

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おい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  $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* が保有する *bla*<sub>CTX-M</sub> 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

## Ⅱ 分担研究報告書

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）  
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）

研究分担者

猿木 信裕（群馬県衛生環境研究所）

研究協力者

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）

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」に不可欠である。最近の遺伝子解析による病原体を特定する技術は急速に発展しており、特に、次世代シーケンサー（NGS）による塩基配列の網羅的解析は、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）と比較して、大容量の情報を得ることが可能である。本研究では、NGS を活用し、広域的に活用できるデータベース構築のために、カンピロバクター属菌の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。一方、PFGE パターン解析による分類は、泳動像の識別が困難な場合や制限酵素による影響を受けることから、疫学解析に限界があると考えられた。今後は、様々な事例による株を加えることによって、広域的に活用できるデータベースを構築することが重要であると考えられた。また、NGS により得られたデータを集積することによって、質の高いデータベースの構築が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

食中毒が発生した場合、発生原因に関する情報を迅速かつ正確に把握することが必要である。

これまで食品由来病原微生物の特定は、培養同定法及び生化学的性状によって行われてきた。また、食中毒菌の分子疫学解析には、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法が行われてきたが、病原体ゲノム解析を活用することにより、発生源の特定や被害拡大の抑制につながると期待されている。

最近の遺伝子解析により病原体を特定する

技術は急速に発展しており、特に、次世代シーケンサー（NGS）による塩基配列の網羅的解析は、PFGE に比較して大容量の情報を得ることが可能である。

本研究では、昨年度に引き続き食中毒由来病原微生物として、カンピロバクターを対象とした NGS 解析の有用性について、PFGE との比較・検討を行った。

B. 研究方法

対象は *Campylobacter jejuni* とし、菌株は当研究所において平成 20 年～27 年に発生した食中

毒事件において採取、保存されていた 16 株および平成 27 年に市販鶏肉から採取された 2 株を用いた。

PFGE は、菌株を制限酵素 *Sma* I、*Kpn* I で処理した後、遺伝子多型解析を実施した。

また、NGS では、菌体を増菌培養後、遠心により集菌し Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit<sup>®</sup> (QIAGEN) によりゲノム DNA を抽出し、Qubit (Invitrogen) を用いて定量した。次に Nextera XT DNA sample prep kit<sup>®</sup> (Illumina) によりライブラリーを作成した。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、精製した後 DNA 量が確保できた 3 検体 (表 1) に対し、Miseq Reagent Kit v3<sup>®</sup> (600cycle) (Illumina) を使用して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に解析を依頼した。

### C. 研究結果

得られた遺伝子をアセンブリし、Clustal W2 を用いた NJ 法による系統樹解析を行った結果、3 株の食中毒由来 *Campylobacter jejuni* は異なるクラスターに属していた (図 1)。また、昨年度実施した牛由来株 *Campylobacter jejuni* (平成 25 年採取 19 株) との間での一致みられなかったが、平成 23 年に採取された食中毒由来株 1 株と牛由来株 *Campylobacter jejuni* 3 株との塩基配列が近似であった (図 1 緑色枠内)。これらは、PFGE による解析においても、類似した泳動像が得られていた (図 2)。

### D. 考察

系統解析の結果 (図 1) から、全体的には菌株の由来ごとにクラスターを形成する傾向があった。一方、食中毒由来 1 株と牛由来 3 株に類似性がみられたが、この食中毒事件は鶏肉が原因であると報告され、牛肉・牛内臓等の喫食は、確認できなかったが、無関係な菌株においても類似性を有する例もあると思われた。

また、PFGE による解析においては、泳動像

の歪みや不明瞭な部分があり、一部の菌株においては、制限酵素 *Sma* I あるいは *Kpn* I 処理後にバンドが検出できない例もあり、解析が困難であった。NGS にて塩基配列が近似であった 4 株では、PFGE 泳動像においても、同分子量と推察されるバンドに「ずれ」が生じており、それが解析結果にも影響を与えていた (図 2)。これらのことから、PFGE による解析には限界があると思われた。

しかしながら NGS においても、今回の検査で増幅・精製後に塩基配列の読み取りが可能であった検体は、18 検体中 3 検体のみで、さらなる精製方法の技術向上が必要と思われた。

