

表8 EHEC O157 のβ-ラクタマーゼ産生株

| 事例 No. | 発生年 | 年齢・性別 | 血清型 | Stx | 薬剤耐性パターン | ESBL | AmpC |
|--------|------|---------|---------|-----|---------------------|-----------------------|------------------|
| 1 | 2006 | 33歳・男性 | O157:H7 | 1&2 | ABPC,SM,CP,CTX,CPDX | | CMY-2 |
| 2 | 2007 | 21歳・男性 | O157:H7 | 1&2 | ABPC,CPDX | | CMY-2 |
| 3 | 2007 | 3歳・女性 | O157:H7 | 1&2 | ABPC,CP,CPDX | | CMY-2 |
| | | 3歳・女性 | O157:H7 | 1&2 | ABPC,SM,CPDX | | (TEM-1) |
| 4 | 2007 | 11ヵ月・女性 | O157:H7 | 1&2 | ABPC,SM,CPDX | | CMY-2 (TEM-1) |
| | | 22歳・女性 | O157:H7 | 1&2 | ABPC,SM,CPDX | | CMY-2 (TEM-1) |
| 5 | 2011 | 5歳・男性 | O157:H7 | 1&2 | ABPC,CTX,CPDX | CTX-M-1グループ (TEM*) | |
| | | 35歳・女性 | O157:H7 | 1&2 | ABPC,CTX,CPDX | CTX-M-1グループ (TEM*) | |

*遺伝子未決定

表9 食肉のMRSA検査数(2009年)

| 検体名 | 検体数 | 陽性検体数 |
|-------|-----|-------|
| 国産 鶏肉 | 20 | |
| 豚肉 | 20 | 1 |
| 牛肉 | 20 | 1 |
| 合計 | 60 | 2 |

表10 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 |
| 牛肉臓 | 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 |

表11 食肉から分離したMRSAの性状

| 菌株No. | 由来 | MRSA スクリーン 「生研」 | オキサシリン MIC(μg/mL) | mecA | SCCmec | その他の病原因子 | |
|--------|-------|-----------------------|----------------------|------|---------|----------|-----|
| | | | | | | TSST-1 | sec |
| SA09-1 | 牛肉ミンチ | + | >4 | + | type IV | + | + |
| SA09-3 | 豚肉ミンチ | + | >4 | + | type IV | + | + |

MRSAスクリーン「生研」：ペニシリン結合蛋白質2'(PBP2')検出用キット

平成 21-23 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

—イヌおよびヒト由来フルオロキノロン耐性大腸菌とセファロスポリン耐性大腸菌の疫学—

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

人医療で重要視されるフルオロキノロン (FQ) とセファロスポリン (CS) 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、ヒトの健康への影響が懸念されている。そこで、イヌおよびヒト由来 FQ 耐性大腸菌及び CS 耐性大腸菌の各種性状を比較検討することにより、イヌ及びヒト間での耐性菌伝播の可能性を検討した。CS 耐性大腸菌においては、イヌ及びヒト由来株において系統発生的分類、保有する β -ラクタマーゼ遺伝子、PFGE 型別において異なる性状を示し、イヌとヒト間での伝播の可能性は低いものと思われた。一方、FQ 耐性大腸菌では、由来に関わらず高度耐性化にエフラックスポンプが重要な役割を示し、多剤耐性に関与することが明らかとなった。さらに、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。これらのプラスミド保有菌あるいは FQ 耐性遺伝子は、イヌ及びヒト由来菌で類似した性状を示し、動物とヒト間での伝播の可能性が考えられた。

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で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) とセファロスポリン (CS) 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。

そこで本研究では、イヌ及びヒト由来 FQ 耐性大腸菌及び CS 耐性大腸菌の各種性状を比較検討することにより、イヌとヒトとの間で耐性菌伝播の可能性を検討した。

B. 研究方法

1. CS 耐性大腸菌の各種性状

(1) 供試菌株

2005 年 6 月~12 月に、酪農学園大学附属動物病院および市中動物病院に来院したイヌから直腸内容物または新鮮糞便を DHL 寒天培地 (日水) により大腸菌を分離した (147 株)。この内、セファゾリン (CEZ; 32 μ g/ml)、セフロキシム (CEX; 64 μ g/ml)、セフポドキシム (CPDX; 8 μ g/ml) のいずれかに耐性を示した 53 株を供試した。

