

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
令和2年度分担研究報告書

高度解析法の構築と近畿ブロックにおける情報共有体制の構築の検討

研究分担者	河合高生	地方独立行政法人大阪健康安全 基盤研究所
研究協力者	若林友騎、梅川奈央、高橋佑介 原田哲也、河原隆二、勢戸和子 石川和彦 浅井紀夫、小仲兼次 渡辺正義 荻田堅一、齋藤悦子 濱夏樹、野本竜平 横田隼一郎、黒田久美子 平垣内雅規、平田翔子 福田弘美、岩崎直昭 吉田孝子 池端孝清 庄真理子	地方独立行政法人大阪健康安全 基盤研究所 滋賀県衛生科学センター 京都府保健環境研究所 京都市衛生環境研究所 兵庫県立健康生活科学研究所 神戸市環境保健研究所 姫路市環境衛生研究所 尼崎市衛生研究所 堺市衛生研究所 奈良県保健研究センター 和歌山市衛生研究所 和歌山県環境衛生研究センター

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）の遺伝子型別法である反復配列多型解析法（Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis ; MLVA）の地方衛生研究所（地衛研）への導入促進を目的として、平成30年度から検討を継続している MLVA 新規解析法に改良を加え、その有効性を評価した。近畿ブロック内の研究協力地衛研10施設を対象に結果の信頼性確保のための精度管理を実施した。また、MLVAに関するQ&Aを作成し、地衛研における MLVA の導入・実施を支援した。研究協力地衛研5施設とともに改良した MLVA 新規解析法を評価した結果、1施設を除いて、供試した83%以上の菌株について17遺伝子座すべてのリピート数を正確に決定することができた。MLVA 新規解析法は、他施設で作成された bin 設定ファイルをインポートする既存の方法と比較して、同等以上の精度でリピート数を決定できると考えられた。MLVA の精度管理については、10施設中4施設が配布した12株すべてを正しく解答した一方で、3施設は2株以上を誤答し、施設間で MLVA の技術レベルに差があることが明らかになった。継続的な精度管理の実施による技術レベルの底上げが必要であると考えられた。

A. 研究目的

食品由来感染症において原因菌の分子疫学解析は行政対応に重要なツールである。近畿ブロックの地方衛生研究所（地衛研）では、腸管出血性大腸菌（EHEC）の遺伝子型別法として、IS-printing System（IS）法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法を共通の解析手法として使用してきた。近年、EHECの遺伝子型別法を反復配列多型解析法（Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis；MLVA）に統一する旨が通知されたことを受け、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。MLVAの大きな利点の一つは、各実施施設で得られた結果を容易に比較できることにあるが、このためには各施設で正確にリピート数を決定できることが大前提となる。通常、各遺伝子座のリピート数を算出するには、実際に検査で使用する機器を用いてbinセットを構築することが必須となる。しかし、binセットの構築には各遺伝子座について様々なリピート数を保有する多数の菌株を解析する必要があるため、これがMLVA導入の際の障害の1つになることが多い。

本分担研究では、24株の参照株の解析結果から回帰分析を実施し、その分析結果に基づいてリピート数を決定する、新規のリピート数決定法（新規解析法）の開発を進めてきた。昨年度の研究では、遺伝子座EHC-6は他の遺伝子座と比較して、リピー

ト数を正確に決定できる菌株の割合が低いことが明らかになった。遺伝子座EHC-6は、回帰分析に用いた参照株のリピート数の最小値が3（塩基長414 bp）、最大値が33（塩基長684 bp）であり、他の遺伝子座と比較してリピート数の幅が広い。そのため、直線回帰では高分子量領域において推定値と実測値に乖離が生じ、これが精度を低下させる要因であると考えられた。そこで、本年度はより実測値に適合した回帰モデルとして、多項式回帰分析を採用し、遺伝子座EHC-6の決定精度の改善を試みた。

また、結果の信頼性確保を目的とするMLVAの精度管理を実施するとともに、MLVA実施時に躓きやすいポイントあるいは悩みやすいポイントをまとめたQ&Aを作成することで、近畿ブロックにおけるMLVAの導入・実施を支援した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

自作binセットの作成には、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所（大安研）で保存しているEHEC 24株（参照株、表1）を使用した。MLVAの精度管理には、大安研で保存しているEHEC 12株を使用した（精度管理株、表2）。新規解析法の評価には、各協力地衛研で今年度に収集された菌株を使用した。

2. MLVAの実施

MLVAは、腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック（O157、O26、O111編 第一版（Ver. 1.2）2018年11月編 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググル

ープ編)を参照して実施した。

3. 遺伝子座 EHC-6 の回帰分析

参照株 24 株のうち増幅産物が得られた 7 株 (2020-08、-14、-15、-16、-21、-23、-24) の泳動データを用いて、単回帰分析と二次多項式回帰分析を実施した。また、これらの結果に基づき、それぞれの bin セットを作成し、過去に大安研で解析した 44 株についてリポート数を決定した。

4. 回帰分析に基づく bin セットの作成

MLVA の新規解析法の評価を担う当所(大安研)ならびに近畿ブロックの地衛研 5 施設においては、参照株 24 株の DNA を用いて MLVA を実施し、保有するキャピラリー式シーケンサーで泳動した際の増幅産物サイズを測定した。参照株のリポート数を説明変数、各施設で泳動した時の増幅産物サイズを目的変数として、表計算ソフト Excel を用いて単回帰分析を実施した。遺伝子座 O157-34 および遺伝子座 O157-19 については、リポート数がそれぞれ 1 となる 5 株 (2020-6、-13、-14、-15、-22) および 10 株 (2020-6、-7、-8、-13、-14、-15、-16、-22、-23、-24) のデータを除いて回帰分析を実施した。遺伝子座 EHC-6 については、二次多項式回帰分析を実施した。得られた回帰分析結果について、回帰直線と回帰係数の有意性の検定を行い、危険率を 5%として評価した。

回帰直線から得られた各リポート数に応じて予測される PCR 増幅産物サイズを bin の中央値とし、bin のオフセット値を ± 1.5 bp として bin セットを作成した。遺伝子座 O157-34 および遺伝子座 O157-19 のリポート数が 1 の bin は、上述の 5 株および 10 株

の増幅産物サイズの平均値 ± 1.5 bp として作成した。

5. 自作 bin セットの評価

施設毎に作成した bin セットを自施設の解析ソフト (GeneMapper) にインポートし、自作 bin セットとして解析に使用した。また、平成 30 年に国立感染症研究所 (感染研) から分与された bin セットを同様にインポートし、感染研 bin セットとして解析に使用した。各施設で分離された EHEC O157、O26、O111 について MLVA を実施し、自作 bin セットおよび感染研 bin セットを用いてリポート数を決定した。リポート数の決定は表 3 の基準に従って実施した。

評価に用いた菌株は感染研に送付し、MLVA の実施を依頼した。感染研での解析結果を当該菌株の標準リポート数とし、施設毎に自作 bin セットあるいは感染研 bin セットを用いて決定したリポート数との一致率を比較した。

6. MLVA の精度管理

精度管理の対象とした 10 施設に、12 株の精度管理株から抽出した DNA を送付した。精度管理株のリポート数を表 2 に示す。各施設には、遺伝子座毎のリポート数を記入した判定表の提出を求めた。判定できない遺伝子座が存在する場合は、その遺伝子座のリポート数は空欄とし、欄外に判定できない理由を記載することとした。17 遺伝子座すべてのリポート数を正確に決定できた場合を正答とみなした。ただし、EQA20-04 の遺伝子座 O157-25 および EQA20-11 の遺伝子座 O157-37 については、判定できない理由が適切に記載されている場合、空欄のまま

