

■ESBL44検体(80.0%) ■AmpC2検体(3.6%) ■非検出9検体

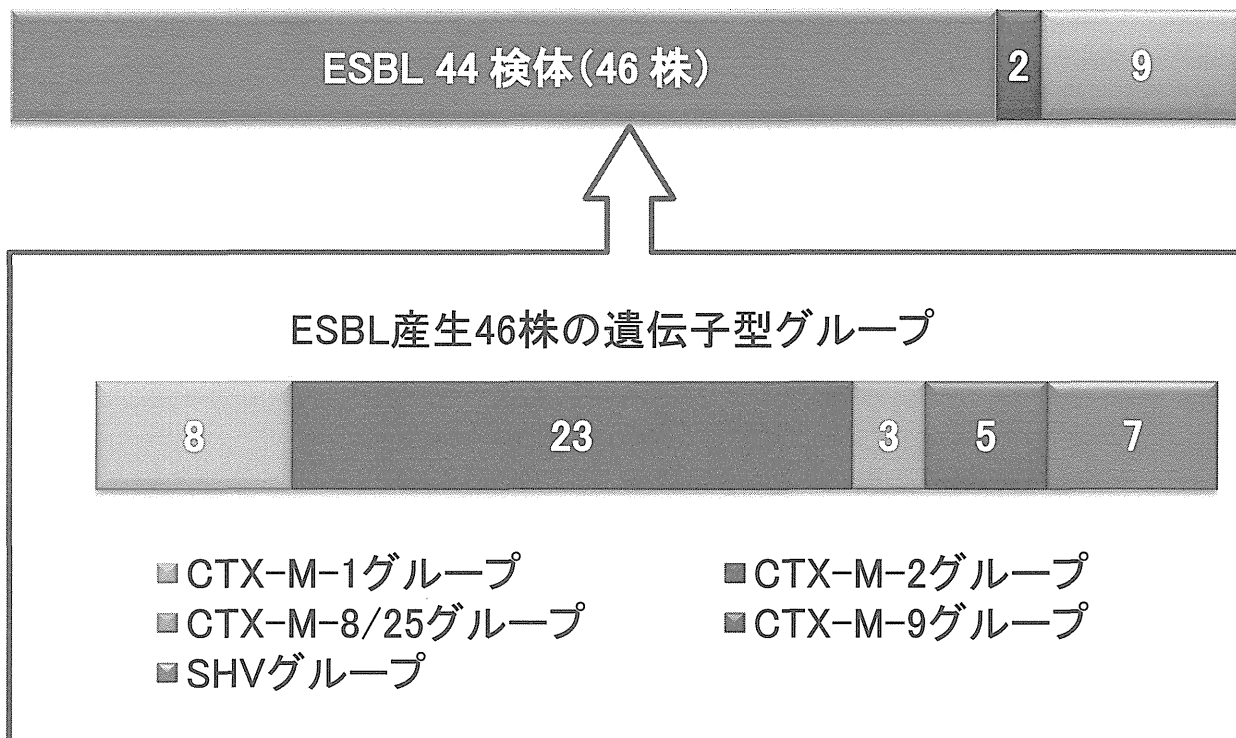


図1 鶏肉からの ESBL および AmpC 産生大腸菌検出

表 1 鶏肉からの ESBL/AmpC 産生大腸菌

	型	菌株数	血清型(菌株数)
ESBL	CTX-M-1	3	O111:H4(2),O8:H19(1)
	CTX-M-14	5	O166:HUT(2),OUT(3)
	CTX-M-15	2	OUT(2)
	CTX-M-2	23	O166:H45(1),O15:H10(3),O111:HNM(4), O166:HUT(1),O157:HNM(1),OUT(13)
	CTX-M-25	3	O166:HUT(1),OT(2)
	CTX-M-55	3	OUT(3)
	SHV-12	7	O114:HNM(2),O18:H7(1),OUT(3)
AmpC	CMY-2	2	OUT(2)

表 2 国産鶏肉から分離されたサルモネラ

血清型	菌株数	ESBLs	AmpC
<i>S. Infantis</i>	21	1 (CTX-M-14)	8 (CMY-2)
<i>S. Schwarzengrund</i>	7		
<i>S. Manhattan</i>	6	1 (SHV-12)	
<i>S. Enteritidis</i>	1		
<i>S. Agona</i>	1		
<i>S.</i> (1) O8:HNM	1	1 (SHV-12)	
<i>S.</i> (1) OUT:r:1,5	1		
合計	38	3 (2検体)	8

分担研究報告書

分担課題名：伴侶動物病院から分離された薬剤耐性菌のヒトへの影響

研究分担者 田村 豊（酪農学園大学 獣医学群食品衛生学ユニット）

研究協力者 白井 優（酪農学園大学 獣医学群食品衛生学ユニット）

研究要旨

プラスミド性キノロン耐性遺伝子の動物および人の間での伝播について問題になっている。そこで今回、伴侶動物および人由来フルオロキノロン耐性大腸菌におけるプラスミド性キノロン耐性遺伝子 *aac(6′)-Ib-cr* の保有状況を調べた。結果、犬由来株では31株中1株(3.2%)、人由来株では118株中1株(0.8%)から検出された。この2株について性状が一致しており、遺伝学的にも近縁であった。このプラスミドを大腸菌 DH5 α に導入したところ一部のフルオロキノロン剤の感受性に影響を与えた。これらのことから、*aac(6′)-Ib-cr* は人と犬の間で広がっていることが示唆された。また、院内感染の原因菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA) 複数の動物病院の獣医師および動物看護師を対象に保菌調査を実施したところ、獣医師 12.0% (6/50) が保菌していた。以上のことから、薬剤耐性遺伝子や薬剤耐性菌は人と犬の間で伝播することが示唆され、今後も注視が必要であると考えられた。

A. 研究目的

近年、獣医学技術の進展や動物福祉への関心の高まりを背景として、伴侶動物獣医療における人体用医薬品の使用が一般化している。抗菌化学療法も例外ではなく、人体用抗菌剤は伴侶動物に対して高頻度で使用されており、その使用に伴い伴侶動物においても薬剤耐性菌が出現している。伴侶動物は人と共通の場で生活し人との接触頻度が極めて高いため、伴侶動物において出現した薬剤耐性菌が人へ伝播する危険性がある。

