

都市下水から単離したバンコマイシン耐性腸球菌の薬剤感受性と遺伝子型別

山形大学農学部	非会員	○甲高	綾乃
山形大学農学部	正会員	西山	正晃
山形大学農学部	正会員	渡部	徹

1. はじめに

腸球菌 (*Enterococcus*) はグラム陽性の球菌であり、ヒトや動物の腸管内に常在し、ふん便中にも存在することから、水環境におけるふん便汚染の指標菌として用いられる^{1,2)}。腸球菌の中には病原性を有する菌種が存在し、免疫力が低下しているヒトに対して日和見感染症や手術後の細菌感染症を引き起こすことが知られている³⁾。腸球菌は各種の抗生物質（アミノグリコシド系、 β ラクタム系）に対して自然耐性を有しているが、その他の複数の抗生物質にも耐性を獲得した多剤耐性腸球菌の出現が報告されている。そのような多剤耐性腸球菌による感染症には、バンコマイシンが最も有効な抗生物質として知られているが、このバンコマイシンにさえ耐性を示すバンコマイシン耐性腸球菌 (*Vancomycin-Resistance Enterococci*, VRE) が出現し世界的に問題となっている。VRE による院内感染が深刻化している米国では、2017 年における VRE を原因とする死亡者数は約 5,400 名と推定されている⁴⁾。日本では VRE 感染症は 5 類感染症（全数把握の対象）に指定されており、1999～2018 年までの 20 年間で 1,377 件が報告されているが、諸外国と比較してその報告数は極端に少ない⁵⁾。

VRE を含む薬剤耐性腸球菌の調査は国内外で実施されているものの、その大部分が臨床や家禽を対象としており、下水や河川といった水環境を対象とした、しかも長期に渡る調査の事例は少ない。本研究では、宮城県仙台市の都市下水処理場の流入下水と病院排水中の VRE のモニタリングを行い、そこで単離された VRE の遺伝子型やその薬剤耐性を評価した。

2. 実験方法

2. 1 サンプルングと VRE の分離

宮城県仙台市の都市下水処理場において流入下水（集水域が異なる 1 系と 2 系の 2 箇所）の試料、及び、同集水域にある病院排水の試料を、2019 年 2 月から 2020 年 2 月の間に月 2 回の頻度で採取した（合計 72 試料）。

VRE のスクリーニングには、CHROMagar™ VRE（関東化学）を用いた。この培地上に流入下水試料を塗布し、培養後に陽性コロニーを選択し、Brain Heart Infusion (BHI, Sigma-Aldrich) 寒天培地で単離・培養した。単離された菌株は、純菌化のために BHI 寒天培地で再度単離・培養した。培養後の菌株は BHI 液体培地にて、以下の試験まで -80 °C で保存した。

2. 2 *van* 遺伝子の同定と菌種同定

2. 1 で単離された菌株について、PCR 法によってバンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*) を検出し、VRE の Van 遺伝子型の型別を行った。同じく PCR 法により、腸球菌の中でも院内感染原因菌として知られる *Enterococcus faecalis* と *Enterococcus faecium* を同定した。

2. 3 薬剤感受性試験

いずれかのバンコマイシン耐性遺伝子が検出された VRE 株について、ドライプレート（栄研化学）を用いた微量液体希釈法による薬剤感受性試験を行った。この試験では各単離株の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、その値を CLSI⁶⁾及び EUCAST⁷⁾の基準と比較することで、薬剤への感受性を判定した。

3. 結果と考察

3. 1 *van* 遺伝子の同定と菌種同定

1 年間で採取された流入下水 1 系、2 系の各 24 試料のうち、それぞれ 17 試料と 19 試料で CHROMagar™ VRE

キーワード バンコマイシン耐性腸球菌, 薬剤耐性, 都市下水

住所: 〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23 Tel: 0235-28-2907 Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

培地上にコロニーの生育が確認された。これらの試料から陽性コロニーを合計 184 株単離した。一方で、病院排水の 24 試料から VRE は検出されなかった。表 1 に各遺伝子の検出数を示す。全 184 株のうち 1 株（0.5%）から *vanA* が、3 株（1.6%）から *vanB* が検出された。日本でのこれまでの調査では、流入下水と河川水から VanC 型の VRE の検出例はあったが、バンコマイシンに高度耐性を示す VanA 型と VanB 型の検出は今回が初めてである。このうち、VanA 型 1 株と VanB 型 2 株は *E. faecium* と同定され、残り 1 株の VanB 型は *E. faecalis* および *E. faecium* 以外の腸球菌であった。VanC 型については、*vanC1* と *vanC2/C3* がそれぞれ 47 株と 1 株から検出された。

