

平成20年度 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

「薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及びサーベイランスシステムの高度化に関する研究」

### 分担研究報告書

分担課題名： 伴侶動物由来耐性菌の疫学調査

分担研究者：田村 豊 酪農学園大学獣医学部食品衛生学ユニット

研究協力者：石原加奈子 酪農学園大学獣医学部食品衛生学ユニット

#### 研究要旨

犬の糞便由来大腸菌がフルオロキノロン剤 (FQ) に対して高度に耐性を示すことが明らかにされている。そこで本研究では、犬、猫及び人由来 FQ 耐性大腸菌においてプラスミド性 FQ 耐性因子である *qnr* 遺伝子の検出行った。犬由来耐性菌大腸菌の 24% に *qnr* 遺伝子が検出され、サブタイプである *qnrA* と *qnrB* が多く検出された。同時に実施した人由来 FQ 耐性大腸菌とほぼ同じ傾向であった。ついで FQ 耐性菌とともに重要と考えられているセフェム剤耐性大腸菌の性状を調べた。犬由来セフェム剤耐性大腸菌は主にクラス C 型  $\beta$ -ラクタマーゼを産生し、人由来耐性菌はクラス A 型  $\beta$ -ラクタマーゼを産生した。セフェム剤耐性大腸菌について系統発生的な分類を実施したところ、犬由来耐性菌の内、クラス A 型産生株は腸管常在性の B1 型、クラス C 型産生株は腸管病原性の D 型に主に分類された。人由来耐性菌では、クラス A 型産生菌は腸管外病原性の B2 型、クラス C 型産生菌は腸管病原性の D 型が多かった。セフェム剤耐性大腸菌の  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を調べたところ、犬由来株では AmpC 型遺伝子が多く、人由来では基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 関連遺伝子が多かった。また、犬由来セフェム剤耐性菌には *ampC* プロモーター領域の変異による  $\beta$ -ラクタマーゼの過剰産生株も多かった。セフェム剤耐性大腸菌の多くが FQ に対しても耐性を示し、*qnr* 遺伝子も多く検出された。以上の成績より、今後ともプラスミド性 FQ 耐性大腸菌の動向を監視するとともに、FQ 耐性菌にセフェム剤耐性が多いことのメカニズムの解析が求められる。

#### A. 研究目的

近年、犬や猫等の伴侶動物は人と共通の場で

生活し、人との接触頻度は極めて高い状況にある。一方、獣医学技術の進展や動物福祉への関心の高まりを背景として、伴侶動物に対して人と遜色のない獣医療が求められるようになった。その結果、伴侶動物医療では人体用医薬品の使用が一般化している。抗菌化学療法も例外ではなく、人体用抗菌剤が高頻度に使用されている実態がある。したがって、家庭内に飼育されている伴侶動物に人体用抗菌剤が使用され出現する薬剤耐性菌が容易に人や食品へ伝播し、ヒトの健康に影響を与える可能性が考えられる。特に、人医療で重要視され、動物分野でも汎用されるフルオロキノロン剤 (FQ) 及び第三代セフェム剤耐性菌の動向の把握は、人医療に与える影響の大きさを考えると極めて重要である。

そこで本研究では、犬、猫及び人由来 FQ 耐性大腸菌の内、伝播を考える上で重要なプラスミド性耐性機構の関与を明らかにするとともに、セフェム剤耐性大腸菌の性状を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 供試 FQ 耐性菌

#### (1) 犬由来 FQ 耐性大腸菌：

2005 年 6 月~12 月に、酪農学園大学付属動物病院 (RGU) および江別市内の動物病院 (市中動物病院) に来院した犬から直腸内容物または新鮮糞便をエンロフロキサシン (ERFX) 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加 DHL 寒天培地 (日水) に直接塗抹し赤色コロニーを単離

して、API20E キット (日本ビオメリュー) により大腸菌と同定した。RGU 由来で 22 株、市中動物病院由来で 12 株の計 34 株の FQ 耐性大腸菌が分離された。

#### (2) 猫由来 FQ 耐性大腸菌

2005 年 6 月~12 月に、市中動物病院に来院した猫から得られた直腸内容物または新鮮糞便を ERFX 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加 DHL 寒天培地 (日水) に直接塗抹し赤色コロニーを単離して、API20E キット (日本ビオメリュー) により大腸菌と同定した。市中動物病院由来で 5 株の FQ 耐性大腸菌が分離された。

#### (3) 人由来 FQ 耐性大腸菌：

2008 年 4 月から 6 月に、札幌臨床検査センターおよび北海道大学付属病院により、患者の尿、喀痰、便、吸引チューブ、腸液、創部、膣分泌液および血液から得られた大腸菌の内、微量液体希釈法で測定したレボフロキサシン (LVFX) に対する MIC が 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、またはシプロフロキサシン (CIP) に対する MIC が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上を示した 118 株を供試した。

### 2. 供試セフェム剤耐性菌

#### (1) 犬由来セフェム剤耐性大腸菌

2005 年 6 月~12 月に、RGU および市中動物病院に来院した犬から直腸内容物または新鮮糞便を DHL 寒天培地 (日水) に直接塗抹し赤色コロニーを単離して、API20E キット (日本ビオメリュー) によ

り大腸菌と同定した (147 株)。この内、セファゾリン (CEZ; 32  $\mu$ g/ml)、セフロキシム (CEX; 64  $\mu$ g/ml)、セフポドキシム (CPDX; 8  $\mu$ g/ml) のいずれかに耐性を示した 53 株を供試した。

## (2) 猫由来セフェム剤耐性大腸菌

2005 年 6 月~12 月に、RGU および市中動物病院に来院した犬から直腸内容物または新鮮糞便を DHL 寒天培地 (日水) に直接塗抹し赤色コロニーを単離して、API20E キット (日本ビオメリユー) により大腸菌と同定した (147 株)。この内、セファゾリン (CEZ; 32  $\mu$ g/ml)、セフロキシム (CEX; 64  $\mu$ g/ml)、セフポドキシム (CPDX; 8  $\mu$ g/ml) いずれかに耐性を示した 7 株を供試した。