伴侶動物に高頻度で使用される抗菌剤の一つに、人医療で特に重要とされるフルオロキノロン剤があり、フルオロキノロン耐性菌の増加は医療および獣医療で問題となっている。

フルオロキノロン耐性機構は、キノロン耐性決定領域(QRDR)の変異によるものが広く知られているが、プラスミド介在性キノロン耐性遺伝子(PMQR)による機構も存在する。PMQRは同菌種および異菌種間で水平伝播する危険性があり、その保有についての実態解明が必要とされている。PMQRの一つである *aac(6′)-Ib-cr* は、アミノグリコシド耐性に関与する *aac(6′)-Ib* のアミノ酸が変異することで一部のフルオロキノロン剤(シプロフロキサシンやノルフロキサシン)に対する耐性を付与することが近年明らかになった遺伝子であり、伴侶動物における保有実態は明らかでない。そこで今回、犬および人由来フルオロキノロン耐性大腸菌における

aac(6')-Ib-cr の検索とプラスミドの解析を行った。

また、院内感染の主な原因菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) について、伴侶動物の保菌率は低いものの、伴侶動物の診察に携わる獣医師の高い MRSA 保菌率がいくつかの動物病院で報告されている。そこで今回、さらなる実態解明のために全国の複数の大学附属動物病院の獣医師および動物看護師を対象に MRSA の保菌調査を実施した。

B. 研究方法

1. *aac(6')-Ib-cr* の検索

酪農学園大学附属動物病院および市中動物病院に来院した犬から分離したフルオロキノロン耐性大腸菌 31 株と札幌臨床検査センターおよび北海道大学附属病院の外來または入院患者の臨床検体から分離された人由来フルオロキノロン耐性大腸菌 118 株を供試した。

aac(6')-Ib-cr の保有について、PCR で検索を行い、陽性を示した株について性状 (血清型、系統分類、MLST、QRDR の変異箇所) および遺伝学的近縁性 (PFGE) を比較した。また、プラスミドプロファイル、サザンブロッティングを行った。さらに、*aac(6')-Ib-cr* 保有プラスミドを大腸菌 DH5 α に導入にすることによるフルオロキノロン系薬剤 (エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、ノルフロキサシン、シタフロキサシン) およびアミノグリコシド系薬剤 (カナマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、ゲンタマイシン) の感受性の変化を最小発育阻止濃度 (MIC) を測定することで調べた。その際のプラスミド導入

は、エレクトロポレーションにより行った。

2. MRSA の保菌調査

酪農学園大学、東京農工大学および岐阜大学附属動物病院に勤務する獣医師 50 名、動物看護師 15 名の鼻腔スワブから MRSA を分離した。

C. 研究結果

1. *aac(6')-Ib-cr* の検索

aac(6')-Ib-cr 遺伝子は犬由来株では 31 株中 1 株 (3.2%)、人由来株では 118 株中 1 株 (0.8%) から検出された。この 2 株について性状解析を行ったところ、血清型 01、系統分類 D、ST 型 648 と同一の性状を示した (表 1)。また、QRDR の変異箇所について、GryA (S83L, D87N), GyrB (wild type), ParC (S80I) および ParE (S458A) の同一箇所に変異が認められた (表 1)。PFGE の結果、*aac(6')-Ib-cr* 保有 2 株の相同率は 86.7% (*BlnI*) および 70.6% (*XbaI*) であった (図 1)。プラスミドプロファイルおよびサザンブロッティングの結果、人由来 *aac(6')-Ib-cr* 保有プラスミドは約 165kb、犬由来プラスミドは約 120kb であった (図 2)。大腸菌 DH5 α への、プラスミド導入の結果、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、カナマイシン、ジヒドロストレプトマイシンの MIC が上昇した (表 2)。その他の薬剤の感受性は変化しなかった (表 2)。

2. MRSA の保菌調査

MRSA は獣医師 50 名中 6 名 (12.0%) か

ら分離された。内訳は、酪農学園大学付属動物病院 5.6% (1/18)、東京農工大学付属動物病院 17.6% (3/17)、岐阜大学付属動物病院 13.3% (2/15) だった。動物看護師からは分離されなかった。

D. 考察

1. *aac(6')-Ib-cr* の検索

aac(6')-Ib-cr 保有 2 株について、性状が一致し、PFGE でも相同な株であったことから、今回見つかった人および犬由来株は近縁であるということが示唆された。プラスミドの導入により、一部のフルオロキノロン剤およびアミノグリコシド系抗菌剤に対する感受性の変化を起こした。今回、薬剤の感受性が変化したフルオロキノロン剤はピペラジニル基にアミンを持つ。*aac(6')-Ib-cr* はフルオロキノロン剤のうちピペラジニル基にアミンを持つ薬剤をアセチル化することが知られている。以上のことから、分離株の保有プラスミドは一部のアミノグリコシド系薬剤およびフルオロキノロン剤の薬剤感受性に影響を与えていることが示された。今回の 2 株は、プラスミドの長さが異なったことから同一ではないが、人と犬の間で *aac(6')-Ib-cr* が伝播拡散している可能性がある。今後も、*aac(6')-Ib-cr* 遺伝子を含む PMQR のヒトと犬の間での伝播については注意が必要である。

2. MRSA の保菌調査

日本の伴侶動物に携わる獣医師の MRSA 保菌率は一般健康人および医療関係者に比べて高く、さらに海外の獣医師の保菌率(オーストラリア, 4.9%; デンマーク, 3%)に比べて、高い保菌率(12.0%)を示した。以上のことから、日本の伴侶動物獣医療に携わる獣医師のさら

なる衛生管理に対する取り組み等が必要であると考えられた。

E. 結論

aac(6')-Ib-cr 遺伝子は人および犬由来大腸菌の間で広がっている可能性がある。また、日本の動物病院で勤務する獣医師の 12.0% で MRSA の保菌が認められた。以上のことから、薬剤耐性遺伝子や薬剤耐性菌は人と犬の間で伝播することが示唆され、今後も注視が必要であると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

<口頭発表>

1. 臼井 優、岩佐 友寛、佐藤 豊孝、大久保 寅彦、田村 豊：薬剤耐性大腸菌の畜舎内伝播におけるハエの役割、第 79 回日本細菌学会北海道支部総会、2012 年 8 月 29 日、北海道
2. 佐藤豊孝、横田伸一、大久保寅彦、臼井優、藤井暢弘、田村 豊：犬由来大腸菌におけるフルオロキノロン耐性およびセファロスポリン耐性の関連、第 79 回日本細菌学会北海道支部総会、2012 年 8 月 29 日、北海道
3. 大久保寅彦、佐藤豊孝、中村昇太、飯田哲也、臼井優、能田淳、萩原克郎、田村豊：南極の氷中に含まれていた細菌叢の解析、第 79 回日本細菌学会北海道支部総会、2012 年 8 月 29 日、北海道
4. 臼井 優、岩佐 友寛、佐藤 豊孝、大久保 寅彦、田村 豊：薬剤耐性大腸菌の畜舎内伝播におけるハエの役割、第 154

