

Ⅱ 分担研究報告書

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）
分担研究報告書

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）

研究分担者

小澤 邦壽（群馬県衛生環境研究所）

研究協力者

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）

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。最近の遺伝子解析による病原体特定技術は急速に発展しており、特に、次世代シーケンサー（NGS）による塩基配列の網羅的解析は、PFGE に比較して大容量の情報を得ることが可能である。本研究では、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、食品中のカンピロバクター属菌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、詳細な解析を行うことにより、1 塩基置換の違いまで明らかにすることができたことから、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。一方、パルスフィールドゲル電気泳動（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。今後は、臨床株を加えることによって広域的に活用できるデータベースを構築することが重要と考えられた。また、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

食中毒が発生した場合、発生に関する情報を迅速かつ正確に把握することが必要である。

これまで食品由来病原微生物の解析は、培養法及び生化学的性状によって行われてきた。また、食中毒菌の疫学解析には、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法が行われてきたが、病原体ゲノム疫学解析を活用することにより、発生源の特定や被害拡大の抑制につながると期待されている。

最近の遺伝子解析による病原体特定技術は

急速に発展しており、特に、次世代シーケンサー（NGS）による塩基配列の網羅的解析は、PFGE に比較して大容量の情報を得ることが可能である。

本研究では、食品由来病原微生物としてカンピロバクターをターゲットにした NGS の有用性について検討を行った。

B. 研究方法

牛肝臓から分離される食中毒原因菌および肝臓内部における分布状況

平成 25 年 8 月～11 月の期間に食肉処処理場へと畜解体のため普通搬入された牛 11 頭を対象として、牛肝臓および同一個体の胆汁、盲腸便を採取し検体とした。盲腸便および肝臓を内臓検査場所から採取、別室にて滅菌済み注射針及び注射筒で胆汁を約 10ml 採取し、次に胆嚢を取り除き、肝臓実質は部位により 18 ブロックに分割した。牛 11 と体から採取した検体数は、肝臓実質が 198 (11×18) 検体、胆汁が 11 検体、盲腸便が 11 検体の計 220 検体であった。

カンピロバクター属菌の検索は、採取した検体について肝臓実質及び盲腸便は 1g、胆汁は 1ml (≒1g) を 9ml のプレストン培地に入れ、42°C で 22～24 時間微好気培養した。培養液を CCDA 培地に画線塗抹し、42°C で 48 時間微好気培養した。そして、カンピロバクター属菌を疑うコロニーを 1～5 個釣菌し、純培養した後、生化学的性状試験および PCR 法にて属種を判定した。さらに分離されたカンピロバクター属菌について、1 と体内で複数箇所から採取された分離株、同一出荷者かつ同種の血清型であった分離株について、菌株間の相同性を確認するために制限酵素 Sma I、Kpn I で処理した後、PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) 法による遺伝子多型解析を実施した。

また、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

得られた遺伝子をアセンブリし、Clustal W2 を用いた NJ 法による系統樹解析を行った結果、19 株の *Campylobacter jejuni* のうち、5 組の遺伝子一致が明らかとなった (表 1)。さらに、それ

ぞれの菌株に対して塩基置換数を解析したところ、1～15,092 ヶ所の塩基置換があることが明らかになった。PFGE パターンが同一であった菌株の塩基配列は、100 %一致した (表 2)。一方、塩基配列が 100 %一致した 4 株のうち、1 株は PFGE パターンが異なっていた。また、*Campylobacter coli* では、5 株中 3 株の塩基配列が 100 %一致した (表 3, 4)。これらの 3 株の PFGE は、制限酵素の違いにより 1 株が異なるパターンとなった。

D. 考察

系統解析の結果から、塩基配列が 100 %一致した菌株は、ほぼ同一のクローンの可能性が高いことが示唆された。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。

今回の調査は、食品中の病原微生物を対象にしたものであり、さらに臨床株を加えることによって広域的に活用できるデータベースを構築することが重要と考えられる。

E. 結論

本研究において、NGS を活用しカンピロバクターの詳細な解析を行うことにより、1 塩基置換の違いまで明らかにすることができた。これらのゲノムデータを蓄積し、その情報を共有することで、広域食中毒の早期探知のために役立てていく必要がある。

したがって、今年度の成果を基に、多くの食中毒菌について、データベース構築のための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.

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

I. その他

謝辞

本研究の遂行にあたり、知識や技術的な御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。

表1 NGS解析とPFGEパターン解析 (C.jejuni)

菌種	検体 No.	牛 個体No.	検体採取日	出荷 農家	検出部位 (肝臓・胆汁・盲腸便)	PFGE結果	
						パターン	備考
C.jejuni	1	2	H25.8.20	①	盲	I	個体内で2種類の泳動増
	2				盲	II	
	3	3	H25.9.9	②	肝	III	個体内で2種類の泳動像
	4				肝	IV	
	5				胆	III	
	6				盲	IV	
	7	5	H25.9.24	③	肝	V	個体内で3種類の泳動像
	8				肝	VI	
	9				肝	VI	
	10				肝	VI	
	11				盲	VII	
	12	8	H25.11.5	④	胆	VIII	同一農家、異なる個体で同一の泳動像
	13				盲	VIII	
	14	9	H25.11.5	④	盲	VIII	
	15	10	H25.11.18	③	肝	IX	個体内で同一の泳動像
	16				胆	IX	
	17	11	H25.11.18	⑤	肝	X	個体内で2種類の泳動像
	18				肝	X	
	19				盲	XI	

同一色は、塩基配列が100%一致した菌株

表2 C.Jejuni 株の塩基置換数

塩基置換数	CJ-Gunma-18	CJ-Gunma-7	CJ-Gunma-8	CJ-Gunma-9	CJ-Gunma-10	CJ-Gunma-2	CJ-Gunma-15	CJ-Gunma-16	CJ-Gunma-1	CJ-Gunma-19	CJ-Gunma-3	CJ-Gunma-5	CJ-Gunma-12	CJ-Gunma-13	CJ-Gunma-14	CJ-Gunma-11	CJ-Gunma-4	CJ-Gunma-6
CJ-Gunma-17	0	14,691	14,691	14,691	14,691	15,082	15,091	15,092	14,447	14,470	14,527	14,527	14,496	14,496	14,496	14,430	14,773	14,773
CJ-Gunma-18	14,691	14,691	14,691	14,691	14,691	15,082	15,091	15,092	14,447	14,470	14,527	14,527	14,496	14,496	14,496	14,430	14,773	14,773
CJ-Gunma-7		0	0	0	0	13,132	13,141	13,142	12,449	12,454	12,611	12,611	13,005	13,005	13,005	13,234	13,271	13,271
CJ-Gunma-8			0	0	0	13,132	13,141	13,142	12,449	12,454	12,611	12,611	13,005	13,005	13,005	13,234	13,271	13,271
CJ-Gunma-9				0	0	13,132	13,141	13,142	12,449	12,454	12,611	12,611	13,005	13,005	13,005	13,234	13,271	13,271
CJ-Gunma-10					0	13,132	13,141	13,142	12,449	12,454	12,611	12,611	13,005	13,005	13,005	13,234	13,271	13,271
CJ-Gunma-2							11	12	11,137	11,109	11,290	11,290	10,688	10,688	10,688	11,638	12,031	12,031
CJ-Gunma-15								1	11,146	11,118	11,299	11,299	10,697	10,697	10,697	11,647	12,040	12,040
CJ-Gunma-16									11,147	11,119	11,300	11,300	10,698	10,698	10,698	11,648	12,041	12,041
CJ-Gunma-1										737	737	8,346	8,346	8,346	9,105	9,536	9,536	
CJ-Gunma-19											748	748	8,299	8,299	8,299	9,138	9,597	9,597
CJ-Gunma-3												0	8,418	8,418	8,418	8,884	9,307	9,307
CJ-Gunma-5													8,418	8,418	8,418	8,884	9,307	9,307
CJ-Gunma-12														0	0	8,946	9,301	9,301
CJ-Gunma-13															0	8,946	9,301	9,301
CJ-Gunma-14																8,946	9,301	9,301
CJ-Gunma-11																	1,193	1,193
CJ-Gunma-4																		0

表3 NGS 解析と PFGE パターン解析 (C.coli)

菌種	検体 No.	牛 個体No.	検体採取日	出荷 農家	検出部位 (肝臓・胆汁・盲腸便)	PFGE結果	
						パターン	備考
C.coli	20	4	H25.9.9	⑥	盲	A	泳動パターン(制限酵素 Sma-I)が2種類のみ。バンド1本の違い。
	21				肝	A	
	22	6	H25.10.21	③	胆	B	
	23				盲	B	制限酵素Kpn-1ではすべて一致。
	24	7	H25.10.21	⑦	盲	A	

表4 C.coli 株の塩基置換数

塩基置換数	Cc-Gunma-24	Cc-Gunma-21	Cc-Gunma-22	Cc-Gunma-23
Cc-Gunma-20		1335	1412	1412
Cc-Gunma-24			87	87
Cc-Gunma-21				0
Cc-Gunma-22				0

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

背景

- 食品汚染による大規模アウトブレイクでは早期の探知が重要
- ゲノム疫学の精度を高めることは食中毒の制御につながる
- 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



- 食品の病原微生物のゲノム解析を実施
- 食中毒菌ゲノムデータベースを構築(精度の高いゲノム疫学)

平成26年度研究計画 カンピロバクター

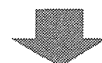
- 代表的な細菌性食中毒(カンピロバクター・ジェジュニ)
- 主な原因食品: 鶏肉(鶏刺し、タタキなど)、牛レバーなど
- 食中毒の原因病原体として最も多い
- 患者数もノロウイルスに続いて2番目に多い
- 分離される菌種はカンピロバクター・ジェジュニが95~99%



出典: 農林水産省ホームページ

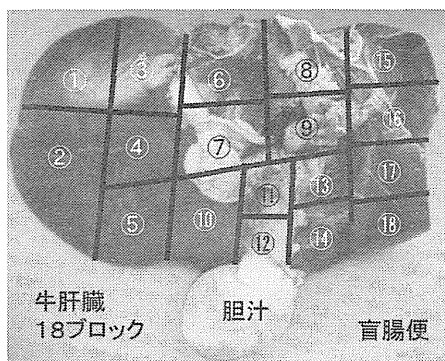
研究概要

- 食品サンプル(生レバー)から分離されたカンピロバクターの解析
- PFGEの結果とNGSの結果を比較



食中毒事例において、
PFGEなどの手法に変わるNGSの有用性を明らかにする

材料(生レバー)



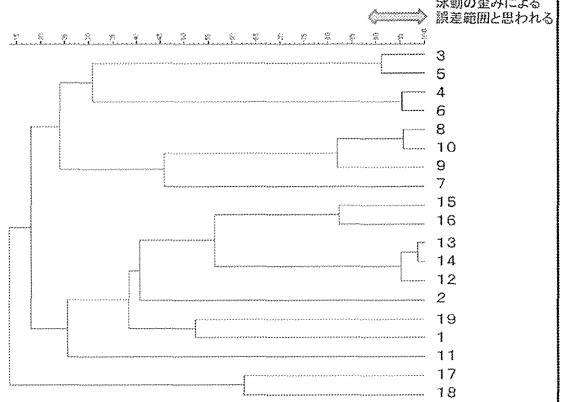
使用した菌株

- 平成25年8月~11月に採取した*C.jejuni* 19株及び*C.coli* 5株を用いた。
- PFGE解析では、*C.jejuni* が11パターン、*C.coli* が2パターンに分類された。

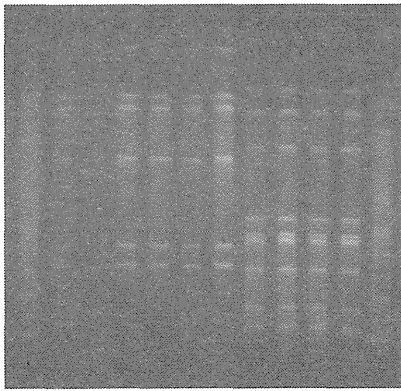
NGS解析とPFGE(C.jejuni)

