

第 3 章 調査研究・報告

第 1 節 原 著

セレウス菌が産生する嘔吐毒セレウリドの分析

長尾舞・清水悠弥・森村実加・安藤尚子・桐山秀樹

Analysis of the emetic toxin, Cereulide produced by *Bacillus cereus*

Mai NAGAO・Yuya SHIMIZU・Mika MORIMURA・Naoko ANDO and Hideki KIRIYAMA

LC-MS/MS を用いて嘔吐毒セレウリドの迅速な分析法を確立し、食品中でのセレウリド産生条件を確認した。確立した分析法は、選択性・真度・精度の各項目において妥当性の目標値を満たした。セレウス菌を添加した食品でのセレウリド産生試験では、25℃で 18 時間以内、30℃及び 35℃では 12 時間以内に最小発症量に達することが確認され、食中毒予防に資する有用な知見が得られた。

緒 言

セレウス菌食中毒は、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) によって起こる食中毒で、厚生労働省発表の食中毒統計 (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html) によると、平成 27 年～令和 6 年の過去 10 年間の日本国内での事件総数は 47 件、患者総数は 727 人であった。図 1 に示すように、事件数は例年一桁台で推移しているが、患者数は数百人に上る年もあり、一件で多数の患者が発生する事件もある。奈良県では、平成 27 年に焼き飯が原因と推定されるセレウス菌食中毒が発生している。

セレウス菌は、土壌、空気及び河川水等の自然環境に広く分布しているため、食品への汚染の機会が多いと言える。セレウス菌は通性嫌気性の桿菌で、耐熱性の芽胞を形成するため、加熱調理された食品でも室温で放置すれば、この菌の発芽増殖を招く。原因食品としては、穀類及びその加工品（米飯類、麺類等）が大部分を占めており、食中毒の発生時期は、気温が高くなる初夏～秋頃に起こりやすい。セレウス菌食中毒は、嘔吐型と下痢型の 2 つに大別され、わが国で発生する食中毒の大半が嘔吐型である。嘔吐型の食中毒は、セレウス菌に汚染された食品中で産生された嘔吐を引き起こす毒素セレウリド（以下「CER」という）の摂取によって起こる。CER の化学構造式を図 2 に示す。CER は疎水性で 1153.38 の分子量を有し、アミノ酸とオキシ酸からなる環状のデブシペプチドで、熱や酸・アルカリ、消化酵素にも安定な毒素である。

本県のセレウス菌による食中毒検査では、残品などからセレウス菌を分離培養後、疑わしい集落が発育した場合、必要に応じて生化学性状試験及び CER 合成酵素遺伝子を対象とした PCR 法で CER 産生遺伝子

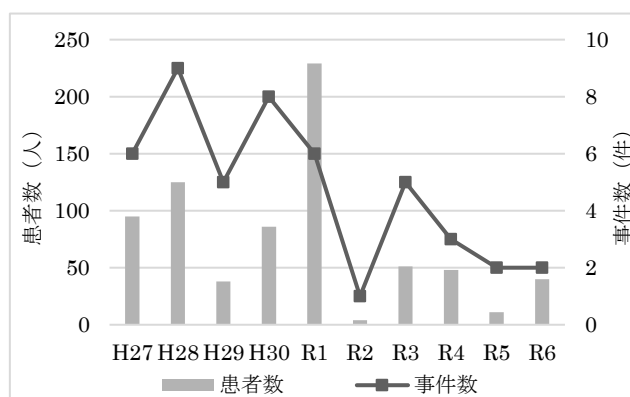


図 1 セレウス菌食中毒発生状況

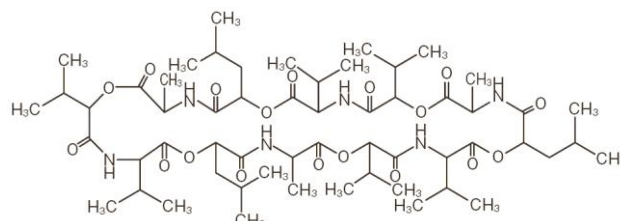


図 2 セレウリド構造式

保有の有無を判定している。この検査方法では、セレウス菌の陽性判定までに最短でも 3 日、その他デンプン加水分解能検査などを実施すると 4 日以上の日数を要す。本研究では、LC-MS/MS を用いて CER を短時間に分析する方法を確立するとともに、CER 産生試験により食品中での CER 産生の条件を確認することで、食中毒の予防に向けた取り組みに資することを目的とする。

調査方法

1. 試薬、器具及び機器等

1) 試薬

CER 標準液 (50 µg/mL メタノール溶液) (食品分析用)、メタノール (LC/MS 用)、超純水 (LC/MS 用)、

1 mol/L 酢酸アンモニウム (HPLC 用) 及び塩化ナトリウム (試薬特級) は富士フイルム和光純薬 (株) 製を用いた。

アキュディア™ NGKG 寒天基礎培地 (顆粒), アキュディア™ 普通寒天培地 (顆粒) は島津ダイアグノスティクス (株) 製を, Bact™ Peptone は Thermo Fisher Scientific 社製を, 卵黄乳液は Oxoid Limited 製を用いた。

2) 器具, 機器

固相精製カラムは Waters 社製 Oasis HLB を使用した。

遠心分離機はエッペンドルフ・ハイマック・テクノロジー (株) 製高速冷却遠心機 CR21N を, 振とう器はイワキ (株) 製 KM Shaker V-DX を, LC-MS/MS は Waters 社製液体クロマトグラフ ACQUITY UPLC H-Class システム及び同社製質量分析計 Xevo TQ-S micro を使用した。

2. CER の LC-MS/MS 分析条件の検討

LC-MS/MS について, CER 標準液を用いて MS 測定条件の最適化を行った。また, LC 条件については山下¹⁾の方法を参考に検討した。

3. 前処理方法の検討

前処理方法は食品衛生検査指針²⁾を参考に, 固相の抽出・精製について検討し, 決定した。

1) 精製方法の検討

Oasis HLB の CER 保持条件を確認するため, 梶田³⁾の方法を参考に, CER 標準液を 50, 60, 70 及び 80% のメタノール溶液に溶解し Oasis HLB に負荷した。また, CER 溶出条件について, 95% 及び 100% メタノールで溶出させ, CER 回収率で確認した。

2) 抽出条件の検討

パックご飯, そうめん, 即席麺及びレトルトカレーの4種類の食品で, 試料採取量及び抽出に用いるメタノール添加量について, 添加回収試験を実施し検討した。対象食品を 200 g 摂取した場合, 人における最小発症量 1 µg⁴⁾ に相当する 5 µg/kg となるように CER 標準液を添加し, 試料とした。この試料 1 g 及び 5 g を 50 mL 遠沈管に採取し, メタノールを試料 1 g には 10 mL, 試料 5 g には 20 mL 加え, 10 分間振とう後, 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上清を回収後, 残渣に試料 1 g には 5 mL, 試料 5 g には 10 mL のメタノールを加えて同様の操作を行い, 先の上清と合わせたものを試料抽出液とした。

4. マトリックス効果の検証

決定した方法で米飯の前処理を行い, 調製した試験溶液を用いて標準液を希釈し, マトリックス検量線を作成し, マトリックスマッチングの必要性を確認した。

5. 分析法の妥当性確認

決定した CER 分析法について, 厚生労働省発出 平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 3 号及び食安監発 0306 第 1 号「下痢性貝毒 (オカダ酸群) の検査について」の別紙 1「妥当性確認の方法」に基づき, 米飯を対象に, 当該分析法の妥当性を確認した。

6. セレウス菌を添加した食品での CER 産生試験の実施

数種類の食品について, 温度条件を変えたときの CER 濃度とセレウス菌数の経時的な変化を測定した。対象食品は, 購入したパックご飯, 柿の葉寿司, 冷凍焼き飯, 冷凍焼きそばに加え, 直前に調理したそうめん, 米飯とした。あらかじめ水分活性と pH を測定し, セレウス菌の至適 pH とされる pH4.9~9.3 域外の食品については除外した。供試菌株は, 事前に CER 合成酵素遺伝子が陽性であることを確認した食中毒事例由来セレウス菌を普通寒天培地に接種し, 35℃で 24 時間培養したものを用いた。食品に供試菌株を約 100 CFU/g となるよう接種し, 25℃, 30℃及び 35℃の条件で, 接種直後, 12, 18, 24, 36, 42, 48, 60, 66 及び 72 時間培養し, 試験品とした。試験品をスパーテルでよく混合し, CER 測定用と菌数測定用に分取した。CER 測定は滅菌後, 確立した方法を用いて LC-MS/MS で測定を行い, 菌数測定は食品衛生検査指針²⁾を参考に計測した。すなわち, 試験品にペプトン加生理食塩水を加え 10 倍乳剤を作製しストマッカー処理を行い, 生理食塩水で適宜段階希釈し, 100 µL を NGKG 寒天培地に塗布し, 35℃で 18~24 時間好気培養後, セレウス菌数を計測した。

結 果

1. CER の LC-MS/MS 分析条件の決定

LC-MS/MS における MS 測定条件を表 1 のとおり決定した。また, LC 条件について, 山下¹⁾の方法を参考に表 2 のとおり決定した。

本条件で 0.25~10 ng/mL の範囲で検量線を作成したところ, $R^2=0.999$ 以上の直線性が得られた。

また, JIS K0136:2015 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則を参考に, 検量線の最低濃度である 0.25 ng/mL を 10 回繰り返し測定し, 標準液の検出下

限値を求めた結果、0.023 ng/mL となった。

表 1 MS/MS 測定条件

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)
Cereulide (C ₅₇ H ₉₆ N ₆ O ₁₈)	1170.97	172.31	34	80
		357.45	34	66
		314.40	34	72
		186.29	34	80
		200.28	34	76
Ion Mode		ESI(+)		
Source Temp.		150°C		
Capillary Voltage		1.6 kV		
Desolvation Temp.		400°C		
Cone Gas Flow		50 L/hr		
Desolvation Gas Flow		800 L/hr		

表 2 LC 条件

Column	ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 mm×100 mm, 1.7 μm
Mobile Phase	A) 5 mM ammonium acetate in water B) 5 mM ammonium acetate in methanol
Gradient (B%)	80(0 min)→80(2 min)→100(10 min) →100(13 min)→20(13.1 min) →20(17 min)→80(17.1 min)→80(20 min)
Column Temp.	50°C
Flow Rate	0.4 mL/min
Injection Volume	5 μL

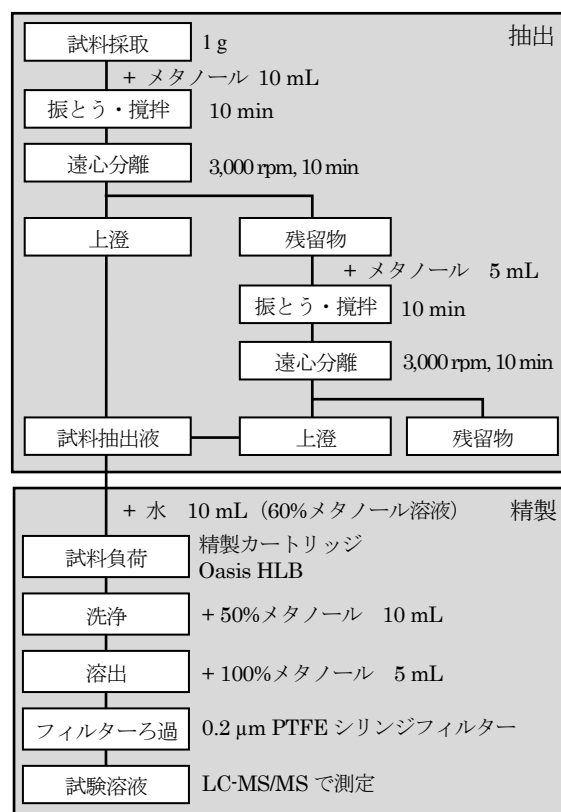


図 3 前処理フロー

2. 前処理方法の決定

1) 精製方法の決定

CER 標準液を用いて固相精製を行い、最も回収率が良好であった Oasis HLB に負荷するメタノール濃度を 60%，溶出液のメタノール濃度を 100%に決定した。

2) 抽出条件の決定

4 種類の食品における添加回収結果は表 3 のとおりであった。全ての食品で 5 g と 1 g での添加回収率は 70～120%を満たしていたが、1 g の方が若干良好な結果となった。これより、試料採取量を 1 g に決定し、試料の前処理フローを図 3 のとおり決定した。

