

- intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol, and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 937-945., 2014
8. Sato T, Okubo T, Usui M, Yokota SI, Izumiyama S, Tamura Y.: Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from dairy cattle in Japan. *PLOS One.*, 9: e96101, 2014.
 9. Okubo T, Tosaka Y, Sato T, Usui M, Nakajima C, Suzuki Y, Imura S, Tamura Y.: Bacterial diversity in sea ice from Southern ocean and the Sea of Okhotsk. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2: 266-272, 2014.
 10. Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.: Epidemiological analysis of Mechicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staffs for companion animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1627-1629, 2014.
 11. Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.: Mechicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staffs and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 58: 149-154, 2014.
 12. Makita K, Inoshita K, Kayano T, Uenoyama K, Hagiwara K, Asakawa M, Ogawa K, Kawamura S, Noda J, Sera K, Sasaki H, Nakatani N, Higuchi H, Ishikawa N, Iwano H, Tamura Y.: Temporal changes in environmental health risks and socio-psychological status in areas affected by the 2011 tsunami in Ishinomaki, Japan. *Environment and Pollution*, 3:1-20, 2014.
 13. Tsukamoto N, Ohkoshi Y, Okubo T, Sato T, Kuwahara O, Fujii N, Tamura Y, Yokota S.: High prevalence of cross-resistance to aminoglycosides in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Chemotherapy* 59:379-384, 2014.
 14. Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh Tran Thi, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y.: Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1001-1008, 2014.
 15. Muramatsu Y, Usaki N, Thongchai C, Kramontong I, Kriegsak P, Tamura Y. Seroepidemiological survey in Thailand of *Coxiella burnetii* infection in cattle and chicken and presence in ticks attached to dairy cattle. *SE Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.*, 45: 1167-1172, 2014
 16. Harada K, Usui M, Asai T.: Application of enrofloxacin and orbifloxacin disks approved in Japan for susceptibility testing of representative veterinary respiratory pathogens. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1427-1430., 2014.
 17. Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, Sekiguchi H,

Kojima A, Asai T.: Phylogenetic Grouping, Epidemiological Typing, Analysis of Virulence Genes, and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Japan. *Ir. Vet. J.*, 64: 14., 2014.

- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床由来株の薬剤感受性試験

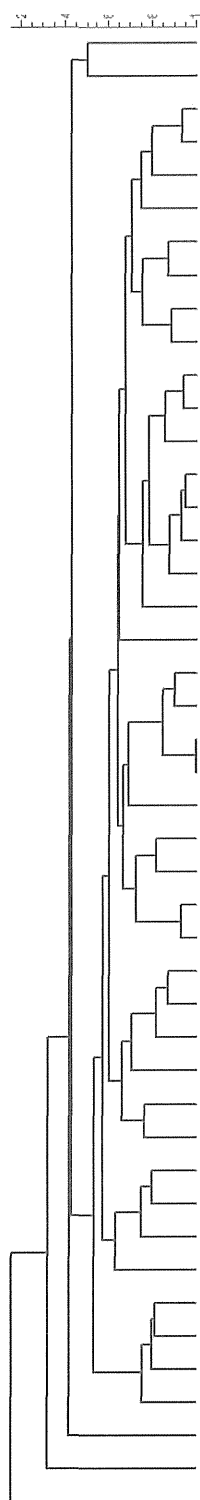
薬剤	Break Point (mg/L)	イヌ (n=68)		ヒト (n=73)	
		MIC range (mg/L)	耐性 割合	MIC range (mg/L)	耐性 割合
VCM	$\geq 32^a$	0.5–8	0%	0.06-2	0%
MNZ	$\geq 32^b$	0.06–1	0%	<0.06-0.25	0%
CLDM	$\geq 8^b$	0.5–256<	90%	0.125–256<	88%
CTRX	$\geq 64^b$	32–128	59%	0.125–256<	85%
EM	$\geq 8^a$	0.5–256<	24%	<0.125–256<	84%
CPFX	$\geq 4^a$	4–256<	100%	0.125-64	93%
TET	$\geq 16^b$	0.06–32	3%	0.015-32	6%

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。

相同率(%)

20 40 60 80 100



リボタイプ	n	Origin
C6	3	Canine
PCR ribotype060	·	ATCC 43593
C26	1	Canine
C5	3	Canine
C27	1	Canine
PCR ribotype078	·	ATCC BAA-1875
C11	2	Canine
R11	2	Human
C20	1	Canine
R01	14	Human
C2	6	Canine
C3	6	Canine
PCR ribotype038	·	ATCC 700057
C10	2	Canine
C17	1	Canine
C22	1	Canine
PCR ribotype027	·	ATCC BAA-1870
C25	1	Canine
R08	2	Human
C16	1	Canine
C28	1	Canine
C4	4	Canine
R05	3	Human
C23	1	Canine
R10	1	Human
R03	4	Human
C30	1	Canine
C7	3	Canine
C12	2	Canine
C19	1	Canine
C29	1	Canine
C13	1	Canine
C1	16	Canine
C21	1	Canine
C15	1	Canine
R09	1	Human
R06	1	Human
C9	2	Canine
C18	1	Canine
R07	1	Human
C8	2	Canine
PCR ribotype001	·	ATCC 9689
C24	1	Canine
R04	13	Human
C14	1	Canine
R02	31	Human

図 1. *C. difficile* の PCR リボタイピングの系統樹解析

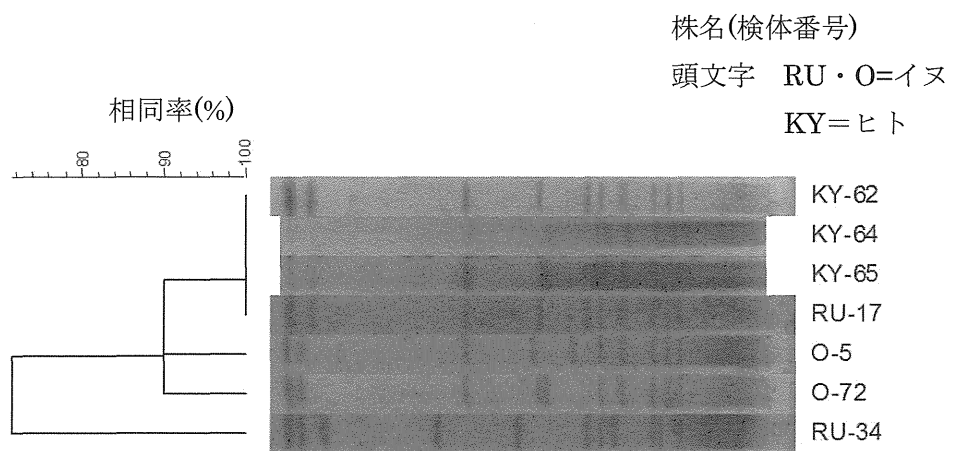


図 2. *C. difficile* リボタイプ C4 の PFGE 解析結果

表 2. *rmtB* 遺伝子陽性株の性状

菌株名	MIC 値 (mg/L)												
	GM	AMK	NEO	APR	KM	DSM	ABPC	CEZ	CEX	CPDX	OTC	CP	ERFX
RGU-60	>256	>256	>256	16	>128	>128	>128	4	8	0.5	>128	>128	0.5
RGU-78	>256	>256	8	16	>128	>128	>128	4	8	0.5	2	>128	<0.125

