

バンコマイシン耐性 *Enterococcus* 属の各種抗菌薬の感受性および

PCR 法による *van* 遺伝子の検出

野々山 勝人¹⁾・井上 松久²⁾

¹⁾ 北里大学医学部小児科*, ²⁾ 同 微生物

(平成 7 年 11 月 16 日受付・平成 7 年 12 月 15 日受理)

最近アメリカを中心に問題となっている vancomycin (VCM) 耐性の *Enterococcus* 属を検討するため、アメリカで分離されたバンコマイシン耐性 *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* を用いて各種抗菌薬に対する感受性動向を検討した。また PCR 法を用いて *vanA* および *vanB* 遺伝子の有無と VCM, teicoplanin (TEIC) の MIC との関係も検討した。その結果 VCM 耐性の *E. faecalis* ではペニシリン系薬、カルバペネム系薬、minocycline (MINO), TEIC が VCM 耐性の *E. faecium* では RP 59500, MINO, chloramphenicol が良好な感受性を示した。各薬剤間で感受性相関は認められず多剤耐性化は認められなかった。VCM 耐性菌を PCR 法で分類した結果, *vanA* 保有株は 9 株, *vanB* 保有株は 16 株とそれぞれ検出されたが *vanA*, *vanB* の同時保有株は検出されなかった。*vanA* 保有株は VCM (MIC; 50~800 $\mu\text{g/ml}$), TEIC (MIC; 6.25 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$) の両薬剤に耐性を示し, *vanB* 保有株は VCM 耐性 (MIC; 6.25~200 $\mu\text{g/ml}$), TEIC に感受性 (MIC; $\leq 0.2\sim 0.39$ $\mu\text{g/ml}$) を示した。

Key words: バンコマイシン耐性 *Enterococci*, PCR 法, *vanA*, *vanB*

グリコペプチド系薬である vancomycin (VCM) はブドウ球菌をはじめとするグラム陽性菌に優れた抗菌力を示す。我が国でもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) の増加と共に本薬の使用量が増加している。

一方 *Enterococcus* 属は日和見感染菌の主要菌のひとつであるが、1989 年に VCM 耐性 *Enterococcus* 属の流行が報告された¹⁾。この VCM 耐性 *Enterococcus* 属は、近年その分離率の増加についていくつかの報告がなされている²⁻⁴⁾。幸いなことに、本邦では VCM 耐性 *Enterococcus* 属の流行の報告は、現在のところなされていないが、今後流行の可能性は皆無ではない。

今回我々は 1994 年~1995 年にかけてアメリカで分離された VCM 耐性 *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* を用いて各種抗菌薬に対する感受性動向を検討した。

I. 材料と方法

(1) 使用菌株

1994~1995 年にアメリカで分離された VCM 耐性 *E. faecalis* 9 株, *E. faecium* 16 株。1990~1991 年分離の日本由来の *E. faecalis* 26 株を用いた。

(2) 薬剤感受性検査

日本化学療法学会標準法に準じ、 $3\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml を接種し、寒天平板希釈法にて MIC を測定した。

(3) 使用薬剤

Ampicillin (ABPC), methicillin (DMPPC),

imipenem (IPM) [萬有製薬], piperacillin (PIPC) [富山化学], ceftazidime (CAZ) [日本グラクソ], cefpirome (CPR) [日本ルセル], cefluprenam (CFLP, E 1077) [エーザイ], VCM, erythromycin (EM) [塩野義製薬], teicoplanin (TEIC) [マリオン・メレル・ダウ], rokitamycin (RKM) [旭化成], RP 59500 [ローヌ・プーラン・ローラー], minocycline (MINO) [日本レダリー], ofloxacin (OFLX) [第一製薬], chloramphenicol (CP) [三共] はいずれも力価の判明したものをそれぞれ分与を受け用いた。