表 3 各食品における添加回収率

食品	添加回収率	
	採取量 5 g	採取量 1 g
バックご飯	80.0%	91.5%
そうめん	96.6%	104.8%
即席麺	93.1%	93.4%
レトルトカレー	106.1%	103.5%

3. マトリックス効果の検証

マトリックス検量線を作成し、各濃度でマトリックス効果（マトリックス存在下の標準溶液面積値／溶媒標準溶液面積値）を算出したところ、すべて 80～120%の範囲内に収まったため、マトリックスマッチングの必要性はないと判断し、定量には溶媒標準による絶対検量線法を採用した（図 4）。

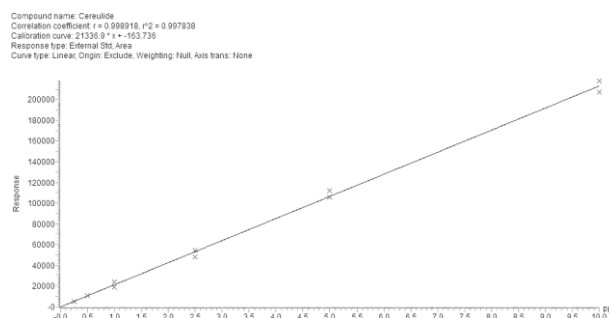


図 4 マトリックス検量線

4. 分析法の妥当性確認

決定した CER 分析法について、ブランク試料及び CER 標準液添加試料の分析結果から、選択性、真度、併行精度及び室内精度について確認した。

まず、選択性について、CER を含まない米飯から得られたクロマトグラム及び CER 標準液 5 ng/mL のクロマトグラムを比較したところ（図 5）、CER のピーク付近に定量を妨害するピークはなく、選択性を満たしていた。

次に、対象食品を 200 g 摂取した場合の最小発症量の CER 濃度 5 μg/kg となるように CER 標準液を添加し、3 人 1 濃度 2 併行 2 日間で添加回収試験を実施した。その結果、真度は 104.6%，併行精度は 2.7%，室内精度は 3.0%であり、決定した CER 分析法は妥当性の目標値である真度 70～120%，併行精度 15%以下、

室内精度 20%以下を満たす良好な結果が得られた。

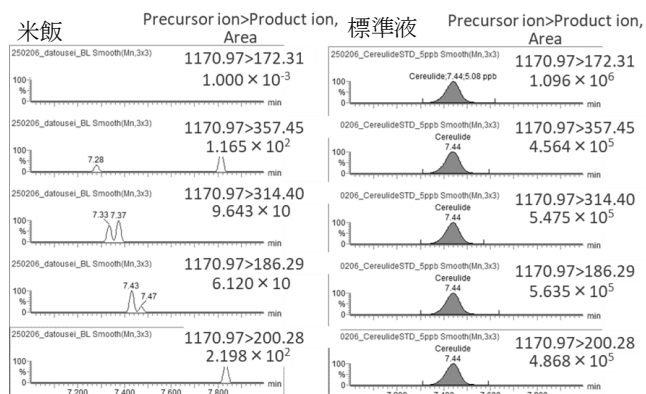


図5 米飯及び標準液のクロマトグラム

5. セレウス菌を添加した食品での CER 産生試験の結果

対象食品について水分活性及び pH を測定した結果、水分活性は全ての食品で 0.98 以上であった。pH はパックご飯、柿の葉寿司で至適 pH 域外であったため除外し、試験品をそうめん、米飯、冷凍焼き飯及び冷凍焼きそばに決定した。

本試験の結果、冷凍焼きそばでは全ての温度帯及び経過時間で培地上にコロニーは確認できず、CER 濃度も定量下限値未満であった。冷凍焼きそばの pH は 5.3 と至適 pH 域の範囲内ではあったが、他の食品より酸

性寄りであったため、増菌しなかったと考えられる。

そうめん、米飯、焼き飯の 3 種の食品の CER 濃度とセレウス菌数の経時変化を図 6 及び表 4 に示す。

対象食品を 200 g 摂取した場合の最小発症量の CER 濃度 5 µg/kg に達する時間について、そうめんでは 25℃で 18 時間以内、30℃、35℃で 12 時間以内、米飯では 25℃で 24 時間以内、30℃、35℃で 18 時間以内、焼き飯では 25℃で 24 時間以内、30℃、35℃で 18 時間以内であった。30℃、35℃の温度帯では 25℃より早く最小発症量に達したが、CER 濃度はそうめん、米飯では 25℃で高濃度を示した。最も CER 濃度が高くなったのは、そうめんの 25℃、66 時間後で 2636.8 µg/kg、菌数は 4.0×10⁸ CFU/g、次に焼き飯の 30℃、66 時間後で 2063.0 µg/kg、菌数は 4.5×10⁷ CFU/g であった。

3 種の食品について、CER 濃度は概ね 48 時間後までは増加していたが、その後そうめんでは 25℃で 66 時間以降、30℃で 60 時間以降に、米飯では 30℃で 48 時間以降に、焼き飯では 25℃、30℃で 66 時間以降に、35℃で 42 時間以降に減少に転じた。セレウス菌数が静止期に達した時間は、そうめんでは 12～18 時間、米飯で 18～24 時間、焼き飯で 12～36 時間で、そうめん、焼き飯では菌数も 60 時間以降に減少傾向を示していた。

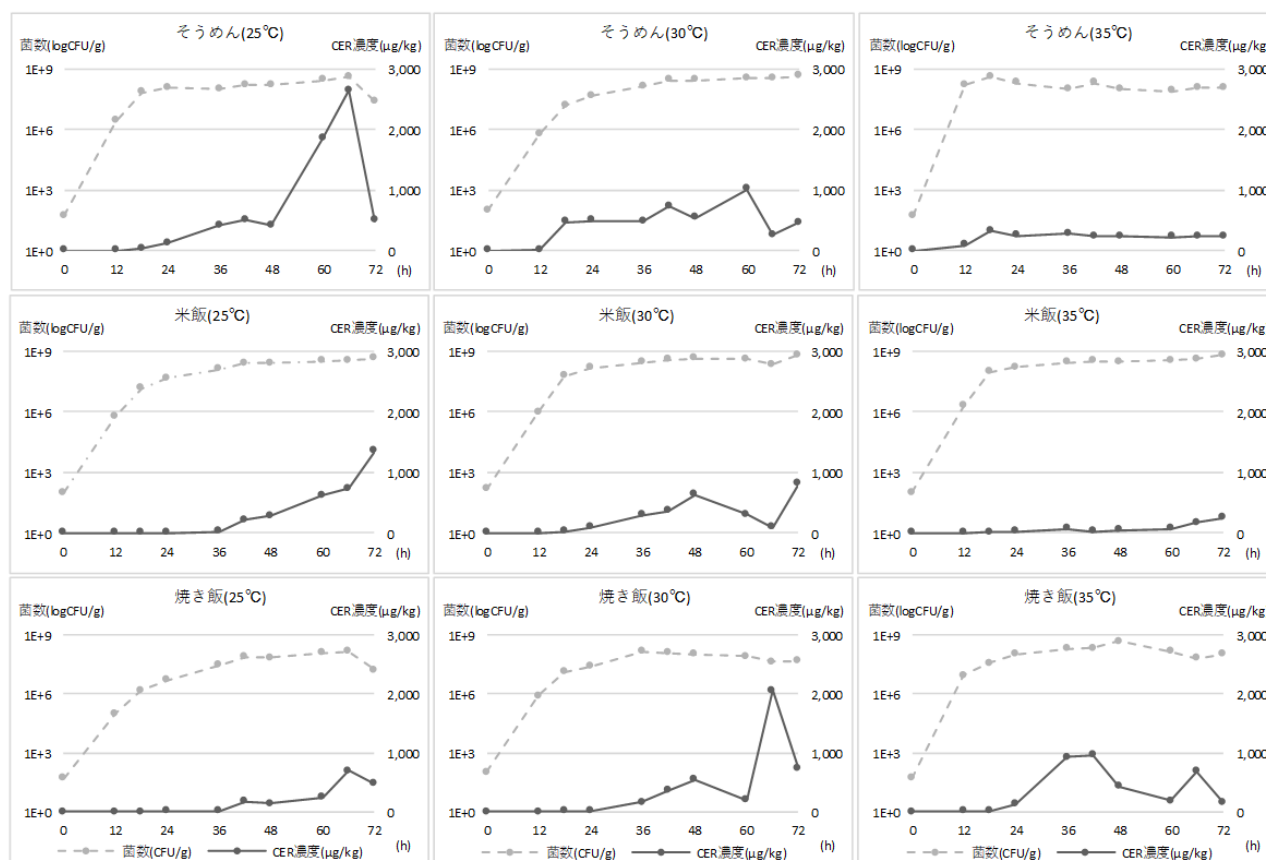


図6 CER 濃度とセレウス菌数の経時変化

表4 CER濃度とセレウス菌数の経時変化

そうめんにおける CER 濃度及びセレウス菌数

培養時間 (h)	培養温度 25℃		培養温度 30℃		培養温度 35℃	
	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]
0	0.0	5.0×10 ⁰	0.0	5.0×10 ⁰	0.0	5.0×10 ⁰
12	0.0	2.5×10 ⁶	5.3	1.5×10 ⁸	88.2	1.5×10 ⁸
18	27.9	6.5×10 ⁷	475.0	3.0×10 ⁸	328.7	4.0×10 ⁸
24	124.9	1.1×10 ⁸	489.7	4.0×10 ⁸	248.4	2.0×10 ⁸
36	409.0	1.0×10 ⁸	482.8	1.0×10 ⁸	283.8	1.0×10 ⁸
42	508.9	1.5×10 ⁸	729.7	2.5×10 ⁸	230.4	2.0×10 ⁸
48	416.3	1.6×10 ⁸	539.6	2.2×10 ⁸	235.6	1.0×10 ⁸
60	1849.5	2.7×10 ⁸	1014.2	1.5×10 ⁸	226.4	8.0×10 ⁷
66	2636.8	4.0×10 ⁸	261.1	3.0×10 ⁷	233.0	1.1×10 ⁸
72	491.2	2.5×10 ⁷	457.0	1.4×10 ⁸	234.6	1.1×10 ⁸

米飯における CER 濃度及びセレウス菌数

培養時間 (h)	培養温度 25℃		培養温度 30℃		培養温度 35℃	
	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]
0	0.0	1.0×10 ²	0.0	1.5×10 ²	0.0	5.0×10 ⁰
12	0.8	6.0×10 ⁵	1.9	9.4×10 ⁵	2.1	2.0×10 ⁶
18	4.3	1.5×10 ⁷	30.5	6.0×10 ⁷	11.2	9.5×10 ⁷
24	8.2	4.6×10 ⁷	95.4	1.5×10 ⁸	21.4	1.6×10 ⁸
36	26.8	1.3×10 ⁸	301.2	2.8×10 ⁸	76.1	2.8×10 ⁸
42	213.0	2.6×10 ⁸	363.4	3.7×10 ⁸	30.5	3.3×10 ⁸
48	283.9	2.6×10 ⁸	631.5	4.4×10 ⁸	50.1	2.9×10 ⁸
60	620.6	3.3×10 ⁸	304.4	4.0×10 ⁸	73.5	3.6×10 ⁸
66	734.2	3.4×10 ⁸	92.2	2.2×10 ⁸	168.2	4.2×10 ⁸
72	1350.5	4.3×10 ⁸	817.0	6.8×10 ⁸	249.2	6.6×10 ⁸

焼き飯における CER 濃度及びセレウス菌数

培養時間 (h)	培養温度 25℃		培養温度 30℃		培養温度 35℃	
	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]	CER 濃度 [μg/kg]	菌数 [CFU/g]
0	0.0	5.0×10 ⁰	0.0	1.0×10 ²	0.0	5.0×10 ⁰
12	0.0	1.0×10 ⁵	1.3	8.0×10 ⁵	4.4	8.8×10 ⁶
18	0.8	1.5×10 ⁶	6.0	1.3×10 ⁷	10.0	3.7×10 ⁷
24	12.9	5.0×10 ⁶	13.7	2.5×10 ⁷	128.5	1.1×10 ⁸
36	8.6	3.0×10 ⁷	160.6	1.4×10 ⁸	927.0	2.0×10 ⁸
42	170.9	7.5×10 ⁷	358.8	1.2×10 ⁸	954.0	2.1×10 ⁸
48	137.6	7.0×10 ⁷	537.5	1.1×10 ⁸	431.3	4.9×10 ⁸
60	239.5	1.2×10 ⁸	193.1	8.5×10 ⁷	188.0	1.5×10 ⁸
66	696.1	1.4×10 ⁸	2063.0	4.5×10 ⁷	681.6	6.5×10 ⁷
72	478.0	1.7×10 ⁷	726.2	4.9×10 ⁷	158.4	1.1×10 ⁸

