

TABLE 2. Results of screening tests using SMA disk

Bacterial species	SMA (+)	SMA (-)	Total
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	180	48	228
<i>Pseudomonas putida/fluorescens</i>	55	1	56
<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	53	0	53
<i>Serratia marcescens</i>	47	9	56
<i>Acinetobacter baumannii</i>	35	13	48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	16	39
<i>Escherichia coli</i>	17	40	57
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	8	13
<i>Burkholderia cepacia</i>	5	2	7
<i>Citrobacter freundii</i>	3	8	11
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	4	6
<i>Providencia rettgeri</i>	2	0	2
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	1
<i>Morganella morganii</i>	1	2	3
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	1	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	3	4
<i>Proteus</i> spp.	0	1	1
Total	431	156	587

TABLE 3. Number of strains of each MBL type among SMA-test positive strains

Bacterial species	IMP-1	IMP-2	VIM-2	Netative	Total
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	116	1	63	0	180
<i>Pseudomonas putida/fluorescens</i>	51	0	4*	0	55
<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	53	0	0	0	53
<i>Serratia marcescens</i>	47	0	0	0	47
<i>Acinetobacter baumannii</i>	30	5	0	0	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	0	0	0	23
<i>Escherichia coli</i>	17	0	0	0	17
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	0	0	0	5
<i>Burkholderia cepacia</i>	5	0	0	0	5
<i>Citrobacter freundii</i>	3	0	0	0	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	0	0	2
<i>Providencia rettgeri</i>	2	0	0	0	2
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	0	0	1
<i>Morganella morganii</i>	1	0	0	0	1
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	1	0	0	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	0	1
Total	357	7	67	0	431

\* These strains were re-identified as *P. putida*.

TABLE 4. Combination of MBL and *intI* genes among all SMA-test positive strains

Type of MBL	Type of integrase gene		
	<i>intI1</i>	<i>intI1+intI3</i>	Total
IMP-1	353	4*	357
IMP-2	7	0	7
VIM-2	67	0	67
Total	427	4	431

\* Re-identified as *P. putida*.

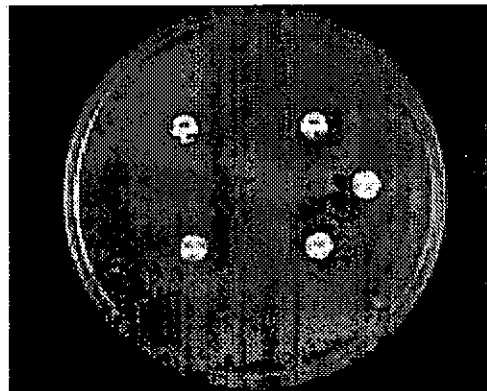
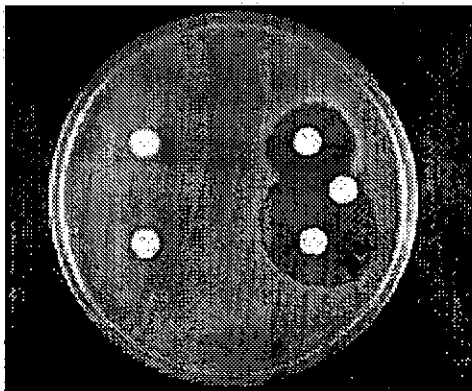
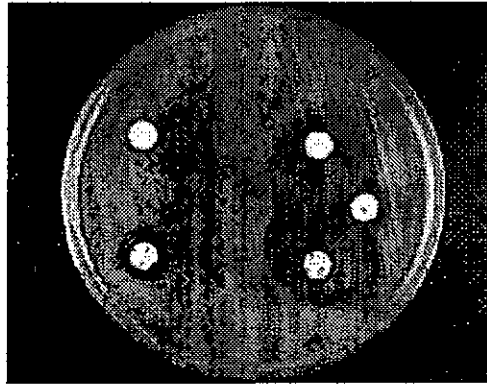
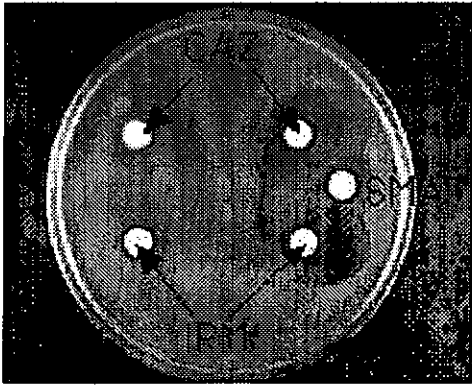
TABLE 5. Combination of MBL and *intI* genes in *Pseudomonas putida/fluorescens*

