datasets, as well as online training and remote technical support (remote OJT).
・Personnel and Commitment
A stable group of staff members who are highly motivated and dedicated to genome analysis and human resource development.
・Capacity to Conduct Regular Training Programs
An established system for planning and delivering systematic, continuous training seminars for staff both within and outside the block.
・Accessibility from Local Public Health Institutes
A location that is easily reachable from local public health research institutes within the block, enabling efficient travel and facilitating face-to-face training.

8. Learning Cycle

Employees who complete the training programs described above can apply the knowledge and skills they have acquired in their daily work at their home institutions, reinforcing and consolidating their learning through practice and reflection. In addition to sharing their expertise through OJT within the institute, they can also serve as instructors at training sessions hosted by other PHI research institutes. Teaching others further deepens their understanding and accelerates the mastery and retention of what they have learned.

【Note】 When trained staff members take on the role of instructors in subsequent training programs, the consolidation of their knowledge and skills is significantly accelerated. In addition, initiating new training programs provides opportunities to identify and nurture new talent.

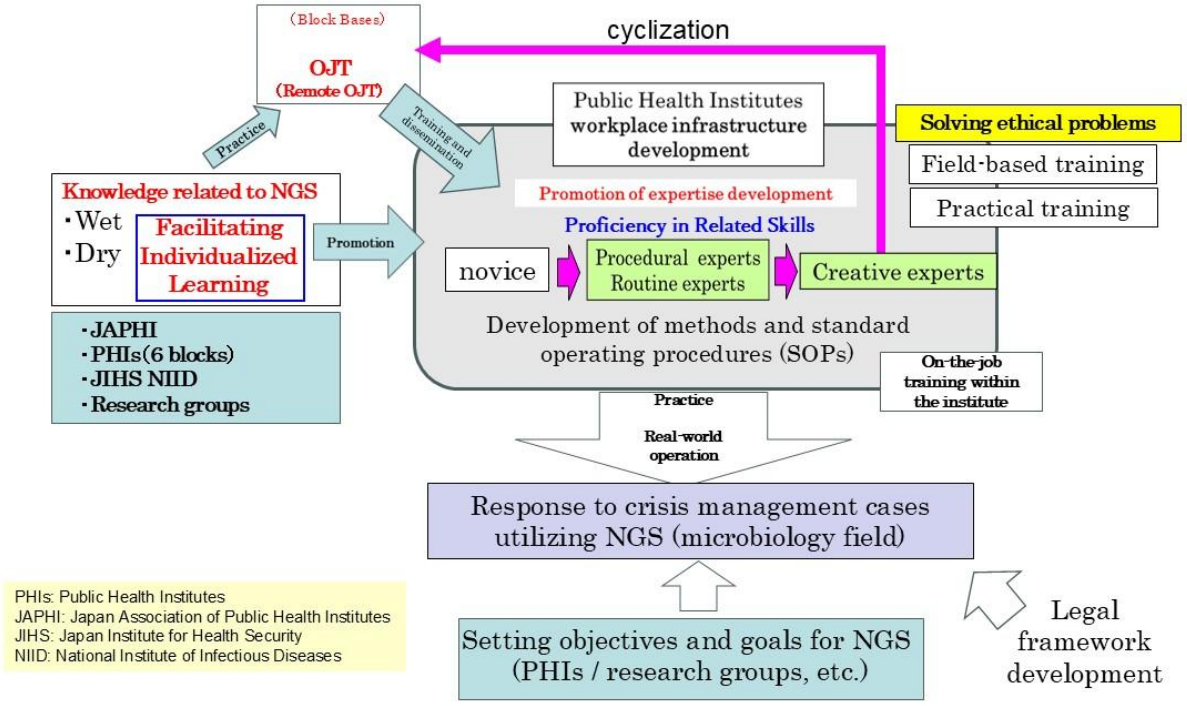


Figure Organizational framework for crisis management response using NGS in Public Health Institutes (microbiology field)

9. Practical Use of NGS

NGS analysis technology should not be limited to research applications; its use in routine administrative testing must also be considered. However, except in cases where national guidance is issued—such as during the COVID-19 pandemic—the decision to adopt NGS for administrative testing is left to individual local governments and public health institutes. As a result, the judgment and leadership of management personnel, including laboratory managers, play a critical role.

To support informed decision-making, it is important for PHIs nationwide to steadily accumulate examples of NGS applications in administrative testing and to share these experiences and outcomes across institutions.

【Note】The ultimate goal of training is the practical application of NGS in infectious disease crisis management, which is a core responsibility of PHIs. Achieving this goal requires management personnel, such as laboratory managers, to actively decide to implement the knowledge and skills acquired through training in real-world practice.

Conclusion

PHI personnel who played key roles in the response to COVID-19 are valuable assets and serve as technical pillars of regional health crisis management. In addition to maintaining and strengthening their emergency response capabilities, it is essential that they continue to acquire new knowledge and skills during non-emergency periods.

Effective human resource development requires making use of training opportunities offered by organizations such as the JIHS National Institute of Infectious Diseases and private companies, as well as establishing training systems based on mutual cooperation among PHIs at the regional and national levels. Within such systems, it is particularly important to develop and effectively utilize personnel who can reliably perform their duties at PHIs through a structured, cyclical, and planned approach to training.

This guideline brings together the collective knowledge of members currently involved in the PHIs' Microbiology Human Resource Development Team. We hope that it will serve as a useful reference for the development of human resources in pathogen genome analysis at PHIs.

References

1. Key Points for Developing a Human Resource Development Manual in the Field of Microbiology at Local Public Health Institutes. https://www.chieiken.gr.jp/koseirodo/guideline20230630.pdf
2. Sadamasu K.: Utilization and Challenges of Next-Generation Sequencing at Local Public Health Institutes. Annual Report of the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 75, 77–81, 2024.
3. Sadamasu K.: Stages of Human Resource Development from Next-Generation Sequencing Analysis to the Introduction of Testing at Local Public Health Institutes. Annual Report, 76, 2025.
4. Masaki, D. (Supervisor): Human Resource Development Handbook. Diamond, Inc., 2019.

FY 2025 Health, Labour and Welfare Policy Research Grants
(Comprehensive Research on Health Security and Crisis Management)

Research Group for Establishing Staffing Structures and Human Resource Development Methods for Genomic Testing at Local Public Health Institutes

Key Points for Human Resource Development in Pathogen Genome Analysis at Japan Public Health Institutes

Principal Investigator

Kenji Sadamasu
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

Co-Investigators

Tomotada Iwamoto, Ryohei Nomoto
Kobe Institute of Health
Hiroyuki Tsukagoshi
Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences
Mami Nagashima, Hiroaki Kubota
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

Collaborating Researchers

Junji Seto
Yamagata Prefectural Institute of Public Health
Takayuki Wada
Osaka Metropolitan University
Yuto Ehara
Saitama Institute of Public Health
Hiroyuki Asakura, Yuki Sadamasu
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
Yusuke Yodotani
Kawasaki City Institute for Health and Safety
Yoshihiro Yasui
Aichi Prefectural Institute of Public Health
Jun Kawase
Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science
Tsubasa Narita
Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment
Akie Sakagami
Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment
Kaburagi Yasuo
Saitama City Institute of Health and Science
Hiroaki Shigemura
Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences
Shintaro Hirai
Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

地衛研　ゲノム DNA ライブラリ作製マニュアル

QIAseq FX DNA Library kit 編

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

＊本マニュアルの内容に関する質問、問い合わせは、下記のゲノム解析ワーキンググループメーリングリスト宛にお願いします。

genome_working_group-ml-bounces￥chieiken.gr.jp

（￥を@に変更してください）

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

変更履歴

・初版作成（2025 年 3 月 19 日）

ゲノム DNA ライブラリ作製手順の概要

Fragmentation
（ゲノム DNA の断片化処理）

↓

Adapter ligation
（各サンプルへのインデックスとアダプターの付与）

↓

Clean up and Elution
（ライゲーション後の溶液の精製）

↓

Library amplification
（ライブラリの PCR 増幅）

↓

Library size selection
本マニュアルでは、磁性ビーズによる方法とアガロースゲル電気泳動ゲル切り出しによる方法を併記した。

↓

ライブラリの定量、モル濃度計算

↓

ライブラリ変性、イルミナシーケンサーのラン

１．試薬・装置

試薬等 消耗品

- DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN)等　同等品
- QIAseq FX DNA Library Kit 各種 （QIAGEN：180475 等）
- Qubit dsDNA HS Assay Kit （ThermoFisher：Q32854 等）
- Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）同等品
- Illumina 社 シーケンシングキット （300-cycle 以上可能なものを推奨 ）
- QIAGEN 社 Buffer EB
- 80%エタノール溶液（用時調整）
- 低吸着性エッペンチューブ（1.5 ml）
- 100 mg/mL RNase A （ニッポンジーン）　同等品
- アガロース S （ニッポンジーン）等　同等品
- ×10,000 GelRed（ニッポンジーン）等　同等品
- 100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）等　同等品
- × 1　TAE buffer：用時調製
- FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）
- QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）等　同等品
- 3M 酢酸ナトリウム水溶液（pH5.0）
- イソプロパノール

器具・機器等

- Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher)
- Illumina 社シーケンサー
- PCR Thermal Cycler 各種（ヒートリッドの温度制御可能なものが望ましい）
- AMPure XP 精製用磁石スタンド（Fast Gene Magna Stand 等）
- 卓上ミニ遠心機・プレート遠心機（スピンダウン用）
- 8 連チューブ用あるいは 96well プレート用アルミブロック
- 電気泳動装置：MupidR-exU（株式会社ミュービッド）あるいは同等品
- LED トランスイルミネーター：FAS-V （日本ジェネティクス） あるいは同等品
- その他基本的な実験器具類

２．ゲノム DNA 抽出

2-1.　ゲノム DNA 抽出（細菌）

菌種に応じた適切な培養条件で培養した菌体についてゲノム DNA を抽出する。一例として、DNeasy Blood and Tissue kit （QIAGEN）を使用した方法を紹介する。

1. 純培養した菌体を回収し 180μL の Buffer ATL でペレットを再懸濁する（グラム陽性菌の場合は前処理で菌体溶解のために追加のステップが必要となる。詳細はキットのマニュアルを参照)。
2. Proteinase K 20 μl を添加後、ボルテックス操作して混和し、組織が完全に溶解するまで 56℃でインキュベートする（1 時間～一晩)。
3. 4 μL の RNase A（100 mg/ml）を添加しボルテックス操作で混和、室温（15 ～ 25℃）で 2 分 間インキュベートする。
4. 15 秒間ボルテックス混和する。200 μl の Buffer AL を添加し、ボルテックス操作で十分に混和する。200 μL のエタノール（96 ～ 100%）をサンプルに添加し、再びボルテックス操作で十分に混和する。
5. 混合液（形成した沈殿物を含む）を、キットに添付されている新しい 2 mL コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column に移す。6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
6. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、 500 μL の Buffer AW1 を添加後、6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心分離する。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
7. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブに移し、 500μL の Buffer AW2 を添加後、20,000 x g （14,000 rpm）で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させる。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
8. DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し、50～100 μL の Buffer EB を DNeasy メンブレン上に添加する。室温（15～25℃）で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g（8,000 rpm）以上で 1 分間遠心分離し、ゲノム DNA を溶出する。

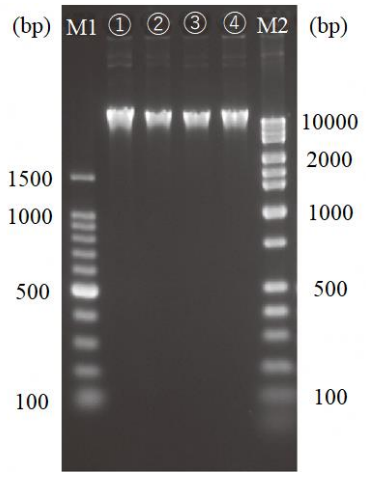
【ゲノム DNA の品質評価】

・アガロースゲル電気泳動で主に 10 kbp 以上の高分子DNA が観察されること（下図参照）

オプション

NanoDrop 等の分光光度計での吸光度測定が可能であれば、A260/A280 が 1.7 以上であることを確認するとよい。ただし、A260 から換算した DNA 濃度は後述の Qubit による測定結果とは一致しないことが多い。DNA 濃度調製は、Qubit 等の蛍光色素を用いて二本鎖 DNA 濃度を正確に定量可能な機器の測定結果を元にすること。ただし、本マニュアルは Qubit を使用した検討結果に基づいており、Qubit 以外の蛍光試薬を用いる場合は濃度設定について事前に検討することを推奨する。

（参考図　大腸菌 ATCC25922 株 DNA のアガロースゲル電気泳動例）



泳動条件：100V、30 分
泳動装置：Mupid-exU（タカラバイオ）
泳動 Buffer：×0.5 TBE
染色方法：Gel-Red
アガロース濃度：2%
M1：100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）
①～④：大腸菌 ATCC25922 株
M2：Wide-range DNA Ladder（タカラバイオ）

