

題がある可能性があり、再解読の必要性が生じる場合があった。特に EtBr 染色 UV 照射下で回収した DNA では注意を要した。

これらの作業により、解析可能なプラスミドを確定したのち、院内感染事例の解析目的であるプラスミドの相同性について解析を行う。まずは、同じ inc type であることを確認する。次に、total base を比較する。同一のプラスミドであれば total base は±10%以内の差異であることが多いが、同一事例由来であっても、遺伝子の挿入等によりプラスミドサイズに違いが生じる可能性もある。

最後にプラスミド間の差異については iPAT を用いて塩基の相同性や共有する ORF 数を比較し相同性を評価する。GPAT iPAT を用いて、相同性の極めて高いプラスミドの抽出は可能であるが、最終的に配列が 100%一致するかどうかの評価は、別途行う必要があった。

菌株受理後、S1 PFGE を実施し、プラスミド DNA を抽出するまでが約 1-2 週間、解読し GPAT を用いた解析が終了するまでも同様に約 1-2 週間を要する。菌株の性質にもよるが、アウトブレイク事例の解析のように緊急を要する場合であれば 1 プレート (96 サンプル) 分のプラスミド配列データが約 2 週間で GPAT,iPAT を用いた解析が可能であった。

D. 考察

グラム陰性桿菌では、複数のプラスミドを保有していることが多い。また、本研究が目的としているデータベースの構築、院内感染事例におけるプラスミド解析では、数十株のプラスミド解析を同時に実施することが求められる。S1 PFGE 後に EtBr 染色 UV 照射した場合、UV による DNA の損傷を防ぐため、株数が多い場合は、数株 (数レーン) ごとにゲルを切り分け、かつ作業を迅速に行うなどの負担が大きかった。一方、UV 照射を行わない場合、これらの懸念が払拭されるが、青色 LED 照射による DNA の検出は感度の低下が懸念された。しかし、SYBR Gold 染色を行った場合は同等以上の感度が得られた。

EtBr 染色 UV 照射は多くの実験室において普及しているが、UV 暴露による DNA の損傷はサンプルのみならず、健康被害の要因ともなりうる。青

色 LED、UV に比べ健康被害も少ないと考えられる。また、サンプル回収における時間的制約が緩和されるため、技術的にも容易となり、今後、本法の普及において有用と考えられた。

一方、GPAT, iPAT により、解読リードが得られた後のプラスミド解析は従来に比べ飛躍的に容易であった。GPAT と iPAT のみで、解析対象としたプラスミドの相同性の概要を評価することが可能であると考えられる。しかし、100%の一致を確認するためには、サンガー法を用いた追加解析が必要となり、これには短くても数週間を要すると思われる。現時点では、プラスミドの分子疫学解析の知見が十分には蓄積されていないため、どの程度の配列の相同性をもって、同一プラスミドであると解釈可能であるかは今後検討が必要と思われる。

E. 結論

多数の菌株からシーケンスグレードのプラスミドを効率よく精製する方法を確立した。また、GPAT,iPAT を活用したプラスミドの相同性評価の手法を検討した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

松井真理、鈴木里和、関塚剛史、山下明史、鈴木仁人、黒田誠、柴山恵吾

IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ保有プラスミドの全塩基配列解読で判明した多菌種の腸内細菌科細菌の院内感染

第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、2015 年 3 月

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

図 1 : S1-PFGE 泳動図

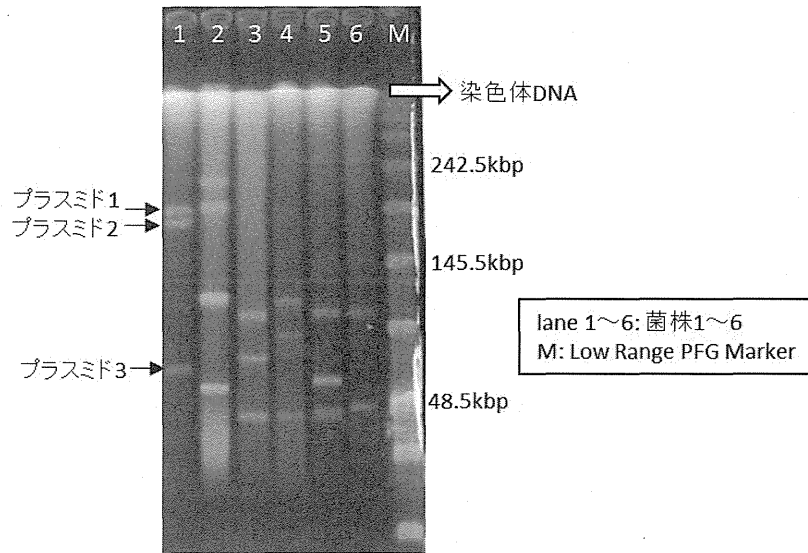


表 : *de novo assemble* で得られた contig の比較

		EtBr 染色 (n=173)	SYBR Gold 染色 (n=328)
contig 数	平均値	10.74	7.21
	中央値	6	4
最長 contig の長さ (bp)	平均値	48,238	56,112
	中央値	43,074	51,085
N50 (bp)	平均値	41,622	50,332
	中央値	32,842	46,798
全塩基配列長 (bp)	平均値	104,921	108,166
	中央値	89,739	94,775

図 2 : GPAT 解析結果画面 (抜粋)

- ① Contigs の確認 ②塩基数の確認 ③incompatibility type の確認 ④耐性遺伝子の確認

Overview

Total reads: 586,675
Quality trimming: 174,857 (29.8%)

Assembly: 4 contigs ← ①
Length: 2,499-38,378 bp
GC: 53.1 %

Total base: 87,507 bp ← ②
N50: 27,733 bp

Number of genes: 115
Detected Inc types: L/M ← ③

Detected AR genes

id	cov	Detected AR genes	Reference
98	99	aminoglycoside 6'-N-acetyl transferase type Ib	84180557
100	100	aminoglycoside adenylyltransferase putative aminoglycoside adenylyltransferase	167731093
100	90	dihydropteroate synthase ← ④	NC_011586
100	100	Unknown product	AJ223604