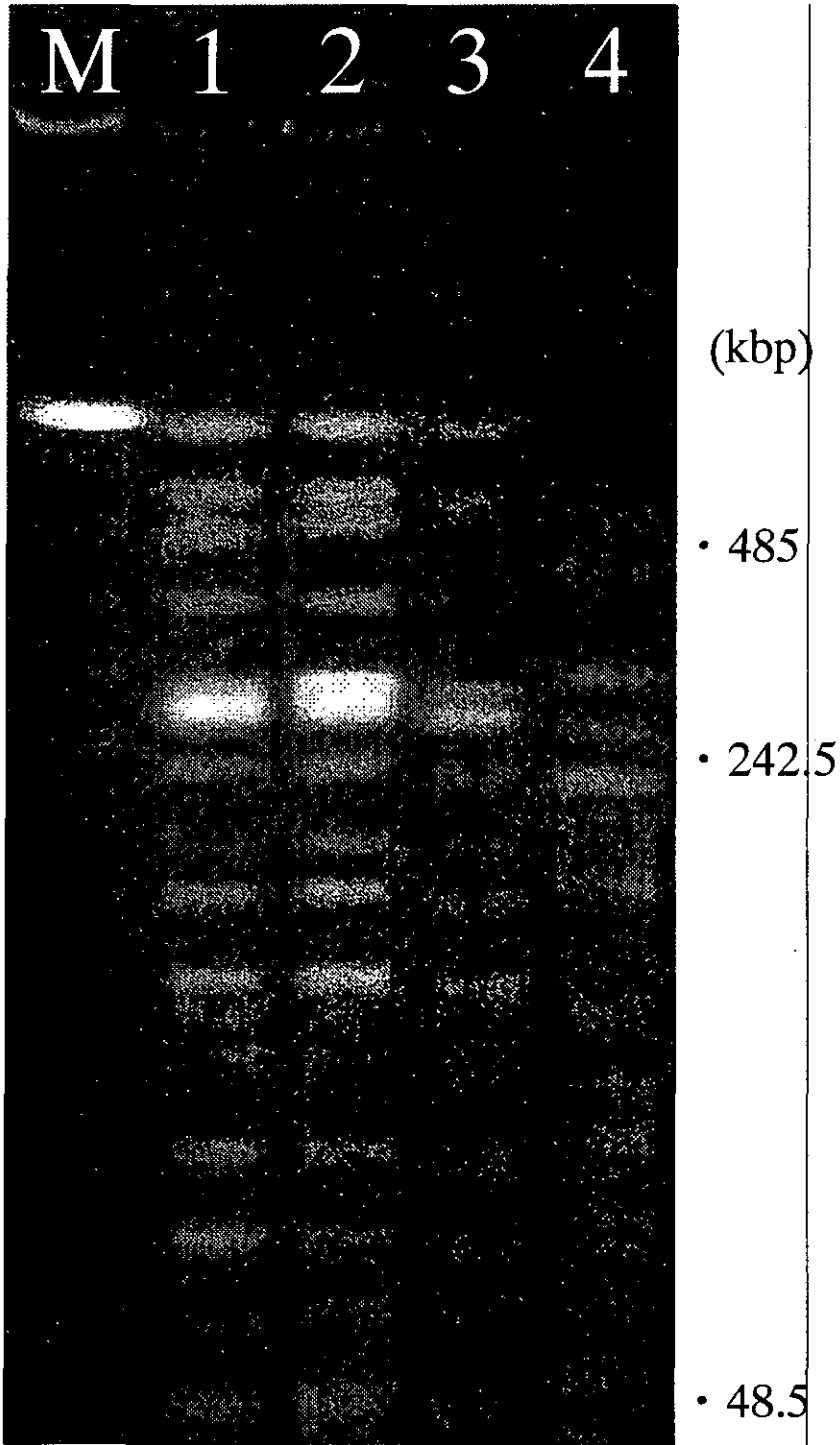
Type of MBL	Type of integrase gene		
	<i>intI1</i>	<i>intI1+intI3</i>	Total
IMP-1	47	4*	51
VIM-2	4*	0	4
Total	51	4	55

\* Re-identified as *P. putida*.

TABLE 6. Clinical associations of *Pseudomonas putida* carrying both *intI1* and *intI3* genes

Strain No.	Age	Sex	Disease	Specimen	Hospital	Date of isolation	Prefecture
NCB 01-121	77	male	prostatic cancer	urine	A	06/2001	Mie
NCB 02-182	79	male	cerebral infarction	urine	A	05/2002	Mie
NCB 02-190	66	female	cerebral infarction	sputum	B	05/2002	Mie
NCB 02-204	76	female	gallbladder cancer	biliary tract drainage tube	A	06/2002	Mie





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

日本で初めて分離された VanD 型 VRE の解析

主任研究者 池 康嘉<sup>1, 2</sup>

研究協力者 谷本 弘一<sup>2</sup>、野村 隆浩<sup>1</sup>、富田 治芳<sup>1</sup>、藤本 修平<sup>1</sup>

群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学<sup>1</sup>、  
群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設<sup>2</sup>

**研究要旨** バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin resistant enterococci, VRE) は vancomycin (VCM) および teicoplanin (TEIC) の耐性値、または VCM 耐性遺伝子構造の違いにより、これまで6種類が報告されている。それらは獲得耐性 VRE の VanA、VanB、VanD、VanG、VanE 型、自然耐性の VanC 型 (C1, C2, C3) である。臨床上問題となるのは、VanA、VanB、VanD 型で、これらは D-Ala<sup>4</sup>, D-Lac<sup>5</sup> ligase 遺伝子をコードし、他の型は D-Ala<sup>4</sup>, D-Ser ligase 遺伝子をコードする。VanA、VanB、VanD 型の中で VanA および VanB 型 VRE は一般的に分離されるが、VanD 型はこれまで世界で数例の報告のみである。日本で臨床分離された *E. raffinosus* VanD VRE の抗菌薬 MIC は、VCM (1,024 µg/ml)、TEIC (256 µg/ml)、GM (2,048 µg/ml)、EM (2,048 µg/ml)、ABPC (32 µg/ml) と、高度多剤耐性であった。ligase 遺伝子の PCR 産物の塩基配列から、この株の ligase 遺伝子は VanD 型 VRE の VanD1, D2, D3, D4 の中で VanD4 型に相同性が高かった。既に報告されている VanD4 型の ligase 遺伝子の違いは、1,032 塩基中、2ヶ所の塩基が異なっていた。また、タンパクのアミノ酸は1ヶ所が異なっていた。VanD4 遺伝子は染色体性で、遺伝子発現は恒常的に発現されていた。

A. 研究目的

腸球菌はヒト、動物の腸管常在菌で、典型的な日和見感染菌である。10数種類の菌種があるが、臨床分離腸球菌は主として *E. faecalis* と *E. faecium* である。バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin resistant enterococci, VRE) は腸球菌の中で Vancomycin (VCM)

獲得耐性または自然耐性菌である。高度 VCM 耐性 VRE (VanA 型) は、1988年に英国とフランスで報告され、続いて1989年に米国で報告された。以来、欧米において環境、医療現場で VRE が広がり、大きな問題となっている。特に米国においては、大規模病院において、集中治療室 (ICU) や外科治療ユニット、臓器移植ユニットなど、感染防御能力の低下し

た患者（易感染患者）の治療を行う部署や、日和見感染症や術後感染症、さらに院内感染症の起因菌として警戒されている。これまでに6種類のバンコマイシン耐性腸球菌が報告されている（表1、図1）。それらは、獲得耐性VREのVanA、VanB、VanD、VanG、VanE型、自然耐性のVanC型（C1、C2、C3）である。臨床上前問題となるのは高度VCM耐性のA、B、D型である。今回、世界的に数株の報告しかないVanD型VRE（表2）の日本の臨床分離例について報告する。

## B. 研究方法

### 材料および方法

用いた菌株：臨床分離VanD型VRE *E. raffinosus*, 実験株として *E. faecalis* FA2-2 (Rif<sup>r</sup>, Fus<sup>r</sup>), *E. fecium* BM4105RF (Rif<sup>r</sup>, Fus<sup>r</sup>) .

