

201522015A

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 27 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 28 (2016) 年 3 月

目 次

I 平成27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 猿木信裕 群馬県衛生環境研究所 8

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 12

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（3）

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 47

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 27 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

猿木 信裕 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)

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)

吉住正和

(利根沼田保健福祉事務所)

小澤邦壽

(横浜市立大学)

綿引 正則、磯部 順子、範本 志保、木全 恵子、三井 千恵子、金谷 潤一

(富山県衛生研究所)

仙波 敬子、園部 祥代、大塚 有加、菅 美樹、山下 まゆみ

(愛媛県立衛生環境研究所)

横山 栄二

(千葉県衛生研究所)

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、村上光一

(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 1.55 兆円に上ると米国農務省により試算されている。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。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新たな早期探知手法の開発のための基礎的データをを得ることを目的として研究を行っている。

今年度は昨年に引き続き、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。*S. Infantis* についての NGS 解析により、患者由来株と食材・動物由来株からなる近縁のペアが認められ、感染源となっていることが示唆された。特に患者由来株と鶏肉由来株で、NGS によるドラフトゲノム配列が完全に一致した例があり、直接的な関連が示唆された。さらに、*S. Infantis* 株のうち薬剤耐性を示す株 (患者由来株、食材由来株) における食品は全て鶏関連であり、鶏飼養における抗菌薬使用を検討する際の参考になると思われる。また、食中毒の原因と思われる *Campylobacter lari* のゲノム解析を実施し、病原性に関連する遺伝子の探索を行った結果 53 個の病原遺伝子が検出され、このような解析が食中毒の原因究明に有用であると考えられた。さらに、カンピロバクター属菌についても網羅的遺伝子解析を行い、その有用性について評価を行った。

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。これに基づいて米国農務省が 2015 年に試算した食品由来疾患全体による医療費、生産性の低下などを含む経済的損失は、155 億ドル円 (1 ドル 100 円として 1 兆 5 千 5 百万円)、サルモネラ属菌で約 36.6 億ドルと推定されている。

このように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。これに代わるより簡便な方法として 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分離株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、2008 年から 2010 年に協力医療機関、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、愛媛県立衛生環境研究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。富山県で 2000 年から 2013 年にかけて分離された *S. Infantis* 株は、37 株は臨床分離株であり、40 株は、市販されていた鶏肉から分離された株である。*Campylobacter lari* (*C. lari*) は、平成 20 年に発生した集団食中毒事例で、共通食材としての鯨肉と複数の患者便から分離された。ここでは、鯨肉から分離された *C. lari* 分離株をゲノム解析対象株 (Toyama07) とした。また、腸管出血性大腸菌 O157:H7 株は、既に完全なゲノム配列が報告されていた堺株 (O157 堺株、大阪大学微生物研究所から入手) を用いた。また、群馬県衛生研究所で分離された *Campylobacter jejuni* 菌株は 2008 年から 2015 年に分離された患者由来株 16 株および 2015 年に市販鶏肉から採取された 2 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 愛媛県立衛生環境研究所における *S. Infantis* の NGS ゲノム解析

患者、食材（鶏肉、豚肉）、家畜（豚）から分離された *S. Infantis* 70 株の系統解析の結果、大きく 5 つのクラスターに分かれた。それぞれのクラスターは、クラスター1 は全て患者由来の 9 株、クラスター2 は患者株 1 株であった。クラスター3 は屠畜場で豚直腸便から採取された豚由来株 10 株と患者由来株 3 株を、クラスター4 は患者株 3 株を含んでいた。クラスター5 は鶏肉由来株 28 株、豚肉由来株 1 株、患者由来株 16 株を含んでいた。クラスター1~5 に属さない株が 1 株(E208H22)存在した。特筆すべき事は、すべての薬剤耐性を示した菌株は、ほとんどが鶏肉或いは患者由来株からなるクラスター5 に含まれ、クラスター1~4 には薬剤耐性菌は存在しなかったことである。

NGS 解析による系統解析から、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。それぞれの分離株の背景を考慮することにより、菌株間の関係を推定することが可能であり、その結果は食中毒の原因を解明等する科学的根拠となると考えられる。

今回得られた *S. Infantis* 70 株の NGS 解析結果を、既に公表されている *S. Infantis* のゲノム配列情報と比較した結果、クラスター1 は、愛媛株では患者由来株のみのクラスターであったが、他都道府県から報告されていた鶏卵由来株と同じクラスターを形成することが示された。また、クラスター5 は愛媛株では患者由来株と食材由来株

