

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

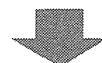
- 代表的な細菌性食中毒(カンピロバクター・ジェジュニ)
- 主な原因食品: 鶏肉(鶏刺し、タタキなど)、牛レバーなど
- 食中毒の原因病原体として最も多い
- 患者数もノロウイルスに続いて2番目に多い
- 分離される菌種はカンピロバクター・ジェジュニが95~99%



出典: 農林水産省ホームページ

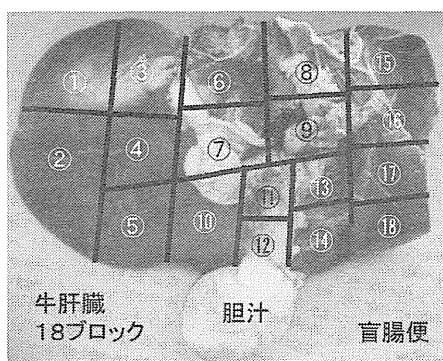
## 研究概要

- 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)



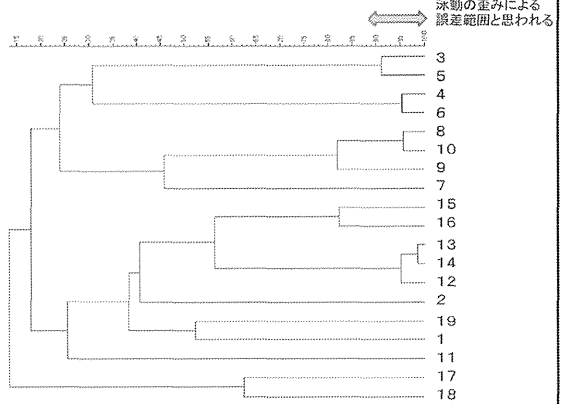
## 使用した菌株

- 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。

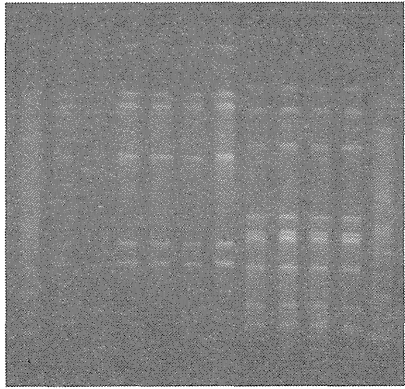
## NGS解析とPFGE(C.jejuni)

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	同一の泳動像
	14				XIV		
	15	10	H25.11.18	③	肝	IX	個体内で同一の泳動像
	16				IX		
	17	11	H25.11.18	⑤	肝	XV	個体内で2種類の泳動像
	18				XVI		
	19				XVII		

