

# Core genome MLSTによる 食中毒菌の汚染ルートの推定 ～食品を汚染した菌はどのように追跡するのか?～

Molecular source tracking of food poisoning bacteria by using core genome MLST  
-How to track the contaminated bacteria?-

**高橋 肇** Hajime Takahashi (Associate Professor)

東京海洋大学 学術研究院 食品生産科学部門 食品微生物学研究室 准教授  
Tokyo University of Marine Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Food Microbiology

**中村 綾花** Ayaka Nakamura (Doctoral Course Student)

東京海洋大学大学院 応用生命科学専攻 食品微生物学研究室 博士後期課程2年  
Tokyo University of Marine Science and Technology, Course of Applied Marine Biosciences, Laboratory of Food Microbiology

キーワード ■■ 食中毒菌、core genome MLST、DNAタイピング

## 01 食品製造現場における微生物検査の現状

近年、食の多様化と食品の安全性に対する社会的関心の高まりを受け、食品の製造現場では高度な衛生管理手法が要求されている。特に、あらかじめ調理され、購入後手を加えることなく食べられるReady-to-Eat食品、少々の手間を加えれば食べられる半調理済み食品の割合は年々増加し、多種多様な食品形態が見られるようになってきている。このような食品は家庭料理として調理される食品とは根本的に異なり、異物の混入や長期にわたる流通、消費者の取り扱いによる温度不備等、想定すべきリスクが多く、その品質、安全性の確保にはHACCPの考え方を導入した高度な衛生管理が要求される。しかし、日本においては、中規模、小規模な食品会社も多く、高度な衛生管理手法を取り入れるのが困難であるという状況も多い。このような中で、食品の安全性を確保すべく、各種食中毒菌の検査法や汚染実態、鮮度のモニタリング法の確立は急務であり、また、これら手法は中規模、小規模な食品会社においても実施可能な簡易でコスト的にも十分実施可能な方法であることが望まれている。

これまでの食品工場などにおける微生物検査は、そのほとんどが培養法に基づくものであり、製品や製造ライン上の衛生管理を行う上で迅速性という点において大きな障害となっていた。また、専門的な知識を有する従業員の育成や、微生物検査に伴う安全性の確保(培養菌体の製品への混入防止)に多大な労力を要しており、より導入しやすい管理手法が求められている。

最近では、遺伝子増幅技術であるPCR法が病原菌の検出に広く用いられるようになり、また、PCR反応終了と同時に遺伝子の増幅が確認でき、電気泳動操作が不要なリアルタイムPCR法も広く普及し、食中毒菌のモニタリングを行うことのできる自主

衛生管理手法の一つとして選択肢に入ってきている。PCR法は、操作自体に専門的知識を要求することは少なく、キット化も容易で、迅速、簡便であるという特徴を有していることに加え、食品製造の現場で病原菌を培養する必要がなく、検査室に近い生産ラインの安全性確保も容易である。また、導入を後押しするように各種食中毒菌の検出キットも発売されており、一昔前よりはPCR検査導入のハードルは下がっているのではないかと考えている。本稿では、遺伝子手法を用いた食中毒菌のモニタリング法、特に、食品製造現場における食中毒菌等の汚染源を解析するための最新手法について解説する。

## 02 遺伝子手法を用いた食中毒菌の検査法

本稿では食中毒菌のモニタリング、汚染源の解析法に焦点を当て解説を行っていくが、その前に、簡単に食中毒菌の検出法、同定法の現状について述べたいと思う。

微生物の検出・同定法はこれまで、ほとんどが培養法に基づき行われてきた。食品の中に存在する菌の大半は食中毒菌以外のいわゆる雑菌であり、そのような中で食中毒菌は優勢菌に埋もれ、ごく微量に存在していることがほとんどである。そのため、雑多な菌群中から特定の食中毒菌を検出するには、増菌培養により全体の菌数を増やし、選択培養により標的菌もしくはその近縁の微生物を増殖させ、鑑別試験により対象とする微生物を確認する手法がとられる。このため、各培養のステップを経る必要があり、少なくとも数日、長いものでは1週間程度の検査時間が必要である。近年になってこれら培養法を用いた検査法に加え、PCR法などの遺伝子手法を用いる試みが急速に広がり、一部の

