

で2株あり、鶏肉由来株との比較が必要であると考えられた。

CPDX 耐性の *S. Enteritidis* が検出された食中毒事例は、患者7名および食品から *S. Enteritidis* が分離された事例であったが、1名の患者の分離株のみ ABPC・CPDX 耐性であり、他の株は感受性であった。原因食品が薬剤耐性株および感受性株に汚染されていたのか、患者の腸管内で薬剤耐性遺伝子が伝達されたのかは不明であるが、食中毒事例の原因食品検査時に、薬剤耐性菌の検索を考慮する必要があると考えられた。

## 2. カンピロバクター

### (1) 食肉の調査：

国産鶏肉 171 検体中 102 検体 (59.6%) からカンピロバクターが分離された。

102 株は *C. jejuni* が 100 株、*C. coli* が 2 株であった。*C. jejuni* では 36 株 (36.0%)、*C. coli* では 2 株すべてがフルオロキノロン耐性であった。

### (2) 散発下痢症患者由来菌株：

*C. jejuni* 78 株のうち、37 株(47.4%)がフルオロキノロン耐性であった。*C. coli* 3 株では、2 株がフルオロキノロン耐性、1 株が EM 耐性であった (表 4)。

*C. jejuni* のフルオロキノロン耐性株検出率の推移をみると、40%を超えたのは過去 5 年では 2007 年と 2010 年であった (図 3)。

## 3. 腸管出血性大腸菌 0157

1 剤以上に耐性を示す株は 37 株 (27.4%) であった。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌および NA 耐性菌は検出されなかった (表 5)。

## 4. MRSA

117 検体を検査したが MRSA は検出されなかった (表 6)。

## D. 結論

鶏肉由来サルモネラの調査で CPDX 耐性菌が 17 株 (16.2%)、NA 耐性菌が 21 株 (20.0%) 認められた。血清型別では *S. Infantis* の NA 耐性率が昨年より上昇した。ヒト由来株では CPDX 耐性株が 3 株 (*S. Infantis* 2 株、*S. Enteritidis* 1 株) あり、NA 耐性菌が 1 株認められた。

*C. jejuni* の鶏肉由来株では 36.0%、散発下痢症患者では 47.4%がフルオロキノロン耐性であった。

今後は分離株について疫学マーカー解析を行い、食肉の薬剤耐性菌汚染状況の変化とヒト由来株の変化の関連を比較する必要がある。

## E. 研究発表

(論文発表)

なし

(口頭発表)

(1) 田口真澄、河原隆二、勢戸和子：海外旅行者下痢症患者から分離したサルモネラのプラスミド性キノロン耐性、第 84 回日本感染症学会総会、2010 年 4 月、京都

(2) 田口真澄：食肉のカンピロバクター汚染実態とイムノクロマト法による検出、第 3 回日本カンピロバクター研究会、2010 年 12 月、宮崎

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 食肉のサルモネラ検査数と陽性検体数(2010年1～8月)

	検体名	検体数	陽性検体数(%)	分離株数
国産 359検体	鶏肉	171	90(52.6)	105
	豚肉	81	1(1.2)	1
	牛肉	95	0	
	合鴨	7	0	
	馬肉	5	0	
外国産 41検体	鶏肉	15	0	
	豚肉	12	0	
	牛肉	12	0	
	馬肉	2	0	
合計		400	0	106

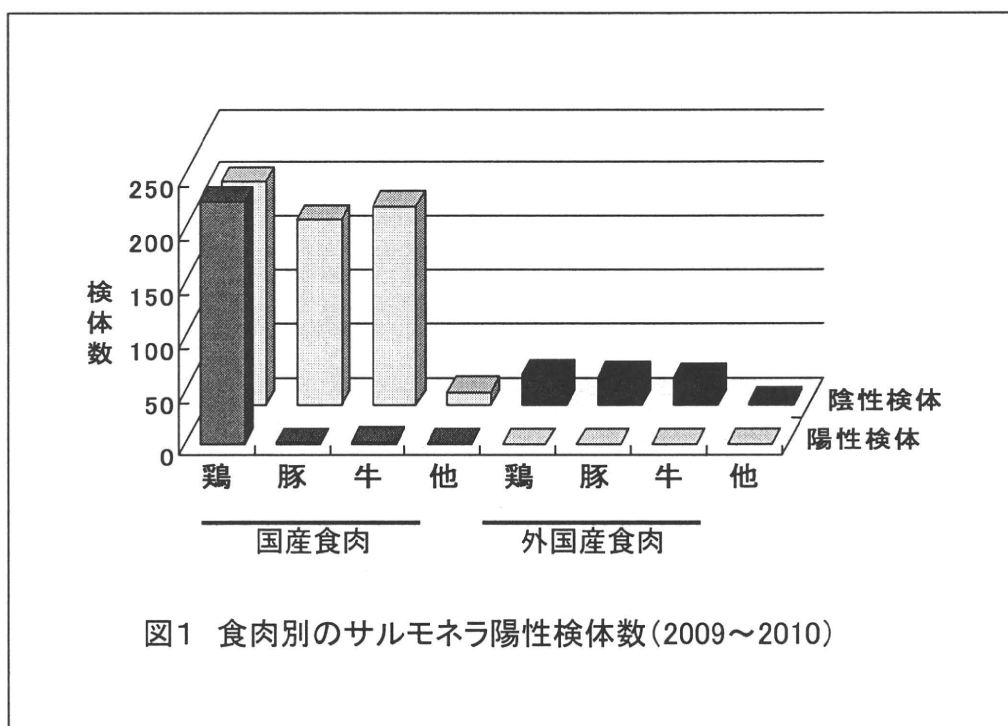


図1 食肉別のサルモネラ陽性検体数(2009～2010)

表2 食肉由来のサルモネラの血清型と薬剤感受性パターン(2010年)