菌株	菌株No.	牛個体No.	検体採取日	出荷農家	検出部位 (肝臓・胆汁・盲腸便)	PFGE結果	
						パターン	備考
C.jejuni	1	2	H25.8.20	①	盲	I	個体内で2種類の泳動像
	2				II		
	3				III		
	4	3	H25.9.0	②	肝	IV	個体内で2種類の泳動像
	5				V		
	6				VI		
	7	5	H25.9.24	③	肝	VII	個体内で3種類の泳動像
	8				VIII		
	9				IX		
	10	8	H25.11.5	④	胆	X	同一畜家、異なる検体で同一の泳動像
	11				XI		
	12				XII		
	13	9	H25.11.5	④	盲	XIII	同一畜家、異なる検体で同一の泳動像
	14				XIV		
	15				XV		
	16	10	H25.11.18	③	肝	IX	個体内で同一の泳動像
	17				IX		
	18	11	H25.11.18	⑤	肝	X	個体内で2種類の泳動像
	19				XI		

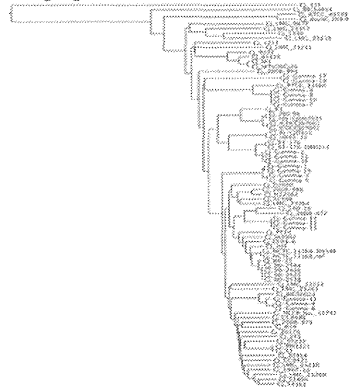
C.Jejuniの系統樹解析結果



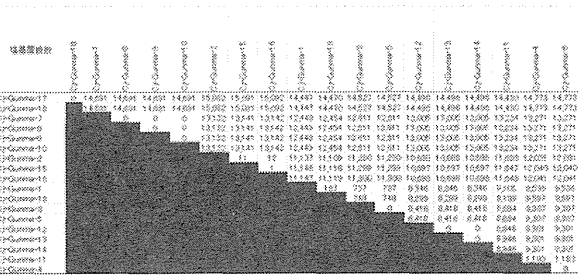
17 18 19



C.jejuni系統樹(NGS)



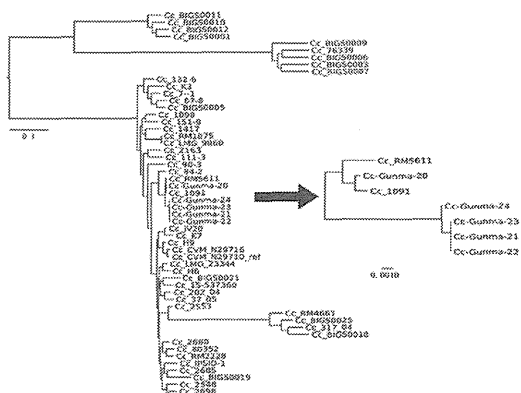
C.Jejuni株の塩基置換数



NGS解析とPFGE(C.coli)

菌株	菌株No.	牛個体No.	検体採取日	出荷農家	検出部位 (肝臓・胆汁・盲腸便)	PFGE結果	
						パターン	備考
C.coli	20	4	H25.9.9	⑥	盲	A	泳動パターン(制限酵素Sma-I)が2種類のみ。バンド1本の違い。
	21				肝	A	
	22	6	H25.10.21	③	胆	B	
	23				盲	B	
24	7	H25.10.21	⑦	盲	A	制限酵素Kpn-Iではすべて一致。	

C.coli系統樹 (NGS)



C.coliの塩基置換数

塩基置換数	Cc-Gunma-24	Cc-Gunma-21	Cc-Gunma-22	Cc-Gunma-23
Cc-Gunma-20	1355	1412	1412	1412
Cc-Gunma-24		87	87	87
Cc-Gunma-21			0	0
Cc-Gunma-22				0

まとめ

牛レバーから分離した*C. jejuni* 19株及び*C. coli* 5株のNGS解析を行ったところ、*C. jejuni* 12株及び*C. coli* 2株がそれぞれのPFGEパターン結果と一致した。

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ると考えられた。

NGSによる食品由来病原微生物の網羅的ゲノム解析は、PFGE法よりも精度が高く、食中毒の疫学解析に有用と考えられる。

今後の課題

- ◆食中毒事例のNGS解析をさらに進め、食中毒菌ゲノムデータベースを構築する。
- ◆地方衛生研究所間でのデータの比較を行う。

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・部長）
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・主任研究員）

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）の公衆衛生分野での活用方法について、検証した。これまでに食中毒の原因物質不明事例で利用され、NGS は原因究明法として極めて有用であることが知られるようになってきた。今年度は、食中毒原因菌として重要なサルモネラ属菌分離株 36 株のゲノム配列を、比較ゲノム解析手法を用いて評価した。さらに、カンピロバクター分離株 20 株についてもゲノム解析を行い、分離菌種のゲノム配列の特徴や機能について解析した。その結果、高精度疫学マーカーとしての SNP 解析や比較ゲノム学的手法を導入した結果、迅速で正確な遺伝子解析法として、NGS は地衛研における公衆衛生学分野で十分利用価値があると考えられた。

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を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検出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。

2011 年に NGS のデスクトップ型機器が発売され、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充実し、NGS が利用しやすくなっていた。このような時期に、富山県を中心として、多数の重症患者を含む腸管出血性大腸菌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目的で、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。近年、

感染症や食中毒もグローバル化し、従来の原因究明のための検査技術も多様化している。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、新規な病原体や多様化する感染症、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場所である。

従って、本研究は、公衆衛生分野での感染症及び食中毒対応、すなわち、予防や蔓延防止等に資する MiSeq の活用法を検討することを目的としている。

研究班 2 年目の今年度は、昨年度より引き続き課題である、食中毒菌として、サルモネラ属菌及びカンピロバクター属分離株の MiSeq によるゲノム解析を実施し、このドラフト配列の活用法として、分子疫学マーカーとしての有用性と分離菌の病原性に関する解析の可能性を、既存のゲノム解析技術を導入し検討したので報告する。これにより、複数株の同時ゲノム解析が可能であり、公衆衛生分野で活用できることが確認された。そこで NGS の活用方法をさらに確認するため、サルモネラ属菌の一つである *S. Infantis* について、多数の株を対象に SNP 抽出を行い、その有用性を評価するために検討を開始した。本報告については、次回とする。

B. 研究方法

B-1. 供試菌株

解析に用いた菌は、サルモネラ属菌とカンピロバクター属菌でいずれも当所保存株である。

サルモネラ属菌は、1995年から2013年にかけて、分離された *S. Enteritidis* および *S. Typhimurium* がそれぞれ18株で、さらにその内訳は食品及び臨床検体（主に便）から分離された株として、9株ずつ選定した合計36株である。

カンピロバクター属菌は、薬剤感受性試験を実施しシプロフロキサシン耐性を中心に、*C. jejuni* 15株、*C. coli* 5株を選定した。

B-2. 供試菌のゲノム DNA の抽出と解析

サルモネラ属菌は、トリプチケースソイ寒天培地（TSA）およびカンピロバクターは羊血液寒天培地上で一晩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 DNA ライブラリーは、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）。DNA 分画は、1%アガロース電気泳動を行い、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 Kit, V3 600PE 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、CLC Genomics Workbench（CLC）を用いて、アセンブルを行ない、アセンブルしたデータは、fasta 形式で出力した。Single Nucleotide Polymorphism (SNP)解析も CLC を用いて行い、統合した SNP データによる系統解析は、MEGA を使用した

(Tamura, K., et al. Mol. Biol. Evol., 2011, 28:2731)。

アセンブルしたデータは、RAST

(<http://rast.nmpdr.org/>)を使用して、注釈づけを行った。また、比較ゲノム学手法である Blast atlas は、Gview Server (<https://server.gview.ca/>) を利用した。薬剤耐性遺伝子の検索は、ResFinder

(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) を用いた。また、ゲノム解析が完全に終了している株をレファレンス株として、*Salmonella Typhimurium* LT2 (AE006468), *S. Enteritidis* (NC_011294) 及び *Campylobacter jejuni* NTCC 11168 (GIB00027CH01) を用いた。

B-5. 分離株の薬剤感受性試験

サルモネラ属菌の薬剤感受性試験には薬剤として、クロラムフェニコール(CP)、テトラサイクリン(TC)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ナリジクス酸(NA)、セファロチン(CET)、アンピシリン(ABPC)、ミノサイクリン(MINO)を使用した。また、カンピロバクター属菌には、ナリジクス酸(NA)、オフロキサシン(OFLX)、ノルフロキサシン(NFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、エンロフロキサシン(ERFX)、エリスロマイシン(EM)、テトラサイクリン(TC)、ホスホマイシン(FOM)、ゲンタマイシン(GM)、ストレプトマイシン(SM)、アンピシリン(ABPC)、アンピシリン・スルバクタム(ABPC/SBT)、セファロチン(CF)、ピペラシリン(PIPC)、ピペラシリン・タゾバクタム(PIPC/TAZ)、セフトキシム(CTX)を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は、臨床情報のない分離菌株を用いるものであり、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. *S. Typhimurium* および *S. Enteritidis* のゲノム解析

C-1-1. ゲノムワイド SNP の抽出と分子疫学マーカーとしての有用性

S. Enteritidis および *S. Typhimurium*、それぞれ18株の配列をアセンブルし、SNP を抽出し、18株の SNP 情報を統合して、最終的に、タンパク質をコードする領域のみ、18種類の株に相同部位の SNP を並べ、*S. Enteritidis* 18株では、301bp、*S. Typhimurium* では、2,438塩基の SNP の配列で系統樹を作成した（図1～3）。

C-1-2. 比較ゲノム学的手法による MiSeq データの利用：Blast Atlas 解析

CLC のアセンブラーにより得られた各株の contig は、すでに報告されている同種のゲノム解析株（レファレンス株）と得られたコード領域（CDS）比較することにより、株の特徴を CDS の有無や相同性の違いを知ることによって推定が可能になる。そこで、Gview Server の Blast Atlas を利用して、*S. Enteritidis* および *S. Typhimurium* 分離株、それぞれ18株の得られた配列上の CDS をレファレンス株に存在するすべての CDS に対して、Blast 解析を実施し、全体の CDS の有無や相同性の違いを解析した。

図4は *S. Enteritidis* 18株、図5は *S. Typhimurium*

18株の、Blast Atlas 解析の結果を示す。図の内側にレファレンス株を配置し、外側に向かい、食品由来9株、続いて臨床由来9株の順で、相同 CDS を配置した。図4の *S. Enteritidis* 18株の CDS は、レファレンス株と比較して、その相同性は高く、ほぼ均一で、臨床分離株と食品分離株で特徴的な構造の違いは見られなかった。しかし、*S. Typhimurium* 18株は、一部に株間で多型を示す座位3か所 (A, B 及び C) が存在していた。この多型を示す座位の機能は、座位 A は、サルモネラが嫌気的な生育時に炭素源としてアラントイン窒化に関する遺伝子群の有無に関していた。また、B, C については、いずれもプロフェージ遺伝子の差に起因していた (図6~8)。

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

C-2-1. ResFinder を用いた薬剤耐性遺伝子の保有状況

20株のドラフトゲノム配列を、薬剤耐性遺伝子の検索 Web サービスである ResFinder を用いて、検索した。結果については、表1の右側の列に記載した。その結果、20株のうち8株から tet(O) が検出されたが、感受性試験で TC 耐性であった7株のうち、2株 (strains Cj07 および Cj19) では tet(10) 陰性であった。また、逆に tet(10) 陽性で感性を示す株 (Cj20) が存在しており、一部で遺伝子型と表現型が合致していなかった。アミノグルコシド耐性株であった Cc01 は、耐性遺伝子として、aac(6')-aph(2'') が検出され、遺伝子型と表現型が合致していた。さらに、今回、検討した20株のうち、Cj07を除く、すべての株で blaOXA-61 が検出された。この遺伝子の保持とβラクタム耐性の表現型は必ずしも一致していなかった。

