

- determination of MICs of oximino-type expanded-spectrum cepheems for *Proteus vulgaris*. *J Clin Microbiol* 38:677-81.
- 68: Okamoto, H., S. Miyazaki, K. Tateda, Y. Ishii, and K. Yamaguchi. 2000. Comparative in vitro activity of telithromycin (HMR 3647), three macrolides, amoxicillin, cefdinir and levofloxacin against gram-positive clinical isolates in Japan. *J Antimicrob Chemother* 46:797-802.
- 69: Tateda, K., Y. Ishii, T. Matsumoto, T. Kobayashi, S. Miyazaki, and K. Yamaguchi. 2000. Potential of macrolide antibiotics to inhibit protein synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*: suppression of virulence factors and stress response. *J Infect Chemother* 6:1-7.
- 70: Rossi, J., Bichoff, M., Wada, A., Berger-Bächi, B. MsrR, a novel cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus sarA* attenuation. submitted.
- 71: Wada, A. An improved method for purifying bacterial genomic DNAs for direct sequencing by capillary automated sequencer. Technical Tips on Line. <http://research.bmn.com/tto> (2001) 1:T02049.
- 72: Bischoff, M., Roos, M., Putnik, J., Wada, A., Glanzmann, P., Giachino, P., Vaudaux, P., Berger-Bächi, B. Involvement of multiple genetic loci in *Staphylococcus aureus* teicoplanin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* (2001) 194:77-82.
- 73: Brandenberger, M., Tschierske, M., Giachino, P., Wada, A., Berger-Bächi, B. Inactivation of a novel three-cistronic operon *tcaR-tcaA-tcaB* increases teicoplanin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta* (2000) 1523:135-139.
- 74: Ikebe, T., Wada, A., Inagaki, Y., Sugama, K., et al. Dissemination of the phage-associated novel superantigen gene *speL* in recent invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* M3/T3 isolates in Japan. *Infect. Immun.* (2002) 70:3227-3233.
- 75: Okada, C., Kura, F., Wada, A., Inagawa, H., Lee, G.-H., Matsushita, H. Cross-reactivity and sensitivity of two Legionella urinary antigen kits, Biotest EIA and Binax NOW, to extracted antigens from various serogroups of *L. pneumophila* and other *Legionella* species. *Microbiol. Immunol.* (2002) 46:51-54.
- 76: Arai, S., Konda, T., Wada, A., Matsunaga, Y., Nobuhiko, O., Watanabe, H., Inouye, S. Use of antiserum-coated latex particles for serotyping *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.* (2001) 45:159-162.
- 77: Rändegger, C., Keller, A., Irla, M., Wada, A., Haechler, H. Contribution of Natural Amino Acid Substitutions in SHV extended-spectrum beta-Lactamases to resistance against various beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) 44:2759-2763.
- 78: R. Osawa, S. Iyoda, S. Nakayama, A. Wada, S. Yamai, H. Watanabe. Genotypic variations of Shiga toxin-converting

phages from enterohaemorrhagic  
*Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J. Med.*  
*Microbiol.* (2000) 49:565- 574.

その他研究成果は各班員の報告書の中に  
記載

## G. 知的所有権の出願・登録状況

### I. 特許取得

#### 1. 特許申請中

名称：グラム陰性桿菌の 16S rRNA メチ  
ラーゼの遺伝子

#### 2. 特許取得

名称：アンピシリン耐性インフルエン  
ザ菌の検出法及びそのキット

出願番号：特許平 11-155399

特許公開：2000 年 12 月

#### 2. 実用新案登録、その他

なし

## II. 総括研究報告書（平成14年度）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

14年度 総括研究報告書

新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究

主任研究者 池 康嘉（群馬大学医学部微生物学教室）

**研究要旨** 本年度はこれまでの研究で開発してきた、薬剤耐性菌の検出方法の実用に向けた研究と、新型の薬剤耐性菌の発見、及びそれらの基礎的研究が行われた。[荒川] アミノ配糖体抗生物質アルベカシン（ABK）高度耐性（MIC 1,000  $\mu\text{g/ml}$ <）緑膿菌から新たな ABK 不活化酵素 MargrA (multiple aminoglycoside resistance gene A) を発見した。[池] 臨床分離 VRE (*E. faecium*) から新型の高頻度接合伝達性プラスミドを分離し、このプラスミドが VRE を含む *E. faecium* で一般的に存在することを示した。[井上] 各種グラム陰性菌には染色体上に ClassC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ構造性遺伝子 *ampC* が存在する。*ampC* は、調節遺伝子 *ampD* と *ampR* によりそれぞれ調節されている。*ampD* 変異により、AmpC 生産量が増加し、各種セフェム系薬剤に耐性となることが解った。[生方] 肺炎球菌とインフルエンザ菌において、 $\beta$ -ラクタマーゼ非生産で PBP の変異による  $\beta$ -ラクタム剤耐性菌が問題となっている。colony PCR 法により、24 時間以内に起炎菌の薬剤耐性機構を調べ、治療薬を決定する方法を開発した。[後藤] 緑膿菌の多剤排出システムが関与する抗菌薬耐性機構を臨床分離株および実験室株を用いて調べ、さらに抗菌薬耐性克服のための排出システム阻害薬の創製を目指して、マルチコンポーネント型多剤排出システムの基質認識機構の研究を行った。[中江] 緑膿菌のマルチコンポーネントシステム（複合蛋白構成）の排出ポンプの基質認識機構の研究を行った。[堀田] MRSA の 8 種類のアミノグリコシドの不活化酵素をコロニーから検出するための Multiplex Colony Direct PCR (CD-PCR) 方法を開発した。[山口] カルバペネム耐性は、一般的にメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼによる。この酵素の生産がなく、AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼによるカルバペネム不活化を見つけた。[山本] フルオキノロンは臨床で最も繁用されているニューキノロン薬である。2000 年 4 月～2001 年 3 月に分離された臨床分離株（グラム陽性菌 331 株、陰性菌 430 株）のニューキノロン耐性を調べた。*P. mirabilis* のニューキノロン高度耐性には GyrB の変異が寄与する可能性が示唆された。[和田] 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性に関連

