

【原著・基礎】

当院で検出されたバンコマイシン耐性腸球菌の解析

石坂 美紀¹⁾・高橋 綾子¹⁾・四方田幸恵¹⁾・飯塚 恵子²⁾・村上 正巳¹⁾¹⁾群馬大学医学部附属病院検査部*²⁾同 薬剤部

(平成16年6月29日受付・平成16年10月20日受理)

当院では、2002年8月に入院患者の喀痰よりバンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin-resistant enterococci: VRE)が検出され、2003年2月に他の患者の糞便よりVREが検出された。前者の分離株はバンコマイシン(VCM)のMICが8 µg/mL、後者の分離株は16 µg/mLであった。後者からはVCM投与中止後に4 µg/mLの株が分離された。これら3株ともVRE selective 培地(BD)に発育を認め、*van B* 遺伝子をもっていた。われわれは、この現象をVCMによる耐性誘導と考え実験を行った。4 µg/mLの株はVCM加培地で培養したところ、MICの上昇が認められ、誘導であることが確認された。日常検査でのMICのみの測定では*van B* 遺伝子をもつVCMのMICが低い株を見逃す危険がある。

Key words: vancomycin-resistant enterococci, *van B*

バンコマイシン耐性腸球菌(Vancomycin-resistant enterococci: VRE)は日和見感染菌であるが、特定の患者においては院内感染の原因菌として問題となっている¹⁾。

日本においても1996年に*van B* および*van C* をもつ *Enterococcus galinarum*²⁾、*van A* をもつ *Enterococcus faecium*³⁾ が分離された。以来、散発的にVRE感染が報告されている^{4,5)}。

当院でも2002年8月、1名の患者の喀痰より *E. faecium* (*van B*) が検出された。この事例をきっかけに、当検査部ではvancomycin(VCM)投与者およびVREの存在が疑われる患者について便中VREの検索を行っており、2003年2月、他の患者1名の糞便よりVREを検出した。この患者の糞便からVCM投与中止後検出された菌のMICは低下していた。この現象をVCMによる誘導と考え実験を行ったので、われわれが経験した2例から分離されたVREの解析と併せて報告する。

I. 材料および方法

1. 使用菌株

E. faecium (TY14830株): A病棟に入院中の男性で白血病治療中の患者(症例1)から2002年8月30日に喀痰より検出された。患者の感染症状は明らかでなく、その後の喀痰からは検出されなかった。VCMの使用状況は検出前0.5g、1カ月間の長期投与であった。

E. faecium (TY15217株): B病棟入院中の男性で骨髄移植経過観察中の患者(症例2)から2003年2月17日に糞便より検出された。患者の感染症状は明らかでなかった。VCMは1~1.5g、1カ月の長期投与で、そのうち3週間は1gの経口投与もなされていた(1月24日~2月23日まで投与)。

E. faecium (TY15403株): 症例2の患者の投与中止2カ月後に得られた株で菌は継続的に検出が認められた。

2. VREの同定

MicroScan Walk Away-96 (DADE BEHRING)にて同定を行った。

3. 選択培地

VRE selective 培地(Becton Dickinson: BD)を用いた。

4. 薬剤感受性

ブレンハートインフュージョン(B.H.I)培地を用いて、日本化学療法学会標準法⁶⁾の寒天平板希釈法によりMICを測定した。MIC測定用薬剤はampicillin(ABPC)、imipenem(IPM)、erythromycin(EM)、rokitamycin(RKM)、minocycline(MINO)、levofloxacin(LVFX)、rifampicin(RFP)、VCM、teicoplanin(TEIC)を使用した。

5. *van* 遺伝子検出

van 遺伝子は*van A*、*van B*、*van C-1*、*van C-2/3*の4種類を対象とし、マイクロプレート・ハイブリダイゼーション(湧永製薬)によるVRE検出試薬を用いた。寒天培地の新鮮培養菌を添付されているプチピックの先端で採取し、増幅反応試薬に懸濁させ、サーマルサイクラーにセットし、菌の溶菌とPCR反応を行った。これを*van* 遺伝子4種のプローブ、および増幅が正しく行われたことをチェックするインターナルコントロールを固定したマイクロプレートウェルに移し、反応させた後、酵素標識アビジンを用いた発色系により発色させ、プレートリーダー(波長: 415 nm)で吸光度を測定した。吸光度0.3以上を陽性と判定した。また電気泳動により*van B* (200 Kb)のバンドを確認した。

Table 1. Drag susceptibilities of *E. faecium*

		MIC ($\mu\text{g/mL}$)											
		Date	Genotype	ABPC	IPM	EM	RKM	MINO	LVFX	RFP	VCM	TEIC	Selective Agar
case 1 TY14830	sputum	02.8.30	<i>van B</i>	64	> 128	> 128	> 128	32	16	8	8	< 0.25	+
case 2 TY15217	feces	03.2.17	<i>van B</i>	2	8	8	1	< 0.25	16	< 0.25	16	< 0.25	+
case 2 TY15403	2 months after drug cessation	03.4.3	<i>van B</i>	2	8	8	1	< 0.25	16	< 0.25	4	< 0.25	+

