

尿路感染症由来 *Enterococcus faecalis* の病原性因子 に関する分子疫学的検討

石 井 亜 矢 乃

キーワード：尿路感染症, *Enterococcus faecalis*, *asaI*, *cylA*

緒 言

近年、臨床各科領域における腸球菌の分離頻度は明らかに増加し、全体の分離菌の約10%を腸球菌が占めるに至っている^{1,2)}。また、尿路における腸球菌の分離頻度も増加傾向にあり、約20%であるとの報告がある³⁾。尿路における腸球菌の病原性は必ずしも高くないと考えられてきたが、臨床現場では腸球菌による有熱性尿路感染症を少なからず経験するようになってきた。事実、岡山大学附属病院泌尿器科での *E. faecalis* 分離症例における有熱性尿路感染症の頻度は、1971～1984年は3.8%、1985～1994年は16.5%と明らかに増加傾向を示している⁴⁾。腸球菌の病原性因子としてヘモリジン、aggregation substance, enterococcal surface protein, gelatinase などが報告されているが^{5,6,7,8,9)}、臨床における尿路での腸球菌の付着・定着性、病原性因子ならびに有熱性感染症の発症メカニズムについてはいまだ十分には明らかにされていない。動物実験では aggregation substance が腸球菌の血管や心臓の内皮細胞への付着、腸や腎の尿細管上皮細胞への付着を促進して感染症の発症に関与していることが報告され^{1,7,10,11,12,13,14,15)}、

付着そのものが心内膜炎や尿路感染症の病原性において重要な virulence factor となりうる可能性が考えられる。

一方、腸球菌の臨床上的問題点は、本菌が院内感染症の原因菌となり、しかも多くの薬剤に自然耐性ならびに獲得耐性を示すことである。バンコマイシンに耐性を獲得したバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は院内感染菌として世界的に重大な問題となっているところである¹⁶⁾。腸球菌は本来アミノ配糖体に対して自然耐性であるが、耐性遺伝子の獲得により高度耐性を示すようになる。アミノ配糖体などの薬剤耐性遺伝子は、aggregation substance 産生遺伝子 (*asaI*) やヘモリジン産生遺伝子 (*cylA*) と同様に高頻度伝達プラスミド上にコードされていることが多いため^{1,8,17)}、院内感染の繰り返しによって種々の病原性因子と薬剤耐性遺伝子が濃縮された菌へと変化していく可能性がある。

本研究では、病原性に関与しうる遺伝子の保有状況と各遺伝子の連関、ならびにその年次推移、および病原性遺伝子保有株の患者間での交差感染の有無とその状況について解析し、*E. faecalis* の尿路での病原的意義と病院内交差感染の実像について検討を加えた。

対象と方法

1. 対 象

菌株は岡山大学附属病院泌尿器科で、1991年から1998年の8年間に、尿培養で 10^4 CFU/ml以上分離さ

(平成12年12月19日受理)
岡山大学医学部泌尿器科学講座
指導：公文裕巳教授 (岡山大学医学部泌尿器科学)
論文請求先：岡山大学医学部泌尿器科学教室
電話：086-235-7287 FAX：086-231-3986
E-mail：uro2@med.okayama-u.ac.jp

れた尿路感染症由来 *E. faecalis* 251株を用いた。

2. 方法

1) aggregation substance 産生遺伝子 (*asaI*)

とヘモリジン産生遺伝子 (*cylA*) の検出法

asaI 遺伝子と *cylA* 遺伝子の検出は Huycke ら¹⁰⁾ の報告したプライマーを使用して multiplex-PCR 法で行った。 *E. faecalis* を 0.5ml Todd Hewitt Broth (Difco, Detroit, USA) に 1 夜培養したものを遠心し、上清を捨てて再蒸留水 50 μ l に懸濁した後、94 $^{\circ}$ C 10 分熱処理し DNA 調製液を作成した。あらかじめ調製した反応液 (PCR buffer, dNTP, primer, Taq polymerase) 22.5 μ l に DNA 調製液の上清 2.5 μ l を加え、反応を開始した。反応はまず 95 $^{\circ}$ C 2 分の熱変性後、熱変性, annealing, 伸長反応をそれぞれ 95 $^{\circ}$ C 1 分, 46 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 5 分で 35 サイクル行った。その後 2% アガロースで電気泳動を行った。電気泳動後エチジウムブロマイドで染色したものを、UV transilluminator にて撮影した。マーカーは 100 base DNA Ladder (New England Biolabs, Beverly, USA) を使用した。尚、*cylA* 遺伝子、*asaI* 遺伝子のサイズはそれぞれ 434bp, 379bp である。

