

201426029A

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26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27(2015)年 3月

目 次

I 平成26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 邦壽 群馬県衛生環境研究所 13

2 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 20

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（2）

研究分担者 四宮博人 愛媛県立衛生環境研究所 38

III 研究成果の刊行に関する一覧表 55

I 総括研究報告書

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 26 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、亀山 光博

(山口県環境保健センター)

吉住 正和、井上 伸子、佐々木 佳子、丹羽 祥一、塚越 博之、塩野 雅孝、黒澤 肇

(群馬県衛生環境研究所)

綿引 正則、磯部 順子、木全 恵子、清水 美和子、増田 千恵子、金谷 潤一

(富山県衛生研究所)

仙波 敬子、木村 千鶴子、大塚 有加、山下 まゆみ

(愛媛県立衛生環境研究所)

黒田 誠、関塚 剛史、山下 明史、加藤 健吾

(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。本研究班では、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っている。

初年度である昨年度は、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。今年度は食品、患者、動物由来のサルモネラ属菌分離株及びカンピロバクター属菌分離株についてゲノム解析を行い、SNPs を抽出し系統樹解析によりゲノム配列を比較した。その結果、サルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌の SNPs 解析では菌株の遺伝的同一性を PFGE よりも高い分解能で区別でき、食中毒の原因究明、食品由来分離株と患者由来の分離株の関連を高い精度で示すことが出来ることがわかった。また、カンピロバクター属菌の薬剤耐性についても、表現型とゲノムデータの解析の比較を行った。

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 (ただし、推定方法により異なる数値が提唱されている)。

この事から、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 法が行われているが、結果を得るまでに 2 ヶ月程度を要していた。これに代わる方法としてより簡便な MLVA 法に変更されたが早期探知に結びつけるには至っていない。

本研究では、地方衛生研究所の病原体の蓄積とネットワークを利用して、病原体ゲノムを次世代シーケンサー (NGS) により網羅的に解読し、国立感染症研究所ゲノム解析研究センターの協力を得てデータベースを構築する。データベースに登録された配列を効率よく比較する方法をゲノムセンターと共同で確立することにより、迅速に広域食中毒の探知を可能とするネットワークの構築に貢献するとともに食中毒菌汚染食品について精度の高い情報を提供することを主要な目的とする。

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。カンピロバクターについては、富山県衛生研究所で分離されたシプロフ

ロキサシン耐性株を中心に、*C.jejuni* 15 株、*C.coli* 5 株を選定した。また、群馬県衛生研究所で分離された *C.jejuni* 19 株、*C.coli* 5 株について解析を行った (表 1, 2)。

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。得られた塩基配列の解析は、各地方衛生研究所及び国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターで行った。

C. 研究結果

C-1. サルモネラ属菌のゲノム解析

C-1-1 愛媛県及び山口県の第 2 相欠損株の鞭毛抗原関連遺伝子領域の解析

サルモネラ属菌の H 抗原の第 2 相が決定できない *S.* 4,5,12:i:- 愛媛株 (EHM21-304) および山口株 (YMG22-133) について、*S.* Typhimurium LT-2 株を標準株とし、第 2 相鞭毛抗原関連遺伝子領域を調べた。また、EHM21-304 とゲノム構造が近縁である *S.* Typhimurium CFSAN001921 株 (2011 年に米国で分離された 10 剤の抗菌薬に耐性の多剤耐性菌)、*S.* 4,5,12:i:- で唯一ゲノム解析されている CVM23701 株とも比較した。

山口株は、CVM23701 株と同様に *fljA*, *B*

を含む 76 遺伝子が欠失しているが、*hin* (regulation of flagellar gene expression) は保持していた。一方、愛媛株では、LT-2 標準株と比較して、*hin* 遺伝子領域を含む 11 個の遺伝子欠失が認められた。

愛媛株について欠失領域の両側を含む DNA 断片を PCR 法で増幅し解析したところ、*S. Typhimurium* LT2 における STM2760~*hin* (STM2772) までの 11 遺伝子が欠失し、代わりに IS26 (820 bp) が挿入されていることが判明した。