2-2.　DNA 濃度測定

Qubit 試薬を用い、製品取扱説明書に従って濃度測定を行う。Qubit での測定範囲外（Out of range）となった場合は適宜希釈して再測定する。ゲノム DNA は、Buffer EB（QIAGEN）で 20 ng/μL に希釈し、ライブラリ作製に用いる。

【注釈】メーカー使用説明書では、Qubit 試薬は 6 ヶ月間安定と記載されている。

操作例：

【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit　（Thermo Fisher Scientific）

Qubit Assay Tube　（Thermo Fisher Scientific）

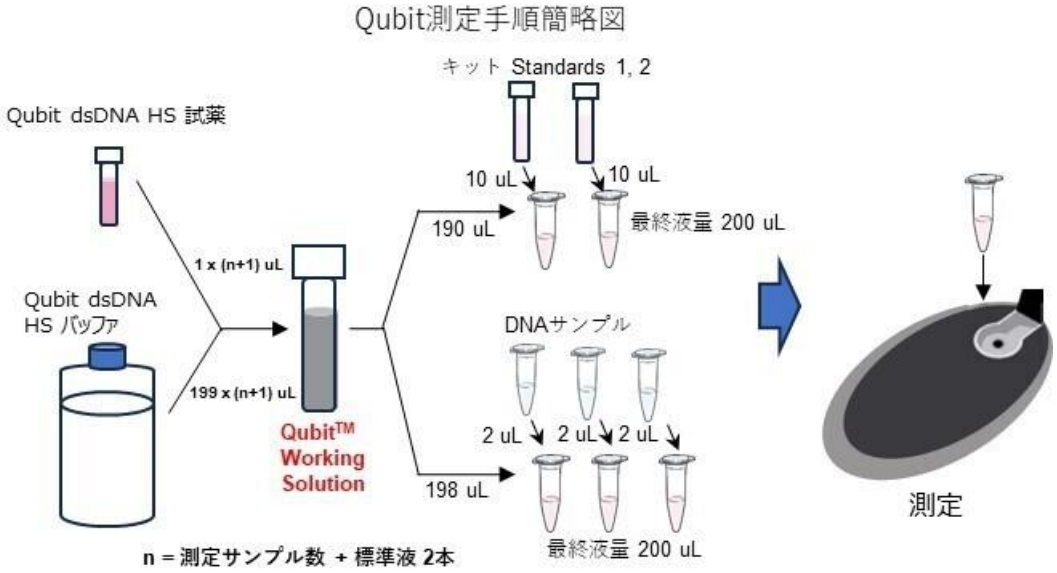
【手順】

・　下図（Qubit 測定手順間略図）を参考に、標準液 (standard #1, standard #2)と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。検体数を n として、Qubit Reagent n+2 μL、Quant-IT Bufer 199×(n+2) μL を混合する。

・ Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 μL を分注する。

・　Qubit DNA HS Standard #1、#2 10 μL を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。

・　DNA サンプル 2 μL に Qubit working solution 198 μL を加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。



（サーモフィッシャー社 Qubit 2.0 Fluorometer カタログを参考に作図）

３．ライブラリ作製

QIAseq FX DNA Library Kit （QIAGEN）

*本マニュアルでは、キットのプロトコルの 1/2 スケールで実施する。

* Clean up and Elution を除く全ての作業を氷上のアルミブロック上で実施する。

※検体数が多い場合は全ての作業について、各マスターミックスや AMPure Beads を 8 連チューブに必要量分注しておき、8 連ピペットを用いて反応チューブに分注・ピペッティングするとサンプル間の時間差や試薬の入れ忘れ、コンタミネーションのリスクが軽減できる。

注意点

本製品は各アダプターが使いきりであり、アルミプレートシールで封をされた 96well プレートに入っている。本プロトコルは 1/2 スケールで実施する関係上、アダプター全量を使用しないため、一度解凍して 8 連チューブなど別の容器に移して再凍結保存（-20℃以下）しておき、必要分だけ取り出して使用することを推奨する。ただし、飛沫によるアダプター同士の交差汚染を防ぐため 96well プレートの遠心操作は必須であり、また、アルミプレートを剥がす場合は交差汚染の防止に細心の注意を払うこと。

3-1. Fragmentation（ゲノム DNA の断片化処理）

・サンプル分の 0.2 mL PCR チューブ もしくは 96 well PCR プレートを用意

・下記の Fragmentation マスターミックスをサンプル数+α 反応分となるように調製する。

試薬	容量（1 検体あたり）
Nucleotide Free Water	15.0 μL
Fx Buffer, x10	2.5 μL
Fx Enzyme Mix	5.0 μL
Total	22.5 μL

※調製後のマスターミックスはボルテックス厳禁

・マスターミックスを 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する。

・20 ng/μL に調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え、8 連ピペットの目盛りを 10 μL に設定して 10 回以上ピペッティングする

・スピンダウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

4℃	1 min
32℃	3 min
65℃	30 min
4℃	1 min

※ ヒートリッド温度が変更可能な機種であれば 80℃に設定する（注釈参照）
※ 試薬調整前にプログラムを開始し、4 ℃ で pause しておくとよい

・反応終了後、すぐに PCR チューブをスピンダウンし氷上のアルミブロック上に置く。

注釈

QIAGEN のマニュアルではヒートリッド温度は 70℃と記載されている。これはヒートリッドが高温の場合、32℃の Fragmentation の工程に影響が出るためであるが、本プロトコルでは SARS-CoV-2 のゲノム解析マニュアルの記載に倣い 80℃とした。リッド温度が変更できない機種の場合は、32℃反応中、リッド(蓋)を開放して、65℃のステップになってからリッドを閉めることを推奨する。また、リッド温度を 70℃～105℃設定で反応させた場合の断片化の経時的変化を巻末に参考データとして記載している（Appendix 図 1、2）。

3-2. Adapter Ligation（各サンプルへのインデックスとアダプターの付与）

試薬	容量（1 検体あたり）
Nucleotide Free Water	7.5 μL
DNA Ligation Buffer, x5	10.0 μL
DNA Ligase	5.0 μL
Total	22.5 μL

- 上記 Ligation マスターミックスをサンプル数+α反応分となるよう調製し、新しい 8 連チューブに 22.5 μL ずつ分注する
- 対応するアダプターを 2.5 μL 加え、数回ピペッティング
- Fragmentation 後の DNA を全量（25 μL）加え、ピペッティング（20 回以上）で十分混和する。

・　スピンダウン後、サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う

20℃	15 min

※ヒートリッドは 20℃、もしくは開放する

※試薬調整前にプログラムを開始し、20℃ で pause しておくとよい

・　反応中に Agencourt AMPure XP beads を冷蔵庫から室温に出しておく

注意点

DNA Ligation Buffer は非常に粘性が高い液体のため、以下の手順で十分に Mixture を混合することを推奨する。これらの混合が不十分の場合はライブラリの質が低下する。

・Nucleotide Free Water と DNA Ligation Buffer, x5 を混合後、ボルテックスで十分混合した後、Ligase を加えてタッピングあるいはピペッティングで混合し Ligation マスターミックスとして使用する。

3-3. Clean up and Elution （磁性ビーズ精製２回による、未反応アダプター等の除去）

（用意するもの）

Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）

80%エタノール（用時調製）

0.2 mL チューブ用マグネットスタンド（日本ジェネティクス社など）

・AMPure Beads を室温に戻しておく。

＜１回目の精製＞

・AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和し、底部に沈んでいる磁気ビーズを均一化させる。

・AMPure Beads を 40 μL （0.8 倍量）ずつ加え、ピペッティングで混和する。

・室温で 5 分間静置する。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間程度（上清がクリアになるまで）静置する。

・ビーズに触れないように上清を取り除く。

・チューブをスタンドに設置したまま、200 μL の 80%エタノールを加える。

・30 秒間静置後、上清を取り除く。

・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回)。

・上清を除き、マグネット上で 3 分間程度静置し、ビーズを乾燥させる(乾燥させすぎ注意)。

・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、25 μL の buffer EB を加える。

・ピペッティング後、スピンダウンする。

※ここの過程のビーズは固まりやすく、分散しづらいのでよくピペッティングすること。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。

＜２回目の精製＞

・AMPure Beads をボルテックスで十分混和する。

・AMPure Beads を 27.5 μL （1.1 倍量）ずつ、回収した上清に加え、混和する。

・室温で 5 分間静置する。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間程度（上清がクリアになるまで）静置する。

・ビーズに触れないように上清を取り除く。

・チューブをスタンドに設置したまま、200 μL の 80%エタノールを加える。

・30 秒間静置後、上清を取り除く。

・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回)。

・上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。

・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、13 μL の buffer EB を加える。

・ピペッティング後、スピンダウンする。

・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を 11.75 μL 回収する。

3-4. Library Amplification（ライブラリの PCR 増幅）

試薬	容量（1 検体あたり）
Primer Mix （10 μM each）	0.75 μL
Hi-Fi PCR マスターミックス, x2	12.5 μL
Total	13.25 μL

・上記 PCR マスターミックスをサンプル数＋α反応分調製し、転倒混和後スピンダウン。
・13.25 μl を Clean up and Elution で溶出したサンプル(11.75 μL)に添加しピペッティングで混和する。
・スピンダウン後サーマルサイクラーにセットし、以下の反応を行う。

98℃	2 min
6 cycles of	
98℃	20 sec
60℃	30 sec
72℃	30 sec
↓	
72℃	1 min

【注釈】この工程を終えた検体について、-20℃保存可能である。

４．ライブラリサイズセレクション

ライブラリの精製およびサイズセレクションはその後の Run の結果に大きく影響する。本マニュアルではアガロースゲル電気泳動後のゲル切り出しによる精製方法と、キットの公式プロトコルに準じた磁性ビーズによる精製方法を記載する。

なお、本工程では既に Index による各サンプルの標識が完了しているので、複数サンプルをプールして実行しても良い。ただし、その際は各個別サンプルの濃度やクオリティについては検証不可となるので注意が必要である。

注釈

それぞれの精製方法によって得られたリードデータの質や、注意点などについては巻末の Appendix で解説しているのでどちらの手法を採用するかの参考にしていただきたい。ただし、磁性ビーズを使用した精製方法では Bioanalyzer や MultiNA、TapeStation 等の、キャピラリー電気泳動装置のスメア解析機能によるライブラリサイズの把握が必要となるため、それらの装置を保有していない施設ではゲル切り出しによる精製方法を選択することを推奨する。

4-1. 電気泳動によるゲル切り出し（**4-2 ビーズ精製を選択する場合は不要**）

（用意するもの）

- ゲル切り出し用トランスイルミネーター：BLooK LED Transilluminator（GeneDireX）等同等品（DNA 損傷の観点から UV イルミネーターは非推奨）
- アガロース S （ニッポンジーン）等　同等品
- ×10,000 GelRed（ニッポンジーン）等　同等品
- 100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）等　同等品
- × 1　TAE buffer：用時調製
- FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）
- QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）等　同等品
- イソプロパノール

（ゲルの作成方法）

＊状況によっては泳動する溶液量が多いため、厚めのゲルを作製するとよい。ゲルが厚いと後染めでは染まりにくいので、染色方法は先染めを推奨する。

・×1 TAE buffer と 1%重量のアガロースを混合する。
・電子レンジで溶解する。
・50℃の恒温水槽で保温する。
・1/10,000 量の×10,000 Gel Red を混合する。
・コームを立てたゲルメーカーに流し、固まるまで待つ。
・冷蔵庫で十分冷却して、ゲルを完全に固化させる。
・コームを外し、保湿して保存する。　※用事調製する。

（PCR 産物の泳動）

- PCR 反応後の各サンプル（25μL）に×6 Loading Buffer を 5μL 加える。
- 各ウェルにアプライする。
- 両サイドのマーカーレーンに 100bp DNA Ladder を 15μL アプライする。
- 100 V、30 分間程度泳動する。
- ブルーライトのイルミネーター上で泳動像を確認する。
- 500-600bp のサイズを切り出し、2 mL マイクロチューブに回収する。
  （FastGene アガロース ゲルバンドカッターを用いるとよい）

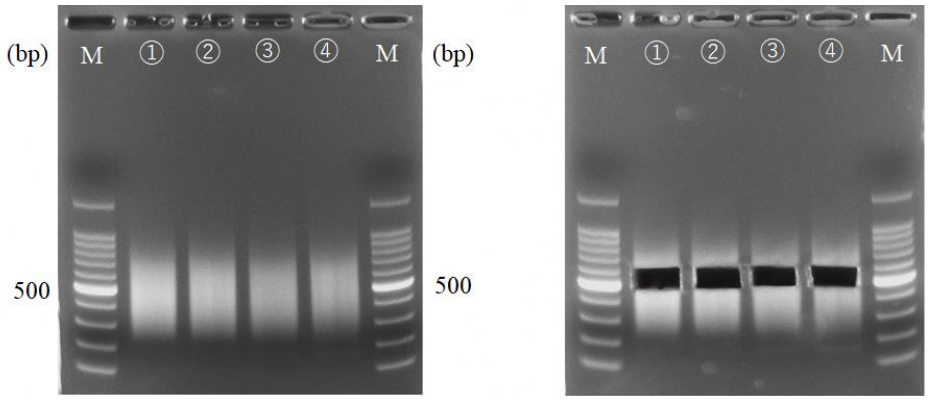
注釈

※複数サンプルをプールする場合は、例えば全量を 36μL となるようにし、×10 Loading Buffer を 4μL 加えてから各ウェルにアプライすること。