GM, ゲンタマイシン、AMK, アミカシン、NEO, ネオマイシン、APR, アプラマイシン、KM, カナマイシン、DSM, ジヒドロストレプトマイシン、ABPC, アンピシリン、CEZ, セファゾリン、CEX, セファレキシム、CPDX, セフトロキム、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

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 26 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、昨年度に開発したプラスミド総合解析ツール(GPAT)を改良した。具体的には、quality trimmingや配列アセンブリでより多くの解析アルゴリズムを使えるようにし、更に、使い勝手の向上にも取り組んだ。これらの改良により GPAT による解析件数が飛躍的に増加したため、過去の解析結果に容易にアクセスできるデータ管理機能を追加する事が必要となった。データ管理機能はある程度までは実装できたもののさらなる改良が必要である。現在 GPAT は、計算能力の都合上、感染症研究所イントラネット内でのみ公開している。今後は増え続ける解析データをより容易に管理できる仕組みを実装し、Plasmid 配列全体の遺伝子水平伝達を過去・現在・地域に渡り俯瞰的に眺めることができるシステムへと発展させる必要がある。

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、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を行った 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

ではユーザーの選択により skewer または fastq-mcf による処理の後 in house perl script で更に詳細なトリミングを行う。Genome subtract は bwa, samtools, Hydra および in house perl スクリプトを組み合わせた独自パイプラインを用いる。Assemble には A5_miseq, A5 assembler, Spades, の他、platanus と price を組み合わせた独自パイプライン (P1Pr) を選択することが出来る。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。

結果の概要 (quality trimming 後のリード数、アセンブル後のコンティグ長、コンティグ数、GC 含量、予測される遺伝子数、薬剤耐性遺伝子、Inc type など) は解析トップページの overview 欄で確認することが出来る。

Plasmid データベースは平成 24 年度の plast システム構築時に作成した plasmid データ抽出法を発展させ、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 日時点のデータをもちいている。

GPAT は MiSeq のシークエン্স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、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。

これらの努力により、GPAT による解析の利便性は劇的に向上し、少数の試験的ユー

ザーのみにより今年度中に通算 1,700 以上の解析が GPAT を使って行われ、一人のユーザーが数百の解析結果を保つケースも現れた。このような多くのデータの扱いを容易にするために、本年度は GPAT に結果リスト表示機能等、データ取り扱い支援機能を追加したものの、利便性向上のためには更なる改良が必要である。

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を解析するためのソフトウェア iPAT (inter Plasmid Analyzing Tool) を平成 25 年度に開発した。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を行う。

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 を用いて解析すると、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 を持つ plasmid 遺伝子を読み込み、iPAT を用いてネットワーク解析を行ったところ、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 に入力してゆかなければならない。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」の過程を自動化できるようにする予定である。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、誰しものが使用でき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、所内イントラネット限定公開した GPAT を改良し、通算 1,700 以上の解析を行った。GPAT は MiSeq による plasmid のシーケンシング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、1,700 以上の解析実績を積んだ。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

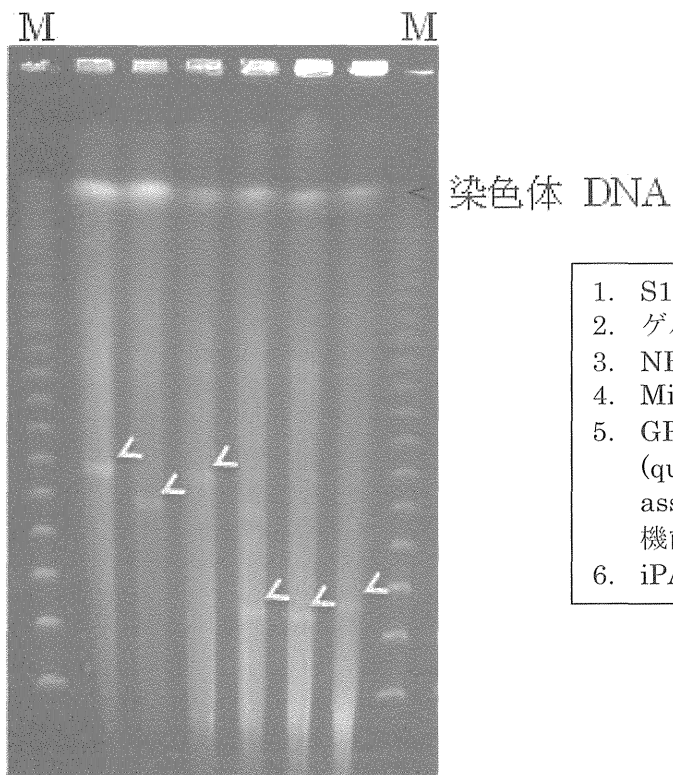
(論文発表)

なし

(学会発表)

第 54 回 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) (ポスター発表 Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda) Plasmidome Community Network Analysis For Antimicrobial Resistance.

2014 年日本細菌学会総会 (ポスター発表 2P-089 山下明史、関塚剛史、黒田誠) Plasmidome network analysis.



1. S1-PFGE
2. ゲル回収
3. NEXTERA XT kit
4. MiSeq 解読
5. GPAT による解析
(quality trimming, de novo assembly, ORF 抽出、遺伝子機能解析など)
6. iPAT による解析

