

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管理、及び性能の評価

研究代表者	明田 幸宏	国立感染症研究所	細菌第一部長
研究分担者	平井 晋一郎	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	島袋 梢	国立感染症研究所	感染症危機管理研究センター

我々は地方衛生研究所（地衛研）における腸管出血性大腸菌の反復配列多型解析（MLVA）法の検査精度を担保するために、精度管理試験を実施してきたが、一部の施設では基本的な検査工程を正しく行えていなかった。現時点で、未参加の地衛研もあり、今後も試験の実施が必要である。精度管理試験は本法で起こり得るトラブルを把握する絶好の機会である。過去の試験で、幾つかの施設で原因不明の非典型的ピークが発生した。今後、参加施設の電気泳動データを解析し、原因特定が必要である。また、精度管理試験で把握したトラブル事例とその解決法を地衛研と共有できれば、検査精度の全国的な向上が図れる。

本研究では、全国の地衛研を対象にMLVA法の精度管理試験の参加依頼をしたところ、国立感染症研究所から1日に発送できる菌株検体数を超える申し込みがあった。そこで、過去試験に未参加の施設や本法の導入歴が少ない施設を中心に21施設を参加施設として選んだ。試験の結果、全体的に高い検査精度にあったが、2施設が回答を誤った。2施設に検査工程を照会したところ、解析ファイルのBin設定が適切でなかったこと、及びタンデムリピート（TR）領域の増幅ピークに釣られて立ち上がったノイズをTRと判定したこと等、基本的な工程を正しくできていなかった。次に、過去の精度管理試験で得られた電気泳動データを収集し、機器や試薬の情報に基づき分析したところ、非典型的ピークの発生を抑えるには、特異性が高いMaster mixの使用が有効と分かった。最後に、これまでの精度管理試験で把握した情報を基にトラブルシューティング集を作成した。今後、この資料を用いた研修会を行うことで、地衛研全体のMLVA法の検査精度の向上を図るつもりである。

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に、分子疫学的解析法として反復配列多型解析（MLVA）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の（TR）数の比較により菌株間の類似性を判定する方法である²⁾。MLVA法の分離能は非常に高く、ゴールドスタンダードだったパルスフィールドゲル電気泳動法と同程度以上と報告されている³⁾。MLVA法はPCR法を用いるため、PFGE法と比較し短時間で解析結果を出すことが可能である。さらに、MLVA法の結果は数値であるため、自治体間での結果の比較が容易であり、近年に頻発している広域な食中毒への対応にも適している⁴⁾。この様に分子疫学的解析法として優れたMLVA法の能力を公衆衛生分野で活かすには、地衛研での検査

精度を高く保つ必要がある。

前身の研究班では地衛研でのMLVA法の検査精度を担保するために、DNA検体を用いた精度管理試験を実施してきた。試験の結果、受験施設の大半は高い精度で本法を実施していたが、一部の施設では基本的な検査工程を正しく行えていなかった⁵⁾。地方衛生研究所全国協議会に加盟する地衛研の内、約30%の施設が前研究班で実施した試験に未参加であり⁵⁾、地衛研の検査精度の把握は十分と言えない。また、試験の際に実施したアンケートでは菌株分離からDNA抽出まで工程も様々あり⁵⁾、この工程の検査精度も評価できていない。今後、菌株検体を用いた本法の精度管理試験の実施が必要だろう。

地衛研のMLVA法検査精度を向上させるために、前研究班では、精度管理試験で不正解だった施設に対し、原因を特定し、改善策を提示してきた。しかし、ある施設に

において非典型的ピークをTR数と間違えたため、その施設に検査工程を照会したが、当該ピークの発生原因が分からなかった。非典型的ピークをTR領域の遺伝子増幅と捉えるかは個人差があり、全参加施設で起きていたのかもしれない。しかし、配布前の確認試験では非典型的ピークは見られなかったため、試薬や機器等の検査工程の条件により発生したことも考えられる。いずれにしても、試験に正解した施設からも電気泳動データを収集し、分析する必要がある。

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ろう。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、地衛研と共有することが有効だろう。

本研究では、地衛研のMLVA法の検査精度をより詳細に把握するために、菌株検体を用いた精度管理試験を実施した。次に、前研究班での精度管理試験で解決できなかった非典型的ピークの発生原因の特定と改善法の提言のために、参加施設から電気泳動データを取集し、アンケート結果を基に分析した。最後に、これまでに実施してきた精度管理試験で把握した情報を基に、トラブルシューティング集を作成した。

B. 研究方法

1. MLVA法の精度管理試験の参加施設の選定

地方衛生研究所全国協議会に加盟している地衛研等の施設から、都道府県及び政令指定都市に属する66施設に参加の依頼をした。施設からの申込みの際、「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行った。国立感染症研究所 村山庁舎から1日に発送できる菌株検体数は約20施設程度である。申込み施設が多数の場合、次の(1)～(4)の基準で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)前身の研究班で実施した精度管理試験に未参加施設を優先的に選ぶ。(3)前研究班での試験で不正解の検体があった施設を優先的に選ぶ。(4)MLVA法の導入歴が2年以下、参加希望者の経験年数が1年未満の施設を優先的に選ぶ。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)に申込みがあった施設に参加可否の連絡をした。

2. 精度管理試験での問題内容

参加施設に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用いられていない菌株を選んだ⁵⁾。これら菌株についてMLVA法を行い、保存中にTR数が変化していなかった3菌株を検体とした(表1)。問題内容として、3検体についてMLVA法を実施してもらいTR数の回答を求めた(図1)。参加施設には、日常検査で実施している実験方法(DNA抽出、DNA希釈、PCR法、電気泳動及びTR数算出等)でMLVA法を行う様に伝えた。問題と併せて、検査工程に関するアンケートを行った。菌株検体であるため、TR数の変化やTR領域を含むプラスミドの脱落もあり得るが、基本的に、各検体について全ての領域で表1のTR数と一致した場合、正解とした。正解でなかった場合、その原因を明らかにするために、参加施設に検査工程を照会し、併せて泳動ファイルの送付を依頼した。

3. 精度管理試験の実施工程

2024年1月17日(水)に、各参加施設に菌株検体1～3をゆうパック常温便にて発送した。同日、各参加施設の担当者に回答用紙のエクセルファイル(図1)をメールにて送付した。回答締切りを2024年2月29日(木)とした。

4. MLVA法の非典型的ピークの発生原因の特定と改善法の提言

前研究班で実施したMLVA法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の発生原因の特定を試みた(図2)⁵⁾。前研究班では、ある参加施設は検体2において143 bp程度の特異的ピークが発生した。検体2の領域0157-37は正しいTRは-2であるが、この施設はTRs = 10と判定した。そこで、当該施設から電気泳動データを収取し、検査工程を照会したが原因が分からなかった。