2) アミノ配糖体 (AGs) 耐性遺伝子の検出法

aph(3')-III および *aac(6')-aph(2'')* 遺伝子の検出は、Klundert ら¹⁸⁾ の報告したプライマーを使用して multiplex-PCR 法で行った。*asaI* と *cylA* の検出法と同様に、DNA 調製液および反応液を作成した。反応はまず 94 $^{\circ}$ C 2 分の熱変性後、熱変性, annealing, 伸長反応をそれぞれ 94 $^{\circ}$ C 1 分, 54 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 1 分で 30 サイクル行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 10 分伸長反応を行った。その後 *cylA* と *asaI* の検出時と同様に、電気泳動、染色、撮影を行った。尚、*aac(6')-aph(2'')* のサイズは 220bp, *aph(3')-III* のサイズは 292bp である。

3) ヘモリジン産生株の検出法

ヘモリジン産生性は 4% ウマ血液加 Todd Hewitt Agar に画線して、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養後、判定した。溶血が認められた場合をヘモリジン産生株とした。

4) パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による遺伝型の検討

Donabedian ら¹⁹⁾ が報告した方法により、*asaI* 保有

ヘモリジン産生株を対象に PFGE による遺伝型の検討を行った。まず、0.5ml Brain Heart Infusion Broth (Nissui, Tokyo, Japan) に一晩培養し、遠心後 pellet に調製した buffer (1.0M NaCl, 10mM Tris, pH 7.6) を 0.2ml 加えた。懸濁した後、55 $^{\circ}$ C, 1.6% low melt agarose と 60 μ l ずつ等量混合し、mold に入れゲルブロックを作成した。リゾチーム、proteinase K を用いて溶菌処理を行い、1X TE buffer (10mM Tris, pH 7.5, 0.1mM EDTA) で 3 回洗浄した後、制限酵素 *Sma* I を用いて切断した。さらに洗浄後 0.8% アガロースに mold を埋め込み、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を行った。泳動条件は泳動電圧 6 V/cm, 泳動時間 18.5 時間, 泳動温度 14 $^{\circ}$ C, 角度 120 度とした。電気泳動後エチジウムブロマイドで染色したゲルを、UV transilluminator にて撮影した。マーカーは lambda ladder (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) を使用した。

5) プラスミドプロファイルの検討

asaI 保有ヘモリジン産生株についてプラスミドプロファイルの検討を行った。5.0ml Todd Hewitt Broth に 1 夜培養したものを遠心し、上清を捨てて冷再蒸留水 1.0ml に懸濁したのち、37 $^{\circ}$ C でリゾチーム (15 mg/ml) 処理してアルカリ溶菌を行った。その後、中和させフェノールクロロホルム抽出を行った。エタノール沈殿を 2 回施行しプラスミドの調製を行った。その後、調製したプラスミドを *Eco*R I により切断し、0.5% アガロースで電気泳動した。泳動電圧は 20 V とした。電気泳動後エチジウムブロマイドで染色したゲルを、UV transilluminator にて撮影した²⁰⁾。マーカーは Lambda DNA *Hind* III Digest (New England Biolabs, Beverly, USA), 5 Kb DNA Ladder (Life Technologies, Rockville, USA) を使用した。

結 果

1. 各遺伝子の保有状況

251 株のうち aggregation substance 産生遺伝子 (*asaI*) 保有株は 205 株 (81.7%)、ヘモリジン産生遺伝子 (*cylA*) 保有株は 94 株 (37.5%) であった。

AGs 耐性遺伝子保有株は251株のうち124株(49.4%)であり, *aph(3')*-III 遺伝子のみを保有する株は20株(8.0%), *aac(6')*-*aph(2'')*遺伝子のみを保有する株は23株(9.2%), 両遺伝子を保有する株は81株(32.3%)であった。

