

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、保健所及び衛生試験所）による MLVA 精度管理  
及び分子疫学手法活用に関する研究

研究分担者 山田和弘 愛知県衛生研究所  
研究協力者 高橋佑太 愛知県衛生研究所  
木全恵子 富山県衛生研究所  
塩本高之 石川県保健環境センター  
東方美保 福井県衛生環境研究センター  
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所  
野田万希子 岐阜県保健環境研究所  
信田充弘 岐阜市衛生試験所  
永井佑樹 三重県保健環境研究所  
石黒亜基子 豊橋市保健所衛生試験所  
中根邦彦 岡崎市総合検査センター  
多和田光紀 豊田市衛生試験所

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）3 血清型（O157、O26、O111）に対する分子疫学解析法である Multiple-Locus Variable numbers tandem repeats analysis (MLVA) 法について、東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、保健所及び衛生試験所）のうち既に MLVA 法が実施可能な 8 施設を対象に、4 件の EHEC 抽出 DNA を用いて精度管理を実施した。また、愛知県内の中核市 3 市を対象に、実習を交えた MLVA 初期導入研修を実施した。東海・北陸ブロックで今年度分子疫学手法を用いて解析した事例の報告を行った。

1. MLVA 法精度管理

各施設から提出された MLVA 法実施結果の各領域のリポート数を比較したところ、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックの MLVA 法の検査精度は良好であった。しかし、各施設における MLVA 法で得られるピークの高さには大きな差がみられ、判定に苦慮すると考えられる程度にピークが低い検体もあった。ピークの高さの施設ごとの差は使用するシークエンサーの違いや PCR 酵素及びプライマー濃度等の反応時点での違い等が考えられ、各施設で安定した結果を得ることを可能にすることは今後の課題であると考えられた。また、出力したファイルの貼り付けと結果の確認のみで、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすことが可能な記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

2. MLVA 法導入研修の実施

MLVA 導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。今後も MLVA 法に関して、担当者間での情報共有が重要であり、研修会等の開催も継続的に必要であると考えられた。

3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された *Shigella sonnei* 集団感染事例について PFGE 解析を行った。その結果、分離株全てが 95% 程度の相同性があった。

## A. 研究目的

東海・北陸ブロックはこれまでの研究班活動として、分子疫学手法である pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 及び IS-printing system (IS-PS) の精度管理を行ってきた。2018年6月、厚生労働省から事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」(MLVA 事務連絡)が発出され、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の遺伝子型別法を反復配列多型解析法 (Multiple-Locus Variable-number tandem repeats Analysis; MLVA) に統一することとなり、地方衛生研究所 (地衛研) において MLVA の導入が進められている。MLVA は、繰り返し配列を含む複数の遺伝子座から得られた PCR 産物について、それぞれの分子量に基づいて算出したリピート数を比較する方法である。数字のみでの比較が可能なため、他施設での実施結果と比較が容易といった利点があるが、数字のみの結果を比較するため、実施施設での検査の精度が保証されていることが必要となる。そこで、今年度の東海・北陸ブロック研究班活動では MLVA 法を既に導入している施設及び導入予定の実施可能施設を対象に、MLVA 法の精度管理を実施することで、東海・北陸ブロックの検査精度の保持・向上を目的とした。

さらに本年度から MLVA 法を導入する予定の施設に対し、実習を交えた MLVA 初期導入研修を実施することで、MLVA 法の導入を推進した。また、東海・北陸ブロックで今年度分子疫学手法を用いて解析した事例の報告も併せて行った。

## B. 研究方法

### 1. MLVA 法精度管理

愛知県衛生研究所 (愛知衛研) から7施設 (衛生研究所4カ所、愛知県内中核市保健所若しくは衛生試験所3カ所) に試薬 (Qiagen Multiplex PCR kit)、リピート数未知 EHEC 抽出 DNA (0.5ng/ $\mu$ L) 4検体 (O111 1検体、O157 2検体及びO26 1検体)、リピート数既知 EHEC 抽出 DNA (0.5ng/ $\mu$ L) 3検体 (O157 2検体及びO26 1検体)、MLVA実施手順書 (別添) 及び MLVA 結果判定用エクセルファイルを配布した。配布した精度管理株のリピート数を

表1及び表2に示した。各施設において、配布 DNA に対して MLVA 法を実施し、MLVA 手順書に従い、GeneMapper からエクスポートした結果を MLVA 結果判定用エクセルシートに結果を貼り付け、当所へメールでの返答を依頼した。令和2年10月に抽出 DNA 及び試薬を各施設に送付し、11月に返信された解析結果を当所にてまとめた。また、MLVA法に使用するPCR使用機器、PCR使用酵素、PCR産物の希釈倍率等のアンケート調査を実施した。アンケートの内容を表3に示す。なお、本研究においては分離菌株抽出 DNA のみを用いており、患者情報は利用していない。

### 2. MLVA 法導入研修の実施

MLVA 法の導入を予定している愛知県内中核市の3施設4名を対象として、令和2年6月25日・26日の2日間で、MLVA 導入研修を愛知県衛生研究所にて開催した。研修は愛知県衛生研究所職員が講師を担当し、MLVA 法の原理及び実際の手順に関する講義の後、EHEC 抽出 DNA 4件を使用した実習を行った。

