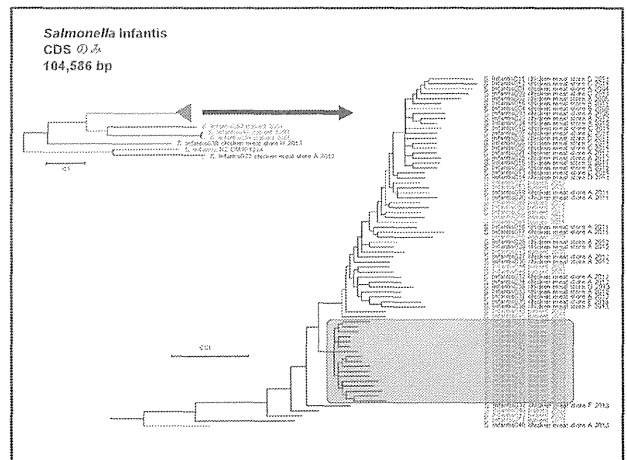
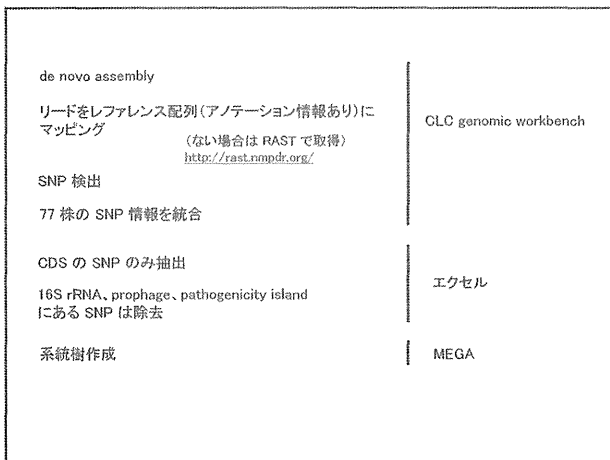


Salmonella Infantis 77 株

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
Maximum		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を用いて抽出した。

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剤の抗菌剤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

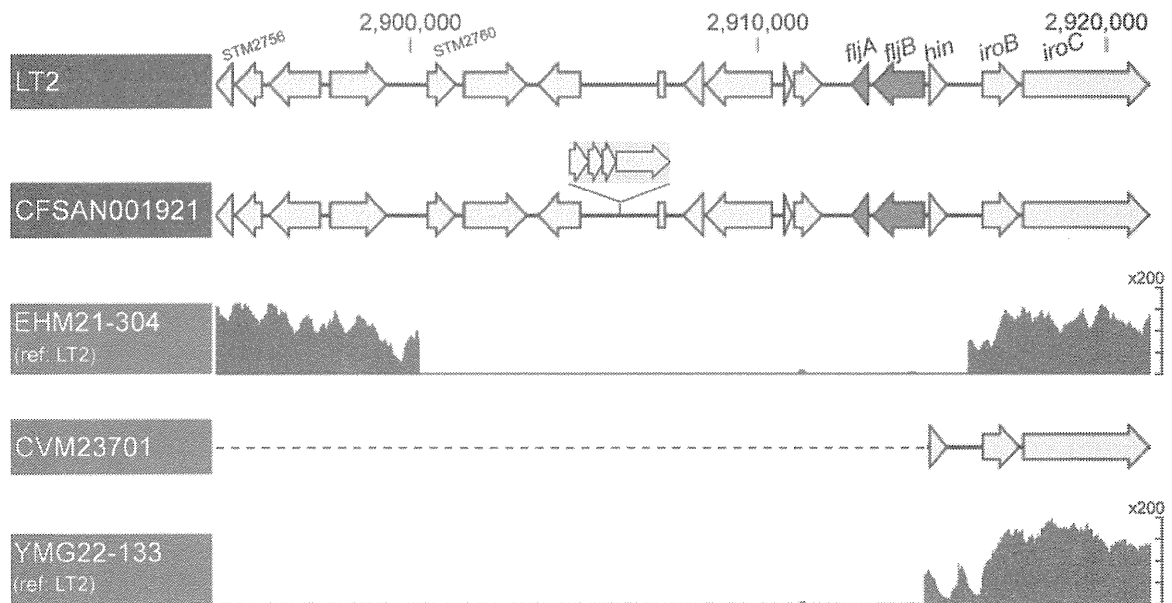
2) Characterization of genomic structures and

