

## 適切な治療の実現を目的とした秋田県内における多剤耐性サルモネラ菌の侵淫実態解明と菌学的性状に関する調査研究

八柳 潤 齊籐志保子 今野貴之

秋田県における薬剤耐性サルモネラ菌による健康被害の発生実態を明らかにすると共に、分離株の耐性機構を検討し、耐性遺伝子の伝播に起因する将来の健康被害拡大の可能性に関する知見を得ることを目的として本事業を実施した。サルモネラ感染症の治療に推奨されている ABP に耐性の株が 309 株中 40 株 (12.9%) 認められた。ABP, KM, TC のいずれかに耐性を示した 28 株について薬剤耐性遺伝子を検索した結果、ABP 耐性 14 株、KM 耐性 6 株について、耐性発現に関与している薬剤耐性遺伝子を特定した。

一方、TC 耐性 25 株については、一部の株で耐性遺伝子が不明であった。ABP 耐性と TC 耐性が接合伝達性プラスミドを介して大腸菌に接合伝達することを実証した。さらに、Sa1685 株が保有する接合伝達性プラスミド上に Class 1 インテグロン (Int p1685) が存在することを示し、その 10,994 bp のシーケンスを決定・解析した結果、Int p1685 に Tn3 がコードされていることを明らかにした。このようなプラスミドが関与する機構により、今後もペニシリン耐性菌が増加するものと考えられた。ABP は近年再評価され、使用が増加する傾向にあるので、医原性健康被害の発生予防のために今回の調査により示された ABP 耐性株の分離状況について関係機関に啓蒙し、治療に際して耐性試験を適切に実施すべきであると考えられる。一方、プラスミド性 *ampC* 遺伝子、メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ、基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を獲得して多剤耐性化したサルモネラ菌は確認されなかったが、これらの株は国内他地域で分離されていることから、今後も秋田県にこれら耐性サルモネラ菌が侵淫していないか監視を継続する必要がある。

### 1. はじめに

平成 16 年度に全国で発生した細菌性食中毒 1152 事例 (患者 13078 名) のうち、サルモネラ菌による食中毒は 225 事例 (3788 名) を占め、患者数では細菌性食中毒中最多であり、且つ、細菌性食中毒では唯一 2 名の死者が発生している。また、平成 18 年度の食中毒統計においても細菌性食中毒 (774 事例、患者 9666 名、死者 2 名) のうち、サルモネラ食中毒は事例数・患者数共にカンピロバクタージェジュニ・コリ (416 事例・2297 名) に次ぎ 2 位 (124 事例・2053 名、死亡者 1 名) を占めていることから、サルモネラ菌による健康被害は全国的に現在も深刻な状況にあるといえる。秋田県においても平成 7 年から 16 年に発生した細菌性食中毒のうち、サルモネラ食中毒は 46 事例発生 (2 位) しており、健康被害は県内においても看過できない状況にあるといえる。サルモネラ菌感染者の臨床症状は細菌性胃腸炎の中でも症状が激しい傾向にあり、適切な治療を施すことが重要である。サル

モネラ患者は抗生物質により治療され、サルモネラ確定診断後に使用が推奨されている抗生物質はフルオロキノロン、ホスホマイシン、アンピシリンである。これらの中で、ペニシリン系抗生物質であるアンピシリンは薬価が安価であること、長年にわたる使用経験の蓄積により副作用も含めたデータが充実していること、細菌感染症の治療における有効性は最新の抗生物質に見劣りしないことなどの理由により近年再評価され、積極的に使用される傾向にある。しかしながら、近年、薬剤耐性サルモネラ菌の増加が問題となっている。感染を惹起したサルモネラ菌が前記抗生物質に耐性を獲得している場合、感受性の腸管内常在菌が減少する一方で耐性サルモネラ菌はむしろ増加し、腸管内でのサルモネラ菌の選択的増加を招く。その結果、症状は逆に増悪する場合があります。これは「医原性健康被害」とも呼称し得る健康被害といえる。薬剤耐性サルモネラ菌については、近年、複数の抗生物質に耐性を獲得した「多剤耐性サルモ

ネラ菌」も問題となってきたおり、サルモネラ分離株の薬剤耐性に関する知見を収集することは、適切な治療を実施することにより医原性健康被害の発生を予防するためには特に重要となってきた。

サルモネラ菌による健康被害の大半は散発感染によるものと考えられ、県内で発生するサルモネラ散発患者由来株の性状に関する情報は、感染症サーベイランス事業の病原体サーベイランスにより得られる。しかし、現行の病原体サーベイランスシステムでは協力医療機関から提供される限られた数の糞便検体から分離される極少数のサルモネラ菌に関する情報しか得られないために、サルモネラ散発患者由来株の血清型、薬剤耐性などに関する詳細な知見を得ることは困難である。このため、県内における耐性サルモネラ菌の侵淫実態、健康被害の発生実態はこれまで明らかではなかった。このような背景に立脚し、秋田県における薬剤耐性サルモネラ菌による健康被害の発生実態を明らかにすると共に、分離株の耐性機構を検討し、耐性遺伝子の伝播に起因する将来の健康被害拡大の可能性に関する知見を得ることを目的として本事業を実施した。

## 2. 方法

### 2.1 供試株

#### 1) 供試したサルモネラ保存株

2001年2月から2006年3月にかけて県内の医療機関から血清型別等のために送付された非チフス性サルモネラ分離株235株を供試した。

#### 2) サルモネラ分離株の収集

県内の医療機関のうち、細菌検査室を持つ大館市立総合病院、秋田組合総合病院、北秋中央病院、仙北組合総合病院、秋田赤十字病院、由利組合総合病院、雄勝中央病院、また、臨床検査機関である秋田県総合健康事業団児桜検診センターからサルモネラ分離株の分与を受けた。2006年4月から2008年3月にかけてこれらの医療・検査機関からサルモネラ菌74株を入手し、薬剤感受性などの検討に供試した。

### 2.2 分離株の薬剤感受性

2001年2月から2008年3月にかけて県内で分離されたサルモネラ菌合計309株を供試した。薬剤感受性試験はNCCLSに準拠し、KB法

により実施した。培地にはミューラーヒントン平板を使用し、37℃1夜培養後に阻止円の直径をデジタルノギスにより計測した。供試薬剤はアンピシリン(ABP)、セフトラジジム(CAZ)、セファロチン(CET)、セフェピム(CFP)、セフォキシチン(CFX)、セフォタキシム(CTX)、ホスホマイシン(FOM)、イミペネム(IPM)、カナマイシン(KM)、ノルフロキサシン(NFX)、テトラサイクリン(TC)とした。

