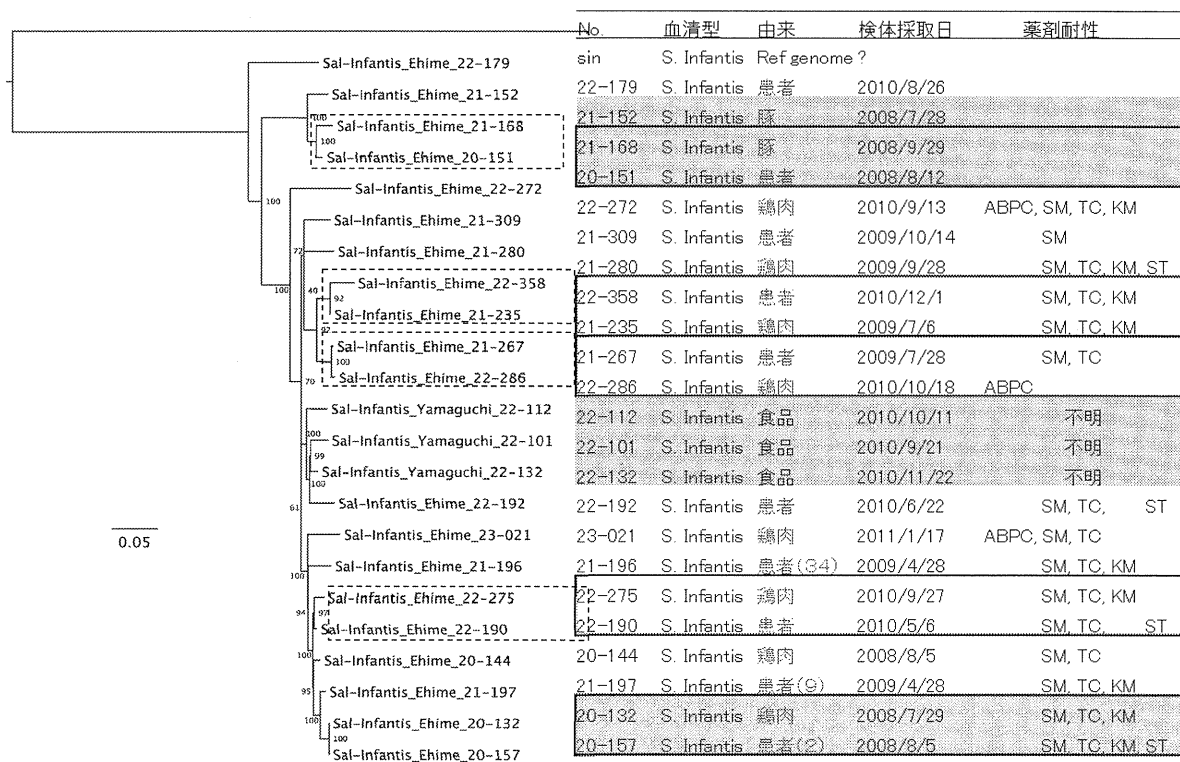


黄=家畜(豚)
青=患者
赤=食材(鶏肉)

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

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



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

図5 S. Infantis 株の NGS 解析に基づく系統解析

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

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

今年度の研究実施報告及び 今後の予定等について

愛媛県立衛生環境研究所

第2回研究班会議報告内容の概要

1. 今年度の研究実施内容の報告

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

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

2. 今後の予定(案)