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

図1 次世代シーケンサーによって示された愛媛株(EHM21-304)山口株(YMG22-133)の第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域の欠失



愛媛株(EHM21-304)山口株(YMG22-133)から次世代シーケンサーによって得られた塩基配列のショートリードを、*S. Typhimurium* LT-2 ゲノムの塩基配列を基に配列した。*S. Typhimurium* CFSAN001921は、登録されている中で最もEHM21-304と近縁のゲノム配列をもつ株である。

第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域を示す。S. 4,[5],12:l:- のうち、本研究以前に唯一ゲノム解析がされていたCVM23701株では、*fljA/B*を含む76個の遺伝子の広範な欠失が認められるが、*hin*は存在していた。YMG22-133株はCVM23701株と似た欠失パターンを示した。

一方、EHM21-304株は、*fljA/B*、*hin*を含む11個の遺伝子が欠失することが明らかにされた。

```

1  GCTACCAATTGCCGCCTTTTCCATGAGAT STM2759 ATATGTCATTCCCTTTGCTGCATCACTGGA 70
71  TGGAAATTTGCGACTGAGAAGTCATTTAC AATACGCTGGGATGGCCGGATTTGAGCCA 140
141  ACTTTGGCTCGAATAATGCTACGCCCCGAAAAGCTCGCTAAAGGGCCTTTAAAGGCCTTTAAGGGTAAGG 210
211  GAGATAAGTGCGCCATTGTGGCTGTCAATTCGTTTTGTTTAGCTCTTCCTGATTTTTCTTCTTGCCCTGGGA 280
281  GAACTGGC LT2とI塩基違い TGGATCCAGAGGAGCTGCGTCCGGCATCAGAGTAACATTCCGCATGG 350
351  TGGGTTAGATCATTCTGCATACCCAATTCTGTTCGTTTAAAGTATTTTAGGTACGGCTGAGATAGCGTGGT 420
421  TTGAACCATCAGAACAATTTAAAATCTACACCCGCAAAGGCTCGCTTTAGCGAGCCTTTGCGGGCGGCATT 490
491  TCTGGATAAATTATCCATGAAAGCCTCACCAGAGATGTAAAAGAATCCTTCCTGCCGCGGCATTCTCTGGA 560
561  CAATATTTTCCCAATCTTCTGATGCTCATGAAACCCGATACTGCATCATGATAATAAAGTTATTTATTAT 630
631  CAATGAATTATGCGGATTAATCAGCTTGACCATCGCATCAACAATGCTATTTTTACGGTAACCTGCCGCA 700
701  GTCCTGGGACTGCACCCGAGACAGCCACGACCTTAGAGGACTGTGCCTGGCTGCTATGTCAGGTTGGTCA 770
771  AGCCCTTAACCCGCAAGCCGGACAATACGGCGGGGGCGTCTCTGACGCAGTCCGGTTCGTTGTTGCTGCT 840
841  ATAACCTGTGCCAGTAAGAGGCAGGTTGGTACCGCCTCTTTAGACGGAGCGTATCTCTGCGCCAGTAAAC 910
911  AGGTTGCCTGAAACGGCGGCGCTCACTTTGGAGGCGAAGCAAAACAAGTGACGCCGACGCACACCGCT 980
981  GCGCCAGCCGCCGTCTTATCAGGCTTATCGTTGTATTAACCCTCTGACGCCATCATTTCTGCGTCAAAAA 1050
1051  GATAACAAGGAGGAATGAACAGTACCGGAGGCGGACCACGACGATCCGGGGGCATCCCTGCTGAGGCAGG 1120
1121  CGGCCTGCACACCGTGCAGTACCGTACCCACCAGGCACTGTTGCAAAGTTAGCGATGAGGCAGCCTTTT 1190
1191  GTCTTATTCAAAGGCCTTACATTTCAAAAACCTCTGCTTACCAGGCGCATTTTCGCCAGGGGATCACCATA 1260
1261  ATAAAATGCTGAGGCCTGGCCTTTGCGTAGTGCACGCATCACCTCAATACCTTTGATGGTGGCGTAAGCC 1330
1331  GTCTTCATGGATTTAAATCCCAGCGTGGCGCCGATTATCCGTTTCAGTTTGCCATGATCGCATTCATCA 1400
1401  CGTTGTTCCGGTACTTAATCTGTCCGTGTTCAACGTCAGACGGGCACCGGCCTTCGCGTTTGAGCAGAGC 1470
1471  AAGCGCGGACCATAGGCGGGCGCTTTA IS26 (820 bp) TCGCGGGATCTGCCACTTCTTCACGTTG 1540
1541  TTGAGGATTTTACCCAGAAACCGGTATC CGACGGGAGGAGAGATAAAAAATCGACAG 1610
1611  TGCGGCCCCCGCTGTGACGCCCCGTACAGATACGCCAGCGGCCATTGACCTTCACGTAGGTTTCATC 1680
1681  CATGTGCCACGGCAAAGATCGGAAGGGTTACGCCAGTACCAGCGCAGCCGTTTTTCCATTTGAGGCGCA 1750
1751  TAACGCTGAACCCAGCGGTAATCGTGGAGTGATCGACATTCACTCCGCGTTCAGCCAGCATCTCCTGCA 1820
1821  GCTCACGGTAACCTGATGCCGATTTGTCAGTACCAGCGTACGGCCACAGAATGATGTCACGCTGAAAATG 1890
1891  CCGGCCTTTGAATGGGTTTATGTGCAGCTCCATCAGCAAAAGGGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTA 1960
1961  TTTGCAACAGTGCCATCAATACTACTCCCTACGTTTCCCGTTACCTTGCTGTCCGTACGTTTACCTCATT 2030
2031  GTCTGAAAGGTTATTTGCGAAGTTATCATTATAATAATCCACGGGCGTCTGGTATGCGAATCCAGTTCCCA 2100
2101  ATCCTGGCGCTTTGCCTGTGCGACCATACGCGCGTAAATAAGCCTGAAACCAAACCTCACCAGCTTAACGC 2170
2171  TCTCATCTTCCCGATTTTTACGCAAAAAATCATCACATGATCAAGTGTATATTAGTTATTCATTTTA 2240
2241  CAAATGATATTGGTAATTATTATCATTCTCATTAACTGTTTCGATTTATGACGTGGAGAGAGAGGAT 2310
2311  TTCTCATGCGTATTCTGTTTGTCCG SCTATACCCTGTGCTGTCTCTGGCGCA 2380
2381  AGCGTTTCGTGTTAATGGCCATGAA iroB (STM2773) GCGAAATTTGCACAGAAAGCAGCCG 2448

