

[総 説]

バンコマイシン耐性腸球菌

富田治芳¹⁾²⁾・野村隆浩¹⁾・久留島潤¹⁾・谷本弘一²⁾

¹⁾群馬大学大学院医学系研究科細菌学分野

²⁾群馬大学大学院医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設

(平成 26 年 7 月 31 日受付)

バンコマイシン (グリコペプチド系抗菌薬) は β -ラクタム剤耐性のグラム陽性菌, 特に MRSA の治療薬として用いられている。現在, 主な高度バンコマイシン耐性菌はバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) であり, 特に欧米においては多剤耐性 VRE の急速な増加と蔓延が深刻な問題となっている。腸球菌は典型的な日和見感染菌であるが, 重度易感染者の VRE 敗血症 (菌血症) では治療不可能なことが起こり得る。臨床で問題となる菌種は主に *E. faecium*, *E. faecalis* であり, 耐性遺伝子型では VanA 型が最も多く, 次に VanB 型が分離される。それら獲得性の耐性遺伝子はグリコペプチド系抗菌薬産生放線菌を起源とし, 伝達性プラスミドや伝達性トランスポゾンなどの遺伝子伝達機構 (転移因子) によって菌間に伝播, 拡散し, 耐性菌が生じた。VRE はグリコペプチド系抗菌薬の多用により選択的に増加し, 環境中に急速に拡がった。医療環境だけでなく, グリコペプチド系薬剤を家畜の肥育目的に使用した国々では家畜環境においても VRE が増加し, 畜産物 (食肉) を介してヒトに伝播したと考えられている。我が国においては, 欧米諸国, 近隣諸国に比べ VRE の分離頻度は低いが, 現在は全国的に VRE による院内感染症や保菌者が増加しつつある。腸球菌は腸管内に定着しやすい菌であるため, 病院内外において VRE 感染者や保菌者から汚染物を介した経口感染によって VRE 保菌者が潜在的に拡大する危険性がある。国内で VRE による感染症が発生した際には感染療法に基づき 5 類感染症として行政に届け出る義務がある。また病院環境を含めた院内スクリーニング検査による VRE の拡散と汚染状況の把握, および感染者や保菌者との接触感染予防策の徹底が重要である。

Key words: VRE, 多剤耐性菌, 院内感染症, 遺伝子伝達機構, 5 類感染症

1. はじめに

腸球菌は腸管内常在菌で典型的な日和見感染菌である。近年, 欧米において腸球菌が重症院内感染症の重要な原因菌として増加している。これは新たな薬剤耐性をもつ多剤耐性腸球菌の出現と拡がり, そしてそれらの耐性菌に無効な抗生物質を多く使用してきたことによる多剤耐性腸球菌の選択的増加と, 重症の基礎疾患を持つ compromised host の増加などが原因と考えられている。腸球菌は種々の抗生物質に自然耐性であ

るだけでなく獲得耐性により高度耐性となる。そのなかで, バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin resistant enterococci : VRE) が院内感染の重要な原因菌となっており, 日本においても VRE による感染症が急増している。VRE の多くはバンコマイシンのみならず感染治療のために先行使用したペニシリンやアミノグリコシド系抗生物質にも高度耐性であるため, その感染症に有効な抗生物質が存在しない事も起こり得る。現在, バンコマイシン耐性 *Enterococcus faecium* に対してリネゾリド (Linezolid), キノプリスチン-ダルホプリスチン (Quinopristin-Dalfopristin) が認可されているが, 耐性となった VRE はすでに海外で報告されており, 慎重な使用が望まれる。

グリコペプチド (glycopeptide) 系抗生物質には

著者連絡先: (〒371-8511) 群馬県前橋市昭和町 3 丁目 39-22
群馬大学大学院医学系研究科細菌学分野
富田治芳

バンコマイシン、テイコプラニン (teicoplanin)、アボバルシン (avoparcin) があり、グラム陽性菌感染症に有効な抗生物質である。作用機構はバンコマイシンにおいて詳しく研究されているが、他の薬剤の作用機構もバンコマイシンと類似の機構と考えられている。グリコペプチド系薬剤各々の薬剤耐性菌は、それぞれ他のグリコペプチド系薬剤に交差耐性を示す。そのため VRE は、グリコペプチド耐性腸球菌 (glycopeptide resistant enterococci : GRE) と呼ぶようになってきている。これまで VRE が一般的に用いられてきたため本稿では VRE を GRE として用いる。

2. 腸球菌の細菌学的特徴

腸球菌は通性嫌気性のグラム陽性球菌であり、糖を分解し乳酸を主要な最終代謝産物とするホモ乳酸発酵によりエネルギーを獲得する。形態的に短いレンサ状に分裂増殖することから、以前はランスフィールド血清型で D 群抗原性を持つレンサ球菌として Group D *Streptococcus* 属と呼ばれていた。様々な遺伝学的、分子生物学的解析および各種生化学的特性から *Enterococcus* 属として 1984 年から独立した分類となり現在まで十数種類の菌種が報告されている。腸球菌属の多くは耐塩性、胆汁抵抗性、エスクリン分解を示すことから、BEAA (bile esculine azide ager) 培地上で黒色の発育コロニーとして選択される。また菌種の同定は細菌検査室においては各種糖分解性、色素生産性、運動性などによって行なわれるが、実験室内では PCR 法を用いた種特異的配列を持つ *ddl* 遺伝子 (細胞壁合成遺伝子) の検出によっても同定可能である。腸球菌はヒトを含め動物の腸管内常在菌であり典型的な日和見感染菌である。時に尿路感染症、胆道感染症、消化管手術後感染症、心内膜炎、敗血症などの起原菌として分離される。実際の臨床において感染症起原菌として分離されるのは主に *E. faecalis* と *E. faecium* 菌であり、他の菌種は感染症起原菌となることは稀であり、VRE として問題となるのもこれらの二菌種である。病原性においては *E. faecalis* の方が *E. faecium* よりも高いと考えられており、臨床分離 *E. faecalis* 株の約半数が β 溶血毒素 (細胞障害毒素) を生産すること、および複数の病原因子が報告されている。そのため VRE 以外に限ると臨床分離株の約 8 割が *E. faecalis* であり、他の多くは *E. faecium* である。一方、VRE においては *E. faecium* がより優位であり、VRE の増加に伴い、*E. faecium* の分離頻度が高くなる傾向にある。その原因は明確ではないが、一般に *E. fae-*

cium の方が *E. faecalis* に比べより多剤耐性であることに起因すると考えられている。

以前より臨床分離腸球菌 (主として *E. faecalis* および *E. faecium*) の多くは薬剤耐性を示すことが知られており、グラム陽性菌の中ではブドウ球菌と共に多剤耐性菌が存在することがその特徴にあげられる。その理由としては抗菌薬による選択圧に曝されることに加え、腸球菌が元来多くの抗菌薬に対し自然耐性であること、および各種の遺伝子伝達機構、特に伝達性プラスミドや伝達性トランスポゾンを持ち、外来性に耐性遺伝子を獲得する能力が高いことが考えられている。腸球菌はゲンタマイシン、カナマイシンのようなアミノグリコシド系薬剤、あるいはセフェム系薬剤に対しては薬剤の細胞内への取り込みが低いため自然耐性 (低~中等度) である。そして、あらゆる薬剤に対して獲得耐性になり得る。テトラサイクリンでは 70%、エリスロマイシンでは 30%、クロラムフェニコールでは 20%、そしてゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン高度耐性菌 (獲得耐性) は 20~30% 前後とされる。ペニシリン耐性は、*E. faecalis* ではペニシリン分解酵素による耐性で、*E. faecium* ではペニシリン結合タンパク質の変化による耐性である。臨床分離される VRE の多くは現存するほとんどすべての抗生剤に耐性である。現在、世界的に院内感染起原菌として拡がっている VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株 (MLST 解析で CC17 に分類) はペニシリン耐性であることを特徴としている。