C-1-2 愛媛株由来プラスミドの NGS 解析

S. 4,5,12:i- 愛媛株は 9 剤の抗菌薬に対する多剤耐性を示す。この耐性のメカニズムを明らかにするためにプラスミドの NGS 解析を行った。NGS によって十分に解析できなかった領域を PCR 法で増幅し Sanger 法によりその gap 領域の配列を決定する事によりプラスミドの全配列を得た。得られた pSO4-21-304 の配列は 179,881 bp で、薬剤耐性遺伝子、接合伝達関連遺伝子(*tra*)、挿入配列(IS)等の遺伝子を多く含み、薬剤耐性プラスミドの特徴を示した。このプラスミドは不和合性群 Inc A/C プラスミドと Inc FII プラスミドが、ほぼ 1 対 1 で含むキメラ構造を有しており、それぞれに薬剤耐性遺伝子等が存在した。

C-1-3 *S. Infantis* の NGS 及び PFGE によるゲノム解析の比較

愛媛県立衛生環境研究所において患者、食材 (鶏肉)、家畜 (豚) から分離された *S. Infantis* 70 株のゲノム DNA を抽出し NGS 解析を実施した。NGS 解析をもとに系統解析を行ったところ大きく 3 つの

クラスター (A, B, C) に分かれた。クラスター A は全て患者由来株であるが他県で鶏卵から分離された *Infantis* 株と近縁であった。クラスター B は豚由来株 10 株と患者由来株 3 株を含んでいた。クラスター C は鶏肉由来株 26 株、豚肉由来株 1 株、患者由来株 14 株を含んでいた。何らかの薬剤耐性を示した菌株は、全てクラスター C に含まれ、クラスター A と B には薬剤耐性菌は存在しなかった。PFGE 解析と NGS 解析を比較すると、同一の PFGE パターンを示す 8 株が NGS 解析では互いに異なる株として区別可能であり、NGS 解析ではより高分解能のデータが得られることが示された。

C-1-4 富山県衛生研究所で行ったサルモネラ属菌の NGS によるゲノム解析

富山県衛生研究所では、*S. Enteritidis* および *S. Typhimurium*、それぞれ 18 株の NGS ゲノム解析の結果をもとに遺伝子翻訳領域 (CDS) の比較により SNPs を抽出し、系統樹の作成を行った。

C-2. *Campylobacter jejuni* / *coli* 分離株のゲノム解析

C-2-1. 比較ゲノム学的手法による MiSeq データの利用

Gview Server の Blast Atlas を *Campylobacter jejuni* NTCC 11168 (GIB00027CH01) を Reference 株として、*Campylobacter jejuni/coli* 分離株のゲノムデータを解析した。

20 株の *Campylobacter* 属菌の解析の結果、特に reference 株との比較から、Capsular polysaccharide (CPS)-associated regions、Lipooligosaccharide

(LOS)-associated regions、I型制限修飾酵素システムの3カ所の遺伝子領域の翻訳領域に株特異的な多型が存在することが明らかになった。これらの遺伝子多型の意義については今後の検討課題である。

D. 考察

1. サルモネラ属菌第2相欠損株のゲノム解析

血清型分類で第2相が決定できないためO4H抗原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。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70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。食材・家畜由来株と患者由来株のNGS解析において、同一あるいは非常に近縁の組み合わせが7対以上見出され、菌株間の関係や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。NGS解析のクラスターAに属する9株は、PFGEでは豚由来株と近縁と当初考えられたが、NGS解析の結果を他県で分離されたものと比較すると、九州で分離された鶏卵由来株と近縁であることが判明した。一般に、PFGEでは、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では、全国的な比較が可能である。この関連が示されたことから、クラスターAの患者由来9株について鶏卵の摂食との関連を調べる根拠となる。このような事例を一つずつ解決していく事が、食品の安全確保につながると考えられる。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. 地方衛生研究所におけるゲノム解析法の検討

富山県衛生研究所では、独自にゲノムデータの解析を試みた。ゲノム解析の結果をもとに遺伝子翻訳領域（CDS）の比較により SNPs を抽出し、系統樹を作成した。従って、今後地方衛生研究所においてもゲノムデータ処理が可能となると思われるが、今後研究班において、国立感染症研究所ゲノム解析研究センターとの協力関係をどのように位置づけるかを検討する必要があると思われる。