### 2.3 薬剤耐性サルモネラ菌の耐性機構

#### 1) 薬剤耐性遺伝子の特定

2006年4月から2007年12月にかけて県内で分離された患者、環境、食品由来サルモネラ菌分離株のうち、ABP、KM、TCのいずれかに耐性を示した28株について薬剤耐性遺伝子の特定を試みた。ABP耐性に関与する耐性遺伝子として *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>PSE-1</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, KMを含むアミノグリコシド修飾酵素遺伝子として *aadA*, *aadB*, *aadD*, *aph(3')-IIa*, *Kn*, *aphA1-ab*, TC耐性に関与するテトラサイクリン排出ポンプ遺伝子として *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG* 遺伝子をPCRにより検索した。使用したプライマーは表1に示すとおりである。なお、*aadA* 遺伝子検出用プライマーは、*aadA1* (GenBank Accession No. DQ875875) と *aadA2* (以下同EF592571) 遺伝子の塩基配列を比較し、共通部分に設定したコモンプライマーとした。従って、*aadA* 遺伝子が検出された株については *aadA* 遺伝子増幅断片の塩基配列をダイレクトシーケンシングにより決定した。すなわち、*aadA* 遺伝子のPCR増幅断片を電気泳動用1.5%アガロースゲルからQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)により切り出し精製し、*aadAcom\_S* プライマーをシーケンシングプライマーに使用してBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)によりシーケンシング反応を実施した。反応終了後の反応液からセファデックスG50スピニングカラムを使用して未反応のDye Terminatorを除去・精製した後、遠心減圧乾燥装置Micro Vac (TOMY)により反応液を減圧・乾固した。残渣をHi-Di formamideに溶解し、ヒートショック・氷冷処理をした後、Applied Biosystems 3100又は310 Genetic Analyzerを使用してシーケンスデータを得た。得られたシーケンスデータをBLAST

(Updated version of the Basic Local Alignment Search Tool program at the National Center for Biotechnology Information server ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 検索し、当該遺伝子が *aadA1* か *aadA2* かを決定した。

## 2) アミノグリコシド修飾酵素遺伝子のクローニングと組み替え大腸菌の表現型

KM 耐性株のアミノグリコシド修飾遺伝子を検索した結果、*aphA1-1ab* 単独保有株と、*aphA1-1ab*, *aadA1*, *Kn*, *aph(3')IIa* 遺伝子を保有する株が認められた。これらのアミノグリコシド修飾遺伝子が当該株が示す KM 耐性という表現型に関与しているかどうか不明であることから、個々のアミノグリコシド修飾遺伝子をクローニングして組み換え大腸菌を作製し、大腸菌内でその遺伝子を発現させ、その大腸菌のアミノグリコシド耐性表現型を調べることにより、個々の遺伝子と KM 耐性表現型との関連を検討した。*aphA1-1ab*, *aadA1*, *Kn*, *aph(3')IIa* 遺伝子を全て保有する Sa1603 株からアルカリ抽出法によりテンプレート DNA を調製した。クローニングベクターには EcoRI と SalI または EcoRI と HindIII で消化した pBluescript II SK(+) を使用した。各アミノグリコシド修飾酵素遺伝子の全長を増幅可能な、表 2 に示すプライマーを設計した。フォワードプライマーの 5'側上流には EcoRI サイトを付加し、pBluescript II の LacZ 遺伝子と各アミノグリコシド修飾酵素遺伝子のフレームが一致するようにリンカー配列を挿入した。また、*aph(3')IIa* 遺伝子増幅用リバープライマーの 5'側上流には HindIII サイトを付加し、その他の遺伝子増幅用リバープライマーの 5'側上流には SalI サイトを付加した。これらのプライマーを使用して *aphA1-1ab*, *aadA1*, *Kn*, *aph(3')IIa* 遺伝子を Sa1603 株の DNA をテンプレートとしてそれぞれ増幅した後、得られた DNA 増幅断片を電気泳動用 1.5%アガロースゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) により精製し、EcoRI と HindIII, または EcoRI と SalI により消化した。消化後の DNA 増幅断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製し、エタノール沈殿した後、ライゲーションパック (ニッポンジーン) を使用して制限酵素消化済みクローニングベクターとライゲーション反応を行い、反応終了後の

反応液でコンピテント *E. coli* JM109 株を形質転換した。アミノグリコシド耐性を発現するコロニーを選択するための選択培地には IPTG 200 mg/ml, アンピシリン 100 µg/ml, カナマイシン 1.5 µg/ml を含む TSA 培地を使用した。選択平板に発育したコロニーを 2 個釣菌し、T7 プライマーと SK プライマーを使用した PCR によりクローニングされた遺伝子断片のサイズが各アミノグリコシド修飾酵素遺伝子の全長と一致するかどうかを確認すると共に、表 1 に示すプライマーを使用した PCR により目的とするアミノグリコシド修飾酵素遺伝子が存在するかどうか併せて確認した。このようにして調製した、アミノグリコシド修飾酵素遺伝子を保有・発現する *E. coli* JM109 株について、200 mg/ml の IPTG の存在下で KM, ゲンタマイシン (GM), ストレプトマイシン (SM) に対する耐性を KB 法により確認した。

## 2.4 ABP 耐性遺伝子と TC 耐性遺伝子の接合伝達実験

2006 年 4 月から 2007 年 12 月に分離・分与されたサルモネラ菌のうち、ABP 耐性を示した 14 株及び TC 耐性を示したうちで *tetA* 遺伝子を保有する 15 株について、各耐性が大腸菌に伝達し得るかどうかを Broth Mating 法により検討し

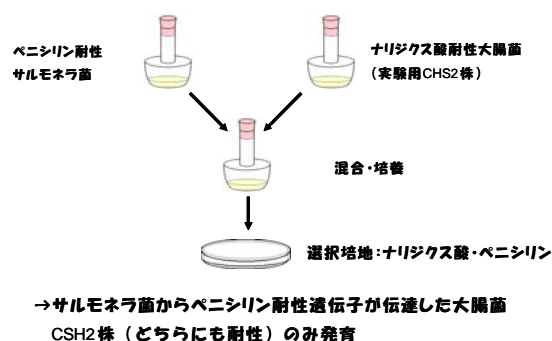


図 1 接合伝達実験方法模式図

た。接合伝達実験方法の模式図を図 1 に示した。

耐性サルモネラ菌をドナーとし、レシピエントには東京医科歯科大学微生物学教室の堀内三吉博士から分与された *E. coli* K-12 CSH2 NA<sup>r</sup> 株を使用した。ドナーを 15 ml の LB 培地に、レシピエントを 50 ml の LB 培地に接種し、37°C で対数増殖期後期まで (約 6 時間) 振盪培養し

た。ドナー培養液 0.5 ml とレシピエント培養液 4.5 ml を混合して 3000 r.p.m で 5 分遠心してペレットとした。その状態で 37°C 2 時間静置培養した後、ボルテックスによりペレットを均一に懸濁し、その 100  $\mu$ l を選択培地にコンラージ棒で塗抹・接種した。選択培地には ABP 50  $\mu$ g/ml とナリジクス酸 (NA) 50  $\mu$ g/ml、または TC 25  $\mu$ g/ml と NA 50  $\mu$ g/ml を加えた BTB 平板を使用した。なお、ドナー培養液とレシピエント培養液を混合する直前に、両者の菌数を BTB 平板を使用して測定し、伝達頻度を算定した。耐性の伝達が認められた場合、耐性化した *E. coli* K-12 CSH-2 NA<sup>r</sup> 株についてドナーが保有していた耐性遺伝子が存在しているかどうかについて表 1 に示すプライマーを使用する PCR により確認した。

