©日本臨床微生物学会 2023

［原　　著］

2013年から2020年における都内2次医療機関から分離されたLinezolid非感受性腸球菌の分子遺伝学的解析

伊藤志昂[1)]・野村隆浩[2)]・谷本弘一[3)]・金子奈緒実[1)]・吉田美江子[1)]
大塚昌信[1)]・中山晴雄[4)]・松瀬厚人[4)]・富田治芳[2) 3)]

[1)] 東邦大学医療センター大橋病院臨床検査部
[2)] 群馬大学大学院医学系研究科細菌学
[3)] 群馬大学大学院医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設
[4)] 東邦大学医療センター大橋病院院内感染対策室

（令和4年7月29日受付，令和4年9月26日受理）

本研究では2013年1月から2020年12月の8年間に，都内2次医療機関にて分離されたLinezolid（LZD）non susceptibility enterococci（LNSE）の耐性メカニズムと分子遺伝学的関連性について検討を行った。各種臨床検体から分離され，薬剤感受性を実施した腸球菌2,191株のうち4株（0.002%）がLREで，*Enterococcus faecium* 1株，*Enterococcus faecalis* 3株であった。LNSE 4株は，*E. faecium*1株で23S rRNA遺伝子domainV領域にA2504T変異，*E. faecalis* 1株で23S rRNA遺伝子domainV領域にG2576T変異がそれぞれ存在した。他の*E. faecalis* 2株は*optrA*保有株であったが，*cfr*保有株，*poxtA*保有株は認めなかった。LZD耐性の伝達実験を行ったところ*optrA*保有の1株で液体培地中での伝達性が確認され，この株においては*optrA*がフェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド上に存在する可能性が示された。

本研究結果から，国内で初めて高頻度接合伝達性を示す*optrA*保有*E. faecalis*が検出されたことは，LZD使用による選択圧下においては耐性遺伝子が腸球菌に急速に拡散されるリスクがあることを示唆している。今後も医療機関や市中におけるLNSEの耐性メカニズム及び拡散状況について継続して調査して行く必要がある。

Key words: Linezolid，enterococci，23S rRNA，*optrA*，接合伝達性プラスミド

序　　文

Linezolid（LZD）はグラム陽性菌感染症治療の最後の砦とされる抗菌薬の1つであり，Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*（MRSA）やVancomycin-resistant enterococci（VRE）などのグラム陽性菌に対してのみ有効な静菌的作用を有するoxazolidinone系の抗菌薬である。50S ribosomeサブユニットの23S rRNAを構成するdomain Vに結合し，タンパク合成を阻害することにより静菌的に作用する[1)]。近年，本薬剤に耐性を示すLinezolid-resistant enterococci（LRE）の報告が増加しており[2)]，感染症治療にとって深刻な脅威となっている。LREは2002年に英国でヒトから分離された*E. faecalis*により初めて報告され[3)]，23S rRNA遺伝子のdomainVのG2576Tの変異によるものであったと報告されている。現在においても，oxazolidinone耐性に関連する最も一般的な耐性メカニズムは23S rRNA遺伝子のdomainVのG2576TまたはG2505Aなどの一塩基変異（SNP）である[4)]。また，他の耐性機構として，細菌の50Sリボソームサブユニットを形成するL3（*rplC*），L4（*rplD*），L22（*rplV*）の3つのタンパクのいずれかの変異の報告もある[3)]。さらに接合伝達性プラスミドによる①23S rRNAメチル基転移酵素をコードする*cfr*の獲得[5)]，②ABCトランスポーター（ATP-binding-caset）をコードする*optrA*，*poxtA*の獲得が報告されている[6)7)]。また，*cfr*遺伝子はoxazolidinonesのみでなく，Phenicol，Lincosamide，Streptogramin Aに交差耐性を示し，*optrA*及び*poxtA*は，リボソーム保護作用により，Florfenicol（FFC），Tetracycline（TC）に交差耐性を生じることが挙げられる。

LREによる感染症は世界的に報告されているが，日本では殆ど報告されていない。特に伝達性プラスミドによる*optrA*，*cfr*，*poxtA*については中国，欧州を中心に増加しており，院内でのアウトブレイクも報告されている[8)]。これまでに国内では，伝達性プラスミドによるLREは*optrA*保有*E. faecalis* 3例のみが報告されており[9)~11)]，*cfr*，*poxtA*については報告されていない。

厚生労働省薬剤耐性菌サーベイランス事業であるJANIS（https://janis.mhlw.go.jp/）によると，国内ではVREの検出率が上昇しており，海外ではVREのLZD耐性株も既に報告されているため[12)]，今後のサーベイランスの強化が必要である。これまでに国内においてLREを継続的に観察した

著者連絡先：（〒153-8515）東京都目黒区大橋2-22-36
東邦大学医療センター大橋病院臨床検査部
伊藤志昂
TEL: 03-3468-1251（PHS：7299）
FAX: 03-3468-1906
E−mail: ito-yuki4121@med.toho-u.ac.jp

研究は報告されていない。

今回我々は，2013年1月から2020年12月の間に当院にてLinezolid non susceptibility enterococci（LNSE）が分離された患者の後方視的解析と菌株の分子遺伝学的解析を行った。

