

図2 国産鶏肉由来 S. Infantis の耐性率の変化

表4 サルモネラのβ-ラクタマーゼ産生株

由来	血清型	菌株数	ESBL	AmpC		
鶏肉	S. Infantis	40	CTX-M-1グループ(1)	CITグループ*(34)		
			CTX-M-2グループ(1)			
			CTX-M-9グループ(4)			
			S. Mantattan		2	TEM型(2)
			S. Hadar		1	CTX-M-2グループ(1)
S. Typhimurium	1	CTX-M-2グループ(1)				
S. Heidelberg	1		CITグループ(1)			
ヒト	S. Infantis	3		CITグループ(3)		

()内は菌株数

* CMY-2を含む

表5 腸管出血性大腸菌O157の薬剤感受性試験成績(2011年)

薬剤耐性パターン	菌株数	
ABPC, CTX, CPDX	2*	} * ESBL (CTX-M-1グループ) 16株(23.5%)
ABPC, SM, TC	2	
ABPC, SM, ST	7	
SM, TC, CP	3	
SM, TC	1	
TC	1	
感受性	52	
合計	68	

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6 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	食中毒(11事例)
<i>C. jejuni</i>			
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC,ABPC	10	3	4
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	11	13	8
NFLX,OFLX,CPFX,NA,ABPC	2	5	2
NFLX,OFLX,CPFX,NA	12	16	6
NFLX,NA,ABPC	1		
フルオロキノロン耐性 小計	36(36.0%)	37(47.4%)	20(64.5%)
TC,ABPC	10	4	2
TC	15	8	1
ABPC	12	2	1
感受性	27	27	7
<i>C. jejuni</i> 合計	100(100%)	78(100%)	31(100%)
<i>C. coli</i>			
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	1		1
NFLX,OFLX,CPFX,NA,ABPC	1		
NFLX,OFLX,CPFX,NA		2	
TC,EM		1	
<i>C. coli</i> 合計	2	3	1

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)

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

—イヌおよびヒト由来フルオロキノロン耐性大腸菌におけるプラスミド介在性キノロン耐性遺伝子の検索—

分担研究者：田村 豊 酪農学園大学獣医学群獣医学類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群獣医学類食品衛生学ユニット

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の点変異によって起こる。最近、プラスミド介在性の FQ 耐性遺伝子が明らかにされたことから、本研究では、これまでの調査で分離されたイヌおよびヒト由来 FQ 耐性大腸菌における *aac(6)-Ib-cr* と *oqxAB* の存在について検討した。その結果、イヌ及びヒト由来 FQ 耐性大腸菌は、低頻度ながらプラスミド介在性の FQ 耐性遺伝子である *aac(6)-Ib-cr* および *oqxAB* を保有することが明らかになった。また、*aac(6)-Ib-cr* 保有株については、イヌ及びヒト由来株で極めて性状が類似したことから、イヌとヒト間での伝播の可能性が示唆された。さらに、*oqxAB* は豚に使用されたオラキンドックスにより選択された耐性遺伝子であり、豚からヒトあるいはイヌへの伝播の可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、イヌやネコ等の伴侶動物はヒトと共通の場で生活し、ヒト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、伴侶動物に対してヒト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ヒトへ伝播し、ヒトの健康に影響を与える可能性が考えられる。

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* と、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) における点変異によるアミノ酸置換といわれている。最近、FQ 耐性に関与するプラスミド介在性の FQ 耐性遺伝子の存在が明らかにされ注目されている。プラスミド介在性 FQ 耐性遺伝子である *aac(6)-Ib-cr* は、アミノグリコシド系抗菌薬のアミノ基をセチル化する Aminoglycoside-N-acetyltransferase の 1 種で、ピペラジニル基にアミンを含む FQ もアセチル化することにより抗菌力を減弱させる。また、*oqxAB* は、プラスミド介在性エフラックスポンプで FQ をはじめ様々な抗菌薬の排出に関与する。

そこで本研究では、これまでの調査から分離されたイヌおよびヒト由来 FQ 耐性大腸菌における耐性機構を明らかにする目的で、近年明らかにされた *aac(6)-Ib-cr* と *oqxAB* の存在について検討した。

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イヌ 96 頭と、市中動物病院のイヌ 80 頭の直腸便からエンロフロキサシン (ERFX) 4 μ g/mL 添加 DHL 寒天培地 (日水) により分離した

31 株の FQ 耐性大腸菌を用いた。一方、ヒト由来 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、膿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 μ g/mL 以上、またはシプロフロキサシン (CPFEX) に対する MIC が 1 μ g/mL 以上を示した 118 株を供試した。

2. *aac(6)-Ib-cr*、*oqxAB* の検出：*aac(6)-Ib-cr* の検出は、*aac(6)-Ib* 遺伝子を PCR にて増幅後に、塩基配列を解読することによった。*oqxAB* は PCR にて検出した。

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、最少発育阻止濃度 (MIC) を求めた。培地は、ミュラーヒントン (MH) 寒天培地 (OXOID) を用いた。供試薬剤は、エンロフロキサシン (ERFX)、シプロフロキサシン (CPFEX)、レボフロキサシン (LVFX)、ピュリフロキサシン (PUFX)、シタフロキサシン (STFX) 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. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)：

イヌ及びヒト由来株の相同性を調べるために、Pulse Net(CDC, USA)のプロトコールに準拠して PFGE を用いて遺伝子型を調べた。

6. Multilocus Sequence Type (MLST) : プラスミド保有株について、*gyrB*, *mdh*, *purA*, *recA* を PCR にて増幅し、塩基配列を解析することにより ST を決定した。

C. 研究結果

1. *aac(6)-Ib-cr* および *oqxAB* の検出

aac(6)-Ib-cr は、イヌ由来 31 株中 3 株 (9.7%) ヒト由来 118 株中 1 株 (0.8%) から検出された。また、*oqxAB* は、イヌ由来 31 株中 1 株 (3.2%)、ヒト由来 118 株中 1 株 (0.8%) から検出された。