3. VRE の疫学

バンコマイシン、テイコプラニンはヒトの感染症治療薬として、アボバルシンは主として養鶏において飼料に添加され鶏の成長促進の目的で用いられてきた。バンコマイシンは世界的に用いられているが、テイコプラニンは先進国では主としてヨーロッパで用いられ、近年日本でも認可されたが、米国では臨床治療薬として認可されていない。バンコマイシンは米国で 50 年近く使用されており、各種のグラム陽性菌感染症に広く用いられている。日本でも使用されているが MRSA に対する特効薬として注射剤は MRSA 感染症にのみ限定されている。ヨーロッパでの使用歴は各国において異なる。アボバルシンは、ヨーロッパとアジアの一部の国において長期間用いられた。特にヨーロッパでは鶏腸管糞便中の VRE を選択的に増やし、それが人間の環境に入ってきたとされている。家畜環境中での VRE の増加とそのヒトへの伝播が問題となり、多くの国々では 2000 年頃までにアボバルシンの

使用が禁止された。日本では約7年間用いられたが現在では使用されていない。日本国内における鶏の調査ではアボパルシンのVREに対する影響は出ていない。しかし、過去にアボパルシンが家畜(鶏や豚)に投与されていた国々(タイ, 中国, フランス, デンマーク, ドイツ, ブラジルなど)からの輸入食肉, 特に鶏肉のVREによる汚染と, 食肉を介したヒト環境中への伝播と拡散が指摘されている。

VRE感染症の最初の報告は*E. faecium*によるもので1988年に英国, 1989年にフランスでそれぞれ報告されている。いずれもバンコマイシンが多量に使用された病院において分離された。以後, 欧米を中心にVREによる重症院内感染や, 敗血症が報告されている。そして, 高度バンコマイシン耐性のほか, ゲンタマイシン耐性, ペニシリン耐性を持つ多剤耐性腸球菌が医療従事者の手, 便, あるいは感染患者または保菌患者の便や, 病院環境から分離されており院内感染の原因となっている。VRE感染症は院内感染によることが多い。グリコペプチド系, セフェム系, アミノグリコシド系抗生物質等の複数の抗生物質の長期投与のほか, 尿管カテーテル, または中心静脈カテーテル挿入状態等がVRE感染症の原因となるとされている。

我が国では欧米でのVREの出現からしばらくの間ヒトからのVREの分離報告はなかったが, 1996年に81歳の女性入院患者の尿から初めてVanA型VRE(*E. faecium*)が分離された。このVREはバンコマイシン, テイコプラニンに対して高度耐性であるだけでなくアミノグリコシド系を含め他のすべての抗生物質に耐性であった。このVREの分離は一度きりで, 便培養でもVREは検出されず, VREの腸管内定着を証明することはできなかった。これ以後, 現在までに複数のVRE感染症例が報告されているが多くの場合散発的なもので大規模な院内感染例は限られている。菌種も*E. faecium*のみならず*E. faecalis*も多く分離されている。欧米では*E. faecium*が大部分を占める事を考えると*E. faecalis*が多く分離されることは我が国のVREの特徴である。耐性型はVanA型とVanB型が分離されているが海外と比べるとVanB型の分離頻度が高く, この点も我が国のVREの特徴である。加えて世界的にも数例しか報告されていないVanD型が1株(*E. raffinosus*)人から, VanN型が1株(*E. faecium*)鶏から分離されている。私たちの最近の研究から, VanN型VRE株が国内産鶏肉から分離されることが明らかとなっており, フランスから輸入される雛鶏との関連性が推測されている。

4. VREの耐性機序

(a) バンコマイシンの作用機構と耐性機構(図1)

バンコマイシンはグラム陽性菌に有効で, その細胞壁の合成を阻害する抗菌剤である。グラム陰性菌においては薬剤が外膜を通過することができず, その作用点であるペプチドグリカン層に到達できない。そのためグラム陰性菌はバンコマイシンに対して自然耐性である。細菌の細胞壁物質はペプチドグリカン(peptidoglycan)で2種類の糖, N-アセチルムラミン酸[N-acetylmuramic acid (MurNAc)]とN-アセチルグルコサミン[N-acetylglucosamine (GluNAc)]の繰り返し結合による直列の鎖が, ペプチドで架橋されている構造をとっている。すなわち糖鎖を縦糸とするとペプチドによる架橋を横糸とする網目構造をしているわけである。細胞壁が合成される時, まず糖鎖の構成成分の1つであるムラミン酸(MurNAc)にアミノ酸が結合し, 最終的に5個のアミノ酸によるペンタペプチド(pentapeptide)が順次N-アセチルムラミン酸に付加される。その際, 4番目, 5番目の2個のD-Alaは宿主菌が染色体上に保持する*ddl*遺伝子産物Ddl(D-Ala:D-Alaリガーゼ酵素)の機能によってD-Ala-D-Alaとして作られ, 合成中の前駆体のペプチド鎖末端のL-Lysに付加される。その結果, UDP-MurNAc-L-Ala¹-D-iGln²-L-Lys³-D-Ala⁴-D-Ala⁵(UDP-MurNAc-pentapeptide)が形成される。次に, もう一つの糖であるN-アセチルグルコサミン(GluNAc)と結合し, lipid-MurNAc(GluNAc)-pentapeptideを形成する。これが細胞壁合成の前駆体となる。次に合成中のペプチドグリカンの糖鎖のGluNAcと前駆体のMurNAcが結合し, ついでペプチド間の結合による糖鎖間の架橋反応が起こる。ペプチド同士が結合する時, PBPの働きによってペンタペプチドの5番目のD-Ala⁵が切れ, 4番目のD-Ala⁴が他のペンタペプチドと架橋されることによって連結する。この架橋構造は菌種によって異なり, 黄色ブドウ球菌では二つのペプチド鎖間の架橋連結は5個のL-Gly(ペンタグリシン)によって行われるが, 腸球菌では*E. faecalis*が2個のL-Ala, *E. faecim*が1個のL-Aspによってそれぞれ連結される。

バンコマイシンはペプチド結合(架橋反応)が行われる前のペンタペプチドの-D-Ala⁴-D-Ala⁵部分に細胞膜外で結合する。そのため架橋反応が阻害され細胞壁合成が停止する。バンコマイシン耐性菌では正常に合成されたペンタペプチドの-D-Ala⁴-D-Ala⁵部分の5番目のD-Ala⁵がD-lactate(乳酸), またはD-serine(セリン)に置換され-D-Ala⁴-D-lactate⁵あるいは-D-Ala⁴-D-

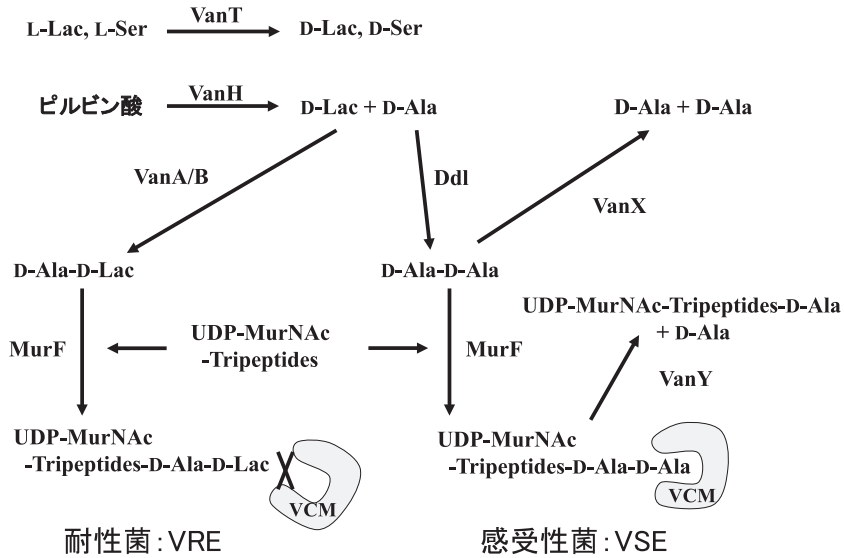


図1. 細胞壁前駆体合成過程とバンコマイシン耐性遺伝子産物(酵素)の働き

明らかにされているバンコマイシン耐性遺伝子産物 VanA, VanB, VanH, VanH, VanX, VanY, VanT の機能を示した。各 Van 型耐性において同一名称の遺伝子は相同性があり、同じ機能を持つと考えられている。各 Van 型遺伝子群のうち、耐性発現に最も重要な役割を果たす D-D リガーゼをコードする遺伝子の名称が Van 型名となっている。図中の Ddl, MurF は腸球菌が染色体上に持つ、細胞壁合成のための遺伝子である。