表 1 バンコマイシン耐性遺伝子と腸球菌の菌種の検出数とその割合

サンプル名(分離菌株数)	van 遺伝子				菌種	
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC1</i>	<i>vanC2/C3</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
流入下水 1 系(n=100)	0(0.0%)	1(1.0%)	22(22%)	1(1.0%)	1(1.0%)	1(1.0%)
流入下水 2 系(n=84)	1(1.2%)	2(2.4%)	24(29%)	0(0.0%)	1(1.2%)	10(12%)
計(n=184)	1(0.5%)	3(1.6%)	47(26%)	1(0.5%)	2(1.1%)	11(6.0%)

3. 2 薬剤感受性試験

表 2 は、各バンコマイシン耐性遺伝子を保有する VRE 株の薬剤感受性を示す。*vanA* 保有株は、グリコペプチド系抗菌薬である VCM と TEIC の両方に耐性（MIC_{VCM} : 32μg/L, MIC_{TEIC} : 32μg/L）であり、VanA 型の VRE の特徴として、両薬剤に高度耐性を示すことが知られている。*vanB* を保有する 3 株のうち、2 株は VCM には耐性を示し、そのうち 1 株は TEIC にも耐性であった。一方で、1 株は *vanB* を保有しているにも関わらず、VCM と TEIC に感受性であった。VCM 耐性 *E. faecium* の治療薬として認可されている LZD には、*vanA* または *vanB* を保有するいずれの株も感受性であった。VanC 型（*vanC1* と *vanC2/C3* 保有株）では、VCM に対してそれぞれ 13 株と 1 株が耐性を示した。臨床における VanC 型 VRE の特徴として、VCM には低度耐性で TEIC には感受性といわれているが、今回の分離株には VCM と TEIC に耐性を持つ株が約 30%存在していた。VanC 型の表現型が臨床での報告と大きく異なったことから、VCM 耐性の作用機序が従来とは異なる、または、*vanA* と *vanB* 以外の耐性遺伝子を持っている可能性があり、今後、詳細に解析する必要がある。

日本における VRE の感染者は諸外国と比較して少なく、本研究で対象とした宮城県内では VRE 感染症は過去 5 年間報告されていない。よって、本研究で分離された VRE は臨床で発生したものではなく、その他の起源（輸入食肉や海外渡航者）が推定される。次のステップとして、これら VRE 株のゲノム情報を詳細に解析する予定であり、海外での流行型との比較によって、今後日本で流行する可能性のある VRE の予測につなげたい。

表 2 各バンコマイシン耐性遺伝子を保有する分離株ごとの薬剤感受性

耐性遺伝子(保有する菌株数)	VCM	TEIC	LZD	ABPC	IPM	S/A	GM	LVFX	MINO	DAP
<i>vanA</i> (n=1)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0.0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0.0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<i>vanB</i> (n=3)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0.0%)	2 (67%)	2 (67%)	2 (67%)	1 (33%)	2 (67%)	2 (67%)	0 (0.0%)
<i>vanC1</i> (n=46)	13 (28%)	13 (28%)	10 (22%)	6 (13%)	2 (4.3%)	6 (13%)	1 (2.2%)	3 (6.5%)	7 (15%)	3 (6.5%)
<i>vanC2/C3</i> (n=1)	1 (100%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100%)

VCM : バンコマイシン, TEIC : テイコプラニン, LZD : リネゾリド, ABPC : アンピシリン, IPM : イミペネム, S/A : スルバクタム/アンピシリン, GM : ゲンタマイシン, LVFX : レボフロキサシン, MINO : ミノサイクリン, DAP : ダプトマイシン

参考文献

- (1) United States. Environmental Protection Agency, Ambient water quality criteria for bacteria—1986, United States. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1986. (2) 国府島泉ら, 腸球菌および糞便性大腸菌の水質汚染指標性に関する検討, 岡山医学会雑誌, 96, 377-38, 1984. (3) バンコマイシン耐性腸球菌感染症, 厚生労働省. (4) Centers for Disease Control and Prevention, 2019 AR Threats Report. (5) 国立感染症研究所, 感染症発生動向調査年別報告数一覧 (全数把握 五類), 2018. (6) M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. (7) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0, valid from 2020-01-01.