2. *aac(6)-Ib-cr* および *oqxAB* 保有株の各種性状

(1) *aac(6)-Ib-cr* 保有株

イヌ (CE13 株) およびヒト (SRE91 株) 由来 *aac(6)-Ib-cr* 保有株の各種性状は極めて類似していた (表 1)。すなわち、O 血清型が O1 で、各種の FQ 剤に対する MIC も全く同じ値を示した。また、QRDR の点変異箇所も全く同一で *gyrA* で 2 か所、*parC* と *parE* で 1 か所であった。さらに、MLST も両株とも ST648 であった。BlnI 及び XbaI を用いた PFGE 解析でも、相同率がそれぞれ 86.7% と 70.6% であった。

(2) *oqxAB* 保有株

ヒト由来 *oqxAB* 保有株 (HUE1 株) の各種性状は、イヌ由来株 (RE4 株、RE64 株、RE64 株) のそれと異なった性状を示した (表 2)。すなわち、HUE1 株は、O 血清型別は不能で、各種の FQ 剤に対する MIC もイヌ由来株に比べて低かった。また、QRDR の点変異も知られている部位に全く確認されなかったが、*qnrS* を保有していることが分かった。PFGE の相同性も、イヌ由来株と比較して 68% 以下であった。一方、イヌ由来株は、分離した 3 株全てが血清型は O1 で、MIC も ERFX に対して 64 ($\mu\text{g/mL}$) で、CPFX に 16 ($\mu\text{g/mL}$)、LVFX と PUFX に 4 ($\mu\text{g/mL}$)、そして STFX に 2 ($\mu\text{g/mL}$) を示した。QRDR の点変異も、*gyrA* で 2 か所、*parC* と *parE* で 1 か所が確認された。しかし、*qnrS* はいずれの株も検出されなかった。PFGE の相同性は、イヌ由来の 3 株で 97% 以上を示した。

D. 考察

本研究から伴侶動物であるイヌ及びヒト由来 FQ 耐性大腸菌は、低頻度ながらプラスミド介在性の FQ 耐性遺伝子である *aac(6)-Ib-cr* および *oqxAB* を保有することが明らかになった。

aac(6)-Ib-cr は、アミドグリコシド系抗生物質を修飾する酵素に関連する遺伝子でありながら、FQ のアミンをアセチル化することにより抗菌力を低下させる極めてユニークな性状を持

っている。これまでの報告から、イヌ由来株の *aac(6)-I b-cr* の保有率は中国で 41.7%とされ、ヒト由来株ではアメリカで 31.9%、韓国で 41.7%、カナダで 4% (2004 年) と 13% (2007 年) とされている。また、東京で実施された調査成績では、ヒト由来株の 13.0%が *aac(6)-I b-cr* 保有することが報告されている。今回、限定された調査であったが他の報告と比べて低い保有率であり、地域性の検討も含めさらなる調査が必要であろう。

一方、*oqxAB* は、2003 年にスウェーデンとデンマークで成長促進用の抗菌性飼料添加物であるオラキンドックスを使用したブタの堆肥由来大腸菌で初めて発見されたものである。*OpxAB* は、プラスミド介在性の RND 型エフラックスポンプで、オラキンドックスをはじめ、トリメトプリム、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、リファンピシン、それに FQ などの様々な抗菌薬の排出に関与することが知られている。これまで中国、韓国、スウェーデン、デンマークにおいて、ヒト及びブタ由来の大腸菌や肺炎桿菌で報告されている。今回、初めてイヌ由来 FQ 大腸菌において *oqxAB* が検出されたことになる。今回、*oqxAB* が検出された性状の類似したイヌ由来株は、いずれも異なるイヌから分離されたものであるが、同一の動物病院由来であり、院内感染の可能性はある。

今回、プラスミド介在性の FQ 耐性遺伝子がイヌとヒト由来 FQ 耐性大腸菌から検出されたことから、その伝播経路に興味を持たれる。

aac(6)-I b-cr 保有株については、イヌ及びヒト由来株で極めて性状が類似したことから、イヌとヒト間での伝播の可能性が示唆された。一方、*oqxAB* 保有株はイヌ及びヒト由来株で異なった性状を示しており、別々の経路で伝播したものと思われた。しかし、元もとブタに使用された抗菌性飼料添加物であるオラキンドックスにより選択された耐性菌であり、ブタからヒトあるいはイヌへの経路を考えると興味深い。なお、今回ヒト由来大腸菌から分離された HUE1 株は、QRDR の点変異が全くないにも関わらず FQ 剤に耐性を示し、*qnrS* と *oqxAB* を保有していた。今後、QRDR に寄らない新たな FQ 耐性機構を含めて検討する必要がある。

いずれにしても、プラスミド介在性 FQ 耐性遺伝子は、FQ に対する高度な耐性を誘導しないものの、同種及び異種細菌に耐性形質を伝達することが可能であり、多剤耐性菌になる可能性もある。したがって、今後も FQ 耐性菌については、QRDR の点変異とともにプラスミド介在性 FQ 耐性遺伝子の分布状況を監視する必要がある。

E. 結論

イヌ及びヒト由来 FQ 耐性大腸菌は、低頻度ながらプラスミド介在性の FQ 耐性遺伝子である *aac(6)-I b-cr* および *oqxAB* を保有することが明らかになった。

