

研究課題の概要

研究課題名	食用動物からヒトに至る薬剤耐性遺伝子の伝播の解明と評価手法の開発
主任研究者	青木 宙
所属機関	東京海洋大学
研究成果の概要	本研究では、キノロン剤、バンコマイシンおよびメチシリンを含む各種抗菌剤の耐性遺伝子、計200種類の薬剤耐性遺伝子の特異的な配列領域を参考にオリゴヌクレオチド マイクロアレイを開発した。開発したマイクロアレイは、ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設(養殖場)に生息する細菌、食品の生産・流通段階における汚染菌や食中毒細菌由来の薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を迅速に検出することを可能にした。同時に、各菌種がコードする薬剤耐性遺伝子の型別を行うことが出来た。薬剤耐性遺伝子の伝播経路については、同じ菌種内において同一の薬剤耐性遺伝子が検出され、拡散していることが、確認できた。しかし、菌種が異なると同じ薬剤耐性でも耐性遺伝子のタイプが異なった。

評価所見	開発されたマイクロアレイ法は、薬剤耐性の迅速評価手法として実用化が期待できる。PCR法との一致率が約50%であるが、耐性表現型と検出された耐性遺伝子との一致率が75%であり、スクリーニング法としては、妥当と考えられる。薬剤耐性の食品からヒトへの伝播に関するリスク評価に活用するためには、更なる改良が必要であるが、今後のサーベイランスや食品からヒトへの伝播に関する評価等に貢献することが期待できる。
評価結果	目標以上の成果があった。

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	食用動物からヒトに至る薬剤耐性遺伝子の伝播の解明と 評価手法の開発
主任研究者名	所属： 東京海洋大学 氏名： 青木 宙(研究課題番号：0707)

細菌が保有する薬剤耐性遺伝子を迅速に検出でき、さらに、耐性遺伝子を分類することができる薬剤耐性遺伝子解析用オリゴヌクレオチドマイクロアレイの開発を行った。199種類の薬剤耐性遺伝子について各遺伝子の特異的配列領域をスライドガラス上にスポットした。作製したマイクロアレイは、ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌および食品の生産・流通段階における汚染細菌由来の耐性遺伝子を分類し、さらに、迅速に薬剤耐性遺伝子の検出を可能とした。薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路については、同じ菌種内で同一の薬剤耐性遺伝子が多く検出され、同じ構造を有する耐性遺伝子が拡散していることが推察できた。菌種が異なると薬剤耐性マーカーが同じでも耐性遺伝子のタイプは異なった。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	食用動物からヒトに至る薬剤耐性遺伝子の伝播の解明と 評価手法の開発 (研究期間：平成19年度～21年度)
主任研究者名	所属： 東京海洋大学 氏名： 青木 宙(研究課題番号：0707)

1. 研究の概要

(1) 研究の目的、概要、必要性及び期待される成果

薬剤耐性菌の出現は、抗菌剤による治療を益々困難にしている。従来の薬剤耐性菌の検出法に比較して迅速に、しかも労力があまり必要としない感染菌の薬剤耐性マーカーを解明できる方法の開発が求められている。今回のプロジェクトの第一の目的は、各薬剤耐性遺伝子の特異的な塩基配列を見つけ、この特異的な塩基配列遺伝子をスライドグラスにスポットし、薬剤耐性遺伝子検出用オリゴヌクレオチドマイクロアレイ作製する。次いで、第二の目的は、作製した薬剤耐性遺伝子検出用オリゴヌクレオチドマイクロアレイが、ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌、食品の生産・流通段階における汚染菌の薬剤耐性遺伝子と迅速に薬剤耐性マーカーが解明できるかどうかを検討する。第三の目的は病原細菌がコードする薬剤耐性遺伝子の構造解析と細菌間における薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路を明らかにする。

- 1) 199 種類の薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子：表 1）について各耐性遺伝子がコードする特異的な塩基配列を参考にマイクロアレイを作製した。
- 2) ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌、食品の生産・流通段階における汚染菌(大腸菌、サルモネラ菌、腸球菌、カンピロバクターおよび魚介類の病原菌 *Vibrio* sp.由来の薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を分類し、さらに、迅速に薬剤耐性遺伝子が、検出が可能になった。
- 3) 魚類病原菌（*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*、*Lactococcus garvieae*）由来の薬剤

耐性遺伝子（薬剤耐性 R プラスミド）構造解析を行った。薬剤耐性菌薬剤耐性遺伝子の伝播経路については、大腸菌、サルモネラ菌、腸球菌、カンピロバクターおよび *Vibrio* sp. がコードする各耐遺伝子は、同一の菌種において同じ構造しているのが、多く認められた。同一菌種内で同じ構造を有する耐性遺伝子が拡散していることが推察できた。菌種が異なると薬剤耐性マーカーが同じでも耐性遺伝子のタイプは異なった。

（２）研究の実施体制とそれぞれの成果

１）青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕（東京海洋大学）

「分担課題：薬剤耐性遺伝子検出用オリゴヌクレオチドマイクロアレイ作製と養殖魚介類の病原細菌および食用魚介類から分離された薬剤耐性遺伝子について」

199 種類の薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子：表 1）について各耐性遺伝子がコードする特異的な塩基配列を参考にマイクロアレイを作製した。今回開発したオリゴヌクレオチドマイクロアレイが魚介類の病原微生物および食用魚介類の薬剤耐性遺伝子の型別および薬剤耐性遺伝子の迅速検出法として有効であることを立証した。さらに、魚介類の病原細菌の薬剤耐性株から検出された R プラスミドの構造解析を行い、コードする遺伝子の由来（起源）を検討した。

２）田村 豊（酪農学園大学獣医学部）

「分担課題：食肉由来薬剤耐性菌における DNA マイクロアレイ法の実用化」

薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路を明らかにする手法としての DNA マイクロアレイ法を実用化するため、これまで収集してきた野生動物由来薬剤耐性菌およびヒトとの距離が近い野生動物として動物園動物由来薬剤耐性菌を使用し、DNA マイクロアレイ法が薬剤耐性菌の食品から人への伝播に関するリスク評価技術になりうるかを明らかにした。

３）花木 秀明（北里大学北里研究所）

「分担課題：ヒト由来耐性菌から分離された耐性菌の分子疫学手法を用いた薬剤耐性遺伝子の解析」

腸球菌（*Enterococcus*）のバンコマイシン耐性遺伝子の PCR による検出法を確立した。ヒトおよび食用動物由来の薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を分類し、迅速に薬剤耐性遺伝子が、検出が可能であるかどうかを検討し、各薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレ

プトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子：表 1) をコードするオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて食用動物由来の大腸菌、サルモネラ菌、腸球菌およびカンピロバクターの多剤耐性株がコードする耐性遺伝子の型別を行った。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

細菌が保有する薬剤耐性遺伝子を迅速に検出でき、さらに、耐性遺伝子を分類することができる薬剤耐性遺伝子解析用オリゴヌクレオチドマイクロアレイの開発を行った。199種類の薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子：別表）について各遺伝子の特異的配列領域をスライドグラス上にスポットした（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）。

作製したマイクロアレイは、ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌および食品の生産・流通段階における汚染菌由来の耐性遺伝子を分類し、さらに、迅速に薬剤耐性遺伝子の検出を可能とした（田村 豊：酪農学園大学獣医学部、花木 秀明：北里大学北里研究所、青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）。

- 1) 魚類の類結節症原因菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 由来の R プラスミドの構造解析（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）
- 2) 魚類のレンサ球菌症原因菌 *Lactococcus garvieae* の薬剤耐性について（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）
- 3) 野ネズミ由来大腸菌と腸球菌の薬剤耐性調査（田村 豊：酪農学園大学）
- 4) ヒト由来耐性菌の分離・同定、薬剤感受性試験（花木 秀明：北里大学北里研究所）
- 5) 薬剤耐性遺伝子オリゴ DNA アレイの作製（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）
- 6) 異なる Incompatibility (Inc) グループに属する R プラスミドの解析（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）
- 7) 種々の魚類病原細菌が保有する薬剤耐性遺伝子の検出（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）
- 8) 野生動物由来多剤耐性大腸菌の薬剤耐性遺伝子の同定（田村 豊：酪農学園大学獣医学部）
- 9) 臨床分離 MRSA および Vancomycin 耐性腸球菌が保有する薬剤耐性遺伝子の検出（花木 秀明：北里大学北里研究所）
- 10) ヒト由来耐性菌の分離・同定、薬剤感受性試験（花木 秀明：北里大学北里研究所）
- 11) 養殖エビ場から分離されたエビの病原細菌 *Vibrio* spp. の薬剤耐性遺伝子型別（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）