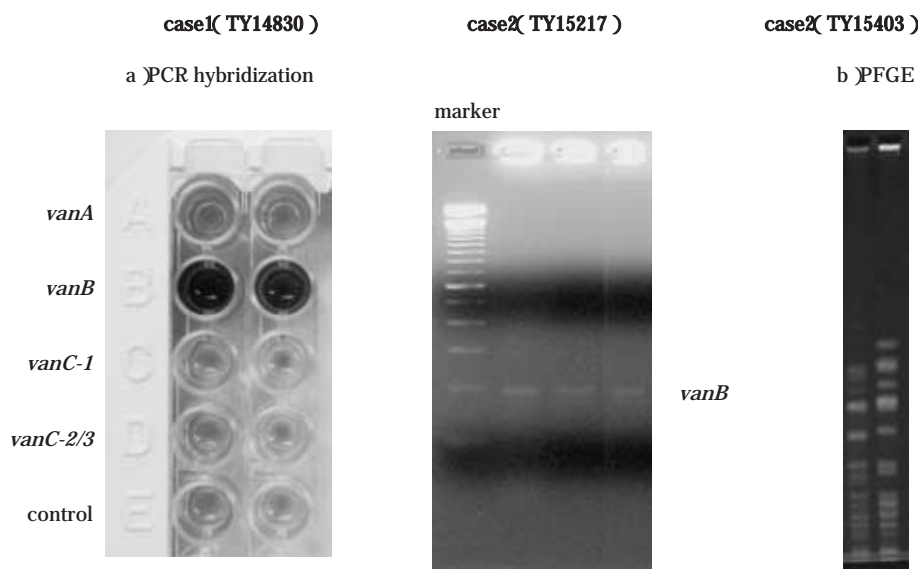


Fig. 1. PCR hybridization and PFGE patterns of VRE isolated from case 1(TY14830)and case 2 (TY15217, TY15403)

6. DNA パターン解析

パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) は、制限酵素 *Sma* I 処理を施したゲノム DNA を用いて、BIO RAD 社製装置ジーンパスにて *Enterococcus* 用の泳動プログラムに従って行った。

7. 誘導実験法

シェドラーブイオン培地 (BD) に VCM 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ をそれぞれ加えた培地と薬剤無添加培地 (コントロール) を用いた。それぞれの培地に菌液を 10^6 cfu/mL になるように添加し 2 日ごとを 1 回とし 10 回まで継代培養し、MIC を測定した。

II. 結 果

1. 薬剤感受性 (Table 1)

VCM の MIC は TY14830 株が 8 $\mu\text{g/mL}$, TY15217 株が 16 $\mu\text{g/mL}$ であった。TY15403 株の VCM の MIC は 4 $\mu\text{g/mL}$ と低値であった。TY14830 株の MIC は ABPC 64 $\mu\text{g/mL}$, IPM > 128 $\mu\text{g/mL}$, EM > 128 $\mu\text{g/mL}$, RKM > 128 $\mu\text{g/mL}$ と高い MIC 値であったが、TY15217 株, TY15403 株は ABPC 2 $\mu\text{g/mL}$, IPM 8 $\mu\text{g/mL}$, EM 8 $\mu\text{g/mL}$,

RKM 1 $\mu\text{g/mL}$ と低い MIC 値であった。3 株とも VRE selective 培地に発育が認められた。

2. *van* 遺伝子検出

TY14830 株と TY15217 株は PCR 法により *van B* と判定された (Fig. 1a)。さらに TY15403 株についても PCR 法で *van B* と判定された。

3. DNA パターン解析

TY14830 株と TY15217 株の DNA パターンは異なっていた (Fig. 1b)。TY15403 株は TY15217 株と同一パターンであった。

4. 誘導実験

TY14830 株と TY15403 株について誘導実験を行った。TY14830 株ではコントロールおよび 0.5 $\mu\text{g/mL}$ VCM 加培地で培養したものは MIC 値に変化はみられなかった。しかし 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ VCM 加培地で培養することにより 1 回目で MIC が 8 $\mu\text{g/mL}$ から 64 $\mu\text{g/mL}$ に上昇した。また、1 $\mu\text{g/mL}$ VCM 加培地で培養することにより、MIC 8 $\mu\text{g/mL}$ であったものが 1 回目から 128 $\mu\text{g/mL}$ となった。以降の継代で MIC の上昇はみられなかった (Fig.

