

ワンヘルス・アプローチに基づく食中毒菌及び薬剤耐性調査

保健福祉局保健環境研究所 ○上野可南子、中村悦子、博多屋ちなみ、坂田和歌子、濱田建一郎[※]
[※]現・門司区役所保健福祉課

1 はじめに

当研究所では、食品の細菌汚染状況を把握し食中毒の未然防止対策を図るために食中毒菌汚染実態調査を実施しているが、近年はワンヘルス・アプローチの観点から食中毒菌の薬剤耐性状況の把握も求められている。

そこで、本研究では定量的知見の少ないウエルシュ菌を対象に定量試験法の検討や同法を用いた食肉の食中毒菌汚染実態調査を行うとともに、検出された食中毒菌(サルモネラ属菌及びカンピロバクター・ジェジュニ/コリ(以下、「カンピロバクター」という。))の薬剤耐性状況を調査した。

2 検査概要

○実施時期：2023年5月～2024年5月

○対象検体：

食肉42検体(牛肉、豚肉及び鶏肉各14検体、
うち外国産は牛肉3検体、豚肉及び鶏肉各2検体)

○検査項目：

(1)ウエルシュ菌の定量試験並びに腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌及びカンピロバクターの定性試験

(2)(1)で検出されたサルモネラ属菌及びカンピロバクターの薬剤耐性

○検査方法：

(1)ウエルシュ菌は「食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018」を参考に作成した検査実施標準作業書(SOP)を用いて実施。概要を図1に示す。その他食中毒菌は厚生労働省が示した「平成30年度食品の食中毒菌汚染実態調査実施要領」に準じて実施。

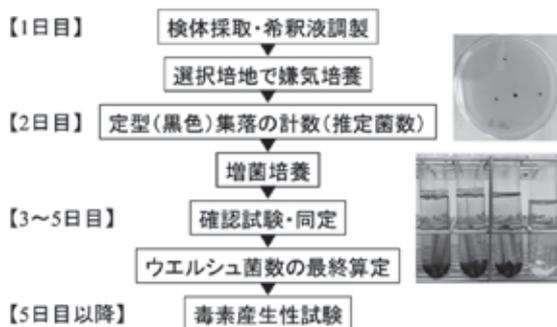


図1 ウエルシュ菌の定量

(2)薬剤耐性は「地衛研グループ薬剤感受性検査プロトコル」に従い、CLSI ディスク拡散法による薬剤感受性検査(サルモネラ属菌17剤、カンピロバクター6剤)を実施。

3 検査結果・考察

(1)食肉の食中毒菌汚染実態

市内流通食肉の食中毒菌検査結果を表1に示す。食肉42検体のうち、鶏肉5検体(鶏肉の35.7%)からウエルシュ菌が検出された。福岡県が実施した食肉(牛肉、豚肉及び鶏肉)の検査でも、鶏肉のみからウエルシュ菌が検出されている¹⁾ことから、汚染率が高いとされる食肉の中でも、鶏肉の汚染割合が高いことが示唆された。一方で、菌数は10 cfu/gが3検体、20 cfu/gが1検体、30 cfu/gが1検体と、いずれも定量限界(10 cfu/g)に近い値であった。発症菌数が $10^8 \sim 10^9$ cfuであることを考慮すると、適切な温度管理で菌の増殖を抑制すれば、ウエルシュ菌食中毒は十分防げることが示された。なお、自然界から分離されるウエルシュ菌のうち、毒素産生性の菌株は数%程度と言われており、今回検出された菌株もすべて毒素非産生性であった。

腸管出血性大腸菌はすべて陰性であった。牛肉1検体のみVT遺伝子陽性であったが、培養による生菌の確認はできなかったため、死菌であった可能性が考えられる。サルモネラ属菌は鶏肉9検体から検出された。血清型は7検体がSalmonella Schwarzengrund、1検体がS. Manhattan、1検体がS. Minnesotaであった。カンピロバクターは4検体から検出され、カンピロバクター・ジェジュニが鶏肉2検体から、カンピロバクター・コリが豚肉1検体及び鶏肉1検体から検出された。

