

201327040A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の
網羅的ゲノム解析を基盤とする新たな食品の安全確
保対策に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 調 恒 明
山口県環境保健センター

平成26(2014)年 3月

目 次

I	平成 25 年度総括研究報告	
	地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析を 基盤とする新たな食品の安全確保対策に関する研究	
	研究代表者 調 恒明 山口県環境保健センター	1
II	分担研究報告	
1	食品および患者由来検体収集および網羅解析ネットワークの構築	
	研究分担者 小澤 邦寿 群馬県衛生環境研究所	14
2	食品中のサルモネラ属菌のメタゲノム解析と食品分離株及び臨床分離 株のゲノム	
	研究分担者 佐多 徹太郎 富山県衛生研究所	19
3	愛媛県内で患者、食材、家畜から分離されたサルモネラ株の次世代 シーケンサーによるゲノム解析	
	研究分担者 四宮 博人 愛媛県立衛生環境研究所	26
III	研究成果の刊行に関する一覧表	42
IV	研究成果の刊行物・別刷.....	45

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析を
基盤とする新たな食品の安全確保対策に関する研究

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者

調 恒明 山口県環境保健センター

研究分担者

小澤 邦寿 群馬県衛生環境研究所
佐多 徹太郎 富山県衛生研究所
四宮 博人 愛媛県立衛生環境研究所

研究協力者

野村 恭晴 山口県環境保健センター
亀山 光博 山口県環境保健センター
佐々木佳子 群馬県衛生環境研究所
丹羽祥一 群馬県衛生環境研究所
塚越博之 群馬県衛生環境研究所
吉住正和 群馬県衛生環境研究所
黒澤肇 群馬県衛生環境研究所
綿引正則 富山県衛生研究所
磯部 順子 富山県衛生研究所
木全 恵子 富山県衛生研究所
清水美和子 富山県衛生研究所
増田千恵子 富山県衛生研究所
金谷 潤一 富山県衛生研究所
仙波敬子 愛媛県立衛生環境研究所
烏谷竜哉 愛媛県立衛生環境研究所
黒田誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
関塚剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
木村博一 国立感染症研究所 感染症疫学センター

研究要旨:

米国における食中毒による社会的損失は年間7兆円に上ると試算されている。我が国においても、食中毒患者数は発表されている実数よりも遙かに多く、食中毒による社会的損失は多大なものがあると考えられる。さらに、食品の流通は大規模、広域化し食中毒の探知は今後、より困難になると思われる。本研究では、食中毒患者由来細菌株と食品由来細菌株のゲノムを、次世代シーケンサー (NGS) を用いて解析する事により、食中毒菌と食品との関連を明らかにすること、また広域的食中毒事例の早期探知のための新たな手法の開発のための基礎的データを得ることを目的として研究を行う。

初年度である今年度は、NGS 技術を習得するため、山口県、群馬県、愛媛県の地方衛生研究所の研究員を国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターに派遣し共同研究としてそれぞれの研究所で分離した菌株のゲノム配列を決定した。今年度はまず、食中毒の原因菌として最も重要な菌の一つとしてサルモネラ属菌について主に解析を行った。山口県、愛媛県で患者から分離されたサルモネラ属菌 O:4, i1, -株のゲノム配列を決定し、これまで報告されているサルモネラ属菌のゲノム配列と比較し、SNPs を抽出し、系統樹を作成した。また、鶏肉由来、豚舎由来、患者由来の *Salmonella* *Infantis* 株のゲノム解析を行い、以下のことが明らかとなった。

1. 山口県で発生した同一食中毒事例の2名の患者由来の菌株のSNPsは完全に一致していた。この事は、菌株のゲノム解析を行い、SNPsを比較することにより菌の遺伝的同一性を検出することが出来る事が示された。この過程を効率よく行う仕組みが出来れば広域食中毒の早期探知が可能となる。

2. 愛媛県の同一地域の鶏肉由来と患者由来のサルモネラ属菌のSNPs配列が完全一致した事例があった。サルモネラ属菌などの細菌では、点突然変異の頻度は比較的高いことから、食品と発症の関連は極めて高い事が示されたと思われる。

3. 鳥肉由来と豚肉由来の菌は系統解析により区別されたことから、患者由来の菌株のゲノム配列を調べることにより原因食品が区別可能となり、食品汚染対策に生かすことのできる情報が得られたと考えられる。

4. 山口県及び愛媛県で分離されたサルモネラ属菌 O:4, i1, -株のゲノム解析の結果、山口株は、スペインで最初に報告され世界中で問題となっているサルモネラ属菌と類似している一方、愛媛株は異なることが示された。愛媛株では多剤耐性を示しており、プラスミドの解析も行った。

5. 細菌ゲノム解析の技術的な検討を行い、効率よくゲノム解析が出来る手法を示した。

6. 食中毒事例の患者由来腸管出血性大腸菌のゲノム解析を行い、SNPsを抽出した。

A.研究目的

厚生労働省食中毒統計資料によると、近年我が国における食中毒の主要な原因微生物はノロウイルス、サルモネラ属菌、カンピロバクターであり、サルモネラ属菌、カンピロバクターによる年間の食中毒患者数はそれぞれ 670 例、1,840 例（平成 24 年）である。これらは、保健所が食中毒として探知した事例における患者数である。

一方、欧米では食中毒患者の推定数が発表されている。2011 年の米国 CDC による推定では、米国における年間推定食中毒患者数は、全体で 9,400 万人、サルモネラ属菌を原因とする食中毒が 103 万人、カンピロバクターが 84 万人となっている。これに基づいて試算された食中毒全体による医療費、生産性の低下などを含む経済的損失は、5-7 兆円（1 ドル 100 円として換算）、サルモネラ属菌で 9、000 億円を超えると推定されている（推定法により異なる数値が提唱されている）。

このことから、食中毒患者数の削減は公衆衛生上極めて重要な問題であり、米国では広域食中毒事例を早期探知し、事例あたりの患者数を削減するための仕組みとして、異なる地域で分離された食中毒原因菌株の遺伝的同一性を比較するため、パルスネットに多額の予算が充てられている。パルスネットによる事例の検出数は年間 1,200 例に及び、その効果は、費用を大きく上回っている。我が国においても国立感染症研究所において全国から収集された菌株について PFGE が行われているが、結果を得るまでに 2 ヶ月程度を要しており、早期探知には役立っていないのが現状である。

ないのが現状である。

本研究では、最近急速に進展している次世代シーケンサー（NGS）解析技術を利用して食品由来及び食中毒患者由来の食中毒原因菌株のゲノム解析を行うことにより、細菌ゲノムを効率よく比較することの出来る手法を検討し、食中毒と食品の関連を明確にするとともに、ゲノム情報を利用した新たな早期探知法の開発につなげることを目的とする。

B.研究方法

B-1. 解析対象とした菌株

山口県において 2010 年に鶏肉、及び患者から分離されたサルモネラ属菌株を使用した。愛媛県における患者由来株は、協力医療機関、検査センター、保健所及び愛媛県立衛生環境研究所で分離された。食材由来株は、当所及び保健所で分離された。また、家畜（豚）由来株として、と畜場に搬入された豚からの分離株を収集した。1995 年から 2013 年に富山県で分離された食品及び患者由来のサルモネラ属菌の血清型 Typhimurium および Enteritidis をそれぞれ 18 株、合計 36 株を用いた。腸管出血性大腸菌 O157 については、2013 年 7 月に群馬県内で届出された VT2 産生株 (7 株)を用いた。

B-2. DNA の抽出とゲノム解析

Genra Puregene Yeast/Bact. Kit (QIAGEN) によりゲノム DNA を抽出し、Qubit (Invitrogen)、あるいは Qubit 2.0 Fluorometer (ライフテクノロジー社) を用いて定量した。Nextera XT DNA (Illumina)によりライブラリー調整を行っ

た。得られたライブラリーは、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とする DNA を切り出し精製後、Miseq Reagent Kit v3 (Illumina) を使用し塩基配列の読み取りを行った。得られた塩基配列は国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターで解析を行った。

C. 研究結果

C-1. *Salmonella* O:4, i1, -株のゲノム解析

山口県、及び愛媛県で分離にされた *S.* 4, :i-株についてゲノム解析を行った。*S.* 4, :i-株は、flagella を H 抗原の第 1 相が i だが、第 2 相が発現しておらず抗原性が決定できない菌であり、近年、世界的にサルモネラ感染症及び食中毒の主要な原因菌となってきた菌種である。そのうち CVM23701 株は全ゲノム解析がなされている。山口県で分離された *S.* 4, :i-株は、世界的に分離された問題となっているサルモネラ属菌である CVM23701 株と類似していた。この株は、*Salmonella* Typhimurium に塩基配列が類似しており、これを起源として第 2 相の H 抗原をコードする flj A および flj B 遺伝子を含む 70 kb のゲノム領域が欠失している。この欠失により、H 抗原の第 2 相の発現が起こらないことを説明できる。

一方、愛媛県で分離された株は、O4 糖鎖抗原以外に O5, 12 を発現していた。また、ABPC、CP、SM、TC、NA、CTX、CAZ の 7 剤に対して耐性を示す多剤耐性菌であった。この分離株のゲノム解析を行ったところ、CVM23701 株よりも欠失の範囲が狭く、異なるメカニズムにより

独立に生じた菌株である事が予想された。また、この分離株の薬剤耐性遺伝子について解析する目的でプラスミドの遺伝子配列を決定した。

このプラスミドは、約 180 kb からなる不和合性群 Inc A/C のプラスミドで、220 個の ORFs(open reading frames)を含み、そのうち約 100 個は既知の遺伝子であった。この中には、 β -lactamase TEM-1, β -lactamase CTX-M-55, tetracycline repressor protein TetA, quinolone resistance protein, aminoglycoside-3-N-acetyltransferase, streptomycin resistance protein A/B, chloramphenicol acetyl transferase II, florfenicol/chloramphenicol resistance protein Flo, sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase 等の薬剤耐性に関わる多くの遺伝子が存在した。また、プラスミドの接合伝達に関わる遺伝子も多く存在した。

C-2. *Salmonella* Infantis のゲノム解析

愛媛県で分離された *S.* Infantis 70 株の PFGE 解析により系統樹を作成し、菌株間の相同性を解析した。その結果、家畜(豚)由来株が含まれるクラスターA と、鶏肉由来株が含まれるクラスターB のグループに分けられ、患者由来株はどちらにも属していた。

この結果に基づき、食品・家畜由来株と患者由来株間で近縁な組み合わせについてゲノム解析を行った。まず、ゲノム解析でも全て *S.* Infantis であることが確認された。ゲノム解析に基づいて SNPs を抽出し系統樹を作成した結果、食品・家畜

由来株と患者由来株の関係がさらに高分解能で解析することが出来た。遺伝的関連を検討する手法としてこれまで行われてきた PFGE 法では同一のパターンを示したが、NGS 解析では近縁であるが SNPs の差違が認められた。また、同時期に食品と患者からそれぞれ分離された 20-132 株と 20-157 株は同一 SNP (ゲノム塩基配列の完全な一致) であり、同一クローンの可能性が高く、患者の感染源となった可能性を示唆する。また、山口県内で分離された鶏肉由来の *S. Infantis* 株は愛媛株とは異なっており、地域に定着して汚染されていると推測された。

C-3. ゲノム解析技術の検討

限られた予算で本研究事業を行うためには、分離株のゲノムを効率よく解析する技術を確認する必要がある。そのため、富山県衛生研究所では 36 株のサルモネラを用いて、多検体について効率よくライブラリーを作成し再現性良く解析出来る方法を検討した。今回使用したライブラリー作成キットは、MiSeq Reagent Micro Kit, v2 300PE であり、最大 400 万クラスター形成を保障している。この条件では、サルモネラゲノム 480 万塩基対を 4-7 回カバーするリードで読むことが出来た。ドラフトであっても塩基配列を決定した範囲において正確な SNPs を抽出するための正確性を保障するには 200-300 のカバー率が必要である。最近新たに販売された MiSeq Reagent Kit, v3 600PE では、2500 万クラスターを形成し、600 塩基対を解析することが可能であり、これを用いて今後十分なリードを得てカバー率を上げることにより、各地方衛生研究所で年間 200

以上の最近株のゲノム配列を決定する体制を確立していきたい。

C-4. 腸管出血性大腸菌のゲノム解析

次世代シーケンサー (NGS) を活用し、広域的に活用できるデータベースの構築のために、地研に保存されている腸管出血性大腸菌株の網羅的遺伝子解析を行い、有用性について評価を行った。その結果、腸管出血性大腸菌においてもサルモネラと同様にパルスフィールドゲル電気泳動で得られているよりも詳細な情報を得ることができた。さらに、PFGE パターンが同一であった 4 株のうち、3 株の塩基置換数は 1~2 箇所であり、同一のクローンによる感染症である可能性が高いことが分かった。今後、さらに NGS を活用したデータを集積することにより、質の高いデータベースの構築ができることが示唆された。

D. 考察

1. サルモネラ属菌 O4 型別不能株の解析
愛媛県及び山口県で分離されたサルモネラ属菌の内、従来法による血清型分類で第 2 相が決定できないため O4 型別不能に分類されていた *S. 4*、*5*、*12:i:-* 分離株についてゲノム解析を行った。その結果、*S. Typhimurium* に近縁で、H 抗原の第 2 相の発現に関与する遺伝子領域 (*fljA*, *fljB* 等) が欠失していることがわかった。*S. 4*、*5*、*12:i:-* 株は 1990 年頃からスペインで報告され、その後多くの国で感染症や食中毒の重要な原因菌として注目されている。愛媛株の遺伝子欠失の様式は、*S. 4*、*5*、*12:i:-* 株のうち全長のゲノム塩基配列が

報告されている CVM23701 株とは異なっており新しいタイプの S. 4、5、12:i:-株と考えられる。一方、山口県で分離された O4 型別不能株は、これまで報告された CVM23701 株と類似していた。

2. サルモネラ属菌株における薬剤耐性プラスミドの解析

愛媛株は、7種の抗菌薬に耐性であるが、プラスミドの NGS 解析により、本プラスミドが不和合性群 Inc A/C であり、 β -lactamase TEM-1、 β -lactamase CTX-M-55、tetracycline repressor protein TetA、quinolone resistance protein 等の薬剤耐性に関わる多くの遺伝子を保有することが明らかにされた。また、接合伝達に関わる多くの遺伝子も保有しており、このプラスミドの水平伝播により薬剤耐性菌が拡散するリスクが示唆される。NGS ゲノム解析によって、種々の薬剤耐性因子を比較的短時間で解析できることは、耐性菌対策において非常に有用である。

3. 食品、家畜、患者由来の *Salmonella* *Infantis* のゲノム解析

愛媛県で分離された PFGE パターンが同一あるいは近縁の 20 株を NGS ゲノム解析することにより、食品・家畜由来株と患者由来株との関係をより詳細に解析した。PFGE パターンが同一でも、NGS 解析では相違が認められる場合があり分解能が高かった。また、NGS 解析後の SNPs 抽出による系統樹においても、食品由来と患者由来のゲノム配列が類似した組み合わせが 5 組見出され、関連した食品が感染源となった可能性が示唆された。特に、同一 SNP を示した鶏肉由来と患者

由来の 2 株は、同一クローンの可能性が高く、感染源である可能性を強く示唆する。また、山口県で食材から分離された株は、愛媛株とは異なる clade となり、地域的な差も認められた。一般に、PFGE は施設間の精度管理が困難であるが、NGS 解析ではこの問題を回避できる。さらに、NGS ゲノム解析は、病原性因子や薬剤耐性因子等の感染や流行につながる菌株の詳細な情報を得ることが出来る点で有利である。

4. ゲノム解析法の技術的検討

サルモネラ属菌株 DNA を用いて、細菌ゲノム配列を効率よく決定するための技術的検討を行った。ゲノムのリード長は約 150 bp と十分であったが、カバー率は約 3.8 から 7.3 であった。これは、今回使用したキットが MiSeq Reagent Micro Kit, v2 300PE であり、最大 400 万クラスター形成の仕様であったためと思われる。正確に SNPs を抽出するには 200-300 のカバー率が必要であり、これには新たに発売された、MiSeq Reagent Kit, v3 600PE を用いて改善していきたい。

5. 腸管出血性大腸菌のゲノム解析

2013 年 7 月に群馬県内で届出された腸管出血性大腸菌 O157 VT2 産生株 (7 株) を用いてゲノム解析を行った。得られた配列を assemble し、SNPs を抽出して、Clustal W2 を用いた NJ 法による系統樹解析を行った結果、7 株中 5 株が clade8 に属することが明らかとなった。さらに、詳細に塩基置換数を求める為に、O157 Sakai 株に対して genome mapping を行い、SNP を抽出した結果 1,818 箇所の SNP が

得られた。PFGE パターンが同一であった 4 株のうち、3 株の塩基置換数は 1~2 箇所であった。

E 結論

技術的な検討では、MiSeq を用いて多検体同時ゲノム解析の条件を検討し、ほぼ満足できる結果が得られた。今後は、多数の菌株のゲノム情報を安定に得る事ができると思われる。

愛媛県、山口県で分離されたサルモネラ株の NGS ゲノム解析では、H 抗原の第 2 相の発現に関連する遺伝子領域(*fljA*, *fljB* 等)が欠失する *S.* 4, 5, 12:i:- 株であることを明らかにした。愛媛株では、これまで多数報告されて来た *S.* 4, 5, 12:i:- CVM23701 株とは遺伝子欠失部分が異なっていた。一方、山口県の分離株は CVM23701 株に類似していた。愛媛株プラスミドの NGS 解析により、CTX-M-55 遺伝子を有する ESBL 産生菌であり、そのほかの種々の薬剤耐性因子を保有することが判明した。一方、患者、食品（鶏肉）、家畜（豚）から分離された *S. Infantis* のゲノム解析により食品と患者由来の菌の関連性を示すことが出来た。また、腸管出血性大腸菌でも同様の NGS 解析により菌株の遺伝的関連を再現性よく示す事が可能なことが示された。

F.健康危機情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1: Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194-200.
- 2: Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto -Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol*. 2013 Sep;57(9):655-9.
- 3: Niwa S, Tsukagoshi H, Ishioka T, Sasaki Y, Yoshizumi M, Morita Y, Kimura H, Kozawa K. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for detection and quantification of norovirus (GI and GII) and sapovirus. *Microbiol Immunol*. 2014 Jan;58(1):68-71.
- 4: Miyaji Y, Kobayashi M, Sugai K, Tsukagoshi H, Niwa S, Fujitsuka-Nozawa A, Noda M, Kozawa K, Yamazaki F, Mori M, Yokota S, Kimura H. Severity of respiratory signs and symptoms and virus profiles in Japanese children with acute respiratory illness. *Microbiol Immunol*. 2013 Dec;57(12):811-21.

