

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
分担研究報告書

「広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究」

反復配列多型解析法の改良版研修会の実施、及びゲノムデータベースを活用した*in silico* MLVAによる性能評価

研究代表者	明田 幸宏	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	平井 晋一郎	国立感染症研究所 検査診断技術研究部
研究協力者	佐藤 梢	国立感染症研究所 検査診断技術研究部
研究協力者	松山 満貴	長野県環境保全研究所 感染症部
研究協力者	重村 洋明	福岡県保健環境研究所 保健科学部

地方衛生研究所における腸管出血性大腸菌(EHEC)の分子疫学サーベイランスでは、反復配列多型解析(MLVA)法が広く用いられている。本研究では、MLVA法の検査精度向上を目的として、解析実習を強化した改良版研修会を実施するとともに、公開ゲノムデータを活用した*in silico* MLVA解析により本法の性能評価を行った。

研修会では、GeneMapperによるデータ解析及び実務上の課題への対応に重点を置き、実習時間の拡充を行った。その結果、研修生の理解度及び業務への活用度はいずれも高い評価を示し、特に講義・実習の量及び速度については、昨年度の研修会と比較して明らかな改善が認められた。

in silico MLVA解析では、分離菌株数が主要3血清型と比較して限られているO145及びO165を対象に性能評価を行った。その結果、O145では既報と概ね一致した結果が得られた一方、O165では複数の領域において欠損率に差異が認められた。これらの差異は、プライマー配列とアセンブル配列の不一致や標的領域の欠失等に起因する可能性が示唆された。

以上より、*in silico* MLVA法は実際のMLVA法の性能を評価する有用な手法であり、分離菌株数が限られている血清型においても、本法の改善に資する知見を得ることが可能であると考えられた。

A. 研究目的

地方衛生研究所(地衛研)では、腸管出血性大腸菌(EHEC)による集団発生を早期に探知するため、反復配列多型解析(MLVA)法を用いたサーベイランスが実施されている¹⁾。本研究班では、これまで精度管理試験、トラブルシューティング集の作成、及び研修会の実施を通じて、地衛研におけるMLVA法の検査精度向上を支援してきた。

昨年度は、MLVA法に関する解析ソフトの操作及び実験手技の確実な習得と改善を目的として、講義及び実習から成る研修会を実施した²⁾。その結果、研修全体としての理解度及び活用度は高かった一方で、MLVA法データの解析実習については、「実習量に対して時間が不足している」との意見が約半数を占めた。これらの結果から、検査能力のさらなる向上を図るためには、解析ソフト実習の内容を強化した改良版研修会の実施が必要と考えられた。

一方、国内の地衛研におけるMLVA法は、これまで主にO157、O111及びO26の主要3血清型を対象として運用されてきたが¹⁾、近年ではO91、O103、O121、O145及びO165に対するMLVA法も開発されている³⁾。しかし、これらの血清型は主要3血清型と比較して分離菌株数が限られてお

り、既報において供試菌株数が十分でない血清型も存在する。

近年、全ゲノム解析の普及により、公開データベースに蓄積されるゲノム情報は飛躍的に増加している。特定の血清型においては、地域によって系統の分布⁴⁾や生化学的性状の陽性率が異なると報告されている⁵⁾。ゲノムデータを活用することで、地域性に依存しない多様な菌株の解析が可能となる。これにより、MLVA法の性能をより詳細に評価できると考えられる。

そこで本年度は、地衛研におけるMLVA法の検査精度向上を目的として、解析実習を強化した改良版研修会を実施するとともに、ゲノムデータベースを活用した*in silico* MLVA解析により、本法の性能評価を行った。

B. 研究方法

1. MLVA法の研修会の実施

(1) 研修会の日程及び内容

研修会は令和8年2月3日(水)、5日(木)及び6日(金)に実施し、講義及び実習で構成した(表1)。研修内容は概ね前年度と同様とし、初日はZoomによる遠隔形式で、MLVA法の基礎、異同判定及びトラブルシューティングに関する講義を実施した。2日

目及び3日目は、国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所(感染研)村山支所において集合形式で実習を行った。

実習では、異なるクローン由来のEHEC O157、O26及びO111の18菌株を使用し、各研修生に3菌株ずつを血清型が判別できないよう配布した。これらを用いて、DNA抽出、PCR反応、電気泳動及びGeneMapperによるMLVAデータ解析を行った。

前年度のアンケート結果を踏まえ、今年度は「GeneMapperによるデータ解析」及び「事前に募った質問や問題点への回答」に重点を置き、実習時間を拡充した。具体的には、解析実習を1区分2時間から3区分(区分:実習③、⑤及び⑥)計5時間に増加させ、質問等への回答(区分:実習⑦)を30分から1時間に延長し、昨年度に指摘された課題の改善を図った。

(2)研修生定員及び対象者

今年度の研修会においても、研修生の定員は、MLVAデータからタンデムリピート(TR)数を算出する解析ソフトウェアGeneMapperが搭載されたパーソナルコンピュータ(PC)の利用可能台数に基づき決定した。メーカー及び感染研内の他部署からGeneMapper搭載PCを合計6台借用し、1台を講師用、残り5台を研修生用とした。研修会では1台のPCを3名で使用する体制とし、1班3名・全5班構成、計15名を定員とした(図1)。これにより、各班に1台のPCが割り当てられた。また、前年度と比較してPCを1台追加で確保したことにより、定員を1班増加させた。

研修会の対象者は、前年度と同様に、EHECのMLVA法を導入予定の地衛研等の検査機関、または新たに本法の担当となった職員とし、導入から3年以内又は実施経験3年以内の職員を要件とした。

(3)研修生の選考

研修会の募集及び参加者の選定は、概ね前年度と同様に実施した。令和7年10月20日(月)に、66施設の地方衛生研究所及び20施設の中核市・特別区の検査機関に対して研修会の実施を通知し、同年11月21日(金)を申込締切日とした。申込時には、施設のMLVA法導入年数や職員の経験年数等を基に研修参加の必要性を評価するとともに、研修機会の均等化に配慮して参加者の選定を行った。選定結果は同年11月28日(金)に通知した。

(4)落選者へのフォロー対応

選考の結果、落選した者に対しては、講義の受講機会を提供した。前年度は研修会の講義を録画し、事後に動画配信サイトを通じて公開したが、今年度は提供内容を見直し、初日の講義のみ当選者と共に受講可能とした。一方、当選者については、すべての講義及び実習を受講可能とした。

(5)アンケートによる評価

研修会終了後、参加者(講義及び実習の両方に参加した者)を対象にアンケートを実施した。アンケートの内容及び評価方法は前年度と同様とし、研修会の課題の把握に用いた。

2. *in silico* MLVA 法による性能評価

(1)解析対象菌株の決定及びデータ取得

解析対象とする血清型の候補として、泉谷らの報告³⁾において供試菌株数が50株未満であった血清型(O91、O145及びO165)を選定した。これらの血清型について、米国国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information: NCBI)のSequence Read Archive(SRA)において“E. coli”、“Shiga toxin”及び各血清型をキーワードとして検索し、50株以上のデータが取得可能な血清型を解析対象とした。取得したショートリードデータ(Illumina プラットフォームによるpaired-end リード)はCLC Genomics Workbench(Qiagen)を用いてde novo アセンブルを行った。得られたアセンブリに対し、Leeらにより開発された*in silico* PCR法(isPCR)を用いて、O-genotyping⁶⁾及び*stx*遺伝子⁷⁾の検出を行い、解析対象菌株の精査を行った。

