

19980091

平成10年度
厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)

臨床分離バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 等の分子遺伝学的研究

研究報告書

平成11年4月

主任研究者 荒川 宜親

I. 総括研究報告書

臨床分離バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）等の分子遺伝学的研究
主任研究者 荒川 宜親 （国立感染症研・細菌・血液製剤部）

研究要旨

本研究では、VREの遺伝子型別や迅速検査法の検討ならびに、国内各地の医療施設等で分離されたVCMに耐性を示す菌について、その遺伝学的解析を行った。

PCR法を用いることなく、バンコマイシン(VCM)とテイコプラニン(TEIC)を含有する感受性試験用ディスクを用いることにより、臨床検査室の日常の業務の中で簡便に、*vanA*、*vanB*、*vanC*の耐性遺伝子の型を推定する方法を考案した。

また、国内の延べ23施設から検査依頼のあった65株のVREを疑う菌について上記の方法並びにPCR法を用いて遺伝子の解析を行った結果、3施設3株は*vanA*型VRE、2施設13株は*vanB*型VRE、8施設21株は*vanC*型VREと判定された。その他の施設からの分離菌は、VCM感受性の腸球菌あるいは、腸球菌以外のVCM生来耐性菌と推定された。例えば、*van*遺伝子陰性のVCM耐性菌について16SリボゾームRNAの解析を行ったところ、それらは、*Lactobacillus*属、*Leuconostoc*属などに含まれる菌であることが疑われた。

一方、VCMに耐性を示すが、TEICに低感受性を示す得意な*vanA*型VREが、国内の複数の医療施設から分離されたため、それらの遺伝学的特徴を解明するため*van*遺伝子領域を解析した結果、*vanS*遺伝子に3箇所、共通の変異が認められた。この変異は、アジア地域からの輸入鶏肉から分離されたVREにも共通に見られたため、輸入鶏肉を介して我が国にVREが侵入し、環境を薄くしかも広く汚染しつつある可能性が示唆された。

他方、VREを臨床検体からスクリーニングし、遺伝子型別を行うことを目的とした検査法（*TaqMan* VRE）などを開発した。その結果、従来の方法による結果と十分な一致が得られ、しかも、*ddl*遺伝子の同時検出を併用することで、類似の生化学的性状を示す*E. faecium*と*E. gallinarum*との識別を迅速かつ簡便に行うことが可能となった。

A. 研究目的

我が国では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)による感染症の治療薬として、バンコマイシン(VCM)の注射剤が1991年に認可されて以降広く用いられている。しかし、既に欧米では、VCMに耐性を獲得した腸球菌が1980年代に出現し、現在、米国では、病院の集中治療室(ICU)などで分離される腸球菌の20-50%がVREと報告され、大きな社会問題となっている。我が国ではVREの検出報告は未だ少なく欧米と状況が大きく異なっている。しかし、VCMやTEICがMRSA感染症の治療薬として用いられており、時間の経過とともに、近い将来、我が国も欧米と同じ状況に立ち至る事が懸念されている。VREによる環境汚染が未だ少ない我が国では、VREが出現したり、それによる感染症が発生した場合、実態を把握し、拡散を防止するための適切な対策を講じる必要がある。そのため、VREの現況に関する科学的情報を得る目的で、国内の医療施設から分離されるVREが疑われる菌に関し、それらの耐性遺伝子の型別や遺伝学的な解析を行なった。また、鶏肉由来株との遺伝学的比較検討や、VREの迅速・簡便な検出同定法に関しても検討を行った。

B. 研究方法

1. VCM耐性遺伝子の簡易的な識別法の確立

臨床検査室における日常的な業務の中で、PCR法などの特別な装置や試薬を用いることなく、VCM耐性遺伝子の型別をする方法を検討した。具体的にはNCCLSの方式に基づきMH寒天培地に被験菌を塗布した後、VCMとテイコプラニン(TEIC)を含有する感受性ディスク(KB)を置き、一夜培養後、阻止円の径を測定し、*vanA*、*vanB*、*vanC*遺伝子の型別を推定する方法を考案した。

2. PCR法を用いたVCM耐性遺伝子の判別

各地の医療施設から送られてきたVREを疑う菌株について、KBディスクを用いた試験により*van*遺伝子の型を推定した後、KBディスク法による感受性試験で用いたMH寒天培地上の、VCMディスクの近傍の菌をプラスチック製のエーゼで少量採り、滅菌精製水を1.0ml入れたエッペンドルフチューブに入れ10E6~7CFU/mlの程度の濃さに懸濁し、99℃で10分加熱処理した後、1500rpmで5分間遠沈する。

上清を15 μ l取り、タカラのTaqポリメラーゼを用いて添付のプロトコルに従い50 μ lの反応系でPCR反応を行います。サーマルサイクラーの設定は、94℃ 2分、94℃ 1分→53~57℃ 1分→70~72℃ 1.5分（30サイクル）、70~72℃ 5分、4℃（保存）を用いた。*vanA*遺伝子検出用のPCRプライマーは
(5'-gtacaatgcgccgta-3') (5'-gggaaaacgacaattgc-3')

*vanB*遺伝子検出用のPCRプライマーは
(5'-gatttcgttcctcgacc-3') (5'-atgggaagccgatagtc-3')
*vanC*遺伝子検出用のPCRプライマーは
(5'-ggtatcaaggaacctc-3') (5'-cttcgccatcatagct-3')
を用いた。

3. 16S リボゾームRNAによる菌種の推定

PCR法により*vanA*、*vanB*、*vanC*遺伝子いずれも陰性の株に対しては、16S リボゾームRNAの菌種特異的な領域の塩基配列を決定することで菌種を推定した。PCRプライマーは、Van de Peerらの方法により細菌の16Sリボゾームに共通した領域を増幅する2種類のプライマーと、種特異的な領域を増幅する2種類のプライマーの2組を用い、dye terminator法により塩基配列の決定を行った。

4. *van*遺伝子領域の解析

臨床分離された*vanA*型VREの中に、VCMには耐性を示すものの、TEICには低感受性を示すという非典型的な薬剤耐性を示す株が数株認められたため、その原因を解明する目的で、*van*遺伝子領域の塩基配列を解析した。

5. TaqMan PCRによるVREの型別

VREを臨床検体からスクリーニングし、遺伝子型別を行うことを目的とした検査法 (TaqMan VRE) などを開発した。また、*ddl*遺伝子の同時検出を併用することで、類似の生化学的性状を示す*E. faecium*と*E. gallinarum*との識別を迅速かつ簡便に行うことを試みた。

6. *vanB*型VREのPFGE

某施設から分離された12株の*vanB*型VREのPFGEを定法により行った。

C. 研究結果

1. VCM耐性遺伝子の簡易的な判別法の確立

特別な試薬や装置を用いることなく、細菌検査室の日常の業務の中で*vanA*、*vanB*、*vanC*遺伝子の型別を推定する方法として、VCMとTEICの2種類のKBディスクを組み合わせる方法を確立した。

この方法によれば、*vanA*型のVREは、両方のディスクの周囲に阻止円が形成されない。*vanB*型のVREの場合は、VCMのディスクの周囲に阻止円が形成されないものの、TEICのディスクの周囲に阻止円が形成される。*vanC*型のVREの場合は、両方のディスクの周囲に阻止円が形成される。但し、臨床分離株や鶏肉由来の*vanA*型VREの一部に、VCMに耐性を示すもののTEICに低感受性を示す株が存在し、一見*vanB*型VREと類似の耐性パターンを示すものがあり

その場合は、PCRによる鑑別が必要となる。

2. PCR法を用いたVCM耐性遺伝子の判別

国内の延べ23施設から分離された65株のVREを疑う菌について上記の方法ならびにPCR法を用いて遺伝子の解析を行った結果、3施設3株は、*vanA*型VRE、2施設13株は、*vanB*型VRE、8施設21株は、*vanC*型VREと判定された。その他の株は、VCMに低感受性や耐性を示したが、*vanA*、*vanB*、*vanC*遺伝子は全て陰性であり、腸球菌以外のVCMに生来耐性を示す菌種であると考えられ、16Sリボゾームの塩基配列の解析を行った。