2. aggregation substance 産生遺伝子 (*asaI*) 保有の有無と他の遺伝子保有との関係

asaI 保有株205株のうち *cylA* 遺伝子もしくは AGs 耐性遺伝子を保有していた株は167株(81.5%)であり, *asaI* 非保有株46株では7株(15.2%)のみであった ($P < 0.0001$). *cylA* 遺伝子もしくは AGs 耐性遺伝子を保有していた *asaI* 保有株167株のうち49株(23.9%)は *cylA* 遺伝子のみを, 74株(36.1%)は AGs 耐性遺伝子のみを, 44株(21.5%)は *cylA* 遺伝子, AGs 耐性遺伝子のいずれも保有していた. *cylA* 遺伝子もしくは AGs 耐性遺伝子を保有していた *asaI* 非保有株7株のうち1株(2.2%)は *cylA* 遺伝子のみを, 6株(13.0%)は AGs 耐性遺伝子のみを保有しており, *asaI* 保有株, *asaI* 非保有株との間に有意差を認めた ($P < 0.0001$). 逆に, *cylA* 遺伝子, AGs 耐性遺伝子のいずれも保有していなかった株は *asaI* 保有株205株のうち38株(18.5%)に過ぎなかったのに対して, *asaI* 非保有株46株では39株(84.8%)と大半が *cylA* 遺伝子, AGs 耐性遺伝子を共に保有していない株であった ($P < 0.0001$)

(表1)。

3. *asaI* 遺伝子を中心とする遺伝子保有率の年次推移

asaI 保有率は1991年69.2%, 1992~1995年83.8% (88/105)と増加傾向を認め, 1996年は74.2%と減少したもののその後再び1997年80.4%, 1998年90.7%と増加傾向を認めた. *cylA* 保有率は1991~1994年30.0% (30/100), 1995~1998年42.4% (64/151)と年次的に増加傾向を認め, 最近の2年間では45.7%~48.8%であり, 保有株の分離頻度が増加していた. AGs 耐性遺伝子保有株は持続的に36%~58.7%の範囲で分離されていた. *aph(3')*-III 遺伝子のみを保有する株は4.0%~15.4%, *aac(6')*-*aph(2'')*遺伝子のみを保有する株は4.0%~19.4%, 両遺伝子を保有する株は23.1%~41.3%の割合で分離されていたが, いずれにおいても分離頻度における明らかな年次推移は認められなかった. *asaI*, *cylA* 遺伝子を共に保有する株の割合は18.8%~48.8%であり, 年次的変動はあるものの1991~1994年では30% (30/100), 1995~1998年では41.7% (63/151)と増加傾向を認めた. *asaI*, AGs 耐性遺伝子を共に保有する株の割合は36.0%~54.3%であり, 年次的にゆるやかな増加傾向を認めた. *asaI*, *cylA* および AGs 耐性遺伝子の全てを同時に保有する株の割合は0%~32.6%であり, 1991~1994年では7% (7/100), 1995~1998

表1 aggregation substance 産生遺伝子 (*asaI*) 保有の有無と他の遺伝子保有との関係

	aggregation substance 産生遺伝子 (<i>asaI</i>)		有意差 P 値
	保有株数 (%)	非保有株数 (%)	
<i>cylA</i> , AG 耐性遺伝子*保有の有無			
<i>cylA</i> (+) または AGs (+)	167 (81.5)	7 (15.2)	<0.0001**
<i>cylA</i> (+) のみ	49 (23.9)	1 (2.2)	<0.0001**
AGs (+) のみ	74 (36.1)	6 (13.0)	<0.0001**
<i>cylA</i> (+) と AGs (+)	44 (21.5)	0 (0)	<0.0001**
<i>cylA</i> (-) と AGs (-)	38 (18.5)	39 (84.8)	<0.0001**
計	205 (100)	46 (100)	

*ヘモリジン産生遺伝子, アミノ配糖体耐性遺伝子 (*aph(3')*-III または *aac(6')*-*aph(2'')*)