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) により大腸菌を分離した (147 株)。この内、セファゾリン (CEZ; 32 μ g/ml)、セフロキシム (CEX; 64 μ g/ml)、セフポドキシム (CPDX; 8 μ g/ml) いずれかに耐性を示した 7 株を供試した。

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、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 μ g/mL 以上、またはシプロフロキサシン (CPF) に対する MIC が 1 μ g/mL 以上を示した 118 株を供試した。

(2) 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。

(3) β -ラクタマーゼ遺伝子の検出

CS 耐性大腸菌について Multiplex PCR を用いて、クラス A 型 β -ラクタマーゼ遺伝子である *bla*CTX-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 β -ラクタマーゼ遺伝子である *bla*CMY、*bla*ALT、*bla*BIL、*bla*FOX、*bla*ACC も確認した。

(4) 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) のプロトコルに準拠して PFGE を用いて遺伝子型を調べた。

2. FQ 高度耐性大腸菌における QRDR 変異と薬物排出ポンプ AcrAB-TolC の関与

(1) 供試菌株：2005 年 6 月~12 月に酪農学園大学附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 FQ 耐性大腸菌を用いた。一方、ヒト由来 FQ 耐性大腸菌は、前述の 118 株を供試した。

ERFX 感受性大腸菌は 12 株 (FQSECs : MIC 幅 0.03~0.125 μ g/mL)、ERFX 中等度耐性大腸菌は 18 株 (iFQRECs : MIC 幅 16~64 μ g/mL)、及び ERFX 高度耐性大腸菌は 20 株 (hFQRECs : MIC 幅 128 μ g/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 β N (Sigma) および NMP (Chess) をそれぞれ 160 μ g/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) β ラクタマーゼ遺伝子の検出： 前述の方法によった。

(6) ERFX 菌体内蓄積試験： 洗浄した菌体 (40mg/mL) を 0.5mL ずつ 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 μ 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。

(6) ウエスタンブロット試験： 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。

3. プラスミド介在性 FQ 耐性遺伝子の検索

- (1) 供試菌株：前述のイヌ及びヒト由来 FQ 耐性大腸菌を供試した。
- (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：前述の方法によった。
- (4) QRDR 塩基配列解析：前述の方法によった。
- (5) PFGE：前述の方法によった。
- (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. CS 耐性大腸菌の各種性状

- (1) イヌ、ネコ及びヒト由来 CS 耐性大腸菌の検出
イヌ由来大腸菌 147 株中 53 株 (36%) が CS 耐性菌であり、そのうち 43 株 (81%) が FQ 耐性菌であった。ネコ由来大腸菌では 70 株中 7 株 (10%) が CS 耐性菌であり、そのうち 3 株 (43%) が FQ 耐性菌であった。ヒト由来大腸菌は全て FQ 耐性菌であるものの、118 株中 40 株 (34%) が CS 耐性大腸菌であった。
- (2) β -ラクタマーゼ産生大腸菌の系統発生学

的分類

イヌ由来 CS 耐性菌 53 株の内、クラス A 型 β -ラクタマーゼ産生株の多くは B1 型であり、クラス C 型 β -ラクタマーゼ産生株では D 型が多かった。一方、ヒト由来 CS 耐性菌 40 株の内、クラス A 型 β -ラクタマーゼ産生株の多くは B2 型で、クラス C 型 β -ラクタマーゼ産生株はイヌ由来と同じく D 型が多かった。

(3) β -ラクタマーゼ遺伝子の検出 (表 1)