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 (黄色矢頭) を示す。

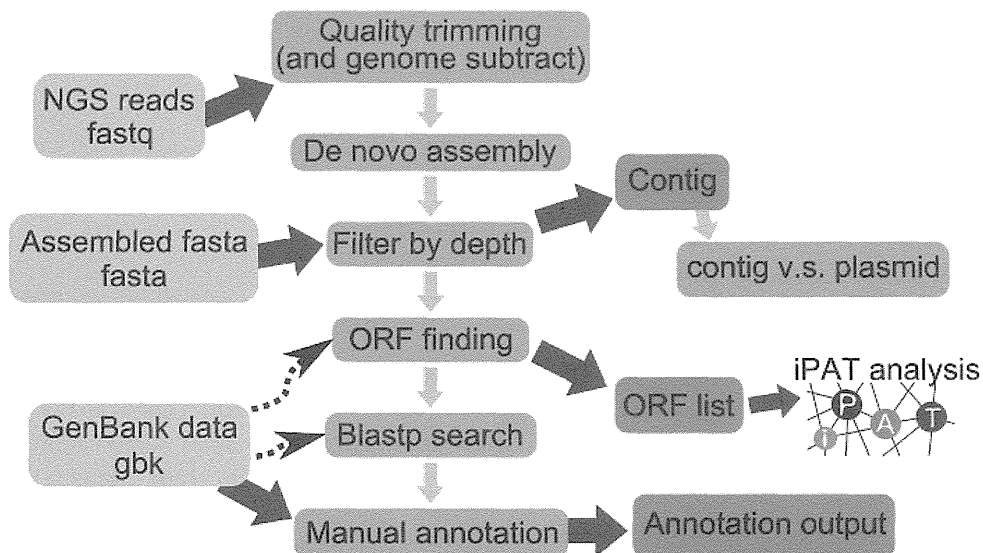


図2 GPAT (Global Plasmidome Analyzing Tool) による plasmid 解析のワークフロー。Quality trimming には skewer または fastq-mcf の後 in house perl スクリプトによる詳細なトリミングを行う。Genome subtract には bwa, samtools, Hydra および in house perl スクリプトを用いる。Assemble には A5_miseq / A5 / spades / P1Pr が選択可能である。ORF 推定には prodigal, gmhmm_heuristic および gmhmm が選択可能である。

GPAT: V001-b

http://naruto/cgi-bin/gpat/showStatus.cgi?ID=...

project name: [redacted]

Collection: [redacted]
 Organism: Escherichia coli, Host: [redacted]
 plasmid size: 110kb, Drug resistance

Upload
 See GPAT change log

Current group: [redacted] Show list Go to another group --- groups ---
 ID: [redacted] (2015-01-19-12:23) show

Overview

Total reads: 117,311
 Quality trimming: 91,001 (77.6%)
 Assembly: 9 contigs
 Length: 1,049-41,350 bp
 GC: 50.9 %
 Total base: 111,136 bp
 N50: 26,645 bp
 Number of genes: 137
 Detected Inc types: Fil, FICF, FIBF

Detected AR genes

id	cov	Detected AR genes	Reference
100	100	AAC(3)-II	41056930
100	100	aminoglycoside 3'-phosphotransferase	17158058
100	100	extended-spectrum beta-lactamase	DQ885477
99	100	tetracycline efflux protein TetA tetracycline resistance protein, class A protein	31795168

Processing Status

Process	Status	Exec
Trimming	Finished	<input type="checkbox"/>
Assemble	Finished	<input type="checkbox"/>
Filter by depth	Finished	<input type="checkbox"/>
Whole Plasmid similarity	Not Analyzed	<input type="checkbox"/>
BLASTN search (Inc type)	Finished	<input type="checkbox"/>
ORF finding	Finished	<input type="checkbox"/>
Blastp Search (plasmid)	Not Analyzed	<input type="checkbox"/>
Blastp Search (cog)	Not Analyzed	<input type="checkbox"/>
Blastp Search (ardb)	Finished	<input type="checkbox"/>
Blastp Search (nr)	Not Analyzed	<input type="checkbox"/>

Run Process

go to Annotation Editor
 go to inter Plasmid Analyzing Tool (iPAT)
 See your project list

About COG

The cog database was downloaded from NCBI cog database (Mar. 2, 2003 version). We subsequently added class B metallo-beta-lactamase genes obtained from The Metallo-Beta-Lactamase Engineering Database, because the cog does not contain the class B metallo-beta-lactamase genes.

About ARDB (ARDB + CARD)

The ARDB used in this service is made of CARD database plus ARDB database. The original ARDB data is a list of accession number of antibiotic resistance genes, and the sequences were extracted from NCBI NR database by us on Jun. 4th, 2013. Note that we do not hold some of the genes in the original ARDB because of the update of NCBI database that make some accession numbers being expired. This database was updated on Sun Jan 18 23:55:10 JST 2015 according to the update of CARD database.

Prefix Parameter Settings

Recommended settings

Advanced settings --

Trimming params

5' trim length:	5
Trimming method:	skewer
Minimum average quality threshold:	15
Trim lower than this q-value:	0 => 15
Minimum remaining sequence length:	80
Maximum length:	0
Remove bacterial genomes:	OFF

Assembler settings

Select an assembler program: A5 miseq
 Cutoff depth: 0
 Cutoff depth=0 means automatic cutoff