今回、NGS にて牛由来株と食中毒由来株を比較したが、さらに多様な株を加えることによって、広域的に活用できるデータベースを構築することが重要と考えられる。

### E. 結論

本研究において、NGS を活用しカンピロバクターの詳細な解析を行うことにより、詳細なデータを得ることであった。これらの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必要がある。

したがって、今後も多くの食中毒菌について、データベース構築のための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 VI, 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

なし。

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



## I. その他

### 謝辞

本研究の遂行にあたり、知識や技術的な御協

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ご心より感謝申し上げます。

表 1. 使用菌株

No.	採取年月		由来
Cj-Gunma-Human-3	H21.6	食中毒	焼き鳥
Cj-Gunma-Human-4	H21.9	食中毒	牛生レバー、焼き鳥
Cj-Gunma-Human-16	H23.9	食中毒	鶏料理

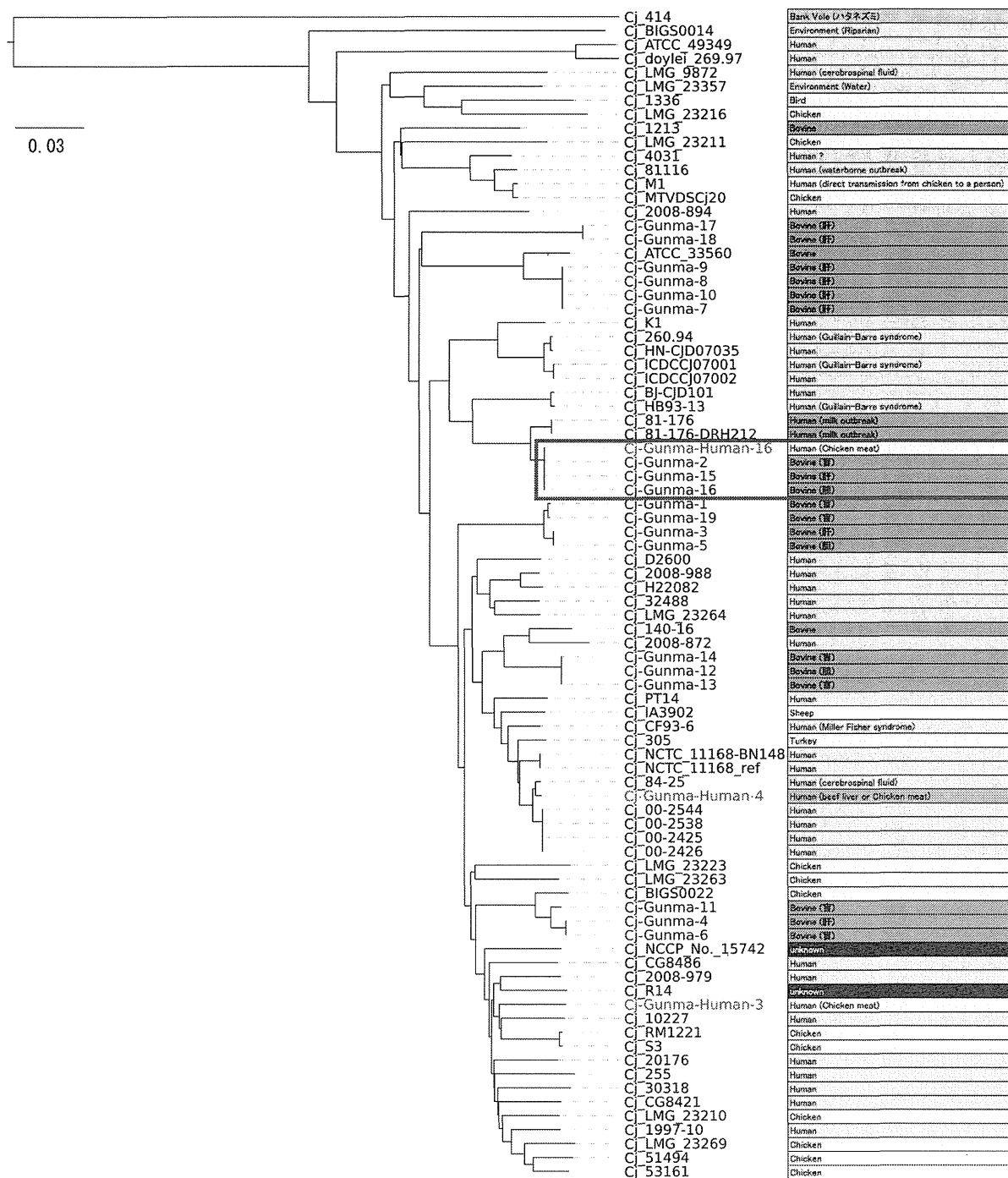
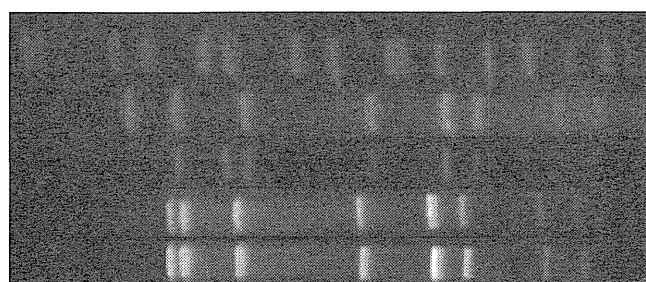