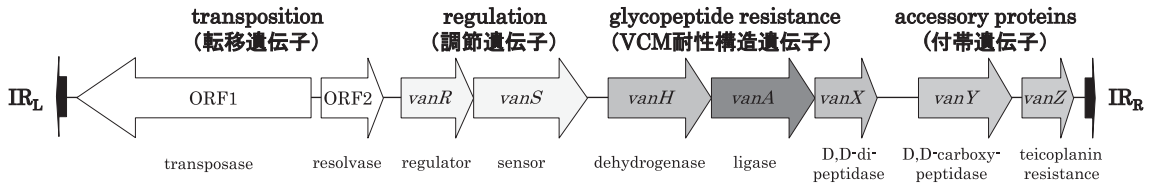


図2. VanA 型バンコマイシン耐性トランスポゾン Tn1546 (10.851 kb) の構造

個々の耐性遺伝子とその転写方向を矢印で示した。5 個の耐性遺伝子と 2 個の調節遺伝子はそれぞれ複合遺伝子オペロンを構成しており、全体が転移因子トランスポゾンの中にコードされている。転移(遺伝子の切出しと挿入)に必要な酵素遺伝子は耐性遺伝子群の上流に位置している。転移酵素が認識する逆向き繰り返し配列 (IR_L と IR_R) がトランスポゾン末端部に存在する。

serine⁵となる。バンコマイシンはこれらに結合できないためバンコマイシン耐性となる。ペプチド鎖による架橋形成時には末端の-D-lactate⁵あるいは-D-serine⁵は切り離されるので出来上がった細胞壁は通常の細胞壁と変わらない。これら二種類の変化した細胞壁前駆体ペンタペプチド末端, -D-lactate⁵と-D-serine⁵に対するグリコペプチド系薬剤の親和性(認識結合)を比較すると、前者の方がより親和性が低い。そのために D-Ala-D-lactate を形成するリガーゼ遺伝子を持つ耐性型(後述の VanA 型, VanB 型, VanD 型, VanM 型) VRE の方が D-Ala-D-serine を形成する他の耐性型

VRE よりもグリコペプチド系薬剤により高度の耐性(高 MIC 値)を示す。

(b) バンコマイシン耐性遺伝子 (図2)

バンコマイシン耐性遺伝子の中で VanA 型耐性遺伝子が最も詳しく研究されている。この遺伝子はトランスポゾン Tn1546 (10.851 bp) 中に存在する。バンコマイシン耐性遺伝子は vanR, vanS, vanH, vanA, vanX, vanY, vanZ の遺伝子からなり、vanR, vanS は vanHAX 発現のための調節遺伝子(細菌の二成分制御系機構)、vanH, vanA, vanX, vanY はバンコマイシン耐性のための遺伝子である。VanH 蛋白は酸化

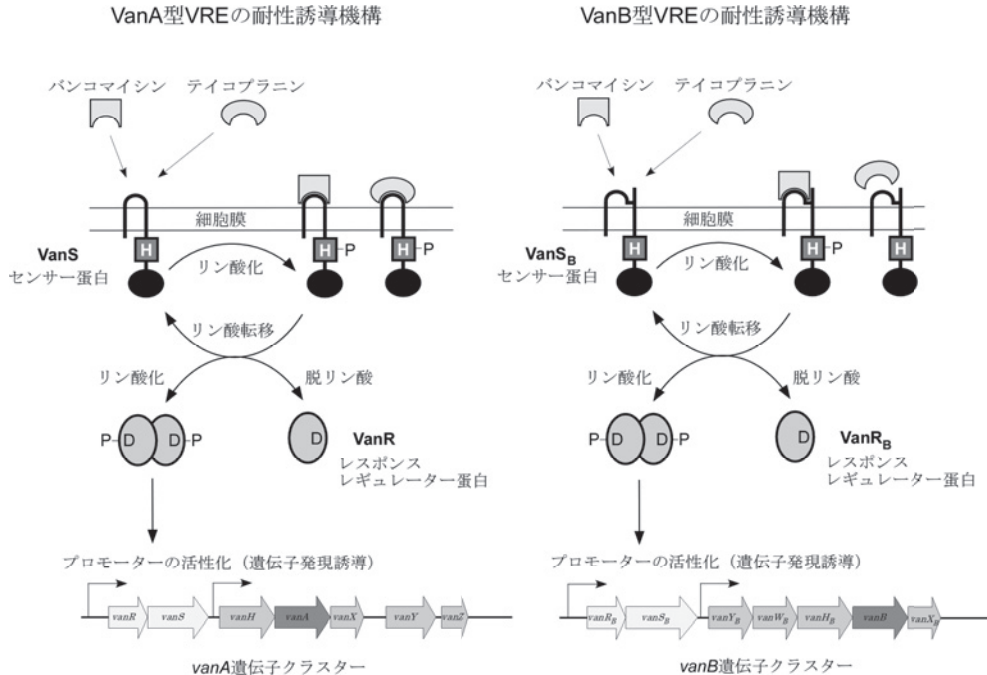


図3. 二成分制御系 (VanRS) を介したグリコペプチド系薬による耐性誘導機構

ここでは耐性誘導が認められる代表的な VanA 型 VRE (左) と VanB 型 VRE (右) について示した。VanA 型はバンコマイシンとテイコプラニンの両方に対して応答し耐性遺伝子の発現が誘導されるが、VanB 型はバンコマイシンにのみ応答する。この違いはセンサー蛋白の細胞表面に存在する薬剤認識の分子構造が異なっているためと考えられている。そのため VanA 型はテイコプラニンに対して高度耐性を示すが、VanB 型はテイコプラニンに感受性を示すと考えられている。VanS センサー蛋白分子はキナーゼ活性 (リン酸化反応) とフォスファターゼ活性 (脱リン酸化反応) の異なる二つの酵素活性を持つ。

還元酵素で NADP (H) を酸化しピルビン酸を還元し D-lactate (乳酸) を生産する。VanA 蛋白は D-alanine (D-Ala) と D-lactate の結合酵素 (ligase) でこれにより D-Ala-D-lactate が形成される。この dipeptide が UDP-tripeptide に結合され UDP-tripeptide-D-Ala⁴-D-lactate⁵ ができる。VanX 蛋白は正常な dipeptide である D-Ala-D-Ala を分解しバンコマイシンに感受性となるペプチドグリカン前駆体の産生を抑える。VanY 蛋白は正常な前駆体である UDP-tripeptide-D-Ala⁴-D-Ala⁵ から末端の D-Ala⁵ を切り離し VanX 蛋白と同様に感受性となるペプチドグリカン前駆体の産生を抑える。VanY 蛋白、VanX 蛋白によって切り出された D-Ala は D-Ala⁴-D-lactate⁵ 合成のための基質として再利用される。VanZ 蛋白の機能は明らかになっていない。

(c) バンコマイシン耐性遺伝子の発現誘導機構 (図 3)

バンコマイシン耐性遺伝子の多くはオペロン内の *vanR*、*vanS* 遺伝子産物の VanR 蛋白、VanS 蛋白から構成される細菌の二成分制御機構によって、転写レ

ベルでの発現調節を受けている。VanS は菌の細胞膜に存在するセンサー蛋白であり、環境中のグリコペプチド薬を感知し、自身の持つキナーゼ活性により自己リン酸化する。このリン酸基は菌体細胞質内のレスポンス・レギュレーター蛋白である VanR に転移伝達され、VanR がリン酸化、二量体形成により活性化し、最終的には自身の *vanR* 遺伝子プロモーター、及び下流の耐性遺伝子のプロモーターを活性化し、転写を誘導する。リン酸化 VanR 蛋白は VanS のフォスファターゼ活性により、逐次、脱リン酸化状態に戻る。このようにバンコマイシン耐性遺伝子は環境中に薬剤があるときにのみに変異型 (耐性型) 細胞壁前駆体が形成され耐性を示すという非常に巧妙な機構を持つ。しかし、一部の VRE ではこれらの耐性誘導機構が遺伝子変異のために失われており、恒常的に耐性遺伝子が発現される型や、細胞壁合成関連遺伝子の変異によって特殊な形質を持つ VRE 株が報告されている。それらは下記に述べるようなテイコプラニン低感受性を示す VanA 型 VRE や、バンコマイシン依存性 VRE、

