

| | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------------------|--|---------|-----|--|-----|---|---|
| ABIシーケンサーデータのAssemble | GeneStudio | ABIシーケンサーで解析した配列の確認、Assembleソフト。波形を確認して編集可能。系統樹解析も可能。 | Windows | 独立 | | 無料 | http://genestudio.com/download | 複数のPCで使用できるので利用価値はあるが、それほど使用頻度は高くない。 |
| 相同性解析 | NCBI blast+ | ペアワイズな塩基配列の局所的なアライメント/相同性検索(ホモロジー検索)を高速に行うプログラム | Windows | 独立 | | 無料 | http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download | Windows10で使うと非常に使いやすい。使用頻度高い。2つのゲノムを比較するとき、ACTを使用するときに必要なcomparison fileを作成するblasstnを実施できる。 ゲノム解析した配列のアノテーション作業には必須の環境を提供する。 |
| DNA配列のアラインメント及び遺伝子の系統解析 | MEGA | DNA配列あるいは蛋白のアミノ酸配列の並列化ソフト。配列の編集及び配列の系統分類。 | Windows | 独立 | | 無料 | http://megasoftware.net/ | 遺伝子の並列化、系統解析等、使用頻度は高い。 |
| 細菌ゲノムから病原性解析 | The virulence factor database (VFDB) | 病原細菌の病原性因子のデータベースが提供されている。 | Windows | ウェブ | | ウェブ | http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/ | 各種病原性細菌の病原性遺伝子が確認できる |
| 細菌ゲノムから病原性解析 | Virulence Searcher | NGSから得られたde novo assemblyデータから、病原性遺伝子の検索 | Windows | ウェブ | | ウェブ | http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/virfactfind_small.html | 病原性遺伝子の検索 |
| 遺伝子解析ユーティリティ | Sequence Assistant | 非常に軽い遺伝子解析ソフト。Genbankから、ダウンロードしたファイルから、塩基配列だけ抽出する、相補鎖変換等も可能。 | Windows | 独立 | | 有料 | http://www2s.biglobe.ne.jp/~haruta/ http://www.vector.co.jp/soft/ から入手可能 | 使用頻度は高い。塩基配列の文字列の抽出、結合、相補鎖変換等が簡単にできる。細菌ゲノムサイズの取扱いも可能。Artemisによる手動アノテーションと一緒に使うと便利。 |
| 遺伝子解析ユーティリティ | Format Assistant | 遺伝子解析ユーティリティ。他の文字が含まれる文字列から塩基、アミノ酸を表す文字のみを抽出することが出来る。 | Windows | 独立 | | 無料 | http://www2s.biglobe.ne.jp/~haruta/ http://www.vector.co.jp/soft/ から入手可能 | 塩基配列、アミノ酸配列文字列のの編集に利用。あまり長鎖のDNA配列は利用できないようである(60,00塩基程度が限界?) |
| 遺伝子解析ユーティリティ | 秀丸 | テキストエディタ | Windows | 独立 | | 有料 | http://hide.maruo.co.jp/software/hidemaru.html | ゲノム解析に用いられるファイル形式は、基本的にテキストベースであり、テキストを直接、加工できるテキストエディタは便利である。特に本ソフトは、1億行まで扱えるため、ある程度の巨大ファイルの編集が |
| 遺伝子解析ユーティリティ | 7-zip | 解凍ソフト | Windows | 独立 | | 無料 | https://sevenzip.osdn.jp/ (日本語サイト) | 巨大な圧縮ファイルの解凍が出来る。 |
| 遺伝子解析ユーティリティ | GENOMICS | ゲノム解析法の紹介 | Windows | 独立 | | 無料 | http://molbiol-tools.ca/Genomics.htm | ゲノム解析手法のリストが紹介されている。 |

GView Server の使用方法と注意事項

用途：微生物ゲノムを比較解析し、可視化する。環状形式と線状形式、遺伝子の転写の方向、等、カスタマイズ可能である。既に複数の完全ゲノム配列が報告されている細菌種が利用できる状況であり、NGS で得られた細菌の *de novo assemble* した *contigs* を、完全ゲノム配列を参照配列 (Ref. seq) として、遺伝子単位で比較 (blastn or blastp)する。