用いた培地：Todd Hewitt Broth (TBH), Mueller Hinton (MH) 培地, 薬剤感受性MIC測定は、NCCLS 標準法による。Mueller Hinton 培地を用いた寒天希釈法を用いた。

薬剤耐性の接合伝達は Filter mating 法を用いた。Southern hybridization および Northern hybridization は非RI系を用い、プローブはPCRにより増殖された断片をアガロースゲルから抽出して用いた。菌種の同定は、同定用キットおよび16sRNA シークエンス解析に拠った。

## C. 結果・考察

### 菌株の分離

2002年9月、原疾患として糖尿病を持つ73歳の男性の両下肢壊死褥創部および便より分離された腸球菌がVREであった。

## VREの菌種とMIC

菌種は *E. raffinosus* であった。各種薬剤に対するMICは、VCM (1,024 µg/ml)、TEIC VCM (256 µg/ml)、GM (2,048 µg/ml)、KM (2,048 µg/ml)、SM (1,024 µg/ml)、EM (2,048 µg/ml)、TC (1,024 µg/ml)、ABPC (32 µg/ml) であった。各種薬剤に高度耐性でVCM、TEIC両薬剤に高度耐性であることから、VanA型またはVanD型VREが推測できた。

### VCM型別

*VanA*、*VanB*、*VanC*、*VanD1*、*VanE* に特異的なプライマーを用いてPCRを行ったが、これらのVREに相当するPCR産物は得られなかった。大腸菌の *ddlA*、*ddlB* (*ddl*, d-Ala-d-Ala ligase) とVREのVanA型ligaseの間で相互に共通に保存されているアミノ酸から設計されたプライマーを用いてPCRを行った。その結果、増幅されたDNA断片を検出することができた。このプライマーを用いて直接シーケンスした結果、VanD4と他界相同性が確認された。以上の結果、分離されたVREはVanD型VREの中でVanD4と相同性の高いVREであると推測された。

### *VanD4* ligase 遺伝子との比較

これまでに *VanD4* 型VREは1株の報告例がある。その塩基配列を参照し、PCRとシーケンスを行った。ligase 遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、全部で1,032塩基中、2ヶ所の塩基が異なっていた（図2）。VanD4の362番目のGがTに、930番目のCがTと変化していた。推測されるligase蛋白のアミノ酸は、VanD4のGlyがValに変化し、930番目の塩基の変化によるアミノ酸の変化はなかった。以上の結果、分離されたVREは



VanD4 VREで *VanD4* と ligase 遺伝子の塩基が 2ヶ所、アミノ酸で 1ヶ所、すでに報告されている VanD4 と異なるものであることが解った (表 3)。

#### バンコマイシン耐性の接合伝達性とプラスミド

受容菌 *E. faecalis* FA2-2 または *E. faecium* 4105RF に filter mating によるバンコマイシン耐性の接合伝達実験を行ったが、いずれの菌にもバンコマイシン耐性は伝達されなかった。プラスミドの分離を行ったが、明らかなプラスミドは分離できなかった。以上の結果、VanD4 遺伝子は染色体上に存在すると推測された。

#### バンコマイシン耐性の誘導性

バンコマイシン耐性遺伝子解析は、バンコマイシンにより誘導されることが知られている。バンコマイシンの存在の有無により Northern hybridization を行い、転写産物を調べた結果、この VRE ではバンコマイシンの有無に関らず転写産物が検出された。この結果 VanD4 遺伝子は恒常的に発現していることが解った (図 3)。

#### E. 結論

高度バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は、VanA、VanB、VanD 型が存在する。VanA、VanB 型は臨床分離の多い菌である。VanD 型は稀な VRE で、これまで世界で数例の報告のみである。日本で臨床分離された VRE で、VanD 型の中で、VanD4 型の VRE が発見された。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tomita H, Tanimoto K, Hayakawa S, Morinaga K, Ezaki K, Oshima H, Ike Y. Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying *Tn1546*-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. J Bacteriol. 2003 185(23):7024-8.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録、その他

なし

# 表1 バンコマイシン耐性腸球菌の分類

VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG
<b>VRE遺伝子型</b>					
MIC( $\mu$ g/ml)	VC	TEIC			
64~>1000	4~>1000	2~32	64~>1000	16~24	12~16
0.5~256	<0.5~8	0.5~1	4~256	0.5	0.5
プラスミド・染色体	染色体・プラスミド	染色体	染色体	染色体	染色体
<b>Ligaseで合成されるプロダクト</b>					
D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser?
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. raffinosus</i>		
<i>E. avium</i>		<i>E. flavescens</i>			
<i>E. durans</i>					
<i>E. gallinarum</i>					
<i>E. casseliflavus</i>					
<b>Ligase遺伝子</b>					
vanA	vanB1	vanC1	vanD1	vanE	vanG
	vanB2	vanC2	vanD2		
	vanB3	vanC3	vanD3		
			vanD4		

表2 VanD 分類

Ligase 遺伝子	MIC		耐性遺伝子存在部位	菌種	国
	VCM( $\mu$ g/ml)	TEIC( $\mu$ g/ml)			
VanD1	16	4	染色体	<i>E.faecium</i>	アメリカ
VanD2	128	4	染色体	<i>E.faecium</i>	アメリカ
VanD3	256	64	染色体	<i>E.faecium</i>	カナダ
VanD4	256	4	染色体	<i>E.faecium</i>	ブラジル

表3 VanD Ligase の相同性

Ligase	% Amino acid identity					
	VanD4	VanD1	VanD2	VanD3	VanA	VanB
VanD4	100	85	84	83	68	68
VanD1		100	96	97	68	67
VanD2			100	96	67	67
VanD3				100	68	67
VanA					100	75
VanB						100