(2)サルモネラ属菌及びカンピロバクターの薬剤耐性

サルモネラ属菌の薬剤感受性検査の結果を表2に示す。一般的に日本の医療機関でヒトのサルモネラ感染症の第一選択薬はニューキノロン系とセフェム系薬剤とされている²⁾。今回、食肉から検出された9株はいずれもニューキノロン系薬剤(CPFX及びNFLX)に対する耐性はなかったが、セフェム系薬剤(CTX、CAZ及びCFX)に対しては、外国産の鶏肉から検出されたS. Minnesota 1株が耐性を示した。「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書2023」³⁾によると、2015～2022年において全国でもセフェム系薬剤に耐性を示す食品由来サルモネラ属菌がCTX耐性4.5%、CAZ耐性4.0%及びCFX耐性3.6%確認されている。同報告書によると、食品由来株とヒト由来株の各種薬剤に対する耐性率パターンに明瞭な類似性が認められ、食品由来株がヒト感染症の感染源になっていることが示唆されていることから、今後も動向を注視する必要がある。

また、オールドキノロン系薬剤であるNAの耐性菌はニューキノロン系薬剤に対しても感受性が低下す

表1 市内流通食肉の食中毒菌検査結果

検体	検体数	ウエルシュ菌 陽性数(%) ^{※1}	腸管出血性大腸菌 陽性数(%)	サルモネラ属菌 陽性数(%)	カンピロバクター・ ジェジュニ/コリ陽性数(%)
牛肉	14	0 (0)	0 (0) ^{※3}	0 (0)	0 (0)
豚肉	14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7.1) ^{※5}
鶏肉	14	5 (35.7) ^{※2}	0 (0)	9 (64.3) ^{※4}	3 (21.4) ^{※5}
計	42	5 (11.9) ^{※2}	0 (0) ^{※3}	9 (21.4) ^{※4}	4 (9.5) ^{※5}

※1: 定量下限値:10 cfu/g

※2: 10 cfu/g が 3 検体、20 cfu/g が 1 検体、30 cfu/g が 1 検体

※3: VT遺伝子のみ陽性が 1 検体

※4: *Salmonella* Schwarzengrund が 7 検体、*S. Manhattan* が 1 検体、*S. Minnesota* が 1 検体

※5: 豚肉から*Campylobacter coli* が 1 検体、鶏肉から*C. jejuni* が 2 検体、*C. coli* が 1 検体

るとの報告がある⁴⁾。今回検出されたサルモネラ属菌では9株中5株(*S. Schwarzengrund* 4株及び*S. Manhattan* 1株)がNA耐性を示し、耐性率56% (5/9株)は全国における2022年のNA耐性率22.0%³⁾と比較して高い傾向であった。いずれのNA耐性株もニューキノロン系薬剤のCPFXに対して感受性でも耐性でもない“中間”を示し、報告と同様に低感受性化していることが確認されたため、こちらも今後の動向に注視する必要性が示唆された。

他に耐性菌株の多かったTC (7/9株)、SM (7/9株)、KM (6/9株)については、全国における2022年の結果でもTC耐性率81.8%、SM耐性率81.1%、KM耐性率59.1%と高い傾向であった³⁾。

次に、カンピロバクターの薬剤感受性検査の結果を表3に示す。一般的に、ヒトのカンピロバクター感染症の第一選択薬はエリスロマイシン(EM)とされている²⁾。今回、食肉から検出されたカンピロバクター4株は、すべてEM感受性であったため、第一選択薬の投与は有効であると考えられるが、近年、ニューキノロン系のCPFX及びオールドキノロン系のNAの耐性株増加が世界的な問題となっており、本調査でも4株中3株が耐性を示した。なお、カンピロバクターはセフェム系薬剤に対して元から耐性を持っているため、全株が耐性を示した。