- 12) 野生動物および動物園動物由来大腸菌のマイクロアレイ法による薬剤耐性遺伝子の検出（田村 豊：酪農学園大学獣医学部）
- 13) ヒトから分離された腸球菌の VCM 耐性について（花木 秀明：北里大学北里研究所）
- 14) 食品およびヒト由来耐性菌の耐性遺伝子のマイクロアレイ法による比較解析（花木 秀明：北里大学北里研究所、青木 宙：東京海洋大学）

1) 平成 19 年度研究成果の概要

① 平成 19 年度研究の目的

食用動物由来の多剤耐性菌または耐性遺伝子がヒトの常在細菌や病原細菌へ直接的あるいは間接的に薬剤耐性を伝達する可能性について、養殖魚介類由来耐性菌、環境に生息する野生動物ならびに家畜由来耐性菌を、さらにはヒト由来耐性菌を分離する。

ヒト、家畜および魚介類の臨床分離株および環境細菌由来の薬剤耐性遺伝子構造を比較検討する。次いで、既報の薬剤耐性遺伝子の塩基配列を参考に特異的な領域のオリゴヌクレオチドを合成し、マイクロアレイを作製する。

② 平成 19 年度研究の方法

1. 魚類の類結節症原因菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 由来の R プラスミドの構造解析（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）

P. damsela subsp. *piscicida* によって引き起こされるブリの類結節症は、化学療法剤による治療が有効であるが、継続的な使用に伴い耐性菌が出現し、治療が困難となっている。そこで、本研究では本菌の薬剤耐性メカニズムの解明に関する研究の一環として、本菌由来の薬剤耐性プラスミドの構造解析を行った。

2. 魚類のレンサ球菌症原因菌 *Lactococcus garvieae* の薬剤耐性について（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）

Lactococcus garvieae は主にブリ属魚類に感染するレンサ球菌症の原因菌であり、毎年各地の養殖場において耐性菌が出現し、治療が困難となっている。本研究では、養殖場で分離された *L. garvieae* について薬剤感受性に関する動態を調べ、耐性株についての薬剤耐性機構について解明を行った。

3. 野ネズミ由来大腸菌と腸球菌の薬剤耐性調査（田村 豊：酪農学園大学）

北海道の野幌原生林に生息する野ネズミを捕獲し、腸内容物に常に生息し薬剤耐性の指標菌といわれる大腸菌と腸球菌を分離し薬剤感受性を調べた。

4. ヒト由来耐性菌の分離・同定、薬剤感受性試験（花木 秀明：北里大学北里研究所）

臨床でもっとも使用されている抗菌薬は b-ラクタム薬であるが、この b-ラクタム薬を

不活化する酵素（b-lactamase）産生菌が増加している。特に、比較的 b-lactamase に安定な構造を有す b-ラクタム薬まで不活化してしまう extended spectrum b-lactamase（ESBL）産生菌の増加は著しく、その上に、全ての b-ラクタム薬を不活化する metallo- b-lactamase までも増加している。臨床で問題となる上記 2 酵素について、その産生菌を分離・同定するとともに、それらの耐性遺伝子の検出を試みた。

5. 薬剤耐性遺伝子オリゴ DNA アレイの作製（青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕：東京海洋大学）

薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロラフェニコール、カナマイシン、リンコマイシン、オキシリン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子）オリゴ DNA アレイを作製する。作製した薬剤耐性遺伝子オリゴ DNA を用いて、種々の魚病細菌由来の薬剤耐性遺伝子の網羅的な検出を行った。

③ 平成 19 年度研究の成果

1. 魚類の類結節症原因菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 由来の R プラスミドの構造解析

本研究では我が国で分離された *P. damsela* subsp. *piscicida* 由来の R プラスミド pP99-018 および pP9014 および米国で分離された本菌由来の R プラスミド pP91278 の全構造解析を行った。R プラスミド pP99-018、pP9014 および pP91278 は全長約 150kb、56kb および 131kb よりなっていた。これらの R プラスミドは薬剤耐性遺伝子を複数コードしていた。薬剤耐性遺伝子以外の R プラスミドの基本構造を構築する伝達や複製に関する遺伝子を比較すると pP99-018 および pP91278 は類似の構造を有していたが、pP9014 のそれらは異なるものであった。R プラスミド pP9014 の基本構造は、同一菌種由来の pP99-018 および pP91278 とは全く異なる起源を有することが明らかとなった。

2. 魚類のレンサ球菌症原因菌 *Lactococcus garvieae* の薬剤耐性について

1999 年から 2006 年に愛媛、大分、鹿児島県の養魚場で分離された *L. garvieae* 146 株に対する 14 種類の化学療法剤の最小発育阻止濃度（MIC）を調べたところ、146 菌株のうち 91 株が全ての薬剤に対し感受性を示したが、残りの 55 株のうち、46 株がエリスロマイシン（EM）（高等度耐性）、リンコマイシン（LCM）およびテトラサイクリン（TC）耐性の 3 剤耐性ならびに 2 株が EM に対し中等度耐性、また、7 株がニューキノロンに対する耐性を示した。伝達性 R プラスミドの検出を行ったところ、EM（高等度耐性）、LCM、TC 耐性株の内、12 株より伝達性 R プラスミドが検出された。検出された R プラスミドは、分離地域、分離年度が異なっても全て同一構造を有することが示された。

検出されたRプラスミドのうちの1つpKL0018の遺伝子構造解析を行った。pKL0018の全長は約20kbであった。薬剤耐性遺伝子はermBタイプのMLS (LCM) 耐性遺伝子、tetSタイプのTC耐性遺伝子にそれぞれ分類され、MLS (LCM) 耐性遺伝子はプラスミド上に2個存在していた。

*L. garvieae*の共試菌株のうち、ニューキノロン耐性7株について*gyrA*、*parC*のキノロン耐性決定領域(quinolone resistance-determining region: QRDR)の変異を調べたところ、*gyrA*では、ニューキノロンに耐性である7株で81番目のアミノ酸残基であるセリンがフェニルアラニンに変異していた。また、共試菌株のうち、最も高いMICを示した1株については*gyrA*の変異に加え、*parC*の80番目のアミノ酸残基のセリンがイソロイシンに変異していた。

3. 野ネズミ由来大腸菌と腸球菌の薬剤耐性調査

大腸菌は151株得られ145株(96%)は供試した全ての抗菌薬に感受性であった。しかし、6株(4%)に耐性菌が認められた。耐性率は、アンピシリン(ABPC)2%、セファゾリン1.3%、カナマイシン(KM)、ジヒドロストレプトマイシン(DSM)、クロラムフェニコール(CP)それぞれが0.7%、オキシテトラサイクリン(OTC)が2.7%であった。耐性株の中には、ABPC・DSM・KM・OTC・CPの5剤耐性株も認められた。一方、腸球菌は103株得られ、96株(93.2%)は供試した全ての抗菌薬に感受性を示した。しかし、7株(6.8%)に耐性株が認められた。耐性率はOTCで2.9%、エンロフロキサシン(ERFX)で5.8%であった。抗菌薬の暴露が極めて少ない自然環境に生息する野ネズミに耐性菌が出現したことは、耐性菌が生態系で循環しており、食品を介したヒトへの伝播経路を考える上で極めて興味ある知見と思われる。また、人医療で重要な抗菌薬といわれるフルオロキノロン耐性菌や多剤耐性菌が認められたことから、確実なヒトの耐性菌対策の策定には野生動物の耐性菌動向を今後も監視していく必要がある。

4. ヒト由来耐性菌の分離・同定、薬剤感受性試験

我が国でもっとも検出頻度の高いESBL産生遺伝子はToho-1とToho-2であり、これらの遺伝子が食品から分離される細菌に共通か否か、今後、詳細につめる予定である。

MRSAは院内感染菌として君臨してきたが、現在は市中からも頻繁に検出されるようになっている。さらに、家畜、ペット等からの検出も増加しており、食品への汚染が懸念され、今後の監視が必要な病原菌と考える。今回、臨床から分離されたMRSAを用いて、MRSA耐性遺伝子(*mecA*)と動物薬として汎用されているアミノグリコシド(AG)耐性遺伝子の検出を行った。AG耐性遺伝子の存在の確認と各種抗菌薬のMICを測定した。2機能酵素である*aac(6')/aph(2'')*のみ、*aad(4',4'')*のみではAG高度耐性にはならず、

