

図5 肉用牛及び肉用鶏由来*C. jejuni*におけるフルオロキノロン耐性の推移

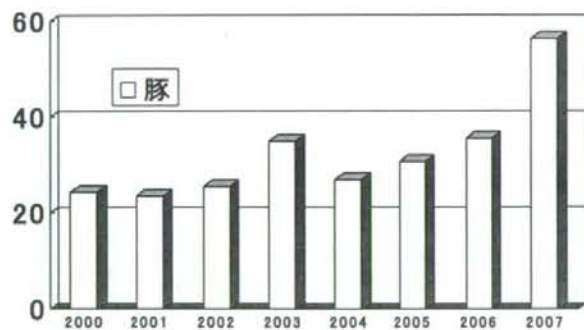


図6 豚由来*C. coli*におけるフルオロキノロン耐性の推移

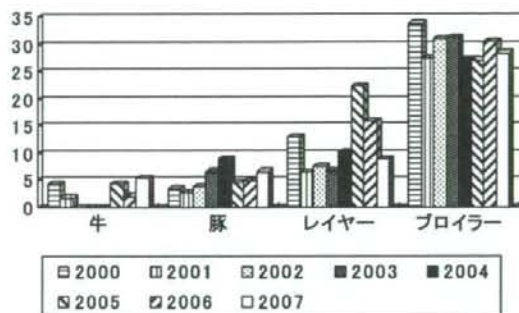


図7 健康動物由来大腸菌における動物種別ナリジクス酸に対する耐性率の年度別推移

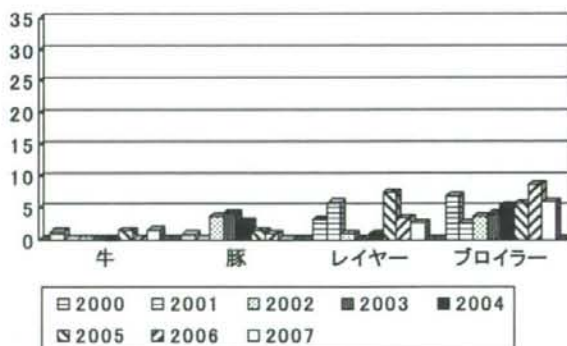
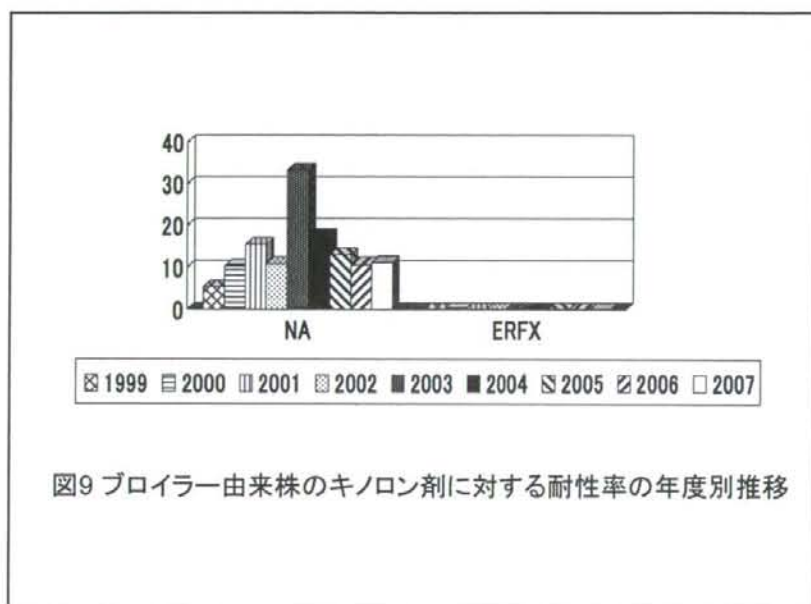


図8 健康動物由来大腸菌における動物種別フルオロキノロン剤に対する耐性率の年度別推移



厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究」

平成 18-20 年度総合研究報告書

課題名：家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析

研究分担者 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
研究協力者 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
研究協力者 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
研究協力者 片岡 康 日本獣医生命科学大学獣医微生物学教室

研究要旨

食用動物に対して抗菌剤を使用することが、どの程度耐性菌を選択するかとの命題に対する科学的評価を行うことを目的として、1976年から2005年の30年間に国内の牛から分離された *Salmonella* Dublin の薬剤感受性と耐性化機構を調べたところ、1980年代半ばのナリジク酸（NAL）製剤の動物薬市場導入が、わが国の牛群における NAL 耐性株の増加につながったことを示唆する成績が得られた。また、動物由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の一端を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。まず、動物由来サルモネラの保有する3種薬剤耐性（R）プラスミドの構造を解析したところ、多剤耐性を規定する因子としての R プラスミドの重要性が明らかとなった。次に牛から分離されたセファロスポリン耐性 *Salmonella* Typhimurium の解析を行った。供試菌株は全て *bla*_{CMY-2} 遺伝子の存在に基づく AmpC 型 βラクタマーゼ産生菌であった。*bla*_{CMY-2} はプラスミド、または染色体上に存在していた。染色体上に存在する株では *bla*_{CMY-2} が IncA/C プラスミドの一部と共に染色体にインテグレートされた可能性が示唆された。さらに動物病院において細菌感染症と診断されたペットから分離された大腸菌の薬剤感受性を調査したところ、小動物医療分野における抗菌剤使用がヒトの治療に汎用される抗菌剤に対する耐性菌の増加につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