今回、解析した *Campylobacter* 属菌は、キノロン耐性菌を主に選択している。キノロン耐性機構は、DNA gyrase や topoisomerase の点変異に起因するアミノ酸置換により耐性を獲得することが知られており (図9)、20株のうち、複数の株でキノロン耐性決定領域 (QRDR) のアミノ酸置換を検出したが、一部の耐性菌では、検出されなかった。このような遺伝子変異による耐性機構では、薬剤耐性遺伝子のデータベースでは検索できない (表1)。キノロン耐性や、多剤耐性が付与する場合、膜タンパクである薬剤排出ポンプの変異が関係することが知られている。そこで、*Campylobacter* 属菌の薬剤耐性に関与する cmeRABC オペロンについて、20株のゲノム配列から抽出し、レファレンス株と Blast 解析を実施した (図10)。ここでは、Blast 検索する際のカットオフ値として、70%と98%を用いて、検索した。その結果、*C. coli* については、

レファレンス株として、*C. jejuni* を用いているため相同性は低かったが、*C. jejuni* とは相同性は高く、キノロン耐性との関係については、明らかな傾向は示せなかった。

C-2-2. 比較ゲノム学的手法による MiSeq データの利用 : Blast Atlas 解析

先のサルモネラゲノム解析で用いた、Gview Server の Blast Atlas を、*Campylobacter jejuni/coli* 分離株に適用した (図11)。Reference 株には、*Campylobacter jejuni* NTCC 11168 (GIB00027CH01) を用いた。

20株の *Campylobacter* 属菌の解析結果は、図○に示した。この結果、株特異的な多型が CDS 上にいくつか存在することが明らかになった。今回は、特に reference 株との比較から、3つの座位 (A, B 及び C) に注目した。座位 A は、Capsular polysaccharide (CPS)-associated regions、座位 B は、Lipooligosaccharide (LOS)-associated regions、及び座位 C は I 型制限修飾酵素システムに該当していた (図12~14)。

D. 考察

NGS を用いて、食中毒対策に資する活用法を探る試みは、①NGS である MiSeq から、目的にあった配列リードを安定に生産する、②出力データから、必要な情報を抽出する、2段階が必要である。昨年度は、①を確立するために、Nextera XT DNA ライブラリーの作成法を検討し、今年度は、その配列リードを、目的のあった方法で解析できるかどうかを確認した。イルミナ社の MiSeq が普及し、それを加工、解析するソフトが充実してきたことにより、簡単にできるようになってきているが、MiSeq から出力されるデータはあまりにも大きく、また、ドラフト配列であるため、どこまで利用活用できるか検証が必要である。

S. Enteritidis 18株及び *S. Typhimurium* 18株のゲノム解析データから、以下のことが確認できた。①最終的に抽出された SNP 数は、株により異なっている。今回は、*S. Enteritidis* 18株は 301bps、*S. Typhimurium* 18株は 2,438bp であり、その差は3倍程度である (図2、3)。この違いの理由は、不明であるが、菌種の生態学的な違い (宿主の違いなど) を反映している可能性があり、Blast atlas 解析により、ゲノム全体を俯瞰しても、前者は後者よりも保存性が高いように見える (図4と5)。また、今回の解析では、サルモネラ属菌が、人獣共通に存在する細菌であり、動物や環境から分離された菌種と臨床分離株とはなにか特徴的な違いがゲノム配列 (特にコード領域の違い) に存在しているかどうか、期待したが、今回解析した *S.*

Enteritidis と *S. Typhimurium* からは、その違いは見いだせなかった。しかしながら、*S. Typhimurium* については、染色体ゲノム上に3つの大きな多型が存在していた(図5)。3つのうち、2つはプロフェージに関する領域の多型であり、*S. Enteritidis* よりもフェージのサイクリングが活発であることが予想される。また、もう一つは、嫌気状態での生育に関する遺伝子の有無に関する領域であり、この遺伝子群の有無は、動物の消化管内で増殖する性質を持つ、サルモネラにとって生存に対して有利に働いている可能性があると考えられた。それだけ、*S. Typhimurium* はヒトと動物の間で生き残るすべを持っているのかもしれない。

カンピロバクターについては、キノロン耐性を示す *C. jejuni* 及び *C. coli* を対象に解析した。近年のキノロン耐性株の増加について、ゲノム配列からそのメカニズムがどうなっているかを推定することが可能であるかどうか、今回の解析で最も知りたい点であった。細菌の抗菌薬耐性のメカニズムは大別すると、菌がもともと持っている耐性である自然耐性と、プラスミドなどを介して、耐性を獲得する機構が存在することが知られている。ドラフトゲノムであっても、ゲノム上の繰返し配列(rRNA や tRNA などの遺伝子)やフェージ由来の配列など、アセンブルが困難なものは MiSeq のドラフト配列から解析は困難であるが、通常の CDS であれば、十分な解析に耐えうるデータとなる可能性は高い。そこで、インターネット上で特に獲得耐性に関連する薬剤耐性遺伝子のデータベースがあり、解析したデータをアップロードするだけで、解析したゲノム中にどのような耐性遺伝子が存在しているかを検索してくれる ResFinder というサイトがある。その結果は、遺伝子の存在の有無と耐性に関する表現型とは必ずしも一致しないことが確認された(表1)。このような違いは、プラスミド媒介性か、染色体性かによっても異なると思われるし、また耐性遺伝子の安定性にも影響すると思われる。たとえば、今回解析したカンピロバクターの場合には、*tet(O)*と *aac(6')-aph(2'')* については、プラスミド媒介性である可能性が高いとも割れるが、20株のうち19株で検出された *blaOXA-61* は、その安定性から、染色体性であると推定される。しかし、半分程度は発現していないが、抗菌薬のストレスの存在する環境中では、発現する遺伝子をもつ菌株が選択される可能性もあり、遺伝子プールとして重要な役割を持っていると思われる。

さらにカンピロバクターにおいても、Blast Atlas 解析を実施した(図11)。その結果、主要な3

つの多型領域が存在していることが分かった。そのうち、2つは、Capsular polysaccharide 合成と Lipooligosaccharide (LOS) 合成に関連する領域であり(図12,13)、いずれも菌体表面の抗原性決定領域であり、宿主である動物の消化管内で生存するために有利となるように、菌体表面の抗原性を変化させ、宿主の攻撃を受けない菌が選択的に生き残った結果であるということができる。また、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* は持っていないが、*C. jejuni* については、持っている株と持っていない株が存在していた(図14)。この遺伝子の機能は、外から侵入してくる DNA の制限に関することであり、一般に *C. coli* は *C. jejuni* より、薬剤耐性能として、多剤化しやすいといわれているが、この現象を説明する証拠となるかは不明であるが、興味深い事実である。

以上の通り、MiSeq を用いた細菌ゲノム解析は、ドラフト配列であっても、SNP 抽出により、高精度の系統解析が可能であること、また、Blast Atlas 解析のような Web サービス等を利用することで、MiSeq を用いて、その株の特徴を解析することが可能であることが確認できた。

今後、さらに複数の株を同時に解析して、疫学情報と比較しながら、さらに大規模にその利用法や活用法を検討したい。

E. 結論

NGS の一つである MiSeq を用いた解析は、細菌のドラフトゲノムデータであっても、高精度分子疫学的マーカーとしての SNP の利用価値が高いこと、さらに完全な配列が明らかなゲノム株を reference 株として全コード領域を対象とした Blast 解析を実施すること(Blast Atlas 解析)により、病原性や株の特徴などゲノムワイドな視点から知ることが可能であり、公衆衛生分野で利用価値は高いと思われる。

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

de novo assembly

リードをレファレンス配列(アノテーション情報あり)に
マッピング

(ない場合は RAST で取得)

<http://rast.nmpdr.org/>

SNP 検出

18 株の SNP 情報を統合

CDS の SNP のみ抽出

16S rRNA、prophage、pathogenicity island
にある SNP は除去

系統樹作成

CLC genomic workbench

エクセル

MEGA

図 1. MiSeq データから、Single Nucleotide Polymorphism (SNP)抽出と系統樹作成の工程表

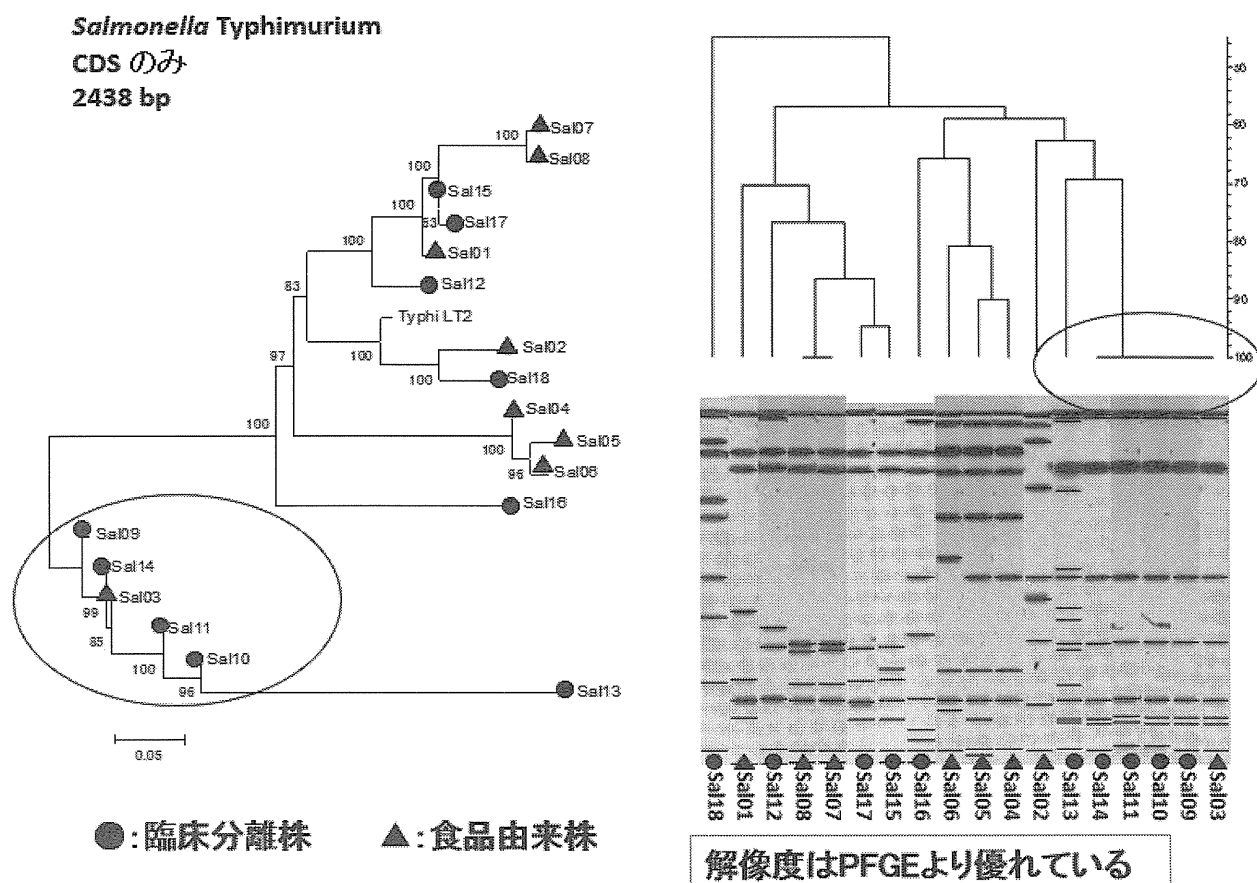
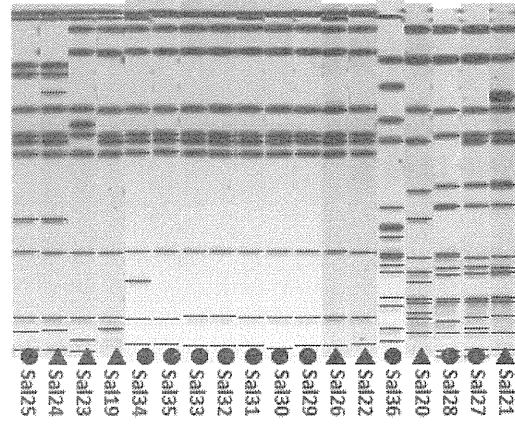
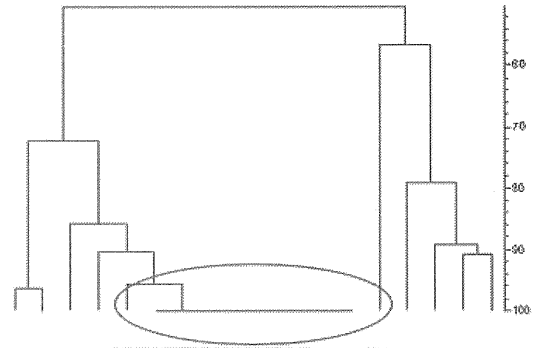
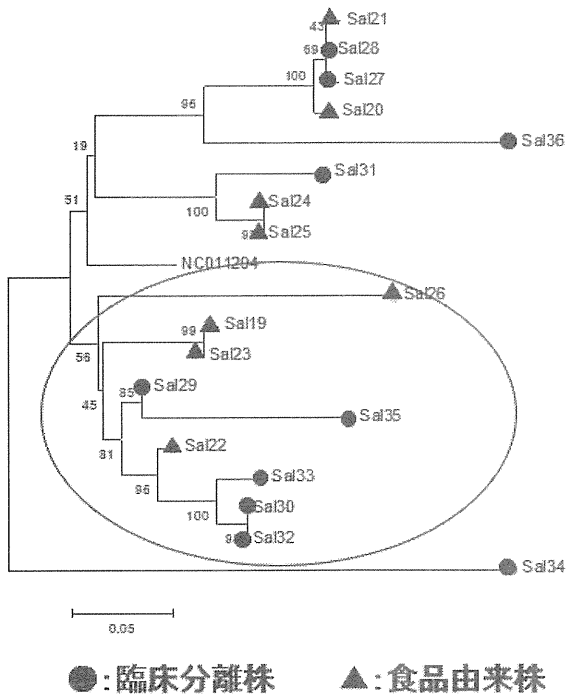