表1. バンコマイシン耐性遺伝子の型分類

耐性型	ligase 遺伝子	標的部位の アミノ酸置換	一般的な耐性度 MIC (μg/ml)		耐性の 発現 誘導	伝達性	転移因子	遺伝子の 存在部位	主な分離菌種
			バンコマ イシン	テイコブ ラニン					
VanA	vanA	D-Ala-D-Lac	64->1000	16-512	あり	あり	Tn1546	プラスミド/ 染色体	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>S. aureus</i> (MRSA)
VanB	vanB	D-Ala-D-Lac	4->1000	0.5-1	あり	あり	Tn1549/ 5382	プラスミド/ 染色体	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
VanC	vanC1	D-Ala-D-Ser	2-32	0.5-1	なし	なし		染色体	<i>E. gallinarum</i>
	vanC2	D-Ala-D-Ser	2-32	0.5-1	なし	なし		染色体	<i>E. casseliflavus</i>
	vanC3	D-Ala-D-Ser	2-32	0.5-1	なし	なし		染色体	<i>E. flavescens</i>
VanD	vanD	D-Ala-D-Lac	64-128	4-64	なし	なし		染色体	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
VanE	vanE	D-Ala-D-Ser	8-32	0.5	あり	なし		染色体	<i>E. faecalis</i>
VanF	vanF	D-Ala-D-Lac	>1000	<0.5	あり	不群		染色体	<i>Paenibacillus</i> <i>popilliae</i>
VanG	vanG	D-Ala-D-Ser	16	0.5	あり	あり		染色体	<i>E. faecalis</i>
	vanG _{cd}	D-Ala-D-Ser	<3	<3	あり	なし		染色体	<i>Clostridium</i> <i>difficile</i>
VanL	vanL	D-Ala-D-Ser	<16	<2	あり	なし		染色体	<i>E. faecalis</i>
VanM	vanM	D-Ala-D-Lac	>256	>64	あり	あり		プラスミド/ 染色体	<i>E. faecium</i>
VanN	vanN	D-Ala-D-Ser	<16	<1	なし	あり		プラスミド	<i>E. faecium</i>

バンコマイシン感受性 VanB 型 VRE などである。

(d) バンコマイシン耐性の分類 (表1, 図4)

バンコマイシン耐性遺伝子はこれまでのところ A, B, C, D, E, G, L, M, N の9つのタイプ(型)が報告されている。それぞれ結合酵素 (ligase) 遺伝子として *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*, が存在する。それぞれの耐性型において耐性遺伝子の構成が若干異なるが、基本となる耐性遺伝子とその働きは同じである。上述したように、各種の耐性型間の耐性を比較すると細胞壁前駆体のペントペプチド鎖末端構造が⁴-D-Ala⁴-D-lactate⁵の耐性型 VRE の方が⁵-D-Ala⁴-D-serine⁵の耐性型 VRE よりも薬剤耐性度が高く、臨床的に問題となる。実際には高度耐性を示し、臨床から多く分離される VanA 型と VanB 型が臨床上問題となる。基本的に臨床分離される VRE は下記のいずれか一種類の耐性型遺伝子を保持するが、稀に複数の耐性型遺伝子を保持する株も存在することが報告されている。

VanA 型: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium* で分離される

が主として *E. faecium* において多く分離されている。ただし我が国においては *E. faecalis* からの分離も多い。この耐性はバンコマイシンおよびテイコプラニンによって誘導され高度耐性を示す。この耐性誘導は Tn1546 上の二成分制御系によって環境中のグリコペプチド系薬剤を感知することによる。腸球菌にはグラム陽性菌では唯一高頻度接合伝達性プラスミドが存在し、VanA 型バンコマイシン耐性トランスポゾンもこのようなプラスミド上に存在し、菌と菌との接合によって耐性プラスミドが伝達することがある。VanA 蛋白は D-Ala と D-lactate から⁴-D-Ala⁴-D-lactate⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体を形成する。院内感染原因バンコマイシン耐性菌として最も問題になっている耐性型である。VanA 型 VRE では環境中のバンコマイシンとテイコプラニンの両方によって耐性が誘導されることから、どちらの薬剤に対しても高度耐性を示す株が一般的である (図3)。しかし、一部の株、特にタイ産の輸入鶏肉から分離される VRE 株から VanS 蛋白に3個のアミノ酸置換があるため、テイコプラニンに対し感受性 (低度耐性) を示す株が高頻度

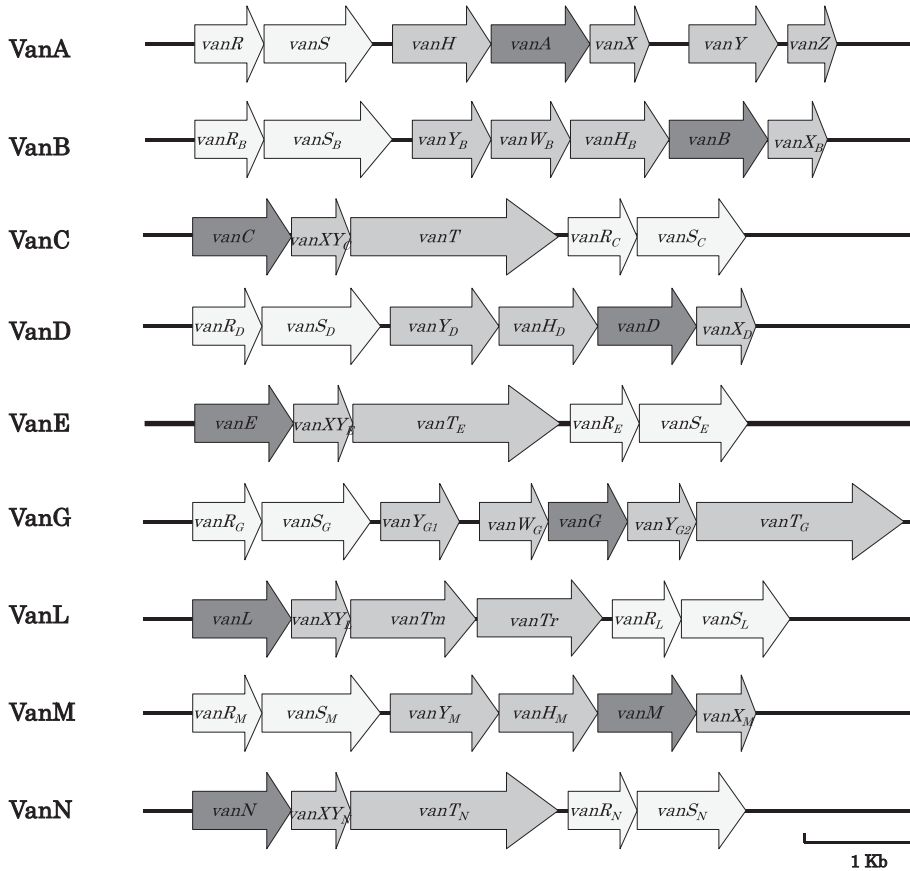


図4. 各種バンコマイシン耐性型の遺伝子構造

これまでVREでは9種類（VanFを除く）の型が報告されている。図中のVanF型耐性遺伝子は、土壌細菌 *Paenibacillus popilliae* から見つかったもので、VREの耐性遺伝子の起源に近い耐性遺伝子と考えられている。全ての耐性型において、二成分制御系遺伝子（VanRS）が存在するが、表1に示されるように耐性の発現誘導を認めない型もある。これらは遺伝子発現調節機構のいずれかに変異等が存在するためと考えられている。最近、VanG型耐性遺伝子と類似した遺伝子が一部の臨床分離 *Clostridium difficile* の染色体上に存在していることが報告された。

で分離された。国内の臨床分離株にも同一の変異を持つVRE株が分離されることから、輸入食肉を介したヒトへの伝播が示唆されている。また特殊なVanA型VRE株として、環境中にバンコマイシンが存在する時のみ菌の発育可能な形質を持つVREが中国産鶏肉から分離された。この株は、染色体上の *ddl* 遺伝子に変異を持ち、その機能が失われたため野生型（バンコマイシン感受性腸球菌）の細胞壁前駆体が合成されず、薬剤存在下で耐性型の細胞壁前駆体のみが作られ生存できるVREと考えられている。