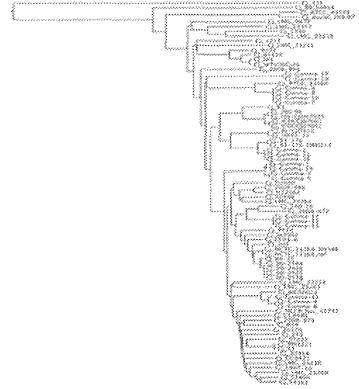
## C.Jejuniの系統樹解析結果



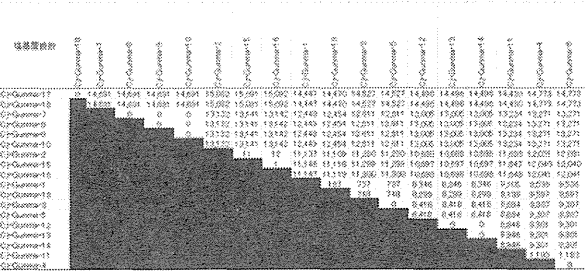
17 18 19



## C.jejuni系統樹(NGS)



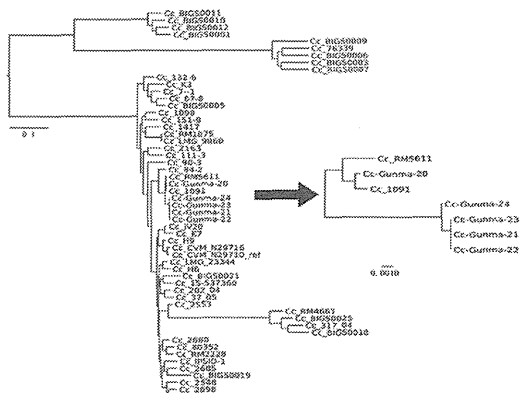
## C.Jejuni株の塩基置換数



## 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た。

## 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

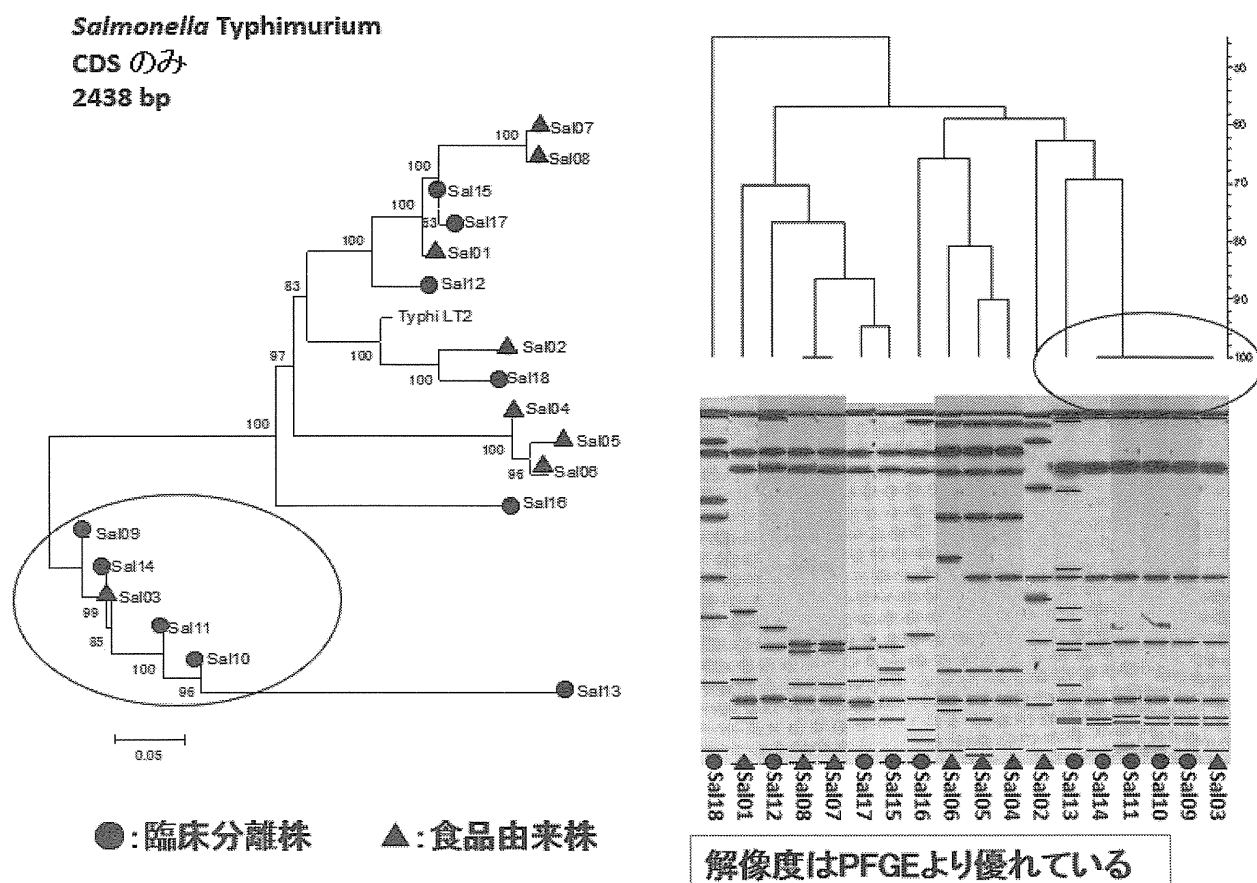
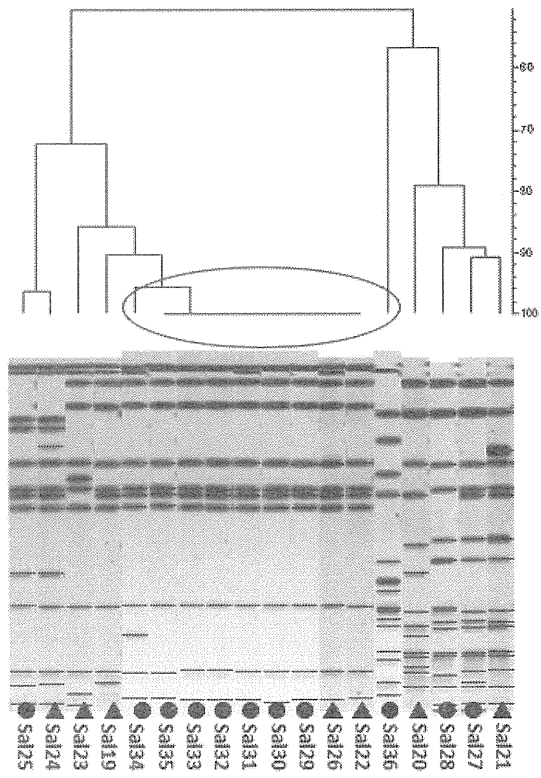
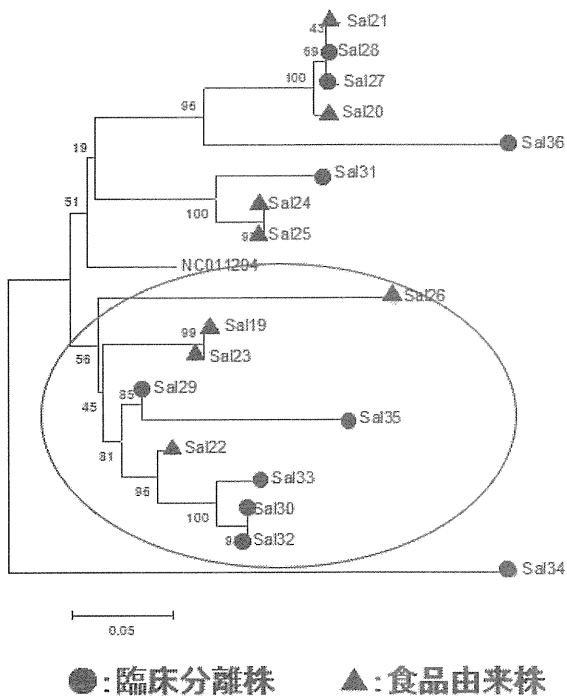


