

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。

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 β 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 産生大腸菌は拡散し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。

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 *Clostridium difficile* 保有調査 及びヒト感染症由来株との比較

日本で飼育されるイヌが、比較的高い割合でトキシン A 及び B を産生する *C. difficile* を保

有していた。分離された菌株について、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる抗菌薬に耐性割合はヒト臨床由来株に比べて低い傾向であるものの、CLDM、CTRX、CPFX に対して 50%以上の株が耐性を示した。ブタ由来 *C. difficile* は TET に対して高い耐性割合を示すが、ブタでの TET の高い耐性割合は抗菌薬の使用実態を反映していると考えられている。以上のことから、イヌにおける 3 薬剤の高い耐性割合は、イヌへの抗菌薬の使用が一因と考えられる。

最も主要なリボタイプに分類された 16 株は全てトキシン A および B を保有していた。イヌにおいて広く拡散している株が、ヒトに伝播した場合にヒトに対して毒性を示す毒素を保有していたことから、イヌからヒトに伝播した際のリスクは高い。

また、イヌとヒトでリボタイプおよび PFGE 型が同一の株が同定された。今回のイヌ由来株とヒト由来株の疫学的な関連は不明であるものの、イヌとヒトが近縁な *C. difficile* を保有し、イヌとヒトの間で伝播し得ることが明らかとなった。今後、疫学的な調査を含めたイヌ由来 *C. difficile* の調査がさらに必要であることが示された。

3. 16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性大腸菌の伴侶動物保有調査

日本のイヌから分離された大腸菌において低率ではあるが、プラスミド性 16S-RMTase (*rmtB*) が同定された。16S-RMTase 保有株は他の耐性因

子と共存することが多く、問題となりやすい。今回分離された2株についても、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し、少なくとも *bla_{TM-1}* 遺伝子を保有していた。また、これら耐性遺伝子は接合伝達した。以上のことから、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及びその耐性遺伝子の拡散には注意が必要であることが示唆された。

RGU-60 株について、NEO 及び APR に対する薬剤感受性は、トランスコンジュガントに伝達しなかった。RGU-60 株の NEO、APR 耐性は *rmtB* 遺伝子以外の因子が関係している可能性がある。また、高度アミノグリコシド耐性を示し、アミノ配糖体修飾酵素の作用による耐性では説明がつかない株も存在した。これらの株については新たな 16S-RMTase の存在の可能性も含めてさらなる研究が必要である。

4. 動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

日本の伴侶動物に携わる獣医師の MRSA 保菌率は一般健常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。

疫学解析の結果から、MRSA 保菌者は陰性者に比べ、診療頭数が有意に多かった。診療頭数が多いほど、MRSA を保菌する患者と接触する確率が高まり、診療動物から獣医師へ MRSA が伝播し

たと考えられた。

E. 結論

本研究において、伴侶動物及び伴侶動物に関わるヒトの薬剤耐性菌の実態について、調査を行い、以下の成績が得られた。

1. 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。
2. 伴侶動物として飼育されているイヌからヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる可能性のある *C. difficile* が分離され、イヌとヒトの間での伝播の可能性が示された。イヌにおける *C. difficile* のヒトへの伝播リスク、制御法についてのさらなる研究が必要であることが示唆された。
3. イヌ由来大腸菌から低率ではあるが、プラスミド性 *rmtB* 遺伝子保有株が分離された。今後、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及びその耐性遺伝子の拡散について注意が必要であることが示唆された。
4. 日本の動物病院で勤務する獣医師の 12% で MRSA の保菌が認められたことから、獣医師の衛生管理に対する取り組み等が必要であることが示唆された。

伴侶動物とヒトの間での耐性菌及び耐性遺伝子の伝播の可能性は高い。今後、伴侶動物にお

いて出現・拡散する耐性菌及び耐性遺伝子のヒトへの伝播リスクについて、さらに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

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, 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, 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, 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, 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, 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, 264-268, 2012.
7. Ishihara K, Takahashi R, Andoh M, Makita K, Kamiji S, Ueno H, Muramatsu Y, Tamura Y: Effects of climatic elements on *Campylobacter* contaminate chicken products in Japan. *Epidemiol. Infect.*, 140:991-996. 2012.
8. 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.* 75: 539-541. 2013.
9. 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 blaCMY-2 gene in broad spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 10:243-249. 2013.
 10. 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. 2013.
 11. 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.* 75: 1063-1065. 2013.
 12. 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.* 19: 415-420. 2013
 13. 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. 2013.
 14. 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.* 57:684-691. 2013.
 15. 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 enteric* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emer.Infect.Dis.*, 19:823-824. 2013.
 16. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying blaCMY-2 from fecal samples of dogs in Japan. *J Med Microbiol.* 63:263-270. 2014.