5. カンピロバクターのゲノム解析

群馬県衛生環境研究所において *Campylobacter jejuni* を 19 株、*Campylobacter coli* を 5 株について解析を行った。PFGE パターン解析による分類は、識別に困難な場合や制限酵素による影響があったことから、食中毒菌の疫学解析には限界があると考えられた。一方、NGS による塩基配列の網羅的解析は、1 塩基置換も明らかにしており、カンピロバクターの疫学的手法として有用と考えられた。富山県衛生研究所において *Campylobacter jejuni* 15 株、*Campylobacter coli* 5 株の解析を行った。Blast Atlas 解析により、Capsular polysaccharide 合成と Lipooligosaccharide (LOS) 合成に関連する領域に多型が見いだされた。これらはいずれも菌体表面の抗原性決定領域である。その意義については今後の検討課題である。もう一つは、I 型制限修飾酵素の有無に関する領域であり、*C. coli* では保有株は見いだされず、*C. jejuni* については、保有する株と非保有株が存在していた。これらの遺伝子多型の意義については今後の検討課題であ

る。

E 結論

技術的には、MiSeq を用いて多検体同時ゲノム解析が可能となった。ゲノムデータから SNPs を抽出する方法については国立感染症研究所ゲノム解析研究センターに依頼して行い、SNPs を元に地方衛生研究所で系統樹を作成する技術が確立された。今後は、全国の地方衛生研究所が蓄積して来た菌株を解析しデータを積み重ねることが重要である。

愛媛県、山口県で分離された *S. 4, 5, 12:i:-* のサルモネラ株の 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) が欠失する株であることを明らかにした。愛媛株は、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ことから新しいタイプの菌株であると思われた。一方、山口県の分離株の欠失の様式は CVM23701 株に類似していた。愛媛株由来のプラスミドの NGS 解析により、CTX-M-55 遺伝子を含む多数の薬剤耐性遺伝子を有する ESBL 産生菌であり、接合伝達関連遺伝子を保有していることから耐性遺伝子の拡散が危惧される。また、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。

これらの結果から、NGS 解析は、食品由来微生物のゲノム解析にきわめて有用であり、今後より多くの菌株のゲノムデータの蓄積と比較解析が重要である。また、今後の公衆衛生対策において自治体

技術系職員のNGS技術の習得が必要であり本研究班でも普及に取り組む必要がある。

F.健康危機情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

1: Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K,

Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia

Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis.* 2015 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25762790.

2: Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* 2015 Feb 2;5:8185.

3: Kawase J, Kurosaki M, Kawakami Y, Kashimoto T, Tsunomori Y, Sato K, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T,

Kameyama M, Etoh Y, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K. Comparison of two methods of bacterial DNA extraction from human fecal samples contaminated with *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Campylobacter jejuni*. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):441-6.

4: Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine.* 2014 ;69(2):206-10.

5: Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T,

Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol.* 2014 ;28:183-91.

6: Saraya T, Kurai D, Nakagaki K, Sasaki Y, Niwa S, Tsukagoshi H, Nunokawa H, Ohkuma K, Tsujimoto N, Hirao S, Wada H, Ishii H, Nakata K, Kimura H, Kozawa K,

Takizawa H, Goto H. Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications.

- Front Microbiol. 2014, 1;5:410.
- 7: Saraya T, Kurai D, Ishii H, Ito A, Sasaki Y, Niwa S, Kiyota N, Tsukagoshi H, Kozawa K, Goto H, Takizawa H. Epidemiology of virus-induced asthma exacerbations: with special reference to the role of human rhinovirus. *Front Microbiol.* 2014; 5:226.
- 8: 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 ;58(1):68-71.
- 9: Watahiki M, Isobe J, Kimata K, Shima T, Kanatani J, Shimizu M, Nagata A, Kawakami K, Yamada M, Izumiya H, Iyoda S, Morita-Ishihara T, Mitobe J, Terajima J, Ohnishi M, Sata T. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. *J Clin Microbiol.* 2014 ;52(8):2757-63.
- 10: Isobe J, Shima T, Kanatani J, Kimata K, Shimizu M, Kobayashi N, Tanaka T, Iyoda S, Ohnishi M, Sata T, Watahiki M. Serodiagnosis using microagglutination assay during the food-poisoning outbreak in Japan caused by consumption of raw beef contaminated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157. *J Clin Microbiol.* 2014 ;52(4):1112-8.
- 11: Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *J Virol.* 2014 ;88(15):8597-614.
- 12: Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T. Ultrasensitive detection of PrP(Sc) in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion. *J Gen Virol.* 2014 ;95(Pt 11):2576-88.
- 13: Mine S, Suzuki K, Sato Y, Fukumoto H, Kataoka M, Inoue N, Ohbayashi C, Hasegawa H, Sata T, Fukayama M, Katano H. Evidence for human herpesvirus-6B infection of regulatory T-cells in acute systemic lymphadenitis in an immunocompetent adult with the drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: a case report. *J Clin Virol.* 2014 ;61(3):448-52.
- 14: Kanoh M, Maruyama S, Shen H, Matsumoto A, Shinomiya H, Przybilla K, Gouin E, Cossart P, Goebel W, Asano Y.