```

図2 EHM21-304 ΔfljAB sequence (2,448 bp)

forward primer を STM2759 上に, reverse primer を *iroB* 上に設計し、得られた増幅産物 2,448 bp* の塩基配列を決定した (primer は下線)。その結果、*Salmonella* Typhimurium LT2 (AE006468) の 2,900,321 ~ 2,916,035 (15,715 bp)、STM2760 ~ *hin* (STM2772) までが欠失し、代わりに IS26 (820 bp) が挿入されていることがわかった。

表1 多剤耐性プラスミドpSO4-21-304のgap fillingのためのプライマー

No.	Product	F primer	R primer	size
1	1-8	s1_168360F	s8_187R	ND
2	1-8RC	s1_168360F	s8_6235F	2,217
3	8-1	s8_6235F	s1_324R	ND
4	8RC-1	s8_187R	s1_227R	989
5	1-7099	s1_6897F	s1_7532R	941
6	1-42099	s1_41779F	s1_42600R	(822)
7	1-43056	s1_42875F	s1_43517R	(643)
8	1-91975	s1_91746F	s1_92227R	(482)
9	1-97405	s1_97226F	s1_97880R	(655)
10	1-105707	s1_105408F	s1_106067R	(588)
11	1-134128	s1_133986F	s1_134667R	(682)
12	1-139302	s1_139097F	s1_139937R	(841)
13	1-141498	s1_141346F	s1_141780R	(435)
14	1-141915	s1_141762F	s1_142353R	(592)
15	8-1011	s8_802F	s8_1526R	(725)
16	8-3183	s8_3027F	s8_3682R	(656)