図 2. *Salmonella* Typhimurium 分離 18 株の PFGE とゲノム SNP による系統樹の比較



**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.

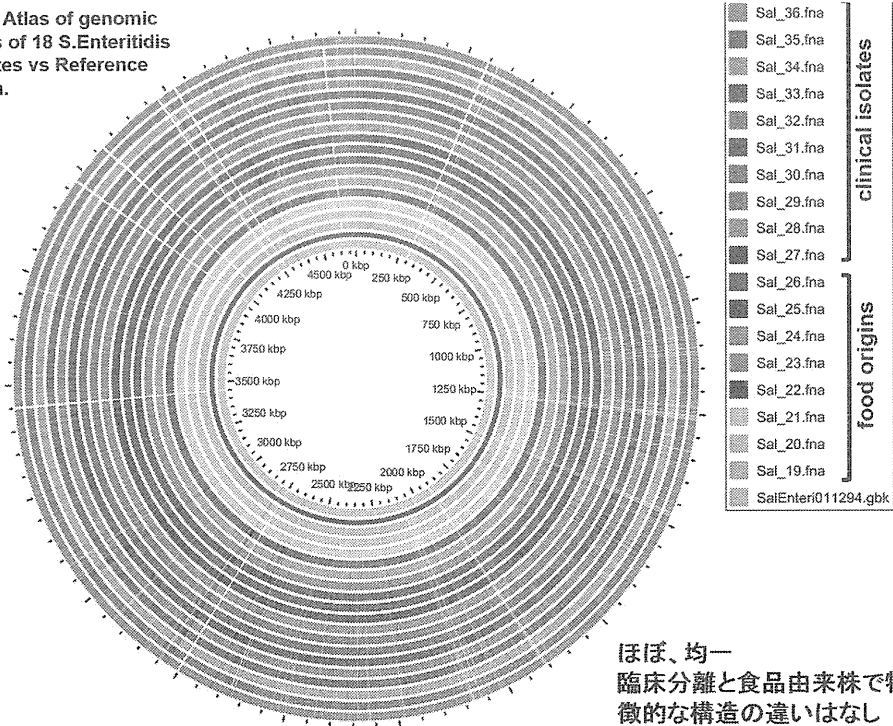


図 4. *S. Enteritidis* 18 株の Blast Atlas 解析

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

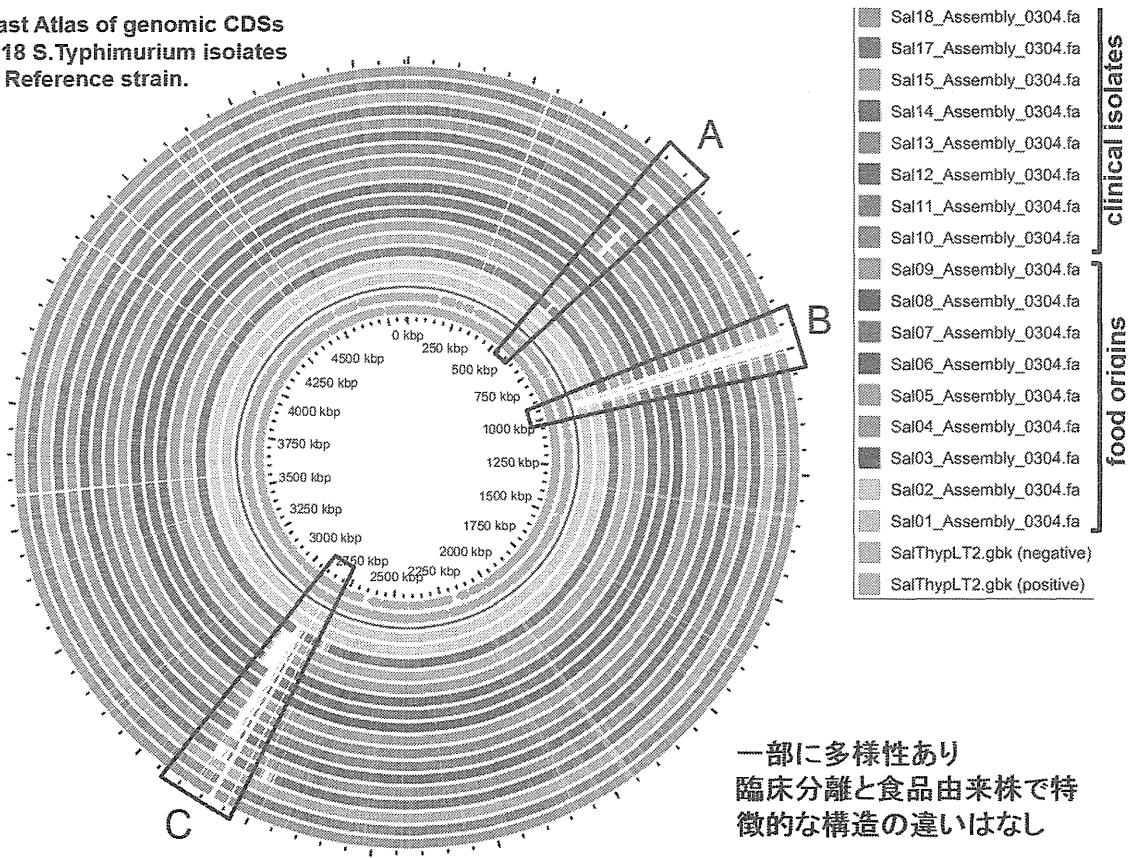


図 5. *S. Typhimurium* 18 株の Blast Atlas 解析

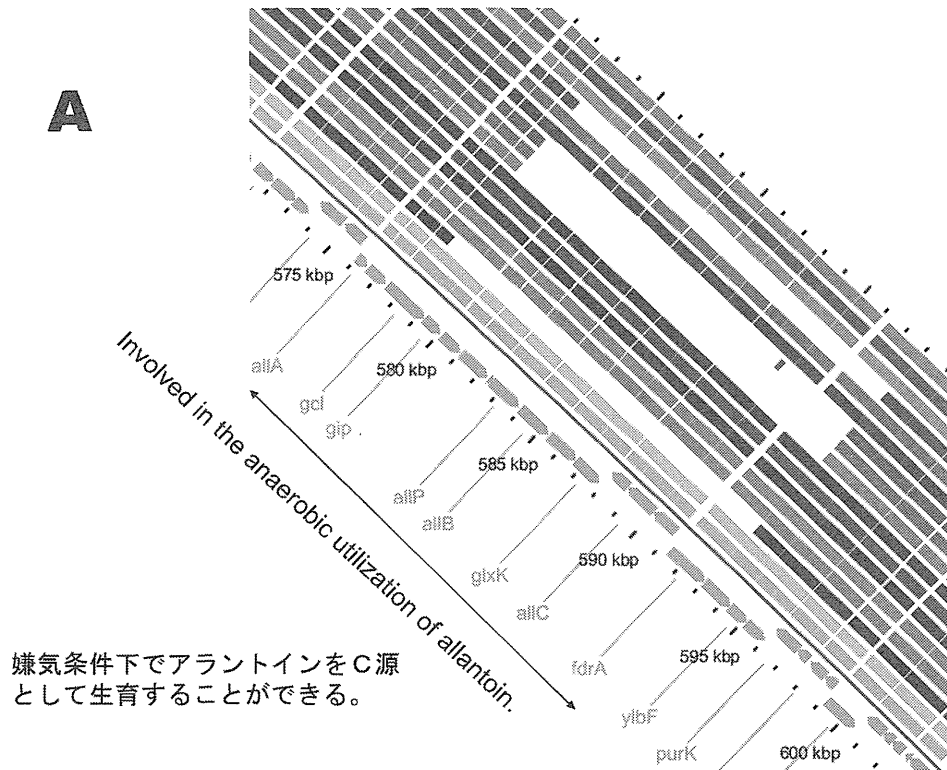


