

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精度向上及び性能評価に関する研究

研究代表者	明田 幸宏	国立健康危機管理研究機構(JIHS) 国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	平井 晋一郎	JIHS 国立感染症研究所 検査診断技術研究部
研究協力者	島袋 梢	(旧)国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター
研究協力者	佐藤 梢	JIHS 国立感染症研究所 検査診断技術研究部
研究協力者	小野 諭子	長野県環境保全研究所 感染症部
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

我が国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、地方衛生研究所におけるMLVA法の検査精度の向上及び本法の性能評価を目的として、以下の検討を行った。1年目には菌株検体を用いた精度管理試験及び非典型的ピークの発生要因の解析を行い、2年目には研修会の実施により技術習得を支援した。3年目には前年度の課題を踏まえ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用いた*in silico* MLVA解析により本法の分離能を評価した。

その結果、精度管理試験では参加施設の大半が高い検査精度を示した一方、経験年数の浅い施設において誤判定が認められ、その原因としてBinファイルの設定不備及び非典型的ピークの誤認が明らかとなった。非典型的ピークの解析では、発生は特定の工程に限定されず、試薬や装置条件の影響が示唆された。研修会の実施により、MLVA法の理解度及び業務適用性はいずれも高く評価され、特に解析ソフト操作に関する教育の重要性が示された。改良版研修では、実習時間の拡充により講義・実習の量及び進行速度に関する課題が改善された。さらに、*in silico* MLVA解析では、O145では既報と概ね一致した一方、O165では複数領域で欠損率に差異が認められ、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に起因する可能性が示唆された。

以上より、本研究は、精度管理試験、教育介入及びゲノム解析を統合したMLVA法の精度向上モデルを提示するものであり、公衆衛生サーベイランスの高度化に資する知見を提供するものと考えられた。

A. 研究目的

全国の地方衛生研究所(地衛研)では、腸管出血性大腸菌(EHEC)の食中毒を早期に探知するため、分子疫学的解析法として反復配列多型解析(MLVA)法によるサーベイランスが行われている¹⁾。本法は、特定の遺伝子領域における繰り返し配列(TR)数の比較により、菌株間の類似性を判定する方法であり²⁾、高い分離能を有し、従来のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法と同程度以上の性能を示すと報告されている³⁾。さらに、MLVA法はPCR法を基盤とするため迅速な解析が可能であり、結果が数値として得られることから自治体間での比較が容易である。このため、近年頻発する広域食中毒への対応にも適している⁴⁾。このような特性を公衆衛生分野で十分に活用するためには、各地衛研における検査精度の維持及び向上が不可欠である。

前身の研究班では、地衛研におけるMLVA法の検査精度を担保するため、DNA検体を用いた精度

管理試験を実施してきた⁵⁾。その結果、受験施設の大半は高い精度で本法を実施していた一方、一部の施設では基本的な検査工程やデータ解析に起因する誤りが認められた。また、地方衛生研究所全国協議会に加盟する地衛研の約30%は本試験に参加しておらず、地衛研全体の検査精度は十分に把握できていない。さらに、試験時のアンケートでは、菌株分離からDNA抽出に至るまでの手順が施設ごとに異なることが示され⁵⁾、これらの工程の精度は本試験では評価対象となっていないことも課題として明らかとなった。加えて、非典型的ピークの発生など原因不明の事象も確認され、不正解施設に対しては原因の検討と改善策の提示を行ったものの、その発生要因の解明には至らなかった。これらの課題を踏まえると、検査精度のさらなる向上には、正解施設を含む電気泳動データの収集・解析による原因解明を進めるとともに、菌株検体を用いた精度管理試験の継続的实施が必要と考えられた。

地衛研の検査精度を上げる手段として、試験に不正解だった施設への改善策の提示のみでは不十分である。これまでは、試験に不正解の施設に個別に対応してきたが、その効果は1施設に限定される。現在、地衛研では人事異動が盛んであり、検査技術・知識の承継が大きな課題となっている⁶⁾。そこで、地衛研の検査精度の向上を効果的・継続的に図るためには、試験で把握したトラブルを基に解決事例集を作成し、広く共有することが有効と考えられる。

しかし、精度管理試験の実施やトラブルシューティング集の作成は主に知識面での支援に留まり、技術の習得や改善には限界がある。これまでの精度管理試験の結果から、電気泳動データからTR数を算出する解析ソフトGeneMapper (Thermo Fisher Scientific)の使用に関して、特に多くの誤りが確認された。これらの課題に対応するためには、解析ソフトの操作方法や実験操作の確実な習得を目的とした、直接的な指導を伴う研修会の実施が必要と考えられる。

これらの取り組みにより地衛研における検査精度の向上を図ってきたが、サーベイランス全体の精度をさらに高めるためには、検査法自体の性能評価及び改良も重要である。我が国のサーベイランスでは、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⁷⁾。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ものも存在する。近年の全ゲノム解析の進展により、公開データベースに蓄積されたゲノム情報を活用することで、地域性に依存しない多様な菌株の解析が可能となり、実験系に依存しない分子疫学手法の性能評価が可能となっている。特定の血清型では地域により系統分布や生化学的性状が異なることも報告されており^{8,9)}、ゲノムデータの活用により、MLVA法の性能をより詳細に評価できると考えられる。

そこで本研究では、地衛研におけるMLVA法の検査精度の向上を図るとともに、本法の性能評価を行った(表1)。1年目には、菌株検体を用いた精度管理試験を実施し、地衛研におけるMLVA法の検査精度の把握に努めた。加えて、前研究班の試験で未解明であった非典型的ピークの発生要因を明らかにするため、参加施設から収集した電気泳動データをアンケート結果に基づき分析した。2年目には、MLVA法に関する知識及び技術の習得を支援するため、研修会を実施した。3年目には、前年度のアンケート結果を踏まえて内容を改良した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を評価した。さらに、本研究期間を通じて、研修会等で得られた質問や問題点を基に、トラブルシューティング集の拡充を行った。

B. 研究方法

1. MLVA法の精度管理試験【1年目】

(1)参加施設の選定

地方衛生研究所全国協議会に加盟する地衛研等のうち、都道府県及び政令指定都市に属する66施設に参加を依頼した。申込みの際には、「MLVA法導入後の年数」及び「参加希望者の経験年数」についてアンケートを実施した。なお、JIHS 国立感染症研究所(感染研)村山支所から1日に発送可能な菌株検体数は約20施設であるため、申込み施設が多数の場合、以下の基準に基づき参加施設を選定した。

- ① 熟練施設として、MLVA法の導入歴が5年以上の施設を除外する。
- ② 前年の研究班で実施した精度管理試験に未参加の施設を優先する。
- ③ 前研究班での試験において不正解の検体があった施設を優先する。
- ④ MLVA法の導入歴が2年以下、又は参加希望者の経験年数が1年未満の施設を優先する。

2023年10月24日(火)から11月17日(金)まで申込期間を設け、11月24日(金)に申込みのあった施設に対し参加可否を通知した。

(2)問題内容

参加施設には共通の菌株検体を配布した。検体は、令和2年度の前研究班で候補としたEHEC菌株の内、過去の精度管理試験で使用されていない菌株を選定した⁵⁾。これらの菌株についてMLVA法を実施し、保存中にTR数の変化が認められなかった3菌株を検体とした(表2)。問題内容として、各施設において3検体についてMLVA法を実施し、TR数を回答させた。参加施設には、日常検査で実施している方法(DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等)により実施するよう指示した。また、問題と併せて検査工程に関するアンケートを実施した。菌株検体であるためTR数の変化等の可能性はあるが、原則として各検体の全領域において表2に示したTR数と一致した場合を正解とした。不正解の場合には、その原因を明らかにするため、検査工程の照会を行うとともに、泳動ファイルの提出を求めた。

(3)実施工程

2024年1月17日(水)に、各参加施設へ菌株検体1～3を発送した。同日、各施設の担当者に回答用紙(エクセルファイル)をメールにて送付した。回答期限は2024年2月29日(木)とした。

2. MLVA法の非典型的ピークの発生要因の特定と改善法の提言【1年目】

前研究班で実施した MLVA 法の精度管理試験において解明に至らなかった非典型的ピークの発生要因について、原因の特定を試みた(図1)⁵⁾。前研究班では、ある参加施設において検体2の解析時に約143 bpの非特異的ピークが認められた。検体2の領域O157-37における正しいTR数は-2であるが、当該施設ではTR数を10と誤判定していた。そこで、当該施設から電気泳動データを収集し、検査工程についても照会したが、原因の特定には至らなかった。

本研究では、前研究班の精度管理試験に参加した38施設に対し、検体2の領域O157-37を含む

電気泳動データの提出を依頼した。受領したデータは解析ソフト GeneMapper Ver. 6.0 を用いて再解析し、135～150 bp の範囲において蛍光強度 50 以上で、かつ領域 O157-37 と同一の蛍光標識 (PET) を有するピークを非典型的ピークと定義した。さらに、試験時に実施したアンケート結果を基に、PCR 時の DNA 希釈率、Master Mix の種類、電気泳動時の希釈率、PCR 条件 (温度及び時間)、並びにシーケンサーの機種に関する情報を電気泳動データと対応付けて解析した。

また、本研究で実施する精度管理試験において非典型的ピークの発生が認められた場合についても、同様の手順により要因の特定を試みた。なお、本試験では菌株検体を用いるため、電気泳動データに加えて、コロニー分離の有無及び DNA 抽出法に関する情報も併せて解析対象とした。

3. MLVA 法の研修会の実施【2 年目】

(1) 研修会の日程及び内容

研修会は令和 7 年 1 月 28 日 (火)、30 日 (木) 及び 31 日 (金) に実施し、講義及び実習で構成した (表 3A、図 2A)。初日は Zoom による遠隔形式で、バイオリスク管理 (区分: 講義①) 及び MLVA 法の総論・各論に関する講義 (区分: 講義②) を行った。2 日目及び 3 日目は感染研村山支所にて集合形式で実施した。

2 日目の MLVA 法の異同判定 (区分: 講義③) では、同一クローン由来と判定可能な TR 変異の範囲について解説した。MLVA 法で使用する代替・解析ツールの紹介 (区分: 講義④) では、地衛研等で広く用いられていた BioNumerics (Applied Maths 社) の新規販売中止を受け、代替解析ツールを紹介した。さらに、実務上の課題に対応するため、トラブルシューティングに関する講義 (区分: 講義⑤) も実施した。

実習では、異なるクローン由来の EHEC O157、O26 及び O111 の 18 菌株を使用した。これらの菌株から、1 班あたり 9 菌株、すなわち各研修生に 3 菌株を検体として配布した。配布時には、検体の血清型が判別できないようブラインド化した。これらの菌株を用いて、2 日目に菌株培養液からの DNA 抽出、PCR 反応及び電気泳動 (区分: 実習①～③) を、3 日目には GeneMapper を用いたデータ解析 (区分: 実習④) を行った。GeneMapper 実習では、Panel 及び Bin ファイルのインポート、ピークのサイジング、Bin の修正、電気泳動データの解析、並びにトラブル事例由来データの解釈を実施した。電気泳動データの解析では各検体の実測データを用い、それ以外の解析 (ピークのサイジング等) では事前に用意したデータを使用した。研修会最後の実習では、参加者から事前に募った日常検査における質問や問題点について、実際の電気泳動データを用いて解説した (区分: 実習⑤)。

(2) 研修生定員及び対象者

受け入れ可能な研修生数は、MLVA データから 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 5 台借用し、1 台を講師用、残り 4 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 名で全 4 班、計 12 名を定員とした。以上より、各班に 1 台の PC が割り当てられた。

対象者は、EHEC の MLVA 法を導入予定の地衛研等の検査機関、又は人事異動等により新たに本法の担当となった職員とし、以下のいずれかに該当する者を要件とした。これらの要件に基づき、研修の必要性が高い職員が優先的に参加できるよう配慮した。

- ① MLVA 法の導入予定、または導入から 3 年以内の職員
- ② MLVA 法の実施経験が 3 年以内の職員

(3) 研修生の選考

令和 6 年 10 月 4 日 (金) に、56 施設の地衛研及び 13 施設の中核市の検査機関に対して研修会の実施を通知し、同年 11 月 15 日 (金) を申込締切とした (図 2A)。申込時には、施設の MLVA 法導入年数や職員の経験年数を申告させ、研修参加の必要性を評価した。さらに、これまでの精度管理試験への参加状況も考慮し、過去に落選又は未参加の施設を優先することで、教育機会の均等化を図った。

(4) アンケートによる評価

研修会終了後、参加者を対象にアンケートを実施した (図 2A)。アンケートでは、「時期」「日数」「カリキュラム内容」「Zoom 講義の視聴環境」について選択式で評価させた。各講義・実習については、「理解度」「業務への活用可能性」「内容量」「進行速度」を評価させた。加えて自由記述欄を設け、選択結果の背景や根拠を把握した。提出結果を基に研修会の課題を抽出した。

(5) 落選者へのフォロー対応

落選者に対しては、録画した講義動画の視聴機会を提供した (図 2A)。集合形式で実施した 2 日目の講義についても Zoom で録画・編集を行い、バイオリスク管理を除く講義を動画配信サイトで公開する計画とした (表 3A)。講義資料の配布と併せて、当該サイトの URL を案内する準備を行った。

4. 改良版 MLVA 法研修会の実施【3 年目】

(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 3B)。研修内容は、前年度の研修会を基本としつつ、アンケート結果を踏まえて一部内容を見直した。初日は Zoom による遠隔形式で講義を行い、2 日目及び 3 日目は JIHS 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実施した。

実習内容は前年度と同様に、異なるクローン由来の EHEC O157、O26 及び O111 の 18 菌株を用い、各研修生に 3 菌株ずつを血清型が判別できないようブラインド化して配布した。これらを用いて、DNA 抽出、PCR 反応、電気泳動及び GeneMapper による MLVA データ解析を実施した。

前年度のアンケート結果を踏まえ、今年度は特に「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対応」に重点を置いた構成とした。具体的には、解析実習を複数区分(区分: 実習④-1、④-2及び④-3)に分割し、合計約5時間を確保した。また、質問等への対応時間(区分: 実習⑤)を従来の30分から1時間に延長した。

(2) 研修生定員及び対象者

研修生の定員は、前年度と同様にGeneMapper搭載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3)。これにより、各班に1台のPCが割り当てられた。なお、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班分増加させた。

対象者は前年度と同様に、MLVA法導入予定又は導入後3年以内、もしくは実施経験3年以内の職員とした。

(3) 研修生の選考

研修生の募集及び選定は、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通知し、同年11月21日(金)を申込締切とした。申込内容に基づき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選定を行い、結果を同年11月28日(金)に通知した。