VanB型：*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* で分離されている。通常Tn1549（34 kb）上に存在する。バンコマイシンによって耐性が誘導されバンコ

マイシンに対して中等度から高度耐性を示すがテイコプラニン感受性である。耐性遺伝子は染色体上に存在するとされてきたが近年接合伝達性プラスミド上に存在するものが分離されている。VanB蛋白はVanA蛋白同様D-AlaとD-lactateからD-Ala⁴-D-lactate⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体を形成する。一般的にVanB型VREはバンコマイシンに高度耐性を示すが、テイコプラニンには感受性である。これは二成分制御系のVanS_Bセンサー蛋白のグリコペプチド薬剤感知能によると考えられている。VanS_Bセンサー蛋白はテイコプラニンを感知できず、耐性遺伝子の発現が誘導されないために感受性を示すと考えられている（図3）。最近、VanB型耐性遺伝子を保持しているに

もかわらず、バンコマイシン低度耐性、あるいは感受性を示す腸球菌株が存在することが、国外で報告された。同様の感受性株が国内の複数の施設からも分離されている。現時点でその原因は明らかとなっていないが、VanB型耐性遺伝子内、あるいは宿主の細胞壁合成代謝に関わる遺伝子に変異があると推定されている。

VanC型：*E. gallinarum* (VanC1型)、*E. casseliflavus* (VanC2型)、*E. flavescens* (VanC3型)で分離されている。バンコマイシン耐性は常に発現されており低度耐性で、テイコプラニンに対しては感受性である。これら菌種の分離菌すべてが耐性であることから自然耐性であると考えられている。耐性遺伝子は染色体上に存在することから、各菌種の同定にも用いられている。各VanC蛋白はD-AlaとD-serineを結合する酵素で-D-Ala⁴-D-serine⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体を形成する。VanC型の自然耐性菌においても感受性菌が生産するD-Ala:D-Ala結合酵素 (ligase) とD-Ala:D-serine結合酵素 (ligase) の両者を生産すると考えられている。

VanD型：*E. faecium*、*E. faecalis*、*E. raffinosus*で分離されているが、これまでに世界中で10株前後の報告しかない。バンコマイシンに対して中等度から高度耐性を示しテイコプラニンに対しては中等度から低度耐性である。耐性は誘導されることなく常に発現している。耐性遺伝子はこれまでのところ染色体上に存在している。VanD蛋白はVanA、VanB蛋白同様D-AlaとD-lactateから-D-Ala⁴-D-lactate⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体を形成する。

VanE型：*E. faecalis*からしか分離されていない。これまでに世界中で5株の報告しかない。バンコマイシンに対して低度耐性を示しテイコプラニンに対しては感受性である。バンコマイシンによって耐性は誘導される。耐性遺伝子はこれまでのところ染色体上に存在している。VanE蛋白はVanC蛋白同様D-AlaとD-serineから-D-Ala⁴-D-serine⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体を形成する。

VanG型：*E. faecalis*で分離されているが、これまでに世界中で3株の報告しかない。バンコマイシンに対して低度耐性を示しテイコプラニンに対しては感受性である。バンコマイシンによって耐性は誘導される。耐性遺伝子はこれまでのところ染色体上に存在している。VanG蛋白はVanC、VanE蛋白同様D-AlaとD-serineから-D-Ala⁴-D-serine⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体を形成する。最近、VanG型耐性遺伝子と類似した遺伝子が一部の臨床分離*Clostridium*

*difficile*の染色体上に存在していることが報告された。ただし*C. difficile*では宿主因子の影響によりバンコマイシン耐性は発現されていないことが示されている。

VanL型：*E. faecalis*がカナダで分離されている。VanL蛋白はVanC、VanE、VanG蛋白同様D-AlaとD-serineから-D-Ala⁴-D-serine⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体を形成する。そのためバンコマイシンに対する耐性値は低い (MIC, 8 µg/ml)。テイコプラニンについての記載は無いが、serineを末端に付加するグループに属することから感受性であると考えられる。バンコマイシンに対する耐性はバンコマイシンによって誘導される。接合伝達による耐性の伝達が観察されなかったことから、耐性遺伝子は染色体上に存在すると考えられている。

VanM型：*E. faecium*が中国で1株報告されている。D-AlaとD-lactateから-D-Ala⁴-D-lactate⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体が形成されていることから、VanM蛋白はVanA、VanB蛋白同様D-Ala:D-Lac ligaseであると考えられる。バンコマイシンにもテイコプラニンに対しても高度耐性である。*E. faecium*への伝達が報告されていることから、耐性遺伝子はプラスミド上に存在していると考えられる。

VanN型：*E. faecium*がフランスと我が国で分離されている。-D-Ala⁴-D-serine⁵を末端に持つペプチドグリカン前駆体を形成するタイプの耐性でバンコマイシンに対して低度耐性を示しテイコプラニンに対しては感受性である。同じタイプであるVanE型やVanG型は誘導型の耐性発現を示すがVanN型はVanC型と同様に常に耐性発現を行っている。耐性遺伝子はプラスミド上に存在し、低い頻度ではあるが*E. faecium*への伝達が報告されている。

(e) VanA型耐性遺伝子群をコードする Tn1546 の タイピング

これまで分離されてきたVanA型VREの持つ耐性遺伝子はすべてTn1546にコードされており、我が国で分離された株も同様である。我が国で分離された株から得られたTn1546のDNA塩基配列を調べた結果、塩基置換や挿入配列 (IS)の有無、ISの転移による副産物であろう欠失の有無によって、現在までにプロトタイプ (図2) 以外に11種の型 (A型~K型)が見つかった。A、B、C、J、K型では異なる塩基置換やvanY遺伝子における1塩基の欠失が見られた。D、E、F、I型ではORF1、ORF2が欠失し、代わりにIS256やIS1542が挿入されていた。E、F型においてはそれに加えてvanXとvanYの間に

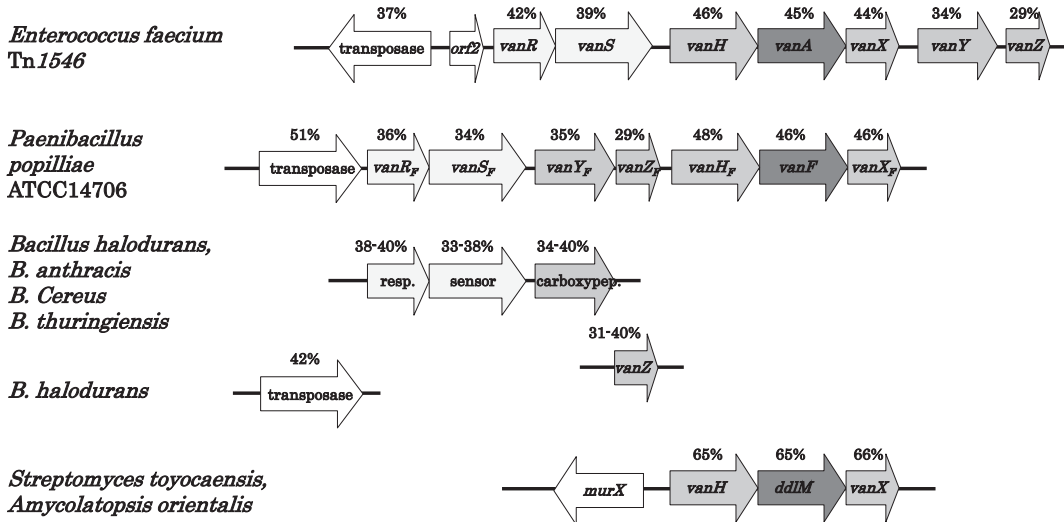


図5. バンコマイシン耐性遺伝子の起源

各遺伝子領域核酸の平均 GC 含有量 (%) の比較を示す。最上段に VanA 型 VRE の耐性遺伝子のオペロン構造，下段に他の細菌種で見出され報告された VRE の耐性遺伝子と相同性を持つ遺伝子の構造を示す。放線菌は GC 含有量が比較的高いが，腸球菌は GC 含有量が低い細菌種である。グリコペプチド系抗生物質を産生する放線菌群が持つ自身の薬剤に対する免疫因子（耐性遺伝子）が，水平伝播によって様々な土壌細菌種を経て，最終的に腸球菌によって獲得され VRE が生じたと推定される。この過程において効率的な耐性発現や遺伝子伝播に有利となる調節遺伝子や転移因子が累積し，最終的に複合遺伝子として形成されたと推定されている。宿主菌の変化に伴い耐性遺伝子の核酸 GC 含有量（使用コドン）も宿主に応じて変遷したと考えられている。