**Fisher's exact probability test

年では24.5% (37/151) と明らかな増加傾向を認めた (図1)。

4. PFGE による遺伝型の検討および同一パターンを示す株の分離状況

251株のうちヘモリジン産生株は30株 (12.0%) であり, *asaI* 保有ヘモリジン産生株は28株であった。28株での PFGE による検討では, 4バンド以上の違

いを異なるパターンとすると²¹⁾, 全部で22種類のパターンが存在した。同一パターンを示した6ペア (図2) の分離状況として, 患者の基礎疾患, 入院外来別, 入院時期, 分離日及び AGs 耐性遺伝子保有状況を表2にまとめた。6ペアのうち4ペアは入院患者より分離され, 2ペアはいずれも入院患者と入院歴のない外来患者より分離されていた。また, 全てのペアにおいて, 再入院時期も含めた入院時期, 外来受

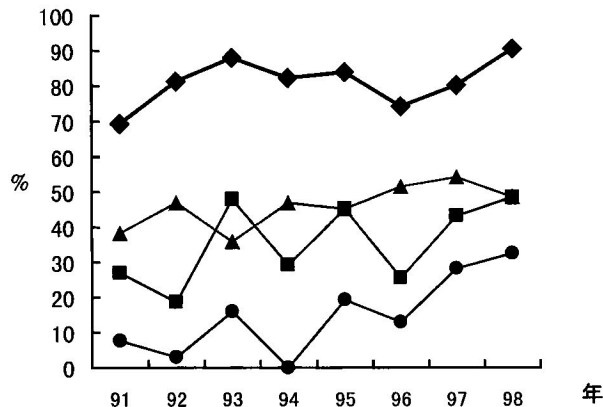


図1 *asaI* 遺伝子を中心とする遺伝子保有率の年次推移
 ◆—*asaI* 遺伝子保有株
 ▲—*asaI* 遺伝子および AGs 耐性遺伝子保有株
 ■—*asaI* 遺伝子および *cylA* 遺伝子保有株
 ●—*asaI* 遺伝子, *cylA* 遺伝子および AGs 耐性遺伝子の全遺伝子保有株

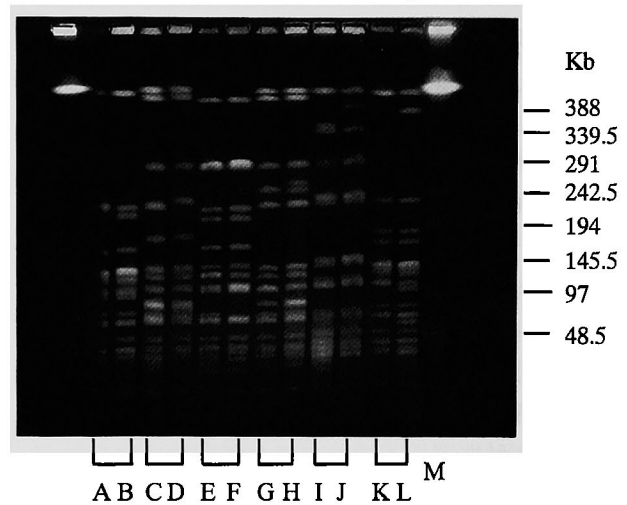


図2 *asaI* 保有ヘモリジン産生 *E. faecalis* の PFGE

表2 PFGE で同一パターンを示す *asaI* 保有ヘモリジン産生 *E. faecalis* 株の分離状況

患者	疾患	入院外来別	入院時期	分離年月日	AGs 耐性遺伝子*
A	Neurogenic bladder	入院	91.8.26—9.25	91.9.17	KG
B	Neurogenic bladder	入院	97.6.9—7.17	97.7.15	—
C	Neurogenic bladder	外来		97.4.7	KG
D	Neurogenic bladder	入院	97.7.1—8.5	97.8.4	KG
E	Neurogenic bladder	入院	98.5.15—10.8	98.9.10	—
F	BPH	入院	98.12.7—12.28	98.12.8	—
G	Adrenal tumor	入院	98.2.4—4.16	98.4.1	G
H	Prostatic ca.	入院	98.5.8—8.3	98.5.25	KG
I	Prostatic ca.	入院	96.11.14—97.2.7	97.1.30	KG
J	Bladder ca.	入院	98.9.4—12.17	98.9.7	KG
K	Neurogenic bladder	外来		97.9.19	G
L	BPH	入院	97.10.2—10.9	97.10.7	KG