考 察

本研究では、LC-MS/MS を用いて CER の迅速な分析法を確立し、本分析法は選択性・真度・精度の各項目において妥当性の基準を満たしており、食中毒検査体制の拡充に資する有効な手法である。セレウス菌を

添加した食品における CER 産生試験では、25℃で 18 時間以内、30℃及び 35℃では 12 時間以内に最小発症量に達することが確認され、室温での保存が食中毒発症の一因となる可能性が示唆された。

奈賀の研究⁵⁾によれば、35℃で培養したセレウス菌は 12 時間まで対数増殖期を示し、その後定常期を経て菌数が減少した。CER は定常期に入ると濃度が増加し、39 時間以降に減少する傾向が認められており、本研究においても同様の傾向が確認された。また、奈賀は CER が加水分解によりエステル開裂を起こし(図 7)、CER の減少に伴い分解物であるテトラデプシペプチドの増加を報告している。これらの知見は、熱・酸・アルカリ・消化酵素に対して高い安定性を示すとされるセレウリドであっても、一定の条件下では分解が進行する可能性があることを示している。

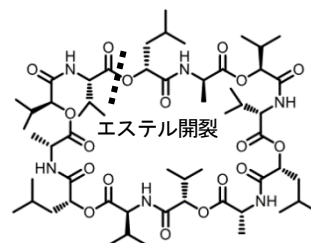


図7 CERのエステル開裂

謝 辞

本研究は、公益財団法人大同生命厚生事業団より地域保健福祉研究助成を受けて行っており、大同生命厚生事業団及び関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 山下清佳, 上村晃秀, 本田俊郎, 他: 鹿児島県環境保健センター所報, 21, 78-83 (2020)
- 2) 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版, 363-383 (2018)
- 3) 梶田弘子, 岩渕香織, 藤井伸一郎, 他: 岩手県環境保健研究センター年報, 7, 75-78 (2007)
- 4) 上田成子: セレウス菌, 食中毒予防必携第3版, 日本食品衛生協会, 115-125 (2013)
- 5) 奈賀俊人: *Bacillus cereus* が産生する嘔吐型毒素に関する生物有機化学的研究 (2020)

鶏の羽毛に付着した真菌叢解析

森村実加・山本紗也・松浦侑輝・持田雅裕*・安藤尚子・山崎聖子・桐山秀樹

Analysis of Fungal flora Adhered to Chicken Feathers

Mika MORIMURA・Saya YAMAMOTO・Yuki MATSUURA・Masahiro MOCHIDA・
Naoko ANDO・Seiko YAMAZAKI and Hideki KIRIYAMA

奈良県所管の大規模食鳥処理場において、複数のスイングドアから 3 種の木材腐朽菌に属する子実体および菌糸体が検出された。外部からの侵入経路として、鶏の体表（羽毛）への真菌の付着が有力な要因と考えられたため、次世代シーケンサ（NGS）を用いた真菌叢解析を実施した。その結果、31 属 50 菌種の真菌が検出されたが、スイングドアに発生した子実体および菌糸体との一致はみられず、侵入経路の解明には至らなかった。しかし、鶏の体表には多様な真菌が付着しており、それらが食品衛生上の危害要因として施設内に持ち込まれている実態が明らかとなった。

緒 言

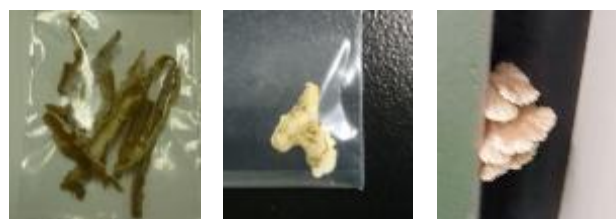
大規模食鳥処理場は、「食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律」の規定により、HACCP に基づく食鳥処理の他、衛生管理計画および手順書をはじめとする HACCP 文書の科学的な妥当性及び遵守状況について、食鳥検査員による検査又は試験（外部検証）を受けることとされている。

令和 5 年に奈良県が実施した外部検証により、対象施設内に設置されたスイングドアから木材腐朽菌に属する子実体および菌糸体の発生を探知した。その子実体および菌糸体を採取し、rDNA の ITS 領域の遺伝子部分についてダイレクトシーケンス法を用いた塩基配列解析により同定した結果、*Irpex laceratus*, *Byssomerulius corium*, *Schizophyllum commune* の 3 種を検出した（図 1）¹⁾。係る発生原因の究明のため、真菌の生育環境について食鳥処理場における室内環境を調査した結果、年間を通じて温度・湿度が真菌の生育に適した状態で常に保たれていることが明らかとなった。さらに、先行調査により確認した鶏舎の周辺環境や飼養管理の状況を踏まえると、鶏や輸送容器を介して真菌の孢子や菌糸が処理場内に持ち込まれている可能性が示唆された。

一方で、酵母菌を含む真菌の検出および同定は、一般的に鏡検や培地への接種による培養が標準的であるが、その多くが難培養性であるため検出は一部の菌

種に限られる。近年、NGS を用いた網羅解析が可能となり、難培養性の菌種でも検出が可能となった。

そこで今回、食鳥処理施設に搬入された鶏の羽毛に付着する真菌の実態を明らかにし、施設内への侵入経路を解明することを目的として、NGS によって得られたゲノムの配列情報を用いた真菌叢の解析を行ったので報告する。



左： *I. laceratus*, 中： *B. corium*, 右： *S. commune*

図 1 外部検証にて探知した木材腐朽菌

方 法

1. 試料

2024 年 12 月に食鳥処理施設（1 施設）に搬入された鶏（同一ロット）から採取した羽毛を対象とした。採取は、懸鳥後の複数羽から抜去もしくは解剖ハサミでの切除により羽毛（正羽・綿羽）を収集した。

血液の混入を防ぐため、羽軸の部分を取り除いた鶏の羽毛 2.3 g に約 100 倍量の生理食塩水を加え 10 分間激しく混濁後、金網メッシュで濾過して羽毛を除去した。この濾液を 12,000 rpm で 4℃、15 分間遠心分離し、上清を除去後、沈渣を試料とした。

* 食品衛生検査所

2. DNA 抽出・精製方法

試料からの DNA 抽出には、シカジーニクス®DNA 抽出試薬 ST (関東化学株式会社), DNeasy Plant Kits (QIAGEN) およびシカジーニクス®トータル DNA プレップキット(組織用) (関東化学株式会社) の 3 種類の抽出試薬を用いて、付属の取扱説明書に記載されている方法に従い DNA を抽出した。

得られた DNA に、rDNA 内の ITS1, ITS2 領域を対象にした PCR を実施した。先のスイングドアに出現した子実体の検出においては、真菌の rDNA のうち、ITS 領域の塩基配列に基づいて同定を行った。これに倣い、羽毛においても同様の ITS 領域を用いることとした。プライマーは ITS1 (ITS5/ITS2) および ITS2 (ITS3/ITS4) を用いた²⁾ (表 1, 図 2)。PCR 反応液の組成は、1 反応あたり TaKaRa Ex Taq HS (タカラバイオ株式会社) を 0.05 μ L, 2 \times Ampdirect Plus (株式会社島津製作所) を 5 μ L, 10 μ M の F-プライマーおよび R-プライマーを各 0.5 μ L, DNA 試料液 1.0 μ L に滅菌精製水を加えて全量 10 μ L とした。反応条件は 98 $^{\circ}$ C 10 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 40 秒を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。PCR 後の増幅産物は 2%アガロースゲルで 100 V, 25 分間電気泳動し、UV 照射下でバンドを検出した。アガロースゲルからの切り出しを行い、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス株式会社) を用いて精製後、Qubit® 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) によって DNA 濃度を測定した。

表 1 ITS 領域のプライマー

Target region	Primer name	Primer sequence(5' \rightarrow 3')	F/R
ITS1	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	F
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	R
ITS2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	F
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	R

F: フォワード, R: リバース

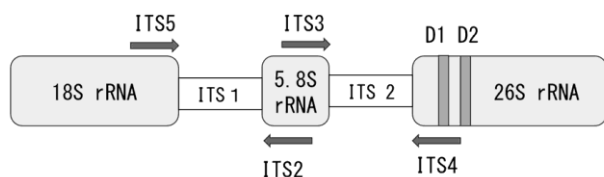


図 2 ITS 領域および D1/D2 領域とプライマー

3. ライブラリーの調製

精製 DNA 溶出液を QIAseq FX DNA Library C DI Kit (QIAGEN) に記載された方法に従いライブラリー調製を行った。

4. シーケンス・データ解析

NGS の iSeq 100 System (illumina) を用いて fastq データを取得した。この fastq ファイルには読み取った DNA の全断片塩基配列とそのクオリティスコアが含まれており、クオリティの低い配列を除去し正確なデータのみを抽出する必要がある。ゲノム解析のワークフローを図 3 に示した。

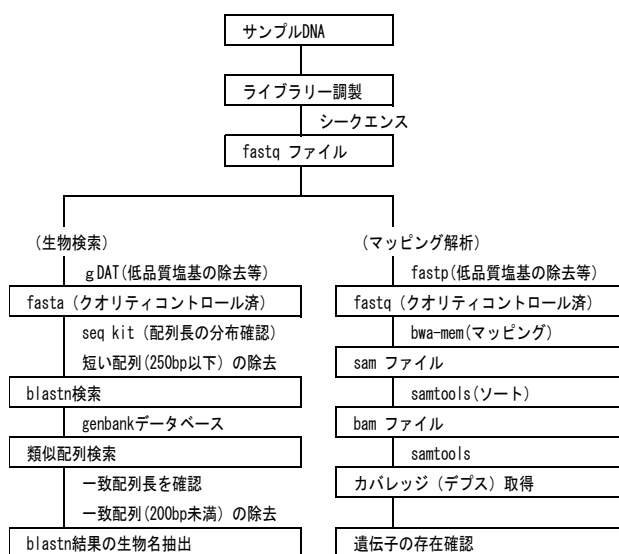


図 3 ゲノム解析のワークフロー

1) 生物検索

fastq ファイルに gDAT³⁾ を用いてデータのクリーンアップ (低クオリティデータの除去), ペアリードマージ (データの結合), キメラリード除去 (2 つ以上の異なる生物から構築された人工的な配列の除去) を行い、クオリティコントロール済みの fasta ファイルを抽出した。fasta ファイルについて seq kit⁴⁾ を用いて配列長の分布を確認し、短い配列 (250 bp 以下) の除去を行った。250 bp よりも長いそれぞれの配列について nucleotide blast (blastn) 検索を行い、genbank のデータベースを参照して類似配列検索を行った。得られた blastn の結果について、blast score の最も高い配列を抽出後に一致配列長を確認し、一致した配列長が 200 bp 未満の結果を除いた。一致した配列長が 200 bp 以上の結果について重複した結果を除き、blastn 結果から生物名を抽出して検索結果とした。

2) マッピング解析

iSeq 100 System から得られた fastq ファイルに fastp⁵⁾ を用いてクオリティコントロールを行い, bwa-mem⁶⁾ を用いてクオリティコントロール後の fastq ファイルを混入が疑われる生物名のリファレンス配列にマッピングし, sam ファイルを作成した. 作成した sam ファイルは, samtools を用いて, データのソートを行い, bam ファイルへ変換した. 得られた bam ファイルをもとに samtools を用いてカバレッジ (デプス) データを取得, gnuplot(<http://www.gnuplot.info/>)を用いてグラフを描画し, 混入が疑われる微生物の遺伝子の存在を確認した.

結 果

1. DNA 抽出・精製

ITS1, ITS2 領域を対象にした PCR を実施後, アガロース電気泳動を行った結果, DNeasy Plant Kit およびシカジーニクス®トータル DNA プレップキット (組織用) のみ薄いバンドが得られた. この 2 種類のうち, よりバンドが濃かった DNA プレップキット (組織用) からゲルの切り出しおよび DNA 抽出を行った. 精製後 DNA 濃度を測定した結果, ITS1 領域で 0.284 ng/μL, ITS2 領域で 0.218 ng/μL であった.