図3 表1のプライマーを用いたPCRアンプリコン

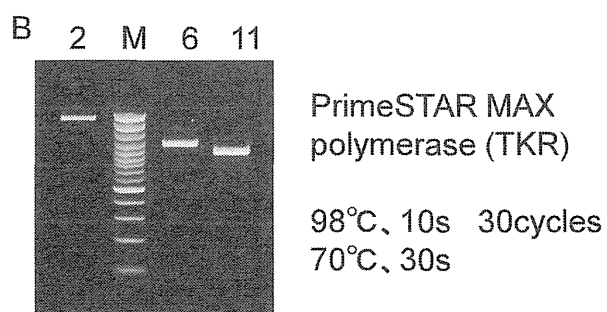
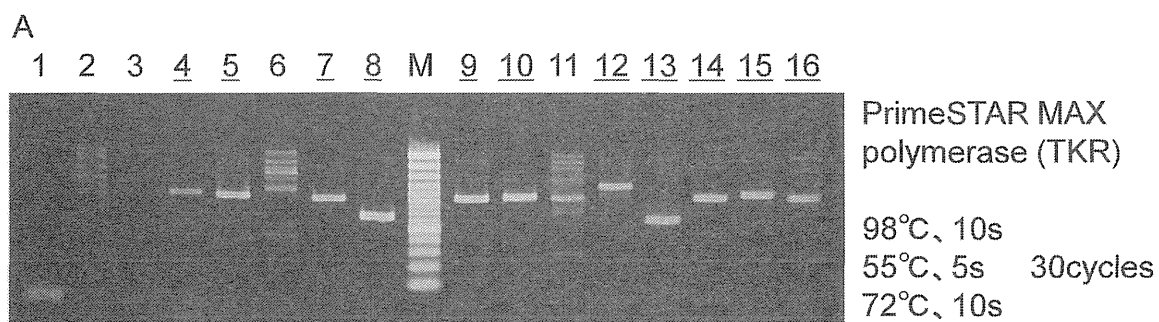