## 3. プラスミド性耐性因子の検出

プラスミド性耐性因子は、最も研究が進んでいる *qnr* 遺伝子を対象とした。*qnr* 遺伝子にはサブタイプが知られており、主要な *qnrA6*、*qnrB* 及び *qnrS* を PCR により検出した。

## 4. Double Disk Synergy Test (DDST)

クラブラン酸による  $\beta$ -ラクタマーゼの阻害を観察するために KB デイスクを用いた DDST を実施した。使用したデイスクは、クラブラン酸とアモキシシリンの合剤 (CAV/AMPC)、CPDX、セフォタキシム、セフトジジムである。CVA/AMPC のデイスクを中央に配置し、その周りにそれ以外のデイスクを配置した。培養後に、阻止円

を観察し、クラブラン酸による阻止円の増大により、クラス A 型及びクラス C 型  $\beta$ -ラクタマーゼを推定した。

## 5. 大腸菌の系統発生的分類

Clemont らの報告 (2005) に準拠し、*chuA* 遺伝子、TspE4.C2 遺伝子、*yjaA* 遺伝子を PCR で検出することにより、腸管病原性の A 型と B1 型、腸管外病原性の B2 型、及び腸管病原性の D 型に分類した。

## 6. セフェム耐性遺伝子の検出

セフェム剤耐性大腸菌について Multiplex PCR を用いて、クラス A 型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子である *blaCTX-M-1* グループ、2 グループ、8 グループ、9 グループであることを確認し、塩基配列を解読することにより耐性遺伝子を同定した。また、クラス C 型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子である *blaCMY*、*blaALT*、*blaBIL*、*blaFOX*、*blaACC* も確認した。

## 7. *ampC* プロモーター領域の変異

クラス C 型  $\beta$ -ラクタマーゼを産生し、上記の方法でセフェム耐性遺伝子が同定されなかった株については、 $\beta$ -ラクタマーゼの過剰産生が報告されている *ampC* プロモーター領域の変異 (翻訳開始部の上流 42 番目 (C→T) と 32 番目 (T→A)) を調べた。

## C. 研究結果

### 1. 犬、猫及び人由来 FQ 耐性大腸菌における

### qnr遺伝子の保有状況

表1にFQ耐性大腸菌のqnr遺伝子保有率を示した。犬由来株では24%の株にqnr遺伝子が検出され、内訳はqnrAが12%、qnrBが9%、qnrSが3%であった。人由来株では27%がqnrを保有し、内訳は犬由来株と良く似ていた。猫由来株からはqnrAのみが検出された。

第三世代セファロスポリンであるCPDX耐性大腸菌におけるqnr遺伝子保有率を調べたところ、CPDX耐性大腸菌の44%がqnr遺伝子を保有し、CPDX感受性株ではqnr保有率が19%に過ぎなかった( $p<0.05$ )。

## 2. 犬、猫及び人由来セフェム耐性大腸菌の検出

犬由来大腸菌147株中53株(36%)がセフェム剤耐性菌であり、その内、43株(81%)がFQ耐性菌であった。猫由来大腸菌では70株中7株(10%)がセフェム剤耐性菌であり、その内、3株(43%)がFQ耐性菌であった。人由来大腸菌は全てFQ耐性菌であるものの、118株中40株(34%)がセフェム剤耐性大腸菌であった。

## 3. セフェム剤耐性菌におけるβ-ラクタマーゼの特定

セフェム剤耐性菌についてDDSTにより産生するβ-ラクタマーゼの種類を推定した。犬由来セフェム剤耐性菌53株中、7

株(13%)がクラスA型、26株(49%)がクラスC型を産生すると推定された。猫由来セフェム剤耐性菌7株では、クラスAとクラスC産生株がそれぞれ1株であった。人由来セフェム剤耐性菌40株中、クラスAが35株(88%)、クラスCが5株(13%)であった。人由来耐性菌の産生するβ-ラクタマーゼがクラスAとC型に限定されるのに対し、犬と猫由来耐性菌ではそれ以外の機構の関与が示唆された。

## 4. β-ラクタマーゼ産生大腸菌の系統発生的分類

犬由来セフェム剤耐性菌53株の内、クラスA型産生株の多くはB1型であり、クラスC型産生株ではD型が多かった(図1)。一方、人由来セフェム剤耐性菌40株の内、クラスA産生株の多くはB2型で、クラスC産生株は犬由来と同じくD型が多かった。

## 5. β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

供試した全てのセフェム剤耐性大腸菌についてMultiplex PCRによりβ-ラクタマーゼ遺伝子を検出し、塩基配列を解読することにより遺伝子を同定した(表2)。犬由来株では、blaCTX-M-14が3株、blaCTX-M-27が4株であり、blaCMY-2が9株から検出された。また、それ以外として、blaLAT1とCMY-likeの遺伝子が各1株から検出された。一方、人由来株では、blaCTX-M-14が13株、blaCTX-M-27が

16株、*bla*CTX-Mが6株から検出された。また、それ以外として*bla*CMY-8が1株から検出された。

#### 6. *ampC*プロモーター領域の変異

Multiplex PCRで耐性遺伝子を検出できなかった犬由来11株、猫由来1株、人由来5株について、 $\beta$ -ラクタマーゼの過剰産生が報告されている*ampC*プロモーター領域の変異を調べた。その結果、犬由来株の1株に42位、3株に32位の変異が認められたが、人由来株ではこの部位の変異は認められなかった。