2. 真菌・酵母菌・菌類叢解析・評価

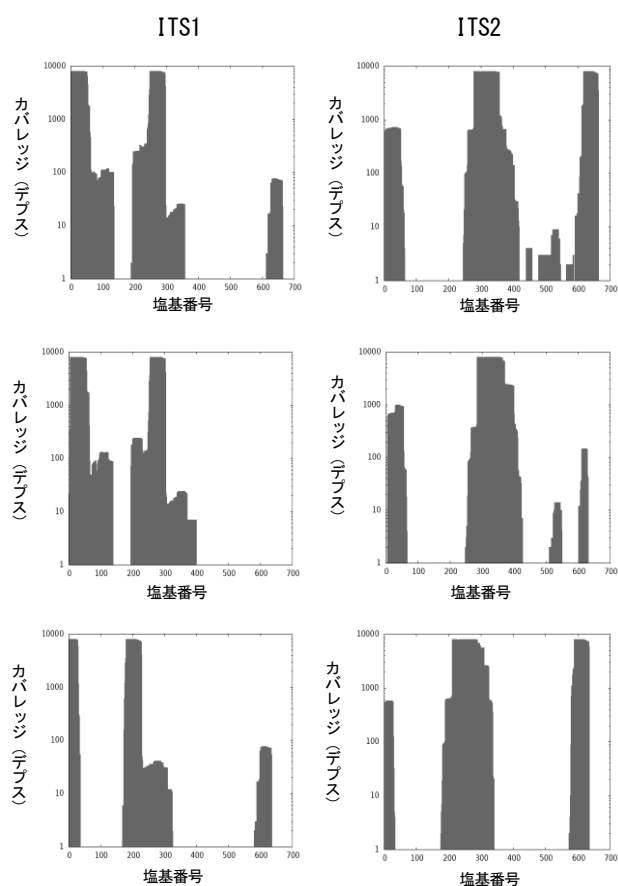
1) 生物検索

真菌は生殖構造, 生活環, 形態学的特徴により, 主に子囊菌門と担子菌門に分類される. 本検討によって試行した DNA 解析手法では, 31 属 50 菌種の真菌が検出された (表 2). その内訳として, 子囊菌門に属する酵母様真菌が 4 属 4 菌種および, 酵母様真菌以外が 13 属 31 菌種, 担子菌門に属する真菌は 14 属 15 菌種であった. その中には, *Exophiala spinifera* や *Rhinocladiella similis* といった黒色真菌症の原因となる真菌⁷⁻⁸⁾ および爪真菌症の原因菌とされる *Scopulariopsis brevicaulis*⁹⁾ が検出された. さらに, 担子菌門に分類されている *Trametes versicolor* (カワラタケ) といった食用・薬用キノコとなる真菌も確認された. 今回検出した担子菌の多くは, 水, 土壌, 植物などの環境中に存在し木材腐朽性がある真菌であったが, 食鳥処理施設のスイングドアから検出した子実体および菌糸体 (*I. laceratus*, *B. corium*, *S. commune*) は確認できなかった.

2) マッピング解析

表 2 NGS 法による真菌叢解析結果

fungal species	phylum
<i>Cyphellophora eucalypti</i>	Ascomycota (Yeast-like)
<i>Exophiala spinifera</i>	Ascomycota (Yeast-like)
<i>Maudiozyma surinensis</i>	Ascomycota (Yeast-like)
<i>Rhinocladiella similis</i>	Ascomycota (Yeast-like)
<i>Acaulium acremonium</i>	Ascomycota
<i>Acremonium aquaticum</i>	Ascomycota
<i>Acremonium sordidulum</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus arxii</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus caesiellus</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus foetidus</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus insolitus</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus kalimae</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus penicillioides</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus salinarum</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus subnutans</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus viticola</i>	Ascomycota
<i>Aspergillus whitfieldii</i>	Ascomycota
<i>Gamszarea kalimantanensis</i>	Ascomycota
<i>Gamszarea lunata</i>	Ascomycota
<i>Knufia cryptophialidica</i>	Ascomycota
<i>Knufia victoriae</i>	Ascomycota
<i>Lecanicillium coprophilum</i>	Ascomycota
<i>Lecanicillium margaretspenceriae</i>	Ascomycota
<i>Lithohypha aloicola</i>	Ascomycota
<i>Lithohypha cladosporioides</i>	Ascomycota
<i>Neosetophoma poaceicola</i>	Ascomycota
<i>Paecilomyces maximus</i>	Ascomycota
<i>Penicillium argentinense</i>	Ascomycota
<i>Penicillium chalabudae</i>	Ascomycota
<i>Penicillium hispanicum</i>	Ascomycota
<i>Penicillium terrenum</i>	Ascomycota
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Ascomycota
<i>Scopulariopsis fusca</i>	Ascomycota
<i>Trichoderma longicollum</i>	Ascomycota
<i>Wardomyces anomalus</i>	Ascomycota
<i>Alboeibula eugenieclarkiae</i>	Basidiomycota
<i>Bjerkandera ecuadorensis</i>	Basidiomycota
<i>Crustodontia nigrodontea</i>	Basidiomycota
<i>Dacryobolus gracilis</i>	Basidiomycota
<i>Favolus longmaniae</i>	Basidiomycota
<i>Hericium rajendrae</i>	Basidiomycota
<i>Metuloidea imbricata</i>	Basidiomycota
<i>Pallidohirschioporus versicolor</i>	Basidiomycota
<i>Peniophora simulans</i>	Basidiomycota
<i>Rhodotus asperior</i>	Basidiomycota
<i>Sidera borealis</i>	Basidiomycota
<i>Steccherinum hirsutum</i>	Basidiomycota
<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomycota
<i>Xylodon afromontanus</i>	Basidiomycota
<i>Xylodon wumengshanensis</i>	Basidiomycota



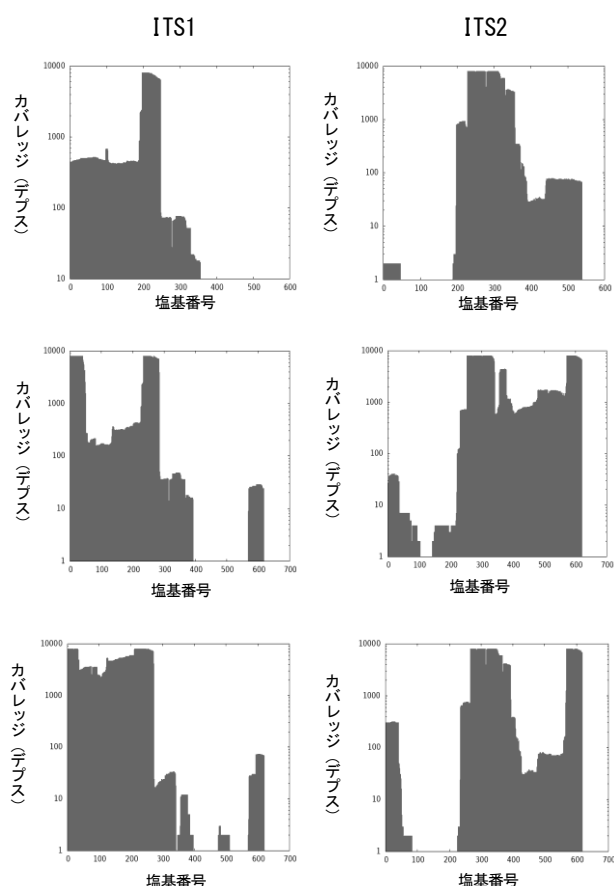
上段: *I. laceratus*, 中段: *B. corium*, 下段: *S. commune*

図4 *I. laceratus*, *B. corium*, *S. commune* のマッピング解析結果

食鳥処理施設のスイングドアから検出した真菌の混入の有無について確認するため、*I. laceratus* (Accession No. LC431580), *B. corium* (KP135008), *S. commune* (LC710146) をリファレンスとしてそれぞれマッピング解析を行い、それぞれの塩基の読み取り回数を棒グラフにした (図 4)。いずれの試料についてもプライマー配列以外での一致は認められなかった。また、生物検索の正確性について調べるため、*E. spinifera*, *R. similis*, *S. brevicaulis* についても同様に解析した結果を図 5 に示す。結果よりプライマー配列以外の塩基の読み取りが確認されたことから、これら 3 菌種の ITS 配列が試料中に含まれていることが示唆され、今回の検査系および解析方法により、真菌を網羅的に検出可能であることを確認した。

考 察

本検討では、食鳥処理施設内部に発生した真菌の流入経路の可能性について、鶏の羽毛に付着した真菌叢を調査するため、NGS 法を用いて解析を行った。



上段: *E. spinifera*, 中段: *R. similis*, 下段: *S. brevicaulis*

図5 *E. spinifera*, *R. similis*, *S. brevicaulis* のマッピング解析結果

3 種類の DNA 抽出試薬によるアガロース電気泳動の結果、シカジーニース® トータル DNA プレップキット (組織用) を用いた場合に、最も明瞭なバンドが得られた。3 種類ともスピнкаラムを用いたキットであるが、シカジーニース® DNA 抽出試薬 ST は処理工程が簡略化され、添加するサンプル量が少なかったため、バンドが得られなかった可能性がある。DNeasy Plant Kits に関しては、以前に子実体および菌糸体を抽出した試薬であるため選定したが、今回は、動物組織に汎用されるシカジーニース® トータル DNA プレップキット (組織用) が DNA 抽出には適していた。しかしバンドが薄く、精製後 DNA 濃度が 0.2~0.3 ng/μL 程度であったことから、グラム陽性の真菌は Proteinase K による溶解だけでは十分でなく、試料に合わせたガラスビーズ破碎を個別に実施することで、DNA 量の増加が期待される。

本解析においては、ITS 領域を標的とした NGS 法を用いることにより、試料中の真菌を検出可能であることを示した。一方で、NGS を用いた場合、ライブ

ラリ中の DNA の存在比によって読み取り回数が異なり、配列の精度にも影響を及ぼすため、目的配列の存在比が検出感度に影響し、妥当な結果の解釈を困難にするなど運用上の課題も明らかとなった。

今回試料とした鶏の羽毛による解析結果から、食鳥処理施設内のスイングドアに発生した子実体や菌糸体と鶏の羽毛から分離した真菌との一致はみられず、侵入経路の解明には至らなかった。しかし、今回の調査で、食鳥処理場に搬入される鶏の体表には多様な真菌が付着しており、それらが施設内に持ち込まれている実態が明らかになった。検出された真菌には、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属に属する種が含まれており、これらの一部の種は、食品衛生上の危害要因であるカビ毒を産生するおそれがある。さらに、同じく検出された *E. spinifera* は、まれに皮膚褐色菌症の起因菌⁷⁾として、また *R. similis* は、色芽球菌症の病原真菌⁸⁾として日和見的に黒色菌糸症を惹起するとの報告がある。また、*S. brevicaulis* に関しても、欧州において爪真菌症の主要な起因菌として最頻に分離されたとの報告もある⁹⁾。このことから、食鳥処理や食肉処理作業に従事する者への健康被害の可能性も否定できず、作業従事者保護の観点において、事業者による適切なリスクアセスメントの実施が重要であると考えられる。

また、検出されたこれらの真菌に関しては、培養方法が標準化されていないもしくは、たとえ最適な環境条件を付与しても生育しない難培養性の真菌であった。真菌の培地における生育様相は多様であり、形態学的特徴や生理学的特性に依存する従来の真菌学的検査法による同定には限界がある。今回、分子生物学的手法である NGS 法を導入することで、培養の可否にかかわらず、多種多様な真菌叢の網羅的検出を可能とした。

結 論

本検討においては、鶏の羽毛を介して多様な真菌（胞子や菌糸）が食鳥処理施設に持ち込まれている事実とその潜在的リスク、適切なリスクアセスメントの重要性が明らかとなった。得られた研究成果は、対象施設を所管する食鳥検査員に情報を還元した。

これらを踏まえ、HACCP に基づいた食鳥処理および食肉処理の衛生管理体制の徹底が指導された。さらに、食肉衛生に加え、食肉処理に従事する者の労働安全衛生の観点からも、適切な作業服や手袋等の着用について従業員への教育が実施され、日常業務における衛生意識の向上と感染リスク低減に寄与する取り組みが進められた。

文 献

- 1) 持田雅裕, 大月翼, 内田美枝, 他 : 奈良県食品衛生検査所 令和 5 年度事業概要, 30-32
- 2) White TJ, Bruns T, Lee S, *et al.* : *Academic Press*, 315-322 (1990)
- 3) Vasar M, Davison J, Neuenkamp L, *et al.* : *Molecular Ecology Resources*, 21, 1380-1392 (2021)
- 4) Shen W, Le S, Li Y, *et al.* : *PLoS One*, 11 (2016)
- 5) Chen S, Zhou Y, Chen Y, *et al.* : *Bioinformatics*, 34, i884-i890 (2018)
- 6) Li H, Durbin R : *Bioinformatics*, 25, 1754-1760 (2009)
- 7) Harris JE, Sutton DA, Rubin A, *et al.* : *Medical Mycology*, 47, 87-93 (2009)
- 8) Heidrich D, González GM, Pagani DM, *et al.* : *Medical Mycology Case Reports*, 16, 25-27 (2017)
- 9) Gupta AK, Drummond-Main C, Cooper EA, *et al.* : *JAAD*, 66, 494-502 (2012)