以下の解析が可能である。

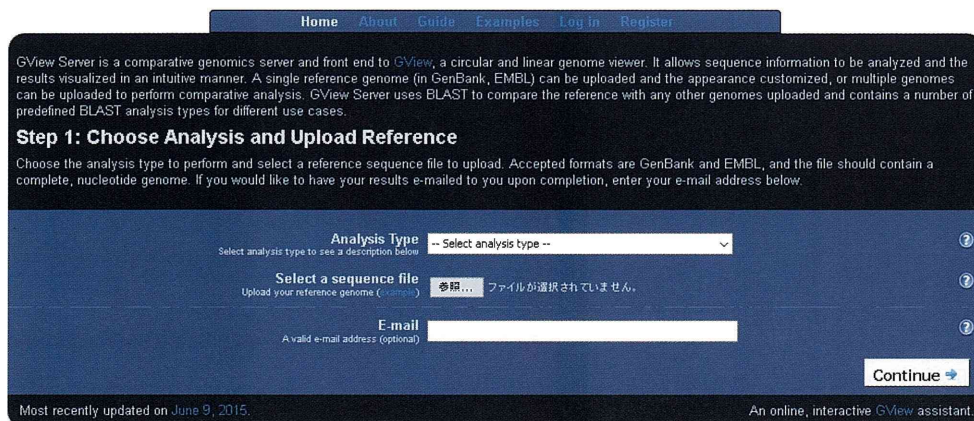
1. BLAST Atlas
2. Pangenome Analysis
3. Core Analysis
4. Accessory Analysis
5. Unique Analysis
6. Signature Analysis
7. Reciprocal Analysis
8. Pangenome Phage Analysis

準備：以下の環境を確認

1. OS: Windows7 以上、Windows10 を推奨。インターネット環境必須。
2. ブラウザ：FireFox
3. <https://server.gview.ca/> (以下、トップページ)

[Register](#) タブから、氏名とメールアドレスを入力し、登録する。

GView Server



The screenshot shows the GView Server web interface. At the top, there is a navigation bar with links for Home, About, Guide, Examples, Log in, and Register. Below the navigation bar, there is a descriptive paragraph about GView Server. The main content area is titled "Step 1: Choose Analysis and Upload Reference". It contains a form with three main sections: "Analysis Type" with a dropdown menu, "Select a sequence file" with a file upload button and a message "ファイルが選択されていません。", and "E-mail" with a text input field. A "Continue" button is located at the bottom right of the form. At the bottom of the page, there is a footer with the text "Most recently updated on June 9, 2015." and "An online, interactive GView assistant."

使用方法：

1. Ref seq は、完全配列が報告されている株を用いる。

2. Ref seq は、注釈情報が付いた gbk ファイルを用いると後で便利。付いていない場合には、RAST 等を利用して注釈付きの gbk ファイルを作成するとよい。
3. Query は、gbk でも fasta 形式でもよい。
4. gbk file は、RAST で autoannotation を行い、merged タイプを使うと、artemis で読み込んでくれるので、後で遺伝子構成を見たり、遺伝子やアミノ酸配列を抽出するのが楽となる。

GviewServer への file の upload は、以下の図中に示す、4 ステップからなり、条件を入力していく。以下は、Pangenomic Analysis したときの例である。Final Step の入力が終わったら、念のため、Job ID はコピーしておき、log out する。解析が終わると登録したメールアドレスに、連絡がある。そのときの解析の込み具合にもよるが、翌日の連絡が多い。

