

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

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 黒田 誠

(国立感染症研究所)

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の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）委託事業による委託業務として、黒田誠（国立感染症研究所）が実施した平成26年度「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」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I . 委託業務成果報告 (総括)	
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 -----	1
黒田 誠	
GenEpid-Jデータベース開発に関わる技術開発	
II . 委託業務成果報告 (業務項目)	
1 . 海外からの耐性菌収集体制の構築 -----	11
柴山 恵吾	
2 . 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 -----	16
鈴木 里和	
3 . サルモネラ属菌の薬剤耐性プラスミドの解析 -----	20
大西 真	
4 . 家畜由来腸内細菌の薬剤耐性因子の疫学解析 -----	23
秋庭 正人	
III . 学会等発表実績 -----	29
IV . 研究成果の刊行物・別刷 -----	31

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- β -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指。

➤ 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- β -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、セフトキサシム(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- β -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サシム(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

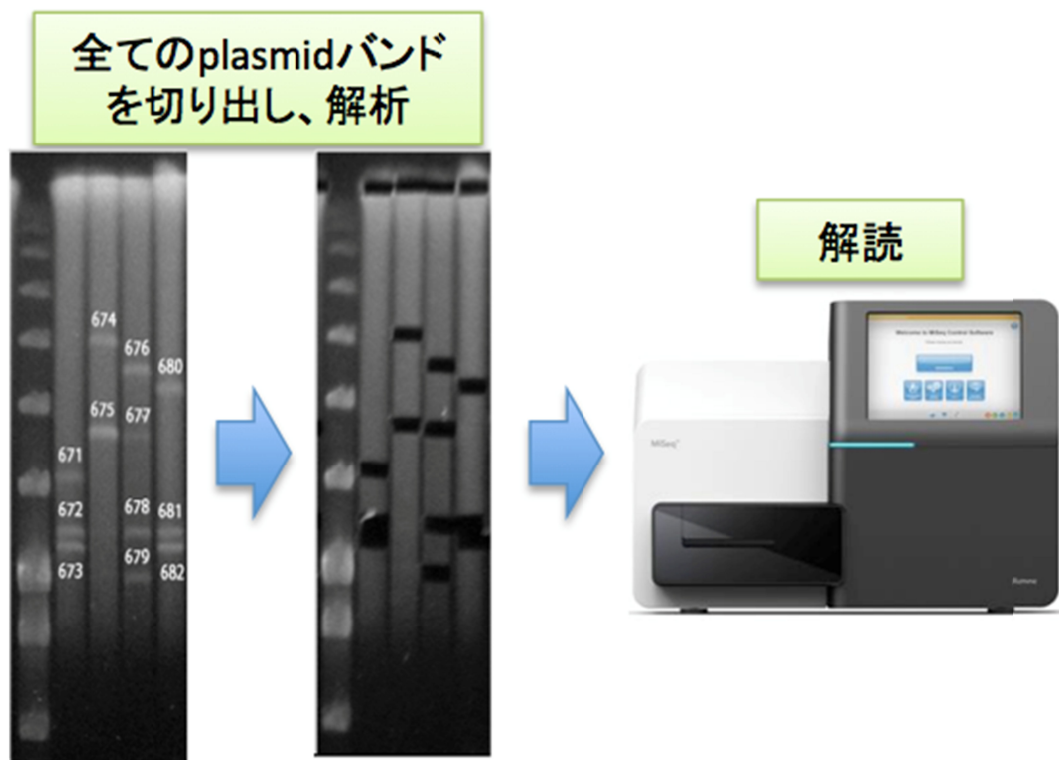


図 1. 薬剤耐性プラスミドの分離と NGS 解読への手順。分離株の PFGE アガロースプラグを S1-nuclease で処理を行い、環状プラスミドを線状にして PFGE 分離にてプラスミドサイズに応じた DNA バンドを個別に取得。菌種・菌株に特徴的な複数のプラスミドを同時に保有していることが多く、PFGE の結果、複数の DNA バンドとして検出ができる。バンド個別に回収・DNA 精製を行い、Nextera XT sample prep kit にてライブラリー作成、そして MiSeq 解読へと進む。



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)

