

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）  
（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

委託業務成果報告（総括・業務項目）  
GenEpid-J データベース開発に関わる技術開発

業務主任者：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  
業務分担者：柴山恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部  
業務分担者：鈴木里和 国立感染症研究所 細菌第二部  
業務分担者：大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部  
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：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  
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

薬剤耐性菌の蔓延は世界中で問題となっており、耐性菌が分布する地域から人、家畜、食糧等の移動に伴い世界中に拡散している。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、菌種を超えた薬剤耐性の水平伝達に着目した。本計画では主に家畜、環境、食品、臨床由来耐性菌を対象にその染色体と薬剤耐性プラスミドの塩基配列情報を取得しデータベース化して耐性遺伝子の動態を監視できるシステムの構築を目指している。

本年度は1年目として薬剤耐性菌のゲノム情報および薬剤耐性プラスミドを中心に配列解読を遂行した。プラスミド解析用サンプル調整プロトコルを確立し、計218株から557プラスミドの配列を取得し、IMP型 metallo- $\beta$ -lactamase と blaCTX-M-2 を保有する Inc N プラスミドの多様性と分布解析、インド環境水からセフトキシムとイミペネムのいずれかに耐性を示した計55株の大腸菌・薬剤耐性プラスミド配列、国内牛糞便由来 STEC 45 株の薬剤耐性プラスミド配列を取得し、臨床、環境および家畜における薬剤耐性プラスミドの情報収集に尽力した。ESBL 産生が疑われる腸チフス菌およびパラチフス A 菌株の薬剤耐性プラスミド配列と全ゲノム情報も取得し、高病原性菌種への薬剤耐性伝達について解明する基盤情報を得た。プラスミド解析システム GPAT と相互ネットワーク解析システム iPAT を開発し、過去の既知プラスミド配列との比較解析により、汚染食材の流通、旅行者等で生じた薬剤耐性菌伝播のトレースを可能にした。今後、海外拠点との連携を深めるなど、薬剤耐性菌伝播のルーツを探る研究体制として更なる強化を図っていくことが必要だと考えている。

### A．研究目的

グローバルに伝播する薬剤耐性細菌、特に临床上重要な抗菌薬（キノロン、セフェム・カルバペネム系）に対する耐性頻度の上昇から治療薬剤の制限が懸念されている。米国疾病予防管理センター（CDC）も2014年における5つの重点項目の1つとして薬剤耐性と高度な遺伝学手法を用いた検出（Antibiotic Resistance & Advanced Molecular Detection）を挙げている。薬剤耐性菌の対策

は G8 サミット共同声明として採用され、リスク根源を突き止めるために早急な対策が必要不可欠になっている。

本計画では、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)と、家畜・食肉の薬剤耐性菌サーベイランス(JVARM)を統合させ、さらに国内分離菌株のゲノム情報を追加して、GenEpid-J (Genomics Epidemiology in Japan) を構築し、社会における薬剤耐性菌と耐性遺伝子の動態を明らかにする。国内で

問題となっている薬剤耐性菌を疫学的・遺伝学的に広くかつ深く把握し、抜本的な対策に必要な情報を提供する。国民の生命、健康の安全に直接係わる危険を察知するためには、薬剤耐性菌の統合的な情報解析が必須であり、本計画により得られた情報を迅速に厚労省・結核感染症課へ通報できるシステムの構築を目的とする。

## B．研究方法

### 1．JANIS と JVARM の連携・統合システムの構築

現在、JANIS(臨床分離株)とJVARM(食肉・家畜分離株)は全く異なるデータフォーマットで運用されているため、お互いのデータの比較により相互で薬剤耐性菌が行き交う可能性を導き出す統合システムを構築する。各種、統一したデータフォーマットを作成し、JANIS・JVARMの収載データを統一化させる。関係部局である厚労省、農水省、感染研、動薬研(研究協力者：川西路子)間で協議を行い、公開する項目・方法について政策面からも十分に討議する。