- epidemiology of respiratory viruses in virus-induced asthma. *Front Microbiol.* 2013 Sep 12;4:278.
- 6: Nishina A, Kimura H, Tsukagoshi H, Kozawa K, Koketsu M, Ninomiya M, Sato D, Obara Y, Furukawa S. Neurite outgrowth of PC12 cells by 4'-O- β -D-glucopyranosyl-3', 4-dimethoxychalcone from *Brassica rapa* L. 'hidabeni' was enhanced by pretreatment with p38MAPK inhibitor. *Neurochem Res.* 2013 Nov;38(11):2397-407.
- 7: Ishioka T, Yamada Y, Kimura H, Yoshizumi M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Maruyama K, Hayashi Y, Kato M. Elevated macrophage inflammatory protein 1 α and interleukin-17 production in an experimental asthma model infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161 Suppl 2:129-37.
- 8: Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect Genet Evol.* 2013 Aug;18:168-73.
- 9: Saraya T, Mikoshihara M, Kamiyama H, Yoshizumi M, Tsuchida S, Tsukagoshi H, Ishioka T, Terada M, Tanabe E, Tomioka C, Ishii H, Kimura H, Kozawa K, Shiohara T, Takizawa H, Goto H. Evidence for reactivation of human herpesvirus 6 in generalized lymphadenopathy in a patient with drug-induced hypersensitivity syndrome. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1979-82.
- 10: Takanashi J, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M. Clinical and radiologic features of encephalopathy during 2011 E coli O111 outbreak in Japan. *Neurology.* 2014 Feb 18;82(7):564-72.
- 12: Asano S, Mori K, Yamazaki K, Sata T, Kurata A, Sato Y, Odajima H, Akaike Y, Wakasa H, Kojima M. Necrotizing lymphadenitis (NEL) is a systemic disease characterized by blastic transformation of CD8+ cells and apoptosis of CD4+ cells. *Virchows Arch.* 2014 Jan;464(1):95-103.
- 13: Obuchi M, Adachi Y, Takizawa T, Sata T. Influenza A(H1N1)pdm09 virus and asthma. *Front Microbiol.* 2013 Oct 14;4:307.
- 14: Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, Watahiki M. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based

typing. Appl Environ Microbiol. 2013 Jul;79(13):3959-66.

15: Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, Watahiki M.

Molecular epidemiology of Legionella pneumophila serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama Prefecture, Japan. J Infect Chemother. 2013 Aug;19(4):644-52.

16: Asano Y, Karasudani T, Tanaka H, Matsumoto J, Okada M, Nakamura K, Kondo H, Shinomiya H. Characterization of the Escherichia coli O157:H7 outbreak strain whose Shiga toxin 2 gene is inactivated by IS1203v insertion. Jpn J Infect Dis. 2013;66(3):201-6.

2. 学会発表

なし

Ⅲ.知的所有権の取得状況

なし

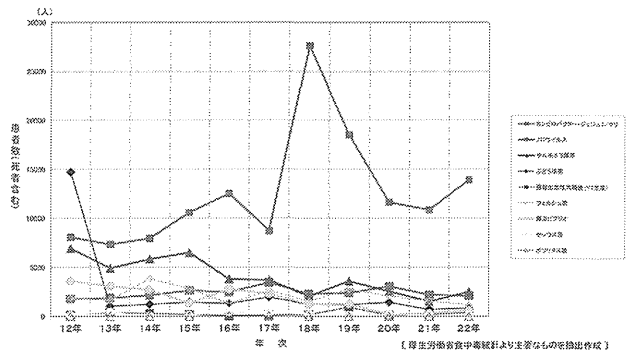
平成26年1月16日 第2回班会議

平成25年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業) 研究

地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析を基盤とする新たな食品の安全確保対策に関する研究 (25231601)

研究代表者 山口県環境保健センター 調 恒明
 研究分担者 群馬県衛生環境研究所 小澤邦寿
 富山県衛生研究所 佐多徹太郎
 愛媛県衛生環境研究所 四宮博人

食中毒発生状況の推移(細菌・ウイルス別 患者数)



年間 患者 / 入院 / 死亡数 (推定)

	サルモネラ			カンピロバクター		
	患者数	入院	死亡	患者数	入院	死亡
英国 FSA	2.7万人	-	84人	32万人	1.5万人	80人
米国 CDC	103万人	1.9万人	378人	84万人	8500人	76人
日本 (実数)	3000人	2300人				
山口県	中規模1医療機関 サルモネラ属菌 10検体/年		小規模1医療機関 カンピロバクター 60検体/年			

患者数(医療負荷)の軽減は公衆衛生の重要課題

PulseNetの日米比較

	日本	米国
解析の場所	感染研	State Labなど87カ所
予算	厚生労働科学研究費	4億円
対象病原体	O157:H7	O157, Non-O157 STEC, Salmonella, Listeria, Shigella, Campylobacter, Vibrio cholerae and parahaemolyticus, Yersinia pestis, and Clostridium botulinum
結果までの期間	1-2ヶ月	1-4日
Cost/benefit analysis	なし	あり
outbreak検出数/年	—	1,200

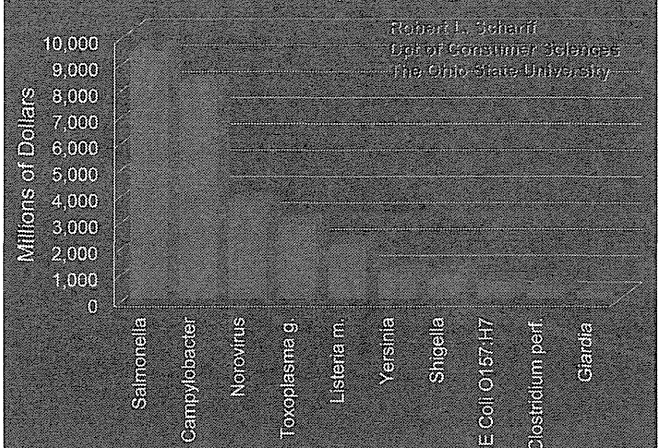
米国: Innovations in Government Award (1999, 2002)

40 MMWR January 21, 2005

Escherichia coli O157:H7 Infections Associated with Ground Beef from a U.S. Military Installation — Okinawa, Japan, February 2004

IASR vol.26, 75-76米軍の牛ひき肉に関連した大腸菌O157:H7感染、2004年—沖縄
 2004年2月、沖縄で米国から輸入された冷凍ひき肉パテにより3名の腸管出血性大腸菌患者が発生(家族内発生:患者由来、パテ由来EHECのPFGEが一致)
 感染研でPFGEを実施し米国にデータを提供
 米国で検出されていないPFGEパターン
 遡り調査により製造元が判明
 翌日、米国食品安全調査機関は4万トンのひき肉の回収を指示

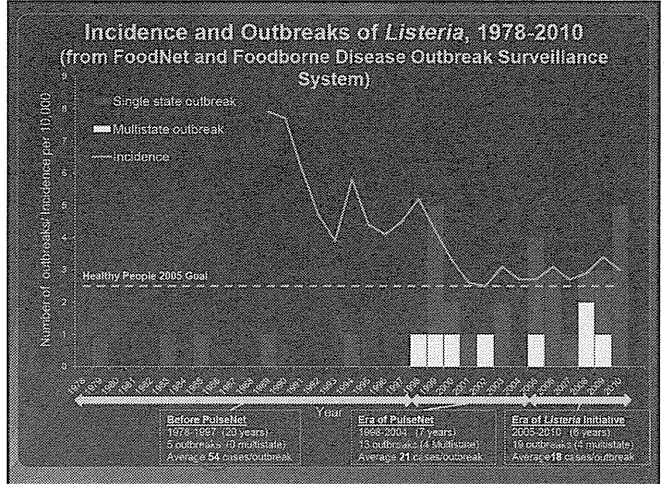
10 Most Costly Pathogens



The Cost Per Case of FBI (\$)

@Risk Used to Perform Monte Carlo Simulations

Pathogen	Mean	Confidence Interval	
		5%	95%
<i>E. Coli</i> O157:H7	14,840	4,430	25,242
<i>Listeria m.</i>	1,695,140	438,420	2,953,520
<i>Salmonella (non-typh)</i>	9,150	2,000	17,970



Fang et al. BMC Bioinformatics 2012, 13:Suppl 1:S4
http://www.biomedcentral.com/1471-2109/13/S4/S4



PROCEEDINGS Open Access

An FDA bioinformatics tool for microbial genomics research on molecular characterization of bacterial foodborne pathogens using microarrays

Hong Fang¹, Jiahua Xu¹, Don Elmg¹, Scott A. Jackson², Isha B. Patel¹, Jonathan G. Frye¹, Wen Zhou¹, Rajesh Nayak¹, Steven Foley¹, James Chen¹, Zhensong Su¹, Rankin Ye¹, Steve Turner¹, Steve Hanft¹, Guangsu Zhou¹, Carl Cheng¹, Wanda Fang¹

From Seventh Annual NCBIS Conference: Bioinformatics Systems, Biology, Informatics and Cooperation, Jacksonville, AR, USA, 19-20 February 2012

ArrayTrack^T

M

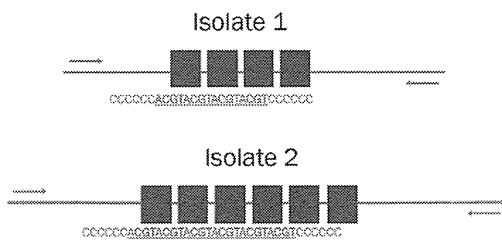
FDA 100 k genome project
July, 2012

PFGEの欠点

- 時間と労力を要する
- データがデータベースによる比較に適していない
- 精度管理が困難
- PFGEパターンが一致しても必ずしもクラスターとは言えない(解像度が悪い)
- 日本では早期探知の役割を果たしていない

MLVA

Multi-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis
Short nucleotide sequences repeated multiple times that vary in copy #



研究の目的

- 広域的アウトブレイクの早期探知法開発への貢献
 - 食中毒菌ゲノム解析によるSNPsの蓄積
 - 将来的にはSNPsを利用したmicroarray?
 - PulseNet (→ MLVA) → SNPsを利用したmicroarray?
- 食中毒原因食品と分離株ゲノムの相関
- 食中毒菌のゲノム解析による薬剤耐性遺伝子情報
- 日本における食中毒原因微生物のゲノムデータベースに貢献

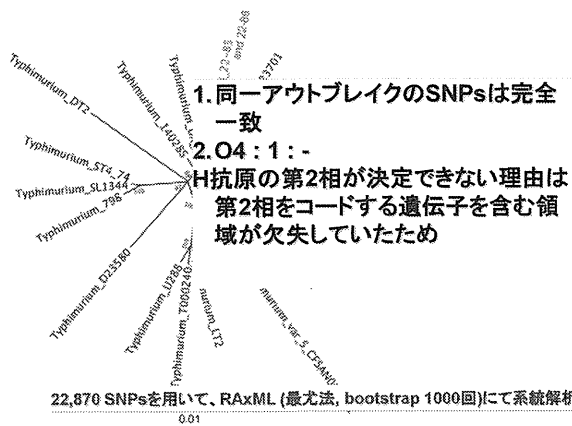
山口県におけるNGSの導入

1. 感染研ゲノムセンターにおける技術研修
2. Illumina社MiSeqの導入
3. 独立したLANの設置
4. Tower PCの購入
5. 解析ソフトの購入

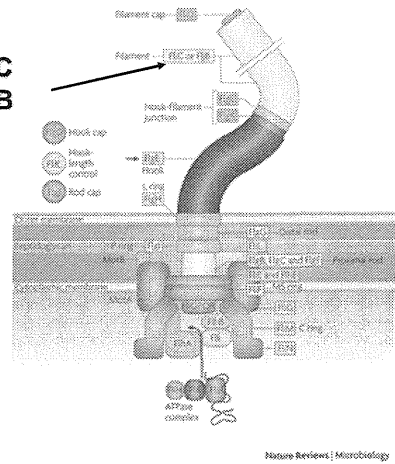
Salmonellaのゲノム解析対象株

2285	O4群:i:- H22 食中毒事例
2286	O4群:i:- H22 食中毒事例 (2285と同一アウトブレイク)
22-133	O4群:i:- H22 汚染実態調査 鶏ミンチ
22-135	O4群:i:- H22 汚染実態調査 鶏ミンチ
Sal24-10	O4群:i:- H24 汚染実態調査 鶏ミンチ

SNPsによる系統解析

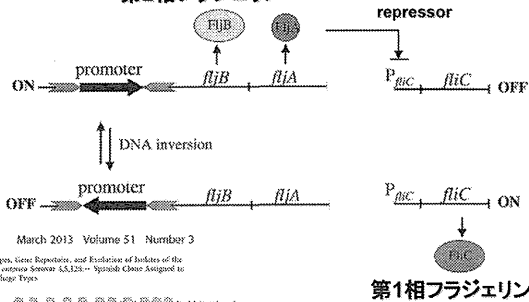


H抗原 第1相:Fli C 第2相:Fli B



サルモネラ菌の鞭毛遺伝子の2者択一的発現

第2相フラジェリン



第1相フラジェリン

March 2013 Volume 51 Number 3

Genetic Types, Gene Repetition, and Evolution of Isolates of the *Salmonella enterica* Serovar 4,5,12:i:- Synovial Chloae Assigned to Different Phylogenetic Types

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

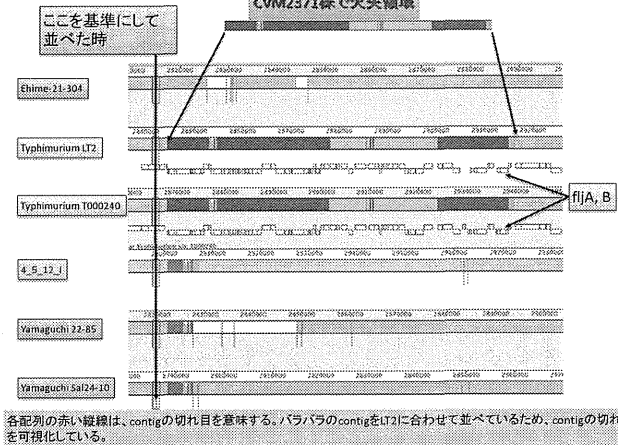
5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