する遺伝子を研究した。[渡邊] 無芽胞性嫌気性グラム陰性桿菌の中で、*Fusobacterium* は分離が困難とされている。*Fusobacterium nucleatum* 50 株を寒天平板希釈法により、各種薬剤耐性を調べた。

#### 分担研究者（五十音順）

荒川宜親	国立感染症研究所	部長
井上松久	北里大学医学部	教授
生方公子	北里大学 北里生命科学研究所	教授
後藤直正	京都薬科大学薬学部	助教授
中江太治	東海大学医学部	教授
堀田国元	国立感染症研究所	室長
山口恵三	東邦大学医学部	教授
山本友子	千葉大学薬学部	教授
和田昭仁	国立感染症研究所	室長
渡邊邦友	岐阜大学医学部	教授

#### A. 研究目的

高度先進医療の発展に伴い、病院の入院患者はより重度の基礎疾患を持つ易感染者が増加し、院内感染の危険性が高まる。院内感染原因菌の多くは各種の薬剤に耐性を獲得した多剤薬剤耐性菌である。各種の抗菌剤の使用により常に新たな薬剤耐性菌が出現し、その種類も多様化している。そしてその感染症に対して現存する抗菌剤では治療不可能な耐性菌が出現している。薬剤耐性菌の防御対策は国家及び世界的規模で取り組まなければならないとされている。その対策には 1) 薬剤耐性菌感染症の調査、2) 薬剤耐性菌の研究、3) 新薬の開発、が不可欠な対策として含まれる。我が国において厚生労働省

の事業として「薬剤耐性菌感染症サーベイランス事業」が平成 12 年度から開始された。そして「薬剤耐性菌の研究」に対応するものとして本研究課題が平成 12 年度より新規に開始された。本研究では常に変異し、出現してくる新型の薬剤耐性菌の耐性機構及び拡散機構を研究し、それらの迅速検出方法を研究開発することを目的とする。

臨床分離される薬剤耐性菌は多種多様であり、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）や拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ（ESBL）産生菌、メタロ $\beta$ -ラクタマーゼなど、多くの薬剤耐性菌において、検査室における日常の試験・検査業務の中での判定が困難な事例が多数存在するため、そのような菌株について、分子・遺伝子レベルで詳しい試験や判定を行い、薬剤耐性菌の防御対策及びサーベイランス事業の精度を保証することを目的とする。さらに、新たに出現する耐性菌についての分子・遺伝子レベルでの解析を実施することで、それらを検出したり識別する新しい検査・検出法の開発を目的とする。

#### B. 研究方法

7. 薬剤耐性検査、NCCLS 法に基づく寒天平板希釈方法及び微量液体方法を用いた。
8. PCR 法を用いた各種薬剤耐性遺伝

子の解析と、新たな薬剤体制遺伝子の検出。

9. 遺伝子塩基配列の決定。
10. 薬剤耐性遺伝子のクローニングと遺伝子構造解析。
11. 遺伝学的変異株の分離と遺伝子発現機構の解析。
12. 免疫化学的方法を用いて、耐性発現蛋白の機能を解析。

### C. 研究結果

荒川 宜親

アミノ配糖体のアルベカシン (ABK) は MRSA 感染症治療薬とされている。ABK 耐性菌はこれまでアセチル化/リン酸化 2 機能酵素によるものが報告されている。ABK 高度耐性 (MIC 1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) 緑膿菌から新たな ABK 不活化酵素 MargrA (multiple aminoglycoside resistance gene A) を発見した。この酵素は、アミノ配糖体抗生物質生産放線菌の生産する 16srRNA メチラーゼ遺伝子と近縁のものであり、実際の機構も同様であった。

池 康嘉

日本の臨床分離 *E. faecium* から、世界で初めて分離されたゲンタマイシン耐性接合伝達性プラスミド pMG1 (65.1 kb) と同様のプラスミドを、米国で分離されたゲンタマイシン耐性 VRE 492 株中の 261 株 (53%) が保持していることが解った。

井上 松久

各種グラム陰性菌には染色体上に ClassC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ構造遺伝子 *ampC* が存在する *ampC* は、調節遺伝子 *ampD* と *ampR* によりそれぞれ調節されている。*ampD* 変異により、AmpC 生産量が増加し、各種セフェム系薬剤に耐性となることが解った。

生方 公子

肺炎球菌とインフルエンザ菌において、 $\beta$ -ラクタマーゼ非生産で PBP の変異による  $\beta$ -ラクタム剤耐性菌が問題となっている。呼吸器感染症及び化膿性髄膜炎は迅速治療が必要なために、治療薬決定のための薬剤感受性の試験が必要である。colony PCR 法により、24 時間以内に起炎菌の薬剤耐性機構を調べ、治療薬を決定する方法を開発した。

後藤 直正

緑膿菌の多剤排出システムが関与する抗菌薬耐性機構を臨床分離株および実験室株を用いて調べ、さらに抗菌薬耐性克服のための排出システム阻害薬の創製を目指して、マルチコンポーネント (複合蛋白構成) 型多剤排出システムの基質認識機構の研究を行い、次の結果を得たキノロン薬耐性には MexAB-OprM と MexXY-OprM が、アミノ配糖体耐性には MexXY-OprM が重要な役割を担っていること、さらに MexAB-OprM と MexXY-OprM の高発現はカルバペネム薬耐性を引き起こすが、その程度は薬物間で異なることが分かった。また、MexD および MexB タンパク質の二次構造から予測されるペリプラスムループに基質認識のドメイ

ンがあることが分かった。

中江 太治

緑膿菌のマルチコンポーネントシステム（複合蛋白構成）の排出ポンプの基質認識機構の研究を行った。MexAB-OprM、MexXY-OprM 排出ポンプにおいて、膜貫通蛋白 MexB は $\beta$ -ラクタマーゼ、MexY はアミノグリコシドを排出する。これをさらに確認する目的で、*mexB*、*mexY* 遺伝子のそれぞれの膜貫通ドメインを、それぞれのドメインで置換した結果、MexY ドメインで置換された MexB は、アミノグリコシドを、MexB で置換された MexY は $\beta$ -ラクタマーゼを排出し、それぞれドメインの基質特異性を確認した。