## C. 研究結果及びD. 考察

### 1. MLVA 法精度管理

各施設から提出された MLVA 法実施結果及び当所で実施した MLVA 法実施結果の各領域のリピート数を比較した。比較結果を表4に示す。検体No.1 (O111) では8施設中1施設で結果が不一致であった。一致していなかった領域はO157-34であり、7施設においてリピート3と回答があったところ、不一致であった1施設においてはバンドが検出されなかった。検体No.2 (O157)、検体No.3 (O26) 及び検体No.4 (O157) では全施設で結果が一致した。

bin set のずれがみられたのは1施設あり、目視による修正を実施したと報告があった。ずれがみられた領域は検体No.1の2領域 (EHC-2及びEH111-11)、検体No.2の1領域 (EH157-12) 及び検体No.4の1領域 (EH157-12) であった。目視による修正後の結果は他施設と一致していた。各施設における MLVA 法で得られるピークの高さには大きな差がみられた。2領域 (EH111-8及びO157-9) では、判定に苦慮する

と考えられる程度にピークが低い検体もあった。ピークの高さの施設ごとの差は使用するシーケンサーの違いやPCR酵素及びプライマー濃度等の反応時点での違い等が考えられた。今回の精度管理においては、ピーク高さの違いによる判定不一致は見られなかったが、今後、低ピークをノイズとして判定することによる誤判定をしてしまう可能性はある。各施設で安定した結果を得ることを可能にすることは今後の課題であると考えられた。

アンケートの結果を表6に示す。PCR使用機器はApplied Biosystems Veritiが4施設、BioRad T100が1施設、GeneAmp PCR System 9700が1施設、SimpliAmp サーマルサイクラーが1施設、TaKaRa PCR Thermal Cycler DiceTM TP600が1施設であり、全ての施設でRamp rateについての回答はなかった。PCR使用酵素はQIAGEN Multiplex PCR kitを使用しているのが7施設、QIAGEN Multiplex PCR plus kitを使用しているのが1施設であった。PCR産物の希釈倍率は50倍希釈が2施設、100倍希釈が5施設あり、1施設では100倍希釈で実施後、ピーク高さを見て希釈倍率を20から50倍で調整していた。使用シーケンサーは3500 Genetic Analyzer Seriesが7施設、SeqStudioが1施設であった。データ解析時使用Bin setは全ての施設において、感染研から配布されたBin setを使用していた。陽性コントロールの使用頻度は毎回使用しているのが3施設、結果に違和感を覚えたときに使用するのが4施設、使用していない施設が1施設であった。陽性コントロールは自施設での検査精度を確認するうえで重要となるため、できる限り使用することが望ましいと考えられる。ピークとして判定する高さは自施設で閾値を設定して判定している施設が3施設、陽性コントロールを参考にする判定するとした施設が2施設あり、それ以外に波形、stutter peak、pull-up peak等から判定している施設や、ピーク高さが低かった場合に再試験を実施する施設があった。MLVA法の実施に関する機器や試薬に関する回答に比べ、判定に関する回答内容は多岐にわたっており、判定に関する研修や判定の統一プロトコルの作成等を行うことが、今後必要となると考えられた。

今回の精度管理ではMLVA結果判定用エクセルファイルも同時に配布したため、領域等の転記ミス等の人的ミスは見られなかった。本ファイルではエクセルのVLOOKUP関数やVALUE関数を利用して、GeneMapperでの解析結果をMLVA事務連絡別添2ファイル中の領域順へと並べ替えをしている。エクセルファイルの一部を表6に示す。MLVA法は数字のみでの比較が可能な方法であるため、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすることが重要である。そのため、出力ファイルの貼り付けと結果の確認のみですむMLVA結果判定用エクセルファイル等の記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

以上の結果、ピークの大小の差はあったが、レポート数が大きく外れていた施設は認められず、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックのMLVA法の検査精度は良好であると考えられた。

## 2. MLVA導入研修会の実施

MLVA導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。特にGeneMapperの使用方法及びデータのエクспорт方法に関する実習が、今後のためになったとの意見が多く聞かれた。今後もMLVA法に関して、担当者間での情報共有が重要であると考えられた。

## 3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された*Shigella sonnei* 集団感染事例についてPFGE解析を行った(図1)。その結果、分離株全てが95%程度の相同性があった。

## E. 結論

### 1. MLVA法精度管理

各施設から提出されたMLVA法実施結果の各領域のレポート数を比較したところ、概ね一致した成績が得られており、東海・北陸ブロックのMLVA法の検査精度は良好であった。しかし、各施設におけるMLVA法で得られるピークの高さには大きな差がみられ、判定に苦慮すると思われる程度にピークが低い検体もあったこと

から、各施設で安定した結果を得ることを可能にすることが今後の課題であると考えられた。

また、出力ファイルの貼り付けと結果の確認のみで、入力ミスや転記ミスといった人的要因のミスをなくすことが可能な記入用紙の統一は非常に有用であると考えられた。

## 2. MLVA 導入研修会の実施

MLVA 導入研修会は、参加者に全体的に好評であった。今後も MLVA 法に関して、担当者間での情報共有が重要であり、研修会等の開催も継続的に必要であると考えられた。

## 3. 東海・北陸ブロックで分子疫学的解析を実施した事例

愛知県で患者が確認された *Shigella sonnei* 集団感染事例について PFGE 解析を行った。その結果、分離株全てが 95%程度の相同性があった。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 リポート数未知 EHEC の MLVA 法におけるリポート数

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
検体No.1	111	3	1	10	2	-2	8	11	9	6	-2	3	8	2	-2	1	-2	8
検体No.2	157	2	-2	1	7	-2	11	4	-2	-2	18	9	15	5	3	7	6	7
検体No.3	26	2	1	1	2	3	8	23	-2	-2	-2	1	13	2	-2	1	-2	-2
検体No.4	157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	-2	24	9	10	3	6	8	-2	9