(4) VCM 耐性遺伝子の検出

VCM 耐性を示す株に対して polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて *vanA*, *vanB* 遺伝子の検出を試みた。Primer は Malen らの報告⁵⁾ にもとづき, *vanA*-1: 5'- GGGAAAACGACAATTGC-3', *vanA*-2: 5'- GTA-CAATGCGGCCGTTA-3', *vanB*-1: 5'- ATGGGAAGCC-GATAGTC-3', *vanB*-2: 5'- GATTTCGTTCTCGACC-3' を用いた。PCR は市販の PCR 用キット (宝酒造) と、DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer Cetus Instrument) にて反応を行った。熱変調 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 分間、アニーリング 54 $^{\circ}\text{C}$ 1 分間、伸長 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 分間の条件で 30 サイクルの増幅を行った。反応後 1.5 % アガロースゲルを用い電気泳動後紫外線下で観察した。*vanA* 遺伝子は 732 bp, *vanB* 遺伝子は 635 bp のバンドの有無を確認した。

II. 結 果

(1) 薬剤感受性

各種抗菌薬に対する MIC range と MIC₅₀, MIC₉₀ を Table 1 に示す。VCM 耐性 *E. faecalis* 9 株については, β -ラクタム薬の中で ABPC, PIPC, IPM, CFLP

(E 1077) が優れた抗菌力を示した。DMPPC, CAZ はすべての株が 12.5 μ g/ml 以上で抗菌力は示さなかった。 β -ラクタム薬以外の抗菌薬では TEIC, MINO が優れた抗菌薬を示した。しかし, VCM の MIC 範囲は 6.25~200 μ g/ml で MIC₅₀ は 100 μ g/ml, MIC₉₀ は

Table 1. Susceptibility distribution of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*

Organisms (No. of strain tested)	Agent	MIC range (μ g/ml)	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>E. faecalis</i> vancomycin-resistant (9)	ABPC	0.39 ~ 0.78	0.78	0.78
	PIPC	1.56 ~ 3.13	1.56	3.13
	DMPPC	12.5 ~ 25	25	25
	CAZ	100 ~ >100	>100	>100
	CPR	3.13 ~ 25	12.5	25
	IPM	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56
	CFLP	0.78 ~ 6.25	1.56	6.25
	RP 59500	3.13 ~ 12.5	3.13	12
	VCM	6.25 ~ 200	100	200
	TEIC	\leq 0.20 ~ 6.25	\leq 0.20	6.25
	EM	0.78 ~ >100	>100	>100
	OL	6.25 ~ >100	>100	>100
	RKM	0.39 ~ >100	3.13	>100
	MINO	\leq 0.20 ~ 6.25	\leq 0.20	6.25
	OFLX	0.78 ~ 100	50	100
	CP	3.13 ~ 100	6.25	100
<i>E. faecalis</i> vancomycin-suseptible (26)	ABPC	0.39 ~ 1.56	0.78	0.78
	PIPC	1.56 ~ 3.13	1.56	1.56
	DMPPC	12.5 ~ 25	12.5	25
	CAZ	6.25 ~ >100	100	>100
	CPR	0.78 ~ 12.5	3.13	6.25
	IPM	0.39 ~ 1.56	0.78	0.78
	CFLP	0.39 ~ 3.13	0.78	3.13
	RP 59500	1.56 ~ 6.25	3.13	3.13
	VCM	0.78 ~ 3.13	1.56	1.56
	TEIC	0.10 ~ 0.20	0.20	0.20
	EM	0.20 ~ >100	0.78	>100
	OL	1.56 ~ >100	3.13	>100
	RKM	0.39 ~ >100	0.78	1.56
	MINO	0.20 ~ 12.5	3.13	6.25
	OFLX	0.78 ~ 100	1.56	3.13
	CP	3.13 ~ 100	6.25	6.25
<i>E. faecium</i> vancomycin-resistant (16)	ABPC	6.25 ~ 100	25	100
	PIPC	50 ~ >100	>100	>100
	DMPPC	>100 ~ >100	>100	>100
	CAZ	>100 ~ >100	>100	>100
	CPR	12.5 ~ >100	>100	>100
	IPM	3.13 ~ >100	>100	>100
	CFLP	>100 ~ >100	>100	>100
	RP 59500	\leq 0.20 ~ 1.56	0.78	0.78
	VCM	12.5 ~ 800	200	800
	TEIC	\leq 0.20 ~ 100	12.5	100
	EM	1.56 ~ >100	>100	>100
	OL	1.56 ~ >100	>100	>100
	RKM	\leq 0.20 ~ >100	>100	>100
	MINO	\leq 0.20 ~ 6.25	0.20	6.25
	OFLX	3.13 ~ 100	3.13	50
	CP	1.56 ~ 12.5	3.13	3.13