(2)*in silico* MLVA 法の実施

MLVA解析は、泉谷らの報告³⁾に基づくプライマー配列を用い(17領域からなるMLVA17及び43領域からなるMLVA43)、アセンブリデータに対してisPCR(未公開、in-house スクリプト)を実施した。プライマーの一致率は85%を基本条件とした。得られた増幅産物について、配列及びサイズ情報から各MLVA領域のTR数を算出した。また、isPCRにおいて一方のプライマーのみがヒットした領域についても抽出し、周辺配列を基にTR数の推定を試みた。さらに、(3)に示す分離能評価の結果、既報と大きく乖離した領域については、プライマー一致率を変更して再解析を行い、結果の妥当性を検証した。

(3)*in silico* MLVA 法の性能評価

各MLVA領域について、多様性指数(Simpson's diversity index; D値)及び欠損率(null率)を算出し、既報³⁾との比較により*in silico* MLVA法の分解能を評価した。また、得られたMLVAプロファイルを基に、BioNumerics(Applied Maths)を用いてminimum spanning tree(MST)を作成し、菌株間の関係性の可視化及び分解能の評価を行った。

C. 研究結果

1. MLVA 法の研修会の実施

(1)研修生の選考

22施設の地衛研及び7施設の中核市の検査機関から各1名の応募があり、全ての施設が参加要件を満たしていた。研修参加の必要性及び研修機会の均等化に配慮して選考を行った結果、13施設の地衛研及び2施設の中核市の検査機関の参加を許可した。また、応募の際、2施設から講義のみの参加を希望する申し出があった。これら2施設については、選考で落選した14施設と併せて、初日に遠隔で実施する講義への参加を認めた。

(2)研修会の実施

初日の講義は、参加者、落選者及び講義のみ参加希望者の計31名が受講した(表1)。初日の講義

終了後、参加者15名のうち、1名が体調不良により欠席した。2日目以降の実習は大きなトラブルなく実施できたが、GeneMapperによるMLVA法データの解析(1)及び(2)(区分:実習③及び⑤)において、進捗が遅れた。そこで、GeneMapperによるMLVA法データの解析(3)(区分:実習⑥)は、初日に実施した講義「MLVA法におけるトラブルシューティング」(区分:講義⑤)の実技に相当する内容であった。そのため、未実施であっても習得効果への影響は小さいと考えられたため、本実習を取りやめた。

また、研修会の最後には、事前に募集した日常検査における質問や問題点について回答を行ったが(区分:実習⑦)、寄せられた質問等は、「ダブルピーク等の複数ピークの判定」、「Binから外れたピークの判定」、「蛍光強度が低いピークの判定」、「PCR産物の希釈倍率」及び「その他」の5つに大別された。最終日は予定時刻どおりに研修会を終了した。なお、研修後のフォローとして、全ての実習で取り扱った、又は取り扱う予定であったデータ及び課題を参加者に送付した。

(3) アンケートによる評価

講義及び実習の両方に参加した14名全員からアンケートの提出があった。研修会全体に関する項目では、昨年度、変更の要望が多かった「日数」及び「カリキュラムへの要望」について、今年度は90%以上が肯定的に評価した(図2)。「時期」については4名から要望があったが、年度の早い時期、年度末、年度末以外の時期、インフルエンザ流行期以外の時期と、意見は分かれた。「Zoomの音声・画像」については2名が問題ありと回答したが、そのうち1名は、音声の途切れは直ぐに解決し、受講への影響はなかったと回答した。

各講義及び実習への評価として、「理解度」及び「業務への活用」では、全ての講義及び実習について、上位2段階の評価または最上位の評価のみであった(図3A、B)。「講義・実習の量」及び「速度」については、昨年度の研修会では「【実習】GeneMapperによるMLVA法データの解析」及び「【その他】事前に募集したご質問への回答」について、約半数の研修生が適切ではないと回答していたが、今年度は大半が適切と回答した(図3C、D)。なお、講義の速度が速すぎると回答した研修生は同一の班(5班)に属していた(図1)。

講義の速度が速すぎるとの回答が同じ班に集中した理由を明らかにするため、寄せられたコメントを精査したところ、「経験の浅い研修生が集まっていたため、実習課題を最後まで仕上げる時間が足りなかった。試行錯誤するための時間がもう1日欲しかった。」及び「スクリーンに映し出された講師の操作画面が非常に小さく、操作説明についていけなかった。」との記載があった。実習テキストにはGeneMapperの実際のPC上の画面のスクリーンショットを掲載したが、そのみでは不十分だったことが示唆された。

2. *in silico* MLVA 法による性能評価

(1) 解析対象菌株の決定及びデータ取得

NCBIにおいてキーワード検索を行った結果、

O145及びO165について、それぞれ50以上のSRAデータが得られたため、これら血清型のデータをダウンロードした。取得したSRAをアセンブルした後、isPCRによりO-genotyping及びstx遺伝子の検出を行った。その結果、O165の1データにおいて血清型が判定不能(O群不明)であったため、解析対象から除外した。最終的に、O145及びO165のSRAは、それぞれ104株及び79株となった。

(2) *in silico* MLVA法の実施及び性能評価

本研究の*in silico* MLVA法と既報³⁾の間でD値を比較したところ、O145ではMLVA17及びMLVA43のいずれにおいても、本研究の方がやや高値を示した(表2)。一方、O165では、MLVA17においては既報の方が高値を示し、MLVA43では同程度であった。

本研究及び既報³⁾のMLVAにおける各領域の検出状況を比較したところ、O145では全ての領域において欠損率及びD値に明らかな差は認められなかった(表3A)。本研究では、isPCRにおいて遺伝子増幅と判定するプライマー一致率を85%とした。既報では領域O157-17及びO157-19の欠損率はそれぞれ6%及び0%であるが、*in silico* MLVAにおいて遺伝子増幅ありの一致率を90%とした場合、これらの欠損率は100%となった。なお、領域O157-17及びO157-19についてプライマー配列とアセンブル配列を比較したところ、フォワード又はリバースプライマーにおいて4塩基の不一致が認められた(表4)。