表2 リポート数既知 EHEC の MLVA 法におけるリポート数

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
陽性コントロール1	157	2	-2	1	4	-2	5	6	-2	12	-2	9	7	3	9	7	5	3
陽性コントロール2	157	2	-2	1	4	-2	5	4	12	-2	13	12	10	5	4	4	12	7
陽性コントロール3	26	2	1	1	2	5	3	19	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2

表3 MLVA 法に関するアンケート

PCR使用機器	[Redacted]	(Ramp rateを変更した場合はその旨の記載をお願いします)
PCR使用酵素	[Redacted]	QIAGEN Multiplex PCR kit その他の場合 QIAGEN Multiplex PCR plus kit Platinum™ Multiplex PCR Master Mix その他
PCR産物の希釈倍率	[Redacted] 倍	
	希釈方法 PCR産物 [Redacted] μL	
	DW [Redacted] μL	
使用シーケンサー	[Redacted]	
データ時使用Bin	[Redacted]	自作Bin その他の場合 感染研配布Bin その他
PCの使用頻度	[Redacted]	毎回 その他の場合 試薬等を変更したとき 結果に違和感を覚えたとき その他
ピークとして判定するHight	[Redacted]	1000以上 その他の場合 500以上 PCを参考にする その他

表4 令和2年度東海・北陸ブロック MLVA 法精度管理の結果

No.	血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
検体No.1	111	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
average	2448.6	2778.0	1627.5	3488.3	-2	3645	5548.6	2034.1	5094.4	1509.1	1503.3	2454.1	4911.4	1670.3				
median	2194	1947.5	1498.5	3287.5		3583	5469	1923	4188.5	1330	1112	2411	4079.5	1190.5				
max	6046	5882	4025	8113		6548	12481	3975	12279	3879	3638	5164	10799	5568				
min	473	1158	519	1025		740	967	460	1164	359	138	604	1010	526				
note	bin修正有						bin修正有			不検出あり								
検体No.2	157		-2	1	7	-2	11	4	-2	-2	18	9	15	5	3	7	6	7
average	2372.3			1149.5	2908.9		3853.4	6440.4		4681.8	1606.0	4621.6	2761.8	2774.4	4480.6	4702.0	2139.6	
median	1736			598	2300.5		3537	5458		5098	989	4222	2463	1374.5	2750	2605	1048.5	
max	6133			4901	7164		7507	15123		7320	3561	10881	6066	9609	10100	13915	8236	
min	374			238	622		541	698		475	465	273	496	405	899	730	253	
note					bin修正有													
検体No.3	26		1	1	2	3	8	23	-2	-2	-2	1	13	2	-2	1	-2	-2
average	2048.1	2021.4	2146.5	3119.9	2418.0	3224.3	3490.8				1611.6	1260.1	2272.4	3685.8				
median	1752	1542.5	1026	2569	2120.5	2650.5	2881				1063	795.5	1780	3084				
max	4488	4091	9898	10632	5264	7193	10018				4987	3057	7003	8626				
min	730	912	197	545	715	786	768				236	92	658	829				
note																		
検体No.4	157		-2	1	6	-2	3	4	-2	-2	24	9	10	3	6	8	-2	9
average	2230.9			1037.5	2779.9		3537.6	6068.0		3600.5	1419.4	4793.5	2449.4	2437.3	4005.6			2138.5
median	2535.5			506	2248		3193	5287.5		3699	1225	4340.5	2068.5	1991	3843			1880
max	3974			4267	6256		6549	13425		5548	3044	10009	5157	5733	6601			4564
min	553			167	1336		955	1378		783	229	873	853	628	937			692
note					bin修正有													

表5 MLVA 結果判定用エクセルファイル抜粋

mix1									
#	Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 1 Ht	Allele 2	Height 2	Sample Name	Marker	Height
1	mix1_XXXXXXXX	O157-34	153-01	6999				O157-34	01
2	mix1_XXXXXXXX	EHC-2	340-21	14685				EHC-2	21
3	mix1_XXXXXXXX	O157-9	520-09	10427				O157-9	09
4	mix1_XXXXXXXX	EHC-1	135-10	12402				EHC-1	10
5	mix1_XXXXXXXX	EHC-5	121-02	5975	181-12	3302	XXXXXXXX	EHC-5	02
6	mix1_XXXXXXXX	O157-3						O157-3	-2
7	mix1_XXXXXXXX	O157-25	122-02	300				O157-25	NG
8	mix1_XXXXXXXX	EH157-12	415-02	8618				EH157-12	02
9	mix1_XXXXXXXX	EH111-8	237-01	7158				EH111-8	01

GeneMapperからのExportファイルを貼り付け

2本目のピークがある場合はこちらに表示 (セル青色)

ピークの高さが1000以下の場合、“NG”と表示  
ピークと判断した場合、数式内部の“1000”を  
適当な数字に変更

=IFERROR(VALUE(VLOOKUP(AO2,\$J\$3:\$K\$11,2,FALSE)),"NG")

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-9	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
XXXXXXXX	3	1	1	2	-2	10	21	2	6	-2	1	9	NG	-2	1	-2	8

表6 アンケート結果

PCR使用機器	施設数	使用シーケンサー	施設数	ピークとして判定するHight	施設数
Applied Biosystems Veriti	4	3500 Genetic Analyzer	6	500以上	1
BioRad T100	1	3500xL Genetic Analyzer	1	PCを参考にする	2
GeneAmp PCR System 9700	1	SeqStudio	1	その他	5
SimpliAmpサーマルサイクラー	1	総計	8	波形等から確認	
TaKaRa PCR Thermal Cycler DiceTM TP600	1	データ解析時使用Bin	施設数	200以上	
総計	8	感染研配布Bin	8	約175	
PCR使用酵素	施設数	総計	8	100以上 (再試験実施)	
QIAGEN Multiplex PCR kit	7	PCの使用頻度	施設数	総計	8
QIAGEN Multiplex PCR plus kit	1	毎回	3		
総計	8	結果に違和感を覚えたとき	4		
PCR産物の希釈倍率	施設数	その他 (使用していない)	1		
50	2	総計	8		
100	5				
20~100	1				
総計	8				