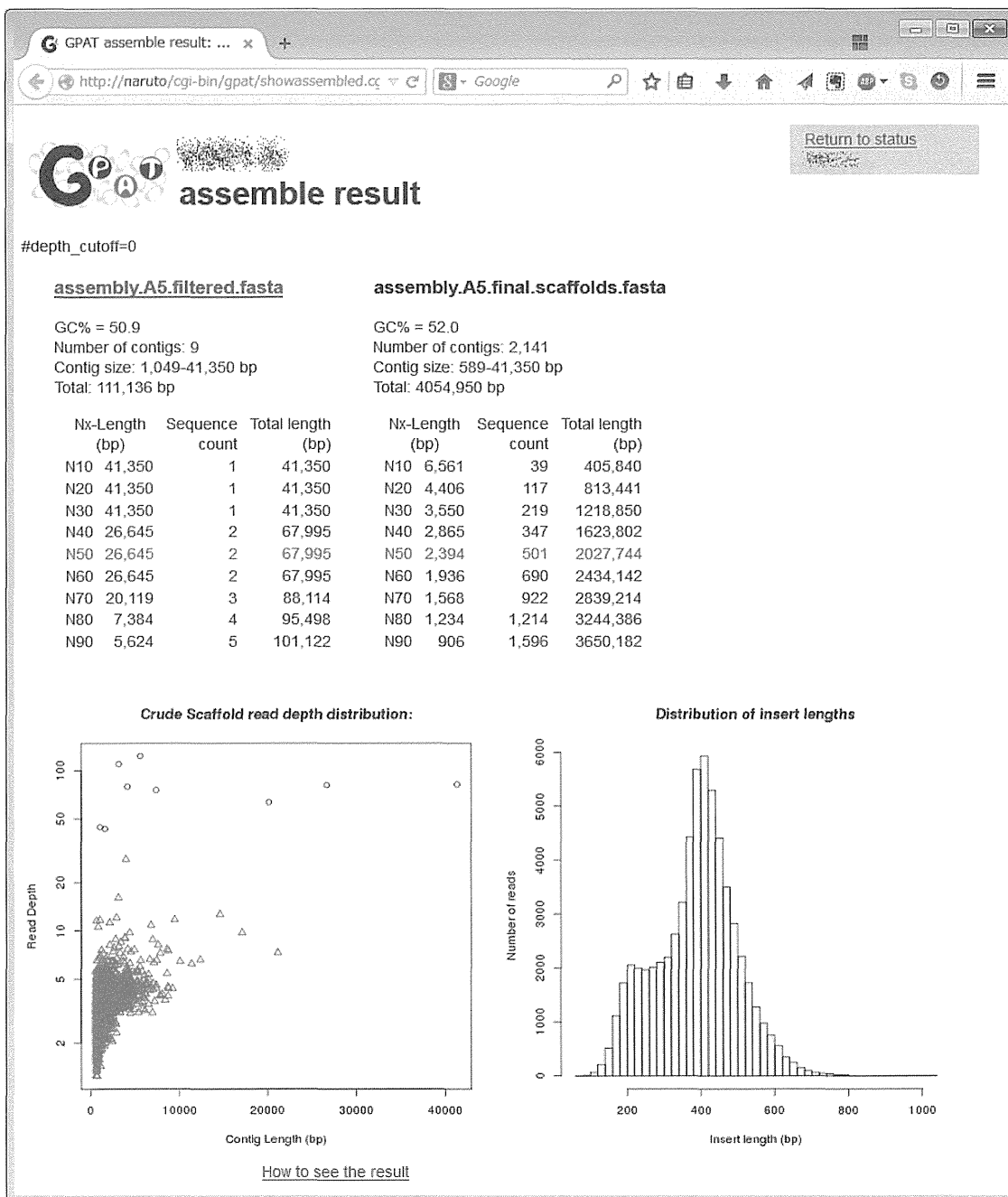
ORF finding settings

ORF finding mode:	single
Target sequence type:	proteidal

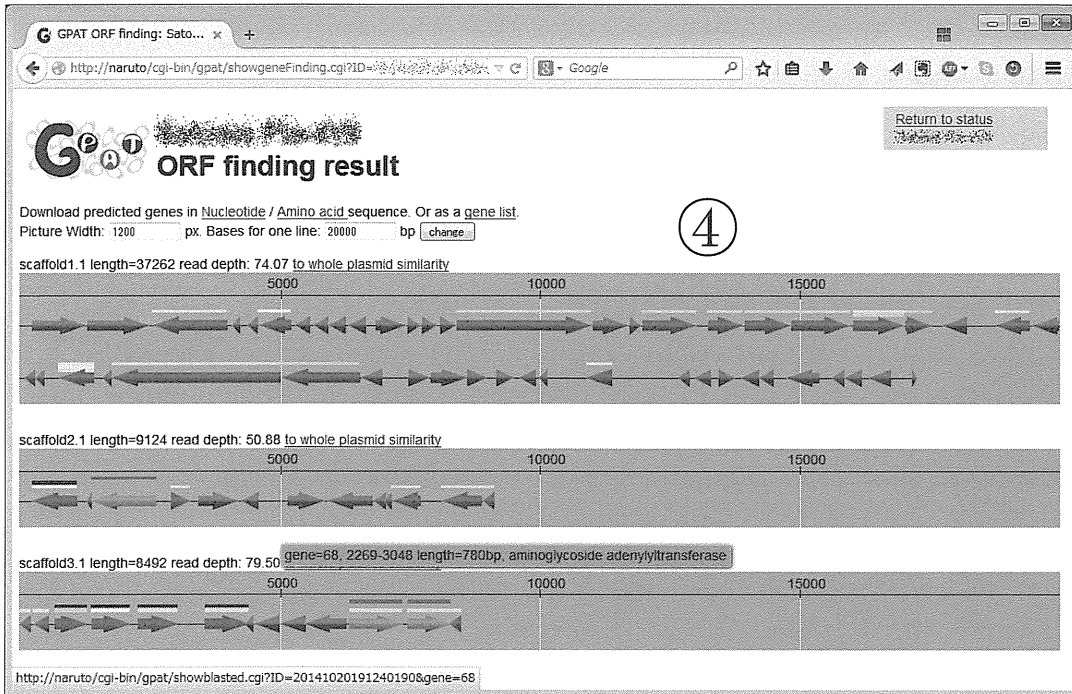
BLAST search settings

Gapped search:	ON
Filter:	OFF
E-value:	1e-10

Collection: Year: Month: Date: Organism: Escherichia coli Host: [redacted]
 Place: [redacted] Project Name: [redacted]
 Note: [redacted]; plasmid size:110kb, Drug resistance Change Project Name
 Your files: [redacted]_L001_R1_001.fastq.gz [redacted]_L001_R2_001.fastq.gz Download
 Show/Hide analysis log
 Reset this analysis Dispose this data



③



GPAT ORF finding: Sato... x

http://naruto/cgi-bin/gpat/showgeneFinding.cgi?ID=...

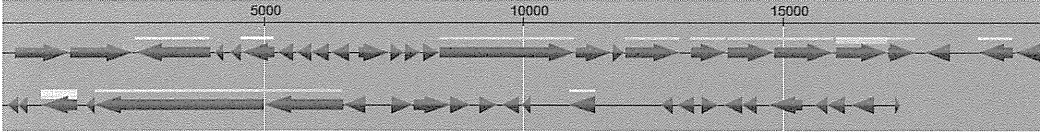
ORF finding result

Return to status

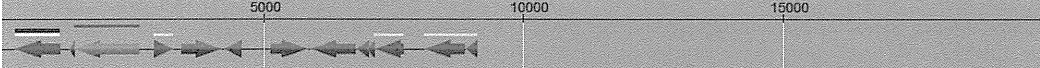
Download predicted genes in [Nucleotide](#) / [Amino acid sequence](#). Or as a [gene list](#).

Picture Width: 1200 px. Bases for one line: 20000 bp [change](#)