図 6. *S. Typhimurium* 18 株の座位 A の拡大図

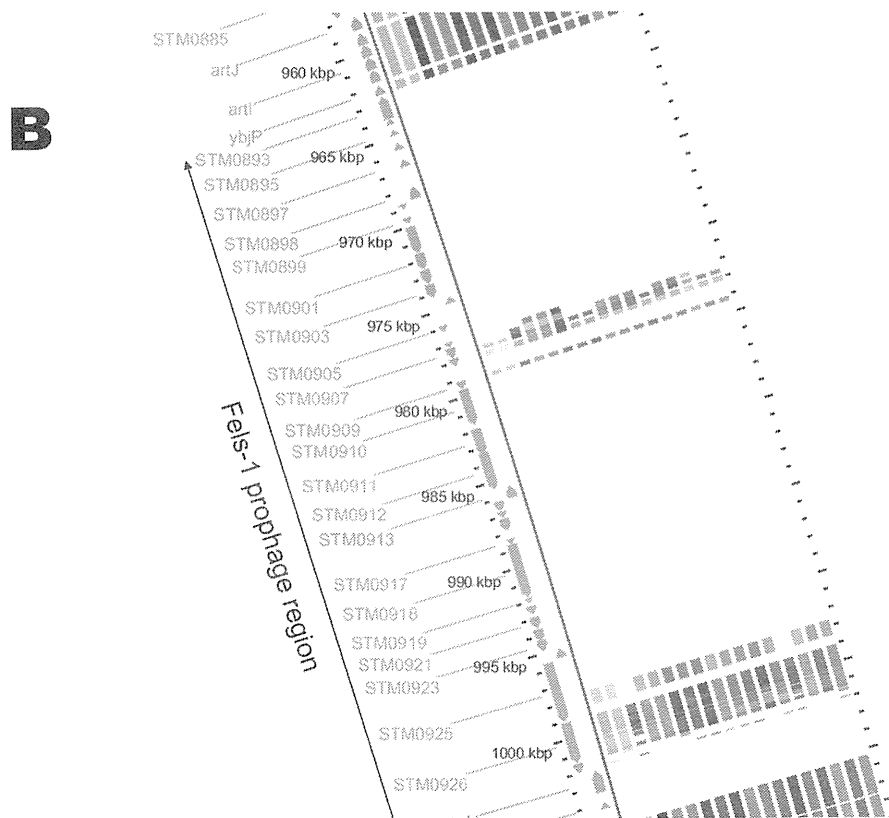


図 7. *S.Typhimurium* 18 株の座位 B の拡大図

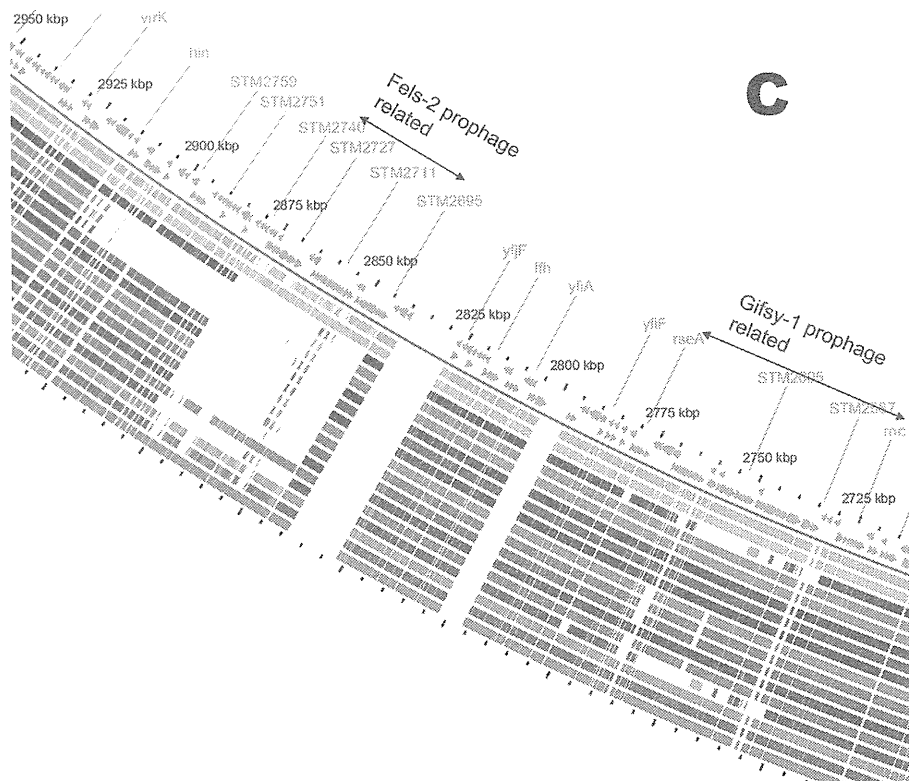


図 8. *S.Typhimurium* 18 株の座位 C の拡大図

# 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のアミノ酸置換(QRDR, quinolone resistance-determining region)  
CmeABC multidrug efflux pump(fluoroquinolones and macrolides):自然耐性と獲得耐性に関与