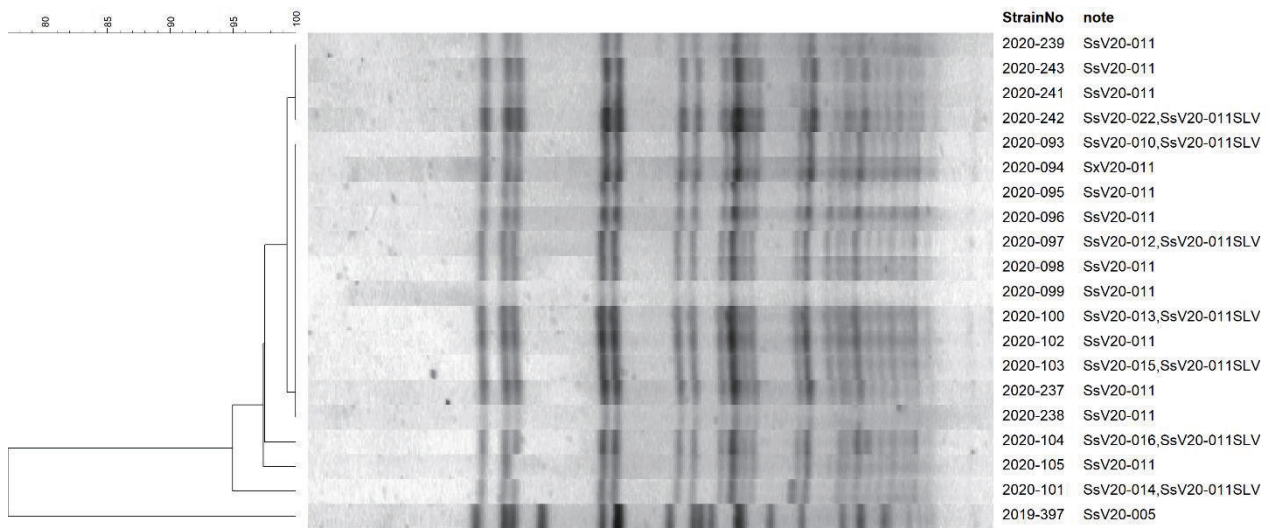
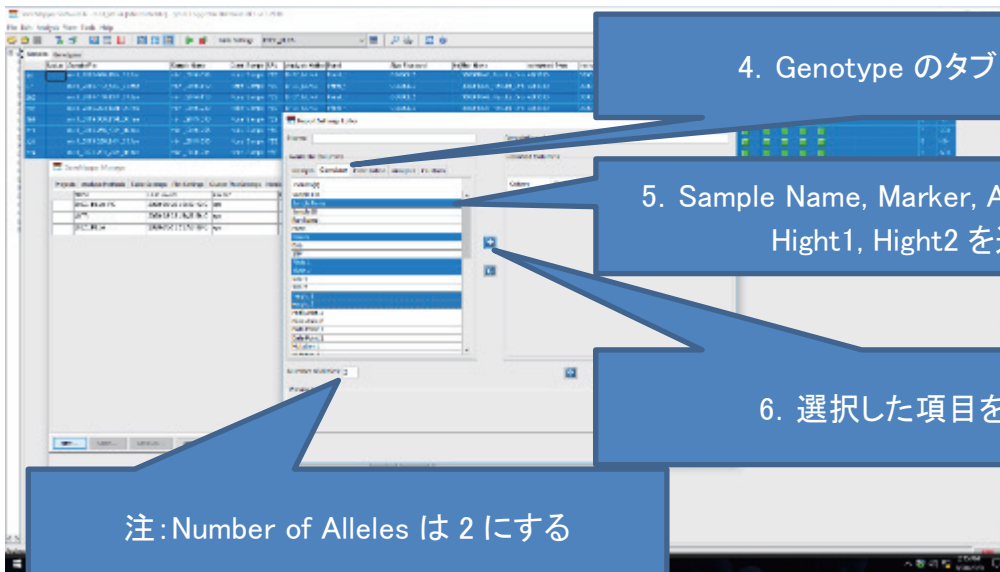
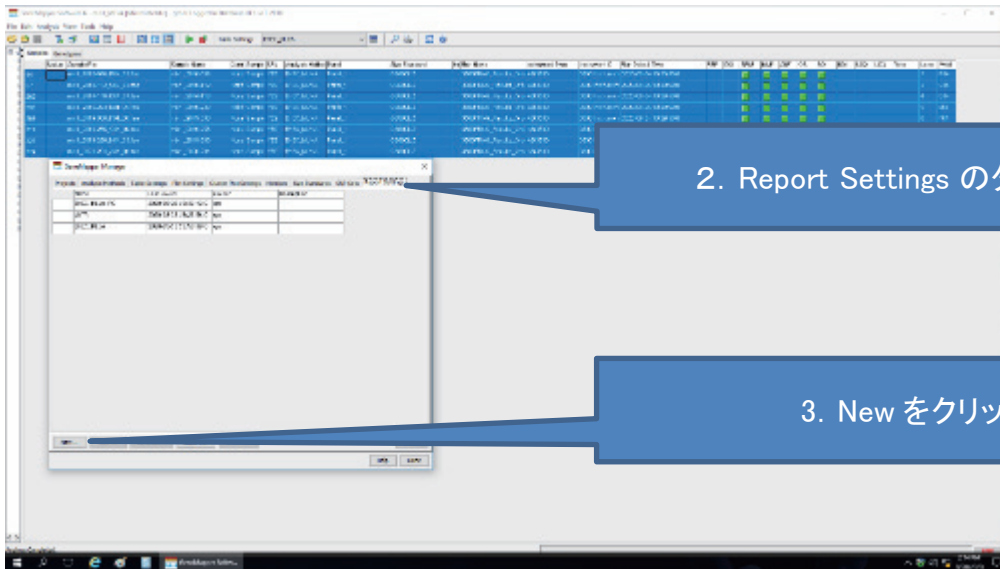
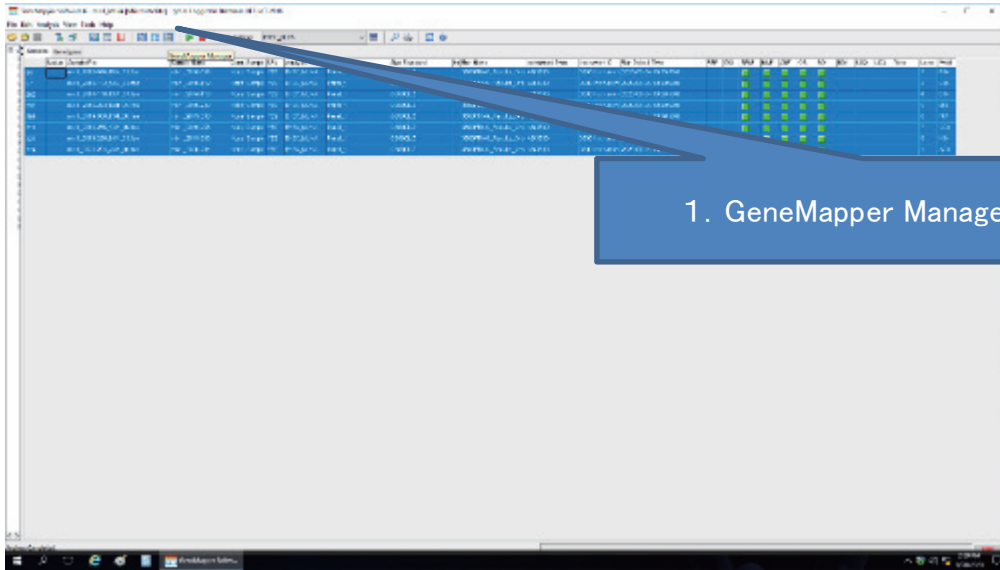


