

Figure 4.
16S rRNA メチラーゼ

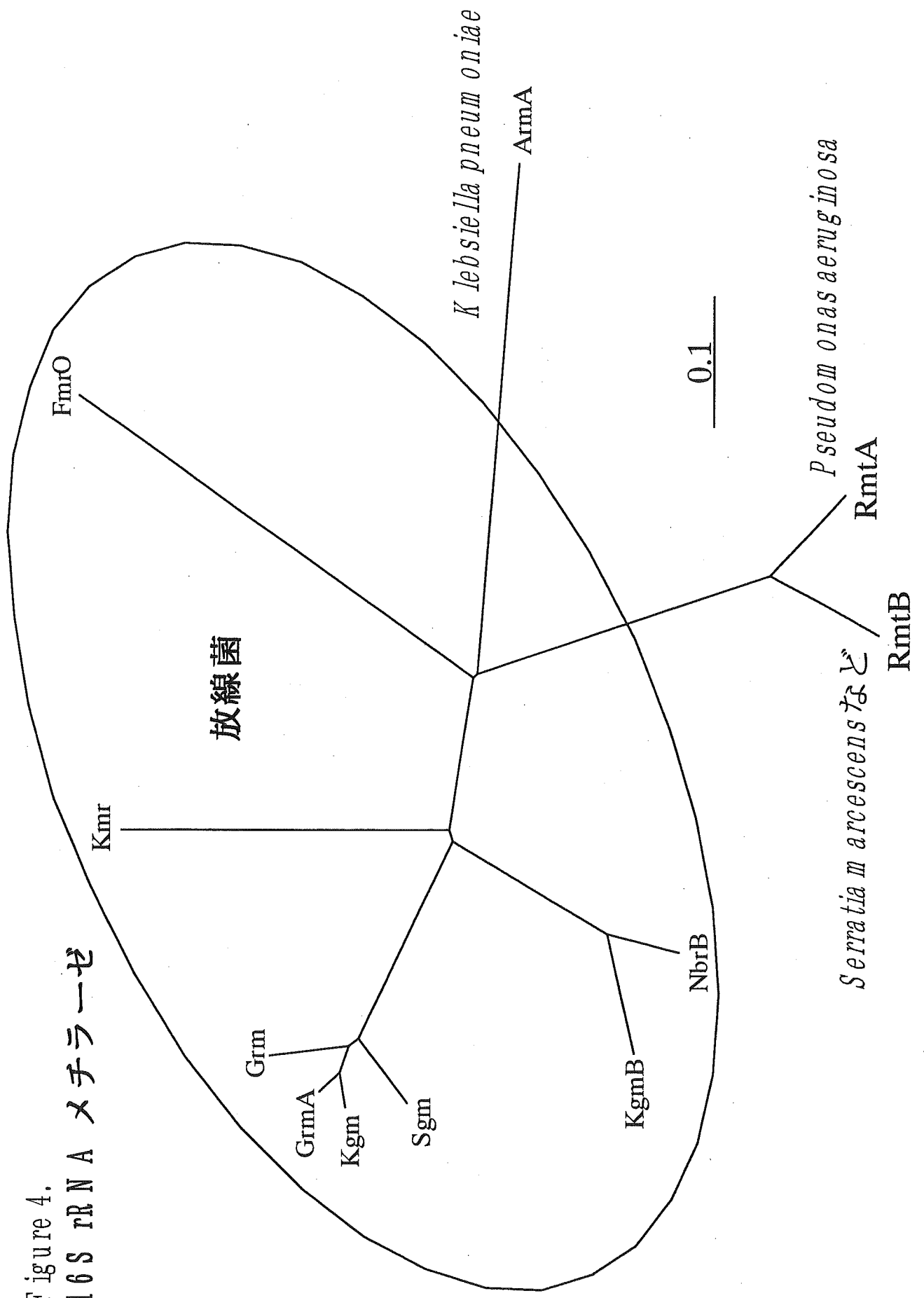