- 回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手
5. 佐藤豊孝、横田伸一、大久保寅彦、臼井優、藤井暢弘、田村 豊：犬由来大腸菌におけるフルオロキノロン耐性およびセファロスポリン耐性の関連、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手
6. 小川 紋 佐藤豊孝 大久保寅彦 臼井優 田村 豊：市販鶏肉由来薬剤耐性サルモネラ属菌における耐性遺伝子の解析、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手
7. 吉沢創太、大久保寅彦、佐藤豊孝、臼井優、田中和之、石塚真由美、田村 豊：イエネズミ糞便由来大腸菌の薬剤耐性調査、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手
8. 一色 ゆかり、石原 加奈子、臼井優、田村 豊：レバー由来及び糞便由来カンピロバクターの薬剤耐性と遺伝子型の解析 第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手
9. 小泉明穂、石原加奈子、臼井優、菊池直哉、田村 豊：犬由来メチシリン耐性 *Staphylococcus pseudintermedius* の分子疫学解析、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手
10. 比企 基高、浅井鉄夫、川西路子、臼井優：健康ブロイラー由来大腸菌における系統群別病原遺伝子の保有状況及び薬剤感受性 第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手
11. 浅井 鉄夫、馬場 光太郎、比企 基高、臼井優、石原 加奈子、田村 豊：国内の豚から分離された黄色ブドウ球菌の分子疫学的解析、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手
- <紙上発表>
1. Baba K, Ishihara K, Ozawa M, Usui M, Hiki M, Tamura Y, Asai T.: Prevalence and Mechanism of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from Diseased Cattle, Swine and Chickens in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 74(5), 561-565, 2012.
 2. Sasaki Y, Usui M, Murakami M, Haruna M, Kojima A, Asai T, Yamada Y.: Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 isolates from beef cattle. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65(2), 117-121, 2012.
 3. Usui M, Hiki M, Murakami K, Ozawa M, Nagai H, Asai T.: Evaluation of transferability of R-plasmid in bacteriocin-producing donors to bacteriocin-resistant recipients. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65(3), 252-255, 2012.
 4. Asai T, Hiki M, Baba K, Usui M, Ishihara K, Tamura Y.: Presence of *Staphylococcus aureus* ST398 and ST9 in swine in Japan *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65(6), 551-552, 2012.
 5. Yokota S, Sato T, Okubo T, Ohkoshi Y, Okabayashi T, Kuwahara O, Tamura Y, Fujii N.: Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strains isolated in Japan. *Chemotherapy*, 58(1), 52-59, 2012.
 6. Kurosawa A, Imamura T, Tanaka K,

- Tamamura Y, Uchida I, Kobayashi A, Hata E, Kanno T, Akiba M, Yukawa S, Tamura Y.: Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i:- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis. Vet. Microbiol. 160(1-2), 264-268, 2012.
7. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Ishihara K, Ueno H, Muramatsu Y, Fujii N, Tamura Y. : Contribution of the AcrAB-TolC Efflux Pump to High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Dogs and Humans. J. Vet. Med. Sci. in press
8. Sato T, Yokota S, Okubo T, Usui M, Fujii N, and Tamura T. : Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-01-ST648 *Escherichia coli* carrying bla_{CMY-2} from fecal samples of dogs in Japan. J Med Microbiol., in press
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 *aac(6')-Ib-cr* 保有株の性状比較

株名	由来	血清型	系統分類	ST	QRDR の変異			
					<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
CE13	イヌ	01	D	648	Ser83Leu Asp87Asn	Wild-Type	Ser80Ile	Ser458Ala
SRE91	ヒト	01	D	648	Ser83Leu Asp87Asn	Wild-Type	Ser80Ile	Ser458Ala

表 2 *aac(6')-Ib-cr* 保有株およびそのトランスフォーマントの MIC

株	MIC (μg/ml)							
	ERFX	CPFX	LVFX	NRFX	STFX	KM	DSM	GM
CE13	>128	>128	16	>128	2	64	128	2
SRE91	>128	>128	16	>128	2	64	16	2
大腸菌 DH5α	0.03	0.01	0.03	0.125	0.006	0.5	0.5	0.25
CE13Tf*	0.03	0.06	0.03	0.5	0.006	4	2	0.25
SRE91Tf*	0.03	0.06	0.03	0.5	0.006	4	2	0.25

*大腸菌 DH5α に CE13 および CE91 のプラスミドを導入した株。

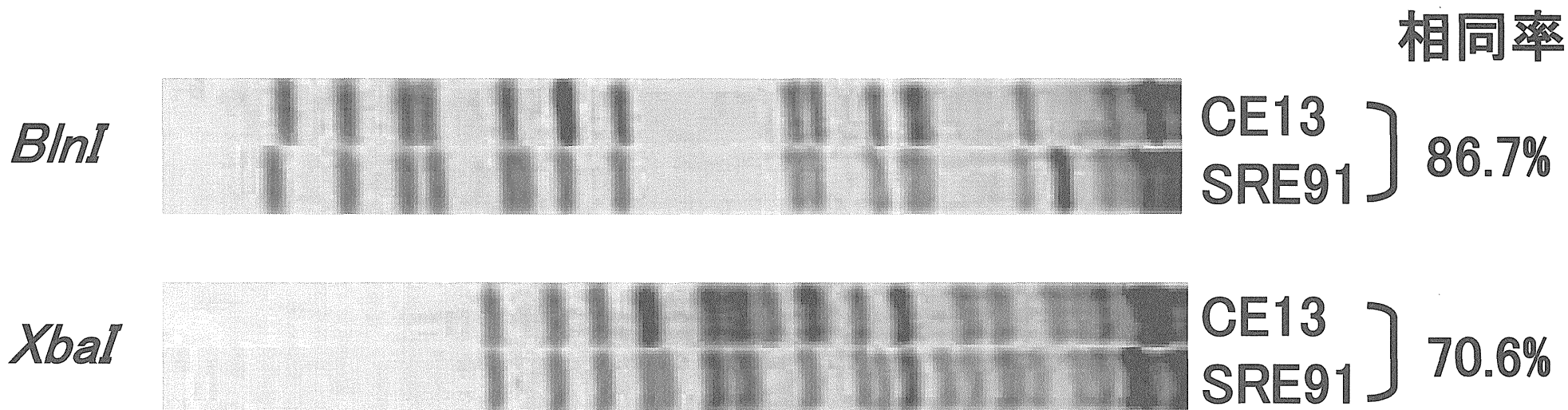
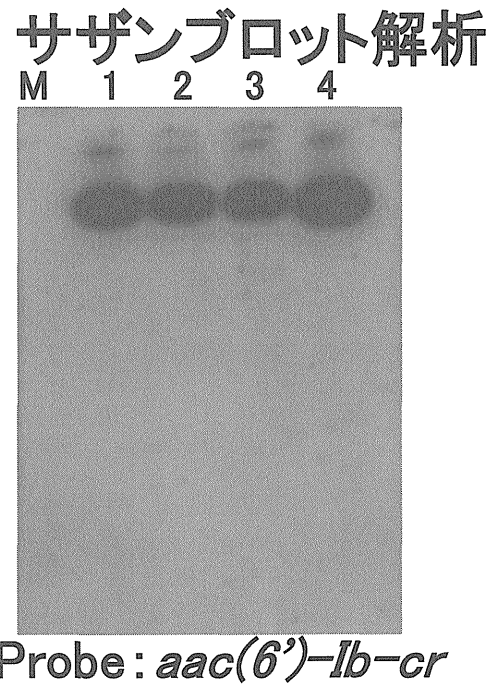
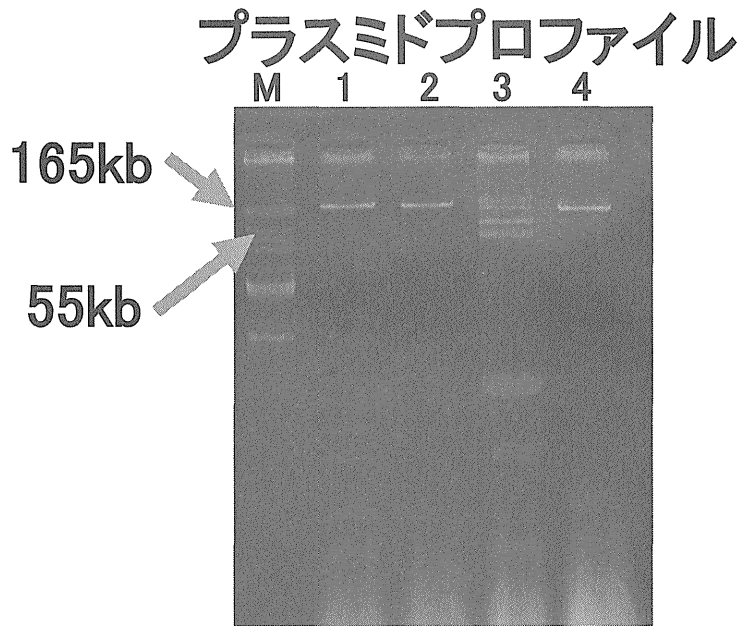