(4) 落選者へのフォロー対応

落選者への対応については、前年度の方法を見直し、講義の受講機会の提供方法を変更した。前年度は録画した講義を事後配信していたが、今年度は初日の講義を当選者と共に受講可能とした。一方、当選者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た。

5. *in silico* MLVA 法による性能評価【3 年目】

(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-

genotyping¹⁰⁾及びstx遺伝子¹¹⁾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⁷⁾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⁷⁾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。

6. トラブルシューティング集の作成及び改訂【1～3 年目】

1年目には、前研究班及び本研究班の精度管理試験の結果を基に、トラブルシューティング集を作成した。また、作成に当たり、不足している情報については試験参加者に照会し補完した。2年目から3年目の研修会において、研修生から募った日常検査における質問や問題点についても、トラブル事例として整理し(図2B)、同様の構成でまとめ、既存のトラブルシューティング集を改訂した。

C. 研究結果

1. MLVA法の精度管理試験【1年目】

(1) 参加施設の選定

地方衛生研究所全国協議会に加盟する66施設の地衛研に対し、精度管理試験への参加を依頼したところ、49施設(74.2%)から申込みがあった(表4)。しかし、感染研村山支所から1日に発送可能な菌株検体数を大きく超過したため、事前に定めた基準①～④に基づいて参加施設を選定した(表5)。その結果、②として過去の試験に未参加の10施設、③として過去の試験で不正解の検体があった6施設、④としてMLVA法の施設導入後2年以下、又は担当者の経験年数が1年未満の5施設を選定し、計21施設を参加施設とした。

(2) 回答の評価

精度管理試験に参加した21施設のうち、19施設は全3検体に正解し、2施設で1検体以上の不正解が認められた(表6)。不正解が認められた2施設はいずれも、選定基準④に該当する、MLVA法の施設導入後の年数又は担当者の経験年数が少ない施設だった。

施設Aでは、検体2及び検体3において不正解が認められた(表6、表7A)。当該施設の検査工程を照会し、併せて電気泳動データを解析した結果、GeneMapperにおけるBinファイルの設定に差異が認められた(図4A)。当該施設で使用されていたBinファイルでは、検体2及び検体3の領域O157-19においてTR数が2と算出されたが、感染研細菌第一部が作成したファイルではTR数が1と算出された。照会の結果、当該施設が使用していたBinファイルは、別の研究施設で作成されたものであることが判明した。また、当該ファイルを施設Aへ提供した地衛研ではそのファイルは使用されておらず、細菌第一部が配布したBinファイルを使用していることも明らかとなった。

施設Bでは、検体3の領域O157-17において、正しいTR数が-2であるところ、6と誤判定されていた(表6、表7B)。当該施設の検査工程を照会し、電気泳動データを解析した結果、領域EH111-14においてTRs=1に相当するピークが検出され、その影響で生じた小ピークをTRとして誤認していたことが確認された(図4B)。

2. MLVA法の非典型的ピークの発生要因の特定と改善法の提言【1年目】

前研究班の精度管理試験に参加した38施設に対し、電気泳動データの提出を依頼したところ、30施設から提供があった。GeneMapperによる解析の結果、非典型的ピークは14施設で認められ、4種類に分類された。141 bp付近に出現し、領域O157-37のTRs=10のBinに入る非典型的ピークをピーク1と定義した(図1)。また、142~145 bpに出現し、領域O157-37のTRs=10及び11のBinの間に位置する非典型的ピークをピーク2とした(図5A)。さらに、領域O157-37のTRs=11及び12のBinに入る非典型的ピークを、それぞれピーク3及びピーク4と定義した(図5B、C)。ピーク1、ピーク2、ピーク3及びピーク4が認められた施設数は、それぞれ2施設、3施設、8施設及び1施設であった。

各施設の電気泳動データと検査工程の情報を対応付け、非典型的ピークの発生とPCR工程との関係を検討した。PCR時にDNAを希釈していた施設は4施設であり(表8A)、これらの施設ではNanodrop(Thermo Fisher Scientific)により20~25 ng/ μ Lに調製されたDNAを1.5~12.5倍に希釈していた。DNA希釈の有無にかかわらず、約半数の施設でいずれかの非典型的ピークが認められた。次に、PCR時に使用されたMaster Mixとの関係を検討した。T社試薬、Q社試薬A及びQ社試薬Bを使用していた施設は、それぞれ9施設、14施設及び7施設であった(表8B)。Q社試薬Bを使用した7施設では、ピーク1、ピーク2及びピーク4は認められなかった。PCR条件については、「腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック(O157、O26、O111編)」¹²⁾に準拠しない条件で反応を行っていた施設は6施設であった(表8C)。ハンドブック記載条件との差異は温度ではなく時間にあり、first denature及びlast extensionの時間に違いが認められたほか、denature時間を20秒から30秒に延長していた施設が4施設あった。しかし、ハンドブック条件に準拠した施設とそれ以外の施設のいずれにおいても、約半数で非典型的ピークが認められた。

さらに、非典型的ピークの発生と電気泳動条件と

の関係を検討した。サンガーシーケンサーとしてT社機種A、T社機種B、T社機種C、T社機種D及びH社機種を使用していた施設は、それぞれ1施設、16施設、4施設、8施設及び1施設であった(表8D)。T社機種Dでは、いずれの非典型的ピークも認められなかった。使用機種を構成する要素として、ポリマー及びキャピラリーに差が認められた。すなわち、T社機種DではPOP-1、それ以外の機種ではPOP-7が使用されていた。また、T社機種Dでは28 cm、H社機種では36 cm、それ以外の機種では50 cmのキャピラリーが使用されていた。なお、T社機種Dでは、試薬及びキャピラリーがカートリッジ式であった。また、電気泳動時のPCR産物の希釈倍率との関係を検討したところ、50倍未満に希釈していた施設及び100倍以上に希釈していた施設はいずれも14施設であり、非典型的ピークの発生率に差は認められなかった(表8E)。

本研究で実施した精度管理試験では、明らかな非典型的ピークの発生は認められなかった。ただし、1施設において全3検体について「ノイズであるかの判断に迷うピークがあり、シングルPCRをしただけで解決した」との回答があった。当該施設から電気泳動データを取り寄せて確認したところ、マルチプレックスPCR産物の電気泳動時に、他の標識蛍光のピークに伴って生じたノイズが判定を困難にしていたことが明らかとなった。

3. MLVA法の研修会の実施【2年目】

(1) 研修生の選考

22施設の地衛研及び2施設の中核市の検査機関から応募があり、全ての施設が参加要件を満たしていた。教育訓練機会の均等化を重視し、本研究班がこれまで実施してきた精度管理試験に一度も参加していない4施設のうち、3施設を研修会参加とした。残る1施設については、MLVA法導入の目的が立っていなかったため、参加対象外とした。また、前年度の精度管理試験に応募したものの選外となった4施設については、機会均等化の観点から本研修会への参加を認めた。加えて、前年度の試験において不正解であった1施設については、検査精度向上の必要が高いと判断し、参加対象とした。さらに、前年度に作成したトラブルシューティング集において事例を提供した4施設についても、MLVA法の実施に課題を抱えている可能性があると考え、参加対象とした。最終的に12施設を参加施設としたが、そのうち1施設の参加者が体調不良により参加を辞退したため、一昨年度の精度管理試験には参加したが前年度は不参加であった1施設を繰り上げて参加対象とした。

(2) 研修会の実施

研修会は予定どおり実施されたが、実習の一部でトラブルが発生した(表3A)。2日目は、PCR産物の電気泳動まで大きな問題なく進行した。しかし、3日目に電気泳動データをGeneMapperで解析した際(区分:実習④)、大半のデータで図6に示すようなトラブルが認められた。すなわち、遺伝子増幅産物及びサイズスタンダードを含むほぼ全てのピークの根元に小さなピークが出現し、GeneMapper上でSQ(Size Quality)がエラーと判定された。SQエラーとなったデータは自動サイジングが行われないうえ、サイズスタンダードの手動補正が必要となり、

解析作業の進行に支障を来した。本実習では、Panel及びBinファイルのインポート、ピークのサイジング、Binの修正、電気泳動データの解析、さらにトラブル事例由来データの解釈を行う予定であった。しかし、上述のトラブルにより、トラブル事例由来データの解釈には至らず、他の項目についても一部短縮せざるを得なかった。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全て解説を行ったが(区分:実習⑤)、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」及び「その他」の4つに大別された。なお、GeneMapperによる解析(区分:実習④)でのトラブルの影響もあり、研修会の終了は予定より30分遅延した。

研修会終了後、以下の対応を行った。まず、GeneMapper実習(表3A、区分:実習④)で扱えなかった内容へのフォローとして、実習で使用予定であったデータ及び模範回答を各研修生に送付し、必要に応じて質問も受け付けた。次に、サンガーシーケンサーのメーカー担当者に協力を依頼し、研修後にトラブルシューティングを実施したが、現時点では明確な原因は特定されていない。当初は、研修で使用したシーケンサーがキャピラリー及びバッファー一体型のカートリッジ式であったことから、カートリッジ自体の異常も疑われた。しかし、メーカーにカートリッジを返却して解析を依頼したところ、異常は確認されなかった。そこで、サンプル又はバッファーに装着したセプターの汚染が原因である可能性を考え、洗浄後のセプターで再解析を行ったが、現象の改善は認められなかった。

(3) アンケートによる評価

研修生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、「時期」及び「Zoom!による講義視聴環境」について90%以上が肯定的に評価した(図7、表3A)。一方、開催時期の変更を希望した1名は、自由記述欄に「年度後半の開催では、参加後に異動により担当者が変わる可能性があるため」と記載していた。また、「時期は適切」と回答した参加者からも、「MLVA法の新任者として業務を始め、疑問や課題が生じ始めた夏頃の開催でも良かった」との意見があった。「日数」については、4名が「短い」と回答し、3名が「カリキュラムの変更」を要望した。これら7名のうち6名は、自由記述欄で「GeneMapperによるデータ解析(区分:実習④)等の実習時間が不足している」と回答した。残る1名からは、「MLVA法の結果を保健所へ適切に説明する方法など、結果の活用方法に関する講義を加えてほしい」との要望があった。

各講義・実習に対する評価では、全ての講義及び実習において、「理解度」及び「業務への活用」について「理解できた」以上の回答が100%、又はほぼ100%であった(表3A、図8A、B)。一方、「内容の量」及び「進行速度」に関しては、GeneMapperによる解析(区分:実習④)について半数以上の研修生が「少なすぎる」及び「早すぎる」と回答した。事前に募った質問等への回答(区分:実習⑤)についても、一定数の研修生が同様に「少なすぎる」及び「早すぎる」と回答した(表3A、図8C、D)。これら以

外の講義・実習では、「内容の量」及び「進行速度」は「適切」との回答が100%、又はほぼ100%であった。自由記述欄では、GeneMapperによる解析(区分:実習④)について10名の研修生から意見が寄せられ、そのうち8件は「解析時間が足りない」とする内容であった。このことから、選択式回答における「内容が少なすぎる」及び「進行速度が早すぎる」は、「実習内容が多い一方で、作業時間が不足していた」ことを反映したものと考えられた。事前に募った質問等への回答(区分:実習⑤)についても、終了時刻の遅れに伴い進行を早めざるを得なかったことから、選択式回答は同様に「内容に対して時間が短かった」ことを示すものと考えられた。また、MLVA法におけるトラブルシューティング(区分:講義⑤)については、「実際のトラブル事例への対応を実習に加えてほしい」との意見があった。トラブル事例への対応はGeneMapper実習(区分:実習④)内で扱う予定であったが、時間不足のため実施できなかった。その他の講義・実習についても複数の要望が寄せられ、講師にフィードバックした。

(4) 落選者へのフォロー対応

録画した講義については、編集後に動画配信サイトへのアップロードを試みたが、令和7年度から感染研が新機構へ移行することに伴い、同サイトのURLが変更される可能性があることが判明した。そのため、動画の配信は令和7年度以降に延期された。現在、令和7年5月から7月までの期間での配信を予定している。なお、講義資料については令和7年3月中に落選者へ送付した。

4. 改良版 MLVA 法の研修会の実施【3年目】

(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、応募時に2施設から講義のみの参加希望があったため、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を合わせた計31名が受講した(表3B)。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④-1及び④-2)において進行の遅れが認められた。そこで、GeneMapperによるMLVA法データの解析(3)(区分:実習④-3)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ことから、未実施であっても習得効果への影響は小さいと判断し、本実習は取りやめた。

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⑤)、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9)。「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10A、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10C、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3)。

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。

5. *in silico* MLVA 法による分離能の評価

【3 年目】

(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法の実施及び分離能評価

本研究の*in silico* MLVA法と既報⁷⁾との間で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9)。一方、O165では、MLVA17で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⁷⁾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10A)。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において増幅ありと判定する一致率を90%とした場合、これらの欠損率はいずれも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4塩基の不一致が認められた(表11)。

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⁷⁾における欠損率が0%であるのに対し、本研究では61%~100%と高値を示した(表10B)。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11)。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%と低値を示した。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11)。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、欠損率は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⁷⁾より低値を示したことから、*in silico* MLVAの結果に基づいてMSTを作成し、分解能の詳細を検討した(図11)。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。

6. トラブルシューティング集の作成及び改訂

【1～3 年目】

前研究班及び本研究班の精度管理試験で把握したトラブル事例を、大分類(トラブルの種類、例:「ピークが出ない」、「Bin にピークが入らない」)及び小分類・原因(例:「電気泳動時の PCR 産物の添加ミス」、「Bin ファイルの調整不足」)に基づいて分類した(図 12A)。各トラブルについては、「1. トラブル概要」、「2. トラブルの原因と解決法」及び「3. 実際の事例」の順に整理した。さらに、使用者にとって理解しやすいよう、実際の事例を挙げて解説した(図 12B)。

1 年目に作成したトラブルシューティング集には、MLVA 研修会で把握した 4 つの事例及びその解決法を追加した(図 2B、図 12A)。大分類 A「ピークが検出されない」には、小分類として「プラスミドの脱落により TR が検出されない事例」を新たに加えた。次に、大分類 D「非典型的ピークの出現」には、小分類として「ダブルピーク等の複数ピークの判定」に加え、本研修においても確認された現象である「スタンダードピークの根元に小さなピークが立つ現象(図 6)」を追加した。この現象は、バッファーに取り付けるセプターの汚染、すなわち前の検体解析時にキャピラリーに付着したサイズスタンダードがセプター内に残留することが原因となり得る。特に、セプター内の特定のスリットが汚染されている場合には、そのスリットを経由するキャピラリーで常に同様の現象が観察されることから、原因推定の手掛かりとなる。また、新たな大分類として、E「疫学的関連性が無い菌株間での MLVA 型の一致」を追加した。