## 2.5 *bla*<sub>TEM</sub> または *tetA* 遺伝子をコードする伝達性プラスミドのサザンブロットによる解析

TC 耐性が大腸菌に接合伝達した Sa1649 株及び ABP 耐性が大腸菌に接合伝達した Sa1685 株と、接合伝達により耐性化した大腸菌 *E. coli* 1649 CSH2 TC<sup>R</sup> 及び *E. coli* 1685 CSH2 ABP<sup>R</sup> について、サザンブロットハイブリダイゼーションにより *tetA* 遺伝子、または *bla*<sub>TEM</sub> がコードされているプラスミドが実際にサルモネラ菌から大腸菌に伝達したかどうか検討した。プラスミドは Kado 法により抽出し、0.8% アガロースゲル (LO3, Takara) を使用して電気泳動した。分子量マーカーには *E. coli* V517 株と *E. coli* K-12 NR1 株を使用した。*bla*<sub>TEM</sub> プローブと *tetA* 遺伝子プローブには前記 PCR により得られた増幅断片を使用した。プローブとする DNA 増幅断片はアガロースゲル電気泳動した後に QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用して精製した。プローブのアルカリホスファターゼラベルとハイブリダイゼーションシグナルの検出は AlkPhos Direct (Amersham pharmacia biotech) を使用して実施した。

## 2.6 *bla*<sub>TEM</sub> 陽性株におけるトランスポゾン Tn3 の検出

トランスポゾン Tn3 は *bla*<sub>TEM</sub> によりペニシリン耐性をコードし、染色体-染色体間や染色体-プラスミド間、あるいはプラスミド-プラスミド遺伝子間で複製・伝達する遺伝子ユニットである。*bla*<sub>TEM</sub> 陽性株 11 株について Tn3 の

有無を検討した。Tn3 検出用プライマーとして、GenBank のシーケンスデータ EF141186 に基づき、Tn3 特異的 *revolvase* (*tnp R*) 遺伝子の 290 bp を標的とする StyTn3tnpRF : 5'-att-ctg-gtt-aag-aag-ctc-gac-3', StyTn3tnpRR : 5'-ttc-tga-tga-agc-gtc-agc-acg-3' を設計した。また、StyTn3tnpRF プライマーと *bla*<sub>TEM</sub> の 3' 末端に位置する TEMcomASJY : 5'-tac-caa-tgc-tta-atc-agt-gag-3' により *tnpR* から *bla*<sub>TEM</sub> にかけての 1420 bp を増幅するプライマーペアも供試した。PCR のヒートサイクルは、前者が 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec, 25 回、後者が 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 40 sec, 25 回とした。

## 2.7 Sa1685 株の伝達性プラスミド上の *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子周辺構造の解析

### 1) クラス 1 インテグロンの検出

Sa1685 株が保有する、*bla*<sub>TEM</sub> をコードする伝達性プラスミド (p1685) 上で *bla*<sub>TEM</sub> がクラス 1 インテグロン内にコードされているかどうか検討した。p1685 は *E. coli* 1685 CSH2 ABP<sup>R</sup> からアルカリ処理法により調製した。すなわち、滅菌精製水 100  $\mu$ l に *E. coli* 1685 CSH2 ABP<sup>R</sup> 株を懸濁し、50 mM NaOH 溶液を等量加えた後沸騰水中で 5 分加熱後氷冷した。200  $\mu$ l の 50 mM Tris-HCl (pH7.5) を加えて中和した後、15,000 r.p.m で 1 分遠心して上清を p1685 溶液として解析に供試した。クラス 1 インテグロンの 5' 末端の保存領域であるインテグララーゼ遺伝子 (*IntI1*) に位置する 5CS プライマー、3 末端の保存領域である *qac*  $\Delta E$  遺伝子内に位置する 3CS プライマー及び *bla*<sub>TEM</sub>ORF の 5' 末端に位置する TEMcomSJY, 3' 末端に位置する TEMcomASJY プライマーを使用して組み合わせを変えて PCR を実施し、増幅断片が出現するプライマーの組み合わせと増幅断片のサイズを特定した。PCR には 10 Kb 以上のサイズの断片が増幅可能なように Roche Expand Long Template PCR Systems (Roche) を使用した。反応条件は Buffer : No.3, Primer : 0.5  $\mu$ M, Template : 15  $\mu$ l, dNTP : 250  $\mu$ M, 全量 50  $\mu$ l とし、ヒートサイクルは 94 °C 2 min の加熱変性ステップの後、94 °C 10 sec, 55 °C 30 sec, 68 °C 20 min を 30 回繰り返し、最終伸長反応 68 °C 7 min とした。増幅断片の検出には 0.6% PFC Agarose (Bio-Rad) を使用した。

### 2) クラス 1 インテグロンのシーケンス解析

1)において、p1685 から 5CS-TEMcomSJY プライマーの組み合わせで約 2,300 bp の増幅断片 (5CS/TEMS 断片), TEMcomASJY-3CS プライマーの組み合わせで約 10,000 bp の増幅断片 (TEMAS/3CS 断片) が得られた。これらの断片について、前記方法に準じてシーケンスを決定した。なお、シーケンスプライマーには始めに増幅用に使用したプライマーを使用し、その後は得られたシーケンスデータに基づきプライマーを設計し、順次シーケンスを実施する、プライマーウォーキングにより解析を進めた。5CS/TEMS 断片は 6 シーケンス反応、TEMAS/3CS 断片は 20 シーケンス反応でクラス 1 インテグロンのシーケンス解析が完了した。なお、得られた 26 シーケンスデータの結合、ORF 検索などの解析は DANSIS Pro (日立ソフト) ソフトウェアにより実施した。また、検出された遺伝子のシーケンスのホモロジーサーチは BLAST により実施した。

### 3. 結果・考察

#### 3.1 秋田県内で患者から分離されたサルモネラ菌の血清型と薬剤感受性

表 3 に 2001 年 2 月から 2008 年 3 月に秋田県内で下痢症患者から分離され、本研究に供試したサルモネラ菌、計 309 株の一覧を示した。最も多い血清型は S.Enteritidis で、S.Harder, S.Infantis, S.Saintpaul, S.Typhimurium, S.Thompson, S.Newport が続いた。分離されるサルモネラ菌の血清群の割合は年次により異なる傾向がみられた。この傾向が顕著であった血清群は S.Enteritidis が属する O9 群であり、2001 年 2 月-2006 年 3 月には O9 群が分離株の 53% を占めていたのに対し (図 2A), 2006 年 4 月-2008 年 3 月ではその割合が 24% と顕著に低下した (図 2B)。

表 3 に示すとおり、供試したサルモネラ O9 群菌 140 株のうち S.Enteritidis が 135 株を占めていること、また、S.Enteritidis は鶏卵を感染源とすることが知られていることなどから、供試株が分離された期間に秋田県内で鶏卵の S.Enteritidis 汚染率が顕著に変動したことが O9 群分離頻度低下の背景にある可能性が考えられた。