イヌ由来株では、*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、*blaLAT-1* と CMY-like の遺伝子が各 1 株から検出された。一方、ヒト由来株では、*blaCTX-M-14* が 13 株、*blaCTX-M-27* が 16 株、*blaCTX-M* が 6 株から検出された。また、それ以外として *blaCMY-8* が 1 株から検出された。

(4) PFGE 解析 (図 1)

ヒト由来株は一つの大きなクラスターを形成した。また、イヌ由来株も大きなクラスターを形成し、その中にヒト由来株も散見される。中には、ヒト由来株と犬由来株で区別のつかない PEGE 像も認められた。

2. FQ 高度耐性大腸菌における QRDR 変異と

薬物排出ポンプ AcrAB-TolC の関与

(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 μ 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 μ g/mL、4 箇所の変異を持つ株は 32~256 μ g/mL であった。

(2) 薬物排出ポンプ阻害剤の影響

PA β N (160 μ 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 2)。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、hFQREC_s 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

hFQREC_s の ERFX 菌体内濃度は、FQREC_s に比べて有意に低く、iFQREC_s に比べて低い傾向にあった (図 3)。CCCP の存在において、全ての hFQREC_s は、FQSEC_s に比べて ERFX 菌体内濃度を有意に増加させた。hFQREC_s と iFQREC_s の ERFX 排出量は FQSEC_s に比べ明らかに多く、hFQREC_s の排出活性は iFQREC_s より高いことが示された。

(4) AcrA 発現量

hFQREC_s の AcrA 発現量は、iFQREC_s と FQSEC_s に比べ明らかに多かった (図 3)。ERFX 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 耐性とセフトロキム (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-14*(n=4)、及び *blaCMY-2*(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 hFQREC_s (50%) 及び iFQREC_s (27.8%) において有意に多く ($p < 0.05$)、iFQSEC_s より hFQREC_s で高頻度である傾向にあった。

AcrA を高度に発現する株は、高頻度にセフトゾリン、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)。

3. プラスミド介在性 FQ 耐性遺伝子の検索

(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* 保有大腸菌の各種性状

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 2)。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* 保有大腸菌の各種性状

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 3)。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、CPFEX に 16 ($\mu\text{g/mL}$)、LVFX と PUFEX 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

1. SP 耐性大腸菌の疫学

動物由来耐性菌のヒト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医療で使用頻度の高い第三世代 CS 剤に対する耐性菌である。イヌ由来 CS 耐性菌は主にクラス C 型 β -ラクタマーゼを産生するのに、ヒト由来株ではクラス 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イヌ由来株とヒト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、イヌ由来株は腸管常在性の B1 型で、ヒト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、ヒト医療で問題視されている基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 関連遺伝子が宿主によって異なる系統発生型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、CS 耐性菌の β -ラクタマーゼ遺伝子を検出したところ、ヒト由来株では殆どが ESBL 関連遺伝子を保有していた。一方、イヌ由来株では ESBL 関連遺伝子が検出される頻度は少なく、CMY 遺伝子が多く検出された。さらに、PFGE 型もヒト由来株とイヌ由来株は大きく異なる二つのクラスターに区別され、イヌとヒト間での CS 耐性大腸菌の伝播は少ないものと思われた。しかし、中にはイヌ由来株と区別つかないヒト由来株も認められたことから、ヒト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 CS 耐性菌の動向を監視する必要があろう。

2. FQ 高度耐性大腸菌における QRDR 変異と薬物排出ポンプ AcrAB-TolC の関与

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。

3. プラスミド介在性キノロン耐性遺伝子

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)-Ib-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)-Ib-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、院内感染の可能性がある。

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)-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。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

本研究においてイヌおよびヒト由来 FQ 耐性

大腸菌及び CS 耐性大腸菌の各種性状を比較検討することにより、イヌ及びヒト間での耐性菌伝播の可能性を検討し、以下の成績が得られた。

1. CS 耐性大腸菌においては、イヌ及びヒト由来株において系統発生的分類、保有する β -ラクタマーゼ遺伝子、PFGE 型別において異なる性状を示し、イヌとヒト間での伝播の可能性は低いものと思われた。

2. イヌ及びヒト由来 FQ 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。また、これら FQ 耐性大腸菌は高頻度に FQ と同様にヒト医療で重要視される CS を含む多剤耐性型を示した。しかし、このような FQ 耐性機構においては、イヌとヒト由来 FQ 耐性大腸菌に差異は認められなかった。