2

愛媛県におけるサルモネラ分離株(2008-2010年)の血清型

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

3

サルモネラ分離株の 薬剤耐性状況

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

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

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

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

4

O4型別不能株の性状

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

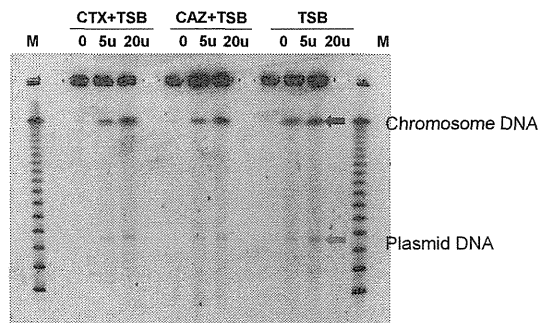


NGS解析で、より詳しい性状を明らかにする

5

S. 4:i:- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

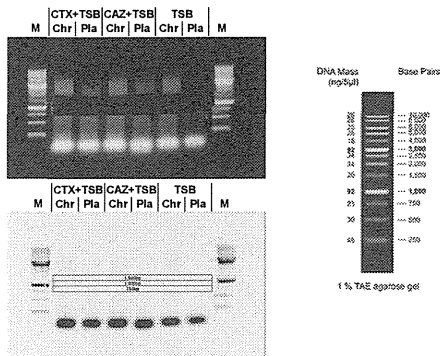
(1) S1 nuclease PFGE によるゲノムおよびプラスミドの調製



6

S. 4:i- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

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

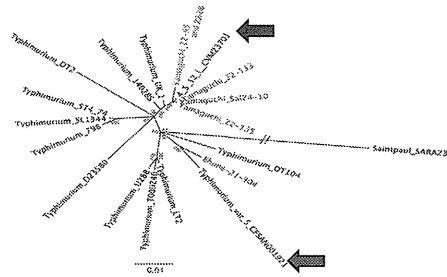


7

S. 4:i- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

(3) S. 4:i- 株ゲノムのNGSシーケンスに基づく系統解析

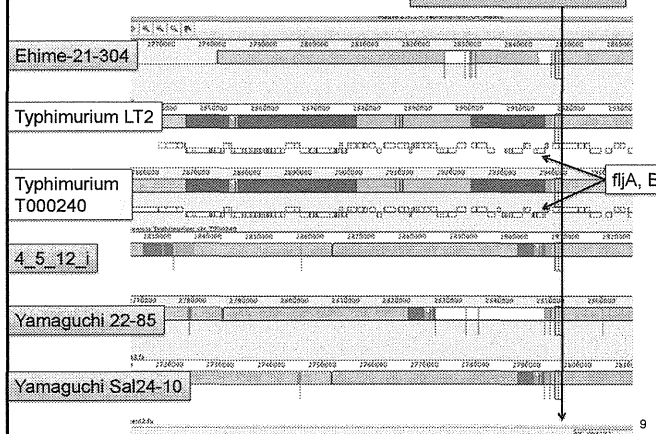
(22,870 SNPs を用いてRAxML(最尤法,bootstrap 1000回)にて系統解析)



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

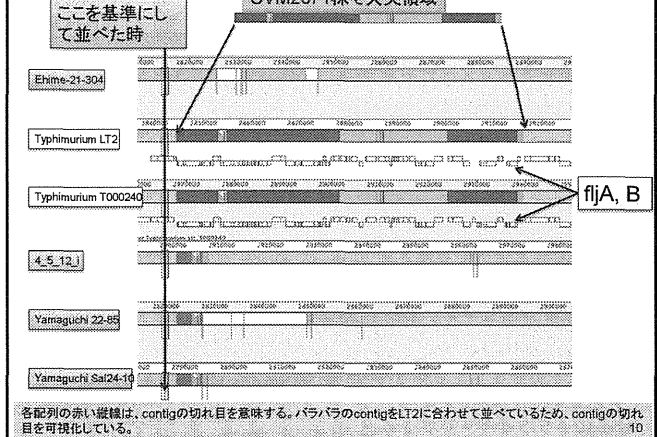
8

fjA, fjB 近傍配列のアライメント



9

山口分離株および CVM2371株で欠失領域



10

S. 4:i- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

(4) ゲノム情報からの結論

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

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

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

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

血清型別が Typhimurium とならず、型別不能となった。

11

Salmonella 4, 5, 12:i- とは

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

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

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

12

S. 4:i- 株のゲノムおよびプラスミドのNGS解析

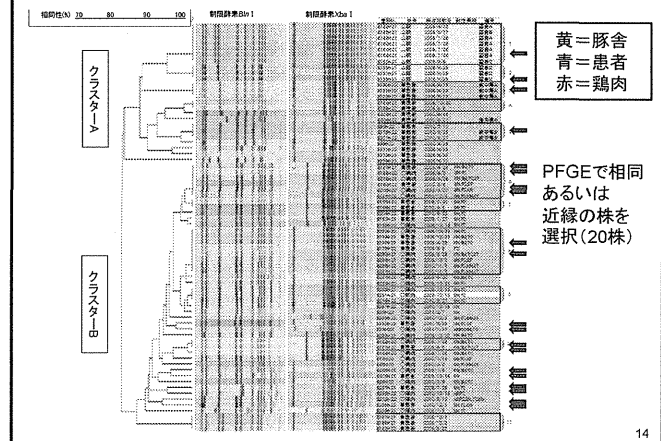
(5) プラスミド解析

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

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

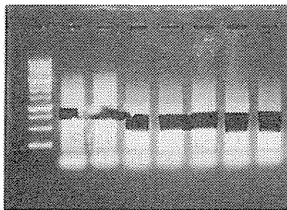
13

S. InfantisのPFGE 解析 vs NGS解析



14

S. InfantisのNGS解析



M 1 2 3 4 5 6 7

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

15

まとめ

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

16

来年度の予定(案)

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

17

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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

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

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

IV 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行物・別刷

該当なし