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ヒトや各種動物から分離される。また、今回の成績からイヌ由来耐性菌のヒトへの直接的な伝播を示す証拠にならず直ち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 FQ 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。

G. 研究発表

1. Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Ishihara K, Fujii N, Tamura Y: A fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolate without quinolone resistant-determining region mutations found in Japan, *Antimicrobiol Agents Chemother*, 55(8), 3964-3965, 2011.
2. Ishihara K, Kanamori K, Asai T, Kojima A, Takahashi T, Ueno H, Muramatsu M, Tamura Y: Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from wild mice in a forest of a natural park in Hokkaido, Japan, *J Vet Med Sci*, 73(9), 1191-1193, 2011.
3. Ishihara K, Hosokawa Y, Makita K, Nod J, Ueno H, Mukai T, Yamamoto H, Ito M, Muramatsu M, Tamura Y: Factor associated with antimicrobial resistant *Escherichia coli* in zoo animals, *Res Vet*

Sci, in press.

4. Yokota S, Sato T, Okubo T, Ohkoshi Y, Okabayashi T, Kuwahara O, Tamura Y, Fujii N: Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strain isolated in Japan, *Chemotherapy*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1. *aac(6')-Ib-cr*保有株の性状

	由来	血清型	MIC; $\mu\text{g}/\text{mL}$					QRDR				PMQR
			ERFX	CPFX	LVFX	PUFX	STFX	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
SRE91	人	O1	>128	>128	16	32	2	S83L, D87N	No mutation	S80I	S458	+
CE13	犬	O1	>128	>128	16	16	2	S83L, D87N	No mutation	S80I	S458	+

* QRDR: キノロン耐性決定領域

PMQR; プラスミド介在性フルオロキノロン耐性遺伝子

表2. *oqxAB*保有株の性状

	由来	血清型	MIC; $\mu\text{g}/\text{mL}$					QRDR				PMQR	
			ERFX	CPFX	LVFX	PUFX	STFX	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>qnrS</i>	<i>oqxAB</i>
HUE1	人	Un- typable	8	4	8	4	2	No mutation	No mutation	No mutation	No mutation	+	+
RE4	犬	O1	64	16	16	4	2	S83L, D87N	No mutation	S80I	Q460A	-	+
RE64	犬	O1	64	16	16	4	2	S83L, D87N	No mutation	S80I	Q460A	-	+
RE65	犬	O1	64	16	16	4	2	S83L, D87N	No mutation	S80I	Q460A	-	+

* QRDR: キノロン耐性決定領域

PMQR; プラスミド介在性フルオロキノロン耐性遺伝子

厚生労働科学研究費補助金（食品の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 23 年度分担研究報告書

分担課題名：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	竹内史比古	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	松井真理	国立感染症研究所	細菌第二部	
研究協力者	荒川宜親	国立感染症研究所	細菌第二部	
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部	
研究協力者	菱沼 昭	獨協医科大医学部	感染制御・臨床検査医学	

研究要旨

2011 年 1 月に本邦初の New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) 陽性大腸菌 NDM-1_Dok01 株 (multilocus sequence typing type: ST38) の臨床分離が報告された。NDM-1 はプラスミド性に伝達することが知られ、カルバペネム耐性がサルモネラ等の腸内細菌科に広く伝播する危険性が想定される。本研究では、NDM-1 獲得様式の解明と広範な伝播様式の解析を目的として、本邦初分離株 NDM-1_Dok01 のゲノム解析を行った。全ゲノム解読と NDM-1 プラスミドの形質転換 DH10B 株を利用して NDM-1 プラスミド (pNDM-1_Dok01) の完全長配列を決定した。全長 195.5 kb の IncA/C 型レプリコンを有するプラスミドであり、225 個の遺伝子の存在が予測された。pNDM-1_Dok01 は、大腸菌 AR060302 株の pAR060302 (166.5 kb) および *Salmonella enterica* serovar Newport の pSN254 (176.4 kb) 等の bla_{CMY-2} 陽性 IncA/C プラスミドと高い保存性を示した。また、pNDM-1_Dok01 には bla_{CMY-4} が存在し、IncL/M 型の bla_{NDM-1} 陽性プラスミド pNDM-HK とは異なっていた。プラスミド上の bla_{NDM-1} は、これまでの NDM-1 陽性プラスミドとは異なり、IS903 に挟まれた新規 composite transposon 内に含まれていた。さらに、composite transposon 内には分子シャペロンの *groES* および *groEL* が存在していた。それら分子シャペロンの系統解析および GC 含量の比較の結果、植物病原体である *Pseudoxanthomonas* および *Xanthomonas* 属に近縁であった。以上の結果から、NDM-1_Dok01 株 (ST38) の bla_{NDM-1} は、環境中に存在する植物病原体細菌等から composite transposon を介して IncA/C プラスミド上に水平伝播された可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト、家畜、食品から分離される薬剤耐性食

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。今年度は本邦初のカルバペネム耐性 New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) 保有大腸菌 NDM-1_Dok01 株 (multilocus sequence typing type: ST38) のゲノム解読と *bla*_{NDM-1} 陽性プラスミド pNDM-1_Dok01 の完全長配列を決定することで、サルモネラ等の腸内細菌科で広範に薬剤伝播するメカニズムについて検討した。