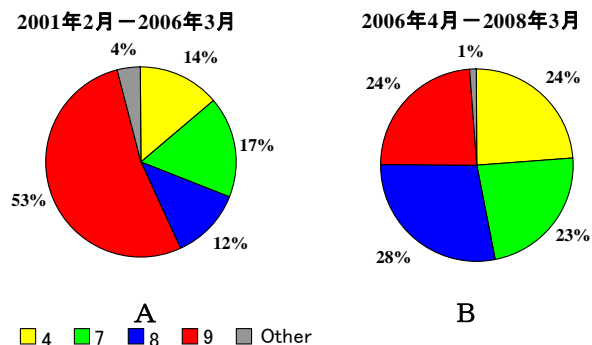


図 2 年次別サルモネラ分離株の血清群

供試した 309 株の 12 薬剤に対する薬剤感受性を検討した結果を表 4 に示した。12 薬剤のうち耐性株が認められた薬剤は ABP (12.9%), CET (1.9%), KM (4.5%), TC (16.5%) であった。CFX に対する耐性株は認められなかったことから、プラスミド性 *ampC* 遺伝子を獲得することにより多剤耐性化し、現在欧米で問題となっているサルモネラ菌は確認されなかった。同様に、IPM 耐性株、CTX 耐性株、CAZ 耐性株が認められなかったことからメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ、基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を獲得して多剤耐性化したサルモネラ菌も確認されなかった。なお、ABP, CET, KM, TC のいずれについても、2006 年 4 月から 2008 年 3 月にかけて分離されたサルモネラ菌の方がそれ以前に分離されたサルモネラ菌と比較して耐性株の比率が増加していた。このことは、薬剤耐性サルモネラ菌が侵淫を拡大する傾向にあることを示すデータとして注目される。

分離株数が 10 株以上であった S.Enteritidis, S.Harder, S.Infantis, S.Saintpaul, S.Typhimurium, S.Thompson について薬剤耐性株の出現頻度を比較すると、表 5 に示すとおり、S.Harder では ABP 耐性株が 52.1%, KM 耐性株が 26.1%, TC 耐性株が 95.7%, S.Typhimurium では ABP 耐性株が 57.1%, KM 耐性株が 14.3%, TC 耐性株が 57.1% と耐性株の出現頻度が非常に高いのに対して、S.Sainpaul では耐性株が全く認められず、また、分離株数が最も多い S.Enteritidis は ABP 耐性株、KM 耐性株、TC 耐性株の頻度がそれぞれ 6.7%, 2.2%, 5.9% に過ぎなかった。以上の結果は、耐性株の出現頻度が血清型により大きく異なることを示していた。サルモネラの血清

型により薬剤耐性株の頻度が異なる理由は不明であるが、サルモネラ菌は家畜が保菌動物であることが知られており、家畜が動物用抗生物質の投与を受けることが耐性株出現の理由の一つと考えられることから、血清型により保菌家畜の動物種に違いがみられ、動物種の違いにより抗生物質の投与頻度が異なる場合には血清型により耐性株の出現頻度に違いが生じる可能性が考えられる。この仮説の妥当性については、今後の検討が必要である。

サルモネラ感染症の治療に推奨されているFOM, NFX, ABPのうち、FOMとNFX耐性株は認められなかったが、ABP耐性株が309株中40株(12.9%)認められた。ABPは歴史的な抗生物質であるが、近年の診療報酬の引き下げに伴い再評価されて使用頻度が増加する傾向にある。しかし、腸内細菌にもペニシリナーゼの産生によるABP耐性株が存在していることから、その使用には注意が必要と考えられる。実際、今回の我々の成績においても、秋田県で分離された下痢症患者由来サルモネラの12.9%がABP耐性であった。ABP耐性サルモネラ菌感染者にABPを投与した場合、腸管内でABP耐性サルモネラ菌が選択的に増殖することにより症状が悪化する可能性が高い。このため、ABPの投与に際しては感受性試験を実施して被検菌がABP感受性であることを確認すること、あるいはペニシリナーゼ阻害薬を併用することが重要である。

### 3.2 薬剤耐性サルモネラ菌の耐性機構

ABP, KM, TCのいずれかに耐性を示した27株について薬剤耐性遺伝子を検索した結果を表6に示した。ABP耐性14株(ABP, KM, TC 3剤耐性株:3株, ABP, TC 2剤耐性株:9株, ABP単剤耐性株:2株)のうち、11株がペニシリナーゼ遺伝子の $bla_{TEM}$ 陽性、2株が $bla_{OXA-1}$ 陽性、1株が $bla_{PSE-1}$ 陽性であった。なお、 $bla_{TEM}$ 陽性株11株は全てTn3陽性であったことから、これらの株の $bla_{TEM}$ の1分子はTn3に由来するものと考えられた。KM耐性株6株のうちABP, KM, TC 3剤耐性株3株はいずれもアミノグリコシド修飾酵素遺伝子である $aphA1-1ab$ ,  $aadA1$ ,  $Kn$ ,  $aph(3')IIa$ 遺伝子を保有していた。一方、KM, TC 2剤耐性株3株はいずれも $aphA1-1ab$ 遺伝子のみを保有してい

た。以上の結果から、KM耐性株6株がいずれも $aphA1-1ab$ 遺伝子を保有していることが示され、このことは、これら6株のKM耐性に $aphA1-1ab$ 遺伝子が関与している可能性を示唆するものと考えられた。なお、 $aphA1-1ab$ ,  $aadA1$ ,  $Kn$ ,  $aph(3')IIa$ はいずれもアミノグリコシド系抗生物質の特定部位をリン酸化、あるいはアデニル化することに不活化する酵素であり、これらの酵素を産生する細菌はアミノグリコシド系抗生物質に耐性となる。しかし、酵素の種類により基質特異性が異なるために、不活化するアミノグリコシド系抗生物質の種類が酵素により異なるものと考えられる。従って、今回検出された $aphA1-1ab$ について実際にKM耐性に関与しているかどうか、さらに、 $aadA1$ ,  $Kn$ ,  $aph(3')IIa$ についてもどのアミノグリコシド系抗生物質の耐性発現に関与するかについて検討した。図3に各アミノグリコシド修飾酵素

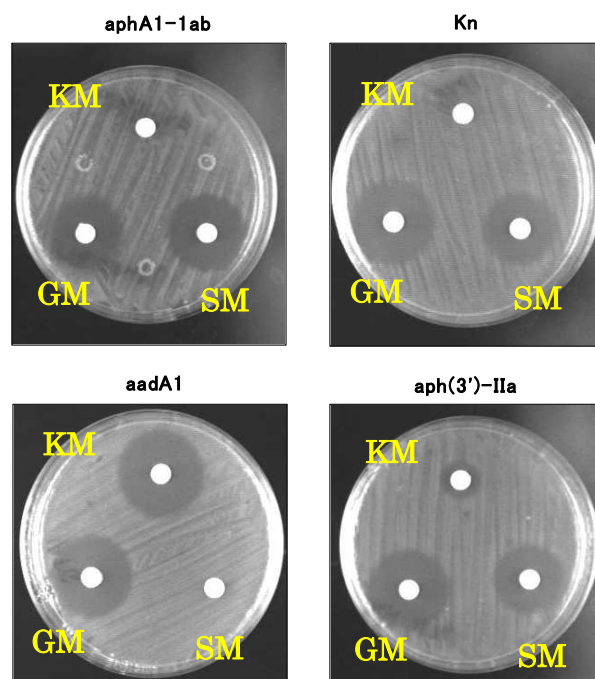


図3  $aphA1-1ab$ ,  $Kn$ ,  $aadA1$ ,  $aph(3')-IIa$  遺伝子をクローニング・発現させた大腸菌のKM, GM, SMに対する感受性