堀田 国元

各種のアミノグリコシド不活化酵素は複数存在し、それぞれの酵素はそれぞれのアミノグリコシドを特異的に不活化する。MRSA の8種類のアミノグリコシドの不活化酵素をコロニーから検出するための Multiplex Colony Direct PCR (CD-PCR) 方法を開発した。1980年代後半から1990年代後半に分離された MRSA (230株) を、CD-PCR 方法を用いてそれぞれの不活化酵素生産株を検出した。

山口 恵三

$\beta$ -ラクタム剤のカルバペネムは *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) 感染症治療薬である。 $\beta$ -ラクタマーゼによるカルバペネム耐性は、一般的にメタロ- $\beta$ -ラク

タマーゼ *P. aeruginosa* TUM1529 株はカルバペネム耐性菌 (imipenem, MIC 32  $\mu\text{g/ml}$ ) であるが、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを生産しておらず、グラム陰性菌の染色体に一般的に存在する AmpC 型 $\beta$ -ラクタマーゼ (セリン $\beta$ -ラクタマーゼ) によるものであることが解った。

山本 友子

フルオキノロンは臨床で最も繁用されているニューキノロン薬である。2000年4月~2001年3月に分離された臨床分離株 (グラム陽性菌 331株、陰性菌 430株) のニューキノロン耐性を調べた。用いて明らかにした。*P. aeruginosa* (32%)、*S. aureus* (70%)、*S. epidermidis* (45%)、*E. faecalis* (31%) で耐性菌の増加が顕著であった。さらに *P. aeruginosa* は高度耐性菌 (Levofloxacin, MIC 64  $\mu\text{g/ml}$  ~ 512  $\mu\text{g/ml}$ ) が耐性菌全体の73%を占めていた。超高度耐性化 *Proteus mirabilis* (MIC 1024  $\mu\text{g/ml}$ ) について、耐性遺伝子を解析した結果、既知の GyrA, ParC 変異に加えて GyrB の変異 (Ser462Tyr) が共通に存在した。*P. mirabilis* のニューキノロン高度耐性には GyrB の変異が寄与する可能性が示唆された。

和田 昭仁

グリコペプチド系薬剤 (バンコマイシン、テイコブラニン) はグラム陽性菌、特に黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 感染症に対する特効薬である。*S. aureus* のテイコブラニン耐性機構の解析を行った。黄色ブドウ球菌

*S.aureus*BB255 (NCTC8325) は、テイコプラニン感受性 (MIC 3 µg/ml) である。テイコプラニン耐性株の DNA による BB255 の形質転換によるテイコプラニン耐性株 BB938 は MIC 8 µg/ml である。BB938 に BB255 の DNA 断片が導入された BB938 はテイコプラニン感受性 (MIC 3 µg/ml) となった。導入断片を解析し、BB938 のテイコプラニン感受性に影響を与えると考えられる遺伝子を同定した。

#### 渡邊 邦友

無芽胞性嫌気性グラム陰性桿菌の中で、*Fusobacterium* は分離が困難とされている。*Fusobacterium nucleatum* 50 株を寒天平板希釈法により、エリスロマイシン、テトラサイクリン、クリンダマイシン、オフレロキサシリン (OFLX)、ペニシリン系 (PC)、セフェム系 (CER) 薬剤の感受性を調べた。エリスロマイシンは自然耐性で、PC 系で 10%、CER 系で 6–10%、OFLX で 4% の耐性株が存在した。

#### D. 考察

本研究対象とした細菌はグラム陽性菌では、黄色ブドウ球菌、腸球菌、肺炎レンサ球菌、グラム陰性菌では、大腸菌を含む各種グラム陰性腸内細菌、及び緑膿菌等の各種ブドウ糖非発酵グラム陰性菌等である。薬剤耐性機構としては(1)不活化機構として、β-ラクタム剤加水分解酵素 (β-ラクタマーゼ)、アミノ糖系抗生物質修飾不活化酵素、(2)排出

機構として、緑膿菌の薬剤排出機構、(3)薬剤作用点 (作用物質) の変異または変換として、キノロン耐性、MRSA、β-ラクタム剤耐性肺炎レンサ球菌及びインフルエンザ菌、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 等で現在問題となっている菌種、耐性機構はすべてその研究対象とした。

日本はカルバペネムの使用量が世界で最も多い国である (世界の使用量の約 50%)。そのため、すべての抗生物質に効かないカルバペネム耐性緑膿菌、中でもメタロ・β-ラクタマーゼ生産緑膿菌 (多剤耐性緑膿菌) は臨床最も重要な耐性菌で、日本ではその分離頻度が世界中で最も多く、増加傾向にある。多剤耐性緑膿菌感染症治療及び院内感染対策上、メタロ・β-ラクタマーゼによるカルバペネム耐性の簡便な迅速検出方法の開発が早急に望まれていた。メタロ・β-ラクタマーゼ検出のために、昨年度までの研究で、新規に開発されたメルカプト酢酸ナトリウム (キレート剤) を利用したディスク拡散法 [荒川] は、臨床検査室で簡便に迅速にメタロ・β-ラクタマーゼを検出可能とした点で、非常に画期的で有用な方法であった。臨床分離株を用いたこの方法による検査室及び臨床検査レベルでの検査において、実用可能な状況であることが証明された。緑膿菌の高度アミノ糖 (アルベカシン) 耐性菌から発見された新型のアミノ糖不活化酵素は、これまで発見されていない機構のもので、今後これによる耐性菌が広がる可能性があり、研究を継続する必



要がある。メタロ-β-ラクタマーゼ生産菌によるカルバペネム耐性の他に、通常のβ-ラクタマーゼ (AmpC 型) の生産量の増加によるものと思われるカルバペネム耐性菌が発見され [山口]、今後この型の耐性の疫学調査等も必要と考えられる。

β-ラクタム剤耐性肺炎レンサ球菌及び、インフルエンザ菌の耐性機構の基礎的研究に基づき開発された、PCR 法を用いたこれらの耐性菌の検出方法 [生方] は、さらに臨床実用化にむけて研究が進められ、迅速検出方法として有用であることが証明された。

MRSA 感染症治療には他薬剤との併用薬剤として、アミノ糖系抗生物質が使用されることがある。MRSA のアミノ糖系抗生物質耐性菌検出のために開発された各種アミノ糖不活化酵素の PCR による検出方法は [堀田]、黄色ブドウ球菌のコロニーからこれらの各種不活化酵素 (耐性) を検出することが可能であり、臨床分離 MRSA を用いた研究においてこの方法が有用であることが実証された。