3. 16S リボゾームRNAによる菌種の推定

PCR法により*vanA*、*vanB*、*vanC*遺伝子が陰性と判定された株について、16Sリボゾームの塩基配列を部分的に決定し、DNAデータベースと照合したところ、それらは、*Lactobacillus*属や*Pediococcus*属、*Leuconostoc*属に属するVCM生来耐性菌であることが示唆された。

4. *van*遺伝子領域の解析

3株の*vanA*型VCM耐性、TEIC低感受性のVREの塩基配列を解析したところ、センサー蛋白であるVanSをコードする*vanS*遺伝子内の3箇所に、共通した点変異が認められた。この変異は、輸入鶏肉から分離されたVCM耐性、TEIC低感受性の*vanA*型VREにも共通に存在しており、患者由来株が輸入鶏肉に由来する可能性が強く示唆された。

5. TaqMan PCRによるVREの型別

VREを臨床検体からスクリーニングし、遺伝子型別を行うことを目的とした検査法 (TaqMan VRE) などを開発した。その結果、従来の方法による結果と十分な一致が得られ、しかも、*ddl*遺伝子の同時検出を併用することで、類似の生化学的性状を示す*E. faecium*と*E. gallinarum*との識別を迅速かつ簡便に行うことが可能となった。

6. *vanB*型VREのPFGE

12株の*vanB*型VREのPFGEを別図1に示す。人から分離された4株と、院内環境から分離された8株は、互いに近縁の関係にあることが示唆された。

D. 考察

1991年にMRSA感染症に対し点滴静注によるVCMの使用が認可されるようになってから、8年が経過した。欧米では、VCMの使用量の増加に伴い、VREの分離数や分離率が増大し、大きな問題となっている。我国では、平成9年に厚生省がVREに注意を喚起する「通達」を出して以来、VREに対する医療関係者の関心も高まりつつあるが、今回の調査では、臨床分離されたVREの大半が*vanC*型であり、*vanA*型や*vanB*型のVREは、未だ少数となっている。この事

実は、国内の*vanA*、*vanB*型VREによる汚染状況は欧米と比べても著しく低い事を示唆しており、VREの蔓延を防止する上で、現時点での有効な対策が重要となっている。したがって、我が国の医療機関は、CDCのガイドラインの中で、VREが未だ検出されていない医療施設における対策法に基づき、的確な院内感染対策等を実施する必要がある。

輸入鶏肉の一部に*vanA*型VREによって汚染されているものがあることが、1998年の池らの調査で判明している。今回の調査・研究により臨床分離株の一部に、輸入鶏肉由来のVREと同じ複数の点変異を持つ株が存在する事が明らかとなった。この事実は、我が国で臨床分離される*vanA*型VREの一部が、輸入鶏肉と密接に関連する可能性を強く示唆しており、輸入鶏肉における、VREの検査の充実を急ぐ必要がある。また、汚染が確認された場合は、輸出国に対ししかるべき対策を求め、VREによるこれ以上の国内環境の汚染の進行を未然に防ぐ必要がある。

今回、各地の医療施設から検査依頼のあったVRE疑いの菌の中に、少なからず*Lactobacillus*や*Leocostoc*などの生来VCM耐性菌が散見された。これは、市販されているVREスクリーニング用培地を用いた場合、これらの菌種も同時に選択してしまうという、検査法の限界を示している。*Enterococcus*の菌種の精確な同定や*Lactobacillus*や*Leocostoc*などの判別には、かなりの知識と経験が必要であることから、(社)日臨技などの学術・職能団体による制度管理のための技術講習会などを検討する必要がある。

平成11年4月からの法律の施行にともない、各施設の検査室においてVREの検出と同定を行い、VREが分離された場合は、報告が求められている。PCR法を用いることなく、簡便に*van*遺伝子の型を推定する方法を考案したが、国内でVCM耐性、TEIC低感受性という、*vanB*型の耐性パターンを示す*vanA*型VREが複数の施設から分離されている事もあり、鑑別のためにはTaqMan PCRによるVREの型別や、*ddl*遺伝子の同時検出を行う検査法なども有用と考えられる。しかし、日常の検査業務の中で実施するためには、検査コストの引き下げ等の改善が必要であろう。

12株の*vanB*型VREのPFGEの結果から、それらは互いに近縁の関係に有ることが示唆された。しかしその伝播経路や院内感染であるか否かの情報は、患者や医療従事者の動線などを詳しく検討する必要があり、今回はこれ以上の解析は実施しなかった。

E. 論文発表等

1. 荒川宜親、腸球菌・バンコマイシン耐性、小児科

臨床 52:513-516, 1999

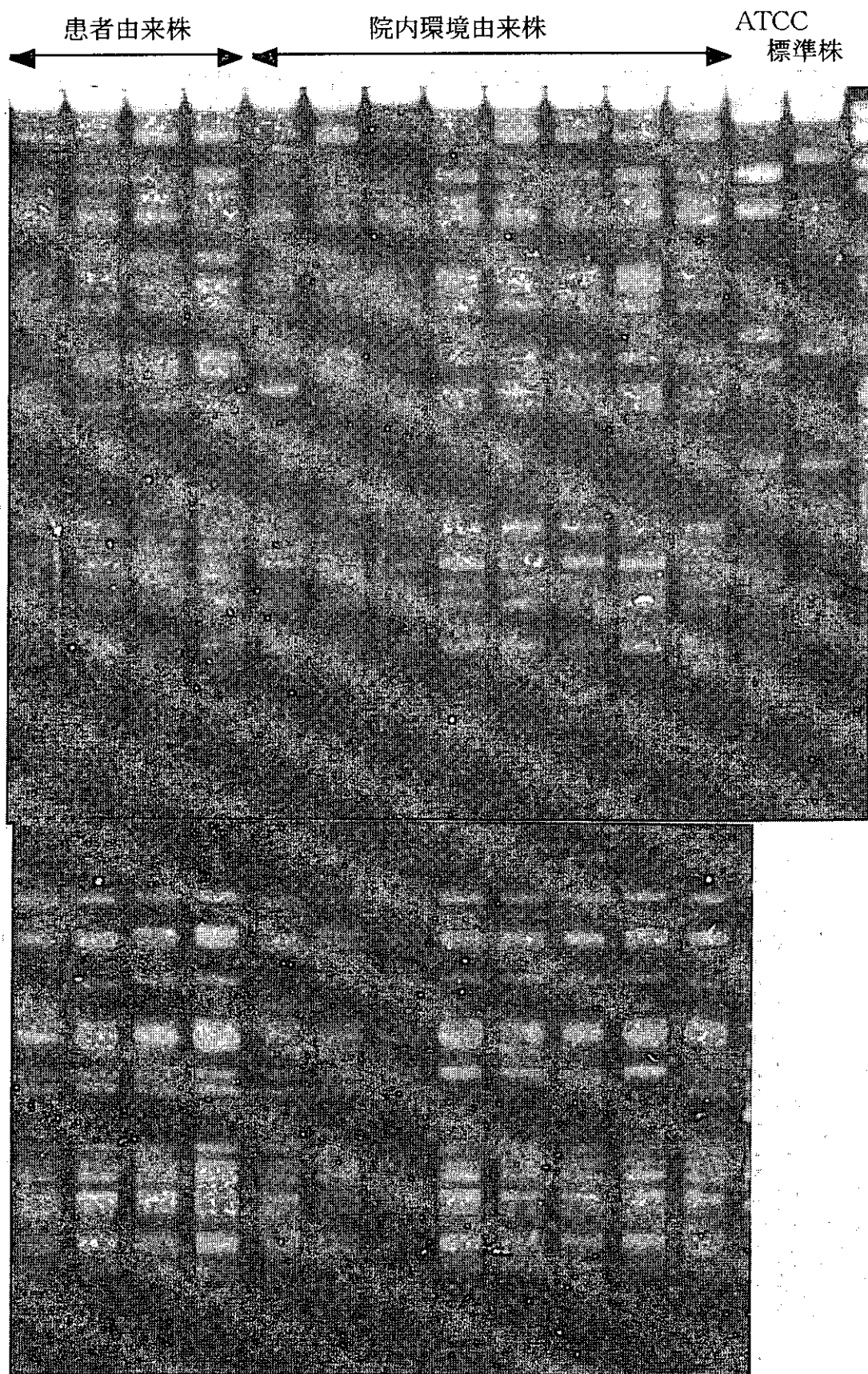
2. H. Tomita, S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike: Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. J. Bacteriol. 179:7843-7855, 1997.
3. Y. Ozawa, K. Tanimoto, S. Fujimoto, H. Tomita, and Y. Ike: Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. J. Bacteriol. 179:7468-7475, 1997.4. N. Fujita, M. Yoshimura, T. Komori, K. Tanimoto, Y. Ike: Letters to the Editor. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 42:2150, 1998
5. Y. Ike, K. Tanimoto, H. Tomita, K. Takeuchi, and S. Fujimoto: Efficient Transfer of the Pheromone-Independent *Enterococcus faecium* Plasmid pMG1 (Gmr) (65.1 Kilobases) to *Enterococcus* Strains during Broth Mating. J. Bacteriol., 180:4886-4892, 1998.
6. X. Ma, M. Kudo, A. Takahashi, K. Tanimoto, and Y. Ike: Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. J. Clin. Microbiol. 36:2460-2464, 1998
7. A. Shiono and Y. Ike: Isolation of *Enterococcus faecalis* clinical isolates that efficiently adhere to human bladder carcinoma T24 cells and inhibition of adhesion by fibronectin and trypsin treatment. Infection and Immunity 67:1585-1592, 1999