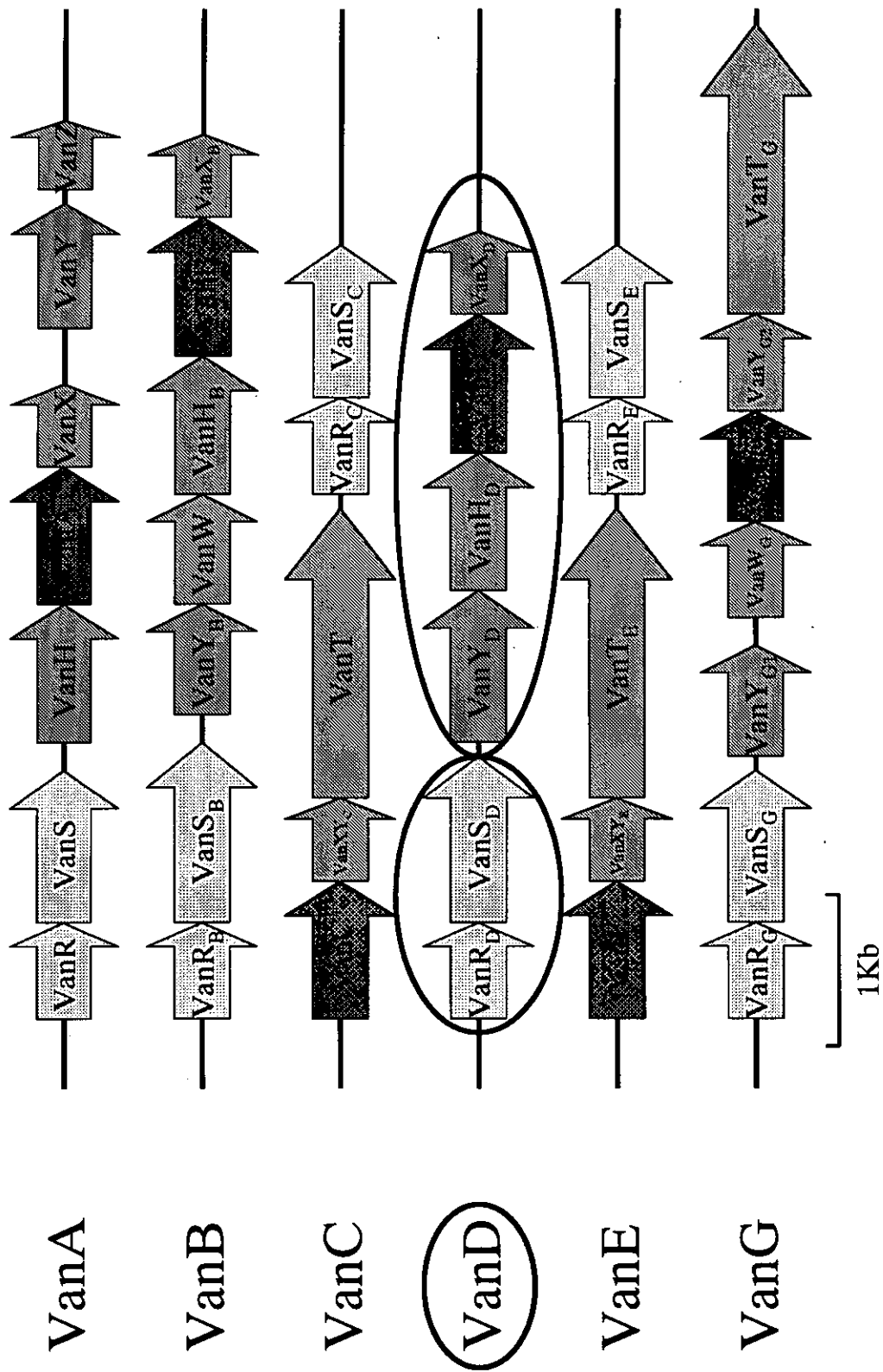


図1 各種バンコマイシン耐性遺伝子の遺伝子構成

vanDH3

1 GGATCGGGTACTGGTCGATACCGTGAGCAATACCATCCGAAATTGTCTGAATTTTGAAAG

61 GAGTCTTGAAAATGTATAAGCTTAAAATTGCAGTCCTGTTTGGAGGCTGCTCAGAGGAAC  
M Y K L K I A V L F G G C S E E

121 ATGATGTTTCAGTGAATCTGCGATGGAGGTTGCAGCAAATATAACAAGGAAAAATACC  
H D V S V K S A M E V A A N I N K E K Y

181 AGCCGTTTTATATTGGAATCACAAAATCCGGCGCATGGAACTATGCGATAAGCCCTGCC  
Q P F Y I G I T K S G A W K L C D K P C

241 GGGACTGGGAGAACTATGCGGGATACCCGGCTGTGATTTCTCCGGACAGAAGGATCCATG  
R D W E N Y A G Y P A V I S P D R R I H

301 GCCTGCTGATACAAAAGGACGGCGGATATGAGAGCCAGCCTGTAGACGTGGTGCTTCCGA  
G L L I Q K D G G Y E S Q P V D V V L P

vanDD1 vanDD2

361 TGATTCATGAAAATTTGGCGAGGACGGAACCATACAGGGTCTGCTTGAGCTGTCCGGCA  
M I H G K F G E D G T I Q G L L E L S G

T

421 TTCCTTATGTGGGATGCGACATTCAAAGTTCTGTAATCTGTATGGATAAGTCGCTCGCTT  
I P Y V G C D I Q S S V I C M D K S L A

V

481 ATATGGTTGTGAAAATGCGGGAATTGAGGTACCTGGGTTTCGAGTTCTACAAAAGGGGG  
Y M V V K N A G I E V P G F R V L Q K G

541 ACAGCCTGGAAGCAGAGACGCTCTCGTATCCGGTCTTTGTAAAGCCTGCCGTTCCGGCT  
D S L E A E T L S Y P V F V K P A R S G

601 CCTCTTTTGGCGTGAATAAGGTATGCCGGGCAGAGGAAGTGCAGGCAGCGTCCACAGAGG  
S S F G V N K V C R A E E L Q A A V T E

661 CGGGTAAGTATGACAGCAAAATATTGGTTGAGGAGGCCGTTTCCGGGAGTGAGGTAGGAT  
A G K Y D S K I L V E E A V S G S E V G

721 GTGCCATACTGGGAAACGGAAACGATCTCATCACCGGCGAGGTCGATCAGATTGAATTGA  
C A I L G N G N D L I T G E V D Q I E L

781 AACACGGGTTTTTTAAGATCCATCAGGAAGCACAGCCGAAAAGGGGTCTGAAAATGCTG  
K H G F F K I H Q E A Q P E K G S E N A

841 TGATTAGAGTTCAGCCGCCCTGCCGGATGAAGTTAGGGAGCAGATTCAGGAAACGGCGA  
V I R V P A A L P D E V R E Q I Q E T A

901 AGAAGATTTACCGGTACTTGGCTGCAGAGGTCTGGCCCGCATTGATTTGTTTTTACGGG  
K K I Y R V L G C R G L A R I D L F L R

T