図 2. *Salmonella* Typhimurium 分離 18 株の PFGE とゲノム SNP による系統樹の比較

Salmonella Enteritidis
CDS のみ
301 bp



解像度はPFGEより優れている

図 3. *Salmonella* Enteritidis 分離 18 株の PFGE とゲノム SNP による系統樹の比較

Blast Atlas of genomic CDSs of 18 *S. Enteritidis* isolates vs Reference strain.

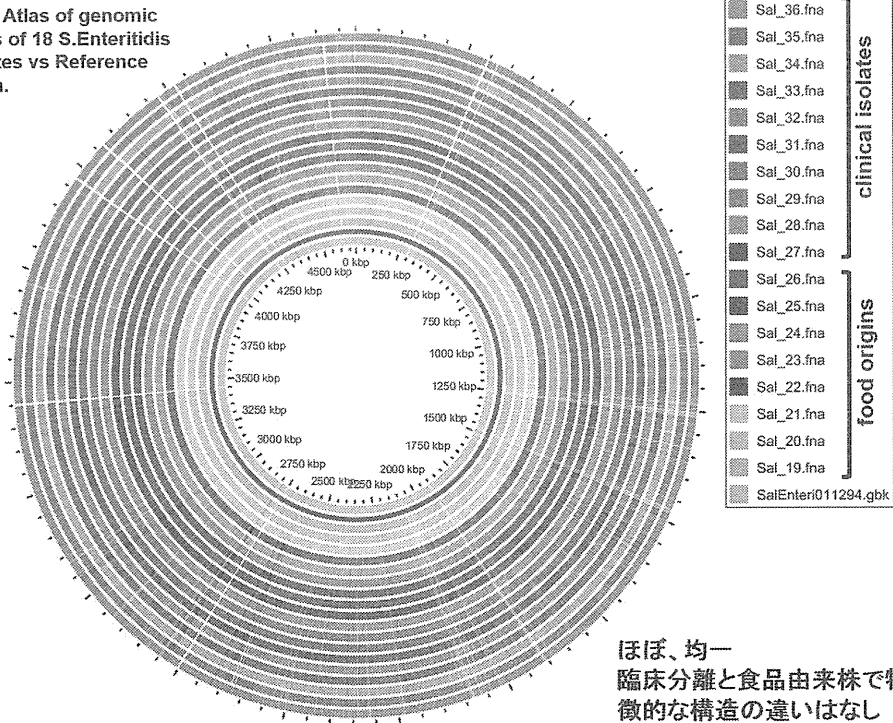


図 4. *S. Enteritidis* 18 株の Blast Atlas 解析

Blast Atlas of genomic CDSs
of 18 *S. Typhimurium* isolates
vs Reference strain.

