

## 本邦で分離されたゲンタマイシン耐性の黄色ブドウ球菌について

第2編 ゲンタマイシン耐性の黄色ブドウ球菌から誘発したファージによる薬剤耐性の導入とプラスミドの解析

生方 公子・紺野 昌俊

帝京大学医学部臨床病理

(昭和56年7月30日受付)

1. 臨床検査材料より分離された gentamicin (GM) 耐性の黄色ブドウ球菌の中から TK 5553 株を選び、その菌より誘発したファージ液を用いて薬剤耐性の導入を試みた。その結果、penicillin G(PCG)-erythromycin(EM)-kanamycin(KM) GM 耐性の連関導入が認められた。また、薬剤耐性の除去実験においても、それらの耐性は同時に脱落した。この耐性型を示す導入株よりプラスミド DNA を分離し、電子顕微鏡で観察したところ、分子量  $32.1 \times 10^6$  dalton の環状 DNA が見出された。PCG-EM-KM-GM 耐性が支配されるこのプラスミドは、pTU 053 と呼称することとした。

2. TK 5568 株より誘発したファージ液を用いた導入実験では、KM あるいは GM 含有の選択培地上からは KM と GM に同時に耐性を示す集落と、PCG-EM-KM に耐性を示す集落とが得られた。KM-GM 耐性が支配されるプラスミドは、 $36.2 \times 10^6$  dalton の環状 DNA (pTU 068) であった。

3. プラスミド pTU 512 (PCG-EM-KM 耐性) と pTU 053 との Heteroduplex 法による DNA の相同性に関する実験的解析では、pTU 053 の DNA 鎖の 92.9% が pTU 512 と同一塩基配列をしていることが示された。しかしながら、ごくわずかではあるが、pTU 512 の DNA 鎖の方に pTU 053 とは非相同の部分があることも見出された。

グラム陰性桿菌におけるアミノグリコシド系 (AGs) 抗生物質の耐性機構に関しては、既に多数の研究報告がなされているが、グラム陽性球菌のそれらに関する報告はそれほど多いものではなく、またその多くは、菌体より抽出した酵素による AGs 抗生物質の修飾機構に関するものであり、GM 耐性の伝達について検討した成績は以外に少ない<sup>1-2)</sup>。しかも、それらの伝達実験には、すべてタイピングファージが用いられている。

上述のことから、著者らは第1編で報告した GM 耐性の黄色ブドウ球菌を用い、mitomycin C(MMC) によって溶原ファージの誘発を行ない、そのファージ液を用いて GM 感性菌への薬剤耐性の導入を試みた。また GM 耐性が導入された株よりプラスミド DNA の単離を行ない、そのプラスミド DNA の分子量などについて、若干の解析を行なったので報告する。

### I. 材料と方法

#### 1. 使用菌株

第1編で報告をした GM 耐性黄色ブドウ球菌の中から、その菌から得たファージ液によって GM 耐性の導入が可能であった TK 5553 株 {PCG, tetracycline(TC),

chloramphenicol (CP), EM, KM および GM 耐性; ファージ型 81; フロファージ型 80/81} ならびに TK 5568 株 (PCG, TC, EM, KM および GM 耐性; ファージ型 81; プロファージ型 80/81) を donor とした。recipient には KM 耐性の導入実験に際して用いた既報<sup>3)</sup>の MS 353 株 (ファージ型 52, 52A/80/81) を使用した。なお、後述する Heteroduplex 法による DNA の解析にあたっては、PCG, EM および KM 耐性が連関導入されている MS 353 (pTU 512) 株を使用した。

#### 2. 薬剤耐性の導入

donor とした TK 5553 株および TK 5568 株は、あらかじめ 37°C で一夜前培養し、その菌液 0.5 ml を 9 ml の heart infusion broth (HI broth, 日水) に接種して、37°C で 2 時間培養を行ない、MMC (協和醗酵工業より分与) を最終濃度が 1 μg/ml となるように添加し、1 時間作用させた。その後、被験菌は HI broth で 1 回洗浄した後、新しい HI broth 10 ml 中に移し、さらに 37°C で 4 時間培養した。次いで、10,000 rpm で 10 分間遠心を行なって上清を採取し、口径 0.45 μm のミリポアフィルターを通して無菌ファージ液を作製し