右図は、記録のため、FileMaker を使い、解析条件等を記録する画面である。Web 上で、ファイルや条件を入力する順番となっている。

この例は、Pangenome analysis を選択したときの例示である。その他の解析をする場合には、この図では、解析タイプを選択できるようになっている。

| | | |
|-------------------|--|--|
| New | Date | 2015/11/09 |
| Step 1 | Analysis Type | Pangenome Analysis |
| | Reference genome | Sinf27-merged.gbk |
| Step 2 | Upload Query Files | |
| | Blast Program & File feathres | |
| | | Sinf27 - Sinf_Meat1_18core-pj033.gbk |
| | | CDS-CDS |
| Step 3 | Blast Parameters | |
| | Filter Low complexity sequences? | <input type="checkbox"/> on <input checked="" type="checkbox"/> off |
| | Expect value cutoff | 1e-10 |
| | Genetic code | Bacterial and Plant Plastid |
| | Alignment length cutoff | 100 |
| | Percent identity cutoff | 80 |
| Final Step | Map Title | SInfantis2015 Pj035 |
| | Description | Meat1 core seeking Pangenome 80% |
| | Display reference feature | <input checked="" type="checkbox"/> CDS <input type="checkbox"/> -10_signal <input type="checkbox"/> misc_RNA <input type="checkbox"/> protein_bind <input type="checkbox"/> rRNA <input type="checkbox"/> -35_signal <input type="checkbox"/> gene <input type="checkbox"/> repeat_region <input type="checkbox"/> RBS <input type="checkbox"/> tRNA |
| | Show GC content | <input type="checkbox"/> on <input checked="" type="checkbox"/> off |
| | Show GC skew | <input type="checkbox"/> on <input checked="" type="checkbox"/> off |
| | Show COG categories | <input type="checkbox"/> on <input checked="" type="checkbox"/> off |
| | Show legends | <input type="checkbox"/> on <input checked="" type="checkbox"/> off |
| | Select a font | Arial |
| | Options | one strand line |
| | Backbone | large |
| | JobID | D985193939986949C7F47FEC56385728 |

解析が終わったという連絡が来たら、Web からログインして、以下のような画面まで行く。

結果の viewing は、2 通りの方法がある。

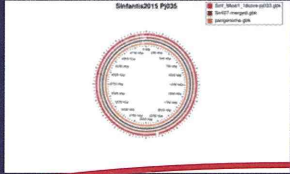
WebStart と結果ファイルを download して、中にあるバッチファイルから、表示する方法である。いずれも JAVA が予めインストールされていることが必要。

GView Server

Home About Guide Examples Account Settings Jobs Log out

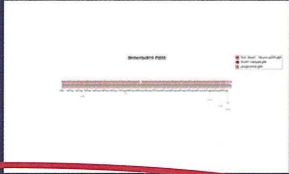
GView Results for Job D965193939986949C7F47FEC56385728

View



①

Launch GView Webstart
Circular



Launch GView Webstart
Linear

The above images are previews of the GView Server analysis. Clicking on the image will display a full size version.

Clicking **Launch GView Webstart** will open the results in GView, an interactive circular and linear genome viewer, where you can pan, zoom, and interact with the results. GView requires Java 1.6 or greater and at least 512MB of memory.

The **Pangenome** analysis type displays a pangenome BLAST Atlas of a set of genomes. The reference genome consists of a pangenome constructed by concatenating all the unique regions among each of the uploaded query genomes. A BLAST atlas is then constructed for each query genome. The features in these slots show regions where there is a BLAST hit between the query genome and the constructed pangenome. An example of how to interpret a Pangenome BLAST Atlas can be found on the examples page at [Pangenome Atlas Example](#).

Download

The below table lists a set of downloadable files containing the resulting data of this analysis. There are two types of data that can be downloaded: the GView zip package, and the BLAST results table. The zip package contains all the necessary information to launch GView offline. The BLAST Results table contains the results of the BLAST analyses that were performed on the uploaded data in a tabular format. To launch GView offline, please execute the appropriate QuickLaunch program, either `QuickLaunch.bat` or `QuickLaunch.sh`.

| File | Type | Description |
|--|-------------------------|---|
| gview-all-D965193939986949C7F47FEC56385728.zip | GView Data + Executable | Contains the resulting data plus the GView executable. |
| gview-data-D965193939986949C7F47FEC56385728.zip | GView Data | Contains only the resulting data from the job, not the gview executable. |
| blast-results-D965193939986949C7F47FEC56385728.csv | BLAST Results Table | A table of the resulting BLAST hits, in csv format. The results may take a while to download for large data sets. |
| blast-results-D965193939986949C7F47FEC56385728.xls | BLAST Results Table | A table of the resulting BLAST hits, in excel format. The results may take a while to download for large data sets. |

Logged in as: MaWata Most recently updated on June 9, 2015. An online, interactive GView assistant.

