

## 香川県内で検出されたバンコマイシン耐性腸球菌の分子疫学調査

Molecular Epidemiological Analysis of Vancomycin Resistant Enterococci Isolated  
in Kagawa Prefecture

福田 千恵美                      岩下 陽子                      有塚 真弓                      内田 順子  
Chiemi FUKUDA                  Yoko IWASHITA                  Mayumi ARIZUKA                  Junko UCHIDA

## 要 旨

2014年に香川県内の医療機関で検出されたバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)8株について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による分子疫学調査を行った。8株とも高い相同性が見られ菌株の起源が同じであると考えられた。VREのアウトブレイク時には、早期検出と拡散防止対策が重要となる。拡散防止対策として疫学調査を行い、拡散経路を究明することで拡散防止・再発防止につなげることが必要である。また、感染症法ではVCMのMIC値が16 $\mu$ g/ml以上を届出基準としているが、今回のように基準を満たさなくても *van* 遺伝子を保有していることがある。疑わしい時は菌種の同定とバンコマイシン耐性遺伝子の確認を行う必要がある。

## Abstract

Molecular epidemiological analysis by pulse field gel electrophoreses (PFGE) was conducted for the 8 strains of the vancomycin resistant enterococci (VRE) which were detected in medical agencies of Kagawa prefecture in 2014. The results showed that there was a high level of similarity among the strains and therefore they seem to have the same origin. Early detection and containment measurements are essential when an outbreak occurs. In order to prevent diffusion and recurrence of disease, it is important to conduct an epidemiological analysis and to identify the route of infection. As stipulated by the Infectious Diseases Control Law, if the MIC value of VCM is more than 16 $\mu$ g/ml, a notice must be issued. However, in such a case, even if the standard is not satisfied, the *van* gene can still be possessed. Therefore, when in doubt, it is necessary to specify the kinds of fungi and to verify the vancomycin resistant genes present.

キーワード：バンコマイシン耐性腸球菌 *E. faecium* *ddl* 遺伝子 パルスフィールドゲル電気泳動

## I はじめに

バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は、腸球菌がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の治療に用いられる抗生物質バンコマイシン(VCM)に対する耐性を獲得した菌である。腸球菌はヒトの常在菌であり、病原性が弱く健康者においては感染症を起こす機会は少ない。しかし医療機関において compromised host の日和見感染が問題となる。またVCM耐性遺伝子がプラスミド上にあり菌種を超えて耐性が伝播する可能性があるため、VREの早期検出と拡散防止対策が重要となる。VREが検出された場合には疫学調査を行い、拡散経路を究明することで再発防止にもつながる。

今回、香川県内の医療機関で検出されたVREの分子疫学調査としてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行

い菌株間の関連性を調査した。

## II 方法

## 1 供試菌株

香川県内の医療機関で平成26年8月から9月の間に検出されたVRE8株を対象とした。VREの検体採取日一覧を表1に示す。

## 2 方法

## (1) 菌種同定

国立感染症研究所(感染研)の方法<sup>1)2)</sup>により *ddl* 遺伝子の検出を *Enterococcus (E.) faecalis*: F 5' -ATC AAGTACAGTTAGTCT-3'、R 5' -ACGATTCAAAGCTAACTG-3' : 941bp、*E. faecium*: F 5' -TAGAGACATTGAATATGCC-3'、R 5' -CATCGTGAAGCTAACTTC -3' : 525 bp、PCR法の反

応条件 95°C20 秒、55°C120 秒を 35 サイクルの後、74°C5 分を行った。2%アガロースゲルで電気泳動後、1.0 μg/ml エチジウムブロマイドにより染色し確認した。

### (2) VCM の minimum inhibitory concentration (MIC) 値

滅菌生食 3ml に McFarland No. 0.5 に調整した菌液を作成し、Müller Hinton agar (関東化学株式会社) に塗布、VCM E test (シスメックス・ビオメリユー) 35°C 24 時間後判定により測定した。

### (3) 耐性遺伝子の検出

感染研の方法<sup>2)</sup> <sup>3)</sup>により *van* 遺伝子のうち *van A*: *vanA*-F GGGAAAACGACAATTGC、*vanA*-R GTACAATGCGGCCGTTA : 732bp、*van B*: *vanB*-F ATGGGAAGCCGATAGTC、*vanB*-R GAT TTCGTTCTCGACC : 635bp、*van C1*: *vanC-1*-F GGTATCAAGG AAACCTC、*vanC-1*-R CTTCGCCATCATAGCT : 822bp、*van C2/3*: *vanC-2/C-3*-F CTCCTACGATTCTCTTG、*vanC-2/C-3*-R C GAGCAAGACCTTTAAG : 436bp、PCR 法の反応条件 95°C20 秒、55°C120 秒を 35 サイクルの後、74°C5 分を行った。2%アガロースゲルで電気泳動後、1.0 μg/ml エチジウムブロマイドにより染色し確認した。