産地	種類	血清型	菌株数合計	菌株数	薬剤耐性パターン
国産 (106株)	鶏肉 (105株)	<i>S. Infantis</i>	65	6	ABPC,SM,TC,CPDX,Su
				3	ABPC,SM,TC,CPDX,ST,Su
				2	ABPC,SM,TC,CPDX,CTX,Su
				2	ABPC,CPDX
				1	ABPC,SM,TC,KM,CPDX,NA,Su
				1	ABPC,SM,TC,CPDX,NA,Su
				1	ABPC,SM,TC,KM,CPDX,Su
				19	SM,TC,ST,Su
				10	SM,TC,NA,Su
				6	SM,TC,KM,ST,Su
				5	SM,TC,Su
				2	TC,KM
				1	ABPC,SM,TC,KM,ST,Su
				1	SM,KM,NA
				1	SM,TC,KM,ST,NA,Su
				1	SM,TC,KM,Su
				1	SM,TC,NA,ST,Su
1	SM,TC,ST,Su				
1	TC,NA				
				1	ABPC,SM,TC,KM,CPDX,CTX,Su
				14	SM,TC,KM,Su
				4	SM,TC,KM,GM,Su
				3	SM,TC,Su
				1	SM,TC,KM,NA,Su
				1	SM,TC,KM,ST,Su
				1	KM
				7	SM,TC,Su
				3	SM,TC,NA,Su
				1	ABPC,SM,TC,KM,Su
				1	SM,TC
				2	感受性
				1	SM,TC,NA
	豚肉	<i>S. London</i>	1	1	感受性

供試薬剤

アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスホマイシン(FOM)、セフポドキシム(CPDX)、セフトキシム(CTX)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、イミペネム(IPM)、メロペネム(MEM)、アミカシン(AMK)、スルフイソキサゾール(Su)

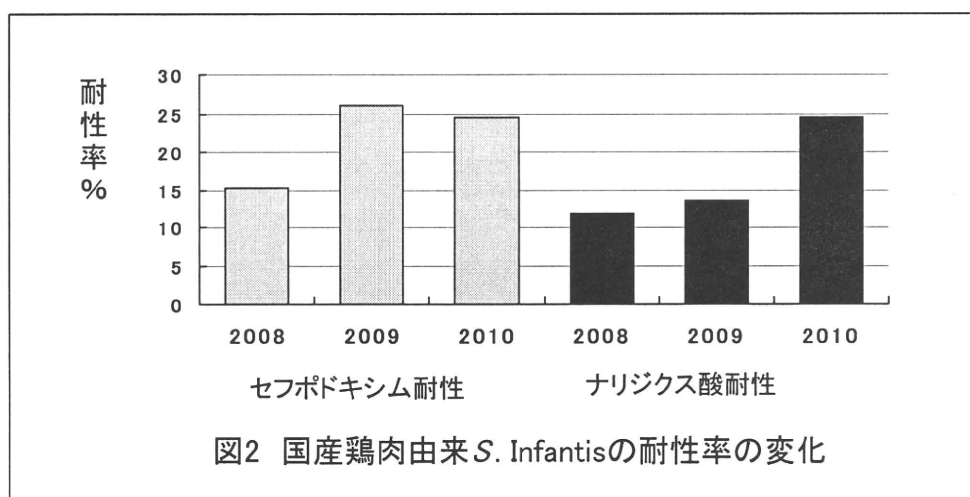


表3 ヒト由来サルモネラの血清型と薬剤耐性パターン(2010年)

血清型	薬剤耐性パターン	食中毒事例		散発事例	
		(菌株数)		患者	保菌者
<i>S. Enteritidis</i>	ABPC,CPDX	1	(1)		
	ABPC				3
	TC			1	
	感受性	5	(18)	1	1
<i>S. Infantis</i>	ABPC,SM,TC,CPDX,CTX,Su				1
	ABPC,SM,TC,CPDX,ST,Su				1
	SM,TC,KM,ST,Su				1
	SM,TC,KM,Su				1
	SM,TC,ST,Su				3
	SM,TC,Su				1
<i>S. Schwarzengrund</i>	SM,TC,KM,Su				1
	SM,TC,Su				1
	TC,KM				1
	Su				1
<i>S. Agona</i>	SM,TC,Su	1	(3)		
<i>S. Bovismorbificans</i>	感受性				1
<i>S. Chingola</i>	感受性				1
<i>S. Hadar</i>	SM,TC,NA				1
<i>S. Idikan</i>	感受性				1
<i>S. Newport</i>	感受性				1
<i>S. Reading</i>	TC				1
<i>S. Rissen</i>	感受性				1
<i>S. Saintpaul</i>	感受性				1
<i>S. Thompson</i>	感受性				1
合計	49株	6	(22)	2	25

供試薬剤

アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスホマイシン(FOM)、セフトロキム(CPDX)、セフトロキム(CTX)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPF)、イミペネム(IPM)、メロペネム(MEM)、アミカシン(AMK)、スルフイソキサゾール(Su)

表4 カンピロバクターの薬剤感受性試験成績(2010年)

薬剤耐性パターン	鶏肉由来株数	ヒト由来株数 散発
<i>C. jejuni</i>		
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC,ABPC	10	3
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	11	13
NFLX,OFLX,CPFX,NA,ABPC	2	5
NFLX,OFLX,CPFX,NA	12	16
NFLX,NA,ABPC	1	
フルオロキノロン耐性 小計	36(36.0%)	37(47.4%)
TC,ABPC	10	4
TC	15	8
ABPC	12	2
感受性	27	27
<i>C. jejuni</i> 合計	100 (100%)	78(100%)
<i>C. coli</i>		
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	1	
NFLX,OFLX,CPFX,NA,ABPC	1	
NFLX,OFLX,CPFX,NA		2
TC,EM		1
<i>C. coli</i> 合計	2	3

供試薬剤:

ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、テトラサイクリン(TC)、エリスロマイシン(EM)、アンピシリン(ABPC)、ゲンタマイシン(GM)