た。なお、ファージ液の力価は一応の日安として、recipient MS 353 株を用いて、重層法により測定した値で表現することとした。上述のファージ液と recipient MS 353 株を感染多重度 (MOI) が 1 以下になるように混合し、30℃ で 30 分間静置した後、集菌して HI broth で 3 回洗浄後、選択培地 (PCG: 1 µg/ml, TC: 10 µg/ml, CP: 5 µg/ml, EM: 2 µg/ml, KM: 20 µg/ml, GM: 10 µg/ml を各々含有する HI agar を使用) に塗抹した。そして、37℃ で 24 時間培養後に、選択培地上に生じた集落を釣菌して、数回選択培地上に継代培養した後、薬剤感受性を測定した。

### 3. 薬剤耐性の除去

HI broth に 37℃ で 18 時間培養した菌を、ethidium bromide (EB, Sigma) を 6.25~12.5 µg/ml 含有する HI broth に接種し、44℃ で 3 日間培養を行なった。同一条件で 3 代継代培養した後、被験菌を 10<sup>9</sup>/ml になるように希釈して HI agar 上に塗抹し、37℃ で一夜培養した。そして、発育した集落を 2) の項に記載した薬剤含有の培地と、薬剤を含有しない培地に同時に画線塗抹し、その培地上での発育の有無の対比から、薬剤耐性の脱落の有無を調べた。耐性の脱落したと思われる集落については、再度 HI agar 上で継代培養した後、寒天平板希釈法により正確にその MIC を測定した。

### 4. プラスミド DNA の分離と電子顕微鏡による観察

2) の方法により recipient MS 353 株へ GM 耐性が導入された株 MS 353 (pTU 053, PCG-EM-KM-GM 耐性) と MS 353 (pTU 068, KM-GM 耐性) について、DNA の解析を行なった。DNA の分離は既に報告<sup>3)</sup>した方法に準じているが、溶菌には lysostaphin (Sigma) を最終濃度が 50 µg/ml になるように加えて行なった。satellite DNA のピークが認められたものについては、電子顕微鏡による観察用の試料を山岸<sup>4)</sup>の方法に準じて作製し、日立 12U 型電子顕微鏡で観察および撮影を行なった。なお、プラスミド DNA の分子量は、DNA の 1 µm を 2.07×10<sup>6</sup> dalton として計算し

た<sup>5)</sup>。

### 5. Heteroduplex 法

プラスミド DNA の相同性については、DAVIS<sup>6)</sup>および SHARP<sup>7)</sup>らの Heteroduplex 法に準じて行なった。pTU 053 と pTU 512 の DNA を、各々 20 µl (1 µg/ml の DNA 含有) ずつと、0.2 M ethylenediamine-tetraacetate (EDTA, pH 8.5) を 20 µl 混合し、1 N の NaOH を加えて室温に 7 分間放置して DNA を変性させた。次いで、1 M の Trizma-HCl 20 µl と 0.2 M EDTA を 100 µl 加えて中和させた後、透析チューブに入れて、下記の透析液中で 2 時間室温にて透析し、DNA の再結合を行なった。

#### 透析液

ホルムアミド	70 ml
1 M Tris-HCl-0.1 M EDTA (pH 8.5)	10 ml
4 M NaCl	6.2 ml
蒸留水	13.8 ml

計 100 ml

続いて、下記の反応停止液中に移し、4℃ で 2 時間透析した。

#### 反応停止液

ホルムアミド	50 ml
1 M Tris-HCl-0.1 M EDTA (pH 8.5)	10 ml
蒸留水	40 ml

計 100 ml

上述の操作で得られた DNA 液は、前項の電子顕微鏡用試料作製方法と同様にしてメッシュ上に展開し、uranyl acetate による positive 染色後、白金パラジウムによる蒸着を行なった後、電子顕微鏡による観察を行なった。

## II. 結果

### 1. 薬剤耐性の伝達ならびに除去

TK 5553 株を donor とし、recipient MS 353 株へ薬剤耐性の導入を行なった際の実験成績は Table 1 に示

Table 1 Transduction from strain TK 5553 to strain MS 353

Resistance pattern: (PC, TC, CP, EM, KM, GM), Phage type: 81, Prophage type: 80/81