までも正答とみなした。

7. MLVA に関する Q&A の作成

近畿ブロックの協力地衛研に対して、MLVA に関する質問事項をメールで募集した。集まった質問事項に回答を加筆し、MLVA に関する Q&A を作成した。作成した Q&A を近畿ブロックの協力地衛研にメールで配布した。

(倫理面への配慮)

本研究で取り扱う菌株および感染者情報は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に基づく調査によって得られたもので、個人情報には研究参加施設において匿名化し、厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 新規解析法の改良

遺伝子座 EHC-6 について、単回帰分析と二次多項式回帰分析を実施した。増幅産物が得られた参照株 7 株のデータに基づいて回帰分析を実施したところ、自由度修正済み決定係数が単回帰分析では 0.999872、二次多項式回帰分析では 0.999998 となり、二次多項式回帰分析を用いることで決定係数がより 1.0 に近似した。

次に、単回帰分析および二次多項式回帰分析の結果に基づいて bin セットを作成し、遺伝子座 EHC-6 のリポート数を決定できた株数を比較した。過去に大安研で解析した菌株のうち、遺伝子座 EHC-6 で増幅産物が得られた 44 株の泳動データを用いたところ、単回帰分析では 8 株のリポート数を決定できなかった (表 4)。リポート数ごとに比較すると、リポート数が 3~12 までの菌株は

単回帰分析でリポート数を決定できたものの、リポート数が 13 の菌株は 3 株中 1 株が、リポート数が 16~21 の菌株はすべてがリポート数を決定できなかった。一方、二次多項式回帰分析を用いた場合は、44 株すべてのリポート数を決定できた。この結果、遺伝子座 EHC-6 には、回帰モデルとして二次多項式回帰を採用することにした。

2. 改良自作 bin セットの評価

当所と研究協力地衛研 5 施設において、自施設で収集した菌株を用いて MLVA を実施し、改良した自作 bin セットおよび感染研 bin セットを使用してリポート数をそれぞれ決定した。決定したリポート数が標準リポート数と一致した菌株の割合を表 5 に示した。施設 No. 4 を除く 5 施設すべてにおいて、自作 bin セットを用いることで、供試菌株の 83% 以上について 17 遺伝子座すべてのリポート数を決定できた。感染研 bin セットを使用した際の一致率と比較すると、自作 bin セットの一致率は、感染研 bin セットのそれと同等以上であった。各 bin セットを用いてリポート数を決定あるいは推定した菌株の割合を表 6 に示した。

自作 bin セットを使用して解析した場合、施設 No. 1 では、6 株中 5 株 (83%) で 17 遺伝子座のリポート数はすべて標準リポート数と一致した。リポート数が一致しなかった 1 株では、決定した遺伝子座 O157-37 のリポート数は 8 であったが、標準リポート数は 9 であった。

施設 No. 2 では、30 株中 25 株 (83%) で 17 遺伝子座すべてのリポート数が標準リポート数と一致した。自作 bin セットでリポー

ト数を決定できなかった遺伝子座のうち、遺伝子座 EHC-1 は近傍の bin からリピート数を推定できた。しかし、遺伝子座 O157-36、遺伝子座 O157-37、遺伝子座 EHC-6 では各 1 株ずつについては、自作 bin セットで決定したリピート数と標準リピート数に差異が見られた。すなわち、上記 3 遺伝子座では、決定したリピート数はそれぞれ、9、6、3 であったが、標準リピート数はいずれも「-2」（増幅なし）であった。また、1 株については、遺伝子座 O157-37 で bin セットの範囲外にピークが検出されたため、リピート数を決定することができなかった。

施設 No. 3 および No. 6 ではそれぞれ 15 株、33 株を解析し、自作 bin セットの使用により、全株について 17 遺伝子座すべてのリピート数が標準リピート数と一致した。

施設 No. 4 では 2 株を解析したが、遺伝子座 EH111-11 および遺伝子座 EH157-12 のリピート数を自作 bin セットで決定できなかった。しかし、いずれの遺伝子座も近傍の bin からリピート数を推定することは可能であった。

施設 No. 5 では、17 株中 16 株（94%）で自作 bin セットで決定したリピート数は標準リピート数と一致した。リピート数を決定できなかった 1 株は、遺伝子座 O157-9 においてピークが bin から外れたものであったが、近傍の bin からリピート数を推定することは可能であった。

遺伝子座 EHC-6 については、6 施設で解析した合計 121 株のうち 7 株で、増幅産物が検出された。このうち 6 株は、自作 bin セットを使用して決定したリピート数と標準

リピート数が一致した。結果が一致しなかった 1 株では、決定したリピート数は 3 であったが、標準リピート数は「-2」（増幅なし）であった。

感染研 bin セットを使用して解析した場合、4 施設では決定したリピート数が標準リピート数と一致する菌株は 1 株もなく、リピート数が一致した株の割合は、施設 No. 1 の 83%が最大であった。リピート数を決定できなかった菌株のほとんどは、近傍の bin からリピート数を推定することが可能だったため、施設 No. 1、No. 2、No. 4、No. 5 においては、それぞれで供試した菌株の 83%、93%、100%、100%で、決定または推定したリピート数が標準リピート数と一致した。また、この 4 施設では、自作 bin セットの範囲外にピークが検出されたためにリピート数を決定できなかった施設 No. 2 の 1 株を除き、感染研 bin セットと自作 bin セットの結果が一致した。一方、施設 No. 3 および施設 No. 6 においては、感染研 bin セットを用いて決定または推定したリピート数が標準リピート数と一致した菌株の割合は、それぞれ 80%、9%となり、自作 bin セットを用いた場合のそれと比較して、低い割合であった。

3. MLVA の精度管理

参加した 10 施設の精度管理結果を表 7 に示す。配布した 12 株すべてで正答が報告された施設は 4 施設であった。一方、結果に誤りが認められた 6 施設のうち 3 施設は、2 株以上を誤答した。EQA20-04 は、遺伝子座 O157-25 のリピート数が 16 の株で、感染研 bin セットの範囲外にピークが検出される

(図 1-1)。この株の遺伝子座 O157-25 については、2 施設が「-2」(増幅なし)と解答した。同様に、感染研 bin セットの範囲外にピークが検出される EQA20-11 の遺伝子座 O157-37 についても(図 1-2)、3 施設が「-2」(増幅なし)と解答した。また、EQA20-07 については、10 施設すべてが正しいリピート数を報告したが、3 施設は遺伝子座 EHC-5 について、正答のピークと同時に検出される小ピーク(ダブルピーク)に関する記載がなかった。加えて、遺伝子座 O157-36 と遺伝子座 O157-37 の解答が逆になっている、「-2」(増幅なし)が正答のところを 2 と解答しているなど、結果の転記ミスと疑われる誤答がいくつか認められた。

4. MLVA に関する Q&A の作成

近畿ブロックの協力地衛研にメールで MLVA に関する質問事項を募集し、9 施設から計 31 項目の質問を得た。得られた質問を項目ごとに分類し、Q&A 形式にして回答を追記した上で、協力地衛研に配布した(別紙 1)。

D. 考察

平成 30 年度から検討を続けている新規リピート数決定法を改良した。遺伝子座 EHC-6 について、二次多項式回帰分析を用いてリピート数決定率の向上を試みたところ、増幅産物が得られた 7 株中、6 株のリピート数を正確に決定できた。残りの 1 株では、感染研の解析結果と一致しなかったが、リピート数を 3 と決定することができた。この 1 株については、感染研に菌株を搬送し、感染研で MLVA を実施するまでの間に