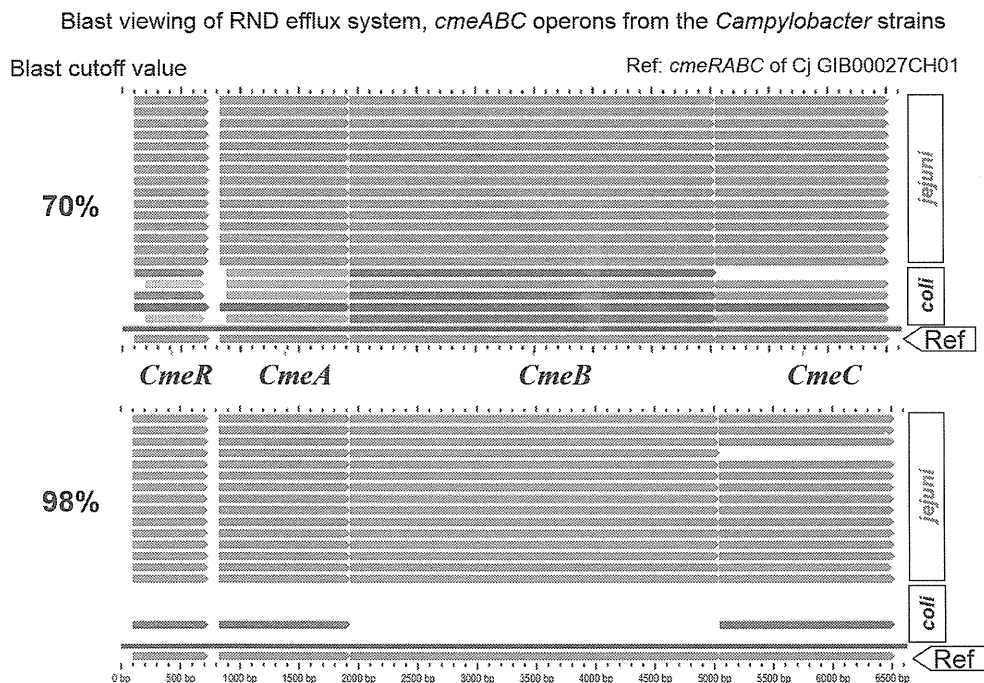
### •Resistance to Tetracyclines.