### 2. 病原体ゲノム情報を基盤とした高度な分子疫学手法による薬剤耐性菌伝播予測システム GenEpid-J の構築

公開済みのゲノム・プラスミド配列情報と、これまでの共同研究で得られた菌株情報・ゲノムデータを元に、GenEpid-J データベース(導入サーバー IBM FLEXSystem)に集積する。疫学情報(分離年、分離場所、検体部位)、菌株情報(菌種、血清型、抗菌薬感受性)そしてゲノム情報(ゲノム分子疫学による伝播クローン等の評価、耐性遺伝子、遺伝子型、プラスミドタイプ)を主体とするデータベースを作成する。逐次、JANIS/JVARMの情報から分離株の収集を精力的に行い、ゲノムおよびプラスミド解読を行う。(病原性大腸菌、薬剤耐性サルモネラ・主要血清型等。年間1000株のゲノム情報を目標。

➤ 以下、基本的な分担内容：

- ・ 黒田誠： GenEpid-J のデータベース構築・運用。ゲノム解読。薬剤耐性菌解析ソフトウェアの開発。
- ・ 柴山恵吾： 臨床分離株の収集、疫学情報解析。

- ・ 鈴木里和： JANIS/JVARM の統合。
- ・ 大西真： 臨床分離株の収集、疫学情報解析。
- ・ 秋庭正人： 家畜由来分離株の収集、疫学情報解析。

## C．研究結果

### 1．薬剤耐性プラスミドの情報解析ツールの開発

セフェム耐性、カルバペネム耐性を示す薬剤耐性腸内細菌科の世界的な伝播を把握するため、菌種・菌株間を伝達する薬剤耐性プラスミドの遺伝的特性をプラスミド・ゲノム配列として解読し(図1)情報解析するシステム GPAT(Global Plasmidome Analyzing Tool)を開発した(図2)。特段のバイオインフォマティクスの知識が無くてもプラスミド配列解析ができるソフトを提供し、国内外の検査現場でも配列解析を可能にした。

プラスミド配列の遺伝的特性・類似性を利用した相互ネットワーク解析システム iPAT(inter Plasmid Analyzing Tool)を開発した。過去の既知プラスミド配列との比較解析により、汚染食材の流通、旅行者等で生じた薬剤耐性菌伝播のトレースを可能にした。現在、過去分離株の耐性プラスミドの配列解読を順次進行中であり、国内外の公開プラスミド情報も加算して重厚なデータベースを構築し、精度の高いトレース・システムを目指す。

➤ 以下、iPATの構築概要を示す。

GPATにてプラスミド上に局在する遺伝子を推定し、保有する遺伝子の有無をリンクさせネットワーク化させる。遺伝子がコードするアミノ酸配列(タンパク質)を基本とし、BLASTP/UCLUST検索にて共有する遺伝子数を抽出する。相同性%の閾値や共有遺伝子数を設定でき(図3)ユーザーの希望値に合わせたネットワーク解析を自在に行うことができる。参考例として、解読したプラスミド20個分のネットワーク図を作成した。ネットワーク図では3つの集団に分かれているが、これはigraph libraryのfastgreedy.communityコマンドを用いて連結したedge毎の関係性でネットワークを更にコミュニティとして表示している。このコミュニティ相関図をCytoscapeでも開

覧できる。Cytoscape の使用方法の概略として、ダウンロードした Cytoscape 用のファイル(graph.txt)をインポートし、Source (あるプラスミド)、interaction (edge を構成する遺伝子数)、Target (リンクさせたいプラスミド)を表示させる(図6)。レイアウトは Cytoscape の使用説明を参照いただきたい。

➤ 以下、業務分担者の成果概要を記す。

・業務分担者(柴山恵吾)

J-GRID のタイ拠点(大阪大学)、インドネシア拠点(神戸大学)との連携で、それぞれの国の医療機関で分離されるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を収集する体制を整えた。インドネシアの医療機関では、JANIS の導入を進めた。さらにタイ拠点を通じてミャンマーの医療機関からも同様の体制を構築している。また、感染研独自に台湾 CDC から耐性菌の分与を受けた。

・業務分担者(鈴木里和)

プラスミド解析用サンプル調整プロトコルを確立した。これにより効率的にプラスミド配列の解読を実施できるようになり、平成26年度は218株、557プラスミドバンドのサンプルを作成し解読した。IMP型 metallo- $\beta$ -lactamase と blaCTX-M-2 を保有する IncN プラスミドの多様性と分布を大規模院内感染事例の分離株および細菌第2部に保存された菌株のプラスミド解析を行う事で明らかにした。

・業務分担者(大西真)