IS1216 の挿入が見られた。I 型ではさらに IS1216V が *vanY* 遺伝子内に挿入されており，その位置から下流の遺伝子が欠失していた。G, H 型においては ORF1 の N 末領域が 120 bp あるいは 890 bp 欠失しており，その上流に IS1216V が存在していた。また，*vanS* と *vanH* の間に IS1251 が挿入されており，G 型においてはさらに *vanX* と *vanY* の間に IS1216 の挿入が見られた。これらのうち *vanS* 遺伝子内に 3 箇所の塩基置換を持つ B, C type（テイコプラニン感受性）がアジア地域に特徴的な型ではないかと思われる。これら IS の挿入や，遺伝子変異，遺伝子欠失によって，薬剤耐性がプロトタイプとは異なる VRE 株が臨床で多く分離されている。

5. バンコマイシン耐性遺伝子の起源（図 5）

一般的に抗生物質に対する特異的な高度耐性遺伝子の起源は，その抗生物質を生産する生物種（その多くはグラム陽性細菌である放線菌に属する）が自ら分泌する抗生物質に対して自身を守るために保持している免疫（耐性）機構であると考えられている。バンコマイシンなどのグリコペプチド系抗生物質を生産し分泌する放線菌 *Streptomyces toyocaensis* や *Amycola-*

topsis orientalis は自ら作り出す抗生物質に耐性となるための遺伝子群を保持していることが解っている。これらは VRE の耐性遺伝子との相同性から *vanH*, D-Ala : D-Ala ligase (*ddl*), *vanX* と命名され，VanA, VanB, VanC, VanD の各型耐性遺伝子群におけるそれぞれ同名の遺伝子の起源(由来)と考えられており，その構成順も同一である。さらに以前は *Bacillus* 属に分類されていた環境細菌の一つ *Paenibacillus popilliae* が VRE の Van 遺伝子群と類似した VanF 型耐性遺伝子を保持していることが明らかとなった。放線菌属の宿主 DNA の GC 含有量は一般的に 60% 以上と高く，先のグリコペプチド生産放線菌の耐性遺伝子領域 DNA の GC 含有量は 65% 前後である。これに対し，腸球菌は低 GC 含量生物種であり，*E. faecalis* で約 38%，*E. faecium* で約 39% である。しかしながら，VRE の各 Van 型遺伝子領域は GC 含量 45-50% と宿主本来の GC 含量に比べ著しく高くなっている。また *P. popilliae* の GC 含量は 45-50% であり，この菌に見出された VanF 型耐性遺伝子領域の GC 含量は 47% 前後であった。これらの事実から，おそらく放線菌を起源とする耐性遺伝子が環境細菌を経由し，最終的に腸球菌によって獲得されたと考えられている。獲得さ

れた耐性遺伝子は宿主菌に適応するように次第に進化しつつ (GC 含量低下やコドン使用頻度など) VRE の持つ Van 型耐性遺伝子となった。この進化の過程で様々な多様性が生まれ多くの耐性型が生じたと考えられる。また調節遺伝子もこの進化の過程で耐性遺伝子の構成要素として組み込まれたものと推察されている。これまでに腸球菌の VanA 型耐性トランスポゾン Tn1546 を構成する遺伝子のうち放線菌を起源とする先の *vanH*, D-D ligase gene (*ddl*), *vanX* 以外の遺伝子は, *Bacillus* 属菌に見出された二成分制御系遺伝子, *vanZ* 遺伝子, トランスポゾン転移遺伝子とその起源であることが相同性の解析結果から示されている。また VanE 型, VanN 型はそれぞれ VanC 型とその遺伝子構成が類似していることから, 元来 VanC 型を染色体上に保持している *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* を起源とする耐性遺伝子が後に *E. faecalis* や *E. faecium* へと伝達され, 獲得されたものと考えられている。

6. 腸球菌の接合伝達性プラスミド

細菌の接合伝達性プラスミドは, 細菌間の遺伝子交換 (genetic exchange) に重要な役割を果たす。薬剤耐性伝達性プラスミドは, 薬剤耐性を細菌間に拡散させる。伝達性プラスミドのうち液体培地中でも接合伝達が可能な, いわゆる高頻度接合伝達性プラスミドはグラム陰性菌では F 因子や R プラスミドとして知られているが, グラム陽性菌では一般的でない。しかし, 腸球菌には高頻度接合伝達性プラスミドが存在し, 臨床分離株に拡がっている。これまでに解析されている腸球菌の接合伝達性プラスミドは 3 種類存在する。

(a) 広域宿主プラスミド

比較的サイズの小さいプラスミド (~40 kb) で, 液体培地中の接合伝達性はなく, 固形培地上でのみ伝達をするプラスミドであり, 菌種を超えて, 各種のグラム陽性菌に伝達する。pAMβ1 (*E. faecalis* 菌) や pIP501 (*S. agalactiae* 菌) が代表的なプラスミドでいずれも Inc18 不和合性群に属し, それぞれマクロライド耐性遺伝子をコードしている。これらのプラスミドは腸球菌属以外, streptococci, lactobacilli, lactococci, *Listeria* spp., clostridia, staphylococci 等, 種々のグラム陽性菌に伝達する広宿主域性を持つ。2002 年に米国で分離, 報告されたバンコマイシン耐性 MRSA (VRSA) は, 患者が保菌していた VRE が Tn1546 が挿入された pIP501 型プラスミドを保持していたことから, この耐性プラスミドが共存していた MRSA に接合伝達し, MRSA 内の別のプラスミド上へ Tn1546

が転移した事により生じたと考えられている。

(b) *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミド (図 6)

腸球菌の *E. faecalis* に特異的な高頻度接合伝達性プラスミドであり, 液体培地中で伝達が可能な, サイズの大きいプラスミド (45~100 kb) である。プラスミドを持たない受容菌が生産する性フェロモン (疎水性の高いアミノ酸 7~8 個のペプチド) が高頻度伝達性の誘導に関与しており, 細菌においては初めてのフェロモンの例になった。*E. faecalis* は複数の性フェロモンを培地中に分泌しており, フェロモン反応性プラスミドを保持する供与菌はこのフェロモンに反応し, 菌体表面に接合凝集蛋白が誘導され, 受容菌と供与菌との物理的結合 (接合) が生じプラスミドの伝達が行われる。これらの高頻度接合伝達性プラスミドには, 種々の薬剤耐性遺伝子や抗菌物質 (バクテリオシン) 遺伝子が存在する。国内の初の VRE 院内感染起因菌では, このフェロモン反応性プラスミド上に Tn1549 (VanB 型耐性) が存在していた (図 6)。また台湾のヒトと家畜 (環境) から分離された VanA 型 VRE に Tn1546 (VanA 型耐性) を持つフェロモン反応性プラスミドが拡がっており, 耐性遺伝子の急速な伝播, 拡散に寄与している。

(c) *E. faecium* の pMG1 型プラスミド (図 7)

pMG1 プラスミド (65 kb) は国内の臨床分離 *E. faecium* 株から見出されたフェロモン反応性プラスミドとは異なる高頻度接合伝達性プラスミドである。pMG1 は高度ゲンタマイシン耐性トランスポゾンを持ち, 他の腸球菌種 (*E. faecalis*, *E. hirae*) へも伝達が可能である。これまでの解析から pMG1 に類似のいわゆる pMG1 型プラスミドが米国ミシガン大学附属病院の VanA 型 VRE 株に広がっていること, また Tn1546 を保持するバンコマイシン耐性 pMG1 型プラスミド (pHT プラスミド) が国内の院内感染 VRE 株 (*E. faecium*, *E. avium*) にも存在することが明らかとなった。これらの pMG1 型高頻度伝達性プラスミドが腸球菌間での各種耐性遺伝子の拡散に関与していること (おそらく非伝達性プラスミドの可動化) が示されている。