変異が生じ、遺伝子座 EHC-6 のリピート数が増えた可能性が考えられた。遺伝子座 EHC-6 にピークが出現する保存株を使った解析において、44 株すべてでリピート数を決定できたことも踏まえると、本遺伝子座については、二次多項式回帰分析を用いることでリピート数の決定精度を改善できると考えられた。

MLVA のリピート数決定法として、他施設で作成された bin セットを使用する方法がしばしば用いられる。この方法は、簡便であるが、MLVA を実施する施設環境によっては bin セットにずれが生じ、リピート数を正しく決定できない場合がある。本研究でも、感染研 bin セットを使用した場合、施設 No. 3~No. 6 では、一部の遺伝子座で bin セットのずれが生じたために、リピート数を決定できなかった。一方で、開発した解析法は、各施設で解析した泳動データを元に回帰分析を実施して bin セットを作成するため、上記のようなずれは生じにくいと考えられる。実際、施設 No. 4 を除いた 5 施設では、83%以上の一致率でリピート数を決定できており、感染研 bin セットを用いた場合と比べても同等以上の成績が得られた(表 5)。

施設 No. 4 については、自作 bin セットを用いた場合、遺伝子座 EH111-11 と遺伝子座 EH157-12 のリピート数を決定できなかった。これは、bin セット作成のために参照株の MLVA を実施したときと bin セットの評価のために MLVA を実施したときで、泳動距離に差が生じたことを示唆している。この要因として、泳動時の気温や使用したポリマ

一のロットなど、泳動条件の違いが存在したと考えられた。

近傍の bin からレポート数を推定できた菌株を含めると、施設 No. 1、No. 4、N. 5 では、自作 bin セットの結果と感染研 bin セットの結果が一致した（表 6）。施設 No. 3 および No. 6 においては、自作 bin セットの方が、感染研 bin セットより高い精度でレポート数を推定できており、レポート数を推定できた菌株を含めた場合も、自作 bin セットは感染研 bin セットと比較して、同等以上の成績が得られると考えられた。一方、施設 No. 2 において、bin セットの範囲外にピークが出現したためにレポート数を決定できなかった株が 1 株報告されており、定期的に回帰分析に用いる参照株の見直しを行い、bin セットの範囲を拡張することが重要であると考えられた。

MLVA の精度管理結果は、施設ごとの正答数に差が見られ、近畿ブロック内の地衛研の MLVA 技術レベルには差があることが明らかになった。特に、bin セットの範囲外にピークが出現する場合に判定を誤るケースが多かった。感染研から定期的に注意喚起されているものの、bin セットの範囲外にピークが出現する可能性があることを改めて周知する必要があると考えられた。また、転記ミスが疑われる誤答もいくつか認められており、こうした些細なミスを減らせる仕組み作りが必要である。ダブルピークが検出される菌株（EQA20-07）については、全参加施設が、ピーク高の高いピークを当該菌株のレポート数として報告した。一方で、同時に検出される小ピークについては、

記載のない施設が 3 施設あった。このような小ピークに関する情報は、菌株異同の判断の際に有用な情報となることから、レポート数と併せて報告することが望ましく、複数ピークが検出される場合の対応について啓発が必要であることが示唆された。参加した地衛研の中には、MLVA を導入した直後で実施経験の浅い施設もあったと考えられることから、検査結果の信頼性確保のための精度管理は、今後も継続する必要があると考えられた。

MLVA に関する Q&A 作成のために協力地衛研から質問事項を募集したところ、9 施設から 31 項目の質問が寄せられた。ピークの判定基準などの類似した質問事項が複数あり、MLVA 実施時に躓きやすいポイントは、共通していることが明らかになった。本研究で作成した Q&A は、近畿ブロック内にとどまらず、MLVA を実施するすべての施設で活用できると期待される。

E. 結論

遺伝子座 EHC-6 について、二次多項式回帰分析を採用することにより、MLVA の新規解析法のレポート数決定精度が向上した。他施設で作成した bin セットを使用して解析する従来法と比較して、開発した新規解析法は同等以上の精度でレポート数を決定できると考えられた。

MLVA の精度管理については、参加 10 施設中 4 施設が配布した 12 株すべてで正しい解答を報告した一方で、2 株以上を誤答した施設が 3 施設あり、近畿ブロック内の施設間で MLVA 技術レベルに差があることが明

らかになった。継続的な精度管理による技術レベルの底上げが必要であることが示唆された。

MLVA に関する疑問点等を近畿ブロック内の地衛研から募集し、Q&A を作成した。作成した Q&A は、近畿ブロック以外の地衛研においても MLVA の導入・実施に役立つと期待される。

F. 研究発表

1. 誌上発表
なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 参照株のリピート数

菌株番号	O血清群	各遺伝子座のリピート数																							
		EH11-11	EH11-14	EH11-8	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							
2020-01	O157	2	-2*	1	4	-2	12	6	-2	9	10	12	5	5	7	15	5	5							
2020-02	O157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	16	9	11	4	5	7	-2	15	12							
2020-03	O157	2	-2	1	6	-2	6	4	-2	13	13	11	6	7	3	5	-2	10							
2020-04	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	3	12	12	21	6	8	6	3	3	8							
2020-05	O157	2	-2	1	4	-2	4	5	-2	-2	9	11	3	5	6	6	6	3							
2020-06	O26	2	1	1	2	3	7	28	6	-2	1	9	2	2	1	-2	-2	-2							
2020-07	O111	3	1	14	2	-2	12	10	-2	-2	3	9	2	-2	1	-2	-2	-2							
2020-08	O111	3	1	10	2	-2	7	3	3	-2	3	10	2	-2	1	-2	-2	6							
2020-09	O157	2	-2	1	3	-2	5	6	-2	5	10	-2	4	2	10	-2	-2	6							
2020-10	O157	2	-2	1	1	-2	6	7	-2	15	-2	5	3	3	6	7	-2	15							
2020-11	O157	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	7	12	13	7	6	3	6	6							
2020-12	O157	2	-2	1	7	-2	7	4	-2	7	10	12	3	3	5	-2	8	8							
2020-13	O26	2	1	1	2	2	7	23	-2	-2	1	16	2	-2	1	-2	-2	-2							
2020-14	O26	2	1	1	2	4	7	16	2	8	-2	9	2	-2	1	-2	-2	-2							
2020-15	O26	2	1	1	2	3	10	19	6	18	-2	9	2	-2	1	-2	-2	10							
2020-16	O111	5	1	5	2	-2	13	11	7	3	-2	9	2	-2	1	-2	-2	14							
2020-17	O157	2	-2	1	3	-2	7	7	6	-2	4	-2	4	3	9	7	7	7							
2020-18	O157	2	-2	1	6	-2	3	4	-2	21	9	10	4	6	7	-2	9	9							
2020-19	O157	2	-2	1	4	-2	5	5	-2	17	10	17	2	17	6	4	7	7							
2020-20	O157	2	-2	1	1	-2	7	6	20	-2	-2	12	4	2	6	6	7	7							
2020-21	O157	2	-2	1	5	-2	6	4	13	33	12	10	4	6	6	8	8	8							
2020-22	O26	2	1	1	2	5	10	19	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2	-2							
2020-23	O111	4	1	5	2	-2	22	10	-2	3	3	10	2	-2	1	-2	-2	10							
2020-24	O111	4	2	6	2	-2	6	12	-2	3	-2	8	2	-2	1	-2	-2	8							

