

201522015B

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25年度～27年度 総合研究報告書

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 総合研究報告書

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 1

II 分担研究総合報告書

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 10

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 18

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

研究分担者 四宮博人 愛媛県立衛生環境研究所 50

III 研究成果の刊行に関する一覧表 69

I 総合研究報告書

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 25－27 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、清水美和子、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、食中毒菌と食品由来病原微生物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を得ることを目的として研究を行った。

NGS 技術を習得するため、山口県、群馬県、愛媛県の地方衛生研究所の研究員を国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターに派遣しそれぞれの研究所で分離したサルモネラ属菌、カンピロバクター属菌株、腸管出血性大腸菌株についてゲノム配列を決定した。その後も継続的にゲノムセンターの技術的指導を受けることによって、研究班に参加した地方衛生研究所におけるゲノム解析の基本的技術を習得した。

国立感染症研究所では、サルモネラ属菌について SNVs (single nucleotide variations) を抽出する解析ソフトを開発した。地方衛生研究所で決定したゲノム配列を国立感染症研究所のサーバーに送るとサーバー上で SNVs を抽出できるプラットフォームが確立された。食品、患者、動物由来のサルモネラ属菌分離株、カンピロバクター属菌分離株、腸管出血性大腸菌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、いずれの菌種においても、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。地方衛生研究所で決定したゲノム配列を感染研のサーバーに送るためには地方自治体と感染研を結ぶ高速なネットワーク回線が必要でありこの整備が今後の課題である。また、本研究班では、地方衛生研究所で市販の windows ソフトを用いて解析することも可能である事を示した。さらに、1 株あたりの NGS 解析に必要な経費について試算した。

研究班によるゲノム解析の具体的成果については、以下の通りである。

1) サルモネラ属菌のゲノム解析：感染性胃腸炎患者、食材、家畜から愛媛県内で分離されたサルモネラ株について次世代シーケンサー(NGS)を用いてゲノム解析を実施した。患者由来、食材(鶏肉、豚肉)由来、豚由来(計 70 株)の *Salmonella Infantis* のゲノム配列を NGS で決定し、SNVs を抽出し、それによる系統樹解析から 3 つの主要なクラスター、患者株のみ、患者由来株と豚直腸由来株、患者株と鶏肉由来株に帰属されることがわかった。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、感染原因となった可能性が示唆された。また、愛媛株では患者株のみのクラスターであったが、他の都道府県で分離された比較すると卵由来分離株と同一のクラスターを形成した。この事から全ての患者由来株は、鶏肉、卵、豚由来株のいずれかに由来する株と近縁であった事が結論された。さらに、薬剤耐性

を示すサルモネラ属菌株（患者由来株、食材由来株）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た。

2) カンピロバクター属菌のゲノム解析：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、この様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) 腸管出血性大腸菌のゲノム解析：腸管出血性大腸菌 O157 の 7 株中 5 株が clade8 に属した。O157 Sakai 株に対して genome mapping を行った結果、1,818 箇所 SNP が得られ、PFGE パターンが同一であった株についても SNVs が検出された。

以上、研究班に参加した地方衛生研究所において NGS による解析技術が確立され、新知見が得られたと同時に、食品と食中毒の関連をより高い精度で示す技術が確立された。また、今後、我が国における食中毒原因菌のゲノムデータを蓄積することにより、広域的食中毒の早期探知のシステムを構築するための基本的技術が確立された。

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。合計252株についてゲノムデータを取得した(表1)。

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

O4型別不能株の解析:愛媛県において分離されたO4型別不能株(EHM21-304)は9歳女児の虫垂部膿から分離された多剤耐性菌であり臨床的・細菌学的に重要であると考えられた。血清型は、O4、O5及びO12抗原を有し、H抗原の第1相がi、第2相が非発現の、*Salmonella* 4,5,12:i:-であった(以下、*S.* 4,5,12:i:-)。本菌株のNGSゲノム解析による系統解析を実施した結果、*S. Typhimurium*と近縁であった。*S.* 4,5,12:i:-は、近年、世界的にサルモネラ感染症及び食中毒の主要な原因菌となってきた。EHM21-304は全ゲノム解析がなされているCVM23701とは異なるタイプであり、一方、山口県で分離された*S.* 4:i:-株はCVM23701と近縁で、地域的に異なる*S.* 4:i:-のクローンが存在することが示された。また、ゲノム解析の結果、愛媛県で分離されたEHM21-304について、標準