（QIAquick Gel Extraction Kit を用いたゲルからの DNA 抽出）

- 切り出したゲルスライスの重量を測定する。
- 測定した重量の mg を μL と見立て、3 倍量の Buffer QG を加えてボルテックスする。
- 50℃のヒートブロック上で時折ボルテックスしながら 10 分間溶解する。
- 溶液の色がオレンジ色、あるいは紫色となった場合は 3M 酢酸ナトリウム水溶液を 10μL 加えてボルテックスする。
- ゲル重量と同量のイソプロパノールを加えてボルテックスする。
- QIAquick カラムに溶解したサンプルを入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- Buffer QG を 500μL 入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- Buffer PE を 750μL 入れて遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、再度コレクションチューブを取り付ける。
- カラムに何も入れないまま遠心（10,000 x g 以上、1 分）する。
- ろ液を捨て、1.5mL のマイクロチューブを取り付ける。
- メンブレンの中央に 30μL の Buffer EB を添加し、1 分間静置する。
- 遠心してマイクロチューブ内に溶出された DNA を回収する。
- 完成したライブラリーは、-30℃で 1 ケ月程度保存可能

（参考図　大腸菌 ATCC25922 株における切り出し前後のゲル画像例）



左：切り出し前　右：切り出し後
ライブラリ調製キット：QIAseq FX DNA Library UDI-A Kit
泳動条件：100V、30 分　　泳動装置：Mupid-exU（タカラバイオ）
泳動 Buffer：×1 TAE　　アガロース濃度：1%　#Gel-Red 先染め
切り出し用トランスイルミネーター：BLooK LED Transilluminator（GeneDireX）
ゲルカッター：FastGene アガロース ゲルバンドカッター（日本ジェネティクス）

M：100 bp DNA Ladder（タカラバイオ）
①～④：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

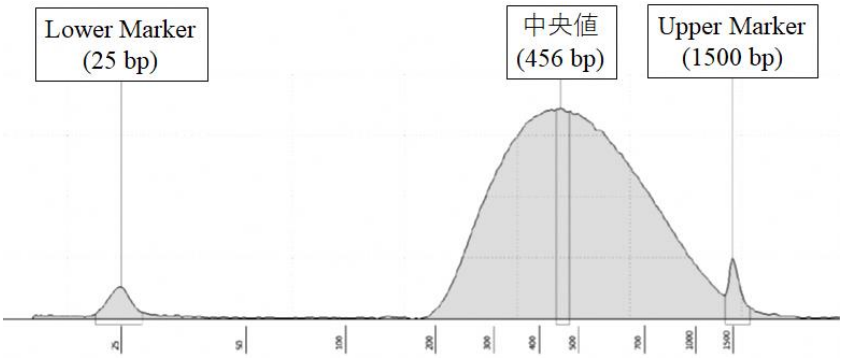
4-2. ビーズ精製**（4-1. 電気泳動によるゲル切り出しを選択した場合は不要）**

Agencourt AMPure XP Beads （Beckman Coulter）等　同等品
80%エタノール（用時調製）
0.2 ml チューブ用マグネットスタンド（日本ジェネティクス社など）

・AMPure Beads を室温に戻しておく。
・AMPure Beads を転倒混和またはボルテックスで十分混和する。
・AMPure Beads を 30 µL（1.1 倍量）ずつ加え、ピペッティングで混和する。
・室温で 5 分間静置する。
・マグネットスタンドに設置し上清が清澄化するまで 2 分間程度静置する。
・ビーズに触れないように上清を取り除く。
・チューブをスタンドに設置したまま、200 µL の 80%エタノールを加える。
・30 秒間静置後、上清を取り除く。
・エタノール洗浄を再度繰り返す（計 2 回）。
・上清を除き、マグネット上で 3 分間静置し、ビーズを乾燥させる。
・チューブの底に残ったエタノールを取り除く。

・チューブをマグネットスタンドから取り出し、30 μL の buffer EB を加える。
・ピペッティング後、スピンダウンする。
・マグネットスタンドに設置し 2 分間静置後に上清を回収する。
・Bioanalyzer や MultiNA 等のキャピラリー電気泳動装置のスメア解析機能によりライブラリサイズの分布を確認し、中央値を控えておく。
・完成したライブラリーは、-30℃で 1 ケ月程度保存可能

（参考図　ビーズ精製後のスメア解析例）



使用機種：Agilent 2200 TapeStation（アジレント・テクノロジー）
使用キット：High Sensitivity D1000
分析サンプル：大腸菌 ATCC25922 株ライブラリ

５．ライブラリ定量

5-1.　Qubit によるライブラリ DNA 濃度測定

【試薬】

Qubit dsDNA HS Assay Kit （Thermo Fisher Scientific）

Qubit Assay Tube （Thermo Fisher Scientific）

【手順】

・　本マニュアル 7 ページの Qubit 測定手順間略図を参考に、標準液 (standard #1, standard #2)と検体全てを測定できる液量の Qubit working solution を準備する。

・　Qubit 用チューブ 2 本に Qubit working solution 190 µL を加える。

・　Qubit DNA HS Standard #1、#2 10 µL を加え、vortex し、室温で 2min 静置後 Qubit Fluorometer で校正用の測定を行う。

・　精製後の DNA ライブラリ 2 µL に Qubit working solution を 198 µL 加え、vortex し、室温で 2 分間静置後 Qubit Fluorometer で測定する。

・　後述「ライブラリのモル濃度計算式」を用いてライブラリモル濃度を算出する。

・　Buffer EB（QIAGEN）で 4 nM となるように希釈する。

ライブラリのモル濃度計算式

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{ライブラリの平均サイズ（bp）×660}

例１：500-600bp の範囲でゲル切り出しを行った場合

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{550（bp）×660}

例２：ビーズ精製後、スメア解析の中央値が 400bp だった場合

ライブラリモル濃度 （nM） ＝

{ライブラリ濃度（ng/µL） x 1,000,000}/{400（bp）×660}

注釈

算出されたライブラリモル濃度が 4nM に満たない場合は、2nM になるように Buffer EB で希釈し、「６．ライブラリ変性等 Run 関係：MiSeq での Run 時の変性・希釈作業」において 2nM を初期値とした手順に移ることが可能である。ただし、その場合は、同時に Run する全ての検体を 2nM に希釈する必要がある。

5-2. qPCR 法による定量（通常は行わない）

注釈

Qubit での定量値で想定通りのデータが得られなかった場合、より精度の高い定量法である qPCR 法での定量を行い、原因を推定する。qPCR 法としては、イルミナシーケンサーで用いられている P5、P7 配列をターゲットとした市販のキットが複数販売されている。本マニュアルでは、Itokawa らの qPCR 法によるライブラリ定量法を掲載する（5-2 参照）。

https://www.protocols.io/view/illumina-truseq-library-quantification-with-qpcr-p-6qpvrddpzgmk/v1

UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution　Thermo Fisher #15632011

PhiX Control v3　Illumina, Inc. #FC-110-3001

PrimeTime® Gene Expression マスターミックス Integrated DNA Technologies #1055770

・Salmon sperm DNA を 5 ng/μL に調整する。

試薬	容量 （μL）
Nucleotide Free Water	9,889
1 M Tris-HCl, pH 8.0	100
0.5 M EDTA	10
UltraPure DNA Solution 10 mg/ml	5
Total	10 mL

・上記 Salmon sperm DNA（5 ng/μL）を使用し、PhiX コントロールの希釈系列を作成する。

50 pM	100 μL
5 pM	100 μL
0.5 pM	100 μL
0.05 pM	100 μL

・Primer ＆ Probe Mix （20x）を調製する。

Probe	5 nM
P5 primer	5 nM
P7 primer	5 nM

Double-quenched probe （IDT）:

/56-FAM/ACACTCTTT/ZEN/CCCTACACGACGCTCTTC/3IABkFQ/

P5 primer: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

P7 primer: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3’

・ライブラリを Buffer EB で 100 倍または 1,000 倍に希釈しておく。

・qPCR

試薬	容量（μL；1 検体あたり）
Prime Time PCR マスターミックス	10
20x primer & probe mix	1
Nucleotide Free Water	8
希釈ライブラリ or 希釈 PhiX コントロール	1
Total	20 μl

95℃	2 min
30 cycles of	
97℃	5 sec
62℃	10 sec
68℃	15 sec

・得られた結果からライブラリのモル濃度（nM）を算出する。

６．ライブラリ変性等 Run 関係

MiSeq のカートリッジは V2 と V3 で推奨のアプライ濃度が異なる。iSeq 100 も含めた各カートリッジの推奨濃度は下記の通りである。

- MiSeq Reagent kit V2： 10 pM からはじめ、クラスター密度を 1000-1200 K/mm2 になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- MiSeq Reagent kit V3： 12 pM からはじめて、1200-1400 K/mm2 になるよう、各施設で最適化を行ってゆくのがよい。
- iSeq 100 il Reagent v2： 50～100 pM（変性作業無し）で occupancy が 80～90%を目指して最適化を行ってゆくのが良い。

MiSeq での Run 時の変性・希釈作業

・ 氷を用意しておき、HT1 バッファーとアルミブロックを冷やしておく。
・ ４本の 1.5 ml チューブを用意、それぞれ以下の用途に使用する。

各ライブラリを 4 nM に希釈した場合（推奨）

- チューブ[N]： 0.2 N NaOH 調製用（Nuclease-Free Water 800 µL と 1N NaOH 200 µL を混合）
- チューブ①：１次希釈用
- チューブ②：２次希釈用 （HT1 バッファー990 µL を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）
- チューブ③: ３次希釈用 （HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）

・ チューブ①に ライブラリ溶液を 5 µL 入れておく。
・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 5 µL を チューブ① に加える。
・ Vortex でよく混ぜる（5 秒）。
・ スピンダウンする。
・ 室温で 5 分間インキュベーション（変性）後すぐに 2 次希釈へ進める。
・ １次希釈後のライブラリ溶液（チューブ①） 全量 10 µL を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
・ Vortex でよく混ぜ（10 秒）、3 次希釈へ進める。
・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
・ Vortex でよく混ぜる （5 秒）。
・ チューブ③から 630 µL を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。

上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/200 まで希釈される（4 nM→20 pM）。
チューブ③が計 1000 µL となるように Run したい最終濃度に希釈する（最終を 15pM としたいのであれば、②:750 µL + HT1: 250 µL）。

各ライブラリを 2 nM に希釈した場合

- チューブ[N]： 0.2 N NaOH 調製用（Nuclease-Free Water 800 µL と 1N NaOH 200 µL を混合）
- チューブ①： 1 次希釈用
- チューブ②：2 次希釈用 （HT1 バッファー980 µL を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）
- チューブ③: 3 次希釈用 （HT1 バッファー適量を予め分注し、氷上のアルミブロックに置いて冷やしておく）

・ チューブ①に ライブラリ溶液を 10 µL 入れておく。
・ チューブ[N]に調整した 0.2N NaOH 10 µL を チューブ① に加える。
・ Vortex でよく混ぜる（5 秒）。
・ スピンダウンする。
・ 室温で 5 分間インキュベーション（変性）後すぐに 2 次希釈へ進める。
・ 1 次希釈後のライブラリ溶液（チューブ①） 全量 20 µL を予め冷やしておいた チューブ② に入れる。
・ Vortex でよく混ぜ（10 秒）、3 次希釈へ進める。
・ チューブ②から適量を分取し、予め冷やしておいたチューブ③へ加える。
・ Vortex でよく混ぜる （5 秒）。
・ チューブ③から 630 µL を分取、カートリッジの 17 番にインプットする。

上記の方法ではチューブ②の段階で初期濃度の 1/100 まで希釈される（2 nM→20 pM）。チューブ③が計 1000 µL となるように Run したい最終濃度に希釈する（最終を 15pM としたいのであれば、②:750 µL + HT1: 250 µL）。

注釈

サンプル濃度が高すぎるとオーバークラスターにより、リードデータが得られない場合がある。不慣れな施設は、まずは、やや低めの最終濃度で試すほうが安全である。
また、2 nM よりも低い濃度に希釈することは、2 次希釈液への NaOH の持ち込みが多くなる理由でメーカーから推奨されていない。