5. Typhimurium DT2

山口分種株およびCVM2371株で欠失領域



各配列の赤い縦線は、contigの切れ目を意味する。バラバラのcontigを1つに合わせ並べているため、contigの切れ目を可視化している。

行政的貢献

- ◎ 次世代シーケンサーの導入と技術習得
- ◎ SNPs解析により遺伝的同一性の比較が可能
- ◎ 血清型では分類できない事の証明
- ◎ 食品由来と食中毒由来の菌の比較
- ◎ 食中毒の原因となるサルモネラ属菌の地域性
- ◎ 食中毒の原因となるサルモネラ属菌の薬剤耐性のメカニズム

学術的アウトプット

◎ 論文作成

O4: i: -

現在のデータでかけるか？

誰がどのように分担するか？

◎ 学会発表

II 分担研究報告

地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析を
基盤とする新たな食品の安全確保対策に関する研究

研究代表者

調恒明 山口県環境保健センター

分担研究者

小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所

研究協力者

佐々木佳子 丹羽祥一 塚越博之 吉住正和 黒澤肇 群馬県衛生環境研究所

関塚剛史 黒田誠 国立感染症研究所

研究要旨

食品汚染による大規模アウトブレイクを早期に探知し、収束させることは「食の安全」には不可欠である。地方衛生研究所（地研）は、食中毒事例などにより病原体の蓄積を行ってきた。地研のネットワークを利用して、病原体ゲノムを広域にわたり網羅的に解析できるデータベースを構築することは大変有用である。そこで、本研究では、次世代シーケンサー (NGS) を活用し、広域的に活用できるデータベースの構築のために、地研に保存されている株の網羅的遺伝子解析を行い、有用性について評価を行った。その結果、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で得られているよりも詳細な情報を得ることができた。さらに、PFGE パターンが同一であった4株のうち、3株の塩基置換数は1～2箇所であり、同一のクローンによる感染症である可能性が高いことが分かった。今後、さらにNGSを活用したデータを集積することにより、質の高いデータベースの構築ができることが示唆された。

A. 研究目的

「食の安全」において、食品汚染を精度良く探知する事が重要である。特に、広域にわたる大規模アウトブレイクでは早期の探知により、事態を収束させることが可能である。近年、急速に発達してきた病原体ゲノムを解析する方法により疫学の精度を高めることや病原体ゲノム情報の活用により発生源の特定や被害拡大の抑制につながることから、培養法を主体とした従来法から病原体のゲノムを活用した新たな方法が求められている。

これまで、地方衛生研究所（地研）では、食中毒事例や感染症発生動向調査事業により分

離された患者由来病原菌株を患者情報と照合できる形で保管してきた。したがって、地研の病原体の蓄積と地研のネットワークを利用し病原体ゲノムのデータベースを構築し、広域食中毒事例の早期探知を可能とするネットワークの構築は有用である。

次世代シーケンサー (NGS) は、大量の核酸配列を偏見無く網羅的に解読することができ、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) よりも詳細な情報を得ることが可能であると考えられる。最近では、すでに結核流行のレトロスペクティブ解析にNGSは利用されている¹。英そこで、本研究では、NGSを活用して、網羅

的な遺伝子解析を行うことの有用性について検討を行った。

B. 研究方法

2013年7月に群馬県内で届出された腸管出血性大腸菌 O157 VT2 産生株 (7株)を用いた。研究に使用した株は、7株のうち4株が PFGE パターンが一致しているが、患者の居住地・行動・食事に共通点なかった。保存してある O157 をトリプトソイブロス (TSB) で24時間培養し、実験に使用する前に、再び TSB で4時間培養した。遠心により菌を集め Genra Puregene Yeast/Bact. Kit[®] (QIAGEN) によりゲノム DNA を抽出し、Qubit (Invitrogen)により定量した。Nextera XT DNA[®] (Illumina)によりライブラリー調整を行った。得られたライブラリーは、電気泳動し、目的とする DNA を切り出し精製後、Miseq Reagent Kit v3[®] (Illumina)を使用し塩基配列の読み取りを行った。得られた塩基配列を、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターに依頼し、解析を行った。

C. 研究結果

得られた遺伝子を assemble し、Clustal W2 を用いた NJ 法による系統樹解析を行った結果、すべての株が O157 であり、7株中5株が clade8 に属することが明らかとなった (図1)。さらに、詳細に塩基置換数を求める為に、O157 Sakai 株に対して genome mapping を行い、SNP を抽出した結果 1,818 箇所 の SNP が得られた。PFGE パターンが同一であった4株のうち、3株の塩基置換数は1~2箇所であった (表1)。

D. 考察

系統解析の結果から、すべての株が O157 であることが確認され、さらに clade8 に属する株が7株中5株であり、同一 PFGE パターンの株間の SNP 数は少ないことから、ほぼ同一のクローンによる EHEC 感染症である可能性が高い

ことが示唆された。今後、さらに疫学的な調査も加えることも重要と考えられる。

E. 結論

本研究において、NGS を活用し O157 の詳細な解析を行うことにより PFGE では分からなかった SNP を多数見つけることができた。このことは食中毒菌ゲノムデータベースを構築するためには、とても重要なことであるため、今後データの蓄積が必要である。したがって、次年度以降は、今年度の成果を基に、多くの食中毒菌について解析を行っていく必要がある。

F. 参考文献

1. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, *et al.* (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 364: 730–739.

G. 研究発表

論文発表

1. Niwa S, Tsukagoshi H, Ishioka T, Sasaki Y, Yoshizumi M, Morita Y, Kimura H, Kozawa K. Triplex real-time PCR assay for detection and quantification of norovirus (GI and GII) and sapovirus. *Microbiol Immunol.* 2013; 58(1), 68-71.

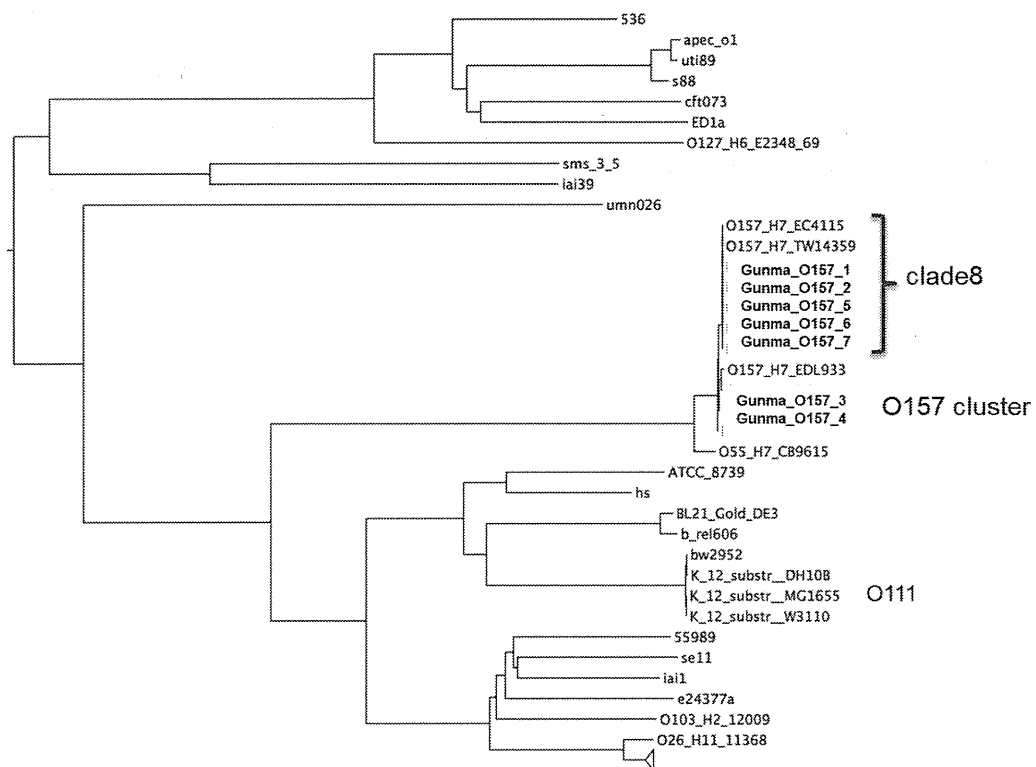
H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

I. その他

謝辞

本研究の遂行にあたり、知識や技術的なご協力を頂きました国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの皆様にご心より感謝申し上げます。



0.02
 図1 分子系統樹 (NJ法)

表1 PFGEパターンが同一であった4株間の塩基置換数

	Gunma_O157_3	Gunma_O157_6	Gunma_O157_7
Gunma_O157_2	1,123	1	2
Gunma_O157_3		1,122	1,123
Gunma_O157_6			1

地方衛生研究所の連携による
食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析を基盤
とする新たな食品の安全確保対策に関する研究

群馬県衛生環境研究所
小澤 邦壽

研究計画

- 次世代シーケンサーを活用
- 食品から網羅的に病原微生物を検出
- 食中毒菌ゲノムデータベースを構築



食中毒事例の菌株のゲノム情報と比較・照合し、
原因食品の同定に活用

平成25年度

- 当研究所への次世代シーケンサー導入
- 次世代シーケンサーを用いた、分離菌株からのゲノム解析技術の研修

使用した菌株

- 2013年7月に群馬県内で届出された腸管出血性大腸菌 O157 VT2産生株 7株
- 7株中4株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)パターンが一致
- 患者の居住地・行動・食事に共通点なし

方法

DNA抽出
Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit®(QIAGEN)



ゲノムライブラリー調整
Nextera XT DNA® (illumina)



電気泳動・切り出し精製



シーケンス

Miseq Reagent Kit v3® (illumina)



期待される成果

結果：現在解析中

- ◆ 正確な塩基配列が判明するため、PFGE法よりも精度の高い解析ができる
- ◆ 地方衛生研究所間でのデータの比較が容易になる
- ◆ 薬剤耐性遺伝子の解析やデータベース化等に活用できる



食中毒の原因究明に役立つ

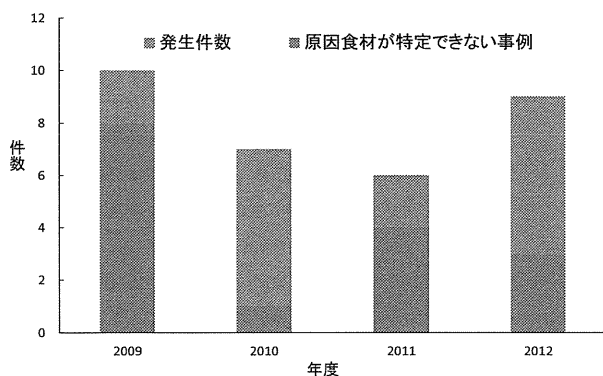
今後の研究計画

- 当研究所において、分離菌株からのゲノム解析を行う
- 次世代シーケンサーを活用した、食品からの病原微生物検出方法の確立
- 食中毒菌ゲノムデータベースを構築するためのデータ収集

EHEC 157 VT2 産生株

	A	B	C	D	E	F	G
届出日	7月1日	7月4日	7月5日	7月8日	7月4日	7月2日	7月8日
居住地	東京都	藤岡市	前橋市	長野県	安中市	高崎市	太田市
年齢	1	24	44	37	8	79	58
性別	女	男	女	男	女	女	男
HUS発症	無	無	無	無	無	無	無
H型別	7	7	7	7	7	NM	7

群馬県における食中毒



背景

- 食品汚染によるアウトブレイクには早期の探知が重要
- 次世代シーケンサーの活用により病原微生物の網羅的遺伝子解析が可能となった
- ゲノム情報の活用により発生源の特定や拡大の抑制につながる

地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析を基盤とする
新たな食品の安全確保対策に関する研究
—食品中のサルモネラ属菌のメタゲノム解析と食品分離株及び臨床分離株のゲノム解析—

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所・所長）
研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所・主幹研究員）
研究協力者 磯部 順子（富山県衛生研究所・副主幹研究員）
研究協力者 木全 恵子（富山県衛生研究所・主任研究員）
研究協力者 清水美和子（富山県衛生研究所・主任研究員）
研究協力者 増田千恵子（富山県衛生研究所・主任研究員）
研究協力者 金谷 潤一（富山県衛生研究所・研究員）

研究要旨 大量の塩基配列データが得られる次世代シーケンサー（NGS）を、感染原因が不明であった事例に活用したところ、NGS は原因究明法として有用であることが知られるようになってきた。そこで、本研究は、NGS を用いた細菌ゲノム解析技術を確立することにより、食品や臨床検体から分離された病原細菌のゲノム情報による食品の安全性を確保する、微生物汚染の制御のための科学的根拠を提供することを目的とする。今年度は、NGS のひとつである MiSeq を用いて食中毒原因菌として重要なサルモネラ属菌 36 株のゲノム解析を効率よく実施するための各工程の技術評価を行なった。その結果、予備的な結果ですが、MiSeq から出力された多数の配列の統計的数字からほぼ満足する結果が得られていることが判明した。今後は、多数の分離株について高品質のゲノム情報が得られることが期待される。

A. 研究目的

近年の食品流通システムの変化により、先進国では、病原微生物に汚染された流通食品が原因となる大規模かつ広域化した集団発生がしばしば報告されている。例えば腸管出血性大腸菌（EHEC）の食中毒の発生は重大な健康危機をもたらしている。その中で、地方衛生研究所（地衛研）は、法律にもとづき、集団発生時に食品あるいは臨床検体から病原体検索を行い、分離された病原体の解析から、原因究明に資する科学的根拠を提供する業務を行っている。しかし、原因となる病原体が検出できず、原因不明となる事例も少なくない。一方で、一度に大量の塩基配列データを簡単に得ることが可能となる次世代シーケンサー（NGS）が利用できるようになり、これまで原因が不明であった事例でも原因究明のための技術として非常に有用であることが知られるようになってきた。

しかしながら、NGS の利用は、これまで一部の研究機関の利用に限られていた。その理由は、当初、装置は非常に高額であり、装置を稼働させるための専用試薬も高額であることによる。さらに膨大な DNA 配列の情報処理を行う技術も、地衛研ではほとんど経験もなく、NGS を用いた解析はほとんど考えられていなかった。

2011 年に NGS のポータブル型機器が発売され、また、この NGS で出力される膨大な塩基配列データを処理する Windows ベースのソフトウェアが利

用可能となりつつあった。このような時期に、富山県を中心として、多数の重症患者（うち死亡 5 名）を含む食中毒患者 181 名の EHEC による集団食中毒事例が発生し、検査機能の充実を図るという理由で、地衛研として初めて富山県衛生研究所に NGS の一つであるイルミナ社の MiSeq が設置された。そこで、本研究では、NGS を用いた細菌ゲノム解析技術を導入、確立することにより、食品や臨床検体から分離された病原細菌のゲノム情報による食品の安全性を確保するための、微生物汚染を制御のための科学的根拠を提供することを目的としている。

さらに近年では、人や様々な食品、物が地球規模で動いており、これに合わせて感染症や食中毒もグローバル化し、複雑化している。従って、地衛研の業務も世界的な視野に立って、遂行することが求められるようになり、新規な病原体や複雑化する感染症、食中毒が発生したとき、迅速な原因究明に NGS の活用が期待される。

従って、本研究では、MiSeq を活用して、臨床及び食品から分離した食中毒菌のゲノム解析を行い、そのデータを利用して、病原性に関わる遺伝子の探索と保有状況、薬剤耐性遺伝子の探索と保有状況、及びその表現形質との比較、さらにゲノム上の SNP を用いた詳細な系統解析の可能性を評価する。

本年度は、まだ導入されたばかりの MiSeq を使

用して、複数のサルモネラ属菌分離株を効率的に解析するための、技術的を行ったので報告する。これにより、高品質な細菌ゲノム解析技術の確立が可能となる。

B. 研究方法

B-1. 供試菌株

今回の研究には、当所の保存株であるサルモネラ属菌のうち、1995年から2013年にかけて、分離された血清型TyphimuriumおよびEnteritidisをおのおの18株、合計36株を選定し、用いた。尚、各血清型では、食品及び臨床検体（主に便）から分離された株として、9株ずつ選定した。

選定された36株の疫学情報については、表1に示した。

B-2. 供試菌のゲノムDNAの抽出と解析

供試菌は、トリプチケースソイ寒天培地（TSA）上で一晚培養した新鮮コロニーから、Genra Puregene Yeast/Bact. Kit（キアゲン社）を用いて、添付プロトコールに従って、ゲノムDNAを調製した。調製したDNAは、Qubit® 2.0 Fluorometer（ライフテクノロジー社）を用いて、DNA濃度を測定した。

