

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10442

研究課題名(和文) 多クローナルなVREの地域流行と院内伝播の拡大を解明するための病原体比較解析

研究課題名(英文) Characterization of endemic vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of different clonal lineages isolated in and around Osaka prefecture

研究代表者

原田 哲也 (Harada, Tetsuya)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：70516723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大阪府とその近隣県における2016年以降の多クローナルなvanA保有 *Enterococcus faecium* の出現と拡大要因を明らかとするため、全ゲノム解析や接合伝達試験により起因菌の比較解析を実施した。その結果、代表株56株中51株が、直線状という特殊な形態を持つvanA耐性プラスミド(vanA線状プラスミド)を保有する可能性が示された。また、vanA線状プラスミドは、比較対照とした環状プラスミドと比べ高頻度に菌株間で伝達された。そのため、多様なE. faeciumに本プラスミドが次々に水平伝播されることが、出現・拡大の一因であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、大阪府とその近隣県で2016年から現在まで続くバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)感染症の拡大について、その要因の一つが、世界的にほとんど例のないvanA線状プラスミドの水平伝播である可能性が示された。これは、本地域内でのバンコマイシン耐性遺伝子伝播に関する新知見となった。この知見により伝播事例においては、プラスミドの同一性という視点からも分離株を精査することが重要であることが分かり、このような精査により精度の高い分子疫学調査が実施できる。そのため、地域内あるいは院内伝播の早期探知が可能となり、迅速な感染拡大防止策につながることから、その社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the last few years, the emergence and dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* harboring vanA in and around Osaka prefecture has become a public health concern. To characterize endemic vancomycin-resistant E. faecium from sporadic infectious diseases and nosocomial outbreaks between 2016 and 2020, whole genome analyses, pulsed field gel electrophoresis with S1 nuclease, Southern blot hybridization with vanA probe, and conjugation experiments were performed in this study. Our results suggested that most of the representative isolates belonged to clonal complex 17 and they might possess a linear plasmid encoding vanA with high transfer efficiency, which was recently reported in Japan. Therefore, the horizontal transfer of the vanA linear plasmid may cause the spread of vancomycin-resistant *Enterococci* in this area.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：vanA線状プラスミド バンコマイシン耐性腸球菌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococci; VRE) 感染症は、5 類感染症で全数把握疾患として届出対象となっている。VRE は、世界各国で重篤な院内感染症の主要起因菌となっており、2016 年に策定された国の薬剤耐性 (AMR) アクションプランでも取り上げられている重要な病原体である。

2013-2015 年の VRE 感染症発生届出数は、全国で年間 60 件程度が報告され、大阪府では 5 件前後であった。しかし、2016 年は全国 61 件・大阪府 11 件、2017 年は全国 83 件・大阪府 27 件、2018 年は全国 79 件・大阪府 24 件と増加に転じ、大阪府は 3 年連続で全国最多の報告数となった。さらに、大阪府で発生した VRE 院内伝播事例は、2008 年から 2015 年までほぼ皆無であったが、2016 年以降は複数発生し 100 症例を超える事例も報告された。

これまでの検査により、2016 年以降に大阪府とその近隣県で分離される VRE の大部分が、*vanA* 遺伝子を保有する多クローナル (染色体 DNA の遺伝子型が多様) な *Enterococcus faecium* で、一部の院内伝播事例では、分離株が同分子量の *vanA* をコードするプラスミドを保有することが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

大阪府とその近隣県における 2016 年以降の多クローナルな *vanA* 保有 *E. faecium* の発生・拡大要因を明らかとするため、全ゲノム情報と表現型の両側面から、①バンコマイシン (VCM) 耐性プラスミドの相同性と伝達機構、②世界的院内感染流行株との遺伝的関連性、③薬剤感受性および環境生残性、の 3 点について代表株の比較解析を実施することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 供試株

2016 年 1 月から 2020 年 9 月に大阪府とその近隣県で患者あるいは無症状保菌者より分離された (臨床由来) *vanA* 保有 VRE 561 株 (*E. avium*; 5 株、*E. casseliflavus*; 2 株、*E. faecalis*; 1 株、*E. faecium*; 549 株、*E. gallinarum*; 1 株、*E. raffinosus*; 3 株) を供試株とした。また、2010 年以前に大阪府内で分離された散発患者由来の *vanA* 保有 *E. faecium* 5 株も供試した。これらに加え、2008 年から 2017 年に大阪府内で流通する鶏肉より分離された *vanA* 保有 VRE 24 株 (*E. faecalis*; 16 株、*E. faecium*; 8 株) も供試した。

