

が求められている。日本国内では食品からの薬剤耐性株検出の年次推移の詳細な報告はなく、薬剤耐性菌がヒトに影響を及ぼしているかどうかの現状は明らかではない。本研究では薬剤耐性菌が食品を介してヒトに健康被害をおよぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性と、ヒト由来病原細菌の薬剤耐性の関連を調べる。

これまでに日本国内で報告されている鶏肉のセファロスポリン系抗菌剤耐性菌の調査成績では、ESBL 産生菌が AmpC 産生菌より多く検出されているが、この理由の一つとして AmpC 産生菌の検出方法が確立されていないことが考えられる。本年は方法の違いによって検出率に差が出るのかどうかを検証した。

## B.研究方法

### (1) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生大腸菌：

市販鶏肉 24 検体を検査した。検査方法は、検体 25g を採取し Bufferd Peptone Water で増菌培養し、市販生培地の chromID ESBL およびセフォキシチン 20 $\mu$ g/mL 加 CHROMagar ECC の 2 種類の平板培地で分離培養を行い、大腸菌様の集落を各平板につき 5 株釣菌して大腸菌を分離した。

ESBL 産生は CLSI のディスク拡散法、AmpC 産生は 3-アミノフェニルボロン酸を用いたダブルディスクシナジー法で表現型を確認した。その後に ESBL 産生菌は遺伝子のグループ型別 (CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-9、

CTX-M-8/25、TEM、SHV) を行い、AmpC 産生菌はプラスミド性遺伝子 (ACC、CIT、DHA、EBC、FOX、MOX) の検出を行った。

### (2) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生サルモネラ：

2013 年は 2 月と 4 月に合計 54 検体を検査した。2006 年から 2013 年の 8 年間に検査した国内産鶏肉の総数は 1,361 検体になったことから年次変化をみた。

検査方法は、検体 25g を採取し一次増菌培養には Bufferd Peptone Water、二次増菌培養には Rappaport-Vassiliadis Enrichment broth を用い、XLD 寒天培地ならびに BGS 培地 (ブリリアントグリーン寒天培地+スルファピリジン) で分離培養を行った。薬剤を添加した増菌培地および分離培地は使用しなかった。

確認培地でサルモネラの性状を示した株について血清型別と薬剤感受性試験を実施し、薬剤感受性試験は 1 検体につき 1 株、複数の血清型が同一検体から分離された場合は複数株実施した。ESBL および AmpC 産生サルモネラのスクリーニングにはセフポドキシムを用い、セフポドキシム耐性株について ESBL および AmpC 産生性を大腸菌と同じ方法で調べた。

## C.研究結果と考察

### (1) 大腸菌：

大腸菌と同定した 201 株の型別を行ったところ、ESBL 産生は 103 株、AmpC 産生は 98 株であった。そして ESBL 産生菌はすべて

chromID ESBL で検出され、AmpC 産生菌はすべてセフォキシチン 20 $\mu$ g/mL 加 CHROMagar ECC で検出されていた (表 1)。ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が両方検出された検体は 22 検体 (91.7%) あり、ESBL のみ検出は 1 検体、AmpC のみ検出は 1 検体であり、24 検体全て (100%) で ESBL/ AmpC 産生大腸菌が検出された。

AmpC 産生大腸菌を検出するには ESBL 用培地だけではなく、AmpC 産生菌検出を目的とした、セフォキシチン加培地などを使用する事が必要であると考えられた。

2013 年の遺伝子のグループ型別は、ESBL 産生大腸菌では CTX-M-1 グループ 7 株、CTX-M-2 グループ 30 株、CTX-M-8/25 グループ 14 株、CTX-M-9 グループ 25 株、SHV 型 22 株、TEM 型 5 株であった。同一検体由来株でも異なる型が検出され、12 検体で複数の型を検出した。一方、AmpC 産生大腸菌はいずれもプラスミド性の CIT 遺伝子保有であった。

## (2) サルモネラ :

2013 年の 54 検体中、30 検体 (55.6%) から 35 株のサルモネラが検出され、血清型は *Salmonella enterica* serovar *Infantis* (*S. Infantis*) が 13 株、*S. Schwarzengrund* 15 株、*S. Manhattan* 6 株、*S. (1)OUT:r:1,5* が 1 株であった。セフトロキシム耐性のサルモネラは 7 検体 (13.0%) から 8 株検出され、ESBL 産生が 1 検体 (1.9%) 1 株、AmpC 産生が 7 検体 7 株であった。AmpC 産生は *S. Infantis* が 6 株、*S. (1)OUT:r:1,5* が 1 株であった (表 2)。

2006 年から 2013 年の 8 年間では、1,361 検体中 650 検体 (47.8%) からサルモネラが検出され、700 株について血清型別と薬剤感受性試験を実施した。血清型は *S. Infantis* が最も多く 472 株、次いで *S. Schwarzengrund* 109 株、*S. Manhattan* 59 株の順であった (表 3,4)。

2012 年までは毎年 *S. Infantis* が最も多い血清型であったが、2013 年は *S. Schwarzengrund* が最も多い血清型であり、調べた検体数が少なかったが、変化の傾向が認められた (図 1)。

8 年間に検出された 700 株のうちセフトロキシム耐性は 127 株 (18.1%) あり、ESBL 産生菌が 34 株、AmpC 産生菌が 93 株であった。ESBL 産生 34 株の血清型は *S. Infantis* 24 株、*S. Manhattan* 7 株、そして *S. Schwarzengrund* と *S. Hadar* と *S. Typhimurium* が各 1 株であった。AmpC 産生菌ではさらに *S. Infantis* の占める割合が高く、93 株中 90 株が *S. Infantis* であった。他の血清型では *S. Manhattan* のセフトロキシム耐性 7 株が全て ESBL 産生であるなど、血清型による差が認められた (表 4)。

*S. Infantis* の ESBL および AmpC 産生菌の年次変化をみると、2009 年から AmpC 産生菌の急増が認められ、2013 年も 13 株中 6 株 (46.2%) が AmpC 産生であった (図 2)。

## D. 結論

本年度の成績から、市販の鶏肉には ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が高率に存在することが明らかになった。そして同一検体から複数の ESBL の型が検出され、さらに AmpC 産生菌も同時に検出される事も判明し

た。また、AmpC 産生大腸菌検出には、セフトキシチン加平板培地などを使用する事が必要であると考えられた。

サルモネラでは、市販の鶏肉から検出される血清型に変化の傾向が認められた。2012 年までは *S. Infantis* が圧倒的に多く検出される血清型であったが、2013 年は *S. Schwarzengrund* が第 1 位であり、今後の動向が注目される。*S. Infantis* では 2009 年以降 AmpC 産生菌が多い傾向が続いているが、他の血清型ではこのような傾向が認められなかった。

#### E.研究発表

(誌上発表)

- 1) Harada T, Hirai Y, Ito T, Hayashida M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Laboratory investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain possessing a *vtx2c* gene with an IS1203 variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 77: 176-178.
- 2) Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: A foodborne outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169: H41 in Osaka, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013, 66: 530-533.
- 3) 田口真澄 : 食品由来細菌の薬剤耐性の疫学 化学療法の領域、29 : 48-54,2013.