B-3. DNAサンプル調製

MiSeqで解析するサンプルは、Nextera XT DNA サンプル調製キット（イルミナ社）を用いて、調製した（これを「Nextera XT DNA ライブラリー」と称する）。合成したDNAの一部を、2%Nusieve3:1アガロース（Takara Bio）で電気泳動して、合成反応がうまく進行しているかどうか確認した。また、DNA分画するときは、1%アガロース電気泳動を行い、電気泳動後、臭化エチジウムで染色し、LEDランプ照射下、アガロースを切り出し、Montage DNA Gel Extraction Kit（ミロポア）で、溶出後、液を濃縮した。その一部をMiSeq Reagent Micro Kit, v2 300PEを用いて、その塩基配列を得た。

B-4. MiSeq データの情報処理

MiSeqからの出力データは、fastq形式として保存し、CLC Genomics Workbenchで読み込み、付属の*de novo assembly*を用いてcontigs作製を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究は、解析対象にはヒトゲノム配列情報等は含まれていないため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

C-1. 供試菌株のゲノムDNAの調製

TSA 寒天培地上の一晚培養した新鮮コロニーから、Genra Puregene Yeast/Bact. Kitを用いて抽出した。

C-2. Nextera XT DNA サンプル調製キットによるマルチプレックス・インデックス配列を含むサルモネラゲノムDNAライブラリーの構築

36株のサルモネラゲノムDNAは、0.2ng/μLとして、その5μL（トータル1ng DNA）をライブラリー作製の出発とした。キットの手順書に準拠した方法で実施した。最後のPCRの工程では、MiSeqで解析する際に、36株の区別を可能とする2つのインデックス配列（8塩基長）を導入した最終50μL反応物の2.5μLを電気泳動したところ、約2kbp程度まで合成産物が検出された（図1）。

これらの反応物を、6株ごとにプールし（サルモネラ株番号1~6、7~12、13~18、19~24、25~30、31~36；各々のプールは、以後、a, b, c, d, e および f とする）、1%アガロース電気泳動し、0.5~1kb（small）および1~2kb（large）の2つの分画にゲルを切り出した（図2）。切出したアガロースゲルブロックから抽出したDNA溶液をQubitでその濃度を測定したところ、DNA pool a, b, c, d, e および f は、各々、0.644, 1.064, 0.822, 0.836, 1.026, 0.832 ng/μL であった。

C-3. MiSeqによる解析

今回は、サルモネラ分離株#1~18のTyphimuriumについて、図2で0.5-1kbの大きさを抽出したDNA pool a, b および c をMiSeq Reagent Micro Kit, v2 300PEを用いて、解析した。DNA pool a, b および c のインプット量は、アガロース電気泳動の切出したサイズの平均鎖長を750bpとし、DNA分子数を推定し、MiSeq解析に使用するキットのFlow Cellに形成可能なクラスター数（約400万クラスター）を参考にしながら決定した。今回は、pool a, b および c について、おのおの150万クラスター形成可能なインプット量とし、推定クラスターは、合計450万とした。これらのDNAライブラリーをMiSeqで解析し、データはfastq形式で保存したファイルを、CLC Genomics Workbenchに読み込んだ。今回、解析した16株については、すべて、独自の組み合わせでインデックス配列を付加しており、16株ごとにリード配列を集計することが可能である。そこで、CLC Genomics Workbenchの*de novo assembly*を用いて、解析した結果の統計値を表2に示した。

その統計値から、解析としてはほぼ満足できる結果であった。そのキットの仕様は、最大400万リードであるが、実際に得られたリード数は、約300万リードであった（表2）。また、サルモネラのゲノムサイズは、約480万塩基対と報告されて

いることから、アセンブル後のトータル塩基として、今回解析したサルモネラの 18 株のいずれの株について、ほぼ 480 万塩基対であった。一方で、解析した塩基のカバー率（各株あたりのトータル塩基数をサルモネラのゲノムサイズ約 480 万塩基で除した値）を見ると、最小 3.82、最大 7.34 であった。

D. 考察

本研究は食中毒菌のゲノム解析を NGS で行い、その配列から、系統関係や新規な病原因子やその関連遺伝子を探索し、より詳細なゲノム情報から、食中毒菌の特徴を把握し、食品の安全確保を可能とする微生物汚染の制御のための科学的根拠を提供することを目的とする。従って、限られた予算の中から、本事業を成功させるためには、複数の分離株ゲノムを効率よく解析する必要がある。従って、使用する MiSeq の試薬キットの仕様を最大限利用することが、重要となる。それには効率のよい DNA ライブラリーの作製が必須である。そこで、今年度は、サルモネラ 36 株の多検体同時に解析する条件を検討し、再現性の高い、解析プロトコールの作製を目指した。

MiSeq の解析にはイルミナ社から発売されている MiSeq Reagent Kit を使用する必要があるが、目的により、様々な仕様のなかから選択する必要がある。特に、解析リード長と解析量（クラスター形成能）が重要である。そこで、解析したい検体のゲノム DNA から、MiSeq で結果を得るためには、専用の試薬キットで DNA ライブラリーを作製する必要がある。しかし、検体 DNA の品質に依存して、作製された DNA ライブラリーの品質に影響することが十分予想された。今回、我々はイルミナ社が発売している Nextera XT DNA サンプル調製キットを使用した。操作は極めて簡単であるが、合成されたライブラリーの品質を上げるためのサイズセレクションや多検体を同時に解析する場合、得られるデータのバラツキによるゲノム配列データの信頼性に影響するため、この点についてまず評価が必要であった。そこで、今回は、サルモネラ 36 株からゲノム DNA を抽出し、同時に Nextera XT DNA ライブラリーを作製し、そのうち 18 株の同時解析を行い評価した。その結果は、表 2 に示したとおり、ほぼ満足できる結果となった。また、

18 株もおおの均一なリード数が得られていた。しかし、そのカバー率は最小 3.82、最大 7.34 であった。NGS を用いた解析では、ゲノムは配列情報に基づき解析をする場合には、カバー率は 200～300 程度は必要であり、それには今回の解析では達していない。これは、今回使用したキットが MiSeq Reagent Micro Kit, v2 300PE であり、最大 400 万クラスター形成の仕様であったためである。MiSeq は、過剰のクラスターを形成させると構造上、データとして全く取れなくなるので、ちょうどよいインプット量を計算し、使用することが重要である。そこで今回の結果であるが、計算上 450 万クラスターを形成するインプット量を使用した。実際には全体で、約 300 万クラスター（表 2 の「Read No」を参照）であったので、適切なクラスターを形成させることにほぼ成功したと思われる。

イルミナ社は MiSeq Reagent Kit, v3 600PE というキットの発売を開始した。このキットは、クラスター形成能が約 2,500 万であることと、一つのクラスターから 600 塩基の情報を取得することができる。これを用いれば、計算上、18 株のサルモネラは、カバー率 150 となり、充分ゲノム解析が可能となると思われる。今後、このようなキットを用いて、安定なデータが得られるように工程の評価を行いながら、年間、100～200 株の菌株を解析できるまでプロトコールの作成を目指したい。

E. 結論

MiSeq を用いて、多検体同時ゲノム解析の条件を検討し、ほぼ満足できる結果が得られた。今後は、多数の菌株のゲノム情報を安定に得られることが期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 本研究で使用するサルモネラ属菌の特徴

(1) Typhimurium

	No.	No.	分離年	血清型	O	HI	HII	由来	ファージ型	備考	薬剤耐性
食品由来株	1	1620	1995	Typhimurium	4	i	1,2	食品			CP,TC,SM,KM
	2	1973	1998	Typhimurium	4	i	1,2	食品			CP,TC,NA,MINO
	3	2538	2001	Typhimurium	4	i	1,2	食品	U302		
	4	2915	2005	Tym-v	4	i	-	食肉			
	5	2939	2005	Tym-v	4	i	-	食肉			
	6	3120	2010	Tym-v	4	i	-	食肉			
	7	3418	2012	Typhimurium	4	i	1,2	食肉			KM,NA,ABPC
	8	3456	2013	Typhimurium	4	i	1,2	食肉			
臨床株	9	2091	1999	Typhimurium	4	i	1,2	男	104		CP,SM,ABPC
	10	2588	2001	Typhimurium	4	i	1,2	男	104B	無症状	CP,TC,SM,MINO
	11	2589	2001	Typhimurium	4	i	1,2	女	104B	無症状	CP,TC,SM,MINO
	12	2202	1999	Typhimurium	4	i	1,2	女	not104 related		
	13	2487	2000	Typhimurium	4	i	1,2	男	not104 related	下痢	CP,TC,SM,KM,ABPC
	14	2495	2000	Typhimurium	4	i	1,2	男	U302		CP,TC,SM,ABPC
	15	2595	2001	Typhimurium	4	i	1,2	女	not104B	下痢・発熱	CP,TC,SM,MINO
	16	2602	2001	Typhimurium	4	i	1,2	女	not104B	下痢・発熱	TC,SM,MINO
	17	3221	2011	Typhimurium	4	i	1,2	便	未	下痢・腹痛・発熱・血便	TC,CET,ABPC,MINO (AmpC)
	18	3369	2012	Typhimurium	4	i	1,2	男			

(2) Enteritidis

	No.	No.	分離年	血清型	O	HI	HII	由来	ファージ型	備考	薬剤耐性
食品由来株	19	2850	2005	Enteritidis	9,12	g,m	-	食肉	RDNC		TC,SM,CET,ABPC
	20	2763	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	環境	7		SM
	21	2764	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	環境	1		SM
	22	2765	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品	47		
	23	2789	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品	RDNC		
	24	2436	2000	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品			
	25	2437	2000	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品			
	26	2446	2000	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品			TC,SM
臨床株	27	2762	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	便	1		SM
	28	2766	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	便	7	下痢	SM
	29	2795	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	便	47	下痢・嘔吐	
	30	2805	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	便	RDNC	下痢・発熱	TC
	31	2807	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	便	4	腹痛・発熱・嘔吐	
	32	2842	2005	Enteritidis	9,12	g,m	-	便	RDNC		
	33	2974	2006	Enteritidis	9,12	g,m	-	便			
	34	2989	2007	Enteritidis	9,12	g,m	-	血液			TC,SM,KM,NA,GM,ABPC,MINO
	35	3014	2008	Enteritidis	9,12	g,m	-	便		下痢	
	36	3020	2008	Enteritidis	9,12	g,m	-	便		下痢・腹痛・嘔吐	SM, ABPC

CP クロラムフェニコール
 TC テトラサイクリン
 SM ストレプトマイシン
 KM カナマイシン
 GM ゲンタマイシン
 NA ナリジクス酸
 CET セファロチン
 ABPC アンピシリン
 MINO ミノサイクリン

表2 サルモネラ分離株 (Sal01~18) の MiSeq によるゲノム配列解析の概要

	Estimated clustered numbers	MiSeq Reads			Contigs by CLC assembler			Av.coverage
		Read No.	Av. Length	Total bases	Contig No.	Av.Length	Total bases	No of reads
Sal01		192,291	149	28,664,858	2,284	2,072	4,732,695	6.06
Sal02		181,550	149	27,059,861	2,759	1,721	4,749,926	5.70
Sal03	pool a 1,568,417	204,369	149	30,550,471	2,036	2,326	4,736,986	6.45
Sal04		120,990	149	18,070,590	4,084	1,006	4,111,524	4.40
Sal05		202,870	149	30,294,865	1,935	2,423	4,689,720	6.46
Sal06		99,531	149	14,796,907	4,691	819	3,845,151	3.85
Sal07		192,839	149	28,670,150	2,906	1,675	4,869,521	5.89
Sal08		186,483	149	27,767,463	3,026	1,595	4,826,830	5.75
Sal09	pool b 1,503,024	167,403	149	24,900,399	2,937	1,580	4,642,361	5.36
Sal10		239,055	149	35,627,468	1,379	3,521	4,855,708	7.34
Sal11		226,558	149	33,762,460	1,614	2,997	4,838,468	6.98
Sal12		219,300	149	32,726,002	1,602	2,955	4,734,577	6.91
Sal13		110,040	150	16,473,335	4,923	834	4,106,046	4.01
Sal14		200,406	150	29,988,188	1,684	2,817	4,745,124	6.32
Sal15	pool c 1,516,579	107,874	150	16,148,005	4,647	865	4,023,893	4.01
Sal16		134,177	150	20,069,505	3,708	1,159	4,298,685	4.67
Sal17		134,900	150	20,182,022	3,685	150	4,336,148	4.65
Sal18		101,342	150	15,151,752	4,892	809	3,962,107	3.82
		4,588,020	3,021,978					

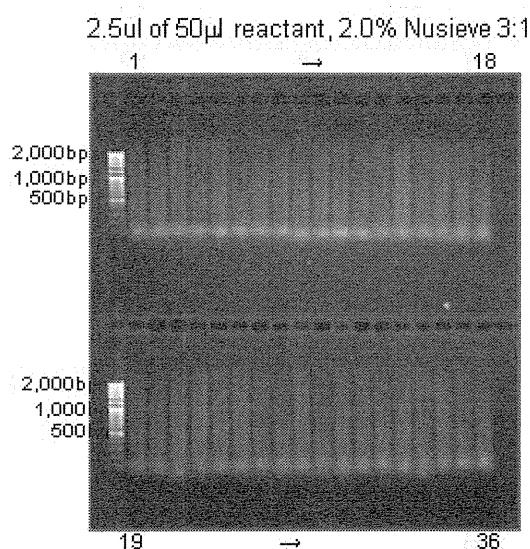


図1 Nextera XT DNA サンプル調製キットによるサルモネラゲノム Nextera XT DNA ライブラリーの調製

Library Pooling:
a; 1-6, b; 7-12, c; 13-18
d; 19-24, e; 25-30, f; 31-36

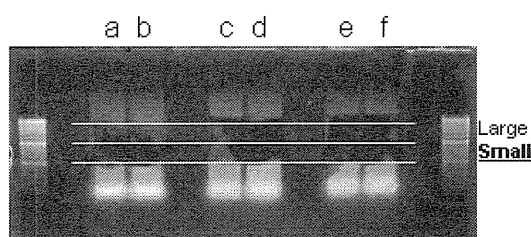


図2 サルモネラゲノム Nextera XT DNA ライブラリーの分画 (ゲルの切出し) とサンプリングの確認

平成25年厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進事業)
平成26年1月16日 平成25年度第2回班会議

地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の
網羅的ゲノム解析を基盤とする新たな食品の
安全確保対策に関する研究

(H25-食品-一般-016)
研究代表者: 調恒明

研究分担者: 佐多徹太郎

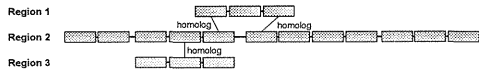
研究協力者: 綿引正則、磯部順子、清水美和子
木全恵子、金谷潤一、増田千恵子

細菌分離株の比較ゲノム解析から見えるもの
-NGSによるゲノム解析から得られる分離株"heterogeneity"-
目的:ゲノムワイドな食中毒菌の解析による新たな食中毒菌制御技術の開発

- ① 食中毒菌制御に必要な情報
 - ・食品分離株と臨床分離株の遺伝的關係
 - ・病原関連遺伝子レパートリー解析による比較
 - ・薬剤耐性遺伝子の有無と発現調節
 - ・新たな疫学マーカーの探索
- ② 必要な技術
 - ・多数の分離株の解析プロトコールの開発
(wet)DNA抽出法、ライブラリー構築法、MiSeq試薬キット
(dry)解析リード処理(Windows or Linux?)
 - ・機能解析
DNA-seqとRNA-seq

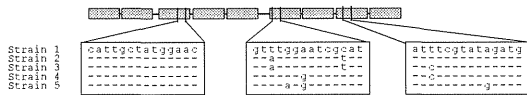
細菌分離株の比較ゲノム解析から見えるもの
-ゲノム解析から得られる分離株"heterogeneity"-

① 遺伝子構成



薬剤耐性菌遺伝子の存在と表現形質
CRISPRの構造(疫学マーカーとしての期待)

② SNPs in the core genome regions



ドラフト配列で可、イルミナリードでassemble後のcontigのみで株特異的SNPを探す

NGSを用いたサルモネラ属菌比較ゲノム解析とその活用
-ゲノム解析から得られる"heterogeneity"の利用-

- ① 分離株のゲノム解析:
SNPsと構成遺伝子情報
- ② 食肉、便の細菌叢解析:
肉にどれだけ存在する?
- ③ 食品分離株と臨床株の関連を示す、疫学マーカーの探索
- ④ 分離株レベルの"株バリエーション配列"の収集とデータベース化

調班事業:食品中のサルモネラ属菌のメタゲノム解析
と食品分離株及び臨床分離株のゲノム解析
技術的検討課題(今年度解析)