図1. *aac(6')-Ib-cr*保有株のPFGE像



Lane 1. SRE 91
 2. SRE 91 Tf
 3. CE 13
 4. CE 13 Tf
 ※Tf: トランスフォーマント

M. BAC-Tracker Supercoiled
 DNA Ladder

図2. *aac(6')-Ib-cr*保有株およびトランスフォーマントのプラスミド解析

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）
「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」
平成 24 年度分担研究報告書

分担課題名：薬剤耐性化食中毒菌のヒトおよび家畜由来株のゲノム比較解析

分担研究者	黒田 誠	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター	第三室
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター	第三室
研究協力者	竹内史比古	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター	第三室

研究要旨

薬剤耐性食中毒菌の多くが多様なプラスミド伝達により薬剤耐性を獲得していることが明らかとなっている。食品と患者分離株との因果関係について、分離株のゲノム情報を活用した研究が行われるようになってきたが、耐性伝播の根本はプラスミド伝達が主体であり、異なる宿主菌でも同様の薬剤耐性プラスミドを有していることが報告されている。つまり、受け渡しを行う宿主菌のゲノム情報よりも、プラスミド単位での分子疫学のほうが頻繁な耐性授受の過程を追跡するのに好都合と考えられる。本分担研究では、家畜・食肉・ヒト臨床から分離された薬剤耐性菌プラスミドの包括的なデータベースを構築し、菌種間を伝播する薬剤耐性因子の追跡を可能にする解析パイプラインの構築を目的とする。本年度は、現在登録されているプラスミド配列のうち、薬剤耐性因子の有無に関係なく全てのプラスミドを抽出し、各配列の特徴（Inc タイプ、薬剤耐性因子、Insertion sequence、Transposon 等）をリスト化した。また、“解読リードからシームレスにプラスミド解析”が可能な解析パイプラインを構築することを目標にし、誰もが使えうる汎用性のある環境整備をはじめた。本年度は Plasmid database と同源性検索システム PLAST の構築をおこなった。まだまだ開発途中であり公開できる状況ではないが、一連の解析パイプラインで未構築の箇所を早急に開発してパイプライン化したい。最終目標として、Plasmid 配列全体を用いた分子系統解析から菌種・株間の水平伝達を容易に推定し、俯瞰的に全体像を眺めることができるシステムへと発展させたい。

A. 研究目的	ゲノム配列レベルおよびプラスミド・レベル
ヒト、家畜、食品から分離される薬剤耐性	ルでより具体的な耐性化機序と株伝播プロ
食中毒菌のサーベイランス結果を基盤にし、	セスを解析する。そのためには、また、現

在登録されているプラスミド配列のうち、薬剤耐性因子の有無に関係なく全てのプラスミドを抽出し、各配列の特徴(Inc タイプ、薬剤耐性因子、Insertion sequence、Transposon 等)をリスト化する。プラスミド保有菌種の情報(菌種、分離年・国・地域・宿主、各種タイピング結果等)を網羅しデータベース化することで、より具体的な伝播過程が見えてくるものと期待している。

B. 研究方法

菌体からプラスミドに相当する DNA を抽出することが先決である。そのためには、Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)用の菌体プラグからプラスミド DNA のみ泳動分離して回収・精製した。PFGE プラグの調整法は菌種に沿ったプロトコールを利用する。プラスミド・サイズに従った泳動距離が得るために、環状 DNA であるプラスミドを S1-nuclease でニックをいれ線状化の前処理を行った。S1-nuclease 処理菌体プラグによる PFGE を S1-PFGE と呼ぶ(図 1)。プラスミドに相当するアガロースバンドを切り出し、DNA を精製した。

精製 DNA を用いて Illumina NEXTERA XT kit にてライブラリー作成した。MiSeq シークエンサーにて解読後、プラスミド解析にかかる一連の情報解析を行った(図 1)。詳細は C. 結果の項目に記述した。

C. 結果

プラスミド配列の解読手法の構築

図 1 にプラスミド DNA の回収から情報解析までの一連の流れを示した。MiSeq シークエンサ

ーにて解読後、CLC genome workbench (有償ソフト)による解読リードの de novo assembly。今後の予定として、無償ソフト(velvet 等)に変更して利用しやすくする予定。

アセンブル後の contig 配列から GeneMarkS にて遺伝子予測(図 3)を行う。GeneMarkS は、自己学習プログラムにより遺伝子候補を抽出するため、多様な生物種のプラスミドの遺伝子抽出に対応している。

GeneMarkS にて抽出したプラスミド遺伝子を Query にしてプラスミド・データベースに対し相同性検索を行う(Plasmid Search Tool: PLAST)。代表的なレファレンス配列のみ収納している NCBI Ref_seq データベースからプラスミドに該当する配列のみ抽出し、662 菌株、1587 プラスミド、114178 蛋白質を含む PLAST 用のカスタム・データベースを構築した(図 4)。PALST は tblastn, blastp の相同性検索項目が利用できる。