### (4) 遺伝子型別分類

PFGE は感染研の方法<sup>4)</sup> に改良を加えて実施した。

Todd-Hewitt broth 3ml で 37°C 一夜静置培養後、培養液を 400 μl マイクロチューブに取り 12000rpm 2 分遠心した。上清を捨て 200 μl の水に再浮遊させ、56°C に加温後、1% Seakem Gold Agarose (TaKaRa) 200 μl を混和しサンプラーキャスター 0.7mm に流し込み室温で 15~30 分固化させた。

ブロックを 2mg/ml Lysozyme (和光) 加 0.5M EDTA (pH 8.0) 1ml で 37°C 一晩振盪。Lysozyme 溶液を抜き取り、TE buffer 8ml を加えて遠心管内壁と plug とをよく洗浄した後、TE buffer を捨て、1mg/ml Proteinase K (Roche) ・ 1%N-Lauroylsarcosin (SIGMA)、0.5M EDTA 1ml に交換し 50°C 一晩振盪。ブロックを取り出し、カバーグラスで 4mm×4.5mm にカットする。4mM Pefabloc SC (Roche)、TE Buffer (pH8.0) 500 μl で 50°C30 分振盪を 2 回を行い Proteinase K を不活化した。TE Buffer 1ml で氷上 30 分振盪洗浄を 2 回を行い、A buffer 200 μl に交換後、氷上 30 分振盪。制限酵素 20U *Sma* I (Roche)、A buffer 100 μl を加え 37°C 一晩振盪。

プラグを取り出し、コムに貼付け乾燥し 1g SeaKem Gold Agarose を 0.5×TBE Buffer 100ml で加温溶解後、

56°C に冷却しゲルを作成した。CHEF DRIII (Bio Rad) にて 0.5×TBE Buffer 14°C、電圧 6V/cm、パルスタイム 2.8~17.4sec で 26.7 時間泳動。0.5 μg/ml のエチジウムブロマイド液で 1 時間染色後、蒸留水で 10 分間脱色したのち解析は Fingerprinting II (Bio Rad) で行った。

## III 結果

### 1 菌種同定

*ddl* 遺伝子の検出結果を図 1 に示す。VRE 8 株、すべて *E. faecium* であった。

### 2 VCM の MIC 値

VCM の E test 法による MIC 値は 8 株すべて 8 μg/ml であった。

### 3 耐性遺伝子の検出

*van* 遺伝子の検出結果を図 2 に示す。VRE 8 株、すべて *van B* であった。

### 4 遺伝子型別分類

PFGE の結果を図 3 に示す。8 株を比較した結果、2~3 バンド以内の違いのパターンを示し、デンドログラムにおいても 90.6% ときわめて高い関連があった。

## IV 考察

2014 年に香川県内の医療機関で検出された VRE 8 株について、PFGE による分子疫学調査を行った結果、8 株とも高い相同性が見られ菌株の起源が同じであると考えられた。耐性遺伝子がプラスミド上にある場合、プラスミドの起源が同じでも菌株の PFGE で関連性がない場合やアウトブレイクが長期にわたると PFGE のバンドに多様性が見られることがある<sup>5)</sup> ので結果の解釈に注意が必要である。今回、検出期間が約 1 か月間と短期間だったので菌の変異が少なかったと考えられた。

また、感染症法上は VCM の MIC 値が 16 μg/ml 以上を VRE の届出基準としているが、今回は 8 μg/ml と届出基準を満たさないものの *vanB* 遺伝子を保有しており、感染対策上、菌種の同定とバンコマイシン耐性遺伝子の確認を行う重要性を再認識した。

## V 結論

1 2014 年に香川県内の医療機関で検出された VRE 8 株の PFGE で高い相同性が見られ医療機関内のアウトブレイクが示唆された。

2 疫学調査を行うことで拡散経路を究明し、拡散防止・

再発防止につなげることが重要である。

3 感染症法上はVCMのMIC値が $16\mu\text{g/ml}$ 以上をVREとしているが、届出基準を満たさなくても*van*遺伝子を保有している可能性があるため、疑わしい時は菌種の同定とバンコマイシン耐性遺伝子の確認を行う必要がある。

## 文献

- 1) 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 H24.12月改訂版, 14-16, (2012)  
<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Resistant20130104.pdf#search='E.faecium+VR+P+EGE'>
- 2) Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P et al, Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification of the species level of clinically relevant Enterococci by PCR, J. Clin. Microbiol. 33:24-27, (1995)
- 3) 厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業) 新型薬剤耐性菌に関する研究 地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究 平成22年度事業「薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会」テキスト, 33-41, (2008)
- 4) 厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業) 新型薬剤耐性菌に関する研究 地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究 平成22年度事業「薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会」テキスト, 13-27, (2008)
- 5) 安部朋子, 松井真理, 関塚剛史ほか, プラスミド水平伝達が関与した院内感染事例: 病原微生物検出情報(IASR), 35(12):9-10, (2014)

