

水環境におけるバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の分布と VRE 耐性遺伝子の伝播ポテンシャルの評価

Investigation of Vancomycin Resistant Enterococci and Evaluation of Transferability on Vancomycin Resistance Gene in Water Environment

西山 正晃^{1*}, 鈴木 祥広²
MASATERU NISHIYAMA^{1*} and YOSHIHIRO SUZUKI²

¹ 山形大学農学部 食料生命環境学科 エコサイエンスコース 〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23

² 宮崎大学工学部 社会環境システム工学科 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

* TEL: 0235-28-2894

* E-mail: m-nishiyama@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

¹ Department of Food, Life and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Yamagata University,
1-23 Wakaba-machi, Tsuruoka, Yamagata 997-8555, Japan

² Department of Civil and Environmental Engineering, Faculty of Engineering, University of Miyazaki,
1-1 Gakuen Kibanadai-Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan

キーワード: 腸球菌, 薬剤耐性, バンコマイシン, 遺伝子伝播

Key words: Enterococcus, Antibiotic Resistance, Vancomycin, Gene transfer

(原稿受付 2020年3月23日/原稿受理 2020年4月20日)

1. はじめに

感染症の治療に使用される抗菌薬や家畜に対する成長促進剤の投与に伴い、薬剤耐性菌が出現し、その感染症は世界的な問題である。特に、薬剤耐性菌は医療機関において極めて深刻な問題となっており、耐性菌が原因となった死者数は世界中で少なくとも年間70万人である試算されている²⁵⁾。また、現状のまま何も対策が講じられず、薬剤耐性菌が世界中で拡大すると想定した場合、2050年には薬剤耐性菌が原因となる死者数が1,000万人に達し、経済的な損失は1兆5000億ドルに及ぶと見積もられている。したがって、薬剤耐性菌と薬剤耐性の発現に関連する遺伝子の存在は、21世紀における人類の公衆衛生を脅かす世界共通の健康問題と認識されており、各国で耐性菌拡大防止の取り組みが策定されている³⁸⁾。これまでの一般認識として、薬剤耐性菌は、特定の医療施設、ならびに抗菌薬を過度に使用している畜産場や養殖場など、限定された場所に存在していると考えられてきた。ところが最近になって、薬剤耐性菌が土壌、下水、都市河川・河口、あるいは沿岸域等の人々が通常の生活を営む周辺環境からも普遍的に検出され始めている^{1,15)}。

著者らは、水環境におけるバンコマイシン (VCM) 耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci, VRE) にフォーカスして研究を進めている。VREは、グラム陽性細菌の特効薬であるVCMに対して耐性を獲得した腸球菌であり、注視すべき耐性菌グループである

ESKAPEの1つである^{2,4,35)}。VREによる院内感染症は世界中で発生しており、中でもアメリカ、ヨーロッパ、および南アジアなどでは発症件数が増加している^{6,10,37)}。我が国のVREの臨床分離報告数は、欧米諸国と比較して少ないものの、VREが原因菌となる院内感染の広がりが危惧されている^{13,18,24)}。その反面、大部分の腸球菌 (*Enterococcus*) は、ヒトを含むほ乳類の腸管内に存在する常在菌であり、ふん便汚染指標細菌として公衆衛生の分野で古くから用いられている³⁴⁾。日本の都市河川や沿岸域からも腸球菌は $10^1 \sim 10^2$ CFU/100 mL レベルで検出されており^{8,30)}、我々の生活圏内に常に存在する細菌である。また、腸球菌は多様な環境因子 (i.e. アルカリ、pH、温度増加、および塩化ナトリウム濃度) に耐性を有している^{16,19)}。したがって、水環境においてVREを含む薬剤耐性腸球菌は、他の細菌と比較して生残性が高く、水系を経由した拡散・感染に関するリスクも高いと推察される。VREに代表する薬剤耐性腸球菌の出現に伴い、環境から普遍的に検出される腸球菌の中に、薬剤耐性を獲得した腸球菌が存在している可能性があり、これらがその他の耐性株の出現や薬剤耐性菌の拡散・伝播に寄与するかもしれない。これまで日本の水環境を対象とした薬剤耐性菌の調査事例では、大腸菌²⁹⁾や緑膿菌³¹⁾で耐性菌の存在が確認されているものの、腸球菌の薬剤耐性に関する情報や知見は極めて少ない。