食中毒菌においては一般的な検出手法となっている。

PCR法を用いた食中毒菌の検出は、検査対象となる食中毒菌だけが持つ特定の遺伝子をPCRで増幅することで行っている。これまでにほとんどの食中毒菌で毒素遺伝子などを標的としたプライマーが開発され、検出方法が確立している。また、PCRで増幅される増幅産物をリアルタイムで定量することが可能なリアルタイムPCRも広く普及しており、目的菌の有無を判別するだけでなく、菌数を定量することも可能となっている。PCR法は分子マーカー（その菌だけが持つ特定の遺伝子配列）となる遺伝子が決まっている場合、すなわち、毒素遺伝子の保有が確認されている、病原因子の遺伝子が決定されているといった場合は、検出系の確立が可能であるが、これといった分子マーカーが無い菌群については、検出系の確立が難しい。食品製造現場においては食中毒菌のみならず、腐敗菌や変敗原因菌の迅速検出といったニーズがかなりあると思われるが、これらの菌群については分子マーカーの抽出が難しく、検出法の確立が困難なケースもある。本稿で取り上げる、次世代シーケンシングによる解析は、分子マーカーの決定にも一役買うと考えられ、今後、検査系の確立が容易になる可能性もある。この点に関しては後で述べたいと思う。

同定法に関しては、分子マーカーとしていくつかの遺伝子が用いられており、この配列情報の相同性にに基づき同定を行うことが多い。この場合、特定の菌を検出する場合とは異なり、全ての生物種に共通している遺伝子、例えば、リボゾームRNA遺伝子、ジャイレース遺伝子等が用いられる。リボゾームRNAはタンパク質合成に関与する細胞内小器官リボゾームを構成しており、構造上も機能上も生物種による相違が少ない核酸物質である。細菌は16S rRNA、23S rRNA、5S rRNAの3つのリボゾームRNAを持っており、このうち16S rRNAは古くからその塩基配列情報が解析されていたため、ほぼすべての培養可能な菌の配列情報がデータベースに登録されており、細菌の系統学的解析や相同性の比較に広く用いられている。また、細菌の主要タンパク質をMALDI-TOF MSにより分析、主要タンパク質の分子量パターンより同定を行う手法も一般的になっている。

16S rRNA遺伝子の配列に基づく菌種判別が一般的となり、そのデータベースが充実するにつれ、遺伝子配列の細かな違い(多型)による分類が細菌の種を問わず行われるようになった。これら手法の多くは、細菌の16S rDNAを対象にし、その配列中に存在する多型を検出することで解析を行っている。16S rDNAは約1500bpからなる遺伝子であるが、その中にはほとんどの細菌に共通な配列部分(保存領域)と菌種毎に異なる配列(多型領域)が交互に繰り返されるように分布している。菌種によってはこの多型領域の配列が菌株間においても異なっていることがあり、そのため同じ属にある菌を種ごとに、あるいはそれ以上の精度で分類することも可能である。この領域を用いたタイピング方法は汚染菌の混入ルートを株レベルで追跡するほどの解像度は持たないものの、工場や製品から分離された菌株が何群に分かれ、どのような内訳なのか、汚染菌のなかで優勢なものはどれのかなど、汚染の実態をおおまかに把握するような場合には簡便で使いやすいものと思われる。

03

これまでの汚染源追跡法  
(DNAフラグメントのパターンによるタイピング)