4 まとめ

(1) 食肉の食中毒菌汚染実態調査について

ウエルシュ菌は土壌や水中、動物の腸管内など、自然界に広く生息する菌であるため食品への汚染を完全に防ぐことは不可能である。しかし、今回の定量試験の結果から、汚染菌数は少ないことが確認された。食中毒の原因となる毒素産生性の菌の汚染率は低いものの、ウエルシュ菌食中毒は毎年全国で発生し、大規模食中毒事例が多いことから、日頃から十分な加熱殺菌と増殖阻止(調理後はすぐに食べる、または急速冷却し適切な温度で保存すること)を徹底しておくことが重要である。

また、鶏肉の食中毒菌汚染率が高かったこと、生食文

表2 サルモネラ属菌の薬剤感受性検査結果

系統	抗菌剤(略号)	サルモネラ属菌(n=9)		
		耐性	中間	感受性
セフェム系	セフトキシム(CTX)	1	0	8
	セフトジウム(CAZ)	1	0	8
	セフトキシチン(CFX)	1	0	8
ニューキノロン系	シプロフロキサシン(CPFX)	0	6	3
	ノルフロキサシン(NFLX)	0	0	9
オールドキノロン系	ナリジクス酸(NA)	5	1	3
ペニシリン系	アンピシリン(ABPC)	1	0	8
カルバペネム系	イミペネム(IPM)	0	0	9
	メロペネム(MEPM)	0	0	9
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール(CP)	0	0	9
ホスホマイシン系	ホスホマイシン(FOM)	0	0	9
テトラサイクリン系	テトラサイクリン(TC)	7	0	2
アミノグリコシド系	ストレプトマイシン(SM)	7	1	1
	カナマイシン(KM)	6	0	3
	ゲンタマイシン(GM)	0	0	9
	アミカシン(AMK)	0	0	9
サルファ剤	ST合剤(SXT)	5	0	4

表3 カンピロバクターの薬剤感受性検査結果

系統	抗菌剤(略号)	カンピロバクター・ ジェジュニ/コリ(n=4)		
		耐性	中間	感受性
マクロライド系	エリスロマイシン(EM)	0	0	4
ニューキノロン系	シプロフロキサシン(CPFX)	3	0	1
オールドキノロン系	ナリジクス酸(NA)	3	0	1
ペニシリン系	アンピシリン(ABPC)	1	1	2
テトラサイクリン系	テトラサイクリン(TC)	1	0	3
セフェム系	セファロチン(CET)	4	0	0

化のない海外でも鶏肉が原因の食中毒が発生していることから、鶏肉を扱う場合は調理器具の使い分けなど二次汚染の防止も重要であると考えられる。

(2) 食品由来の薬剤耐性菌について

薬剤耐性菌を制御するためには、ヒト、動物、食品及び環境の統合的なワンヘルス動向調査が必要である。

このうち、食品由来の薬剤耐性菌については「ワンヘルス・アプローチに基づく食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスと伝播機序解明のための研究」として、全国の地方衛生研究所を中心にデータが収集されている。当研究所もこの研究班に参加し、データ収集に協力しているため、本調査のデータも薬剤耐性菌の動向把握や今後の対策に寄与することを期待している。

参考文献

- 1) 片宗千春、カール由起、上田紗織、重村洋明、江藤良樹、芦塚由紀：2022年度取去食品の細菌学的検査及び残留抗生物質モニタリング検査、福岡県保健環境研究所年報第50号、135-137、2023
- 2) 李榕真、田内春香、安達悠太、永田栞、渡邊哲史、大石和樹、岡谷友三アレシャンドレ、下島優香子、森田幸雄：市販鶏肉のカンピロバクター・サルモネラ汚染と衛生指標菌数との関連性、日本食品微生物学会雑誌、41 (3)、103-112、2024
- 3) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会：薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書2023、2024
- 4) 松下秀、小西典子、有松真保、甲斐明美、山田澄夫、諸角聖、森田耕司、金森政人、工藤泰雄：散発事例由来サルモネラにおけるナリジクス酸耐性株の出現状況、感染症学雑誌、74 (4)、345-352、2000