株の第 2 相鞭毛抗原関連遺伝子領域を比較したところ、*hin* (regulation of flagellar gene expression) 遺伝子を含む 11 遺伝子が欠損しており、これが第 2 相抗原を発現しない原因であると考えられた。また、この株は多剤耐性であり、保有するプラスミドは Inc A/C と Inc FII の異なる不和合成領域を含むキメラ構造を有し、それぞれの領域に薬剤耐性遺伝子をもつ新規プラスミドであることを明らかにした。患者由来、食材（鶏肉、豚肉）由来、豚由来（計 70 株）の *Salmonella* *Infantis* のゲノム配列を NGS で決定し、SNVs を抽出し、それによる系統樹解析から 3 つの主要なクラスター、1) 患者株のみ、2) 患者由来株と豚直腸由来株、3) 患者株と鶏肉由来株に帰属された。これらのクラスター内で、患者由来株と食材・動物由来株の中にゲノム配列がほぼ一致したペアが認められ、菌株が分離された食品が感染原因となった可能性が示唆された。また、愛媛株の解析では患者株のみのクラスターであったが、他の都道府県で分離された株のゲノム配列と比較すると鶏卵由来分離株と同一のクラスターを形成した。この事から全ての患者由来株は、鶏肉、卵、豚由来株のいずれかに由来する株と近縁であった事が結論された。この事は、サルモネラ属菌による食中毒は殆どが鶏、豚、卵を原因となる事が示唆される。さらに、薬剤耐性を示すサルモネラ属菌株（患者由来株、食材由来株）は全て鶏に関連しており、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た。

富山県衛生研究所における解析：S.

Infantis 77 株について NGS 解析を行い、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。そこで、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。

山口県環境保健センターにおける解析：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。また、山口県で分離された *S. 4:i:* 株について NGS による解析を行った結果、近年、世界的にサルモネラ感染症及び食中毒の主要な原因菌となってきた CVM23701 と近縁である事が示された。

C-2. カンピロバクター属菌のゲノム解析
富山県衛生研究所における解析：平成 20 年に富山県で発生した *C.lari* が原因と考えられた食中毒事例について解析した。本事例では、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。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.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。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、GAP により欠失している遺伝子は、細胞表面の LPS の多型及びフェージ遺伝子の有無に関係していた。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。

群馬県衛生環境研究所における解析：
Campylobacter jejuni においては、牛由来 19 株のうち、5 組でゲノム配列が一致した。また、それぞれの菌株に対して塩基置換数を解析したところ、1~15,092 ヶ所の SNVs を示した。PFGE パターンが同一

であった菌株の塩基配列は、100%一致していた。さらに食中毒由来株と比較したところ、平成 23 年に採取された食中毒由来株 1 株と牛由来株 3 株との塩基配列が類似であった。また、*Campylobacter coli* では、5 株中 3 株の塩基配列が 100%一致した。これらの 3 株の PFGE は、制限酵素 *Sma I* では 1 株が異なるパターンを示していた。

D. 考察

本研究班では、5 つの都道府県の地方衛生研究所が参加したが、全ての研究所において NGS による解析技術が習得された。地方衛生研究所で決定した細菌ゲノム配列を感染研のサーバーに送り、そのプラットフォーム上で SNVs を抽出し、系統樹を作成することが可能となった。しかし、これを効率よく行うためには今後、地方自治体と国立感染症研究所の間に高速のインターネット回線が必要となる。菌株を解析するために必要な予算の参考とするため、細菌 1 株あたりに必要な費用を試算したが、解析費用は約 2 万 5 千円程度であり、今後技術革新によりさらに経費は低下すると考えられる事から、多数の株を解析し我が国において分離された食中毒関連病原微生物のゲノムデータベースを構築していく事は可能であると考えられた。