材料と方法

1. 使用菌株，臨床データ

東邦大学医療センター大橋病院（東京都目黒区，320床，二次医療機関）にて，2013年1月1日から2020年12月31日までに，微生物検査室に提出された検体から腸球菌が分離され，薬剤感受性検査が施行された患者を対象とした。同一の腸球菌のエピソードが繰り返された患者は，最初に分離された菌株をカウントした。患者データは電子カルテ（日本IBM）から，年齢，性別，基礎疾患，検体材料，投与抗菌薬のデータを収集した。

本研究は，東邦大学医療センター大橋病院倫理委員会の承認を得て行った（no.H21124_H19044）。

2. 菌種同定，薬剤感受性試験

菌種同定および薬剤感受性試験はMicroScan WalkAway 96plus（Beckman Coulter）にて，2013-2016年はPos Combo 1Tパネル，2017-2020年はPos Combo 2Tパネルを用いて行った。またLZDのMICが≧4 mg/Lの株については，寒天平板希釈法にて各種抗菌薬の詳細なMICを測定した。寒天平板希釈法は精度管理株としてATCC 29212株を使用し，薬剤感受性の判定はClinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）のM100-S26ガイドラインに従った[13]。

3. Multi-loccus sequence typing（MLST）

7つのハウスキーピング遺伝子を用いて*E. faecalis*（*gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yqiL*）と*E. faecium*（*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS*, *adk*）のMLSTを行った。7つの遺伝子のDNA配列をMLSTデータベース（https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis, https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium）に登録し，STを取得した。

4. Pulsed-field gel electrophoresis（PFGE）

単一コロニーを4 mLのLB-Broth（Difco）に接種し，35℃で一夜培養後，供試菌液とした。供試菌液1 mLに100 μLのホルマリンを加え，攪拌処理後，遠心分離し，沈渣をTE buffer 200 μLに懸濁し，等量の1% agaroseを加え，サンプルプラグキャスターを用いてアガロースプラグを作製した。作成したプラグを既報[14]に従いLysozyme，Pronase Kで処理し，その後Phenylmethylsulfonyl fluoride（PMSF）でPronase Kを不活化した。Wash bufferにて洗浄後，バッファーを置換し*Sma*I 100 units（Roche）を使用して25℃で18時間消化した。製造元のプロトコールに従いCHEF-MAPPER（Bio-Rad）で，0.5×TBE bufferを使用し21時間電気泳動を行った。電圧6.0 V/cm，パルスタイム2.2-54.2s，水温12℃の条件で，19時間泳動後，0.5 mg/L ethidium bromideで染色し撮影した。S1-PFGEは，*Sma*I消化の代わりにS1 nuclease処理（10 units，37℃，45分）を行った後，上記条件でCHEF-MAPPERによる電気泳動を行った。

5. oxazolidinone，macrolide，tetracycline耐性機構解析

羊血液寒天培地（日水製薬）で35℃ 18時間培養したコロニーからPureLink Genomic DNA mini kit（ThermoFisher）を用いてDNA抽出を行った。4株のLNSEについて伝達性プラスミド性の遺伝子である*optrA*，*cfr*，*poxtA*の検索[15]，23S rRNA遺伝子domain V領域の変異，および50Sリボソームサブユニット蛋白のL3（*rplC*），L4（*rplD*），L22（*rplV*）の変異についてPCR，シークエンスにて解析を行った[16]。さらに，macrolide耐性遺伝子（*ermA*，*ermB*）[17]，Phenicol系薬に交差耐性を示す薬剤排出型Florfenicol耐性遺伝子（*fexA*，*fexB*），tetracycline耐性遺伝子（*tetM*，*tetL*，*tetK*）をMultiplex PCRを用いて確認した[18][19]。

6. 病原因子解析

腸球菌の病原因子として知られている凝集物質（*asa1*），サイトリシン（*cylA*），コラーゲン結合タンパク質（*ace*），*E. faecalis*の心内膜炎抗原（*efaAfs*），腸球菌表面タンパク質（*espfm*），ゼラチナーゼ（*gelE*）およびヒアルロニダーゼ（*hylfm*）をコードする遺伝子の有無をPCRにて確認した[20]。

7. プラスミド抽出

サザンハイブリダイゼーションおよびフェロモン反応性を確認するためプラスミド抽出を行った。4 mlのLB broth（Difco）で35℃・終夜増菌後，Qiagen plasmid mini kit®（Qiagen）を用いて抽出した。

8. 接合伝達実験

2つの*optrA*をコードするプラスミドの接合伝達は，プラスミドを保有しないrifampicin（RFP）およびfusidic acid（FA）耐性の*E. faecalis* FA2-2を受容菌株として使用し，メンブレンフィルター上で接合伝達（35℃，18時間）を行った。接合伝達の後，2 mg/LのLZD，25 mg/LのRFP，25 mg/LのFAを添加したBrain Heat Infusion（BHI）寒天培地（Becton Dickinson）を選択培地とし，35℃で終夜培養後，生育したコロニーを純化し，感受性試験及びPCRによる*optrA*の検出を行い，プラスミドの伝達を確認した。