#### C. 考察

本研究から伴侶動物である犬由来FQ耐性大腸菌の24%にプラスミド性耐性因子である*qnr*遺伝子が検出されることが明らかにされた。また、人由来FQ耐性菌における*qnr*検出率が27%に認められた。これは中国における7.5%、上海における8%を越えるものであり、わが国の人由来FQ耐性大腸菌における高い*qnr*保有率が明らかにされた。*qnr*のサブタイプの保有率は、犬由来株と人由来株で良く似ていた。*qnr*の人と犬間での伝播の可能性については、今後、慎重に検討する必要があるものと思われた。いずれにせよ、プラスミド性FQ耐性因子は薬剤感受性に対する影響は少ないとされているが、FQ耐性を拡散させるとともに、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を同時に伝達することや、染色体性のFQ耐性を誘導することが報告されており、今後と

もその動向を監視する必要がある。

動物由来耐性菌の人の健康への影響を考えた場合、FQ耐性菌とともに重要なのが人の医療で使用頻度の高い第三世代セフェム剤に対する耐性菌である。そこで今回は伴侶動物と人由来セフェム剤耐性菌について解析した。犬由来セフェム剤耐性菌は主にクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼを産生するのに、人由来株ではクラスA型を主に産生していた。また、系統発生的な分類では、クラスC型産生菌については犬由来株と人由来株が同じ腸管病原性のD型に、クラスA型産生菌については、犬由来株は腸管常在性のB1型で、人由来株では腸管外病原性のB2型であった。このことを直ちに解釈することはできないものの、人医療で問題視されているESBL関連遺伝子が宿主によって異なる系統発生源に属する大腸菌に見出されることは興味ある成績である。

今回、セフェム剤耐性菌の $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を検出したところ、人由来株では殆どがESBL関連遺伝子を保有していた。一方、犬由来株ではESBL関連遺伝子が検出される頻度は少なく、CMY遺伝子や*ampC*プロモーター領域の変異が多く検出された。このことは人由来株に比べて伴侶動物由来株においてESBL産生菌が少ないことを意味している。しかし、人と生活圏を共有する機会の多い伴侶動物については、今後もセフェム耐性菌の動向を監視する必要がある。

これまでFQ耐性大腸菌はセフェム剤に対し

ても耐性を示す頻度が高いことが報告されてきた。今回の成績でも、第三世代のセフェム剤である CPDX 耐性株と *qnr* 保有率との関連が示されるとともに、セフェム耐性株の多くが FQ にも同時に耐性を示すことが示された。この現象のメカニズムについては未だ十分に明らかにされていない。FQ 耐性とセフェム剤耐性を同時に保有する細菌の出現は、人の健康に対する最大の脅威となりうるものであり、その有効な対策を策定する意味でも早急な耐性メカニズムの解析が望まれる。

#### D. 結論

今回、伴侶動物由来 FQ 耐性大腸菌の多くにプラスミド性耐性因子の関与が明らかにされた。また、伴侶動物由来大腸菌の多くがセフェム剤に対しても耐性を示した。しかし、産生するβ-ラクタマーゼの種類や遺伝子は人由来株と相違が認められた。伴侶動物と人との間で耐性菌や耐性遺伝子の伝播については、更なる検討が必要である。また、伴侶動物由来 FQ 耐性大腸菌の多くはセフェム剤に対する耐性も同時に保持しており、早急な耐性メカニズムの解析が必要である。

#### E. 健康危機情報

FQ やセフェム剤はヒト医療で最も汎用される抗菌剤である。FQ やセフェム剤耐性菌は程度の差こそあれ人や各種動物から分離される。また、今回の成績から犬由来耐性菌の人への直

接的な伝播の可能性は明らかでないことから直ぐに対応する必要はないものと思われる。しかし、今回分離された耐性大腸菌は人でも使用される抗菌剤にも耐性を示す耐性菌であり、今後も伴侶動物における耐性菌や耐性遺伝子の動向を注視していく必要がある。

#### F. 研究発表

##### <口頭発表>

1. 横田伸一, 佐藤豊孝, 大越康雄, 岡林環樹, 桑原 理, 田村 豊, 藤井暢弘: ヒト臨床検体から分離されたキノロン耐性大腸菌分離株の分子疫学的解析, 第 77 回日本細菌学会北海道支部学術総会, 2009 年 9 月, 札幌.
2. 齋藤美恵子, 石原加奈子, 上野弘志, 村松康和, 前谷茂樹, 田村 豊: 伴侶動物病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学調査, 第 77 回日本細菌学会北海道支部学術総会, 2009 年 9 月, 札幌.
3. 石原加奈子, 齋藤美恵子, 上野弘志, 村松康和, 前谷茂樹, 田村 豊: 伴侶動物病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の疫学解析, 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 9 月, 鳥取.
4. 齋藤美恵子, 石原加奈子, 上野弘志, 村松康和, 前谷茂樹, 田村 豊: 伴侶動物病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学調査, 第 148 回日本獣医学

会学術集会, 2009年9月, 鳥取.

<紙上発表>

1. Ishihara K., Takahashi T., Morioka A.,  
Kojima A., Kijima M., Asai T., Tamura Y.:  
National surveillance of Salmonella  
enterica in food-producing animals in  
Japan, *Acta Vet. Scand.*, 51:35-40, 2009.
2. Kojima A., Asai T., Ishihara K., Morioka  
A., Akimoto K., Sugimoto Y., Sato T.,  
Kijima M., Tamura Y. and Takahashi T.:  
National monitoring for antimicrobial  
resistance among indicator bacteria  
isolated from food-producing animals in  
Japan, *J. Vet. Med. Sci.*, 7:1301-1308,  
2009.