D. 考察

1. MLVA 法の精度管理試験【1 年目】

本研究班では、EHEC 菌株を用いた MLVA 法の精度管理試験を実施した結果、参加施設は全体として高い検査精度を有していた。我々が精度管理試験を実施する目的は、検査精度の把握に加え、不正解が認められた施設について検査工程上の問題点を特定し、改善法を提示することにある。前身の研究班で実施した精度管理試験において不正解の検体があった 6 施設が本試験にも参加したが、これらの施設はいずれも全検体に正解した。このことは、これまで継続して実施してきた精度管理試験が、地衛研における検査精度の向上に寄与してきた可能性を示している。一方、今回の精度管理試験では 2 施設で 1 検体以上の不正解が認められたが、1 施設は MLVA 法導入後 2 年、参加者の経験年数 1 年であり、もう 1 施設は導入年数、経験年数ともに 0 年であった。すなわち、不正解は主として経験の浅い施設で認められており、MLVA 法の地衛研への普及を進めるだけでなく、導入初期施設に対する継続的な技術支援が重要であることが示された。

本研究では、不正解が認められた施設に対して、原因に応じた改善策を提案することができた。施設 A で検体 2 及び検体 3 の回答が誤っていた原因は Bin ファイルの調整不足であったため、細菌第一部が作成した Bin ファイルの使用を推奨した。また、TR サイズは理論値と電気泳動上の実測値が一致しないこと、さらにその測定値はシーケンサー機種等の影響を受けることを説明し、各施設で Bin ファイルを設定する際には、TR 数が既知の菌株を用いて調整する必要があることを伝えた。今回誤判定が生じた領域 O157-19 では、TR 数 2-3 間の Bin 間隔が他の TR 数間より狭く、特に慎重な設定が必要である。これは、TRs=1 又は 2 を有する菌株では、他の TR 数を有する菌株とオフセット部分が異なるためであり、Bin 設定の難しさそのものが誤判定の要因となり得ることを示している。

施設 B で検体 3 が不正解となった原因は、非典型的ピークを TR として判定したことにある。そのため、4 種類の蛍光標識の波長が PET、NED、VIC、FAM の順に近接していることから、ある蛍光の強いピークに伴って波長の近い他の蛍光にノイズ様ピークが生じ得る点を説明した。さらに、このようなピークの確認にはシングル PCR による単一領域の電気泳動が有効であることを伝えた。また、血清型によってはほぼ全ての菌株で TR を持たない領域があることから^{3,13)}、血清型情報自体もノイズ判定の補助となる。実際、検体 3 の菌株は O111 であり、施設 B が TR 数 6 と回答した領域 O157-17 は、一般に O111 では TR を持たない領域とされている³⁾。このことから、MLVA 法の結果判定では、電気泳動波形のみならず、血清型などの生物学的背景情報を併せて解釈することが重要であると考えられた。

以上より、MLVA 法の精度向上には、精度管理試験の継続実施に加え、Bin 設定の標準化、非典型的ピークの判定能力の向上、及び導入初期施設への重点的支援が不可欠であると考えられた。

2. MLVA 法の特異的ピークの発生要因の特定と改善法の提言【1 年目】

本研究では、MLVA 法の電気泳動データと検査工程に関する情報を対応付けることにより、非典型的ピークの発生要因の解明を試みた。その結果、明確な単一要因を特定するには至らなかったものの、いくつかの有用な知見が得られた。まず、非典型的ピークが発生した施設は全体の約半数に及んでいたことから、その発生は検体固有の問題ではなく、検査工程に起因する可能性が高いと考えられた。また、解析対象が DNA 検体を用いた精度管理試験由来であったことから、少なくとも菌株分離や DNA 抽出以前の工程ではなく、PCR 以降の過程に要因が存在することが示唆された。次に、PCR 試薬との関係を見ると、T 社試薬 B を使用した施設では他試薬と比較して非典型的ピークの発生率が低かった。試薬 B は試薬 A の改良版であり、より特異性の高い PCR が可能とされていることから、非典型的ピークの抑制に寄与した可能性がある。ただし、本研究は観察的検討であり、試薬の差のみを単独で評価したものではないため、この点については今後の検証が必要である。また、電気泳動機器との関係では、T 社機種 D を使用した 8 施設では非典型的ピークが認められなかった。機種 D は、他機種と比較してポリマー、キャピラリー長、及び試薬供給方式が異なっていた。すなわち、機種 D では POP-1 を用い、28 cm キャピラリーを採用し、試薬及びキャピラリーがカートリッジ式である。一方、他機種では主として POP-7 及び 50 cm キャピラリーが用いられていた。しかしながら、メーカーが公開している情報には、これらの要素と非典型的ピーク発生との因果関係を直接示す知見はなく、また機種 D に特異的なノイズ低減機能の存在も示されていない。従って、機種 D で非典型的ピークが認められなかった理由は現時点では不明であり、今後の課題である。さらに、PCR 産物の希釈倍率と非典型的ピーク発生率との間に差は認められなかった。一般にサンガーシーケンサーのピーク高は PCR 産物量の影響を受ける傾向があるが、本研究の結果は、少なくとも本条件下では、非典型的ピークの発生が単純に産物量に規定されるものではないことを示している。なお、本研究班が実施した EHEC 菌株を用いた精度管理試験では、原因不明の明瞭な非典型的ピークは認められなかった。そのため、菌株分離から DNA 抽出までの工程が非典型的ピークの発生に与える影響については、今回の研究からは評価できなかった。

以上より、非典型的ピークの発生は単一の要因では説明できず、PCR 試薬、電気泳動機器、解析条件など複数の要素が関与している可能性が高いと考えられた。このことは、MLVA 法の運用において、個々の工程のみならず、検査系全体を視野に入れた標準化とトラブル対応が必要であることを示している。

3. MLVA 法の研修会の実施【2 年目】

本年度の MLVA 法研修会では、参加対象を明確に定めたことにより、ニーズの高い層に対して効果的な研修を実施することができた。講義及び実習

を通じて、全体として学習効果の高い指導が行われた一方、一部の実習では時間不足が課題として認められた。そこで、研修終了後にはデータ及び模範回答の送付などのアフターフォローを実施し、理解の補完を図った。これらの結果を踏まえ、本研究では時間配分や構成を見直し、次年度の改良版カリキュラムの構築につなげた(表3)。

研修に対する高いニーズは、全国の地衛研等から24施設の応募があったことから明らかである。参加条件として、MLVA法の実施経験が3年以内の職員を対象としたにもかかわらず、多数の応募があったことは、地衛研における人事異動が頻繁である実態を反映している⁶⁾。すなわち、MLVA法の運用を継続するためには、単発ではなく継続的な技術習得支援の仕組みが必要であることが示された。

アンケート結果では、全ての講義及び実習について「理解できた」「業務に活用できる」との評価が得られ、研修全体としては高い教育効果が確認された。一方で、GeneMapperによる解析及び事前質問への対応については、時間不足を指摘する意見が複数寄せられた。事前に収集した質問のうち、「ダブルピーク」、「Binから外れたピーク」及び「蛍光強度の低いピーク」の判定は、いずれもGeneMapperによる解析に深く関係する内容であった。また、改訂したトラブルシューティング集に収録された13事例の多くも、GeneMapperを適切に運用することで原因推定が可能なものであった。これらの結果は、地衛研等におけるMLVA法の実務では、解析ソフトの操作技術が極めて重要であることを示している。

GeneMapper実習及び事前質問への回答は、理解度及び業務への活用可能性の評価自体は高く、内容そのものには大きな問題はなかったと考えられる。課題は主として時間配分にあった。特にGeneMapper実習では、1班3名に対し1台のGeneMapper搭載PCを割り当て、交代で作業を行う体制であったため、個々の受講者が十分に操作経験を積む時間を確保しにくかった。PC台数を増やすことができれば一定の改善は期待できるが、メーカー及び感染研内からの借用により確保できた台数は最大5台に留まった。このため、ハードウェア制約を前提として、研修全体の構成を見直す必要があった。

そこで、本研究では改良版の研修会を構築した(表3)。具体的には、1日目にZoomによる講義を集中して実施し、2日目及び3日目の集合型研修では十分な実習時間を確保する構成とした。また、GeneMapper実習を「Panel及びBinのインポートとサイジング」、「Binの修正とデータ解析」、「トラブル事例への対応」の三部構成に再編し、従来2時間であった実習時間を合計5時間へと大幅に拡充した。加えて、事前質問への回答時間も30分から1時間に延長した。これらの改良は、2年目の研修で明らかとなった課題を具体的な次年度改善につなげた点で、本研究の教育的成果の一つといえる。

以上より、2年目の研修会はMLVA法の知識及び技術の習得支援として有効であったとともに、地衛研における継続的教育の必要性和、特にGeneMapper操作を中心とした実習時間確保の重

要性を明らかできた。

4. 改良版 MLVA 法の研修会の実施【3 年目】

アンケート結果から、今年度のMLVA研修会は、全体及び各講義・実習に対する評価が高く、有効性の高い研修であったことが示された。前年度の研修会では、GeneMapper実習及び質問への対応に十分な時間を確保できないという課題が残っていたが、今年度は各実習時間を延長したことにより、この課題は概ね解消した。2年目に把握された問題点を3年目の研修設計に反映し、その改善効果を確認できたことは、本研究で構築した研修体系の有効性を示すものである。

一方で、同一班に属する研修生から、前年度と同様に時間不足を訴える回答が認められた。GeneMapper実習及び事前質問への回答について、時間不足と回答した研修生が同じ班に集中していたことから、その要因として、①経験の浅い研修生が同一班に集まっていたこと、②講師用PCの操作画面を投影したスクリーンから遠い座席であったため、視認性が十分でなかったこと、の2点が考えられた。①への対策としては、研修生募集時に経験年数だけでなく、年間の実検体数なども併せて把握することで、受講者の実務レベルをより適切に評価し、班編成に反映させることが有効と考えられた。②への対策としては、講義室後方への大型モニター設置や、HDMI分配器を用いた複数画面投影により、講師の操作画面をどの座席からも視認しやすくすることが有効と考えられた。また、講師用PCがWindowsであったことから、画面拡大機能(Windowsキーと「+」及び「-」キーの同時押し)の活用も有用であった可能性がある。

このように今年度の研修会では前年度に指摘された時間配分の課題は概ね改善された一方で、受講者の経験差及び講義室環境といった新たな課題が明らかとなった。研修効果をさらに高めるためには、単に実習時間を延長するだけでなく、受講者のレベル差を踏まえた班編成及び視認性を考慮した会場設計も重要であると考えられた。以上より、改良版研修会は2年目の課題に対する有効な改善策として機能したが、今後はこれらの課題にも対応した、より精緻な研修設計が必要であると考えられた。

5. *in silico* MLVA 法による分離能の評価【3 年目】

本研究では、公開データベースに蓄積されたゲノムデータを活用し、*in silico* MLVA 法により本法の性能を評価した。その結果、得られた所見は概ね既報⁷⁾を支持するものであった一方、いくつかの新たな知見も得られた。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、遺伝子増幅ありと判定するプライマー一致率を 90%とした場合、これらの領域の欠損率はいずれも 100%となった。これは、当該領域においてフォワード又はリバースプライマーの 5' 末端側 4 bp がアセンブル配列と一致しなかったことに起因すると考えられた。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 酵素が用いられるため、

5' 末端側に数塩基の不一致が存在しても増幅が成立する可能性がある。これらのプライマーは O145 以外の血清型にも共用されていることから、O145 用に新規プライマーを設計することは一案であるものの、MLVA 法が複数血清型を同一プライマーミクスチャーで解析できる利便性を損なう可能性もある。従って、プライマーの追加又は再設計の必要性は、実菌株を用いた検証結果を踏まえて判断すべきと考えられる。

O165 では、既報⁷⁾で欠損率 0%とされているにもかかわらず、*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 領域についてみると、EH111-8 では、全菌株においてフォワード又はリバースプライマーに対応する配列が認められず、欠損率差の原因推定は困難であった。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認められた一方で、リバース側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ている可能性、あるいは本来の TR 領域がプラスミド上に存在し、その脱落が関与している可能性が考えられた。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自体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の存在が示唆された。

一方、q1720 では、既報⁷⁾では欠損率 100%とされているのに対し、本研究ではプライマー一致率 85%を基準とした場合、欠損率は 27%となり、大きく異なった。増幅ありと判定された菌株では TR 数はいずれも 1 であり、この増幅が真の TR 領域を反映しているのか、それとも非典型的な増幅産物であるのかは明らかでなかった。従って、この点についても実際の菌株を用いた実験的検証が必要である。

本研究にはいくつかの限界がある。まず、*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、解析対象菌株の多様性や収集バイアスの影響を受ける。本研究では NCBI に登録された O145 及び O165 の SRA データを網羅的に収集したが、その多くは国内の特定施設により取得されたものであり、多様性に偏りが存在する可能性は否定できない。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⁷⁾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も示唆された。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。

以上より、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 で認められた複数領域の欠損率の差異は、MLVA17 の分離能や MST 構造にも影響しており、本法の特性理解に重要な知見を与えるものである。今後、これらの知見を実菌株で検証することにより、MLVA 法の適用範囲及び解析精度に関する理解がさらに深ま

り、本法の改良及び運用最適化に資することが期待される。

6. トラブルシューティング集の作成及び改訂【1～3 年目】

1 年目に作成したトラブルシューティング集は、MLVA 法の精度管理試験で把握した実際の事例に基づいて構成されており、地衛研における検査精度向上に有用と考えられる。本資料は、精度管理試験に正解した施設のみならず、未参加施設にとっても有益である。今回不正解が認められた 2 施設の参加者はいずれも経験年数が 1 年以下であり、人事異動に伴う技術・知識の承継が依然として課題であることが示された。本資料は、事例に基づいて原因と解決法を解説しているため、経験の浅い担当者にとっても理解しやすく、日常検査の支援ツールとして有効であると考えられる。今後は、本資料を活用した研修を併せて実施することで、より効果的な知識・技術の継承が可能になると期待される。