*K: *aph(3')*-III, G: *aac(6')*-*aph(2')*

診日に重なりはなく、各ペア内では分離時期に約1ヶ月から6年の違いがあった。6ペアのうち3ペアはAGs耐性遺伝子保有パターンが同一であり、3ペアでは異なっていた。

5. プラスミドプロファイルの検討

検討した28株のプラスミドのプロファイルについては同一のプロファイルは2株存在した。その2株は表2の患者I, Jより分離された株であり、PFGEでも同一パターンを示していた。それ以外のPFGEで同一パターンを示していた5ペアについてはプラスミドのプロファイルはすべて異なっていた(図3)。

考 察

近年、腸球菌の尿路感染症からの分離頻度ならびに腸球菌による有熱性尿路感染症の頻度は増加傾向にあるものの^{3,4)}、尿路における腸球菌の付着・定着性、病原性因子ならびに有熱性感染症の発症メカニズムについてはいまだ十分には明らかにされていない。一方、腸球菌は感染症全体の原因菌の約10%を占め、院内感染の主な原因菌の1つであり^{1,2)}、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は院内感染菌として

極めて深刻な問題を投げかけている¹⁶⁾。

今回、尿路感染症由来 *Enterococcus faecalis* の病原性因子と病院内交差感染について分子疫学的に解析するにあたり、腸球菌の aggregation substance に最も注目した。aggregation substance は、*Enterococcus faecalis* のフェロモン反応性プラスミド上にコードされている aggregation substance 産生遺伝子 (*asaI*) が、フェロモンに反応して発現する表面蛋白質である^{1,9)}。aggregation substance の病原性因子としての役割は次の2つがあると思われる。1つは凝集素としての機能である。*asaI* 遺伝子保有株の表面がプラスミド非保有株の放出するフェロモンに反応して aggregation substance で被われ、その結果、プラスミド保有株と非保有株との間で凝集形成が起こる。すると高頻度伝達プラスミド上にコードされている病原性因子や薬剤耐性遺伝子だけでなく、その他の接合伝達性遺伝子も伝達する可能性が高くなると報告されている^{5,7,10,12,14,22,23,24,25)}。つまり、aggregation substance は、菌と菌との凝集に関与することにより遺伝情報を交換する役割がある。もう1つは付着因子としての機能である。Chow ら⁷⁾や Kreft ら¹⁴⁾の動物実験で aggregation substance は、腸球菌の血管や心臓の内皮細胞、腸や腎の尿細管上皮細胞への付着を促進して、腸球菌による感染症発症に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。つまり、付着そのものが心内膜炎や尿路感染症の病原性において重要な因子になりうると考えられる。以上の文献的考察に基づき、尿路における aggregation substance 産生遺伝子 (*asaI*) を中心とする病原性遺伝子および薬剤耐性遺伝子の保有状況を解析することが、*E. faecalis* の尿路での病原的意義を考える上で重要と思われた。

岡山大学附属病院泌尿器科で8年間に分離された尿路感染症由来 *E. faecalis* の *asaI* 保有率は81.7%であった。Coque ら⁸⁾の報告によると *E. faecalis* での *asaI* 保有率は尿路感染症では67%、敗血症では77%、心内膜炎52%、健康人の便からでは30%であると報告されており、腸内に常在定着する株と尿路感染症由来株を含めた病原性株とでは明らかに差が