結核菌のキャピラリーシーケンサーによる 24 領域 VNTR 型別 を用いた分子疫学的解析

築山結衣・大西航平・足立有彩・井ノ上美紅・倉井悠貴・佐伯美由紀・田邊純子

Molecular Epidemiological Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* by 24-locus VNTR Typing
Using Capillary Sequencer

Yui TSUKIYAMA・Kohei ONISHI・Arisa ADACHI・Miku INOUE・Yuki KURAI・
Miyuki SAEKI and Sumiko TANABE

24 領域を対象とする Variable numbers of tandem repeats (VNTR) 型別を実施するため、キャピラリーシーケンサーによる VNTR 解析条件を検討し、当センターにおける解析手法を確立した。結核菌分子疫学調査事業において収集した菌株について、確立した手法により 24 領域 VNTR 型別を実施したところ、Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR 型別によるクラスターが細分化され、実地疫学調査に有用な情報を提供することが可能となった。

緒 言

結核は、国内患者数および罹患率（人口 10 万人に対する新登録結核患者数）が減少傾向にあるものの、全国で毎年 1 万人以上の患者報告がある我が国の主要な感染症である。奈良県においては、2023 年の新登録結核患者数は 140 人で前年（122 人）より増加した。罹患率は 10.8 で、前年値（9.3）より増加し、全国値（8.1）より高い値となっており、さらなる結核対策が必要である。

平成 28 年に改正された「結核に関する特定感染症予防指針」では、積極的疫学調査や発生動向の把握に分子疫学的手法の積極的な活用が推奨されており、地方衛生研究所では分子疫学的手法として Variable numbers of tandem repeats (VNTR) 型別による解析が進められている。VNTR 法は、結核菌のゲノム上に存在する反復配列領域を分析して菌株の異同を判定する方法で、12 領域を分析対象とする Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR 法¹⁾が国内標準法として提唱されている。奈良県では、2013 年度から結核菌分子疫学調査事業として県内患者由来の結核菌株を収集し、当センターにおいてアガロースゲル電気泳動を用いた JATA(12)-VNTR 型別（以下 JATA(12)）を実施してきた。JATA(12)は、導入が容易で、疫学的関連がある事例においては菌株の異同判断に有用である一方、網羅的な病原体サーベイランスにおいては、菌株識別能が不足していると指摘されており、必要に応じ分析領域を追加して分解能を高める必要がある²⁾。そこで今回、超可変領域 (QUB 18, QUB

3232, VNTR 3820, VNTR 4120) および Supply's-15MIRU に含まれる 6 領域 (Mtub 39, MIRU40, MIRU04, Mtub30, MIRU16, ETR-C)³⁾ を含む 24 領域を対象とする分析法 (24Beijing-VNTR, 以下 24VNTR) について当センターで実施するため、キャピラリーシーケンサーによる解析条件を検討した。さらに、結核菌分子疫学調査事業において収集した菌株について、24VNTR およびクラスター解析を実施したので報告する。

方 法

1. キャピラリーシーケンサーによる 24VNTR の解析条件の設定

1) Gene Mapper の Bin 補正

キャピラリーシーケンサーによるフラグメント解析は、解析ソフトウェアの Bin を設定することにより、各領域の反復数を自動で算出できる。Bin は、他施設で設定されたものをインポート可能であるが、使用機器や泳動条件の違いにより、検出されるピークが設定された Bin からずれることが報告されている^{4,5)}。そこで、結核研究所から Bin set のデータ提供を受け、当センターの解析条件に合わせて Bin を補正するため検討した。

(1) 材料

結核菌 VNTR 解析の外部精度評価事業において分与された DNA 15 検体を VNTR 既知検体として使用した（表 1）。

(2) 方法

表 1 外部精度管理事業で分与された DNA 検体の VNTR 型

検体管理番号	JATA(15)															Hypervariable					Supply's-15 MLU							
	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20	J21	J22	J23	J24				
	Mtub04	MIRJ10	Mtub21	Mtub24	QUB11b	V3820	V3820	QUB15	MIRU31	QUB3396	QUB36	QUB4156	QUB18	QUB11a	ETRA	QUB3232	V3820	V4120	Mtub39	MIRU40	MIRU4	Mtub30	MIRU16	ETRC				
H37Rv	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	5	2	3	4	3	2	5	1	3	2	2	4				
2015-A	4	3	4	3	4	3	7	4	5	6	8	3	8	8	4	14	14	10	3	2	2	4	3	4				
2016-A	2	2	2	4	3	2	5	4	3	3	7	3	3	>20	3	13	5	4	3	3	2	2	3	4				
2016-B	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	12	11	12	3	3	2	4	3	4				
2016-2	2	5	2	1	2	3	1	2	3	13	7	4	7	7	3	4	8	2	2	2	1	4	1	4				
2018-2	2	3	1	3	3	2	4	4	3	12	5	3	4	2	3	6	5	2	4	1	2	2	3	4				
2018-3	4	3	4	3	6	3	7	4	5	8	8	3	8	8	4	14	12	12	3	3	2	4	3	4				
2022-A	4	5	3	3	2	4	10	4	5	10	8	5	10	9	4	9	5	8	3	3	2	2	4	2				
2022-B	2	2	0	3	4	2	5	4	3	20	8	3	0	5	2	15	3	3	1	2	4	2	3	3				
2022-2	4	3	4	3	5	4	7	4	5	5	6	3	9	5	4	12	14	10	3	3	2	4	3	4				
2022-3	1	4	8	3	7	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4	1	9	4	2	2	5	2	3	4				
2023-A	5	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	7	8	4	16	17	20	3	3	2	4	3	4				
2023-B	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	9	3	8	8	4	14	14	10	3	3	2	4	3	4				
2023-1	3	3	3	4	6	3	7	5	5	8	2	5	10	8	4	11	12	9	3	3	2	4	4	4				
2023-2	4	3	2	3	6	3	7	4	5	7	9	3	9	8	3	12	13	10	1	3	2	4	3	4				

結核研究所から Bin set のデータ提供を受け、同研究所の手順書⁶⁾に従い、PCR およびキャピラリー電気泳動を実施した。内部分子量マーカーは、Gene Scan 1200LIZ dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific) を使用した。また、キャピラリー電気泳動は、SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用い、泳動結果の解析には、Gene Mapper 6.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、増幅産物の大きさから反復数を算出した。

2) プライマー濃度および内部分子量マーカー添加量の検討

プライマー濃度は 0.2 μ M と 0.1 μ M の 2 種類について、内部分子量マーカーの添加量は、0.3 μ L, 0.25 μ L, 0.2 μ L, 0.15 μ L, 0.1 μ L, 0.05 μ L, 0.025 μ L の 7 種類について検討を行った。使用した検体は、外部精度評価事業において分与された VNTR 既知の DNA 検体とし、上記 1) 同様の条件で 24VNTR を実施した。

2. 過去の結核菌 VNTR 型別データとの比較検証

過去にマイクロチップ電気泳動およびアガロースゲル電気泳動による 24VNTR を検討し実施していたため、24VNTR 結果が得られている県内患者由来 DNA 10 検体を用いて、上記 1 で設定した条件によりキャピラリーシーケンサーを用いて 24VNTR を実施し、過去の VNTR 型別データとの比較検証を行った。

3. 24VNTR によるクラスター解析

2013 年度から 2023 年度に搬入された県内患者由来 587 株のうち、① 疫学的関連性ありと判明している株、② ①と JATA(12)クラスターを形成した株、③ 疫学的関連性が不明な 5 株以上で JATA(12)クラスターを形成した株、合わせて 151 株について、24VNTR およびクラスター解析を実施した。今回、「24 領域の反復数がすべて一致するもの」を同一クラスターと定義し、1 つの領域に 2 つのピーク (ダブルピーク) が検出された株については、ダブルピークのうち一方でも他の株と一致した場合、同一 VNTR 型と判断した。

4. 遺伝系統の推定

24VNTR によりクラスターを形成した株について、遺伝系統を推定した。Seto らの方法に従い、VNTR 型別結果のパターンから遺伝系統を推定する MAP (maximum a posteriori) estimation⁷⁾ を利用した。

結果

1. キャピラリーシーケンサーによる 24VNTR の解析条件の設定

1) Gene Mapper の Bin 補正

VNTR 既知検体を用いて 24VNTR を実施した結果、複数の領域において、検出されたピークが Bin に入らない現象が認められ、さらに、一部ではピークが検出されない現象も見られた。

J10, J11, J16, J17 および J18 の 5 つの領域では、複数検体においてピークが Bin に入らなかった (図 1)。そこで、これらの領域については、反復数を x 軸、PCR 産物サイズの実測値を y 軸に相関図を作成し、求めた近似直線を検量線として各反復数に対応する PCR 産物サイズを算出し、Bin の値を補正した (図 2, 表 2)。補正後は、新たに VNTR 既知の検体を用いて、すべての領域でピークが Bin に入ることを確認した。

J21 では、1 検体 (H37Rv) で、反復数 2 と 3 を示す Bin の間に 345 bp のピークが検出された (図 3)。多くの臨床分離株では、J21 の PCR 産物は 77 bp を単位とした反復配列に加えて 3'末端に 53 bp の配列を有するため、Bin も 3'末端に 53 bp の配列を含むものとして設定されている。一方、H37Rv 株では 3'末端の 53 bp の配列の欠損が報告されており³⁾、その影響に

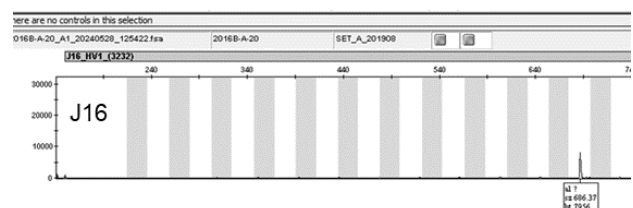


図 1 Bin に入らなかった検体の泳動像

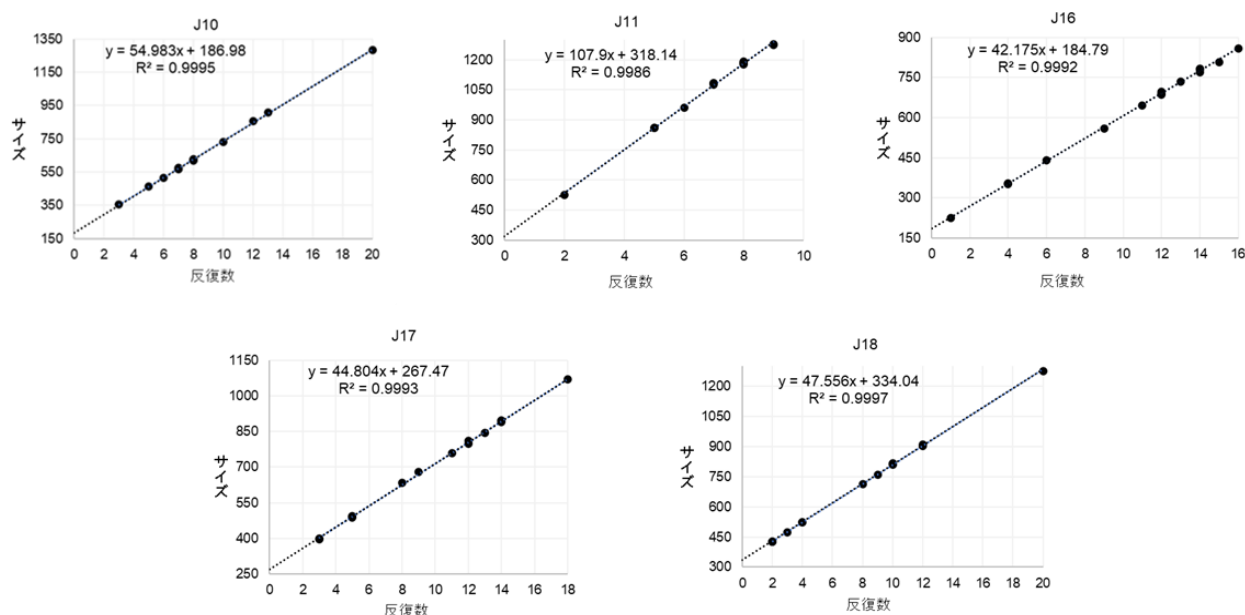


図2 PCR産物サイズと反復数の相関図

表2 各領域の理論値と補正值

領域番号	理論値(bp)	補正值(bp)
J10	194+59n	186.98+54.983n
J11	324+111n	318.14+107.9n
J16	182+56n	184.79+42.175n
J17	273+57n	267.47+44.804n
J18	333+57n	334.04+47.556n