3. 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。これらのプラスミド保有菌あるいは FQ 耐性遺伝子は、イヌ及びヒト由来菌で類似した性状を示し、動物とヒト間での伝播の可能性が考えられた。

F. 健康危機情報

FQ 及び CS はヒト医療で最も汎用される抗菌剤である。FQ 及び CS 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. 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.
3. 酒見蓉子, 御園雅昭, 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.
4. Ishihara K., Shimokubo N., Sakagami A., Ueno H., Muramatsu Y., Kadosawa T., Yanagisawa C., Hanaki H., Nakajima C., Suzuki Y., Tamura Y.: 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.

5. Baba K., Ishihara K., Ozawa M., Tamura Y., Asai T.: Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swabs of slaughtered swine in Japan, *J Antimicrob. Agents*, 36, 352-354, 2010.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

9. 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. セファロスポリン耐性大腸菌から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 |
| イヌ | 3/53 | 4/53 | 0/53 | 9/53 | LAT-1, CMY-like |
| ネコ | 1/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 | |
| ヒト | 13/40 | 16/40 | 6/40 | 0/40 | CMY-8 |

* 検出株数/耐性株数

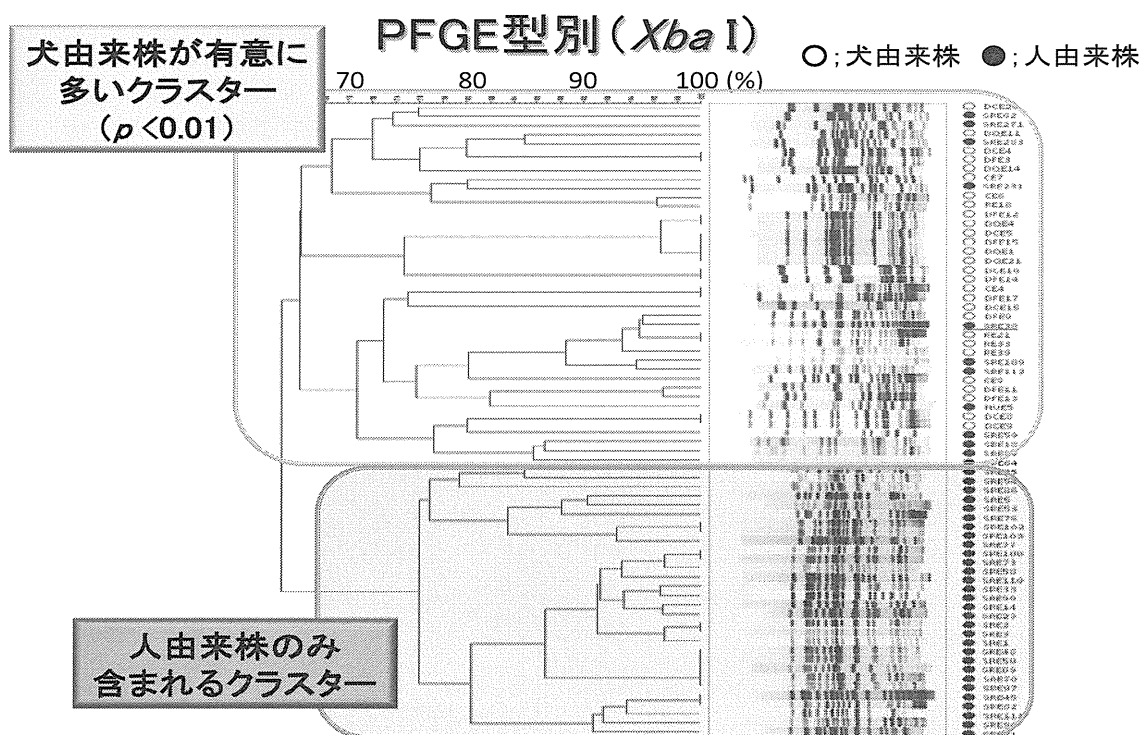


図1. セファロスポリン耐性大腸菌の PFGE 像

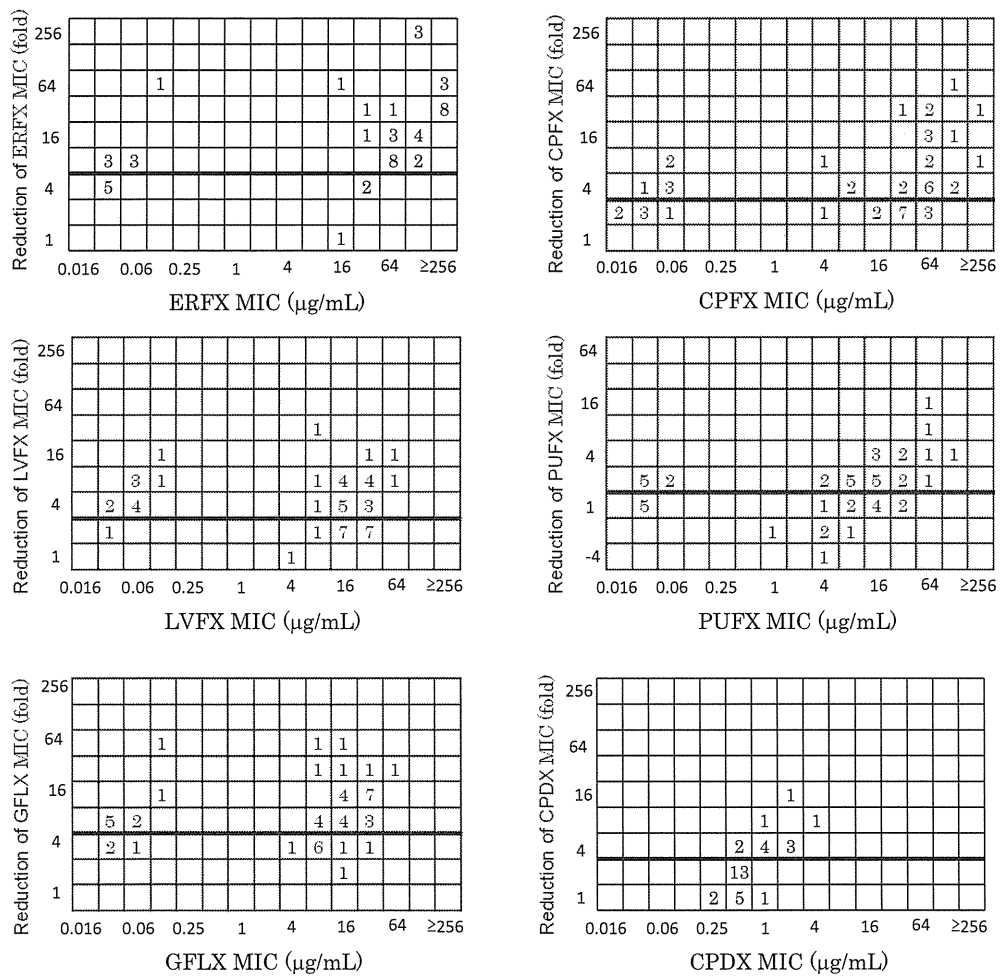


図2. PAβNによるERFXとCPDXに対するMICの減少

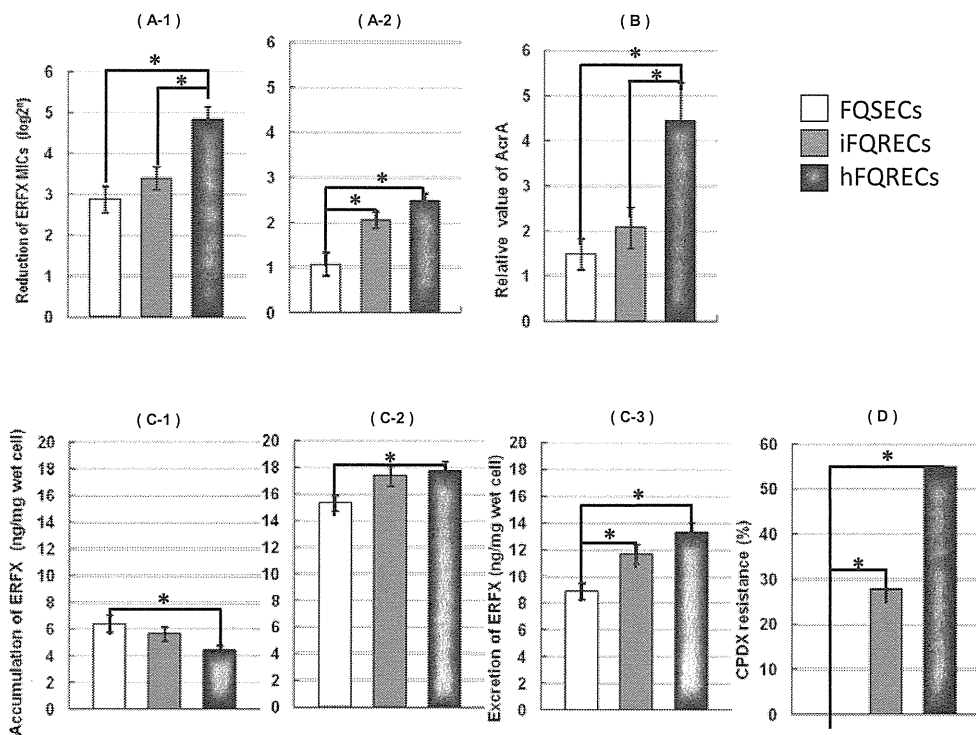


図 3. ERFX 耐性度の違いによる薬物排出ポンプの影響

A : PA β N (160 μ g/mL ; A-1) と NMP (160 μ g/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 (%)