遺伝子をクローニングし、その活性を発現させた大腸菌のKM, GM, SMに対する感受性を検討した平板の写真をそれぞれ示した。 $aphA1-1ab$ 遺伝子、 $Kn$ 遺伝子を発現する大腸菌は同様の表

現型を示し、KM に耐性、GM と SM には感受性であった。*aph(3')-IIa* 遺伝子を発現する大腸菌も同様に KM 耐性、GM と SM 感受性であったが、KM ディスクの周囲には小さな阻止円がみられ、KM に対する耐性は前 2 株と比較して比較的弱かった。一方、*aadA1* 遺伝子を発現する大腸菌は SM 耐性、KM と GM 感受性であった。以上の結果から、今回確認された KM 耐性サルモネラ菌 6 株については、*aphA1-1ab* 遺伝子、あるいは *aphA1-1ab*、*Kn*、*aph(3')IIa* 遺伝子が KM 耐性の発現に関与していることが確認された。

TC 耐性 25 株中、15 株が *tetA* 陽性、2 株が *tetB* 陽性、1 株が *tetG* 陽性であったが、7 株が今回検索対象としたテトラサイクリン排出ポンプ遺伝子のいずれも保有していなかった。

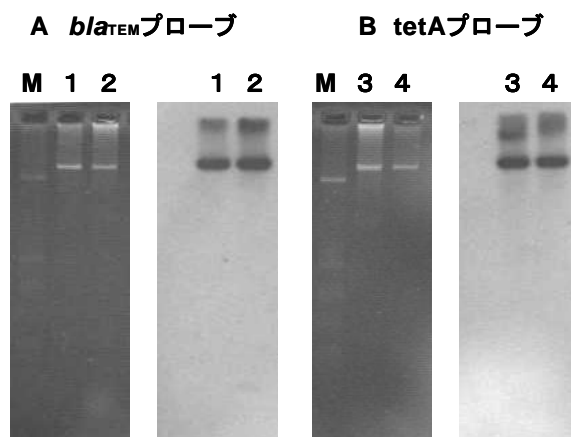
サルモネラによる下痢症の治療に際して問題となる ABP 耐性株について、耐性機構を遺伝子レベルで検討した。その結果、ABP 耐性サルモネラ菌 14 株全てにペニシリナーゼ遺伝子が存在することが確認された。今回検出されたペニシリナーゼ遺伝子のうち、*bla<sub>OXA-1</sub>* と *bla<sub>PSE-1</sub>* は秋田県で今回初めて確認された。これらのペニシリナーゼ遺伝子を保有する菌の薬剤耐性パターンは *bla<sub>TEM</sub>* 保有株と同様であると考えられ、今後もこれらの遺伝子を保有する菌の動向に注意する必要がある。*bla<sub>TEM</sub>* 遺伝子は最もポピュラーなペニシリナーゼ遺伝子あり、グラム陽性菌だけではなく大腸菌などのグラム陰性桿菌にも広く分布している。今回、*bla<sub>TEM</sub>* 遺伝子が検出された 11 株は全て Tn3 陽性であった。Tn3 は *bla<sub>TEM</sub>* 遺伝子を 1 分子その構造内にコードし、染色体から染色体、染色体からプラスミド、プラスミドから染色体、あるいはプラスミドからプラスミドへとそれ自身を複製しながら転移する、いわゆる Transposable element である。Tn3 は R1drd19 プラスミドに起源を持つとされており、菌から菌への伝播、複製、転移が繰り返された結果、現在は極めて多彩な菌のプラスミドや染色体に分布している。Tn3 が菌から菌へ伝播する機構にはバクテリオファージや接合伝達性プラスミドが関与すると考えられており、Tn3 が組み込まれることにより宿主はペニシリン耐性化することから、このような機構によりペニシリン耐性菌が侵淫を拡大しているものと

考えられる。今回、11 株の *bla<sub>TEM</sub>* 遺伝子陽性サルモネラ菌の全てに Tn3 が検出されたことから、これらのサルモネラ菌も過去にこのような機構で Tn3 を獲得しペニシリン耐性化した可能性が考えられ、今後も同様の機構でペニシリン耐性株は侵淫を拡大していくものと推察される。このシナリオの妥当性を実証するためには、Tn3 をコードする接合伝達性プラスミドを保有するサルモネラ菌の存在を示す必要がある。一方、TC 耐性株が高頻度に確認されたことの背景には動物用医薬品としてテトラサイクリンが使用されている実態があると推察される。また、今回、TC 耐性株 25 株のうち 7 株が既知テトラサイクリン排出ポンプ遺伝子を保有していなかった。これらの株の TC 耐性機構についてはさらなる検討が必要であるが、KM 耐性と TC 耐性は治療上問題とならないことから、今回、これ以上の検討は実施しなかった。

### 3.3 ABP 耐性遺伝子と TC 耐性遺伝子の接合伝達実験と接合伝達性プラスミドの証明

ABP 耐性を示した 14 株及び *tetA* 遺伝子を保有する 15 株について図 1 に示す方法により接合伝達実験を実施した。その結果、下水由来 O4:i:-ABP<sup>R</sup> (Sa1685) 株と患者由来 S.Typhimurium TC<sup>R</sup> (Sa1649) 株の 2 株の ABP 耐性と TC 耐性が *E.coli* CSH2 NA<sup>R</sup> 株に伝達することが証明された。なお、ABP 耐性となった *E.coli* CSH2 を *E.coli* 1685 CSH2 株、TC 耐性となった *E.coli* CSH2 を *E.coli* 1649 CSH2 株とした。Sa1685 株の ABP 耐性伝達頻度は  $5.6 \times 10^{-3}$  であった。データは示さないが、PCR により *E.coli* 1685 CSH2 は *bla<sub>TEM</sub>* 遺伝子、*E.coli* 1649 CSH2 株は *tetA* 遺伝子陽性であることが確認された。耐性化する以前の *E.coli* CSH2 NA<sup>R</sup> 株は両遺伝子共に陰性である。次に、この耐性伝達が接合伝達性プラスミドを介しているかどうかを調べるために、宿主菌と耐性化した *E.coli* CSH2 NA<sup>R</sup> 株からプラスミドを抽出し、それぞれのプラスミドのサイズを比較すると共に、*bla<sub>TEM</sub>* プローブ、あるいは *tetA* プローブを使用するサザンブロットハイブリダイゼーション法によりプラスミド上に *bla<sub>TEM</sub>* 遺伝子、あるいは *tetA* 遺伝子が実際に存在するかどうかを確認した。図 4 に Sa1685 株と *E.coli* 1685 CSH2 株のプラスミドプロファイル (パネル A 左) と *bla<sub>TEM</sub>* プローブを使用したサ