工場内外で分離した菌をすべて同定したとしても、それらの伝播動態を把握することは困難である。例えば、同じ食中毒菌が出荷した製品と複数の原料と工場内の複数箇所から検出された場合は、同じ菌種だからすべて疑わしいとするには無理があり、菌株レベルでの解析を行い、真の原因を突き止める必要がある。このような場合には、種レベルの群別・同定よりさらに精度の高い、株レベルでのDNAタイピング法が必須である。株レベルの判別を行うには、細菌の持つ全てのDNA(ゲノム)を対象として解析を行い、同じ遺伝型なのかどうかというタイピングを行う。このタイピングは菌株個々の指紋を解析するに等しいことからフィンガープリンティングと呼ぶこともある。

全ゲノムを対象としたDNAタイピングは、大規模な食中毒や感染症が発生した際の疫学調査のためのツールとして発展してきた。DNAタイピング法として古くから行われ、国際的にも標準的なものとして広く使われていた方法はPFGE(Pulse-field Gel electrophoresis)である。本法は、全ゲノムを制限酵素で切断し、得られた高分子量のDNA断片を電場の向きを連続的に変えられる特殊な泳動層で分離し、そのバンドパターンを比較する手法で、各国の衛生研究所などで疫学解析のツールとして広く使われており、信頼性の高さ、解像度の高さから国際ネットワークとしてパルスネットが作られ、稼働している<sup>1)</sup>(図1)。パルスネットには、PFGEによる菌株の解析情報と食中毒等の発生事例に関する種々の疫学情報が登録され、その情報を各国の研究機関などが共有することで、感染症発生時に迅速な対応と原因の究明ができるよう運営が行われている。しかしながら、PFGEは解像度が高いという特徴がある反面、操作が非常に煩雑であり手法の習熟にも時間を要するため、食品会社において導入しているところはほとんどないのが現状である。



図1 PulsNet Internationalのネットワーク

一方、操作が簡便で食品製造の現場においても特殊な機械を必要としないため、広く用いられてきたものに、RAPD(Random Amplification of Polymorphic DNA)がある。これはPCRを用いた全ゲノムを対象としたタイピング法で、通常のPCRのように特異性を持ったプライマーを用いるのではなく、特段の特異性を持たせていないプライマーをゲノムの非特異な領域にランダムにアニーリングさせ、増幅されてきたDNA断片をバンドパターンとして解析するものである。PCR法を利用しているため、操作自体は簡便であるが、プライマーをランダムにアニーリングさせ、ゲノム上の領域をランダムに増幅するという特性上、PCR反応液の組成やPCR機器により得られる結果が異なり、再現性や研究機関毎における互換性について問題点が指摘されている。しかしながら、国際的な微生物学のジャーナルにおいて、特に食品工場内の汚染源追跡に本法を使用している研究報告はいまだ多く、簡易に工場汚染菌のタイピングを行う方法として、一定の定着を見ることができている。なお、本法に関してはRAPDという名称ではなく、他の名称で報告している研究論文も多いが、原理は同じと考えてよい。

## 04

### これからの汚染源追跡法 (配列情報比較によるタイピング)

これまでに述べた全ゲノムを対象としたタイピング法は、基本的に染色体DNAを制限酵素などで切断、もしくは、PCRで増幅したDNAのフラグメントを電気泳動により分離することで、可視化したバンドパターンにより判別する方法である。これらの方法の最大の欠点は、バンドパターンとして表れている物の再現性を得るのが難しく、試験研究機関の間における共有、データ化が難しいという点である。つまり、同じ電気泳動のゲル内においては、隣のレーンに泳動したバンドパターンの比較は容易に行えるが、他の研究機関、あるいは過去の解析において示されたバンドパターンとの比較は、別な写真として撮影された写真を並べ比較し

ているため、詳細な比較は困難である。一般的には電気泳動は分子量マーカーを同時に流しているため、大まかにバンドパターン比較することも可能であるし、マーカーとの比較によりある程度の数値化も可能ではある。しかしながら微妙なバンドのずれ、泳動の乱れなどがある場合にはゲル間での比較は困難であることも多い。

これらの方法に変わり、MLVA(Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis)、MLST(Multilocus Sequence Typing)と呼ばれる塩基配列情報に基づくタイピング法が開発され、10年ほど前から菌株識別、タイピングの手法として広く用いられるようになってきた。