ABPC: ampicillin, PIPC: piperacillin, DMPPC: methicillin, CAZ: ceftazidime, CPR: cefpirome, IPM: imipenem, CFLP: ceftuprenam, VCM: vancomycin, TEIC: teicoplanin, EM: erythromycin, OL: oleandomycin, RKM: rokitamycin, MINO: minocycline, OFLX: ofloxacin, CP: chloramphenicol

200 $\mu\text{g/ml}$ と中等度耐性から高度耐性株まで認められた。これに対して、TEIC に耐性を示す株は 1 株だけであった。マクロライド系抗菌薬では EM, RKM は 9 株中 6 株が耐性を示したが、RP 59500 の MIC 範囲は 3.13~12.5 $\mu\text{g/ml}$ で、一峰性の分布を示した。さらに OFLX は 9 株中 7 株が耐性を示した。

日本由来の VCM 感受性 *E. faecalis* 26 株について、 β -ラクタム薬では ABPC, PIPC, IPM, CFLP (E 1077) が優れた抗菌力を示した。DMPPC, CAZ はすべての株が 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示し、抗菌力は示さなかった。しかし、CAZ は VCM 耐性株が高度耐性を示したのに対し、VCM 感受性株の中には中等度耐性を示す株が認められた。 β -ラクタム薬以外の抗菌薬では VCM, TEIC, RP 59500 が優れた抗菌力を示した。なかでも TEIC は 26 株すべてが 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、VCM の MIC₉₀ が 1.56 $\mu\text{g/ml}$ に比べきわめて優れた抗菌力を示した。マクロライド系抗菌薬では EM の MIC₉₀ が 0.78 $\mu\text{g/ml}$ で、VCM 耐性株の MIC₉₀ が 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上に比べ良好な抗菌力を示した。MINO の MIC₉₀ が VCM 耐性株で 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 以下に対し、VCM 感受性では 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と VCM 感受性の方が MINO 耐性株が多く認められた。しかし、MIC₉₀ は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ で差が認められなかった。また、OFLX は MIC₉₀ が 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と VCM 感受性の方が VCM 耐性株の 100 $\mu\text{g/ml}$ に比べて感受性を示す株が多く認められた。

アメリカ由来 VCM 耐性 *E. faecium* 16 株については、 β -ラクタム薬は大部分の株が耐性を示した。他の抗菌薬では RP 59500 の MIC₉₀ が 0.78 $\mu\text{g/ml}$, MINO の MIC₉₀ が 6.25 $\mu\text{g/ml}$, CP の MIC₉₀ が 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と優れた抗菌力を示した。

(2) 薬剤感受性相関

各菌種について TEIC, EM, MINO, OFLX の薬剤感受性相関を χ^2 検定を行いそれぞれの p 値を Table 2 に示した。アメリカ由来 VCM 耐性 *E. faecalis* において、TEIC と MINO の間に相関関係が認められた (Fig. 1 A)。しかし他の薬剤間および他の菌種においては相関関係は認められなかった (Fig. 1 B, C, D)。