- ①JAVAstart のスイッチがリンクされている。ここをクリックすると、うまくすると JAVAstart が開始され、結果のファイルが読み込まれて、結果が図で表示される。しかし、PC により、エラーになる場合が多く、使いにくい。うまく、表示されても、色を変更したりしたい場合には、結果のファイルを一度、PC に download (DL)して、Viewing soft である Gview で表示した方が使いやすいので、ほとんどは、②で行っている。
- ②の JobID をダブルクリックして、Downlord から Gview Data+ Excutable type の file (ZIP)を PC に DL する。DL したファイルは圧縮されているので、解凍する。

解凍すると解凍ホルダ内には以下のようなファイル構成となっている。

JAVA上で動く、gviewのソフトが入っているので、インストールする必要はない。勿論、インストールしても利用できる。

| 名前 | 更新日時 | 種類 | サイズ |
|-----------------|------------------|---------------------|----------|
| task_1 | 2015/11/03 18:17 | ファイル フォルダ | |
| gview.jar | 2014/01/03 13:09 | Executable Jar File | 6,746 KB |
| QuickLaunch.bat | 2015/11/03 3:16 | Windows バッチ ファ... | 1 KB |
| QuickLaunch.sh | 2015/11/03 3:16 | SH ファイル | 1 KB |
| results.gff | 2015/11/03 0:50 | GFF ファイル | 1,598 KB |
| style.gss | 2015/11/03 0:50 | GSS ファイル | 4 KB |

Task_1ホルダの中には、gbkファイルが入っている。

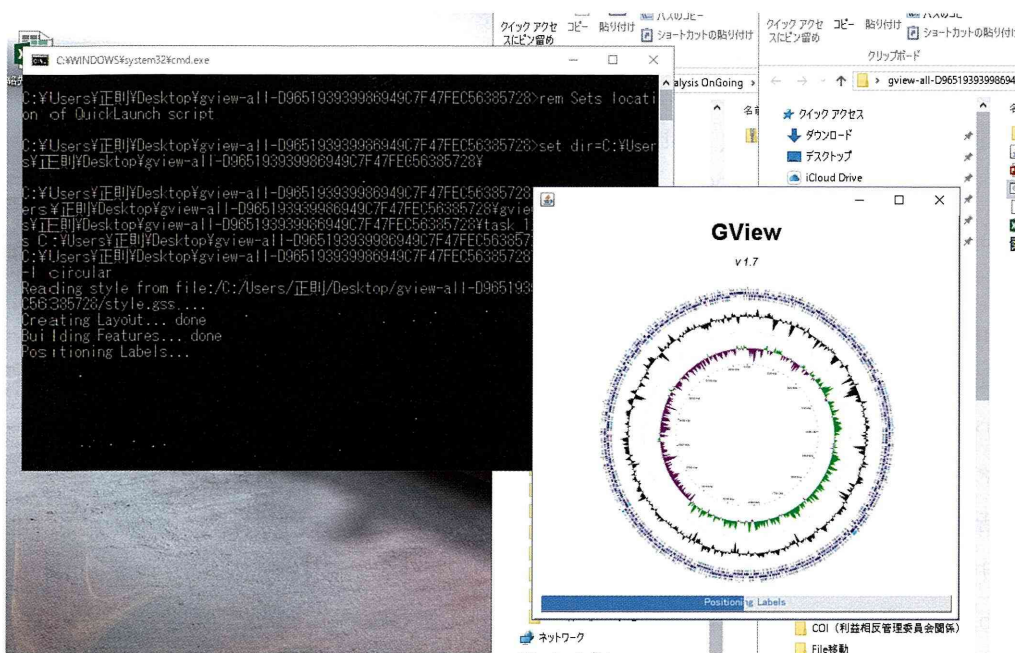
クリックランチャーのバッチファイルが装備されており、まずは、試しにダブルクリックしてみる。運が良ければ、プログラムが稼働し、blast atlasの画面が表示される。

| 名前 | 更新日時 | 種類 | サイズ |
|----------------|-----------------|----------|----------|
| pangenome.gbkg | 2015/11/03 0:47 | GBK ファイル | 8,947 KB |

クイックランチャーのバッチファイルをダブルクリックすると、一瞬、何かウインドウが現れるが、直ぐに消える現象が現れる。これが現れるとうまく、表示してくれない。

これは、インストールされている JAVA アプリの状態に依存するものと考えられ、Windows 環境でこれを設定することは、素人には難しい。これは、Linux でもそうであるが、作業ホルダのディレクトリを理解する必要があり、Windows で慣れている人間にはなかなか理解しにくいところ。おそらく、Gview Server から DL したクイックランチャーのバッチファイルには、相対パスではなく、絶対パスで記述されており、これが WindowsPC 上で合致しないとプログラムが動作しないと考えられた。そこで、動作するディレクトリーを探したところ、デスクトップでうまく行くことが分かった。