QIAseq FX DNA Library UDI キットを使用した際のサンプルシートの作成方法について

2025 年 3 月現在、QIAseq FX DNA Library には CDI アダプター付属の製品と Unique Dual Index（UDI）アダプター付属の製品が販売されている。このうち CDI アダプターはイルミナ純正の TruSeq キットと同一のインデックス配列であるため、イルミナ NGS に付属の Local Run Manager (LRM)の初期状態でインデックスの指定が可能である。一方で、UDI アダプターキットのインデックス配列は QIAGEN 独自の配列であるため、LRM には配列が登録されておらずサンプルシートの作成が困難である。そこで、LRM に UDI アダプターキットのインデックス配列を登録するための手法を掲載する。

- 別添の 4 種類のテキストファイルを USB メモリ等の外付けドライブに保存し、イルミナ NGS（iSeq または MiSeq）に接続する。
- LRM を立ち上げ、TOOLS→Library Prep kit を選択する
- Add Library Prep Kit を押し、目的のテキストファイルを選択する（使用するキットによって必要に応じて A～D まで 4 回繰り返す）＊通常 A キットしか使用しないという施設は A のみ登録すると間違いがなくて良い。
- サンプルシート作成画面に行き、QIAseq の UDI キットが選択できるようになっていれば成功（ウェルポジション指定で自動的に R1 と R2 のインデックス配列が入力される）

ゲノム解析ワーキンググループメンバ

池田徹也　　北海道立衛生研究所
瀬戸順次　　山形県衛生研究所
大澤修一　　茨城県衛生研究所
塚越博之　　群馬県衛生環境研究所
江原勇登　　埼玉県衛生研究所
久保田寛顕　　東京都健康安全研究センター
中嶋直樹　　神奈川県衛生研究所
金谷潤一　　富山県衛生研究所
鈴木雅和　　愛知県衛生研究所
髙橋剣一　　名古屋市衛生研究所
若林友騎　　地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
野本竜平　　神戸市健康科学研究所
平塚貴大　　広島県立総合技術研究所保健環境センター
亀山光博　　山口県環境保健センター
平井真太郎　　愛媛県立衛生環境研究所
重村洋明　　福岡県保健環境研究所
グループ長：地全協　精度管理部会員　神戸市健康科学研究所　岩本　朋忠

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。
厚生労働行政推進調査事業費補助金　健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升　健志）

Appendix

1. Fragmentation における Lid 温度および反応時間の影響について

本マニュアル 3. ライブラリ作製の Fragmentation については、公式マニュアルでは input DNA 量の違いにより 2〜30 分という記載になっている。本マニュアルでは input DNA 量を 50 ng に固定しているため、反応時間が断片化に与える影響は大きい。そのため、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、反応時間による断片化の進行具合を検証した。なお、検討は以下の試薬および機器を使用し、本マニュアルの作業手順に従って実施した。

DNA 抽出試薬：DNeasy Blood and Tissue kit （QIAGEN）

サーマルサイクラー：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch TP350 (タカラバイオ)

キャピラリー電気泳動：Agilent 2100 Bioanalyzer (アジレント・テクノロジー)

Agilent High Sensitivity DNA キット(アジレント・テクノロジー)

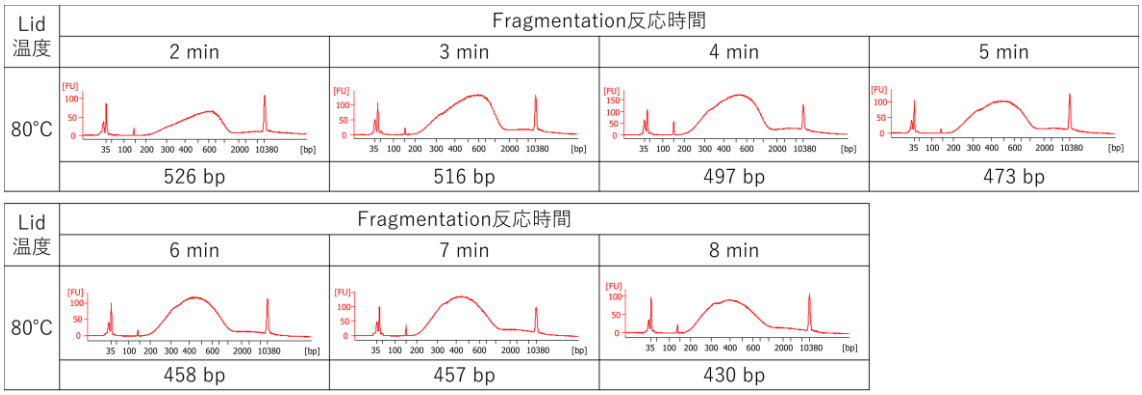


図 1. Fragmentation の反応時間における断片化の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

断片化は反応時間 3 分でも十分進行しており、ライブラリ作製に適していると考えられた。MiSeq を使用してリードデータを取得する場合、片側 250 または 300 bp となるペアエンドリードを想定するケースが多いため、少し長めの断片を残存させる条件で反応時間を設定することを推奨する。

続いて、Lid 温度が断片化に与える影響について検証した。同様に大腸菌 ATCC25922 株を用いて Lid 温度を 70℃、80℃、105℃に設定し反応を行った。105℃については Fragmentation 反応中に Lid を開放した状態と閉めた状態の 2 条件で検証を行った。その結果を図 2 に示す。70℃、80℃、105℃（開放）では断片化の進行に大きな違いは見られなかったが、105℃で閉めた場合は若干断片化の進行が早くなる傾向が認められた。しかし、その影響は軽微であり、Lid を開放した条件では他と差がないため、Lid 温度を調節可能なサーマルサイクラーを所持しない施設は参考にしていただきたい。

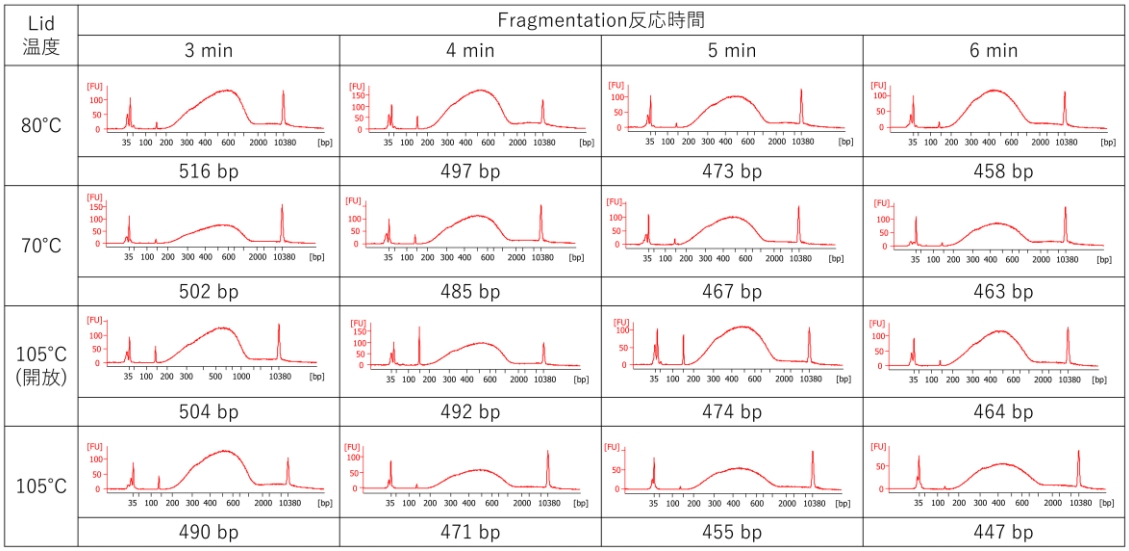


図 2. Lid 温度の違いによる Fragmentation 反応の進行。各ライブラリの平均サイズを泳動像の下に示した。

2. ライブラリ精製方法の違いによるリードデータへの影響について

本マニュアル 4. ライブラリのサイズセレクションの項でも述べたように、ライブラリの精製やサイズセレクションはその後の解析に影響を与える重要な工程である。キットの公式マニュアルでは磁性ビーズによる精製手法が記載されている。この手法は簡便であるが、ライブラリサイズの推定が難しい点や、ライブラリサイズがブロードに広がってしまうという難点がある。このことは、想定を大幅に逸脱したサイズのフラグメントが混ざることで、クラスターの形成不全や、解析サイクルの後半部分でのリードのクオリティ低下を招くことにつながってしまう。一方で、電気泳動によるゲル抽出での精製方法は、工程としては煩雑になるものの、目的のサイズのライブラリのみを収集できるため、ライブラリサイズの推定が容易で質の良いリードデータを再現性良く取得することが可能となる。

本マニュアル作成に際し、大腸菌 ATCC25922 株を用いて、ビーズ精製とゲル抽出の違いによるライブラリの状態と取得したリードデータの違いについて検証したので参考にしていただきたい。

両手法によるライブラリサイズの分布の解析結果を図 3 に示す。ゲル抽出精製が 550bp 付近で比較的シャープな山を形成しているのに対し、ビーズ精製ではアダプターダイマーやプライマーダイマーなどは見られなかったものの、山がブロードで 1000 bp を超えるサイズのフラグメントも残存しているのがわかる。

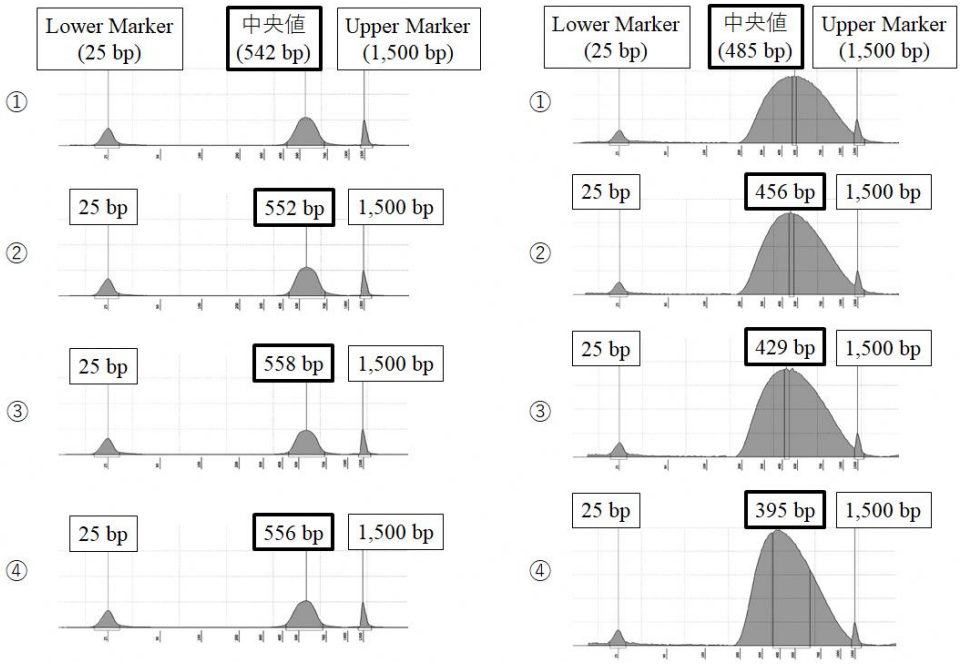


図 3. ライブラリサイズの分布。ゲル抽出（左）とビーズ精製（右）を TapeStation により解析した

1000 bp を超えるフラグメントは MiSeq のクラスター形成過程において Bridge PCR がうまくいかずクラスター形成不全を引き起こす。そのため、想定したライブラリの DNA 濃度

から推定したライブラリの想定クラスター密度と実際の密度の乖離が大きくなってしまう可能性がある。

続いて、作製したライブラリから MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてリードデータを取得し、fastp v0.23 によるトリミングを実施した。その結果、リード数の残存率はトリミングの前後でどちらの手法も 98%となり大きな違いはなかったが、残存した総リード長はゲル抽出が約 94%であるのに対し、ビーズ精製は約 74%しか残存せず、大きく差がついた（Table 1）。これはビーズ精製ではリードの後半部分のクオリティが急激に落ちることが原因と考えられる。

Table 1. トリミング前後でのリード数と総リード長の残存率

	残存リード数割合（%）	残存総リード長割合（%）
ビーズ精製	98.4	73.5
ゲル抽出精製	98.1	93.7

図 4 に示す通り、170 サイクル付近からビーズ精製のリードはクオリティの低下が確認される。これは insert size が短いリードでは反応サイクルの後半でアダプター領域以降を解析してしまうためであり、ライブラリ精製過程で短いフラグメントが残存してしまうことに起因する。