サルモネラ属菌の薬剤耐性プラスミドの解析

担当責任者 大西真 国立感染症研究所 細菌第一部 部長

研究要旨

本邦にて分離された第三世代セファロスポリン薬耐性チフス菌、パラチフス A 菌の耐性決定因子を決定した。2008 年以降で耐性チフス菌、耐性パラチフス A 菌がそれぞれ 1 株ずつ確認され、いずれから CTX-M-15 型の基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子が検出された。また耐性菌特異的なプラスミドが確認され、そのプラスミドを用いた形質転換により感受性大腸菌が耐性となったことから、プラスミド上に ESBL 遺伝子がコードされていることが示唆された。さらには耐性プラスミドの完全長配列の決定を目指し、プラスミドの配列を含む耐性株のドラフト配列を取得した。

A. 研究目的

腸チフス、パラチフスの治療にはニューキノロン薬が第一選択薬として使われていたが、輸入感染症としての特徴から海外で出現している治療薬に対する耐性菌の問題がわが国にも波及し、治療無効例が増加した。現在ではニューキノロン薬の単独使用は少なくなり、第三代セファロスポリン薬との併用や第三代セファロスポリン薬の単独使用が行われるなど、第一選択薬として第三世代セファロスポリン薬も考慮されている。しかしながら、既に少数ながら基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) による第三世代セファロスポリン薬耐性株が出現し、本邦においても報告されている。ニューキノロン薬耐性菌はゲノム上の *gyrA* 遺伝子及び *parC* 遺伝子のキノロン耐性決定領域における変異が耐性化の主要な因子であるが、第三代セファロスポリン薬耐性遺伝子はプラスミドにより媒介される。その伝達性から、他の血清型のサルモネラ属菌への伝播や耐性チフス菌、パラチフス A 菌の蔓延が考えられ、その出現機序や拡散リスクを評価することは防疫施策上重要である。そこで本研究課題では、第三世代セファロスポリ

ン耐性チフス菌、パラチフス A 株の耐性遺伝子、菌株の系統解析、プラスミド解析から、薬剤耐性菌の出現メカニズムを検証することを目的とする。

本年度は第三世代セファロスポリン耐性チフス菌、パラチフス A 株について、薬剤耐性プラスミド上の耐性遺伝子を決定した。また、第三世代セファロスポリン薬非感受性菌を含む第三世代セファロスポリン耐性菌のドラフトゲノム配列を取得した。

B. 研究方法

国内で分離されたチフス菌、パラチフス A 菌の薬剤感受性試験を実施した。対象は 2008 年に本邦で初めて ESBL 産生チフス菌が確認されたことから、2008 年以降に分離されたチフス菌、パラチフス A 菌 406 株とした。セフトリアキソンの MIC 値を微量液体希釈法に測定し、CLSI2014 のブレイクポイントに従って、感受性 ($1 \leq$)、中間 (2)、耐性 ($4 \geq$) を決定した。耐性菌については耐性プラスミドの確認のため、プラスミド抽出後、感受性大腸菌を形質転換した。また非感受性菌のゲ

ノム DNA を精製し、次世代シーケンサーを用いてドラフト配列を取得した。

(倫理面への配慮)

人を対象とする研究ではなく、また動物実験も行なっていないので、該当しない。

C. 研究結果

第三世代セファロスポリン薬であるセフトリアキソンに対する感受性試験の結果、耐性チフス菌 1 株、耐性パラチフス A 菌 1 株が確認された。また、MIC 値が 2 であるチフス菌が 1 株確認された (表)。

耐性を示した 2 株について、さらなる解析を試みたところ、プラスミドプロファイルから耐性菌に特異的なプラスミドが観察された。このプラスミドを用いて大腸菌を形質転換したところ、第三世代セファロスポリン薬に対して耐性となった。また両耐性菌からは CTX-M-15 型 ESBL 遺伝子が検出され、当該遺伝子がプラスミド上にコードされていることが示唆された。一方、耐性菌 2 株を含む非感受性菌 3 株のゲノム DNA ライブラリーを、Illumina 社 MiSeq でペアエンド解読し、一株あたり約 382Mb の解読情報を得た。

D. 考察

腸チフス、パラチフスの治療での第三世代セファロスポリン薬の使用例が増加している現状において、耐性チフス菌、パラチフス A 菌の出現は深刻な問題である。この耐性を担う ESBL 遺伝子がプラスミド上にコードされていたことから、今後第三世代セファロスポリン耐性が広範囲に伝播する危険性は十分に考えられる。その拡散リスクを評価するために、耐性遺伝子やプラスミドの由来を明確にし、伝播メカニズムの推定をしておかなくてはならない。本年度ではドラフトゲノムを得ることはできたが、解析までは至らなかった。今後、ドラフトゲノムの解析を進め、プラスミド

の完全長配列から、耐性遺伝子の獲得機序、伝播様式などが明らかになると期待される。

E. 結論

CTX-M-15 型 ESBL 遺伝子をコードしたプラスミドにより第三世代セファロスポリン薬耐性となったチフス菌 1 株、パラチフス A 菌 1 株が分離された。

F. 健康危機情報

特に無し。

G. 研究発表

特に無し。

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

表 セフトリアキソン非感受性菌における各種薬剤の MIC 値

	Serovar	AP	NA	CPFX	CTRX
#1	<i>S. Typhi</i>	>64	>128	0.5	>32
#2	<i>S. Paratyphi A</i>	>64	>128	1	>32
#3	<i>S. Typhi</i>	32	>128	16	2