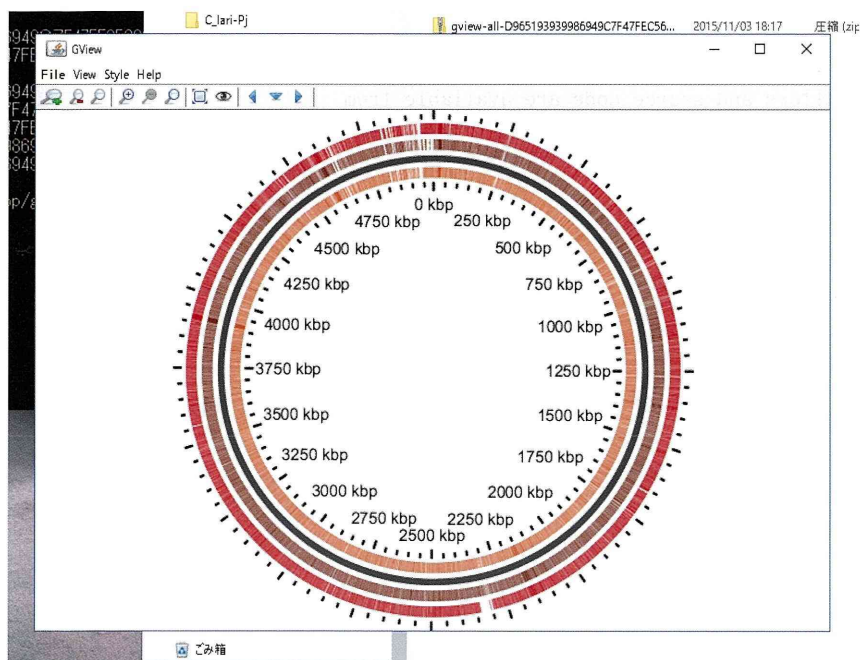
解凍したホルダをデスクトップ画面にドラッグして、クイックランチャーバッチファイルをダブルクリックすると、以下のような画面が現れて、動作が始まる。もし、ここでうまく表示されない場合には、C:ドライブの直下等に解凍したフォルダをコピーして、試してみると開く場合がある。このことは、使用する PC 環境、固有の条件となっている可能性があるため、GViewServer が使用できるディレクトリーを決定しておくことが重要である。



以下のように、うまく表示されるはずですが。

ここまで来れば、後は比較的簡単に、カスタマイズできるようになる。詳細は GView の help を参照のこと。

gbk ファイルを使っているので、カーソルを重ねると遺伝子名が表示される、拡大が出来る、blast 検索のカットオフ値が、ファイルの upload 時に変更できるなど、便利にゲノム全体を比較することが出来る。



(Ver1.1)

Windows PC を用いたスタンドアロン BLAST のセットアップと Blast 検索

はじめに

NCBI では、BLAST 検索サービスを Web 上のサービスとして提供しているだけでなく、Windows PC を用いて、Web を介さない BLAST 検索ができる環境も提供している。この検索は、DOS コマンドウインドウから、コマンドラインで操作するもので、グラフィカルインターフェイスではない。

これに使用するプログラムはblast+と呼ばれ、NCBI C++ based BLAST programs をWindows PCにインストールして使用する。これまでのWindows バージョンでは、Windows PCのDOSコマンドの入力には、コピー&ペーストは利用できなかったため、作業領域として、pathを理解する必要があることと正確にコマンドスクリプトをタイプする必要があるため、非常に使いにくかったが、最新のバージョンであるWindows10から、コピー&ペーストが出来るようになり、非常に簡単にコマンドが使えるようになった。これまで、blast検索は、blastnやblastpなどを中心として、DDBJやNCBIのWeb service を用いた利用がほとんどであったが、Windows PC単独で、NCBI blast+ packageが使えるようになれば、blast+で提供されているすべてのプログラムが利用できるようになり、その解析の幅が大きく広がることが期待される。また、NGSから得られたリードやContigsを利用した検索に利用できるため、Windows PCを用いたNGSデータの解析の幅が広がることを期待できる。

1. ソフトの入手と準備

Blast Packages:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download

BLAST+ executables の Installers and source code are available from

<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>.