本研究では、前研究班の精度管理試験に参加した38施設に対して、検体2の領域0157-37が含まれる電気泳動データの送付を依頼した。受領した電気泳動ファイルを解析ソフトGeneMapper Ver. 6.0 (Thermo Fisher Scientific)で解析し、135～150 bpに強度50以上で、領域0157-37の標識蛍光と同じPETのピークがあった場合、非典型的ピークと判定した。また、試験の際に実施したアンケートを基に、PCR時のDNA希釈率、Master Mixの種類、電気泳動時の希釈率、PCRの温度・時間、シーケンサーの種類を電気泳動データと紐付けた。

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起きた場合も同様の手順で原因特定を試みた。今回の試験では菌株検体を用いるため、電気泳動データと紐づける情報にコロニー分離の有無やDNA抽出法を含めた。

5. トラブルシューティング集の作成

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。全体の構成として、大分類をトラブルの種類（例えば、ピークが出ない、Binにピークが入らない）にし、小分類を原因（例えば、電気泳動時のPCR産物の添加ミス、Binファイルの調整不足）にした。各トラブルについて、「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」の順で解説した。また、トラブルシューティング集の作成に当たり、足りない情報について試験参加者に照会した。

C. 研究結果

1. MLVA法の精度管理試験の参加施設の選定

地方衛生研究所全国協議会に加盟している66施設の地衛研に精度管理試験の参加依頼をしたところ、7割以上に当たる49施設から申込みがあった（表2）。国立感染症研究所 村山庁舎から1日に発送できる菌株検体数を大きく超えたため、事前に定めた基準(1)～(4)で選定した（表3）。(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、または担当者の経験年数1年未満の5施設の合計21地衛研を参加施設とした。

2. MLVA法の精度管理試験の回答の評価

精度管理試験に参加した21施設の内、19施設が全3検体に正解し、2施設が1つ以上の検体で不正解だった（表4）。不正解があった2施設は選定基準(4)のMLVA法の施設導入後の年数、または担当者の経験年数が少ない施設として選ばれていた。

施設Aは検体2及び検体3に不正解だった（表4、表5（A））。施設Aに検査工程を照会し、泳動ファイルの送付も依頼したところ、両検体の回答を間違えた原因はGeneMapperのBinファイルの調整不足だった（図3（A））。施設Aは同じ機種である日立DS3000でMLVA法を行っている他の地衛研から提供されたBinファイルを使用していた。このBinファイルで解析すると、検体2及び検体3の領域0157-19はTRs = 2となるが、国立感染症研究所 細菌第一部が作成したファイルで解析するとTR = 1と正しく算出された。これは泳動時の遺伝子増幅産物の移動度の変化ではなく、Binファイルの調整不足を示している。なお、照会の結果、施設Aが使用していたBinファイルは、ある研究施設で作成されたことが判明した。施設Aに提供した地衛研は当該ファイルを使っておらず、国立感染症研究所 細菌第一部が配布したBinファイルを使っていることも明らかになっ

た。

施設Bは検体3の領域0157-17のTR数を正しくは-2であるところ、6と誤った（表4、表5（B））。検査工程を照会し、泳動ファイルを取り寄せたところ、不正解の原因は、領域EH111-14でTRs = 1にピークが立ったことで、釣られて立ち上がった小さなピークをTRと判定したことと判明した（図3（B））。

3. MLVA法の不典型的ピークの発生原因特定と改善法の提言

前研究班の精度管理試験に参加した38施設に電気泳動データの送付を依頼したところ、30施設から提供があった。データをGeneMapperで解析した結果、不典型的のピークが発生した地衛研は14施設であり、ピークは4つに分類された。141 bp程度に発生し、領域0157-37のTRs = 10のBinに入る不典型的のピークであり、これをピーク1と定義した（図2）。また、142～145 bp、つまり領域0157-37のTRs = 10及び11のBinの間に入る不典型的のピークが発生しており、これをピーク2とした（図2（A））。さらに、領域0157-37のTRs = 11及び12のBinに入る不典型的のピークであり、これらそれぞれピーク3及びピーク4と定義した（図4（B）及び（C））。ピーク1、ピーク2、ピーク3及びピーク4が発生した地衛研は、それぞれ2施設、3施設、8施設及び1施設だった。

各電気泳動データと検査工程の情報を結び付け、不典型的のピークの発生とPCR工程の関係を調査した。PCR時にDNAを希釈した地衛研は4施設だった（表6（A））。検体はNanodrop (Thermo Fisher Scientific) で20～25 ng/ μ Lに調製されたDNAだったが、4施設は1.5～12.5倍に希釈していた。希釈の有無に関わらず、およそ半数の施設でいずれかの不典型的のピークが起きていた。次に、PCRの際、T社試薬、Q社試薬A及びQ社試薬BのMaster Mixを使用した地衛研は、それぞれ9施設、14施設及び7施設だった（表6（B））。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が起きず、合計に占める不典型的のピークの無しの割合が最も低かった。また、PCRの条件については、「腸管出血性大腸菌 MLVAハンドブック（0157、026、0111編）⁷⁾」に基づかない条件で反応を行っていた地衛研は6施設あり、ハンドブックの条件との違いは各ステップの温度ではなく、時間だった（表6（C））。first denature及びlast extensionの時間の違い以外では、denatureを20秒から30秒に延長した施設が4施設あった。ハンドブック及びそれ以外の条件のどちらも約半数の施設でいずれかの不典型的のピークが起きていた。

次に、不典型的のピークの発生と電気泳動の関係を調査したところ、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社機種を使用した地衛研はそれぞれ1施設、16施設、4施設、

8施設及び1施設だった(表6 (D))。T社機種Dではいずれの非典型的ピークも起きていなかった。機種を構成する要素としてポリマーとキャピラリーがある。ポリマーはT社機種DではPOP-1を、それ以外の機種ではPOP-7を使用していた。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のキャピラリーを使用していた。なお、T社機種Dは試薬及びキャピラリーがカートリッジ式である。また、電気泳動時のPCR産物を50倍未満と100倍以上に希釈した地衛研はそれぞれ14施設で、合計に占める非典型的ピークの発生率は同じだった(表6 (E))。

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起きなかった。1施設において全3検体で「ノイズであるかの判断に迷うピークがあり、シングルPCRをしたら解決した。」と回答があった。この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後に電気泳動した際、他の標識蛍光のピークが立ったことで、釣られて立ち上がったノイズが判断を迷わせた原因と判明した。

4. トラブルシューティング集の作成

前研究班及び本研究班での精度管理試験で把握したトラブル事例を大分類及び小分類に基づき分類した後(図5 (A))、各分類について解決法を示した。使用者にとってより分かり易くするために、実際の事例を挙げて解説した(図5 (B))。