(口頭発表)

- 1) 田口真澄、河原隆二、勢戸和子：市販鶏肉には AmpC 型  $\beta$ -lactamase 産生大腸菌と ESBL 産生大腸菌が同率に存在する、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月、東京
- 2) 勢戸和子、神吉政史、原田哲也、田口真澄：大阪府で分離された O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-O157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較、第 17 回腸管出血性大腸菌出血性大腸菌感染症研究会、2013 年 7 月、つくば

#### F.知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 2013 年の国内産鶏肉由来大腸菌株の型別成績

検体 No.	販売店	部位	大腸菌201株の遺伝子型別成績*										
			菌株数	ESBL					AmpC				
				-1 group	-2 group	-9 group	-8/25 group	SHV	TEM	菌株数	CMY-2	CIT まで	
1	A	ムネ	4		1				3		5	5	
2	A	キモ	5	1					4		5	5	
3	B	キモ	5		2	3					5	5	
4	B	ムネ	4	1	3						3	3	
5	B	モモ	2		2						2	2	
6	C	モモ	5		1		3	1			5	5	
7	C	ムネ	5		4	1					5	5	
8	C	キモ	5	1		2	2				5	5	
9	D	ミンチ	0								1	1	
10	E	モモ	5		4	1					5	2	3
11	E	ササミ	3		3						2	2	
12	F	モモ	5				5				2	2	
13	F	ムネ	5		1		4				5	5	
14	F	ササミ	5						5		4	4	
15	F	キモ	5		5						5	5	
16	G	キモ	1		1						5	5	
17	G	ムネ	5			5					0		
18	G	モモ	5	2		3					5	5	
19	G	ミンチ	5	2		2		1			5	5	
20	H	キモ	5		3			2			5	5	
21	H	ミンチ	5					5			5	5	
22	I	モモ	5					5			4		4
23	J	ムネ	5			5					5	5	
24	J	ササミ	4			3		1			5	5	
合計			103	7	30	25	14	22	5		98	91	7

\* ESBL 産生菌:すべて chromID ESBL で検出

AmpC 産生菌:すべてセフォキシチン 20 μg/mL 加 CHROMagar ECC で検出

表 2 2013 年に国産鶏肉から分離されたサルモネラ

血清型	菌株数	ESBL	AmpC
<i>S. Infantis</i>	13		6
<i>S. Schwarzengrund</i>	15		
<i>S. Manhattan</i>	6	1	
<i>S. (1) O:1,5</i>	1		1
合計	35	1	7

表 3 年別サルモネラ検査数とセフトロキム耐性株数

年	検体数	サルモネラ 陽性検体数	サルモネラ 分離菌株数	セフトロキム 耐性株		
				合計	ESBL	AmpC
2006	224	78	81	3	2	1
2007	227	96	107	8	3	5
2008	201	87	90	8	4	4
2009	260	135	145	28	7	21
2010	170	92	103	17	5	12
2011	170	96	102	45	10	35
2012	55	36	37	10	2	8
2013	54	30	35	8	1	7
合計	1361	650	700	127	34	93

表 4 サルモネラの血清型別菌株数とセフトロキム耐性株数(2006～2013 年)

血清型	菌株数	セフトロキム 耐性株		
		合計	ESBL	AmpC
<i>S. Infantis</i>	472	114	24	90
<i>S. Schwarzengrund</i>	109	1	1	
<i>S. Manhattan</i>	59	7	7	
<i>S. Hadar</i>	10	1	1	
<i>S. Typhimurium</i>	7	1	1	
<i>S. Heidelberg</i>	1	1		1
<i>S. (1) O7:HNM</i>	1	1		1
<i>S. Enteritidis</i>	15			
その他	26	1		1
合計	700	127	34	93