から、最新版の

ncbi-blast-2.2.30+-win64.exe (64-bit PC用)をダウンロードする。

(バージョンアップされていれば、そのバージョンとして明記されたファイル名となっています)

今回インストールした PC 環境

Windows 10 Home, Intel Core i3-4160 CPU 3.60 GHz

16.0 GB RAM, 64-bit operating system

インストール

ncbi-blast-2.2.30+-win64.exeをダブルクリックすると自動的にインストールが始まり、終了する。これでWindows環境下、提供されているblastプログラムがすべて利用できるようになる。

作業フォルダの設定

C:\¥blast¥db を作成する。今後、この db フォルダを使って、blast 検索を実施する。

2. プログラム一覧 (一部の説明文は、ウィキペディアから抜粋)

| | | |
|----|-------------------|--|
| 1 | blastdbcheck | BLAST データベースの完全性を確認する。 |
| 2 | blastdbcmd | BLAST データベースから塩基配列やその他の情報を検索する。 |
| 3 | blastdb_aliastool | |
| 4 | blastn | 塩基配列 (ヌクレオチドのシーケンス) をクエリシーケンスとして、ユーザが指定した塩基配列データベースから類似するシーケンスを検索する。 |
| 5 | blastp | アミノ酸配列 (タンパク質のシーケンス) をクエリとして、ユーザが指定したアミノ酸配列データベースから類似するシーケンスを検索する。 |
| 6 | blastx | 塩基配列のクエリシーケンスを、6 フレームで翻訳して、アミノ酸配列データベースから類似するシーケンスを検索する。 |
| 7 | blast_formatter | |
| 8 | convert2blastmask | |
| 9 | deltablast | |
| 10 | dustmasker | |
| 11 | legacy_blast.pl | |
| 12 | makeblastdb | blast 検索をするために、FASTA ファイルを BLAST データベース (db) に変換する。 |
| 13 | makembindex | |
| 14 | makeprofiledb | |
| 15 | psiblast | プロファイルを利用したホモロジー検索を行う。blastp よりも遠縁種の検索が得意。アミノ酸配列をクエリとして、ユーザが指定したアミノ酸配列データベースから類似するシーケンスを検索する。最近開発された BLAST プログラムの一つ。このプログラムはタンパク質の遠い系統的関連性を発見するために使われる。まず、クエリのアミノ酸配列と近い関連性をもつタンパク質の一覧を作成する。そしてこの一群のタンパク質を統合して「プロファイル」(平均化したシーケンスのようなもの) を作る。このプロファイルを使ってアミノ酸配列データベースに対する検索を行い、プロファイルのもととなったアミノ酸配列より多い件数のアミノ酸配列を見つける。見つかったアミノ酸配列でさらにプロファイルを作成する。この一連の処理を繰り返し行う。検索を行う際に関連するタンパク質を考慮するため、遠い系統的関連性を発見する場合に、PSI-BLAST は blastp よりもはるかに正確な処理を行う。 |
| 16 | rpsblast | blast のアルゴリズムを使ったプロファイル検索プログラム。 |
| 17 | rpsblastn | |
| 18 | segmasker | |
| 19 | tblastn | アミノ酸配列をクエリとして、塩基配列データベースを 6 フレームで翻訳しながら、類似するシーケンスを検索する。 |
| 20 | tblastx | 塩基配列のクエリシーケンスを、6 フレームで翻訳して、アミノ酸 |

| | | |
|----|-------------------|--|
| | | 配列に翻訳された塩基配列データベースから類似するシーケンスを検索する。このプログラムは BLAST のプログラムの中で最も処理速度が遅い。このプログラムの使用目的は、塩基配列のシーケンス間の非常に遠い関連性を発見することである。 |
| 21 | update_blastdb.pl | |
| 22 | windowmasker | |

空欄は、ほとんど使うことはないが、今後、利用法について研究したい。また NCBI の BLAST データベースは日々、アップデートされているらしい。

Databases

BLAST databases are updated daily and may be downloaded via FTP from <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>. Database sets may be retrieved automatically with update_blastdb.pl, which is part of the BLAST+ suite. Please refer to the [BLAST database documentation](#) for more details.