食用動物に対して抗菌剤を使用することが、耐性菌の出現にどの程度影響するかとの命題に対する科学的評価を行うことが求められている。そこで、我々は一時点における限られた地域での調査ではなく、長期間にわたって日本全国から収集した牛由来 *Salmonella* Dublin の薬剤感受性を調べ、動物薬市場への新規抗菌剤導入に関する情報と併

せることで、食用動物に対する抗菌剤投与の影響を評価することを試みた。加えて本研究では動物由来食中毒菌サーベイランスの一環として、サルモネラ及び大腸菌の薬剤耐性化機構の一端を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 薬剤感受性試験

センディディスク(日本BD)を用いてClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ガイドラインに準拠した方法で耐性を判定した。また、最小発育阻止濃度(MIC)を測定するためにCLSIガイドラインに準拠した寒天平板希釈法またはEtest(AB Biodisk)を用いた。

なお、研究全体を通じて使用した薬剤とその略号は以下の通りである。アンピシリン, AMP;セフアゾリン, CFZ;セファロチン, CEF;セフォキシチン, FOX;セフロキシム, CXM;セフォタキシム, CTX;セフトリアキソン, CRO;セフチオフル, CTF;セフトジジム, CAZ;セフポドキシム, CPD;セフェピム, FEP;アズトレオナム, ATM;アモキシシリン, AMX;クランプラン酸, CLA;セフォタキシム+クランプラン酸, CTL;ストレプトマイシン, STR;ゲンタマイシン, GEN;カナマイシン, KAN;テトラサイクリン, TET;クロラムフェニコール, CHL;コリスチン, CST;ナリジクス酸, NAL;エンフロキサシン, EFX;オフロキサシン, OFX;シプロフロキサシン, CIP;ST合剤, SXT。

2) 遺伝子解析

薬剤耐性遺伝子のクローニング、PCR、シーケンス等の遺伝子解析はMolecular Cloning: A Laboratory Manual(第3版)に記載の方法に準じて行った。

3) パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)

既報のプロトコールに準じて実施した(獣医畜産新報, 53:14-21, 2000)。

4) 薬剤耐性(R)プラスミドの大腸菌への導入

大腸菌 ML1410 株を受容菌とした接合伝達試験または大腸菌 JM109 を受容菌としたエレクトロポレーション法によりRプラスミドを大腸菌に導入した。

5) キノロン系薬剤耐性化機構の解析

トポイソメラーゼ遺伝子(*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*)のQuinolone Resistance Determining

RegionをPCR増幅し、その塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。これによりキノロン系薬剤耐性を引き起こしたトポイソメラーゼのアミノ酸置換部位を特定した。さらに、温度感受性ベクターpTH18ks1またはpTH18cs1を用いた遺伝子交換法により、*gyrA*復帰変異株またはサルモネラの主要な多剤排出ポンプを規定する遺伝子*acrAB*の欠失変異株を作出し、親株との間でキノロン系薬剤に対するMICを比較した。

C. 研究結果および考察

1) *Salmonella* Dublin 薬剤感受性の変化に関する研究

食用動物に対して抗菌剤を使用することがどの程度耐性菌を選択するかとの命題に対する科学的評価を行うために、1976年から2005年の30年間に国内の牛から分離した*S. Dublin* 168株の薬剤感受性を調べた。

1980年代前半から1990年代前半までに分離された菌株の多くはRプラスミドを保有し、AMP、STR、KAN、TET等、4種以上の薬剤に耐性を示した(図1)。1980年代前半までの分離株にNAL耐性菌は認められなかったが、動物用NAL製剤が市場導入された1980年代半ばには典型的な2峰性分布を示し、1990年代前半以降の株はほとんどがNAL耐性を示した(表1)。1990年代後半以降の分離株の多くはRプラスミドを保有せず、KANとNALの2剤に耐性を示した。フルオロキノロン(FQ)製剤EFXが導入された1990年代前半以降もFQ系抗菌剤であるEFX、OFX、CIPに対する耐性菌は認められなかった。

NAL感受性の5株と耐性の9株を選び、トポイソメラーゼ遺伝子のQRDRの塩基配列からアミノ酸置換部位の特定を試みたところ、NAL耐性株では*gyrA*遺伝子の87番目のアスパラギン酸(Asp)がチロシン(Tyr)に変異していることが明らかと

なった。本研究では単一の変異しか認められないにもかかわらず、FQに対するMICは最大で4倍異なっており(表2)、トポイソメラーゼ変異以外の耐性化機構の関与が示唆された。

AcrAB-TolCシステムはサルモネラの主要な多剤排出ポンプである。S. DublinのFQ低感受性に対する本システムの関与を検証する目的で、表2に含まれる6株を用いて *acrAB* 遺伝子欠失変異株及び *gyrA* 復帰変異株を作成し、親株との間でキノロン系薬剤に対するMICを比較した。表3に示したように、NALでは *gyrA* 復帰変異株の方が *acrAB* 遺伝子欠失変異株よりもMICの減少幅が大きかった。一方、FQでは *acrAB* 遺伝子欠失変異株の方が *gyrA* 復帰変異株よりもMICの減少幅が大きく、親株のMICが大きい株ほど *acrAB* 遺伝子欠失変異によるMICの減少幅が大きい傾向が示された。以上の結果から、*gyrA* 変異株はNALの使用により選択されたもので、AcrAB-TolCシステムはFQに対する感受性の低下に寄与している可能性が示唆された。これらの成績は、獣医領域におけるNAL導入が国内の牛群におけるS. Dublinの薬剤感受性に影響したが、EFXの導入は影響を及ぼさなかったことを示唆している。