F. 学会発表・講演・その他

1. 荒川宜親、平成10年度 院内感染対策に関する講習会、国立大阪病院、バンコマイシン耐性腸球菌、2月17日
2. 荒川宜親、平成10年度 食品保健特殊技術講習会、薬剤耐性菌の出現とその蔓延—その社会的インパクト—、国立公衆衛生院、港区白金、2月23日
3. 荒川宜親、バンコマイシン耐性腸球菌、感染症情報センターホームページ、
<<http://idsc.nih.gov/jp/others/vre-index.html>>

検査結果

VRE12株(*vanB*)のPFGE結果



実施者：細菌部 和田昭仁

II. 分担研究報告書

VRE等の再同定とAP-PCR解析およびPFGE解析の研究
—臨床分離バンコマイシン耐性腸球菌等の遺伝子型別—

主任研究者 荒川 宜親（国立感染症研・細菌・血液製剤部）
研究協力者 黒川 博史、八木 哲也、柴田 尚宏（同上）

研究要旨

本研究では、平成10年度に臨床分離されたVREの遺伝子型別の推定法や迅速検査法の検討ならびに、国内各地の医療施設等で分離されたVCMに耐性を示す菌について、遺伝学的解析を行った。

van遺伝子の型別を確定するには、PCR法が確実であるが、一般の検査室における日常業務の中でこの検査法を用いることは、コストの面などで実用性に問題がある。そこで、バンコマイシン(VCM)とテイコプラニン(TEIC)を含有する感受性試験用ディスクを組み合わせて用いることにより簡便に、vanA、vanB、vanCの耐性遺伝子の型を推定する方法を考案した。これにより、平成11年4月より施行された「新感染症法」で報告が義務づけられたVREのvan遺伝子の推定を、一般の検査室でも実施することが可能となると期待される。

また、国内の延べ23施設から新たに検査依頼のあった65株のVREを疑う菌について、上記の方法ならびにPCR法を用いて遺伝子の解析を行った。調査を開始した以降の検査結果は、3施設の3株はvanA型VRE、2施設の13株はvanB型VRE、8施設の21株はvanC型VREと判定された。その他の施設からの分離菌は、van遺伝子陰性のVCM感受性腸球菌あるいは、腸球菌以外のVCM生来耐性菌と推定された。例えば、van遺伝子陰性のVCM耐性菌について、16S リボゾームRNAの解析を行ったところ、それらは、*Lactobacillus*属、*Leuconostoc*属などに含まれる菌であると判定された。この結果は、市販のVRE選択分離培地の一層の改良が必要であることを示している。

A. 研究目的

我が国では、MRSA感染症の治療薬として注射用のバンコマイシン(VCM)が1991年以降広く用いられている。しかし、既に欧米ではVCMに耐性を獲得した腸球菌(*Enterococci*)が1980年代に出現し、現在、ICUなどがこの菌によって広く汚染されるなど深刻な事態に陥っている。我が国では、幸いにもVREの検出例は未だ少なく、散発的な報告が有るのみであるが、VCMやテイコプラニン(TEIC)の使用の今後の状況によっては、近い将来、我が国も、欧米と同様の事態に直面する事が懸念される。そこで、国内におけるVREへの対策を講じる上で、その参考となる科学的根拠を得るため、国内におけるVREの分離状況を把握する目的で、本研究を行った。また、細菌検査室における日常業務の中で、VREの耐性遺伝子の型別を簡便に推定する方法等を検討した。

B. 研究方法

1. VCM耐性遺伝子の簡易推定法の確立

臨床検査室における日常的な業務の中で、PCR法などの特別な装置や試薬を用いることなく、VCM耐性遺伝子の型別を簡便に推定する方法を検討した。具体的にはNCCLSの方式に基づきMH寒天培地に被験菌を塗布した後、VCMとTEICを含有する感受性ディスク(KB)を置き、一夜培養後、阻止円の径を測定し、vanA、vanB、vanC遺伝子の型別を推定する方法を考案した。

2. PCR法を用いたVCM耐性遺伝子の判別

各地の医療施設から送られてきたVREを疑う菌株について、KBディスクを用いた試験によりvan遺伝子の型を推定した後、KBディスク法による感受性試験で用いたMH寒天培地上の、VCMディスクの近傍の菌をプラスチック製のエーゼで少量採り、滅菌精製水を1.0ml入れたエッペンドルフチューブに入れ10E6~7 CFU/mの程度の濃さに懸濁し、99℃で10分加熱処理した後、15000rpmで5分間遠沈する。

上清を15μl取り、タカラのTaqポリメラーゼを用いて添付のプロトコルに従い50μlの反応系でPCR反応を行います。サーマルサイクラーの設定は、94℃ 2分、94℃ 1分→53~57℃ 1分→70~72℃ 1.5分（30サイクル）、70~72℃ 5分、4℃（保存）を用いた。

vanA遺伝子検出用のPCRプライマーは

(5'-gtacaatgcggccgta-3') (5'-gggaaaacgacaattgc-3')

vanB遺伝子検出用のPCRプライマーは

(5'-gatttcgttctcgcacc-3') (5'-atgggaagccgatagtc-3')

vanC遺伝子検出用のPCRプライマーは

(5'-ggtatcaaggaaacctc-3') (5'-cttccgccatcatagct-3')

を用いた。

3. 16S リボゾームRNAによる菌種の推定

PCR法によりvanA、vanB、vanC遺伝子いずれも陰性の株に対しては、16S リボゾームRNAの菌種特異的な領域の塩基配列を決定することで菌種を推定した。PCRプライマーは、Van de Peerらの方法により

細菌の16Sリボゾームに共通した領域を増幅する2種類のプライマーと、種特異的な領域を増幅する2種類のプライマーの2組を用い、dye terminator法により塩基配列の決定を行った。

C. 研究結果

1. VCM耐性遺伝子の簡易的な判別法の確立

特別な試薬や装置を用いることなく、細菌検査室の日常の業務の中で*vanA*、*vanB*、*vanC*遺伝子の型別を推定する方法として、VCMとTEICの2種類のKBディスクを組み合わせる方法を確立した。