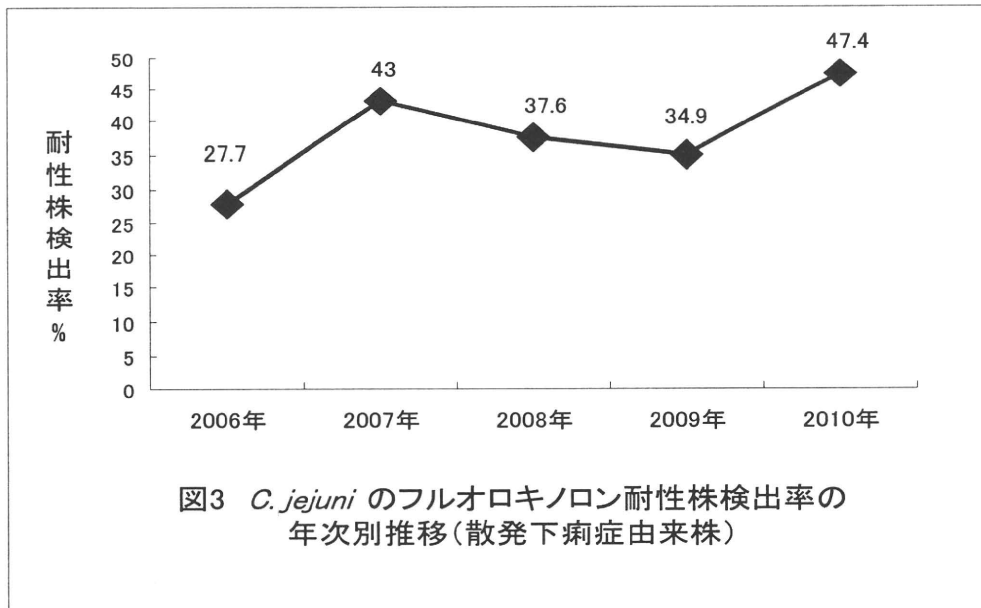


表5 腸管出血性大腸菌O157の薬剤感受性試験成績(2010年)

薬剤耐性パターン	菌株数	
ABPC,SM,TC,ST	2	} 37株(27.4%)
ABPC,SM,TC	11	
ABPC,SM	3	
SM,TC	15	
SM	4	
CP	2	
感受性	98	
合計	135	

供試薬剤

アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスホマイシン(FOM)、セフトロキム(CPD)、セフトロキム(CTX)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)

表6 食肉のMRSA検査数(2010年)

	検体名	検体数	陽性検体数
国産	鶏肉	18	0
	牛肉	35	0
	牛レバー	9	0
	牛内臓	10	0
	豚肉	31	0
	豚レバー	3	0
	合挽ミンチ	1	0
	馬肉	5	0
外国産	牛肉	1	0
	牛レバー	3	0
	豚肉	1	0
合計		117	0

### 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

—犬および人由来フルオロキノロン高度耐性大腸菌における薬物排出ポンプ AcrAB-TolC の関与とセファロスポリン耐性との関連—

研究分担者：田村 豊 酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室

研究協力者：石原加奈子 酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室

### 研究要旨

大腸菌のフルオロキノロン(FQ)耐性は主に DNA ジャイレースとトポイソメラーゼIVのキノロン耐性決定領域 (QRDR) の点変異によって起こる。AcrAB-TolC 薬物排出ポンプは同様に FQ や他の抗菌剤に対する耐性に関与することが知られている。本研究は、人と犬の臨床現場から分離された大腸菌の FQ 耐性と多剤耐性との関連について検討した。FQ 高度耐性大腸菌は高頻度に多剤耐性を示し、特に FQ と同様に人医療で重要視されるセファロスポリンに対しても耐性を示した。また、FQ 高度耐性大腸菌は菌体内エンロフロキサシン (ERFX) 濃度が低く、薬剤排出ポンプ阻害剤による FQ の MIC を大きく減少し、AcrA の発現量が明瞭に増加していた。これらの結果は、AcrAB-TolC 薬物排出ポンプの活性化は FQ 高度耐性に関与するのみならず、セファロスポリンを含む多剤耐性化に関連することが示唆された。

#### 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、人体用抗菌剤が伴侶動物に高頻度に使用されている実態がある。特に人医療で重要視されるフルオロキノロン (FQ) 剤は伴侶動物でも汎用され、家庭内で飼育されている伴侶動物に

使用されて出現する薬剤耐性菌が容易に人へ伝播し、人の健康に影響を与える可能性が考えられる。FQ 耐性菌の主な耐性機構は、DNA ジャイレースを担う *gyrA* と *gyrB*、トポイソメラーゼを担う *parC* と *parE* のフルオロキノロン耐性決定領域 (QRDR) における染色体性点変異といわれている。また、FQ 耐性には菌体内の FQ 剤を能動的に排出する薬物排出ポンプも関与することが知られている。そこで本研究では、これまでの調査から分離された犬および人由来 FQ 耐性大腸菌における耐性機構を明らかにする目的で、QRDR の点変異と薬物排泄ポンプ AcrAB-TolC の関与について検討した。

## B. 研究方法

1. 供試菌株：2005 年 6 月~12 月に酪農学園大学付属動物病院に来院した犬 96 頭と、市中動物病院の犬 80 頭の直腸便から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) により分離した FQ 耐性大腸菌を用いた。一方、人由来 FQ 耐性大腸菌は、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、膈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 (CPFX) 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。

ERFX 感受性大腸菌は 12 株 (FQSECs: MIC 幅 0.03~0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、ERFX 中等度耐性大腸菌は 18 株 (iFQRECs: MIC 幅 16~64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、及び ERFX 高度耐性大腸菌は 20 株 (hFQRECs: MIC 幅 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上) を用いた。FQSECs は 12 頭の犬から、iFQRECs は 10 人と 8 頭の犬から、hFQRECs は 13 人と 7 頭の犬からの分離株であった。