2) 家畜由来サルモネラが保有する3種Rプラスミドの構造解析

豚由来S. Choleraesuisが保有する208 kbプラスミド、pMAK1、牛由来S. Dublinの保有する62 kbプラスミド、pMAK2と40 kbプラスミド、pMAK3の全塩基配列をショットガンシーケンシング法で決定し、アノテーション終了後、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)に登録した。

ショットガンシーケンシング法による塩基配列決定の冗長度はpMAK1、pMAK2、pMAK3でそれぞれ12.7、12.4、10.7であった。DDBJに登録した各プラスミドの概要を表4に示した。

pMAK1はS. Typhi str. CT18株の保有するIncHI1プラスミドと類似度が高く、水銀耐性に関与する *merRTPCADE* オペロンの他、11の薬剤耐性遺伝子を座乗していた。このうち *dfraA12*、*aadA2*、及び *sul1* はクラス1インテグロンを構成していた。IncHI1 Rプラスミドの保有はS. Typhi及びS. ParatyphiAについて報告されている。一方、我々の調査によると国内の家畜から分離された血清型Typhimurium, Dublin, Panamaでも類似のプラスミド保有が確認されており(未発表成績)、サルモネラの多剤耐性を規定する因子としてのIncHI1プラスミドの重要性を示唆する成績と考えられた。

pMAK2はpMUR050(大腸菌由来)及びR46に近縁なIncNプラスミドで7つの薬剤耐性遺伝子を座乗していた。このうち *blaTEM-1* はTn3に、*aph*、*ble*、*sph*はTn5に、*tetA*はTn1721に含まれていた。本プラスミドはS. Dublinが1980年代前半に獲得したもので、pMAK2及びその派生プラスミドを保有する株は1990年代前半まで最優勢であった。その後、pMAK2を保有する株の割合は減少し、2000年代前半における保有率は15.4%であった。1980年代半ばのNAL及び1990年代前半のEFX等の動物薬市場導入に伴う、野外での薬剤使用状況の変化がpMAK2保有率の変化に影響を与えたと考えられる。

pMAK3は大腸菌由来R388に近縁なIncWプラスミドでクラス1インテグロンを構成する4つの薬剤耐性遺伝子、*aac(6')-Iae*、*aadA2*、*sul1*、*floR*を座乗していた。本プラスミドは1990年代前半に分離されたS. Dublinの一部が保有していたもので、1990年代後半以降の株からは分離されていない。

3) 牛由来Salmonella Typhimuriumのセファロスポリン耐性に関する研究

牛から分離されたセファロスポリン耐性S.

Typimurium はいずれも bla_{CM-2} 遺伝子の存在に基づく AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌であった (表 5)。

bla_{CM-2} の存在部位を明らかにする目的で HindIII 消化後のプラスミド DNA を用いてサザンプロット解析を実施したところ、3687、3695、3714 株ではプラスミド上にシグナルを認めたが、3553、3601、3609 株では認められなかった (図 2)。

次に 3553、3601、3609 株を用いてゲノミックサザンプロット解析を実施したところ、PstI を除く 14 の制限酵素で bla_{CM-2} シグナルを 1 本認めたが、PstI では 2 本のシグナルが認められた (図 3)。 bla_{CM-2} 配列中には PstI 切断部位が 1 カ所存在するため、この結果は bla_{CM-2} がゲノム中に 1 コピー存在することを示唆する成績と考えられた。

さらに bla_{CM-2} が、いわゆるメガプラスミド (1000 kb プラスミド) 上に存在する可能性を排除するため、PFGE 後のゲノム及びプラスミド DNA を用いてサザンプロット解析を実施した。3553、3601、3609 株において約 500 kb の XbaI 消化フラグメントに bla_{CM-2} シグナルが認められたが、プラスミドサンプルについては XbaI 消化、未消化のいずれの場合もシグナルが認められなかった (図 4)。

そこで、これらの株の染色体上における bla_{CM-2} 挿入部位を明らかにする目的で、ゲノミックサザンプロット解析を実施し、EcoRI と SacI で 2 重消化したときに得られる約 9 kb 断片に bla_{CM-2} シグナルを確認した。この断片を pSTV ベクターにクローニング後、塩基配列を決定し、DBJ に登録した (AB365867)。図 5 に示す 4 つの ORF が確認されたが、全長にわたって本フラグメントは *Salmonella* Newport 由来 IncA/C プラスミド、pSN254 の配列 (CP000604) と完全に一致しており、染色体上の挿入部位特定には到らなかった。

3553、3601、3609 株と S. Newport 由来 IncA/C プラスミド pSN254 の関連を明らかにするために

Welch ら (PLOS ONE, 2: 1-6, 2007) の IncA/C backbone 13 領域の PCR 検出を試みたところ、3609 株の 140 kb プラスミドには bla_{CM-2} 遺伝子及び IncA/C backbone は座乗していないことが明らかとなった (表 5)。一方、3553、3601、3609 株の解析では IncA/C backbone の一部が検出できたことから、これらは bla_{CM-2} を含む IncA/C プラスミドの一部が染色体に挿入された株である可能性が考えられた (表 5)。3609 株は CHL 及び SXT に対して耐性であるのに対し、SMA1 株は感受性であることから、IncA/C プラスミド上に存在した両薬剤に対する耐性遺伝子も bla_{CM-2} と共に染色体に挿入された可能性が考えられた (表 5)。この領域は複数の薬剤耐性遺伝子が存在する新規の genomic island かも知れない。今後はこの領域の染色体における挿入部位と構造を明らかにする必要がある。