薬剤耐性菌におけるNGS解析の現状と課題

北九州市保健福祉局保健環境研究所 ○上野 可南子、中村 悦子、博多屋 ちなみ、濱田 建一郎

1 はじめに

近年、新型コロナウイルスのゲノム解析を実施するため、本市を含む多くの地方衛生研究所において次世代シーケンサー（NGS）が導入された。NGSを用いた全ゲノム解析(WGS)には、遺伝子情報の「解読」と解読したデータの「解析」の2つの作業が必要である(図1)。新型コロナウイルスについては、どちらの作業も標準化された手法が既に完成し、広く周知・活用されているが、それ以外の多くの病原体においては、現時点では、手法の標準化には至っていない状況である(表1)。

今後、WGSが不可欠とされている病原体の一つとして、「薬剤耐性菌」が注目されている。今回、薬剤耐性菌について、国立感染症研究所が「解読」した遺伝子配列データを利用し、複数の解析ツールを用いて「解析」を試みたところ、当研究所においても活用の可能性が示された。また、WGSの活用に向けては3つの課題が明確になったので、解析結果と併せて報告する。

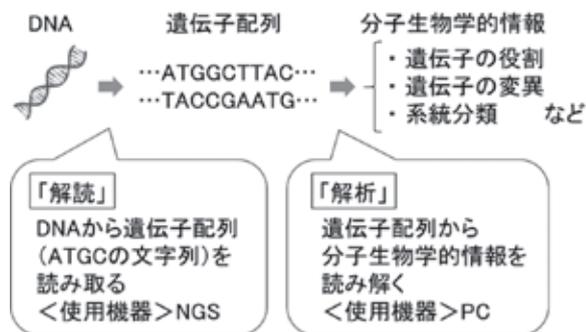


図1 「解読」と「解析」

表1 標準化された手法の有無

	標準化された「解読」手法	標準化された「解析」手法
新型コロナウイルス	あり(※1)	あり(※2)
その他多くの病原体	なし	なし

(※1) 国立感染症研究所が公開している「新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル (Qiagen 社 QiaSEQ FX 編)」

(※2) 国立感染症研究所が開発・管理しているWeb解析システム「COG-JP」

2 解析方法

解析には、当研究所に搬入された薬剤耐性菌のうち、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌であった大腸菌1株について、国立感染症研究所が解読した遺伝子配列データを用いた。

細菌の遺伝子情報には、染色体由来のものとプラスミド由来のものがあるため、図2のとおりS1 nuclease処理後に電気泳動にて染色体とプラスミドを分子量の大きさで分離した。それぞれの切り出しDNAバンドのゲノム解読が行われたものを、解析項目に応じて、表

2に示した各種解析ツールを使用し解析を実施した。

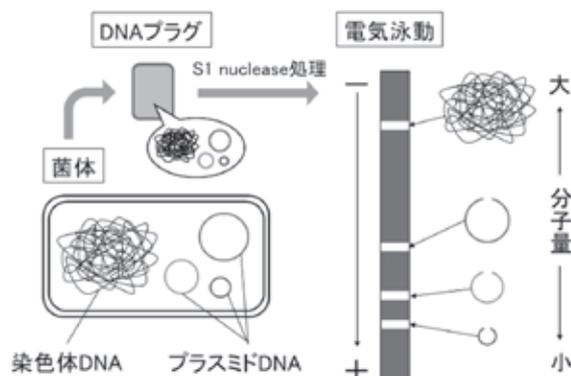


図2 染色体とプラスミドの分離方法

表2 解析項目とWeb解析ツール

解析項目	Web解析ツール
菌種同定、塩基長の確認	DFAST (FastANI)
血清型の決定	SerotypeFinder 2.0
MLST法によるST型の決定	PubMLST
cgMLST法によるcgST型の決定	cgMLSTFinder 1.2
fimH型の決定	FimTyper 1.0
プラスミドのInc typeの決定	PlasmidFinder 2.1
薬剤耐性遺伝子の検出	ResFinder 4.4.2