本研究班では 2 年目から 3 年目にかけて、GeneMapper の操作や MLVA 法の解析上の課題に対応するため、研修会で把握した事例を基にトラブルシューティング集を継続的に改訂してきた。これらの資料は実技を伴わないため、技術習得という観点では実習に及ばない面があるものの、解析ソフトや機器といったハードウェア上の制約を受けずに活用できる点で、極めて実用的な教育資料である。特に、地衛研等では人事異動が頻繁に行われ、経験年数の浅い職員が担当となる状況が繰り返される⁸⁾。そのような環境では、現場で遭遇するトラブルを個人の経験として蓄積することは難しく、事例と対応策が体系的に整理された資料の意義は大きい。本トラブルシューティング集は、これまで不正解施設への個別対応に依存していた支援を、地衛研全体で共有可能な知識基盤へと転換するものである。今後、本資料を研修会と組み合わせることで、MLVA 法の検査精度向上と技術継承の双方に寄与すると考えられる。

E. 結論

EHEC菌株を用いた精度管理試験の実施により、MLVA法を適切に実施できていなかった一部施設に対して改善策を提示した。さらに、精度管理試験で得られた電気泳動データを解析することで、非典型的ピークの発生原因に関する知見を得た。加えて、MLVA法研修会の実施により、一定の学習効果を有する指導が可能となった。また、ゲノムデータベースを活用した*in silico* MLVA法により、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が得られた。最後に、精度管理試験で把握した情報を基に作成したトラブルシューティング集は、地衛研における検査精度の向上に資するコンテンツと考えられた。

F. 謝辞

本研究の遂行にあたり、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。また、研修会の実施に際し、講義動画の公開にご尽力いただきました同所 感染症危機管理研究センターの吉見逸郎先生ならびに吉松英美先生に厚く御礼申し上げます。さらに、研修会の実施におけるGeneMapperの借用に際し、サーモフィッシャーサイエンティフィック社のご厚意に深く感謝申し上げます。何より、業務ご多忙の中、精度管理試験および研修会にご参加、ご協力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) Noller AC et al. J Clin Microbiol. 2002; 41(12): 5389-5397.
- 3) Izumiya H et al. Microbiol Immunol. 2010; 54(10): 569-577.
- 4) 厚生労働省. 病原微生物検出情報. 2019; 40(5): 83-85.
- 5) 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「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究」. 2023; 43-62.
- 6) 高崎ら. 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「地方衛生研究所における感染症等による健康危機の対応体制強化に向けた研究」. 2022; 1-5.
- 7) Izumiya H et al. Jpn J Infect Dis. 2020; 73(6): 481-490.
- 8) Mellor GE et al. J Clin Microbiol. 2014; 53(2): 579-586.
- 9) Karch H et al. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2043-2049.
- 10) Iguchi A et al. J Clin Microbiol. 2015; 53(8): 2427-2432.
- 11) Scheut F et al. J Clin Microbiol. 2012; 50(9): 2951-2963.

- 12) 秋田ら. 腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック (O157、O26、O111編)第一版(Ver1.2). 2018; 1-3.
- 13) 国立感染症研究所 細菌第一部. 参考資料: 腸管出血性大腸菌感染症調査のためのMLVA法の活用(MLVAの説明、効果、意義、精度等). 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会, 2019年3月13日.

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

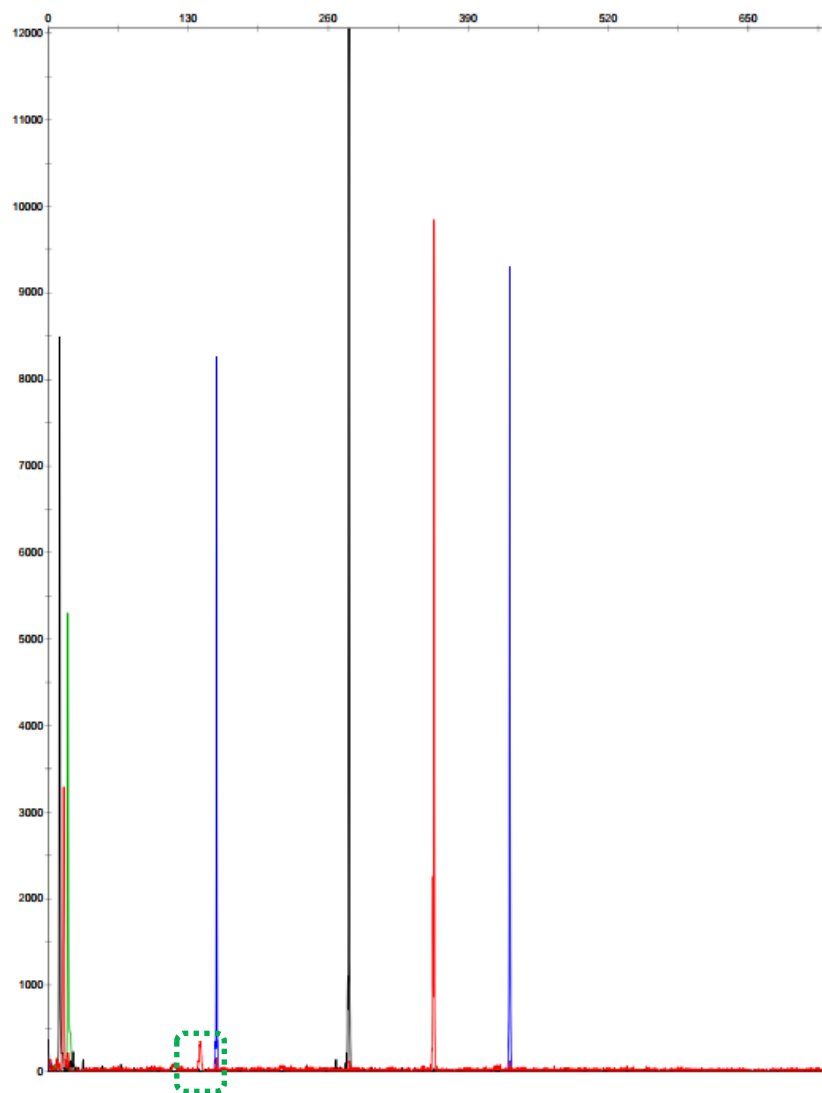
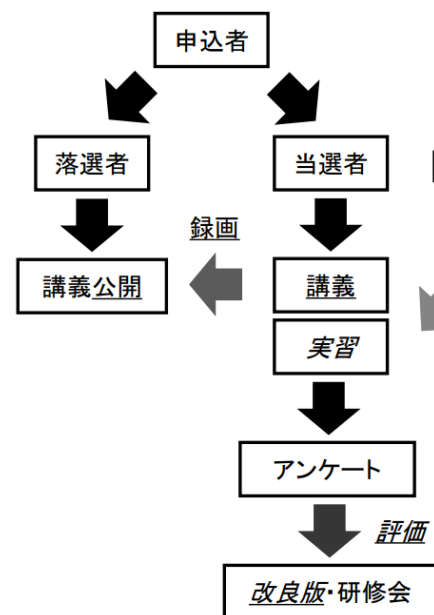


図 1 前身の研究班で実施した反復配列多型解析 (MLVA) 法の精度管理試験において解決できなかった非典型的ピーク

(A)研修会の概要



(B)トラブルシューティング集の改訂

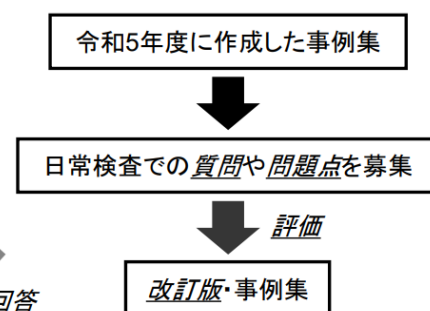


図2 2年目の実施概要

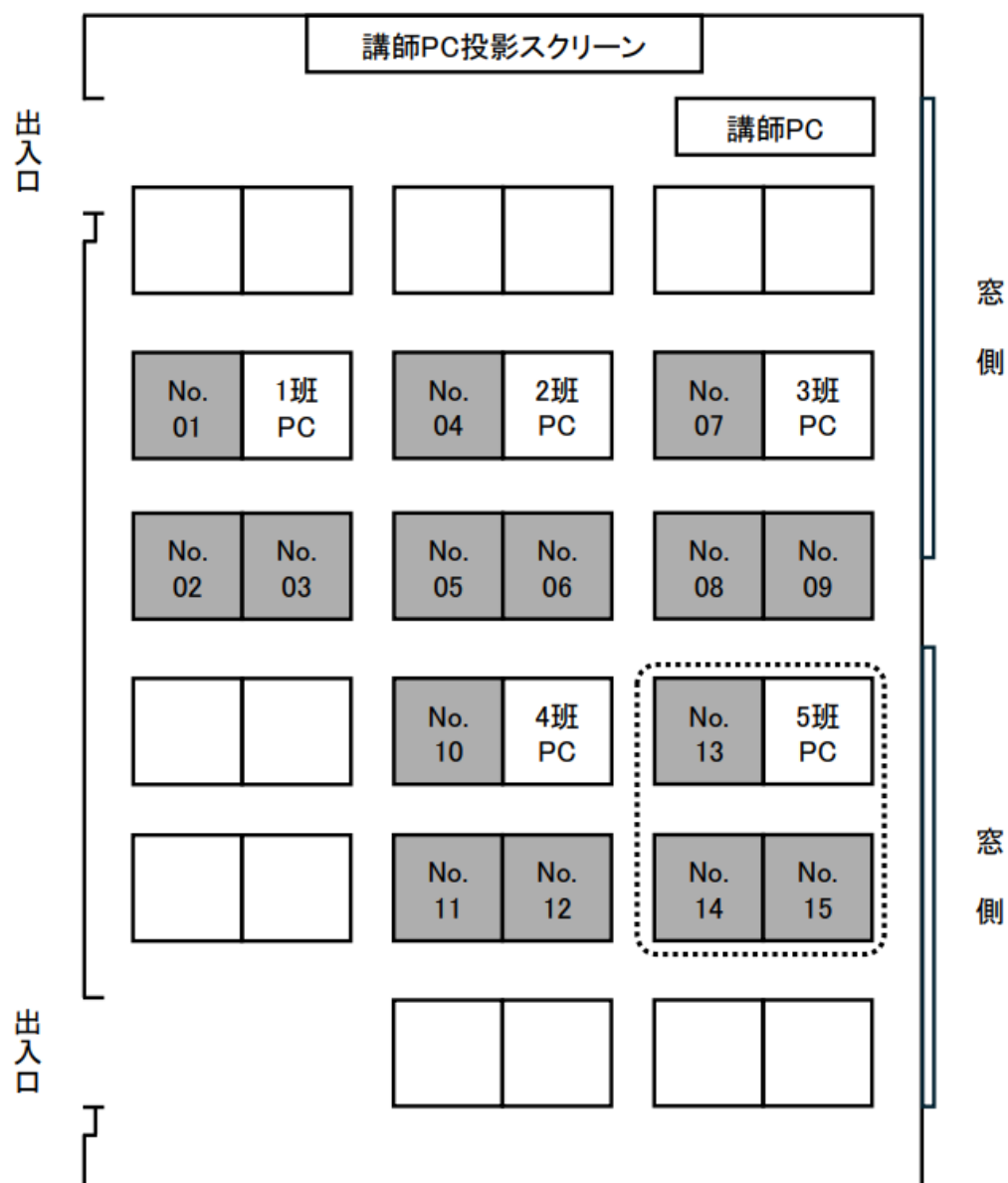


図3 3年目に実施したMLVA法研修会における講義室内の班配置および研修生の位置
No.は研修生の番号を示し、No. 01-03が1班、No. 04-06が2班、No. 07-09が3班、No. 10-12が4班、No. 13-15が5班の研修生。

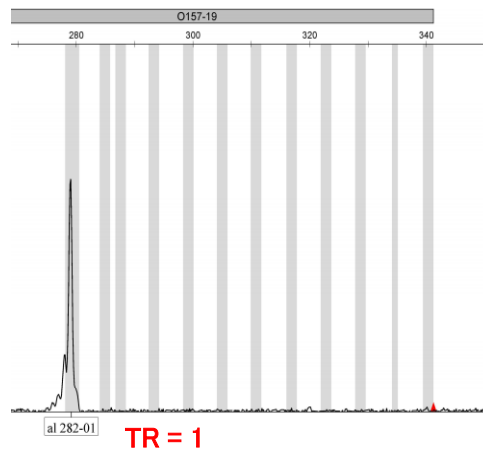
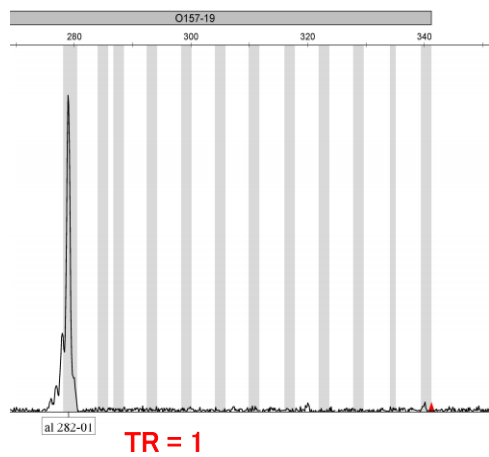
(A)施設 A

Bin ファイル

検体 2

検体 3

細菌第一部作成



施設 A が使用

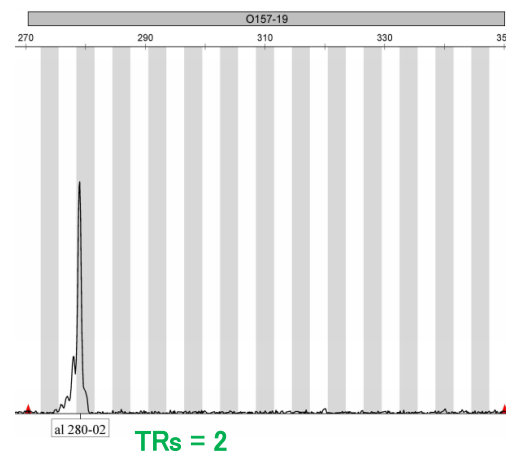
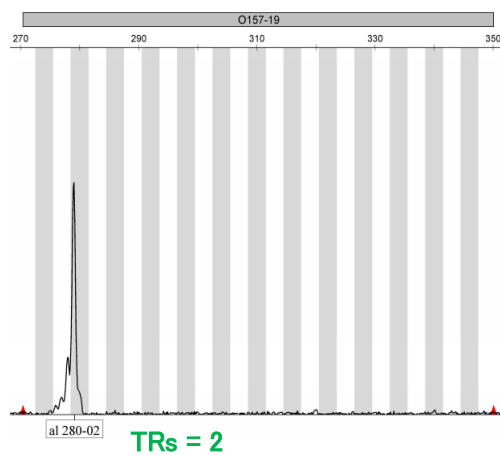