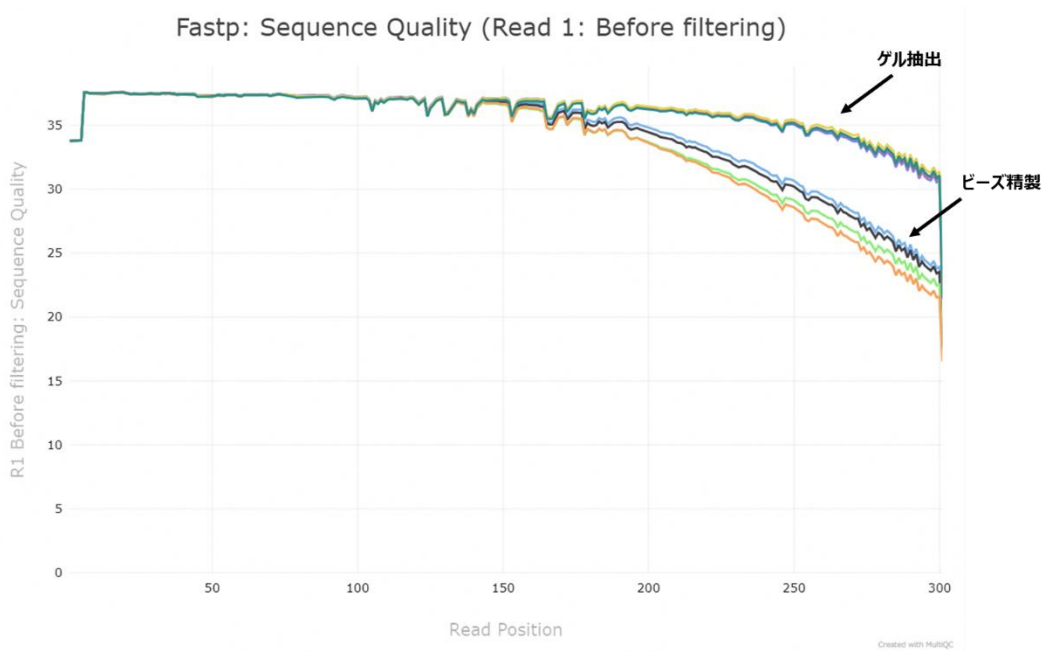


図 4. トリミング前のリードクオリティの推移。X 軸の数字は反応サイクル数と同義

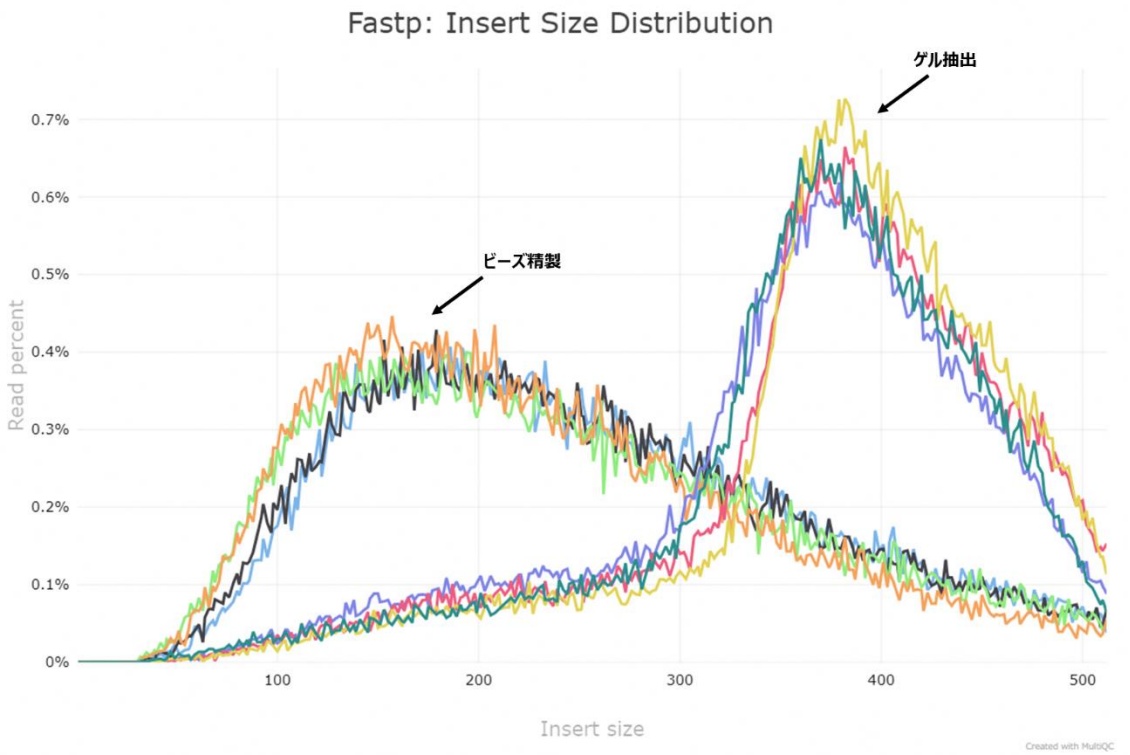


図 5. リードの Insert size の分布

またそれぞれのリードデータの Insert size の分布を図 5 に示した。ゲル抽出のピークは 380 bp 付近であるのに対し、ビーズ精製では 160 bp 付近がピークとなった。500 サイクルや 600 サイクルの Reagent kit で解析する際は短い Insert size では無駄になる部分が多いため得られたデータ量に対し、解析に使用できるデータ量の割合が少ないという問題が生じてしまう。

一方で、今回のリードデータを用いて大腸菌 ATCC25922 株の完全長配列（Accession no. CP009072）をレファレンスとして SNVs 解析を実施したところ、取得した 8 検体間では SNV は検出されず、レファレンス配列に対しては 8 検体とも 2 SNVs が検出された。これは株の継代の際に蓄積された SNV であると考えられる。また、Assembly 結果もビーズ精製の方が若干コンティグ数が多くなる傾向があるが、概ねデータの差異は認められなかった。従って、ビーズ精製とゲル抽出ではインサートサイズなどの違いはあるが、SNVs 解析などでは同様の結果が得られるであろう。ビーズ精製の方がデータのロスが大きくなるため、目標とする解析に合わせて精製方法を選択するよう参考にしていただきたい。

地衛研　エンテロウイルスゲノム解析プロトコル

Version 1.0

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

ゲノム解析ワーキンググループ

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

1. 概要

本プロトコルは、以下の参考文献を改変したPCRと次世代シークエンサー(NGS)を用いてエンテロウイルスのゲノム解析を行うことを目的としたものである。

参考文献:Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing:Application for Viral Mixtures. Marie-Line Joffret, et al. Frontiers in Microbiology.September 2018 | Volume 9 | Article 2339

本プロトコルでは、図1のとおりエンテロウイルスゲノムをRT-PCRで5´末端側のFragment 1と3´末端側のFragment 2に分けて増幅し、それぞれの増幅産物を合わせてNGSを用いてゲノムデータを取得する。本プロトコルは、検出感度を得るために参考文献の方法を表1のとおり改変している。また、本プロトコルで用いる試薬を表2のとおり例示する。

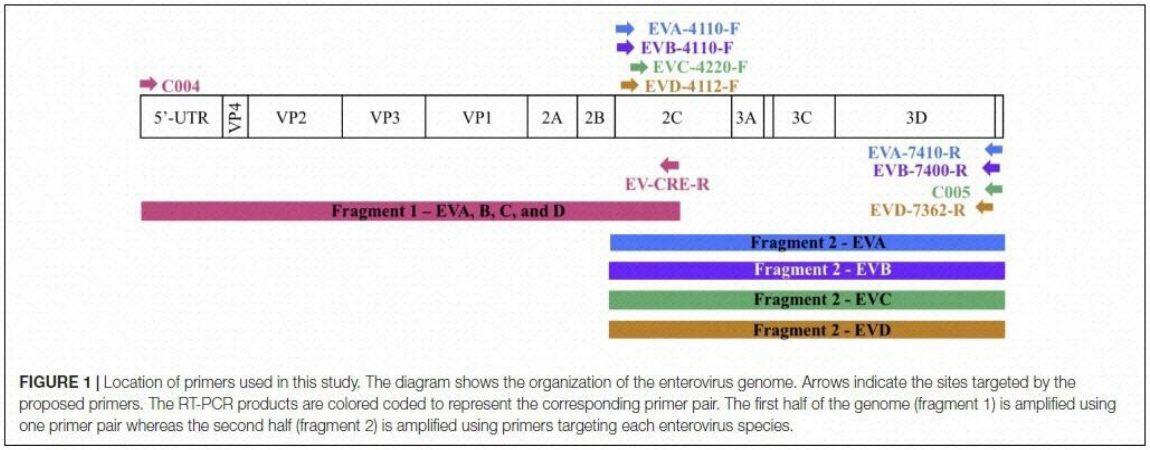


FIGURE 1 | Location of primers used in this study. The diagram shows the organization of the enterovirus genome. Arrows indicate the sites targeted by the proposed primers. The RT-PCR products are colored coded to represent the corresponding primer pair. The first half of the genome (fragment 1) is amplified using one primer pair whereas the second half (fragment 2) is amplified using primers targeting each enterovirus species.

図1　参考文献　Figure 1より抜粋

表1　参考文献の方法からの主な改変箇所

	参考文献	本プロトコル
逆転写反応	One-Step-RT-PCR	RT-PCR
PCR	Multiplex	single 2種類
Fragment 1 の Forward primer	C004	EVP2
Anneling 温度	55℃	一部 45℃

表2 使用試薬リスト（例示）

試薬の種類	品名	メーカー	コードNo	容量
逆転写反応試薬	SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scinetific	18090050	50反応
逆転写反応試薬	Random Hexamers (50 μM)	Thermo Fisher Scinetific	N8080127	5nmol
逆転写反応試薬	dNTP mix (10mM each)	Thermo Fisher Scinetific	18427013	100μl
逆転写反応試薬	RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scinetific	10777019	5000 unit
PCR	EmeraldAmp PCR Master Mix	Takara Bio	RR300A	160回用

1. Random hexamer primer、dNTP、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は例示と異なるメーカーのものを使用しても問題ない。
2. Random hexamer primer ではなく Oligo (dT) primer を用いることもできるが、Random hexamer primer と比較して Fragment 1 の検出感度が下がり、Fragment 2 の検出感度が上がる傾向がある。ウイルス株によっては、Fragment 1 の感度低下が大きく、EV-D68の一部のウイルス株で検出できなくなる例がみられた。
3. 例示されたPCR試薬以外を使用することもできるが、特に Fragment 1 で非特異的増幅がみられるので留意すること。またOne-Step-PCR 試薬を使用し逆転写反応とPCR反応を同時に行うことも可能であるが、こちらも非特異的増幅がみられるので留意すること。
4. EmeraldAmp PCR Master Mix は、過度な凍結融解の繰り返しにより活性が低下する場合がある為、使用頻度が高い場合、いったん融解したものは 4℃保存を推奨する。

2. 対象試料

培養細胞により分離されたエンテロウイルス株を用いる。本プロトコルの検出感度では臨床検体を解析するのは困難である。本プロトコルで増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型は表3のとおり。増幅産物の確認は、ゲノムワーキンググループ各施設が保有している遺伝子型のエンテロウイルス分離3株ずつ（施設BのEV-A71のみ5株）を用いて本プロトコルを実施し、標的とするバンドが検出されることで行った。

表3　増幅産物が確認されたエンテロウイルスの遺伝子型

		SPECIES A						SPECIES D
		CV-A2	CV-A4	CV-A6	CV-A10	CV-A16	EV-A71	EV-D68
施設A	Fragment 1		○ ○ ○				○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2		× × ×				× × ○	× × ×
施設B	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ × ○ ○	
	Fragment 2		○ ○ ○	○ ○ ×	× × ○	○ × ×	○ × × × ○	
施設C	Fragment 1					○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2					○ ○ ○	○ ○ ○	
施設D	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設E	Fragment 1	○ ○ ○						
	Fragment 2	○ ○ ○						
施設F	Fragment 1	○ ○ ○	○ ○ ○	× × ×	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	
	Fragment 2	× ○ ○	○ × ○	× × ×	○ × ×	× × ×	○ ○ ×	
施設G	Fragment 1							
	Fragment 2							
施設H	Fragment 1						○ ○ ○	○ ○ ○
	Fragment 2						○ ○ ○	○ ○ ○

		SPECIES B										
		CV-A9	CV-B2	CV-B3	CV-B4	CV-B5	E-3	E-6	E-7	E-11	E-18	E-25	E-30
施設A	Fragment 1									× ○ ○			
	Fragment 2									× × ×			
施設B	Fragment 1												
	Fragment 2												
施設C	Fragment 1					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
	Fragment 2					○ ○ ○				× ○ ○	○ ○ ○		
施設D	Fragment 1	○ ○ ○					○ ○ ○	○ ○ ○			○ ○ ○		○ ○ ○
	Fragment 2	× ○ ○					× ○ ○	× × ×			○ ○ ○		○ ○ ×
施設E	Fragment 1								○ ○ ○			○ ○ ○	
	Fragment 2								○ ○ ○			○ ○ ○	
施設F	Fragment 1	○ ○ ○											
	Fragment 2	○ ○ ○											
施設G	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	× × ○	○ ○ ○	○ ○ ○				○ ○ ○			
施設H	Fragment 1		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			
	Fragment 2		○ ○ ○	○ × ○	○ ○ ○		○ ○ ○		○ ○ ○	○ ○ ○			