B. 研究方法

1) NDM-1_Dok01 株の全ゲノム解読

NDM-1_Dok01 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 600 bp と 1.3 kb インサート長) を作製し、Illumina GAIIX シークエンサーでペアエンド解読した。得られた解読リード (70 mer) を *de novo* assembler ABySS-pe v. 1.2.5 にて contig 配列を作成した。NDM-1 プラスミドを詳細に解析するために、NDM-1 プラスミドを大腸菌 DH10B ヘフィルター接合法にて形質導入した耐性株 (800 μ g/mL streptomycin と 16 μ g/mL ceftazidime で選択) をゲノム解読し、公開済の DH10B 染色体配列との比較解析で、NDM-1_Dok01 が保有する NDM-1 プラスミドを解析した。環状 NDM-1 プラスミド配列 (pNDM-1_Dok01) を確定するために、サンガー・キャピラリー法にてギャップクロージングした。

2) プラスミド pNDM-1_Dok01 のアノテーション

pNDM-1_Dok01 配列から GeneMarkS を用いて遺伝子抽出を行い、blastp アミノ酸相同性検索にて該当する機能注釈 (アノテーション) を行った。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。分子系統解析は、MEGA5 を用いてアライメント解析と最尤法による系統分類・系統樹作成をおこなった。NDM-1 遺伝子の近傍領域の比較解析は、対象プ

ラスミド配列を blastn 相同性解析し、結果を ACT プログラムにて図示化した。

C. 結果

1) プラスミド pNDM-1_Dok01 の完全長配列

全ゲノム解読と NDM-1 プラスミドの形質転換 DH10B 株を利用して NDM-1 プラスミド (pNDM-1_Dok01) の完全長配列を決定した (図 1)。全長 195.5 kb の IncA/C 型レプリコンを有するプラスミドであり、225 個の遺伝子の存在が予測された。pNDM-1_Dok01 は、大腸菌 AR060302 株の pAR060302 (166.5 kb) および *Salmonella enterica* serovar Newport の pSN254 (176.4 kb) 等の *bla*_{CM-2} 陽性 IncA/C プラスミドと高い保存性を示した (図 1・円環図の最外側)。また、pNDM-1_Dok01 には *bla*_{CM-4} が存在し、香港の大腸菌分離株が保有する IncL/M 型の *bla*_{NDM-1} 陽性プラスミド pNDM-HK とは異なっていた。一方、*bla*_{TEM-1} は共通して保有していた。マクロライド耐性 (*mph2*, *meI*)、アミノグリコシド耐性 (*aadA2*, *armA*)、ST 合剤耐性 (*sulI*, *dfraI2*) に関与する因子がプラスミドの一箇所に集積している様子が完全長配列の決定により明らかとなった。

2) *bla*_{NDM-1} を伝達する composite transposon

pNDM-1_Dok01 上の *bla*_{NDM-1} は、これまで報告されている NDM-1 陽性プラスミドとは異なり、IS903 に挟まれた新規 composite transposon 内に含まれていた (図 2、表 1)。公開されている *bla*_{NDM-1} 近傍配列と比較アライメントを行ったところ、それぞれの *bla*_{NDM-1} は多様な IS エlement を介して獲得していることが示唆された。また、近傍の薬剤耐性因子も多様な遺伝子構造を有することから、それぞれが独立して薬剤耐性因子を 1 箇所に集積させていった様子が伺える。これを支持する遺伝情報として、香港分離

株の pNDM-HK が IncL/M レプリコンであり、pNDM-1_Dok01 の IncA/C とは異なる。さらに *Klebsiella pneumonia* 05-506, *E. coli* 271 のプラスミド・レプリコンも異なるタイプであることから、既に bla_{NDM-1} は腸内細菌科の多様なプラスミドに伝播しており、かつ IS を介した伝達ユニットも多様性を示すことが明らかとなった。

3) bla_{NDM-1} composite transposon 内に存在する分子シャペロン $groES/EL$

非常に興味深いことに、 bla_{NDM-1} composite transposon 内に分子シャペロン $groES$ および $groEL$ 遺伝子が存在していた。分子シャペロン GroES/EL は必須蛋白質であり、細菌を問わず生物が生存するために必要なストレス応答蛋白質である。ゆえに、大腸菌 NDM-1_Dok01 株の染色体上に大腸菌が個別に保有する $groES/EL$ があり、大腸菌・染色体 DNA の GC% に沿った ~50% 程度の GC% を示す (図 3, 4 の中央)。しかしながら、この composite transposon 内に存在する分子シャペロン $groES/EL$ は、GC% が 60% 以上と非常に高いことから外来性に獲得した遺伝子であることが推測された (図 3, 4 の上方)。GroES/EL アミノ酸配列の分子系統解析の結果、植物病原体である *Pseudoxanthomonas* および *Xanthomonas* 属が有する GroES/EL と非常に近縁であることが明らかになった。

D. 考察

獨協医科大で臨床分離された NDM-1_Dok01 株が保有する NDM-1 プラスミド (pNDM-1_Dok01) の完全長配列を決定し、水平伝播にかかる数多くの遺伝情報を得ることができた。多様なレプリコン・タイプのプラスミドに bla_{NDM-1} は局在しており、その獲得機構は多様な IS エlement を介した水平伝達であることが示唆された。獨協

医科大 NDM-1_Dok01 株は、腸内細菌科で広範に伝播できる IncA/C 型レプリコンを有していることから、サルモネラ等の高病原性食中毒菌が NDM-1 を獲得してカルバペネム耐性化になってもおかしくないと想定される。事実、Walsh らはインド・ニューデリーの環境から NDM-1 を保有するサルモネラ、コレラ、赤痢菌の分離に成功しており (Lancet Infect Dis 2011, 11: 355- 362.)、高度薬剤耐性化への危険性が一層現実的になってきた。本研究においても、pNDM-1_Dok01 プラスミドは、サルモネラのプラスミド pAR060302 と 7 割程度が相同領域であり、大腸菌とサルモネラ間の耐性伝播が頻繁に行われていると考えてよいだろう。