2. Efflux pump 阻害試験：Efflux pump 阻害剤である PA $\beta$ N (Sigma) および NMP (Chess) をそれぞれ 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で MH 寒天培地に添加し、5 種の FQ 抗菌剤に対する MIC を測定し、阻害剤無添加で測定した MIC と比較した。
3. 薬剤感受性試験  
CLSI 法に準拠した寒天平板希釈法により、MIC を求めた。培地は、ミューラーヒントン (MH) 寒天培地 (OXOID) を用いた。供試薬剤は、ERFX、CPFX、LVFX、ピュリフロキサシン (PUFX)、ガチフロキサシン (GFLX) であった。
4. QRDR 塩基配列解析：DNA ジャイレースをコードする *gyrA* および *gyrB* 遺伝子と、トポイソメラーゼ IV をコードする *parC* および *parE* 遺伝子の QRDR の変異によるアミノ酸置換を調べた。
5.  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子の検出： $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子の検出は PCR および塩基配列



の解読によった。

6. ERFX 菌体内蓄積試験：洗浄した菌体 (40mg/mL) を 0.5mL づつ 2 本の試験管に分注する。最終濃度 15mg/mL になるように ERFX を添加する。1 本に 15 $\mu$ l の DMSO を加え、他の 1 本に carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) (Sigma)加 DMSO を加える。遠心後、沈査に 1 mL の 0.1M glycine-HCL (pH.3.0)を加え、室温で一昼夜放置する。遠心後、上清の ERFX の濃度は蛍光光度計 (279nm と 452nm) により測定した。ERFX 排出量は、CCCP 存在下での ERFX の菌体内濃度から引いた ERFX 菌体内濃度により計算した。

7. ウエスタンプロット試験：LB 培地で増殖した菌体を 1%SDS で溶菌した。タンパク量 1mg の溶菌液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により泳動し、その後、タンパクは Immobilon-P 膜に転写した。転写膜はウサギ抗 AcrA 抗体 (1:10000) で 1 時間感作し、洗浄後にアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギ免疫グロブリン抗体を感作し発色させた。大腸菌 AG100 株を参照株として AcrA 発現量を示した。

## C. 研究結果

### 1. QRDR 変異と FQ 感受性との関係

FQ 耐性大腸菌における ERFX の MIC は供試した他の FQ 剤 (CPFX, LVFX,

PUFX, GFLX) と良く相関した。また、全ての FQ 耐性大腸菌はナリジクス酸にも耐性を示した (>128 $\mu$ g/mL)。

全ての耐性株は、*gyrA*(S83 と D87)と *parC*(S80 と E84) に 3 箇所または 4 箇所の変異を認めた。QRDR に 2~3 箇所の変異を持つ株の ERFX の MIC は 16~64 $\mu$ g/mL、4 箇所の変異を持つ株は 32~256 $\mu$ g/mL であった。

### 2. 薬物排出ポンプ阻害剤の影響

PA $\beta$ N (160 $\mu$ g/mL) は FQ 剤に対する MIC を確実に減少させた (ERFX:2~256 倍、CPFX:2~64 倍、GFLX:2~64 倍、LVFX:1~32 倍、PUFX:4~16 倍) (図 1)。MIC の減少は、FQ 剤に対する MIC が高いほど顕著であった。このことは、hFQRECs の FQ 耐性機構に QRDR の点変異ばかりでなく薬物排出ポンプも関与することを示唆している。

### 3. ERFX 菌体内濃度の測定

hFQRECs の ERFX 菌体内濃度は、FQRSECs に比べて有意に低く、iFQRECs に比べて低い傾向にあった (図 2)。CCCP の存在において、全ての hFQRECs は、FQSECs に比べて ERFX 菌体内濃度を有意に増加させた。hFQRECs と iFQRECs の ERFX 排出量は FQSECs に比べ明らかに多く、hFQRECs の排出活性は iFQRECs より高いことが示された。

#### 4. AcrA 発現量

hFQRECs の AcrA 発現量は、iFQRECs と FQSECs に比べ明らかに多かった (図 3)。REFX に対する MIC の増加は、それぞれの QRDR 型において AcrA 発現量と関連した。これら結果は、AcrA の過剰発現と薬物排出活性が ERFX の MIC を増加させ、高度 FQ 耐性を誘導することを示唆している。

#### 5. ERFX 耐性とセフポドキシム (CPDX) 耐性との関係

供試株の 16 株が CPDX に対して耐性を示した。15 株は *blactx-M-2*(n=3)、*blactx-M-1*(n=4)、及び *blacMY*(n=8) を保有した。残りの 1 株は染色体性の *ampC* プロモーター領域の変異であった。

CPDX 耐性は hFQRECs (50%) 及び iFQRECs (27.8%) において有意に多く ( $p < 0.05$ )、iFQSECs より hFQRECs で高頻度である傾向にあった。

AcrA を高度に発現する株は、高頻度にセファゾリン、セファレキシン、CPDX、クロラムフェニコール、ナリジクス酸及び ERFX に耐性を示した (図 3)。高頻度の多剤耐性型は、高度 ERFX 排出株や PA $\beta$ N により MIC を大幅に減少する株でも認められた。

#### D. 考察

本研究から伴侶動物である犬及び人由来大腸

菌は、QRDR の点変異とともに薬物排出ポンプにより FQ に対して高度耐性を獲得することを示した。加えて、これら FQ 耐性大腸菌は高頻度に FQ と同様に人医療で重要視されるセファロスポリンを含む多剤耐性型を示した。また、このような FQ 耐性機構においては、犬と人由来大腸菌に差異は認められなかった。

FQ 耐性の程度は、これまで主に QRDR の点変異数によって説明されてきた。しかし、hFQRECs においては、同じ QRDR 変異型を示すのに ERFX に対する MIC が広範囲にわたることが観察され、QRDR の点変異だけで説明できないこと示した。薬物排出ポンプ阻害剤は、殆どの供試株の FQ に対する MIC を劇的に減少させ、CCCP 存在下で菌体内の ERFX 濃度が上昇した。また、hFQRECs の AcrA 発現量は、iFQRECs や FQSECs より多かった。これらの成績は、薬物排出ポンプが QRDR 変異とともに FQ に対する高度耐性化に関与することを示唆している。