bla_{CM-2} は *Citrobacter freundii* の染色体に存在したものがプラスミドに転移し、その後、他の腸内細菌に広がったと考えられている。これまで報告されているサルモネラの bla_{CM-2} のほとんどはプラスミド上に存在する。Zigota ら (Antimicrob. Agents Chemother., 61: 1389-1399, 2008) は bla_{CM-2} がプラスミドと染色体の両方に存在する株を報告しているが、この株における染色体上の bla_{CM-2} コピー数は不明である。 bla_{CM-2} が染色体に 1 コピーのみ存在するサルモネラに関する報告はない。そこで、これら菌株のセファロスポリン感受性を調査したところ、3553、3601、3609 株は CEF、CXM、FOX、CPD に対して耐性を示したが、CXM、FOX に対する MIC は bla_{CM-2} がプラスミド上に存在する 3687、3695、3714 株と比べて同じか、または低い値を示した。同様に 3553、3601、3609 株の CTX、CRO、CAZ に対する MIC も 3687、3695、3714 株と比べて同じか、または低い値を示した (表 6)。3553、3601、3609 株において bla_{CM-2} は染色体上に 1 コピー存在するのに対し、3687、3695、3714 株

では *bla_{W-2}* がプラスミド上に存在するため、そのコピー数は複数と考えられ、これがセファロスポリン感受性の差につながった可能性が考えられた。

4) ペットからの食中毒菌分離と薬剤感受性調査

2005年4月から2007年3月までに日獣大動物医療センターにて、二次診療を受診した犬、猫、小鳥、エキゾチックアニマルなどの症例のうち、910症例(2005年度581症例、2006年度329症例)が細菌感染症と診断され、このうち58症例(6.4%)で起病菌として大腸菌が分離同定された。

分離された大腸菌59株を用いて12薬剤(AMP、CFZ、CTF、STR、GEN、KAN、TET、CHL、CST、NAL、EFX、SXT)に対する受性を調べたところ、48株(81.4%)が何らかの薬剤に耐性を示した。このうち33株(55.9%)は3剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。第3世代セファロスポリン、CTFとFQ系薬剤、EFXの耐性率は、それぞれ39.0%及び54.2%であった(表7)。

食品安全委員会は薬剤耐性菌が出現した場合の代替薬の有無という判断基準に基づいて動物用抗菌剤を系統別に分類した。それによると、第3、4世代セファロスポリンとFQは極めて高度に重要であることを示すランクIに分類されている。したがって、これらの薬剤に対する耐性大腸菌の存在は公衆衛生上、問題であると考えられた。

EFXに対するMICが512または512 μ g/mlを示した5株のトポイソメラーゼにおけるアミノ酸置換部位の同定を試みたところ、全ての株でGyrAの2カ所(Ser83→Leu、Asp87→Asn)及びParCの1カ所(Ser80→Ile)に同じ変異が認められた。加えて、4株ではParCの他の部位に1カ所変異が認められたが、変異のパターンは3つ存在した(表8)。3カ所認められた共通の変異はFQ耐性大腸菌野外分離株で高頻度に観察されることが文献的に報告されている。さらに、5株のトポイソメラ

ーゼにおける変異の総数が3または4個であることも野外分離株に関する文献的報告と一致していた。

D. 結論

30年間にわたって収集したS Dublin株の薬剤感受性動向は、1980年代半ばのNAL製剤の動物薬市場導入が、わが国の牛群におけるNAL耐性株の増加につながったことを示唆している。

サルモネラ由来3種Rプラスミドの解析結果から、サルモネラの多剤耐性を規定する因子としてのRプラスミドの重要性が明らかとなった。

染色体上に1コピー存在する *bla_{W-2}* がS Typhimuriumのセファロスポリン耐性に寄与することが明らかとなった。この遺伝子領域は新規のgenomic islandである可能性がある。

小動物医療分野における抗菌剤使用がヒトの治療に汎用される抗菌剤に対する耐性菌の増加につながる可能性が示唆された。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

- 1) M. Akiba, Y. Nakaoka, M. Kida, Y. Ishioka, T. Sameshima, N. Yoshii, M. Nakazawa, I. Uchida, N. Terakado: Changes in antimicrobial susceptibility in a population of *Salmonella enterica* serovar Dublin isolated from cattle in Japan from 1976 to 2005. 60, 1235-1242, 2007.
- 2) M. Akiba, T. Sameshima, I. Uchida, M. Nakazawa: Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Japan. Food Additives and Contaminants. 25, 1076-1079, 2008.
- 3) M. Sugawara, D. Fukamizu, H. Okazaki, K.

Tanaka, I. Uchida, H. Izumiya, H. Watanabe, M. Kusumoto, T. Iwata, M. Akiba: Chromosomal location of *bla_{CM-2}* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its contribution to cephalosporin resistance. 2009. Submitted for publication.

4) 秋庭正人: 動物に対するキノロン系抗菌剤の使用と耐性菌選択との関連。動物用抗菌剤研究会報、30、29-33、2008。

5) 秋庭正人: わが国の牛群における *Salmonella* Dublin 薬剤感受性の変化。畜産技術、643、6-10、2008。

6) 秋庭正人、喜田宗敬、中岡祐司、内田郁夫、吉井紀代、中澤宗生: わが国の牛から分離された *Salmonella* Dublin の薬剤感受性。第142回日本獣医学会学術集会、2006年9月22日、山口。

7) M. Akiba, I. Uchida, N. Yoshii, M. Nakazawa: Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from cattle in Japan, 10th International Symposium on Toxic

Microorganisms, Nov. 8, 2006, Washington D. C., USA.