scaffold1.1 length=37262 read depth: 74.07 to whole plasmid similarity

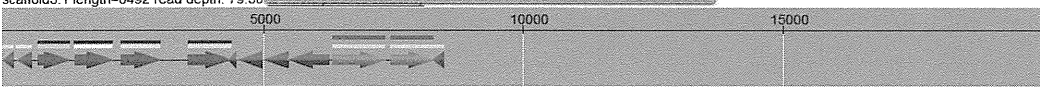


scaffold2.1 length=9124 read depth: 50.88 to whole plasmid similarity



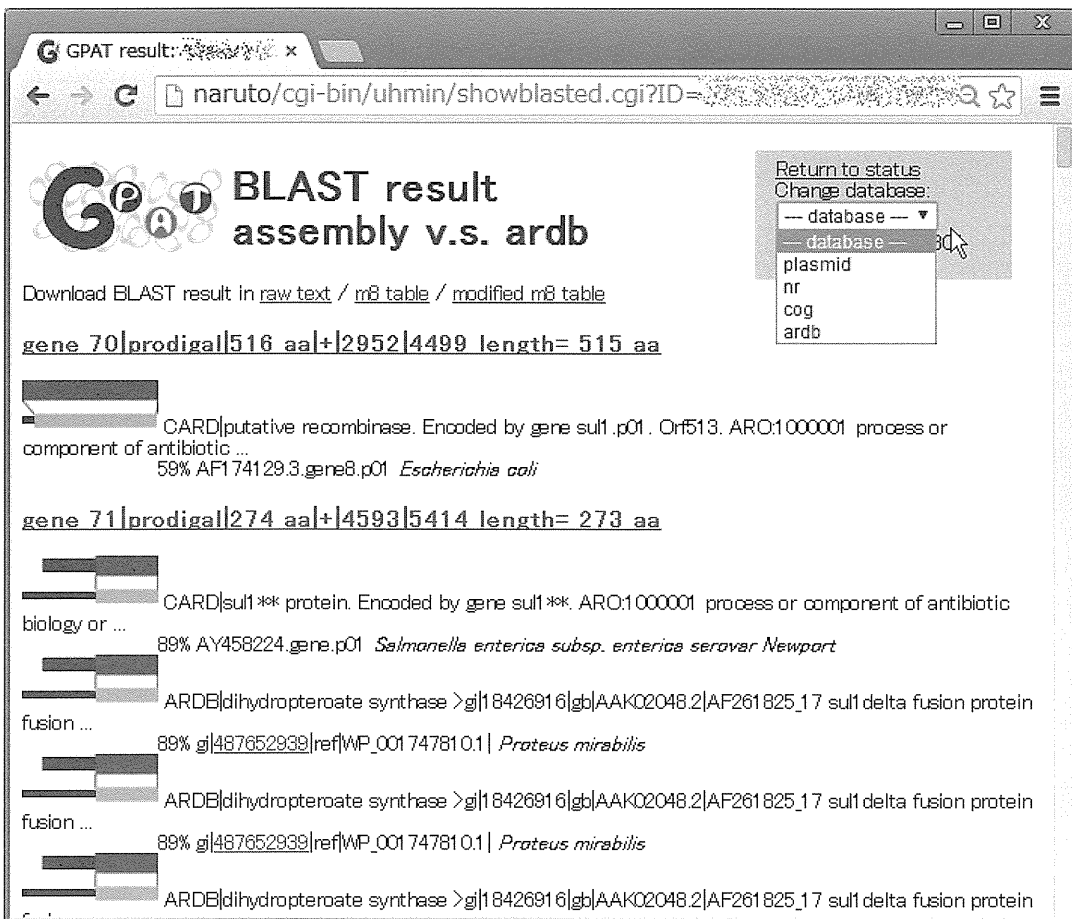
scaffold3.1 length=8492 read depth: 79.50

gene=68, 2269-3048 length=780bp, aminoglycoside adenyltransferase



http://naruto/cgi-bin/gpat/showblasted.cgi?ID=20141020191240190&gene=68

④



GPAT result: ... x


naruto/cgi-bin/uhmin/showblasted.cgi?ID=...

BLAST result assembly v.s. ardb

Return to status
Change database:
-- database --
-- database --
plasmid
nr
cog
ardb


Download BLAST result in [raw text](#) / [m8 table](#) / [modified m8 table](#)

gene 70|prodigal|516 aa|+|2952|4499 length= 515 aa




CARD|putative recombinase. Encoded by gene sul1.p01. Orf513. ARO:1000001 process or component of antibiotic ...
59% AF174129.3.gene8.p01 *Escherichia coli*


gene 71|prodigal|274 aa|+|4593|5414 length= 273 aa




CARD|sul1** protein. Encoded by gene sul1**. ARO:1000001 process or component of antibiotic biology or ...
89% AY458224.gene.p01 *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport*



ARDB|dihydropteroate synthase >gi|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825_17 sul1 delta fusion protein fusion ...
89% gi|487652939|ref|WP_001747810.1| *Prateus mirabilis*



ARDB|dihydropteroate synthase >gi|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825_17 sul1 delta fusion protein fusion ...
89% gi|487652939|ref|WP_001747810.1| *Prateus mirabilis*



ARDB|dihydropteroate synthase >gi|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825_17 sul1 delta fusion protein

5

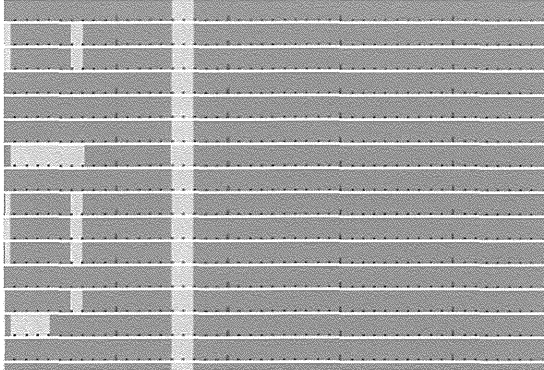
6

GPAT result: assembly v.s. plasmid

Return to status
Inverse mode
Show All Hide All

Download raw blast result or tabular format
go to plasmid view

scaffold1.1|size48513 length= 48513 bp. Average depth: 367.44 to ORF Show this Hide this




96.0% * JN883043|pSH11_166|165791|circular| Salmonella enterica subsp. e
 92.4% * AB277724|pP91278|131520|circular| Photobacterium damsela subsp
 92.4% * AB277723|pP99-018|150157|circular| Photobacterium damsela sub
 96.0% * FJ621586|pE-H1-1|48105|circular| Escherichia coli strain HH plasmid
 96.0% * FJ621587|pAM04528|158213|circular| Salmonella enterica strain AM
 96.0% * CP000604|pSN254|176473|circular| Salmonella enterica subsp. enter
 82.3% * JN687470|pMR0211|178277|circular| Providencia stuartii plasmid pM
 96.0% * HQ023862|pUMN188|160573|circular| Escherichia coli UMN188 plas
 92.7% * CP000603|pP1202|182913|circular| Yersinia pestis biovar Orienta
 92.6% * J0824049|pTC2|180184|circular| Providencia stuartii plasmid pTC2,
 92.7% * CP003225|pKPH53|105974|circular| Klebsiella pneumoniae subsp. pn
 96.0% * HQ023863|pAPEC1990_61|161081|circular| Escherichia coli strain AF
 93.4% * JG010984|pR55|170810|circular| Klebsiella pneumoniae plasmid pR5
 88.3% * JN157804|pNDM-KN|162746|circular| Klebsiella pneumoniae strain K
 85.5% * JK141473|pR148|165906|circular| Aeromonas hydrophila plasmid pR1

GPAT result tabular for: x

Project: scaffold1.1|size48513, length = 48513
 Query: scaffold1.1|size48513, length = 178277
 Subject: JN687470|pMR0211|178277|circular, length = 178277
 Annotata: Providencia stuartii plasmid pMR0211, complete sequence.

