

平成26年度 厚生労働省委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発研究事業）
（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

分担研究報告書

分担研究課題：入院患者分離株の薬剤耐性菌のゲノム解読およびプラスミド解析

研究分担者 鈴木 里和（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・室長）
研究協力者 柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
松井 真理（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・主任研究官）
鈴木 仁人（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・主任研究官）
筒井 敦子（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・研究員）

研究要旨

本研究では、薬剤耐性グラム陰性桿菌を主な対象とし、疫学研究や調査に利用可能な薬剤耐性菌のプラスミドデータベース構築を目指している。今年度は耐性菌が持つプラスミドの塩基配列をハイスルーブットで解析する効率的な手法を検討した。効率的な解析のためには、良好な解読結果を得るため、菌体から回収するプラスミド DNA が断片化されず、かつ染色体の混入の少ないサンプルの調整手法を確立すること重要である。S1PFGE 後のゲルをエチジウムブロマイド染色と UV 照射ではなく、SYBR Gold で染色し、青色 LED 光源(460nm)照射によりバンドを切り出して回収した。これにより、DNA に与える損傷を最小限にとどめつつシークエンスグレードの DNA サンプルを容易に得ることが出来た。また、病原体ゲノム解析研究センター開発の GPAT（Global Plasmidome Analyzing Tool）iPAT（Inter Plasmid Analyzing Tool）を用いて、実際の院内感染事例のプラスミド解析を実施し、プラスミドの相同性評価手法の検討を行った。現在の GPAT,iPAT の機能により、迅速にプラスミドの相同性を評価できると思われた。しかし、塩基配列を確定や 100%の一致を確認するためには追加の解析が必要となることもある。今後、どの程度の相同性が実際の疫学解析で必要となるかの検討が必要である。

A．研究目的

薬剤耐性菌、特に腸内細菌科細菌を中心とするグラム陰性桿菌におけるβ-ラクタム薬耐性が近年公衆衛生学上の大きな問題となっており、その動向を把握するためのサーベイランスの強化が世界的に進められている。グラム陰性桿菌におけるβ-ラクタム薬耐性は多くの場合、様々なβ-ラクタマーゼ遺伝子(*bla*)の獲得による。そしてその拡散においてプラスミドが重要な役割を果たしていると考えられる。

近年、プラスミドも含め、細菌のゲノムデータが数多く登録されるようになってきた。しかし、いつ、どこで分離されたなどの疫学情報が十分でなく、またそれらを結びつけて解析するシステムはない。本研究では、疫学的情報を含めた薬剤耐性菌の耐性遺伝子のデータベースを構築し、社会における耐性遺伝子の動態を時間軸と空間軸で俯瞰的に把握することを目標とする。本年度は、プラスミドの塩基配列を効率的に解析するための手法の確立および実際の院内感染事例における有用性について検討を行った。

現在、次世代シーケンサーを用いた解析を行うためのプラスミド DNA は、アガロースゲルに包埋された全菌体の DNA（DNA プラグ）を S1 nuclease 処理後にパルスフィールドゲル電気泳動（S1 PFGE）し、該当する DNA バンドを切り出すことで回収している。ゲル切り出しによって得られるプラスミド DNA が断片化されていない事、および、染色体の混入が少ないことがその後精度の高い解析を行う上で重要であるため、その条件について検討を行った。

一方、国内の医療機関では腸内細菌科細菌の異なる菌種による院内感染事例の報告が相次ぎ、平成26年12月19日付、厚生労働省医政局地域医療計画課の課長通知（医政地発 1219 第 1 号）においても、薬剤耐性遺伝子がプラスミドを介して複数の菌種間で伝播することが関与する院内感染事例についての注意喚起がなされた。病原体ゲノム解析研究センター開発の GPAT（Global Plasmidome Analyzing Tool）iPAT（Inter Plasmid Analyzing Tool）は次世代シーケンサーの解読リードを解析し、かつ比較可能とするソフトである。

GPAT、iPAT はバイオインフォマティクスの専門知識が無くても、疫学調査に必要なプラスミドゲノム情報が得られるよう開発されている。院内感染事例の疫学解析を行う際、プラスミド解析をどのような形で実施可能であるが、実際の事例の解析をもとに検討を行った。

B. 研究方法

1. 効率的なプラスミドの塩基配列の解析手法の確立

対象菌株は国立感染症研究所細菌第二部保有の臨床分離グラム陰性桿菌 (*Klebsiella* 属、*Escherichia coli*、*Enterobacter* 属、*Citrobacter* 属、*Serratia marcescens*、*Providencia* 属、*Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属など) とした。

S1-PFGE によるプラスミド DNA の分離精製手法の検討を行った。

プラスミド DNA をエチジウムブロマイド (EtBr) 染色後に UV 照射下で回収した場合と、Gel Red あるいは SYBR Gold 染色後に青色 LED 光源 (460nm) 照射下で回収した場合の配列解読結果を比較した。また、DNA プラグ作成時の菌濃度については、通常の PFGE に用いるプラグ作製時と方法で準備したプラグと、菌液濃度を 2 倍にしたプラグを作製し、プラスミドバンドの可視性について評価を行った。