*aac(6')/aph(2'')*と*aph(3')*-□もしくは*aac(6')/aph(2'')*と*aad(4',4'')*で高度耐性を示すことが判明した。

5. 薬剤耐性遺伝子オリゴDNAアレイの作製

供試細菌ゲノムを蛍光標識する際に、通常の5倍程度の酵素を用い、反応時間を改変することにより、薬剤耐性遺伝子の検出効率を高めることが可能となった。また、解析に用いた細菌からはグラム陰性あるいは陽性に関わらず、薬剤耐性遺伝子の検出が可能であった。以上のことより、DNAマイクロアレイ法により、薬剤耐性遺伝子の存在からそのタイプまで同定できる技術が間発されたことより、今後は、ヒト健康へのリスク評価手法開発研究に応用できると考えられた。

2) 平成20年度研究成果の概要

① 平成20年度研究の目的

ヒト、家畜および魚介類の臨床分離株および環境細菌由来の薬剤耐性遺伝子構造を解析し、各薬剤耐性遺伝子特異的な領域の塩基配列を基にオリゴDNAマイクロアレイを作製する。薬剤耐性遺伝子、インテグロンやトランスポゾン領域を解析し、薬剤耐性領域がどのように構築されたかを解析する。また、食用動物や環境由来細菌がコードする薬剤耐性遺伝子が、ヒトの病原菌や常在細菌に伝播しているかどうかを、マイクロアレイを用いて調べる。

平成20年度は(1)薬剤耐性遺伝子検出マイクロアレイの汎用化のためのバージョンアップおよびマイクロアレイ法による種々分離の異なる耐性菌からの耐性遺伝子の同定（海洋大、青木）、(2)野生動物から分離された耐性菌の分子疫学手法を用いた環境からヒトへの伝播経路に関する研究（酪農学園大、田村）および(3)ヒト由来耐性菌から分離された耐性菌の分子疫学手法を用いた薬剤耐性遺伝子の解析（北里大学、花木）を実施した。

② 平成20年度研究の方法

薬剤耐性遺伝子オリゴヌクレオチドマイクロアレイ ver.2.0 を用いた薬剤耐性遺伝子検出の網羅的解析および各分離菌の薬剤耐性遺伝子の型別

前年度は、153種類の薬剤耐性遺伝子を検出することができるオリゴDNAアレイの有用性について報告した。本年度はさらに汎用性を高めるためにキノロン剤、バンコマイシンおよびメチシリン耐性遺伝子を含む合計47種類の薬剤耐性遺伝子を新たにオリゴDNAアレイに加え、合計200種類の薬剤耐性遺伝子を検出することができるプラットフォームを作製した。オリゴDNAアレイの内訳は51種類のアミノグリコシド系抗生物質、13種類の

エリスロマイシン、7 種類のキノロン剤、25 種類のクロラムフェニコール、3 種類のサルファ剤、32 種類のテトラサイクリン、25 種類のトリメトプリム、5 種類のフロルフェニコール、9 種類のバンコマイシン、16 種類のペニシリン、4 種類のホスホマイシン、4 種類のメチシリンおよび 6 種類のリンコマイシンの耐性遺伝子であり、ヒト、家畜等で問題になっているバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)にも対応できるようにした。

この薬剤耐性遺伝子オリゴ DNA アレイを用い、不和合性 (Inc グループ) の異なる代表的な R プラスミドを保持する大腸菌、魚病細菌、野生動物およびヒトから分離された薬剤耐性菌について解析した。

③平成 20 年度研究の成果

1. 異なる Incompatibility (Inc)グループに属する R プラスミドの解析

プラスミドには Incompatibility (不和合性)があり、複製機構が類似したプラスミド同士は同一宿主細胞内に同時に存在しない。この性質を利用して R プラスミドがグループ分けされており、これを Inc グループと呼ぶ。そこで、いかなる Inc グループの R プラスミドに対してもオリゴ DNA アレイが使用できるかどうか、IncA、IncB-O、IncC、IncE、IncFII、IncII、IncJ、IncK、IncL、IncN、IncP、IncT、IncX および IncW に属する R プラスミドがコードしている薬剤耐性遺伝子の検出・同定を行った。各々のプラスミド DNA を保持した大腸菌宿主の全 DNA を抽出し蛍光標識した後、オリゴ DNA アレイによって解析を行った結果、薬剤耐性マーカーと一致する薬剤耐性遺伝子が検出された。さらに、検出した薬剤耐性遺伝子についてはそのタイプ分けすることも可能であった。以上より、本プロジェクトで新たに改良したオリゴ DNA アレイは、いかなる Inc タイプの R プラスミドに対しても利用することが可能で、薬剤耐性遺伝子の塩基配列を決定すること無く迅速に薬剤耐性遺伝子のタイプを決定することができるようになった。

2. 種々の魚類病原細菌が保有する薬剤耐性遺伝子の検出

現在、我国の水産養殖で問題になっている、*Aeromonas hydrophila*、*A. salmonicida*、*Lactococcus garvieae*、*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* および *Vibrio anguillarum* の培養菌体より直接抽出した DNA から薬剤耐性遺伝子が検出できるかどうか試験を行った。解析の結果、カナマイシン、ストレプトマイシンおよびトリメトプリムに対して耐性を持つ *A. hydrophila* GMA0361 株からは順に、*aph(3')*_{1c}/*aph(3')*_{7a}、*aadA2* および *dfp12* 遺伝子が検出された。*A. salmonicida* ATCC14174 株のサルファ剤およびテトラサイクリンに対する耐性は *sul1* および *tetE2* 遺伝子によるものであることが分かった。*L. garvieae* Lg0511 株のエリスロマイシンおよびテトラサイクリン耐性は、順に *ermB* および *tetS* 遺

伝子であった。*P. damsela* subsp. *piscicida* PP0509 株はカナマイシン、クロラムフェニコールおよびテトラサイクリンに対して耐性であり、順に *aph(3')*_7A、*cat1/PP-cat* および *tetD1* を薬剤耐性遺伝子として同定した。*V. anguillarum* pJA8750 株はクロラムフェニコール、サルファ剤、ストレプトマイシンおよびテトラサイクリンに対して耐性があり、順に *cat4*、*sul1*、*aad1/aad2* および *tetB/tetC1/tetD2* が耐性遺伝子であった。

3. 野ネズミ(ヤチネズミ)由来多剤耐性大腸菌の薬剤耐性遺伝子の同定

初年度の調査で得られた、野生ヤチネズミから分離した *Escherichia coli* 158-2 株は、アンピシリン、オキシテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコールおよびストレプトマイシンに対して耐性を示す多剤耐性菌であった。この *E. coli* 158-2 株の薬剤耐性遺伝子保有状況をオリゴ DNA マイクロアレイで確認したところ、アンピシリン耐性遺伝子(*blaTEM10*)、オキシテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetB/tetC1*)、カナマイシン耐性遺伝子(*aph1/aph(3')*)およびクロラムフェニコール耐性遺伝子(*cat1/PP-cat*)を保有していることが分かった。

4. アマミノクロウサギ由来大腸菌と腸球菌の薬剤耐性調査

薬剤耐性菌のヒトへの伝播経路を解明するためには、環境における耐性菌の生態を明らかにする必要がある。そこで抗菌剤の暴露が極めて限定的と考えられる野生動物の疫学調査が必要である。今回、奄美大島に生息するアマミノクロウサギの糞便を採取し、糞便中に生息している大腸菌と腸球菌を分離し薬剤感受性を調べた。大腸菌は 198 株得られ 194 株(98%)は供試した全ての抗菌薬に感受性であった。しかし、4 株 (2%) はアンピシリン (ABPC) とアモキシシリン(AMPC)の 2 剤に耐性を示した。耐性菌はペニシリナーゼを産生し、 3×10^{-5} の頻度で耐性形質を大腸菌 C600 に伝達した。一方、腸球菌は 110 株の *Enterococcus faecalis*、4 株の *E. faecium* が分離された。耐性菌は *E. faecalis* 2 株(1.7%)でオキシテトラサイクリン (OTC) に対して認められ *tetM* 遺伝子を保有していた。今回得られた *tetM* 遺伝子の塩基配列は、昨年分離された野ネズミ由来のそれと全く同じであった。また、これまで報告された環境由来、生産動物由来およびヒト由来細菌の各種動物の *tetM* 遺伝子の塩基配列とも同じであった。したがって、抗菌薬の暴露が極めて少ない自然環境に生息するアマミノクロウサギに出現した耐性菌の保有する耐性遺伝子は生態系で循環しており、食品を介したヒトへの伝播経路を考える上で極めて興味ある知見と思われる。また、耐性菌から耐性形質が感受性菌に伝達されたことから、確実なヒトの耐性菌対策の策定には野生動物の耐性菌動向を今後も監視していく必要がある。