3 解析結果

(1) 菌種同定

菌種同定では、既知の細菌の遺伝子配列と比較してどの菌種と似ているか、相同性検索を行う。今回、2種類の相同性検索を行った結果、1つ目は「*Shigella boydii*」、2つ目は「*Escherichia coli*」が最も高い相同値(95%以上)を示した。*Shigella*と*E. coli*の遺伝子の相同性は平均85%以上であるため、遺伝子配列の比較だけでは判定が難しいとされている¹⁾。そこで、菌を培養し生化学性状(ガス産生性や運動性など)の試験を実施したところ、*E. coli*の性状を示したため、対象菌株の菌種は「*E. coli*」であると判定した(表3)。

(2) 菌株の型別決定

通常、菌株の型別決定では市販の血清キットを用いたり、従来のシーケンサーにより特定の配列のみを解読・解析する方法が取られているが、今回はNGSで解読された全ゲノム配列を活用し、各種解析ツールを用いて様々な型別決定を行った。解析の結果、血清型はO99:H6、MLST法によるST型は68、cgMLST法によるcgST型は23425、*fimH*型はH49に型別された(表3)。この中で、cgMLST法による解析は対象とする遺伝子領域が広いいため、NGSを用いた全ゲノム配列が必要となるが、その他の型別と比べてより高い識別能であるため、院内感染など狭い範囲での菌株比較が可能となる。

表3 解析結果

菌種	血清型	ST	cgST	fimH型	染色体		プラスミド			
					サイズ (bp)	薬剤耐性遺伝子	No.	サイズ (bp)	Inc type	薬剤耐性遺伝子
E. coli	O99:H6	68	23425	H49	5,321,708	なし	P1	30,552	IncX4	なし
							P2	63,835	No hit	なし
							P3	136,217	IncFII	<i>bla</i> _{NDM-1} 、 <i>bla</i> _{OXA-1} 、 <i>bla</i> _{CTX-M-15} 、 <i>aadA2</i> 、 <i>aph(6)-Id</i> 、 <i>aph(3'')-Ib</i> 、 <i>aac(3)-IIa</i> 、 <i>aph(3')-Ia</i> 、 <i>mph(A)</i> 、 <i>catB3</i> 、 <i>sul1</i> 、 <i>sul2</i> 、 <i>tet(B)</i> 、 <i>dfrA12</i>

(3) プラスミドの型別決定

プラスミドの複製に参与する遺伝子配列に基づく Inc type による型別を行ったところ、3つのプラスミドのうち1つはIncX4、もう1つはIncFIIであった(表3)。IncFIIを含むIncFグループは、E. coliに広く分布しているプラスミドであるが、プラスミドは菌種を越えて伝達されることが知られており、近年、プラスミドを介した薬剤耐性遺伝子の拡散が問題視されているため、薬剤耐性菌におけるプラスミド解析は重要である。

(4) 薬剤耐性遺伝子の検出

解析の結果、IncFIIプラスミド上に、*bla*_{NDM-1}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{CTX-M-15}の3つのβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出され、このうちの1つ、*bla*_{NDM-1}がカルバペネム耐性遺伝子であった。さらに、表3のとおり、その他にも多数の薬剤耐性遺伝子を保有していることがわかった。

なお、解析結果のデータ上では、染色体にも薬剤耐性遺伝子が存在していたが、妥当性評価のため散布図を作成した結果(図3)、図2に示した電気泳動による分離の際のプラスミド配列の紛れ込みと判断した。