*-2:増幅産物なし

表 2 精度管理株のリピート数

菌株番号	各遺伝子座のリピート数																備考
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH111-12	EH26-7	EH157-12	EH111-12	EH111-12	EH157-12	EH111-12	EH157-12	EH111-12	EH157-12	EH111-12	EH157-12	EH111-12	
EQA20-01	2	-2*	1	4	-2	5	5	-2	-2	20	10	9	2	11	7	4	7
EQA20-02	2	-2	1	4	-2	4	4	-2	-2	11	11	7	5	7	4	12	6
EQA20-03	2	1	1	2	5	7	12	-2	-2	1	1	10	2	-2	1	-2	-2
EQA20-04	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	16	4	8	5	7
EQA20-05	2	1	1	2	5	7	14	-2	-2	1	1	9	2	-2	1	-2	-2
EQA20-06	3	2	5	2	-2	8	10	3	-2	3	3	7	2	-2	1	-2	6
EQA20-07	2	-2	1	5	-2	5	4	-2	-2	12	13	11	5	8	7	5	7
EQA20-08	2	-2	1	5	-2	6	4	-2	-2	10	12	14	5	9	6	6	8
EQA20-09	2	1	1	2	4	10	20	-2	21	-2	1	8	2	-2	1	-2	12
EQA20-10	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	12	4	8	5	7
EQA20-11	2	1	1	2	3	12	13	-2	11	-2	1	8	2	-2	1	-2	1
EQA20-12	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	-2	20	10	7	2	13	7	4	7

*-2 : 増幅産物なし

EHC-5:10と14に
ダブルピーク

表 3 bin セットの評価基準

判定結果	判定基準	記載方法
リピート数の決定	ピークの中心がbinの中に入っている	リピート数を記載
リピート数の推定	ピークの中心がbinの中に入っていないが、 ピークの一部が近傍のbinに入っている	前後のbinから推定されるリピート数の直後に? に?を付与して記載
binセットの範囲外	用いたbinセットの最小値より増幅産物サイズが小さい、 もしくはbinセットの最大値より大きい	binセットの最小値の前に<を付与して記載、 もしくは最大値の前に>を付与して記載
増幅なし	ピークが見られない	-2と記載
判定不能	上記以外の場合	?と記載

表 4 遺伝子座 EHC-6 の回帰モデルの比較結果

EHC-6の リピート数	試験株数	リピート数を決定できた株数	
		単回帰分析	二次多項式 回帰分析
3	14	14	14
6	2	2	2
7	2	2	2
8	5	5	5
10	1	1	1
11	1	1	1
12	6	6	6
13	3	2	3
14	2	2	2
15	1	1	1
16	1	0	1
17	1	0	1
18	2	0	2
20	2	0	2
21	1	0	1
合計	44	36	44

表5 bin セットを用いて決定したリポート数と標準リポート数^aとの一致率

施設 (n=供試株数)	17遺伝子座すべて一致した株の割合 (%)																	
	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	
No.1 (n=6)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
感染研binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
No.2 (n=30)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	90	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	100	93
感染研binセット	100	100	100	100	100	100	100	90	93	100	100	100	100	100	100	100	100	97
No.3 (n=15)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	0	0	87	100	0	93	100	0	100	100	40	0	27	100	40	53	100	67
No.4 (n=2)																		
自作binセット	0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	0	100	100	100	0	100	100	50	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100
No.5 (n=17)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	0	47	100	100	18	100	100	0	100	94	100	94	100	100	100	100	100	100
No.6 (n=33)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	0	97	100	100	0	100	100	36	100	94	97	100	76	97	100	100	100	100

^a, 感染研で MLVA を実施して決定されたリポート数

表 6 bin セットを用いて決定あるいは推定したリポート数と標準リポート数^aとの一致率

施設 (n=供試株数)	17遺伝子座すべて一致した株の割合 (%)	遺伝子座ごとのリポート数一致率 (%) (推定できたものを含む)																
		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
No.1 (n=6)																		
自作binセット	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
感染研binセット	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
No.2 (n=30)																		
自作binセット	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93
感染研binセット	93	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	97
No.3 (n=15)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
No.4 (n=2)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
No.5 (n=17)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
No.6 (n=33)																		
自作binセット	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
感染研binセット	9	100	100	100	9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

^a, 感染研で MLVA を実施して決定されたリポート数

表 7 MLVA 精度管理結果

菌株番号	施設A	施設B	施設C	施設D	施設E	施設F	施設G	施設H	施設I	施設J	正答数
EQA20-01	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
EQA20-02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	9
EQA20-03	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
EQA20-04	○	○	×	×	○	×	○	×	○	○	6
EQA20-05	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
EQA20-06	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○	8
EQA20-07	○	○	○	○*	○	○	○	○*	○*	○	10
EQA20-08	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
EQA20-09	○	○	×	○	×	○	○	○	○	○	8
EQA20-10	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	9
EQA20-11	○	○	×	×	○	○	○	×	○	○	7
EQA20-12	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
正答数	12	12	7	9	11	11	12	10	12	11	110

○：正答、×：誤答

*ダブルピークに関する記載なし。

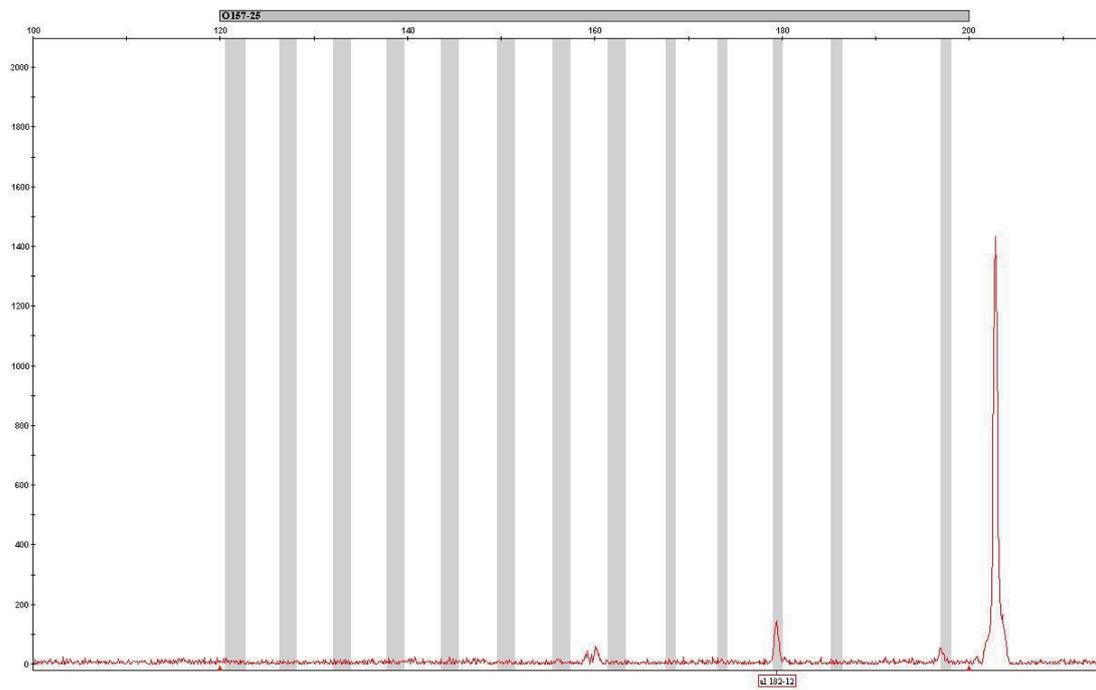


図 1-1 精度管理株 EQA20-04 の GeneMapper の解析結果 (遺伝子座 O157-25)。平成 30 年に配布された感染研 bin セットの範囲は、灰色網掛けで表示した。