D. 考察

本研究班ではEHECの菌株検体を用いたMLVA法の精度管理試験を行ったところ、参加施設は全体として高い検査精度を持っていた。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て、不正解があった施設に検査工程の問題点を特定し、改善法を提言することである。前身の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6施設が本試験にも参加したが、これら施設は全検体に正解した。これは我々が実施してきた精度管理試験により、地衛研の検査能力を向上させられたことを示唆している。一方で、今回の精度管理試験では2施設が1検体以上で不正解だったが、1施設はMLVA法の施設導入年数が2年、参加者の経験年数が1年であり、もう1施設は導入年数も経験年数も0年だった。これは、今後も、MLVA法の地衛研への普及と検査精度向上の必要性を示している。

本研究では、精度管理試験で不正解の検体があった施設に対して改善法を提案できた。施設Aが検体2及び検体3で不正解だった原因はBinファイルの調整不足だったので、細菌第一部が作成したBinの使用を勧めた。施設Aには、TR算出の際の注

意点として、TRのサイズは理論上の数値と電気泳動での測定値が異なること、測定値はシーケンサーの機種等の影響を受けることを伝えた。さらに、TR数によってオフセット部分が変化する領域もあるため、各施設でBinファイルを設定する際は、TRが分かっているサンプルを流してBinを調整する必要性も伝えた。今回、施設Aが回答を誤った領域0157-19では、TR数が2-3のBinの間隔(約3 bp)は、他のTR数のBinの間隔(6 bp)より狭いという特徴を持つ。この理由は、TRs = 1または2を持つ菌株は、それ以外のTR数を持つ菌株とオフセット部分が異なるためである。

施設Bが検体3で不正解となった原因は、非典型的ピークをTRと判定したためだったことから、判定のコツを伝えた。具体的には、4種の蛍光標識の波長はPET-NED-VI C-FAMの順に近く、ある蛍光のピークが立った時、波長が近い他の蛍光は釣られて検出され易いことを念頭に置く必要があると説明した。釣られて検出されるピーク解決法として、シングルPCRによる1領域の電気泳動を行うと当該ピークを防げると伝えた。さらに、血清型によってはほぼ全ての菌株がTRを持たない(つまり、-2)領域もあるので^{3,8)}、血清型もノイズであるかの判定の役に立つと教えた。検体3の菌株の血清型は0111であり、施設Bはこの検体の領域0157-17のTR数を6と回答したが、一般的に0111はこの領域にTRを持たない³⁾。

本研究では、MLVA法の電気泳動データと検査工程の情報を結び付け、非典型的ピークの発生原因を探ったところ、明確な発生原因を見付けられなかったが、幾つかの知見が得られた。最初に、非典型的ピークが発生した施設は全体の約半数だったことから、発生原因は検体固有ではなく、検査工程にあると思われた。また、分析した電気泳動データは、DNA検体を用いた精度管理試験由来であることから、発生要因はPCR以降の過程にもあることが分かった。次に、T社試薬BのMaster Mixを使った施設では、非典型的ピークの発生率が他試薬より低かった。試薬Bは試薬Aの改良版であり、特異性が高いPCRを行える特徴を持つため、非典型的ピークの発生率が低くなったと思われた。さらに、電気泳動にT社機種Dを用いた地衛研は8施設あったが、非典型的ピークは起きていなかった。機種Dは、試薬及びキャピラリーがカートリッジ式であり、利便性が高いと言う利点があるが、その反面、試薬やキャピラリーの種類を変えられない。ポリマーとしてT社機種DではPOP-1が採用されており、それ以外の機種ではPOP-7が使われていた。機種Dのキャピラリーは28 cmであり、それ以外の機種のキャピラリーより短かった。しかし、メーカーのT社が公開している情報では、ポリマーやキャピラリーの種類と非典型的ピーク発生との因果関係は示されていない。また、機

種Dにノイズの検出を抑える機能があるとは示されておらず、機種Dで非典型的ピークが観察されなかった原因は不明である。また、サンガーシーケンサーで電気泳動した際、ピークの高さでPCR産物の定量はできないが、産物量が多い程、ピークが高くなる傾向にある。PCR産物の希釈率が50倍未満と100倍以上との非典型的ピークの発生率には差が無かったことから、当該ピークの検出と希釈率には関係が無いことが示された。なお、本研究班では、EHEC菌株を用いた精度管理試験を実施したが、原因不明の非典型的ピークの発生は見られなかったため、菌株分離からDNA抽出まで工程における当該ピークの発生原因は分析できなかった。

MLVA法の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、地衛研の検査精度の向上に有効だろう。本トラブルシューティング集の共有は、精度管理試験に正解した施設は勿論のこと、試験に未参加の施設にも有益だろう。本試験で不正解となった2施設の参加者の経験年数は1年以下であり、これは異動による検査技術・知識の承継問題の表れと言える。本トラブルシューティング集は実際の事例を示して、原因や解決法を解説しており、初心者にも分かり易く構成されている。地衛研全体のMLVA法の検査精度向上のためにも、また、経験年数が少ない担当者への技術・知識伝達のためにも、今後、トラブルシューティング集を用いた研修を行う予定である。

E. 結論

EHEC菌株を用いた精度管理試験を実施したことで、MLVA法を正しく実施できていなかった一部の施設に対して改善法を提案できた。次に、精度管理試験で得られた電気泳動データを、検査情報を基に分析したところ、非典型的ピークの発生に関する要因を推測できた。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、地衛研の検査精度の向上に有効なコンテンツである。

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。何より、業務ご多忙の中、本年度のMLVA法の精度管理試験にご参加くださり、惜しみないご貢献をくださいまし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, 36(1): 10-12, 2019

- 2) Noller, et al., J Clin Microbiol, 41: 5389-5397, 2002
- 3) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 4) 厚生労働省, 病原微生物検出情報, 40(5): 83-85, 2019
- 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」, 43-62, 2023
- 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」, 1-5, 2022
- 7) 秋田ら, 腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック(0157、026、0111編), 1-3, 2018
- 8) 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, 13 March 2019

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

なし

J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

別紙 1

所属：
担当者：

1. 問題及び回答

検体1～3は腸管出血性大腸菌O157、O26またはO111の菌株です。

検体1～3について反復配列多型解析（MLVA）法を行い、Tandem Repeat（TR）数をご回答ください。

日常の検査において貴所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）でMLVA法を行ってください。

TR数を算出できる遺伝子増幅が見られず、TR数を算出できない非典型的な遺伝子増幅が確認された場合、UNとご記入ください。また、その増幅産物のサイズ（bp）をご記入ください。

各検体の結果について、詳細に説明したい事がある場合は備考欄にご記入ください。

検体名	TR数（上段）及び遺伝子増幅産物のbp数（下段）																
	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
記載例	5	2	6	3	-2	UN	7	-2	4	-2	4	10	3	-2	2	-2	7
	721																
検体1																	
検体2																	
検体3																	