#### 3-2. 代表株の決定

臨床由来の供試株について、既報 (1) に準じて制限酵素 SmaI を用いたパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による遺伝子型別を実施した。Dice 法 (最適化 1.0%、トレランス値 1.0%) で類似度を算出後、非荷重結合法により系統樹を作成した。*E. faecium* 以外の菌種は、類似度 90% 以上の株を遺伝的関連性が高いと判断し、これらのうち一株を代表株とした。一方、*vanA* 保有 *E. faecium* については、類似度 80% を基準として代表株を選定した。なお、鶏肉由来株については、全てを代表株とした。

#### 3-3. 全ゲノムシーケンス

ショートリードデータの取得は、HiSeq X Five あるいは MiSeq システムによるイルミナシーケンスプラットフォームを用いて実施した。解析には、各代表株につき ×40 カバレッジ以上のデータを用いた。ショートリードのゲノムアセンブリは Shovill v1.0.9 あるいは Unicycler v0.4.8 で実施した。一部に代表株について、Oxford Nanopore Technologies 社の MinION あるいは GridION システムを用いてロングリードデータを取得した。NucleoBond® HMW DNA (TaKaRa) により得られたゲノム DNA について、Rapid Barcoding Kit によるバーコーディングを行いフローセル (R9.4.1) にアプライしてリードデータを取得した。ショートリードデータとのハイブリッドアセンブリは、Unicycler v0.5.0 による bold mode で実施し、Pilon version 1.24 によるポリッシングを行った。

#### 3-4. 全ゲノム解析

ショートリードデータのアノテーションは DFAST により実施し、CheckM を用いたクオリティチェックと Average Nucleotide Identity 解析をオプションで実行した。薬剤耐性遺伝子および病原遺伝子の検索は ABRicate (ResFinder、VFDB) により実施し、さらに MLST で ST 型を決定した。

*E. faecium* 代表株については、prokka により得られた gff ファイルを用いて、roary、snpsites ならびに iqtree によるコア遺伝子一塩基多型 (SNP) 解析を実施した。さらに、Hashimoto et al. (2) により国内で分離された VRE より近年報告された *vanA* 線状プラスミド pELF2 (DDBJ アクセッション番号; LC495616) を参照配列とし、bowtie2 によるマッピング解析を実施した。また、ハイブリッドアセンブリにより得られた *vanA* プラスミド配列については

RAST (version 2.0) によるアノテーション後、Easyfig による構造比較を実施した。

### 3-5. S1-PFGE および *vanA* プロローブを用いたサザンハイブリダイゼーション

代表株が保有する *vanA* プラスミドの形態学的特徴を明らかにするため、各菌株の S1 ヌクレアーゼ処理および未処理プラグを用いた PFGE と *vanA* プロローブによるサザンハイブリダイゼーションを実施した (3)。S1 ヌクレアーゼ処理の有無により、*vanA* プラスミドの泳動距離に変化のない場合、線状プラスミドと判断した。

### 3-6. *vanA* 線状プラスミドスクリーニング法の確立

*vanA* 線状プラスミドをスクリーニングするための分子生物学的手法を確立するため、pELF2 を参照配列として、OligoAnalyzer™ Tool (IDT 社) を用いてプライマーペアを設計し、TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version による PCR 法を構築した。さらに代表株の DNA テンプレートを用いて、その有用性を評価した。

### 3-7. エタノール抵抗性試験

近年、オーストラリアではアルコール製剤に耐性をもつ VRE の出現が、急速な院内感染・院内伝播拡大の一つの要因として推察されている (4)。そこで、大阪府内で 2017-2019 年に発生した VRE 院内伝播事例の分離株ならびにそれ以前に分離された散発患者由来株について、エタノールへの抵抗性を明らかにするため、ブレインハートインフュージョン (BHI) ブロスー夜培養液 400  $\mu$ l を 0%、23%、30%、40%エタノール添加 PBS (終濃度) で 10 倍希釈し、5 分間処理した。その後、菌数を計測し、エタノール処理の影響を評価した。