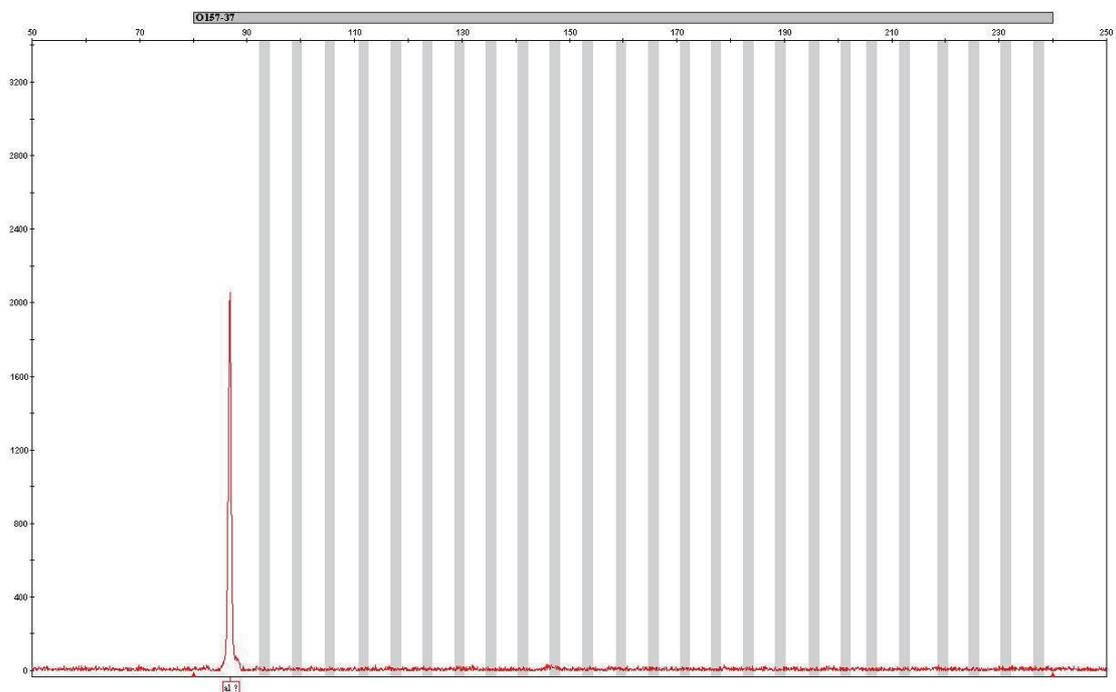


図 1-2 精度管理株 EQA20-11 の GeneMapper の解析結果 (遺伝子座 O157-37)。平成 30 年に配布された感染研 bin セットの範囲は、灰色網掛けで表示した。

令和3年2月12日版

MLVA に関する Q&A

厚生労働科学研究

「食品由来感染症の病原体の解析手法及び
共有化システムの構築のための研究」

近畿ブロック研究班作成

MLVA に関する Q&A 目次

	頁
● MLVA 全般に関する Q&A -----	3
● 試薬に関する Q&A -----	3
● GeneMapper の設定に関する Q&A -----	4
● bin の調整に関する Q&A -----	5
● 陽性コントロールに関する Q&A -----	5
● 特徴的なピークに関する Q&A -----	6
● ピークの判定基準に関する Q&A -----	8
● MLVA 結果に関する Q&A -----	11
● その他の Q&A -----	13

<MLVA 全般に関する Q&A>

Q. MLVA の原理はわかりますが、実際には何を測定しているのか、実感としてイメージしづらいです。

A. 各遺伝子座ごとに非蛍光単一プライマーを使って PCR を実施し、アガロースゲル電気泳動などで、産物の泳動サイズを1つ1つ確認してください。次に、蛍光プライマーミックスを用いて Multiplex PCR を実施し、キャピラリー電気泳動後のフラグメント解析を実施してください。得られた2つのデータを観察し、各遺伝子座についての泳動サイズとピークのサイズを比較することで、MLVA 全体の理解が深まると考えます。また、複数の菌株について、いくつかの遺伝子座の PCR 産物のダイレクトシーケンスを行い、塩基配列からリピート数を算出してフラグメント解析データと比較すれば、より理解が深まるのではないのでしょうか。

<試薬に関する Q&A>

Q. 泳動装置に使用するポリマーは、高温になると劣化が進むと説明書に記載されています。3500 Genetic analyzer を設置している実験室の温度管理には、何か特別な注意を払う必要があるのでしょうか。

A. 高温になるとポリマーが劣化するのはもちろん、室温が大きく変化することで泳動距離が変化するため、特に MLVA のようなフラグメント解析を行う場合は、室温を一定に保つことが望ましいです。Genetic Analyzer を設置する実験室は温度管理を実施することを推奨します。大安研森ノ宮センターの場合、冷房により年間を通して 22°C 程度に室温を維持しています。

Q. 泳動時に使用する陰極バッファのセプタは、バッファの交換の都度、変えていますでしょうか（当所では、96 ウェルのセプタはプレートが変わる毎に変えています、陰極バッファ用は使い回しています）。

A. 大安研森ノ宮センターでは ABI の Genetic Analyzer 3130 を使用しており、陰極バッファ、96 ウェルのセプタともに、使用後に洗浄して再利用しています。しかし、再利用を繰り返すと、バッファコンテナとセプタの密着が弱くなり、外れやすくなります。シーケンサー作動中にセプタが外れると故障の原因になりますので、セプタが外れやすくなってきたら新品に交換します。あくまでもセプタは消耗品ですので、繰り返し使用した際に生じるリスクをご理解の上、再利用してください。

Q. ポリマーやバッファーなどのシーケンサーの消耗品は開封後の使用期限が短いので、できるだけ試薬が無駄にならないように、検体を溜めて一斉に解析したり、割高ですが96ウェル用のポリマーを購入したりしています。検査の運用上で工夫されていることがあれば、ご紹介ください。

A. 大安研森ノ宮センター（Genetic Analyzer 3130）の場合、ポリマーは大容量のものを購入後、チューブに小分け分注して冷蔵保存し、一定期間ごとに少量ずつ交換しています。バッファーは、サードパーティーの販売する非純正のシーケンスバッファーを使用しています。また、フラグメント解析とサンガーシーケンスは、同じポリマーとバッファーを共通で使用しています。

<GeneMapper の設定に関する Q&A>

Q. 当所では、EHEC-MLVA のフラグメント解析の Run Module に、感染研の「Fragment Analysis50_POP7_izu」を使用していますが、デフォルトの「Fragment Analysis50_POP7」と比較すると泳動時間に差がみられます。このことに関して、「Fragment Analysis50_POP7_izu」を使用した方が良い理由、メリットなどはあるでしょうか。

A. 基本的にはどちらの使用でも問題ないと考えます。解析できる塩基長は「Fragment Analysis50_POP7」では約 700 bp、「Fragment Analysis50_POP7_izu」では約 1,100 bp です（大安研森ノ宮センターの Genetic Analyzer 3130 の場合）。遺伝子座 EHC-6 では、600 bp 以上の位置にピークがまれに出現しますが、これまでに大安研森ノ宮センターで確認されたピークサイズの最大値は約 630 bp です。そのため、「Fragment Analysis50_POP7」でも解析可能と予想します。