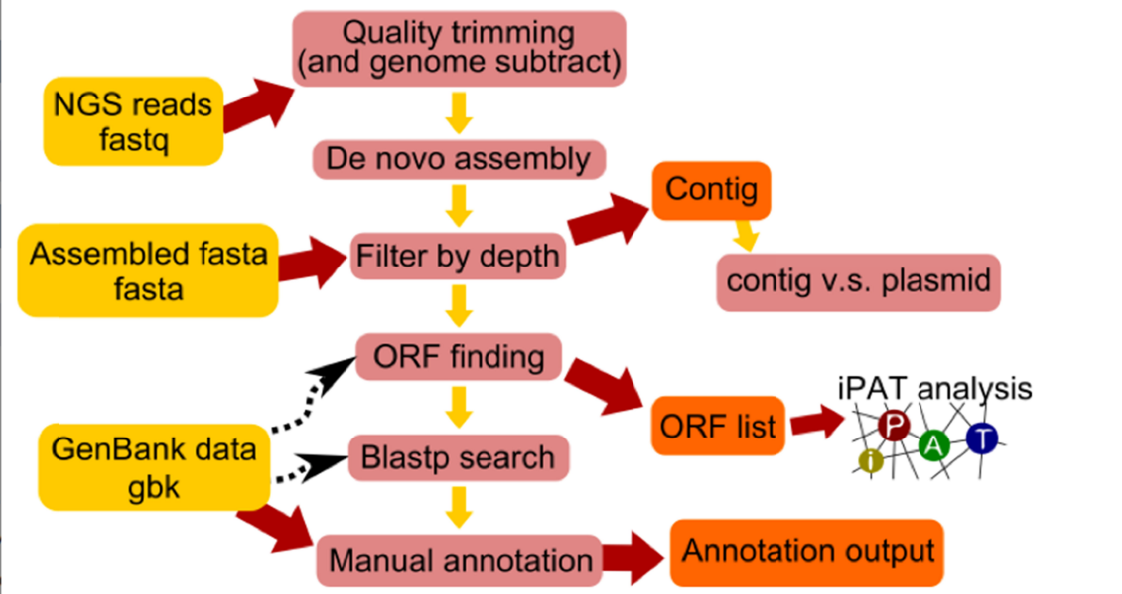


図2 GPAT によるプラスミド配列解析。MiSeq 解読で得られた NGS リード (.fastq.gz) を GPAT 解析パイプラインにアップロードして、プラスミド配列の遺伝情報 (塩基長、薬剤耐性因子、Inc タイプ、ホモロジー検索等) を取得。