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

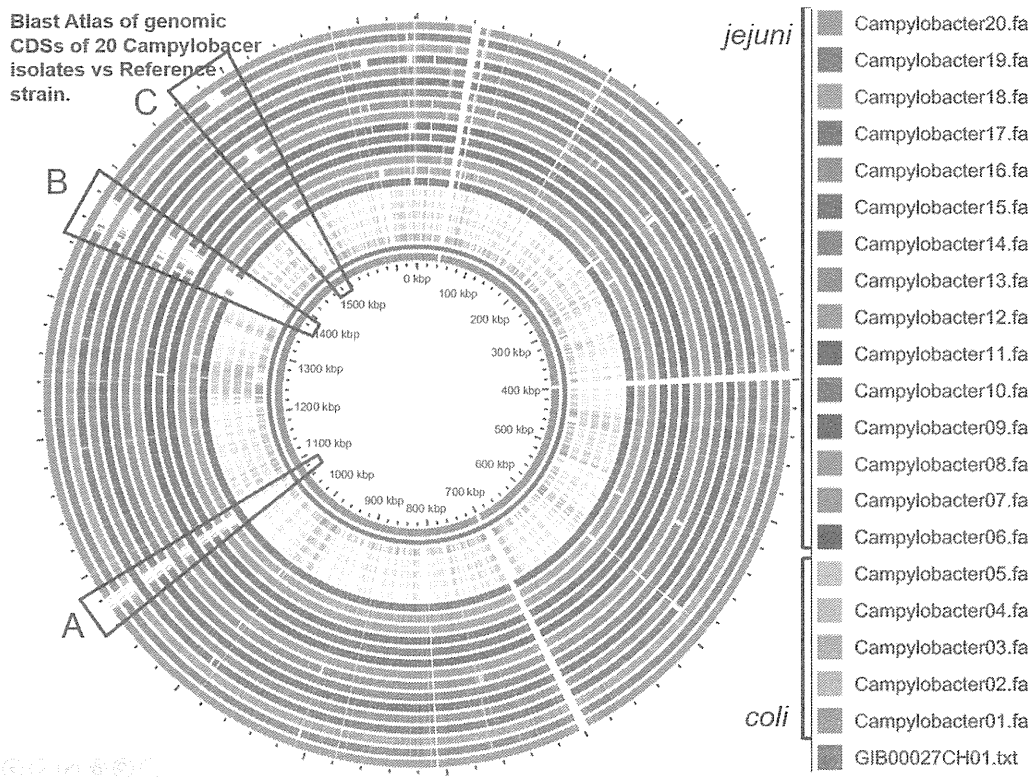


図 11. *Campylobacter* 属菌 20 株の Blast Atlas 解析

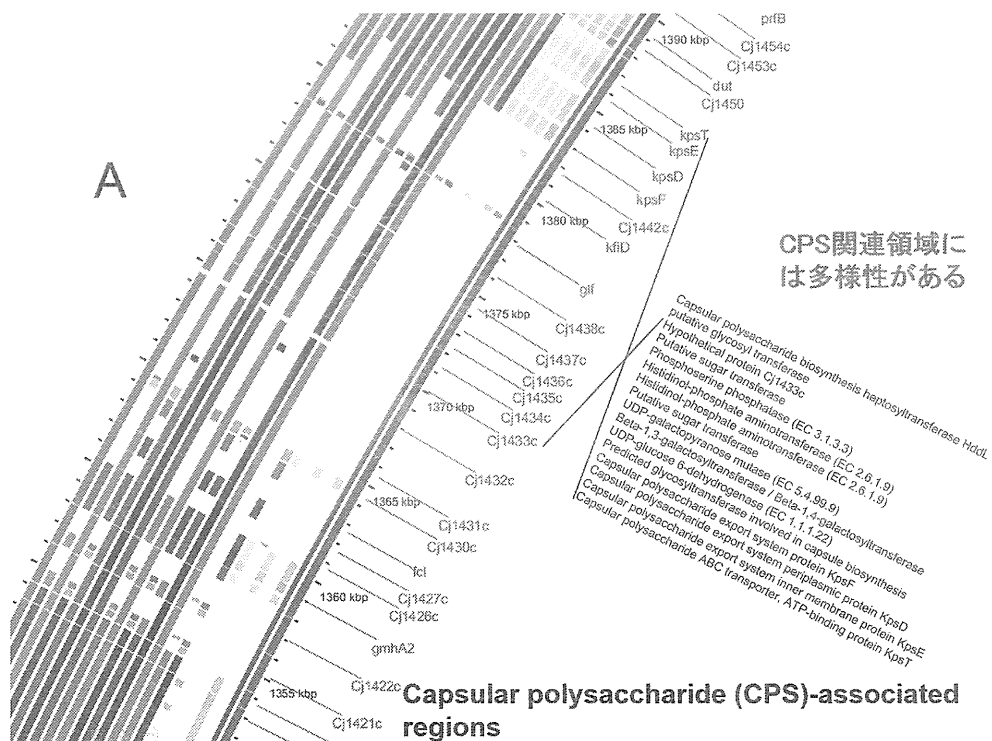


図 12. *Campylobacter* 属菌 20 株の座位 A の拡大図

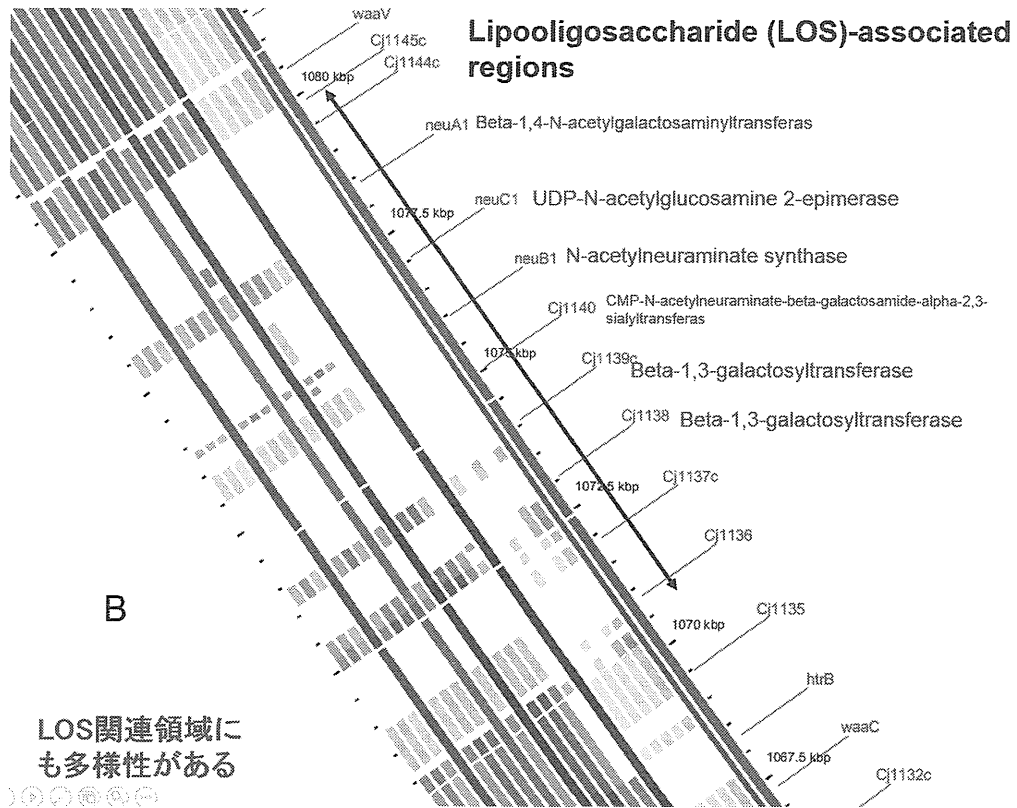


図 13. *Campylobacter* 属菌 20 株の座位 B の拡大図