このような腸内細菌科における耐性伝播の基本はプラスミド伝達を中心に行われていると考えられるが、もともとの耐性因子がどのソースから獲得しているのか明確に理解されていない。一例であるが、CTX-M β -ラクタマーゼ (bla_{CTX-M}) は、*Kluyvera* 属の染色体 DNA から発見されており、それが腸内細菌科の伝達プラスミドに水平伝達して薬剤耐性化をもたらしていると考えられている。そのアイデアと類似して、本研究でも bla_{NDM-1} と環境に生息する植物病原体 *Pseudoxanthomonas* 属との関連性について示唆する結果を得た。具体的な接点を解明するためには、環境バイオリソースを塩基配列として完全に解明する必要があるかもしれない。世界各国のゲノムセンターがバイオリソースの配列解読に取り組んでおり、環境メタゲノム・データベースの充実が待ち遠しいところである。

E. 結論

本邦初分離・NDM-1 保有大腸菌のゲノム解読を通して NDM-1 の獲得機構を解析した。世界各

国から多様なNDM-1 保有腸内細菌科の分離報告があり、既にその危険性は現実となっている。幸い、日本ではヒト臨床および家畜においてNDM-1 株の報告は殆どなく、今のところインド・ニューデリーにおける汚染状況ほどの懸念は全くない。しかしながら、腸内細菌科全般に水平伝達することが証明されている以上、NDM-1 によるカルバペネム耐性の監視をより一層強化すべきであり、事前に対応策を整えておくべきであろう。本研究により薬剤耐性を賦与する推定ドナー役を見出しており、最初の薬剤耐性化のルートを阻止する重要な基盤情報だと考えている。継続的な耐性疫学調査そして適切な抗菌薬使用を推奨するとともに、薬剤耐性化を阻止するための一歩踏み込んだ対応策に耐性菌ゲノム情報を活用していきたい。

F. 健康危害情報
なし

G. 研究発表
(論文発表)

- 1) Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. (2011) Complete Sequencing of the *bla*(NDM-1)-Positive IncA/C Plasmid from *Escherichia coli* ST38 Isolate Suggests a Possible Origin from Plant Pathogens. *PLoS one* 2011. 6: e25334.
- 2) Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, Okazaki H, Tanaka K, Uchida I, Izumiya H, Watanabe H, Tamamura Y, Iwata T, Akiba M (2011) Characterization of *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 4114-4121.

(学会発表)

- 1) Francis Shahada、関塚剛史、黒田誠、楠本正博、大石大樹、松本敦子、岡崎ひづる、田中聖、内田郁夫、泉谷秀昌、渡邊治雄、玉村雪乃、岩田剛敏、秋庭正人。多剤耐性ゲノミックアイランドを保有するセファロスポリン耐性 *Salmonella* Typhimurium の出現。第152回日本獣医学会学術集会 (2011年9月大阪府立大)
- 2) Makoto Kuroda, Hidemasa Izumiya, Tsuyoshi Sekizuka, Masumi Taguchi, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi. *IS1*-mediated Horizontal Acquisition Of Multiple Antibiotics Resistance In *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. 51st ICAAC Sept. 17-20, 2011. Chicago, USA.
- 3) Makoto Kuroda, Hidemasa Izumiya, Tsuyoshi Sekizuka, Masumi Taguchi, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi. 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. IUMS 2011 Bacteriology 2011/9/6 ~ 10. Sapporo, Japan.
- 4) Yosikazu Ishii, Maki Eto, Hidetake

Esaki, Tomoo Saga, Sohei Harada, Ayumi Yoshizumi, Kazuhiro Tateda, Makoto Kuroda, Shizunobu Igimi, Alain Rambach and Keizo Yamaguchi. Characterization of Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* from clinical patients, chicken meat and domestic animals. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and the 27th International Congress of Chemotherapy. 7 - 10 May 2011 / Milan, Italy

- 5) Shizunobu Igimi, Akiko Ishiwa, Shuko Monden, Yumiko Okada, Hiroshi Asakura,

Tetsuo Asai, Akemi Kai, Masumi Taguchi, Yoshikazu Ishii, Makoto Kuroda and Haruo Watanabe. Antimicrobial Susceptibility Profiles and PFGE Typing of *Campylobacter jejuni* Isolated from Various Sources in Japan. the 16th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms. August 28 - September 1, 2011. Vancouver, Canada.