国内で分離された腸チフス菌(およそ400株)、パラチフスA菌(およそ300株)の薬剤感受性試験を実施した。その結果から ESBL 産生性が疑われる菌株(1株、2株)を見いだした。これらの耐性遺伝子の同定を行い、さらにプラスミド性であることを感受性大腸菌を用いた形質転換法で確認した。これら3株のドラフトゲノム配列を取得した。

・業務分担者(秋庭正人)

インド環境水から合計522株の大腸菌を分離し、セフトキシム(第3世代セファロsporin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計55株をプラスミド配列解析に供した。国内牛糞便由来

STEC(148株)のうち1剤以上に耐性を示した45株をプラスミド配列解析に供した。計393サンプルの染色体DNAとプラスミドDNAを国立感染症研究所・ゲノムセンターで配列解読を行った。

#### D. 考察

本年度は1年目として薬剤耐性菌のゲノム情報および薬剤耐性プラスミドを中心に配列解読を遂行した。プラスミド解析用サンプル調整プロトコルを確立し、計218株から557プラスミドの配列を取得し、IMP型 metallo- $\beta$ -lactamase と blaCTX-M-2 を保有する Inc N プラスミドの多様性と分布を包括的に解析することができた。

また、インド環境水からセフトキシム(第3世代セファロsporin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計55株の大腸菌から薬剤耐性プラスミド配列を取得し、国内牛糞便由来 STEC 45 株からも薬剤耐性プラスミド配列を取得して環境および家畜における薬剤耐性プラスミドの情報収集に尽力した。さらに、国内分離の ESBL 産生性が疑われる腸チフス菌およびパラチフスA菌株(1株、2株)を見だし、これら3株の薬剤耐性プラスミド配列と全ゲノム情報も取得し、高病原性菌種への耐性伝達について解明する基盤情報を得た。

これら配列情報から水平伝達に関わるエッセンスが平易に見つけ出せるよう、プラスミド解析システム GPAT と相互ネットワーク解析システム iPAT を開発し、過去の既知プラスミド配列との比較解析により、汚染食材の流通、旅行者等で生じた薬剤耐性菌伝播のトレースを可能にした。

今後、J-GRID のタイ拠点(大阪大学)、インドネシア拠点(神戸大学)との連携を深めるなど海外との情報共有も含め、薬剤耐性菌伝播のルーツを探る研究体制として更なる強化を図っていく。

#### E. 結論

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。これらの地域が

ら人、家畜、食糧等の移動に伴い、耐性菌が世界中に拡散している。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払う必要がある。家畜、環境、食品、臨床由来耐性菌を対象に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できる。

F．健康危険情報  
なし

G．研究発表

論文発表

- ・ Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis. *Pathogens*. 3(2):356-376, 2014
- ・ Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of blaTEM-52-Carrying Plasmids of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Isolates from Chicken Meat with a Common Supplier in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Dec;58(12):7545-7. doi: 10.1128/AAC.02731-14. Epub 2014 Sep 22. PubMed PMID: 25246394.
- ・ Sekizuka T, Lee K, Kuroda M, Kusumoto M, Iwata T, Uchida I, Tanaka K, Tamamura Y, Akiba M. Whole-Genome Sequence of CMY-2-β-Lactamase-Producing *Salmonella enterica*

Serovar Typhimurium Strain L-3553. *Genome Announc*. 2014 Jul 24;2(4). pii: e00711-14. doi: 10.1128/genomeA.00711-14. PubMed PMID: 25059867; PubMed Central PMCID: PMC4110225.

その他発表

- ・ 安部朋子、永田由美、青木知信、松井真理、鈴木里和、柴山恵吾、関塚剛史、山下明史、黒田誠。プラスミド水平伝達が関与した院内感染事例 IASR(病原微生物検出情報) 2014年12月
- ・ 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 柴山恵吾 関塚剛史 山下明史 黒田誠 吉田英樹 廣川秀徹 坂本徳裕 伯井紀隆 奥町彰礼 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 吉村高尚 甲田伸一 上平朝子 谷口美由紀 小川吉彦 宮本敦史 中森正二 多和昭雄。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 IASR(病原微生物検出情報) 2014年12月