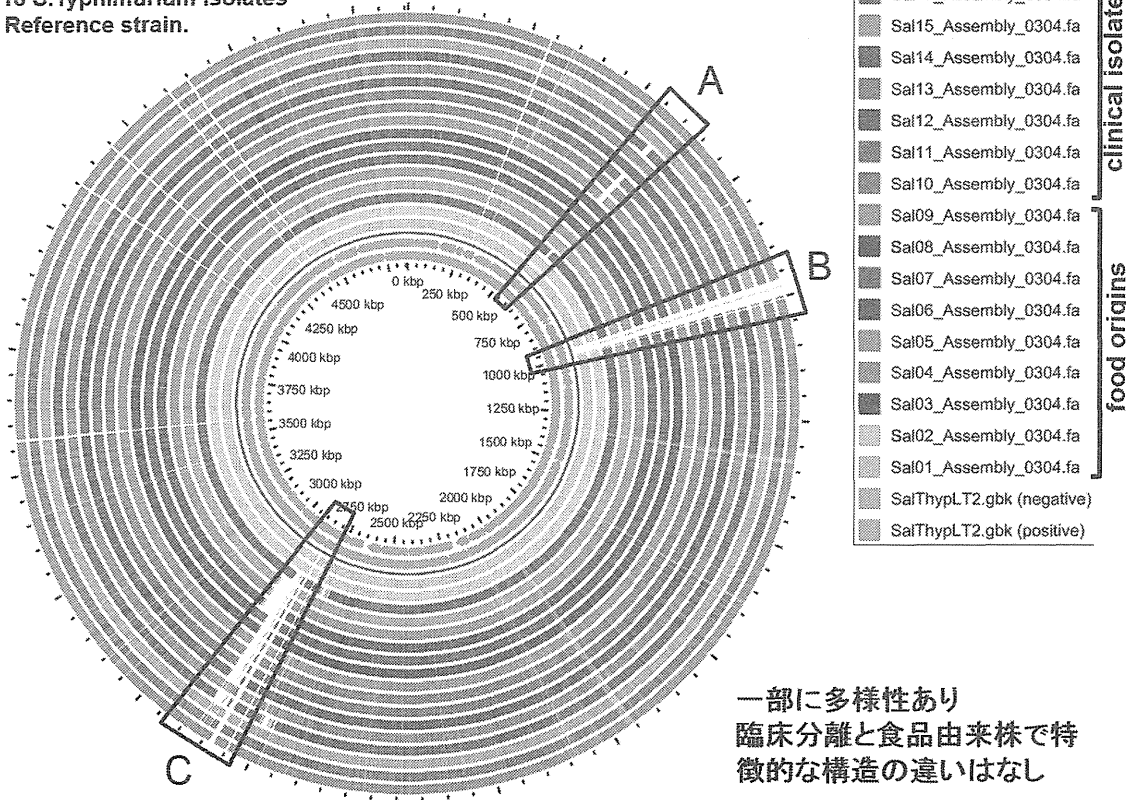


図 5. *S. Typhimurium* 18 株の Blast Atlas 解析

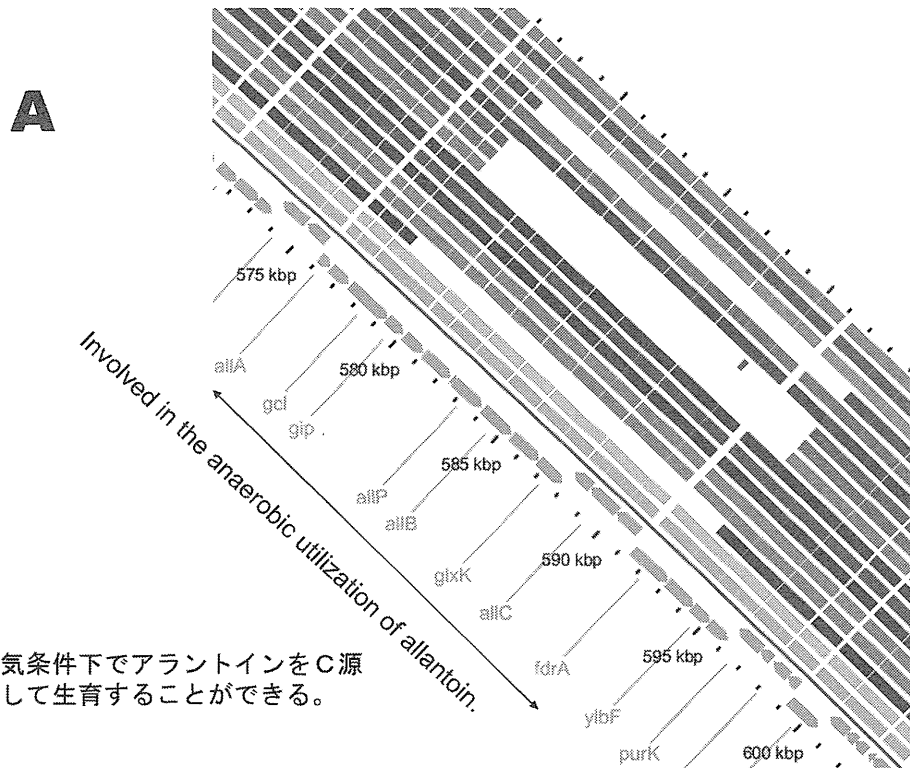


図 6. *S. Typhimurium* 18 株の座位 A の拡大図

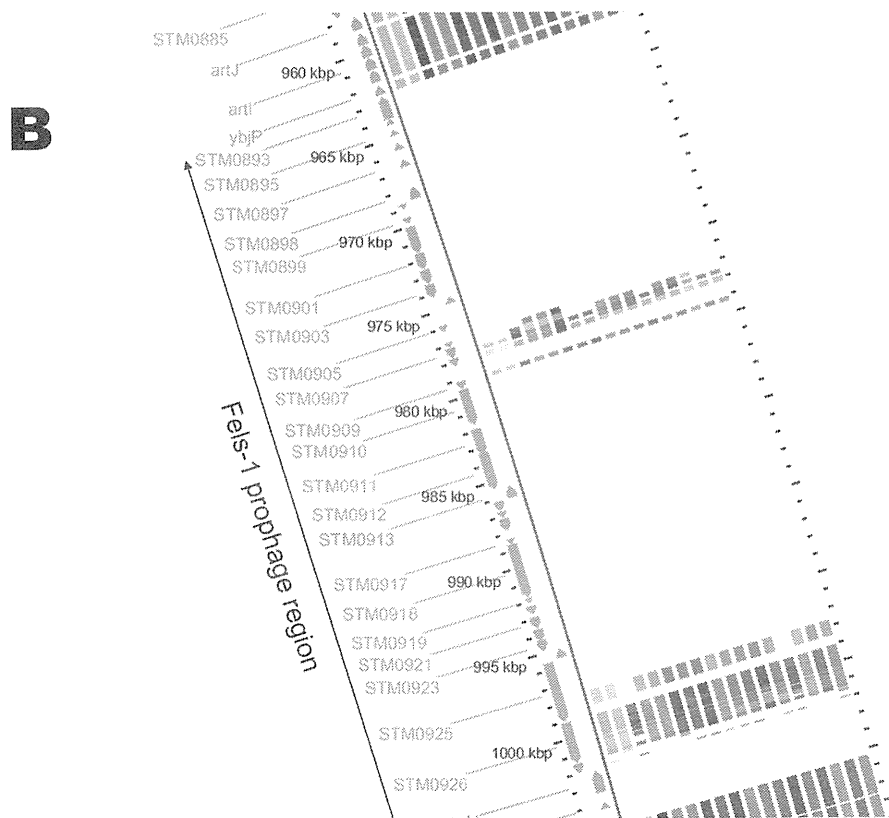


図 7. *S.Typhimurium* 18 株の座位 B の拡大図

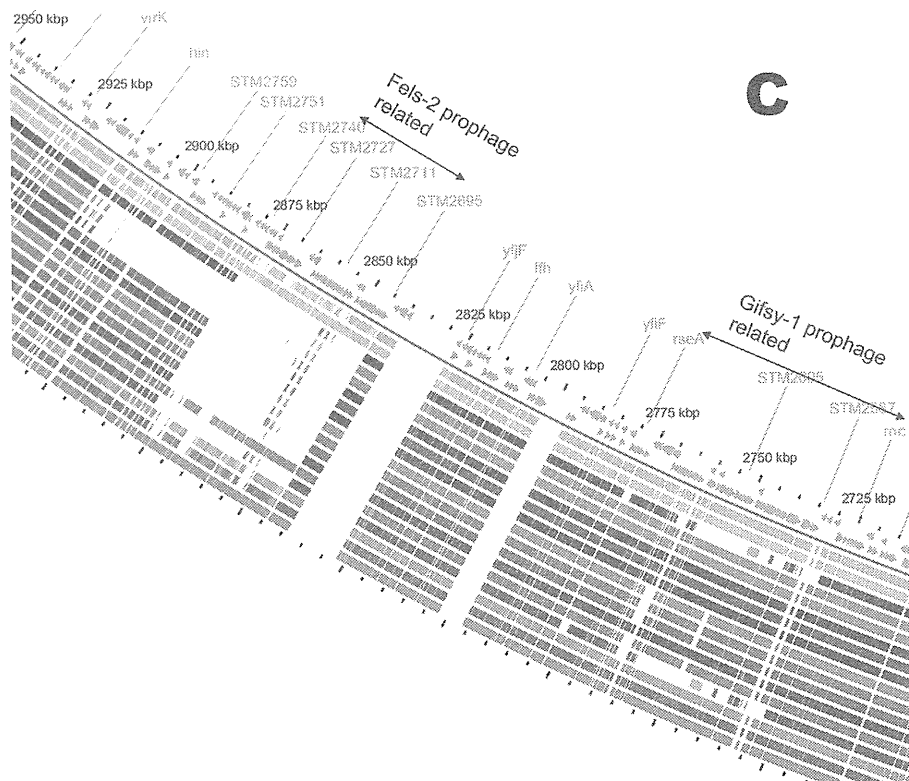


図 8. *S.Typhimurium* 18 株の座位 C の拡大図

Campylobacter jejuni/coli分離株のゲノム解析 富山県分離株の薬剤耐性機構の解析

カンピロの薬剤耐性メカニズム(ref: BioMed Res. Int., 2013:12)

背景

動物由来の食品から薬剤耐性:

フルオロキノロン耐性、マクロライド、アミノグリコシド、βラクタム耐性が最近、問題

自然耐性: ペニシリン、セファロスポリン、トリメトプリム、リファンピシン、バンコマイシン

Mechanism

•Resistance to Quinolones.

DNA gyrase, topoisomerase IVの amino acid substitution (QRDR, quinolone resistance-determining region)

CmeABC multidrug efflux pump (fluoroquinolones and macrolides): 自然耐性と獲得耐性に関与

•Resistance to Tetracyclines.

tet(O):カンピロバクターに共通、プラスミド媒介性が多い

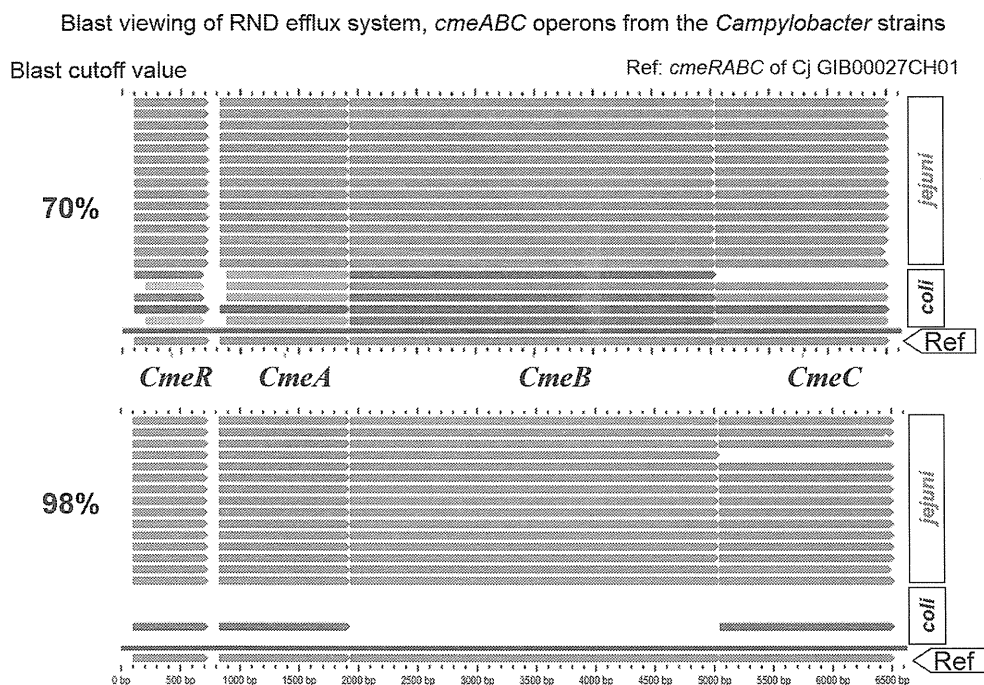
•Resistance to Macrolides.

Interrupt protein synthesis. 23S nuc no. 2058 and 2059=key contact sites for macrolides binding.

Resistance phenotype, modification of the rRNA target binding (mutation,

CmeABC multidrug efflux pump

図 9. カンピロバクター属菌の薬剤耐性機構 (総説)



*cmeRABC*の多型構造とキノロン耐性の相関については、もう少しデータの検証が必要である。

図 10. *Campylobacter* 属菌の *cmeABC* オペロンの Blast 解析

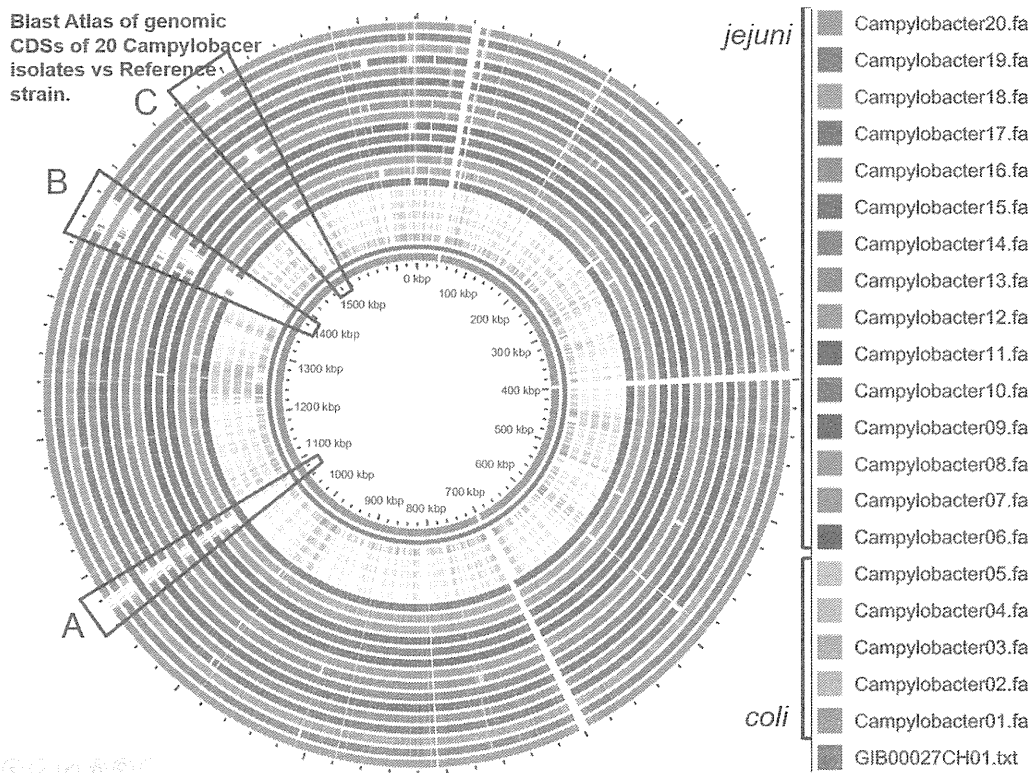


図 11. *Campylobacter* 属菌 20 株の Blast Atlas 解析

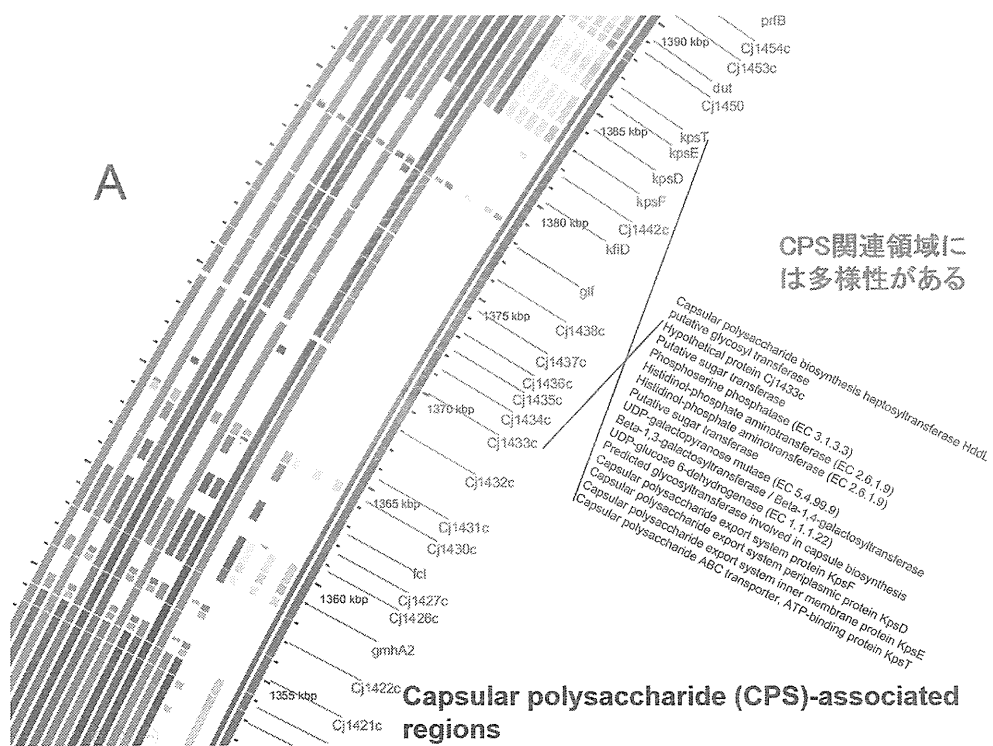


図 12. *Campylobacter* 属菌 20 株の座位 A の拡大図

表 1

*Campylobacter jejuni/coli*分離株のゲノム解析
 富山県分離株の薬剤耐性機構の解析: 解析株の特徴

株選定基準: ニューキノロン耐性(4 *coli*+12 *jejuni*)、感性(1 *coli*+3 *jejuni*)