このような背景において、著者らの研究グループでは、日本の地方都市である宮崎の水環境において微生物汚染の疫学調査を実施している。そこで本総説では、水

環境における VRE の拡散・分布に関する調査事例を紹介する。さらに、水環境において VRE 耐性遺伝子が腸球菌に伝播する可能性について、水環境を模擬した *in vitro* 伝達実験による評価結果の一部についても報告する。

2. VRE の種類とその特徴

VRE の出現は、1986 年にフランスで Leclercq ら¹⁴⁾ による臨床材料からの検出の報告が最初とされる。VCM はグリコペプチド系抗生物質であり、細菌の細胞壁合成酵素の基質であるペントペプチド末端の D-alanyl-D-alanine に結合して細胞壁合成を阻害する働きがある。末端である D-alanine を他のアミノ酸に置換、もしくは本来とは異なるアミノ酸で構成された腸球菌属に対して、VCM の結合能が低下するため、VRE となる²⁶⁾。VRE には 6 種類のタイプがあり、ペントペプチド末端のアミノ酸、耐性遺伝子の存在部位、耐性発現、グリコペプチド抗菌薬に対する感受性などの特徴によって分類される(表 1)。VCM 耐性は、ペントペプチド最末端の D-alanine が lactate, または serine に変化しており、VanA 型と VanB 型の耐性遺伝子の局在部位は、伝達性のトランスポゾンであり、他の VanC 型、VanD 型、VanE 型、ならびに VanG 型は染色体上にコードされていることから非伝達性である^{7,9)}。院内感染対策上問題となるのは、VanA 型と VanB 型であり、これらの遺伝子 (*vanA*, *vanB*) は主にプラスミド上に存在する外来遺伝子である。そのため、同一菌種間だけではなく、どの腸球菌属へも伝播することが報告されている^{9,36)}。VanA 型は、VCM と別のグリコペプチド系抗菌薬であるテイクプラニン (TEIC) に高度耐性、VanB 型、VanC 型、および VanE 型は VCM に中度から高度耐性を示し、TEIC に対して感受性である。VanD 型と VanG 型は、VCM に中度耐性を示し、TEIC に対して感受性が中度耐性を示す特徴がある²⁶⁾。

3. 下水と河川における薬剤耐性腸球菌のモニタリング

腸球菌の薬剤耐性を調査するために、下水処理施設の流入下水と宮崎市内を流下する河川を対象として年間モニタリング調査を実施した²²⁾。年間モニタリングは、

宮崎県内の A 下水処理施設 (日平均流量 6,300 m³/day) と宮崎市内を流れる一級河川の八重川 (流路延長 8.4 km, 流域面積 17.6 km²) の定点から採取した。調査は、2011 年 6 月から 2012 年 7 月までの期間において、月 1 回 (計 10 回) 実施した。

調査期間を通じて、流入下水と河川から腸球菌の選択培地を使用したメンブランフィルター法によってそれぞれ 239 株と 261 株の腸球菌を単離・同定し、薬剤感受性試験 (MIC 試験) を行った。腸球菌全 500 株の中から VCM に対して耐性を示した株は検出されなかったものの、中度耐性を示す株がそれぞれ 10% (24 株) と 5.7% (24 株) 検出された (表 2)。ここで既往の VRE 検出率と比較すると、VRE が原因となる院内感染が深刻化しているアメリカでは、都市下水処理場から単離した腸球菌の最大 3% が VRE であると報告されている²⁸⁾。ヨーロッパ諸国の都市流入下水を対象とした疫学調査では、0.6~60% の範囲で VRE が検出されている¹¹⁾。河川や沿岸環境を対象とした調査事例では、北アメリカの沿岸域から単離した腸球菌のうち、8% (18 株/227 株) が *vanA* あるいは *vanB* のいずれかの遺伝子を保有する VRE であったと報告されている²⁷⁾。韓国の 3 つの主要な河川を対象とした調査では、VRE が最大 23 CFU/100 mL で検出されている²⁰⁾。本研究で対象とした下水処理場の流入下水と河川から VCM に対して耐性を示す VRE は検出されなかったが、中度耐性を示す VRE が検出され、日本の地方都市である宮崎の水環境における VRE の拡散の程度は諸外国の VRE 検出率と比較して極めて低かった。これには日本における VRE の院内感染の発生件数が、諸外国と比較して低いことと関連していると推察している。日本の臨床現場における VCM の投薬量は欧米と比較して少なく¹²⁾、VRE が発生しにくい環境であると考えられる。また VRE の発生には、家畜の成長促進剤として家畜飼料に投薬されるアボパルシンの使用歴が関係していると考えられる^{3,17)}。アボパルシンは VCM と類似した化学構造を有し、この成長促進剤の使用が VRE の発生に寄与していると言われている。長期間アボパルシンを使用した国 (現在では使用禁止) では、今も農場やその周辺環境から VRE が検出されている¹⁷⁾。日本ではアボパルシンの使用が短期間であったため、VRE の発生が抑えられたといわれている³⁹⁾。これらのことから日本の水環境中の VRE の検出率が諸外