この方法によれば、*vanA*型のVREは、両方のディスクの周囲に阻止円が形成されない。*vanB*型のVREの場合は、VCMのディスクの周囲に阻止円が形成されないものの、TEICのディスクの周囲に阻止円が形成される。*vanC*型のVREの場合は、両方のディスクの周囲に阻止円が形成される。(図1)但し、臨床分離株や鶏肉由来の*vanA*型VREの一部に、VCMに耐性を示すもののTEICに低感受性を示す株が存在し、一見*vanB*型VREと類似の耐性パターンを示すものが存在し、その場合は、PCRによる鑑別が必要となる。

2. PCR法を用いたVCM耐性遺伝子の判別

国内の延べ23施設から分離された65株のVREを疑う菌について上記の方法ならびにPCR法を用いて遺伝子の解析を行った結果、3施設3株は、*vanA*型VRE、2施設13株は、*vanB*型VRE、8施設21株は、*vanC*型VREと判定された(表1)。その他の株は、VCMに低感受性や耐性を示したが、*vanA*、*vanB*、*vanC*遺伝子は全て陰性であり、腸球菌以外のVCMに生来耐性を示す菌種であると考えられ、16Sリボゾームの塩基配列の解析を行った。

3. 16SリボゾームRNAによる菌種の推定

PCR法により*vanA*、*vanB*、*vanC*遺伝子が陰性と判定された株について、16Sリボゾームの塩基配列を部分的に決定し、DNAデータベースと照合したところ、それらは、*Lactobacillus*属や*Pediococcus*属、*Leuconostoc*属に属するVCM生来耐性菌であることが示唆された。

D. 考察

1991年にMRSA感染症に対し点滴静注によるVCMの使用が認可されるようになってから、8年が経過した。欧米では、VCMの使用量の増加に伴い、VREの分離数や分離率が増大し、大きな問題となっている。我国では、平成9年に厚生省がVREに注意を喚

起する「通達」を出して以来、VREに対する医療関係者の関心も高まりつつあるが、今回の調査では、臨床分離されたVREの大半が*vanC*型であり、*vanA*型や*vanB*型のVREは、未だ少数となっている。この事実は、国内の*vanA*、*vanB*型VREによる汚染状況は欧米と比べても著しく低い事を示唆しており、VREの蔓延を防止する上で、現時点での有効な対策が重要となっている。したがって、我が国の医療機関は、CDCのガイドラインの中で、VREが未だ検出されていない医療施設における対策法に基づき、的確な院内感染対策等を実施する必要がある。

市販のVRE選択培地を用いた場合、VRE以外にVCMに生来耐性を示す細菌である、*Leuconostoc*属や*Pediococcus*属、*Lactobacillus*属なども生育し、VREと鑑別する必要が生じる。その場合、生化学的性状や生物学的検査を行うが、その前に、グラム染色で桿菌か球菌かを識別することで、VRE以外を概ね除外可能である。今回の調査研究では、腸球菌以外のVCM耐性菌の検査依頼があったが、市販のVRE選択培地の一層の改良が望まれる。また、培地の価格も1枚数百円と割高であるため、スクリーニング検査用の安価な培地の供給が望まれる。

「新感染症法」の施行に伴い、平成11年4月1日からVREの報告が義務つけられた。しかし、病院の検査室の日常業務の中で、PCR検査を実施し、*van*遺伝子の型別を行うことは、検査コストの点などで未だ実際的ではない。したがって、日常の感受性試験に用いる方法を応用して*van*遺伝子の型を推定する方法の確立が不可欠となっている。本研究では、PCR法を用いず、*van*遺伝子の型別を推定する方法を考案したが、この方法は概ねPCR法に置き換えることが可能と考えられ、検査室での実施を推奨していく必要がある。

国内でのVREの検出は稀となっており、その理由として検査法の不備が指摘されている。しかし、現在、VREに対する関心も高まっており、実際に多くの医療施設においてVREの検出が試みられている。しかし、*vanA*、*vanB*型のVREの報告は少なく、その多くが*vanC*型となっている。しかもその検体の多くが、便という傾向がある。腸球菌は、腸管の常在菌であるため、便から分離された場合でもVCMの感受性試験を行わない場合もあるが、特に、VCMによる治療を受けている患者では、定期的な監視培養が必要であろう。