7. VRE 感染症の診断

(a) VRE 検出法と抗菌薬感受性試験

1. 日本で臨床分離されるバンコマイシン感受性腸球菌の, バンコマイシンの MIC は 1 μg/ml 以下である。
2. バンコマイシンの MIC が 4 μg/ml 以下の場合を

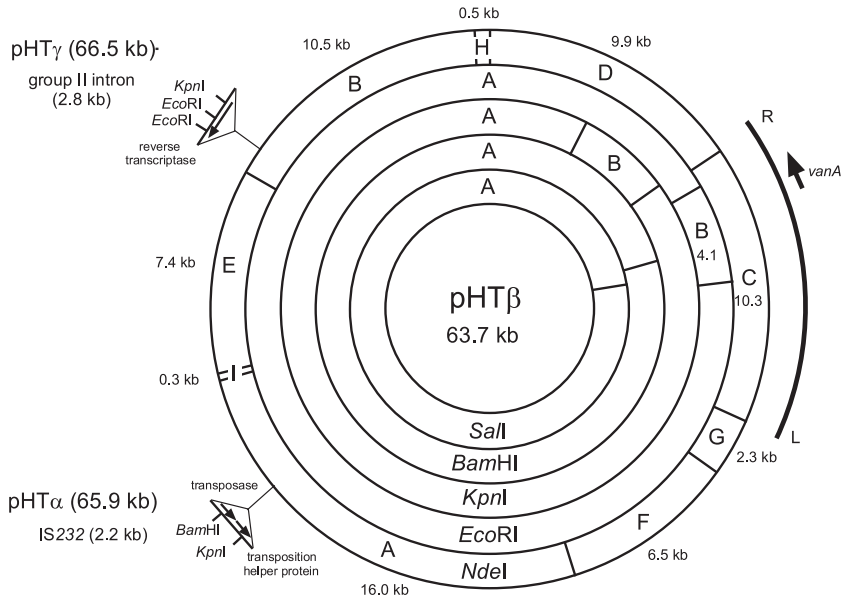


図7. 国内の臨床分離 VanA 型 VRE 株 (*E. faecium*) に存在したバンコマイシン耐性 pMG1 型高頻度接合伝達性プラスミド pHT プラスミド

国内の医療施設で広範な院内感染症を起こした VRE 株 (*E. faecium*, *E. avium*) には、pMG1 型高頻度接合伝達性プラスミドとして互いに構造が類似する 3 種類の pHT プラスミドが存在していた。それぞれ pHTα (65.9 kb), pHTβ (63.7 kb), pHTγ (66.5 kb) と命名されたが、これらは全て VanA 型耐性トランスポゾン Tn1546 を持っていた (プラスミド地図右側の弧の領域)。これらのうち pHTβ がプロトタイプであり、pHTα と pHTγ はそれぞれ転移因子である IS232 とグループ 2 イントロンが挿入された派生型であった。

出をすることが求められている。現在、法令の修正によって、届け出にあたり VRE が疑われる腸球菌について耐性遺伝子型 (VanA, VanB, VanC 型) を検査する義務は無くなっている。本来は無菌的である検体材料などからの分離の場合 (血液、髄液、関節液、腹水、尿など) は常在菌の混入 (腸管内容物による汚染) の可能性を考慮し、臨床所見、他の検査データと合わせ総合的に VRE による細菌感染症の診断を行う。特に尿検体からの VRE 検出時には尿路感染症起因菌としての判断に注意が必要である。

(c) 糞便等検査材料よりの VRE の選択的分離

1. 培地: Enterococcosel agar (BBL), または EF 寒天培地 (日本製薬), 等を選択培地として用いる。

2. 検査材料あるいはスワブからあらかじめ VRE を選択的に増菌させたい時は検査材料等を入れたシャーレにバンコマイシン 6 μg/ml を含む Enterococcosel broth (BBL) を 10 ml 加え 35~37°C にて終夜培養する。その後、バンコマイシン 6 μg/ml を含む上記寒天培地上に菌液 100 μl を塗布する。選択的増菌を行わない時はバンコマイシン 6 μg/ml を含む上記寒天培地上に検査材料をエーゼまたはスワブにて直接

塗布する。

3. 2 日間 35~37°C にて培養する。

4. Enterococcosel agar を用いた時、直径 0.5~1.5 mm 程度の黒または黒灰色のコロニー、EF 培地を用いた時、海老茶色 (*E. faecalis*), 黄色 (*E. faecium*) のコロニーをバンコマイシン耐性腸球菌と推定し、純培養を行い薬剤耐性検査、菌種の同定を行う。バンコマイシンを含む腸球菌分離用培地には VRE, *Pediococcus*, *Leuconostoc* が生育するが VRE は比較的コロニーが大きく液体培地での生育も良い。臨床分離腸球菌の 80~90% は *E. faecalis* で他は *E. faecium* を主として *E. gallinarum* 等が分離される。

(d) van 遺伝子検出のための PCR (表 2, 図 8)

VRE を証明するため、または VRE の van 遺伝子を検出し型別を行う時には結合酵素 (ligase) 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR を行うのが簡便で迅速である。現在までに 9 つのバンコマイシン耐性型が報告されているが臨床問題となる高度耐性を示す型は A, B, D, M 型である。このうち M 型は中国で 1 例の報告があるだけであり、また D 型も我が国では 1 例報告されているだけにすぎないため、現実

表2. 主な van 遺伝子検出と菌種同定のための PCR 手法

遺伝子名	プライマー名	プライマー配列 (5' → 3')	増幅領域	PCR 産物の 大きさ (bp)
<i>vanA</i>	VanA A1	GGGAAAACGACAATTGC	175-191	732
	VanA A2	GTACAATGCGGCCGTTA	907-891	
<i>vanB</i>	VanB B1	ATGGGAAGCCGATAGTC	173-189	635
	VanB B2	GATTTCGTTCTCTCGACC	807-791	
<i>vanC1</i>	VanC1 C1	GGTATCAAGGAAACCTC	246-272	822
	VanC1 C2	CTTCCGCCATCATAGCT	1067-1051	
<i>vanC2 vanC3</i>	VanC2/3 D1	CTCCTACGATTCTCTTG	455-486	439
	VanC2/3 D2	CGAGCAAGACCTTTAAG	885-869	
<i>ddl E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> DDL E1	TCAAGTACAGTTAGTCTT		941
	<i>E. faecalis</i> DDL E2	ACGATTCAAAGCTAACTG		
<i>ddl E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> DDL F1	GCAAGGCTTCTTAGAGA		550
	<i>E. faecium</i> DDL F2	CATCGTGTAAGCTAACTTC		

PCR サイクル：94℃ 2分 (1回), 94℃ 1分→54℃ 1分→72℃ 1分 (30回), 72℃ 10分 (1回)

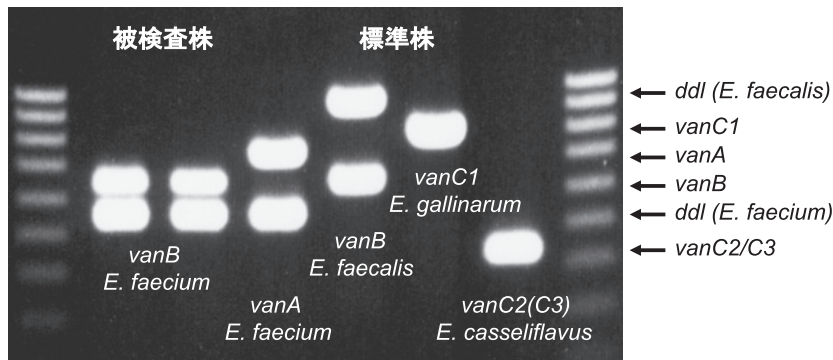


図8. マルチプレックス PCR による VRE 同定方法の実際

表2で示す5種類のプライマーを用いたマルチプレックスPCRの増幅産物のアガロース電気泳動像を示す。コントロール株としてVanA型*E. faecium*、VanB型*E. faecalis*、VanC1型*E. gallinarum*、VanC2型*E. casseliflavus*の4菌種を用いた(右側4レーン)。それぞれの遺伝子産物の予想されるサイズ位置を右側の矢印で示す。実際の被検査2株を、本PCR法によって解析した(左側2レーン)。ここに示された結果から、被検査株はどちらもVanB型VRE(*E. faecium*)と同定された。