標的とするバンドが検出されたものを ○ とした

3. RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)等のRNA抽出キットを用いてエンテロウイルスRNAを対象試料から抽出する。Carrier RNAについては、添加していても問題ない。

4. 逆転写反応

本プロトコルでは、SuperScript Ⅳ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) (以下SS4)でRandom hexamer primer を用いる方法を表4－1に示す[注1)]。SS4には Random hexamer primer、dNTP mix (10mM each)、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor は付属していないので別途用意が必要となる。

表4-1のとおり反応調製液を作成し、表4－2のとおり 65℃ 5分 反応させた後、少なくても 1分 氷上でインキュベートし、annealed RNA 13μlを作成する。

表4－1

Component	Volume
50 μ M Random hexamer primer	1 μl
dNTP mix (10mM each)	1 μl
Template RNA	11 μl
Total	13 μl

表4－2

temperature	Reaction time
65℃	5 min

表5－1のとおり反応調製液を作成し、annealed RNA 13 μ l と混合する。表5-2の条件で反応させ cDNA を作成する。

表5－1

Component	Volume
5×SSIV Buffer	4 μl
100 mM DTT	1 μl
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 μl
SuperScirpt IV Reverse Transcriptase (200U/μL)	1 μl
annealed RNA	13 μl
Total	20 μl

表5－2

temperature	Reaction time
23℃	10 min
55℃	10 min
80℃	10 min

5. PCR反応

得られたcDNAを鋳型としてPCR反応を行う。参考文献では、Fragment 1 と Fragment 2 の primer を混合してPCRをしているが、Fragment 1 と Fragment 2の検出感度が異なること、非特異的増幅がみられることがありバンドの切り出しを必要とする場合があることから、本プロトコルではFragment 1 と Fragment 2を分けてPCRを行う。本プロトコルでは、非特異的増幅が少なかったことからPCR試薬に EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio) を使用する。

5－1. Fragment 1 のPCR

Fragment 1 のPCRでは、検出感度が低いこと、ウイルス株によっては検出ができないことから、Forward primer を参考文献の C004 から EVP2 に変更している。EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されている primer である[注2)]。表6－1のとおり反応調製液を作成し、表6－2の条件で反応させる[注3)]。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い4060bp前後にバンドが認められるか確認する。用いる primer 配列は表10のとおり。

表6－1

component	Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 µl
10µM Forward primer EVP2 (Final conc 200nM)	0.5 µl
10µM Reverse primer EV-CRE-R (Final conc 200nM)	0.5 µl
Nucleotide Free Water	9.5 µl
cDNA	2 µl
Total	25 µl

表6－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
55℃	30 sec	×30 cycle
72℃	4 min 30 sec	

5－2. Fragment 2 のPCR

Fragment 2 のPCRは、エンテロウイルスの種（EV-A、EV-B、EV-C、EV-D）により用いる primer が異なる。また、EV-A と EV-D のPCRでは、アニーリング温度を参考文献の 55℃ では増幅がみられなかったことから 45℃ に変更している。EV-Cについては、ウイルス株を用いた検証を行っていない為、本プロトコルでは示さない。得られた遺伝子増幅産物を用いて電気泳動を行い標的とするバンドの有無を確認する。得られる遺伝子増幅産物は、どのPCRでも3300bp 前後である。用いる primer 配列は表10のとおり。

5－2－1. Fragment 2 EV-A のPCR

表7－1のとおり反応調製液を作成し、表7－2の条件で反応させる。

表7－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVA-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVA-7410-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表7－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
45℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

5－2－2. Fragment 2 EV-B のPCR

表8－1のとおり反応調製液を作成し、表8－2の条件で反応させる。

表8－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVB-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVB-7400-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表8－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
55℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

5－2－3. Fragment 2 EV-D のPCR

表9－1のとおり反応調製液を作成し、表9－2の条件で反応させる。

表9－1

component		Volume
EmeraldAmp PCR Master Mix		12.5 µl
10µM Forward primer EVD-4112-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVD-7362-R	(Final conc 400nM)	1 µl
Nucleotide Free Water		7.5 µl
cDNA		3 µl
Total		25 µl

表9－2

temperature	Reaction time	
98℃	10 sec	
45℃	30 sec	×35 cycle
72℃	3 min 30 sec	

表10 各 primer の配列

PCR	Primer name	5´-3´ Sequence	Position
Fragment 1	EVP2	CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT	※1
	EV-CRE-R	CGGBRTTTGSWCTTGAACTG	※2
Fragment 2	EVA-4110-F	AARAARTTYAAYGAYATGGC	4110 - 4130※3
EV-A	EVA-7410-R	TTTGCTATTCTGGTTATAAC	7410 - 7390※3
Fragment 2	EVB-4110-F	GGCGNTGGCTYAARCRAARG	4110 - 4130※4
EV-B	EVB-7400-R	GCACCGAATGCGGAGAATTTAC	7400 - 7378※4
Fragment 2	EVD-4112R	GGCTAKCMCAAAAGATWGAC	4112 - 4132※5
EV-D	EVD-7362-R	CCAAKTRACCAAAATTTACC	7362 - 7342※5

※1 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 452 - 476
CV-B4 E2 (AF311939) : 450 - 474
EVD-68 Femon (AY426531) : 445 - 469

※2 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065) : 4418 - 4437
CV-B4 E2 (AF311939) : 4375 - 4394
EVD-68 Femon (AY426531) : 4390 - 4409

※3 EVA-71 MAD-72341-04 (LT719065)

※4 CV-B4 E2 (AF311939)

※5 EVD-68 Femon (AY426531)

6. 遺伝子増幅産物の精製

Fragment 1 、Fragment 2 それぞれのPCRで得られた遺伝子増幅産物を電気泳動し、標的バンドが認められるか確認する。標的バンドが認められたら、QIAquick PCR Purification Kit等による精製、もしくは AMPure XP（Beckman Coulter）等による磁気ビーズ精製を行う。また、非特異的バンドが確認されず、明瞭な標的バンドが認められていれば、遺伝子増幅産物をNucleotide Free Water等で5倍程度希釈することで精製工程を省略することができる。明瞭な非特異的バンドが認められた場合、標的バンドの切り出しとQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)等を用いた精製を行うことで、標的遺伝子以外によるゲノムデータ圧迫を抑えることができる。

7. Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物の混合

精製した Fragment 1 と Fragment 2 の遺伝子増幅産物を Qubit dsDNA HS Assay Kit 等でDNA濃度を測定する。Fragment 1 と Fragment 2 で同程度の濃度になるように調製して混合する。複数の検体を同時に解析する場合は、検体間で同程度の濃度に調製しておいた方がよい。

8. ライブラリ調製

新型コロナウイルスゲノム解析プロトコル（国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター）に記載されている NGSライブラリ調製（QIASeq FX）の手順に従いライブラリ調製を行う。

9. シーケンシング

Illumina NGS のマニュアルに従い、ライブラリを希釈し、カートリッジにロードする。

10. ゲノムデータ解析

得られた Fastq データを用いてゲノム解析を行う。

注記

1. 多くの施設で使用しているPrimeScript RT Reagent kit（Takara Bio）、LunaScript RT SuperMix Kit（NEB）の使用は避けた方が良い。
2. EVP2 primer は、手足口病病原体検出マニュアルに記載されているVP4-VP2-semi-nested RT-PCRの1st PCR で 使用されている。元の文献は以下のとおり。
   Rotbart, H. A. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol 28, 438-442, doi:10.1128/jcm.28.3.438-442.1990 (1990).
3. Fragment 1 と Fragment 2 で検出感度が異なる為、Fragment 1 PCRの primer 濃度、cycle 数、template 量を変更して検出感度を調整している。

Appendix

1．本プロトコルで Fragment 2 の PCR 増幅不良の場合における代替法の一例

ワーキンググループ内の検証において、本プロトコルに記載した試薬類を使用した際に Fragment 2 の増幅がみられない施設が散見された。こういったケースにおいて異なる試薬を使用した場合の PCR 増幅についての事例を紹介するので解析を実施する際の参考にされたい。なお、RNA 抽出までは 3．と同様の手順で実施し、使用したプライマー配列も同一のものである。また、検証は EV-B の特定の種においてのみ実施したものである。

1-1．使用試薬および機器

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara, #R026A)

1-2．Fragment 2　EV-Ｂ　のPCR

表S1-1のとおり反応調製液を作成し、表S1-2の条件で反応させる。

表S1-1

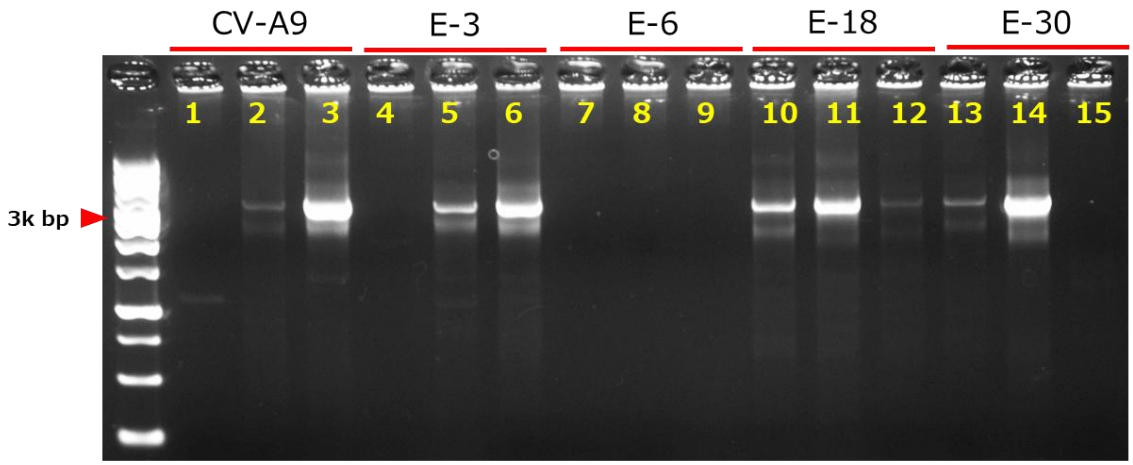
component		Volume
Nucleotide Free Water		3.0 µl
2 × 1 step High Fidelity Buffer		12.5 µl
PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR		2.0 µl
PrimeScript II RT Enzyme Mix		0.5 µl
10µM Forward primer EVB-4110-F	(Final conc 400nM)	1 µl
10µM Reverse primer EVB-7400-R	(Final conc 400nM)	1 µl
RNA		5 µl
Total		25 µl

表S1-2

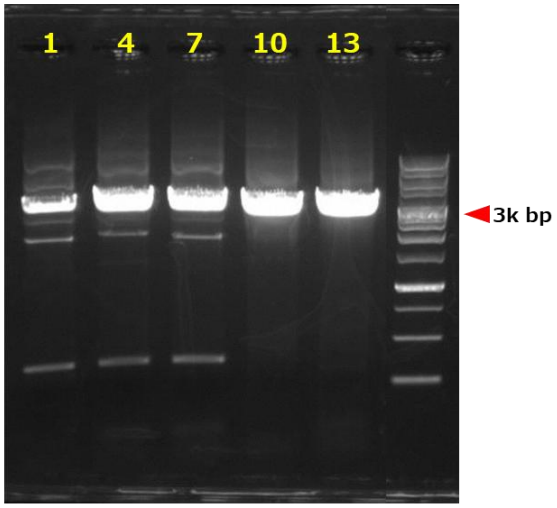
Temperature	Reaction time	
45℃	15 min	
94℃	2 min	
98℃	10 sec	
55℃	15 sec	×40 cycles
68℃	1 min	

1-3. PCR結果の比較

プロトコル本文の方法（以下、本法）で実施したFragment 2のPCR結果を図S1、PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（以下、検証法）を使用して実施したPCR結果を図S2に示す。なお、検証法は各遺伝子型から1検体ずつを選抜して実施した。泳動図の検体番号はそれぞれ同一検体である。この検証は 1 施設のみで実施したものであり、施設間誤差や使用する機器の違いは考慮されていない。



図S1．本プロトコルに従い実施したFragment 2の泳動図



図S2．PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kitを使用して実施したFragment 2の泳動図

本法で増幅不良であった検体番号1, 4, 7, 13について十分な増幅が確認された。一方で非特異増幅も複数確認された。また、図では示していないが、Fragment 1についても同じ試薬で検証したところ、増幅は確認されたものの、本法で実施した結果よりも非特異増幅が多かった。

地衛研　ゲノム解析精度管理マニュアル

細菌 SNP 解析編

Version 0.5

＊本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではありません。使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。