8) 秋庭正人、岡崎ひづる、石岡幸子、内田郁夫、吉井紀代、中澤宗生: わが国の牛から分離されたセファゾリン耐性 *Salmonella* Typhimurium の性状。第144回日本獣医学会学術集会、2007年9月2日、札幌。

9) 秋庭正人、中岡祐司、鮫島俊哉、吉井紀代、中澤宗生、内田郁夫、寺門誠致: 日本の牛群における *Salmonella* Dublin の薬剤感受性。第81回日本細菌学会総会、2008年3月25日、京都。

10) 菅原克、深木大、岡崎ひづる、石岡幸子、岩田剛敏、内田郁夫、秋庭正人: 国内の牛から分離されたセファロスポリン耐性サルモネラにおける *bla_{CM-2}* 遺伝子の存在様式。第146回日本獣医学会学術集会、2008年9月25日、宮崎。

11) 秋庭正人: 家畜・家禽のサルモネラ感染症の動向と薬剤耐性株の分離。第82回日本細菌学会総会、2009年3月12日、名古屋。

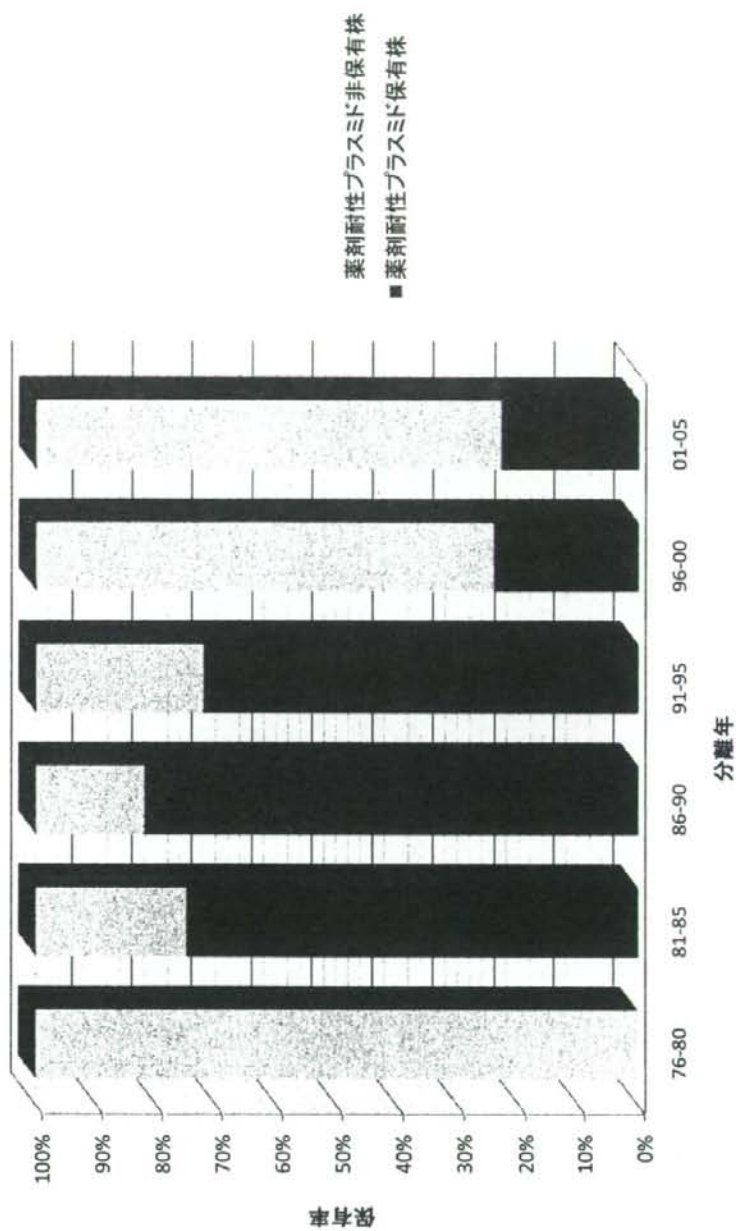


図1. S. Dublin薬剤耐性プラスミド保有率の推移

表1. S. Dublinのキノロン系抗菌剤に対する感受性の推移

期間	株数	MIC (mg/L)											
		NAL		EFX		OFX		CIP					
		値幅	MIC ₉₀	値幅	MIC ₉₀	値幅	MIC ₉₀	値幅	MIC ₉₀				
1976-1980	7	2-4	4	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125		
1981-1985	8	2-4	4	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125		
1986-1990	39	2->512	512	<0.125-1	0.5	<0.125-1	0.5	<0.125-0.25	0.25	<0.125-0.25	0.25		
1991-1995	68	128->512	512	<0.125-1	0.5	0.25-2	1	<0.125-1	0.25	<0.125-1	0.25		
1996-2000	33	4->512	512	<0.125-1	1	<0.125-2	2	<0.125-1	0.5	<0.125-1	0.5		
2001-2005	13	256-512	512	0.25-0.5	0.5	0.5-1	1	0.25-0.5	0.25	0.25-0.5	0.25		