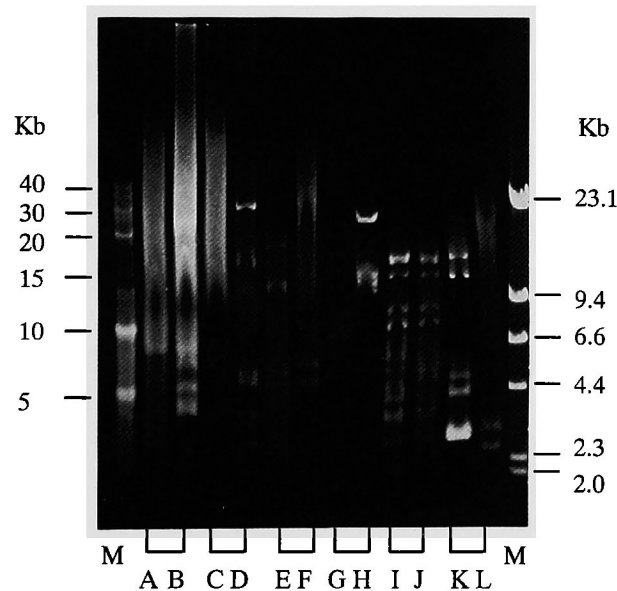


図3 PFGEで同一パターンを示す株のプラスミドプロファイル

見られた。今回の検討では1991年の *asaI* 保有率は69.2%であり、Coqueらの1989~1993年の分離菌での報告と極めて良く一致している。一方、今回の検討で明らかなることは年次的にその保有率が増加し、1998年では90.7%となっていることである。腸球菌の病原性因子の年次的推移に関して、ヘモリジン産生株が増加傾向であるとの報告はあるが¹⁾、*asaI* 遺伝子保有株や *asaI* と他の遺伝子を同時に保有する株の割合についての報告は、今回検索した限り存在しなかった。病原性因子に關与する各遺伝子の連関についての解析では、*asaI* 遺伝子保有株のうち81.5%は *cylA* もしくは AGs 耐性遺伝子を保有しており、逆に *asaI* 非保有株のうち84.8%は *cylA*、AGs 耐性遺伝子のいずれも保有していなかった ($P < 0.0001$)。つまり、*asaI* 遺伝子保有株は *cylA* もしくは AGs 耐性遺伝子を保有する割合が有意に高い。さらに今回の尿路感染症由来株での検討では、*asaI* 保有率だけでなく、*asaI*、*cylA* 遺伝子を共に保有する株の割合、*asaI*、AGs 耐性遺伝子を共に保有する株の割合、*asaI*、*cylA*、AGs 耐性遺伝子全てを保有する株の割合も年次的に増加傾向を示していた。以上の成績は、*asaI* 遺伝子の発現型である aggregation substance により凝集が起こり、細菌間で遺伝情報の交換が起こった結果であると推測される。さらに *asaI* 保有 *E. faecalis* 株の増加傾向、腸球菌の尿路感染症からの分離頻度が増加傾向にあることをふまえると³⁾、*asaI* 遺伝子の発現が *E. faecalis* の尿路へ付着、定着という尿路感染症発症における最も重要な病原性因子として機能している可能性が高い。つまり、*asaI* 遺伝子保有株の増加による尿路への付着定着性の増強、さらに aggregation substance による凝集を介した病原性因子、薬剤耐性遺伝子の細菌間における伝達、それによる *asaI* 遺伝子を中心とした様々な病原性因子、薬剤耐性遺伝子保有株の増加が臨床の場における有熱性、難治性尿路感染症の増加に關与しているものと思われる。