No	Strain	Source	Penner type	NA	OFLX	NFLX	CPEX	ERFX	EM	TC	FOM	GM	SM	ABPC	ABPC / SBT	CF	PIPC	PIPC / TAZ	CTX	ResFinder		
																				<i>tet</i> (0)	<i>aac</i> (6)- <i>aph</i> (2'')	<i>bla</i> OXA-61
1	Cc01	ヒト	/	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	S	I	<i>tet</i> (0)	<i>aac</i> (6)- <i>aph</i> (2'')	<i>bla</i> OXA-61
2	Cc02	牛レバー	/	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>tet</i> (0)		<i>bla</i> OXA-61
3	Cc03	ヒト	/	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	I	R	R	I	I	<i>tet</i> (0)		
4	Cc04	ヒト	/	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	I			<i>bla</i> OXA-61
5	Cc05	ヒト	/	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	I	R	R	S	S			<i>bla</i> OXA-61
6	Cj06	ヒト	G	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	<i>tet</i> (0)		<i>bla</i> OXA-61
7	Cj07	ヒト	Y	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S			
8	Cj08	ヒト	B	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>tet</i> (0)		<i>bla</i> OXA-61
9	Cj09	ヒト	B	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S			<i>bla</i> OXA-61
10	Cj10	ヒト	D	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S			<i>bla</i> OXA-61
11	Cj11	ヒト	UT	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S			<i>bla</i> OXA-61
12	Cj12	ヒト	G	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S			<i>bla</i> OXA-61
13	Cj13	ヒト	L	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	I			<i>bla</i> OXA-61
14	Cj14	ヒト	UT	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>tet</i> (0)		<i>bla</i> OXA-61
15	Cj15	ヒト	UT	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S			<i>bla</i> OXA-61
16	Cj16	ヒト	UT	R	R	R	S	R	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	S			<i>bla</i> OXA-61
17	Cj17	ヒト	UT	R	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	S	S	R	S	S			<i>bla</i> OXA-61
18	Cj18	ヒト	UT	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>tet</i> (0)		<i>bla</i> OXA-61
19	Cj19	ヒト	B	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S			<i>bla</i> OXA-61
20	Cj20	ヒト	D	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I	<i>tet</i> (0)		<i>bla</i> OXA-61

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年度 第1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

研究分担者: 佐多徹太郎 (富山衛研)

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

サルモネラ36株のMiSeqによる解析

目的
NGSを用いて、細菌のゲノム解析を効率よく実施するためのプロトコルの確立

ゲノムDNA抽出→ライブラリー調製→MiSeqRun→解析

- ① ゲノムDNA抽出
- ② ライブラリー調製
Nextera XT
- ③ MiSeqRun
MiSeq Reagent Kit V2, V3
- ④ 解析
SNP解析 (分子疫学マーカー、解析のスクリプト化、データベース化)
ゲノム解析 (責任遺伝子の探索: 臨床分離株と食品分離株との比較など)

クラスターコントロールが可能か?

何を知らないか?

de novo アセンブルで得られた配列から薬剤耐性遺伝子の検索

Center for Genomic Epidemiology

ResFinder 2.1 (Acquired antimicrobial resistance gene finder)

ResFinder 2.1 (Acquired antimicrobial resistance gene finder) interface showing search results for antibiotic resistance genes. The interface includes a search bar, a list of detected genes, and a legend for antibiotic classes.

薬剤感受性試験: phenotype と genotype
S.Typhimurium 18株の概要

株番号	菌株	薬剤感受性	遺伝子	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型
1	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
2	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
3	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
4	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
5	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
6	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
7	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
8	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
9	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
10	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
11	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
12	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
13	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
14	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
15	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
16	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
17	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
18	ATCC 19619	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin

aac(6)-Iaa遺伝子の保有率は高い(100%)
が発現していない

薬剤感受性試験: phenotype と genotype
S.Enteritidis 18株の概要

株番号	菌株	薬剤感受性	遺伝子	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型
1	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
2	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
3	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
4	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
5	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
6	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
7	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
8	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
9	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
10	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
11	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
12	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
13	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
14	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
15	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
16	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
17	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin
18	ATCC 12220	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin	Colistin

遺伝子型と表現型は一致している

de novo assembly

リードをレファレンス配列(アノテーション情報あり)に
マッピング
(ない場合は RAST で取得)
<http://rast.nmpdr.org/>

SNP 抽出

18 株の SNP 情報を統合

CDS の SNP のみ抽出

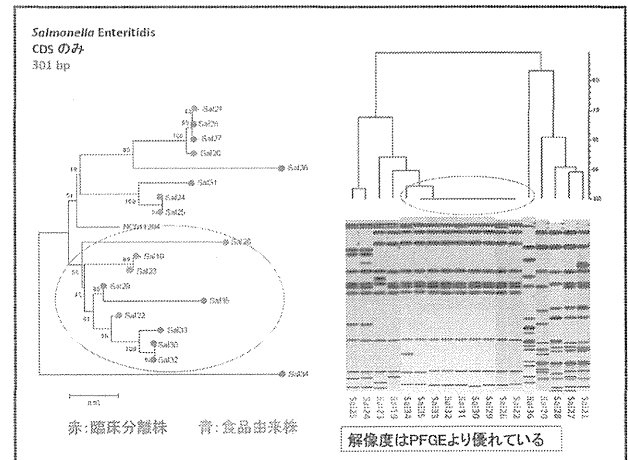
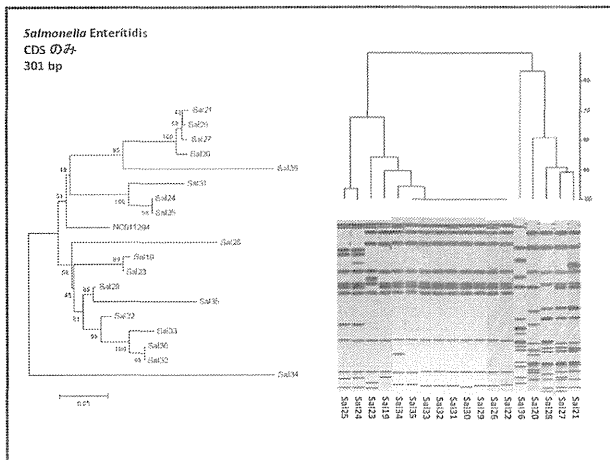
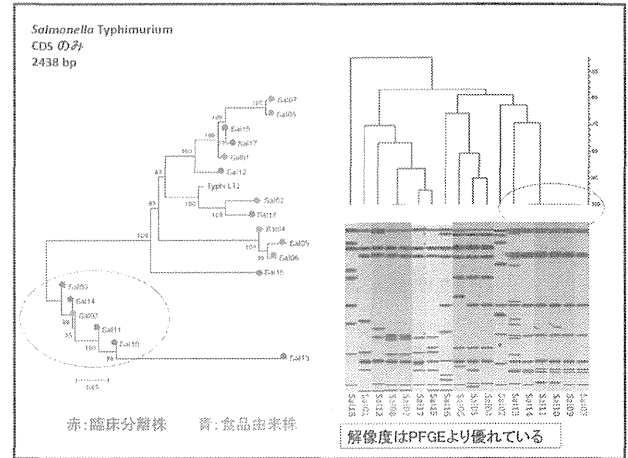
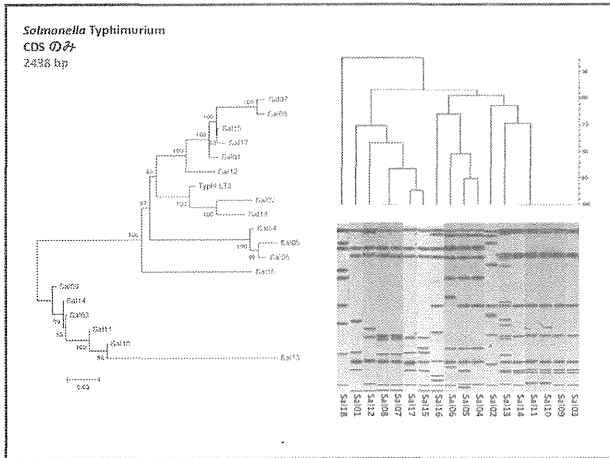
16S rRNA, prophage, pathogenicity island
にある SNP は除去

系統樹作成

CLC genomic workbench

エクセル

MEGA



Salmonella 36株のMiSeqによるゲノム解析:まとめ

- ① MiSeq一回のRunで36株のサルモネラ分離株のゲノム解析を行った。
- ② MiSeqRun時、クラスターコントロールを可能とするインプット量を計算することができた。
- ③ 薬剤耐性遺伝子の検索と感受性試験表現系を比較した。
- ④ 解析したSalmonella分離株のcoreSNPを抽出して、系統解析マーカーとして利用できることを確認した。
- ⑤ 得られたNGSリードデータの利用法をさらに検討する

今年度(平成26年度)の計画

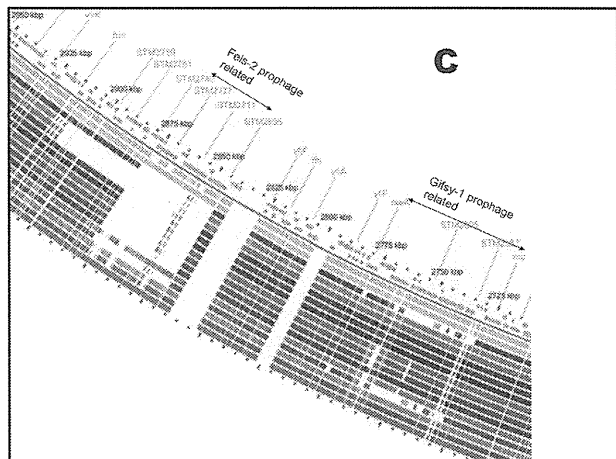
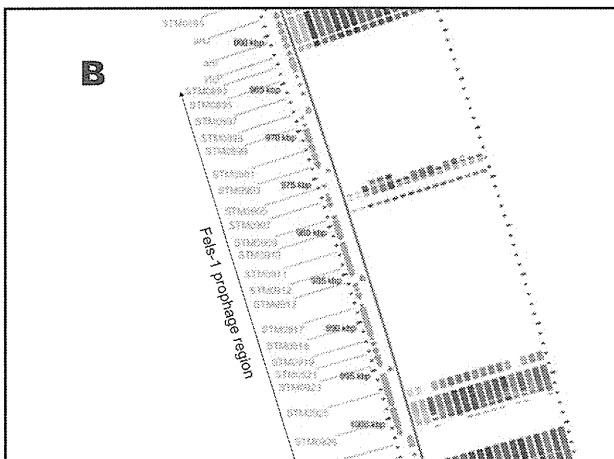
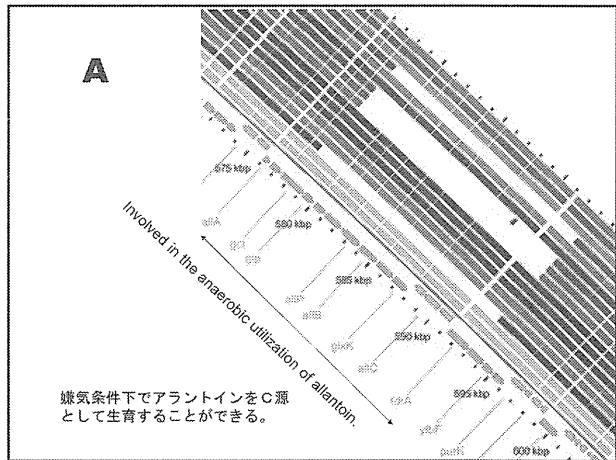
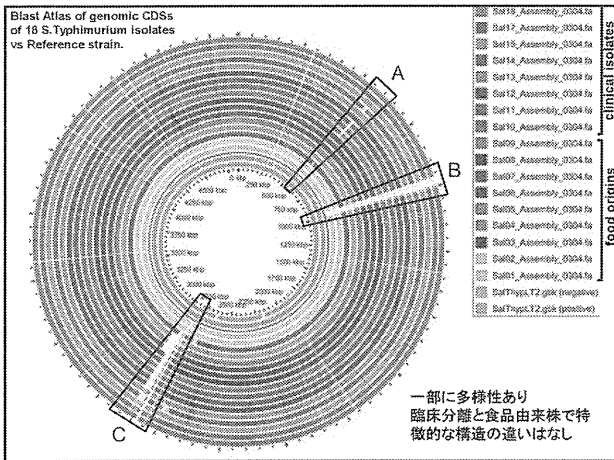
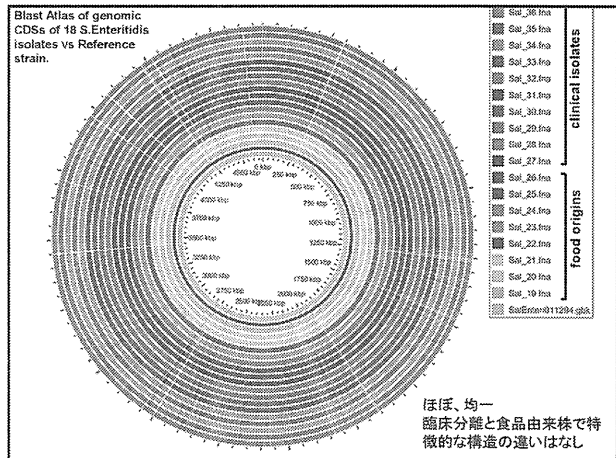
平成26年6月25日会議で説明