表1. 伴侶動物及び人由来フルオロキノロン剤耐性大腸菌における *qnr* 遺伝子の保有状況

由来	<i>qnr</i> 保有率* (%)			合計
	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	
犬	4/34 (11.8)	3/34 (8.8)	1/34 (2.9)	8/34 (23.5)
猫	3/5 (60.0)	0/5 (0)	0/5 (0)	3/5 (60.0)
人	18/118 (15.3)	16/118 (13.6)	8/118 (6.8)	32/118 (27.1)

\* 陽性株数/ 供試株数

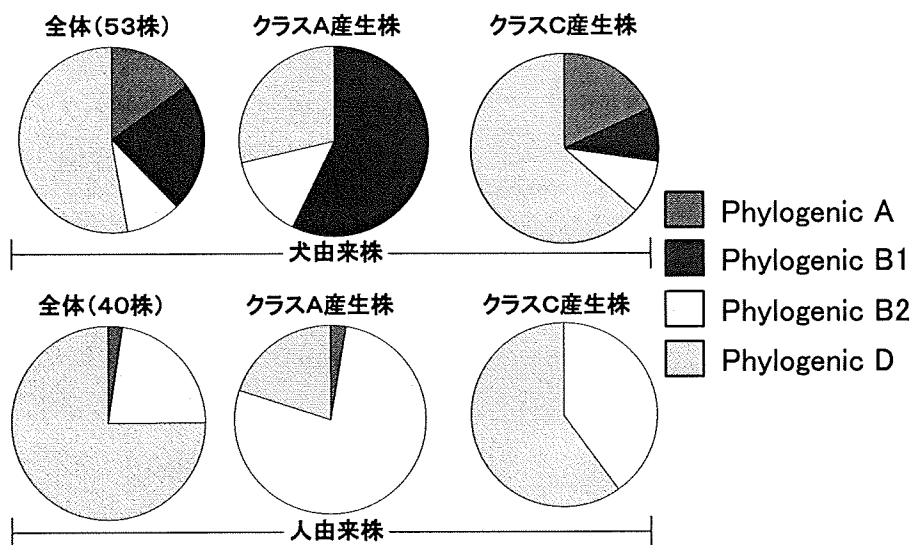


図1. セフェム剤耐性大腸菌の系統発生的分類



表 2. セフェム剤耐性大腸菌からβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出

由来	β-ラクタマーゼ遺伝子*				
	CTX-M-14 (Group 9)	CTX-M-27 (Group 9)	CTX-M (Group 2)	CMY-2	その他
犬	3/53	4/53	0/53	9/53	LAT-1, CMY-like
猫	1/7	0/7	0/7	0/7	
人	13/40	16/40	6/40	0/40	CMY-8

\* 検出株数/耐性株数

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）

「薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及びサーベイランスシステムの高度化に関する研究」

平成 21 年度分担研究報告書

課題名：薬剤耐性化食中毒菌のヒトおよび家畜由来株のゲノム比較解析

分担研究者 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 第三室  
研究協力者 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 第三室  
研究協力者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌一部  
研究協力者 小口晃央 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部 資源情報解析課

#### 研究要旨

ヒトおよび食品由来の *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Infantis, Typhimurium, およびその他血清型（タイ分離）の薬剤耐性株を中心に計 20 株の全ゲノム配列を解読した。入手可能な *S. enterica* のゲノム情報（30 株）と、今年度解読した全ゲノム情報 20 株の計 50 株のゲノム情報を統合し、コアゲノムに存在する 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を 65,844 箇所抽出できた。その SNPs 情報を元に最尤法による系統樹解析を行った結果、血清型固有の特徴的な SNPs を見だし、また血清型同士の類縁関係も明らかにした。Enteritidis (12 株) および Infantis (5 株) のみを個別に SNPs 再解析して系統分類解析した結果、薬剤耐性株は特有のグループに集約されることが分かった。ここ数年伝播が危惧されている Typhimurium 薬剤耐性の代表株 T000240 全ゲノム解読を製品評価技術基盤機構との共同研究で全ゲノム解読と Complete 配列を確定した。T000240 株に特徴的な薬剤耐性 Class I integron を 2 loci 見だし、耐性プロファイルに対応する耐性遺伝子マーカー全てを明らかにした。

#### A. 研究目的

ヒト、家畜、食品から分離される薬剤耐性 *Salmonella* 食中毒菌のサーベイランス結果を基盤にし、ゲノム配列レベルでより具体的な耐性化機序と株伝播過程を解析する。

#### B. 研究方法

1) *Salmonella enterica* 各種血清型のゲノム情報による系統分類解析

GenBank 等、公共データベースから計 30 株の *Salmonella enterica* ゲノム情報を入手した（表 1）。さらに、Enteritidis 11 株、Infantis 4 株、Typhimurium 1 株の日本分離株と、タイで頻繁に

分離される血清型 Anatum, Corvalis, Rissen, Stanley の 4 株の計 20 株（表 2）のゲノム配列を次世代シーケンサー Genome Analyzer II（イルミナ社）で解読した（40 mer を約 1,000 万本）。*S. Typhi* CT18 株の complete genome 配列をレファレンス配列とし、イルミナ解読リードを maq v0.7.1 マッピングソフトにて比較解析して遺伝子上に存在する SNP を網羅的に抽出した。公共データベースから取得したゲノム配列から 36 mer の疑似リードを作成し、イルミナ解読リードと同様に maq で SNP 抽出した。各株ごとに抽出した SNPs アレルを連結して疑似配列を作成し、アライメント結果を

最尤法 (RAxML を使用) にて系統分類・系統樹作成をおこなった。

## 2) Typhimurium T000240 株の全ゲノム解読と complete 配列の確定

上記1で得られたイルミナ解読リード (50 mer, 13,460,777 本) を *de novo assembler Euler-SR* にて contig 配列を作成した。得られた contig 配列を complete 配列になっている Typhimurium LT2 株のゲノム配列に OSLay ソフトを用いて貼り付け、相対的なゲノム構造を理解し、ギャップクロージングのための情報を得た。ギャップクロージングは研究協力者である製品評価技術基盤機構・小口晃央が行った。染色体およびプラスミドをギャップの無い complete 配列にまで確定後、GeneMark.hmm により遺伝子予測を行い、その推定遺伝子の機能を blastp 相同性検索にて検討した。ゲノム配列の図示化等は IMC-GE ソフト (インシリコバイオロジー) を用いた。