よりピークが Bin に入らなかったと考えられた。H37Rv 株の J21 は、77 bp の反復配列が 3 回繰り返されているため、結核研究所に従い反復数を 3' と表記し、他の株の反復数と区別した。

J14 では、15 検体のうち 1 検体 (2016-A) でピークが検出されなかったことから (図 4)、アガロースゲル電気泳動により確認したところ、1500 bp 以上の位置に PCR 産物のバンドが認められた。ピークが検出されなかった要因は、PCR 産物のサイズが使用した内部分子量マーカーの測定範囲 (20~1200bp) を超えていたためと考えられ、キャピラリーシーケンサーによる解析でピークが検出されない場合、PCR 増幅不良や PCR 産物サイズが 1200 bp を超えている可能性があることから、このような場合にはゲル泳動を併用し確認することとした。

2) プライマー濃度および内部分子量マーカー添加量の検討

プライマー濃度について検討した結果、0.1 μM においては、J12 のピークの蛍光強度が小さく反復数の判別が困難であった。一方、0.2 μM はすべての領域で正

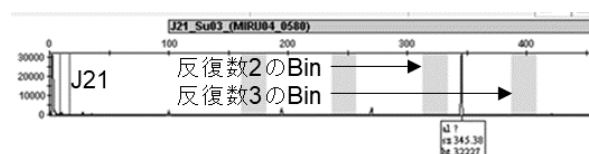


図3 H37Rv の J21 泳動像

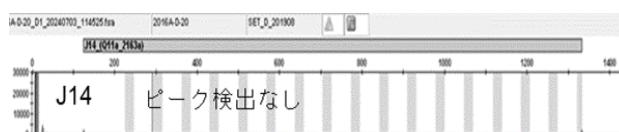


図4 2016-A の J14 泳動像

しい反復数が確認されたことから、各プライマー濃度は 0.2 μM とした。

また、内部分子量マーカー添加量について検討した結果、0.05 μL 以下では検量線の精度が低下し再解析が必要となったことから、内部分子量マーカー添加量を 0.1 μL に設定した。

2. 過去の結核菌 VNTR 型別データとの比較検証

過去に実施したマイクロチップ電気泳動およびアガロースゲル電気泳動による 24VNTR 結果と、キャピラリーシーケンサーの結果を比較したところ、10 検体のうち 9 検体はすべての領域で反復数が一致したが、1 検体で J21 の反復数が不一致となった。過去の VNTR 型別データでは反復数 2 と判別していたが、キャピラリーシーケンサーでは前述の H37Rv 株と同様に反復数 2 と 3 の Bin の間に 345 bp のピークが確認されたため、反復数を 3' と判別した。

3. 24VNTR によるクラスター解析

対象とした 151 株について 24VNTR クラスター解析

表 3 24VNTR クラスター解析結果

事例	菌株番号	JATA(12)												JATA(15)			Hypervariable			for internatiol comparision						疫学的 関連	遺伝 系統
		J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20	J21	J22	J23	J24		
1	tb13008	4	3	3	3	3	3	3	4	5	8	7	2	10	8	4	13	20	11	3	1	2	3	3	4	あり	北京祖先型
	tb13009	4	3	3	3	3	3	3	4	5	8	7	2	10	8	4	13	20	11	3	1	2	3	3	4		
	tb13013	4	3	3	3	3	3	3	4	5	8	7	2	10	8	4	13	20	11	3	1	2	3	3	4		
2	tb13019	2	3	1	3	4	2	5	4	3	11	5	3	3	2	3	5	5	2	8	1	2	2	3	4	あり	非北京型
	tb14033	2	3	1	3	4	2	5	4	3	11	5	3	3	2	3	5	5	2	8	1	2	2	3	4		
3	tb15024	4	3	5	3	3	3	6	4	2	4	8	4	9	7,8	4	15	12	12,14	3	3	2	2	3	4	あり	北京祖先型
	tb15033	4	3	5	3	3	3	6	4	2	4	8	4	9	7	4	15	12	12	3	3	2	2	3	4		
4	tb17005	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3	7	8	3	18	12	9	3	3	2	4	3	4	あり	北京新異型
	tb17013	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3	7	8	3	18	12	9	3	3	2	4	3	4		
5	tb18038	4	3	2	4	3	3	7	4	5	7	5	5	5	10	4	15	14	8	3	3	2	4	3	4	あり	北京祖先型
	tb18043	4	3	2	4	3	3	7	4	5	7	5	5	5	10	4	15	14	8	3	3	2	4	3	4		
6	tb19001	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	17	15	12	3	3	2	4	2	4	あり	北京祖先型
	tb19002	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	17	13,15	12	3	3	2	4	2	4		
7	tb20001	4	3	4	3	3	3	7	4	4	7	3	4	10	8	2	12	14	10	3	3	2	2	3	4	あり	北京祖先型
	tb20004	4	3	4	3	3	3	7	4	4	7	3	4	10	8	2	12	14	10	3	3	2	2	3	4		
8	tb23004	4	3	3	3	1,7	3	7	4	5	7	8	5	8	7	4	13	12	5	3	3	2	4	4	4	あり	非北京型
	tb23031	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	8	7	4	13	12	5	3	3	2	4	4	4		
9	tb23025	2	3	3	3	3	3	7	4	3	4	8	4	5	6	4	11	13	12	4	3	2	2	3	4	あり	北京祖先型
	tb23032	2	3	3	3	3	3	7	4	3	4	8	4	5	6	4	11	13	12	4	3	2	2	3	4		
10	tb13001	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	8	4	14	14	6	2	3	2	4	3	4	不明	北京新異型
	tb13011	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	8	4	14	14	6	2	3	2	4	3	4		
	tb14014	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	8	4	14	14	6	2	3	2	4	3	4		
	tb15003	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	8	4	14	14	6	2	3	2	4	3	4		
	tb18059	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	8	4	14	14	6	2	3	2	4	3	4		
	tb23048	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	8	4	14	14	6	2	3	2	4	3	4		
11	tb13029	4	3	3	3	3	3	7	4	5	5	7	4	10	>20	2	12	12	9	3	3	3'	2	3	4	あり	北京祖先型
	tb14040	4	3	3	3	3	3	7	4	5	5	7	4	10	>20	2	12	12	9	3	3	3'	2	3	4		
12	tb21019	4	3	3	3	3	3	7	4	5	5	7	4	10	>20	2	12	12	9	3	3	3'	2	3	4	不明	北京祖先型
	tb14041	4	3	5	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	15	6	3	3	2	4	3	4		
	tb17055	4	3	5	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	15	6	3	3	2	4	3	4		
	tb17056	4	3	5	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	15	6	3	3	2	4	3	4		
	tb18072	4	3	5	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	15	6	3	3	2	4	3	4		
	tb14043	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3	8	8	4	14	14	12	3	3	2	4	3	4		
13	tb15001	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3	8	8	4	14	14	12	3	3	2	4	3	4	不明	北京新異型
	tb17058	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3	8	8	4	14	14	12	3	3	2	4	3	4		
	tb13006	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb13026	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb14004	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb18019	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4		
14	tb18024	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4	不明	北京新異型
	tb19033	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb22017	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb23039	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb23042	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	8	4	15	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb13014	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	11	10	10	3	3	2	4	3	4		
15	tb15034	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	11	10	10	3	3	2	4	3	4	不明	北京新異型
	tb13017	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	5	2	3	5	3	2	5	1	2	2	3	4		
	tb14029	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	5	2	3	5	3	2	5	1	2	2	3	4		
	tb14039	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	5	2	3	5	3	2	5	1	2	2	3	4		
	tb16007	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	5	2	3	5	3	2	5	1	2	2	3	4		
	tb19065	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	5	2	3	5	3	2	5	1	2	2	3	4		
16	tb19073	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	5	2	3	5	3	2	5	1	2	2	3	4	不明	非北京型
	tb16001	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	5	4	14	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb17071	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	5	4	14	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb18008	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	5	4	14	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb21048	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	5	4	14	14	10	3	3	2	4	3	4		
	tb14008	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	10	9	7	3	3	2	4	4	4		
17	tb14046	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	10	9	7	3	3	2	4	4	4	不明	北京祖先型
	tb18031	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	10	9	7	3	3	2	4	4	4		
	tb14017	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	3	3	2	4	3	4		
	tb16018	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	3	3	2	4	3	4		
	tb23026	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	3	3	2	4	3	4		
	tb23045	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	3	3	2	4	3	4		
18	tb14027	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	11	3	3	2	4	4	4	不明	北京祖先型
	tb19054	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	11	3	3	2	4	4	4		
19	tb17015	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	12	3	3	2	4	3	4	不明	北京祖先型
	tb18023	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	12	3	3	2	4	3	4		
	tb18051	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	12	3	3	2	4	3	4		
	tb17025	4	1	3	2	7	4	9	4	5	7	8	5	7	9	4	16	14	12	3	3	2	4	3	4		
20	tb18066	4	1	3	2	7	4	9	4	5	7	8	5	7	9	4	16	14	12	3	3	2	4	3	4	不明	北京祖先型
	tb17070	4																									

不明な菌株間においても 24 領域の数字パターンの一一致が多数見られた。

4. 遺伝系統の推定

24VNTR クラスター23 組について遺伝系統を推定した結果、北京祖先型が 14 組 (60.9%)、北京新興型が 6 組 (26.1%)、非北京型が 3 組 (13.0%) と推定された (図 5)。

考 察

キャピラリーシーケンサーを用いた 24VNTR の解析条件を設定する際は、他機関の報告^{4,5)}と同様に、当センターにおいても複数領域で PCR 産物サイズの理論値と実測値の乖離が確認されたため、設定されていた Bin の補正を行った。キャピラリーシーケンサーによる泳動では、キャピラリーの劣化状況などにより PCR 産物のサイズが変動することが知られており⁶⁾、キャピラリーシーケンサー導入時のみならず、キャピラリー交換時においても、ポジティブコントロールとして VNTR 既知の検体を用い、反復数の算出が適切に行われていることを確認する必要がある。さらに、キャピラリーシーケンサーによる解析でピークが検出されない場合には、PCR 増幅不良または PCR 産物サイズが使用した内部分子量マーカーの測定範囲に入っていないことが考えられる。このような場合は、PCR 増幅不良との識別のためにも、アガロースゲル電気泳動を併用して確認することが有効であると考ええる。

また、過去に実施したマイクロチップ電気泳動およびアガロースゲル電気泳動による 24VNTR の結果と、キャピラリーシーケンサーの結果を比較検証したところ、J21 において反復数が不一致となる株が認められた。この原因としては、以前の解析では H37Rv 株のような一部配列の欠損株の存在を認識しておらず、この株が他と異なる特徴を有していることに気づけなかったためと考えられた。キャピラリーシーケンサーによる解析では、解析ソフトウェアを用いることで、PCR 産物サイズの測定および反復数の算出を自動化することができるため、今回のように Bin の設定範囲外にピークが検出された場合でも即座に異常に気づくことができ、検査精度が向上したと考えられる。

今回、結核菌分子疫学調査事業において収集した菌株について 24VNTR を実施した結果、JATA(12)クラスターがより詳細に分類され、菌株識別能の向上を確認した。疫学情報を合わせて解析したところ、疫学的関連性が不明な JATA(12)クラスター形成株では、24 領域の VNTR 型の不一致が示されることで、散发事例であることの確認が可能となり、保健所の実地疫学調

査に対して科学的裏付けとなる情報を提供できると考えられた。また、事例 10~23 (表 3) のように 24 領域の VNTR 型が一致しているにもかかわらず疫学的関連性が確認できないケースでは、当初の実地疫学調査で把握できていない疫学的リンクが存在する可能性が考えられ、患者間の「場所」と「時間」の共有について追加調査が求められる。一方で、24 領域の VNTR 型が一致しているにもかかわらず、追加調査においても疫学的関連性が確認できない場合には、VNTR 型別の識別能の限界により、由来の異なる株を同一クラスターと判断している可能性が考えられる。今後は、こうした株に対して全ゲノム解析を用いた一塩基多型 (SNP) 解析の導入により、より高精度な菌株の同一性を判定することが求められる。