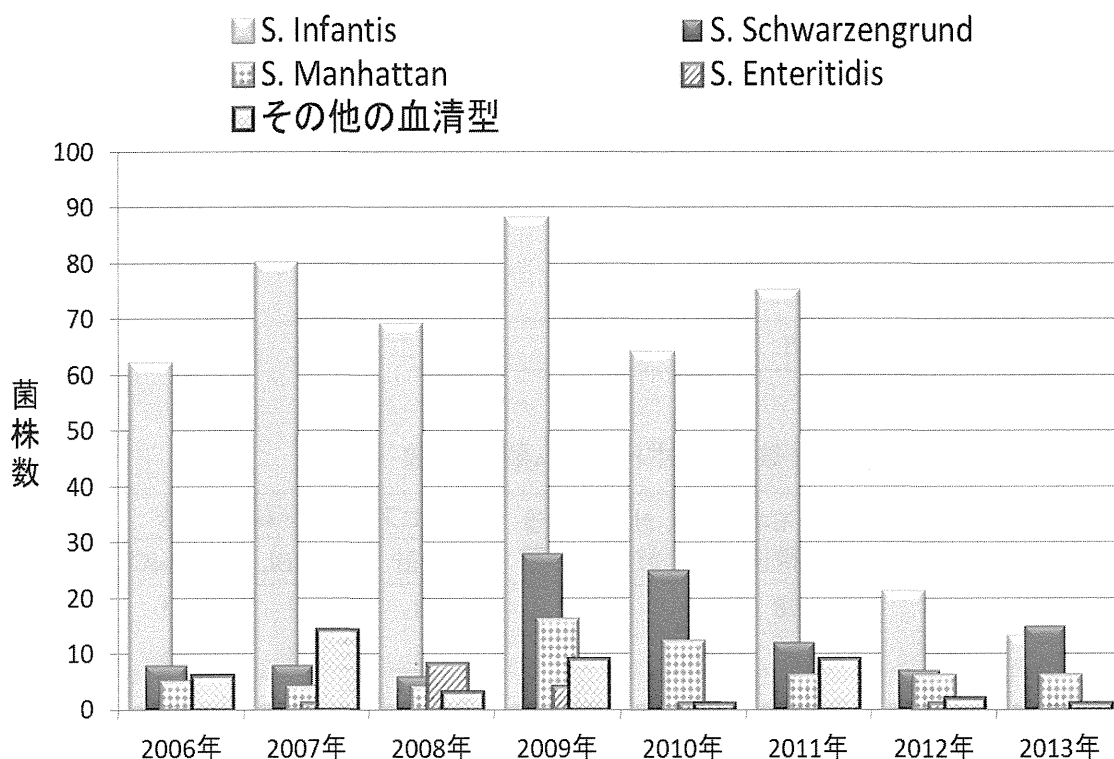


図1 鶏肉由来サルモネラの血清型別検出数

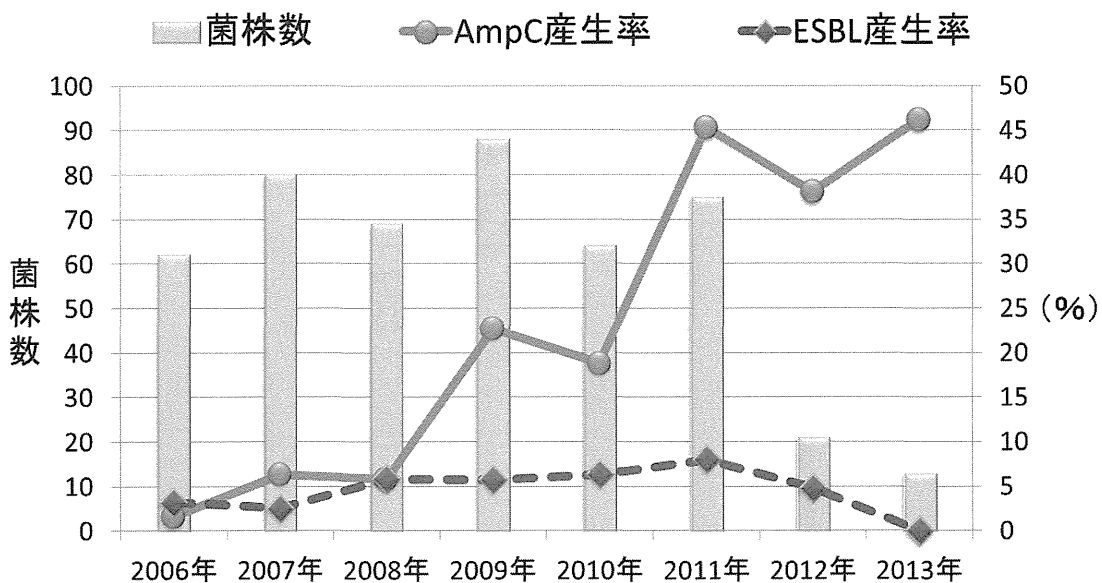


図2 鶏肉由来 S. Infantis における ESBL/AmpC 産生株検出率

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 獣医学部食品衛生学ユニット）

研究協力者 臼井 優（酪農学園大学 獣医学部食品衛生学ユニット）

研究要旨

伴侶動物はヒトと密接な関係にある。伴侶動物に使用される抗菌性物質の多くは人体用であり、伴侶動物由来薬剤耐性菌がヒトへ伝播することによる影響が懸念される。今回、伴侶動物における薬剤耐性菌の現状を明らかにすることを目的として、情報が不足しているネコ由来大腸菌及びイヌ由来 *Clostridium difficile* の薬剤感受性及びその性状を決定した。ネコ由来大腸菌からは、低率ながら第三世代セファロスポリン耐性菌が分離され（7.9%）、それらの株の一部は毒素産生性を有していた。*C. difficile* は、イヌから比較的高率に分離された（33.3%）。*C. difficile* の一部は毒素産生性を有しており（30.9%）、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる抗菌薬に対して耐性を示す株も多かった。以上の結果より、ネコ由来細菌やイヌ由来 *C. difficile* はヒトに伝播した際のリスクが高いことが示唆された。

A. 研究目的

1.  $\beta$ ラクタム系抗菌薬の一種であるセファロスポリン系抗菌薬は、その抗菌スペクトルの広さと副作用の少なさから、人医療および獣医療において汎用される薬剤である。一方、セファロスポリン耐性グラム陰性菌の出現が世界的に報告されており、特に基質特異性拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の拡散が問題となっている。また、同じくセファロスポリン耐性をもたらし ampC 型 $\beta$ ラクタマーゼ産生菌の拡散も報告されており、こうした $\beta$ ラクタマーゼを保有する病原性細菌が感染症治療の障害となることが懸念されている。

$\beta$ ラクタマーゼ産生菌の分離はヒトの医療現場からのものが多いが、動物からの分離も報告されている。中でも、伴侶動物は人間の生活空間の中で飼育されており、飼い主を含む人間との接触頻度が極めて高い。そのため、そこで出現した薬剤耐性菌や耐性遺伝子がヒトへ伝播する危険性は極めて高い。これまで、伴侶動物を対象にした耐性菌の研究ではイヌを採材対象とする場合が多く、ネコにおける耐性菌の実態には不明な点が多く残されている。そこで今回、ネコにおける薬剤耐性菌の存在状況を明らかにすることを目的として、ネコの直腸スワブから指標細菌である大腸菌を分離し、その抗菌薬感受性を測定するとともに、

セファロスポリン耐性株についてその詳細な性状を調査した。

2. *Clostridium difficile* はヒトの抗菌薬関連下痢症・偽膜性大腸炎の原因となり世界的な問題となっている。海外では、介護施設の入所者を訪問するイヌから過去にヒトでアウトブレイクを起こしたことがあるリボタイプ 027 型菌が分離された。イヌを含む伴侶動物はヒトの生活と密接な関係があることから、伴侶動物が *C. difficile* のレゼルボアとなっている可能性が示唆されている。また、日本の動物病院においては、ヒトが抗菌薬関連下痢症になった際の治療に用いられるメトロニダゾールが日常的に使用されているため、イヌ由来 *C. difficile* のメトロニダゾールに対する感受性が低下している可能性がある。イヌからヒトに伝播した際のリスクを評価する上でイヌ由来株の薬剤感受性を調べることは重要である。そこで今回、イヌからヒトへの伝播のリスクを明らかにすることを目的として、イヌの糞便から *C. difficile* を分離し、分離株について薬剤感受性試験を実施した。

## B. 研究方法

### 1. ネコ由来大腸菌の分離および性状解析

#### 菌分離と抗菌薬感受性試験

酪農学園大学附属動物病院および江別市内の 8 ヶ所の動物病院に来院したネコから直腸スワブを採取し、菌分離に供した。スワブは DHL 寒天培地に直接塗布し、37°C24 時間好気下で培養した。発育した赤色集落を純培養して菌株を得た後、生化学性状試験に基づいて大腸菌 (*Escherichia coli*) と同定し、以降の実験に供した。抗菌薬感受

性試験としてアモキシシリン (AMPC)、セファレキシム (CEX)、セフトロキム (CPDX)、カナマイシン (KM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、エンロフロキサシン (ERFX) の 7 薬剤について最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