表 1. VRE の分類と VCM 耐性の局在部位²⁶⁾

耐性タイプ (関連する耐性遺伝子)	MIC (µg/mL)		耐性遺伝子の 局在部位	ペントペプチド 末端構造	分離菌種
	VCM	TEIC			
VanA (<i>vanA</i>)	64-1,000	16-512	プラスミド, 染色体	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , etc
VanB (<i>vanB</i>)	4-1,000	≤ 1	プラスミド, 染色体	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , etc
VanC (<i>vanC</i>)	2-32	≤ 1	染色体	D-Ala-D-Ser	<i>E. casseliflavus</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. flavescens</i>
VanD (<i>vanD</i>)	64-128	4-64	染色体	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i>
VanE (<i>vanE</i>)	16	0.5	染色体	D-Ala-D-Ser	<i>E. faecalis</i>
VanG (<i>vanG</i>)	< 16	< 0.5	染色体	D-Ala-D-Ser	<i>E. faecalis</i>

VCM: バンコマイシン, TEIC: テイクプラニン

表 2. 流入下水と河川から単離した腸球菌の薬剤感受性 (ABPC: アンピシリン, PCG: ペンジルペニシリン, TC: テトラサイクリン, IMP: イミペネム, EM: エリスロマイシン, VCM: バンコマイシン)

抗菌薬	下水 (239 株)			下水 (261 株)		
	感受性	中度耐性	耐性	感受性	中度耐性	耐性
	単離菌株数 (% , 割合)			単離菌株数 (% , 割合)		
ABPC	239 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	261 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
PGC	239 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	260 (99.6%)	0 (0%)	1 (0.4%)
TC	131 (54.8%)	27 (11%)	81 (34%)	149 (57.0%)	29 (11%)	83 (32%)
IPM	239 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	261 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
EM	95 (40%)	85 (36%)	59 (25%)	102 (39.1%)	138 (52.9%)	21 (8.0%)
VCM	215 (90.0%)	24 (10%)	0 (0%)	246 (94.3%)	15 (5.7%)	0 (0%)

表 3. VRE の流域調査における各調査地点のバンコマイシン耐性遺伝子の分布

調査日	地点	単離菌株数 (株)	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC1</i>	<i>vanC2/C3</i>
Dec-13	St. 1	30	N.D.*	N.D.	3	17
	St. 2	16	N.D.	N.D.	N.D.	11
	St. 3	3	N.D.	N.D.	N.D.	3
May-14	St. 1	10	N.D.	N.D.	N.D.	1
	St. 2	7	N.D.	N.D.	1	0
	St. 3	7	N.D.	N.D.	N.D.	7
Sep-14	St. 1	60	N.D.	N.D.	N.D.	25
	St. 2	60	N.D.	N.D.	N.D.	3
	St. 3	34	N.D.	N.D.	N.D.	34
合計 (割合, %)		227	N.D.	N.D.	4 (1.8%)	101 (44%)

*Not Detection

国と比較して低かったのではないかと考えている。

その他の抗菌薬への耐性化をみてみると、テトラサイクリン (TC) とエリスロマイシン (EM) のいずれかに対して、下水と河川水から中度耐性または耐性を示した菌株が多数検出された (表 2)。TC と EM は、古くからヒトのみならず畜産や養魚場で使用される汎用性の高い抗菌薬である。本研究と同一の対象河川である八重川河川流域を対象とした薬剤耐性緑膿菌の調査では、単離株のすべてが TC に対して耐性を示し、TC の耐性株は広範囲で拡散していることを示唆する報告がある³¹⁾。腸球菌においても、TC の耐性株が水環境中に存在していることが確認された。表 2 をみると、下水と河川に存在する腸球菌の大部分は、汎用性の高い抗菌薬に耐性を示すことがわかる。

4. 河川流域を対象とした VRE の拡散実態と遺伝子型解析

河川流域を対象とした VRE の実態調査は上記の同一の河川において、上流から下流に至る 3 つの調査地点を選定し、河川流域における VRE の拡散実態を調査した²³⁾。流域調査の調査は計 3 回 (2013 年 12 月, 2014 年