ザンブロットハイブリダーゼーションの結果 (パネル A 右) と, Sa1649 株と *E. coli* 1649 CSH2 株のプラスミドプロファイル (パネル B 左) と *tetA* プローブを使用したザンブロットハイブリダーゼーションの結果 (パネル B 右) を示した。



M: 分子量マーカー *E. coli* V517株 (60Kb)  
 1: Sa1685株  
 2: *E. coli* 1685 CSH2株  
 3: Sa1649株  
 4: *E. coli* 1649 CSH2株

図4 Sa1685株の *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子陽性伝達性プラスミド及び Sa1649株の *tetA* 遺伝子陽性伝達性プラスミド

Sa1685株 (O4:i:-, ABP<sup>R</sup>) と *E. coli* 1685 CSH2株はいずれも同じサイズである約 90Kb のプラスミドを保有していること (パネル A 左), そして *bla*<sub>TEM</sub> プローブを使用したザンブロットハイブリダーゼーションによりこのプラスミド上に *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子が存在することを示す黒色バンドが出現 (パネル A 右) したことから, この約 90Kb プラスミド (p1685) が *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子をコードする伝達性プラスミドであることが確認された。同様に, Sa1649株 (*S. Typhimurium*, TC<sup>R</sup>) も *tetA* 遺伝子をコードする約 90 Kb の伝達性プラスミド (p1649) を保有すること (パネル B) が確認された。

### 3.4 Sa1685株の伝達性プラスミド p1685 上の *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子周辺構造の解析

次に, p1685 の *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子周辺遺伝子の構造を解析した。伝達性プラスミドにはしばしば Class 1 Integron がコードされている。Class 1 Integron は複数の Gene Casette を含み, Gene

Casette には種々の薬剤耐性遺伝子が組み込まれている。この Gene Casette は Class 1 Integron 同士で組み換えにより転移することが知られており, Class 1 Integron は薬剤耐性遺伝子の伝播に重要な役割を果たしている。これらのことから, p1685 上に Class 1 Integron が存在するかどうか, そして, その Class 1 Integron の Gene Casette に *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子が組み込まれているかどうかについて検討した。Class 1 Integron の 5'末端の保存領域に位置する 5CS プライマーと 3'末端の保存領域に位置する 3CS プライマー及び *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子の 5'末端に位置する TEMcomSJY, 3'末端に位置する TEMcomASJY プライマーを組み合わせて p1685 をテンプレートとして PCR を実施したところ, 5CS-TEMcomSJY プライマーの組み合わせで約 2,300 bp の増幅断片 (5CS/TEMS 断片), TEMcomASJY-3CS プライマーの組み合わせで約 10,000 bp の増幅断片 (TEMAS/3CS 断片) が得られた。以上の結果は p1685 上に Class 1 Integron が存在し, 図 5 に示す位置関係と配列で *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子がその中にコードされていることを示していた。この知見に基づき, 5CS/TEMS 断片と TEMAS/3CS 断片のシーケンスの解読を実施し, Class 1 Integron (Intp1685) 10,994 bp の全塩基配列を決定, 解析した。その結果を模式図で図 6 に示した。特定された遺伝子は矢印で示した。矢印の向きが遺伝子の方向を示し, 矢部分が 3'末端に該当する。図 6 に示すように, Intp1685 は 5'末端保存領域の IntI1 遺伝子を含めて 16 の遺伝子をコードしていた。これらのうち, *aadA2*, IS1294 transposase, *iph*, transposase (Position 8566-9711), ORF2 の 5 遺伝子は 5'または 3'が部分脱落しており (図 6 中遺伝子を示す矢印のギザギザ部分), 機能し得ない遺伝子断片であった。特定された 16 遺伝子のうち, *bla*<sub>TEM</sub> 以外で薬剤耐性に関与する遺伝子は *dhfrI* (トリメトプリム耐性) と *SulIII* (サルファ剤耐性) 遺伝子のみであった。*bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子の下流には Tn3 Revolvase と Tn3 Transposase が存在し, これら 3 種の遺伝子が Transposon Tn3 を構成していることが明らかとなった。部分脱落のない遺伝子のうち, *glmM* は Phosphoglucosamine mutase, *yacA* は Predicted Transcriptional regulator, *yacB* は Plasmid stabilization system protein, *yacC* は



Putative DNA polymerase III, epsilon subunit and related 3'-5' exonucleaseである。Int p1685は5'末端と3'末端にClass1 Integronの構造を持っているものの、Class 1 Integronに特有のGene Casetteとしては*dhfr1*が該当するのみであること、また、コードされている遺伝子に部分脱落している遺伝子が多くみられることなどから、

複雑な組み換え過程を経て現在の姿に至ったものと推察される。そして、その過程のいずれかの段階で*aadA2*とIS1294遺伝子の間にTransposon Tn3の挿入を受けたと考えられる。p1685は接合伝達性プラスミドであり、Tn3をコードしている点がユニークである。接合伝達性プラスミドは受容菌にとっては外来性遺伝子