#### CPDX 耐性株の性状解析

上記試験で抗菌薬耐性を示した株のうち、CPDX 耐性であった株を対象に DNA を抽出し、PCR 法による  $\beta$  ラクタム耐性遺伝子の検索に供した。検出された遺伝子は塩基配列を解析することでその亜型を決定した。また、これらの株については染色体性 AmpC 過剰産生による  $\beta$  ラクタム耐性化の有無を調べるため、ampC プロモーター領域の塩基配列を解析し、点突然変異の有無を確認した。

#### 菌株の病原性試験

同じく CPDX 耐性株について、O 抗原血清型を血清凝集反応 (病原大腸菌免疫血清「生研」、デンカ生検株式会社) により決定した。また、PCR により系統発生分類を決定するとともに病原性遺伝子を検出した。

### 2. イヌ由来 *C. difficile* の分離及び性状解析

動物病院来院犬及びセラピー犬合計 204 頭の糞便からクロストリジウム選択培地 (CCMA-Ex 培地) により *C. difficile* を分離した。分離株について、PCR 法によりトキシシン A, B, 及びバイナリートキシシン産生性について決定した。加えて、CLSI の方法に従い、ヒトの抗菌薬関連下痢症に対して使用されるバンコマイシン及びメトロニダゾール、抗菌薬関連下痢症の原因となるクリンダマイシン、セフトリアキソン、エリスロマイシン、シプロフロキサシンに対する



感受性を寒天平板希釈法により調べた。

## C. 研究結果

### 1. ネコ由来大腸菌の分離および性状解析

#### 菌分離と抗菌薬感受性試験

9ヶ所の動物病院(A~J)から92検体のネコ直腸スワブを採集し、うち70検体(76.1%)から大腸菌を分離した。分離菌株のうち19株(27.1%)が1剤以上の抗菌薬耐性を示し、測定した7剤すべてに耐性をもつ株も1株存在していた。AMPCおよびOTCに対する耐性株はそれぞれ全体の21.4%、15.7%とやや高い傾向を示したが、他の薬剤に対する耐性率はいずれも全体の5~8%程度であった(表1)。CPDX耐性株(6株、8.6%)やERFX耐性株(3株、4.3%)も確認された。また、施設ごとに耐性菌分離状況を比較した場合、検体数の多かった病院(A, B, H)で多種の耐性菌が検出される傾向にあるものの、その分離率には施設ごとの有意差は認められなかった。

#### CPDX耐性株の性状解析

第3世代セファロスポリン系抗菌薬であるCPDXに耐性を示した6株について、保有するβラクタマーゼの検索を行なった(表2)。被検株のうち、セファロスポリン耐性に関わる因子としてESBLのCTX-M-14およびampC型βラクタマーゼのCMY-2保有株がそれぞれ1株ずつ(CFE5およびCFE3)確認された。また、うち2株(CFE7およびCFE9)については、ESBLやampC型βラクタマーゼは保有していなかったものの、染色体上のampCプロモーター領域の-32部分に変異(T to A)が生じていたことから、染色体性ampC過剰産生株であると考えられた。残り2株(CFE1およびCFE11)については、セフ

アロスポリン耐性に関わる因子を特定することができなかった。

#### 菌株の病原性試験

0抗原型別の結果、上記6株はいずれも使用した抗血清と凝集反応を示さなかった。病原性遺伝子に基づく系統発生分類では、系統Aが1株、系統B1が1株、系統B2が3株、系統Dが1株であった(表2)。病原性遺伝子として、全株がアドヘジンをコードする*fimA*, *fimH*遺伝子を保有していたのに加え、系統B2の3株(CFE7, CFE9, CFE11)は毒素をコードする*hly*, *cnf*遺伝子を保有していた。

### 2. イヌ由来*C. difficile*の分離及び性状解析

68/204検体(33.3%)から*C. difficile*が分離された。そのうち、21株がトキシゲンA/Bを保有していた(30.9%)。バイナリートキシンを保有する株は分離されなかった。

抗菌薬感受性試験の結果、バンコマイシン及びメトロニダゾールに耐性を示す株は分離されなかった(表3)。一方、抗菌薬関連下痢症の原因となる薬剤に対しては耐性を示す株が比較的高率に分離された(26.5~98.5%)。中でもクリンダマイシンとシプロフロキサシンに耐性を示す株の割合が高かった(それぞれ、88.2%と98.5%)。

## D. 考察

### 1. ネコ由来大腸菌の分離および性状解析

#### 菌分離と抗菌薬感受性試験

CPDX耐性やERFX耐性といった、抗菌活性の強い薬剤に対する耐性をもった大腸菌株が低率ながらも分離されたことから、ネコがこうした耐性菌を腸管細菌叢の一部として保菌していたことが確認された。

また、AMPC や OTC など古典的な抗菌薬に対する耐性株が比較的多かったことから、こうした抗菌薬に対する耐性菌がネコにおいても広く拡散していることが示された。一方で、全ての抗菌薬の耐性割合がイヌ分離菌株の約半分であった。このことは、イヌとネコにおける薬剤の使用状況または、ネコ分離菌株の特徴であることが考えられた。

さらに、それぞれの動物病院の間では耐性菌分離率に有意差が認められなかったことから、本研究におけるネコの耐性菌保菌率は特定の動物病院の治療方針に影響されるものではなく、伴侶動物として飼われているネコ全体に当てはまるものだと考えられた。

#### CPDX 耐性株の性状解析

ヒトの臨床現場で広がっているセファロスポリン耐性大腸菌の多くは CTX-M 型  $\beta$ ラクタマーゼを保有していることが報告されている。一方、今回の研究では分離された CPDX 耐性株が少なく (6 株、8.6%)、ESBL である CTX-M-14 を保有していたのも 1 株だけであったことから、ネコにおいて ESBL 産生大腸菌は広がっていないものと考えられた。

また、被検株のうち 2 株ではセファロスポリン耐性に関わる因子を特定できなかったことから、検索の対象としなかった耐性化因子 (minor ESBL など) の存在があったのではないかと考えられた。

#### 菌株の病原性

CPDX 耐性株はいずれも血清型を特定できず、高病原性の大腸菌は存在しなかった。しかしながら系統発生分類の結果、腸管外病原性株が多いとされる系統 B2 や腸管内病原性株が多いとされる系統 D の株が検出

された。また、系統 B2 の株は毒素遺伝子 (*hly* および *cnf*) も保有していたことから、ネコが保菌している CPDX 耐性大腸菌がヒトに対してある程度の病原性を示すことが示唆された。