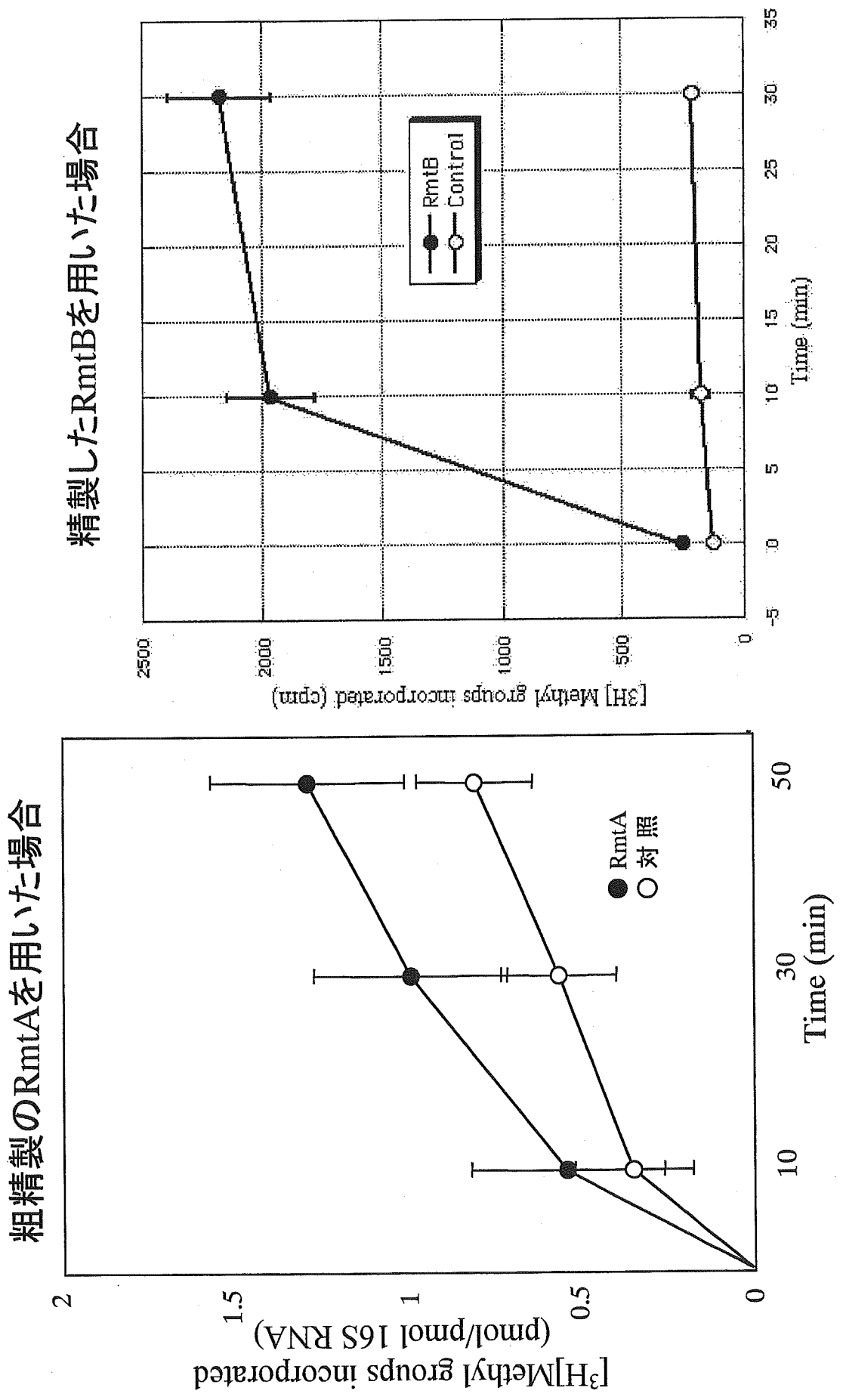