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 ▾

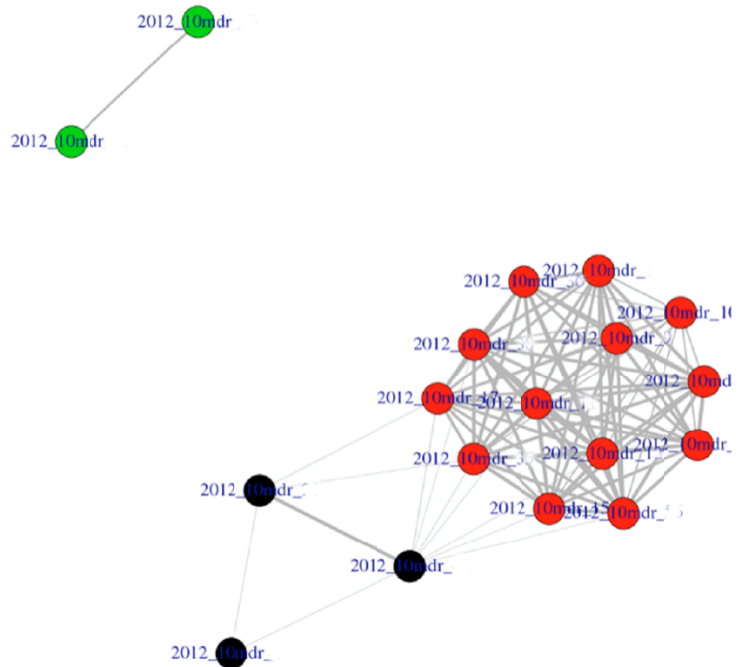


図4 iPAT によるネットワーク解析の結果(例)。90%相同性・5つ以上共通するアミノ酸配列を有する条件。およそ3つの集団に分離できることが判明した。



[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。

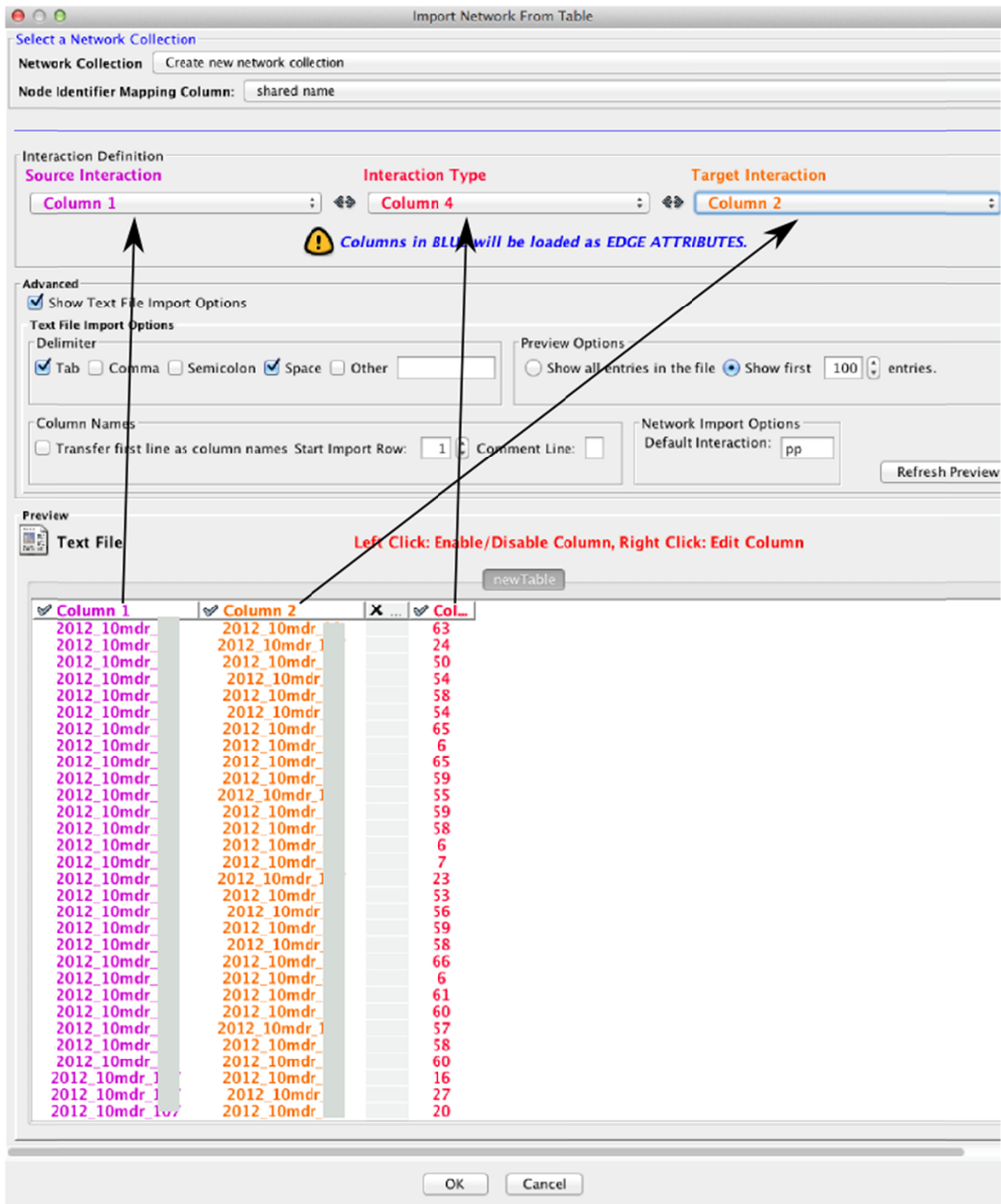


図6 Cytoscape v3.20 の import 機能から、Cytoscape 用のファイル(graph.txt)をインポートする。Column 1, 2, 4 をそれぞれ指定の位置に選択し、Source(あるプラスミド), interaction (edge を構成する遺伝子数)、Target (リンクさせたいプラスミド)として選択し、OK ボタンを押す。