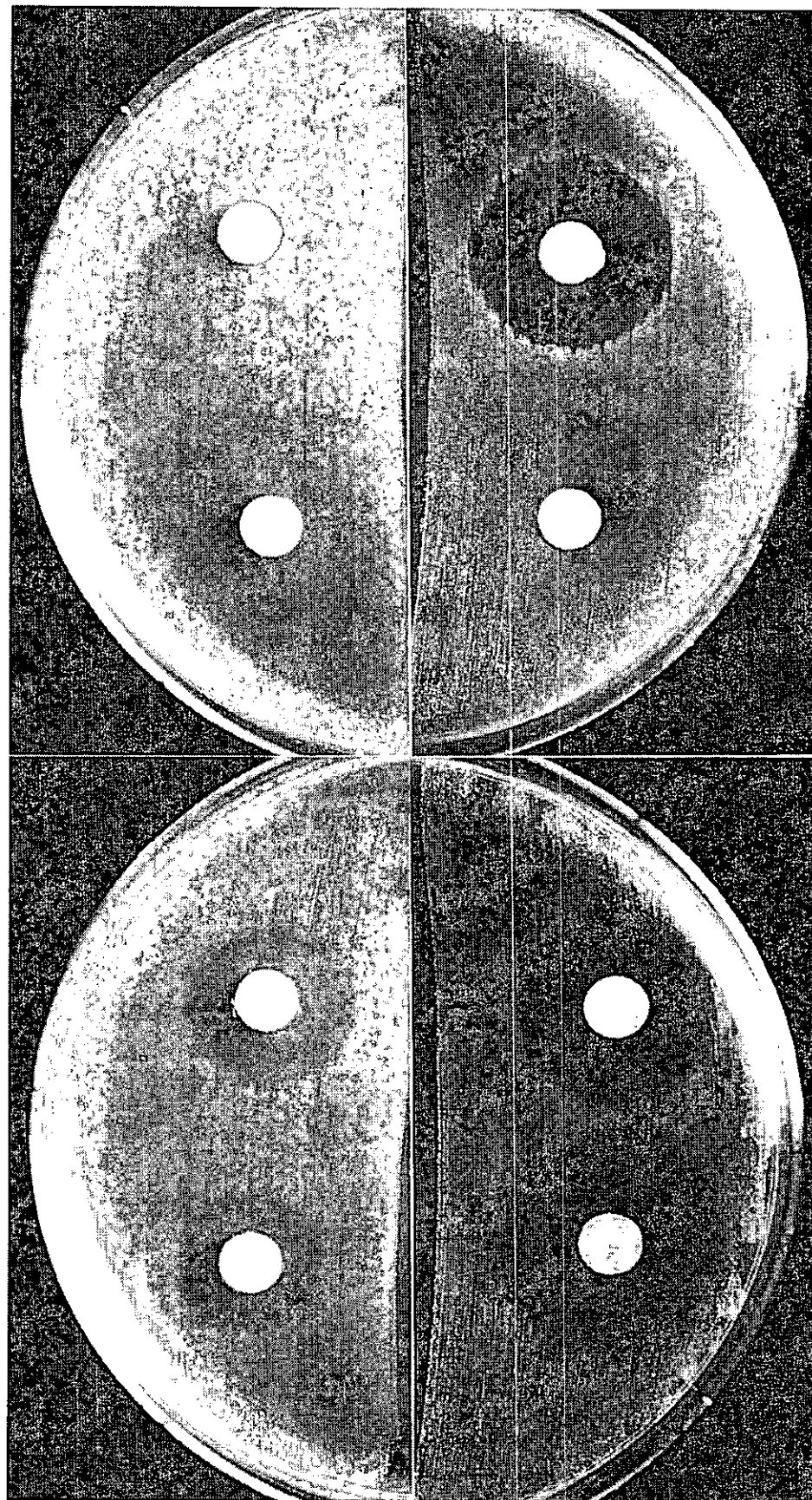
図1 KBディスク法によるVREのvan遺伝子型の推定法

vanC 型VRE

バンコマイシン テイコプラニン

vanA 型VRE

バンコマイシン テイコプラニン



バンコマイシン テイコプラニン

バンコマイシン テイコプラニン

van 遺伝子陰性腸球菌

vanB 型VRE

表1 国内で分離されたVCM耐性菌の解析結果

検査依頼の あった施設等	検査した株数	遺伝子型	患者数・その他
調査開始以前に確認されていた事例			
----	1株	A	1名
----	4株	A	4名
----	2株	A	2名 (TEIC低感受性)
調査開始後に新たに確認された事例			
----	1株	陰性	<i>Lactobacillus pentosus</i> の近縁種
----	4株	C	
----	2株	陰性	
----	1株	陰性	
----	4株	C	
----	12株	B	4人+手すり(5ヶ所)+病棟(3ヶ所)
----	6株	陰性	
----	1株	陰性	
----	4株	C	
----	2株	C	
----	2株	陰性	<i>Leuconostoc</i>
----	1株	B	
----	1株	陰性	VCM感受性腸球菌
----	1株	陰性	<i>E. saccharolyticus</i> に近い菌種
----	1株	C	
----	1株	C	
----	4株	A	(CDC標準株)
----	2株	陰性	
----	1株	A	(TEIC低感受性)
----	1株	陰性	<i>Lactobacillus</i> 属
----	1株	A	(TEIC低感受性)
----	1株	A	(TEIC低感受性)
----	3株	C	
----	1株	陰性	VCM感受性腸球菌
----	1株	A	(厚生省へ未報告)
----	1株	陰性	VCM感受性腸球菌
----	2株	C	
----	1株	陰性	VCM感受性腸球菌
その他	2株	A	2名 (TEIC低感受性)

調査開始後			
延べ23施設	65株		

分担研究報告書
蛍光プローブをもちいた PCR による
バンコマイシン耐性腸球菌の遺伝子型別方法の開発

分担研究者 和田昭仁、村井則之、渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌部

研究要旨

本邦でも分離報告が見られるようになった、バンコマイシン耐性腸球菌を臨床検体からスクリーニングし、蛍光プローブを用いた PCR により、遺伝子型別する方法を開発した。また、*vanA*、*vanB* が検出される頻度が高い *E. faecalis*, *E. faecium* の *ddl* をも同時に増幅することにより、これらの、運動性 (-) の菌の同定を可能にした。迅速性と、簡便さにすぐれたこの手法は、院内感染防止手段を取るための情報を与えるのに有効であると考えられた。

A. 研究目的

欧米においては、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) による院内感染は、1989 年より増加の一途をたどっており、その危険因子として、バンコマイシンを含む複数の抗生剤の前投与、重篤な基礎疾患、免疫抑制状態、開腹手術などが、指摘されている。ヨーロッパにおいては、養鶏に成長促進剤として投与されていた、アボパルシンが VRE 出現を招いたとの考え方が受け入れられているが、アメリカにおいては、この添加剤が認可されていないにもかかわらず VRE 感染の増加傾向が見られており、治療薬として使われているバンコマイシンの大量使用が VRE の分離率増加に寄与していると考えられている(1,2)。本邦においては、輸入食鳥からの VRE の検出が報告される一方(3)、バンコマイシンの使用量も顕著に増大しており(4)、近いうちに、VRE が、院内感染起炎菌として高率に分離されるようになることが予想される。

現在、VRE に関する問題点として、

1. 1999 年 4 月 1 日から感染症新法に VRE は 4 類、全例報告疾患として挙げられている。対象患者、検査法に関するマニュアルが必要とされる。
2. 検査全般にわたるクオリティーコントロール

が要求される。

3. 感染症新法施行にともない、増加する検査、それに必要な人員、費用を現在の医療保険点数体系で、サポートされないために、実際に、VRE を検出する検査が行われるか疑問である。
4. このような状態で得られるサーベイランスの数字の信頼性に疑問が残る。
ことがあげられる。

われわれは、過去 2 年間にわたる班研究の成果として、一般の細菌検査室でも実施可能な VRE のスクリーニング、検出、同定、遺伝子型別方法を示してきた。今回の報告では、実際に、院内感染防止対策上有用な、より迅速な、VRE の同定法に関して報告する。

B. 研究方法

菌株とその同定法

標準菌株として、*E. faecalis* ATCC29212 (wild type), *Enterococcus faecium* ATCC51559 (*vanA*), *E. faecalis* ATCC51299 (*vanB*), 臨床分離 *E. gallinarum* (*vanC-1*), 臨床分離 *E. casseliflavus* (*vanC-2*), *E. faecium* BM4339 (*vanD*, Dr. P. Courvalin より分与)(5)を用いた。臨床分離菌の同定には、ストレプトグラム (テルモ株式会社、東京)と、用手法による運動性の検査をおこなった。臨床より分離された菌は、バンコマイシン 6 mg/L 含有 BHI 培地 (Difco, MI,

USA)に塗布後、35度、一晚培養をおこない、コロニーを形成した菌を検査対象とした。

遺伝子検出

遺伝子型別を行うために、以下の方法で菌からDNAを抽出した。コロニーを、0.1 mlの100 mg/L mutanolysin (Sigma, MO, USA)を含むバッファーに McFarland 1 程度にけん濁後、37度、30分インキュベート、その後、DNA Extraction Reagent (PE Biosystems, CA, USA)を等量加え、95度で、10分インキュベートしたのち、細胞残さと、イオン交換樹脂を遠沈、上清2 µlをPCRのテンプレートとして用いた。*vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3*, *vanD*, *E. faecalis ddl (ddlfaecalis)*, *E. faecium ddl (ddlfaecium)*の各々に対して、DNA データベースから、Primer Express (PE Biosystems)ソフトウェアの助けを借りて、プライマーと、プローブを設定した。すべてのプローブは、5'をFAM (reporter dye) で、3'をTAMRA (quenching dye) でラベルした。蛍光の検出はABI PRISM 7200 (PE Biosystems)をもちい、マニュアルにしたがってPCR前後の蛍光強度を比較した。陽性と陰性の判断基準は99.9%に設定した。全反応量は25 µl中には、1 X TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems)、5 mM MgCl₂、各プライマー 800 nM、各プローブ 400 nMが含まれている。PCRの条件は、50 C 2分、95 C 10分のHoldのあと、95 C 15秒、63 C 1分の2ステップPCRを30回行った。

C. 研究結果

蛍光プローブによる *van* 型別

最初に、標準菌株から、proteinaseK、phenol処理にて抽出したDNAをtemplateとして、*van*型別と*E. faecalis*, *E. faecium*の*ddl*検出をおこなったところ、*vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3*すべてが正しく判定され、*van*遺伝子を持たない、*E. faecalis* ATCC29212は、*van*増幅は陰性であった。また、*ddlfaecalis*, *ddlfaecium*も正しく判定された。つぎに、標準菌株の菌体から、mutanolysin

をもちいて、研究方法の項で記述した方法により抽出したDNAをテンプレートとして、遺伝子型別を行ったところ、精製DNAと同様に、すべて正しく判定された。

菌種同定

前年の報告書で述べたように、*Enterococcus*属の同定には、市販キットが簡便であるが、*E. faecalis*, *E. faecium*と、*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavascens*を同定するには、キットで得られる情報以外に、運動性検査が必要である(特に、*E. faecium*と*E. gallinarum*の鑑別同定)。しかし、実際には、これらの方法をもちいても、運動性の判定が不可能であったり、キットのスコアに載っていない糖分解性を示すため、同定不可能な菌が存在する。これらの同定不能株のうちから無作為に15株を選び、菌体からmutanolysinによって抽出したDNAをもちいて、*van*型別を行ったところ、*vanC-1* 10株、*vanC-2/3* 3株または*van*を持たない株2株であり、*ddlfaecalis*, *ddlfaecium*の増幅検知により、*E. faecalis*, *E. faecium*の同定も可能であった。