1. Salmonella 36株のゲノム比較による解析結果の確認
2. Campylobacter jejuni/coli分離株のゲノム解析(新規に追加)
 - ・ 富山県分離株の薬剤耐性機構の解析
3. Salmonella Infantis 分離株のゲノム解析
 - ・ 約100株を解析する。
保存株236株(うち、臨床分離株65株)⇒77株
 - ・ 臨床分離株、食品由来株
 - ・ coreSNPによる系統解析
 - ・ グループ特異的責任遺伝子の探索

富山県で整備を試みたゲノム解析法

- CLC genomic workbench (commercially available)
 - QC of Reads
 - de novo Assembly
 - SNP
- Web services
 - RAST, MiGAP: annotation
 - GView Server: Blast Atlas for comparative genomics
- Artemis, ACT, GView, DNA plotter
- Sequencher (commercially available)
- Linux
 - Standalone blast searching
 - Mapping BWA, SAMtools
 - MUMmer

以上の解析法をMiSeq Readのゲノム解析法として、目的に応じて選択する。



**Campylobacter jejuni/coli分離株のゲノム解析
富山県分離株の薬剤耐性機構の解析**

カンピロの薬剤耐性メカニズム(ref: BioMed Res. Int. 2013:12)

背景

動物由来の食品から薬剤耐性:

フルオロキノロン耐性、マクロライド、アミノグリコシド、βラクタム耐性が最近、問題
自然耐性: ペニシリン、セファロスポリン、トリメトプリム、リファンピシム、バンコマイシン

Mechanism

•Resistance to Quinolones.

DNA gyrase, topoisomerase IVのアミノ酸置換(ORDR, quinolones resistance-determining region)

CmeABC multidrug efflux pump(fluroquinolones and macrolides):自然耐性と獲得耐性に関与

•Resistance to Tetracyclines.

tet(O):カンピロバクターに共通、プラスミド媒介が多い

•Resistance to Macrolides.

Interrupt protein synthesis, 23S nuc no. 2050 and 2059=key contact sites for macrolides binding.

Resistance phenotype, modification of the rRNA target binding (mutation).

CmeABC multidrug efflux pump

**Campylobacter jejuni/coli分離株のゲノム解析
富山県分離株の薬剤耐性機構の解析: 解析株の特徴**

株選定基準: ニューキノロン耐性(4 col#12 jejuni)、感症性(1 col#3 jejuni)

No	Strain	Source	Penner type	NA	OFLX	BEFLX	CPFX	EPFX	EM	TC	FOM	GM	SM	ABPC	ABPC /SBT	CF	PIPC	TAZ	CTX
1	Co01	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	Co02	牛レバー		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3	Co03	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4	Co04	ヒト		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	Co05	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6	Co06	ヒト	G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7	Co07	ヒト	Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8	Co08	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
9	Co09	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
10	Co10	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
11	Co11	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
12	Co12	ヒト	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	Co13	ヒト	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	Co14	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15	Co15	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
16	Co16	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
17	Co17	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
18	Co18	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
19	Co19	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
20	Co20	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

**Campylobacter jejuni/coli分離株のゲノム解析
富山県分離株の薬剤耐性機構の解析: 解析株の特徴**

株選定基準: ニューキノロン耐性(4 col#12 jejuni)、感症性(1 col#3 jejuni)

No	Strain	Source	Penner type	NA	OFLX	BEFLX	CPFX	EPFX	EM	TC	FOM	GM	SM	ABPC	ABPC /SBT	CF	PIPC	TAZ	CTX	RefIndex
1	Co01	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
2	Co02	牛レバー		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
3	Co03	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
4	Co04	ヒト		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
5	Co05	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
6	Co06	ヒト	G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
7	Co07	ヒト	Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
8	Co08	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
9	Co09	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
10	Co10	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
11	Co11	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
12	Co12	ヒト	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
13	Co13	ヒト	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
14	Co14	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
15	Co15	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
16	Co16	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
17	Co17	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
18	Co18	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
19	Co19	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
20	Co20	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000

**Campylobacter jejuni/coli分離株のゲノム解析
富山県分離株の薬剤耐性機構の解析: 解析株の特徴**

株選定基準: ニューキノロン耐性(4 col#12 jejuni)、感症性(1 col#3 jejuni)

No	Strain	Source	Penner type	NA	OFLX	BEFLX	CPFX	EPFX	EM	TC	FOM	GM	SM	ABPC	ABPC /SBT	CF	PIPC	TAZ	CTX	RefIndex
1	Co01	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
2	Co02	牛レバー		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
3	Co03	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
4	Co04	ヒト		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
5	Co05	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
6	Co06	ヒト	G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
7	Co07	ヒト	Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
8	Co08	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
9	Co09	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
10	Co10	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
11	Co11	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
12	Co12	ヒト	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
13	Co13	ヒト	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
14	Co14	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
15	Co15	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
16	Co16	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
17	Co17	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
18	Co18	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
19	Co19	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
20	Co20	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000

**Campylobacter jejuni/coli分離株のゲノム解析
富山県分離株の薬剤耐性機構の解析: 解析株の特徴**

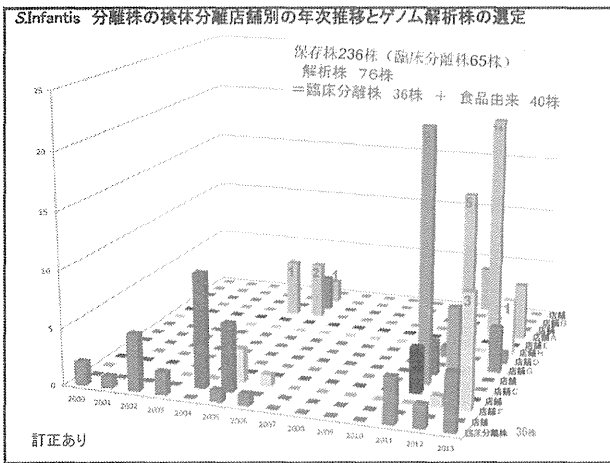
株選定基準: ニューキノロン耐性(4 col#12 jejuni)、感症性(1 col#3 jejuni)

No	Strain	Source	Penner type	NA	OFLX	BEFLX	CPFX	EPFX	EM	TC	FOM	GM	SM	ABPC	ABPC /SBT	CF	PIPC	TAZ	CTX	RefIndex
1	Co01	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
2	Co02	牛レバー		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
3	Co03	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
4	Co04	ヒト		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
5	Co05	ヒト		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
6	Co06	ヒト	G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
7	Co07	ヒト	Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
8	Co08	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
9	Co09	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
10	Co10	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
11	Co11	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
12	Co12	ヒト	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
13	Co13	ヒト	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1000000000
14	Co14	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
15	Co15	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
16	Co16	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
17	Co17	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
18	Co18	ヒト	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
19	Co19	ヒト	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000
20	Co20	ヒト	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1000000000

**Campylobacter jejuni/coli分離株のゲノム解析
富山県分離株の薬剤耐性機構の解析: 解析株の特徴**

株選定基準: ニューキノロン耐性(4 col#12 jejuni)、感症性(1 col#3 jejuni)

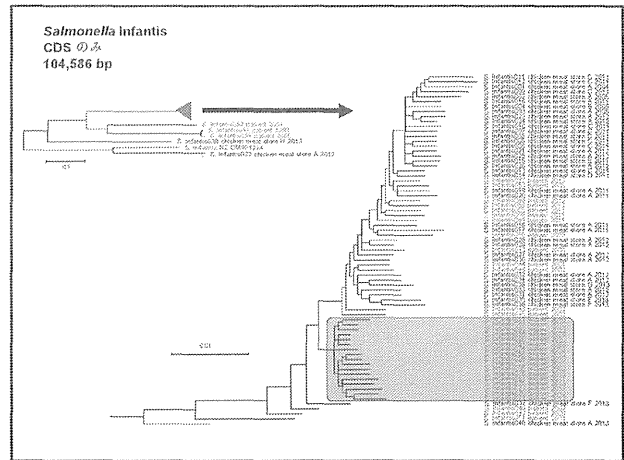
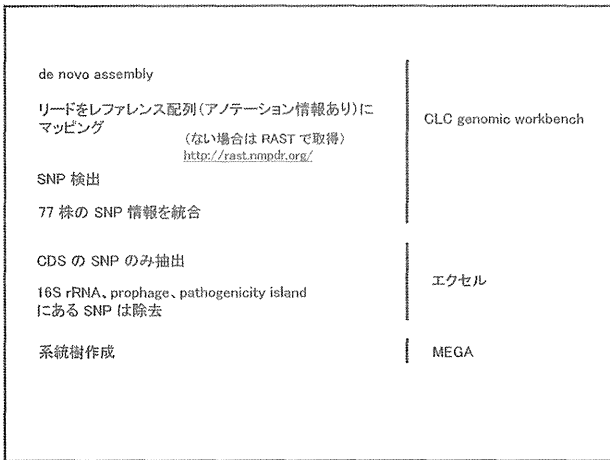
No	Strain	Source	Penner type	NA	OFLX	BEFLX	CPFX
----	--------	--------	-------------	----	------	-------	------



Salmonella Infantis 77 株

Miseq Reagent Kit v3 (600 cycle)

	平均値	最大値	最小値	
No. of reads	2,047,210	3,835,990	603,348	
Total base	490,074,777	825,754,204	158,906,599	
Coverage	100	169	33	
Contig	Total base	4,891,271	5,158,601	4,588,724
	Count	138	567	64
Maximam	1,051,615	1,241,747	480,288	
N50	290,813	521,185	159,289	



- まとめ**
- MiSeqを用いて、細菌ゲノム配列 (ドラフト) を安定して得られるようになった。
 - coreSNP抽出から、系統樹解析が可能となった。
 - de novo assembly, Annotation, Comparative genomic analysisをLinuxを使用せずに、解析できるように整備した。
 - LinuxによるBlast検索、リードマッピング、ACTによるゲノム比較ができるようになった。

- 研究班3年目**
- 研究計画—広域食中毒早期探知ネットワークを構築するための基礎作り
 - 食中毒菌ゲノムデータベース
 - ゲノム情報の利用
薬剤耐性遺伝子等
 - 研修会

