

NGS解析のコスト(計算例)

24細菌分離株、カバー率、>100とし、均一で高品質のデータを得るために、MiSeqRunを2回実施を前提として、1検体(=1細菌株)当たりのコストを試算した。

試薬キット名	規格	納入価	1検体(株)当り	24検体当り
Qiagen PureGene Yeast/Bact Kit B	200mL	¥35,100	¥176 (1mL)	¥4,224
Qubit dsDNA HS Assay Kit	500回	¥30,000	¥60	¥3,200 (2回分+α)
Qubit Assay Tube	500回	¥5,900	¥12	¥624
Nextera XT DNA Library Kit	24回分	¥103,680	¥4,320	¥51,840 (1/2 scale)
Wizard SV Gel and PCR Clean-up System	250回分	¥33,372	¥134	¥3,204
KAPA Library Quantification Kit	500回分	¥135,000	¥270	¥13,500 (50回分)
MiSeq reagent Kit v3 600PE		¥270,000		¥540,000 (2 runs)
			合計 1検体当り	¥616,592 ¥25,691

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 (3)

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
	園部 祥代	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
	菅 美樹	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
	横山 栄二	千葉県衛生研究所
	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

サルモネラ属菌による食中毒・感染性胃腸炎の起因菌として、*Salmonella Infantis* は上位を占める確かな感染制御が望まれる。愛媛県内で分離された、患者由来株 31 株、食材（鶏肉、豚肉）由来株 29 株、家畜（豚）由来株 10 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(NGS)で決定し、詳細な系統解析を実施した。その結果、3つの主要なクラスター、クラスター1（患者株のみ）、クラスター3（患者株と動物由来株）、クラスター5（患者株と食材由来株）、が得られた。これらのクラスター内で、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、感染経路を示唆する。なかでも、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。また、クラスター1は、愛媛株では患者株のみであったが、公開されている *S. Infantis* のゲノム情報と比較すると、他の都道府県で分離された鶏卵由来株と同一のクラスターを形成した。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）は全てクラスター5に属していた。これらの薬剤耐性株はメガプラスミドの遺伝子マーカーである *irp2* 遺伝子を保有していたことから、本プラスミド上に薬剤耐性遺伝子が存在することが示唆された。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。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。我々は、患者、食材、家畜由来株の血清型分類、薬剤感受性試験、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析を実施してきた³⁾。分離株の中で、*Salmonella* *Infantis*(*S. Infantis*)は、患者のみならず食材や家畜からも高率に分離されている。また、*S. Infantis* は食中毒・感染性胃腸炎の原因菌として、*S. Enteritidis* に次ぐ血清型である(2012年第2位、2013年第3位、2014年第2位、2015年第4位)⁴⁾。

近年、次世代シーケンサー(NGS)の開発により、短時間の全ゲノム解析が可能になり、より詳細な分子疫学解析ができるようになった。今回、我々は、患者、食材(鶏肉、豚肉)、家畜(豚)から分離された *S. Infantis* の全ゲノム解析を基に分子系統解析を実施し、分離株間の分子疫学的な関連性を検討したので報告する。

B 材料と方法

1 サルモネラ菌株

愛媛県内で2008年～2010年に、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。家畜由来株として、と畜場に搬入された豚(盲腸便、皮剥前腎・腹部)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、*S. Infantis*を同定した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 の抽出

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 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⁵⁾。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⁶⁾。得られた *S. Infantis* のゲノム配列から SNV(single nucleotide variation)を抽出し、RAxML (最尤

法)、bootstrap 1000回で系統樹を作製し、クラスター解析を実施した。

5 *S. Infantis* 株の *irp2* 遺伝子の検出

S. Infantis 株のメガプラスミド(megaplasmid)保有を検出するため、本プラスミドの遺伝子マーカーである *irp2* 遺伝子の特異プライマー(Forward primer, 5'-AAGGATTCGCTGTTACCGGAC-3'; Reverse primer, 5'-TCGTCGGGCCAGCGTTTCTTCT-3')を用いて PCR 法にて検出した^{7,8,9)}。