が認められたが、他都道府県から報告されていた食材（鶏肉）由来株及びヒト（患者、無症候保菌者）由来株も同じクラスターを形成し、このクラスターに属する株は薬剤耐性を示した。

最近、*S. Infantis* が保有する約 300 kb のメガプラスミド (megaplasmid) が、薬剤耐性に関与することが明らかにされつつある。メガプラスミドに特異的に存在する *irp2* 遺伝子を PCR 法で検出したところ、薬剤耐性を示した *S. Infantis* 株は全てメガプラスミドを保有することが示唆された。

C-1-2 富山県衛生研究所におけるサルモネラ属菌の NGS によるゲノム解析

C-1-2.1. *S. Infantis* 77 株の SNP データによる系統解析

S. Infantis 77 株の MiSeq による解析リードを、完全ゲノム配列が明らかになっていた *S. Infantis* CM001274 のゲノム配列にマッピングし、SNP を抽出し、77 株の SNP 情報を統合して、タンパク質翻訳領域から 104,586 塩基の SNP を抽出し系統樹を作成した。この結果、臨床分離株 17 株からなる大きなクラスターが検出された。また、臨床分離株 13 株と食品分離株 36 株の混在した大きなクラスターを形成した。

C-1-2.2. 比較ゲノム学的手法による MiSeq データの利用の試み—クラスター特異的遺伝子の探索

系統樹で検出された、クラスターC5 は、食品分離株の混在がなく特徴的なグループであった。そこで今回は、複数株のゲノム解析の試みとして、臨床分離株に特異的な遺伝子(CDS)が存在するかどうかを検討し、その結果、56 の候補遺伝子を得た。この 56 遺伝子の内訳は、機能が付与された 22 遺伝

子と機能未知遺伝子(hypothetical protein)、34 遺伝子であった。

この 56 遺伝子について、blast 検索を用いて臨床分離株特異的な遺伝子かどうかの検証を試みたが、このマトリックスの結果からは、特異的な遺伝子の特定には至らなかった。

C-1-3 山口県環境保健センターにおけるサルモネラ属菌のゲノム解析

山口県内で分離された平成 22 年から 24 年までの間に下痢症患者から分離された *Salmonella* Enteritidis 12 株と、平成 20 年から 24 年までの間に鶏肉及び豚肉から分離された *Salmonella* Infantis 12 株について NGS 解析を行った。ドラフトゲノム配列から株間の SNVs (single nucleotide variations) を抽出し PopART の median joining network により SNVs の関係性をネットワーク図示した。この方法では株間の分岐が可視化されるため、系統樹解析よりも株間の遺伝的相互関係を理解しやすいという利点がある。その結果、食品由来株では、同一加工所で処理された食材由来の菌株に類似が見られた。今後、この方法により解析を行うことで広域的に分離された菌株同士の比較を効率よく行う事ができると考えられた。

C-2. *Campylobacter lari* 分離株のゲノム解析

C-2-1. *C.lari* 分離株の MiSeq データの取得

本食中毒事例は、平成 20 年に富山県で発生したもので、2 つの飲食店で提供された料理に含まれていた鯨肉が共通食であり、患者数 61 名を数えた事例であり、鯨肉残品と患者便から分離された *C.lari* は、PFGE で一致した。そこで、今回、鯨肉から分離され

た *C.lari* 株 (Toyama 07) のゲノム解析を実施した。

C-2-2. *C.lari* Toyama07 の他のカンピロバクター属とのゲノム配列の比較

カンピロバクター属のゲノム解析は既に複数の株で実施されており、入手可能であった。*C.lari* については、RM2100 株、LMG11760 株の配列が既に報告されている。また、*C.jejuni*、*C.coli* 及び *C.fetus* の配列が報告されており、各 2 株ずつ選び、今回、解析した *C.lari* Toyama07 株の配列と比較した。

ゲノム配列の比較は、*C.lari* RM2100 株の配列を参照配列として、GViewServer の Blast atlas(図 4)及び Pangenome Analysis

(Pangenomic blast atlas) を行った (図 5)。

Blast atlas の結果から、*C.lari* Toyama07 株は、報告されている *C.lari* のゲノム配列と類似していた。また、参照株と異なるゲノム配列上の GAP が検出されたが、この GAP の遺伝子は、細胞表面の LPS の多型及びフエージ遺伝子の有無に関係していた。また、Pangenome Analysis の結果から、*C.jejuni* と *C.coli* は、ゲノム配列の 2/3 はほぼ共通なゲノム配列であるが、*C.lari* と *C.fetus* のゲノム配列は互いに相同性が低いことがわかる。また、*C.lari* Toyama07 株に特異的な配列があることが判明した。