にはA型とB型の検出を念頭に置いておけば問題ない。また、自然耐性としてのC型が分離され得るためA型、B型、に加えC型の3つについてPCRを行えばよい。PCRのためのプライマーの塩基配列およびPCRの条件を表2に示した⁹⁾。同時に*E. faecalis*と*E. faecium*を鑑別するための、それぞれのD-Ala:D-Ala ligase 遺伝子に対するプライマーも表1に示した。これら6種類のプライマーを1度に用いて行うmultiplex PCRが表2で示した条件で可能ではあるが、時折正しく検出されないことがあるのもっぱら別々のPCR反応によって型別を行っている。臨床分離の株についてはMICが高い場合には、まずVanA、

B型についてPCRを行い、陰性であった場合やMICが高くない場合にはVanC型について検討を行っている。食肉由来株については、まずVanC型についてPCRを行ってVanC型を除外し、次にVanA、B型について検討を行っている。PCRに用いる鋳型DNAとして我々は菌体からの全DNAをISOPLANT(ニッポンジーン社/和光純薬)にて抽出し用いている。煮沸処理した浮遊菌液を用いたりコロニーから直接菌体を加えたりする方法もあるが、時折正しく検出されないことが経験されたことから時間が許す限り全DNAを用いてPCRを行っている。

8. 治療

VREを含め腸球菌による感染症患者の多くは、生体防御能や免疫能が低下するような基礎疾患や要因が存在するため、それらに対する治療および原因を取り除くことが最重要である。そのうえで適切な抗菌薬治療を行う。IVHや尿道カテーテルなどの医療用デバイス関連による腸球菌感染が疑われた場合には、使用の中止や交換のみで改善することも多い。細菌感染症の抗菌薬治療においては、起因菌の薬剤感受性試験結果と体内薬物動態に基づき最適な抗菌薬を選択することを原則とする。腸球菌感染症に対し、ペニシリン系薬とアミノグリコシド系薬（ゲンタマイシン、ストレプトマイシン等）との併用が行われることもあるが、VREの多くは多剤耐性であり、院内感染症起因菌としてはVanA型*E. faecium*菌でアンピシリン耐性の特定クローンが多く分離される。また臨床分離腸球菌株の多くが各種アミノグリコシド系薬に高度耐性を示すことから、実際の治療薬選択には難渋する場合が多い。VRE、特に*E. faecium*に対してLinezolid（商品名Zyvox）、Quinopristin-Dalfopristin（商品名Synercid）が認可されているが、耐性となったVREはすでに海外で報告されており、慎重な使用が望まれている。Linezolidは*E. faecalis*菌にも臨床効果が期待できるが、耐性菌も既に存在している。

9. VREの拡散防止、院内感染対策

VRE感染者の多くは、一般にVREが腸管に定着、保菌していることからVREが糞便中に高頻度で検出される。VREは尿路感染症の尿からも分離されることが多いが、特に便からは常に排出され続ける状態が生ずる。そのため、VREが検査材料から分離されたとき最初に行うことは、腸管内容物のスクリーニング検査（検便）により、その患者や同室患者あるいは病院関係者の便にVREが存在するかどうかを調べることであり、VREを含む便により環境汚染が広がらないようにすることである。VREの保菌者を早期に発見し、個室管理を含めた接触予防策の徹底が重要である。また院内拡散の状況とVREの伝播状況を把握するために、同時に環境調査も行い、VREによる汚染箇所を確認し、正確な情報に基づいて伝播・拡散防止対策を講じる必要がある。自力での対応が困難な場合には、地域の基幹病院や専門家に相談し、支援を受けて対策を進めることが重要である。また実際の保菌状況のスクリーニング検査においては、抗菌薬投与歴がない患者や抗菌薬投与中止後長期の場合などでは、腸内のVRE菌数がVRE検出感度の限界未満であるこ

とも考慮し、一回のみの検査結果だけで判断せず、期間を置いて複数回（3回以上）の検査をすることも重要である。

今後VREによる院内感染症の増加が危惧されているが、VRE感染を認めない病院であってもVRE増加の選択圧と考えられているグリコペプチド系薬やβ-ラクタム系薬などの投与がされている患者、基礎疾患を持つ患者や超高齢者など易感染状態で手術予定の患者では事前の検便検査の実施を考慮する必要がある。

文 献

- 1) Clewell, DB. 1981. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol Rev* 45: 409-436.
- 2) Clewell, DB. 2011. Tales of conjugation and sex pheromones: a plasmid and enterococcal odyssey. *Mob Genet Elements* 1: 38-54.
- 3) Arthur, M, P Courvalin. 1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1563-1571.
- 4) Kristich, CJ, LB Rice, CA Arias. 2014. Enterococcal infection-treatment and antibiotic resistance. In: *Enterococci* (MS Gilmore, et al ed.), ASM press.
- 5) Courvalin, P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42: S25-S34.
- 6) Kak, V, JW Chow. 2002. Acquired antibiotic resistances in enterococci. In: *The Enterococci* (MS Gilmore, et al ed.), ASM press.
- 7) Willem, RJ, et al. 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerging Infectious Diseases* 11: 825-828.
- 8) Patel, R, et al. 2000. The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 705-709.
- 9) Dutka-Malen, S, S Evers, P Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 24-27.
- 10) Drews, SJ, et al. 2006. 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 44: 1578-1580.
- 11) Fujita, N, et al. 1998. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus fae-*

- cium* from a patient in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2150.
- 12) Ike, Y, et al. 1999. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet* 353: 1854.
 - 13) Ike, Y, et al. 1998. Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gm^r) (65.1 kb) to *Enterococcus* strains during broth mating. *J Bacteriol* 180: 4886-4892.
 - 14) Hashimoto, Y, et al. 2000. Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *FEMS Microbiol Lett* 185: 247-254.
 - 15) Lim, SK, et al. 2006. Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl Environ Microbiol* 72: 6544-6553.
 - 16) Nomura, T, et al. 2012. Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolates from chicken meat in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 6389-6392.
 - 17) Ozawa, Y, et al. 2002. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *Appl Environ Microbiol* 68: 6457-6461.
 - 18) Ozawa, Y, et al. 2000. Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for D-alanine: D-alanine ligases. *Syst Appl Microbiol* 23: 230-237.
 - 19) Tanimoto, K, et al. 2005. A vancomycin-dependent VanA-type *Enterococcus faecalis* strain isolated in Japan from chicken imported from China. *Lett Appl Microbiol* 41: 157-162.
 - 20) Tanimoto, K, et al. 2006. First VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3966-3967.
 - 21) 富田治芳. 2009. 腸球菌の高頻度接合伝達性プラスミド. *日本細菌学雑誌* 64: 343-355.
 - 22) Tomita, H, et al. 2002. Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 40: 3326-3333.
 - 23) Tomita, H, et al. 2003. Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* 185: 7024-7028.
 - 24) Zheng, B, et al. 2009. Isolation of VanB-type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 735-747.
 - 25) Kudo, M, et al. 2014. Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* over a long term in a university hospital in Japan. *Microbiol Immunol* (in press).

VRE: vancomycin resistant enterococci

Haruyoshi Tomita¹⁾²⁾, Takahiro Nomura¹⁾, Jun Kurushima¹⁾, Koichi Tanimoto²⁾

¹⁾Department of Bacteriology, Gunma University, Graduate School of Medicine

²⁾Laboratory of Bacterial Drug Resistance, Gunma University, Graduate School of Medicine

The clinical significance of the Gram-positive bacteria *Enterococcus* spp. is related to the antibiotic resistances contributing to the risk of colonization and infection for human. The vancomycin (glycopeptide) resistant *E. faecalis* and *E. faecium* (VRE) are the greatest clinical importance and are the main causative species occurring nosocomial enterococci infections in the advanced countries. In Japan, the incidence of VRE infections are gradually increasing, and VRE became a serious problem in the medical facilities. This review describes the bacteriological features of enterococci, the genetic and molecular mechanisms of glycopeptide resistance, the epidemiology of VRE in Japan, the mobile conjugative plasmids enable facile transfer and spread of antibiotic resistance genes among enterococci, the methodology for VRE-detection, and the clinical control of VRE infections. The data obtained from our studies on the VRE isolates from human and animals (environments) are also shown.