### 3-8. 接合伝達試験

*vanA* 線状プラスミドの伝達頻度を評価するため、filter mating 法による接合伝達試験を実施した。リファンピシンおよびフジジン酸耐性 *E. faecium* ATCC51558 をレシピエント株とし、*vanA* 環状プラスミドを保有する *E. faecium* ATCC700221 を比較対照ドナー株として使用した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 代表株の選定

SmaI-PFGE バンドパターンの類似度により臨床由来 *vanA* 保有 *E. faecium* 供試株 554 株から代表株 56 株を決定した (図 1)。*vanA* 保有 *E. avium* 5 株および *vanA* 保有 *E. casseliflavus* 2 株については、それぞれの菌種でバンドパターンの類似度は 90%以下で、全てを代表株とした。一方、*vanA* 遺伝子保有 *E. raffinosus* の 3 株は、類似度が 95%以上で、これらのうち一株を代表株とした。

### 4-2. MLST 型別およびコア遺伝子 SNP 解析

臨床由来 *vanA* 保有 *E. faecium* 代表株 56 株では、92.9% (52 株) が世界的に院内感染起因菌として拡大する clonal complex 17 (CC17) に属した (ST555 ; 18 株、ST17 ; 16 株、ST78 ; 5 株、ST80 ; 5 株、ST203 ; 3 株、ST192、ST363、ST736、ST761、ST1570 ; 各 1 株)。これ以外の 4 株は、ST546 と ST896 が各 1 株で、型別不能株が 2 株含まれた。一方、鶏肉由来 *vanA* 保有 *E. faecium* は、CC17 とは関連がなく、ST1707 (5 株)、ST370 (2 株) および ST421 (1 株) に型別された。また、*vanA* 保有 *E. faecalis* では、患者由来の 1 株が ST6 であったが、鶏肉由来の 16 株は全て ST116 に型別された。

臨床ならびに鶏肉由来 *vanA* 保有 *E. faecium* 64 株について、コア遺伝子 SNP 解析を実施したところ、鶏肉由来株は臨床由来株とは異なる系統に属することが明らかとなった (図 2)。また、臨床由来の代表株についても系統学的多様性が確認されたことから、大阪府とその近隣県で多様なクローンによる VRE の地域内流行が発生していることが全ゲノムデータからも裏付けられた (図 2)。

### 4-3. 薬剤耐性遺伝子および病原遺伝子保有状況

全ての株で VCM 耐性の構造遺伝子群である *vanHAX* が検出された。*E. avium* では、5 株全てにおいて *ant(9)-Ia* ならびに *erm(A)* が検出された。*E. faecium* 56 株について、アミノグリコシド耐性遺伝子 *aac(6')-Ii* が全株より検出され、44 株で *ant(9)-Ia* が検出された。また、マクロライド耐性遺伝子 *msr(C)*、*erm(A)*、*erm(B)* がそれぞれ 55 株、44 株、46 株から検出された。さらに、22 株からトリメトプリム耐性遺伝子 *dfpG* が検出され、24 株がテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(M)* を保有していることが明らかとなった。

*E. faecium* の病原遺伝子は、*acm*、*bopD*、*bsh*、*clpP*、*cpsA*、*cpsB*、*hasC* が全ての株で検出された。また、*ebpC*、*esp*、*fss3*、*psaA*、*scm*、*sgrA* および *srtC* の検出率は 89.3%以上で、これらの多くがバイオフィルムや接着に関与する病原遺伝子であった。

### 4-4. pELF2 をリファレンス配列としたマッピング解析

pELF2 をリファレンス配列として、臨床由来 *E. faecium* 代表株 56 株のショートリードデー

タをマッピングした (図 3)。その結果、51 株でリファレンス配列のほぼ全長にマッピングされたことから、これらが pELF2 およびそれに類似するプラスミドを保有する可能性が示された。

#### 4-5. S1-PFGE および *vanA* プローブ-ハイブリダイゼーション

代表株について S1-PFGE と *vanA* プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを実施した。S1 ヌクレアーゼ処理の有無による *vanA* プラスミドの泳動距離比較により、少なくとも 54 株については、*vanA* 線状プラスミドの保有が確認された。