次に、O165について比較したところ、EHC-6、EH111-8、O157-37及びq1705の4領域では、既報³⁾における欠損率は0%であるのに対し、本研究では61%~100%と高値を示した(表3B)。これらの領域について、isPCRにおける増幅判定のプライマー一致率を70%まで低下させても、欠損率に変化は認められなかった。領域EHC-6(欠損率72%)については、TR数を算出できたアセンブル配列を確認したところ、不明塩基(N)が多く含まれており、アセンブルが適切に行われていないことが欠損率の上昇に寄与した可能性が示唆された。一方、領域EH111-8(欠損率100%)では、全菌株のアセンブルにおいて、フォワード又はリバースプライマーのいずれか一方に一致する配列すら検出されなかった。また、領域O157-37(欠損率61%)では、29菌株のアセンブルにおいてフォワードプライマーとほぼ一致する配列が検出されたが、リバースプライマーに近似する配列は検出されなかった(表4)。さらに、領域q1705(欠損率68%)では、isPCRで増幅が認められなかった54菌株のアセンブルにおいても、プライマーに近似する配列は検出されなかった。これら4領域とは対照的に、領域q1720では、既報における欠損率がほぼ100%であるのに対し、本研究で増幅ありの場合のプライマー一致率を85%とすると欠損率が27%と低値を示した。遺伝子増幅ありと判定されたアセンブルでは、プライマーとほぼ一致する配列が確認された(表4)。なお、増幅ありと判定するプライマー一致率を95%にすると、欠損率100%となり既報に近い値を示した。

本研究では、O165においてMLVA17のD値が既報³⁾より低値を示したことから、*in silico* MLVAの結果に基づきMSTを作成し、分解能の詳細を検討した(図4)。その結果、MLVA17では79菌株中22菌株が集積する大きなノードが形成された。このノードに含まれる菌株は、MLVA43では複数のノードに分散した。さらに、当該22菌株では、既報と欠損率が大きく異なったEHC-6、EH111-8及びO157-37の各領域において、いずれもTRが検出されなかった。これらの結果から、MLVA17における巨大ノードの形成は、これら特定領域の欠損に起因し、結果としてD値の低下に寄与した可能性が示唆された。

D. 考察

アンケートの結果、今年度のMLVA研修会では全体及び各講義・実習に対する研修生の評価は高く、本研修会が有効性の高い研修であったことが示された。昨年度の研修会では、GeneMapper実習及び質問等への回答に十分な時間を確保できないという課題が残ったが²⁾、今年度は各実習時間を延長したことで、この課題は概ね解消した。

しかし、同じ班に属する研修生から、昨年度と同様に時間が足りないとの回答があった。GeneMapper実習(表1 区分: 実習③、⑤及び⑥)及び事前に募集した日常検査における質問や問題点への回答(区分: 実習⑦)について、時間不足と回答した研修生が同じ班に集中していた。その原因として、(1)経験年数の少ない研修生が同じ班に集まっていたこと、(2)講師用PCの画面を投影するスクリーンから遠い座席であったため、作業内容を把握しづらい環境であったこと、の2点が考えられた。(1)への対策として、研修生募集時に経験年数等を照会するだけでなく、年間に実際に検査する検体数を確認することで、研修生の検査レベルをより適切に把握することが有効と考えられた。(2)への対策としては、スクリーンに加えて講義室後方に大型モニターをサブ画面として設置し、HDMI分配器を用いて操作画面を複数箇所に投影することが有効と考えられた。また、講師用PCのOSがWindowsであることから、画面拡大機能(Windowsキーと「+」及び「-」キーの同時押し)の活用が有効であったと考えられた。

本研究では、全ゲノム解析の普及に伴い公開データベースに蓄積されたゲノムデータを利用し、*in silico* MLVA法により本法の性能を評価した。その結果、本研究の所見は概ね既報³⁾を支持するものであったが、いくつかの新たな知見も得られた。例えば、O145では、既報において領域O157-17及びO157-19の欠損率はそれぞれ6%及び0%とされているが、本研究では遺伝子増幅ありの基準をプライマー一致率90%とした場合、これらの領域の欠損率は100%となった。これは、これらの領域においてフォワードまたはリバースプライマーの5'末端側の4 bpがアセンブル配列と一致しなかったことが原因と考えられた。しかし、実際のMLVA法では伸長性の高いマルチプレックスPCR酵素を用いることから、5'末端側の数塩基の不一致が存在しても、遺伝子増幅が認められる可能性がある。これらのプラ

イマーはO145以外の血清型にも対応しているため、O145用に新たにプライマーを設計し直すことも一案であるが、MLVA法は複数の血清型を同一のプライマーミクスチャーで検出できる利便性を有する。従って、プライマーの追加や再設計の必要性については、実際の菌株を用いた検討結果を踏まえて判断すべきと考えられる。

O165では、既報³⁾において欠損率0%とされているに関わらず、*in silico* MLVA法では欠損率が60%以上となった4領域(EHC-6、EH111-8、O157-37及びq1705)が認められた。アセンブル不良が示唆されたEHC-6を除く3領域について見ると、領域EH111-8では、全菌株においてフォワードまたはリバースプライマーに対応する配列が認められず、欠損率が異なった原因の推定は困難だった。領域O157-37では、29菌株においてフォワードプライマーにほぼ一致する配列がアセンブル中に認められた一方、リバース側の配列は検出されなかった。このことから、*in silico* MLVA法では標的外領域を検出し、本来のTR領域についてはプラスミド上にあり脱落している可能性も考えられた。領域q1705では、全菌株のアセンブルにおいてプライマー配列に近い領域が認められなかったことから、本プライマーに対応しないクローンが存在する可能性が示唆された。

一方、領域q1720では、既報³⁾において欠損率100%とされているのに対し、本研究では遺伝子増幅ありと判定するプライマー一致率を85%とした場合、欠損率は27%となり、大きく異なった。遺伝子増幅産物ありの菌株についてTR数を求めると全て1であり、TRの存在を確実に確認することは困難であった。そのため、この遺伝子増幅が非典型的なものであるのか、あるいは既報では把握されていなかったこの領域にTRを持つクローンが存在することを示しているのかは明らかではない。従って、本研究で遺伝子増幅が認められた菌株については、実際の菌株を用いた実験的検証が必要である。

本研究には次のリミテーションがある。*in silico* MLVA解析は公開データベースに登録されたゲノムデータに依存するため、菌株の多様性の影響を受ける。本研究ではNCBIに登録されているO145及びO165のSRAデータを網羅的に収集して解析したが、その多くは国内の特定施設により取得されたデータであり、多様性に偏りが存在する可能性がある。一方で、本研究で得られた分離能は国内サーベイランスに基づく既報³⁾と概ね一致しており、本データセットが国内の菌株集団を一定程度反映している可能性が示唆された。さらに、既報では示されていない新たな知見も得られたことから、本データセットは本法の性能評価において一定の有用性を有すると考えられる。

以上のように、本研究で実施した*in silico* MLVA法は、公開ゲノムデータを活用することで、実際のMLVA法の性能を多角的に評価する有効な手段であると考えられた。特に、O165において認められた複数領域での欠損率の差異は、MLVA17の分離能やMST構造にも影響を及ぼしており、本法の特性を理解する上で重要な知見と考えられる。今後、これらの知見について実際の菌株を用いた検証を

行うことで、MLVA法の適用範囲及び解析精度に関する理解がさらに深化し、本法の改良や運用の最適化に資することが期待される。

E. 結論

MLVA法の改良版研修会の実施により、解析実習の内容を強化したことで、昨年度の研修会と比較して、より効果的な技術指導を行うことができた。また、ゲノムデータベースを活用した*in silico* MLVA解析を実施することで、分離菌株数が限られている血清型についても、MLVA法の改善に資する知見を得ることができた。

F. 謝辞

本研究の遂行において、終始、貴重なご指導とご助言を賜りました国立感染症研究所 細菌第一部の泉谷秀昌先生に深く感謝申し上げます。ご多忙の中、本年度のMLVA法研修会に応募、またはこちらにご参加くださった地方衛生研究所の先生方に心より感謝申し上げます。

G. 参考文献

- 1) 泉谷ら. 日本食品微生物学会雑誌. 2019; 36(1): 10-12.
- 2) 明田ら. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)総括研究報告書「広域食中毒発生時の早期探知のための調査の迅速化及びゲノム解析技術を利用した調査法の確立に資する研究」. 2024; 52-65.
- 3) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481-490.
- 4) Mellor GE et al. J Clin Microbiol. 2014; 53(2): 579-586.