## 2. イヌ由来 *C. difficile* の分離及び性状解析

日本で飼育されるイヌが、比較的高い割合でトキシシン A 及び B を産生する *C. difficile* を保有しており、これらの株の中には抗菌薬に対して耐性を示す株が存在したことから、イヌからヒトに *C. difficile* が伝播した際、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となることが示唆された。

今回、ヒトの治療に使用されるバンコマイシン及びメトロニダゾール耐性株は分離されなかったが、下痢症のイヌにはメトロニダゾールが頻用されるため、今後も両方の薬剤に対する感受性調査は重要である。豚由来 *C. difficile* に比べてエリスロマイシンに対する耐性割合が低く、セフトリアキソンに対する耐性割合が高いのは、イヌ由来 *C. difficile* の特徴であり、イヌへの抗菌性物質の使用ととの関連が示唆された。

## E. 結論

伴侶動物として飼育されているネコが、その腸管細菌叢の一部として、セファロスポリン耐性菌やフルオロキノロン耐性菌などの強力な耐性菌を保有しており、ヒトに対しての病原性が疑われる株も存在したことから、その拡散状況については今後も注視する必要がある。

イヌから比較的高率に *C. difficile* が分離され、その中にはヒトの病原性に重要で

ある毒素を産生する株が多数存在した。そして、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる可能性も示されたことから、ヒトに伝播した際のリスクは高い。今後、ヒト臨床由来株との性状の比較を行うことで、ヒトとイヌとの関係をより明らかにしていく必要がある。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

<口頭発表>

1. 臼井 優:細菌のフルオロキノロン耐性機構、第 155 回日本獣医学会、2013 年 3 月 29 日、東京
2. 臼井優、南部雪江、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊: 子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株との比較、第 80 回日本細菌学会北海道支部会、2013 年 8 月 30 日、北海道
3. 間瀬香織、臼井優、大久保寅彦、岩野英知、田村豊: 犬の膿皮症治療のための *Staphylococcus pseudintermedius* 特異ファージの分離と抗菌薬によるファージ溶菌活性の増強、第 64 回北海道獣医師大会、2013 年 9 月 6 日、北海道
4. 大久保寅彦、小野匡、佐藤豊孝、臼井優、田村豊: 動物病院来院猫からのセファロsporin耐性およびフルオロキノロン耐性大腸菌の検出、第 64 回北海道獣医師大会、2013 年 9 月 6 日、北海道

5. 南部雪江、臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊: 子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株との比較、第 156 回日本獣医学会、2013 年 9 月 21 日、岐阜
6. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊: 薬剤耐性遺伝子はイェバエ腸管内で接合伝達する、第 156 回日本獣医学会、2013 年 9 月 21 日、岐阜

<紙上発表>

1. Ishihara K, Takahashi R, Andoh M, Makita K, Kamiiji S, Ueno H, Muramatsu Y, Tamura Y.: Effects of climatic elements on *Campylobacter*-contaminate chicken products in Japan. *Epidemiol. Infect.*, 2012. 140:991-996.
2. Asai T, Usui M, Hiki M, Kawanishi M, Nagai H, Sasaki Y.: *Clostridium difficile* Isolated from the Fecal Contents of Swine in Japan. *J Vet Med Sci.* 2013. 75: 539-541.
3. Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. equal distribution H. M and U. M.: Diversity of plasmid replicons encoding the bla<sub>CMY-2</sub> gene in broad spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 2013. 10:243-249.
4. Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T.: Effect of antimicrobial exposure on AcrAB expression in *Salmonella enterica* subspecies

- enterica* serovar Choleraesuis. Front. Microbiol. 4:53.
5. Sato T, Okubo T, Usui M, Higuchi H, Tamura Y.: Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves. J Vet Med Sci. 2013. 75: 1063-1065.
  6. Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The Role of Flies in Spreading the Extended-Spectrum Beta-lactamase Gene from Cattle. Microbial Drug Resistance 2013. 19: 415-420.
  7. Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, Akiba M, Fujii N, Tamura Y. : Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance determining region mutations. Front. Microbiol. 4:125.
  8. Ishihara K, Nakajima K, Kishimoto S, Atarashi F, Muramatsu Y, Hotta A, Ishii S, Takeda Y, Kikuchi M, Tamura Y. : Distribution of antimicrobial resistant lactic acid bacteria in natural cheese in Japan. Microbiol. Immunol. 2013. 57:684-691.
  9. Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y. : Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. 2013. Emer. Infect. Dis., 19:823-824.
  10. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y. : Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-01-ST648 *Escherichia coli* carrying blaCMY-2 from fecal samples of dogs in Japan. J Med Microbiol. 2014. 63:263-270.
  11. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y. : Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia, and Thailand). J. Vet. Med. Sci. 2014. In press
  12. Okubo T, Sato T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y. : Comparison of broad spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. J. Infect. Chemother. 2013. In press
  13. Usui M, Sakemi Y, Uchida I, Tamura Y. : Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone resistant *Campylobacter*. Vet. Microbiol. 2014. In press
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1. 施設ごとの薬剤耐性株数と耐性率

施設名	耐性株数 (%)						
	AMPC*	CEX	CPDX	GM	OTC	CP	ERFX
A (n = 12)	4 (33.3%)	3 (25.0%)	3 (25.0%)	3 (25.0%)	2 (16.7%)	2 (16.7%)	4 (33.3%)
B (n = 9)	2 (22.2%)	0	0	1 (11.1%)	2 (22.2%)	1 (11.1%)	0
C (n = 4)	0	0	0	0	1 (25.0%)	1 (25.0%)	0
D (n = 10)	1 (10.0%)	0	0	0	2 (20.0%)	0	0
E (n = 2)	0	0	0	0	0	0	0
F (n = 6)	0	0	0	0	0	0	0
G (n = 7)	2 (28.6%)	1 (14.3%)	1 (14.3%)	0	1 (14.3%)	0	0
H (n = 10)	4 (40.0%)	2 (20.0%)	2 (20.0%)	0	1 (10.0%)	1 (10.0%)	0
I (n = 8)	2 (25.0%)	0	0	0	2 (25.0%)	0	1 (12.5%)
J (n = 2)	0	0	0	0	0	0	0
Total (n = 70)	15 (21.4%)	6 (8.6%)	6 (8.6%)	4 (5.7%)	11 (15.7%)	5 (7.1%)	5 (7.1%)

\* AMPC, アンピシリン; CEX, セファレキシム; CPDX, セフトロキム; GM, ゲンタマイシン; OTC, オキシテトラサイクリン; CP, クロラムフェニコール; ERFX, エンロフロキサシン。抗菌薬の MIC が CLSI の定めるブレイクポイント値 (AMPC, 32mg/L; CEX, 32mg/L; CPDX, 8mg/L; GM, 16mg/L; OTC, 16mg/L; CP, 32mg/L; ERFX, 4mg/L) を上回った株を耐性株とみなした。