Figure 5. [³H]ラベルしたS-アデノシルメチオニンを基質とし、メチル化反応を測定



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

—国内で分離されたメタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子型別—

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

近年、カルバペネム耐性を獲得したセラチアや緑膿菌の臨床分離株の増加が問題となっている。特に、カルバペネム高度耐性を獲得した株としては、メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)と呼ばれる特殊な金属酵素を産生する株が、各地の医療施設から分離され問題となっている。そこで、2001-2002年に国内の医療施設で分離された、広域β-ラクタム薬耐性株におけるMBLの産生状況やその遺伝子型別を試みた。

その結果、MBLの産生性を獲得した菌種としては、*Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)、*Pseudomonas ptida/fluorescens*などが多く、その他、*Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia*などのブドウ糖非発酵菌でMBL産生菌が多い傾向が見られた。一方、腸内細菌では、*Serratia marcescens*, *Klensiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*などで、MBL産生株が確認された。MBLの遺伝子型としては、IMP-1型が最も多かったが、欧州で多く報告されているVIM-2型MBL産生株も各地から分離される傾向が見られた。また、少数ではあるがIMP-2型MBL産生株も確認された。

我が国においてMBLを産生する株が、各種の病原性グラム陰性桿菌に広がりつつある事が確認されたため、今後の広がりを監視するとともにそれらを増やさないための実効性のある対策を急ぐ必要がある。

研究協力者：

柴田尚宏、山根一和、和知野純一、土井洋平、
八木哲也、柴山恵吾、加藤はる、甲斐久美子
(国立感染症研究所 細菌第二部)

ペネム-ベタミブロン (PAPM/BP)、メロペネム (MEPM)、ピアペネム(BIPM)などは、日本で開発されたカルバペネム系抗生物質で、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。国内では、1987年にIPM/CS、1993年にPAPM/BP、1995年にMEPM、2001年にBIPMと各種のカル

A. 研究目的

イミペネム-シラスタチン (IMP/CS)、パニ

バベネム薬が相次いで認可され、細菌感染症の治療薬として重要な役割を果たしている。しかし、院内感染症の起因菌として問題となっている *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) や *Serratia marcescens* などにおいて 1990 年代より IPM 高度耐性株 (MIC, >128 μ g/ml) が国内の医療施設において散発的に分離されるようになり、荒川らは、*S. marcescens* の臨床分離株より IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) を世界で最初に発見した。その後、国内各地の医療施設で MBL を産生するカルバペネム耐性株が散見されるようになり、現時点では国内ほぼ全ての都道府県の医両施設から MBL 産生株が報告される事態となっている。

そこで、国内の医療施設で分離された広域セファロスポリン耐性グラム陰性桿菌の産生する MBL の遺伝子型別を PCR により行った。

B. 研究方法

1. 試験に用いた菌株

2001 年 1 月より 2002 年 12 月までの間に国内の医療施設から検査の依頼のあった 978 株のグラム陰性菌のうち、セフトジジムとスルペラゾンとともに高度耐性 (MIC, \geq 128 μ g/ml) を獲得した 587 株 (ただし *Acinetobacter baumannii* については、MIC, \geq 16 μ g/ml) について解析を行った。MBL の産生性を検出するため、メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) による阻害試験をスクリーニング試験として実施した。

2. PCR 解析

表 1 に示す PCR 用プライマーを用いて PCR 解析を行った。

3. *intI3* 遺伝子陽性株の PFGE

クラス 3 インテグロンの特徴である *intI3* 遺伝子陽性株については、菌株の遺伝的関連性を確認する為、定法により PFGE 解析を行った。

C. 研究結果

セフトジジムとスルペラゾンとともに耐性を獲得した 587 株について、SMA を用いた MBL 産生性試験を実施した結果、431 株について陽性と判定された (Fig. 1, Table 2)。

そこで、その 431 株について Table 1 に示す PCR プライマーを用いて解析を行ったところ、Table 3 に示すように IMP-1, IMP-2, VIM-2 型 β -ラクタマーゼ遺伝子が各々検出された。

Table 3 に示すごとく、IMP-1 型 MBL は 357 株より検出され、*P. aeruginosa*, *Alcaligenes xylooxidans*, *P. putida/fluorescens*, *S. marcescens*, *Acinetobacter baumannii* の順であった。VIM-2 型 MBL は 67 株より検出され、それらは全て *P. aeruginosa*, *P. putida/fluorescens* であった。IMP-2 型 MBL 産生株は 7 株であったが、それらは、*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *A. lwoffii* であった。