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。クラスター内で、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

Campylobacter jejuni のPFGEパターン解析による分類は、識別が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、この様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から、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。

E 結論

地方衛生研究所において食中毒原因菌株のゲノム解析を行い、効率よく遺伝的同一性を比較する技術を確立した。この技術は、NGSによるゲノム解析によって広域的食中毒を早期探知するための基盤となる技術である。今後、地方衛生研究所と国立感染症研究所を結ぶ高速ネットワークが必要となると思われる。

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、久保田寛頭、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) 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：*Salmonella enterica* serovar 4:i:- 株の次世代 シークエンサーによるゲノム解析. 第 67 回日本細菌学会中国四国支部総会 2014. 10.4-5 徳島
- 2) Tatsuya Karasudani、 Tsuyoshi Sekizuka、 Akifumi Yamashita、 Makoto Kuroda、 Komei Shirabe、 Keiko Semba、 Chizuko Kimura、 Yasuharu Nomura、 Hitoshi Miyamoto and Hiroto Shinomiya: Characterization of genomic

structures and multidrug resistances of *Salmonella* 4、5、12:i:- isolates. 第 88 回日本細菌学会総会 2015. 3. 26-28 岐阜

- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

表1 研究班においてNGSによる解析を行った菌株数

	患者	食品	動物	計
<i>Salmonella</i> Infantis	67	70	10	147
<i>Salmonella</i> Enteritidis	22	8	-	30
<i>Salmonella</i> Typhimurium	10	8	-	18
<i>Salmonella</i> O4:i:-	3	3	-	6
<i>Campylobacter jejuni</i>	15	-	19	34
<i>Campylobacter coli</i>	4	-	5	9
<i>Campylobacter lari</i>	-	1	-	1
EHEC	7	-	-	7
計	128	90	34	252

Ⅱ 分担研究総合報告書

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）

吉住 正和（利根沼田保健福祉事務所）

小澤邦壽

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、被害の拡大を防止させることは「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特定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、大容量の遺伝子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の構築のため、食中毒原因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。その結果、PFGE パターンによる疫学解析に比較して詳細な解析結果が得られた。今後は、様々な菌種あるいは由来の株を NGS により解析し、質の高いデータベースを構築、疫学情報として活用することが重要と考えられた。

A. 研究目的

食中毒が発生した場合、発生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。

これまで病原微生物の解析は、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、病原体ゲノム疫学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る病原体特定技術は急速に発展しており、次世代シーケンサー

（NGS）は、大量の核酸配列を偏見無く網羅的に解読することができ、PFGE よりも詳細な情報を得ることが可能であると考えられている。最近、NGS は結核菌の流行におけるレトロスペクティブ解析にも利用されている¹。

本研究では、食中毒由来病原微生物として腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターをターゲットにした NGS の有用性について、PFGE との比較・検討を行った。

B. 研究方法

NGS を実施した菌体は、2013 年 7 月に群馬

県内で届出された腸管出血性大腸菌 O157 VT2 産生株 (7 株)、平成 25 年 8 月～11 月に牛から採取された *Campylobacter jejuni* 19 株、*Campylobacter coli* 5 株、当所において平成 20 年以降に発生した食中毒事件により採取された *Campylobacter jejuni* 3 株を用いた。

保存していた菌株を増菌培養後、遠心により菌を集め Genra Puregene Yeast/Bact. Kit® (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® (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、電気泳動し、目的とする DNA を切り出し精製した後、Miseq Reagent Kit v3® (600cycle) (Illumina) を使用し塩基配列の読み取りを行った。得られた塩基配列を、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。

腸管出血性大腸菌 O157 では、全ての株が O157 であり、7 株中 5 株が clade8 に属することが明らかとなった (図 1)。さらに詳細に塩基置換数を求める為に、O157 Sakai 株に対して genome mapping を行い SNP を抽出した結果、1,818 箇所の SNP が得られた。PFGE パターンが同一であった 4 株のうち、3 株の塩基置換数は 1～2 箇所であった (表 1)。