return to whole plasmid search

Identity	Hit Length	Mismatch	Gap	Query From	To	Subject From	To	E-value	Score
100	88	0	0	1	88	127317	127230	0.0	174.0
96	476	19	0	91	566	108535	108060	0.0	793.0
99	4891	2	0	7219	12109	158119	163009	0.0	9680.0
99	2811	2	0	12104	14914	162984	165794	0.0	5557.0
100	7563	0	0	16869	24431	165790	173352	0.0	14990.0
100	20	0	0	18116	18135	79462	79443	0.0	40.1
99	4931	1	0	24427	29357	173347	178277	0.0	9767.0
100	21	0	0	24843	24863	53920	53900	0.0	42.1
99	19156	2	0	29358	48513	1	19156	0.0	87960.0
100	19	0	0	35065	35063	86499	86481	0.0	88.2
100	19	0	0	45479	45497	83086	83088	0.0	88.2
100	64	0	0	48450	48513	21155	21082	0.0	127.0



>JN687470|pMR0211|178277|circular| Providencia stuartii plasmid pMR0211,
 complete sequence.
 Length = 178277

naruto/cgi-bin/uhmin/showwholeblasted.cgi?ID=

7

8

GPAT result

http://naruto/cgi-bin/gpat/showmcbast.cgi?ID=...

BLAST result: assembly v.s. incdb

Download BLAST result in [raw text](#) / [m8 table](#) / [modified m8 table](#)

Detected Inc types: N (scaffold2.1)

scaffold2.1 length= 9124 nt

99% N_group,IncN

BLASTN 2.2.18 [Mar-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Query= scaffold2.1 / [go to top](#)
(37,262 letters)

Database: PBRT-inc-seq_ver2.fa
25 sequences; 11,253 total letters

Searching.....done

**** No hits found ****

BLASTN 2.2.18 [Mar-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Query= scaffold2.1 / [go to top](#)
(9124 letters)

Inc type	<i>in silico</i> PCR typing in GPAT	PBRT kit: PCR-based replication typing Carattoli A, Barlin A, Villa L, et al. Identification of plasmids by PCR-based repicon typing. <i>J Microbiol Methods</i> . 2005;63:213-28.
A/C	O	O
B/O	O	O
F/A	O	O
F/B	O	O
F/B-M	O	O
F/C	O	O
F/I	O	O
F/I-K	O	O
F/I-S	O	O
H/1	O	O
H/2	O	O
H/B-M	O	O
I/1	O	O
I/2	X	O
K	O	O
L/M	O	O
N	O	O
P	O	O
R	O	O
T	O	O
U	O	O
W	O	O
X/1	O	O
X/2	O	O
Y	O	O

GPAT

http://naruto/cgi-bin/gpat/showStatus.cgi?group=237

List of

ID	Gene Name	Project Name	System ID	Program	Inc	Size	Host	Host Strain	Clarity	Protein	Protein	Size	Size	Protein	Protein	Inc type	Hit genes
1	2247114
2	2247115
3	2247116
4	2247117
5	2247118
6	2247119
7	2247120
8	2247121

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。⑦ Inc タイプの推定結果。⑧解析結果のリスト表示。

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 26 年度分担研究報告書

分担課題名：JANIS と JVARМ の連携

分担研究者	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	川西路子	動物医薬品検査所	検査第二部
研究協力者	比企基高	動物医薬品検査所	検査第二部

研究要旨

わが国における薬剤耐性菌のモニタリング/サーベイランスシステムである農林水産省の食品媒介性病原体細菌の薬剤耐性モニタリング事業（JVARМ）において蓄積されたデータを、厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）事業のデータと比較可能な形式でデータベース化したうえで再集計を行った。JVARМ と JANIS では薬剤感受性を測定している抗菌薬の種類が異なるため、同系統の抗菌薬で代替したうえで、2003 年から 2013 年までの薬剤耐性率の推移を比較した。JANIS データでみられる大腸菌のセファロスポリン、フルオロキノロンの顕著な耐性化は JVARМ データでは認められなかった。テトラサイクリン系やクロラムフェニコールについては肉用鶏や豚で、過去 10 年間継続的に JANIS データよりも高い耐性率を示していたが、JANIS データ、JVARМ データともに耐性率の明らかな上昇または低下の傾向は認められなかった。今後継続的に JANIS データと JVARМ データを比較するにあたっては、薬剤感受性を測定する抗菌薬の共有が重要と考えられた。

A. 研究目的

我が国では、農林水産省が食品媒介性病原体細菌の薬剤耐性モニタリング事業（JVARМ）を 1999 年より開始している。一方、臨床分離株の薬剤耐性の調査として厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）事業が 2000 年より開始されている。現在、これらの結果は独立した形で公表されているため、直接の比較を実施しにくい。そこで、昨年度、JANIS 事業のシステムを JVARМ にも適用し、JANIS-JVARМ のデータを経時的に比較可能とする体制を整備した。今年度は、JVARМ の実データを昨年度構築したデータベースに取り込み、現在 JANIS 事業で実施している集計方法に準じて再集計することで、JANIS と JVARМ、それぞれの薬剤耐性率を直接比較した。

B. 研究方法

1. JVARМ データの格納

肉用牛、豚、肉用鶏、採卵鶏由来大腸菌 2003 年～2013 年分の JVARМ データをエク

セル形式で受理し、昨年度構築した JVARМ データベースに格納した。

2. 主要抗菌薬における薬剤耐性の比較

JVARМ と JANIS における薬剤耐性率の年次推移を比較した。JVARМ データについては測定された MIC 値から CLSI2007 のブレイクポイントを用いて感性（S）、中等度耐性（I）、耐性（R）を判定した。CLSI2007 の基準がない抗菌薬については、同じく CLSI が定めている動物用抗菌薬の基準である M31-A3/VET01-S2 を用いた。また JVARМ では 2010 年以降、測定抗菌薬が一部変更されたため、同系統の抗菌薬を用いて年次推移とした。具体的には、セフトオフルからセフトキシム（広域セファロスポリン）とエンロフロキサシンとシプロフロキサシン（フルオロキノロン）である。

JANIS の 2007 年以降の薬剤耐性率は検査部門公開情報年報の薬剤耐性率を使用した。検査部門年報は CLSI2007 のブレイクポイントを用いて SIR を判定している。一方、2006 年以前の公開情報年報は参加

医療機関が報告した SIR に基づいて集計されており、医療機関によっては中等度耐性以上 (I or R) の形式で報告している場合もあるため、本研究における耐性を R と I or R と定義した。また、JANIS 公開情報では集計されていない抗菌薬については、2013 年の耐性率のみ、2013 年 1 月から 2013 年 9 月の JANIS データより医療機関が報告した SIR を抽出して集計した。

