

(様式4)

学位論文の内容の要旨

橋本 佑輔 印

(学位論文のタイトル)

Characteristics of vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated from medical fields in Japan
(日本国内の医療現場より分離されたバンコマイシン耐性腸球菌に関する解析)

(学位論文の要旨)

【序論】

近年、腸球菌の多剤耐性化が問題となっており、その中でもバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は米国CDCが”serious”と位置付けている耐性菌である(1, 2)。国内では1996年に初めてVREが分離され、現在、感染症法にて Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 値 $\geq 16\text{mg/L}$ 以上のVRE感染症は届出疾患と定められている(3)。国内のVRE患者数は年間100例程度と他先進国と比較して極めて少ないものの、治療薬が少ない為、厳格なモニタリングと感染対策が重要とされる。

VREの耐性型には現在までに9つの型 (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN) が報告されているが、そのうち臨床上特に問題になるのはVanA型とVanB型である(4)。バンコマイシン(VAN)耐性は二成分制御系で発現調整が行われており、VanB型耐性ではレギュレーター蛋白をコードする *vanRB*、センサー蛋白をコードする *vanSB* とその下流に位置する耐性遺伝子群 *vanYB*, *vanW*, *vanHB*, *vanB*, *vanXB* で構成されている(5)。本論文では以下2つの研究を行った。

(I) 近年、VAN耐性遺伝子を保持しながらもVAN感受性を示すVAN低度耐性腸球菌が国内外で少数報告されている。これらが臨床現場にてVAN耐性へ復帰した症例も既に報告されており、臨床現場で脅威になりうると考えられている(6-8)。しかしながら、その疫学的知見や低度耐性の分子生物学的機序については現在までに報告がない。本論文では、国内医療機関より得たVanB型VAN低度耐性腸球菌19株についての解析を行った。

(II) VanD型VAN耐性は世界的にみても極めて報告例の少ない耐性型である(9)。今回、県内医療機関入院中の同一患者より得たVanD型VAN耐性腸球菌3株について分子生物学的解析を行った。

【材料と方法】

上記株(I, II)について、薬剤感受性試験、Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)と系統樹解析、Multilocus sequence typing (MLST)にて疫学解析を行った。続いて、VAN耐性遺伝子群の他実験株への接合伝達・伝達頻度の確認、Southern blottingによるVAN耐性遺伝子群の局在の確認、VAN耐性遺伝子群の塩基配列の決定を行った。

(I) VanB型低度耐性腸球菌については、更にin vitroでのVAN耐性復帰頻度の確認、得られたVAN耐性復帰株について耐性遺伝子群の塩基配列の決定、更に定量RT-PCR解析にて耐性遺伝子群の転写量の確認を行った。VanB型VAN低度耐性腸球菌に特異的に認められた塩基変異に対して遺伝子変異導入実験を行い、低度耐性の原因を探索した。

【結果・考察】

(I) 19株の薬剤耐性及びPFGEパターンは極めて類似し、MLST解析では院内アウトブレイクに関連のあるST78に属していた。VanB型耐性遺伝子群の塩基配列も19株全てで一致し、高度耐性VanB型VREの塩基配列と比較すると、*vanSB*, *vanW*, *vanB*の3つの遺伝子に特異的な塩基変異が認められた。このVanB型耐性遺伝子群は $10^6 \sim 10^8/\text{donor cell}$ の頻度で実験株へ接合伝達が可能であった。Southern blotting解析よりVanB型耐性遺伝子群は臨床分離株ではプラスミド上に、接合伝達株では染色体上に存在することが確認された。また、これら低度耐性株は薬剤非存在下にて $10^6 \sim 10^7/\text{cell}$ の頻度でVAN耐性へ復帰変異が可能であり、復帰株の定量RT-PCR解析では、VAN存在下で耐性遺伝子群の転写量増加を認めた。多くのVAN耐性復帰株で*vanSB*遺伝子に新規変異が存在したことから、VAN耐性復帰の機序としてはセンサー蛋白であるVanSBへの変異によりVAN耐性遺伝子群の転写量が増加したた

めと推測された。VAN 低度耐性腸球菌に特異的な3箇所の塩基変異をVAN 高度耐性株の塩基配列に換える変異導入実験では、3箇所の塩基変異を導入することでVAN MIC 値 16mg/L まで上昇を認め、これらの塩基変異がVAN 耐性低下の一因と考えられた。

(II) 長期間 VAN 治療を受けていた入院患者の尿検体より1株 (AA620, VAN MIC 64mg/L)、便検体より2株 (AA622/AA624, VAN MIC 16mg/L) 分離された。3株の MLST は一致し、PFGE は indistinguishable isolates と判定された。AA620 は細胞壁合成酵素である *ddl* 遺伝子の酵素活性に重要な部位周辺に12塩基の欠失が認められ、酵素活性の低下が示唆された。更にセンサー蛋白である VanS_D に frame shift を伴う1塩基の欠失が認められ、dephosphatase 活性に重要な4つの domain が消失したことで耐性遺伝子群の恒常的発現が示唆された。これらの変異が AA620 の VAN 高度耐性化に寄与していると推測された。また VanD 耐性遺伝子群とその周辺の塩基配列は、VanD 耐性遺伝子群を保有していると既に報告のある *Ruminococcus* spp. と類似しており、VanD 耐性遺伝子群のリザーバーとして腸管内嫌気性菌の重要性が示唆された(10)。

【結論】

定型的検査では発見困難かつ耐性復帰可能な VanB 型 VAN 低度耐性腸球菌、ならびに腸管内嫌気性菌がリザーバーとして推測されている VanD 型 VRE は国内に潜在的に存在している可能性があり、モニタリング・感染対策が重要であると考えられた。

【引用文献】

1. Courvalin P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Disease* 42:S25-S34.
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013:67
3. Fujita N, Yoshimura M, Komori T, Tanimoto K, Ike Y. 1998. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2150.
4. Hollenbeck BL, Rice LB. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 3:421-33.
5. Evers S, Courvalin P. 1996. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR(B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* 178:1302-9.
6. Coburn B, Low DE, Patel SN, Poutanen SM, Shahinas D, Eshaghi A, Willey BM, McGeer A. 2014. Vancomycin-variable *Enterococcus faecium*: in vivo emergence of vancomycin resistance in a vancomycin-susceptible isolate. *J Clin Microbiol* 52:1766-7.
7. Thaker MN, Kalan L, Waglechner N, Eshaghi A, Patel SN, Poutanen S, Willey B, Coburn B, McGeer A, Low DE, Wright GD. 2015. Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1405-10.
8. Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Ronning TG, Radtke A, Hegstad K. 2016. A Silenced vanA Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4119-27.
9. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2016-8.
10. Domingo MC, Huletsky A, Giroux R, Picard FJ, Bergeron MG. 2007. vanD and vanG-like gene clusters in a *Ruminococcus* species isolated from human bowel flora. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4111-7.