AP:ampicillin, NA: nalidixic acid, CPFX: ciprofloxacin, CTRX: ceftriaxone

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

薬剤耐性菌サーベイランスとゲノムデータの集約・解析に関する研究

委託業務成果報告（業務項目）

家畜由来腸内細菌の薬剤耐性因子の疫学解析

業務分担者：秋庭正人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

業務協力者：楠本正博 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

業務協力者：岩田剛敏 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

業務協力者：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

業務協力者：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

研究要旨

本研究の目的は環境および家畜由来薬剤耐性菌の塩基配列情報を取得し、データベース化することで耐性菌、あるいは耐性遺伝子の動態を監視できるシステムの構築に貢献することである。今年度はインドで採取した汚水処理施設の水や河川水から大腸菌を分離し、その薬剤感受性を調べたところ、その33%が第3世代セファロsporin系やカルバペネム系抗菌剤に耐性を示した。これら菌株はフルオロキノロンを含む3～11薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。また、国内の牛糞便からシガ毒素産生性大腸菌（STEC）を分離し、その薬剤感受性を調べたところ、その30%が1～3剤に耐性を示したが、テトラサイクリンやストレプトマイシンといった古典的な薬剤に対する耐性がほとんどで、第3世代セファロsporin系やフルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株は認められなかった。インド環境水由来大腸菌55株と牛由来STEC45株から染色体およびプラスミドDNA、計393検体を調製し、現在、塩基配列を解析中である。

A. 研究目的

薬剤耐性菌の蔓延は世界中で問題となっているが、既存の抗菌剤で対処できないスーパーバグと呼ばれる耐性菌の分布は様でなく、ホットスポットが存在する。これらの地域から主に人の移動に伴い、多剤耐性菌が世界中に拡散している。また、家畜や食糧等の移動に伴う耐性菌の伝播も報告されている。一方、薬剤耐性遺伝子はプラスミド等の可動性因子を介して他の菌に伝達することが知られており、これら菌種を超えた耐性遺伝子の伝播にも注意をはらう必要がある。本課題では家畜および環境由来耐性菌に焦点を絞り、その染

色体とプラスミドの塩基配列情報を取得し、データベース化することで、耐性菌、あるいは耐性遺伝子の動態を監視できるシステムの構築に貢献することを目指す。今年度はインド環境および国内牛由来シガ毒素産生性大腸菌（STEC）の分離と性状解析、ならびにDNAの抽出を行った。

B. 研究方法

1. インド環境水からの大腸菌分離と薬剤感受性試験

インドで採取した汚水処理施設の水や河川水からクロモカルトコリフォーム寒天培地（メルク社）

を用いて β -ガラクトシダーゼおよび β -グルクロニダーゼ陽性のコロニーを分離し、インドール陽性、オキシダーゼ陰性を確認後、大腸菌として保存した。分離菌の薬剤感受性試験はディスク法で実施した。以下に示す 12 薬剤を供試した；アンピシリン、セファゾリン、セフォキシチン、セフォタキシム、イミペネム、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ST 合剤、ナリジクス酸、シプロフロキサシン。

2. 牛糞便からの STEC 分離と薬剤感受性試験

糞便試料 1 g を 9 ml のバンコマイシン (10 μ g/ml) およびセフスロジン (3 μ g/ml) 加 mEC 培地で 42° C、16 時間培養後、DNA 抽出およびシガ毒素遺伝子 *stx1* および *stx2* を標的とした PCR を行った。*stx* 遺伝子陽性となった培養液をマッコンキー寒天平板に塗抹培養後、コロニーハイブリダイゼーション法によって、*stx* を有するコロニーを分離した。 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、インドール陽性、およびオキシダーゼ陰性を確認後、STEC として保存した。分離菌の薬剤感受性試験はディスク法で実施した。以下に示す 12 薬剤を供試した；アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ホスホマイシン、ST 合剤、ナリジクス酸、シプロフロキサシン。

3. DNA 抽出と塩基配列の解析

S1ヌクレアーゼ消化後のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により得られた染色体およびプラスミドのバンドを切り出し、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターにおいて次世代シーケンサーによる塩基配列解析を実施する。

C. 研究結果

1. インド環境水からの大腸菌分離と薬剤感受性

試験

インド環境水 228 検体から、1 検体当たり最大 10 株までの分離を試みた結果、合計 522 株の大腸菌を得た。このうち、173 株 (33%) がセフォタキシム (第 3 世代セファロスポリン系) とイミペネム (カルバペネム系) のいずれかに耐性を示した。この中から耐性パターンをもとに菌株の絞り込みを行い、計 55 株を解析に供した。これら菌株は供試した 12 薬剤のうち 3~11 薬剤に耐性を示した。イミペネム耐性を示した 12 株中 8 株は 10 剤以上に耐性を示した (図 1)。

2. 牛糞便からの STEC 分離と薬剤感受性試験

牛糞便 551 検体中、130 検体から 148 株の STEC を分離した。1 剤以上に耐性を示した 45 株を塩基配列解析に供した。これら菌株は供試した 12 薬剤のうち、1~3 剤に耐性を示した (図 2)。

3. DNA 抽出と塩基配列の解析

S1-ヌクレアーゼ消化後の PFGE で、供試菌株に複数のプラスミドを認めた (図 3)。全ての染色体由来断片とプラスミド (10~550 kb) を切り出し、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターに送付した。内訳はインド環境水由来が 184 検体、STEC 由来が 209 検体で、STEC の方がプラスミドバンドの数は多い傾向が認められた。これら検体の塩基配列解析は現在、実施中である。

D. 考察

インド環境水由来大腸菌の 33%がヒトの治療に汎用される第 3 世代セファロスポリンやカルバペネムに耐性を示した。これらの多くはフルオロキノロンを含む複数薬剤に耐性を示す多剤耐性菌で、なかでもカルバペネム耐性を示した 12 株中 8 株は 10 剤以上に耐性を示した。インド環境が多剤耐性菌に高度に汚染されていることが示された。

国内の牛から分離された STEC の 30%は 1~3 剤に耐性を示したが、テトラサイクリンやストレブ

トマイシンといった古典的な薬剤に対する耐性のみで、第3世代セファロスポリン系やフルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株は認められなかった。すなわち、牛由来 STEC において薬剤耐性はほとんど問題にならないことが示された。