MLVA法はゲノム上に複数箇所存在する特定の繰り返し配列のうち、菌株間で繰り返し回数が異なることが分かっている領域の配列を解析することで菌株間の差異を判断するものである。この繰り返し回数は、菌株間でかなり差がある領域も多く、そのため、菌株をPFGEと同様かそれ以上の精度で識別することが可能である。しかしながら、繰り返し配列や採用する領域について複数の論文や方法が発表されており、後述のMLSTほどはデータベースとして拡充されてはならず、特定の菌種、あるいは特定のフィールドにおける解析に利用されている<sup>2-4)</sup>。

MLSTはゲノム上の5~8箇所程度の遺伝子領域(数百bpを数か所)の塩基配列を決定し、その配列情報の差異に基づき菌株を判別する手法である。同一菌種内で、高解像度に菌株を識別できる遺伝子領域が選ばれており、各食中毒菌について、それぞれ方法が提供されている<sup>5)</sup>(図2)。本法では、シークエンサーにて読み取った各遺伝子領域の塩基配列に対し、配列が同じものには同じ番号、違うものには違う番号を振る。この振り付けたアレル番号の組み合わせにより、Sequence Type(ST)が決定する。本手法は、各遺伝子領域の配列さえ取得できれば、STを決定することができるため、ATGCの羅列である塩基配列情報(生データ)をいつまでも保持することなく、菌株の遺伝型を番号で管理できるため、誰にでも取り扱いやすい方法として急速に広まった。

これまでの研究報告では、MLVA法、MLST法に基づくタイピ

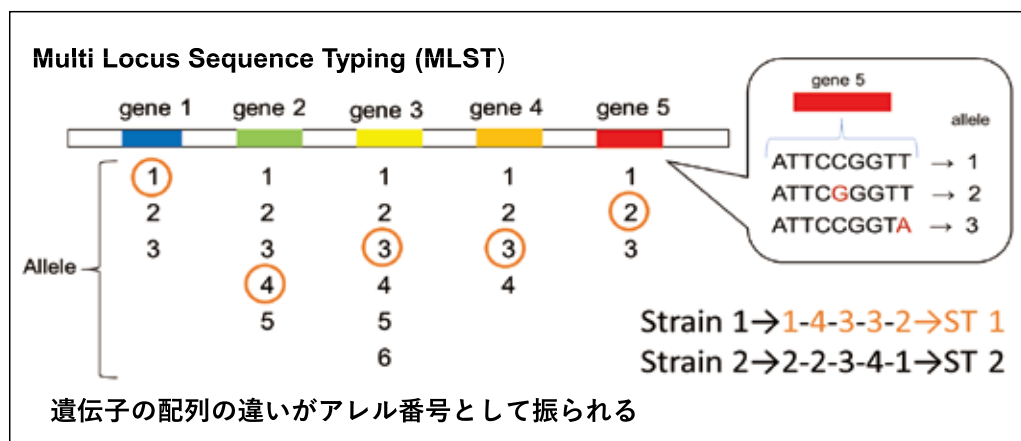


図2 MLST解析の原理

ング法は従来から行われてきたバンドパターンとして解析を行う判別方法と株の識別能力的には大差はなく、これまでのバンドパターンを用いた方法にかわるタイピング法として引き続き使われていくものと考えられる。

## 05 より高い識別能をもつcgMLST法の登場

ここ数年、注目を集めているのがcore genome MLST(cgMLST)法である。従来のMLST法では、株識別に用いる解析対象領域が5~8遺伝子であったのに対し、cgMLST法はその菌種が共通に持つ全ての遺伝子領域、すなわちcore geneを対象としている(図3)。core geneを定義するためには、始めに複数株の全ゲノムデータを取得し、そこから共通に持つ配列部分を抽出する必要がある。ここで、抽出した共通領域は必ずしも遺伝子の一部ではなく、遺伝子以外の配列部分も抽出されるため、厳密にはcore geneの数はloci(遺伝子座)で表記する。例えば*Salmonella*では3,002 loci<sup>6)</sup>、*E. coli*では2,513 loci<sup>7)</sup>がcore geneとして定義されている。疫学的に重要かつ主要な食中毒菌などは、すでに