(3) *vanA*, *vanB* 遺伝子の検出

バンコマイシン耐性遺伝子 *vanA*, *vanB* の有無と VCM, TEIC の MIC の結果を Fig. 2 に示した。*vanA* 保有株は 9 株, *vanB* 保有株は 16 株とそれぞれ検出されたが *vanA*, *vanB* の同時保有株は検出されなかった。*vanA* 遺伝子保有株は VCM の MIC が 50~ \geq 800 $\mu\text{g/ml}$, TEIC の MIC が 6.25~100 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。一方, *vanB* 遺伝子保有株は VCM の MIC が 6.25~200 $\mu\text{g/ml}$, TEIC の MIC が 0.2~0.39 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。*vanA* 遺伝子保有の *E. faecalis* は 1 株のみのため VCM と TEIC との相関は比較できなかったが, *vanB* 保有の *E. faecalis* と *E. faecium* の MIC 分布

Table 2. Correlation between the activities of teicoplanin, erythromycin, minocycline and ofloxacin against clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*

Organism		TEIC	EM	MINO	OFLX
<i>E. faecalis</i> (vancomycin-resistant)	TEIC	—	0.34	0.05	0.57
	EM		—	0.85	0.15
	MINO			—	0.39
	OFLX				—
<i>E. faecium</i> (vancomycin-resistant)	TEIC	—	0.08	0.27	—
	EM		—	0.14	—
	MINO			—	—
	OFLX				—
<i>E. faecalis</i> (vancomycin-susceptible)	TEIC	—	—	—	—
	EM		—	0.62	0.27
	MINO			—	0.10
	OFLX				—

Numbers show the p value of χ^2 analysis

—, not calculated

TEIC: teicoplanin, EM: erythromycin, MINO: minocycline, OFLX: ofloxacin

に明らかな差は認められなかった。

III. 考 察

E. faecalis を初めとする *Enterococcus* 属は腸内細菌叢の構成細菌であるが、尿路感染症や心内膜炎、compromized host に対する敗血症の原因菌として臨床で問題となっている⁹⁾。

今回の結果では、VCM 耐性の *E. faecalis* ではペニシリン系薬、カルバペネム系薬、MINO, TEIC が、VCM 耐性の *E. faecium* では RP 59500, MINO, CP が良好な感受性を示した。MINO の耐性菌が VCM 感受性株で多く認められた。本邦での *Enterococcus* 属の MINO 耐性菌の割合は報告により大きく異なっており⁷⁻⁹⁾、院内感染の影響が大きいと考えられた。今回検討した株は 5 施設から分離された株を用いており、その影響は少ないと考えられる。したがって、アメリカ由来の VCM 耐性株と本邦由来の VCM 感受性株に差が認められた原因として、菌株の由来の差か、抗菌薬使用状況の差が関与していることが考えられた。

各種薬剤間の感受性相関をみると、アメリカ由来 VCM 耐性 *E. faecalis* において、TEIC と MINO の間に相関関係が認められた以外に、他の薬剤間および他の菌種では相関関係が認められなかった。このことから VCM 耐性を含めた *Enterococcus* 属の多剤耐性化は進んでいないことが分かった。

VCM, TEIC 耐性菌の中には理論的には *vanA*, *vanB* 遺伝子の共存が考えられるが、我々の PCR 法による *vanA*, *vanB* 遺伝子の検討では、*vanA*, *vanB* 同時保有株は Malen らの報告と同様に認められなかった⁹⁾。これが何に起因しているかは不明である。

一方、Malen らによると *vanA* 遺伝子保有株は VCM の MIC が 64 $\mu\text{g/ml}$ 以上、TEIC の MIC が 16 $\mu\text{g/ml}$