5. 臨床分離 MRSA および Vancomycin 耐性腸球菌が保有する薬剤耐性遺伝子の検出

現在院内感染等以外にも家畜等で問題になっている MRSA および VRE について薬剤耐性遺伝子の検出・同定を行った。MRSA の試験にはヒトより分離された RHM7 株およ

び KB35 株を供した。何れの株からも、メチシリン耐性に関わる *LmecRI* が検出された。メチシリン耐性に関わる遺伝子以外にも、トリメトプリム耐性遺伝子の *dfrB*、ホスホマイシン耐性遺伝子の *fosB* が両菌株より検出された。さらに、KB35 株についてはエリスロマイシン耐性遺伝子の *ermA* を保有していた。VRE の試験には同じくヒトより分離した VanA1 株を用いた。VanA1 株からは、バンコマイシン耐性に関わる *vanA* および *vanZ* が検出でき、さらにエリスロマイシン耐性遺伝子の *ermB* も検出できた。

6. ヒト由来耐性菌の分離・同定、薬剤感受性試験

血液分離 MRSA の aminoglycoside 耐性遺伝子と SCCmec の保有状況

β -lactam 薬と aminoglycoside 薬の感受性に負の相関が認められたため、その関連を遺伝子レベルで解析することを目的とした。使用菌株は 1978 年から 2002 年にわたって同一病院から血液分離された MRSA を用いた。抗菌薬感受性は clinical laboratory standards institutes (CLSI) に準じて寒天平板希釈法で実施した。各遺伝子は既存の primer を用いて検出した。

抗菌薬感受性は MIC50 で Methicillin (DMPPC) と Gentamicin (GM) の感受性を 1978-1984、1985-1989、1990-1994、1995-1999、2000-2002 の年代別に比較すると、DMPPC は 16、>128、>128、>128、>128 $\mu\text{g/mL}$ と耐性化が確認されたが、GM は >128、>128、0.5、0.5、0.5 $\mu\text{g/mL}$ と感性感が確認された。この傾向は、他の β -lactam 薬と aminoglycoside 薬でも同様であり、Cloxacillin では 2、32、64、64、64 $\mu\text{g/mL}$ 、Imipenem で 0.25、16、32、16、16 $\mu\text{g/mL}$ 、Amikacin (AMK) では 16、8、8、8、8 $\mu\text{g/mL}$ 、Arbekacin (ABK) では 2、 ≤ 0.5 、 ≤ 0.5 、 ≤ 0.5 、 ≤ 0.5 であった。

Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) の検出を行った。SCCmec を検出することで MRSA の type を 4 種類に分類した。1978-1984、1985-1989、1990-1994、1995-1999、2000-2002 の年代別に分類すると、type I は 55.6、33.3、4.1、4.1、0 %、type II は 15.6、46.7、85.7、93.9、76.7 %、type III は 2.2、0、0、0、0 %、type IV は 2.2、11.1、0、0、0 %、分類不能 (UN) が 4.4、8.9、10.2、2.0、23.3 % であった。特に、type I と type II は全く逆の動きをしていることが確認された。

Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AME) の検出を行った。AME として *aac(6')/aph(2'')*、*aph(3')*、*aad(4',4'')* の 3 遺伝子を検出したが、上記年代別の検出率では *aac(6')/aph(2'')* が 11.1、4.4、4.1、2.0、3.3 %、*aph(3')* は 8.9、2.2、2.0、0、0 %、*aad(4',4'')* が 11.1、28.9、51.0、57.1、36.7 % であった。さらに、*aac(6')/aph(2'')* と *aph(3')* 保有株は 11.1、22.2、40.8、34.7、40.0 %、*aac(6')/aph(2'')* と *aad(4',4'')* 保有株が 0、2.2、0、0、0 %、3 遺伝子保有株が 2.2、0、0、0、0 % であり、これらの遺伝子を全く保有していない株が、2.2、4.4、0、2.0、16.7 % であった。特に GM や ABK の不活化に関与している

aac(6')/aph(2'')+ α 保有株 (GM と ABK 耐性) は、77.8、62.2、46.9、40.8、46.7 %と減少していたが、それらの不活化に関与しない *aad(4',4'')*+ α 保有株 (AMK と tobramycin 耐性) は 22.2、53.3、91.87、91.8、76.7 %と増加していた。

Vancomycin 耐性腸球菌 (VRE) の抗菌薬感受性と *van* 遺伝子保有状況

β -lactam 薬と aminoglycoside 薬の感受性に負の相関が認められたため、その関連を遺伝子レベルで解析することを目的とした。使用菌株は 1997 年から 2004 年にわたって分離された VRE を用いた。抗菌薬感受性は clinical laboratory standards institutes (CLSI) に準じて寒天平板希釈法で実施した。*vanA*、*B* および *C* の各遺伝子は既存の primer を用いて検出した。

van 遺伝子の保有状況について調べた。46 株から分離された *vanA* 保有 VRE は、43 株が *E. faecium*、3 株が *E. faecalis* であった。また、22 株から分離された *vanB* は、13 株 *E. faecium* が、8 株が *E. faecalis*、1 株が *E. gallinarum* であった。さらに、22 株から分離された *vanC* は、1 株 *E. faecium* が、2 株が *E. faecalis*、16 株が *E. gallinarum*、未同定が 3 株であった。*vanA* 保有 VRE は、Glycopeptide (VCM, TEIC)、 β -lactam (ABPC, IPM)、Aminoglycoside (GM)、Chloramphenicol、Tetracycline (RFP, TC)、Macrolide (EM)、Quinolone (PZFX, CPFX) 薬に対して、何らかの自然耐性か獲得耐性を有していた。また、*vanB* や *vanC* 保有株の TEIC に対する感受性はある程度維持されていたが、構成型耐性に移行した場合、TEIC も高度耐性になると考えられる。

3) 平成 21 年度研究成果の概要

① 平成 21 年度全体の研究目的

この食品健康影響評価技術研究プロジェクトの平成 19 年度および 20 年度において薬剤耐性遺伝子検出マイクロアレイを開発した。今年度は、このプロジェクトで開発したが、ヒト、家畜および魚介類の臨床分離株、食用動物および飼育施設 (養殖場) 由来の薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を分類し、さらに、迅速に薬剤耐性遺伝子が、検出が可能であるかどうかを検討する。マイクロアレイ法の実用化と薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路を明らかにする。

② 平成 21 年度全体の研究方法

199 種類の薬剤耐性遺伝子 (アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよ

びトリメトプリム耐性遺伝子：表 1) について各耐性遺伝子がコードする特異的な塩基配列を参考にマイクロアレイを作製した。次いで、養殖エビ場から分離されたエビの病原細菌 *Vibrio* spp. の薬剤耐性株、野生動物(野ネズミ)由来大腸菌、動物園の動物由来の大腸菌、食用動物およびヒト由来の大腸菌、腸球菌、サルモネラおよびカンピロバクターの薬剤耐性菌を集めた。作製したマイクロアレイを用いて採集した薬剤耐性株がコードする薬剤耐性遺伝子を検出し、さらに、各耐性菌がコードする薬剤耐性遺伝子を調べた。さらに、魚類病原菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* の薬剤耐性株から検出された R プラスミドの構造解析を行い、R プラスミドがコードする遺伝子の起源を検討した。

③ 平成 21 年度研究の成果

各分担研究者（分担課題）の成果

1) 青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕（東京海洋大学）

「分担課題：養殖魚介類の病原細菌および食用魚介類から分離された薬剤耐性について」

① 平成 21 年度全体の研究目的

今回開発したオリゴヌクレオチドマイクロアレイが魚介類の病原微生物および食用魚介類の薬剤耐性遺伝子の型別および薬剤耐性遺伝子の迅速検出法として有効であるかどうかを検討した。さらに、魚介類の病原細菌の薬剤耐性株から検出された R プラスミドの構造解析を行い、コードする遺伝子の由来（起源）を検討した。