表2. キノロン系抗菌剤に対する*S. Dublin*の感受性とトポイソメラーゼ変異

菌株番号	分離年	MIC (mg/L)					トポイソメラーゼ 変異
		NAL	EFX	OFX	CIP		
974	1985	2	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	ND ^a
489	1981	4	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	ND
729	1983	4	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	ND
2876	1998	4	<0.125	0.125	0.125	<0.125	ND
2402	1996	4	<0.125	0.25	0.25	<0.125	ND
1886	1992	256	0.5	0.5	0.5	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
1177	1988	512	0.25	0.5	0.5	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
1242	1989	512	0.5	0.5	0.5	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
1506	1990	512	0.5	0.5	0.5	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
3486	2004	512	0.5	1	1	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
1563	1990	512	1	1	1	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
2185	1995	512	1	1	1	1	GyrA (Asp87Tyr)
3468	1998	512	1	1	2	0.5	GyrA (Asp87Tyr)
2226	1994	>512	1	2	2	0.5	GyrA (Asp87Tyr)

^a検出できず

表3. *gyrA*復帰変異と*acrAB*欠失変異が*S. Dublin*のキノロン系抗菌剤
に対する感受性に及ぼす影響

菌株番号	<i>gyrA</i> 変異	MIC (µg/ml)											
		NAL		EFX		OFX		CIP					
親株	<i>gyrA</i> ^{int a} <i>acrAB</i> ^{del b}	親株	<i>gyrA</i> ^{int} <i>acrAB</i> ^{del}	親株	<i>gyrA</i> ^{int} <i>acrAB</i> ^{del}	親株	<i>gyrA</i> ^{int} <i>acrAB</i> ^{del}	親株	<i>gyrA</i> ^{int} <i>acrAB</i> ^{del}				
974	ND ^c	2	ND ^d	0.5	0.063	ND ^d	0.004	0.063	ND ^d	0.008	0.016	ND ^d	0.004
729	ND ^c	4	ND ^d	0.5	0.063	ND ^d	0.004	0.063	ND ^d	0.008	0.016	ND ^d	0.004
1242	Asp87Tyr	512	4	16	0.5	0.063	0.063	0.5	0.125	0.063	0.25	0.031	0.031
1506	Asp87Tyr	512	4	16	0.5	0.063	0.063	0.5	0.125	0.063	0.25	0.031	0.031
3468	Asp87Tyr	512	8	16	1	0.125	0.031	2	0.25	0.063	0.5	0.063	0.031
2226	Asp87Tyr	>512	8	16	1	0.125	0.031	2	0.25	0.063	0.5	0.063	0.031

^a *gyrA*復帰変異株; ^b *acrAB*欠失変異株; ^c検出できず; ^d実施せず

表4. サルモネラ由来3種薬剤耐性プラスミドの概要

プラスミド名	pMAK1	pMAK2	pMAK3
DDBJ登録番号	AB366440	AB366441	AB366442
由来	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>S. Dublin</i>	<i>S. Dublin</i>
サイズ(kb)	208	62	40
ORF数	236	54	52
レプリコン	IncHI1	IncN	IncW
耐性遺伝子	<i>bla</i> TEM-1, <i>catA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA2</i> , <i>aphA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA12</i> , <i>mphA</i> , <i>merRTPCADE</i>	<i>bla</i> TEM-1, <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sph</i> , <i>tetA</i> , <i>aph</i> , <i>ble</i>	<i>floR</i> , <i>aac(6')-Iae</i> , <i>aadA2</i> , <i>sul1</i>
近縁プラスミド	<i>S. Typhi</i> str. CT18 pHCM1 (218 kb)	<i>E. coli</i> pMUR050 (57 kb) R46 (51 kb)	<i>E. coli</i> R388 (34 kb)

表5. セファロスポリン耐性*S. Typhimurium*及び関連菌株の性状

株名	種名	由来	分離年	プラスミド (Kb)	PCR 結果 ^a												
					<i>bla_{CMY-2}</i>		IncA/C backbone ^b										
					repA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3553	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2004	140	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3601	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2005	140	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3609	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2005	140	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3687	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2007	95, 180	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3695	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2007	150, 180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3714	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2006	95, 210	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JM109	<i>E. coli</i>	Takara Bio Inc.		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMA1	<i>E. coli</i>	JM109 transformant of 3609 plasmid		140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA1	<i>E. coli</i>	JM109 transformant of 3687 plasmid		95	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA2	<i>E. coli</i>	JM109 transformant of 3695 plasmid		180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMA3	<i>E. coli</i>	JM109 transformant of 3714 plasmid		210	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a+, 増幅陽性; -, 増幅陰性

^bWelch ら (2007)

表6. セファロスポリン耐性*S. Typhimurium*及び関連菌株の薬剤感受性

株名	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																			
	AMP	CEF	FOX	CXM	CTX	CRO	CAZ	CPD	FEP	ATM	AMX/CL		ESBL test		CHL	STR	KAN	GEN	TET	SXT
											A	A	CTX	CTL						
3553	256<	256<	48	32	12	32	16	256<	0.125	1.5	48	16<	1<	96	256	256<	0.25	96	256<	
3601	256<	256<	48	64	16	32	48	256<	0.38	4	48	16<	1<	256<	384	256<	0.25	96	256<	
3609	256<	256<	32	64	12	32	24	256<	0.25	1.5	48	16<	1<	96	512	256<	0.25	96	256<	
3687	256<	256<	256<	256<	48	64	256<	256<	1	12	128	16<	1<	4	48	256<	0.25	128	0.19	
3695	256<	256<	256<	256<	32	96	256<	256<	0.75	8	32	16<	1<	256<	1024<	256<	24	192	0.5	
3714	256<	256<	96	64	16	48	96	256<	0.5	4	64	16<	1<	4	24	256<	0.25	128	0.19	
JM109	2	8	4	3	0.032	0.032	0.125	0.38	0.023	0.047	3	<0.25	0.032	6	1	1	0.125	1	0.032	
SMA1	256<	8	4	3	0.032	0.032	0.125	0.5	0.023	0.047	4	<0.25	0.032	6	96	256<	0.125	32	0.094	
CMA1	256<	256<	192	32	12	32	48	256<	0.25	4	96	16<	1<	6	1	1	0.125	2	0.032	
CMA2	256<	256<	192	32	12	32	48	256<	0.25	4	96	16<	1<	256<	128	1.5	6	32	0.19	
CMA3	256<	256<	96	32	8	24	48	256<	0.25	4	48	16<	1<	6	6	256<	0.19	64	0.047	