JANIS と JVARМ で共通した抗菌薬が無い場合は、同系統の抗菌薬を比較した。フルオロキノロン系について、JANIS ではレボフロキサシンの耐性率を示し、一方、JVARМ ではエンロフロキサシンとシプロフロキサシンを示した。JVARМ でのテトラサイクリンについては JANIS のミノサイクリンのデータを用いた。

表 1、表 2 に JANIS と JVARМ において測定されている抗菌薬および SIR 判定基準を示す。

C. 結果

1. JVARМ データ概要

肉用牛、豚、肉用鶏、採卵鶏由来大腸菌、計 6798 株のデータがデータベースに格納された。畜種の内訳は、肉用牛が最も多く 34% をしめ、その他の畜種はいずれも 22% であった。年別、畜種別の株数を図 1 に示す。畜種の割合は期間を通じて変化はなかったが、菌株数は 2008 年以降増加していた。2003-2007 年については毎年各畜種 100 株前後であったが、2008 年以降は 200 株前後となっている。

2. 主要抗菌薬における薬剤耐性の比較

図 2~図 7 に JANIS と JVARМ データに基づく、大腸菌おける各抗菌薬に対する耐性率の推移を示す。

図 2~図 4 は、 β -ラクタム剤に対する耐性率の推移である。図 2 のアンピシリンはペニシリン系抗菌薬であり、JANIS では 2013 年の耐性率が約 50% であるが、2003 年は約 30% であり、過去 10 年間で明らかな増加傾向が認められた。一方肉用鶏由来株は 2013 年の耐性率が約 50% と JANIS 同様高い耐性率を示しているが、10 年前からすでに 40% を超える耐性率を示しており、過去 10 年間にわたり高い耐性率を維持していたと思われる。図 3 と図 4 はそれ

ぞれ、一般的には第 1 世代と第 3 世代と呼ばれるセファロsporin 系抗菌薬である、セファゾリンとセフトオフル/セフトキシムの耐性率を示す。JANIS ではいずれの抗菌薬も過去 10 年間に著明かつ継続的な耐性率の上昇を認めた。一方、肉用鶏由来株のセファゾリン耐性は、2011 までは 20% 前後であったが、2012 年に急落し、2013 年は約 5% まで低下している。同じく肉用鶏のセフトオフル耐性とセフトキシム耐性も、同様の傾向を示しているが、2009 年まではセフトオフル、2010 年以降はセフトキシムで測定されており、測定抗菌薬の切り替えと同じ 2010 年に耐性率が急落している。実際の耐性率の低下よりも抗菌薬の切り替えを反映していると考えられた。

図 5 はフルオロキノロン耐性率の推移である。JANIS ではセファロsporin 系同様、過去 10 年間に耐性率が顕著に上昇しており、2003 年には約 10% であった耐性率が 2013 年には 30% を超えている。一方、JVARМ データではいずれの畜種においても過去 10 年間に耐性率の増加傾向は認めていない。

図 6 はクロラムフェニコール耐性率の推移である。ヒト臨床では現在クロラムフェニコールの使用は限定的であり、薬剤感受性試験実施数は少なく、2007 年以降は公開情報での集計はしていない。ただ、JANIS データベース上での 2013 年の耐性率は約 5% であり、10 年間ほぼ変化ないと思われる。JVARМ では、豚由来株での耐性率が 15-25% と高く、過去 10 年間同様の耐性率で推移していた。

図 7 はテトラサイクリン/ミノサイクリンの耐性率である。JVARМ、JANIS 共に 10 年間継続したデータは得られていないが、ヒトでのミノサイクリン耐性率は 10% 以下であるのに対し、豚、肉用鶏由来株のテトラサイクリン耐性率は 50% を超えていた。牛、採卵鶏由来株も 20-30% のテトラサイクリン耐性率であった。

D. 考察

近年問題となっている大腸菌のセファロsporin、フルオロキノロン系抗菌薬に対する継続的かつ著明な耐性化は、JANIS ヒト臨床分離株では明確に認めたが、

JVARM のいずれの畜種由来株においても認められなかった。肉用鶏において 2000 年代後半にセファロスポリン系抗菌薬耐性が進行していたが、その後 2010 年代に入り、著明に低下していた。また、 β -ラクタム剤やフルオロキノロン系抗菌薬など、現在ヒトの臨床分野での使用頻度が高い抗菌薬については、JANIS ヒト臨床分離株の耐性率が JVARM の動物由来株よりも高かった。一方、クロラムフェニコールやテトラサイクリン系など、以前はヒト臨床においても使用されていたが、現在は使用頻度が低いと思われる抗菌薬については、JVARM の動物由来株の耐性率が高い傾向が見られた。

家畜の薬剤耐性菌が食品を介してヒトに広まっていったと仮定した場合、家畜由来株での耐性率が先行し、そのあとをヒト臨床分離株の耐性率が追う形での相関がみられることが想定される。しかし、今回の研究において、そのような相関を認めた抗菌薬耐性は無かった。もう一つの可能性は、家畜由来株の薬剤耐性菌がなんらかの契機にヒト臨床株に入り込み、ヒトでのみ急速に広まった可能性である。これについては、耐性遺伝子の種類など、分子疫学的アプローチが必要になる。

ヒト臨床株におけるセファロスポリン系抗菌薬の耐性は、これまでの研究により CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の蔓延によるものであると考えられている。さらに、フルオロキノロンに耐性を示す CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌 O25-ST131 という特定のクローンが世界的に流行し、大腸菌の多剤耐性化に寄与していることも知られている。一方、JVARM の肉用鶏における耐性率の増加と減少については、鶏ブロイラーにおけるセフトオフルの適用外使用と 2012 年以降のその自主的規制の影響が考えられた。さらに、家畜由来株ではヒト臨床株に比較し、CTX-M 型 ESBL 産生菌の割合が低く、AmpC β -ラクタマーゼ産生菌の割合が多いことが知られている。さらに、フルオロキノロン耐性が JVARM データでは増加していないことは、大腸菌 O25-ST131 が家畜由来大腸菌においてはヒト臨床株に比べ少ないことを示唆する。ヒト臨床株と家畜由来株では

耐性機序が異なる可能性があり、これは JANIS や JVARM で現在集計している耐性率のみでは把握できない。今後は、家畜由来株とヒト臨床株の耐性菌の相関関係を検討するうえでは、同時期に分離された大腸菌の耐性遺伝子や分離株のタイピング解析を行うことが必要と思われる。

本研究において、薬剤耐性率の比較を行う上で最も問題となったのは、JANIS と JVARM における測定抗菌薬の違いであった。JANIS データは医療機関で測定されている薬剤感受性データを収集している。医療機関において感受性試験が実施される抗菌薬は、臨床的な必要性により決まるため、研究目的での追加が不可能である。特に動物用抗菌薬の薬剤感受性試験については今後も比較不可能である。一方、JVARM では実際に菌株を収集し、研究目的で薬剤感受性試験を実施しているため、追加等が可能である。今後は、比較対象とする抗菌薬を事前に調整する事により、より有用性の高い比較結果が得られると思われる。