備考欄

以上で、「1. 問題及び回答」は終了です。誠に有難うございました。

図1 腸管出血性大腸菌（EHEC）の反復配列多型解析（MLVA）法精度管理試験での回答用紙

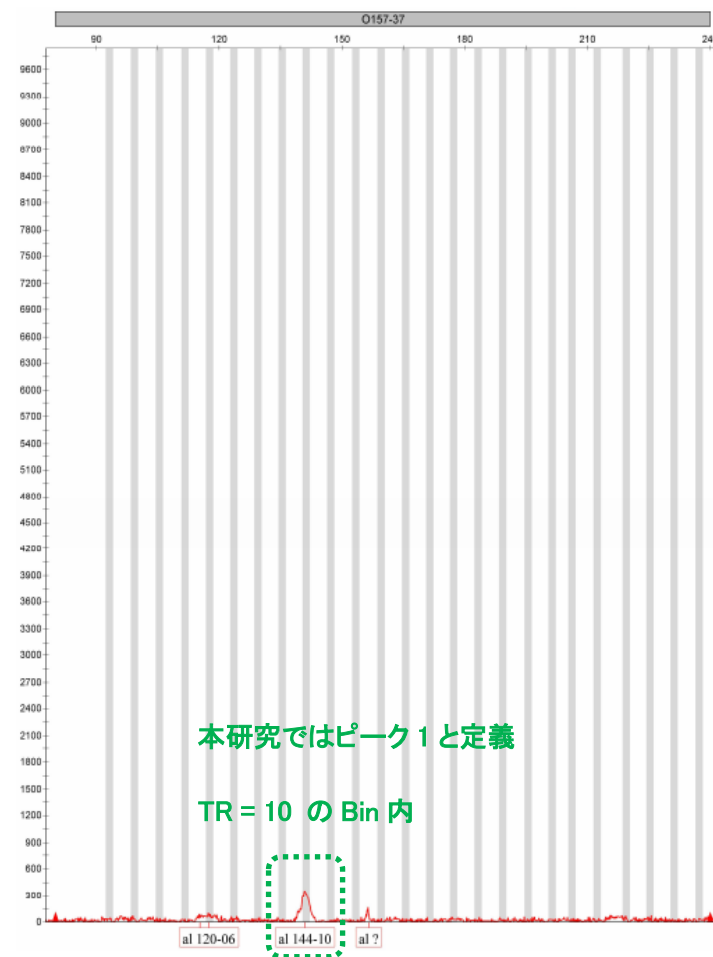
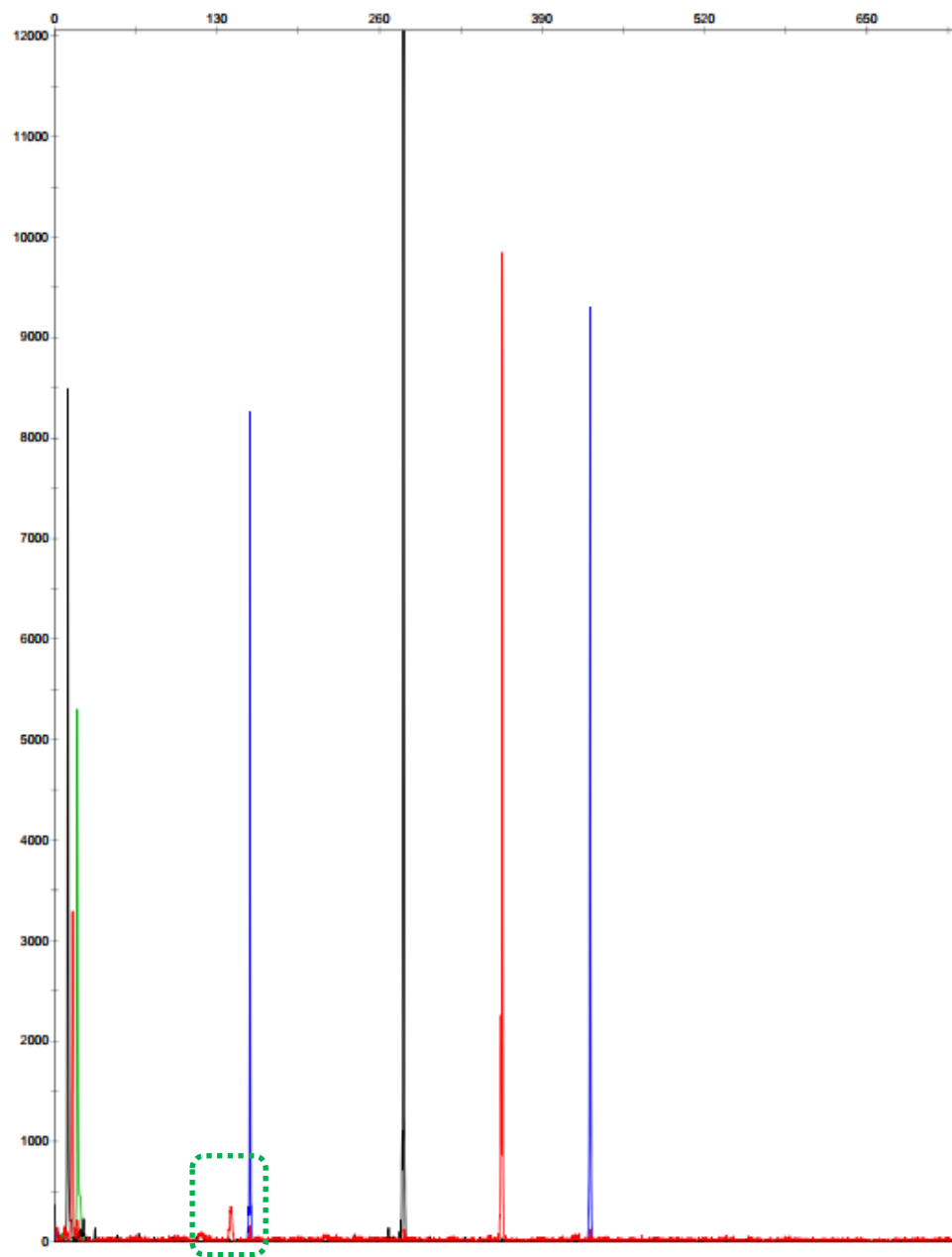