5 月, および 9 月) 実施した。VRE の拡散実態を調査するにあたり、著者らが提案した環境水中から VRE 株のスクリーニング法を用いて VRE 株を回収した²¹⁾。回収した VRE 株についてバンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, および *vanC2/C3*) の保有を PCR 法によって確認したところ、河川水において、全ての腸球菌株から *vanA*, および *vanB* は検出されなかった (表 3)。一方で、*vanC1*, および *vanC2/C3* を保有する菌株がそれぞれ、3% (9 株) と 49% (165 株) 検出され、中でも *vanC2/C3* 陽性株は全調査地点から確認された。本調査対象流域の河川環境中には *vanC2/C3* の VRE が広範囲で分布した。これら *vanC2/C3* の VRE は、VCM に対して耐性を有しておらず、中程度の耐性 (MIC 値: 4–8 µg/mL) を示した。アメリカでは沿岸域から VanA 型 VRE の分離報告があり、プラスミドを媒介とした耐性遺伝子の拡散を危惧する報告もある²⁷⁾。今回の対象流域で分離された VRE は全て VanC 型で染色体上に *van* を保有する菌株であり、VCM 耐性を伝播する菌株ではなかった。

vanC2/C3 型の VRE が全調査地点か広範囲で検出されたことから、パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 法によって菌株の遺伝子

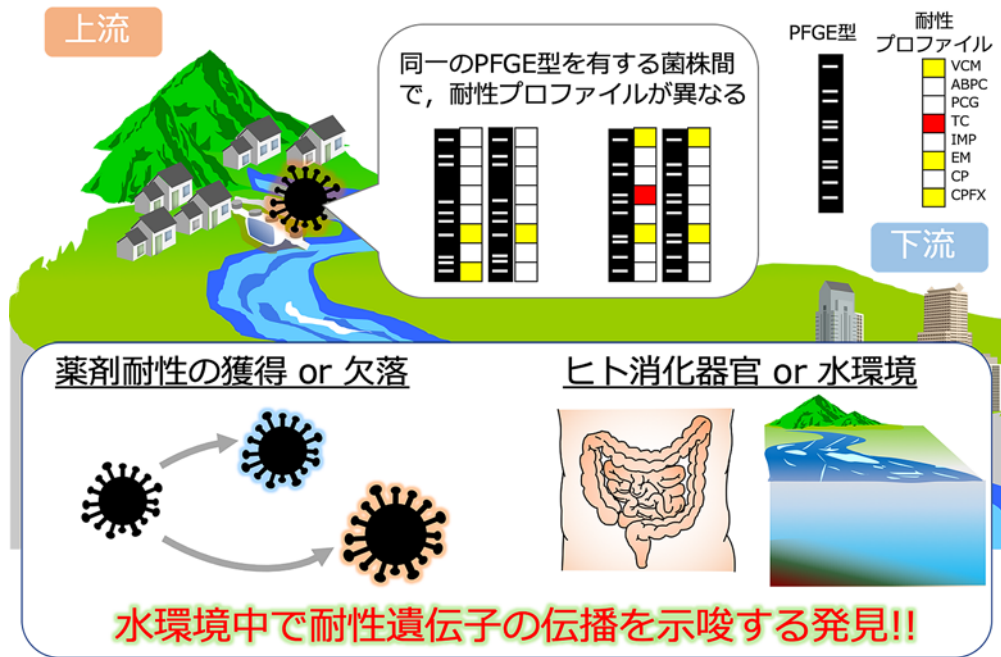


図1. 宮崎の八重川流域における VRE の実態調査から明らかとなった環境中での耐性遺伝子の伝播

型を取得し、菌株間のゲノムパターンを比較した。さらに PFGE 法によって得られたバンドパターンに基づきデンドログラムを作製し、薬剤耐性プロファイルとの関連性を評価した。各調査地点から単離した 101 株の PFGE 型を取得した結果、88 タイプの遺伝子型が検出され、河川流域に分布する *vanC2/C3* 保有株の遺伝子型は著しく多様化していることがわかった。特に注視すべき点は、上流域で単離した菌株の中で、同一の PFGE 型を有する菌株でも、薬剤耐性プロファイルが異なる菌株が存在した点である。これは、ヒト消化管内・水環境中のいずれで生じたのかは明らかではないものの、水環境中で耐性遺伝子の伝播、あるいは欠落を示唆するものであった (図1)。著者らは下水処理水の影響のある都市河川において、同一の PFGE 型大腸菌の感受性株が下水処理水と混合し流下する過程において、薬剤耐性を発現しており³²⁾、環境水中で耐性遺伝子が伝播されることを示唆する発見をしている。河川流域における薬剤耐性プロファイルのモニタリングや遺伝子型解析の結果から総じてみると、様々な排水のリザーバーである水環境は、耐性遺伝子の伝播による薬剤耐性菌の発現のホットスポットとなっている可能性が高い。