Selective drug	MOI	Transduction frequency	No. of transductants	No. of transductants resistant to:			
				PC-EM-KM-GM	EM	TC	CP
PC		—	—	0	0	0	0
TC		1.0×10 <sup>-7</sup>	45	0	0	45 (100%)	0
CP	0.33	2.0×10 <sup>-8</sup>	9	0	0	0	9 (100%)
EM		1.4×10 <sup>-7</sup>	63	23 (36.5%)	40(63.5%)	0	0
KM		2.3×10 <sup>-8</sup>	10	10(100%)	0	0	0
GM		1.4×10 <sup>-8</sup>	6	6(100%)	0	0	0

Table 2 Transduction from strain TK 5568 to strain MS 353  
Resistance pattern : (PC, TC, EM, KM, GM), Phage type : 81, Prophage type : 80/81

Selective drug	MOI	Transduction frequency	No. of transductants	No. of transductants resistant to :				
				KM GM	PC-EM-KM	EM	TC	
PC		—	—	0	0	0	0	
TC		$6.8 \times 10^{-8}$	15	0	0	0	15(100%)	
EM	0.54	$8.2 \times 10^{-8}$	18	0	10(55.6%)	8(44.4%)	0	
KM		$4.3 \times 10^{-7}$	94	90(95.7%)	4(4.3%)	0	0	
GM		$1.9 \times 10^{-7}$	107	107(100%)	0	0	0	

Table 3 Elimination of drug resistance from strain TK 5553 and TK 5568 after growth at 44°C with ethidium bromide

Strain	No. of colonies tested	Elimination of drug resistance to :			
		PCG	PCG-EM	GM	PCG-EM-KM-GM
TK 5553	500	0	0	0	468(93.6%)
TK 5568	732	137(18.7%)	448(61.2%)	9(1.2%)	0

Table 4 Minimal inhibitory concentrations of aminoglycoside antibiotics against *Staphylococcus aureus* studied

Strain (plasmid)	Minimal inhibitory concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )							
	Kana-mycin	Livido-mycin	Genta-micin	Dibekacin	Tobra-mycin	Sisomicin	Amikacin	Netilmicin
TK 5553	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50	100
MS 353 (pTU 053)	>100	>100	>100	>100	100	>100	6.25	50
TK 5568	>100	>100	>100	100	100	>100	12.5	50
MS 353 (pTU 068)	>100	3.13	>100	>100	100	>100	12.5	25
MS 353 (pTU 069)	>100	>100	0.2	0.2	0.1	0.1	1.56	0.39
MS 353 (pTU 512)	>100	>100	0.2	0.39	0.1	0.2	0.78	0.39

す。KM あるいは GM 含有の選択培地上に発育した集落は、すべて PCG, EM, KM および GM に同時に耐性を示し、この耐性型の導入頻度は  $1.4 \sim 2.3 \times 10^{-8}$  であった。EM 含有の選択培地上に発育した集落は、上述した耐性型を示す集落が約 1/3 であり、残りの約 2/3 は EM のみに耐性を示す集落であった。それらを含めての EM 耐性の導入頻度は、 $1.4 \times 10^{-7}$  であった。その他には、TC 単独耐性の導入が  $1.0 \times 10^{-7}$ 、CP 単独耐性の導入が  $2.0 \times 10^{-8}$  の頻度で認められたが、TC と CP の連関導入、あるいはその他の薬剤耐性との連関導入は認められなかった。

TK 5568 株から MS 353 株への薬剤耐性の導入に関する成績は Table 2 に示す。GM を含有させた選択培地上に発育した集落は、KM と GM に同時に耐性を示し、その導入頻度は  $4.9 \times 10^{-7}$  であった。一方、KM を含有させた選択培地上に発育した集落の中には、KM と GM に同時に耐性を示す集落が 95.7% と大部分を占めてい