- 5) Karch H et al. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2043-2049.
- 6) Iguchi A et al. J Clin Microbiol. 2015; 53(8): 2427-2432.
- 7) Scheutz F et al. J Clin Microbiol. 2012; 50(9): 2951-2963.

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimabukuro S, Kobayashi T, Yokoyama E, Ando N, Kikuchi T, Momose F, Kageyama T, Matsuoka H, Ishioka T, Hirai S. Establishment of autoclave conditions for disaccharide-containing liquid media using spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. Journal of Microbiological Methods. 2026; 245: 107487.

2. 学会発表

- 1) 平井晋一郎. 腸管出血性大腸菌感染症のMLVA解析について. 分子疫学を活用した感染拡大防止対策立案研修(長崎県開催、オンライン発表). 令和8年2月25日.

J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

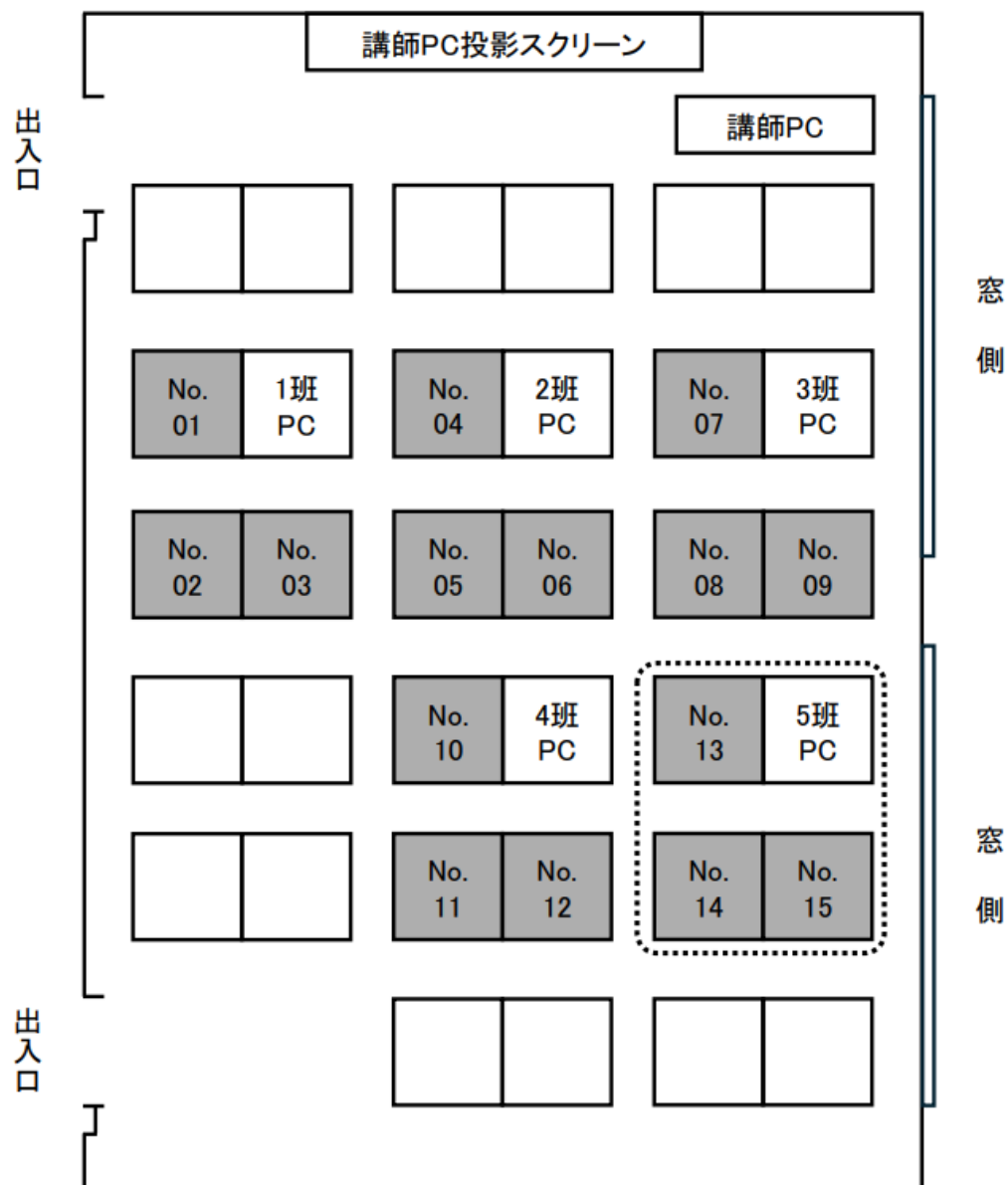


図 1 MLVA 法研修会の講義室における班及び研修生の位置

No.は研修生の番号を示し、No. 01-03 が 1 班、No. 04-06 が 2 班、No. 07-09 が 3 班、No. 10-12 が 4 班、No. 13-15 が 5 班の研修生。