図1. NGS による解析結果



マーカー

Cj-Gunma-Human-16

Cj-Gunma-2

Cj-Gunma-15

Cj-Gunma-16

図2. 近似4株の PFGE 泳動像

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）  
研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）  
研究協力者 磯部 順子（富山県衛生研究所）  
研究表力者 範本 志保（富山県衛生研究所）  
研究協力者 木全 恵子（富山県衛生研究所）  
研究協力者 三井 千恵子（富山県衛生研究所）  
研究協力者 金谷 潤一（富山県衛生研究所）

**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、特に地方衛生研究所（地衛研）での活用方法について、検討してきた。最終年度は、食中毒原因菌として重要である、*Salmonella Infantis* 77 株のゲノム配列を取得し、比較ゲノム解析手法を用いて、遺伝的背景と保有遺伝子の状況の相関を調査した。しかし、遺伝的背景と保有遺伝子の関係は明らかにならなかった。また、食中毒事例で分離された *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い、53 遺伝子が検出された。このように NGS の有用性は明らかになってきたが、得られた配列は、ドラフト配列であり、その活用法について注意が必要である。このドラフト配列を定量的に理解するために、既に完全配列が明らかになっている株を解析して、ドラフト配列の定量的な解析を試みた。その結果、コーディング領域の約 85% が一致した。以上の解析は、普段使い慣れた Windows 環境の利用を念頭に入れて実施した。このことは高い専門性が必要とされていたゲノム解析手法が、地衛研でも十分活用できるということを示しており、さらに公衆衛生学分野での活用に応用できると思われる。

#### 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食中毒の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、原因がこれまで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。

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。

研究班最終の今年度は、昨年度より引き続き課題である、サルモネラ属菌のひとつである *S. Infantis* について、複数株を対象に SNP 抽出を行い、その有用性を評価した。NGS より得られたこれらのゲノム配列は、ドラフト配列であるが、分子疫学マーカーとして SNP の有用性と分離菌の病原性に関する解析を試みたので報告する。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。

さらに、食中毒事例で分離された *Campylobacter*

*lari* の起因菌としての特徴を、比較ゲノム生物学的な視点から考察したので報告する。最後に MiSeq で得られる「ドラフト配列」について定量的に考察するため、配列既知の細菌を解析して、このドラフトゲノム配列について、考察を加えた。今後、地衛研がどのように活用していくのか、使いなれた Windows PC 環境でどこまでできるのか、検討したので合わせて報告する。

## B. 研究方法

### B-1. 供試菌株

*S. Infantis* 株は、富山県で 2000 年～2013 年にかけて分離された株で、うち 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、いずれも PFGE パターンは一致していた。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。

### B-2. 供試菌のゲノム DNA の抽出と解析

供試菌は、*S. Infantis* 株と O157 堺株については、トリプチケースソイ寒天培地 (TSA)、*C. lari* 株については、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) を用いて、製品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 ライブラリーの調製と MiSeq による解析

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) を用いて、調製した (これを「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 (ミリポア) で、溶出後、溶出液を濃縮した。KAPA Library Quantification Kits を用いて定量後、MiSeq Reagent Kit, V3 600PE を用いて MiSeq から塩基配列リードを得た。