Listeria arpJ Gene Modifies T Helper Type 2 Subset Differentiation. J Infect Dis. 2015 Jan 13. pii: jiv021. [Epub ahead of print]

15: Yamaguchi S, Suzuki T, Kobayashi T, Oka N, Ishikawa E, Shinomiya H, Ohashi Y.

Genotypic analysis of Pseudomonas aeruginosa isolated from ocular infection. J Infect Chemother. 2014 ;20(7):407-11.

2. 学会発表
なし

H.知的所有権の取得状況
なし

表 1. サルモネラ属菌の全ゲノム解析株数

<i>S. Infantis</i>		<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. 4,5,12:i-</i>		<i>S. Enteritidis</i>		合計
患者	食品	患者	食品	患者	食品	患者	食品	
51	56	10	5	3	3	10	0	138

表 2. カンピロバクター属菌の全ゲノム解析株数

<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	合計
34	10	44

平成27年2月19日 中間評価ヒアリング

平成26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

研究協力者 国立感染症研究所
 病原体ゲノム解析研究センター 黒田誠 (センター長)
 感染症疫学センター 木村博一(室長)

研究の目的

1. 食中毒関連細菌株のゲノム配列を、次世代シーケンサー(NGS)を用いて地方衛生研究所で解読する技術を新たに導入し、ゲノムデータの蓄積を行う
2. 細菌株の遺伝的性質を効率よく比較・照合することの出来る手法を開発することにより、これまで困難であった広域的食中毒の早期探知を目指す
3. 食品由来、患者由来の菌株のゲノム配列を比較し食中毒の原因を高精度で推定する技術を確立する
4. 食品由来、患者由来の菌株の薬剤耐性プラスミドのゲノム解析を行う

研究班におけるゲノム解析数

1. サルモネラ属菌のゲノム解析

<i>S. Infantis</i>		<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. 4,5,12:i-</i>		<i>S. Enteritidis</i>		合計
患者	食品	患者	食品	患者	食品	患者	食品	
51	56	10	5	3	3	10	8	146

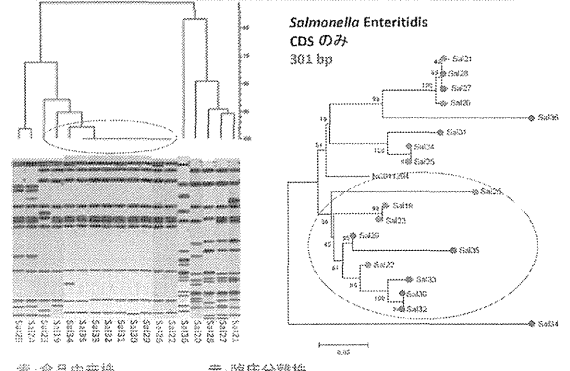
- SNPs抽出と系統樹解析、EFGEとの比較
- 薬剤耐性プラスミドの解析

2. カンピロバクターのゲノム解析

<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		合計
患者	食品	患者	食品	
15	19	4	6	44