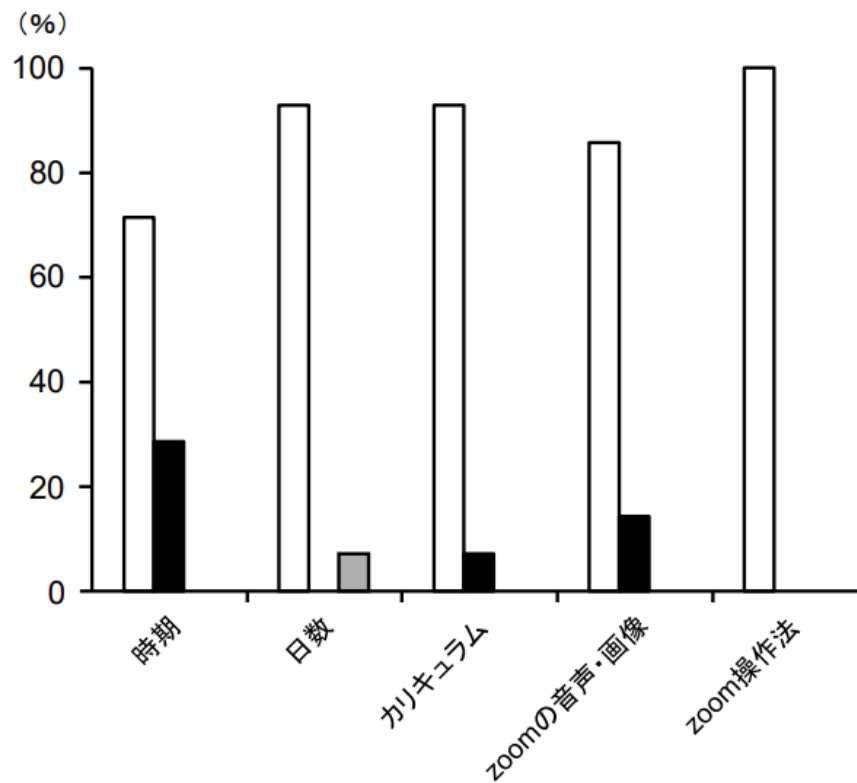
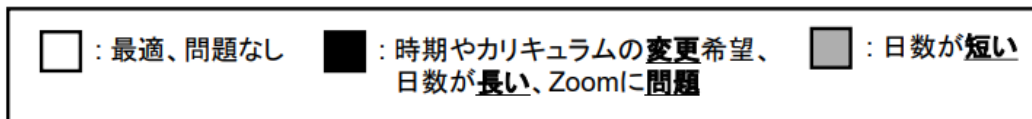
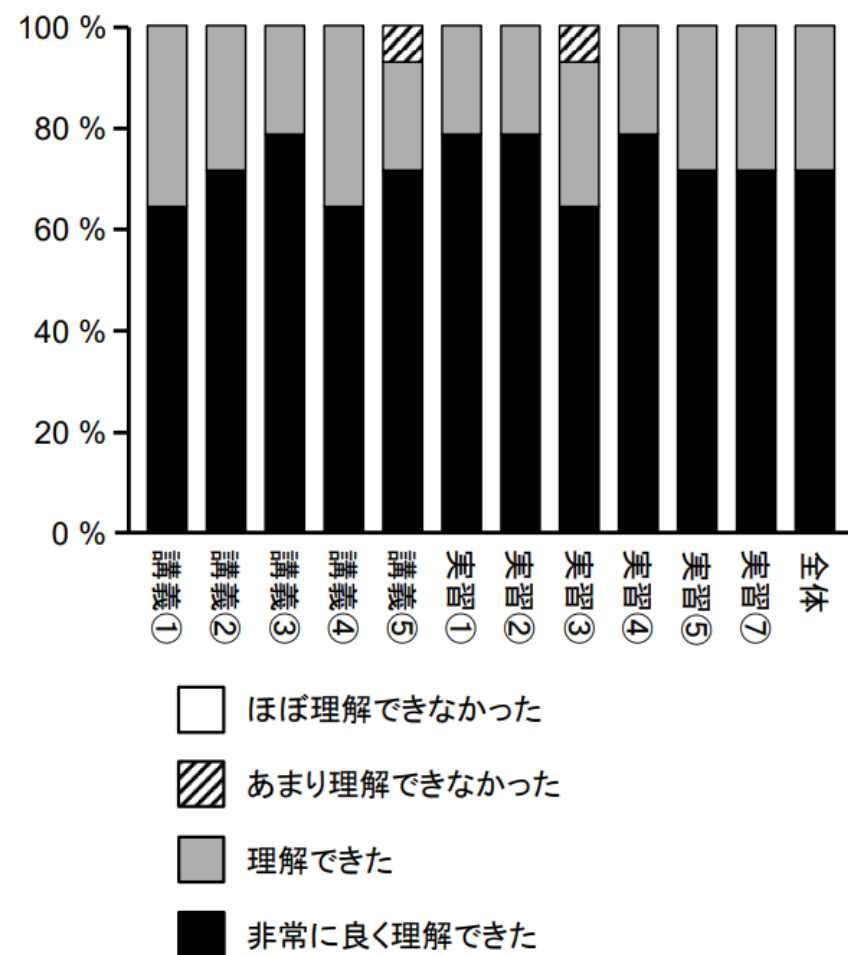


図2 反復配列多型解析 (MLVA) 法研修会全体における評価

(A)理解度



(B)業務への活用

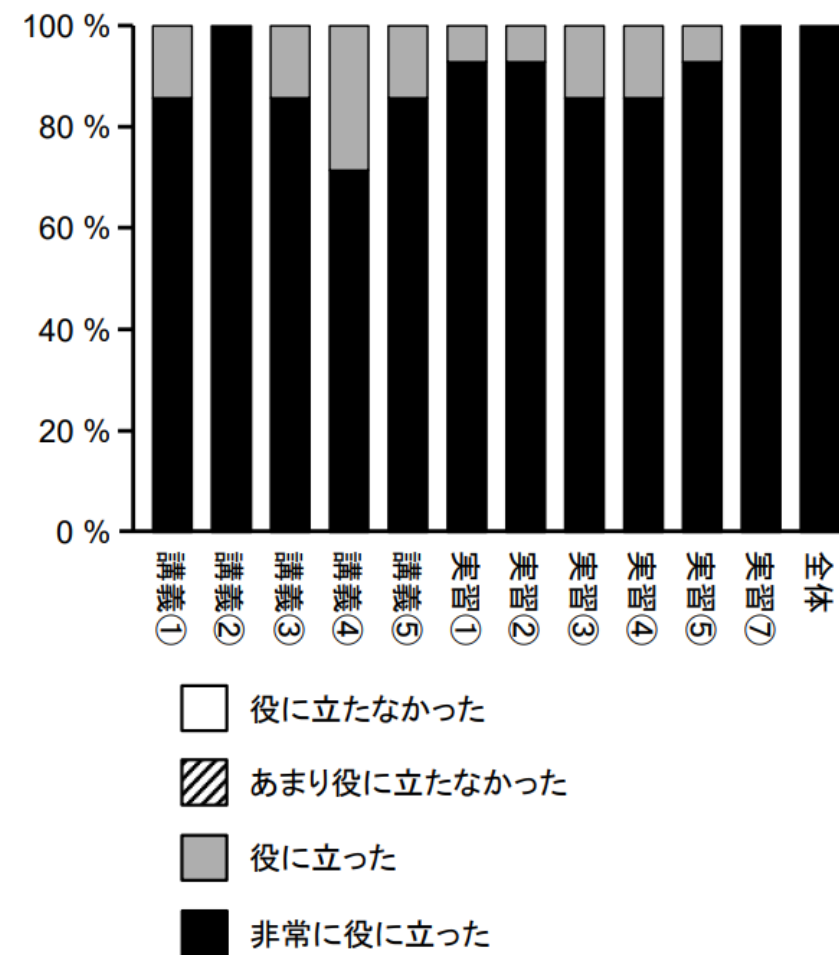
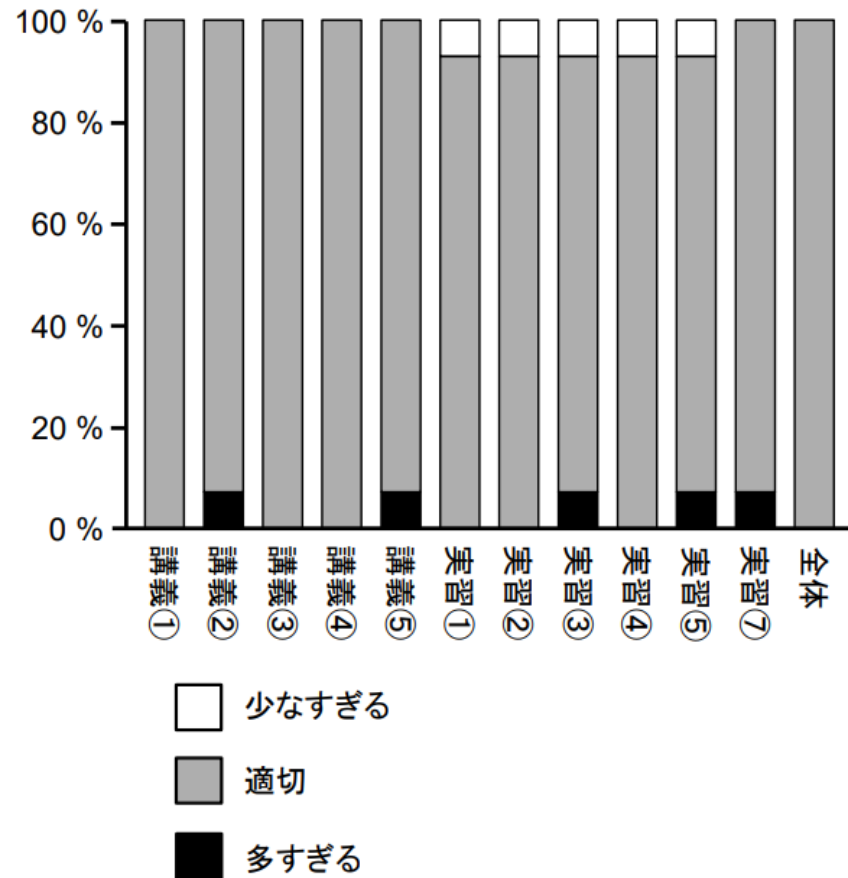