(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 *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 に基づき、系統解析を実施し(図1)、大きく5つのクラスターに分かれた。クラスター1は全て患者由来株9株であった。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株を含んでいた。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。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。

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1の E48H23, 22-179, E207H22, クラスター3の H152H20~E150H20, E151H21~E145H21, ク

ラスター5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。

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(図2)。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300kbのメガプラスミド(megaplasmid)が同定され、本プラスミドが薬剤耐性にも関与することが明らかにされつつある^{8,10)}。今回の解析で、薬剤耐性を示す株がクラスター6にのみ認められ、明瞭な分布を示したことから(図2)、今回用いた *S. Infantis* 70株のメガプラスミド保有を調べた。このメガプラスミドの遺伝子マーカーである *irp2*(図3)に特異的なプライマーを用いて PCR 法で検出したところ、薬剤耐性を示した *S. Infantis* 株は全て *irp2* 陽性で、メガプラスミドを保有することが示唆された(表1)。

D 考察

愛媛県において感染性胃腸炎患者、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。これらの分離株のうち、*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1)。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5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1 に属する患者由来株 9 株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 (図 2)。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1 の患者由来株 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3 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、豚由来株にヒトの感染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¹¹⁾、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) 病原体検出情報 サルモネラ血清型割合、2012 ~ 2016 年 <http://www0.nih.go.jp/niid/idsc/iasr/Byogentai/Pdf/data48j.pdf>
- 5) Kuroda M et al., Characterization of quaspecies 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.
- 6) 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.
- 7) Karch H et al., A genomic island, termed

high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect Immun.* (1999) 67(11):5994-6001.

- 8) Aviv G et al., A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environ Microbiol.* (2014) 16(4):977-994.
- 9) Yokoyama E et al., Phylogenetic and population genetic analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis strains isolated in Japan using whole genome sequence data. *Infect Genet Evol.* (2014) 27:62-68.
- 10) Franco A et al., Emergence of a clonal lineage of multidrug-resistant ESBL-producing *Salmonella* Infantis transmitted from broilers and broiler meat to humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS One.* (2015)10(12):e0144802
- 11) Octavia S et al., Delineating community outbreaks of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using whole genome sequencing: insight 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

- 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 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* が保有する *bla*_{CTX-M} 型別に関する検討. *感染症学雑誌* 印刷中