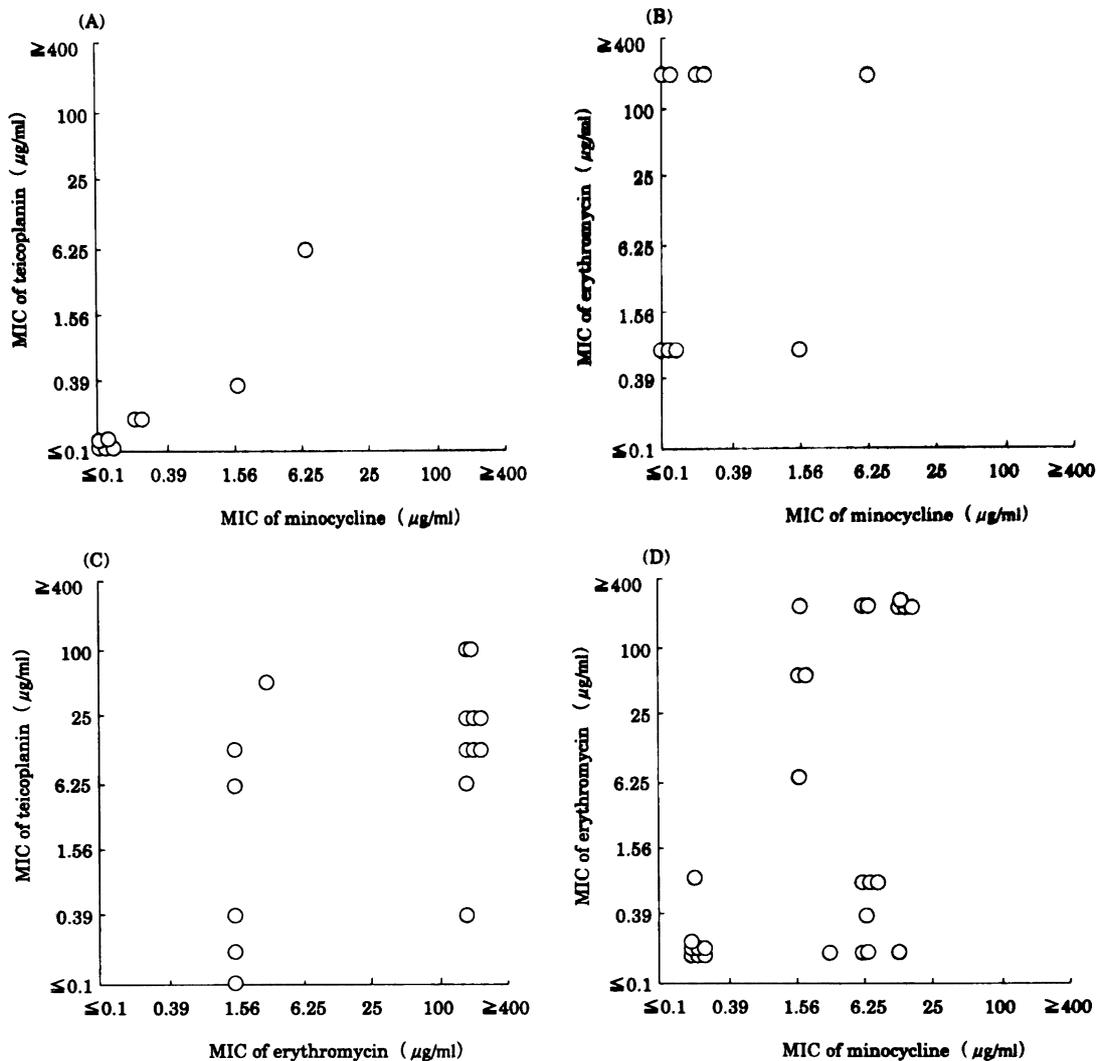


Fig. 1. Scattergram of MICs.

(A) Teicoplanin (TEIC) compared with minocyclin (MINO) against of clinical isolates of vancomycin (VCM)-resistant *Enterococcus faecalis*. (B) MINO compared with erythromycin (EM) against of clinical isolates of VCM-resistant *E. faecalis*. (C) TEIC compared with EM against of clinical isolates of VCM-resistant *E. faecium*. (D) MINO compared with EM against of clinical isolates of VCM-susceptible *E. faecalis*.
 ○; indicates a strain.