図3 MLVA 法研修会における各講義・実習の評価

横軸に記載されている各棒の下は表1の区分に該当する。

(C) 講義・実習の量



(D) 講義・実習の速度

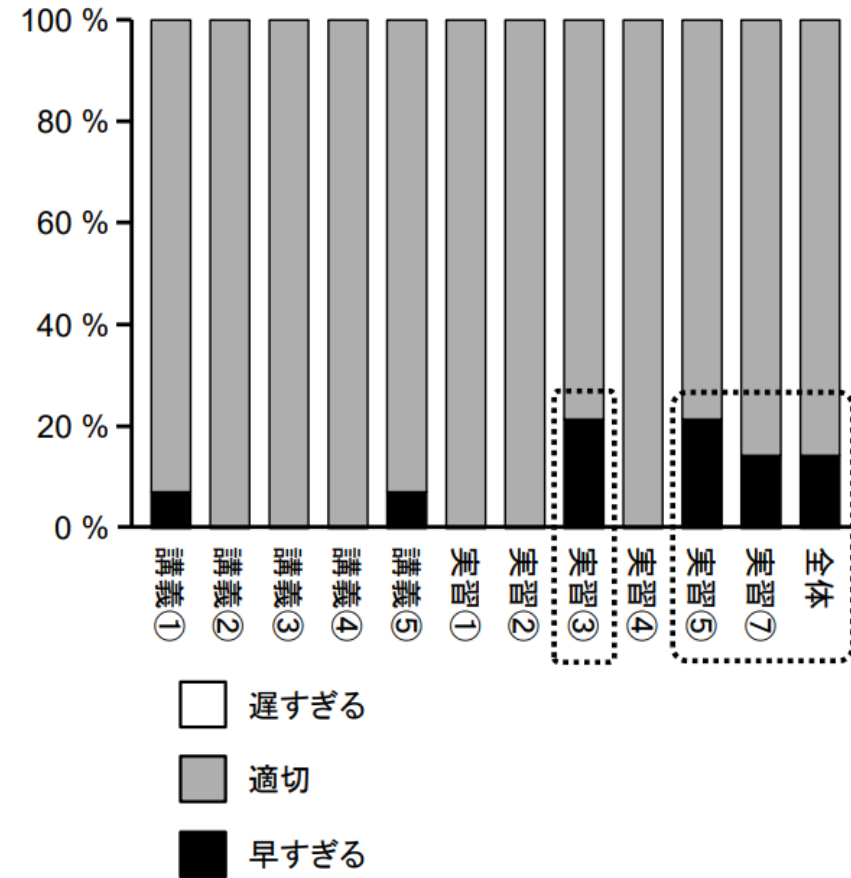
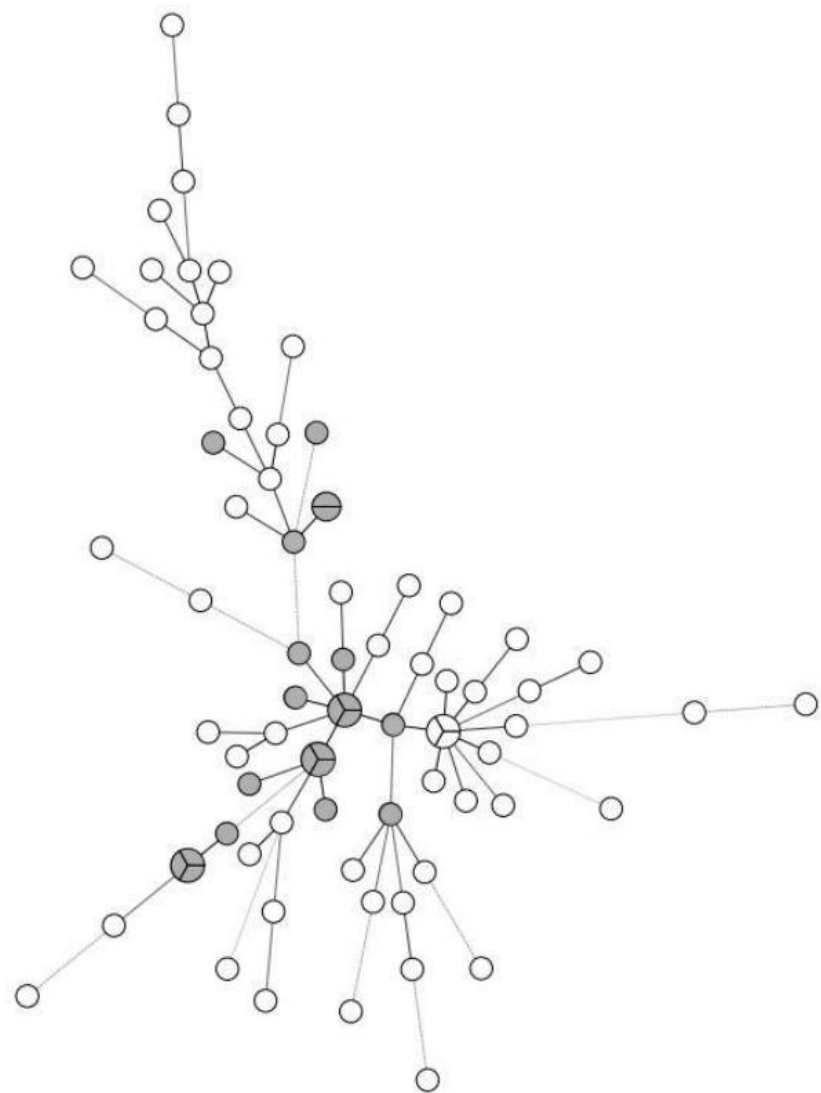