② 平成 21 年度全体の研究方法

養殖エビ場から分離されたエビの病原細菌 *Vibrio* spp. の薬剤耐性株がコードする薬剤耐性遺伝子を作製したオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いてクラス分けを行った。さらに、*P. damsela* subsp. *piscicida* の薬剤耐性株から検出された R プラスミドの構造解析を行い、コードする遺伝子の起源を検討した。

③ 平成 21 年度研究の成果

エビの病原細菌 *Vibrio* spp. の薬剤耐性株より種々の薬剤耐性マーカーをコードする伝達性 R プラスミドが検出された。R プラスミドの薬剤耐性マーカーは、アンピシリン(AMP)、ストレプトマイシン(SM)、キノロン (QN)、テトラサイクリン(TC)、サルファ剤 (SSMX) およびトリメトプリム(TMP)耐性の 1 剤から 5 剤の組み合わせであった。これらの耐性遺伝子は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ法により、迅速に検出することが出来た。AMP 耐性遺伝子は *blaROB-I*、*ampC* タイプに、SSMX 耐性遺伝子は *sul2* タイプに、CP 耐性遺伝子は *flor* タイプに型別出来た。SM 耐性遺伝子は、3 種類の耐性にハイブリした。ハイブリ

した3種類のSM耐性遺伝子の配列は類似しており、今後、塩基配列の再検討が必要であろう。QN耐性遺伝子は、199種類の耐性遺伝子とハイブリしなかった。新しいQN耐性遺伝子であるかどうか、再度検討する必要があると思われた。

P. damsela subsp. *piscicida* の薬剤耐性株から検出されたRプラスミドは、全長55,851bpでAMP, TC, CP 3剤耐性で、これらの耐性遺伝子は、ClassA、*tetD* および *catIII* タイプにそれぞれ型別された。伝達遺伝子領域は、Incompatibility（不和合性）グループ P-1 のものと類似構造を有していることが明らかになった。今まで明らかにされている *P. damsela* subsp. *piscicida* の薬剤耐性株から検出されたRプラスミドとは、遺伝子構造が大きく異なった。

2) 田村 豊（酪農学園大学獣医学部）

「分担課題：食肉由来薬剤耐性菌におけるDNAマイクロアレイ法の実用化」

① 平成21年度全体の研究目的

薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路を明らかにする手法としてのDNAマイクロアレイ法を実用化するため、これまで収集してきた野生動物由来薬剤耐性菌及び人との距離が近い野生動物として動物園動物由来薬剤耐性菌を使用し、DNAマイクロアレイ法が薬剤耐性菌の食品から人への伝播に関するリスク評価技術になりうるかを明らかにする。

② 平成21年度全体の研究方法

(1) 供試株

1. 野ネズミ由来耐性大腸菌：2006年に野幌原生林に生息していたヤチネズミの糞便から分離した大腸菌(158-2株)で、微量液体希釈法による薬剤感受性試験の結果、アンピシリン(ABPC)、ジヒドロストレプトマイシン(DSM)、カナマイシン(KM)、クロラムフェニコール(CM)、オキシテトラサイクリン(OTC)に対して耐性を示した。
2. 動物園動物由来大腸菌：2008年に札幌動物園で飼育されている動物55種102頭から糞便を採取し、DHL寒天培地、エンロフロキサシン(2 µg/ml)添加DHL寒天培地、セフトロキシム(2 µg/ml)添加DHL寒天培地により大腸菌を分離した。菌種の同定はApi20Eにより実施した。

(2) PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出

PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出については、文献を参考にプライマーを作成して実施した。*aadA4*、*aadA11b*、*aadA2*、*aadA1*、*ant(3'')-Ia*、*ant(3'')-Ia2*、*dfr12*の各耐性遺伝子はclass1インテグロンのPCRを実施し、PCR産物のサイズが大きいものについて塩基配列から同定することにした。

(3) DNA マイクロアレイ法による薬剤耐性遺伝子の検出

DNA マイクロアレイ法による薬剤耐性遺伝子の検出については東京海洋大学の廣野育生教授に依頼して実施した。供試株からの DNA 抽出は InstaGene Matrix (日本バイオラッド) を用いた。

(4) 薬剤感受性試験

動物園動物由来大腸菌は、フローゼンプレート「栄研」を用いた微量液体希釈法により最小発育濃度 (MIC) を求めた。供試薬剤は ABPC、セファゾリン (CEZ)、セファメタゾール (CMZ)、セフトジジム (CAZ)、セフポドキシム (CPDX)、KM、ゲンタマイシン (GM)、ストレプトマイシン (SM)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン (TC)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、オフロキサシン (ORFX)、トリメトプリム (TMP) の 14 種類であった。各薬剤のブレイクポイントは CLSI に準拠し、ABPC; 32 µg/ml、CAZ; 32 µg/ml、CEZ; 32 µg/ml、CMZ; 64 µg/ml、CPDX; 8 µg/ml、GM; 16 µg/ml、KM; 64 µg/ml、SM; 64 µg/ml、CP; 32 µg/ml、TC; 16 µg/ml、NA; 32 µg/ml、CPFX; 4 µg/ml、OFLX; 8 µg/ml、TMP; 16 µg/ml とした。

③ 平成 21 年度研究の成果

(1) 野ネズミ由来耐性大腸菌

供試された多剤耐性大腸菌 (No.158-2 株) について PCR 法による薬剤耐性遺伝子を調べたところ、*blaTEM*、*strA*、*strB*、*aph1*、*tetB* 及び *cat1* 遺伝子が検出された。一方、DNA マイクロアレイ法では、*blaTEM*、*aph1*、*tetB*、*tetC1*、*cat1*、*PP-cat* 及び *sul2* 遺伝子が検出された。

(2) 動物園動物由来大腸菌

1. 薬剤耐性菌の分離：DHL 寒天培地により 66 株、ERFX 添加 DHL 寒天培地より 34 株、CPDX 添加 DHL 寒天培地により 18 株の大腸菌を分離し、薬剤感受性試験を実施した。DHL 寒天培地分離株は、TC(30.3%)、SM(19.7%)及び ABPC(15.2%)に対して高い耐性率を示した (図 2)。サルファ剤 (SA) に関しては試験を実施していないが過去の成績から全てを耐性とした。また、薬剤添加培地分離株は DHL 寒天培地分離株より耐性を示す薬剤が多い傾向にあった。DNA マイクロアレイ法を実施する供試株を全ての薬剤に感受性を示す株 3 株、多剤耐性株 10 株を任意に選択した。
2. 薬剤感受性大腸菌：供試薬剤全てに対して感受性を示した大腸菌 No.4、No.6、No.7 株について DNA マイクロアレイ法を実施したところ、*blaROB-1*、*aac(3)-IIIc*、*aac(6)-Iib*、*aac(6)-Iv*、*strU*、*sph*、*tetC*、*sul2*、*qnrA*、*qepA* 遺伝子を検出した。一方、DNA マイクロアレイ法で検出した遺伝子に関して、それぞれの耐性遺伝子に対して PCR 法を実施した

ところ、全ての遺伝子が検出されなかった。

3. 薬剤耐性大腸菌：各供試薬剤に対して多剤耐性を示した 10 株 (No.8~114) を選択し、DNA マイクロアレイ法を実施した。その後、DNA マイクロアレイ法で検出された耐性遺伝子について PCR 法により耐性遺伝子の存在を確認した。その結果、No.49 は表現型として ABPC-SM-CP-TC-NA-CPFX-OFLX-TMP-SA で 7 系統の抗菌剤に耐性を示し、DNA マイクロアレイ法では *blaTEM-10*、*tetB*、*aadA4*、*sul2*、*PP-cat* 遺伝子を検出した。PCR 法では *blaTEM-10*、*tetB*、*sul2*、*PP-cat* を検出した。一方、No.8 株は、表現型として ABPC-KM-SM-TC-NA-CPFX-ORFX-TMP-SA で 6 系統に耐性を示し、DNA マイクロアレイ法で *blaTEM-10*、*blaROB-1*、*aac(3)-IIIc*、*aac(3)-Iva*、*aac(6)-Iib*、*sph*、*sul2*、*qepA*、*qnrA* を検出した。しかし、PCR 法では *blaTEM-10* しか検出できなかった。このように株により耐性表現型、DNA マイクロアレイ法、PCR 法の結果に供試菌株により差異が認められた。