S1-ヌクレアーゼ消化後の PFGE で認められるプラスミドバンドは多い株で7本認められ、インド環境水由来大腸菌より、STEC 由来大腸菌の方が多し傾向が認められた。しかしながら、全てのバンドが異なるプラスミドに由来するか否かは不明である。プラスミドの状態によっては同じプラスミドが複数のバンドとして観察される可能性も考えられる。この点については塩基配列を決定することで明らかにする予定である。

E. 結論

インド環境水から分離し、重要なβ-ラクタム剤に耐性を示した大腸菌 55 株と古典的薬剤に対する耐性を示す国内牛由来 STEC 45 株の染色体およびプラスミド DNA、計 393 検体を調製し、その塩基配列を解析中である。

F. 健康危険情報

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）

なし

株名	AMP	CFZ	FOX	CTX	IPM	CHL	TET	STR	KAN	SXT	NAL	CIP
V001	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V003	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V004	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V021	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V023	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V035	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V044	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V046	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V048	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V070	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V085	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V097	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V120	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V123	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V130	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V133	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V139	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V143	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V147	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V150	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V158	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V160	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V228	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V233	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V234	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V242	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V244	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V251	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V252	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V263	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V264	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V266	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V272	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V273	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V274	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V275	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V279	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V293	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V294	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V299	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V300	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V301	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V308	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V313	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V318	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V323	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V408	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V420	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V423	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V431	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V437	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V472	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V475	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V487	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
V512	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■ : 耐性 □ : 感受性または中間

図 1. インド環境水由来大腸菌の薬剤感受性

AMP, アンピシリン ; CFZ, セファゾリン ; FOX, セフォキシチン ; CTX, セフトキシム ; IPM, イミペネム ; CHL, クロラムフェニコール ; TET, テトラサイクリン ; STR, ストレプトマイシン ; KAN, カナマイシン ; SXT, ST 合剤 ; NAL, ナリジクス酸 ; CIP, シプロフロキサシン

株名	AMP	CFZ	CTX	CHL	TET	STR	KAN	GEN	FOM	SXT	NAL	CIP
SEC001					■							
SEC007					■							
SEC021					■	■						
SEC026					■							
SEC050					■	■						
SEC081	■				■	■						
SEC084					■	■						
SEC107					■	■						
SEC110					■	■						
SEC125					■	■						
SEC132					■	■						
SEC133					■	■						
SEC136					■	■						
SEC141	■				■	■						
SEC147					■	■						
SEC152					■	■						
SEC174					■	■						
SEC187					■	■						
SEC190					■	■						
SEC196				■	■	■						
SEC197					■	■					■	
SEC201					■	■	■					
SEC219					■	■						
SEC228					■	■						
SEC234					■	■	■					
SEC235					■	■						
SEC239					■	■						
SEC243	■				■	■						
SEC249					■	■						
SEC262					■	■						
SEC264					■	■						
SEC274					■	■						
SEC282	■				■	■						
SEC302					■	■						
SEC303					■	■						
SEC313					■	■						
SEC316					■	■	■					
SEC331	■				■	■						
SEC334					■	■	■					
SEC347					■	■						
SEC348					■	■						
SEC351					■	■	■					
SEC357					■	■	■					
SEC373	■				■	■					■	
SEC377	■				■	■					■	

■ : 耐性 □ : 感受性または中間

図 2. 牛由来 STEC の薬剤感受性

AMP, アンピシリン; CFZ, セファゾリン; CTX, セフトキシム; CHL, クロラムフェニコール;
TET, テトラサイクリン; STR, ストレプトマイシン; KAN, カナマイシン; GEN, ゲンタマイシン;
FOM, ホスホマイシン; SXT, ST 合剤; NAL, ナリジクス酸; CIP, シプロフロキサシン

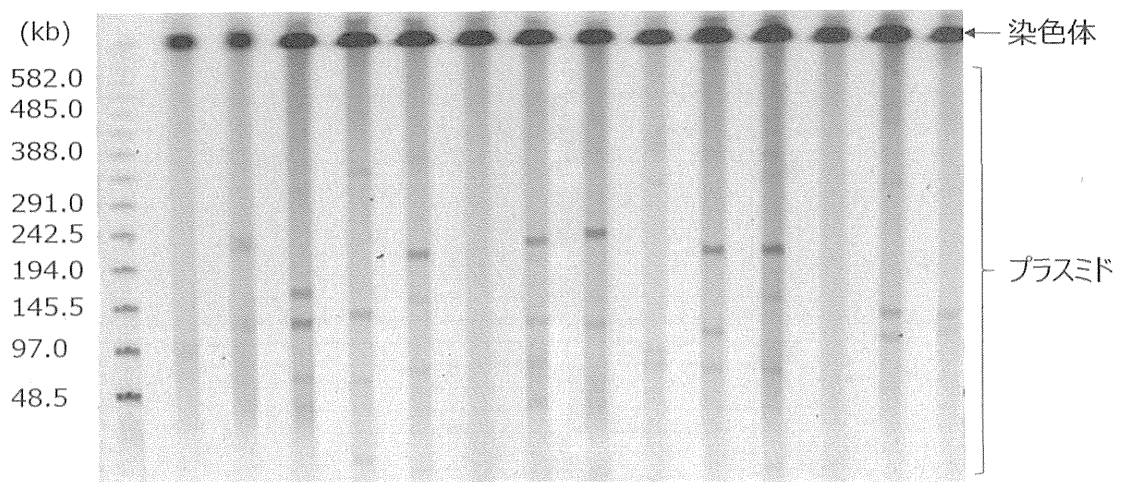


図 3. S1-ヌクラーゼ消化後の PFGE 像

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「薬剤耐性菌サーベイランスとゲノムデータの集約・解析に関する研究」