9. *optrA*の局在性の確認

*optrA*がプラスミド上か染色体上に存在するものかを確認するため，サザンハイブリダイゼーションを行った。プラスミドDNAをPFGEで検出するためにゲルブロックをPronase K処理後にS1ヌクレアーゼで処理した。その後S1-PFGEを行い泳動後，ゲルをアルカリ処理（0.5 M NAOH）し，メンブレンフィルターへプラスミドDNAをキャピラリー法にてブロッティングした。PCR DIG Probe Synthesis Kit（Roche）を用い*optrA*をプローブとして使用し，DIGアプリケーションマニュアルに記載のプロトコールに従い，50%のフォルムアミド存在下でフィルターを42℃，一晩ハイブリダイゼーションを行った。プローブの低ストリンジェンシー洗浄には1× SSC＋0.1% SDSを用い，高ストリンジェンシー洗浄には0.25× SSC＋0.1% SDSを用いた。その後，CDP-Star（Roche）によってシグナルを検出した。

10. フェロモン反応性

5種類の合成フェロモン（cCF10，cAD1，cPD1，cAM373，cOB1）と*E. faecalis* FA2-2の培養上清を用いて被検菌のフェロモン反応性を確認した。*E. faecalis* FA2-2のN2GT

Table 1. The clinical data and virulence genes in LNSE

Strain	Species	Isolation year	Specimen	Age/Sex	Department	Primary disease	Drug (pre)	Drug (past)	Virulence gene
TOH-EF1	*E. faecium*	2013	Drain	43/Female	Gastroenterology	Amoebic liver abscess	LZD DRPM	VCM	*esp*
TOH-EF9	*E. faecalis*	2018	Urine	83/Female	Urology	Asymptomatic pyuria	-	-	*asa1, esp*
TOH-588	*E. faecalis*	2019	Urine	84/Male	Surgery	Aigmoid colon cancer	MEPM	LVFX	*hyl*
TOH-1411	*E. faecalis*	2020	Blood	95/Female	Surgery	Acute cholangitis Chronic renal insufficiency	TZD	PIPC/TAZ	*asa1, hyl, esp*

LZD, Linezolid; TZD, Tedizolid; VCM, Vancomycin; PIPC/TAZ, Piperacillin/Tazobactam; DRPM, Doripenem; MEPM, Meropenem; LVFX, Levofloxacin.

Table 2. Antimicrobial susceptibility test of four LNSE strains

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)			
	TOH-EF1	TOH-EF9	TOH-588	TOH-1411
Linezolid	4	4	4	4
Linezolid*	4	4	8	8
Florfenicol*	4	64	64	8
Chloramphenicol*	16	64	64	8
Tetracycline*	128	128	256	64
Vancomycin	1	1	1	2
Teicoplanin	0.5	0.25	0.25	0.25
Daptomycin	0.5	0.5	1	0.5
Erythromycin*	2	≧512	≧512	≧512
Lincomycin*	≦1	≧512	≧512	≧512
Tigecycline*	1	1	1	1
Ciprofloxacin*	≧512	64	2	1
Fosfomycin*	64	32	32	32
Gentamicin*	≧512	≧512	16	32
Streptmycin*	32	≧512	64	64
Fusidate acid*	≦0.25	4	4	2
Bacitracin*	8	2	≧512	2

Drug sensitivity was determined by the WalkAway Pos Combo 2T panel.
Drugs marked with an asterisk (*) were tested by agar dilution method.

培地での対数増殖期における上清を遠心分離により回収し，メンブレンフィルター（孔径：0.22 μm）により濾過をした。濾過液を 95℃ で 10 分間加温しこれをフェロモン含有液として反応性試験に用いた。N2GT 培地（組成：Nutrient Broth No. 2 25 g（Oxoid），Glucose 2 g，1 M Tris-HCl pH7.5 100 mL，DW 900 mL）による対象菌株の終夜培養液を N2GT 培地で 1/10 希釈し，50 μL をマイクロタイタープレートのウエルに入れ，そこへ培養上清あるいは合成フェロモン（100 μg/L）を含む N2GT 培地を 50 μL 滴下した。37℃ で振盪培養を行うと，フェロモンに対する反応性があれば，通常 2 時間ほどで被検菌の凝集塊を肉眼で観察することが可能である。

結　　果

1. LZD 耐性腸球菌の分離

2013 年 1 月から 2020 年 12 月までに臨床検体から分離され，薬剤感受性を施行した腸球菌 2191 株の中で LZD に MIC ≧ 4 mg/L を示す株が 4 株（0.002%）分離された。内訳は，*E. faecalis* 3 株（2018 年：TOH-EF9，2019 年：TOH-588，2020 年：TOH-1411），*E. faecium* 1 株（2013 年：TOH-EF1）であった。検出材料はドレーンチューブ 1 件，尿 2 件，血液 1 件であった（Table 1）。

LNSE が分離された 4 例中，2 例が oxazolidinone 系薬（LZD，Tedizolid（TZD））の投与歴があった。TOH-EF1 が分離された患者は LZD が 7 日間，TOH-1411 が分離された患者は TZD が 14 日間にわたり投与されていた。

2. LZD 耐性株の薬剤感受性試験

薬剤感受性結果を Table 2 に示す。WalkAway にて LZD に≧4 mg/L を示す株について寒天平板希釈法にて感受性を再確認した結果，MIC はそれぞれ 4〜8 mg/L であった。*optrA* を保有する株（TOH-EF9，TOH-588）では，リボソーム保護作用により，FFC，TC に交差耐性を生じることが報告されており，各々の MIC を測定した結果，FFC ではいずれの株も高い MIC（64 mg/L）を示し，TC においても 128, 256 mg/L と高い MIC を示した。