(3) DNA マイクロアレイ法の評価

多剤耐性大腸菌 10 株について評価した。耐性薬剤系統数と DNA マイクロアレイ法で検出した耐性遺伝子は良く一致した (75.0 %)。しかし、DNA マイクロアレイ法で検出された耐性遺伝子は PCR 法で検出されないものも多く、47.9%しか検出されなかった。

今回の供試した株において、DNA マイクロアレイ法で検出される耐性遺伝子と PCR 法で検出される耐性遺伝子を見ると、*blaTEM-10*、*pp-cat* 及び *cmlA* 遺伝子は全ての株で一致し、*tetB* で 86%、*sul2* で 30%の株で一致した。

(4) まとめ

今回、野生動物由来の多剤耐性大腸菌を用いて、薬剤耐性の表現型と DNA マイクロアレイ法で検出した耐性遺伝子との関係を調べ、さらにその遺伝子が PCR 法で検出されるか否かを検討した。その結果、耐性表現型 (抗菌剤系統数) と DNA マイクロアレイ法で検出される耐性遺伝子は比較的良く一致し (75.0 %)、検出された耐性遺伝子の半数が PCR 法で確認された。DNA マイクロアレイ法で検出される耐性遺伝子が必ずしも PCR 法で検出できない理由は明らかでないが、今回の実験で使用した PCR の条件は文献に記載された方法に準拠して実施したものであり、今後 PCR 条件をさらに検討する必要があるものと思われた。また、今回、多剤耐性大腸菌の中に 3 者が比較的良く一致する株と一致しない株が存在することが明らかとなった。DNA マイクロアレイ法は迅速に網羅的な耐性遺伝子解析手法として優れた特性を持った方法であるものの、株により PCR による耐性遺伝子の検出とに差異が認められた。さらに感受性大腸菌株で認められたように、DNA マイクロアレイ法で検出された耐性遺伝子が PCR で検出されなかったことを考えると DNA マイクロアレイ法は非特異的な反応が生じる可能性があるものと思われた。今後、この非特異的な反応をでき

るだけ抑えた手法の改良が必要に思われた。いずれにせよ短時間で網羅的な耐性遺伝子の検出法である DNA マイクロアレイ法は、薬剤耐性菌や耐性遺伝子の動物や食品から人への伝播経路を解明するスクリーニング法として応用できる可能性があると考えられた。

3) 花木 秀明（北里大学北里研究所）

「分担課題：ヒト由来耐性菌から分離された耐性菌の分子疫学手法を用いた薬剤耐性遺伝子の解析」

① 研究目的

近年、薬剤耐性菌の増加が国際的に問題となっている。ヒトにおける耐性菌は、医療現場で使用する抗菌薬によって出現してくると考えられているが、その一方で食品を介して伝播する危険性も各方面から指摘されてきている。

腸球菌（*Enterococcus*）は、ヒトの腸管間に存在する常在菌の一種であり、病原性はきわめて弱い細菌であるが、免疫不全患者、外科手術後の患者などには感染を起こすことがあり、これらは時として重症感染症に発展する場合のある菌でもある。*Enterococcus* は各種抗菌薬に自然耐性を有し、さらに耐性遺伝子の獲得や自己遺伝子の変異による耐性を獲得している。この中で唯一バンコマイシン（VCM）は、効果を維持していた。しかし、近年 VCM に耐性の *Enterococcus*（VRE）が出現し問題となっている。VRE の検出は、欧州での食用肉の糞便から高頻度に分離されることが報告されており、ヒトを介して伝播する可能性は否定しがたい。

これらの伝搬性を解明することを目的として、今回はヒトから分離された VRE について、分子疫学的解析を行った。

② 研究方法

1. ヒトから分離された VCM 耐性 *Enterococcus* について、PCR 法による菌種（*Enterococcus faecium*, *E. faecalis*）を同定した。分離した試験株から熱水抽出法を用いて DNA の抽出を行い、既報のプライマー（J Clin Microbiol 2000; 38: 3092-5）と、Phusion DNA polymerase 酵素を用いて各遺伝子断片を増幅した。増幅産物を泳動、染色しバンドの有無から菌種の同定を決定した。
2. 上述の VCM 耐性 *Enterococcus* について遺伝子解析（PCR 法）を用い、VCM 耐性遺伝子の検索を実施した（*vanA*、*vanB* gene）。分離した試験株から熱水抽出法を用いて DNA の抽出を行い、既報のプライマー（J Clin Microbiol 1995; 33: 24-7）と、Phusion DNA polymerase 酵素を用いて各遺伝子断片を増幅した。増幅産物を泳動、染色しバンドの有無から菌種の同定を決定した。
3. 上述の菌株について、各種抗菌薬の薬剤感受性調査を実施した。測定法は寒天平板希釈

法による MIC の測定を行った。試験菌株を各々 MHB (Mueller-Hinton broth) に植菌し、晩培養した。種々の濃度の薬剤を含むように調製した Mueller-Hinton agar 培地に植菌し、35 ℃ で 20 時間培養し MIC 値を判定した。

③ 研究成果

腸球菌の VCM 耐性遺伝子(*vanA* および *vanB*)を検出するために作製した 2 種類のプライマーを用いて PCR を行った結果、732 bp の *vanA* 遺伝子および 635 bp の *vanB* 遺伝子のいずれかを増幅することができた。

表 2. バンコマイシン耐性腸球菌に対する各種薬剤の最小発育阻止濃度

【VRE 耐性株の MIC 結果】							
株 No	菌名	遺伝子	MIC (μg/mL)				
			ABPC	IPM	VCM	TEIC	LZD
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanB</i>	2	1	8	1	2
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanA</i>	1	1	>128	>128	2
3	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>128	>128	>128	>128	2
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanB</i>	2	2	16	2	2
5	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>128	>128	>128	>128	2
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanB</i>	1	1	8	2	2
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanB</i>	1	1	4	1	2
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanA</i>	2	1	>64	2	2
9	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanA</i>	2	1	>64	2	2
10	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>128	128	128	>128	2
11	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>128	>128	>128	128	2
12	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>128	>128	128	>128	2
13	<i>Enterococcus avium</i>	<i>vanA</i>	32	2	>128	128	2
14	<i>Enterococcus avium</i>	<i>vanA</i>	16	1	>128	>128	2
15	<i>Enterococcus avium</i>	<i>vanA</i>	1	2	128	>128	2
16	<i>Enterococcus sp</i>	<i>vanB</i>	>128	64	16	2	2
17	<i>Enterococcus sp</i>	<i>vanB</i>	>128	>64	32	1	2
18	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	16	2
19	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	32	2
20	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	32	2

21	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
22	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
23	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
24	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
25	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
26	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
27	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
28	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
29	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2
30	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	>256	>256	>256	>256	2

(2) 今後への展望

今回、ヒトから分離された VRE 株の生物学的解析と遺伝学的解析を実施した。その結果、各種抗菌薬に対する高度耐性が確認され、耐性遺伝子も保有が確認された。今後これらの耐性株がヒトの手を介して食用動物間に感染する可能性があり、また逆に食用肉から検出された VRE がヒトへ感染する可能性も考えられる。

今回は実施していないが、今後は、食用の肉から VRE の検出を行いヒトに感染している VRE と食用肉から分離された菌についての分子疫学的解析を実施し、各種伝播様式をあきらかにしていく必要があると考えられる。この伝播様式をあきらかにすることで、ヒトに対する薬剤耐性菌伝播に関するリスク評価がかなり期待できると考えられる。

研究論文

1. Matsui H, Hanaki H, Takahashi K, Yokoyama A, Nakae T, Sunakawa K, Omura S. Rapid detection of vaginal *Candida* species by newly developed immunochromatography. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16: 1366-8.
2. Yamaguchi Y, Hanaki H, Yanagisawa C, Ikeda-Dantsuji Y, Hashimoto T, Yazaki H, Sugahara K, Yanagisawa T, Kawajiri H, Sato S, Ishizaki A, Tachihara-Sato R, Takahashi Y, Ono T, Kageyama Y, Kawaguchi T, Tamura A, Hagane K, Sunakawa K. Characterization of beta-lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR) in a patient with septicemia during long-term vancomycin administration. J Infect Chemother 2009; 15: 274-8.