## C. 結果

### 1) *Salmonella enterica* 各種血清型のゲノム情報による系統分類解析

血清型特有のコアゲノムを系統的に保持しているかどうか検討するために、今年度の解読株を含めた計 50 株のゲノム情報から網羅的に SNPs 抽出を行った。計 65,844 箇所の SNPs locus をコアゲノムから見だし (図1)、疑似配列として集約した SNPs アレルを用いてアライメント解析・系統分類解析した (図2)。Typhi, Paratyphi A の高病原性タイプと比較し、Enteritidis, Infantis, Typhimurium 等は同じ血清型であるがゆえ同じクラスターに集約されることが分かった。例外として、Saintpaul の2株は同じ血清型にも関わらず異なるクラスターに分類されたことから、必ずしも血清型がコアゲノムと同様の系統関係を示すの

ではないことが分かった。

タイで頻繁に分離される血清型4つを選んで系統分類した結果、StanleyはParatyphi Bと、AnatumはParatyphi Cと近い類縁関係を示し、タイにおける分離頻度や血清型固有の病原性となんらかの関係性を示唆しているものと考えられた。

### 2) *Salmonella* Infantis の SNP 系統分類

Infantis 4株 (表2) のイルミナ解読リードを Sanger Centre から取得した SIN 株 (表1) ゲノム情報と比較解析し、Infantis コアゲノムから新たに全 SNP 情報を抽出し、計 913 箇所の SNPs を選別した。薬剤耐性株は SIN 株とは大きく異なる系統関係を示し、数十カ所の SNPs を用いれば耐性株間を識別できることを示唆していた (図3)。PFGE・MLVA 解析では Infantis の株分類が困難であることから、得られた SNPs 情報による系統分類は有効と思われた。

### 3) *Salmonella* Enteritidis の SNP 系統分類

Enteritidis 11株 (表2) のイルミナ解読リードを Sanger Centre から取得した P125109 株 (表1) ゲノム情報と比較解析し、Enteritidis コアゲノムから新たに全 SNP 情報を抽出し、計 232 箇所の SNPs を選別した (図4)。薬剤耐性3株 (E980560, E981123 E070163) は分離場所・年・耐性プロファイルに違いがあるにも関わらず、同じクラスターに分類された (図4)。PFGE プロファイルによるUPGMA系統樹とSNPs系統樹に相関性が認められ、薬剤耐性株に特徴的なSNPsで鑑別できることを示唆していた (図4)。

薬剤耐性株ではPFGE-BlnI消化断片が特徴的なプロファイルを示し、10カ所程度BlnIサイトが増えている可能性が示唆されている (図4)。薬剤耐性3株の解読リードを *de novo assembly* し、得られた contig から BlnI 制限酵素サイトを付与す

る挿入配列 (Insertion sequence: IS) を見いだした。薬剤耐性化の経緯において、このような IS の挿入は頻繁に見られ、耐性株・感受性株の鑑別に有用な配列情報を得た。

#### 4) 薬剤耐性 Typhimurium T000240 株の complete ゲノム配列

旧来伝播していた薬剤耐性 DT104 株とは異なる系統の薬剤耐性株の伝播が報告されるようになった。その代表株である T000240 株 (耐性プロファイル: ASTCpCSxTmGNSu) のイルミナ解読リードから *de novo assembly* により約 200 本の contig 配列を得た。ギャップクローリング後、最終的に、環状の染色体 DNA (4,966,609 bp)、環状のプラスミド 2 つ (94,715 bp, 8,670 bp) で構成されることが明らかとなった (図 5)。

公開されている Typhimurium LT2 株と DT104 株の染色体 DNA 配列を比較した結果、IS1 と酷似した IS 配列が染色体上に 8 カ所散在しており (図 5)、その 1 カ所を起点に外来配列 (約 94 kb) が挿入していた (図 6)。外来配列を詳細にアノテーションしたところ、Class I integron (*intI1*, *dfrA1*, *aadA1*, *qacED1*, *sul1*; *intI1*, *bla*, *aadA1*, *qacED1*, *sul1*) と称される薬剤耐性アイランドが 2 つ並んでおり、その間にはゲンタミシン耐性 (*aac(3)-II*)、テトラサイクリン耐性 (*tetA* class B)、クロラムフェニコール耐性 (*cat*) が散在していた。結果、薬剤ディスク法により分かっていた耐性プロファイルに対応する耐性遺伝子マーカー全てを明らかにし、その具体的な遺伝子構造を明確にすることができた。さらに、その上流下流には鉄獲得系 (aerobactin 合成系、Sit 鉄輸送体) と重金属排泄系 (*mer* オペロン) を獲得しており、薬剤耐性以外の生存戦略に関与する外来遺伝子群も同定した (図 7)。

## D. 考察

### 1) *Salmonella enterica* 各種血清型のゲノム情報による系統分類解析

これまでに *Salmonella enterica* の血清型に由来する遺伝情報を包括的に比較解析した報告は無く、本研究により血清型とコアゲノムの相関関係を明確にした。O 抗原・H 抗原検査により血清型は判別されるが、その抗原性とコアゲノムとの関係は *S. enterica* の伝播および病原性と宿主域 (tropism) 等にも関連性が深いと想定され、本研究で示した系統関係は血清型の特徴をより明確に分類し位置づけることができた。より広範な血清型の解析を加え、血清型に起因する病原性・薬剤耐性等を検討していく予定である。

### 2) *Salmonella* Infantis の SNP 系統分類

PFGE/MLVA 解析による株系統分類が困難な *Infantis* には本研究により見いだした SNPs 系統分類が有効と思われる。今年度は 4 株しか解読できなかったが、分離年・場所・耐性プロファイル等の指標が異なる代表株を加えることで、コアゲノムを基準にして株の素性を分類し、耐性株の起源とその伝播に迫りたい。また、起源の特定には薬剤耐性アイランドの遺伝子構造の解明も重要であり、イルミナ解読リードを十分に生かしてその全容を解明したい。