表 2. CPDX 耐性株の性状

株名	分離 施設	系統発生 分類	MIC (mg/L)				βラクタマーゼ	<i>ampC</i> プロモーター領域の変異	病原性遺伝子*2)
			AMPC (32)*1)	CEX (32)	CPDX (8)	ERFX (4)			
CFE 1	A	D	>128	>128	>128	≤0.125	TEM-1b	C-88T, A-82G, G-18A, C-1T, C+58T	<i>fimA</i> , <i>fimH</i>
CFE 3	A	A	>128	>128	>128	64	TEM-1b, CMY-2	Wild Type	<i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>aer</i>
CFE 5	A	B1	>128	>128	>128	64	TEM-1b, CTX-M-14	C-88T, A-82G, G-18A, C-1T, C+58T	<i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>aer</i>
CFE 7	G	B2	128	>128	16	≤0.125	TEM-1b	C-73T, T-32A, C+58T, T+63C	<i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>sfa/foc</i> , <i>pap</i> , <i>hly</i> , <i>cnf</i>
CFE 9	H	B2	>128	>128	32	≤0.125	(not detected)	C-73T, T-32A, G+33A, C+58T, T+63C	<i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>sfa/foc</i> , <i>pap</i> , <i>hly</i> , <i>cnf</i>
CFE 11	H	B2	>128	>128	64	≤0.125	(not detected)	C-73T	<i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>sfa/foc</i> , <i>pap</i> , <i>hly</i> , <i>cnf</i>

\*1) 括弧内の数値は CLSI の定める Break point 値を示す

\*2) *aer*, エロバクチン; *cnf*, 細胞障害性 necrotizing factor; *fimA*, *fimH*, アドヘジン; *hly*, アルファヘモリジン; *pap*, P 線毛; *sfa/foc*, S/F1C 線毛;

表3 イヌ由来 *C. difficile* の薬剤感受性

抗菌薬	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )		Range	耐性株数(%) (n=68)
	Break point	50%	90%		
Vancomycin	$\geq 32^a$	1	1	0.5-8	0
Metronidazole	$\geq 32^b$	0.25	0.5	<0.06-1	0
Clindamycin	$\geq 8^b$	8	>256	1->256	60(88.2%)
Ceftriaxon	$\geq 64^b$	32	128	4->256	37(54.4%)
Erythromycin	$\geq 8^a$	1	>256	0.5->256	18(26.5%)
Ciprofloxacin	$\geq 4^a$	4	>256	0.5->256	67(98.5%)

a Break point 値は過去の報告[Oka et. al. J. Clin. Microbiol. 2012]で設定した値を基準とした。

b Break point 値は CLSI で規定された値を基準とした。

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 25 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
研究協力者	山下明史	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	柴山恵吾	国立感染症研究所	細菌第二部	
研究協力者	鈴木里和	国立感染症研究所	細菌第二部	
研究協力者	松井真理	国立感染症研究所	細菌第二部	

#### 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、昨年度開発した PLAST システムを大幅に発展させ、解読リードを入力すると配列のトリミング・アセンブルを行い、遺伝子機能・Inc タイプの推定、薬剤耐性因子の発見までをシームレスに行うことのできる web アプリケーション GPAT を構築した。また、GPAT (Global Plasmidome Analyzing Tool) と連携して複数の plasmid 間での遺伝子の授受関係の解析を容易にする iPAT (inter Plasmid Analyzing Tool) の開発を行った。iPAT を用いることで、GPAT で解析した Plasmid 配列全体の遺伝子の水平伝達を俯瞰的に眺める事ができるようになった。現在 GPAT, iPAT は、本研究班の中で運用し機能向上のためテストを繰り返している。Plasmid 配列全体の遺伝子水平伝達を俯瞰的に眺めることができる統合システムを構築し、検査現場においても有用なツールへ発展させることを目標とする。



## A. 研究目的

ヒト、家畜、食品から分離される薬剤耐性食中毒菌のサーベイランス結果を基盤にし、ゲノム配列レベルおよびプラスミド・レベルでより具体的な耐性化機序と株伝播プロセスを解析する。この解析の基盤を作るために、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、各種タイプング結果等）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、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を得るために、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本年度開発した GPAT, iPAT を用いて行った（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、新規に開発した GPAT を用いて解読リードの quality

trimming, (genome subtract), de novo assembly, ORF 推定、推定した ORF の機能推定、および Inc タイプ推定を行う（図2）。Quality trimming では fastq-mcf および in house perl script を用いる。Genome subtract には bwa, samtools, Hydra および in house perl スクリプトを用いる。Assemble には A5 を用いる。ORF 推定には prodigal, gmhmm\_heuristic, および gmhmm が選択可能である。ORF の機能推定および Inc タイプ推定には BLAST を用いる。データベースとして、既知の plasmid データベース、COG, ARDB + CARD、および NCBI NR を選択することができる。Inc タイプ推定には PBRT の replicon typing プライマーを用いた *in silico* PCR によって得られた配列データベースを用いる。

Plasmid データベースは NCBI から最新のデータをダウンロードできるシステムを構築した。ただし、解析する日によって結果が変わってしまう事態を防ぐため、GPAT では 2013年6月10日時点のデータももちいている。

GPAT は MiSeq のシーケンス結果だけでなく、fasta format や GenBank format のデータも入力として受け付けることができる。GPAT 内部で使用しているソフトウェア、およびデータベースは全て無償で利用できるものを使用し、利用者および開発者の負担にならないよう配慮した。GPAT はバイオインフォマティクス解析に慣れていない研究者でも簡単に高度な解析ができるよう、操作性に配慮しながら開発を行い、直感的に操作できるユーザーインターフェースを構築した（図3）。更に、実際に plasmid の解析を行っている研究者に試用してもらい、開発者側と利用者のあいだに認識のズレが生じないようにした。

### プラスミド間の関係性解析手法の構築

GPAT の開発により、大量の plasmid 配列を容易に解析することが可能になったが、薬剤耐性遺伝子や plasmid そのものの伝播課程を明らかにするためには plasmid 同士の関係性を大規模に解析する必要がある。そのため、plasmid が共通して持つ遺伝子のネットワーク解析のソフトウェア iPAT (inter Plasmid Analyzing Tool)