5. 水環境を模擬した *in vitro* 伝達実験における *vanA* 遺伝子の伝播ポテンシャルの評価

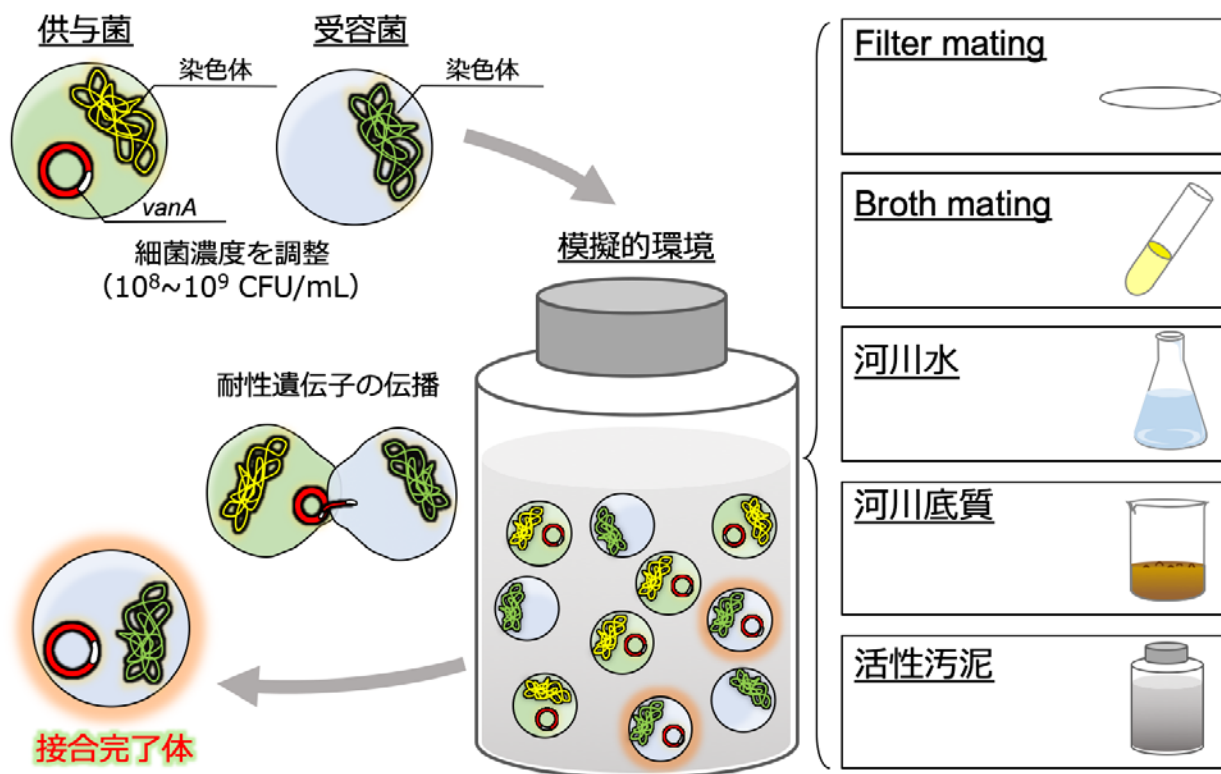
薬剤耐性菌の拡大と発生と考えるうえで鍵となることは、環境中で薬剤耐性遺伝子を獲得し、他の細菌へ伝播するかを明らかにすることである。様々な薬剤や耐性を含む排水が最終的に流入する水環境は、薬剤耐性菌が拡大する場となっている可能性が指摘されている³³⁾。しかしながら、環境中における薬剤耐性遺伝子の伝播に関する知見は少ないことが現状である。そこで、VRE において VCM に高度耐性を示し、かつ伝達性プラスミド

(*vanA* をコード) である VanA 型 VRE をモデル細菌として、環境中で VRE の *vanA* が他の腸球菌種に伝播する可能性を評価した結果を報告する。