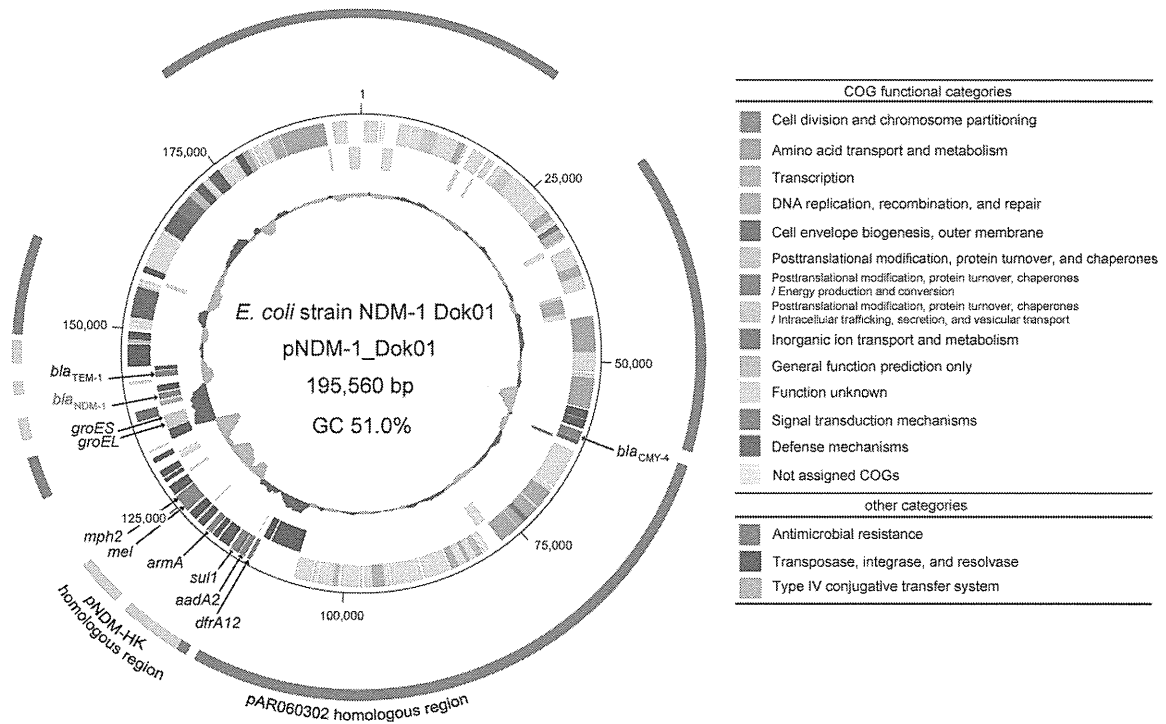


図1 NDM-1 保有大腸菌 NDM-1_Dok01 株 (multilocus sequence typing type: ST38) の *bla*_{NDM-1} プラスミド pNDM-1_Dok01 の完全長配列を決定した。全長 195.5 kb の IncA/C レプリコンを有するプラスミドであり、225 個の遺伝子の存在が予測された。pNDM-1_Dok01 は、大腸菌 AR060302 株の pAR060302 (166.5 kb) および *Salmonella enterica* serovar Newport の pSN254 (176.4 kb) 等の *bla*_{CMY-2} 陽性 IncA/C プラスミドと高い保存性を示した。pNDM-1_Dok01 には *bla*_{CMY-4} が存在し、IncL/M 型の *bla*_{NDM-1} 陽性プラスミド pNDM-HK とは異なっていた。外側から、サイズ(Mb)、推定 CDS の位置 (時計回り、反時計回り) と COG カテゴリーに分類される色で機能分別している。4 番目に GC% のプロット図を示している。

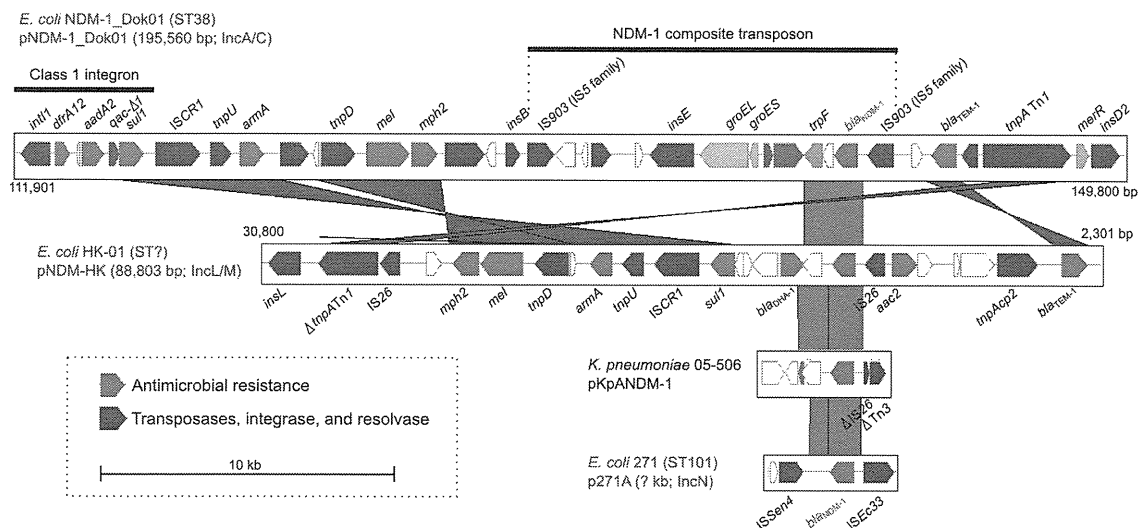


図2 プラスミド上の bla_{NDM-1} は、これまでの NDM-1 陽性プラスミドとは異なり、IS903 に挟まれた新規 composite transposon 内に含まれていた。更に、composite transposon 内には分子シャペロンの $groES$ および $groEL$ が存在していた。それら分子シャペロンは、系統解析および GC 含量の比較の結果、植物病原体である *Pseudoxanthomonas* および *Xanthomonas* 属に近縁であった。以上の結果から、NDM-1_Dok01 株 (ST38) の bla_{NDM-1} は、環境中に存在する植物病原体細菌等から composite transposon を介して IncA/C プラスミド上に水平伝播された可能性が示唆された。