たが、ごくわずかながら GM 耐性を含まず、PCG, EM および KM に同時に耐性を示す集落が 4.3% 認められた。EM を含有させた培地上には、KM 含有培地上で 4.3% にみられたものと同一の耐性型を示す集落と、EM のみに耐性を示す集落とが、ほぼ同頻度で認められた。EM 耐性の導入頻度は  $8.2 \times 10^{-8}$  であった。TC 含有の選択培地上に発育した集落は、すべて TC 単独耐性であり、その耐性導入頻度は  $6.8 \times 10^{-8}$  程度であった。この際にも、TC と連関して他の薬剤耐性が導入された集落は見出されなかった。

EB と温度処理の併用による TK 5553 株と TK 5568 株からの薬剤耐性の除去実験についての成績は、Table 3 に示したが、前者の株では調べた 500 集落中、468 集落 (93.6%) において、PCG, EM, KM および GM 耐性の脱落が同時に認められた。後者の TK 5568 株では、調べた 732 集落中、GM 耐性の脱落した集落が 9 集落 (1.2%) 認められ、PCG と EM の耐性が同時に脱落し

Fig. 1 EB-CsCl ultracentrifugation of the DNA from strain MS 353(pTU 053) labeled with [ $^3\text{H}$ ] thymidine

Cells were grown into logarithmic phase in defined medium(CY medium) in the presence of [ $^3\text{H}$ ]thymidine. Radioactive cultures were lysed and analyzed separately on ethidium bromide-cell gradients. Note the change of scale between fraction 31

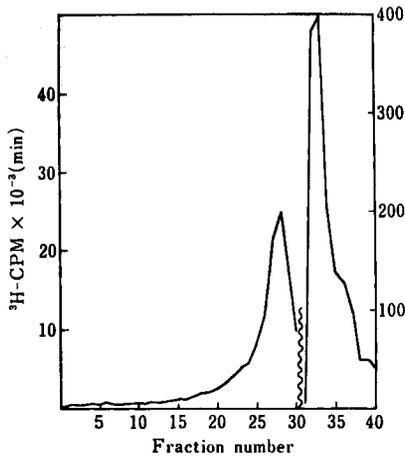
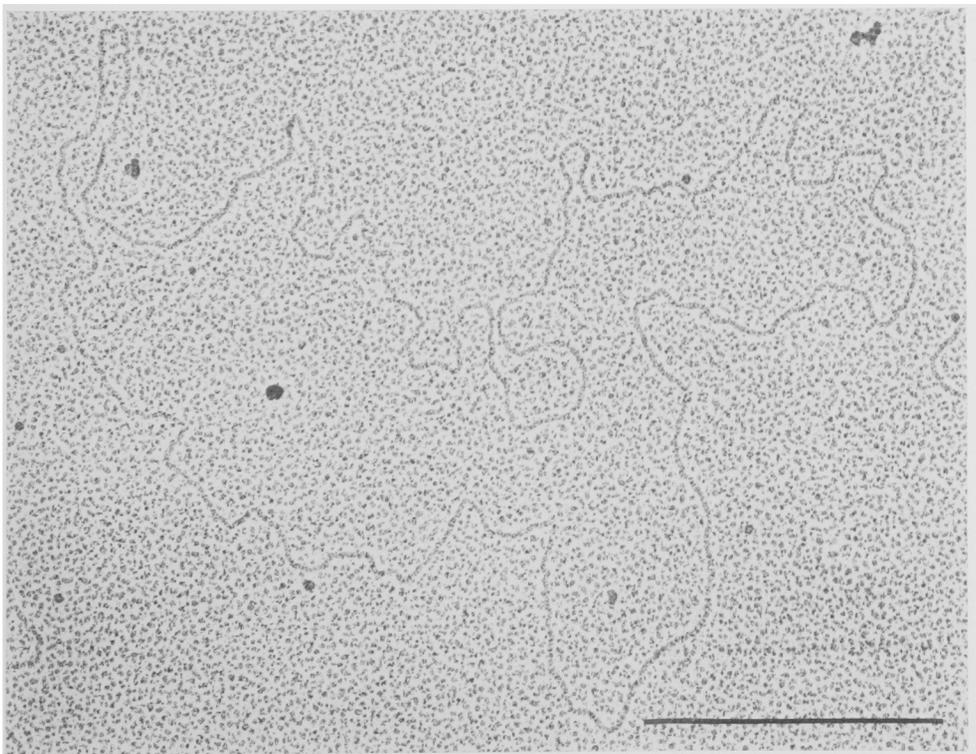