961 AGGATGGAAGCATTGTCCTGAATGAAGTGAACCCATGCCCGGATTTACTTCCTATAGCC  
E D G S I V L N E V N T M P G F T S Y S

1021 GTTATCCACGCATGATGACAGCAGCAGGGTTTACGCTTTCTGAAAATATTGGACCGCTTGA  
R Y P R M M T A A G F T L S E I L D R L

vanDX3

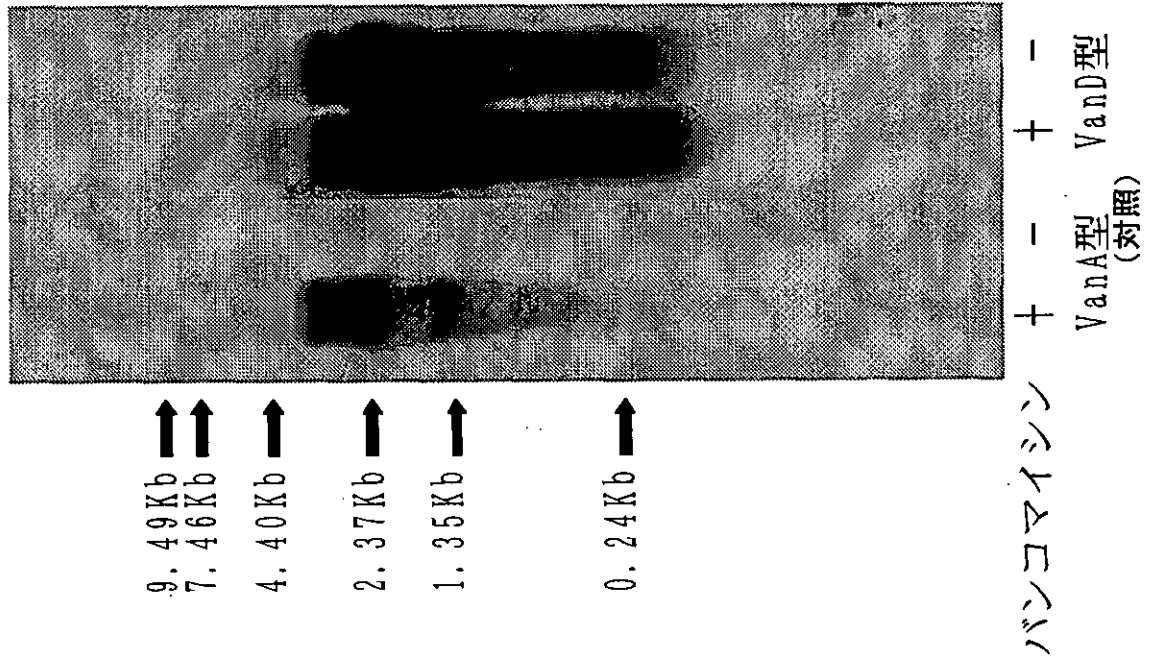
1081 TTGGACTTTCACCTTAGGAGTAACCATCATGGAAAAGAACTTTGTCTTTTGGATGAAAT  
I G L S L R R \*

1141 GCTGCCGGGCATCCGGTGGGATGCCAAATATGCCACAT

## 図2 既報のVanD4遺伝子のDNA塩基配列とアミノ酸配列

- ・ VanD4型 *E. raffinosus* の VanD4 遺伝子との違いを矢印で示してある。
- ・ 水平矢印はシーケンスに用いたプライマー。

# 図3 VanD型耐性遺伝子の発現



- probe: vanA遺伝子 (lane1、2)
- probe: vanD遺伝子 (lane3、4)

## 日本初の VRE 院内感染症株から分離されたバンコマイシン耐性プラスミドの解析

主任研究者 池 康嘉<sup>1, 2</sup>

研究協力者 富田 治芳<sup>1</sup>、麻 興華<sup>3</sup>、石綿 司<sup>1</sup>、浦部 優子<sup>1</sup>、藤本修平<sup>1</sup>

群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学<sup>1</sup>、  
群馬大学医学部附属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>

**要旨[背景・目的]** 1999年7月、日本で初めて VanB 型のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が検出された。本実験では、そのとき検出された菌から *vanB* 遺伝子のコードされたプラスミドを単離し、解析を行うことを目的とした。**[対象と方法]** NKH 病院にて分離された 19 の菌株を対象に抗生剤耐性実験、接合伝達実験を行い、代表菌株より得られたプラスミド (pUI22) を対象に PCR およびサザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。**[結果]** プラスミド pUI22 は 117 kbp であった。また pUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされており、そのタイプは *vanB2* であることが判明した。また、フェロモン反応性の接合伝達遺伝子群もコードしており、高頻度で耐性を伝達することが明らかとなった。バンコマイシン以外の薬剤に対する耐性遺伝子はコードしていなかった。**[結語]** 同じプラスミド上に *vanB* 遺伝子とフェロモン反応性遺伝子がコードされているという結果は、この VRE の急速な伝播を示唆している。

キーワード：VRE, VanB, 接合伝達性プラスミド, フェロモン

### はじめに

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は、MRSA などとともに世界的に問題となっている院内感染原因菌のひとつである。特に米国では救急治療室、移植・癌・腎疾患病棟などで VRE の水平伝播による院内感染が多発し、その増加は社会的に問題化している。VRE 感染症患者あるいは保菌患者の殆どが免疫機能低下患者であり、感染症治療の経過中に抗菌剤投与による菌交代症の中で出現する。現在、6 種の耐性型を持つ VRE が発見、同定されているが、臨床的あるいは院内感染