### 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、アセンブルを行なった。

アセンブルしたデータを RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) を使用して、自動注釈 (アノテーション) を行い、遺伝子の機能単位である、蛋白質コーディング領域 (CDS) 等の情報を得た。また、比較ゲノム学手法である Blast atlas 解析は、Gview Server (<https://server.gview.ca/>) を利用した。病原性因子の探索は、Virulence Searcher ([http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pese/virfactfind\\_small.html](http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pese/virfactfind_small.html)) を利用した。

blast 検索は、公的データベースを利用する場合は、DDBJ の Web サービスを、In-house データベースを利用する場合は、NCBI blast+ を Windows PC にインストールして実施した。

*S. Infantis* 77 株のゲノム配列から得られた CDS の比較には、RAST により得た CDS 情報をデータベースソフトである、File Maker Pro (ファイルメーカー) を用いて、すべての CDS をデータベース化し、ソフト上で比較した。

(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. *Salmonella Infantis* のゲノム解析

#### C-1-1. *S. Infantis* 77 株の MiSeq による解析データの品質評価

*S. Infantis* 77 株を MiSeq で解析した。取得した配列は、CLC でアセンブルを実施した。得られた塩基配列の品質を評価するためにその概要を表 1 に示した。今回 MiSeq から得られた配列は、カバー率 (全リード塩基数/コンティグ長の塩基数)、最大 169、最小 33、平均 100 であった。アセンブル後のコンティグ数は、最大 567、最小 64、平均 138 となり、得られた情報としては、若干、バラツキがあるものの、これ以降の解析に耐えうる値であると判断した。

#### C-1-2. *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、最終的に、タンパク質をコードする領域のみとして、104,586 塩基の SNP を得た。これらの配列から系統樹を作成した(図 1、2)。この結果、臨床分離株 17 株からなる大きなクラスター (C5) 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(IC-1)。

### C-1-3. 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

図 2 の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た。

方法としては、解析するクラスター内の各 *S. Infantis* ゲノム配列について、アセンブル後、RAST により自動アノテーションを行った。そこで、得られたすべての Genbank ファイル(拡張子 =gbk) を用いて、クラスター毎に GViewServer の Pangenome analysis を実施し、そのクラスター全体で検出された CDS を統合した Pangenome 配列を得た。今回の解析では、クラスター C5 (17 株)、クラスター IC-1 (49 株)、及び IC-1 に含まれる食品由来株 (36 株) の Pangenome 配列を得た。これら 3 つの Pangenome 配列の gbk ファイルを作成し、GViewServer の Signature Analysis を選択し、クラスター C5 と IC-1 にともに存在し、IC-1 の食品由来株に存在しない、臨床分離株に特異的な CDS の検出を試みた。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(表 2)。

この 56 遺伝子が、臨床分離株特異的な遺伝子かどうかを検証した。方法は、今回、配列解析した *S. Infantis* 77 株のアセンブル後の配列を、RAST で自動アノテーションを行い、得られた CDS の塩基配列の fasta ファイルのデータをすべて統合した、*S. Infantis* 77 株の CDS データベースを作成した。次に、この CDS データベースに対して、先の 56 遺伝子をクエリー配列として、blast 検索を実施した。その結果を図 3 に示した。この図は、系統樹に示された株について、56 遺伝子の有無を示したマトリックスとして示した。このマトリックスの結果からは、臨床分離株特異的な遺伝子の特定には至らなかった。

## 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。

MiSeq からの解析リードのアセンブルした後の統計数字は、表 3 に示した。今回の解析では、コンティグ数 38、カバー率約 400、ゲノムサイズ 1,617,445 塩基のドラフト配列を得た。

### 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 の多型及びファ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. 病原性遺伝子の検索

病原性遺伝子の検索は、Virulence Searcher を用いた。Web から、得られた *C. lari* Toyama07 のドラフト配列をアップロードし、解析してところ、53 遺伝子(図 7) 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のは *C. jejuni* である。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 について、今回の *C. lari* Toyama07 株では、CadF, MOMP, CdtABC および CiaB がゲノムデータから検出された(表 4)。

### C-3. 既知ゲノム解析株の MiSeq から得られたゲノム配列と報告配列との比較

O157 堺株のゲノム配列を MiSeq で解析した。



MiSeq の 2 回のランにより得られた解析リードを個別にアセンブルしたコンティグ SK01, SK02, 及びこの 2 つのランデータを統合したコンティグ SK12 を得た。これらのアセンブル後の統計データを表 5 に示した。この結果、SK01, SK02, および SK12 のシーケンスのカバー率は、それぞれ 43.5、50.9、及び 94.1 であり、MiSeq より得られた解析リードの品質を評価することが出来るこれらの統計データから、ドラフト配列の定量的な解析に耐えうる品質であると判断した。そこで、これらのコンティグを用いて、蛋白コーディング領域 (CDS) を抽出し、既知配列と比較した。