17. 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.*, 76: 685-692. 2014
18. 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.*, 170: 438-441, 2014.
19. Usui M, Uchida I, Tamura Y.: Selection of macrolide-resistant *Campylobacter* in pigs treated with macrolides. *Vet. Rec.*, 175: 430, 2014.
20. Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y.: Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol.*, 5: 513, 2014.
21. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying *bla*_{CMY-2} from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 63: 263-270, 2014.
22. 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.*, 20: 243-249. 2014.
23. Sato T, Yokota SI, Ichihashi R, Miyauchi T, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Isolation of *Escherichia coli* strains with AcrAB-TolC efflux pump-associated 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
24. 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.
25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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
 32. 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.

33. 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. 施設ごとの薬剤耐性大腸菌株数と耐性率

施設名	耐性株数 (%)						
	ABPC	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%)

ABPC, アンピシリン; CEX, セファレキシン; 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 (ABPC, 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 耐性大腸菌株の性状

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)
			ABPC (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. *C. difficile* の薬剤感受性試験結果

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	≥32	0.5-8	0%	0.06-2	0%
MNZ	≥32	0.06-1	0%	<0.06-0.25	0%
CLDM	≥8	0.5-256<	90%	0.125-256<	88%
CTRX	≥64	32-128	59%	0.125-256<	85%
EM	≥8	0.5-256<	24%	<0.125-256<	84%
CPFX	≥4	4-256<	100%	0.125-64	93%
TET	≥16	0.06-32	3%	0.015-32	6%

VCM, バンコマイシン、MNZ, メトロニダゾール、CLDM, クリンダマイシン、CTRX, セフトリアキソン、EM, エリスロマイシン、CPFX, シプロフロキサシン、TET, テトラサイクリン

*CLDM、CTRX 及び TET は、CLSI 基準より、VCM、MNZ、EM 及び CPFX は、[J. Clin. Microbiol. 50: 915-921.]参照

相同率(%)