病原性遺伝子保有株の患者間での交差感染の有無とその状況について解析する目的で、腸球菌の重要な病原性因子の1つであるヘモリジンに着目した。

今回のウマ血液を用いた検討では、*cylA* 遺伝子の発現型であるヘモリジンを産生する株は *cylA* 遺伝子保有株の32%で認められた。*asaI* 保有ヘモリジン産生 *E. faecalis* 28株を対象として PFGE による遺伝型の比較検討を行った結果、同一のパターンを示す菌株が6ペアに認められた。そのうち5ペアはプラスミドのプロファイルを変化させていたが、1ペアではプロファイルを変化させずに長期間環境に生存していたと思われる。Witteら²⁶⁾やWendtら²⁷⁾はナースコールのベル、下水汚物、ストレッチャー、風呂場、看護の制服、カーテンが腸球菌により汚染されており、腸球菌が環境に長期間棲息したと報告している。表2にまとめたように、ペアのそれぞれは全て入院時期、外来受診日の重なりはなく、分離時期に約1ヶ月から6年の違いがあり、時間、空間を越えて分離されていたことから、患者間での直接的な交差感染は否定的であった。しかし、*E. faecalis* 430株(尿培養で 10^4 CFU/ml未満も含む)のうちヘモリジン産生株56株を用いて検討した結果では²⁸⁾、分離日の違いは6日で入院時期の重なりがあり、PFGEのパターンおよびプラスミドプロファイルが同一であった株が1ペア存在し、直接的な交差感染の事例が存在していた。結局、病院という半閉鎖的空間においては、尿路感染症由来 *E. faecalis* における遺伝情報の交換は、単に医師や看護婦といった医療従事者の手指などを介する患者間での単純かつ直接的な交差感染(狭義の院内感染)だけではないものと思われる。汚染された病棟の環境と患者との接触、食物交換を含む患者同士の接触による菌の伝播に加えて、患者自身の尿路内で生育する *E. faecalis* 同士ならびに尿中生育菌と腸内に常在定着する *E. faecalis* との接合伝達などによる遺伝情報の交換など、極めてダイナミックな遺伝情報の交換(複雑な広義の院内感染)が存在するものと考えられる。今回の検討結果から、尿路では *asaI* 保有 *E. faecalis* がこの遺伝情報の交換において中心的な役割を担っているものと考えられるが、より直接的なエビデンスの集積が必要であろう。バンコマイシン耐性菌などの難治性感染症の治療を益々困難とさせるような薬剤耐性遺伝

子の異菌種への伝達を生じさせないためにも、医療現場で生じている腸球菌における広義の交差感染の実像を更に明らかにする必要があると思われる。

結 論

E. faecalis の尿路での病原的意義を考察する目的で、岡山大学医学部附属病院泌尿器科で、尿培養で 10^4 CFU/ml以上分離された尿路感染症由来 *E. faecalis* 251株を用いて、*E. faecalis* の病原性因子と病院内交差感染について解析し、以下の結論を得た。

1. 尿路感染症由来 *E. faecalis* 251株のうち81.7%が *asaI* 遺伝子保有株であった。また、*asaI* 遺伝子保有株は *cylA* もしくは AGs 耐性遺伝子を保有する割合が有意に高かった。年次の検討では、*asaI* 遺伝子保有株および *asaI* 遺伝子、*cylA* 遺伝子、AGs 耐性遺伝子すべてを同時に保有する株の明らかな増加傾向を認めた。以上の成績は *asaI* 遺伝子の発現型である aggregation substance により凝集が起こり、細菌間で遺伝情報の交換が起こった結果であると推測された。
2. 病院という半閉鎖的空間においては、尿路感染症由来 *E. faecalis* は患者間での単純かつ直接的な交差感染（狭義の院内感染）だけでなく、人を含めた環境において遺伝情報のダイナミックな交換（複雑な広義の院内感染）を行っていることが示唆された。
3. 尿路では *asaI* 保有 *E. faecalis* がこの遺伝情報の交換において中心的な役割を担っているものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始御指導、御校閲を賜りました恩師公文裕己教授、狩山玲子助手に心より深謝いたします。また、実験の御指導を頂いた泌尿器科学講座技術補佐員、光畑律子氏に感謝します。

本論文の要旨は第47回日本化学療法学会西日本支部総会（1999、優秀演題賞受賞）、第74回日本感染症学会（2000）で発表した。

文 献

- 1) Jett BD, Huycke MM and Gilmore MS : Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev (1994) 7, 462—478.
- 2) Wells VD, Wong ES, Murray BE, Coudron PE, Williams DS and Markowitz SM : Infections due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Ann Intern Med (1992) 116, 285—292.
- 3) Gatermann SG : Virulence factors of *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, and enterococci ; in Urinary Tract Infections, Mobley HLT and Warren JW eds, American Society for Microbiology, Washington, DC (1996) pp. 313—340.
- 4) 公文裕己 : 臨床から分離される腸球菌の意義. 日本臨床微生物学雑誌 (1996) 6, 83—88.
- 5) Ike Y, Hashimoto H and Clewell DB : Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. Infect Immun (1984) 45, 528—530.
- 6) Dupont H, Montravers P, Mohler J and Carbon C : Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. Infect Immun (1998) 66, 2570—2575.
- 7) Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB and Zervos MJ : Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrob Agents Chemother (1993) 37, 2474—2477.
- 8) Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM and Murray BE : Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. J Infect Dis (1995) 171, 1223—1229.
- 9) Mundy LM, Sahm DF and Gilmore M : Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev (2000) 13, 513—522.
- 10) Huycke MM and Gilmore MS : Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. Plasmid (1995) 34, 152—156.
- 11) Hancock LE and Gilmore MS : Pathogenicity of enterococci ; in Gram-positive pathogens, Fischetti

- VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA and Rood JI eds, American Society for Microbiology, Washington, DC (2000) pp. 251–258.
- 12) Ike Y and Clewell DB : Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. J Bacteriol (1992) **174**, 8172–8177.
 - 13) Moellering RC : Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis (1992) **14**, 1173–1178.
 - 14) Kreft B, Marre R, Schramm U and Wirth R : Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect Immun (1992) **60**, 25–30.
 - 15) Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R and Wirth R : Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2000) **19**, 39–42.
 - 16) Murray BN : Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerging Infections Disease (1998) **4**, 37–47.
 - 17) Hall LMC, Duke B, Urwin G and Guiney M : Epidemiology of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection in a teaching hospital in London, United Kingdom. J Clin Microbiol (1992) **30**, 1953–1957.
 - 18) Van de Klundert JAM and Vliegenthart JS : PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes ; in Diagnostic Molecular Microbiology, Persing DH, Smith TF, Tenover FC and White TJ eds, American Society for Microbiology, Washington, DC (1993) pp. 547–552.
 - 19) Donabedian S, Chow JW, Shlaes DM, Green M and Zertz MJ : DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococci to the species level. J Clin Microbiol (1995) **33**, 141–145.
 - 20) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J : Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1989).
 - 21) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol (1995) **33**, 2233–2239.
 - 22) Ma X, Kudo M, Takahashi A, Tanimoto K and Ike Y : Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. J Clin Microbiol (1998) **36**, 2460–2464.
 - 23) Clewell DB : Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. Eur J Microbiol Infect Dis (1990) **9**, 90–102.
 - 24) Ike Y, Hashimoto H and Clewell DB : High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. J Clin Microbiol (1987) **25**, 1524–1528.
 - 25) Clewell DB : Sex pheromone systems in enterococci ; in Cell-cell signaling in bacteria. Dunny GM and Winans SC eds, American Society for Microbiology, Washington, DC (1999) pp. 47–65.
 - 26) Witte W, Wirth R and Klare I : Enterococci. Chemotherapy (1999) **45**, 135–145.
 - 27) Wendt C, Wiesenthal B, Dietz E and Ruden H : Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. J Clin Microbiol (1998) **36**, 3734–3736.
 - 28) 石井亜矢乃, 門田晃一, 狩山玲子, 津川昌也, 公文裕巳 : 尿路感染症由来 *Enterococcus faecalis* の分子疫学的検討. Bacterial Adherence 研究 (1999) **13**, 82–86.

**Molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* isolated
from patients with urinary tract infection**

Ayano ISHII

Department of Urology,

Okayama University Medical School

Okayama 700-8558, Japan

(Director: Prof. H. Kumon)

Enterococcus faecalis is a frequent cause of hospital-acquired infection. Two hundred fifty one *E. faecalis* isolates from patients with urinary tract infection at Okayama University Hospital over an 8-year period from 1991 through 1998 were collected. The presence of the *asaI*, *cylA*, *aac* (6')-*aph* (2''), and *aph* (3')-III genes was analyzed by PCR methods. Of the 251 isolates, 205 (81.7%) were positive for *asaI*. The 81.5% (167/205) of *asaI*-positive isolates also possessed either *cylA* or aminoglycoside resistance genes, compared to only 15.2% of (7/46) *asaI*-negative isolates ($p < 0.0001$). The incidence of *asaI* gradually increased from 69.2% in 1991 to 90.7% in 1998. The number of isolates that contain *asaI*, *cylA* and aminoglycoside resistance gene (s) also increased. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analyses of 28 *asaI*-positive and hemolysin-producing isolates revealed 22 different banding patterns, including 6 pairs with similar patterns. The plasmid analyses of these isolates showed different patterns except for 1 pair with similar PFGE pattern. These results suggest that *E. faecalis* possessing the *asaI* gene may play an important role in the exchange of genetic information among enterococci in the urinary tract.