薬物排出ポンプの活性は、FQ 耐性に関与するのみならず他薬剤の耐性にも関与していた。AcrA は広域基質特異性を持つ RND ファミリートランスポーターに属する AcrAB-TolC の一部分である。今回の成績は、大腸菌における AcrA による薬物排出ポンプの活性化が多剤耐性に関与することを示唆した。

#### E. 結論

人及び犬由来大腸菌における FQ 高度耐性は

QRDR の点変異に加えて薬物排出ポンプの活性化が関与した。FQ 高度耐性は AcrA の発現と関連した。また、AcrA はセファロスポリンを含む多剤耐性に関連した。

#### F. 健康危機情報

FQ はヒト医療で最も汎用される抗菌剤である。FQ 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低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 ERFX 耐性大腸菌は人でも使用される抗菌剤にも耐性を示す多剤耐性菌であり、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。

#### G. 研究発表

##### <口頭発表>

1. 佐藤豊孝, 横田伸一, 大久保寅彦, 石原加奈子, 岡林環樹, 藤井暢弘, 田村 豊: 人および犬由来大腸菌のフルオロキノロン高度耐性とセフェム耐性における Efflux pump の関与, 第 78 回日本細菌学会北海道支部総会, 2010 年 9 月 3 日, 北海道.
2. 大久保寅彦, 佐藤豊孝, 石井良和, 石原加奈子, 田村 豊: 犬由来フルオロキノロン・セファロスポリン多剤耐性大腸菌の系統発生分類による解析, 第 78 回日本細菌学会北海道支部総会, 2010 年 9 月 3 日, 北海道.

菌学会北海道支部総会, 2010 年 9 月 3 日, 北海道.

3. 佐藤豊孝, 横田伸一, 大久保寅彦, 石原加奈子, 岡林環樹, 藤井暢弘, 田村 豊: 人および犬由来大腸菌のフルオロキノロン高度耐性とセフェム耐性における Efflux pump の関与, 第 150 回日本獣医学会学会術集会, 2010 年 9 月 10 日, 北海道.
4. 大久保寅彦, 佐藤豊孝, 石原加奈子, 石井良和, 田村 豊: 犬および人由来セファロスポリン耐性大腸菌における耐性因子の比較, 第 150 回日本獣医学会学会術集会, 2010 年 9 月 10 日, 北海道.

##### <紙上発表>

1. 酒見蓉子, 御囲雅昭, 篠田浩二郎, 村松康和, 上野弘志, 田村 豊: 北海道石狩地域における牛乳房炎由来 *Escherichia coli* および *Klebsiella* 属菌の薬剤感受性, 日本獣医師会雑誌 63(3), 215-218, 2010.
2. Kanako Ishihara, Natsumi Shimokubo, Akie Sakagami, Hiroshi Ueno, Yasukazu Muramatsu, Tsuyoshi Kadosawa, Chie Yanagisawa, Hideaki Hanaki, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki, Yutaka Tamura: Occurrence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital, Appl.

Environ.Microbiol., 76(15), 5165-5174,  
2010.

3. Kotaro Baba, Kanako Ishihara, Masao Ozawa, Yutaka Tamura, Tetsuo Asai: Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swabs of slaughtered swine in Japan, *J Antimicrobial Agents*, 36, 352-354, 2010.
4. Toyotaka Sato, Shin-ichi Yokota, Torahiko Okubo, Tamaki Okabayashi, Kanako Ishihara, Hiroshi Ueno, Yasukazu Muramatsu, Nobuhiro Fujii, Yutaka Tamura: High-level fluoroquinolone resistant are mediated by efflux pump of AcrAB-TolC and related to cephalosporine resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and humans, (投稿中)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

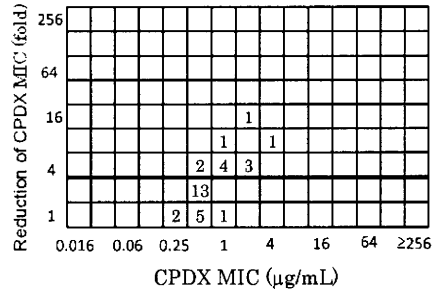
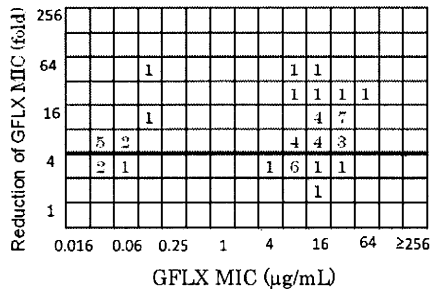
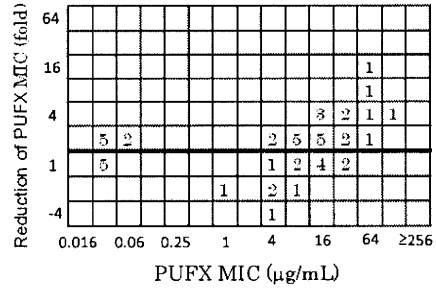
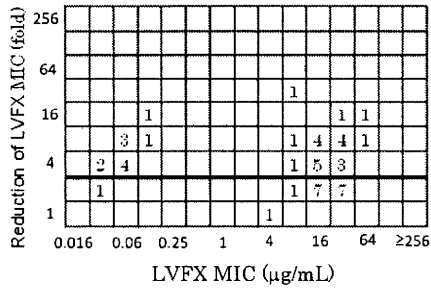
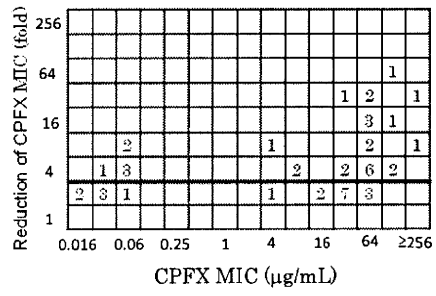
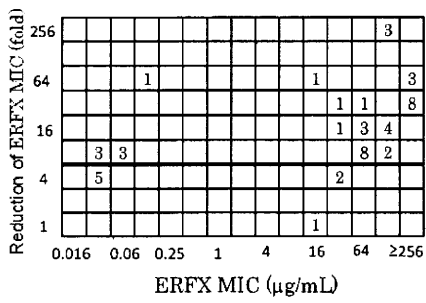