を開発した。iPAT は GPAT が解析した plasmid の ORF 同士の相同性検索を行い、相同性のあった plasmid 同士をエッジで結合してゆくネットワーク解析である。図には示していないが、臨床で採取され、GPAT で解析した plasmid を iPAT で解析すると、同じ起源を持つと思われる plasmid はネットワーク上でも密接な関係性を示し、起源が違ふと思われる plasmid はネットワーク上も疎な関係性を示した。また、NDM-1 を持つ既知の plasmid のネットワーク解析を行ってみた結果を図 4 に示す。GPAT の持つ GenBank format 読み込み機能を用いて NCBI に登録されている NDM-1 保有 plasmid を読み込み、iPAT を用いてネットワーク解析を行った。NDM-1 保有 plasmid は 4 つのグループに分類できることが示唆された。iPAT は GPAT が解析したデータだけを扱うことができるため、既知の plasmid との関係性を解析するためには配列を手動で GPAT に入力する必要がある。新たに解読した plasmid と既知の plasmid との関係性の解析を容易にするために、「既知のデータの入力」の過程を自動化する予定である。この手法は、既知の plasmid 全体の解析にも応用できる可能性がある。今後はこの手法を応用して plasmid による薬剤耐性伝播の網羅的な解析を行う予定である。

#### 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、昨年度構築した PLAST システムを大幅に発展させ、GPAT/iPAT を開発した。GPAT は次世代シーケンサー MiSeq

による plasmid のシーケンサーリードからほとんどクリックだけでアセンブリや遺伝子予測・アノテーションまでを通常の web ブラウザのみで行うことを可能にした。また、iPAT は GPAT で解析した plasmid 同士の関係性を図示することを可能にした。今後は GPAT/iPAT の利便性を更に充実させるとともに、これらの技術を用いて菌株・株間の plasmid そのものや plasmid 上の遺伝子の水平伝達を俯瞰的に解析できるシステムを構築してゆく予定である。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

山下 明史, 関塚 剛史, 黒田 誠

Comprehensive analysis of horizontal plasmid transfer based on a component network analysis: Plasmidome network analysis. 第 36 回日本分子生物学会年会(ポスター発表 2P-0087) (2013 年 12 月神戸国際会議場)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

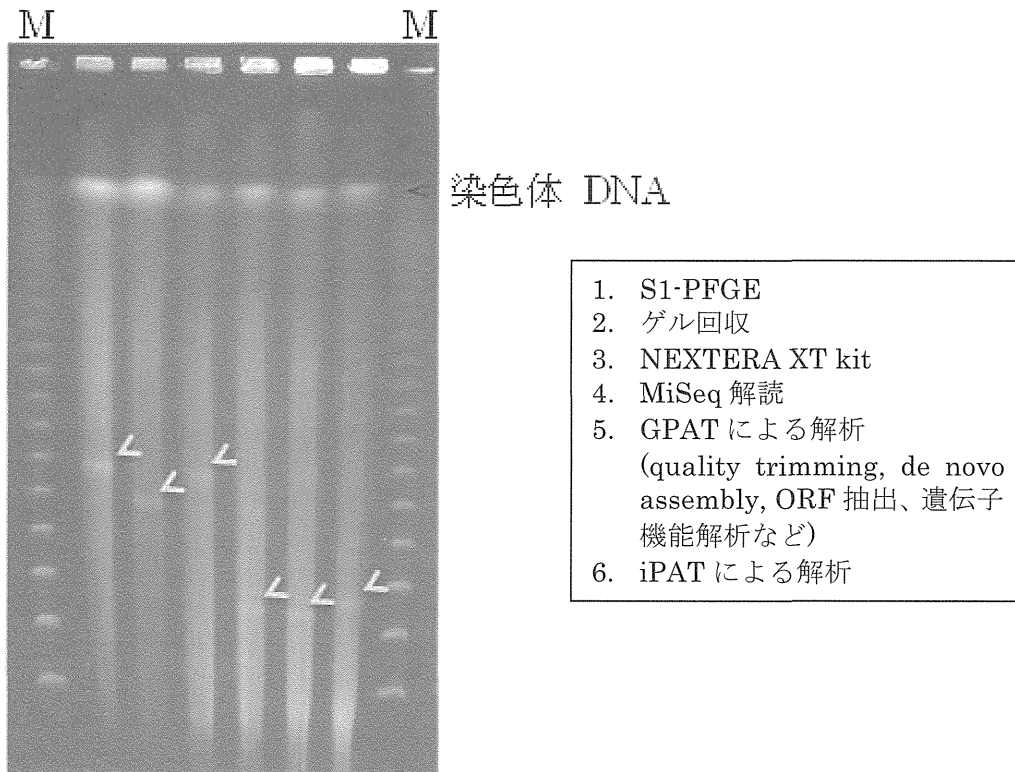


図1 プラスミド DNA の PFGE 分離から配列解読そして情報解析までの流れ。S1-PFGE 泳動図に泳動分離されたプラスミド断片（黄色矢頭）を示す。

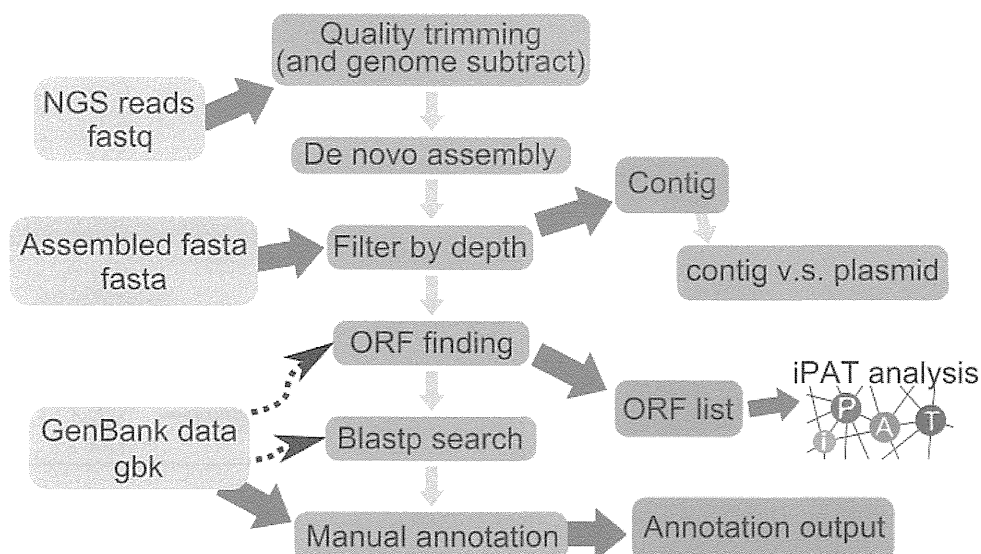


図2 GPAT (Global Plasmidome Analyzing Tool) による plasmid 解析のワークフロー。Quality trimming には fastq-mcf および in house perl スクリプトを用いる。Genome subtract には bwa, samtools, Hydra および in house perl スクリプトを用いる。Assemble には A5 を用いる。ORF 推定には prodigal, gmhmm\_heuristic, および gmhmm が選択可能である。

project name: **Salmonella enterica subsp. enterica**

Overview  
 Total reads: 430,000  
 Quality trimming: 4,625,099,934  
 Genome trimming: 20,115,572,781