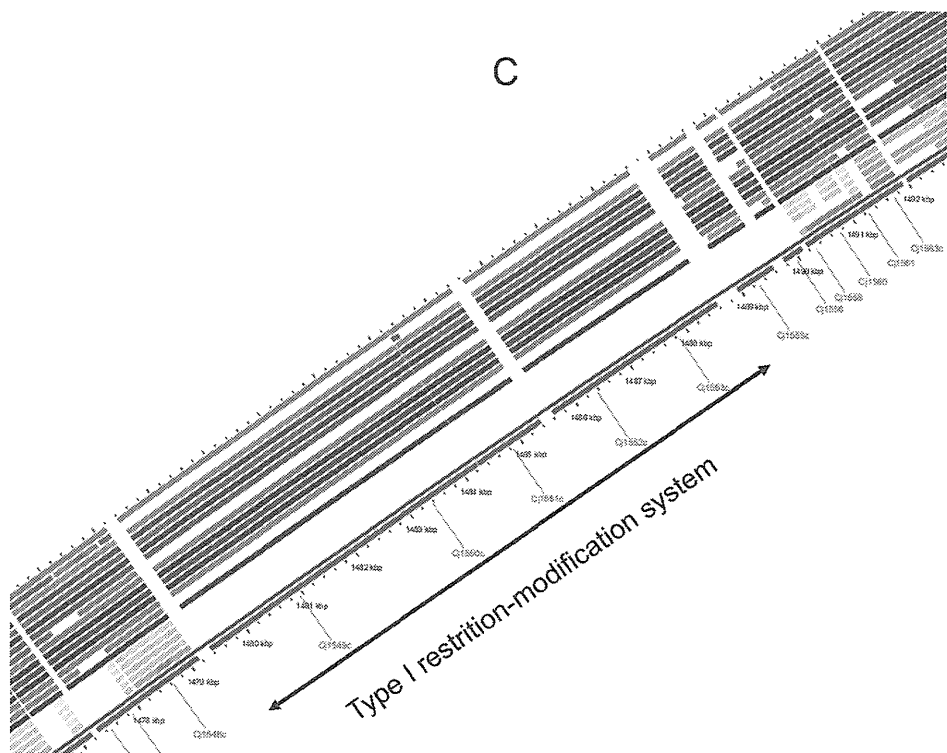


図 14. *Campylobacter* 属菌 20 株の座位 C の拡大図

表 1

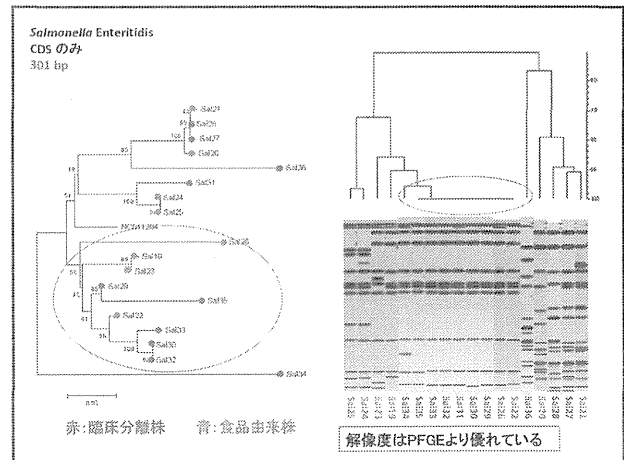
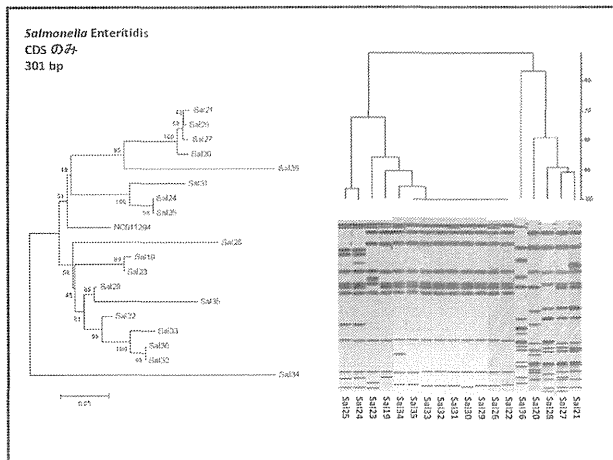
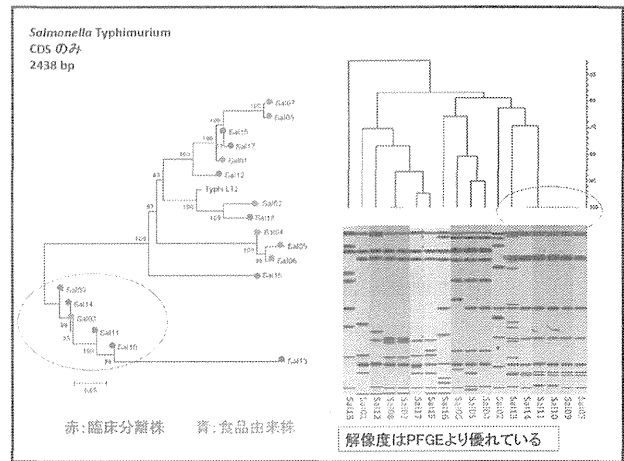
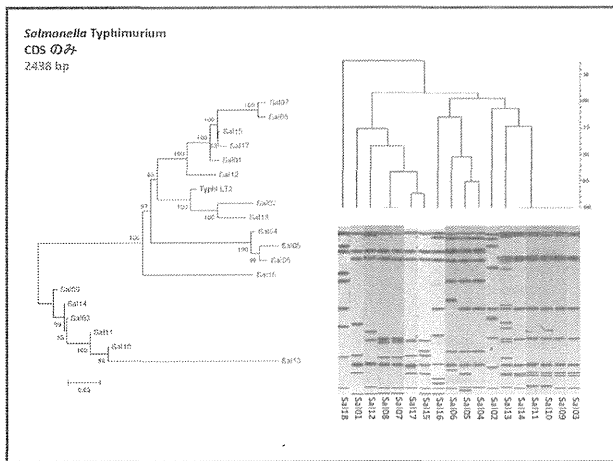
*Campylobacter jejuni/coli*分離株のゲノム解析  
 富山県分離株の薬剤耐性機構の解析: 解析株の特徴