4) 花木 秀明 (北里大学北里研究所)・青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕 (東京海洋大学)

「分担課題：食品およびヒト由来耐性菌の耐性遺伝子のマイクロアレイ法による比較解析」

① 研究目的

ヒトおよび食用動物由来の薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を分類し、迅速に薬剤耐性遺伝子が、検出が可能であるかどうかを検討する。さらに、マイクロアレイ法の実用化と薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路を明らかにする。

② 研究方法

各薬剤耐性遺伝子 (アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子：表1) をコードするオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて食用動物由来の大腸菌、サルモネラ菌、腸球菌およびカンピロバクターの多剤耐性株がコードする耐性遺伝子の型別を行った。

③ 研究の成果

大腸菌がコードする AMP 耐性遺伝子は *blaROB-1*、*blaTEM-10* あるいは *blafos-3* タイプ別出来た。TC 耐性遺伝子は *tetA*、*tetB* および *tetC2* に、SSMX 耐性遺伝子は *sul2* タイプに、TMP 耐性遺伝子はおよび *dfr12* タイプに分類できた。CP 耐性遺伝子は *cmlA* あるいは *PP-cat* タイプであった。SM および KM 耐性遺伝子は 1 から 3 種類の遺伝子とハイブリダイズした。

サルモネラ菌由来の AMP 耐性遺伝子は大腸菌と同じ *blaROB-1*、*blaTEM-10* あるいは *blafos-3* タイプであった。TC 耐性遺伝子は *tetC2* あるいは *tetAJ* に分類された。SA 耐性遺伝子は *sul2*、TMP 耐性遺伝子は *dfr14* および *dfr1b* タイプに属した。QN 耐性遺伝子は *qepA* および *qnrA* タイプに属した。SM および KM 耐性遺伝子は、大腸菌の耐性遺伝子と同様に 1 から 3 種類の遺伝子とハイブリダイズした。

腸球菌の CP 耐性遺伝子は *CmlB* あるいは *cat-TC* に、QN 耐性遺伝子は *qnrA* あるいは *qepA* に、TC 耐性遺伝子は *tetL*、*tetM1* あるいは *tetM2* タイプに属した。バンコマイシン耐性遺伝子は *vanA*、*vanB* および *vanZ* タイプであった。EM 耐性遺伝子は *ermB* あるいは *ImrB* タイプに、KM 耐性遺伝子は *aac(6)-lib* あるいは *aad-sta* タイプに属した。

カンピロバクターの全株は、TC 耐性であった。さらに SM 耐性と QN 耐性が付加したのも若干検出された。TC 耐性遺伝子は *tetO* タイプがほとんどであるが、さらに *tetM*、*tetB* あるいは *tetD2* タイプの遺伝子の両方を有するものもあった。また、*tetC2* タイプに属するも

のもあった。QN 耐性遺伝子は *qnrA* と *qepA* の 2 種類のタイプを有する。

4) 3 年間の研究成果のまとめ

「研究課題：食用動物からヒトに至る薬剤耐性遺伝子の伝播の解明と評価手法の開発」

1 研究全体の成果

①全体の研究目的

種々の抗菌剤の使用により、多剤耐性菌の出現し、抗菌剤による治療を益々困難にしている。細菌感染症の治療の際に、いずれの抗菌剤が最も有効であるかを迅速に確認する必要がある。従来の薬剤感受性試験による感染菌の薬剤耐性を調べる方法より迅速で、しかも労力があまり必要としない方法の開発が求められている。今回のプロジェクトの第一の目的は、薬剤耐性遺伝子を迅速に見つける手法の開発である。199 種類の薬剤耐性遺伝子が既に見付かっている。そこでこれらの薬剤耐性遺伝子の特異的な塩基配列を見つけ、この特異的な塩基配列遺伝子 DNA をスライドグラスにスポットし、薬剤耐性遺伝子検出用オリゴヌクレオチドマイクロアレイ作製する。次いで、第二の目的は、作製した薬剤耐性遺伝子検出用オリゴヌクレオチドマイクロアレイが、ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌、食品の生産・流通段階における汚染菌や食中毒菌の薬剤耐性遺伝子を迅速に解析できるかどうかを検討する。第三の目的は薬剤耐性菌の増加を少しでも食い止めるために、病原細菌がコードする薬剤耐性遺伝子の構造解析と細菌間における薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路を明らかにする。

②全体の研究方法

平成 19 年および 20 年度に薬剤耐性遺伝子を検出するオリゴヌクレオチドマイクロアレイを各耐性遺伝子がコードする特異的な塩基配列を参考に作製した。平成 21 年度に新しい薬剤耐性遺伝子を加えて 199 種類の薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子：別表）についてマイクロアレイを作製した。

次いで、ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌、食品の生産・流通段階における汚染菌(大腸菌、サルモネラ菌、腸球菌、カンピロバクターおよび魚介類の病原菌、*Vibrio* sp.)を集めた。これらの細菌より薬剤耐性株を選択し、薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を今回作製したマイクロアレイを用

いて型別を行った。

次に、薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路を明らかにすることと新しい構造を有する薬剤耐性遺伝子を見つけるため、細菌および R プラスミドがコードする薬剤耐性遺伝子の構造解析を行った。

③研究の成果

1 研究全体の成果

1. 199 種類の薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子：表 1）について各耐性遺伝子を有するオリゴヌクレオチドマイクロアレイを作製した。
2. ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌、食品の生産・流通段階における汚染菌（大腸菌、サルモネラ菌、腸球菌、カンピロバクターおよび魚介類の病原菌、*Vibrio* sp.由来の薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を分類し、さらに、迅速に薬剤耐性遺伝子が、検出が可能になった。
3. 魚類病原菌（*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*、*Lactococcus garvieae*）由来の薬剤耐性遺伝子（薬剤耐性 R プラスミド）構造解析を行った。薬剤耐性菌薬剤耐性遺伝子の伝播経路については、大腸菌、サルモネラ菌、腸球菌、カンピロバクターおよび *Vibrio* sp. がコードする各耐性遺伝子は、同一の菌種において同じ構造しているのが、多く認められた。同一菌種内で同じ構造を有する耐性遺伝子が拡散していることが推察できた。菌種が異なると薬剤耐性マーカーが同じでも耐性遺伝子のタイプは異なった。

2 各分担研究者（分担課題）の成果

1) 青木 宙・廣野 育生・近藤 秀裕（東京海洋大学）

「分担課題：薬剤耐性遺伝子検出用オリゴヌクレオチドマイクロアレイ作製と養殖魚介類の病原細菌および食用魚介類から分離された薬剤耐性遺伝子について」

199 種類の薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子：別表）について各耐性遺伝子がコードする特異的な塩基配列を参考にマイクロアレイを作製した。今回開発したオリゴヌクレオチドマイクロアレイが魚介類の病原微生物および食用魚介類の薬剤耐性遺伝子の型別および薬剤耐性遺伝子の

迅速検出法として有効であることを立証した。さらに、魚介類の病原細菌の薬剤耐性株から検出された R プラスミドの構造解析を行い、コードする遺伝子の由来（起源）を検討した。

2) 田村 豊（酪農学園大学獣医学部）

「分担課題：食肉由来薬剤耐性菌における DNA マイクロアレイ法の実用化」

薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路を明らかにする手法としての DNA マイクロアレイ法を実用化するため、これまで収集してきた野生動物由来薬剤耐性菌およびヒトとの距離が近い野生動物として動物園動物由来薬剤耐性菌を使用し、DNA マイクロアレイ法が薬剤耐性菌の食品から人への伝播に関するリスク評価技術になりうるかを明らかにした。

3) 花木 秀明（北里大学北里研究所）

「分担課題：ヒト由来耐性菌から分離された耐性菌の分子疫学手法を用いた薬剤耐性遺伝子の解析」

腸球菌（*Enterococcus*）のバンコマイシン耐性遺伝子の PCR による検出法を確立した。ヒトおよび食用動物由来の薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を分類し、迅速に薬剤耐性遺伝子が、検出が可能であるかどうかを検討し、各薬剤耐性遺伝子（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子）（表 1 および 2）をコードするオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて食用動物由来の大腸菌、サルモネラ菌、腸球菌およびカンピロバクターの多剤耐性株がコードする耐性遺伝子の型別を行った。

④今後のリスク評価への貢献、リスク評価との関係

家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌、食品の生産・流通段階における汚染菌における薬剤耐性菌の増加は、ヒトの細菌感染症の抗菌剤による治療にも多大なる影響を与えている。今回、この研究プロジェクトが開発した薬剤耐性遺伝子検出用オリゴヌクレオチドマイクロアレイは、迅速に耐性菌を検出することができるので、ヒトの細菌感染症の治療に使用する抗菌剤の選定におおいに役立つものと思われる。

（2）本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

- 1) Kim MJ, Hirano I, Kurokawa K, Maki T, Hawke J, Kondo H, Santos MD and Aoki T (2008)
Complete DNA sequence analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R

plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates collected in Japan and the United State. Antimicrob. Agents Chemoth. 52: 606-11.