- ① MiSeqを利用した解析のパイプラインの構築
分離株ゲノム解析とメタ解析
- ② 食品分離株と臨床分離株のゲノム解析:
株の多様性を示す、疫学マーカーの探索(core SNPsと構成遺伝子情報)⇒複数株のゲノム比較、一回のランでどれだけ解析
- ③ 食肉、便の細菌叢解析:
食肉一汚染菌数は少ない
・MiSeqリード数で充分か→ V3 (2500万クラスター)
・16S rDNAによる細菌叢解析
便一ヒト配列も解析してしまう⇒倫理問題配慮
- ④ 分離株レベルの"株バリエーション配列"の収集とデータベース化:
⇒研究班目的のひとつ

Salmonella Typhimurium 18株のゲノム解析 (食品由来8株+臨床分離10株)

No.	No.	分離年	血清型	O	H	H	由来	ファージ型	備考	薬剤耐性
1	1620	1995	Typhimurium	4	i	1,2	食品			C,Te,S,KM
2	1870	1998	Typhimurium	4	i	1,2	食品			C,Te,NA,M
3	2238	2001	Typhimurium	4	i	1,2	食品	U902		
4	2915	2005	Typhimurium	4	i	-	食肉			
5	2928	2005	Typhimurium	4	i	-	食肉			
6	3120	2010	Typhimurium	4	i	-	食肉			
7	3418	2012	Typhimurium	4	i	1,2	食肉			
8	3456	2013	Typhimurium	4	i	1,2	食肉			
9	4201	1999	Typhimurium	4	i	1,2	男	104		C,S,AM
10	2598	2001	Typhimurium	4	i	1,2	男	104B	無症状	C,Te,S,M
11	2589	2001	Typhimurium	4	i	1,2	女	104B	無症状	C,Te,S,M
12	2702	1999	Typhimurium	4	i	1,2	女	not104 related		
13	2487	2009	Typhimurium	4	i	1,2	男	not104 related	下痢	C,Te,S,K,AM
14	2495	2009	Typhimurium	4	i	1,2	男	L802		C,Te,S,AM
15	2595	2001	Typhimurium	4	i	1,2	女	not104B	下痢+発熱	C,Te,S,M
16	2602	2003	Typhimurium	4	i	1,2	女	not104B	下痢+発熱	Te,S,M
17	3221	2011	Typhimurium	4	i	1,2	便		下痢+腹痛+発熱+悪臭	Te,CF,AM,M (AmpC)
18	3389	2012	Typhimurium	4	i	1,2	男			

株の選定
・食品由来株8株(保管株のすべて)
・ファージ型別、薬剤耐性プロファイル

Salmonella Enteritidis 18株のゲノム解析 (食品由来8株+臨床分離10株)

No.	No.	分離年	血清型	O	H	H ₂	由来	ファージ型	備考	薬剤耐性型
19	2950	2005	Enteritidis	9,12	g,m	-	肉類	RDNC		TE,S,CF,AM
20	2762	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏糞	7		CS
21	2764	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏糞	1		CS
22	2765	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品	47		
23	2769	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品	RDNC		
24	2406	2000	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品			
25	2437	2000	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品			
26	2446	2000	Enteritidis	9,12	g,m	-	食品			Te,S
27	2762	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏	1		CS
28	2765	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏	7	下痢	CS
29	2765	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏	47	下痢・嘔吐	
30	2805	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏	RDNC	下痢・発熱	Te
31	2807	2004	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏	4	腹痛・発熱・嘔吐	
32	2842	2005	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏	RDNC		
33	2974	2009	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏			
34	2989	2007	Enteritidis	9,12	g,m	-	血液			Te/S/K/NA/SMA/AM/SH
35	3014	2008	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏		下痢	
36	3020	2008	Enteritidis	9,12	g,m	-	鶏		下痢・嘔吐・発熱	S/AM

株の選定

- 食品由来株8株(保管株のすべて)
- ファージ型別、薬剤耐性プロファイル

MiSeqを用いたサルモネラ属菌ゲノム解析パイプラインの構築 : 今年度実施内容

DNA and/or RNA isolation

プロトコル (細菌ゲノム、発現遺伝子解析 etc)

⇒サルモネラ36株のゲノム

(gentra Purgene Yeast/Bact.Kit, Qiagen)

ライブラリー作製

プロトコル (NexteraXT, Amplicon, TureSeq?)

⇒サルモネラ36株のライブラリー作製

MiSeq run

使用試薬キット (V3 600PE) - MiSeq不具合、現在、調整中

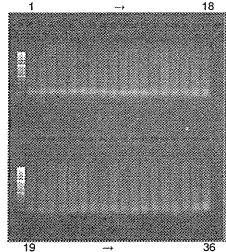
解析ソフトウェア (解析プラットフォームの構築)

Linux環境の整備 (blast, SAMtools, etc) - 現在、整備中

DNA library construction of Salmonella 36 strains by Nextera XT+Index Kit

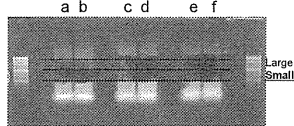
- 注目点: ①多検体同時処理 ②DNAライブラリーのインサート長
③プールサンプルのノーマライゼーション

2.5ul of 50ul reactant, 2.0% Nusieve 3:1



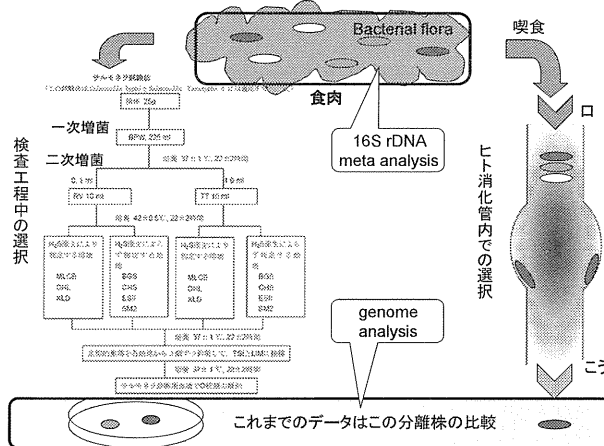
Library Pooling:

- a; 1-6, b;7-12, c;13-18
d; 19-24, e; 25-30, f; 31-36



MiSeq Run: (1st) Reagent 600 cycle Kit v3, (2nd) Reagent 150 cycle Kit v3
Results: Machine errors!
Under checkup by Illumina. (2014.1.13)

細菌性食中毒を考える



今後の研究スケジュール

平成25年度 (食肉のサルモネラ属菌の網羅解析、分離株ゲノム解析の準備)

- 網羅解析のための対象遺伝子の選定と評価
- 高品質ゲノム情報のためのライブラリー作製技術の検討とその評価

平成26年度 (分離株のゲノム解析と食品メタ解析)

- サルモネラ分離株36株+α (計150株程度)
- 食品 (食肉) のメタ解析 (16S rDNA等)

平成27年度 (食中毒菌の制御技術に関する新規情報の抽出)

- サルモネラ分離株のプラスミドの解析、発現遺伝子の網羅解析 (耐性遺伝子等)
- 迅速検査法の提言 (分離株の遺伝子型別、便・食肉における新たなサーベイランス法)
- 解析プロトコルの整備
- 取りまとめ (データベースの構築、ネットワークの利用)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析を基盤とする
新たな食品の安全確保対策に関する研究
研究代表者 調 恒明 山口県環境保健センター・所長

分担研究報告書

愛媛県内で、患者、食材、家畜から分離されたサルモネラ株の
次世代シーケンサーによるゲノム解析

研究分担者	○ 四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
	烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	黒田 誠	国立感染症研究所
	関塚 剛史	国立感染症研究所
	小笠原 由美子	国立感染症研究所

研究要旨

愛媛県において、感染性胃腸炎患者、食材、家畜から分離されたサルモネラ株を対象に、次世代シーケンサー(NGS)を用いてゲノム解析を実施し、いくつかの新たな知見が得られた。まず、従来の方法では、血清型が O4 型別不能に分類されていた患者由来株が、NGS ゲノム解析により、遺伝的に *S. Typhimurium* に近縁で、H 抗原の第 2 相発現に関連する遺伝子領域(*fljA*, *fljB* 等)が欠失する *S. 4,5,12:i:-* 株であることが判明した。本菌株の遺伝子欠失は、*S. 4,5,12:i:-* 株のうち全長のゲノム塩基配列が決定されている既知の CVM23701 株とは欠失パターンが異なる新しいタイプであった。また、この菌株は 7 種の抗菌薬に耐性であるが、プラスミドの NGS 解析により、CTX-M-55 遺伝子を有する基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌である他、種々の薬剤耐性因子を保有することが明らかになった。一方、患者、食材（鶏肉）、家畜（豚）から分離された *S. Infantis* のうち、パルスフィールド電気泳動で同一あるいは近縁の 20 株を NGS ゲノム解析することにより、食材・家畜由来株と患者由来株との関係をより詳細に解析した。特に、同一 SNP を示した鶏肉由来と患者由来の 2 株は、同一クローンの可能性が高く、原因食材である可能性を強く示唆する。以上の結果は、NGS による迅速ゲノム解析が病原体の高精度同定や分子疫学に基づく感染症対策に極めて有用であることを示している。

A 研究目的

サルモネラ属菌はヒトの急性胃腸炎・食中毒の原因菌であり、数多くの血清型が存在する。サルモネラ属菌による食中毒事例は、毎年全国で多数発生し、発生件数、患者数ともに細菌性食中毒の原因菌の上位を占めている¹⁾。愛媛県においても

1999年に学校給食による大規模食中毒(患者904人)が発生したほか²⁾、ほぼ毎年食中毒事例が発生し、様々な血清型が食中毒の原因となっている。

一方、食中毒として扱われない散発性サルモネラ感染症についても、県内において多種類の血清型が検出されているが、「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」における全数把握対象疾患とされていないため、感染経路等がほとんど解明されておらず、公衆衛生上の問題となっている。

以上のことから、サルモネラ感染症の感染経路に関する調査、特に、原因食材及び患者からの分離株の分子疫学的解析は感染を制御するうえで重要であると考えられる。そこで、我々は、患者、食材、家畜由来株の血清型分類と薬剤感受性試験を実施し、さらに詳細な解析のため、次世代シーケンサー(NGS)を用いてゲノム解析を行い、これらの分離株の性状や菌株間の分子疫学的な関連性を検討したので報告する。

B 材料と方法

1 愛媛県でのサルモネラ感染症の患者発生動向

2008年4月～2010年12月に、愛媛県感染症発生動向調査事業において、病原体定点医療機関で採取された感染性胃腸炎患者検体の病原体検査を実施した。また、本研究への協力が得られた県内3医療機関(検査室を有する総合病院)及び2検査センターから、糞便検査数及び病原体検出数の報告を受け、発生動向の集計を行った³⁾。

2 患者、食材、家畜由来株の収集と血清型分類

患者由来株は、協力医療機関3機関、検査センター2機関、保健所及び当所から分離された。食材由来株は、当所及び保健所で実施した愛媛県食中毒菌汚染実態調査及び委託検査から得られた。家畜(豚)由来株として、と畜場に搬入された豚からの分離株を収集した。調査期間中に、患者由来株141株(糞便由来137株、血液由来4株)、食材由来株48株(うち鶏肉由来45株)、家畜(豚)由来株48株等、計262株を収集し、O抗原、H抗原の組み合わせによって、Kauffmann-Whiteの様式により血清型を分類した³⁾。

3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、CLSIの抗菌薬ディスク感

受性試験実施基準に基づき感受性ディスク(BD)を用いて実施した。供試薬剤はアンピシリン(ABPC)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、ST合剤(ST)、セフトキシム(CTX)、カナマイシン(KM)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、ホスホマイシン(FOM)の10剤を、2009年9月以降の検体についてはさらにセフトジジム(CAZ)、イミペネム(IPM)を用いた。

4 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析

PFGEは常法に従って行った。得られたDNA切断パターンは、画像解析ソフト(BioNumerics Ver6.5, Applied Maths)を用いて解析を行い、類似係数Dice(トレランス1%)、デンドログラムタイプUPGMAで系統樹を作成した。

5 ゲノムDNA及びプラスミドの抽出

Salmonella O4, 5, 12:i:-株(21-304)のゲノムDNA及びプラスミドは、PFGEプラグをS1 Nuclease処理後、PFGEで得られた染色体DNAのバンドとプラスミドのバンド(200kb程度)を切り出し、それぞれについてWizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)で抽出した。*S. Infanis*のゲノムDNAは、菌体をPhenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol(25:24:1)処理後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いて抽出した。

6 次世代シーケンサーによるDNAシーケンス

ライブラリはNextera XT DNA Sample Prep Kit(illumina)を用いて作成し、1%アガロースゲル電気泳動で得られた750bp~1000bpのバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemで抽出した。ライブラリのシーケンスには、MiSeq Reagent Kit v3 600

cycles (illumina) を用いて実施した⁴⁾。得られたリードの *de novo* アセンブリは国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターで実施した⁵⁾。プラスミド塩基配列のギャップは、特異的プライマーペアを用いた PCR 後、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C 結果

1 サルモネラ感染症の発生動向

調査期間中、感染性胃腸炎が疑われた患者糞便の 10.6% から病原細菌が検出された (表 1)。検出された下痢原性細菌は、カンピロバクターが 79.3% を占め、サルモネラ属菌は 9.1% であった。カンピロバクターは年間を通じて検出されたが、サルモネラ属菌は 7~10 月に多い傾向がみられた。

2 血清型分類

分離株の血清型を表 2 に示す。患者由来株 141 株は、25 種類の血清型に分類された。複数の患者から分離された血清型は 14 種類で、最も多く分離された血清型は *S. Enteritidis* 48 株で、次いで *S. Infantis* 31 株であった。患者由来株中に、O 抗原が O4 で H 抗原の第 2 相が非発現により、血清型が決められない株が存在した (表 2 矢印上)。食材由来株 48 株については *S. Infantis* が最も多く分離され、鶏肉から 28 株が分離された (表 2 矢印下)。家畜 (豚) 由来株 48 株のうち 27 株は、*S. Typhimurium* であった。

3 分離株の薬剤感受性

分離株 262 株について薬剤感受性試験を実施した結果を表 3 に示す。いずれかの薬剤に対して耐性を示した株は、患者由来株 141 株中 31 株

(22.0%)、食材由来株 48 株中 47 株 (97.9%)、家畜 (豚) 由来株 48 株中 25 株 (52.1%) であった。

患者由来株の O4 型別不能株は、ABPC, CP, SM, TC, NA, CTX, CAZ の 7 剤に対して耐性を示す多剤耐性菌である (表 3 矢印上)。患者由来株の多くを占める *S. Infantis* では 31 株中 14 株 (45.2%) に (表 3 矢印下)、*S. Enteritidis* は 48 株中 4 株 (8.3%) に耐性が見られた。食材由来株の薬剤耐性率は高度であった。一方、家畜 (豚) 由来株では、*S. Typhimurium* 27 株中 22 株 (81.5%) が耐性菌であり、そのうち 4 株は ABPC, CP, SM, TC, ST の 5 剤耐性であり、*S. Infantis* 10 株は耐性を保有していなかった。

なお、表 1~3 は文献 3 より改変・転載したものである。

4 O4 型別不能株ゲノムの NGS 解析

表 2 に示した O4 型別不能株 (21-304) は 9 歳女児の虫垂部膿から分離され、表 3 に示したように多剤耐性菌であり、臨床的・細菌学的重要性からより詳細に検討した。血清型については、O4 以外に O5 及び O12 抗原を有し、H 抗原の第 1 相が i, 第 2 相が非発現の、*Salmonella* 4,5,12:i:- であることが判明した (以下、*S.* 4,5,12:i:- 愛媛株)。

本菌株の NGS ゲノム解析により得られた 22,870 SNPs を用いて、RAxML (最尤法, bootstrap 1000 回) にて系統解析を実施し、*S. Typhimurium* と近縁であることが明らかにした (図 1)。*S.* 4,5,12:i:- は、近年、世界的にサルモネラ感染症及び食中毒の主要な原因菌となってきた菌種で、そのうち CVM23701 株は全ゲノム解析がなされているが、*S.* 4,5,12:i:- 愛媛株 (図 1●) は CVM23701 (図 1 矢印) とは異なるタイプであることが明らかにされた。一方、山口県で分離された *S.* 4:i:- 株は CVM23701 と近縁で、地域的に異なる *S.* 4:i:- のクローンが存在することが示された。