機関名 国立感染症研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
プラスミド・ネットワーク解析：プラスミド上の遺伝子の水平伝達ネットワーク解析	山下明史、黒田誠	博多（第62回日本化学療法学会総会）	2014年6月18-20日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis.	Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M.	Pathogens.	3(2):356-376, 2014	国外
Characterization of blaTEM-52-Carrying Plasmids of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Salmonella enterica Isolates from Chicken Meat with a Common Supplier in Japan.	Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M.	Antimicrob Agents Chemother.	2014 Dec;58(12):7545-7. doi: 10.1128/AAC.02731-14. Epub 2014 Sep 22. PubMed PMID: 25246394.	国外
Whole-Genome Sequence of CMY-2 β-Lactamase-Producing Salmonella enterica Serovar Typhimurium Strain L-3553.	Sekizuka T, Lee K, Kuroda M, Kusumoto M, Iwata T, Uchida I, Tanaka K, Tamamura Y, Akiba M.	Genome Announc.	2014 Jul 24;2(4). pii: e00711-14. doi: 10.1128/genomeA.00711-14. PubMed PMID: 25059867; PubMed Central PMCID: PMC4110225.	国外
プラスミド水平伝達が関与した院内感染事例	安部朋子、永田由美、青木知信、松井真理、鈴木里和、柴山恵剛、吾、関塚剛史、山下明史、黒田誠。	IASR（病原微生物検出情報）	2014年12月	国内

<p>大阪市内大規模病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の長期間にわたる院内伝播</p>	<p>山岸拓也 松井珠乃 大石和徳 伊東宏明 福住宗久 松井真理 鈴木里和 柴山恵 関塚剛史 山田下明史 黒田誠 吉田英樹 廣川秀徹 坂本徳裕 伯井紀隆 奥町侑彰 礼津田侑子 松生誠子 半羽宏之 松本健二 今井龍也 中山浩二 谷和夫 甲田村高尚 甲平朝伸 上平朝子 谷口美由紀 小川吉彦 宮本敦史 中森正二 多昭雄。</p>	<p>IASR (病原微生物検出情報)</p>	<p>2014年12月</p>	<p>国内</p>
---	--	-------------------------	-----------------	-----------

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

Article

Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis

Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda *

Pathogen Genomics Center, National institute of infectious diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan; E-Mails: uhmin@niid.go.jp (A.Y.); sekizuka@niid.go.jp (T.S.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: makokuro@niid.go.jp; Tel.: +81-3-5285-1111; Fax: +81-3-5285-1166.

Received: 27 November 2013; in revised form: 4 April 2014 / Accepted: 9 April 2014 /

Published: 15 April 2014

Abstract: The global clustering of gene families through network analysis has been demonstrated in whole genome, plasmid, and microbiome analyses. In this study, we carried out a plasmidome network analysis of all available complete bacterial plasmids to determine plasmid associations. A blastp clustering search at 100% aa identity cut-off and sharing at least one gene between plasmids, followed by a multilevel community network analysis revealed that a surprisingly large number of the plasmids were connected by one largest connected component (LCC), with dozens of community sub-groupings. The LCC consisted mainly of *Bacilli* and *Gammaproteobacteria* plasmids. Intriguingly, horizontal gene transfer (HGT) was noted between different phyla (*i.e.*, *Staphylococcus* and *Pasteurellaceae*), suggesting that *Pasteurellaceae* can acquire antimicrobial resistance (AMR) genes from closely contacting *Staphylococcus* spp., which produce the external supplement of V-factor (NAD). Such community network analysis facilitate displaying possible recent HGTs like a class 1 integron, *str* and *tet* resistance markers between communities. Furthermore, the distribution of the Inc replicon type and AMR genes, such as the extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M or the carbapenemases KPC NDM-1, implies that such genes generally circulate within limited communities belonging to typical bacterial genera. Thus, plasmidome network analysis provides a remarkable discriminatory power for plasmid-related HGT and evolution.

Keywords: plasmidome; network analysis; horizontal gene transfer; Inc replicon; antimicrobial resistance; ESBL; carbapenemase

1. Introduction

Bacterial plasmids are self-replicating, extrachromosomal replicons that are key agents of change in microbial populations [1]. It is well known that plasmid vectors are frequently transmitted from one bacterium to another [2–5]. Plasmids, as well as conjugative transposons, are crucial mediators of horizontal gene transfer (HGT), a process that significantly influences bacterial activity and evolution. Most antimicrobial resistance (AMR) genes can be acquired through plasmid-mediated HGT [2]. The increased number of AMR genes acquired by pathogenic bacteria threatens to return us to the pre-antibiotics era. The misuse of antimicrobial medications accelerates this natural phenomenon. Moreover, poor infection control practices have encouraged the spread of AMR. Thus far, it has been challenging to reveal the global dissemination of AMR plasmids by molecular genotyping. Molecular genotyping techniques, such as MLST, MLVA, and IS-typing, are available to hospitals, communities, and global organisations for tracing clonal bacteria dissemination. Furthermore, next-generation sequencing (NGS) can identify bacterial strain-specific genetic markers including single nucleotide polymorphisms, facilitating the identification of disseminated pathogenic bacteria clones, such as *Staphylococcus aureus* [6], *Clostridium difficile* [7], *Acinetobacter baumannii* [8], and *Mycobacterium tuberculosis* [9].

AMR can be widely transferred among different strains and species from closely related taxonomic classes [2,3,10]. Indeed, the extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M and several carbapenemases have been widely identified in many species of Enterobacteriaceae [11], indicating that a molecular characterisation of plasmid sequences would be more beneficial for tracing the transmission of AMR than would characterising whole genome sequences, because most AMR genes can be acquired through plasmid-mediated HGT [2]. As whole genome sequencing of a strain harbouring multiple plasmids is not able to characterize single source of plasmid genetic feature, sequencing only plasmid is rather simple and cost effective.