### 3) *Salmonella* Enteritidis の SNP 系統分類

本研究では、耐性株 3 株と感受性株 8 株の比較解析が行えたゆえ、耐性株が非常に近縁のクラスターに集合することを明らかにできた。従来の PFGE-BlnI 消化断片は、耐性株が特徴的なプロファイルを示し、その原因である IS 配列を特定する事ができた。今後、耐性

株に特有の IS 配列かどうか検討するとともに、IS を指標にして耐性株間の簡易検査法も開発していきたい。また、Infantis 同様、コアゲノム・SNPs 系統分類法を提案するだけの株数にまで解読数を増やしていきたい。

#### 4) 薬剤耐性 Typhimurium T000240 株の complete ゲノム配列

今年度は Typhimurium T000240 株を 1 株のみゲノム解読した。Typhimurium は従来の PFGE, MLVA 法にて系統分類できるため、全ゲノム配列の確定による薬剤耐性アイランドの全容解明を優先して解析した。高度薬剤耐性化した T000240 株は、旧来伝播していた DT104 株とは耐性プロファイルが異なり、また全ゲノム配列が示すように、特徴的な IS 配列と薬剤耐性アイランドが染色体に挿入していることが明らかになった。耐性遺伝子マーカーの多様性と水平伝達機構の解明は Typhimurium の耐性伝播様式を知る上で重要な基盤情報となる。今後、この特徴的な IS、アイランド構造を軸にした簡易検査法の確立を目指したい。

#### E. 結論

*Salmonella enterica* 血清型の SNPs 系統解析により、コアゲノムの全 SNPs を用いれば、血清型の特徴が分類できる可能性が示唆された。例えば、宿主域や病原性が似通った血清型は集まりやすい傾向が見られた。

*Salmonella* Enteritidis 11 株と Infantis 4 株のゲノム解読とその全 SNPs (coding のみ) による系統解析から、PFGE・ファージ型・MLVA 等の分類法に加え、コアゲノムに内在する SNPs 分類法を開発する基盤情報を得た。

旧来の流行・多剤耐性 DT104 株と系統が異なる Typhimurium T000240 株 (DT12) の全ゲノム解読と complete 配列を確定した (製品評価技術基盤機構との共同研究)。T000240 に特徴的な薬剤耐性 Class I integron を 2 loci 見だし、耐性プロファイルと耐性遺伝子の関係を明らかにした。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

なし

表1. 公共データベースから取得した *Salmonella enterica* ゲノム配列

Serovar and strain	Organization	Status
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar 4,[5],12:i:- str. CVM23701	TIGR	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona str. SL483	TIGR/J. Craig Venter Institute	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis str. SC-B87	Chang Gung Genomic Medical Center, Chang Gung Memorial Hospital	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. P125109	Wellcome Trust Sanger Institute	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Gallinarum str. 287/91	Wellcome Trust Sanger Institute	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Hadar str. RI 05P066 SL485	TIGR/JCVI	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Heidelberg str. SL476	TIGR/J. Craig Venter Institute	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Heidelberg str. SL486	TIGR/JCVI	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis SIN	Wellcome Trust Sanger Institute	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Javiana str. GA MM04042433	TIGR/J. Craig Venter Institute	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky str. CDC 191	TIGR/J. Craig Venter Institute	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky str. CVM29188	TIGR	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL254	TIGR	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL317	TIGR/J. Craig Venter Institute	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A str. AKU 12601	Wellcome Trust Sanger Institute	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A str. ATCC 9150	Washington University Genome Sequencing Center	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B str. SPB7	The <i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi B Genome Sequencing Project	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi C strain RKS4594	Peking University Health Science Center	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Saintpaul str. SARA23	TIGR	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Saintpaul str. SARA29	TIGR	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Schwarzengrund str. CVM19633	TIGR	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Schwarzengrund str. SL480	TIGR/J. Craig Venter Institute	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Tennessee str. CDC07-0191	CDC/CGID/NCZVED/DFBMD/EDLB	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	Sanger Institute	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. E02-1180	Pathogen Sequencing Unit, Wellcome Trust Sanger Institute	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. E98-3139	Pathogen Sequencing Unit, Wellcome Trust Sanger Institute	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. Ty2	Univ. Wisconsin	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium LT2	Wash U	Complete
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Virchow str. SL491	TIGR/JCVI	Assembly
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Weltevreden str. HI N05-537 SL484	TIGR/JCVI	Assembly