Campylobacter jejuni においては、牛由来 19 株のうち、5 組の遺伝子の一致が明らかとなった (図 2、表 2)。また、それぞれの菌株に対して塩基置換数を解析したところ、1～15,092 ヶ所の塩基置換があることが明らかになった。PFGE パターンが同一であった菌株の塩基配列は、100 %一致していた (表 3)。さらに食中毒由来株と比較したところ、平成 23 年に採取された食中毒由来株 1 株と牛由来株 3 株との塩基配列が類似であった (図 3)。

また、*Campylobacter coli* では、5 株中 3 株の

塩基配列が 100 %一致した (図 4、表 4, 5)。これらの 3 株の PFGE は、制限酵素 *Sma* I では 1 株が異なるパターンを示していた。

D. 考察

系統解析の結果から、塩基配列が 100 %一致した菌株は、ほぼ同一のクローンの可能性が高いことが示唆された。

PFGE パターン解析による分類は、泳動像の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。

一方、NGS による塩基配列の網羅的解析は、1 塩基の置換も明らかにしており、疫学的解析の手法として有用と考えられた。

今回の調査では、食中毒菌を対象に患者由来株及び食品由来株について実施した。今後はこれらの関連性を明らかとするため、さらに調査を加え、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 を活用し食中毒菌の詳細な解析を行うことにより、1 塩基置換の違いまで明らかにすることができた。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活用していく必要がある。

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ことが重要である。

F. 参考文献

1. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, 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

1. Niwa S, Tsukagoshi H, Ishioka T, Sasaki Y, Yoshizumi M, Morita Y, Kimura H, Kozawa K.

Triplex real-time PCR assay for detection and quantification of norovirus (GI and GII) and sapovirus. Microbiol Immunol. 2013; 58(1), 68-71.

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。

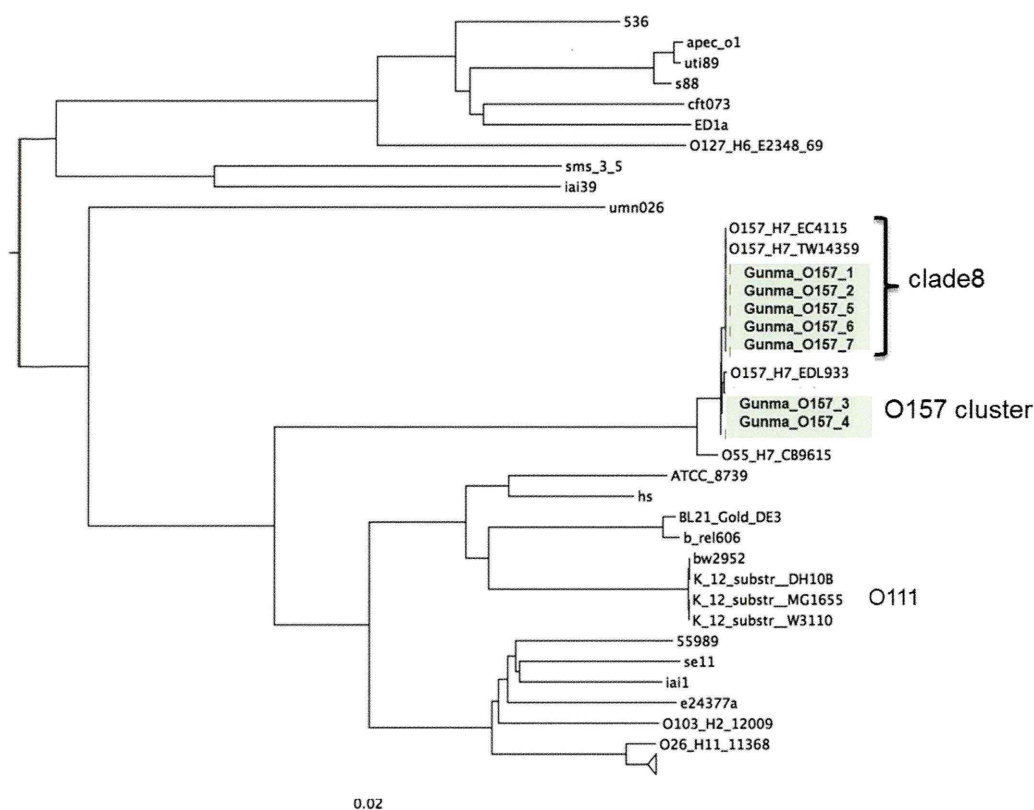


図1 腸管出血性大腸菌 O157 の分子系統樹 (NJ 法)