家畜の薬剤耐性菌とヒト臨床株の薬剤耐性菌の相関を検討するうえでは、クロラムフェニコールやテトラサイクリンなど、過去 10 年にわたって、その耐性率が両者で大きな変化が見られない場合は、評価が難しい。その点では、大腸菌のセファロスポリン耐性やフルオロキノロン耐性は過去 10 年間でヒト臨床株の耐性率の上昇が顕著であり、解析対象としては得られる知見が多いと思われる。さらに、カルバペネム耐性大腸菌については、現在家畜由来株、ヒト臨床分離株ともに耐性率が極めて低いものの、ヒト臨床株において増加している可能性があり、その臨床的な重要性からも今後両者で注視していく必要がある。

E. 結論

10 年間のみの比較では、動物由来株とヒト臨床分離株との耐性率推移に明らかな相関は認めなかった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

表1 JANIS JVARMにおいて薬剤感受性試験を実施、もしくは集計している抗菌薬

JVARM 測定抗菌薬		JVARM		JANIS		JANIS 345, 381株の <i>E. coli</i> のうち MIC 測定株割合
		2003-2009	2010-2013	2003-2006	2007-	
1216	ABPC (アンピシリン)	○	○	○	○	64.19%
1537	CEZ (セファゾリン)	○	○	○	○	67.44%
1636	CTX (セフトキシム)		○	○	○	54.50%
1801	KM (カナマイシン)	○	○	×	×	0.07%
1821	GM (ゲンタマイシン)	○	○	○	△	64.16%
2101	TC (テトラサイクリン)		○	×	×	0% (MIN066.99%)
2201	CP (クロラムフェニコール)	○	○	○	△	5.28%
2401	NA (ナリジクス酸)	○	○	-	-	ND
2521	CPFX (シプロフロキサシン)	○	○	○	△	33.05%(LVFX65.52%)
2726	ST (スルファメトキサゾール/トリメトプリム)			○	△	54.36%
A002	BCM (ピコザマイシン)	○		×	×	
A003	CTF (セフトチオフル)	○		×	×	
A005	DSM (ジヒドロストレプトマイシン)	○		×	×	
A006	ERFX (エンロフロキサシン)	○		×	×	
A008	TMP (トリメトプリム)	○		×	×	

抗菌薬コード		CLSI2007		M31-A3/VET01-S2		CLSI2012	
		S 基準	R 基準	S 基準	R 基準	S 基準	R 基準
1216	ABPC (アンピシリン)	8	32				
1537	CEZ (セファゾリン)	8	32			2	8
1636	CTX (セフトキシム)	8	64			1	4
1801	KM (カナマイシン)	16	64				
1821	GM (ゲンタマイシン)	4	16				
2101	TC (テトラサイクリン)	4	16				
2201	CP (クロラムフェニコール)	8	32				
2401	NA (ナリジクス酸)	16	32				
2521	CPFX (シプロフロキサシン)	1	4				
2726	ST (スルファメトキサゾール/トリメトプリム)	2/38	8/152			2/38	4/76
A002	BCM (ピコザマイシン)				128*JVARM 基準		
A003	CTF (セフトチオフル)			2	8		
A005	DSM (ジヒドロストレプトマイシン)				32*JVARM 基準		
A006	ERFX (エンロフロキサシン)			0.25	2		
A008	TMP (トリメトプリム)	4	16	8	16	8	16

表2 SIR 判定基準

図1 JVARM集計データ・年別・畜種別、2003-2013

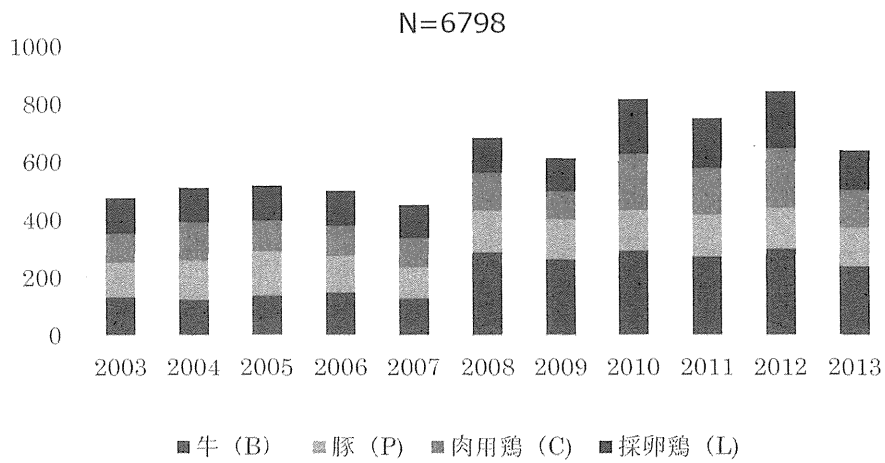


図2 大腸菌におけるアンピシリン(ABPC) 耐性菌割合

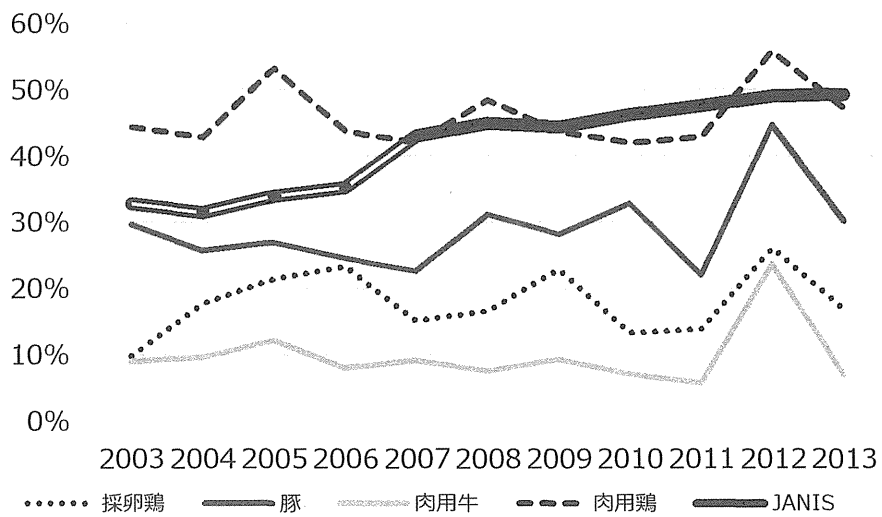


図3 大腸菌におけるセファゾリン (CEZ)耐性菌割合