Q. GeneMapper で解析する際に Analysis Method の設定に変更を加えているでしょうか。

A. 大安研森ノ宮センターでは、Peak detector のタブに変更を加えています。デフォルトの設定ではノイズや非特異ピークも allele として検出されることが多いため、サイズマーカーに使用する LIZ（オレンジ）を除く蛍光色素の Peak Amplitude Thresholds の数値をデフォルト値より高く設定しています。Peak Amplitude Thresholds の数値は、本 Q&A の 10 頁に記載の方法で決定した Cut off 値を目安に設定します。その他、Analysis Method の設定を変更することで、検出する allele の数やピークの形状を指定できますので、各施設で使用するシーケンサーの特性に合わせて変更してください。

<bin の調整に関する Q&A>

Q. 解析を繰り返すと、初回に MLVA を実施した時よりもピークが左にずれる傾向がみられます。こういった理由でピークがずれるのでしょうか。

Q. 年度初めと年度末では、参照株のピークの位置が bin と少しずつずれてきます。また、試験株のピークも bin から外れ、「allele:？」と表示されることが徐々に増える気がします。原因と対処法を教えてください。

A. フラグメント解析の泳動距離は、キャピラリーやポリマーを交換した際に変化することがあります。また、泳動距離は温度によって変化するため、季節の変化によってピーク位置がずれるケースもあります。ピーク位置のずれによってピークが bin に入らなくなった際は、bin の位置を調整してください。

Q. bin の調整は、こういったタイミングで行うのでしょうか。また、調整する場合は全領域を調整するのでしょうか。それとも、該当する領域のみ調整するのでしょうか。

A. bin 調整のタイミングに明確な基準はありません。1 つの目安として、毎回の測定時に、リピート数既知の菌株 DNA を陽性コントロールとして同時に測定し、その陽性コントロールが bin に入らなくなった時に調整することがタイミングの候補に挙げられます。調整する場合は、bin に入らなくなった遺伝子座のすべてを一律に調整することが望ましいと考えます。

<陽性コントロールに関する Q&A>

Q. 増幅がない領域について、それが希釈過剰や反応効率の悪さ、機器の親和性や試薬の劣化などによるものではないことを担保するための検査系やコントロールの設定について、良い方法があれば教えてください。

A. 大安研森ノ宮センターでは、毎回の測定時にリピート数既知の菌株 DNA を陽性コントロールとして同時に測定し、そのリピート数を正しく決定できることをもって検査系の精度を担保しています。

Q. O 血清群によってピークが出現しない遺伝子座があります。血清群によって陽性コントロールの種類を変える必要があるでしょうか（例えば、O157 用、O26 用など）。

A. 17 遺伝子座すべてについて増幅する陽性コントロールを毎回測定することが理想と考えます。このような陽性コントロールは、最低 2 種類の DNA を用いることで準備できま

す。しかし、4本キャピラリーのシーケンサーを使用している大安研森ノ宮センターの場合、陽性コントロールだけで1 run分（2種類のDNA×2種類のPCR Mix = 4反応）を使用することは効率が悪いと見なされ、通常はどの血清群の場合でも、EH111-14 およびEH26-7以外の15遺伝子座の増幅が得られるO157株DNAのみを陽性コントロールとして使用しています。EH111-14あるいはEH26-7の結果に疑義があるなど、反応系に問題がないことを確認する場合には、これらの2遺伝子座が増幅する別のDNAを陽性コントロールに使用します。

Q. 陽性コントロールのピークがbinからずれた場合、その時の測定のみbinをずらすのか、それとも「change」で既知のピークに合わせるのか、または測定し直すのか、どのような対応がよいのでしょうか。

A. 陽性コントロールの意義を考えると、その測定は不成立とみなし、再測定が必要です。それでも陽性コントロールがbinの範囲から外れてしまう場合は、binを調整し、陽性コントロールが正しく決定できる条件に再設定した後に、実際のサンプルを測定すべきと考えます。

<特徴的なピークに関する Q&A>

Q. それぞれの血清型で必ずピークが出現する遺伝子座と出現しない遺伝子座を一覧にしてみてもらえないでしょうか。

Q. ダブルピークの出やすい遺伝子座や出にくい遺伝子座は存在するのでしょうか。

A. 大安研森ノ宮センターの解析データをまとめました。O血清群による解析数に差がありますので、あくまでも参考データとして活用してください。ダブルピークは、特にEHC-5で出現する傾向がありますが、株数が少ないため、こちらも参考程度に考えてください。

表1 大安研森ノ宮センターにおける各遺伝子座のピーク出現割合

O血清群	株数	各遺伝子座において増幅が見られる株の割合 (%)							
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5
O157	190	100	0	100	100	0	100	100	31
O26	46	100	98	100	100	98	100	100	20
O111	24	100	100	100	100	0	100	100	21

O血清群	株数	各遺伝子座において増幅が見られる株の割合 (%)							
		EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36
O157	8	86	100	95	100	100	100	99	100
O26	28	0	100	100	100	0	100	0	9
O111	92	0	100	100	100	0	100	0	88

表2 大安研森ノ宮センターにおけるダブルピークの出現率と遺伝子座の割合

遺伝子座名	ダブルピークが 検出される株数	解析株総数（260 株）に占めるダブル ピーク出現株の割合
EHC-5	14	5.4%
EHC-6	1	0.4%
O157-3	1	0.4%
O157-9	4	1.5%
O157-25	1	0.4%
O157-37	4	1.5%

Q. 真のピークとノイズを見分けるに当たって、遺伝子座毎に典型的なピークの特徴（形、スタッターピークが出やすい、など）や注意点などがあれば、例示していただけないでしょうか。

A. 遺伝子座 EH111-8 や O157-34 は PCR 増幅効率が悪く、検出される蛍光強度が低い場合が多いです。遺伝子座 EHC-1 や EHC-5、O157-17 は付加されるアデノシンの数の違いによる split peak が明瞭に検出されやすく、1塩基違いのピークが2~3個連なったような形状になる傾向があります。スタッターピークに関しては、繰り返し数が非常に大きな一部の菌株で観察される以外、明瞭なピークとして観察されることは、経験上ほとんどありません。

Q. False peak について以下のような経験があれば、その対処法を教えてください

- (1) O26 株の遺伝子座 O157-37 において、ややブロードな false peak が見られました。
- (2) キャピラリー交換からしばらくの間、すべての蛍光色素 (VIC、PET、NED、6-FAM、LIZ) において、同じサイズに false peak が見られました。

A. (1) ブロードな false peak は血清群 O26 に特有の現象ではなく、アーティファクトによるものと考えますが、同様の経験がないので対処法はわかりません。しかしながら、DNA テンプレートの希釈や DNA 抽出法の変更により改善する可能性がありますので、ご検討ください。

(2) このようなピークは一般に、気泡やポリマーの結晶、細胞残渣（デブリ）などの異物がキャピラリーに入った場合に観測されます。異物がキャピラリーを通過すると機械が蛍光と認識し、すべての蛍光色素において同じサイズの false peak が出現します。キャピラリー交換の際に、異物混入の原因となる何かが起こったと想像されます。

<ピークの判定基準に関する Q&A>

Q. 高さの低いピークについて、ノイズや非特異ピークとの判別に苦慮するケースがあります。判別のポイントや追加の確認検査などがあれば、教えてください。

Q bin にかかるところに比較的小さなピークが出現した場合、判定に悩むことがあります。例えば、ピークの蛍光強度が 200~300 程度で、それが bin に収まってリピート数が表示されている場合などです。プライマーダイマーに由来するピークが数十 bp 程度の位置に明瞭に出現していれば、その遺伝子座では PCR 増幅が行われなかったと考えて、蛍光強度の低いピークはノイズと判断しています。しかし、ノイズかどうか判断しにくい遺伝子座のグループ（蛍光色）があります。EH111-8 が含まれるグループでは、プライマーダイマーに由来するピークが明瞭に観察できるため、それ以外に小さなピークが出現してもノイズだとわかりますが、O157-36 の含まれるグループでは未反応のプライマーに由来するピークがわかりにくくてノイズとして捨てる必要があります。希釈倍率を変えて再泳動、場合によっては PCR をやり直して再判定することになるのでしょうか。ケースバイケースかもしれませんが、ノイズの判定方法を教えてください（段階的に希釈して、希釈倍率に応じてピークの高さが変われば真のピークとみなし、そうでなければノイズと判定するのでしょうか。もしくは、経験に裏付けされた感覚的な判定をするのでしょうか）。