耐性菌を検出する方法開発のための基礎的耐性機構の研究として、グラム陰性菌の高度β-ラクタム剤耐性の一つである染色体性 AmpC 耐性遺伝子の調節遺伝子の研究が行われた [井上]。緑膿菌は多くの薬剤に自然耐性である。各種薬剤に対する自然耐性機構の薬剤排出機構は、まだ充分解明されていない。薬剤排出機構発現のための調節機構、及び薬剤排出機構の蛋白の機能を解明した。さ

らに、排出蛋白の排出物質相互の特異性についての研究が進められ、排出機構による耐性発現の研究に進展があった [後藤、中江]。MRSA の *in vitro* のグリコペプチド (テイコプラニン) 低感受性菌の耐性機構を解明するための遺伝学的研究がなされた [和田]。

臨床分離各種細菌のキノロン耐性の分離頻度と高度耐性機構の研究は、キノロン高度耐性の機構解明につながる [山本]。臨床分離 *Fusobacterium nucleatum* の各種抗菌剤に対する感受性 [渡邊] の研究は、耐性菌の疫学データとして有用である。

薬剤耐性を拡散させる因子として、高頻度接合伝達性プラスミドは重要な働きをしている。腸球菌 *E. faecium* は VRE の主な菌であるが、これまで高頻度接合伝達性プラスミドは知られていなかった。先に日本の臨床分離ゲンタマイシン耐性 *E. faecium* から、液体培地での高頻度接合伝達性プラスミドを分離し、報告した。今回これと同じプラスミドが、米国の VRE の約 50% を保持していることを発見し、このプラスミドは *E. faecium* に一般的に存在する重要なプラスミドであることを証明した [池]。

## E. 結論

緑膿菌におけるアミノグリコシド高度耐性機構の新たな発見は、これまでに報告のない全く新しい機構によるもので、今後疫学調査等の研究が必要となる。昨年度までの研究で、臨床上問題となる耐性菌であるメタロ-

$\beta$ -ラクタマーゼ生産菌、カルバペネム耐性菌、肺炎レンサ球菌及びインフルエンザ菌等の、 $\beta$ -ラクタム剤耐性菌の PCR 法による各種  $\beta$ -ラクタム剤耐性菌検出方法の開発、及び MRSA の各種アミノ糖耐性の PCR 法による検出方法の開発等が行われてきた。本年度はこれらの検出方法の実用化に向けた研究が、臨床分離株を用いて行われた。その他の耐性機構については、その検出方法の開発に向けた基礎的臨床的研究で、今後の検査方法の開発に必須の研究である。

#### F. 研究成果

- 1: Doi Y, Shibata N, Shibayama K, Kamachi K, Kurokawa H, Yokoyama K, Yagi T, Arakawa Y. Characterization of a novel plasmid-mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 ;46(8):2427-34
- 2: Tomita H, Pierson C, Lim SK, Clewell DB, Ike Y. Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002 ;40(9):3326-33
- 3: Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2002 ;68(12):6457-61
- 4: Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 ;45(5):1343-8
- 5: Eda S, Maseda H, Nakae T. An elegant means of self-protection in gram-negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space. *J Biol Chem* 2003; 24:278(4):2085-8
- 6: Maseda H, Kitao M, Eda S, Yoshihara E, Nakae T. A novel assembly process of the multicomponent xenobiotic efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2002;46(3):677-86
- 7: Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M, Konno M. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(6):1693-9
- 8: 生方公子、小林玲子、千葉菜穂子、長谷川恵子、紺野昌俊。  
本邦において 1998 年から 2000 年の間に

分離された *Streptococcus pneumoniae* の  
分子疫学解析—肺炎球菌等による市中感  
染症研究会収集株のまとめ—

日本化学療法学会雑誌 51(2)2003

9: 生方公子、千葉菜穂子、小林玲子、長谷  
川恵子、紺野昌俊.

本邦において 1998 年から 2000 年の間に  
分離された *Haemophilus influenzae* の  
分子疫学解析—肺炎球菌等による市中感  
染症研究会収集株のまとめ—

日本化学療法学会雑誌 50(11)2002

その他研究成果は各班員の報告書の中に  
記載

### Ⅲ. 分担研究報告書（平成14年度）

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

平成14年度分担研究報告書

新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び

迅速・簡便検出法に関する研究

—アルベカシン高度耐性緑膿菌の耐性機構の解析—

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

## 研究要旨

1997年、アルベカシン(ABK)の最小発育阻止濃度(MIC)が1,024 µg/ml以上を示す超高度耐性緑膿菌が臨床分離された(AR-2株)。AR-2株は、アミカシンやトブラマイシン、イセパマイシンなど他のAG系抗生物質にも同様に超高度耐性を示し、新規の耐性機構を獲得している可能性が示唆されたため、その耐性メカニズムの解析を行った。ABK耐性遺伝子をクローニングし解析を行ったところ、カナマイシンやゲンタマイシンなどのAgを産生する放線菌が、自らの16S rRNAをメチル化して保護するために産生する16S rRNAメチラーゼ遺伝子に近縁の遺伝子であった(*magrA*: multiple aminoglycoside resistance gene A) *MagrA*は、ABKのみならず類似の基本構造を有するカナマイシン(KM)系、ゲンタマイシン(GM)系の抗生物質全てに高度耐性(MIC, >1,024 µg/ml)を付与した。また接合実験の結果、*magrA*遺伝子は他の緑膿菌株に伝達されることから、プラスミド上に存在することが示唆された。さらにアイソトープ標識したS-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として酵素反応を行い、*MagrA*の16S rRNAメチラーゼ活性を測定した。その結果、放射活性の取り込みが認められ、*MagrA*は16S rRNAメチラーゼであることが強く示唆された。

本研究においてABK高度耐性緑膿菌より、AG産生放線菌が産生する16S rRNAメチラーゼ遺伝子と近縁の遺伝子が発見された。現在までに放線菌以外の細菌からこのような遺伝子が検出された報告例はなく、我々は全く新しいAG高度耐性メカニズムを獲得した緑膿菌が臨床現場に出現したことを世界で初めて確認した。