VITEKによるバンコマイシン感受性の測定

前年度の報告書では、ATCC51299 (*vanB*)の感受性が、VITEKでは正しく判定できなかったことを、報告したが、現在、VITEKには、バンコマイシン 6 mg/L含有ウェルが、新しくもちいられており、*vanB*のバンコマイシン感受性は正しく判定された。

D. 考察

VREとして、現在報告されている型は、*vanA* (*E. faecalis*, *E. faecium* and others)、*vanB* (*E. faecalis*, *E. faecium* and others)、*vanC-1* (*E. gallinarum*)、*vanC-2/3* (*E. casseliflavus*/*E. flavascens*)、*vanD* (*E. faecium*)がある。このうち、欧米、本邦で院内感染の起炎菌として、報告されているものは、*vanA*と*vanB*に限られている(6, 7)。したがって、本邦においても、これらの遺伝子を持つVREと、*vanC*のVREを区別す

ることが、院内感染対策上必要であるが、感受性検査だけでは、この区別ができない(8)。たとえば、ディスク法では、I (intermediate)の判定(阻止円直径 15-16 mm)が、*vanC*と、*vanC*を持たない菌にみられるため、この方法だけで、中程度から高度耐性を示す *vanB*と、*vanC*を区別することは困難である。また、自動測定法のひとつとして、広く用いられている VITEK は、*vanC*の菌の運動性を(−)と入力すると(実際にこう判定されることがある)、実際は MIC 8 mg/Lとなるべきところ、*vanA* または *vanB*をもつ *E. faecalis*, *E. faecium*の感受性測定結果として、>32 mg/Lの値を返してしまう。逆に、*E. faecalis* (*vanB*)の運動性を(+)と入力すると、MIC =<0.5の値を返す。このように、自動測定機器では、感受性測定以前の同定が、重要である。また、*van*型別の結果は、reference laboratory からではなく、各病院の細菌検査室が、迅速に出さなくては、院内感染を防止することはできない。この目的のため、われわれは、2年間にわたって、一般の細菌検査室でも実施可能な VRE のスクリーニング、検出、同定、遺伝子型別方法を示してきた。前年度の報告書で示した、multiplex PCR は *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3*を一つのチューブで増幅、アガロースゲル電気泳動では一つのウェルで検出する便利な方法であるが、これを成功させるためには、テンプレート DNA を高度に精製する必要がある。このため、実際には、報告までの迅速性が損なわれることがあった。この問題を改善するために、今回は、検出に蛍光プローブをもちいる方法を *van*型別に導入した。これは、通常の PCR にもちいるプライマーにくわえ、蛍光色素で標識した PCR 産物の配列特異的なプローブをもちい、特異的増幅により、蛍光色素がプローブから遊離し、蛍光強度が増加する現象を検出することにより、増幅の有無をみる方法である。この方法の利点は、1) 高度にテンプレート DNA を精製することなしに、多検体を、同時に短時間で処理できる。2) チューブの蓋を開けないで、PCR

の有無を蛍光強度の差としての検出ができるため、carry-over contamination が起こる可能性を減少させることができる (TaqMan Universal PCR Master Mix には、dUTP と uracil glycosylase が使われているため、これも carry-over contamination の防止に寄与する)。3) 今回の検査法には、過去に行ってきた、*vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3*にくわえ、*ddlfaecalis*, *ddlfaecium*を検出する系をふくめた。これにより、*vanA*, *vanB*の検出頻度が高い菌種の同定を、*van*型別と同時にできるようにした。運動性(−)の菌であることの確かな同定は、VITEK 感受性検査を取り入れている検査室にはぜひとも必要である。4) まだ、outbreak を起こした報告はないが、*vanD*の菌は、その感受性(5)から、院内感染起炎となりうると考えられるため、*vanD*も同時に検出できるようにした。欠点は、必要な機器と試薬が高価なことである。しかし、迅速性、同定確立を考えると、院内感染対策を実際に効果的に行うことができる病院には、導入する価値のあるものであると考えられる。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1. H. Kirst, D.G. Thompson and T.I. Nicas. 1998. Historical yearly usage of vancomycin. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1303-1304 (Letter to the editor).
2. H. C. Wegener. 1998. Historical yearly usage of glycopeptides for animals and humans: the American-European paradox revisited. 42:3409 (Letter to the editor).
3. 野村隆浩、谷本弘一、池 康嘉 1999. 食肉より分離された高度バンコマイシン耐性腸球菌について. 日本細菌学雑誌 54:201.
4. 平松啓一 1998. in abstract of VRE(バンコマイシン耐性腸球菌)フォーラム. 東京.

5. B. Perichon, P. Raynolds and P. Courvalin. 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob. Agents Chemother. 41:2016-2018.
6. J.G. Morris Jr., D.K. Shay, J.N. Hebben, R.J. McCarter Jr., B.E. Perdue, W. Jarvis, J.A. Johnson, T.C. Dowling, L.B. Polish and R.S. Schwalbe. 1995. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Annals Intern. Med. 123:250-259.
7. 荒川宜親 personal communication.
8. P.C. Kohner, R. Patel, J.R. Uhl, K.M. Garin, M.K. Hopkins, L.T. Wegener and F.R. Cockerill III. 1997. Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion and automated Vitek methods for testing susceptibility of *Enterococcus* spp. to vancomycin. J. Clin. Microbiol. 35:3258-3263.

VREのクラス型別とプラスミド解析の研究
—日本で分離されたバンコマイシン高度耐性腸球菌 (VRE) の
バンコマイシン耐性遺伝子 (*van*) の分子遺伝学的研究—

分担研究者 池 康嘉

研究協力者 谷本弘一、小澤良之、藤本修平、野村隆浩
(群馬大学医学部微生物学教室)

研究要旨

1996年以来国内で分離された人及び輸入鶏肉由来のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の遺伝学的、分子生物学的研究を行った。調べたVREは日本の4地域8人から分離された8株、輸入鶏肉から分離された5株、鶏舎糞便由来VRE 2株である。調べたVREはすべて *vanA* 遺伝子をもつVREであった。人分離VREのうち2地域3人から分離された3株のVREは *vancomycin* 高度耐性、*teicoplanin* 低感受性で野生型のVanA型VREの示す *vancomycin* - *teicoplanin* 高度耐性と異なる耐性値を示した。輸入鶏肉分離VREはタイ国産3株、フランス産2株である。このうちタイ国産3株はすべて *vancomycin* 高度耐性、*teicoplanin* 低感受性であった。VanA型遺伝子の中で *glycopeptide* に対する *sensor* 蛋白の遺伝子である *vanS* 遺伝子のDNA塩基配列を調べた結果、*vancomycin* 高度耐性、*teicoplanin* 低感受性VREはすべて同一部位の3ヶ所の塩基に変異があることが解った。このことは、日本の2地域3人から分離されたVREとタイ国産鶏肉のVREのVanA型 *vancomycin* 耐性遺伝子の起源が同じである可能性を示唆している。さらに一般に鶏VREが鶏肉の *van* 遺伝子と人VREの *van* 遺伝子の関連性を示唆するものである。

A. 目的

日本において *vancomycin* 耐性腸球菌 (VRE) は、1996年以来4地域(A, B, C, D地域) 8人 (A, 1人; B, 4人; C, 2人; D, 1人) の患者から分離されている。又輸入鶏肉の1998年度のVRE調査では、タイ国産、フランス産鶏肉からそれぞれ20%、30%の頻度でVREが分離される。国内の *avoparcin* 使用中あるいは使用歴のある鶏農場由来の複数の鶏肉を調査した結果では、国内鶏肉からはVREは分離されていない。又国内鶏由来糞便中のVREの調査では全部で2株のVREが分離されているがVREが国内の鶏糞便中に選択的に増加している証拠はない。

今回、これまで日本で分離されたVREの遺伝学的、分子生物学的解析を行った結果を報告する。

B. 材料と方法

用いた菌株。野生型又は標準型 VanA VREとして *E. faecium* BM4147を使用。 *E. faecium* BM4147はフランスの臨床分離株で *vanA* geneは *plasmid pIP816* (34kb)上のトランスポゾン *Tn1546*(10.851kb)に存在