表1 PFGE パターンが同一であった腸管出血性大腸菌 O157 4 株間の塩基置換数

	Gunma_O157_3	Gunma_O157_6	Gunma_O157_7
Gunma_O157_2	1,123	1	2
Gunma_O157_3		1,122	1,123
Gunma_O157_6			1



図2 *Campylobacter jejuni* の分子系統樹 (NJ 法)

表2 NGS解析とPFGEパターン解析 (C.jejuni)

菌種	検体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	
						PFGE パターン	
C.jejuni	1	2	H25.8.20	①	盲	I	個体内で2種類の泳動像
	2				盲	II	
	3	3	H25.9.9	②	肝	III	個体内で2種類の泳動像
	4				肝	IV	
	5				胆	III	
	6				盲	IV	
	7	5	H25.9.24	③	肝	V	個体内で3種類の泳動像
	8				肝	VI	
	9				肝	VI	
	10				肝	VI	
	11	8	H25.11.5	④	盲	VII	同一農家、異なる個体で同一の泳動像
	12				胆	VIII	
	13				盲	VIII	
	14	9	H25.11.5	④	盲	VIII	
	15	10	H25.11.18	③	肝	IX	個体内で同一の泳動像
	16				胆	IX	
	17	11	H25.11.18	⑤	肝	X	個体内で2種類の泳動像
	18				肝	X	
	19				盲	XI	

同一色は、塩基配列が100%一致した菌株

表3 C.Jejuni株の塩基置換数

塩基置換数	CJ-Gunma-18	CJ-Gunma-7	CJ-Gunma-8	CJ-Gunma-9	CJ-Gunma-10	CJ-Gunma-2	CJ-Gunma-15	CJ-Gunma-16	CJ-Gunma-1	CJ-Gunma-19	CJ-Gunma-3	CJ-Gunma-5	CJ-Gunma-12	CJ-Gunma-13	CJ-Gunma-14	CJ-Gunma-11	CJ-Gunma-4	CJ-Gunma-6
CJ-Gunma-17	0	14,691	14,691	14,691	14,691	15,082	15,091	15,092	14,447	14,470	14,527	14,527	14,496	14,496	14,496	14,430	14,773	14,773
CJ-Gunma-18		14,691	14,691	14,691	14,691	15,082	15,091	15,092	14,447	14,470	14,527	14,527	14,496	14,496	14,496	14,430	14,773	14,773
CJ-Gunma-7			0	0	0	13,132	13,141	13,142	12,449	12,454	12,611	12,611	13,005	13,005	13,005	13,234	13,271	13,271
CJ-Gunma-8				0	0	13,132	13,141	13,142	12,449	12,454	12,611	12,611	13,005	13,005	13,005	13,234	13,271	13,271
CJ-Gunma-9					0	13,132	13,141	13,142	12,449	12,454	12,611	12,611	13,005	13,005	13,005	13,234	13,271	13,271
CJ-Gunma-10						13,132	13,141	13,142	12,449	12,454	12,611	12,611	13,005	13,005	13,005	13,234	13,271	13,271
CJ-Gunma-2							11	12	11,137	11,109	11,290	11,290	10,688	10,688	10,688	11,638	12,031	12,031
CJ-Gunma-15								1	11,146	11,118	11,299	11,299	10,697	10,697	10,697	11,647	12,040	12,040
CJ-Gunma-16									11,147	11,119	11,300	11,300	10,698	10,698	10,698	11,648	12,041	12,041
CJ-Gunma-1										187	737	737	8,346	8,346	8,346	9,105	9,536	9,536
CJ-Gunma-19											748	748	8,299	8,299	8,299	9,138	9,597	9,597
CJ-Gunma-3												0	8,418	8,418	8,418	8,884	9,307	9,307
CJ-Gunma-5														8,418	8,418	8,418	8,884	9,307
CJ-Gunma-12															0	8,946	9,301	9,301
CJ-Gunma-13																0	8,946	9,301
CJ-Gunma-14																	8,946	9,301
CJ-Gunma-11																		1,193
CJ-Gunma-4																		