図1. PAβNによるERFXとCPDXに対するMICの減少

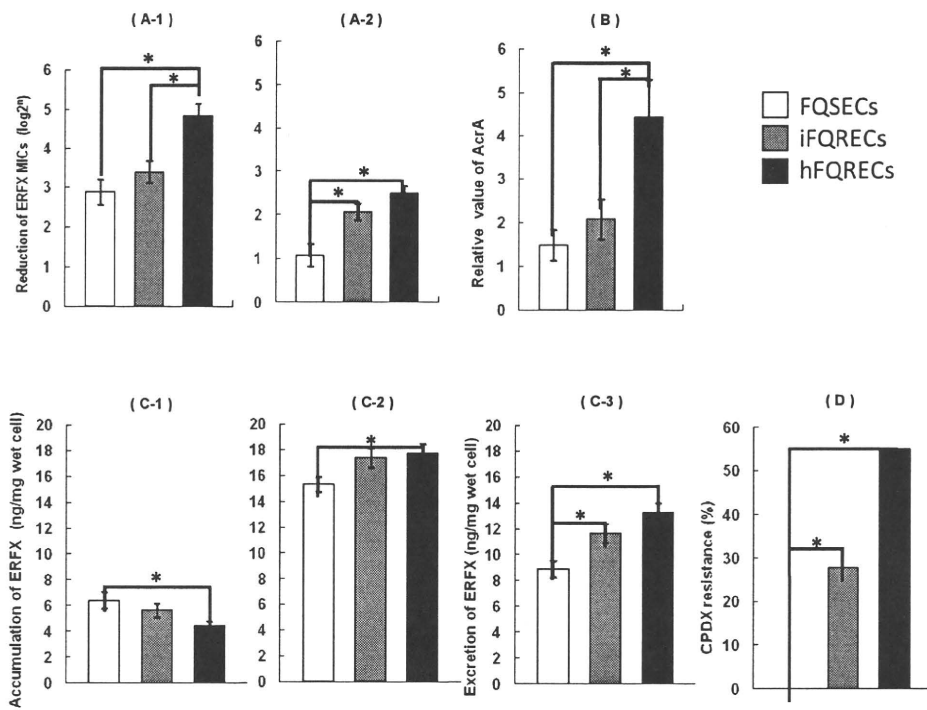


図 2. ERFX 耐性度の違いによる薬物排出ポンプの影響

A : PAβN (160 μg/mL ; A-1) と NMP (160 μg/mL ; A-2) の影響

B : AcrA のウェスタンブロット解析。AcrA の発現量は AG100 株に対する相対値で示す。

C : ERFX 菌体内濃度。CCCP 非存在下 (C-1) と存在下 (C-2)。ERFX 排出量 (C-3)。

D : CPDX 耐性株の分離 (%)

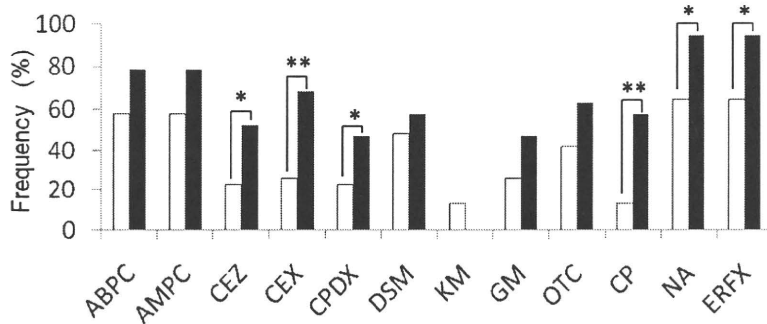


図3. AcrA発現量と多剤耐性の関係

AcrA 発現量はウエスタンブロット法で測定した。AcrA 発現量が 2.0 以下 (□) と 2.0 以上 (■)。

ABPC : アンピシリン, AMPC : アモキシリン, CEZ : セファゾリン, CEX : セファレキシリン, CPDX : セフポドキシム, DSM : ジヒドロストレプトマイシン, KM : カナマイシン, GM : ゲンタマイシン, OTC : オキシテロラサイクリン, CP : クロラムフェニコール, NA : ナリジクス酸, ERFX : エンロフロキサシン。

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 22 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

研究分担者 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 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所  
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

ここ数年伝播が危惧されている *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 薬剤耐性株の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 配列を確定し論文報告を行った。全ゲノム解読の対象株は、2000 年に胃腸炎を訴えるヒト患者から臨床分離されたフルオロキノロン耐性を示す多剤耐性 *S. Typhimurium* T000240 株を用いた。全ゲノム配列の比較解析から、T000240 株は 1940 年に分離された Typhimurium 代表株である LT2 株と非常に近縁であることが分かり、LT2 類縁株が再び蔓延していることを示していた。T000240 株は、独自のゲノム・アイランド (82-kb, GI-DT12 と命名) を染色体に保有していた。GI-DT12 は、Tn2670 様のトランスポゾン (Class 1 インテグロン、水銀耐性、クロラムフェニコール耐性) と Tn10 様のトランスポゾン (テトラサイクリン耐性)、そして複数の鉄獲得系を混在させた複合型トランスポゾンを構成していることが明らかとなった。また、GI-DT12 は IS1 が介在した相同組換えにより染色体に挿入・獲得していた。他、アミノグリコシドおよびゲンタミシン耐性に関与する遺伝子をプラスミド上に見出し、それらは IS26 を介した相同組換えにより耐性を獲得していた。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。本研究は、IS1/IS26 により外来性に獲得したユニークな薬剤耐性ゲノム・アイランド構造を初めて明らかにした。さらなるサルモネラ・ゲノム解析により、伝播・蔓延の続く多剤耐性株の水平伝達機構をより明確に解明することができるであろう。