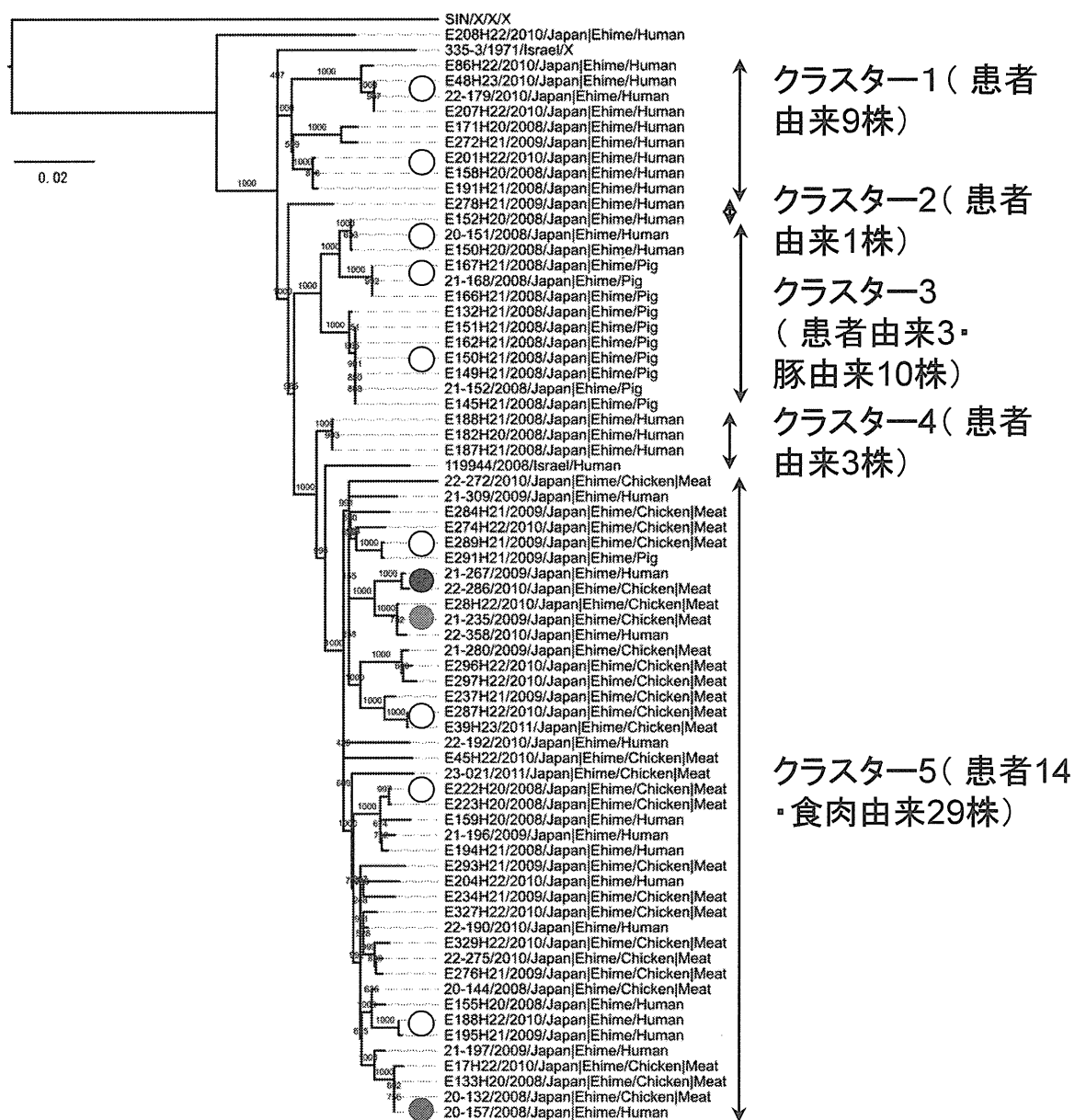
2. 学会発表

- 1) 仙波敬子, 園部祥代, 木村俊也, 大倉敏裕, 鳥谷竜哉, 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 (予定)