## 研究協力者:

横山佳子、土井洋平、山根一和、柴田尚宏、八木哲也、柴山恵吾、加藤はる(国立感染症研究所 細菌第二部)

アルベカシン(ABK)は日本で開発された半合成アミノグリコシド(AG)系抗生物質で、グラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで幅広い抗菌活性を示すことを特徴としている。日本では、1990年に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染症の治療薬として認可され、現在臨床現場で広く用いられている。

## A. 研究目的

ABK は細菌が産生するアセチル化酵素、リン酸化酵素、アデニル化酵素など種々の薬剤修飾酵素による耐性化機構を回避することを想定して創製されており、耐性菌が出現しがたい抗生物質といわれてきた。現在までに報告されている ABK 耐性菌の出現については MRSA に関して、最小発育阻止濃度 (MIC) が 12.5–25 µg/ml、即ち中等度耐性 MRSA がわずかながら出現しているという報告がある。この耐性化機構は薬剤のアセチル化とリン酸化を同時に行う二機能酵素によるものであり、ABK の 6'位のアミノ基と 2'位の水酸基が同時に修飾を受けることにより不活化される。

しかし、1997 年に ABK の MIC が 1,024 µg/ml 以上を示す超高度耐性緑膿菌が臨床分離された (AR-2 株)。AR-2 株は ABK 以外の種々の AG 系抗生物質にも超高度耐性 (MIC, >1,024 µg/ml) を示したことから、二機能酵素によるものとは異なる全く新規の耐性機構を獲得している可能性が示唆された。院内感染や術後感染の原因菌である緑膿菌でこのような株が臨床現場に広まっている可能性が考えられ、化学療法の実施において将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。本研究では AR-2 株から ABK 耐性遺伝子をクローニングし、塩基配列の決定および遺伝子産物の機能を検討した。

## B. 研究方法

### 1. ABK 耐性遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

AR-2 株から全 DNA を抽出し、*Hind*III で切断した後、大腸菌用クローニングベクターである pBC-SK+ の *Hind*III 部位にライゲーションを行った。大腸菌 XL1-Blue に形質転換後、得られた大腸菌クローンからプラスミドを回収し、自動 DNA シークエンサー (3100 Genetic Analyzer ; ABI 社) により塩基配

列を決定した。ホモロジー検索は BLAST 法を用いた。

### 2. 接合実験

ABK 耐性遺伝子がプラスミド性であるかどうかを検討するために AR-2 株 (ABK<sup>R</sup>, CPF<sup>X</sup><sup>S</sup>) をプラスミド供与株、緑膿菌 No.105 株 (ABK<sup>S</sup>, CPF<sup>X</sup><sup>R</sup>) をプラスミド受容株として接合を行った。

### 3. MIC 値の測定

各々の抗菌薬の MIC 値の測定は NCCLS 法に準じて行った。

### 4. 遺伝子産物の 16S rRNA メチラーゼ活性の測定

アイソトープ標識した S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とし、リボソームの 30S サブユニットを基質として酵素反応を行った。粗酵素液は ABK 耐性遺伝子を緑膿菌—大腸菌シャトルベクター pTO001 にサブクローニングし、緑膿菌 PAO1 に形質転換して得られたクローンより抽出したものをを用いた。

## C. 研究結果

ABK 耐性遺伝子の塩基配列を決定した結果、この遺伝子は 756 塩基、251 アミノ酸で構成されており、ホモロジー検索の結果、AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼ遺伝子と近縁であることが判明した。相同性はアミノ酸レベルで約 30% 程度であった。我々は ABK 耐性遺伝子を *magrA* (multiple aminoglycoside resistance gene A) と命名した。数種の AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼおよび *MagrA* のアミノ酸配列の比較を Fig. 3 に示す、また、それらもとに作成した dendrogram を Fig. 1 に示した。

大腸菌クローンにおける種々の AG 系抗生物質の MIC 値を測定した結果、*MagrA* は ABK のみならず類似の基本構造を有するカナマイシン (KM) 系、ゲンタマイシン (GM) 系の抗生物質すべてに高度耐

性 (MIC, >1,024 µg/ml) を付与した (Table 1)。

また接合実験において得られた接合体、AR-2 株および No.105 株の MIC 値を測定したところ、少なくともトブラマイシン (TOB)、アミカシン (AMK)、ABK、イセパマイシン (ISP) についての耐性が伝達されていることが明らかとなった (Table 1)。

MagrA の 16S rRNA メチラーゼ活性を測定した結果、MagrA を含む粗酵素抽出液を酵素溶液として用いた場合、30S サブユニットへの放射活性の取り込みが強く認められた (Fig. 2)。

#### D. 考察

今回クローニングした *magrA* 遺伝子の産物は、AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼと約 30% の相同性があり、KM 系および GM 系の抗生物質全てに高度耐性を付与した。またメチル基取り込み実験より、16S rRNA メチラーゼ活性を有することが強く示唆された。これらの結果は、*magrA* 遺伝子が、AG を産生する放線菌など何らかの細菌から由来している可能性を強く示唆するものである。つまり、細菌は、放線菌から緑膿菌というように、遺伝的に非常に大きく隔たった菌種間でさえ、遺伝子の伝達を行い、その結果、抗菌薬が多量に使用される病院環境や患者の体内で、生き延び進化する潜在的能力を示すものである。

AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼは AG の標的部位である 30S リボソームにおける 16S rRNA の特定の塩基をメチル化することにより AG の結合を妨げる作用をし、AG 産生放線菌が自己防衛手段として生来獲得している酵素である。また特徴として転写後に rRNA を修飾することが挙げられ、リボソームの立体構造の構成過程で関与する種々の RNA メチラーゼとは性質が異なる酵素であることが報告されている。このような酵素がグラム陰性菌にお

いて確認された報告例は現在のところ全くない。また接合実験結果より、この遺伝子はプラスミド上に存在し、他の緑膿菌株に伝達することが示唆された。この結果は、今後、臨床現場において AG の使用量が増加するにつれて、この *magrA* 遺伝子がグラム陰性桿菌の間に拡散し、各種のアミノグリコシドに超高度かつ多剤耐性を獲得した緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性桿菌が増加する危険性を示しており、AG の適正使用の推進とともにその動向の監視が強く臨まれる。

