

7. 千葉県内で分離されたバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の分子疫学的解析方法の検討

○中山 孝子、菊池 俊、蜂巢 友嗣、安藤 直史、中村 正樹、植田 菜月、
岸澤 充（千葉県衛生研究所）

【研究目的】VRE にバンコマイシン耐性化をもたらすバンコマイシン耐性遺伝子 *vanB* は Mobile genetic elements (MGEs) 上に存在し、菌種間、菌株間に伝達される¹⁾²⁾。2022 年に千葉県内の複数の医療施設から *vanB* 遺伝子保有の *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) が 47 菌株検出された。パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)により菌株間の類似性を比較したが、解釈に苦慮する結果となった。そこで MGEs 領域の解析を実施し、PFGE の結果と比較することで VanB 型 VRE 菌株間の関連を調査する方法を検討する。

【研究の必要性】世界的な薬剤耐性菌の増加を受け本邦においても薬剤耐性 (AMR) アクシンプランが決定され、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は 2027 年に罹患数を 80 人以下にするという数値目標が設定された³⁾。国内で問題となる VRE のバンコマイシン耐性遺伝子型は VanA 型、VanB 型であるが、これらの耐性遺伝子は MGEs 上に存在し、菌種間、菌株間で MGEs ごと伝達するため VRE、VRSA(バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌)を含む新たな耐性菌が生じる¹⁾²⁾⁴⁾。しかし、現在 VanB 型 VRE の集団感染時に行われている分子疫学的解析は主に PFGE や multilocus sequence typing (MLST) 解析といった菌株自体を比較する方法であり、同じく MGEs 上に耐性遺伝子が存在するカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の解析で行われているプラスミド比較などの MGEs を比較する方法は行われていない。

2022 年に千葉県内の隣接する 4 市 6 医療施設の患者より分離された VRE 47 菌株は全て *vanB* 遺伝子保有の *E. faecium* と同定された。関連が疑われたため、PFGE により菌株の比較を行ったが、複数施設から分離された菌株で類似性が確認された一方、同一施設から分離された菌株で類似性がみられない等解釈に苦慮する結果となった。そこで、本研究ではこれらの菌株の MGEs 領域を比較することで、VRE の集団感染が発生した際に新たな分子疫学的解析方法として活用できるかを検討した。

【研究計画】2022年に千葉県内で分離されたVREの*vanB*遺伝子はTn1549/5382というMGEs上に存在することがPCR検査で確認された。*vanB*遺伝子を含むTn1549/5382は韓国⁵⁾や台湾⁶⁾でも*E. faecium*から分離され各々特徴的な挿入配列が検出されている。またオランダの研究では、院内感染が疑われたVanB型*E. faecium* 36株について全ゲノムシーケンスを実施し、MGEsの型別結果により複数のアウトブレイクの発生を結論づけている⁷⁾。

(1) 供試菌株 2022年に当所へ搬入されたVRE 47検体を使用する。

(2) プライマーの設計 データベース(National Center for Biotechnology Information, NCBI)よりTn1549/5382を保有する*E. faecium*のゲノム情報(レファレンスゲノム)を取得し、プライマー設計ソフトウェア(Primer3Plus)を用いて*vanB*遺伝子を含むTn1549/5382全領域を増幅するのに最適なプライマーセットの候補を複数作製する。(1)のうち、PFGEで類似性の低い判定結果となった2株を使用して、Tn1549/5382全領域を1~2組/株のプライマーセットで増幅できる組み合わせを選別する。PCR反応により増幅を確認後、増幅産物を精製し次世代シーケンサー(MiSeq sequencing, illumina)を用いて解析する。

(3) 次世代シーケンサーによる解析 (2)で設計したプライマーを用いて、供試菌株の残り45株についても同様にTn1549/5382全領域の塩基配列を取得する。

(4) 解析方法の検討 取得された塩基配列をCLC Genomics Workbench(QIAGEN)を用いてレファレンスゲノムにマッピングする。マッピングされた各株のゲノム情報を比較し、一塩基変異(single nucleotide variants; SNVs)及び挿入配列の検出を行う。また、樹形図を作成しPFGEデータをもとにした樹形図と比較し、集団感染の解析法として検討する。

【実施内容・結果】

1. 実施内容

(1) 供試菌株 2022年千葉県衛生研究所へ搬入されたVanB型VRE 47株を使用した。菌株はパールコアミューラーヒントンS寒天培地(栄研化学)上にKBディスクVCMバンコマイシン(栄研化学)を置いて培養し実験に供した。

(2) DNAの抽出 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を使用した。

(3) プライマーの選別 データベース(National Center for Biotechnology Information, NCBI)よりTn1549/5382を保有するVREのゲノム情報(リファレンス配列)を取得し、プライマー設計ソフトウェア(Primer3Plus)を用いて*vanB*遺伝子を含むTn1549/5382全領域を増幅するのに最適なプライマーセットの候補を複数作製した。(1)のうち、PFGEで類似性の低い判定結果となった2株を鋳型として使用し、Tn1549/5382全領域を1組/株のプライマーセットで増幅できる組み合わせを選別した。