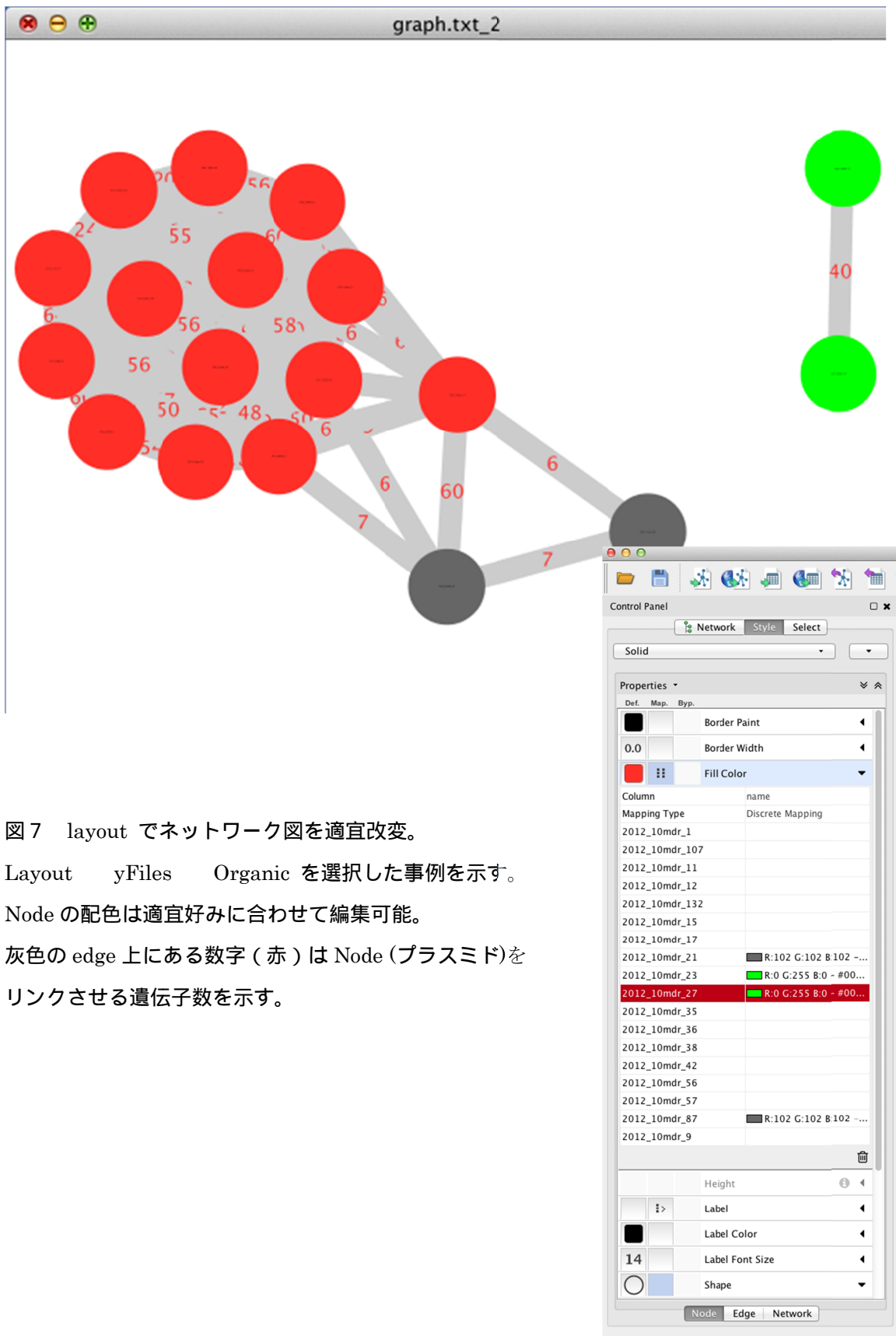


図7 layout でネットワーク図を適宜改変。

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。

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：海外からの耐性菌収集体制の構築

研究分担者 柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
研究協力者 鈴木 里和（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・室長）
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）

本研究では、国内外の入院患者由来のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を主な対象として、薬剤耐性のプラスミドのデータベースを構築し、国際社会における薬剤耐性菌、耐性遺伝子の動態を体系的に把握するシステムを構築することを目指している。今年度は国内医療機関から菌株を収集するとともに、アジア各国の耐性菌を収集するための体制構築を進めた。国内医療機関からは、カルバペネムに耐性または低度感受性の腸内細菌科細菌を266株受け入れ、それぞれの菌株からプラスミドを精製して696プラスミドの全塩基配列を決定し、データベースに格納した。タイ、ミャンマーについては、菌株の解析について共同研究を行うことで合意した。タイからは実際に8株のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を送付してもらい、菌株の輸送、解析の体制を構築できた。カンボジアについては、共同研究を開始することで双方が合意し、今後具体的な内容を検討することとした。台湾については、今年度は台湾CDCの研究者にこちらの解析の流れを体験してもらったが、来年度以降の共同研究の継続について引き続き協議を行う予定である。来年度以降、海外からも本格的に菌株を収集し、プラスミドを精製して解析を進める予定である。インドネシアについては、JANISの導入を始めた。海外機関から自動検査機器のデータを送信するにあたり、プログラム上の問題点を明らかにできたので、今後本格稼働にむけて改良を行う予定である。

A．研究目的

世界では新たな薬剤耐性菌が次々と出現し、国境を越えて拡散している。特に途上国では、新型のカルバペネム耐性菌が急速に拡散している。これらの耐性菌は日本にも輸入例がある。米国でも、CDCがカルバペネム耐性腸内細菌科細菌がこの10年で急速に増加したと報告した。国内でも類似の薬剤耐性菌による院内感染が散発しており、今後諸外国のように薬剤耐性菌が拡散していくことが危惧される。これらの耐性菌は有効な薬剤が無いが極めて限られるため、公衆衛生上深刻な問題である。薬剤耐性菌対策のためには、まず状況を的確に把握する必要がある。WHOは2013年に薬剤耐性菌対策に関するAdvisory Groupを組織し、各国にサーベイランスの強化を求めている（Global Report on Surveillance, 2014）。

このような背景から、本研究は国内外の入院患者由来のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を主な対象として、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指している。今年度は国内医療機関から菌株を収集するとともに、アジア各国の研究機関との共同研究体制の構築を進めた。

B．研究方法

1. 国内の医療機関からの菌株収集

医療機関でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌が分離された場合に、遺伝子解析を引き受け、プラスミドの解析を行った。