O157 堺株については、既にその完全なゲノム配列が明らかにされており、詳細な解析結果が報告されている (Hayashi, T., et al. *DNA Res.*, 8:11, 2001)。報告では、O157 堺株は、2 つのプラスミドを保有しているため、今回解析した配列中には、プラスミド由来の配列が当然含まれることになる。そこで、今回決定した SK01, SK02, および SK12 は、それぞれコンティグ数は、203, 181, および 182 であり (表 6)、そのうち、スキヤフォールド領域は (ペアエンドで解析していることから、配列が不明のまま、長さのみ情報としたリードが存在しているコンティグのこと)、それぞれ 17, 19, および 20 か所検出された (データ未提示)。先の論文では、大きさ 150 塩基対以上の CDS の数は、5,447 個として報告されているが、今回、MiSeq で得られた解析リードのアノテーションと比較できるように、O157 堺株の既知である完全ゲノム配列を改めて、RAST によるアノテーション情報を得たところ、プラスミドの CDS と合わせると、総計で、5,310 個の CDS が検出された (これを以後、「Sakai」と呼ぶ)。この値は、Hayashi らの報告数より若干少ない。この差は、RAST の CDS の抽出法の問題もあるが、アノテーションについては、最終的には、ひとつひとつの CDS を詳細に検討することが必要となる。しかし、今回、ほぼ、同じ数字であること、完全な配列は得ていないことから、この後は、RAST で得られた 5,310 の CDS をそのまま用いることとした。そして、MiSeq により得られた O157 堺株の配列である SK01, SK02 および SK12 も同じく RAST を用いて、アノテーションを行い、比較した。

得られた CDS 情報は、File Maker 上で比較した。実際には、Sakai と SK01, SK02 および SK12 それぞれ比較し、共通に存在する CDS、あるいはどちらか一方にのみ存在する CDS を数え、その結果を図 7 に示した。

解析リードのカバー率が約 50 と 100 で比較したところ、コンティグ数、Web サービスによる自動アノテーションの結果から、カバレッジ 50 程度でも充分、ドラフト配列として、活用できることが

示された。また、報告された配列と MiSeq から得られた配列から、CDS を比較したところ、83%~87%であった。

#### D. 考察

NGS から出力される解析配列は、大量であり、従って、ゲノム解析は、情報処理を適切に行うことが要求される。この大量のゲノム情報の解析技術のほとんどが、我々が日常的に利用している WindowsPC 環境ではないので、高い専門性が要求されることになり、多くは情報処理の専門家が担当していることが多い。これは地衛研で、NGS 技術を検査や感染症、食中毒の原因究明のひとつの方法として活用する場合、大きな壁となる。しかし、最近、Windows 環境も新しい OS の出現や、これまで Unix, Linux や MacOS の利用を前提としていたアプリケーションに、Windows 環境でも利用できるソフトが少しずつ増えているのも事実である。従って、最終年である今年度は、情報処理の専門家でない、研究者が Windows 環境でのゲノム解析がどこまで出来るか検討することも目的とした。

S.*Infantis* 77 株の解析については、臨床分離株と食品分離株を含めて、SNP を抽出し、SNP による系統関係を明らかにした。その結果、臨床分離株 17 株の特徴的なクラスターが検出された。この原因としては、我々が選択した食品由来株は、市販の鶏肉がほとんどであり、分離元としては偏っており、今回、検出された臨床分離株由来のクラスターの感染源は、鶏肉ではない別な感染源の可能性が高いと思われた。

さらに、S.*Infantis* の人に対する病原性に関する情報を今回の 77 株を用いて、抽出できるかどうかについて検討した。臨床分離株と食品分離株のゲノム配列上の遺伝子を比較 (GViewSever) し、臨床株に特異的な候補遺伝子として、56 遺伝子を選択した (表 2)。今回、この 56 遺伝子の評価については、S.*Infantis* 77 株から得られた全 CDS をデータベース化し、その保有状況を調べることで実施した。もし、臨床分離株特異的な遺伝子であれば、その保有分布については、臨床分離株にのみ検出されるはずである。しかし、今回、そのような結果にはならなかった (図 3)。今後、改めて、抽出方法等を検討し、評価することが必要である。