#### E. 結論

現在までにグラム陰性菌において、AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼと類似の酵素遺伝子が検出された報告はなく、本研究により、全く新しい AG 高度耐性メカニズムを獲得した緑膿菌が臨床現場に出現したことが世界ではじめて確認された。

院内感染症や術後感染症の原因菌である緑膿菌において、臨床現場で使用頻度が高い AG 系抗生物質全般に対し高度耐性を付与する、新規な耐性機構を獲得した臨床分離菌の出現は、化学療法実施の上で将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。また、*magrA* 遺伝子がプラスミド上に存在することから、緑膿菌間さらに他菌種、特にグラム陰性菌間における伝播拡散の危険性が強く懸念される。

#### F. 健康危険情報

我々の予備調査では 1997-2002 年度に臨床分離された緑膿菌 1,404 株中、少なくとも 11 株が *magrA* 遺伝子を保有していた (0.78%)。さらに 11 株中 9 株について、パルスフィールド電気泳動により解析を行ったところ、それらは全く異なるバンドパター

ンを示したことから、*magrA* 遺伝子がプラスミドを介して異なる緑膿菌株間に接合伝播し、拡散しつつある可能性が強く示唆された。本遺伝子を保有している緑膿菌は、現在臨床現場で用いられている多種類の AG 系抗生物質に耐性を与えるため、临床上極めて危険性が高い。薬剤耐性菌サーベイランス事業などの中で、16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有緑膿菌の分離状況、他菌種への同遺伝子の伝播状況の把握を検討項目として付け加える必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kurosaki H, Yasuzawa H, Yamaguchi Y, Jin W, Arakawa Y, Goto M. Detection of a metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1) by fluorescent probes having dansyl and thiol group. *Org Biomol Chem.* 2003 (1):17-20.

2. Goto M, Yasuzawa H, Higashi T, Yamaguchi Y, Kawanami A, Mifune S, Mori H, Nakayama H, Harada K, Arakawa Y. Dependence of hydrolysis of  $\beta$ -lactamase with a Zinc(II)- $\beta$ -lactamase production from *Serratia marcescens* (IMP-1) on pH and concentration of Zinc(II) Ion: Dissociation of Zn(II) from IMP-1 in acidic medium. *Biol. Pharm. Bull.* 2003 May;26(5): inpress

### 2. 学会発表

1. 山根一和、土井洋平、八木哲也、柴田尚宏、加藤はる、荒川宜親:アルベカシン高度耐性緑膿菌から分離された 16S rRNA メチル化酵素遺伝子の周辺構造の解析、第 51 回日本感染症学会東日本地方会、宮城、10 月、2002 年

2. Y. Doi, K. Yokoyama, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T.Yagi, Y. Arakawa: Prevalence of putative 16S rRNA methylase gene conferring consistent resistance to all aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan. American Society for Microbiology 102nd General Meeting Salt Lake City, USA, May, 2002

3. 横山佳子、土井洋平、柴田尚宏、黒川博史、山根一和、八木哲也、柴山恵吾、加藤はる、荒川宜親:アルベカシン高度耐性緑膿菌から新規に発見されたプラスミド性 16S rRNA メチル化酵素、第 75 回日本細菌学会総会、横浜、4 月、2002 年

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許申請中

(発明の名称)グラム陰性桿菌の 16S rRNA メチラーゼの遺伝子

### 2. 実用新案登録、その他

なし



Table 1. AR-2、大腸菌クローンおよび接合体における各種AG系抗生物質のMIC値

	MIC (μg/ml)									
	KM系				GM系					
	KM	TOB	AMK	ABK	GM	SISO	ISP	NEO	SM	HYG-B
<i>P.aeruginosa</i> AR-2	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	128	1024
pBCH9 / XL1-Blue	>1024	256	>1024	>1024	>1024	512	>1024	4	4	64
pBCH913 / XL1-Blue	>1024	512	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	2	2	32
pBC / XL1-Blue	2	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	4	4	32
XL1-Blue	2	1	4	0.5	0.5	0.5	0.25	4	4	32
AR-2/105 conjugant	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
<i>P. aeruginosa</i> 105	>1024	256	4	4	>1024	>1024	8	>1024	>1024	512

pBCH9/XL1-Blue: 約7kbの断片を有するクローン pBCH913/XL1-Blue: 塩基配列決定に用いたクローン  
 KM: カナマイシン、TOB: トブラマイシン、AMK: アミカシン、ABK: アルベカシン GM: ゲンタマイシン、  
 SISO: シソマイシン、ISP: イセパマイシン、NEO: ネオマイシン SM: ストレプトマイシン、HYG-B: ハイグロマイシン  
*P.aeruginosa* 105: recipient strain