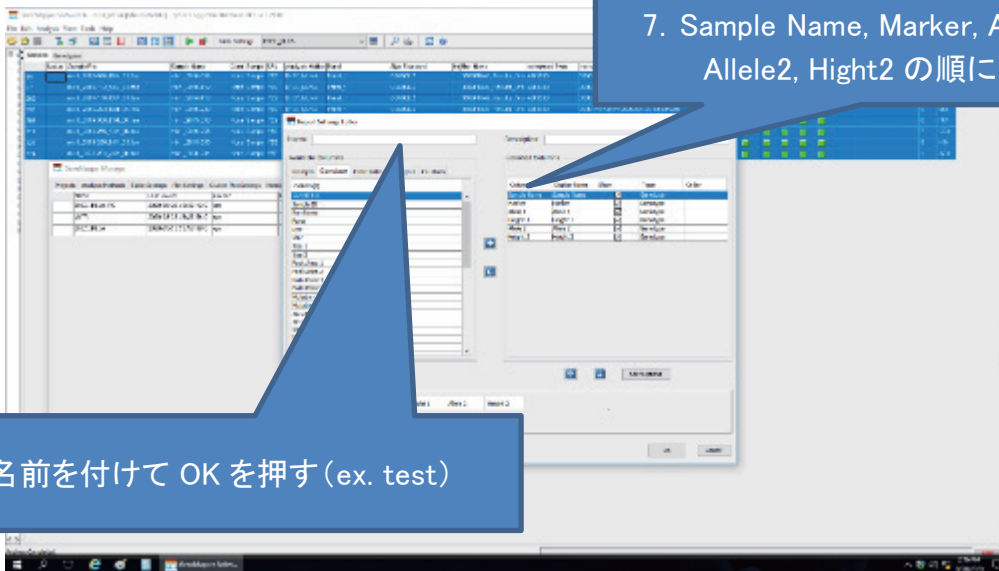
図1 *Shigella sonnei* の PFGE 図

note に記載されているのは国立感染症研究所にて実施した MLVA 法の解析結果

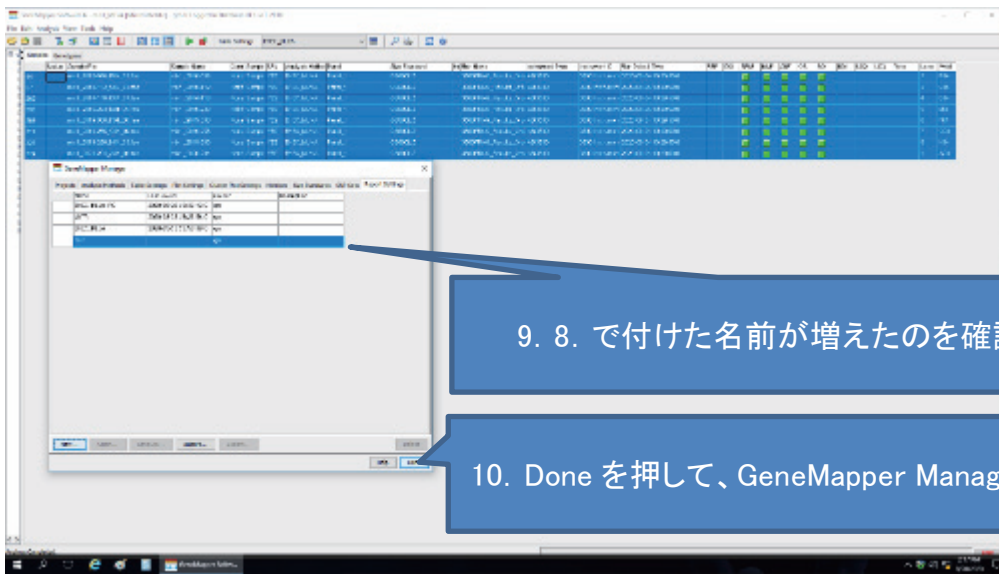


(別添) MLVA 実施手順書 (GeneMapper からのデータの Export の手順のみ抜粋)



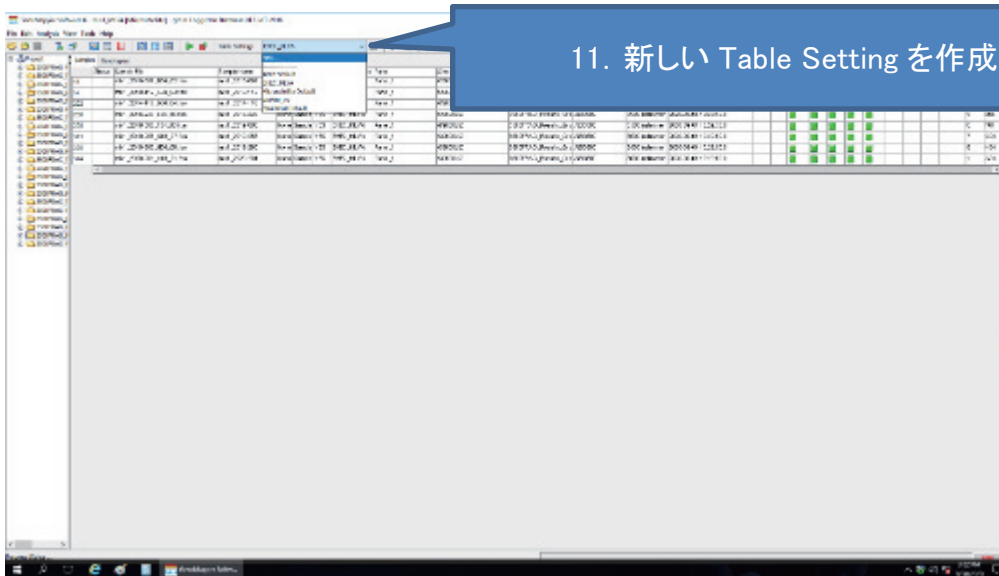


8. 名前を付けて OK を押す(ex. test)

