研究成果報告書

１．研究課題名：プラスミド性薬剤耐性菌院内感染対策のための逐次全ゲノム細菌伝播解析タイムリーフィードバックワークフローの開発と検証

２．研究代表者氏名：青木 弘太郎

３．研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

論文

・Aoki K, et al., Microbiol Resour Announc. 2026 Mar 12;15(3):e0145125.

・青木弘太郎,環境感染学雑誌, 41 (5): 221-226, 2026

学会発表

・Aoki K, 36th World Congress of Biomedical Laboratory Science, Symposium 5,幕張 2026

４．研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

【背景】

薬剤耐性菌の院内伝播には、同一菌株がクローナルに広がる様式と、薬剤耐性遺伝子を搭載したプラスミドが菌種を超えて広がる様式がある。申請者らは前者に対し、逐次全ゲノム解析(WGS)とコアゲノム一塩基多型(cgSNP)系統解析の結果を感染対策へ速やかに返すワークフローのコンセプトである Tracking Antimicrobial Resistant Organisms Timely: TAROT を提案し、MRSA を用いた研究で妥当性を示した(Aoki K, et al. JAC Antimicrob Resist. 2025 May 7;7(3):dlaf069.)。しかし cgSNP 解析はクローナル伝播様式の同一菌種・同一 ST の菌株間でしか比較できず、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌(CPE)で問題となるプラスミド伝播は捉えられない。プラスミド伝播の解析は全ゲノム解析の中でもロングリードシークエンサーを用いた解析によってプラスミドそのものの構造全体を明らかにする必要があり、クローナル伝播様式の解析に比べて極めて専門的である。本研究では、代表者が開発した、ユーザー側で高性能なコンピューターを必要としない、クラウド型自動菌株バイオインフォマティクス解析ツールの TAROT-Analyzer にプラスミド解析ワークフローを新たに開発してアップデートし、その性能を保存菌株を用いて検証することを目的とした。

【開発したツール】

クラウド型自動菌株バイオインフォマティクス解析ツールの TAROT-Analyzer の一部として、ロングリードシークエンサーのナノポアシークエンサー(MinION, Oxford Nanopore Technologies)のリードを Web ブラウザの画面からアップロードするだけで、以下を自動で実行するパイプラインを開発した。

（1）Flye による *de novo* アセンブリで完全長ゲノムを得て、菌種同定、MLST、薬剤耐性遺伝子の検出(AMRFinderPlus、ResFinder)、インテグロン解析を行う。

（2）MOB-suite、PlasmidFinder、pMLST によりプラスミドを再構成・型別し、各 contig を染色体とプラスミドに分類する。閉じた環状プラスミドは施設ごとのプラスミドデータベースに自動登録する。MOB-suite が分類できない大型プラスミドも、環状でプラスミドと判定されたものは登録する。

（3）新規解析株のプラスミドをデータベースと照合し、Double Cut and Join (DCJ)-Indel 距離(pling: Frolova D et al., Microb Genom. 2024 Oct;10(10):001300., 2 つのプラスミドが互いに同じ構造を取るためには何回の遺伝的イベントとしての Indel が必要かをカウントし、遺伝的距離とするモデル)によって類似プラスミドを抽出する。結果はミニマムスパニングツリーの距離マップとして表示し、各プラスミドの宿主の菌種・ST・分離日・保有する耐性遺伝子を重ねて示す。

（4）選択したプラスミド同士の構造(相同領域、反転、挿入、耐性遺伝子の位置)を並べて比較・可視化する。

申請時は PlasmidFinder の Inc 型ごとに類似プラスミドを選ぶ計画であったが、同じ Inc 型でも系統の異なるプラスミドを区別できないため、配列全体の構造距離で判定する方式とした。なお、クローナル伝播解析の一貫として同一 ST に属する菌株同士は cgSNP 解析が実施される仕様である。したがって、ユーザーは cgSNP 解析やプラスミド解析のどちらを