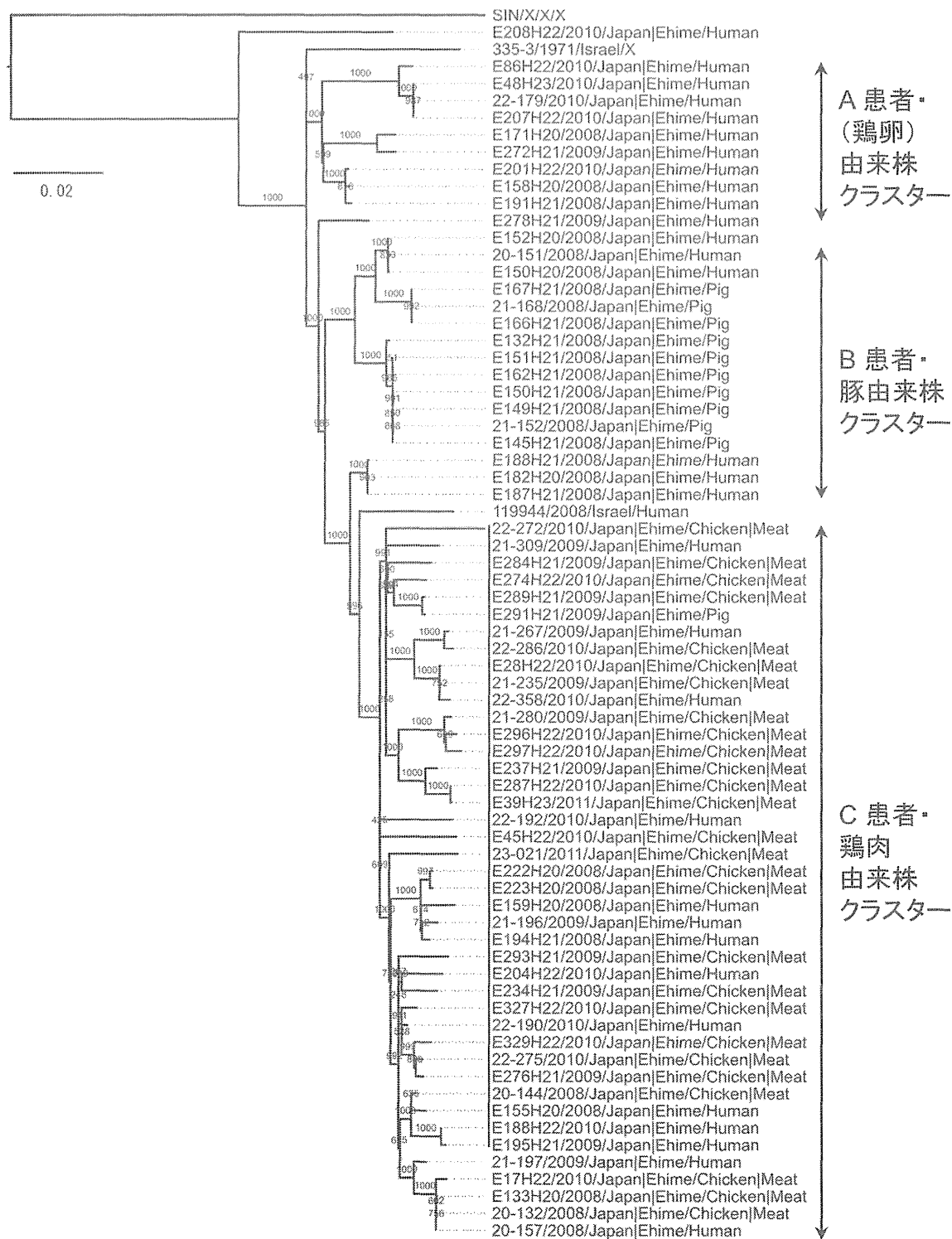
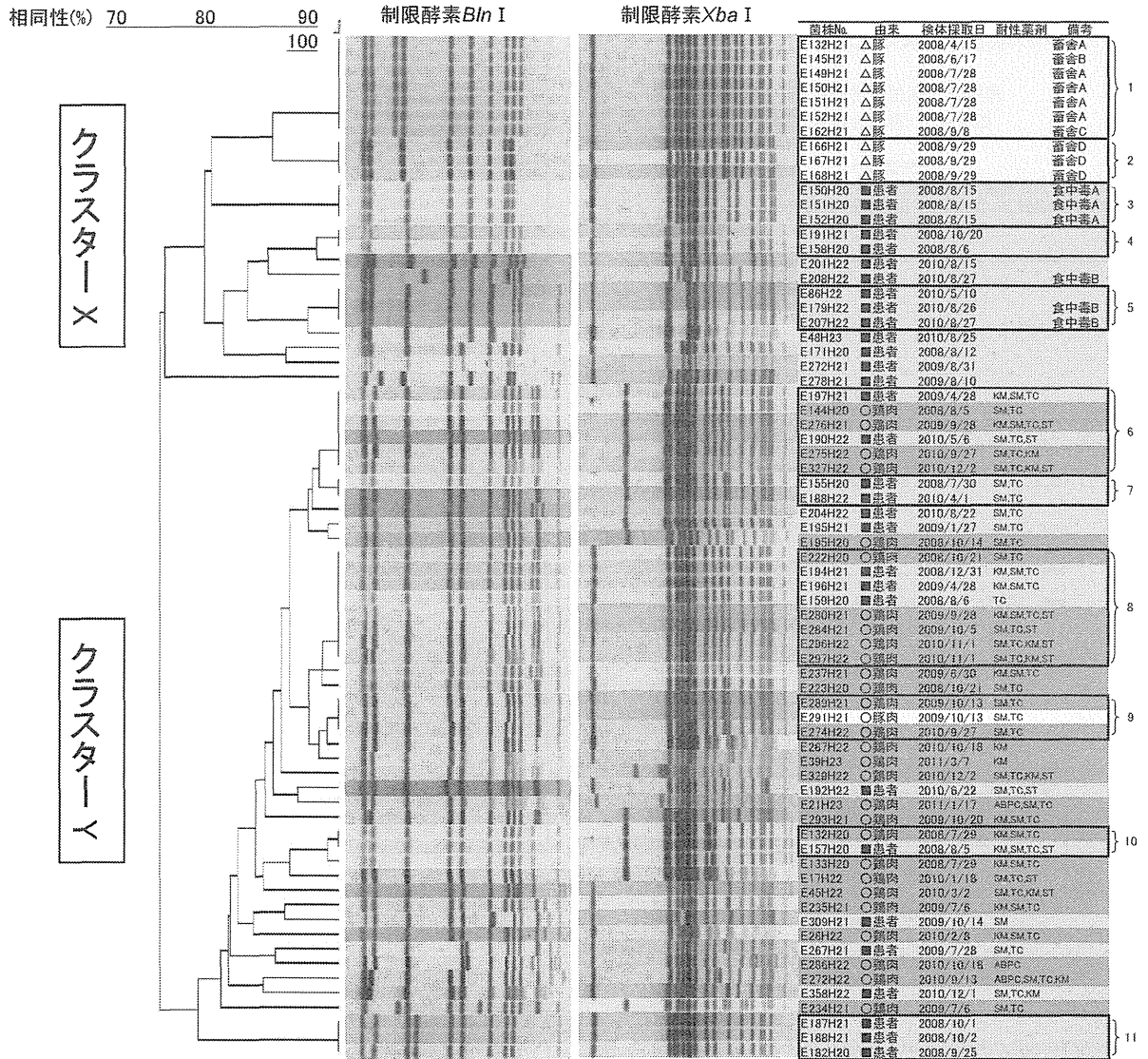