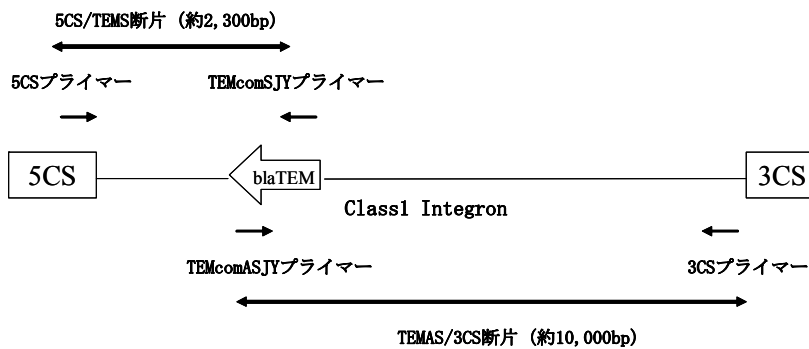


図5 p1685上に存在するClass1 Integronの構造概要とblaTEM遺伝子の相対的位置関係

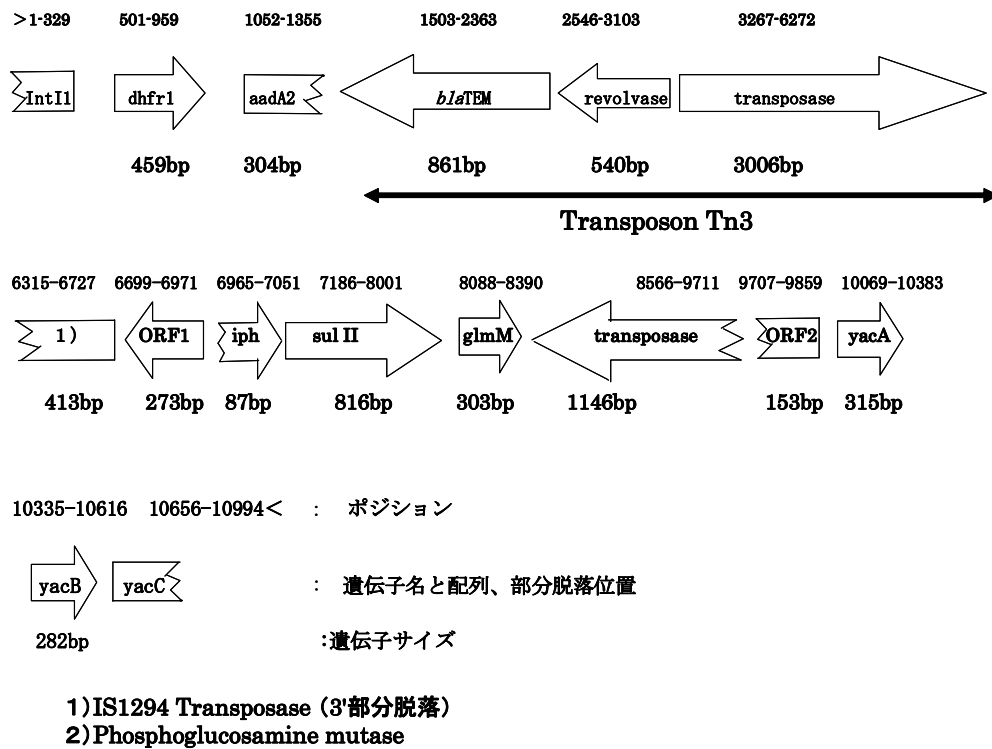


図6 p1685上に存在するClass1 Integron 10994bpのシーケンス解析により判明した遺伝子構造

であるために、Plasmid Incompatibility など種々の要因により必ずしも菌内に安定に存在し得るとは限らず、一旦伝達した受容菌から容易に脱落してしまう場合がある。この場合、もし *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子が単独でプラスミド上にコードされているとすると、プラスミドの脱落によりペニシリン耐性は失われることとなる。抗生物質との接触による選択圧がかからない状況では、このようなプラスミドの脱落は容易に発生し得ると考えられる。しかしながら、p1685 では *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子が Tn3 の一部として存在しているため、受容菌内で Tn3 が p1685 から染色体への転移が生じ、その後 p1685 が脱落したとしても *bla*<sub>TEM</sub> は Tn3 の一部として染色体に留まり、菌はペニシリン耐性を失わないと考えられる。このように、p1685 は接合伝達と Tn3 を介した *bla*<sub>TEM</sub> の染色体への転移という機構をとおしてペニシリン耐性菌の増加に重要な役割を果たすと考えられる。実際、今回、*bla*<sub>TEM</sub> が非伝達性プラスミドにコードされているサルモネラ菌と染色体にコードされていると考えられるサルモネラ菌が確認され、これらの菌は Tn3 陽性であることから、これらの菌が p1685 のような伝達性プラスミドを介して Tn3 を獲得した後、伝達性プラスミド自体は脱落により失われることにより発生した可能性が考えられる。今回の調査により ABP 耐性サルモネラ菌が時間と共に増加する傾向があることが示された。その理由の一つとして、p1685 のような Tn3 をコードする伝達性プラスミドを介した機構によるペニシリン耐性株の増加が考えられ、ペニシリン耐性サルモネラ菌はこのような機構により今後も増加するものと推察される。

#### 4. まとめ

- 秋田県で分離されたサルモネラ菌の血清型の推移、薬剤耐性について検討し、不適切な抗生物質治療により惹起される「医原性健康被害」の発生予防に資する知見の集積を試みた。また、薬剤耐性サルモネラ菌の耐性機構についても検討し、薬剤耐性サルモネラ菌が侵淫拡大する可能性を裏付ける知見の集積も試みた。
- 2001年2月から2008年3月にかけて O9 群が顕著に減少したことが示されたことか
- ら、この期間に秋田県内におけるサルモネラ菌の感染源、特に O9 群の大多数を占める *S. Enteritidis* の感染源である鶏卵の汚染が低減した可能性が示唆された。
- サルモネラ感染症の治療に推奨されている FOM, NFX, ABP のうち、ABP 耐性株が 309 株中 40 株 (12.9%) 認められた。
- ABP は近年再評価され、使用が増加する傾向にあるので、医原性健康被害の発生予防のために今回の調査により示された ABP 耐性株の分離状況について関係機関に啓蒙し、治療に際して耐性試験を適切に実施する必要性を指摘する必要がある。
- 本研究で得られた知見の一部を病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report) に投稿し、2008年6月号に掲載された。
- プラスミド性 *ampC* 遺伝子、メタロβ-ラクタマーゼ、基質拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子を獲得して多剤耐性化したサルモネラ菌は確認されなかったが、これらの株は国内他地域で分離されていることから、今後も秋田県にこれら耐性サルモネラ菌が侵淫していないか監視を継続する必要がある。
- 2006年4月から2007年12月にかけて県内で分離されたサルモネラ菌のうち ABP, KM, TC のいずれかに耐性を示した 28 株について薬剤耐性遺伝子を検索した結果、ABP 耐性 14 株、KM 耐性 6 株について、耐性発現に関与している遺伝子を特定した。
- 接合伝達性プラスミドを介して ABP 耐性と TC 耐性が大腸菌に接合伝達することを実証した。
- ABP 耐性の伝達に関与する接合伝達性プラスミドに Tn3 がコードされていることを明らかにし、このようなプラスミドが関与する機構により今後もペニシリン耐性菌が増加するものと考えられた。

表 1 耐性遺伝子の検索に使用したプライマー、標的耐性遺伝子、増幅断片サイズ

Primer	Sequence (5' to 3')	Target gene	Amplicon size (bp)
Mab/F	GGG GAG CTC ATA AAA TTC TTG AAG AC	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	1192
Mab/R	GGG GGA TCC TTA CGA ATG CTT AAT CA		
SHV-F	AGG ATT GAC TGC CTT TTT G	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	392
SHV-R	ATT TGC TGA TTT CGC TCG		
OXA-1-like_F	ACC AGA TTC AAC TTT CAA	<i>bla</i> <sub>OXA-1-like</sub>	598
OXA-1-like_R	TCT TGG CTT TTA TGC TTG		
PSE-1_F	TTT GGT TCC GCG CTA TCT G	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub>	150
PSE-1_R	TAC TCC GAG CAC CAA ATC CG		
aadAcom_S	ACG GCT CCG CAG TGG ATG	aadA	529
aadAcom_AS	TCG GCA GCG ACA TCC TTC		
aadB_F	GAG CGA AAT CTG CCG CTC TGG	aadB	320
aadB_R	CTG TTA CAA CGG ACT GGC CGC		
aadD_F	ATA TTG GAT AAA TAT GGG GAT	aadD	161
aadD_R	TCC ACC TTC CAC TCA CCG GTT		
Kn_F	ACT GGC TGC TAT TGG GCG A	Kn	515
Kn_R	CGT CAA GAA GGC GAT AGA AGG		
aph(3)-IIa_F	TCC GGT GCC CTG AAT GAA CT	aph(3)-IIa	519
aph(3)-IIa_R	ACG GGT AGC CAA CGC TAT GT		
aphA1-1ab_F	AAA CGT CTT GCT CGA GGC	aphA1-1ab	462
aphA1-1ab_R	CAA ACC GTT ATT CAT TCG TGA		
tetA_F	GAT ATT CTG AGC ACT GTC GC	tetA	950
tetA_R	CTG CCT GGA CAA CAT TGC TT		
tetB_F	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	tetB	600
tetB_R	GTA ATG GGC CAATAA CAC CG		
tetG_F	GCT CGG TGG TAT CTC TGC	tetG	500
tetG_R	AGC AAC AGA ATC GGG AAC		
tetD_F	CTG GGC AGA TGG TCA GAT AA	tetD	832
tetD_R	TGA CCA GCA CAC CCT GTA GT		
tetC_F	TTG CGG GAT ATC GTC CAT TC	tetC	1019
tetC_R	CAT GCC AAC CCG TTC CAT GT		
tetE_F	CGT CGC CCT GTA TTG TTA CT	tetE	814
tetE_R	TGG TCA GCA CCC CTT GTA AT		