(4) 次世代シーケンサーによる解析 次世代シーケンサーは、MiSeqを用いた。PCR

反応により得られた増幅産物を Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH) を用いて精製した。Nextera XT DNA Library Preparation Kit (illumina) を使用してライブラリ調整を実施し、MiSeq Reagent Nano Kit v2 500 cycle (illumina) により 46 株の塩基配列を取得した。

(5) バイオインフォマティクス MiSeq から取得した配列データに *vanB* 遺伝子が含まれることを ResFinder 4.1 を用いて確認した。CLC Genomics Workbench (QIAGEN) を用いて配列データをトリミングした後 De novo アセンブリを行った。得られた Tn1549/5382 全領域データを DDBJ Fast Annotation and Submission Tool によりアノテーション後、Mauve 2015-02-26、Easyfig 2.2.5、MAFFT を用いてリファレンス配列 (GenBank Accession No. AB374546、AF192329、KR066794、LRAQ01000090) と構造比較、SNVs と挿入配列の検出を行った。

2. 結果

(1) プライマーの設計、選別

Forward プライマーを 3 種 (F1、F2、F3)、Reverse プライマーを 3 種 (R1、R2、R3) 設計しそれぞれの組み合わせで PCR 反応を実施した (図 1)。以降の検討には F3 プライマー、R3 プライマーを使用した。

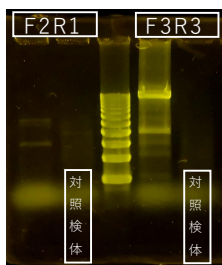
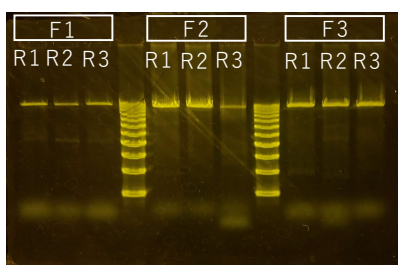


図 1 新規設計プライマーによる PCR 反応の泳動像

(2) Tn1549/5382 塩基配列と PFGE の結果の比較

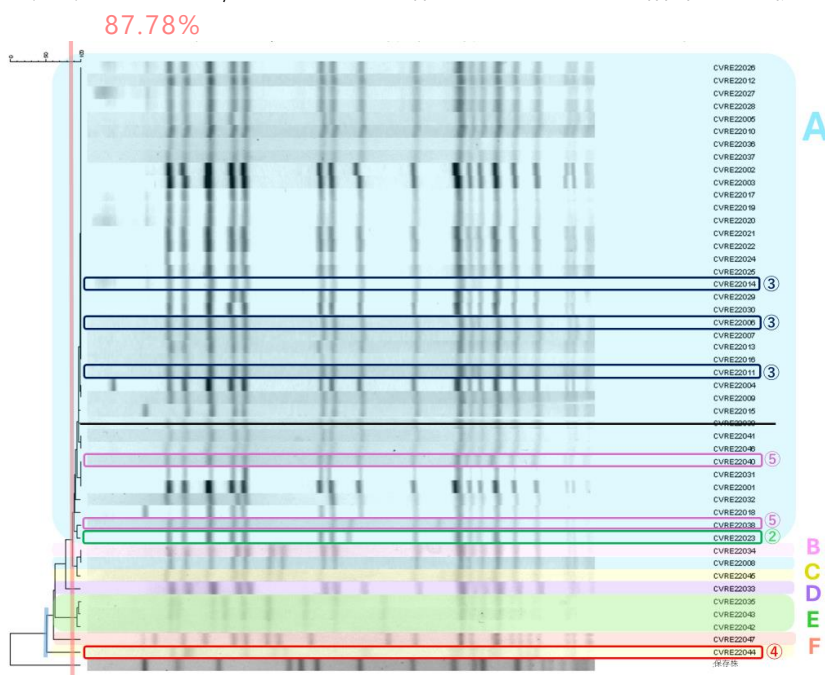


図 2 Tn1549/5382 遺伝子型と PFGE の結果
塩基配列の比較により 5 種類の Tn1549/5382 が検出された。同じ背景色は、同じ医療施設由来の株を示す。同色の枠線は、同じ Tn1549/5382 を持つ株を示す (②型、③型、④型、⑤型)。枠線のない株は、全て同じ Tn1549/5382 (①型) を保持 (保存株を除く)。