2. アジア各国との共同研究体制の構築

J-GRIDとの連携により、各国との共同研究体制の構築を進めた。大阪大学微生物病研究所のタイ拠点とは、マヒドン大学ラマチボディ病院、ウドンタニ病院、ミャンマー保健省のDepartment of Medical Research、インドチェンナイのVellore、Christian Medical College & Hospitalと共同研究体制の構築を進めた。神戸大学のインドネシア拠点とは、スラバヤのアイランガ大学熱帯病研究所、ストモ病院と共同研究体制の構築を進めた。その

ほか、WHO からの紹介で、カンボジア保健省と共同研究体制の構築を進めた。また、国立感染症研究所細菌第二部が従来から他研究プロジェクトで共同研究を行っていた台湾 CDC に、新たに本プロジェクトでの共同研究について協議した。

(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

1. 国内の菌株の収集

H26年4月から、H27年1月までに、カルバペネムに耐性または低度感受性の腸内細菌科細菌を266株受け入れ、それぞれの菌株からプラスミドを精製して696プラスミドの全塩基配列を決定し、データベースに格納した。これらについて、研究代表者が開発しているプラスミドの解析ツール GPAT(Global Plasmidome Analyzing Tool)と、プラスミド相互ネットワーク解析ツール(Inter Plasmid Analyzing Tool)による解析を進めている。

2. 大阪大学微生物病研究所との連携による共同研究体制

大阪大学微生物病研究所の研究者らと、9月にバンコクのラマチボディ病院、ウドンタニのウドンタニ病院を訪問し、先方で分離されるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の耐性遺伝子の解析について、共同研究の打ち合わせを行った。

これらの病院はいずれも1000床規模の病院であるが、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離は年間10-20株程度とのことだった。これは日本と比較して若干高い程度である。ベトナムやインドなどの医療機関では、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離頻度は非常に多いが、タイのこれらの病院は医療のレベルが高く、感染対策が充実しているものと思われた。タイではカルバペネム耐性の遺伝子はNDM-1型が最も多いとのことだった。ただ、耐性遺伝子が同定出来ない耐性株が半数程度あるとのことだった。これら2病院で分離されるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を提供してもらい、大阪大学のタイ拠点、感染研が連携して、耐性遺伝子をもつ Plasmid の全塩基配列を決定し、解析を行うことで合意した。大阪大学微生物研究所が先方と契約を交わした。

そして、H27年1月末にラマチボディ病院で分離された *Klebsiella pneumoniae* 8株が送付されて来た。これらの遺伝子型は、ST231が2株、ST11が2株、ST340が2株だった。すべての株がカルバペネム耐性遺伝子NDM-1を保有していた。現在、ゲノム解析を進めている。

日本の厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)を先方に説明したところ、関心をめしただため、今後先方の若手研究者に感染研に来てもらい、実際にJANISを見てもらうこととした。タイにはJANISのようなNational surveillanceがないため、今後これらの病院にJANISを展開していくことを念頭に、技術的な課題を整理していくこととした。

12月には大阪大学微生物病研究所の研究者らと、ミャンマー保健省のDepartment of Medical Researchを訪問した。Director General、Director、Deputy Director、微生物担当の研究者、Yangon General Hospitalの微生物検査ラボの現場担当者と共に共同研究について協議を行った。Department of Medical Researchは、薬剤耐性菌のゲノムデータベース構築に高い関心を示し、今後Yangon General Hospitalで分離される耐性菌株を使って共同研究を行うことに同意した。当面、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌に焦点を当てて菌株収集を行うこととした。まず先方の若手研究者に感染研で研修を行った上で、あちらで菌株を収集してもらうこととした。Yangon General HospitalからはJANISの導入を積極的に進めたいとの意向が示された。ただ、現場では薬剤耐性の検査について、コンピュータ管理がなく、報告は全て紙ベースで行われているなど、基本的なインフラに整備が必要であったので、今後お互いに情報交換をし、また研修を実施しながらJANISの導入を図っていくこととした。

3月に大阪大学微生物病研究所の研究者らとインドチェンナイのVellore、Christian Medical College & Hospitalを訪問し、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌に関する共同研究について交渉を行うことになった。

3. 神戸大学との連携による共同研究体制

神戸大学の研究者らとH27年2月にインドネシアスラバヤのJ-GRID神戸大学拠点のアイランガ大学熱帯病研究所及びストモ病院を訪問し、感染対策サーベイランス(JANIS)の概要及び日本の薬剤耐性菌の状況を解説した。日本で開発した

JANIS のシステムを紹介して、薬剤耐性菌の状況が継続的にビッグデータをもとに集計されていることを説明した。米国や一部の東南アジアの国では腸内細菌科細菌においてカルバペネム耐性菌が急速に増加しているが、日本ではまだ1%未満と、比較的少ないこと等を紹介した。また薬剤耐性遺伝子のデータベースについて紹介した。アイルランガ大学熱帯病研究所からは、小児の下痢性疾患の起病病原体についての調査の結果が報告された。雨期にロタウイルス、ノロウイルスによる下痢が多く、その他腸管出血性大腸菌、赤痢菌などによる下痢も多いことが報告された。