いずれの場合もプラスミド塩基配列の決定は病原体ゲノム解析研究センターにおいて、Nextera XT ライブラリーキット (Illumina) を用いて精製したプラスミドの DNA ライブラリーを作成し、その後、MiSeq (Illumina) にて 300 x 300 mer の paired-end 解読が行われた。また、プラスミド配列の解析は得られた MiSeq 解読リードは GPAT を用いた。解読結果の比較は主に得られた contig 数、最長 contig の長さ (bp)、N50 (bp)、全塩基配列長 (bp) により行った。

2. 事例に基づく有用性の検討

IMP-1 メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子を保有するプラスミドを介した院内感染事例の疫学解析を行った。

(倫理面への配慮)

菌株分離患者の個人情報、国立感染症研究所へは送付されていない。遺伝子配列解析は分離菌株のみが対象であり、患者の遺伝子情報は含まれない。従って、患者個人が特定できる情報は本研究では一切扱っていない。

C. 研究結果

DNA 染色方法

ゲルの染色に EtBr を用いた場合は、UV 照射による DNA 退色が激しく、一度に多数のサンプル

を泳動してバンドを切り出し、回収するのは困難だった。UV 照射不要の DNA 染色液である Gel Red で染色し青色 LED 照射をした場合、EtBr 染色 UV 照射に比べ感度が低く、確認できないバンドが認められた。プラグ作成時の菌液濃度を通常の 2 倍にした場合も、バンドの可視性に改善は認められなかった。一方、同じく UV 照射不要の DNA 染色液 SYBR Gold で染色し青色 LED 照射した場合、EtBr 染色とほぼ同等あるいはそれ以上の感度を示した。図 1 に SYBR Gold を用いた染色結果を示す。

解読結果の比較

EtBr 染色 UV 照射で回収したプラスミド DNA サンプル (n=173) と、SYBR Gold 染色青色 LED 照射下で回収したプラスミド DNA サンプル (n=328) の assemble 結果の比較を表に示す。EtBr 染色に比べて、SYBR Gold 染色で回収したサンプルは、contig 数が少なく、最長 contig の長さ及び N50 が長いことから、よりよい assemble 結果が得られた。

2. 事例に基づく有用性の検討

S1 PFGE により得られたプラスミド DNA の解読リードは GPAT を用いて解析を行った。院内感染事例の疫学解析の場合、対象とするプラスミド配列の相同性を確認することが重要となる。最初のスクリーニングとして、確認が必要であったのは、対象となる耐性遺伝子 (本事例の場合は *bla_{IMP}*) を保有するプラスミドの incompatibility type (inc type) と assembly 後の contig 数、全 contig の塩基数総和の (total base) であった。これらはすべて図 2 のように、GPAT の結果画面トップに表示される。またリスト形式でも表示されており、多量のプラスミドデータであっても効率的に確認できる。

対象となる耐性遺伝子の有無は、耐性遺伝子一覧表で確認可能である。しかし、*bla_{IMP}* は表記が “unknown” となる場合もあった (例: 図 2)。

解析対象となるプラスミドであると確認できたら、total base により、想定されたサイズであるか確認する。S1 PFGE 時の切り出しサイズと total base とに大きな乖離がある場合、より詳細な配列の検討を行う前に、trimming, assemble の条件検討や、サンプルの再調整の検討が必要となる。また、Contig 数は表で示したように、これまで解読したプラスミドにおいて、4-6 個以内が一般的であり、かつ同一のプラスミドであれば、その数に大きな差異は認めない。contig 数が 10 以上など、つながりが悪い場合は、回収したプラスミド DNA に問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

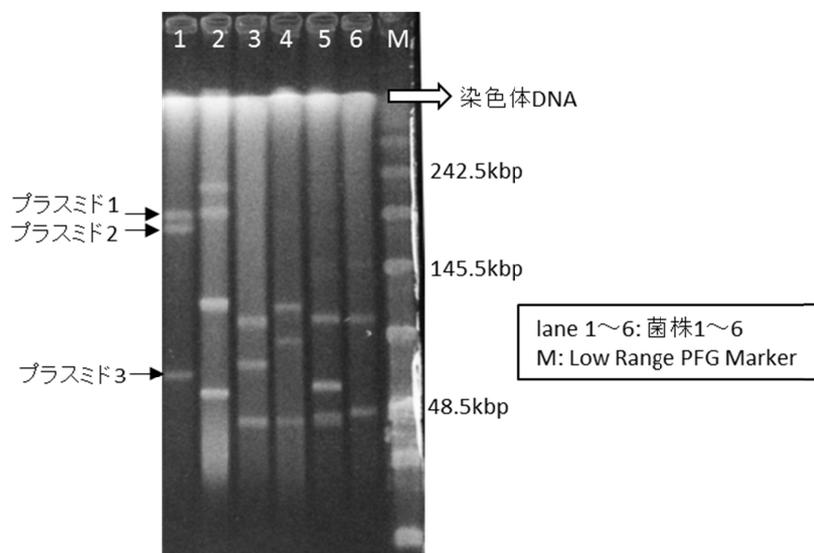


表 : *de novo assemble* で得られた contig の比較

		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)

Contigs の確認 塩基数の確認 incompatibility type の確認 耐性遺伝子の確認