図 2 前身の研究班で実施した MLVA 法精度管理試験において解決できなかった非典型的ピーク

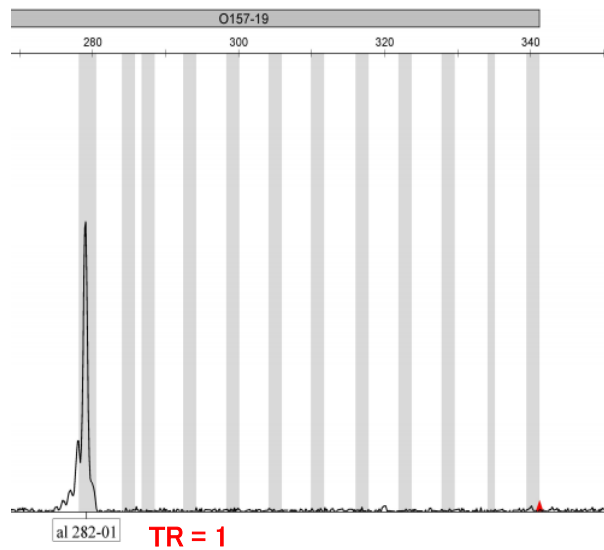
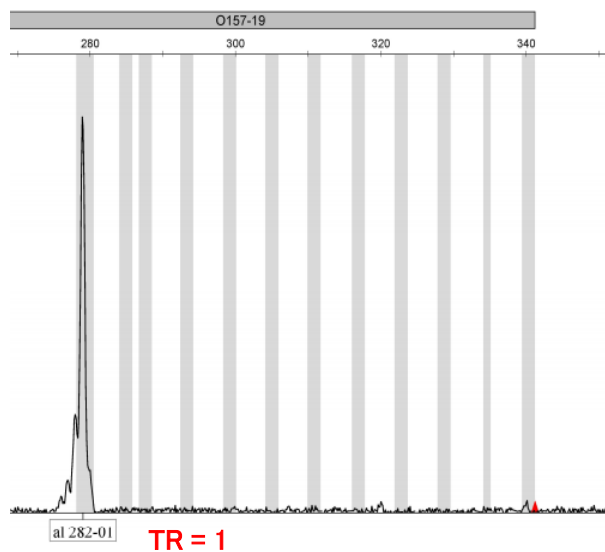
(A) 施設 A

Bin ファイル

検体 2

検体 3

細菌第一部作成



施設 A が使用

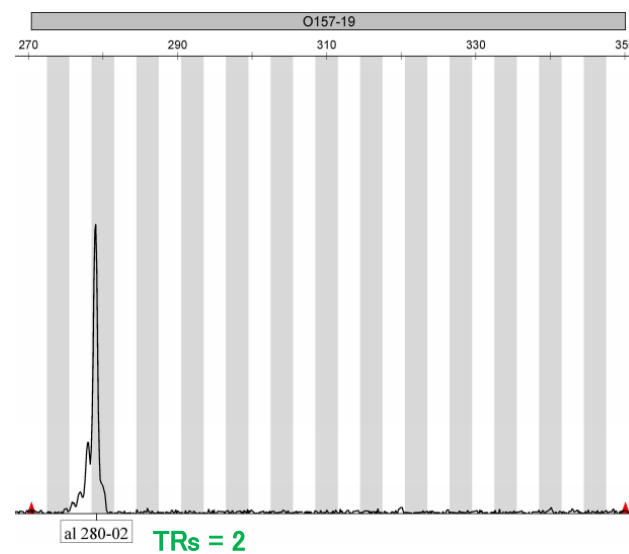
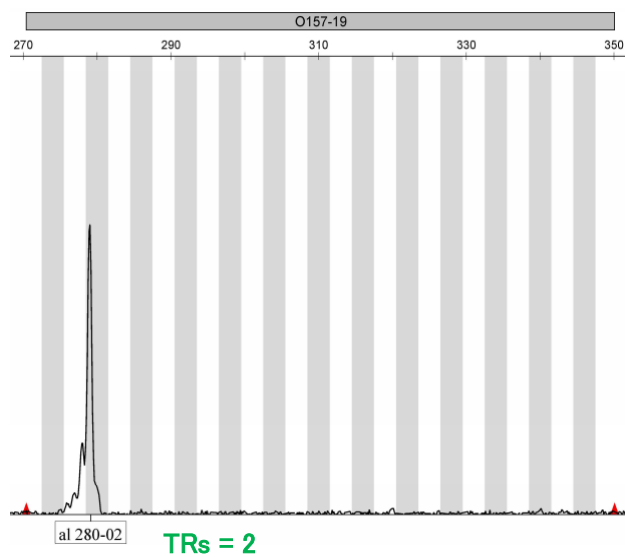