Previous research has investigated global clustering of gene families using network analysis, as well as global network analysis of DNA families shared among cellular, plasmid, and phage genomes [12]. Similar studies focusing on plasmids showed frequent HGT over geographical habitat or taxonomical barrier [13,14]. The evolutionary dynamics of plasmids in *Acinetobacter* spp. (pan-plasmidome analysis) have also been examined [14]. Furthermore, both microbiome and plasmidome analyses have been performed for the bovine rumen [15]. Plasmidome analysis in particular has been carried out for ESBL in *Escherichia coli* [16] and various plasmids in *Enterococcus faecalis* [17]. Module-based phage network analysis has been demonstrated to suggest a reticulate representation of evolutionary and functional relationships between phage genomes [18].

These intensive studies focused on comprehensive network analysis using relatively lower gene similarity (~95%), thus, we performed a network analysis at 100% aa identity cut-off and sharing at least one gene between plasmids, leading to characterize the most recently occurred HGT or plasmid transfer. Such strict parameters will facilitate a better understanding of the current and future prospects of AMR dissemination based on the plasmid transfer.

2. Results and Discussion

In total, 3793 complete plasmid sequences were selected from the NCBI database. Accordingly, 275,954 protein sequences were extracted (downloaded on 10 June, 2013).

2.1. Number of Edges and Nodes between Each Plasmid

Plasmids that share at least one homologous sequence were extracted as connected nodes based on either a blastp or uclust homology search of coding sequences in each plasmid. As shown in Table 1, the number of connected-nodes decreases as the identity cut-off value increases, indicating that lower thresholds generate more connected nodes. The single connected components (CCs) are composed of all of the plasmids (nodes) with at least a single connection to others. The number of CCs is always slightly larger for uclust than it is for blastp, suggesting that blastp is a more rigorous clustering search method for finding the homologous lineages of ORFs following CC assignment. Thus, we performed blastp searches for the subsequent plasmidome network analysis. We obtained an image of the plasmidome network using a 100% identity cut-off value (Figure 1A).

Table 1. Number of connected component and community according to identity cutoff values.

Clustering program	Identity cutoff (%)	Edges	Connected nodes	Connected components	Nodes in LCC	LCC % in total	Number of communities in the LCC using multilevel method
BLASTP	50	251,961	3529	57	3265	86.1%	19
BLASTP	60	177,932	3444	70	2793	73.6%	25
BLASTP	70	129,545	3358	90	2613	68.9%	31
BLASTP	80	104,815	3229	127	2265	59.7%	26
BLASTP	90	81,752	3060	162	1995	52.6%	34
BLASTP	99	52,029	2633	236	1389	36.6%	36
BLASTP	100	41,956	2496	259	1241	32.7%	26
UCLUST	50	188,844	3524	71	3233	85.2%	ND
UCLUST	60	147,899	3435	75	2762	72.8%	ND
UCLUST	70	121,841	3349	98	2558	67.4%	ND
UCLUST	80	101,902	3213	133	2241	59.1%	ND
UCLUST	90	82,046	3057	174	1949	51.4%	ND
UCLUST	99	52,578	2626	240	1369	36.1%	ND
UCLUST	100	43,275	2501	263	1232	32.5%	ND

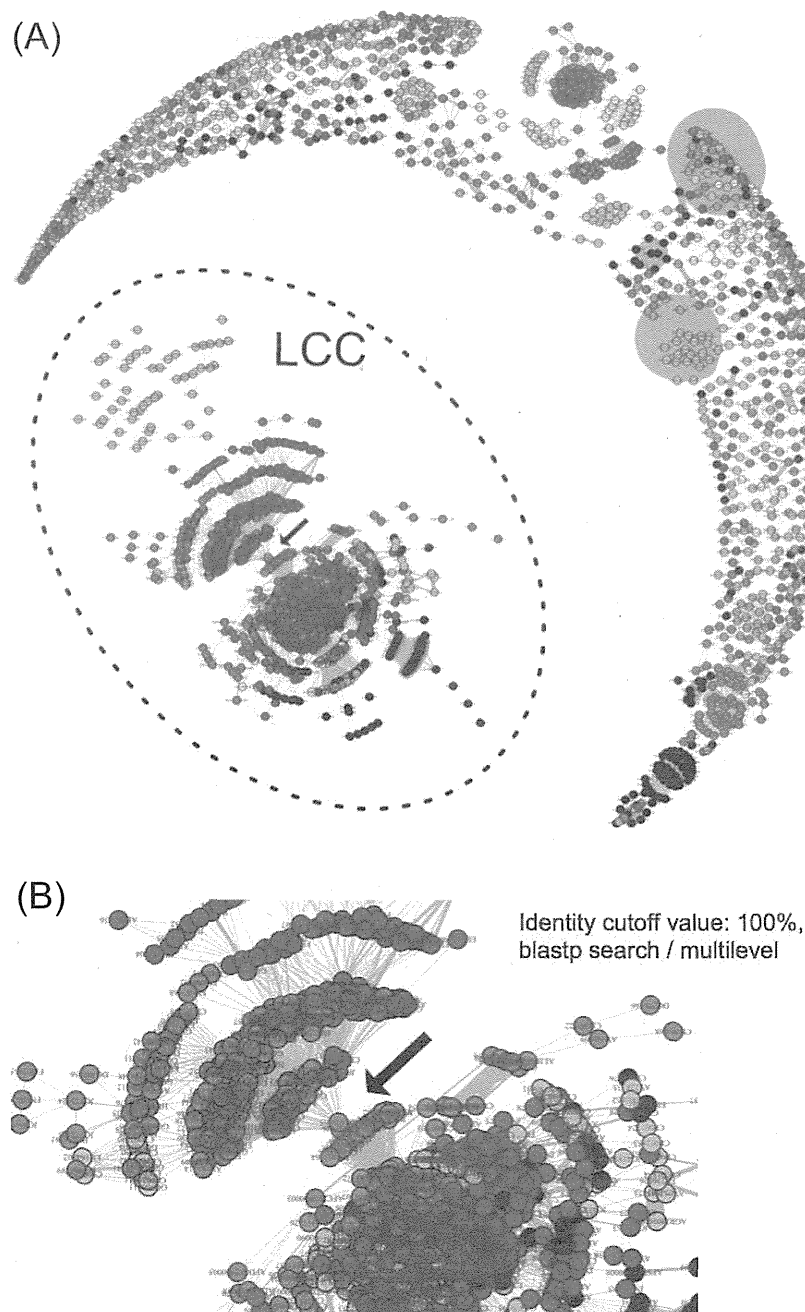
CC: connected component; LCC: largest connected component; ND: not determined.