3. 公的データベースのダウンロード(公的データベースの利用が前提の場合)

1. 次のリンクをクリックしてNCBIのftpサーバーにアクセスする。
<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/>
2. ダウンロードしたいデータベースファイル(たとえば16SMicrobial.tar.gz)をダブルクリックする。
3. ファイルをC:\blast\dbに保存する。
4. ダウンロードしたファイルを展開する。解凍ソフトとして7-zipが使いやすい(無料)。

解凍したファイルは、

16SMicrobial.nsq
16SMicrobial.nsi
16SMicrobial.nsd
16SMicrobial.nog
16SMicrobial.nni
16SMicrobial.nnd
16SMicrobial.nin

16SMicrobial.nhrの8つファイルが存在する。blastnを実施するとき、この8つの一つのセットとして、そのまま使用可能である。

4. In-house データベースの作成とblastサーチ

準備

1. blast 検索に使用したいデータベースは、FASTA ファイル形式として作成する。このままでは、blast のデータベースとしては使用できないので、データベースとして使用できるように様式を変換する必要がある。
2. コマンドプロンプトを開く。「管理者用のコマンドプロンプト」も存在するが、これは使用しない
3. [cd 半角スペース]入力し、C:\blast ウィンドウ内のフォルダ db をコマンドプロンプト・ウィンドウにマウスを使って、ドラッグする。Enter
4. C:\blast\db>
表示になる。
5. 点滅カーソル状態で、[dir] Enter
6. XXXXX.fas が表示されていることを確認する。
7. この後、query 配列とデータベースは全て、このディレクトリを使用する。また、blast の結果は、全てこのディレクトリに作成される。

データベースの作成

1. DNA 配列かアミノ酸配列の FASTA ファイルとして作成する。ファイル名は、DNA の場合には、XXXXXnuc.fas、蛋白質の場合には、XXXXXaa.fas などと区別するように命名するとよい。ここで、作成した FASTA ファイル、例えば、XXXXXnuc.fas は、C:\¥blast¥db フォルダにコピーする。

次にこの“XXXXXnuc.fas”という名前の fasta ファイルをデータベースとして利用する様式に変換する。

2. “makeblastdb -in XXXXXnuc.fas -out XXXXXnucDB -dbtype nucl”と入力し、を押す。
3. 「XXXXXnucDB」は、データベース名である。「-dbtype nucl」は、入力必須項目である。因みに蛋白質の場合は、「-dbtype prot」と入力する。
4. “db” ディレクトリに以下の3つのファイルが作成されたことを確認する。
XXXXXnucDB.nhr
XXXXXnucDB.nin
XXXXXnucDB.nsq
5. blastn

query に” dna-query.fas” ファイルを使用する場合、

“C:\¥blast¥db>”の後に、以下のように入力する。

```
blastn -query dna-query.fas -db XXXXXDB -out dna-query.out
```

と入力して、を押すところであるが、この入力に、コピー&ペーストを利用する。

C:\¥blast¥db>blastn -query まで入力して、db フォルダ（のアクティブウィンドウ）から、「dna-query.fas」をドラッグすると、以下のようになる。

```
C:\¥blast¥db>blastn -query C:\¥blast¥db¥dna-query.fas
```

、そこで続けて

```
C:\¥blast¥db>blastn -query C:\¥blast¥db¥dna-query.fas -db
```

と入力し、db フォルダから、データベースとして、作成した上記3つの「XXXXXDB」のうち、いずれか一つをドラッグする（今回は、「XXXXXnucDB.nhr」を用いる）と、

```
C:\¥blast¥db>blastn -query C:\¥blast¥db¥dna-query.fas -db
```

```
C:\¥blast¥db¥XXXXXDB.nhr
```

となる。そこで、データベースファイルの3つに共通な部分である

「XXXXXuncDB」だけを残すため、「.nhr」の文字を `BackSpaceKey` で削除する。

そして、その後に結果の出力ファイル名として、「-out dna-query.out」と入力して、`Enter`を押す。

“db”内に、瞬時に”dna-query.out”が作成される。

このコマンドの意味は、クエリー (-query) に「dna-query.fas」という fasta 形式のファイルにある配列 (単独でもマルチでも可) を用いて、データベース (-db) として、[XXXXXDB] (上記の3つのファイルを指定するために、最初の共通の文字列のみを入力する) を使用して、その結果を (-out) [dna-query.out] というファイル名として、書き出す、ことである。