変更履歴

・初版作成（）

集団感染事例における細菌 SNP 解析（情報解析）精度管理の概要

本マニュアルは、単一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism、以下 SNP）解析ツールとして SNPcaster（https://github.com/leech-rr/SNPcaster）を使用することを念頭に置いて作成されている。リードデータの品質評価（Quality Check、以下 QC）および SNP 解析両方で使用できる。

リードデータの QC

リードデータのトリミング
（アダプター配列や低クオリティデータの除去）

⬇

データカバレッジの計算
（解析対象微生物ゲノムに対して何倍量のデータが取得できたかの確認）

⬇

ドラフトゲノム配列のアセンブリ
(生物種、Total ゲノムサイズ、コンティグ数などの確認)

⬇

CheckM による最終評価
(生物種、コンタミネーションの確認)

集団事例における SNP 解析

対象となる微生物の参照株を選定（通常は標準株で構わない）

⬇

集団事例関連株のトリミング済みリードを参照株のゲノム配列にマッピング
（SNP の検出）

⬇

コアゲノムサイズの確認、系統解析を実施
（コアゲノムサイズは十分確保できているか、系統的に離れた株が解析に混ざっていないかを確認）

⬇

系統的に離れた株があった場合、それらを除いて再度 SNP 解析を実施

⬇

コアゲノムサイズが小さい場合など必要に応じて参照株を変更
（集団事例の 1 株を選択してアセンブルデータを用意し、新たな参照株として用いる）

１．はじめに

COVID-19 のパンデミック以降、次世代シーケンサー（NGS）を導入する地方衛生研究所が急増した。また、民間企業の NGS の受託解析についても以前より安価なものが増加しており、病原体のリードデータ取得のハードルは下がっている。一方で、NGS から得られるデータ量は膨大であり、データ解析のためにはバイオインフォマティクスの知識が必要となる側面があり、このことが病原体ゲノム解析におけるソフト面での問題となっている。病原細菌の分野では、集団事例における菌株解析技術として、主にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) が用いられてきたが、当該機器のサポート終了に伴う代替法の導入が急務となっている。

本マニュアルでは、これまで PFGE が担ってきた菌株の同一性に関する解析手法の代替法として、全ゲノム SNP 解析について解説する。これから全ゲノム SNP 解析を導入する施設などで、自身が採用する手法やデータが妥当であるかどうかの参考になれば幸いである。対象はショートリード（Illumina 等）を用いた単離株解析を想定している。ただし、「SNP が何個以内であれば同一の株とみなすことができるのか」という基準については、病原体ごとに状況が異なるため、汎用的な答えを用意するのは困難である。そこで本マニュアルでは、SNP 解析に至るまでのリードデータの精度や、解析に用いられた手法そのものの妥当性を評価する方法について紹介する。

なお、本マニュアルでは JIHS 国立感染症研究所細菌第一部で開発された SNPcaster（https://github.com/leech-rr/SNPcaster）の使用を前提とした記載となっているが、SNPcaster のインストールや使用方法については詳細には記載しない。インストールや使用方法については https://github.com/leech-rr/SNPcaster/tree/main/doc/manual より日本語マニュアルが入手可能である他、マニュアルを学習させた ChatGPT (URL: https://chatgpt.com/g/g-69118b0d42f48191906ba605a540cba8-snpcaster-gpt) において対話形式での情報入手が可能（ただし無料ログインが必要）なので、それらを確認してほしい。

また、本マニュアルにはデータの準備や検証を行う際に一部 Linux を使用する箇所が存在するが、コマンドについての詳細な解説は省略する。Windows パソコン（PC）を用いた Linux コマンドでのゲノムデータ取り扱いについては、厚生労働行政推進調査事業費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升健志）により実施された、ゲノムデータ解析研修会の研修資料が地方衛生研究所全国協議会のホームページ（https://www.chieiken.gr.jp/）に掲載されているので、そのマニュアルにより操作法を身に付けていただきたい。

２．リードデータの QC（品質評価）

適用範囲

- 対象：単離された病原細菌株
- 入力データ：ペアエンド FASTQ ファイル
- 推奨 PC スペック：メモリ 16–128 GB（サンプル数・アセンブル方法に依存）、CPU 8 コア以上推奨

解析ツール

本マニュアルは SNPcaster(https://github.com/leech-rr/SNPcaster)での操作を前提としている。ただし、市販のソフトウェアであっても、同等の内容が担保されていれば本マニュアルの流れに沿った解析を実行可能である。あるいは、独自にオープンソースのプログラムを組み合わせて解析することも可能である。各地衛研におけるバイオインフォマティクスの習熟度や予算を考慮して選択されたい。

QC フロー

ここではショートリードデータの品質確認方法について、以下の 4 ステップを紹介する。SNPcaster では 1 度の操作で下記の一連の解析が実行されレポートファイルが出力される。

1. トリミング（fastp など）
2. カバレッジ（深度）確認（SeqKit など）
3. アセンブルによるゲノムサイズ確認（SPAdes, SKESA など）
4. CheckM（次ページ参照）による Completeness, Contamination 確認

カバレッジとはリードデータの厚みのことであり、下記の計算式により計算される。

カバレッジ ＝（R1 + R2 の総塩基長）/ 解析対象微生物のゲノムサイズ(bp)

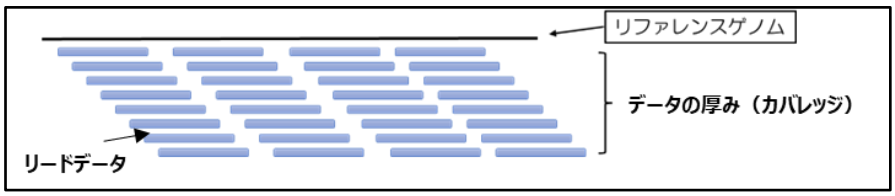


図 1. データカバレッジの概念図

信頼性のある SNP 解析を実施するうえで必要なカバレッジの目安は以下の通りである。

- ✓ 必要最低限：30x
- ✓ 推奨：50x 以上

カバレッジが 30x を下回るデータ量の検体を用いた解析では SNP の誤判定を生む可能性が高くなるため、このような検体は解析からは除外することを強く推奨する。
その他、1～4 まで考慮した QC のチェックリスト（目安）を以下に記載する。

- □ カバレッジ 30x 以上
- □ アセンブルゲノムサイズ(標準株の±10%)
- □ CheckM completeness(97%以上)
- □ CheckM contamination(3%以下)

メモ

CheckM の completeness（完全性） と contamination（汚染度） は、ゲノムアセンブリの品質を評価する上で重要な指標となる。CheckM は分類系統（門・綱・目…）ごとにそのグループが必ず持っている必須遺伝子セットが定義されたデータベースがあり、completeness はその必須遺伝子がどれだけ揃っているかを示す指標で、100%に近いほど欠落が少なく完全性が高いと判断される。contamination は本来 1 コピーのはずの必須遺伝子が複数コピー検出された場合に、多生物由来の配列が混ざっている可能性があるとして数値化される。

QC の実行（SNPcaster）

SNPcaster（Jupyter Lab 版）を使用する場合は、プロジェクト作成後にプロジェクトフォルダ内に「grape_qc_assembly.ipynb」という QC 解析用のノートブックが作成されているので、それを利用する。ノートブック内に詳細な解析手順についての記載があるので、それを確認しながら実行する。

なお「grape_qc_assembly.ipynb」で選択可能なアセンブラ（コンティグを作成するソフト）は SKESA と SPAdes との 2 種類があり、前者のほうが解析に要する時間が短い。 QC チェックリストさえクリアされれば、いずれのアセンブラを用いても問題ないが、集団事例中の株を参照配列に用いたい場合（3-4 で後述する）は SKESA の利用を推奨する。

QC を行う場合は、configuration.txt の作成を行う。まず、https://github.com/leech-rr/SNPcaster よりダウンロードした SNPcaster フォルダ内の app/notebook/sample_data/ehec 内に腸管出血性大腸菌用の「configuration.txt」ファイルがあるので、これを自身のプロジェクトフォルダにコピーする。初期値は右図の通りとなっているので、解析する菌種に応じて適宜編集すれば良い。

```
Genome size [Mbp]:  5.5
Coverage threshold:  40
Maximum number of contigs:  1000
Minimum genome size (Mbp):  4
Maximum genome size (Mbp):  6.5
Minimum completeness (%):  98
Maximum contamination (%):  2
```

解析が終了すると、プロジェクトフォルダ内に qc_assembly_[日付]_[時間]_[リスト名]のフォルダが作製される。解析フォルダ内に「qc_results.xlsx」というファイルが出力されているので、

qc のシートのデータを確認する。特に、coverage、total_length、completeness、contamination について確認し、その後の解析（SNP 解析等）に用いて良いかどうか判断する。

３．SNP 解析

本マニュアルでは、https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_datasetに記載されている、腸管出血性大腸菌の集団事例で解析されたリードデータ、を使用してSNPcasterで解析した例を示す。自施設にSNPcaster以外のツールを導入してSNP解析を試みる際も、このテストデータを使用して解析を実施し、SNPcasterの結果と比較して大きな齟齬が無いことを確認することを推奨する。

上記ページに記載のリードデータのアクセッション番号をもとに、データベースからダウンロードしても良いが作業が煩雑であるため、ここではLinux（Ubuntu）環境（WindowsのWSL2を含む）でコマンドを利用したデータの準備方法を紹介する。

なお、以下　　の網掛けでハイライトした部分はUbuntuターミナルで使用するコマンドを表す。

Ubuntuのターミナルを起動し、デスクトップなどの任意の場所に`cd`コマンドで移動して下記コマンドをタイプする

```
git clone https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_dataset.git
```

「WGS_benchmark_dataset」というフォルダがダウンロードされるので、そこに`cd`コマンドで移動する。次に、https://github.com/leech-rr/WGS_benchmark_datasetの「How to download short-read files」を参考にダウンロードする。「fasterq-dump_2023-05-30.sh」の利用には、SRA Toolkitのインストールが必要である。自身のPC環境に応じて、必要であればconda環境を作成してインストールする。

*SRA-Toolkitインストール参考コマンド

```
conda create -n sratools sra-tools
```

その後は、「fasterq-dump_2023-05-30.sh」と「list」ファイルがフォルダ内にあることを確認して下記コマンドでリードデータがダウンロードできる。`THREADS`は計算に使用するCPUのスレッド数なので、自身のPC環境に応じて任意の数字に入れ替える。

```
fasterq-dump_2023-05-30.sh list THREADS
```

各ファイルサイズを巻末の表に示すので、問題なくダウンロードできたかどうかを確認する際に参考にされたい。

3-1. SNP解析の実行

ダウンロードしたデータを用いてSNP解析を実行する。マニュアルとノートブック内に詳

細な解析手順についての記載があるので、それを確認しながら実行する。参照配列にはSNPcasterに付属しているSakai_BA000007.fastaを用いた。なお、SNPcasterは図2に示すフローで解析が進むパイプラインであり、BactSNP（SNP検出ソフト）にトリミングツールが付属しているため、解析にあたってはリードデータのトリミングの必要はない。

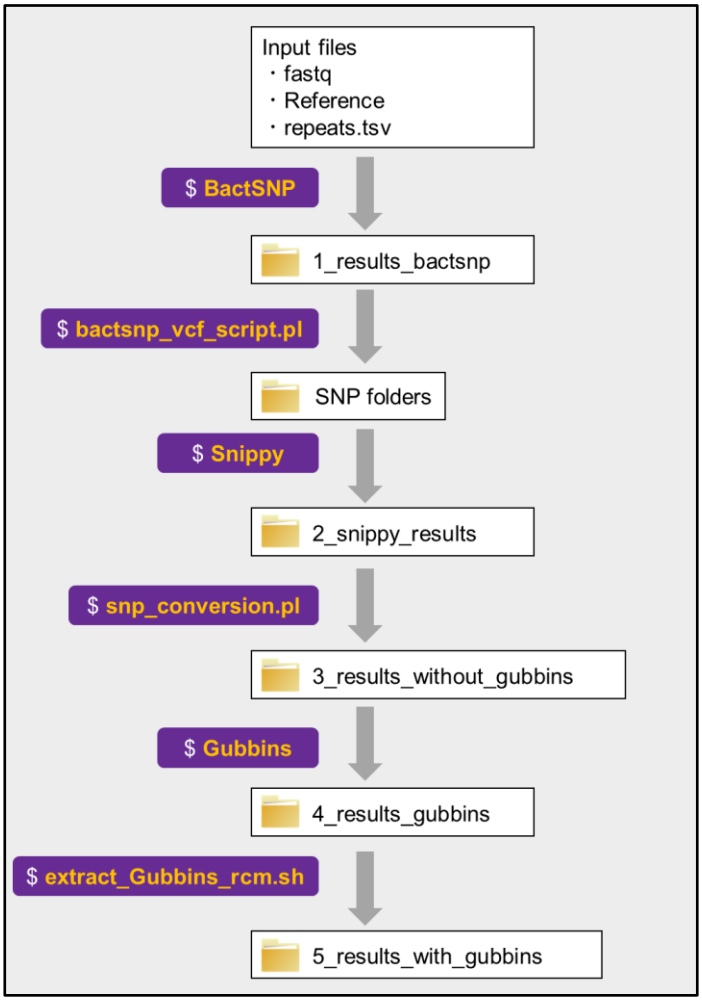


図2. SNPcasterの比較ゲノム解析フロー図

3-2. 全検体を用いたスクリーニング解析

本マニュアルでは、まず、ダウンロードした15検体（O157：10株、O121：5株）全てを用いて解析を実施した例を示す。これは、集団事例における分離株すべてを用いた解析に即した流れであると考えて良い。解析パラメータはほぼ基本値（変更なし）のままで、Gubbinsについては「実行する（１）」を選択した。解析が終了すると、プロジェクトフォルダ内に「snpcaster_[日付]_[時間]_[リスト名]」という名称のフォルダが作製され、出力ファイルが格納される。解析結果は「SNPcaster_report.txt」に集計されており、本解析では右記のようになった。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 4291372
After Gubbins : 4204425