表 1 IS903 に挟まれた NDM-1 composite transposon の遺伝子情報

Gene_ID	Location	direction	gene	Top hit (blastp analysis)	Hit organism	aa identities
NDM1Dok01_N01630	129343..130266	+		gb AAO15539.1 IS903D transposase	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	307/307 (100%)
NDM1Dok01_N01640	130312..131013	-		ref YP_025329.1 hypothetical protein pRA2_07	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	81/207 (39%)
NDM1Dok01_N01650	131197..131421	-		ref ZP_04663571.1 hypothetical protein AbauAB_18243	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB900	33/68 (49%)
NDM1Dok01_N01660	131543..132220	+		ref YP_001966417.1 resolvase	<i>Moraxella bovis</i> Epp63	93/205 (45%)
NDM1Dok01_N01670	133044..133328	+		ref ZP_06727037.1 acyltransferase	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 19194	70/82 (85%)
NDM1Dok01_N01680	133539..135068	-	<i>insE</i>	ref YP_001102021.1 transposase InsE	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL254	483/498 (97%)
NDM1Dok01_N01690	135257..136897	-	<i>groEL</i>	ref YP_001102020.1 chaperonin GroEL	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL254	489/533 (92%)
NDM1Dok01_N01700	136953..137243	-	<i>groES</i>	ref YP_004145503.1 chaperonin Cpn10	<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1	81/96 (84%)
NDM1Dok01_N01710	137437..137766	+		ref YP_003374846.1 periplasmic divalent cation tolerance protein	<i>Xanthomonas albilineans</i> GPE PC73	64/100 (64%)
NDM1Dok01_N01720	137771..138802	+		ref ZP_08267023.1 tat twin-arginine translocation pathway signal sequence domain protein	<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC 11568	141/188 (75%)
NDM1Dok01_N01730	138813..139451	-	<i>trpF</i>	gb ADY00042.1 phosphoribosylanthranilate isomerase	<i>Escherichia coli</i> pNDM-HK	195/200 (98%)
NDM1Dok01_N01740	139456..139821	-		ref ZP_05033688.1 glyoxalase family protein	<i>Brevundimonas</i> sp. BAL3	76/119 (64%)
NDM1Dok01_N01750	139825..140637	-	bla_{NDM-1}	gb ADP05158.1 New Delhi metallo-beta-lactamase 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	270/270 (100%)
NDM1Dok01_N01760	140970..141893	-		ref YP_961838.1 transposase, IS4 family protein	<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1	302/306 (99%)

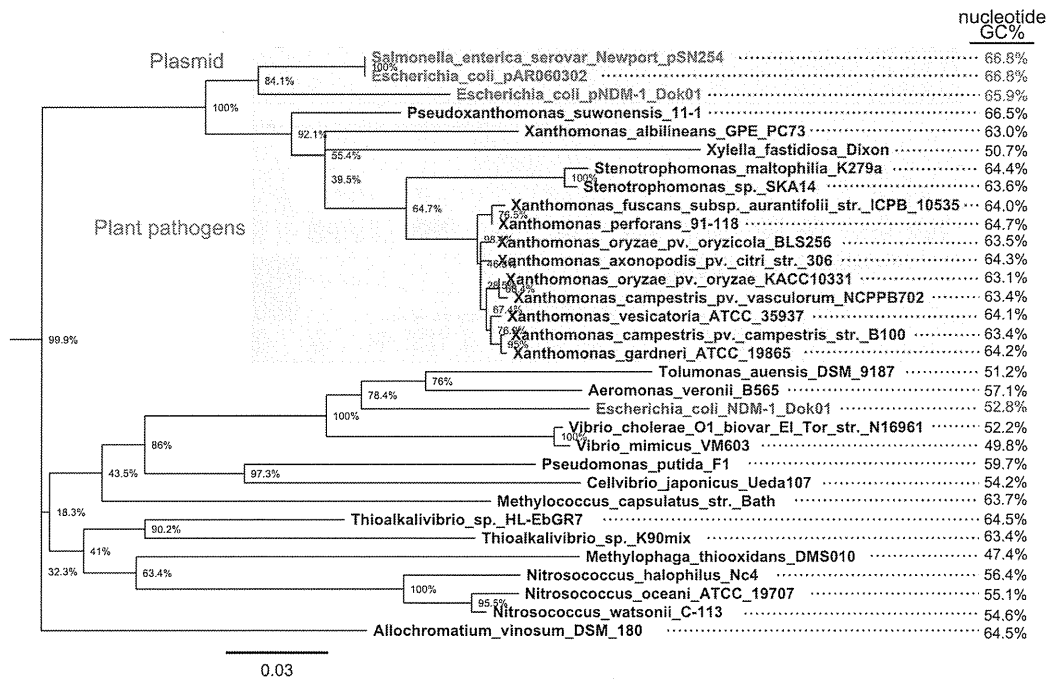


図3 GroEL分子シャペロンのアミノ酸配列系統解析（最尤法。1000回のブートストラップ解析）。系統解析およびGC含量の比較の結果、植物病原体である *Pseudoxanthomonas* および *Xanthomonas* 属に近縁であった。