表2. H21年度に解読した *Salmonella enterica*

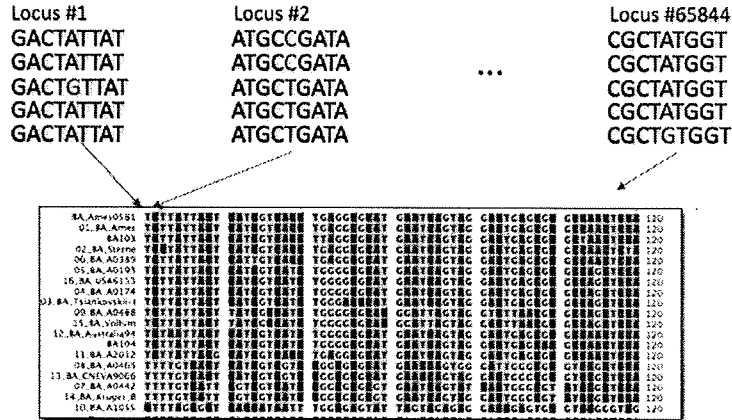
Serovar and strain	Organization	Status	都道府県	材料	分離年	ファージ型	薬剤
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E060004	NIID	Assembly	宮城	鶏肉(ブラジル)	2005	4	N
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E060234	NIID	Assembly	大阪	患者	2006	47	susceptible
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E060311	NIID	Assembly	愛媛	患者	2006	1	susceptible
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E980560	NIID	Assembly	岡山県	便	1998	34b	S
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E981123	NIID	Assembly	滋賀県	吐糞便	1998	RDNC(6d)	ASCf
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E070004	NIID	Assembly	山口	患者便	2006	14b	susceptible
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E070163	NIID	Assembly	茨城	患者便	2006	3	S
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E070187	NIID	Assembly	沖縄県	食品	2007	21	susceptible
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E070327	NIID	Assembly	鹿児島	便	2007	6a	susceptible
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E070345	NIID	Assembly	福島	便	2007	4	susceptible
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis str. E070478	NIID	Assembly	奈良	便	2007	59/55	susceptible
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis str. S080134	NIID	Assembly	大阪	鶏肉	2008	-	ASTCtSxSuCf
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis str. S080215	NIID	Assembly	埼玉	患者	2006	-	STKSu
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis str. S090174	NIID	Assembly	-	鶏	2005	-	ASTKSuCfFx
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis str. S090175	NIID	Assembly	-	鶏	2006	-	ASTKcTsuCf
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. T000240	NIID & NITE	Complete	大阪	患者	2000	-	ASTCpCSxTmG
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Stanley str. S090136	NIID	Assembly	Thailand	-	-	-	susceptible
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Rissen str. S090137	NIID	Assembly	Thailand	-	-	-	ATSxSuN
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Corvalis str. S090138	NIID	Assembly	Thailand	-	-	-	TSu
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Anatum str. S090139	NIID	Assembly	Thailand	-	-	-	ATCtGCf

N, nalidixic acid; S, streptomycin; T, tetracycline; K, kanamycin; Sx, trimethoprim-sulfamethoxazole; Su, sulphonamide; Tm, Trimethoprim; A, ampicillin; C, chloramphenicol; Cp, ciprofloxacin; Cf, cephalothin; Ct, cefotaxime; G, gentamicin

図1 *Salmonella enterica* のゲノム解読と分子系統解析

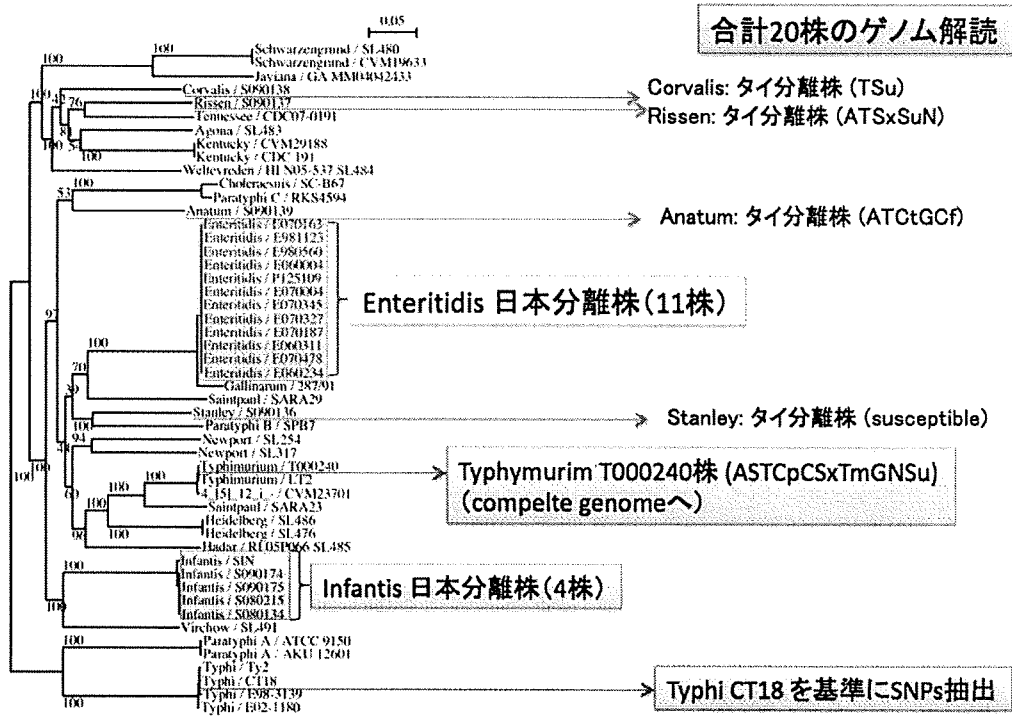
ゲノムワイドなSNPsを用いた系統解析

1. *Salmonella enterica* subsp. 公開ゲノム配列(~4.9 Mb, 15 complete, 15 draft)を取得
2. Maq.pl を用いて(30株. Draft assemblyを含む + 今年度の解読 20株)からSNPsを抽出
3. 65,844箇所(箇所)のSNPs を連結した疑似配列を作製



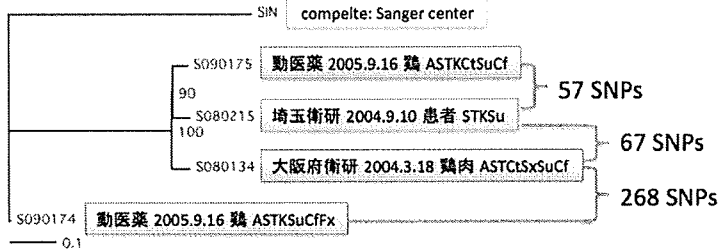
3. アライメント結果を最尤法 (Maximum likelihood estimation) で系統樹作製 (phylipのdnaml)

図2 *Salmonella enterica* 公開ゲノム配列を用いたSNPs系統解析  
 ~ コアゲノムから全抽出65,844 loci (codingのみ) を使用 ~