Table 3.　Antimicrobial resistance gene analysis of four LNSE strains

Strain	Resistance genes	Transfer of *fexA* and *optrA*	Mutation in 23S rRNA domainV	Mutation in 50S ribosomal subunit L3, L4, L22
TOH-EF1	*tetM*, *tetL*	−	A 2504 T	None
TOH-EF9	*tetM*, *tetL*, *ermA*, *fexA*, *optrA*	+ +	None	None
TOH-588	*tetM*, *tetL*, *fexA*, *optrA*	−	None	None
TOH-1411	*tetM*	−	G 2576 T	None

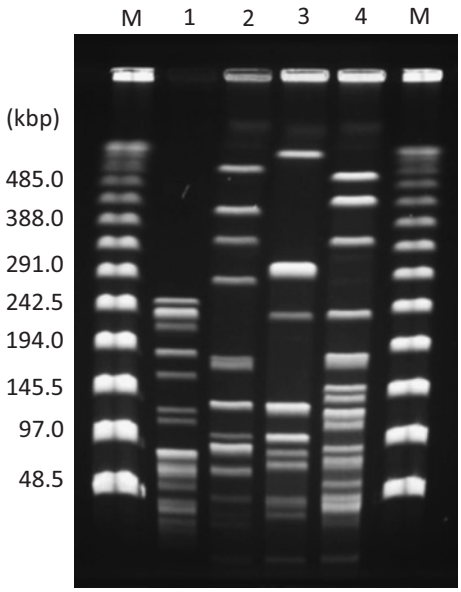

Fig. 1.　Bacterial strains used in this study and their pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns (*Sma*I-digestion)

3. 分子疫学解析

MLST 解析の結果，TOH-EF1 は ST17，TOH-EF9 は ST 480，TOH-588 は ST234，TOH-1411 は ST179 であった。PFGE は 4 株全て異なるパターンを示し菌株間の遺伝的関連性は低いと考えられた（Fig. 1）。

4. Oxazolidinone 耐性因子の検出と解析

23S rRNA 遺伝子 domain V 領域の変異を確認した結果，TOH-EF1 では 2504 番目の A の T への変異，TOH-1411 では，2576 番目の G の T への変異が確認された。TOH-EF9，TOH-588 株では 23S rRNA 遺伝子 domain V 領域の変異は認められなかった。50S リボソームサブユニット蛋白の L3（*rplC*），L4（*rplD*），L22（*rplV*）についてはいずれの株でも変異は認められなかった（Table 3）。

一方，TOH-EF9，TOH-588 の 2 株からはプラスミド性の遺伝子である *optrA* が検出された。*optrA* 保有の 2 株は phenicol 耐性遺伝子である *fexA* も同時に保有しており，FFC，CP に交差耐性が認められた。

5. LNSE の病原因子

optrA が陽性であった TOH-EF9 は *asa1*，*esp*，TOH-588 はヒアルロニターゼ（*hyl*）に関連する病原因子を保有していた。その他の病原因子であるプロテアーゼ（*gelE*），接着（*ace*），バイオフィルム産生（*ebpA*，*ebpB*，*ebpC*）は全ての株で保有していなかった。

6. 接合伝達実験

接合伝達実験の結果，*optrA* が陽性であった 2 株中，TOH-EF9 で LZD 耐性の受容菌への伝達が確認され，伝達頻度は供与菌あたり 10^{-6} 程度であった。また，PCR によって耐性遺伝子（*optrA*，*fexA*）の受容菌への伝達も確認できた。

7. *optrA* の局在性の確認

optrA が染色体とプラスミドのどちらに存在しているかを調べるために S1-PFGE を行った後，*optrA* をプローブとして Southern hybridization を行った。その結果 2 株の *optrA* がプラスミド由来の DNA 断片（55 kbp と 90 kbp）上に存在することが明らかとなった（Fig. 2）。

8. フェロモン反応性プラスミドの確認

optrA がプラスミド由来であると判明した 2 株（TOH-EF 9，TOH-588）について 5 種類の合成フェロモンとの反応性を確認した結果，TOH-EF9 は cAD1，cPD1，cAM373，cOB1 に強い凝集が確認された。一方，TOH-588 は FA2-2 の上清を含めいずれの合成フェロモンにも凝集を示さなかった（Table 4）。その結果 2 株はともに *optrA* をコードするプラスミドを持つが，TOH-588 はフェロモン反応性プラスミドを保有していない可能性が示唆された。一方，TOH-EF9 はフェロモン反応性プラスミドを保有していることが明らかとなった。

考　　察

LZD は MRSA や VRE などの多剤耐性グラム陽性菌感染症の治療に有効な薬剤であるが，海外では LZD 耐性株の割合は近年増加しており[21)22)]，公衆衛生上の脅威を与えている。また，LRE は家畜や食品からも分離・報告されており，特に畜産分野では増加傾向にある[23)]。本研究での LNSE の分離頻度は 8 年間で 2191 株中 4 株（0.002%）であり，LZD は現在においてもグラム陽性菌に対し有効な抗菌薬の一つと考えられた。

LRE の最も一般的な耐性メカニズムは 23S rRNA 遺伝子の変異であるが，本研究では株数は少ないものの，LNSE 4 株中 2 株（50%）から *optrA* が検出された。また，*optrA* 保有の 2 株については，23S rRNA 遺伝子の変異や，50S リボソームサブユニット蛋白の L3，L4，L22 部分の変異は認めなかった。今回分離された 4 株には，高度 oxazolidinone 耐性遺伝子である *cfr* や，新規の oxazolidinone 耐性遺伝子である *poxtA* は検出されなかった。