抽出遺伝子ごとに PLAST 検索結果が閲覧可能である(図 5)。公開済みの全配列データベース NCBI nt/nr とは異なり、プラスミド配列のデータベースのみに限定されているため、NCBI-nt/nr 等の包括データベースへの検索チェックを要する。各抽出遺伝子リストのトップ(gene_1|GeneMark.hmm1337_aal)の show detail をクリックすると、blastp 相同性検索にて検出された遺伝子リストが表示される(図 6)。また、リストトップの gene_1|GeneMark.hmm1337_aal 遺伝子と類似性のあるターゲットの配列情報(NCBI BioProject へのリンク)やアライメント結果が閲覧できる。

D. E. 考察・結論

薬剤耐性食中毒菌の多くは薬剤耐性プラスミ

ドによる耐性獲得であり、プラスミド単位で菌種・株間の伝播を追跡できるのであれば、より正確な耐性伝播の様式を明確にできるものと考えている。そのためには、プラスミド配列を利用した詳細な系統分類法の構築が必要である。配列解読から情報解析までの必要な手法がパイプライン化されておらず、配列解読後の解析に時間と負担を要していた。本分担研究において、“解読リードからシームレスにプラスミド解析”が可能な解析パイプラインを構築することを目標にし、誰しもの使用できる汎用性のある環境整備をはじめた。

本年度は Plasmid database と相同性検索システム PLAST の構築をおこなった。まだまだ開発途中であり、満足できるものを提供できる状況ではないが、一連の解析パイプラインで未構築の箇所

- 解読リードの quality trimming
- De novo assembly (velvet)
- ORF extraction (GeneMarkS)
- ResFinder (薬剤耐性マーカー) へのダイレクトリンク
- 対象 ORF の ortholog 解析・系統樹作成等

- Contig 配列の ORF viewer

について、開発を進めたい。このパイプラインの最終目標として、Plasmid 配列全体を用いた分子系統解析から、菌種・株間の水平伝達を容易に推定し(図8)、俯瞰的に全体像が眺められるようなシステムへと発展させる予定である。

F. 健康危害情報

なし

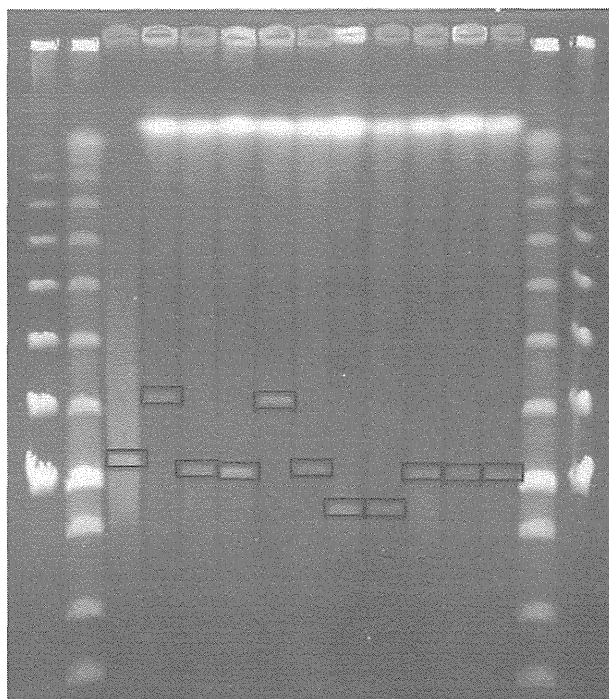
G. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

なし



1. S1-PFGE
2. ゲル回収
3. NEXTERA XT kit
4. MiSeq 解読



5. De novo assembly
6. ORF抽出
7. Plasmid Search Tool (PLAST)
によるプラスミド解析

図1 プラスミド DNA の PFGE 分離から配列解読そして情報解析までの流れ。S1-PFGE 泳動図に泳動分離されたプラスミド断片 (青枠□) を示す。

CLCgenome workbench (有償ソフト)による denovo assembly

Name	Consensus length	Total read count	Average coverage
mdr104_S20_L001...	35412	8375	39.47
mdr104_S20_L001...	17310	4608	46.96
mdr104_S20_L001...	10635	2634	41.07
mdr104_S20_L001...	9175	2153	39.59
mdr104_S20_L001...	1995	454	38.37
mdr104_S20_L001...	1748	188	17.03
mdr104_S20_L001...	758	152	32.60

無償 Open source の assembler でも解析可能にする予定

図2 CLC genome workbench (有償ソフト) による解読配列の de novo assembly. 今後の予定として、無償ソフトに変更して利用しやすくする予定。

Gene Prediction in Viruses, Phages and Plasmids

For novel virus, phage and plasmid gene prediction you can use either the Heuristic approach (if the sequence is shorter than 50 kb) or the self-training program GeneMarkS (aka GeneMark.hmm-PS). Both options will run the parallel combination of GeneMark and GeneMark.hmm.

<http://exon.gatech.edu/genemarks.cgi>

GeneMarkS

John Besemer, Alexandre Lomsadze and Mark Borodovsky
 GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions.
 Nucleic Acids Research (2001) 29: 2607-2618

This webpage provides accesses to version 4.7(e) of gene prediction program GeneMarkS. This version combines the original 2001 prokaryotic GeneMarkS with later development which extended the unsupervised gene prediction to intron-less eukaryotes, eukaryotic viruses, phages and EST/cDNA sequences.

[Browse GeneMarkS manual](#)
 Input sequence

Enter sequence (FASTA or multi FASTA format)

Or, upload file:

Action:

Sequence type	Output format for gene prediction	Output options	Optimal obtaining output by E-mail
<input checked="" type="radio"/> Prokaryotic <input type="radio"/> Intronless eukaryotic <input type="radio"/> Virus <input type="radio"/> Phage <input type="radio"/> EST/cDNA	<input checked="" type="radio"/> LST <input type="radio"/> GFF	<input type="checkbox"/> Protein sequence <input type="checkbox"/> Gene nucleotide sequence <input type="checkbox"/> Coding potential graph (not for multi FASTA) <input type="checkbox"/> PDF <input type="checkbox"/> PostScript	E-mail: <input type="text"/> Subject: <input type="text"/> GeneMarkS <input type="checkbox"/> Compress files

Advanced options

- De novo assembly で得られた contigs からORF抽出を行う。
(GeneMarkS はself-training program によるORF抽出)
- Output options に抽出ORFsの塩基配列、アミノ酸配列をmultifasta で排出してくれる。
- それらアミノ酸配列を用いて PLAST解析を行う。

```
>gene_1|GeneMark.hmm|337_aa|-|204|1217 >mdr107_S21_L001_R1_001_21_
(paired)_contig_2 Average coverage: 161.30
MKTATAPLPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSLPTEQAYVHWVRAFRFHGVRHPATLGSSE
VEAFLSWLANERKVSVSTHRQALALLFFYGVKVLCTDLPWLQEIQRPRPSRRLPVVLTDP
EVVRLGFLEGEHRLFAQLLYGTGMRISEGLQLRVKDLDFDHGTIIVREGKSKDRALML
PESLAPSLREQLSRARAWWLKDDQAEGRSGVALPDALERKYPRAGHSWPWFVWFAQHTHST
DPRSGVRRHHMYDQTFQRAFKRAVEQAGITKPATPHTLRHSFATALLRSGYDIRTVQDL
LGHSDVSTTMIIYTHVLKVGAGVRSPLDALPPLTSE
```