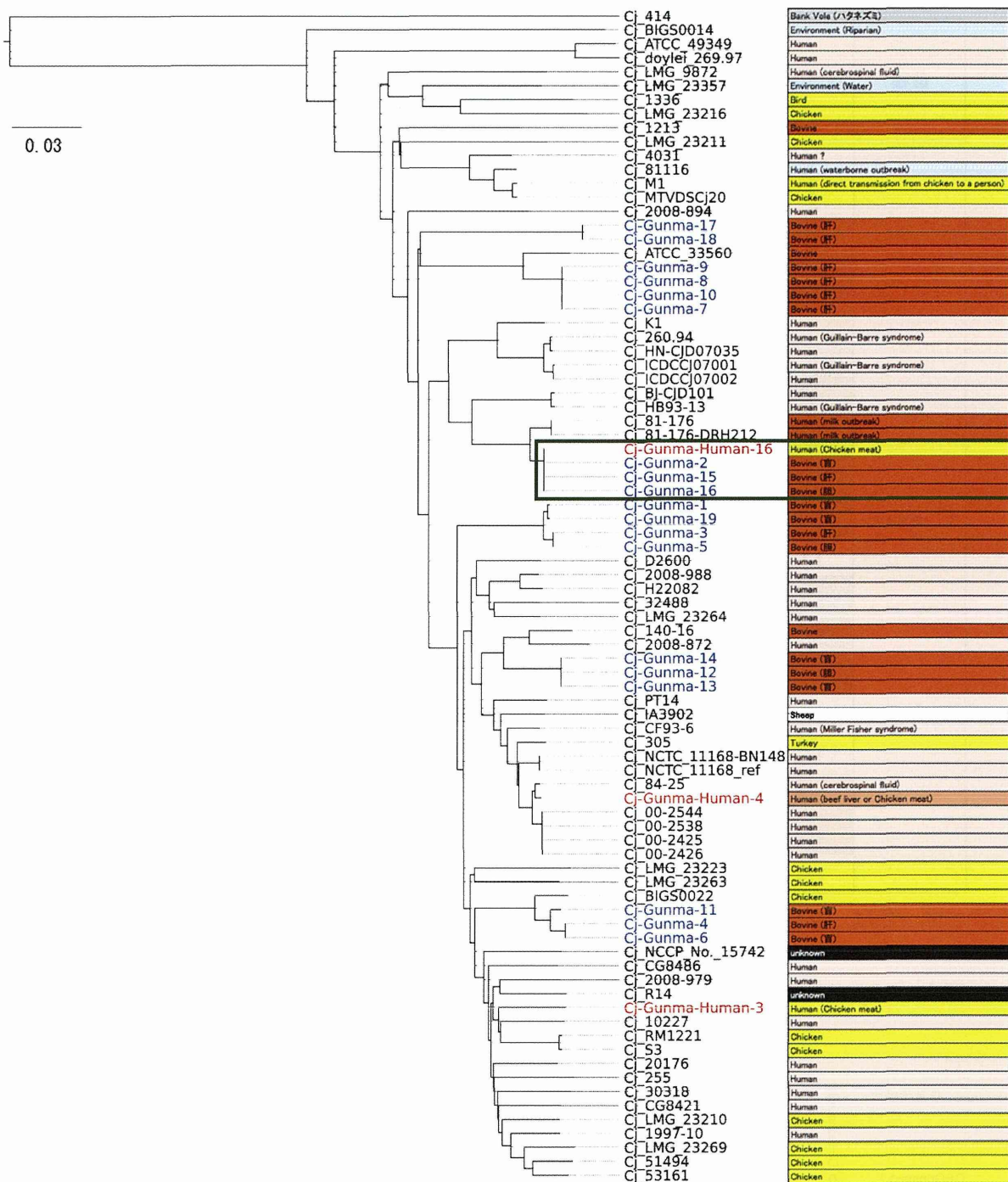


図3 *Campylobacter jejuni* の分子系統樹 (NJ法)