S. 4,5,12:i:- 愛媛株の第 2 相鞭毛抗原が発現し

ない原因を明らかにするため、*fljB*(phase 2 flagellin)及び*fljA*(repressor of phase 1 flagellin gene)等の遺伝子が存在する領域を解析した。愛媛株、*S. Typhimurium*, CVM23701の当該遺伝子領域の上流部位を基準に並べた場合(図 2A)、下流部位で並べた場合(図 2B)、それぞれで比較すると、愛媛株では*fljB*, *fljA*を含む領域に大きな欠失が認められた。この愛媛株の欠失パターンは CVM23701 の欠失とは異なり、愛媛株では*hin*(regulation of flagellar gene expression)まで欠失し、逆に CVM23701 で欠失している領域(図 2 で青色で示す部分)が愛媛株では残存していた。

5 *S. 4,5,12:i:-* 愛媛株プラスミドの NGS 解析

S. 4,5,12:i:- 愛媛株は多剤耐性菌なので、耐性遺伝子の存在を明らかにするために、プラスミドの NGS 解析を実施し、完全長の塩基配列を決定した。図 3 に示すように、このプラスミドは 180,613 bp からなる不和合性群 Inc A/C のプラスミドで、その塩基配列から遺伝子機能を推定した。本プラスミドは 220 個の ORFs(open reading frames)含み、そのうち約 100 個は既知の遺伝子であった。この中には、 β -lactamase TEM-1, β -lactamase CTX-M-55, tetracycline repressor protein TetA, quinolone resistance protein, aminoglycoside-3-N-acetyltransferase, streptomycin resistance protein A/B, chloramphenicol acetyl transferase II, florfenicol/chloramphenicol resistance protein FloR, sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase 等の薬剤耐性に関わる多くの遺伝子が存在した。また、遺伝子水平伝播機構である接合伝達に関わる多くの遺伝子も存在した。

6 *S. Infantis* の NGS ゲノム解析—PFGE 解析との比較

S. Infantis 70 株は、*Xba* I, *Bln* I を用いた複合 PFGE 解析により 39 種類のパターンに分類で

きた(図 4)。系統樹を作成し、菌株間の相同性を解析した結果、家畜(豚)由来株が含まれるクラスター A と、食材由来株が含まれるクラスター B のグループに分けられ、患者由来株はどちらにも属していた。

この PFGE パターンから、食材・家畜由来株と患者由来株間で近縁な組み合わせを選び(図 4 矢印)、それらのゲノムの NGS 解析を実施した。*S. Infantis* は血清型に基づいて同定されたが、ゲノム解析でも全て *S. Infantis* であることが確認された。図 5 に示すように、食材・家畜由来株と患者由来株の関係がさらに高精度に解析された。お互いに非常に類似した組み合わせが 5 対見出された(図中黒枠で囲んだ対)。21-197 株と 20-144 株、及び 22-190 株と 22-275 株は、PFGE では同一のパターンを示したが、NGS 解析では近縁ではあるが差違が認められた。また、20-132 株と 20-157 株は同一 SNP であり、同一クローンの可能性が高く、感染源である可能性を示唆する。また、山口県内で分離された食材(鶏肉)由来の *S. Infantis* 株も合わせて解析したが、これらは愛媛株とは分かれ、地域的な特徴も示された。

D 考察

愛媛県において、感染性胃腸炎患者、食材、家畜から分離されたサルモネラ株を対象に、血清型分類と薬剤感受性試験を実施した(表 1-3)。これらの分離株のうち、臨床的・細菌学的に重要な株について NGS ゲノム解析を実施した。

従来の方法では血清型が O4 型別不能に分類されていた患者由来株(小児の虫垂部膿から分離)について、遺伝的に *S. Typhimurium* に近縁で、H 抗原の第 2 相発現に関連する遺伝子領域(*fljA*, *fljB* 等)が欠失している *S. 4,5,12:i:-* 株であることを決定した(図 1, 2)。*S. 4,5,12:i:-* は、第 2 相鞭毛抗原が発現しないという特徴があり、1990 年頃から報告され、近年多くの国でヒト感染症や食中毒の主要な原因菌として注目されている⁶⁻⁹⁾。欧米では豚や豚肉から分離されること

が多く、豚が保菌動物である可能性がある¹⁰⁾。*S. 4,5,12:i:-* 愛媛株では、*fljB*(phase 2 flagellin), *fljA*(repressor of phase 1 flagellin gene), 及び *hin*(regulation of flagellar gene expression)等の遺伝子領域が欠失しており、そのため第2相抗原を発現できないと考えられる。愛媛株の遺伝子欠失パターンは、*S. 4,5,12:i:-* 株のうち全長のゲノム塩基配列が決定されている CVM23701 株の欠失パターンとは異なっており(図2)、新しいタイプの *S. 4,5,12:i:-* 株と考えられる。

また、*S. 4,5,12:i:-* 愛媛株は、7種の抗菌薬に耐性であるが、プラスミドの NGS 解析により、本プラスミドが不和合性群 Inc A/C タイプの耐性プラスミドであり、 β -lactamase TEM-1, β -lactamase CTX-M-55, tetracycline repressor protein TetA, quinolone resistance protein 等の薬剤耐性に関わる多くの遺伝子を保有することが明らかにされた(図3)。本菌株多剤耐性の基盤となる知見である。また、接合伝達に関わる多くの遺伝子も保有しており、このプラスミドの水平伝播により薬剤耐性菌が拡散するリスクが示唆される。

Inc A/C プラスミドは腸内細菌科に属する細菌に広く分布し¹¹⁾、多剤耐性のサルモネラから分離されることも多い¹²⁾。CTX-M(cefotaximases)産生菌¹³⁾は、近年、世界的に問題になっている基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生菌¹⁴⁾の主流なタイプで、CTX-Mは100種類以上の亜型があり、亜型により地域分布や薬剤感受性に特徴がある。CTX-M-55は2007年にタイで初めて報告された¹⁵⁾。このように、NGS ゲノム解析によって、種々の薬剤耐性因子を比較的短時間で特定できることは、耐性菌対策において非常に有用である。

一方、患者、食材(鶏肉)、家畜(豚)から分離された *S. Infantis* のうち、PFGE パターンが同一あるいは近縁の20株を NGS ゲノム解析することにより、食材・家畜由来株と患者由来株との関係をより詳細に解析した(図4, 5)。PFGE

パターンが同一でも、NGS 解析では相違が認められる場合があり、後者の分解能が高かった。また、NGS 解析においても、お互いに非常に類似した組み合わせが5対見出され、感染源の由来が見えてくる可能性がある。特に、同一 SNP を示した鶏肉由来と患者由来の2株は、同一クローンの可能性が高く、感染源である可能性を強く示唆する。また、山口県で食材から分離された株は、愛媛株とは分かれ、地域的な特徴も認められた。一般に、PFGE のような電気泳動に基づくバンドパターンは、異なった施設間での比較が難しい場合があるが、NGS 解析によるシーケンスに基づく比較はそのような曖昧さを排除できる。さらに、NGS ゲノム解析は、菌株間の近縁性を測るだけでなく、病原性因子や薬剤耐性因子等の感染や流行につながる菌株の特徴についての情報を提供できる。

今回得られた結果は、NGS による迅速ゲノム解析が、サルモネラ等病原体の高精度同定や分子疫学に基づく感染症対策において極めて有用であることを示している。

E 結論

愛媛県で分離されたサルモネラ株の NGS ゲノム解析を実施し、血清型が O4 型別不能に分類されていた患者由来株が、H 抗原の第2相発現に関連する遺伝子領域(*fljA*, *fljB* 等)が欠失する *S. 4,5,12:i:-* 株であることを明らかにした。既知の *S. 4,5,12:i:-* CVM23701 株とは遺伝子欠失パターンが異なっていた。さらに、本菌株プラスミドの NGS 解析により、CTX-M-55 遺伝子を有する ESBL 産生菌である他、種々の薬剤耐性因子を保有することが判明した。一方、患者、食材(鶏肉)、家畜(豚)から分離された *S. Infantis* のうち、PFGE パターンが同一あるいは近縁の20株を NGS ゲノム解析することにより、食材・家畜由来株と患者由来株との関係をより詳細に解析した。特に、同一 SNP を示した鶏肉由来と患者由来の2株は、同一クローンの可能性が高く、原因

食材である可能性を強く示唆する。これらの結果は、NGS による迅速ゲノム解析が、病原体の同定や分子疫学に基づく感染症対策に極めて有用であることを示している。

参考文献

- 1) 厚生労働省 食中毒統計資料 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.htm> #4-2
 - 2) 薦田洋司ほか:病原微生物検出情報. (2000) 21,118-119.
 - 3) 松本純子ほか:愛媛県内におけるサルモネラ感染症の発生動向調査と分子疫学的解析,愛媛県立衛生環境研究所年報 (2013) 14:1-9.
 - 4) Kuroda M et al., Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by *de novo* sequencing using a next-generation DNA sequencer. PLoS One. (2010) 5(4):e10256.
 - 5) Sekizuka T et al., Complete sequencing of the *bla*(NDM-1)-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. PLoS One. (2011) 6(9):e25334.
 - 6) Echeita MA et al., Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. J Clin Microbiol. (1999) 37(10):3425.
 - 7) Agasan A et al., Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. J Clin Microbiol. (2002) 40(6):1924-9.
 - 8) Amavisit P et al., Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. J Clin Microbiol. (2005) 43(6):2736-40.
 - 9) Gallati C et al., Characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,[5],12:i:- clones isolated from human and other sources in Switzerland between 2007 and 2011. Foodborne Pathog Dis. (2013) 10(6):549-54.
 - 10) de la Torre E et al., Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302. J Clin Microbiol. (2003) 41(6):2395-400.
 - 11) Carattoli A, Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. (2009) 53(6):2227-38.
 - 12) Lindsey RL., Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. Appl Environ Microbiol. (2009) 75(7):1908-15.
 - 13) Bauernfeind A et al., A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection. (1990) 18(5):294-8.
 - 14) Pitout JD et al., Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. (2005) 56(1):52-9.
 - 15) Kiratisin P et al., The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum β -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis. (2007) 58(3):349-55.
- F 研究発表
1. 論文発表
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 愛媛県における感染性胃腸炎患者検体からの病原体検出数

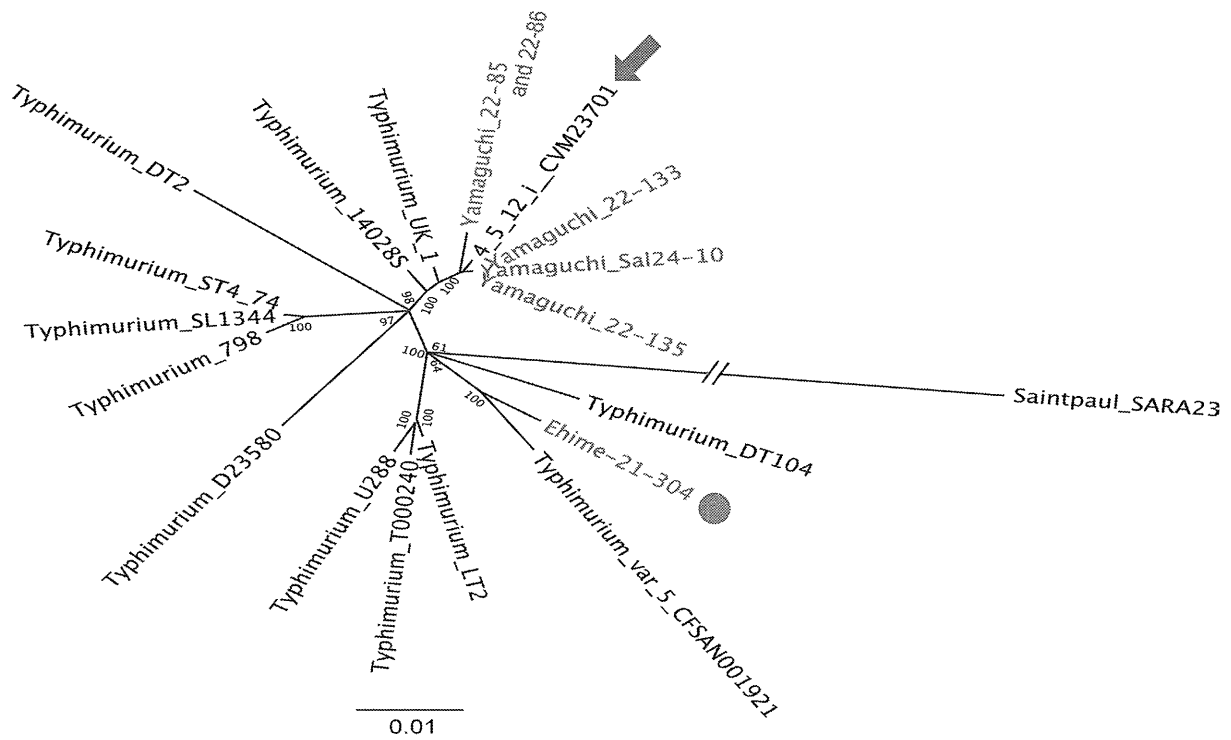
(2008年4月～2010年12月)

検出病原菌	2008年	2009年	2010年	計	(%)
サルモネラ	70	40	48	158	9.1
カンピロバクター	409	479	483	1371	79.3
腸管出血性大腸菌	8	3	1	12	0.7
その他の病原大腸菌	14	19	62	95	5.5
下痢原性ビブリオ	4	1	5	10	0.6
エロモナス	18	26	19	63	3.6
セレウス菌	8	4	7	19	1.1
検出数	531	572	625	1728	
検査数	3776	5957	6525	16258	
(%)	14.1	9.6	9.6	10.6	

亜種	O型別	血清型	由来				計	
			患者	市販食材	豚	爬虫類		
I	O4	S. Abony				1	1	
		S. Agona	1				1	
		S. Derby			8		8	
		S. Heidelberg	1				1	
		S. Paratyphi-B	5				5	
		S. Saintpaul	7 (集団発生5)				8	
		S. Sandiego				1	1	
		S. Schwarzengrund	1	8 (鶏肉8)			9	
		S. Typhimurium	7		27		34	
		型別不能	1				1	
		O7	S. Bareilly	1				1
	S. Braenderup		3				3	
	S. Choleraesuis		1				1	
	S. Infantis		31 (集団発生3)	29 (鶏肉28、豚肉1)	10		70	
	S. Mbandaka		1				1	
	S. Montevideo		2				2	
	S. Oranienburg		3				3	
	S. Richmond					1	1	
	S. Thompson		3	1 (すっぽん1)		5	9	
	S. Virchow		7				7	
	型別不能		1				1	
	O8		S. Bovismorbificans				1	1
			S. Corvallis	3				3
			S. Hadar		1 (鶏肉1)			1
			S. Litchfield	1				1
		S. Manhattan		8 (鶏肉8)			8	
S. Muenchen					2	2		
S. Newport		1		1	1	3		
S. Enteritidis		48				48		
S. Javiana					1	1		
S. Miami					1	1		
O9	S. Panama			2		2		
	O3,10 S. Falkensee	1				1		
O11 S. Rubislaw				1	1			
O13 S. Poona	2				2			
O17 S. Matadi				2	2			
O18 S. Cerro	3				3			
OUT S. OUT	6	1 (合挽肉1)			8			
III					1	1		
IV					5	5		
	計	141	48	48	25	262		