2.2. Connected Components (CCs)

The largest CC (LCC) contains 32.7% of all the investigated plasmids, even after increasing the identity cut-off value to 100% (Figure 1A, Table 1). Although this network may contain identical plasmid pairs by means of vertical inheritance or plasmid transfer, the existence of such a large LCC from vast variety of hosts (will be discussed in the next section) clearly indicates that most of the plasmids share genes by HGT or plasmid transfer, suggesting that a frequent and ongoing dissemination of genes occurs between plasmids. To detect most recently occurred HGTs (not just phylogenetic relationships) we selected a threshold with identity cut-off value of 100% for further analysis. Under this condition 1297 plasmids from many kinds of bacterial species remain unconnected. As well as the previous study, the LCC showed power law distribution of the degree measures of nodes, which comes from the “scale-free” network feature [19,20]. Accordingly, the LCC mostly is composed of

Enterobacteriaceae, such as *Escherichia*, *Klebsiella*, and *Salmonella*, corresponding to the result in Tamminen *et al.* [13].

Figure 1. Plasmidome network analysis. (A) The filled circles (nodes) represent the respective plasmids. The grey lines (edges) represent the connections among the plasmids. The thickness of the edges represents the number of genes shared among the plasmids. The edges denoting large numbers of shared genes appear as grey ellipses. The colours of the nodes are automatically set according to the plasmid communities inferred from the multilevel method using the R igraph package. The nodes within the dotted circle represent the largest connected component (LCC). (B) Close-up of the connecting points between *Gammaproteobacteria* and *Bacilli*.



2.3. Community Network Analysis

The obtained LCC contains large number of nodes for further representing the characteristic network structure, thus, we subdivided the LCC into several —communities”, using available clustering methods in the R igraph package [21] including the fastgreedy, multilevel, edge betweenness, walktrap, label propagation, and infomap methods. To estimate the best method for community analysis, we employed the Shannon index [22], which estimates the diversity index of the host bacterial lineage. We selected the method that provided the set of communities with the lowest Shannon index.

As shown in Figure 2, the fastgreedy, multilevel and betweenness methods generated relatively better results, with lower diversity index values at every identity cut-off level for distinct taxonomic levels (Figure 2A: phylum, 2B: class, 2C: order). Accordingly, the fastgreedy and multilevel methods generated significantly fewer communities in the LCC (Figure 2D). The multilevel method, however, was considered a better choice at every identity cut-off. Thus, we decided to employ the multilevel method in the subsequent analysis because it obtained the fewest communities. Based on the multilevel method, a total of 291 communities (e.g., co68 ...) were extracted from all CCs at an identity cut-off of 100%, while the LCC can be well subdivided into 26 communities (Table 1 and Figure 3).

Figure 2. Evaluation of community connections using several methods. The Shannon index values for the LCC using different identity cut-off values and community estimation methods at the phylum (A), class (B), and order (C) levels. (D) The numbers of communities in the LCC using different identity cut-off values.