臨床由来 *E. faecium* 代表株 56 株では、45 株で *vanA* 線状プラスミドが確認されたが、残りの 11 株では *vanA* 線状プラスミドが確認されなかった。この 11 株のうち 5 株はマッピング解析で pELF2 との配列の一致率が低い株であったため、これらは線状プラスミドとは異なる VCM 耐性機構を保有する可能性が示唆された。一方、それ以外の 6 株については、サザンハイブリダイゼーション法の改善を含め、さらなる検討が必要であると考えられた。

#### 4-6. *vanA* 線状プラスミドの構造比較

サザンハイブリで分子量が異なることが明らかとなった 5 株の *vanA* 線状プラスミドについて (図 4)、ロングリードシーケンスデータの取得とハイブリッドアセンブルによりプラスミド構造を決定し、pELF2 と比較を行った (図 5)。2102-016 および 2008-007 線状プラスミドは pELF2 と全長で塩基配列の一致率が高く、同一構造であることが明らかとなった。一方、pELF2 よりも分子量が大きい 1911-016、2018-48 および 2017-25 線状プラスミドは、pELF2 には存在しない配列が保存されており、これが分子量増加の一因と考えられた。

また、これら 5 つの線状プラスミドおよび pELF2 の構造比較により、pELF2 の left end (Hairpin end) から約 6.6 kbp の領域は非常に保存性が高いことが明らかとなった。

#### 4-7. *vanA* 線状プラスミドスクリーニングを目的とした PCR 法の確立

*vanA* 線状プラスミドスクリーニングのため、保存性の高い left end の一部を Forward primer とした PCR 法を確立した。臨床由来 *E. faecium* 代表株 56 株についてその感度を確認したところ、pELF2 をリファレンス配列としたマッピング解析で *vanA* 線状プラスミドの保有が推察された 51 株については、全て PCR 陽性と判定された。これらの結果から、確立した PCR 法は、*vanA* 線状プラスミドのスクリーニング法として有用であると考えられた。

#### 4-8. エタノール抵抗性

2017 年から 2019 年に大阪府内で発生した VRE 集積事例の起因菌について、エタノール存在下での生残性を 2010 以前に分離された VRE と比較した。いずれの株も 0% 濃度と比較し、23% 濃度では 1 オーダー程度の菌数の減少が確認されたが、分離年代と生残性に関連性は確認されなかった。

#### 4-9. *vanA* 線状プラスミドの接合伝達試験

構造比較により、代表株が保有する *vanA* 線状プラスミドの多様性が明らかとなった。そこで、これらの多様性と接合伝達頻度の関連性を明らかにするため、接合伝達試験を実施した。その結果、pELF2 と同一構造であった 2102-016 および 2008-007 線状プラスミドの伝達頻度は、それぞれ  $(1.423 \pm 0.612) \times 10^{-2}$  および  $(1.305 \pm 0.472) \times 10^{-2}$  であった。一方、pELF2 に比べ分子量が大きい 2018-48、1911-016 および 2017-25 線状プラスミドの伝達頻度は  $(5.441 \pm 0.224) \times 10^{-3}$  から  $(2.433 \pm 0.741) \times 10^{-9}$  で、分子量の増加に伴い伝達頻度が低下する傾向が確認された。なお、対照とした *vanA* 環状プラスミドの伝達効率は  $(8.598 \pm 3.483) \times 10^{-8}$  であった。

### 5. 結論と今後の展望

本研究により 2016 年以降の大阪府およびその近隣県における VRE の大部分が、*vanA* をコードする線状プラスミドを保有することが明らかとなった。本プラスミドは、環状プラスミドと比べ高頻度に伝達されることから、院内環境に順応した CC17 に次々に伝播することが、多クローナルな VRE 出現の要因である可能性が示唆された。今後は、院内感染事例毎に線状プラスミドの構造比較を実施し、事例間における線状プラスミドの異同あるいは同一性を明らかにする予定である。

### 6. 引用文献

- (1) 原田哲也 他 IASR Vol. 42 p158-160: 2021 年 8 月号
- (2) Hashimoto Y. et al. DOI: 10.1128/mSphere.00102-20
- (3) Harada T. et al. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.029
- (4) Pidot S. J. et al. DOI: 10.1126/scitranslmed.aar6115