表2. *aac(6')-Ib-cr*保有株の性状

| | 由来 | 血清型 | MIC; µg/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3. *oqxAB*保有株の性状

| | 由来 | 血清型 | MIC; µg/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 21-23 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 |
| 研究協力者 | 田口真澄 | 大阪府立公衆衛生研究所 | | |
| 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

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 箇所抽出し、血清型と相関する分子系統解析をおこなった。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フルオロキノロン耐性 Typhimurium T000240 株の全ゲノム解読を行い Complete 配列を確定した。比較ゲノム解析から、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 株の染色体上に特徴的な薬剤耐性ゲノムアイランド (82-kb, GI-DT12 と命名) を明らかにした。薬剤耐性に関与する 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。本ゲノム解読により、IS1/IS26 による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。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。NDM-1_Dok01 のゲノム解析を行い、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。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、その系統解析の結果、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。

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

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。

3) 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 µg/mL streptomycin と 16 µg/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。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) *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 (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、最終的に、環状の染色体 DNA (4,954,814 bp 図 5)、環状のプラスミド 2 つ (106,510 bp, 8,670 bp 図 6) を保有していることが明らかとなった (表 3)。

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 7)。

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、その 1 カ所を起点に外来配列 (約 82 kb) が挿入していた (図 8)。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 (図 8)。

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*, *su1*) 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 8)。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4)。

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。

5) NDM-1 保有大腸菌のプラスミド 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9)。全長195.5kb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(166.5kb)および*Salmonella enterica* serovar NewportのpSN254(176.4kb)等の bla_{CMY-2} 陽性IncA/Cプラスミドと高い保存性を示した(図9・円環図の最外側)。また、pNDM-1_Dok01には bla_{CMY-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*, *me1*)、アミノグリコシド耐性(*aadA2*, *armA*)、ST合剤耐性(*sul1*, *dfrA12*)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。

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10、表5)。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エレメント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。

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11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11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*