リボソームサブユニット蛋白である L3，L4，L22 の変異は，腸球菌よりもコアグラーゼ陰性ブドウ球菌（CoNS）で一般的であると報告されている[24)]。また，L22 タンパク質の

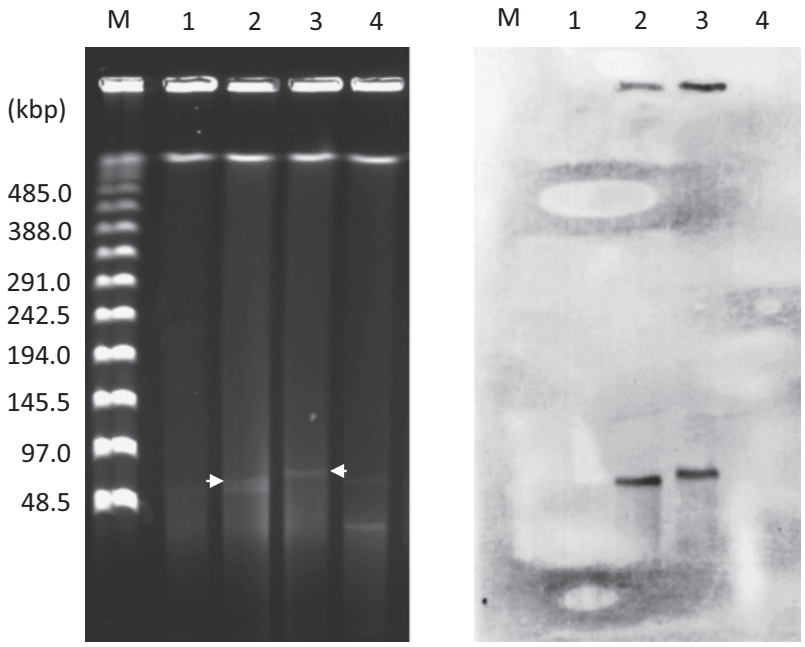

Fig. 2. PFGE of S1 nuclease-treated DNA and southern hybridization with *optrA*
PFGE analysis of S1 nuclease-untreated DNA (left) and Southern hybridization with *optrA* gene probe (right). Red arrowheads indicate *optrA* gene.
Lanes: M, Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs); 1, TOH-EF1; 2, TOH-EF9; 3, TOH-588; 4, TOH-1411.

Table 4. Pheromone response of *optrA*-harboring *E. faecalis*

Strain	FA2-2	cCF10	cAD1	cPD1	cAM373	cOB1
TOH-EF9	+ +	−	+ +	+ +	+ +	+ +
TOH-588	−	−	−	−	−	−

+ + : aggregation

変異はLZDとリボソームの結合部位に干渉することでLZDの感受性を低下させる可能性があることが報告されているが，この変異は腸球菌では稀である[25]。今回，23S rRNAの変異株でのLZDのMICは4-8と低く，既報では変異型23S rRNAのcopy数の増加は，oxazolidinone系薬のMIC値の上昇につながることが報告されている[26]。よって，本報告の変異型23S rRNAのコピー数は増加していないためMIC値が低いのではないかと考えられた。

*optrA*を保有するTOH-EF9，TOH-588は，*optrA*に隣接していることが多い*fexA*も保有していた。*fexA*はFFCおよびCPのefflux MFS transpoterをコードする遺伝子であり，*Staphylococcus*属や*Enterococcus*属のプラスミドにコードされていることが報告されている[27][28]。*fexA*陽性の2株はいずれもFFC，CPのMICが64 mg/Lと高度な耐性を示した。LZDは国内の畜産分野では使用されていないが，LREの出現は，牛および豚に使用するFFCを有効成分とする動物用医薬品の使用による耐性遺伝子の水平伝播とphenicol耐性株の選択の結果であると考えられている[7]。韓国では*optrA*保有LRE株の殆どがFFCとCPに対して耐性があり，23S rRNAやリボソームサブユニット蛋白L3に変異は無いとされている[29]。本研究でも*optrA*は*fexA*と同一プラスミド上に存在していたが，このように*optrA*が他の耐性遺伝子と共に同一プラスミド上にあればLZDによる直接的な選択圧がなくとも，他の薬剤による選択圧によってもLZD耐性が容易に広がり得る。

これまでに*optrA*によるLZD感受性の低下は，*Staphylococcus sciuri*[27]，*Staphylococcus aureus*[30]，*E. faecalis*，*E. faecium*[7]，*Streptococcus suis*[31]，*Campylobacter jejuni*[32]，*Campylobacter coli*[33]から報告されている。これらの株の多くはLZDのMICが4-32 mg/Lと幅広く，MICが2 mg/Lの株[34]も報告されていることを考慮すると，LZD低感受性腸球菌は微生物検査室で見落とされる可能性がある。*optrA*は腸球菌やブドウ球菌に対するFenicol耐性を付与するため，これらLZDのMICの低い株をスクリーニングするためには，食用動物専用に承認されているFFCもしくはCPを最初のスクリーニング薬剤に使用し，*optrA*に特異的なPCRを行うことが有用である。今回，*optrA*が陽性となったTOH-EF9の症例では無症候性膿尿のため抗菌薬治療の対象とはならなかったが，TOH-588の症例では尿路感染症のためLevofloxacinが投与され軽快された。*optrA*はバリアントや遺伝的背景によりLZDのMICに影響を及ぼす可能性があり[35]，薬剤感受性結果からLZD以外の適切な抗菌薬を選択することが重要である。また，*optrA*はLZD耐性の拡散に重要な役割を果たす可能性があり，院内感染の潜在的な脅威となりう