複数の研究者によりcore geneが定義されており、我々は彼らの開発したschemeに準拠しcgMLST解析を行えばよい。MLST解析のような配列の差異に基づく株識別法は、他の研究者が決定したSequence Type(ST)と比較することが容易である。そのため、世界中の研究者が自らの分離株のSTを、分離源(国、臨床株、食品由来株など)、分離年、病原性の有無、血清型などの情報とともに、データベースに登録している(図4)。例えば、サルモネラのデータベースには、286,159株もの分離株データが登録されている(2021年2月4日現在)。現在、MLST解析のためのデータベースは大きく3つあり(図5)、Enterobase(Organized by Warwick University, UK)、PubMLST(Organized by University of Oxford, UK)、Pasteur MLST(Organized by Institut Pasteur, FR)である。Enterobaseは、腸内細菌科菌群に属する菌種の情報が豊富であり、*E. coli* や*Salmonella*等を分析したい場合に最適である。PubMLSTは*Campylobacter*や*S. aureus*など、Pasteur MLSTは*L. monocytogenes*等を分析したい場合に用いると良い。このように、これらのデータベースでは、core geneの定義及びschemeが異なっているため、自身の分離株を解析する上で最も都合の良いデータベースを選択するのが望ましい。

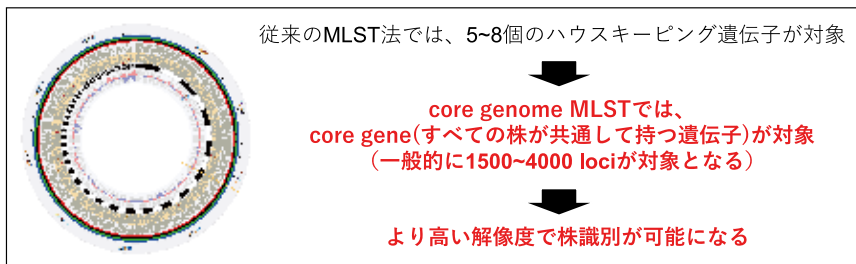


図3 cgMLST解析の特徴

Strain ID	Name	Data Source	Species	Collection Date	Location	Lab Contact	Species	Serology	ST	H30 (ref)
ESC_AA	AZ-TG71511	RR213329	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17560	17560	
ESC_AA	AZ-TG7134	RR213329	poultry	11/2014	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17559	17559	
ESC_AA	AZ-TG71555	RR213334	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17558	17558	
ESC_AA	AZ-TG71529	RR213332	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17557	17557	
ESC_AA	AZ-TG71539	RR213321	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	16681	16681	
ESC_AA	AZ-TG71535	RR213321	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17556	17556	
ESC_AA	AZ-TG71543	RR213320	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17555	17555	
ESC_AA	AZ-TG71535	RR213318	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17554	17554	
ESC_AA	AZ-TG71531	RR213318	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17553	17553	
ESC_AA	AZ-TG71507	RR213318	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	1	1	
ESC_AA	AZ-TG71551	RR213316	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	16221	16221	
ESC_AA	AZ-TG71547	RR213316	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17852	17852	
ESC_AA	AZ-TG71527	RR213316	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17551	17551	
ESC_AA	AZ-TG71523	RR213316	poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17550	17550	
ESC_AA	AZ-TG73325	RR213315	poultry	7/2013	United States	FOOD AND DRUG AD	Escherichia coli	17549	17549	
ESC_AA	PSIS1503189	RR213320	livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli	17546	17546	
ESC_AA	PSIS1503190	RR213320	livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli	17546	17546	
ESC_AA	PSIS1503260	RR213207	livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli	17543	17543	
ESC_AA	PSIS1503255	RR213207	livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli	17538	17538	
ESC_AA	PSIS1503266	RR213206	livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli	501	501	
ESC_AA	PSIS1503263	RR213206	livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli	17536	17536	