インテグロンの型別では、MBL 産生株 431 株の大半の 427 で *imiI1* 遺伝子が確認されたが、4 株の *P. putida* からは *intI1* と *intI3* の両方の遺伝子が検出された (Table 4)。また、それらは、IMP-1 型 MBL を産生する株であった (Table 5)。

intI1 と *intI3* の両方の遺伝子を保有する *P. putida* は、西日本の 2 つの医療施設より分離されたが、1 施設より分離された 3 株は、

同じ PFGE パターンを示した (Fig. 2)。

D. 考察

今回の調査により、国内で臨床分離されるグラム陰性桿菌の中には、既に IMP-1 型 MBL 産生株が広く分布し、さらに欧米で多く分離されている VIM-2 型 MBL 産生株も各地の医療施設に分布している明かとなった。また、IMP-2 型は少数に留まるものの、*Acinetobacter baumannii* で IMP-2 型 MBL 産生株が検出されたことから、今後さらに、*P. aeruginosa* やその近縁の *P. putida/fluorescens* を含むブドウ糖非発酵菌群における MBL 産生株の増加を警戒する必要がある。また、*Serratia marcescens* のみならず、*Klebsiella* 属菌や *E. coli* などの腸内細菌科でも、MBL 産生株が各地より分離されつつあり、今後の動向に注意する必要がある。

我が国で最初に確認されたクラス 3 のインテグロンは、今回の調査では未だ稀な状態である事が確認されたが、最近、海外でもクラス 3 のインテグロンを保有する *Klebsiella pneumoniae* が報告 (EMBL accession No. AY219651) されており、今後、各種の耐性遺伝子を媒介しつつ増加する事が懸念される。

MBL を産生することで、「切り札」的な抗生物質であるカルバペネムをはじめ、セファマイシンや広域セファロスポリンに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を増加させないために、今後もそれらの継続的監視とともに抗菌薬の適正使用の推進が強く望まれる。

E. 結論

本研究により、国内で分離されるカルバペネム耐性の緑膿菌やセラチアが産生する MBL の遺伝子型が概ね把握された。

院内感染症や術後感染症の原因菌である緑膿菌およびセラチアにおいて、臨床現場で使用頻度が高いカルバペネム系抗生物質に対し高度耐性を付与する、MBL の産生能力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、これらの遺伝子がプラスミド上に存在することから、今後、さらに各種のグラム陰性桿菌において MBL 遺伝子の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 2001 2002 年の 24 ヶ月間に臨床分離された広域β-ラクタム薬耐性の緑膿菌など 978 株中、少なくとも 431 株がメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) の遺伝子を保有している事が判明した。MBL 遺伝子を保有する株は、カルバペネムやセファマイシンなどの臨床的に重要なβ-ラクタム薬に広範な耐性を示す傾向があり、それらの増加は、臨床上大きな問題となる。したがって、今後も引き続き、MBL 産生株の動向を監視するとともに、抗菌薬の適正使用も含め、実効ある対策を急ぐ必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

3. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai

K, Arakawa Y. PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo- β -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5407-13.

Produced by *Chryseobacterium* and *Myeroides* Species in Japan. N. Shibata, Y. Doi, H. Kurokawa, T. Yagi, K. Shibayama, Y Arakawa, 103rd ASM General Meeting. 2003