A. 検出されるピークには、①蛍光の漏れ込み、②ノイズ、③真のピークの 3通りが考えられます。順に確認を行い、①と②が否定された場合、③の可能性が高いと判断します。大安研森ノ宮センターでは、以下の手順で①~③を区別しています。

①は、PCR 産物の希釈が不十分な場合など、蛍光強度の高いピークが波長の近い蛍光検出器へ漏れ込むことで生じます。この場合、各蛍光色素（6-FAM、VIC、NED、PET、LIZ）の波長と検出器の性質、他の PCR 産物のピーク強度などから、漏れ込みと推定できるケースが多いです（図 1）。

・例 1：遺伝子座 EHC-1 や EHC-2 の蛍光(VIC[Emission wavelength(E): 554nm]) が、6-FAM[E: 520nm]の検出器に漏れ込み、遺伝子座 O157-34 にピークとして検出される

・例 2：遺伝子座 O157-37 の蛍光(PET[E: 595nm])が、NED[E: 575nm]の検出器に漏れ込み、遺伝子座 O157-36 にピークとして検出される。

このように、検出される小ピークに近い蛍光波長を有するピークと比較することにより、ほとんどの小ピークは蛍光の漏れ込みと判断できると考えます。

②については、Height 値の低いピークが、設定した bin セットと関連性の低い位置に点状する場合、あるいは、測定ごとにピーク的位置が移動する場合などに、ノイズの可能性があると判断します。必要に応じて、希釈率を段階的に下げて再泳動し、ピーク的位置が変化するかどうか、あるいは、希釈率に応じてピークの Height 値が変動するかどう

かを基準に、ノイズと真のピークのどちらであるかを判別します。ノイズが頻繁に検出されて判定の妨げとなる場合は、PCR 産物の希釈倍率を上げる、cut off 値を変更する、PCR 条件の再検討を行うなど、MLVA 実施条件を見直すことを推奨します。

①蛍光の漏れ込みと②ノイズが否定でき、明瞭なピーク(プライマーダイマーによるものを除く)が検出されれば、③真のピークと判定します。確認が必要な場合は、当該遺伝子座の単一プライマーセットを用いて PCR を実施し、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物のバンドが明確に認められれば、③真のピークであると判断する材料の 1 つになります。

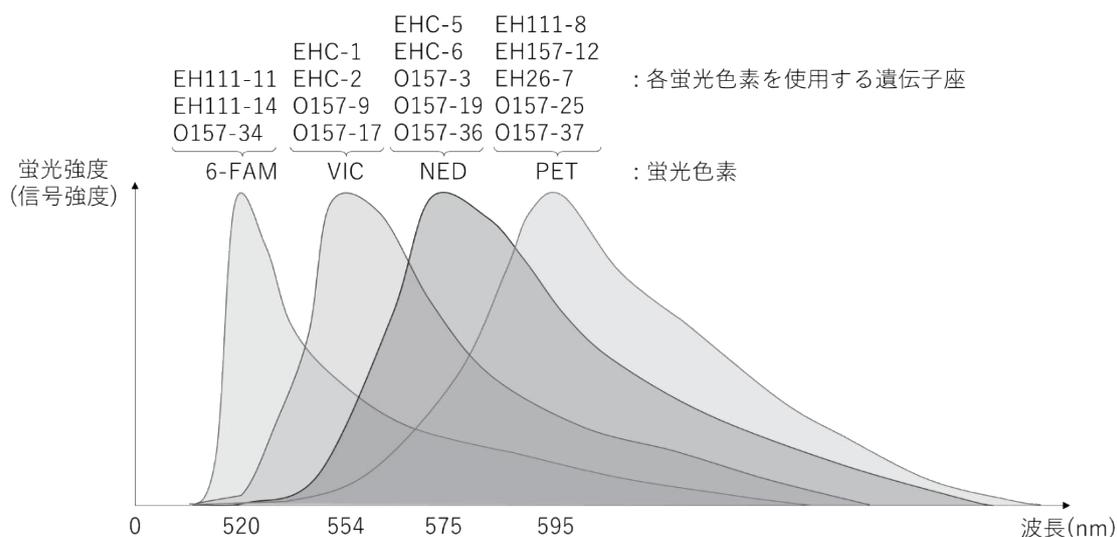


図 1: 各蛍光プライマーに使用する蛍光波長の分布と、検出される蛍光強度のイメージ

-
- Q. 当所では現在、2018 年に感染研から配布いただいたパネルと bin セットを使用しています。通常の検査で特に困ることはないのですが、精度管理株の中にはパネルで指定された領域外にピークが出現して解析できないものがありました。今後、このような菌株が分離される可能性もあると思います。その際は、検出されたピークが本物かどうか実際に塩基配列を読むことにより判定し、パネルや bin セットの修正を行うという考え方でよいでしょうか。
- Q. bin の設定範囲以外にピークが認められた場合は、どのように判断したらよいでしょうか。
- Q. bin が設定されていない位置に未知のピークが出現した場合は、どのように判定すればよいでしょうか。

A. はじめに、当該ピークが蛍光の漏れ込みやノイズ、プライマーダイマーでないことを確認してください。真のピークであることが確認できれば、以下の①、②いずれかの方法でリピート数を決定してください。

①当該遺伝子座について、非蛍光の単一プライマーセットを用いて PCR を実施し、サンガーシーケンス法で増幅産物の塩基配列を解読してリピート数を算出します。

②近接する既存の bin から比例計算で推定します。近接する既存の bin の位置(サイズ)と検出されたピークサイズの差を、各遺伝子座の繰り返し単位の塩基長で除算し、その差分からリピート数を推定します。

上記の2つの方法で決定できなかった場合や、算出されたリピート数が小数になった場合などは、感染研に相談してください。

bin セットの範囲外に検出されたピークのリピート数を決定した際は、パネルおよび bin セットの修正を行ってください。上記のいずれの方法で決定しても問題はありませんが、決定したリピート数の確度に不安がある場合は、泳動データや菌株を感染研に送付して確認を依頼することを強く推奨します。

Q. ピークが2つ以上認められた場合は、どのように判断すればよいでしょうか。

Q. 1つのローカスに複数のピークが検出された場合は、どれを判定に用いればよいのでしょうか。

A. Height 値が最も高いピークを、その遺伝子座のリピート数としてください。その際、Height 値の低いピークも合わせて報告してください。1遺伝子座においてしばしば2つ以上のピークが認められることがあり、近縁株では、主要ピーク以外のピークのリピート数まで一致する場合があります。また、測定するタイミングによって各ピークの Height 値の高低が逆転することもあります。Height 値の低いピークを記録に残すことで、Height 値の逆転が起こった際に菌株異同の判断に活用できます。このような情報は菌株間の関連性を調べる上で有用な手がかりとなるため、大安研森ノ宮センターでは、主要ピーク以外のピークリピート数を、備考欄に記録しています。