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）

分担研究報告書

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

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
研究協力者	仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
	木村 千鶴子	愛媛県立衛生環境研究所
	大塚 有加	愛媛県立衛生環境研究所
	山下 まゆみ	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
	山下 明史	国立感染症研究所
	加藤 健吾	国立感染症研究所

研究要旨

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た。血清型が O4 型別不能に分類されていた患者由来 EHM21-304 株が，NGS ゲノム解析により，*Salmonella* 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)の 11 個の遺伝子が欠失する世界的にも新しいタイプの *Salmonella* 4,5,12:i:- 株であることが判明した。この遺伝子欠失は IS26 の挿入によって生じたことが示唆された。また，EHM21-304 株は 9 種の抗菌薬に耐性であるが，この菌株が保有するプラスミド pSO4-21-304 の NGS 解析により，本プラスミドは不和合性群 Inc A/C プラスミドと Inc FII プラスミドをほぼ 1 対 1 で含むキメラ構造を有し，Inc A/C 関連領域には *floR*, *tetA/tetR*, *strA/strB*, *sul2*, *bla_{TEM-1b}* の 7 個の薬剤耐性遺伝子が存在し，Inc FII 関連領域には，*catA2*, *bla_{CTX-M-55}*, *qnrS1*, *aac(3)-IId* の 4 個の薬剤耐性遺伝子が存在することを明らかにした。一方，患者，食材（鶏肉，豚肉），家畜（豚）から分離された *Salmonella* Infantis 70 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詳細に解析した。鶏卵由来株，豚由来株，鶏肉由来株の 3 つのクラスターに分かれ，それぞれのクラスターと近縁な患者由来株が認められた。特に，同一の SNV(single nucleotide variation)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。非チフス性のサルモネラ属菌による感染性胃腸炎は、世界的には年間1億人近い患者が発生している¹⁾。日本においても、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²⁾。

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は、「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、分離菌の性状、薬剤耐性、感染経路等に不明な点が多く、公衆衛生上の問題となっている。

サルモネラ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。近年、次世代シーケンサー(NGS)の開発により、短時間のゲノム解析が容易になった。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、得られた分離株に対し、NGS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。

まず、臨床株として分離され、9剤の抗菌薬に耐性の *Salmonella* 4,5,12:i:- (以下、*S.* 4,5,12:i:-) 株の第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域の欠失部分の塩基配列を決定し、多剤耐性プラスミドの全遺伝子配列を決定した。次に、患者、食材(鶏肉)、家畜(豚)から分離された *S. infantis* のゲノム解析を基に系統解析を実施し、分離株間の分子疫学的な関連性を検討した。これらについて報告する。

B 材料と方法

1 サルモネラ菌株

愛媛県内で2008年4月～2010年12月に、患者、食材、家畜等から収集した菌株を用いた。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。分離株はサルモネラと同定された後、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⁾。

2 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)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、ST合剤(ST)、サルファ剤(SUL)、セフトキシム(CTX)、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)、セフトジジム(CAZ)、イミペネム(IPM)を用いた。

3 ゲノムDNA及びプラスミドの抽出

S. 4,5,12:i:-株(EHM21-304)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. infantis* のゲノムDNAは、菌体から粗抽出したDNA分画から DNeasy 96 Blood & Tissue Kit 用いて抽出した。

4 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は、MiSeqあるいはNextSeq 500 (illumina) を用いて行った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 研究結果

1 EHM21-304 株の第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域の DNA 欠失

S. 4,5,12:i:- 愛媛株(EHM21-304)および山口株(YMG22-133)ゲノムの NGS 解析に基づき、*fljB*(phase 2 flagellin)及び*fljA*(repressor of phase 1 flagellin gene)等の第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域を調べた(図1)。標準株として、*S. Typhimurium* LT-2 株を用いた(図1上段)。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)、及び *S. 4,5,12:i:-* で唯一ゲノム解析されている CVM23701 株も比較のため示した(図1の2段目、4段目)。CVM23701 株では、*fljA, B*を含む76遺伝子が欠失しているが⁶⁾、YMG22-133 株も類似の遺伝子欠失を示し、両者とも *hin*(regulation of flagellar gene expression)は保持していた。一方、EHM21-304 株では、LT-2 標準株と比較して、11個の遺伝子欠失が認められ、*hin* も欠失していた(図1の3段目)。

EHM21-304 株ゲノムの STM2759~*iroB* を含む領域の塩基配列は、contig 25 と contig 37 の2本の contig から決定された。contig 37 内に存在した約600 bp相当の gap と contig 25-37間の gap を gap filling するため、EHM21-304 株のゲノム DNA をテンプレートとし STM2759 から *iroB* までの DNA 断片を PCR によって調製し、その塩基配列を決定した(図2)。その結果、EHM21-304 株は、*S. Typhimurium* LT2 (AE006468) の 2,900,321 ~

2,916,035 (15,715 bp)に相当する部分の塩基対、遺伝子としては 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。

2 愛媛株 EHM21-304 由来プラスミド pSO4-21-304 の NGS 解析

S. 4,5,12:i:- 愛媛株は9剤の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌であり、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 解析を実施した。得られたリードの *de novo* アセンブリから、2本の scaffold, scaffold 1.1 と scaffold 8.1 が得られた。この2本の scaffold 間の gap, 及びそれぞれの scaffold 内の gap を gap filling するために、16セットのプライマーを作成した(表1)。まず、No.1, No.3のプライマーセットでPCR増幅せず、No.2, No.4のプライマーセットで増幅したことから、scaffold 1.1 と scaffold 8.1の配向が決定された。さらに、各プライマーセットを用いたPCR反応の条件を変えることで、全てのプライマーセットでアンプリコンが得られた(図3)。これらのアンプリコンをダイレクトシーケンスし、NGS解析と合わせて pSO4-21-304 の全塩基配列を決定した。

最終的に確定した pSO4-21-304 の全長配列は179,881 bp, GC 含量は52.2%で(図4)、DDBJ に登録した(accession number: AP014634)。図4の最外周に示すように、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。興味あることに、このプラスミドは不和合性群 Inc A/C プラスミドと Inc FII プラスミドを、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。表2に示すように、IncA/C 関連領域には IncA/C replicon の他、*floR* (CP), *tetA/tetR* (TC), *strA/strB* (SM), *sul2* (SUL), *bla_{TEM-1b}* (AMP)の7個の薬剤耐性遺伝子(括弧内は耐性薬剤名を示す)、*traD, traF, traG*などの数個の *tra* 遺伝子、IS15, IS26, IS*Vsa3* などの IS が存

在した。一方、IncFII 関連領域には、*catA2* (CP), *bla_{CTX-M-55}* (AMP, CTX, CAZ), *qnrS1* (NA), *aac(3)-IId* (SM, GM)の4個の薬剤耐性遺伝子、*traR*, *traV*, *traY* など30個以上の *tra* 遺伝子、IS15, IS26, ISPa40 などの IS が存在した。

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

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 解析によって見出された SNV (single nucleotide variation) に基づき、系統解析を実施し（図 5）、大きく 3 つのクラスターに分かれた。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（データは示していない）。クラスター B は屠畜場で豚から採取された豚由来株 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。興味深いことに、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 とクラスター B には薬剤耐性菌は存在しなかった。

PFGE 解析と NGS 解析の比較のため、昨年度の報告書で示した *Infantis* 株の *Xba* I, *Bln* I を用いた複合 PFGE 解析結果を再掲する（参考資料、図 6）。PFGE 解析において実線で囲んだ 1~11 グループは、それぞれ同一のバンドパターンを示している。例えばグループ 8 に属する 8 株は同一の PFGE パターンを示すが（図 6）、NGS 解析では互いに異なった株として系統樹内に位置しており（図 5）、NGS 解析により高分解能のデータが得られた。

NGS 解析による SNV に基づく系統解析から、70 株の *Infantis* 株中に同一あるいは極めて近縁の菌株が見出された。クラスター A の E48H23, 22-179, E207H22, クラスター B の H152H20~E150H20, E151H21~E145H21, クラスター C の 21-267 と 22-286, E28H22~22-358, 20-132

と 20-157, 等である。それぞれの分離株の背景を考慮して解析することにより、菌株間の関係を推定することが可能であり、その結果は感染経路の解明等に科学的根拠を提供すると考えられる。

D 考察

愛媛県において 2008~2010 年に、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の血清型分類と薬剤感受性試験を実施した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。

従来では血清型が O4 型別不能に分類されていた患者由来 EHM21-304 株（小児の虫垂部膿から分離）について、*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⁷⁻¹⁰⁾。EHM21-304 株では、*fljB*(phase 2 flagellin), *fljA*(repressor of phase 1 flagellin gene), 及び *hin*(regulation of flagellar gene expression) を含む 11 個の遺伝子 (STM2760~STM2772(*hin*)) が欠失し、代わりに IS26 が挿入されており（図 2）、そのため第 2 相抗原を発現できないと考えられる。EHM21-304 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 1）、新しいタイプの *S. 4,5,12:i:-* 株と考えられる。

また、EHM21-304 株は、9 種の抗菌薬に耐性であるが、本菌株由来のプラスミド pSO4-21-304 の NGS 解析により、本プラスミドは不和合性群 Inc A/C タイプのプラスミドであるが、Inc FII プラスミドとほぼ 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。表 2 に示すように、Inc A/C 関連領域には *floR*, *tetA/tetR*, *strA/strB*, *sul2*, *bla_{TEM-1b}* の 7 個の薬剤耐性遺伝子

が存在し、一方、Inc FII 関連領域には、*catA2*, *bla_{CTX-M-55}*, *qnrS1*, *aac(3)-IId* の4個の薬剤耐性遺伝子が存在した。本菌株多剤耐性の基盤となる知見である。また、接合伝達関連遺伝子や挿入配列領域も多数存在し、このプラスミドの水平伝播により薬剤耐性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、*S. Infantis* については、患者、食材(鶏肉、豚肉)、家畜(豚)から分離された70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詳細に解析した(図5)。PFGE解析のパターンが同一でも、NGS解析では相違が認められ、より高分解能の解析が可能となった。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。特にクラスターCの同一SNPを示した鶏肉由来20-132株と患者由来20-157株の2株は、同一クローンの可能性が高く、直接の感染源であることが強く示唆される。また、鶏肉由来22-286株と患者由来21-267株が近縁であり、22-286株が存在していた同じ鶏舎で飼育されたものから感染した可能性がある。さらに、鶏肉由来のE28H22株と21-235株および患者由来22-358株が近い系統で、E28H22株と21-235株が存在していた鶏と同じ鶏舎由来のものから感染した可能性がある。

NGS解析のクラスターA(図5)に属する9株

は、PFGEではクラスターXに属するため豚由来株と近縁と当初考えられた。しかし、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(データは示していない)。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ため、全国的な比較が可能である。この関係が示されたことは、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。また、クラスターBは豚由来株が多く、畜舎でまとまっている傾向が認められた。このクラスターに属する患者由来株も存在することから、豚由来株にヒトが関連する経路も示唆される。

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遺伝子解析によって提供できる。この点もPFGEにはない長所である。

今回得られた結果、および関連する最近の研究は¹⁶⁾、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(*fliA*, *fliB*等)に存在する11個の遺伝子が欠失する*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、多数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、豚肉)、家畜(豚)から分離さ

れた *S. Infantis* 70 株の 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 SNV 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) Majowicz SE et al., The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis.* (2010)50: 882-9.
- 2) 厚生労働省 食中毒統計資料 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-2>
- 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.

16) Octavia S et al., Delineating community outbreaks of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using whole genome sequencing: on-site into genomic variability within an outbreak. *J Clin Microbiol.* (2015) doi:10.1128/JCM.03235-14

G 研究発表

1. 論文発表

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 遵, 有川健太郎,

船渡川圭次, 鈴木匡弘, 久保田寛顕, 調 恒明
日本細菌学雑誌 印刷中

2. 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.

烏谷竜哉, 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, Kei-
ko 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)

H 知的財産権の出願・登録状況
なし