表3 サルモネラ分離株の薬剤耐性状況

血清種	O型別	血清型	耐性薬剤	由来				計	
				患者	市販食材	豚	爬虫類		
		<i>S.</i> Abony	-				1	1	
		<i>S.</i> Agona	TC	1				1	
			ABPC,SM,TC			1		1	
		<i>S.</i> Derby	SM,ST			1		1	
			SM,TC			1		1	
			-			5		5	
		<i>S.</i> Heidelberg	NA	1				1	
		<i>S.</i> Paratyphi-B	TC	2				2	
			-	3				3	
		<i>S.</i> Saintpaul	-	7			1	8	
		<i>S.</i> Sandiego	-				1	1	
	O4		SM,TC	1	4			5	
		<i>S.</i> Schwarzengrund		SM,TC,KM		1			1
				SM,TC,KM,ST		2			2
				SM,TC,ST		1			1
			ABPC,CP	1				1	
			ABPC,CP,SM,TC	1				1	
			ABPC,CP,SM,TC,ST			4		4	
		<i>S.</i> Typhimurium	ABPC,SM,TC,NA			3		3	
			SM			1		1	
			SM,TC	1		13		14	
			SM,TC,ST			1		1	
			-	4		5		9	
		型別不能	ABPC,CP,SM,TC,NA,CTX,CAZ	1				1	
		<i>S.</i> Bareilly	-	1				1	
		<i>S.</i> Braenderup	KM	1				1	
			-	2				2	
		<i>S.</i> Choleraesuis	ABPC,CP,SM,TC,KM,NA	1				1	
			ABPC,CAZ		1			1	
			ABPC,SM,TC		1			1	
			ABPC,SM,TC,KM		1			1	
			SM,TC,KM	3	6			9	
			SM,TC,KM,ST	1	2			3	
			KM		2			2	
		<i>S.</i> Infantis	SM	1				1	
			SM,TC	5	8			13	
			SM,TC,KM	1	1			2	
			SM,TC,KM,ST		5			5	
			SM,TC,ST	2	2			4	
			TC	1				1	
			-	17		10		27	
		<i>S.</i> Mbandaka	-	1				1	
		<i>S.</i> Montevideo	-	2				2	
		<i>S.</i> Oranienburg	-	3				3	
		<i>S.</i> Richmond	-				1	1	
		<i>S.</i> Thompson	-	3	1		5	9	
		<i>S.</i> Virchow	TC,ST	2				2	
			-	5				5	
		型別不能	-	1				1	
		<i>S.</i> Bovismorbificans	-				1	1	
		<i>S.</i> Corvallis	-	3				3	
		<i>S.</i> Hadar	SM,TC,KM		1			1	
		<i>S.</i> Litchfield	-	1				1	
		<i>S.</i> Manhattan	SM,TC		7			7	
			SM,TC,NA		1			1	
		<i>S.</i> Muenchen	-				2	2	
		<i>S.</i> Newport	-	1		1	1	3	
			NA	3				3	
		<i>S.</i> Enteritidis	SM	1				1	
			-	44				44	
		<i>S.</i> Javiana	-				1	1	
		<i>S.</i> Miami	-				1	1	
		<i>S.</i> Panama	-			2		2	
	O3,10	<i>S.</i> Falkensee	-	1				1	
	O11	<i>S.</i> Rubislaw	-				1	1	
	O13	<i>S.</i> Poona	-	2				2	
	O17	<i>S.</i> Matadi	-				2	2	
	O18	<i>S.</i> Cerro	-	3				3	
	OUT	<i>S.</i> OUT	SM,TC,KM		1			1	
			-	6			1	7	
III							1	1	
IV			SM				2	2	
			-				3	3	
		計	耐性株数	31	47	25	2	105	
			分離株数	141	48	48	25	262	
			(%)	22.0	97.9	52.1	8.0	40.1	



愛媛株 (●) は、既知の *Salmonella* 4,5,12:i:- 株 CVM23701(矢印)とは異なる。

Salmonella Typhimurium var.5, CFSAN001921 (4,12:i:1,2)と近縁。

これの H 抗原欠損株？

図 1 *Salmonella* 4,5,12:i:- 愛媛株の NGS ゲノム解析に基づく系統

(22,870 SNPs を用いて RAXML (最尤法, bootstrap 1000 回)にて系統樹作製)

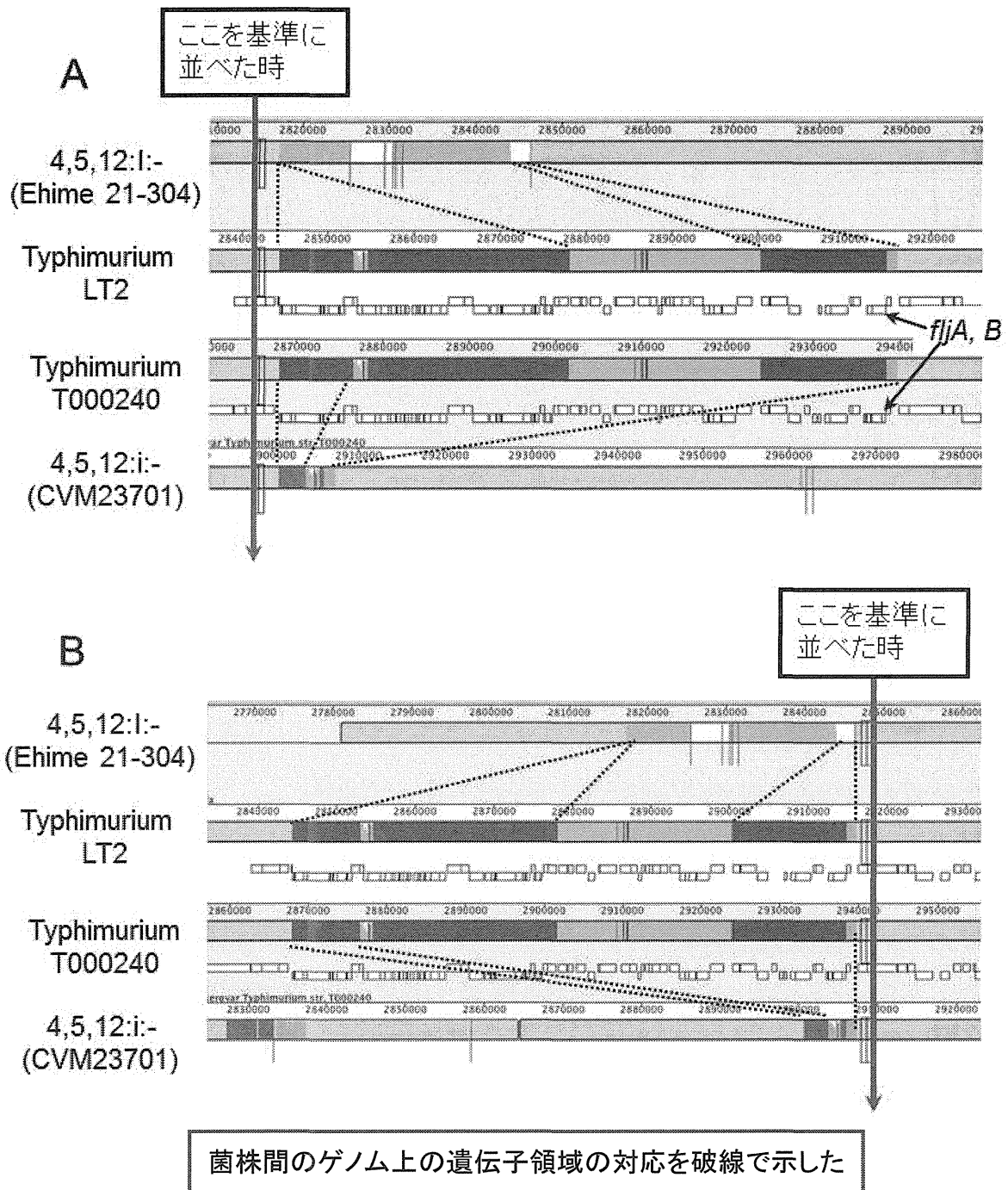
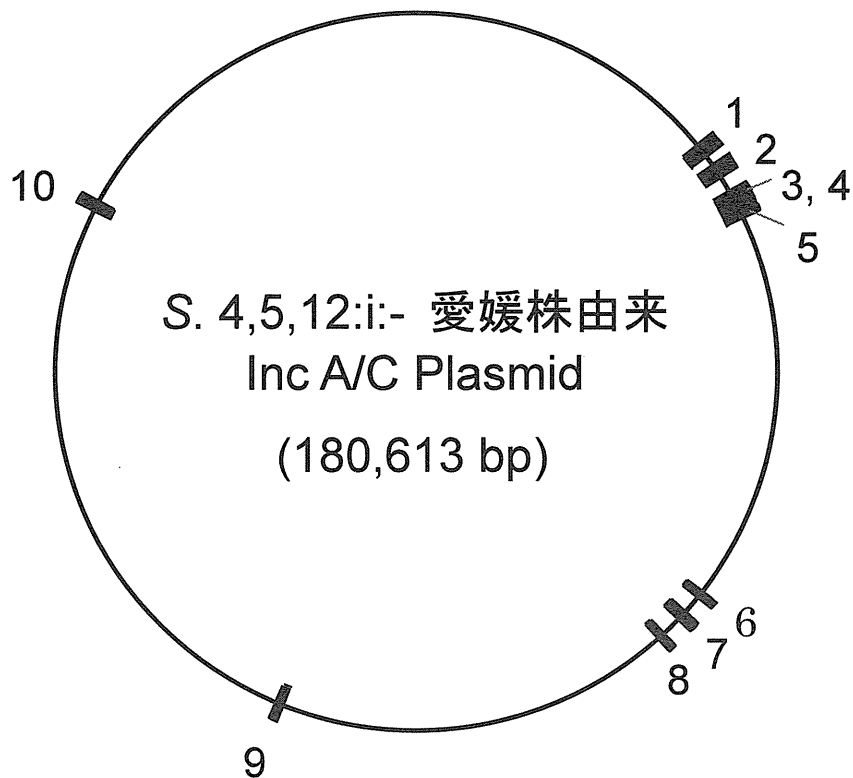


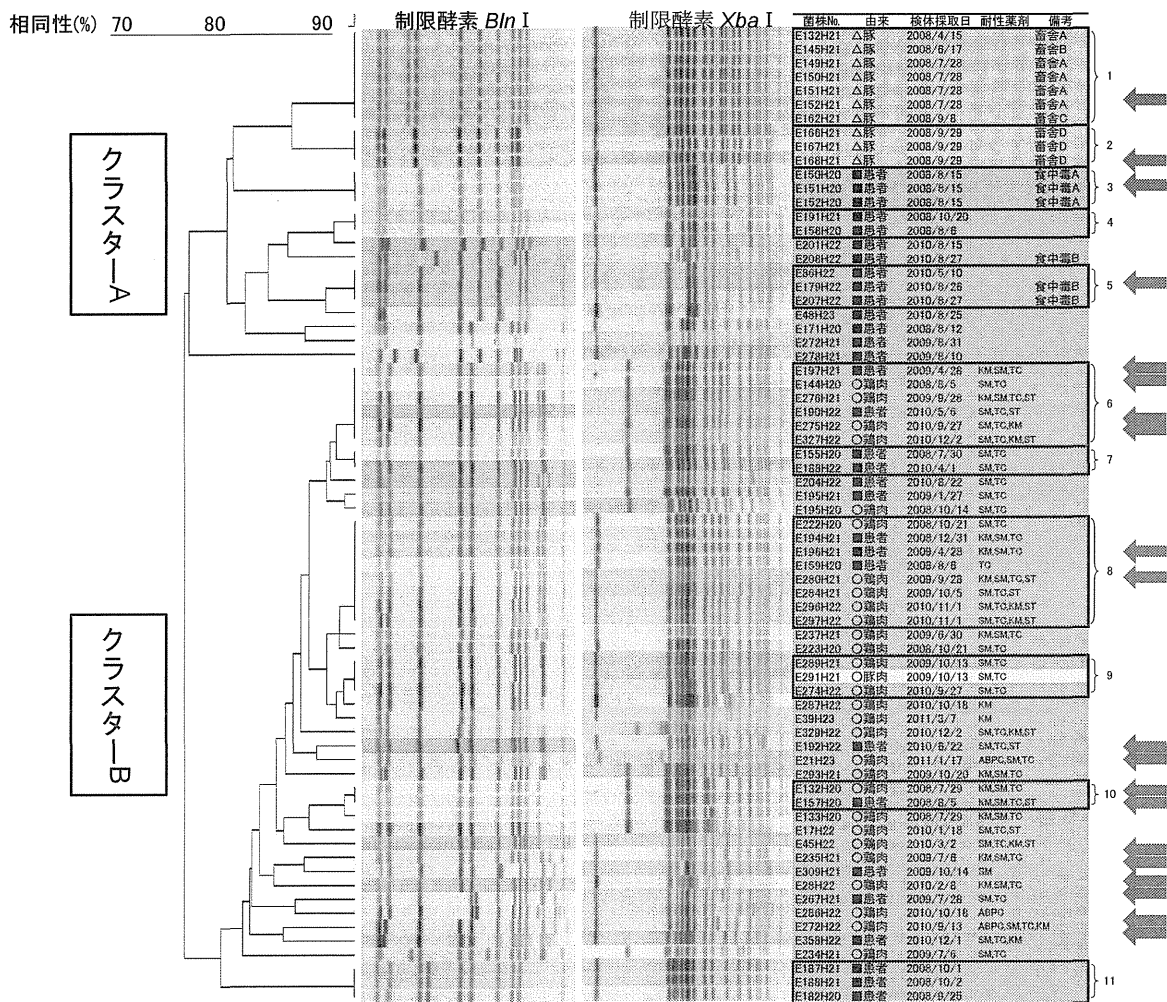
図2 S.4,5,12:i:- 愛媛株の第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域の欠失
(*fljA*, *fljB* 近傍配列のアラインメント)



- 1: florfenicol/chloramphenicol resistance protein FloR,
- 2: tetracycline repressor protein TetA,
- 3, 4: streptomycin resistance protein B, A
- 5: sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase
- 6: chloramphenicol acetyl transferase II
- 7: β -lactamase CTX-M-55
- 8: quinolone resistance protein
- 9: aminoglycoside 3-N-acetyltransferase
- 10: β -lactamase TEM-1

等の薬剤耐性因子に加え、遺伝子水平伝播に関わる接合伝達関連の多数の遺伝子も認められた。

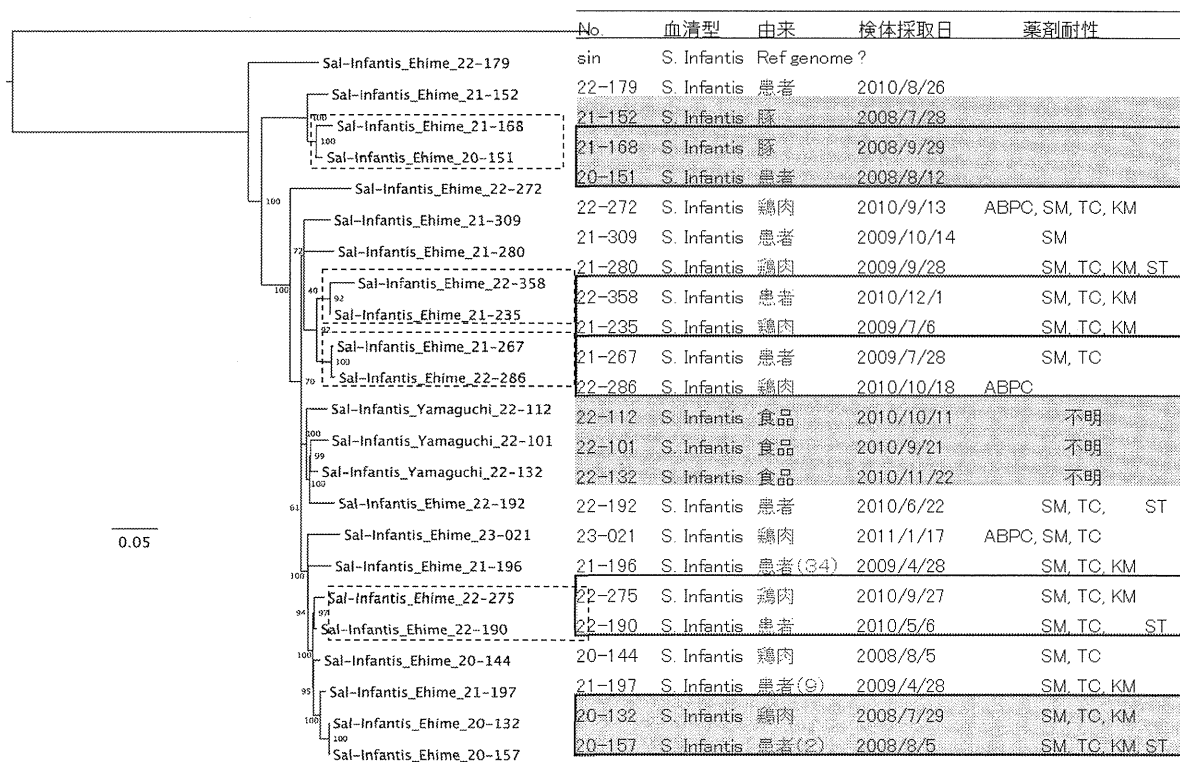
図 3 S. 4,5,12:i- 愛媛株由来プラスミドに存在する薬剤耐性遺伝子



黄=家畜(豚)
青=患者
赤=食材(鶏肉)

矢印
食材・家畜由来株
と患者由来株間で
PFGE パターンが
同一あるいは
近縁の株を選択
(20株)

図4 S. infantis の PFGE 解析(Bln I, Xba I 複合解析)
(同一パターンを示したグループを太線 1~11 で表記)



食材・家畜由来株と患者由来株間で非常に類似したペアを黒枠で囲む。特に、20-132と20-157は同一SNPで、同じクローンの可能性が高い。山口株(黄色)は愛媛株とは分かれた。