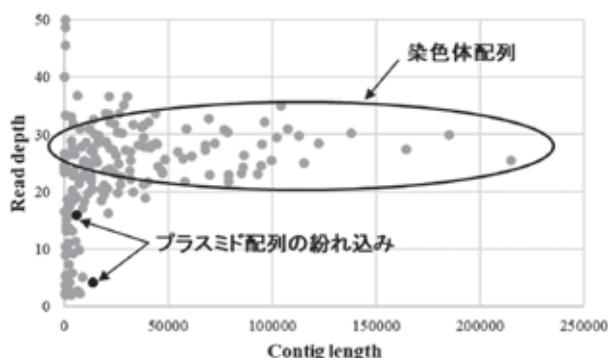


図3 染色体配列とプラスミド配列のプロット

4 今後の課題

NGSにより得られた配列データを解析することで、菌種同定、菌株の型別決定、プラスミドの型別決定、薬剤耐性遺伝子の検出など、従来は各種検査をする必要があった多くの情報を一度に得ることができるうえに、より高い識別能の型別決定を行うことができた。一方で、実用化に向けては以下の3つの課題が明確になった。

(1) 従来法と比べて高コスト

WGSにかかる試薬代や機器の保守契約料、解析ソフトウェアなどの必要経費は高額である。しかし、菌株比較に不可欠な従来法(PFGE)の機器はすでに販売終了しており、修理サポートも2023年で終了したため、今後、院内感染発生時の解析は、必然的にWGSへと移行していくことになる。

(2) 情報解析が複雑

解析を行うには、まずNGSで得られた遺伝子配列が使えるデータかどうか、量と質を精査したうえで、目的に合わせて種々の解析ツールやコマンドの選択・設定を行う必要があり、情報解析が複雑である。さらに、今回の菌種同定や、染色体配列へのプラスミド配列の紛れ込みのように、得られた解析結果が全て正しいとは限らないため、妥当性を評価する必要がある。そのためには、情報解析の知識に加えて、NGSの原理の理解や、細菌の知識も必須であり、技術の習得には時間を要する。

(3) 標準化された解析手法・解釈基準がない

薬剤耐性菌におけるWGSの研究は活発に行われているものの、解析手法や解析結果の解釈基準については、まだ検討が必要な段階である。使用する解析ツールや設定によって解析結果が多少異なってくるため、研究所間での比較のためにも、統一・標準化された手法が望まれる。

以上の課題はあるものの、今後、WGSへと移行していくことは必至である。当研究所においても、最新情報の収集、NGSを用いた読解及び解析技術の研鑽など鋭意進める必要があると考えている。

謝辞

本解析にあたりゲノム解読データのご提供だけでなくご指導及びご助言いただきました、国立感染症研究所薬剤耐性研究センター及び病原体ゲノム解析研究センターの先生方に深謝いたします。なお、本研究はAMEDの課題番号JP23fk0108604の支援を受けました。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所: 赤痢菌検査・診断マニュアル(平成24年6月改訂)

A型インフルエンザウイルスの全ゲノム解析の手法の検討

保健福祉局保健環境研究所 ○田口 裕也、泉田 園子、久保田 昌嗣

1 はじめに

当研究所では、Covid-19の変異株の流行状況を詳細に把握するため、令和3年度に次世代シーケンサー(Miseq)を導入し、ゲノム解析に取り組んできた。現在は、Covid-19の大規模な流行がほぼ収束したことから、Miseqの新しい活用方法について様々な検討を行っているところである。

その1つとして、毎年、流行が確認されるA型インフルエンザを対象に、市内の流行状況をより正確に把握することを目的として、全ゲノム解析の手法について検討した。

2 A型インフルエンザウイルスの全ゲノム解析

(1) 試料

2022年10月～2024年3月の病原体サーベイランスのうち、A型陽性と判明した検体(分離培養を含む)の中からリアルタイムPCR法によりCt値30以下と判明した計40検体を試料とした。

(2) ウイルスRNA抽出

(1)の試料について、QIAamp Viral RNA Mini Kit [QIAGEN]を用いてウイルスRNAを抽出した。

(3) A型全セグメントのPCR増幅

国立感染症研究所の病原体検出マニュアルを参考にPCRプライマーを設計し、PCR試薬については、QIAGEN One step RT-PCR kit [QIAGEN]を用いて、表1に示した条件下でPCRを行った。(以下、「従来法」という。)