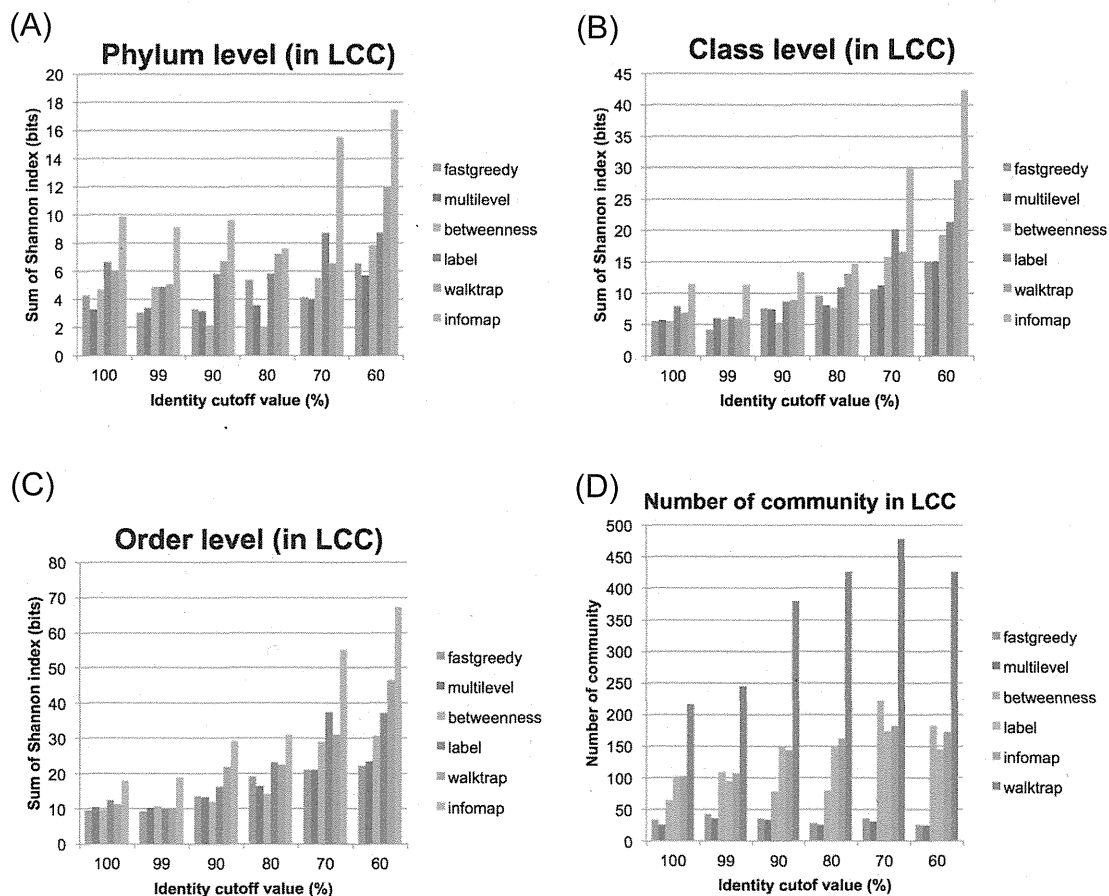
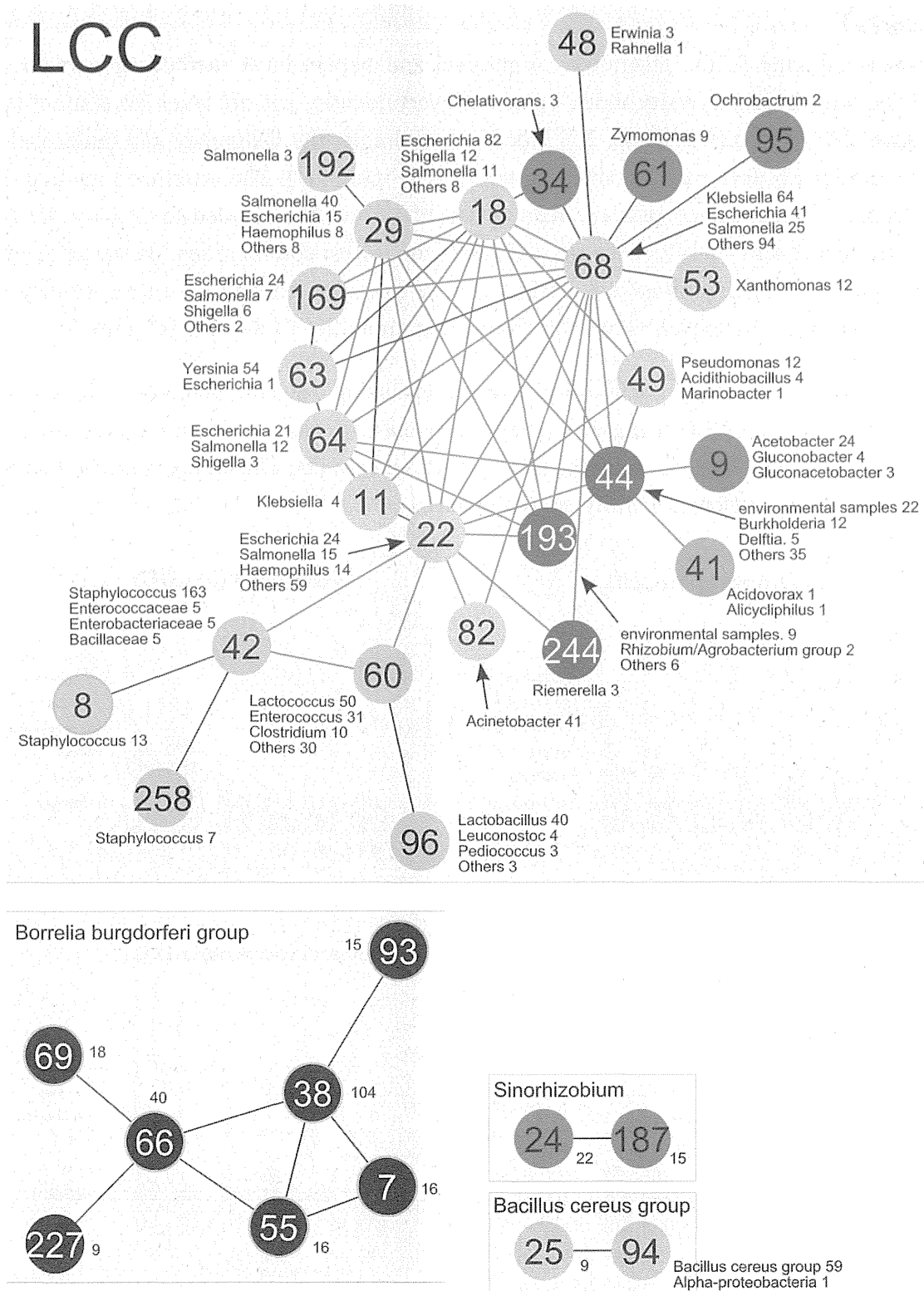


Figure 3. A schematic representation of the communities from the whole image shown in Figure 1. The communities mainly included *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, and *Borrelia*, which are indicated by purple, green, pink, grey, and black circles, respectively. The other communities are indicated by blue circles. The number of the top three species in the community is shown beside the circle. The circle with the light-blue rim represents the communities without AMR genes. The red lines represent the AMR gene related connections among the communities.



Most of the communities in the LCC consisted of plasmids from the *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Bacilli* classes (Figure 4A) or *Enterobacteriales* and *Bacillales* orders (Figure 4B). For instance, co68 was mostly composed of *Enterobacteriales*, such as *Klebsiella*, *Escherichia*, and *Salmonella* spp. (Figures 3 and 4B). In addition, co22 and co29 were composed of *Enterobacteriales* such as *Escherichia*, *Salmonella* and *Haemophilus* spp. (Figures 3 and 4B). Some specific bacterial plasmids were predominant in smaller communities (e.g., *Yersinia* in co63, *Acinetobacter* in co82, *Staphylococcus* in co8 and co258, and *Xanthomonas* in co53).

Figure 4. The host bacterial components of the communities. The upper and lower graphs show the numbers and ratios of the host bacterial components, respectively, for the class (A) and order (B) levels.