20 40 60 80 100

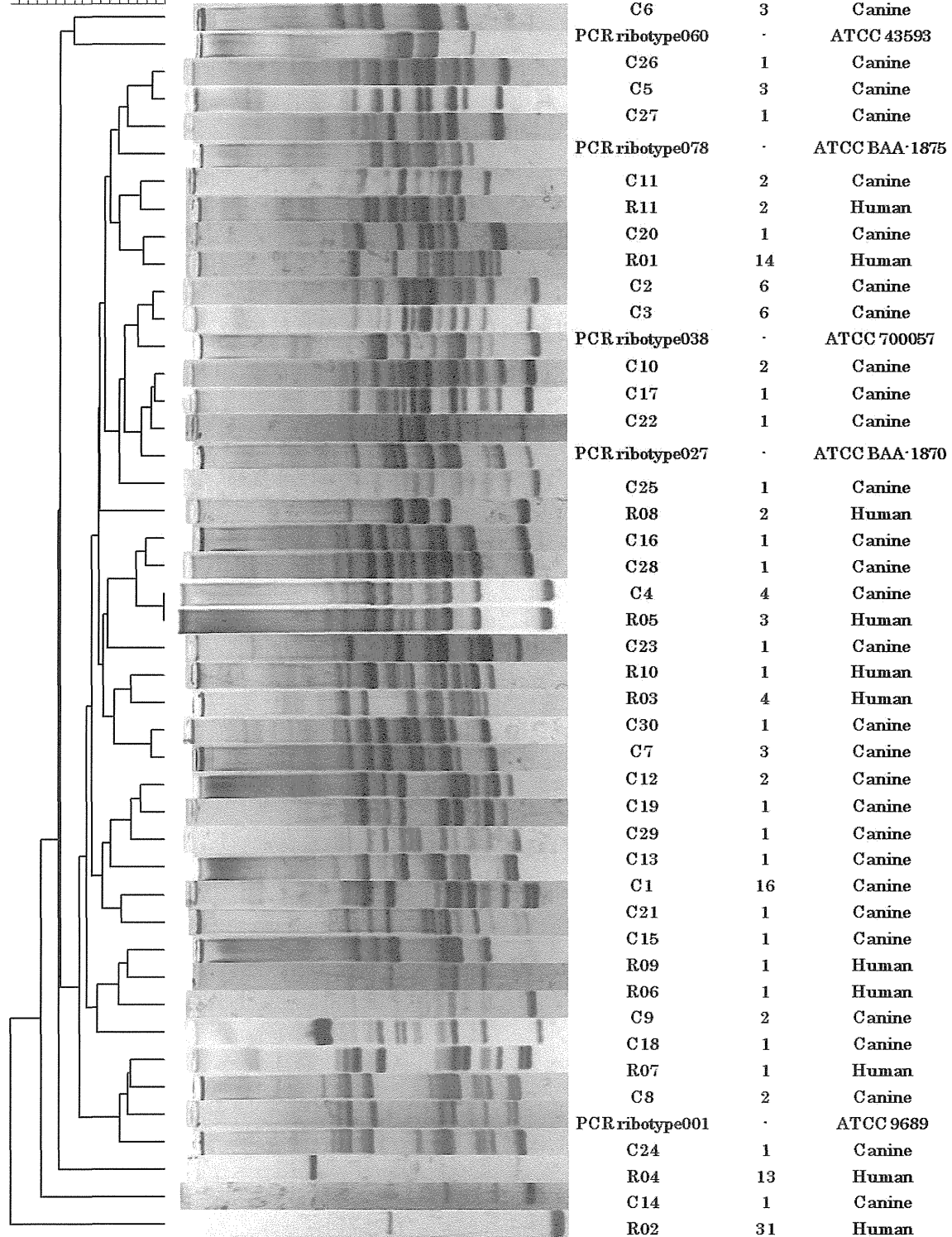


図 1. *C. difficile* の PCR リボタイピングの系統樹解析

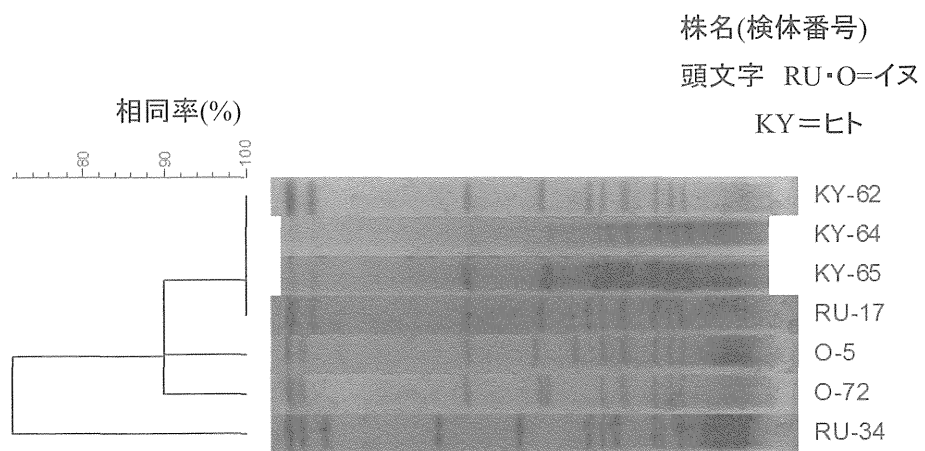


図 2. *C. difficile* リボタイプ C4 の PFGE 解析結果

表4. *rmtB* 遺伝子陽性大腸菌株の性状

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, セフトロキシム、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 24-26 年度 総合研究報告書

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

研究分担者	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類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した。次世代シーケンサーで得た解読リードを入力すると、配列のトリミング・アセンブル、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 (Global Plasmidome Analyzing Tool) を構築した。また、GPAT 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) の開発も行った。iPAT により plasmid が保有する遺伝子水平伝達を俯瞰的に眺める事が可能になった。今後、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のできるシステムへと発展させるが望まれる。

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に従った。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に係るシステム開発を行った（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、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た。

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ような仕様にした。

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 日時点のデータを用いた。

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。

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システムにした。

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、誰しもが使用できる汎用性のある環境整備が望まれる。

GPAT は MiSeq による plasmid のシーケンス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 同士の関係性をネットワーク図として図示することを可能にし、俯瞰的に関連性を理解しやすいシステムとして開発した。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より詳細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)

1. 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)
2. 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.

3. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

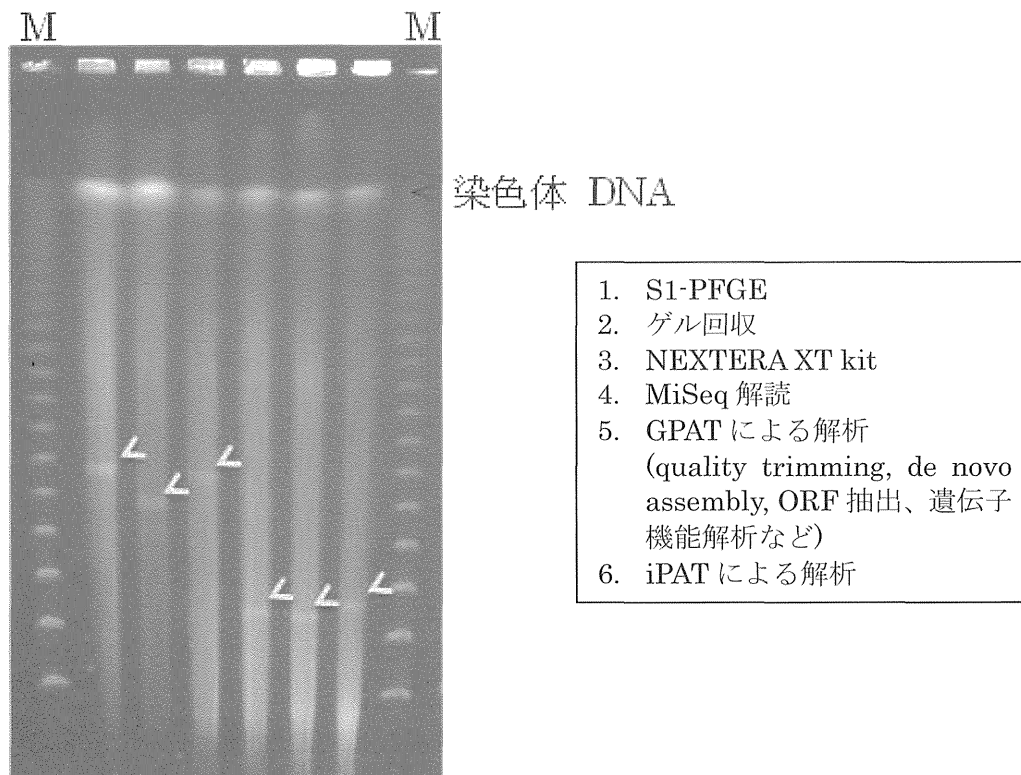


図1 プラスミド DNA の PFGE 分離から配列解読そして情報解析までの流れ。S1-PFGE 泳動図に泳動分離されたプラスミド断片（黄色矢頭）を示す。

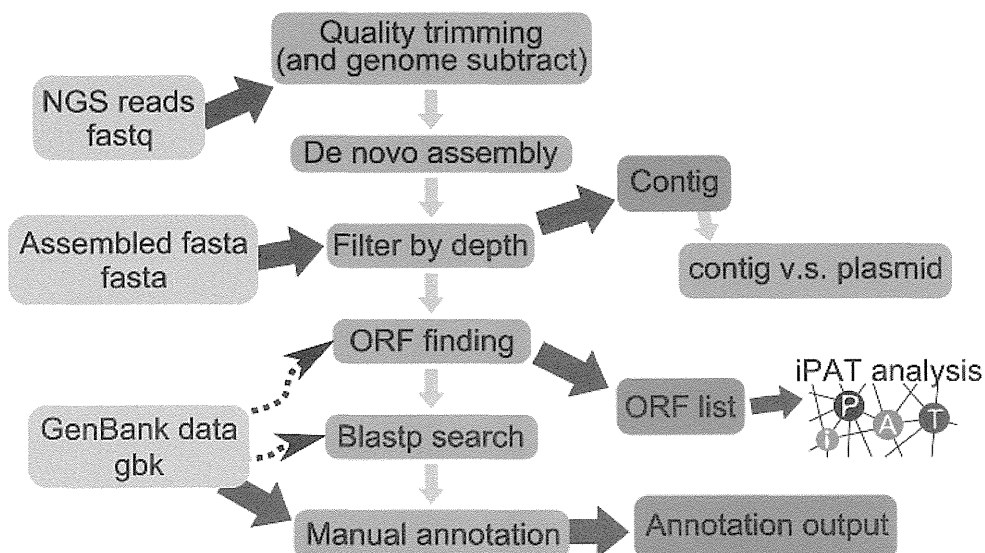


図2 GPAT (Global Plasmidome Analyzing Tool) による plasmid 解析のワークフロー。Quality trimming には skewer または fastq-mcf の後 in house perl スクリプトによる詳細なトリミングを行う。Genome subtract には bwa, samtools, Hydra および in house perl スクリプトを用いる。Assemble には A5_miseq / A5 / spades / P1Pr が選択可能である。ORF 推定には prodigal, gmhmm_heuristic および 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] show (2015/01/19-12:23) <>

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: FII, 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.

Prefixed 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:	proteinal

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](#)