るため，臨床的なサーベイランスが必要である。

MLST解析の結果，LRE4株は異なるST型（ST17，ST480，ST234，ST179）であることが判明しPFGEの結果においても遺伝的関連性は低いと考えられた。その中でST17は*vanA*保有VREで世界的に報告されているclonal complex 17に属するSTであり，スロバキアや韓国の*vanA*保有VREの優勢なクローンであることが報告されている[36)37)]。また，ST480は中国，フランス，スペイン，韓国，アイルランドで*optrA*保有LREとして分離されており，フランスでは主要なSTであることが報告されている[38)～42)]。ST179はアミノグリコシド高度耐性株として国内で分離されており[43)]，ST234はこれまでに報告されていないマイナーなSTであり，高リスクな系統である可能性は低いことを示唆している。

これまでに腸球菌において2つのタイプの高頻度接合伝達性プラスミドの報告がある。一つは*E. faecalis*のフェロモン反応性プラスミド，もう一つは*E. faecium*のpMG1フェロモン非反応性プラスミドである。フェロモン反応性プラスミドは受容菌の生産するペプチドフェロモン（性フェロモン）に供与菌が反応し，プラスミド上にコードされる凝集物質の誘導発現により供与菌と受容菌との安定な接合対が形成され高頻度で接合伝達が行われる。これまでに複数種類のフェロモンとそれぞれに特異的なフェロモン反応性プラスミドが報告されている。TOH-EF9はフェロモン（cAD1，cPD1，cAM373，cOB1）に反応性を示したためフェロモン反応性プラスミド上に*optrA*が存在している可能性が高いが，LZD耐性の伝達頻度がそれほどは高くないため，確定させるためには少なくともプラスミドの単離が必要になると考えられた。

LRE感染症の危険因子として，外部の医療機関からの転入，年齢，悪性腫瘍，尿路感染症，複数菌感染，気管内挿管，カルバペネムやフルオロキノロン等の抗菌薬の暴露が報告されている[44)]。今回，LZDおよびTedizolid（TZD）の長期投与により，rRNAの突然変異による耐性株が選択された可能性が高いことから，oxazolidinone系薬の長期投与には引き続き注意が必要であると考えられた。近年国内で販売されたTZDはLZDと異なり，血小板減少症を主とする骨髄抑制が生じにくいことや，腎機能低下症例においても用法・容量の調整の必要がなく，バイオアベイラビリティが高いことから，肺炎や皮膚軟部組織感染症および骨感染症などにおいてLZDよりも長期の投与が可能な薬剤となっている。そのため，長期投与による薬剤耐性株の選択を避けるために，適切な抗菌薬投与期間の設定と定期的な培養検査を行うことが重要である。一方で，LREの病原因子については，いまだ明らかとなっていない部分が多く，プラスミド性の病原因子や医療関連感染などで問題となりうるバイオフィルム形成など環境応答性が高い株かを確認するため実施を行った。TOH-EF9ではプラスミドにより伝達可能な凝集物質遺伝子*asa1*が検出され，今後，LREの病原因子の詳細について明らかにする必要がある。

今回の我々の研究結果は国内の医療施設におけるLNSEの分離頻度が極めて低いこと（0.002%）を示唆しており，LZDが依然として腸球菌感染症治療における有用な抗菌薬の一つであることが確認できた。一方で，高頻度接合伝達可能な*optrA*保有LREの存在が確認された。これは，出現に長期間にわたる薬剤による曝露と選択が必要とされる23S rRNAやリボソーム蛋白遺伝子の変異を待つことなく，接合伝達という瞬時のイベントによる耐性獲得，すなわち菌の耐性化が国内の環境中で既に生じていることを示している。薬剤使用による選択圧下においてはこの伝達性耐性遺伝子が効率的に菌株間に伝播拡散し，医療環境中で耐性菌が急速に増加する可能性を示しており，今後の重要な懸念事項である。伝達性*optrA*獲得によるLZD耐性*E. faecalis*の国内での拡散状況を今後も追跡調査し，その動向を常に把握することが求められる。そして適切な耐性菌対策を実施するためには臨床および家畜環境中でのLREモニタリングやサーベイランスの強化が必要であると考えられる。

結　　語

本研究の結果は，臨床由来のLNSEに可動性遺伝因子の一つである接合伝達性プラスミドにコードされたoxazolidinone系薬耐性遺伝子が存在していることを示唆している。それゆえ，本耐性はoxazolidinone系薬の使用による選択圧がない場合でも菌株間で急速に伝達されるリスクがある。LZDは腸球菌感染症の治療における最後の手段と考えられているため，様々な環境や，動物，ヒトから分離された腸球菌におけるLZD耐性の発生を監視し，耐性遺伝子の拡散を防ぐ必要がある。