対策上問題となるものは、*vanA* と *vanB* の耐性遺伝子を保有する VRE である。VanA 型はバンコマイシン、テイコブラニンの両者に耐性であるのに対し、VanB 型はテイコブラニンに感受性である。VanA 型と VanB 型の腸球菌におけるグリコペプチド系抗生剤耐性は、細胞壁構成タンパク質の末端が *D*-lactate (*D*-Lac) に変化していることによるものである。グリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシンやテイコブラニンは、細胞壁の構成成分タンパク質の C 末端残基 *D*-alanyl-*D*-alanine (*D*-Ala-*D*-Ala) に結合し、細胞壁の構築を阻害する。<sup>1</sup> VCM 耐性菌株ではこの C 末端が



D-Ala-D-Lac に変化しており、このため VCM が結合できなくなり耐性となる。VCM 耐性に関連する遺伝子は、*vanRS* と *vanYWHBX* からなる *van* オペロンで構成される。*van* オペロンは多くの場合、接合・転移に関連する染色体やプラスミドの一部だと考えられている。*vanA* オペロンは通常プラスミド上に存在し、Tn1546 により伝達される。<sup>2</sup> 一方、*vanB* オペロンは通常染色体上に存在する。

遺伝子伝達機構は、微生物が抗生剤耐性を伝播する過程において重要な役割を果たす。腸球菌は、独特な方法で同種間や異種間でプラスミドを高頻度に伝達することができる。<sup>3-6</sup> 腸球菌プラスミドには、限られた種にのみ存在するフェロモン反応性のプラスミド<sup>3,4,7</sup>と、*Enterococcus faecalis*<sup>8,9</sup>と *Streptococcus agalactiae*<sup>10,11</sup>から分離された、固体培地において低頻度で伝達し、多種に渡り存在できるプラスミドの2種類がある。<sup>8-12</sup> フェロモン反応性のプラスミドを保有しているのは主に *E. faecalis* であり、<sup>13-18</sup> その伝達は、数時間の液体培地中での接合においてドナー1に対し  $10^0 \sim 10^{-2}$  の高頻度で起こる。この型のプラスミドは通常 45 kb 以上の大きさであり、受容菌が分泌する性フェロモンに反応して伝達を開始する。<sup>13-18</sup> この接合シグナルにより菌の接合凝集が起こる。このとき性フェロモンは、プラスミド伝達に必要な一連の遺伝子群を発現させる。プラスミドを保有しない受容菌は複数の性フェロモンを分泌し、各々関与するフェロモン反応性プラスミドを持つ供与菌に特異的に影響を与える。受容菌が1つのプラスミドを獲得すると、その反応に関与していた1つの性フェロモンの分泌は終了するが、それ以外のフェロモン分泌は続く。性フェロモンは、供与菌の自己凝集を誘導する。フェロモン反応性プラスミドにコードされている遺伝因子としては、溶血毒素、バクテリオシン(抗菌活性物質)、抗生剤耐性、紫外線耐性がある。<sup>13,19-27</sup>

近年、日本においても複数の病院から VRE 検出の報告がなされている。1999年7月に、日本

で初めて VanB 型の VRE が検出された。この *vanB* 遺伝子は 110-kb プラスミドにコードされていることがわかったが、そのプラスミド DNA の単離に成功しておらず、性質等は不明である。<sup>21</sup> 今回我々は、そのときに検出された菌を用いて、高頻度にバンコマイシン (VCM) 耐性遺伝子が伝達されることを確認後、そのバンコマイシン耐性プラスミドの単離、解析を行った。

## 対象と方法

### 菌株と培養方法

今回の調査には、H病院にて分離された *E. faecalis* (VanB type) 19 菌株を用いた。これらは、日本で初めて検出された VanB 型の VRE である。<sup>28</sup> 今回の実験においてこれらの菌株は、Todd-Hewitt broth (THB) または Brain Heart Infusion (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 中で培養した。

### 接合伝達実験

バンコマイシン (VCM) 耐性が接合伝達されるか否かについて、検出された 19 株においての実験を行った。受容菌として *E. faecalis*、プラスミドを持たない FA2-2 (リファンピシン、フシジン酸耐性) と JH2SS (ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性) を用い、液体培地中での接合伝達実験を行った。滅菌された試験管に Todd-Hewitt broth (THB) 5ml、受容菌 500.1、供与菌 50.1 を混合し、37°C で 3 時間培養した。その後、混合液 50.1 を vancomycin (6. g/ml) と抗生剤を入れた固体培地 Brain Heart Infusion (BHI) に植え、37°C で 48 時間培養した。発育したコロニーは、同種の培地にて純培養した。同様の手法で、再伝達実験、再々伝達実験も行った。固体培地の抗生剤濃度はそれぞれリファンピシン 25. g/ml、フシジン酸 25. g/ml とストレプトマイシン 250. g/ml、スペクチノマイシン 250. g/ml

とした。

### 抗生剤耐性実験

VCM 以外の抗生剤に対する耐性も伝達されているかを確認するため、4種類の抗生剤について実験を行った。HGH15、22、25 及びこれらから得られた伝達株のそれぞれを、各抗生剤を含む THB 培地で 37°C、48 時間培養した。抗生剤の種類と濃度は、アミカシン 64. g/ml、レボフロキサシン 8. g/ml、カナマイシン 100. g/ml、ゲンタマイシン 100. g/ml とした。

### アガロースゲル電気泳動

分離された VRE の遺伝子解析のため、プラスミド DNA を *EcoRI* で切断し、アガロースゲルで電気泳動した。プラスミド DNA の抽出には、アルカリ少量法を用いた。<sup>29</sup> 電気泳動終了後、アガロースゲルを臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下、確認、撮影した。

### pUI22 の制限酵素地図の作成

pUI22 の DNA を *EcoRI* で切断後電気泳動し、各断片の大きさを測定した。また、*Bam*HI、*Nco*I、*Xba*I 制限酵素のうち 1 種類、2 種類、3 種類を使って完全に DNA を切断、電気泳動した後各断片の大きさを測定し、制限酵素地図を作成した。