図5 愛媛県内で患者、食材、家畜から分離された*S. Infantis*の次世代シーケンサーを用いたゲノム解析に基づく系統解析



(参考資料) 図6 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)



材料と方法

菌株: *Salmonella* serovar 4,5,12:i:- 株は愛媛県と山口県でそれぞれ分離され、Kauffmann-Whiteの様式で分類された。

薬剤感受性試験: 抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づいて実施した。

DNA塩基配列決定: 愛媛株と山口株のゲノム、および多剤耐性を示した愛媛株のプラスミドを抽出し、ライブラリを作成後、Illumina MiSeqでシーケンスし、得られたリードの *de novo* アセンブリを実施した。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、通常のシーケンサーで決定した。

系統解析: NGSゲノム解析により得られたSNPsを用いて、RAxML (最尤法, bootstrap 1000回)により実施した。

O4型別不能株(EHM21-304)の性状

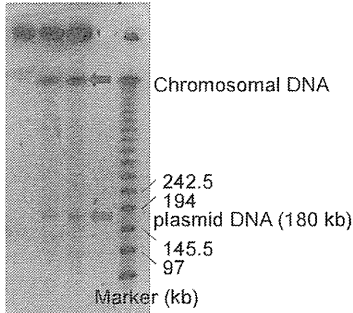
1. O抗原がO4、H抗原の1相が*i*、2相が決定不能の、*Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- (以下、S. 4,5,12:i:-)である。
2. ABPC, CP, SM, GM, SUL, TC, NA, CTX, CAZ の9剤に対して耐性であるESBL (基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ)産生菌である。



NGS解析で、より詳しい性状を明らかにする

S1 nuclease:

0 5 20 (U/plug)



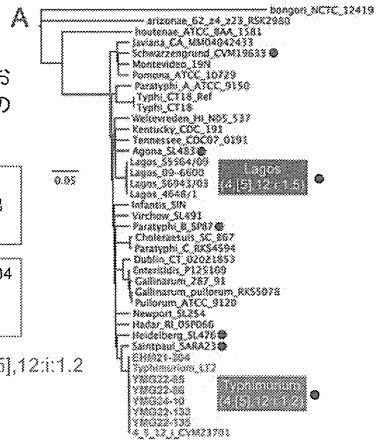
Isolation of chromosomal and plasmid DNA from the *S. enterica* serovar 4,5,12:i:- EHM21-304 strain via PFGE.

Salmonella 4,5,12:i:- 愛媛株および山口株ゲノムの系統解析 (A)

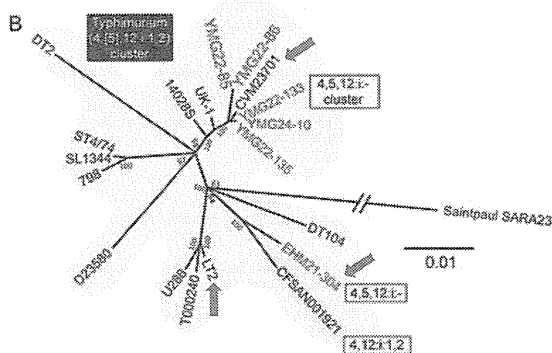
SNPs系統解析
•468,998 SNPs抽出
•RAxML (最尤法)

