

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出来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

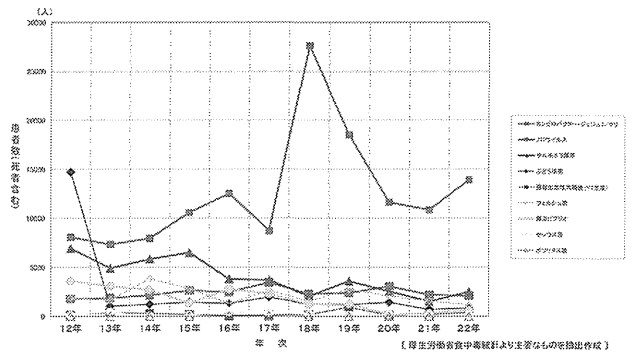
平成26年1月16日 第2回班会議

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

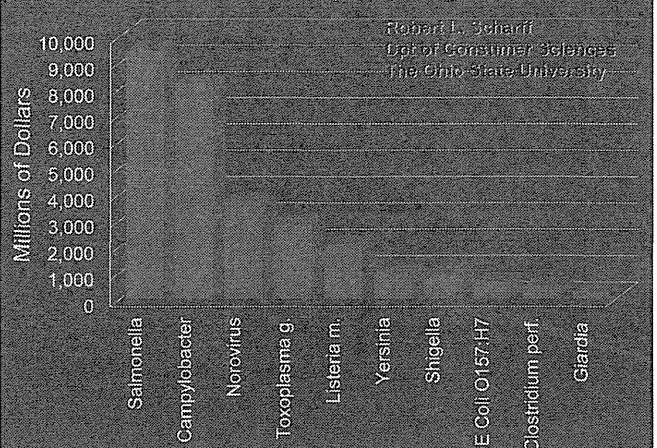
米国: Innovations in Government Award (1999, 2002)

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



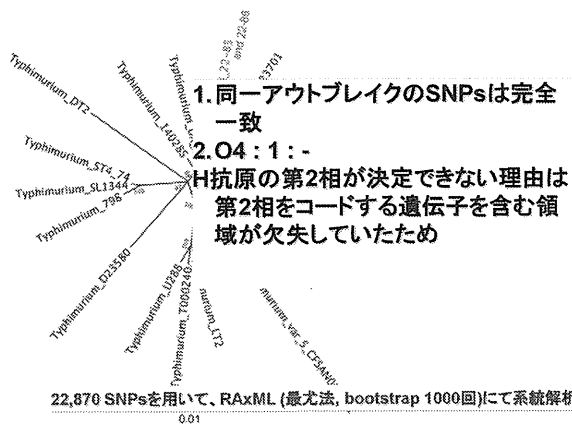
山口県におけるNGSの導入

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

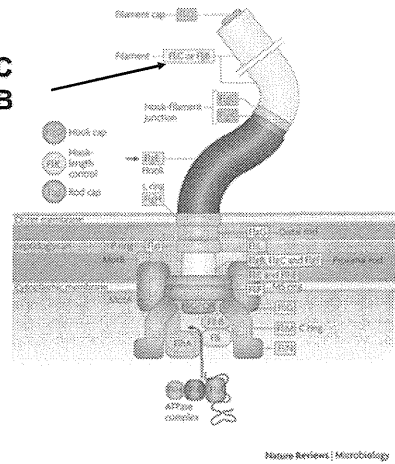
Salmonellaのゲノム解析対象株

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

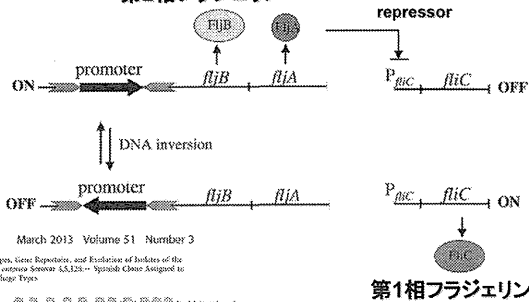


H抗原 第1相:Fli C 第2相:Fli B



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



March 2013 Volume 51 Number 3

Genetic Types, Gene Repetition, and Evolution of Isolates of the *Salmonella enterica* Serovar 4,5,12:i:- Specific Clones 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