薬剤耐性遺伝子の伝播実験は、細菌学分野で採用されている Filter mating 法と Broth mating 法を採用し、寒天培地上と液体培地中で遺伝子の伝播を評価した。また、環境を模擬した条件として、都市河川水、河川底質、下水処理場の活性汚泥を想定した。河川水は菌体が想定水中で分散している状態を想定しており河川底質と活性汚泥は菌体が高濃度で集密する環境として想定した (図2)。環境中における細菌間の耐性遺伝子の伝播は、薬剤耐性株 (供与菌) から薬剤非耐性株 (受容菌) への接合伝達による耐性遺伝子の伝播を計数することによって評価した。ここで使用した供与菌と受容菌はこれまで著者らが水環境と食品から分離した腸球菌株を用いた。供与菌には外国産食肉から分離した *vanA* 保有 *E. faecalis* を用いた。また、受容菌には環境分離した異なる 3 種の腸球菌株とリファレンス株として *E. faecalis* OG1RF を用い、それぞれに耐性遺伝子マーカーを導入した。

薬剤耐性遺伝子の伝播実験は、供与菌と受容菌の菌体濃度を 10^8 CFU・mL⁻¹ に調整し、混合比を 1:1 で実施した。伝播実験は、以下の 5 条件で実施した: (1) Filter mating 法, (2) Broth mating 法, (3) 河川水, (4) 河川底質, (5) 活性汚泥。(1) は、供与菌と受容菌の混合液をメンブランフィルターに濾過し寒天培地上で実施した。(2) は、液体培地中で反応させた。(3) ~ (5) は、滅菌した河川水、河川底質、および活性汚泥に供与菌と受容菌の混合液を摂取した。各条件で培養した後、受容菌、供与菌、および耐性遺伝子が伝播した接合完了体のコロニー数を計数した。薬剤耐性遺伝子の伝播率は、受容菌に対する接合完了体の比によって評価した。

表4に、環境中を模擬した耐性遺伝子の伝播率を示す。Filter mating 法によって供与菌から受容菌への

図 2. 環境を模擬した *in vitro* 伝達実験の概略図表 4. 環境を模擬した *in vitro* 伝達実験によって得られた *vanA* の伝播率

受容菌	Filter mating	Broth mating	河川水	河川底質	活性汚泥
<i>E. faecalis</i>	1.4×10^{-7}	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. faecalis</i> (OG1RF)	4.6×10^{-10}	N.D.	N.D.	2.1×10^{-7}	2.0×10^{-8}
<i>E. faecium</i>	4.6×10^{-7}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. hirae</i>	9.4×10^{-9}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

* 各伝播率は受容菌あたりの接合完了体の数で表している

**Not Detection

vanA の伝播率を推定した結果、供与菌から異なる 3 種の腸球菌属の受容菌への伝播率は $1.4 \times 10^{-7} \sim 4.6 \times 10^{-10}$ の範囲であった。同一の Filter mating 法による臨床分離株の *vanA* の伝播を検討した研究事例では、*E. faecalis* から *Enterococcus* 属への *vanA* の伝播率は $10^{-7} \sim 10^{-8}$ と報告されている^{5,36)}。今回の環境分離株を用いた伝播率は、臨床分離株と同等の耐性遺伝子の伝播ポテンシャルを有していた。*vanA* が伝播した接合完了体株について薬剤感受性試験をすると、VCMに加えて、EMとTCに対しても耐性を獲得しており、VCM耐性を含む複数の耐性遺伝子の伝播が示唆された。次に Broth mating 法を用いた場合は、全ての腸球菌種において *vanA* の伝播は確認されなかった。同様に河川水で交配させた場合においても、遺伝子の伝播は確認されなかった。*vanA* をコードするプラスミドは接合伝達性プラスミドであることが知られている³⁶⁾。Broth mating 法や河川水による交配では供与菌と受容菌と間に距離があり、菌同士の接触の頻度が少なく、接合による伝播は生じにくいと考え

られる。したがって、液相中で菌体が分散している状況では *vanA* が伝播する可能性は極めて低いことが示唆された。これに対して、河川底質と活性汚泥において *vanA* の伝播が確認された。河川底質と活性汚泥の伝播率は、受容菌に *E. faecalis* OG1RF 株を用いた場合にそれぞれ 2.1×10^{-7} と 2.0×10^{-8} であった。菌体が集密する環境において、*vanA* に代表される接合伝達プラスミドが伝播したと考えられる。本研究で使用した河川底質と活性汚泥中の腸球菌数は、それぞれ 10^4 CFU/dry-100 g と 10^8 CFU/100 mL であった。したがって、伝播率 10^{-8} から推定すると、実際の下水処理施設の活性汚泥中において *vanA* を保有する VRE から感受性腸球菌に *vanA* が伝播する可能性がある。今回の実験系では同属間における接合伝達プラスミドの伝播率について検討した。今後は、腸球菌以外の細菌属への伝播の可能性や環境要因の変化による伝播速度への影響なども評価する必要があると考えている。