図3 de novo assembly で得られた contig 配列から GeneMarkS による遺伝子抽出。
 GeneMarkS は、自己学習プログラムにより遺伝子候補を抽出するため、多様な生物種のプ
 ラスミドの遺伝子抽出に対応している。

Plasmid Search Tool (PLAST) 解析の概要

Ref_seqからデータベース構築

Number of Hits

strain: 662 hits
 plasmid: 1587 hits
 protein: 114178 hits

[show result \(plasmid\)](#)

[show result \(plasmid and protein\)](#)

Plasmid Search Tool (PLAST)

BLAST search [\[Go to keyword search\]](#)

Plasmid genome database (tblastn)
 Protein database (blastp)
 E-value cutoff | 10.0

```

>gene_1[GeneMark.hmm|337_aa|-|204|1217
>mdr107_821_L001_R1_001_21 (paired) contig_2 Average coverage: 161.30
MKTATAPLPELRSVKVLDQLRERIRVLYSLPTEQAYVHWVRAFIRFQGVHHPATLGSSE
VEAPLGLWLANERKQVSVSTRQALALLFFYQKVLCTDLFWLOSIGRDRPSRRLPVVLTDP
EVVRLIGFLSGEHRLLPAQLLYGTGMRISBGLQLRVKDLDPDHTIIVPBGKSGDRALML
PESLAPSLREQLSRARAWWLKQOAGBGRSGVALPDALERKYFRAGHSWPFVWFAQPHST
DPRSGVVRBHHYDQTFQMAFKRAVEQNGTFRFAPHLANSFATALLESQYDRTVODL
LQSDMSFTHTTSLVKVGGQAVSSELDALPPLTSEA
>gene_2[GeneMark.hmm|190_aa|*|1216|1788
>mdr107_821_L001_R1_001_21 (paired) contig_2 Average coverage: 161.30
MAGYDQPFVOSNPRASKOQARYAVGRCLMLHSSNDVFPQGSRETKLDALLCAQISASNK
EVFFLKSNIPLRGTFRWNILKNMLFATALLFEVYATSAKSSSEGFRLVPSFTVWAGY
AALFYLSLTKLSPVCIAYAVWSCLGLVLTATAVWLHCQKLDHWGPFVQGFIIQGVAV
LNLLSKASVH
>gene_3[GeneMark.hmm|246_aa|+|1907|2647
MSKLSVFFIPLFCSIATAAESLPDLKIEKLDGUVVHTSPPEVNGWGVVPHGLVVLVNA
EAYLIDTFFFAKDFEKLVTWVFRGVKIKGSLSSHPHSDS7GGI2HWNRSIPTYASELT
NELLKDKGKQVATNSFSGVNYLWKNKIEVYYPGPGHTPDWVVVNLPERKILFQGCFTKF
YGLGHLGDANIEMPKSAKLLKSKYGRKLVVPSHSEVGDASLLKLTLEQAVKGLMESKK
ESKPSN
>gene_4[GeneMark.hmm|185_aa|+|2708|3265
>mdr107_821_L001_R1_001_21 (paired) contig_2 Average coverage: 161.30
LWFASQSTFORATYKLPENLALAKGVKIKISLSAVSENGVIGSGPDIHPSVKGEQLLF
KALTYNCHLVGRKTPDSMGVLPNRKYAVUSKNGISSNEMVLFPSIENALKELSKVVD
    
```

Paste above or upload file

Enter amino acid sequence in (Multi)FASTA format.
 Maximum: 1,000 proteins, 10,000 amino acids per protein

[About](#)

図4 NCBIの代表的なレファレンス配列のみ収納しているRef_seqデータベースからプラスミドに該当する配列のみ抽出し、662菌株、1587プラスミド、114178蛋白質を含むPLAST用のカスタム・データベースを構築した。GeneMarkSにて抽出したプラスミド遺伝子をQueryにしてプラスミド・データベースに対し相同性検索を行う。

Blast Result Overview

Query		Minimum e-value	Detail
No	ID		
1	gene_1 GeneMark.hmm 337_aa	0.00e+0	show detail
2	gene_2 GeneMark.hmm 190_aa	1.90e-37	show detail
3	gene_3 GeneMark.hmm 246_aa	9.44e-122	show detail
4	gene_4 GeneMark.hmm 185_aa	5.51e-92	show detail
5	gene_5 GeneMark.hmm 262_aa	3.10e-150	show detail
6	gene_6 GeneMark.hmm 115_aa	6.28e-58	show detail
7	gene_7 GeneMark.hmm 279_aa	1.04e-157	show detail
8	gene_8 GeneMark.hmm 67_aa	1.39e-33	show detail
9	gene_9 GeneMark.hmm 401_aa	0.00e+0	show detail

図5 PLASTにて得られた結果の一部。抽出遺伝子ごとに検索結果が閲覧可能。公開済みの全配列データベースNCBI nt/nrとは異なり、プラスミド配列のデータベースのみに限定されている。