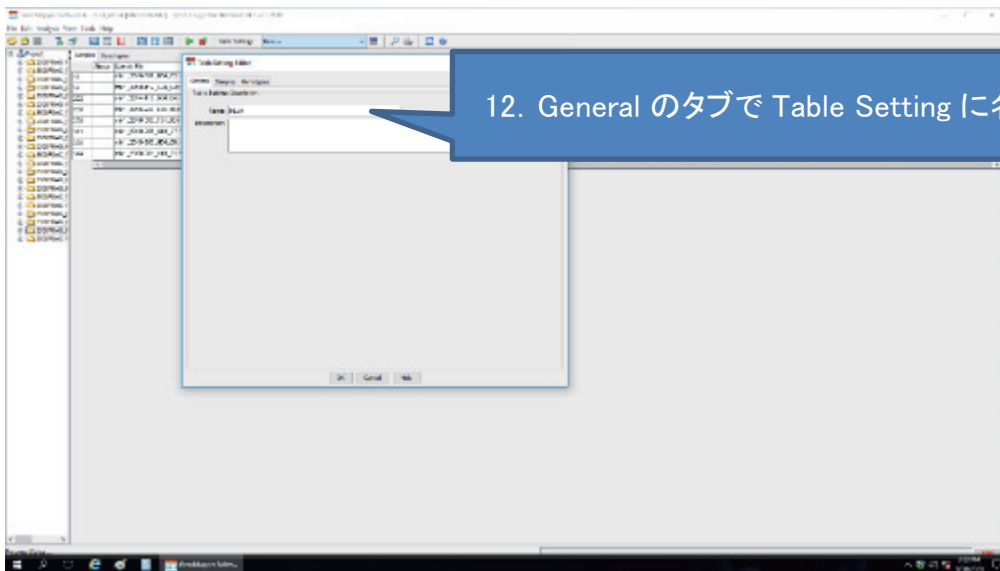


9. 8. で付けた名前が増えたのを確認

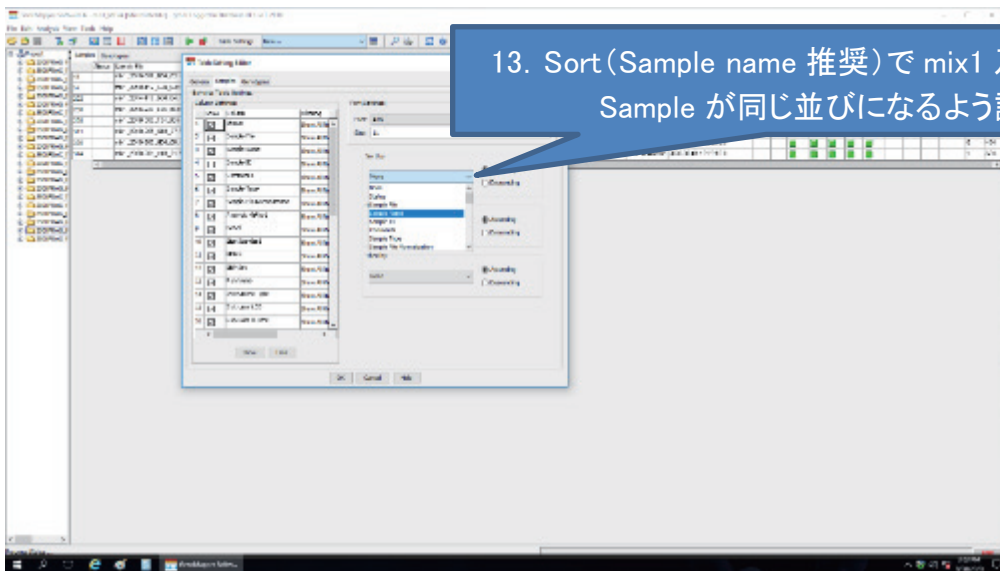
10. Done を押して、GeneMapper Manager を閉じる



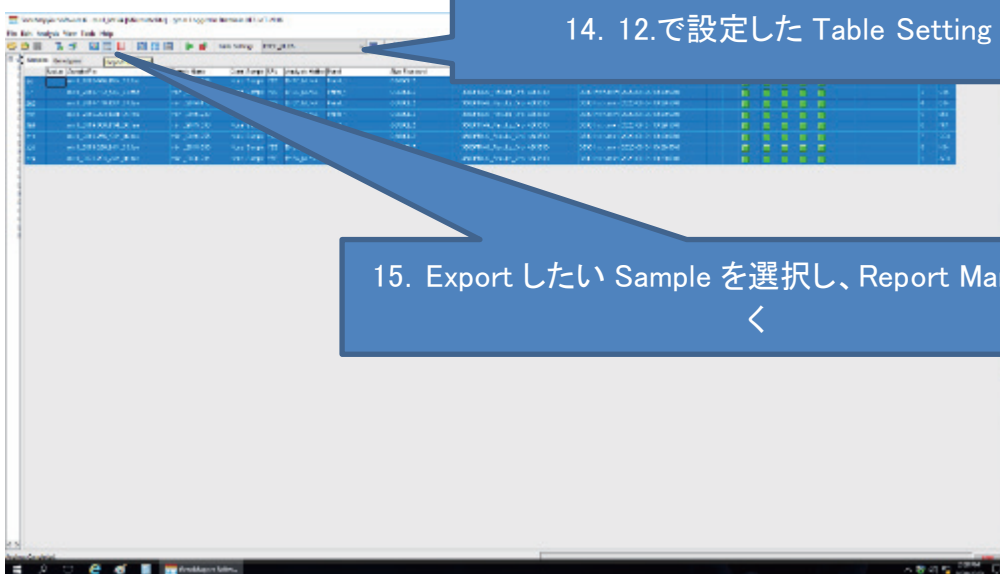
11. 新しい Table Setting を作成する