#### 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) 薬剤耐性 *Salmonella* Typhimurium T000240 株の全ゲノム解読と complete 配列の確定

T000240 株のゲノム DNA からイルミナ解読用の DNA ライブラリー (平均 500 bp インサート長) を



作製し解読した。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。また、最終的なアノテーションは NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/pipeline.html>) にて行った。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。

*S. Typhimurium* LT2 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塩基バリエーション (Single nucleotide variations: SNVs) を網羅的に抽出した。さらに4株の *S. Typhimurium* ゲノム配列を公共データベースから取得し、36 mer の疑似リードを作成してイルミナ解読リードと同様に maq で SNVs 抽出した。各株から抽出した SNVs 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。

ゲノム・アイランド (Genomic island: GI) のペアワイズアライメントは、blastn 相同性検索結果を ACT プログラムにて図示化した。

## C. 結果

### 1) 薬剤耐性 *Salmonella* Typhimurium T000240 株の全ゲノム解読と complete 配列の確定

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 (図 1A)。LT2 株ゲノム配列を参照にしてギャップクロージング後 (図 1B)、最終的に、環状の染色体 DNA (4,954,814 bp)、環状のプラスミド 2 つ (106,510 bp, 8,670 bp) を保有していることが明らかとなった (図 2, 3 および表 1)。

全ゲノム配列の比較解析から得られた SNVs 系統樹を最尤法で作製した結果、T000240 株は 1940 年に分離された Typhimurium 代表株である LT2 株と非常に近縁であることが分かり、LT2 類縁株が再び蔓延していることを示唆していた (図 4)。

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 82 kb) が挿入していた (図 6)。この独自のゲノム・アイランドを GI-DT12 と命名した。PFGE と Class 1 integron をプローブにしたサザン法にて、157, 80 kb の 2 本の *BlnI* 消化断片にハイブリした。染色体に該当する 157 kb と プラスミド由来と想定される 80 kb の断片に Class 1 integron が局在していることが推測された (表 2)。

GI-DT12 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-OXA30*, *aadA1*, *qacED1*, *sul1*) と称される薬剤耐性アイランドが存在し、その近傍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 (図 7)。従来知られている *S. Typhimurium* のプラスミド pUO-StVR2

と非常に酷似した遺伝子構造をしており、元来プラスミド由来の配列であったことを示唆していた。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 (表3)。

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)。この領域は、起源となるバクテリアが不明のプラスミド pRSB107 と酷似していた。この pRSB107 は、下水処理場の活性汚泥から分離されたプラスミドであり、汚泥中の細菌が代謝する重金属関連因子を何らかの方法で外来性に獲得した経緯が伺える。

他、アミノグリコシドおよびゲンタミシン耐性に関与する遺伝子をプラスミド上に見出し、それらは IS26 を介した相同組換えにより耐性を獲得していた。

#### D. 考察

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

S. Typhimurium T000240 株をのゲノム解読を行った。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

を示唆していた。本研究は、IS1/IS26 により外来性に獲得したユニークな薬剤耐性ゲノム・アイランド構造を初めて明らかにした。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。さらなるサルモネラ・ゲノム解析により、伝播・蔓延の続く多剤耐性株の水平伝達機構をより明確に解明することができるであろう。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

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 見いだし、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

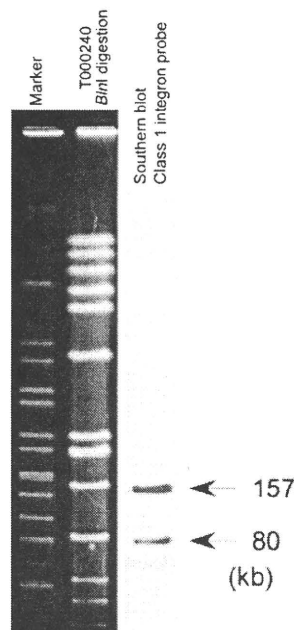
Whole-Genome Analysis of Salmonella enterica Serovar Typhimurium T000240 Reveals the Acquisition of a Genomic Island Involved in Multidrug Resistance via IS1 Derivatives on the Chromosome. Izumiya H, Sekizuka T, Nakaya H, Taguchi M, Oguchi A, Ichikawa N, Nishiko R, Yamazaki S, Fujita N, Watanabe H, Ohnishi M, Kuroda M. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):623-30. Epub 2010 Nov 22.

表1 T000240株のゲノム情報

	chromosome	plasmid L	plasmid S
Length (bp)	4,954,814	106,510	8,670
G+C Content (%)	52.2	53.5	60.9
CDS (no.)	4723	139	11
rRNA genes (no.)	22	-	-
tRNA genes (no.)	84	-	-
Avg. CDS length (bp)	920	634	2942
Coding density (%)	87.4	82.4	88.2
Non-coding density (%)	12.6	17.6	11.8
Function assigned	3909	112	9
Hypothetical protein	814	27	2

表2 T000240株のPFGE結果と Class 1 integron をプローブにしたサザンブロット

BinI cut site		Predicted band (bp)	PFGE band (kb)	var	Class 1 integron*
Start	End				
Chromosome DNA					
1929935	2795366	865436	977	-111.6	
1127617	1929934	802322	885	-82.7	
404072	1127616	723549	756	-32.5	
4501451	186674	640042	634	6.0	
3018165	3589426	571266	564	7.3	
3595349	4016831	421487	417	4.5	
4206933	4456135	249207	243	6.2	
2795367	3018164	222802	215	7.8	
186675	404071	217401	215	2.4	
4042330	4205160	162835	155	7.8	Class I Integron
4456136	4501450	45319	38	7.3	
4016832	4042329	25502	29	-3.5	
3589427	3593576	4154	8	-3.8	
3593577	3595348	1776			
4205161	4206932	1776			
plasmid pSTMDT12_L					
44122	28093	90486			Class I Integron
28094	44121	16032			



\* Labelled PCR product (chromosome DNA: 4073851-4075846) was used for Southern blot detection.