2. 学会発表

1. 当院で分離されたメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の臨床的検討, 吉田耕一郎、二木芳人、宮下修行、小橋吉博、河口豊、荒川宜親、柴田尚宏、松島敏春, 日本化学療法学会, 2003
2. 当研究所におけるメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の検出状況, 飯田眞佐栄、柴田尚宏、荒川宜親, 日本医学検査学会, 2003
3. 当院で分離したメタロ- β -ラクタマーゼ産生株 7 症例の臨床的検討, 中野学、井端英憲、柴田尚宏、荒川宜親, 日本感染症学会, 2003
4. IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子を担うクラス 3 型インテグロン構造の解析, 和知野純一、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、八木哲也、横山佳子、柴山恵吾、黒川博史、伊藤秀郎、荒川宜親, 日本細菌学会, 2003
5. *Pseudomonas putida* におけるクラス 3 型インテグロンに担われるメタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子の解析, 柴田尚宏、和知野純一、土井洋平、山根一和、八木哲也、横山佳子、柴山恵吾、黒川博史、荒川宜親, 日本細菌学会, 2003
6. Genotyping of Metallo- β -Lactamases

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記すべきものなし

2. 実用新案登録、その他

特記すべきものなし

表1 メタロ-β-ラクタマーゼとインテグラーゼを検出する PCR プライマー

| PCR primer for | Sequence | Expected size of amplicon (bp) | Reference |
|--|---|--------------------------------|--------------------|
| MBL gene | | | |
| <i>bla</i> _{IMP} -1 | F1: 5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3' | 587 | Shibata, N. et al. |
| | R1: 5'-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3' | | |
| <i>bla</i> _{IMP} -2 | F2: 5'-GTT TTA TGT GTA TGC TTC C-3' | 678 | Shibata, N. et al. |
| | R2: 5'-AGC CTG TTC CCA TGT AC -3' | | |
| <i>bla</i> _{VIM} -1 | F3: 5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3' | 261 | Tsakris, A. et al. |
| | R3: 5'-ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3' | | |
| <i>bla</i> _{VIM} -2 | F4: 5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3' | 801 | Poirel, L. et al. |
| | R4: 5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3' | | |
| <i>bla</i> _{SPM} -1 | F5: 5'-GCG TTT TGT TTG TTG CTC-3' | 786 | Shibata, N. et al. |
| | R5: 5'-TTG GGG ATG TGA GAC TAC-3' | | |
| integrase gene | | | |
| <i>int</i> _{I1} | F6: 5'-GCA TCC TCG GTT TTC TGG-3' | 457 | Shibata, N. et al. |
| | R6: 5'-GGT GTG GCG GGC TTC GTG-3' | | |
| <i>int</i> _{I2} | F7: 5'-CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T-3' | 789 | Shibata, N. et al. |
| | R7: 5'-GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G-3' | | |
| <i>int</i> _{I3} | F8: 5'-ATC TGC CAA ACC TGA CTG-3' | 922 | Shibata, N. et al. |
| | R8: 5'-CGA ATG CCC CAA CAA CTC-3' | | |
| co-amplification of the | | | |
| <i>int</i> _{I3} - <i>bla</i> _{IMP} -1 region | F9: 5'-GGT CTT GTA GGC TGT AAT TG-3' | 609 | Shibata, N. et al. |
| | R9: 5'-TTG TGG CTT GGA ACC TTT AC-3' | | |

Shibata, N. et al., 2003. J. Clin. Microbiol. 41:5407-5413.

Tsakris, A. et al., 2000. J. Clin. Microbiol. 38:1290-1292.

Poirel, L. et al., 2000. Antimicrob. Agents Chemother. 44:891-897. ただし論文のシーケンスに誤植があるため修正したものを示す。

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 xylosoxidans</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 | | Total |
|-------------|------------------------|--------------------|-------|
| | <i>intI1</i> | <i>intI1+intI3</i> | |
| IMP-1 | 353 | 4* | 357 |
| IMP-2 | 7 | 0 | 7 |
| VIM-2 | 67 | 0 | 67 |
| Total | 427 | 4 | 431 |

* Re-identified as *P. putida*.