6. ま と め

宮崎県宮崎市の水環境をフィールドとして、VRE とその他の薬剤耐性腸球菌の存在実態を調査した。幸いなことに、VRE のモニタリング結果では、院内感染症において最重要である VanA 型と VanB 型の VRE は検出されなかった。しかしながら、VanC 型 VRE が河川流域に広く分布していること、薬剤耐性プロファイルの異なる同一の遺伝子型の株が存在することも確認された。しかし、これらの結果はローカルな 1 ケーススタディでしかなく、海外と比較すると、日本の水環境における薬剤耐性菌に関する情報・知見は大幅に不足している。また、水環境を模擬した *in vitro* 伝達実験では、*vanA* の伝播は環境の菌体密度が重要なファクターであり、下水処理場の活性汚泥のように菌体が高密度の条件では、接合型の *vanA* のほか、EM と TC の耐性遺伝子も受容菌に伝播する可能性が示唆された。当面の重要課題として、下水処理水の放流域も含めた水環境における薬剤耐性菌の拡散・蓄積に関する調査データの蓄積、薬剤耐性菌の発現とその機構の解明、そしてこれらの情報・知見に基づくリスク管理があげられる。しかし、著者らのように水環境分野を専門とする研究者らのみでは、これらの難題に立ち向かうことは困難である。環境微生物学や医学・細菌学の薬剤耐性菌や細菌ゲノム解析のスペシャリストに加えて、疫学などの多様な分野の研究者・有識者との連携が必須である。

文 献

- Alm, E.M., D. Zimble, E. Callahan, and E. Plomaritis. 2014. Patterns and persistence of antibiotic resistance in faecal indicator bacteria from freshwater recreational beaches. *J. Appl. Microbiol.* 117(1): 273–285.
- Boucher, H.W., G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, and J. Bartlett. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 48(1): 1–12.
- Bustamante, W., A. Alpizar, S. Hernández, A. Pacheco, N. Vargas, M.L. Herrera, Á. Vargas, M. Caballero, and F. García. 2003. Predominance of *vanA* genotype among vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates from poultry and swine in Costa Rica. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7414–7419.
- Cetinkaya, Y., P. Falk, and C.C. Mayhall. 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 686–707.
- Clewell, D.B. 2007. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cotolysin. *Plasmid.* 58: 205–227.
- Deshpande, L.M., T.R. Fritsche, G.J. Moet, D.J. Biedenbach, and R.N. Jones. 2007. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North American and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 163–170.
- Fines, M., B. Perichon, P. Reynolds, D.F. Sahn, and P. Courvalin. 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43: 2161–2164.
- Furukawa, T., T. Yoshida, and Y. Suzuki. 2011. Application of PFGE to source tracking of faecal pollution in coastal recreation area: a case study in Aoshima Beach, Japan. *J. Appl. Microbiol.* 110: 688–696.
- Gholizadeh, Y. and P. Courvalin. 2000. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16: S11–S17.
- Hsueh, P.R., M.L. Chen, C.C. Sun, W.H. Chen, H.J. Pan, L.S. Yang, S.C. Chang, S.W. Ho, C.Y. Lee, W.C. Hsieh, and K.T. Luh. 2002. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981–1999. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 63–68.
- Iversen, A., I. Kuhn, A. Franklin, and R. Mollby. 2002. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2838–2842.
- Kirst, H.A., D.G. Thompson, and T.I. Nicas. 1998. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 1303–1304.
- 厚生労働省 (2016) 院内感染対策サーベイランス事業. <http://www.nih-janis.jp/report/kensa.html> (2016年9月現在)
- Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, P. Courvalin. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* 319(3): 157–161.
- Leonard, A.F., L. Zhang, A.J. Balfour, R. Garside, and W.H. Gaze. 2015. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ. Int.* 82: 92–100.
- Lleó, M.M., B. Bonato, D. Benedetti, and P. Canepari. 2005. Survival of enterococcal species in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 189–196.
- Manson, J.M., J.M.B. Smith, and G.M. Cook. 2004. Persistence of vancomycin resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5764–5768.
- Matsushima, A., S. Takakura, M. Yamamoto, Y. Matsumura, M. Shirano, M. Nagao, Y. Ito, Y. Iinuma, T. Shimizu, N. Fujita, and S. Ichiyama. 2012. Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31: 1095–1100.
- Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46–65.
- Nam, S., M.J. Kim, C. Park, P.J. Maeng, and G.C. Lee. 2013. Detection and genotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. by multiplex polymerase chain reaction in Korean aquatic environmental samples. *Int. J. Environ. Health.* 216: 421–427.
- Nishiyama, M., A. Iguchi, and Y. Suzuki. 2015. Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as *vanC*-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 50(1): 16–25.
- 西山正晃, 竹下友作, 鈴木祥広. 2015. 下水と河川水における薬剤耐性腸球菌の存在実態とその比較. *水環境学会誌.* 38(2): 57–65.
- Nishiyama, M., Y. Ogura, T. Hayashi, and Y. Suzuki. 2017. Antibiotic resistance profiling and genotyping of vancomycin-resistant enterococci collected from an urban river basin in the provincial city of Miyazaki, Japan. *Water.* 9(2): 1–17.
- Oana, K., Y. Kawakami, M. Ohnishi, M. Ishikawa, M. Hirota, M. Tozuka, K. Atarashi, K. Baba, K. Fujiki, M. Okazaki, T. Honda, and T. Hayashi. 2001. Molecular and epidemiological study of the first outbreak of *vanB* type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54: 17–22.
- O'Neill J, Chair. The Review on Antimicrobial Resistance: Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations. London: Review on Antimicrobial Resistance; 2016.
- 大野 章, 石井良和, 山口恵三. 1997. バンコマイシン耐性腸球菌の耐性発現メカニズム. *日本臨床.* 55: 1206–1212.