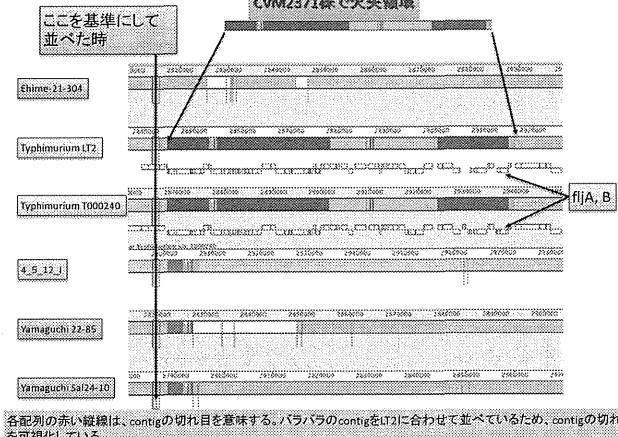
5. Typhimurium DT2

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.

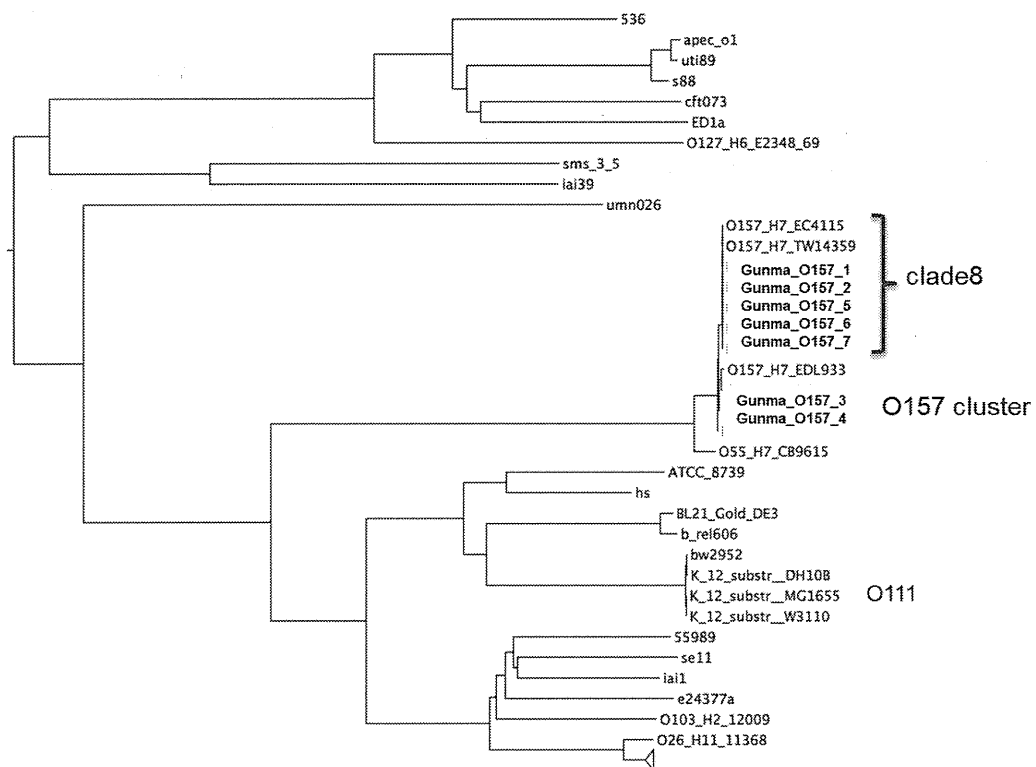
H. 知的財産の出願・登録状況

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