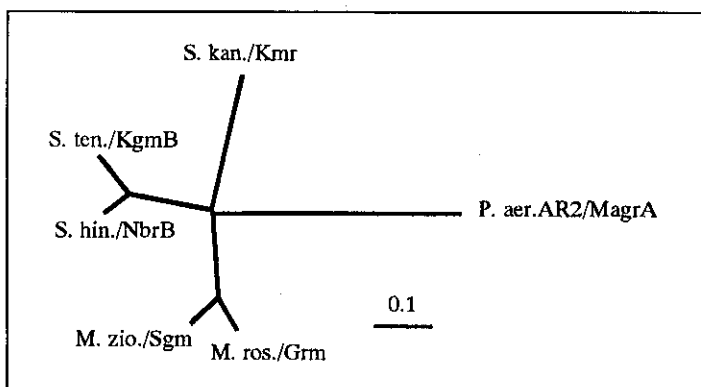


Fig.1 放線菌の16S rRNAメチラーゼおよびMagrAのアミノ酸配列をもとに作成したデンドログラム

Fig.2 30Sサブユニットへのメチル基取り込み活性

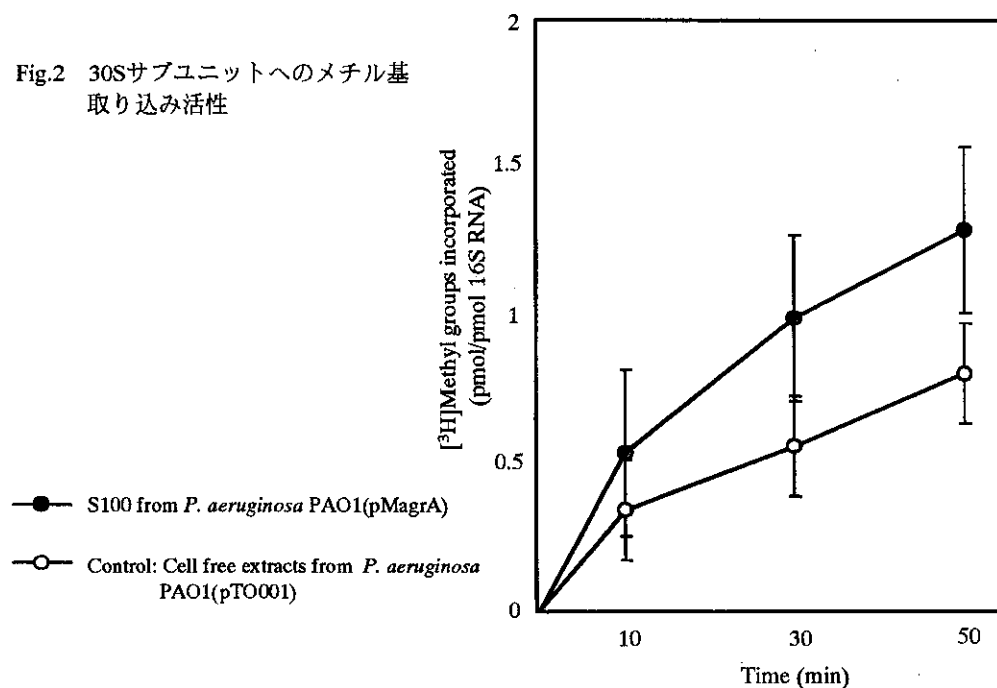


Fig. 3 MagrA と放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼのアミノ酸配列の比較検討

P. aer. AR-2/MagrA	-----MSFDDALASILSSKKYRSLCPDVTVRRILDQEWGRHKSPLAVEATR	46
M. ros. /Grm	---MT-TSTGD--D-RIDQLQQAITSRRYQTVAPATVRRRLARAALVASRGDVPDAV-KR	52
M. zio. /Sgm	---MT-APAAD--D-RIDEIERAITSRRYQTVAPATVRRRLARAALVAARGDVPDAV-KR	52
S. hin. /NbrB	MHPA-PGPADAEDPRLAEVMAAVRSSRRYQSVAPETVRRRLAANALVASRGDLAEAV-KR	58
S. kan. /Kmr	----MSQSASDE-DPKLTRVVEAVRGRRYSVTDQAVRRLARAALAVEGGDVTRAT-KR	54
S. ten. /KgmB	MHPA-PGPGDPEDPRLAEVVDVAVRSSRRYQSVAPETVRRRLATSALVASRGDLAEAV-KR	58
	. . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . *	
P. aer. AR-2/MagrA	TR--LHGICGAYV--TPES---L-KAAAAALSVGDVQ--KA--LSLHA-----STKERLAE	90
M. ros. /Grm	TKRGLHEIYGAFLLPPSAPNYTALLRHLDLSDAVEAGDDEAVVRWD-RRAMSVHMSTRERLPH	111
M. zio. /Sgm	TKRGLHEIYGAFLLPPSPPNYAALLRHLDLSDAVDAGDDEAV-RAALLRAMSVHISTRERLPH	111
S. hin. /NbrB	TKRSLHEVFGAYLPSPP-KYDALLRQLRDAVDAGDDEAVRAVLHRAMSTHAST-RERLPI	116
S. kan. /Kmr	TKRGLHEVFGAFMPMPK-YEALLRDVPEALELDDPEAIRTAAL-KPALGAHSSTRERLPI	112
S. ten. /KgmB	TKRGLHEIYGAYLPSPP-KYDALLRQLRGAVDAATTRPCGHPAPRHVHARLHP-RA-LPI	115
	* . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	
P. aer. AR-2/MagrA	LDCLYDFIFSGGVPHRVL--DIACGLNPLAL-FIRDITS-V-W-ACDIHQGLGDVITPFA	144
M. ros. /Grm	LDEFYREIFRHVPRPNTL-RDLACGLNPLAVPWM-GLSDETVYVASDIDARLMDVFVGAAL	169
M. zio. /Sgm	LDEFYRELFRHLRPRPNTL-RDLACGLNPLAAPWM-GLPAETVYIASDIDARLVGFVDEAL	169
S. hin. /NbrB	LEEFYREVFAFLDAPTSV-RDLACGMNPLAAPWM-PGSDAFTYHASDIDTRLTEFLAAAL	174
S. kan. /Kmr	LTEMAYEVFDRDLTAPATVRDLACGMNPLVTPWM-PLPAGTTYLASDIDHRLMDFAGTVL	171
S. ten. /KgmB	LDEFYREVFAFCADPASV-RDLACGMNPLAAPWM-PGSDAFTYHASDIDTRLMEFLDAAL	173
	* . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	
P. aer. AR-2/MagrA	HHQGLDFTFALQDVMCTPPTETGDLALVF-KLLPLLEREQAGAAMALLQALATPRIAVSF	203
M. ros. /Grm	TRLGVAHRVSVVDLLEARLDEP-ADVTLKTLPCLETQQRGSGWEVIDIVNSPIIVVTF	228
M. zio. /Sgm	TRLNVPHRTNVADLLEDRLDEP-ADVTLKTLPCLETQQRGSGWEVIDIVNSPNIVVTF	228
S. hin. /NbrB	ETLGVADHVRVRLDLMGTGVG-EVATDVTLLKTLPCIEAQGRGQGWLDLIDAIRSPVVVVSF	233
S. kan. /Kmr	TALGVPNRVEVRDLDLDPDEPAD-VTFLFKAVPCLEAQGKGLGWKLLDQINSPVLVVSF	230
S. ten. /KgmB	ETLGVADHVRVRLDLMGTGVG-EVETDVTLLKTVPCIEAQGRGQGWLDLIDAIRSPLVVVSF	232
	. . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	
P. aer. AR-2/MagrA	PTRSLGGRGKGMENYSAWFEGALPDE-FEIEDTKTIGIELVYMIKRNK	251
M. ros. /Grm	PTKSLGQRSGKGMFQNYQSFSQASERSCRIQRLEI-GNELIYVIHK--	274
M. zio. /Sgm	PTKSLGQRSGKGMFQNYQSFSQARERSCRIQRLEI-GNELIYVIQK--	274
S. hin. /NbrB	PTKSLGQRSGKGMFNTYSANFGAWLENRPHDVEQVEF-RNELVYFVRKNA	281
S. kan. /Kmr	PTKTLGRRSRGMYQTHSAEFARRVAERPWCDEIEF-GDELVYVVTKG-	277
S. ten. /KgmB	PTKSLGQRSGKGMFNTYSANFDWLENRPHDVEQLEF-RNELVYFVRKNA	280
	** . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