- 27) Roberts, M.C., O.O. Soge, M.A. Giardino, E. Mazengia, G. Ma, and J.S. Meschke. 2009. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in marine environments from the West Coast of the USA. *J. Appl. Microbiol.* 107: 300–307.
- 28) Rosenberg Goldstein, R.E., S.A. Micallef, S.G. Gibbs, A. George, E. Claya, A. Sapkota, S.W. Joseph, and A.R. Sapkota. 2014. Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four U.S. wastewater treatment plants that provide effluent for reuse. *Sci. Total. Environ.* 466–467: 404–411.
- 29) 清野敦子, 長谷川泰子, 益永茂樹. 2004. 金目川, 鶴見川, 多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布. *水環境学会誌.* 27: 693–698.
- 30) Suzuki, Y., N. Kanda, and T. Furukawa. 2012. Abundance of *Enterococcus* species, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, essential indicators of fecal pollution, in river water. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 47: 1500–1505.
- 31) Suzuki, Y., S. Kajii, M. Nishiyama, and A. Iguchi. 2013. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents. *Sci. Total. Environ.* 450–451: 148–154.
- 32) Suzuki, Y., R. Hashimoto, H. Xie, E. Nishimura, M. Nishiyama, K. Nukazawa, and S. Ishii. 2019. Growth and antibiotic resistance acquisition of *Escherichia coli* in a river that receives treated sewage effluent. *Sci. Total. Environ.* 690: 696–704.
- 33) Taylor, N.G., D.W. Verner-Jeffreys, and C. Baker-Austin. 2011. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilizing antimicrobial resistance? *Trends. Ecol. Evol.* 26: 278–284.
- 34) United States Environmental Protection Agency (1986) Ambient Water-Quality Criteria for Bacteria-1986, EPA A440/5-84-002, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- 35) Uttley, A.H., C.H. Collins, J. Naidoo, and R. C. George. 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1: 57–58.
- 36) Werner, G., A.R. Freitas, T.M. Coque, J.E. Sollid, C. Lester, A.M. Hammerum, L. Garcia-Migura, L.B. Jensen, M.V. Francia, W. Witte, R.J. Willems, and A. Sundsfjord. 2011. Host range of enterococcal *vanA* plasmids among Gram-positive intestinal bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 273–282.
- 37) Werner, G., T.M. Coque, A.M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K.G. Kristinsson, R. Leclercq, C.H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L.V. Peixe, E. Sadowy, G.S. Simonsen, J. Top, R.J. Vuopio-Varkila, R.J. Willems W. Witte, and N. Woodford. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro. Surveill.* 13(47), pii: 19046
- 38) World Health Organization (WHO). (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/> (accessed May 4, 2014).
- 39) Yoshimura, H., M. Ishimaru, Y.S. Endoh, M. Suginaka, and S. Yamatani. 1998. Isolation of glycopeptide-resistant enterococci from chickens in Japan. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 3333.