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 74374
After Gubbins : 65665

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 74327
After Gubbins : 65627

Removed SNPs
Gubbins: 8709
```

コアゲノムサイズ（Core genome size）は参照配列の5.5Mに対して約4.3M（78%）であった。検出されたSNP数は組換え領域除去前で74,327個であり、多数のSNPsが検出されたことがわかる。それぞれの株間のSNP数をマトリックスで表示したファイルは、SNPcasterの出力フォルダ内の「3_results_without_gubbins」（組換え領域除去前）もしくは 「5_results_with_gubbins」（組換え領域除去後）に格納されている。図３は、そのうち組換え領域除去前のファイルを示したものである。このうち7万以上のSNPsが検出されている株を黄色でハイライトしているが、これらは血清型O121のグループである。

	REF	DRR14706	DRR14706	DRR14707	DRR14707	DRR14707	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969	DRR14974	DRR14975	DRR14976	DRR14976	DRR14977
REF	0	73759	73758	73759	73759	73760	138	137	136	137	137	981	980	982	982	980
DRR147067	73759	0	1	2	2	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147069	73758	1	0	1	1	2	73783	73782	73781	73782	73782	73844	73843	73845	73845	73843
DRR147072	73759	2	1	0	2	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147075	73759	2	1	2	0	3	73784	73783	73782	73783	73783	73845	73844	73846	73846	73844
DRR147079	73760	3	2	3	3	0	73785	73784	73783	73784	73784	73846	73845	73847	73847	73845
DRR149584	138	73784	73783	73784	73784	73785	0	3	2	3	3	1025	1024	1026	1026	1024
DRR149590	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	0	1	2	2	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149598	136	73782	73781	73782	73782	73783	2	1	0	1	1	1023	1022	1024	1024	1022
DRR149646	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	2	1	0	2	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149690	137	73783	73782	73783	73783	73784	3	2	1	2	0	1024	1023	1025	1025	1023
DRR149748	981	73845	73844	73845	73845	73846	1025	1024	1023	1024	1024	0	1	3	3	1
DRR149750	980	73844	73843	73844	73844	73845	1024	1023	1022	1023	1023	1	0	2	2	0
DRR149762	982	73846	73845	73846	73846	73847	1026	1025	1024	1025	1025	3	2	0	4	2
DRR149766	982	73846	73845	73846	73846	73847	1026	1025	1024	1025	1025	3	2	4	0	2
DRR149771	980	73844	73843	73844	73844	73845	1024	1023	1022	1023	1023	1	0	2	2	0

図3. dist_final_snp_matrix.tsv（全検体）の中身

3-3. 遠縁菌株の除外

集団事例におけるSNP解析では、異なる血清型やSequence Type（ST）の菌群は、解析群からは除外することが望ましい。3-2.のような例では、2つの血清型（O157とO121）が含まれており、ここでは血清型O121を除いた10検体を解析することとした。その結果の集約(SNPcaster_report.txt) は右記の通りである。コアゲノムサイズは4.9M（89%）まで上昇している一方で、総SNP数は組換え領域除去前で1,578個まで減少した。それぞれの株間のSNP数マトリックス表を図4に示す。血清型O157株間のSNP数は、図3および図4において緑色でハイライトされた部分に相当する。血清型O121を除外する前後のO157株間のSNP数を比較すると、SNP数が4桁を超える株間では、O121を除外した場合に検出SNP数が500個近く増加しているのがわかる。これは、遠縁菌株であるO121を除去したことによってコアゲノム領域が拡張され、検出対象となったSNPsが増加したことに起因する。一方で、このような場合でもSNP数が1桁の株間では大きな変化は認められなかったのは、ほとんどの検出SNPsが最初の解析の際に定義されたコア領域に含まれていたからである。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 4959266
After Gubbins : 4916717

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 1578
After Gubbins : 750

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 1521
After Gubbins : 701

Removed SNPs
Gubbins: 828
```

	REF	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969	DRR14974	DRR14975	DRR14976	DRR14976	DRR14977
REF	0	256	255	254	255	255	1372	1371	1373	1373	1371
DRR149584	256	0	3	2	3	3	1514	1513	1515	1515	1513
DRR149590	255	3	0	1	2	2	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149598	254	2	1	0	1	1	1512	1511	1513	1513	1511
DRR149646	255	3	2	1	0	2	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149690	255	3	2	1	2	0	1513	1512	1514	1514	1512
DRR149748	1372	1514	1513	1512	1513	1513	0	1	3	3	1
DRR149750	1371	1513	1512	1511	1512	1512	1	0	2	2	0
DRR149762	1373	1515	1514	1513	1514	1514	3	2	0	4	2
DRR149766	1373	1515	1514	1513	1514	1514	3	2	4	0	2
DRR149771	1371	1513	1512	1511	1512	1512	1	0	2	2	0

図4. dist_final_snp_matrix.tsv（O121除外）の中身

3-4. 集団事例中の1株を参照株とした解析

3-3. で示したO157 Sakai株を参照配列とした解析では、解析対象株を血清型O157のみに限定することで十分なコア領域が確保され、近接な菌株は検出SNP数が1桁となった。このような明解なケースでは通常必要ないと考えられるが、本マニュアルでは更に集団事例のうちの1株を参照配列として解析する例を示す。

QCの実行（SNPcaster）の項目でアセンブルされたfastaファイルのうち、解析したい集団株から1株を選択し、SNPcaster.ipynbの「6. 参照配列をつなげて一つのFASTAファイルにする」を用いて、ドラフトゲノムのコンティグを連結してSNPcasterで使用可能な参照配列を作成する。その後は、作成された配列を参照配列としてSNPcasterを実行すれば良い。なお、この方法でド作成された配列を参照配列とする場合は、Gubbinsによる組換え領域の除去は実施できないので注意されたい。今回はDRR149598を参照株として、それとSNP数が1桁であった近縁の5株を解析した。その結果の集約 (SNPcaster_report.txt) は右記の通りである。コアゲノムサイズは5.2M（96%）となり、参照配列のほぼ全域がカバーされている一方で、検出SNP数は6個にまで減少した。それぞれの株間のSNP数マトリックス表を図5に示す。これまでの解析と比較して、わずかに検出SNP数の変化がみられる。これは、より近接な菌株ゲノムを参照配列としたことによってコア領域がさらに拡張され、SNP解析の解像度がさらに増加したことによるものである。

```
Core genome size (bp)
Before Gubbins : 5201544

Number of informative SNP sites (with reference)
No masking: 6

Number of informative SNP sites (without reference)
No masking: 6
```

	REF	DRR14958	DRR14959	DRR14959	DRR14964	DRR14969
REF	0	2	1	0	1	2
DRR149584	2	0	3	2	3	4
DRR149590	1	3	0	1	2	3
DRR149598	0	2	1	0	1	2
DRR149646	1	3	2	1	0	3
DRR149690	2	4	3	2	3	0

図5. dist_final_snp_matrix.tsv（近接株のみ）の中身

3-2から3-4までで述べたように、コアゲノムSNPsの検出は「解析するサンプル群」や「参照配列」によって大きな影響を受ける。そのため、集団事例におけるコアゲノムSNP解析においては「近接な株同士を比較すること」が大前提となる。集団事例にNGS解析を適用する際はこのことを念頭に置き、解析しているサンプル群に遠縁の株が混ざっていないか、コアゲノム領域が十分に確保されているか（概ね75%以上を推奨）、について確認するよう努める必要がある。

冒頭でも述べたように、今後自施設において集団事例のSNP解析を導入する際には、本マニュアルに記載のデータを参考にして、自施設の解析環境が適切に機能するかどうかを確認してから解析を実行することを推奨する。

謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。

厚生労働行政推進調査事業費補助金　健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所におけるゲノム検査などに係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究」（研究代表者　貞升　健志）

別表．テストデータのファイルサイズ

DRR147067_R1.fastq.gz	105,783K
DRR147067_R2.fastq.gz	137,620K
DRR147069_R1.fastq.gz	112,819K
DRR147069_R2.fastq.gz	147,869K
DRR147072_R1.fastq.gz	110,675K
DRR147072_R2.fastq.gz	133,088K
DRR147075_R1.fastq.gz	95,208K
DRR147075_R2.fastq.gz	125,344K
DRR147079_R1.fastq.gz	104,785K
DRR147079_R2.fastq.gz	132,131K
DRR149584_R1.fastq.gz	144,066K
DRR149584_R2.fastq.gz	180,278K
DRR149590_R1.fastq.gz	116,620K
DRR149590_R2.fastq.gz	144,171K
DRR149598_R1.fastq.gz	154,462K
DRR149598_R2.fastq.gz	196,001K
DRR149646_R1.fastq.gz	103,696K
DRR149646_R2.fastq.gz	123,745K
DRR149690_R1.fastq.gz	146,901K
DRR149690_R2.fastq.gz	175,732K
DRR149748_R1.fastq.gz	183,890K
DRR149748_R2.fastq.gz	216,995K
DRR149750_R1.fastq.gz	163,170K
DRR149750_R2.fastq.gz	198,485K
DRR149762_R1.fastq.gz	187,530K
DRR149762_R2.fastq.gz	225,209K
DRR149766_R1.fastq.gz	160,643K
DRR149766_R2.fastq.gz	188,637K
DRR149771_R1.fastq.gz	89,887K
DRR149771_R2.fastq.gz	107,189K

令和８年５月２１日

厚生労働大臣
（国立医薬品食品衛生研究所長） 殿
（国立保健医療科学院長）

機関名　東京都健康安全研究センター

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　成田　友代

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働行政推進調査事業補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

２．研究課題名　地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　東京都健康安全研究センター・参事研究員

（氏名・フリガナ）　貞升　健志・サダマスケンジ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	■　□	■	東京都健康安全研究センター	□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年３月１８日

厚生労働大臣
（国立医薬品食品衛生研究所長） 殿
（国立保健医療科学院長）

機関名　神戸市健康科学研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　岩本　朋忠

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働行政推進調査事業補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

２．研究課題名　地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　神戸市健康科学研究所 所長

（氏名・フリガナ）　岩本　朋忠・イワモト　トモタダ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年３月２４日

厚生労働大臣
（国立医薬品食品衛生研究所長）　殿
（国立保健医療科学院長）

機関名　群馬県衛生環境研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　猿木　信裕

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働行政推進調査事業補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

２．研究課題名　地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　群馬県衛生環境研究所 保健科学係長

（氏名・フリガナ）　塚越　博之・ツカゴシ　ヒロユキ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無 有　無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		審査済み	審査した機関	未審査 （※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有　■　無　□（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有　■　無　□（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有　■　無　□（無の場合はその理

	由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有　□　無　■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年５月２１日

厚生労働大臣
（国立医薬品食品衛生研究所長）　殿
（国立保健医療科学院長）

機関名　東京都健康安全研究センター

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　成田　友代

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働行政推進調査事業補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

２．研究課題名　地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　東京都健康安全研究センター・課長

（氏名・フリガナ）　長島　真美・ナガシマ　マミ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	■　□	■	東京都健康安全研究センター	□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年３月１８日

厚生労働大臣
（国立医薬品食品衛生研究所長） 殿
（国立保健医療科学院長）

機関名　神戸市健康科学研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　岩本　朋忠

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働行政推進調査事業補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

２．研究課題名　地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　神戸市健康科学研究所 副部長

（氏名・フリガナ）　野本　竜平・ノモト　リョウヘイ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年５月２１日

厚生労働大臣
（国立医薬品食品衛生研究所長）　殿
（国立保健医療科学院長）

機関名　東京都健康安全研究センター

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　成田　友代

次の職員の令和６年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働行政推進調査事業補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

２．研究課題名　地方衛生研究所におけるゲノム検査等に係る人員体制及び人材育成法を確立するための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　東京都健康安全研究センター・統括課長代理

（氏名・フリガナ）　久保田　寛顕・クボタ　ヒロアキ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	■　□	■	東京都健康安全研究センター	□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。