### PCR

抽出された HGH22 の DNA を用いて PCR を行った。混合液の組成は、DNA サンプル 5.1、各プライマー 0.5.1 (100pM/1.1)、dNTP 混合液 4.1、.Taq DNA polymerase 0.25.1、.Taq 添付 10×PCR buffer 5.1、滅菌蒸留水 35.1 とした。

DNA 増幅のための PCR は、DNA thermal cycler (Gene Amp 9700) を用いて、最初のサイクルを 95°C で 2 min、95°C で 1 min、56°C で 1 min、72°C で 2 min を単位とするものを 30 サイクル、最終サイクルを 72°C で 2 min として行った。

DNA シークエンスのための混合液の組成は、サ

ンプル DNA 4.1、各プライマー溶液 (3.3pM/1.1) 1.1、half TERM XL 2.1、Big-Dye Terminator RR Mix 2.1、滅菌蒸留水 1.1 とした。PCR には、96°C で 30 sec、50°C で 15 sec、60°C で 4 min を 25 サイクル行う Big Dye 法を用いた。PCR 処理後の DNA は、電気泳動後、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて回収した。

### サザンハイブリダイゼーション

DIG 標識 DNA を用いた dioxigenin-based nonradioisotope system (Boehringer GmbH) を標準のプロトコルにしたがって行った。<sup>30</sup>

## 結 果

### 接合伝達と抗生剤耐性実験

HGH21 を除く全ての菌株は、等しい抗生剤耐性を示した。VCM 耐性は液体培地中において、高頻度で伝達された (表 1)。

表 1. VanB 耐性の接合伝達頻度

菌株	遺伝子型	伝達頻度 (供与菌当り)
HGH7	<i>vanB</i>	10 <sup>-7</sup>
HGH8	<i>vanB</i>	10 <sup>-7</sup>
HGH9	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH10	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH11	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH12	<i>vanB</i>	10 <sup>-4</sup>
HGH13	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH14	<i>vanB</i>	10 <sup>-3</sup>
HGH15	<i>vanB</i>	10 <sup>-7</sup>
HGH16	<i>vanB</i>	10 <sup>-6</sup>
HGH17	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH18	<i>vanB</i>	10 <sup>-4</sup>
HGH19	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH20	<i>vanB</i>	10 <sup>-6</sup>
HGH21	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH22	<i>vanB</i>	10 <sup>-7</sup>
HGH23	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH24	<i>vanB</i>	10 <sup>-3</sup>
HGH25	<i>vanB</i>	10 <sup>-3</sup>

気泳動を行った。pUI22 を *EcoRI* で切断したとこ

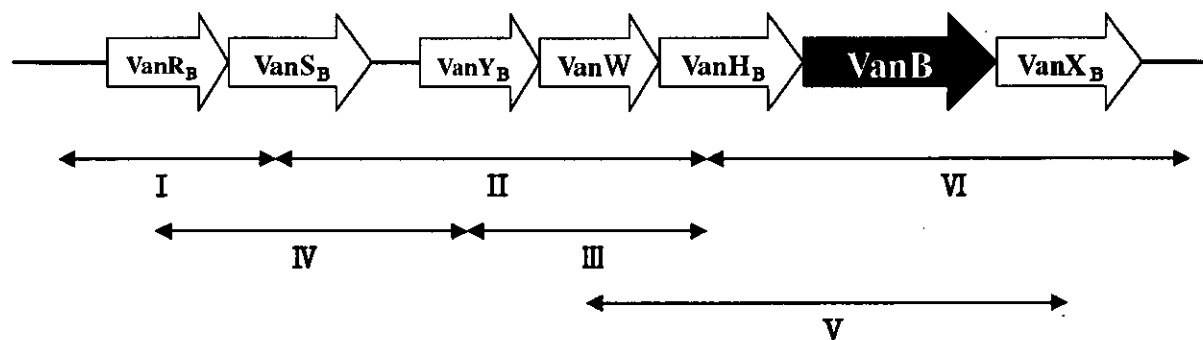


図 2. *vanB* 遺伝子のクラスター

配列は 5' から 3' 方向に示してある。

Combination		Forward primers		Reverse primers
I	<i>vanB</i> - <i>vanN</i> <sub>B</sub> 1	TGGGGCAITACAGGGCGTTG	<i>vanB</i> - <i>vanS</i> <sub>B</sub> 2	GCTGTGCTTCCATCGCTCTG
II	<i>vanS</i> <sub>B</sub> - <i>vanY</i> <sub>B</sub> 1	ATATGCGCTGGAAAACACCTC	<i>vanB</i> - <i>vanH</i> <sub>B</sub> 2	TGCGGAAAGCATTTGCCTCA
III	<i>vanB</i> - <i>vanY</i> <sub>B</sub> 3	ATATGTCGGCATCGAAGCTG	<i>vanB</i> - <i>vanH</i> <sub>B</sub> 2	TGCGGAAAGCATTTGCCTCA
IV	<i>vanB</i> - <i>vanR</i> <sub>B</sub> 3	TGACGGTGATGGCAGCACAG	<i>vanS</i> <sub>B</sub> - <i>vanY</i> <sub>B</sub> 2	CCCCAGATTGTTTCATATGCC
V	<i>vanB</i> - <i>vanW</i> <sub>B</sub> 1	ACGGATGCAAGTTGCCTTAG	<i>vanB</i> - <i>vanX</i> <sub>B</sub> 2	CCAACGAACACCATGCAACA
VI	<i>vanB</i> - <i>vanH</i> <sub>B</sub> 1	GCTGCGAGATACCACAGAAA	<i>vanB</i> - <i>vanN</i> <sub>B</sub> 2	AGCAGATTCCATCAGCGCAG

表 2. 用いたプライマーの組み合わせ

再伝達実験、再々伝達実験においても、ほとんどの菌で耐性の伝達が確認された。接合伝達の実験中、液体培地中でフェロモン誘発性の凝集に似た自己凝集塊が観測され、このことから、供与菌がフェロモン反応性のプラスミドを保有していることが推測された。また VCM 以外の抗生剤についての耐性遺伝子は伝達されていないことが判明した。