バンコマイシン耐性腸球菌（vancomycin resistant enterococci, VRE）の  
新型の高頻度接合伝達性プラスミドと薬剤耐性の拡散

主任研究者 池 康嘉<sup>1, 2</sup>

研究協力者 谷本弘一<sup>1</sup>、藤本修平<sup>1</sup>、富田治芳<sup>1</sup>、野村隆浩<sup>1</sup>、林 淑璟<sup>3</sup>、麻 興華<sup>3</sup>

群馬大学医学部微生物学教室<sup>1</sup>、同 薬剤耐性菌実験施設<sup>2</sup>、  
(財)ヒューマンサイエンス振興財団<sup>3</sup>

**研究要旨** 1994年～1999年間の米国ミシガン大学病院の臨床分離バンコマイシン耐性 *E. faecium* 菌 (Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*, VRE) 640株の薬剤耐性と、接合伝達性プラスミドを調べた。640株のうち、611株は vanA 型、29株は vanB 型であった。492株(77%)は耐性値(MIC)64 µg/ml から 1,024 µg/ml 以上の高度ゲンタマイシン耐性であった。492株のゲンタマイシン耐性菌のうち、261株(53%)のゲンタマイシン耐性は液体培地中での接合伝達で、受容菌 *E. faecium* 菌に供与菌あたり  $10^{-5}$ ～ $10^{-6}$ の頻度で接合伝達した。この261株のうち90%以上はバンコマイシン耐性が固形培地上で接合伝達した。

接合伝達株より接合伝達性ゲンタマイシン耐性プラスミドを分離した。これらのプラスミドの制限酵素 (*EcoRI*) 切断断片のアガロースゲル電気泳動型から、プラスミドは A～E の5型に分類できた。A、B型が最も多く、それぞれ接合伝達株の40%が保持していた。それぞれのプラスミドは *E. faecium*、*E. faecalis* 菌に液体培地中での接合伝達で供与菌あたりそれぞれ  $10^{-3}$ ～ $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ ～ $10^{-7}$ の頻度で接合伝達した。それぞれのプラスミドは、日本の臨床分離 *E. faecium* から世界で初めて分離された高頻度接合伝達性プラスミド pMG1 (65.1 kb) との DNA 相補実験で相同性を示した。

**A. 目的**

接合伝達性プラスミドは、薬剤耐性を細菌

間で拡散させる重要な因子である。グラム陽性菌では、液体培地中で高頻度に接合伝達を

行うプラスミドは一般的ではなく、これまで *E. faecalis* 菌のフェロモン反応性プラスミドのみが知られていた。

VanA 型バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は、すべての抗菌剤に耐性であることが多く、その感染症に有効な治療薬が存在しないことがおこる。VRE の多くは *E. faecium* 菌である。*E. faecium* 菌においては、これまで薬剤耐性を拡散させる接合伝達性プラスミドは分離されていなかった。先に、日本の臨床分離ゲンタマイシン耐性 *E. faecium* 菌から液体培地中で高頻度に接合伝達するゲンタマイシン耐性プラスミド pMG1 (65.1 kb) を世界で初めて分離した。

pMG1 は日本の臨床分離 *E. faecium* 菌から分離されたものであるが、これが VRE を含め *E. faecium* 菌に一般的に存在し、薬剤耐性を拡散させる働きをしているプラスミドであることを調べる目的で、米国で分離されたバンコマイシン耐性 *E. faecium* 菌の薬剤耐性の接合伝達性を調べた。

## B. 材料及び方法

### 用いた菌株

米国ミシガン大学病院で1994年から1999年の間に臨床分離されたバンコマイシン耐性 *E. faecium* 640 株。実験株として *E. faecium* BM4147, *E. faecalis* FA2-2 (Rif, Fus), *E. faecalis* JH2SS (Str, Spc) *E. faecium* BM4105RF, *E. faecium* BM4105SS, プラスミド pMG1 (Gm<sup>r</sup>, 65.1 kb).  
用いた培地: Todd Hewitt broth (THB),

Mueller Hinton (MH) broth.

MIC 測定は NCCLS 方法を用いた。

### 接合伝達実験

THB を用いた。液体培地中での接合実験、供与菌 1, 受容菌 10, 新鮮液体培地 100 の割合で混合し、37°C で 3 時間接合伝達を行った。filter mating は同様の混合液を membrane filter を通した後、寒天培地上で接合伝達(接合時間, 3 時間)を行った。選択培地はゲンタマイシン 100 µg/ml 又はバンコマイシン 12.5 µg/ml と、それぞれの受容菌の耐性を選択する薬剤を含む培地を用いた。プラスミド DNA の分離, DNA-DNA 相補実験は前報に従った。

## C. 結果

### VRE の薬剤耐性

ペニシリン (Apc)、ゲンタマイシン (Gen)、カナマイシン (Kan)、ストレプトマイシン (Str)、テイコブラニン (Tei)、バンコマイシン (Van)、テトラサイクリン (Tet) の MIC を調べた。図 1 にはバンコマイシン、テイコブラニン、アンピシリンに対する VRE の MIC 分布を示す。多くの株は、これらの薬剤に高度に耐性を示した。表 1 は MIC 値から得られた 640 株の薬剤耐性を示したものである。ほとんどすべての株は多剤耐性を示し、約 50% の株はすべての薬剤に耐性を示した。

### 高度ゲンタマイシン耐性の接合伝達性

640 株の VRE の中で、492 株 (77%) はゲンタマイシン耐性値 (MIC) 64 µg/ml ~