し、最も詳しく解析されている。臨床分離バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)。日本の4地域(A, B, C, D)から8人から分離された8株 (A, 1株; B, 4株; C, 2株; D, 1株) を使用。このうちB, 4株は *vancomycin*, *teicoplanin* 高度耐性VREのプロトタイプのVanA型VREであるため、*E. faecium* EF2 1株のみを使用した (表1)。その他の使用したVREは表1に示した。

用いた培地。菌の生育にはTodd Hewitt broth (Difco)を用いた。薬剤耐性検査、Muller Hinton medium(Difco)を用いて薬剤寒天平板を作製した。方法はNCCLS法に従った。

Plasmid DNAの分離。アルカリ溶解法に従った。Southern Hybridization、Pulsed field gel electrophoresis、PCR法、塩基配列の決定等は前報に従った。

C. 結果

1) 日本で分離されたVREの *glycopeptide* 耐性

1996年以来日本において人、鶏糞便、輸入鶏肉からVREが分離されている。人分離VREは1人1株として、日本の4地域8人の患者から分離され

表1 Mutation of *vanS* Gene of *VanA* type Vancomycin Resistant Enterococci (*VanA* VRE)

Class	Strain	Origin (Area)	Source or specimen	Drug resistance level (MIC, µg/mt)		Nucleotide sequence of <i>vanS</i> gene
				Vancomycin	Teicoplanin	
Wild type or prototype	<i>E. faecium</i> BM4147	France	human	high	high	T T G G A 148 160 172 207 (Q) 1152 bases
	<i>E. faecium</i> FN1	Japan(A)	human	256	128	
	<i>E. faecium</i> EF2	Japan(B)	human	512	128	
Mutation of one nucleotide	<i>E. faecalis</i> C47	France	chicken	512	128	* A 172 (N)
Mutation of three nucleotide	<i>E. faecium</i> KV12	Japan(C)	human	high	low	* T 207 (H)
	<i>E. faecium</i> KV5	Japan(C)	human	512	32	* G C 148 160 (V) (Q)
	<i>E. faecium</i> CV1	Japan(D)	human	512	4	
	<i>E. duran</i> Y43	Thai	chicken	256	2	
	<i>E. faecalis</i> Y46	Thai	chicken	512	8	
	<i>E. faecalis</i> Y55	Thai	chicken	512	32	
	<i>E. faecalis</i> CB26	Japan	chicken feces	512	4	
	<i>E. faecalis</i> KM22	Japan	chicken feces	512	8	

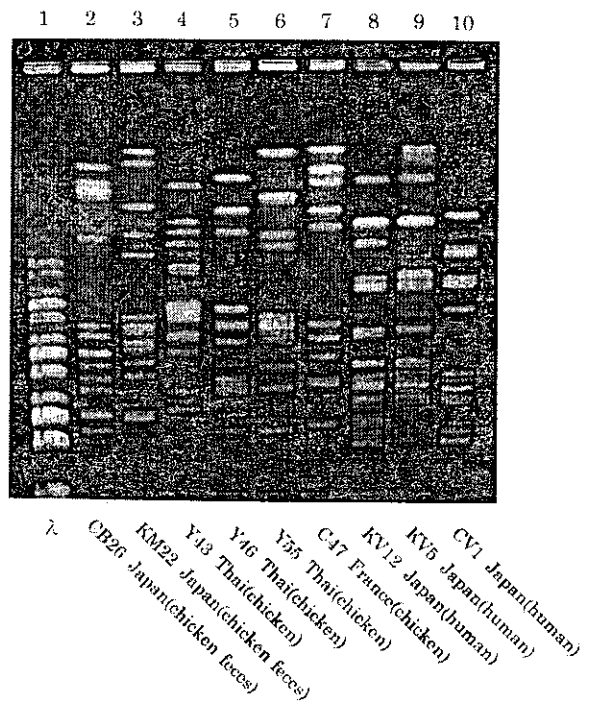
た8株。鶏糞便分離VREは2株、輸入鶏肉分離VREは5株（タイ3株、フランス2株）である。これらのVREのglycopeptide耐性値は人分離VREのうち2地域3人から分離された3株すべて、タイ輸入鶏肉分離VRE3株すべて、日本の鶏糞便分離株2株、合計8株がvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性であった（表1）。これらの株はvanco-

mycinとteicoplaninが存在する寒天培地の方が、teicoplaninのみ含む寒天培地の時より、teicoplanin耐性（MIC値）が高値を示した。

2) VRE DNAとVREのplasmid DNAの解析

VRE DNAの *Sma*I断片のpulsed field gel electrophoresisの結果を図1に示す。調べたVREはすべてDNAの *Sma*I断片のpulsed field gel electrophoresisの型が異なっていた。VREから分離されたplasmid DNAの *Eco*RI断片のagarose gel electrophoresisの結果を図2に示す。この結果、VREはそれぞれ異なるplasmidを含んでいることが解った。これらの結果から調べたvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性VREはそれぞれ異なる菌株であることが解った。

図1 Pulsed Field of Gel Electrophoresis of VRE DNA



3) *vanA* probeを用いたVRE plasmid DNAのSouthern hybridizationとVRE DNAのPCR法による *van*遺伝子解析。図2のplasmid DNAの *Eco*RI断片のagarose gel electrophoresisを *vanA* probeを用いてsouthern hybridizationを行った（図3）。*vanA* probeはそれぞれのplasmid DNAの4.1kbの *Eco*RI断片に相補結合を行った。この結果はVREのvancomycin耐性遺伝子がplasmid DNA上に存在することを示している。*vanA*, *vanB*, *vanC*に特異的なprimer DNAを用いて解

析した結果を図4に示す。増幅されたDNAは *vanA* primerによる0.732kb DNA断片である。この結果からも調べたVREが *vanA*型であることが解った。

図2
Agarose Gel Electrophoresis of *Eco*RI Fragments of VRE Plasmid DNA

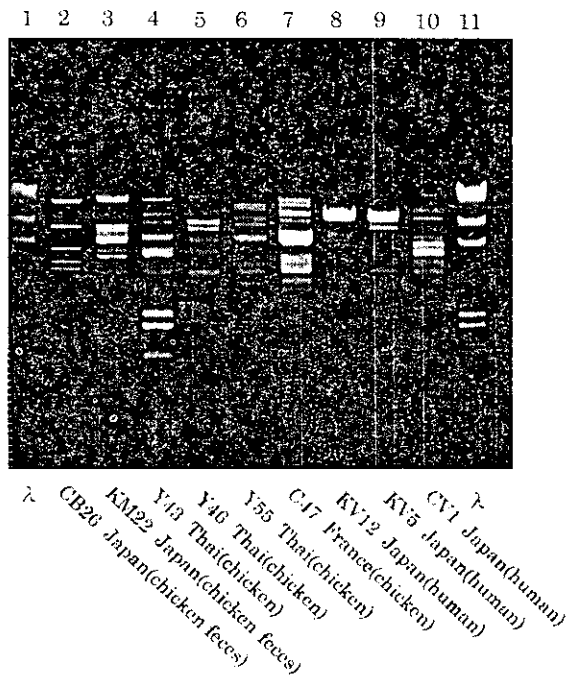


図3
Southern hybridization of *Eco*RI fragment of VRE plasmid DNA with *vanA* probe