ストモ病院では、病院を見学するとともに、検査室にて JANIS を導入するためのソフトウェアのインストール、動作確認を行った。ストモ病院は病床数がおよそ1500床で、主に低所得層が対象であり、常に満床で廊下にもベッドがある状況であった。こちらの臨床検査室部門はインドネシアで最も大きく、20名ほどのスタッフから構成されている。インドネシア東部のレファレンスセンターとして機能しており、他の病院から検体が送られてくることもあるようであった。自動検査機器はBD社 Phoenix と Vitek2 の2つを有し、細菌検査については前者が利用されていた。1日あたり100-150検体が処理され、培養陰性検体は手書きで管理されていた。培養陽性検体(1日あたり60-70検体)は、Phoenixにより菌種同定および抗菌薬感受性測定されていた。ストモ病院における JANIS システムの導入に向け、検査システム EpiCentre で集計されたデータを JANIS データに変換するため、日本 BD 社により予め JANIS データ抽出用フィルターを作成してもらった。しかし、現地でフィルターを使用しても EpiCentre からデータを抽出できず、日本 BD 社の EpiCentre サポート担当者に国際電話で調整を行い、ストモ病院の臨床検査医とともに問題の確認と対応を行って、最終的に、JANIS 用 CSV ファイルの作成が可能となった。事前に作成していた BD 社の CSV ファイルを JANIS データフォーマットに変換するツールにより、JANIS データに変換されたファイルがデータベースに取り込まれる形式に整ったことを確認した。一部エラーデータもみられたため、今後 BD 社のコードと JANIS マスタとのすり合わせなどをしていく必要があることが分かった。

アイルランガ大学では最近新たに大学病院が設立されたが、現在は稼働しているのが部分的で

あるため、細菌検査の数は非常に少ないが、今後病院が本格稼働すれば大きな数になるとのことだった。将来的に JANIS の導入を働きかけることとした。

薬剤耐性遺伝子に関する共同研究については、引き続き内容について協議を継続することになった。

4. WHO を通じたカンボジアとの共同研究体制構築

WHO の紹介により、カンボジア厚生省を訪問し、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)の概要及び日本の薬剤耐性菌の状況を発表した。またカンボジア WHO 事務所も訪問し、同様の説明を行った。感染研で開発した JANIS のシステムを紹介し、薬剤耐性菌の状況が継続的にビッグデータをもとに集計されていることを説明した。そして多くの外国と比較して日本では肺炎球菌等の市中感染症の原因となる細菌でマクロライド耐性が多く、一方で院内感染を起こす大腸菌や *Klebsiella* 属、腸球菌、*Acinetobacter* 属では -ラクタム系薬剤の耐性が少ないことを説明した。

カンボジア厚生省の Department of Hospital Services の Director の Dr. Srun Sok から、カンボジアでは微生物検査を行う専門スタッフが不足していることや、検査は主に市中感染症を起こす病原体について実施されていること、さらに院内感染については対応する疫学の専門家や Infection control doctor も限られているという状況が説明された。まずは専門家を日本に派遣して研修を受けさせたいとの意向が示された。Department of Communicable Disease Control の Dr. Bun Srengからは、カンボジアの医療現場や社会の状況についてさらに詳細な説明があった。現在、厚生省として耐性菌対策のための行動計画を策定しつつあるが、サーベイランスについては基本的なインフラ整備から始めなければならない状況であることが説明された。また、国に承認されていない抗菌薬で粗悪なものが密輸され市中で安価で売られていることや、売り手も全く知識がなく、医師も病院の収入のために抗菌薬を多く処方することがあるようだった。法律や、その他の規制など、多くの面で制度が未整備であるようだった。しかしながら、Dr. Bun Sreng は薬剤耐性菌対策に関して日本との連携を要望しており、その後カンボジア厚生省から共同研究に合意する旨の正式な文

書が送付された(サインは Professor ENG HUOT、SECRETARY OF STATE)。

カンボジアの WHO 事務所では、Technical officer の Dr. Alex Costa、Dr. Tsuyuoka と WHO との協力関係について協議を行った。Dr. Alex は、JANIS のシステムについて高い関心を示し、カンボジアでの薬剤耐性菌のサーベイランスのキャパシティを向上させるため、日本にインフラの整備の支援を行ってほしいとの意向が示された。Dr. Tsuyuoka からは、カンボジアの医療現場スタッフの意欲の問題や、専門家を育成し活用する制度が十分でないことから、慎重に進めるよう助言があった。当方としてはこの研究班で出来る限りのことをやる旨回答し、今後も協議を継続することとした。WHO としても、カンボジア厚生省との橋渡しを積極的にやりたいとの意向が示された。