Comments & Options

① option switch を指示しなければ、デフォルトでは、500 行と 250 アラインメントの表示となる (従って、長大なファイルとなる)。これを変更する場合には、以下の通り、表示 option スイッチと表示数を加える

```
>blastn -query [dna-query.fas] -db [XXXXXDB] -out [dna-query.out] (-num_descriptions <500> -num_alignments <250>)
```

②表形式結果表示 ⇒ エクセルでの表形式で結果を示すことができるので、利用価値は高い。

```
>blastn -query [dna-query.fas] -db [XXXXXDB] -out [dna-query.out] -outfmt [String]
```

*String=6: tabular (ACT で利用する Comparison file の作製に必要)

*String=7: tabular with comment lines

*String=10: Comma-separated values

その他、多数の formatting option が利用可能である。この説明は、[-help] で確認することができる。

(Version 1.2 2016.02.29)

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

| | | |
|-------|--------|-------------|
| 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

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に 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。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 Inc A/C と Inc FII 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が存在することを明らかにした。一方、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 *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*) の全ゲノム配列を NGS で決定し、その系統解析から 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（患者由来株と動物由来株）、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。また、クラスター1 は愛媛株では患者株のみであったが、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、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 に属したが、これらの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。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てきた³⁾。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、これまでに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、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、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⁾ことから、患者、食材(鶏肉、豚肉)、家畜(豚)から分離された *S.* *Infantis* の全ゲノム配列に基づく系統解析を実施した。

B 材料と方法

1 サルモネラ株

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(豚直腸便、皮剥前臀・腹部)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決定した(表1)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(表2)。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。

なお、表1、2は文献3より、改変・転載したものである。

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。*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 Next Seq 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⁾。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。得られたサルモネラ株のゲノム配列から 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'-TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT-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 O4 型別不能株ゲノムの NGS 解析

表 1 に示した O4 型別不能株(EHM21-304)は 9 歳女兒の虫垂部膿から分離され、表 2 に示したように多剤耐性菌であり、臨床的・細菌学的重要性からより詳細に検討した。血清型については、O4 以外に 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:- であることが判明した (以下, *S.* 4,5,12:i:-)。

本菌株の NGS ゲノム解析により得られた 22,870 SNPs を用いて、RAxML (最尤法, bootstrap 1000 回) にて系統解析を実施し、*S. Typhimurium* と近縁であることが明らかにした (図 1)。*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菌種で、そのうち CVM23701 株は全ゲノム解析がなされているが、EHM21-304 は CVM23701 とは異なるタイプであることが明らかにされた (図 2)。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。

2 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 3)。標準株として、*S. Typhimurium* LT-2 株を用いた (図 3 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 3 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¹⁰⁾、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 3 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 4)。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。

3 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。リードの *de novo* アセンブリから得られた 2 本の scaffold 間の gap、及びそれぞれの scaffold 内の gap を gap filling し、pSO4-21-304 の全塩基配列を決定した。

pSO4-21-304 の全長配列は 179,881 bp、GC 含量は 52.2% で (図 5)、DDBJ に登録した (accession number: AP014634)。図 5 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 3 に示すように、Inc A/C 関連領域には Inc A/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、Inc FII 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、IS*Pa40* などの IS が存在した。

4 *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 6)、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 7)。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^{8,11)}。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7)、*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8) 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4)。

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。

従来の方法では血清型が 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。*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¹²⁻¹⁵⁾。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、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、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3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¹⁶⁾、多剤耐性のサルモネラから分離されることも多い¹⁷⁾。CTX-M(cefotaximases)産生菌¹⁸⁾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¹⁹⁾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²⁰⁾。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。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。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²¹⁾、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(*fljA*, *fljB* 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) 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/Byogen tai/Pdf/data48j.pdf>
- 5) Kuroda M et al., Characterization of quasi-species 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) 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.
 - 11) 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
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Carattoli A, Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* (2009) 53(6):2227-38.
 - 17) Lindsey RL., Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Appl Environ Microbiol.* (2009) 75(7):1908-15.
 - 18) Bauernfeind A et al., A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* (1990) 18(5):294-8.
 - 19) Pitout JD et al., Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother.* (2005) 56(1):52-9.
 - 20) 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.
 - 21) 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