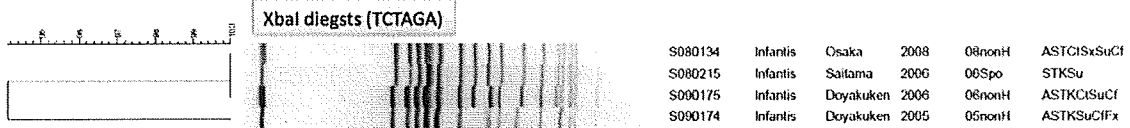


### 図3 *Salmonella* Infantis SNPs系統解析

Infantis 5株、ORF上に存在するSNP (infantis間でのcore genome region)  
913カ所を用いた最尤法bootstrap (1000回)



PFGE(泉谷先生)との比較



### 図4 *Salmonella* Enteritidis SNPs系統解析

Enteritidis 11株、ORF上に存在するSNP (core genome region)  
232カ所を用いた最尤法bootstrap (1000回)



PFGE(泉谷先生)との比較

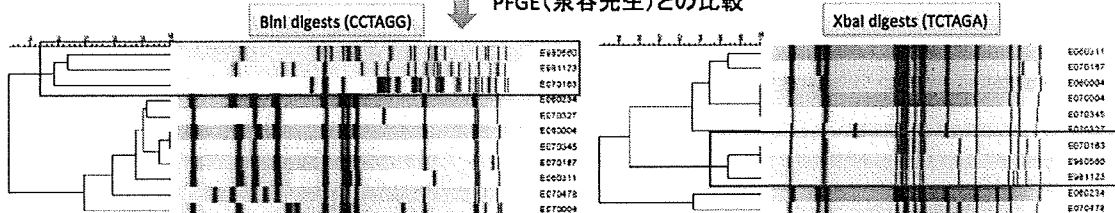
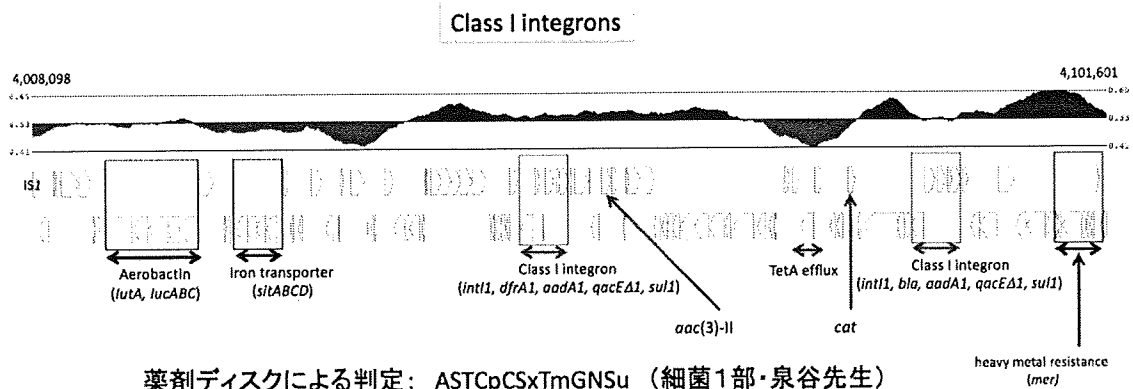






図7 *Salmonella* Typhimurium T000240 ゲノム解析



薬剤ディスクによる判定: ASTCpCSxTmGNSu (細菌1部・泉谷先生)

Resistant	antibiotics	resistance marker
A	ampicillin	<i>bla<sub>amp30</sub></i>
S	streptomycin	<i>aadA1</i>
T	tetracycline	<i>tetA class B</i>
Cp	ciprofloxacin	QRDR
C	chloramphenicol	<i>cat</i>
Sx	Trimethoprim-Sulfamethoxazole	<i>dfrA1, sul1</i>
Tm	Trimethoprim	<i>dfrA1</i>
G	gentamicin	<i>aac(3)-II</i>
N	nalidixic acid	QRDR
Su	sulphonamide	<i>sul1</i>

研究発表(平成21年度)

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Niwa, T. Anzai, H. Izumiya, T. Morita-Ishihara, H. Watanabe, I. Uchida, T. Tozaki, and S. Hobo	Antimicrobial resistance and genetic characteristics of <i>Salmonella typhimurium</i> isolated from horses in Hokkaido, Japan.	J.Vet. Med. Sci.	71 (8)	1115-9	2009
H. Izumiya, Y. Tada, K. Ito, T. Morita-Ishihara, M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe	Characterization of <i>Shigella sonnei</i> isolates from travel-associated cases in Japan.	J.Med.Microbiol.	58 (11)	1486-1491	2009
Harada, K., Ozawa, M., Ishihara, K., Asai, T., Koike, R., Ishikawa, H.	Prevalence of antimicrobial resistance among serotypes of <i>Campylobacter jejuni</i> isolates from cattle and poultry in Japan.	Microbiol. Immunol.	53	107-11	2009
Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R., Ishikawa, H.	Relationships between multidrug-resistant <i>Salmonella enterica</i> serovar Schwarzengrund and both broiler chickens and retail chicken meats in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	62	198-200	2009

Ishihara, K., Takahashi, T., Morioka, A., Kojima, A., Kijima, M., Asai, T., Tamura, Y.	National surveillance of <i>Salmonella enterica</i> in food- producing animals in Japan.	Acta Vet Scand.	51	35-40	2009
Masumi Taguchi, Ryuji Kawahara, Kazuko Seto, Kiyoshi Inoue, Akihiro Hayashi, Nobuaki Yamagata, Kazumasa Kamakura, and Etsuro Kashiwagi	Plasmid-mediated quinolone resistance in <i>Salmonella</i> isolated from patients with overseas travelers diarrhea in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	62	312-314	2009
Kojima A., Asai T., Ishihara K., Morioka A., Akimoto K., Sugimoto Y., Sato T., Kijima M., Tamura Y. and Takahashi T.	National monitoring for antimicrobial resistance among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan.	J. Vet. Med. Sci.	7	1301- 1308	2009
泉谷秀昌	サルモネラ食中毒について	月間HACCP	第16卷 第2号	100-103	2010