5. 台湾との共同研究体制構築

9月に台湾 CDC を訪問し、これまで国立感染症研究所細菌第二部と別プロジェクトで共同研究を行っていた台湾 CDC と、カルバペネム耐性腸内細菌会細菌に関する共同研究について交渉を行った。厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)についても解説し、日本の薬剤耐性菌の状況について紹介した。また、台湾での薬剤耐性菌の状況について情報収集を行った。

台湾では KPC 型カルバペネマーゼを産生する *Klebsiella* 属菌の増加が著しいことが紹介された。これは輸入例を発端として、台北から徐々に南の地方に拡散しているとのことだった。途上国で多く見られる NDM 型も頻繁に分離されることが紹介されていた。台湾 CDC にて収集している菌株の耐性遺伝子について、共同研究を行うことで合意した。11月に台湾 CDC で薬剤耐性菌の研究室の研究者が来所し、台湾で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌のサンプルを持参してゲノム研究センターと細菌第二部で解析を行った。

台湾では院内感染に関するサーベイランスとして、Taiwan Nosocomial Infections Surveillance (TNIS)がある。このサーベイランスは、台湾で医療機関に参加が義務づけられており、ほとんどの医療機関が参加しているとのことだった。このサーベイランスは、JANIS でいうと ICU 部門と SSI 部門に限られており、薬剤耐性菌の実態を調査する検査部門にあたるサーベイランスは実施されていないとのことだった。台湾 CDC の担当者に

JANIS の検査部門を紹介したところ、導入に関心を示したため、今後共同研究を始めることを視野にいれつつ、さらに情報交換を行うこととした。

D . 考察

国内の医療機関からの菌株収集については、従来からの感染研細菌第二部の体制をさらに強化することが必要である。海外の研究機関との連携については、海外の研究者が必ずしも薬剤耐性菌の分離や解析に精通していないことから、研修を通じて知識と技術を普及させることが必要である。

菌株の移動については、アジアの国では国外へ持ち出すことを禁止または制限していることがある。その場合でも DNA であれば可能のことも多いので、今後 Material Transfer Agreement を必要に応じて整備する必要がある。

JANIS の海外展開については、先方の国が薬剤耐性菌の分離状況に関する情報を無制限に海外に提供することに難色を示す場合が多い。JANIS は、提供されたデータを Confidential に扱うこと、またデータの所有権は病院にあることを十分説明し、公式に契約を交わす必要がある。

E . 結論

国内医療機関から、カルバペネムに耐性または低度感受性の腸内細菌科細菌を 266 株受け入れ、それぞれの菌株からプラスミドを精製して 696 プラスミドの全塩基配列を決定し、データベースに格納した。

タイ、ミャンマーについては、菌株の解析について共同研究を行うことで合意がされた。タイからは、8株のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を送付してもらい、菌株の輸送、解析の体制を構築できた。カンボジアについては、共同研究を開始することで双方が合意し、今後具体的な内容を検討することとした。台湾については、今年度は先方の研究者にこちらの解析の流れを体験してもらったが、来年度以降の共同研究の継続については、今後協議を行う予定である。インドについては、これから協議予定である。インドネシアについては、JANIS の導入を始めた。データの送信にあたり、プログラム上の問題点を明らかにした。今後、本格稼働にむけてプログラムの改良を行う予定である。

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
なし

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

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ケンシンググレードの 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 $\pm 10\%$ 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