以上, *vanB* 遺伝子保有株は VCM の MIC が 16~64 $\mu\text{g/ml}$, TEIC の MIC が 2 $\mu\text{g/ml}$ 以下と報告されている¹⁰⁾。しかし, 今回の検討では *vanA* 遺伝子保有株は VCM の MIC が 50~800 $\mu\text{g/ml}$, TEIC の MIC が 6.25~100 $\mu\text{g/ml}$, *vanB* 遺伝子保有株は VCM の MIC が 6.25~200 $\mu\text{g/ml}$, TEIC の MIC が ≤ 0.2 ~0.39 $\mu\text{g/ml}$ であった。これは先の報告によるデータと若干異なるが, VCM 耐性遺伝子は誘導型耐性であり, かつ plasmid 上に存在することから^{11,12)}, VCM 耐性の誘導のかかりやすさや VCM 耐性を担う plasmid のコピー数によって耐性値が影響される可能性も考えられる。

1989 年に VCM 耐性の *Enterococcus* 属の流行がイギリスで報告され¹⁾, その後分離率の増加がいくつか報告されている²⁻⁴⁾。VCM 耐性の *E. faecium* は VCM 以

外に良好な抗菌力を示す薬剤に限られる。また VCM 耐性の *E. faecalis* に対して ABPC が有効である。しかし, アメリカを中心に *E. faecalis* の中にペニシリナーゼ産生株が報告されており¹³⁻¹⁵⁾, これらの株は菌数が多い条件下では ABPC 高度耐性となる。また, 臨床での報告はないが実験室レベルで *S. aureus* に VCM 耐性のプラスミドが伝達された報告がある¹⁶⁾。本邦では VCM 耐性の *Enterococcus* 属の流行の報告は認められていないが, 本邦の抗菌薬の使用状況を反映した耐性菌の出現傾向から考えると, 今後 VCM 耐性菌が分離されることも十分に考えられる。また, VCM 耐性菌と薬剤間の相関関係を求めることは, その菌の多剤耐性傾向を知るために意義があると考えられる。いずれにしても, 現在アメリカを中心に分離されている VCM 耐性

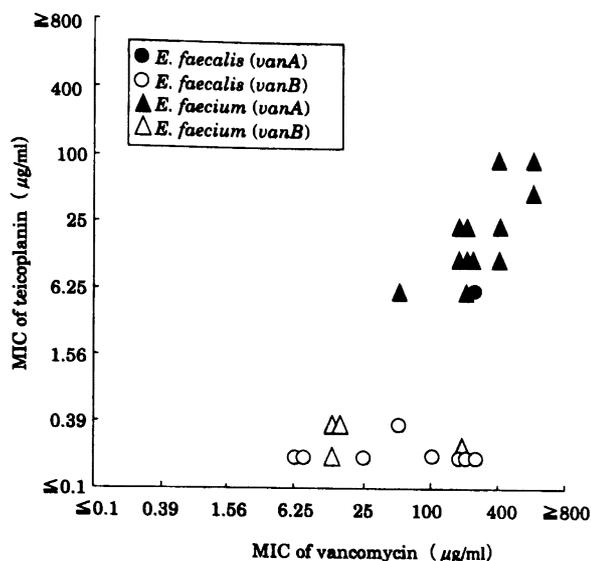


Fig. 2. Correlation between vancomycin- and teicoplanin-MICs with *vanA* and *vanB*.

The *vanA* and *vanB* genes were detected by the PCR method. Strains with the *vanA* gene are inducible high levels of resistant to VCM and TEIC. Strains with the *vanB* gene are inducible resistant to various levels of VCM but remain susceptible to TEIC.