24VNTR 型から遺伝系統を推定したところ、24VNTR でクラスターを形成した 23 組のうち、6 組が北京新興型と推定された。北京新興型は、感染伝播性および発病性が高く、感染伝播によるクラスターを形成しやすいと報告されている²⁾ことから、今後は 24VNTR 結果に遺伝系統の情報を加え、保健所へ提供していきたいと考える。

今回、24 領域の反復数がすべて一致するものを同一クラスターと定義したが、結核菌の偶発的な遺伝子変異を考慮して、保健所には 1 領域違いを含めた情報を報告すべきとの指摘もあり²⁾、クラスターの定義については今後の検討課題と考える。

最近の結核感染伝播を把握するためには、24VNTR の結果を実地疫学調査へ積極的に活用する体制が重要であり、そのためには、VNTR 型別結果と疫学情報結果を統合したデータベースを作成し、結核行政担当者間で共有する必要がある。今後も、科学的根拠となる VNTR 型別結果の情報を活用しやすい形で保健所等に提供することで、奈良県の結核対策に貢献していきたい。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、Bin set のデータを提供していただきました結核予防会結核研究所の皆様へ深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 結核, 83, 673-678 (2008)
- 2) 加藤誠也, 瀧井猛将, 大角晃弘, 他: 結核分子疫学調査の手引き第一版 (2017 年 7 月)
- 3) Supply P, Mazars E, Lesjean S, *et al.*: Mol

Microbiology, 6, 62-771 (2000)

4) 氏家絢子, 矢儀田優佳, 浅野由紀子, 他: 愛媛県立衛生環境研究所年報, 23, 11-19 (2020)

5) 目黒響子, 福田千恵美, 関和美, 他: 香川県環境保健研究センター所報, 22, 51-55 (2023)

6) 結核予防会結核研究所: キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法の標準作業手順書 (2024年6月)

7) Seto J, Wada T, Iwamoto T, *et al.*: *Infect. Genet. Evol.*, 35, 82-88 (2015)

次世代シーケンサによるノロウイルス遺伝子全長塩基配列解析に関する検討

松浦侑輝・平井志宜・山本紗也・松井恵梨子・山崎聖子

Study on Whole Genome Sequencing of Norovirus Using Next-Generation Sequencer

Yuki MATSUURA・Yukinori HIRAI・Saya YAMAMOTO・Eriko MATSUI and Seiko YAMAZAKI

感染性胃腸炎の原因病原体として知られるノロウイルスについて、詳細な遺伝子解析を実施するため、過去に当センターで検出されたノロウイルスの遺伝子全長を One Step RT-PCR 法によって逆転写、相補鎖 DNA の増幅を行い、次世代シーケンサによって全長塩基配列を解析した。結果について、現行の検査法によって得られる分子疫学的な情報と比較した。その結果、現行の検査法で得られる情報のみでは区別が困難な事案について、遺伝子的な違いを明確にできた。一方で、全長塩基配列を比較しても分子疫学解析のみでは区別できない事案の存在も明らかとなり、改めて実地疫学調査の重要性が示された。

緒 言

ノロウイルス (NV) はカリシウイルス科ノロウイルス属に分類される一本鎖 RNA ウイルスで、主に GI と GII の遺伝子群がヒトに感染することが知られている。感染力が非常に強く、乳児から高齢者まですべての年齢層に感染し、下痢・嘔吐などの急性胃腸炎症状を引き起こす。冬期を中心に毎年流行し、保育所、小学校、高齢者施設など、人が集まって生活する場での集団感染や、汚染された食品による食中毒の原因となることもある。航空機、車、電車など、輸送網や経済網が高度に発達した現代社会では、NV に汚染された人や物資が移動することで、国内だけでなく、大陸を超えた感染の拡大の可能性も指摘されている¹⁾。

NV のゲノムの全長は約 7500 塩基であり、3 つのタンパク質コード領域 (open reading frame ; ORF) からなる。ORF1 はウイルスの複製に必要な非構造タンパク質を、ORF2 は構造タンパク質 1 (VP1) を、ORF3 は構造タンパク質 2 (VP2) をそれぞれコードしている。このうち、免疫に関与するとされるウイルスの外殻タンパク質 (capsid) である VP1 領域に加えて、上流の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 領域がウイルスの流行に影響することが示唆されている。ORF1 と ORF2 の間で組換えが生じやすいことから、VP1 領域と RdRp 領域の両方の解析が重要とされている。一方、2006 年に日本を含めた全世界で流行を起こした GII.4 でウイルスゲノム全体に渡って蓄積された変異の存在が確認されていたことや、VP2 が細胞侵入に関与していることが報告されている²⁾ことから、NV の全長塩基配列解析に対する関心が高まっている。

また、NV の全ゲノム解析が可能になることで、ウ

イルスの遺伝子的な関係性を明らかにすることができる。これは、集団発生時の原因究明・感染経路推定において有用な情報であり、感染拡大の予防・対策に重要な情報である。

今回、次世代シーケンサ (NGS) を用いたアンプリコンシーケンスによる NV の遺伝子全長塩基配列解析手法を用いて、過去に当センターで行ったサンガーシーケンスにより得られた方法と比較し、不一致塩基数について比較したので、その結果を報告する。

方 法

1. NV 全長塩基配列増幅法

1) 検査対象

当センターで検出した NVGII のうち、capsid 領域の遺伝子型が過去 10 年間に検出実績のある 2 型 (以下①)、3 型 (以下②)、4 型 (以下③)、6 型 (以下④)、7 型 (以下⑤)、8 型 (以下⑥)、17 型 (以下⑦) であった検体をそれぞれ用いた。

2) 方法

それぞれ 10% 糞便懸濁液から、Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification kit (プロメガ) を用いて遺伝子抽出を行った。得られた遺伝子抽出液について、Cotten らの設計した汎用プライマーセット³⁾と Prime Script II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (タカラバイオ) を用いて、amplicon 1, amplicon 2, amplicon 3 の 3 つの反応系でそれぞれ One Step RT-PCR を実施し、Quantifluor One dsDNA system (プロメガ) を用いて二本鎖 DNA の濃度を測定した。また、得られた増幅液をアガロースゲル電気泳動によって標的サイズの遺伝子増幅産物の有無を確認した。

2. NV 全長塩基配列の決定

得られた増幅産物について、それぞれの検体ごとに各 amplicon の cDNA 溶液を等量プールし、「新型コロナウイルスゲノム解析マニュアル Qiagen 社 QiaSEQ FX 編 ver.1.4」(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html>) 中の「4. ライブラリ調製 (QIASeq FX)」の項に従ってライブラリ調製を行った。得られたライブラリを iSeq 100 system (イルミナ) を用いて NGS 解析を実施し、fastq データを得た。

得られた fastq データについて、fastp⁴⁾ を用いてクオリティコントロール (QC) を行い、ノイズや信頼度の低いデータを除いた前処理済データを得た。この前処理済データに SKESA⁵⁾ と SPAdes⁶⁾ の 2 種類のアセンブラを用いて、リファレンス配列を使用せずに前処理済データのみを繋ぎ合わせて配列を作成する de novo assembly を行い、contig 配列を得た。

得られた contig 配列について National Center for Biotechnology Information の提供する standard nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて相同性検索を行い、類似する部分配列を持つ NV の全長塩基配列を得た。この全長塩基配列をリファレンス配列として Barrows-Wheeler Aligner⁷⁾ の mem アルゴリズム (bwa-mem) を用いて、リファレンス配列と前処理済データを比較して情報を得る mapping 解析を行った。得られた解析データに samtools⁸⁾ および varscan⁹⁾ を用いて、カバレッジ情報、一塩基多型 (SNP)、遺伝子挿入および遺伝子欠失について情報を得た。リファレンス配列の各塩基について、NGS の際に読み取られた回数であるカバレッジ (n) を出力した。出力した n が 10x 以上および 100x 以上である塩基の数をそれぞれ調べ、この数をリファレンス配列の全塩基数で除してカバレッジカバー率を算出した。SNP、遺伝子挿入および遺伝子欠失の情報をもとにリファレンス配列を置換するプログラムを自作し、目的とする NV の全長塩基配列について consensus 配列を作成した。得られた consensus 配列について、Norovirus Typing Tool¹⁰⁾ および Human Calicivirus Typing Tool¹¹⁾ を用いて RdRp 領域および VP1 領域による遺伝子型解析を実施した。

また、MAFFT¹²⁾ を使用して検体の塩基配列を比較できるように整列させるアライメントを行い、検体間での不一致塩基数を比較した。同様に、当センターで従来実施している検査系¹³⁾ (以下、従来法) で得られる塩基配列 (387 塩基) についても比較した。

3. NVGII. 4 の比較解析

当センターに搬入された検体のうち、過去 5 年間に NVGII.4 が陽性となった 5 事例 16 検体 (発生時期: 事例 A 令和 3 年 5 月, 事例 B 令和 3 年 6 月, 事例 C 令和 5 年 1 月, 事例 D 令和 5 年 4 月, 事例 E: 令和 6 年 4 月) について、2. と同様の方法で consensus 配列を自動で生成するプログラムを作成、実行し、consensus 配列を得た。得られた配列について Norovirus Typing Tool および Human Calicivirus Typing Tool を用いて RdRp および VP1 による遺伝子型解析を実施した。また、MAFFT を使用して検体の塩基配列を比較できるように整列させるアライメントを行い、検体間での不一致塩基数を比較した。同様に、従来法で得られる塩基配列 (387 塩基) についても比較した。

結 果

1. NV 全長塩基配列増幅法

One Step RT-PCR によって得られた増幅液の二本鎖 DNA の濃度を表 1 に示す。全ての検体の全ての amplicon で、陰性対照よりも二本鎖 DNA 濃度が増加していた。

表1 PCR増幅後の二本鎖DNA濃度

	amplicon1	amplicon2	amplicon3
陰性対照	11	6.8	4.6
①(GII.2)	131	40	60
②(GII.3)	65	65	52
③(GII.4)	124	94	102
④(GII.6)	139	149	54
⑤(GII.7)	53	133	61
⑥(GII.8)	110	78	69
⑦(GII.17)	118	70	69

得られた増幅液についてアガロースゲル電気泳動を行った電気泳動像を図 1 に示す。非特異増副産物の存在が確認できるものの、目的とする 3000 bp 前後に増幅産物のバンドが確認できた。

2. NV 全長塩基配列の決定

一例として、③について SKESA を用いて得られた配列および SPAdes を用いて得られた配列を Norovirus Typing Tool を用いて解析した結果を図 2 および図 3 に示す。

用いたすべての検体の fastq データについて、2 種のアセンブラにより、NV の部分塩基配列を復元することができ、capsid 領域遺伝子型別の結果は当センターで過去に実施したサンガーシーケンスで型別したものと一致していた。一方で、2 種のアセンブラにより全長塩基配列を復元できた検体はなかった。

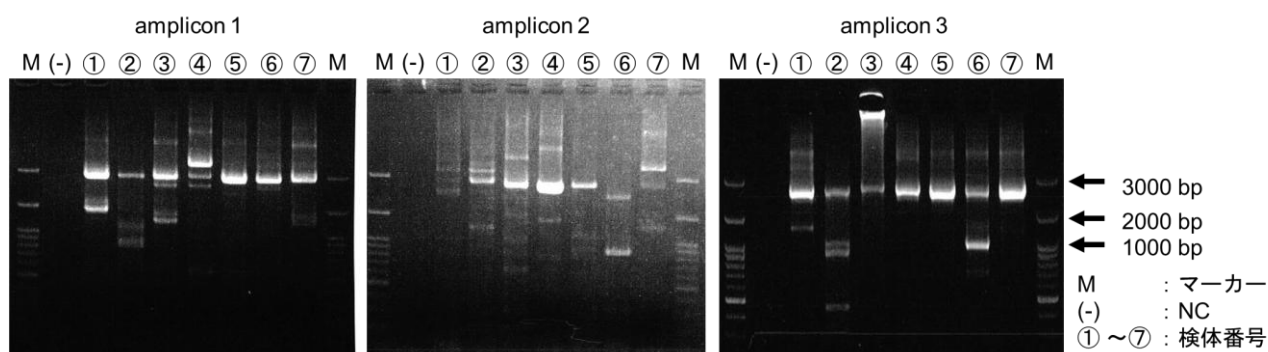


図1 PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動像

Name	Length	Family Genus Genogroup	BLAST score	polymerase	capsid	Report	genome
Contig_1_68.8494	2172	Caliciviridae Norovirus GII	78.24885	GII.P16		Report	
Contig_2_225.847	1959	Caliciviridae Norovirus GII	67.60355		GII.4 Sydney_2016	Report	
Contig_3_153.558	2314	Caliciviridae Norovirus GII	76.42241			Report	