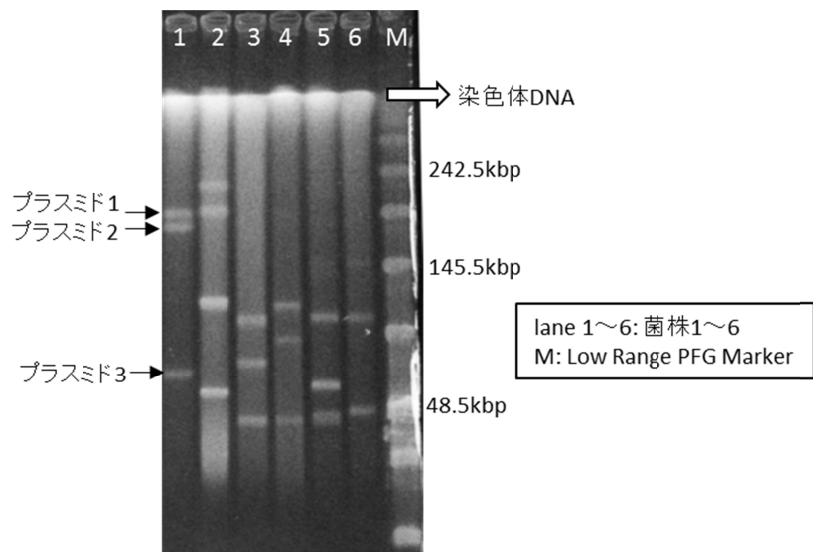
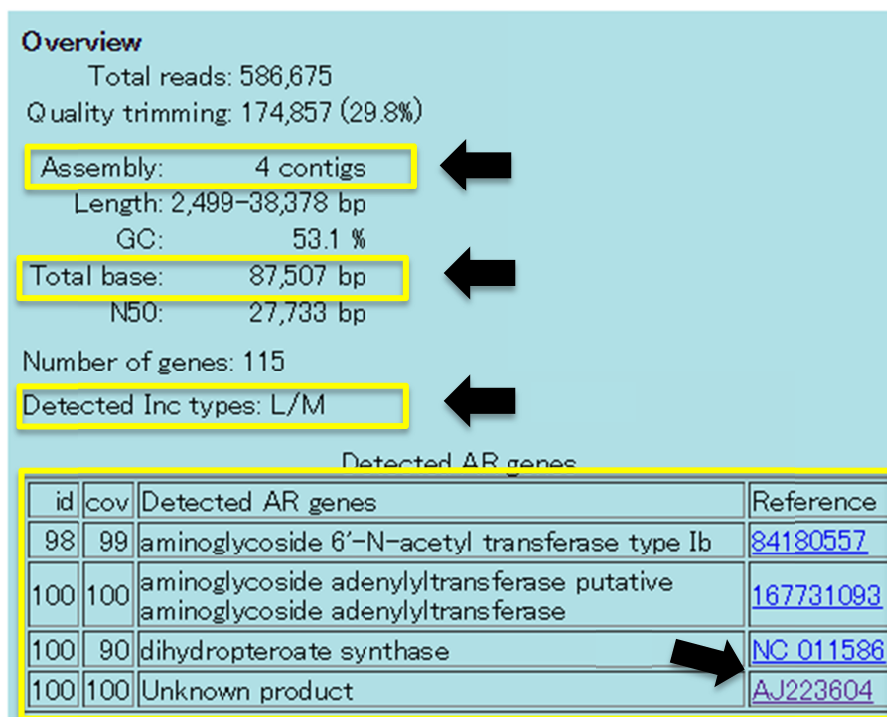


表 : *de novo assemble* で得られた contig の比較

		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



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）
委託業務成果報告書

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、いずれからも CTX-M-15 型の基質拡張型 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 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)、中間 (2)、耐性 (4) 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 世代セファロスポリン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。インド環境水由来大腸菌 55 株と牛由来 STEC 45 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払う必要がある。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いう傾向が認められた。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

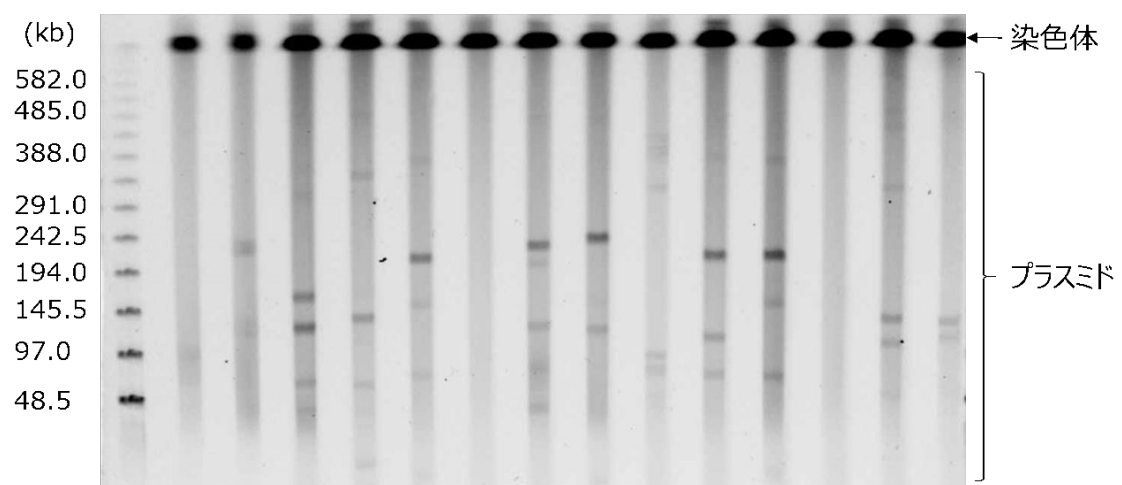


図 3.S1-ヌクレアーゼ消化後の PFGE 像

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
プラスミドーム・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	Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M.	Pathogens.	3(2):356-376, 2014	国外

Analysis.				
Characterization of blaTEM-52-Carrying Plasmids of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing <i>Salmonella enterica</i> 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):75-45-7. doi: 10.1128/AAC.02731-14. Epub 2014 Sep 22. PubMed PMID: 25246394.	国外
Whole-Genome Sequence of CMY-2-β-Lactamase-Producing <i>Salmonella enterica</i> 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。</p>	<p>IASR (病原 微生物検出 情報)</p>	<p>2014年12月</p>	<p>国内</p>
---	---	-----------------------------------	-----------------	-----------