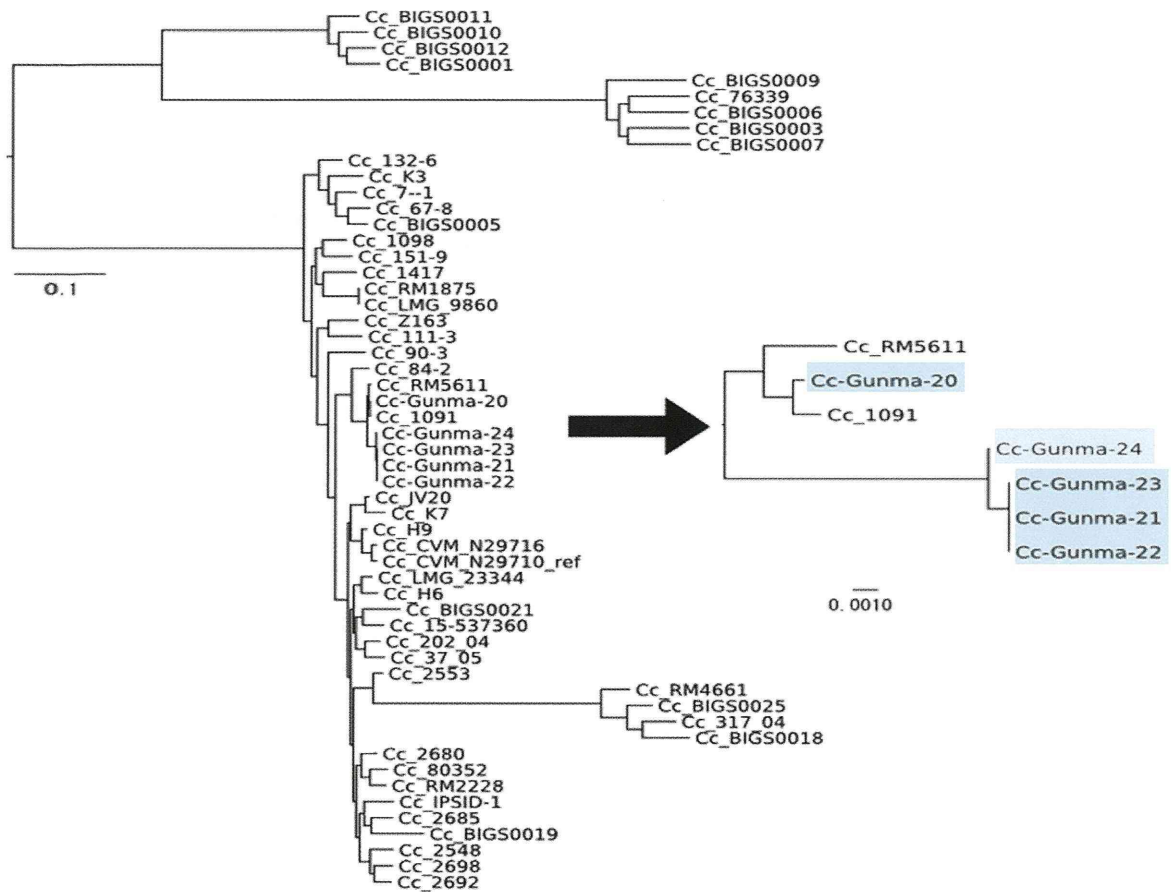


図4 *Campylobacter coli* の分子系統樹 (NJ法)

表4 NGS解析とPFGEパターン解析 (C.coli)

菌種	検体 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	制限酵素Kpn-1ではすべて一致。
	23				盲	B	
	24	7	H25.10.21	⑦	盲	A	