H．知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
なし

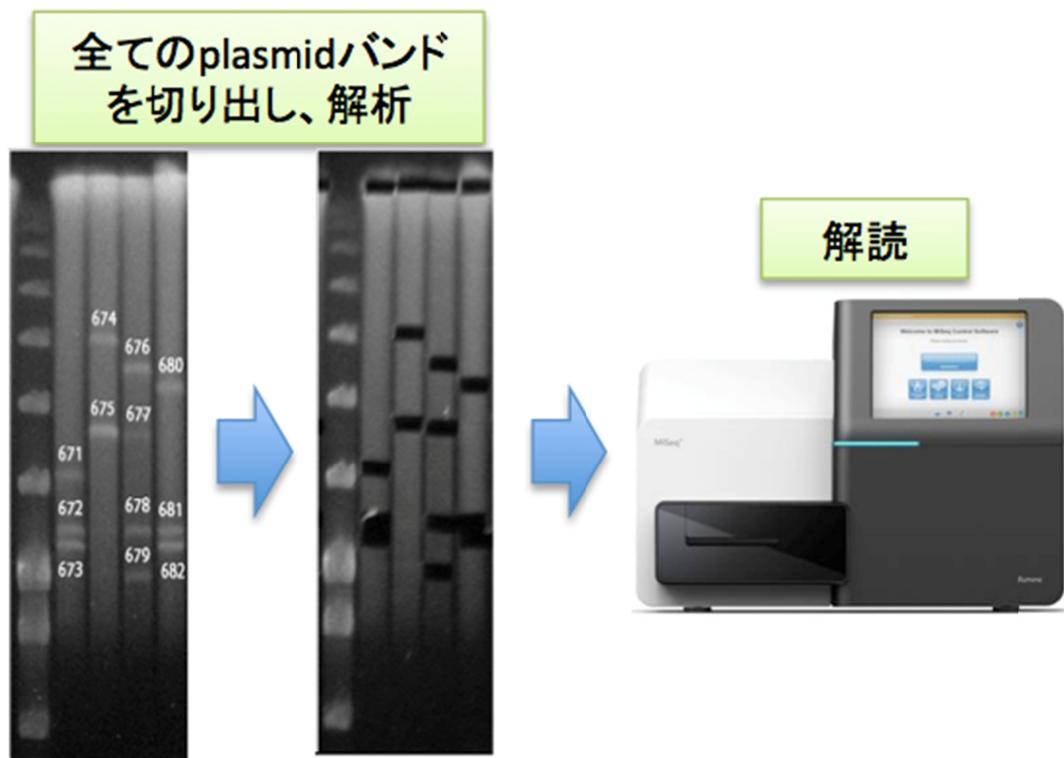


図 1. 薬剤耐性プラスミドの分離と NGS 解読への手順。分離株の PFGE アガロースプラグを S1-nuclease で処理を行い、環状プラスミドを線状にして PFGE 分離にてプラスミドサイズに応じた DNA バンドを個別に取得。菌種・菌株に特徴的な複数のプラスミドを同時に保有していることが多く、PFGE の結果、複数の DNA バンドとして検出ができる。バンド個別に回収・DNA 精製を行い、Nextera XT sample prep kit にてライブラリー作成、そして MiSeq 解読へと進む。



# Welcome to GPAT

Global Plasmidome Analyzing Tool

 Upload

 Result

[Go to data uploading page](#)

[Go to see the results](#)

[GPAT manual](#)

[S1-PFGE protocol](#)

[Change log of GPAT](#) (from Sep. 4, 2014)