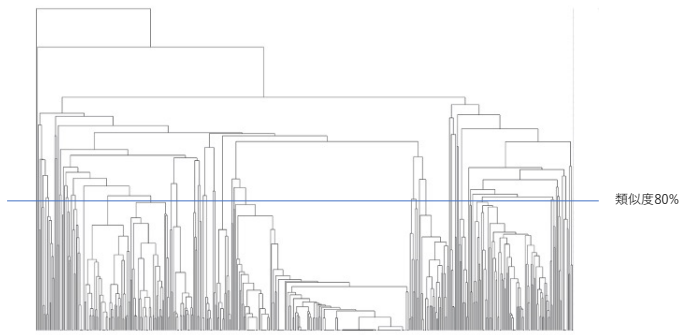


図1. *vanA*保有 *E. faecium* 554株のSmal-PFGE解析  
Dice係数(Optimization, 1.0%; Band-Tolerance, 1.0%)、デンドログラムタイプ, UPGMA

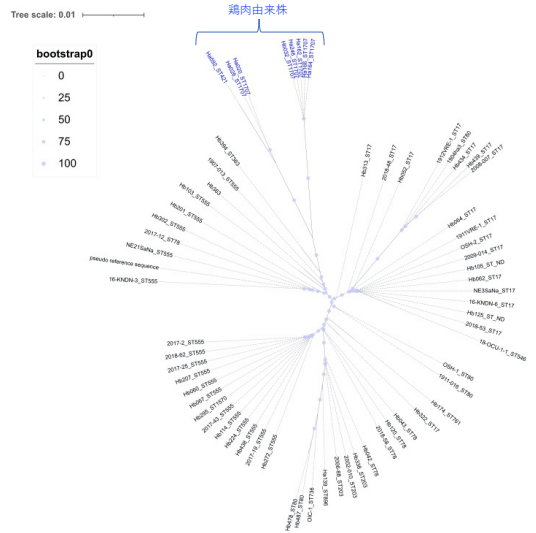


図2. *vanA*保有 *E. faecium* のcore gene SNP解析による系統樹

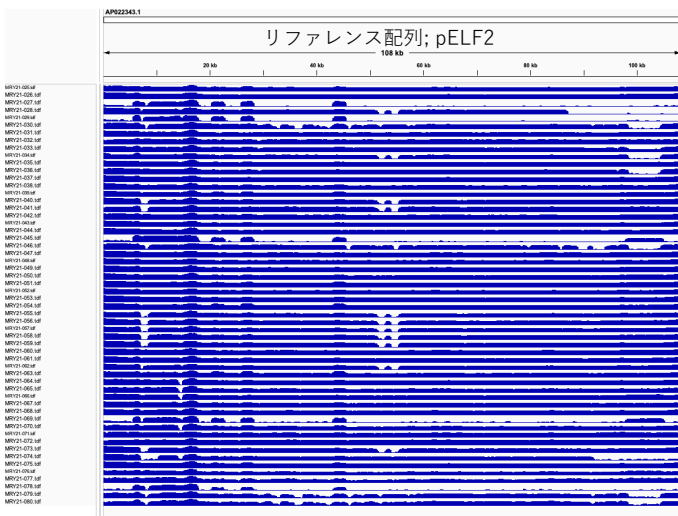


図3. *vanA*保有 *E. faecium* のショートリードマッピング

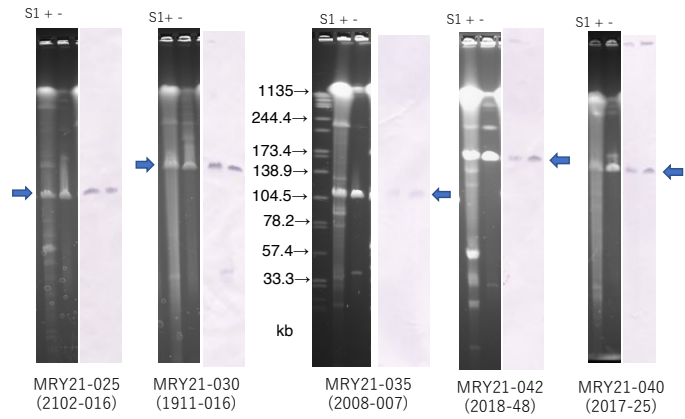


図4. 分子量の異なる5つの *vanA*線状プラスミドにおけるサザンハイブリ

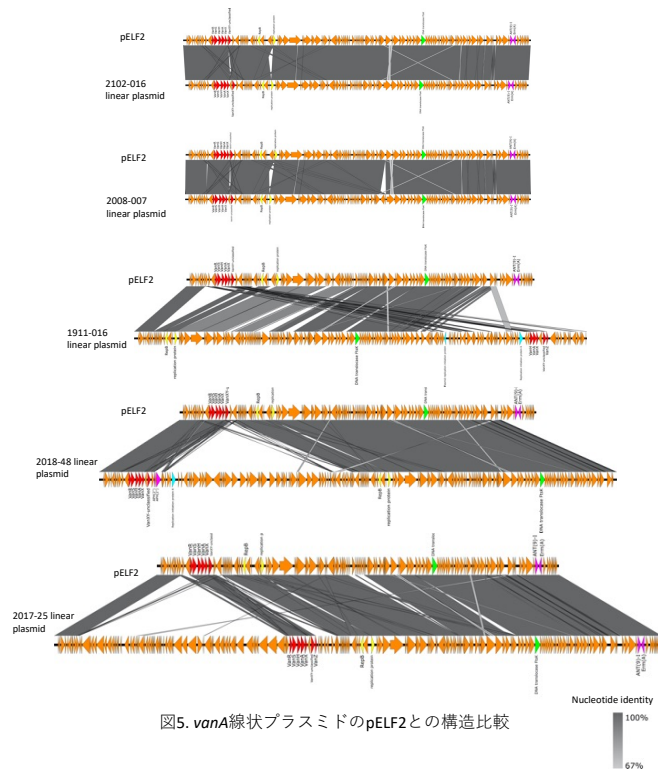


図5. *vanA*線状プラスミドのpELF2との構造比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujiya Yoshihiro, Harada Tetsuya, Sugawara Yo, Akeda Yukihiko, Yasuda Masako, Masumi Ayako, Hayashi Junichi, Tanimura Nobuhiro, Tsujimoto Yoshihiro, Shibata Wataru, Yamaguchi Takahiro, Kawahara Ryuji, Nishi Isao, Hamada Shigeyuki, Tomono Kazunori, Kakeya Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Transmission dynamics of a linear vanA-plasmid during a nosocomial multiclinal outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a non-endemic area, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94213-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 原田哲也 梅川奈央 河原隆二 川津健太郎	4. 巻 42
2. 論文標題 大阪健康安全基盤研究所におけるバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 検査	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 病原微生物検出情報 (IASR)	6. 最初と最後の頁 158-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuya Harada, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, Yoshimasa Yamamoto, Takahiro Yamaguchi, Ryuji Kawahara, and Kentaro Kawatsu	4. 巻 17