図4 Enterobase内の*E. coli*のデータベース  
出典:Enterobase, <https://enterobase.warwick.ac.uk/> (参照2021-02-05)



図5 MLST解析のための代表的なデータベース  
 (A)PubMLST, <https://pubmlst.org/>(参照2021-02-05)  
 (B)Enterobase, <https://enterobase.warwick.ac.uk/>(参照2021-02-05)  
 (C)PasteurMLST, <https://bigsd.b.pasteur.fr/>(参照2021-02-05)

## 06

## cgMLST解析の方法

実際にどのような手順で自身の分離株をcgMLST解析するのか解説する。まず始めに、分離した株よりDNAを抽出し、次世代シーケンサー(NGS)を用いてドラフトゲノムデータを取得する。用いるNGSのプラットフォームとしては、IlluminaやIon Torrentなどが挙げられる。しかし、NGSは依然として高価な機器であり、加えて試薬の手配や実験操作など、導入には障壁も大きい。近年では、NGSの受託サービスを行う会社も増えてきており、機器を持っていなくても簡単にドラフトゲノムデータを取得できるようになった。得られたドラフトゲノムデータについて、クオリティコントロール及びアセンブルなどのデータ処理を行い、その後は各菌の定義されたschemeに準拠しcore gene

にアレル番号を振っていく(図6)。この際、アレル番号を振るのに、MentaLiSTなどのLinuxベースのソフトウェア、あるいはBioNumericsやRidom SeqSphereなどのソフトウェアを用いると良い。各lociのアレル番号の差異を基に、樹形図を作成すると、遺伝的に近い株(全lociのうち、同じ塩基配列のlociが多いと遺伝的に近いと言える)が明らかとなる。

## 07

## cgMLST解析の食品工場における応用例

食品製造現場では製品が規格に適合しているか調べるため、出荷前に抜き取り検査を行っている。その検査において危害菌が検出された場合は、再度同じ汚染が起らないよう、汚染源を



図6 Enterobaseを用いたアレル番号の振り方  
 出典:Enterobase, <https://enterobase.warwick.ac.uk/>(参照2021-02-05)

特定し、衛生管理手法を見直すことが重要である。先日、我々は食品会社との共同研究の中で、最終製品の抜き取り検査において検出された危害菌(製品分離株)について、その汚染源を探るべくcgMLST解析を応用した。本解析では、工場内の製造ラインを中心とした複数箇所より製品へと混入した危害菌と同じ菌種を数百株分離し、その中からある程度絞り込んだ菌株について、全ゲノムの配列情報を取得、上述の方法に従って、これら菌株と製品分離株のcore geneのアレルパターンを比較した(図7)。この解析によって、製品分離株は工場の特定の箇所より分離された株と全く同じアレルパターンを有する。すなわち、クローンである可能性が高いことが明らかとなり、製品が汚染されたと考えられる場所の特定につながる有力な情報を得ることができた。このように、工場の各所より分離された菌株と製品分離株をクローンレベルで解析することで、どこでどのように汚染が起きたのか、その汚染実態を把握することができる。

cgMLST解析を行う際に得られたドラフトゲノムデータは、汚染源の特定だけでなく、その後の衛生管理手法の確立にも大いに貢献できることについても言及したい。食品製造現場において、製品への汚染を繰り返すような危害菌は、一般的に他の菌株よりも環境ストレスに対して強いという傾向を有していることも多い。このような個々の菌株の性状はドラフトゲノムデータを取得し、菌株間で比較することで、その性状を持つ理由をゲノム情報の中に見出すことができる。また、特有の耐性遺伝子や遺伝子変異など極めて重要な因子を特定できる可能性もある。さらに、先に述べた通り、食中毒菌のように病原因子など特異的な分子マーカーを持たないものの、製品への腐敗を引き起こすような食品産業においては重要な菌群についても、ドラフトゲノムデータと近縁種のゲノムデータ比較により、その菌をモニタリングするための分子マーカーを開発することも可能である。このように、NGSを食品製造現場の衛生管理に導入することで、①cgMLST解析を用いた汚染源追跡、及び、②その後の衛生管理手法の確立といった今までの技術では難しかったようなことまでごく短時間に実施、解決が可能になると考えられる。