Fig. 2 Electron micrograph of open circular DNA from MS 353 (pTU 053)



た集落が 448 集落 (61.2%), その他に PCG のみが単独で脱落した集落が 137 集落 (18.7%) 認められた。

上記の実験成績から、TK 5553 株より PCG, EM, KM および GM の耐性が連関導入された株は MS 353(pTU 053), TK 5568 株から KM と GM の耐性が導入された株は MS 353 (pTU 068) と呼称することにした。また、TK 5568 株から PCG, EM および KM の導入された株は、MS 353 (pTU 069) とした。これらの transductant とその donor ならびに MS 353 (pTU 512) 株の各種 AGs 抗生物質に対する感受性は、Table 4 に示した通りであるが、それぞれの株によって、耐性を示す薬剤が若干異なっていた。

## 2. プラスミド DNA の解析

GM 耐性の導入された MS 353 (pTU 053) 株と、MS 353 (pTU 068) 株について、 [ $^3\text{H}$ ]-thymidine による DNA の標識を行ない、溶菌操作後超遠心によって核 DNA とプラスミド DNA を単離した。得られた成績のうち、MS 353 (pTU 053) についての成績を Fig. 1 に示したが、核 DNA とは別に明瞭な satellite DNA が認められた。また、その部分を電子顕微鏡下に観察すると、pTU 053 は Fig. 2 に示したように、比較的大きな環状 DNA が見出された。MS 353 (pTU 068) におい

Table 5 Contour length and estimated molecular weight of plasmid pTU 053 and pTU 068

Plasmid	No. of measured	Mean length ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ S. D.*	Estimated molecular weight**
pTU 053	20	15.5 $\pm$ 1.04 $\mu\text{m}$	32.1 $\times 10^6$ dalton
pTU 068	20	17.5 $\pm$ 1.21 $\mu\text{m}$	36.2 $\times 10^6$ dalton

\* S. D.: Standard deviation

\*\* Molecular weight of the plasmid were calculated by assuming 1  $\mu\text{m}$  of DNA to be equivalent to  $2.07 \times 10^6$  daltons

ても明瞭な satellite DNA が認められ、電子顕微鏡下でも MS 353 (pTU 053) と同様のプラスミド DNA の存在が確認された。それらの DNA 分子の中から、それぞれ 20 個を無作為に選び、環状分子としての大きさを測定した。その結果は Table 5 に示したが、pTU 053 が  $15.5 \pm 1.04 \mu\text{m}$  の大きさであり、この長さから推測される分子量は  $32.1 \times 10^6$  dalton であった。また、pTU 068 では DNA の大きさは  $17.5 \pm 1.21 \mu\text{m}$  であり、分子量は  $36.2 \times 10^6$  dalton と計算された。

3 回の繰り返し実験による核 DNA に対するプラスミド DNA の割合は、pTU 053 が平均 5.3%、pTU 068

で平均 1.7% であった。GILLIS ら<sup>9)</sup>の報告による黄色ブドウ球菌の核 DNA  $3 \times 10^9$  dalton を基に、両プラスミドの細胞当りの個数を算出すると、pTU 053 が 5 個、pTU 068 が 3 個程度と計算された。