### 接合伝達性 VCM 耐性プラスミドの単離

接合伝達に関与するプラスミドの解析を行うために、伝達実験で得られた伝達株からプラスミドを毎回抽出・解析した。各接合伝達株は数個のプラスミドを保有しており、それぞれの電気泳動バンドパターンは似ていた。数回の伝達実験を繰り返した結果、HGH22 から得られた VCM 耐性伝達株が、単一のプラスミドを保有していることがわかった。そのプラスミドを pUI22 とし、対象と方法に記した方法で切断し、アガロースゲル電

ろ 19 の断片が見られ、その大きさを測定したところ、pUI22 の全体の大きさは約 117 kbp ということがわかった。また、pUI22 を 4 種類の制限酵素 (*Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I, *Xba*I) で切断し、その結果から、図 1 に示す制限酵素地図を作成した。

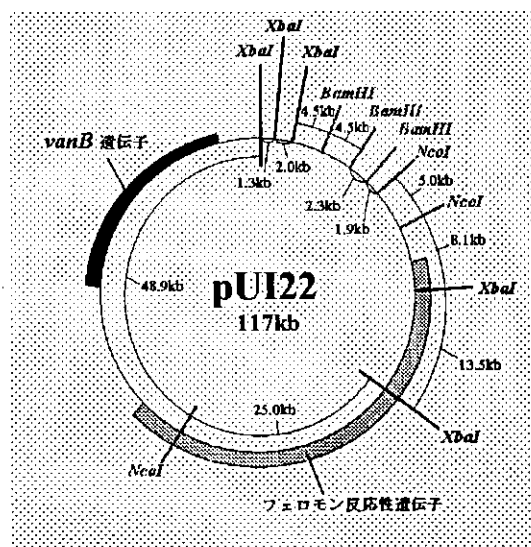


図 1. pUI22 のマップ。DNA の切断に用いた制限酵素は、*Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I, *Xba*I。

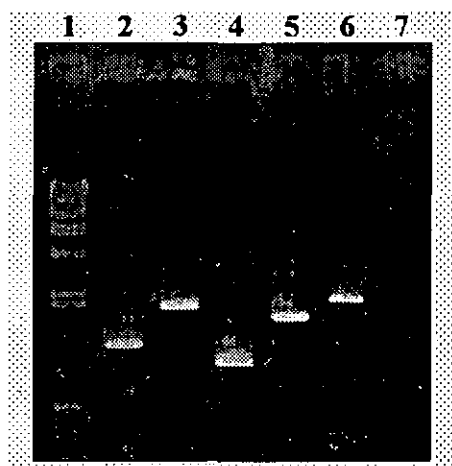


図3. 表2のプライマーを用いたPCRの結果。PCR後の電気泳動の結果を示した。VIの組み合わせでのみ、増幅が行われなかった(lane 7)。Bacteriophage lambdaのDNAをマーカーとして用いた(lane 1)。lane 2、3、4、5、6はそれぞれ順に組み合わせI、II、III、IV、Vである。

### vanB オペロンの解析

プラスミドにコードされている *vanB* オペロンクラスターの構造を調べるために、表2に示されるような6種類のプライマーの組み合わせによって pUI22 に PCR を行った。プライマーの設計に当たっては、これまでにわかっている *vanB* オペロンの塩基配列 (図2) を参考とした。<sup>31</sup> その後、得られた断片それぞれをアガロースゲルで電気泳動したところ図3のような結果が得られた。I~Vの組み合わせではPCRによる遺伝子の増幅がなされたが、VIの組み合わせでは増幅が行われなかった。このことから、図2のIからVまでの領域においてはクラスターの塩基配列が保存されており、*vanX<sub>B</sub>*の下流で変異または構造変化を起こしていることが推測された。

### vanB 遺伝子の存在確認

pUI22 を *Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I, *Xba*I それぞれで切断し電気泳動してみると、図4 (A) の結果が

得られた。*vanB* 遺伝子が得られたプラスミド上にコードされているかどうか、そして存在した場合はその位置を決定するために、このゲルを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。用いた *vanB* 検出用プローブは、pUI22 を V のプライマーの組み合わせで PCR 増幅した DNA 断片である。サザンハイブリダイゼーションの結果は図4 (B) である。いずれのレーンにも発色反応が見られ、pUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされていることがわかった。(図1)

*vanB* 遺伝子には *VanB1*, *VanB2*, *VanB3* の3つのタイプがあることが知られている。<sup>32</sup> そこで、pUI22 上にコードされている *vanB* 遺伝子がどのタイプであるのか決定するために、この *vanB* 遺伝子に対して DNA sequence を行った。その結果 (data not shown) を、すでに知られている *vanB* のタイプ別の配列 (図5)<sup>32</sup> と比較すると、pUI22 上にコードされている *vanB* 遺伝子のタイプは *vanB2* であることがわかった。

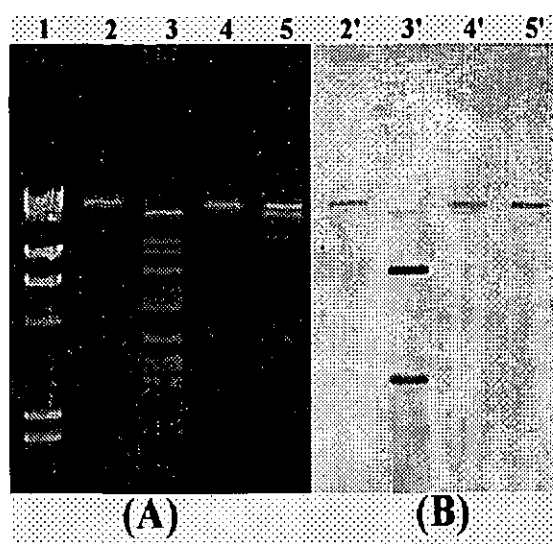


図4. pUI22 の DNA 電気泳動の結果(A)と *vanB* プローブ (*vanB-vanH<sub>B1</sub>* と *vanB-vanN<sub>B2</sub>*) によるサザンハイブリダイゼーションの結果。用いた制限酵素は、*Bam*HI (lane 2, 2'), *Eco*RI (lane 3, 3'), *Nco*I (lane 4, 4'), *Xba*I (lane 5, 5')であった。Bacteriophage lambda の DNA をマ