菌を初めとした抗菌薬の耐性化の動向などについて注意しておくことが必要であろう。今回の報告では VCM 耐性 *E. faecalis* 9 株, *E. faecium* 16 株についての報告であるが, これらの耐性菌と日本で分離された *E. faecalis* の, グリコペプチド系薬以外の抗菌薬に対する耐性の違いも認められた。そのためアメリカ由来 VCM 耐性菌の感受性結果が, 日本で分離される *Enterococcus* 属, 特に *E. faecalis*, *E. faecium* の耐性菌の出現動向を予測させるものではないが, その概要は十分推測できると考えられる。

文 献

- 1) Uttly A A C, George R C, Naidoo J, Woodford N, Johnson A P, Collins C H, Morrison D, Gilfillana J, Fitch L B, Heptonstall J: High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol. Infect.* 103: 173~181, 1989
- 2) Handwerger S, Perlman D C, Altarac D, McAuliffe V: Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of Enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 14: 655~661, 1992
- 3) Centers for Disease Control and Prevention: Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-

United States. 42: 597~599, 1993

- 4) Montercalvo M, Horowitz H, Gedris C, Carbonaro C, Tenover F C, Issah A, Cook P, Wormser G P: Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1363~1367, 1994
- 5) Malen S D, Stefan E, Patrice C: Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24~27, 1995
- 6) Schaberg D R, Culver D H, Gaynes R P: Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections. *Am. J. Med.* 91: 72~75, 1990
- 7) 原岡正志, 他: 尿路感染分離菌の年次的変遷 (第 16 報)。西日泌尿 55: 1333~1344, 1993
- 8) 米田尚生, 他: 入院患者における尿路感染症分離菌の検討—1983 年~1990 年の臨床統計—。西日泌尿 55: 343~349, 1993
- 9) 深津英捷, 他: 尿路感染症分離菌の年次的変遷と薬剤感受性の検討 (ニューキノロン系を中心として)。泌尿紀要 38: 1215~1223, 1992
- 10) Malen S D, Leclercq R, Coutant V, Duval J, Courvalin P: Phenotypic and Genotypic Heterogeneity of Glycopeptide Resistance Determinants in Gram-Positive Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1875~1879, 1990
- 11) Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P: Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* 319: 157~161, 1988
- 12) Shlaes D M, Bouvet A, Devine C, Shlaes J H, Al-Obeid S, Williamson R: Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 198~203, 1989
- 13) Barbara E M, Barbara M S: Transferable β -Lactamase A New Mechanism for *in vitro* Penicillin Resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest.* 72: 1168~1171, 1983
- 14) Barbara E M, et al.: Evidence for clonal spread of a single strain of β -lactamase-producing *Enterococcus (streptococcus) faecalis* to six Hospitals in five states. *J Infect Dis.* 163: 780~785, 1991
- 15) Louis B R, George M E, Christine W, Donald G, George A J, Robert C M: Chromosomally mediated β -lactamase production and gentamicin resistance in *enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 272~276, 1991
- 16) Noble W C, Zarina V, Rosemary G A C: Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Rev.* 93: 195~198, 1992

Activities of antimicrobial agents against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. and detection of *van* gene by PCR method

Masato Nonoyama¹⁾ and Matsuhisa Inoue²⁾

¹⁾ Department of Pediatrics, and ²⁾ Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa 228, Japan

Enterococcus faecalis and *Enterococcus faecium* isolates that are resistant to vancomycin have recently been identified in North America and Europe. We investigated the susceptibility to antimicrobial agents against 51 clinical isolates of enterococci (9 vancomycin-resistant *E. faecalis*, 16 vancomycin-resistant *E. faecium* and 26 vancomycin-susceptible *E. faecalis*). Ampicillin, piperacillin, imipenem, minocycline and teicoplanin were more effective than other antibiotic agents against vancomycin-resistant *E. faecalis*. RP 59500, minocycline chloramphenicol were more effective than other antibiotic agents against vancomycin-resistant *E. faecium*. Among 25 strains of *Enterococcus* spp., either *vanA* or *vanB* gene was detected in 9 and 16 strains, respectively, by the PCR method. The strains possessing *vanA* gene are resistant to vancomycin (MIC; 50~800 $\mu\text{g/ml}$) and teicoplanin (MIC; 6.25~100 $\mu\text{g/ml}$). The strains possessing *vanB* gene are resistant to vancomycin (MIC; 6.25~200 $\mu\text{g/ml}$) but susceptible to teicoplanin (MIC; $\leq 0.2\sim 0.39$ $\mu\text{g/ml}$).