愛媛株 = EHM21-304
山口株 = YMG
● = O4 group

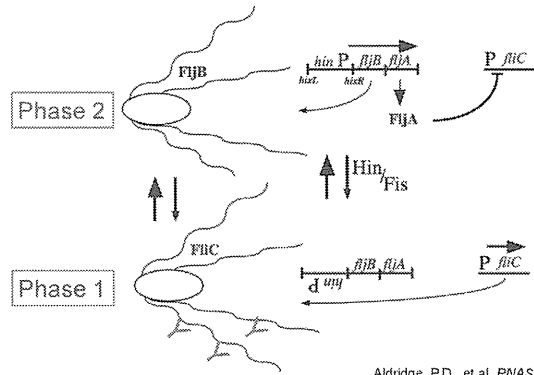
S. Typhimurium 4,[5],12:i:1.2 からの変異



Salmonella 4,5,12:i:- 愛媛株および山口株ゲノムの系統解析(B) ~ *S. Typhimurium* との比較~

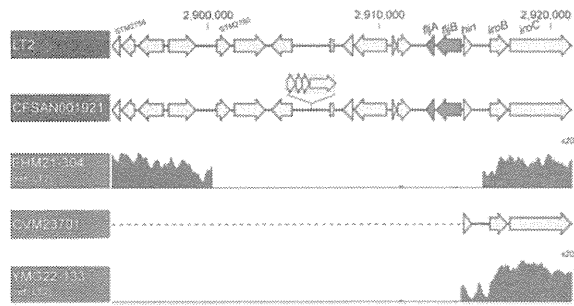


サルモネラ鞭毛抗原の相変異機構

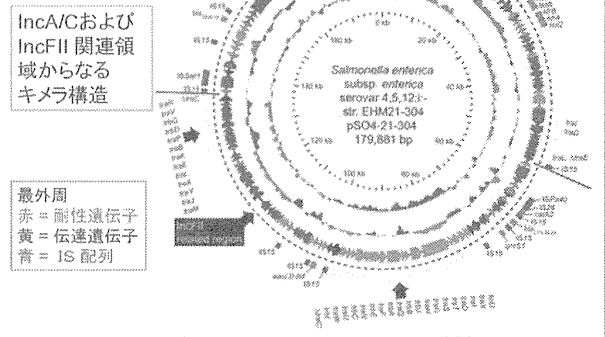


Aldridge, P.D., et al. *PNAS* 2006

愛媛株(EHM)および山口株(YMG)の第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域の欠損



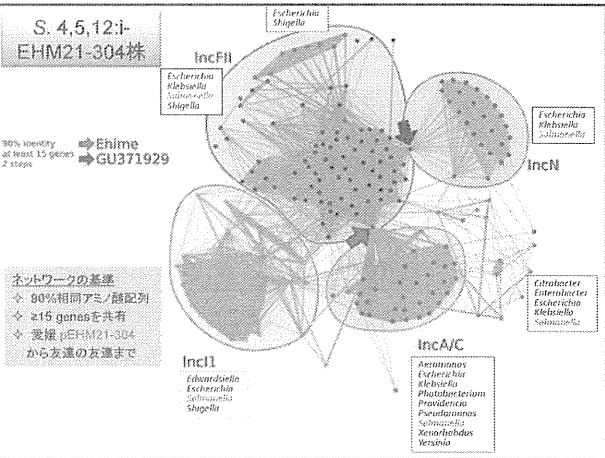
EHM21-304株由来多剤耐性プラスミドの遺伝子構造



EHM21-304株由来プラスミドpSO4-21-304の特徴

IncA/C 関連領域	耐性遺伝子	<i>bla</i> TEM-1b, <i>flo</i> R, <i>tet</i> A/ <i>tet</i> R, <i>str</i> B/ <i>str</i> A, <i>sul</i> 2
	伝達性遺伝子	<i>tra</i> D, <i>tra</i> F, <i>tra</i> G など7個
	IS 配列	IS15, IS26, ISVsa3 など
IncFII 関連領域	耐性遺伝子	<i>cat</i> A, <i>bla</i> CTX-M-55, <i>qnr</i> S1, <i>aac</i> (3)-IId
	伝達性遺伝子	<i>tra</i> R, <i>tra</i> V, <i>tra</i> Y など34個
	IS 配列	IS15, IS26, ISPa40 など

pSO4-21-304は、IncA/CとIncFIIからなるキメラ構造を有し、宿主域の広いIncA/Cと接合伝達能の高いIncFIIの特性を併せ持つことが示唆される。



まとめ

1. NGSゲノム解析による系統解析を実施し、分離S. 4,5,12:i- 株がS. Typhimuriumと近縁であることを明らかにした。
2. 全ゲノム解析が実施されているS. 4,5,12:i- CVM23701株と比較すると、愛媛株は異なるが山口株は近縁で、地域的に異なるS.4,5,12:i-の存在が示された。
3. 第2相H抗原に関する*fli*B(phase 2 flagellin), *fli*A(repressor of phase 1 flagellin gene)等の遺伝子が存在する領域を解析し、愛媛株の遺伝子欠失パターンが、これまで報告のあったものとは異なることを明らかにした。
4. 愛媛株は7種の抗菌剤に耐性を示したが、そのプラスミドは179,881 bpからなる不和合性群Inc A/C repliconで、220個のORFsを含み、そのうち約100個は既知の遺伝子であった。このなかには、CTX-M-55を含む多くの薬剤耐性遺伝子のほか、遺伝子の接合伝達に関わる遺伝子も多く存在した。
5. これらの結果は、NGSゲノム解析がサルモネラ属菌の高精度同定や分子疫学解析において極めて有用であり、感染症対策に重要な分子基盤を提供していることを示している。