08 おわりに

本稿では、遺伝子解析手法を用いた細菌のモニタリング法、また、DNA タイピングによる汚染源追跡法の変遷と最新の解析法cgMLST法を紹介した。DNAタイピング法はここ10年ほどの間に劇的に進化し、従来の電気泳動により可視化したフラグメント解析から次世代シーケンサーにより取得した全ゲノムの配列を利用した高い識別能をもつ解析へと大きく変わった。次世代シーケンサーから出力される膨大なデータは、バイオインフォマティクスなどを専門としている研究者でないと取り扱いが難しかったが、それもタイピング程度であれば、深い知識を有していなくても特段支障なく行えるようになってきている。今後の技術の進歩により、また新たな解析法、アプローチが生まれてくることが大変楽しみであるが、食品製造の現場では、問題を引き起こす菌種も多様であり、解決したい問題も違ってくるため、それぞれの現場に最も適した解析手法を選択、実施していく必要があるだろう。

製品が消費者の手に渡る前に微生物による危害を察知できれば、食中毒を引き起こすことにもなりかねない。製品の微生物的危害を防止するためには、高感度で迅速な検査法を整備し、危害菌の動態を把握し、万一危害菌が混入した際には迅速に原因究明できるツールを用意しておくことが望まれる。

参考文献

- 1) PulseNet International, <https://pulsenetinternational.org/protocols/pfge/> (参照 2021-02-05)
- 2) Techaruvichit P, Takahashi H, Vesaratchavest M, Keeratipibul S, Kuda T, Kimura B. *Applied and Environmental Microbiology* 81:5318-5325(2015)
- 3) Takahashi H, Ohshima C, Nakagawa M, Thanatsang K, Phraephaisarn C, Chaturongkasumrit Y, et al. *PLoS ONE* 9(9): e105803. (2014)
- 4) Miya S, Kimura B, Sato M, Takahashi H, Ishikawa T, Suda T, Wiedmann M. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (3), 239-249(2008)
- 5) PubMLST, <https://pubmlst.org/organisms> (参照 2021-02-05)
- 6) Alikhan NF, Zhou Z, Sergeant MJ, Achtman M. *PLoS Genetics* 14(4): e1007261. (2018)
- 7) Zhou Z, Alikhan NF, Mohamed K, Fan Y; Agama Study Group, Achtman M. *Genome Research*. 30(1):138-152. (2020)

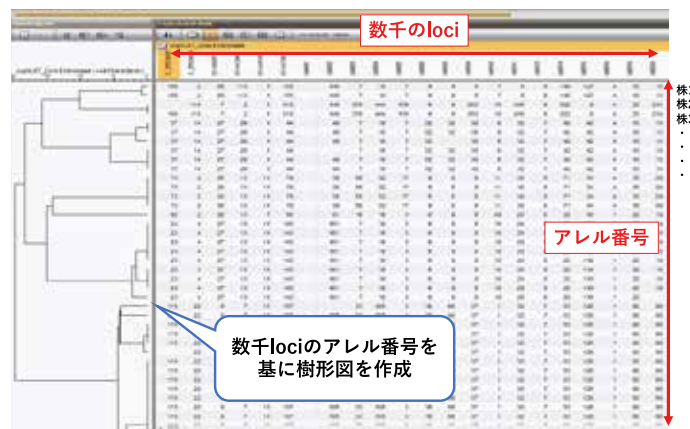


図7 Bionumericsを用いたcgMLSTデータの解析例