Q. 微妙なピークはどのくらいの Height 値まで採用すればよいでしょうか。

Q. ピークの Cut off 値の設定方法を教えてください。

A. シーケンサーの種類や希釈条件など、MLVA の実施環境によって蛍光強度が異なるため、ピークの Height 値の基準 (Cut off 値) を一律に示すことはできません。また、ピークの高さについては、同じ施設、同じ実施環境であっても、テンプレート DNA の状態や PCR の増幅効率、希釈の際の手技のばらつきなどによって、実施の都度に変化する場合もあります。一方、実施条件を変えない限り、ノイズの高さは測定ごとに大きく変化し

ません。このことを利用して、各施設でのノイズの高さから Cut off 値の目安を決定することができます。リピート数既知の菌株を何株か泳動し、「増幅産物なし」ということが明らかな遺伝子座について、観測されるノイズや非特異ピークの蛍光強度を元に Cut off 値の目安を決定してください。

Q. 特定の遺伝子座 (EH111-8 など) の蛍光ピーク (真のピーク) が弱く、リピート数を決定できないことがあります。よい対処法はないでしょうか。

A. 検出される蛍光強度を上げるため、PCR 産物の希釈率を下げて再度キャピラリー電気泳動を実施してください。複数の株で同様の現象が継続的に認められる場合は、希釈倍率を検討するか、プライマーミックスを新たに調製する必要があります。なお、増幅効率の悪い遺伝子座については、プライマー配列や PCR 条件の改良が今後の検討課題と考えています。

Q. ピークが 2 つの連続した山のような形になり、bin には片方のピークのみ含まれることがあります。allele が表示されることもありますが、「allele : ?」と表示される場合があります。この理由と対処法を教えてください。

A. 塩基長が約 1 bp 異なる連続した 2 つ、もしくは 2 つ以上のピークは、PCR 増幅時に付加されるアデノシンの数が異なることで生じると考えられています。いずれかのピークが bin に含まれていれば、その bin の allele number をリピート数として問題ありません。

<MLVA 結果に関する Q&A>

Q. MLVA の結果を検査成績書に記載する場合、どのように記載すればよいでしょうか。

A. ①MLVA 型のみ、②リピート数のみ、③MLVA 型とリピート数の両方、いずれの記載でも問題ないと考えます。ただし、①MLVA 型のみの場合、菌株間の遺伝的距離 (異なる遺伝子座の数) がわからなくなるため、これを補足するための情報を追加することが望ましいと考えます。例えば、2 つの菌株の MLVA 結果を 20m0001 と 20m0002 と報告する場合、これだけではこの 2 菌株が「何遺伝子座違い」なのかがわからず、近縁な株かどうかの判断ができません。大安研森ノ宮センターでは、成績書には MLVA 型名のみを記載し、補足資料として、MLVA 型間の遺伝的距離がわかるように Minimum Spanning Tree を併せて添付しています。

Q. 感染研から返却される MLVA 解析結果は、中心となる MLVA 型以外が線で結ばれていることがしばしばあります（下図例）。この Minimum Spanning Tree の解釈について教えてください。

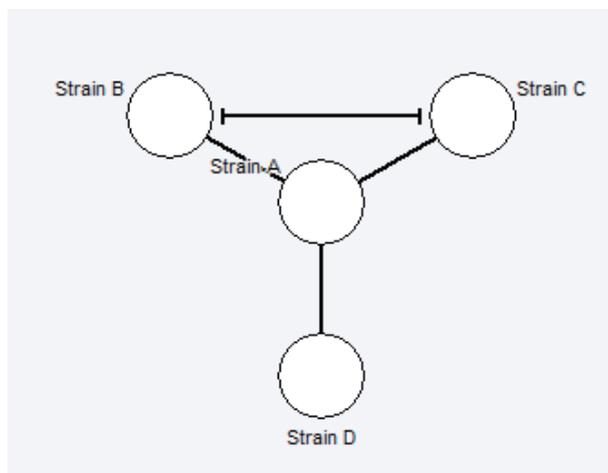


図 2. 中心となる MLVA 型以外が線で結ばれている Minimum Spanning Tree の例

A. この図において、菌株 A を基準とすると、菌株 B、C、D は菌株 A に対してそれぞれ 1 遺伝子座異なる菌株です。加えて、菌株 B と菌株 C も互いに 1 遺伝子座違いです。菌株 A、B、C の変異箇所が同じ遺伝子座の場合、このような図になります。参考に、図 2 の作成に使用した菌株のリピート数を下表に示します。

表 3. 図 2 の Minimum Spanning Tree 作成に用いた菌株のリピート数

菌株 番号	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
A	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	16	4	8	5	7
B	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	12	4	8	5	7
C	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	13	4	8	5	7
D	2	-2	1	6	-2	15	5	-2	-2	11	9	16	16	4	8	5	6

Q. MLVA の結果をもって食中毒事件と断定する場合、リピート数の不一致はいくつまで許容されますか。

A. 感染源が同一と考えられる事例の調査において、2 遺伝子座異なる菌株が検出されたケースがいくつか報告されています。このため、同一事例であっても 2 遺伝子座程度の変異は起こりうると考えられています。

しかし、この逆は必ずしも成立しません。すなわち、「2 遺伝子座以内の変異であれば、すべて同一事例である」ということは成立しません。そのため、MLVA の結果を解釈す

際には、絶対的な基準としてリピート数の不一致数を定めることはせず、疫学情報と MLVA の結果を照らし合わせて妥当性を評価することが必要です。

例えば、疫学情報から共通の感染源の存在を疑われた複数患者から 2 遺伝子座違いの菌株が検出された場合、上述の通り、「もともと同じクローンの菌株に変異が生じた」と考えて、食中毒事例と断定することは妥当と考えます。一方、患者から分離された菌株の MLVA 型が完全一致した場合でも、同じ MLVA 型の菌株に別々の要因で感染した可能性が否定できないので、疫学情報と菌株情報を総合的に判断し、最も妥当な結論を見いだすことが基本となります。

また、いくつかの遺伝子座はプラスミド上に存在していると考えられています。この場合、複数の遺伝子座のリピート数が一度に変化する可能性があるため、どの遺伝子座に変異が見られるかを考慮することも必要になります。

<その他の Q&A>

Q. MLVA の結果が特に活用できた事例について、紹介できるものがあれば教えてください。

A. セントラルキッチンをもつ同一系列の複数の飲食店で発生した EHEC O157 の食中毒事例において、MLVA が有効に活用されました。それぞれの店舗で発生した患者は数人でしたが、セントラルキッチンを通して同じ O157 株に感染する機会（可能性）があったこと、患者から同一 MLVA 型の菌株が分離されたことから、食中毒と断定することができました。

Q. 今後、IS-printing のように、近畿ブロックの分離菌株の MLVA type のデータベース的なもの（アシルプロファイルも閲覧可能な）を構築する予定はありますか。

A. Diffuse outbreak の早期探知のため、IS-printing のような MLVA データベースの構築が必要と考えています。一方で、データベースの有効活用には、協力地衛研担当者の全面的な協力が不可欠です。今後、アンケートなどを通じて、MLVA データベース構築の必要性について担当者と意見交換を行いながら、検討を進めたいと考えています。

<Q&A 作成協力施設一覧 (50 音順) >

尼崎市立衛生研究所

大阪健康安全基盤研究所

京都市衛生環境研究所

京都府保健環境研究所

神戸市環境保健研究所

滋賀県衛生科学センター

姫路市環境衛生研究所

兵庫県立健康生活科学研究所

和歌山市衛生研究所

<謝辞>

本 Q&A は厚生労働科学研究費「食品由来感染症の病原体の解析手法及び共有化システムの構築のための研究 (H30-新興行政-一般-001)」の支援を受けて作成されました。