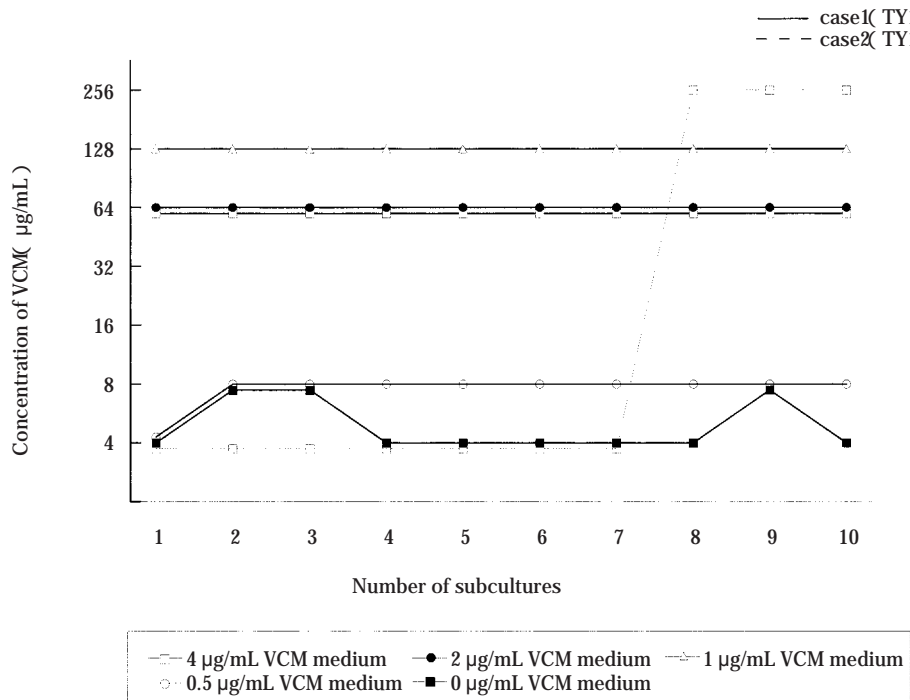


Fig. 2. Induction experiment:VRE from case 1 (TY14830) and case 2 (TY15403)

2)

同様に TY15403 株でも MIC の上昇が認められ、4 µg/mL VCM 加培地で 7 回目までは変化なく、8 回目で MIC が 4 µg/mL から 256 µg/mL となった (Fig. 2)。誘導により MIC の上昇した株を薬剤無添加培地で培養したところ、MIC の低下がみられた。

III. 考 察

van B は VCM の MIC が 16~64 µg/mL といわれている⁷⁾。VCM の MIC が 4 µg/mL であっても *van B* 遺伝子を保有していたことは、われわれが日常検査をするうえで、MIC のみの測定による VRE 選択では VCM の MIC が低い *van B* を見逃す可能性が示唆された。

症例 1 と症例 2 から分離した 2 株の VCM の MIC はそれぞれ 8 µg/mL と 16 µg/mL であった。VCM 投与中の症例 2 の初期分離株と VCM 投与中止 2 カ月後に得られた株は、VCM の MIC に相異がみられた。実験結果からも VCM の存在下で VCM の MIC 上昇、VCM 非存在下では低下する結果が得られた。このことからわれわれの経験した株についても患者の体内でこれと同様の現象がおきている可能性が示唆された。しかし当初から糞便中に VCM の MIC が 4~16 µg/mL の株が混在していた可能性も否定できない。

われわれの経験した症例株では VCM の長期投与によ

り、比較的低い MIC の株の誘導を惹起し、中止後もより低い MIC の *van B* 保有株が得られたことから、慎重な VCM の投与が必要と考えられた。

文 献

- 1) Murray B E: Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. *N Engl J Med* 342:710~721, 2000
- 2) Ishi Y, Ohno A, Kashitani S, et al: Identification of van B-type vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* from Japan. *J Infect Chemother* 2:102~105, 1996
- 3) Fujita N, Yoshimura M, Komori T, et al: First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant enterococci *faecium* from a patient in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2150, 1998
- 4) 今福裕司, 吉田 浩, 佐藤敏夫, 他: *Van B* 型 VRE による子宮頸癌術後骨盤内感染性膿瘍の 1 例. *感染症雑誌* 73: 473~476, 1999
- 5) 渡邊都貴子, 安井晃榮, 信定さおり, 他: バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の院内感染制御体制に関する報告 VRE 保菌患者の入院を経験して。 *環境感染* 14: 200~204, 1999
- 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改正について (1968 年制定, 1974 年改定)。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 7) 小澤良之, 橋本由利子, 野村隆浩, 他: バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)。 *臨床と微生物* 26: 111~119, 1999

Analysis of vancomycin-resistant enterococci detected in our hospital

Miki Ishizaka¹⁾, Ayako Takahashi¹⁾, Sachie Yomoda¹⁾, Keiko Iizuka²⁾ and Masami Murakami¹⁾

¹⁾Clinical Laboratory Center and ²⁾Department of Pharmacy, Gunma University Hospital,
3-39-15 Showa-machi, Maebashi, Gunma, Japan

Vancomycin-resistant enterococci (VRE) was first isolated in our hospital from a sputum specimen from an inpatient in August 2002. Subsequently, VRE was also isolated from a fecal specimen in another patient in February 2003. The former strain exhibited an MIC of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for vancomycin (VCM), and the latter strain exhibited an MIC of 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Another strain with an MIC of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was isolated from the latter patient after the cessation of VCM treatment. All three strains grew in a VRE-selection medium and were demonstrated to have the *van B* gene. The MIC increased when the strain with an MIC of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was cultured in VCM-supplemented medium, indicating the induction of VCM resistance. These results suggest that routine laboratory tests might not detect the presence of VRE with the *van B* gene, which has a MIC.