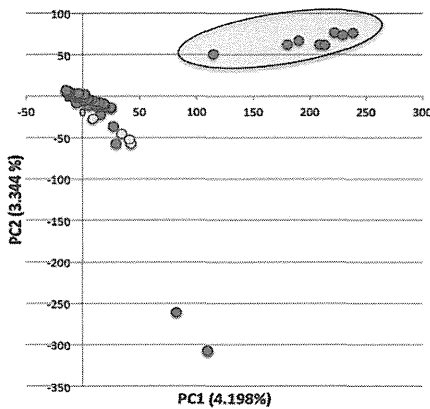
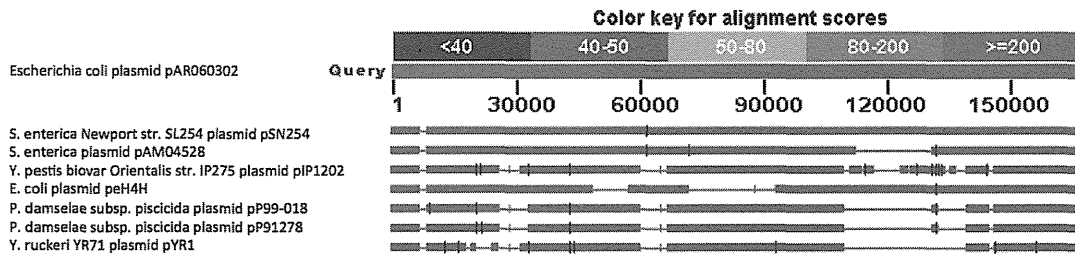
Blast Result										
STRAIN		PLASMID			PROTEIN					
TAXONOMY_ID	STRAIN_NAME	ACCESSION	DEFINITION	BIOPROJECT	PROTEIN_ID	PRODUCT	E_VALUE	QUERY COVERAGE	IDENTITY	ALIGNMENT
550	Enterobacter cloacae	NC_012556	Enterobacter cloacae plasmid pEC-IMPQ, complete sequence.	36673	YP_002791708.1	Intf1	0.00e+0	100.00%	95.85%	show alignment
		NC_012555	Enterobacter cloacae plasmid pEC-IMP, complete sequence.		YP_002791399.1	Intf1	0.00e+0	100.00%	95.85%	show alignment
562	Escherichia coli	NC_015589	Escherichia coli IncN plasmid N3, complete sequence.	16224	YP_004558216.1	integrase	0.00e+0	100.00%	95.85%	show alignment
		NC_013122	Escherichia coli plasmid pEK499, complete sequence.	40091	YP_003108349.1	integrase/recombinase	0.00e+0	100.00%	95.55%	show alignment
550	Enterobacter cloacae	NC_012556	Enterobacter cloacae plasmid pEC-IMPQ, complete sequence.	36673	YP_002791935.1	Intf1 integrase	0.00e+0	100.00%	95.55%	show alignment
					YP_002791719.1	Intf1	0.00e+0	100.00%	95.55%	show alignment
					YP_002791507.1	Intf1 integrase	0.00e+0	100.00%	95.55%	show alignment
573	Klebsiella pneumoniae	NC_011617	Klebsiella pneumoniae plasmid pK96, complete sequence.	33013	YP_002338260.1	integrase	0.00e+0	100.00%	95.55%	show alignment
					NC_011385	Klebsiella pneumoniae plasmid 12, complete sequence.	32301	YP_002286930.1	integrase/recombinase	0.00e+0
439843	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Schwarzengrund str. CVM19633	NC_011092	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Schwarzengrund str. CVM19633 plasmid pCVM19633_110, complete sequence.	58915	YP_002112947.1	integrase/recombinase	0.00e+0	100.00%	95.55%	show alignment
573	Klebsiella pneumoniae	NC_010888	Klebsiella pneumoniae plasmid pK245, complete sequence.	30261	YP_001968227.1	Intf1 integrase	0.00e+0	100.00%	95.55%	show alignment
841	Aeromonas hydrophila	NC_010919	Aeromonas hydrophila plasmid pRA3, complete sequence.	30305	YP_001968865.1	integrase	0.00e+0	100.00%	95.55%	show alignment

図6 図5リストのトップ (gene_1|GeneMark.hmm1337_aal) の show detail をクリックすると、blastp 相同性検索にて検出された遺伝子リストが表示される。

The screenshot displays two overlapping web pages. The background page is the NCBI BioProject page for 'Enterobacter cloacae', showing project details, sequence data (2 Nucleotide Genomic DNA, 622 Protein Sequences), and publications (1 PubMed, 1 PMC). The foreground page is a detailed view of a BLAST result for the top hit, YP_002791708.1. It shows a score of 650.973 bits (1678), an identity of 323/337 (95.85%), and a query coverage of 100.00%. The alignment position is shown as Query Length: 337, Query From: 1, Query To: 337, Hit From: 1, Hit To: 337. The sequence alignment is also visible, showing a perfect match between the query and the hit sequence.

図7 gene_1|GeneMark.hmm1337_aal 遺伝子と類似性のあるターゲットの配列情報 (NCBI BioProject へのリンク) やアライメント結果が閲覧できる。

Gammaproteobacteriaのplasmidの主成分分析



IncA/C plasmidがまとまる。
 BLASTNの結果でも、plasmid全体に渡ってhitしている。

このタイプのplasmidは、*Escherichia*, *Salmonella*, *Photobacterium*, *Yersinia*に存在し、配列全体に渡って高い相同性を有する。

図8 レファレンス配列として登録されている Gammaproteobacteria のプラスミド遺伝子の総当たり blast 検索を行い、該当する共通遺伝子の有無を基準にして主成分分析を行った。1例として、IncA/C レプリコンを有するプラスミドの特徴として分別することが可能であった。今後、自己組織化マップ等の高度な成分分析法を活用し、プラスミド固有の特徴を図示化することを試みる予定。

今後の改善点(予定)

- 解読リードからシームレスにプラスミド解析が行えるよう整備する。
 - 解読リードのquality trimming
 - De novo assembly (velvet)
 - ORF extraction (GeneMarkS)
 - ResFinder (薬剤耐性マーカー) へのダイレクトリンク
 - Plasmid Search Tool (PLAST)
 - ORF単位で blast検索
 - Contig 配列の ORF viewer
 - 対象ORFのortholog解析 ... 系統樹作成等
 - Plasmid配列全体を用いた系統解析...菌種・株間の水平伝達の推定

JANIS 事業との連携；ヒト由来菌の解析

研究分担者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所 細菌第二部）

研究要旨

この研究では厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS 事業)で収集されているデータベースを利用して、国内におけるリステリア感染症の罹患率の推定、及びサルモネラの薬剤耐性の実態について解析を行った。リステリアの解析には、2008~2011年に JANIS 検査部門参加医療機関から提出されたデータを用いた。4年間の罹患患者合計は307例、病床規模に応じた補正を行い算出された罹患率は1.06~1.57/100万人で、4年間の平均年間罹患率は1.40/100万人であった。罹患患者数の年齢分布は、65歳以上の高齢者が236人(77.6%)とその多くを占めていた。サルモネラに関しては、家畜や食肉から分離される株は第三世代セファロスポリン耐性が多いと報告されているが、人分離株で薬剤耐性で目立ったものとしてアンピシリンに対して耐性を示すものが約7%程度であった。フォスホマイシンに対する耐性は約1%から2%程度だった。セフトキシム、セフトチジム等の第三世代セファロスポリンに対する耐性株は1%未満だった。これらは経年的に耐性率は特段に変化していなかった。レボフロキサシンに耐性を示す株は、2010年までは1%未満だったが、2011年は2.0%だった。レボフロキサシン耐性は大腸菌などでは近年耐性率が増加しているため、サルモネラについても注意が必要であると考えられる。

研究協力者

鈴木 里和 （国立感染症研究所・細菌第二部）

山根 一和 （川崎医科大学・公衆衛生学）

A. 研究目的

リステリア症は免疫力の低下している患者や高齢者、新生児で髄膜炎、敗血症などの重症感染症となることが多く、食品を介した *Listeria monocytogenes* 感染が原因となる。リステリア症の疫学に関し、本邦では Okutani らがアンケート調査により1996年から2002年間の推定罹患率を0.65/100万人と報告しているが(Epidemiol Infect 2004;132:769-772)、近年の状況は明らかでない。厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)検査部門は、医療機関の細菌検査に関する全データを収集しており2)、参加医療機関における *L. monocytogenes* 分離患者数を把握することが可能である。本研究では JANIS 検査部門のデータを用い本邦の罹患率を推計した。