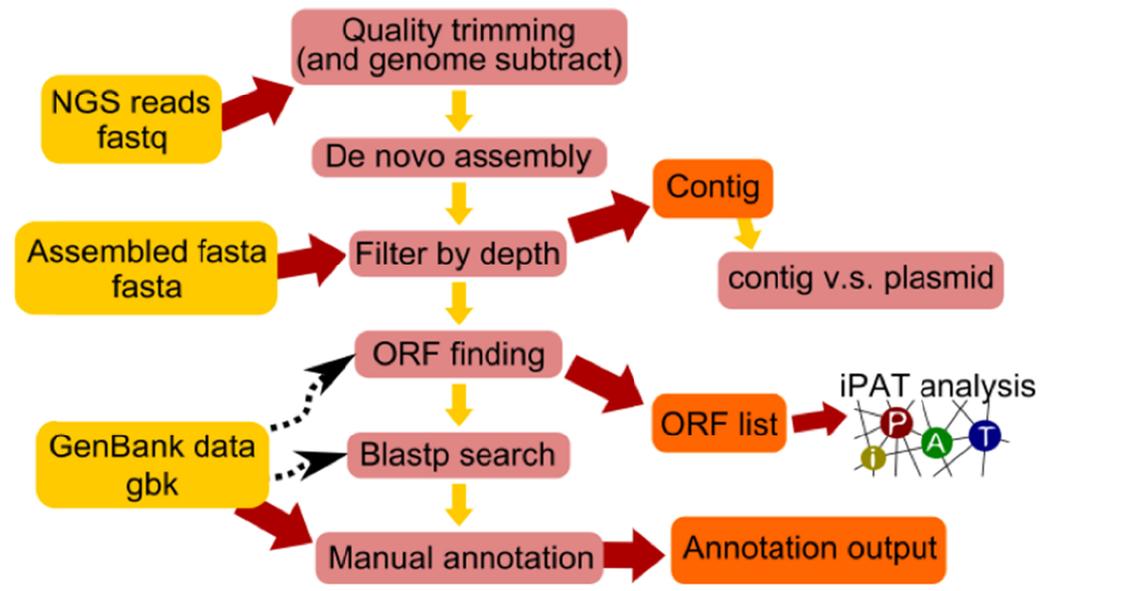


図2 GPAT によるプラスミド配列解析。MiSeq 解読で得られた NGS リード (.fastq.gz) を GPAT 解析パイプラインにアップロードして、プラスミド配列の遺伝情報 (塩基長、薬剤耐性因子、Inc タイプ、ホモロジー検索等) を取得。



上記 20 プラスミドを練習材料として選択した。

Identity cut off , Num of gene cut off  (Edges must share genes more than this number)

Re-draw

Group	Project	
<input type="checkbox"/>	1	2012_10mdr_1 auto ▾
<input type="checkbox"/>	1	2012_10mdr_2 auto ▾
<input type="checkbox"/>	1	2012_10mdr_3 auto ▾
<input checked="" type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_4 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_5 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_6 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_7 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_8 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_9 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_10 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_11 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_12 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_13 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_14 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_15 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_16 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_17 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_18 auto ▾
<input type="checkbox"/>	2	2012_10mdr_19 auto ▾
<input type="checkbox"/>	3	2012_10mdr_20 auto ▾
<input type="checkbox"/>	3	2012_10mdr_21 auto ▾

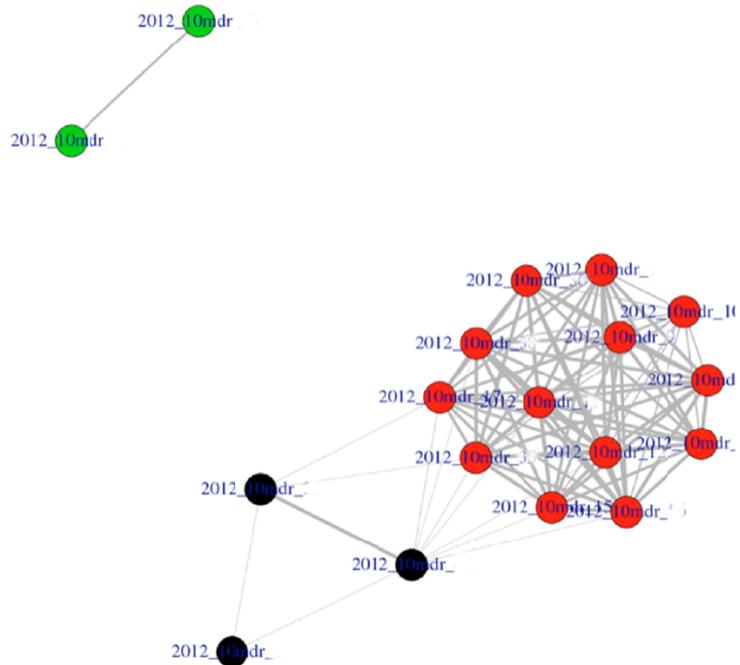


図4 iPAT によるネットワーク解析の結果(例)。90%相同性・5つ以上共通するアミノ酸配列を有する条件。およそ3つの集団に分離できることが判明した。



[download PDF version](#), [download graph data for cytoscape](#)