H 知的財産権の出願・登録状況

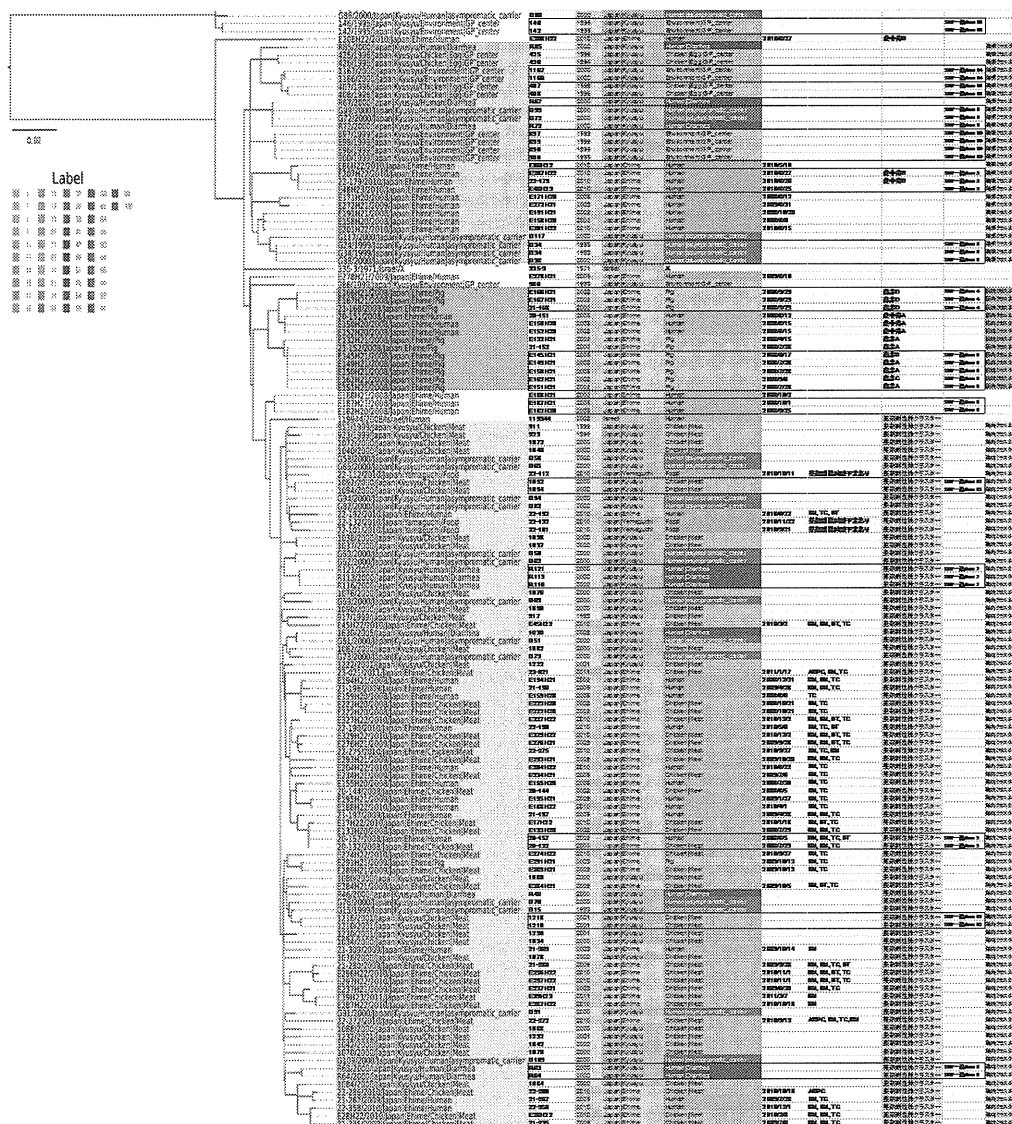
なし

図1. S. Infantis愛媛70株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



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10対以上見出された(○)。特にクラスタ-5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。

図2. 愛媛株及び他都道府県株を含む141株の解析



鶏卵クラスター

豚クラスター

鶏肉クラスター

NGS解析のクラスター1に属する愛媛の9株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(上図)。

この関係が示されたことは、クラスター1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、他の都道府県のヒト由来株、鶏肉由来株も愛媛株のクラスター5と同じクラスターを形成し、薬剤耐性菌は全てこのクラスターに属していた。

图3

Environ Microbiol 16: 977-994, 2013

Aviv G et al., A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain.