図5 S. Infantis 株の NGS 解析に基づく系統解析

(1,394 SNPs 抽出し, RAxML(最尤法), bootstrap 1,000 回で系統樹作製)

平成25年度厚生労働科学研究
「地方衛生研究所の連携による食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析を
基盤とする新たな食品の安全確保対策に関する研究」
調班第2回班会議 オフィス東京事務所会議室(C5), 2014.1.16

今年度の研究実施報告及び 今後の予定等について

愛媛県立衛生環境研究所

第2回研究班会議報告内容の概要

1. 今年度の研究実施内容の報告

- A. 新しいタイプの *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- 株の同定
1) 同株のゲノム解析
2) 同株の薬剤プラスミド解析

B. *Salmonella enterica* serovar Infantis のゲノム解析

2. 今後の予定(案)

2

愛媛県におけるサルモネラ分離株(2008-2010年)の血清型

血清型	分離株数	患者由来株	畜産由来株	食品由来株	爬虫類由来株	計
O4	141	48	49	44	20	141
O6	48	1	1	46	0	48
O7	49	1	1	47	0	49
O8	1	0	0	1	0	1
O9	1	0	0	1	0	1
O10	1	0	0	1	0	1
O11	1	0	0	1	0	1
O12	1	0	0	1	0	1
O13	1	0	0	1	0	1
O14	1	0	0	1	0	1
O15	1	0	0	1	0	1
O16	1	0	0	1	0	1
O17	1	0	0	1	0	1
O18	1	0	0	1	0	1
O19	1	0	0	1	0	1
O20	1	0	0	1	0	1
O21	1	0	0	1	0	1
O22	1	0	0	1	0	1
O23	1	0	0	1	0	1
O24	1	0	0	1	0	1
O25	1	0	0	1	0	1
O26	1	0	0	1	0	1
O27	1	0	0	1	0	1
O28	1	0	0	1	0	1
O29	1	0	0	1	0	1
O30	1	0	0	1	0	1
O31	1	0	0	1	0	1
O32	1	0	0	1	0	1
O33	1	0	0	1	0	1
O34	1	0	0	1	0	1
O35	1	0	0	1	0	1
O36	1	0	0	1	0	1
O37	1	0	0	1	0	1
O38	1	0	0	1	0	1
O39	1	0	0	1	0	1
O40	1	0	0	1	0	1
O41	1	0	0	1	0	1
O42	1	0	0	1	0	1
O43	1	0	0	1	0	1
O44	1	0	0	1	0	1
O45	1	0	0	1	0	1
O46	1	0	0	1	0	1
O47	1	0	0	1	0	1
O48	1	0	0	1	0	1
O49	1	0	0	1	0	1
O50	1	0	0	1	0	1
O51	1	0	0	1	0	1
O52	1	0	0	1	0	1
O53	1	0	0	1	0	1
O54	1	0	0	1	0	1
O55	1	0	0	1	0	1
O56	1	0	0	1	0	1
O57	1	0	0	1	0	1
O58	1	0	0	1	0	1
O59	1	0	0	1	0	1
O60	1	0	0	1	0	1
O61	1	0	0	1	0	1
O62	1	0	0	1	0	1
O63	1	0	0	1	0	1
O64	1	0	0	1	0	1
O65	1	0	0	1	0	1
O66	1	0	0	1	0	1
O67	1	0	0	1	0	1
O68	1	0	0	1	0	1
O69	1	0	0	1	0	1
O70	1	0	0	1	0	1
O71	1	0	0	1	0	1
O72	1	0	0	1	0	1
O73	1	0	0	1	0	1
O74	1	0	0	1	0	1
O75	1	0	0	1	0	1
O76	1	0	0	1	0	1
O77	1	0	0	1	0	1
O78	1	0	0	1	0	1
O79	1	0	0	1	0	1
O80	1	0	0	1	0	1
O81	1	0	0	1	0	1
O82	1	0	0	1	0	1
O83	1	0	0	1	0	1
O84	1	0	0	1	0	1
O85	1	0	0	1	0	1
O86	1	0	0	1	0	1
O87	1	0	0	1	0	1
O88	1	0	0	1	0	1
O89	1	0	0	1	0	1
O90	1	0	0	1	0	1
O91	1	0	0	1	0	1
O92	1	0	0	1	0	1
O93	1	0	0	1	0	1
O94	1	0	0	1	0	1
O95	1	0	0	1	0	1
O96	1	0	0	1	0	1
O97	1	0	0	1	0	1
O98	1	0	0	1	0	1
O99	1	0	0	1	0	1
O100	1	0	0	1	0	1

3

サルモネラ分離株の 薬剤耐性状況

◆分離株262株中、いずれかの薬剤に対して耐性を示した株は、患者由来株141株中31株(22.0%)、食材由来株48株中47株(97.9%)、家畜(豚)由来株48株中25株(52.1%)、爬虫類由来株25株中2株(8.0%)。

◆患者由来株については、*Salmonella* O4型別不能株が7剤に対して耐性を示し、2000年以降世界的に拡散しているESBL産生菌であることが判明した。また、6剤に耐性を示す *S. Choleraesuis* 1株が分離された。患者由来株の多くを占める *S. Enteritidis* は48株中4株(8.3%)に、*S. Infantis* では31株中14株(45.2%)に耐性が見られた。

◆市販食材由来株のうち薬剤耐性を保有していなかった菌株は *S. Thompson* 1株(すっぽん由来)のみであった。

◆家畜(豚)由来株の *S. Typhimurium* は27株中22株(81.5%)が耐性菌であり、そのうち4株はABPC, CP, SM, TC, STの5剤耐性であった。一方、*S. Infantis* 10株は耐性を保有していなかった。

4

O4型別不能株の性状

- O抗原がO4、H抗原の1相がi、2相が決定不能の、*Salmonella enterica* serovar 4:i:- (以下、*S. 4:i:-* 愛媛株)である。
- ABPC, CP, SM, TC, NA, CTX, CAZ の7剤に対して耐性であるESBL(基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ)産生菌である。

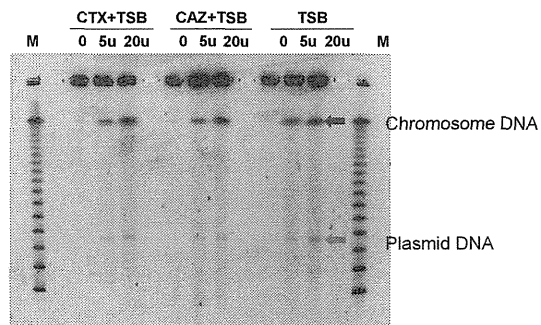


NGS解析で、より詳しい性状を明らかにする

5

S. 4:i:- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

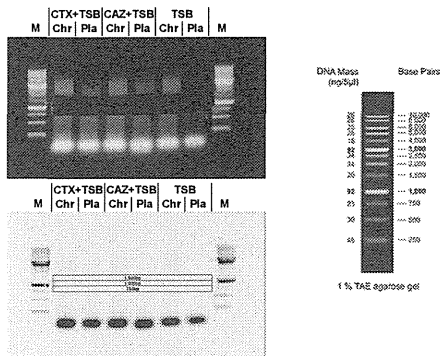
(1) S1 nuclease PFGE によるゲノムおよびプラスミドの調製



6

S. 4:i- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

(2) S1 Nuclease PFGE ライブラリ (chromosome, plasmid) の切り出し

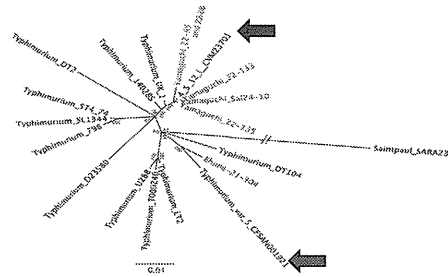


7

S. 4:i- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

(3) S. 4:i- 株ゲノムのNGSシーケンスに基づく系統解析

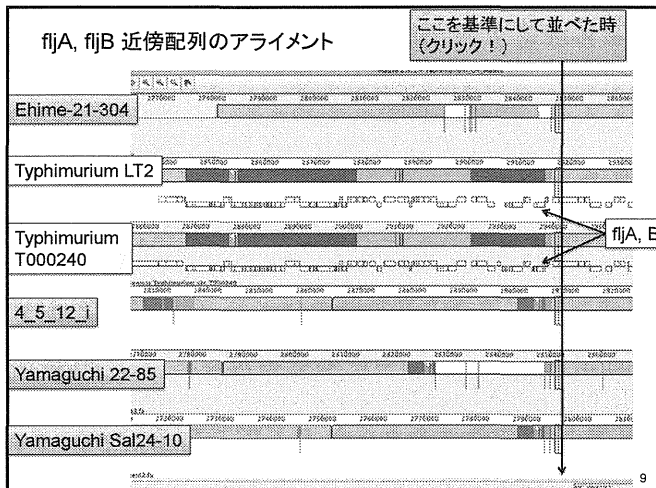
(22,870 SNPs を用いてRAxML(最尤法,bootstrap 1000回)にて系統解析)



愛媛株は、Salmonella 4[5],12:i-, CVM23701株とやや異なる。
Salmonella Typhimurium var. 5, CFSAN001921 (4,12:i:1,2)と近縁。これのH抗原欠損株？

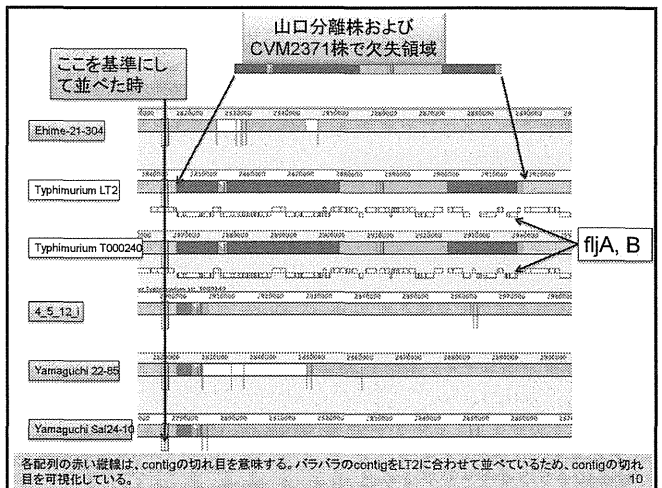
8

fjA, fjB 近傍配列のアライメント



9

山口分離株および CVM2371株で欠失領域



10

S. 4:i- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

(4) ゲノム情報からの結論

山口県の Salmonella O4および Salmonella 4,5,12:i: CVM23701は、Fels-2phageおよび、その下流のfjBまでを大規模に欠失。
この領域→

Core-Genome SNPs系統解析の結果と同様に、4,5,12:i: CVM23701と非常に近縁であることが判明した。

この領域を共有→
(22-85には、更に他の挿入が認められるような絵になっているが、contigの配置を無理矢理LT2に合わせている為、本来は他の領域の断片と思われる。)

愛媛株でもこの箇所に大きな欠失が認められたが、山口株/CVM23701に共通する挿入配列は異なり、欠失のパターンも異なっていた(hinまで欠失)。SNP系統解析の結果と一致している。

血清型別が Typhimuriumとならず、型別不能となった。

11

Salmonella 4, 5, 12:i- とは

S. 4, 5, 12:i- は、近年、世界中の多くの国でヒトの感染性胃腸炎の原因菌として問題となっている。

遺伝子型的には、S. Typhimurium の近縁で、鞭毛抗原の第2相抗原を発現できない。

第2相抗原を発現できない分子機序については複数の機序が想定されているが、不明な点も多い。

12

S. 4:i- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

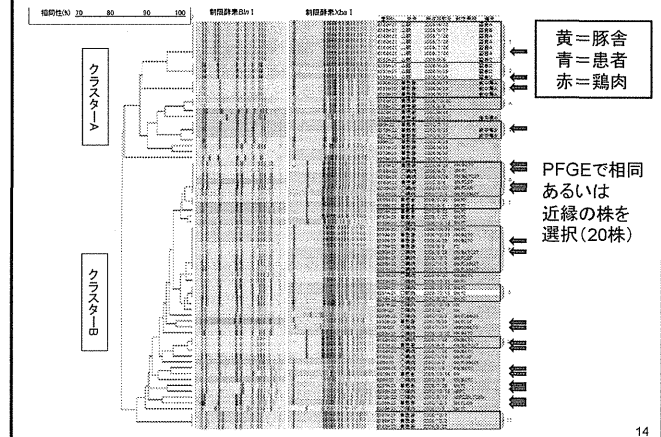
(5) プラスミド解析

プラスミドDNA配列をNGSで決定した。168,679 bpと6,465 bp の2つのcontigが得られた。

薬剤耐性として、CTX-M-55を保有し、セフェム耐性に関与している。他の薬剤感受性試験にそった遺伝子も見つかっている。詳細について解析中。

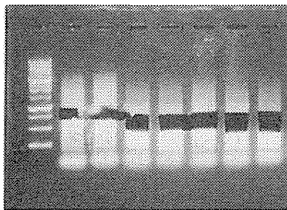
13

S. InfantisのPFGE 解析 vs NGS解析



14

S. InfantisのNGS解析



M 1 2 3 4 5 6 7

ライブラリの切り出し
(7+13=20株)
↓
NGSシーケンス(終了)
↓
データ解析中

15

まとめ

1. S. 4:i- 愛媛株ゲノムのNGS解析により、新しいタイプのS. 4, 5, 12:i- 株であり、fljA, B遺伝子を欠損することが明らかにされた。
2. S. 4:i- 愛媛株プラスミドのNGS解析により、CTX-M-55等の薬剤耐性遺伝子を保有することが明らかにされた。
3. 豚舎、鶏肉、患者由来のS. Infantis 20株のゲノムをNGS解析し、そのシーケンスに基づく系統解析から、株間の関係を明らかにし、PFGE解析との比較を実施する(解析中)。

16

来年度の予定(案)

1. サルモネラ株の解析を進展させる(株数、種類)
2. 薬剤耐性菌での解析(来年度から別研究課題として薬剤耐性菌株を収集・保管する予定)
3. ウイルスでの応用(メタゲノム解析など)

17

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号ページ	出版年
Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T.	Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection.	Cytokine.	63(2):194-200.	2013
Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto -Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H.	Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan.	Microbiol Immunol.	57(9):655-9.	2013
Niwa S, Tsukagoshi H, Ishioka T, Sasaki Y, Yoshizumi M, Morita Y, Kimura H, Kozawa K.	Triplex real-time polymerase chain reaction assay for detection and quantification of norovirus (GI and GII) and sapovirus.	Microbiol Immunol.	58(1):68-71 .	2014
Miyaji Y, Kobayashi M, Sugai K, Tsukagoshi H, Niwa S, Fujitsuka-Nozawa A, Noda M, Kozawa K, Yamazaki F, Mori M, Yokota S, Kimura H.	Severity of respiratory signs and symptoms and virus profiles in Japanese children with acute respiratory illness.	Microbiol Immunol.	57(12):811-21.	2013
Tsukagoshi H, Ishioka T, Noda M, Kozawa K, Kimura H.	Molecular epidemiology of respiratory viruses in virus-induced asthma.	Front Microbiol .	12;4:278.	2013

Ishioka T, Yamada Y, Kimura H, Yoshizumi M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Maruyama K, Hayashi Y, Kato M.	Elevated macrophage inflammatory protein 1 α and interleukin-17 production in an experimental asthma model infected with respiratory syncytial virus.	Int Arch Allergy Immunol.	161 Suppl 2:129-37.	2013
Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H.	Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011.	Infect Genet Evol.	18:168-73.	2013
Takanashi J, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M.	Clinical and radiologic features of encephalopathy during 2011 E coli O111 outbreak in Japan.	Neurology.	18;82(7):564-72.	2014
Obuchi M, Adachi Y, Takizawa T, Sata T.	Influenza A(H1N1)pdm09 virus and asthma.	Front Microbiol	14;4:307.	2013
Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, Watahiki M.	Close genetic relationship between Legionella pneumophila serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing.	Appl Environ Microbiol	79(13):3959-66	2013

<p>Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, Watahiki M.</p>	<p>Molecular epidemiology of Legionella pneumophila serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama Prefecture,</p>	<p>19(4):644-52.</p>	<p>Japan. J Infect Chemother.</p>	<p>2013</p>
<p>Asano Y, Karasudani T, Tanaka H, Matsumoto J, Okada M, Nakamura K, Kondo H, Shinomiya H.</p>	<p>Characterization of the Escherichia coli O157:H7 outbreak strain whose Shiga toxin 2 gene is inactivated by IS1203v insertion.</p>	<p>66(3):201-6.</p>	<p>Jpn J Infect Dis.</p>	<p>2013</p>

IV 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行物・別刷

該当なし