Assembly  
 Length: 204,485,513 bp  
 GC: 52.24%  
 Total bases: 173,762,160  
 N50: 43,000 bp  
 Number of genes: 214

Processing Status

Process	Status	Start
Trimming	Completed	10/11/2017 10:00
Assembly	Completed	10/11/2017 10:00
Filter by depth	Completed	10/11/2017 10:00
More Plasmid similarity	Completed	10/11/2017 10:00
BLAST search (incb type)	Completed	10/11/2017 10:00
ORF finding	Completed	10/11/2017 10:00
BLAST search (cog)	Completed	10/11/2017 10:00
BLAST search (ardb)	Completed	10/11/2017 10:00
BLAST search (plasmid)	Completed	10/11/2017 10:00

Trimming parameters  
 Trim length: 50  
 Trun lower than this value: 3 + 1  
 Quality threshold for filtered: 20  
 Minimum remaining sequence length: 50  
 Maximum length: 100  
 Remove bacterial genomes: ON

Assembler settings  
 Select an assembler program: SP  
 Cutoff depth: 100  
 Cutoff depth (reads): 100

ORF finding settings  
 Show the ORFs: ON  
 Target sequence type: protein  
 BLAST search settings  
 Database search: ON  
 Filter: ORF  
 Evaluate: 1e-10

Collector: **Japan** (Month) **2017** (Date)  
 Operator: **Salmonella enterica subsp. enterica** (Project Name)  
 Host: **Salmonella enterica subsp. enterica** (Change Project Name)

BLAST result: assembly v.s. ardb

Download BLAST result in raw text / nB table / modified nB table

Query: scaffold1.1|size=48513 length= 48513 nt

Hit 1: **CARD6 (outactive recombinase)** Encoded by gene sul1.01. CV513. ARO1000001. process or component of antibiotic. 55% AFI74129.3.geneB.p01. *Escherichia coli*

Hit 2: **CARD6 (protein)** Encoded by gene sul1.01. ARO1000001. process or component of antibiotic biology or. 85% AY458224.gene p01. *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport*

Hit 3: **ARDE6 (hydroxysterate synthase)** g|g|842691|g|g|AAAC2048.2|AF261825.17 sul1 delta fusion protein. 85% g|g|83755253|eRMP\_00174781.01| *Proteus mirabilis*

Hit 4: **ARDE6 (hydroxysterate synthase)** g|g|842691|g|g|AAAC2048.2|AF261825.17 sul1 delta fusion protein. 85% g|g|83755253|eRMP\_00174781.01| *Proteus mirabilis*

Hit 5: **ARDE6 (hydroxysterate synthase)** g|g|842691|g|g|AAAC2048.2|AF261825.17 sul1 delta fusion protein. 85% g|g|83755253|eRMP\_00174781.01| *Proteus mirabilis*

assemble result

Filtered reads	Final scaffolds fasta	crude scaffolds fasta	contig fasta
GC=52.2 Number of contig: 6 Total: 172,762 bp	GC=51.6 Number of contig: 23 Total: 204,485 bp	GC=50.0 Number of contig: 23 Total: 204,485 bp	GC=50.0 Number of contig: 23 Total: 204,485 bp

Crude Scaffold read depth distribution

Span of paired ends

BLAST result: assembly v.s. plasmid

Download BLAST result in raw text / nB table / modified nB table

Query: scaffold1.1|size=48513 length= 48513 bp. Average depth: 367.44 to GDBE

Hit 1: **Salmonella enterica subsp. enterica** 92.4% + J285033.1|g|g|H11.160|65781|locus| *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A*

Hit 2: **Proteus mirabilis** 92.4% + AF261825.1|g|g|842691|g|g|AAAC2048.2|AF261825.17 sul1 delta fusion protein

Hit 3: **Salmonella enterica subsp. enterica** 92.4% + J285033.1|g|g|H11.160|65781|locus| *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A*

Hit 4: **Proteus mirabilis** 92.4% + AF261825.1|g|g|842691|g|g|AAAC2048.2|AF261825.17 sul1 delta fusion protein

Hit 5: **Salmonella enterica subsp. enterica** 92.4% + J285033.1|g|g|H11.160|65781|locus| *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A*

BLAST result table

Query	Length	Match	Query	Subject	E-value	Score
100	16	0	D	117207.22220000	1.419	100
99	16	0	D	117207.22220000	250.0	100
98	16	0	D	117207.22220000	400.0	100
97	16	0	D	117207.22220000	550.0	100
96	16	0	D	117207.22220000	700.0	100
95	16	0	D	117207.22220000	850.0	100
94	16	0	D	117207.22220000	1000.0	100
93	16	0	D	117207.22220000	1150.0	100
92	16	0	D	117207.22220000	1300.0	100
91	16	0	D	117207.22220000	1450.0	100
90	16	0	D	117207.22220000	1600.0	100
89	16	0	D	117207.22220000	1750.0	100
88	16	0	D	117207.22220000	1900.0	100
87	16	0	D	117207.22220000	2050.0	100
86	16	0	D	117207.22220000	2200.0	100
85	16	0	D	117207.22220000	2350.0	100
84	16	0	D	117207.22220000	2500.0	100

ORF finding result

Download predicted genes in raw text / nB table / modified nB table

Protein: **ORF1** (start=1, end=100, length=100)  
 Protein: **ORF2** (start=101, end=200, length=100)  
 Protein: **ORF3** (start=201, end=300, length=100)  
 Protein: **ORF4** (start=301, end=400, length=100)  
 Protein: **ORF5** (start=401, end=500, length=100)  
 Protein: **ORF6** (start=501, end=600, length=100)  
 Protein: **ORF7** (start=601, end=700, length=100)  
 Protein: **ORF8** (start=701, end=800, length=100)  
 Protein: **ORF9** (start=801, end=900, length=100)  
 Protein: **ORF10** (start=901, end=1000, length=100)

BLAST result: assembly v.s. incb

Download BLAST result in raw text / nB table / modified nB table

Query: scaffold1.1|size=48513 length= 48513 nt

Hit 1: **Proteus mirabilis** 93% A/C\_group|incb/C

図3 GPAT 実行結果画面。①パラメータ設定、進捗状況確認など。②de novo assembly 結果。③ORF 検索結果。④ORF の blast 検索結果。⑤、⑥既知の plasmid に対する相同性検索結果。⑦Inc タイプの推定結果。