- 2) Maki T, Santos MD, Kondo H, Hirono I and Aoki T (2009) A transferable 20-kilobase multiple drug resistance-conferring R plasmid (pKL0018) from a fish pathogen (*Lactococcus garvieae*) is highly homologous to a conjugative multiple drug resistance-conferring Enterococcal plasmid. Appl. Environ. Microbiol. 75: 3370-2.

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

3 今後の問題点等

研究の結果、得られた成果の中で健康危害情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報）として食品安全委員会事務局に報告すべきものはない。3年間の研究により、薬剤耐性遺伝子の検出用オリゴヌクレオチドマイクロアレイを開発することができた。このマイクロアレイを用いることにより、ヒト、家畜等の食用動物および魚介類の病原細菌、食用動物の飼育施設（養殖場）に生息する細菌、食品の生産・流通段階における汚染菌や食中毒細菌由来の薬剤耐性株がコードする耐性遺伝子を分類し、さらに、迅速に薬剤耐性遺伝子が、検出が可能になった。今回オリゴヌクレオチドマイクロアレイにスポットした薬剤耐性遺伝子は、既報の199種類であった（アンピシリン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フロルフェニコール、フォスホマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メチシリン、キノロン酸、サルファ剤、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリム耐性遺伝子）。今回、表現系で耐性を示しながら、このマイクロアレイで検出できない新しい耐性遺伝子もあった。さらに、アミノ配糖体系のカナマイシンやストレプトマイシンの耐性遺伝子の塩基配列が類似しているため、一つの遺伝子に絞ることが難しかった。今後、改良を加え、より精度の高いマイクロアレイの開発して行く予定である。

薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播経路については、同じ菌種内で同一の薬剤耐性遺伝子が検出され、拡散していることが、推察できた。しかし、菌種間の薬剤耐性遺伝子の伝播経路については、今後より詳細に薬剤耐性遺伝子領域あるいはRプラスミドの遺伝子構造解析を進めることが、必要と思われた。

表 1. オリゴヌクレオチドマイクロアレイ上の遺伝子

薬剤 (遺伝子数)	耐性遺伝子名
アンピシリン (16)	<i>ampC</i> , <i>bla</i> , <i>bla1</i> , <i>bla2</i> , <i>blages-1</i> , <i>bla-oxa1</i> , <i>blaVIM-2</i> , <i>blaIMP-8</i> , <i>blaFox-3</i> , <i>blaSHV-6</i> , <i>blaROB-1</i> , <i>blaPes-1</i> , <i>bla-oxa-35</i> , <i>oxa-1</i> , <i>cam1</i> , <i>blaTEM-10</i>
バンコマイシン (9)	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>vanC2</i> , <i>vanD</i> , <i>vanD2</i> , <i>vanE</i> , <i>vanG</i> , <i>vanZ</i>
クロラムフェニコール (25)	<i>catI</i> , <i>catII</i> , <i>catIII</i> , <i>catIV</i> , <i>cat86</i> , <i>cmxA</i> , <i>cat</i> , <i>cat</i> , <i>cat</i> , <i>catB1</i> , <i>catB2</i> , <i>catB5</i> , <i>catB7</i> , <i>catB9</i> , <i>catB</i> , <i>catC</i> , <i>catC</i> , <i>catD</i> , <i>catQ</i> , <i>catS</i> , <i>cat-TC</i> , <i>cmlA</i> , <i>cmlB</i> , <i>cmlV</i> , <i>cmrA</i>
エリスロマイシン (13)	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermCd</i> , <i>ermGT</i> , <i>ermM</i> , <i>ermML</i> , <i>ermQ</i> , <i>ermTR</i> , <i>ereA</i> , <i>ereB</i> , <i>mefE</i> , <i>msrB</i> , <i>mefA</i>
フロルフェニコール (5)	<i>fexA</i> , <i>flor</i> , <i>flor</i> , <i>flor</i> , <i>PP-cat</i>
フォスホマイシン (4)	<i>fosA</i> , <i>fosB</i> , <i>fosC</i> , <i>fosD</i>
カナマイシン (14)	<i>aac(3)-IIIa</i> , <i>aac(3)-IIIb</i> , <i>aac(3)-IIIc</i> , <i>aac(3)-IVa</i> , <i>aphD</i> , <i>aac(3)-Ia</i> , <i>aph1</i> , <i>aph(3')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aph(3')-VIIa</i> , <i>aph(3')-VIIa</i> , <i>aphA6</i> , <i>aphA</i>
リンコマイシン (6)	<i>linA</i> , <i>linB</i> , <i>linF</i> , <i>lmrA</i> , <i>lmrB</i> , <i>lnu(C)</i>
メチシリン (4)	<i>mecA</i> , <i>mecRI</i> , <i>mecI</i> , <i>mecRI_delta</i>
キノロン酸 (6)	<i>qnrA</i> , <i>qnrB1</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrB3</i> , <i>qnrS1</i> , <i>qnrS2</i>
サルファ剤 (3)	<i>sul I</i> , <i>sul II</i> , <i>sul III</i>
ストレプトマイシン (15)	<i>aadA1</i> , <i>aadA4</i> , <i>aadD</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadA11b</i> , <i>aadB</i> , <i>aadE</i> , <i>aad_sta</i> , <i>ant</i> , <i>sph</i> , <i>strU</i> , <i>strV</i> , <i>strW</i> , <i>strW</i> , <i>strX</i>
テトラサイクリン (32)	<i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC1</i> , <i>tetC2</i> , <i>tetD1</i> , <i>tetD2</i> , <i>tetE1</i> , <i>tetE2</i> , <i>tetG1</i> , <i>tetG2</i> , <i>tetH</i> , <i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM1</i> , <i>tetM2</i> , <i>tetO</i> , <i>tetP</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetS</i> , <i>tetT</i> , <i>tetV</i> , <i>tetW</i> , <i>tetX2</i> , <i>tetX3</i> , <i>tetY</i> , <i>tetAJ</i> , <i>tet31</i> , <i>tet(33)</i> , <i>tet34</i> , <i>tet37</i> , <i>tet39</i> , <i>tet347</i>
トリメトプリム (25)	<i>dfrI</i> , <i>dfrI</i> , <i>dfrIIa</i> , <i>dfrIIb</i> , <i>dfrIIc</i> , <i>dfrIId</i> , <i>dfrIII</i> , <i>dfrIIIb</i> , <i>dfrV</i> , <i>dfrVI</i> , <i>dfrVII</i> , <i>dfrVIII</i> , <i>dfrIX</i> , <i>dfrX</i> , <i>dfrXII</i> , <i>dfrXIV</i> , <i>dfrXV</i> , <i>dfrXVI</i> , <i>dfrXVII</i> , <i>dfrXVIII</i> , <i>dfrXX</i> , <i>dfrXXI</i> , <i>dfrXXIII</i> , <i>dfrB</i> , <i>tmpR</i>
アミノグリコシド系 (22)	<i>aac(6)_29a</i> , <i>aac(6)_Ilmq</i> , <i>aac(6)_Ig</i> , <i>aac(6)_Iy</i> , <i>aac(6)_If</i> , <i>aac(6)_Iw</i> , <i>aac(6)_Ia</i> , <i>aac(6)_Ir</i> , <i>aac(6)_Ih</i> , <i>aac(6)_Iz</i> , <i>aac(6)_Ik</i> , <i>aac(6)_Lib</i> , <i>aac(6)_Ib</i> , <i>aac(6)_Isux</i> , <i>aac(6)_Ii</i> , <i>aac(6)_Iad</i> , <i>aac(6)_Ie</i> , <i>aac(6)_Iv</i> , <i>aac(6)_Ic</i> , <i>aac(6)_It</i> , <i>aac(6)_Ij</i> , <i>aac(6)_liac</i>