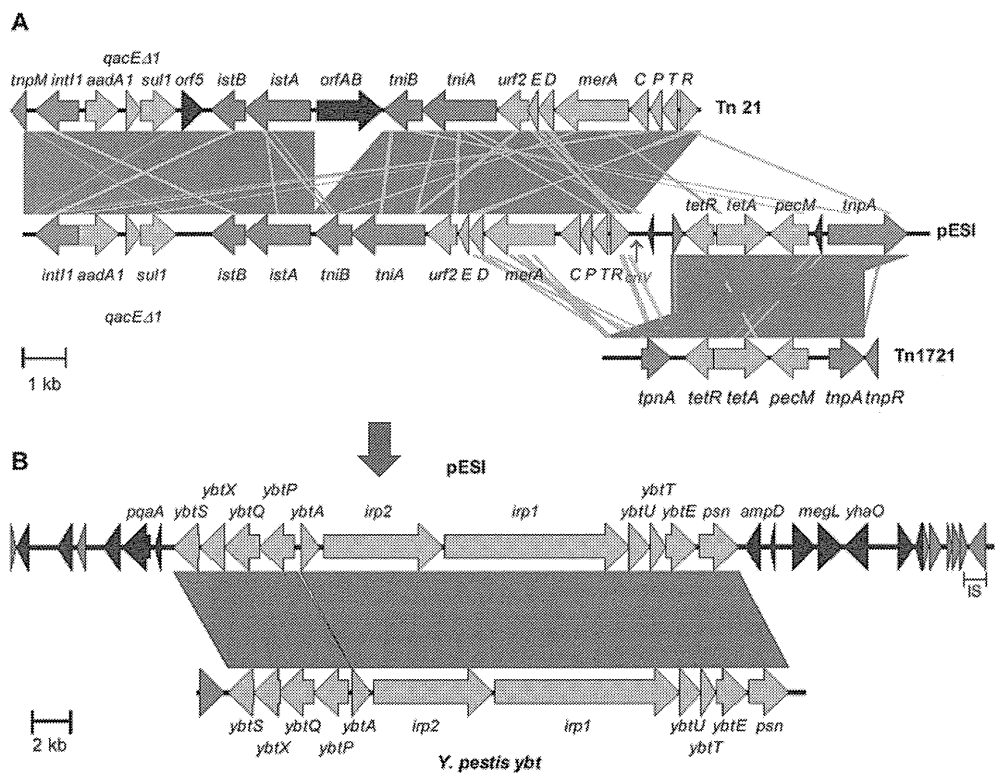


表1. *S. Infantis* 株における *irp2* 遺伝子保有と薬剤耐性との相関

NGS解析に基づくクラスター	菌株の由来	薬剤耐性	<i>irp2</i> 保有*
クラスター1	患者9	—	no
クラスター2	患者1	—	no
クラスター3	患者3, 動物10	—	no
クラスター4	患者3	—	no
クラスター5	患者14, 食材29	ABPC, KM, SM, TC, ST	yes

*PCRによる検出

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.	15;212(6):88 9-98	2015
Shinomiya H, Seto K, Kawase J, Arikawa K, Funatogawa K, Suzuki M, Kubota H, Shirabe K.	Current status of bacteriological studies at prefectural and municipal public health institutes in Japan	Nihon Saikingaku Zasshi.	70(2):309-18.	2015
Kimura H, Saitoh M, Kobayashi M, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Tsukagoshi H, Shirabe K, Nishina A, Kozawa K, Kuroda M, Takeuchi F, Sekizuka T, Minakami H, Ryo A, Takeda M.	Molecular evolution of haemagglutinin (H) gene in measles virus.	Sci Rep.	5: 11648..	2015
Kawase J, Etoh Y, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K.	Improved multiplex real-time SYBR Green PCR assay for analysis of 24 target genes from 16 bacterial species in fecal DNA samples from patients with foodborne illnesses.	Jpn J Infect Dis.	[Epub ahead of print]	2015

<p>Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H.</p>	<p>Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I.</p>	<p>Sci Rep..</p>	<p>5:13806</p>	<p>2015</p>
<p>Obuchi M, Yagi S, Oguri A, Takizawa T, Kimura H, Sata T.</p>	<p>Outbreak of human bocavirus 1 infection in young children in Toyama,</p>	<p>Jpn J Infect Dis.</p>	<p>68(3):259-61.</p>	<p>2015</p>
<p>Yamasaki E, Watahiki M, Isobe J, Sata T, Nair GB, Kurazono H.</p>	<p>Quantitative Detection of Shiga Toxins Directly from Stool Specimens of Patients Associated with an Outbreak of Enterohemorrhagic Escherichia coli in Japan—Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC outbreak.</p>	<p>Toxins (Basel).</p>	<p>27;7(10):438 1-9.</p>	<p>2015</p>