12. General のタブで Table Setting に名前を付ける

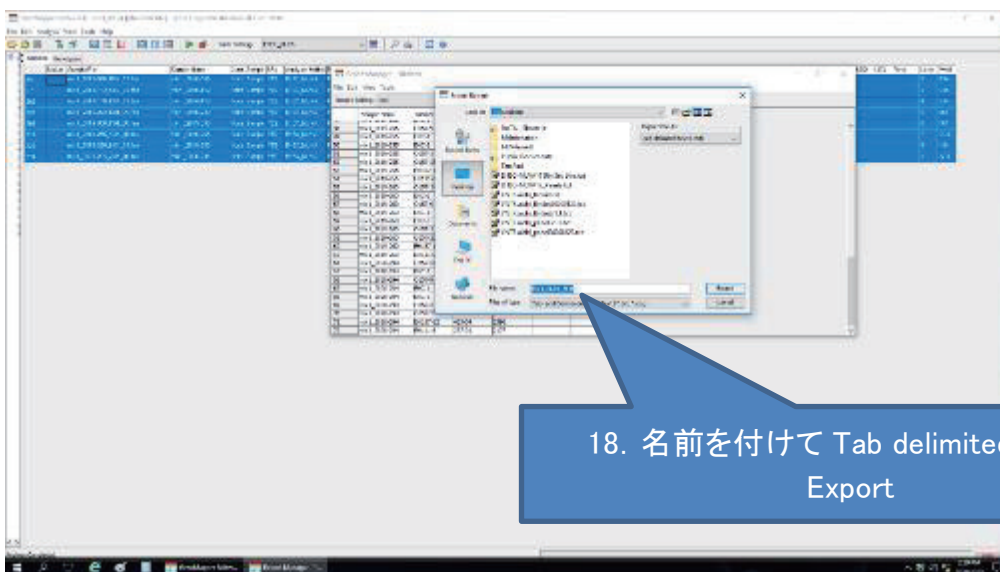
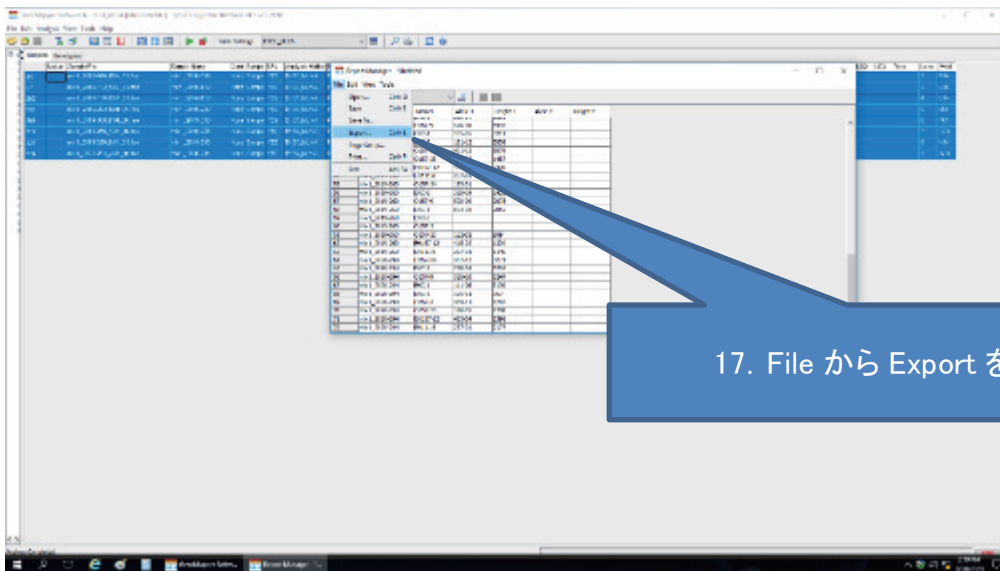
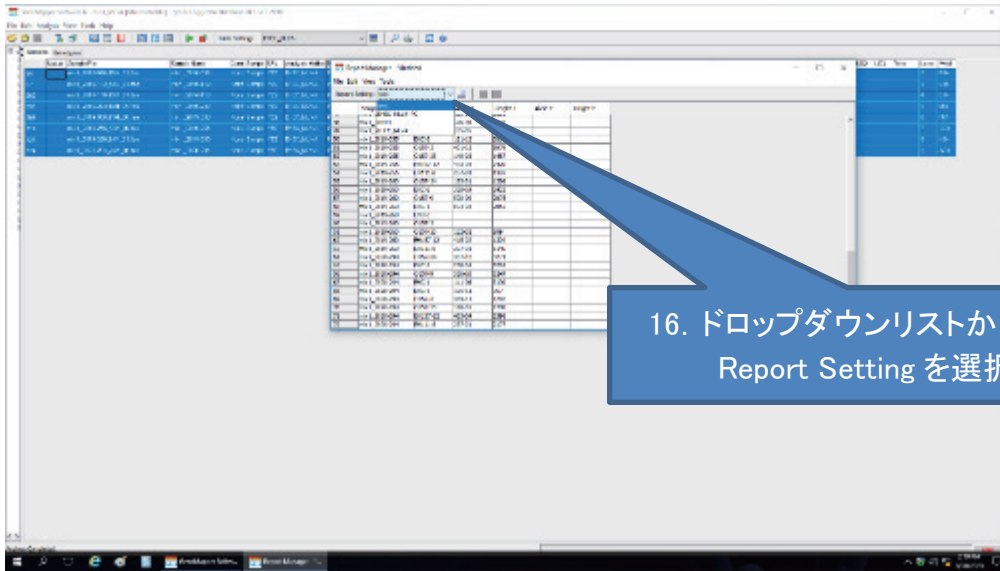


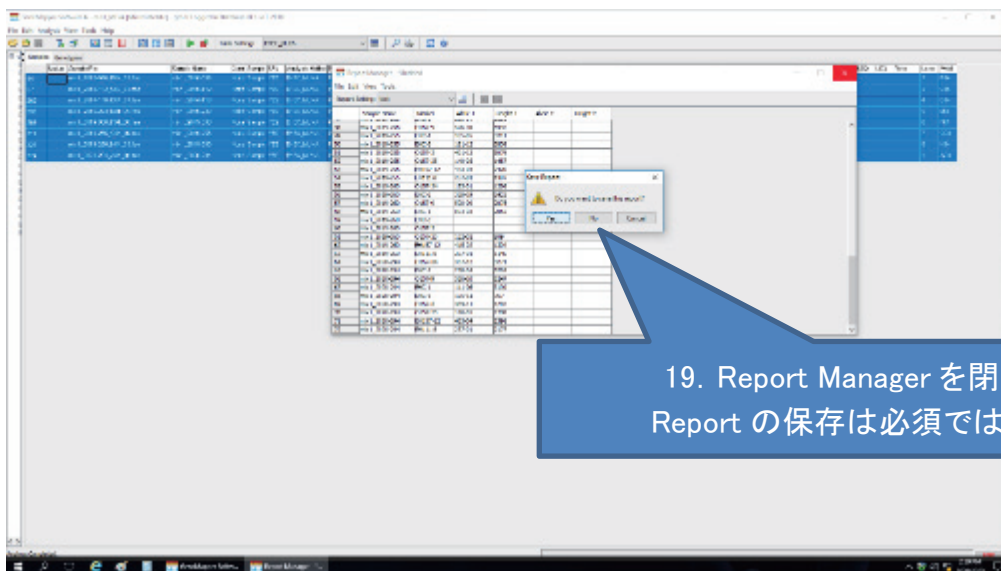
13. Sort (Sample name 推奨) で mix1 及び mix2 の Sample が同じ並びになるよう設定



14. 12.で設定した Table Setting を選択

15. Export したい Sample を選択し、Report Manager を開く  
◀





Export file (Tab delimited text) を MLVA 解析用エクセルファイルに貼り付ける (Sample 48 件まで貼り付けることが可能)。