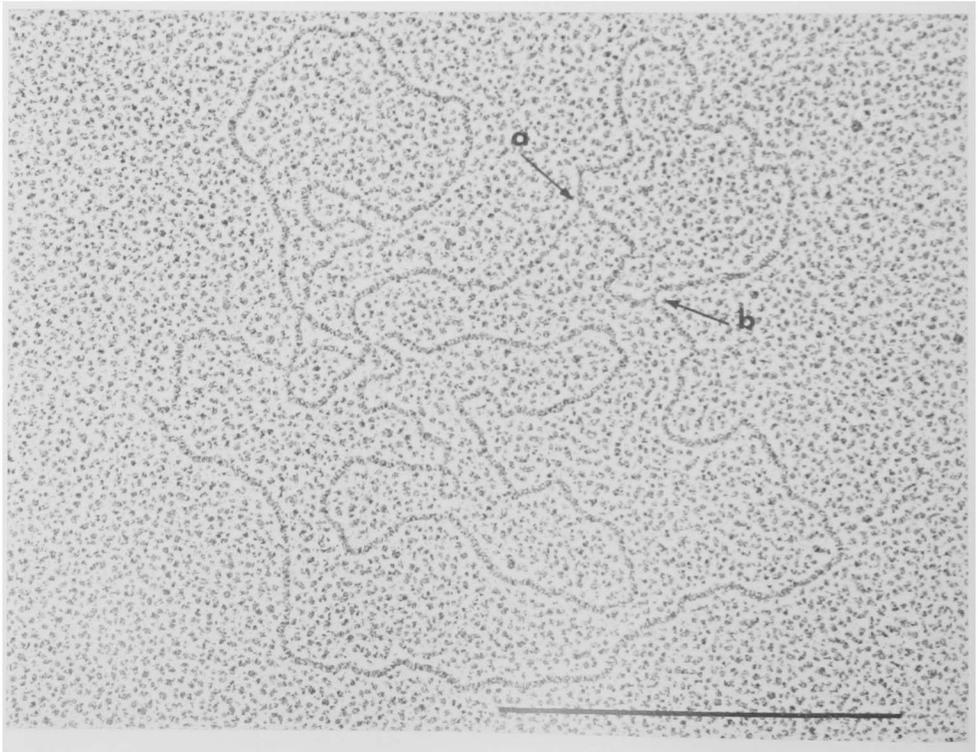
### 3. Heteroduplex 法によるプラスミド pTU 053 と pTU 512 の解析

GM 耐性遺伝子を含む pTU 053 (PCG-EM-KM-GM 耐性) と含まない pTU 512 (PCG-EM-KM 耐性) を、それぞれ等量ずつ混合し、方法の 5) 項に従って、DNA のアルカリ処理による変性、再結合を行ない、得られた DNA について電子顕微鏡下での DNA の 2 本鎖部分と 1 本鎖部分についての解析を行なった。Fig. 3 に示したように、pTU 053 ( $15.5 \mu\text{m}$ ) と pTU 512 ( $14.4 \mu\text{m}$ ) の DNA 鎖は、92.9% の部分が同一塩基配列をしているが、矢印で示した a から b の 3.5% の部分において、pTU 512 の DNA 鎖に pTU 053 とは異なった塩基配列部分のあることが認められた。

### III. 考 察

黄色ブドウ球菌における GM 耐性の導入に関する報告は既にいくつか散見されるが<sup>1,2,9,10)</sup>、その中では 1978 年に VOGEL ら<sup>9)</sup>によってなされた報告中に多少詳しい

Fig. 3 Electron micrograph of heteroduplex pTU 512 and pTU 053. Aloms a and b are the junctions of duplex DNA with single stranded DNA. Bar =  $1 \mu\text{m} \times 52,800$



記載がみられる。すなわち、彼らはタイピングフェージの 53 を用いて GM 耐性の導入実験を試みているが、donor とする株がフェージ型 III 群あるいは III 群を含む混合群の場合には、recipient にも同一のフェージ型の株を用いた方が導入頻度が高く、その頻度は  $5 \times 10^{-6}$  ~  $4 \times 10^{-8}$  程度であったと述べている。しかしながら、それらの報告中には臨床材料から分離した GM 耐性の黄色ブドウ球菌を donor として用いた成績はみられず、GM 耐性菌から溶原フェージを誘発して GM 感性菌への薬剤耐性の導入を試み、その詳細について述べたのは、恐らくこの報告が最初であろうと思われる。

この実験における GM 耐性の導入頻度は、TK 5553 株で  $1.4 \sim 2.3 \times 10^{-8}$ 、TK 5568 株で  $4.3 \sim 4.9 \times 10^{-7}$  程度であったが、ブドウ球菌の溶原フェージによる薬剤耐性の導入頻度としてはそれほど低い成績ではなかった。その中で最も注目されたのは、TK 5553 株から MS 353 株への耐性導入で、PCG, EM, KM および GM の連関導入がみられたことである。そして、それらの耐性遺伝子がひとつのプラスミド上に存在していることは、薬剤耐性の除去実験あるいは電子顕微鏡によるプラスミド DNA の解析などによっても明らかにできたと考えている。