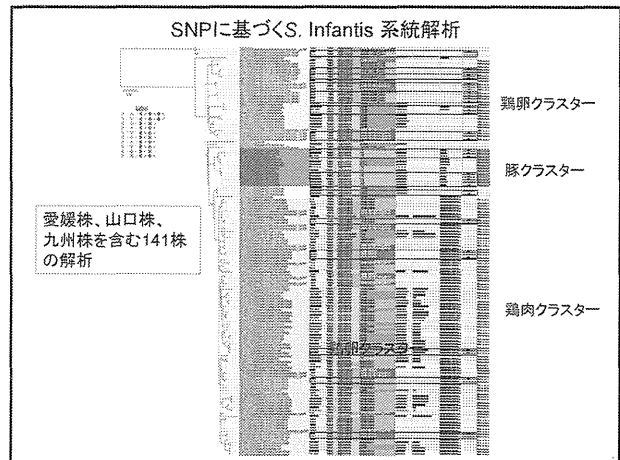
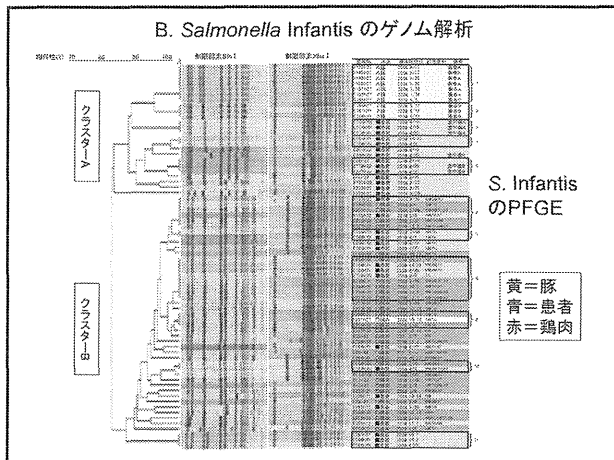
成果発表

学会発表
Salmonella enterica serovar 4:i- 株の次世代シーケンサーによるゲノム解析
 島谷竜哉, 関塚剛史, 山下明史, 黒田 誠, 野村恭晴, 讀 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

Characterization of genomic structures and multidrug resistances of *Salmonella* 4,5,12:i- isolates.
 Tatsuya Karasudani, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Makoto Kuroda, Komei Shirabe, Keiko 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)

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 遼, 有川健太郎, 松渡川圭次, 鈴木匡弘, 久保田寛顕, 讀 恒明
 日本細菌学雑誌 印刷中

Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i- isolates from Japan reveals a notable deletion in the *fliAB* operon and an IncA/C plasmid encoding CTX-M-55 extended-spectrum β -lactamase
 Tatsuya Karasudani, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Makoto Kuroda, Komei Shirabe, Keiko Semba, Chizuko Kimura, Yasuharu Nomura, Hitoshi Miyamoto and Hiroto Shinomiya
 Submitted



SNP系統解析から示唆されること

全体の比較

- ◆ 薬剤耐性株は、1つのクラスターに含まれる。
- ◆ 豚由来株は、1つのクラスターを形成し、畜舎でまとまっている傾向。
- ◆ 鶏卵由来株と鶏肉由来株は、それぞれクラスターを形成する傾向。

細かな菌株同士の比較

- 20-157 (ヒト由来) および 20-132 (鶏肉由来) のSNVが一致。20-132株に非常に近い株に汚染された鶏肉が原因食の可能性高い
- 22-286 (鶏肉由来) および 21-267 (ヒト由来) が近い系統で、22-286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。
- E28H22 (鶏肉由来)、21-235 (鶏肉由来) および 22-358 (ヒト由来) が近い系統で、E28H22 および 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。

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)

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
Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M.	Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan.	J Infect Dis.	In press	2015
Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H.	Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C.	Sci Rep.	2;5:8185.	2015
Kawase J, Kurosaki M, Kawakami Y, Kashimoto T, Tsunomori Y, Sato K, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Etoh Y, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K.	Comparison of two methods of bacterial DNA extraction from human fecal samples contaminated with <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i>	Jpn J Infect Dis.	67(6):441-6.	2014