図 3 MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(B) 施設 B

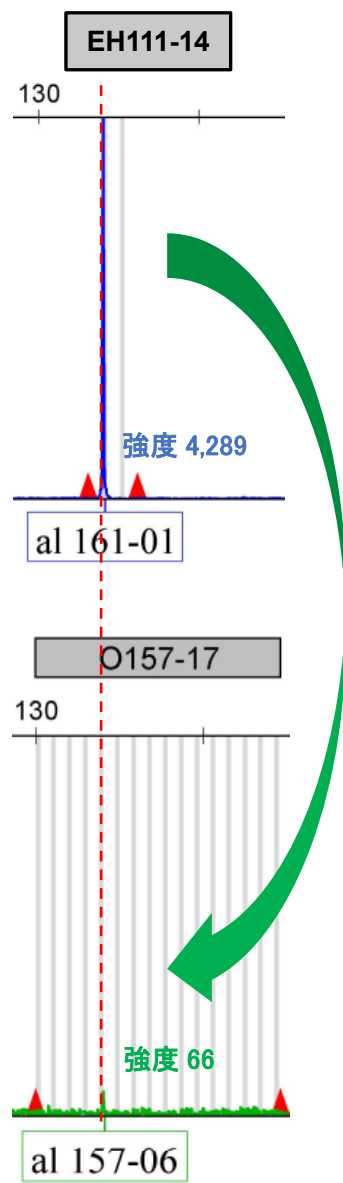


図 3(続き) MLVA 法の精度管理試験で不正解だった検体の電気泳動像

(A) 非典型的ピーク 2 の例

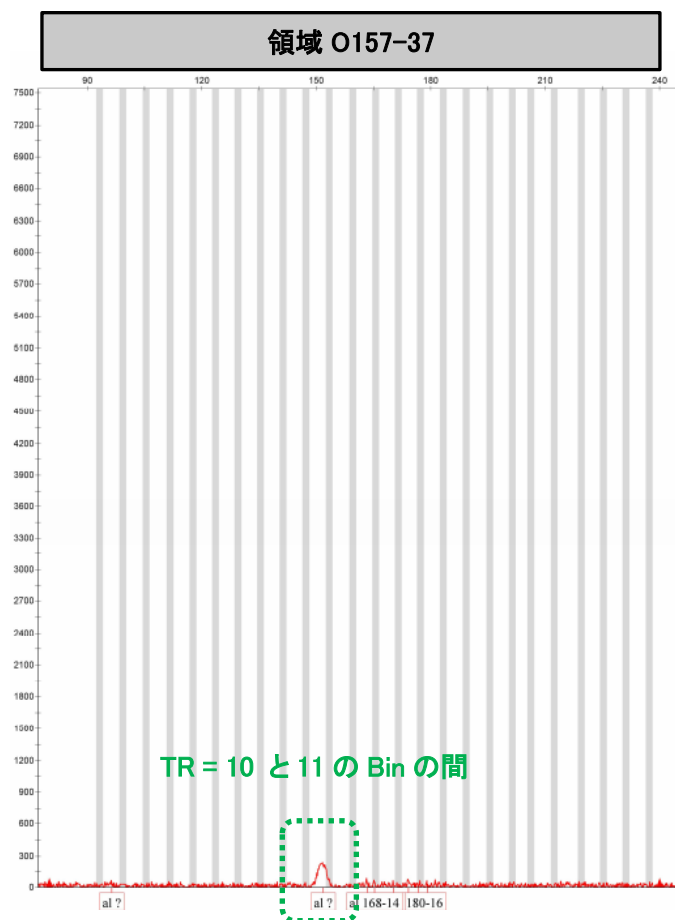
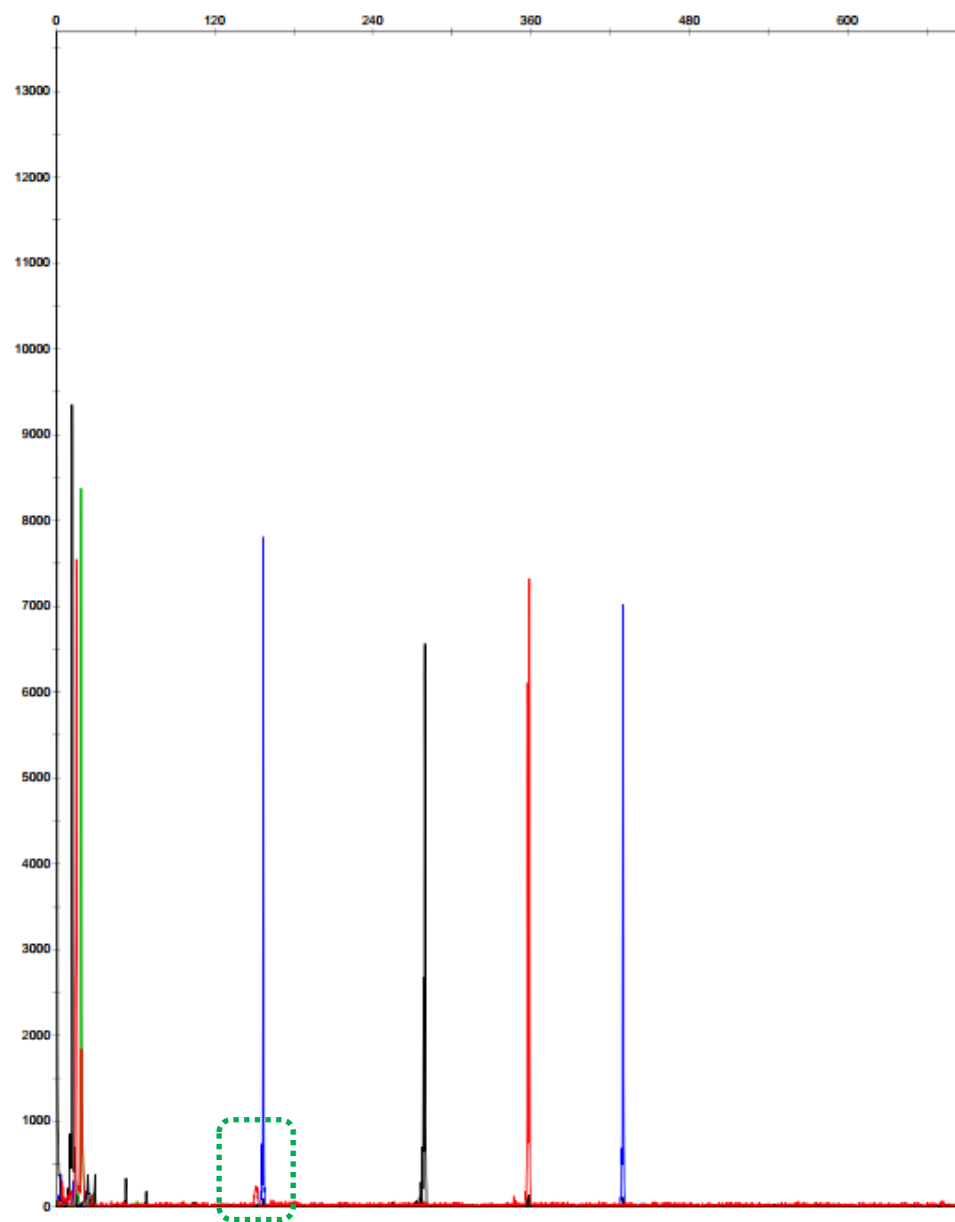