既に報告のみられる黄色ブドウ球菌の GM 耐性の多くは、薬剤耐性の除去実験<sup>2,11,12)</sup> やその耐性型<sup>9,11,13)</sup> から推測すると、薬剤耐性に関しては AGs 抗生物質耐性遺伝子のみが存在しているプラスミドによって支配されているものが多いと思われ、TK 5568 株に見出された pTU 068 がその大きさは異なるものの、それらに近いものであろうと推察された。このことは、今までに報告されている GM 耐性を支配するプラスミドの大きさからも推測できよう。すなわち、VOGEL ら<sup>2)</sup> はプラスミドの大きさを  $11 \times 10^6$  dalton (35 S)、LE GOFFIC ら<sup>14)</sup> は  $2.7 \times 10^6$  dalton ( $1.4 \mu\text{m}$ ) および WOOD ら<sup>12)</sup> は 50 S と報告し、いずれのプラスミドもそれほど大きくはなく、著者らが見出した 2 つのプラスミドは黄色ブドウ球菌のプラスミドの中では大きい方に属するものである。

いずれにしても、著者らが分離したプラスミドが欧米のそれらに比較して大きいこと、それに加えて多種類の薬剤耐性の連関がみられたことは、かつての KM 耐性に関するプラスミドの違いにその端緒があるものと考えられる。すなわち、1976 年当時、著者ら<sup>15)</sup> が小児の重症ブドウ球菌感染症の病巣より分離した黄色ブドウ球菌 (PCG, TC, CP, EM, KM 耐性) は、すべて PCG-EM-KM 耐性を支配するプラスミドを保有していることが推定された。そして、そのうちの 1 株について詳細に検討した結果明らかにされたのが pTU 512 (PCG-EM-KM

耐性) と呼称したプラスミドであり、 $29.8 \times 10^6$  dalton の大きなプラスミドであった<sup>8)</sup>。一方、欧米におけるそれは大きさの点でもかなりの相違があり、それによって支配されている薬剤耐性は KM のみであった<sup>16,17)</sup>。

上述したようなことから、今回検出された GM 耐性が支配される pTU 053 の出現した背景を推察するために、pTU 512 と pTU 053 の DNA の相同性を検討し、その関連性を追求したものである。得られた成績からは、2 つのプラスミドはごくわずかの DNA 鎖部分が非相同である以外は完全に相同であることが見出されたが、この事実は pTU 053 はかつての pTU 512 に GM 耐性を支配する遺伝子がさらに組み込まれたものである可能性を示唆している。この詳細については、第 3 編で報告する AGs 抗生物質の耐性機構の成績と併せて、さらに第 3 編で考察したいと考えている。

いずれにしても、このような特徴を有する耐性菌出現の背景には、欧米と本邦における医療制度の相違による抗生物質の使用頻度あるいは使用量の違いが強く反映されていることが想像される。

#### 文 献

- BINT, A. J.; R. H. GEORGE, D. E. HEALING, R. WISE & M. DAVIES: An outbreak of infection caused by a gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Pathol. 30: 165~167, 1977
- VOGEL, L.; C. NATHAN, H. M. SWEENEY, S. A. KABINS & S. COHEN: Infections due to gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in a nursery for neonatal infants. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 466~472, 1978
- KONO, M.; M. SASATSU, K. UBUKATA, M. KONNO & R. FUJII: New plasmid (pTU 512), mediating resistance to penicillin, erythromycin, and kanamycin, from clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 691~694, 1978
- 日本生化学会編: 生化学実験講座 2, 核酸の化学 1, 10 章 電子顕微鏡による核酸分子の構造解析とその進歩 (山岸秀夫). 349~420 頁, 東京化学同人, 1975
- LANG, D.: Molecular weights of coliphages and coliphage DNA. III. Contour length and molecular weight of DNA from bacteriophages T4, T5 and T7, and from bovine papilloma virus. J. Mol. Biol. 54: 557~565, 1970
- GROSSMAN, L. & K. MOLDAVE: Method in enzymology. Academic press New York, 31. Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids (DAVIS, R. W., M. SIMON & N. DAVIDSON) 21: 413~428, 19