表 2 アミノグリコシド修飾酵素遺伝子クローニング・発現用プライマー

プライマー名称	標的遺伝子	プライマー 配列(5'-3')												
aphA11ab5'ExpEcoRI	aphA1-1ab	GGC	TGC	AGG	AAT	TCT	GAA	atg	agc	cat	att	caa	cgg	ga
aphA11ab3'ExpSalI		GGC	TGC	AGG	GTC	GAC	GAA	TCA	GAA	AAA	CTC	ATC	GAG	CAT
aph3'IIa5'ExpEcoRI	aph(3)-IIa	AGT	CTG	ATG	AAT	TCT	GAA	atg	att	gaa	caa	gat	gga	ttg c
aph3'IIa3'ExpHindI		AGT	CTG	ATA	AGC	TTT	GAA	TCA	GAA	GAA	CTC	GTC	AAG	AAG G
Kn 5'ExpEcoRI	Kn	GGC	TGC	AGG	AAT	TCT	GAA	atg	att	gaa	caa	gat	gga	ttg
Kn 3'ExpSalI		GGC	TGC	AGG	GTC	GAC	GAA	tca	gaa	gaa	ctc	gtc	aag	aag
aadA1 5'ExpEcoRI	aadA1	GGC	TGC	AGG	AAT	TCT	GAA	atg	agg	gaa	gcg	gtg	atc	gcc
aadA1 3'ExpSalI		GGC	TGC	AGG	GTC	GAC	GAA	tta	ttt	gcc	gac	tac	ctt	ggt

表 3 供試株の血清型と株数 (2001年2月-2008年3月)

血清型	O群	株数 (%)	血清型	O群	株数 (%)
Enteritidis	9	135 (43.7)	Othmarchen	7	2 (0.65)
Harder	8	23 (7.4)	Potsdam	7	2 (0.65)
Infantis	7	19 (6.1)	Singapore	7	2 (0.65)
UT		16 (5.2)	Virchow	7	2 (0.65)
Saintpaul	4	14 (4.5)	Weltevreden	3,10	2 (0.65)
Typhimurium	4	14 (4.5)	Amherstiana	8	1 (0.32)
Thompson	7	10 (3.1)	Bareilly	7	1 (0.32)
Newport	8	8 (2.6)	Bredeney	4	1 (0.32)
Braenderup	7	6 (1.9)	Cerro	18	1 (0.32)
Livingstone	7	6 (1.9)	Haifa	4	1 (0.32)
Montevideo	7	6 (1.9)	Heidelberg	4	1 (0.32)
Bardo	8	5 (1.6)	Hindmarsh	8	1 (0.32)
Agona	4	4 (1.3)	Hvittingfoss	16	1 (0.32)
Javiana	9	4 (1.3)	Istanbul	8	1 (0.32)
Brandenburg	4	3 (1.0)	Mikawashima	7	1 (0.32)
Litchfield	8	3 (1.0)	Rissen	7	1 (0.32)
Nagoya	8	3 (1.0)	Schleissheim	4	1 (0.32)
Narashino	8	3 (1.0)	Sendai	9	1 (0.32)
ParatyphiB	4	3 (1.0)	Senftenberg	1,3,19	1 (0.32)
			合計		309

表4 年次別耐性株

年次	株数	耐性株数 (%)			
		ABP	CET	KM	TC
Feb.01-Mar.06	235	26(11.1)	3(1.0)	9(4.0)	29(12.0)
Apr.06-Mar.08	74	14(18.9)	3(4.1)	5(6.8)	22(29.7)
合計	309	40(12.9)	6(1.9)	14(4.5)	51(16.5)

表5 血清型別薬剤耐性株 (10株以上の血清型, 2001年2月-2008年3月)

血清型	株数	耐性株数 (%)			
		ABP	CET	KM	TC
Enteritidis	135	9( 6.7)	0	3( 2.2)	8( 5.9)
Harder	23	12(52.1)	4(17.4)	6(26.1)	22(95.7)
Infantis	19	1( 5.3)	1( 5.3)	2(10.5)	7(36.9)
Saintpaul	14	0	0	0	0
Typhimurium	14	8(57.1)	0	2(14.3)	8(57.1)
Thompson	10	1(10.0)	0	0	0

表6 サルモネラ菌の薬剤耐性パターンと薬剤耐性遺伝子

耐性パターン	株番号	血清型	由来	ペニシリナーゼ	アミノグリコシド修飾酵素	テトラサイクリン排出ポンプ
ABP, KM, TC	1603	S.Typhimurium	食肉	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	aphA1-1ab, aadA1, Kn, aph(3')IIa	—
	1604	S.Typhimurium	食肉	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	aphA1-1ab, aadA1, Kn, aph(3')IIa	—
	1693	O4:i:-	散発	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	aphA1-1ab, aadA1, Kn, aph(3')IIa	tetA
ABP, TC	1615	S.Singapore	散発	bla <sub>OXA1</sub>	ND	tetA
	1617	S.Singapore	散発	bla <sub>OXA1</sub>	ND	tetA
	1639	S.Harder	散発	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	ND	tetA
	1641	S.Typhimurium	散発	bla <sub>PSE-1</sub>	ND	tetG
	1642	S.Harder	散発	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	ND	tetA
	1643	S.Harder	散発	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	ND	tetA
	1644	S.Harder	散発	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	ND	tetA
	1682	S.Harder	下水	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	ND	tetA
ABP	1690	S.Typhimurium	散発	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	ND	tetB
	1652	S.Enteritidis	食中毒	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	ND	ND
KM, TC	1685	O4:i:-	下水	bla <sub>TEM</sub> (Tn3)	ND	ND
	1610	S.Harder	散発	ND	aphA1-1ab	tetA
	1665	S.Harder	散発	ND	aphA1-1ab	—
TC	1670	S.Harder	散発	ND	aphA1-1ab	tetA
	1605	S.Infantis	食肉	ND	ND	tetA
	1609	S.Harder	散発	ND	ND	tetA
	1612	S.Infantis	食肉	ND	ND	—
	1613	S.Harder	散発	ND	ND	tetA
	1622	S.Infantis	散発	ND	ND	—
	1637	S.Infantis	食肉	ND	ND	—
	1649	S.Typhimurium	散発	ND	ND	tetA
	1666	S.Newport	散発	ND	ND	tetB
	1667	S.Harder	散発	ND	ND	tetA
1692	S.Infantis	散発	ND	ND	—	

ND: 当該抗生物質に感受性のため検討せず。

—: 検索対象遺伝子、全て不検出。