図 3(続き) MLVA 法研修会における各講義・実習の評価

横軸に記載されている各棒の下は表 1 の区分に該当する。

(A) MLVA43



(B) MLVA17

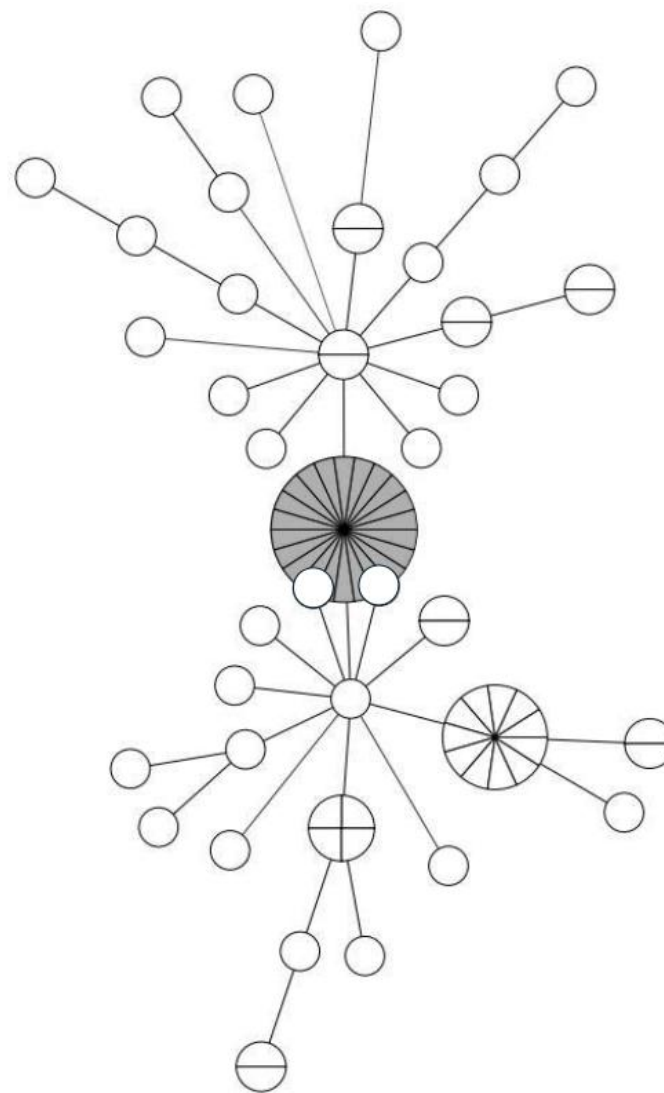


図 4 O165 の *in silico* MLVA の結果を基に作成した minimum spanning tree

灰色は MLVA17 で最も大きな node に含まれる菌株と、MLVA43 における各菌株の node を示した。

表 1 MLVA 法研修会で実施された改良版カリキュラム

1 日目: Zoom

時間	区分	題名	内容(昨年度からの変更点)
10:30-10:35(5 分)	その他	開会挨拶	-
10:35-11:00(30 分)	その他	オリエンテーション	-
11:00-12:00(1 時間)	講義①	バイオリスク管理	BSL2 施設を利用するための教育訓練
12:00-13:00(1 時間)	その他	休憩	-
13:00-14:00(1 時間)	講義②	EHEC O157、O26、O111 の MLVA 法	MLVA 総論・各論
14:00-15:00(1 時間)	講義③	MLVA 法の異同判定	MLVA 法の結果の解釈 (Zoom に変更)
15:00-15:15(15 分)	その他	休憩	-
15:15-15:45(30 分)	講義④	MLVA 法で使用する代替・解析ツールの紹介	MLVA 法のツールの紹介 (Zoom に変更)
15:45-16:15(30 分)	講義⑤	MLVA 法におけるトラブルシューティング	MLVA 法でのトラブルと解説法 (Zoom に変更)

2 日目: 集合

時間	区分	題名	内容(昨年度からの変更点)
10:00-10:10(10 分)	その他	庁舎利用の説明	-
10:10-11:00(50 分)	実習①	菌株培養液からの DNA 抽出	キレックス樹脂を利用して DNA 抽出
11:00-12:00(1 時間)	実習②	PCR 反応	異なる 2 つのメーカーの製品を使用してマルチプレックス PCR を実施
12:00-13:00(1 時間)	その他	休憩	-

表 1(続き) MLVA 法研修会で実施された改良版カリキュラム

2 日目: 集合

時間	区分	題名	内容(昨年度からの変更点)
13:00-15:00(2 時間)	実習③	GeneMapper による MLVA 法データの解析(1)	Panel と Bin のインポート/ サイジング(3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加)
15:00-15:20(20 分)	その他	休憩	-
15:20-16:00(40 分)	実習④	PCR 産物の電気泳動	キャピラリーゲルシーケンサーで PCR 産物を電気泳動
16:00-16:30(30 分)	その他	質疑応答	-

3 日目: 集合

時間	区分	題名	変更内容(昨年度からの変更点)
10:00-12:00(2 時間)	実習⑤	GeneMapper による MLVA 法データの解析(2)	Bin の修正/ データの解析(3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加)
12:00-13:00(1 時間)	その他	休憩	-
13:00-14:00(1 時間)	実習⑥	GeneMapper による MLVA 法データの解析(3)	トラブル事例への対応(3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加)
14:00-15:00(1 時間)	実習⑦	事前に募集した質問や問題点へ回答	1 時間に増加

表 2 *in silico* MLVA 及び既報 MLVA における分離能の比較

血清型	解析法	MLVA 数(菌株型数)		D 値(95 %信頼区間) ^{a)}			
		本研究 ^{b)}	既報 ^{c)}	本研究 ^{b)}		既報 ^{c)}	
O145	MLVA17	36 (104)	16 (50)	<u>0.873</u>	<u>(0.864–0.873)</u> ^{d)}	0.802	(0.710–0.895)
	MLVA43	86 (104)	27 (50)	<u>0.991</u>	<u>(0.993–0.988)</u>	0.940	(0.905–0.974)
O165	MLVA17	38 (79)	24 (31)	0.903	(0.892–0.914)	<u>0.983</u>	<u>(0.981–1.002)</u>
	MLVA43	70 (79)	27 (31)	<u>0.996</u>	<u>(0.993–0.998)</u>	0.991	(0.961–0.995)

a) 多様性指数(Simpson's diversity index; D 値)。

b) 本研究で実施した *in silico* MLVA。

c) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481–490.