謝辞：本研究は，下記の研究費の一部を使用し実施した。
厚生労働省（食品の安全確保推進事業：21KA1004）
日本医療研究開発機構（AMED事業：JP22fk0108604h0902，JP22wm0225008h0203）
科研費（基盤C：22K07067）
利益相反：申請すべき利益相反なし

文　　献

1）Mendes, RE. 2014. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. Drug resistance updates 17: 1-12.
2）Deshpande, L.M., M. Castanheira, R.K. Flamm, et al. 2018. Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J. Antimicrob. Chemother 73: 2314-2322.
3）Auckland, C. 2002. Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. J. Antimicrob. Chemother 50: 743-746.
4）Klare, I. 2015. Increased frequency of linezolid resistance among clinical *Enterococcus faecium* isolates from German hospital patients. Journal of global antimicrobial resistance 3: 128-131.
5）Long, KS. 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother 50: 2500-2505.
6）Antonelli, A. 2018. Characterization of *poxtA*, a novel

phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. J. Antimicrob. Chemother 73: 1763-1769.
7) Wang, Y. 2015. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. J. Antimicrob. Chemother 70: 2182-2190.
8) Egan, S.A. 2020. Hospital outbreak of linezolid-resistant and vancomycin-resistant ST80 *Enterococcus faecium* harbouring an *optrA*-encoding conjugative plasmid investigated by whole-genome sequencing. J. Hosp. Infect 105: 726-735.
9) Kuroda, M, T Sekizuka, H Matsui, et al. 2018. Complete Genome Sequence and Characterization of Linezolid-Resistant *Enterococcus faecalis* Clinical Isolate KUB3006 Carrying a *cfr*(B)-Transposon on Its Chromosome and *optrA*-Plasmid. Frontiers in microbiology 9: 2576.
10) Iimura, M, W Hayashi, E Arai, et al. 2020. Identification of a multiresistant mosaic plasmid carrying a new segment of IS1216E-flanked *optrA* with integrated Tn551-ermB element in linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* human isolate. Journal of global antimicrobial resistance 22: 697-699.
11) 永倉良美, 宇賀神和久, 吉田勝彦, 他. 2019. *optrA* 遺伝子の獲得による Linezolid 耐性 *Enterococcus faecalis* が検出された 1 例. 臨床病理 67: 93-98.
12) Lazaris, A. 2017. Novel multiresistance cfr plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. J. Antimicrob. Chemother 72: 3252-3257.
13) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Six Information Supplement M100-S26, CLSI, Wayne, PA, USA.
14) Hashimoto, Y., J. Kurushima, T. Nomura, et al. 2018. Dissemination and genetic analysis of the stealthy *vanB* gene clusters of *Enterococcus faecium* clinical isolates in Japan. BMC Microbiol 18: 213-224.
15) Bender, JK. 2019. Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes *cfr*, *optrA* and *poxtA* in enterococci of clinical origin. J. Microbiol. Methods 160: 101-103.
16) Mališová, L., V. Jakubů, K. Pomorská, et al. 2021. Spread of Linezolid-Resistant *Enterococcus* spp. in Human Clinical Isolates in the Czech Republic. Antibiotics (Basel) 10: 219 doi: 10.3390/antibiotics10020219.
17) Bai, B., K. Hu, H. Li, et al. 2018. Effect of tedizolid on clinical *Enterococcus* isolates: in vitro activity, distribution of virulence factor, resistance genes and multilocus sequence typing. FEMS Microbiol.Lett 365: 10.1093/femsle/fnx284.
18) Kehrenberg, C. 2005. Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn558. Antimicrob. Agents Chemother 49: 813-815.
19) Ng, L.K. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. Mol. Cell. Probes 15: 209-215.
20) Billström, H. 2008. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. Int. J. Antimicrob. Agents 32: 374-377.
21) Kehrenberg, C., S. Schwarz. 2006. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. Antimicrob. Agents Chemother 50: 1156-1163.
22) Gawryszewska, I., D. Żabicka, W. Hryniewicz, et al. 2017. Linezolid-resistant enterococci in Polish hospitals: species, clonality and determinants of linezolid resistance. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 36: 1279-1286.
23) Fan, R., D. Li, A.T. Feßler, et al. 2017. Distribution of *optrA* and *cfr* in florfenicol-resistant *Staphylococcus sciuri* of pig origin. Vet. Microbiol 210: 43-48.
24) Mendes, R.E., L.M. Deshpande, A.J. Costello, et al. 2012. Molecular epidemiology of Staphylococcus epidermidis clinical isolates from U. S. hospitals. Antimicrob. Agents Chemother 56: 4656-4661.
25) Miller, W.R., J.M. Munita, C.A. Arias. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Rev. Anti Infect. Ther 12: 1221-1236.
26) Marshall, S.H., C.J. Donskey, R Hutton-Thomas, et al. 2002. Gene dosage and linezolid resistance in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. Antimicrob. Agents Chemother 46: 3334-3336.
27) Li, D., Y. Wang, S. Schwarz, et al. 2016. Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr* on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. J. Antimicrob. Chemother 71: 1474-1478.
28) Cavaco, L.M., J.F. Bernal, E. Zankari, et al. 2017. Detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent (Colombia). J. Antimicrob. Chemother 72: 678-683.
29) Tamang, MD. 2017. Detection of novel oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* in enterococcal isolates from food animals and animal carcasses. Vet. Microbiol 201: 252-256.
30) Guo, D., Y. Liu, C. Han, et al. 2018. Phenotypic and molecular characteristics of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolated from pigs: implication for livestock-association markers and vaccine strategies. Infect. Drug Resist 11: 1299-1307.
31) Huang, J., J. Sun, Y. Wu, et al. 2019. Identification and pathogenicity of an XDR *Streptococcus suis* isolate that harbours the phenicol-oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr*, and the bacitracin resistance locus bcrABDR. Int. J. Antimicrob. Agents 54: 43-48.
32) Tang, S., R. Yang, Q. Wu, et al. 2021. First report of the *optrA*-carrying multidrug resistance genomic island in *Campylobacter jejuni* isolated from pigeon meat. Int. J. Food Microbiol 354: 109320.
33) Liu, D., D. Yang, X. Liu, et al. 2020. Detection of the enterococcal oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Campylobacter coli*. Vet. Microbiol 246: 108731.
34) Cai, J., Y. Wang, S. Schwarz, et al. 2015. Enterococcal iso-