実行するのか、選択する必要がない。

【検証に用いた材料と結果】

2007～2026 年に関東の 4 医療施設で分離された *bla*$_{IMP}$ 保有 CPE 77 株の保存菌株コレクション(16 菌種。*Enterobacter hormaechei* 32 株、*Klebsiella pneumoniae* 12 株ほか。既報 3 編の株を含む – Aoki K. et al., Antimicrob Agents Chemother. 2018 Feb 23;62(3):e02091-17.; Harada S, Aoki K. et al., BMC Infect Dis. 2021 Mar 22;21(1):289., Tsukada M, Miyazaki T, Aoki K, et al., Am J Infect Control. 2024 Jul;52(7):801-806.)を MinION で解析した。使用した Flow Cell は R10.4.1,ライブラリ調整キットは Rapid Barcoding Kit V14,ベースコーラーは Dorado v1.1.1 (sup@v5.2.0)を用いた。下流の解析に用いた解読深度はゲノム長の約 20x~50x とした。

(1) 完全長ゲノムと耐性遺伝子の検出：contig 数は中央値 3 (2～13)で、72 株では染色体が 1 本の環状 contig として再構築された。全株で *bla*$_{IMP-1}$ (75 株)または *bla*$_{IMP-11}$ (2 株)を検出し、76 株ではこれが環状プラスミド上にあることを特定できた。*bla*$_{IMP}$ は全株でクラス 1 インテグロンの遺伝子カセットとして存在し(主に *intI1-bla*$_{IMP-1}$-*aac(6')-IIc*)、1 株あたりの耐性遺伝子数は中央値 9 (4～29)であった。

(2) *bla*$_{IMP}$ 保有プラスミドの全体像：主に 2 群に分かれた。IncL/M プラスミド(約 77 kb、34 株)は 14 菌種から検出され、2017 年の病棟シンクに関連したアウトブレイク株に加え、2012～2026 年の株にも認められた。IncHI2 プラスミド(265～399 kb、32 株)はすべて pDLST ST1 で、2007 年から 2026 年まで約 20 年にわたり、*E. hormaechei* ST78 (18 株)を中心に、5 菌種 12 STs から検出された。ほかに、MOB-suite では分類できなかった IncHI1 プラスミド(408～421 kb、3 株)がある 1 施設で、2010 年と 2015 年に *E. hormaechei* ST88・ST62 と *E. roggenkampii* ST984 から検出され、互いの DCJ-Indel 距離は 2～4 であった。

(3) 類似薬剤耐性プラスミド保有株の自動検出：DCJ-Indel 距離 4 以下の類似プラスミドを共有する株の組を自動で抽出した。IncL/M 群では 458 ペアのうち 417 ペア(91%)が異なる菌種間、34 ペアが同じ菌種の異なる ST 間で、同一 ST かつ cgSNP 差 20 以下の組は 5 ペアにとどまった。構造上区別できない DCJ-Indel 距離 0 の 218 ペアのうち 195 ペアも異なる菌種間であった。IncHI2 群でも 80 ペアのうち 16 ペアが異なる菌種間、19 ペアが異なる ST 間、29 ペアが同一 ST でも cgSNP 差が 20 を超え、IncHI1 群の 3 ペアはすべて異なる菌種または ST 間であった。すなわち、菌種が異なる場合、および同菌種で ST が異なる場合でも、類似プラスミドを共有する株のペアを自動的に検出することができた。

(4) バイオインフォマティクス所要時間：TAROT-Analyzer を稼働させる解析サーバーはオーケストレーターとして 1 台、ワーカーとして 3 台の並列構成とし、2 台あたり 2 株を並列して解析可能とした。リードデータ(fastq.gz)の投入からレポート出力までの解析時間は、1 株あたり約 10～21 分だった。

【まとめ】

本研究では、TAROT-Analyzer を薬剤耐性プラスミド解析に対応させるアップデートを施し、その性能を CPE 保存菌株コレクションを用いて検証した。検証における解析結果の妥当性は既報に対して矛盾はなく、解析速度も感染対策へ貢献するタイムリーフィードバックにおいて問題ないと考えられた。今後は東邦大学医療センター大森病院において薬剤耐性菌分離株を前向きに逐次解析し、プラスミド伝播の早期探知に用い、その検出結果と病院疫学的情報との突合による検証研究を行う。