図 4 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

(B) 非典型的ピーク 3 の例

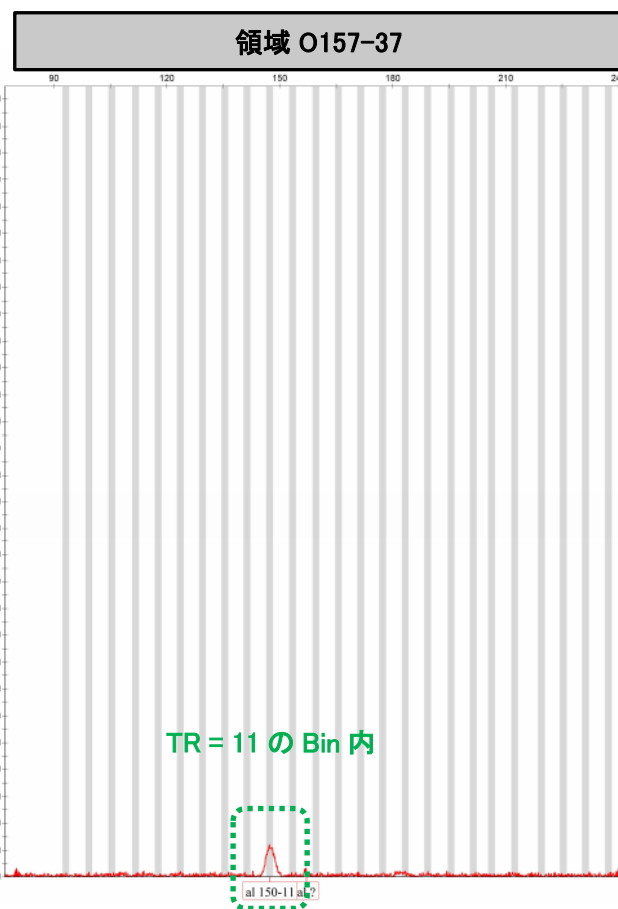
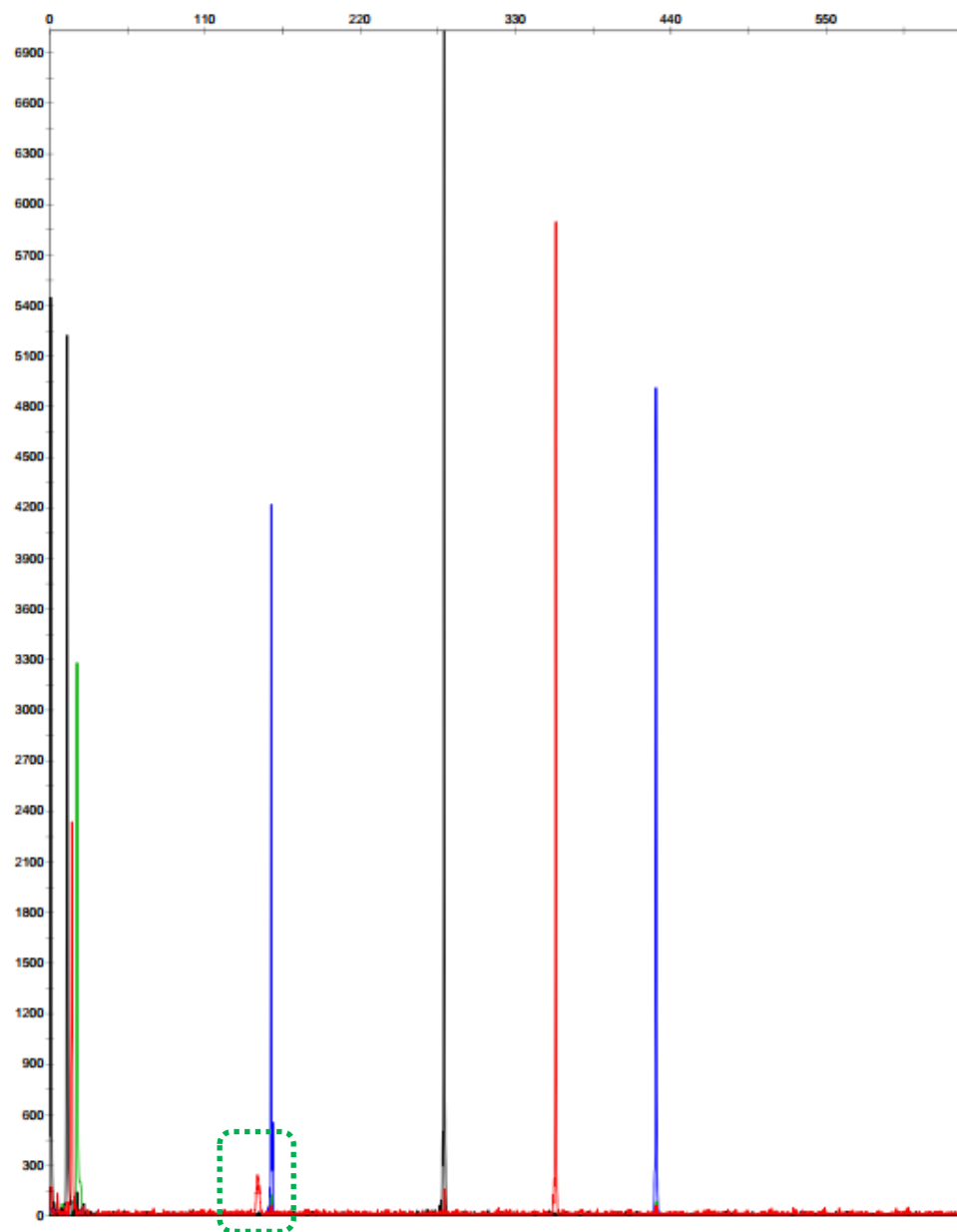


図 4(続き) 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

(C) 非典型的ピーク 4 の例

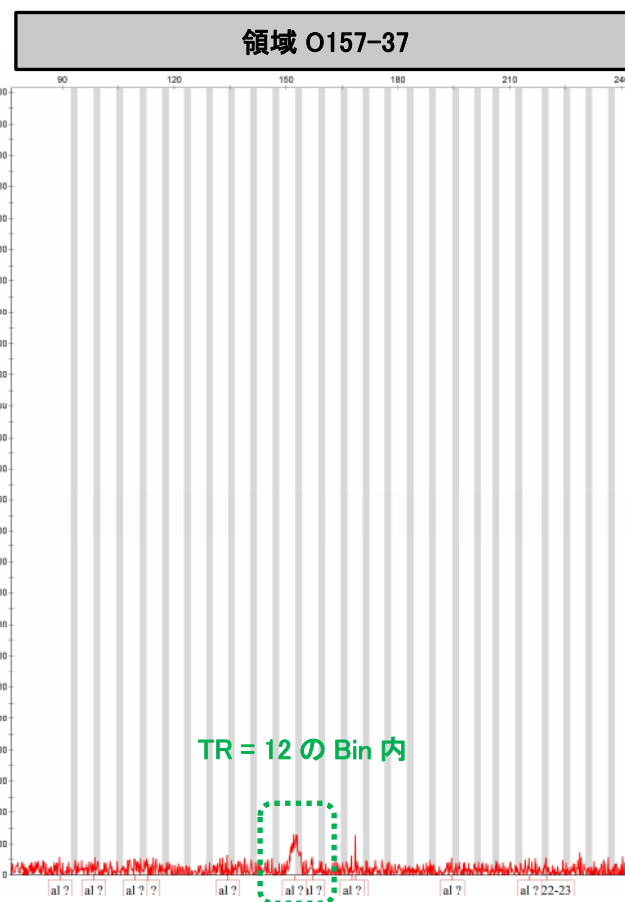
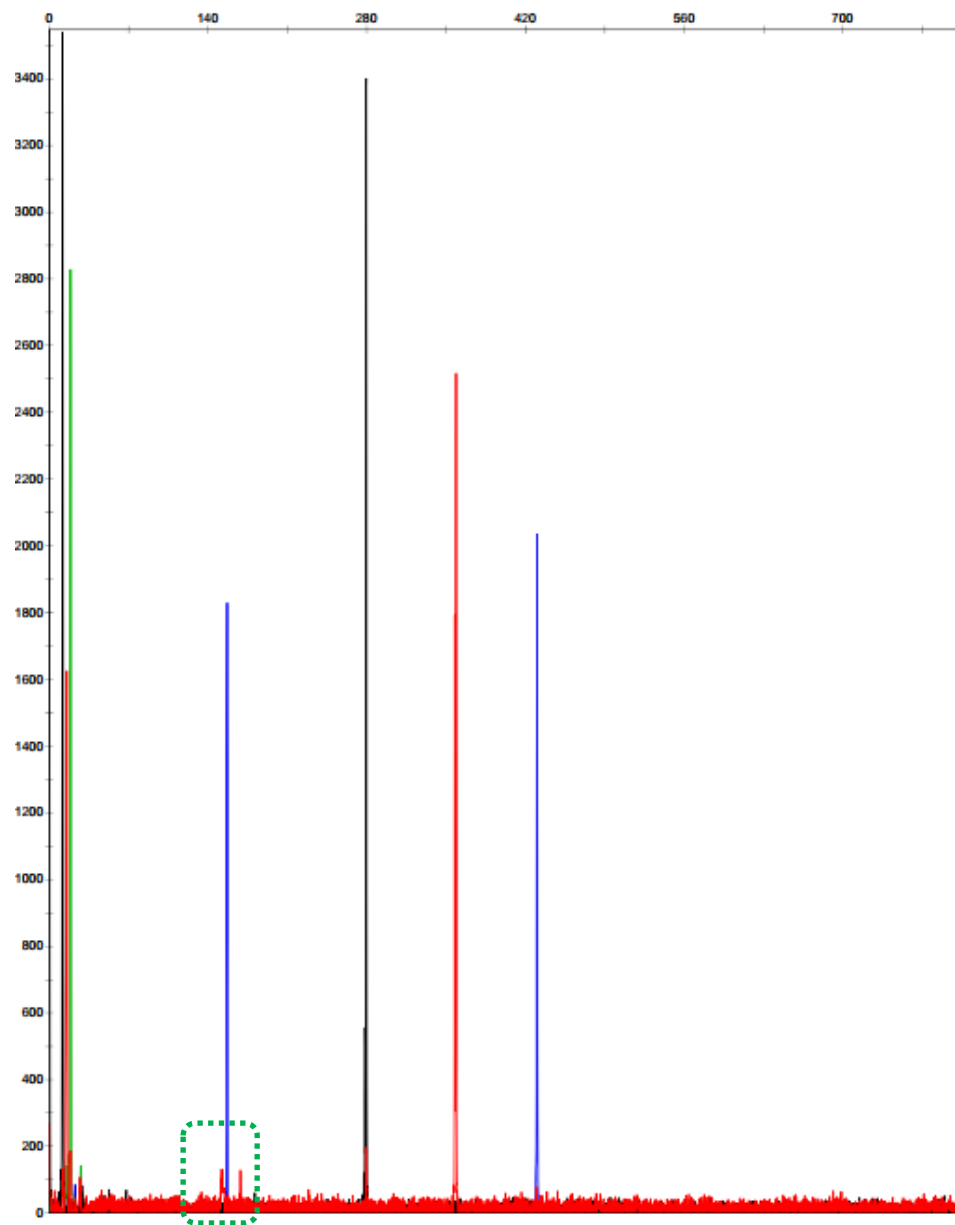