表3 T000240株の薬剤耐性マーカーとその局在

Antibiotics	Resistance gene marker	Resistance determinants
Nalidixic acid	QRDR*	GyrA: S83F, D87N
Ciprofloxacin	QRDR*	GyrA: S83F, D87N; ParC: S80R
Ampicillin	<i>bla<sub>oxa-30</sub></i>	GI-DT12
Streptomycin	<i>aadA1</i>	GI-DT12 / pSTMDT12_L
	<i>strA</i> [ <i>aph(3)</i> ], <i>strB</i> [ <i>aph(6)</i> ]	pSTMDT12_S
Sulphonamide	<i>sul1</i>	GI-DT12 / pSTMDT12_L
	<i>sul2</i>	pSTMDT12_S
Tetracycline	<i>tetA</i> (class B)	GI-DT12
Chloramphenicol	<i>cat</i>	GI-DT12
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	<i>dfrA1, sul1</i>	pSTMDT12_L / GI-DT12
Trimethoprim	<i>dfrA1</i>	pSTMDT12_L
Gentamicin	<i>aac(3)</i>	pSTMDT12_L

\*Quinolone Resistance Determining Region.

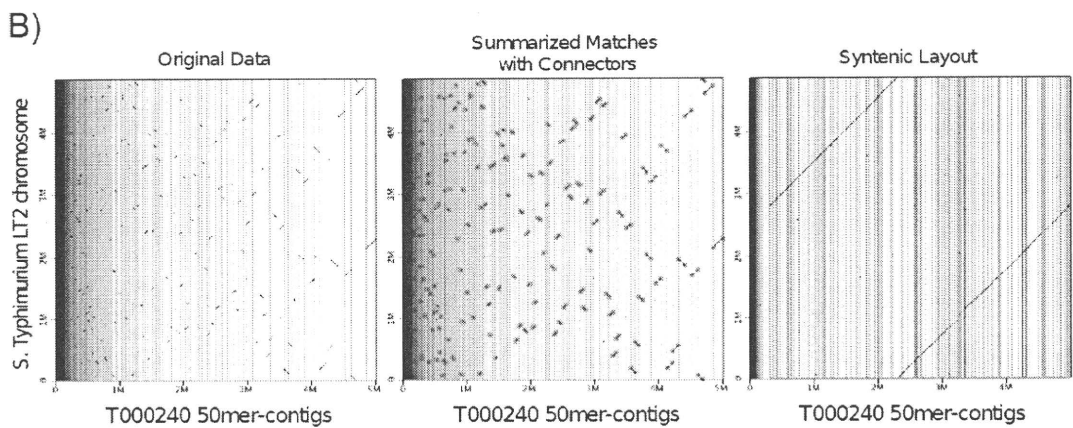
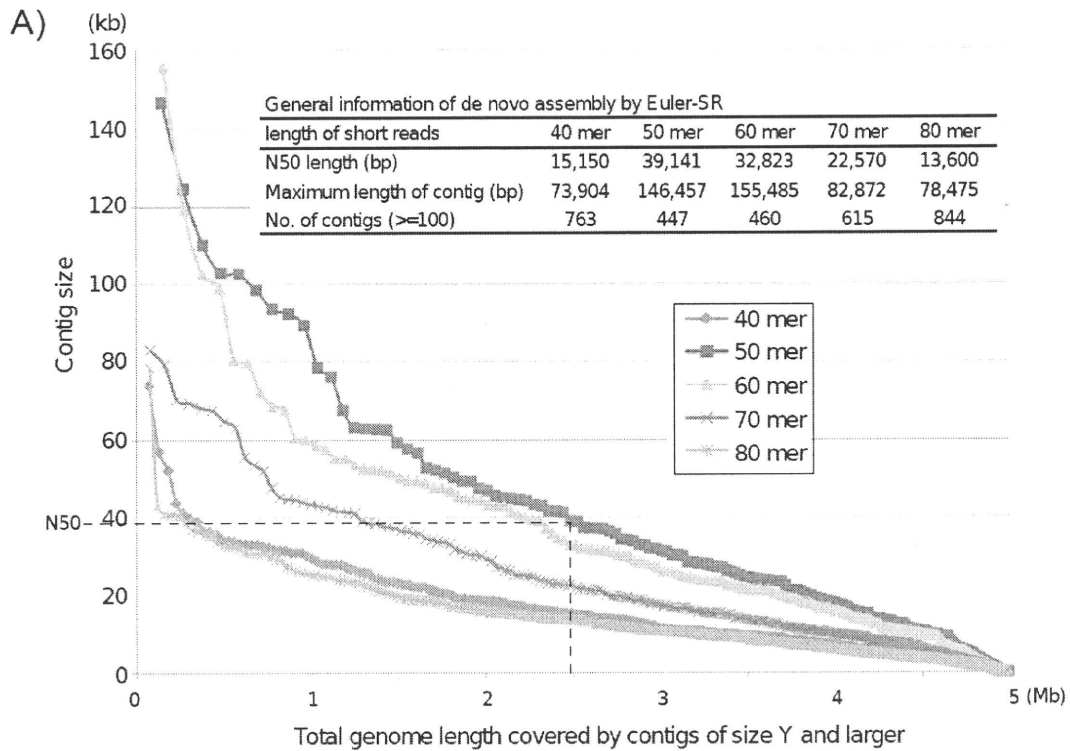


図1 *S. Typhimurium* T000240 株のイルミナ・リードの *de novo* assembly. A) イルミナ解読リード (80 mer) を5'末端から 40, 50, 60, 70, 80 mer を選別し、Euler-SR v1.0 にて最も良好なアセンブル結果を示す長さを検討した。50 mer 使用により、最も成績の良い N50 値と最少の contig 数にまでアセンブルすることができた。

B) 50 mer 使用 contigs を *S. Typhimurium* LT2 ゲノム配列に並べ、およそのゲノム配列構造を推定した。