- SNPs抽出と系統樹解析、EFGEとの比較
- 薬剤耐性プラスミドの解析

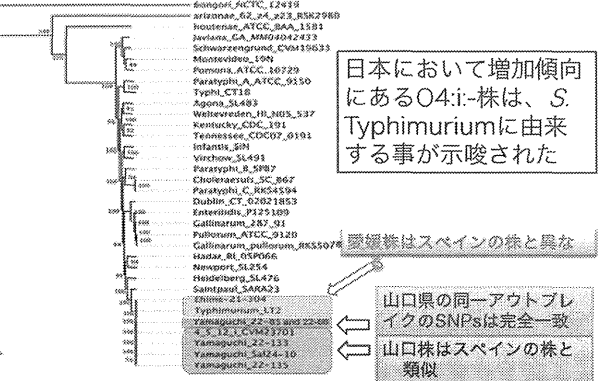
従来法 (PFGE) よりもNGS法は高い解像度を示す



S. Infantis, *S. Typhimurium*, *C. jejuni*, *C. coli* についても同様の結果を得た

S. 4:i- ゲノムのSNPsによる系統解析

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



Salmonella Infantis sin株を参照株としたSNPsによる系統樹解析

株名	患者別	経路	検出施設	発症時期	検出地
Salmonella_Infantis_20-152	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-153	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-154	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-155	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-156	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-157	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-158	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-159	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-160	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-161	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-162	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-163	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-164	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-165	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-166	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-167	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-168	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-169	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-170	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-171	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-172	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-173	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-174	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-175	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-176	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-177	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-178	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-179	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-180	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-181	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-182	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-183	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-184	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-185	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-186	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-187	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-188	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-189	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-190	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-191	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-192	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-193	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-194	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-195	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-196	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-197	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-198	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-199	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県
Salmonella_Infantis_20-200	患者	鶏肉由来	山口県	2016/7/29	山口県

1. 豚肉由来、鶏肉由来、鶏卵由来株のクラスターに分かれる
2. 食品由来、患者由来株で非常に類似した株の組み合わせが5対ある
3. 20-132(鶏肉由来)と20-157(患者由来)は同一SNPであり、同一クローンの可能性が高い

結果のまとめ

1. 山口県、群馬県に新たにNGSを導入、解析技術を習得した（富山県では既に導入済み）
 2. サルモネラ属菌、カンピロバクターについて、NGSによるゲノム解析によりSNPs（一塩基置換）を抽出し系統樹解析を行う技術を確認した
 3. NGS法はPFGE（従来法）よりも解像度が高いことを示した（PFGEデータの施設間比較は困難）
- ・サルモネラ属菌が原因の同一アウトブレイク患者由来株ではゲノム配列が完全に一致することを示した
→ 直接の原因食と患者由来株ではSNPsがほとんど一致すると思われる
 - ・鶏肉と患者由来のゲノム配列が完全に一致したケースが1事例があり、非常に近い株に汚染された鶏肉が原因食の可能性高い
 - ・鶏肉と患者由来のゲノム配列がSNPsが高度に類似していた2事例では、鶏肉由来株を保有していた鶏と強い関連が疑われる

平成27年度の計画

1. 幅広い地域(各支部2施設程度)から菌株を収集しゲノム解析を行いデータを蓄積する
2. アウトブレイク由来の菌株、同一地域由来の解析数を増やしSNPsの変化と時間の相関を明らかにする
3. 地方衛生研究所に対する成果の周知を行い、NGS技術の普及を図る

他の研究班との連携

1. 薬剤耐性プラスミドの解析

平成27-28年度（申請中）
食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
研究代表者：渡辺治雄 研究分担者：黒田誠、調恒明ほか

2. NGS解析技術に関する連携(地衛研と感染研の高速通信など)

平成26-27年度
迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワークの構築に関する研究
研究代表者：黒田誠 研究分担者：調恒明、佐多徹太郎ほか

学会及び論文発表

学会発表

1. *Salmonella enterica* serovar 4*i*-株の次世代シーケンサーによるゲノム解析
島谷竜哉、関塚剛史、山下明史、黒田誠、野村恭晴、調恒明、仙波敬子、宮本仁志、四宮博人 第67回日本細菌学会中国四国支部総会(徳島) 2014. 10.4-5

2. Characterization of genomic structures and multidrug resistances of *Salmonella* 4,5,12*i*- isolates.
Tatsuya Karasudani, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Makoto Kuroda, Komei Shirabe, Keiko Semba, Chizuko Kimura, Yasuharu Nomura, Hitoshi Miyamoto and Hiroto Shinomiya 第88回日本細菌学会総会(岐阜) 2015. 3. 26-28 (予定)

論文発表

1. 地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情
四宮博人、勢戸和子、川瀬遼、有川健太郎、松濤川圭次、鈴木匡弘、久保田寛顕、調恒明
日本細菌学雑誌 印刷中

2. Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar 4,5,12*i*- isolates from Japan reveals a notable deletion in the *fljB* operon and an IncA/C plasmid encoding CTX-M-55 extended-spectrum β -lactamase
Tatsuya Karasudani, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Makoto Kuroda, Komei Shirabe, Keiko Semba, Chizuko Kimura, Yasuharu Nomura, Hitoshi Miyamoto and Hiroto Shinomiya 投稿中

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（食品の）安全確保推進事業
平成26年度 第2回班会議
平成27年1月9日 国立感染症研究所共用第二会議室