図 4 MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(B)施設 B

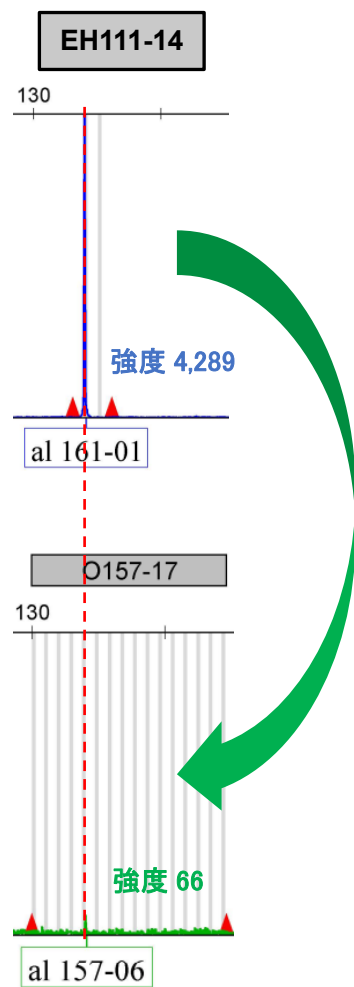


図 4(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(A) 非典型的ピーク 2 の例

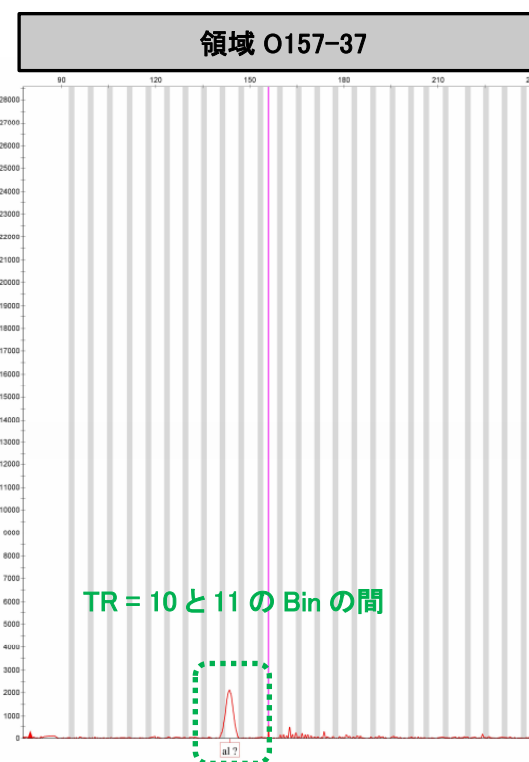
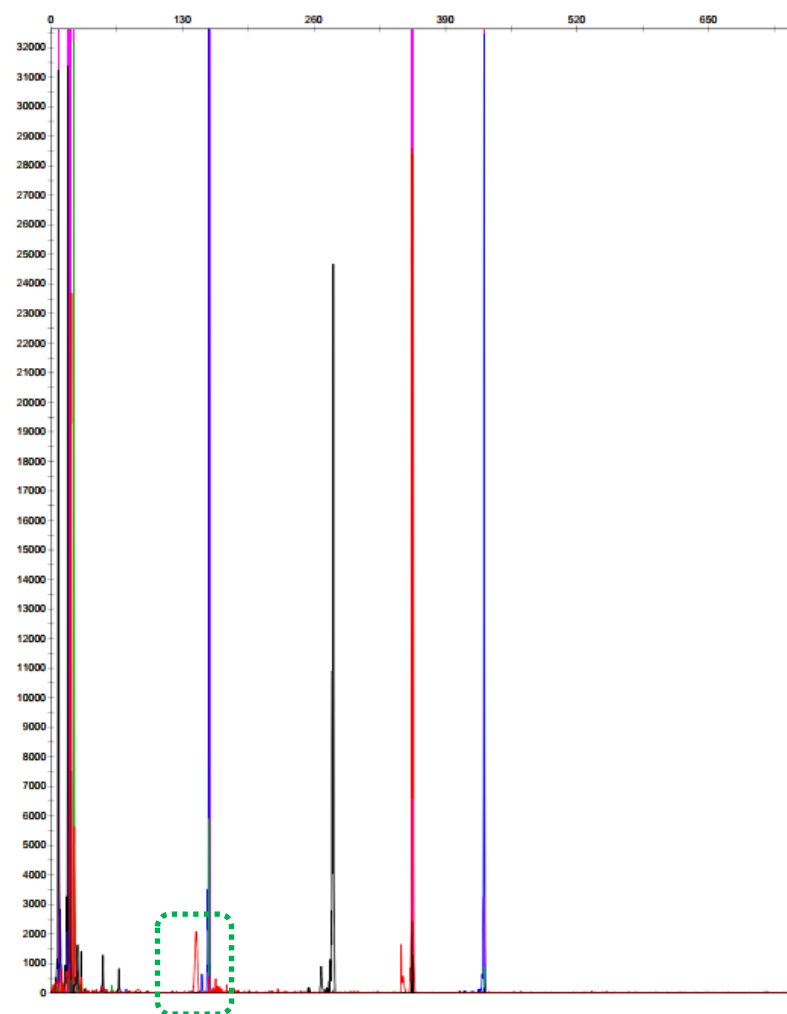


図 5 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

(B) 非典型的ピーク 3 の例

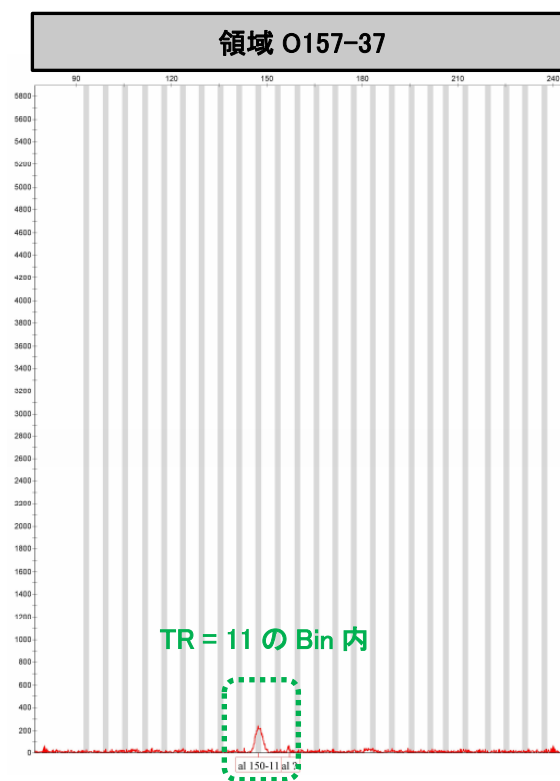
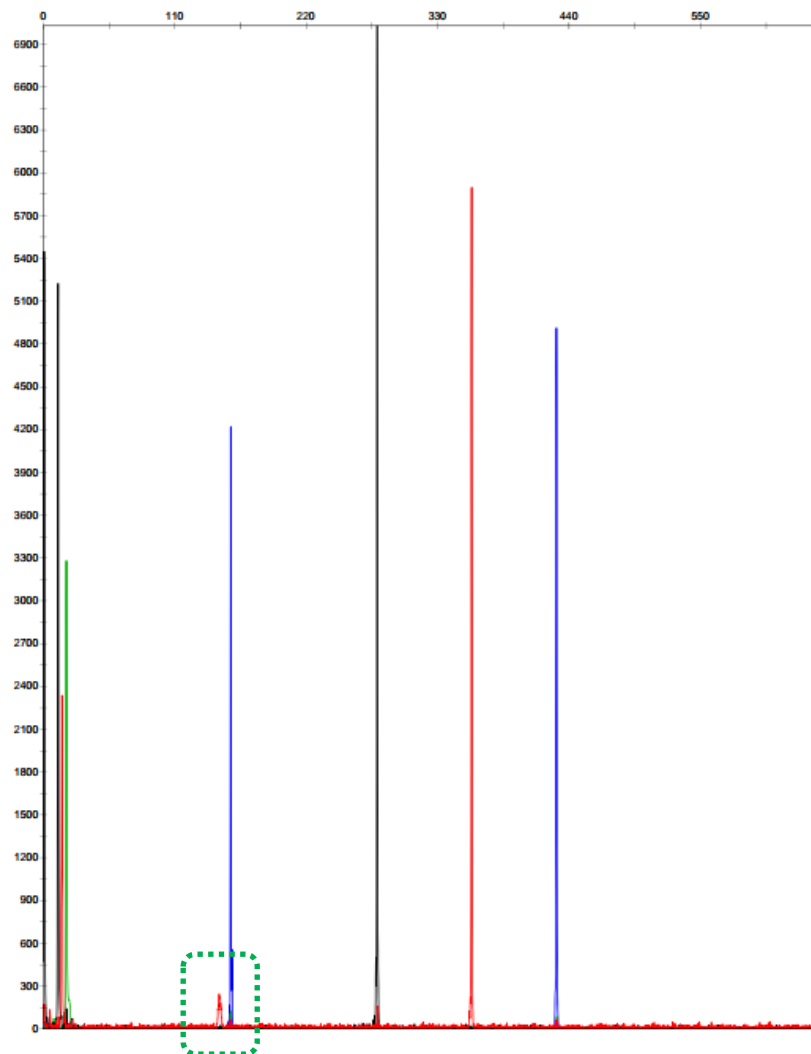


図 5(続き) 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

(C) 非典型的ピーク 4 の例

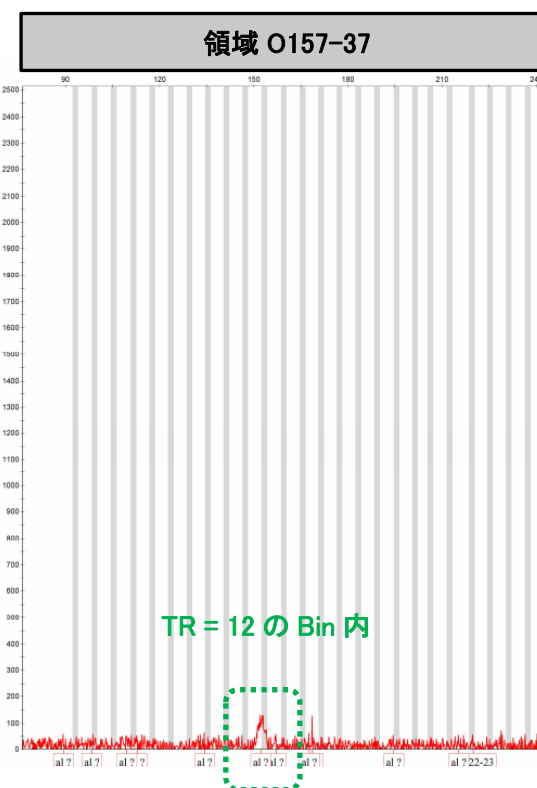
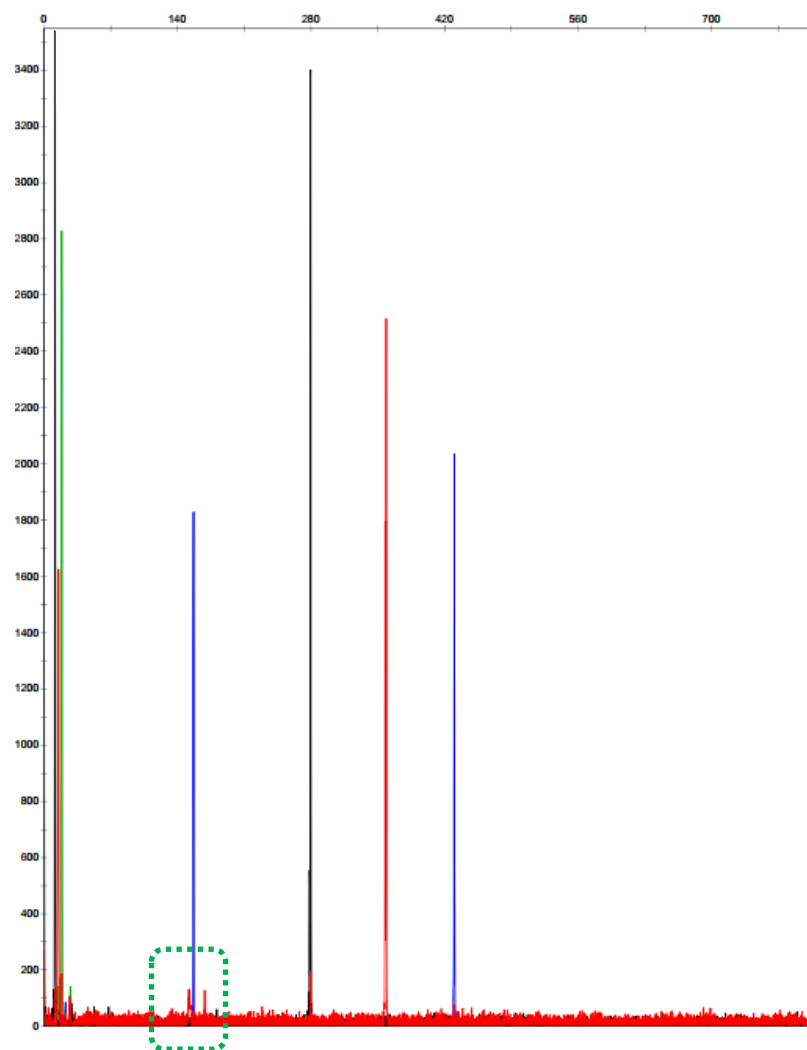


図 5(続き) 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

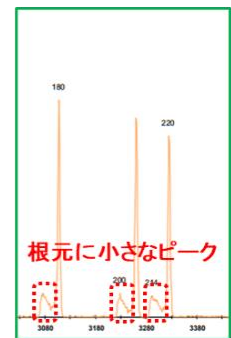
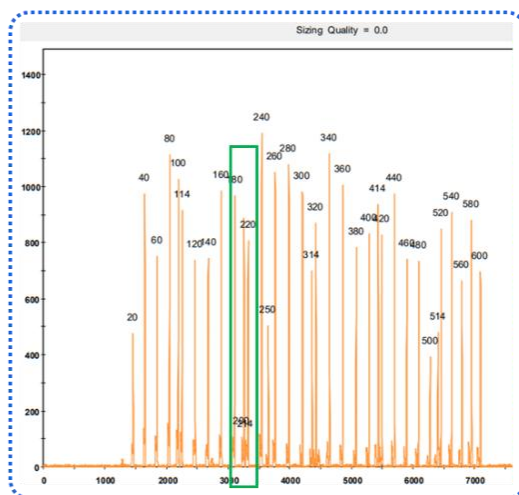