図2 Norovirus Typing Tool 検索結果 (SKESA)

Name	Length	Family Genus Genogroup	BLAST score	polymerase	capsid	Report	genome
NODE_1_length_2827_cov_86.3578	2827	Caliciviridae Norovirus GII	75.934494			Report	
NODE_2_length_2244_cov_36.8781	2244	Caliciviridae Norovirus GII	78.33259	GII.P16		Report	
NODE_3_length_2151_cov_115.652	2151	Caliciviridae Norovirus GII	67.690056		GII.4 Sydney_2016	Report	

図3 Norovirus Typing Tool 検索結果 (SPAdes)

表2 Norovirus Typing Tool および Human Calicivirus Typing Tool による解析結果およびカバレッジ情報

	Polymerase (Norovirus Typing Tool)	capsid (Norovirus Typing Tool)	Genotype (Human Caliciviruses Typing Tool)	coverage cover(%, n≥10)	coverage cover(%, n≥100)
①(GII.2)	GII.P16	GII.2	GII.2[P16]	99.8	98.7
②(GII.3)	GII.P12	GII.3	GII.3[P12]	99.7	96.2
③(GII.4)	GII.P16	GII.4	GII.4[P16]	99.6	98.3
④(GII.6)	GII.P7	GII.6	GII.6[P7]	99.7	98.9
⑤(GII.7)	GII.P7	GII.7	GII.7[P7]	99.6	98.7
⑥(GII.8)	GII.P8	GII.8	GII.8[P8]	99.6	98.9
⑦(GII.17)	GII.P17	GII.17	GII.17[P17]	100.0	99.4

mapping 解析することにより得られたカバー率, Norovirus Typing Tool および Human Calicivirus Typing Tool による解析結果を表2に, ③のカバレッジ情報を図4に示す. 全ての検体で③と同様にカバレッジに偏りが見られた.

3. NVGII.4 の比較解析

得られたカバー率および遺伝子型別結果を表3に, 得られた塩基配列の不一致塩基数を比較した結果を表4に示す. 表4の()内には従来法で得られる塩基配列を比較した際の検体間の不一致塩基数を示す. 全ての検体について, capsid 領域は GII. 4 に分類され, RdRp 領域は P16 と P31 の2種類に分類された.

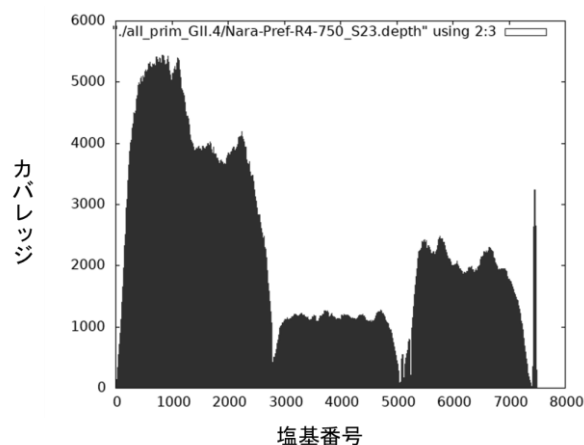


図4 カバレッジ情報 (③)

表 3 Norovirus Typing Tool および Human Calicivirus Typing Tool による解析結果およびカバレッジ情報

事例名	検体番号	Polymerase (Norovirus Typing Tool)	capsid (Norovirus Typing Tool)	Genotype (Human Calicivirs Typing Tool)	coverage cover(%, n \geq 10)	coverage cover(%, n \geq 100)
事例A	A-1	GI.4.P31[GI.4.Pe]	GI.4 could not assign	GI.4 Sydney[P31]	99.3	99.3
	A-2	GI.4.P31[GI.4.Pe]	GI.4 could not assign	GI.4 Sydney[P31]	100.0	97.7
	A-3	GI.4.P31[GI.4.Pe]	GI.4 could not assign	GI.4 Sydney[P31]	99.6	73.4
事例B	B-1	GI.4.P31[GI.4.Pe]	GI.4 could not assign	GI.4 Sydney[P31]	100.0	100.0
	B-2	GI.4.P31[GI.4.Pe]	GI.4 could not assign	GI.4 Sydney[P31]	100.0	100.0
	B-3	GI.4.P31[GI.4.Pe]	GI.4 could not assign	GI.4 Sydney[P31]	100.0	99.3
事例C	C-1	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	99.6	98.2
	C-2	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	99.5	90.4
	C-3	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	98.5	93.3
	C-4	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	99.1	97.7
	C-5	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	99.0	98.0
	C-6	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	99.4	99.4
事例D	D-1	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	99.7	98.0
	D-2	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	99.7	98.0
事例E	E-1	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	99.6	70.0
	E-2	GI.4.P16	GI.4 Sydney_2016	GI.4 Sydney[P16]	100.0	70.0

表 4 検体間での不一致塩基数

	事例A			事例B			事例C						事例D		事例E	
	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	D-1	D-2	E-1	E-2
事例A	A-1	0(0)	0(0)													
	A-2															
	A-3															
事例B	B-1	6(0)	6(0)	6(0)	4(0)	7(0)										
	B-2	6(0)	6(0)	6(0)												
	B-3	3(0)	3(0)	3(0)												
事例C	C-1	1307(14)	1307(14)	1307(14)	1307(14)	1308(14)	1307(14)	2(1)	6(2)	6(3)	4(2)	2(1)	1(0)	5(3)	1(1)	2(2)
	C-2	1309(15)	1309(15)	1309(15)	1309(15)	1310(15)	1309(15)									
	C-3	1311(14)	1311(14)	1311(14)	1311(14)	1312(14)	1311(14)									
	C-4	1309(14)	1309(14)	1309(14)	1309(14)	1310(14)	1309(14)									
	C-5	1310(15)	1310(15)	1310(15)	1310(15)	1311(15)	1310(15)									
	C-6	1308(13)	1308(13)	1308(13)	1308(13)	1309(13)	1308(13)									
事例D	D-1	1314(14)	1314(14)	1314(14)	1314(14)	1315(14)	1314(14)	48(2)	48(1)	50(2)	48(2)	47(1)	47(1)	3(1)		
	D-2	1313(13)	1313(13)	1313(13)	1313(13)	1314(13)	1313(13)	47(1)	49(2)	51(1)	49(1)	50(2)	48(0)			
事例E	E-1	1303(14)	1303(14)	1303(14)	1305(14)	1304(14)	1303(14)	155(6)	155(5)	159(6)	157(6)	156(5)	156(5)	153(4)	154(5)	6(0)
	E-2	1305(14)	1305(14)	1305(14)	1307(14)	1306(14)	1305(14)	161(6)	161(5)	165(6)	163(6)	162(5)	162(5)	159(4)	160(5)	

※0内は従来法で得られる部分配列塩基における不一致塩基数を示す

考 察

1. NV の全長遺伝子配列増幅

今回検討に使用した検体全てにおいて、標的とする遺伝子の逆転写・増幅ができていると考えられた。しかし、検体によって各 amplicon の二本鎖 DNA 濃度に差があったことから、この方法によって得られる DNA の量はウイルス RNA の量や状態、遺伝子型等によって差がある可能性が示唆された。

2. NV 全長塩基配列の決定

今回検討に使用した検体全てにおいて、n \geq 10x で 99% 以上のカバー率でデータが得られ、概ね全長塩基配列を決定することができた。一方で、塩基位置によってカバレッジの多寡が見られた。全ての検体において de novo assembly のみで全長塩基配列が復元できなかったのは、このカバレッジの偏りが原因であったと考えられる。

5' 末端、3' 末端および 5' 末端から 2808～2870 番目と 5049～5090 番目のカバレッジが低くなっている領域はプライマーが結合する領域であり、QC の際

にプライマー由来のデータとともに検体由来のデータも除去されていることが考えられる。この領域で不一致が生じて検体由来のデータがプライマーの配列と異なる場合は除去されないため、この領域でカバレッジが 0 に近くなっている場合はプライマーと検体の配列が一致していると考えられる。

NGS での読み取りの際は、得られるデータ量と読み取る DNA 量が比例する。そのため、各 amplicon に対応した領域ごとの偏りは、RT-PCR によって生じた目的サイズ以外の遺伝子断片を除去し、正確に目的の増幅産物濃度を計測し、プールの際に濃度調整することで平均化できると考えられる。そのためには PCR 後の各 amplicon について精製作業が必要であるため、データの取得量・正確性と作業コストのバランスについての検討が今後の課題である。

3. NVGI.4 の比較解析

得られた全長塩基配列を用いて遺伝子型別を実施することで、従来法では検出できなかった事例 A、B と事例 C、D、E の間の RdRp 領域の差異について明ら

かにすることができ、ORF1/2 での組換え体が存在していたことが示された。

得られた全長塩基配列と従来法で得られる部分塩基配列の不一致塩基数について比較すると、従来法で得られる部分塩基配列に比べ全長塩基配列の方が事例毎の差が明確であった。従来法では区別が困難であった C, D の 2 事例間についてみると、全長塩基配列を比較することで明確に区別することが可能であると考えられる。一方で、A, B の 2 事例間では、全長塩基配列を比較しても不一致塩基数は同一事例間の場合と明確な違いは認められず、遺伝子学的情報のみでは A, B の 2 事例を区別することは困難であると考えられる。

まとめ

今回用いた方法から、ORF1 と ORF2 での組み換え体の存在および capsid 領域について従来法では区別が困難であった 3 事例の NV の差異を明らかにすることができた。一方で、全長塩基配列を比較しても区別が困難な事例の存在も明らかになり、患者背景等から得られる疫学情報と併用しながら遺伝子学的情報を活用することの重要性が示された。また、全長塩基配列データを蓄積していくことで、NV の性質の解明の一助となることも期待される。

NV に限らず、多くの病原体の NGS による全長塩基配列解析の手法については、いまだ世界的に標準化された方法が確立されていない。今回使用した解析の手法では、QC の方法や de novo assembly から得られる塩基配列の正確性の評価方法、mapping 解析から検出される SNP、遺伝子挿入および遺伝子欠失のカバレッジ cut off 値など、検討すべき課題は多く残されており、信頼性・正確性の担保できる解析を実施するためには、今後も知見の蓄積および情報収集が必要であると考えられる。

コスト面に着目すると、iSeq 100 system を使用する場合、検体数にかかわらず 1 回の使用に対して一定の費用が必要であり、1 回の検体数が少ないと 1 検体当たりにかかる検査費用が高くなってしまうため、迅速性とコストを勘案して、運用方法を模索していく必要がある。また、得られた結果を有効活用していくた

めの還元方法を検討し、費用に対して効果の高い情報の提供方法についても検討すべきであると考えられる。

また、NGS では膨大な量のデータが出力されるため、解析にはコンピュータプログラミングおよびバイオインフォマティクスの両方の知識が必要である。継続した検査体制の確立のためには、他の職員への技術の継承や研修方法についても検討する必要があると考える。

謝 辞

感染症発生動向調査において検体採取を担当された医療機関の諸先生方、保健所等の関係各位に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一, 他: 感染症学雑誌, 86, 563-568 (2012)
- 2) 左近直美, 駒野淳: 日食微誌, 33, 97-106 (2016)
- 3) Cotten M, Petrova V, Phan MV, et al.: J Virol. 88, 11056-11069 (2014)
- 4) Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al.: Bioinformatics, 34, i884-i890 (2018)
- 5) Souvorov A, Agarwala R, Lipman DJ: Genome Biol., 19, 153 (2018)
- 6) Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al.: J Comput Biol., 19, 455-477 (2012)
- 7) Li H, Durbin R: Bioinformatics, 25, 1754-1760 (2009)
- 8) Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al.: Bioinformatics, 25, 2078-2079 (2009)
- 9) Koboldt DC, Chen K, Wylie T, et al.: Bioinformatics, 25, 2283-2285 (2009)
- 10) Kroneman A, Vennema H, Deforche K, et al.: J Clin Virol., 51, 121-125 (2011)
- 11) Tatusov RL, Chhabra P, Diez-Valcarce M, et al.: J Clin Virol., 134, 104718 (2021)
- 12) Katoh K, Misawa K, Kuma K, et al.: Nucleic Acids Res., 30, 3059-3066 (2002)
- 13) 尾西美咲, 松浦侑輝, 松本朋子, 他: 奈良県保健研究センター年報, 54, 78-80 (2019)