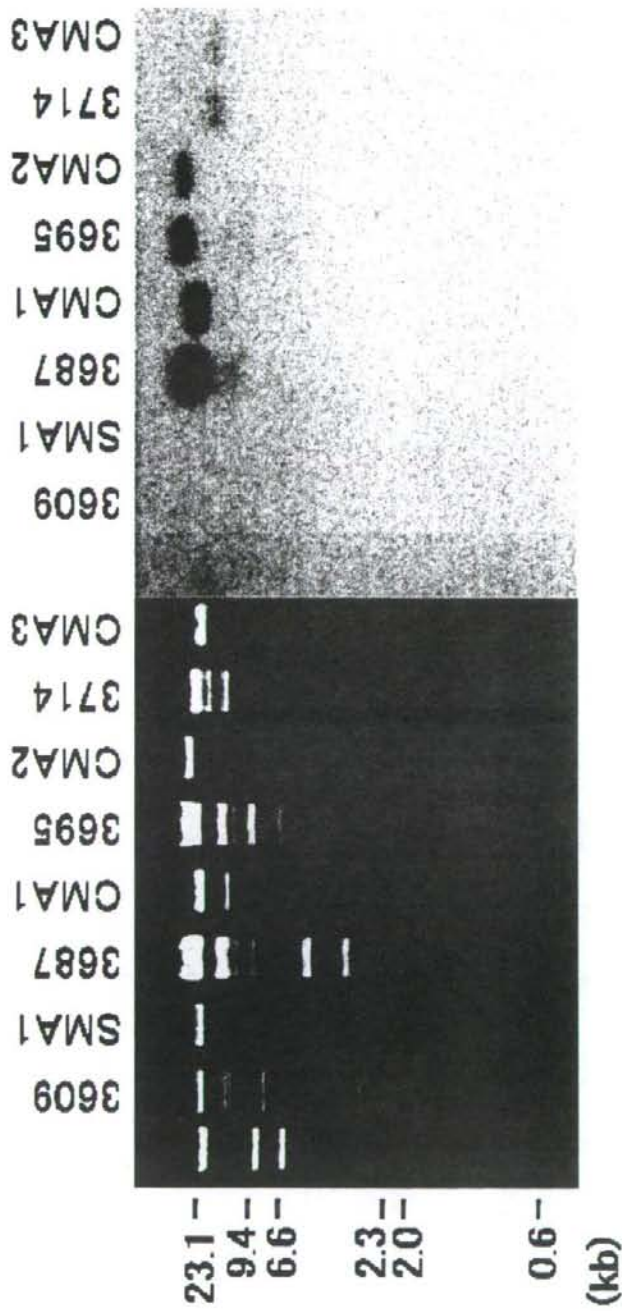


図2. *S. Typhimurium* プラスミドのサザンブロット解析結果

HndIII消化後のプラスミド泳動像(左)と *bla*_{C_{MY-2}} プロローブを用いて実施したサザンブロット解析結果(右).