図 6 2 年目に実施した MLVA 研修会で発生したトラブル

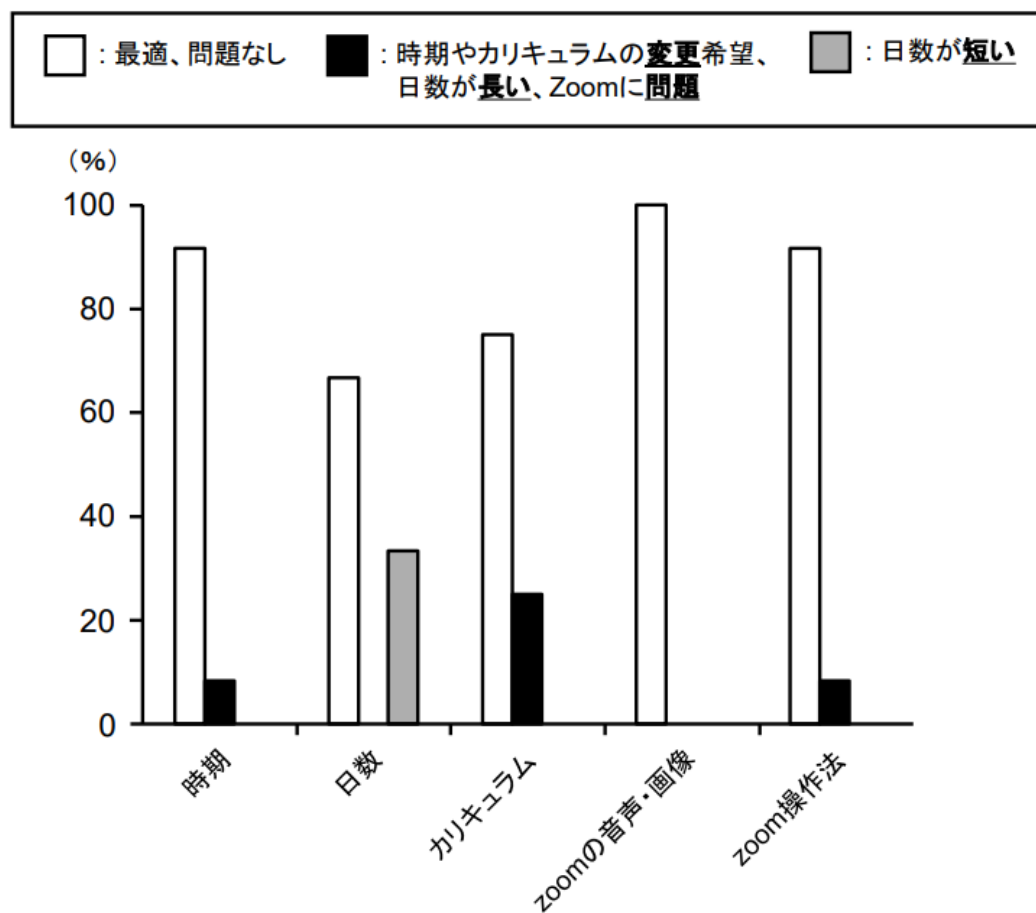
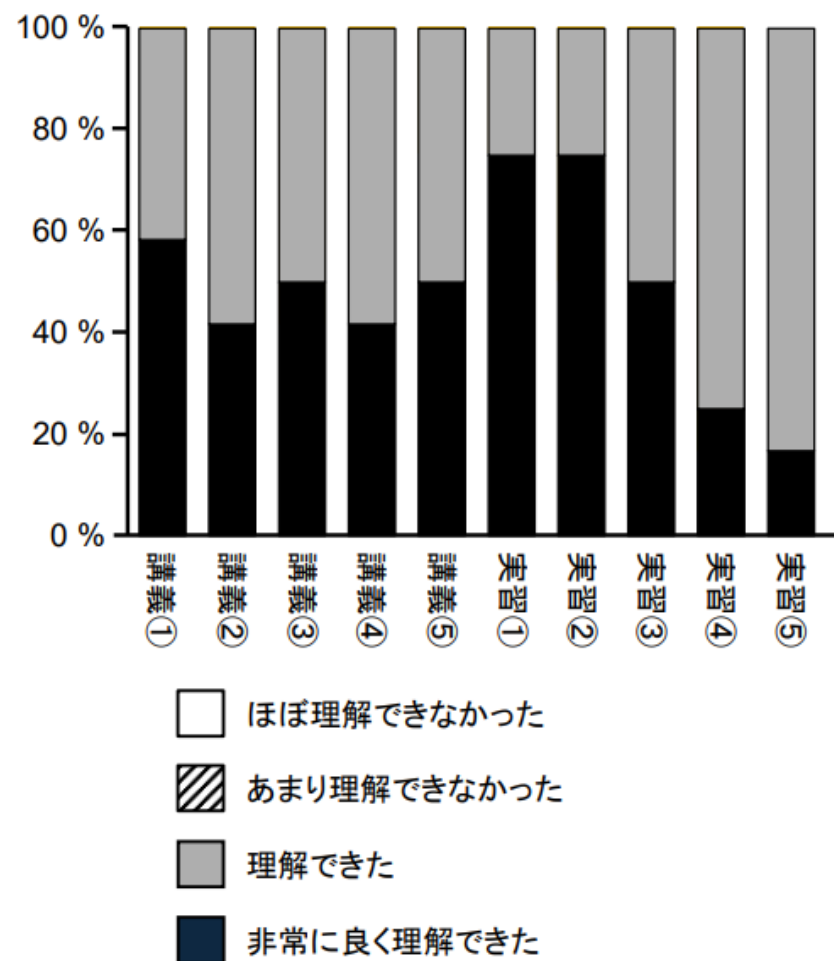


図 7 2 年目に実施した MLVA 法研修会全体における評価

(A)理解度



(B)業務への活用

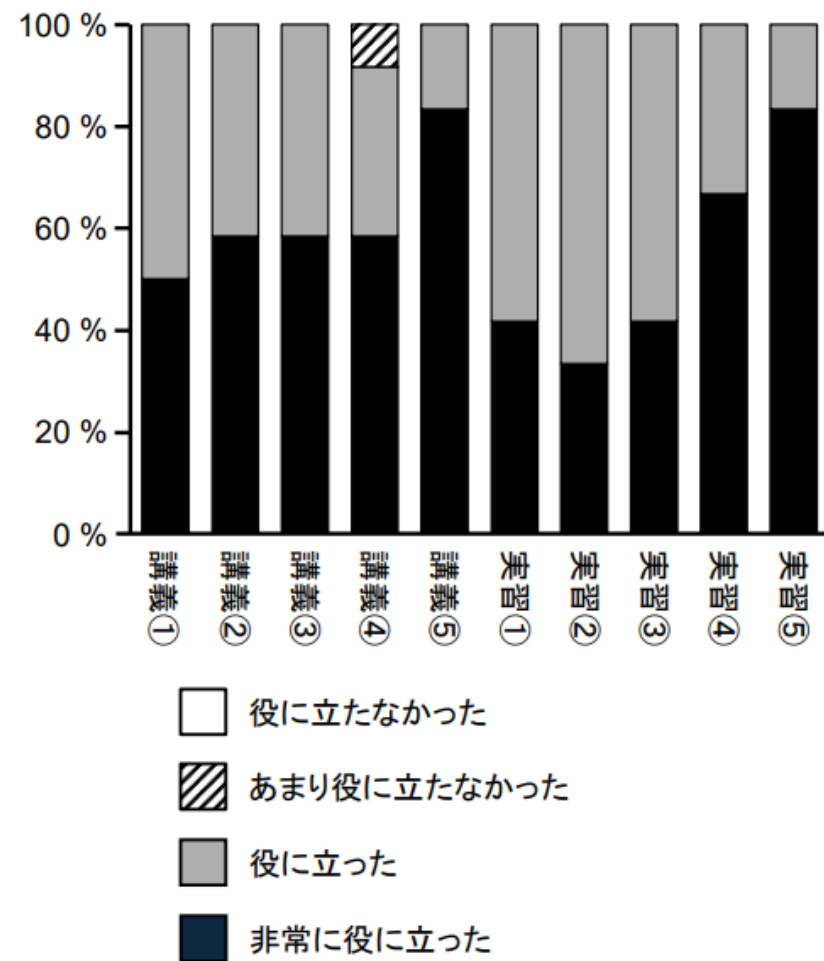
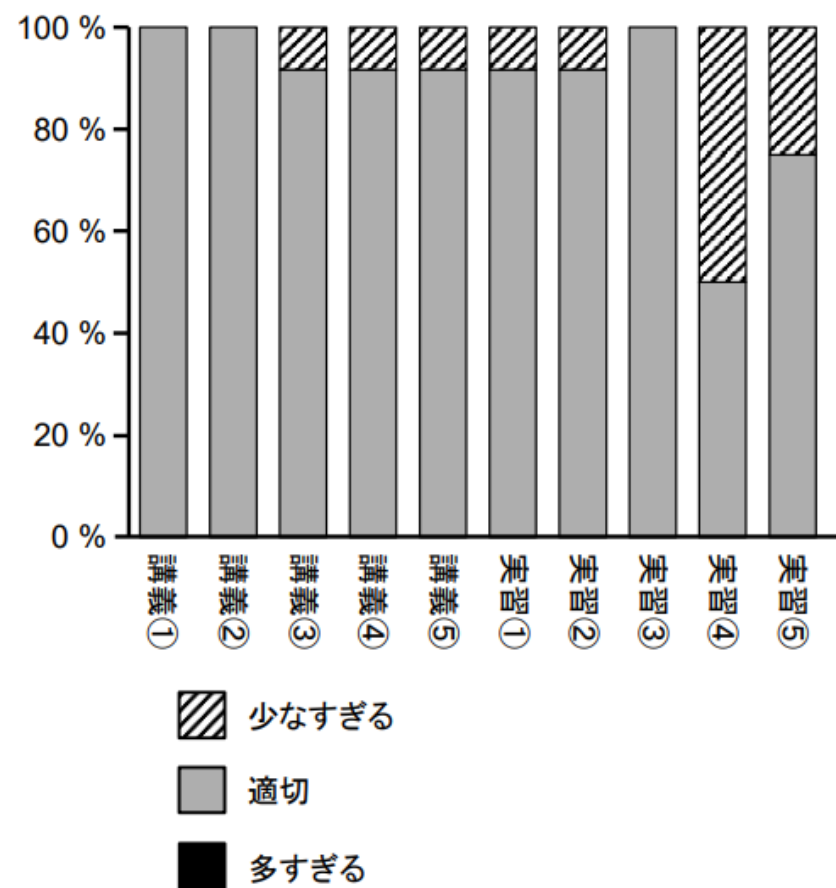