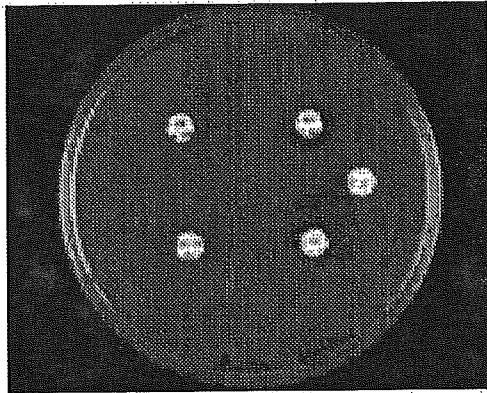
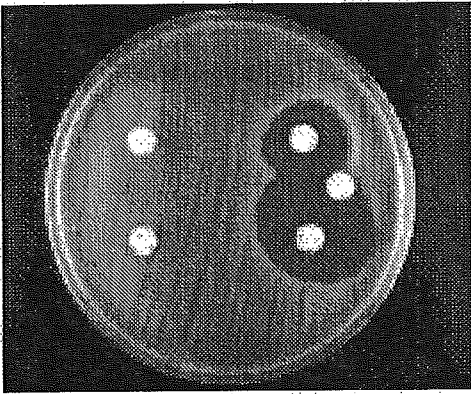
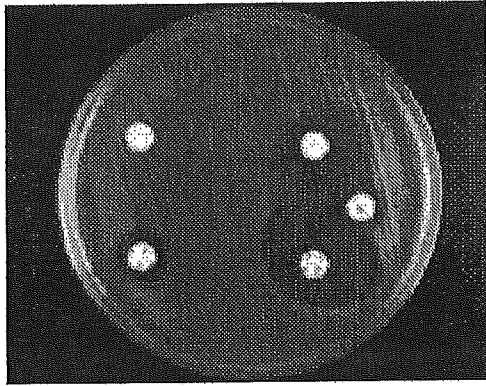
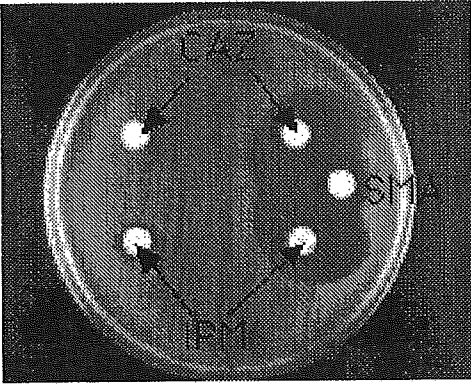
TABLE 5. Combination of MBL and *intI* genes in *Pseudomonas putida/fluorescens*