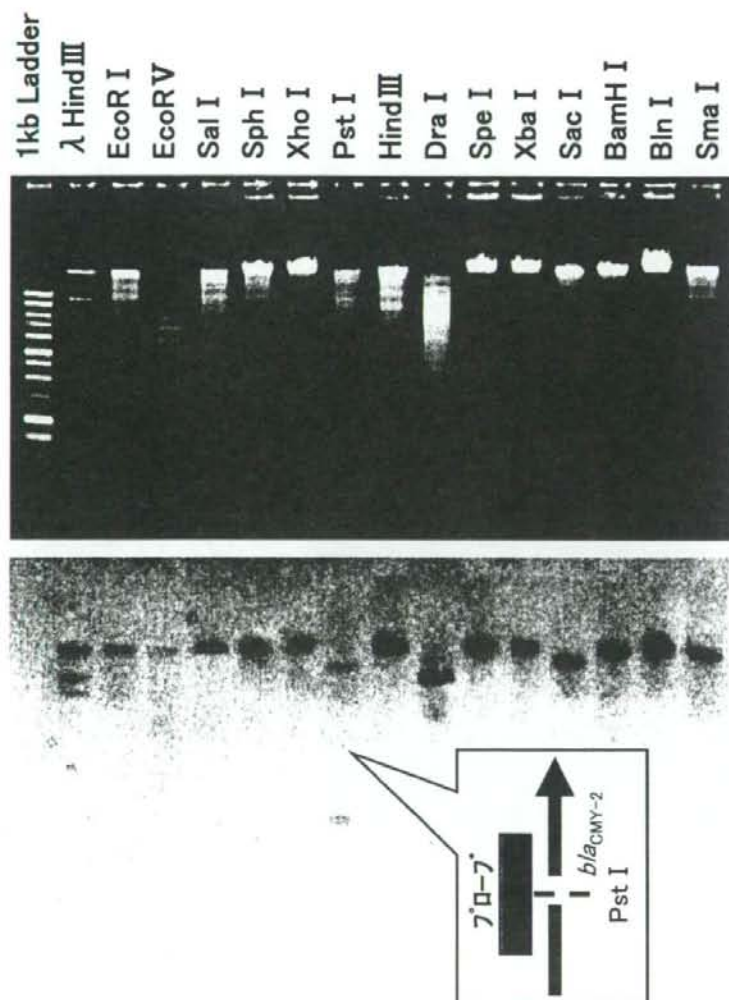


図3. ゲノミックサザンブロット解析結果

制限酵素消化後の *S. Typhimurium* 3609株ゲノムDNA(右)と *bla*_{CMY-2}プローブを用いて実施したサザンブロット解析結果(左).

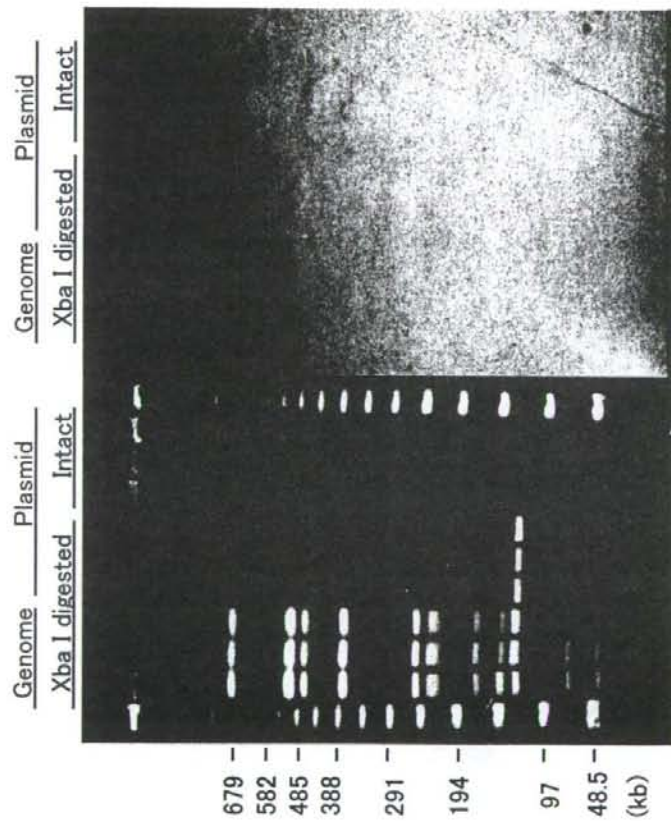


図4. ゲノム及びプラスミドDNAのサザンブロット解析結果

S. Typhimurium 3553、3601、3609株のゲノム及びプラスミドDNAのPFGE像(左)と *bla*_{CMY-2} プローブを用いて実施したサザンブロット解析結果(右).

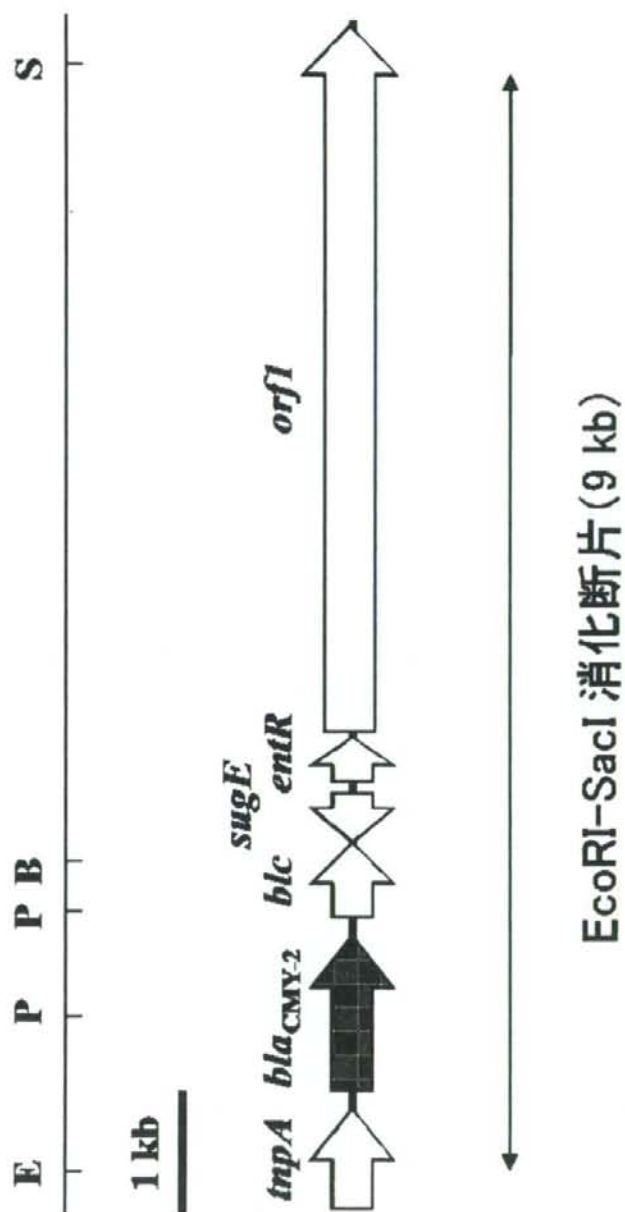


図5. *S. Typhimurium* 染色体由来制限断片の構造