- 7) SHARP, P. A.; M. T. HSU, E. OHTSUBO & N. DAVIDSON: Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. I. Structure of F-prime factors. *J. Mol. Biol.* 71: 471~497, 1972
- 8) GILLIS, M.; J. D. LEY & M. D. CLEENE: The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12: 143~153, 1970
- 9) DOWDING, J. E.: Mechanisms of gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 47~50, 1977
- 10) PORTHOUSE, A.; D. F. J. BROWN, R. G. SMITH & T. ROGERS: Gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet* i: 20~21, 1976
- 11) SOUSSY, C. J.; D. H. BOUANCHAUD, J. FOUACE, A. DUBLANCHET & J. DUVAL: A gentamicin resistance plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Ann. Microbiol. (Paris)* 126 B: 91~94, 1975
- 12) WOOD, D. O.; M. J. CARTER & G. K. BEST: Plasmid-mediated resistance to gentamicin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 513~517, 1977
- 13) MCGOWAN, J. E.; P. M. TERRY, T. S. R. HUANG, C. L. HOUK & J. DAVIES: Nosocomial infection with gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*: plasmid analysis as an epidemiologic tool. *J. Infect. Dis.* 140: 864~872, 1979
- 14) LE GOFFIC, F.; A. MARTEL, M. L. CAPMAU, B. BACA, P. GOEBEL, H. CHARDON, C. J. SOUSSY, J. DUVAL & D. H. BOUANCHAUD: New plasmid-mediated nucleotidylation of aminoglycoside antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 258~264, 1976
- 15) 生方公子, 紺野昌俊, 沢井 稔, 斎藤洪太, 柳原義男, 高橋洋子, 藤井良知: 最近の重症ブドウ球菌感染症に対する疫学的研究, 第1編, 分離したブドウ球菌の各種抗生物質に対する感受性とその $\beta$ -lactamase について. *小児科臨床* 30: 865~876, 1977
- 16) CHOPRA, I.; P. M. BENNETT & R. W. LACEY: A variety of staphylococcal plasmids present as multiple copies. *J. Gen. Microbiol.* 79: 343~345, 1973
- 17) STIFFLER, P. W.; H. M. SWEENEY, M. SCHNEIDER & S. COHEN: Isolation and characterization of a kanamycin resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 516~520, 1974

## GENTAMICIN RESISTANCE IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED IN JAPAN

### PART 2: TRANSDUCTION OF DRUG RESISTANCE BY PHAGE LYSATE AND ANALYSIS OF PLASMID FROM GENTAMICIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

KIMIKO UBUKATA and MASATOSHI KONNO

Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Teikyo University

For the transduction of drug resistance, strains TK 5553 and TK 5568 were selected from gentamicin (GM)-resistant *Staphylococcus aureus* as donor. Strain MS 353 which has already been shown to lack plasmid deoxyribonucleic acid(DNA), was used as a recipient. Transduction experiments were performed by the phage lysate induced from donor strain with mitomycin C. Analysis of plasmid DNA was attempted to the resulting GM-resistant transductants.

The results were as follows:

1. In the transduction experiments by use of the phage lysate induced from strain TK 5553, resistance to penicillin G(PCG), erythromycin(EM), kanamycin(KM) and GM was always transduced to recipient strain simultaneously, and the transduction frequency was  $1.4\sim 2.3\times 10^{-8}$ . It was also found that the quadruple drug resistance was jointly eliminated by the treatment with ethidium bromide. Moreover, a single class of plasmid DNA was isolated from a transductant and found to be  $32.1\times 10^6$  daltons in molecular weight. From the above findings, it was strongly suggested that PCG-EM-KM-GM resistance was located on a single plasmid(named pTU 053).

2. In the transduction experiments by use of the phage lysate induced from strain TK 5568, transductants obtained from selective plates containing KM or GM could be classified into two resistant types: PCG-EM-KM resistance, KM-GM resistance. The transduction frequency of KM-GM resistance was about  $4.9\times 10^{-7}$ , and the plasmid DNA was  $36.2\times 10^6$  daltons(named pTU 068).

3. In heteroduplex experiments of two DNA's pTU 512(PCG-EM-KM resistance) and pTU 053 (PCG-EM-KM-GM resistance), 92.9% of pTU 053 DNA was found to be homologous with pTU 512 DNA.