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

研究協力者：野村恭晴、亀山光博（山口県環境保健センター）

研究の目的

1. 広域的アウトブレイクの早期探知法開発への貢献
2. 食中毒原因食品と分離株ゲノムの相関
3. 食中毒菌のゲノム解析による薬剤耐性遺伝子情報の収集
4. 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

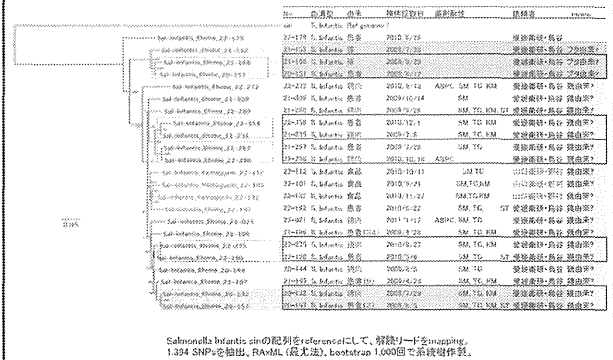
サルモネラ属菌のゲノム解析

供試菌株：S. Infantis 3株 4,5,12:i:- 5株

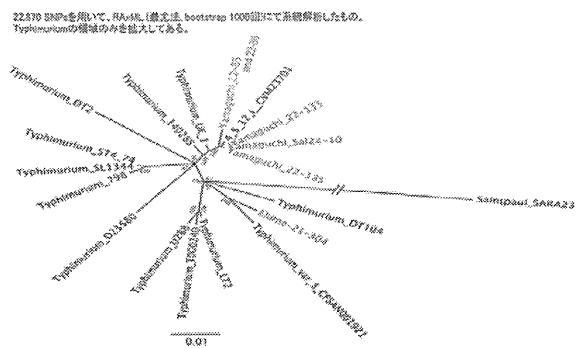
番号	血清型	分離年月日	検体	加工所
1	20-46	20.10.31	食品 国産わかめミンチ	A 下松市
2	20-81	20.12.19	食品 鶏たまご	B 宇部市
3	20-65C	21.1.27	食品 国産わかめミンチ	C 防府市
4	20-65C	21.1.27	食品 桜香鶏むねミンチ	D 防府市
5	20-65C	21.1.27	食品 国産わかめミンチ	C 防府市
6	22-82	22.9.7	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
7	22-100	22.9.21	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
8	22-101	22.9.21	食品 国産鶏胸むねミンチ	F 山口市
9	22-112	22.10.11	食品 鶏ミンチ	G 柳井市
10	22-132	22.11.22	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
11	22-134	22.11.22	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
12	22-11	23.11.15	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
13	22-14	23.11.22	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
14	sa24-9	24.10.9	食品 国産鶏胸むねミンチ	F 山口市
15	sa24-14	24.10.30	食品 国産鶏胸むねミンチ	F 山口市

1	22-65	4.5.12:i:-	22.9.8	農産物（鶏胸 下脚）	-
2	22-66	4.5.12:i:-	22.9.8	農産物（鶏胸 下脚）	-
3	22-133	4.5.12:i:-	22.11.24	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
4	22-135	4.5.12:i:-	22.11.24	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
5	sa24-14	4.5.12:i:-	24.10.9	食品 国産鶏胸むねミンチ	F 山口市

S. Infantis



4,5,12:i:-



今後の予定

・ S. Infantis : 未解析の12株の解析実施

番号	血清型	分離年月日	検体	加工所
1	20-46	20.10.31	食品 国産わかめミンチ	A 下松市
2	20-81	20.12.19	食品 鶏たまご	B 宇部市
3	20-65C	21.1.27	食品 国産わかめミンチ	C 防府市
4	20-65C	21.1.27	食品 桜香鶏むねミンチ	D 防府市
5	20-65C	21.1.27	食品 国産わかめミンチ	C 防府市
6	22-82	22.9.7	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
7	22-100	22.9.21	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
8	22-101	22.9.21	食品 国産鶏胸むねミンチ	F 山口市
9	22-112	22.10.11	食品 鶏ミンチ	G 柳井市
10	22-132	22.11.22	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
11	22-134	22.11.22	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
12	22-11	23.11.15	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
13	22-14	23.11.22	食品 国産わかめミンチ	E 広島市
14	sa24-9	24.10.9	食品 国産鶏胸むねミンチ	F 山口市
15	sa24-14	24.10.30	食品 国産鶏胸むねミンチ	F 山口市

・ S. Enteritidis : 39株 (LDC+ 7株 LDC- 32株) の解析実施