d) 本研究と既報において D 値が高い方を下線部で示した。

表 3 *in silico* MLVA 及び既報 MLVA における各領域の検出状況

(A) O145

領域	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	EH26 -7	EH111 -8	EH111 -11	EH111 -14	EH157 -12	O157 -3	O157 -9	O157 -17	O157 -19	O157 -25	O157 -34	O157 -36	O157 -37
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	0	99	92	88	100	0	0	100	1	100	84	<u>15</u> ^{c)}	<u>0</u> ^{c)}	0	1	100	99
既報の 欠損率(%) ^{b)}	2	96	98	88	100	0	0	98	0	100	78	6	0	0	2	100	92
本研究の D 値 ^{a)}	0.426	0.019	0.148	0.217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.294	0.541	0.038	0.000	0.019	0.000	0.019
既報の D 値 ^{b)}	0.544	0.079	0.040	0.224	0.000	0.040	0.000	0.040	0.040	0.000	0.389	0.259	0.040	0.000	0.040	0.000	0.154

領域	q1701	q1702	q1704	q1705	q1707	q1708	q1710	q1711	q1712	q1714	q1715	q1716	q1717	q1718	q1720	q1721	q1722
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	100	0	96	4	5	3	4	0	99	1	99	99	91	100	100	100	100
既報の 欠損率(%) ^{b)}	98	0	92	4	8	6	6	0	96	0	98	98	86	98	100	100	100
本研究の D 値 ^{a)}	0.000	0.038	0.075	0.295	0.164	0.264	0.667	0.000	0.019	0.019	0.019	0.019	0.160	0.019	0.000	0.000	0.000
既報の D 値 ^{b)}	0.040	0.000	0.150	0.190	0.187	0.224	0.633	0.000	0.078	0.000	0.040	0.040	0.246	1.246	0.000	0.000	0.000

領域	q1723	q1724	q1725	q1726	q1727	q1728	q1729	q1730	q1731
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	1	1	39	99	0	1	99	100	14
既報の 欠損率(%) ^{b)}	0	2	30	96	0	2	98	100	4
本研究の D 値 ^{a)}	0.019	0.019	0.741	0.019	0.148	0.038	0.019	0.000	0.249
既報の D 値 ^{b)}	0.000	0.079	0.766	0.079	0.154	0.079	0.040	0.000	0.078

a) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481-490.

b) 本研究で実施した *in silico* MLVA。

c) プライマー一致率 90%で PCR の増幅ありとした場合、欠損率 100%になった数値を下線で示した。

表 3(続き) *in silico* MLVA 及び既報 MLVA における各領域の検出状況

(B) O165

領域	EHG -1	EHG -2	EHG -5	EHG -6	EH26 -7	EH111 -8	EH111 -11	EH111 -14	EH157 -12	O157 -3	O157 -9	O157 -17	O157 -19	O157 -25	O157 -34	O157 -36	O157 -37
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	0	100	44	<u>72</u> ^{c)}	100	<u>100</u> ^{c)}	0	100	1	100	100	100	0	0	0	100	<u>61</u> ^{c)}
既報の 欠損率(%) ^{b)}	0	100	42	0	100	0	0	100	3	100	100	100	0	0	0	100	0
本研究の D 値 ^{a)}	0.426	0.019	0.148	0.217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.294	0.541	0.038	0.000	0.019	0.000	0.019
既報の D 値 ^{b)}	0.544	0.079	0.040	0.224	0.000	0.040	0.000	0.040	0.040	0.000	0.389	0.259	0.040	0.000	0.040	0.000	0.154

領域	q1701	q1702	q1704	q1705	q1707	q1708	q1710	q1711	q1712	q1714	q1715	q1716	q1717	q1718	q1720	q1721	q1722
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	100	0	92	<u>68</u> ^{c)}	100	100	100	0	0	0	0	0	100	100	<u>100</u> ^{d)}	100	100
既報の 欠損率(%) ^{b)}	100	0	97	0	100	100	100	0	0	0	0	0	100	100	97	100	100
本研究の D 値 ^{a)}	0.000	0.038	0.075	0.295	0.164	0.264	0.667	0.000	0.019	0.019	0.019	0.019	0.160	0.019	0.000	0.000	0.000
既報の D 値 ^{b)}	0.040	0.000	0.150	0.190	0.187	0.224	0.633	0.000	0.078	0.000	0.040	0.040	0.246	1.246	0.000	0.000	0.000

領域	q1723	q1724	q1725	q1726	q1727	q1728	q1729	q1730	q1731
本研究の 欠損率(%) ^{a)}	0	0	3	100	0	0	100	100	100
既報の 欠損率(%) ^{b)}	0	0	0	100	0	0	100	100	100
本研究の D 値 ^{a)}	0.019	0.019	0.741	0.019	0.148	0.038	0.019	0.000	0.249
既報の D 値 ^{b)}	0.000	0.079	0.766	0.079	0.154	0.079	0.040	0.000	0.078

a) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481–490.

b) 本研究で実施した *in silico* MLVA。

c) プライマー一致率 70%で PCR の増幅ありとした場合でも、欠損率は変化しなかった数値を二重下線で示した。

d) プライマー一致率 85%で PCR の増幅ありした場合、欠損率が 27%となったが、増幅の基準を一致率 95%に変更した場合、欠損率が 100%となった数値を下波線で示した。

表 4 既報と欠損率が異なった領域におけるプライマー配列とアセンブルで一致した配列

血清型	領域	位置	種類 ^{a)}	配列 (5'-3') ^{b)}
O145	O157-17	フォワード	プライマー	<u>GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA</u>
			アセンブル	TTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA
		リバーズ	プライマー	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGTTGGCGATC
			アセンブル	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-19	フォワード	プライマー	GCAGTGATCATTATTAGCACCGC <u>TTT</u>
			アセンブル	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCGTT
		リバーズ	プライマー	<u>CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC</u>
			アセンブル	CAGGGGATAAGACCACCTGTTAAGC
O165	O157-37	フォワード	プライマー	AATCAGAGC <u>AG</u> CAGGAAAAAGAAGA
			アセンブル	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA
		リバーズ	プライマー	<u>GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG</u>
			アセンブル	類似領域なし
	q1720	フォワード	プライマー	GCGAACAGCTGTATCTTAATGAGTT
			アセンブル	GCGAACAGCTGTATCTTAATGAGTT
		リバーズ	プライマー	GAGGATTTAATTTTCC <u>CA</u> ACTGTTC
			アセンブル	GAGGATTTAATTTTCTAACTGTTC

a) プライマーは泉谷ら (Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481-490) の報告。アセンブルは本研究において作成。

b) アセンブル配列と一致しなかったプライマーの配列を下線で示した。