食中毒事例で分離された *C.lari* のゲノム解析に関しては、病原遺伝子を検出する Web サービスを利用することが出来たので、ある程度の品質の配列リードが得られれば、簡単に病原遺伝子のスクリーニングは可能となる。そして、その細菌の病原性遺伝子が検出されれば、起因菌判断が難しいときに、起因菌とするかどうかの判断に役に立つ

情報になると思われる。今回の結果では、*C.lari* のこれまでの報告と矛盾しない結果であった。しかし、一部で *C.jejuni* で保有している因子が *C.lari* で検出できなかったことから、このことが、所謂「ドラフト配列」を用いた結果、見逃しているのか、あるいは、*C.lari* による病態が比較的 *C.jejuni* よりも軽症傾向にあることと関連があるのか、興味もたれる。

今年度の *S.Infantis* 77 株のゲノム解析と食中毒事例で分離された *C.lari* のゲノム解析は、MiSeq で取得したリードのみで実施したもので、完全な配列でない

通常、完全なゲノム配列を得るためには、ドラフト配列を元にして、「finishing」という工程が必要であり、通常は、膨大なコストと時間が必要となる。その意味で、地衛研での finishing 作業は、事実上、不可能であり、ドラフト配列を利用した活用方法が主流となると思われる。その意味で、SNP による系統解析は十分利用価値が高いことは、既にこれまでの検討から明らかになっている。しかし、病原性に関する検討には、完全ゲノム配列が理想ではあるが、「ドラフト配列」でもある程度は可能であることは、先の *C.lari* のゲノム解析でも示唆されている。従って、この「ドラフト配列」がどの程度のものであるか、定量的に理解することを試みた。その結果は、図 7 に示した。既に完全なゲノム配列が報告されている腸管出血性大腸菌 O157 堺株を MiSeq で解析し、報告配列、MiSeq で取得した配列を比較することで「ドラフト配列」の評価を試みた。その結果、この数字をどう考えるかについては、Hayashi らの論文の報告と較べてみると、O157 堺株の全 CDS は 5,447 であり、そのうち、大腸菌 K-12 のコアゲノムとしては、3,729 個であり、全体の 70% を占めており、残りは、株特異的な遺伝子となり、病原性に関与する遺伝子が含まれると推定される。このようなことから、83%~87% という数字が示す、一致度は、MiSeq の解析結果としては順当なところであろうと推定された。

## 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。

また、Windows PC 環境においても、インターネ

ット環境の整備と、NGS 解析が出来るソフトウェアの導入、Windows 環境で動作するソフトウェアの導入、Web サービスの利用で、専門性の高い Linux 等を用いなくとも、充分解析が可能であることが示された。

さらに、公的データベースで実施している NGS データの解析支援プログラムを利用することにより、予算的に厳しくても、インターネット環境があれば、Windows 環境でも安価に NGS 解析が出来る可能性がある。このような状況から、地衛研において、MiSeq 等の NGS を所持に関係なく、膨大な NGS データを利用できる環境が整いつつあるなかで、NGS の活用について、検討することは、それほど高いハードルではないと考えられる。

## 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

- ① 鯨肉の刺身を原因とする食中毒事例から分離されたカンピロバクター・ラリのゲノム解析と病原因子の検出  
磯部順子、金谷潤一、木全恵子、三井千恵子、範本志保、佐多徹太郎、綿引正則  
第 49 回腸炎ビブリオシンポジウム (東京都渋谷区、平成 27 年 10 月 16 日)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## I. 参考資料

以下、巻末に参考資料として添付した。

### 1. Windows PC 環境における有用な NGS データ解析用ソフト、アプリケーションのリスト

ここで示したソフト等は、一例を示しただけであり、他にも多くのソフトがある。予算や解析目的に沿ったソフトを導入し、評価しながら使うことが重要である。

### 2. Windows PC で活用することが有用と思われるソフトの導入例 (チュートリアル)

参考まで、ゲノム解析のために使用頻度が高い、あるいは、汎用性の高いソフトを導入のためのチュートリアルを参考資料として紹介する。ソフトの正式な使い方は、それぞれ入手して確認していただきたいが、ここでは、Windows PC