図5 ネットワーク結果のダウンロード。PDF ファイルもしくは Cytoscape ファイルとしてダウンロード可能。以下、Cytoscape ファイルのダウンロード後の使用を概説する。

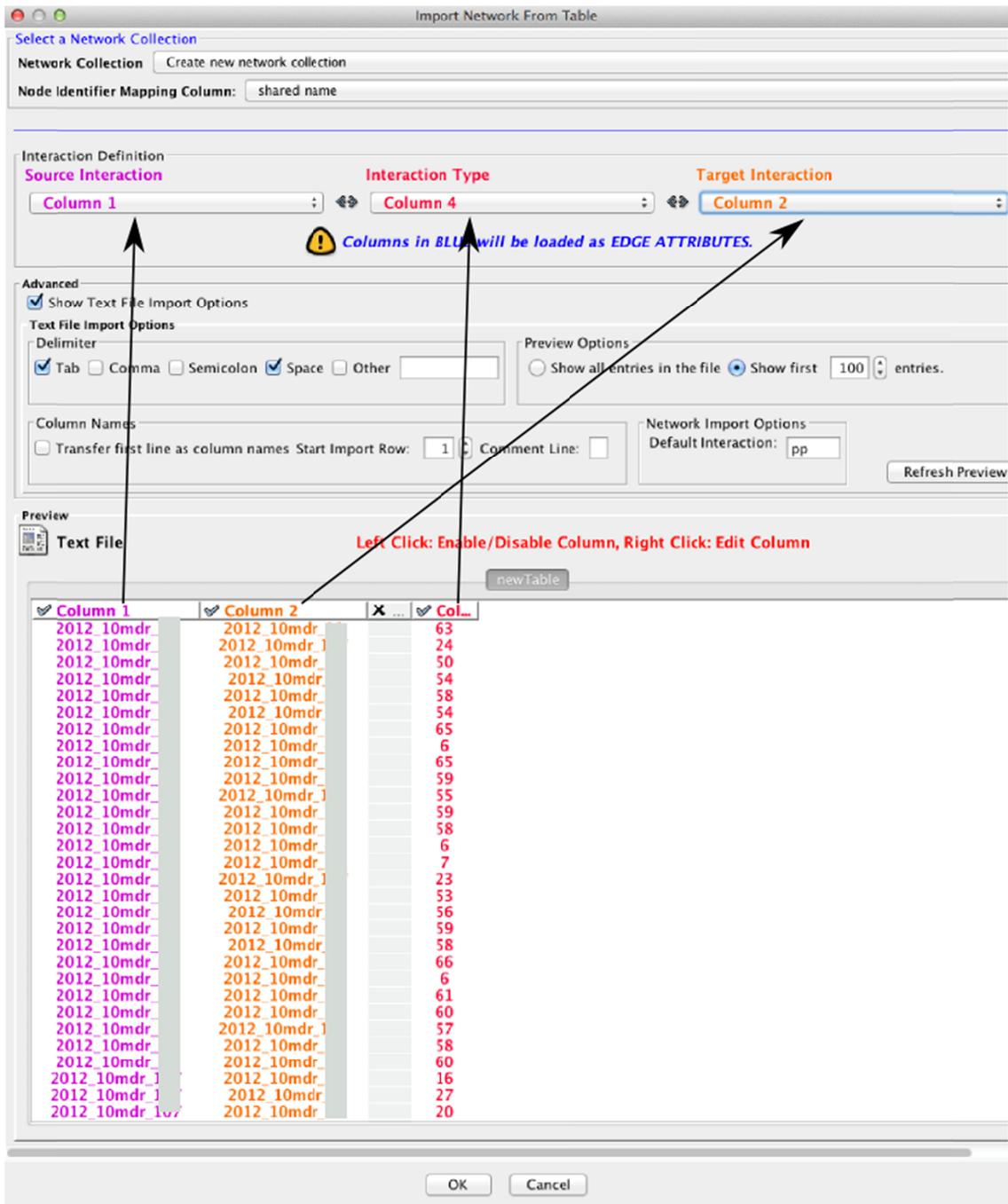


図6 Cytoscape v3.20 の import 機能から、Cytoscape 用のファイル(graph.txt)をインポートする。Column 1, 2, 4 をそれぞれ指定の位置に選択し、Source(あるプラスミド), interaction (edge を構成する遺伝子数)、Target (リンクさせたいプラスミド)として選択し、OK ボタンを押す。