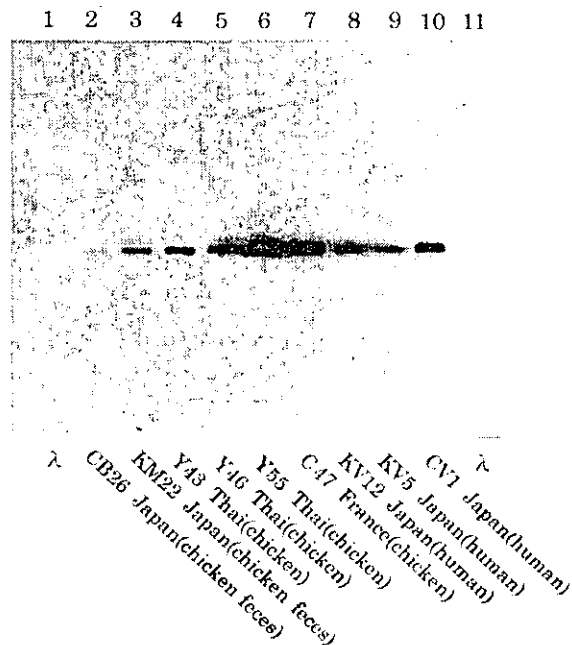
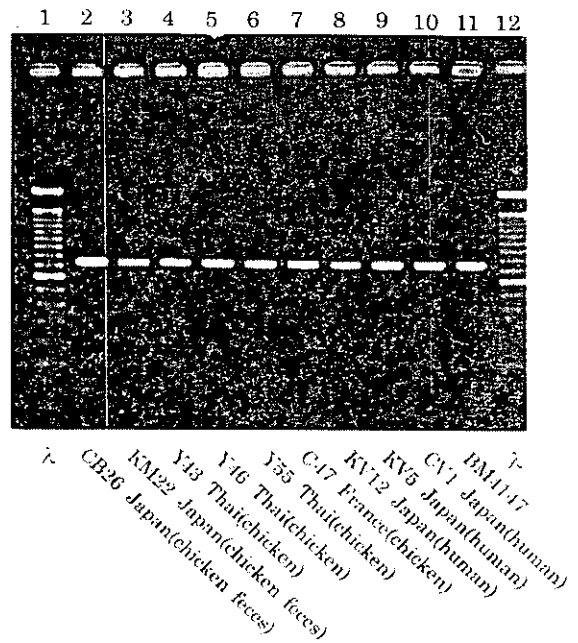


図4 PCR of VRE with *vanA* primer



4) VanA型遺伝子の *vanS* 遺伝子解析

日本で分離された vancomycin 高度耐性 teicoplanin 低感受性 VRE のすべてについて *vanS* 遺伝子の塩基配列を調べた (表1)。vancomycin 高度耐性、teicoplanin 低感受性 VRE の VanA 型遺伝子と野生型 VanA 型遺伝子は *vanS* 遺伝子の塩基配列が異なっていた。vancomycin 高度耐性 teicoplanin 低感受性 VRE はすべて *vanS* 遺伝子の 1152 塩基の 148、160、207 番の塩基が野生型から変異していることが解った。

D. 考察

1996年以來日本では、4地域8人の患者からVREが分離されている。これらはすべてVanA型VREであった。そのうち2地域5人の患者から分離されたVRE5株はvancomycin高度耐性、teicoplanin高度耐性の野生型VanA VREであった。残りの2地域3人の患者から分離されたVRE3株はすべてvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性株であった。ヨーロッパ、アメリカ合衆国等の臨床分離株は一般に野生型VanA VREである。輸入鶏肉のVREの調査では、France鶏肉の約30%からVREが分離され、Thai鶏肉の約20%からVREが分離される。フランス鶏肉からは高頻度にVREが分離されるが、その薬剤耐性はvancomycin-teicoplanin高度耐性の野生型VanA VREであった。一般的な野

生型VanA VREの場合、鶏肉VREのVan遺伝子と人VREのVan遺伝子構造が一般に同一の野生型であるためにその特徴を論ずることができない。そのため野生型VanA VREの場合 VREの由来をvan遺伝子から論ずることは困難である。今回たまたま遺伝子解析を行ったフランス鶏肉VanA VRE *E. faecalis* C47は *van S*に1ヶ所変異が存在したがその変異はteicoplanin耐性に影響を与える変異ではなかった。

Thai輸入鶏肉から分離されたVRE 3株はすべてvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性のVanA型VREであった。これらのThai鶏肉VREと、人由来のvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性VREは、vancomycinとteicoplanin両薬剤を含む寒天培地で耐性検査を行った時、vancomycinの濃度に比例して、teicoplanin耐性値が上昇することからVanA型vancomycin耐性遺伝子の*van S*遺伝子の変異が推測された。塩基配列を調べた結果、これらの株の*van S*遺伝子の塩基配列は3ヶ所の塩基が野生型*van S*と異なっていた。そして、その変異はすべて同じ部位であった。遺伝子において同じ部位3ヶ所に独立に変異がおきる確率は一般的には非常に小さい。Thai鶏肉から分離されたVREと日本の2地域3人から分離されたVREのVanA遺伝子の*van S*の同じ3ヶ所に野生型と異なる変異が存在することは、これらの人のVREのVanA型遺伝子とThai鶏肉から分離されるVREのVanA型遺伝子が共通の遺伝子に由来することを示唆する。今回の研究では人由来VREと、Thai鶏肉由来VREの*van S*遺伝子に、独立には起き難い同じ3ヶ所に変異が存在していたことから人、鶏肉由来VREの*van*遺伝子のお互いの関連性が明らかになった。この結果はこのような特徴的な*van*遺伝子のみならず一般に鶏肉VREと人VREの*van*遺伝子の関連性を示唆するものである。

日本の鶏肉輸入量は年間約60万トンである。一方国内生産量は120万トンである。60万トンの輸入量のうちタイからの輸入量は約10万トンである。タイ産鶏肉の20%からVREが分離される。フランス産鶏肉の年間輸入量は約2300トンである。フランス産鶏肉の約30%からVREが分離される。ヨーロッパにおいて家畜や家禽類のVREと人のVREとの関連性が推測されている多くの報告がある。こ

れまでの報告では動物由来のVREと人由来のVREの菌株の同一性は証明されていない。多くの報告は家禽生産者、食肉取扱者からVREが高頻度に分離されることにより人のVREが家畜から由来することが推測されているものである。その中で細菌学的に証明されているのはribosome RNA型(ribotyping)の同一性によるものである。又最近、肉を多く食べる人は菜食主義者よりその便にVREが多く分離されることが報告されている。これらの報告から我々の今回の研究の結果は、現在までに日本において臨床からVREの分離は少ないが日本人のある人々の便の中に鶏肉を介して鶏のVREが既にコロナイゼーション(細菌叢を形成)している可能性が推測される。

E. 結論

- 1) 日本人8人の患者分離VREのうち2地域3人から分離されたVREはvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性で、VanA型VREであった。
- 2) 輸入鶏肉分離VREのうちタイ産鶏肉VRE 3株はvancomycin高度耐性、teicoplanin低感受性でVanA型VREであった。
- 3) 人から分離された3株とタイ産鶏肉VRE 3株のvancomycin高度耐性、teicoplanin低感受性VanA型VREの*van S*遺伝子の塩基配列はすべての株において、野生型の*van S*遺伝子の塩基配列のなかで同じ3ヶ所に変異があった。

F. 研究発表

H. Tomita, S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike: Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. J. Bacteriol. 179:7843-7855, 1997

Y. Ozawa, K. Tanimoto, S. Fujimoto, H. Tomita, and Y. Ike: Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. J. Bacteriol. 179:7468-7475, 1997

N. Fujita, M. Yoshimura, T. Komori, K. Tanimoto, Y. Ike: Letters to the Editor. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 42:2150, 1998

Y. Ike, K. Tanimoto, H. Tomita, K. Takeuchi, and S.

Fujimoto: Efficient Transfer of the Pheromone-Independent *Enterococcus faecium* Plasmid pMG1 (Gm^r) (65.1 Kilobases) to *Enterococcus* Strains during Broth Mating. J. Bacteriol., 180:4886-4892, 1998.

X. Ma, M. Kudo, A. Takahashi, K. Tanimoto, and Y. Ike: Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. J. Clin. Microbiol. 36:2460-2464, 1998

A. Shiono and Y. Ike: Isolation of *Enterococcus faecalis* clinical isolates that efficiently adhere to human bladder carcinoma T24 cells and inhibition of adhesion by fibronectin and trypsin treatment. Infection and Immunity 67:1585-1592, 1999