2. 論文標題 Detection of Genetic Elements Carrying vanA in Vancomycin-Resistant Enterococcus saigonensis VE80T Isolated from Retail Chicken Meat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foodborne Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 772-774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/fpd.2020.2827.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakimoto K., Nishiki S., Kaga Y., Harada T., Kawahara R., Takahashi H., Ueda E., Koshimo N., Ito H., Matsui T., Oishi K., Yamagishi T.	4. 巻 134
2. 論文標題 Effectiveness of patient and staff cohorting to reduce the risk of vancomycin-resistant enterococcus (VRE) acquisition: a retrospective cohort study during a VRE outbreak in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hospital Infection	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhin.2022.11.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田哲也、梅川奈央、中村寛海、河原隆二、川津健太郎、久恒順三、沓野祥子、松井真理、鈴木里和、菅井基行
2. 発表標題 大阪府におけるVRE感染症の現状と分離株の解析
3. 学会等名 第50回薬剤耐性菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田哲也、中村寛海
2. 発表標題 バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)感染症 - 大阪府の現状と分離株の解析 -
3. 学会等名 衛生微生物技術協議会第41回研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

薬剤耐性菌感染症 -バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)感染症が増加しています- <a href="http://www.iph.osaka.jp/s008/020/010/030/20210115105030.html">http://www.iph.osaka.jp/s008/020/010/030/20210115105030.html</a>
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------