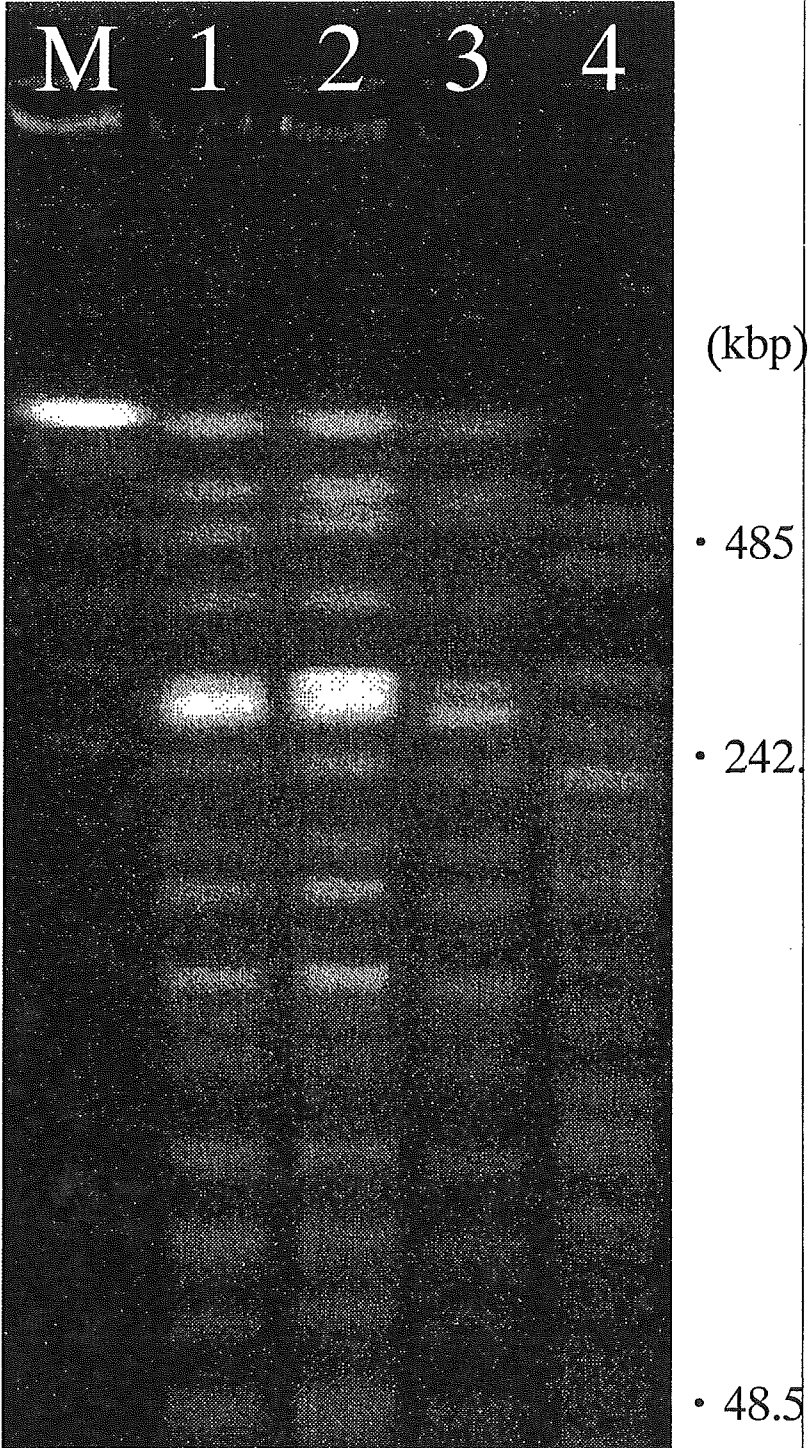
| Type of MBL | Type of integrase gene | | Total |
|-------------|------------------------|--------------------|-------|
| | <i>intI1</i> | <i>intI1+intI3</i> | |
| IMP-1 | 47 | 4* | 51 |
| VIM-2 | 4* | 0 | 4 |
| Total | 51 | 4 | 55 |

* 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^{1, 2}

研究協力者 谷本 弘一²、野村 隆浩¹、富田 治芳¹、藤本 修平¹

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¹、

群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設²

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-Ala⁴, D-Lac⁵ ligase 遺伝子をコードし、他の型は-D-Ala⁴, 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原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^r, Fus^r), *E. fecium* BM4105RF (Rif^r, Fus^r) .

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シーケンス解析に拠った。

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 ケ所、アミノ酸で 1 ケ所、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

| VRE遺伝子型 | VanA | VanB | VanC | VanD | VanE | VanG |
|-------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| MIC(μ g/ml) | 64~>1000 | 4~>1000 | 2~32 | 64~>1000 | 16~24 | 12~16 |
| TEIC | 0.5~256 | <0.5~8 | 0.5~1 | 4~256 | 0.5 | 0.5 |
| 耐性遺伝子存在部位 | 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 |
| Ligaseで合成されるプロダクト | D-Ala-D-Lac | D-Ala-D-Lac | D-Ala-D-Ser | D-Ala-D-Lac | D-Ala-D-Ser | D-Ala-D-Ser? |
| 分離菌種 | <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> | | | | | |
| Ligase遺伝子 | <i>vanA</i> | <i>vanB1</i> | <i>vanC1</i> | <i>vanD1</i> | <i>vanE</i> | <i>vanG</i> |
| | | <i>vanB2</i> | <i>vanC2</i> | <i>vanD2</i> | | |
| | | <i>vanB3</i> | <i>vanC3</i> | <i>vanD3</i> | | |
| | | | | <i>vanD4</i> | | |

表2 VanD 分類

| Ligase 遺伝子 | MIC | | 耐性遺伝子存在部位 | 菌種 | 国 |
|------------|------------------|-------------------|-----------|------------------|------|
| | VCM(μ g/ml) | TEIC(μ 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 |