表1 A型インフルエンザ全セグメントの増幅反応

試薬	用量 (μl)	終濃度 (μM)	温度	反応時間
5×buffer	10		50°C	30分
dNTP Mixture	2		95°C	15分
Primer 1 (10μM)	2.5	0.5	94°C	15秒
Primer 2 (10μM)	2.5	0.5	56°C	30秒
Enzyme mixture	2		72°C	1分
DW	26		72°C	10分
Template RNA	5		4°C	オーバーナイト
Total	50			

×40回

(4) サンプルライブラリ調製

QIAseq FX DNA Library Kit [QIAGEN]を用いて、表2及び表3に示した条件下でライブラリを作製した後、AMPure XP [Beckman Coulter]を用いてサンプルを精製した(図1)。次に、表4に示したライブラリ増幅を行い、各サンプル濃度をQubit [Thermo Fisher Scientific]を用いて測定した後、DNA濃度の低い6検体を除いた34検体について0.4ng/μlに調製した。そ

の後、全サンプルを1つのチューブに入れて混合し、Miseqのプロトコルに従いロードサンプルを調製し、MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycles) [Illumina]を用いてランを実行した。

表2 断片化、末端修復反応

試薬	用量 (μl)	温度	反応時間
FX buffer (10×)	2	4°C	ホールド
FX Enzyme Mix	4	32°C	15分
DW	12	65°C	30分
PCR産物	2	4°C	オーバー
Total	20		ナイト

サーマルサイクラーの温度は予め4°Cの状態に設定し、蓋の温度は70°Cに設定した。

表3 アダプター付加反応

試薬	用量 (μl)	温度	反応時間
DNA Ligase Buffer (5×)	8	20°C	15分
DNA Ligase	4	4°C	オーバー
Adapter	2		ナイト
DW	6		
Sample (表2反応物)	20		
Total	40		

サーマルサイクラーの蓋を開けておくか、温度をOffにする

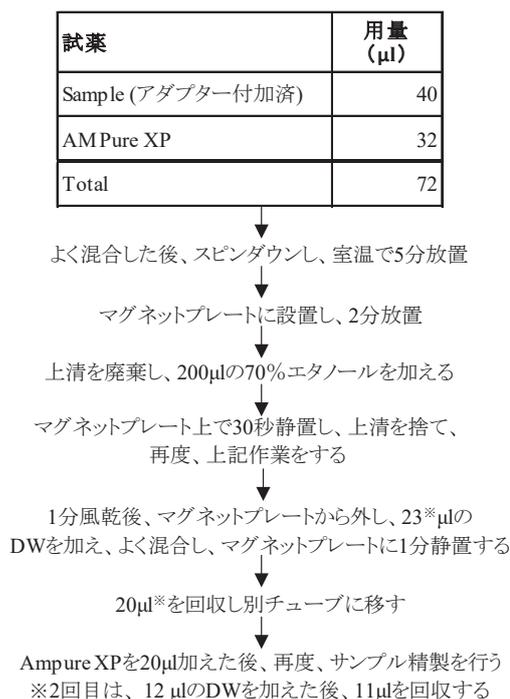


図1 サンプルの精製フロー

表4 ライブラリ増幅反応

試薬	用量 (μ l)	温度	反応時間
		98°C	2分
HiFi PCR Master Mix (2x)	10	98°C	20秒
Primer Mix (10 μ M each)	0.5	60°C	30秒
Sample (図1の精製物)	9.5	72°C	30秒
Total	20	72°C	1分
		4°C	オーバー ナイト

表4の反応後、AMPure XP 20 μ lを加え、図1のサンプルの精製フローに従いDWを加えて混合後、マグネットプレートに1分静置し、11 μ lを回収した。

(5) データ解析

Miseqラン終了後、得られたfastqデータについて、トミーデジタル社提供Genious Prime を用いて解析した。その結果、34検体中33検体の全ゲノム解析に成功した。