lates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010-2014. Clin. Microbiol. Infect 21: 1095.e1-1095.e4.
35) Cai, J., S. Schwarz, D. Chi, et al. 2019. Faecal carriage of *optrA*-positive enterococci in asymptomatic healthy humans in Hangzhou, China. Clin. Microbiol. Infect 25: 630.e1-630.e6.
36) Jozefíková, A., A. Valček, K. Šoltys, et al. 2022. Persistence and multi-ward dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST17 clone in hospital settings in Slovakia 2017-2020. Int. J. Antimicrob. Agents 59: 106561.
37) Kim, S.H., S.Y. Cho, H.M. Kim, et al. 2021. Sequence type 17 is a predictor of subsequent bacteremia in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*-colonized patients: a retrospective cohort study. Antimicrob. Resist Infect. Control 10: 108.
38) Egan, S.A., A.C. Shore, B. O'Connell, et al. 2020. Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. J. Antimicrob. Chemother 75: 1704-1711.
39) Park, K., Y.S. Jeong, J. Chang, et al. 2020. Emergence of *optrA*-Mediated Linezolid-Nonsusceptible *Enterococcus faecalis* in a Tertiary Care Hospital. Ann. Lab. Med 40: 321-325.
40) Moure, Z., N. Lara, M. Marín, et al. 2020. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the *optrA* and *poxtA* genes. Int. J. Antimicrob. Agents 55: 105977.
41) Sassi, M., F. Guérin, A. Zouari, et al. 2019. Emergence of *optrA*-mediated linezolid resistance in enterococci from France, 2006-16. J. Antimicrob. Chemother 74: 1469-1472.
42) Chen, H., X. Wang, Y. Yin, et al. 2019. Molecular characteristics of oxazolidinone resistance in enterococci from a multicenter study in China. BMC Microbiol 19: 162.
43) Harada, S., Y. Shibue, K. Aoki, et al. 2020. Prevalence of High-Level Aminoglycoside Resistance and Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated in a University Hospital in Tokyo. Jpn. J. Infect. Dis 73: 476-480.
44) Zou, J. 2020. Molecular characteristics and risk factors associated with linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in Southwest China. Journal of global antimicrobial resistance 22: 504-510.

Molecular characterization of Linezolid non susceptibility enterococci isolated from secondary healthcare hospital in Tokyo, 2013-2020

Yukitaka Ito[1) 2)], Takahiro Nomura[2)], Koichi Tanimoto[3)], Naomi Kaneko[1)], Mieko Yoshida[1)], Masanobu Otsuka[1)], Haruo Nakayama[4)], Hiroto Matsuse[4)], Haruyoshi Tomita[2) 3)]

[1)] Division of Clinical Microbiology Laboratory, Toho University Ohashi Medical Center
[2)] Department of Bacteriology, Gunma University Graduate School of Medicine
[3)] Laboratory of Bacterial Drug Resistance, Gunma University Graduate School of Medicine
[4)] Department of Infection and Prevention, Toho University Ohashi Medical Center

We performed a molecular genetic characterization of Linezolid non susceptibility enterococci (LNSE) isolated from January 2013 to December 2020 in secondary healthcare hospital in Tokyo, Japan. Four LNSE (0.002%) were detected from 2, 191 clinical isolates of enterococci. LNSE were examined to have resistance genes, namely *optrA*, *cfr*, *poxtA*, by PCR, and mutations in 23S rRNA gene and ribosomal protein genes, such as L3 (*rplC*), L4 (*rplD*), and L22 (*rplV*) by DNA sequencing. TOH-EF1 had a base substitution (A2504T) in 23S rRNA gene and TOH-1411 had a base substitution (G2576T) in 23S rRNA gene. In addition, TOH-EF9 and TOH-588 were found to have *optrA* on a plasmid as well as *fexA* conferring florfenicol and chloramphenicol resistance to the host.

The *optrA*-carrying plasmid of TOH-EF9 was transferred to *E. faecalis* FA2-2 in broth at a high frequency. PFGE revealed no genetic relationship between the 4 LNSE, which were classified as different STs (ST17, ST480, ST234, and ST179) by MLST.

In conclusion, LNSE harboring *optrA* encoded on a mobile genetic factor (conjugative plasmid) may spread rapidly under drug pressure, so we should take precautions. There is also concern that the effectiveness of LZD treatment may decrease in the future.