図8 2年目に実施したMLVA法研修会における各講義・実習の評価
横軸に記載されている各棒の下項目は表3(A)の区分に該当する。

(C) 講義・実習の量



(D) 講義・実習の速度

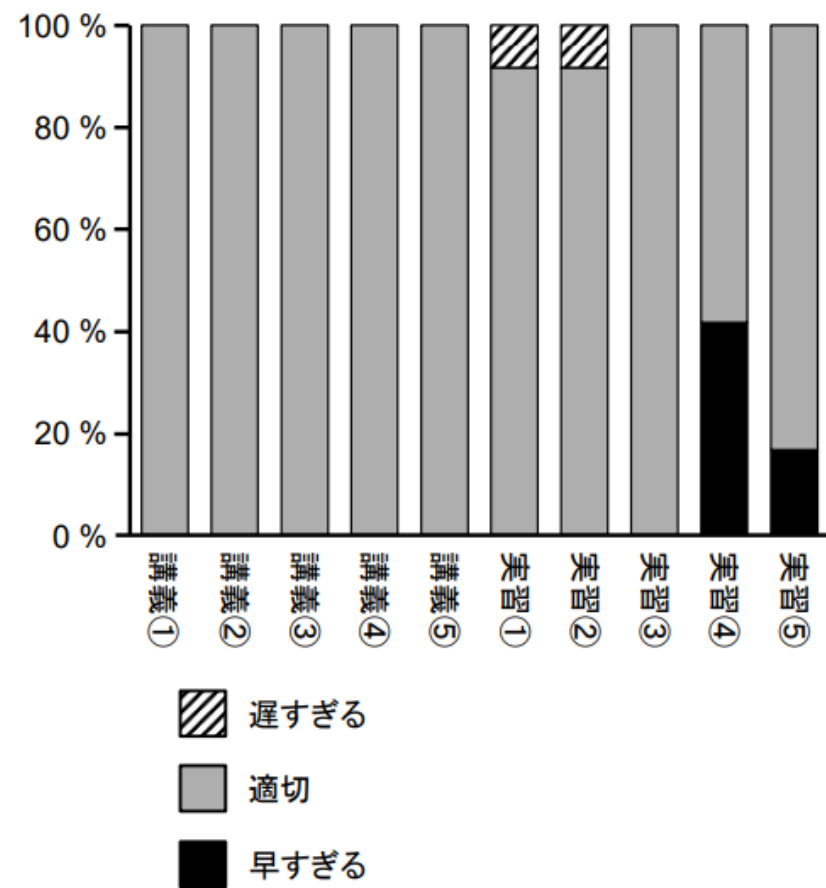


図 8(続き) 2 年目に実施した MLVA 法研修会における各講義・実習の評価
横軸に記載されている各棒の下の項目は表 3 (A)の区分に該当する。

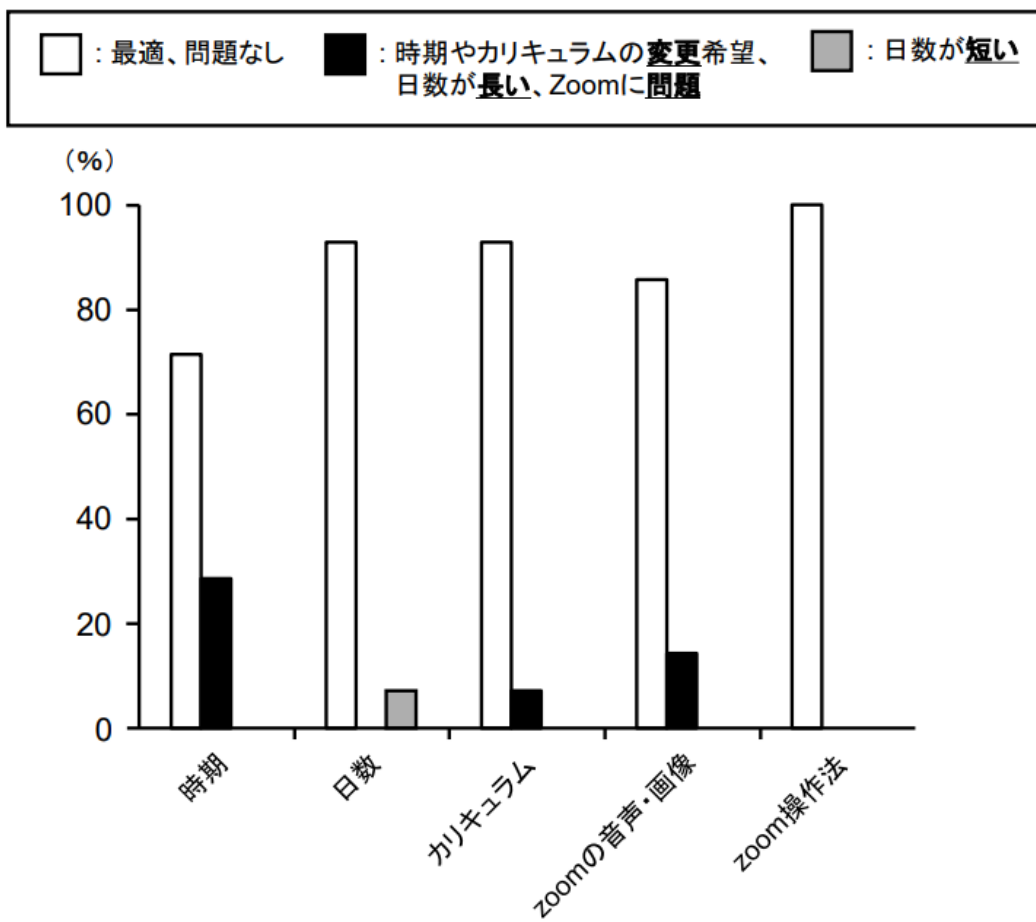
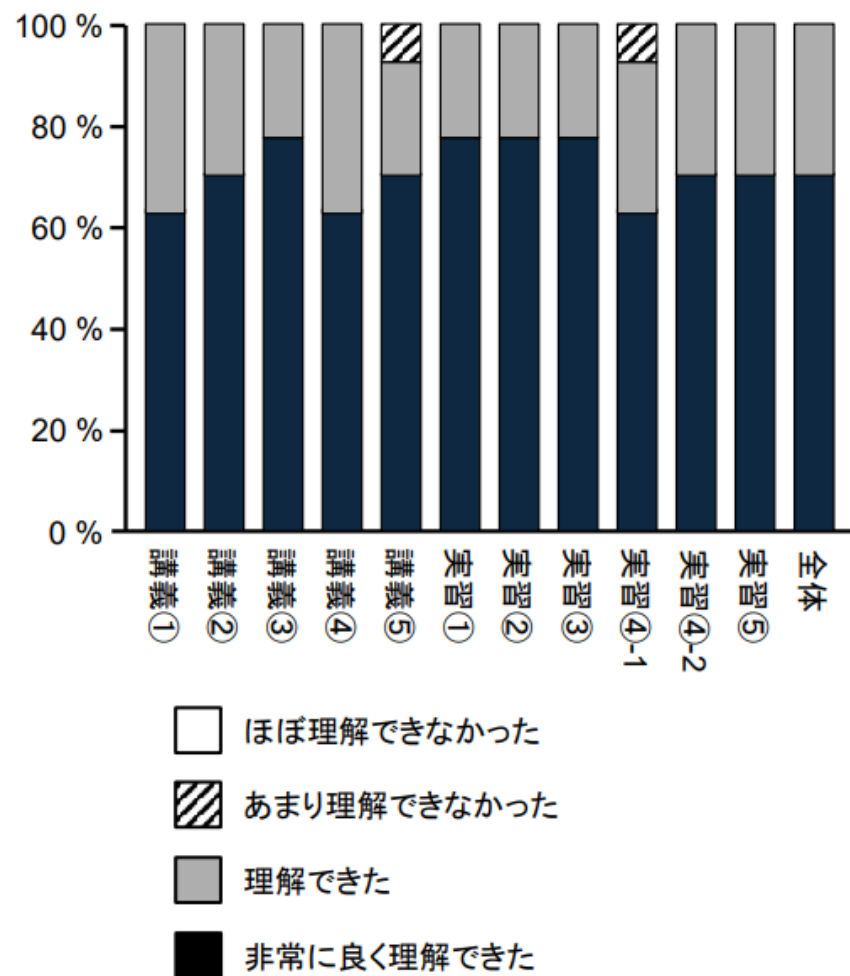


図 9 3 年目に実施した MLVA 法研修会における各講義・実習の評価

(A)理解度



(B)業務への活用

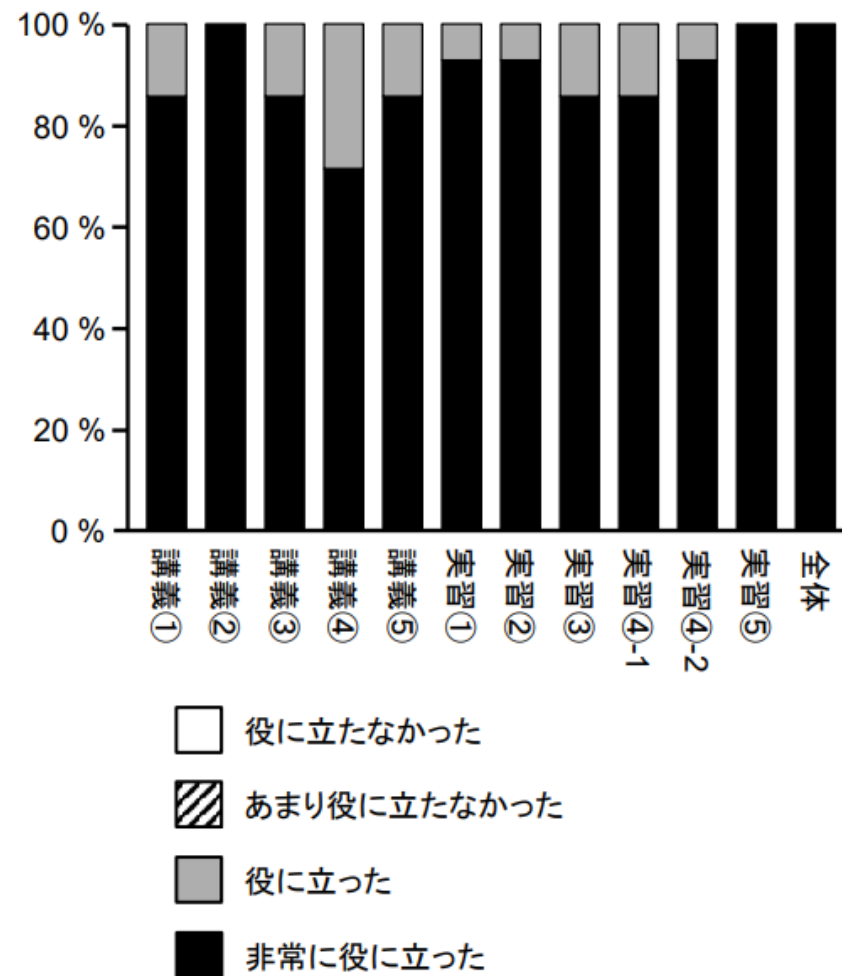
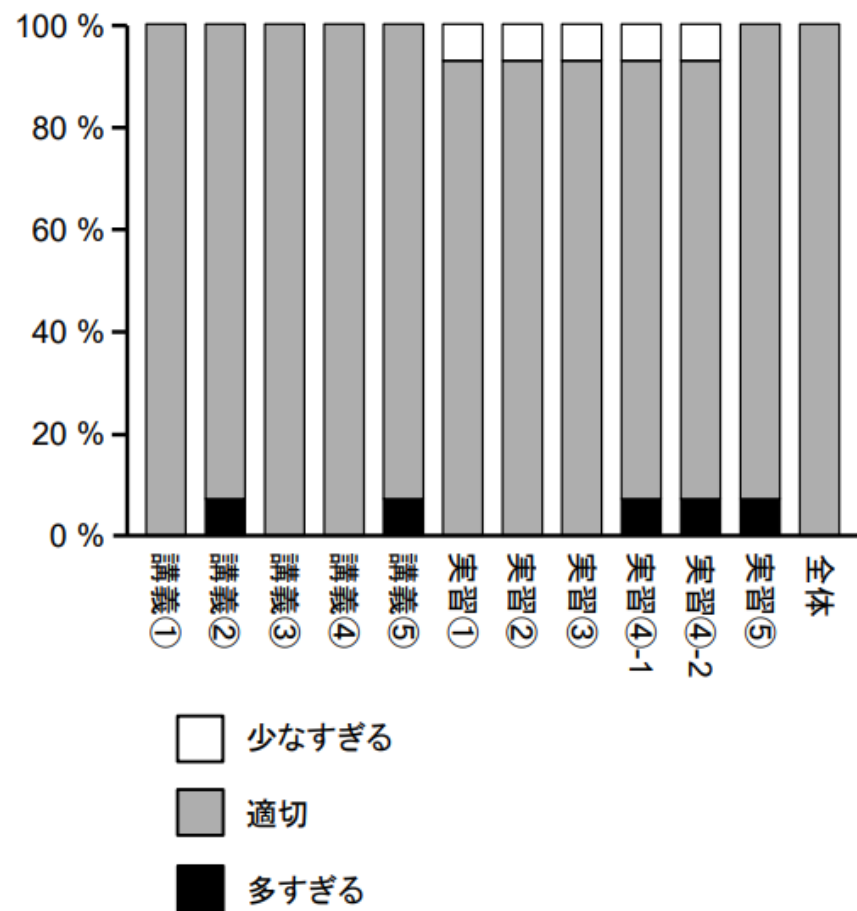


図 10 3 年目に実施した MLVA 法研修会における各講義・実習の評価
横軸に記載されている各棒の下の項目は表 3 (B)の区分に該当する。

(C) 講義・実習の量



(D) 講義・実習の速度

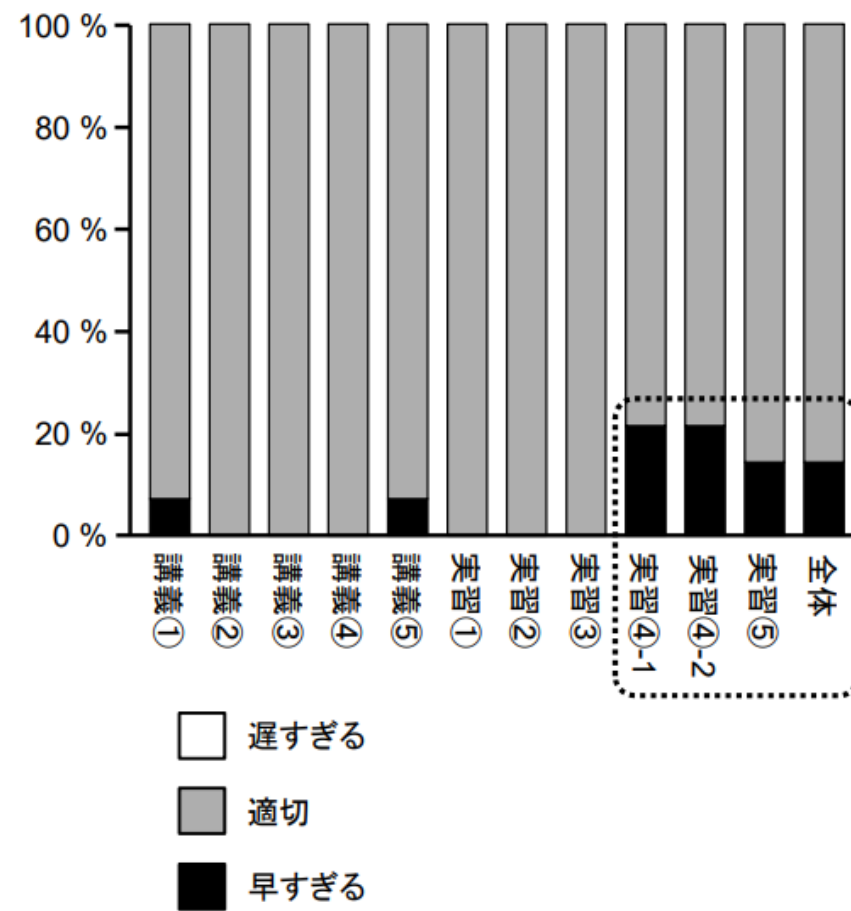
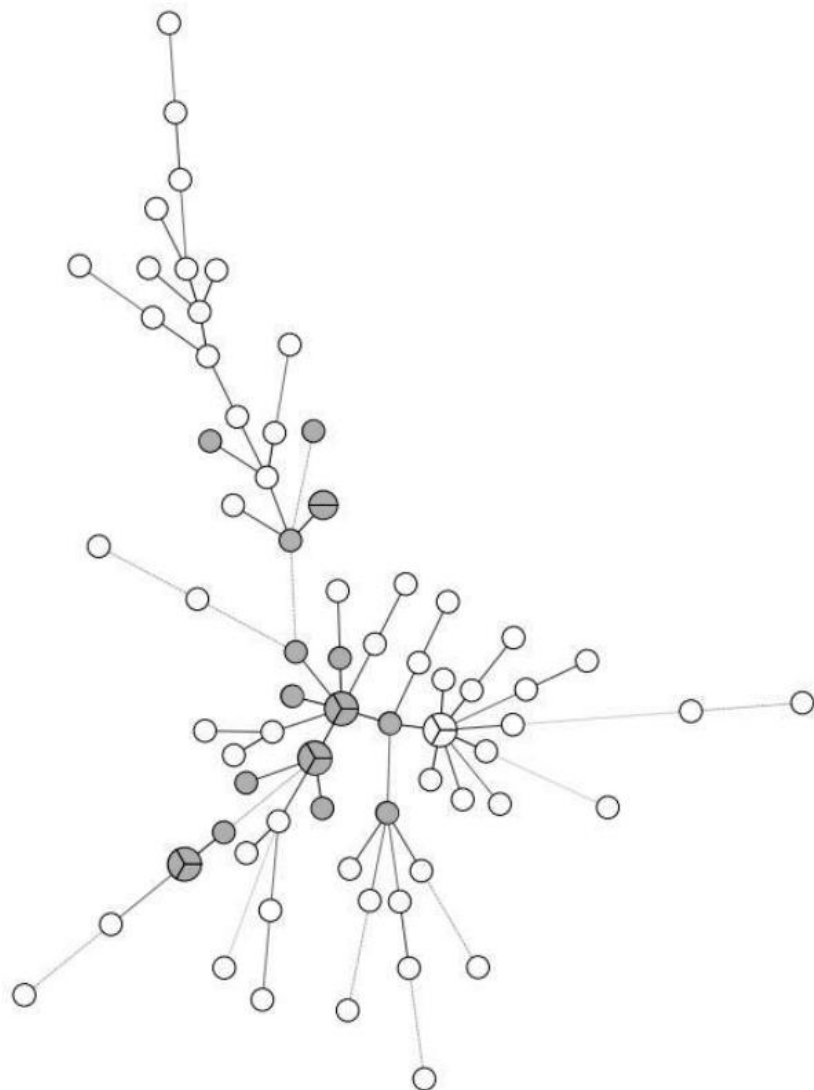