表1 VRE 検体採取日一覧

| No. | 検体採取日      |
|-----|------------|
| 1   | 平成26年8月27日 |
| 2   | 平成26年9月2日  |
| 3   | 平成26年9月9日  |
| 4   | 平成26年9月9日  |
| 5   | 平成26年9月9日  |
| 6   | 平成26年9月12日 |
| 7   | 平成26年9月12日 |
| 8   | 平成26年8月9日  |

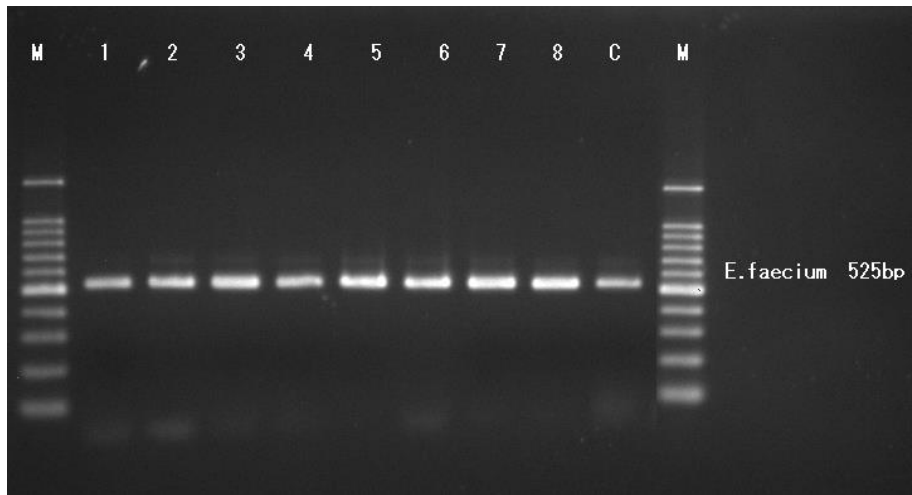


図1 *ddl* 遺伝子 検出結果

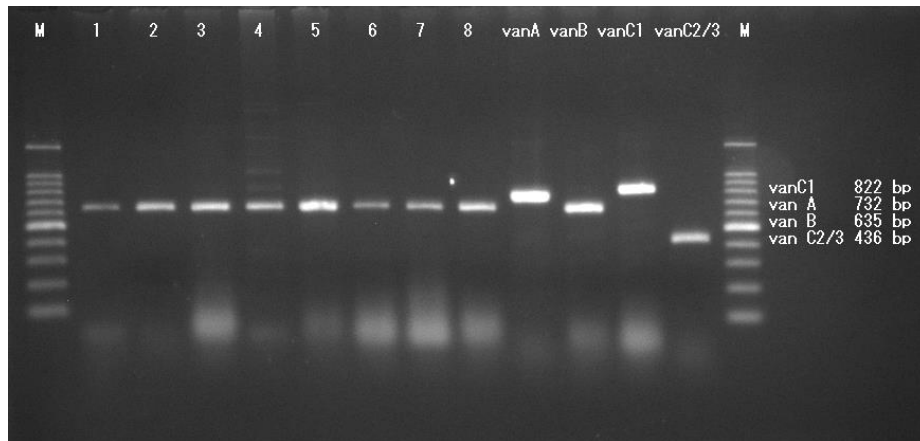


図2 *van* 遺伝子 検出結果

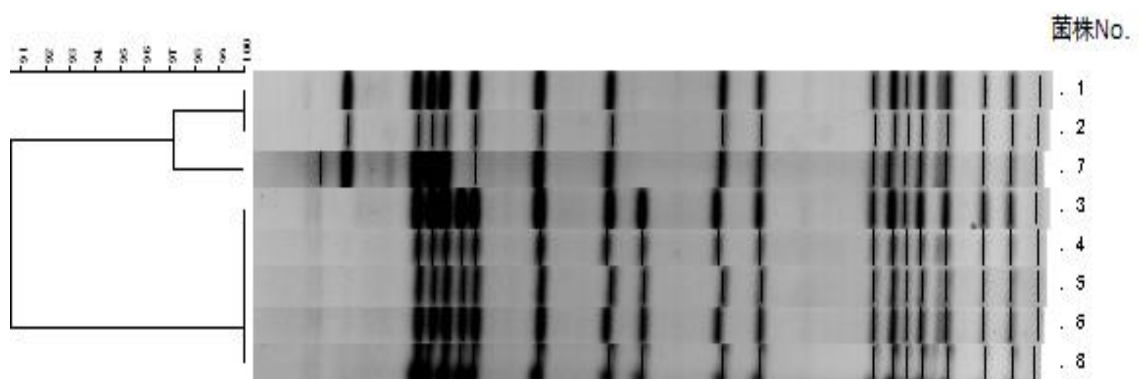


図3 VRE の PFGE デンドログラム