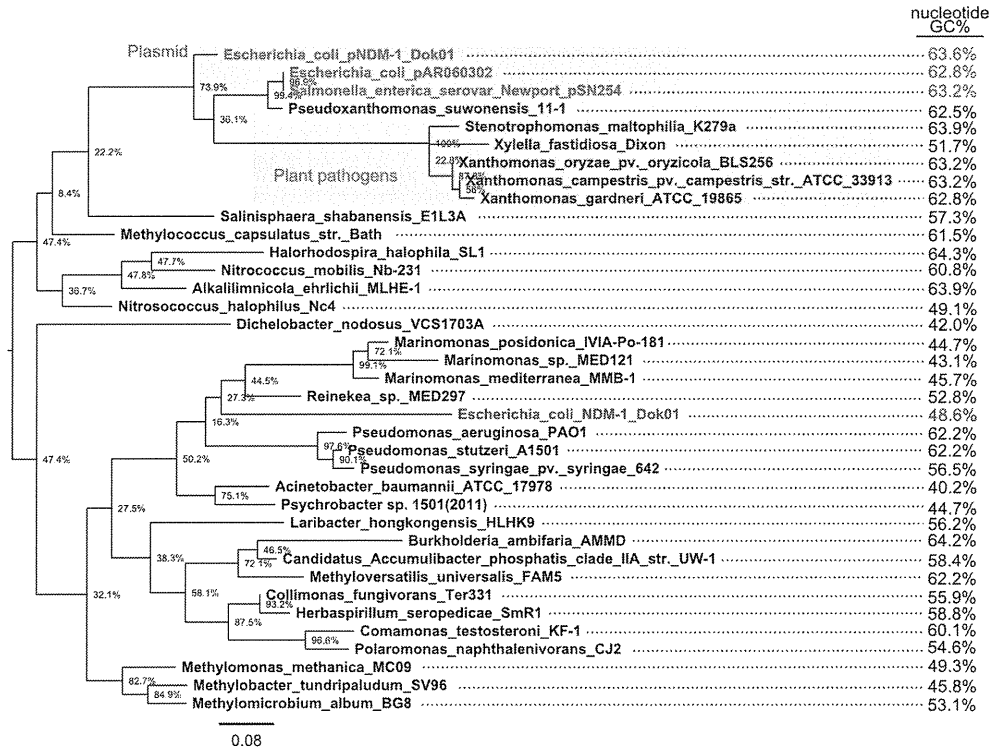


図4 GroES分子シャペロンのアミノ酸配列系統解析（最尤法。1000回のブートストラップ解析）。系統解析およびGC含量の比較の結果、植物病原体である *Pseudoxanthomonas* および *Xanthomonas* 属に近縁であった。

研究発表(平成23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
N. Sithivong, T. Morita-Ishihara, A. Vongdouangchanh, T. Phouthavane, K. Chomlasak, L. Sisavath, B. Khamphaphongphane, B. Sengkeoprasedh, P. Vongprachanh, O. Keosavanh, K. Southalack, J. Lee, R. Tsuyuoka, M. Ohnishi, and H. Izumiya	Molecular subtyping in cholera outbreak, Laos, 2010.	Emerg. Infect. Dis.	17 (11)	2060-2062	2011
Pinto AF, Todorovic S, Hildebrandt P, Yamazaki M, Amano F, Igimi S, Romão CV, Teixeira M.	Desulforubrythrin from <i>Campylobacter jejuni</i> , a novel multidomain protein.	J. Biol. Inorg. Chem.	16(3)	501-510	2011
Okada Y, Okutani A, Suzuki H, Asakura H, Monden S, Nakama A, Maruyama T, Igimi S.	Antimicrobial susceptibilities of <i>Listeria monocytogenes</i> isolated in Japan.	J Vet Med Sci.	73(12)	1681-1684	2011

Asai, T., Masani, K., Sato, C., Hiki, M., Usui, M., Baba, K., Ozawa, M., Harada, K., Aoki, H., Sawada, T.	Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of <i>Escherichia coli</i> from diseased food-producing animals in Japan.	Acta Vet Scand.	53	52	2011
Usui, M., Uchiyama, M., Baba, K., Nagai, H., Yamamoto, Y., Asai, T.	Contribution of enhanced efflux to reduced Susceptibilities of <i>Salmonella enterica</i> serovar Choleraesuis to fluoroquinolone and other Antimicrobials.	J Vet Med Sci.	73	279-282	2011
Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Ishihara K, Fuji N, Tamura Y	A fluoroquinolone-resistant <i>Escherichia coli</i> clinical isolate without quinolone resistant-determining rfeqion mutations found in Japan.	Antimicrobiol Agents Chemothr.	55(8)	3964-3965	2011
Ishihara K, Kanamori K, Asai T, Kojima A, Takahashi T, Ueno H, Muramatsu M, Tamura Y	Antimicrobial susceptibility of <i>Escherichia coli</i> isolates from wild mice in a forest of a natural park in Hokkaido, Japan.	J Vet Med Sci.	73(9)	1191-1193	2011

Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M.	Complete Sequencing of the <i>bla</i> (NDM-1)-Positive IncA/C Plasmid from <i>Escherichia coli</i> ST38 Isolate Suggests a Possible Origin from Plant Pathogens.	<i>PloS one</i> 2011.	6	e25334	2011
Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, Okazaki H, Tanaka K, Uchida I, Izumiya H, Watanabe H, Tamamura Y, Iwata T, Akiba M	Characterization of <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island.	<i>Antimicrobial agents and chemotherapy</i>	55	4114- 4121	2011
M. Sugawara, F. Shahada, H. Izumiya, H. Watanabe, I. Uchida, Y. Tamamura, M. Kusumoto, T. Iwata, M. Akiba	Change in antimicrobial resistance pattern in <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> serovar Typhimurium isolates detected in a beef cattle farm.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	74	93-97	2012
Baba, K., Ishihara, K., Ozawa, M., Usui, M., Hiki, M., Tamura, Y., Asai, T.	Prevalence and Mechanism of Antimicrobial Resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> Isolates from Diseased Cattle, Swine and Chickens in Japan.	<i>J Vet Med Sci.</i>	in press		

<p>Ishihara K, Hosokawa Y, Makita K, Nod J, Ueno H, Mukai T, Yamamoto H, Ito M, Muramatsu M, Tamura Y</p>	<p>Factor associated with antimicrobial resistant <i>Escherichia coli</i> in zoo animals.</p>	<p>Res Vet Sci .</p>	<p>in press</p>		
<p>Yokota S, Sato T, Okubo T, Ohkoshi Y, Okabayashi T, Kuwahara O, Tamura Y, Fuji N</p>	<p>Prevalence of fluoroquinolone-resistant <i>Escherichia coli</i> O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strain isolated in Japan.</p>	<p>Chemotherapy</p>	<p>In press</p>		