図 10(続き) 3 年目に実施した MLVA 法研修会における各講義・実習の評価
横軸に記載されている各棒の下は表 3 (B)の区分に該当する。

(A) MLVA43



(B) MLVA17

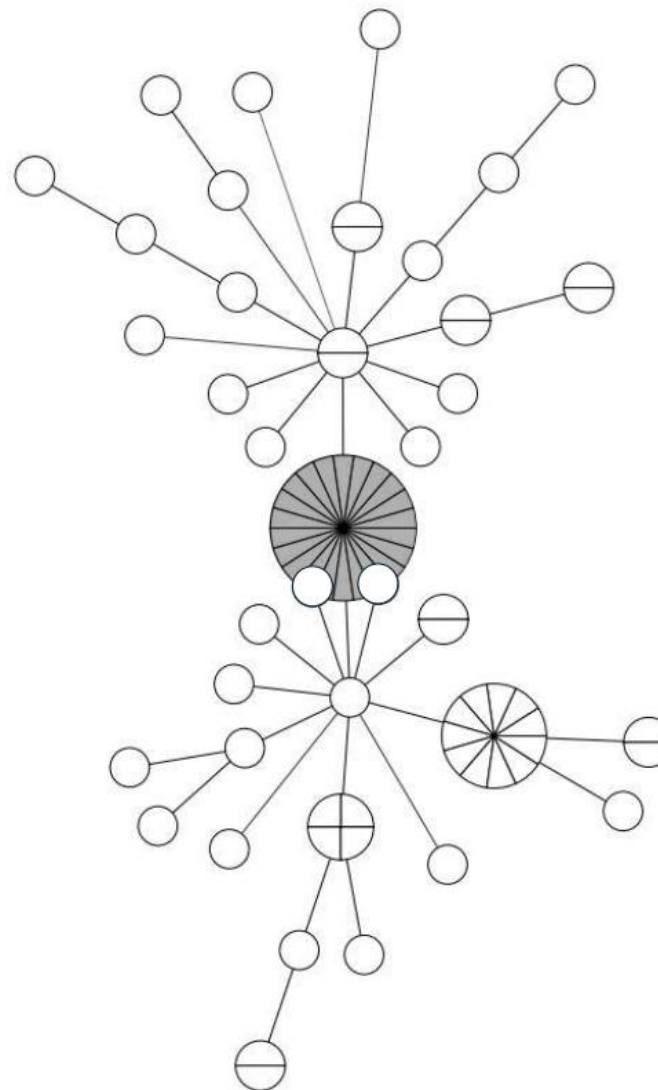


図 11 O165 の *in silico* MLVA の結果を基に作成した minimum spanning tree
灰色は MLVA17 で最も大きな node に含まれる菌株と、MLVA43 における各菌株の node を示した。

(A) 目次

目次

A : ピークが検出されない

- 1 : 電気泳動時のPCR産物の添加ミス/ PCRミクスチャーへの蛍光標識プライマーの添加ミス
- 2 : PCRの失敗
- 3 : プラスミドの脱落

B : Binにピークが入らない

- 1 : Binファイルの調整不足
- 2 : 電気泳動での移動度の変化
- 3 : タンデムリピート(TR)領域のインデル
- 4 : テイルドプライマーの使用

C : 一部のピークが低い

- 1 : プライマーミクスチャーの状態が悪い

D : 非典型的ピークの出現

- 1 : 他の蛍光標識の影響
- 2 : 原因不明
- 3 : 複数ピークの判断
- 4 : スタンダードピークが割れる

E : 疫学的関連性がない菌株間でのMLVA型の一致

- 1 : 蔓延菌株

図 12 トラブルシューティング集の一部

(B) の赤点線は改訂版で追加された事例。

(B)トラブル事例の解説の例



図 12(続き) トラブルシューティング集の一部

表1 本研究の各年における実施内容

年度	主な実施内容	主な目的
1年目	・菌株検体を用いたMLVA法の精度管理試験 ・非典型的ピークの要因解析 ・トラブルシューティング集の作成	・地方衛生研究所におけるMLVA法の検査精度の把握と課題抽出 ・MLVA法の知識面における支援ツールの開発
2年目	・MLVA法研修会の実施 ・トラブルシューティング集の改訂	・MLVA法の知識・技術の習得支援 ・MLVA法の知識面における支援ツールの拡充
3年目	・改良版研修会の実施 ・<i>in silico</i> MLVA解析 ・トラブルシューティング集の改訂	・MLVA法の研修内容の改良 ・MLVA法自体の性能評価 ・MLVA法の知識面における支援ツールの拡充

表2 本研究で用いたEHEC菌株のMLVA法におけるTRパターン

検体	血清型	MLVA 法の各遺伝子領域における TR 数																
		EH 111 -11	EH 111 -14	EH 111 -8	EH 157 -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
1	O157	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	5	4	7	9	6
2	O26	2	1	1	2	3	9	16	2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2
3	O111	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	-2	1	-2	9

表 3 2 年目及び 3 年目の MLVA 法研修会のカリキュラム

(A)2 年目

1 日目 : Zoom

時間	区分	題名	内容
13:00-13:05 (5 分)	その他	開会挨拶	-
13:05-13:30 (30 分)	その他	オリエンテーション	-
13:30-15:00 (1 時間 30 分)	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
15:00-15:15 (15 分)	その他	休憩	-
15:15-16:15 (1 時間)	講義②	EHEC O157、O26、O111 の MLVA 法	MLVA 総論・各論

2 日目 : 集合

時間	区分	題名	内容
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	DNA 抽出にキレックス樹脂を利用
11:00-12:00 (1 時間)	実習②	PCR 反応	異なるメーカーのマルチプレックス PCR 酵素を使用して比較
12:00-13:00 (1 時間)	その他	休憩	-
<u>13:00-14:00 (1 時間)</u>	<u>講義③</u>	<u>MLVA 法の異同判定^a</u>	<u>MLVA 法の結果の解釈</u>
<u>14:00-14:30 (30 分)</u>	<u>講義④</u>	<u>MLVA 法で使用する代替・解析ツールの紹介^a</u>	<u>MLVA 法のツールの紹介</u>
<u>14:30-15:00 (30 分)</u>	<u>講義⑤</u>	<u>MLVA 法におけるトラブルシューティング^a</u>	<u>MLVA 法でのトラブルと解説法</u>

^a (A)の集合型から(B)の Zoom での講義に変更。下線で表記。

表 3(続き) 2 年目及び 3 年目の MLVA 法研修会のカリキュラム

(A)(続き)2 年目

2 日目:集合

時間	区分	題名	内容
15:00-15:20(20 分)	その他	休憩	-
15:20-16:00(40 分)	実習③	PCR 産物の電気泳動	SeqStudio を使用
16:00-16:30(30 分)	その他	質疑応答	-

3 日目:集合

時間	区分	題名	内容
<u>10:00-12:00(2 時間)</u>	<u>実習④</u>	<u>GeneMapper による MLVA 法データの解析^b</u>	<u>Panel 及び Bin のインポート/ サイジング/ Bin の修正/ データの解析/ トラブル事例への対応</u>
<i>12:00-12:30(30 分)</i>	<i>実習⑤</i>	<i>事前に募集した質問や問題点へ回答^c</i>	<i>日常検査での疑問点を募集</i>

^b (B)では、3 つに分割し、合計 2 時間から 5 時間に増加。二重下線で表記。

^c (B)では、時間を 1 時間に増加。斜字で表記。

表 3(続き) 2 年目及び 3 年目の MLVA 法研修会のカリキュラム

(B)3 年目

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 3(続き) 2 年目及び 3 年目の MLVA 法研修会のカリキュラム

(B)(続き)3 年目

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④-1	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③	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④-2	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④-3	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⑤	事前に募集した質問や問題点へ回答	1 時間に増加

表4 MLVA法の精度管理試験への申込み状況

支部 ^a	施設 総数 ^b	申込 施設数	申込率(%)
北海道・東北・新潟地区	11	8	72.7
関東・甲・信・静地区	17	15	88.2
東海・北陸地区	7	5	71.4
近畿地区	9	6	66.7
中国・四国地区	11	7	63.6
九州地区	11	8	72.7
全国	66	49	74.2

^a 地方衛生研究所全国協議会の支部。

^b 地方衛生研究所(地衛研)の総数。つまり、都道府県及び政令市の施設数を示す。

表5 MLVA法の精度管理試験の参加施設

支部	受験 施設数	選定条件			受験率(%) ^d
		過去試験に 未参加 ^a	過去試験で 不正解 ^b	導入歴・ 経験年数 ^c	
北海道・東北・新潟地区	2	1	0	1	18.2
関東・甲・信・静地区	7	4	3	0	41.2
東海・北陸地区	2	1	1	0	28.6
近畿地区	3	2	0	1	33.3
中国・四国地区	2	1	1	0	18.2
九州地区	5	1	1	3	45.5
全国	21	10	6	5	31.8

^a 前研究班で実施した精度管理試験に未参加であるために選ばれた施設数。

^b 前研究班で実施した精度管理試験で不正解の検体があったために選ばれた施設数。

^c MLVA法の導入歴が2年以下、または参加希望者の経験年数が1年未満だったために選ばれた施設数。

^d 表2の施設総数に対する受験施設数の割合。

表6 MLVA法の精度管理試験の回答における正解、不正解及び保留の内訳

支部	受験 施設数	正解 施設数	不正解 施設数	不正解施設名 (不正解検体 No.)	不正解施設の MLVA 法 の導入歴 ^a (経験年数 ^b)
北海道・東北・新潟地区	2	1	1	施設 A(2、3)	0(0)
関東・甲・信・静地区	7	7	0	－	－
東海・北陸地区	2	2	0	－	－
近畿地区	3	3	0	－	－
中国・四国地区	2	2	0	－	－
九州地区	5	4	1	施設 B(3)	2(1)
全国	21	19	2	－	－

^a 不正解の検体があった施設におけるMLVA法の導入後年数。

^b 不正解の検体があった施設からの精度管理試験参加者の MLVA 法の経験年数。

表7 MLVA法の精度管理試験で不正解だった回答の詳細

(A) 施設 A

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) ^a																
	EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EH157 -1	EH157 -2	EH157 -5	EH157 -6	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
2	2	1	1	2	3	9	16	2	-2	-2	1	9	2	-2	<u>2</u>	-2	-2
3	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	-2	<u>2</u>	-2	9

^a 不正解の回答を下線で表示した。

(B) 施設 B

検体	TR 数(上段)及び遺伝子増幅産物の bp 数(下段) ^a																
	EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EH157 -1	EH157 -2	EH157 -5	EH157 -6	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
3	3	1	8	2	-2	6	13	-2	3	-2	3	11	2	<u>6</u>	1	-2	9

^a 不正解の回答を下線で表示した。

表8 非典型的ピークの発生と検査工程の関係

(A) PCR 時の DNA の希釈

DNA 希釈	非典型的ピーク ^a					合計 (発生率(%) ^b)
	1	2	3	4	無し	
希釈有り	0	0	2	0	2	4(50.0)
希釈無し	2	3	6	1	14	26(46.2)

^a いずれかの非典型的ピークが発生した施設数、またはいずれも発生しなかった施設数。

^b 合計に対する非典型的ピークが発生した施設

(B) PCR での Master Mix の種類

Master Mix	非典型的ピーク					合計 (発生率(%)
	1	2	3	4	無し	
T 社試薬	1	1	3	0	4	9(55.6)
Q 社試薬 A	1	2	3	1	7	14(50.0)
Q 社試薬 B ^a	0	0	2	0	5	7(28.6)

^a Q 社試薬 A の改良版の試薬。

(C) PCR の条件変更

PCR 条件	非典型的ピーク					合計 (発生率(%)
	1	2	3	4	無し	
ハンドブック ^a	2	3	5	1	13	24(45.8)
それ以外	0	0	3	0	3	6(50.0)

^a 腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック(O157、O26、O111 編)の PCR 条件¹²⁾。

表8(続き) 非典型的ピークの発生と検査工程の関係

(D) サンガーシーケンサーの種類

シーケンサー	非典型的ピーク ^a					合計 (発生率(%) ^b)
	1	2	3	4	無し	
T 社機種 A ^{c, d}	0	1	0	0	0	1(100.0)
T 社機種 B ^{c, d}	2	2	4	1	7	16(56.3)
T 社機種 C ^{c, d}	0	0	3	0	1	4(75.0)
T 社機種 D ^e	0	0	0	0	8	8(0.0)
H 社機種 ^f	0	0	1	0	0	1(100.0)

^a いずれかの非典型的ピークが発生した施設数、またはいずれも発生しなかった施設数。

^b 合計に対する非典型的ピークが発生した施設の割合。

^c 機種 B は機種 A の上位機種であり、機種 C は機種 B のさらに上位の機種。

^d 参加施設では POP-7 ポリマー及び 50 cm キャピラリーを使用していた。

^e 試薬及びキャピラリーがカートリッジ式であり、利便性が高い機種。POP-1 ポリマー及び 28 cm キャピラリーが採用されている。

^f 参加施設では POP-7 ポリマー及び 36 cm キャピラリーを使用。

(E) 電気泳動時の PCR 産物の希釈率

PCR 産物の希釈率	非典型的ピーク					合計 (発生率(%))
	1	2	3	4	無し	
50 倍未満	1	1	4	0	8	14(42.9)
50 倍以上 - 100 倍未満	0	0	1	1	0	2(100.0)
100 倍以上	1	2	3	0	8	14(42.9)

表 9 *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 10 *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 10(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	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	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 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%となった数値を波下線で示した。

表 11 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>T</u> TT
			アセンブル	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCGTT
		リバーズ	プライマー	<u>CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGT</u> TAAAGC
			アセンブル	CAGGGGATAAGACCACCTGTTAAAGC
O165	O157-37	フォワード	プライマー	AATCAGAGC <u>A</u> GCAGGAAAAAGAAGA
			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>A</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。