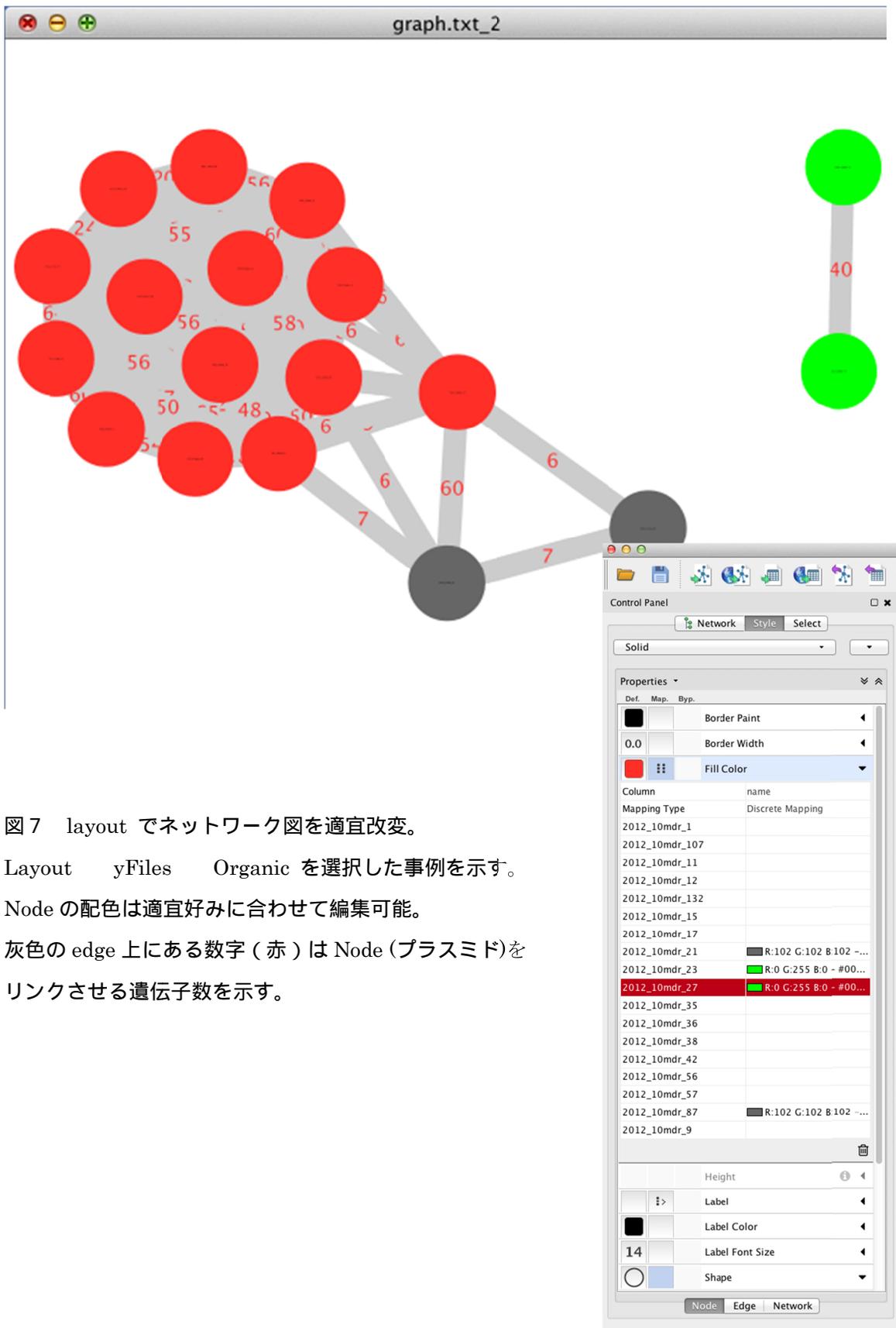


図7 layout でネットワーク図を適宜改変。

Layout yFiles Organic を選択した事例を示す。

Node の配色は適宜好みに合わせて編集可能。

灰色の edge 上にある数字 (赤) は Node (プラスミド) をリンクさせる遺伝子数を示す。