2022年に分離された47株中46株についてTn1549/5382塩基配列のデータが得られた。

塩基配列を比較したところ、①～⑤型まで5種類のTn1549/5382を認めた。

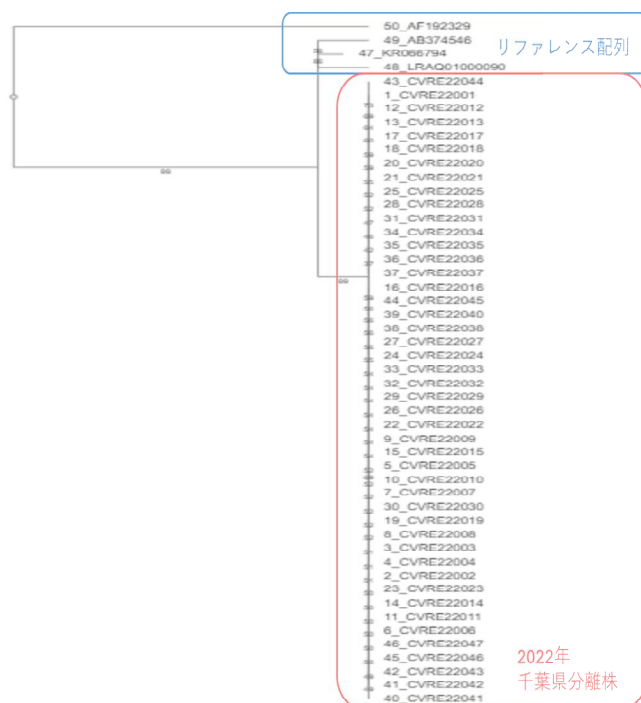
①型に比較して、②型、③型、⑤型は塩基配列が挿入されていたが、SNVsは認められなかった。

一方、①型に比較して、④型には塩基配列の挿入と、1か所のSNVsを認めた。

また医療施設A、B、C、D、E、Fの分離株から、PFGEの結果に関わらず①型を検出した(図2)。

(3) リファレンス配列との比較

データベース(NCBI)上のリファレンス配列(GenBank Accession No. AB374546、AF192329、KR066794、LRAQ01000090)と千葉県分離検体のTn1549/5382塩基



配列を比較した結果を図3に示す。各リファレンス配列と千葉県で分離されたTn1549/5382のうち①型の塩基配列を比較すると、AB374546とは13か所、AF192329とは85か所、KR066794とは12か所、LRAQ01000090とは13か所のSNVsがそれぞれ検出された。リファレンス配列と比較すると2022年に千葉県で分離された検体は全て非常に高い類似性を示すことが分かった。

図3 Tn1549/5382の塩基配列を基に作成した樹形図

青枠内がリファレンス配列、赤枠内が2022年千葉県分離株を示す。

【考察と今後の課題】

2022年に千葉県で分離された株のうちCVRE22044を除く45株のTn1549/5382は、PFGEの結果に関わらずSNVsが1か所も認められなかった。データベース上に登録されているリファレンス配列と比較すると、少なくとも12か所のSNVsが認められた。このことを考慮すると2022年に千葉県で分離され、今回データが得られた46株のTn1549/5382領域の塩基配列は非常に類似しており、Tn1549/5382の獲得は水平伝達された、又は同じ菌株から行われた可能性が高いことを示した。本研究に用いた菌株は6か所の医療施設から得られたが、Tn1549/5382の解析により、6か所全ての医療施設に

またがる VRE のアウトブレイクが発生した可能性を示す結果となった。

また、医療施設 A から分離され、PFGE でも類似性を示した VRE 38 株から変異（塩基配列の挿入）を伴う 4 種の Tn1549/5382 を検出したことから、変異した Tn1549/5382 をたどり、より詳細な VRE の感染経路を特定できる可能性が示された。

しかしながら、CVRE22044 は、PFGE で他の VRE と類似性が低く、Tn1549/5382 上に 1 か所の SNV が存在し、さらに別の 1 か所に塩基配列が挿入されていた。CVRE22044 を除く 45 株において SNVs が 1 か所も認められなかったこと、PFGE で CVRE22044 と同一由来と考えられる菌株が 1 株もないことから、この菌株が他の VRE と関連しているかは検討の余地が残る結果となった。他の集団感染事例で検出された VRE の Tn1549/5382 領域を解析し、複数の事例で SNVs の有無や塩基配列の挿入といった変異を確認し、比較していくことが必要であると感じた。

【参考文献】

- 1) 富田治芳ら, 日本臨床微生物学雑誌, Vol.24, No.3 2014.
- 2) 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.0
- 3) 令和 5 年 4 月 7 日 国際的に脅威となる感染症対策の強化のための 国際連携等関係閣僚会議 「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2023-2027」
- 4) F. C. Tenover et al., Antimicrob. agents chemother., 48, 275-280, 2004
- 5) W. G. Lee and W. Kim., Lett. appl. Microbiol., 36, 186-190, 2003
- 6) J. J. Lu et al., Antimicrob. agents chemother., 49, 3937-3939, 2005
- 7) X. Zhou et al., J. Antimicrob. Chemother., 73, 3259-3267, 2018
doi:10.1093/jac/dky349

【経費使途明細】

使 途	金 額
Qubit 4 Fluorometer with WiFi	299,970 円
通信費 (郵送代)	180 円
合 計	300,150 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円