3 従来法の改良について

次に、解析可能な検体数の増加及び作業工程の簡略化について、Covid-19ゲノム解析を参考に次のような検討を行った。

(1) PCR反応液量の検討

QIAGEN One step RT-PCR kitの推奨量は50 μ lだが、半分量の25 μ lでPCRを行い、PCR産物の濃度測定したところ、PCR産物の濃度変化はなかった。このため、以降は反応量25 μ lとして次に進めた。

(2) PCR反応におけるプライマー濃度の検討

PCR産物の濃度は全ゲノム解析の成功に影響を与えるため、プライマー濃度(終濃度)を0.5 μ M ~ 1.0 μ Mの範囲で検討した。その結果、0.8 μ M前後でPCR産物の濃度が一番高くなる傾向が見られたため、本反応におけるプライマー濃度を0.8 μ Mに決定した(表5)。

表5 プライマー濃度によるPCR産物の濃度の検討

検体	DNA濃度 (μ g/ μ l)						
	プライマー濃度 (終濃度(μ M))	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Sample 1		2.72	7.30		38.0		58.8
Sample 2		14.7	31.4		69.0		67.2
Sample 3		1.74	1.80		9.36		6.76
Sample 4				17.7	23.1	26.0	
Sample 5				102.2	100.2	83.8	
Sample 6				6.55	6.99	4.24	

(3) サンプルライブラリ調製時間の短縮化(図2)

今回の解析対象となる検体数が40検体のため、従来法では、サンプル精製以降の作業負担が大きく、かなりの時間を要した。そこで、図2のとおり、2つの改良法についてそれぞれ検討した。

改良法1	全セグメント PCR(プライ マー終濃度0.8 μ M)	→断片化、アダプター付 加	→サンプル精製	→
		ライブラリ増幅反応	→サンプル精製	→
改良法2	全セグメント PCR(プライ マー終濃度0.8 μ M)	DNA (ng/ μ l) 濃度測定 し、各サンプル0.4ng/ μ l に希釈	0.4ng/ μ lに希釈し た各サンプルを1 つのチューブに 採取	→
		Miseq測定		
改良法2	全セグメント PCR(プライ マー終濃度0.8 μ M)	→DNA (ng/ μ l) 濃度測定	→断片化、アダプ ター付加	→
		DNA (ng/ μ l) 濃度結果 に応じて各サンプルを1 つのチューブに採取	→サンプル精製及 び濃度(μ M)測 定	→
		Miseq測定		

図2 サンプルライブラリ調製方法(改良法1と改良法2)

(4) データ解析

改良法1、2についてデータ解析を行った。その結果、改良法1は、DNA濃度の低い1サンプルを除いた39サンプルを全ゲノム解析の対象としたところ、38サンプルの解析に成功した。また、解析に成功したサンプルについて、インフルエンザAH1pdm09もしくはAH3について、HA遺伝子もしくはNA遺伝子の分子系統樹を作成し、遺伝子型を判定することもできた。

改良法2は、作業時間は短縮されたが、ロードサンプルの質が低かったため、解析不可であった。

4. 考 察

今回検討した従来法により、インフルエンザの全ゲノム解析に成功した。また、PCR反応におけるプライマー濃度を0.8 μ Mにした改良法1では、PCR産物の濃度の増加により解析の対象となる検体数が34から39に増え、解析成功率も若干、高くなった。一方で、改良法2のように作業を簡略化した場合、データ解析が不可能だったため、改良法1の「ライブラリ増幅」工程は、当該ウイルスゲノム解析にとって重要な工程だと考えられた。

更に、得られたゲノム情報をもとに分子系統樹を作成し、本市における感染状況を調査した結果、国内で主流の遺伝子型に約7割、感染していたことが示された。

5. 総 括

現在、当研究所においてMiseqの新しい活用方法を検討しているが、今回、インフルエンザウイルスの全ゲノム解析の活用成功した。今後、インフルエンザウイルスについて、Covid-19のような大規模流行が発生した場合、Miseqを活用することで、感染源の推定、感染拡大の状況推移の解析にも寄与できるものと期待される。

【参考文献】

- 1) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル(第5版) 2023年8月