図 4(続き) 前研究班の MLVA 法の精度管理試験において、新たに発生が確認された非典型的ピーク

目次

A : ピークが出ない

- 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

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

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 5 トラブルシューティング集の一部

(B)トラブル事例の解説の例

A-1. 電気泳動時のPCR産物の追加ミス/PCRミクスチャーへの蛍光標識プライマーの追加ミス

1.トラブル概要

PCR産物をシーケンサーで電気泳動すると、ピークが全く検出されなかった。

2.トラブルの原因と解決法

①電気泳動の際、Hi-DHにPCR産物の追加忘れが原因。または、②PCRミクスチャーへの蛍光標識プライマーの追加ミスが原因。
PCRで反応しなかった蛍光標識プライマーのピークが検出されないことから①または②と判断できる。潜水型電気泳動装置 (Mupid等) で電気泳動しても通伝子増幅を確認できれば①で、確認できれば②。

3. 実際の事例

PCRのMixture 1で検出される全てのピークが検出されなかった。

赤字:正しい結果

検体名	TR数(上段)、TR数が判定不能場合の通伝子増幅産物のbp数(下段)																
	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH25-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
不正解	2	1	-2	-2	3	-2	-2	-2	5	-2	-2	-2	-2	-2	1	-2	7
正解	2	1	1	2	3	12	14	-2	5	-2	1	8	2	-2	1	-2	7

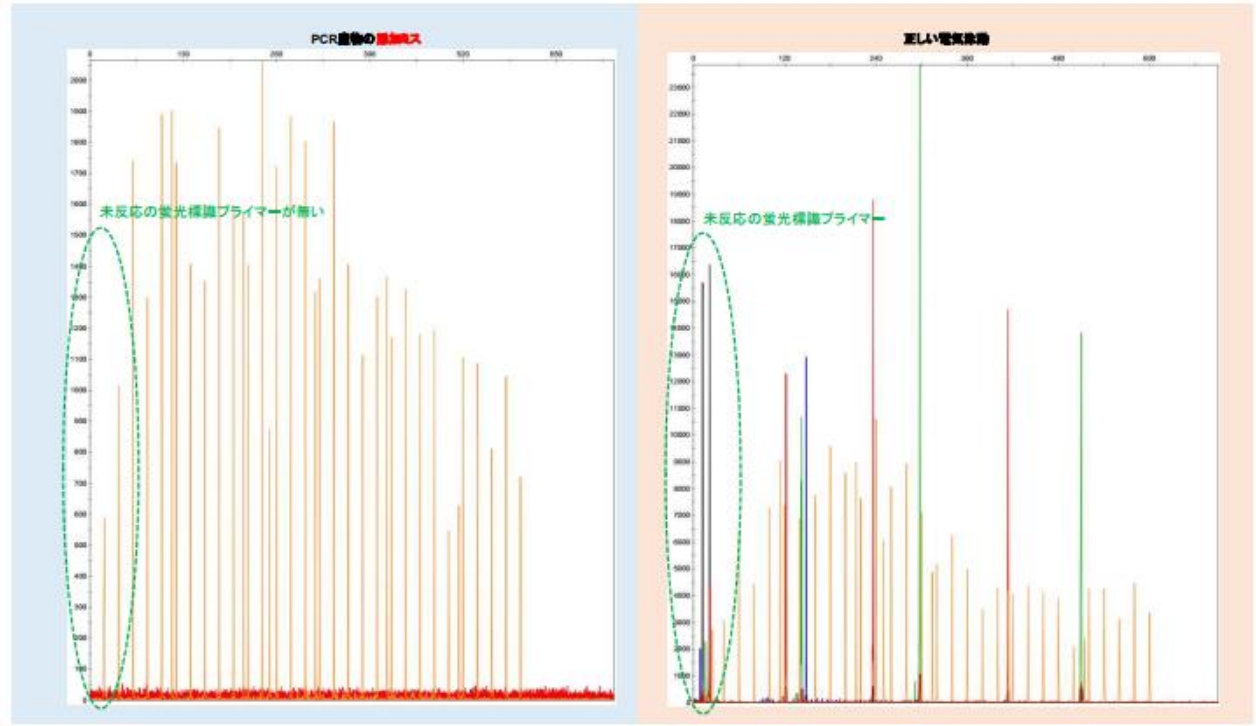


図 5(続き) トラブルシューティング集の一部

表1 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2 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3 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4 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経験年数。

表5 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	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -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	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -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6 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 ⁷⁾。

表6(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)