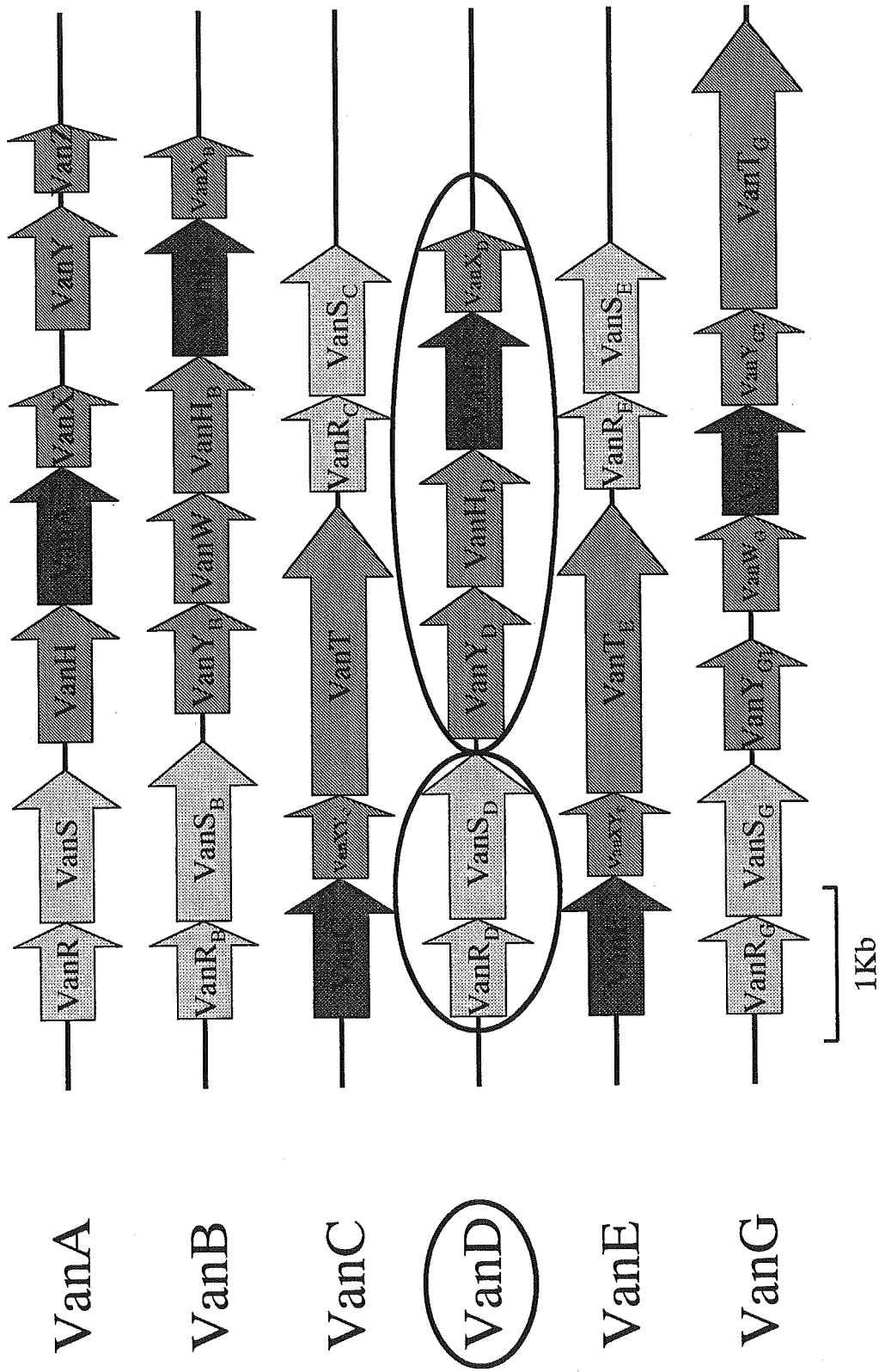


図1 各種バンコマイシン耐性遺伝子の遺伝子構成