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







**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**

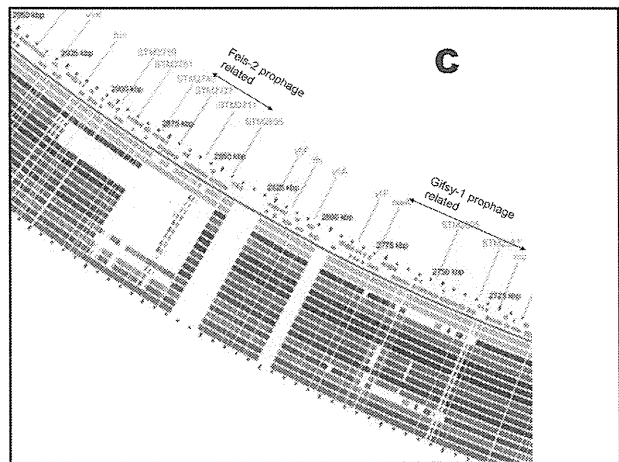
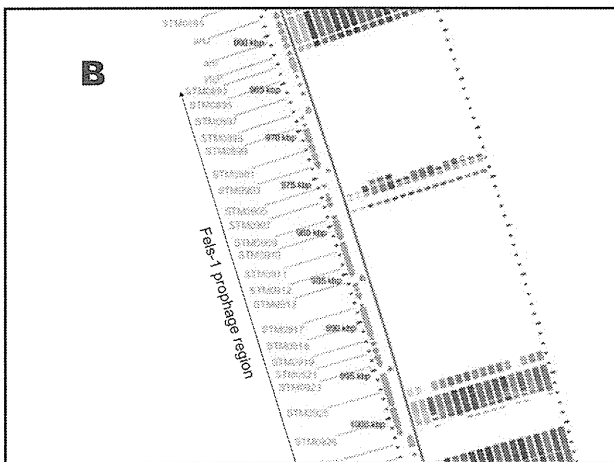
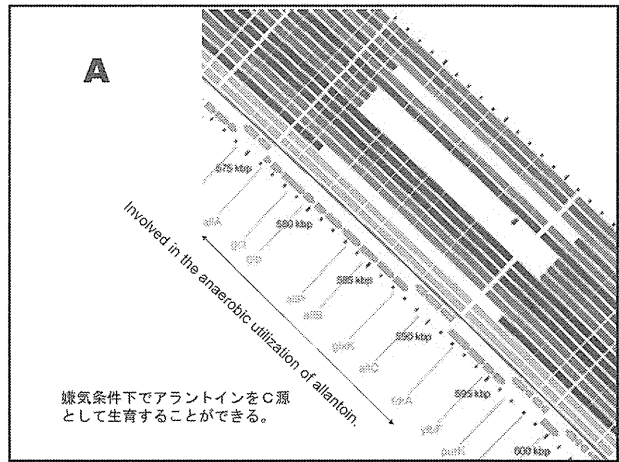
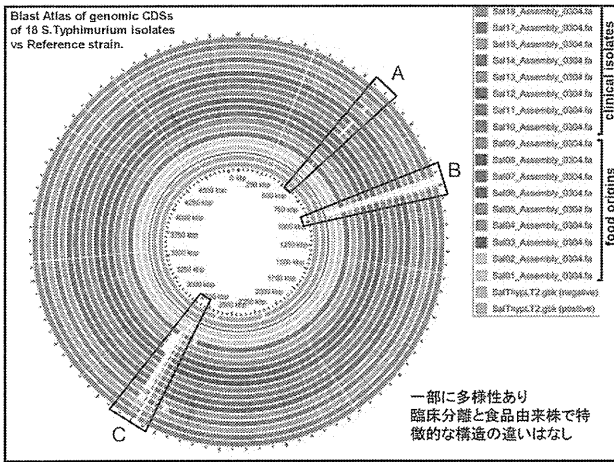
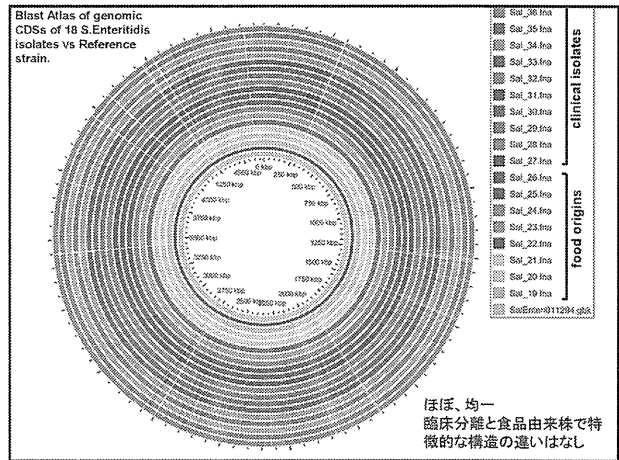
平成26年6月25日会議で説明

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: 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	sa	oflX	oflB	oflC	oflF	oflG	oflH	oflI	oflK	oflM	oflN	oflP	oflQ	oflR	oflS	oflT	oflU	oflV	oflW	oflX	oflY	oflZ	Ref
1	Cj031	h		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
2	Cj041	h		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
3	Cj051	h		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
4	Cj061	h		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HeNY14f
5	Cj071	h		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
6	Cj081	h	G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
7	Cj091	h	Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
8	Cj101	h	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
9	Cj111	h	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
10	Cj121	h	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
11	Cj131	h	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
12	Cj141	h	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HeNY14f
13	Cj151	h	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HeNY14f
14	Cj161	h	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
15	Cj171	h	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
16	Cj181	h	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
17	Cj191	h	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
18	Cj201	h	UT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
19	Cj211	h	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f
20	Cj221	h	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	HeNY14f

ニューキノロン耐性は?  
⇒ *cmeABC* operon