C-2-3. *C.lari* Toyama07 病原性遺伝子の検索

Virulence Searcher による病原性遺伝子の検索の結果、得られた *C.lari* Toyama07 のドラフト配列から 53 遺伝子が病原性遺伝子として検出された。*Campylobacter* 属菌でもっとも解析が進んでいる *C.jejuni* において検出される主要な病原因子である定着因子、CadF, JipA, MOMP, PEBA, 毒素 CdtABC、侵

入因子 CiaB のうち、今回の *C.lari* Toyama07 株では、CadF, MOMP, CdtABC および CiaB が検出された。

D. 考察

1. サルモネラ属菌株のゲノム解析

愛媛県内で分離された食物（鶏肉、豚肉）由来株 29 株、動物（豚直腸便）株 10 株、患者由来株 31 株の計 70 株の *S. Infantis* の全ゲノム配列を次世代シーケンサーで解読し、それを基に従来法よりも詳細な系統解析を実施した。その結果、患者株のみ、患者株と動物由来株、患者株と食物由来株のクラスターが得られた。クラスター内、お互いに近縁の異なる由来株のペアが認められ、感染源の有力な候補と思われる。

患者由来で食品由来の株との関連が不明であったクラスターの NGS 解析の結果を、他の都道府県で分離されたものと比較すると、鶏卵由来株と近縁であることが判明した。PFGE では、異なる施設間でのデータの比較が難しいが、NGS 解析結果では、全国的な比較が可能である。鶏卵由来株との関係が示されたこれらの患者について、鶏卵の摂食との関連を調べる根拠となる。また、豚由来株のクラスターに属する患者由来株も存在したことから、豚由来株にヒトの感染が関連する経路も示唆される。この様に、全ゲノム解析により、感染源の探索に有力な方法論を確立することができた。

2. 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 18 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が、NGS による塩基配列の網羅的解析は、より高い分解能を示し、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食中毒の原因と思われる *Campylobacter lari* のゲノム解析を実施し、病原性に関連する遺伝子の探索を行った結果 53 個の病原遺伝子が検出され、このような解析が食中毒の原因究明に有用であると考えられた。

3. 地方衛生研究所におけるゲノム解析法の検討

NGS から出力されるゲノム配列は、大量であり情報処理を適切に行うことが要求されるが、解析技術のほとんどが、Windows PC 環境ではなく、高い専門性が要求されることになり、情報処理の専門家が担当していることが多い。そのため、地方衛生研究所で、NGS 技術を検査や感染症、食中毒の原因究明に使用する場合、データ解析がボトルネックの一つとなることが懸念される。富山県衛生研究所では、最近普及しつつある windows を用いた解析ソフトを使用し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。また、*C.lari* のドラフトゲノム解析による CDS の解析により、病原性に関与する遺伝子の解析も有用である事が示唆された。

E 結論

愛媛県で分離された患者，食材（鶏肉，豚肉），家畜（豚）から分離された *S. Infantis* 70 株の NGS ゲノム解析を実施し，食品もしくは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。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，原因食品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食品の安全確保対策に極めて有用であることを示している。また，カンピロバクターについても NGS 解析を行うことにより，詳細なデータを得ることが可能であった。

今後，より多くの自治体で分離された食品由来，患者由来のサルモネラ属菌，カンピロバクター属菌等について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仕組みを構築する必要がある。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) 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：地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情.日本

細菌学雑誌 70(2):309-318, 2015.

- 2) 菅 美樹、四宮博人、北尾孝司：市販鶏レバーおよび臨床材料から分離した基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* が保有する *bla*_{CTX-M} 型別に関する検討. 感染症学雑誌 印刷中
2. 学会発表
 - 1) 仙波敬子、園部祥代、木村俊也、大倉敏裕、烏谷竜哉、四宮博人：地研における薬剤耐性菌解析の取り組み、衛生微生物技術協議会第 36 回研究会、2015. 7. 23-24、仙台
 - 2) 木村千鶴子、仙波敬子、園部祥代、木村俊也、四宮博人：小児感染性胃腸炎患者から分離された腸管凝集付着性大腸菌の性状について、第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2105.10.3-4、岡山
 - 3) Keiko Semba, Mayumi Yamashita, Sachiyo Sonobe, Eiji Yokoyama, Tsuyoshi Sekizuka, Komei Shirabe, Makoto Kuroda, and Hiroto Shinomiya: Whole genome analysis of *Salmonella* isolates from foods and patients reveals their detailed relationships. シンポジウム 7「ゲノム解析手法の最前線」、第 89 回日本細菌学会総会、2016.3.23-25、大阪

H.知的所有権の取得状況

なし