サルモネラについては、家畜や食肉で分離される菌株で第三世代セファロスポリンを始めとして様々な薬剤に対して耐性を示す菌株が多く分離されている。これは飼育の際に抗菌薬を投与されていることが関連していると考えられている。家畜で広まっている耐性菌が人社会に入ってくる可能性があるため、まず現在の人のサルモネラ感染症における薬剤耐性の実態を把握する必要がある。これについても、JANIS 検査部門のデータを用いて、国内の医療機関で分離されるサルモネラの薬剤耐性について実態を調査した。

B. 研究方法

リステリアの罹患率に関する解析には、2008~2011年に JANIS 検査部門参加医療機関から提出されたデータを用いた。本邦の全医療機関の病床数の算出には、厚生労働省医療施設調査の結果(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/79-1.html>)を用いた。罹患患者の定義は、血液または髄液から *L. monocytogenes* が分離された患者とし、各年で症例定義に合致する患者データを抽出し、分離された医療機関の病床規模別に、患者数を集計した。また本邦の200床以上の全医療機関を病床規模別に分類の上、それぞれの規模群別病床数の合計を算出した。次に JANIS 検査部門に参加し期間中に血液検体を提出した医療機関の病床数も算出し、本邦の全医療機関の病床規模群別病床数に占める割合を算出した。JANIS 検査部門参加医療機関の病床規模群別罹患患者数を算出した割合で除した値を、国内の各病床規模群別推定罹患患者数とし、その合計を本邦における推定罹患患者数とした。

サルモネラに関しては、2001年から2011年に JANIS 検査部門参加医療機関から提出されたデータを用いた。菌種は、医療機関の自動検査機器で一般的に同定される *Salmonella arizonae*、*Salmonella enteritidis*、*Salmonella paratyphi* A、*Salmonella typhi*、*Salmonella typhimurium*、に加え、*Salmonella* spp.として報告されるものを対象とした。抗菌薬は、OTC、NA、CEZ、KM、ABPC、STFX、CPFX、LVFX、MEPM、CTX、CTR、CPDX-PR、AZT、CAZ、CMZ、ABPC+MCIPC、ABPC+MDIPC、PIPC、IPM/CS、AMK、FOMのデータを収集した。

倫理面への配慮

JANIS 検査部門データは統計法 32 条に基づく申請を厚生労働省に行い、承認を受けた上で利用した。

C. 研究結果

リステリアに関しては、4 年間の罹患患者合計は 307 例、病床規模に応じた補正を行い算出された罹患率は 1.06~1.57/100 万人で、4 年間の平均年間罹患率は 1.40/100 万人であった。2011 年では、国内の患者数は 200.9 名と推定された。血液培養を提出した集計対象医療機関は 426 医療機関から 579 医療機関に増加した(表 1)。罹患患者数の年齢分布は、65 歳以上の高齢者が多く(図 1)全体の 77.6%を占めていた。都道府県別では、東京都、愛知県、大阪府など大都市で分離数が多い傾向にあった(図 2)。2008 年から 2011 年の罹患率について、病床規模別の解析結果を表 2 から表 5 に示す。リステリアの分離は、大規模の医療機関に偏る傾向があり、200-299 床の医療機関の分離は非常に少なかった。このことから今回解析対象に入れていない JANIS 非参加の 200 床未満の医療機関では、リステリアの分離は少なく、無視出来る程度と判断した。

サルモネラは、検体の内訳は *S. typhi*、*S. paratyphi* A では血液が多く、その他は便が多い傾向にあった。年齢別では、10 歳以下が多く、また 10 歳以下を 1 歳毎に分けたところ、低年齢が多い傾向にあった(図 5、6)。都道府県別では、愛知県が多い傾向にあった(図 7)。薬剤感受性パターンを図 8 から図 20 に示す。JANIS は 2007 年にシステム更新を行っており、2001 年から 2007 年前半までは、参加医療機関の数が少ないため、それぞれの年別集計の他に、2001 年から 2007 年前半までをまとめて集計したデータを図 13 に示した。目立ったものとしてアンピシリンに対して耐性を示すものが約 7%程度あった。 fosfomicin に対する耐性は約 1%から 2%程度だった。セフトキシム、セフトチジム等の第三世代セファロスポリンに対する耐性株は 1%未満だった。これらは経年的に耐性率は変化していなかった。レボフロキサシンに耐性を示す株は、2010 年までは 1%未満だったが、2011 年は 2.0%だった。CPDX-PR については、I と分類されているものが 30%-40%程度あったが、システム上ここでは I または S と判定されたものが含まれているため、実際に I と判定されるものは少ないと予想される。

D. 考察

日本におけるリステリア症は、その症例の 3/4 以上が高齢者であり、かつその罹患率は年間 1.00~1.60/100 万人程度であると推定された。この結果は、60 歳以上の症例の占める割合が 42 例中 19 例(45.2%)の Okutani らの研究(Epidemiol Infect 132: 769-772, 2004)と比較し、高齢者群が多く、年間罹患率も 1.5~2.5 倍に相当する。乖離の要因としては、後ろ向きのアンケート調査であった Okutani らの研

究で高齢者症例の脱落が主なリコールバイアスとしてかかっていた可能性が考えられた。また、Okutani らの研究と本研究では調査時期が異なることも乖離の要因となった可能性がある。一方、JANIS は任意参加であるため、病床規模別の参加率に差があり、参加率は 200~300 床規模の医療機関では低く、600 床以上の規模の医療機関では高い。さらにリステリア症は一般的に重篤であるため、症例の多くは比較的規模の大きい医療機関を受診している可能性が高い。そのため、本研究の推定方法では、病床規模の小さい群における罹患患者数を高く推計しているため、推定罹患率も高くなっている可能性がある。

サルモネラは、家畜や食肉から分離される株は第三世代セファロスポリン耐性が多いと報告されているが、患者からの分離株では 1%未満と、状況が大きく異なった。少なくとも家畜で分離される耐性菌の状況は、そのまま人で分離される耐性菌の状況と相関するものではないことが明らかになった。家畜の耐性菌と人の耐性菌とでどのようなつながりがあるのかは、バイオインフォマティクスを活用した俯瞰的な解析が必要と思われる。

E. 結論

リステリア感染症は高齢者に多く、人口 100 万人あたりの罹患率は 2011 年で 1.57 人、国内で年間およそ 200 人の患者が発生していることが分かった。

サルモネラについては、第三世代セファロスポリンに対する耐性は 1%未満であることが分かった。レボフロキサシンに耐性を示す株は、2010 年までは 1%未満だったが、2011 年は 2.0%と増加傾向だったため、今後も注意を払う必要がある。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

- 1) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた本邦におけるリステリア症罹患率の推定。

山根 一和、鈴木里和 柴山恵吾

病原体微生物検出情報 (IASR) 33(9):247-8, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。